

サラブレッドの輸送関連性呼吸器疾患の予防法に関する研究

遠藤 祥郎

目次

主な略号一覧	1
緒論	2
第1章 長距離輸送される健常サラブレッドの体温および気管内好中球数に対する エンロフロキサシン単回投与の効果	6
1. 緒言	7
2. 材料と方法	9
1) 供試動物	9
2) 実験デザイン	9
3) 臨床検査および血液学的検査	9
4) TBA の採材と分析	10
5) 輸送	11
6) 輸送熱を発症した供試馬の治療	11
7) 統計学的解析	12
3. 成績	13
4. 考察	14
5. 小括	16
第2章 長距離輸送される健常サラブレッド競走用馬の直腸温および血液性状に対 するエンロフロキサシンの輸送前投与の効果	18
1. 緒言	19
2. 材料と方法	20

1) 供試動物および輸送	20
2) 検査項目	20
3) 統計学的解析	21
3. 成績	22
4. 考察	23
5. 小括	25

第3章 長距離輸送される健常サラブレッドの直腸温および血液性状に対するマル

ボフロキサシンの輸送前投与の効果

1. 緒言	28
2. 材料と方法	29
1) 供試動物	29
2) 輸送	29
3) 臨床検査および血液学的検査	30
4) 統計学的解析	31
3. 成績	32
4. 考察	33
5. 小括	36

第4章 若齢サラブレッドにおけるマルボフロキサシンの予防的投与導入前後での

輸送熱発生率の比較

1. 緒言	40
2. 材料と方法	41
1) 供試動物および輸送	41

2) 検査項目および治療	41
3) 統計学的解析	41
3. 成績	43
4. 考察	44
5. 小括	45
第5章 健常サラブレッドにおける長距離輸送後の血液性状に対する低用量 G-CSF	
製剤の効果	49
1. 緒言	50
2. 材料と方法	51
1) 供試動物	51
2) 薬物投与	51
3) 輸送	51
4) 採材および検査	52
5) 統計学的解析	52
3. 成績	54
4. 考察	55
5. 小括	57
総括	59
要旨	64
英文要旨	68

謝辞 72

引用文献 74

主な略号一覧

ERFX	Enrofloxacin
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
Hgb	Hemoglobin
IFN- α	Interferon- α
MRFX	Marbofloxacin
N/L ratio	Neutrophil to Lymphocyte ratio
PCV	Packed Cell Volume
RBC	Red Blood Cell
SAA	Serum Amyloid A
SD	Standard Deviation
<i>S. zooepidemicus</i>	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>
TBA	Tracheobronchial aspirate
WBC	White Blood Cell

緒 論

競馬の国際化に伴い、競走用馬の飛行機や馬専用輸送車(馬運車)を用いた長距離輸送は一般的なウマの輸送手段になっている。このような中、輸送関連性呼吸器疾患、いわゆる“輸送熱”は調教や競馬出走のスケジュールを狂わせ得る重要な疾患として認識されている。特に、長距離輸送の結果引き起こされる細菌性の肺炎や胸膜炎はウマの死亡率を増加させることが報告されている(20, 25)。このことから、輸送熱予防に関する調査研究が世界的に熱望されている。すなわち、輸送熱を予防することができれば、調教や競馬出走のスケジュールが立て易くなり、輸送に伴うウマのコンディションの悪化を最小限に抑えることが可能であると考えられている。

輸送熱に対する研究は、疫学調査や原因研究をはじめとした様々な側面から行われてきた(18, 20, 25, 26, 32)。その結果、輸送熱は輸送に伴うストレスと馬運車内の環境悪化が主な原因で発生し、一般的には輸送時間が 20 時間を超える場合に発症率が高くなることが明らかとなった(18, 25, 26)。また、長距離輸送中にウマの頭頸部を挙上した状態が継続すると、気道粘膜の自浄作用が阻害されることにより、下気道の細菌数が増加することが輸送熱の原因となると考えられている(28-30)。特に、扁桃や気管の常在菌である *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) を含む病原性細菌が、ウマの気管支肺胞領域に日和見感染することが輸送熱の主要原因と考えられている(20, 25, 26, 36)。

このように輸送熱の発症機序が解明されたことから、輸送熱を予防するための研究が積極的に実施されてきた(2, 9, 19, 29, 30)。その一つとして、Interferon- α (IFN- α) の輸送開始前投与が挙げられる(2)。この中では、ウマの免疫機能を賦活化するため輸送開始日を含む輸送前の 3 日間に連続で IFN- α を投与すると、輸送熱発症後の臨床症状の改善が良好であったことが報告された。しかしながら、当該プロトコルでは輸送熱を完全に予防することはできなかったため、さらなる予防法の開発が熱望されてきた。これらの報告に基づいて著者らは、IFN- α の投与により免疫機能を賦活化した上で、ウマの輸送熱の主要原因菌

である *S. zooepidemicus* を含む病原性細菌に有効な抗菌薬を輸送期間中の気管支肺胞領域に存在させることが輸送熱を予防する上で重要であると考えた。しかしながら、ウマ医療で一般的に用いられている抗菌薬の多くは抗菌活性の持続時間が短く(27)、輸送前の単回投与により体内の有効濃度を長時間維持するのが困難であった。

このような中、エンロフロキサシン(Enrofloxacin:ERFX)やマルボフロキサシン(Marbofloxacin:MRFX)をはじめとしたフルオロキノロン系抗菌薬は広域スペクトルを有する抗菌薬であることから、ウマ医療において長時間作用型の抗菌薬として臨床的に使用されてきた(3, 7-10)。成馬へのフルオロキノロン系抗菌薬の静脈内投与により、これら抗菌薬は気管支肺胞領域へ良好に移行し、投与後 24 時間血中濃度が高く維持されることが報告されている(7, 8, 15)。また Davis らは、長距離輸送されたウマの輸送後の治療における ERFX 投与の有効性を報告している(9)。しかしながら、著者らの知る限り ERFX や MRFX を輸送熱の予防を目的として輸送前に投与し、効果を判定した報告は見当たらない。

一方で、抗菌薬の使用には耐性菌出現の問題がある。顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte Colony-Stimulating Factor:G-CSF)は骨髄中の顆粒球の増殖および末梢血への動因を促進することが知られている(1)。フィルグラスチム、ナルトグラスチム、レノグラスチムをはじめとした医薬品が販売されており、人医療では腫瘍の化学療法による好中球減少症をはじめとした疾患に適用されている(1)。ウマ医療でも新生子溶血性黄疸への使用例があるものの(34)、高価であるために臨床応用は進んでいなかった。しかし、近年ジェネリック薬品が発売され、ウマ医療においても応用可能な価格帯となった。輸送熱と G-CSF の関係について、過去の調査によると、輸送熱を発症した群で血清中の G-CSF が有意に高かったという結果が報告されている(22)。それゆえ、G-CSF の上昇は自然な治癒反応の一つであり、輸送熱の主要原因菌である *S. zooepidemicus* の排除に適した状態であると考えられる。しかしながら、著者らの知る限り輸送中のウマに対する G-CSF 製剤の効果に関する報告は見当たらない。

このように、サラブレッドにおける抗菌薬および免疫賦活剤を用いた輸送熱予防に関する研究は十分に実施されていない。そこで、本研究ではウマの輸送熱予防に対する抗菌薬および免疫賦活剤の有効性を検討するために、以下の研究項目を実施した。

まず、第 1 章において IFN- α を併用した ERFX の輸送直前投与の輸送熱予防効果を検証した。続いて、第 2 章において IFN- α を併用しない ERFX 単独での輸送直前投与の輸送熱予防効果を検証した。また、第 3 章において IFN- α を併用した MRFX の輸送直前投与の輸送熱予防効果を ERFX と比較検討した。第 4 章においては、IFN- α を併用しない MRFX 単独での輸送直前投与の輸送熱予防効果を MRFX 導入前と比較検討した。さらに、第 5 章において G-CSF 製剤の一つであるフィルグラスチムの輸送直前投与後の血液性状における効果を検証した。

これらの 5 項目の検討により、サラブレッドにおいて輸送熱予防に対する抗菌薬および免疫賦活剤の有効性について検討することを本研究の目的とした。

第1章

長距離輸送される健常サラブレッドの体温および気管内好中球数に対する
エンロフロキサシン単回投与の効果

1. 緒言

輸送関連性呼吸器疾患、いわゆる輸送熱は調教や競馬出走のスケジュールを狂わせてしまう可能性が高い重要な疾患であることから、輸送熱を予防することができれば、調教や競馬出走のスケジュールが立て易くなり、輸送に伴うウマのコンディションの悪化を最小限に抑えることが可能となる。そのため、輸送熱に関する研究は様々な側面から行われてきた(18, 20, 25, 26, 32)。

輸送熱は一般的には輸送時間が 20 時間を超えた場合に発症率が高くなることが知られている(18, 25, 26)。すなわち、長時間の輸送によりウマの気道粘膜の自浄作用が低下し、結果的に扁桃と気管の常在菌である *S. zooepidemicus* のような病原性細菌が下気道に日和見感染することが輸送熱の主要原因と考えられている(20, 25, 26, 36)。また、輸送熱発症時には、下気道における細菌数の増加が宿主の免疫状態を変化させ(28, 29)、好中球を含む末梢血中白血球数は増加すること(28)や、炎症の非特異的な指標である血清アミロイド A (Serum Amyloid A: SAA) の血中濃度が増加することが知られている(17)。

一方、免疫機能を賦活化するためウマに輸送開始前 3 日間連続で IFN- α を経口投与すると、輸送熱発症後の臨床症状が改善されることが報告されている(2, 19)。しかしながら、当該プロトコルでは輸送熱を完全には予防することができないと考えられている。そこで、著者らは IFN- α の輸送前投与により免疫機能を賦活化した上で、ウマの輸送熱の主要原因菌である *S. zooepidemicus* を含む病原性細菌に有効な抗菌薬を輸送期間中の気管支肺胞領域に存在させることが輸送熱を予防する上で重要であると考えた。特に、フルオロキノロン系抗菌薬である ERFX は広域スペクトルを有し *S. zooepidemicus* を含む病原性細菌に有効な抗菌薬であり、静脈内投与により気管支肺胞領域へ良好に移行し、投与後 24 時間血中濃度は高く維持されることが報告されている(15)。しかしながら、著者らの知る限り ERFX を輸送熱の予防のために投与し、効果を判定した報告は見当たらない。

本研究の目的は、IFN- α が輸送前に予め投与され、長距離輸送された健常サラブレッド

における体温および気管内好中球数に対する ERFX(5 mg/kg, 静脈内投与)の単回投与の効果を評価することである。

2. 材料と方法

1) 供試動物

本研究には臨床的に健常なサラブレッド 32 頭(雄 16 頭, 雌 16 頭; 年齢: 2 歳)を供試した。供試馬は試験の前年にセリで購入され, 日本中央競馬会日高育成牧場(北海道浦河郡浦河町)で約 6 ヶ月間に渡り競走用馬になるための調教を受けてきた。また供試馬は, 輸送前に馬臨床を専門とする獣医師により肺炎や胸膜肺炎をはじめとした呼吸器感染症に罹患していないことが臨床的に確認された。供試馬に日常的に給餌した飼料は燕麦やペレットがあらかじめ混合されたアソートタイプのもので, 輸送中も同一の飼料を給餌した。なお, 本研究は日本中央競馬会日高育成牧場動物実験委員会の承認を得て実施された。

2) 実験デザイン

供試馬は日本中央競馬会中山競馬場(千葉県船橋市)で行われるトレーニング・セールに上場するために輸送された。供試馬全頭は, 輸送当日を含む輸送前の連続した 3 日間に渡り 24 時間毎に 0.5 U/kg の IFN- α (ビムロン, バイオベット, 日本)の舌下投与を受けた(2, 12)。供試馬は無作為に 16 頭(雄 8 頭, 雌 8 頭)ずつの 2 群(ERFX 投与群および対照群)に群分けされた。ERFX 投与群には ERFX(5 mg/kg 体重, バイトリル 5%, バイエル, 日本)が, 対照群には生理食塩水(50ml, 大塚生食注, 大塚, 日本)が静脈内投与された。ERFX および生理食塩水の静脈内投与は, 供試馬が馬運車に積載される 1 時間前に行われた。臨床検査および血液学的検査が輸送前後に実施された。さらに, 両群から 6 頭(雄 3 頭, 雌 3 頭)が無作為に選出され, 輸送前後の気管吸引液(Tracheobronchial aspirate: TBA)検査が実施された。輸送後, 臨床的に健康で発熱が認められなかった供試馬は, 輸送終了翌日から 7 日間にわたって競走用馬としての調教を受けた。

3) 臨床検査および血液学的検査

輸送前、輸送中および輸送後において、供試馬は視診および触診にて投薬により ERFX あるいは生理食塩水の投与による臨床上的異常所見がないか確認された。また、輸送前および輸送後において、心臓および肺の聴診が実施されるとともに、体重計測、糞便性状検査も実施された。さらに供試馬は、輸送直前および輸送直後に水銀体温計で直腸温が測定され、38.5°C以上を発熱と判断した。

