

牛輸送熱の病態解明ならびに輸送熱治療法に関する研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

林 淳

2016年度入学

目次

主な略号一覧	p. 5
緒 論	p. 6
第1章 黒毛和種育成雌牛における長距離・長時間輸送による体重及び血液 性状の変化	p. 11
1. 緒言	p. 12
2. 材料と方法	
1) 供試動物	p. 14
2) 輸送	p. 14
3) 検査項目	p. 14
4) 統計学的解析	p. 15
3. 成績	p. 16
4. 考察	p. 17
5. 小括	p. 20

第2章 家畜市場導入肥育素牛における牛呼吸器病症候群の治療状況の調査 ならびに発症に関与する細菌の同定	p. 22
1. 緒言	p. 23
2. 材料と方法	p. 25
1) BRDC 罹患情報及び治療状況の調査	p. 25
2) 供試牛の身体検査と BRDC の発症に関与する細菌の同定	p. 25
3. 成績	p. 28
1) BRDC 罹患情報及び治療状況の調査	p. 28
2) 供試牛の身体検査と BRDC の発症に関与する細菌の同定	p. 28
4. 考察	p. 30
5. 小括	p. 32
第3章 マルボフロキサシンの牛気管支肺胞領域への移行性	p. 36
1. 緒言	p. 37
2. 材料と方法	p. 38
1) 供試動物	p. 38

2) 試験デザイン	p. 38
3) 血液の分析	p. 38
4) 気管支肺胞洗浄液検査	p. 38
5) 抗菌薬濃度測定	p. 39
6) 統計学的解析	p. 41
3. 成績	p. 42
4. 考察	p. 43
5. 小括	p. 45
総括	p. 48
要旨	p. 52
英文要旨	p. 56
謝辞	p. 60
引用文献	p. 62

主な略号一覧

AST	Aspartate aminotransferase
AUC	Area Under the Curve
BAL	Bronchoalveolar lavage
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid
BRDC	Bovine Respiratory Disease Complex
BUN	Blood Urea Nitrogen
ELF	Epithelial lining fluid
Glu	Glucose
Hct	Hematocrit
HDL-Cho	High-density lipoprotein cholesterol
Hgb	Hemoglobin
<i>H. somni</i>	<i>Histophilus somni</i>
MBFX	Marbofloxacin
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
Mg	Magnesium
<i>M. haemolytica</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
<i>M. bovis</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>
NEFA	Non-Esterified Fatty Acid
<i>P. multocida</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
RBC	Red Blood Cell
SD	Standard Deviation
TBA	Tracheobronchial aspirate
T-Cho	Total Cholesterol
Vit. A	Vitamin A

緒 論

現在の日本における牛の飼養状況は、農林水産省による統計によると、2018年の全国肉用牛の飼養頭数は251.4万頭、飼養戸数は4万8300戸であった[41]。全国の牛の飼養頭数は1995年より減少傾向を示していたが、2018年に増加に転じた。しかし、牛の飼養戸数は1974年の53万2200戸から小規模層を中心に減少傾向で推移しており、1戸当たりの牛の飼養頭数は2018年で52頭であった[41]。

日本における牛の飼養形態は、繁殖経営方式と肥育経営方式の2方式に大別され、それぞれの農場で特色を持つ。

繁殖経営方式では、繁殖母牛及び育成雌牛を飼養する黒毛和種繁殖農家で繁殖を行い、生産された子牛は生後10ヶ月齢前後で市場（市場）へ出荷される方式を取っている。市場へ出荷される牛は健康であることが求められるため、出荷までに市場で決められたワクチネーションを受けていることが多い。その多くは牛呼吸器病対応ワクチンであり、牛呼吸器病の発生予防に主眼が置かれている。

いっぽう、肥育経営方式では繁殖は実施せず、繁殖農場で生産された子牛や酪農場で生産された子牛を市場もしくは家畜商経由で導入し、出荷適齢期まで肥育を行い、食肉用肉用牛として出荷する。肥育農場での牛の導入は、繁殖から肥育までの一貫経営農場を除いては外部導入方式を取っている。外部導入方式としては、生後若齢期（おおむね3ヶ月齢以内）での導入と育成期（おおむね生後10ヶ月齢前後）の2種類がある。前者は主に乳牛あるいはF1交雑牛肥育で、後者は主として黒毛和種牛肥育で認められる。近年は、繁殖及び肥育の両方の特徴を併せ持つ一貫経営農場も多くなってきている。

これらの牛の飼養農場は全国的に展開しており、市場や取引農場の立地位置によっては牛の移動に近距離輸送や長距離輸送が必要となる。農場間での牛の移動は、市場を経由して実施されることが多いため、車両を用いた輸送が必須となる。輸送による影響については、Gonzalezらや斎藤らの報告があるが[14, 50]、輸送によって発生する牛体の変化を知ることは、到着後の牛の取り扱いにとって重要な情報となり得る。

牛の呼吸器病は、様々な外的要因が体内の浄化機構の低下や免疫機構の攪乱を引き起こし、ウィルスや鼻咽頭部の常在細菌が気管支肺胞領域へ侵入、定着することによって発症するとされている [49]。牛体に影響を及ぼす外的要因としては、飼養環境の変化、給与飼料の変化、離乳、除角、牛の集合、離散をはじめとした要因が挙げられており、特に輸送は大きな要因となり得ることが報告されている [14]。

牛、特に肥育農場における導入牛の呼吸器病の発生は、ウィルス、細菌（マイコプラズマ属細菌を含む）を原因とする感染症が主であり、農場にとって脅威となっている [17, 52]。近年の肥育農場の飼養形態は多頭飼育が一般的であり、一旦呼吸器病が発生すると、農場は受診のために牛の観察の強化や診療時の補助に人員と時間を取られる。そのため、治療対象頭数の増加や長期化、ひいては死亡・廃用事故へとつながることも多く、その影響は計り知れない。これらのことから、導入後の牛呼吸器病の病態を調査することは極めて重要である。

肥育農場に導入された牛の呼吸器病発生状況を家畜共済制度加入者における統計で見ると、2017年度の宮崎県では肥育成牛（生後6ヶ月を超える牛）では、総病傷件数（診療件数）13,502件中の呼吸器病は6,982件であり、その52%を占めていた [26]。また、死亡・廃用頭数は、総件数で887件であり、呼吸器病はそのうちの179件（20%）を占めていた [26]。これらの数字は農場が治療及び死亡・廃用事故対応に農場が苦慮していることを示している。また、2014年4月1日から2018年3月31日までの宮崎中央地域における肥育牛導入後の呼吸器病発症状況をみると、全体で1,603頭の牛が農場導入後に治療を受けていたが、導入後30日以内に初診を受けた頭数は865頭であり、全体の54%を占めていた。このことから導入後の牛の状態を把握することは、導入後の牛への対応に有益になると考えられる。

いっぽう、牛の診療を実施する獣医師側からみると、感染症の広がりによって多頭数の治療を実施しなくてはならず、使用抗菌薬の量とともに、診察及び処置にかかる時間

も多くなる。そのため、呼吸器病が発生してからの対応では後手に回ることも多く、その発生予防に主眼が置かれている。現在実施されている代表的な予防法はワクチネーションであり、目的のウイルスや細菌に対応したワクチン接種が実施されている [43, 44]。しかし、ワクチン接種による抗体価の上昇を期待するためには、健康牛であっても 3 週間程度の期間が必要であり、導入牛においては、十分な抗体抗対価を得る前に感染が成立する場合も多く、対応が間に合わないこともあり得る。

牛呼吸器病の治療にあたっては、抗菌薬の選択及び使用に対して慎重な注意が必要であり、抗菌薬の使用においては、十分な根拠をもとに使用する抗菌薬を選択することが求められている。また、抗菌薬の耐性化を防ぐために家畜への抗菌薬投与を必要最小限とすることも必要である。いっぽう、抗菌薬を予防的に投与するためには、家畜に感染する原因菌の存在が明らかになっていて、それらの原因菌の感染を防ぐためにおいてのみ使用されなければならない。すなわち、予防的に抗菌薬を使用する場合には、感染症の発生率を顕著に減少させることが必要である。

フルオロキノロン系抗菌薬であるマルボフロキサシン (MBFX) は家畜においての使用が認められ、日本では 2010 年以降家畜の治療に広く臨床応用されている [16, 35, 56]。MBFX の対象菌種はグラム陰性菌、グラム陽性菌及びマイコプラズマ属細菌とされている [16, 35, 56]。また、MBFX の体内動態については、犬において薬剤経口投与後の気管支肺胞領域への動態について報告されている [7]。牛においては、体内における血液中の MBFX の動態についての報告はあるが [3, 6, 34]、肺炎の主病変が存在する気管支肺胞領域における動態については明らかにされていない。そのため、全身投与した抗菌薬が同領域へ移行しているかは不明である。これらの知見を得ることは臨床領域における牛呼吸器病の診断及び治療を実施する際の有力な情報となり得る。

以上の問題点を解決するために、本研究では以下の 3 章において研究を実施した。

第 1 章では、牛の長距離輸送が生体に与える影響を明らかにするために、宮崎県から北海道へ車両及び船舶を用いて輸送された繁殖雌育成牛の体重測定結果及び血液検査を解析した。

第 2 章では、子牛期に牛呼吸器病ワクチネーション実施済みの導入牛に対して、導入後の牛呼吸器病の発生状況を調査するとともに、気管支肺胞洗浄液を用いて牛呼吸器病の原因菌を検索した。

第 3 章では、フルオロキノロン系であるマルボフロキサシンの全身投与による薬物動態を、血液及び気管支肺胞液を解析することにより明らかにした。

第 1 章

黒毛和種育成雌牛における長距離・長時間輸送による 体重及び血液性状の変化

1. 諸言

2014年の農林水産統計年報によると肉用牛の飼養戸数は全国で57,500戸であり、飼養頭数は2,567,000頭となっている。肉用牛の飼養地域で見ると、戸数では九州が43.8%、東北が26.8%を占めている。また、肉用牛の飼育頭数では九州が35.9%、北海道が19.9%、関東・東北が11.6%と続いている。子牛生産は沖縄、南九州、東北にその主体を置き、肥育は全国的に展開されている[40]。また、2014年度に宮崎県内7市場から県外に販売された頭数は雌が13,357頭、去勢が11,113頭であり、全国の市場に占める割合はそれぞれ43.1%及び35.8%となっている。これらの牛は、雌は子牛生産のための繁殖用育成雌牛や肥育用素牛として、去勢雄は肥育用素牛として埼玉県及び広島県を除く都道府県に販売されている[37]。売買後は子牛生産地域から全国へ移動することになり、長距離・長時間輸送が実施されることも少なくない[59]。

牛の長距離輸送では、主に体重の変動、代謝の変化及び免疫機能の低下を引き起こすことが知られている[14, 38, 50, 61]。長距離輸送に伴う体重変動については、体重が減少したとの報告が多くある一方で、増加したとの報告もある。また、長距離輸送に伴う様々なストレス要因として、主に輸送前管理、騒音、振動、群編成、収容密度、気象条件、係留の有無、積み下ろし、輸送時間があり、それらが牛の代謝に及ぼす影響については多くの報告がある[1, 14, 58, 61]。これら長距離輸送に伴う牛の体重の変動、代謝の変化あるいは免疫機能の低下の原因については、主に給餌及び給水の制限が関与しているとの報告もあり[14]、結果として牛に対して大きなストレスが負荷されている。

