

沖縄美ら海水族館における展示動物-  
小型歯クジラ類の臨床

植田啓一

## 目 次

緒言	1
第 I 章 小型歯クジラ類に対する内科的アプローチ	
序文	3
第 1 節 検査方法の改良, 開発に関する研究	5
第 2 節 抗菌剤の血中濃度変化に関する研究	31
第 3 節 真菌感染症に関する研究	
飼育鯨類の真菌感染症例について	39
国内で初めて分子生物学的に診断されたラカジオーシス 2 症例	60
小括	91
第 II 章 小型歯クジラ類に対する外科学的アプローチ	
序文	92
第 1 節 外科手術に関する研究	93
第 2 節 人工尾びれプロジェクト	119
揚抗力測定	120
遊泳能力解析	128
QOL 改善のためのリハビリテーション	135
小括	149
総括	150
謝辞	153
引用文献	155

## 緒言

小型歯クジラ類，いわゆるイルカ類の飼育史は，紀元一世紀のローマ時代に始まったといわれている．海で野生個体を捕獲し，大型の水槽（オセアナリウム式の施設）で観客にその生態行動を見せる現在の飼育展示形態は，1938年アメリカのフロリダに最初に誕生した．我が国における鯨類の飼育・展示の歴史は，1930年に始まり，試行錯誤を繰り返しながら飼育技術の向上を図ってきたものの，「客観的データに基づく飼育動物の健康管理の実践」という意識の導入までにはかなりの時間を要した．1970年に鴨川シーワールドが開館し，シャチの導入をきっかけに飼育先進国であったアメリカとの交流が活発となり，一部の水族館でイルカやびれ脚類などの血液検査が実施され始め[19]，そこで蓄積したデータを飼育動物の健康管理にフィードバックするようになった．

現在日本では13種500頭以上にのぼるイルカ類が30館を超える施設で飼育展示されており，ショー運営のための飼育技術とともに，健康管理のための診断法や治療技術も向上している．現在ではイルカ自身に受診動作をさせるための日常訓練を実施し検査に伴うイルカと実施者との負担を最小限に抑える方法も進んできている[19]とは言え，鯨類は水中生活を営む大型哺乳動物であり，中・小型の陸上動物に実施するような保定や処置・管理が難しく，医療技術の導入に関しては，立ち後れていると言わざるを得ない．

このような状況を改善するために，著者らは，1996年より水族館の獣医師として飼育動物の疾病の確定診断に積極的に取り組み，その中でも大型の水生動物の治療に適した医療機器の導入および，メーカーと共同して内視鏡や超音波診断機器の改良を行い，積極的な治療を試みた．

内科学的治療においては，とくに，イルカ類や海牛類であるマナティの真菌学的検査，診断を行い [31]，太平洋地域では初症例となるラカ

ジオーシスの確定診断を行った。

またこれら内科学的アプローチと並んで、水族館では敬遠されがちな、外科的治療にも取り組んできた [38]。ウミガメの一種であるタイマイの嘴の整形や烏口骨骨折の内固定，ミナミバンドウイルカの背びれの裂創に対する成形手術，バンドウイルカの尾びれ成形手術，オキゴンドウの胴体背部銹摘出手術，シワハイルカの左頸部リンパ節摘出手術等がその例である。中でも，2002年10月，1頭のバンドウイルカの尾びれに発症した壊疽症例に対し，尾びれの約75%を切除するという水族館では極めてまれな外科的処置を行ったことは，その後多方面に渡る協力を得て世界初の「人工尾びれ」の開発にまで発展し，国内外に大きな反響をもたらした。この外科的症例に対しては，その後飼育員との共同作業によって補助装具としての人工尾びれを使った理学療法を試みた。症例の遊泳能力は著しく回復し，他個体との共棲，すなわち社会性を再獲得するに至っている。この試みは，水族館で飼育されている障害を負った展示動物であるイルカに対してのQOLの改善を施すという新たな概念を導入することになった。

本研究では，沖縄美ら海水族館において飼育されている展示動物としての小型歯クジラ類に関して，獣医臨床の立場から取り組んできた経緯について述べる。第一章では，内科的アプローチについて，各種検査方法，診断機器である内視鏡や超音波断層装置の改良開発に関する研究，真菌症感染症に関する研究について報告する。第二章では，外科的アプローチとして取り組んだ外科手術に関する研究，人工尾びれプロジェクトに関して述べる。また，それら経緯をふまえ，水族館の役割そして水族館の獣医師の果たすべき役割についても考察する。

## 第 I 章

### 小型歯クジラ類に対する内科的アプローチ

#### 序文

水族館での飼育しているイルカ類（小型歯クジラ類）を含む動物の治療のほとんどが抗菌剤の投与を中心とした内科学的アプローチである。その理由としては、各々の飼育動物種に対して施される検査が血液検査のみという場合が多いためであり、加えて国内における飼育頭数が限られているためデータが少ないことが挙げられる。また、我が国の水族館には臨床を専門に行う獣医師の数が圧倒的に少なかったという歴史的背景もある。水族館の飼育動物に対してより適切な治療を行うためには、血液検査だけでなく、細菌・真菌学的検査の他、種々の画像診検査を駆使して確定診断を導くべきであることは明白である。しかしながら、検査方法が確立しておらず、水中で生活する大型水棲動物であるための困難さから、これらの検査が実施されていなかった。

本研究では、内科的アプローチとして、①临床上重要な検査方法の改良、開発、②抗菌剤の血中濃度変化、③真菌感染症について 3 節に分けて報告する。

第 1 節の「検査方法の改良、開発」では、従来の血液検査、細菌学的検査、尿検査、糞便検査に加えて、画像診断を導入することで確定診断に基づいた治療方針を決定することを目指した。またそれぞれの検査に沿った受信動作訓練を取り入れることで、より低侵襲に健康管理を実施可能となった。受信動作訓練に伴い検査機器の改良や開発にも積極的に取り組んだ。その結果、動物への負担を減らすと共に、確定診断に基づいた適切な治療を施すことに成功したのでその概要について報告する。

第 2 節の「抗菌剤の血中濃度変化」では、イルカ類に対する適切な抗

菌剤の投与量を調査したので、その結果を報告する。そもそも感染症の治療には抗菌剤が多く用いられるが、動物種により薬物の吸収、分布、代謝および排泄が異なるにも関わらず、水族館での飼育鯨類の投与量はヒトや家畜への投与量の体重換算によって決められている場合が多い。

特に完全に水中生活に適応している鯨類は、臓器の構造、機能、生理値も陸上動物であるヒトや家畜と相違があるにも関わらず、これらに関する疑問を持ちつつも上記の投与方法を続けてきたのが現状である。

そのため抗菌剤の鯨類への投与に関して、現行のヒト、又は家畜用に定めた体重換算の適用の可否を探るためニューキノロン系抗菌剤一般名オルビフロキサシン Orbifloxacin(OBFX)の鯨類血中動態を調査し検討したので報告する。

第3節の「真菌感染症」では、近年国内の水族館で報告例が増加している鯨類の真菌感染症について報告する。全国の水族館で調査された「水族館における飼育鯨類の罹患症例」[40]によると、飼育感染症25%、不明75%といった報告があり、1990年代では真菌感染症に対する認識がほとんど無かったことが伺える。2001年にバンドウイルカの前胃真菌感染症の確定診断、治療に初めて成功し、それら感染症の原因が、広範囲抗菌薬使用による菌交代、耐性菌の発現、その他ストレス等による体力、免疫力の低下が関係していると推測された。そのため迅速に治療を行うために、現場に即した確定診断方法について実施に治療を行った症例の治療についての概要を記す。また沖縄美ら海水族館にて実施している外部診療の結果、新興真菌感染症の一種であるラカジオーシスが人畜を通じて初めて確認された。本症例は、大西洋沿岸地域に流行するヒトとイルカを宿主とする高度病原性真菌症の一種である。本症例を飼育している2園館より依頼を受けて、診断と治療を試み、臨床症状、病理組織学的検査および分子生物学的手法により日本近海の太平洋地域に特有な菌種によるラカジオーシスと診断したので報告する。

## 第 1 節

### 検査方法の改良，開発に関する研究

イルカ類は生活史が水中であるために，健康管理に必要な日常のルーチン検査はプールサイド，プール底，プール内の浅瀬，水中などの水場で実施することが殆どである．実際に当館では，採血，呼気採集や体温測定の外に画像診断のための検査などを積極的に導入している（図 1）．そのために採血や多くの検査や治療をプールサイドで行っている（図 2）．また様々な器材，器機は，防水加工を施したケースに入れるなどの工夫をしなければ使用することすら出来ない．

また，彼らの体躯は分厚い脂肪層に覆われている上に，体躯断面が円型である．さらに上部消化器官においては，口腔から咽頭，食道上部，食道下部，前胃（第一胃），主胃（第二胃），幽門胃（第三胃）の順に続き，種によってそれぞれの湾曲の程度や幽門の位置も異なっている．

そのため高度医療機器を用いた画像診断検査を行うためには受信動作訓練の導入，検査機器や検査手技をイルカ類に使用するために改良や開発が必要であった．

ここでは確定診断に有効である内視鏡検査，X線検査と CT 検査，超音波画像診断検査について手技と機器の改良開発について報告する．

#### 【受信動作訓練】

受信動作訓練は，動物に行う検査や治療を円滑に実施するために，類似動作や類似道具を使用して動物を馴致させることである．本訓練は，対象動物，検査や治療方法によってトレーニングの内容や訓練期間が異なる（表 1）．沖縄美ら海水族館では，検温，採血，胃内容液の採取などのために受信動作訓練を行っていた経緯があった．更に医療技術の積極的な導入を行うためには，受信動作訓練が必須であった．

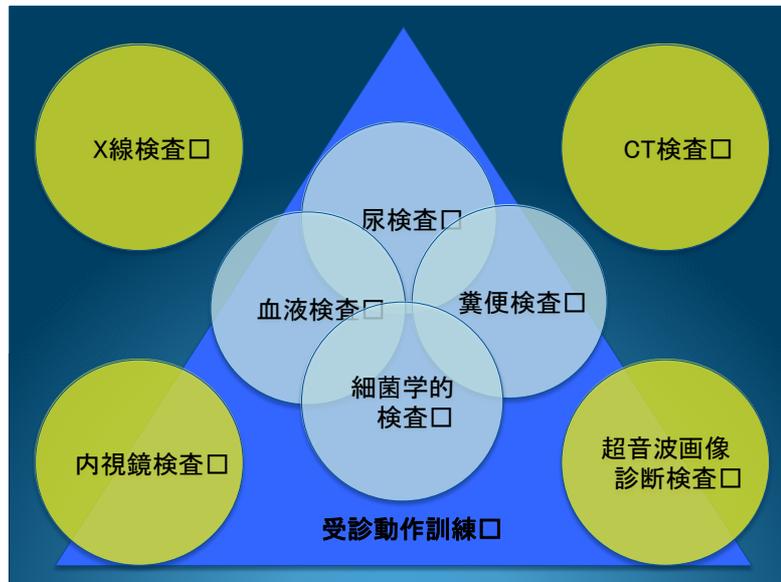


図 1. 沖縄美ら海水族館の診療モデル



図 2. プールサイドでの受診動作訓練による採血

表 1. 受信動作訓練期間

種目□	侵襲性□	期間(日)□
呼気採取□	-□	14-30□
検温□	+ □	14-30 □
排尿□	-□	14-60 □
採血□	++□	30-90□
静脈注射□	++□	60-120□
内視鏡検査□	+ □	60-90□
超音波画像診断検査□	-□	14-30□
保定器具のランディング□	-□	14-30□

## 【内視鏡検査】

体長が 2-3m のミナミバンドウイルカ、カマイルカ、バンドウイルカに対しては、全長 2200mm、挿入プローブ外径 11.2mm、鉗子チャンネル内径 2.8mm、ファイバー先端の湾曲上下角度 180 度及び左右角度 160 度の操作機能をもった電子内視鏡（VQ-1123A, Olympus Ves, 東京）を使用している。また体長が 3m を超えるオキゴンドウでは、全長 3000mm、挿入プローブ外径 8.6mm、鉗子チャンネル内径 2.8mm、ファイバー先端の湾曲上下角度 210 度、90 度及び左右角度 100 度の操作機能をもった電子内視鏡（VQ-8303A, Olympus Ves, 東京）を改良し、挿入プローブ外径を 11.2mm にしたものを使用している（図 3）。

検査は、飼育個体であるミナミバンドウイルカ、バンドウイルカ、カマイルカ、オキゴンドウを対象に実施している。検査を行う際には、異物誤嚥などの緊急の場合をのぞいて、検査前 12 時間以上絶食させた状態で行う。バンドウイルカとカマイルカでは、プール内の海水を落水した状態か、クレーンにてプール外に搬出した後、専用担架に載せて浸水スポンジとタオルで体表を覆い、ベルトによる保定を行う。この保定法では 1 回の内視鏡挿入につき 5-20 分の観察が可能で、3-5 回繰り返し実施できる（図 4） [5]。

特にミナミバンドウイルカとオキゴンドウでは、事前に 10 日前後の内視鏡挿入の疑似訓練を行うことで、短時間ではあるが無保定で内視鏡観察が可能となった。訓練は内視鏡プローブに見立てたホースや不要になった内視鏡プローブを用いて給餌しながら検査に対する馴致を行うものである。訓練完成時期には、飼育員の合図により水中で立位の状態で静止させて内視鏡を挿入する方法や（図 5）、ショーステージ上に乗り上げた状態（ランディング）で検査する無保定方法での観察が可能となった（図 6）。検査時間は、1 回の挿入につきおおよそ、水中立位で 10 分、ランディングで 5 分である。この方法では、食道から前胃、そして主胃

開口部の観察の他に餌料種の消化速度の観察が可能である。

内視鏡の操作に関しては、内視鏡を実際に操作し観察する検査者と内視鏡を挿入する助手との2名で行う。助手は被検動物の飼育担当者があたり、動物の状態により観察中止の合図を出す。内視鏡検査保護用のバイトブロックを吻部に装着し、バイトブロック中央の挿入孔よりプローブを挿入し、咽頭、食道、前胃、主胃の順に観察を行う。野外での観察が主となるので、日差しによりモニター画像が見えにくいことがあるため、検査者は内視鏡走査画面が常に観察出来るように内視鏡用眼鏡（アイトレック, Olympus, 東京）を使用することで対応している [5]。



図 3. 内視鏡用スコープ沖縄モデル



図 4. 保定台に載せてのイルカの内視鏡検査



図 5. 水中で立位の状態で静止させて内視鏡を挿入する方法

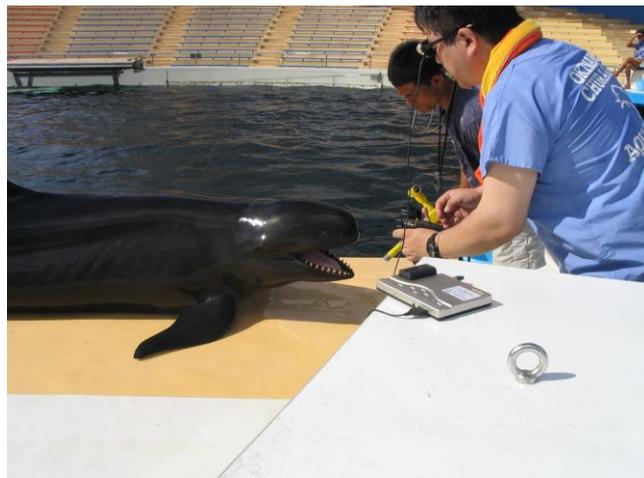


図 6. ショーステージ上に乗り上げた状態での検査方法

## 【X線検査】

イルカ類にX線検査を実施することは、動物をプール外に出して撮影を行うという非常に制約が厳しい検査であることから、水族館では永らく敬遠されてきた。また体躯の断面が円く厚みがあるため、ヒトやイヌやネコなどでの撮影距離であるカセットから管球までの距離が100cmという基本的な条件では、診断に必要な写真を撮影することは出来ない。しかしながらウミガメの烏甲骨骨折手術やイルカの誤嚥、呼吸器疾患の診断、治療を経験していく段階でX線検査が必要不可欠であることを認識したため、著者らは、積極的にイルカをプール外に搬出し、様々な条件にてX線検査が可能であるか否かの調査を実施した。

### ・撮影機器

動物の移送等の負担を考えると、イルカを対象とした撮影の際に、ヒトや伴侶動物で行うような鉛板が埋蔵された専用の室内でのX線撮影方法は、ルーチンの検査には不向きである。そのためポータブルタイプ(回診用小型機器)でより多くの線量を出力できる機種を選ぶ必要がある。産業動物分野で使用されている、吊り下げ型の小型X線撮影機器は、線量が足りないことと、固定方法が下り下げの事のみであるため、イルカの側面方向からの撮影の際に非常にバランスがとりにくく不向きである。そのため、体長250cm、体重200kgのイルカを基本としたX線検査の撮影条件を構築した。

まずX線撮影器機であるが、プールに併設した施設を持たないものであれば、イルカ類をプール外に搬出して撮影することになるため、回診型の器機を選択しなければならない。国内で最も飼育頭数が多いバンドウイルカの体躯の最大幅が約60cmであることより、X線撮影管電圧は100kVp以上、撮影管電圧は60-200mAsを出力する器機を使用しなければならない。当館では回診用移動型X線撮影装置AMX-4plus(GEヘルスケア・ジャパン株式会社、東京)と更に出力の大きいMOBILETT XP Hybrid(シ

一メンス・ジャパン株式会社，東京)を用途にあわせて使用している(図7)．それらの器機の導入により，体長450cm，体重600kgのオキゴンドウの側面の撮影まで対応している．

#### ・撮影方法

イルカのX線撮影を行う上で，重要なのが散乱線を除去するグリッドの役割である．イルカの体躯の断面が丸い形をしているため，被写体が厚くなる．そのため散乱線の発生率が高くなるため，コントラストや鮮鋭度が低下し，不鮮明な画像となる(図8)．この問題を解消する為に頭部，胸部，腹部の撮影時にはグリッドを使用し，より診断に適した画像を得る必要がある．当財団では，10:1と12:1の2種類を撮影部位により使い分けている．またグリッドは歪みが生じると散乱線を的確に除去しないため，グリッドケース等に入れて使用する(図9)．

X線検査の撮影を行うにあたっては，水生動物であるイルカを野外の陸上で撮影するため，ヒトや陸上動物と同様な留意点と，異なる問題点をよく理解したい上で行わなければならない．

陸上動物と異なり，水生動物は陸上では負重がかかるため，低反発マットレス等の上におく事が必要となる．また撮影の間体表面が乾燥しないように水をかけるなどの処置が必要となる．撮影時間は，動物の状態を観察しながらではあるが，最長で30分程度とし撮影後は迅速にプール内に戻すものとする．個体によっては鎮静剤等の投与も考慮する必要があると考えられる．背腹側(DV)の撮影においては，イルカの体躯の厚みを考慮して，カセット(グリッド)から160-200cmとして撮影を行う．但しオキゴンドウの場合においては，現在腹背側の撮影は物理的理由で行われてはいない．側面側(LT)の撮影においては，イルカを保定台に乗せた状態で行うか，イルカを側臥位にしてカセットの上に保定するかのいずれの方法で行う(図10)．また肺野の診断を行う画像を得るには，呼吸した直後の撮影を行う必要がある．それ以外の部位については逆に

呼吸後の動きの少ないときを狙い撮影を行う。

またイルカの X 線検査を実施するにあたり、陸上動物と大きく異なる点はユニックなどのクレーンを使用してプールより外に出す作業を安全に行う事が不可欠となる。またイルカを撮影する際、放射能による被曝を避けるため半径 3m 以内に立ち入らないように境界線をもうける事、被曝する恐れがある位置にやむ終えず立ち入る際には、防護服の着用を徹底しなければならない。特に保定台を使用して側位側より撮影を行う際には、直接照射位置に入る為、絶対に防護服の着用を忘れてはならない。また撮影時においては、イルカを担架シートから出して、直接体にカセット（グリッド）を当てて行うようにして撮影を行う。担架シートなどが一緒に画像として取り込まれると、デジタル加工を行った際に診断において不必要な情報が入るため、読影が困難となる。バンドウイルカ以上のサイズとなると半切カセットでは左右の肺野を同時に撮影する事が困難であるために、左右片方ずつ撮影する事が望ましい。

バンドウイルカであれば肺野の撮影条件は、90-120kv、60-200mAs で鮮明な肺野や脊椎の写真を得ることができる。これらにより肺野像（図 11）、重度肺炎像（図 12）、異物誤飲像（図 13）、脊柱横突起変性像（図 14）の確定診断が可能となり、ルーチン検査として応用出来るようになった。



図 7. ポータブル X 線撮影器機

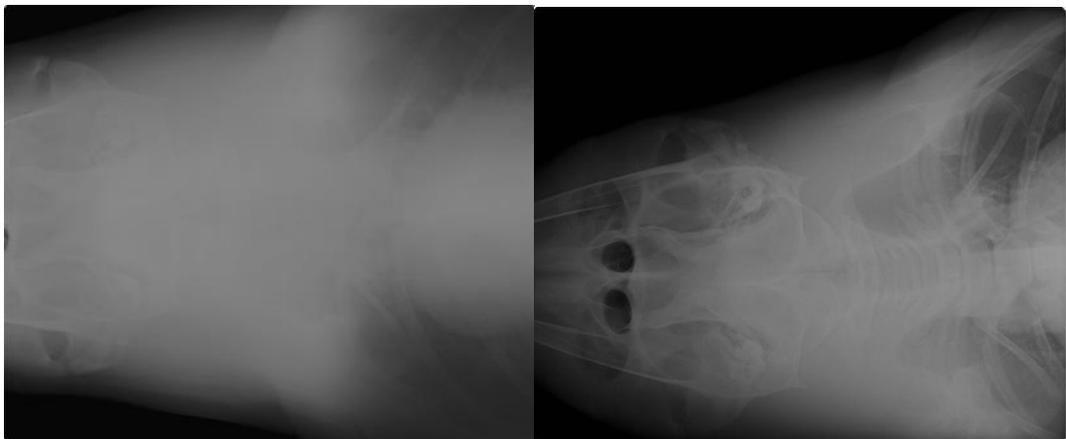


図 8. イルカの肺野の DV 像

左：グリッド無しの像，右：グリッド有りの像



図 9. 長尺カセット用のグリッドとグリッドケース



図 10. 側臥位での撮影風景

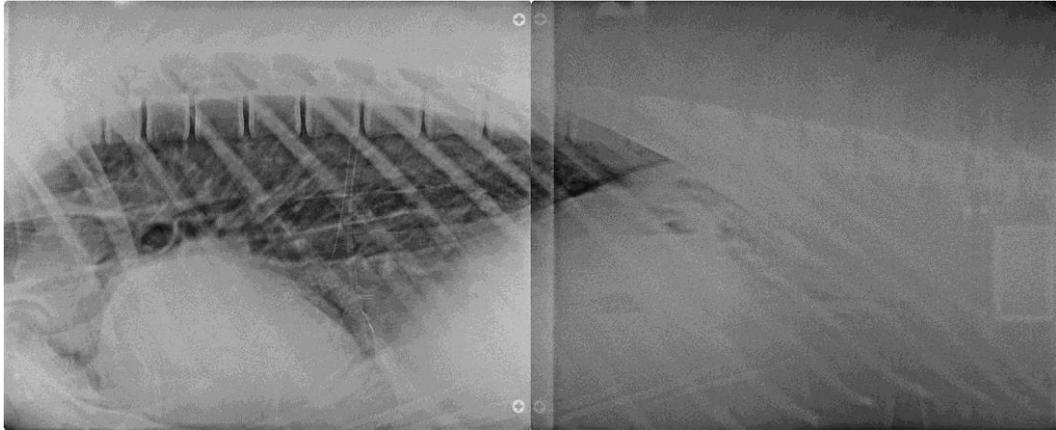


図 11. バンドウイルカの肺野 X 線像 (LT)



図 12. 重度肺炎症例の X 線像

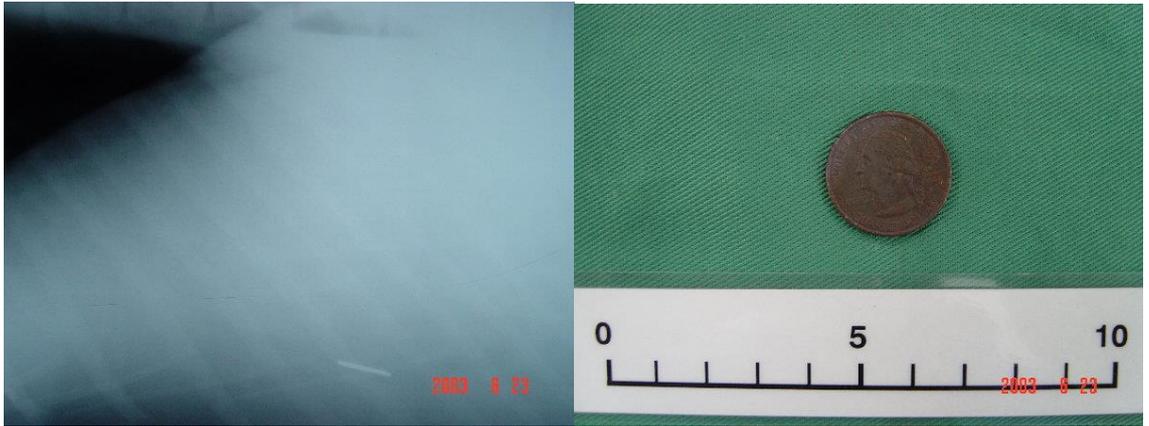


図 13. 異物誤飲したコインの X 線像と取り出されたコイン

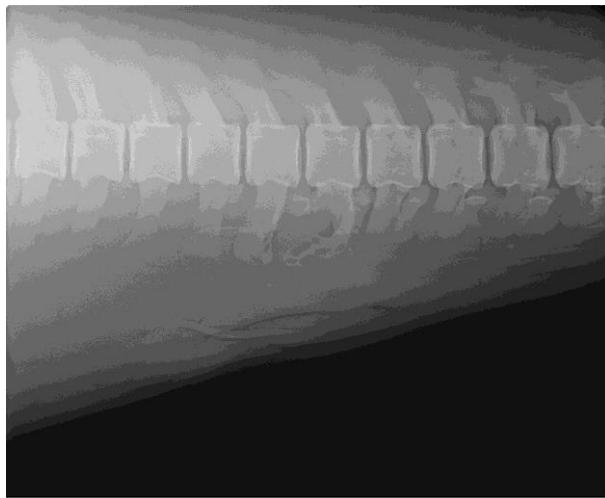


図 14. 横突起の骨変性 X 線像

### 【CT 線検査】

CT 検査器機は X 線検査では確定しにくい画像診断には非常に有益である。沖縄美ら海水族館では、SOMATOM Spirit（シーメンスジャパン，東京）を導入し，線量 130kv, 100mAs で撮影を行い，イルカの骨格（図 15），重度肺炎症例像（図 16）前述の *Aspergillus. sp* による肺炎症例のファンガスボール像（図 17）や脊柱横突起変性像の 3D 画像（図 18）を得ることができた。

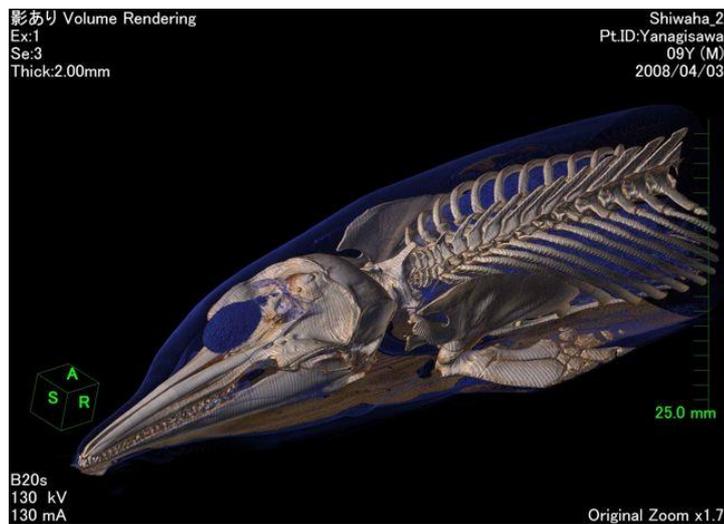


図 15. シワハイルカの頭部周辺の CT 画像

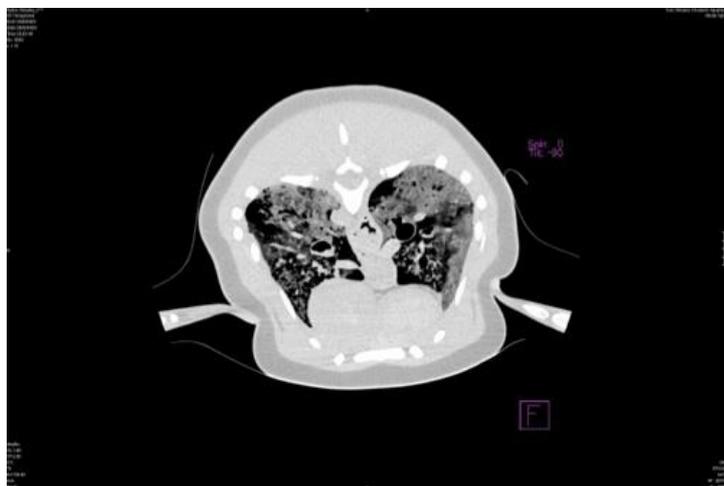


図 16. 重度肺炎症例 CT 像

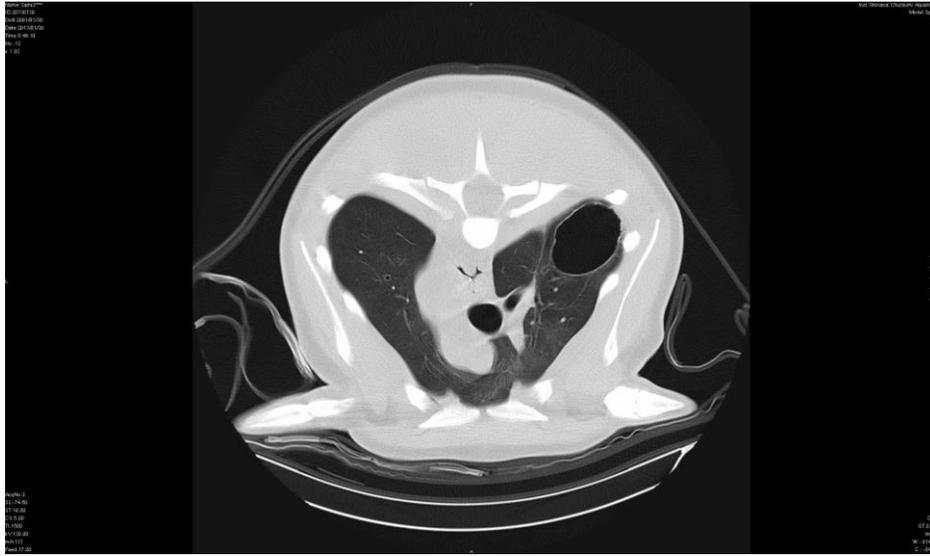


図 17. *Aspergillus. sp* による肺炎症例のファンガスボール像



図 18. 横突起の骨変性 CT 画像

### 【超音波画像診断検査】

90年代、国内に於ける海獣類の超音波画像診断検査の報告例は極めて少なく、特に鯨類のものは無かった。その理由としては検査装置を水のある現場近くにもっていけなかった事、装置が大型であった事、装置の取り扱い、画像診断に熟練性が必要だった事などが挙げられえる。しかし近年装置の小型化が進み、鯨類の飼育技術に伴う保定方法の上達、解剖学的な知見の蓄積等により以前からの問題点が徐々に解消されてきた（図 19）。そのため沖縄美ら海水族館では、県内の超音波認定技師、上江州安弘技師の協力を得て 2000 年末にバンドウイルカの胎児の妊娠成長過程を超音波画像診断装置で追うことに成功した。その後初期の妊娠確定、胎仔の運動状態、成育（図 20-21）を観察するだけでなく、胎仔の心臓の血流像の把握が出来た（図 22）。使用するプローブは診断部位に併せて 3.5MHz と 7.5MHz を使い分ける。特に 3.5MHz コンベックスが多くの臓器の初期診断に有効である。使用した機器は、SSD-900（ALOKA 社、東京）、 $\alpha$ -7（ALOKA 社、東京）と FAZONE-M（フジフィルムメディカル社、東京）であった。

