



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

ハンドウイルカ (Tursiops truncatus)の呼吸器真菌感染症の治療に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-02-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大野, 佳 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/79647">http://hdl.handle.net/20.500.12099/79647</a>

ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) の  
呼吸器真菌感染症の治療に関する研究

2020年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

大 野 佳

ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) の  
呼吸器真菌感染症の治療に関する研究

大 野 佳

# 目 次

緒 言	1
図 表	7
第1章 ハンドウイルカ ( <i>Tursiops truncatus</i> ) における ミカファンギンの静脈内投与による安全性の評価	14
序 論	15
材料および方法	17
動物	17
体温測定	17
血液検査	17
呼気真菌培養検査と検出菌種の同定	18
血液培養検査，呼気の細菌培養検査および薬剤感受性試験	18
超音波検査と気管支鏡検査	18
抗真菌剤の投与	19
血漿 VRCZ 濃度の測定	20
VRCZ 投与による副作用の評価	20
抗生剤の投与	20
顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の投与	21
結 果	22
診断と転帰	22
体温	22

血液検査	23
呼気の真菌培養検査と検出菌種の同定	23
血液培養検査，呼気の細菌培養検査および薬剤感受性試験	23
超音波検査と気管支鏡検査	24
血漿 VRCZ 濃度と VRCZ 投与による副作用	24
考 察	25
図 表	27
第2章 ハンドウイルカ ( <i>Tursiops truncatus</i> ) における ポリコナゾールの胎盤と乳汁への移行と母仔獣の 安全性の評価	38
序 論	39
材料および方法	41
動物	41
母獣 No. 1 とその仔獣 No. 2	41
母獣 No. 3 とその仔獣 No. 4	41
母獣 No. 5 とその仔獣 No. 6	41
母獣 No. 7 とその仔獣 No. 8	42
呼気の真菌培養検査と検出菌種の同定	42
VRCZ の投与方法	42
検体採取	43
血液（血漿）	43
臍帯血（血漿）	43

乳汁	43
VRCZ 濃度の測定	44
VRCZ 投与による副作用の評価	44
結 果	45
呼気真菌培養検査と検出菌種の同定	
および VRCZ の投与（治療）	45
母獣 No. 1 とその仔獣 No. 2	45
母獣 No. 3 とその仔獣 No. 4	45
母獣 No. 5 とその仔獣 No. 6	45
母獣 No. 7 とその仔獣 No. 8	46
VRCZ 濃度と VRCZ 投与による副作用	46
母獣 No. 1 とその仔獣 No. 2	46
母獣 No. 3 とその仔獣 No. 4	47
母獣 No. 5 とその仔獣 No. 6	47
母獣 No. 7 とその仔獣 No. 8	48
考 察	49
図 表	54
第3章 ハンドウイルカ ( <i>Tursiops truncatus</i> ) の	
呼気から分離された真菌の種同定と薬剤感受性試験	62
序 論	63
材料および方法	65
動物	65

呼気真菌培養検査と分離真菌の種同定	65
薬剤感受性試験	66
結 果	67
抗真菌剤の投与（治療）	67
呼気真菌培養検査と分離真菌の種同定	67
薬剤感受性試験	67
考 察	69
表	72
総 括	75
謝 辞	79
引用文献	81

## 略語一覧

AMPH-B : amphotericin B, アムホテリシン B

AST : aspartate transaminase, アスパラギン酸トランスアミナーゼ

AUC : area under the concentration-time curve, 血中濃度-時間曲線下面積

CLSI : Clinical Laboratory Standards Institute, 臨床検査標準委員会

ESR : erythrocyte sedimentation rate, 赤血球沈降速度

FIB : fibrinogen, フィブリノーゲン

FLCZ : fluconazole, フルコナゾール

G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor, 顆粒球コロニー刺激因子

ITCZ : itraconazole, イトラコナゾール

ITS : internal transcribed spacer, 内部転写スペーサー

JAZA : Japanese Association of Zoos and Aquariums, 日本動物園水族館協会

LYM : lymphocyte number, リンパ球数

MCFG : micafungin, ミカファンギン

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

M/P ratio : milk/plasma ratio, 乳汁中薬物濃度と血漿中薬物濃度との比

PSCZ : posaconazole, ポサコナゾール

R : resistant, 耐性

S : susceptible, 感性

S-DD : susceptible-dose dependent, 用量依存的感性



SEG : segmented neutrophil number, 分葉核好中球数

VRCZ : voriconazole, ポリコナゾール

WAZA : World Association of Zoos and Aquariums, 世界動物園水族館  
協会

WBC : white blood cell number, 総白血球数

## 緒 言

ハンドウイルカ（バンドウイルカ）（*Tursiops truncatus*）は鯨偶蹄目ハクジラ亜目マイルカ科ハンドウイルカ属に属するイルカで（図Ⅰ），世界中の熱帯から温帯海域，沿岸から外洋に至る広範囲の海域に生息している（5，84）（図Ⅱ）。また，国内外を問わず，水族館等の飼育施設において一般的に飼育されている鯨種である（39，84）（表Ⅰ）。国内の水族館等の飼育施設で飼育されている本種のほとんどは，これまで和歌山県太地町において伝統的な鯨類の捕獲方法である“追い込み漁”により捕獲されてきた（40，73，74）。しかし，2004年に世界動物園水族館協会（WAZA）から“追い込み漁”による鯨類の捕獲はWAZAの定める倫理および動物福祉規範に反すると非難され，これを受けた日本動物園水族館協会（JAZA）は2015年に，協会に加盟している水族館等の飼育施設に対して“追い込み漁”で捕獲された鯨類の生体入手を禁止した（50，75）。つまり，これまで“追い込み漁”で本種を入手してきたJAZA加盟の水族館等の飼育施設は，その入手の道が絶たれたのである（いわゆるイルカ問題）（50，75）。近年，この“イルカ問題”により，JAZA加盟の水族館等の飼育施設（著者が所属する名古屋港水族館を含む）は野生から本種を入手することができなくなり，その飼育頭数は年々，減少している（JAZA，未発表データ）（図Ⅲ）。以上を考慮すると，国内の水族館等の飼育施設においては，現飼育個体群に対して，これまで以上に日々の健康管理や適切な治療を実施することで長期飼育を目指す必要性がある。さらに，飼育下での繁殖を積極的に推進することで本種の飼育頭数を維持，確保する必要性もある。

呼吸器感染症は本種が罹患する疾患の中で最も罹患率が高い疾患であ

る (83)。著者自身も名古屋港水族館において、本種だけではなくシャチ (*Orcinus orca*) やベルーガ (*Delphinapterus leucas*) といったさまざまな鯨類において呼吸器 (真菌) 感染症による死亡例を複数経験している。これは、本種を含む鯨類の呼吸様式が特殊であり (1回の換気量が多い)、また、解剖学的に呼吸器の構造も特殊である (鼻甲骨がない) という 2 つの理由から病原体が呼吸器に侵入しやすいことと関係している (63, 83)。

呼吸器感染症の病原体の 1 つである真菌、中でもカンジダ (*Candida*) 属やアスペルギルス (*Aspergillus*) 属の真菌は本種において主な起因菌になることが知られている (14, 65, 83)。これらの真菌は、水族館等の飼育施設を含め、あらゆる環境中に常在し (43, 63, 65, 71)、また、カンジダ属の真菌については本種の正常菌叢の 1 つとして呼吸器粘膜面に常在する (8, 12, 63, 65)。しかし、何らかの要因 (ストレス, 疾病, 薬剤, 等) によって個体の免疫が低下した際、これらの真菌が重篤な呼吸器感染症を引き起こすため (63, 65)、長期飼育を実現するためには、呼吸器真菌感染症を適切に治療することが重要と考えられる。

本種の呼吸器真菌感染症の治療にはさまざまな抗真菌剤、中でもアゾール系抗真菌剤のフルコナゾール (FLCZ) やイトラコナゾール (ITCZ) が使用されてきた (65)。最近では、ヒトの真菌感染症の治療で使用されているボリコナゾール (VRCZ) が本種においても使用され始めている (63)。VRCZ もアゾール系抗真菌剤の 1 つであり、他と同様、真菌の細胞膜成分であるエルゴステロールの生合成を阻害することで抗真菌活性を発揮する (44)。また VRCZ は、他のアゾール系抗真菌剤に比べて広範な真菌種へのスペクトル、高いバイオアベイラビリティおよび肺を含めた各組織への優れた移行性を特徴として持つ (44)。一方 VRCZ は、ヒト

や本種を含むさまざまな動物種で薬物動態が異なるため、その使用においては副作用を避けるために血中濃度をモニタリングすることが推奨されている(18, 49)。VRCZの副作用としては食欲減退、視覚異常、肝機能異常、心機能異常、神経機能異常、血液学的異常がヒトや本種を含むさまざまな動物種において報告されている(6, 7, 18, 59, 61, 62, 80, 82)。さらに近年、海外では同じアゾール系抗真菌剤のポサコナゾールがVRCZと同様、本種において使用されている(9, 63)。これらアゾール系抗真菌剤以外にもポリエンマクロライド系抗真菌剤であるアムホテリシンB(AMPH-B)が本種の呼吸器真菌感染症の治療で静脈内投与された報告例がある。しかし、その副作用により腎不全を引き起こしている(58)。AMPH-Bは真菌の細胞膜成分であるエルゴステロールに結合し、細胞膜に機能障害を引き起こすことで抗真菌活性を発揮する(85)。また、広範な真菌種へのスペクトルや強い殺真菌活性を特徴として持つ。しかし、ヒトにおいても重篤な腎障害が生じることが知られている(46)ため、本種でのAMPH-Bの使用は十分な注意が必要と考えられる。近年、海外では呼吸器真菌感染症の治療のために鯨類専用の吸入装置(INH001, Taylor's Pharmacy, Orlando, FL, U.S.A.)が開発され(15)(図IV)、治療法(投与量, 投与頻度, 等)の詳細は確立されていないものの、AMPH-Bを用いた吸入療法が実施され、ある程度の効果が報告されている(63)。このように本種の呼吸器真菌感染症の治療のために、さまざまな抗真菌剤が使用されているが、使用する抗真菌剤の起因菌に対するスペクトル、使用する抗真菌剤に対する起因菌の感受性(耐性)の有無および使用する抗真菌剤の副作用リスクを考慮すると今後、本種においてアゾール系やポリエンマクロライド系以外の抗真菌剤の効果と安全性を詳細に検討する必要がある。ヒトでは今日、カンジダ属やアスペルギルス属の真菌に

よる感染症に対してキャンディン系抗真菌剤の1つであるミカファンギン（MCFG）が使用されている。MCFGは、アゾール系抗真菌剤耐性株を含むカンジダ属やアスペルギルス属の真菌に対して *in vitro* と *in vivo* の双方において優れた抗真菌活性を発揮することが報告されている（1）。国内外の臨床試験においては、用量依存的に発現する副作用はなく、高齢者や重度腎障害等を有する真菌症患者においても有効かつ安全であることが報告されている（46）。その他にも、MCFGはアゾール系抗真菌剤やポリエンマクロライド系抗真菌剤とは異なる作用機序、すなわち、ヒトにはない真菌に特異的な細胞壁の主要構成成分の1つである1, 3-β-D グルカンの生合成を阻害することで抗真菌活性を発揮する（46）。このような理由から、MCFGはヒトの真菌感染症に対して優れた臨床効果と高い安全性を持つと考えられている（1, 45, 46）。一方で、MCFGはヒトへの投与によりアスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）値の増加や白血球減少症等の副作用が生じることも報告されている（17）。本種を含む鯨類についてはMCFGの投与例やそれに伴う副作用の例はこれまで報告されていない。そのため、本種におけるMCFGの効果や安全性（副作用）について検討することは今後、本種の呼吸器真菌感染症を適切に治療する上で有益と考えられる。

ヒトや馬においては、妊娠、授乳中のストレスが原因で免疫が低下し、アスペルギルス感染症が起こることが知られている（2, 79）。本種においても、授乳中にカンジダ属やアスペルギルス属の真菌による呼吸器感染症が起こったことが報告されている（81）。そのため、繁殖により本種の飼育頭数を維持、確保するためには、妊娠、授乳中の母獣において起こり得る呼吸器真菌感染症を適切に治療することが課題である。しかし、胎仔、仔獣への薬剤の影響を考慮すると、妊娠、授乳中の母獣に抗真菌剤を

投与することはできる限り避けられるべきである。ヒトにおいては、妊娠、授乳中の母体へ抗真菌剤であるケトコナゾール、FLCZ、ITCZ、AMPH-B および 5-フルオロシトシンを投与した場合、胎盤、乳汁を介して胎児、子に移行するが、その移行による胎児、子への影響はない（安全である）ことが報告されている（23, 38, 42, 48, 52, 55-57, 60）。しかし、本種の呼吸器真菌感染症の治療で、今日よく使用されている VRCZ（63）については、実験動物（ラットとウサギ）で胎盤移行の報告（59）があるだけで、ヒトや本種を含むその他の動物種における胎盤、乳汁を介した胎児（胎仔）、子（仔獣）への移行性や妊娠、授乳中の母（獣）へ投与することの安全性については明らかとなっていない。そのため本種において、VRCZ が胎盤、乳汁移行するのかどうかや妊娠、授乳中の母獣へ VRCZ を投与することが安全であるのかどうかについて検討することは、今後、妊娠、授乳中の母獣の呼吸器真菌感染症を適切に治療する上で有益と考えられる。

ヒトでは、カンジダ属やアスペルギルス属の真菌がアゾール系抗真菌剤の長期投与や頻回使用により、その使用した薬剤や同系統の薬剤に対して耐性（交差耐性を含む）を獲得することが知られている（3, 4, 10, 20, 47, 53, 69, 72）。抗真菌剤を使用しなくても周囲の環境から薬剤耐性を有する真菌が飛散することも知られている（67, 71, 72）。今日、本種の呼吸器真菌感染症の治療でアゾール系抗真菌剤がよく使用されていること（63）を考慮すると、本種の飼育個体群（その飼育環境を含む）においてアゾール系抗真菌剤に耐性（交差耐性を含む）を示す真菌が蔓延している可能性が考えられる。しかし、国内の水族館等の飼育施設において、分離された真菌の種同定や薬剤感受性試験を慣用的に実施している施設は非常に少なく、そのほとんどが経験的治療に依存している（私信）。

そのため、本種の呼気から分離された真菌の種やアゾール系抗真菌剤に対する分離真菌の感受性（耐性）の有無を把握すること（種同定と薬剤感受性試験の実施）は、ヒトと同様（66, 69）、本種の呼吸器真菌感染症を適切に治療する上で有益と考えられる。

以上より本研究では、以下の課題について取り組んだ。第 1 章では本種へ MCFG を投与することの安全性（副作用）について評価した。*Aspergillus fumigatus* による呼吸器感染症が認められた本種に対して MCFG の静脈内投与による治療を試みるも、MCFG の投与期間中に体温低下や白血球減少症を伴う副作用が認められたことから本剤の投与を終了し、VRCZ の経口投与に切り替え治療を継続した。その治療期間中における体温低下と白血球減少症の発現時期、MCFG の投与時期、AST 値および血漿 VRCZ 濃度に注目することで MCFG の安全性（副作用）について評価した。第 2 章では本種における胎盤、乳汁を介した胎仔、仔獣への VRCZ の移行性や妊娠、授乳中の母獣へ VRCZ を投与することによる母獣と仔獣の安全性（副作用）について評価した。これらはカンジダ属やアスペルギルス属の真菌による呼吸器感染症が認められた妊娠、授乳中の母獣を VRCZ の経口投与で治療する際、母獣と仔獣の血液、臍帯血、乳汁中の VRCZ 濃度をそれぞれ測定し、また母獣と仔獣の行動、血液検査等による副作用のモニタリングを行うことで評価した。第 3 章では本種の呼気から分離されたカンジダ属やアスペルギルス属の真菌の種同定と薬剤感受性試験（アゾール系抗真菌剤（ITCZ, VRCZ）に対する分離真菌の感受性評価）を実施した。また、これらアゾール系抗真菌剤の投与（治療）の有無と耐性獲得の関係性や飼育下における隠蔽種、自然耐性株あるいは低感受性株の存在についても評価した。

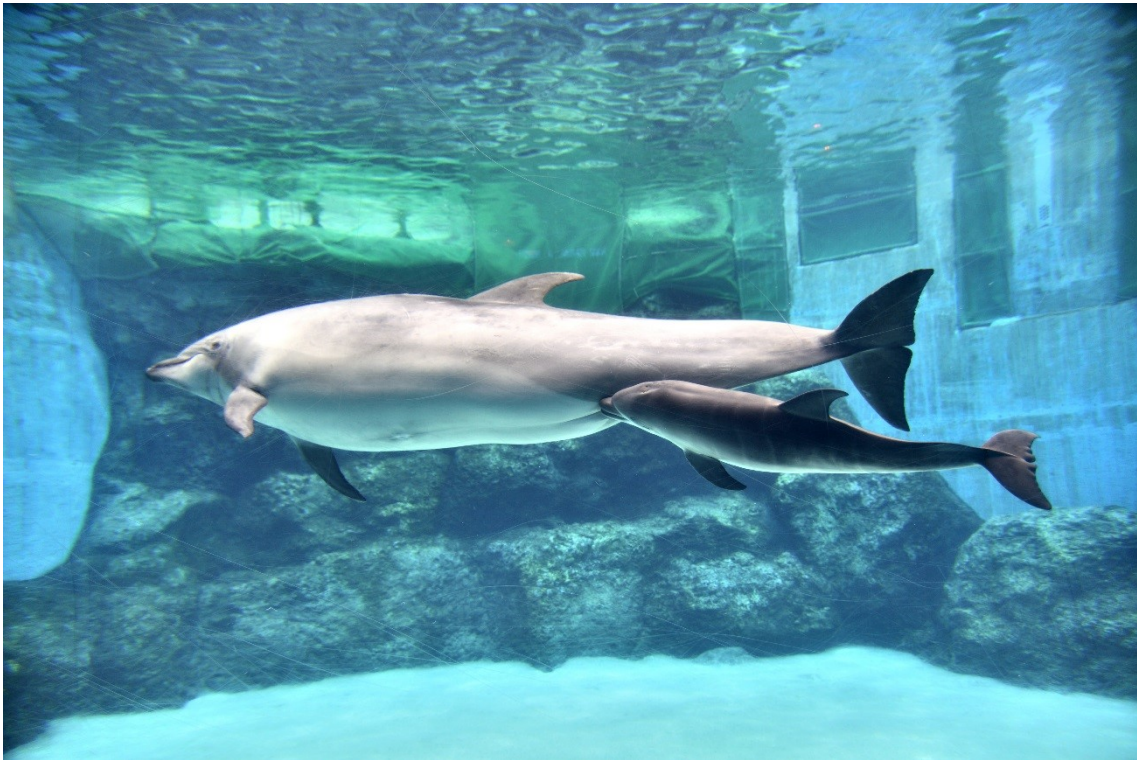
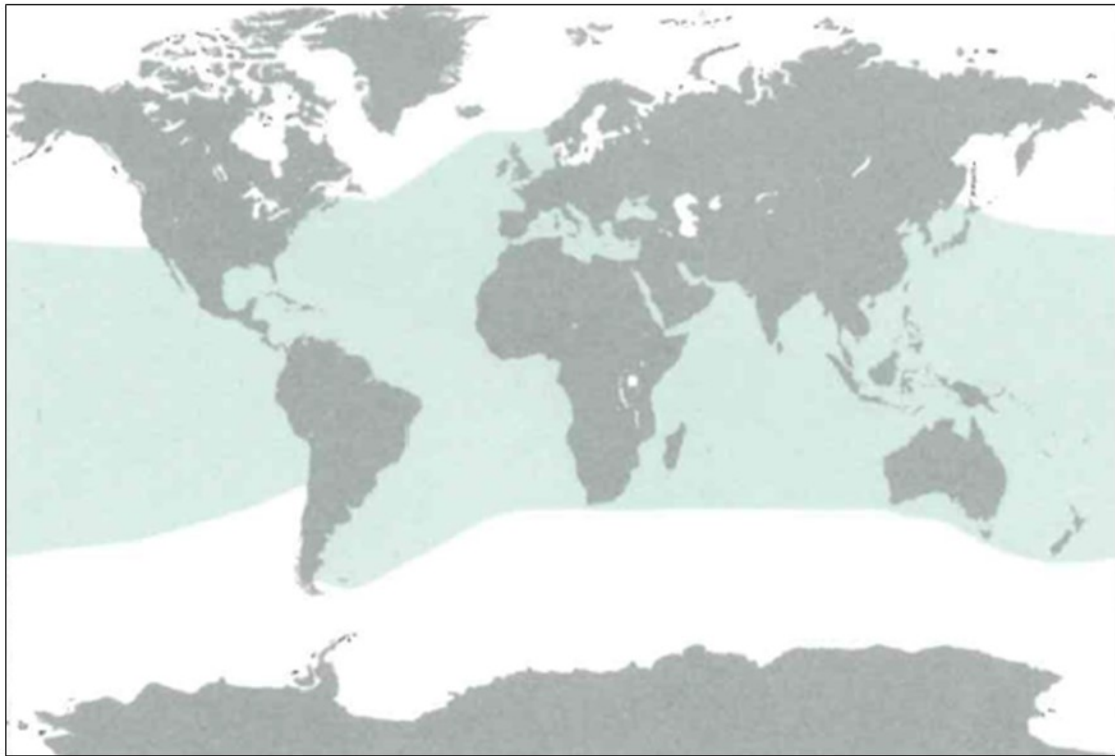



