

Development of a rapid screening technique for the detection of macrolide-resistant strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine.

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): high resolution melter analysis, macrolide-resistance, <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , 23S rDNA. 作成者: 小林, 秀樹, 金崎, 未香, 秦, 英司, 西森, 敬, 江口, 正志 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24514/00001820">https://doi.org/10.24514/00001820</a>

## *Mycoplasma hyopneumoniae* の薬剤感受性試験ならびに マクロライド耐性簡易スクリーニング法の開発

小林秀樹<sup>1)</sup>, 金崎未香<sup>1)</sup>, 秦 英司<sup>2)</sup>, 西森 敬<sup>3)</sup>, 江口正志<sup>4)</sup>

(平成19年7月9日 受付)

### Development of a rapid screening technique for the detection of macrolide-resistant strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine.

Hideki KOBAYASHI<sup>1)</sup>, Mika KANAZAKI<sup>1)</sup>, Eiji HATA<sup>2)</sup>, Kei NISHIMORI<sup>3)</sup> & Masashi EGUCHI<sup>4)</sup>

国内各地域の10道県70農場から2004～2005年にかけて出荷された肉豚の肺炎病巣部から分離した *Mycoplasma hyopneumoniae* 野外分離90株について薬剤感受性試験を実施した。供試抗菌薬剤は豚呼吸器マイコプラズマ対策に有効とされる各種薬剤系9種を選択した。薬剤耐性株は7株見いだされ、いずれもマクロライド系薬剤とリンコマイシンに交差耐性を示した。マクロライド系薬剤はマイコプラズマ感染症対策の特効薬として頻用される抗菌剤であることから、耐性を示した7株と感受性株について分子生物学的な比較を実施したところ、耐性株はいずれも23SリボソームRNAに1カ所(2058位A→G, A2058G)あるいは2カ所(A2058GおよびA2062C)のミューテーションが確認された。そこで当該領域からミューテーションを検出するDNAシーケンス法以外の、より簡便で安価な方法を検討したところPCR産物のDNA蛍光融解曲線解析法の有効性が示唆された。この方法で分離培養菌株を供試した場合、サンプルの処理から結果を得るまでに要する時間は4時間であった。また、肺炎病巣部の乳剤を材料として実施する場合はnested PCRを実施するため、結果を得るまでの所要時間は約8時間であった。

### 緒 言

豚のマイコプラズマ肺炎(MPS)は *Mycoplasma hyopneumoniae* によって惹起される。「豚の存在するところにはMPSあり」と言われるほど豚に親和性の高い慢性の消耗性疾患である<sup>15, 17)</sup>。PRRSやサーコウイルス感染症等との多重感染でより重篤化し、離乳豚の高い事故率に関与している<sup>16)</sup>。

MPS対策として、ワクチンと抗菌剤の使用が一般的である。これらの使用による効果はと畜場の検査成績から判断する限り高いものとなっている<sup>5)</sup>。すなわち病変部スコアを見る限り大きな減少がみられるということである。しかし依然としてMPS罹患豚の割合は大きく変化することなく

- 1) 動物衛生研究所・疫学研究チーム(動物衛生研究所・動物学的製剤製造グループ品質管理科)
- 2) 動物衛生研究所・疫学研究チーム(動物衛生研究所・細菌寄生虫病研究チーム)
- 3) 動物衛生研究所・疫学研究チーム(動物衛生研究所・ヨーネ病研究チーム)
- 4) 動物衛生研究所・北海道支所

\* Corresponding author ; Mailing address : Hideki KOBAYASHI, National Institute of Animal Health, Center for Animal Disease Control and Prevention, Group of Biological Products, Quality Control Division, 3-1-5, Kannondai, Tsukuba Ibaraki 305-0856, JAPAN  
Tel&Fax : 029-838-7874  
E-mail : reptile@affrc.go.jp

