

称号及び氏名	博士（獣医学）中埜 康幸
学位授与の日付	平成18年3月31日
論文名	「犬外耳炎の臨床微生物学的精査およびβ-thujaplicinによるマラセチア感染性外耳炎の治療に関する研究」
論文審査委員	主査 馬場 栄一郎 副査 大橋 文人 副査 松尾 三郎 副査 笹井 和美

## 論文要旨

はじめに

小動物診療のなかで耳の疾患、とくに犬の外耳炎は診察頻度の高い疾患であるが、耳の疾患を主訴として来院する以外に、各種の検査実施中に発見される症例を含むと相当数存在する。外耳炎は致命的な疾患ではないが、罹った動物のみならず飼い主の QOL (Quality of Life) までも悪化させる。また、適切に管理しないと、感染性炎症の波及で鼓膜が穿孔し中耳炎にまで進行する症例や、慢性的経過をとって外耳道が狭小化し、さらに進むと外科的な処置が必要になる症例もある。獣医師はその原因や素因を的確に診断し理論的に治療をすることが要求されるが、一般獣医療では軽視されがちである。犬が外耳炎の症状を示せばそれ以上の検査をせずに感染性外耳炎として処置され、その後に診断が修正される症例も少なくない。外耳炎の症状があっても耳垢の塗抹や培養で微生物が検出されない例も経験され、感染性外耳炎の実態は意外に不明瞭である。一方、犬の感染性外耳炎の主たる原因が *Malassezia pachydermatis* であることについては多くの報告がなされているが、最近になって治療薬である抗真菌薬に対する耐性株の出現が懸念されており、その実態把握と新たな治療薬の開発が望まれる。

本研究では、感染性外耳炎の診断的評価として、詳細な耳垢の細胞診と微生物培養を行い臨床症状との関連を検討した。ついで、感染性外耳炎の主たる病原菌である *M. pachydermatis* の発育を抑制する可能性のあると考えられる抗真菌剤β-thujaplicinの臨床応用の可能性について検討した。

## 第1章 犬外耳炎症例の診断学的精査

外耳炎の診断は困難なものではないが、多くの原因や素因が含まれるため治療法を慎重に選択する必要がある。感染性外耳炎の原因となる耳道内微生物はほとんどのものが正常な耳道からも検出され、したがって外耳炎を診断するためには種類だけでなく菌数が重要な因子となる。臨床現場では最初に症状を把握し、次いで耳垢塗抹の細胞診を行うことが多いので、この段階で高い診断精度を得ることが望ましい。そこで、犬外耳炎 124 症例について臨床観察による 12 段階の外耳炎病状診断スコア（以下、診断スコア）を記録し、耳垢塗抹標本について顕微鏡下で菌形と菌数を精査した。さらに、耳垢を培養して微生物フローラを定量的に調べ、診断スコアおよび細胞診の結果と比較した。

細胞診による外耳炎の評価： 外耳炎症例の耳垢細胞診において、マラセチア様酵母は 79.8%の例に、細菌は 66.9%の例に認められた。Ginelの基準であるマラセチア様酵母数で 400 倍 1 視野に 5 個以上あるいは細菌数で 25 個以上観察された例、すなわち感染性外耳炎と診断された例が 69.4%存在した。一方、臨床観察をもとに診断スコアが記録されながら細胞診で微生物が検出されない例が 12.1%あった。

微生物フローラによる外耳炎の評価： 血液寒天培地、サブロー寒天培地およびDHL寒天培地で耳垢を培養した結果、82.3%から何らかの微生物が検出された。ブドウ球菌が 48.4%と最も多く、*M. pachydermatis*が 39.5%、グラム陰性桿菌が 29.8%とこれに次いだ。ブドウ球菌を同定したところ *Staphylococcus aureus*と *S. delphini*が主な種であった。定量的にはいずれの微生物についても耳垢 10mgあたり  $10^6$  CFUに達する例がみられた。診断スコアが上昇すれば検出菌数も上昇する傾向がみられたが、診断スコアが高くても微生物が検出されない例も多く存在した。細胞診でマラセチア様酵母が確認されながら *M. pachydermatis*が培養されなかった例が 99 例中 42 例存在し、臨床現場で一般的に行われている真菌培養に関して今後、工夫が必要であると考えられる。