主な診断部位としては、腎臓（図 23-a）、肝臓（図 23-b）、眼球（図 23-c）、心臓（図 23-d）、腸（図 23-e）、胃（図 23-f）である。

特に妊娠診断においては、子宮内での胎仔の口腔の開閉（図 24）や胎仔への母体からの血流を鮮明に捉えることに成功した（図 25）。また肝変成の状態（図 26）、腎盂腎炎（図 27）、イルカが誤嚥したスーパーボール像（図 28）を確定診断することも可能となった。



図 19. 受診動作訓練でのエコー検査



図 20. 妊娠初期の子宮内でのイルカ胎仔の様子

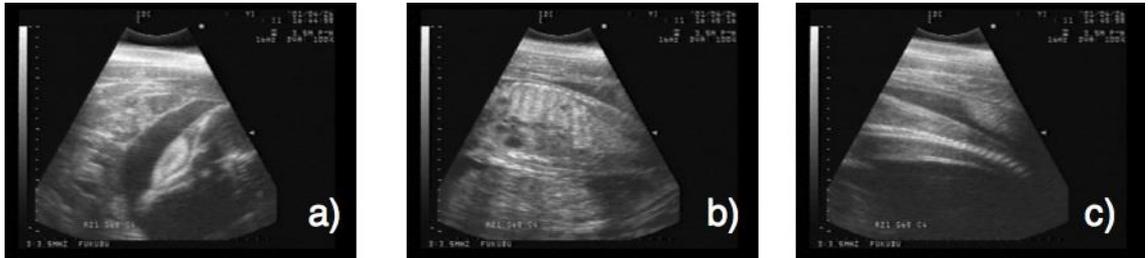


図 21. 子宮内でのイルカ胎仔の様子  
a) 頭部, b) 胸部と腹部, c) 尾部



図 22. 胎仔の大動脈弓の血流像

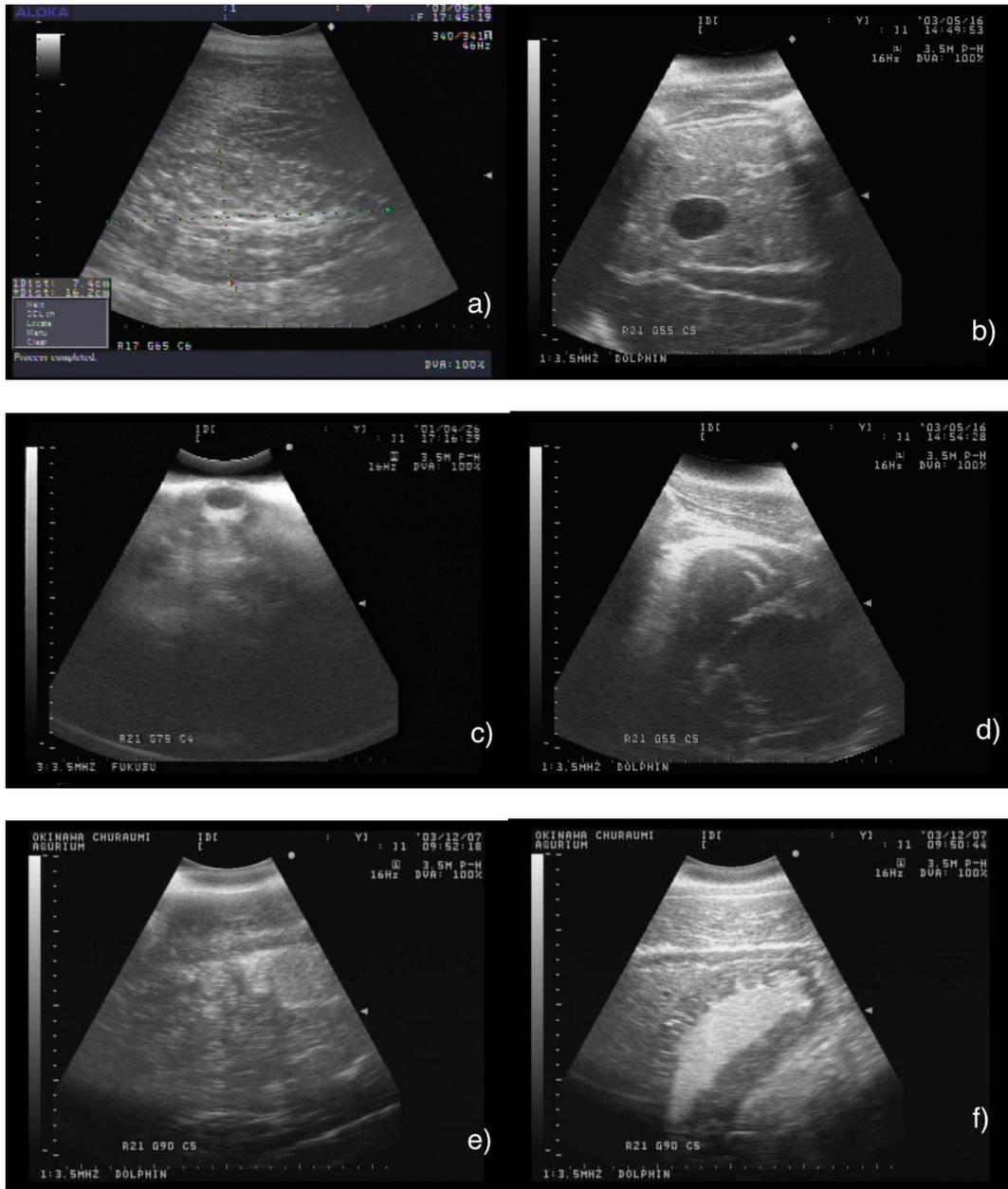


图 23. 超音波画像診断写真.

腎臓 (图 23-a), 肝臓 (图 23-b), 眼球 (图 23-c),  
心臓 (图 23-d), 腸 (图 23-e), 前胃 (图 23-f)

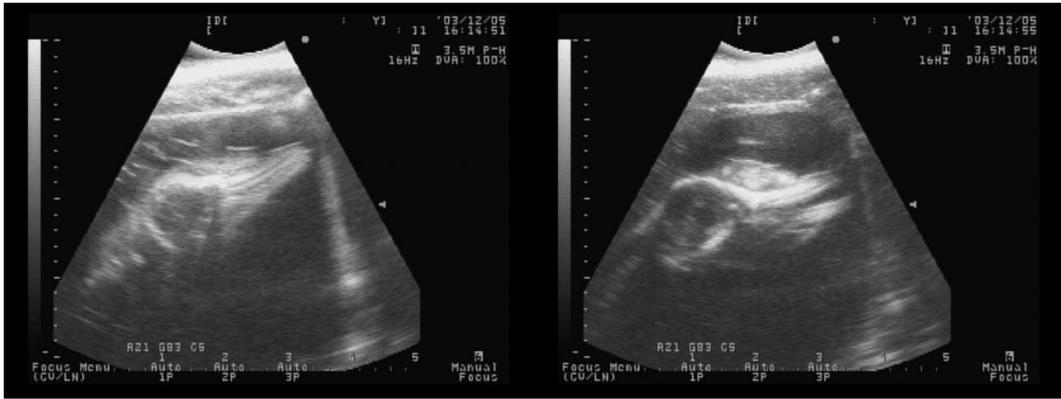


図 24. 子宮内での胎仔の口の開閉の様子



図 25. カマイルカの胎仔の臍帯血流像



図 26. バンドウイルカ薬物性肝炎像

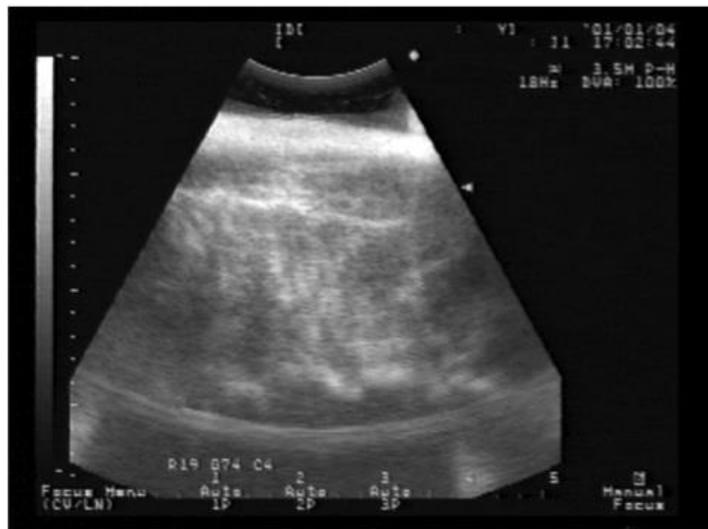


図 27. バンドウイルカの腎盂腎炎像

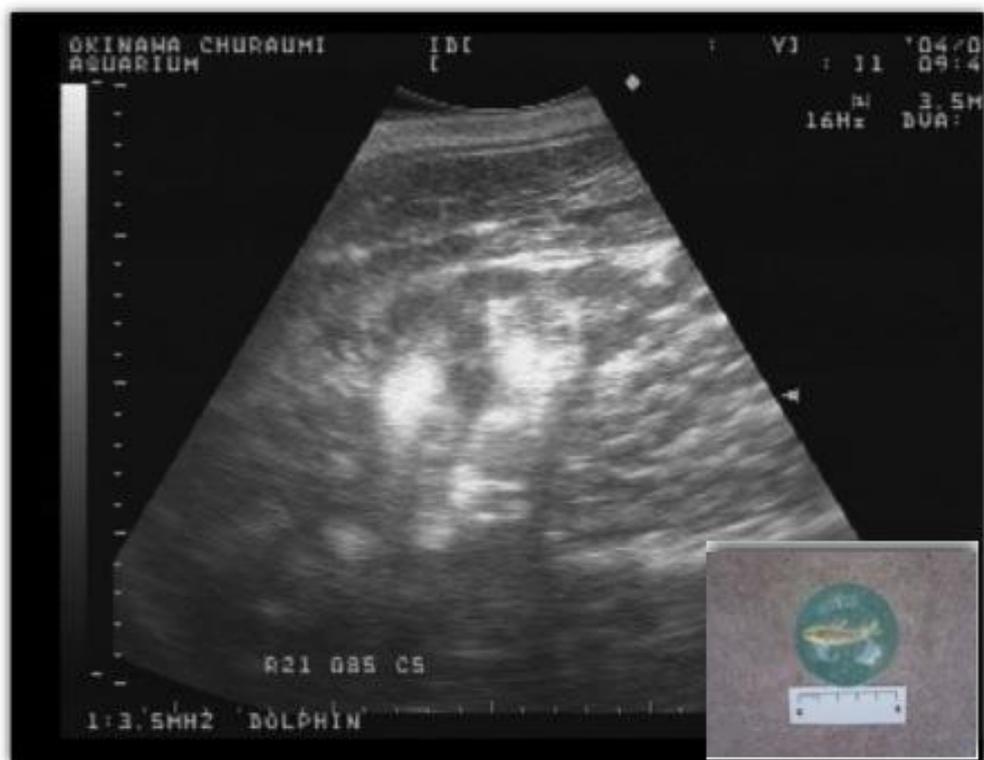


図 28. バンドウイルカが誤嚥したスーパーボールのエコー像

## 考察

多くの水族館では動物治療のための検査として、血液検査、細菌学的検査、尿検査、糞便検査を実施し、その結果を元に近隣の医師や獣医師に治療方針を仰いでいた。著者らは、沖縄美ら海水族館において、それらの検査に加え画像診断を導入することで確定診断を行い、治療方針を決定することを目的とした。またそれぞれの検査に沿った受診動作訓練を取り入れることでより低侵襲に健康管理を行うことが可能となった。

小型歯クジラ類で比較的良好に認められる臨床症状の一つに摂餌不良がある。摂餌不良や嘔吐を示す原因には前胃内異物、前胃真菌症、ヘリコバクター感染症、レプトスピラ症、豚丹毒、パスツレラ症、潰瘍、腫瘍、穿孔、アニサキス症、クロストリジウム感染症などが報告されているが、多くの場合、生前の確定診断にまで至らないのが現状である [5]。上部消化管内視鏡検査はこれらの疾病の早期診断と治療に有益であった。内視鏡検査を用いることで、前胃及び主胃の観察だけでなく、バイオプシー検査や胃液採取が可能となり、空腹時の正常な前胃内容液の pH は pH = 1-3 で、それ以上の値を示す際には、更なる検査と治療を必要とするが判明した。また異常所見の早期発見のためには、頻回の定期検査が有効であるが、受診動作訓練により無鎮静かつ無保定法でも必要な検査が可能となり、ルーチン検査に応用出来た。

一般の小動物病院では多く用いられている X 線検査であるが、長年イルカ類に対しては導入が困難であった。その大きな理由の一つが、動物をプール外に搬出する作業の困難さであり、もう一つがポータブル X 線の適正な線量の把握である。線量に関しては、イルカ類が厚い脂肪層を有するため高い線量が必要となる [29]。そのため当館では、飼育員の全面的な協力のもと、週に 1 度の搬出作業と X 線の撮影を行い、適正線量の把握に努めてきた。その結果、バンドウイルカだけでなく更に大型のオキゴンドウにおいても鮮明な肺野や脊椎の写真を得ることが出来た。

それらによりルーチン検査として応用出来るようになった。

加えて現在では、CT 検査器機の導入を行ったことにより骨の異常や肺の内部の構造変性を的確に診断可能となった。しかしながら現機種では、対象がヒト用であるため、ガントリーの内径幅や架台の加重域がイルカを撮影するには明らかに不足しているため、ルーチン検査とするには撮影部位の選択、スリングを用いた加重の軽減等々の工夫が不可欠で、機種の変更を含め今後の検討が必要である。

近年、器機の小型化により水族館で一番多く導入されている確定診断器機が超音波画像診断器機で、用途は妊娠診断、および肝臓、腎臓の疾患の診断に用いている。以前は動物をプール外に出して検査を実施していたが、2000年に国内の水族館や動物園で初めてプローブを水中に浸けての検査を実施し、診断に適した画像を得ることに成功した。動物をプール外へ出す必要が無く、かつ受診動作訓練を導入することにより、より簡便に検査が実施出来るようになり、ルーチン検査の中でも初期診断検査の一つとして有効である。

## 第 2 節

### 抗菌剤の血中濃度変化に関する研究

飼育下の鯨類 (*Tursiops truncatus*) における薬剤の血中動態に関する報告としては Linnehan *et al.* (1999) の他 [14], シロイルカ (*Delphinapterus lucas*) にアミカシン (Amikacin) を筋肉内注射した例 [22], シロイルカとバンドウイルカに対してフロルフエニコール (Florfenicol) を筋肉内注射した報告 [2], シロイルカ, シャチ (*Orcinus orca*) およびバンドウイルカにアジスロマイシン (Azithromycin) を投与した例 [3] がある。しかし, いずれの報告も  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $t_{1/2}$  等について詳細な結果は記載されていない。

そのため, 鯨類の抗菌薬の投与量に関する疑問解決への糸口をつかむべく, ミナミバンドウイルカ (*Tursiops aduncus*) 及びオキゴンドウ (*Pseudorca crassidens*) におけるニューキノロン系抗菌剤 orbifloxacin (OBFX) の血中動態を測定した。

#### 材料と方法

##### 1. 供試動物

沖縄美ら海水族館の飼育個体, ミナミバンドウイルカ (indo-pacific bottlenose dolphin) 2 頭およびオキゴンドウ (False killer whale) 1 頭を実験に供試した。ミナミバンドウイルカは, 鹿児島県奄美大島産でいずれも雄, 測定時のデータは, 飼育年数 25 年, 推定年齢 28 才であり, 個体名: ムク, 体長および体重は, 258cm/185kg と個体名: クロ, 259cm/188kg であった。またオキゴンドウは, 長崎県壱岐産, 個体名: ゴン, 雌, 測定時のデータは, 飼育年数 16 年, 推定年齢 24 才, 体長 406cm, 体重 582kg であった。

ミナミバンドウイルカの 2 頭は, 直径 14m, 深さ 3m, 容量 480m<sup>3</sup> の

円形水槽に収容されており，他の個体を同居させていない．通常は水中ショーに使用している．オキゴンドウは長径 25m，短径 15m，深さ 4m，容量 1240m<sup>3</sup> の楕円形水槽で飼育され，同居個体はミナミバンドウイルカ 4 頭，カマイルカ (*Lagenorhynchus obliquidens*) 2 頭であり，通常はこれらの個体と共にショーを行っている．実験時の健康状態は良好であり，他の薬剤の投薬は行っていなかった．

## 2. 供試薬剤

薬剤は，動物専用ニューキノロン系抗菌剤として市販されているオルビフロキサシン（ビクタス S 錠，1 錠中の含量は 40mg，10mg，大日本製薬）を使用した．剤型としては前記の錠剤の他，注射液（牛・豚用は筋肉内投与，犬・猫用は皮下投与）がある．（図 29）にオルビフロキサシンの構造式を示す．

## 3. 投与方法

実験実施はショー行動が不要な休館日とし，前日及び当日は通常通り給餌を行い，食餌制限は行わなかった．通常の 1 日給餌量は，ミナミバンドウイルカでマサバ (*Scomber japonicus*) 4kg，カラフトシシャモ (*Mallotus villosus*) 5kg で，オキゴンドウはマサバ 13kg，カラフトシシャモ 13kg である．薬剤投与は朝 7 時実施，前回の給餌から約 15 時間経過後となる．

オルビフロキサシンの投与量は，犬および猫における用量として承認されている体重当たり 5mg/日とし，体重は前記の数値を採用した．平均全長 18.4cm，平均体重 40g のシシャモの体内に錠剤を挿入し，経口投与した．投与に必要なシシャモはミナミバンドウイルカで 5 本，オキゴンドウで 15 本であり，薬剤投与時は他の餌料は与えなかった．投与後しばらくの間は動物を観察し，確実に嚥下したことを確認した．その後は 7 回の採血時毎にミナミバンドウイルカで約 1.4kg，計約 10kg/24 時間，オキゴンドウは 6 回の採血の度に 4.3kg，計約 26kg/24 時間と通常の給

餌量を与えた。

#### 4. 採血と定量方法

薬剤投与後 1, 2, 4, 8, 12, 24 時間目にヘパリン（ノボ・ヘパリン注，ノボ・ノルディスク）処理した注射筒へ 21G 翼状針を接続し，採血した。落水による取揚げや，担架による保定等を行わない受診動作により毎時 10mL の採血を行った。なおミナミバンドウイルカでは，上記の採血時間に加え薬剤投与後 0.5 時間目にも採血を行った。頻回採血に起因すると思われる異常行動は認められず，採血後は直ちに通常の一般行動に戻った。

遠心分離して得られた血漿はただちに低温冷凍庫（EBARA LOW-TEMP ESL-70A）で $-70^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し，凍結状態のまま大日本製薬（株）アニマルサイエンス部開発研究所に輸送し，*Escherichia coli* Kp 株を指標菌とする，生物学的定量法（薄層カップ法）により定量した。

#### 5. 薬動学的分析

オルビフロキサシンの薬動学的パラメータは，以下のように求めた。最高血漿中濃度（the maximum plasma concentration:  $C_{\text{max}}$ ），最高血漿中濃度到達時間（time to maximum plasma concentration:  $T_{\text{max}}$ ）は実測値から求めた。消失半減期（half period:  $t_{1/2}$ ）は最小二乗法による直線回帰より算出した。

## 結果

### 1. 各個体の血漿中濃度の経時的推移

投与直後から 24 時間後までの血漿中オルビフロキサシン濃度の経時的推移を示した（図 30）。表 2 には各測定時点における血漿中オルビフロキサシン濃度を示し，ミナミバンドウイルカでは 2 頭の平均値も示した。ミナミバンドウイルカでは，2 頭とも投与 1 時間後に最高濃度（平均値  $3.81 \mu\text{g/mL}$ ）を示した後，漸次減少した。またオキゴンドウでは，

投与 2 時間後に最高濃度  $2.21 \mu\text{g/mL}$  に到達し, その後は同様に漸次減少した.

## 2. 薬動学的パラメータ

表 3 に, 血漿中オルビフロキサシン濃度の薬動学的パラメータを示した. なおミナミバンドウイルカにおいては, 2 頭の平均値も示した. 血漿中オルビフロキサシンの消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は, ミナミバンドウイルカで平均 7.08 時間, オキゴンドウで 4.71 時間であり, オキゴンドウの方が短かった. ミナミバンドウイルカにおける各パラメータは 2 頭で良く一致していたが, オキゴンドウとミナミバンドウイルカの間には差が見られた.

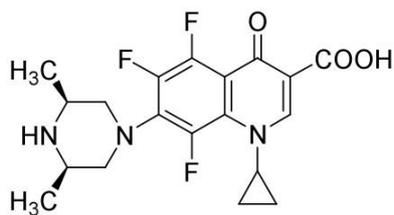


図 29. オルビフロキサシンの化学式

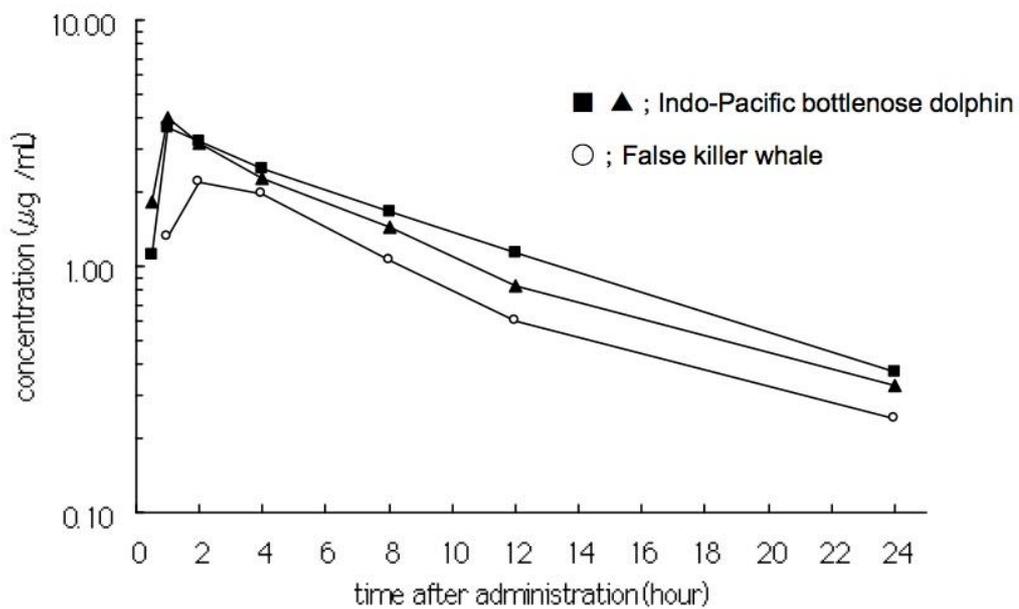


図 30. 投与後 24 時間後までの血漿中オルビフロキサシン濃度の経時的推移

表 2. 各測定時点における血漿中オルビフロキサシン濃度

Species	Name of animals	Time after administration of orbifloxacin (hour)						
		0.5	1	2	4	8	12	24
Indo-Pacific bottlenose dolphin	Kuro	1.82	3.98	3.15	2.28	1.44	0.83	0.33
	Muku	1.12	3.63	3.23	2.50	1.68	1.14	0.37
	Mean	1.47	3.81	3.19	2.39	1.56	0.99	0.35
False killer whale	Gon		1.30	2.21	1.96	1.05	0.60	0.24

表 3. 血漿中オルビフロキサシン濃度の薬動学的パラメータ

Species	Name of animals	Pharmacokinetic parameters		
		T <sub>max</sub> (h)	C <sub>max</sub> (μg/mL)	t <sub>1/2</sub> (h)
Indo-Pacific	Kuro	1	3.98	6.83
bottlenose dolphin	Muku	1	3.63	7.34
	Mean	1.00	3.81	7.08
False killer whale	Gon	2	2.21	4.71

## 考察

飼育下のイルカ類に対する内科学的治療の大部分が抗菌剤の投与であるが、1990年代以前に国内でそれらの血中濃度について論じられた例は無かった。今回測定を行ったオルビフロキサシン 5mg/kg の経口投与の報告では、犬では  $T_{max}$   $1.7 \pm 0.2$  時間、 $C_{max}$   $3.29 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$ 、猫ではそれぞれ  $0.9 \pm 0.2$  時間、 $2.81 \pm 0.13 \mu\text{g/mL}$ 、豚では  $1.0 \pm 0.3$  時間、 $1.88 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$  である [15]。これらと今回測定を行ったミナミバンドウイルカおよびオキゴンドウに同量を経口投与した結果とを比較すると、血漿中オルビフロキサシン濃度は投与後 1-2 時間に最高値に達し、最高濃度はそれぞれ平均値  $3.81 \mu\text{g/mL}$ 、 $2.21 \mu\text{g/mL}$  となり、陸上動物と同様の血中濃度を獲得することが明らかとなった。経口投与されたオルビフロキサシンは投与後餌のシシャモからすみやかに放出され、消化管から吸収された後、オルビフロキサシンは、血中から主要な臓器・組織内に高濃度で移行し、その後主に尿中に排泄される。ミナミバンドウイルカやオキゴンドウにおけるオルビフロキサシンの消失半減期は 4.71 時間～7.34 時間であり、これまでの陸上動物での検討から、犬 ( $6.51 \pm 0.44$  時間)、猫 ( $3.49 \pm 0.26$  時間) [15] および豚 ( $5.09 \pm 0.31$  時間) [16] と類似した値であった。これら薬動学的パラメータの比較により、オルビフロキサシンはミナミバンドウイルカやオキゴンドウにおいても犬、猫および豚と同様高い組織移行性を示しており、体重比による経口投与が有効であることが確認出来たことは、投薬プログラムの立案および実施に有効であると推察される。

ニューキノロンは細菌の DNA 合成を阻害することにより殺菌的に作用する。このような作用機序から従来の抗生物質耐性菌にも抗菌活性を示す。また、組織移行性が良好で生体内で代謝されにくいこと、抗菌活性が用量依存性であること、そして比較的長い PAE (post antibiotic effect; 抗菌剤除去後の細菌増殖抑制作用) を有することが特徴である。

今回の結果から、若干の種差が認められるものの、鯨類が罹患する多くの細菌による感染症に対して 1 日 1 回のオルビフロキサシン 5mg/kg 経口投与で有効な抗菌作用が期待できる。

今後は、更なる薬剤の適正な投与量を明らかにするために、他の鯨種をも使用し、多くの個体で実験を継続するつもりである。

### 第3節：真菌感染症に関する研究

#### 飼育鯨類の真菌感染症例について

1990年代以降、全国の水族館で報告されているイルカ類の真菌感染症のほとんどは、死後の病理解剖による結果報告であり、生存中に確定診断がなされ、適切な治療が行われた例は非常に少なかった。また飼育個体において、抗菌剤治療を施しても改善が見受けられない個体が多く診られたため、それらの症例に対し抗真菌剤を投与した結果、改善が認められた。そこで著者らは、従来のルーチン検査である血液検査や細菌学的検査に加えて、飼育個体の真菌学的検査を定期的に行うことにより、常在真菌叢を把握することに努めた [33] (表4)。

加えて内視鏡検査やX線検査等の画像診断を実施することにより確定診断が可能となった。

ここでは沖縄美ら海水族館においてイルカ類にみられた深在性真菌症例、前胃真菌炎症例、*non-albicans* 感染症例、*Aspergillus. sp* による肺炎症例について報告する。

表 4. 飼育個体の真菌罹患一覧

Sex, age, and housing periods of dolphins.