血液サンプルの採材は、ウマの頸静脈からプレーン採血管(VP-P100K, テルモ, 日本)および EDTA 入り採血管(VC-C50, テルモ, 日本)を用いて実施された。EDTA 血を用いて自動血球計算機(K-4500, シスメックス, 日本)により白血球(White Blood Cell: WBC)数およびヘモグロビン(Hemoglobin: Hgb)濃度が測定された。また、EDTA 血はヘマトクリット管を用いた血球容積(Packed Cell Volume: PCV)検査および簡易迅速染色(Diff-Quick 16920, シスメックス, 日本)により血液塗沫標本検査(好中球/リンパ球比(Neutrophil to Lymphocyte ratio: N/L Ratio)の測定)に供された。N/L Ratio は、血液塗沫標本において200個の細胞を計数して算出された。

プレーン採血管からは、遠心分離(3,000 rpm, 10 分間, 25°C)後、血清を得た。SAA 濃度は、ウマの標準血清(SAA 濃度 0.0~400.0 µg/ml)を用いたラテックス凝集反応(LZ テスト‘栄研’ SAA, 栄研, 日本)により測定された。これらの標準血清は、過去の報告に基づき作成されたものである(17)。全血および血清の分析は、共著者の1人(Hobo S)によって盲検による方法で行われた。

4) TBA の採材と分析

TBA の採材は、輸送の3日前(IFN- α の投与前)および到着後1時間に、短時間の物理的保定下で実施された。TBA はビデオ内視鏡(VQ8303A, オリンパス, 日本)の鉗子孔を経由して30 ml の滅菌食塩水で無菌的に回収された(21)。なお、ビデオ内視鏡の表面および鉗子孔は、TBA 回収前に塩化ベンザルコニウム、50%イソプロパノールおよび滅菌蒸留

水で殺菌消毒された。TBA の塗沫標本は、メーカーの説明書に従って細胞遠心法 (Shandon Cytospin 4 cytocentrifuge, Thermo Electron, 米国) およびライト・ギムザ染色法 (Diff-Quick 16920, シスメックス, 日本) で作製され、光学顕微鏡下で計数された。鏡検は、100 倍の倍率で 200 個の白血球分画を計数することにより実施され、白血球百分率が算出された。全ての計数は、共著者の 1 人 (Hobo S) によって盲検による方法で行われた。

5) 輸送

出発地点は日本中央競馬会日高育成牧場、到着地点は日本中央競馬会中山競馬場とした。輸送時間は 26 時間であり、輸送距離は陸路で 1,100 km (うち高速道路が 1,000 km, 国道が 100 km)、海路で 110 km の計 1,210km であった。海路の輸送 (北海道函館港～青森県青森港) には大型のフェリーを用い、所要時間は 3 時間 30 分であった。

輸送には、1 台に 6 頭のウマを積載することができる馬専用輸送車 (馬運車) 10 台を用いた。なお、馬運車 10 台の構造は全て同一であった。供試馬は、輸送中に 2 回 (出発から 7 時間後および 23 時間後に馬運車を停車した状態で給餌)、個別に 1 頭当たり 1 kg アソートタイプの飼料を給餌された。また、輸送中は常時飲水可能とした。輸送中は、4 時間ごとに 15～30 分の休憩を取り、全ての休憩で車内の換気を実施した。

なお、出発時の気温は 5.5 °C であり、到着時の気温は 15.9 °C であった。

6) 輸送熱を発症した供試馬の治療

輸送後に直腸温が 38.5 °C 以上に上昇していた供試馬は、ウマの輸送に豊富な経験を保有する獣医師の判断により抗菌薬を用いた治療が行われた。この際、獣医師はウマの群分けについて盲検化されていた。治療内容は、直腸温の上昇度合およびウマの臨床症状に基づき決定された。すなわち、軽症例には国内において広く臨床応用されているペニシリン・ストレプトマイシンの合剤 (ペニシリン 8,000 U/kg およびストレプトマイシン 10 mg/kg,

筋肉内投与, 24 時間毎;マイシリン, 明治, 日本)が投与され, 重症例にはセファロチン・ナトリウム(20 mg/kg, 静脈内投与, 8 時間毎;コアキシン, ケミックス, 日本)が投与された。38.5 °C 以上の発熱を呈した供試馬には, これら 2 種類の抗菌薬のうち 1 種類が概ね以下の基準により投与された。直腸温が 38.5~39.0 °C の間で呼吸器症状のない供試馬に対してはペニシリン・ストレプトマイシンの合剤が, 直腸温が 39.1 °C 以上で元気消失や発咳をはじめとした呼吸器症状が認められた供試馬に対してはセファロチン・ナトリウムが投与された。なお, ペニシリン・ストレプトマイシンの合剤とセファロチン・ナトリウムは, ウマの下気道感染から一般的に分離される細菌の感受性に基づいて選択された(17, 31)。

7) 統計学的解析

データは平均値 ± 標準偏差(Standard Deviation: SD)で示した。各項目については市販の統計解析ソフト(StatView version 5.0, SAS Institute Inc, 米国)を用いてマン・ホイットニ検定によって ERFX 投与群と対照群の数値を比較した。本研究では, いずれも危険率 5 % 未満($p < 0.05$)を有意差ありとみなした。

3. 成績

輸送前, 輸送中および輸送後のいずれにおいても, 投薬に伴うと推測される副作用は認められなかった。輸送前においては, 全ての項目で2群間に有意な差は認められなかった (Table 1)。

輸送後の直腸温は ERFX 投与群において対照群と比較して有意に ($p < 0.05$) 低値を示した (ERFX 投与群 38.1 ± 0.3 °C, 対照群 38.5 ± 0.4 °C; Table 1)。ERFX 投与群においては 38.5 °C 以上の発熱を呈した3頭中2頭に対してペニシリン・ストレプトマイシンの合剤が投与された。一方, 対照群においては 38.5 °C 以上の発熱を呈した9頭中3頭に対してセファロチン・ナトリウムが投与され, 4頭に対してペニシリン・ストレプトマイシンの合剤が投与された。ペニシリン・ストレプトマイシンの合剤が投与された供試馬では, 1回の投与により体温が正常 ($38.0 \sim 38.4$ °C) に回復した。一方, 対照群における3頭のセファロチン・ナトリウムが投与された供試馬は, 直腸温が回復するまでに 4 ± 2 回のセファロチン・ナトリウムの投与が必要であった。

輸送後において, 末梢血中の WBC 数 ($p < 0.01$), N/L Ratio ($p < 0.01$) および SAA ($p < 0.01$), また TBA 中の WBC 数 ($p < 0.01$), 白血球百分率 ($p < 0.01$) は ERFX 投与群において対照群と比較して有意に低値を示した (Table 1)。一方, 血液サンプルの PCV および Hgb 濃度, また輸送後の体重については, 2群間で有意差は認められなかった。なお, いずれの項目においても雌雄差は認められなかった。

4. 考察

ウマにERFXを高濃度で投与すると、関節軟骨でプロテオグリカン合成を阻害する可能性が示唆されている(4, 35)。しかしながら、フルオロキノロンの毒性に関する報告は *in vitro* でこれらの薬剤を高濃度で投与した研究報告であり(5, 6, 9, 16)、著者らの知る限り *in vivo* で通常の投与量(1.25 mg/kg から 7.5 mg/kg)で副作用が認められたという報告は見当たらない。本研究においては、免疫賦活剤として IFN- α (0.5 U/kg, 舌下投与, 24 時間毎)が輸送日を含む輸送前3日間に渡り投薬された健常サラブレッドに対してERFX(5 mg/kg, 静脈内投与, 1 回)もしくは生理食塩水(50ml, 静脈内投与, 1 回)が投与された。ERFX が投与された供試馬において、輸送前、輸送中および輸送後に運動器系および消化器系の徴候を含めた副作用は一切認められなかった。

輸送後の直腸温, 末梢血中 WBC 数, N/L Ratio および SAA, また TBA 中 WBC 数および白血球百分率は ERFX 投与群において対照群と比較して有意に低値を示した。対照群では 16 頭中 9 頭が輸送後に発熱(直腸温が 38.5 °C 以上)したのに対し、ERFX 投与群では 16 頭中 3 頭が輸送後に発熱したのにとどまった。ペニシリン・ストレプトマイシンの合剤は国内においてウマへの使用が認可されており、本研究で使用された用量で日常的に投与されている。輸送後に発熱していた供試馬に対しペニシリン・ストレプトマイシンの合剤もしくはセファロチン・ナトリウムを投与した臨床獣医師の決定に基づいた判断では、臨床症状は ERFX 投与群において対照群より軽度であった。

過去の研究において、輸送は気道内において線毛運動をはじめとした正常粘膜防御機構に悪影響を与え、ウマの扁桃と気管の一般的な常在細菌である *S. zooepidemicus* の下気道への侵襲を招き、その結果、下気道の急性炎症を誘導すると考えられてきた(25, 26, 36)。本研究において、ERFX の輸送直前投与は *S. zooepidemicus* の菌数を顕著に減少させ、結果的に *S. zooepidemicus* の侵襲を軽減したことが示唆された。

競走用馬の輸送前における IFN- α の投与効果については 2 報がある(2, 19)。そのうちの

1 報では IFN- α は輸送熱の発生率は減少させられないが、対照群と比較して有意に炎症を減少させ、ウマの臨床症状を改善させることが報告されている(2)。本研究では供試馬全頭に対して過去の研究と同量の IFN- α を投与したが(2)、輸送後の直腸温、末梢血中 WBC 数、N/L Ratio、SAA、TBA 中 WBC 数および白血球百分率は ERFX 投与群において対照群と比較して有意に($p < 0.05$)低値を示した。これらの所見から、IFN- α を併用した ERFX の輸送直前投与は、IFN- α の単独投与よりも効率的に輸送熱を予防することが明らかとなった。

ERFX を含む抗菌薬の使用には耐性菌出現の可能性が否定できず、ERFX のような抗菌薬が不適切に使用されないことが重要である(6, 16)。日本中央競馬会の競走馬診療所では ERFX の使用に関するガイドラインを作成している。すなわち、ERFX は 20 時間を越える輸送時のみ使用すること、過去に輸送熱を発症したことがあるウマにのみ使用すること、過去に喉頭形成術を受けたもしくは肺炎に罹患したことがあり輸送熱を発症するリスクが高いウマにのみ使用することである。加えて、耐性菌の出現をモニタリングするため、輸送後の TBA および糞便の細菌叢の抗菌薬感受性試験を定期的に行っている。

5. 小括

本章では、IFN- α を併用した ERFX の輸送直前投与の輸送熱予防効果を検証した。その結果、ERFX 投与群の輸送後の直腸温、末梢血中 WBC 数、N/L Ratio、SAA、TBA 中 WBC 数および白血球百分率は対照群と比較して有意に低く、IFN- α を併用した ERFX の輸送直前投与は、IFN- α の単独投与よりも効率的に輸送熱を予防することが明らかとなった。本研究により IFN- α を併用した ERFX の輸送直前投与は輸送熱予防に対し有効であることが証明された。

Table 1. Mean \pm SD values for variables evaluated in 32 healthy Thoroughbreds that received enrofloxacin (5 mg/kg, IV, once; enrofloxacin group) or saline (0.9 % NaCl) solution (50 mL, IV, once; control group) \leq 1 hour before long-distance transportation (duration, approx 26 hours).

Variable	Group			
	Enrofloxacin (n = 16)		Control (n = 16)	
	Before transportation	After transportation	Before transportation	After transportation
Body weight (kg)	492.4 \pm 27.2	477.3 \pm 25.7	488.4 \pm 24.9	470.9 \pm 24.0
Rectal temperature ($^{\circ}$ C)	38.1 \pm 0.3	38.0 \pm 0.2 ^a	37.9 \pm 0.2	38.5 \pm 0.4 ^b
Peripheral blood				
WBC count (No./mm ³)	8,150 \pm 965	8,225 \pm 904 ^c	8,294 \pm 1,722	10,825 \pm 2,256 ^d
N/L Ratio	1.5 \pm 0.5	1.6 \pm 0.4 ^c	1.5 \pm 0.7	4.3 \pm 2.8 ^d
SAA concentration (μ g/mL)	0.2 \pm 0.2	0.6 \pm 1.6 ^c	0.1 \pm 0.1	63.4 \pm 82.6 ^d
PCV (%)	39.5 \pm 3.5	42.3 \pm 2.8	39.5 \pm 2.5	41.3 \pm 3.7
Hgb concentration (g/dL)	13.6 \pm 1.2	14.6 \pm 1.0	13.5 \pm 0.9	14.1 \pm 1.4
TBA				
WBC count (X 10 ⁵ /mL)	1.3 \pm 0.5	1.3 \pm 0.5 ^c	1.3 \pm 0.5	14.5 \pm 11.1 ^d
Neutrophils (%)	2.7 \pm 1.2	2.8 \pm 1.0 ^c	2.5 \pm 0.8	67.0 \pm 47.3 ^d

All horses were premedicated with interferon- α for 3 days (2 days before transportation and on the day of transportation).