総合的診断： 細胞診とフローラの結果から症例を感染パターンで分類したところ、*M. pachydermatis*単独あるいは混合感染症例を含んだ症例は 66.0%であり、グラム陽性球菌を含んだものは 48.3%、グラム陰性桿菌では 31.3%、グラム陽性桿菌では 18.5%であった。一方、非感染と判断した症例は 21.0%であった。診断スコアの平均で比較すると、感染した微生物の種類が多くなるほど平均診断スコアが高くなる傾向を示した。

## 第2章 新たな犬外耳炎治療薬としての $\beta$ -thujaplicin の可能性：*Malassezia pachydermatis* とブドウ球菌に対する発育抑制効果

感染性外耳炎の主要な病原微生物である *M. pachydermatis* とブドウ球菌の両者に感受性があり、かつ安価である薬剤の開発が望まれる。 $\beta$ -Thujaplicin は、強い抗真菌作用を持

つ薬剤であり、特にイーストに分類される *M. pachydermatis* に対する効果と報告にあるブドウ球菌の発育抑制効果を期待して試験に供した。

*M. pachydermatis*に対する発育抑制効果： *M. pachydermatis*の  $\beta$ -thujaplicinに対する感受性を調べるために、薬剤感受性試験法を検討した後に、犬外耳炎由来*M. pachydermatis* 43 株について最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。比較のために、臨床現場で用いられている抗真菌薬、nystatin、ketoconazoleおよびterbinafine-HClに対する感受性試験を行った。 $\beta$ -thujaplicinは、nystatinやterbinafine-HClと同様な濃度 (MIC<sub>50</sub>=3.13  $\mu$ g/ml) で*M. pachydermatis*に対して発育抑制効果のあることが示された。今回試験した*M. pachydermatis*株はどの薬剤に対しても耐性を示さなかったが、ketoconazoleには高いMICを示すものがみられ、今後、耐性株出現の可能性を示唆した。

ブドウ球菌に対する発育抑制効果：  $\beta$ -Thujaplicinのブドウ球菌に対する発育抑制効果を試験するため犬外耳炎由来ブドウ球菌 57 株について、 $\beta$  thujaplicin を含め、nystatin、ketoconazoleおよびterbinafine-HClのMICを調べた。 $\beta$ -Thujaplicin のブドウ球菌に対するMIC<sub>50</sub>は 50  $\mu$ g/mlであったが、nystatin、ketoconazole、terbinafine-HClは測定に用いた一般的な臨床現場で使用される濃度では、ブドウ球菌の発育抑制を示さなかった。

抗真菌薬に対する*M. pachydermatis*の耐性獲得能： イヌの外耳炎は難治性であり、再発を繰り返すため薬剤を長期投与する必要があるため、薬剤に対する耐性株の出現が危惧される。そこで、 $\beta$ -thujaplicinを含めた抗真菌薬のMIC付近濃度で*M. pachydermatis* 10 株を継代培養し、*M. pachydermatis*の各薬剤に対する耐性獲得能について試験した。30 代継代した結果、 $\beta$ -thujaplicinのMIC<sub>50</sub>は全く変化しなかったが、他の 3 剤はいずれも上昇し、特にketoconazole、terbinafin-HClに対する耐性を獲得しやすいことが示された。

$\beta$ -Thujaplicin鉄錯体の*M. pachydermatis*とブドウ球菌に対する発育抑制効果：  $\beta$ -Thujaplicin鉄錯体は  $\beta$ -Thujaplicinに比べて、ブドウ球菌に対する発育抑制効果が強まり、昇華性、金属腐食性の消失と光安定性が得られることが報告されている。そこで、*M. pachydermatis*とブドウ球菌について  $\beta$ -thujaplicin鉄錯体に対する感受性試験を行ったが、鉄錯体を形成した  $\beta$ -thujaplicinは*M. pachydermatis*およびブドウ球菌に対して全く発育抑制効果を示さなかった。