Animal No.	Name	Animal specie	Sex	Age (years) and/or (housing period)	No. of colonies* Fungal species at Aug. 2006	No. of colonies* Fungal species at Feb. 2007
1	Gon	FKW	F	Approx. 30 (23)	16 <i>C. tropicalis</i>	1 <i>C. albicans</i>
2	Sky	BD	M	7 (7)	12 <i>C. tropicalis</i>	59 <i>C. tropicalis</i>
3	Sami	IOBD	F	7 (7)	9 <i>C. albicans</i>	2 <i>C. albicans</i>
4	Fuji	BD	F	Approx. 36 (30)	1 <i>C. albicans</i>	1 <i>C. albicans</i>
5	Kana	F1	F	9 (died at 21, Aug. 2006)	225 <i>C. tropicalis</i>	ND ND
6	Oki	IOBD	F	Approx. 33 (31)	4 <i>C. glabrata</i>	6 <i>C. glabrata</i>
7	Okigon-4	FKW	F	Approx. 12 (2)	407 <i>C. tropicalis</i>	None -----
8	Kama-2	PWD	M	Unknown (1)	None -----	None -----
9	Cony	F1	F	17 (17)	2 <i>C. albicans</i>	23 <i>C. albicans</i>
10	Chao	F1	M	11 (11)	601 <i>C. tropicalis</i>	428 <i>C. tropicalis</i>
11	Kuro	IOBD	M	Approx. 35 (31)	13 <i>C. albicans</i>	2 <i>C. albicans</i>
12	Okigon-1	FKW	M	Approx. 11 (2)	None -----	None -----
13	Larf	RTD	M	Unknown (8)	2 <i>C. albicans</i>	26 <i>C. albicans</i>
14	Okigon-3	FKW	F	Approx. 35 (2)	291 <i>C. tropicalis</i>	2425 <i>C. tropicalis</i>
15	Muku	IOBD	M	Approx. 35 (31)	None -----	None -----
16	Dan	IOBD	M	Approx. 38 (31)	20 <i>C. albicans</i>	None -----
17	Poi	IOBD	M	Approx. 35 (31)	1 <i>C. albicans</i>	None -----
18	Chura	FKW	F	6 (6)	None -----	None -----
19	Momo	FKW	F	Approx. 4 (2)	None -----	None -----
20	Kama-1	PWD	F	Unknown (1)	None -----	None -----

FKW; False killer whale (*Pseudorca crassidens*), BD; Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), IOBD; Indo-Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*), PWD; Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*), F1; F1 offspring between BD and IOBD, RTD; Rough-toothed dolphin (*Steno bredanensis*), Approx.; Approximately, \*; total numbers of colonies obtained from 2 CHROMagar Candida and 2

赤字 : *Candida albicans*, 青字 : *Candida tropicalis*

## 材料と方法

### 症例 1：深在性真菌症

飼育中のオキゴンドウ (*Pseudorca crassidens* , 個体名：ゴン, 雌, 体長 420cm, 体重 580kg, 1985 年搬入) に食欲低下, 呼吸の異常が認められ, 血液検査の結果, 赤沈査の亢進がみられたが, 体温と白血球数に顕著な上昇はなく, 血液像中のリンパ球数の減少が確認された. 抗菌剤による治療では改善が認められず, 呼気と便中より多量の *Candida albicans* と *C. tropicalis* が検出されたことより, 呼吸器・消化器の深在性真菌症を疑い, 治療を開始した (図 31) .

治療経過：真菌の採取には, CHROMagarCandida 培地 (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を使用した. 2008 年 4 月 1 日の呼気から 119 コロニー, 4 月 2 日の便から 116 コロニーの *C. albicans* が検出されたことより, ホスフルコナゾール (F-FLCZ 2mg/kg/day) の静脈内投与を開始した. 4 月 5 日の便から 1000 コロニー以上の *C. tropicalis* が検出されたことより, 4 月 6 日からミカファンギン (MCFG 3mg/kg/day) の静脈内投与を開始した. 呼気の *C. albicans* は F-FLCZ 投薬後 7 日目で消失したため経口投与薬が存在するフルコナゾール (FLCZ 2mg/kg/day) に切り替えた. 便の *C. tropicalis* は MCFG 投薬後 2 日目で検出されなくなった (図 32) . その後, 一般状態と食欲の改善しリンパ球数が正常値に回復したため, FLCZ 投与 7 日目, MCFG 投与 10 日目の 4 月 15 日に治療を終了した [26] .

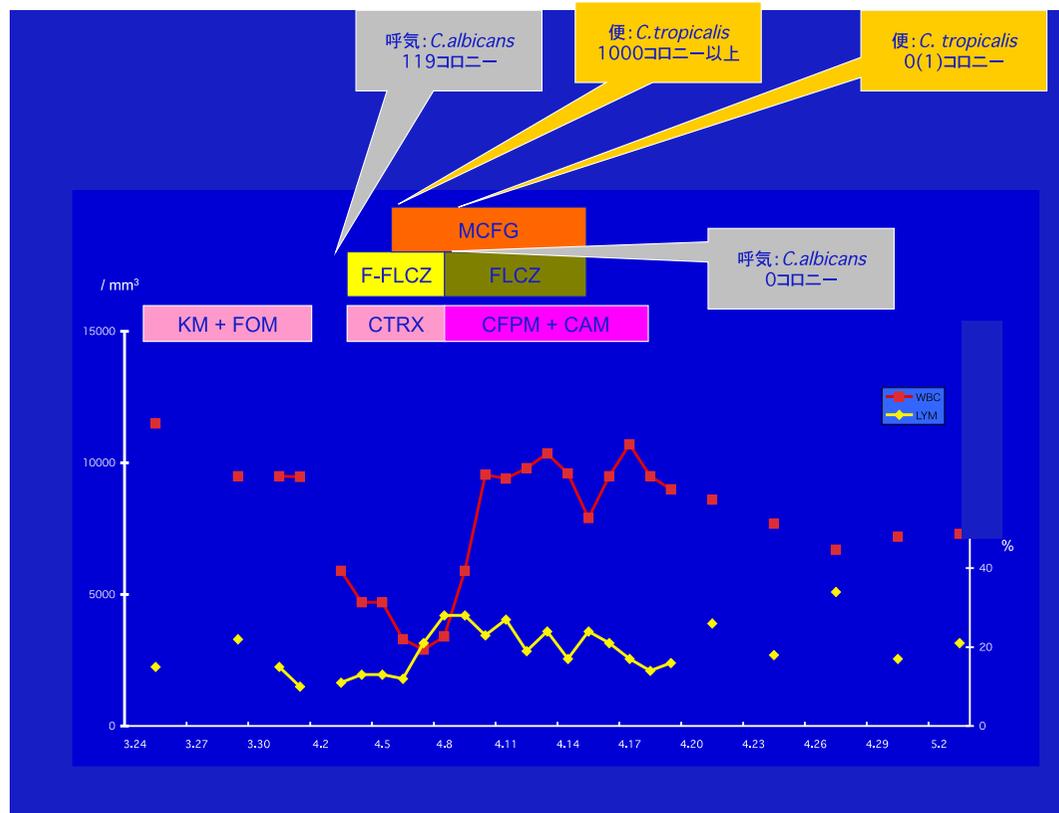


図 31. 深在性真菌治療経過

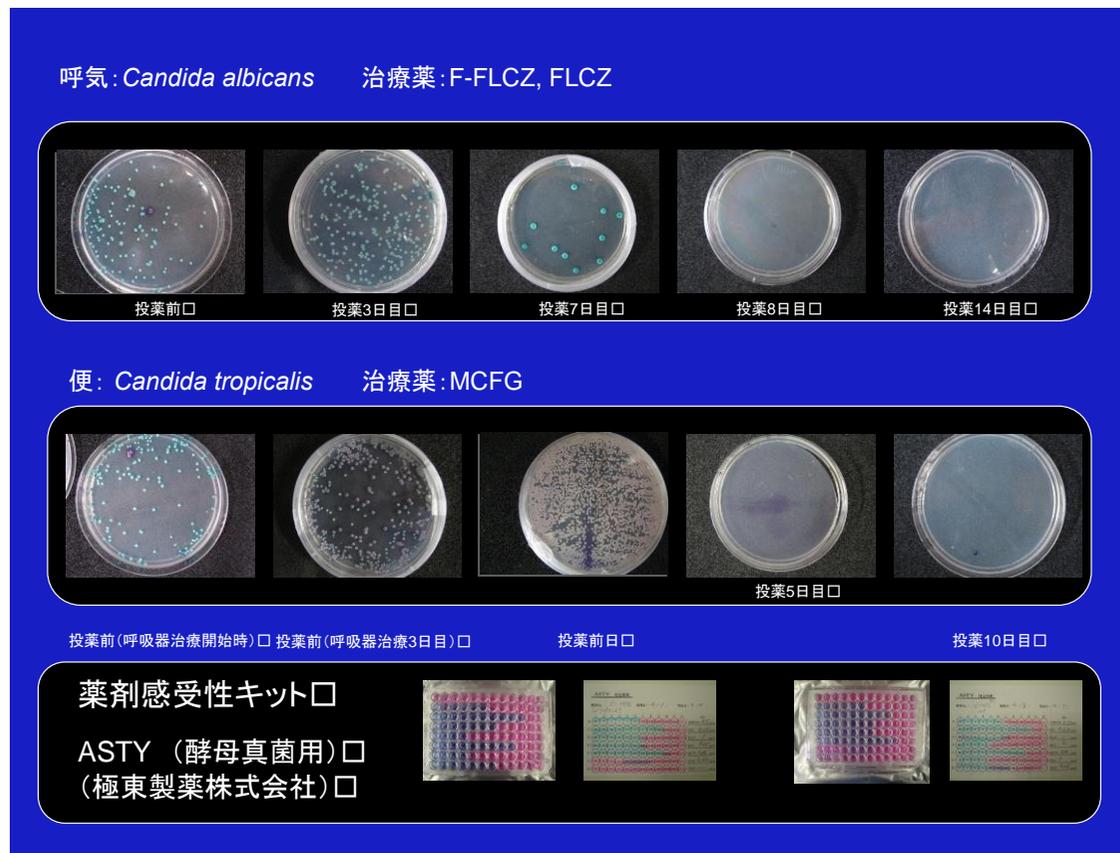


図 32. 治療経過に伴う真菌数の変化

## 症例 2：前胃真菌炎症

水槽内繁殖個体のバンドウイルカ (*Trusiops truncatus*, 個体名：カナ, 雌, 年齢 9 歳, 体長 249 cm, 体重 180 kg, 1998 年生) で, 摂餌不良となり, 削瘦, 体重の減少, 摂餌後に嘔吐が認められた. 血液検査および内視鏡 (OYMPUS 社 VQ-11223A 外径  $\phi$  10.9mm 有効長 2175mm チャンネル  $\phi$  2.8mm) による前胃の観察を行い, 内容液を採取し細菌培養と PH 測定を実施した.

治療経過：内視鏡検査により前胃内壁の白色化, 肥厚像, 収縮運動の低下が観察された (図 33). 内容液から *Candida albicans* が検出され, 内壁のバイオプシー材料から真菌炎と診断された (図 34). 以上の結果より, 抗真菌薬フルコナゾール (FLCZ:1mg/kg/day), H<sub>2</sub> ブロッカーであるファモチジン (ガスター:160mg /day), 電解質液の静脈内投与, 抗真菌薬の筋肉内投与および経口投与を開始した (図 35). 治療開始約 1 ヶ月目の内視鏡検査により, 前胃壁色調, 前胃の運動の改善が認められた (図 36). また内壁のバイオプシーにより真菌感染は確認されなかった (図 37). しかし, 食道の一部に潰瘍状の病変が認められ, 前胃内壁にも一部発赤部が確認されたことより消化性潰瘍治療薬プラウノトール (ケルナック:720mg /day) の投与を行い, 粘膜改善を目的とした治療を開始した (図 38). 治療開始約 4 ヶ月目に摂餌, 一般行動等が正常に回復したことにより治療を終了した.

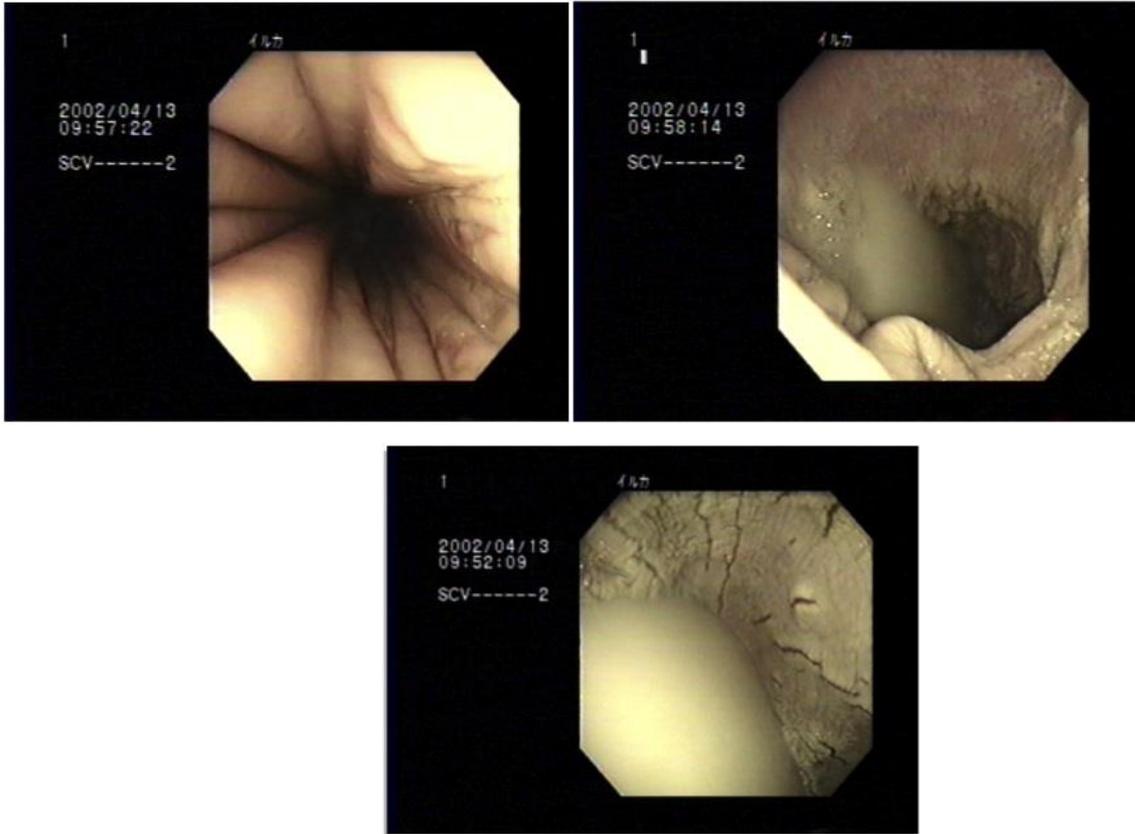


図 33. 発症時の前胃の状態

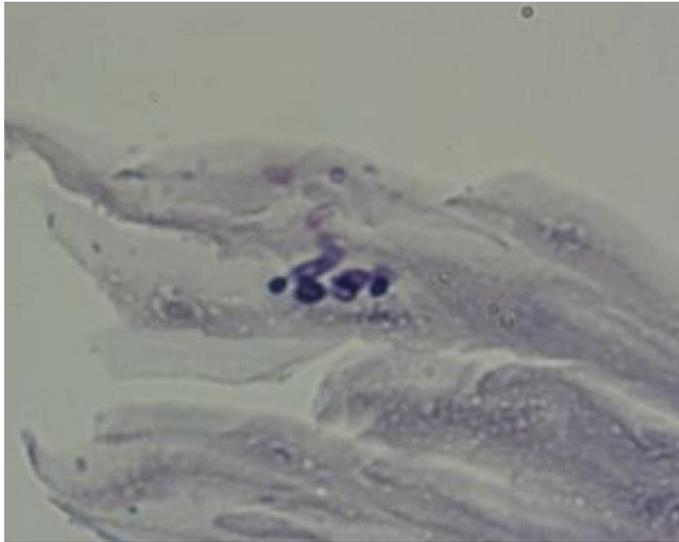


図 34. 前胃内壁に観察された *Candida albicans*

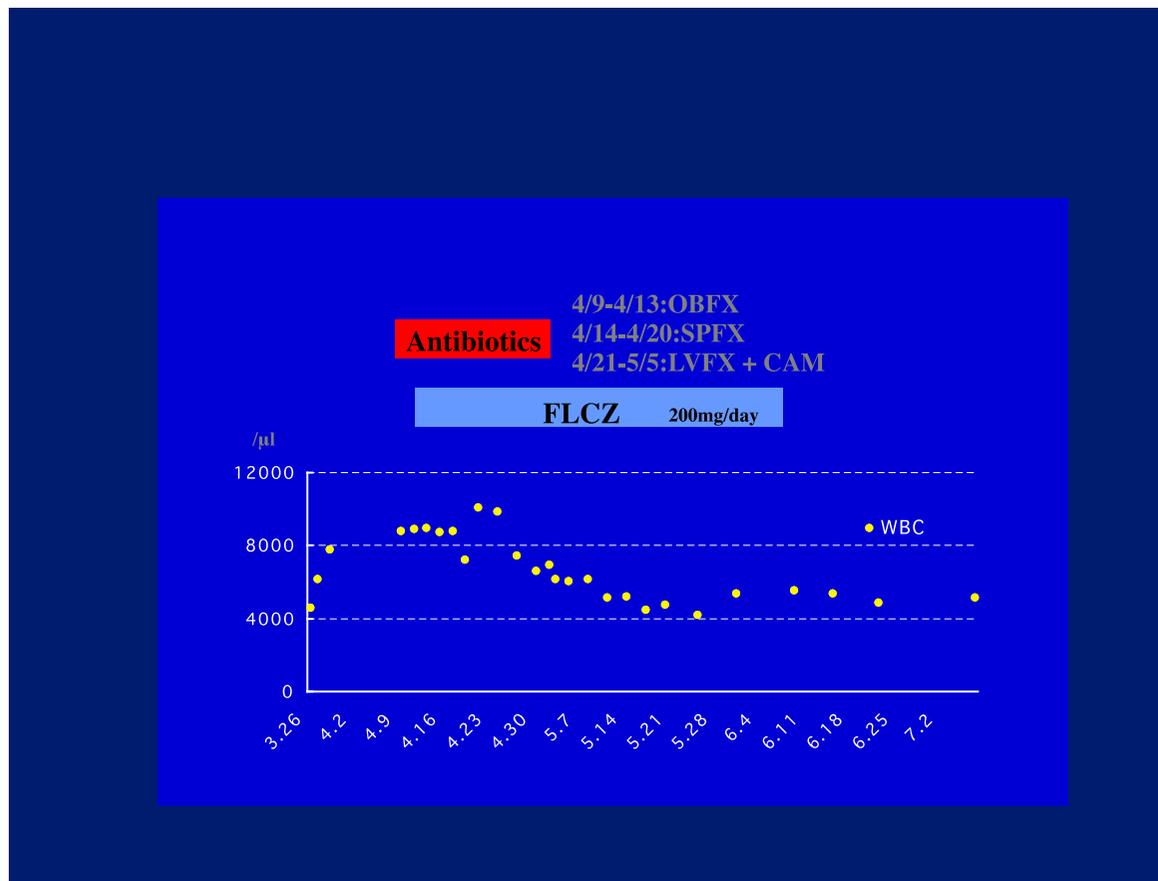


図 35. 抗菌剤と抗真菌剤の投与経過

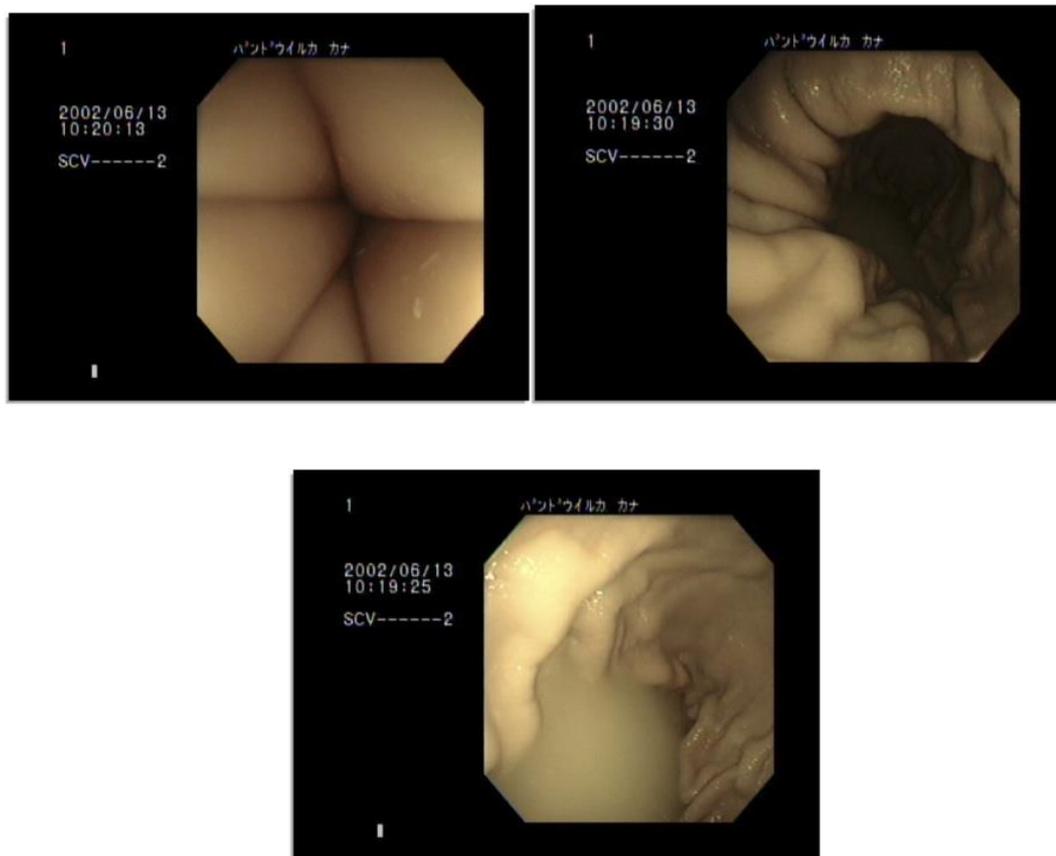


図 36. 治療 1 ヶ月後の前胃の状態

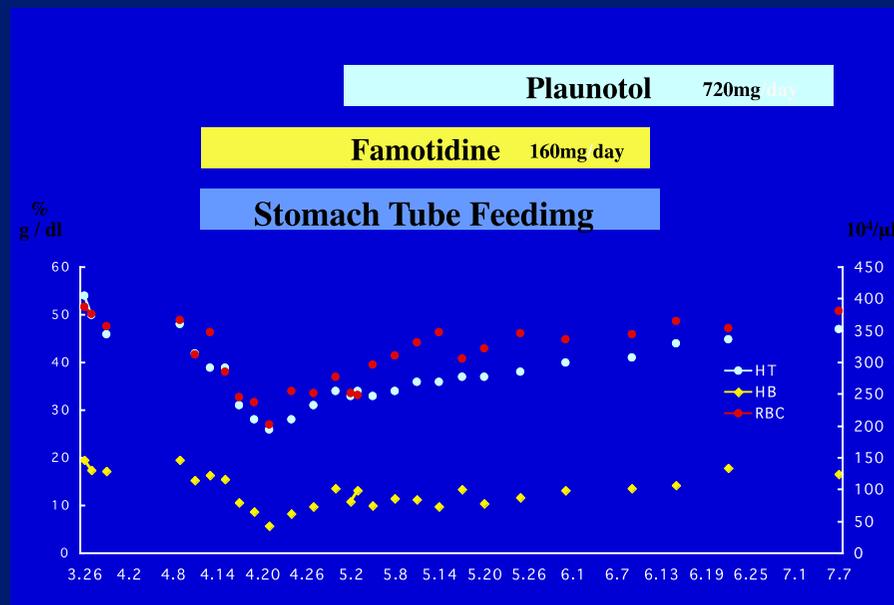


图 37. 消化器改善剂投与経過

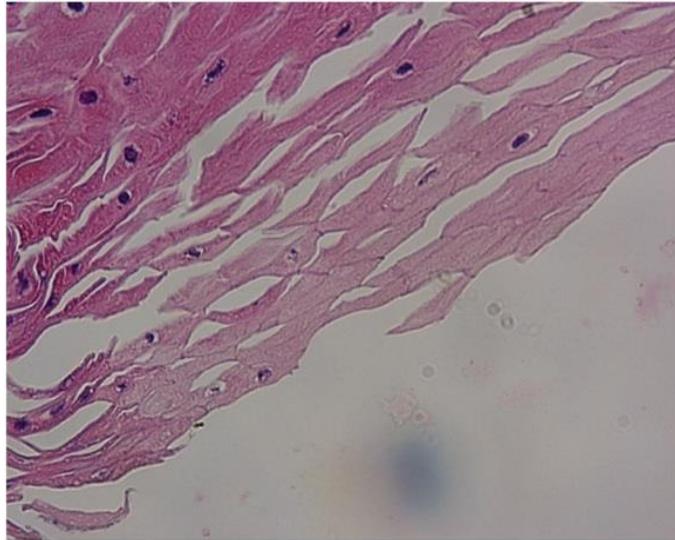


図 38. 前胃内壁には *Candida albicans* は認められない

### 症例 3 : non-*albicans* 感染症

飼育中の既往歴無しの水槽内繁殖のバンドウイルカ (*Tursiops truncatus*: 雄:4 歳, 体長:265cm, 体重:220kg, 2002 年生) に, 白血球数の顕著な上昇を伴わない血液像中のリンパ球の減少が確認され, 体温上昇, 体重の減少, 嘔吐が頻発した. 真菌感染症を疑い血液検査, 呼気, 前胃内容液, 糞便等の真菌学的検査で *Candida tropicalis* 等の non-*albicans* が検出され (図 39), X線検査で気管支に炎症像が確認されたことにより non-*albicans* *Candida* 感染症と診断した.

初期治療薬としてフルコナゾール (FLCZ: 4mg/kg/day) 7 日間と 2mg/kg/day 3 日間) の静脈内投与を行ったが効果を認めず (図 40). 7 日間の休薬後に, 薬剤感受性試験で有効であったミカファンギンナトリウム (MCFG: 3mg/kg/day) の投与を開始した. 投与 9 日目の前胃内容液では *Candida tropicalis* 等の菌量が減少し, 呼気, 鼻腔内スワブからもこれらが検出されなくなったこと (図 41), 一般状態が回復したことによりイトラコナゾール (ITCZ:4mg/kg/day) の経口投与に切り替え, 血液学的検査値が正常となった投与 14 日目で治療を終了した (図 42).



図 39. 治療開始時の前胃の状態と胃液内の真菌

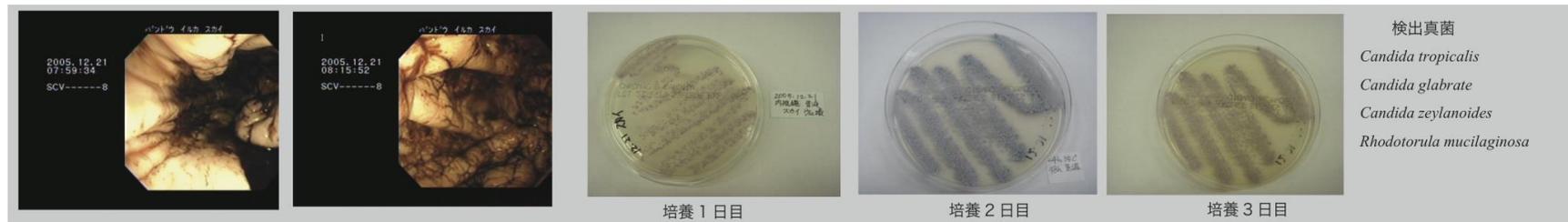


図 40. 約 2 週間後の前胃の状態と胃液内の真菌

53

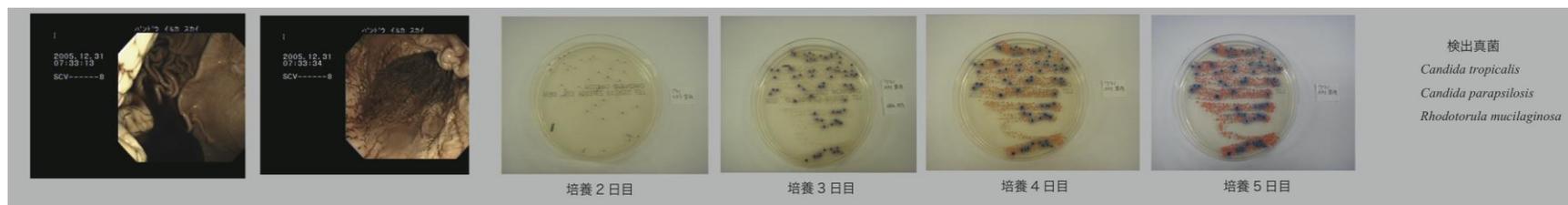


図 41. 約 4 週間後の前胃の状態と胃液内の真菌

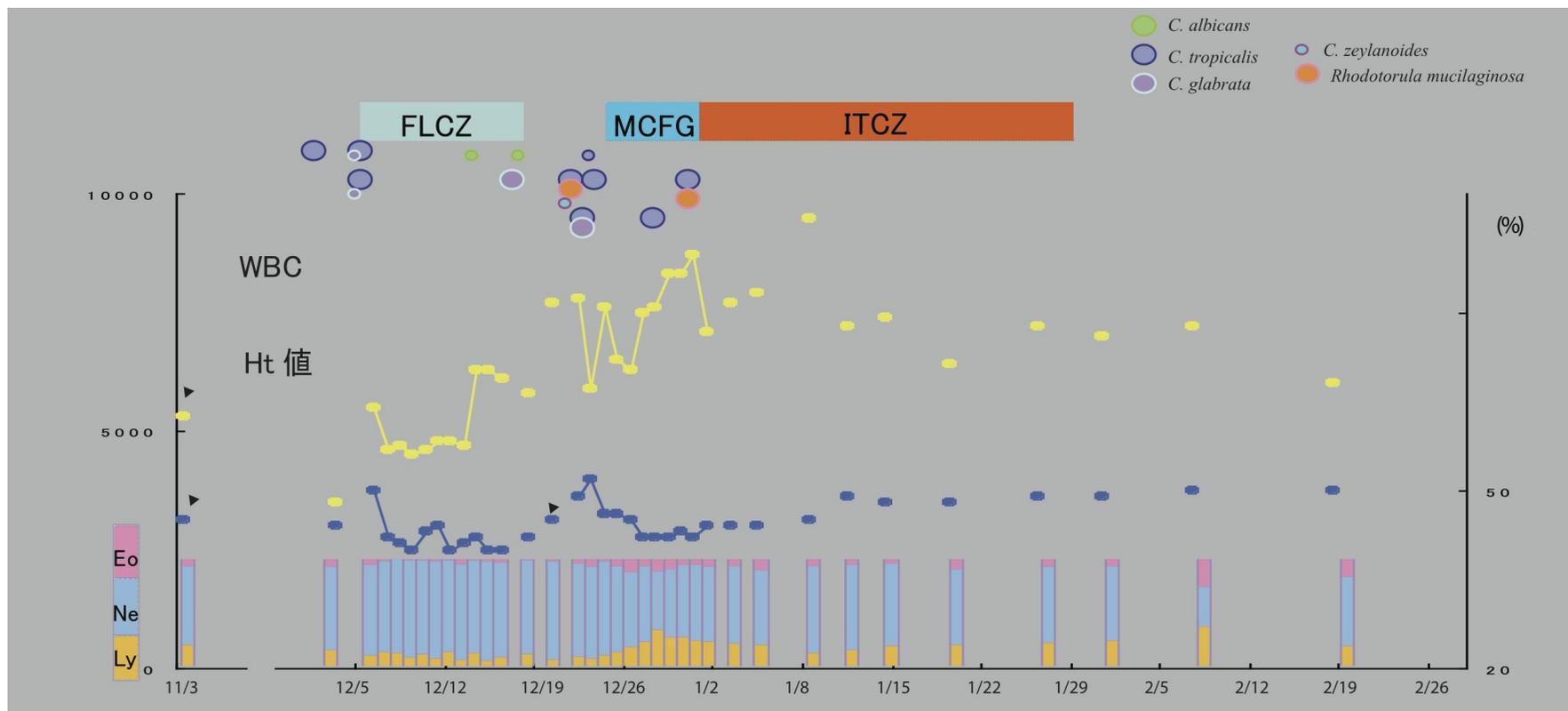


図 42. 抗真菌剤の投与経過

#### 症例 4 : *Aspergillus. sp* による肺炎

対象および方法: 症例は水槽内繁殖個体のミナミバンドウイルカ(雌:6才, 体長:230cm, 体重:150kg, 1998年生)で, 2004年12月31日より摂餌不良となり, 削瘦, 体重の減少, 呼吸音の濁音, 呼吸孔内壁の白色化が認められた. 血液検査およびX線撮影装置(GE medical社)と超音波画像検査(ALOKA社)による肺野の観察を実施した.