^{a,b}Within a row, values with different superscript letters are significantly ($p < 0.05$) different.

^{c,d}Within a row, values with different superscript letters are significantly ($p < 0.01$) different.

第2章

長距離輸送される健常サラブレッド競走用馬の直腸温および血液性状に対する
エンロフロキサシンの輸送前投与の効果

1. 緒言

輸送関連性呼吸器疾患, いわゆる輸送熱は, 主に輸送に伴うストレスと馬運車内の環境悪化が原因で発生し, 一般的には輸送時間が 20 時間を超える場合に発症率が高くなることが知られている(18, 25, 26)。輸送熱は, 扁桃と気管の常在菌である *S. zooepidemicus* をはじめとした病原体がウマの気管支肺胞領域に日和見感染することが輸送熱の主因と考えられている(20, 25, 26, 36)。

そこで著者らは, *S. zooepidemicus* に対して 24 時間以上の抗菌活性を有するフルオロキノロン系抗菌薬に着目した(33)。当該報告では, 2 歳のサラブレッドに対する ERFX(5 mg/kg 体重, 静脈内投与)の予防的投与により輸送熱が有意に減少することを報告した。しかしながら, この調査は若齢のウマを対象にしたものであり, また抗菌薬だけでなく IFN- α を併用したものであった。著者らの知る限り, 成馬において IFN- α を併用せず ERFX のみを輸送熱の予防のため投与したという報告は見当たらない。競馬出走直前の競走用馬は非常に強いトレーニングが負荷されており, 成熟した競走用馬の強運動に伴うストレスは, まだレースを経験していない若駒と比較してはるかに高いことが知られている。特に, ストレスが主因と考えられている胃潰瘍の罹患率がそれを証明している(14)。また, コルチゾルは運動に伴うストレスを評価する指標の一つとして注目されており, ストレスの強度とその上昇度合とは正の相関関係にあるとされている(23)。

本研究の目的は、長距離輸送後の成熟したサラブレッド競走用馬における直腸温および血液性状に対する ERFX 単独投与の効果を検証することである。

2. 材料と方法

1) 供試動物および輸送

本試験には、臨床的に健常な 68 頭のサラブレッド競走用馬を供試した。供試馬は ERFX 投与群(雄 26 頭, 去勢 1 頭および雌 25 頭; 3.5 ± 1.3 (平均値 \pm SD) 歳; 体重 470 ± 30 kg) および対照群(雄 8 頭, 去勢 1 頭および雌 7 頭, 3.4 ± 0.5 歳, 体重 462 ± 25 kg) の 2 群に分けられた。2 群の供試馬には, ERFX (5 mg/kg, バイトリル 5 %, バイエル, 日本) もしくは生理食塩水 (50 ml, 大塚生食注, 大塚, 日本) がそれぞれ静脈内投与された。投与量は過去の研究をもとに決定した (33)。なお, 本研究は日本中央競馬会栗東トレーニング・センター動物実験委員会の承認を得て実施された。

輸送の出発地点は日本中央競馬会栗東トレーニング・センター (滋賀県栗東市), 到着地点は日本中央競馬会函館競馬場 (北海道函館市) とした。輸送時間は 21 時間であり, 輸送距離は陸路 1,022 km (うち高速道路が 1,002 km, 国道が 20 km), 海路 110 km の計 1,132 km であった。海路の輸送 (青森県青森港 ~ 北海道函館港) には大型のフェリーを用い, 所要時間は 3 時間 30 分であった。

輸送には, 1 台に 4 頭のウマを積載することができる馬専用輸送車 (馬運車) 31 台を用いた。31 台の馬運車の構造は全て同一であった。供試馬は 2010 年の 6 月 1 日から同年の 8 月 13 日までに輸送された。

2) 検査項目

輸送前, 輸送中および輸送後において, 供試馬は身体検査を実施され, 運動器系および消化器系の異常所見の有無が確認された。また, 水銀体温計で輸送直前および輸送直後の直腸温が測定された。

血液サンプルは, 輸送前後に供試馬の頸静脈から EDTA 入り採血管 (VC-C50, テルモ, 日本), プレーン採血管 (VP-P100K, テルモ, 日本) およびクエン酸ナトリウム入り採血管

(VP-C050, テルモ, 日本)を用いて採血された。EDTA 血を用いて自動血球計算機 (K-4500, シスメックス, 日本)により WBC 数, 赤血球 (Red Blood Cell:RBC) 数および Hgb 濃度が測定された。また, EDTA 血はヘマトクリット管を用いた PCV の測定にも利用された。クエン酸ナトリウム入り採血管で採材された血液サンプルからは, 遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間, 4 °C)により血漿を得, コルチゾル酵素免疫学的測定法キット (Correlate-EIA, Enzo Life Sciences, 米国)によって血漿コルチゾル濃度が測定された。血清は, プレーン採血管を用いて採血された血液サンプルを遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間, 25 °C)して得た。SAA 濃度は, ウマの標準血清 (SAA 濃度 0.0~400.0 µg/ml)を用いてラテックス凝集反応 (LZ テスト '栄研' SAA, 栄研, 日本)で測定された。これらの標準血清は, 過去の報告に基づき作製されたものである (17)。

3) 統計学的解析

一部のデータが正規分布に従わなかったため, 統計解析にはノンパラメトリック検定を用いた。データは中央値および範囲として表した。マン・ホイットニ検定によって各数値を比較した。危険率 5 %未満 ($p < 0.05$)を有意差ありとみなした。

3. 成績

輸送前, 輸送中および輸送後のいずれにおいても, 投薬に伴うと推測される副作用は認められなかった。

ERFX 投与群と対照群を比較して, 輸送前の項目には有意差は認められなかった (Table 2)。輸送後において, 直腸温, WBC 数, SAA 濃度およびコルチゾルは対照群と比較して ERFX 投与群で有意に低かった (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$)。RBC 数, Hgb および PCV に 2 群間で有意差は認められなかった。なお, いずれの項目においても雌雄差は認められなかった。

4. 考察

幼弱なウマに対する ERFX の高用量投与は、関節軟骨でプロテオグリカン合成を阻害する可能性が示唆されている(4, 35)。しかしながら、成馬においてはその心配はないと考えられる。

過去の研究において、輸送は気道内において線毛運動をはじめとした粘膜防御機構に悪影響を与え、ウマの扁桃や気管の常在細菌である *S. zooepidemicus* の下気道への侵入感染を許し、その結果として下気道の急性炎症が引き起こされると考えられてきた(25, 26, 36)。本研究において、ERFX の輸送直前投与は *S. zooepidemicus* の菌数を顕著に減少させ、その結果、*S. zooepidemicus* の侵入感染を軽減したことが考えられた。

コルチゾル値が対照群に比較し ERFX 投与群において有意に低かったことは、ERFX 投与群では *S. zooepidemicus* の下気道への侵入が抑制された結果、供試馬のストレスが比較的軽度であったためと考えられた。Nambo *et al.* は過去の研究において、レースに未出走のサラブレッド2歳雌馬の輸送後の血漿コルチゾル最高値は 59.2 ng/ml であったと示している(24)。著者らの本研究では、輸送後の血漿コルチゾルの値は Nambo *et al.* の報告よりも高値(対照群において中央値 78.2 ng/ml および ERFX 投与群において中央値 64.1 ng/ml)であったが、この傾向は輸送前においても同様であった。このことは、成熟した競走用馬にかかっているストレスが未出走の若いウマよりも高いことを示唆しており、成熟した競走用馬を輸送する際には若いウマと比較してより慎重に注意することが必要であると考えられた。

ウマは一旦輸送熱に罹患すると、数日間に渡る治療が必要となる(20)。競馬に出走させるために輸送しても、輸送熱を発症したウマは走ることができず、その経済的損失は重大である。ERFX を輸送直後に投与した過去の研究では、治療期間は数日間に渡るという結果であった(9)。それゆえ、ERFX の輸送直前投与は予防手段として有用であると考えられた。しかしながら、ERFX を含む抗菌薬の使用には耐性菌出現の可能性が否定できないため、ERFX を濫用しないことが重要である。それゆえ、日本中央競馬会の競走馬診療所

では ERFX の使用に関するガイドラインを作成している。

結論として、ERFX の輸送直前投与は 2 歳の若駒同様成熟したサラブレッドに対しても輸送熱予防において臨床的に有効であることが証明された。

しかしながら、ERFX 製剤は強アルカリ性であり高い組織侵襲性を持つため、注射液の血管外への漏れにより組織の壊死を起こす危険性がある。また、ERFX 製剤の投与量が比較的多いため、この危険性はより高まる。そのため、今後は組織侵襲性を持たない、ERFX とは別のフルオロキノロン系抗菌薬の輸送熱予防効果を検討することが必要であると考えられた。

5. 小括

本章では、IFN- α を併用しない ERFX 単独での輸送直前投与の輸送熱予防効果を、レース未経験の 2 歳馬ではなく成熟した競走用馬で検証した。その結果、輸送後の直腸温、末梢血中の WBC 数および SAA は対照群と比較して有意に低く、ERFX 製剤の輸送直前投与は、IFN- α を併用しなくても効果的に輸送熱を予防することが明らかとなった。また、血漿中のコルチゾルも対照群と比較して有意に低く、これは ERFX が *S. zooepidemicus* の下気道への侵入を軽減した結果、輸送中のウマが受けるストレスが低減されたためと考えられた。本研究により IFN- α を併用しない ERFX 単独での輸送直前投与は輸送熱予防に対し有効であることが証明された。また、ERFX は レース未経験の 2 歳馬ではなく成熟した競走用馬においても有効であることが示唆された。しかしながら、ERFX 製剤は強アルカリ性であり高い組織侵襲性を持つため、注射液の血管外への漏れにより組織の壊死を起こす危険性がある。また、ERFX 製剤の投与量が比較的多いため、この危険性はより高まる。そのため、今後は組織侵襲性を持たない、ERFX とは別のフルオロキノロン系抗菌薬の輸送熱予防効果を検討することが必要であると考えられた。

Table 2. Rectal temperatures and blood parameters before and after transportation in horses dosed prophylactically with ERFX

Group	Sampling	Rectal temperature (°C)	Peripheral blood					
			WBC (/mm ³)	RBC (10 ⁴ /mm ³)	Hgb (g/dL)	PCV (%)	SAA (µg/mL)	Cortisol (ng/mL)
Control	Before transportation	38.0 (37.7-38.1)	8,800 (6,700-14,600)	1,028 (919-1,322)	16.5 (15.0-21.3)	46.0 (41.0-57.0)	0.2 (0.1-1.5)	32.7 (16.1-61.7)
	After transportation	38.5 ^A (37.8-40.1)	10,700 ^B (8,200-16,900)	1,060 (900-1,253)	16.5 (13.0-19.5)	47.0 (37.5-55.5)	0.2 ^c (0.0-140.0)	78.2 ^d (29.0-181.9)
ERFX	Before transportation	38.0 (37.3-38.3)	8,700 (6,200-11,100)	985 (838-1,278)	16.1 (13.3-20.4)	44.0 (36.0-55.0)	0.2 (0.0-0.8)	37.1 (10.0-130.7)
	After transportation	38.1 ^A (37.3-38.8)	8,800 ^B (6,300-10,800)	1,086 (922-1,284)	16.7 (13.6-20.2)	48.0 (40.0-58.3)	0.1 ^c (0.0-4.2)	64.1 ^d (19.3-127.4)

Data are expressed as the median (range).

^{A,B} Values with the same superscript letters are significantly ($p<0.01$) different according to the Mann-Whitney U-test.

^{c,d} Values with the same superscript letters are significantly ($p<0.05$) different according to the Mann-Whitney U-test.