本邦での牛の陸上輸送は殆どの場合に自動車車両を用いて行われているが、距離や時間は様々である。本邦における牛の陸上輸送に関する報告例では、北海道から関東への輸送に伴うものがあるが[58]、さらに長距離の輸送（九州から北海道への輸送）についての報告はなく、牛に与える影響については不明な点も多い。

本研究では，長距離輸送が牛に与える影響を明らかにするために，宮崎県から北海道へ長距離輸送を行った黒毛和種育成雌牛における体重及び血液性状の変化を調査した．

2. 材料と方法

1) 供試動物

2013 年 10 月に宮崎県宮崎市の市場において、宮崎市及び東諸県（ひがしもろかた）郡から最長 1 時間の車両輸送を経て上場・販売された黒毛和種育成雌牛 10 頭を用いた。同市場での売却雌牛 472 頭の平均日齢は 295 ± 20 日であり、平均体重は 275 ± 29 kg、1 日当たりの増体量（DG）は 0.8 ± 0.1 kg/日であった。供試牛の平均日齢は 305 ± 14 日であり、平均体重は 284 ± 30 kg、DG は 0.8 ± 0.1 kg / 日であった。また、上場時及び輸送直前における目視による検査では健康上の異常所見を認めなかった。

2) 輸送

輸送は宮崎県宮崎市から北海道石狩市まで家畜専用輸送車両を用いて行われ、途中経路は高速道路、フェリー及び一般道路を使用した。なお、総輸送距離は 2,078 km（陸路 1,130 km、海路 948 km）、総輸送時間は 62 時間であった。輸送は係留方式ではなくばら積みで行われ、輸送車両には常時飲料水が積載されていた。輸送中の飲水給与は、途中の休憩時に上水道水の給与により行われた。飼料給与については、配合飼料は給与されず、粗飼料給与の有無については確認できなかった。北海道石狩市に到着 1 日後に臨床経験の豊富な獣医師により目視による生体検査を実施した。

3) 検査項目

体重測定は電子体重計（D1052、アカダ電器、東京）を用いて、市場上場日（10 月 14 日；輸送前）及び北海道到着時（10 月 17 日；輸送直後）に実施した。血液採取は、輸送前及び北海道到着後の生体検査時（10 月 18 日；輸送 1 日後）に、頸静脈から真空採血管（ベノジェクト II 真空採血管 VP-NA052K, VP-P070K30, テルモ、東京）を用いて実施した。

採取した血液は、ただちに検査機関（保健科学研究所，横浜市）に送付し，血液一般及び血液生化学検査を行った．検査項目は，白血球数，赤血球数（RBC），ヘモグロビン（Hgb），ヘマトクリット（Hct），平均赤血球容積，平均赤血球ヘモグロビン量（MCH），平均赤血球ヘモグロビン濃度，総蛋白，アルブミン（Alb），総コレステロール（T-Cho），血中尿素窒素(BUN)，グルコース（Glu），遊離脂肪酸（NEFA），アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）， γ -グルタミントランスフェラーゼ，ビタミン A（Vit. A），カルシウム，リン，マグネシウム（Mg）， β -リポ蛋白，HDL コレステロール（HDL-Cho）及び LDL コレステロールとした．

なお，得られた検査結果の参考値として獣医内科学に記載されている値 [9]を用いた．

4) 統計学的解析

得られた結果は，平均値 \pm 標準偏差で示し，Student-*t* 検定を用いて輸送前後において比較を行った．危険率 5%未満を有意差ありとした．

3. 成績

体重は、輸送前 283.5 ± 29.6 kg に対して、輸送後 256.2 ± 26.5 kg と有意に減少した。輸送前に対する輸送後の体重の平均減少率は 9.6 ± 1.3 % (7.0~11.0 %) であった。輸送前後の血液一般及び血液生化学検査の比較では、RBC, Hgb 濃度, Hct 値, MCH 及び NEFA 濃度の有意な上昇 ($p < 0.05$) ならびに T-Cho 濃度, BUN 濃度, Glu 濃度, AST 活性値, Vit. A 濃度, Mg 濃度及び HDL-Cho 濃度の有意な低下 ($p < 0.05$) を認めた [表 1]。他の項目では、有意な差は認めなかった。

4. 考 察

輸送の際には、ある程度の制限給餌、制限飲水が行われるため、体重が減少することが知られている [14, 38, 50]. Warriss らは、5 時間輸送された牛で 4.6 %、10 時間輸送された牛で 6.5 %、15 時間輸送された牛で 7.0 % の体重減少率を認めたと報告している [61]. Gonzalez らは 400 km を越える輸送により肥育牛で 7.94 %、子牛で 6.13 % の体重減少率を報告している [14]. 三角らは、輸送前の削蹄の有無による輸送後の体重減少率は、削蹄あり群が 0.30 %、削蹄なし群が 1.52 % であったと報告している [38]. 齊藤らは、輸送により去勢牛で 1.4 %、雌牛で 1.2 % の体重減少率を認め、雌雄差があることを報告している [50]. いっぽうで、植竹らは北海道から栃木県への 25 時間の輸送で、肥育素牛の体重が 2.6 % 増加したことを報告している [58]. 輸送における肥育素牛の体重変動は、輸送時間、輸送距離、日齢、性別、輸送前の哺乳・育成方式の異なる飼養形態が影響するとの報告がある [23]. また、体重減少の原因として、腸管内の糞便と膀胱内の尿がなくなること、発汗、酸化及び呼吸による細胞内の水分とエネルギー喪失が関与していると報告されている [14]. 輸送による体重減少はこれまでも報告されているが、今回の 2,078 km、62 時間輸送における体重減少率は、これまでのいずれの報告よりも大きかった.

本調査では RBC、Hgb 濃度、Hct 値及び MCH が、輸送前に比べ輸送後に有意に上昇した. これら項目の測定値の相対的な増加は、体内の水分量の減少により起こることから、水分の消失に対する飲水量の不足が疑われた. また、輸送ストレスの影響は脱水に関連しているとの報告がある [14]. NEFA 濃度は 0.15~0.35 mEq/l が基準値とされているが [25], 今回の調査では輸送前に 0.5 ± 0.2 mEq/l とすでに上昇しており、さらに輸送後において有意に上昇した. 植竹らは、輸送前に市場にて NEFA 濃度が高い値を示していたと報告している [58]. 輸送前の高値は、牛が市場に搬入されるまでに農場より最長 1 時間程度の車両輸送が行われており、すでにその輸送の影響を受けてい

たものと推察された。NEFA 濃度は脱水によっても上昇するが、乾物摂取量不足や飢餓状態になると体脂肪の分解により血中に動員される [53]。大津らは、制限給餌により NEFA 濃度が上昇したと報告している [42]。よって、本試験の供試牛は長距離輸送により飢餓あるいは脱水状態にあったと考えられた。

いっぽう、T-Chol 及び HDL-Chol 濃度は有意に低下していた。血中 T-Chol 濃度は、飼料として摂取される量、腸管より吸収される量、肝で合成される量、再吸収される量、糞便とともに排泄される量を主体とした要因によって左右されるが [27]、本研究でみられた T-Chol 濃度の低下の原因として摂取エネルギーの不足が推察された。BUN 濃度は蛋白質代謝を示す指標として用いられ、今回認められた有意な低下は、輸送途中の飼料給与不足が影響したものと考えられた。Glu 濃度は有意に低下した。Glu 濃度はストレスにより上昇するとされている [59]。今回、輸送ストレスにより一過性に Glu 濃度が上昇した可能性はあるが、その後、食餌が不十分なためにエネルギーの供給不足に陥り低下したものと考えられた。AST は肝臓のほか、心筋、骨格筋、赤血球などにも多く含まれる酵素であり、有意な低下がみられた。暑熱時は乾物摂取量 (DMI) 低下により相対的に肝臓の負担が減るため AST 活性値が低下することが報告 [21] されていることから、本研究においても DMI 低下による影響と考えられた。Mg 濃度低下の理由としては、Mg 代謝における摂取量の不足、消化管よりの吸収障害、排泄亢進、脱水、低蛋白血症などが考えられ [28]、今回の輸送では、摂取量不足が疑われた。Vit. A 濃度の有意な低下については、ストレスにより消費量が増大するも供給量が十分でない場合に下がることが報告されており [1]、今回の牛についても輸送ストレスにより Vit. A の消費が増え、食餌が十分でなかったために、血中濃度が低下したものと考えられた。

本研究は、長距離・長時間輸送が牛の体重及び血液性状に及ぼす影響を明らかにするために行った。輸送距離 2,000 km 以上、輸送時間 60 時間以上の長距離・長時間輸送の結果、目視による臨床状態の変化は観察されなかったが、体重の減少は著明であった。

また、血液性状から輸送中の乾物摂取量の減少に伴うエネルギー不足、及び飲水不足による脱水が疑われた。これらのことから、家畜を長距離・長時間輸送を行う際は、家畜が受ける輸送ストレスを最小限に抑えるとともに、輸送途中でエネルギー不足や脱水が生じないように、乾物摂取量及び飲水量が十分に確保できる環境を整え、嗜好性、消化率の高い飼料を十分に給与するなど、輸送中の環境に配慮することが必要であると考えられた。

5. 小括

黒毛和種育成雌牛において、長距離・長時間輸送の影響を調査した。黒毛和種育成雌牛 10 頭を用い、家畜輸送専用車で宮崎県から北海道までの 2,078 km（陸路 1,130 km, 海路 948 km）を 62 時間かけて長距離輸送し、輸送前後における体重及び血液性状を測定した。輸送前の体重は 283.5 ± 29.6 kg（平均値 \pm 標準偏差）で、輸送後は 256.2 ± 26.5 kg と有意に減少した（ $p < 0.001$ ）。輸送前に対する輸送後の体重の平均減少率は 9.6 ± 1.3 %（7.0~11.0 %）であり、10 頭すべての個体で体重の減少が認められた。血液性状においては、輸送後の赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球ヘモグロビン濃度及び遊離脂肪酸濃度の有意な上昇、ならびに総コレステロール濃度、血中尿素窒素濃度、グルコース濃度、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性値、ビタミン A 濃度、マグネシウム濃度及び HDL コレステロール濃度の有意な低下（ $p < 0.05$ ）を認めた。血液性状の変化より、輸送中に乾物摂取量の低下による摂取エネルギーの不足及び飲水量の不足が生じていると考えられた。以上のことから、黒毛和種育成雌牛の長距離・長時間輸送による体重の減少の要因の一つに、乾物摂取量及び飲水量の低下が関係していることが考えられた。

