

全国農業共済協会会長賞

肺炎罹患子牛における 気管深部洗浄液回収方法の検討

ながはら めぐみ 長原 恵 南雲 翔子 大橋 さやか¹⁾

NOSAI山形 中央家畜診療所 ¹⁾同 家畜診療研修所

(〒990-2171 山形市大字七浦字北川原 286-1)

要 約

呼吸器病罹患子牛からの細菌学的検査用サンプル採取のために、鼻腔より非目視下(ブラインド法)または簡易内視鏡を用いた目視下(内視鏡法)にて気管深部洗浄液(tracheal wash fluid: TWF)を回収する手法について検討した。TWF回収では栄養カテーテルが他器具と比較し回収成功率が高く、栄養カテーテルを用いたTWF回収率(回収量/注入量)はブラインド法と内視鏡法で同等(39%, 32%)であった。細菌学的検査では、鼻腔スワブとTWFを同時に採取した11頭中4頭で細菌種が一致し、また、20頭中14頭でTWFから主要な肺炎原因菌が分離された。本試験で試行したTWFによる細菌学的検査用サンプルの採取は、臨床現場における検査方法のひとつとして有用であることが示唆された。

【キーワード：ブラインド、子牛、内視鏡、肺炎、気管深部洗浄液】

..... 家畜診療, 70, 453-460(2023)

牛呼吸器病症候群(BRDC)は子牛に頻発し、その後の生産性に影響を与える重要な疾病である。臨床現場における治療法は、抗菌剤、消炎剤の全身投与が主であり、選択肢は多くない。近年、耐性菌の問題から、抗菌剤の適正利用のための病原微生物特定および薬剤感受性試験の実施は重要である。臨床現場での病原微生物の検査用サンプル採取手法は、鼻腔スワブが一般的であるが、鼻腔は環境の影響を受けるため、真の原因病原微生物を示していないとの報告もある¹⁻⁴⁾。

馬では古くから、気管支肺胞洗浄(BAL)の活用

による、重症肺炎疾患の病原微生物特定および治療効果が認められており⁴⁻⁶⁾、近年、牛においてもBALの有用性が報告されている^{4, 7-9)}。しかし、BAL実施には高価な機材と熟練技術が必要であるため、臨床現場に広くは普及していない。2020年、町田ら¹⁰⁾は臨床現場で応用可能な手法として、鼻腔より簡易内視鏡を気管内に挿入し、気管深部から気管スワブを採取する新しい手法を報告した。過去にも、気管へのアプローチ手法には、気管を直接切開あるいは穿刺し気管内の洗浄液を採取する気管吸引(Trans-tracheal aspiration: TTA)^{1, 11-13)}や鼻腔より

表1 供試牛の概要

個体番号	月齢	抗菌剤の投与歴	使用カテーテル*1		気管深部洗浄液(TWF)回収率		細菌およびマイコプラズマ培養		
			ブラインド法	内視鏡法	ブラインド法*2	内視鏡法*2	鼻腔スワブ	ブラインド法	内視鏡法
1	12	あり	多用途	多用途	不成功	記録なし	+	ND	+
2	10	あり	多用途	多用途	不成功	不成功	-	ND	ND
3	12	あり	尿道	多用途	記録なし	不成功	+	+	ND
4	9	なし	尿道	栄養	記録なし	0%	+	+	ND
5	7	なし	尿道	栄養	不成功	30%	-	ND	+
6	4	あり	尿道	栄養	不成功	40%	-	ND	-
7	5	あり	栄養	栄養	不成功	25%	-	ND	-
8	12	あり	栄養	栄養	22%	32%	+	+	+
9	11	なし	栄養	栄養	30%	38%	+	+	+
10	4	あり	栄養	ND	67%	ND	ND	+	ND
11	7	あり	栄養	ND	28%	ND	ND	-	ND
12	5	あり	栄養	ND	40%	ND	ND	-	ND
13	5	あり	栄養	ND	25%	ND	+	+	ND
14	5	あり	栄養	ND	65%	ND	+	+	ND
15	6	あり	栄養	栄養	不成功	60%	-	ND	+
16	9	あり	栄養	ND	38%	ND	ND	+	ND
17	5	あり	栄養	栄養	不成功	25%	ND	ND	-
18	7	あり	ND	栄養	ND	47%	ND	ND	+
19	8	なし	栄養	栄養	不成功	33%	ND	ND	+
20	9	あり	栄養	栄養	不成功	18%	ND	ND	+
実施頭数			19	14					
栄養カテーテルでの実施頭数			13	11					
栄養カテーテルでの回収成功率*3					62%	91%			
栄養カテーテルでのTWF回収率					39%	32%			