第3章

長距離輸送される健常サラブレッドの直腸温および血液性状に対する

マルボフロキサシンの輸送前投与の効果

1. 緒言

輸送関連性呼吸器疾患(輸送熱)は、調教や競走のスケジュールを狂わせ得る重要な問題であり、輸送熱を予防することができれば、調教や競走のスケジュールが立て易くなり、輸送に伴うコンディションの悪化を最小限に抑えることが可能となる。

輸送熱は、一般的には輸送時間が 20 時間を超える場合に発症率が高くなることが知られている(18, 25, 26)。扁桃や気管の常在菌である *S. zooepidemicus* をはじめとした病原体がウマの気管支肺胞領域に日和見感染することが輸送熱の主因と考えられている(20, 25, 26, 36)。

一方、ERFX や MRFX をはじめとしたフルオロキノロン系抗菌薬は *S. zooepidemicus* に有効であり、静脈内投与後 24 時間に渡って血中濃度が高く維持される(7, 8, 15)。

そこで著者らは、フルオロキノロン系抗菌薬に着目し、ERFX を輸送直前に予防的投与(5 mg/kg 体重、静脈内投与)することで輸送熱が有意に減少することを報告している(11, 33)。しかしながら、ERFX 製剤は強アルカリ性であり高い組織侵襲性を持つため、注射液の血管外への漏れにより組織の壊死を起こす危険性がある。また、ERFX 製剤の投与量が比較的多いため、この危険性はより高まる。一方、MRFX の組織侵襲性は、皮下や筋肉内投与したとしても低いことが知られている(7, 8)。しかしながら、著者らの知る限り MRFX を輸送熱の予防のため投与し、効果を判定した報告は見当たらない。

そこで著者らは、輸送熱予防における MRFX の有効性を ERFX 投与と比較し調査した。

2. 材料と方法

1) 供試動物

本研究には臨床的に健常なサラブレッド48頭(雄24頭, 雌24頭; 年齢:2歳)を供試した。供試馬は試験の前年にセリ市場で購入され, 日本中央競馬会日高育成牧場(北海道浦河郡浦河町)で約6ヶ月間に渡り競走用馬になるための調教を受けてきた。また供試馬は, 輸送前に馬臨床を専門とする獣医師により肺炎や胸膜炎をはじめとした呼吸器感染症に罹患していないことが臨床的に確認された。

供試馬全頭は, 輸送当日を含む連続した3日間, 24時間毎に0.5 U/kgのIFN- α (ビムロン, バイオベット, 日本)の舌下投与を受けた(2)。供試馬は無作為に16頭(雄8頭, 雌8頭)ずつのMRFX投与群, ERFX投与群および対照群の3群に分けられた。3群にはそれぞれMRFX(2 mg/kg, マルボシル10%, 明治, 日本), ERFX(5 mg/kg, バイトリル5%, バイエル, 日本), もしくは生理食塩水(10 ml, 大塚生食注, 大塚, 日本)が静脈内投与された。なお, これらの薬剤の投与量は, 既報に基づき決定した(7, 8, 11, 33)。静脈内投与は, 供試馬が馬運車に積載される1時間前に行われた。輸送時間は26時間であり, 臨床検査および血液学的検査が輸送前後に実施された。

なお, 本研究は日本中央競馬会日高育成牧場動物実験委員会の承認を得て実施された。

2) 輸送

輸送の出発地点は日本中央競馬会日高育成牧場, 到着地点は日本中央競馬会中山競馬場(千葉県船橋市)とした。輸送時間は26時間であり, 輸送距離は陸路で1,100 km(うち高速道路が1,000 km, 国道が100 km), 海路で110 kmの計1,210 kmであった。海路の輸送(北海道函館港~青森県青森港)には大型のフェリーを用い, 所要時間は3時間30分であった。出発時の気温は2.8°Cであり, 到着時の気温は13.4°Cであった。

輸送には、1 台に 6 頭のウマを積むことができる馬専用輸送車(馬運車)10 台を用いた。馬運車 10 台の構造は全て同一であった。供試馬には輸送中 2 回(輸送開始 7 時間後および 23 時間後に馬運車を停車した状態で)、個別に 1 頭当たり 1 kg の燕麦やペレットがあらかじめ混合されたアソートタイプの飼料が与えられた。また、輸送中は常時飲水可能とした。輸送中 4 時間ごとに 15 分~30 分の停車休憩を取り、全ての休憩で車内の換気が行われた。輸送後は、全ての供試馬が 7 日間の調教を受けた。

3)臨床検査および血液学的検査

輸送前、輸送中および輸送後において、供試馬は視診および触診により運動器系および消化器系の異常所見の有無が確認された。また、水銀体温計で輸送直前、輸送直後および到着翌日に直腸温が測定された。輸送後に 38.5 °C 以上の発熱を呈した供試馬は、豊富な臨床経験を持つ獣医師の判断により抗菌薬を用いた治療が行われた。治療内容は、直腸温および臨床症状に基づき決定された。すなわち、発熱はあるものの呼吸器症状のない軽症例にはペニシリン・ストレプトマイシンの合剤(ペニシリン 8,000 U/kg およびストレプトマイシン 10 mg/kg, 筋肉内投与, 24 時間毎:マイシリン, 明治, 日本)が投与され、元気消失や発咳をはじめとした呼吸器症状が認められた重症例にはセファロチン・ナトリウム(20 mg/kg, 静脈内投与, 8 時間毎:コアキシ, ケミックス, 日本)が投与された。ペニシリン・ストレプトマイシンの合剤とセファロチン・ナトリウムは、ウマにおいて下気道感染から一般的に分離される細菌の感受性に従って選択された(20, 32)。

血液サンプルは供試馬の頸静脈からプレーン採血管(VP-P100K, テルモ, 日本)および EDTA 入り採血管(VC-C50, テルモ, 日本)を用いて採血された。EDTA 血を用いて自動血球計算機(K-4500, シスメックス, 日本)により WBC 数および Hgb 濃度が測定された。また EDTA 血は、ヘマトクリット管を用いた PCV の測定および簡易迅速染色(Diff-Quick 16920, シスメックス, 日本)された血液塗沫標本を用いた N/L Ratio の測定にも利用された。MRFX

投与群および対照群では、血液塗沫標本において 200 個の細胞が計数され、N/L Ratio が算出された。

血清はプレーン採血管を用いて採血された血液サンプルを凝固した後、遠心分離(3,000 rpm, 10 分間, 25 °C)して得られた。SAA 濃度は、ウマの標準血清(SAA 濃度 0.0~400.0 µg/ml)を用いてラテックス凝集反応(LZ テスト‘栄研’ SAA, 栄研, 日本)で測定された。これらの標準血清は、過去の報告に基づき作成されたものである(17)。

4) 統計学的解析

データは平均値 ± SD で示した。N/L Ratio についてはマン・ホイットニ検定を用いて MRFX 投与群と対照群の数値を比較した。その他の項目については母分散をバートレット検定で評価した。母分散が等しい場合は一元配置分散分析法が用いられ、母分散が等しくない場合はクラスカル・ワーリス検定が用いられた。全ての分析は上側検定で行われた。本研究では、いずれも危険率 5 %未満($p < 0.05$)を有意差ありとみなした。

3. 成績

輸送前、輸送中および輸送後のいずれにおいても、投薬に伴うと考えられる副作用は認められなかった。

輸送前においては、全ての項目で3群間に有意な差は認められなかった(Table 3-1)。

輸送後においては、直腸温に関しては3群間で有意な差は認められなかった(MRFX 投与群 38.3 ± 0.2 °C, ERFX 投与群 38.3 ± 0.3 °C, 対照群 38.5 ± 0.5 °C, Table 3-1)。

MRFX 投与群および ERFX 投与群ではそれぞれ2頭、対照群では3頭の発熱馬に対してペニシリン・ストレプトマイシンの合剤が投与された。対照群において3頭の発熱馬に対してセファロチン・ナトリウムが投与された(Table 3-2)。ペニシリン・ストレプトマイシンの合剤が投与された供試馬では、1回の投与により体温が正常に回復した。一方、対照群における3頭のセファロチン・ナトリウムが投与された供試馬は、直腸温が回復するまでに 6 ± 1 回のセファロチン・ナトリウムの投与が必要であった。

輸送後、N/L Ratio は MRFX 投与群において対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) に低値を示した。WBC 数は MRFX 投与群および ERFX 投与群において対照群と比較して低かったが、統計学的な有意差は認められなかった(Table 3-1)。

輸送直後および到着翌日ともに、SAA は MRFX 投与群および ERFX 投与群において対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) に低値を示した(Table 3-1)。なお、いずれの項目においても雌雄差は認められなかった。

4. 考察

ウマにERFXを高濃度で投与すると、関節軟骨でプロテオグリカン合成を阻害する可能性が示唆されている(4, 35)。MRFX は ERFX と同じフルオロキノロン系の抗菌薬であり、幼若な動物において関節軟骨に同様の副作用がある可能性がある。しかしながら、フルオロキノロンの毒性に関する報告は *in vitro* でこれらの薬剤を高濃度で投与した研究であり(5, 6, 16)、著者らの知る限り *in vivo* で通常の投与量で副作用が認められたという報告は見当たらない。本研究においては、MRFX を投与されたウマにおいて輸送前、輸送中および輸送後に運動器系および消化器系の徴候を含めた副作用は一切認められなかった。それゆえ、MRFX は若い競走用馬において輸送直前に静脈内投与(2 mg/kg)しても安全であると考えられた。

輸送後、末梢血中の N/L Ratio および SAA 濃度は MRFX 投与群において対照群と比較して有意に低かった。また、SAA は ERFX 投与群においても対照群と比較して有意に低かった。本研究では、過去の調査で対照群との有意差がすでに明らかとなっているため(33)、ERFX 投与群においては N/L Ratio は計算しなかった。MRFX 投与群および ERFX 投与群において、発熱頭数は対照群より少なく臨床症状は軽微であった。さらに、MRFX 投与群および ERFX 投与群における発熱馬は、ペニシリン・ストレプトマイシンの合剤の単回投与により直腸温が正常に回復した。

過去の研究において、輸送は気道内において例えば線毛運動のような正常粘膜防御機構に悪影響を与え、ウマの扁桃や気管の一般的な常在細菌である *S. zooepidemicus* の下気道への侵入を招き、その結果下気道の急性炎症を誘導すると考えられてきた(25, 26, 36)。本研究において、MRFX の輸送直前投与は *S. zooepidemicus* の菌数を顕著に減少させ、その結果として *S. zooepidemicus* の侵入を軽減したものと推察された。

ウマは一旦輸送熱に罹患すると、数日間に渡る治療や休養が必要となる(20)。競馬に出走させるために輸送しても、輸送熱を発症したウマは出走することができず、その経済的損

失は重大である。ERFX を輸送直後に投与した過去の研究では、治療期間は数日間に渡るといった結果であった(9)。それゆえ、MRFX の輸送直前投与は予防手段として有用である。

競走用馬の輸送前における IFN- α の投与効果に関する報告がある(2)。その研究では IFN- α は輸送熱の発生率は減少させられないが、対照群と比較して有意に炎症を減少させ、ウマの臨床症状を改善させることが報告されている(2)。本研究では、試験に用いた全てのウマに過去の研究と同量の IFN- α を投与したが(2)、輸送後における発熱馬の頭数および血液検査の結果に有意差が認められた。これらの所見から、IFN- α を併用した MRFX もしくは ERFX の輸送直前投与は、IFN- α の単独投与よりも効果的に輸送熱を予防することが明らかとなった。

著者らの研究において、MRFX の輸送直前投与(2 mg/kg 体重、静脈内投与)は輸送熱予防に対して生理食塩水よりも効果的であり、その効果は ERFX(5 mg/kg 体重、静脈内投与)と同様であった(11, 33)。さらに、MRFX は ERFX に認められるような組織侵襲性が殆ど無いため、馬臨床においては ERFX よりも有用であると考えられた。しかしながら、MRFX を含む抗菌薬の使用には耐性菌出現の可能性が否定できない。*S. zooepidemicus* に感受性があり 24 時間以上の抗菌活性を有するためフルオロキノロン系抗菌薬を選択したが、その使用は制限されるべきである。腸内細菌への副作用を最小限にするため、投与経路は静脈内にされるべきである。さらに、日本中央競馬会の競走馬診療所では MRFX の使用に関するガイドラインを作成している。すなわち、MRFX は 20 時間を越える輸送時のみ使用すること、過去に輸送熱を発症したことがあるウマにのみ使用すること、過去に喉頭形成術を受けたもしくは肺炎に罹患したことがあり輸送熱を発症するリスクが高いウマにのみ使用することである。加えて、耐性菌の出現をモニタリングするため、輸送後の TBA および糞便の細菌叢の抗菌薬感受性試験を定期的に行っている。また、抗菌薬は、馬運車の換気を含む輸送熱予防のための他のあらゆる処置を講じた上に、最終手段として使

われるべきである。

結論として、サラブレッドにおける IFN- α を併用した MRFX の輸送直前投与は、その輸送熱の予防効果についてさらなる研究を行う価値があると考えられた。

5. 小括

本章では、IFN- α を併用したMRFXの輸送直前投与(MRFX投与群)の輸送熱予防効果をERFX投与(ERFX投与群)と比較検討した。その結果、MRFX投与群の輸送後の血液性状においてN/L RatioおよびSAAが対照群と比較して有意に低く、ERFXと同様の効果があることが示された。これはMRFXが輸送熱の主因菌である*S. zooepidemicus*の菌数を顕著に減少させ、その結果、*S. zooepidemicus*の下気道への侵入を軽減したためであると考えられた。本研究により輸送後の炎症反応抑制におけるMRFXの有効性が示された。今後はIFN- α を併用しないMRFX単独での輸送熱予防効果を検討することが必要であると考えられた。

Table 3-1. Rectal temperatures and blood parameters before and after transportation in horses dosed prophylactically with IFN- α and quinolone antibiotic.