本病が国内に広く高い割合で浸潤している。その理由として、PRRSVやサーコウイルス等の感染にともなう免疫不全期間でのマイコプラズマワクチンの投与や薬剤耐性マイコプラズマの出現がある<sup>4, 7, 8, 9, 10, 18)</sup>。後者においては投薬の前にマイコプラズマ分離を実施し薬剤感受性試験により対象マイコプラズマ株に感受性を示す有効薬剤の選択が必要である。残念なことに現実には農場ごとにマイコプラズマを分離することはなく、一般的に推奨される薬剤を使用している。なぜなら*M. hyopneumoniae*は難培養菌のひとつで、MPS病変部から本菌を分離するまでに約3ヶ月程度要することや取り扱いの難しさから分離をあきらめてしまうのである<sup>15, 17)</sup>。*Mycoplasma hyopneumoniae*の薬剤耐性に関する報告は極めて数が少なく、Yamamotoらが日本で1980年代中頃に分離したほとんどの株がテトラサイクリンに耐性化にあることを示すこと<sup>20)</sup>、Viccaらが2004年にベルギーで分離した株からマクロライドとフルオロキノロン耐性<sup>18)</sup>、著者らも2005年に国内分離株からマクロライドとリンコマイシン耐性をそれぞれ報告しているだけである<sup>6, 9)</sup>。

本研究では、MPS対策として使用される抗菌性物質の薬剤感受性試験と*M. hyopneumoniae*薬剤耐性株に焦点をあて、野外における薬剤耐性菌株の性状や浸潤状況を広範囲に調査するとともに薬剤耐性株にあってはその耐性機構を解明し、さらにその機構を利用した薬剤耐性株の迅速スクリーニング法を開発することを目的とした。

### 材料と方法

**供試マイコプラズマと培養条件**：国内各地域の70農場から2004～2005年にかけて出荷された肉豚の肺炎病巣部から分離した*M. hyopneumoniae*野外分離株90株と基準株J株を供試株とした。これら全ての*M. hyopneumoniae*株は各種試験に供する場合BHL液体培地<sup>20)</sup>で37℃、赤色のフェノールレッドが橙黄色に変化する4ないし5日間培養した。

**薬剤感受性試験**：薬剤感受性試験は薬剤希釈等の共通項目は全てNCCLSの液体培地希釈法に準じて実施した<sup>12)</sup>。供試した薬剤はIn vitroで*M. hyopneumoniae*に有効とされる6系統9薬剤で、マクロライド系のタイロシン(TS)、ジョサマイシン(JM)およびエリスロマイシン(EM)、リンコマイシン系のリンコマイシン(LCM)、チアムリン-バルネムリン系のチアムリン(TML)およびバルネムリン(VNL)、アミノグリコシド系のカナマイシン(KM)、テトラサイクリン系のオキシテトラサイクリン(OTC)、フルオロキノロン系(ピリドンカルボン酸系、ニューキノロン系)のエンロフロキサシン(ERFX)である。TS、KMおよびOTC

はシグマから購入、バルネムリンはノバルティス-アニマルヘルス(K.K.)より、残り5剤は農水省動物医薬品検査所より分与頂いた。

判定は薬剤無添加コントロールでそれぞれの被検株の発育がはじめて確認されるまでの必要日数(初期MIC)の2倍の日数(最終MIC)で実施した。J株を含むほぼ全ての株は3～4日で初期MICが観察可能であったので、最終MIC(本実験の結果として採用されているMIC)の判定に要する培養期間は約1週間であった。

***Mycoplasma hyopneumoniae*株および肺乳剤からのPCR用DNAテンプレート作製**：BHL培地で*M. hyopneumoniae*株を4～5日間培養した菌液1mlを集菌、PBSで洗浄した後、遠心集菌したペレットについて説明書に従いインスタジーン(InstaGene, Bio-Rad)処理したものをPCR用のDNAテンプレートとした。すぐに検査に供試しない場合はテンプレートを-20℃に保存した。肺乳剤からのテンプレート調整は細断した肺病変部約1gを10mlのBHL培地で浮遊、スタマッキングした上清1mlをx1000g、5分間遠心し、その上清をx13,500g、5分間遠心した。得られたペレットをPBSで遠心洗浄した後、菌株での処理方法と同様にインスタジーン処理をしてDNAテンプレートを作製した。