### 第3章 マラセチア性犬外耳炎に対する $\beta$ -thujaplicin 点耳薬の治療効果

前章までに  $\beta$ -thujaplicin が犬外耳炎の主たる病原菌である *M. pachydermatis* とブドウ球菌の発育抑制効果を示すことが確認されたので、犬外耳炎症例について  $\beta$ -thujaplicin を含む点耳薬による治療試験を行った。これらの成績をもとに  $\beta$ -thujaplicin が外耳炎治療薬として使用可能かどうかを総合的に検討した。

$\beta$ -Thujaplicin治験用点耳薬の毒性試験： 犬外耳炎を治療するために外耳道を洗浄する場合、鼓膜の損傷がないことを確認してから行うのが原則であるが、現実には実施できない

ことが多い。そこで、治療試験を行う前に $\beta$ -thujaplicin溶液を外耳道内に注入した場合の毒性を試験するため、鼓膜を穿孔したモルモットに点耳薬を連日注入しながら臨床的徴候と病理学的変化を観察した。その結果、全く臨床症状はみられず、病理学的検査でも穿孔鼓膜は再生し、組織像において炎症や毒性を示す変化はみられなかった。

$\beta$ -Thujaplicin治療用点耳薬によるマラセチア性外耳炎に対する治療試験：治療試験には、近畿圏内の開業獣医師の協力を得て、外来受診した犬外耳炎症例 31 例を用いた。治療試験に際しては、主に次の条件を満たし、飼い主からも理解が得られた場合に供試犬とした。すなわち、臨床検査の結果、アレルギー性の所見がみられず、かつ細胞診からマラセチア感染性外耳炎と診断されたこと；斜頸、眼震などの症状が見られず、中耳炎や内耳炎を併発していないこと；他に明らかな合併症がないこと；供試犬に対して自宅で試験点耳薬の定期的な投与が可能であり、他の薬剤を使用しないこと；経過観察と細胞診のために通院できること；本試験点耳薬は生体にとって安全であるが、異物であることから点耳を継続することで耳道や聴覚、平衡感覚に一時的な障害の起こる可能性を飼い主が理解することを条件とした。 $\beta$ -Thujaplicinの濃度を  $100\mu\text{g/ml}$ に調整した液を治療用点耳薬とした。効果判定には診断スコアに鏡検マラセチア様酵母数を加えた 15 段階の判定スコアを用いた。試験期間を 3～6 週間とし、点耳薬を片耳あたり  $0.5\sim 2.0\text{ml}$ を毎日注入した。この間 3～7 病日ごとに来院させ、判定スコアを記録し、スコアの低下により治療効果を判断した。その結果、31 症例中、著効例 11 症例、有効例 11 症例、やや有効例 5 症例、無効例 1 症例、試験中止例 3 例であり、 $\beta$ -thujaplicin点耳薬を用いた家庭内での処置が外耳炎に有効であると判断された。

## まとめ

犬外耳炎について耳垢の細胞診と培養を行い、外耳炎の全体像の把握を行った。さらに、新しい外耳炎治療薬として $\beta$ -thujaplicinの可能性を評価するため、感染性外耳炎の主たる病原菌である *M. pachydermatis* とブドウ球菌に対する発育抑制効果と、臨床例を用いた治療試験を行って、以下のような結果を得た。

1. 犬外耳炎症例を精査したところ、症状を示していても、耳垢の細胞診や培養で感染性と診断できるほどの微生物が検出されない症例が約 20.0%存在したが、平均診断スコアは感染性に比べると低く、多種類感染型の平均スコアほど高い傾向がみられた。
2. *M. pachydermatis* は犬外耳炎の主たる病原菌の一つと言われており、今回の検査でもブドウ球菌とともに優勢な微生物であった。しかし、細胞診と培養の結果が一致しない例が多く、今後、培養法の工夫が必要であると考えられる。
3.  $\beta$ -Thujaplicin は、nystatin や terbinafine-HCl と同様な濃度で *M. pachydermatis* に発育抑制効果のあることが示され、また耐性を賦与しにくいことが判明した。
4.  $\beta$ -Thujaplicin はブドウ球菌に対しても発育抑制効果のあることが示された。

5.  $\beta$ -Thujaplicin 点耳液を用いた犬のマラセチア感染性外耳炎症例に対する治療試験を行った結果、家庭内での点耳継続だけでも外耳炎に有効であることが分かった。

