

13 *Moraxella bovoculi* の関与が疑われた公共牧場の角結膜炎流行と浸潤状況調査

留萌家畜保健衛生所

○田村 幸子 坂本 光弘
松田 きく 上村 伸子

はじめに

管内 A 公共牧場（A 牧場）では、平成 30 年から乳用牛の角結膜炎の発生が年々増加している。令和 2 年 5 月に実施した病性鑑定で、A 牧場利用歴のある 1 酪農場の角結膜炎罹患牛群より *Moraxella bovis* (*M.bovis*) 及び *Moraxella bovoculi* (*M.bovoculi*) を分離し、A 牧場の角結膜炎流行に *Moraxella* 属菌の関与が疑われたことから、同属菌の浸潤状況調査を実施するとともに、多発の要因を検討したので概要を報告する。

I 背景

1 角結膜炎発生状況

A 牧場における平成 29 年～令和 2 年の乳用牛の角結膜炎発生頭数は、各年 7、50、180 及び 250 頭で、平成 30 年以降、年々増加している。一方、同町内の管理団体が同じ別公共牧場（B 牧場）では各年 9、25、38 及び 35 頭で、平成 30 年に増加以降、発生数は 30 頭前後で推移している（図 1）。

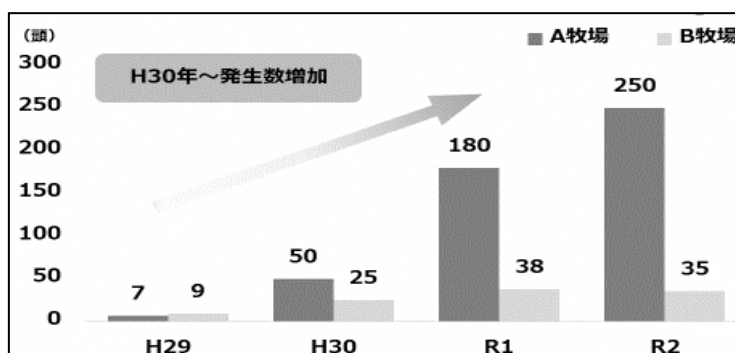


図 1 角結膜炎発生状況（平成 29 年～令和 2 年）

2 預託元農場の病性鑑定

令和元年冬季に A 牧場預託元の 1 酪農場で退牧牛を中心に角結膜炎が発生し、令和 2 年 5 月に当所に病性鑑定依頼があった。罹患牛 9 頭は、結膜充血、流涙、眼球白濁及び角膜潰瘍を呈していた（図 2）。未治療牛 6 頭の涙液スワブを用い、一般細菌、マイコプラズマ及び牛伝染性鼻気管炎（IBR）ウイルス検査を実施し、3 検体から *M.bovis* 及び *M.bovoculi* を有意に分離した。また、オキシテトラサイクリン（OTC）軟膏による点眼治療後の再発事例 3 頭については、一般細菌検査のみ実施し、全検体から *M.bovoculi* を有意に分離した。

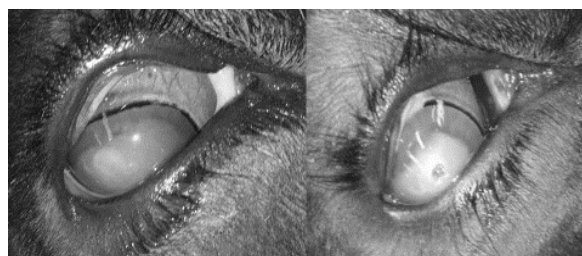


図 2 角結膜炎罹患牛の眼症状
（左：眼球白濁 右：角膜潰瘍）

II 浸潤状況調査

令和 3 年 5 月～9 月に、A 牧場及び B 牧場の 2 牧場を対象に預託元農場の保菌状況

調査、入牧牛の角結膜炎原因検索及び分離菌の薬剤感受性試験を行った。

1 調査対象牧場の概要

2 牧場の放牧可能頭数は、A 牧場が 500 頭、B 牧場が 450 頭で、令和 3 年の受託戸数は A 牧場が 25 戸、B 牧場が 14 戸であった。

入牧時の衛生条件は、5 種混合不活化ワクチン 2 回及び嫌気性 3 種ワクチン接種、牛ウイルス性下痢ウイルス遺伝子検査陰性で、入牧期間中の衛生対策として、入牧時にペルメトリン含有耳標を装着し、5 月と 9 月に内部寄生虫駆除剤、7 月と 8 月に外部寄生虫駆除剤の体表塗布を実施している。

