

競走馬の骨折手術における手術部位感染に対する
新規治療法の開発に関する研究

山口大学大学院共同獣医学研究科

三田 宇宙

2025 年 3 月

略語表

SSI : surgical site infection (手術部位感染)

JRA : Japan Racing Association (日本中央競馬会)

MIC : minimum inhibitory concentration (最小発育阻止濃度)

PLGA : poly-lactic-co-glycolic acid (乳酸・グリコール酸共重合体)

CLAP : continuous local antibiotics perfusion (持続的局所抗菌薬灌流療法)

RLP : regional limb perfusion (下肢局所灌流療法)

MAR : marbofloxacin (マルボフロキサシン)

目次

緒言

1. 背景	2
2. 骨折手術の手術部位感染	3
3. 難治性手術部位感染に対する抗菌薬治療と課題	4
4. 高濃度抗菌薬による局所治療法	5
5. 本研究の目的	8
6. 図表	9

第1章

1. 背景	14
2. 材料と方法	16
2.1 研究デザイン	16
2.2 手術手技	16
2.3 調査項目	17
2.4 細菌同定と薬剤感受性試験	17
2.5 統計処理	18
3. 結果	19
3.1 手術の概要	19

3.2 SSI の治療と予後	19
3.3 抗菌薬投与	21
3.4 細菌分離	21
4.考察	23
5.小括	27
6.図表	28

第2章

1. 背景	30
2. 材料と方法	33
2.1 MAR-MPs の調整	33
2.2 MAR-MPs の MAR 含有率	34
2.3 MAR-MPs の粒子径	34
2.4 徐放試験	34
3. 結果	36
4. 考察	37
5. 小括	39
6. 図表	40

第3章

1. 背景	46
2. 材料と方法	48
2.1 使用動物	48
2.2 マルボフロキサシンマイクロパーティクル (MAR-MPs) の作製 ..	48
2.3 MAR-MPs の皮下投与と皮下組織液の回収	49
2.4 MAR 濃度の測定	50
2.5 統計処理	52
3. 結果	53
4. 考察	54
5. 小括	58
6. 図表	59

第4章

1. 背景	64
2. 症例の経過	66
2.1 関節固定手術と SSI の発症	66
2.2 1 回目の CLAP	68
2.2.1 感染範囲の推定	68

2.2.2	CLAP ラインの構築	68
2.2.3	投与・回収ラインの接続	69
2.2.4	CLAP の結果	70
2.3	2 回目の CLAP	70
2.3.1	CLAP の改善点	71
2.3.2	投与・回収ラインの構築	72
2.3.3	馬房内でのラインの接続	73
2.3.4	CLAP の効果	74
3.	考察	76
4.	小括	80
5.	図表	81
	総括	91
	本研究で用いた製品の企業情報	96
	謝辞	100
	引用文献	102

緒言

1. 背景

競走馬はより高いパフォーマンスを目指して、高強度の調教を日々行っている。そのため、骨に繰り返し大きな負荷がかかることによる疲労骨折や、不安定な着地に伴う重度の骨折、腱靱帯損傷がしばしば発生する¹⁻⁴。日本中央競馬会（JRA）の保健衛生年報によれば、2023 年の診療実頭数 40,431 頭のうち 31.5%の 12,718 頭が骨、関節、腱、靱帯などに関わる運動器疾患を発生しており、そのうち 8.5%の 1,078 頭に四肢の骨折が発生していた⁵。競走期のサラブレッド種競走馬で発生が多い骨折は二つある。一つ目は関節構成骨の辺縁が欠けて関節内に小骨片を生じる骨折である（図 1-A）。この骨折では関節鏡を用いて小骨片を摘出する骨片摘出術が一般的に行われる⁶。二つ目は第三中手/足骨遠位もしくは第一指/趾骨近位の関節面から骨体を縦断するように骨折線が伸長する骨折である。この骨折では皮質骨螺子を用いて骨折線を圧迫する螺子固定術（図 1-B）、もしくはステンレスプレートを用いて骨にかかる力学的負荷を中和しながら骨癒合を促すプレート固定術が行われる（図 1-B）⁷。JRA におけるこれらの骨折の発生件数は過去 20 年間で横ばいもしくは減少傾向にある（図 2）。しかし、その手術割合に注目すると以前は保存療法を選択する症例が多くいた一方で、近年は疼痛の緩和や良好な予後を期待して手術を実施する症例が増えており、その割合が増加している（図 2）。これらの骨折では、競走復帰までに手術後 6 か月から 1 年の期間が必要とさ

れる。JRA 所属の競走馬の多くは現役期間が 2 歳から 5 歳と短期間な馬が多いため早期の競走復帰が望まれる。そのため、骨折手術を合併症などのトラブル無く終えることは重要である。

2. 骨折手術の手術部位感染

骨折手術には様々な合併症がある。その一つに手術部位感染（surgical site infection：SSI）があげられる。手術部位感染とは「手術操作が及んだ部位に発生する感染」と定義される⁸。米国の National Healthcare Safety Network の報告では、2006 年から 2008 年までにヒトで実施された 849,659 件の様々な手術において 16,147 件の手術部位感染が発生し、医療関連感染のなかで占める割合は第 2 位であった⁹。また、ヒト医療における日本国内の腹部手術と心臓手術を対象にした調査では、SSI を発生した症例は入院期間が延長し、医療費は患者一人当たり \$8,791 増加したことが報告されている¹⁰。そのため、SSI の発生要因の検討や効果的な予防・治療策が望まれている。競走馬の SSI の発生率や発生因子は海外の診療施設から報告されている。例えば、関節鏡手術は清潔手術に分類されインプラントの使用がないという特徴から SSI の発生率が 1.9%と低かった¹¹。その一方、螺子固定術やプレート固定術のうち皮膚の離開がない閉鎖性の骨折に対する手術は、同じく清潔手術に分類されるものの、インプラントの設置や手術時間が比較的長くなる特徴から SSI 発生率は

14.2%から 80%と関節鏡手術に比べてはるかに高いことが報告されている¹²⁻¹⁶。

骨や関節に感染を起こすと、慢性的な関節炎などに起因する機能障害を引き起こし予後が悪化することがある¹⁷⁻¹⁹。このため、実験的な検証ならびに疫学データに基づいた適切な予防と治療が必要である。しかし、JRA をはじめとする日本国内の診療施設において競走馬の骨折手術に関する手術部位感染の疫学データは無く、発生状況やリスク因子について報告がない。そのため、手術部位感染に対する効果的な対策を検討するための基礎データを得ることが喫緊の課題である。

3. 難治性手術部位感染に対する抗菌薬治療と課題

骨折手術の手術部位感染に対する基本的治療は、インプラント交換、抗菌薬投与、局所洗浄、デブリードメントによって原因細菌を減量・撲滅することである。しかし、競走馬の骨折手術ではインプラントの交換が難しい症例が散見される。例えば下肢部の骨折にプレートを設置した症例でインプラント交換を行う場合、プレート再設置に使用できる骨領域が少ないことや全身麻酔の倒馬・覚醒に伴う骨折の悪化が懸念される。これらの理由で SSI に対する外科的介入が遅延すると感染コントロールが難しくなることを臨床現場ではしばしば経験している。近年、細菌が形成するバイオフィルムがこのよ

うな難治性の手術部位感染に関与していると報告されている²⁰。バイオフィルムとは、微生物やそれが産生する物質が集合してできた構造体の総称である。一般に、微生物自身が産生する菌体外多糖類、タンパク質や DNA などの物質によって微生物を覆い、内部で微生物が増殖すると考えられている²¹。バイオフィルムの存在は、抗菌薬の細菌への到達を阻害することに加えて、微生物の代謝活性や性質に変化をもたらす。特に抗菌薬に対する抵抗性が増すことが知られ、最小発育阻止濃度（minimum inhibitory concentration : MIC）の抗菌薬暴露では抗菌効果が不十分となる。バイオフィルム内の細菌を殺菌するための濃度は MIC の 100 倍から 1,000 倍と報告されており^{22,23}、感染部位において通常の抗菌薬の投与方法によってこの濃度を得ることは難しい。そのため、難治性症例に対して局所に高濃度の抗菌薬を供給するための製剤や治療方法の検討が必要である。

4. 高濃度抗菌薬による局所治療法

バイオフィルムが関与する難治性感染症例の治療では高濃度の抗菌薬を感染巣に供給する必要がある。この手段として抗菌薬パウダーを術創へ直接散布する方法²⁴や抗菌薬を混合した骨セメントの留置²⁵などがヒト医療で臨床応用されてきた。前者は脊椎手術の閉創前にバンコマイシンパウダーを散布

するものである。この方法は観察研究において有用と示された報告があるものの²⁴、メタ解析やランダム化比較試験²⁶では有用性が示されていない²⁷⁻³⁰。

また、この方法は術創内の抗菌薬濃度のコントロールができないことが課題である。つまり、局所濃度上昇による組織毒性が懸念されることや、耐性菌選択濃度や突然変異選択濃度域に維持される可能性がデメリットとしてあげられる。そのため世界的に使用を控える傾向にある⁸。二つ目の骨セメントを使用した方法は、抗菌薬を混合した骨セメントを術創に留置して術創内の感染を予防・治療するものである。この方法はヒト医療において人口膝関節置換術や人工股関節全置換術でよく使用され、観察研究では SSI リスクを低減するというデータが報告されている³¹⁻³³。しかしながら、ランダム化比較試験を中心としたエビデンスが不足しており、国際的に使用の是非が分かれてい³²る。ウマ医療においてもインプラントを用いた重度の骨折手術で抗菌薬含有骨セメントを用いた術式が報告されている³⁴。しかし、この方法を使用しても SSI が発生してしまうことを JRA の臨床現場でも経験がある。その理由の一つは骨セメントの一番の欠点である生体非分解性という特徴である。その特徴ゆえ、抗菌薬量が一定以下になると細菌増殖の足場となり SSI を発症することがある³⁵。また、その周囲は血流が乏しいため感染コントロールが非常に難しく、骨セメントの除去にも手間がかかるなどの課題がある。その一方、生体分解されるマテリアルを用いて抗菌薬を徐放化した製剤が近年開

発されている。これらの一つにポリ乳酸-グリコール酸共重合体（poly-lactic-co-glycolic acid：PLGA）を用いた製剤がある。本製剤はポリマーと抗菌薬を混合・結晶化させることで作製され、ポリマーの加水分解に伴ってポリマー内に分散している抗菌薬が放出される。また、使用するポリマーの組成や抗菌薬との配合割合を調整することで抗菌薬の放出速度を変えられることが *in vitro* 試験や実験動物への全身投与試験によって報告されている^{36,37}。その一方、本製剤を用いて生体局所で高い抗菌薬濃度が維持できるかについて検証された報告はなく、本製剤が難治性 SSI の治療に有用かどうかの基礎検討は行われていない。

また、ヒト医療では難治性感染に対する治療方法として持続的局所抗菌薬灌流療法（continuous local antibiotics perfusion：CLAP）が近年発展してきている。CLAP は高濃度の抗菌薬を感染巣に持続的に供給し、陰圧をかけて感染巣全体に灌流させる方法である（図3）。これまで感染巣を生理食塩水や低濃度の抗菌薬で洗浄する方法はあったが^{38,39}、これらの方法は感染巣の深部へのアプローチとバイオフィルムの殺菌の観点で十分な治療ではなかった。CLAP はこれらの欠点を克服した治療法で、ヒトの整形外科分野において良好な臨床成績が報告されている⁴⁰⁻⁴²。その一方、CLAP を動物に使用した報告はこれまでない。動物に対する CLAP の効果検証やその課題を検討することで、CLAP が難治性感染に対する獣医領域での新たな治療方法になる可能性

がある。

5. 本研究の目的

そこで本研究では、まず第 1 章で JRA の骨折手術における SSI の特徴を明らかにするために、2011 年から 2020 年に行った 451 頭の骨折手術馬を回顧的に調査し、SSI の発症率とリスクファクターを分析した。続いて第 2 章では局所に高濃度の抗菌薬を比較的長時間分布させることを目的に生体分解性ポリマーを用いた抗菌薬製剤の検討を行った。第 3 章では第 2 章で作製した製剤をウマの皮下に投与して局所の抗菌薬濃度推移を検討した。最後の第 4 章では CLAP をウマの難治性 SSI 症例に試験的に使用し、その効果と課題を検討した。

6. 図表

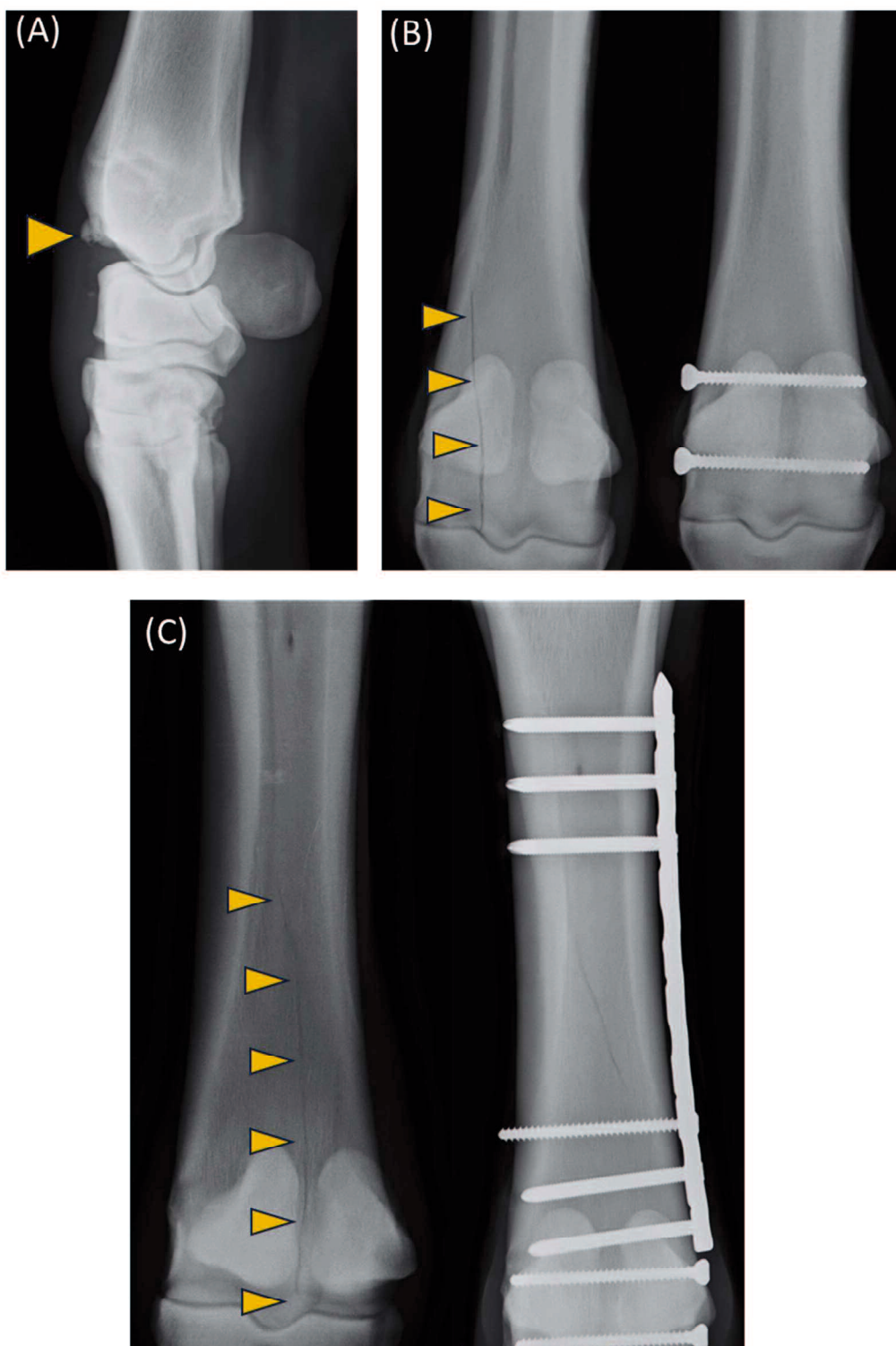


図 1：競走期のサラブレッド種競走馬で発生が多い骨折

(A) 腕節構成骨の剥離骨折

(B) 第三中手骨々折；外側顆から比較的短い骨折線が伸長。

(左：手術前、右：螺子固定手術後)

(C) 第三中手骨々折。内側顆から発生した骨折線が骨体中位まで認められる。

(左：手術前、右：プレート固定術後)