図 I . ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) の親子

2018年5月17日に、名古屋港水族館で初めて人工授精により誕生した仔獣（愛称ハル，オス，3日齢）と母獣（愛称ルル，推定21歳）の授乳風景。

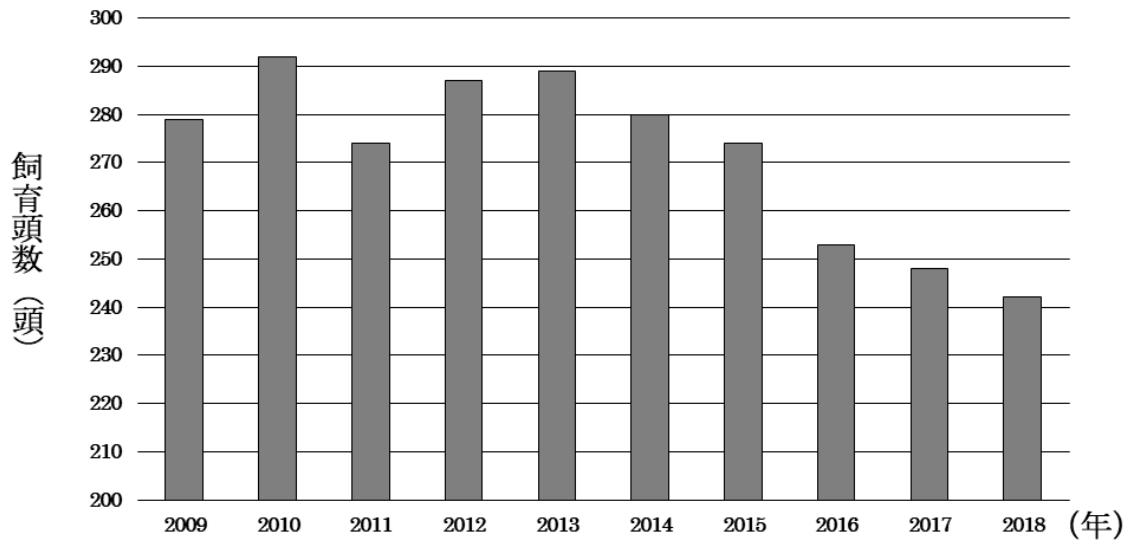




図Ⅱ. ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) の生息域

 は生息域を示す。

世界のクジラ・イルカ百科図鑑, 第1版., p. 182. 株式会社 河出書  
房新社, 東京. (5) より許可を得て転載。



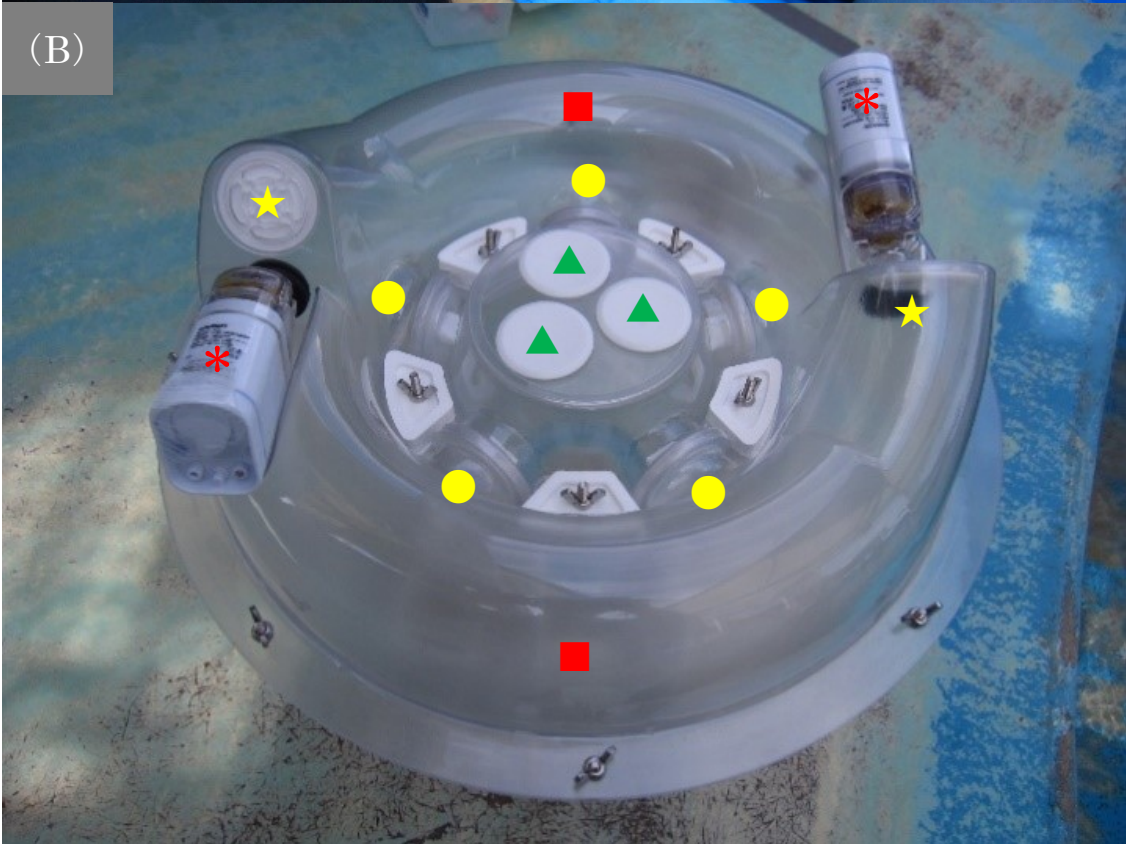
図Ⅲ. 国内におけるハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) の飼育頭数の推移

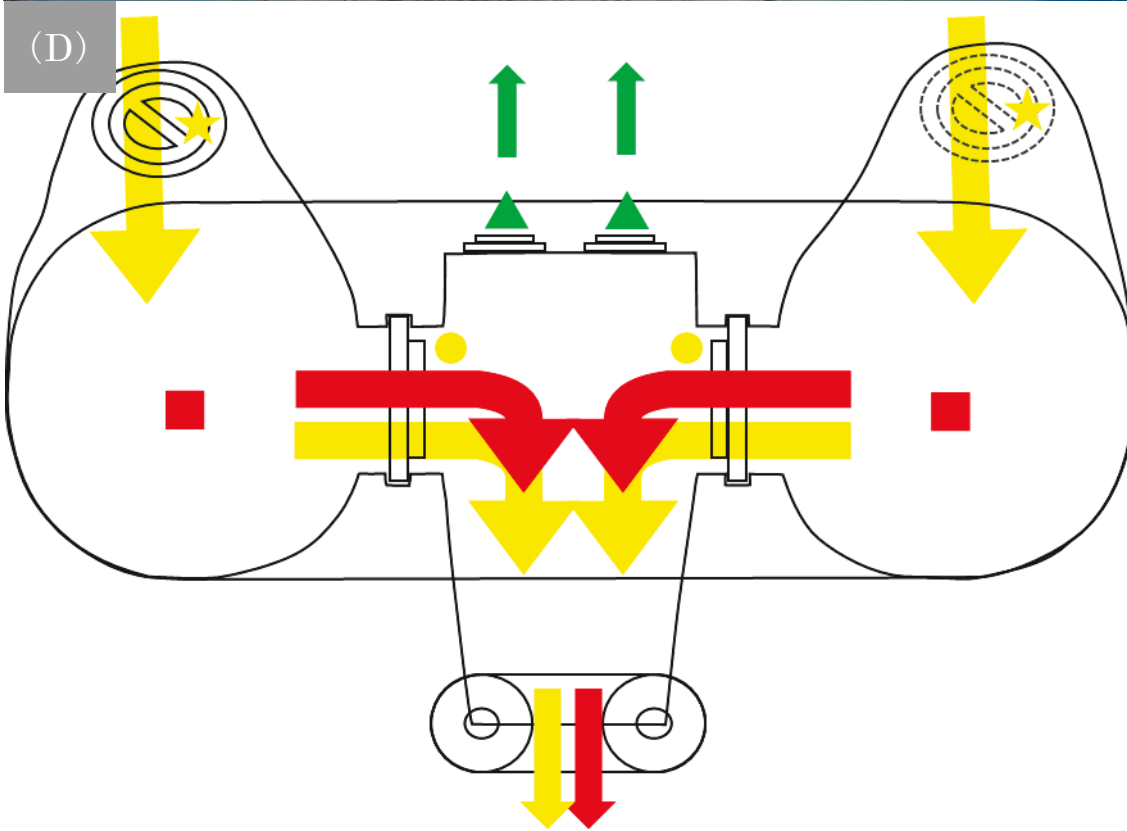
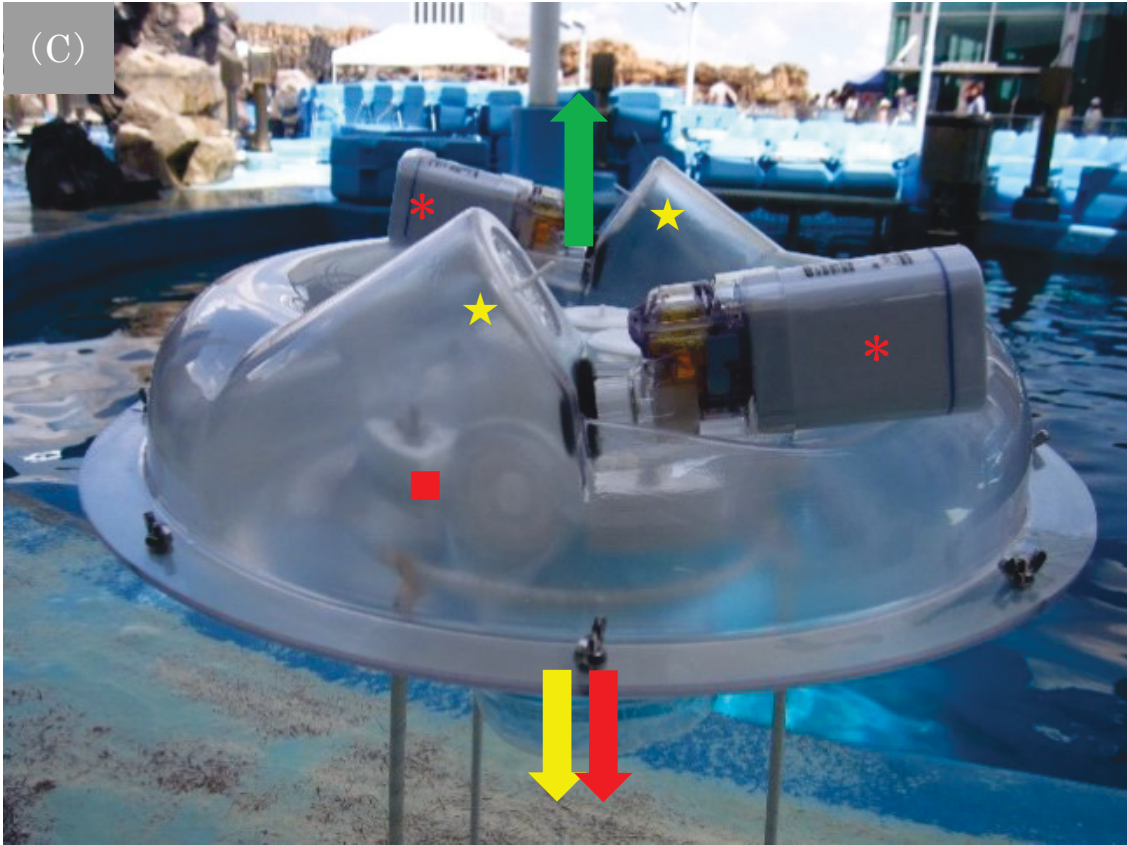
日本動物園水族館協会の許可を得て、ハンドウイルカ国内血統登録(未発表データ)より抜粋。

(A)



(B)





図IV. 鯨類専用の吸入装置 (INH001, Taylor's Pharmacy, Orlando,

FL, U.S.A.)

(A)本装置を使用した吸入療法の様子, (B)本装置を上から見た図, (C)本装置を横から見た図, (D)本装置を横から見た模式図 をそれぞれ示す。本装置の使用方法(メカニズム)と利点は以下の通りである。本装置はハンドウイルカの噴気孔上部に配置して使用する(A)。配置後, 2台のネブライザー(B, C:赤色\*)を使用して薬剤を霧化させる。霧化した薬剤(B, C, D:赤色■)は動物が呼吸するまでの間, 一時的に本装置内に貯留(充満)する。動物の呼吸のタイミングで, 吐気は中央にある3つの逆止弁(B, D:緑色▲)を介して上方へ抜ける(C, D:緑色矢印)。霧化した薬剤(B, C, D:赤色■)は, 吸気とともに中央にある5つの逆止弁(B, D:黄色●)を介して気道内へ吸い込まれる(C, D:赤色矢印)。この時, ネブライザー前上方にある2つの逆止弁(B, C, D:黄色★)を介して空気もあわせて気道内へ吸い込まれる(C, D:黄色矢印)。本装置は軽量コンパクト, 持ち運び可能, 電源不要(ネブライザーは電池式)であることから, 獣医師や飼育係がプールサイドで簡便に使用することができる。また, 霧化した薬剤を, 動物の呼吸のタイミングに合わせて効率よく気道内に吸い込ませることができる。

表 I . 国内におけるハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) の飼育施設数と飼育頭数 (2018 年)

地域	飼育施設数	飼育頭数	内訳	
			オス	メス
北海道	2	8	3	5
東北	2	9	2	7
関東	10	65	19	46
中部	7	53	13	40
関西	5	51	19	32
中国・四国	2	12	4	8
九州・沖縄	5	44	17	27
計	33	242	77	165

日本動物園水族館協会 (JAZA) の許可を得て, ハンドウイルカ国内血統登録 (未発表データ) より抜粋。JAZA 加盟施設と非加盟施設を含む。



## 第 1 章

### ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) における ミカファンギンの静脈内投与による安全性の評価

本章は公益社団法人日本獣医学会 (The Japanese Society of Veterinary Science) の許可を得て次の論文から一部転載しています。

タイトル : Leukopenia induced by micafungin in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): a case report.

著者 : Yoshito Ohno, Yuichiro Akune, Hiroshi Nitto, Yasuo Inoshima

雑誌 : The Journal of Veterinary Medical Science

出版年・巻号・頁 : 2019 年 81 巻 3 号 449-453 頁

DOI : <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0391>

## 序 論

ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) において呼吸器真菌感染症は罹患率の高い疾患であり，その主な起因菌の1つとしてアスペルギルス属の真菌が知られている (14, 63, 64, 83)。本種のアスペルギルス感染症の治療にはさまざまな抗真菌剤，中でもアゾール系抗真菌剤 (イトラコナゾール (ITCZ)，ボリコナゾール (VRCZ)，ポサコナゾール (PSCZ)) がよく使用されている (9, 63)。しかし，本種においてアゾール系抗真菌剤 (ITCZ, VRCZ, PSCZ) に耐性を示す *Aspergillus fumigatus* が呼吸器から検出された報告例 (9) やアゾール系抗真菌剤 (ITCZ, VRCZ) の使用による副作用の報告例 (18, 63, 65, 80) がある。そのため，使用する抗真菌剤に対する起因菌の感受性 (耐性) の有無や使用する抗真菌剤の副作用リスク等を考慮すると，本種においてアゾール系以外の抗真菌剤の効果と安全性を詳細に検討する必要がある。キャンディン系抗真菌剤の1つであるミカファンギン (MCFG) は緒言で述べた理由から，ヒトのアスペルギルスを含む真菌感染症に対して優れた臨床効果と高い安全性を持つと考えられている (1, 45, 46)。しかし，本種を含む鯨類についてはMCFGの投与例やそれに伴う副作用の例はこれまで報告されていない。

そこで本章では，名古屋港水族館で飼育しているハンドウイルカで *A. fumigatus* による呼吸器感染症が認められた1頭に対してMCFGの静脈内投与による治療を試みた。しかし，MCFGの投与期間中に体温低下や白血球減少症を伴う副作用が認められたため本剤の投与を終了し，VRCZの経口投与に切り替え治療を実施した。その治療期間中における体温低下と白血球減少症の発現時期，MCFGの投与時期，アスパラギン酸トラ



ンスアミナーゼ（AST）値および血漿 VRCZ 濃度に注目することで本種  
へ MCFG を投与することの安全性（副作用）について評価した。

## 材料および方法

### 動物

対象個体は、2004年に和歌山県太地町で追い込み漁により捕獲されて以降、名古屋港水族館で飼育しているハンドウイルカで、愛称はセナ、性別はメス、2014年の本研究開始時（呼吸器真菌感染症の発症時）の体長と体重はそれぞれ270 cmと240 kgである。また、本研究開始時の年齢は、野生捕獲時の体長（258 cm）から推定すると13-16歳である。

### 体温測定

Katsumata (41) の報告に基づき、対象個体の肛門に体温計（テルモファイナーCTM-303, テルモ（株），東京）のプローブ（ME-PDK041, テルモ（株））を30 cm挿入して直腸温の測定を実施した（図1-1（A））。

### 血液検査

採血は21ゲージ翼状針（テルモ（株））と10 mLシリンジ（テルモ（株））を用いて尾鰭の血管から実施した（図1-1（B））。採取した血液は随時、0.5 mL EDTA-2K チューブ（富士フィルム（株），東京）、1.5 mL ヘパリンチューブ（富士フィルム（株））、3.2%クエン酸ナトリウムチューブ（テルモ（株））および血液培養ボトル（BACT/ALERT FA PLUS, BACT/ALERT FN PLUS, ビオメリュー・ジャパン（株），東京）に分注し、それぞれを全血球計算と血液塗抹、生化学検査と血漿 VRCZ 濃度の測定、フィブリノーゲン（FIB）の測定および血液培養検査に使用した。血液塗抹は白血球分画をカウントするためにメイ・グリュンワルド・ギムザ染色液で染色した。血漿 VRCZ 濃度の測定と血液培養検査以外はすべ

て名古屋港水族館において実施した。

### 呼気の真菌培養検査と検出菌種の同定

呼気の実験室での真菌培養検査は第 1, 5, 9, 15, 23, 37, 45 および 53 病日に実施した。呼気採取は Frère ら (19) の報告に基づき、直接サブローデキストロース寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン (株), 東京) に呼気を 5 回吹き付けた (図 1-1 (C))。その後、名古屋港水族館において、37°C 下の培養器 (IC-450A, アズワン (株), 大阪) 内で 48 時間培養した。培養後、培地に生えた真菌コロニーの種同定は、Hussain ら (31) の報告に基づいて、その色調や性状から簡易的に実施した。

### 血液培養検査、呼気の細菌培養検査および薬剤感受性試験

対象個体の病態評価 (敗血症の有無等) のために血液培養検査を実施した。血液培養検査は、検査会社の (株) 保健科学研究所 (横浜) において BACT/ALERT 3D (ビオメリュー・ジャパン (株)) を使用し、第 9, 15, 23, 26, 35 および 45 病日に実施した。呼気の細菌培養検査と薬剤感受性試験も上記検査会社に依頼し、第 1, 5, 9, 15, 23, 37, 45 および 53 病日に実施した。Frère ら (19) の報告に基づき、滅菌シャーレに呼気を 5 回吹き付けた後 (図 1-1 (C))、その呼気をシードスワブ γ 1 号 '栄研' (栄研化学 (株), 東京) でぬぐいとり、上記検査会社に提出した。

### 超音波検査と気管支鏡検査

第 9 病日には、肺の表面 (浅部) を評価 (胸水貯留, 膿瘍形成, 等) するために超音波画像診断装置 (SSD-900, 3.5 MHz プローブ, アロカ (株), 東京) を使用して左右の肺の超音波検査を実施した。第 15 病日には、気

管支内を評価（気管支粘膜面の炎症，膿貯留，等）するために内視鏡装置（EN-450T5/W，フジノン東芝 ES システム（株），東京）を使用して気管支鏡検査を実施した。気管支鏡検査は対象個体をプールから陸場に上げて実施するため，作業 15 分前にミダゾラム（ドルミカム注射薬 10mg，アステラス製薬（株），東京）を 0.1 mg/kg で筋肉内投与し，鎮静下において実施した。内視鏡は局所麻酔剤のキシロカイン（キシロカイン注射薬「2%」，アストラゼネカ（株），大阪）を随時，気管内に噴霧しながら挿入した（64，78）（図 1-2（A，B））。

### 抗真菌剤の投与

第 2 病日から第 5 病日（1 回目），第 27 病日から第 29 病日（2 回目），第 41 病日（3 回目）および第 49 病日（4 回目）に VRCZ（ブイフェンド錠 200mg，ファイザー（株），東京）を 2.5 mg/kg，1 日 2 回で経口投与した。1 回目と 2 回目の投与はそれぞれ 4 日間と 3 日間，連続で投与した。ヒトにおいては，VRCZ の有効血中濃度を確保するために負荷高用量を 1 日で投与するが（59），本研究では副作用を避け，かつ有効血中濃度を確保するために，負荷高用量（1 日量）を数日間に分割して連続投与し，これをローディングドーズとした。その後，3 回目の投与は第 30 病日（2 回目の連続投与後 24 時間），4 回目の投与は第 41 病日（3 回目の投与直前）と第 42 病日（3 回目の投与後 24 時間）の血漿 VRCZ 濃度をそれぞれモニタリングしながら 8-12 日間隔で投与した（メンテナンスドーズ）（図 1-3，1-4）。本種では VRCZ の半減期が長く，ヒトや他の動物種と薬物動態が異なることが報告されている（18）。そのため，メンテナンスドーズにおいても VRCZ の副作用を避けるためにこのような間欠投与方法を使用した。本投与方法は，一般的に本種において使用されている

(63)。第 11 病日から第 20 病日に MCFG (ファンガード点滴用 75mg, アステラス製薬 (株), 東京) を 3 mg/kg, 1 日 1 回で静脈内投与した (図 1-3, 1-4)。第 7 病日から第 37 病日に VRCZ や MCFG の投与と並行して, 鯨類専用の吸入装置 (INH001, Taylor's Pharmacy, Orlando, FL, U.S.A.) (15) (図IV) を使用して, アムホテリシン B (AMPH-B) (ファンギゾン注射用 50mg, ブリストル・マイヤーズ スクイブ (株), 東京) を 0.2-0.4 mg/kg, 1 日 1 回で吸入投与した (図IV, 1-3, 1-4)。