表1. 輸送前後における血液成分値の変化

項目	単位	輸送前	輸送後	<i>P</i>	参考値*
RBC	($\times 10^4/\mu\ell$)	793.7 \pm 48.9	856.6 \pm 48.8	<0.001	500-1000
Hb	(g/dℓ)	10.9 \pm 0.7	12.1 \pm 0.6	<0.001	9-15
Hct	(%)	33.3 \pm 1.7	35.8 \pm 1.2	<0.001	24-46
MCH	(pg)	13.8 \pm 0.7	14.2 \pm 0.7	<0.05	8-12
T-Cho	(mg/dℓ)	126.4 \pm 28.3	108.2 \pm 21.9	<0.01	80-120
BUN	(mg/dℓ)	13.6 \pm 2.8	5.6 \pm 1.1	<0.001	10-25
Glu	(mg/dℓ)	79.4 \pm 3.8	73.5 \pm 5.3	<0.05	45-75
NEFA	(mEq/ℓ)	0.5 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1	<0.05	0.15-0.35
AST	(IU/ℓ)	76.8 \pm 8.3	63.0 \pm 11.4	<0.01	43-127
Vit.A	(IU/dℓ)	90.2 \pm 11.3	63.1 \pm 13.8	<0.001	90-150
Mg	(mg/dℓ)	2.5 \pm 0.2	1.9 \pm 0.2	<0.001	1.8-2.3
HDL-Cho	(mg/dℓ)	97.0 \pm 23.4	84.4 \pm 20.0	<0.01	

*獣医内科学アカデミー編，獣医内科学 2版，文永堂出版（2014）

第2章

家畜市場導入肥育素牛における牛呼吸器病症候群の
治療状況の調査並びに発症に関与する細菌の同定

1. 諸言

牛生産農場で生産された子牛は、肥育素牛として市場を経由して牛生産農場あるいは肥育農場へと売却される。肥育素牛は、殆どの場合において車両により輸送され、その飼養環境は輸送前後で大きく変化する。これらにより、肥育素牛は様々なストレスを受け健康に異常をきたすことも少なくない。特に輸送に関連する発熱、いわゆる輸送熱は、牛呼吸器病症候群（Bovine Respiratory Disease Complex：BRDC）の原因のひとつとして牛の成長を阻害する。さらには、重症肺炎や死廃用の原因となることもある重要な疾患である。また、死亡に至らなくとも長期間にわたる抗菌薬投与を余儀なくされたり、輸送熱を含む BRDC に伴う肺炎が完治しないままに飼養されたりして、その成長が著しく阻害される例も少なくない。さらに、場合によっては保菌牛となり周辺動物への感染源となり得る [11, 52]。これらのことから、肥育素牛の BRDC 治療状況を調査し、対策を講じることが重要であると考えられる。

いっぽう、人医療では呼吸器病の確定診断は X 線検査、CT 検査あるいは気管支鏡検査により行われる。特に、気管支鏡経由で気管支肺胞領域を洗浄する気管支肺胞洗浄（Bronchoalveolar lavage：BAL）は、同領域の細胞成分や液性成分の情報も得ることが可能な手技として、肺胞蛋白症をはじめとした肺疾患の確定診断に応用されている。獣医療域においても、馬では BAL により得られる気管支肺胞洗浄液（Bronchoalveolar lavage fluid：BALF）や、気管領域を洗浄して得られる気管吸引液（Tracheobronchial aspirate：TBA）を採取し、様々な解析により同領域の細胞成分や液性成分に関する情報を得ている [19, 20, 24]。

馬の輸送熱の発症率は比較的高く、死亡に至る症例も少なくなかったが、気管支鏡を用いた輸送熱の原因究明、治療法及び予防法に関する研究が多角的に行われた結果 [54]、輸送熱の原因菌が特定され、適切な対策を実施することにより輸送熱の発症率は著しく減少した [24]。また、輸送熱を予防するためにフルオロキノロン系抗菌薬の輸

送直前投与が有効であることも報告されている [12]. しかし、牛では BRDC の原因菌の特定が、鼻腔スワブあるいは死廃用となった肺炎罹患牛の剖検肺を用いて実施されてきたため [29, 31, 32, 48], BRDC の発症や病態悪化に強く関連する気管支肺胞領域の情報は極めて少ない [4, 5, 39]. そのため、輸送熱を含む BRDC の予防法や治療法が確立されているとはいえない. これらのことを解決するためには、牛においても BAL を実施し、気管支肺胞領域の情報を得ることが重要であると考えられる.

本研究では、市場から肥育農場へ導入後の肥育素牛の BRDC 治療状況を調査するとともに、導入肥育素牛に対して BAL を実施し BRDC の発症に関与する細菌を同定することを目的とした.

2. 材料と方法

1) BRDC 罹患状況及び治療状況の調査

宮崎市内の 1 肥育農場における肥育素牛導入状況について 2011 年 11 月から 2013 年 3 月までの間における宮崎中央市場からの導入状況及び治療状況の調査を行った。導入状況については農場台帳により、治療状況（治療頭数、治療率）については診療簿により抽出し算出した。また、一年を気象庁統計に準じて四季に分け呼吸器病発生傾向を調査した。すなわち、3 月から 5 月を春季、6 月から 8 月を夏季、9 月から 11 月を秋季及び 12 月から 2 月を冬季とした。

成績は平均値 ± 標準偏差で表記した。

2) 供試牛の身体検査と BRDC の発症に関与する細菌の同定

BRDC の発症に関与する細菌の特定のために、2013 年 12 月に同市場にて購買された肥育素牛 15 頭のうち体温 39.7°C 以上の発熱が認められた牛 3 頭及び非発熱牛から無作為に抽出した 3 頭を供試した。同様に 2014 年 3 月の同市場にて購買された肥育素牛 33 頭中体温 39.7°C 以上の発熱を認めた 3 頭及び非発熱牛から無作為に抽出した 5 頭を供試した。供試牛には輸送開始直前にヒストフィルス・ソムナスワクチン（京都微研牛ヘモフィルスワクチン-C，微生物化学研究所，京都）が接種されていたが，抗菌薬は投与されていなかった。

輸送には牛輸送用車両を用い，市場から農場への輸送時間は 0.5 時間であった。供試牛に対して，市場導入後 7 日目及び 9 日目に身体検査を実施するとともに，血液，鼻腔スワブ，TBA 及び BALF を採取し，各種検査に供した。身体検査では，動物用抗菌剤研究会作成の評価ガイドライン[9]を参考に，視診，体温，心拍数及び呼吸数を測定したのち聴診器により肺野聴診を実施することにより，臨床兆候が認められた牛を発熱牛とした。採血は，頸静脈から真空採血管（ベノジェクト II 真空採血管 VP-AS109K50，

VP-DK052K, テルモ, 東京) を用いて実施し, 動物用多項目自動血球計数装置 (pocH-100iV Diff, シスメックス, 兵庫) により白血球数, ヘマトクリット値及びヘモグロビン濃度を測定した.

鼻腔スワブ検体は, 消毒用エタノールに浸漬した綿花を用いて鼻孔周辺を清拭した後, 培養用綿棒 (BD BBL カルチャースワブ™プラス, 日本ベクトン・ディッキンソン, 東京) を可能な限り鼻腔内深部まで挿入し, スワブすることにより得た. BALF は, 非鎮静下でビデオスコープ (OLYMPUS VQ TYPE 5112B, オリンパス, 東京) を供試牛の鼻孔から挿入し, 以下の手順により採取した. まず, 鼻腔及び咽喉頭部を観察後, 塩酸リドカイン (キシロカイン注射液 2 %, アストラゼネカ, 大阪) による気道粘膜の表面麻酔を実施しながら気管, 気管支へと内視鏡を進めた. 我々が本調査の前から実施している肺炎発症牛を対象とした診療の実際において, 肺炎を発症している牛の殆どは中葉に病変を有していたことを踏まえ, 気管支鏡を肺の中葉領域へとつながる気管支に楔入後, 気管支内視鏡のチャンネルから 37 °C に加温した生理食塩水 30 ml を注入し, 即座に回収する方法を 2 回実施した. BALF は, 全量をプールして BALF 検体として供試した. また, BAL 後に 37 °C に加温した生理食塩水 30 ml を用いた気管洗浄により TBA を採取し TBA 検体とした. BALF 検体及び TBA 検体は, 採取した液のまま, 鼻腔スワブ検体は 300 µl の滅菌生理食塩水に懸濁した液体で細菌分離検査に供した. 細菌分離検査は, TBA 及び BALF を 5 %馬血液含有コロムビア寒天培地 (BA 培地) 及びマッコンキー寒天培地 (MAC 培地) に播種した. 播種された BA 培地は, 2 種類の培養法 (37 °C ; 5 % CO₂ 条件下, 及び嫌気条件下) で, MAC 培地は 1 種類の培養法 (37 °C ; 好気条件下) で 24 時間培養された. 培養後の BA 培地から細菌を分離し, 純培養後にグラム染色検査及び細菌同定検査 (飛行時間型質量分析法 : Time of Flight Mass Spectrometry : MALDI-TOF/MS 法) を実施し種を同定した. マイコプラズマ分離検査は, 鼻腔スワブ懸濁液, TBA 及び BALF をマイコプラズマ (NK) 平板培地

(マイコプラズマ NK 平板培地；関東化学) に塗布し，5 % CO₂ 条件下で 7 日間培養 (直接培養) するとともに，マイコプラズマ増菌培地 (マイコプラズマ NK 培地；関東化学) に播種し，37 °C，5 % CO₂ 条件下で 3～7 日間培養 (増菌培養) した．増菌培養液は，その後 1 白金耳をマイコプラズマ (NK) 平板培地に塗布し，炭酸ガス培養で 7 日間培養し，実体顕微鏡で観察した．目玉状のコロニーについては MALDI-TOF/MS 法及び LAMP 法 (Loop-Mediated Isothermal Amplification) [15]により種を同定した．なお本研究においては，*Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) ，*Pasteurella multocida* (*P. multocida*) ，*Histophilus somni* (*H. somni*) 及び *Mycoplasma* 属菌を分離・同定対象細菌とし，それ以外の細菌はその他細菌とした．

3. 成績

1) BRDC 罹患状況及び治療状況調査

調査した農場へは調査期間中、計 12 回、延べ 23 日の市場から合計 408 頭の肥育素牛が導入されていた。導入が最も多かったのは 2012 年 10 月 3 日の 32 頭であり、最少は 2013 年 3 月 17 日の 7 頭であった。

これら導入牛を対象に呼吸器疾患罹患状況は診療簿を集計したところ、導入後 2 週間以内に呼吸器病で治療された個体は 64 頭であった。それぞれの平均導入頭数は 1 開催日あたり 18 頭であり、平均治療頭数は 3 頭、平均発症率 15.2 %であった。導入後 2 週間以内の呼吸器病治療頭数は、最大で 2012 年 2 月 24 日と同年 3 月 19 日導入の 8 頭であった。2011 年 11 月 12 日及び 2012 年 8 月 21 日導入については 2 週間以内の呼吸器病治療はなかった。1 導入日における治療率をみると 2012 年 2 月 24 日導入で 42.1 %と最も高かった。四季それぞれでの導入頭数は春季で 134 頭、夏季で 33 頭、秋季で 76 頭及び冬季で 165 頭とばらつきが認められた [表 1]。導入後 2 週間以内の呼吸器病発生率は春季で 13.2 %、夏季で 8.8 %、秋季で 6.2 %及び冬季で 22.3 %であり、冬季で多くなる傾向が認められた。導入後 2 週間以内の呼吸器病発症に至る平均日数は春季で 8.0 ± 3.1 日、夏季で 11.0 ± 0.0 日、秋季で 12.2 ± 0.6 日及び冬季で 9.5 ± 3.0 日であり、春季で短くなる傾向が認められた [表 1]。