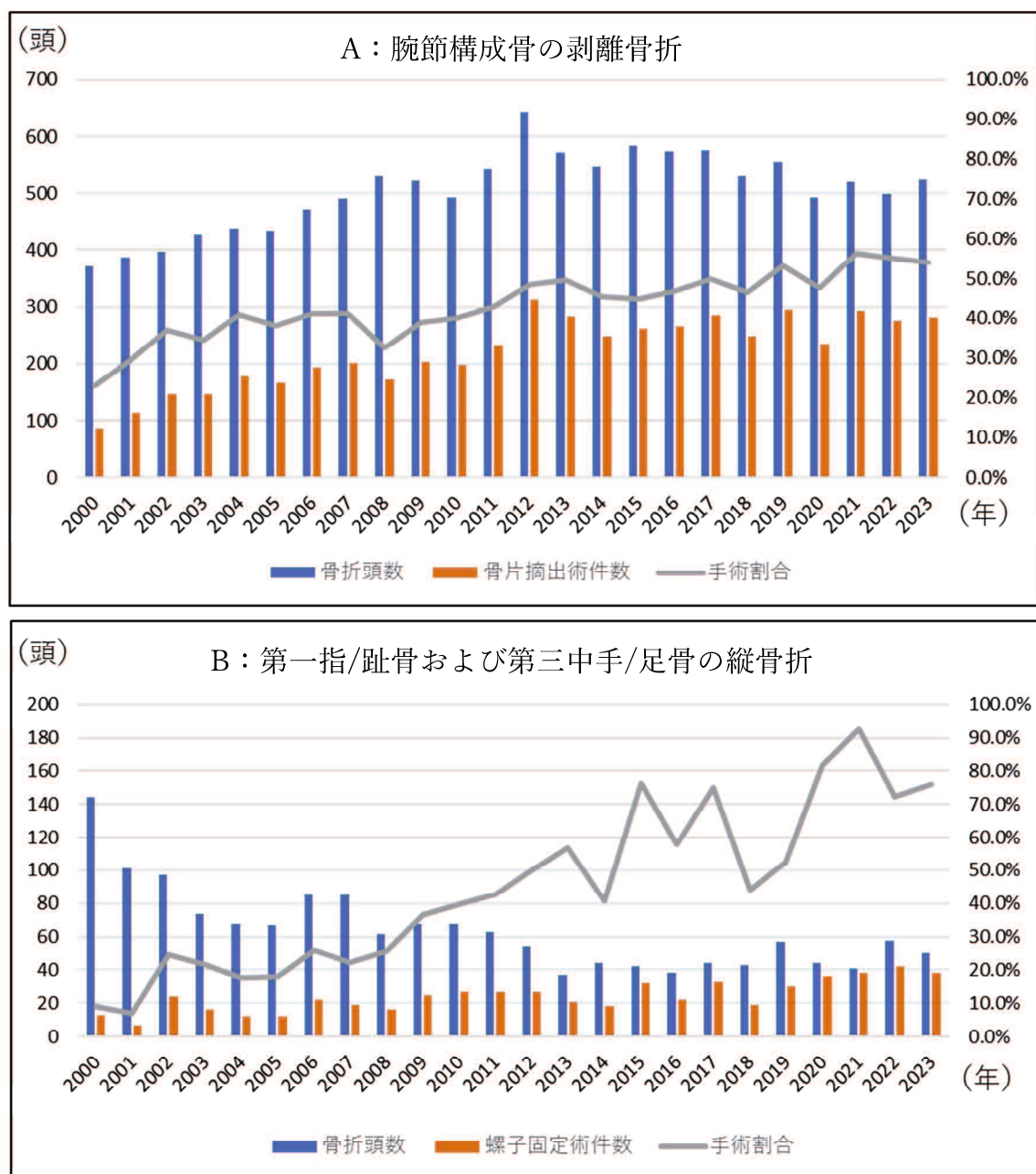


図 2：競走馬で発生件数が多い骨折の発生頭数・手術件数・手術割合の年次推移

(A) 腕節構成骨の剥離骨折の剥離骨折

(B) 第一指/趾骨および第三中手/足骨の縦骨折

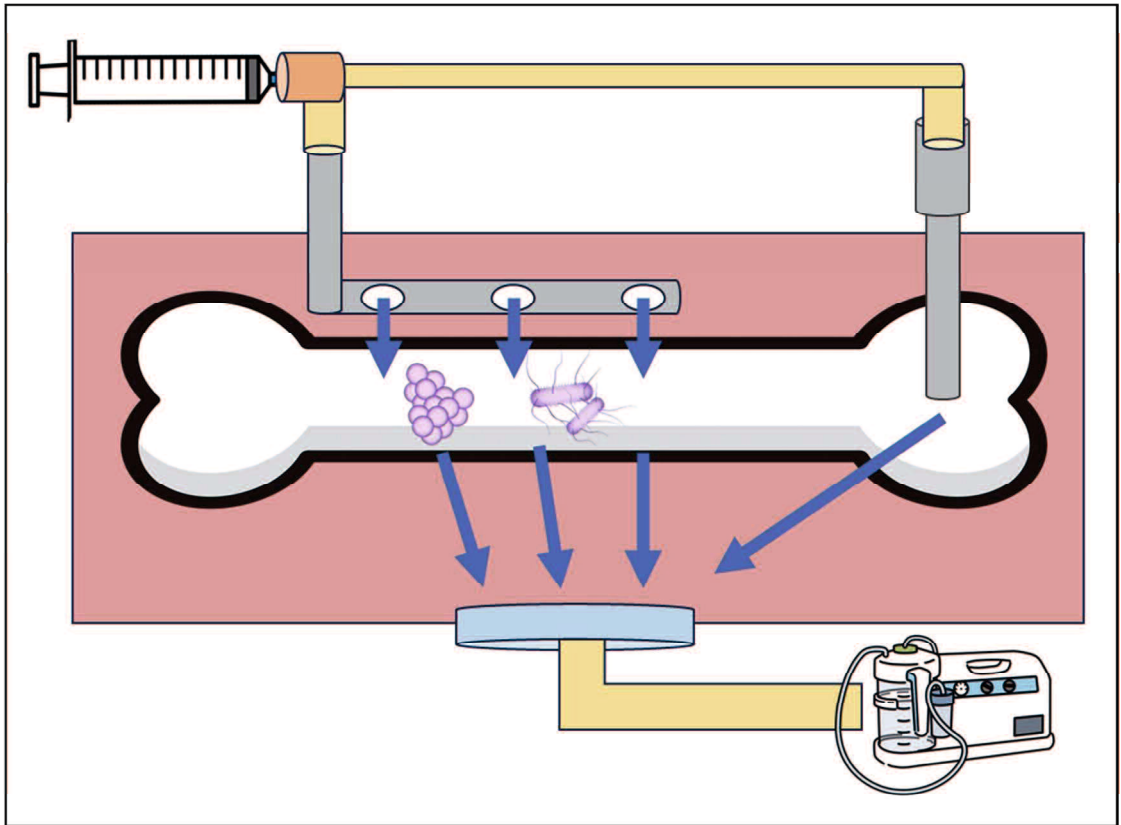


図 3：局所抗菌薬灌流療法の概念図

シリンジから投与された抗菌薬液は皮下もしくは骨髄に留置されたチューブやピンから感染巣に供給され、感染巣を通して吸引装置によって回収される。

第 1 章

骨折手術における手術部位感染の疫学調査

1. 背景

手術部位感染（surgical site infection :SSI）はウマの骨折手術における一般的な合併症である⁴³。SSI の発生は退院率の低下^{12,13}、入院期間の延長^{12,44}、治療費の増加⁴⁵⁻⁴⁷を招くため、SSI のリスク要因を調査することが重要である。

ウマの整形外科手術の SSI 発生率は、関節鏡を用いた骨片摘出術で 0.2%²、インプラントを用いた軽度から重度の骨折整復術で 14.2 から 80%¹²⁻¹⁶と報告されている。また、SSI のリスクファクターとして開放性骨折⁴⁸、性別¹⁶、骨折整復時の皮膚の切開^{12,14}、手術時間^{12,16}など様々なものが報告されている。これらのウマの骨折手術の SSI に関する報告は、重度の骨折を対象にしたものが多く、それらの症例は術部の汚染があることやインプラントの使用量が多い特徴がある^{12,13,16}。その一方、日本の競走馬の骨折は、第三中手/足骨（MC3/MT3）の関節顆や第一指骨（P1）から発生する比較的軽度の縦骨折が多く、汚染度が低くインプラント量が少ないという既報と対照的な特徴がある。

手術の際に使用される予防的抗菌薬について、ウマの整形外科手術のガイドライン⁴⁹では、インプラントを伴わない待機的手術では術創切開の 1 時間前にペニシリンもしくはゲンタマイシンを全身投与することが推奨されている。インプラントを設置する手術ではそれに加えて術後 24-48 時間の投与が推奨されている。また、感染の予防や治療として用いられる抗菌薬を下肢部の

局所血管に投与する下肢局所灌流療法（regional limb perfusion : RLP）についても薬物動態と安全性が様々な抗菌薬で調査されており⁵⁰⁻⁵³、SSI の発生リスクが高い手術で予防的に使用されている⁵⁴。海外ではこのようなガイドラインがあるものの、SSI の発生率、原因菌は国や手術内容によって異なるため^{55,56}、各手術施設ではこれらのデータに基づいた適切な抗菌薬の選択が必要となる。しかしながら JRA 内での予防的抗菌薬の使用状況はこれまで明らかになっておらず、それらの有効性を示した報告もない。

そこで、本研究では日本国内で発生が多い MC3/MT3 と P1 の骨折について手術後の SSI の発生率とそのリスクファクターを調査することと、予防的抗菌薬の使用状況と効果を検証することを目的に調査を行った。

2. 材料と方法

本疫学調査の内容は日本中央競馬会総合研究企画委員会によって承認された（承認番号 2022-3296-04）。

2.1 研究デザイン

2011 年から 2020 年の間に P1 の縦骨折、Mc3/Mt3 の顛骨折に対して螺子固定もしくはプレート固定を行ったサラブレッド種競走馬の医療情報を電子カルテから収集して回顧的調査を行った。

2.2 手術手技

手術は全身麻酔もしくは立位鎮静下で行った。手術部位の消毒作業はバリカンで毛刈りした後に、ポピドンヨードスクラブ^aで洗浄し、70%イソプロパノールと 10%ポピドンヨード^aを用いて行った。その後、抗菌粘着ドレープ（アイオバン^b）を貼り付けた。インプラントの挿入は、インプラント挿入位置の皮膚のみを小切開する方法を用いた。螺子固定のみの手術では基本的に 4.5 mm の皮質骨スクリュー^c、プレート固定では 10～13 穴のロッキングコンプレッションプレート^c（LCP）を用いた。使用された抗菌薬は、セファロチン（10 g/頭、IV、2 回/日、コアキシシ注 2 g^d）、アミカシン（1.0 g/頭、RLP、1 回/日、アミカシン硫酸塩注射液 200 mg^e）、カナマイシン（5.0 g/頭、IM、1

回/日、カナマイシン注 250^{f)} などの中から主治医によって選択された。また、投与期間についても主治医によって決定され、予防的抗菌薬として用いる場合は皮膚切開の1時間以内に投与が行われた。

2.3 調査項目

各症例の年齢、性別、骨折部位、手術施設、術者の手術経験年数、手術時間、予防的抗菌薬の種類、術後抗菌薬の使用期間、SSIの発症有無、入院期間、退院の有無、競走復帰の有無を調査した。競走復帰は手術後にJRA主催競走に最低1回以上出走したと定義した。SSIの定義はCurtissら¹³の報告に従い、「手術部位からの細菌培養陽性」、「手術部位の疼痛を伴う浸出液の排出」、「SSI以外に疑われる所見がない状態での38.6℃以上の体温」のいずれかの条件を満たした場合とした。

2.4 細菌同定と薬剤感受性試験

排膿スワブを採取して血液寒天培地に塗布した。分離されたコロニーに対して Sensi-Disc^g を用いて薬剤感受性試験を行った。細菌の同定は微生物迅速同定 MALDI-TOF/MS システム^hを用いて定法に従って行った。

2.5 統計処理

データは中央値（四分位範囲）で示した。アウトカムを SSI の発生有無として、SSI の発生と各調査項目の間に関連があるかを検定した。検定の方法は退院率と競走復帰率に対してはフィッシャーの正確確率検定とカイ 2 乗検定を用い、入院期間に対してはウィルコクソンの順位和検定を用いた。また、変数が複数にわたる時には Benjamini–Hochberg method を事後検定として用いた。Benjamini–Hochberg 調整 P 値が 0.05 未満の時に有意と判定した。統計処理ソフトは JMP v16（SAS Institute Inc.、NC、USA）もしくは EZR⁵⁷を使用した。

3. 結果

症例抽出条件に合致した症例は 451 頭だった。年齢の中央値は 3 (2-3) 歳だった。全体の 2.9 % (n=13/451) の症例が SSI を発症した。SSI の発症と各調査項目との関連性を表 1 に示した。SSI の発生率はプレート固定手術症例で螺子固定手術症例よりも有意に高かった。他の調査項目と SSI の発生率に有意な関係はなかった。

3.1 手術の概要

手術時間は螺子固定手術で 55 (40-77) 分、プレート固定手術で 160 (123-191) 分だった。手術執刀医は 33 人だった。螺子固定手術に使用された螺子本数は 2 (2-4) 本、プレート固定手術には 1 本の LCP と 11 (9.75-12) 本の螺子が使用された。全症例の退院率は 98.0% (n = 442/451) だった。

3.2 SSI の治療と予後

SSI の発生日は手術後 7 (4.5-10) 日だった。13 症例中 12 症例は感染範囲が皮下組織までの表層の SSI と考えられた。これらの症例は抗菌薬の全身投与と皮下組織の洗浄によって治療された。その他の 1 症例では手術後 3 日目に Mt3 のプレート固定部分に SSI を発症した。同症例では全身および局所血管への抗菌薬投与を行った。手術後 2 か月目にプレート抜去した結果、感染兆候

は無くなった。

螺子固定手術症例の予後について、退院率はSSI非発生症例が98.1% (n = 419/427)、SSI発生症例が100% (n = 10/10) で有意差を認めなかった。退院できず安楽死となった8症例について、その原因の内訳は麻酔覚醒中もしくは入院中の致命的な骨折が4頭、腸炎と疝痛が2頭、蹄葉炎が2頭だった。入院期間はSSI非発生症例が14 (13-18) 日、SSI発生症例が20 (15-33.5) 日でSSI発生症例が有意に長かった。競走復帰率はSSI非発生症例が61.4% (n = 262/427)、SSI発生症例が60% (n = 6/10) で有意差はなかった。

プレート固定手術症例の予後について、退院率はSSI非発生症例が100% (n = 11/11)、SSI発生症例が66.7% (n = 2/3) で有意差を認めなかった。入院期間はSSI非発生症例で26 (18-44) 日だった。SSI発生症例のうち1頭は手術25日後に退院したが術後56日目に放牧先でSSIを発症し再入院した。その後治療により回復し、術後71日目に退院した。もう1頭は術後88日目に退院した。残りの1頭は治療中の薬物ショックにより死亡した。競走復帰率はSSI非発生症例が45.5% (n = 5/11)、SSI発生症例が33.3% (n = 1/3) で有意差を認めなかった。

3.3 抗菌薬投与

SSIを発症するまでに使用された抗菌薬の種類と投与期間は、セファロチンの全身投与のみを行った症例が146頭で投与期間は4（4-5）日間だった。これに手術中のアミカシン RLPを追加した症例が101頭だった。カナマイシンの全身投与は64頭で投与期間は3（2-3）日だった。抗菌薬の全身投与をせずにアミカシンの RLPを手術日にのみ行った症例が54頭だった。他の抗菌薬を使用した症例は51頭おり、抗菌薬を全く使用していない症例が35頭だった。抗菌薬の選択は手術の種類によって大きく異なった。螺子固定症例ではセファロチンの単独投与が最も多く（33.2%）、アミカシン（RLP）の追加（22.2%）、カナマイシン（14.6%）と続き幅広い選択がなされていた。手術に使用された螺子本数と抗菌薬の種類間に有意な関連はなかった。その一方、プレート固定術ではセファロチンとポリミキシンの併用（57%、n = 8/14）、セファロチンの全身投与とアミカシンの RLPの併用（28.6%、n = 4/14）という二つの抗菌薬セットの選択がほとんどであった。また、カナマイシンやアミカシンが単独で使用された症例は無かった。

3.4 細菌分離

SSI発症症例に対する微生物検査は13症例中5症例で行われた。5症例から11株の細菌が分離された。分離細菌の内訳は methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus (MRSA) と *Pseudomonas aeruginosa* がそれぞれ 2 株、methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA)、*Mammaliicoccus sciuri*、*Streptococcus equisimilis*、*Aerococcus* sp.、*Elizabethkingia* sp.、*Escherichia coli*、および嫌気性グラム陽性桿菌がそれぞれ 1 株だった。MRSA を除く分離細菌の多くは競走馬診療でよく用いられる抗菌薬に感受性であった。その一方で MRSA 2 株はこれらの抗菌薬に対して耐性で、スルファメタゾンートリメトプリム合剤 (ST 合剤) に感受性であった。

4. 考察

本邦ではこれまで MC3/MT3 および P1 の比較的軽度の骨折に対する SSI の報告はなかった。本研究において、これらの手術の SSI 発生率は全体で 2.9% であり、プレート固定術では螺子固定術に比べて発生率が高かったことがわかった。過去のウマの整形外科での報告では、清潔手術での SSI 発生率は 5% もしくは 8.1%、螺子・ワイヤー・プレート固定術では 13.3% もしくは 16% と示されている^{12,16}。これらの報告は重症の骨折症例が含まれているため本調査との単純な比較はできないが、本調査の SSI 発生率は既報に比べて高い数値ではないことが推察された。既報では SSI の発生要因は骨折発生時の皮膚の離開（汚染度）、骨片の変位、骨折整復時の皮膚切開の有無が報告されている^{12,16}。本研究の骨折は非開放性、非変位性、整復時に皮膚切開を伴わないという特徴があり、これらは SSI 発生率が低かった要因と考えられる。

全体の SSI 発生率が低かった一方で、プレート固定術では螺子固定術に比べて発生率が有意に高かった。プレート固定手術ではインプラント挿入量が多いため、生体侵襲が大きくなる。また、プレート周囲に血流の乏しいデッドスペースが多くできる特徴がある。これらの領域には生体免疫が働きにくいことや投与された抗菌薬が供給されにくい特徴があり、これらが高い SSI 発生率の要因と考えられた。さらに、プレート固定術後に感染した症例では従来の抗菌薬治療に反応せず入院期間が延長した症例がいたことから、治

療方法の改善が必要であることが示唆された。

SSI が発生すると入院期間が延長し^{12,44}、退院率が減少することが報告されている^{12,13}。本研究でも SSI の発生に伴う入院期間の延長が認められた。その一方で退院率とは有意な関連はなかった。この結果は本研究で発生した SSI のほとんどが表層の SSI であり、早期に軟部組織の洗浄や適切な抗菌薬を投与することで治癒したためと考えられた。しかしながら、MRSA が分離された SSI 症例では治療期間が大きく延長しインプラントを抜去するまで SSI をコントロールできなかった。このことから、薬剤耐性菌による感染の場合は治療方法の改善が必要な症例がいることも明らかとなった。

予防的抗菌薬の選択はセファロチンが最も多く、次にセファロチンの全身投与とアミカシンの局所投与の併用が多かった。有意差はなかったものの、セファロチンを使用した二つの群ではアミカシン単独の投与や他の抗菌薬と比較して SSI の発生割合が少なかった。本調査では SSI 発生症例における細菌検査の実施症例数は半数ほどだったが、グラム陽性菌や大腸菌が主要な原因菌として同定された。既報でも整形外科の SSI ではブドウ球菌などのグラム陽性菌が分離されていた^{12,13,58}。セファロチンは本調査の手術で用いられた用量（22 mg/kg、IV、2-3 回/日）でグラム陽性球菌感染症のウマに効果があることが報告されている⁵⁹。これらを考慮すると、海外でのガイドライン⁴⁹と同様に JRA でも β -ラクタム系抗菌薬のセファロチンが予防的抗菌薬として

効果があることが示唆された。予防的抗菌薬として β -ラクタム系薬が推奨されている一方で、本調査集団ではカナマイシンやアミカシンを単独で投与した症例がいた。この背景には骨折手術、去勢術、喉頭形成術など様々な手術後に *Clostridioides difficile* 感染症が多発した時期があったことがあげられる。⁶⁰ これらの症例では予防的抗菌薬としてセファロチンが投与されていた。そのため、抗菌薬誘発性下痢のリスクが低いアミノグリコシドを選択していたと推察される^{61,62}。この一時的な抗菌薬の選択バイアスは同腸炎の発症症例が減少すると同時に解消された。また、カナマイシン単独投与症例での SSI 発生は認めなかったが、サンプルサイズが少なかったことや回顧的調査の側面があるため、その予防効果については今後も検討が必要である。さらに、術者による抗菌薬の選択バイアスがあった可能性も考えられた。そのため、ランダム化比較試験によって SSI に対する予防効果、副作用、長期投与による抗菌薬耐性のリスク⁶³について今後調査する必要がある。

本調査で分離された SSI の原因菌は過去の報告と同様にグラム陽性球菌が中心だった^{12,13}。しかし、MRSA も分離されたことが特徴的だった。MRSA は感受性のある抗菌薬に限られ、感染コントロールが難しい。バンコマイシンの髄内投与やイミペネムの RLP は MRSA を原因とするウマの下肢部感染症に有効な可能性が示されているが^{64,65}、両抗菌薬はヒト医療で重要な抗菌薬として位置づけられているためウマ医療において使用することは難し

い。したがって、薬剤感受性試験において MRSA に感受性が確認された ST 合剤などによる治療が望ましいと考えられる。

本研究のリミテーションは SSI 発生の追跡期間が主に入院期間中となっていたことである。ウマの整形外科手術の SSI 発生時期について詳細な報告はないがヒトの整形外科手術では 40%が 10 日以内、88%が 30 日以内と報告されている⁶⁶。本調査では SSI 非発症馬の入院期間は中央値で 14 日であったことから、退院後に JRA 以外の獣医師が治療を行った症例がいたかもしれない。

本調査結果から、JRA 内での単純骨折手術では SSI 発生率が低く保たれており、 β -ラクタム系薬を中心としたさまざまな予防的抗菌薬が使用されていることが明らかとなった。また、SSI 発生症例の多くは抗菌薬投与や局所の洗浄によって治癒することがわかった。しかしながら、プレート固定術では SSI 発生率が比較的高く、手術侵襲の大きさやプレート周囲の血流が乏しい部位の大きさが要因となっていることが推察された。そのため、このような部位で効果的な抗菌薬製剤の作製や投与方法の検討が必要と考えられた。

5. 小括

2011年から2020年にJRA附属施設内で行われた単純骨折手術症例451頭を対象に、SSIの発生状況と抗菌薬の使用状況を調査した。その結果、SSIの発生率は2.9%と低く、様々な予防的抗菌薬が使用されていることがわかった。

しかし、プレート固定術は螺子固定術に比べてSSI発生率が高く、SSIの発生が入院期間の延長を引き起こすため効果的な治療方法の検討が必要であると考えられた。

6. 図表

表1:SSIの発症と各調査項目の関係性

調査項目		SSI 発症 (n)	SSI非発症 (n)	オッズ比	p 値
手術施設	函館	0	17		1.00
	美浦	5	229	基準	
	栗東	8	192	1.90	0.82
性別	牝	0	17		
	牝	1	146	基準	
	牡	12	275	6.40	0.21
年齢				0.89 (1歳毎)	0.51
骨折肢	第一趾骨	1	75	基準	
	第一指骨	3	113	2.05	1.00
	第三中手骨	7	198	2.65	1.00
	第三中足骨	2	55	2.73	1.00
手術時間	<30分	0	33		1.00
	31-60分	5	172	基準	
	>60分	6	132	1.56	0.90
	記録なし	2	101		
インプラントの種類	螺子のみ	10	427	基準	
	螺子とプレート	3	11	11.65	<0.01
螺子本数 (螺子のみを用いた手術)	1-2	6	224	基準	
	3-4	1	157	0.24	0.25
	>5	3	43	2.60	0.25
	記録なし	0	3		
術者の手術経験年数	3-5	2	84	基準	
	6-10	5	185	1.49	1.00
	>11	6	169	1.14	1.00
予防的抗菌薬	カナマイシン	0	64		1.00
	セファロチン (IV)	2	144	基準	
	セファロチン (IV)と アミカシン (RLP)	2	99	1.45	1.00
	アミカシン (RLP)	4	50	5.76	0.23
	その他*	3	48	4.50	
	なし	2	33	4.36	0.37