角結膜炎の治療は、令和 2 年まで OTC 軟膏による点眼治療を行い、令和 3 年からロメフロキサシン含有点眼薬を併せて使用している。

2 預託元農場の保菌状況調査

(1) 材料

入牧時に採材した A 牧場 24 戸 119 頭、B 牧場 13 戸 38 頭の涙液スワブを用いた。

(2) 方法

5%ヒツジ血液寒天培地（ニッスイ）及び DHL 寒天培地を用いて、37℃、24～48 時間、好気培養を行い、*Moraxella* 属菌の分離培養を実施した。分離菌は、グラム染色及びオキシダーゼ試験による一次鑑別後、簡易同定キット（ID テスト・HN-20 ラピッド（ニッスイ））、硝酸塩還元能、カゼイン分解能及びフェニルアラニンデアミナーゼ（PADase）活性試験により生化学的性状検査を実施し、菌種を同定した。また、生化学的性状検査で鑑別のできない分離菌については 16S-23S-ISR（intergenic spacer region）をターゲット領域とした PCR 産物制限酵素切断プロファイル（PCR-RFLP）[1]を実施した（図 3）。

菌種	菌形	生化学的性状			PCR	
		硝酸塩還元能	カゼイン分解能	PADase 活性※	増幅産物	制限酵素処理後
<i>M.bovis</i>	短桿	-	+/-	-	650bp	切断されず
<i>M.bovoculi</i>	球	+	-	+/-	600bp	切断 450bp 150bp
<i>M.ovis</i>	球	+	-	-	600bp	切断されず

※PADase：フェニルアラニンデアミナーゼ

【 PCR検査 】

16S-23S intergenic spacer region(ISR) 遺伝子を標的としたPCR及び制限酵素Afa I 処理による切断試験を実施

①：増幅産物
②：①の制限酵素処理後



図 3 *Moraxella* 属菌の同定方法

(3) 結果

入牧時に *M.bovoculi* を保菌していた預託元農場の割合は、A 牧場が 12.5% (3/24 戸)、B 牧場が 7.7% (1/13 戸) で、*M.bovis* は、A 牧場が 4.1% (1/24 戸)、B 牧場が 7.7% (1/13 戸) であった。A 牧場の預託元農場は、*M.bovis* よりも *M.bovoculi* を保菌している割合が高く、また、*M.bovoculi* を保菌している割合は B 牧場よりも高い傾向がみられた。

3 入牧牛の角結膜炎原因検索

Moraxella 属菌分離培養、マイコプラズマ及び IBR ウイルス検査を実施した。

(1) 材料

調査期間中に、流涙、結膜充血等の症状を呈した牛から都度採材した 2 牧場延べ 60 頭の涙液スワブを用いた。なお、1 頭あたりスワブ 2 本で採材ができなかった個体については、*Moraxella* 属菌の分離を優先したため、マイコプラズマは 59 検体、ウイルス

検査は 50 検体での実施となった。

(2) 方法

Moraxella 属菌の分離培養は、II の 2 の (2) と同様の方法で実施した。マイコプラズマは、マイコプラズマ NK 液体培地（関東化学）に接種し、黄変したものを平板培養並びに PCR 検査を実施した。IBR ウイルス検査は、MDBK 細胞を用い、5%FBS 加 MEM、5% CO₂、37℃の条件下で 7 日間培養を実施し、細胞変性効果を指標として 3 代目まで盲継代を行った。