*1 多用途：多用途チューブ，尿道：尿道カテーテル，栄養：栄養カテーテル，ND：実施せずを示す
 *2 「不成功」とは，挿入困難であったもの，食渣混入し食道からの回収であったものを含む
 *3 回収成功率とは，実施数に対し気管挿入が成功し，かつTWF回収量が1mL以上の回収が可能であったものの割合

気管内にカテーテルを挿入し抗菌剤を直接噴霧し治療する手法である気管噴霧療法 (ITS療法)¹⁴⁻¹⁶⁾ などが報告されているが，臨床現場では普及していない。しかしながら，現場で応用可能な気管へのアプローチは，今後の抗菌剤選択のための細菌学的検査や治療に有用であると考えられる。

そこで，今回，臨床現場で簡便に行える気管深部採材の新たな手法として気管深部洗浄液 (tracheal wash fluid : TWF) の回収方法を試行し，その有用性について検討を行った。

材料および方法

供試動物

管内の2農場において飼養され，呼吸器症状を呈す4~12カ月齢の黒毛和種子牛20頭を供試した (表1)。供試牛のうち10頭は自家産，10頭は素牛導入されており，採材日までの抗菌剤による治療歴があった個体は，自家産では10頭全頭，導入牛では6頭であった。抗菌剤治療中に採材した個体は4頭で，それ以外の12頭では，最終治療日から採材まで4日から72日経過していた。

採材方法

牛を保定後，鼻孔をアルコール綿にて清拭し，30

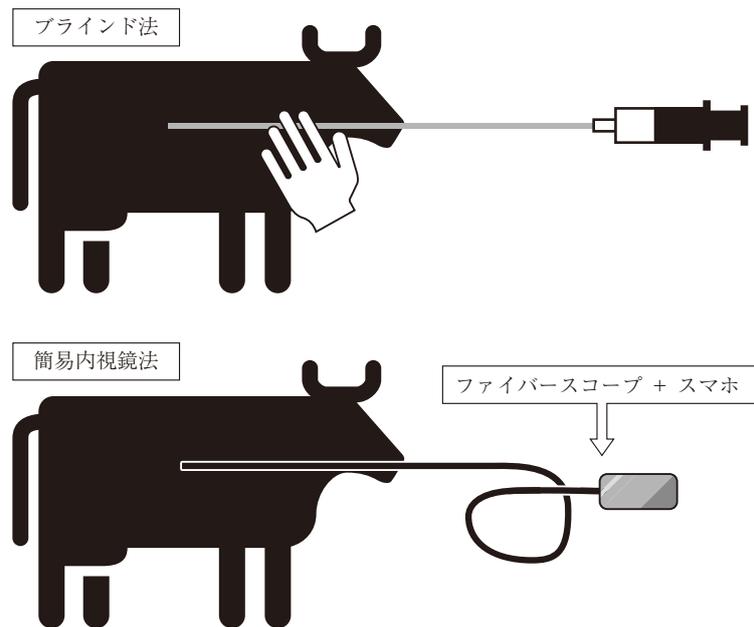


図1 気管深部洗浄液(TWF)回収方法
 ブラインド法では、頸部外側から触診にて気管内への挿入を確認し、内視鏡法ではモニターにて気管分岐部確認後、外套を残しカテーテルに入れ替える

