

重症慢性肺炎罹患牛の気管支肺胞洗浄液からの細菌
分離と薬剤感受性ならびに抗菌薬の気管支肺胞領域に
おける薬物動態に関する研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

藏前 哲郎

2021年3月

目 次

主な略号一覧	p. 6
緒 論	p. 8
第1章 重症慢性肺炎罹患牛の気管支肺胞洗浄液からの細菌分離と薬剤感受性	p. 12
1. 緒言	p. 13
2. 材料及び方法	
1) 供試牛及び検査	p. 14
2) 身体検査	p. 14
3) 血液検査	p. 14
4) 鼻咽頭スワブ及び BALF の採材	p. 14
5) 細菌分離検査	p. 15
6) マイコプラズマ分離検査	p. 15
7) 薬剤感受性検査	p. 16
3. 結果	p. 17
4. 考察	p. 19
5. 小括	p. 21

第 2 章 皮下投与されたエンロフロキサシンの健康子牛血漿及び気管支肺胞領域における薬物動態	p. 27
1. 緒言	p. 28
2. 材料と方法	p. 30
1) 供試動物	p. 30
2) 試験デザイン	p. 30
3) 血液の採取及び分析	p. 30
4) 気管支肺胞洗浄液検査	p. 31
5) 抗菌薬濃度測定	p. 31
6) PK パラメータ	p. 32
7) 統計学的解析	p. 33
3. 結果	p. 34
4. 考察	p. 36
5. 小括	p. 40
総 括	p. 46
要 旨	p. 50
英文要旨	p. 54

謝 辞	p. 57
引用文献	p. 59

主な略号一覧

ABPC	Ampicillin
AMPC	Amoxicillin
AUC	Area Under the concentration-time Curve
AUMC	Area Under the first moment Curve
BAL	Bronchoalveolar lavage
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid
BRDC	Bovine Respiratory Disease Complex
BUN	Blood Urea Nitrogen
Cmax	Peak concentration
CTC	Chlortetracycline
ELF	Epithelial lining fluid
ERFX	Enrofloxacin
FF	Florfenicol
Hct	Hematocrit
Hgb	Hemoglobin
<i>H. somni</i>	<i>Histophilus somni</i>
KM	Kanamycin
<i>M. haemolytica</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
<i>M. bovis</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>
MBFX	Marbofloxacin
MRT	Mean Residence Time
OBFX	Orbifloxacin
PK	Pharmacokinetics
PD	Pharmacodynamics
<i>P. multocida</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
RBC	Red Blood Cell

SD	Standard Deviation
Swab	Nasopharyngeal swab
t1/2	elimination half-time
TIL	Tilmicosin
TP	Thiamphenicol
TYL	Tylosin
Tmax	Time to Cmax
WBC	White blood Cell

緒 論

牛の呼吸器病症候群（Bovine Respiratory Disease Complex : BRDC）は、ウイルスや細菌（マイコプラズマ属細菌を含む）をはじめとした病原性微生物の感染や、様々な外的要因（飼養環境の変化、給与飼料の変化、離乳、除角、牛の集合及び離散）が、体内のクリアランス機構を低下させたり、免疫機構の攪乱を引き起こしたりした結果、ウイルスや鼻咽頭部に存在する細菌が気管支肺胞領域へ侵入、感染することによって発症するとされている[48]。近年の農場の飼養形態は多頭数飼育が一般的であり[41]、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。結果的に、治療対象頭数が増加したり、治療期間が長期化したりすることも多く、ひいては死亡・廃用事故へとつながることもあるため、その経済的な損失は計り知れない。

2017年度の農林水産省・家畜共済統計表―農業災害補償制度家畜共済統計表によると子牛肺炎の病傷件数は153,188頭であり、死亡・廃用頭数は5,716頭であった。病傷件数に対する死亡・廃用率は3.7%にも達している[14]。昨今の畜産業界における抗菌薬の利用や普及にも関わらず、未だ罹患率や死廃率の高い疾患の一つに挙げられ、多大な経済的損失を招いている。

牛呼吸器病の治療において、細菌感染症の治療手段として抗菌薬は非常に有効であることが広く知られている。抗菌薬の選択及び使用には慎重な判断が必要であり、科学的根拠に基づいて抗菌薬を選択することが重要である。一方、原因細菌の耐性化や多剤耐性菌の出現により、抗菌薬による治療効果の低下が懸念されており、食の安心・安全への不信感や、ヒト医療への影響を含めた問題がとりただされている。このことを解決するためには、抗菌薬に対する病原性細菌の耐性化を防ぐ観点から、家畜への抗菌薬投与を必要最小限とすることも重要である。

獣医療において最も重要な感染症の一つである細菌性肺炎やマイコプラズマ性肺炎の多くは肺胞性肺炎であるため[5]、全身投与した抗菌薬が効果を発揮するためには、効率的に気管支肺胞領域に移行することが重要である。しかし抗菌薬の種類によっては全身循環から気管支肺胞領域へ移行しないものや、不良なものも少なくな

い。このことを解決するためには、気管支肺胞領域への移行性の良好な抗菌薬を選択することが必要である。また、投与量、投与期間及び投与方法により効果が異なる可能性があることも考慮する必要がある。

一方、抗菌薬を効率的に使用するために考え出されたのが PK/PD パラメータである。PK とは薬物動態 (pharmacokinetics : PK) を意味し、抗菌薬の用法・用量と体内での濃度推移 (吸収, 分布, 代謝及び排泄) の関係を表す。

抗菌薬は、感染領域において目標とする薬物濃度が得られなければならない。そこで、PK の指標には Cmax (最高血中濃度) , AUC (Area Under the concentration-time curve ; 濃度-時間曲線下面積) , t1/2 (消失半減期) をはじめとした指標が用いられる。また、PD とは薬力学 (Pharmacodynamics : PD) を意味し、抗菌薬の生体内での濃度と作用 (有用性と副作用) の関係を表す。PD の指標には、抗菌力の指標である MIC (Minimum Inhibitory Concentration ; 最小発育阻止濃度) が用いられる。この 2 つの指標を組み合わせたものが PK/PD パラメータとして使用されている [54]。ヒト医療では、PK/PD パラメータを考慮した抗菌薬療法が実施されており、効果的かつ効率的な治療効果が得られることが期待されている。このような実績を受けて、獣医療にも同様の考え方が取り入れられはじめている [19, 36, 43, 45]。

牛肺炎の抗菌薬療法においては、臨床経験に基づく知見や鼻咽頭スワブ (Nasopharyngeal swab : Swab) を用いた細菌学的解析により得られた情報に基づいて抗菌薬が選択されたされることが多い [31, 32, 35, 46]。しかし健常子牛の気道においても、鼻腔領域、咽頭領域及び気管には様々な細菌が恒常的に存在することは一般的には知られている [12, 31-33, 35, 39, 46]。肺炎罹患牛の Swab を用いた細菌学的解析により得られた結果が、肺炎罹患領域の情報を正確に反映しているかは疑問である。

一方、気管支肺胞洗浄 (Bronchoalveolar lavage : BAL) は、気管支肺胞領域の様々な情報をダイレクトに得る手法として人医療、馬医療及び小動物医療において実施されている。特に馬医療においては、肺炎原因菌の特定に留まらず肺炎の治療

を目的とした BAL が臨床応用され、良好な臨床成績をあげている [23, 28]。しかし、馬以外の大動物の BAL に関する報告は極めて少ないため [1, 2]、同一牛の鼻咽頭領域内及び気管支肺胞領域内からの細菌分離に関する情報は殆ど見あたらない。

以上の問題点を解決するために、本研究では以下の 2 章において研究を実施した。

第 1 章では、南九州地域において臨床的に肺炎と診断され、初診から 1 ヶ月以上の肺炎に対する治療によっても良化しなかった黒毛和種牛（重症慢性肺炎罹患牛）から、Swab と気管支肺胞洗浄液（Bronchoalveolar lavage fluid : BALF）を採取し、肺炎に関連する細菌分離を行うとともに、その薬剤感受性を明らかにした。

第 2 章では、第 1 章の薬剤感受性に関する結果から、細菌性肺炎の治療に有効であると考えられたフルオロキノロン系抗菌薬のひとつであるエンロフロキサシン（ERFX）を全身投与した際の、血漿中及び気管支肺胞領域における ERFX と ERFX の代謝産物であるシプロフロキサシン（CPFX）の動態を解析した。

第1章

重症慢性肺炎罹患牛の気管支肺胞洗浄液からの 細菌分離と薬剤感受性

1. 緒言

子牛の肺炎は、その成長に多大な影響を及ぼすばかりかその生命をも奪いかねない重要な疾患であり、経済的な損失も極めて大きい[20, 51]。牛肺炎の抗菌薬療法においては、臨床経験に基づく知見や鼻咽頭スワブ (Nasopharyngeal swab : Swab) を用いた細菌分離検査結果により得られた情報により抗菌薬が選択されることが多い[31, 32, 35, 46]。しかし、健常子牛の気道においても、鼻腔領域、咽頭領域及び気管には様々な細菌が恒常的に存在することは一般的に知られていることから[12, 31-33, 35, 39, 46]、肺炎罹患牛の Swab を用いた細菌分離検査により分離された細菌が、肺炎罹患領域の情報を正確に反映しているかは疑問である。

一方、気管支肺胞洗浄 (Bronchoalveolar lavage : BAL) は、気管支肺胞領域の様々な情報をダイレクトに得る手法として人医療、馬医療及び小動物医療において実施されている。特に馬医療においては、肺炎原因菌の特定に留まらず肺炎の治療を目的とした BAL が臨床応用され、良好な臨床成績をあげている[22, 28]。しかし、馬以外の大動物の BAL に関する報告は極めて少ないため[1, 2]、同一牛の鼻咽頭領域内及び気管支肺胞領域内からの細菌分離に関する情報は殆ど見あたらない。

本研究では、南九州において臨床的に肺炎と診断され、初診から 1 ヶ月以上の肺炎に対する治療によっても良化しなかった黒毛和種牛 (重症慢性肺炎罹患牛) から Swab と気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid : BALF) を採取し、肺炎に関連する細菌の分離とともに、その薬剤感受性を明らかにすることを目的とした。

2. 材料及び方法

本研究は、鹿児島大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

1) 供試牛及び検査

南九州（鹿児島県，宮崎県，熊本県）において，臨床経験が豊富な獣医師により主に臨床症状及び身体検査から肺炎と診断され，家畜共済の診療指針に則った治療を初診時から1ヶ月間以上実施しても終診に至らなかった黒毛和種牛50頭（重症慢性肺炎罹患牛；雄あるいは去勢29頭，雌21頭；月齢 5.3 ± 2.2 （平均値 \pm 標準偏差）カ月；範囲3～13ヶ月）を供試し，身体検査，血液検査，Swab及びBALFの細菌学的検査を実施した。

2) 身体検査

身体検査では，聴診による心拍数及び呼吸数の計数，水銀体温計による直腸温測定及び胸部聴診を実施した。

3) 血液検査

血液は，供試子牛の頸静脈から真空採血管（ベノジェット，テルモ，東京）を用いて採取した。得られた血液は血液自動分析装置（pocH®-100iV Diff，Sysmex，兵庫）により白血球数（WBC），赤血球数（RBC），ヘモグロビン濃度（Hgb）及びヘマトクリット値（Ht）を測定した。