また、治療に 2 週間以上を要した事例を難治例として区分し、検出された病原体との関連性について調査した。

(3) 結果

検査を実施した全検体からマイコプラズマ及び IBR ウイルスは検出されなかった。60 検体中 48 検体（80%）から *Moraxella* 属菌を分離し、12 検体（20%）は有意な病原体は検出されなかった。菌種の内訳は、*M.bovoculi* 単独が 21 検体（35%）、*M.bovis* 単独が 13 検体（22%）、2 菌種の混合が 14 検体（23%）であった。月別の検出割合では、*M.bovis* 単独の検出は漸減し、*M.bovoculi* との混合検出が漸増した（図 4）。

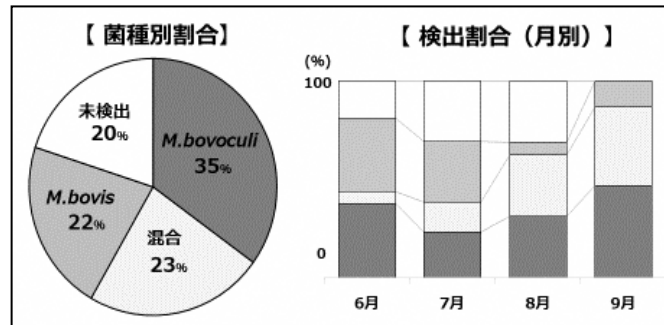


図 4 角結膜炎の原因検索結果

なお、分離された *M.bovoculi* は、II の 2 の保菌状況調査を含め、全て PADace 活性が陰性であった。この結果は、令和 2 年の A 牧場預託元農場の罹患牛由来株も同じで、国内の報告[2,3]とは異なっていた。

検出された病原体と治療期間との関連性については、難治例 12 頭全てから *M.bovoculi* を分離、*M.bovis* のみが分離された事例はなく、2 菌種の混合感染が 5 頭で、*M.bovoculi* の感染により治療が長期化する傾向が認められた。

4 薬剤感受性試験

(1) 材料

II の 2 及び 3 で分離した *M.bovis* 及び *M.bovoculi* 各 22 株を用いた。

(2) 方法

微量液体希釈法[4]により、OTC、ベンジルペニシリン (PCG)、ジヒドロストレプトマイシン (DSM)、エンロフロキサシン (ERFX) の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。判定は、*M.bovis* 及び *M.bovoculi* の各薬剤に対するブレイクポイントの報告はないことから、J. D. Loy らの報告[5]の MIC₉₀ 値を参考とした。

また、今後の判定基準の参考とするため、一濃度ディスク拡散法も併せて実施し、微量液体希釈法と成績を比較した。ミュラーヒントン 5%ヒツジ血液寒天培地 (BD) を用いて、薬剤はテトラサイクリン (TC)、PCG、ストレプトマイシン (SM)、ERFX を供試した。

(3) 結果

M.bovis は、全株で SM の MIC 値は $\geq 64\mu\text{g/ml}$ 、ディスク阻止円 (円) は 6mm を示し、感受性が低かった。TC の MIC 値は $0.25\sim 0.5\mu\text{g/ml}$ 、円は 28~32mm、PCG の MIC 値は $0.12\mu\text{g/ml}$ 、円は 26~32 mm、ERFX の MIC 値は $\leq 0.0625\mu\text{g/ml}$ 、円は $\geq 34\text{mm}$ で、SM 以外の薬剤に対して全て感受性が認められた (表 1)。

M.bovoculi は、8 株で PCG の MIC 値は $\geq 1\mu\text{g/ml}$ 、円は $\leq 16\text{mm}$ を示し感受性が低かった。TC の MIC 値は $0.25\sim 0.5\mu\text{g/ml}$ 、円は 22~26mm、SM の MIC 値は $\leq 4.0\mu\text{g/ml}$ 、円は 14~20mm、ERFX の MIC 値は $\leq 0.0625\mu\text{g/ml}$ 、円は 27~32mm で、PCG 以外の薬剤に対して全て感受性が認められた (表 2)。

表 1 *M.bovis* の薬剤感受性成績

上段：最小発育阻止濃度 (菌株数, n=22)		下段：ディスク阻止円径の範囲 (mm)											参考基準※
濃度 (µg/ml)	≤0.031	0.062	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥64	
OTC			8	14									1
T.C			28 - 32										
PCG			22										≤0.12
			26 - 32										
DSM												22	N/A
SM												6	
													≤0.12
ERFX		4	17										
		≥34											

※A、B牧場の点眼治療薬
 ※参考基準：MIC90値 (J.D. Loy, B. W. Brodersen, J. Vet. Diagn. Invest. 26, 761-768, 2014.)