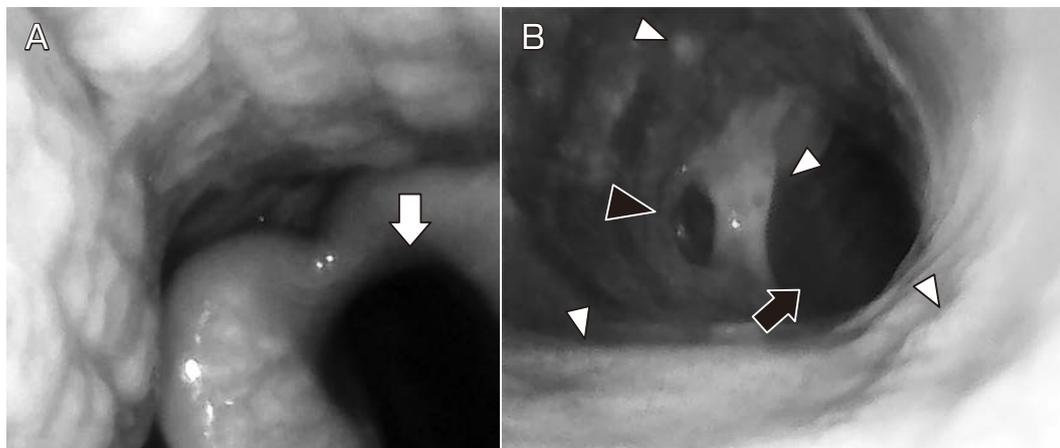


図2 肺炎罹患牛の内視鏡画像(A：咽頭，B：気管の気管支)
 A) 白矢印：気管の入口。十分開口したタイミングで内視鏡を挿入する。B) 黒矢頭：気管の気管支の入口。気管分岐部へは黒矢印の方向に内視鏡を推送する。白矢頭：気管周囲に白濁，泡沫性の滲出物が確認できる。解像度は不十分であるが，カテーテルの誘導には十分確認可能である

cmの滅菌綿棒(メンティップ，日本綿棒)を用い，常法にて鼻腔深部スワブを採取後，鼻腔内に局所麻酔(キシロカインポンプスプレー8%，サンド株)を噴霧した。続いて，鼻腔より気管深部までカテーテルを挿入後，洗浄液として生理食塩水を20~40 mL

注入し，直ちに吸引回収した。また，抜去後は雑菌が混入しないよう注意しながらカテーテル先端を上にし，カテーテル内腔に残存するすべてのTWFを回収した。回収の可否の判定方法は，気管への挿入自体が成功し，なおかつシリンジ内に最低でも1



図3 気管深部洗浄液(TWF)の回収(内視鏡法)

mLのTWFが回収できた個体を成功、それ以外を不成功と判定し回収した。TWFはコニカルチューブに保存し試験に供した。

TWFの回収方法(図1)は、カテーテルを鼻腔より挿入し、頸部外側からの触診により気管内へカテーテルを誘導し、気管深部まで挿入する非目視下による手法(以下、ブラインド法)、および町田らの手法¹⁰⁾を基にスマートホンに接続した簡易内視鏡のモニターを確認しながら内視鏡を気管内へ誘導し(図2)、気管分岐部を確認後、外套を残して内視鏡を引き抜き、カテーテルを挿入し目視下でTWFの回収を行う簡易内視鏡法(以下、内視鏡法)とした(図3)。なお、基本的な実施手順としては、鼻腔スワブを採取後、ブラインド法を実施し、最後に内視鏡法を実施した。そのため一部を除き、ブラインド法および内視鏡法のTWF回収には同一個体を用いた。TWF回収に供試した頭数は、ブラインド法で19頭、内視鏡法で14頭であった。

採取用器具の選定

ブラインド法ではTWF採取カテーテルとして、多用途チューブ(直径2.7 mm, 長さ80 cm, アトム)(n=2)、尿道カテーテル(直径7 mm, 長さ90 cm, 富士平)(n=4)、栄養カテーテル(直径5.3 mm, 長さ120 cm, トップ)(n=13)の3種を比較した。内視鏡法ではマイクロファイバースコープ(5.5 mm,

長さ2 m, SEEK)に塩化ビニルチューブ(直径10 mm, 内径8 mm, 長さ80 cm~1 m)を外套として使用し、TWF採取用のカテーテルとしては多用途チューブ(n=3)、栄養カテーテル(n=11)の2種を用い、各カテーテルでのTWF回収の可否を調査した。

予備実験として3種のカテーテルを用いたが、栄養カテーテルが成功率に優れていることが判明し、その後の調査にはすべて栄養カテーテルを使用した。

栄養カテーテルを用いて採材した個体のうち、気管内への挿入に成功したブラインド法(n=8)と内視鏡法(n=11)のTWF回収量を回収率(回収量/注入量)として比較した。多用途チューブおよび栄養カテーテルは使い捨てとし、尿道カテーテルは煮沸洗浄により滅菌した。内視鏡法に用いる全ての器具は使用前にアルコール綿にて清拭し、使用後は逆性洗剤にて洗浄後、乾燥させて使用した。