### 血漿 VRCZ 濃度の測定

高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC SYSTEM, 10Avp series, (株) 島津製作所, 京都) により, 第 6, 13, 21, 30, 37, 41, 42, 49, 50 および 53 病日の血漿 VRCZ 濃度を測定した。血漿 VRCZ 濃度の測定は, 検査会社の (株) エスアールエル (東京) に依頼した。

### VRCZ 投与による副作用の評価

VRCZ の投与期間中, 主な副作用である食欲減退, 視覚異常および肝障害 (AST 値の増加) (18, 80) について評価した。食欲減退については, 飼育係が給餌に対する対象個体の意欲で主観的に評価した。視覚異常と肝障害 (AST 値の増加) については Ferrier ら (18) の報告に基づいて評価した。

### 抗生剤の投与

呼気の細菌培養検査と薬剤感受性試験の結果に基づき, 第 5 病日から第 52 病日に抗生剤を投与した (図 1-3, 1-4, 表 1-1)。

## 顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）の投与

第 23 病日から第 25 病日までの 3 日間（1 回目）と第 31 病日から第 34 病日までの 4 日間（2 回目）に G-CSF（フィルグラスチム BS 注「モチダ」，持田製薬（株），東京）を 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，1 日 1 回で筋肉内投与した（図 1-3，1-4）。

## 結 果

### 診断と転帰

対象個体において、第 1 病日に活発性の低下、噴気孔からの痰の排出、甘い呼気臭（真菌感染を示唆する臭い（私信））が認められた。発熱はなく、体温は対象個体の平熱（36.7℃）であった。血液検査を実施したところ総白血球数（WBC：8,700/ $\mu$ l）、分葉核好中球数（SEG：6,864/ $\mu$ l）および FIB（278 mg/dl）の軽度の上昇といった非特異的な炎症反応が認められた（図 1-3）。また、第 1 病日に実施した呼気の真菌培養検査において *A. fumigatus* が検出された（図 1-5）。第 2 病日以降、発熱や臨床症状と血液性状の悪化が認められたことから（図 1-3）、*A. fumigatus* による呼吸器感染症と診断した。最終的に対象個体は、VRCZ の経口投与（全身投与）と AMPH-B の吸入療法（局所投与）を併用することにより *A. fumigatus* 感染症から回復した。これは体温、臨床症状、血液検査、呼気の真菌培養検査に基づいて判断した（図 1-3）。

### 体温

第 1 病日は対象個体の平熱（36.7℃）であったが、その後、発熱し、第 6 病日に最高値（38.8℃）を示した。しかし、第 13 病日（MCFG の投与開始後 2 日目）に体温低下（36.0℃）が認められ始め、最終的に第 20 病日（MCFG の投与開始後 9 日目）に最低値（34.2℃）を示した。第 21 病日（MCFG の投与終了後）には、さらなる体温低下（35.7℃）は認められなかった。第 24 病日（1 回目の G-CSF の投与期間中）に体温（38.2℃）が一時的に上昇するも、その後は徐々に低下し、最終的に第 53 病日に対象個体の平熱（36.7℃）まで低下した（図 1-3）。

## 血液検査

第 1 病日に WBC と SEG の軽度の増加 (8,700/ $\mu$ l と 6,864/ $\mu$ l) が認められ、第 16 病日までにそれぞれがさらに増加 (18,600/ $\mu$ l と 13,894/ $\mu$ l) した。しかし、第 22 病日 (MCFG の投与開始後 11 日目) に減少 (2,100/ $\mu$ l と 380/ $\mu$ l) が認められ始め、最終的に第 24 病日と第 25 病日 (MCFG の投与開始後 13 日目と 14 日目) にそれぞれ最低値 (600/ $\mu$ l と 67/ $\mu$ l) を示した。第 29 病日 (1 回目の G-CSF の投与後 4 日目) に WBC と SEG がそれぞれ対象個体の正常範囲 (7,300/ $\mu$ l と 4,446/ $\mu$ l) まで増加した。しかし、第 31 病日と第 33 病日に再度それぞれ減少 (3,600/ $\mu$ l と 773/ $\mu$ l) した。第 36 病日 (2 回目の G-CSF の投与後 2 日目) に WBC と SEG がそれぞれ急増 (30,400/ $\mu$ l と 23,074/ $\mu$ l) するも、その後は徐々に減少し、最終的に第 50 病日に対象個体の正常範囲 (6,700/ $\mu$ l と 4,844/ $\mu$ l) まで減少した (図 1-3)。AST 値は、第 13 病日 (MCFG の投与開始後 2 日目) から明らかな増加が認められ始め、最終的に第 21 病日 (MCFG の投与開始後 10 日目) に最高値 (412 IU/l) を示した。第 22 病日 (MCFG の投与終了後) 以降、さらなる AST 値の増加は認められなかった (図 1-4)。

## 呼気真菌培養検査と検出菌種の同定

第 1, 5, 9, 15, 23 および 37 病日に採取した呼気から真菌が検出され、Hussain ら (31) の報告に基づき、真菌コロニーの色調や性状 (青緑色で粉末状) から簡易的に *A. fumigatus* と同定した。第 45 病日と第 53 病日に採取した呼気から真菌は検出されなかった (図 1-3, 1-5)。

## 血液培養検査、呼気の細菌培養検査および薬剤感受性試験



血液培養検査はすべて陰性であった（図 1-3）。呼気から合計 7 種の細菌（*Vibrio fluvialis*, *Staphylococcus intermedius*,  $\alpha$ -*Streptococcus*, *Alcaligenes faecalis*, *Aeromonas caviae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium* sp.）が検出された（表 1-1）。各検出細菌に対する薬剤感受性試験の結果は表 1-1 に示した。

### 超音波検査と気管支鏡検査

超音波検査において、左右ともに肺の表面（浅部）に異常（胸水貯留，膿瘍形成，等）は認められなかった（図 1-6）。気管支鏡検査において、左右の気管支粘膜面に炎症が認められた（図 1-2（C））。

### 血漿 VRCZ 濃度と VRCZ 投与による副作用

第 6, 13, 21, 30, 37, 41, 42, 49, 50 および 53 病日の血漿 VRCZ 濃度はそれぞれ 8.55, 5.09, 2.30, 12.94, 5.68, 3.36, 6.99, 2.79, 6.16 および 4.30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった（図 1-4）。VRCZ の投与期間中，対象個体に副作用は認められなかった。

## 考 察

本研究では、治療期間中の対象個体に体温低下と白血球減少症が認められた（図 1-3, 1-4）。しかし、直接の原因や発生メカニズムについては不明であった。そこで著者は、体温低下と白血球減少症の発現時期、MCFG の投与時期、AST 値および血漿 VRCZ 濃度に注目し、以下の考察を行った。

体温低下は、第 13 病日（MCFG の投与開始後 2 日目）から認められ、MCFG の投与中は継続し、その投与終了後には認められなかった（図 1-3, 1-4）。そのため、MCFG の投与による副作用である可能性が示唆された。また、同じく第 13 病日（MCFG の投与開始後 2 日目）から対象個体に AST 値の増加が認められた（図 1-4）。ヒトにおいて、MCFG の主な副作用の 1 つとして AST 値の増加が報告(17)されている。体温低下が、この AST 値の増加と同時期に認められたことから、体温低下の原因として MCFG の投与による副作用の可能性が高いと考えられた。白血球減少症については、MCFG の投与後である第 22 病日から認められた（図 1-3, 1-4）。そのため、MCFG の投与による副作用の可能性があると考えられた。しかし、その治療のために G-CSF を投与したため正確な考察はできなかった。また、対象個体には VRCZ の投与も実施していることから、その副作用である可能性についても考えなければならない。血漿 VRCZ 濃度については、1 回目の VRCZ の投与後、一時的（第 6 病日から第 13 病日、 $5.09\text{--}8.55\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ）に本種で報告(18)されている安全濃度域（ $2\text{--}4\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ）および AST 値の増加が生じる濃度（ $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ）を超えていた。しかし、第 21 病日（ $2.30\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ）には安全濃度域および AST 値の増加を生じない濃度まで低下した（図 1-4）。そのため第 13 病日以降、

対象個体に認められた AST 値の増加は VRCZ の投与によるものではなく、MCFG の投与によるものと推察される。これらのことから、体温低下と白血球減少症が VRCZ の副作用である可能性は低いと考えられた。

以上より、対象個体に認められた体温低下と白血球減少症は MCFG の投与による副作用であると著者は判断した。そのため今後、本種に MCFG を投与する必要がある場合、著者は定期的に体温や白血球数をモニタリングしながら投与することを推奨する。MCFG の投与により AST 値の増加も認められたことから、AST 値をあわせてモニタリングすることを推奨する。また、本研究では副作用が生じたため MCFG の投与を中断したことに加え、投与例数が 1 例であったことから、本種の呼吸器真菌感染症に対する MCFG の治療効果や安全性を十分に評価することができなかった。しかし、国内の水族館等の飼育施設で飼育されている本種において、カンジダ感染症の治療のために今回と同量の MCFG が投与され、効果的かつ今回のような副作用が生じることなく安全に使用されている例を著者は知っている（私信）。そのため今後、本種において MCFG がより効果的かつ安全に使用できるよう、症例数を蓄積することや、本種における MCFG の薬物動態を把握することが必要と考えられた。

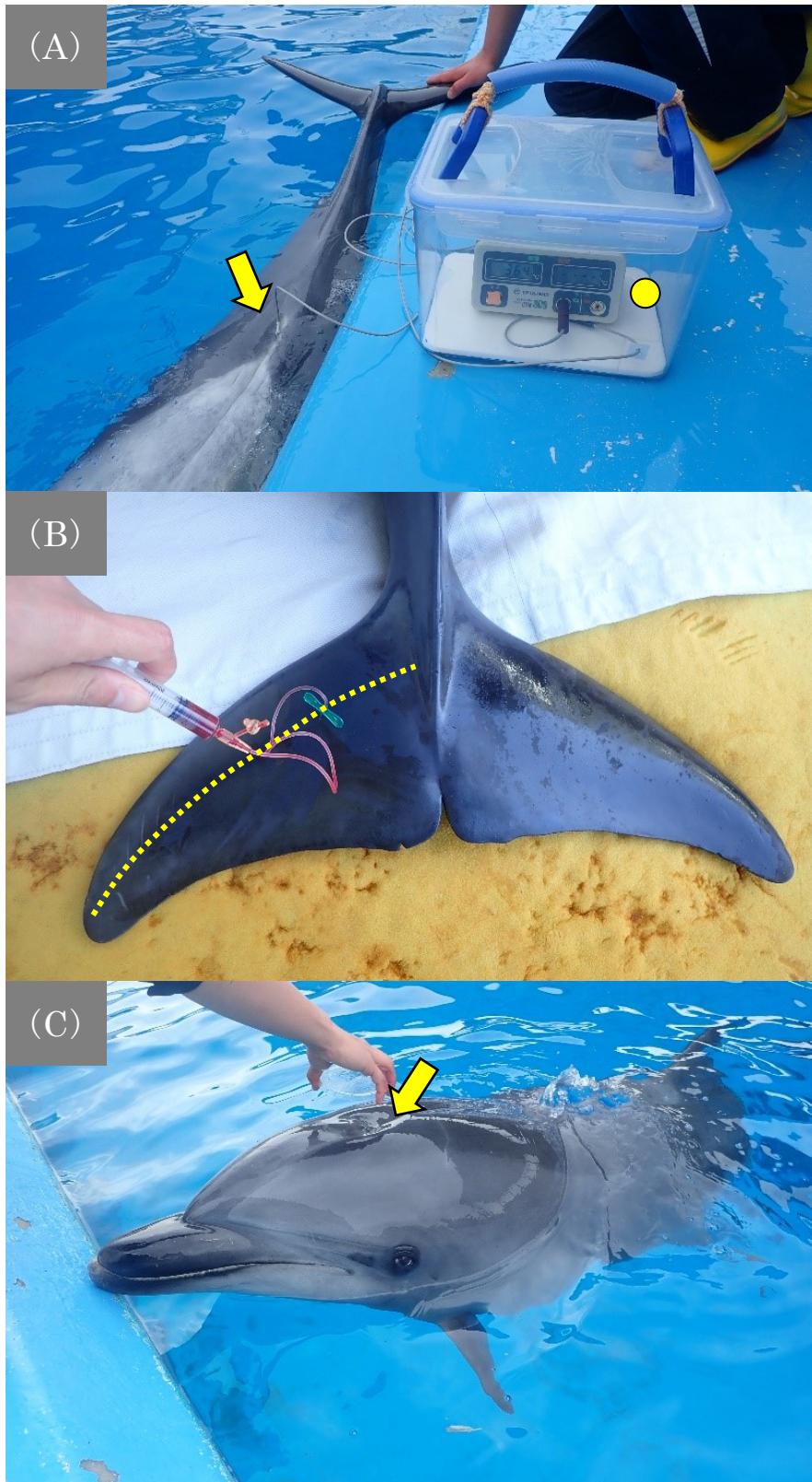


図 1-1. 各種検査

(A) 体温測定：肛門（黄色矢印）に体温計のプローブを挿入（30cm）

して直腸温を測定している様子。容器内の装置（黄色丸印）は体温計。

(B) 採血：尾鰭の血管（黄色点線）から採血をしている様子。

(C) 呼気採取：噴気孔（黄色矢印）に培地（あるいは滅菌シャーレ）をかざして呼気を採取している様子。



図 1-2. 気管支鏡検査

- (A) 気管支内を評価（気管支粘膜面の炎症，膿貯留，等）するために，イルカを陸場に上げて気管支鏡検査を実施している様子。
- (B) 噴気孔から気管支内に内視鏡を挿入している様子。
- (C) 気管支粘膜面の炎症（黄色矢印）。

ただし，対象個体の当時の記録がないため写真 A-C は同様の疾患を呈した他個体のものを使用。



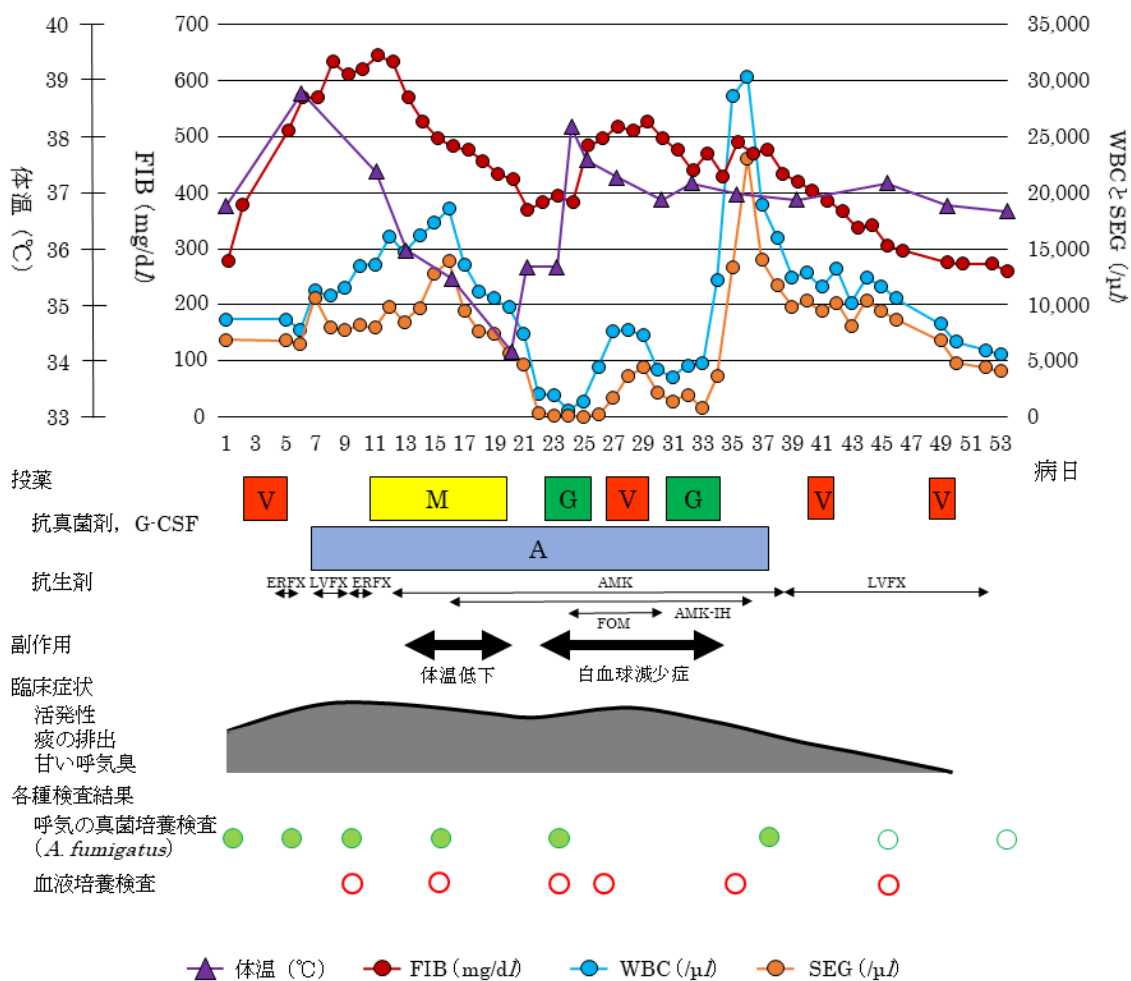


図 1-3. 治療期間中における臨床症状，各種検査（体温（°C），血液検査（総白血球数（WBC）（/μL），分葉核好中球数（SEG）（/μL），フィブリノーゲン（FIB）（mg/dL），呼気真菌培養検査，血液培養検査）の推移と副作用

赤色の四角（V）はポリコナゾール（5 mg/kg/day，経口投与），黄色の四角（M）はミカファンギン（MCFG）（3 mg/kg/day，静脈内投与），青色の四角（A）はアムホテリシン B（0.2-0.4 mg/kg/day，吸入投与），緑色の四角（G）は顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）（2.5 μg/kg/day，筋肉内投与）による治療期間を示す。細い黒色矢印は抗生剤（ERFX：エンロフロキサシン；LVFX：レボフロキサシン；AMK：アミカシン；AMK-IH：アミカシンの吸入；FOM：ホスホマイシン）による治療期間を示す。

太い黒色矢印は副作用（体温低下，白血球減少症）が認められた期間を示す。灰色の波形は臨床症状（活発性，痰の排出，甘い呼気臭（真菌感染を示唆する臭い（私信））の推移を示す。この推移は主観的な評価（獣医師や飼育係の記憶，診療カルテや飼育日誌の記録）に基づく。緑色の丸印は呼気の真菌培養検査の実施日を示し，緑色で塗られた丸印は真菌（*A. fumigatus*）陽性，緑色で塗られていない丸印は真菌陰性を示す。赤色の丸印は血液培養検査の実施日と陰性結果を示す。体温低下が第 13 病日（MCFG の投与開始後 2 日目）から認められ，第 21 病日（MCFG の投与終了後）には認められなくなった。白血球減少症が第 22 病日（MCFG の投与後）から認められた。これらは MCFG の投与によるものと考えられた。



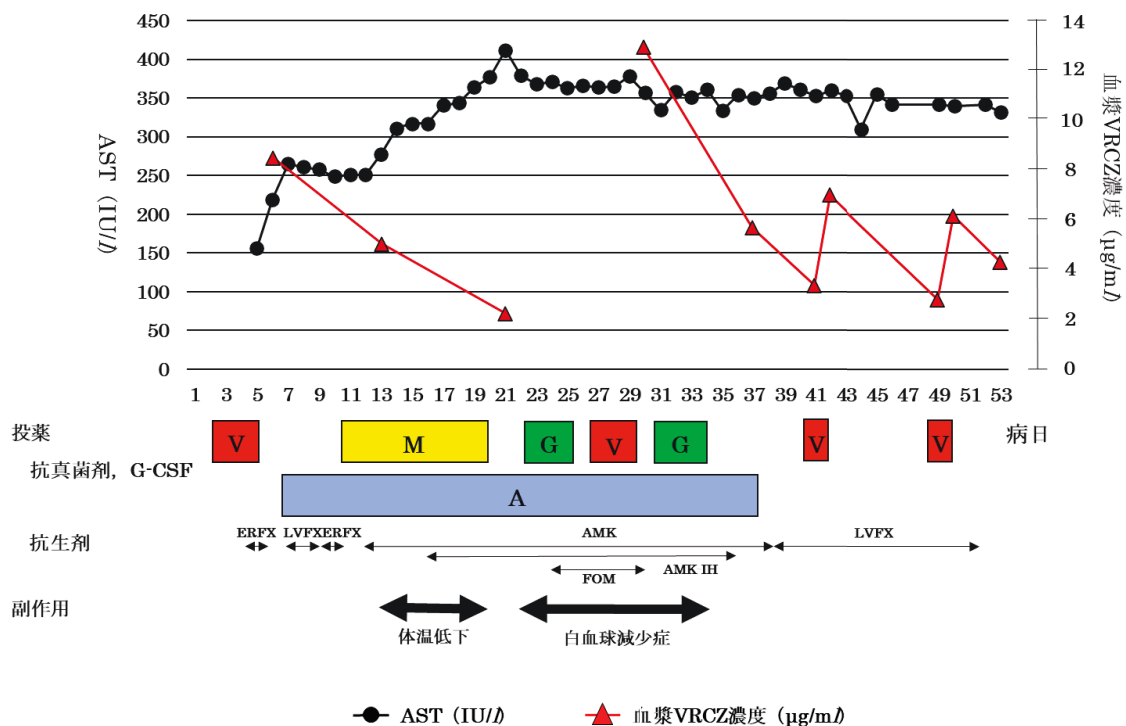


図 1-4. 治療期間中におけるアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) (IU/l) と血漿ポリコナゾール (VRCZ) 濃度 (µg/ml) の推移と副作用  
 赤色の四角 (V) は VRCZ (5 mg/kg/day, 経口投与), 黄色の四角 (M) はミカファンギン (MCFG) (3 mg/kg/day, 静脈内投与), 青色の四角 (A) はアムホテリシン B (0.2-0.4 mg/kg/day, 吸入投与), 緑色の四角 (G) は顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) (2.5 µg/kg/day, 筋肉内投与) による治療期間を示す。細い黒色矢印は抗生剤 (ERFX: エンロフロキサシン; LVFX: レボフロキサシン; AMK: アミカシン; AMK-IH: アミカシンの吸入; FOM: ホスホマイシン) による治療期間を示す。太い黒色矢印は副作用 (体温低下, 白血球減少症) が認められた期間を示す。AST 値の増加が第 13 病日 (MCFG の投与開始後 2 日目) から認められた。同時期から体温低下も認められた。白血球減少症が第 22 病日 (MCFG の投与後) から認められた。これらの時期における血漿 VRCZ 濃度が本種の安全濃度域 (2-4 µg/ml) および AST 値の増加を生じない濃度 (< 5 µg/ml)