**23SリボソームRNA遺伝子(23S rDNA)のnested PCRによる増幅**：*M. hyopneumoniae*に特異性の高い領域でかつポイントミューテーションを含む可能な限り小さな分子量で増幅可能な領域を23S rDNAから選定しnested PCRのためのプライマー配列とした。1st, 2nd PCRともアンチセンスプライマーは同一の配列としたので、プライマーは全部で3種類である。プライマー名と塩基配列、および23S rDNAとそれらプライマーの配列部分はFig.1のとおりである。

1st PCRはMhp Dom5F(23S rDNAの1866-1884位)とMhp Dom5R(23S rDNAの2143-2124位)のプライマーを供試し、全量50μlからなる次の組成で実施した：1x KOD-Plus PCRバッファー、1mM MgSO<sub>4</sub>、dNTPそれぞれ150mM、KOD-Plus DNAポリメラーゼ(TOYOBO)1ユニット、25nMの各プライマーおよびDNAテンプレート5μl。PCRプログラムとしてPerkin Elmer 9700 thermocyclerでpre-incubationを94℃5分、94℃30秒→60℃30秒→68℃30秒のステップを30サイクル行った後、68℃7分の最終extensionを実施した。この反応で得られたPCR産物は1：10および1：100希釈し、それぞれ5μlを2nd PCRのテンプレートとした。2nd PCRはForwardプライマーにMhp NesF(23S rDNAの1976-1995位)を用いていること

```

tittaataa ataagatgat ttggtggatg ootggggtot gaaagtogat gaaggaogtg attaootgog staagottog tggagttgga aataaaotat
gatacggaga ttocgaatg ggggaacoca atotagcaaa octagattgc gctttaatga attcataatt aaagcagoga gatacgttgc gaattgaaac
atotttagtag caacaggaaa agaaaataaa taatgattoo caaagtagtg gogagogaaa tgggaagago oaaacogctt ttacoggggt tataggaacat 301
ttaattgag ttagaaaatt atataatagt agaaaagtt gaaaagcttt gacatagaag gtgatatooc tgtatatata attatataat ctcatagatg
tatootgagt aggggggggo aogtgaaco ogtotgaaat ttgocaggac caoctgtaa ggotaaatac taatogaaoc ocatagatga actagtaooc
tgagggaag gtgaaaagaa ccccgagagg ggaatgaaat agattotgaa accatttact tacaagtatg caaagcagct taatgtgta tggcgtacat 601
cttcagatg gttocggoga gttatgtaa caagcaaggt taagoggatt aaagoggago ogtagggaaa ocatgotata ataggogott aagtttggg
acatagacoc gaaaccaggt gatctatoca tgaagaaat gaaacttgg taacacaag tggaggttgg aaccgtatga cgtataaag tgcccgatg
aottgggat agoggtgaaa ttocaatoga aocctgagat agotggttot otcogaata gotttagggo tagotatag aatotaatta atggsgatg 901
agcactgaat ggggaatggo ggcocotago tttactgact ataatcaaac toogaatacc attaatotta tctatgcaat oggaacgtgg gtagtaactg
oogogotogo gagggaacaa accagatog toagclaagg toocaaaatt atgttaagt agaaaagttt lgaatttot laaacaata gtagttggo
ttagaagoc caacattta aagagtgogt aattgctcac tagtoaagag atottgogcc aataatgtaa cggactaaa acataatacc gaagotgogc 1201
gtaaacottt taatttagc ttaggagago gtttaattt ogotgaagct agagggtgac caoctatgga gaaatataaa gtgagaatg ogaatgagt
aacatgoga agtgaatg toagaocot atggggaag gtttoctgg caaggtogt ocacocaggg ttagtcaggg octaaggaga ggotgaaaag
ogtatoogat ggataatgg ttaatatoo gatactggt attggaatga tgggattag aaaaaagata gtttaaacac ttaactgatt gtgggtaag 1501
cagtaagaa agttatag goaatocot atgacattaa tttaagotg tgaatagat ggaagaggag actcaagtac ogaatataat gactototg
ttocaaagaa agtototago gotaattcaa taacaocotg taocaagaac ggaacacogt oocaaagatg agtattotaa ggtgagogag aaaaocaaat
ttaggaaact otcocaaatt atocctagc ttogaagaa gggatgocct ttttotaaa gggocotagt aaaaatgggg gggcaactgt ttatocaaaa 1801
cacagtoctc tgcocaaagt taacaogaag atagaggggt gaagotgoc oagtgocoga aggttaagcg gagatgtag cctattgga ogaogtcaa
gtgaocogog ggtgaocgo ggcotaaat ataacgtoc taagtagoc aaacttoctg tcaactaat attgaotgoc acgaaagggg caatgactoc
octactgtot caoactgga otoggtgaaa ttatgtaac agtgaacag ogtgttaooc goataogac gaaaagaoc ogtggagott taotataot 2101
tgotattgag aatlggttta ttatlgtag gataagttgg agatgtogt ocaagggogo tagtoottg gtagtoaac tgaataac accoatata
aattgatttt taactogct tocttaaca ggaagagaga cagtogtgg tggtagttt gactgggog gtcogootc aaagagtaac gggagtttc
aaagctaac toaatatgt oggaaacot atgoagaca taaggtaaa agtgggttg actgoaacac ctacaagtg agcaggtgog aaagocggac 2401
ttagtatoc ggcggttcat tgtgaaatg cogtgcoca acggataaaa gctacocogg gataaacagg ctaacttcc ocaagagatc acatogacg
gaaggttgg caootogatg toggtoato goatootgga gotgaagtog gttocaaagg tttgogtt ogocaaata agoggtagct gactgggtt
cagaaoctog tgagacagtt cgttccatc ctgatgtgg cgttgaata ttgatgagag ctgctcttag tacagagga cgggagtgga cgtacogctg 2701
gtgttoactg tgtottgocaa aagcogatag tgggtagota agtaocgaaa agataocgo tgaagocotc taagogggaa gottocooaa agatgagat
tocttatgaa attocctata gaccatgagg ttgatggtt agaggtgtaa gtagtaoat acattcagot gactaatac aataaatac aagttaaa
ag (3002)
    
```