4) 鼻咽頭スワブ及びBALFの採材

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，滅菌綿棒（メンテック 病院用綿棒 1P3005，日本綿棒，東京）を常法に従い鼻咽頭部まで挿入し，スワブすることによりSwabを得た。続いて，内視鏡を用いたBALFの採取を既報[14]を参考に実施した。すなわち，非鎮静下で内視鏡（OLYMPUS VQ TYPE 5112B，オリンパス，東京）を鼻孔から挿入し，鼻腔及び咽喉頭部を観察後，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

施しながら気管支へと内視鏡を進めた。その後、内視鏡を滲出液が観察される肺葉（主に中葉あるいは副葉に楔入。一部症例で左前葉前部あるいは左前葉後部に楔入）へとつながる気管支へ進め、気管支直径約 5.5 mm の気管支に楔入した。楔入部位の脱気後、37 °C に加温した滅菌生理食塩水 30 ml を気管支鏡の鉗子孔から注入し、即座に回収した。同操作を計 2 回実施し、混和したものを BALF 検体とした。得られた検体は冷蔵状態で検査室へ搬送し、検体採取後 4 時間以内に細菌分離検査に供した。

Swab 及び BALF の細菌学的検査：Swab は 300 μ l の滅菌生理食塩水に懸濁後、細菌分離検査に供した。

5) 細菌分離検査

馬脱繊維素血液を 5 % 含有するコロンビア寒天培地（BA 培地；BBL Columbia Agar Base, 日本ベクトン・ディッキンソン, 東京）及びマッコンキー寒天培地（MAC 培地；MacConkey 寒天培地「ニッスイ」, 日水製薬, 東京）を用いて常法[15]により実施した。Swab 及び BALF を各培地に定量（1 培地あたり 50 μ l 及び 0.5 μ l）を接種した。接種された BA 培地は 2 種類の培養法（37 °C, 5 % CO₂ 条件下；37 °C, 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計：MALDI-TOF/MS；autoflex speed TOF/TOF-KG, Bruker Daltonics, U.S.A.）を実施した。

6) マイコプラズマ分離検査

細菌分離検査と同じ検体をマイコプラズマ分離用寒天培地（マイコプラズマ(NK)寒天生培地, 関東化学, 東京）に塗布し、同培地の操作手順通りに培養（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）に接種し、同増菌培地の操作手順通りに培養（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分離用寒天培地に塗布後、同培地の操作手順通りに

培養し、実体顕微鏡で観察した。培地上の目玉状のコロニーについては、MALDI-TOF/MS を用いて同定した。なお本研究においては、主要肺炎原因菌であるとされる *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* 及び *Mycoplasma* 属細菌を分離・同定対象細菌とし、それ以外の細菌はその他細菌とした。

7) 薬剤感受性試験

BALF から分離された *P. multocida* 22 株及び *M. bovis* 25 株について、既報[3, 6]に準じた微量液体希釈法あるいは寒天平板培地希釈法により実施した。すなわち、*P. multocida* は馬脱繊維素血液を 5 %含有するミューラーヒントン寒天平板希釈法（抗菌薬濃度：8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）により、*M. bovis* については、微量液体希釈法（抗菌薬濃度：16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）により、各細菌の発育を 50 %あるいは 90 %阻止する最小発育阻止濃度（それぞれ MIC₅₀, MIC₉₀）を検査した。供試薬剤は、アモキシリン（AMPC）、アンピシリン（ABPC）、チアンフェニコール（TP）、フロルフエニコール（FF）、タイロシン（TYL）、チルミコシン（TIL）、カナマイシン（KM）、オキシテトラサイクリン（OTC）、クロルテトラサイクリン（CTC）、エンロフロキサシン（ERFX）、マルボフロキサシン（MRFX）及びオルビフロキサシン（ORFX）の 12 薬剤とした。

さらに、鼻咽頭スワブから分離された細菌については、純培養され、かつ同一供試牛の BALF でも同種の細菌が分離された *P. multocida* 14 株（供試牛 No. 5, 10, 16, 17, 18, 22, 24, 25, 30, 35, 38, 45, 47 及び 48）及び *M. bovis* 12 株（供試牛 No. 7, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 27, 32, 38 及び 48）について、同様に薬剤感受性試験を実施した。

成績の表記：データの一部は、平均値 \pm 標準偏差で示した。

3. 結 果

身体検査：供試牛全頭で、心拍数、呼吸数及び体温の上昇が認められ、胸部聴診により異常呼吸音が聴取されたことから肺炎の病態が継続しているものと診断された（表1）。

血液検査：血液検査では、WBCが高値（ $12,200 \pm 4,804 / \mu l$ ）を示したが、RBC、Hgb及びHtは概ね健常牛の値に近似していた（表1）。

細菌学的検査：BALF及び鼻咽頭スワブの細菌学的検査では、主要肺炎原因菌をはじめ多数の細菌が分離された（表2）。BALF及び鼻咽頭スワブからの主要肺炎原因菌の分離割合は*P. multocida*が鼻咽頭スワブ50検体中25検体（50.0%）及びBALF50検体中22検体（44.0%）から、*M. haemolytica*が50検体中1検体（2.0%）から分離された（表2）。また、*M. bovis*は鼻咽頭スワブ50検体中16検体（32.0%）及びBALF50検体中50検体（100%）から分離された。鼻咽頭スワブからは*M. haemolytica*及び*H. somni*の分離はなかったが、その他細菌も一部分離された。一方、BALFからは、*H. somni*の分離及びその他細菌の分離はなかった（表2）。

同一牛において鼻咽頭スワブ及びBALFの両検体から同一細菌種が分離された割合（分離陽性一致率）は、両検体のいずれか、あるいは両検体ともに分離陽性であった検体のうち*P. multocida*では42.4%（33頭中14頭）、*M. haemolytica* 0.0%（1頭中0頭）、*M. bovis*では32.0%（50頭中16頭）であった（表2）。

薬剤感受性試験：BALFから分離された*P. multocida*及び*M. bovis*の薬剤感受性試験結果からは、同2菌種ともにMIC₉₀はフルオロキノロン系抗菌薬（エンロフロキサシン、マルボフロキサシン及びオルビフロキサシン）では1 $\mu g/ml$ 以下であったが、他の抗菌薬では比較的高かった（表3）。

一方、同一供試牛の Swab 及び BALF から分離された細菌の薬剤感受性は、採材部位により異なっていた。すなわち、Swab から分離された *P. multocida* 及び *M. bovis* の MIC はフルオロキノロン系抗菌薬を含めた供試抗菌薬全てにおいて高値であったが、同一供試牛の BALF から分離された同 2 菌種ともに、フルオロキノロン系抗菌薬（エンロフロキサシン、マルボフロキサシン及びオルビフロキサシン）の MIC₉₀ は 1 μ g/ml 以下であった（表 4, 5）。

4. 考 察

従来、肺炎原因菌の分離は、主に鼻汁や Swab の細菌学的検索により行われてきた [3-9] が、鼻腔や鼻咽頭には健常時でも細菌が存在することから、分離されてきた細菌が肺炎原因菌であると断定することは一般的に困難である。また、気管カテーテルを用いた簡易な BAL から得られた検体を解析した報告 [2, 12] もあるが、盲目的にカテーテルを挿入していることから、鼻腔や鼻咽頭も含めどの部位から採材しているか不明である。そのため、肺炎に関与している細菌が分離されているかは不明である。いずれにしても、重症慢性肺炎罹患牛の BALF を内視鏡下で採取し、細菌学的に解析した報告は見当たらない。そこで本研究では、南九州で飼養される重症慢性肺炎罹患牛の BALF を鼻咽頭スワブとともに検査し、肺炎に関与する細菌及びその薬剤感受性を調査した。

子牛の肺炎の多くは、ウイルス、*P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* 及び *M. bovis* が複雑に絡み合って発症すると報告されている [51, 40, 12, 39]。しかし、本研究における BALF からの細菌分離は、*P. multocida* と *M. bovis* が主体であり、*M. haemolytica* 及び *H. somni* は殆ど分離されなかった。このことは、供試した重症慢性肺炎罹患牛が 1 ヶ月以上の長期間にわたって、様々な抗菌薬で治療されてきたことや採材した地域が関連したのかもしれないが、詳細は明らかにすることはできなかった。しかし、*M. bovis* が供試牛から採取した BALF の 100 % から、*P. multocida* が同 44.0 % から分離されたことは、これら細菌が肺炎の重症化や慢性化に強く関与している可能性が示されたので、今後も引き続き調査することが重要であると考えられた。

薬剤感受性試験の結果からは、Swab から分離された *P. multocida* 及び *M. bovis* の MIC は、フルオロキノロン系抗菌薬を含む多くの抗菌薬で高値であったが、BALF から分離された同 2 菌種の MIC はフルオロキノロン系抗菌薬においては低値であった。このことは、同一供試牛から分離された同一菌種の細菌であっても、細菌株もしくは薬剤感受性が異なる可能性を示している。本研究では、分離細菌株の遺伝学

的な検査は実施していないため、このことを明らかにすることはできなかったが、Swab による肺炎原因菌の推定には慎重を要するものと思われた。

本研究により、南九州における重症慢性肺炎罹患牛の BALF からは *P. multocida* 及び *M. bovis* が高率に分離され、これら細菌にはフルオロキノロン系抗菌薬が主に感受性であることが示された。一方、限られたサンプル数であったが、Swab と BALF から分離された *P. multocida* 及び *M. bovis* の薬剤感受性がそれぞれ異なっていたことは、薬剤選択時に考慮することが重要であると考えられた。今後は、南九州以外の地域における調査を行うとともに、肺炎罹患牛の初期病態を BAL により解明することが重要であると考えられた。

5. 小 括

本研究では、臨床的に重症慢性肺炎と診断された黒毛和種牛 50 頭から鼻咽頭スワブ (Swab) 及び気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、細菌分離とともに、その薬剤感受性を調査した。Swab 及び BALF からは主に *Mycoplasma bovis* 及び *Pasteurella multocida* が分離されたが、同一牛において両検体から同一細菌種が分離された割合は比較的低かった。また、BALF から分離された *M. bovis* 及び *P. multocida* は、主にフルオロキノロン系抗菌薬に感受性であったが、Swab から分離された同 2 菌種の同系抗菌薬に対する薬剤感受性は低かった。以上より、重症慢性肺炎罹患牛の鼻咽頭領域及び気管支肺胞領域からは、主に *M. bovis* 及び *P. multocida* が分離されるが、同一菌種であっても採材部位によって薬剤感受性が異なる可能性があることから、Swab による肺炎原因菌の推定には慎重を要するものと思われた。

表1 供試肺炎罹患子牛の身体検査及び末梢血液検査結果

	心拍数	呼吸数	直腸温	白血球数	赤血球数	ヘモグロビン濃度	ヘマトクリット値
	回/分	回/分	°C	/ μ l	$\times 10^3$ / μ l	g/dl	%
平均値±標準偏差	82±7	81±8	39.5±0.3	12,200±4,804	1,221±171	12.8±2.1	42.7±7.9
範囲（最小値～最大値）	70～90	60～90	38.9～40.0	6,900～24,000	835～1,461	8.5～16.4	28.6～53.5
中央値	84	84	39.4	11,400	1,260	13.1	44.5