であったことから,AST 値の増加,体温低下および白血球減少症は MCFG  
の投与によるものと考えられた。

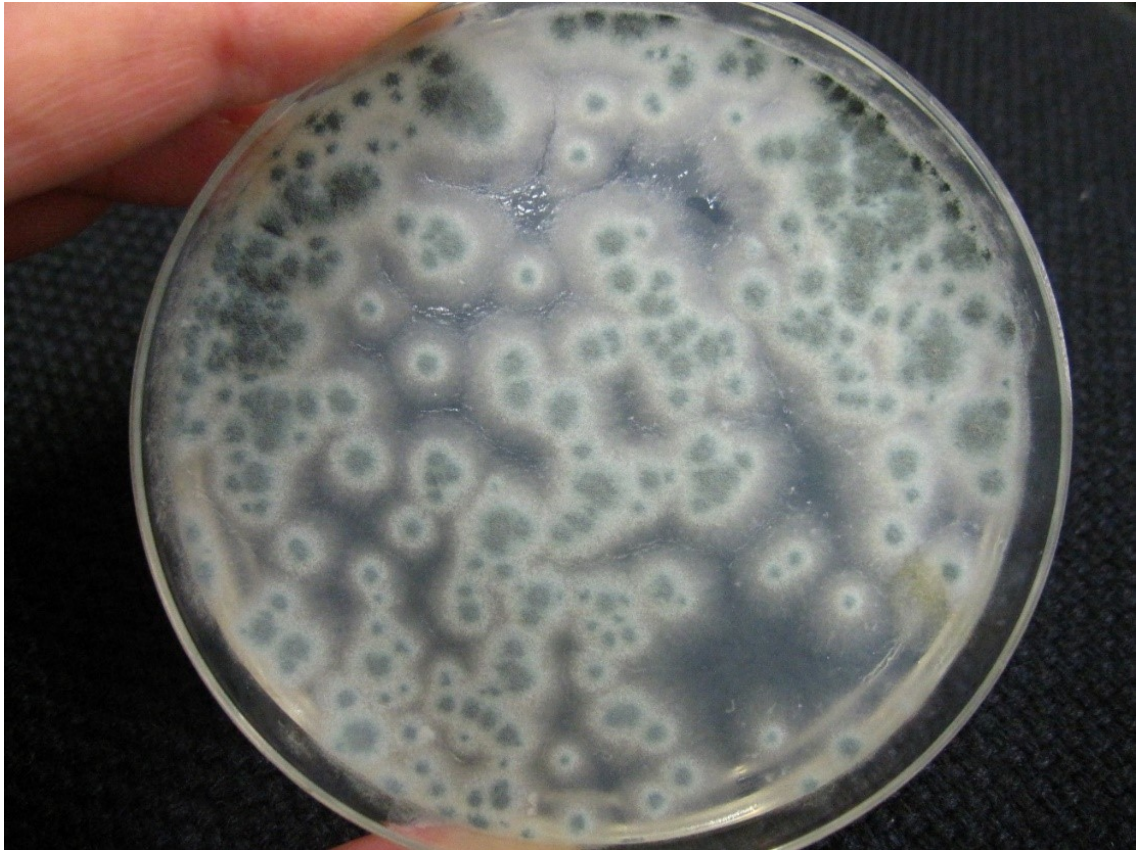


図 1-5. 呼気から青緑色で粉末状のコロニーを特徴とする *Aspergillus fumigatus* が検出された (第 1 病日)

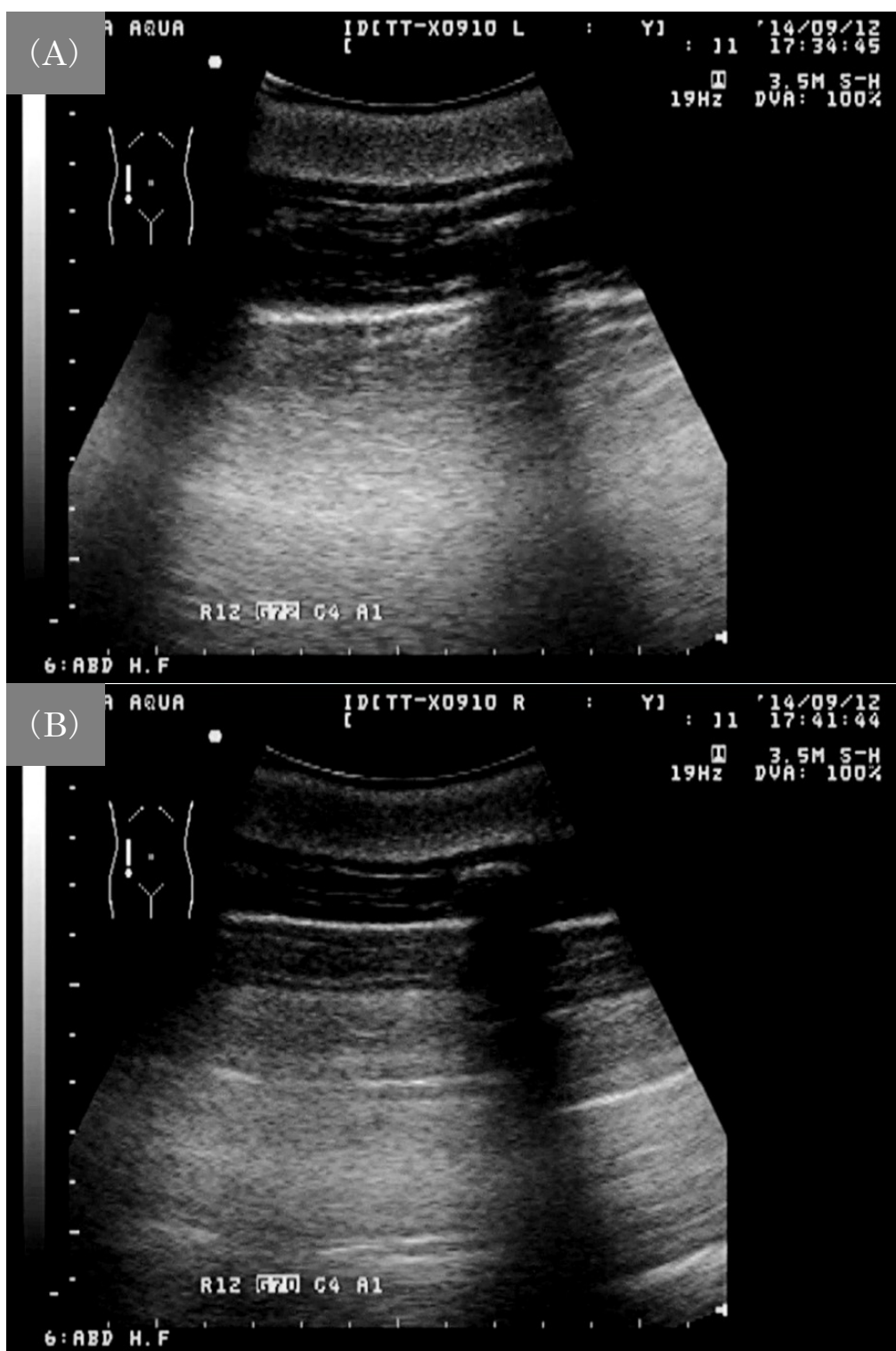


図 1-6. 超音波検査

(A) 左肺と (B) 右肺の表面（浅部）の超音波画像で、左右ともに異常（胸水貯留，膿瘍形成，等）は認められなかった。

表 1-1. 呼気の細菌培養検査と薬剤感受性試験の結果および治療に用いた抗生剤

検出細菌 <sup>a)</sup>	薬剤感受性試験 <sup>b)</sup>	抗生剤 <sup>c)</sup>	投与力価 (mg/kg)	投与頻度と 投与経路 <sup>d)</sup>
<i>V. fluvialis</i> (1)	AMPC, PIPC, CEX, CTRX, OFLX, CPFEX, LVFX, MINO, AMK, FOM	—	—	—
<i>S. intermedius</i> (1)	AMPC, PIPC, CEX, CTRX, OFLX, CPFEX, LVFX, MINO, AMK, FOM	—	—	—
<i>V. fluvialis</i> (5)	AMPC, PIPC, CEX, CTRX, OFLX, CPFEX, LVFX, MINO, AMK, FOM	ERFX (5, 10)	5.0	SID, IM
<i>α-Streptococcus</i> (5)	FOM	—	—	—
<i>A. faecalis</i> (9)	PIPC, CTRX, MINO, AMK	LVFX (7–9)	7.0	SID, PO
<i>α-Streptococcus</i> (9)	FOM	—	—	—
<i>A. caviae</i> (15, 23)	PIPC, CTRX, OFLX, CPFEX, LVFX, MINO, AMK, FOM	AMK (12–38)	11.0	SID, IM
<i>P. aeruginosa</i> (15, 23)	PIPC, OFLX, CPFEX, LVFX, AMK, FOM	AMK <sup>e)</sup> (16–36)	0.8–0.9	SID, IH
<i>α-Streptococcus</i> (37)	LVFX, MINO, FOM	FOM (24–30)	20.0	BID, IV
<i>P. aeruginosa</i> (37)	PIPC, OFLX, CPFEX, LVFX, AMK, FOM	—	—	—
<i>A. caviae</i> (45)	PIPC, CTRX, LVFX, MINO, AMK, FOM	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i> (45)	PIPC, CPFEX, LVFX, AMK, FOM	LVFX (39–52)	7.0	SID, PO
<i>Corynebacterium</i> sp (53)	PIPC, CEX, CTRX, MINO, AMK	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i> (53)	PIPC, OFLX, CPFEX, LVFX, AMK, FOM	—	—	—

a) *V. fluvialis*: *Vibrio fluvialis*; *S. intermedius*: *Staphylococcus intermedius*; *A. faecalis*: *Alcaligenes faecalis*; *A. caviae*: *Aeromonas caviae*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; 括弧内の数字は細菌が検出された病日を示す。b) 検出細菌に対して感受性があった抗生剤のみを示す; AMPC: アモキシシリン; PIPC: ピペラシ

リン； CEX：セファレキシン； CTRX：セフトリアキソン； OFLX：オフロキサシン； CPFX：シプロフロキサシン； LVFX：レボフロキサシン； MINO：ミノサイクリン； AMK：アミカシン； FOM：ホスホマイシン。c) ERFX：エンロフロキサシン，バイトリルワンショット注射液，バイエル薬品（株），大阪； LVFX：クラビット錠 500mg，第一三共（株），東京； AMK：アミカシン硫酸塩注射液 200mg「F」，富士製薬工業（株），東京； FOM：ホスミシン錠 500，明治製菓ファルマ（株），東京； 括弧内の数字は抗生剤を投与した病日を示す。d) SID：1日1回投与； BID：1日2回投与； IM：筋肉内投与； PO：経口投与； IH：吸入投与，鯨類専用の吸入装置（INH001，Taylor's Pharmacy, Orlando, FL, U.S.A.）（図IV）を使用； IV：静脈内投与。e) 生理食塩水で4倍希釈したアミカシンを使用。

## 第 2 章

### ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) における ボリコナゾールの胎盤と乳汁への移行と母仔獣の安全性の評価

本章は Oxford University Press の許可を得て次の論文から一部転載しています。

タイトル : Placental and breastmilk transfer of voriconazole to offspring from pregnant and lactating bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*).

著者 : Yoshito Ohno, Marisa Kobayashi, Yuichiro Akune, Yasuo Inoshima

雑誌 : Medical Mycology

出版年・巻号・頁 : 2020 年 58 巻 4 号 469-477 頁

DOI : <https://doi.org/10.1093/mmy/myz086>

## 序 論

ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) はカンジダ属やアスペルギルス属の真菌を主な起因菌とする呼吸器感染症の罹患率が高い(14, 65, 83)。ヒトや馬においては妊娠, 授乳中にそのストレスが原因で免疫が低下し, アスペルギルス感染症が起こることが知られている(2, 79)。そのため, 本種においても妊娠, 授乳中の母獣に呼吸器真菌感染症が起こる可能性がある。胎仔, 仔獣への薬剤の影響を考慮すると, 妊娠, 授乳中の母獣に抗真菌剤を投与することはできる限り避けられるべきであるが, 繁殖により本種の飼育頭数を維持, 確保するためには妊娠, 授乳中の母獣においても抗真菌剤を使用し, 適切な治療を実施する必要性がある。

本種の呼吸器真菌感染症の治療にはさまざまな抗真菌剤(フルコナゾール(FLCZ), イトラコナゾール(ITCZ), ボリコナゾール(VRCZ), アムホテリシン B(AMPH-B))が使用されている(63, 65)。しかし, FLCZ はアスペルギルス属の真菌に対してスペクトルがない(33)。また, AMPH-B は本種に静脈内投与することで腎不全を引き起こすことが報告されている(58)。ミカファンギンは第1章で明らかにしたように本種に静脈内投与することで体温低下や白血球減少症を引き起こす可能性がある。以上を考慮すると妊娠, 授乳中の母獣においてはアゾール系抗真菌剤(ITCZ, VRCZ), 中でも今日, 本種でよく使用されている VRCZ(63)を治療薬として考える必要性がある。しかし, VRCZ は実験動物(ラットとウサギ)で胎盤移行の報告(59)があるだけで, ヒトや本種を含むその他の動物種における胎盤, 乳汁を介した胎児(胎仔), 子(仔獣)への移行性や妊娠, 授乳中の母(獣)へ投与することの安全性については明らかとなっていない。



そこで本章では、名古屋港水族館で飼育しているハンドウイルカ 4 頭の母獣（妊娠/授乳中）のうち、カンジダ属やアスペルギルス属の真菌による呼吸器感染症が認められた 3 頭の母獣を VRCZ で治療した。その際、母獣と仔獣から採取した血液、臍帯血、乳汁中の VRCZ 濃度をそれぞれ測定し、また母獣と仔獣の行動、血液検査等による副作用のモニタリングを行うことで、本種における胎盤、乳汁を介した胎仔、仔獣への VRCZ の移行性や妊娠、授乳中の母獣へ VRCZ を投与することによる母獣と仔獣の安全性（副作用）について評価した。

## 材料および方法

### 動物

対象個体は、名古屋港水族館で飼育しているハンドウイルカのうち、4頭の母獣（妊娠/授乳中）（No. 1, 3, 5, 7）とその4頭の仔獣（No. 2, 4, 6, 8）の合計8頭である。それぞれの個体情報は表 2-1 に示した。また、本研究では“出産日を0日目”と定義した。

### 母獣 No. 1 とその仔獣 No. 2

No. 1 は、妊娠初期に微熱（36.9–37.1℃；No. 1 の平熱は 36.0–36.5℃）、臨床症状（痰の排出，甘い呼気臭（真菌感染を示唆する臭い（私信））および血液検査異常（総白血球数（WBC）とフィブリノーゲン（FIB）の増加，リンパ球数（LYM）の低下，赤血球沈降速度（ESR）の亢進）を示し，呼吸器真菌感染症が疑われた。

No. 2 は，出生直後（0日目と1日目）に No. 1 の健康状態が悪化したため，No. 1 から採取した乳汁（初乳）を人工哺育により給与した。

### 母獣 No. 3 とその仔獣 No. 4

No. 3 は，妊娠初期および授乳期間中（70日目）に No. 1 と同様の臨床症状や血液検査異常を示し，呼吸器真菌感染症が疑われた。

No. 4 は，出生後（21日目）に臨床症状（活発性の低下，授乳不良，呼吸音の異常，甘い呼気臭）や血液検査異常（WBC と FIB の増加，LYM の低下，ESR の亢進）を示し，呼吸器真菌感染症が疑われた。

### 母獣 No. 5 とその仔獣 No. 6

No. 5 は、授乳期間中（396 日目）に臨床症状（痰の排出，甘い呼気臭）や血液検査異常（FIB の増加）を示し，呼吸器真菌感染症が疑われた。

No. 6 は出生後，特に異常所見は認められず健康状態は良好であった。

### 母獣 No. 7 とその仔獣 No. 8

No. 7 は授乳期間中，特に異常所見は認められず健康状態は良好であった。

No. 8 は出生後，特に異常所見は認められず健康状態は良好であった。しかし，出生後 4 か月目（117 日目）に臨床症状（活発性の低下，授乳不良，甘い呼気臭）や血液検査異常（FIB の増加，ESR の亢進）を示し，呼吸器真菌感染症が疑われた。

### 呼気の真菌培養検査と検出菌種の同定

カンジダ属の真菌については，CHROMagar カンジダ寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン（株），東京）に第 1 章で述べた通りに呼気を採取し，また第 1 章と同条件下で培養後，使用説明書（日本ベクトン・ディッキンソン（株））に従い，培地に生えた真菌コロニーの色調と性状に基づいて簡易的に種同定を実施した。

アスペルギルス属の真菌については，第 1 章で述べた通りに培養検査と種同定を実施した。

### VRCZ の投与方法

No. 2, 6, 7 を除くすべての対象個体において，第 1 章と同様，副作用を避け，かつ有効血中濃度を確保するために最初の 3 日間は連続で VRCZ（ポリコナゾール錠 200mg「アメル」，共和薬品工業（株），大阪）を 1.1-

2.3 mg/kg, 1日2回で経口投与した（ローディングドーズ）。その後は投与直前や投与24時間後の血漿 VRCZ 濃度をそれぞれモニタリングしながら5-18日間隔で1.3-3.1 mg/kg, 1日2回で経口投与した（メンテナンスドーズ）（表 2-1）。第1章と同様，メンテナンスドーズにおいても VRCZ の副作用を避けるためにこのような間欠投与法を使用した。

## 検体採取

### 血液（血漿）

No. 1 と No. 3-8 は尾鰭の血管から，出生直後（1日目）に死亡した No. 2 は剖検時に心臓からそれぞれ血液を採取した。採取した血液は，VRCZ 濃度測定用の血漿を確保するためにヘパリンチューブ（富士フィルム（株），東京）に分注した。

### 臍帯血（血漿）

No. 1 は，出産直後に健康状態が悪化したため各種検査と処置を実施するために出産後3時間（0日目）で捕獲した。その際，生殖孔から手で胎盤を取り出し，臍帯血を採取した。No. 3, 7 は，出産後4時間（0日目）でプール内に胎盤を排出したため回収し，臍帯血を採取した（図 2-1 (A)）。採取した臍帯血は，VRCZ 濃度測定用の血漿を確保するためにヘパリンチューブ（富士フィルム（株））に分注した。

### 乳汁

No. 1 は，出産直後の処置時（0日目と1日目）に自作の吸乳器具（図 2-1 (B)）を使用して乳汁を採取した。No. 3, 5 は，授乳期間中に手で滅菌チューブ（アズワン（株），大阪）に乳汁を採取した。No. 7 は，授

乳期間中に自作の吸乳器具（図 2-1 (B)）を使用して乳汁を採取した。乳汁採取は、それぞれの血液採取と同時あるいは別時に実施した。

### **VRCZ 濃度の測定**

母獣と仔獣の血液、臍帯血および乳汁中の VRCZ 濃度の測定は第 1 章で述べた通りに実施した。

### **VRCZ 投与による副作用の評価**

VRCZ の投与期間中、第 1 章と同様、その主な副作用である食欲減退、視覚異常および肝障害（アスパラギン酸トランスアミナーゼ値の増加）（18, 80）について評価した。これらの評価は第 1 章で述べた通りに実施した。また本研究では、VRCZ の主な副作用の 1 つである心機能異常（7, 59, 61）についても評価した。心機能異常の評価は、定期的な心臓の超音波検査、胸部の聴診や触診（心臓の拍動やリズム）および血液検査で実施した。心電図検査は、心機能評価のために有用であることが報告されている（7, 25）。しかし、水環境下での使用が困難であること、妊娠中の母獣をプールから取り出すことは流産の危険性があること（Akune, 未発表データ）、検査のために母獣や仔獣をプールから長時間取り出すことで急性心不全を引き起こす危険性があること（70, 76）から、本研究では心電図検査を実施しなかった。

## 結 果

### 呼気真菌培養検査と検出菌種の同定および VRCZ の投与（治療）

#### 母獣 No. 1 とその仔獣 No. 2

No. 1 は、妊娠初期の呼気検査で *Candida albicans* と *Aspergillus fumigatus* が検出された。妊娠初期における VRCZ の投与による催奇形性を考慮し、妊娠 7 か月目（-155 日目）からその投与を開始した。VRCZ の投与後、呼気から両菌種が消失することはなかったが、乳汁移行の可能性を考慮し、出産前（-44 日目）にその投与を終了した（表 2-1）。

