

大腸菌症非発症鶏の盲腸から分離された常在大腸菌の 初生雛に対する病原性

加藤麻美¹⁾ 佐々木 淳¹⁾ 倉持 好¹⁾ 川崎武志²⁾ 御領政信^{1)†}

1) 岩手大学農学部 (〒020-8550 盛岡市上田3-18-8)

2) 人と鳥の健康研究所 (〒099-3119 網走市鱒浦2-7-1)

(2015年3月4日受付・2015年7月17日受理)

要 約

鶏大腸菌症と鶏の盲腸内の大腸菌との関連性を解明すべく、大腸菌症非発症鶏の盲腸から分離した大腸菌を初生雛に接種し、病原性の有無について病理組織学的に検索した。得られた5種の菌株(A~E株)は*Escherichia coli*と同定された。O血清型はC株でO8と判別された以外は判別不能だった。接種実験では接種7日目までにE株を除くすべての株で死亡雛がみられた。接種2日目以降の死亡雛では接種部位の蜂窩織炎が高率に観察され、1羽で心膜炎が認められた。生残雛でも接種部位の蜂窩織炎や卵黄囊遺残が観察され、1羽で組織学的に軽度の心膜炎が認められた。接種部位と卵黄囊内で観察された細菌塊はグラム陰性桿菌であった。本実験から鶏大腸菌症非発症鶏の盲腸内から分離された大腸菌は、初生雛に対して非経口的接種では病原性があることが明らかとなった。

——キーワード：盲腸，蜂窩織炎，鶏大腸菌症，正常細菌叢，病原性。

----- 日獣会誌 68, 693~698 (2015)

鶏大腸菌症は鶏病原性大腸菌 (avian pathogenic *Escherichia coli*: APEC) に起因する細菌性疾病で、養鶏産業に大きな経済的損失を生じる疾病の一つである [1]。厚生労働省による平成23年度食肉検査等情報還元調査では、大腸菌症による廃棄は254万羽で、と殺禁止及び全部廃棄羽数の合計の約30%を占めている。

鶏大腸菌症野外例由来分離株の多くは初生雛に対して強い病原性を持ち、初生雛は感染後数日で死亡するが、中には接種後7日目までに1羽も死亡せず心膜炎や肝被膜炎の形成を引き起こす分離株も存在する [2]。食鳥検査において問題となる鶏大腸菌症を引き起こす菌株は、後者のような大腸菌も含まれているのではないかと考えられる。

大腸菌 (*E. coli*) は、鶏では小腸中央部から盲腸、直腸に常在しているが、腸内細菌叢は日齢や飼育環境により変化することがわかっている [3-5]。局所感染症である蜂窩織炎の発生には鶏の糞便由来の大腸菌が関与している可能性も考えられるが、健康鶏及び農場の糞便より分離された大腸菌を用いた接種実験は少なく [6, 7]、一般的に鶏が腸内細菌叢の一部として保菌する大腸菌に

よる鶏大腸菌症について病理組織学的に詳細な検索は行われていない。

この研究の目的は、鶏大腸菌症の発病機序を解明する手がかりとして、鶏大腸菌症を発症していない鶏の腸管内に常在する大腸菌を使用して大腸菌症を引き起こすことができるか否かを確認することであり、初生雛への接種実験を行うことにより検討した。

材料及び方法

実験は、岩手大学動物実験委員会の承認を得て実施し、鶏は炭酸ガス殺後に剖検した。

細菌分離：研究室で維持している、およそ100日から150日齢の採卵鶏のうち、剖検時に漿膜炎及び蜂窩織炎の形成が肉眼的に認められない5羽を用いた。盲腸の上部と下部を結紮して取り出し、漿膜面を切開、盲腸内容を白金耳で採取した。これをDHL寒天培地に直接塗布し、37℃、24時間好気培養した後、桃色または赤色を示すコロニーを鈎菌し、DHL寒天培地を用いて同条件下で2代継代した。

性状検査のためグラム染色及びカタラーゼ試験を実施

† 連絡責任者：御領政信 (岩手大学農学部獣医病理学研究室)