表2 供試肺炎罹患子牛50頭の鼻咽頭スワブ及び気管支肺胞洗浄液からの主要肺炎原因菌の分離結果

供試牛番号	<i>Pasteurella multocida</i>		<i>Mannheimia haemolytica</i>		<i>Histophilus somni</i>		<i>Mycoplasma bovis</i>	
	鼻咽頭スワブ	BALF	鼻咽頭スワブ	BALF	鼻咽頭スワブ	BALF	鼻咽頭スワブ	BALF
1	-	-	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	-	-	+
3	-	+	-	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	-	-	-	+
5	+	+	-	-	-	-	-	+
6	-	-	-	-	-	-	-	+
7	+	-	-	-	-	-	+	+
8	-	+	-	-	-	-	-	+
9	-	+	-	+	-	-	-	+
10	+	+	-	-	-	-	-	+
11	-	+	-	-	-	-	+	+
12	-	+	-	-	-	-	-	+
13	-	-	-	-	-	-	+	+
14	-	-	-	-	-	-	+	+
15	-	-	-	-	-	-	-	+
16	+	+	-	-	-	-	+	+
17	+	+	-	-	-	-	+	+
18	+	+	-	-	-	-	+	+
19	-	-	-	-	-	-	-	+
20	-	-	-	-	-	-	+	+
21	+	-	-	-	-	-	-	+
22	+	+	-	-	-	-	-	+
23	+	-	-	-	-	-	-	+
24	+	+	-	-	-	-	-	+
25	+	+	-	-	-	-	-	+
26	-	-	-	-	-	-	-	+
27	-	-	-	-	-	-	+	+
28	-	-	-	-	-	-	-	+
29	+	-	-	-	-	-	-	+
30	+	+	-	-	-	-	-	+
31	-	-	-	-	-	-	-	+
32	+	-	-	-	-	-	+	+
33	-	+	-	-	-	-	-	+
34	-	+	-	-	-	-	-	+
35	+	+	-	-	-	-	-	+
36	+	-	-	-	-	-	-	+
37	+	-	-	-	-	-	-	+
38	+	+	-	-	-	-	+	+
39	-	+	-	-	-	-	+	+
40	-	-	-	-	-	-	-	+
41	-	-	-	-	-	-	-	+
42	-	-	-	-	-	-	+	+
43	-	-	-	-	-	-	-	+
44	+	-	-	-	-	-	-	+
45	+	+	-	-	-	-	-	+
46	+	-	-	-	-	-	-	+
47	+	+	-	-	-	-	-	+
48	+	+	-	-	-	-	+	+
49	+	-	-	-	-	-	+	+
50	+	-	-	-	-	-	+	+

+ : 分離陽性, - : 分離陰性

表3 気管支肺胞洗浄液から分離された*Pasteurella multocida* 及び*Mycoplasma bovis* の薬剤感受性試験結果

抗菌薬名	略号	<i>Pasteurella multocida</i> (22株)			<i>Mycoplasma bovis</i> (25株)		
		範囲	MIC ₅₀	MIC ₉₀	範囲	MIC ₅₀	MIC ₉₀
アモキシシリン	AMPC	≦0.25~>8	>8	>8	16~>16	>16	>16
アンピシリン	ABPC	≦0.25~>8	0.5	8	16~>16	>16	>16
チアンフェニコール	TP	≦0.25~>8	2	>8	1~>16	4	16
フロルフェニコール	FF	≦0.25~>8	0.5	>8	0.25~>16	4	8
タイロシン	TYL	8~>8	>8	>8	0.125~>16	8	>16
チルミコシン	TIL	≦0.25~>8	4	>8	4~>16	>16	>16
カナマイシン	KM	4~>8	>8	>8	0.125~>16	4	16
オキシテトラサイクリン	OTC	4~>8	>8	>8	0.5~>16	>16	>16
クロルテトラサイクリン	CTC	1~>8	>8	>8	0.25~>16	8	>16
エンロフロキサシン	ERFX	≦0.25~1	0.5	1	≦0.125~2	0.5	1
マルボフロキサシン	MRFX	≦0.25~1	0.5	1	≦0.125~2	0.5	1
オルビフロキサシン	OBFX	≦0.25~1	0.5	1	≦0.125~2	0.5	1

単位 : $\mu\text{g/ml}$

表4 同一供試肺炎罹患子牛14頭の鼻咽頭スワブ及び気管支肺胞洗浄液から分離された*Pasteurella multocida* の最小発育阻止濃度(MIC)

抗菌薬	略語	鼻咽頭スワブ			気管支肺胞洗浄液		
		範囲	MIC ₅₀	MIC ₉₀	範囲	MIC ₅₀	MIC ₉₀
アモキシシリン	AMPC	1~>8	>8	>8	≦0.25~>8	>8	>8
アンピシリン	ABPC	1~>8	8	>8	≦0.25~>8	0.5	4
チアンフェニコール	TP	2~>8	8	>8	0.5~>8	2	>8
フロルフェニコール	FF	2~>8	4	8	≦0.25~>8	0.5	>8
タイロシン	TYL	8~>8	>8	>8	8~>8	>8	>8
チルミコシン	TIL	8~>8	>8	>8	0.5~>8	4	>8
カナマイシン	KM	8~>8	>8	>8	8~>8	>8	>8
オキシテトラサイクリン	OTC	2~>8	8	>8	4~>8	>8	>8
クロルテトラサイクリン	CTC	4~>8	8	>8	2~>8	>8	>8
エンロフロキサシン	ERFX	2~>8	8	>8	≦0.25~1	0.5	1
マルボフロキサシン	MRFX	2~>8	8	>8	≦0.25~1	0.5	1
オルビフロキサシン	OBFX	2~>8	8	>8	≦0.25~1	0.5	1

単位：μg/ml

表5 同一供試肺炎罹患子牛12頭の鼻咽頭スワブ及び気管支肺胞洗浄液から分離された*Mycoplasma bovis*の最小発育阻止濃度(MIC)

抗菌薬	略語	鼻咽頭スワブ			気管支肺胞洗浄液		
		範囲	MIC ₅₀	MIC ₉₀	範囲	MIC ₅₀	MIC ₉₀
アモキシシリン	AMPC	16~>16	>16	>16	16~>16	>16	>16
アンピシリン	ABPC	16~>16	>16	>16	>16	>16	>16
チアンフェニコール	TP	2~>16	8	16	1~16	4	16
フロルフェニコール	FF	2~>16	4	16	0.5~8	2	8
タイロシン	TYL	8~16	16	16	1~8	8	8
チルミコシン	TIL	8~>16	>16	>16	4~>16	>16	>16
カナマイシン	KM	8~>16	>16	>16	1~>16	4	16
オキシテトラサイクリン	OTC	2~>16	8	16	0.5~>16	4	16
クロルテトラサイクリン	CTC	4~16	8	16	0.25~16	8	16
エンロフロキサシン	ERFX	4~16	8	8	≦0.125~1	0.25	0.5
マルボフロキサシン	MRFX	8~16	16	16	≦0.125~1	0.5	1
オルビフロキサシン	OBFX	8~>16	16	>16	≦0.125~1	0.5	1

単位 : $\mu\text{g}/\text{ml}$

第2章

皮下投与されたエンロフロキサシンの健常子牛血漿
及び気管支肺胞領域における薬物動態

1. 緒 言

子牛の細菌性肺炎やマイコプラズマ性肺炎は、その成長や生命に多大な影響を及ぼすことから、獣医療において最も重要な感染症の一つである[5]。子牛の肺炎の多くは肺胞性肺炎であるため[5]、全身投与された抗菌薬が効果を発揮するためには、効率的に気管支肺胞領域へ移行することが重要である。しかし抗菌薬の種類によっては、全身循環から気管支肺胞領域へ移行しないものや移行性が悪いものも少なくない。そのため、肺胞性肺炎の治療にあたっては、気管支肺胞領域への移行性の良好な抗菌薬を選択することが重要である。

エンロフロキサシン (ERFX) は、フルオロキノロン系抗菌薬の代表的な位置づけのもと広く臨床応用されており、ウシの各種組織への移行性については数多くの報告がある[8, 27, 34, 47]。それら報告の中では、肺炎原因菌の MIC 以上の濃度の ERFX が肺組織にも分布することが確認されている[34, 47]。しかし、体内にありながら外界にも直接通じる気管支肺胞領域への移行性については十分な情報がない。

ERFX は、一般的に牛呼吸器疾患に関連する病原体に対する広域スペクトルの抗菌活性を有するフルオロキノロン系抗菌薬である[8, 27, 34, 47]。しかし、ERFX が肺胞性肺炎に対して有効な治療法であるか否かを判断するには、その薬物動態及び肺胞内分布を明らかにする必要がある。さらに、標的とする病原性細菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) 以上の肺胞内濃度に達することが必須条件である [34, 47]。

著者らは、健康な子牛に対して ERFX を皮下投与し、その前後に採取した血液及び BALF サンプルの解析により、血漿中、肺胞上皮被覆液 (ELF) 及び気管支肺胞洗浄液中細胞 (Alveolar cells) の ERFX 濃度分布を報告した[42]。しかし、当該報告では短期間のみの ERFX 濃度分布を調査し、ERFX 濃度分布の過程を詳細に明らかにすることはできなかった。そこで本研究では、ERFX の子牛気管支肺胞領域への経時的な移行性を気管支肺胞洗浄法 (BAL) により得られる気管支肺胞洗浄液 (BALF) を解析することにより明らかにすることを目的とした。また、薬物動態 (PK) 分析では、

各サンプルの血漿中の ERFX とその代謝産物であるシプロフロキサシン (CPFX) の ELF 及び肺胞細胞への分布を解析した。

2. 材料と方法

1) 供試動物

本研究には、臨床的に健康な 4 頭のホルスタイン種牛（雄；5 週齢；体重：63.8 ± 5.2 kg（平均値 ± 標準偏差））を供した。本研究は、鹿児島大学動物実験委員会によって承認され、供試牛は鹿児島大学共同獣医学部附属動物実験施設（AAALAC 認証取得）の SOP に従って実施した。

2) 試験デザイン

子牛の頸部に ERFX（5 mg/kg B.W. バイトリル 5 %注射液，バイエル薬品，東京，日本）を皮下投与した。ERFX の投与前（0 時間）及び投与後 1，2，3，6，10 及び 24 時間目に身体検査（体温，心拍数及び呼吸数）とともに，血液採取を実施した。また，BALF の採取を ERFX 投与前（0 時間），投与後 2，6，10 及び 24 時間目に非鎮静下で，身体検査及び血液採取の直後に実施した。

3) 血液採取及び分析

血液採取は，頸静脈よりヘパリン含有採血管（VP-H100K，テルモ，東京，日本）及び二カリウム含有エチレンジアミン四酢酸（EDTA）含有採血管（EDTA-2AK，テルモ）を用いて実施した。