治療経過: 真菌学的検査により呼気, 前胃内容液より *Aspergillus. sp* が検出された. 呼吸時に呼吸孔より出血(図43), 内壁の白色化が観察された. 超音波画像診断検査(図44)により, 肺の内部に変性が確認され, X線検査により右肺に空洞化が確認された(図45). 以上の結果より, 抗真菌薬ミカファンギンナトリウム(MCFG 3mg/kg/day), 電解質液の静脈内投与を開始し, 摂餌が安定後に抗真菌薬イトラコナゾール(ITCZ:4mg/kg/day)の経口投与に切り替えた. 治療開始約120日目のX線検査により空洞化の消失が認められ, 呼気, 呼吸孔内壁のスワブ, 前胃内容液より真菌感染は確認されなかったことより治療を終了した(図46).



図 43. 呼吸孔内の出血

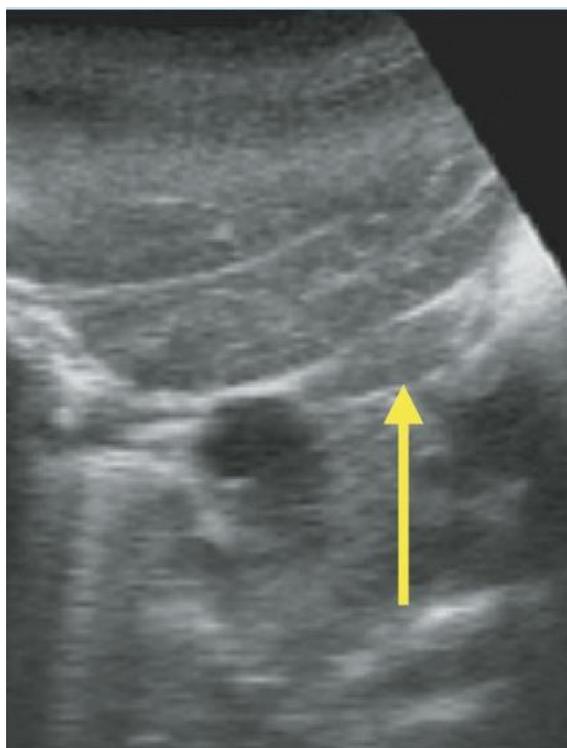


図 44. 肺野の超音波画像診断像  
矢印部：変性部位

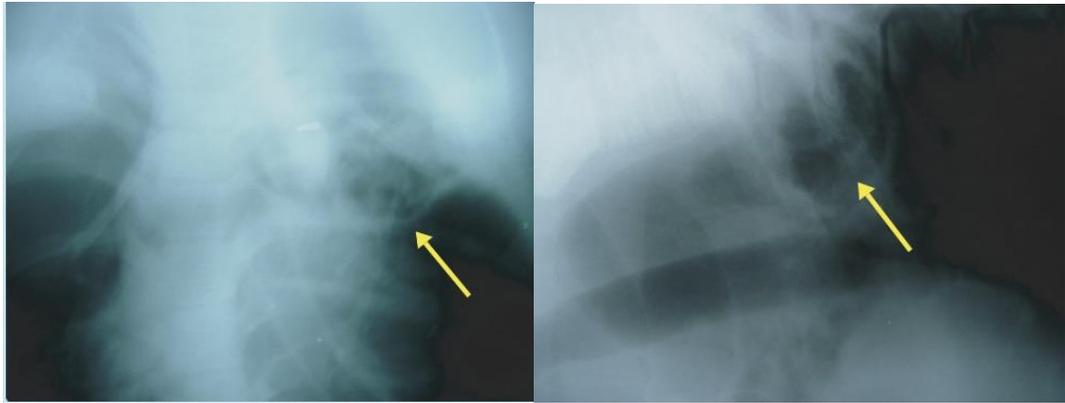


図 45. 肺野の X 線像

矢印：ファンガスボールによる空洞化部

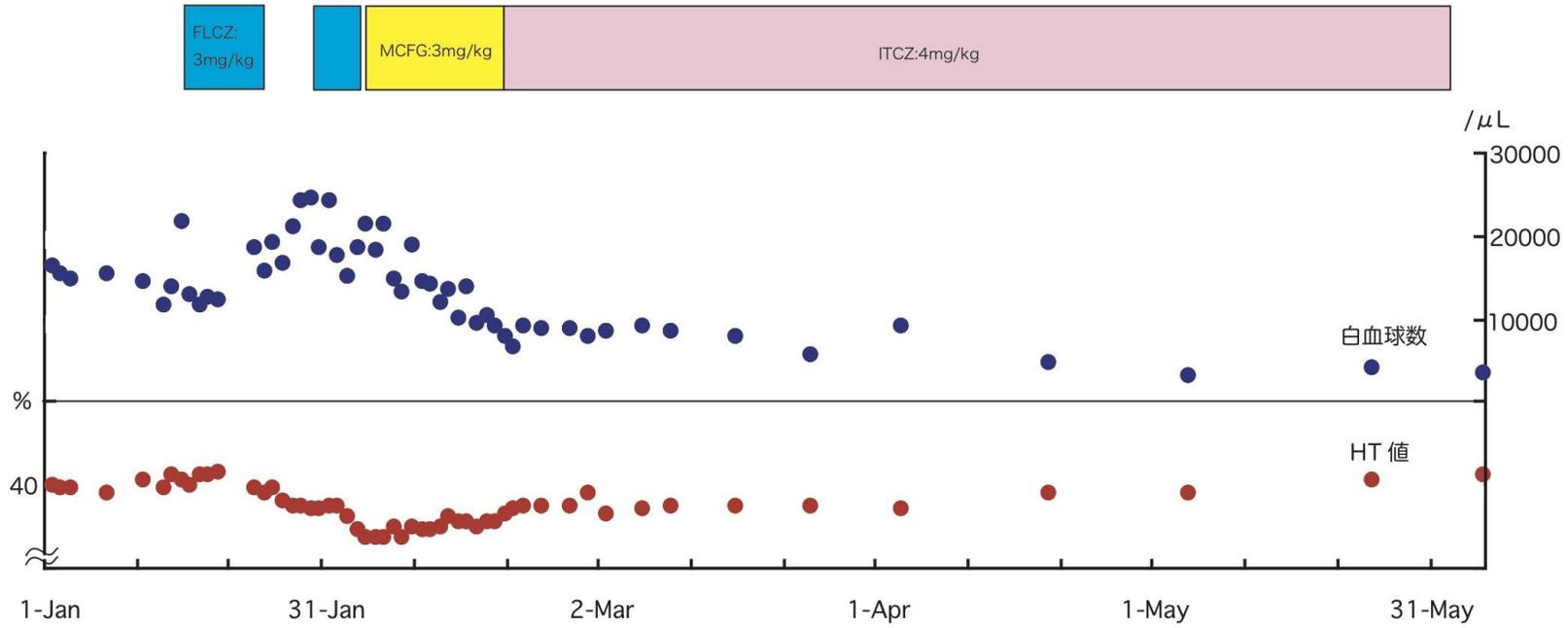


図 46. 治療経過

## 考察

飼育イルカ類の真菌感染症に対して、2000年以前には *Candida albicans* による真菌感染症のみを治療対象とし、抗真菌剤フルコナゾールを経口投与するのみであった。一般に深在性真菌症においては、特異的な症状や所見に乏しく、他の疾患とりわけ細菌感染症との鑑別がしばしば困難な事から、診断の確定には真菌学的検査が必要不可欠となる [39]。そのため著者らは、飼育イルカ類の真菌感染症を診断するために、呼気や胃液を採材し、ポテトデキロース培地やクロムアガー培地などの真菌学的検査に適した培地を用いて培養し、千葉大学医真菌センターの協力により同定、薬剤感受性を実施することにより、non-*albicans* 酵母様真菌である *Candida tropicalis* や *Aspergillus* などの糸状菌についても感染症の起因菌であることが判明した。それらに対しても薬剤感受性検査キット (ASTY, 極東化学, 東京) を導入して治療薬剤の選択を容易にした。これらにより水族館におけるイルカ類の真菌感染症の治療は、細菌感染症と同様の治療レベルまで引き上げることが出来たと考える。しかしながら野生個体の真菌感染症の罹患率は不明であり、海外で報告されている新興真菌感染症についても調査が不十分である。今後は他の水族館とも協力してイルカ類の真菌感染症についてデータを増やす必要があると思われる。

## 国内で初めて分子生物学的に診断されたラカジオーシス 2 症例

ラカジオーシスは（旧称ロボミコーシス）は高度病原性真菌症の一種で、大西洋沿岸の中南米諸国のヒトとイルカの風土病で、掻痒感、熱感、疼痛をともなう慢性肉芽腫性ケロイド状皮膚炎を特徴とする [21] .

本菌種の自然界での生態は明らかではないが、感染源は水源、土壌、植物等にあると考えられている。またイルカ症例から、自然界の保菌者としてイルカがあげられる。現在のところヒトからヒトへの感染は報告されていないが、オランダでイルカからヒトへ感染したと推定されるイルカトレーナーの症例が確認されていることから人獣共通真菌症でもある [27] . 原因菌は *Lacazia loboi* は実験室内での培養が困難なため、臨床症状、病理組織学的手法、近縁菌の *Paracoccidioides brasiliensis* との抗原性の共通性を用いた交差反応などにより診断されている。

しかしながら、流行地以外でのラカジオーシス診断は極めて難しく、症例が発症することを予測することは不可能に近い。本症が疑われたとしても、培養が不可能なことから、原因を同定することが出来ない。

そこで著者らは、臨床的特徴、細胞診、組織病理学、免疫学的検査、分子生物学的検査により、国内の日本海太平洋岸で同時期に捕獲されたラカジオーシス様疾患を呈したバンドウイルカに 2 例に対して診断を行った。

## 症例と方法

### 症例 1

バンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) の雄、推定年齢 17 歳は 2007 年日本近海で捕獲され、国内の水族館で屋外飼育されていた。死亡時の体長 303 cm, 体重 280 kg.

当個体は、2010 年 3 月より血中テストステロン値が低下し（データは

示さず)，同年 7 月に背部に腫脹が現れた。

同年 8 月，カリフラワー状の皮膚炎が背部に出現（図 47）。抗菌剤での治療を行ったが無効であった。β グルカン測定を行ったところ陽性（22.4 pg/ml：6 pg/ml 以上を陽性とする），生体組織に酵母様構造物が検出され，外部の検査会社により真菌性肉芽腫性皮膚炎と診断された。そこで塩酸テルビナフィン（2 mg/kg）を経口投与したが，効果は見られなかった。

同年 10 月，病巣が拡大し，触診により痛みを伴うことが判明した。フルコナゾール（ジフルカンカプセル 800 mg，2.7 mg/kg に相当）を投与したが，効果は見られず，体温が 37 °C 台で推移し微熱状況が続いた。

同年 11 月，体温が 35 °C 台前半に低下した。サーモグラフィー（図 48-a）で病巣部が局所的に発熱していることを確認した。またエコーにより病巣は皮下結合組織まで至っていたが，筋肉に及んでいないと推定された（図 48-b）。また病巣部周辺に多数の小孔が出現した。生検組織の細胞診で酵母様構造物が再度検出された。なお白血球の増加が認められた（33,000 / $\mu$ l：通常は 5,000 から 14,000 / $\mu$ l）。

真皮の皮膚生検サンプルのスメアを PAS 染色，GMS 染色を行ったところ母細胞から多極性出芽形式で 2 ないし 4 個の細胞を出芽する多数の酵母細胞が確認された（図 49）。酵母細胞は円形から洋梨型で，母細胞の直径は 10～14  $\mu$ m，娘細胞の直径は 2～8  $\mu$ m，母細胞と娘細胞の連結部は狭基底でその幅は 1  $\mu$ m，長さは 0.5  $\mu$ m であった。

同年 12 月 19 日，急激に元気消失し，呼吸速拍が見られた。敗血症を疑い，補液による治療を開始するが，改善されなかった。翌日 12 月 20 日の午後 13:16 に死亡が確認された。

剖検を行ったところ肺，および血液から，*Staphylococcus* sp. と *Morganella morganii* が分離され，これらを原因とする敗血症による死亡と診断された。

剖検時の皮膚サンプルをポテトデキロース寒天培地とクロムアガー培地で 35°C 培養したが、4 週間後に陰性の結果を得た。

剖検時に得られた皮膚の組織を症例 1 と同様にヘマトキシリン・エオジン染色，PAS 染色，GMS 染色を行ったところ母細胞から多極性出芽形式で 2 ないし 4 個の細胞を出芽する多数の酵母細胞が確認された。酵母細胞は円形から洋梨型で，母細胞の直径は 10~14  $\mu\text{m}$ ，娘細胞の直径は 2~8  $\mu\text{m}$ ，母細胞と娘細胞の連結部は狭基底でその幅は 1  $\mu\text{m}$ ，長さは 0.5  $\mu\text{m}$  であった。死亡時の病理組織標本を *Paracoccidioides brasiliensis* の抗ウサギ血清を用いて免疫染色したところ，マウスの実験的 *P. brasiliensis* 感染組織と同様に陽性を示した（図 50）。さらに死亡時の血清は *P. brasiliensis* 抗原に対し，寒天ゲルを用いた沈降試験で弱い沈降線を形成した。また，類縁菌の *P. brasiliensis* に特異的な 43kDa 糖タンパク抗原遺伝子検出用のプライマーを用いて，遺伝子検出を行ったところ，*P. brasiliensis* の遺伝子配列に極めて高い相同性を持つ遺伝子配列 582 塩基が得られた。臨床症状，病理所見，血清学的診断，分子生物学的遺伝子検出の結果をあわせてラカジオーシスと診断した。

## 症例 2

バンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) の雌，推定年齢 5 歳は 2007 年症例 1 と同群，日本近海で同時に捕獲され，2009 年 2 月まで症例 1 と同じ飼育施設にて飼育され，死亡するまで現在の飼育施設にて飼育されていた。死亡時の体長は 240 cm，体重は 175 kg であった。

2011 年 2 月に，両方の上眼瞼皮膚に肉芽腫病変が認められた（図 51）。同年 3 月には病変は拡大傾向を示したため，我々は *lacaziosis* を疑い，病変部の生検を行った。その結果，病変部のギムザ塗抹標本で酵母様菌体を確認したが，遺伝子検出，病理組織標本での菌体の検出に至らず，また gp43 も増幅されなかった。このときに呼気から *Candida glabrata*

が検出された。

同年 5 月に病変部の生検サンプル採集と焼烙処置を行った。生検組織の培養および呼気からの *C. grablata* および *Aspergillus niger* が検出された。そのため患部にケトコナゾールクリームを塗布し、抗真菌剤としてミカファンギンの静脈内投与やイトラコナゾール 1,000 mg/頭 BID の経口投与を実施した。また、口腔内にも同様の腫瘤を認めた。

同年 6 月以降、経時的に行っている  $\beta$ -グルカンの値は 8 - 41 pg/ml と陽性で推移していた。

同年 9 月、新たな病巣が出現するとともに、過去にサメによる咬傷を受けた部分にも同様の腫瘤が出現した。これらの病巣を生検、塗抹、病理検査をするとともに、遺伝子検出の材料としたところ、生検標本で *L. lobo* に特徴的な球形で狭い接着面で連結した酵母細胞の集団を確認した(図 52)。この症例は、2012 年の夏以降 7 回/分の高い呼吸率を示し、同年 12 月に突然死亡した。

剖検所見は、心臓疾患、重度の肺炎及び腸閉塞が確認された。



図 47. カリフラワー状の皮膚炎

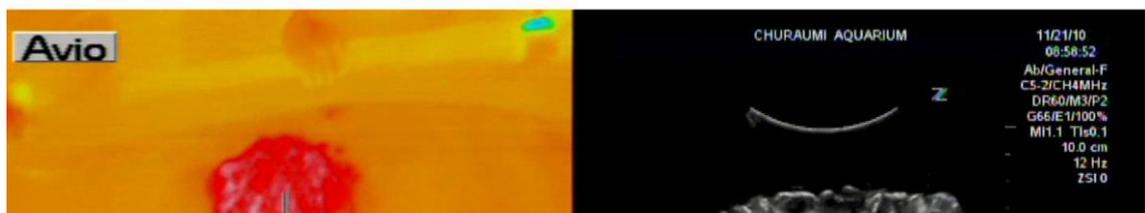


図 48. 患部のサーモグラフィー像および超音波画像診断像

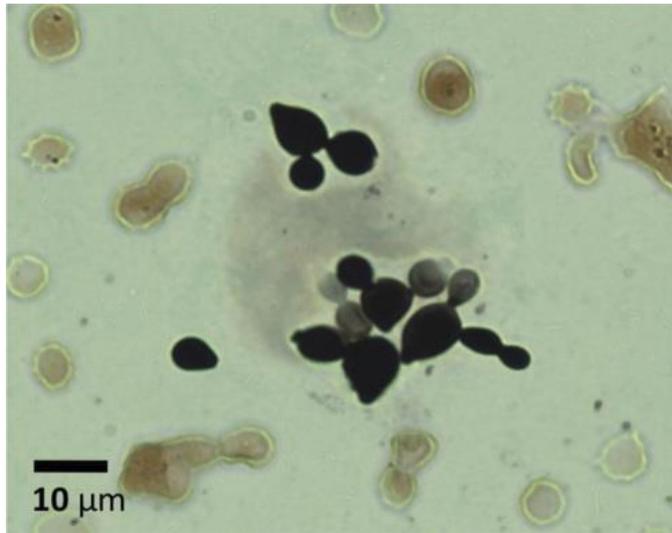


図 49. 多極性出芽形式の細胞を出芽する多数の酵母細胞

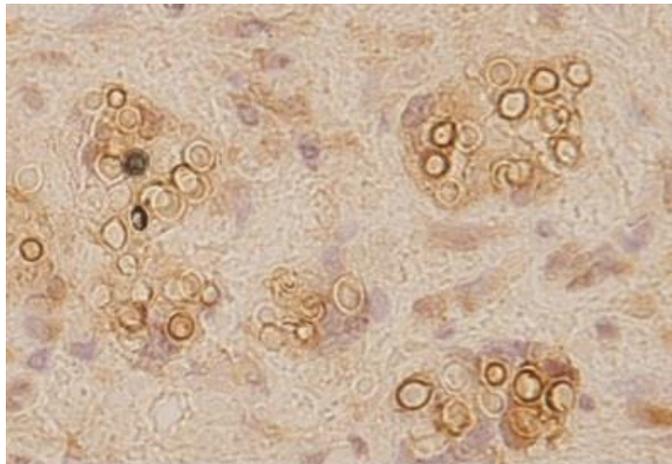


図 50. 陽性反応像



図 51. 上眼瞼皮膚に肉芽腫病変像

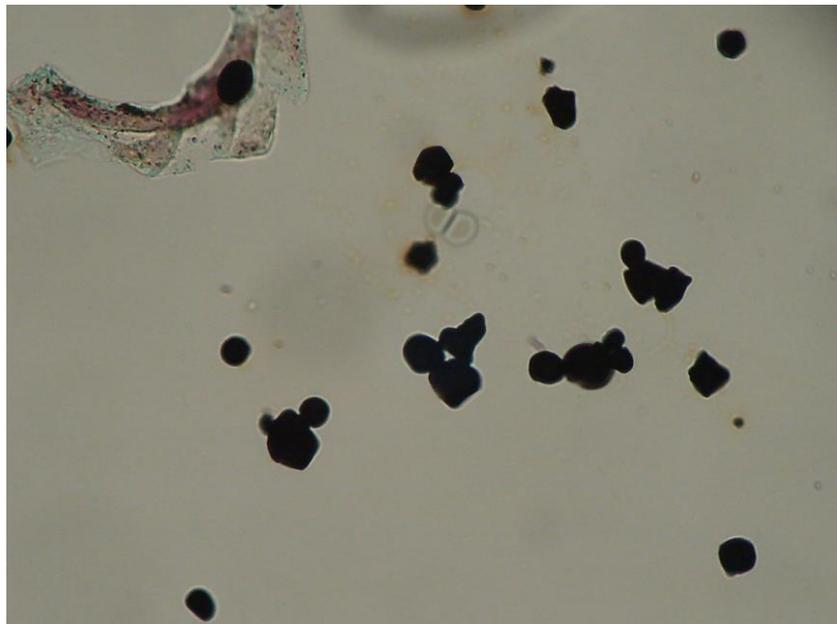


図 52. *L. loboi* の酵母細胞集団

## 診断方法

### $\beta$ グルカン値

(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-グルカンは真菌細胞壁を特徴づける主要な構成成分で、接合菌、いわゆるムコールを除くすべての真菌にみられる。したがって、血中(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-グルカンは侵襲性深在性真菌症のマーカーとなり、極微量の血中(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-グルカンを検出できる本法は侵襲性深在性真菌症のスクリーニングテストとして有用である。また、経時的に測定することにより治療効果の判定もできる。今回、外注した方法は比濁時間分析法( $\beta$ -グルカンテストワコー)を用いている検査センターのデータを使用した。正常値は11 pg/ml以下とされているが、6 pg/ml以上を注目して、測定値を検証した。

### 細胞診および病理組織での特殊染色

真皮の皮膚生検サンプルのスミアを真菌細胞の多糖を染色するために過ヨウ素酸シッフ法(periodic acid Schiff's method: PAS染色)および真菌の細胞壁を特異的に染色するゴモリ・メチナミン・渡銀染色(Gomori's methenamin silver staining: GMS染色)を用いた。採材した皮膚病変組織は、10%中性緩衝ホルマリンで浸漬固定し、定法に従ってパラフィンブロックを作製した。パラフィンブロックは4・mmの厚さで薄切し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、PAS染色、GMS染色を施した。

### 病理組織での免疫染色

血清学的交差反応を利用した免疫染色として病理組織標本を用いて *Paracoccidioides brasiliensis* の抗ウサギ血清による免疫染色を行った。陽性コントロールとして6週齢の雄 ddY マウス (SLC, 静岡)に *P. brasiliensis* の酵母細胞  $10^6$  個を生理食塩水に浮遊させ、静脈内接種に

より感染させたのち、28日目に実験を中止して安楽殺させて得られた肺組織を用いた。

抗ウサギ血清の作成に用いた菌体は1%ブドウ糖（和光純薬，大阪）添加したブレインハートインフュージョン寒天培地（日本ベクトン・デッキンソン，東京）スラントを用い，35°Cで培養した *P. brasiliensis* (Pb18株と B339株)の酵母細胞，2株あわせて約2 ml容量を得た。2株をほぼ同一量混合した酵母細胞は20倍量の1%ホルマリン（和光純薬）で48時間固定後，滅菌蒸留水で懸濁，3,000 rpm，20分の遠心分離を3回繰り返した。得られた固定菌体に70%エタノールを入れて1日放置後遠心し，100%エタノールに入れて同様な処理を行い，最終的にアセトンに置換した後，真空ポンプで乾燥させ，0.5 ml容量の乾燥菌体とした。ここに Freund の完全アジュバントを1g加え，滅菌流動パラフィン5 mlとともにガラスホモゲナイザーで破砕し，この液を日本白色家兎，雄，4キロの皮下に接種した。接種後，4週間後に全血を採集し，常法により血清を分離して，抗 *P. brasiliensis* 血清とした。血清は同様の菌体から抽出した抗原液と免疫拡散反応を行い，沈降線が出ることを確認した。抗原液はアセトン処理後，乳鉢にて破砕し，生理食塩水に懸濁し，透析膜に入れ，硫酸にて濃縮後，ミリポアフィルターを通過させた。

なおマウスの感染実験，ウサギの血清の作製は共同研究者 佐野文子が千葉大学在職中に作製し，動物福祉委員会の審議を得た上で行っている。

## 免疫染色方法

採材した皮膚病変組織は，10%中性緩衝ホルマリンで浸漬固定し，定法に従ってパラフィンブロックを作製した。4・mのパラフィン切片を脱パラフィンし，抗原賦活を行った後，5%スキムミルクで非特異反応をブロックし，ウサギ抗 *Paracoccidioides brasiliensis* 抗体(1:100; Pb-18

株) と反応させた (4° C, 一晚) . その後, 3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼ阻害 (室温, 20分) を行い, 二次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体(ヒストファインシンプルステイン, ニチレイ) を反応させ (室温, 1時間), 発色には3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Vector Laboratories)を使用した. 発色後, ヘマトキシリンにて対比核染色を行い, 脱水, キシレン透徹, オイキットにて封入した. パラフィンブロックは4・mの厚さで薄切し, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色, 過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色, グロコックト染色を施した.

## 分子生物学的診断法

### 1) 標的遺伝子

ロボミコーシスの原因菌 *Lacazia loboi* は近縁にあるパラコクシジオイデス症の原因菌 *Paracoccidioides brasiliensis* の 43 kDa 糖蛋白抗原遺伝子 (*gp43*) と相同性の高い遺伝子の存在が知られ, GenBank のデータベースにも *L. loboi* の同遺伝子配列が多数登録されている. この遺伝子はパラコクシジオイデス症の遺伝子診断に用いられている遺伝子で, 特異的プライマーも報告されている [34]. また抗原抗体反応でパラコクシジオイデス症とロボミコーシスとの交差反応が知られていることから *P. brasiliensis* 特異的プライマーでも *L. loboi* の同遺伝子が増幅される可能性が考えられた. そこで GenBank に登録されている *P. brasiliensis* の *gp43* 配列 (PBU26160, AY005408, AB304681, AB047690) と *L. loboi* (AY697436 と EU109947) の配列を用いアライメントをとり, 相同性のある塩基配列の存在を確認するとともにプライマー設計の基礎データとした (図 53) .