2) 供試牛の身体検査と BRDC の発症に関与する細菌の同定

2013 年 12 月の検査では、発熱牛 3 頭では鼻漏が認められ、異常呼吸音も聴取された。血液検査では、非発熱牛 1 頭において白血球数の増加 ($13,600 \text{ counts} / \mu\text{l}$) が認められたが、他は正常範囲であった。

2014年3月の検査では、発熱牛3頭では鼻漏が認められ、異常呼吸音も聴取された。血液検査では、非発熱牛1頭において白血球数の増加(12,700 counts / μ l)が観察されたが、他は正常範囲であった。

2013年12月の細菌分離検査では、発熱牛3頭のBALFから *M. haemolytica* (1頭: No. 1) , *P. multocida* (1頭: No. 2) 及び *H. somni* (1頭: No. 3) が分離された [表3]。非発熱牛3頭のBALFからは末梢血中白血球の増加が認められた1頭 (No. 4) から *P. multocida* が分離された。また、TBAからは、発熱牛で *M. haemolytica* (1頭: No.1) , *P. multocida* (2頭: No. 2, 3) が分離され、非発熱牛では、BALFの検査結果と同様に末梢血中白血球の増加を認めた1頭 (No.4) から *P. multocida* が分離された。なお、TBAからは発熱の有無に関わらず他の細菌も多種多数分離された。鼻腔スワブからも多種多数の細菌が分離されたが、子牛の肺炎主要原因菌としては *H. somni* (1頭: No.3) のみが発熱牛で分離された。いっぽう、*Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) は発熱牛及び非発熱牛において、それぞれ1頭及び3頭のTBAから分離されたが、鼻腔スワブ及びBALFからは分離されなかった [表2]。

2014年3月の細菌分離検査では、発熱牛3頭のBALFから、*M. haemolytica* (1頭: No. 3) , *P. multocida* (1頭: No. 1) が検出された。非発熱牛のBALFからは *P. multocida* (1頭: No. 6) が分離された。また、TBAから発熱牛で *M. haemolytica* (1頭: No. 3) , *P. multocida* (1頭: No. 1) が、非発熱牛で *M. haemolytica* (2頭: No. 5, 8) , *P. multocida* (4頭: No. 4-6, 8) が検出された。さらに他の細菌も多種多数分離された。鼻腔スワブからは発熱牛で *M. haemolytica* (1頭: No. 3) が、非発熱牛で *M. haemolytica* (4頭: No. 4, 6-8) , *P. multocida* (1頭: No. 7) 分離された。いっぽう、*M. bovis* は発熱牛1頭 (No. 3) , 非発熱牛2頭 (No. 4, 8) の計3頭においてTBAから、発熱牛1頭 (No. 2) において鼻腔スワブから分離されたが、BALFからは分離されなかった [表3]。

4. 考察

本研究は、市場から肥育農場への導入後の肥育素牛の BRDC 治療状況を調査するとともに、導入肥育素牛に対して BAL を実施し BRDC の発症に関与する細菌を特定することを目的として、導入後の牛の身体検査とともに、鼻腔スワブ、TBA 及び BALF を採取し細菌学的に解析した。

輸送熱を含む導入時の BRDC は輸送管理や群編成編、気象条件、飼養環境の変化をはじめとした要因がストレスとなり、ウィルスや細菌の感染の成立により発症するとされている [30] ことから、今回のように市場経由で導入される牛は出荷前農場での飼養環境等が同一ではなく、各導入時の各種要因が異なることが影響していると考えられた。呼吸器病発症調査において乙丸らは、呼吸器病の発生に大きな季節的变化はなかったと報告している [43]。いっぽう、秋季や冬季に多く発生するとの報告もある [22]。本研究では、冬季に発症が多くなる傾向が認められたことから、発症率が增加する時期の特定については、今後も継続的な調査が必要であると考えられた。

既報 [4, 5] によると臨床的に健康な牛であっても比較的高率に気管支肺胞領域から細菌が分離されている。本研究における 2013 年 12 月の調査では、導入後に BAL を実施した供試牛のうち発熱や呼吸器症状を示さない供試牛の気管支肺胞領域では細菌分離は 1 頭のみであったが、発熱を呈した供試牛 3 頭の気管支肺胞領域では全頭から肺炎の主要原因菌と考えられている *M. haemolytica*, *P. multocida* あるいは *H. somni* のいずれかが検出された。また、2014 年 3 月の調査においては発熱牛の BALF から *M. haemolytica*, *P. multocida* が、非発熱牛の BALF から *P. multocida* が分離された。これら 2 回の検査結果からは、輸送を伴う導入後に発熱や呼吸器症状を示す牛の気管支肺胞領域においては肺炎起因菌が非発熱牛と比較すると極めて高率に存在することが示されており、導入後の BRDC の予防や治療指針の決定に重要な情報であると考えられた。今回の調査では、発熱牛を含む全供試牛の BALF 中から *M. bovis* は分離されな

かった。しかし、*M. bovis* が BRDC の発症に大きく関与することが指摘されている [30]とともに、重症化した肺炎症例の BALF からは、牛の肺炎主要原因菌とともに *M. bovis* が分離される報告がある [55]。このことから本研究の供試牛が重症化しなかった理由として、気管支肺胞領域への *M. bovis* の感染がなかったことが大きく関与したものと推察された。

本研究のようにわずか 0.5 時間程度の輸送においても、農場から市場への輸送や集合、市場から購買農場への輸送や輸送後の飼養環境の変化が加わると病原微生物の気管支肺胞領域への侵入を許容する可能性が推察された。また、本研究では導入後 7 日目及び 9 日目に調査を行ったところ、BRDC 発症に関与する主要肺炎原因菌が感染していることが示されたが、これらは導入前から存在していたことも完全には否定できないことから感染時期の特定には輸送前の採材が必要であると考えられた。

本研究においては、輸送前の採材は不可能であったことから、輸送前に肺炎原因菌を既に保持していた可能性は完全には否定できないが、臨床的に健康な牛が市場に出荷されることから、市場への輸送、集合、再輸送及び飼養環境変化が肥育素牛に及ぼす影響は極めて大きいものと考えられた。さらに、本研究ではウィルスの検査を実施していないが、導入牛の発熱の原因のひとつとして、気管支肺胞領域への細菌感染が推察された。今後は、これらの情報を元に追加試験を実施し、輸送を伴う導入牛の損耗軽減法を確立することが重要であると考えられた。

5. 小括

市場導入肥育素牛の牛呼吸器病症候群の治療状況について診療簿を基に調査した。また、2013年と2014年にそれぞれ鼻腔スワブを採取するとともに、気管支肺胞洗浄を実施し気管支肺胞洗浄液及び気管洗浄液を得た。得られた鼻腔スワブ、気管支肺胞洗浄液、気管洗浄液を細菌学的に解析した。

調査期間中に408頭の肥育素牛が導入され、導入後2週間以内に治療された牛は64頭(15.7%)であった。治療頭数割合は冬季で多くなり、発症に至る日数は春季で短くなる傾向があった。気管支肺胞洗浄液からは、2013年の6頭による調査では非発熱供試牛(対照牛)では1頭のみから *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) が検出されたが、発熱供試牛(発熱牛)では全頭から *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*)、*P. multocida* あるいは *Histophilus somni* のいずれかが分離された。2014年の8頭による調査では、調査対象牛の1頭のみから *P. multocida* を検出し、発熱牛からは *M. haemolytica*、*P. multocida* を分離した。全供試牛から *Mycoplasma* 属細菌は分離されなかった。

これらの知見は、導入後に発熱を呈する牛の気管支肺胞領域に肺炎原因菌が存在することを示しており、治療方針の決定に重要であると考えられた。

表1 調査期間別の導入及びその後の呼吸器治療状況

	調査期間				合 計
	3～5月 (春季)	6～8月 (夏季)	9～11月 (秋季)	12月～翌年2月 (冬季)	
導入回数	8	2	4	9	23
導入頭数	134	33	76	165	408
治療頭数 (%)	19 (14.2)	3 (9.1)	6 (7.9)	36 (21.8)	64 (15.7)
発症までの日数	8.0 ± 3.1 [*]	11.0 ± 0.0	12.2 ± 0.6	9.5 ± 3.0	9.4 ± 3.2

*平均値 ± 標準偏差

表2 鼻腔スワブ、気管吸引液及び気管支肺胞洗浄液からの細菌分離結果（2013.12.11採材）

検 体	供試牛発熱の		細 菌				<i>M. bovis</i>	
	番号	有無	<i>M. haemolytica</i>	<i>P. multocida</i>	<i>H. somni</i>	その他	直接培養	増菌培養
鼻腔スワブ	1	有	-	-	-	> 5種類	-	-
	2	有	-	-	-	> 5種類	-	-
	3	有	-	-	+	> 5種類	-	-
	4	無	-	-	-	> 5種類	-	-
	5	無	-	-	-	> 5種類	-	-
	6	無	-	-	-	> 5種類	-	-
気管吸引液	1	有	+	-	-	> 5種類	-	-
	2	有	-	+	-	> 5種類	-	-
	3	有	-	+	-	> 5種類	-	+
	4	無	-	+	-	> 5種類	-	+
	5	無	-	-	-	> 5種類	-	+
	6	無	-	-	-	> 5種類	-	+
気管支肺胞洗浄液	1	有	+	-	-	-	-	-
	2	有	-	+	-	-	-	-
	3	有	-	-	+	-	-	-
	4	無	-	+	-	-	-	-
	5	無	-	-	-	-	-	-
	6	無	-	-	-	-	-	-

細菌名：Mannheimia haemolytica:M. haemolytica, Pasteurella multocida:P. multocida, Histophilus somni:H. somni
 +: 分離陽性, -: 分離陰性

表3 鼻腔スワブ, 気管吸引液及び気管支肺胞洗浄液からの細菌分離結果(2014.3.25採材)

検 体	供試牛 発熱の 番号 有無	細 菌				<i>M. bovis</i>		
		<i>M. haemolytica</i>	<i>P. multocida</i>	<i>H. somni</i>	その他	直接培養	増菌培養	
鼻腔スワブ	1	有	-	-	-	> 5種類	-	-
	2	有	-	-	-	> 5種類	-	+
	3	有	+	-	-	> 5種類	-	-
	4	無	+	-	-	> 5種類	-	-
	5	無	-	-	-	> 5種類	-	-
	6	無	+	-	-	> 5種類	-	-
	7	無	+	+	-	> 5種類	-	-
	8	無	+	-	-	> 5種類	-	-
気管吸引液	1	有	-	+	-	> 5種類	-	-
	2	有	-	-	-	> 5種類	-	-
	3	有	+	-	-	> 5種類	-	+
	4	無	-	+	-	> 5種類	-	+
	5	無	+	+	-	> 5種類	-	-
	6	無	-	+	-	> 5種類	-	-
	7	無	-	-	-	> 5種類	-	-
	8	無	+	+	-	> 5種類	-	+
気管支肺胞洗浄液	1	有	-	+	-	-	-	-
	2	有	-	-	-	-	-	-
	3	有	+	-	-	-	-	-
	4	無	-	-	-	-	-	-
	5	無	-	-	-	-	-	-
	6	無	-	+	-	-	-	-
	7	無	-	-	-	-	-	-
	8	無	-	-	-	-	-	-