細菌学的検査

鼻腔スワブ(n=11)、ブラインド法および内視鏡法にて回収されたTWF(n=21)は採取後、同日中に細菌用培地(羊血液寒天培地, 日水製薬(株))およびマイコプラズマ用培地(PPLO寒天培地, 関東化学(株))に塗布し、7.5%二酸化炭素下で培養した。分離された細菌は純培養後、微生物分類同定装置(MALDIバイオタイパー, BECKMAN COULTER)にて細菌種を同定し、鼻腔スワブとTWFが同時に採取で

表2 鼻腔スワブとTWF(気管)からの分離細菌種の比較

個体番号	採材部位	発育の有無	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Histophilus somni</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>	<i>Moraxella sp.</i>	<i>Mycoplasma</i>
1	鼻腔	あり	-	-	-	-	-	-
	気管	あり	-	-	-	-	+	-
4	鼻腔	あり	-	-	-	-	+	+
	気管	あり	-	-	-	-	+	+
5	鼻腔	なし	-	-	-	-	-	-
	気管	なし	-	-	-	-	-	-
6	鼻腔	あり	+	-	-	-	-	-
	気管	あり	+	-	-	-	-	-
7	鼻腔	あり ¹⁾	-	-	-	-	-	-
	気管	あり	+	-	-	+	-	-
8	鼻腔	あり	-	-	-	-	+	-
	気管	なし	-	-	-	-	-	-
9	鼻腔	あり	-	-	-	-	+	+
	気管	あり	+	-	-	-	-	+
10	鼻腔	あり ¹⁾	-	-	-	-	-	-
	気管	あり	-	-	-	+	-	-
13	鼻腔	あり	-	-	-	-	+	-
	気管	あり	+	-	-	-	-	-
14	鼻腔	あり	-	-	-	-	+	-
	気管	あり	-	-	-	-	+	-
15	鼻腔	なし	-	-	-	-	-	-
	気管	あり	+	-	-	-	-	-

¹⁾ 多菌種増殖

きた11頭について両者の菌種を比較した。マイコプラズマについては設備・資材不足のため属レベルの同定にとどまった。

成績

採取用器具の選定

TWFが回収できた個体の割合は、ブラインド法の多用途チューブで0% (0/2)、尿道カテーテルで50% (2/4)、栄養カテーテルで62% (8/13)、内視鏡法では多用途チューブで33% (1/3)、栄養カテーテルで91% (10/11)であった。また、栄養カテーテルを用いたTWFの回収率は、ブラインド法で39% (n=8)、内視鏡法で32% (n=11)であった。

細菌学的所見

20頭中TWFは19頭で回収でき、14頭から細菌およびマイコプラズマが分離された。この14頭のうち、同一個体からブラインド法および内視鏡法による

TWFが得られたものは2頭あり、どちらも細菌種は一致した。TWFが主な分離菌種とその頭数は*Pasteurella multocida*が5頭、*Trueperella pyogenes*が4頭、*Mannheimia haemolytica*が2頭、*Mycoplasma*属が7頭であった。

鼻腔スワブとTWFが同時に採取できた11頭中4頭で分離細菌種が一致した(表2)。また、鼻腔および気管深部にて分離された細菌種の一致した個体(n=4)と不一致であった個体(n=7)間で、抗菌剤の投与歴の有無による違いあるか比較した結果、一致した個体での抗菌剤投与歴有りが2頭(2/4)、一致しなかった個体での抗菌剤投与歴有りが6頭(6/7)であった。

考察

BALの実施は、肺炎罹患牛の病巣からの病原微生物検出とともに、炎症起因物質や細菌を洗浄回収

することによりバイオフィームが排除され、治癒の向上に役立つとされる⁴⁻⁶⁾。またBALの利点は、目視で確認するため目標とする限られた肺胞領域からの採材が可能である。一方で、内視鏡を用いない非目視下の手法である特殊カテーテルを用いたBALにより、BALと同等の有用性があるとの報告がある^{2, 17, 18)}。しかし、非内視鏡下では、目的の肺胞領域に到達しなければ原因微生物の採取に至らない。これに対し、気管内であればすべての肺胞からの滲出物が集まるため、確実な病原微生物の検出が可能である。

馬では、気管洗浄液(TW)とBALFの細胞診の比較において、TWの細胞診を見ることでより感度、特異度が高く呼吸器感染の臨床診断に有用であると報告されている^{6, 11)}。また、人における細菌性肺炎罹患患者では、気管吸引液と気管支肺胞洗浄液には優勢な病原体に高い類似性があるとの報告がある¹⁹⁾。そのため、TWFの採取は病原微生物の検出に有用であると考えられた。