ヘパリン含有採血管の遠心分離（3,000 g，15 分間，4 °C）により血漿を得，分析まで -80 °C で保存した。EDTA 含有採血管により得た血液は，自動血球計算機（pocH-100iV，シスメックス，神戸，日本）を用いて白血球数（WBC），赤血球数（RBC），ヘモグロビン濃度（Hgb）及びヘマトクリット値（HCT）を測定に供した。

血漿中尿素濃度は，尿素濃度測定キット（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 [3, 38]。

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 1.1 m, オリンパス, 東京, 日本) を用いて実施した。フレキシブル電子内視鏡をアルコール含有綿花で清拭した鼻腔から挿入し、無作為に選択した採材部位に楔入した。その後、37 °C に加温した滅菌生理食塩水 30 mL を採材部位に注入し、即座に回収する方法により BALF を得た。この手順を各肺葉について 2 回実施した。1 回目と 2 回目の BAL で得られた BALF の容積を測定した。BAL 実施部位は左右肺のそれぞれ 3 カ所の計 6 カ所 (中葉, 右後葉の吻側から 3 番目と 5 番目の細気管支, 左後葉の吻側から 2 番目, 3 番目, 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

ERFX 濃度及び CPFX 濃度は、既報 [9, 42] に準じて、タンデム質量分析 (LC/MS/MS) を用いた高速液体クロマトグラフィーにて測定した。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/L 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) にロードした。残留物

は250 μ lの移動相に溶解した。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。ERFX と CPFX の検出限界はともに0.001 μ g/mlであった。

ERFX 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, 13]. ELF (ERFX_{ELF}) の ERFX の濃度は, 次の計算式により求めた。

$$\text{ERFX}_{\text{ELF}} = \text{ERFX}_{\text{BALF}} \times \text{urea}_{\text{PLASMA}} / \text{urea}_{\text{BALF}}$$

すなわち, ELF 中 ERFX 濃度=BALF 中 ERFX 濃度 \times 血漿中尿素濃度 / BALF 中尿素濃度により算出した。

ERFX_{BALF} は, BALF 中の ERFX 濃度を指し, urea_{PLASMA} は, 血漿中の尿素濃度を示す. urea_{BALF} は BALF 中の尿素濃度を示した。

肺胞細胞 (ERFX_{AC}) の ERFX の濃度は次のように計算した。

$$\text{ERFX}_{\text{AC}} = \text{AC}_{\text{PELLET}} / \text{VAC}$$

AC_{PELLET} は, 肺胞細胞ペレット中の ERFX 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した。CPF_X 濃度は上記の ERFX を CPF_X に変えて計算した。

BALF 細胞中 ERFX 濃度は, 過去の研究により 1.28 μ l/10⁶ 個の BALF 細胞として換算した [17, 18]。

BALF 細胞分画確認法は, サイトスピン塗抹標本を (Cytospin4, Thermo Fisaer scientific, ウォルサム, MA, 米国) を作成し, 常法に従い 200 個の白血球を計数した。

6) PK パラメータ

PK パラメータは, 各子牛に ERFX 5 mg/kg の皮下投与後, 血漿, ELF 及び肺胞細胞における ERFX 及び CPF_X 濃度にて決定した。ERFX 及び CPF_X 分布は, 吸収相を含むノンコンパートメントモデルを用いた。0 から 24 時間目までの濃度-時間曲線下面積

(AUC_{0-24}) と、0 から 24 時間目までのモーメント曲線下面積 ($AUMC_{0-24}$) を線形台形法で決定し、0 から 24 時間目までの平均滞留時間 (MRT_{0-24}) は $AUMC / AUC$ とした。消失半減期 ($t_{1/2}$) は $0.693 / \text{消失速度定数}$ とした。

7) 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ERFX濃度及びCPFX濃度を比較した。また、PKパラメータおよびPK/PDパラメータも同様に比較した。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。データは、平均値 ± 標準偏差 (SD) とした。

3. 結 果

試験中における各子牛の臨床症状（体温，心拍数及び呼吸数），末梢血中の WBC，RBC，Hb 及び HCT に有意な変化は認められなかった。

BALF 回収率は投与前，投与後 2，6，10，24 時間目はそれぞれ 43.3 ± 8.2 ， 44.4 ± 8.3 ， 47.9 ± 6.9 ， 42.9 ± 4.8 及び 41.7 ± 5.8 %であった。このように，BALF 回収率の顕著な変化は認められなかった。同様に，肺胞細胞の回収率は投与前，投与後 2，6，10 及び 24 時間目はそれぞれ 38.7 ± 12.8 ， 36.6 ± 0.3 ， 37.1 ± 12.9 ， 38.2 ± 11.1 及び 37.8 ± 13.2 ($\times 10^5 / \text{mL}$) であり，有意差は認めなかった。また，BALF 細胞塗抹標本の白血球百分比検査では 95 %以上がマクロファージであった。

血漿，ELF 及び肺胞細胞中 ERFX に対応する PK パラメータを表 1 に示した。血漿中 ERFX 濃度は投与後 2.3 ± 0.5 時間でピーク値 (C_{max}) $1.6 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ に達し，その後徐々に減少し，24 時間後に $0.14 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった (図 1)。ERFX 分布は，吸収相を含むノンコンパートメントモデルに従った。ELF と肺胞細胞中の濃度は 3.0 ± 2.0 時間 ($C_{\text{max}} : 10.4 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$) 及び 4.0 ± 2.3 時間 ($C_{\text{max}} : 5.9 \pm 2.1 \mu\text{g}/\text{mL}$) でそれぞれピーク値に達し，その後 24 時間目でそれぞれ 0.9 ± 0.8 及び $0.8 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ まで徐々に減少した (図 1)。さらに，ELF 及び肺胞細胞の C_{max} は，血漿中のそれよりも有意 ($p < 0.05$) に高く，ELF では肺胞細胞よりも有意 ($p < 0.05$) に高かった。また，血漿，ELF 及び肺胞細胞の最高濃度到達時間 (T_{max}) は，それぞれ 2.3 ± 0.5 ， 3.0 ± 2.0 及び 4.0 ± 2.3 時間であった (表 1)。2 時間後の ELF 及び肺胞細胞における ERFX 濃度は，血漿よりも有意 ($p < 0.05$) に高く，肺胞細胞における ERFX 濃度は ELF よりも有意 ($p < 0.05$) に高かった。同様に，ELF の 6 時間における ERFX 濃度は，血漿中よりも有意 ($p < 0.05$) に高く，24 時間の肺胞細胞では血漿よりも有意 ($p < 0.05$) に高かった。さらに，血漿，ELF 及び肺胞細胞中の AUC_{0-24} はそれぞれ 14.2 ± 1.1 ， 92.3 ± 34.0 及び $70.0 \pm 25.2 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ (表 1) であり，ELF 及び肺胞細胞 よりも有意 ($p < 0.05$) に

高かった。血漿、ELF 及び肺胞細胞の AUC_{0-24} はそれぞれ 99.6 ± 21.1 , 646.9 ± 278.6 及び $580.0 \pm 212.3 \mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{mI}$ であった (表 1)。ELF 及び肺胞細胞の AUC_{0-24} は血漿中のそれよりも有意 ($p < 0.05$) に高かった。血漿、ELF 及び肺胞細胞の MRT_{0-24} はそれぞれ 6.9 ± 1.0 , 6.9 ± 1.5 及び 8.3 ± 0.9 時間であったが、統計的な差異は認められなかった。血漿、ELF 及び肺胞細胞の半減期 ($t_{1/2}$) はそれぞれ 6.5 ± 0.7 , 6.5 ± 3.6 及び 7.4 ± 4.3 時間であったが、統計的な差異は認められなかった。

血漿、ELF 及び肺胞細胞中 CPF_X に対応する PK パラメータを表 2 に示した。血漿中 CPF_X 濃度は投与後 5.3 ± 1.5 にピーク値 ($C_{\text{max}} : 0.4 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{mI}$) に達し、その後徐々に減少し、24 時間後に $0.06 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{mI}$ であった (図 2)。CPF_X 分布は、吸収相を含むノンコンパートメントモデルに従った。ELF 及び肺胞中 CPF_X 濃度は 5.0 ± 3.8 時間 ($C_{\text{max}} : 0.4 \pm 0.06 \mu\text{g}/\text{mI}$) 及び 4.0 ± 2.3 時間 ($C_{\text{max}} : 1.1 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mI}$) でそれぞれピーク値に達し、投与後 24 時間でそれぞれ 0.1 ± 0.07 及び $0.4 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{mI}$ まで減少した (図 2)。

肺胞細胞の C_{max} は血漿及び ELF のそれよりも高く、 T_{max} は血漿及び ELF のそれよりも長かった。さらに、投与後 2 時間の肺胞細胞中における CPF_X 濃度は、血漿及び ELF 中のそれよりも有意 ($p < 0.05$) に高かった。一方、6 時間の肺胞細胞中における CPF_X 濃度は、血漿中の CPF_X 濃度よりも有意 ($p < 0.05$) に高かった。血漿、ELF 及び肺胞細胞の AUC_{0-24} はそれぞれ 5.2 ± 0.6 , 5.1 ± 0.4 及び $14.1 \pm 3.1 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mI}$ (表 2) であり、血漿及び ELF よりも肺胞細胞が有意 ($p < 0.05$) に高かった。同様に血漿、ELF 及び肺胞細胞の $AUMC_{0-24}$ はそれぞれ 43.9 ± 4.1 , 52.5 ± 10.5 及び $144.5 \pm 49.8 \mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{mI}$ であった (表 2)。血漿、ELF 及び肺胞細胞の MRT_{0-24} はそれぞれ 8.5 ± 1.0 , 10.2 ± 1.9 及び 10.1 ± 1.9 時間であったが、統計的な差は認められなかった。血漿、ELF 及び肺胞細胞の $t_{1/2}$ はそれぞれ 6.1 ± 1.5 , 10.6 ± 1.5 及び 16.9 ± 11.1 時間であった (表 2)。ELF の $t_{1/2}$ は血漿中の $t_{1/2}$ より有意 ($p < 0.05$) に長かった。

4. 考 察

本研究における血漿の PK 分析を De Lucas [11]らが報告されたものと比較してみると、ERFX 及び CPFX はともに C_{max} は高く、 T_{max} は長かった。また ERFX と CPFX の AUC_{0-24} は高く、 $t_{1/2}$ と MRT_{0-24} は長かった。Shoaf ら [50]によると初生期のシトクロム P-450 のような代謝酵素活性の変化を報告している。我々の実験では生後 5 週齢の子牛を使っており、De Lucas らは生後 2, 3 ヶ月の子牛を使用していることから、ERFX と CPFX の PK パラメータの違いは、代謝能力に関連する年齢差が原因である可能性があると思われる。

肺胞領域における ERFX 分布を血漿、ELF 及び肺胞細胞間のパラメータを比較することによって評価した。ELF 及び肺胞細胞における AUC_{0-24} 及び C_{max} は血漿中よりも有意に高かった。したがって、牛への ERFX 投与は、肺胞領域への非常に高い薬物分布をもたらす可能性があると考えられた。また、血漿、ELF 及び肺胞細胞の $t_{1/2}$ は異なっていたが、血漿、ELF 及び肺胞細胞では定常状態を達成できなかった。