*ミノサイクリン、マルボフロキサシンの単独投与またはセファロチン、アミカシン、カナマイシンいずれかの組み合わせ

第 2 章

抗菌薬の徐放化と徐放速度評価

1. 背景

第1章では骨折手術における SSI の発生率が全体的には低く保たれているものの、プレート固定手術では SSI 発生率が高く、その治療が課題としてあげられた。プレート固定手術では皮下組織周辺のデッドスペースやインプラント表面が血流に乏しく、通常の抗菌薬の投与方法ではこの領域に対する抗菌薬移行が不十分であることが、SSI 発生率が高い要因の一つと推察される^{2,14,67-69}。また、SSI では細菌がバイオフィルムを形成することで難治性感染に移行するケースがある。バイオフィル内の細菌は通常の全身投与で効果が得られる血漿中抗菌薬濃度に対して耐性である^{70,71}。そのため、殺菌には非常に高濃度の抗菌薬を長時間暴露する必要がある⁷⁰⁻⁷²。そこで第2章では血行性の抗菌薬供給が不十分と考えられる感染巣での使用を想定し、抗菌薬濃度を持続的に維持できる局所投与可能な徐放製剤を作製し、試験管内で性能評価することとした。

近年、生体分解性ポリマーの乳酸・グリコール酸共重合体（poly-lactic-co-glycolic acid : PLGA）によって抗菌薬を徐放製剤に加工できることが報告されている⁷³⁻⁷⁷。PLGA は乳酸とグリコール酸を様々な比率でブロック共重合して得られる直鎖脂肪族共重合体である⁷⁵。PLGA はエステル結合の加水分解によって水性媒体中で酵素反応を介さずに水と二酸化炭素に加水分解される性質がある。PLGA の重合度（分子量）や乳酸/グリコール酸の比、配合する界

面活性剤の有無などによって製剤の徐放速度を変化させられることが知られている⁵⁸。また、単回の皮下・筋肉内投与で血中抗菌薬濃度を長く維持できることも報告されている^{78,79}。この加工技術がウマで使用されている抗菌薬に応用できれば SSI 治療に有用な製剤となる可能性がある。

PLGA は生体分解性であるが、投与部位に副作用が観察される⁷⁶。そのため治療に必要な抗菌薬量に対して PLGA の量をできる限り少なくする、つまり抗菌薬含有率が高いことが副作用軽減の観点から理想的である。この含有率は抗菌薬の性質や製剤の作製方法によって異なることが知られている^{75,77}。第 1 章で明らかになったように、ウマの整形外科手術ではセフェム系もしくはアミノグリコシド系の水溶性抗菌薬が広く使用されている⁷。しかしながら、水溶性抗菌薬では PLGA 内の抗菌薬含有率が低くなるため⁷⁷、PLGA の総投与量が多くなる懸念がある。その一方、ウマで使用する疎水性抗菌薬であるマルボフロキサシン (MAR) について、近年、PLGA で加工して徐放化できることが示された⁷⁵。同報告では MAR が高い含有率を示すことと、マルボフロキサシンマイクロパーティクル (MAR-MPs) が抗菌効果を持つことが示された。また、MAR はグラム陰性・陽性細菌に対して効果を示されていることから SSI 治療には有用と考えられる⁸⁰⁻⁸⁴。

前述のように PLGA の分子量の違いや界面活性剤の添加は製剤の徐放速度を変化させる。そのため、ウマの SSI 治療に適した製剤作製に向けて材料検

討が欠かせない。しかしながら、既報⁷⁵で用いられた PLGA は 1 種類のみで種類ごとの検討がなされていない。そこで第 2 章では MAR と各種 PLGA を材料に徐放製剤を作製して、試験管内で徐放性能を比較・検討した。

2. 材料と方法

2.1 MAR-MPs の調整

MAR-MPs の作製方法は既報に準じて以下の通り行った⁷⁵。

- ① 200 mg の各種 PLGAⁱ（表 2）と水溶性非イオン性界面活性剤（F127、poloxamer 407ⁱ）を 1.6 ml の混合有機溶媒（アセトン^j: ジクロロメタン^j=3:1）に混合してポリマー溶液を作製した。
- ② 200 mg の MAR^kをポリマー溶液に加えた。
- ③ 混合液を超音波破碎機（Astrason XL-2020^l）で 80 W、30 秒処理して MAR 粉末をポリマー溶液に分散させた（solid-in-oil 分散液）。
- ④ ポリビニルアルコール（PVA、MW 30,000 ～ 70,000、けん化率 87%～90%ⁱ）を用いて 5%PVA 溶液を作製した。
- ⑤ 5%PVA 溶液 40 ml を攪拌機（Ultra Turrax T25 basic^m）で 8,000 rpm で攪拌しながら solid-in-oil 分散液を 40 秒かけて滴下した。これによって solid-in-oil-in-water エマルジョンを作製した。
- ⑥ エマルジョン溶液をスターラーで 800 rpm の速度で 10 分間攪拌した。
- ⑦ 濾紙（Grade 40ⁿ）で回収した MAR-MPs をミリ Q 水で 3 回洗浄した。
- ⑧ -80°C で凍結した後に凍結乾燥した。

2.2 MAR-MPs の MAR 含有率

30 mg の MAR-MPs を 10 ml のクロロホルム^jに溶解した。吸光度系（V730^o）を用いて 335 nm の吸光度を測定し、以下の式で抗菌薬含有割合を求めた。

抗菌薬含有割合（%）

$$= (\text{MAR-MPs 中の MAR 質量} / \text{MAR-MPs の質量}) \times 100$$

2.3 MAR-MPs の粒子径

MAR-MPs を Osmium Plasma Coater（OPC80T^p）オスミウムで 10 nm の厚さにコーティングした。コーティング試料を低真空走査型電子顕微鏡（S-3400N Type II^q）で観察し、粒子 100 個の直径を計測し平均値を求めた。

2.4 徐放試験

5 mg の MAR-MPs を 1.5 ml チューブに加えて、1 ml の PBS（pH=7.4）を加えた。チューブを室温（25℃）で 60 rpm で攪拌しながらインキュベートした。タイムポイントごとにチューブを 14,000 rpm、4℃で遠心して上清を 500 μL 回収した。チューブに新しい PBS を 500 μL 加えてインキュベートを再開した。タイムポイントは 1、2、4、8、24、48、72、146、172、218、242 時間とした。

回収した上清は前述の方法で吸光度を測定して上清内の抗菌薬量を求めた。5 mg の MAR-MPs に含まれる MAR 量を 100% として、各タイムポイントで上清中に新たに放出された MAR 量の割合を求めた。その割合を基に積算放出割合を算出した。また、コントロールには 5 mg の未加工 MAR を使用し、各サンプルについて 5 個の独立サンプルを用いて試験を行った。

3. 結果

全てのサンプルで MAR-MPs の作製が可能であった。各 MAR-MPs の含有率と粒子径を表 3 に示した。作製した MAR-MPs について加工前と加工後の走査型電子顕微鏡像を図 4 に示した。MAR を添加せずに作製した PLGA 結晶は直径 40-50 μm だった。その一方、MAR 結晶は PLGA と混合すると扁平上から球上のマイクロパーティクルとなり、MAR-MPs は概ね直径 12~95 μm であった。

徐放試験の結果を図 5 に示した。コントロールの未加工 MAR は最初の 1 時間で 95%以上の MAR が上清中に含まれた。界面活性剤 F127 を加えていない加工サンプルでは、最初の 3 時間までに 30~40%の放出が認められ、その後は少量ずつの放出が認められた。最終的な積算放出割合は製剤によって異なり、504H では 65.5%と最も小さく、502H では 88.2%で最も大きかった。各製剤に F127 を加えた徐放試験結果を図 6 に示した。F127 を加えたいずれの製剤でも実験開始早期に多くの MAR が放出した。また、各製剤で実験 72 時間目までに放出割合がプラトーに達し、MAR の新規の放出が認められなくなった。

4. 考察

製剤を感染巣に皮下注射するためには、①皮下注射可能な粒子径、②副作用を増加させないための高い MAR 含有率、③持続的な MAR 放出という 3 点が重要である。

まず、粒子径はどの製剤も概ね 100 μm 以下であり、ウマの皮下注射で用いられる 21G 針（内径 510 μm ）で投与が可能と考えられた。

次に、MAR 含有率は 502H と 504H が 40%以上と高く、505 は 30%代で低かった。さらに、F127 を添加すると MAR 含有率は各製剤で低下した。この傾向は F127 の添加量の増加に伴って MAR 含有率が低下した既報と同様であった⁷⁵。

生体局所で一定の抗菌薬濃度を長時間維持するためには、初期の急激な薬剤放出（初期バースト）が少ないことと、一定の割合で MAR の放出が起こることが望ましい。PLGA 製剤は溶媒に加えた時にポリマーの浸食、膨張、薬物の拡散による初期バーストが起こることが報告されている^{85,86}。4 時間までの初期放出は 504H が 30%ほどで一番少なく、502H が次に続いた。その他の 505 や F127 を添加した各製剤で初期バーストが顕著だった。分子量が大きい 505 で初期バーストが多かったことから、分子量が大きい PLGA と MAR の組み合わせではポリマーの浸食や膨張が起こりやすいことが示唆された。また、F127 はポリエチレンオキシド（親水性部分）とポリプロピレンオキシド（疎

水性部分)を含むカチオン性のトリブロックコポリマーである。そのため、疎水性末端はマイクロパーティクルの粒子表面に固定され、親水性部分は水性媒体を向き、親水性層を形成する^{87,88}。これによって溶媒が粒子内に流入しやすくなり初期バーストが非常に大きくなったと考えられた。初期バーストが多い製剤では投与から数時間は局所のMAR濃度が高く維持できるが、それ以降は低い濃度で推移すると推察され、生体利用には不適と考えられた。次に、初期バースト後に概ね一定の速度でMARを放出できた製剤は502Hと504Hだった。これらの製剤は72時間から242時間まで概ね一定の割合で抗菌薬が放出されることがわかった。502Hと504Hの放出速度を比較すると、分子量の小さい502Hで積算放出速度が速く、PLGAの分解が早いことが示唆された。PLGAの分解は①水和と分子量の減少に伴って生じる共有結合の切断、②カルボキシル基末端が分解プロセスを自己触媒して主鎖の共有結合が大量に切断される永久分解、③断片がさらに分解され水溶性分子になる可溶化の過程を経る⁸⁵。そのため分子量が小さいほど分解速度が速くなると考えられており^{89,90}、本結果もそれを支持するものであった。生体利用を想定した場合、生体では炎症による酸性環境であることが考えられる。酸性環境ではPLGAの分解が促進されることが報告されており、これを考慮すると未放出割合が高かった504Hが生体利用に向いていることが予想された。

5. 小括

局所で高い抗菌薬濃度を長時間保つことを目的に PLGA を用いて MAR の徐放製剤を作製した。複数材料の組み合わせを用意して、徐放性能を比較した。その結果、皮下に投与可能な粒子サイズで、PLGA の投与量をできるだけ抑えながら MAR を一定割合で徐放できる製剤を選択できた。第 3 章ではこの製剤をウマの皮下に投与して局所濃度を調査した。

表 2：各マルボフロキサシンマイクロパーティクルの作製に用いた材料と PLGA の組成

サンプル名	PLGAの種類	PLGA分子量	粘度 (dL/g)	乳酸：グリコール酸	末端官能基	PLGA(mg)	F127 (mg)	MBF(mg)
502H	Resomer RG502H	13500	0.20	50 : 50	acid	200	—	200
504H	Resomer RG504H	55800	0.57	50 : 50	acid	200	—	200
505	Resomer RG505	54,000- 69,000	0.72	50 : 50	ester	200	—	200
F502H	Resomer RG502H	13500	0.20	50 : 50	acid	200	8	200
F504H	Resomer RG504H	55800	0.57	50 : 50	acid	200	8	200
F505	Resomer RG505	54,000- 69,000	0.72	50 : 50	ester	200	8	200

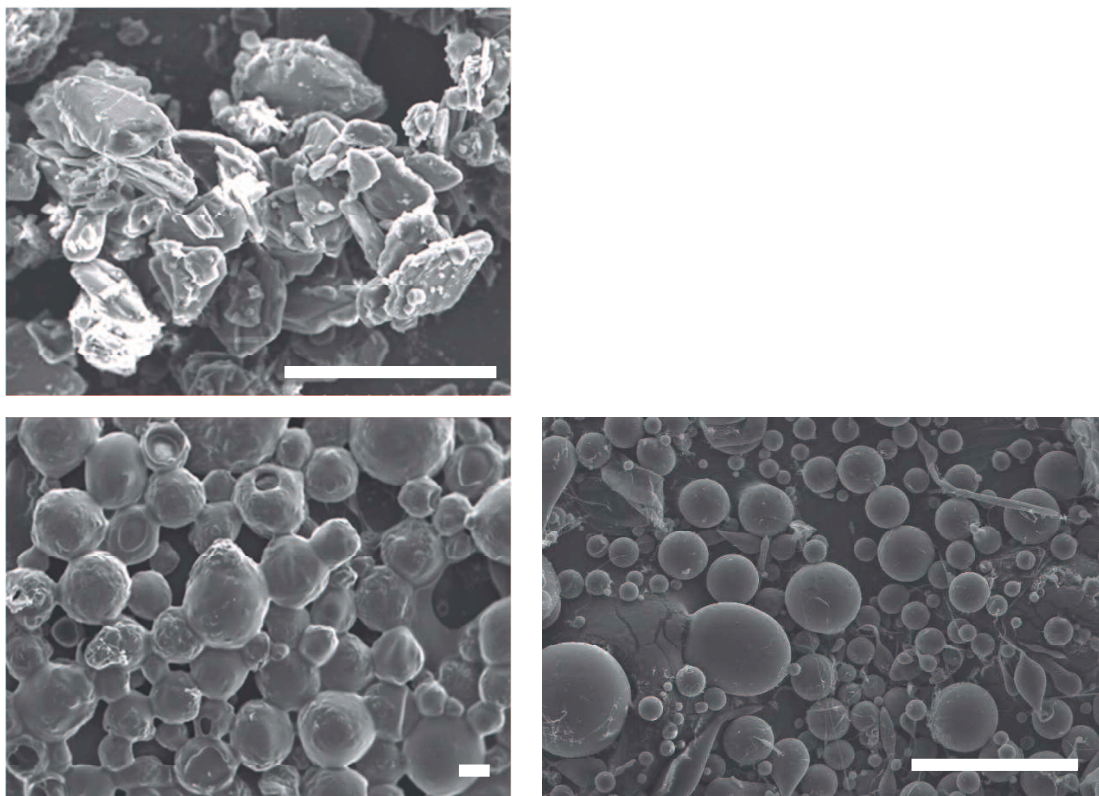
PLGA：poly-lactic-co-glycolic acid（乳酸・グリコール酸共重合体）

F127：poloxamer 407（水溶性非イオン性界面活性剤）

表 3：マルボフロキサシンマイクロパーティクルの MAR 含有率

サンプル名	含有率 (%)	粒子径 (μm)
502H	42.8%	12.5±7.6
504H	42.5%	37.0±2.4
505	35.9%	37.0±2.7
F502H	28.0%	9.52±5.4
F504H	33.6%	9.30±5.2
F505	31.9%	13.2±7.6