表 2 *M.bovoculi* の薬剤感受性成績

上段：最小発育阻止濃度 (菌株数, n=22)		下段：ディスク阻止円径の範囲 (mm)											参考基準※
濃度 (µg/ml)	≤0.031	0.062	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥64	
OTC				5	17								4
T.C				22 - 26									
PCG		3	1	3	1	6	8						0.25
		≥31		14 - 20									
DSM							2	20					N/A
SM							14 - 20						
													≤0.12
ERFX		14	8										
		27 - 32											

※A、B牧場の点眼治療薬
 ※参考基準：MIC90値 (J.D. Loy, B. W. Brodersen, J. Vet. Diagn. Invest. 26, 761-768, 2014.)

III A 牧場の多発要因調査

A 牧場での角結膜炎多発要因の検討のため、2 牧場のハエ捕獲数、衛生管理状況、角結膜炎の月別発生状況について調査を実施した。

1 方法

(1) ハエの捕獲数

令和 3 年 6 月～9 月に、ペットボトルを利用した捕獲器に誘引剤として乳酸菌飲料原液を用いて、2 牧場の授精場近辺の各 3 カ所に設置し、週に 1 回、ハエの数を計測した (図 5)。



図 5 ハエ捕獲器

(2) 衛生管理状況

牧区数、飼養密度、飼養管理等の聞き取り調査を実施し、2 牧場で比較した。

(3) 月別発生状況

平成 29 年～令和 3 年 9 月における角結膜炎の月別発生状況について、北海道中央農業共済組合の診療記録から調査を行った。

2 結果

(1) ハエの捕獲数調査

ハエ捕獲数は波状に推移し、6～8 月中旬までは 2 牧場とも漸増、8 月下旬から A 牧場で急増した (図 6)。

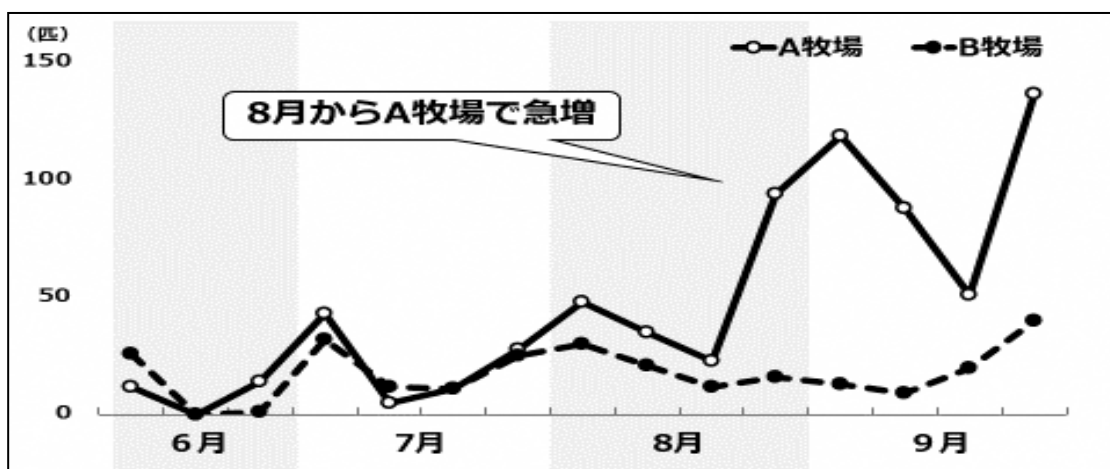


図 6 ハエの捕獲数の推移

(2) 衛生管理状況の比較

牧場の立地は、A 牧場が丘陵地で周囲に林があり、B 牧場は平地で日陰が少なく、地理的に条件が異なっていたが、角結膜炎の増加に結びつく要因は認められなかった。異常牛の対応は、B 牧場では隔離牧区が整備されていたが蹄病罹患牛が対象であった。また、従事人数も同数で、角結膜炎の発見、治療体制について 2 牧場の差は認められなかった。2 牧場の 1 牧区当たりの平均飼養頭数は約 20 頭で大きな差はなかったが、A 牧場では例年 8 月頃に、牛の栄養状態及び牧草生育状況により草架を設置し、サイレージロールを給与するため、牛同士が接触する機会が増加していた。また、A 牧場では平成 30 年から年々、放牧頭数が増加していた（表 3、図 7）。

