

称号及び氏名	博士（獣医学）	寺本 英司
学位授与の日付	平成28年2月29日	
論文名	犬外耳道からの <i>Malassezia pachydermatis</i> 分離法および分離菌株の分子系統解析と生物学的活性について	
論文審査委員	主査	向本 雅郁
	副査	山崎 伸二
	副査	渡来 仁

## 論文要旨

### 緒言

*Malassezia* 属菌は動物の皮膚や外耳などに常在する酵母様真菌で癬風や脂漏性皮膚炎の原因菌として古くから知られている。イヌやネコにおいても外耳炎や皮膚炎の原因菌であり、本菌が分離されなくても感染の可能性の高い症例を含めマラセチア関連疾患とされ、臨床疾患上問題となっている。

*Malassezia* 属菌は現在 14 菌種に分類されているが、*M.pachydermatis* は *Malassezia* 属菌の中で脂質を必要としない唯一の脂質非要求性菌である。*M.pachydermatis* はヒトに対してもアトピー性皮膚炎、院内感染、人畜共通感染症との関連が注目されている。イヌからヒトへの感染の危険性があるにも関わらず、イヌにおける *M.pachydermatis* の保菌状況や飼育環境の汚染状況についてはほとんど把握されていない。

本研究では、イヌの皮膚疾患の中で多数の症例が確認されている外耳炎の診断において、イヌの耳垢からの *M.pachydermatis* の分離が適切に実施されるため、検体採取用綿棒の生菌保持能および分離寒天培地の発育能を検討し、簡便性と

迅速性に優れた同定法を確立した。外耳炎罹患犬由来株と非罹患犬由来株について、ITS 領域と IGS1 領域の塩基配列による分子系統解析を行った。さらに菌が産生するリパーゼ活性およびホスホリパーゼ活性と病原性との関連を比較した。確立した同定法を用いて動物病院およびトリミングショップに来院したイヌからの *M.pachydermatis* 検出状況を調べた。

## 第 1 章 犬外耳道からの *M.pachydermatis* 分離法

イヌの耳垢からの *M.pachydermatis* 分離に必要な採取綿棒の種類、寒天培地および同定法を検討した。

耳垢からの採取綿棒の使用に際して、使用頻度の高い市販綿棒による *M.pachydermatis* の生存期間の違いを調べた。活性炭綿棒と乾燥綿棒の 5℃ 保存における *M.pachydermatis* 生菌保持期間は活性炭綿棒で 4 日、乾燥綿棒で 2 日と活性炭綿棒の方が本菌の生菌保持に適していた。活性炭綿棒の長期の生菌保持は綿棒保存液中に含まれる活性炭および変法アミーズ培地によると考えられる。

検体からの *Malassezia* 属菌の分離には通常、サブロー寒天培地またはポテトデキストロース寒天培地にオリーブオイルを重層した培地が使用される。*Malassezia* 属菌はほとんどが脂質要求性を有しており、オリーブオイル重層寒天培地でのみ発育するため、他の微生物との鑑別は比較的容易である。一方、*M.pachydermatis* は脂質非要求性であるため、オリーブオイル重層の有無に関わらず両寒天培地に発育するため、鑑別は困難である。真菌以外の微生物を強く抑制するクロモアガーマラセチア/カンジダ寒天培地で、*M.pachydermatis* を含む一部の *Malassezia* 属菌は特徴的な赤紫色集落と周囲に沈澱物を形成した。*M.pachydermatis* がサブロー寒天培地に発育し、クロモアガーマラセチア/カンジダ寒天培地上で特徴的な集落を形成する性状を利用して、両寒天培地を併用することにより、迅速かつ簡便に *M.pachydermatis* を分離・同定できる方法を確認した。この方法により *M. pachydermatis* と同定された臨床分離株 55 株は ITS 領域の塩基配列解析で、すべて *M.pachydermatis* と確認されたことから、正確性の面でも非常に優れた同定法であると考えられる。

## 第 2 章 分離菌株の分子系統解析および生物学的活性

動物病院に来院したイヌから分離された *M.pachydermatis* の外耳炎罹患犬由来株と非罹患犬由来株について、菌種同定に用いられる ITS および IGS I 塩基配