PLGA：poly-lactic-co-glycolic acid（乳酸・グリコール酸共重合体）



図中白線：100 μm

図4：マルボフロキサシンとマルボフロキサシンマイクロパーティクルの走査型電子顕微鏡像

加工前のマルボフロキサシン（左上）と加工したマルボフロキサシン（左下）。マルボフロキサシンを添加せずに作製した PLGA 結晶（右下）。

PLGA：poly-lactic-co-glycolic acid（乳酸・グリコール酸共重合体）

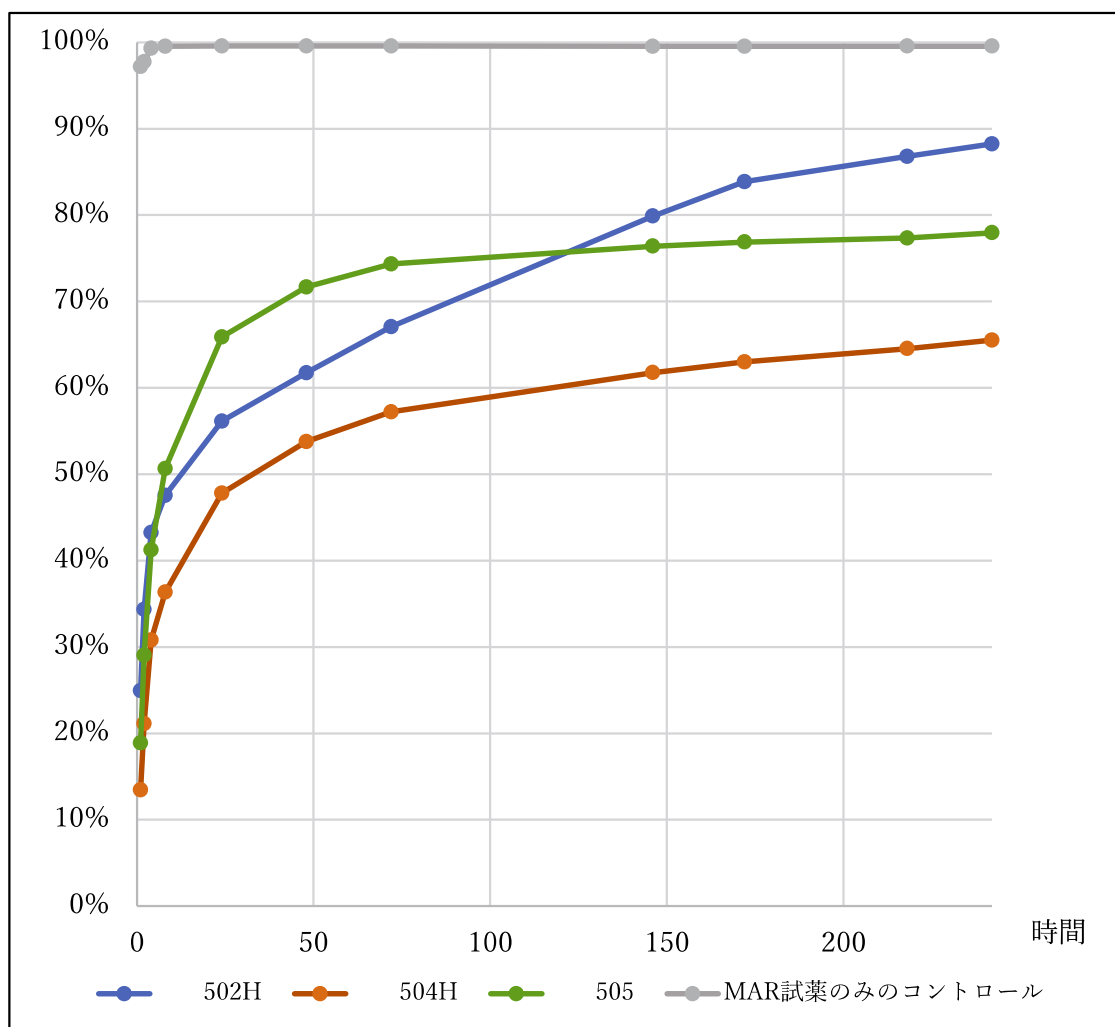


図 5 : MAR-MPs から放出された MAR の積算放出割合

MAR：マルボフロキサシン

MAR-MPs：マルボフロキサシンマイクロパーティクル

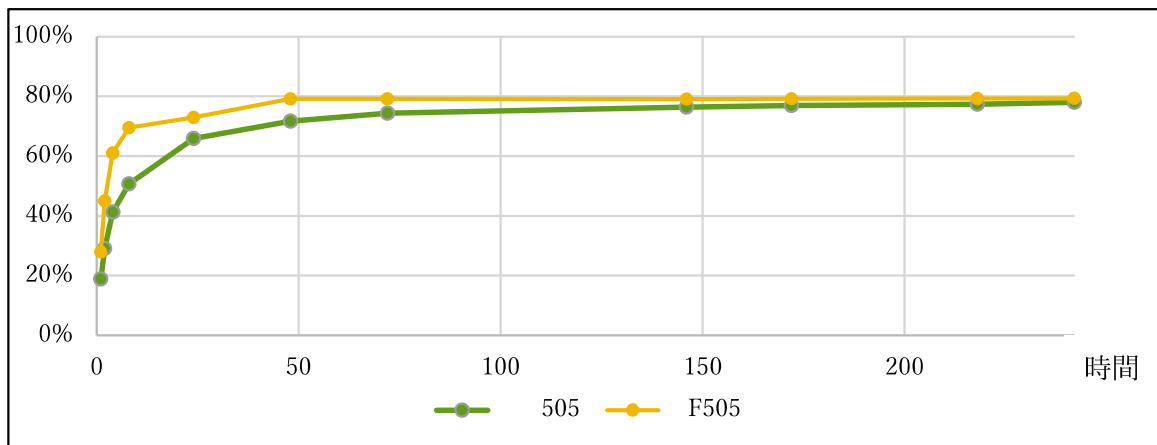
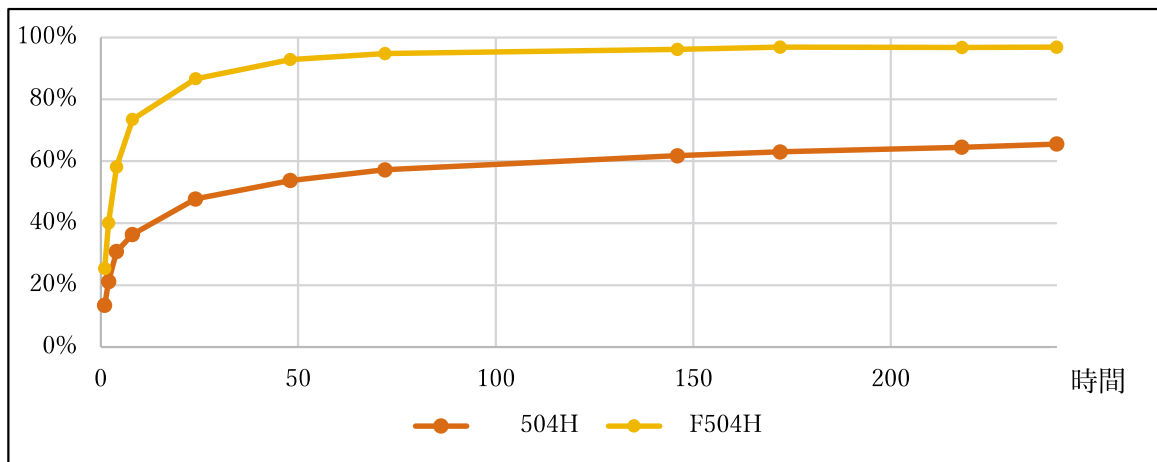
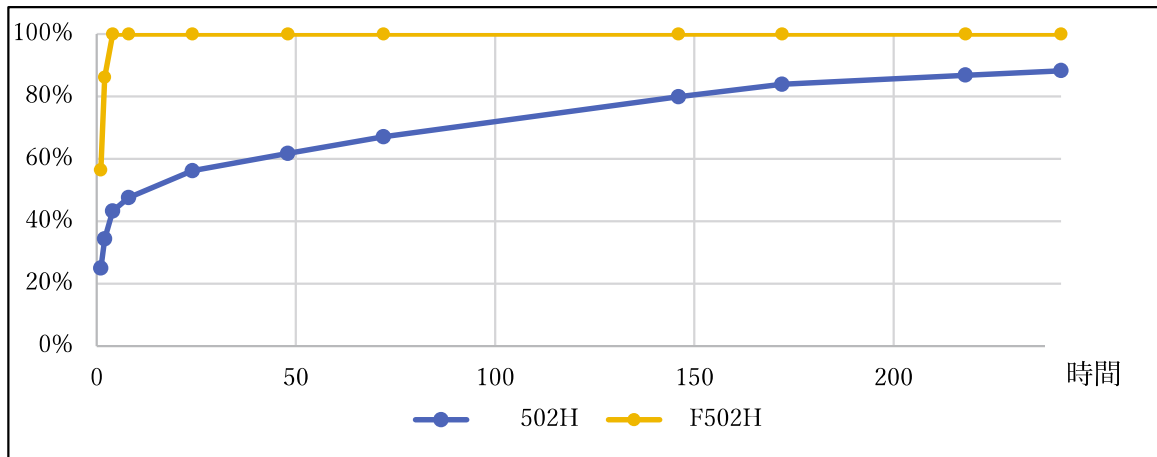


図 6 : F127 を添加した MAR-MPs の MAR 積算放出割合

MAR : マルボフロキサシン

第 3 章

徐放性抗菌薬の皮下投与後の局所濃度推移

1. 背景

第1章ではウマの SSI が皮下組織やインプラント周囲のデッドスペースで起きている可能性が強く示唆された。これらの領域の感染をコントロールするために、抗菌薬の全身投与や下肢局所灌流療法（regional limb perfusion : RLP）が行われているが、いくつかの課題がある。一つ目は RLP が長期間の治療に向かない点である。RLP は下肢部の静脈に高濃度の抗菌薬を投与するため血管炎に伴う静脈塞栓症を併発し、投与ができなくなることがある。二つ目はそもそも血流が乏しい感染巣に対しては抗菌薬の供給が不十分な点である。早期の感染コントロールに失敗した場合、細菌がバイオフィルムを形成するため、殺菌するために必要な抗菌薬濃度が非常に高くなる⁷⁰⁻⁷²。そのため、このような感染巣には直接抗菌薬を高濃度で供給し、さらに単回の投与で濃度が維持できる製剤が望ましい。

これまで PLGA を材料に作製した徐放性抗菌薬製剤の生体投与試験が実験動物で報告されている^{78,79}。これらの報告では徐放化製剤を実験動物の血管・消化管・腹腔内に投与した後、血中や尿中の抗菌薬濃度が長期にわたって維持されることが示されている。しかし、本製剤について投与部位局所の抗菌薬濃度推移を示した報告は著者が知る限りない。第2章で作製した製剤がウマの生体局所で有効な抗菌薬濃度を維持することができれば SSI の治療製剤として期待できる。また、サルなどの実験動物を用いた生体試験では投

与部位の副反応が報告されているが⁷⁶、ウマに本製剤を投与した場合の副反応は明らかになっていない。そこで本章では第 2 章で作製した徐放性抗菌薬をウマの皮下に投与し、経時的な局所濃度の推移と副作用について検討した。

2. 材料と方法

実験手順は日本中央競馬会競走馬総合研究所動物実験委員会で審査され承認された（承認番号：21-8）。

2.1 使用動物

6頭のサラブレッド種研究用馬（雄1頭、雌2頭、去勢雄3頭）を使用した。平均体重と平均年齢（±標準偏差）はそれぞれ 481 ± 36 kg、 4.2 ± 1.9 歳だった。

2.2 マルボフロキサシンマイクロパーティクル（MAR-MPs）の作製

MAR-MPsの作製方法は既報に準じて以下の通り行った⁷⁵。

- ① 200 mgのPLGA（Risomer 504hⁱ）を1.6 mlの混合有機溶媒（アセトン^j: ジクロロメタン^j=3:1）に混合してポリマー溶液を作製した。
- ② 200 mgのMAR^kをポリマー溶液に加えた。
- ③ 混合液を超音波破碎機（Astrason XL-2020^l）で80 W、30秒処理してMAR粉末をポリマー溶液に分散させた（solid-in-oil分散液）。
- ④ ポリビニルアルコール（PVA、MW 30,000～70,000、けん化率87%～90%ⁱ）を用いて5%PVA溶液を作製した。
- ⑤ 5%PVA溶液40 mlを攪拌機（Ultra Turrax T25 basic^m）で8,000 rpmで攪

拌しながら solid-in-oil 分散液を 40 秒かけて滴下した。これによって solid-in-oil-in-water エマルジョンを作製した。

- ⑥ エマルジョン溶液をターラーで 800 rpm の速度で 10 分間攪拌した。
- ⑦ 濾紙（Grade 40ⁿ）で回収した MAR-MPs をミリ Q 水で 3 回洗浄した。
- ⑧ -80°C で凍結した後に凍結乾燥した。

2.3 MAR-MPs の皮下投与と皮下組織液の回収

6 頭のウマに対して塩酸メデトミジン（7 µg/kg、ドルベネ注^r）と酒石酸ブトルファノール（10 µg/kg、ベトルファール^a）を投与して鎮静を行った。両頸部をバリカンで剃毛しポピドンヨードスクラブ^aで洗浄した。3×4 cm の局所麻酔領域を作製するようにリドカイン（40 mg/部位、キシロカイン注射液 2%^s）を皮下に投与した。これを 15 cm の間隔を開けて両頸に 3 か所ずつ作製して 1 頭あたり 6 か所の局所麻酔領域を作製した。それぞれの局所麻酔領域の上部の皮膚を No.15 のメスを用いて 3 cm 切開した。皮下組織を鈍性剥離して 3×4 cm の皮下ポケットを作製した。皮下ポケット内を止血し、生理食塩水で洗浄した後に 50 mg の MAR を含有する MAR-MPs を各ポケットに投与した。切開した皮膚を 2-0 エチロン^tで水平マットレス縫合した。消炎鎮痛剤としてフルニキシンメグルミン（1.0 mg/kg、バナミン注射液 5%^u）を MAR-MPs の投与直後のみ投与した。処置日から 1, 2, 3, 4, 7 日後に末梢血白血球

数、体温、薬剤投与部位の腫脹面積を測定した。それと同時に皮下組織液を1頭につき1ヵ所のポケットから回収した。つまり、1回採取したポケットはそれ以降のサンプル採取では使用せず、それぞれの採材日には別のポケットの皮下組織液を回収した。皮下組織液の回収手順は次の通りに行った。まず、前述の通り鎮静を行い、リドカイン 5.0 ml をポケット周囲に投与した。この際、リドカインが皮下ポケットに入らないように注意した。縫合糸を切除し、皮下ポケット内の皮下組織液をステンレススプーンで 1.5 ml チューブに採取した。ポケットの開口部はステープラーで縫合した。回収した皮下組織液は回収後すぐに 10,000 g、4 °C で遠心してパーティクルと上清を分離した。上清は測定まで -80 °C で保存した。

2.4 MAR 濃度の測定

冷凍保存した皮下組織液 2.0 μ L をミリ Q 水 (998 μ L) で希釈した。希釈液 20 μ L を 2.0 mL の Safe-Lock チューブ^{aq}に加えた。次に、メタノールで希釈した marbofloxacin-d8^{ar} (100 ng/mL) 20 μ L を内部標準物質として加えた。アセトニトリル^x 200 μ L を加え、10,000 g、4 °C で 5 分間遠心してタンパク質を除去し、上清 100 μ L を 0.3 mL の LC バイアル^{as}に分注した。その後、サンプル 2 μ L を液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) で測定した。LC-MS/MS には Nexera X2 UHPLC system^z と QTRAP 4500 triple

quadrupole mass spectrometer^{at}を組み合わせたものを使用した。移動相には 0.1vol%ギ酸を含む水とアセトニトリルの混合液を用いて流量を 0.5 mL/min とし、LC カラムには Acquity UPLC BEH C18 カラム^{as} (100 mm×2.1 mm、内径 1.7 µm) を用いた。質量分析パラメータは以下のように設定した：エレクトロスプレーイオン化のポジティブモード、スプレー電圧 4500 V、キャピラリー温度 300 °C、ネブライザーガス圧 40 psi。測定モードには Selected Reaction Monitoring モードを用い、測定に使用したトランジションは、MAR が m/z 363.0-320.0、marbofloxacin-d8 が m/z 371.0-328.0 とした。クオリティコントロールサンプルには MAR を含まない MPs を皮下投与した後の皮下組織液をブランクマトリックスとして、MAR 標準品を添加したものを用いた。MAR 検量線には 5-5,000 µg/mL の範囲で濃度を設定し、検量線の重みづけは 1/y² としたところ、直線性を示す R² 値は常に 0.995 以上であった。MAR 濃度 10、100、4,000 µg/mL のクオリティコントロールサンプル (n=6) を用いて、日内および日間再現性 (n=3) を評価した。日内および日間における精度については、RSD が全て 14.0%以下であった。日内および日間における真度の範囲は 81.4-115%であった。検出下限値 (LOD) と定量下限値 (LLOQ) はそれぞれ 0.5 µg/mL と 1 µg/mL であった。

2.5 統計処理

組織液の量と抗菌薬濃度の関係を検定するためにスピアマンの順位相関係数を求めた。採材日の各測定項目が MAR-MPs の投与直後と異なるかどうかの検定には、正規分布しなかった測定項目については Kruskal-Wallis 検定と Steel 検定、正規分布した測定項目に対しては ANOVA 検定と Dunnett 検定を用いた。また、腫脹サイズの検定では、既にサンプル採取が終了したポケットの測定値は検定に加えなかった。

3. 結果

1 日目の皮下組織液中の MAR 濃度の中央値（四分位範囲）は 23.2（9.56-65.5） $\mu\text{g/mL}$ 、2 日目は 17.7（4.89-125.6） $\mu\text{g/mL}$ 、3 日目は 33.05（15.1-71.6） $\mu\text{g/mL}$ 、4 日目は 21（2.5-48.3） $\mu\text{g/mL}$ 、7 日目は 27.4（11.5-142.3） $\mu\text{g/mL}$ であった（図 7）。同じ日に採取された組織液の間で容量や抗菌薬濃度にはばらつきがあった。しかし、サンプル液量と抗菌薬濃度との間には相関は認めなかった（ $\rho=0.2$ 、 $p=0.29$ ）。

投与部位の腫脹面積は 1～4 日目で 0 日目より有意に大きかった（ $p<0.05$ 、図 8）。7 日目のデータはメモリーカードの故障によって得られなかったが、腫脹面積は肉眼的には 4 日目より小さかった。体温は 6 頭中 3 頭で 38.5°C 以上（最高で 38.8°C ）に上昇したが、0 日目と有意差はなかった（図 9）。末梢血白血球数は 6 頭中 5 頭で増加したが全てのサンプルで $1.2\times 10^4/\mu\text{L}$ 以下であり、0 日目と有意差はなかった（図 10）。

4. 考察

組織液のマルボフロキサシン濃度の中央値は7日間にわたって15 µg/mLを上回った。各国の臨床分離株のMICを調査した複数の報告では *Enterobacteriaceae* の MIC₉₀ は 0.027 µg/mL もしくは 4 µg/mL、 *Staphylococcus* spp. では 0.210 µg/mL、 *Streptococcus* では 1.667 µg/mL もしくは 2 µg/mL と示されている^{91,92}。本調査では組織液のマルボフロキサシン濃度は全てのサンプルで 1.0 µg/mL を超えていたため、多くの *Enterobacteriaceae* と *Staphylococci* による感染が本剤を用いた治療の対象になると考えられる。

従来の製剤および投与方法と本研究で得られた抗菌薬濃度を比較すると、RLP 後の橈骨手根関節中のマルボフロキサシン濃度を測定した報告では、最高濃度が 40.65 µg/mL、半減期が 7.2 時間、投与から 48 時間後に 0.1 µg/mL まで低下することが示されている⁸²。また、静脈投与後の血中濃度を調べた報告では最高濃度が 17 µg/mL、半減期が 7.56 時間、投与後 36 時間で 0.1 µg/mL を下回ることが示されている⁹¹。本研究結果と既報では測定対象の体液が異なるため単純な比較はできない。しかし、組織中の濃度は血漿中濃度と近似するという報告がある⁹³⁻⁹⁵。これを参考にすると、MAR-MPs の単回投与によって既報の投与方法で得られた最高濃度に近い値を数日間にわたって維持できたことは注目すべきである。

従来の抗菌薬製剤に比べて MAR-MPs の投与はいくつかのメリットがある。

ウマの臨床分野では高い抗菌薬濃度を得るために下肢部に RLP を行うことがある^{82,96,97}。しかし、この投与方法は手技が幾分難しいことに加えて頻回の投与の後に投与血管の静脈塞栓症を併発することがある⁹⁸。そのため、長期の治療には向かない。さらに、血管を利用した投与方法のため血管が乏しいインプラント周囲に高濃度の抗菌薬を供給することは難しい。一方で、MAR-MPs の皮下投与は簡易的に感染巣に投与することが可能で、単回の投与で有効な抗菌薬濃度を長期的に維持できることが利点であると考えられる。また、ウマのインプラント手術では SSI の予防や治療に polymethyl methacrylate に抗菌薬を混合させた製剤を術創に留置する方法が古くから用いられてきた。しかし、この基材は生体で分解されず、抗菌薬の放出が終了すると細菌感染の温床になることが懸念されている^{99,100}。この点で PLGA が生体分解性であることは大きな利点と考えられる。

MAR-MPs 投与後の副反応について、体温と末梢血白血球数は MAR-MPs 投与前と比較して有意差はなかった。その一方で、投与部位の腫脹面積は投与直後と比較して 1～4 日目で有意な増加を認めた。本研究の予備試験では MAR-MPs を作製する材料（PLGA、PVA、MAR）をそれぞれウマの皮下に投与したが、わずかな腫脹しか認められなかった。そのため、基材総量が大きくなることが腫脹増加の要因と考えられた。

本製剤の臨床応用を検討するにあたって検討が必要な課題がある。一つ目

はマルボフロキサシン濃度のばらつきが大きかったことである。本実験では、同一日に得られたサンプル間でマルボフロキサシン濃度のばらつきが大きかった。これは個体ごとの腫脹の大きさやポケットごとの組織液の量が異なっていたことが要因の一つと考えられる。二つ目は、投与が想定される感染部位では健常部位と環境が異なる点である。つまり、感染が起こっている関節内や骨の周囲では組織 pH が健常な皮下組織と異なっていることが予想される。PLGA を基材にした徐放化製剤は周囲の溶媒の量や pH によって抗菌薬の放出速度が変化することが知られている¹⁰¹。三つ目はマルボフロキサシンの使用症例を慎重に選択することである。本研究では、MAR の疎水性という特徴が PLGA への含有率の増加をもたらし、生体への PLGA 投与量を減らせる利点があることからニューキノロン系薬の MAR を用いた。しかし、MAR をはじめとするニューキノロン系抗菌薬は WHO の重要な抗菌薬リストに掲げられており¹⁰、使用症例は重度の感染症例などに限定されるべきである。最後に、本研究では加工していない MAR 単独の投与試験を行っておらず、PLGA による加工効果を正確に評価できていないことである。これらの理由から、本研究で用いた製剤が臨床的に応用可能かどうかについて引き続き検討が必要である。

本調査では、MAR を加工した PLGA 製剤をウマの皮下に単回投与して 1 週間にわたって投与部位の皮下組織液の抗菌薬濃度推移を計測した。その結果、

既報で示された有効濃度を 1 週間にわたって維持することが可能であり、高い抗菌薬濃度を維持した個体も認められた。その一方で、製剤投与後の腫脹反応が大きいことやそれが原因と考えられる抗菌薬濃度のばらつきも認められた。今後これらの課題を修正して放出速度の安定化を図る取り組みが必要である。

5. 小括

本章では第 2 章で得られた抗菌薬徐放製剤をウマの頸部皮下に投与し、投与部位の組織濃度を経時的に計測した。その結果、皮下組織液の抗菌薬濃度は既報で示されている有効濃度を 1 週間にわたって維持することが可能であった。また、細菌増殖を抑制するために必要な濃度よりもはるかに高い濃度のサンプルも認められた。このことから本製剤の皮下投与は MAR に感受性の細菌を原因とする感染症に対して有効となる可能性が示唆された。その一方で、製剤投与後の副作用として腫脹反応が認められ、個体によってその程度が異なることが明らかとなった。これが原因と考えられる組織液中の抗菌薬濃度のばらつきも認められたため今後これらの課題を修正して放出速度の安定化を図る取り組みが必要である。