Group	Sampling (elapsed time)	Rectal temperature (°C)	Peripheral blood				
			WBC (/mm ³)	N/L ratio	SAA (μ g/ml)	PCV (%)	Hgb (g/dl)
Control	Before transportation (0 hr)	38.0 \pm 0.4	9,681 \pm 1,466	1.4 \pm 0.5	0.8 \pm 0.1	38.0 \pm 4.1	14.5 \pm 1.4
	After transportation (24 hr)	38.5 \pm 0.5	10,613 \pm 2,646	2.5 \pm 1.1	153.8 \pm 319.1	47.3 \pm 4.5	15.3 \pm 1.3
	Next day after transportation (48 hr)	38.3 \pm 0.3	11,475 \pm 2,197	2.0 \pm 1.9	160.0 \pm 348.5	45.2 \pm 5.6	14.8 \pm 1.5
MRFX	Before transportation (0 hr)	38.0 \pm 0.2	9,181 \pm 2,088	1.4 \pm 0.5	0.8 \pm 0.2	38.8 \pm 3.1	14.8 \pm 1.2
	After transportation (24 hr)	38.3 \pm 0.2	9,325 \pm 1,725	1.7 \pm 0.6 *	7.1 \pm 19.8 *	49.6 \pm 5.3	16.0 \pm 1.4
	Next day after transportation (48 hr)	38.3 \pm 0.3	10,719 \pm 1,412	1.3 \pm 1.0	9.1 \pm 29.0 *	48.3 \pm 4.6	15.9 \pm 1.3
ERFX	Before transportation (0 hr)	37.9 \pm 0.2	9,006 \pm 1,225	No Data	0.8 \pm 0.1	39.8 \pm 3.5	15.0 \pm 1.3
	After transportation (24 hr)	38.3 \pm 0.3	8,894 \pm 1,748	No Data	7.0 \pm 23.9 *	50.4 \pm 2.1	16.2 \pm 0.7
	Next day after transportation (48 hr)	38.3 \pm 0.3	10,081 \pm 1,460	No Data	12.5 \pm 43.7 *	46.7 \pm 5.9	15.3 \pm 1.8

Data are expressed as the mean \pm SD.

*Significant difference as compared with the control group ($p < 0.05$).

Table 3-2. Numbers of febrile horses distributed according to rectal temperature during and after transportation.

Group	Rectal temperature (°C)		
	< 38.5	≥ 38.5	≥ 39.1
Control	10	4 (3A, 1B)	2 (2B)
MRFX	12	4 (2A)	0
ERFX	13	2 (1A)	1 (1A)

^A Number of horses administered penicillin-streptomycin combination.

^B Number of horses administered cephalothin sodium.

第4章

若齡サラブレッドにおけるマルボフロキサシンの
予防的投与導入前後での輸送熱発生率の比較

1. 緒言

サラブレッド競走用馬は、一般的には輸送時間が 20 時間を超える馬運車輸送を実施すると、発熱のリスクが顕著に上昇することが知られている(18, 25, 26)。これを輸送関連性呼吸器疾患(輸送熱)と呼び、扁桃や気管の常在細菌である*S. zooepidemicus* が気管支-肺胞領域に侵入し、感染することが主な原因であると報告されている(20, 25, 26, 36)。一旦輸送熱を発症すると、セファロチン・ナトリウムをはじめとした抗菌薬の数日間に渡る投与が必要となる(33)。場合によっては気管支肺胞洗浄や胸腔洗浄といった大掛かりな治療法が必要となる(20)。さらに、重症例では肺胸膜炎へと進行し、治療が遅れると死に至ることもある(26)。

ERFX は *S. zooepidemicus* に対して抗菌活性を持つことが報告されており(9)、同じ系統である MRFX もまた *S. zooepidemicus* に対して 24 時間以上抗菌活性を持つことが報告されている(7, 8)。それゆえ、著者らはフルオロキノロン系抗菌薬により輸送熱を予防することが可能であるという仮説を立て、輸送されるウマを投与群と対照群に分けて血液性状を比較した。投与群のウマには ERFX(5 mg/kg 体重, 静脈内投与)もしくは MRFX(2 mg/kg 体重, 静脈内投与)を輸送直前に投与した(12)。投与群の炎症マーカー(SAA)は対照群のそれより有意に低く、細菌感染が阻害されたことを示唆した(12)。しかしながら、2 群間の直腸温は有意な差を認めなかった(12)。

本研究の目的は、MRFX の輸送直前投与の導入前後での輸送熱発生状況を比較し、臨床的な効果を科学的に検証することである。

2. 材料と方法

1) 供試動物および輸送

北海道日高地方にある日本中央競馬会日高育成牧場から兵庫県にある日本中央競馬会阪神競馬場(距離 1,540 km, 輸送時間 36 時間)および千葉県にある日本中央競馬会中山競馬場(距離 1,210 km, 輸送時間 26 時間)に輸送した健常サラブレッド 211 頭(2 歳)を調査の対象とした(Table 4-1)。2008 年, 2012 年および 2013 年は同じ道程により, 到着時刻および休憩時間を統一した。2007 年に輸送した 50 頭および 2008 年に輸送した 49 頭には抗菌薬の輸送直前投与を行わなかった。2012 年に輸送した 56 頭および 2013 年に輸送した 56 頭には輸送直前にマルボフロキサシンを投与した(マルボシル 10%, 明治, 日本)。投与量は過去の研究をもとに決定(2 mg/kg 体重, 静脈内投与)した(7, 8, 12)。

2) 検査項目および治療

試験では, 輸送前後の直腸温および輸送後の発熱頭数を比較した。

治療内容については, 5 年以上の競走馬の臨床経験を有する獣医師が体温のみならず元気・食欲などの一般状態を総合的に加味した上で決定した。直腸温が 39.0 °C 以上あり, 元気・食欲も低下しているような重症例には *S. zooepidemicus* に感受性が高いセファロチン・ナトリウム(コアキシン, ケミックス, 日本)の複数回投与を行った。セファロチンの投与量は過去の研究に基づき 20 mg/kg 体重, 静脈内投与, 6 時間毎とした(33)。直腸温は 38.5 °C 以上あるものの, 元気・食欲は正常な軽症例にはペニシリン・ストレプトマイシンの合剤(マイシリン, 明治, 日本)を単回投与した。マイシリンの投与量はペニシリン 8,000 U/kg およびストレプトマイシン 10 mg/kg, 筋肉内投与, 24 時間毎とした(33)。

3) 統計学的解析

直腸温のデータは平均値 \pm SD で表し, バートレット検定を行った。分散が等しくなかつ

たためノンパラメトリック検定であるクラスカル・ワーリス検定で評価し、さらにノンパラメトリック多重比較検定である Steel-Dwass 法で評価した。発熱頭数は χ^2 独立性の検定で評価した。全ての検定は上側で行い、危険率 5%未満 ($p < 0.05$) を有意差ありとした。

3. 成績

調査の結果、輸送前の直腸温には4群間で差は認められなかった (Table 4-2)。しかしながら、輸送後の直腸温は、MRFX の輸送直前投与導入後の群で導入前と比較して有意に低かった (2007 年と 2013 年の比較, 2008 年と 2012 年の比較, 2008 年と 2013 年の比較, それぞれ $p < 0.01$)。治療内容の比較では、まず、発熱した供試馬が MRFX 導入前は 19 頭であったのに対し、導入後はわずか 7 頭であった (Table 4-3)。また、重症例と判断されセファロチン・ナトリウムを投与された供試馬は、MRFX 導入前には 5 頭もいたのに対し、導入後はわずかに 1 頭であった (Table 4-3)。さらに、軽症例でペニシリン・ストレプトマイシンの合剤を投与された供試馬も、導入前の 14 頭に対し導入後は 6 頭であった (Table 4-3)。MRFX の予防的投与後、痙痛やショック様症状などを呈すウマは 1 頭も存在しなかった。

4. 考察

著者らは以前、輸送熱の主な原因菌である *S. zooepidemicus* に感受性を持つフルオロキノロン系抗菌薬である ERFX を輸送直前に投与する方法で輸送熱を高率に予防できることを明らかにした(11, 33)。しかし、ERFX 製剤は強アルカリ性で組織侵襲性が高く、注射液を血管外に漏らしてしまうと組織の壊死を引き起こす可能性がある。さらに、ERFX 製剤は投与量が比較的多いため注射液を血管外へ漏らすリスクは高い。一方、MRFX は低局所侵襲性で皮下や筋肉内にも投与できる(7, 8)。本研究において、MRFX を投与されたウマに副作用は全く認められなかったことから、MRFX の高い安全性が確認された。

本研究では、輸送前後の直腸温および輸送後の治療内容を比較した。MRFX 導入後における輸送後の直腸温が導入前の直腸温と比較して有意に低かったことから、MRFX の輸送熱予防効果が明らかとなった。また、輸送後の治療内容から、MRFX を輸送前に投与すると治療が必要となるウマが減少し、発熱しても軽症で済むことが明らかとなった。MRFX の輸送直前投与の導入前のウマの中には、36 時間輸送された 50 頭および 26 時間輸送された 49 頭のウマがいたが、それらの輸送後の直腸温に有意差が認められなかったため、今回はそれらを同一に扱った。

結論として、MRFX の輸送直前投与は輸送熱予防に対して臨床的に有効であることが証明された。

5. 小括

本章では、IFN- α を併用しない MRFX 単独での輸送直前投与の輸送熱予防効果を、MRFX による輸送熱予防法を導入する前と比較検討した。その結果、MRFX 導入後の輸送後の直腸温が導入前と比較して有意に低く、MRFX の輸送熱予防効果が明らかとなった。また、輸送後の治療内容から、MRFX を輸送前に投与すると治療が必要となるウマが減少し、発熱しても軽症で済むことが明らかとなった。本研究により MRFX の輸送直前投与は単独でも輸送熱予防に対して臨床的に有効であることが証明された。今後は抗菌薬以外の免疫賦活化剤などの輸送熱予防効果を検討することが必要であると考えられた。

Table 4-1. Horse groups investigated

MRFX administration	Transported Year	Departure	Arrival	Distance (km)	Transportation Time (hours)	Horses number		
						Male	Female	Total
—	2007	Hokkaido	Hyogo	1,540	36	24	26	50
—	2008	Hokkaido	Chiba	1,210	26	25	24	49
+	2012	Hokkaido	Chiba	1,210	26	27	29	56
+	2013	Hokkaido	Chiba	1,210	26	30	26	56

MRFX = marbofloxacin

- : not administrated, + : administrated

Table 4-2. Changes of rectal temperature before and after transportation

MRFX administration	Transported Year	Horses number	Rectal Temperature (°C)	
			Before transportation	After transportation
—	2007	50	38.0 ± 0.22	38.5 ± 0.40 ^a
—	2008	49	37.9 ± 0.16	38.6 ± 0.42 ^b
+	2012	56	37.9 ± 0.18	38.3 ± 0.26 ^b
+	2013	56	37.9 ± 0.25	38.3 ± 0.21 ^{ab}

MRFX = marbofloxacin

— : not administrated, + : administrated

^{a,b}Within a row, values with same superscript letters are significantly ($p < 0.01$) different.

Data are expressed mean ± SD.

Table 4-3. Treatment after transportation

MRFX administration	Transported Year	Horses number	Horses number	
			Not febrile	Febrile
—	2007 - 2008	99	80	19 (14 ^A , 5 ^B)
+	2012 - 2013	112	105	7 (6 ^A , 1 ^B)

MRFX = marbofloxacin

^ANumber of horses administered penicillin-streptomycin combination.

^BNumber of horses administered cephalothin sodium.

Number of horses needed treatment was significantly lower ($p < 0.01$) in MRFX administered group.