PBU26160 B339	2341	CAAGAACATTGCTGCGGCGGGGTTAAACCATGT CAGGATCCCGATCGGGTACTGGGCAGT	2400
Pb AY005408	294	CAAGAACATTGCTGCGGCGGGGTTAAACCATGT CAGGATCCCGATCGGGTACTGGGCAGT	353
AB304681 Pb339	1	-----TGCTGCGGCGGGGTTAAACCATGT CAGGATCCCGATCGGGTACTGGGCAGT	51
AB047690 Pb18	1	-----TGCTGCGGCGGGGTTAAACCATGT CAGGATCCCGATCGGGTACTGGGCAGT	51
AY697436LL	1	-----	1
EU109947LL	1	-----	1
.....			
PBU26160 B339	2401	AAATCCTATAGAGGGAGAGCCATATGTACAAGGTCAACTCGACTATTTGGACAAGGCGCT	2460
Pb AY005408	354	AAATCCTATAGAGGGAGAGCCATATGTACAAGGTCAACTCGACTATTTGGACAAGGCGCT	413
AB304681 Pb339	52	AAATCCTATAGAGGGAGAGCCATATGTACAAGGTCAACTCGACTATTTGGACAAGGCGCT	111
AB047690 Pb18	52	AAATCCTATAGAGGGAGAGCCATATGTACAAGGTCAACTCGACTATTTGGACAAGGCGCT	111
AY697436LL	1	-----	1
EU109947LL	1	-----	1
.....			
PBU26160 B339	2461	TGTCTGGGCCAAAACTCAAATCTGAGGGTCGT CATCGATCTCCATGGTGGTAAGTTACA	2520
Pb AY005408	414	TGTCTGGGCCAAAACTCAAATCTGAGGGTCGT CATCGATCTCCATGGTGGTAAGTTACA	473
AB304681 Pb339	112	TGTCTGGGCCAAAACTCAAATCTGAGGGTCGT CATCGATCTCCATGGTGGTAAGTTACA	171
AB047690 Pb18	112	TGTCTGGGCCAAAACTCAAATCTGAGGGTCGT CATCGATCTCCATGGTGGTAAGTTACA	171
AY697436LL	1	-----	1
EU109947LL	1	-----	1
.....			
PBU26160 B339	2521	TAGTCCCTGTAAAGTGAGCATATACTATCGACCCTCATCCATTATTAAGTGAATATCTC	2580
Pb AY005408	474	TAGTCCCTGTAAAGTGAGCATATACTATCGACCCTCATCCATTATTAAGTGAATATCTC	533
AB304681 Pb339	172	TAGTCCCTGTAAAGTGAGCATATACTATCGACCCTCATCCATTATTAAGTGAATATCTC	231
AB047690 Pb18	172	TAGTCCCTGTAAAGTGAGCATATACTATCGACCCTCATCCATTATTAAGTGAATATCTC	231
AY697436LL	1	-----	1
EU109947LL	1	-----	1
.....			
PBU26160 B339	2581	ACTCCCAGTCCCAGGTTCCCAAAACGGCTTCGACAACAGCGGTACCCGTGGCGCCATCAA	2640
Pb AY005408	534	ACTCCCAGTCCCAGGTTCCCAAAACGGCTTCGACAACAGCGGTACCCGTGGCGCCATCAA	593
AB304681 Pb339	232	ACTCCCAGTCCCAGGTTCCCAAAACGGCTTCGACAACAGCGGTACCCGTGGCGCCATCAA	291
AB047690 Pb18	232	ACTCCCAGTCCCAGGTTCCCAAAACGGCTTCGACAACAGCGGTACCCGTGGCGCCATCAA	291
AY697436LL	1	-----AACGGCTTCGACAACAGCGGTACCCGTAGCCCCATCAA	38
EU109947LL	1	-----AACGGCTTCGACAACAGCGGTACCCGTAGCCCCATCAA	38
.....*****.***.***.***			
PBU26160 B339	2641	CTGGCAAAGGGTGACACGATCAAACAAACCCTGATCGCCATCCATACTCTCGCAATCCG	2700
Pb AY005408	594	CTGGCAAAGGGTGACACGATCAAACAAACCCTGATCGCCATCCATACTCTCGCAATCCG	653
AB304681 Pb339	292	CTGGCAAAGGGTGACACGATCAAACAAACCCTGATCGCCATCCATACTCTCGCAATCCG	351
AB047690 Pb18	292	CTGGCAAAGGGTGACACGATCAAACAAACCCTGATCGCCATCCATACTCTCGCAATCCG	351
AY697436LL	39	CTGGCAAAGGGTGACACAGTCAAACAAACCCTGGCCGCCATCCGCGCACTCGCAAACCG	98
EU109947LL	39	CTGGCAAAGGGTGACACAGTCAAACAAACCCTGGCCGCCATCCGCGCACTCGCAAACCG	98
*****.*****.*****.*****.***			
PBU26160 B339	2701	TTACGCCAATCGTACCGACGTCGTTGACTCCATAGAATTGGTCAACAAACCCTCCATACC	2760
Pb AY005408	654	TTACGCCAATCGTACCGACGTCGTTGACTCCATAGAATTGGTCAACAAACCCTCCATACC	713
AB304681 Pb339	352	TTACGCCAATCGTACCGACGTCGTTGACTCCATAGAATTGGTCAACAAACCCTCCATACC	411
AB047690 Pb18	352	TTACGCCAATCGTACCGACGTCGTTGACTCCATAGAATTGGTCAACAAACCCTCCATACC	411
AY697436LL	99	TTACGCCAAGCGTACCGACGTCGTTAACTCCATCGAATTGGTCAACGAACCCTTCGTTCC	158
EU109947LL	99	TTACGCCAAGCGTACCGACGTCGTTAACTCCATCGAATTGGTCAACGAACCCTTCGTTCC	158
*****.*****.*****.*****.***			



## (1) DNA の抽出

生検組織，剖検組織および剖検組織をパラフィン包埋した組織を用いた。

生検および剖検組織は 70 %エタノールで固定後，約 5 x 5 x 5 cm<sup>3</sup>の大きさに切り出し，滅菌蒸留水で洗浄後，1.5 ml サイズの滅菌エッペンチューブに入れ，DEXPAT (TaKaRa, Ohtsu, Japan) を 0.5 ml 入れ，プラスチックホモゲナイザーで粉碎し，100 °C で 10 分加温後直ちに氷水に入れ，12,000 rpm で 10 分遠心後，上清を別の滅菌エッペンチューブに入れ替えた。

さらに上清はエタノール沈殿法により蛋白質などの混雑物を除去した。上清 20  $\mu$ l に対し，3 M の酢酸ナトリウム（和光純薬工業株式会社，大阪，日本）2  $\mu$ l を加え，そこに 100 %エタノールを 50  $\mu$ l 加えた後，静かに転倒混和し，4 °C，15,000 rpm で 10 分遠心した。さらに上清を捨て，そこに 70 %エタノールを 200  $\mu$ l 入れ静かに転倒混和し，4 °C，15,000 rpm で 10 分遠心し，上清を捨て，真空乾燥機で乾燥させた。ここに 20  $\mu$ l の滅菌蒸留水を加え，ボルテックスで混和し，遺伝子検出用の検体とした。なお，DNA 量はイルカ組織も含まれているため，測定はしなかった。

## (2) PCR による *gp43* の増幅

0.2 ml サイズの滅菌エッペンチューブに Ready-to-Go ビーズ（GE ヘルスケアジャパン，東京，日本）1 粒を入れ，検体 2.5  $\mu$ l，20 pM 濃度の *P. brasiliensis* 特異的プライマー MAE（5' -TGC TGC GGC GGG GTT AAA CCA TGT C-3'）および ATO（5' -GTT GTG GTA TGT GTC GAT GTA GAC G-3'）をそれぞれ 2.5  $\mu$ l 加え，ここに滅菌蒸留水を 20  $\mu$ l 加えた後，卓上遠心機でスピンドウンし，下記の条件で遺伝子増幅を行った。

95 °C 4 分で加熱後，94 °C 1 分間-50 °C 1.5 分間-72 °C 2 分間を 40 サイ

クル行った後, 72 °C 10 分間で増幅された遺伝子を伸長させ電気泳動(後述)によりバンドが確認できなかつたため, さらにエタノール沈殿による精製を行った後, 同じ PCR 系をもう 1 回繰り返した.

### (3) 電気泳動による増幅産物の確認

使用したゲルは 1 %のアガロース(和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本)と TBE 緩衝液(バイオラッドラボラトリーズ株式会社, 東京, 日本)を用いた. PCR 産物(サンプル)を 2.5  $\mu$ l とローディング・ダイ(バイオラッドラボラトリーズ株式会社, 東京, 日本)1  $\mu$ l を混合させて, ゲルにアプライした. 遺伝子バンドの指標として, ラダーマーカ(和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本)を 2  $\mu$ l を サンプルの左もしくは左右にアプライし, 100 V で 30 分間, 泳動を行った.

## Nested-PCR 系による遺伝子検出のためのプライマー設計

### (1) プライマーの設計

症例 2 は *P. brasiliensis* 特異的プライマーセット MAE および ATO を用い, 2 回の PCR によっても増幅することが出来なかつた. そこで, GenBank に登録されている *P. brasiliensis* の *gp43* 配列と *L. lobo* とのアライメントをとり, MAE の内側および ATO の短縮配列もしくは内側にプライマーを設計した(図 54).

これらのプライマーを SUM F1 (5' -GTC ATC GAT CTC CAT GGT GTT AAG-3' ), SUM F2 (5' -CCA TCC ATA CTC TCG CAA TC-3' ), SUM R1 (5' -GTT GGT GTG TGT GTC GAT GTA G-3' ) および SUM R2 (5' -GGC AGA RAA GCA TCC GAA A -3' ) とした. なお, R は混合塩基 (C と T の混合) を表す.

*Paracoccidioides brasiliensis* gp43 の部分配列

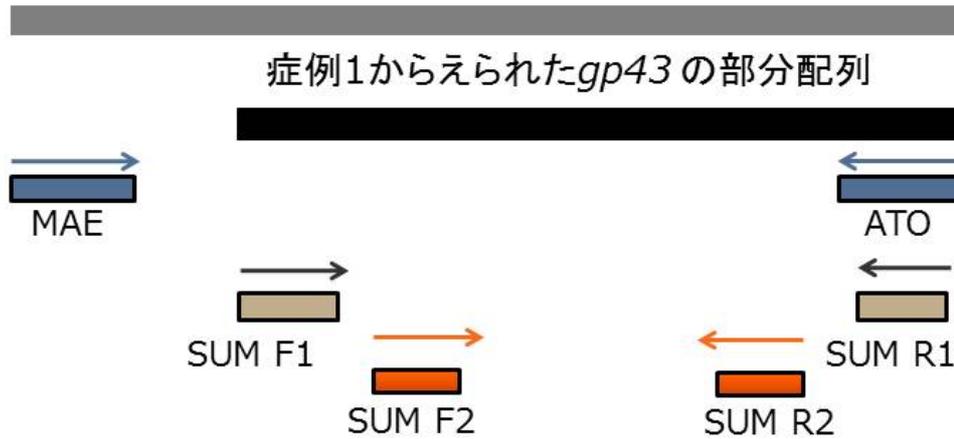


図 54(a). GenBank に登録されている *P. brasiliensis* の *gp43* 配列に基づいた Nested-PCR 系 :

MAE および ATO: ファースト PCR でのプライマー位置, SUM F1, SUM F2, SUM R1, SUM R2: セカンド PCR でのプライマー位置.

MAE	1	-----TGCTGGCGGGGTTAAACCATGTC-----	25
SUM F1	1	-----	1
SUM F2	1	-----	1
PBU26160 Pb	2341	CAAGAACATTGCTGCGGGGGTTAAACCATGTCAGGATCCCGATCGGGTACTGGGCAGT	2400
AY005408 Pb	294	CAAGAACATTGCTGCGGGGGTTAAACCATGTCAGGATCCCGATCGGGTACTGGGCAGT	353
AB304681 Pb339	1	-----TGCTGGCGGGGTTAAACCATGTCAGGATCCCGATCGGGTACTGGGCAGT	51
Present Case	1	-----	1
AY697436 LL	1	-----	1
EU109947 LL	1	-----	1
SUM R2	1	-----	1
SUM R1	1	-----	1
ATO	1	-----	1
MAE	25	-----	25
SUM F1	1	-----	1
SUM F2	1	-----	1
PBU26160 Pb	2401	AAATCCTATAGAGGGAGAGCCATATGTACAAGGTCACTCGACTATTTGGACAAGGCGCT	2460
AY005408 Pb	354	AAATCCTATAGAGGGAGAGCCATATGTACAAGGTCACTCGACTATTTGGACAAGGCGCT	413
AB304681 Pb339	52	AAATCCTATAGAGGGAGAGCCATATGTACAAGGTCACTCGACTATTTGGACAAGGCGCT	111
Present Case	1	-----	1
AY697436 LL	1	-----	1
EU109947 LL	1	-----	1
SUM R2	1	-----	1
SUM R1	1	-----	1
ATO	1	-----	1
MAE	25	-----	25
SUM F1	1	-----GTCATCGATCTCCATGGTTAAG-----	24
SUM F2	1	-----	1
PBU26160 Pb	2461	TGCTGGGCCAAAACTCAAATCTGAGGGTCTGATCATGATCTCCATGGTGGTAAGTTACA	2520
AY005408 Pb	414	TGCTGGGCCAAAACTCAAATCTGAGGGTCTGATCATGATCTCCATGGTGGTAAGTTACA	473
AB304681 Pb339	112	TGCTGGGCCAAAACTCAAATCTGAGGGTCTGATCATGATCTCCATGGTGGTAAGTTACA	171
Present Case	1	-----GTCATCGATCTCCATGGTTAAGTTACA	29
AY697436 LL	1	-----	1
EU109947 LL	1	-----	1
SUM R2	1	-----	1
SUM R1	1	-----	1
ATO	1	-----	1
MAE	25	-----	25
SUM F1	24	-----	24
SUM F2	1	-----	1
PBU26160 Pb	2521	TAGTCCCTGTAAGTGAGCATATACTATCGACCTCATCCATTATTAAGTAAATATCTC	2580
AY005408 Pb	474	TAGTCCCTGTAAGTGAGCATATACTATCGACCTCATCCATTATTAAGTAAATATCTC	533
AB304681 Pb339	172	TAGTCCCTGTAAGTGAGCATATACTATCGACCTCATCCATTATTAAGTAAATATCTC	231
Present Case	30	TAGTCCCTGTAAGTGAGCATATACTATCGACCTCATCCATTATTAAGTAAATATCTC	89
AY697436 LL	1	-----	1
EU109947 LL	1	-----	1
SUM R2	1	-----	1
SUM R1	1	-----	1
ATO	1	-----	1
MAE	25	-----	25
SUM F1	24	-----	24
SUM F2	1	-----	1
PBU26160 Pb	2581	ACTCCAGTCCCGGTTCCAAAACGGCTTCGACAACAGCGGTACCGTGGCGCCATCAA	2640
AY005408 Pb	534	ACTCCAGTCCCGGTTCCAAAACGGCTTCGACAACAGCGGTACCGTGGCGCCATCAA	593
AB304681 Pb339	232	ACTCCAGTCCCGGTTCCAAAACGGCTTCGACAACAGCGGTACCGTGGCGCCATCAA	291
Present Case	90	ACTCCAGTCCCGGTTCCAAAACGGCTTCGACAACAGCGGTACCGTGGCGCCATCAA	149
AY697436 LL	1	-----AACGGCTTCGACAACAGCGGTACCGTGGCGCCATCAA	38
EU109947 LL	1	-----AACGGCTTCGACAACAGCGGTACCGTGGCGCCATCAA	38
SUM R2	1	-----	1
SUM R1	1	-----	1
ATO	1	-----	1
MAE	25	-----	25
SUM F1	24	-----	24
SUM F2	1	-----CCATCATACTCTCGCAATC--	20
PBU26160 Pb	2641	CTGGCAAAAGGGTGACACGATCAAAACAAACCTGATCGCATCATACTCTCGCAATCCG	2700
AY005408 Pb	594	CTGGCAAAAGGGTGACACGATCAAAACAAACCTGATCGCATCATACTCTCGCAATCCG	653
AB304681 Pb339	292	CTGGCAAAAGGGTGACACGATCAAAACAAACCTGATCGCATCATACTCTCGCAATCCG	351
Present Case	150	CTGGCAAAAGGGTGACACGGTCAAAACAAACCTGATCGCATCATACTCTCGCAATCCG	209
AY697436 LL	39	CTGGCAAAAGGGTGACACAGTCAAAACAAACCTGATCGCATCATACTCTCGCAATCCG	98
EU109947 LL	39	CTGGCAAAAGGGTGACACAGTCAAAACAAACCTGATCGCATCATACTCTCGCAATCCG	98
SUM R2	1	-----	1
SUM R1	1	-----	1
ATO	1	-----	1
MAE	25	-----	25

SUM F2 20 ----- 20  
PBU26160 Pb 2701 TTACGCCAATCGTACCGACGTCGTTGACTCCATAGAATTGGTCAACAAACCCCTCCATACC 2760  
AY005408 Pb 654 TTACGCCAATCGTACCGACGTCGTTGACTCCATAGAATTGGTCAACAAACCCCTCCATACC 713  
AB304681 Pb339 352 TTACGCCAATCGTACCGACGTCGTTGACTCCATAGAATTGGTCAACAAACCCCTCCATACC 411  
Present Case 210 TTACGCCAATCGTACCGACGTCGTTGACTCCATAGAATTGGTCAACAAACCCCTCCATACC 269  
AY697436 LL 99 TTACGCCAAGCGTACCGACGTCGTTAACTCCATCGAATTGGTCAACGAACCCCTCGTTCC 158  
EU109947 LL 99 TTACGCCAAGCGTACCGACGTCGTTAACTCCATCGAATTGGTCAACGAACCCCTCGTTCC 158  
SUM R2 1 ----- 1  
SUM R1 1 ----- 1  
ATO 1 ----- 1

MAE 25 ----- 25  
SUM F1 24 ----- 24  
SUM F2 20 ----- 20  
PBU26160 Pb 2761 AGGAGGCGTGCAGGTGCCCTACTGAAGGAATATTAGAGGATGGATATCACATCGTTCC 2820  
AY005408 Pb 714 AGGAGGCGTGCAGGTGCCCTACTGAAGGAATATTAGAGGATGGATATCACATCGTTCC 773  
AB304681 Pb339 412 AGGAGGCGTGCAGGTGCCCTACTGAAGGAATATTAGAGGATGGATATCACATCGTTCC 471  
Present Case 270 AGGAGGCGTGCAGGTGCCCTACTGAAGGAATATTAGAGGATGGATATCACATCGTTCC 329  
AY697436 LL 159 AGGAGGCGTGCAGTGGACCACTGAAGGAATTTACAAGGATGGATATCCATCGTACG 218  
EU109947 LL 159 AGGAGGCGTGCAGTGGACCACTGAAGGAATTTACAAGGATGGATATCCATCGTACG 218  
SUM R2 1 ----- 1  
SUM R1 1 ----- 1  
ATO 1 ----- 1

MAE 25 ----- 25  
SUM F1 24 ----- 24  
SUM F2 20 ----- 20  
PBU26160 Pb 2821 TGATATAGACAGCACCGTTGGCGTGCCAATTCGGATGCTTCTGCCCCCGGCACCTG 2880  
AY005408 Pb 774 TGATATAGACAGCACCGTTGGCGTGCCAATTCGGATGCTTCTGCCCCCGGCACCTG 833  
AB304681 Pb339 472 TGATATAGACAGCACCGTTGGCGTGCCAATTCGGATGCTTCTGCCCCCGGCACCTG 531  
Present Case 330 TAATATAGACAGCACCGTTGGCGTGCCAATTCGGATGCTTCTGCCCCCGGCACCTG 389  
AY697436 LL 219 CGGGTAGACAGCACCGTCAAGGAGTTCAAGAATGTCCACCTCGACGGCAGCTG 278  
EU109947 LL 219 CGGGTAGACAGCACCGTCAAGGAGTTCAAGAATGTCCACCTCGACGGCAGCTG 278  
SUM R2 1 -----TTTCGGATGCTT-TCTCCC----- 18  
SUM R1 1 ----- 1  
ATO 1 ----- 1

MAE 25 ----- 25  
SUM F1 24 ----- 24  
SUM F2 20 ----- 20  
PBU26160 Pb 2881 GAATGGCTTTTGGGCCCAAGACATACAAGAAGCTTACCTCGACACATACCA----C 2935  
AY005408 Pb 834 GAATGGCTTTTGGGCCCAAGGATACAAGAAGCTTCTCCGACACATACCA----C 888  
AB304681 Pb339 532 GAATGGCTTTTGGGCCCAAGACATACAAGAAGCTTACATCGACACATACCA----C 586  
Present Case 390 GAATGGCTTTTGGGCCCAAGGCTTCAAGAAGCTTACATCGACACATACCAACCCAC 449  
AY697436 LL 279 GAATGGCTTTCATGGGCCCAAGGAGTTCAAGAATGTCCACCTCGACGGCAGCTG----C 333  
EU109947 LL 279 GAATGGCTTTCATGGGCCCAAGGAGTTCAAGAATGTCCACCTCGACGGCAGCTG----C 333  
SUM R2 18 ----- 18  
SUM R1 1 -----CTACATCGACACATACCA----C 19  
ATO 1 -----CGTCTACATCGACACATACCA----C 22

MAE 25 ----- 25  
SUM F1 24 ----- 24  
SUM F2 20 ----- 20  
PBU26160 Pb 2936 AACCAAGTCTTCGATGATATCTTTAGGACCTTCACCATTGACCAGCACGTGAAGCTTGCA 2995  
AY005408 Pb 889 AACCAAGTCTTCGATGATATCTTTAGGACCTTCACCATTGACCAGCACGTGAAGCTTGCA 948  
AB304681 Pb339 587 AAC----- 589  
Present Case 450 AACCAAGTCTTCGATGATATCTTTAGGACCTTCACCATTGACCAGCACGTGAAGCTTGCA 509  
AY697436 LL 334 TACCAAGTCTTCGATGATGCTTTAAGACCTTCA---TTGACCAGCACGTGAAGCTTGCA 390  
EU109947 LL 334 TACCAAGTCTTCGATGATGCTTTAAGACCTTCA---TTGACCAGCACGTGAAGCTTGCA 390  
SUM R2 18 ----- 18  
SUM R1 20 AAC----- 22  
ATO 23 AAC----- 25

MAE 25 ----- 25  
SUM F1 24 ----- 24  
SUM F2 20 ----- 20  
PBU26160 Pb 2996 TGCTCGCTTCTCATGACAGACTTAGAGGAGCCGATAAGCCGTTGATTGTGAAGAGTGG 3055  
AY005408 Pb 949 TGCTCGCTTCTCATGACAGACTTAGAGGAGCCGATAAGCCGTTGATTGTGAAGAGTGG 1008  
AB304681 Pb339 589 ----- 589  
Present Case 510 TGCTCGCTTCTCATGACAGACTTAAAGGAGCCGATAAGCCGTTGATTGTGAAGAGTGG 569  
AY697436 LL 391 TGCTCGCTGCCAAGGACAGACTTAGCGGGGTTGATAAGCCGTTGATTGTGGCGAGTGG 450  
EU109947 LL 391 TGCTCGCTGCCAAGGACAGACTTAGCGGGGTTGATAAGCCGTTGATTGTGGCGAGTGG 450  
SUM R2 18 ----- 18  
SUM R1 22 ----- 22  
ATO 25 ----- 25

MAE 25 ----- 25  
SUM F1 24 ----- 24  
SUM F2 20 ----- 20

AY005408 Pb	1009	AGCGGTGCCATGACTGACTGCGCCATGTATCTAAATGGGCGTGGCATAGGTTTCGCGATT	1068
AB304681 Pb339	589	-----	589
Present Case	570	AGCGGTGCCATGA-----	582
AY697436 LL	451	AGCGGTGCCATGACTGACTGCGCCATGTATCTA-----	483
EU109947 LL	451	AGCGGTGCCATGACTGACTGCGCCATGTATCTA-----	483
SUM RZ	18	-----	18
SUM R1	22	-----	22
ATO	25	-----	25

図 54(b). *P. brasiliensis* および *L. loboi* の *gp43* 配列とプライマー配列のアラインメント.

## (2) Nested-PCR 系による遺伝子増幅

ファースト PCR は MAE および AT0 を用いて、前述と同じ条件で増幅させた。ファースト PCR 終了後、泳動で増幅産物を確認したが検出されなかった。そこでファースト PCR 増幅産物をエタノール沈殿し、セカンド PCR はプライマーセット SUM F1 と SUM R1, SUM F1 と SUM R2, SUM F2 と SUM R1, SUM F2 と SUM R2 を用い、アニーリング温度は 50°C と 53°C の 2 種類を使い、確実に最も長い遺伝子増幅産物を得られるプライマーの組み合わせを検討した。

上記検討から、セカンド PCR に SUM F1 と SUM R2 にて増幅された PCR 産物が最も長い配列が得られたことから (図 55) , このプライマーの組み合わせで得られた PCR 産物の配列を決定した。

## (3) Nested-PCR で増幅された遺伝子の配列決定

配列決定のための処理として、PCR 増幅産物 20  $\mu$  l をとり、3 M の酢酸ナトリウム 2  $\mu$  l を加え、そこに 100 % エタノールを 50  $\mu$  l 加えた後、静かに転倒混和し、4°C, 15,000 rpm で 10 分遠心した。さらに上清を捨て、そこに 70% エタノールを 200  $\mu$  l 入れ静かに転倒混和し、4°C, 15,000 rpm で 10 分遠心し、上清を捨て、真空乾燥機で乾燥させた。ここに 20  $\mu$  l の滅菌蒸留水を加え、ボルテックスで混和し、遺伝子配列決定用の検体とした。このときの DNA 量は PCR バンドと DNA 量指標となるラダーマーカーの太さからおおよその DNA 量を推定し、20~40 ng/ $\mu$  l になるように適宜希釈して、配列決定用 DNA 原液とした。

配列決定は 6.4 pM の各プライマーと希釈した検体 1  $\mu$  l を加え、全体量を 14  $\mu$  l とし、遺伝子解析会社 (FASMAC, 神奈川, 日本, ABI PRISM 3100 sequencer (Applied Biosystems) を使用) に配列解読用データの作製を依頼した。

配列の解読は GENETYX-MAC (Ver. 12.1, GENETYX, 東京) を用い、アラ

イメントをとり症例 1 由来配列 582 塩基を決定し，DDBJ に AB811031 と  
して登録するとともに，症例 2 由来配列は 382 塩基を決定し，症例 1 と  
100% 相同であることを確認した（図 56）．なお配列後半の詳細に就い  
ては，今後の論文に記載するため，ここでは割愛する．

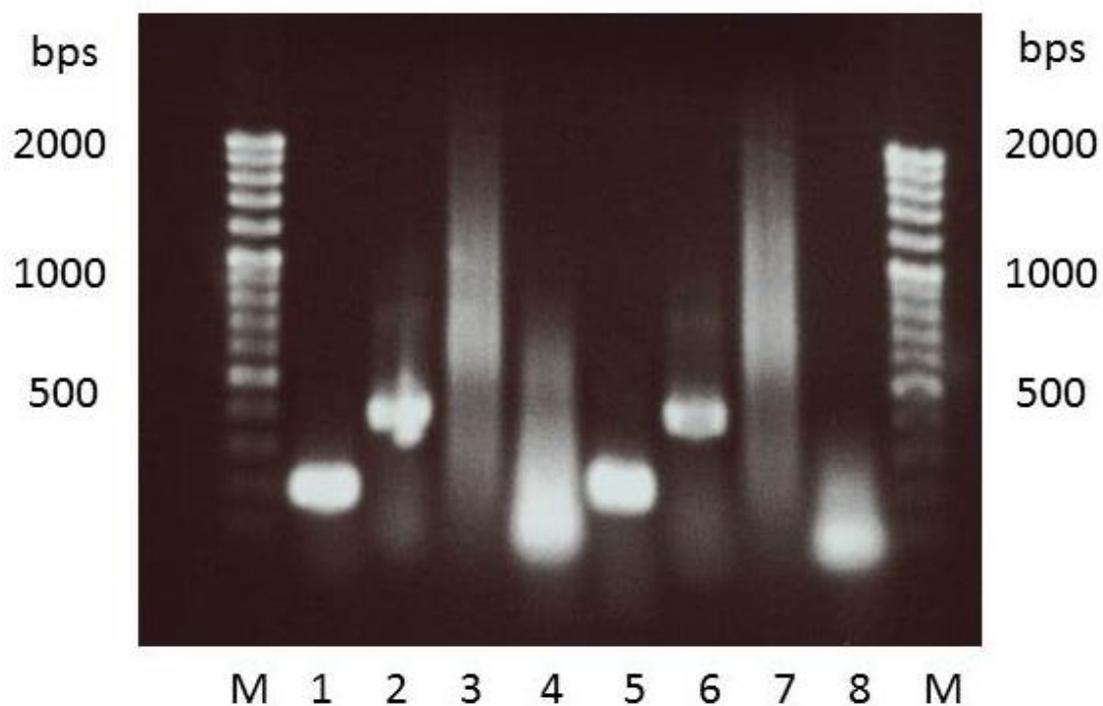


図 55. Nested-PCR 系による遺伝子増幅

M: マーカー, 1~4: 50°C 条件, 5~8: 53°C 条件 1: SUM F2-SUM R2,  
 2: SUM F1-SUM R2, 3: SUM F2-SUM R1, 4: SUM F1-SUM R1,  
 5: SUM F2-SUM R2, 6: SUM F1-SUM R2, 7: SUM F2-SUM R1,  
 8: SUM F1-SUM R1.

症例1	1	GTCATCGATCTCCATGGTGTTAAGTTACATAGTCCCTGTAAAGTGAGCATATACTATCGA	60
症例2	1	GTCATCGATCTCCATGGTGTTAAGTTACATAGTCCCTGTAAAGTGAGCATATACTATCGA	60
		*****	
症例1	61	CCCTCATCCATTATTAAGTGAATATCTCACTCCCAGTCCCGGGTCCCAAACGGCTTC	120
症例2	61	CCCTCATCCATTATTAAGTGAATATCTCACTCCCAGTCCCGGGTCCCAAACGGCTTC	120
		*****	
症例1	121	GACAACAGCGGTACCGTGGCGCCATCAACTGGCAAAGGGTGACACGGTCAAACAACC	180
症例2	121	GACAACAGCGGTACCGTGGCGCCATCAACTGGCAAAGGGTGACACGGTCAAACAACC	180
		*****	
症例1	181	CTGGTCGCCATCCATACTCTCGCAATCCGTTACGCCAATCGTACCACGTCGTTGACTCC	240
症例2	181	CTGGTCGCCATCCATACTCTCGCAATCCGTTACGCCAATCGTACCACGTCGTTGACTCC	240
		*****	
症例1	241	ATAGAATTGGTCAACAAACCCTTCGTACCAGGAGCGTGCAGGTGCCCTACTGAAGGAA	300
症例2	241	ATAGAATTGGTCAACAAACCCTTCGTACCAGGAGCGTGCAGGTGCCCTACTGAAGGAA	300
		*****	
症例1	301	TATTATAAGAATGGATATGACATCGTTTCGTAATATAGACAGCACCGTTGGCGTCGCAATT	360
症例2	301	TATTATAAGAATGGATATGACATCGTTTCGTAATATAGACAGCACCGTTGGCGTCGCAATT	360
		*****	
症例1	361	TCGGATGCTTTTCTGCCCCCGCGCAGCTGGAATGCTTTTTTGGCGCCAAGGCCTTCAAG	420
症例2	361	TCGGATGCTTTTCTGCCCCCGC-----	382
		*****	

図 56. Nested-PCR で増幅された遺伝子の配列決定結果

症例 2 から 382 塩基を決定したところ、症例 1 と 100% 相同であった。

## Nested-PCR 用プライマーの特異性の確認

ファースト PCR 用プライマーは *P. brasiliensis* に特異的であることは既報で報告されている [34]. 今回設計した Nested-PCR 用プライマーの特異性を確認するために、イヌ、ネコ、ヤギ、パピローマ症のイルカ、ヒト、牛、豚、ラットおよび主な病原真菌の *P. brasiliensis* (IFM 41621), *Coccidioides immitis* (IFM 59903), *Blastomyces dermatitidis* (IFM 41316), *Histoplasma capsulatum* (IFM 41612), *Absidia corymbifera* (IFM 40776), *Alternaria alternata* (IFM 53969), *Aspergillus flavus* (IFM 41621), *Aspergillus fumigatus* (IFM 41621), *Aspergillus terreus* (IFM 54306), *Aspergillus niger* (IFM 54309), *Basidiobolus ranarum* (IFM 414131), *Candida albicans* (IFM 5740), *Candida dubliniensis* (IFM 41621), *Candida glabrata* (IFM 5520), *Candida kefyr* (IFM 51428), *Candida guilliermondii* (IFM 5942), *Candida krusei* (IFM 47973), *Candida parapsilosis* (IFM 47375), *Candida tropicalis* (IFM 49331), *Cladophialophora bantiana* (IFM 4807), *Cladophialophora carrionii* (IFM 4809), *Cokeromyces recurvatus* (IFM 47049), *Conidiobolus coronatus* (IFM 46067), *Cryptococcus neoformans* (IFM 5830), *Cunninghamella bertholletiae* (IFM 46110), *Emericella nidulans* (IFM 54308), *Exophiala dermatitidis* (IFM 4836), *Exophiala spinifera* (IFM 45990), *Exophiala jeanselmei* (IFM 54222), *Fonsecaea pedrosoi* (IFM 54322), *Fusarium moniliforme* (IFM 54323), *Fusarium solani* (IFM 54324), *Geotrichum candidum* (IFM 5806), *Hortaea werneckii* (IFM 41539), *Malassezia furfur* (IFM 52635), *Malassezia sympodialis* (IFM 48109), *Mortierella isabellina* (IFM 40782), *Mucor circinelloides* (IFM 40507), *Mucor racemosus* (IFM 40781), *Neosartorya fischeri* (IFM 54311), *Paecilomyces lilacinus* (IFM 54312), *Penicillium citrinum* (IFM 54313), *Penicillium griseofulvum* (IFM 54314), *Penicillium*

*marneffeii* (IFM 41708), *Phialophora richardsiae* (IFM 54325),  
*Phialophora verrucosa* (IFM 5089), *Prototheca wickerhamii* (IFM 5695),  
*Rhinoctadiella atrovirens* (IFM 4931), *Rhizomucor pusillus* (IFM  
41621), *Rhizopus microsporus* (IFM 41621), *Rhizopus oryzae* (IFM  
40786), *Rhizopus stolonifer* (IFM 41594), *Scedosporium apiospermum*  
(IFM 49731), *Schizophyllum commune* (IFM 46097), *Scopulariopsis*  
*brevicaulis* (IFM 54315), *Sporothrix schenckii* (IFM 41598),  
*Syncephalastrum racemosum* (IFM 40788), *Trichophyton mentagrophytes*  
(IFM53931), *Trichosporon asahii* (IFM 45429), *Veronaea botryosa* (IFM  
53351), および *Zygorhynchus exponens* (IFM 40789)についてセカンド  
PCR のプライマーでの増幅を試みた.