6. 図表

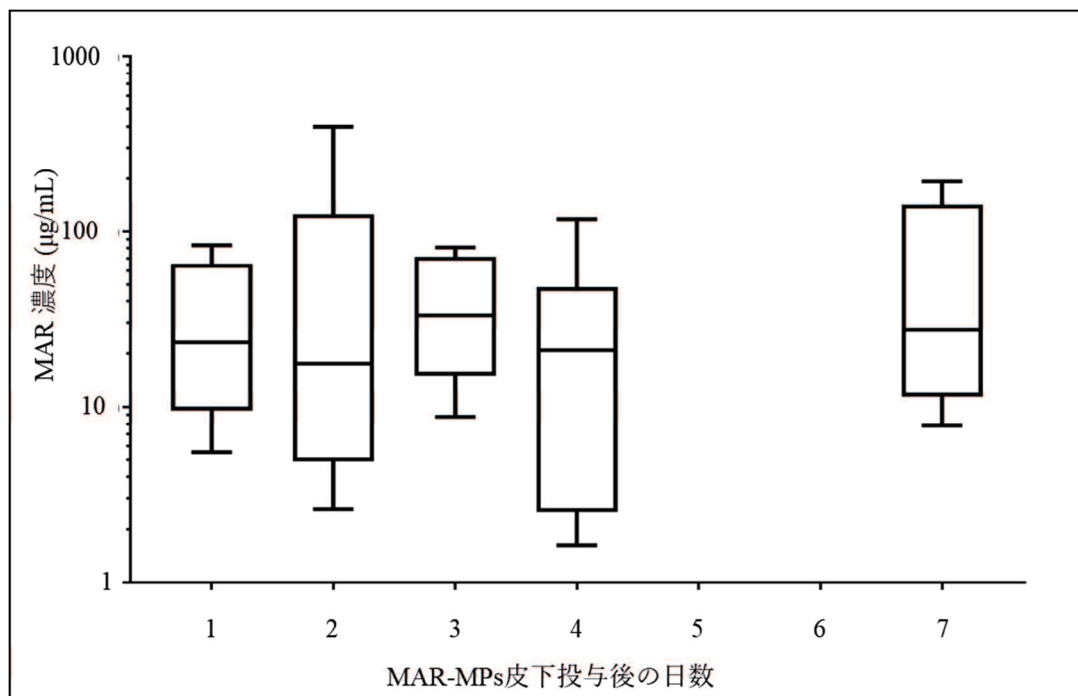


図7：マルボフロキサシンマイクロパーティクル（50 mg のマルボフロキサシンを含有）を皮下に投与した後の組織液中マルボフロキサシン濃度

MAR：マルボフロキサシン

MAR-MPs：マルボフロキサシンマイクロパーティクル

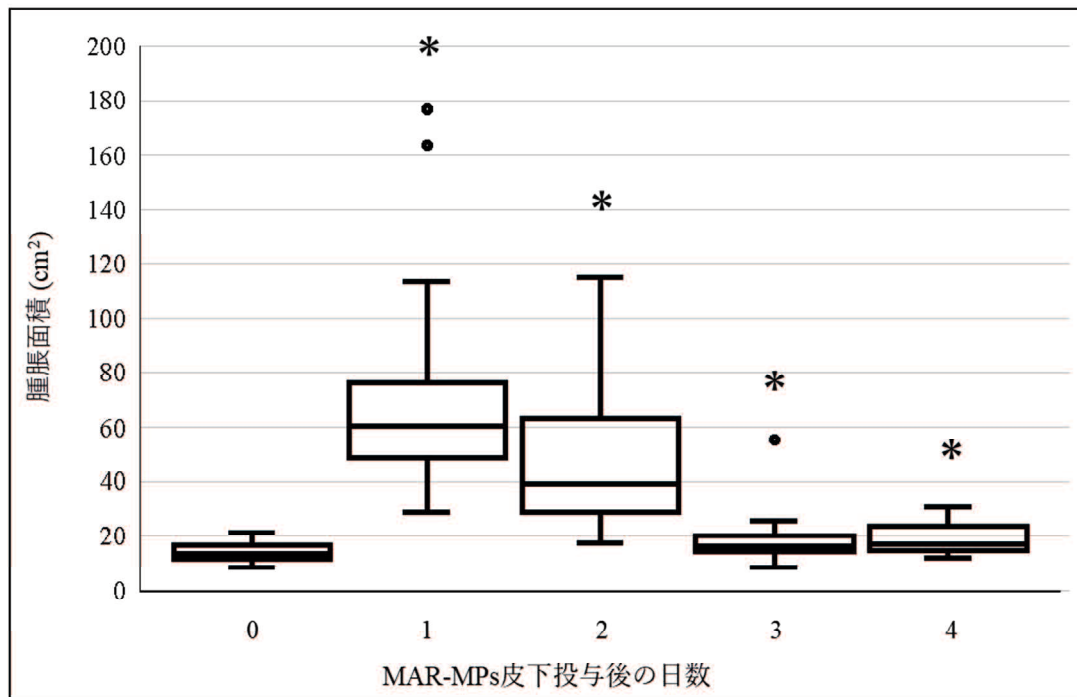


図 8：マルボフロキサシンマイクロパーティクル（50 mg のマルボフロキサシンを含有）を皮下に投与した後の投与部位の腫脹面積

アスタリスク（*）：0 日目（投与直後）と有意差あり（ $p < 0.05$ ）

MAR-MPs：マルボフロキサシンマイクロパーティクル

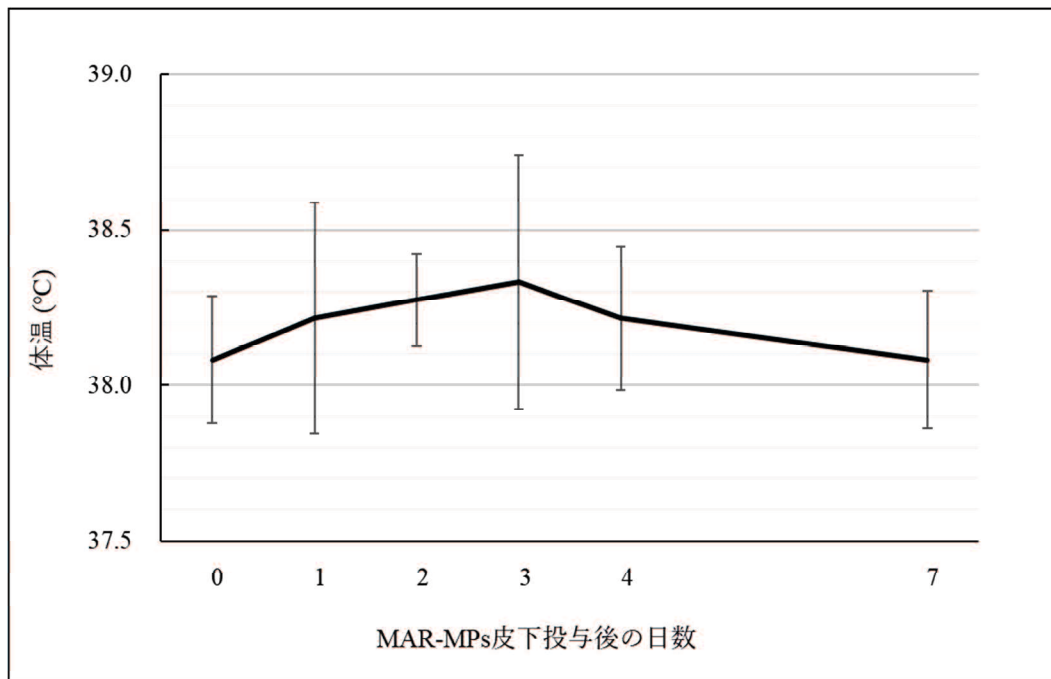


図 9：マルボフロキサシンマイクロパーティクル（50 mg のマルボフロキサシンを含有）を皮下に投与した後の体温

MAR-MPs：マルボフロキサシンマイクロパーティクル

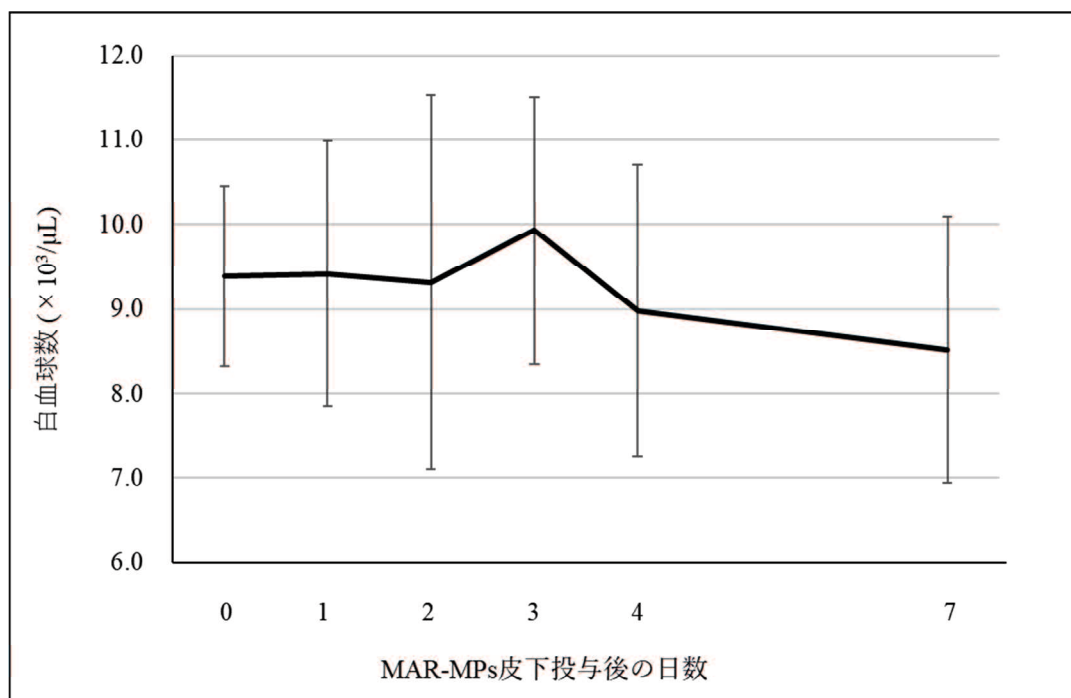


図 10：マルボフロキサシンマイクロパーティクル（50 mg のマルボフロキサシンを含有）を皮下に投与した後の末梢血白血球数

MAR-MPs：マルボフロキサシンマイクロパーティクル

第 4 章

難治性の手術部位感染に対する局所抗菌薬灌流療法：症例報告

1. 背景

インプラント手術の SSI に対する一般的な治療方法はインプラントの交換、洗浄・デブリードメント、抗菌薬投与である¹⁰²。しかし、ウマの重症骨折に対する手術では、全身麻酔時の倒馬や起立に伴う骨折悪化を避けるためにインプラント交換が行いづらい。そのため、感染の根治が難しい症例にしばしば遭遇する。SSI が難治性となる要因の一つとして、細菌のバイオフィルムの存在が考えられている。バイオフィルムはインプラント表面やその周囲にある血流の乏しいデッドスペースに形成されやすい。バイオフィルム内の細菌を撲滅するためには MIC の 100~1,000 倍の抗菌薬濃度が必要であることが報告されており^{22,23}、難治性の SSI を治療するためには高濃度の抗菌薬を安定して供給する必要がある。第 3 章では抗菌薬徐放製剤の生体局所濃度を検討した。結果として局所で高い抗菌薬濃度を数日間維持することができたが、安定した抗菌薬濃度の確保にはさらなる検討が必要であった。近年ヒト医療では高濃度の抗菌薬を安定して局所に供給する方法として、持続的局所抗菌薬灌流療法（continuous local antibiotics perfusion : CLAP）が報告され、難治性感染に対して良好な成績を収めている⁴⁰⁻⁴²。本法は皮下や骨内などの感染巣に高濃度の抗菌薬を一定速度で持続投与して、陰圧を利用して感染巣全体に抗菌薬を供給・回収する方法である（図 3）。本法では血管分布が乏しい部位に対しても安定した濃度の抗菌薬供給が可能である。そのため、CLAP はウマの難

治性 SSI 治療の課題を解決できる可能性がある。これまで CLAP の治療報告はヒト医療分野に限られており、ウマをはじめ動物での報告はない。そこで本章では関節固定手術後に慢性的な SSI を発生した症例に対して CLAP を実施した。本章では、CLAP による感染制御とウマで CLAP を行う際の注意点を把握することができたので概要を示す。

2. 症例の経過

2.1 関節固定手術と SSI の発症

症例は 3 歳・牡のサラブレッド種競走馬（骨折発症時の体重：460 kg）で競走中に左前肢の両側性近位種子骨横骨折を発症した（図 11）。CLAP に関わる治療内容は美浦トレーニング・センター動物福祉・倫理委員会によって審査され承認された（承認番号：MIHO2023K10）。

症例は American Association of Equine Practitioners（AAEP）が提唱する跛行グレードで 4/5 を呈していた。エコー検査にて繋靱帯内側脚と内側斜種子骨靱帯に損傷を認めた。脱臼の予防を目的として骨折発症から 11 日目に中手指節関節の関節固定術が実施された。関節固定手術は定法に従って行われた¹⁰³。

まず、10 穴の 4.5/5.0 LCP プレート[®]を 7 本のロックヘッドスクリューと 3 本の皮質骨螺子（ ϕ 4.5 mm）を用いて第三中手骨と第一指骨の背側に固定した。第三中手骨中位と第一指骨中位に外内側方向に 2 mm の骨孔を作製した。その骨孔に 1.7 mm のステンレスケーブル[®]を両骨の掌側で交差するように通した。第一指骨の近位背側から第三中手骨の遠位掌側に向かって 2 本の 5.5 mm 皮質骨螺子を挿入した。さらに、第三中手骨の遠位背側から近位種子骨に向かって 5.5 mm の皮質骨螺子を挿入した。手術時間は 238 分で麻酔時間は 306 分だった。術後抗菌薬はセファロチン（10 g/horse、IV、1 日 2 回、コアキ

シン注 2 g^d)、アミカシン (1.0 g/horse、RLP、1 日 1 回、アミカシン硫酸塩注射液 200 mg^e) を投与し、腸炎等によるエンドトキシン対策を目的にポリミキシン B 硫酸塩 (3,000,000 単位、IV、1 日 1 回) を投与した。消炎鎮痛剤としてフェニルブタゾン (Butatron^{ac}、4 mg/kg、1 日 2 回) とフルニキシンメグルミン (バナミン注 5%^u、1 mg/kg、IV、1 日 2 回) を投与し、その他の投薬は臨床症状に応じて行った。

術後 17 日目に術創から膿の排出を認めた。排膿からは多様な細菌が分離され SSI と診断した (表 4)。薬剤感受性試験 (Sensi-Disc^g) の結果をもとに ST 合剤 (バクトラミン配合剤^{ad}、15 g/頭、経口投与、1 日 2 回) を術後 59 日目まで投与した。さらに、排膿口から 0.2%ポピドンヨード^a を皮下に注入して感染巣を局所洗浄した。しかし、これらの治療で SSI のコントロールができなかった。また、術後 79 日目には第三中手骨遠位に挿入していた螺子が緩んだため抜去した。感染は継続していたものの、術後 197 日目には歩行時の疼痛が消失し、一般状態が良好となったため投薬を終了した。

2.2 1 回目の CLAP

引き続き症例に疼痛はなかったものの、瘻孔からの排膿は続いたことから（図 12-A）、感染は依然として継続していると考えられた。そこで感染の根治を目的に術後 266 日目に CLAP を実施した。

2.2.1 感染範囲の推定

ヒト医療分野では CLAP を実施する際には感染範囲を推定するために CT や MRI を用いる。しかし、美浦トレーニング・センター競走馬診療所で所有する 3D 画像診断装置（O-arm^{ae}）の使用には全身麻酔が必要だった。全身麻酔は倒馬や起立時に重度の骨折が発生する可能性があるため本症例では用いなかった。代替手段として、単純 X 線検査と臨床症状を基に、感染範囲の中心が球節の背内側にあると推定した（図 12-A）。さらに、術後 79 日目に螺子を抜去した骨孔付近も感染範囲と推定した（図 12-B）。

2.2.2 CLAP ラインの構築

抗菌薬投与ラインと回収ラインの作製は立位鎮静下で行った。はじめに、塩酸メデトミジン（ドルベネ注^r、4 µg/kg、IV）と酒石酸ブトルファノール（ベトルファール^{af}、0.1 mg/kg、IV）で鎮静処置を行い、術野を定法に従っ

て洗浄・消毒した。High-4 ポイントブロックと第三中手骨中位へのリングブロックによって局所麻酔を行った。次に、螺子の抜去孔に 3.2 mm のドリル孔を再度作成し抗菌薬の投与口とした（図 12-D）。第一指骨の中位内側から第三中手骨の遠位掌側に向かって 2.7 mm のドリル孔を作製して先ほどの 3.2mm のドリル孔とつなげた（図 12-C）。これを抗菌薬の排出路とした（図 12-C）。3.2mm のドリル孔に 3.2 mm のイリゲーションカニューレ^{ag}を挿入した。18Fr のダブルルーメンチューブ（セイラムサンプチューブ^{ah}）を瘻孔から近位に向けて挿入した。本チューブは抗菌薬の投与ラインと排液回収ラインの機能を併せ持つ（図 12-C、12-E）。陰圧閉鎖療法装置（NPWT 装置、RENASYS TOUCH^h）をダブルルーメンチューブの排液ラインに接続した。NPWT 装置によって-120 mmHg の陰圧をかけてライン内の陰圧が維持されたことを確認した。次に造影剤（オムニパーク 350^{aj}）と生理食塩水をイリゲーションカニューレとダブルルーメンチューブの投与ラインからそれぞれ注入して、目的の経路に造影剤が流れることを確認した。非粘着性のドレッシング材（メロリン^{ai}）、コットンバンテージとベトラップ^bで包帯をした。

2.2.3 投与・回収ラインの接続

イリゲーションカニューレとダブルルーメンチューブの投与ラインをポータブルインフュージョンポンプ（シュアフューザー^{ak}）に接続した。インフュ

ージョンポンプはタテガミに吊り下げ、1.2 mg/ml のゲンタマイシン溶液を 2 ml/h で各ルートから注入した。ダブルルーメンチューブの排液ラインは首にぶら下げたプラスチックボトルに接続し、天井に吊り下げた NPWT 装置に繋いだコイルチューブとタテガミに吊り下げた排液ボトルを接続した。これによって肢から回収された抗菌薬や浸出液が首に吊り下げたプラスチックボトルに溜まるようにした。症例は馬房内で寝起きができる程度の張馬状態にして自由採食と飲水ができる状態で CLAP を開始した（図 13）。

2.2.4 CLAP の結果

CLAP を開始した数時間後に重度の跛行を呈した（AAEP Grade 4/5）。処置開始から 2 日後に包帯を外したところ、イリゲーションカニューレの湾曲と排液ラインの破断を認めた。それぞれのラインを修復して再度 CLAP を実施したものの、投与した抗菌薬を排液ボトルに十分に回収できない状態となった。その結果、投与した抗菌薬が生体内のデッドスペースに多量に貯留した。これにより CLAP 開始後 7 日目に球節掌側の皮膚が自潰したため CLAP を中止した。中止後、自潰した皮膚の周囲は 0.2%ポピドンヨードで洗浄し、フェニルブタゾン（Butatron^{ac}、4 mg/kg、2 回/日）で疼痛コントロールを行った。以上を示したように 1 回目の CLAP は各種機器のトラブルにより失敗した。

2.3 2 回目の CLAP

1 回目の CLAP を終えてから約 50 日後（関節固定術後 322 日目）にレントゲン検査で関節の癒合評価を行った。その結果、関節が十分に癒合していたため全身麻酔下でインプラントを全て抜去した。抜去した LCP プレートを走査型顕微鏡（S-3400N^q）で観察したところ、プレート全体の表面にバイオフィルムの形成が観察された（図 14）。その後 2 週間にわたって 0.2%ポピドンヨードでの局所洗浄と ST 合剤の投与を継続したが、管背側と自壊した球節掌側からの排膿は続き、感染がコントロールできなかった。感染の根治を目指してインプラントの抜去から 16 日後に 2 回目の CLAP を行った。

2.3.1 CLAP の改善点

2 回目の CLAP では 1 回目の失敗から三つの点について改善を行った。一つめはラインの破綻を防ぐことである。ウマが寝起きする際に下肢部に取り付けたカニューレやチューブが破綻しない仕組みが必要と考えられた。二つ目は排液ルート of 陰圧リークを防ぐことである。ウマの動きによって排液チューブが皮下から抜けてしまい排液ルートに大量の空気が入ってしまった。そのため、ウマが動いても陰圧が保たれるライン構築が必要と考えられた。三つ目は陰圧強度の改善である。NPWT 装置の陰圧によって排液チューブ内の液体を排液ボトルまで吸引するためには、排液チューブ内の静水圧を超える

陰圧をかける必要となる。これらの課題を解決しながら 2 回目の CLAP を実施した。

2.3.2 投与・回収ラインの構築

まず、全身麻酔下で O-arm^{ac} を用いて患部の状態を観察した（図 15）。その結果、第三中手骨遠位に球節掌側の瘻孔に連続する骨欠損部を認め、ここが感染巣の中心と考えた。さらに、プレートを抜去した時に生じた管背側の皮膚欠損部にも感染が残っていたため、上記 2 か所に対して抗菌薬が灌流できるようにラインを構築することとした。抗菌薬の投与ルートに 3 本用意し（図 16）、1 本目のラインは第三中手骨背側の皮下に 8 Fr チューブ^{al} を留置した。2 本目のラインは 3.2 mm のドリルビットを用いて第三中手骨の遠位に背側から掌側に向けて骨孔を作成した。この骨孔に 4.5mm のねじ山を作製し、皮質に固定できる中空型の iMAP ピン（intra-medullary antibiotic perfusion ピン^{am}）を挿入して固定した。3 本目のラインは 2 本目と同じ方法で第一指骨近位背側から第三中手骨遠位の骨欠損部に向けて作製して、iMAP ピンを固定した（図 16）。各投与ラインに造影剤を投与して想定された流路に流れていることを確認した。次に回収ラインを作製した。1 回目の CLAP では吸引ラインが馬の動きによって皮下から抜けたため陰圧が維持できなかった。そこで、2 回目の CLAP では吸引ラインにチューブを使用しない構造とした。まず、スポン