Mhp Dom5F: 5'-aag cgg aga tgt tag cct a-3'  
Mhp Dom5R: 5'-tct ccc acc tat cct aca ca-3' } 1st PCR  
Mhp NesF : 5'-ctg cac gaa agg cgc aat g-3'  
Mhp Dom5R: 5'-tct ccc acc tat cct aca ca-3' } 2nd PCR

Fig 1. 23S rDNA sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* and primers for nested PCR used in this study.

を除けば反応液組成や術式は1st PCRと同じである。引き続き検査を実施しない場合、PCR産物は-20℃に保存した。

PCR産物のDNAシーケンスとHR-1による蛍光融解曲線解析：nested PCRにより増幅された約170bpの部分23SrDNA PCR産物はポイントミューテーションの存否確認のためDNAシーケンスを実施した。また、PCR産物についてDNA変異解析用蛍光色素LCGreen I<sup>TM</sup>とSNP（一塩基多型）検出装置（ポイントミューテーション検出装置）HR-1（Idaho Technology Inc., USA）による蛍光融解曲線解析を実施した<sup>19)</sup>。Nested PCRによるPCR産物9μlに1μlの10x LCGreen I<sup>TM</sup>を加え、HR-1で95℃ 3秒反応させたのち蛍光融解曲線解析を行った。薬剤感受性株である基準株J株をWild型として基準値を設定し融解曲線の負の一次微分曲線（-df/dT）を描かせた場合、Wild型（感受性株）は負の二次曲線、ヘテロ変異型あるいは二重ヘテロ変異型（ポイントミューテーションが存在するもの）は負の四次あるいは六次曲線を示す<sup>19)</sup>。

### 結 果

薬剤感受性試験：野外分離90株の最終MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub>および基準株のMICをTable 1に示した。ほぼ全ての株が供試薬剤に対し、感受性株として供試した基準株と同程度の感受性を示したが、7株がTSやJM等のマクロ