第5章

健常サラブレッドにおける長距離輸送後の 血液性状に対する低用量 G-CSF 製剤の効果

1. 緒言

輸送関連性呼吸器疾患(輸送熱)は、一般的には輸送時間が 20 時間を超える場合に発症率が高くなることが知られている(18, 25, 26)。扁桃や気管の常在菌である *S. zooepidemicus* をはじめとした病原体がウマの気管支肺胞領域に日和見感染することが輸送熱の主因と考えられている(20, 25, 26, 36)。

そこで著者らは、*S. zooepidemicus* に対して 24 時間以上の抗菌活性を有するフルオロキノロン系抗菌薬に着目し、ERFX(5 mg/kg 体重)および MRFX(2 mg/kg 体重)の予防的投与により輸送熱が有意に減少することを報告した(11-13, 33)。しかしながら、抗菌薬の使用には耐性菌出現の問題が残る。また、24 時間以上の長時間輸送における輸送熱予防法は確立されていない。

一方、G-CSF は骨髄中の顆粒球の増殖および末梢血への動因を促進することが知られている(1)。フィルグラスチム、ナルトグラスチム、レノグラスチムをはじめとした医薬品が販売されており、人医療では腫瘍の化学療法による好中球減少症をはじめとした疾患に適用されている(1)。ウマ医療でも新生子溶血性黄疸への使用例があるものの(34)、高価なため応用が進んでいなかった。しかし、近年ジェネリック薬品が発売され、ウマ医療においても応用可能な価格帯となった。輸送熱と G-CSF の関係について、過去の調査によると、輸送熱を発症した群で血清中の G-CSF が有意に高かったという結果が得られている(22)。それゆえ、G-CSF の上昇は自然な治癒反応の一つであり、輸送熱の原因菌である *S. zooepidemicus* の排除に適した状態であると考えられる。しかしながら、著者らの知る限り輸送中のウマに対する G-CSF 製剤の効果に関する報告は見当たらない。

本研究では、G-CSF 製剤の一つであるフィルグラスチムを輸送直前に投与された後、長距離輸送された健常サラブレッドの血液性状に及ぼす影響について検証した。

2. 材料と方法

1) 供試動物

本研究には16頭の临床上健常なサラブレッド(1歳)を供試した。16頭をフィルグラスチム投与群(G-CSF群;雄4頭,雌4頭;体重 429 ± 22 kg)および対照群(雄3頭,雌5頭;体重 421 ± 25 kg)の2群に群分した。

2) 薬物投与

G-CSF群にはフィルグラスチム製剤(0.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重, フィルグラスチム BS 注 300 μg シリンジ, 持田, 日本)を, 対照群には生理食塩水(0.3 ml, 大塚生食注, 大塚, 日本)をそれぞれ皮下投与した。投与量は健常サラブレッド6頭を用いた予備実験の結果に基づいて決定した。すなわち, 3つの異なる投与量(0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$, あるいは0.31 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を試した結果, 0.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上でフィルグラスチムの投与1日後および2日後において好中球がテューキー・クレーマー法にて有意に増加していた。6頭のウマにフィルグラスチムを0.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下投与した場合, 好中球数は投与前の $3,185 \pm 914 /\text{mm}^3$ と比較して投与1日後は $5,702 \pm 914 /\text{mm}^3$, 投与2日後は $4,902 \pm 1,128 /\text{mm}^3$ と有意に増加した(数値は平均値 \pm SDで示す)。なお, 薬剤は輸送開始の1時間前に投与した。

3) 輸送

出発地点は北海道日高郡新ひだか町にある日高軽種馬農協北海道市場であり, 到着地点は宮崎県宮崎市にある日本中央競馬会宮崎育成牧場であった。輸送時間は44時間であり, 輸送距離は陸路で2,420 km(うち高速道路2,320 km および国道100 km), 海路で110 kmの計2,530 kmであった。海路(北海道函館港~青森県青森港)は大型フェリーを利用し, 所要時間は3時間30分であった。なお, 出発時の気温は22.4 $^{\circ}\text{C}$ であり, 到着時の気温は26.2 $^{\circ}\text{C}$ であった。

輸送には3台の馬輸送専門に設計されたトラック(馬運車)を使用した。なお、各馬運車には6頭のウマを載せることが可能であった。3台の構造は全て同一であった。供試馬が頭を下げて怪我をすることを予防するため、供試馬は輸送中および休憩時間の間馬運車の壁にロープで結ばれた。供試馬には輸送中4回の給餌(出発から6時間後、21時間後、30時間後および41時間後に停車した状態で給餌)が行われた。飼料の内容は、1頭当たり1kgの燕麦やペレットがあらかじめ混合されたアソートタイプの飼料であり、個別に与えられた。また、常時飲水可能とした。4時間毎に15~30分間の停車休憩を取り、休憩毎に車内の換気を行った。輸送後、全ての供試馬は4時間の放牧を実施された。

4) 採材および検査

輸送前、輸送中および輸送後において、運動器系および消化器系に投薬と関連する兆候が出現しないかを視診および触診にて検査した。また、水銀体温計で輸送直前、直後および到着翌日の直腸温が測定された。

血液サンプルは、輸送前、輸送後および到着翌日にプレーン採血管(VP-P100K, テルモ, 日本)およびEDTA添加採血管(VC-C50, テルモ, 日本)を用いて頸静脈から採取された。EDTA血は自動血球計算機(K-4500, シスメックス, 日本)による末梢血中のWBC数の測定に用いられた。また、EDTA血を用いて血液塗抹標本を作製、染色し(Diff-Quick 16920, シスメックス, 日本), N/L Ratio および桿状/分葉好中球比を計算した。N/L Ratio および桿状/分葉好中球比は、血液塗抹標本上の200個の細胞を計数して算出した。

5) 統計学的解析

一部のデータが正規分布に従わなかったため、統計解析にはノンパラメトリック検定を用いた。データは中央値および範囲として表した。フリードマン検定にて有意性が認められたデータについて、多重比較検定(Steel-Dwass法)を行った。危険率5%未満($p < 0.05$)を

有意差ありとみなした。

3. 成績

供試馬全頭において、輸送前、輸送中および輸送後のいずれにおいても、投薬に伴うと推測される運動器系もしくは消化器系の異常を含む副作用は認められなかった。

輸送前においては、全ての項目で G-CSF 群と対照群の間に有意な差は認められなかった (Table 5-1)。到着直後 (48 hr) において、直腸温は G-CSF 群では中央値 38.6 °C (範囲: 38.0-39.0)、対照群では中央値 38.6 °C (範囲: 38.0~39.0 °C) と、両群間で有意な差は認められなかった。しかしながら、到着直後 (48 hr) の WBC 数および桿状/分葉好中球比は対照群と比較して G-CSF 群で有意に高かった。さらに、到着直後 (48 hr) における対照群の桿状/分葉好中球比と比較して、到着翌日 (72 hr) における G-CSF 群の桿状/分葉好中球比の方が有意に高かった。G-CSF 群において、N/L Ratio は輸送前 (0 hr) と比較して到着直後 (48 hr) で有意に高かった。なお、いずれの項目においても雌雄差は認められなかった。

4. 考察

ヒトにおいて、G-CSF 製剤の投与により頭痛、発熱および背部痛といった副作用が起こることが報告されている(31)。しかしながら、本研究においてフィルグラスチムを投与された供試馬に輸送前、輸送中および輸送後における運動器系もしくは消化器系の異常を含む副作用は認められなかった。したがって、フィルグラスチムは若齢競走用馬の輸送直前に皮下投与(0.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$)しても安全であることが推察された。

対照群において輸送熱を発症した供試馬がいなかったため、両群間の直腸温に差は認められなかった。到着直後(48 hr)の WBC 数および桿状/分葉好中球比は対照群と比較して G-CSF 群で有意に高かった。さらに、到着直後(48 hr)における対照群の桿状/分葉好中球比と比較して、到着翌日(72 hr)における G-CSF 群の桿状/分葉好中球比の方が有意に高かった。好中球は分化の最後の段階で桿状好中球から分葉好中球に成熟する(1)。桿状好中球および分葉好中球の両方とも殺菌作用を持つ。しかしながら、桿状好中球の割合が高いことは骨髄からより活発な好中球の動員が行われていることを意味する。G-CSF 群において、N/L Ratio は輸送前(0 hr)と比較して到着直後(48 hr)で有意に高かった。このように、フィルグラスチムを投与した場合、好中球を含む顆粒球が骨髄から動員され、自然免疫が活性化された状態でウマたちが輸送されたことが推察された。本研究において、従来の投与量(1.4~3.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)より非常に低い投与量(0.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$)で効果は十分であった(34)。本研究においては骨髄抑制の起こっていない健常なウマに G-CSF 製剤が適用されたため、低用量でも十分効果があったものと考えられた。それゆえ、G-CSF 製剤はコストの面からもウマに対して適用可能であると考えられた。

過去の研究において、輸送は気道内において例えば毛様体運動など正常な粘膜防御機構に悪影響を与え、ウマの扁桃と気管の一般的な常在細菌である *S. zooepidemicus* の下気道への侵襲を導き、その結果下気道の急性炎症を誘導すると考えられてきた(25, 26, 36)。本研究において、フィルグラスチムの輸送直前投与は自然免疫を 48 時間以上活性化させ、

その結果, *S. zooepidemicus* の侵入を防ぐ可能性が示唆された。

結論として, 健常なサラブレッド1歳馬においてフィルグラスチムは骨髄から末梢血中への好中球の動員を促進すると考えられた。輸送熱予防におけるフィルグラスチムの輸送直前投与効果について, 今後さらなる研究を実施する価値がある。

5. 小括

本章では、G-CSF 製剤の一つであるフィルグラスチムの輸送直前投与後の血液性状における効果を検証した。その結果、輸送後の血液性状において WBC 数および桿状/分葉好中球比は対照群と比較して G-CSF 群で有意に高かった。このことにより、フィルグラスチムを投与した場合、好中球を含む顆粒球が骨髄から動員され、自然免疫を 48 時間以上活性化させ、その結果、*S. zooepidemicus* の侵襲を防ぐ可能性が示唆された。本研究により輸送中の自然免疫活性化におけるフィルグラスチムの有効性が示された。今後は輸送熱予防に対する本法の臨床応用が期待された。

Table 5-1. Rectal temperatures and blood parameters before and after transportation in horses dosed prophylactically with filgrastim

Group	Sampling (elapsed time)	Rectal temperature (°C)	Peripheral blood		
			WBC (/mm ³)	N/L ratio	Bacillary neutrophil to segmented neutrophil ratio
Control	Before transportation (0 hr)	38.0 (37.4-38.6)	12,295 (8,640-16,480)	1.12 (0.63-1.91)	0.02 (0.00-0.12)
	After transportation (48 hr)	38.6 (38.0-39.0)	9,300 ^a (8,000-12,200)	1.12 (0.78-1.54)	0.02 ^{cD} (0.00-0.05)
	Day after transportation (72 hr)	38.2 (37.6-38.4)	11,550 (8,100-14,300)	1.12 (0.81-1.60)	0.03 (0.00-0.10)
G-CSF	Before transportation (0 hr)	38.1 (37.6-38.7)	13,545 (8,930-16,280)	0.92 ^b (0.63-1.33)	0.01 (0.00-0.17)
	After transportation (48 hr)	38.6 (38.0-39.0)	13,500 ^a (10,200-19,600)	1.91 ^b (1.22-3.05)	0.10 ^D (0.07-0.17)
	Day after transportation (72 hr)	38.2 (38.0-38.3)	12,400 (8,400-13,700)	1.28 (0.76-1.69)	0.06 ^c (0.04-0.09)

Data are expressed as the median (range).

^{a,b,c} Values with the same superscript letters are significantly ($p<0.05$) different according to the Steel-Dwass test.

^D Values with the same superscript letters are significantly ($p<0.01$) different according to the Steel-Dwass test.

総括

サラブレッド競走用馬は、一般的には輸送時間が 20 時間を超える馬運車輸送を実施すると、輸送関連性呼吸器疾患(輸送熱)発症のリスクが顕著に上昇することが知られている(18, 25, 26)。この輸送熱は、扁桃や気管の常在細菌である *S. zooepidemicus* が気管支-肺胞領域に侵入し、感染することが主な原因である(20, 25, 26, 36)。一旦輸送熱を発症すると、抗菌薬の継続的な投与が必要となる(33)。場合によっては気管支肺胞洗浄や胸腔洗浄といった大掛かりな治療法が必要となる(20)。さらに重症例では、肺胸膜炎へと進行し、治療が遅れると死に至ることもある(26)。

過去に輸送熱を予防するための様々な研究が実施されてきた(2, 9, 19, 29, 30)。その中では、免疫機能を賦活化するためウマに輸送前 3 日連続で IFN- α を投与すると、輸送熱発症後の臨床症状の改善が良好であったことが報告されている(2)。しかしながら、当該プロトコルでは輸送熱を完全には予防することができなかつたため、さらなる予防法の確立が熱望された。これらの調査に基づいて、著者らは IFN- α の投与により免疫機能を賦活化した上で、ウマの輸送熱の主要原因菌である *S. zooepidemicus* を含む病原性細菌に有効な抗菌薬を輸送期間中の気管支肺胞領域に存在させることが輸送熱を予防する上で重要であると考えた。しかしながら、ウマ医療で用いられている抗菌薬の多くは抗菌活性の持続時間が短く(27)、輸送前の単回投与により体内の有効濃度を長時間維持するのが困難であった。

このような中、ERFX や MRFX をはじめとしたフルオロキノロン系抗菌薬は *S. zooepidemicus* に対して有効であり、静脈内投与により気管支肺胞領域へ良好に移行し、投与後 24 時間血中濃度が高く維持されることが報告された(7, 8, 15)。しかしながら、著者らの知る限りフルオロキノロン系抗菌薬を輸送熱の予防のため投与したという報告は見当たらなかった。

一方で抗菌薬の使用には耐性菌出現の問題が残る。G-CSF は骨髄中の顆粒球の増殖および末梢血への動因を促進することが知られている(1)。フィルグラスチム、ナルトグラス