ジフォーム（フォームファイラー^{ai}）を管背側と球節掌側の皮膚欠損部に充填した。それから、薄いコットン（コットンファイラー^{ai}）を術創全体に巻いた。その上から粘着性ドレッシング材（オブサイト^{ai}）を巻いた。これにより術部全体がフィルムで覆われて密閉された状態とした。次に、吸引ルートへの接続部を作製した。球節掌側の皮膚自壊部位のオブサイトをメスで 4 cm×4 cm に切り取り、この部位だけ皮下領域と連続するようにした。この部位にサクシヨンプート（ソフトポート^{ai}）を取り付けて皮下領域からの薬液と排液を吸引できるようにした。1 回目の CLAP では吸引ラインに液体が溜まりすぎることによって吸引圧が足りなくなったが、サクシヨンプートには適量の空気を吸引ラインに持続的に加えられる仕組みが備わっている。吸引ラインが液体と適量の空気で満たされることで排液チューブ内の静水圧が大きくなりすぎないようにした。投与ラインから生理食塩水を投与して、吸引ラインの NPWT 装置に液体が回収されることを確認した。その後、固定した関節をサポートするためのハーフリムキャストをラインに干渉しないように装着した。

2.3.3 馬房内でのラインの接続

ウマが覚醒して馬房に戻った後に、投与ラインと回収ラインを接続した。まず、天井につるしたカゴに 3 台のシリンジポンプ^{an}を設置した。シリンジポンプと 3 本の投与ラインにそれぞれ伸縮性コイルチューブ（大動物用輸液セ

ット⁴⁰⁾、最大伸長時の長さ：3.5 m) を接続して 8 Fr チューブと 2 本の iMAP ピンに接続した。次に、天井のカゴに NPWT デバイスを設置して、8 mm ポリウレタン伸縮性コイルチューブ (AT4-04⁴⁰⁾、最大伸長時の長さ：7m) を介して患部に接続してあるソフトポートに接続した。最後に iMAP ピン周囲に樹脂を成形したドーナツ状の保護具をあてがってウマの寝起きの際に肢から突き出している iMAP ピンに力がかからないようにした (図 17)。シリンジポンプを用いて 1.2 mg/ml のゲンタマイシンを 2 ml/h で各ラインから投与して、NPWT 装置を用いて -120 mmHg で吸引した。また、全身抗菌薬としては原因細菌に対して感受性が認められた ST 合剤を経口投与した。

2.3.4 CLAP の効果

CLAP を開始してから徐々に歩様の改善を認め、CLAP 開始から 14 日目には跛行グレードが治療前の 4/5 から 2/5 に改善した。また、排膿量が顕著に減少した。この時点で術部からの細菌は検出されたが、臨床症状の改善を認めたことから一定の効果があつたと判断して CLAP を終了した。この期間に投与・回収ラインの破断を認めなかった。その後、皮膚が二期癒合するまで 0.2%ポピドンヨードによる洗浄を継続して 2 回目の CLAP を開始してから 59 日目で皮膚の閉鎖を認めた (図 18)。全ての投薬は 2 回目の CLAP を開始してから 94 日目に終了した。症例は騎乗用乗馬として転用された。関節固定手術

後 548 日目（2 回目の CLAP 終了から 204 日目）の再診では感染の再燃は無く
速歩までの騎乗が可能であった。

3. 考察

本症例は両側性近位種子骨々折に伴う中手指節関節の関節固定術の後に SSI を発症した。局所の洗浄・デブリードメントや全身性の抗菌薬投与を行ったが難治性となり CLAP を実施した。1 回目の CLAP ではウマでの治療が初めてだったこともあり失敗し、手技の改善が必要であった。2 回目の CLAP ではインプラント抜去術を併用した CLAP によって感染コントロールが達成できた。

ヒト医療分野での治療報告^{41,42}や本研究の治療経過を考慮すると CLAP が適切に行われればウマ医療でも効果的な治療になりうると考えられた。つまり、本症例ではインプラントの全抜去のみでは感染コントロールができなかったが、2 回目の CLAP 治療を開始してから 14 日目で症状の改善を認めた。この事実は CLAP が感染コントロールに寄与していることを示唆している。しかしながら、ヒト医療で報告されているような顕著な改善が認められなかったことも事実である。日本ではウマの骨関節感染症例が少なく、治療経験が少ない。そのため、治療方法が局所洗浄や全身の抗菌薬投与など一般的案ものに限定されがちである。このような従来治療は一般的な軟部組織の感染症には十分と考えられるが、多量のインプラントを使用した手術の SSI に対しては不十分と考えられる。ひとたびバイオフィルムが形成されると感染の根治には非常に高濃度の抗菌薬を長期にわたって供給する必要がある^{72,104}。本症例でも CLAP が行われたのは関節固定術後 266 日であり、バイオフィルム

形成の懸念や多剤耐性菌の検出がある状況だった（表4）。そのため、感染急性期の治療方法について再考する必要がある、CLAPは有用な選択肢になりうるかもしれない。

CLAPで用いたゲンタマイシンの選択にはいくつかの利点がある。まず、ゲンタマイシンが濃度依存性の抗菌薬であるということである。そしてゲンタマイシンなどのアミノグリコシド系抗菌薬は他の抗菌薬に比べてバイオフィルムへの効果が高いこと²²、さらにウマ医療においてこれまで長く使用されてきた実績があり安全性が高いことである^{105,106}。安全性に関して、アミノグリコシド系抗菌薬は腎毒性や聴覚毒性が報告されている¹⁰⁷。しかし、CLAPでは局所に抗菌薬を灌流させるため、全身投与に比べて抗菌薬の総投与量を減らせることで副作用が軽減できることも大きな利点である。具体的には、ゲンタマイシンの通常の投与量は全身投与で4.4 mg/kgで500 kgのウマでは2,200 mg/mlとなる。^{108,109}その一方で、2回目のCLAPでは1.2 mg/mlの高濃度のゲンタマイシン溶液を2 ml/hで3本のラインから投与したため投与量は1日当たり172 mgとなり、全身投与量を大きく下回った。さらに、NPWT装置によって大部分が回収されることを考慮すると全身循環に移行する量はさらに少ないことが考えられた。

本症例を通してウマでCLAPを行う際の注意点が主に三点あげられた。

一点目は全身麻酔と詳細な画像診断の必要性である。骨折関連感染に対して

CLAP を行う場合、画像診断をもとにして感染範囲の推定とライン設計を行う必要がある。本症例では全身麻酔リスクを避けるために単純 X 線検査と臨床症状によって感染範囲を推定したが感染範囲の推定は不十分だった。また、鎮静と局所麻酔によって立位での処置を試みたが十分な処置が難しかった。そのため、可能な限りリスクを減らしながら全身麻酔による詳細な画像診断と手術を実施することが望ましいと考えられる。

二点目はウマの動きに耐えられるラインを設計することである。下肢部に疼痛があるウマでは、動物福祉の観点から立位で数日間治療することは避けるべきである。そのため、馬房内でのウマの寝起きや歩行に耐えうるライン構築が必要であった。本症例では下肢部と天井との距離が 3 m あったが伸縮性のコイルチューブを用いることでウマを自由にした状態での抗菌薬投与と回収が可能だった。また、ウマの寝起きの際に患部に挿入したピンが損傷しないように保護することも重要であった。

三点目はドレナージ管理である。1 回目の CLAP では回収ラインにエアリークが発生したため十分なドレナージを行えなかった。一般的に CLAP を行う際には 1 日に数回ラインの閉塞・リークチェックを行う必要がある。簡易的なチェック方法は投与ラインに生理食塩水や少量の空気を注入して、回収チューブ内の薬液や空気の移動を確認することである。さらに、投与量と回収量に大きな乖離がないこともチェックポイントの一つである。これらに注意

することで、CLAP の失敗を最小限に抑えられると考えられた。

本章の研究にはいくつかのリミテーションがある。まず本研究が 1 症例のみの症例報告である点である。CLAP の有用性を評価するためにはより多くの症例での CLAP の成績評価が必要である。次に、CLAP とインプラントの抜去を同時期に行ったため CLAP の真の評価ができないことである。将来的にはインプラントを温存しなければならない感染症例に対して CLAP を実施して評価する必要がある。

本章では関節固定手術後に骨関節に難治性細菌感染を発生した症例に対して CLAP を実施して良好な成績が得られた。難治性感染の治療で重要な高濃度抗菌薬の安定供給を可能とする本法はウマの SSI 治療の新しい選択しとなりうると考えられた。

4. 小括

従来治療では治癒しなかった関節固定手術後の難治性骨関節細菌感染に対して CLAP を実施した。本治療法をウマで使用したのは本症例が初めてだったため、手技的なトラブルが発生した。しかし、各種手技を改善した結果、ウマで下肢部に対する CLAP が行えることが明らかとなり、感染コントロールを達成することができた。従来の治療法では血流が乏しい生体内の死腔に抗菌薬を供給することが難しく、治療成績が悪かった。その一方、CLAP は高濃度の抗菌薬を安定的に供給することが可能で、ウマの SSI 治療の新たな治療オプションになりうると考えられる。

5. 図表

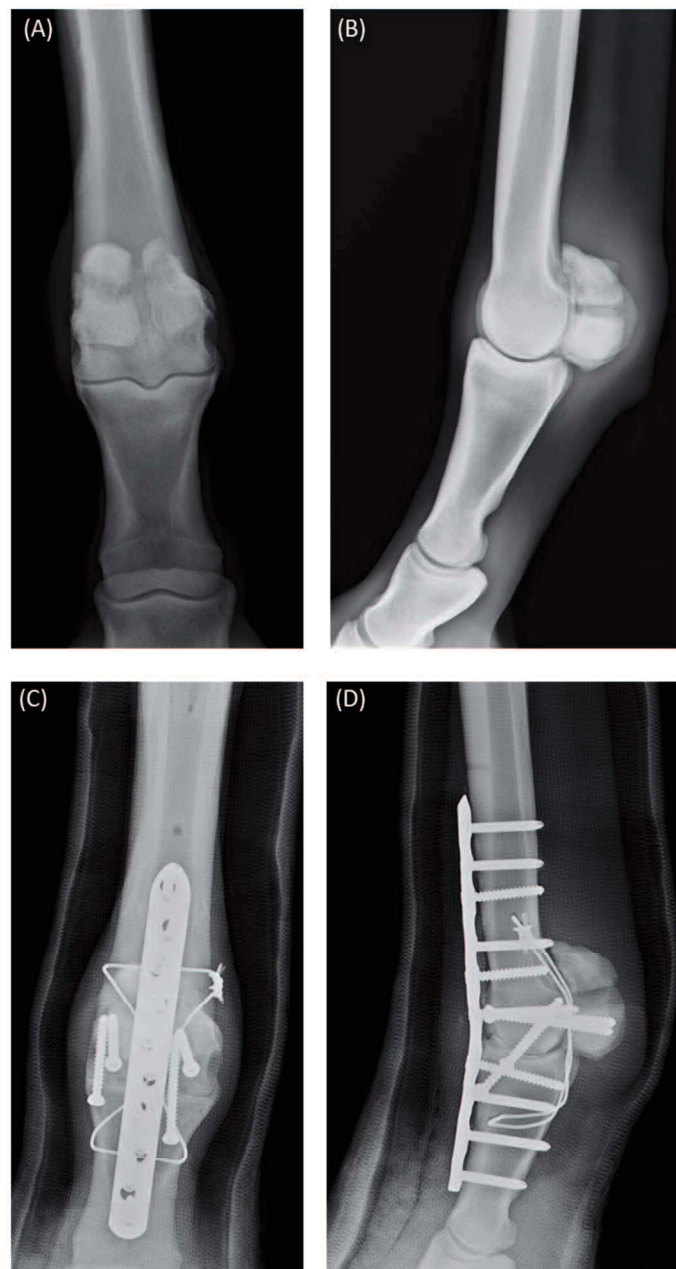


図 11：骨折発症時と関節固定術後のレントゲン画像

骨折発症時の（A）背掌像と（B）外内像。手術後の（C）背掌像と（D）
外内像

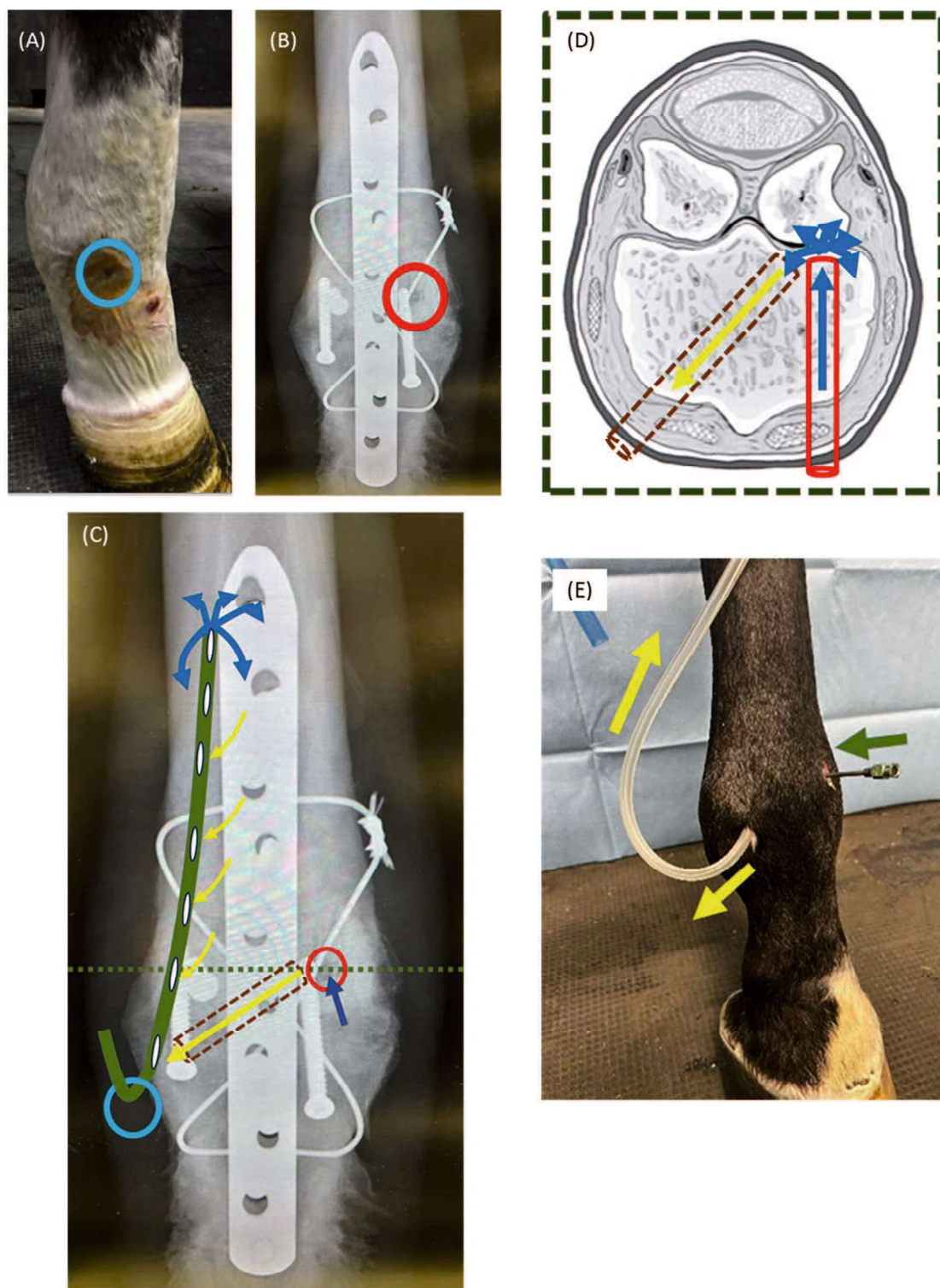


図 12：1 回目の持続的抗菌薬灌流療法の外観とラインの模式図

図の説明は次ページに記載。

(A) 患肢の外観。球節近位内側の瘻孔（青丸）。(B) ルーズニングした
螺子を抜いた骨孔（赤丸）。(C) ラインの模式図。抗菌薬液は 3.2 mm の骨孔
（赤丸）を通過して 2.7 mm の骨孔（茶色点線）に抜ける。それから瘻孔（青丸）
から挿入したダブルルーメンチューブ（緑線）に回収される。(D) 図 (C)
の緑点線における横断像。(E) 検体を用いたモデルの外観像。緑矢印と黄色
矢印はそれぞれ投与ラインと排液ラインを示している。

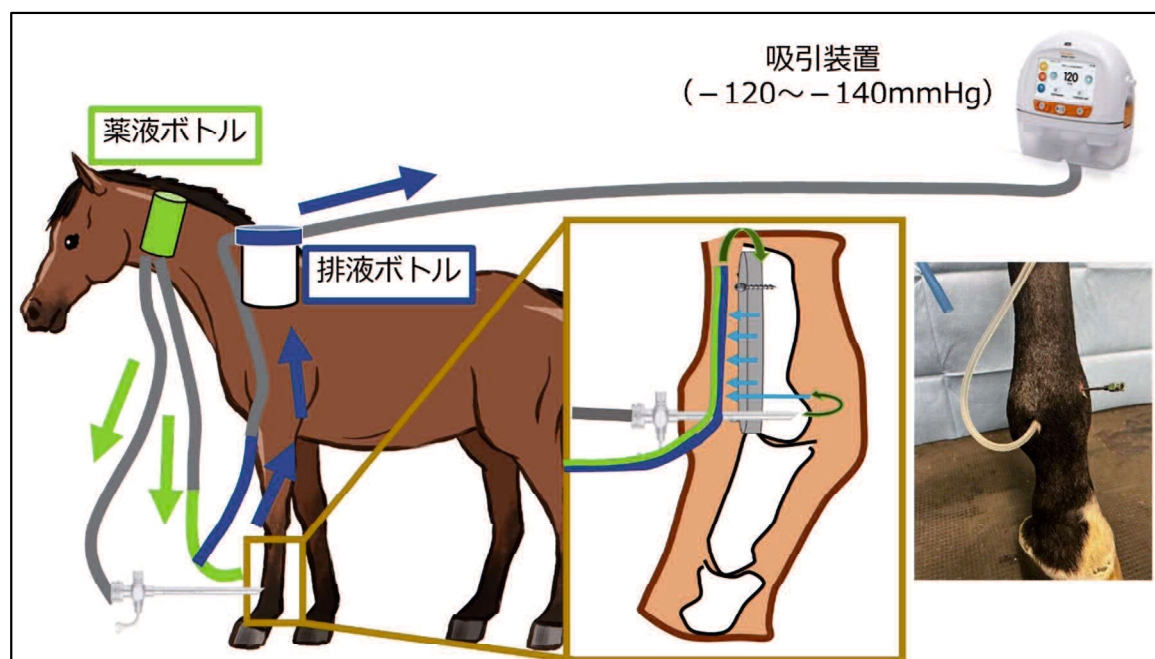


図 13：1 回目の CLAP の模式図

薬液ボトルの抗菌薬がカニューレとチューブを通して骨内と皮下に注入される。陰圧がかかっているダブルルーメンチューブの排液ライン（青線）から骨内と皮下の抗菌薬が回収され排液ボトルまで回収される。右写真は別個体の解剖肢を用いた投与部位の外観。