(3) 月別発生状況

平成 29 年～令和 3 年の角結膜炎の月別発生状況では、例年 8 月～9 月にかけて発生が多くみられ、ハエ捕獲数のピークや草架の設置時期と一致していた。また、令和元年は 7 月に発生が急増し、令和 2 年は入牧直後の 6 月から増加しており、平成 30 年以前と比較して、発生時期の始まりが早くなっていた（図 8）。

表 3 飼養衛生管理の比較

	A牧場	B牧場
立地	丘陵地	平地
日陰	多い（周囲に林）	少ない
隔離牧区	なし	あり（主に蹄病）
従事人数	各牧場2～3名（両牧場5名）	
牧区数 （総面積）	28 （232ha）	16 （135ha）
平均飼養密度	約20頭／牧区	

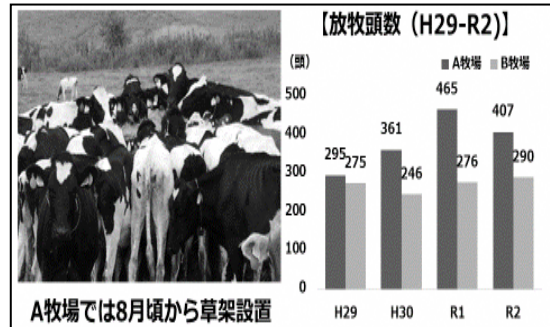


図 7 飼養衛生管理の比較

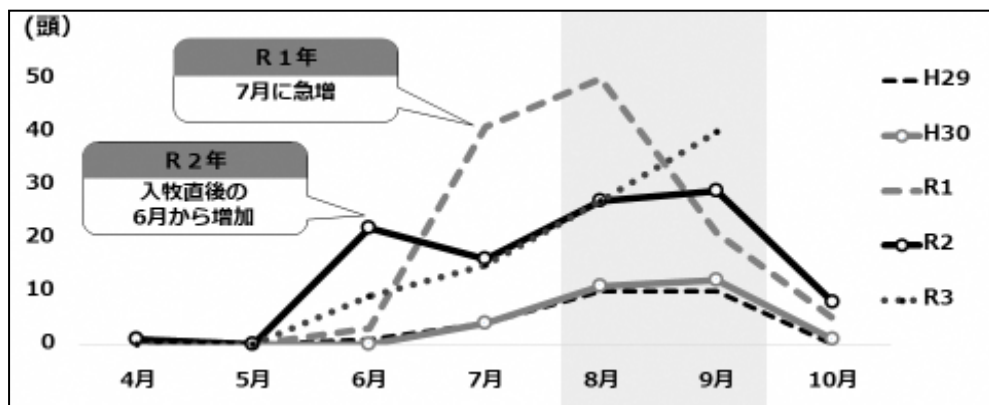


図 8 角結膜炎の月別発生状況（H29～R3）

IV まとめ及び考察

入牧時の預託元農場の保菌状況調査の結果、複数の預託元農場で *Moraxella* 属菌の感染が維持されていることが示唆された。また、放牧期間中の角結膜炎原因検索では *M.bovoculi* の検出率が最も高く、*M.bovoculi* 感染事例は、*M.bovis* の単独感染事例よりも治療が長期化する傾向が確認されたことから、同菌が A 牧場の角結膜炎流行に関与していると推察された。

国内外で *Moraxella* 属菌の薬剤耐性が報告されているが[3,5-8]、本調査においては、*M.bovis* 及び *M.bovoculi* とともに主な治療薬の OTC に感受性がみられたことから、今回の A 牧場での流行に耐性株が関与した可能性は低いと考えられた。