列による分子系統解析を行った。その結果、*M.pachydermatis* は他の *Malassezia* 属菌とは別のクラスターに区別され、3つの genotype (I-1~I-3) に分類された。genotype I-3 は最も大きいグループを形成し、供試した株(59 株)の 69%(41 株)が含まれた。また、IGS1 領域についても 3つの genotype (G1~G3) に分類され、genotype G3 は最も大きいグループを形成し、供試した株(45 株)の 69%(31 株)が含まれた。ITS と IGS1 による分子系統解析では外耳炎罹患犬と非罹患犬の株間による違いはみられなかった。

*M.pachydermatis* の病原因子として考えられているホスホリパーゼの活性について外耳炎罹患犬由来株と非罹患犬由来株で比較した。ホスホリパーゼ活性は卵黄加平板法と L- $\alpha$ -phosphatidylcholine dimyristoyl を基質とする 2つの方法で評価した。外耳炎罹患犬由来株のホスホリパーゼ活性は非罹患犬由来株より有意に高値を示したが、ITS genotype 間では活性の差はみられなかった。以上の結果から、*M.pachydermatis* の病原性にホスホリパーゼが関わっている可能性が示唆された。

### 第 3 章 動物病院およびトリミングショップの外耳炎罹患犬および非罹患犬からの *M.pachydermatis* の検出

今回確立した 2 種類の寒天培地を併用した簡易同定法を用いて、動物病院とトリミングショップにおけるイヌの *M.pachydermatis* 保有率を調べた。動物病院における検出率は外耳炎罹患犬 55.0% (220 頭中 121 頭)、非罹患犬 26.9% (208 頭中 56 頭) で、罹患犬で有意に高かった。トリミングショップに来店したイヌでは罹患犬 27.3% (33 頭中 9 頭)、非罹患犬 16.3% (98 頭中 16 頭) で、動物病院と同様に外耳炎犬からの検出率が有意に高かった。動物病院の垂耳犬種からの検出率は罹患犬 55.7% (115 頭中 64 頭)、非罹患犬 42.3% (71 頭中 30 頭)、立耳犬種からはそれぞれ 52.5% (40 頭中 21 頭) と 22.7% (22 頭中 5 頭) であり、耳の形状による検出率に差は見られなかった。

動物病院に来院したイヌの季節別 *M.pachydermatis* 検出率は夏期では罹患犬 46.4% (97 頭中 45 頭)、非罹患犬 33.3% (57 頭中 19 頭)、冬季では罹患犬 61.9% (42 頭中 26 頭)、非罹患犬 9.6% (52 頭中 5 頭) で、外耳炎犬の来院数は冬季の方が少ないにも関わらず、*M.pachydermatis* 検出率は冬期の外耳炎罹患犬で高い傾向がみられた。

## 総括

1. *M.pachydermatis* の犬外耳道からの分離用採取綿棒は活性炭綿棒が適していた。
2. *M.pachydermatis* の分離および同定法はクロモアガーマラセチア/カンジダ寒天培地とサブロー寒天培地を併用し、サブロー寒天培地上での発育およびクロモアガーマラセチア/カンジダ寒天培地上での赤紫集落および周辺部の沈殿物形成で同定する方法が迅速性および簡便性の点で優れていた。
3. ITS および IGS1 の分子系統解析により *M.pachydermatis* 分離株は3つの genotype に分かれたが、外耳炎罹患犬と非罹患犬の菌株間で分子系統的違いは認められなかった。
4. *M.pachydermatis* から産生されるホスホリパーゼがイヌ外耳炎の病原性に関与している可能性が示唆された。
5. 外耳炎罹患犬と非罹患犬における *M.pachydermatis* 検出率は罹患犬で有意に高かった。

## 審査結果の要旨

*Malassezia* 属菌は動物の皮膚や外耳などに常在する酵母様真菌で癬風や脂漏性皮膚炎の原因菌として古くから知られている。イヌやネコにおいても外耳炎や皮膚炎の原因菌であり、本菌が分離されなくても感染の可能性の高い症例を含めマラセチア関連疾患とされ、臨床疾患上問題となっている。*Malassezia* 属菌は現在 14 菌種に分類されているが、イヌのマラセチア関連疾患の原因菌のほとんどが *Malassezia pachydermatis* である。最近、ヒトにおいて *M pachydermatis* の耐性菌が発見されたことから、イヌにおいても耐性菌の発生を考慮し、動物病院においても、薬剤感受性試験が必要と考えられる。外耳炎起因菌についての正確な情報を得るためには、菌の生存にとって最適な条件で検査機関へ送付することが必須の条件となる。イヌからヒトへの感染の危険性があるにも関わらず、イヌにおける *M pachydermatis* の保菌状況や飼育環境の汚染状況についてはほとんど把握されていない。本研究では、簡便性・迅速性および正確性に優れた *M pachydermatis* の同定法を確立した。常在菌である本菌の外耳炎罹患犬由来株と非罹患犬由来株を用いて、病原性についての探索を