No. 2 は、出生直後（1 日目）に栄養不良で死亡したため、呼気検査や抗真菌剤の投与は実施しなかった（表 2-1）。

#### 母獣 No. 3 とその仔獣 No. 4

No. 3 は、妊娠初期の呼気検査で *C. glabrata* と *A. fumigatus* が検出された。No. 1 と同様、妊娠初期における VRCZ の投与による催奇形性を考慮し、妊娠 5 か月目（-226 日目）からその投与を開始した。VRCZ の投与後、呼気から両菌種が消失することはなかったが、乳汁移行の可能性を考慮し、出産前（-10 日目）にその投与を終了した（表 2-1）。授乳期間中も継続して呼気から両菌種が検出されたため VRCZ の投与を再開した（70 日目から 362 日目）（表 2-1）。

No. 4 は、出生後（21 日目）の呼気検査で *A. fumigatus* が検出された。そのため、VRCZ の投与を開始した（25 日目から 86 日目）（表 2-1）。

#### 母獣 No. 5 とその仔獣 No. 6

No. 5 は、授乳期間中（396 日目）の呼気検査で *A. fumigatus* が検出

された。そのため、VRCZ の投与を開始した（411 日目から 656 日目）（表 2-1）。

No. 6 は、出生後（294 日目）の呼気検査で *C. tropicalis* が検出されたが、健康状態が良好であったため抗真菌剤の投与は実施しなかった（表 2-1）。

#### 母獣 No. 7 とその仔獣 No. 8

No. 7 は、授乳期間中（82 日目）の呼気検査で *A. fumigatus* が検出されたが、健康状態が良好であったため抗真菌剤の投与は実施しなかった（表 2-1）。

No. 8 は、出生後（117 日目）の呼気検査で *A. fumigatus* が検出された。そのため、VRCZ の投与を開始した（127 日目から 206 日目）（表 2-1）。

#### VRCZ 濃度と VRCZ 投与による副作用

##### 母獣 No. 1 とその仔獣 No. 2

No. 1 の妊娠期間中（-155 日目から -44 日目）の血漿 VRCZ 濃度は 2.53-7.09  $\mu\text{g}/\text{m}l$  であった（図 2-2 (A)）。VRCZ を投与した期間中、No. 1 に副作用は認められなかった。出産直後（0 日目）に採取した臍帯血（0.14  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ）と乳汁（0.28  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ）からそれぞれ VRCZ が検出された（表 2-2）。出産翌日（1 日目）に採取した乳汁（0.24  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ）と No. 2 の血漿（0.18  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ）からそれぞれ VRCZ が検出された（表 2-2）。両日（0 日目と 1 日目）に採取した乳汁 VRCZ 濃度は、同時に採取した No. 1 の血漿 VRCZ 濃度（ともに 0.16  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ）よりも高値を示した（表 2-2）。

#### 母獣 No. 3 とその仔獣 No. 4

No. 3 の妊娠期間中 (-226 日目から-10 日目) と授乳期間中 (70 日目から 362 日目) の血漿 VRCZ 濃度は、それぞれ 2.56-8.02  $\mu\text{g}/\text{m}l$  と 1.97-6.08  $\mu\text{g}/\text{m}l$  であった (図 2-2 (B))。出産直後 (0 日目) に採取した臍帯血 (2.35  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ) から VRCZ が検出された (表 2-2)。No. 4 に VRCZ を投与していないにも関わらず、No. 4 の血漿 (17 日目, 2.82  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ; 21 日目, 2.40  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ; 25 日目, 1.87  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ) からそれぞれ VRCZ が検出された (図 2-3 (A))。No. 3, 4 の両方に VRCZ を投与した期間中 (78 日目から 119 日目), No. 4 の血漿 VRCZ 濃度 (最高値, 87 日目, 7.54  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ) は、一時的に No. 3 の血漿 VRCZ 濃度や乳汁 VRCZ 濃度と同レベルかそれ以上を示した (図 2-3 (A))。No. 3 の血漿 VRCZ 濃度と乳汁 VRCZ 濃度がヒトの治療有効濃度域 (2-4  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ) かそれよりも高濃度域で推移しているにも関わらず、No. 4 が摂餌していない期間中 (131 日目から 210 日目), No. 4 の血漿 VRCZ 濃度 (3.10-3.59  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ) は低下することなく、ある一定の濃度を維持していた (図 2-3 (B))。その後 (228 日目から 362 日目), No. 4 の摂餌量 (魚の摂取総熱量) (kcal) が増加するにつれて No. 4 の血漿 VRCZ 濃度は徐々に低下した (図 2-3 (C))。No. 3 に VRCZ を投与していない期間中 (38 日目から 55 日目), 乳汁 VRCZ 濃度 (検出限界以下 ( $<0.09$ ) -0.46  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ) は低値を示したが (図 2-3 (A)), No. 3 に VRCZ を投与した期間中 (70 日目から 362 日目), 乳汁 VRCZ 濃度 (最高値, 301 日目, 9.75  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ) は No. 3 の血漿 VRCZ 濃度よりも高値を示した (図 2-3 (A, B, C))。VRCZ を投与した期間中, No. 3, 4 に副作用は認められなかった。

#### 母獣 No. 5 とその仔獣 No. 6



No. 5 に VRCZ を投与した期間中（411 日目から 656 日目）、No. 5 の血漿 VRCZ 濃度と乳汁 VRCZ 濃度は、それぞれ 2.75–7.62  $\mu\text{g}/\text{m}l$  と 3.83–13.45  $\mu\text{g}/\text{m}l$  であり、乳汁 VRCZ 濃度（最高値、414 日目、13.45  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ）は血漿 VRCZ 濃度よりも高値を示した（図 2-4 (A, B)）。No. 6 に VRCZ を投与していないにもかかわらず、No. 6 の血漿から VRCZ が検出された（図 2-4 (A, B)）。No. 5 の血漿 VRCZ 濃度と乳汁 VRCZ 濃度がヒトの治療有効濃度域かそれよりも高濃度域で推移しているにもかかわらず、No. 6 の摂餌量 (kcal) が少量である期間中（460 日目から 561 日目）、No. 6 の血漿 VRCZ 濃度（1.22–1.55  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ）は低下することなく、ある一定の濃度を維持していた（図 2-4 (A)）。その後（590 日目から 658 日目）、No. 6 の摂餌量 (kcal) が増加するにつれて No. 6 の血漿 VRCZ 濃度は徐々に低下した（図 2-4 (B)）。VRCZ を投与した期間中、No. 5, 6 に副作用は認められなかった。

#### 母獣 No. 7 とその仔獣 No. 8

出産直前（0日目）と出産直後（0日目）に採取した No. 7 の血液と臍帯血から VRCZ は検出されなかった（いずれも検出限界以下、 $< 0.09 \mu\text{g}/\text{m}l$ ）（表 2-2）。授乳期間中（88 日目から 223 日目）、No. 7 の血漿 VRCZ 濃度と乳汁 VRCZ 濃度もそれぞれ検出限界以下（ $< 0.09 \mu\text{g}/\text{m}l$ ）であった（図 2-4 (C)）。No. 8 に VRCZ を投与していない期間中（98 日目、117 日目、123 日目、127 日目）、No. 8 の血漿 VRCZ 濃度はそれぞれ検出限界以下（ $< 0.09 \mu\text{g}/\text{m}l$ ）であった（図 2-4 (C)）。No. 8 に VRCZ を投与した期間中（127 日目から 206 日目）、No. 8 の血漿 VRCZ 濃度（4.08–9.46  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ）は増加したが（図 2-4 (C)）、特に副作用は認められなかった。

## 考 察

ヒトでは、さまざまな抗真菌剤(ケトコナゾール, FLCZ, ITCZ, AMPH-B, 5-フルオロシトシン)が胎盤(臍帯血), 乳汁を介して胎児, 子に移行することが報告されている(38, 42, 48, 52, 55, 60)。しかし VRCZ については, 実験動物(ラットとウサギ)で胎盤移行の報告(59)があるだけで, ヒトやその他の動物種における胎盤, 乳汁を介した胎児(胎仔), 子(仔獣)への移行性については明らかとなっていない。本研究において, VRCZ が本種の胎盤, 乳汁を介して胎仔, 仔獣へ移行することが明らかとなった。

出産直後(0日目)に採取したNo. 1, 3の臍帯血や同じく出産直後(1日目)に採取したNo. 2の血漿からVRCZが検出された(表2-2)。薬剤の胎盤移行は主に受動拡散(薬剤の血中濃度が高い母体側から血中濃度の低い胎児(胎仔)側へエネルギーを使用せずに自発的に薬剤が胎盤を介して移動, 拡散する現象)によって起こり, また受動拡散の起こりやすさは, その薬剤の化学的特徴(高脂溶性, 低分子量, 等)によって決まることが知られている(55)。VRCZはこの2つの化学的特徴を保有していることから(59), 本種においてVRCZが胎盤(臍帯血)を介して胎仔に移行したと考えられた。また, 組織学的に胎盤形態は母体側の血管と胎児(胎仔)側の血管との間にある細胞の数によって分類され, その数は動物種によって異なる。そして, 細胞の数が少ない胎盤の方がより薬剤が胎児(胎仔)に移行しやすい(21)。すでにVRCZの胎盤移行が報告(59)されている実験動物(ラットとウサギ)の胎盤形態は血絨毛胎盤であり, 母体側の血管と胎仔側の血管との間にある細胞の数は少ない(栄養膜合胞体細胞と胎仔血管内皮細胞の2つ)(21)。しかし本研究において, 母体側の血管と

胎仔側の血管との間により多くの細胞（母体血管内皮細胞，子宮内膜細胞，栄養膜細胞，胎仔血管内皮細胞の4つ）を持つ本種の胎盤（上皮絨毛胎盤）（13，21）においてもVRCZが胎盤（臍帯血）を介して胎仔に移行することが明らかとなった。No. 2には人工哺育のためにNo. 1から採取した乳汁（VRCZを含む）を給与した。そのため，No. 2の血漿から検出されたVRCZは胎盤（臍帯血）を介して移行したものと乳汁を介して移行したものの2つが含まれると考えられた（表2-2）。

著者は No. 1, 3 を VRCZ で治療する際，催奇形性を考慮し，妊娠初期ではなく妊娠 7 か月目と妊娠 5 か月目にそれぞれ VRCZ を投与した（表 2-1）。栄養不良で出生直後（1 日目）に死亡した No. 2 に剖検および病理組織学的検査上，各臓器（肝臓，腎臓，心臓，等）に明らかな異常は認められなかった。死後の X 線検査や剖検上，筋骨格系にも明らかな異常は認められなかった（データは示さず）。一方 No. 4 は，出生後の血液検査で明らかな異常は認められなかったが，目視と X 線検査において脊椎彎曲が確認された（それぞれ出生後 7 日目と 21 日目）（図 2-5 (A, B)）。催奇形性の発生にはさまざまな要因（薬剤を投与する妊娠時期，薬剤の投与量，動物種，等）が関与することが報告されている（27）。VRCZ については，器官形成期に高用量（10，30，60 mg/kg）を投与したラットの胎仔に催奇形性（口蓋裂や水腎症）が認められたことが報告されている（59）。一方，同じく器官形成期に高用量（10，40，100 mg/kg）を投与したウサギの胎仔に催奇形性が認められなかったことも報告されている（59）。本研究において，妊娠期間中の No. 1, 3 に投与した VRCZ の投与量と投与頻度（表 2-1）は，本種で報告されているものと同程度であった（18，63，80）。また，妊娠期間中の No. 1, 3 の血漿 VRCZ 濃度（図 2-2 (A, B)）は，本種で報告されている安全濃度域内（2-4  $\mu\text{g}/\text{m}l$ ）（18）

および耐容濃度域内 (9-12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (80) であり, VRCZ の副作用も認められなかった (データは示さず)。そのため, 妊娠期間中の母獣に VRCZ を投与すること (今回の場合, 妊娠 5 か月目の No. 3 への投与) が, 仔獣 (今回の場合, No. 4) に脊椎弯曲を引き起こすかどうかは不明である。今後, 妊娠期間中の母獣に VRCZ を投与する必要がある場合, 著者は母獣の血漿 VRCZ 濃度をモニタリングしながら妊娠 7 か月目以降に投与することを推奨する。その理由は以下の 3 つである。1 つ目は, 妊娠 7 か月目の No. 1 に VRCZ を投与したが, No. 2 に脊椎弯曲を含め異常所見は認められなかった。2 つ目は, ヒトで知られているように (27), 妊娠 2 か月目から妊娠 4 か月目 (器官形成期) は投与した薬剤に対して胎児の感受性が高い時期である。3 つ目は, ラットの胎盤 (血絨毛胎盤) で受動拡散される薬物の量 (受動拡散を介して母体から胎仔に移行する薬物の量) は妊娠後期の方が妊娠前期より制限されることが報告されている (68)。そのため, 本種の胎盤 (上皮絨毛胎盤) においても妊娠後期の方が子宮内で胎仔が VRCZ に暴露される程度が減少する可能性があり, これにより胎仔が受ける VRCZ の毒性効果もより少なくなると考えられる。いずれにしても著者は, 妊娠期間中の母獣に VRCZ を投与する必要がある場合, 投与によって得られるメリット (治療効果) とデメリット (副作用) を十分に評価することを推奨する。

VRCZ を投与した No. 1, 3, 5 の乳汁からのみ VRCZ が検出されたこと (表 2-2, 図 2-3 (A, B, C), 図 2-4 (A, B)), その VRCZ を含む乳汁を人工哺育のために給与した No. 2 の血漿やその乳汁を飲んだ No. 4, 6 の血漿から VRCZ が検出されたこと (表 2-2, 図 2-3 (A, B, C), 図 2-4 (A, B)) から, 本種において VRCZ が乳汁を介して仔獣に移行することが明らかとなった。No. 1, 3, 5 の 3 頭において, 乳汁 VRCZ 濃度と血漿 VRCZ 濃

度の比 (M/P比) を算出すると、 $1.66 \pm 0.27$  (平均値 $\pm$ 標準偏差値) ( $n=134$ ) であった。これはヒトの1.0 (ファイザー (株), 未発表データ) よりも高値であった。この結果は、本種の方がヒトよりも血漿中から乳汁中にVRCZが移行しやすいことを示唆している。薬剤の乳汁移行については、さまざまな要因 (イオン化 (母体血漿や乳汁のpHとその薬剤の解離定数 (pKa), 脂溶性, 等) が関与しており、非イオン型 (分子型) の薬剤や高脂溶性の薬剤は乳汁中へ移行しやすい (26, 29, 51)。ヒトの母体血漿と乳汁のpHはそれぞれ7.4と6.6-7.2であり (26, 29, 51), 本種についても母体の血漿pH (Akune, 未発表データ) と乳汁pH (16) がヒトと同じであることが知られている。そのため、弱塩基性薬剤でそのpKaが1.63であるVRCZ (22, 59) は本種とヒトの母体血漿中において非イオン型 (分子型) が多くなり、(母体血漿より若干, 酸性である) 乳汁中への移行については両者で差が生じる可能性は低いと考えられた。一方で、本種とヒトの乳汁成分は異なり、本種の方がヒトより乳汁中の脂肪含有率が高いことが報告されている (本種の乳汁中脂肪分は22-41%, ヒトの乳汁中脂肪分は3-5%) (16, 32, 34)。VRCZが高脂溶性の特徴を保有すること (59) を考慮すると、本種とヒトの乳汁成分の違いが乳汁中へのVRCZの移行性の違い、つまり本種のM/P比がヒトよりも高値であったことに関係していると考えられた。本種を含む海棲哺乳類では、同じ高脂溶性を特徴とするポリ塩化ビフェニルが乳汁移行しやすいこと、また、その移行は経産個体よりも初産個体の方が起こりやすいことが報告されている (54)。そのため、VRCZについても、本種、特に初産個体において乳汁移行が起こりやすいと考えられた。今後、授乳期間中の母獣、特に初産個体にVRCZを投与する場合、仔獣管理の観点から、より注意する必要があると考えられた。授乳期間中のNo. 3, 5の血漿VRCZ濃度と乳汁VRCZ濃度がヒトの

治療有効濃度域かそれよりも高濃度域で推移しているにも関わらず、No. 4, 6が摂餌していない、あるいは摂餌量 (kcal) が少量である期間中、No. 4, 6の血漿VRCZ濃度は低下することなく、ある一定の濃度を維持していた (図2-3 (B), 図2-4 (A))。その後、No. 4, 6の摂餌量 (kcal) が増加 (あるいは吸乳量が低下) するにつれて、No. 4, 6の血漿VRCZ濃度は徐々に低下した (図2-3 (C), 図2-4 (B))。これは、母獣の血漿VRCZ濃度 (あるいは乳汁VRCZ濃度) や仔獣の摂餌量 (あるいは吸乳量) 次第で、仔獣にVRCZが蓄積する可能性やその蓄積によりVRCZの副作用が仔獣に生じる可能性を示唆している。そのため今後、授乳期間中の母獣にVRCZを投与する必要がある場合、母獣だけではなく仔獣の血漿VRCZ濃度やその副作用についてもモニタリングすることが重要と考えられた。特に仔獣の肝機能や腎機能はヒトと同様、未熟であることから (29, 70), モニタリングは重要と考えられた。

以上、本研究から、血中濃度や副作用のモニタリングが必要であるものの妊娠 (ただし、妊娠7か月目以降の投与を推奨)、授乳中の本種においてVRCZが呼吸器真菌感染症の治療薬として使用できる可能性が示唆された。

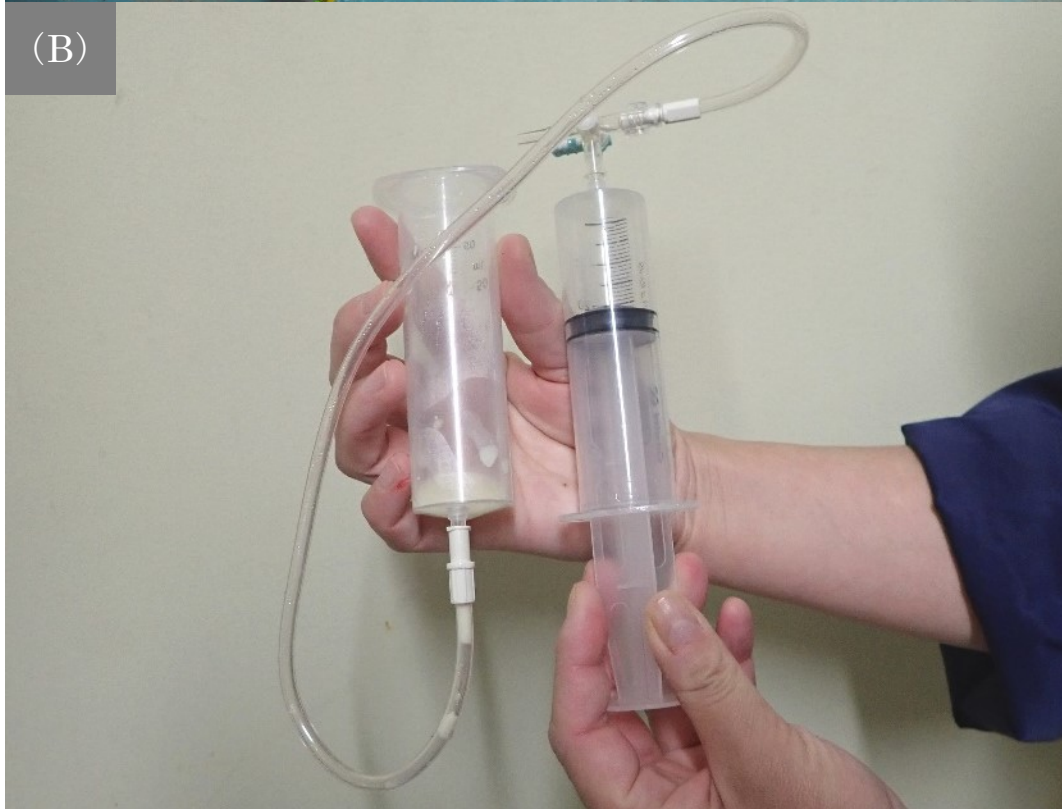


図 2-1. (A) プールから回収した胎盤と (B) 自作の吸乳器具

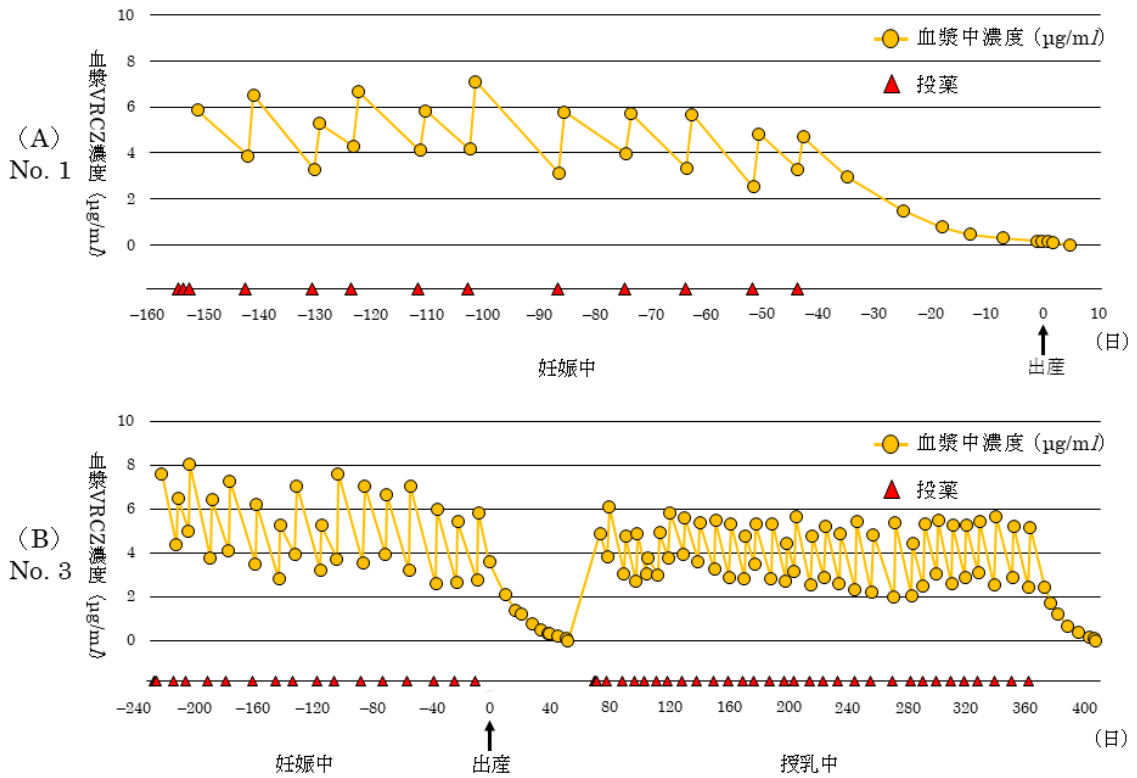


図 2-2. 妊娠期間中 (A : No. 1) と妊娠および授乳期間中 (B : No. 3) に呼吸器真菌感染症の治療のためにポリコナゾール (VRCZ) を投与したハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) における血漿 VRCZ 濃度 (µg/ml) の推移