ライド系薬剤およびリンコマイシンに交差耐性を示し、マクロライド系薬剤に耐性を示す株は*M. hyopneumoniae*の8%程度であることが明らかになった。*Mycoplasma hyopneumoniae*のIn vitroでの感受性ではチアムリンバルネムリン系薬剤がより低濃度で、それに続きフルオロキノロンやマクロライド、リンコマイシンが低濃度でも抗菌活性を示した。なお、耐性株の発育性状は感受性株のそれと差異は認められなかった。

Antimicrobial	MIC (μg/ml) *			Type strain J
	50%	90%	Range	
Tylosin	0.06	0.25	0.06 - >64	0.125
Josamycin	0.25	0.5	0.125 - >64	0.25
Lincomycin	0.25	0.5	0.125 - >64	0.125
Erythromycin	16	32	8 - >64	8
Tiamulin	0.06	0.125	0.03 - 0.125	0.06
Valnemulin	0.002	0.004	0.002-0.004	0.004
Kanamycin	1	4	0.25 - 8	2
Oxytetracycline	1	2	0.25 - 4	2
Enrofloxacin	0.125	0.125	0.06 - 1	0.06

\*50% and 90%, MIC at which 50 and 90% of the tested strains were inhibited, respectively.

Table 1. MIC for *Mycoplasma hyopneumoniae* strains isolated in Japan by the broth-dilution method (n=90).

マクロライド系薬剤に耐性を示した7株の23S rDNA性状：マクロライド系薬剤およびリンコマイシンに交差耐性を示した7株の23S rDNAのシーケンスを実施し、感受性株のそれと比較したところ耐性7株はいずれも1カ所（2058位A→G, A2058G）あるいは2カ所（A2058Gおよび

A2062C) のミューテーションが確認された。2カ所のミューテーションが確認された株は1カ所しか確認されなかった株よりもより高度な耐性を示した (Table 2)。

HR-1による蛍光融解曲線解析: マクロライド耐性 *M. hyopneumoniae* 株の nested PCR 産物を HR-1 で蛍光融解曲線解析したところ, いずれの株も明瞭な負の四次曲線を描き感受性株の負の二次曲線と明瞭な区別が可能であった (Fig. 2)。

肺乳剤を供試した nested PCR 産物の解析もまた, マクロライド耐性 *M. hyopneumoniae* が分離された肺乳剤サンプルは明瞭な負の四次曲線を示した。対照として感受性株が分離された肺乳剤サンプルは Fig 2 と同じ負の二次曲線を示し, 耐性株を含む肺乳剤サンプルとは容易に区別可能であった。

Strain	Partial 23S rDNA sequence <sup>a</sup>	MIC <sub>TS</sub> <sup>b</sup>	Susceptibility
J <sup>T</sup>	aagacgaaaagaccccggtgg	0.125	Sensitive
C14	aagacgaaaagaccccggtgg	0.125	Sensitive
C15	aagacgaaaagaccccggtgg	0.125	Sensitive
Ni01	aagacgaaaagaccccggtgg	0.06	Sensitive
FK08	aagacgaaaagaccccggtgg	0.25	Sensitive
IK21	aagacga <sup>g</sup> aagaccccggtgg	32	Resistant
Ni04	aagacga <sup>g</sup> aagaccccggtgg	32	Resistant
C10	aagacga <sup>g</sup> aagaccccggtgg	32	Resistant
C30	aagacga <sup>g</sup> aagaccccggtgg	16	Resistant
C21	aagacga <sup>g</sup> aagaccccggtgg	32	Resistant
Ni10	aagacga <sup>g</sup> aagc <sup>cc</sup> cccggtgg	>64	Resistant
C03	aagacga <sup>g</sup> aagc <sup>cc</sup> cccggtgg	>64	Resistant

<sup>a</sup>The nucleotides are numbered on the basis of the *E. coli* sequences at 2051-2070.

<sup>b</sup>MIC of tylosin obtained by broth dilution method

Table 2. Relationship between MIC value of tylosin and mutated sequences of 23S rDNA in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains.