チム、レノグラスチムをはじめとした医薬品が販売されており、ヒト医療では腫瘍の化学療法による好中球減少症などの疾患に適用されている(1)。ウマ医療でも新生子溶血性黄疸への使用例があるものの(34)、高価なため応用が進んでいなかった。しかし、近年ジェネリック薬品が発売され、ウマ医療においても応用可能な価格帯となった。輸送熱と G-CSF の関係について、過去の調査によると、輸送熱を発症した群で血清中の G-CSF が有意に高かったという結果が得られている(22)。それゆえ、G-CSF の上昇は自然な治癒反応の一つであり、輸送熱の原因菌である *S. zooepidemicus* の排除に適した状態であると考えられる。しかしながら、著者らの知る限り輸送中のウマに対する G-CSF 製剤の効果に関する報告は見当たらない。

以上より、サラブレッドにおいて輸送熱予防に対する ERFX, MRFX および G-CSF 製剤の有効性について検討することを本研究の目的とした。

第 1 の検討では、IFN- α を併用した ERFX の輸送直前投与の輸送熱予防効果を検証した。その結果、輸送後の直腸温、末梢血中の WBC 数、N/L Ratio および SAA、また TBA 中の WBC 数および好中球の百分率は対照群と比較して有意に低く、IFN- α を併用した ERFX の輸送直前投与は、IFN- α の単独投与よりも効果的に輸送熱を予防することが明らかとなった。これは ERFX が輸送熱の主因菌である *S. zooepidemicus* の菌数を顕著に減少させ、その結果、*S. zooepidemicus* の下気道への侵入を軽減したためであると考えられた。本研究により IFN- α を併用した ERFX の輸送直前投与は輸送熱予防に対し有効であることが証明された。しかしながら、本研究では IFN- α を併用していたため、IFN- α を併用しない ERFX 単独での輸送熱予防効果を検討することが必要であると考えられた。

そこで第 2 の検討として、IFN- α を併用しない ERFX 単独での輸送直前投与の輸送熱予防効果を、レース未経験の 2 歳馬ではなく成熟した競走馬で検証した。その結果、輸送後の直腸温、末梢血中の WBC 数および SAA は対照群と比較して有意に低く、ERFX 製剤の輸送直前投与は、IFN- α を併用しなくても効果的に輸送熱を予防することが明らかとなっ

た。また、血漿中のコルチゾルも対照群と比較して有意に低く、これは ERFX が *S. zooepidemicus* の下気道への侵入を軽減した結果、輸送中のウマが受けるストレスが低減されたためと考えられた。本研究により IFN- α を併用しない ERFX 単独での輸送直前投与は輸送熱予防に対し有効であることが証明された。また、ERFX は レース未経験の 2 歳馬ではなく成熟した競走用馬においても有効であることが示唆された。しかしながら、ERFX 製剤は強アルカリ性であり高い組織侵襲性を持つため、注射液の静脈外への漏れにより組織損傷を引き起こす危険性がある。また、ERFX 製剤の投与量が比較的大量であるため、その危険性はより高まる。そのため、今後は組織侵襲性を有しないか極めて低い ERFX 以外のフルオロキノロン系抗菌薬の輸送熱予防効果を検討することが必要であると考えられた。

第 3 の検討では、IFN- α を併用した MRFX の輸送直前投与の輸送熱予防効果を、ERFX と比較した。その結果、輸送後の血液性状において N/L Ratio および SAA が対照群と比較して有意に低く、ERFX と同様の効果があることが示された。これは MRFX が輸送熱の主要因菌である *S. zooepidemicus* の菌数を顕著に減少させ、その結果、*S. zooepidemicus* の下気道への侵入を軽減したためであると考えられた。これらのことから、輸送後の炎症反応抑制における MRFX の有効性が示された。しかしながら、本研究では IFN- α を併用していたため、MRFX 単独での輸送熱予防効果を検討することが必要であると考えられた。

そこで第 4 の検討として、IFN- α を併用しない MRFX 単独での輸送直前投与の輸送熱予防効果を、MRFX 導入前と比較した。その結果、MRFX 導入後の輸送後の直腸温が導入前と比較して有意に低く、MRFX の輸送熱予防効果が明らかとなった。また、輸送後の治療内容から、MRFX を輸送前に投与すると治療が必要となるウマが減少し、発熱しても軽症で済むことが明らかとなった。これらのことから、MRFX の輸送直前投与は単独であっても輸送熱予防に対して臨床的に有効であることが証明された。

以上の 4 検討より、ERFX および MRFX の輸送直前投与は単独でも輸送熱予防に対し

て臨床的に有効であることが証明された。しかしながら、抗菌薬の使用には耐性菌出現の問題が残るため、抗菌薬以外の免疫賦活化剤をはじめとした製剤やサプリメントによる輸送熱予防効果を検討することが必要であると考えられた。

本研究では第 5 の検討として、G-CSF 製剤の一つであるフィルグラスチムの輸送直前投与後の血液性状における効果を検証した。その結果、輸送後の血液性状において WBC 数および桿状/分葉好中球比は対照群と比較して G-CSF 群で有意に高かった。このことにより、フィルグラスチムを投与した場合、好中球を含む顆粒球が骨髄から動員され、自然免疫を 48 時間以上活性化させ、その結果、*S. zooepidemicus* の侵入を防ぐ可能性が示唆された。以上の検討により、輸送中の自然免疫活性化におけるフィルグラスチムの有効性が示された。今後は輸送熱予防に対する本法の臨床応用が期待された。

本研究により、ERFX および MRFX の輸送直前投与はそれぞれ単独でも輸送熱予防に対して臨床的に有効であることが証明された。また、輸送中の自然免疫活性化におけるフィルグラスチムの有効性が示された。

要 旨

輸送熱の主な原因は、扁桃や気管の常在細菌である *S. zooepidemicus* が気管支-肺胞領域に侵入し感染することである。免疫機能を賦活化するためウマに輸送日を含む輸送前3日連続で IFN- α を投与すると、輸送熱発症後の臨床症状の改善が良好であったことが報告されているが、当該プロトコルでは輸送熱を完全には予防することができなかった。一方、フルオロキノロン系抗菌薬は広域スペクトルであり、ウマ医療域において長時間作用型の抗菌薬として臨床的に使用されてきた。しかし、フルオロキノロン系抗菌薬を輸送熱の予防のため投与したという報告は見当たらなかった。

一方で抗菌薬の使用には耐性菌出現の問題がある。G-CSF は骨髄中の顆粒球の増殖および末梢血への動因を促進することが知られている。また、輸送熱を発症した群で血清中の G-CSF が有意に高かったという結果が得られているため、G-CSF の上昇は自然な治癒反応の一つであり、輸送熱の原因菌である *S. zooepidemicus* の排除に適した状態であると考えられる。しかしながら、著者らの知る限り輸送中のウマに対する G-CSF 製剤の効果に関する報告は見当たらなかった。このことから、サラブレッドにおいて輸送熱予防に対する抗菌薬および免疫賦活剤の有効性を検討するために以下の5検討を実施した。第1および第2の検討は ERFX の有効性を、第3および第4の検討は MRFX の有効性を、第5の検討はフィルグラスチムの有効性を検討することを目的とした。

第1の検討として、IFN- α を併用した ERFX の輸送直前投与の輸送熱予防効果を検証した。その結果、輸送後の直腸温、末梢血中の WBC 数、N/L Ratio および SAA、また TBA 中の WBC 数および好中球の百分率は対照群と比較して有意に低く、IFN- α を併用した ERFX の輸送直前投与は、IFN- α の単独投与よりも効果的に輸送熱を予防することが明らかとなった。これは ERFX が輸送熱の主因菌である *S. zooepidemicus* の菌数を顕著に減少させ、その結果、*S. zooepidemicus* の下気道への侵入を軽減したためであると考えられた。これらのことから、IFN- α を併用した ERFX の輸送直前投与は輸送熱予防に対し有効であることが証明された。

第 2 の検討として、IFN- α を併用しない ERFX 単独での輸送直前投与の輸送熱予防効果を、レース未経験の 2 歳馬ではなく成熟した競走用馬で検証した。その結果、輸送後の直腸温、末梢血中の WBC 数および SAA は対照群と比較して有意に低く、ERFX 製剤の輸送直前投与は、IFN- α を併用しなくても効果的に輸送熱を予防することが明らかとなった。また、血漿中のコルチゾルも対照群と比較して有意に低く、これは ERFX が *S. zooepidemicus* の下気道への侵入を軽減した結果、輸送中のウマが受けるストレスが低減されたためと考えられた。本研究により IFN- α を併用しない ERFX 単独での輸送直前投与は輸送熱予防に対し有効であることが証明された。また、ERFX は レース未経験の 2 歳馬ではなく成熟した競走用馬においても有効であることが示唆された。

第 3 の検討として、IFN- α を併用した MRFX の輸送直前投与の輸送熱予防効果を、ERFX と比較した。その結果、輸送後の血液性状において N/L Ratio および SAA が対照群と比較して有意に低く、ERFX と同様の効果があることが示された。これは MRFX が輸送熱の主因菌である *S. zooepidemicus* の菌数を顕著に減少させ、その結果、*S. zooepidemicus* の下気道への侵入を軽減したためであると考えられた。これらのことから、輸送後の感染に伴う炎症反応抑制における MRFX の有効性が示された。

第 4 の検討として、IFN- α を併用しない MRFX 単独での輸送直前投与の輸送熱予防効果を、MRFX 導入前と比較した。その結果、MRFX 導入後の輸送後の直腸温が導入前と比較して有意に低く、MRFX の輸送熱予防効果が明らかとなった。また、輸送後の治療内容から、MRFX を輸送前に投与すると治療が必要となるウマが減少し、発熱しても軽症で済むことが明らかとなった。以上のことから、MRFX の輸送直前投与は単独でも輸送熱予防に対して臨床的に有効であることが証明された。

第 5 の検討として、G-CSF 製剤の一つであるフィルグラスチムの輸送直前投与後の血液性状における効果を検証した。その結果、輸送後の血液性状において WBC 数および桿状/分葉好中球比は対照群と比較して G-CSF 群で有意に高かった。このことにより、フィルグ

ラスチムを投与した場合、好中球を含む顆粒球が骨髄から動員され、自然免疫を 48 時間以上活性化させ、その結果、*S. zooepidemicus* の侵入を防ぐ可能性が示唆された。以上のことから、輸送中の自然免疫活性化におけるフィルグラスチムの有効性が示された。

本研究により、ERFX および MRFX の輸送直前投与はそれぞれ単独でも輸送熱予防に対して臨床的に有効であることが証明された。また、輸送中の自然免疫活性化におけるフィルグラスチムの有効性が示された。

英文要旨

Transportation-associated fever is mainly caused by the infection of the bronchoalveolar regions with *S. zooepidemicus* that is resident in the tonsillar tissues and trachea of healthy horses. A decrease in the incidence of fever associated with transportation and improvement in clinical condition was reported for horses orally administered IFN- α for 3 consecutive days before transportation to activate the immune system. However, this protocol did not completely prevent fever associated with transportation, so further prophylactic measures are needed. In contrast, new broad-spectrum quinolone antibiotics have been used clinically as long-acting antimicrobial agents, including for treatment of infections of the respiratory system. However, there are, to our knowledge, no previous reports of the administration of new broad-spectrum quinolone antibiotics for the prevention of fever associated with transportation.

Regarding the use of an antimicrobial agent, there is the problem of onset of resistant bacteria. On the other hand, it is known that the G-CSF promotes granulocytic growth in marrow and mobilization to peripheral blood. According to a previous investigation, serum G-CSF was significantly high in horses that developed transportation-associated fever. Therefore, an increase level of G-CSF represents one of the natural healing responses and is thought to be a condition suitable for exclusion of *S. zooepidemicus*. However, there are, to our knowledge, no previous reports of the effect of a G-CSF formulation during transportation. Therefore, we performed the following five studies to investigate the effectiveness of pre-shipping ERFX, MRFX and G-CSF administration on fever and blood properties in healthy Thoroughbreds transported a long distance.

In the first study, we evaluated the effects of single-dose enrofloxacin in protecting horses against fever associated with transportation using 32 healthy Thoroughbreds. All horses were premedicated with IFN- α for 2 days before transportation and on the day of

transportation. Post-transportation rectal temperature, WBC count, N/L ratio and SAA in the peripheral blood, together with WBC count and percentage of neutrophils in TBAs were significantly lower in horses in the ERFX group compared with the control horses. It suggested that ERFX conspicuously decreased number of organisms of *S. zooepidemicus* which is main reason bacteria of the shipping fever and, as a result, it relieved the invasion into lower respiratory tracts of *S. zooepidemicus*. These results show that prophylactic ERFX administration with IFN- α just before transportation was clinically effective at preventing transportation-associated fever.