次に、肺胞領域における CPFX 分布を同様に評価した。その結果、肺胞細胞の AUC_{0-24} 及び C_{max} が、血漿及び ELF のそれよりも有意に高かった。これらの結果は、子牛への ERFX 皮下投与後に比較的少量の CPFX のみが肺胞領域に分布することを示唆していると思われた。また、ELF の $t_{1/2}$ は血漿のそれに比べて有意に長くなっていたので、ELF では定常状態を達成できた。

ニューキノロン系抗菌薬はマクロファージによって急速に取り込まれるが、薬物濃度は組織より細胞分画の方が高いとされている [10, 22, 44]。さらに、ERFX は好中球に組み込まれ、その抗菌活性が強化される。これが好中球細胞外トラップ現象である [25, 29]。我々の結果では、ERFX 及び CPFX 濃度が血漿よりも肺胞細胞の方が高かった。これは炎症部位から得られた微生物の侵入に対し、強力な抗菌効果を示していると考えられた。

感染症の治療には、罹患した臓器や組織の特定が必要であり、関連する病原体を特定して治療戦略が決定される。肺炎の場合、効果的な薬物動態 (PK) 及び薬力学

(PD) 分析の両方に基づく薬剤の抗菌効果の予測が必要である。このような PK/PD を組み合わせたアプローチは臨床現場で広く使用されている[6]。MIC のレベルでの抗菌剤の血中濃度は細菌の増殖を抑制する可能性がある。しかし、それらは必ずしも治療には十分ではない。例えば、宿主の免疫システムが損なわれると、ほとんどの細菌が MIC と同等の薬物レベルで死滅されても耐性菌が出現する可能性があり、より高い MIC が必要となる。MIC を高くするために、以前より多い量の抗菌薬投与も必要とし、潜在的に耐性菌のさらなる菌株を生み出す。この悪循環により、最終的に抗菌剤は無効になる。したがって、ヒト医学では、MIC に近い用量での薬物投与による突然変異によって発生した耐性菌を含む細菌を死滅させるために、抗菌薬を高濃度の突然変異防止濃度 (MPC) で投与する必要性があるとされている[13]。獣医学でも同じアプローチが採用されている[19, 36, 43, 45]。

PK/PD の臨床治療の効果を予測するための基本的なパラメータは、 C_{max}/MIC 及び AUC/MIC 比ならびに Time above MIC (%T>MIC) である[6, 43, 45]。アミノグリコシドとキノロン系薬物 (濃度依存系) は、抗菌作用と C_{max}/MIC または AUC/MIC 比に相関関係があるとされ、 β -ラクタム薬は抗菌効果と %T>MIC に相関があるとされている[6]。ニューキノロン系抗菌薬である ERFX は濃度依存性のため、パラメータは治療効果[7, 40, 52]、細菌の薬剤耐性獲得の防止[15, 26, 53]、及び費用対効果に従って選択する必要がある[49]。したがって、 C_{max}/MIC 比と AUC/MIC 比は PK/PD 分析において有用な指標である。ヒト医学におけるグラム陰性菌の AUC/MIC 比は 100~105、 C_{max}/MIC 比は 8~10[7, 16, 40, 52] とされている。しかし、McKellar らは獣医学における濃度依存性抗菌薬に対する C_{max}/MIC 比は少なくとも 10 以上、 AUC/MIC 比は少なくとも 125 以上を推奨している[36]。

PK パラメータには AUC_{0-24} を使用した。また PD パラメータとしては日本で飼養されている健康牛から検出された肺炎の主要原因菌 3 菌種 (*Pastuerella multocida*, *Mannheimia Haemolytica* [21] 及び *Mycoplasma bovis* [55]) の MIC を用いた (表 3)。*P. multocida*, *M. haemolytica* 及び *M. bovis* の MIC はそれぞれ 0.125, 0.5 及び 1.0

$\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。AUC₀₋₂₄に対するMIC₉₀の比率 (AUC₀₋₂₄/MIC₉₀) を評価し、各細菌種に対する治療効果を評価した。血漿中のこれらの細菌の AUC₀₋₂₄/MIC₉₀ 比は 125 以下であった。血漿中のこれらの細菌の AUC₀₋₂₄/MIC₉₀ 比は、ELF 及び肺胞細胞中のものより有意に低かった ($p < 0.05$)。しかし、ELF 及び肺胞細胞中の *P. multocida* 及び *M. haemolytica* の ERFX の AUC₀₋₂₄/MIC₉₀ 比は 125 を超え、ELF 及び肺胞細胞中の両方で MPC を超えていた。したがって、ERFX は *P. multocida* と *M. haemolytica* に対して優れた抗菌活性を有すると考えられた。一方、*M. bovis* の AUC₀₋₂₄/MIC₉₀ 比は、ELF 及び肺胞細胞中では 125 未満であった。さらに、ERFX は ELF 及び肺胞細胞中における *M. bovis* に対して MPC を達していないと思われた。しかし、投与後 24 時間の ELF 及び肺胞細胞中の ERFX 濃度は、それぞれ 0.9 ± 0.8 及び $0.8 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、投与後約 24 時間の MIC を上回っていることが示唆された (図 1)。ERFX は post-antibiotic effect (PAE) を有する [30, 56] ため、その抗菌活性は $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下に維持されていると思われた。この結果は、ERFX が ELF 及び肺胞細胞中において投与後 24 時間でも MIC を超えることが示唆された。したがって、ERFX は *M. bovis* に対する抗菌活性を示すために必要な MIC を超えていると思われた。本研究では、*M. bovis* に対する抗菌活性は MIC よりも高く、MPC よりも低い濃度の範囲、すなわち MSW (変異選択窓) と呼ばれる範囲である [19, 36, 43, 45] が、*M. bovis* に対しては耐性菌が容易に選択され誘導されると考えられた。

PK/PD 分析において、肺胞領域における AUC/MIC 比が *P. multocida*, *M. haemolytica* 及び *M. bovis* に対する治療効果を示すことを示した。しかし、本研究における ELF 及び肺胞細胞における消失半減期は 6.5 ± 3.6 及び 7.4 ± 4.3 時間であった。肺胞領域への分布は十分であったが、ERFX (5 mg/kg) での 1 日 1 回投与では定常状態は達成できないため、複数回投与する必要があると考えられた。

治療方法のさらなる調査には、MIC のフィールド測定が必要である。臨床現場では、各農場に対してアンチバイオグラムが生成され、その MIC が $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 未満の場合、これらの細菌に対する臨床的治療効果が期待できると思われた。

本研究では、ERFX (5 mg/kg) の皮下投与後の血漿、ELF、肺胞細胞中 ERFX 濃度、及び CPFX (ERFX の代謝産物) 濃度を測定した。薬物動態学的パラメータ分析は、ERFX における治療が様々な菌種に対して有効であることを示唆された。しかし、ERFX を用いた治療を行う前に、肺炎の子牛での ERFX の移行性を含めた知見を明らかにするためには、追加の研究が必要であると思われた。

5. 小 括

本研究は、健康な4頭の乳用子牛にERFX (5 mg/kg) を単回皮下投与し、血漿、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 及び肺胞細胞中のエンロフロキサシン (ERFX) 及びその代謝産物であるシプロフロキサシン (CPFEX) の薬物動態を解析した。投与後のERFX 及び CPFEX は、吸収相を含むノンコンパートメントモデルにて分析した。血漿中 ERFX のCmax は、投与後 2.3 ± 0.5 時間で1.6 ± 0.4 µg/mlとなり、徐々に減少し投与後 24 時間目で0.14 ± 0.03 µg/mlとなった。血漿中の投与後 0 から 24 時間目の平均滞留時間 (MRT₀₋₂₄) は6.9 ± 1.0時間であった。ELF 及び肺胞細胞中のERFX 濃度は、投与後それぞれ3.0 ± 2.0 及び4.0 ± 2.3時間でピークに達し、徐々に減少し投与後 24 時間目でそれぞれ0.9 ± 0.8 及び0.8 ± 0.5 µg/mlとなった。血漿中、ELF 及び肺胞細胞中のERFX の半減期 (t_{1/2}) はそれぞれ6.5 ± 0.7, 6.5 ± 3.6 及び7.4 ± 4.3時間であった。ERFX 投与後 0 から 24 時間目までの濃度時間曲線下面積 (AUC₀₋₂₄) と最高血中濃度 (Cmax) は、血漿中よりも肺胞領域において有意に高かった ($p < 0.05$)。これらの結果は、ERFX が投与後 24 時間におけるBALF 領域において、ELF では高濃度で移行し、肺胞細胞において高濃度で維持されることを示唆している。したがって、ERFX は肺炎に対する有効な治療薬であると思われた。

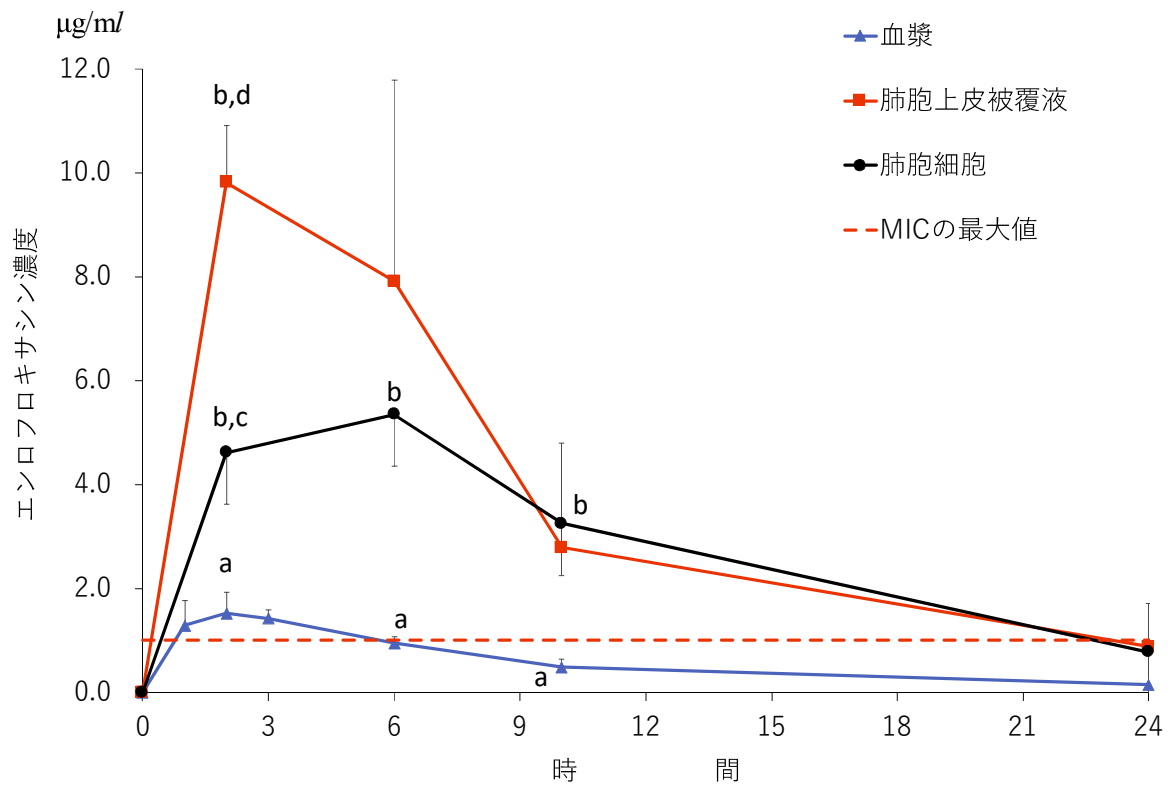


図1. エンロフロキサシン5%注射液 (5 mg/kg) 皮下投与後の血漿中，肺胞上皮被覆液中及び肺胞細胞中のエンロフロキサシン濃度変化

Mycoplasma bovis の最大MIC値 (原田ら[15])