黒色矢印は出産日 (0 日目と定義) を示す。



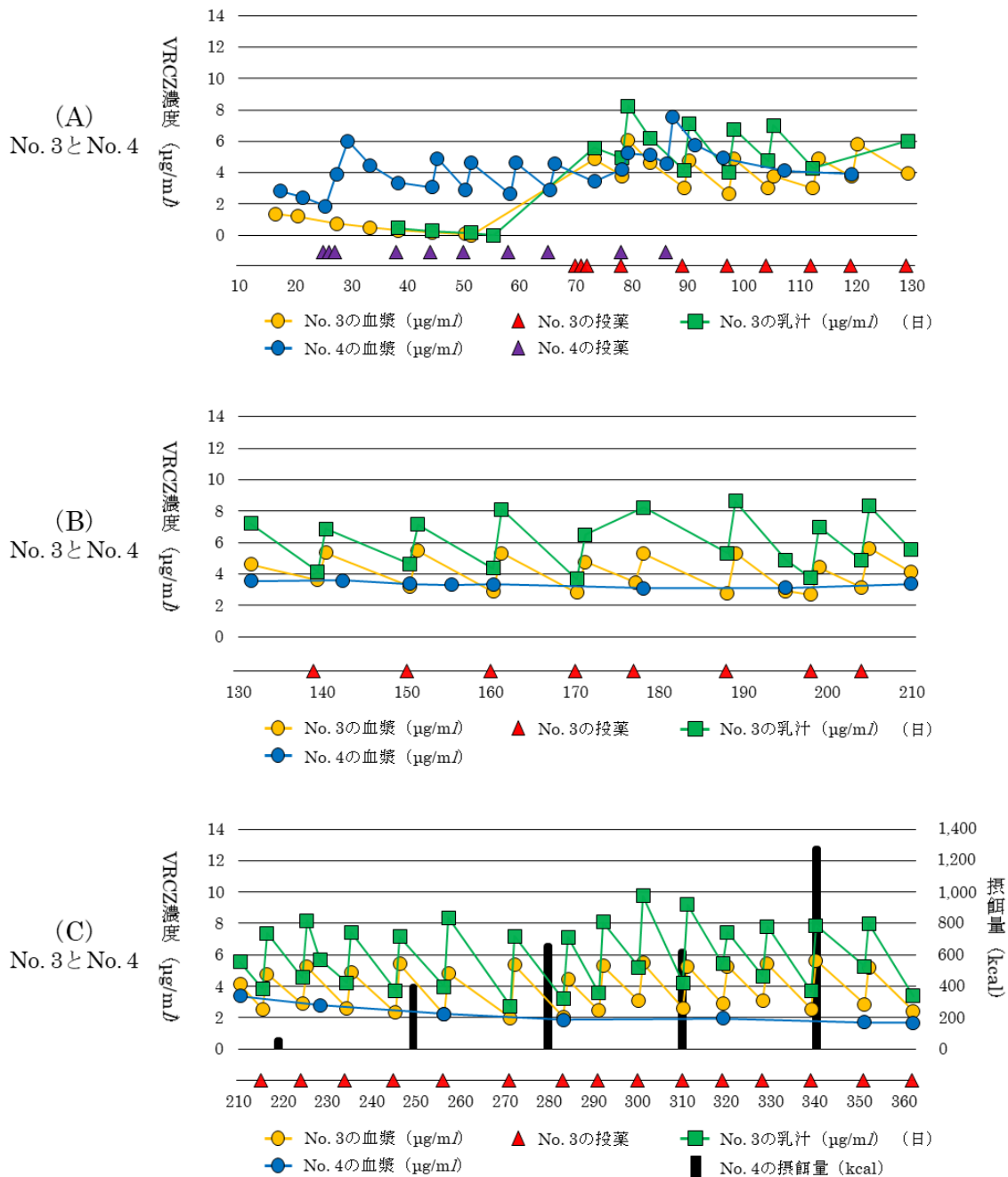


図 2-3. 授乳期間中に呼吸器真菌感染症の治療のためにポリコナゾール (VRCZ) を投与したハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) における血漿および乳汁 VRCZ 濃度 (μg/ml) (A, B, C) と摂餌量 (魚の摂取総熱量) (kcal) (C) の推移

データ A, B, C は No. 3, 4 のものを示す。No. 4 の摂餌量 (kcal, 黒色棒グラフ) は 30 日間の平均値で示す。

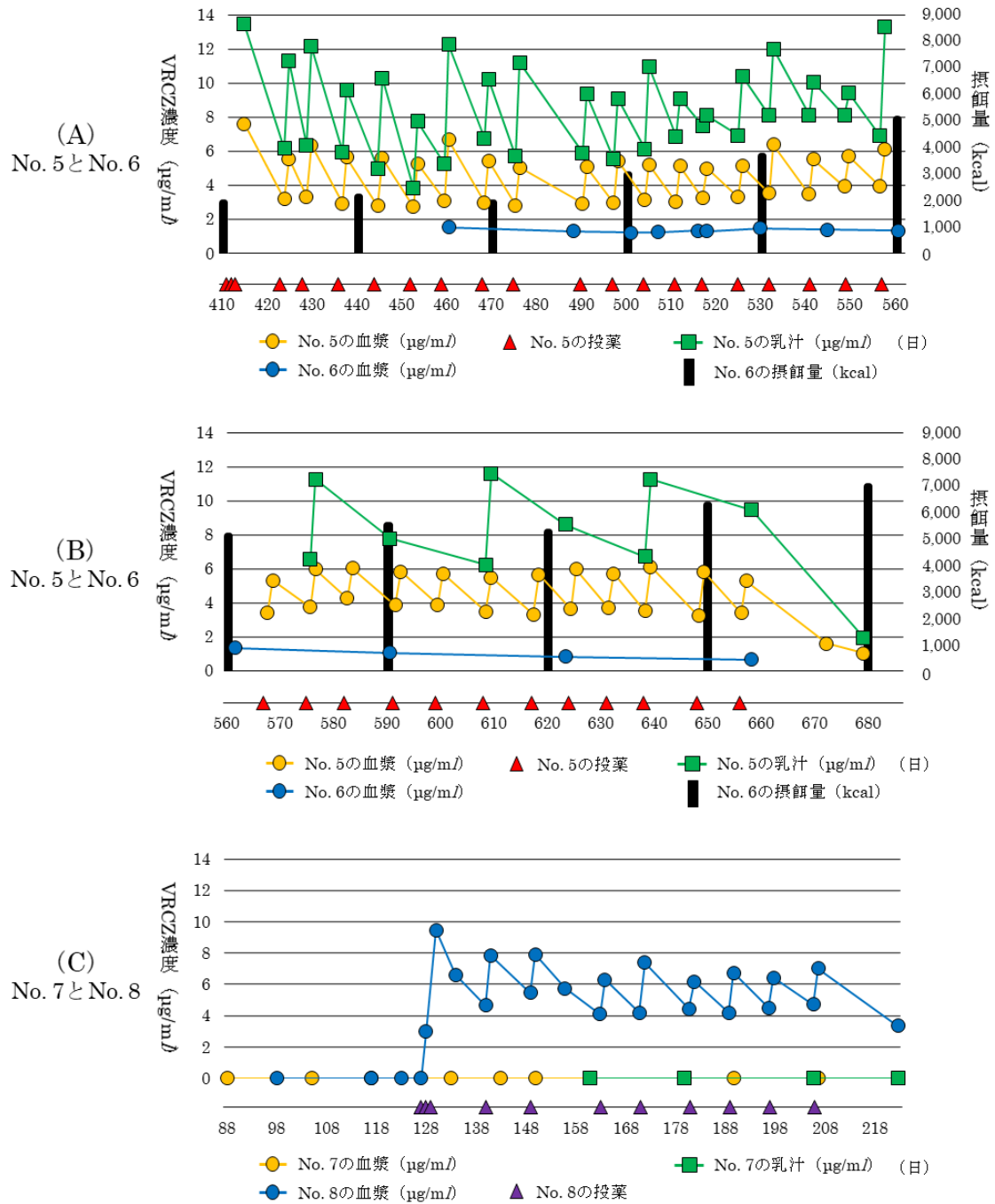


図 2-4. 授乳期間中に呼吸器真菌感染症の治療のためにポリコナゾール (VRCZ) を投与したハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) における血漿および乳汁 VRCZ 濃度 (μg/ml) (A, B, C) と摂餌量 (魚の摂取総熱量) (kcal) (A, B) の推移

データ A, B は No. 5, 6, データ C は No. 7, 8 のものを示す。No. 6 の摂餌量 (kcal, 黒色棒グラフ) は 30 日間の平均値で示す。

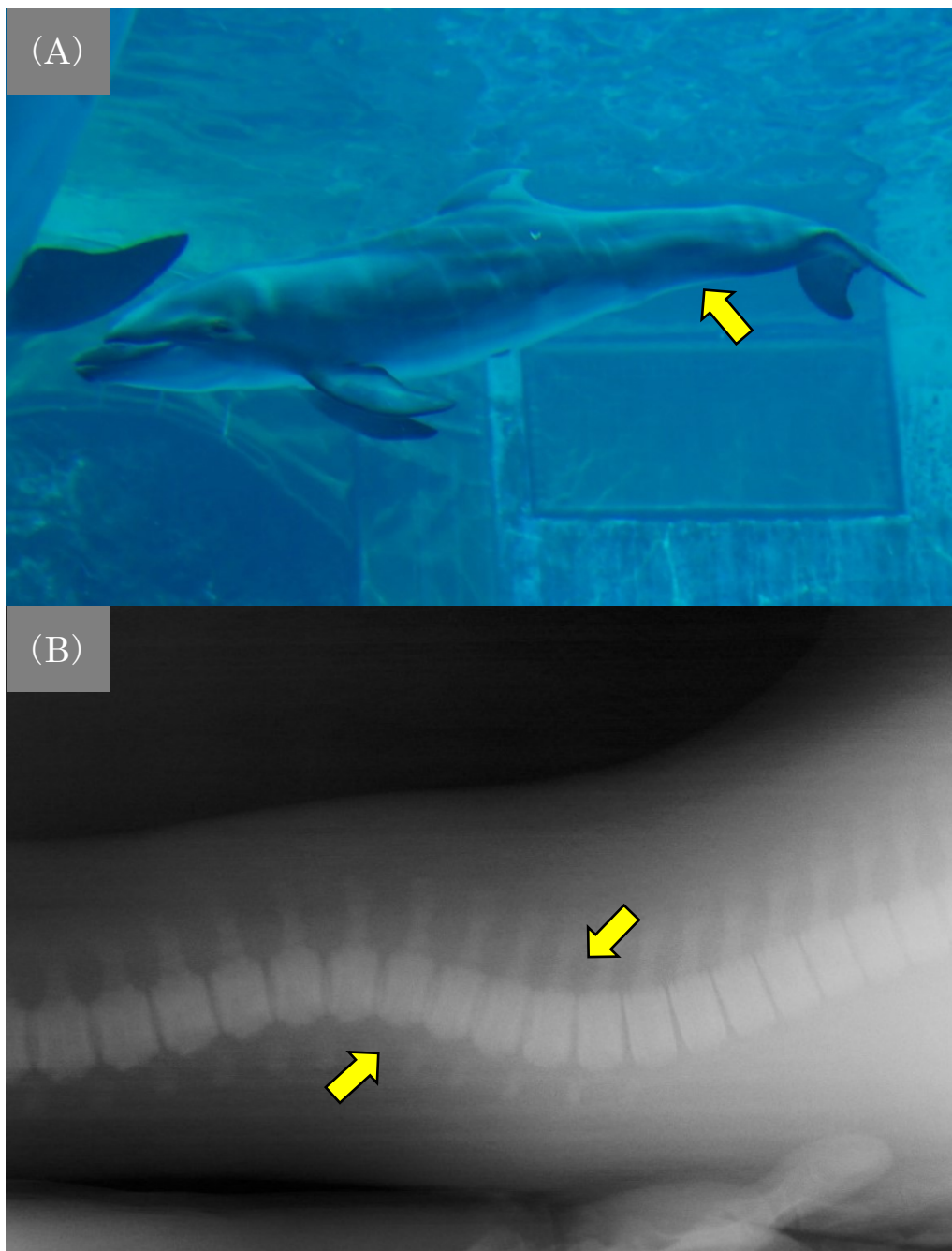


図 2-5. No. 4 の脊椎弯曲（黄色矢印）

(A) 出生後 7 日目に目視と (B) 出生後 21 日目に X 線検査で脊椎弯曲を確認した。脊椎弯曲は、過去に名古屋港水族館で正常（健常）個体として生まれた仔獣（同程度の日齢時）の記録写真や、出生直後に死亡した正常（骨格異常がない）個体の X 線画像と比較して判断した。X 線は腰-尾椎付近を右-左方向に 12 kV, 63 mAs で撮影した。

表 2-1. 妊娠/授乳中ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) とその仔獣およびポリコナゾール (VRCZ) の投与に関する情報

対象個体 No.	年齢 <sup>a)</sup>	体重 (kg) <sup>b)</sup>	状況	ローディング ドーズ (mg/kg) <sup>c)</sup>	メンテナンス ドーズ (mg/kg) <sup>d)</sup>	投与頻度と 投与経路 <sup>e)</sup>	投与日 <sup>f)</sup>
1	推定21歳	253	妊娠中	2.3	2.3-3.1	BID, PO	-155から-44
2	1日齢	15	人工哺育中	-	-	-	-
3	推定14-17歳	255	妊娠中	2.0	2.4-2.8	BID, PO	-226から-10
			授乳中	1.5	1.5-2.4	BID, PO	70から362
4	25日齢	18-85	吸乳中	1.1	1.6-2.3	BID, PO	25から86
5	推定18-19歳	247	授乳中	2.0	1.6-2.8	BID, PO	411から656
6	1歳	126-153	吸乳中	-	-	-	-
7	推定21-22歳	283	授乳中	-	-	-	-
8	127日齢	47-76	吸乳中	1.4	1.3-2.0	BID, PO	127から206

a) 妊娠中 (No. 1, 3) と授乳中 (No. 3, 5, 7) の推定年齢；推定年齢は野生捕獲時の体長から算出；剖検時 (No. 2) と最初に投薬を実施した時 (No. 4, 8) の日齢；吸乳中 (No. 6) の年齢。b) 妊娠前 (No. 1, 3, 7)；剖検時 (No. 2)；投薬中 (No. 4, 5, 8)；吸乳中 (No. 6)。c) 最初の3日間は連続投与；VRCZの副作用を避け、かつ有効血中濃度を確保するために負荷高用量 (1日量) を3日間に分割して投与。d) 投与直前や投与24時間後の血漿VRCZ濃度をそれぞれモニタリングしながら5-18日間隔で投与；第1章で述べた理由により、VRCZの副作用を避けるためにこのような間欠投与法を使用。

e) BID : 1 日 2 回投与 ; PO : 経口投与。 f) 数字は VRCZ の投与開始日から投与終了日を示す ; - : 出産前を示す。

表 2-2. 出産直前と出産直後のハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) におけるポリコナゾール (VRCZ) 濃度

対象個体 No.	日 a)	VRCZ濃度(μg/ml)			
		母獣の血液(漿) <sup>b)</sup>	臍帯血(漿) <sup>c)</sup>	乳汁 <sup>d)</sup>	仔獣の血液(漿) <sup>e)</sup>
1と2	0	0.16	0.14	0.28	—
	1	0.16	—	0.24	0.18
3と4	0	—	2.35	—	—
7と8	0	< 0.09	< 0.09	—	—

a) 出産日を 0 日目と定義。b) 出産後 3 時間 (0 日目) と出産翌日 (1 日目) (No. 1) および出産前 4 時間 (0 日目) (No. 7) に採取。c) 出産後 3, 4, 4 時間 (0 日目) (No. 1, 3, 7) に採取。d) 出産後 3 時間 (0 日目) と出産翌日 (1 日目) (No. 1) に採取。e) 剖検時 (1 日目) (No. 2) に採取, No. 2 には人工哺育により No. 1 から採取した乳汁 (VRCZ を含む) を給与した。

## 第 3 章

### ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) の 呼気から分離された真菌の種同定と薬剤感受性試験

本章は公益社団法人日本獣医学会 (The Japanese Society of Veterinary Science) の許可を得て次の論文から一部転載しています。

タイトル : First isolation of voriconazole-resistant *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *Aspergillus niger* from the blowholes of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*).

著者 : Yoshito Ohno, Yuichiro Akune, Yasuo Inoshima, Rui Kano

雑誌 : The Journal of Veterinary Medical Science

出版年・巻号・頁 : 2019 年 81 巻 11 号 1628-1631 頁

DOI : <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0749>

## 序 論

ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) の呼吸器真菌感染症の治療にはさまざまな抗真菌剤，中でもアゾール系抗真菌剤（イトラコナゾール (ITCZ)，ボリコナゾール (VRCZ)) がよく使用されている (63)。また，第 2 章で VRCZ が血中濃度や副作用のモニタリングが必要であるものの妊娠（ただし，妊娠 7 か月目以降の投与を推奨），授乳中の本種において呼吸器真菌感染症の治療薬として使用できる可能性が示唆された。そのため，今後 VRCZ は妊娠，授乳中を含む本種の呼吸器真菌感染症の治療薬の主体になると考えられる。

ヒトでは，カンジダ属やアスペルギルス属の真菌がアゾール系抗真菌剤の長期投与や頻回使用により，その使用した薬剤や同系統の薬剤に対して耐性（交差耐性を含む）を獲得することが知られている (3, 4, 10, 20, 47, 53, 69, 72)。そのため，本種においても同様，アゾール系抗真菌剤の使用により起因菌が耐性（交差耐性を含む）を獲得する可能性がある。このような理由から，本種において呼吸器真菌感染症を適切に治療するためには，本種の呼気から分離された真菌の種同定と薬剤感受性試験を実施する必要がある。しかし，国内の水族館等の飼育施設において，分離された真菌の種同定や薬剤感受性試験を慣用的に実施している施設は非常に少なく，そのほとんどが経験的治療に依存している（私信）。

そこで本章では，名古屋港水族館で飼育しているハンドウイルカ 14 頭の呼気から分離されたカンジダ属やアスペルギルス属の真菌の種同定と薬剤感受性試験（アゾール系抗真菌剤 (ITCZ, VRCZ) に対する分離真菌の感受性評価）を実施した。また，これらアゾール系抗真菌剤の投与（治療）の有無と耐性獲得の関係性や飼育下における隠蔽種，自然耐性株ある



いは低感受性株の存在についても評価した。

## 材料および方法

### 動物

対象個体は、名古屋港水族館で飼育している 14 頭のハンドウイルカ (No. 1-14) である (表 3-1)。14 頭のうち 12 頭 (No. 2-6, 8-14) に臨床症状 (発熱, 痰の排出, 甘い呼気臭 (真菌感染を示唆する臭い (私信))) や血液検査異常 (総白血球数, 分葉核好中球数およびフィブリノーゲンの増加, 赤血球沈降速度の亢進) のいずれかが認められ (表 3-1), 呼吸器真菌感染症が疑われた。

### 呼気の真菌培養検査と分離真菌の種同定

14 頭において, 第 1 章で述べた通りに呼気の真菌培養検査を実施した。培養後, Hinrikson ら (28) や Kano ら (36, 37) の報告に基づいて, ゲノム DNA を抽出し, 内部転写スペーサー (ITS) 領域を増幅するプライマーセット (ITS-5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') と ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')) および Takara Taq (タカラバイオ (株), 滋賀) を使用して PCR を実施した。PCR は, 95°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返すことを反応条件とした。また, 上記報告に基づいて, PCR 産物を精製し, 上記プライマーセットおよび BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) を使用して DNA シークエンスを実施した。DNA シークエンスは, 96°C 5 秒で熱変性後, 96°C 10 秒, 50°C 5 秒, 60°C 4 分を 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返すことを反応条件とした。その後, ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を使用して塩基配列を解読し, その塩基配列の

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 検索により分離株の種同定を実施した。

### 薬剤感受性試験

分離株に対してEテストを実施し、ITCZとVRCZの最小発育阻止濃度(MIC)を求めた。

カンジダ属の真菌については、臨床検査標準委員会(CLSI)が公表しているM27-A3ガイドライン記載の臨床ブレイクポイントに基づいて、感性(S)、用量依存的感性(S-DD)および耐性(R)の分類分けを実施した。つまり、ITCZに対するS、S-DDおよびRのMIC値をそれぞれ $\leq 0.125 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.25\text{--}0.5 \mu\text{g/ml}$ および $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$ にした。VRCZに対するSとRのMIC値をそれぞれ $\leq 1.0 \mu\text{g/ml}$ と $\geq 4.0 \mu\text{g/ml}$ にした(11)。