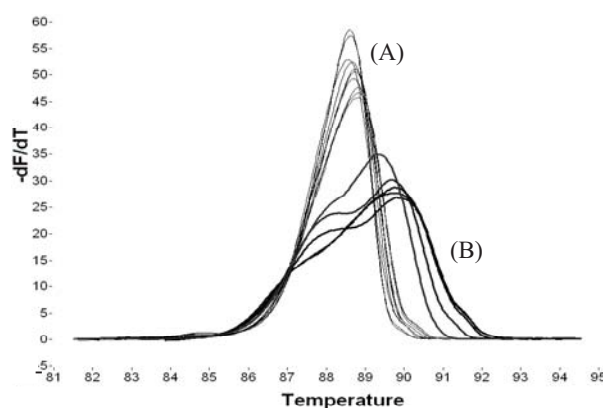


Fig 2. Melting curve analyses of *Mycoplasma hyopneumoniae* amplicons obtained from porcine lung samples. Quadratic curves (A) obtained from nested PCR amplicons that showed the same sequences of macrolide-sensitive strains. Quartic curves (B) obtained from nested PCR amplicons that showed the same sequences of macrolide and lincomycin-resistant strains.

## 考 察

マイコプラズマはその遺伝学的特性, すなわちコドン「UGA」がストップコドンとしてではなく「トリプトファン」に翻訳されるため, プラスミドやファージを介した他の微生物からの外来遺伝子を発現する可能性が低い。薬剤耐性遺伝子もまたしかりで, マイコプラズマの薬剤耐性機構のほとんどが膜タンパクの物理的変化による薬剤の透過抑制や細胞内小器官, 特にタンパク合成装置であるリボソームへの薬剤定着抑制と考えられている<sup>9, 11, 13</sup>。フルオロキノロン耐性マイコプラズマに関しては他の細菌同様, DNA ジャイレースやトポイソメラーゼ遺伝子のミューテーションに関与することが明らかとなっている<sup>1, 14</sup>。

Yamamotoらが1980年代に分離した *M. hyopneumoniae* 株はそれより10年以上前に分離したそれらよりもテトラサイクリン系薬剤に対しMICで約10倍の値であった<sup>20</sup>。OTCのみではあるが, 我々の試験結果は野外分離株のMICは基準株の値とほぼ一致し耐性の傾向はなかった。このことは1980年代にテトラサイクリン系薬剤が多用された可能性を示唆している。近年の豚肺炎対策としてテトラサイクリン系薬剤はあまり用いられていないことから, テトラサイクリン耐性株の割合が減少したものと考えられる。豚マイコプラズマのマクロライド耐性株は1990年に子豚から分離された *M. hyorhinis* および *M. hyosynoviae* で報告された<sup>7, 10</sup>。それらの耐性機構も明らかにされている<sup>9</sup>。 *M. hyopneumoniae* のマクロライド耐性の最初の報告はViccaらが2004年末ベルギーで分離した株で, 著者らもほぼ同時期に報告した。マクロライド耐性 *M. hyopneumoniae* 株の耐性機構は他のマイコプラズマ同様, 23S rRNAのドメインVのループ部位のミューテーションであった。この部位の2058 ~ 2062位はマクロライド系薬剤やリンコマイシンがリボソームのタンパク合成阻害をするときの作用点であることが明らかになっている<sup>3</sup>。ベルギーで分離された2株の耐性株はいずれもA2058G変異のみであったが, 我々が分離した耐性株の7株のうち2株はA2058G変異に加え, A2062C変異があり, A2058G変異単独のものより耐性値がさらに上昇していた。作用点での変異の増減はマクロライド耐性レベルに大きく影響しており, マクロライド耐性株に感染している豚への使用は耐性レベルを更に上昇させる危険性がある。Viccaらはマクロライド耐性のほかにフルオロキノロン耐性についても述べている。彼らが報告したフルオロキノロン耐性株のMIC値はERFXで1 ~ 2µg/mlである。感受性株が0.06 ~ 0.125µg/mlであるから1 ~ 2µg/mlは耐性の範疇と考えている。Viccaらの基準でみると我々の分離株の中にも耐性菌が存在することになる。こ