数値は，平均 ± 標準偏差 検体採取時の異符号は有意差を示す ($p < 0.05$)

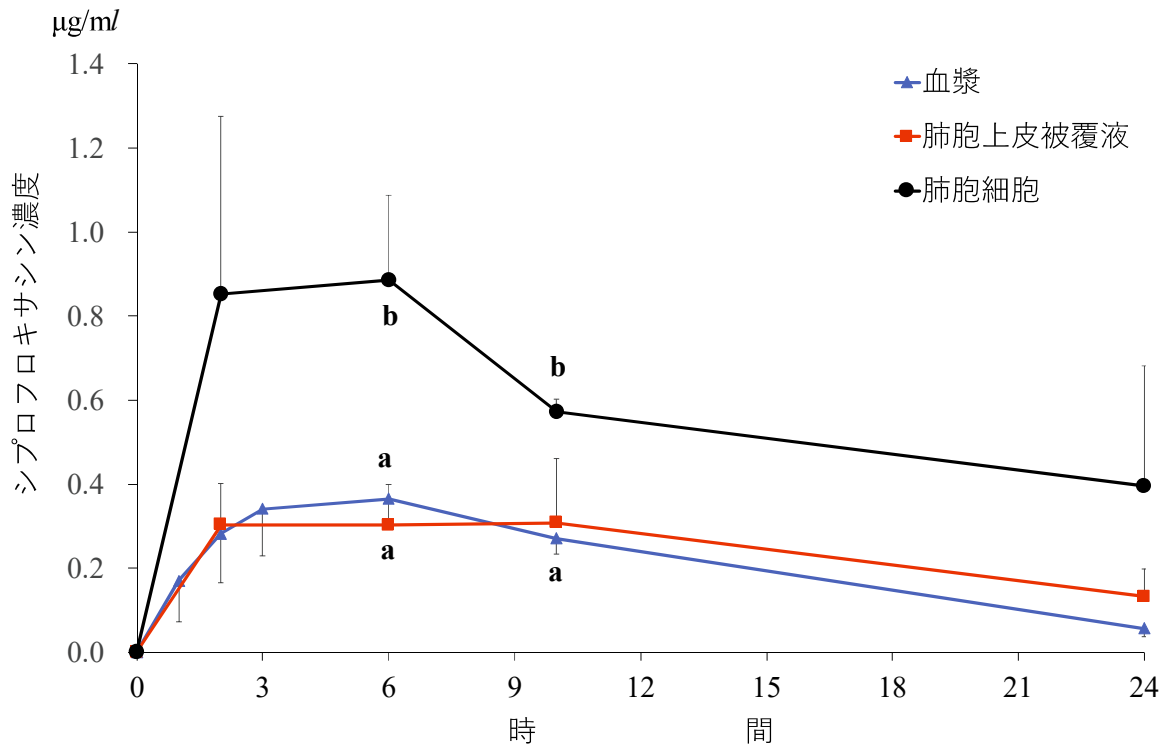


図2. エンロフロキサシン5%注射液 (5 mg/kg) 皮下投与後の血漿中，肺胞上皮被覆液中及び肺胞細胞中シプロフロキサシン (代謝産物) 濃度
 数値は，平均 ± 標準偏差 検体採取時の異符号は有意差を示す (a-b : $p < 0.05$)

表 1. エンロフロキサシン5%注射 (5 mg/kg)皮下投与後の血漿中, 肺胞上皮被覆液 (ELF) 中および肺胞細胞中のエンロフロキサシン薬物動態パラメータ (PKパラメータ)

PKパラメータ	血漿	ELF	肺胞細胞
C _{max} (μg/ml)	1.6±0.4 ^{a)}	10.4±2.0 ^{b,c)}	5.9±2.1 ^{b,d)}
T _{max} (hr)	2.3±0.5	3.0±2.0	4.0±2.3
AUC ₀₋₂₄ (μg·hr ² /ml)	14.2±1.1 ^{a)}	92.3±34.0 ^{b)}	70.0±25.2 ^{b)}
AUMC ₀₋₂₄ (μg·hr ² /ml)	99.6±21.1 ^{a)}	646.9±278.6 ^{b)}	580.0±212.3 ^{b)}
MRT ₀₋₂₄ (hr)	6.9±1.0	6.9±1.5	8.3±0.9
t _{1/2} (hr)	6.5±0.7	6.5±3.6	7.4±4.3

数値は平均値±標準偏差 異符号間で有意差あり (a - b, c - d ; $p < 0.05$)

C_{max} : 最高濃度 T_{max} : 最大濃度到達時間 AUC : 濃度時間曲線下面積 AUMC : モーメント曲線下面積 MRT : 平均滞留時間 t_{1/2} : 半減期

表 2. エンロフロキサシン 5 %注射液 (5 mg/kg)皮下投与後の血漿中, 肺胞上皮被覆液 (ELF)中
および肺胞細胞中のシプロフロキサシン (代謝産物として) 薬物動態パラメータ (PKパラメータ)

PKパラメータ	血漿	ELF	肺胞細胞
Cmax ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.4±0.09 ^{a)}	0.4±0.06 ^{a)}	1.1±0.2 ^{b)}
Tmax (hr)	5.3±1.5	5.0±3.8	4.0±2.3
AUC ₀₋₂₄ ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{ml}$)	5.2±0.6 ^{a)}	5.1±0.4 ^{a)}	14.1±3.1 ^{b)}
AUMC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{ml}$)	43.9±4.1	52.5±10.5	144.5±49.8
MRT ₀₋₂₄ (hr)	8.5±1.0	10.2±1.9	10.1±1.3
t1/2 (hr)	6.1±1.5 ^{a)}	10.6±1.5 ^{b)}	16.9±11.1

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

Cmax: 最高濃度 Tmax: 最大濃度到達時間 AUC: 濃度時間曲線下面積 AUMC: モーメント曲線下面積

MRT: 平均滞留時間 t1/2: 半減期

表 3. エンロフロキサシン5%注射液 (5 mg/kg)皮下投与後における血漿中, 肺胞上皮被覆液 (ELF) 中 および肺胞細胞中のエンロフロキサシン濃度時間曲線下面積 (AUC)₀₋₂₄ / 最小発育濃度 (MIC)₉₀ 比

細菌名	血漿	ELF	肺胞細胞
<i>P. multocida</i>	117.1 ± 7.4 ^{a)}	842.8 ± 273.3 ^{b)}	603.6 ± 294.1 ^{b)}
<i>M. haemolytica</i>	28.1 ± 1.8 ^{a)}	202.3 ± 65.6 ^{b)}	144.9 ± 70.6 ^{b)}
<i>M. bovis</i>	14.1 ± 0.9 ^{a)}	101.1 ± 32.8 ^{b)}	72.4 ± 35.3 ^{b)}

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

Pastuerella multocida (*P. multocida*), *Manheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) and *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) のMIC₉₀値はそれぞれ0.125, 0.5 そして 1.0 µg/ml を用いた

総 括

牛の呼吸器病症候群（Bovine Respiratory Disease Complex : BRDC）は、ウイルスや細菌（マイコプラズマ属細菌を含む）をはじめとした病原性微生物の感染や、様々な外的要因（飼養環境の変化、給与飼料の変化、離乳、除角、牛の集合及び離散）が、体内の浄化機構を低下させたり、免疫機構の攪乱を引き起こしたりした結果、ウイルスや鼻咽頭部に存在する細菌が気管支肺胞領域へ侵入、感染することによって発症するとされている。近年の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。結果的に、治療対象頭数が増加したり、治療期間が長期化したりすることも多く、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。

牛呼吸器病の治療において、細菌感染症の治療手段として抗菌薬は非常に有効であることが広く知られている。抗菌薬の選択及び使用には慎重な注意が必要であり、科学的根拠に基づいて抗菌薬を選択することが重要である。一方、原因細菌の耐性化や多剤耐性菌の出現により抗菌薬による治療効果の低下が懸念されており、食品の安全・安心への不信感や、ヒト医療への影響を含めた問題がとりただされている。このことを解決するためには、抗菌薬に対する病原性細菌の耐性化を防ぐ観点から、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。

獣医療において最も重要な感染症の一つである細菌性肺炎やマイコプラズマ性肺炎の多くは肺胞性肺炎であるため、全身投与した抗菌薬が効果を発揮するためには、効率的に気管支肺胞領域に移行することが重要である。しかし抗菌薬の種類によっては全身循環から気管支肺胞領域へ移行しないものや、不良なものも少なくない。そのことを解決するためには、気管支肺胞領域への移行性の良好な抗菌薬を選択することが必要である。また、投与量、投与期間及び投与方法により効果が異なる可能性があることも考慮する必要がある。

牛肺炎の抗菌薬療法においては、臨床経験に基づく知見や鼻咽頭スワブ（Nasopharyngeal swab : Swab）を用いた細菌分離検査結果により得られた情報に

より抗菌薬が選択されたされることが多い。しかし健常子牛の気道においても、鼻腔領域、咽頭領域及び気管には様々な細菌が恒常的に存在することは一般的には知られている。肺炎罹患牛の Swab を用いた細菌分離検査により細菌が、肺炎罹患領域の情報を正確に反映しているかは疑問である。

一方、気管支肺胞洗浄 (Bronchoalveolar lavage : BAL) は、気管支肺胞領域の様々な情報をダイレクトに得る手法として人医療、馬医療及び小動物医療において実施されている。特に馬医療においては、肺炎原因菌の特定に留まらず肺炎の治療を目的とした BAL が臨床応用され、良好な臨床成績をあげている。しかし、馬以外の大動物の BAL に関する報告は極めて少ないため、同一牛の鼻咽頭領域内及び気管支肺胞領域内からの細菌分離に関する情報は殆ど見あたらない。

以上の問題点を解決するために、本研究では以下の 2 章において研究を実施した。第 1 章では、臨床的に重症慢性肺炎と診断された黒毛和種牛 50 頭から Swab 及び気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、細菌分離とともに、その薬剤感受性を調査した。Swab 及び BALF からは主に *Mycoplasma bovis* 及び *Pasteurella multocida* が分離されたが、同一牛において両検体から同一細菌種が分離された割合は比較的低かった。また、BALF から分離された *M. bovis* 及び *P. multocida* は、主にフルオロキノロン系抗菌薬に感受性であったが、Swab から分離された同 2 菌種の同系抗菌薬に対する薬剤感受性は低かった。以上より、重症慢性肺炎罹患牛の鼻咽頭領域及び気管支肺胞領域からは、主に *M. bovis* 及び *P. multocida* が分離されるが、同一菌種であっても採材部位によって薬剤感受性が異なる可能性があることから、Swab による肺炎原因菌の推定には慎重を要すると思われた。