〒020-8550 盛岡市上田3-18-8 ☎019-621-6217 FAX019-621-6274 E-mail: goryo@iwate-u.ac.jp

表1 死亡羽数の推移

菌株	接種後日数 (日目)							計
	1	2	3	4	5	6	7	
A	1	0	0	2	3	0	0	6/18*
B	0	1	1	0	2	0	1	5/18
C	0	1	0	0	0	0	0	1/18
D	0	0	0	0	1	0	0	1/18
E	0	0	0	0	0	0	0	0/18
計	1	2	1	2	6	0	1	13/90

* 死亡羽数 / 接種羽数

した。また、LIM 培地 (37°C, 20 時間), TSI 培地 (37°C, 20 時間) にて確認培養を行い, リシン脱炭酸酵素, インドール産生能, 運動性, 乳糖・白糖分解性, ブドウ糖発酵による酸・ガス産生性, 硫化水素産生性について検査した。5羽の盲腸内容物から分離された5種の菌株をそれぞれ A, B, C, D, 及び E 株と命名し, 菌種の同定及び O 血清型の血清型判別を, 人と鳥の健康研究所 家禽診療センターで行った。

感染実験: 市販採卵鶏由来の初生雛 18羽ずつ 5群を設定し, 接種実験に供した。A から E 株をそれぞれ乾燥ブイヨン培地にて 37°C, 36 時間培養し, 約 10^8 CFU/0.1ml に増菌した菌懸濁液を接種菌液とし, 各群に 0.1ml/羽を右側大腿部筋肉内に接種した。なお, 別の 14羽は対照群とし, 無処置で観察した。観察期間は 7日間とし, 観察期間中の死亡雛については随時, 生残雛は観察期間終了後に全羽剖検に供した。剖検時, 肉眼的観察と, 卵黄嚢の重量測定を行った。0.1g 未満の卵黄嚢は長軸の長さの測定のみとした。観察終了後, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 心臓, 肺, 卵黄嚢及び接種部位である右側大腿部を採材した。

病理組織学的検索: 採材した材料は定法に従い 10% ホルマリン液にて固定後, パラフィン包埋し, ミクロトームにて $4\mu\text{m}$ の切片を作製後, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し, 光学顕微鏡にて病理組織学的に検索した。また, 必要に応じてグラム染色 (Brown Hopps 法) を施し, 光学顕微鏡にて病理組織学的に検索した。

成 績

大腸菌症非発症鶏からの細菌分離及び同定: DHL 寒天培地を用いた分離培養は, ほとんどが赤色または桃色を示すコロニーであり, ほかに黒色を示すコロニーが数個観察されたのみであった。性状検査では 5種すべてで同様の結果が得られた。グラム染色ではグラム陰性の桿菌が観察され, カタラーゼ, リシン脱炭酸酵素, インドール産生能, 乳糖・白糖分解性, ブドウ糖発酵による酸・ガス産生性は陽性, 運動性及び硫化水素産生性は

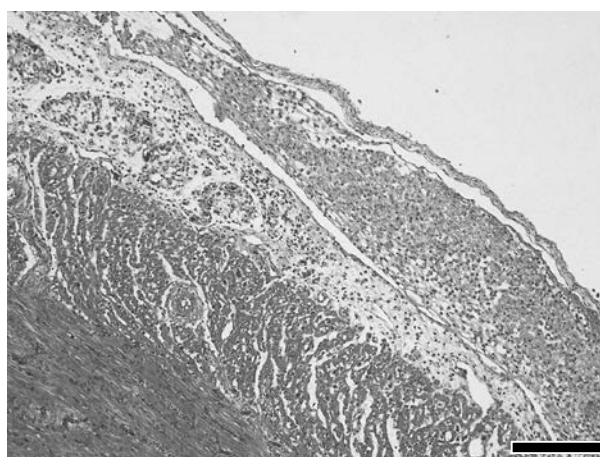


図1 A株接種群, 接種4日目死亡雛, 心臓 (HE 染色 Bar=200 μm)