In the second study, in order to reveal the preventive effect of ERFX administration without IFN- α just before transportation, we compared 68 adult Thoroughbred racehorses. Post-transportation rectal temperature, WBC count and SAA in the peripheral blood were significantly lower in horses in the ERFX group compared with the control horses. Furthermore, the result that cortisol in the ERFX group was significantly lower was considered that ERFX decreases the stress of transported horses by relieving the invasion by *S. zooepidemicus*. We have demonstrated that the prophylactic ERFX administration without IFN- α just before transportation is clinically effective at preventing transportation-associated fever in adult Thoroughbred racehorses in the same way as 2YO young Thoroughbreds.

In the third study, we evaluated the effects of single-dose MRFX in protecting horses against fever associated with transportation using 48 healthy Thoroughbreds. All horses were premedicated with IFN- α for 2 days before transportation and on the day of transportation. Post-transportation N/L ratios were significantly lower in horses in the MRFX group compared with the control horses. The SAA levels were significantly lower in horses in the MRFX group and ERFX group compared with the control horses. It suggested that MRFX conspicuously decreased number of organisms of *S. zooepidemicus* which is main

reason bacteria of the shipping fever and, as a result, it relieved the invasion into lower respiratory tracts of *S. zooepidemicus*. Therefore, it was shown that MRFX had efficacy in the inflammatory reaction suppression after the transportation.

In the fourth study, in order to reveal the preventive effect of MRFX administration just before transportation, we compared the occurrence of transportation-associated fever before and after introduction of MRFX administration. No horses were premedicated with IFN- α . After the introduction of prophylactic MRFX administration, the rectal temperatures of horses after transportation were significantly lower than before the introduction of MRFX administration and the number of febrile horses was significantly lower than before the introduction of MRFX administration. These results show that prophylactic MRFX administration alone just before transportation was clinically effective at preventing transportation-associated fever.

In the fifth study, we evaluated the effects of single-dose filgrastim on hematology in 16 healthy horses after long-distance transportation. Because the post-transportation WBC counts and bacillary neutrophil to segmented neutrophil ratio were significantly higher in the G-CSF group, filgrastim may have promoted the mobilization of neutrophils from marrow. It suggests that administration of filgrastim just before transportation activates natural immunity for more than 48 hours and can protect against invasion by *S. zooepidemicus*. Therefore, it was shown that G-CSF had efficacy in activating natural immunity during transportation.

Based on the results of the five studies, it was demonstrated that prophylactic EFRX and MRFX administration each alone just before transportation was clinically effective at preventing transportation-associated fever. And, it was shown that G-CSF had efficacy in activating natural immunity during transportation.

謝 辭

本研究にあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました鹿児島大学共同獣医学部獣医学科臨床獣医学講座産業動物内科学分野の帆保誠二教授に深謝いたします。また、本論文の作成にあたりまして数々の御助言と御指導を賜りました山口大学農学部獣医学科臨床獣医学講座獣医外科学研究室の田浦保穂教授、鹿児島大学共同獣医学部獣医学科臨床獣医学講座外科学分野の三角一浩教授、鹿児島大学共同獣医学部獣医学科臨床獣医学講座産業動物獣医学分野の畠添孝准教授、鹿児島大学共同獣医学部獣医学科附属動物病院の三浦直樹准教授に深謝いたします。

そして、研究に際して多大なる御助力、御助言を賜りました帯広畜産大学獣医学研究部門産業動物獣医療学系の都築直准教授に深謝いたします。最後に、終始実験にご協力して頂いた日本中央競馬会日高育成牧場、日本中央競馬会宮崎育成牧場の皆様に心から感謝申し上げます。

引用文献

1. Aapro, M.S., Cameron, D.A., Pettengell, R., Bohlius, J., Crawford, J., Ellis, M., Kearney, N., Lyman, G.H., Tjan-Heijnen, V.C., Walewski, J., Weber, D.C. and Zielinski, C. 2006. EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphomas and solid tumours. *Eur. J. Cancer.* **42** :2433-53.
2. Akai, M., Hobo, S. and Wada, S. 2008. Effect of low-dose human interferon-alpha on shipping fever of Thoroughbred racehorses. *J. Equine Sci.* **19** :91-95.
3. Art, T., Moffarts, B. D., Bedoret, D., Erck, E. V. and Lekeux, P. 2007. Pulmonary function and antimicrobial concentration after marbofloxacin inhalation in horses. *Vet. Rec.* **161** :348-350.
4. Beluche, L. A., Bertone, A. L., Anderson, D. E., Kohn, C. W. and Weisbrode, S. E. 1999. In vitro dose-dependent effects of enrofloxacin on equine articular cartilage. *Am. J. Vet. Res.* **60** :577-582.
5. Bermingham, E. C., Papich, M. G. and Vivrette, S. L. 2000. Pharmacokinetics of enrofloxacin administered intravenously and orally to foals. *Am. J. Vet. Res.* **61** :706-709.
6. Bertone, A. L., Tremaine, W. H., Macoris, D. G., Simmons, E. J., Ewert, K. M., Herr, L. G. and Weisbrode, S. E. 2000. Effect of long-term administration of an injectable enrofloxacin solution on physical and musculoskeletal variables in adult horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2000. **217** :1514-1521.
7. Bousquet-Melou, A., Bernard, S., Schneider, M. and Toutain, P. L. 2002. Pharmacokinetics of marbofloxacin in Horses. *Equine Vet. J.* **34** :366-372.

8. Carretero, M., Rodriguez, C., San Andres, M. I., Fores, P., Lucas, J. J., Nieto, J., Waxman, S., San Andres, M. D. and Gonzalez, F. 2002. Pharmacokinetics of marbofloxacin in mature horses after single intravenous and intramuscular administration. *Equine Vet. J.* **34** :360-365.
9. Davis, E., Rush, B. R., Herr, L. G. and Ewert, K. M. 2006. Enrofloxacin use in a long-distance transport model of equine respiratory disease. *Vet. Ther.* **7** :232-242.
10. Dechant, J. 1997. Combination of medical and surgical therapy for pleuropneumonia in a horse. *Can. Vet. J.* **38** :499-501.
11. Endo, Y., Ishikawa, Y., Arima, D., Mae, N., Iwamoto, Y., Korosue, K., Tsuzuki, N. and Hobo, S. 2017. Effects of pre-shipping enrofloxacin administration on fever and blood properties in adult Thoroughbred racehorses transported a long distance. *J. Vet. Med. Sci.* **79** :464-466.
12. Endo, Y., Tsuchiya, T., Omura, T., Nakai, K., Korosue, K., Ishimaru, M., Ishikawa, Y. and Hobo, S. 2015. Effects of pre-shipping marbofloxacin administration on fever and blood properties in healthy Thoroughbreds transported long distance. *J. Vet. Med. Sci.* **77** :75-79.
13. Endo, Y., Tsuchiya, T., Akiyama K., Takebe N., Nakai K., Korosue, K., Ishimaru, M., Tsuzuki N. and Hobo, S. 2014. Comparison of the occurrence of transportation-associated fever in 2 years old Thoroughbreds before and after introduction of prophylactic antibiotic administration. *J. Equine Sci.* **25** :79-81.
14. Endo, Y., Tsuchiya, T., Sato, F., Murase, H., Omura, T., Korosue, K., Nambo, Y., Ishimaru, M. and Wakui, Y. 2012. Efficacy of omeprazole paste in the prevention of gastric ulcers in 2 years old Thoroughbreds. *J. Vet. Med. Sci.* **74**: 1079–1081.

15. Giguere, S., Sweeney, R. W. and Belanger, M. 1996. Pharmacokinetics of enrofloxacin in adult horses and concentration of the drug in serum, body fluids, and endometrial tissues after repeated intragastrically administered doses. *Am. J. Vet. Res.* **57** :1025-1030.
16. Haines, G. R., Brown, M. P., Gronwall, R. R. and Merritt, K. A. 2000. Serum concentrations and pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intragastric administration to mares. *Can. J. Vet. Res.* **64** :171-177.
17. Hobo, S., Niwa, H., and Anzai, T. 2007. Evaluation of serum amiloid a and surfactant protain d in sera for identification of the clinical condition of horses with bacterial pneumonia. *J. Vet. Med. Sci.* **69** :827-830.
18. Hobo, S., Kuwano, A. and Oikawa, M. 1995. Respiratory change in horses during automobile transportation. *J. Equine Sci.* **6** :135-139.
19. Hobo, S., Tomita, T., Nambo, Y., and Anzai, T. 2006. Preventive effect of low-dose interferon alpha oral medication against shipping fever in Thoroughbreds. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* **59** :741-745.
20. Ito, S., Hobo, S., Eto, D. and Sato, H. 2001. Bronchoalveolar lavage for the diagnosis and treatment of pneumonia associated with transport in Thoroughbred racehorses. 2001. *J. Vet. Med. Sci.* **63** :1263-1269.
21. Kusano, K., Hobo, S., Ode, H., and Ishikawa, Y. 2008. Tracheal endoscopic and cytological findings and blood examination results in Thoroughbred racehorses suspected to have lower respiratory tract disease. *J. Equine Sci.* **19** :97-102.
22. Momoi, Y., Kato, H., Youn, H.Y., Aida, H., Takagi, S., Watari, T., Goitsuka, R., Tsujimoto, H. and Hasegawa, A. 1996. Elevation of serum G-CSF level in horses with transportation-induced fever. *J. Vet. Med. Sci.* **58** :537-41.

23. Nagata, S., Takeda, F., Kurosawa, M., Mima, K., Hiraga, A., Kai, M. and Taya, K. 1999. Plasma adrenocorticotropin, cortisol and catecholamines response to various exercises. *Equine Vet. J. Suppl.* **30**: 570–574.
24. Nambo, Y., Oikawa, M., Yoshihara, T., Kuwano, A., Hobo, S., Nakata, S., Watanabe, G. and Taya, K. 1996. Effects of transport stress on concentrations of LH and FSH in plasma of mares: a preliminary study. *J. Equine Sci.* **7**: 1–5.
25. Oikawa, M. and Kusunose, R. 1995. Some epidemiological aspects of equine respiratory disease associated with transport. *J. Equine Sci.* **6** :25-29.
26. Oikawa, M., Takagi, S., Anzai, R., Yoshikawa, H. and Yoshikawa, T. 1995. Pathology of equine respiratory disease occurring in association with transport. *J. Comp. Path.* **113** :29-43.
27. Orsini, J. A., Soma, L. R., Rourke, J. E. and Park, M. 1985. Pharmacokinetics of amikacin in the horse following intravenous and intramuscular administration. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **8** :194-201.
28. Raidal, S. L., Love, D. N. and Bailey G. D. 1996. Effect of posture and accumulated airway secretions on tracheal mucociliary transport in the horse. *Aust. Vet. J.* **73** :45-49.
29. Raidal, S. L., Love, D. N. and Bailey G. D. 1995. Inflammation and increased numbers of bacteria in the lower respiratory tract of horses within 6 to 12 hours of confinement with the head elevated. *Aust. Vet. J.* **72** :45-50.
30. Raidal, S. L., Taplin, R. H., Bailey G. D., and Love D. N. 1997. Antibiotic prophylaxis of lower respiratory tract contamination in horses confined with head elevation for 24 or 48 hours. *Aust. Vet. J.* **75** :126-131.

31. Sveilata, A., Gumbrevicius, G., Sestakauskas, K., Kregzdyte, R., Janulionis, V. and Fokas, V. 2014. Comparison of the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties two recombinant granulocyte colony-stimulating factor formulations after single subcutaneous administration to healthy volunteers. *Medicina* **50** :144-149.
32. Takizawa, Y., Hobo, S., Yamauchi, J., Yamane, T., Kuwamoto, Y., Wada, R. and Anzai, T. 2005. Cytological and bacteriological observation of tracheobronchial aspirates from young Thoroughbred transported by vehicle over long distance. *J. Equine Sci.* **16** :117-121.
33. Tsuchiya, T., Hobo, S., Endo, Y., Narita, S. and Sakamoto, K. 2012. Effect of a single dose of enrofloxacin on body temperature and tracheobronchial neutrophil count in healthy Thoroughbreds premedicated with interferon- α and undergoing long-distance transportation. *Am. J. Vet. Res.* **73** :968-972.
34. Wong, D.M., Alcott, C.J., Clark, S.K., Jones, D.E., Fisher, P.G. and Sponseller, B.A. 2012. Alloimmune neonatal neutropenia and neonatal isoerythrolysis in a Thoroughbred colt. *J. Vet. Diagn. Invest.* **24** :219-26.
35. Yoon, J. H., Brooks, R. L., Khan, A., Pan, H., Bryan, J., Zhang, J., Budsberg, S. C., Mueller, P. O. E. and Halper, J. 2004. The effect of enrofloxacin on cell proliferation and proteoglycans in horse tendon cells. *Cell Biol. Toxicol.* **20** :41-54.
36. Yoshikawa, H., Yasu, T., Ueki, H., Oyamada, T., Oishi, H., Anzai, T., Oikawa, M. and Yoshikawa, T. 2003. Pneumonia in horses induced by intrapulmonary inoculation of *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus*. *J. Vet. Med. Sci.* **65** :787-792.