第 2 章では、健康な 4 頭の乳用子牛にエンロフロキサシン注射液 (5 mg/kg) を単回皮下投与し、血漿、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 及び肺胞細胞中のエンロフロキサシン (ERFX) 及びその代謝産物シプロフロキサシン (CPF) の薬物動態、すなわち移行性及び分布を分析することである。投与後の ERFX 及び CPF は、吸収相を含むノンコンパートメントモデルにて分析した。血漿中 ERFX の C_{max} は、投与後 $2.3 \pm$

0.5 時間目で $1.6 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{mI}$ となり、徐々に減少し投与後 24 時間目で $0.14 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{mI}$ となった。血漿中の 0 から 24 時間目の平均滞留時間 (MRT_{0-24}) は 6.9 ± 1.0 時間であった。ELF 及び肺胞細胞中の ERFX 濃度は、投与後それぞれ 3.0 ± 2.0 及び 4.0 ± 2.3 時間目でピークに達し、徐々に減少し投与後 24 時間でそれぞれ $0.9 \pm 0.8 \mu\text{g}/\text{mI}$ 及び $0.8 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{mI}$ となった。血漿中、ELF 及び肺胞細胞中の ERFX の半減期 ($t_{1/2}$) はそれぞれ 6.5 ± 0.7 , 6.5 ± 3.6 及び 7.4 ± 4.3 時間であった。ERFX 投与後 0 から 24 時間目までの濃度時間曲線下面積 (AUC_{0-24}) と最高血中濃度 (C_{max}) は、血漿中よりも肺胞領域において有意に高かった ($p < 0.05$)。これらの結果は、ERFX が投与後 24 時間目における BALF 領域において、ELF では高濃度で移行し、肺胞細胞において高濃度で維持されることを示唆している。したがって、ERFX は肺炎に対する有効な治療薬になると思われた。

以上の成績から、臨床的に重症慢性肺炎と診断された黒毛和種牛の Swab 及び BALF からは主に *Mycoplasma bovis* 及び *Pasteurella multocida* が同様に分離されたが、BALF から分離された同 2 菌種は主にフルオロキノロン系抗菌薬に感受性であったのに対し、Swab から分離された同 2 菌種は同系抗菌薬に対する薬剤感受性は低いことが明らかとなった。このことから、同一菌種であっても採材部位によって薬剤感受性が異なる可能性が高いことが示された。一方、フルオロキノロン系抗菌薬であるエンロフロキサシンを子牛に投与し薬物動態解析を行ったところ、投与直後から投与後 24 時間目までの BALF 領域において ELF 及び肺胞内細胞中では高濃度で移行し、投与後 24 時間目までにおいて高濃度が維持されることが明らかとなった。

これらの成績は、牛呼吸器病の原因菌の特定とともに、その治療法の一助となり得るものと考えられた。

要 旨

牛の呼吸器病症候群 (Bovine Respiratory Disease Complex : BRDC) は、ウイルスや細菌 (マイコプラズマ属細菌を含む) をはじめとした病原性微生物の感染や、様々な外的要因 (飼養環境の変化, 給与飼料の変化, 離乳, 除角, 牛の集合及び離散) が、体内の浄化機構を低下させたり、免疫機構の攪乱を引き起こしたりした結果、ウイルスや鼻咽頭部に存在する細菌が気管支肺胞領域へ侵入、感染することによって発症するとされている。

牛肺炎の抗菌薬療法においては、臨床経験に基づく知見や鼻咽頭スワブ (Nasopharyngeal swab : Swab) を用いた細菌分離検査結果により得られた情報により抗菌薬が選択されたされることが多い。しかし健常子牛の気道においても、鼻腔領域、咽頭領域及び気管には様々な細菌が恒常的に存在することは一般的には知られている。肺炎罹患牛の Swab を用いた細菌分離検査により細菌が、肺炎罹患領域の情報を正確に反映しているかは疑問である。

一方、気管支肺胞洗浄 (Bronchoalveolar lavage : BAL) は、気管支肺胞領域の様々な情報をダイレクトに得る手法として人医療、馬医療及び小動物医療において実施されている。特に馬医療においては、肺炎原因菌の特定に留まらず肺炎の治療を目的とした BAL が臨床応用され、良好な臨床成績をあげている。しかし、馬以外の大動物の BAL に関する報告は極めて少ないため、同一牛の鼻咽頭領域内及び気管支肺胞領域内からの細菌分離に関する情報は殆ど見あたらない。

本研究では、臨床的に重症慢性肺炎と診断された黒毛和種牛 50 頭から Swab 及び気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、細菌分離とともに、その薬剤感受性を調査した。Swab 及び BALF からは主に *Mycoplasma bovis* 及び *Pasteurella multocida* が分離されたが、同一牛において両検体から同一細菌種が分離される割合は比較的低かった。また、BALF から分離された *M. bovis* 及び *P. multocida* は、主にフルオロキノロン系抗菌薬に感受性であったが、Swab から分離された同 2 菌種の同系抗菌薬に対する薬剤感受性は低かった。以上より、重症慢性肺炎罹患牛の鼻咽頭領域及び気管支肺胞領域からは、主に *M. bovis* 及び *P. multocida* が分離されるが、同一菌種

であっても採材部位によって薬剤感受性が異なる可能性があることから、Swab による肺炎原因菌の推定には慎重を要すると思われた。

これらの結果を受け、フルオロキノロン系抗菌薬の代表的な薬剤であるエンロフロキサシン (ERFX) の薬物動態を試験した。健康な 4 頭の乳用子牛に ERFX (5 mg/kg) を単回皮下投与し、血漿、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 及び肺胞細胞中の ERFX 及びその代謝産物であるシプロフロキサシン (CPFEX) の薬物動態、すなわち気管支肺胞領域への移行性及び分布を試験した。投与後の ERFX 及び CPFEX は、吸収相を含むノンコンパートメントモデルにて分析した。血漿中 ERFX の C_{max} は、投与後 2.3 ± 0.5 時間目で $1.6 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ となり、徐々に減少し投与後 24 時間目で $0.14 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ となった。血漿中の 0 から 24 時間目の平均滞留時間 (MRT_{0-24}) は 6.9 ± 1.0 時間であった。ELF 及び肺胞細胞中の ERFX 濃度は、投与後それぞれ 3.0 ± 2.0 及び 4.0 ± 2.3 時間目でピークに達し、徐々に減少し投与後 24 時間目でそれぞれ 0.9 ± 0.8 及び $0.8 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ となった。血漿中、ELF 及び肺胞細胞中の ERFX の半減期 ($t_{1/2}$) はそれぞれ 6.5 ± 0.7 , 6.5 ± 3.6 及び 7.4 ± 4.3 時間であった。ERFX 投与後 0 から 24 時間目までの濃度時間曲線下面積 (AUC_{0-24}) と最高血中濃度 (C_{max}) は、血漿中よりも肺胞領域において有意に高かった ($p < 0.05$)。これらの結果は、ERFX が投与後 24 時間目までの BALF 領域において、ELF では高濃度で移行し、肺胞細胞において高濃度で維持されることを示唆している。したがって、ERFX は肺炎に対する有効な治療薬となるものと思われた。

以上の成績から、臨床的に重症慢性肺炎と診断された黒毛和種牛の Swab 及び BALF からは主に *Mycoplasma bovis* 及び *Pasteurella multocida* が同様に分離されたが、BALF から分離された同 2 菌種は主にフルオロキノロン系抗菌薬に感受性であったのに対し、Swab から分離された同 2 菌種は同系抗菌薬に対する薬剤感受性は低いことが明らかとなった。このことから、同一菌種であっても採材部位によって薬剤感受性が異なる可能性が高いことが示された。一方、フルオロキノロン系抗菌薬であるエンロフロキサシンを子牛に投与し薬物動態解析を行ったところ、投与直後から投

与後 24 時間目までの BALF 領域において ELF 及び肺胞内細胞では高濃度で移行し、投与後 24 時間目までにおいて高濃度が維持されることが明らかとなった。

これらの成績は、牛呼吸器病の原因菌の特定とともに、その治療法の一助となり得るものと考えられた。

SUMMARY

Bovine Respiratory Disease Complex (BRDC) 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. Main changes in feed and feeding environment, weaning, dehorning, and herd round-up and dispersal are often among the first factors to be cited.

Mycoplasma spp. and other bacterial pathogens can infect the respiratory system in calves, causing potentially severe, adverse effects to their development and life expectancy, thus, presenting a major challenge in veterinary medicine. Numerous cases of calf respiratory diseases have been classified as alveolar pneumonia. Accordingly, the treatment of alveolar pneumonia requires an antibacterial agent with adequate distribution to the intrapulmonary region, including alveolar or BALF fluid. In addition, the effect may vary depending on the dose, duration of administration, and method of administration.

In the antimicrobial therapy of bovine pneumonia, antibacterial agents are often selected based on knowledge based on clinical experience and information obtained by bacterial separation test results using nasopharyngeal swab (Nasopharyngeal swab: Swab). However, it is generally known that various bacteria are constantly present in the nasal, pharyngeal, and trachea in the trachea of healthy calves. It is doubtful whether bacteria accurately reflect information about the area affected by pneumonia by bacterial separation tests using Swab in cattle suffering from pneumonia.

On the other hand, bronchial alveolar lavage (Bronchoalveolar lavage: BAL) has been carried out in human medicine, horse medicine and small animal medicine as a method of obtaining various information directly in the bronchial alveolar region. Since there are very few reports on BAL of large animals other than horses, information on bacterial separation from the nasopharyngeal region and bronchial alveolar region of the same cow is hardly found.

In Experiment-1, nasopharyngeal swabs (Swab) and bronchoalveolar lavage fluids (BALF) were collected from 50 Japanese black cattle clinically diagnosed as having severe chronic pneumonia, and the identification of the causative bacteria of pneumonia and its antibiotic susceptibilities were investigated. *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) and *Pasteurella Multocida* (*P.*

multocida) were mainly isolated from Swab and BALF. However, the rates at which the same bacterial species were isolated from both specimens in the same cow were relatively low. In addition, *M. bovis* and *P. multocida* isolated from BALF were mainly sensitive to fluoroquinolones, but the antibiotic susceptibilities of the same two species isolated from Swab were low. From the above, *M. bovis* and *P. multocida* were mainly isolated from the nasopharyngeal area and bronchoalveolar area of cattle with severe chronic pneumonia, but the antibiotic susceptibility differs depending on the collection site even if the same bacterial species there is a possibility. From this, it seems that it is necessary to be careful to estimate the pneumonia causing bacteria by Swab.