心外膜に線維素の析出がみられ, マクロファージが多数浸潤している。

陰性であった。

分離した菌株の菌種の同定では, A から E 株のすべてが *E. coli* と同定された。O 血清型は C 株において O8 と判別された。その他の株では O 血清型は判別不能であった。

感染実験における臨床経過: 接種 2~3 時間後より翌日まで, 菌液接種群全羽で沈うつ症状が認められた。E 株を除くすべての菌株で死亡雛がみられ, 接種 7 日目までに 90羽中 13羽が死亡した。接種 5 日目の死亡数が 6羽と最多であり, 死亡のピークは接種 5 日目であった (表 1)。対照群で死亡雛はみられなかった。

心臓及び肝臓の病変: 死亡雛及び生残雛において体腔内臓器に肉眼的な病変形成が認められたのは A 株接種 4 日目死亡雛 1 例における心膜炎のみであった。心膜は黄白色滲出物を伴ってやや肥厚していた。病理組織学的にも, 同例の心膜においてマクロファージ主体の炎症性細胞浸潤, 水腫及び線維素の析出を伴う軽度の線維素性心膜炎が認められた (図 1)。偽好酸球の浸潤はわずかであり, 細菌塊は認められなかった。C 株接種群の生残雛の 1 例でもごく軽度の心膜炎が認められた。心膜炎以外の病変として, 心筋線維間における髄外造血が認められた。

肝臓では, 死亡雛の 3 例と生残雛の 1 例で肝被膜表面に細菌を貪食したマクロファージの集塊及び線維素, 壊死退廃物の付着が限局的に認められた。その他, 死亡雛では肝細胞の空胞変性が顕著に認められ, 生残例には髄外造血もみられた。対照群に著変は認められなかった。

蜂窩織炎: 接種部位周囲に黄色または黄白色のチーズ様凝固物を伴う蜂窩織炎もしくは筋肉内に黄色または黄白色病巣が観察された場合に病変陽性とした (表 2)。

A 及び B 株接種群のうち, 接種 2 日目以降に死亡し

表2 死亡雛及び生残雛における接種部位の肉眼的及び病理組織学的病変

	死亡雛				生残雛			
	肉眼的 蜂窩織炎	炎症性 細胞浸潤	細菌塊の 有無	肉芽腫の 形成	肉眼的 蜂窩織炎	炎症性 細胞浸潤	細菌塊の 有無	肉芽腫の 形成
A	4/6*	5/6	4/6	3/6	7/12	12/12	6/12	6/12
B	5/5	5/5	4/5	2/5	4/13	13/13	11/13	11/13
C	0/1	1/1	0/1	0/1	12/17	17/17	8/17	10/17
D	0/1	1/1	0/1	0/1	4/17	17/17	13/17	15/17
E	-	-	-	-	8/18	18/18	15/18	16/18