これらの株は上述の機序により耐性を獲得しているものと考えられるが、短期的、定性的に高度の薬剤耐性を獲得していない。現在のところ耐性菌であっても通常投与による体内分布薬剤濃度で十分な殺菌作用を受けることが考えられるが、耐性菌の高度耐性化を防除するため、フルオロキノロン系薬剤の慎重使用はいうまでもない。

薬剤感受性試験の実施には菌分離が必須であり、逆に菌分離できるなら薬剤感受性試験の実施は容易といえる。現実には *M. hyopneumoniae* の菌分離がなされていないので薬剤感受性試験は実施されていない。上述したように *M. hyopneumoniae* のマクロライド耐性は 23S rRNA の特定部位のミューテーションであることが判明している。従って肺病変部に感染している *M. hyopneumoniae* の 23S rRNA の塩基配列情報が解析できれば感受性株と耐性株との区別が可能となり、マイコプラズマ対策の大きな指針となる。肺病変部に存在する *M. hyopneumoniae* の菌量は疾病のステージや状況で異なり、本研究では肺病変部 1グラムあたり  $10^6$  CFU 程度の感染菌量を下限とした。その理由は MPS 病変を鑑別するための *M. hyopneumoniae* PCR を供試した場合、この感染菌量がこの PCR で検出できる下限であるからである。この PCR 産物をテンプレートにした nested PCR 産物は DNA シーケンスにも供試できるが、PCR 産物精製、シーケンスの手間、時間およびコストを考えると蛍光融解曲線解析法とは比較にならない。すなわち、蛍光法は nested PCR 産物に LCGreen I<sup>TM</sup> を加え、HR-1 でプログラム加熱するだけなのでサンプルあたりに必要な処理解析時間は約 5 分であり、コストも 300 円程度である。*Mycoplasma hyopneumoniae* は菌分離だけでも 3 ヶ月程度必要で、その間何度となく継代が繰り返されるため薬剤耐性の性状を変化させてしまう可能性がある。今回開発した手法はこれらの問題を解決し、マクロライド耐性株を迅速に検出できることが明らかとなった。

肺病変材料から蛍光融解曲線解析を実施する場合の問題点として、肺病変材料に多重感染した *M. hyopneumoniae* 以外の細菌の存在がある。nested PCR のプライマー設計は *M. hyopneumoniae* に特異性の高い部分を設定しているため、マイコプラズマを除く細菌の DNA は増幅されない。しかしながら、*M. hyopneumoniae* に近縁な *M. flocculare* と *M. hyorhinis* の培養菌を用いた場合 nested PCR で増幅が確認された。これらの増幅率は *M. hyopneumoniae* のそれよりも低いので、肺病変部における *M. hyopneumoniae* の感染菌量が多重感染したその他のマイコプラズマ菌量と同等以上であれば問題なく解析可能であった。*Mycoplasma hyopneumoniae* 以外の DNA

から増幅された産物を多く含む試料の蛍光融解曲線解析では、解析曲線がフラットになり、*M. hyopneumoniae* の通常解析と明確に区別可能である。より効率的に肺材料を検査する場合、1st PCR の際に *M. hyorhinis* や *M. flocculare* の PCR を同時に行うことを推奨する<sup>2, 8)</sup>。この場合、*M. hyorhinis* や *M. flocculare* の PCR プログラムは *M. hyopneumoniae* のそれと同条件で実施可能である。