In Experiment-2, this study aimed to analyze the pharmacokinetics of enrofloxacin (ERFX) and its metabolite ciprofloxacin (CPFEX) in plasma, as well as their migration to, and retention in, the epithelial lining fluid (ELF) and alveolar cells within the bronchoalveolar fluid (BALF). Four healthy calves were subcutaneously administered a single dose of ERFX (5 mg/kg). ERFX and CPFEX dynamics post-administration were analyzed via a non-compartment model, including the absorption phase. The C_{max} of plasma ERFX was $1.6 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ at 2.3 ± 0.5 hr post-administration and gradually decreased to $0.14 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ at 24 hr following administration. The mean residence time between 0 and 24 hr (MRT₀₋₂₄) in plasma was 6.9 ± 1.0 hr. ERFX concentrations in ELF and alveolar cells peaked at 3.0 ± 2.0 hr and 4.0 ± 2.3 hr following administration, respectively, and gradually decreased to $0.9 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$ and $0.8 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ thereafter. The plasma half-life (t_{1/2}) of ERFX was 6.5 ± 0.7 hr, while that in ELF and alveolar cells was 6.5 ± 3.6 and 7.4 ± 4.3 hr, respectively. The C_{max} and the area under the concentration-time curve for 0–24 hr for ERFX were significantly higher in alveolar cells than in plasma ($p < 0.05$). These results suggest that ERFX is distributed at high concentrations in ELF and is retained at high concentrations in alveolar cells after 24 hr in the BALF region; hence, ERFX may be an effective therapeutic agent against pneumonia.

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 帆保誠二教授及び三角一浩教授、山口大学田浦保穂教授及び高木光博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 石川慎吾助教及び乙丸孝之介准教授にご指導いただきました。心より感謝申し上げます。英語翻訳に関してご指導いただいた **Mr. Smith Henry** に感謝申し上げます。

薬物動態に関しご指導を頂いた東京農工大学の小久江栄一名誉教授、下田実名誉教授、佐々木一昭准教授に深謝いたします。また、統計処理に関しご指導いただいた鹿児島中部農業共済組合の剣崎真司氏に感謝いたします。さらに、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] Allen, J.W., Viel, L., Bateman, K.G., Rosendal, S., Shewen, P.E., 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
- [2] Angen, O., Thomse, J., Larse, L.E., Larsen, J., Kokotovic, B., Heegaard, P.M., 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
- [3] 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.
- [4] Brown, S.A., Chester, S.T., Robb, E.J. 1996. Effects of age on the pharmacokinetics of single dose ceftiofur sodium administered intramuscularly or intravenously to cattle. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 19:32-38.
- [5] Bryson, D. G. 1985. Calf pneumonia. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1: 237-257.
- [6] Craig, W.A. 1998. Pharmacokinetics/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* 26: 1-10.
- [7] Dalhoff, A. and Schmitz, F.J. 2003. In Vitro Antibacterial activity and pharmacodynamics of new quinolones. *Eur. J. Clin. Microbiol. Dis.* 22: 203-221.
- [8] Davis, J.L., Foster, D.M., Pachi, M.G. 2007. Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in calves. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 30: 564-571.
- [9] De Baere, S., Goossens, J., Osselaere, A., Devreese, M., Vandenbroucke, V., De Backer, P. and Croubels, S. 2011. Quantitative determination of T-2 toxin, HT-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.
- [10] Deguchi, Y., Sun, J., Tauchi, Y., Sakai, S. and Morimoto, K. 2003. Distribution characteristics of grepafloxacin, a fluoroquinolone antibiotic, in lung epithelial lining fluid and alveolar macrophage. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 18: 319-326.

- [11] De Lucas, J.J., San Andrés, M.I., González, F., Froyman, R. and Rodríguez, C. 2008. Pharmacokinetic behaviour of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after subcutaneous administration in cattle. *Vet. Res. Commun.* 32: 275-279.
- [12] DeRosa, D.C., Mechor, G.D., Staats, J.J., Chengappa, M.M., Shryock, T.R. 2000. Comparison of *Pasteurella spp.* simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. *J Clin Microbiol.* 38. 327-332
- [13] Dong, Y., Zhao, X., Domagala, J. and Drlica, K. 1999. Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 43: 1756-1758.
- [14] e-Stat 家畜共済統計表 / 確報 平成 29 年度農業災害補償制度家畜共済統計表
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/katiku_kyosai/index.html
- [15] Firsov, A.A., Vostrov, S.N., Lubenko, I.Y., Drlica, K., Portnoy, Y.A. and Zinner, S.H. 2003. In vitro pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 47: 1604-1613.
- [16] Forrest, A.L., Nix, DE, Ballow, C.H., Goss, T.F., Birmingham, M.C. and Schentag, J.J. 1993. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients, *Antimicrob. Agent. Chemother.* 37: 1073-1081.
- [17] Giguère, 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.
- [18] Gotfried, M. H., Danziger, L. H. and Rodvold, K. A. 2001. Steady-state plasma and intrapulmonary concentrations of levofloxacin and ciprofloxacin in healthy adult subjects. *Chest*, 119: 1114-1122.
- [19] Griffin, D., Chengappa, M.M., Kuszak, J. and McVey, D.S. 2010. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Vet. Clin. Food Anim.* 26: 381-394.
- [20] Griffin D. 1997. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle, *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 13. 367-377

- [21] Harada, K., Usui, M. and Asai, T. 2014. Application of enrofloxacin and orbifloxacin disks approved in Japan for susceptibility testing of representative veterinary respiratory pathogens. *J. Vet. Med. Sci.* 76: 1427-1430.
- [22] Hawkins, E. C., Boothe, D. M., Guinn, A., Aucoin, D. P. and Ngyuen, J. 1998. Concentration of enrofloxacin and its active metabolite in alveolar macrophages and pulmonary epithelial lining fluid of dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 21: 18-23.
- [23] Hobo, S., Yoshihara, T., Oikawa, M., Jones, J.H. 2001. Surfactant proteins in bronchoalveolar lavage fluid of horses: assay technique and changes following road transport. *Vet Rec.* 148. 74-80
- [24] Hobo, S., Oikawa, M., Kuwano, A., Yoshida, K., Yoshihara, T. 1997. Effect of transportation on the composition of bronchoalveolar lavage fluid obtained from horses. *Am J Vet Res.* 58. 531-534
- [25] Hoeben, D., Burvenich, C. and Heyneman, R. 1997. Influence of antimicrobial agents on bactericidal activity of bovine milk polymorphonuclear leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 56: 271-282.
- [26] Hyatt, J.M. and Schentag, J.J. 2000. Potential role of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and computerized databases in controlling bacterial resistance. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 21: S18-S21.
- [27] Idowu, O.R., Peggins, J.O. Cullidon, R., Bredow, J. von. 2009. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. *Res. Vet. Sci.* 89: 230-235.
- [28] Ito, S., Hobo, S., Eto, D., 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
- [29] Jerjomiceva, N., Seri, H., Völlger, L., Wang, Y., Zeitouni, N., Naim, H.Y. and von Köckritz-Blickwede, M. 2014. Enrofloxacin enhances the formation of neutrophil extracellular traps in bovine granulocytes. *J. Innate Immun.* 6: 706-712.
- [30] Kaartinen, L., Pyörälä, S., Moilanen, M. and Räisänen, S. 1997. Pharmacokinetics of enrofloxacin in newborn and one-week-old calves. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 20: 479-482.

- [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] 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
- [33] 加藤敏英, 山本高根, 小形芳美, 漆山芳郎, 荻野祥樹, 齋藤博水. 2008. 薬剤感受性に基づいた牛呼吸器感染症治療プログラムの臨床効果. 日獣会誌. 61. 294-298
- [34] Katsuda, K., Kohmoto, M., Mikami, O. and Uchida, I. 2009. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle with bovine pneumonia. *Vet. Microbiol.* 139: 74-79.
- [35] 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
- [36] McKellar, Q.A., Sanchez Bruni, S.F. and Jones, D.G. 2004. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27: 503-514.
- [37] 牧野壮一, 楠本晃子: 固形培地とコロニー観察. 2009. 獣医微生物学実験マニュアル, 原澤亮, 本多英一監修. 28-35. チクサン出版社. 東京
- [38] Mark, G. 2016. Saunders handbook of veterinary drugs: small and large animal. 4th ed. Elsevier Saunders. Philadelphia.
- [39] Maunsell, F. P., Woolums, A. R., Francoz, D., Rosenbusch, R. F., Step, D. L., Wilson, D. J., Janzenm, E.D. 2011. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *Vet Intern Med.* 25. 772-783
- [40] Nightingale, C. H. Grant, E. M. and Quintillani, R. 2000. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of levofloxacin. *Chemotherapy.* 46: 6-14.
- [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] Otomaru, K., Hirata, M., Ikedo, T., Horinouchi, C., Noguchi, M., Ishikawa, S., Nagata, S. and Hobo, S. 2016. Intrapulmonary concentration of enrofloxacin in healthy calves. *J. Vet. Med. Sci.* 78: 681-683.
- [43] Page, S.W. and Gautier, P. 2012. Use of antimicrobial agents in livestock. *Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz.* 31:145-188.
- [44] Pascual, A., Garcia, I., Ballesta, S. and Perea, E.J. 1997. Uptake and intracellular activity of trovafloxacin in human phagocytes and tissue-cultured epithelial cell. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 41: 274-277.
- [45] Papich, MG 2014. Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling and rational selection of dosage regimes for the prudent use of antimicrobial drugs. *Vet. Microbiol.* 171: 480-486.
- [46] Portis, E., Lindeman, C., Johansen, L., 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
- [47] Prescott, J.F. and Yielding, K.M. 1990. In vitro susceptibility of selected veterinary bacterial pathogens to ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin. *Can. J. Vet. Res.* 54: 195-197.
- [48] Roger, J. P., Anthony, W. C. 2010. Pathogenesis and Pathogen of Bovine Pneumonia. *Vet. Clin. Food Anim.* 26: 191-214.
- [49] Scaglione, F. 2002. Can PK/PD be used in everyday clinical practice. *Int. J. Antimicrob. Agent.* 19: 349-353.
- [50] Shoaf, S. C., Schwark, W. S., Guard, C. L. and Babish, J. G. 1987. The development of hepatic drug-metabolizing enzyme activity in the neonatal calf and its effect on drug disposition. *Drug Metab. Dispos.* 15: 676-681.
- [51] Snowden, 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

- [52] Stass, H. and Dalhoff, A. 2005. The integrated use of pharmacokinetics and pharmacodynamic models for the definition of breakpoints. *Infection* 33: 29-35.
- [53] Thomas, J.K., Forrest, A., Bhavnani, S.M., Hyatt, J.M., Cheng, A., Ballou, CH and Schentag, J.J. 1998. Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 42: 521-527.
- [54] 戸塚恭一, 三鴨廣繁, 宮崎修一, 森田邦彦, 山岸由佳. 2010. 「日常診療に役立つ抗菌薬の PK/PD」改訂版 日常診療に役立つ抗感染症薬の PK/PD. 第 1 版. 8-9. 株式会社ユニオンエース. 東京
- [55] Uemura, R., Sueyoshi, M. and Nagatomo, H. 2010. Antimicrobial susceptibilities of four species of *Mycoplasma* isolated in 2008 and 2009 from cattle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 1661-1663.
- [56] Varma, R., Ahmad, A.H., Sharma, L.D., Aggarwal, P. and Ahuja, V. 2003. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in cows following single dose intravenous administration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 26: 303-305.