* 病変陽性羽数 / 総羽数

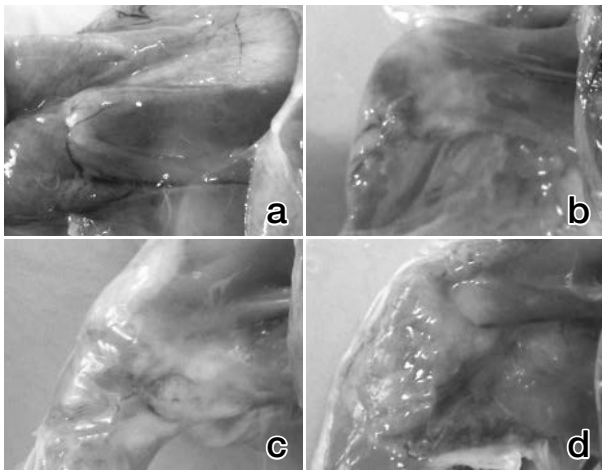


図2 A株接種群, 死亡雛

a: 接種1日目, b: 接種4日目, c: 接種4日目
d: 接種5日目に死亡

a, dでは死後変化が強いが, 死後変化とは異なる筋肉の部分的な黄変がみられる。

b, cでは黄色のチーズ様凝固物の付着が認められる。

た雛で高率に蜂窩織炎の形成が認められた。A株接種群では、大腿部筋肉の黄変または黄色チーズ様凝固物を伴う蜂窩織炎が認められたが、病変部はごく一部だった(図2)。一方B株ではより重度の病変が形成されており、黄色チーズ様凝固物により接種部位が広範に覆われていた。B株接種5日目及び7日目死亡雛では周囲組織にまで蜂窩織炎が波及しており、皮下組織と大腿部筋肉が癒着していた。

生残雛においても蜂窩織炎の形成が認められたが、筋肉の黄変または黄白色のチーズ様凝固物を伴う病変は小さな領域であり、周囲組織にまで波及するような重度の蜂窩織炎形成は肉眼的に認められなかった。

蜂窩織炎の病理組織学的所見を表2に示してある。接種2日目から4日目の死亡雛では、筋組織及び周囲脂肪組織にマクロファージを主体とした重度の炎症性細胞浸潤が全例で認められた。肉芽腫の形成はみられず、A及びB株接種群ではグラム陰性を示す多数の細菌塊を伴う筋組織の壊死が特徴的であった。接種5日目以降の死

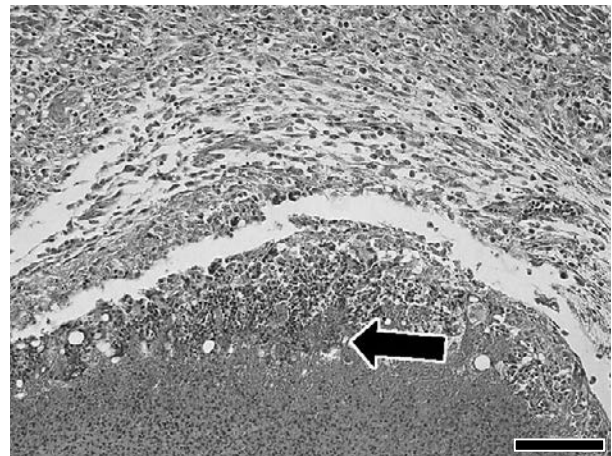


図3 A株接種群, 接種5日目死亡雛, 接種部位筋肉 (HE染色 Bar=100μm)

好酸性退廃物を類上皮細胞が取り囲み肉芽腫が形成されている。好酸性壊死退廃物内には細菌塊(矢印)がみられる。

亡雛では、グラム陰性を示す細菌塊を含む好酸性壊死組織を類上皮細胞や多核巨細胞が取り囲んだ肉芽腫性病変の形成が認められた(図3)。また、肉芽腫性病変部以外の筋組織や皮下脂肪組織においてもマクロファージを主体とした炎症性細胞浸潤が重度に認められた。

生残雛では、細菌塊を伴う肉芽腫性病変の形成が高率に認められた。炎症性細胞の浸潤はマクロファージやリンパ球、形質細胞が主体であり、偽好酸球の浸潤が顕著でないものもあった。B株接種群には肉芽腫性病変が広範囲に及ぶものが多く、偽好酸球の浸潤が多く認められた。肉芽腫性病変部以外の筋組織や皮下脂肪組織及び肉芽腫性病変のみられなかった個体においても、マクロファージやリンパ球を主体とした炎症性細胞の浸潤が認められ、筋組織や皮下脂肪組織中の異所性リンパ組織の増数がみられた。対照群では炎症性細胞浸潤は認められず、異所性リンパ組織が1例のみに認められた。

卵黄囊: 死亡雛の卵黄囊重量は1.2~3.7g, 外観は黄色または黄緑色を呈しており著変は認められなかった。病理組織学的に接種3日目までの死亡雛卵黄囊では、中心部の好酸性均一な卵黄を取り囲み、一部で内腔に向