細菌名:表3参照 +:分離陽性, -:分離陰性

第3章

マルボフロキサシンの牛気管支肺胞領域への移行性

1. 諸 言

子牛の呼吸器感染症は、子牛で最も多い疾病のひとつである。子牛の呼吸器感染症は主に、ウィルス、細菌、マイコプラズマによって引き起こされ [45, 46]、細菌及びマイコプラズマに起因する呼吸器感染症の治療には一般的に抗菌薬が使用される [16, 56]。

子牛の細菌性肺炎やマイコプラズマ性肺炎は、殆どの場合、肺胞腔内で炎症が引き起こされる肺胞性肺炎である [45, 46]。このことから、抗菌薬の気管支肺胞領域への移行性に関する情報は極めて重要であり、その情報を基に肺胞性肺炎治療における抗菌薬を選択することは、子牛の肺炎の早期治療に結びつくと考えられている。

マルボフロキサシン (MBFX) は新しいタイプのフルオロキノロン系の抗菌薬であり、日本では 2010 年から家畜の治療に広く活用されている [16, 35, 56]。対象菌種はグラム陰性菌、グラム陽性菌及びマイコプラズマとされており、これまで家畜においての使用報告が複数なされている [16, 35, 56]。

MBFX の薬剤体内動態については、犬において薬剤経口投与後の気管支肺胞領域への薬剤体内動態について報告されている [7]。牛においては、血液中の動態についての報告はあるが [3, 6, 34]、気管支肺胞領域の動態についてこれまで明らかにされていない。

本研究は、健康な子牛への MBFX 投与後の血液中及び BALF 中の MBFX の薬物動態を明らかにすることを目的とした。

2.材料と方法

1) 供試動物

臨床的に健康なホルスタイン種雄子牛 4 頭を 2 回の試験（雄；1 回目：4 週齢；体重 $53.9 \pm 2.9\text{kg}$ （平均値±標準偏差）：50.5～57.5 kg（範囲），2 回目：6 週齢；体重 $70.5 \pm 5.8\text{kg}$ ：62.5～76.5 kg）に供した．供試牛は食欲，活力があり，咳，発熱または呼吸数の異常を示していなかった．供試牛は鹿児島大学獣医学部の実験動物管理ガイドラインにより管理された．

2) 試験デザイン

子牛に MBFX（2 mg/kg B.W.マルボシル®10 %注射液，Meiji Seika ファルマ，東京，日本）を頸部筋肉内に投与した．体温，心拍数，呼吸数の測定を行い，末梢血の採取は頸静脈よりヘパリン処理チューブ（VP-H100K，テルモ，東京，日本），バキュテナーチューブ（VP-NA052K，テルモ）及び二カリウム含有エチレンジアミン四酢酸（EDTA-2AK）を用いて投与前，投与後 1，2，6 及び 24 時間後に実施した．また，BALF の採材も同採材時間で実施した．なお，同手順の試験が 2 週間後に同様に実施された．

3) 血液の分析

EDTA-2AK を含む血液は，自動血球計算機（Poch-100iV，シスメックス，神戸，日本）を用いて白血球（WBC），赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（Hgb）及びヘマトクリット値（HCT）測定が採取後 30 分以内実施された．血漿は遠心分離によってヘパリン処理したチューブに分離され分析まで $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存された．血漿中の尿素濃度は，既報に順じて市販の尿素測定キット（Quantichrom 尿素アッセイキット，バイ

オアッセイシステム，ハイワード，カリフォルニア州，米国）を用いて比色法により測定した [7, 35].

4) 気管支肺胞洗浄液検査

BAL は各供試子牛を保定後，フレキシブル電子内視鏡（VQ TYPE 6112B，先端部直径 5.5 mm，有効長 1.1m，オリンパス，東京，日本）を用いて 0（投与前），1，2，6 及び 24 時間後に実施した．フレキシブル電子内視鏡をアルコール綿花で清拭した鼻腔から挿入し，内視鏡内スプレーチューブを用いて上気道，気管支肺胞領域に 2 %リドカインを局所麻酔として使用し，気道粘膜の表面麻酔を行いながら内視鏡を進め，検査部位に楔入した．その後，37 °Cに加温した滅菌 0.9 %生理食塩水 30 ml を各葉に注入し，即座に回収する方法により BALF を得た．この手順を各葉について 2 回実施した．1 回目と 2 回目の BAL で得られた BALF の体積を測定した．BAL 実施部位は左右肺のそれぞれ 3 カ所の計 6 カ所（右中葉，右尾葉の 3 番目の細気管支，5 番目の細気管支の 5 つの細気管支及び右尾葉，左尾葉の 2 番目の細気管支，左尾側葉の 3 番目の細気管支及び左の 5 番目の細気管支）を選定し，同一子牛の同一試験において同一部位を洗浄しないように無作為に洗浄部位を決定した．BALF は冷蔵保存下で管理され，検査に供された．

BALF 検体は，回収量を計測後，遠心分離（400 g，5 分間，4 °C）により細胞成分と液性成分とに分離された．BALF の回収率は，回収量が注入量（30 ml）に占める割合として算出した．遠心分離により得た細胞成分は，生理食塩水で洗浄後，白血球数を計数し冷凍保存した（BALF 中細胞）．また，同液性成分（BALF 上清）は尿素濃度を血漿中尿素濃度と同様に測定後，冷凍保存された．

5) 抗菌薬濃度測定

MRFX 濃度は、高速液体クロマトグラフィー法により De Baere らによって報告された手順に準じて測定された [8]。血漿は蒸留水で 10 倍に希釈され、各 BALF 細胞ペレットを 0.5 ml の 1 mol 水酸化ナトリウムと混合して細胞を溶解した後、各サンプルを 1.0 ml の 3 %ギ酸で混和した。300 μ l の各サンプル（希釈血漿、BALF の上清及び溶解した BALF 細胞ペレット）を 60 μ l の内部標準（ロメフロキサシン、シグマアルドリッチ、東京、日本、1 %ギ酸 / メタノール中の 300 ng / ml (4 : 1)) 及び 60 μ l のメタノールで混和した。希釈したサンプル (350 μ l) を固相抽出カラム (Oasis HLB, Waters, 東京、日本) にロードし、残留物は 250 μ l の移動相に溶解しました。抽出物のアリコート (10 μ l) を High performance liquid chromatography (HPLC; Prominence, 島津、京都、日本) に注入した。

MBFX 濃度は、肺上皮内層液 (ELF) 及び BALF 中の肺胞細胞で測定した [12, 14]。ELF ($MBFX_{ELF}$) の MBFX の濃度は、次の計算式により求めた。

$$MBFX_{ELF} = MBFX_{BALF} \times urea_{PLASMA} / urea_{BALF}$$

すなわち、「ELF 中 MBFX 濃度=BALF 中 MBFX 濃度×血漿中尿素濃度/BALF 中尿素濃度」により算出した。

$MBFX_{BALF}$ は、BALF 中の MBFX 濃度を指し、 $urea_{PLASMA}$ は、血漿中の尿素濃度を示す。 $urea_{BALF}$ は BALF 中の尿素濃度を示す。

肺胞細胞 ($MBFX_{AC}$) の MBFX の濃度は次のように計算された：

$$MBFX_{AC} = AC_{PELLET} / V_{AC}$$

ACPELLET は、肺胞細胞ペレット中の MBFX 濃度を示し、VAC は、気管支肺胞洗浄液中細胞の平均体積を示す。

BALF 細胞中 MBFX 濃度は、過去の研究により $1.28 \mu\text{l} / 10^6$ 個の BALF 細胞として換算された [13, 15]。MBFX 投与後 24 時間までの血中濃度-時間曲線下面積 0-24

(Area under the curve : AUC_{0-24}) は、過去に Wang らによって報告された手順に基づいて計算した [60]。数値は、1 回目と 2 回目の合計値として示した。

6) 統計学的解析

データの統計学的解析は、分散分析（一元配置分散分析）を行った後、Tukey-Kramer 多重比較検定を使用して同じサンプリング時間で 3 種類の検体間の MBFX 濃度を比較した。すべての統計分析は、IBM SPSS Statistics 24 ソフトウェア（IBM, 東京, 日本）を使用し、危険度 5%未満を有意差ありとした。

3. 成績

試験実施中における臨床症状、直腸温、心拍数、呼吸数、末梢血中の WBC、RBC、Hgb 及び HCT に有意な変化は認めなかった。

血漿中 MBFX 濃度は、MBFX 投与 1 時間後において平均 2.02 µg/ml、2 時間後に 2.04 µg/ml、6 時間後に 1.25 µg/ml 及び 24 時間後に 0.27µg/ml を示した [図 1]。ELF 中 MBFX 濃度は、MBFX 投与 1 時間後において平均 2.37 µg/ml、2 時間後に 3.42 µg/ml、6 時間後に 1.76 µg/ml 及び 24 時間後に 0.39 µg/ml を示し、肺胞細胞中 MBFX 濃度は、MBFX 投与 1 時間後において平均 1.71 µg/ml、2 時間後に 2.02 µg/ml、6 時間後に 1.23 µg/ml 及び 24 時間後に 0.37 µg/ml を示した。ELF 中 MBFX 濃度と血漿中 MBFX 濃度との比率は、MBFX 投与後 2 時間において約 1.7 倍に達し有意に高値となった ($p < 0.05$)。血漿中、ELF 中及び肺胞細胞中の AUC_{0-24} は、それぞれ 21.3, 32.6 及び 23.0 µg-hr / ml であった[表 1]。これらの結果より ELF 中 AUC_{0-24} は、血漿中の AUC_{0-24} と比較して有意に高値であった ($p < 0.05$)。

4. 考 察

本研究における血漿中の MBFX 濃度の推移は既報 [3, 6, 35]と同程度のものであった。BALF 細胞中の MBFX 濃度は血漿中の MBFX 濃度とほぼ同様に推移した。いっぽう ELF 中の MBFX 濃度及び AUC₀₋₂₄は、血漿中濃度及び AUC₀₋₂₄と比較し高値であった。これらの結果により、子牛の筋肉内へ投与された MBFX は、気管支肺胞領域への移行が優れていることが示唆された。

抗菌薬がその効果を十分に発揮するためには、同様に標的細菌が感染している領域に抗菌薬が到達していることが重要であるとともに、病原微生物の最小発育阻止濃度 (MIC) を上回ることは必要不可欠であるとされている [33]。呼吸器病原因起菌である *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) , *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) , *Histophilus somni* (*H. somni*) 及び *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) における MBFX に対する MIC₉₀は、それぞれ 0.12, 0.25, 0.06 及び 2.00 µg/ml であると報告されている [33]。MBFX をはじめとしたフルオロキノロン系抗菌薬は、濃度依存型の抗菌薬である [51, 62]。したがって、AUC₀₋₂₄と MIC の比 (AUC / MIC) は、殺菌活性の指標として使用されている [47, 51, 57]。

ヒトの臨床試験と実験動物の感染モデルにおける報告では、一般的にフルオロキノロン系抗菌薬においては、AUC / MIC が 100–125 以上であると、治療効果が高いとされている [2, 10, 51, 57, 62]。本研究では、*P. multocida*, *M. haemolytica*, 及び *H. somni* の ELF における AUC / MIC, 及び *P. multocida* 及び *H. somni* の肺胞細胞における AUC / MIC は 125 を超えていた。いっぽう、*M. bovis* では ELF の AUC / MIC, *M. bovis* 及び *M. haemolytica* では肺胞細胞の AUC / MIC は 100 未満であった。炎症状態を示す呼吸器疾患の子牛においては、気管支肺胞領域における MBFX の分布は、今回の研究の数値よりも低い可能性がある。いっぽう、野外での呼吸器疾患の治療において MBFX の良好な治療効果が報告されている [16, 56]。