おこなった。確立した同定法を用いて動物病院およびトリミングショップに来院したイヌからの *M pachydermatis* 検出状況を調べた。

第 1 章では、イヌの皮膚疾患の中で多数の症例が確認されている外耳炎の診断において、イヌの耳垢からの *M pachydermatis* の分離が適切に実施されるため、検体採取用綿棒の生菌保持能および分離寒天培地の発育能を検討し、簡便性と迅速性に優れた同定法を確立した。耳垢採取用綿棒で使用頻度の高い市販綿棒のうち、5℃保存における *M pachydermatis* 生菌保持期間は活性炭綿棒が最も長く、本菌の生菌保持に適していた。*M pachydermatis* は *Malassezia* 属菌の中で唯一脂質非要求性であるため、オリーブオイルを重層しない寒天培地に発育する。そのため、脂質要求性の *Malassezia* 属菌と異なり、他の細菌や真菌との鑑別が困難である。一方、真菌以外の微生物を強く抑制するクロモアガーマラセチア/カンジダ寒天培地において *M pachydermatis* を含む一部の *Malassezia* 属菌は特徴的な赤紫色集落と周囲に沈澱物を形成した。*M pachydermatis* がオリーブオイルを重層しないサブローデキストロース寒天培地に発育し、クロモアガーマラセチア/カンジダ寒天培地上で特徴的な集落を形成する性状を利用して、両寒天培地を併用することにより、迅速かつ簡便に *M pachydermatis* を分離・同定できる方法を確立した。この方法により *M pachydermatis* と同定された臨床分離株 55 株は internal transcribed spacer (ITS) 領域の塩基配列解析で、すべて *M pachydermatis* と確認されたことから、正確性の面でも非常に優れた同定法であることを明らかにした。

第 2 章では外耳炎罹患犬由来株と非罹患犬由来株について、菌種同定に用いられる ITS 領域と internal spacer 1 (IGS1) 領域の塩基配列による分子系統解析を行った。さらに菌が産生するホスホリパーゼ活性と病原性との関連を比較した。分子系統解析の結果、*M pachydermatis* は他の *Malassezia* 属菌とは別のクラスターに区別され、3 つの genotype (I-1~I-3) に分類された。また、IGS1 領域についても 3 つの genotype (G1~G3) に分類された。しかしながら、ITS と IGS1 による分子系統解析では外耳炎罹患犬と非罹患犬の株間による違いはみられなかった。*M pachydermatis* の病原因子として考えられているホスホリパーゼ活性について卵黄加平板法と L- $\alpha$ -phosphatidylcholine dimyristoyl を基質とする 2 つの方法で評価した。外耳炎罹患犬由来株のホスホリパーゼ活性は非罹患犬由来株より有意に高値を示し、阻害剤を用いた抑制試験によりサブクラス D(phosD) を産生することが明らかになった。これらの結果から、*M pachydermatis* の病原性にホスホリパーゼが関わっている可能性が強く示唆された。

第 3 章では確立した同定法を用いて動物病院およびトリミングショップに来院したイヌからの *M pachydermatis* 検出状況を調べた。動物病院およびトリミングショップにおいて、いずれも外耳炎罹患犬からの検出率が非罹患犬と比較して有意に高かった。動物病院における垂耳犬種と立耳犬種における検出率に差は見られなかった。季節の違いによる *M pachydermatis* の検出率に関しては

ヒトと異なり、夏期より冬期で高かった。このヒトの結果との違いは、ほとんどのイヌが室内飼育されている北海道という地域性が反映されている可能性が示唆された。

以上、本研究は *M pachydermatis* のイヌ外耳道からの簡便・迅速さらには信頼性の高い分離培養法を確立し、外耳炎罹患犬由来株が産生するホスホリパーゼがその病原因子であることを明らかにした。また、我が国で飼育されているイヌにおける *M pachydermatis* の汚染状況を詳細に解析し、高度に家庭飼育犬において本菌の汚染が浸潤していることを明らかにした。これらの成果は家庭飼育犬の *M pachydermatis* の保菌状況から飼主の *M pachydermatis* 感染が危惧されるため、院内感染を含めた *M pachydermatis* 感染対策や環境汚染調査に有用な技術と情報を提供し、獣医学の発展に貢献するものである。本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。