表3 計画剖検時の卵黄囊の肉眼病変及び病理組織学的成績

	肉眼病変	病理組織学的成績
	卵黄囊遺残	肉芽腫性炎
A	9/12*	7/12
B	5/13	4/13
C	9/17	9/17
D	4/17	4/17
E	6/18	6/18
対照群	1/14	1/14

* 病変陽性羽数 / 総羽数

かって乳頭状に突出する卵黄囊上皮細胞が認められた。接種4日目以降の死亡雛では、卵黄囊上皮細胞の細胞質空胞内、その直下の血管内及び卵黄内に細菌塊が多数認められ、細菌塊はグラム染色で陰性を示した。グラム染色ではHE標本で観察された細菌塊のほかに、卵黄内にグラム陰性の桿菌が分布している様子が観察された。卵黄囊構造は接種3日目までの死亡雛とほぼ同様の組織像が観察されるものがほとんどだったが、数羽で卵黄囊壁及び内腔におけるマクロファージや偽好酸球の浸潤、線維芽細胞の増生による卵黄囊壁の肥厚、卵黄辺縁部の壊死退廃物が観察された。

計画剖検時に卵黄囊重量が0.1g以上であったものは卵黄囊遺残とし、その有無については表3に示してある。遺残卵黄囊重量は0.2～3.1gとばらつきが大きく、外観は黄白色を呈し、黄色のチーズ様凝固物の付着を伴うものや腹壁に癒着しているものが観察された(図4)。遺残卵黄囊のほとんどで、卵黄を中心とした細菌塊を伴う肉芽腫性炎が認められた(表3)。好酸性の卵黄内には多数の細菌集塊が散在性に認められ、死亡雛卵黄囊よりも大型の細菌塊が特徴的であった。卵黄辺縁部、肉芽腫との境界部には変性した偽好酸球や細胞退廃物が集積し、これが類上皮細胞や多核巨細胞により取り囲まれていた。卵黄囊壁では線維芽細胞の増生や血管新生がみられ、炎症性細胞の浸潤も認められた。

対照群の重量はほとんどが0.1g未満であり、メックル憩室の先端に長径1～6mmの黄白色の卵黄囊が認められた。病理組織学的には、細胞質に空胞を持ち内腔面に核が偏在する卵黄囊上皮細胞により卵黄囊壁が内張りされていた。卵黄は泡沫状もしくは好酸性の顆粒状を呈しており、細菌塊はみられなかった。また、卵黄囊壁では髄外造血が認められた。

その他の病変：肉眼的に、死亡雛及び生残雛の数例で腹腔内に黄色チーズ様凝固物の付着を伴う漿膜炎が認められた。病理組織学的には、死亡雛の脾臓表面で、肝被膜にみられたような細菌貪食マクロファージ及び壊死退廃物の集積が認められた。また、A株接種群生残雛の1例において、腎臓周囲結合組織の血管内に細菌塊を伴う



図4 E株接種群、生残雛
卵黄囊の周囲には黄色のチーズ様凝固物の付着が認められ、腹壁に癒着している。

肉芽腫性病変がみられた。病変部には細胞退廃物が類上皮細胞により取り囲まれ、周囲に偽好酸球の浸潤や線維芽細胞の増殖がみられる部分と、血管壁に偽好酸球が浸潤する部分がみられた。その他、腎臓及び肺にしばしば髄外造血がみられた。

考 察

大腸菌症非発症鶏からの細菌分離及び細菌検査では *E. coli* が分離され、LIM 培地及び TSI 培地を用いて確認した性状も大腸菌の性状に一致していた [1]。 *E. coli* の運動性は菌株によって異なっており、分離された菌株の運動性は陰性であることがわかった。鶏病原性大腸菌の O 血清型は O1, O2, O35, O78 が多く、特に蜂窩織炎では O78 が多く分離される [8, 9] が、本実験で分離された大腸菌のうち判別できた O 血清型は O8 のみであった。