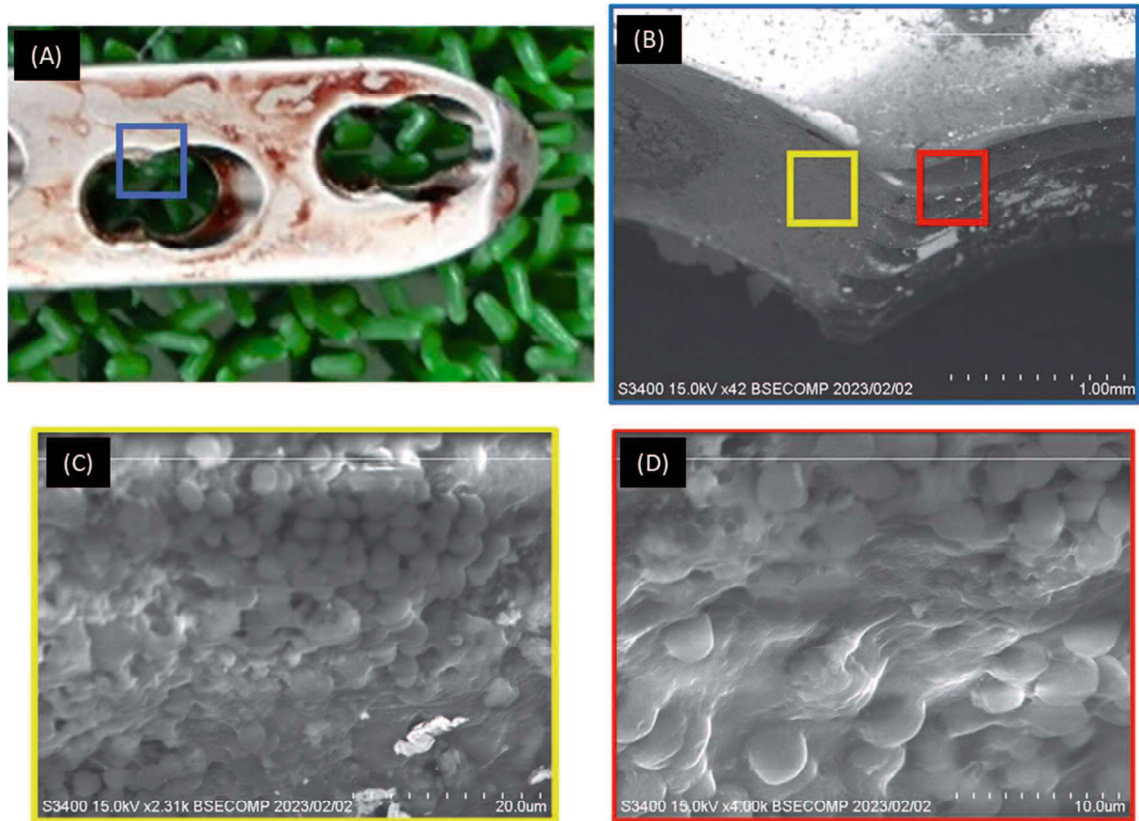


図 14：インプラント表面のバイオフィルム

(A) 抜去された Locking compression plate。

(B) 図 (A) の青四角領域の走査型電子顕微鏡像。

(C) 図 (B) の黄四角領域の拡大像。

(D) 図 (B) の赤四角領域の拡大像。



図 15：インプラント抜去後の Cone-beam CT 像（矢状断面）

第三中手骨遠位に近位種子骨と連続する骨欠損部が認められる（橙点線で囲んだ領域）。

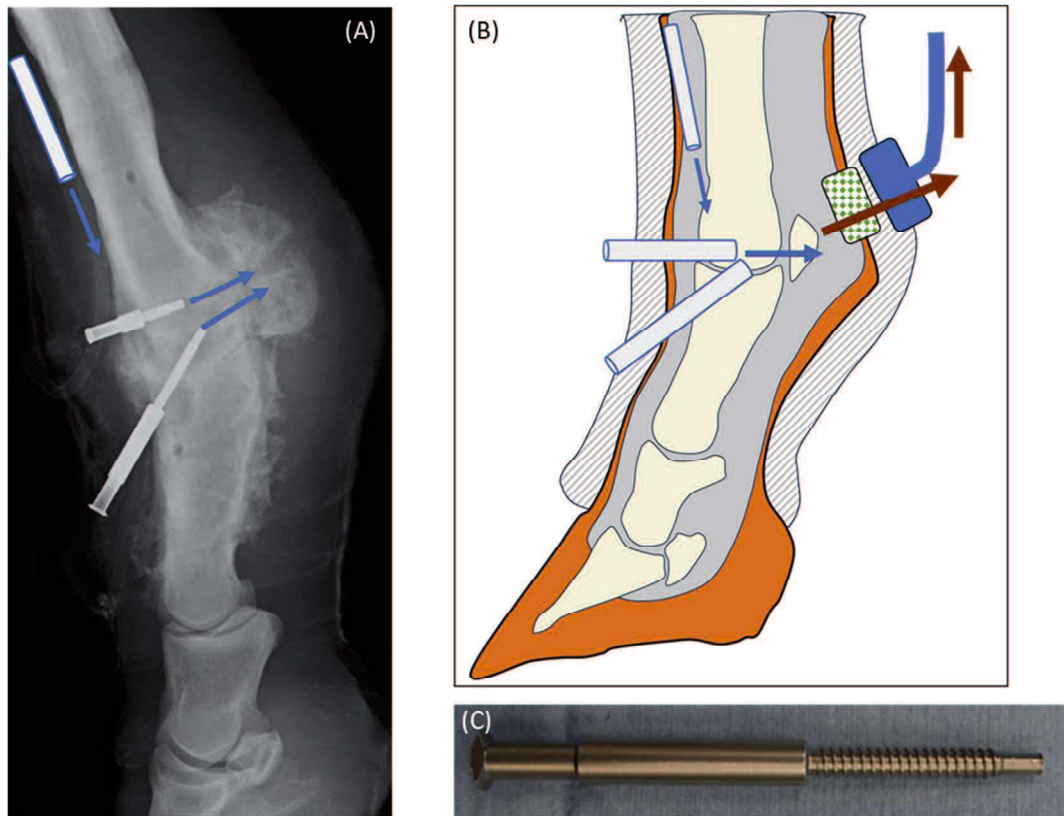


図 16：2 回目の CLAP の模式図

(A) 8 Fr チューブを第三中手骨の背側に設置し、第三中手骨遠位背側と第一指骨の近位背側から髓内ピンを挿入。青矢印は抗菌薬の流路を示す。 (B) 抗菌薬流路の模式図。図 (A) に示した 3 つのルートから注入された抗菌薬は球節掌側のコットンフォーム（緑点四角）を通過して皮膚表面に吸引される。吸引された抗菌薬はコットンファイラー（灰色斜線エリア）を通して吸引ライン（青四角）に入り回収される。(C) 抗菌薬投与に用いた髓内ピン



図 17：2 回目の CLAP の外観。

伸縮式の抗菌薬投与・回収ラインを作製し、ウマが馬房内で移動と寝起きが可能な状態とした。カゴの収容物は①定量投与を行うための 3 台のシリンジポンプ、②吸引装置、③排液の回収ボトル、④電源。カゴから延びる 3 本の透明コイルチューブは抗菌薬投与ライン。黒いコイルチューブは排液ライン。



図 18：皮膚損傷の外観

(A) 2 回目の CLAP 直後。膿が少量しか認められない。(B) 2 回目の CLAP 終了から 45 日目で皮膚の閉鎖が認められた。

表 4：術部から分離された細菌株と抗菌薬感受性

素材日（手術後の日数）	細菌名	Gentamicin	Ambicacin	Vancomycin	Chloramphenicol	Benzylpenicillin	Cephalexin	Imipenem	Fosfomycin	Mimocycline	Tetracycline	Levofloxacin	Colistin	Sulfamethoxazole Trimethoprim
21	<i>Atalgiaes facialis</i>	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S	0	S	S
	<i>Enterococcus avium</i>	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	0	R	S
	<i>Enterococcus faecidis</i>	R	I	S	S	S	S	S	S	I	R	0	R	S
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	R	R	R	I	R	R	R	R	S	S	0	S	S
	<i>Streptococcus oris</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	0	R	S
40	<i>Enterococcus faecidis</i>	R	R	S	S	S	R	I	S	R	R	0	R	S
	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	0	R	S
61	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	S	R	R	R	R	S	I	S	S	0	S	R
	<i>Enterococcus faecidis</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0	R	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	I	R	R	R	R	S	S	R	R	0	S	R
	<i>Staphylococcus epiderm</i>	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	0	S	S
	<i>Streptococcus sp.</i>	I	R	S	S	S	S	S	S	S	I	0	R	R
76	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	0	S	R
79	<i>Enterococcus faecidis</i>	R	R	S	S	S	I	R	S	R	R	0	R	S
91	<i>Enterococcus faecidis</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	I	R	0	R	S
	<i>Staphylococcus sp.</i>	S	S	S	S	R	S	S	R	S	I	0	S	S
116	<i>Enterococcus faecidis</i>	R	I	R	R	R	S	S	S	R	R	0	S	S
	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	0	S	R
	<i>obligate anaerobic bacteria</i>	R	S	S	S	R	R	R	S	I	R	S	R	R
126	<i>Enterococcus faecidis</i>	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	0	R	R
	<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	0	S	R
	<i>Staphylococcus sp.</i>	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	0	R	R
140	<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	0	S	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	0	S	R
	<i>alpha hemolytic streptococcus</i>	I	R	S	S	S	S	S	I	I	R	0	R	S
175	<i>Enterococcus faecidis</i>	R	R	0	S	0	R	S	S	I	R	S	R	S
	<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	0	S	R
	<i>Staphylococcus simulans</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	0	R	S
238 (1回目のCLAPの前)	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	0	S	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	0	S	R
	<i>Staphylococcus aureus</i>	R	S	S	R	R	S	S	S	I	R	0	R	S
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	S	R	S	I	S	S	S	S	R	R	0	R	I
	<i>Streptococcus zooglydemicus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	0	R	S
274	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	0	S	R
	<i>Staphylococcus aureus</i>	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	0	R	S
	<i>Streptococcus zooglydemicus</i>	S	I	S	S	R	S	S	S	S	I	0	R	S
	<i>obligate anaerobic bacteria</i>	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	0	R	S
	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	0	R	S
338 (2回目のCLAPの前)	<i>Enterococcus faecidis</i>	R	R	S	S	S	I	S	R	S	S	0	R	S
	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	0	R	S
	<i>Proteus hauseri</i>	S	S	R	S	R	R	S	S	S	I	0	R	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	0	S	S
	<i>Staphylococcus aureus</i>	I	S	S	S	R	S	S	S	S	I	0	R	S
351	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	S	I	S	S	S	S	S	S	R	R	0	R	S
	<i>Streptococcus zooglydemicus</i>	I	R	S	S	S	S	S	S	R	R	0	R	S
	<i>obligate anaerobic bacteria</i>	R	R	R	S	R	I	S	S	S	R	0	R	S
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	S	R	R	S	R	S	I	0	I	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	0	S	S
344	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	0	R	S
	<i>Streptococcus zooglydemicus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	0	R	S
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	I	R	R	R	R	S	R	S	S	0	S	S
	<i>Actinobacillus equuli</i>	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	0	S	S
	<i>Irisibacterium burkham</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0	R	R
373	<i>Enterococcus faecidis</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	I	R	0	R	S
	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	0	S	R
	<i>Proteus hauseri</i>	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	0	R	R
	<i>Providencia rettgeri</i>	R	R	R	I	S	S	S	R	R	R	0	R	S
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	R	I	S	S	S	S	S	S	R	R	0	R	S
373	<i>Streptococcus zooglydemicus</i> No.1	S	I	S	S	R	I	S	S	S	I	0	R	S
	<i>obligate anaerobic bacteria</i> No.2	R	R	S	S	R	R	S	R	S	S	0	I	R
	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	0	R	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	R	R	S	S	R	I	R	0	S	R
	<i>Staphylococcus aureus</i>	R	S	S	S	R	I	S	S	I	R	0	R	R
373	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R	0	R	I
	<i>Streptococcus zooglydemicus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	R	S

総括

手術部位感染（SSI）とは手術操作が及んだ部位に発生する感染と定義される。ウマの臨床現場では骨折手術後の SSI に対して標準的な治療を行っても感染コントロールができない症例が散見される。また、下肢部の骨折手術で SSI が発生すると、骨癒合の遅延、対側肢の蹄葉炎など様々な二次的な合併症が起こり安楽死に至る症例もある。そのため、骨折手術に対する SSI の予防・治療策の改善が必要とされている。

SSI の発生要因として周術期の抗菌薬投与の有無、使用するインプラントの量、手術時間などが報告されている。しかし、競走馬において最も多く実施される手術である下肢部の骨折手術に焦点をあてた疫学調査はなく、SSI の予防、治療策の改善に必要な基礎的データが不足している。また、骨折手術ではインプラント表面や感染組織は血流が少ないためにバイオフィームが形成されやすい環境となっており、難治性の感染に移行しやすい。このような感染をコントロールするためにはバイオフィーム内の細菌を殺菌する必要がある、これには非常に高濃度の抗菌薬を長時間感染巣に供給する必要がある。しかし、ウマ医療で用いられている一般的な製剤と投与方法ではこれを行うことは難しい。そのため、感染巣に高濃度の抗菌薬を持続的に供給できる製剤の開発や投与方法を確立できれば SSI の治療方法の改善ができる可能性がある。

そこで本研究では、まず第 1 章で 2011 年から 2020 年に行った下肢部の骨折手術馬を回顧的に調査し、競走馬の骨折手術の SSI の特徴を明らかにした。

続いて第 2 章では局所に高濃度の抗菌薬を分布させることを目的とした抗菌薬製剤の検討を行った。そして第 3 章では第 2 章で作製した製剤を生体に局所投与し、局所抗菌薬濃度の推移を検討した。最後の 4 章では難治性の感染を発生した骨折症例に対して高濃度の抗菌薬を持続的に局所灌流する新規治療方法を試験的に行い、その課題と解決策を検討するとともにウマでの効果の有無を明らかにした。

第 1 章では 2011 年から 2020 年の間に第一指骨と第三中手骨/中足骨の縦骨折を手術した 451 症例に対する SSI の発生状況を調査した。SSI の発生率は 2.9%で、手術方法別ではプレート固定手術の SSI 発生率（21.4%）は螺子固定手術の発生率（2.3%）よりも有意に高かった。また、予後については SSI が発生しても競走復帰率や退院率に差がなかったものの、入院期間が延長することが明らかとなった。プレート固定では使用するインプラントの量が多く細菌が定着しやすいことに加えて、その周囲のデッドスペースは血流に乏しく生体免疫や抗菌薬が届きにくい。これらが要因となって SSI の発生率が高くなると考えられた。そこで、第 2 章ではこのようなデッドスペースに使用できる抗菌薬製剤を検討した。

第 2 章では人工合成ポリマーのポリ乳酸・グリコール酸共重合体（PLGA）とウマ医療で使用されている抗菌薬のマルボフロキサシンを用いて局所投与可能な徐放製剤を作成した。乳酸・グリコール酸比が 50:50 で分子量が 13,500

から 69,000 の種々の PLGA を用いてマルボフロキサシンのマイクロパーティクルを作製した。これらの製剤を用いて試験管内での徐放性能の比較を行った。その結果、数日間にわたって持続的な抗菌薬の放出が可能な製剤を選定できた。この結果から、この製剤を生体内に投与した時に、難治性感染症の治療に必要な濃度の抗菌薬を持続的に供給できる可能性が期待された。

第 3 章では第 2 章で作製した徐放性抗菌薬製剤を投与した組織の組織液中抗菌薬濃度を検討した。ウマの皮下に徐放製剤を単回投与したところ、投与部位の組織液中マルボフロキサシン濃度について各タイムポイントの中央値は 17.7~33.1 $\mu\text{g/mL}$ であった。この濃度は既報で示された、対象細菌の 90% の発育を抑制できる濃度 0.027~4.0 $\mu\text{g/ml}$ を上回った。組織液中濃度が個体による誤差が大きいことや、短期的な投与部位の腫脹が課題としてあげられたが、これらを改善することで高濃度の抗菌薬を局所に比較的長時間分布させる方法として将来的な応用ができると考えられた。

ヒトの整形外科領域では難治性の感染症に対して適切な濃度の抗菌薬を持続的に局所投与しながら、陰圧によって感染巣への誘導と回収を行う持続的局所抗菌薬灌流療法（CLAP）が良好な成績を収めている。しかしながら、ウマをはじめとした動物で使用された報告はない。そこで、第 4 章では両側性近位種子骨々折に伴う中手指節関節の関節固定手術後に難治性の SSI を発生した症例に対して CLAP を実施した。細菌汚染された多量のインプラントを

温存した状態で実施した 1 回目の CLAP では、器材の破損など多くのトラブルに遭遇し、治療継続を中断した。症状の改善に向けてインプラントを全て抜去したが感染コントロールができなかったため、課題を改善して 2 回目の CLAP を行った。その結果、CLAP を開始してから 2 週間で臨床症状が大きく改善し、CLAP 終了後 204 日目までに感染の再燃は無く乗馬としての使用ができるほどに快復した。本症例を通してウマで CLAP を行う手技を確立できたとともに、これまで有効な治療方法が無く安楽死に至っていた難治性の骨関節感染症例に対して CLAP が一定の効果をもたらすことが示された。

本研究では、サラブレッド種競走馬の下肢部の骨折手術について SSI の特徴を明らかにするとともに、ウマに使用可能な抗菌薬を用いた徐放製剤の開発と投与後の抗菌薬濃度推移を調査し、さらなる検討により新たな治療方法として応用できる可能性を示した。さらに、実症例に対する新規抗菌薬投与方法の試行とともにその改良を行い、難治性 SSI 症例に対する効果を明らかにした。本研究で得られた結果を基に、今後も製剤・投与方法の改善を行うことで難治性 SSI の効果的な治療方法の確立に寄与できると考えられた。

本研究で用いた製品の企業情報

a : Meiji Seika ファルマ、東京、日本

b : 3M、東京、日本

c : DePuy Synthes、東京、日本

d : 株式会社ケミックス、神奈川、日本

e : 日医工株式会社、富山、日本

f : フジタ製薬株式会社、東京、日本

g : ベクトン・ディッキンソン株式会社、東京、日本

h : ブルカー・ダルトニクス、神奈川、日本

i : Sigma-Aldrich、ミズーリ、アメリカ

j : 関東化学株式会社、東京、日本

k : 東京化成株式会社、東京、日本

l : Misonix、ニューヨーク、アメリカ

m : IKA、Staufen、ドイツ

n : Whatman®、アメリカ

o : Jasco、東京、日本

p : Filger、愛知、日本

q : 日立、東京、日本

r : 共立製薬株式会社、東京、日本

s : 丸石製薬株式会社、大阪、日本

t : Johnson and Johnson, 東京、日本

u : 産物アニマルヘルス株式会社、大阪、日本

v : Eppendorf、ハンブルグ、カナダ

w : Toronto Research Chemicals、トロント、カナダ

x : 富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本

y : Waters、マサチューセッツ、アメリカ

z : 島津製作所、京都、日本

aa : Sciex、フラミンガム、マサチューセッツ、アメリカ

ab : ファイザー株式会社、東京、日本

ac : Bimeda、ダブリン、アイルランド

ad : 太陽ファルマ株式会社、東京、日本

ae : メドトロニック、ミネアポリス、アメリカ

af : 明治アニマルヘルス株式会社、熊本、日本

ag : KARL STORZ Endoscopy Japan K. K.、東京、日本

ah : Cardinal Health K.K.、東京、日本

ai : スミスアンドネフュー株式会社、東京、日本

aj : GE Healthcare、東京、日本

ak : 株式会社ニプロ、大阪、日本

al : アトムメディカル、東京、日本

am : キューベックスメディカル、東京、日本

an : テルモ株式会社、東京、日本

ao : クリエイトメディカル株式会社、神奈川、日本

ap : 潤商、東京、日本

aq : Eppendorf、ハンブルグ、ドイツ

ar : Toronto Research Chemicals、トロント、カナダ

as : Waters、マサチューセッツ、アメリカ

at : Sciex、フラミンガム、マサチューセッツ、アメリカ

謝辭

本稿を終えるにあたり、本研究のとりまとめに対する貴重なご助言ならびに本論文のご高閲を頂いた日本中央競馬会 競走馬総合研究所 丹羽 秀和博士に心から感謝の意を表します。また、本論文の作製にあたり終始御懇篤なご指導を賜り、ご高閲を頂いた日本中央競馬会競走馬総合研究所 太田 稔 博士に感謝の意を表します。さらに、本論文をご審査いただいた山口大学教授 度会 雅久 博士、鹿児島大学 帆保 誠二 博士、山口大学教授 早坂 大輔 博士、山口大学准教授 清水 隆 博士に深謝いたします。

本研究の遂行を支援していただいた、日本中央競馬会 競走馬総合研究所 臨床医学研究室ならびに美浦トレーニング・センターの皆様にも心から深謝いたします。特に、本研究の考察において抗菌薬分野の幅広いアドバイスをくださった黒田 泰輔 博士と、第4章の症例の主治医として新規治療法の導入を推進し治療サポートをしてくださった西岡 孝之 獣医師には心から深謝申し上げます。また、第4章の新規治療について技術指導をはじめ多角的な視点からアドバイスをくださった千葉県総合救急災害医療センターの姫野 大輔 医師に心からお礼申し上げます。さらに、第2章の徐放製剤の検討について、豊富な経験と知識に基づいてご指導してくださった京都大学 田畑 泰彦 博士に深謝いたします。最後に、抗菌薬濃度の測定を実施してくださった競走馬理化学研究所 南島 陽平 博士にも心よりお礼申し上げます。

引用文献

1. Sun TC, Riggs CM, Cogger N, et al: Noncatastrophic and catastrophic fractures in racing Thoroughbreds at the Hong Kong Jockey Club. *Equine Vet J* 51:77-82, 2019.
2. Mita H, Tamura N, Fukuda K, et al: Incidence of carpal fractures and risk factors for recurrent fractures after arthroscopic removal of carpal chip fracture fragments in Thoroughbred racehorses. *Vet Rec* 190:e1482, 2022.
3. Martig S, Chen W, Lee PV, et al: Bone fatigue and its implications for injuries in racehorses. *Equine Vet J* 46:408-415, 2014.
4. Riggs CM: Fractures--a preventable hazard of racing thoroughbreds? *Vet J* 163:19-29, 2002.
5. 日本中央競馬会: 日本中央競馬会馬事部 (2023) 競走馬保健衛生年報.
6. McIlwraith CW, Nixon AJ, Wright IM: Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse (ed 4th ed), Mosby/Elsevier, 2015.
7. Auer JA, Stick JA, Kümmeler JM, et al: *Equine surgery* (ed 5th ed), Elsevier, 2019.
8. Berríos-Torres SI, Umscheid CA, Bratzler DW, et al: Centers for Disease Control and Prevention Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection, 2017. *JAMA Surg* 152:784-791, 2017.
9. Mu Y, Edwards JR, Horan TC, et al: Improving risk-adjusted measures of surgical site infection for the national healthcare safety network. *Infect Control Hosp*

Epidemiol 32:970-986, 2011.