各種病原真菌のうち *P. brasiliensis* は約 450 塩基サイズ, *Candida albicans* で約 350 塩基サイズのバンドを検出した以外, 他の菌種でのバンドは増幅されなかった. なお, 泳動は *P. brasiliensis* と同じオニゲナ目菌種に属する高度病原性真菌症原因菌の *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* とともにを行い比較した (図 57) .

また, 症例 1 および 2 由来の DNA を直接セカンド PCR 用のプライマーで増幅させたが, 増幅は認められず, 哺乳類由来の DNA に対する特異性はヒト由来 DNA で約 430 塩基, イルカのパピローマ症例由来 DNA で約 520 塩基のバンドが検出された以外の増幅は認められなかった (図 58) .

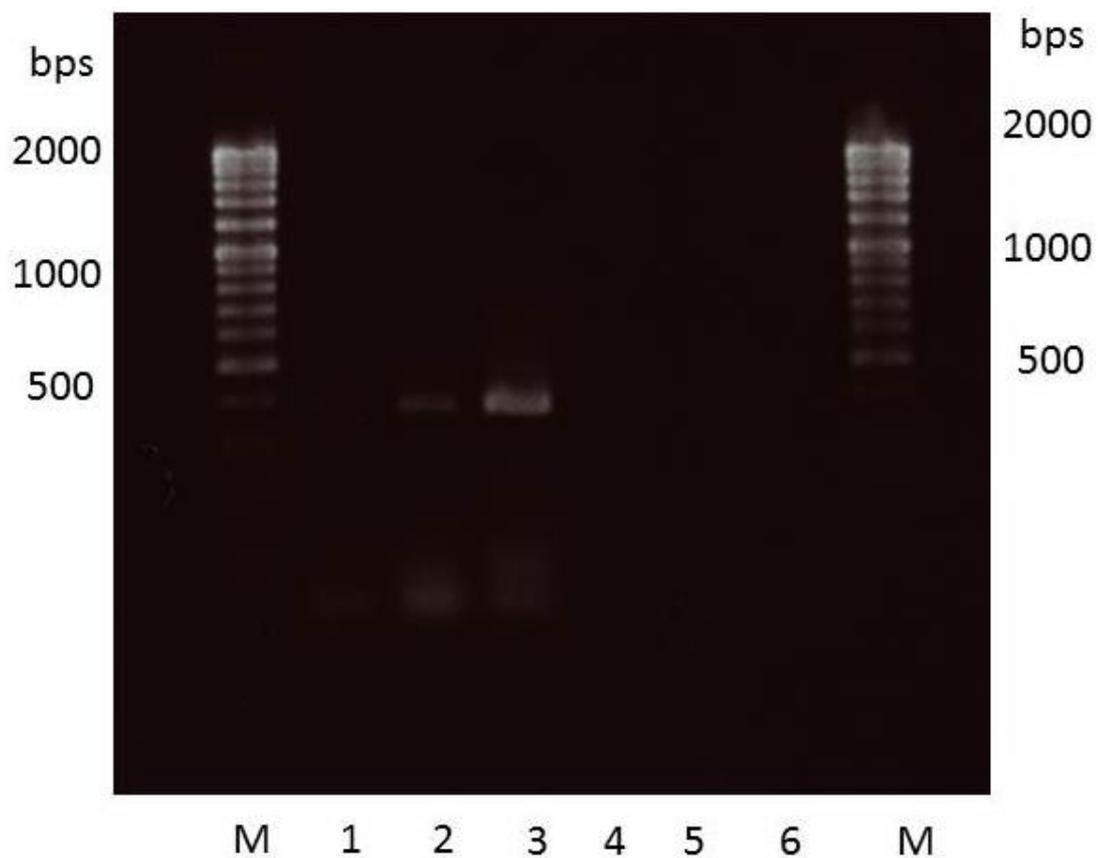


図 57. Nested-PCR 用プライマーの特異性の確認  
(ロボミコーシス関連菌種)

M: マーカー, 1: SUM F1-SUM R2 のみの症例 2 サンプル, 2: nested-PCR による症例 2 サンプル, 3: *Paracoccidioides brasiliensis*, 4: *Coccidioides immitis*, 5: *Blastomyces dermatitidis*, 6: *Histoplasma capsulatum*.

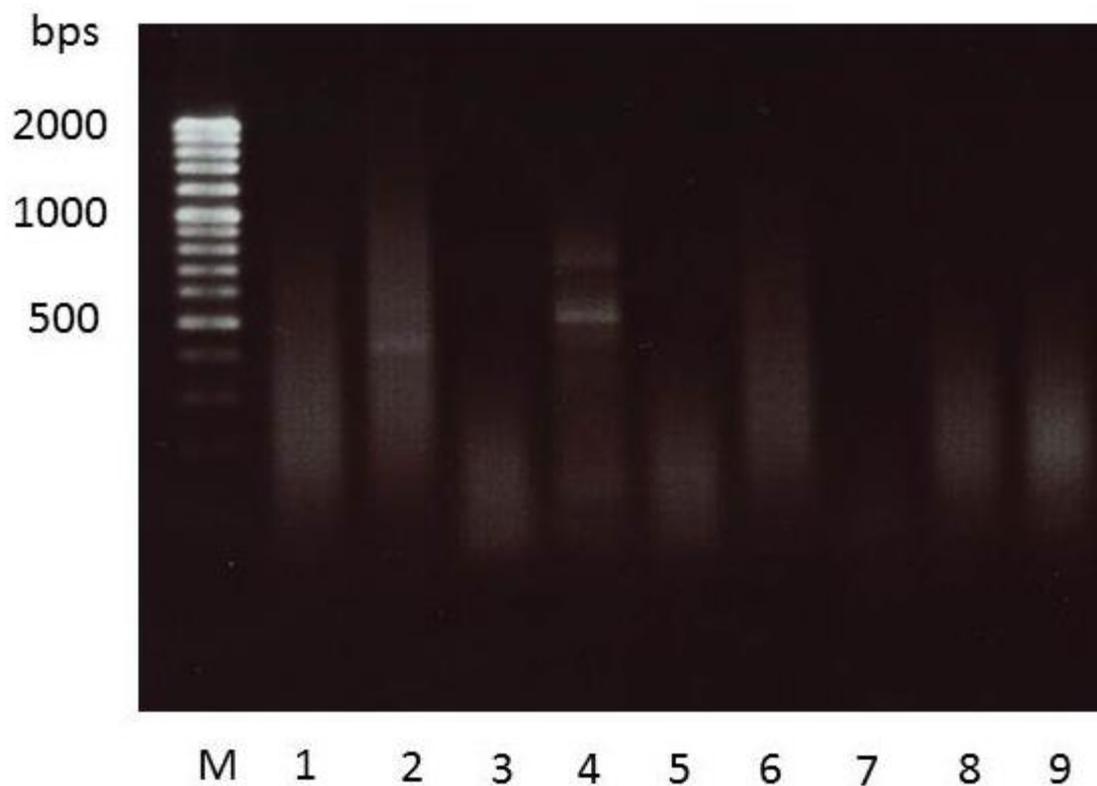


図 58. Nested-PCR 用プライマーのほ乳類由来 DNA に対する  
特異性の確認

M: マーカー, 1: イヌ DNA , 2: ヒト DNA , 3: ネコ DNA 1,  
4: イルカ DNA (パピローマ症), 5: ウシ(食肉), 6: ヤギ DNA,  
7 :ネコ DNA 2, 8: ラット DNA, 9: ブタ(食肉).

## 分子系統学的解析

症例1由来の配列と *P. brasiliensis* の *gp43* 配列 (PBU26160) , 関連菌種の *P. lutzii* (XM\_002792442) , *L. loboii* (EU109947) , および近縁菌種の *Ajellomyces dermatitidis* ( XM\_002624715 ) と *A. capsulatus* (XM\_001540694) の配列の相同性を GENETYX-MAC (Ver. 12.1, GENETYX, 東京) [7] を用い, アライメントをとって比較した. それぞれの相同性は (図59) に示した.

今回の症例由来配列は既知の *L. loboii* 配列との相同性は84.1%, 一方 *P. brasiliensis* とは94.9%, *P. lutzii* とは87.7% で, *P. brasiliensis* との相同性が高かった. また, これらの配列を用い最大節約法により, 系統樹を作成した. アライメントは CLUSTALX (Version 1.8) [7] で行い, PAUP v4.0b10 [30] により, 最大節約法による系統樹のデータを作成し, Tree View PPC [23] (Roderic D. M. Page, Glasgow, Scotland, UK, 1998; <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) により, 作図した. ブートストラップ値は50%以上を記入した. その結果, 今回の分離株の分子系統樹に占める位置は既報の *L. loboii* とは異なり, *P. brasiliensis* に近縁であった (図60) .



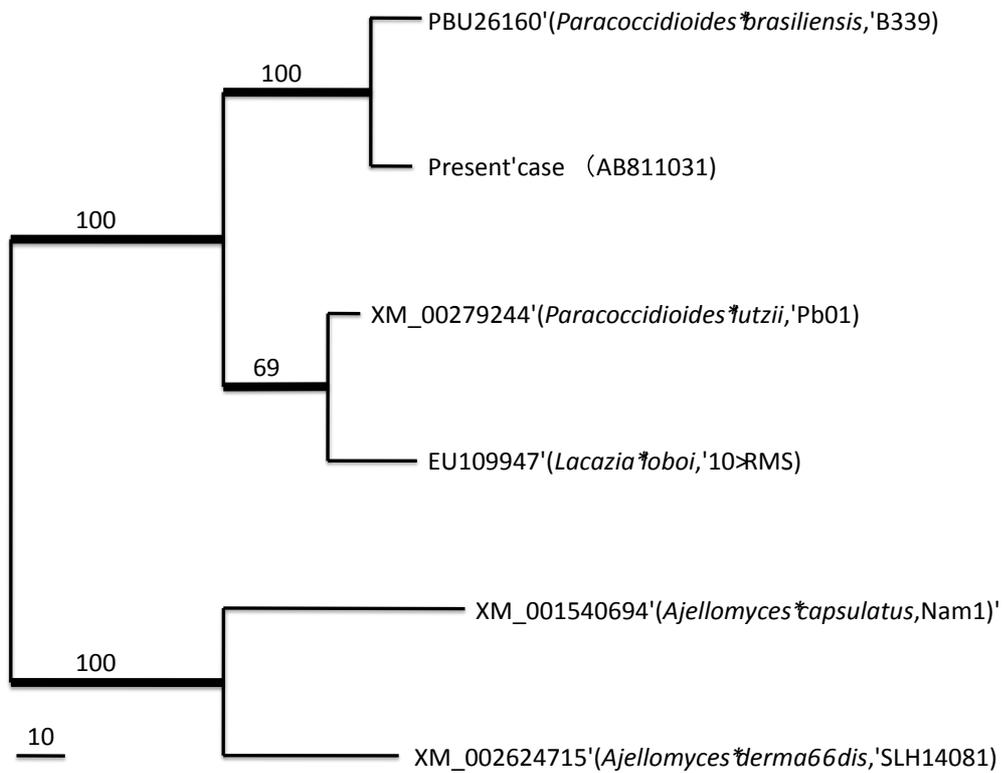


図 60. 最大節約法による gp43 配列に基づく分子系統樹.

Tree length = 273

Consistency index (CI) = 0.9377

Homoplasy index (HI) = 0.0623

CI excluding uninformative characters = 0.8988

HI excluding uninformative characters = 0.1012

Retention index (RI) = 0.8786

Rescaled consistency index (RC) = 0.8239

ブートストラップ値は 50%以上を太線で示した. 各データはアクセシ  
ョン番号, 菌種, 株名で表した. バーは置換塩基数を示す.

## 考察

各種診断方法に基づいて、新興真菌感染症の一つであるラカジオーシスの確定診断がなされた今回の症例は太平洋地域では初めてである。それ以前に日本周辺海域でもラカジオーシス様の症状を呈したイルカ症例の目撃例が報告されていたが [34]，分子生物学的データに基づいた診断は行われていなかった。今回の症例から解読された遺伝子配列は、既知のロボミコーシス由来の *L. loboï* 配列よりも中南米の風土病的高病原性真菌症の一つであるパラコキシジオイデス症の原因菌 *P. brasiliensis* との相同性が高いことが示唆された。よって、今回の原因菌の遺伝子型は太平洋地域に限局した特異的な遺伝子型であることが推測された。さらに、複数例が同じ遺伝子型で発症していたことから偶発的な発症ではなく、少なくとも、我が国沿岸で生息しているバンドウイルカの中で流行している遺伝子型であることが示唆された。一方、太平洋地域では、ハワイの水族館でのイルカ症例が報告されているが [32]，こちらでも分子生物学的診断はなされていないばかりでなく、イルカはフロリダから搬入されたもので、従来の流行地である地中海沿岸地域での感染と推測されている。

また、真菌では一般にリボゾーム RNA 遺伝子の internal transcribed spacer (ITS)-1-5.8S-ITS 2 領域の配列の相同性に基づいて同一種と判定する方法がとられている。種内多型は一般的には 98-99%以上 [18]，種内変異が多い菌種でも 95%以上の相同性を示すと報告されている [18]。今回もリボゾーム RNA 遺伝子の検出を予備的に試みたが検出に至らなかった。そのため GenBank データベースに多数の配列が登録されている機能遺伝子の 43 kDa 糖蛋白抗原遺伝子 (*gp43*) に着目して、検出した経緯がある。

この *gp43* 配列を比較すると *P. brasiliensis* と *L. loboï* 由来配列は 15%以上異なるものの、それぞれの菌種の種内変異は 2 %以下である。

一方、今回の症例由来の遺伝子配列は *P. brasiliensis* との相同性が 94%以上、*L. loboi* との相同性が 84%以上であったことから、*P. brasiliensis* により近縁な系統学的関連にあることが示唆された。さらに 1 症例だけでなく 2 症例から同じ遺伝子型が検出されたことから、新種を提唱できる可能性がある。

ラジオーシスは高度病原性真菌症の一種で、我が国では現在までヒト、動物を通じて報告された例は見当たらない。ラジオーシスはこのように稀でかつ危険度の高い病原体による感染症であることに加え、培養困難であることから、臨床症状、細胞検査、病理組織学的検査と免疫学的診断法や遺伝子検出による補助診断との総合による診断が必要である。なかでも遺伝子検出による診断は免疫学的診断法と並んで迅速診断法として有用である。今回設計した nested-PCR 系による遺伝子検出法は遺伝子抽出から 2 回の PCR および泳動による増幅された遺伝子の確認までのプロセスがおおよそ 24 時間以内である。

プライマーの特異性、検出感度についてまだ改良の余地があるが、現在のところ、この検出系で遺伝子増幅が認められることにより、我が国沿岸で発生したラジオーシスの診断に対応できると考えている。

今後は、近縁菌種の *P. brasiliensis* の迅速診断と同様に loopmediated isothermal amplification method (LAMP 法) [4] を本菌種遺伝子検出に応用すること、ならびに *P. brasiliensis* のゲノムサイトを参照して、他の遺伝子の検出系も開発し、多遺伝子検出による診断精度の向上を目指す必要があると考えている。

## 小括

内科学的アプローチにおいては，受信動作により種々の検査が低侵襲に実現可能となった．これは水棲動物である小型歯クジラ類の検査方法において非常に有益であった．また陸上動物と同様に画像診断が可能となり，様々な病気を診断することができた．

抗菌剤の投与については，供試個体が展示動物であるため非常に少ない例数ではあるが，体重比による経口投与が有効であることが示唆された．また現在多くの水族館で問題となっている真菌感染症治療においては，従来の予防的投与だけでなく，確定診断を行い適切な抗真菌剤の選択を行うことでより迅速に治療を行うことができた．

更に高度病原性真菌症であるラカジオーシスについても，遺伝子検出による診断を用いることで免疫学的診断法と並んで迅速診断が可能となった．

## 第Ⅱ章

### 小型歯クジラ類に対する外科的アプローチ

#### 序文

イルカは水棲の大型動物で保定などの扱いが難しいばかりでなく、体表は分厚い脂肪層を伴った硬い皮膚で覆われており、傷の縫合方法1つとっても陸上動物とは大きく異なった鯨類の生物学的特質が手術治療をさらに困難にさせている。従って、水族館におけるイルカ類の日常の治療の多くは保存的治療であり、血液学的検査細菌学的検査に基づいた内科学的治療が主体に行われ、外科的治療は飼育施設設備や管理上の困難さにより敬遠されてきた。沖縄美ら海水族館では、飼育するイルカ類の健康管理の一環として、これまで超音波診断装置、X線撮影装置、CT画像診断装置などを導入して適正診断に心がけ、外科的治療を積極的に実施してきた。

そのため小型歯クジラ類をはじめとする水棲動物に対する外科的アプローチの一環として、①外科手術を実施した4症例について②尾びれ成形手術後に遊泳補助具として開発したバンドウイルカの人工尾びれについての2節に分けて報告する。

第1節の「外科手術に関する研究」では、背びれの裂創に対する成形手術、尾びれ成形手術、胴体背部鉗摘出手術、縫合を伴うリンパ節摘出手術の4手術例を経験し良好な結果を得たので、術後経過を含めて報告する。

第2節の「人工尾びれプロジェクト」では、株式会社ブリヂストン社と開発を行った人工尾びれの有益性を検証するために実施した「揚抗力測定」、データロガーと画像データより導いた「遊泳能力解析」と、障害のある飼育イルカに理学療法を施すことにより成功させた「QOL改善のためのリハビリテーション」について、その詳細を述べる。

## 第 1 節

### 外科的手術に関する研究

我が国の水族館では多くのイルカ類が飼育されているが、イヌやネコなどの中・小型の伴侶動物などと比較して、健康時のデータや疾病に関するデータ蓄積が少なく、治療方法に関しても他の陸棲哺乳類のデータを参考にして判断する事もある。また、イルカは水棲の大型動物で保定などの扱いが難しいばかりでなく、体表は分厚い脂肪層を伴った硬い皮膚で覆われており、傷の縫合方法 [13] を 1 つとっても陸上動物とは大きく異なった鯨類の生物学的特質が手術治療をさらに困難にさせている。従って、水族館におけるイルカ類の日常の治療の多くは保存的治療であり、血液学的検査細菌学的検査に基づいた内科学的治療が主体に行われ、外科的治療は飼育施設設備や管理上の困難さにより敬遠されてきた。

沖縄美ら海水族館では、飼育するイルカ類の健康管理の一環として、これまで超音波診断装置、X線撮影装置、CT画像診断装置などを導入して適正診断に心がけ、外科的治療を積極的に実施してきた。今回、背びれの裂創に対する成形手術から、縫合を伴うリンパ節摘出手術に至る 4 手術例について述べる。

#### 材料と方法

##### 【症例 1】背びれの裂創に対する成形手術

ミナミバンドウイルカ (*Tursiops aduncus*, 個体名: ポイ, 雄, 飼育歴 26 年, 体長 259cm, 体重 194kg) であり, 2002 年 4 月に背びれが飼育プールの金属突起物に激突し, 血管損傷を伴う裂傷を負った (図 61)。電気メスにより焼絡し止血したが, 遊泳により生じる水圧で裂創部はめくれ上がり, 遠位部が湾曲して裂創は癒合することはなかった (図 62)。

第 33 病日目に背びれ湾曲部の整形手術を実施した。500t の円形プー

ル（直径 5m，深さ 3m）の水を抜き（落水），その中で保定台に乗せて拘束帯にて体幹を固定した（図 63）．背びれ近位部にエピネフリン入キシロカイン（商品名：キシロカイン注射液「0.5%」エピレナミン）を用いた局所麻酔を実施し，めくれ上がった背びれの遊離部を水流の抵抗を軽減するために体軸に対して鈍角に切除した（6cm×6cm）．切除部は電気メスにて止血した（図 64）．手術時間は 30 分であった．

術後 9 日目までは，1 日 2 回落水し，結合組織の腐敗部分を鈍性剥離にてデブリードメントし，その後ポピドンヨードで洗浄し，水槽に水を注入するまでの数十分間はポピドンヨードゲルにショ糖を加えた軟膏を創部に塗布した．術後 10 日目には肉芽組織の再生が確認された為，落水処置を停止しイルカショーステージにランディングさせて，同様の処置を反復した．そ術後 62 日目で創部は皮膚で覆われ，現在では欠損が確認できないまでに修復している（図 65）．



図 61. 裂創患部

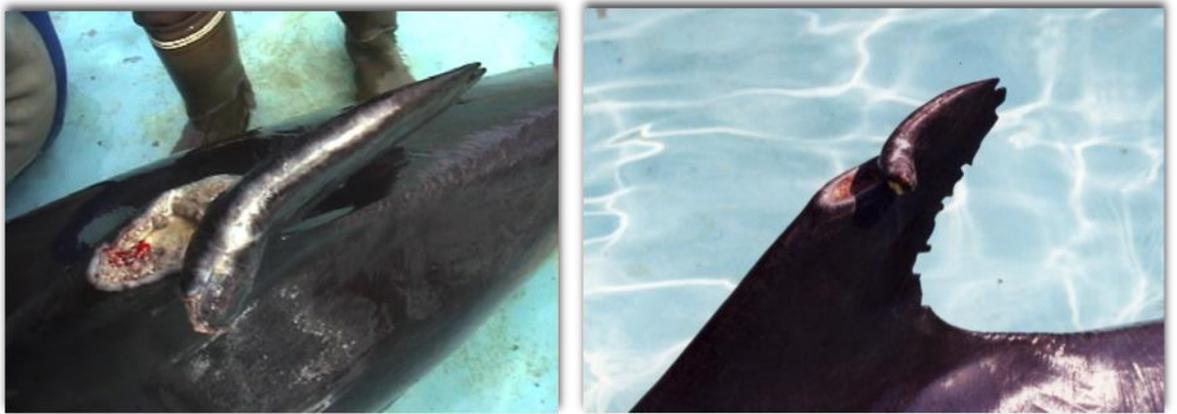


図 62. 遠位部が湾曲して裂創患部



図 63. 落水したプールでの保定方法

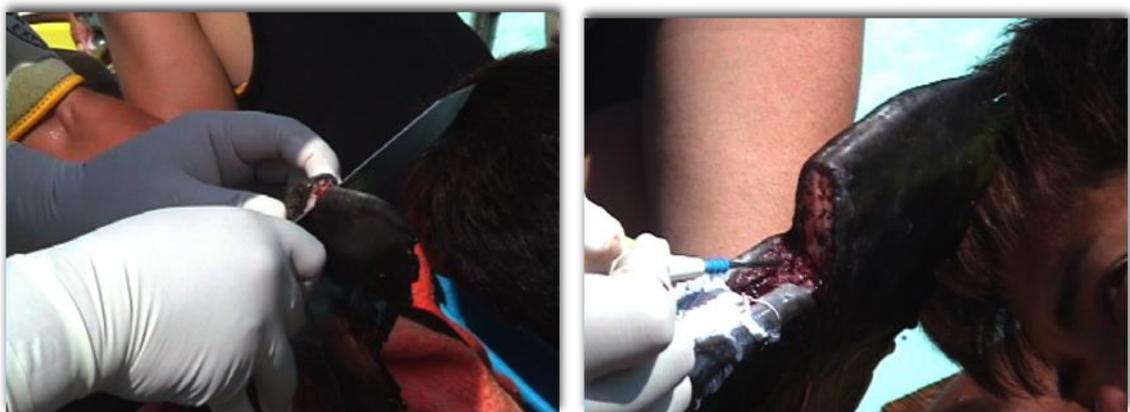


図 64. 手術風景



図 65. 完治した患部

## 【症例 2】尾びれ成形手術

バンドウイルカ (*Tursiops truncatus*, 個体名: フジ, 雌, 飼育歴 26 年, 体長 270cm, 体重 220kg) .

細菌感染および循環不全により尾びれが壊死した (図 66) . 抗菌剤の投与および輸液により改善を試みたが, 尾びれの壊死の進行を阻止できなかったため, 結合組織が露出して湾曲した壊死部の切除を行った (図 67) .

しかしながら尾びれの壊死の進行は止まることは無く (図 68), 第 23 病日目に尾びれの成形手術を実施した. 手術は, 落水した 500t の円形プール (直径 5m, 深さ 3m) 内で体躯を保定台に乗せて行った. 拘束帯にて体幹を固定し, 尾びれの血行状態をサーモグラフィー検査で確認した後 (図 69), 切除部位の近位部にエピネフリン入キシロカインによる局所麻酔を施し, 尾びれ両端と後端部, すなわち尾びれ全体の約 75% に相当する部分を電気メスで切除すると同時に止血を行った. 創部の縫合は行わず, 開放とした (図 70) . 手術時間は 30 分であった.

術後 2 日目からは, 1 日 2 回落水し, 結合組織の腐敗部分を鈍性剥離にてデブリードマンし, その後ポピドンヨードにて創部の洗浄消毒を徹底的に行った. 術後 3 日目に肉芽組織の再生が確認された (図 71) . その後術後 83 日目までは前述の消毒処置を実施した. 翌 84 日目から 174 日目までの間は, 摂餌および体調の安定に伴い, 受診動作訓練にて尾びれを水上で保定した状態で 1 日 3-5 回の頻度でポピドンヨードを塗布し, 最低 3 分以上の間, 水に浸けることなく患部を消毒した. 術後 174 日目患部は皮膚に覆われ (図 72-73), その後, 多くの専門家の協力を得て開発された人工尾びれを装着し (図 74), リハビリテーションを経て, 健康個体と同様のジャンプなどが出来るまでに回復した (図 75) .