A から E 株の大腸菌接種群全体で 13/90 羽 (14.4%) が接種7日目までに死亡した。菌株によって致死率が異なっており、病原性に違いが認められた。山口ら [2] の鶏大腸菌症野外例分離株の初生雛右側大腿部接種実験では、7種の菌株のうち6種で接種7日以内に全羽が死亡し、死亡のピークは接種1日目から2日目であった。本実験で最も死亡雛の多かった A 株の致死率は 6/18 羽 (33.3%) であり、また、大腸菌接種群全体で、死亡のピークは接種5日目であることから、野外例由来分離株と比較すると分離された大腸菌の致死性は低く、死亡のピークにも相違がみられた。死亡雛では、右側大腿部接

種部位の蜂窩織炎以外に肉眼病変はほとんど認められなかったことから、全身性の急性敗血症型で死亡したと考えられる。死亡雛では心筋間や心外膜、肝細胞間に細菌塊は認められなかったが、接種4日目以降の死亡雛では卵黄嚢内の細菌塊が顕著であった。死亡のピークが接種2日以内ではなく、接種5日目に認められたことは、接種部位筋肉及び卵黄嚢内で大腸菌が増殖したためではないかと考えられた [10]。

亜急性漿膜炎型では心膜炎に次いで肝被膜炎がみられる [2, 11, 12]。本実験では死亡雛及び生残雛のそれぞれ1例ずつで病理組織学的に心膜炎が認められたが、肝被膜炎は肉眼的にも病理組織学的にも観察されなかった。死亡雛の心膜では線維素の析出や偽好酸球、マクロファージの浸潤などが観察されたが、細菌塊はみられなかった。このため今回観察された心膜炎は軽度の病変と考えられた。大腸菌感染による漿膜炎の発生として心膜に病変形成がみられる点は同様だが、病変の程度において本実験で用いた分離株は鶏大腸菌症野外例由来分離株と異なっていた。

接種部位では生残雛の53/77羽(68.8%)に病理組織学的に細菌塊を伴う肉芽腫性病変の形成が認められ、肉眼的及び病理組織学的に蜂窩織炎を形成し得る大腸菌が鶏大腸菌症非発症鶏の盲腸内に存在することが明らかとなった。蜂窩織炎は、鶏同士の闘争により形成された搔傷部や床面との接触部位からの大腸菌感染が原因として疑われており [9]、大腿部、腹部皮下のほかにも総排泄腔周囲に発生が多い。本実験で分離されたような、致死率は低いが肉芽腫性病変を高率に形成する菌株が搔傷部より感染した場合、食鳥処理場において廃棄の原因となる病変を形成する可能性が示唆された。さまざまな日齢のブロイラーを用いたJohnsonら [6] の蜂窩織炎由来大腸菌の接種実験では、4日齢及び16から52日齢のブロイラーにおいて蜂窩織炎の発症率は同程度であった。本実験で分離された大腸菌の蜂窩織炎発症率と日齢の関係については今後さらなる検討が必要となる。

大腸菌接種群では33/77羽(42.9%)に肉眼的に卵黄嚢の遺残がみられ、病理組織学的にそのほとんどに細菌塊を伴う肉芽腫性炎が認められた。鶏では孵卵数日前に体外にある卵黄嚢が体内に引き込まれ、孵化する。孵化直後、腹部の卵黄嚢が引き込まれた部分は完全に閉じておらず、この部分から細菌が感染すると臍帯炎を生じ卵黄嚢は吸収されずに遺残するとされている [10, 13]。

また、われわれは過去の実験において致死性の低い菌株が卵黄嚢内に侵入すると、卵黄嚢遺残を伴う大腸菌症が発症することを認めている(未発表)。臍帯感染は端打ち時にも生じ、原因菌には*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus*属菌などの日和見菌があげられる。本実験では*E. coli*を用いたが接種部位は右側大腿部筋肉内であった。このことから、臍帯感染以外の感染経路においても細菌感染により卵黄嚢の遺残が生じることが示唆された。