10. Kusachi S, Kashimura N, Konishi T, et al: Length of stay and cost for surgical site infection after abdominal and cardiac surgery in Japanese hospitals: multi-center surveillance. *Surg Infect (Larchmt)* 13:257-265, 2012.
11. Brunsting JY, Pille FJ, Oosterlinck M, et al: Incidence and risk factors of surgical site infection and septic arthritis after elective arthroscopy in horses. *Vet Surg* 47:52-59, 2018.
12. Ahern BJ, Richardson DW, Boston RC, et al: Orthopedic infections in equine long bone fractures and arthrodeses treated by internal fixation: 192 cases (1990-2006). *Vet Surg* 39:588-593, 2010.
13. Curtiss AL, Stefanovski D, Richardson DW: Surgical site infection associated with equine orthopedic internal fixation: 155 cases (2008-2016). *Vet Surg* 48:685-693, 2019.
14. James FM, Richardson DW: Minimally invasive plate fixation of lower limb injury in horses: 32 cases (1999-2003). *Equine Vet J* 38:246-251, 2006.
15. Levine DG, Richardson DW: Clinical use of the locking compression plate (LCP) in horses: a retrospective study of 31 cases (2004-2006). *Equine Vet J* 39:401-406, 2007.
16. MacDonald DG, Morley PS, Bailey JV, et al: An examination of the occurrence of

- surgical wound infection following equine orthopaedic surgery (1981-1990).
Equine Vet J 26:323-326, 1994.
17. Neil KM, Axon JE, Begg AP, et al: Retrospective study of 108 foals with septic osteomyelitis. Aust Vet J 88:4-12, 2010.
 18. Smith LJ, Marr CM, Payne RJ, et al: What is the likelihood that Thoroughbred foals treated for septic arthritis will race? Equine Vet J 36:452-456, 2004.
 19. Rinnovati R, Butina BB, Lanci A, et al: Diagnosis, Treatment, Surgical Management, and Outcome of Septic Arthritis of Tarsocrural Joint in 16 Foals. J Equine Vet Sci 67:128-132, 2018.
 20. Edmiston CE, Jr., McBain AJ, Roberts C, et al: Clinical and microbiological aspects of biofilm-associated surgical site infections. Adv Exp Med Biol 830:47-67, 2015.
 21. Rather MA, Gupta K, Mandal M: Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. Braz J Microbiol 52:1701-1718, 2021.
 22. Ceri H, Olson ME, Stremick C, et al: The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol 37:1771-1776, 1999.
 23. Sandoe JA, Wysome J, West AP, et al: Measurement of ampicillin, vancomycin,

- linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *J Antimicrob Chemother* 57:767-770, 2006.
24. Sweet FA, Roh M, Sliva C: Intrawound application of vancomycin for prophylaxis in instrumented thoracolumbar fusions: efficacy, drug levels, and patient outcomes. *Spine (Phila Pa 1976)* 36:2084-2088, 2011.
25. Hamoudi C, Hamon M, Reiter-Schatz A, et al: Cement loaded with high-dose gentamicin and clindamycin does not reduce the risk of subsequent infection after aseptic total hip or knee revision arthroplasty: a preliminary study. *J Orthop Traumatol* 25:37, 2024.
26. Tubaki VR, Rajasekaran S, Shetty AP: Effects of using intravenous antibiotic only versus local intrawound vancomycin antibiotic powder application in addition to intravenous antibiotics on postoperative infection in spine surgery in 907 patients. *Spine (Phila Pa 1976)* 38:2149-2155, 2013.
27. Bakhsheshian J, Dahdaleh NS, Lam SK, et al: The use of vancomycin powder in modern spine surgery: systematic review and meta-analysis of the clinical evidence. *World Neurosurg* 83:816-823, 2015.
28. Chiang HY, Herwaldt LA, Blevins AE, et al: Effectiveness of local vancomycin powder to decrease surgical site infections: a meta-analysis. *Spine J* 14:397-407, 2014.

29. Evaniew N, Khan M, Drew B, et al: Intrawound vancomycin to prevent infections after spine surgery: a systematic review and meta-analysis. *Eur Spine J* 24:533-542, 2015.
30. Khan NR, Thompson CJ, DeCuypere M, et al: A meta-analysis of spinal surgical site infection and vancomycin powder. *J Neurosurg Spine* 21:974-983, 2014.
31. 日本化学療法学会 日: 術後感染予防抗菌薬適正使用のための実践ガイドライン. *日化療会誌* 64:153-232, 2016.
32. Society(MSIS) MI: Second International Consensus Meeting(ICM) on Musculoskeletal Infection. 2018.
33. 田中栄ほか監訳、山田浩司編: 人工関節周囲感染対策における国際コンセンサスー204 の設問とコンセンサスー. 2016.
34. Holcombe SJ, Schneider RK, Bramlage LR, et al: Use of antibiotic-impregnated polymethyl methacrylate in horses with open or infected fractures or joints: 19 cases (1987-1995). *J Am Vet Med Assoc* 211:889-893, 1997.
35. Neut D, van de Belt H, Stokroos I, et al: Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *J Antimicrob Chemother* 47:885-891, 2001.
36. Lecaroz MC, Blanco-Prieto MJ, Campanero MA, et al: Poly(D,L-lactide-coglycolide) particles containing gentamicin: pharmacokinetics and

- pharmacodynamics in *Brucella melitensis*-infected mice. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1185-1190, 2007.
37. Makino K, Nakajima T, Shikamura M, et al: Efficient intracellular delivery of rifampicin to alveolar macrophages using rifampicin-loaded PLGA microspheres: effects of molecular weight and composition of PLGA on release of rifampicin. *Colloids Surf B Biointerfaces* 36:35-42, 2004.
38. 白井純宏, 具嶋泰弘, 前原潤一, et al: 創内持続陰圧洗浄療法と局所陰圧閉鎖療法を用いて下肢を救済し得た壊死性筋膜炎の 1 例(Leg salvage in necrotizing fasciitis by combining intra-wound continuous negative pressure and irrigation therapy with negative pressure wound therapy: a case report). *28:21-26*, 2017.
39. Caesar BC, Morgan-Jones RL, Warren RE, et al: Closed double-lumen suction irrigation in the management of chronic diaphyseal osteomyelitis: long-term follow-up. *J Bone Joint Surg Br* 91:1243-1248, 2009.
40. Oe K, Maruo A, Fukui T, et al: Treatment of chronic osteomyelitis of the femur by intramedullary antibiotic perfusion (iMAP): a case report. *J Orthop Case Rep* 11:35-38, 2021.
41. Himeno D, Matsuura Y, Maruo A, et al: A novel treatment strategy using continuous local antibiotic perfusion: a case series study of a refractory infection caused by

- hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *J Orthop Sci* 27:272-280, 2022.
42. Maruo A, Oda T, Mineo R, et al: Continuous local antibiotic perfusion: A treatment strategy that allows implant retention in fracture-related infections. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 30:10225536221111902, 2022.
43. Richardson DW: Complications of orthopaedic surgery in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 24:591-610, viii, 2008.
44. Ban KA, Minei JP, Laronga C, et al: American College of Surgeons and Surgical Infection Society: Surgical Site Infection Guidelines, 2016 Update. *J Am Coll Surg* 224:59-74, 2017.
45. Fukuda H, Sato D, Iwamoto T, et al: Healthcare resources attributable to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* orthopedic surgical site infections. *Sci Rep* 10:17059, 2020.
46. O'Connor O, Thahir A, Krkovic M: How Much Does an Infected Fracture Cost? *Arch Bone Jt Surg* 10:135-140, 2022.
47. Zimlichman E, Henderson D, Tamir O, et al: Health care-associated infections: a meta-analysis of costs and financial impact on the US health care system. *JAMA Intern Med* 173:2039-2046, 2013.
48. Stewart S, Richardson D, Boston R, et al: Risk Factors Associated With Survival to Hospital Discharge of 54 Horses With Fractures of the Radius. *Vet Surg*

- 44:1036-1041, 2015.
49. Santschi EM: Prevention of postoperative infections in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 22:323-334, viii, 2006.
50. Dahan R, Oreff GL, Tatz AJ, et al: Pharmacokinetics of regional limb perfusion using a combination of amikacin and penicillin in standing horses. *Can Vet J* 60:294-299, 2019.
51. Gustafsson K, Tatz AJ, Dahan R, et al: Synovial Concentration of Trimethoprim-Sulphadiazine Following Regional Limb Perfusion in Standing Horses. *Animals (Basel)* 11, 2021.
52. Mosichuk AP, Smith JS, Tatarniuk DM, et al: Meropenem Administered via Intravenous Regional Limb Perfusion for Orthopedic Sepsis in Horses: A Clinical Retrospective Study. *Front Vet Sci* 8:629627, 2021.
53. Rubio-Martínez LM, López-Sanromán J, Cruz AM, et al: Evaluation of safety and pharmacokinetics of vancomycin after intravenous regional limb perfusion in horses. *Am J Vet Res* 66:2107-2113, 2005.
54. Daniels A, Pezzanite LM, Griffenhagen GM, et al: Evaluation of factors associated with surgical site infection in equine proximal interphalangeal joint arthrodesis: 54 cases (2010-2019). *Vet Med Sci* 8:1478-1488, 2022.
55. Curcio D, Cane A, Fernández F, et al: Surgical site infection in elective clean and

- clean-contaminated surgeries in developing countries. *Int J Infect Dis* 80:34-45, 2019.
56. Control. ECfDPa: Healthcare-associated infections: surgical site infections. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018-2020. Stockholm: ECDC; 2023.
 57. Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48:452-458, 2013.
 58. Arciola CR, Cervellati M, Pirini V, et al: Staphylococci in orthopaedic surgical wounds. *New Microbiol* 24:365-369, 2001.
 59. Kuroda T, Minamijima Y, Niwa H, et al: Rational dosage regimens for cephalothin and cefazolin using pharmacokinetics and pharmacodynamics analysis in healthy horses. *Equine Vet J* 53:1239-1249, 2021.
 60. Nomura M, Kuroda T, Tamura N, et al: Mortality, clinical findings, predisposing factors and treatment of *Clostridioides difficile* colitis in Japanese thoroughbred racehorses. *Vet Rec* 187:e14, 2020.
 61. Barr BS, Walldridge BM, Morresey PR, et al: Antimicrobial-associated diarrhoea in three equine referral practices. *Equine Vet J* 45:154-158, 2013.
 62. B. C. McGorum RSP: Antimicrobial associated diarrhoea in the horse. Part 2: Which antimicrobials are associated with AAD in the horse? *Equine vet Educ* 22:43-50, 2010.

63. So JP, Aleem IS, Tsang DS, et al: Increasing Compliance With an Antibiotic Prophylaxis Guideline to Prevent Pediatric Surgical Site Infection: Before and After Study. *Ann Surg* 262:403-408, 2015.
64. Rubio-Martínez LM, López-Sanromán J, Cruz AM, et al: Evaluation of safety and pharmacokinetics of vancomycin after intraosseous regional limb perfusion and comparison of results with those obtained after intravenous regional limb perfusion in horses. *Am J Vet Res* 67:1701-1707, 2006.
65. Kelmer G, Tatz AJ, Kdoshim E, et al: Evaluation of the pharmacokinetics of imipenem following regional limb perfusion using the saphenous and the cephalic veins in standing horses. *Res Vet Sci* 114:64-68, 2017.
66. Boxma H, Broekhuizen T, Patka P, et al: Randomised controlled trial of single-dose antibiotic prophylaxis in surgical treatment of closed fractures: the Dutch Trauma Trial. *Lancet* 347:1133-1137, 1996.
67. Rothenberg AC, Wilson AE, Hayes JP, et al: Sonication of Arthroplasty Implants Improves Accuracy of Periprosthetic Joint Infection Cultures. *Clin Orthop Relat Res* 475:1827-1836, 2017.
68. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR: The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 27:2331-2339, 2006.

69. Isgren CM, Williams NJ, Fletcher OD, et al: Antimicrobial resistance in clinical bacterial isolates from horses in the UK. *Equine Vet J* 54:390-414, 2022.
70. Babushkina IV, Mamonova I, Ulyanov VY, et al: Resistance to Antibiotics in Plankton and Biofilm Cultures of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains. *Bull Exp Biol Med* 172:155-157, 2021.
71. Macias-Valcayo A, Aguilera-Correa JJ, Broncano A, et al: Comparative In Vitro Study of Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility in Gram-Negative Bacilli Isolated from Prosthetic Joint Infections. *Microbiol Spectr* 10:e0085122, 2022.
72. Castaneda P, McLaren A, Tavaziva G, et al: Biofilm antimicrobial susceptibility increases with antimicrobial exposure time. *Clin Orthop Relat Res* 474:1659-1664, 2016.
73. Abdelghany SM, Quinn DJ, Ingram RJ, et al: Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Int J Nanomedicine* 7:4053-4063, 2012.
74. Kashi TS, Eskandarion S, Esfandyari-Manesh M, et al: Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. *Int J Nanomedicine* 7:221-234, 2012.
75. Lee J, Kwon HJ, Ji H, et al: Marbofloxacin-encapsulated microparticles provide

- sustained drug release for treatment of veterinary diseases. *Mater Sci Eng C*
Mater Biol Appl 60:511-517, 2016.
76. Quenelle D, Winchester GA, Staas JK, et al: Sustained release characteristics of rifampin-loaded microsphere formulations in nonhuman primates. *Drug Deliv* 11:239-246, 2004.
 77. Sabaeifard P, Abdi-Ali A, Soudi MR, et al: Amikacin loaded PLGA nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Pharm Sci* 93:392-398, 2016.
 78. Wright L, Rao S, Thomas N, et al: Ramizol(®) encapsulation into extended release PLGA micro- and nanoparticle systems for subcutaneous and intramuscular administration: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Dev Ind Pharm* 44:1451-1457, 2018.
 79. Abazinge M, Jackson T, Yang Q, et al: Comparison of in vitro and in vivo release characteristics of sustained release ofloxacin microspheres. *Drug Deliv* 7:77-81, 2000.
 80. Spreng M, Deleforge J, Thomas V, et al: Antibacterial activity of marbofloxacin. A new fluoroquinolone for veterinary use against canine and feline isolates. *J Vet Pharmacol Ther* 18:284-289, 1995.
 81. Endo Y, Tsuchiya T, Omura T, et al: Effects of pre-shipping marbofloxacin administration on fever and blood properties in healthy Thoroughbreds

- transported a long distance. *J Vet Med Sci* 77:75-79, 2015.
82. Lallemand E, Trencart P, Tahier C, et al: Pharmacokinetics, pharmacodynamics and local tolerance at injection site of marbofloxacin administered by regional intravenous limb perfusion in standing horses. *Vet Surg* 42:649-657, 2013.
 83. Lees P, Aliabadi FS: Marbofloxacin in equine medicine: have we got the doses right? *Equine Vet J* 34:322-325, 2002.
 84. Celani G, Straticò P, Albano P, et al: Clinical Efficacy of a Single Intravenous Regional Limb Perfusion with Marbofloxacin versus Ceftiofur Sodium to Treat Acute Interdigital Phlegmon in Dairy Cows. *Animals (Basel)* 13, 2023.
 85. Bakhrushina EO, Sakharova PS, Konogorova PD, et al: Burst Release from In Situ Forming PLGA-Based Implants: 12 Effectors and Ways of Correction. *Pharmaceutics* 16, 2024.
 86. Salcido R, Popescu A, Ahn C: Animal models in pressure ulcer research. *J Spinal Cord Med* 30:107-116, 2007.
 87. Stolnik S, Daudali B, Arien A, et al: The effect of surface coverage and conformation of poly(ethylene oxide) (PEO) chains of poloxamer 407 on the biological fate of model colloidal drug carriers. *Biochim Biophys Acta* 1514:261-279, 2001.
 88. Redhead HM, Davis SS, Illum L: Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide)

- nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *J Control Release* 70:353-363, 2001.
89. Patel RB, Solorio L, Wu H, et al: Effect of injection site on in situ implant formation and drug release in vivo. *J Control Release* 147:350-358, 2010.
 90. Yewey GL, Duysen EG, Cox SM, et al: Delivery of proteins from a controlled release injectable implant. *Pharm Biotechnol* 10:93-117, 1997.
 91. Bousquet-Melou A, Bernard S, Schneider M, et al: Pharmacokinetics of marbofloxacin in horses. *Equine Vet J* 34:366-372, 2002.
 92. Bousquet-Mélou A, Schneider M, El Garch F, et al: Determination of the pharmacokinetic-pharmacodynamic cut-off values of marbofloxacin in horses to support the establishment of a clinical breakpoint for antimicrobial susceptibility testing. *Equine Vet J* 53:1047-1055, 2021.
 93. DeGuchi Y, Terasaki T, Yamada H, et al: An application of microdialysis to drug tissue distribution study: in vivo evidence for free-ligand hypothesis and tissue binding of beta-lactam antibiotics in interstitial fluids. *J Pharmacobiodyn* 15:79-89, 1992.
 94. Ekstrøm PO, Andersen A, Warren DJ, et al: Determination of extracellular methotrexate tissue levels by microdialysis in a rat model. *Cancer Chemother*

- Pharmacol 37:394-400, 1996.
95. Liu P, Müller M, Grant M, et al: Tissue penetration of cefpodoxime and cefixime in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 45:564-569, 2005.
96. Redding LE, Elzer EJ, Ortved KF: Effects of regional limb perfusion technique on concentrations of antibiotic achieved at the target site: A meta-analysis. *PLoS One* 17:e0265971, 2022.
97. Rubio-Martínez LM, Elmas CR, Black B, et al: Clinical use of antimicrobial regional limb perfusion in horses: 174 cases (1999-2009). *J Am Vet Med Assoc* 241:1650-1658, 2012.
98. O'Brien M, Mochel JP, Kersh K, et al: Phenylbutazone concentrations in synovial fluid following administration via intravenous regional limb perfusion in the forelimbs of six adult horses. *Front Vet Sci* 10:1236976, 2023.
99. Bertazzoni Minelli E, Della Bora T, Benini A: Different microbial biofilm formation on polymethylmethacrylate (PMMA) bone cement loaded with gentamicin and vancomycin. *Anaerobe* 17:380-383, 2011.
100. Clauss M, Laschkolnig E, Graf S, et al: Influence of Sonication on Bacterial Regrowth from Antibiotic Loaded PMMA Scaffolds - An In-vitro Study. *J Bone Jt Infect* 2:213-217, 2017.
101. Holy CE, Dang SM, Davies JE, et al: In vitro degradation of a novel poly(lactide-

- co-glycolide) 75/25 foam. *Biomaterials* 20:1177-1185, 1999.
102. Metsemakers WJ, Kuehl R, Moriarty TF, et al: Infection after fracture fixation: Current surgical and microbiological concepts. *Injury* 49:511-522, 2018.
 103. Chapman HS, Richardson DW, Ortved KF: Arthrodesis of the metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints to treat osteoarthritis in 17 horses. *Vet Surg* 48:850-857, 2019.
 104. Holmberg A, Rasmussen M: Mature biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are highly resistant to antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis* 84:19-21, 2016.
 105. Beech J, Kohn C, Leitch M, et al: Therapeutic use of gentamicin in horses: concentrations in serum, urine, and synovial fluid and evaluation of renal function. *Am J Vet Res* 38:1085-1087, 1977.
 106. Godber LM, Walker RD, Stein GE, et al: Pharmacokinetics, nephrotoxicosis, and in vitro antibacterial activity associated with single versus multiple (three times) daily gentamicin treatments in horses. *Am J Vet Res* 56:613-618, 1995.
 107. Aleman MR, True A, Scalco R, et al: Gentamicin-induced sensorineural auditory loss in healthy adult horses. *J Vet Intern Med* 35:2486-2494, 2021.
 108. Whithair KJ, Bowersock TL, Blevins WE, et al: Regional limb perfusion for antibiotic treatment of experimentally induced septic arthritis. *Vet Surg* 21:367-

373, 1992.

109. Mattson S, Bouré L, Pearce S, et al: Intraosseous gentamicin perfusion of the distal metacarpus in standing horses. Vet Surg 33:180-186, 2004.