角結膜炎の発生は、平成 30 年から増加していること、また、令和元年から発生時期が早まり、発生数が激増していることから、平成 30 年頃には *M.bovoculi* が牧場に侵

入し、A 牧場で流行したと考えられた。

A 牧場の流行要因調査では、角結膜炎の発生ピークは A 牧場でのハエ発生ピーク、草架設置時期と一致していたことから、B 牧場に比べ、ハエの発生数と牛同士の接触機会が多いことが流行に関与したと考えられた。また、入牧時の *M.bovoculi* 保菌状況から、退牧牛を介して預託元農場の牛群で感染が維持され、翌年、保菌牛が入牧したことが流行の一因と考えられた。放牧期間の牛伝染性角結膜炎 (IBK) 予防には冬季の飼養管理も重要であることが示唆された。

M.bovoculi は、平成 19 年に新種として提唱され[9]、国内では平成 22 年に兵庫県で初分離され[6]、北海道十勝での IBK 多発事例では眼病変重症化との関連が示唆された[8]。今回の調査においても、難治例では *M.bovoculi* の検出率が高く、角結膜炎の原因因子として認識する必要があると考えられた。また、類縁菌との鑑別項目である PADace 活性は分離株全てで陰性を示し、国内の報告[2,3]とは異なる性状を有していた。

今回、分離された *M.bovoculi* 菌株は、薬剤感受性試験で治療薬剤系統に感受性を示したが、一部はペニシリンに対して低感受性を示した。また、国内では薬剤耐性株が報告[3,6-8]されていることから、今後、今回実施した微量液体希釈法と一濃度ディスク拡散法の比較成績を薬剤選択の一助として活用していきたい。

稿を終えるにあたり、ハエの捕獲方法についてご助言頂きました留萌農業改良普及センター工藤智弘主査、本調査に御協力いただきました公共牧場の皆様並びに北海道中央農業共済組合留萌支所北部家畜診療所 成瀬洋平先生、松田英介先生、竹村昌人先生に深謝いたします。

引用文献

- [1] John A. Angelos, Louise M. Ball : Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp.nov.from other coccoid moraxellae by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA, J. Vet. Diagn Invest. 19,532 -534 (2007)
- [2] 藤井猪一郎、吉野文彦、下條憲吾、興梶哲文、谷山敦、田中英隆 : *Moraxella bovoculi* による伝染性角結膜炎と牛伝染性鼻気炎混合感染症の発生について、長崎県、平成 26 年度家畜保健衛生業績発表会、26-28 (2014)
- [3] 石原径佳、中井悠華 : *Moraxella bovoculi* による牛伝染性角結膜炎 (IBK) の発生及び保菌調査、埼玉県、埼玉県調査研究成績報告書(家畜保健衛生業績発表集録)第 57 報 (平成 27 年度)、34-38 (2015)
- [4] 浅井鉄夫他、動物用抗菌剤研究会薬剤感受性試験法検討委員会編集 : 動物由来細菌に対する薬剤感受性試験法ガイドライン (動物用抗菌剤研究会 2013 年改訂標準法)、129-149 (2014)
- [5] John Dustin Loy, Bruce W. Brodersen : *Moraxella* spp. isolated from field outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis: a retrospective study of case submissions from 2010 to 2013, J. Vet. Diagn Invest. Vol. 26(6) 761-768(2014)
- [6] 加茂前優花、小島温子 : 角結膜炎発症牛から分離された *Moraxella bovoculi* 、平成 23 年度全国家畜保健衛生業績抄録、33 (2011)
- [7] 村上成人 : *Moraxella bovoculi* による牛伝染性角結膜炎の発生、平成 24 年度全国家畜保健衛生業績抄録、25(2012)
- [8] 千葉悠斗、伊藤めぐみ、土屋博威、楠本晃子、茅野光範、高橋英二 : 伝染性角結膜炎が多発した乳用牛育成牧場から検出された *Moraxella bovoculi* と眼病変重症化との関連、産業動物臨床医誌. 12(1)、21-26(2021)
- [9] John A. Angelos, Phillip Q. Spinks, Louise M. Ball, Lisle W. George: *Moraxella bovoculi* sp. nov., isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57,789 -795 (2007)