## 審査結果の要旨

犬の外耳炎は、小動物診療件数の約 10%を占め、致命的ではないが罹った動物のみならず患部の悪臭や性格の変化などにより飼い主の QOL (Quality of Life) まで悪化させる疾患である。適切に診断治療しないと進行して慢性化するので、獣医師はその原因や素因を的確に診断して適切な治療を施すことが要求されるが、一般獣医療では往々にして軽視されがちである。犬が外耳炎の症状を示せばそれ以上の検査をせずに感染性外耳炎として処置され、その後診断が修正される症例も少なくない。外耳炎の症状があっても耳垢の塗抹や培養で微生物が検出されない例も経験され、感染性外耳炎の実態は意外に不明瞭である。一方、犬の感染性外耳炎の主たる原因が *Malassezia pachydermatis* とブドウ球菌であることについては多くの報告がなされているが、治療薬に対するこれら微生物の耐性獲得が懸念されており、その実態把握と新たな治療薬の開発が望まれる。

本研究は、感染性外耳炎の診断的評価法として、詳細な耳垢の細胞診と微生物培養を行い臨床症状との関連を検討した。ついで、感染性外耳炎の主たる病原菌である *M. pachydermatis* の発育を抑制する可能性があると考えられる抗真菌剤  $\beta$ -thujaplicin の臨床応用の可能性について検討した。

第1章では、犬外耳炎 124 症例について診断学的精査を行った。まず、初診時に病状を基に設定した 12 段階の外耳炎病状診断スコアを記録し、耳垢サンプルを用いて細胞診により微生物の種類と数を評価した。さらに、同じサンプルについて培養によるフローラの検索を行い、これらの成績を総合的に評価して外耳炎の実態を把握し、症例を感染性と非感染性に分類した。その結果、約 20%の症例が非感染性と診断され、予想に反して感染によらない外耳炎が多いことが判明した。感染性症例のなかではやはり *M. pachydermatis* とブドウ球菌が優位を占めることがわかったが、一方でグラム陰性菌が検出されるものも多く存在した。また、混合感染を示す症例が多く、感染する微生物の種類が多いほど病状診断スコアが高いことがわかった。

第2章では、新たな犬外耳炎治療薬として  $\beta$ -thujaplicin の可能性を検討した。犬の外耳炎の主たる病原菌が *M. pachydermatis* であることから、治療にはこれまでから抗真菌薬が用いら

れてきた。しかし、長期に使用する必要から耐性株の出現が懸念されている。 $\beta$ -thujaplicinは真菌以外の細菌にも発育抑制効果があると報告されており、混合感染症例には理想的な治療薬と考えられる。そこで、前章で主たる病原菌であることを確認した *M. pachydermatis* とブドウ球菌について  $\beta$ -thujaplicin に対する感受性試験を行ったところ、*M. pachydermatis* に対しては既存の抗真菌薬と同様の発育抑制効果があり、ブドウ球菌には他の抗真菌薬が全く効果を示さなかったのに対して  $\beta$ -thujaplicin は中等度の抑制を示した。さらに、*M. pachydermatis* の  $\beta$ -thujaplicin に対する繰り返し継代による耐性獲得試験を行ったところ、他の抗真菌薬には耐性に移行する傾向を示したが、 $\beta$ -thujaplicin ではその傾向が全くみられなかった。

第3章では、 $\beta$ -thujaplicin 点耳薬によるマラセチア性犬外耳炎に対する治療試験をおこなった。 $\beta$ -thujaplicin 点耳薬を調整し、モルモットを用いて毒性のないことを確認した後、犬外耳炎症例の中から協力が得られた 31 症例について3-6週間の治験を実施した。その結果、著効例、有効例、やや有効例を合わせると87%に達し、家庭内での点耳継続だけでも外耳炎に有効であることがわかった。

以上の結果は、小動物獣医療で最も診察頻度が高いと報告されている犬の外耳炎の診断法を再評価し、また、治療法に対して新たな提案をするものであり、臨床獣医学に寄与するところが大きい。また、獣医療現場で新しい薬剤治療試験を行う際のインフォームドコンセントに関連する手法についても多くの示唆を与えるものである。したがって、本論文の審査および最終試験の結果とあわせて博士(獣医学)の学位を授与することが適当であると認める。