本研究では，健康な子牛への MBFX の筋肉内投与における気管支肺胞領域における MBFX の分布が明らかになった．今後は，呼吸器疾患のある子牛へ MBFX を投与した際の気管支肺胞領域における MBFX の分布を明らかにすることが必要であると考えられた．

5.小 括

マルボフロキサシン (MBFX) の子牛の気管支肺胞領域への移行性を明らかにすることを目的とした。臨床的に健康な 4 頭の子牛に MBFX を筋肉内に投与 (2 mg/kg) した。投与前, 投与 1 時間後, 2 時間後, 6 時間後及び 24 時間後に血液採取及び気管支肺胞洗浄を実施し, 得られた検体を MBFX 濃度及び尿素濃度測定用に供した。試験は, 2 週間後に同一子牛を用いて再度実施した。

検体は, 高速液体クロマトグラフィー法により MBFX 濃度を, バイオアッセイ法により尿素濃度を測定した。肺胞上皮被覆液 (ELF) 中の MBFX 濃度は, 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の MBFX 濃度に血漿中尿素濃度を乗じて BALF 中尿素濃度で除して求めた。

その結果, 投与後 2 時間後での ELF 中の MBFX 濃度は, 血漿及び BALF の細胞中濃度より有意に高かった ($p < 0.05$)。投与後 0~24 時間の時間枠で計算された MBFX 濃度曲線下平均面積においては, ELF 内の MBFX の濃度は, 血漿よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。

これらの結果から, 子牛の筋肉内に投与された MBFX は気管支肺胞領域へ良好に移行していることが明らかになった。

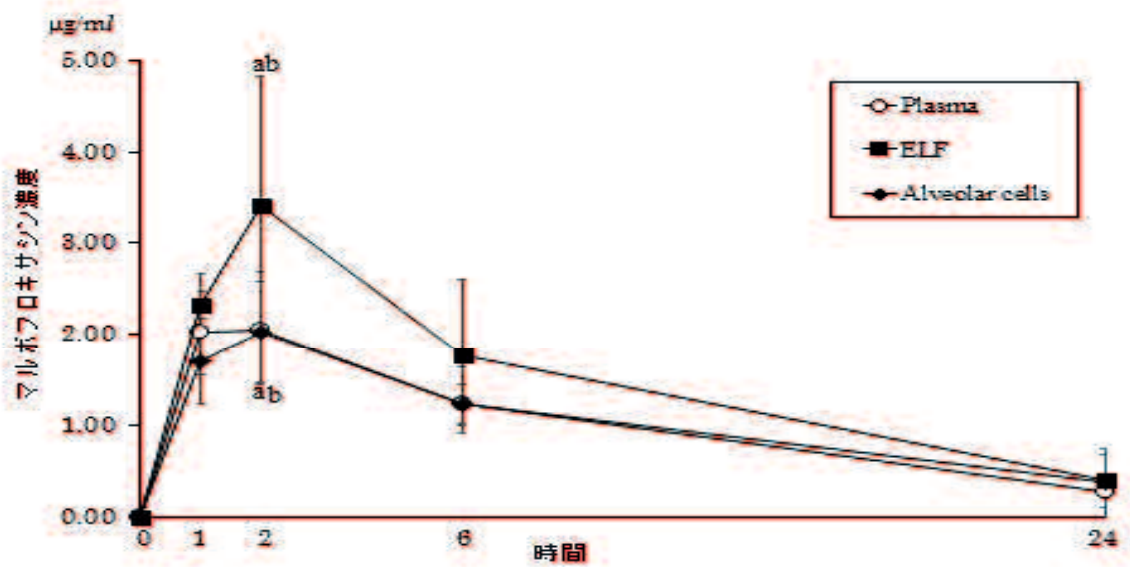


図 1. 血漿中, 肺胞上皮被覆液中および肺胞細胞中での筋肉内投与されたマルボフロキサシン濃度
 Plasma; 血漿 ELF; pulmonary epithelial lining fluid 肺胞被覆液 Alveolar cells; 肺胞細胞
 数値は, 平均値±標準偏差 検体採取時の同一符号は有意差を示す ($p < 0.05$).

表1 マルボフロキサシン筋肉内投与後0から24時間までの血中濃度－時間曲面下面積（AUC）値

測定箇所	単位	AUC ₀₋₂₄
血漿中	μg・hr/ml	21.29 ± 7.28 ^a
肺胞被覆液中	μg・hr/ml	32.57 ± 11.07 ^a
肺胞細胞中	μg・hr/ml	23.02 ± 4.51

数値は平均値±標準偏差
 同符号間で有意差あり（a: $p < 0.05$ ）

総括

日本における牛の飼養形態は、繁殖経営方式と肥育経営方式の 2 方式に大別され、それぞれの農場で特色を持つ。繁殖経営方式で生産、育成された牛は市場へと出荷される。市場で購買された牛は、肥育農場や別の繁殖農場へと移動が必要となり、車両を使用した輸送がなされる。輸送は近距離輸送であったり長距離輸送であったりするが、輸送が牛体へ与える影響は小さくない。

牛の呼吸器病、特に農場へ導入された牛の呼吸器病は、様々な外的要因が体内の浄化機構の低下や免疫機構の攪乱を引き起こし、ウィルスや鼻咽頭部の常在細菌が気管支肺胞領域へ侵入、定着することによって発症する。牛体に影響を及ぼす外的要因として、飼養環境の変化、給与飼料の変化、離乳、除角、牛の集合、離散をはじめとした要因が挙げられるが、特に輸送は大きな要因となり得る。輸送を伴って導入された牛の呼吸器病の病態を調査することは重要である。

細菌感染を原因とする牛呼吸器病の治療にあたっては、使用する抗菌薬の選択及び使用に関して慎重な注意が必要である。また、抗菌薬の使用にあたっては、十分な根拠をもとに使用する抗菌薬の選択が求められる。

本研究では、野外における導入牛の輸送が生体へ与える影響、特に長距離輸送が牛体に与える影響を調査した。また、導入後の呼吸器病の発生状況を調査し、導入後の牛に気管支内視鏡を用いて気管支肺胞洗浄液を得て、気管支肺胞領域における呼吸器病の発症に関連する細菌の存在を確認した。さらに近年、家畜においての使用が認められ広く臨床応用されているフルオロキノロン系抗菌薬であるマルボフロキサシンについての薬物体内動態について測定した。

第 1 章（黒毛和種育成雌牛における長距離・長時間輸送による体重及び血液性状の変化）においては、宮崎県から北海道へ長距離輸送を行った黒毛和種育成雌牛において、長距離輸送が牛に与える影響を明らかにするために、体重及び血液性状の変化を調査した。その結果、輸送後の体重は輸送前と比較して減少した。血液性状においては、輸送

後の赤血球数，ヘモグロビン濃度，ヘマトクリット値，平均赤血球ヘモグロビン濃度及び遊離脂肪酸濃度の上昇，ならびに総コレステロール濃度，血中尿素窒素濃度，グルコース濃度，アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性値，ビタミン A 濃度，マグネシウム濃度及び HDL コレステロール濃度の低下を認めた．以上のことから，黒毛和種育成雌牛の長距離・長時間輸送による体重の減少の要因の一つに，乾物摂取量及び飲水量の低下が関係していることが推察された．

第 2 章（市場導入肥育素牛における牛呼吸器病症候群の治療状況の調査並びに発症に関与する細菌の同定）においては，市場から肥育農場へ導入後の肥育素牛の BRDC 治療状況を調査するとともに，導入肥育素牛に対して BAL を実施し BRDC の発症に関与する細菌を同定する目的で，市場導入肥育素牛の牛呼吸器病症候群の治療状況を調査した．また鼻腔スワブ，気管洗浄液及び気管支肺胞洗浄液を採取し細菌学的に解析した．その結果，治療頭数の割合は冬季で多くなり，発症に至る日数は春季で短くなる傾向があった．気管支肺胞洗浄液からは，非発熱供試牛（対照牛）では *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) が検出されたが，発熱供試牛（発熱牛）では *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*)，*P. multocida* あるいは *Histophilus somni* (*H. somni*) のいずれかが分離された．2014 年の 8 頭による調査では，対照牛の 1 頭のみから *P. multocida* を検出し，発熱牛からは *M. haemolytica*，*P. multocida* を検出した．全供試牛から *Mycoplasma* 属菌は検出されなかった．

第 3 章（マルボフロキサシンの牛気管支肺胞領域への移行性）においては，牛におけるマルボフロキサシン投与後の気管支肺胞領域におけるマルボフロキサシン体内動態を明らかにすることを目的として採血及び気管支肺胞洗浄を実施した．その結果，血漿中，肺胞上皮被覆液（ELF）及び BALF 細胞中の MBFX 濃度は，いずれも MBFX 投与後 2 時間において高い値を示し，その後徐々に低下した．BALF 細胞中 MBFX 濃度と血漿中 MBFX 濃度は測定期間中，有意な差はなく同様な推移であった．ELF 中

MBFX 濃度は血漿中 MBFX 濃度と比較し、血中濃度-時間曲線下面積は有意に高い値を示した。これらの結果から、子牛に筋肉内投与された MBFX は気管支肺胞領域へ良好に移行していることが明らかとなった。

以上の本研究による成績から、長距離輸送が牛体に与える影響は体重の減少をはじめ、血液学的にも病的な影響を及ぼしていることが明らかとなった。また、農場へ導入された牛を用いた疾病発生状況調査によって治療頭数割合は冬季で多くなり、発症に至る日数は春季で短くなる傾向を認めた。さらに、農場への導入牛の気管支肺胞洗浄を用いた検査では、気管支肺胞領域に牛呼吸器病起因菌である *P. multocida*, *M. haemolytica*, 及び *H. somni* が検出確認された。いっぽう、フルオロキノロン系抗菌薬であるマルボフロキサシンの気管支肺胞領域への良好な移行が明らかとなった。

これらの結果は肥育農場へ導入された牛の牛呼吸器病の病態把握の根拠となるとともに、牛呼吸器病に対する治療法の一助となり得るものである。

要 旨

牛の呼吸器病，特に農場へ導入された牛の呼吸器病は，様々な外的要因が体内の浄化機構の低下や免疫機構の攪乱を引き起こし，ウィルスや鼻咽頭部の常在細菌が気管支肺胞領域へ侵入，定着することによって発症する．牛体に影響を及ぼす外的要因として，飼養環境の変化，給与飼料の変化，離乳，除角，牛の集合，離散をはじめとした要因が挙げられるが，特に輸送は大きな要因となり得る．輸送を伴って導入された牛の呼吸器病の病態を調査することは重要である．並びに，細菌感染を原因とする牛呼吸器病の治療にあたっては，使用する抗菌薬の選択及び使用に関して慎重な注意が必要である．また，抗菌薬の使用にあたっては，十分な根拠をもとに使用する抗菌薬の選択が求められる．