図 66. 尾びれが壊死の状態



図 67. 壊死した部分の切除手術



図 68. 壊死の進行状態

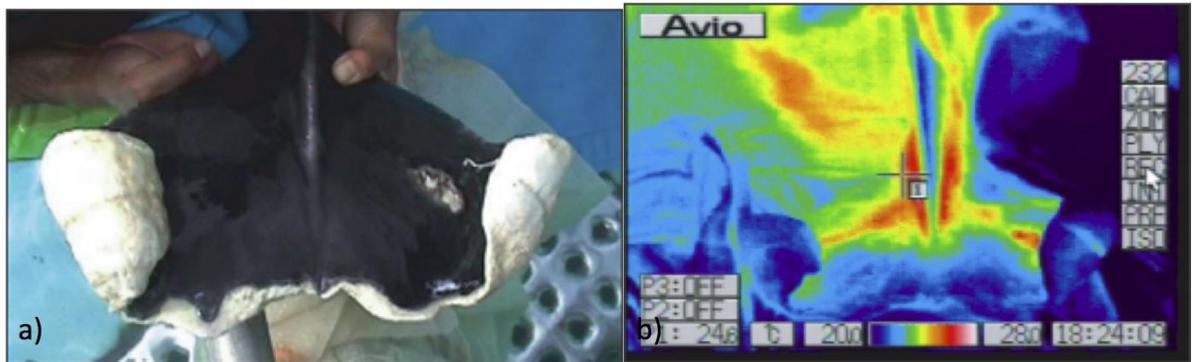


図 69. サーマグラフィー検査にて尾びれの血流状態を確認した

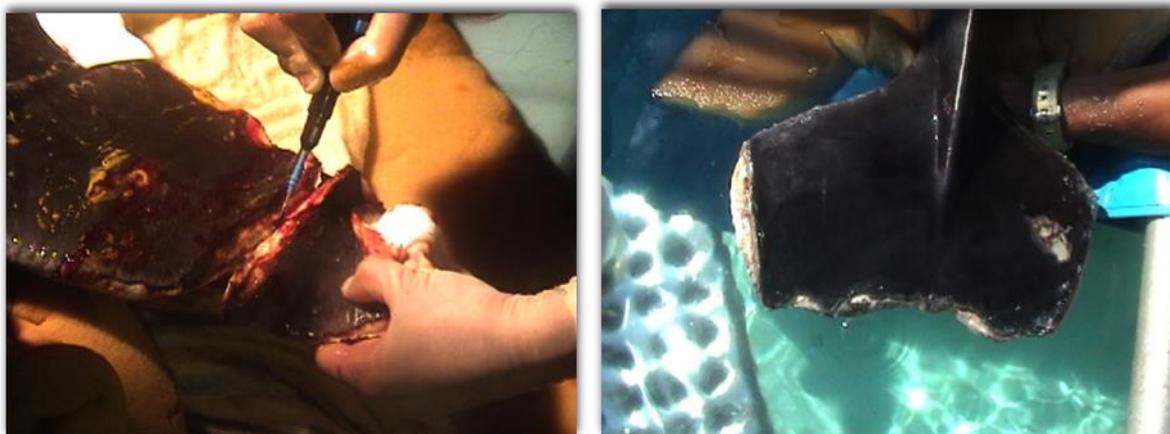


図 70. 電気メスにて尾びれの切除手術を行った



図 71. 壊死の進行が止まる



図 72. 患部の治癒経過



図 73. 患部の治癒経過



図 74. 人工尾びれを取り付けたバンドウイルカ



図 75. 人工尾びれを取り付けてのジャンプ

### 【症例 3】胴体背部銛摘出手術

緊急保護したオキゴンドウ (*Pseudorca crassidens*, 個体名: オキゴンドウ No.4, 雌, 飼育歴 3 年, 体長 406cm, 体重 615kg) であり, 2004 年 3 月の搬入当時より背びれの左前方約 10cm に排膿を伴う瘻孔が観察された。2005 年 5 月より排膿量が著しく増加したため (図 76), サーモグラフィ検査, X 線検査と超音波画像診断検査を実施したところ, 約 10cm のイルカ漁用の着脱型の突棒銛が埋没していることが確認された (図 77)。

診断後第 20 病日目に胴体背部銛摘出手術を実施した。症例をプール外に搬出して, 体躯を低反発マットレス上に保定してイルカ自身の体重による内臓への圧迫を軽減させながら手術を実施した (図 78-79)。エピネフリン入キシロカインにて創部より半径 10cm を円形状に局所麻酔を行った。銛の埋没位置を超音波画像検査により確認し, 瘻管より外側に約 3cm 離れた健常部の皮膚を銛の方向に直線状に約 10cm 切開した。創口から鉗子を挿入し銛を摘出した (図 80)。手術創は USP 5 号の針付きナイロン糸 (ETHILON 2, ETHICON) を用いてクロスパターン法で結紮縫合した (図 81)。手術時間は 65 分で, 個体を水槽から出して戻すまでは 95 分であった。摘出したイルカ銛はステン性で折れた枝の一部が腐敗していた (図 82)。

術後管理: 術後 10 日目までは, 1 日 2 回落水し, 縫合部位にポピドンヨードを塗布し洗浄消毒を行った (図 83)。翌 11 日目から抜糸を終了する術後 14 日目までは, 1 日 1 回落水し同様の処置を実施した。術後 43 日目には縫合部は癒合した。瘻孔は 60 日目に閉鎖した (図 84)。



図 76. オキゴンドウの背部の排膿を伴う婁孔

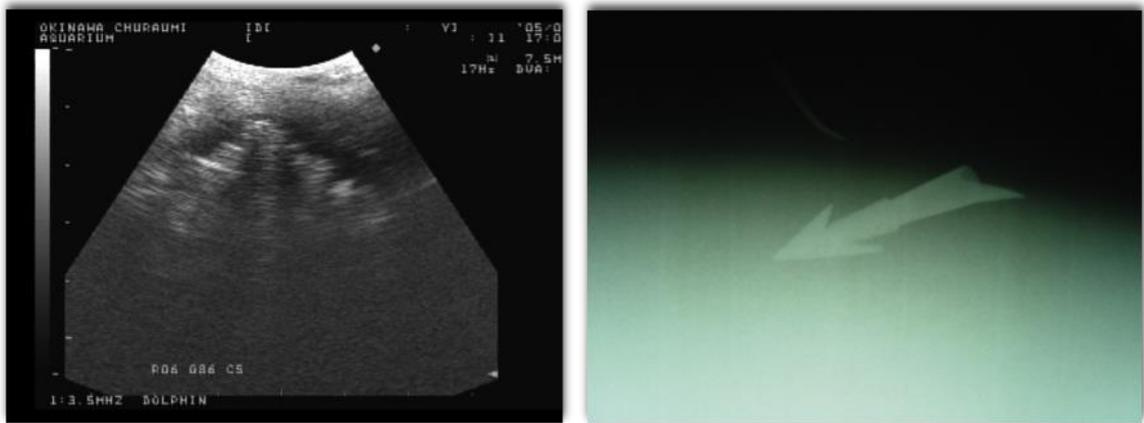


図 77. 創部の超音波画像診断像と X 線像



图 78. 搬出及び保定方法



图 79. 手術風景



図 80. 創口から鉗子を挿入し鉤を摘出した



図 81. クロスパターン法で結紮縫合



図 82. 摘出したイルカ銚



図 83. 術後の消毒方法



図 84. 術後の患部の治癒経過

#### 【症例 4】左頸部リンパ節摘出手術

1998年9月に保護したシワハイルカ (*Steno bredanensis*, 個体名: ラーフ, 雄, 体長 250cm, 体重 164kg) .

搬入時より頸部左下部に手拳大の腫脹が見られた. 1年をかけて腫脹部は次第に大きくなり (図 85), 同時に白血球数 (好中球) の増加が認められた. 腫脹部を穿刺すると排膿が回収され, *Staphylococcus aureus* が検出された. その後経時的に腫脹部の超音波画像診断検査を行い, 内部の状態を観察し, 洗浄, 消毒, 抗菌薬の投与を行うも腫脹を繰り返した. さらに1年後, 腫脹部がソフトボール大にまで大きくなり, それに伴い一般状態の悪化が認められたため, X線検査, サーモグラフィー検査と超音波画像診断検査により (図 86-87) リンパ節の変性と診断し摘出を試みた.

手術は, プール外にて担架に乗せ, その両端を三脚で固定する「担架つり下げ状態」にて実施した (図 88). 患部にエピネフリン入キシロカインを創部周辺に局所麻酔して, 呼吸数と心拍数のモニタリングを行いながら実施した. 切開は, 腫脹部0時から6時までを尾側に円を描く半円上に切皮し, 皮弁を頭側に牽引しその間隙から腫瘍周囲の組織を切離し摘出した (図 89). 皮下組織は, USP 0号の合成吸収糸 (PDS, ETHICON) を用いて単結紮の埋没縫合を行い, 皮膚は USP 5号の針付きナイロン糸 (ETHILON 2, ETHICON) を用いてクロスパターン法で結紮縫合し, さらにかがり縫合を追加した. 特に皮膚縫合においては, 切開面のずれや縫合時の閉め過ぎによる凹凸などにより間隙や段差が生じないように注意を払って実施した (図 90). 手術時間は90分で, 個体を水槽から出して戻すまでは125分であった.

術後2日目から術後36日目までは, 1日2回落水し, 縫合部位及び結合組織の腐敗部分を鈍性剥離にてデブリードマンし, その後ポピドンヨードにて創部の洗浄消毒を徹底的に行った. 術後20日目に抜糸を終了

した．術後 37 日目から術後 70 日目に正常部の皮膚で覆われるまでは，1 日 1 回落水と受信動作訓練にて患部を水上で保定した状態で 1 日 3 回の頻度でポピドンヨードを塗布し最低 3 分以上の間，水に浸けることなく患部を消毒した（図 91）．摘出した腫瘤は病理検査の結果，化膿性肉芽腫リンパ節炎であった．



図 85. シワハイルカの左頸部腫脹部位

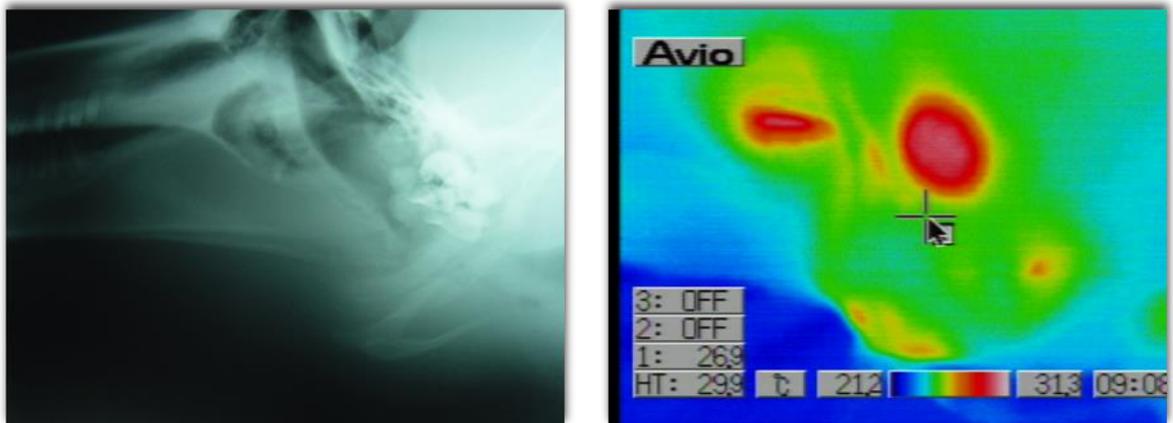


図 86. 腫脹部の X 線像とサーモグラフィー像



図 87. 腫脹部の超音波画像診断像



図 88. 手術風景

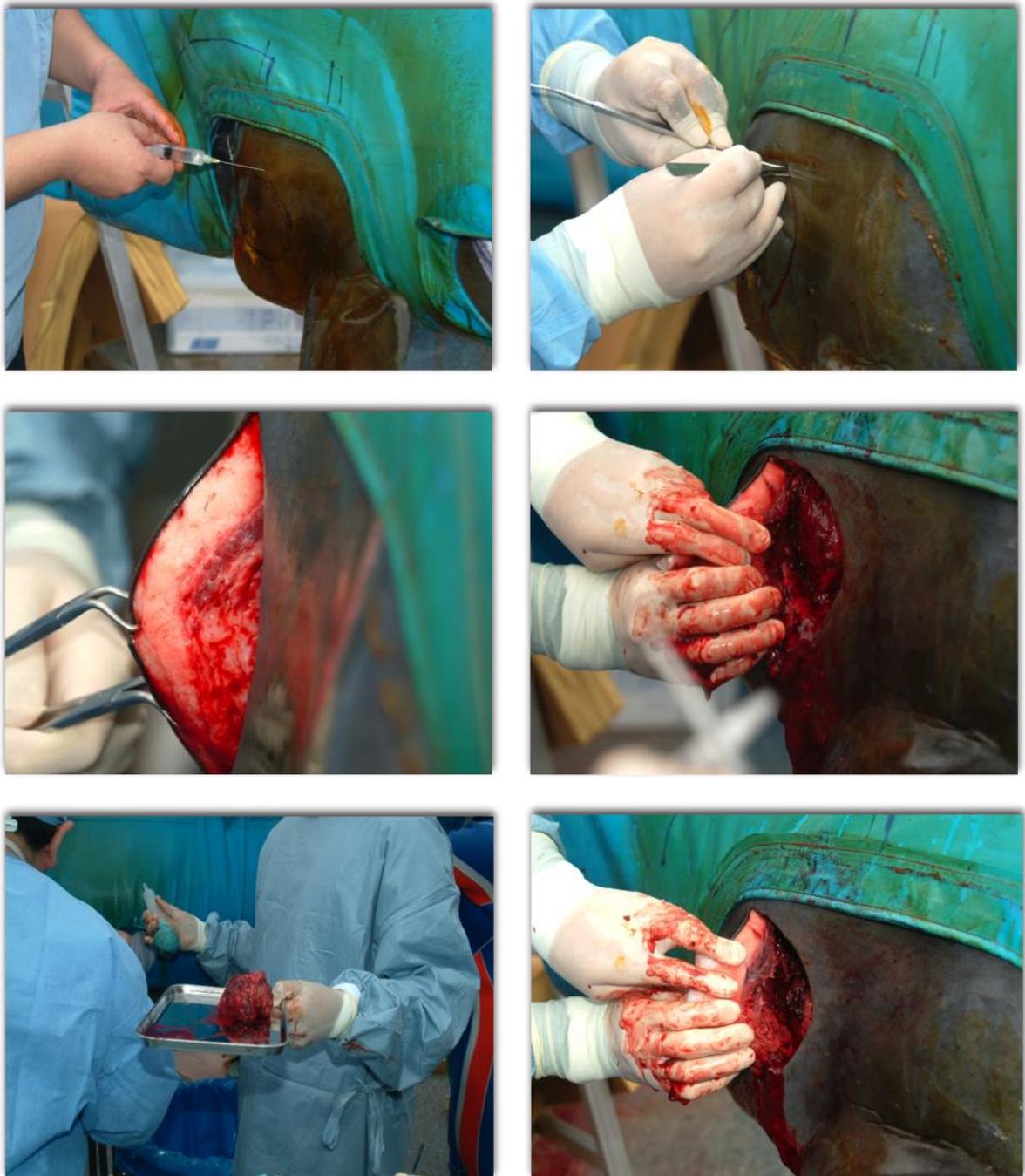


図 89. 切開術及びリンパ節の摘出

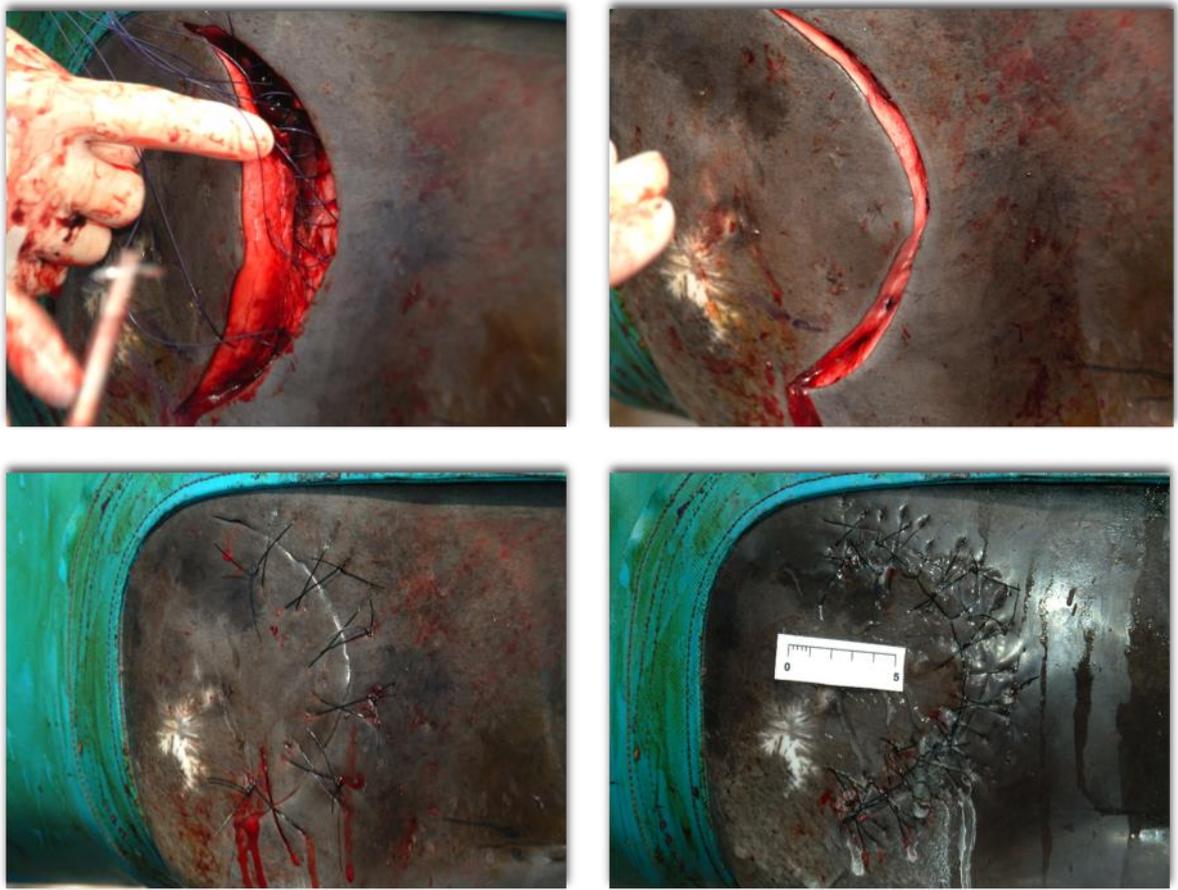


図 90. クロスパターン法で結紮縫合し，さらにかがり縫合を実施した

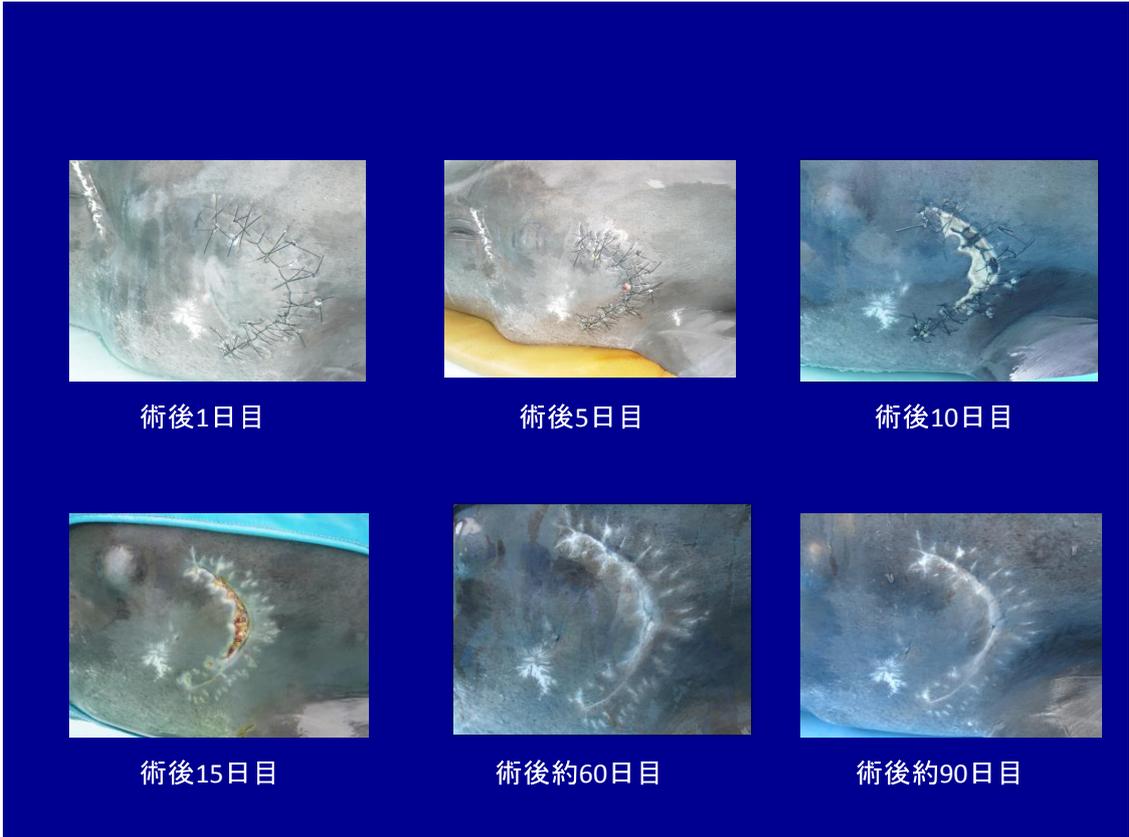


図 91. 患部の治癒経過

## 考察

日本は世界的に例を見ないほどの水族館保有国であり、飼育している生物も多種多様である。しかしそれら生物に対する獣医学的な知見や臨床例は決して多くはない。また水族館の展示の花形であるイルカ類は水中生活であることにより陸上動物では容易な種々の検査や治療が困難である。このため、外科的治療データは少なく、これまで動物購入による補充が比較的容易であったことから積極的な外科治療がなされてこなかった。しかし近年、動物愛護の観点からも適正な飼育管理、健康管理を行うことが必要不可欠となってきている。加えて水族館の責務として、野生個体の新規搬入は可能な限り少なくし、繁殖個体によって必要な飼育個体を維持することが求められている。こうした状況の元、水族館での展示動物飼育の長期化に伴い、日常的な外傷はもとより、より重症度の高い疾患への外科的対応が必要になってきている。

長年の課題であった皮膚の切離や、皮膚切開による体内病変の摘出、その後の縫合などの経験を積むことにより、適切な外科的処置による治療の可能性が示された。また、手術時の保定では、低反発マットや担架を使うことにより自重による内臓圧迫のストレスを軽減することができ [28]、2 時間にわたる水槽外での外科的処置が可能であることが明らかとなった。手術部の皮膚の回復には、家畜では通常抜糸は通例 7 日目に行われるが [10]、イルカ類に特有の皮膚構造と水棲動物であることにより、陸上動物のそれに比べて長時間を要した。この間、創部周囲の壊死組織を付着させたままにしておくと二次感染の原因や肉芽組織の再生の妨げになるものと推察されたことから、手術後直後から積極的な創部の清浄化とデブリードメントを実施した。また周術期においては、通常飼育プールの塩素濃度は 0.1ppm で管理している所を、二次感染を予防する目的で、飼育員が観察、管理出来る 8 時間の間、2-4ppm の高濃度にした。さらに落水処置や受信動作訓練を行うことによって患部を確実に観察、

デブリードメント出来る体制を整えることが重要であると考える。獣医師や飼育員には水の無い環境で患部を消毒処置することを意識付けし、また消毒剤の効果が得られる処置後の時間確保が求められる。

我々の経験を踏まえて、今後多くの園館でイルカ類に対する適正な外科的治療が実施されることを期待している。数多くの症例を得る事で、より高度な術式や全身麻酔等による麻酔管理技術も向上していくことと思われる。また美ら海水族館では、今後飼育動物の高齢化により腫瘍性疾患の発生も危惧される。このような場合の外科的治療に対処すべく、各種診断機器の応用、手術時に動物に与える負荷を軽減するための保定方法と麻酔方法、手術時のモニタリング方法と手術式、周術期の管理方法等について検討していきたい。

## 第 2 節

### 人工尾びれプロジェクト

2002 年 10 月，突然 1 頭のバンドウイルカの尾びれに壊疽が発症した．抗菌剤の投薬治療では壊疽の進行をくいとめることが出来ず，尾びれの約 75% を切除するという水族館ではまれな外科的処置に踏み切った．飼育員と協力して術後管理にも工夫を重ね，術後 197 日目で創部の傷は完治に至ったが，尾びれの大部分を切除する事による遊泳能力の低下だけではなく，遊泳意欲の喪失が顕著となり，同じ飼育水槽にいる他個体との社会性も失われ孤立した状態が続いた．そのような状況を改善するために，世界初の試みである遊泳補助具として有効な「人工尾びれ」を立案し，遊泳能力の補完はもとより，補助装具を使った理学療法を通じて，患畜自身の遊泳能力の向上と社会性の再獲得を諮った．

2002 年 12 月，イルカの尾びれの感触が硬いゴム様であることから，ゴム製品の製造に優れた株式会社ブリヂストン社の協力により「イルカの遊泳運動能力回復を目的とした補助装具としての人工尾びれの開発」に着手した [9, 35]．制作にあたり，人工尾びれを装着することにより (1) 健常なイルカと同等の遊泳動作が可能になること (2) 他の正常個体との共棲を取り戻すこと，を目標に，イルカを傷つけることなく安全性が高く，，丈夫で遊泳時に高い推進力が得られ，着脱が容易であることを設計条件とした [8, 24] ．

2004 年 12 月に最終型が完成し，患畜は遊泳能力も社会性も取り戻す事が出来た．これらの一連の経過を「人工尾びれプロジェクト」と称しているが，本小節では人工尾びれの有益性を検証するために実施した，揚抗力測定，遊泳能力解析，QOL 改善のためのリハビリテーションについて述べる．

## 揚抗力測定

人工尾びれの性能を客観的に評価するために、尾びれの形状が飛行機の翼と類似しているという事実[11-12] から東京大学大学院工学系研究科所有の船型試験水槽にて揚抗力測定の実験を行い、ゴム硬度の違い及び、バンド装着とカウリング装着との違いの定量的な検討を行った。

### 材料と方法

#### 材料

##### 1) クロスバンド型 (図 92)

主材料：硬度 40 度及び 70 度シリコーンゴム

クッション剤：エバーライトモラン

形状：横幅 70cm, 縦幅 25cm, 重量 2.2kg

健全なバンドウイルカの尾びれを CAD スキャンし、可能な限り忠実に外形を再現した。人工尾びれ内部には擦過傷防止のため、保水性に富む FPDM 製発泡ゴム（エチレン・プロピレン・ジエンゴム, 商品名：エバーライトモラン<sup>TM</sup>）保護層として採用した。取り付けは人工尾びれの前縁部に切り込みを入れてフジの尾びれを挿入し、尾びれ付け根部位の両端からたすき様にナイロン製のバンドで締めて固定した。

##### 2) カウリング型 (図 93)

尾びれ材料：硬度 70 度シリコーンゴム

中芯素材：カーボクロス

カウリング素材：カーボクロス綾織

クッション剤：エバーライトモラン

形状：横幅 70cm, 縦幅 25cm, 重量 2.2kg

人工尾びれ内部に CFRP（カーボン繊維による強化プラスチック）製のブーメラン型中芯を入れて翼部の強度を増し、曲げ剛性を得た。また遊泳

時の抵抗力を軽減するために、CFRP 製のカバーで尾びれ両肩の部分より後端までを覆い、後端部をねじとナットで固定した。

## 方法

実験水槽は、東京大学大学院工学系研究科所有の船型試験水槽を使用した（長さ 80m，幅 3.5m，深さ 2.4m）。図 94 に示すように、フジの尾びれモデル（シリコンゴム製）へ東大保有の計測用具を取り付け、そこへ、人工尾びれを装着し、バンドまたはカウリングで固定する。なお、フジの尾びれモデルは、流体抵抗を低減させるため、先端を丸く削ってある（図 95）。上記モジュールを 3 分力計へ取り付け、深さ 550mm，規定の迎角に設定した。そして、速度 2.5m/sec で曳航し、その時に発生する揚力および抗力を測定した。

図 96 に実験装置の写真を、図 97 に測定の概略を示す。

人工尾びれモデルは基準面がないので、概略水平と思われる面を作り、ここに計測用具をセットした。そのため、迎角が  $0^\circ$  の所でも、揚力が発生する場合があった。その際は、迎角が  $0^\circ$  で揚力が 0 になる様に補正を実施し、揚力データとした。また、計測用具の抵抗分は、補正を行った。

- ・揚抗比 = (揚力) / (抗力)
- ・抗力係数  $C_D = (\text{抗力}) / (0.5 * \rho * V^2 * S)$
- ・揚力係数  $C_L = (\text{揚力}) / (0.5 * \rho * V^2 * S)$

ただし、S：尾びれの平面面積



図 92. クロスバンド型人工尾びれ



図 93. カウリング型人工尾びれ

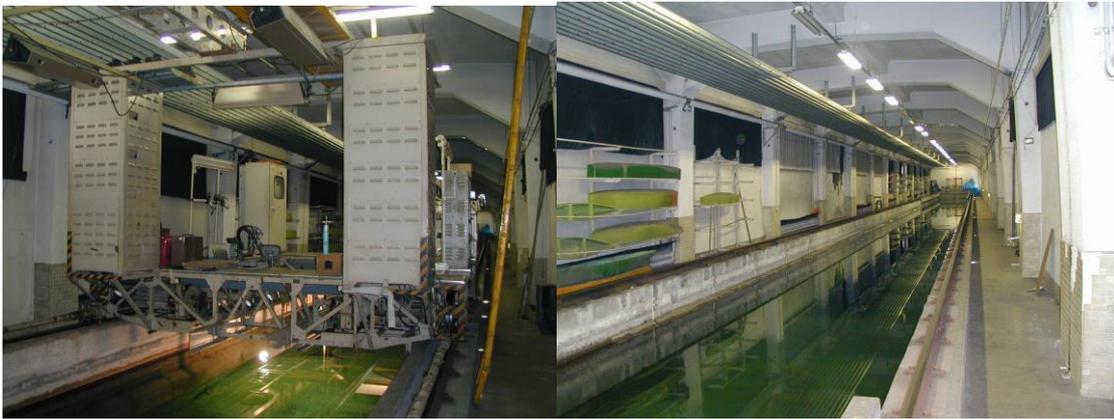


図 94. 実験水槽

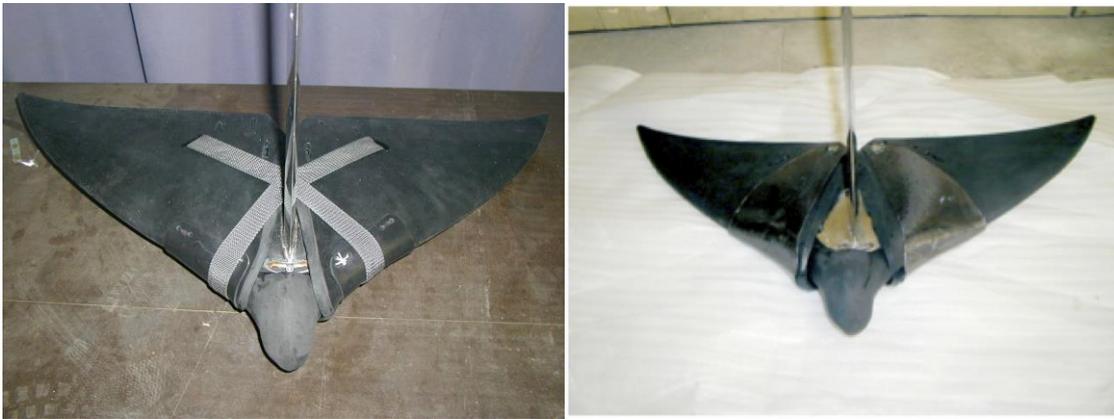


図 95. 実験器具に固定させた人工尾びれ



図 96. 実験水槽を用いた人工尾びれの流体特性計測

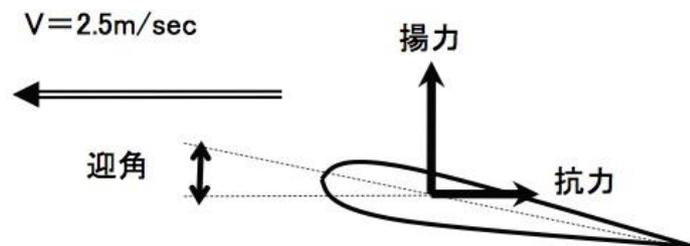


図 97. 測定の概略

## 結果

揚抗比が高い，すなわち抗力係数が低くかつ揚力係数が高いものが翼性能として良い人工尾びれと考え，下記評価基準で，各人工尾びれでの実験から得られた結果をプロットし，比較した．その結果，形状が同じ尾びれ型を用いて，クロスバンド型とカウリング型との比較をした結果，迎角 20 度以下の範囲において，カウリング型の方がクロスバンド型より約 2 倍の揚抗比を示すことが判明した（図 98）．

また形状が同じ尾びれ型において，ゴムの硬度の違いの定量的な検討を行った結果，硬度 40 度品，70 度品，カーボンファイバー性の中芯を埋め込んだ硬度 70 度品の 3 パターンを，同一クロスバンド装着型で比べた場合，揚抗比は 40 度 < 70 度 < 70 度 + 中芯の順となった（図 99）．