引用文献

- [1] Barnes HJ, Nolan LK, Vaillancourt JP: Colibacillosis, Diseases of Poultry, Saif YM et al eds, 12thed, 691-737, Blackwell Publishing, Iowa (2008)
- [2] 山口達作, 佐々木 淳, 倉持 好, 川崎武志, 御領政信: 鶏大腸菌症における最近の大腸菌分離株及び接種経路の相違による病態の検討, 鶏病研報, 47, 167-176 (2011)
- [3] 光岡知足: ニワトリの腸内細菌叢, 鶏病研報, 7, 67-75 (1971)
- [4] 光岡知足: 腸内細菌叢研究の歩み, 腸内細菌誌, 25, 113-124 (2011)
- [5] 越智勇一, 光岡知足: 鶏の腸内細菌叢に関する研究II. 健康鶏の腸内細菌叢について, 日獣医誌, 20, 45-51 (1958)
- [6] Johnson LC, Bilgili SF, Hoerr FJ, McMurtrey BL, Norton RA: The influence of *Escherichia coli* strains from different sources and the age of broiler chickens on the development of cellulitis, Avian Pathol, 30, 475-479 (2001)
- [7] Peighambari SM, Vaillancourt JP, Wilson RA, Gyles CL: Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis, Avian Dis, 39, 116-124 (1995)
- [8] Gomes SM, Goodhope R, Kumor L, Caddy N, Riddell C, Potter AA, Allan BJ: Isolation of *Escherichia coli* from cellulitis and other lesion of the same bird in broilers at slaughter, Can Vet J, 38, 159-162 (1997)
- [9] 渡邊 理, 藪上 剛, 亀山 衛, 山口悦司, 浦本京也: ブロイラーにおける蜂窩織炎の発生とその要因, 日獣会誌, 62, 121-125 (2009)
- [10] 板倉智敏: 卵黄嚢(メッセル憩室)感染症, 鶏病病理学カラーアトラス, 54-55, 学窓社, 東京(1988)
- [11] 板倉智敏: 大腸菌症, 鶏病病理学カラーアトラス, 46-48, 学窓社, 東京(1988)
- [12] 黒田雄介, 佐々木 淳, 倉持 好, 川崎武志, 御領政信: 実験的鶏大腸菌症の慢性化病変, 鶏病研報, 49, 40-49 (2013)
- [13] 橋本和典: 鶏の大腸菌症, 鶏病研報, 8, 13-20 (1972)

Pathogenicity in Day Old Chicks of *Escherichia coli* Isolated From Cecum
of Chickens Not Affected by Colibacillosis

Asami KATO¹⁾, Jun SASAKI¹⁾, Konomi KURAMOCHI¹⁾, Takeshi KAWASAKI²⁾
and Masanobu GORYO^{1)†}

1) *Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, Iwate University, 3-18-8 Ueda,
Morioka, 020-8550, Japan*

2) *Laboratory of Health of Human and Bird, 2-7-1 Masu-ura, Abashiri, 099-3119, Japan*

SUMMARY

Escherichia coli (*E. coli*) isolated from the cecum of chickens not affected by colibacillosis was inoculated into day-old chicks, and its pathogenicity was histopathologically investigated to identify the association between chicken colibacillosis and resident cecal *E. coli* of chicken. All five strains (A, B, C, D, E) obtained were identified as *E. coli*. Strain C was classified into O8 serotype, but none of the other strains could be classified. In an experimental study, all strains except strain E caused death. Cellulitis was frequently found in chicks who died two days postinoculation, and pericarditis was found in one chick. In the surviving chicks, cellulitis at the inoculation site and yolk sac remnant was observed grossly, and mild pericarditis was observed histologically. Bacterial colonies at the inoculation site and yolk sac consisted of Gram-negative bacteria. This study revealed that *E. coli* isolated from the cecum of chickens not affected by colibacillosis has pathogenicity in day-old chicks when inoculated intramuscularly.

— Key words : cecum, cellulitis, chicken colibacillosis, normal flora, pathogenicity.

† Correspondence to : Masanobu GORYO (*Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, Iwate University*)

3-18-8 Ueda, Morioka, 020-8550, Japan

TEL 019-621-6217 FAX 019-621-6274 E-mail : goryo@iwate-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 68, 693 ~ 698 (2015)