本研究では，野外における導入牛の輸送が生体に与える影響，特に長距離輸送が牛体に与える影響を調査した．また，導入後の呼吸器病の発生状況を調査し，導入後の牛に気管支内視鏡を用いて気管支肺胞洗浄液を得ることにより気管支肺胞領域における呼吸器病起因菌の存在を確認した．さらに近年，家畜においての使用が認められ広く臨床応用されているフルオロキノロン系の抗菌薬であるマルボフロキサシンについての薬物動態について調査した．

黒毛和種育成雌牛において，長距離・長時間輸送の影響を調査した．黒毛和種育成雌牛 10 頭を用い，家畜輸送専用車で宮崎県から北海道まで，2,078 km（陸路 1,130 km，海路 948 km）を 62 時間かけて長距離輸送し，輸送前後における体重及び血液性状を測定した．輸送前の体重は 283.5 ± 29.6 kg（平均値 \pm 標準偏差）で，輸送後は 256.2 ± 26.5 kg と有意に減少した（ $p < 0.001$ ）．輸送前に対する輸送後の体重の平均減少率は 9.6 ± 1.3 %（7.0～11.0 %）であり，10 頭すべての個体で体重の減少が認められた．血液性状においては，輸送後の赤血球，ヘモグロビン濃度，ヘマトクリット値，平均赤血球ヘモグロビン濃度及び遊離脂肪酸濃度の有意な上昇，並びに総コレステロール濃度，血中尿素窒素濃度，グルコース濃度，アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ

活性値，ビタミン A 濃度，マグネシウム濃度及び HDL コレステロール濃度の有意な低下 ($p < 0.05$) を認めた．血液性状の変化より，輸送中に乾物摂取量の低下による摂取エネルギーの不足及び飲水量の不足が生じていると考えられた．以上のことから，黒毛和種育成雌牛の長距離・長時間輸送による体重の減少の要因の一つに，乾物摂取量及び飲水量の低下が関係していることが考えられた．

市場導入肥育素牛の牛呼吸器病症候群の治療状況を調査した．また，気管支肺胞洗浄液，気管洗浄液，鼻腔スワブを採取し細菌学的に解析した．調査期間中に 408 頭の肥育素牛が導入され，導入後 2 週間以内に治療された牛は 64 頭であった．治療頭数割合は冬季で多くなり，発症に至る日数は春季で短くなる傾向があった．気管支肺胞洗浄液からは，2013 年の 6 頭による調査では非発熱供試牛（対象牛）では 1 頭のみから *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) が検出されたが，発熱供試牛（発熱牛）では全頭から *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) ， *P. multocida* あるいは *Histophilus somni* のいずれかが分離された．2014 年の 8 頭による調査では，調査対象牛の 1 頭のみから *P. multocida* を検出し，発熱牛からは *M. haemolytica*， *P. multocida* を検出した．全供試牛から *Mycoplasma* 属菌は検出されなかった．これらの知見は，導入後に発熱を呈する牛の気管支肺胞領域に肺炎原因菌が存在することを示しており，治療指針の決定に重要であると考えられた．

マルボフロキサシン (MBFX) の子牛の気管支肺胞領域への移行性を明らかにすることを目的に研究を実施した．臨床的に健康な 4 頭の子牛に MBFX を筋肉内に投与 (2 mg/kg) し，投与前，投与 1 時間後，2 時間後，6 時間後及び 24 時間後に採血及び気管支肺胞洗浄を実施し MBFX 濃度を測定した．試験は，2 週間後に同一子牛を用いて再度実施した．その結果，投与後 2 時間後での肺胞上皮被覆液 (ELF) 中の MBFX 濃度は，血漿及び気管支肺胞洗浄液 (BALF) の細胞中濃度より有意に高かった ($p < 0.05$) ．投与後 0～24 時間の時間枠で計算された MBFX 濃度曲線下平均面積において

は、ELF 内の MBFX の濃度は、血漿よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。これらの結果から、子牛の筋肉内に投与された MBFX は気管支肺胞領域へ良好に移行していることが明らかにされた。

以上の結果は肥育農場へ導入された牛の牛呼吸器病の病態把握の根拠となるとともに、牛呼吸器病に対する治療法の一助となり得るものである。

英文要旨

Bovine respiratory disease (BRD) is a threat to cattle, especially those introduced to farms. BRD emerges as viruses and bacteria resident in the nasopharynx invade and colonize the alveolar region after extrinsic factors reduce the animal's capability to eliminate pathogens from the body and disrupt its immune system. Although changes in feed and feeding environment, weaning, dehorning, and herd round-up and dispersal are often among the first factors to be cited, transportation has the potential to be a major extrinsic factor affecting cows physically. Cattle being transported for introduction to a new farm are thus clearly an important population for research on BRD pathology. Furthermore, the selection and use of antibacterial agents targeting BRD also necessitate careful attention, and should be determined based on a sufficient body of evidence.

Accordingly, in this study, we set out to investigate the physical (Experiment-1) and BRD-related (Experiment-2) effects of transportation on field-grazed cattle being introduced to a new farm, and distribution of an anti-bacterial agent to the bronchoalveolar region (Experiment-3). Experiment-1 involved a focus on cattle undergoing long-range transportation. Experiment-2 involved determining the post-introduction BRD rate, and testing transported cattle for BRD-inducing bacteria with analysis of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) obtained by bronchoendoscopy. Experiment-3 involved investigating the pharmacokinetics of marbofloxacin, a fluoroquinolone antibacterial drug that has been approved for use in livestock and has been widely used clinically in recent years.

In Experiment-1, we targeted ten Japanese Black heifers transported 2,078 km (1,130 km by road and 947 km by ferry) from Miyazaki to Hokkaido over 62 hours on a cattle transport vehicle, for measurements of body weight and hematological and serum biochemical parameters. Post-transportation, the cows showed significantly increased mean body weight [post- vs. pre (mean \pm standard deviation):

283.5 ± 29.6 kg vs. 256.2 ± 26.5 kg (p<0.001; mean increase: 9.6%)], and significantly increased red blood cell count, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular hemoglobin, and serum nonesterified fatty acid (p<0.05). Conversely, these cows showed significantly decreased serum levels of total cholesterol, blood urea nitrogen, glucose, aspartate aminotransferase, vitamin A, magnesium, and high-density lipoprotein cholesterol (p<0.05). These findings indicate insufficient nutrient intake and dehydration. Accordingly, we suggest that decreased body weight after transportation could be related to decreased dry matter and water intakes.

In Experiment 2, we targeted 488 head of fattening cattle introduced to a farm after purchase at market between 2011 and 2013 for an investigation of BRD morbidity and treatment (based on treatment records, and bacteriological analysis of BALF, tracheal lavage fluid, and nasal swabs). Sixty-four animals required treatment for BRD in the two weeks following introduction to the farm, and were designated as febrile; the other animals were designated as non-febrile controls. The number of cows requiring treatment tended to be greater in winter, and the time to symptom onset (number of days) was shorter in spring. Bacteriological examinations revealed BRD pathogens—*Mannheimia haemolytica* (*Mh*), *Pasteurella multocida* (*Pm*), and/or *Histophilus somni*—in all febrile steers, but in only one non-febrile control (that showed cough and runny nose and had *Mh*) in December 2013. Further examinations in March 2014 revealed *Pm* or *Mh* in some febrile steers, but *Pm* in only one non-febrile steer. All samples were negative for *Mycoplasma spp.* We demonstrated the presence of pneumonia-inducing microbes in the bronchoalveolar region of cattle that developed post-transportation BRD, illustrating the importance of prevention and treatment measures for steers introduced from market.

In Experiment 3, we targeted four clinically healthy calves intramuscularly injected with a single dose of marbofloxacin (MBFX; 2 mg/kg), to investigate distribution of the drug to the bronchoalveolar region. Plasma and BALF samples were obtained for each calf at 0 (before administration), and 1, 2, 6 and 24 hr after injection of MBFX. The injection-and-sample-collection procedure was repeated after two weeks. MBFX concentrations were significantly higher in pulmonary epithelial lining fluid (ELF) than in plasma and alveolar cells at 2 hr after injection ($p < 0.05$). The mean area under the MBFX concentration vs time (0 to 24 hr) curve (AUC_{0-24}) was significantly greater for pulmonary ELF than plasma ($p < 0.05$). Our findings suggest that intramuscularly injected MBFX was well distributed to the bronchoalveolar region.

謝 辭

本博士論文は、筆者が山口大学大学院連合獣医学研究科臨床獣医学専攻に在学中に行った研究をまとめたものである。ご指導ご鞭撻頂いた鹿児島大学帆保誠二教授，鹿児島大学三角一浩教授，鳥取大学原田和記准教授に深謝いたします。また，本論文の内容，及び実験指導など鹿児島大学助教の石川慎吾博士，鹿児島大学准教の乙丸孝之介博士にご指導いただきました。心より感謝申し上げます。

今回の調査を行うにあたり，全面的にご協力いただきました宮崎中央農業協同組合畜産部，購買者，及び輸送先で採材にご協力いただいた北海道石狩家畜保健衛生所の横井佳寿美獣医師及び所員の皆様に深謝いたします。また，大学院生，所属組織獣医師と職員の協力に感謝いたします。最後に妻，子供をはじめとする家族の協力に対して心から感謝します。

引用文献

- [1] Adachi, K., Fukumoto, K., Nomura, Y., Katsura, N., Arikawa, A., Tsuji, A. and Onimaru, T. 1998. Significant decrease of serum Vitamin A level in Japanese Black beef steers after introduction to a farm. *J. Vet. Med. Sci.* **60**: 101-102.
- [2] Aliabadi, F. S. and Lees, P. 2000. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimization. *Int. J. Antimicrob. Agents* **14**: 307-313.
- [3] Aliabadi, F. S. and Lees, P. 2002. Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamics integration of marbofloxacin in calf serum, exudate and transudate. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **25**: 161-174.
- [4] Allen, J. W., Viel, L., Bateman, K. G., Rosendal, S., Shewen, P. E. and Physick-Sheard, P. 1991. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Can. J. Vet. Res.* **55**: 341-346.
- [5] Angen, O., Thomse, J., Larse, L. E., Larsen, J., Kokotovic, B., Heegaard, P. M. and Enemark, J. M. 2009. Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Vet. Microbiol.* **28**: 165-171.
- [6] Belew, S., Kim, J. W., Hossain, M. A., Park, J. Y., Lee, S. J., Park, Y. S., Suh, J. W., Kim, J. C. and Park, S. C. 2015. Pharmacokinetics of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administration in Hanwoo, Korean native cattle. *J. Vet. Med. Sci.* **77**: 327-329.
- [7] Boothe, H. W., Jones, S. A., Wilkie, W. S., Boeckh, A., Stenstrom, K. K. and Boothe, D. M. 2005. Evaluation of the concentration of marbofloxacin in alveolar macrophages and pulmonary epithelial lining fluid after administration in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **66**: 1770-1774.