アスペルギルス属の真菌については、CLSIが公表しているM38-A2ガイドライン記載の臨床ブレイクポイントに基づいて、同じく、S、S-DDおよびRの分類分けを実施した。つまり、ITCZとVRCZに対するS、S-DDおよびRのMIC値をそれぞれ $\leq 1.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $2.0 \mu\text{g/ml}$ および $\geq 4.0 \mu\text{g/ml}$ にした(11)。

EテストはE-test Technical Guide 10(バイオメリュー・ジャパン(株), 東京)に従って実施した。

## 結 果

### 抗真菌剤の投与（治療）

呼吸器真菌感染症が疑われた 12 頭のうち、3 頭（No. 2, 3, 14）には ITCZ（イトラコナゾール錠 100mg「日医工」、日医工（株）、富山）を 2.0–2.5 mg/kg, 1 日 2 回で経口投与した（表 3-1）。また、9 頭（No. 4–6, 8–13）には VRCZ（ブイフェンド錠 200mg, ファイザー（株）、東京）を経口投与した（表 3-1）。第 1 章と同様、副作用を避け、かつ有効血中濃度を確保するために最初の 3 日間は連続で VRCZ を 1.0–2.4 mg/kg, 1 日 2 回で経口投与した（ローディングドーズ）。その後は投与直前や投与 24 時間後の血漿 VRCZ 濃度をそれぞれモニタリングしながら 7–10 日間隔で 1.0–3.1 mg/kg, 1 日 2 回で経口投与した（メンテナンスドーズ）。第 1 章と同様、メンテナンスドーズにおいても VRCZ の副作用を避けるためにこのような間欠投与法を使用した。

### 呼気の真菌培養検査と分離真菌の種同定

14 頭の呼気から合計 5 種、20 株の真菌が分離された。その内訳は、3 種、13 株のカンジダ属の真菌（*Candida albicans* が 6 株、*C. tropicalis* が 3 株、*C. glabrata* が 4 株）と 2 種、7 株のアスペルギルス属の真菌（*Aspergillus fumigatus* が 6 株、*A. niger* が 1 株）であった（表 3-2）。

### 薬剤感受性試験

アゾール系抗真菌剤（ITCZ あるいは VRCZ）を投与する前の 2 頭（No. 3, 4）と投与していない 3 頭（No. 1, 2, 7）から分離されたカンジダ属の真菌 10 株（分離株 No. 1–3, 5–7, 10–13）のうち 1 株（分離株 No. 6）

は ITCZ と VRCZ の両方に対して R (MIC 値は ITCZ と VRCZ の両方とも  $>32 \mu\text{g}/\text{m}l$ ), 3 株 (分離株 No. 10-12) は ITCZ に対して R (MIC 値は  $1.5-2.0 \mu\text{g}/\text{m}l$ ), 3 株 (分離株 No. 5, 7, 13) は ITCZ に対して S-DD (MIC 値は  $0.19-0.25 \mu\text{g}/\text{m}l$ ) をそれぞれ示した (表 3-1, 3-2)。アゾール系抗真菌剤 (ITCZ あるいは VRCZ) を投与した後の 3 頭 (No. 2, 5, 6) から分離されたカンジダ属の真菌 3 株 (分離株 No. 4, 8, 9) のうち 2 株 (分離株 No. 8, 9) は ITCZ と VRCZ の両方に対して R (MIC 値は ITCZ と VRCZ の両方とも  $>32 \mu\text{g}/\text{m}l$ ) を示した (表 3-1, 3-2)。

また, アゾール系抗真菌剤 (VRCZ) を投与する前の 2 頭 (No. 10, 13) と投与した後の 4 頭 (No. 8, 9, 11, 12) から分離された *A. fumigatus* (分離株 No. 14-19) はすべて ITCZ と VRCZ の両方に対して S (MIC 値は ITCZ が  $0.047-0.75 \mu\text{g}/\text{m}l$ , VRCZ が  $0.025-0.64 \mu\text{g}/\text{m}l$ ) を示した (表 3-1, 3-2)。アゾール系抗真菌剤 (ITCZ) を投与した後の 1 頭 (No. 14) から分離された *A. niger* (分離株 No. 20) は VRCZ に対して R (MIC 値は  $>32 \mu\text{g}/\text{m}l$ ) を示した (表 3-1, 3-2)。

## 考 察

本種において、ヒトと同様（3, 4, 10, 20, 47, 53, 69, 72）、アゾール系抗真菌剤を長期投与あるいは頻回使用した場合、起因菌がその使用した薬剤や同系統の薬剤に対して耐性（交差耐性を含む）を獲得する可能性がある。実際、本研究においてアゾール系抗真菌剤（ITCZ あるいは VRCZ）を投与した後の3頭（No. 5, 6, 14）から ITCZ や VRCZ に対して耐性を示す *C. tropicalis*（分離株 No. 8, 9）や *A. niger*（分離株 No. 20）が分離された（表 3-1, 3-2）。カンジダ属やアスペルギルス属の真菌のアゾール系抗真菌剤への耐性獲得は、標的酵素であるラノステロール 14 $\alpha$ -デメチラーゼをコードする遺伝子（*CYP51A/ERG11*）の過剰発現や変異あるいは排出ポンプ（ABC トランスポーターや MFS トランスポーター）をコードする遺伝子（*CDR1, CDR2/MDR1*）の過剰発現によって起こることが知られている（33, 35, 85）。そのため、アゾール系抗真菌剤（ITCZ, VRCZ）に対して耐性あるいは低感受性を示した今回の分離株についても上記遺伝子の過剰発現や変異が関与している可能性が考えられた。

本研究において著者は、呼気から分離された真菌の種同定を ITS 領域の解析により実施した。しかし近年、アスペルギルス属の真菌において形態学的によく似ているが遺伝学的には異なり、また薬剤感受性も異なる別の菌種、いわゆる“隠蔽種”の存在が知られている（24, 72, 77）。この隠蔽種の中には形態学的に、あるいは ITS 領域の解析だけで正確に種を同定することが困難な菌種が存在する（24, 30, 77）。そのため、今回分離された *A. niger*（分離株 No. 20）が本当に *A. niger* であるかは不明であり（広義では *A. niger*）、*Aspergillus* section *Nigri*（隠蔽種）のうち

の 1 種（例えば *A. tubingensis*）である可能性も考えられた（24, 77）。また、隠蔽種（特に *A. tubingensis*）はアゾール系抗真菌剤（ITCZ, VRCZ）に対して耐性あるいは低感受性を示すことが知られている（24, 30, 77）。そのため今後、適切な抗真菌剤を選択するためにも隠蔽種を考慮し、ITS 領域だけではなく、他の遺伝子領域（ $\beta$  チューブリン、カルモジュリン、等）を組み合わせた解析による種同定を実施することが重要と考えられた。

本研究において、アゾール系抗真菌剤（ITCZ あるいは VRCZ）を投与する前の 2 頭（No. 3, 4）と投与していない 1 頭（No. 7）から ITCZ や VRCZ に耐性を示す *C. albicans*（分離株 No. 6）や *C. glabrata*（分離株 No. 10-12），そして ITCZ に低感受性を示す *C. tropicalis*（分離株 No. 7）や *C. glabrata*（分離株 No. 13）が分離された（表 3-1, 3-2）。Sandhu ら（66）は、ノンアルビカンスカンジダ属の真菌（例えば *C. glabrata*）はアゾール系抗真菌剤（特にフルコナゾール（FLCZ））に対して自然耐性を持つことや、*C. albicans* よりもアゾール系抗真菌剤（FLCZ, VRCZ）に対して低感受性を示すことを報告している。そのため、今回分離された *C. glabrata*（分離株 No. 10-12）は ITCZ に対して自然耐性を持っている可能性が考えられた。また、*C. tropicalis*（分離株 No. 7）や *C. glabrata*（分離株 No. 13）は ITCZ に対して低感受性であった可能性が考えられた。

Takahashi ら（71）は、アゾール系抗真菌剤（FLCZ, ITCZ）に耐性を示すカンジダ属の真菌に感染した本種から飼育個体群に飛沫感染が起こることや、その真菌に汚染された飼育水を介して飼育個体群に感染が起こることも報告している。その他にも、Sidrim ら（67）はヒト、家畜、野生動物、水や陸環境を介して耐性菌が他個体へ感染することを報告し

ている。そのため本研究において、アゾール系抗真菌剤を投与する前の 1 頭 (No. 3) と投与していない 1 頭 (No. 7) から分離された ITCZ や VRCZ に耐性を示すカンジダ属の真菌 4 株 (分離株 No. 6, 10-12) は、飼育個体群あるいはその飼育環境下で蔓延し、感染した可能性が考えられた。

以上、本研究から、本種の飼育個体群 (やその飼育環境) において、アゾール系抗真菌剤 (ITCZ, VRCZ) に耐性を示すカンジダ属やアスペルギルス属の真菌が蔓延している可能性および隠蔽種、自然耐性株あるいは低感受性株が存在する可能性が示唆された。また、本種においてもアゾール系抗真菌剤 (ITCZ, VRCZ) の投与 (治療) により起因菌が耐性 (交差耐性を含む) を獲得する可能性が示唆された。そのため、より適切な抗真菌剤を選択するためにも呼気から分離された真菌の種同定と薬剤感受性試験を実施することが重要と考えられた。今後、本種においてアゾール系抗真菌剤 (ITCZ, VRCZ) を使用した呼吸器真菌感染症の治療をより効果的なものとし、また起因菌の耐性化を防止するためにも、ヒトと同様、アゾール系抗真菌剤 (ITCZ, VRCZ) の血中濃度と薬剤感受性試験によって得られた分離株の MIC 値 (例えば、血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) と分離株の MIC 値との比 (AUC/MIC)) を指標にして、その臨床効果を評価することが必要と考えられた。



表 3-1. ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) の個体および抗真菌剤の投与に関する情報とその分離株

対象個体 No.	性別	年齢 (歳) <sup>a)</sup>	臨床症状 <sup>b)</sup>	血液検査異常 <sup>c)</sup>	投薬 <sup>d)</sup>	採取日 <sup>e)</sup>	分離株 No.
1	メス	17	—	—	—	2013/08/07	1
		17	—	—	—	2013/08/07	2
		20	—	—	—	2016/06/06	3
2	メス	16	臭	SEG	ITCZ <sup>f)</sup> (83, 16)	2013/08/07	4
		19	—	—	—	2016/06/14	5
3	メス	19	臭, 熱	SEG, FIB, ESR	ITCZ (24, -2)	2016/05/27	6
4	メス	3	臭, 熱	SEG, FIB, ESR	VRCZ <sup>g)</sup> (54, -109)	2017/08/04	7
5	メス	16-17	臭, 熱, 痰	WBC, SEG, FIB, ESR	VRCZ (139, 139)	2017/08/16	8
6	メス	22	臭, 熱, 痰	WBC, SEG, FIB, ESR	VRCZ (112, +9)	2017/08/10	9
7	メス	11-14	—	—	—	2013/08/07	10
		11-14	—	—	—	2013/08/07	11
		11-14	—	—	—	2013/08/07	12
		14-17	—	—	—	2016/05/27	13
8	メス	19	臭, 痰	SEG, FIB, ESR	VRCZ (256, 199)	2015/05/07	14
9	メス	15-16	臭, 熱, 痰	WBC, SEG, FIB, ESR	VRCZ (134, 32)	2016/12/13	15
10	オス	2 か月	臭, 熱, 痰	WBC, SEG, FIB, ESR	VRCZ (86, -4)	2016/10/24	16
11	オス	17	臭, 熱, 痰	WBC, SEG, FIB, ESR	VRCZ (46, +38)	2014/06/12	17
12	メス	14-17	臭, 熱, 痰	WBC, SEG, FIB, ESR	VRCZ (220, 140)	2015/05/10	18
13	メス	14-17	臭, 熱, 痰	WBC, SEG, FIB, ESR	VRCZ (66, -11)	2015/05/09	19
14	オス	21	臭, 痰	WBC, SEG, FIB, ESR	ITCZ (31, +42)	2016/06/12	20

a) 呼気採取時の年齢を示す ; No. 4, 10 以外は推定年齢 ; 推定年齢は野生捕獲時の体長から算出。

- b) 抗真菌剤投与前の臨床症状を示す； 臭：甘い呼気臭（真菌感染を示唆する臭い（私信））； 熱：発熱；  
痰：痰の排出。
- c) 抗真菌剤投与前の血液検査異常を示す； **SEG, FIB, WBC**：それぞれ分葉核好中球数，フィブリノー  
ゲン，総白血球数の増加； **ESR**：赤血球沈降速度の亢進。
- d) 括弧内の数字は抗真菌剤の投与日数と呼気採取時の日数を示す； -：投与前； +：投与後。
- e) 数字は呼気採取日（年/月/日）を示す。
- f) イトラコナゾール。
- g) ボリコナゾール。

表 3-2. 分離株の菌種と E テストによるイトラコナゾールあるいはボリコナゾールに対する最小発育阻止濃度

分離株 No.	菌種	最小発育阻止濃度 (μg/ml)	
		イトラコナゾール	ボリコナゾール
1	<i>Candida albicans</i>	0.032	0.003
2	<i>Candida albicans</i>	0.047	0.008
3	<i>Candida albicans</i>	0.047	0.012
4	<i>Candida albicans</i>	0.023	0.008
5	<i>Candida albicans</i>	0.19	0.125
6	<i>Candida albicans</i>	> 32	> 32
7	<i>Candida tropicalis</i>	0.25	0.125
8	<i>Candida tropicalis</i>	> 32	> 32
9	<i>Candida tropicalis</i>	> 32	> 32
10	<i>Candida glabrata</i>	2.0	0.047
11	<i>Candida glabrata</i>	1.5	0.064
12	<i>Candida glabrata</i>	1.5	0.064
13	<i>Candida glabrata</i>	0.19	0.023
14	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.25	0.094
15	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.047	0.064
16	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.75	0.025
17	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.75	0.64
18	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.25	0.064
19	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.25	0.047
20	<i>Aspergillus niger</i>	1.0	> 32

## 総 括

近年、国内の水族館等の飼育施設においては、ハンドウイルカを野生から入手することができなくなり、その飼育頭数は年々、減少している。また、本種ではカンジダ属やアスペルギルス属の真菌を主な起因菌とする呼吸器感染症の罹患率が高いことが知られている。そのため、現飼育個体群を健康に長期間飼育するためには、ヒトと同様、使用する抗真菌剤の起因菌に対するスペクトル、使用する抗真菌剤に対する起因菌の感受性（耐性）の有無、および使用する抗真菌剤の副作用リスクを十分に考慮した適切な呼吸器真菌感染症の治療が必要となる。また、本種の飼育頭数を繁殖により維持、確保するためには、妊娠、授乳中の母獣においても同様、適切な呼吸器真菌感染症の治療が必要となる。そこで、本種において以下の研究を実施した。

第 1 章では、呼吸器真菌感染症が認められた本種に対して MCFG を静脈内投与することの安全性（副作用）について評価した。その結果、本種に MCFG を投与することで体温低下や白血球減少症を伴う副作用が生じることを示した。副作用が生じた直接の原因や発生メカニズムについては不明であった。これにより、本種に MCFG を投与する必要性がある場合、定期的に体温や白血球数をモニタリングすることの重要性が示唆された。また、本種に MCFG を投与することで AST 値が増加することを示した。これにより、AST 値をあわせてモニタリングすることの重要性も示唆された。本章では、副作用が生じたため MCFG の投与を中断したことに加え、投与例数が 1 例であったことから、本種の呼吸器真菌感染症に対する MCFG の治療効果や安全性を十分に評価することができなかった。そのため今後、本種において MCFG がより効果的かつ安全に使用

できるよう、症例数を蓄積することや、本種における MCFG の薬物動態を把握することが必要と考えられた。

第 2 章では、呼吸器真菌感染症が認められた妊娠、授乳中の母獣に対して実施した VRCZ の経口投与により、胎盤、乳汁を介した胎仔、仔獣への VRCZ の移行性や、妊娠、授乳中の母獣へ VRCZ を投与することによる母獣と仔獣の安全性(副作用)について評価した。妊娠期間中に VRCZ を投与した母獣から出産直後に採取した臍帯血や、同じく出産直後に採取したその仔獣の血液からそれぞれ VRCZ を検出したことで、本種において VRCZ が胎盤(臍帯血)を介して胎仔に移行することを初めて明らかにした。また、妊娠 7 か月目の母獣に VRCZ を投与したが、母獣やその仔獣に副作用は認められなかった。一方、妊娠 5 か月目の母獣に VRCZ を投与したところ、母獣に副作用は認められなかったが、その仔獣に脊椎彎曲が認められた。妊娠期間中の母獣に VRCZ を投与したことで脊椎彎曲との因果関係は不明であった。これにより、妊娠期間中の母獣に VRCZ を投与する必要がある場合、母獣の血漿 VRCZ 濃度をモニタリングしながら妊娠 7 か月目以降に投与すること、および投与によって得られるメリット(治療効果)とデメリット(副作用)を十分に評価することの重要性が示唆された。さらに本章では、授乳期間中に VRCZ を投与した母獣から採取した乳汁や、その乳汁を人工哺育のために給与した、あるいは飲んだ仔獣の血液からそれぞれ VRCZ を検出したことで、本種において VRCZ が乳汁を介して仔獣に移行することを初めて明らかにした。授乳期間中の母獣に VRCZ を投与したが、母獣やその仔獣に副作用は認められなかった。乳汁 VRCZ 濃度が同時に採取した母獣の血漿 VRCZ 濃度よりも高値であること、および乳汁中と血漿中の VRCZ 濃度の比 ( $1.66 \pm 0.27$ , 平均値 $\pm$ 標準偏差値,  $n=134$ ) がヒト (1.0) よりも高値で

あることを示した。これにより、本種ではヒトよりも VRCZ が乳汁中へ移行しやすいこと、また、その移行性の違いは、本種とヒトにおける乳汁成分の違い（本種の乳汁中脂肪含有率はヒトよりも高値）や VRCZ の高脂溶性が関与している可能性が示唆された。授乳期間中の母獣の血漿 VRCZ 濃度と乳汁 VRCZ 濃度がヒトの治療有効濃度域かそれよりも高濃度域で推移しているにも関わらず、仔獣の摂餌量 (kcal) が増加（あるいは吸乳量が低下）するにつれて仔獣の血漿 VRCZ 濃度が徐々に低下することを示した。これにより、母獣の血漿 VRCZ 濃度（あるいは乳汁 VRCZ 濃度）や仔獣の摂餌量（あるいは吸乳量）次第で、仔獣に VRCZ が蓄積する可能性、およびその蓄積により VRCZ の副作用が仔獣に生じる可能性が示唆された。また今後、授乳期間中の母獣に VRCZ を投与する必要がある場合、母獣だけではなく仔獣についても血漿 VRCZ 濃度やその副作用をモニタリングすることの重要性が示唆された。

第 3 章では、本種の呼気から分離されたカンジダ属やアスペルギルス属の真菌の種やアゾール系抗真菌剤 (ITCZ, VRCZ) に対する分離真菌の感受性 (耐性) の有無について評価することを目的とし、分離真菌の種同定と薬剤感受性試験を実施した。14 頭の呼気から合計 5 種、20 株の真菌 (*C. albicans* が 6 株, *C. tropicalis* が 3 株, *C. glabrata* が 4 株, *A. fumigatus* が 6 株, *A. niger* が 1 株) を分離した。アゾール系抗真菌剤 (ITCZ あるいは VRCZ) を投与した後の 8 頭から分離した真菌 8 株のうち 2 株 (ともに *C. tropicalis*) は ITCZ と VRCZ の両方に対して、1 株 (*A. niger*) は VRCZ に対してそれぞれ耐性を示した。アゾール系抗真菌剤 (ITCZ あるいは VRCZ) を投与する前と投与していない 7 頭から分離した真菌 12 株のうち 1 株 (*C. albicans*) は ITCZ と VRCZ の両方に対して、3 株 (すべて *C. glabrata*) は ITCZ に対してそれぞれ耐性を示

し、また3株 (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*) は ITCZ に対して低感受性を示した。これにより、本種においてアゾール系抗真菌剤 (ITCZ, VRCZ) を投与 (治療) する場合、起因菌が耐性 (交差耐性を含む) を獲得する可能性、および本種の飼育個体群やその飼育環境においてアゾール系抗真菌剤 (ITCZ, VRCZ) に耐性 (自然耐性を含む) あるいは低感受性を示すカンジダ属やアスペルギルス属の真菌 (隠蔽種を含む) が蔓延している可能性が示唆された。また、より適切な抗真菌剤を選択するために分離真菌の種同定と薬剤感受性試験を実施することの重要性も示唆された。今後、本種においてアゾール系抗真菌剤 (ITCZ, VRCZ) を使用した呼吸器真菌感染症の治療をより効果的なものとし、また起因菌の耐性化を防止するためにも、ヒトと同様、アゾール系抗真菌剤 (ITCZ, VRCZ) の血中濃度と薬剤感受性試験によって得られた分離株の MIC 値 (例えば、AUC/MIC) を指標にして、その臨床効果を評価することが必要と考えられた。

本研究により得られた知見は今後、妊娠、授乳中を含む本種の呼吸器真菌感染症を適切に治療するための非常に有益な基礎データとなるだけでなく、現飼育個体群を健康に長期間飼育すること、および繁殖により飼育頭数を維持、確保することに大きく貢献し得ると考えられた。

## 謝 辞

本論文を終えるにあたり，ご指導，ご鞭撻ならびに本論文のご審査を賜りました国立大学法人 東海国立大学機構 岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 食品環境衛生学研究室 教授 猪島 康雄 博士に深甚なる感謝の意を表します。