気管スワブの採材¹⁰⁾では、気管への挿入で外套を用いるものの、針金の先端に鼻腔スワブ用綿棒を装着し挿入しているため、落下の危険性が懸念される。この点、本手法のように、気管内への挿入に医療用栄養カテーテルを用いることで、より安全に実施できると考えられた。

本試験にて検討したTWFの回収の可否では、ブラインド法では栄養カテーテルを用いた手法が他の器具に比べ良好であった。また、回収率については、ブラインド法、内視鏡法で同等の結果が得られた。以上から、ブラインド法または内視鏡法、いずれの手法でもTWFの回収が可能であることが示された。しかしながら、内視鏡法に比べブラインド法では、回収自体の成功率が低かった。原因として、鼻腔から咽喉頭を経過し気管内へ非目視下で挿入する技術が難しいことや、成長に伴い皮下脂肪や筋肉により頸部外側からの触診が困難になるためと考えられ

た。この点については、技術の向上や器具の更なる検討で改善の可能性があると思われた。

細菌学的検査では、TWFから主要な肺炎病原菌分離が可能であった。同一個体でのブラインド法と内視鏡法、どちらも得られた個体は2頭あり、いずれも細菌種は一致していた。本試験ではブラインド法を行った後に内視鏡法を行っているため、同じ注入液を回収している可能性があり、ブラインド法と内視鏡法との違いについては判断できないものと考ええる。そのため、鼻腔スワブとTWFの違いに着目した。鼻腔スワブと気管深部の分離菌の比較では、細菌種の一貫性が低かった。これは、鼻腔に存在する細菌種には環境由来の病原微生物が混在しているためで、同一細菌が検出されたとしてもその薬剤感受性が異なることが報告されている^{1-3, 8, 10)}。よって、本試験の結果は過去の報告と一致する。また、抗菌剤投与の影響を受けた個体で、鼻腔スワブとTWFの細菌種に差が生じる可能性を考えた。そこで、本試験では分離菌の一致群、不一致群における過去の抗菌剤投与履歴との間に、何らかの関連があるか比較したが、両群とも抗菌剤投与有り、なしの個体が存在しており、明らかな関係性は認められなかった。しかし、抗菌剤の投与履歴が与える影響や細菌種の変化²⁰⁾についても今後検討する必要がある。

以上のように、本試験で試行したTWF採取法は、専用機材が必要なBALの実施に比べ、安価でかつ簡易であることから、臨床現場で応用可能であると考えられた。しかし、内視鏡法を行う場合、本調査で使用した簡易内視鏡は医療機器ではないため、町田ら¹⁰⁾の報告にもあるように、直接気管を傷めないよう外套チューブを使用した。そのため、使用する際には十分安全に配慮し、畜主の同意を得た上で注意を払って利用する必要がある。また、回収されたTWFからは、肺炎罹患子牛の病原微生物の各種検査において鼻腔スワブとは異なる細菌種が検出された。本試験では、真の病原微生物の確定には至って

いないが、環境要因に左右されない、より真の病原微生物に近い検体を採取することが可能と考えられ、本手法によるTWFの検査は、臨床現場において有用性が高いと評価された。