- [8] De Baere, S., Goossens, J., Osselaere, A., Devreese, M., Vandenbroucke, V., de backer, P. and Croubels, S. 2011. Quantitative determination of T-2 toxin, deoxynivalenol and deepoxy-deoxynivalenol in animal body fluids using LC-MS/MS detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **879**: 2403-2415.
- [9] 動物用抗菌剤研究会. 2013. 牛の細菌性肺炎を適応症とする動物用抗菌性物質製剤の臨床試験実施基準. 動物用抗菌会報. **35**: 104-110.
- [10] Drusano, G. L., Johnson, D. E., Rosen, M. and Standiford, H. C. 1993. Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of *Pseudomonas* sepsis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 483-490.
- [11] Duff, G. C., Galyean, M. L. 2007. Board-invited review: Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* **85**: 823-840.
- [12] Endo, Y., Ishizawa, Y., Arima, D., Mae, N., Iwamoto, Y., Korosue, K., Tsuzuki, N. and Hobo, S. 2017. Effects of pre-shipment enrofloxacin administration on fever and blood properties in adult Thoroughbred racehorses transported a long distance. *J. Vet. Med. Sci.* **79**: 464-466.
- [13] Giguere, S., Huang, R., Malinski, T. J., Dorr, P. M., Tessman, R. K. and Somerville, B. A. 2011. Disposition of gamithromycin in plasma, pulmonary epithelial lining fluid, bronchoalveolar cells, and lung tissue in cattle. *Am. J. Vet. Res.* **72**: 326-330.
- [14] Gonzalez, L. A., Schwartzkopf-genswein, K. S., Bryan, M., Silasi, R. and Brown, F. 2012. Factors affecting body weight loss during commercial long haul transport of cattle in North America. *J. Anim. Sci.* **90**: 3630-3639.

- [15] Gotfried, M. H., Danziger, L. H. and Rodvold, K. A. 2001. Steadstate plasma and intrapulmonary concentrations of levofloxacin and ciprofloxacin in healthy adult subjects. *Chest*. **119**: 1114-1122.
- [16] Grandemange, E., Fournel, S., Giboin, H. and Woehrle, F. 2012. Efficacy of a single injection of marbofloxacin in the treatment of bovine respiratory disease. *Revue. Med. Vet.* **163**: 287-294.
- [17] Griffin, D.1997. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **13**: 367-377.
- [18] Higa, Y., Uemura, R., Goto, S., Goto, Y. and Seyoshi, M. 2016. An improved loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Mycoplasma bovis*. *J. Vet. Med. Sci.* **78(8)**: 1343-1346.
- [19] Hobo, S., Oikawa, M., Kuwano, A., Yoshida, K. and Yoshihara, T. 1997. Effect of transportation on the composition of bronchoalveolar lavage fluid obtained from horses. *Am. J. Vet. Res.* **58**: 531-534.
- [20] Hobo, S., Yoshihara, T., Oikawa, M., and Jones, J, H. 2001. Surfactant proteins in bronchoalveolar lavage fluid of horses : assay technique and changes following road transport. *Vet Rec.* **148**: 74-80.
- [21] 生田健太郎, 岡田啓二, 佐藤繁, 安田準. 2010. 暑熱が泌乳牛の血液成分値に及ぼす影響. 産業動物臨床医誌. **1** : 190-196.
- [22] Irwin, M. R., McConnell, S., Coleman, J,D. and Wilcox, G. E.1979. Bovine respiratory disease complex: a comparison of potential predisposing and etiologic factors in Australia and the United States. *J Am Vet Med Assoc.* **175**: 1095-1099.
- [23] Ishiwata, T., Uetake, K., Eguchi, Y. and Tanaka, T. 2007. Transport stress resistance of steers reared in different management systems. *Animal behavior and Management.* **43**: 164-173.

- [24] 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. *J. Vet. Med. Sci.* **63**: 1263-1269.
- [25] 獣医内科学アカデミー編. 2014. 臨床検査項目の基準範囲. 獣医内科学. **2** 版. 385-389. 文永堂出版. 東京
- [26] 家畜共済事業報告書. 2017. 宮崎県農業共済組合連合会資料
- [27] 家畜共済における臨床病理検査要領. 2005. 86-90. 農林水産省経営局. 東京
- [28] 家畜共済における臨床病理検査要領. 2005. 103. 農林水産省経営局. 東京
- [29] 加藤敏英, 小屋正人, 渡辺栄次, 酒井淳一, 小形芳美, 曳沼 徹. 1996. 肺炎罹患牛の鼻汁由来細菌及びマイコプラズマの薬剤感受性. 日獣会誌, **49**: 81-84.
- [30] 加藤敏英, 齊藤雅一, 庄司和明, 板垣昌志. 2012. *Pasteurella multocida* および *Mycoplasma* が関与した導入牛の呼吸器病に対するエンロフロキサシンとチルミコシンの予防効果. 日獣会誌. **56**: 7-11.
- [31] 加藤敏英, 遠藤 洋, 酒井淳一. 2013. 健康肥育牛の鼻汁から分離された *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* 及び *Ureaplasma diversum* の薬剤感受性. 日獣会誌. **66**: 852-858.
- [32] 小池新平, 井上恭一, 米山州二, 市川 優, 田島和彦. 2009. 栃木県で過去 16 年間に分離された牛呼吸器病原菌の薬剤感受性. 日獣会誌. **62**: 533-537.
- [33] Kroemer, S, Galland, D., Guerin-Faublee, V., Giboin, H. and Woehrle-Fontaine, F. 2012. Survey of marbofloxacin susceptibility of bacteria isolated from cattle with respiratory disease and mastitis in Europe. *Vet. Rec.* **170**: 53.
- [34] Luders, C., Baroni, E.E., Rubio, S., De Lucas, J.J., Diaz, D.C. and San Andres, M.I. 2012. Pharmacokinetic behavior and pharmacokinetic/pharmacodynamic indices of marbofloxacin after intravenous, subcutaneous, and intramuscular

- administrations in buffalo calves (<10 days old). *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **35**: 301-314.
- [35] Mark, G. 2016. Saunders handbook of veterinary drugs: small and large animal. 4th ed., Elsevier Saunders, Philadelphia.
- [36] McKellar, Q., Gibson, I., Monteiro, A. and Bregante, M. 1999. Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in plasma, inflammatory exudate, and bronchial secretions of calves following subcutaneous administration. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1988-1992.
- [37] 宮崎県, 宮崎県畜産協会. 2015. 宮崎県の肉用子牛平成 26 年度, 63-69, 宮崎県.
- [38] 三角一浩, 新里健, 青木修, 瀬戸山健太郎, 三浦直樹, 柳田宏一, 坂本紘. 肉用牛の輸送ストレスに対する削蹄の効果. 2001. 日獣会誌. **54**: 837-840
- [39] Mohammadi, G. R., Nazifi, S., Rezakhani, A. and Esmailnejad, Z. 2007. Effect of transportation stress on blood and bronchoalveolar lavage fluid components in calves. *Comp. Clin. Pathol.* **16**: 85-95.
- [40] 農林水産省大臣官房統計部. 2014. 農林水産統計 (畜産統計) 平成 26 年. 7-8, 28-40. 農林水産省. 東京
- [41] 農林水産省大臣官房統計部. 2018. 農林水産統計 (畜産統計) 平成 30 年. 農林水産省. <http://www.maff.go.jp/i/tokei/kouhyou/tikusan/index.html>
- [42] 大津昇三, 中村松夫, 阿久沢栄一. 1987. 黒毛和種未経産牛の血中遊離脂肪酸と繁殖性に及ぼす絶食の影響. 家畜繁殖学誌. **33**: 105-108.
- [43] 乙丸孝之介, 久保田整, 大塚浩通, 安藤貴朗, 小岩正照. 2012. 黒毛和種導入子牛に対する *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* 混合不活化ワクチンの呼吸器病予防効果. 日獣会誌. **65**: 767-770.
- [44] 乙丸孝之助. 育成牛におけるワクチネーションによる呼吸器病対策. 家畜感染症学会誌. Vol2: **3**, 105-110.

- [45] Pardon, B., De Bleecker, K., Dewulf, J., Boyen, F., Catry, B. and Deprez, P. 2011. Prevalence of respiratory pathogens in diseased, non-vaccinated, routinely medicated veal calves. *Vet. Rec.* **169**: 278.
- [46] Patrick, R. L. 2009. A dairy producer's view of respiratory disease. *Anim. Health Res. Rev.* **10**: 111-112.
- [47] Paulin, A., Schneider, M., Dron, F. and Woehrle, F. 2018. Pharmacokinetic/pharmacodynamics evaluation of marbofloxacin as a single injection for Pasteurellaceae respiratory infections in cattle using population pharmacokinetics and Monte Carlo simulations. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **41**: 39-50
- [48] Portis, E., Lindeman, C., Johansen, L. and Stoltman, G. 2012. A ten-year (2000-2009) study of antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex – *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni* – in the United States and Canada. *J. Vet. Diagn. Invest.* **24**: 932-944.
- [49] Roger, J. P., Anthony, W. C. 2010. Pathogenesis and Pathology of Bovine Pneumonia. *Vet. Clin. Food Anim.* **26**: 191-214.
- [50] 齊藤隆夫, 高橋覚志, 岩間永子, 小川慎吾, 堀越忠泰, 合原義人. 2010. 肉用子牛のストレス軽減による市場性向上試験, 茨城県畜産センター研報, 27-30.
- [51] Schentag, J. J. 2000. Clinical pharmacology of the fluoroquinolones: studies in human dynamic/kinetic models. *Clin. Infect. Dis.* **31** Suppl 2. 40-44.
- [52] Snowder, G. D., Van, Vleck, L. D., Cundiff, L.V., Bennett, G. L. 2006. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors, *J. Anim. Sci.* **84**: 1999-2008.
- [53] 鈴木保宣. 2013. 乳牛の移行期の栄養管理と繁殖. 日獣会誌. **66**: 689-695.

- [54] Takizawa, Y., Hobo, S., Yamauchi, J., Uamae, 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.
- [55] Thomas, A., Bal,l H., Dizier, I., Trolin, A., Bell, C., Mainil, J. and Lindon, A. 2002. Isolation of mycoplasma species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. *Vet. Rec.* **151**: 472-476.
- [56] Thomas, E., Caldow, G. L., Borell, D. and Davot, J. L. 2001. A field comparison of the efficacy and tolerance of marbofloxacin in the treatment of bovine respiratory disease. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **24**: 353-358.
- [57] Thomas, J. K., Forrest, A., Bhavnani, S. M., Hyyatt, J. M., Cheng, A., Ballow, C. H. and Schentag, J. J. 1998. Pharmacodynamic evaluation of factors associated with development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 521-527.
- [58] 植竹勝治, 田中智夫, 安部直重, 江口祐輔, 2005. 広域輸送される肥育素牛のストレスおよび動物福祉レベルの評価. 麻布大学雑誌. **11・12**: 146-048.
- [59] 植竹勝治, 石渡俊江, 江口祐輔, 田中智夫, 佐藤衆介. 2008. 輸送牛の家畜福祉. 畜産の研究. **62**: 70-86
- [60] Wang, Z., Kim, S., Quinney, S. K., Zhou, J. and Li, L. 2010. Non-compartment model to compartment model pharmacokinetics transformation meta-analysis a multivariate nonlinear mixed model. *BMC Syst. Biol.* **4**: Suppl 1: S8.
- [61] Warriss, P. D., Brown, S. N., Knowles, T. G., Kestin, S. C., Edwards, J. E., Dolan, S. K. and Philips, A. J. 1995. Effects on cattle of transport by road for up to 15hours, *Vet. Rec.* **136**: 319-323.

- [62] Wright, D. H., Brown, G. H., Peterson, M. L. and Rotschafer, J. C. 2000. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *J. Antimicrob. Chemoter.* **46**: 669-683.