本論文のご審査を賜りました国立大学法人 北海道国立大学機構 帯広畜産大学 原虫病研究センター 高度診断学分野 教授 横山 直明 博士，国立大学法人 岩手大学 農学部 共同獣医学科 小動物外科学研究室 准教授 福井 大祐 博士，国立大学法人 岩手大学 農学部 共同獣医学科 小動物病態診断学研究室 教授 山崎 真大 博士，国立大学法人 東京農工大学 農学部 共同獣医学科 獣医薬理学研究室 准教授 佐々木 一昭 博士，国立大学法人 東海国立大学機構 岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 獣医内科学研究室 准教授 西飯 直仁 博士，国立感染症研究所 獣医科学部 部長 前田 健 博士に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり，分離真菌の種同定と薬剤感受性試験ならびに論文執筆のご指導を賜りました日本大学 生物資源科学部 獣医学科 獣医臨床病理学研究室 准教授 加納 暁 博士に深謝いたします。終始，多大なご指導とご助言を賜りました鴨川シーワールド 獣医師 勝俣 悦子 博士，沖縄美ら海水族館 獣医師 植田 啓一 博士，米国シーワールド 獣医師 Todd Schmitt 氏に謹んで感謝の意を表します。ハンドウイルカ国内血統登録に関する情報提供を賜りました公益社団法人 日本動物園水族館協会に心から謝意を表します。終始，本研究へのご理解とご指導を賜りました名古屋港水族館 前館長 日登 弘 博士，館長 栗田 正徳 氏，飼育展示部長 春日井 隆 博士に心から謝意を表します。終始，本研究へ



のご理解とハンドウイルカの治療や検体採取にご尽力をいただきました  
名古屋港水族館 飼育展示第二課 課長 阿久根 雄一郎 氏をはじめ第一  
係, および衛生管理担当の皆様にご心から謝意を表します。そして最後に,  
すべての検体提供をいただきましたハンドウイルカ達に感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Aikawa, N., Kusachi, S., Oda, S., Takesue, Y. and Tanaka, H. (2008). Clinical effects of micafungin, a novel echinocandin antifungal agent, on systemic fungal infections in surgery, emergency, and intensive-care medicine; Evaluation using the AKOTT algorithm. *Jpn. J. Chemother.* 56, 330–343.
- 2) Alves, R. C., Borges, I. L., Dutra, V., Junior, F. G., Miranda-Neto, E. G., Dantas, A. F. M., Riet-Correa, F. and Galiza, G. J. N. (2018). Systemic infection by *Aspergillus flavus* in a mare. *Acta. Sci. Vet.* 46, 345.
- 3) Arendrup, M. C., Mavridou, E., Mortensen, K. L., Snelders, E., Frimodt-Møller, N., Khan, H., Melchers, W. J. G. and Verweij, P. E. (2010). Development of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy associated with change in virulence. *PLoS One.* 5, e10080.
- 4) Belleste, B., Raberin, H., Morel, J., Flori, P., Hafid, J. and Manh Sung, R. T. (2010). Acquired resistance to voriconazole and itraconazole in a patient with pulmonary aspergilloma. *Med. Mycol.* 48, 197–200.
- 5) Berta, A. (2016). 世界のクジラ・イルカ百科図鑑, 第1版., p. 182. 株式会社 河出書房新社, 東京.
- 6) Brooks, I. J., Walton, S. A., Shmalberg, J. and Harris, A. (2018). Novel treatment using topical malachite green for nasal phaeohyphomycosis caused by a new *Cladophialophora* species in

- a cat. *J. Feline. Med. Surg. Open Rep.* 1–7.
- 7) Brown, J. D., Lim, L. I. and Koning, S. (2014). Voriconazole associated torsades de pointes in two adult patients with haematological malignancies. *Med. Mycol. Case. Rep.* 4, 23–25.
  - 8) Buck, J. D., Wells, R. S., Rhinehart, H. L. and Hansen, L. J. (2006). Aerobic microorganisms associated with free-ranging bottlenose dolphins in coastal Gulf of Mexico and Atlantic Ocean waters. *J. Wildl. Dis.* 42, 536–544.
  - 9) Bunskoek, P. E., Seyedmousavi, S., Gans, S. J. M., van Vierzen, P. B. J., Melchers, W. J. G., van Elk, C. E., Mouton, J. W. and Verweij, P. E. (2017). Successful treatment of azole-resistant invasive aspergillosis in a bottlenose dolphin with high-dose posaconazole. *Med. Mycol. Case. Rep.* 16, 16–19.
  - 10) Camps, S. M. T., van der Linden, J. W. M., Li, Y., Kuijper, E. J., van Dissel, J. T., Verweij, P. E. and Melchers, W. J. G. (2012). Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of the literature. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 56, 10–16.
  - 11) Cantón, E., Espinel-Ingroff, A. and Pemán, J. (2009). Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 7, 107–119.
  - 12) Chan, O. S., Mukherjee, J., Kinoshita, R. E. and Yuen, C. S. (2001). Microbial flora of blowhole samples in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus aduncus*-type) in Hong Kong, 1993-2000. *In: 32nd Annual International Association for Aquatic Animal*

Medicine Conference Proceedings, pp. 24–25. Tampa.

- 13) Cozzi, B., Huggenberger, S. and Oelschläger, H. (2017). *Anatomy of Dolphins: Insights into Body Structure and Function*, 1st ed., p. 389. Elsevier, Amsterdam.
- 14) Delaney, M. A., Terio, K. A., Colegrove, K. M., Briggs, M. B. and Kinsel, M. J. (2013). Occlusive fungal tracheitis in 4 captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Vet. Pathol.* 50, 172–176.
- 15) Dold, C., Deaver, A., Gearhart, S., Croft, L. and McBain, J. (2008). Development and use of a “pool-side” nebulized drug delivery system for bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *In: 39th Annual International Association for Aquatic Animal Medicine Conference Proceedings*, pp. 160–161. Pomezia.
- 16) Eichelberger, L., Fetcher, E. S. Jr., Geiling, E. M. K. and Vos, B. J. Jr. (1940). The composition of dolphin milk. *J. Biol. Chem.* 134, 171–176.
- 17) European Medicines Agency. (2011). Mycamine: EPAR summary for the public. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/mycamine-epar-summary-public\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/mycamine-epar-summary-public_en.pdf). [accessed on February 15, 2018].
- 18) Ferrier, K. R. M., van Elk, C. E., Bunskoek, P. E. and van den Broek, M. P. H. (2017). Dosing and therapeutic drug monitoring of voriconazole in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Med. Mycol.* 55, 155–163.
- 19) Frère, C. H., Krzyszczyk, E., Patterson, E. M., Hunter, S., Ginsburg, A. and Mann, J. (2010). Thar she blows! A novel method

for DNA collection from cetacean blow. PLoS One. 5, e12299.

- 20) Fujita, S. (2007). Measurement of the minimal inhibitory concentrations and minimal fungicidal concentrations of antifungal agents against *Candida* strains isolated from blood cultures. Jpn. J. Chemother. 55, 257–267.
- 21) Furukawa, S., Kuroda, Y. and Sugiyama, A. (2014). A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. J. Toxicol. Pathol. 27, 11–18.
- 22) Gubbins, P. O., McConnell, S. A. and Amsden, J. R. (2005). Antifungal agents. *In*: Piscitelli, S. C. and Rodvold, K. A. [eds] Drug Interactions in Infectious Diseases, 2nd ed., pp. 289–337. Humana Press, Totowa.
- 23) Gupta, A. and Dadhich, J. P. (2007). Maternal medication and breastfeeding. J. Neonatol. 21, 10–12.
- 24) Hashimoto, A., Hagiwara, D., Watanabe, A., Yahiro, M., Yikelamu, A., Yaguchi, T. and Kamei, K. (2017). Drug sensitivity and resistance mechanism in *Aspergillus* section *Nigri* strains from Japan. Antimicrob. Agents. Chemother. 61, e02583–16.
- 25) Haulena, M. and Schmitt, T. (2018). Anesthesia. *In*: Gulland, F. M. D., Dierauf, L. A. and Whitman, K. L. [eds] CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, 3rd ed., pp. 567–606. CRC Press, Boca Raton.
- 26) Hayashi, M. (2011). Medications in pregnancy and lactation: assessment of risk to fetus and infants. Organ. Biol. 18, 279–286.
- 27) Hayashi, M., Sato, K. and Kitagawa, H. (2010). Drugs in

Pregnancy, 2nd ed., pp. 3–18. Jiho, Tokyo.

- 28) Hinrikson, H. P., Hurst, S. F., Lott, T. J., Warnock, D. W. and Morrison, C. J. (2005). Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2092–2103.
- 29) Hotham, N. and Hotham, E. (2015). Drugs in breastfeeding. *Aust. Prescr.* 38, 156–159.
- 30) Howard, S. J., Harrison, E., Bowyer, P., Varga, J. and Denning, D. W. (2011). Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55, 4802–4809.
- 31) Hussain, A. F., Sulaiman, G. M., Dheeb, B. I., Hashim, A. J. and Seddiq, S. H. (2017). Improving conditions for gliotoxin production by local isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J. Biotechnol. Res. Cent.* 11, 14–24.
- 32) Iverson, S. J. (2007). Milk composition and lactation strategies across mammalian taxa: implications for hand-rearing neonates. *In: 7th Annual Zoo and Wildlife Nutrition Conference Proceedings*, pp. 1–7. Knoxville.
- 33) Izumikawa, K., Tashiro, M. and Kohno, S. (2013). Current status of drug-resistant *Aspergillus*: evolution of resistance and future. *Jpn. J. Chemother.* 61, 149–156.
- 34) Jenness, R. (1979). The composition of human milk. *Semin. Perinatol.* 3, 225–239.
- 35) Kakeya, H., Miyazaki, T., Miyazaki, Y. and Kohno, S. (2003).

- Azole resistance in *Candida* spp. Jpn. J. Med. Mycol. 44, 87–92.
- 36) Kano, R., Kawasaki, M., Mochizuki, T., Hiruma, M. and Hasegawa, A. (2012). Mating genes of the *Trichophyton mentagrophytes* complex. Mycopathologia. 173, 103–112.
- 37) Kano, R., Sakai, M., Hiyama, M. and Tani, K. (2019). Isolation of *Aspergillus caninus* (synonym: *Phialosimplex caninus*) from a canine iliac lymph node. Mycopathologia. 184, 335–339.
- 38) Kaplan, Y. C., Koren, G., Ito, S. and Bozzo, P. (2015). Fluconazole use during breastfeeding. Can. Fam. Physician. 61, 875–876.
- 39) 粕谷俊雄. (2011). ハンドウイルカ. *In*: 粕谷俊雄. [編者] イルカ-小型鯨類の保全生物学, 第1版., pp. 363–400. 財団法人 東京大学出版会, 東京.
- 40) 粕谷俊雄. (2011). イルカ追い込み漁業. *In*: 粕谷俊雄. [編者] イルカ-小型鯨類の保全生物学, 第1版., pp. 85–131. 財団法人 東京大学出版会, 東京.
- 41) Katsumata, E. (2010). Study on reproduction of captive marine mammals. J. Reprod. Dev. 56, 1–8.
- 42) King, C. T., Rogers, P. D., Cleary, J. D. and Chapman, S. W. (1998). Antifungal therapy during pregnancy. Clin. Infect. Dis. 27, 1151–1160.
- 43) Kohata, E., Kano, R., Akune, Y., Ohno, Y., Soichi, M., Yanai, T., Hasegawa, A. and Kamata, H. (2013). Environmental isolates of fungi from aquarium pools housing killer whales (*Orcinus orca*). Mycopathologia. 176, 403–408.
- 44) Kohno, S. (2005). Overview of voriconazole. Jpn. J. Chemother. 53,

1–3.

- 45) Kohno, S., Niki, Y., Amitani, R., Ogawa, K., Kurashima, A. and Miyazaki, Y. (2010). Clinical efficacy and safety of micafungin, a novel echinocandin antifungal drug, in pulmonary aspergillosis in a postmarketing setting. *Jpn. J. Chemother.* 58, 128–139.
- 46) 河野茂, 山口英世. (2002). ミカファンギン (MCFG) の概要. *日本化学療法学会雑誌* 50, 1–3.
- 47) Magill, S. S., Shields, C., Sears, C. L., Choti, M. and Merz, W. G. (2006). Triazole cross-resistance among *Candida* spp.: case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. *J. Clin. Microbiol.* 44, 529–535.
- 48) Mathew, J. L. (2004). Effect of maternal antibiotics on breast feeding infants. *Postgrad. Med. J.* 80, 196–200.
- 49) Matsumoto, K. (2012). The development of appropriate dosage of anti-bacterial and anti-fungal agents based on pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Yakugaku Zasshi.* 132, 1171–1177.
- 50) 溝井裕一. (2018). 「イルカ捕獲禁止」ショック. *In: 溝井裕一. [編者] 水族館の文化史 ひと・動物・モノがおりなす魔術的世界, 第1版., pp. 278–280. 勉誠出版 株式会社, 東京.*
- 51) 水野克己. (2013). 授乳中の女性に処方するときの注意点. *昭和学会誌* 73, 301–306.
- 52) Moriello, K. A. (1986). Ketoconazole: clinical pharmacology and therapeutic recommendations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188, 303–306.
- 53) Moudgal, V., Little, T., Boikov, D. and Vazquez, J. A. (2005).



Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49, 767–769.

- 54) O'Hara, T. M. and Hart, L. (2018). Environmental toxicology. *In*: Gulland, F. M. D., Dierauf, L. A. and Whitman, K. L. [eds] *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*, 3rd ed., pp. 297–317. CRC Press, Boca Raton.
- 55) Ostrea, E. M. Jr., Mantaring, J. B. 3rd. and Silvestre, M. A. (2004). Drugs that affect the fetus and newborn infant via the placenta or breast milk. *Pediatr. Clin. North. Am.* 51, 539–579.
- 56) Panchaud, A., Di Paolo, E. R., Koutsokera, A., Winterfeld, U., Weisskopf, E., Baud, D., Sauty, A. and Csajka, C. (2016). Safety of drugs during pregnancy and breastfeeding in cystic fibrosis patients. *Respiration.* 91, 333–348.
- 57) Pasternak, B., Wintzell, V., Furu, K., Engeland, A., Neovius, M. and Stephansson, O. (2018). Oral fluconazole in pregnancy and risk of stillbirth and neonatal death. *JAMA.* 319, 2333–2335.
- 58) Petermann, E. R., Townsend, F. I. Jr., Barger, P. C. and Newton, J. C. (2012). A retrospective look at a case of mucormycosis in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) treated with liposomal amphotericin B and monitored with serum ELISA levels. *In*: 43rd Annual International Association for Aquatic Animal Medicine Conference Proceedings, pp. 42–43. Atlanta.
- 59) Pfizer for professionals. (2018). VFEND Interview Form.

<https://pfizerpro.jp/documents/if/vfd/vfd01if.pdf>. [accessed on February 1, 2019].

- 60) Pilmis, B., Jullien, V., Sobel, J., Lecuit, M., Lortholary, O. and Charlier, C. (2015). Antifungal drugs during pregnancy: an updated review. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 14–22.
- 61) Quimby, J. M., Hoffman, S. B., Duke, J. and Lappin, M. R. (2010). Adverse neurologic events associated with voriconazole use in 3 cats. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 647–649.
- 62) Raghu, C. and Reagh, C. (2018). Novel treatment of disseminated coccidioidomycosis in a dog with voriconazole. *Case. Rep. in Vet. Med.* 1785748.
- 63) Reidarson, T. H., García-Párraga, D. and Wiederhold, N. P. (2018). Marine mammal mycoses. *In: Gulland, F. M. D., Dierauf, L. A. and Whitman, K. L. [eds] CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, 3rd ed., pp. 389–423. CRC Press, Boca Raton.*
- 64) Reidarson, T. H., Harrell, J. H., Rinaldi, M. G. and McBain, J. (1998). Bronchoscopic and serologic diagnosis of *Aspergillus fumigatus* pulmonary infection in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 29, 451–455.
- 65) Reidarson, T. H., McBain, J. F., Dalton, L. M. and Rinaldi, M. G. (2001). Mycotic diseases. *In: Dierauf, L. A. and Gulland, F. M. D. [eds] CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, 2nd ed., pp. 337–355. CRC Press, Boca Raton.*
- 66) Sandhu, R., Dahiya, S., Sayal, P. and Budhani, D. (2017). Increased role of nonalbicans *Candida*, potential risk factors, and

- attributable mortality in hospitalized patients. *J. Health Res. Rev.* 4, 78–83.
- 67) Sidrim, J. J. C., Carvalho, V. L., de Souza Collares Maia Castelo-Branco, D., Brilhante, R. S. N., de Melo Guedes, G. M., Barbosa, G. R., Lazzarini, S. M., Oliveira, D. C. R., de Meirelles, A. C. O., Attademo, F. L. N., da Bôaviagem Freire, A. C., de Aquino Pereira-Neto, W., de Aguiar Cordeiro, R., Moreira, J. L. B. and Rocha, M. F. G. (2016). Antifungal resistance and virulence among *Candida* spp. from captive *Amazonian manatees* and west Indian manatees: potential impacts on animal and environmental health. *EcoHealth*. 13, 328–338.
- 68) Šimůnek, J., Siddique, A. B. and Hegerová, E. (1978). Placental transfer of sulfamethazine in mice and rats. *Acta Vet. Brno.* 47, 145–151.
- 69) Sütçü, M., Acar, M., Genç, G. E., Kökçü, İ., Aktürk, H., Atay, G., Törün, S. H., Salman, N., Erturan, Z. and Somer, A. (2017). Evaluation of *Candida species* and antifungal susceptibilities among children with invasive candidiasis. *Turk. Pediatri. Ars.* 52, 145–153.
- 70) Sweeney, J. C., Stone, R., Campbell, M., McBain, J., Leger, J. S., Xitco, M., Jensen, E. and Ridgway, S. (2010). Comparative survivability of *Tursiops* neonates from three U.S. institutions for the decades 1990-1999 and 2000-2009. *Aquat. Mamm.* 36, 248–261.
- 71) Takahashi, H., Ueda, K., Itano, E. N., Yanagisawa, M., Murata,

- Y., Murata, M., Yaguchi, T., Murakami, M., Kamei, K., Inomata, T., Miyahara, H., Sano, A. and Uchida, S. (2010). *Candida albicans* and *C. tropicalis* isolates from the expired breathes of captive dolphins and their environments in an aquarium. *Vet. Med. Int.* 2010, 349364.
- 72) Tashiro, M. and Izumikawa, K. (2016). The current status of drug-resistant *Aspergillus*. *Med. Mycol. J.* 57J, J103–J112.
- 73) 伴野準一. (2015). 太地追い込み漁成立秘話. *In*: 伴野準一. [編者] イルカ漁は残酷か, 第1版., pp. 77–106. 株式会社 平凡社, 東京.
- 74) 伴野準一. (2015). 乱獲と生体ビジネスの始まり, 包囲網の形成. *In*: 伴野準一. [編者] イルカ漁は残酷か, 第1版., pp. 159–180. 株式会社 平凡社, 東京.
- 75) 伴野準一. (2015). イルカと水族館. *In*: 伴野準一. [編者] イルカ漁は残酷か, 第1版., pp. 181–203. 株式会社 平凡社, 東京.
- 76) Townsend, F. I., Smith, C. R. and Rowles, T. K. (2018). Health assessment of bottlenose dolphins in capture-release studies. *In*: Gulland, F. M. D., Dierauf, L. A. and Whitman, K. L. [eds] *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*, 3rd ed., pp. 823–833. CRC Press, Boca Raton.
- 77) Toyotome, T. (2016). Causative agents of aspergillosis including cryptic *Aspergillus* species and *A. fumigatus*. *Med. Mycol. J.* 57J, J149–J154.
- 78) Tsang, K. W., Kinoshita, R., Rouke, N., Yuen, Q., Hu, W. and Lam, W. K. (2002). Bronchoscopy of cetaceans. *J. Wildl. Dis.* 38, 224–227.

- 79) Vaideeswar, P., Chaudhari, J. and Goel, N. (2019). Fungal fibrosing mediastinitis in pregnancy: case report with review of literature. *J. Postgrad. Med.* 65, 52–55.
- 80) van Elk, C. E. (2007). Voriconazole dosage in bottlenose dolphins. *In: 38th Annual International Association for Aquatic Animal Medicine Conference Proceedings*, p. 245. Orlando.
- 81) van Elk, C. E., Gans, S. J. M. and Epping, N. (2006). A *Candida glabrata* bronchopneumonia treated with voriconazole in a *Tursiops truncatus*. *In: 37th Annual International Association for Aquatic Animal Medicine Conference Proceedings*, pp. 111–112. Nassau.
- 82) van Waeyenberghe, L., Baert, K., Pasmans, F., van Rooij, P., Hellebuyck, T., Beernaert, L., de Backer, P., Haesebrouck, F. and Martel, A. (2010). Voriconazole, a safe alternative for treating infections caused by the *Chrysosporium anamorph* of *Nannizziopsis vriesii* in bearded dragons (*Pogona vitticeps*). *Med. Mycol.* 48, 880–885.
- 83) Venn-Watson, S., Daniels, R. and Smith, C. (2012). Thirty year retrospective evaluation of pneumonia in a bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* population. *Dis. Aquat. Organ.* 99, 237–242.
- 84) Wells, R. S. and Scott, M. D. (2018). Bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, common bottlenose dophin. *In: Würsig, B., Thewissen, J. G. M. and Kovacs, Kit. M. [eds] Encyclopedia of Marine Mammals*, 3rd ed., pp. 118–125. Elsevier, London.
- 85) Yamaguchi, H. (2004). The current status and challenges for

antifungal susceptibility testing. *J. Jpn. Soc. Clin. Microbiol.* 14,  
129–145.