## 謝 辞

本研究は平成17年から18年度動物衛生研究所、所内プロジェクト研究の助成を受けて実施した。

## 引用文献

- 1) Bebear, C. M., Charon, A., Bove, J. M. et al.: Cloning and nucleotide sequences of the topoisomerase IV parC and parE genes of *Mycoplasma hominis*. Antimicrob. Agents Chemother. 42, 2024-2031 (1998).
- 2) Caron, J., Ourdani, M. & Dea, S.. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. J. Clin. Microbiol. 38, 1390-1396 (2000).
- 3) Garza-Ramos G., Xiong, L., Zhong, P., et al.: Binding site of macrolide antibiotics on the ribosome: new resistance mutation identifies a specific interaction of ketolides with rRNA. J. Bacteriol. 183, 6898-907 (2001).
- 4) Hannan, P. C. T.: Guidelines and recommendation for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. Vet. Res. 31, 375-395 (2000).
- 5) 川倉裕和.: 浜松と場における豚と畜検査データの活用. All about SWINE. 27, 24-32 (2005).
- 6) 小林秀樹.: と畜場出荷豚における肺炎病変部由来病原細菌の現状. All about SWINE. 27, 24-32 (2005).
- 7) Kobayashi, H., Morozumi, T., Munthali, G., et al.: Macrolide susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* isolated from piglets. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 1030-1032 (1996).
- 8) Kobayashi, H., Morozumi, T., Miyamoto, C., et al.: *Mycoplasma hyorhinis* infection levels in lungs of piglets with porcine reproductive and respiratory

- syndrome (PRRS). *J. Vet. Med. Sci.* 58, 109–113 (1996).
- 9) Kobayashi, H., Nakajima, H., Shimizu, Y., et al.: Macrolides and lincomycin susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* and variable mutation of domain II and V in 23S ribosomal RNA. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 795–800 (2005).
- 10) Kobayashi, H., Sonmez, N., Morozumi, T., et al.: In vitro Susceptibility of *Mycoplasma hyosynoviae* and *M. hyorhinis* to antimicrobial agents. *J. Vet. Med. Sci.* 58, 1107–1111 (1996).
- 11) Lucier, T. S., Heitzman, K., Liu, S. K., et al.: Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2770–2773 (1995).
- 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7–A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. USA (1997).
- 13) Pereyre, S., Guyot, C., Renaudin, H., et al.: In vitro selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 460–465 (2004).
- 14) Reinhardt, A. K., Bebear, C. M., Kobisch, M., et al.: Characterization of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV involved in quinolone resistance of *Mycoplasma gallisepticum* mutants obtained in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 590–593 (2002).
- 15) Ross, R. F. Mycoplasmal diseases, p. 469–483. In A. D. Leman, B. Straw, & R. D. Glock (ed.), *Diseases of Swine*, 6th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa. (1986).
- 16) Thacker, E. L., Halbur, P. G., Ross, R. F., et al.: *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 37: 620–627 (1999).
- 17) Tully, J. G., & Whitcomb, R. F.: The mycoplasmas II, p. 137. In R. F. Whitcomb (ed.), *Porcine mycoplasmas*, Academic Press, New York. (1979).
- 18) Vicca, J., Stakenborg, T., Maes, D., et al.: In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4470–4472 (2004).
- 19) Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., et al.: High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin. Chemist.* 49, 853–860 (2003).
- 20) Yamamoto, K., Koshimizu, K., & Ogata, M.: In vitro susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* to antibiotics. *J. Jpn. Vet. Sci.* 48, 1–5 (1986).

## Summary

### Development of a rapid screening technique for the detection of macrolide-resistant strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine

Hideki KOBAYASHI<sup>1)</sup>, Mika KANAZAKI<sup>1)</sup>, Eiji HATA<sup>2)</sup>, Kei NISHIMORI<sup>3)</sup> & Masashi EGUCHI<sup>4)</sup>

A total of 90 strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* from 70 farms in 10 prefectures, collecting between 2004 and 2005, were investigated to determine *in vitro* susceptibilities to nine drugs that are considered as an effective antimicrobial agent for mycoplasmas. Seven strains were found resistant to 16-membered macrolide antibiotics and lincomycin. All resistant strains had point mutations either at A2058G (five strains) or A2058G and A2062C (two strains) in 23S rDNA. Strains possessed two mutations showed higher resistance to tylosin than those of one mutation. Been focused on the mutation in 23S rDNA, we developed a rapid detecting technique, using HR-1<sup>TM</sup> and LCGreen I<sup>TM</sup>, for the screening of macrolide resistant *M. hyopneumoniae*. This technique is on the basis of detection of a point mutation in the limited region on 23S ribosomal RNA. It took four hours to yield a result when a strain was harvested, whereas, eight hours when a lung lesion sample was examined. KEY WORDS: high resolution melter analysis, macrolide-resistance, *Mycoplasma hyopneumoniae*, 23S rDNA.