稿を終えるにあたり、(株)微生物化学研究所・加藤敏英先生ならびに、酪農学園大学・臼井優准教授ほか、本調査にご協力いただいたすべての方々に深謝する。

引用文献

- 1) Nicola I, Cerutti F, Grego E *et al.* : Characterization of the upper and lower respiratory tract microbiota in Piedmontese calves, *Microbiome*, 5:152(2017)
- 2) Van Driessche L, Valgaeren BR, Gille L *et al.* : A deep nasopharyngeal swab versus nonendoscopic bronchoalveolar lavage for isolation of bacterial pathogens from preweaned calves with respiratory disease, *J Vet Intern Med*, 31, 946-953 (2017)
- 3) Doyle D, Credille B, Lehenbauer TW *et al.* : Agreement among 4 sampling methods to identify respiratory pathogens in dairy calves with acute bovine respiratory disease, *J Vet Intern Med*, 31, 954-959(2017)
- 4) 帆保誠二: 内視鏡検査の概要と牛呼吸器の内視鏡検査, *臨床獣医*, 40(7), 106-113(2022)
- 5) Ito S, Hobo S, Eto D *et al.* : Bronchoalveolar lavage for the diagnosis and treatment of pneumonia associated with transport in thoroughbred racehorses, *J Vet Med Sci*, 63 (12), 1263-1269(2001)
- 6) Rossi H, Virtala AM, Raekallio M *et al.* : Comparison of tracheal wash and bronchoalveolar lavage cytology in 154 horses with and without respiratory signs in a referral hospital over 2009-2015, *Front Vet Sci*, 5(61), 1-9(2018)
- 7) 林淳, 石川真悟, 津曲圭太ら : 導入肥育素牛の気管支肺胞領域に認められた牛呼吸器症候群原因菌及び牛RSウイルスと導入後の治療状況, *日獣会誌*, 74, 497-502(2021)
- 8) 藏前哲郎, 石川真悟, 林淳ら : 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, *日獣会誌*, 73, 31-36(2020)
- 9) 林淳, 石川真悟, 藏前哲郎ら : 市場導入肥育素牛における牛呼吸器症候群の治療状況の調査並びに発症に關与する細菌の同定, *日獣会誌*, 71, 431-436 (2018)
- 10) 町田麻依, 岡田翔一, 蕪木洋之ら : 牛の肺炎診断における気管スワブ検査の有用性, *家畜診療*, 67, 559-565(2020)
- 11) Uchida-Fujii E, Kinoshita Y, Niwa H *et al.* : High prevalence of *Mycoplasma equirhinis* in thoroughbred horses with respiratory symptoms in autumn 2018, *J Vet Med Sci*, 83 (12), 1907-1912 (2021)
- 12) Angen Q, Thomsen J, Larsen LE *et al.* : Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response, *Vet Microbiol*, 137(1-2), 165-171(2009)
- 13) Vaught ME, Rozanski EA, Armelle DeLaforcade AM : Effect of transoral tracheal wash on respiratory mechanics in dogs with respiratory disease, *Can J Vet Res*, 82, 75-79(2018)
- 14) 小形芳美, 宇井彰, 山口純ら : 牛肺炎に対する気管内噴霧療法 (ITS療法) について, *家畜診療*, 262, 17-23(1985)
- 15) 小形芳美, 佐藤淳一, 阿部成義ら : 子牛の肺炎に対する気管内ジェットカナマイ「東洋」の治療効果, *獣畜新報*, 818, 585-588(1989)
- 16) 其田三夫, 高橋清志, 黒沢隆ら : カナマイシン

の気管内噴霧療法 (ITS療法) の子牛に対する安全性に関する研究, 獣畜新報, 819, 647-651 (1989)

17) Leenen KV, Driessche LV, Cremer LD *et al.* : Factors associated with lung cytology as obtained by non-endoscopic broncho-alveolar lavage in group-housed calves, BMC Vet Res, 15(1), 167 (2019)

18) Khilnani GC, Luqman Arafath TK, Hadda V *et al.* : Comparison of bronchoscopic and non-bronchoscopic techniques for diagnosis of

ventilator associated pneumonia, Indian J Crit Care Med, 15(1), 16-23 (2011)

19) Kalantar KL, Moazed F, Christenson SC *et al.* : Metagenomic comparison of tracheal aspirate and mini-bronchial alveolar lavage for assessment of respiratory microbiota, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 316(3), L578-L584 (2019)

20) 加藤敏英 : 肺炎, 子牛の医学, 家畜感染症学会編, 188-193, 第1版, 緑書房, 東京 (2014)

Comparison of methods for collecting tracheal wash fluid in calves with pneumonia

Megumi Nagahara, Shoko Nagumo, Sayaka Ohashi¹⁾

Central Livestock Clinic,

¹⁾Livestock Clinic Training Center, Yamagata A.M.A.A.

(286-1 Kitagawara, Nanaura, Yamagata-shi, Yamagata, 990-2171)

SUMMARY

A comparison was made between methods with or without visualization (i.e., blind and endoscopic methods) for collection of tracheal wash fluid (TWF) from calves with respiratory disease. In both endoscopic and blind methods, the success rate of collecting TWF was higher with a feeding catheter than other catheters, and the recovery rate of TWF was similar between the blind and endoscopic methods (39% and 32%, respectively). In a bacteriological examination, it is only in 4 of the 11 calves that the same bacterial species were collected in deep nasal swab samples and TWF samples taken at the same time. The major pneumonia-causing pathogens were isolated from TWF samples in 14 of the 20 calves. These results suggested that the TWF collection tried in this study was useful for bacteriological examination in the clinical settings.

【Key words : blind, calves, endoscopy, pneumonia, tracheal wash fluid】

.....J Livestock Med, 70, 453-460 (2023)