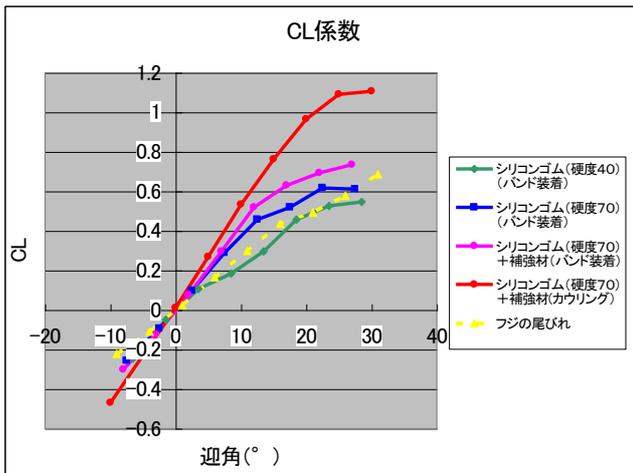
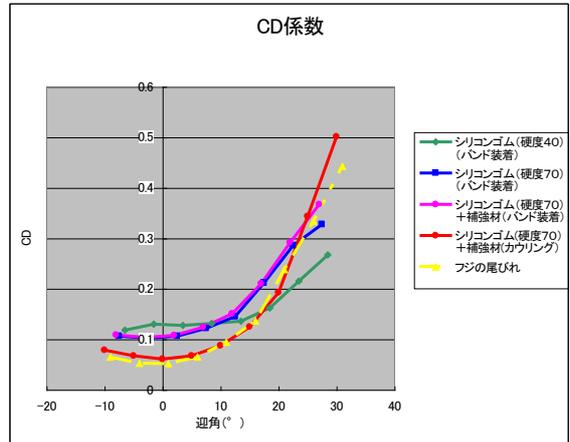
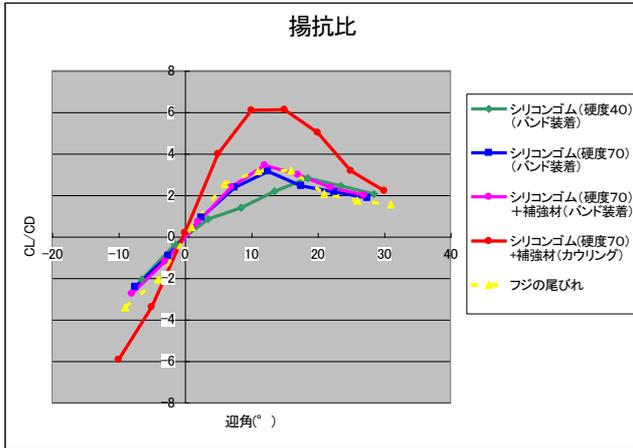


図 98. 揚抗力比の実験結果

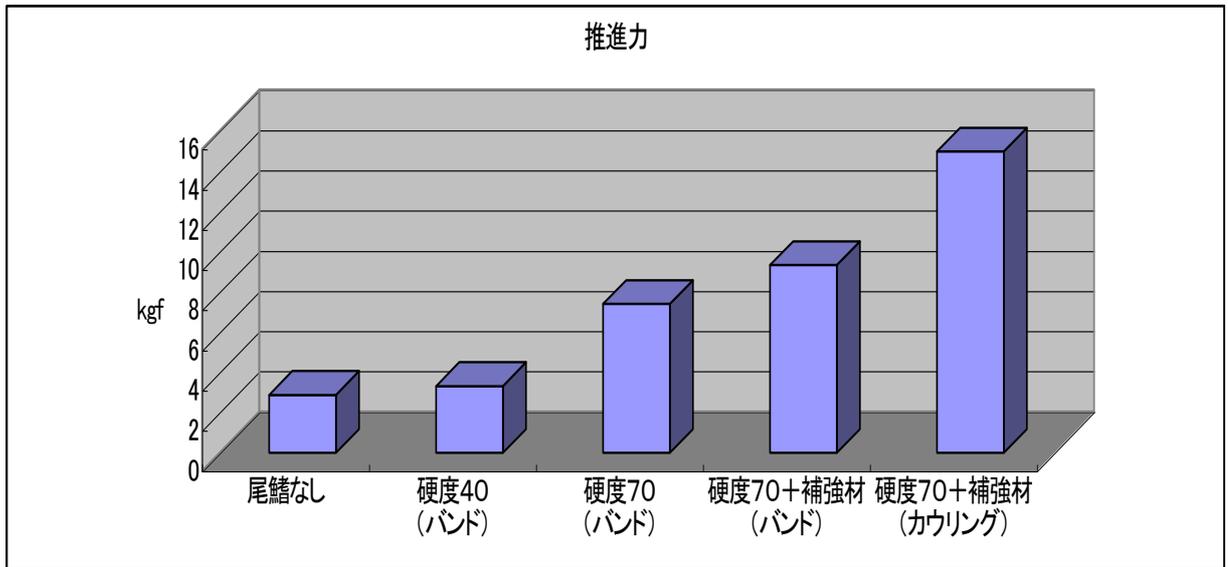


図 99. ゴム硬度及び固定方法の違い

## 遊泳能力解析

### 方法

フジおよび健常イルカの遊泳比較のために、ラグーンプールのメイン水槽(25m×17m×4m, 面積 300m<sup>2</sup>, 体積 1200m<sup>3</sup>) (図 100) にてデータロガー(W190L-PD2GT: 直径 21mm, 長さ 113mm(空中) 重量 64g: リトルレオナルド社製, 東京) を使用して計測を行った (図 101) .

遊泳速度を 0.125 秒毎, 水深を 1 秒毎, 二軸の加速度を 1/32 秒毎, 周辺の水温(環境水温)を 10 秒毎に記録した. データロガーは吸盤でイルカの左体側の背びれ下部に固定した (図 102) . イルカはハイジャンプの際に, 最大の遊泳速度が記録されることを想定し, ハイジャンプ前の潜水開始からジャンプまでを, 潜水開始時(D 期: Diving 期), 加速期(A 期: Acceleration 期), ジャンプ直前(J 期: Jump 期)の 3 つに分け, その間の平均遊泳速度を算出し, 併せて遊泳動作をビデオ撮影した (図 10) . また実験はカウリング型人工尾びれ五輪モデルを使用した.



図 100. ラグーンプール外観



図 101. データーロガー



図 102. データロガーの設置方法



図 103. ビデオシステムと水中ハウジング

## 結果

データロガーによりハイジャンプ直前の遊泳パターンは、健常イルカでは、平均遊泳速度 4.5m/s、最高遊泳速度 7.0m/s、この遊泳パターンでの尾びれ平均振動周波数は 2.0Hz であった（図 104）。人工尾びれ装着時では、平均遊泳速度 4.9m/s、最高遊泳速度 6.8m/s、この遊泳パターンでの尾びれ平均振動周波数は 2.3Hz であった（図 105）。人工尾びれ非装着時では、平均遊泳速度 3.7m/s、最高遊泳速度 5.9m/s、この遊泳パターンでの尾びれ平均振動周波数は 2.5Hz であった（図 106）。

D 期, A 期, J 期の平均速度は、人工尾びれ装着時はそれぞれ  $3.10 \pm 0.81\text{m/s}$ ,  $4.28 \pm 0.57\text{m/s}$ ,  $5.33 \pm 0.74\text{m/s}$ , 非装着時は  $2.40 \pm 0.89\text{m/s}$ ,  $3.87 \pm 0.84\text{m/s}$ ,  $5.01 \pm 0.61\text{m/s}$ , 健常個体は  $2.87 \pm 1.35\text{m/s}$ ,  $3.88 \pm 0.85\text{m/s}$ ,  $5.50 \pm 0.69\text{m/s}$  であり、いずれも非装着時に比べて早く（図 107）、ジャンプ直前には 5m/s に達した。人工びれ装着時には 3m のターゲットに到達できたが、非装着時では到達できなかった。

また、フジと健常イルカのハイジャンプの際の水中動作をビデオ解析した結果（図 108）、A 期の尾びれの振幅動作は、健常個体が 3 秒間に 4 回であったのに対し、人工尾びれ装着時は 4.5 秒で 7 回と長い時間をかけて多くのキックを行った。

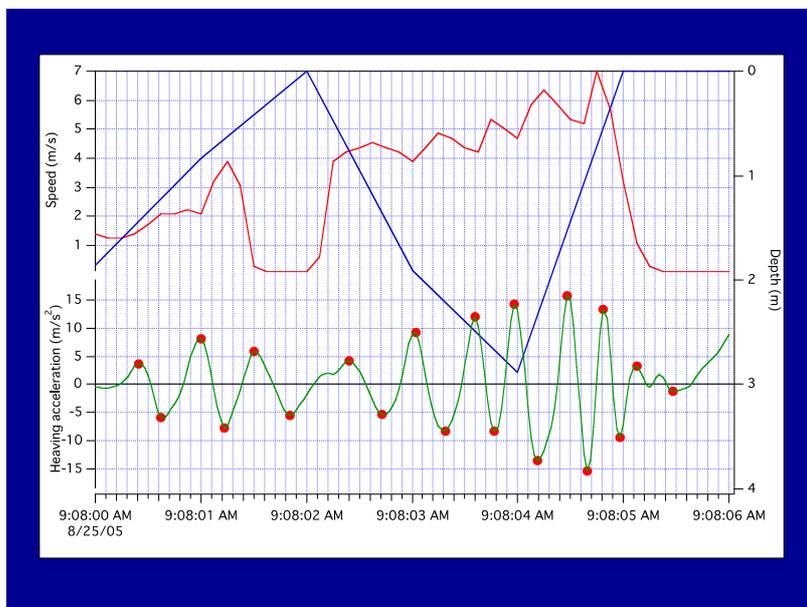


図 104. 健常バンドイルカのハイジャンプ直前の遊泳パターン

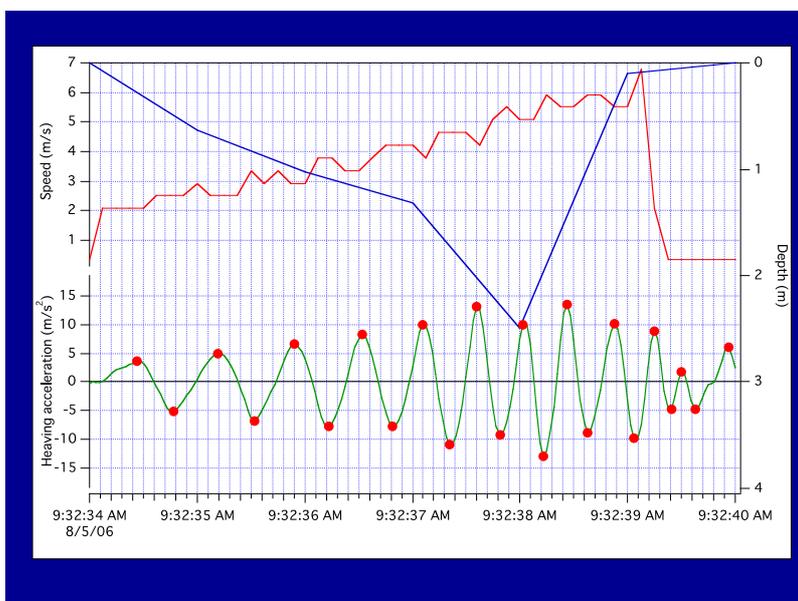


図 105. 人工尾びれを装着したハイジャンプ直線の遊泳パターン

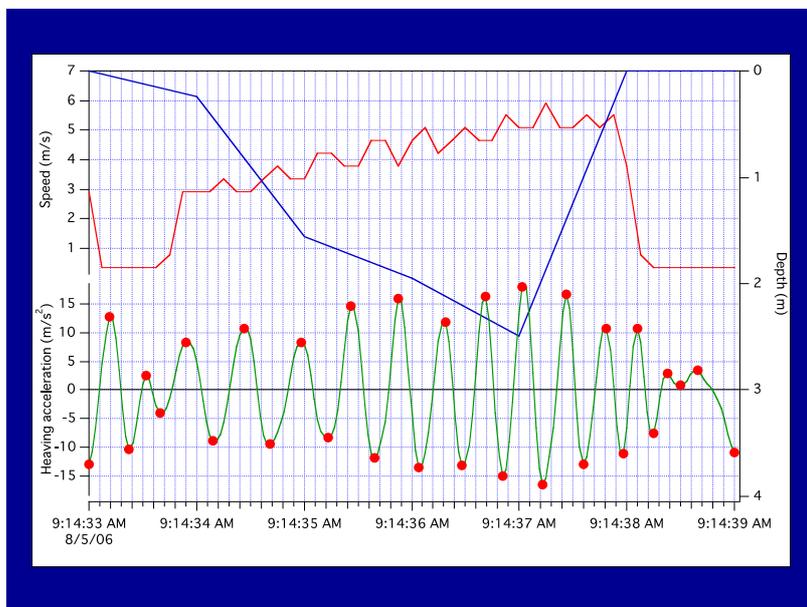


図 106. 人工尾びれ非装着時のハイジャンプ直線の遊泳パターン

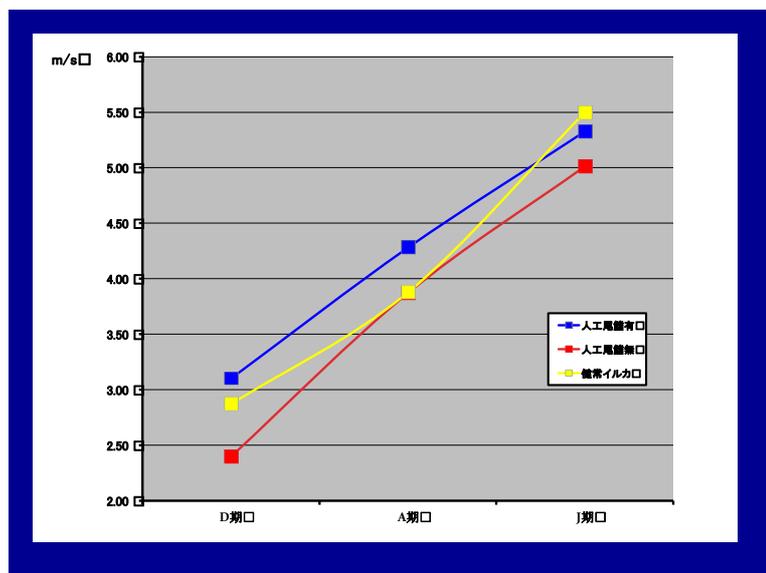


図 107. D 期, A 期, J 期の平均速度の比較

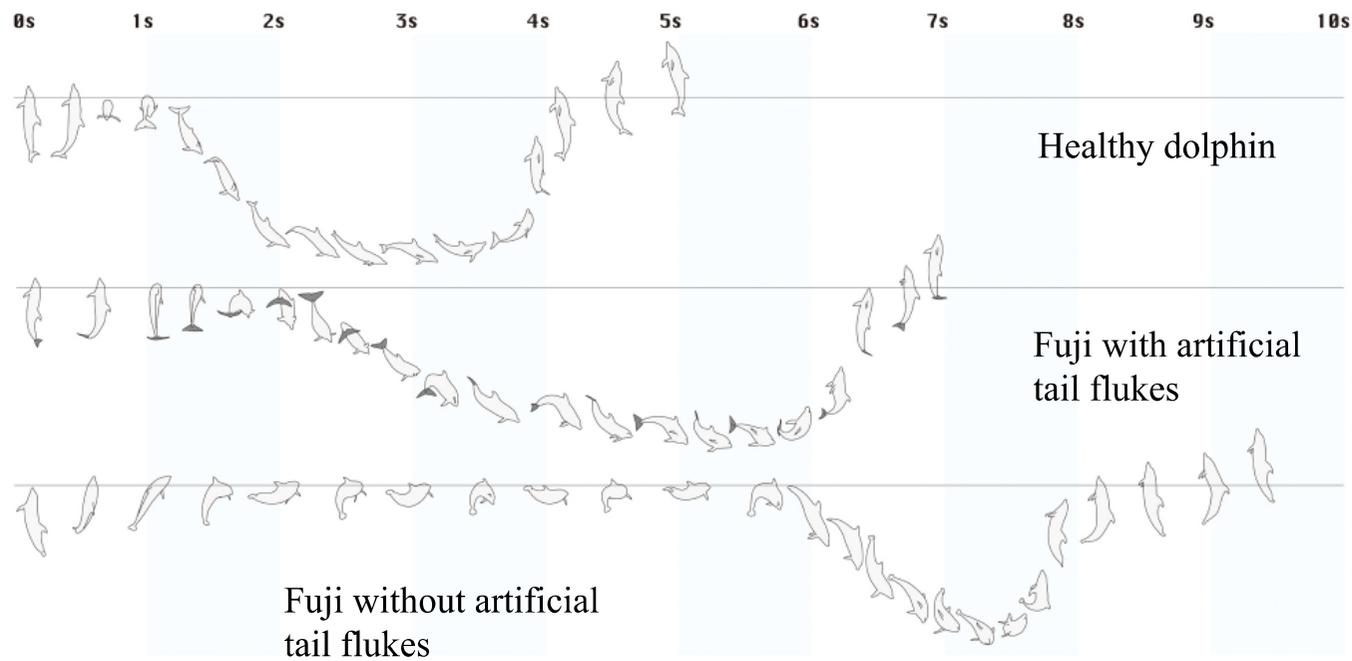


図 108. フジと健常イルカのハイジャンプの際の水中動作

## QOL 改善のためのリハビリテーション

### 材料と方法

#### I. Impairment level

##### 『評価及び問題点』

患部に関しては、対象動物の特性上、人や陸上動物の様に皮膚を寄せて縫合することが不可能であったため、開放性とした。そのため、二次感染の予防を目的とした継続的な抗菌剤の投与と徹底したデブリードを実施し、早期の断端整復を行う必要があると判断した。また尾びれ遠位端切断手術後、フジは、尾びれを上下に振るドルフィンキックを行わなくなり、遊泳時に体躯を変える際にはワニが泳ぐように、尾柄を左右にくねらすようになった。同居個体との並泳はもとより、遊泳自体をほとんど行わずに、一日の大半を飼育プールの水面で浮いた状態で過ごした。その結果、運動量低下に起因する体重の増加と血液中総コレステロール値の高値を示し、早急な遊泳意欲と日常運動の回復による体調改善の必要があると判断し、基本的遊泳動作の再獲得が必要であると評価した。

##### 『アプローチ』

治療的アプローチとして、術後 2 日目より抗菌剤の投与と 2 回/日の徹底した患部の消毒及びデブリードを施した。また Disability level の改善に利用すべく、人で使用されている義足の役割を果たすイルカ用の人工尾びれの開発に先立ち、飼育員の指示に従って水面で仰臥位、あるいは腹臥位を保つ「受診動作訓練」を実施した。この訓練は術後 57 日目の 2003 年 1 月 3 日から 83 日目の 2003 年 1 月 29 日までの 27 日間を要した。これは陸棲の小動物とは異なり、イルカでは水中での保定が困難であるため理学療法においては必須な訓練である。引き続き「装具馴致訓練」を開始した。それらは、術後 175 日目の 2003 年 5 月 1 日から 321 日目の 2003 年 9 月 24 日までの 147 日間を要した、この時期の目標は、飼育員

の指示と餌とを結びつけるオペラントによる条件付けを強化し、安定してフジ自身を訓練に参加させること、及び人工尾びれ装着に対して忌避感を持たせないことと、人工尾びれの着脱を容易にし、フジと飼育員の双方の負担を軽減するための訓練である。具体的には飼育員に尾びれを水上で持たせたまま、静止状態を保持する「尾びれ持ち」すなわち受信動作時間の延長と、尾びれの負担が少ない「背泳」、正確なドルフィンキックの回復及びそれを引き出すために、水中で立ち泳ぎの体勢で体軀をひねる「回転」の3種目に訓練の重点を置いた。訓練は、訓練がかけやすい空腹時の午前中の給餌時間に併せて15分×2回/日で実施した。

## II. Disability I level

### 『評価と問題点』

本来の約75%となった尾びれにより著しい遊泳意欲、能力低下と遊泳速度の低下が認められたため、遊泳補助具を用いた遊泳能力の回復が必要であると判断した。人工尾びれの開発に関しては、ゴムメーカーである株式会社ブリヂストンの全面的な協力を得て開発、改良を行うこととした。

### 『アプローチ』

イルカは異物を体に装着することを極端に嫌う動物なので、最初に人工尾びれ装着に先立ち、布やウェットスーツ生地などで尾びれを覆うなどして異物に対する抵抗感を減らす「装具馴致訓練」を行った。患部の閉鎖と治癒を確認してから、本物の尾びれよりもかなり小さめに作ったゴム製の初期型尾びれ（図109）を装着し、フジが装具を拒否しないこと、術後初めて尾びれを上下に振る「ドルフィンキック」を行ったことを確認した上で、「遊泳機能回復訓練」を実施した。「ドルフィンキック」を獲得したことを確認の後に、その後遊泳能力の回復に伴い、取り付け方法をより簡便にし、形状を正常なイルカの尾びれの大きさに近づけた

クロスバンド型人工尾びれを開発使用した。それにより装具馴致訓練時から引き続き、「回転」時の回数の増加、背泳を通じたドルフィンキック力の強化に加えて、目標を設定し誘導を行う「輪運び」、立ち泳ぎによる水上 20 cm の「ターゲットタッチ」を取り入れた。訓練時間は午前中の給餌時間に加え、時間的に余裕のある最終回の給餌時間にあわせての 15 分×3 回/日で実施した。訓練期間は、術後 322 日目の 2003 年 9 月 25 日から開始し、2004 年 6 月 11 日までの 261 日間であった。

人工尾びれの開発は、より負担のかかる訓練をこなせるように、また遊泳時の抵抗力を軽減するために、抵抗の少ないカバーで尾びれ両肩の部分より後端までを覆い、後端部をねじとナットで固定する「カウリング型」を考案した。

カウリング型人工尾びれを開発したことにより、訓練内容は複数種目(ツイスト、ジャンプ他)を組み合わせ、回復具合を勘案しながら少しずつ負荷をかけていった。これらは頭部あるいは上半身を水面上に出したまま行う訓練であるため、水中での遊泳時よりも、より強力なキック力を必要とすると同時に道具を用いた目標設定下での種目で、遊泳能力の向上とともに遊泳意欲の回復を意図とした。人工尾びれを用いてのドルフィンキックの安定強化とターゲットタッチが完成すると同時に、フジが積極的に訓練に取り組む行動が認められた。しかし健常なバンドウイルカに比べて遊泳速度は明らかに劣っていた。

カウリング型人工尾びれを用いた訓練は、術後 583 日目の 2004 年 6 月 12 日から 771 日目の 2004 年 12 月 18 日の 190 日間であった。主な訓練種目は、ターゲットタッチに加えて、体躯を 1 m 以上水面に持ち上げ 10 秒間保持する「ツイスト」、全身を水面上に完全に出し、弓なりにジャンプする「ボウジャンプ」、ターゲットに向かって、垂直にジャンプし体躯を水面上に完全に出す「ハイジャンプ」を導入した。訓練時間は、全給餌時間に併せての 20 分×5 回/日である。

また人工尾びれは、イルカの持ちうるあらゆる動作に対応することが可能となった「カウリング型オリンピックモデル」(図 110)の開発に成功した。この尾びれの主材料は硬度 40 度シリコンゴム、中芯素材はガラスクロス+ベクトランクロスとした。人工尾びれ内部の中心素材に高弾性繊維(ベクトラン)を用いて、翼部の強度を増し、曲げ剛性を得ると同時に、全体のしなりを増して水の抵抗を逃がすことが可能となった。カウリングは、装着する際に広げる腹部には柔軟性に富み、強度が高いベクトランのみを積層したが、その他の部分については、圧縮性に強いグラスファイバーとベクトランを併用することで軽さと強度を備えた。また安全性と耐久性を考慮して、ボルトを固定する埋め込み式ナットには海水で腐食しない純チタン製を使用した。

カウリング本体の素材は、カーボクロス綾織+ガラスクロス平織+ベクトラン平織を用い、内部クッション剤とエバーライトモランを使用した。

また遊泳能力の回復を確認するために、「カウリング型オリンピックモデル」用いて、健常なイルカ、人工尾びれ装着時と非装着時の遊泳比較を行った。

### Ⅲ. Handicap level

#### 『評価』

尾びれが著しく小さくなったことにより他個体との並泳が不可能となり、また様々なショー種目を行うことが不可能となった。それにより給餌以外は単独行動となり、他個体との社会行動を行っていないと評価した。また耐久性が完璧でない人工尾びれを常に装着することが不可能であることから、日常の生活を人工尾びれ無しで過ごせることが必要であると判断した。

#### 『アプローチ』

訓練者は、決して訓練の無理強いをせずに自発的な行動を引き出すま

で時間をかけることとし、日常的に飼育員がフジと接触する時間を多く確保した。さらにターゲット等の器具を使用するなどして、フジの意欲を保つ努力をした。加えて、一般のお客様に人工尾びれの開発の経過と、人工尾びれを用いての理学療法の様子を披露する「人工尾びれ観察会」に参加させることにより、フジ自身に日常生活における規則的な目標意識を自覚させた。また人工尾びれ非装着時においても、「ツイスト」、「ボウジャンプ」、「ハイジャンプ」などの尾びれに負担のかかる種目を積極的に訓練に取り入れた。

期間は、術後 772 日目の 2004 年 12 月 18 日から 2006 年 10 月 4 日までの 656 日間であった。主な種目は、現状の能力維持の為に引き続き「ツイスト」、「ボウジャンプ」、「ハイジャンプ」に加えて、イルカショーへの参加、他個体とペア種目の訓練、水族館の観客に対する人工尾びれ観察会への参加で、同居個体との共泳、社会復帰を目標とした。人工尾びれ観察会は 20 分×1 回/日でそれ以外の 4 回の全給餌時間に併せての 20 分×4 回/日で訓練を実施した。



図 109. 初期型人工尾びれ



図 110. カウリング型オリンピックモデル

## 結果

本症例に於ける理学療法の結果は、以下の通りである（図 111）。

### I. IMPAIRMENT LEVEL

第 31 病日には創部辺縁に沿って肉芽が形成され始めた。第 59 病日には体温や血液性状が正常値で安定したので、抗菌剤の全身投与を中止し、消毒とデブリード（2-3 回/日）のみを続けたところ、第 197 病日には患部の閉鎖と治癒を確認した。

この間、消毒やデブリードに伴う受診動作の完成も訓練の一環と位置づけ、継続したところ、フジは、飼育員が指示した際に確実に 10 分以上の受診動作を保持出来るようになった。また「回転」と「背泳」種目が完成し、正確なドルフィンキックを獲得した。さらに 230kg 以上であった体重は、この訓練と餌量のコントロールにより適正体重である 220kg 前後、訓練開始前に最高 295mg/ml だった総コレステロール値は 200mg/ml 以下に安定させることが出来た。

### II. Disability level

本訓練を通じて、人工尾びれを用いてのドルフィンキックの安定強化とターゲットタッチが完成すると同時に、フジが積極的に訓練に取り組む行動が認められた。同時に訓練中にタイプの異なる人工尾びれを装着することに対するフジの忌避行動は一切認められなかった。

また遊泳能力解析結果として、ハイジャンプを行う際の潜水開始時（D 期）、加速期（A 期）、ジャンプ期（J 期）の平均速度は、人工尾びれ装着時はそれぞれ  $3.10 \pm 0.81\text{m/s}$ 、 $4.28 \pm 0.57\text{m/s}$ 、 $5.33 \pm 0.74\text{m/s}$ 、非装着時は  $2.40 \pm 0.89\text{m/s}$ 、 $3.87 \pm 0.84\text{m/s}$ 、 $5.01 \pm 0.61\text{m/s}$  であり、いずれも非装着時に比べて早く（図 107）、ジャンプ直前には  $5\text{m/s}$  に達した（正常個体では  $6-7\text{m/s}$ ）。人工尾びれ装着時には 3m のターゲットに到達できたが、非装着時では到達できなかった。すなわち、遊泳速度、ジャンプ

能力に於いて、装着時の方が非装着時より向上していることが判明した。

またフジと健常イルカの「ハイジャンプ」の際の水中動作をビデオ解析した結果（図 108）、A 期の尾びれの振幅動作は、健常個体では 3 秒間で 4 回であったのに対し、人工尾びれ装着時は 4.5 秒で 7 回と長い時間かけて多くのキックを行った。

すなわちフジは人工尾びれ装着時においても正常イルカの遊泳能力に及ばないことが判明した。しかし ADL(日常生活活動: Activities of Daily Living)の向上が明らかとなった。

しかし人工尾びれ装着時のフジの尾びれと健常イルカの尾びれの振幅動作をハイスピードで撮影して解析した結果、生体に比べて人工尾びれの「しなり」が著しく劣るため、尾柄部の振幅動作と尾びれの先端の動きが精密に連動していないことが判明した（図 112）。

### Ⅲ. HANDICAP LEVEL

この回復訓練の結果、ダイナミックな「ハイジャンプ」動作を獲得することが出来、安定したショー種目への参加も可能となった。また、人工尾びれの非装着時においても日常的に同居個体との並泳を行い、完全なボウジャンプを安定して行うことが可能となった（図 113）。そこでこの訓練期間をもって理学療法の修了とし、その後は他個体と同様の日常訓練、ショー種目参加と継続し、人工尾びれの装着は 6 時間/日としている（2013 年 11 月現在）。

	impairment level	disability level		handicap level
評価	・尾鰭の75%を切除 ・体重の増加、血液検査値の悪化	・遊泳能力の低下 ・遊泳速度の低下 ・遊泳量の極端な低下		・単独行動の増加 ・イルカショーからの離脱
アプローチ	治療的アプローチ  ・創部の早期断端整復、基本的遊泳動作の獲得	代謝的アプローチ ・遊泳意欲の喚起 ・遊泳補助具を用いての遊泳能力の回復		環境改善的アプローチ  ・他個体との同居展示
具体的内容	尾鰭持ち ドルフィンキック 背泳 回転	ドルフィンキック 回転 背泳 輪運び ターゲットタッチ	ツイスト ボウジャブ ハイジャンプ	ボウジャブ ハイジャンプ イルカショー参加 人工尾鰭観察会への参加 人工尾鰭無のジャンプ動作
補助具	ウエットスーツ生地	初期型、クロスバンド型	カウリング型、カウリング型 オリンピックモデル	カウリング型 オリンピックモデル
訓練回数	15分×2回/day	15分×3回/day	20分×5回/day	20分×5回/day
訓練期間	147日間 (2003.5.1-2003.9.24) 術後175日目-術後321日目	261日間 (2003.9.25-2004.6.11) 術後322日目-術後582日目	190日間 (2004.6.12-2004.12.18) 術後583日目-術後772日目	655日間 (2004.12.19-2006.10.4) 術後773日目-術後1427日目

図 111. フジの理学療法プログラム

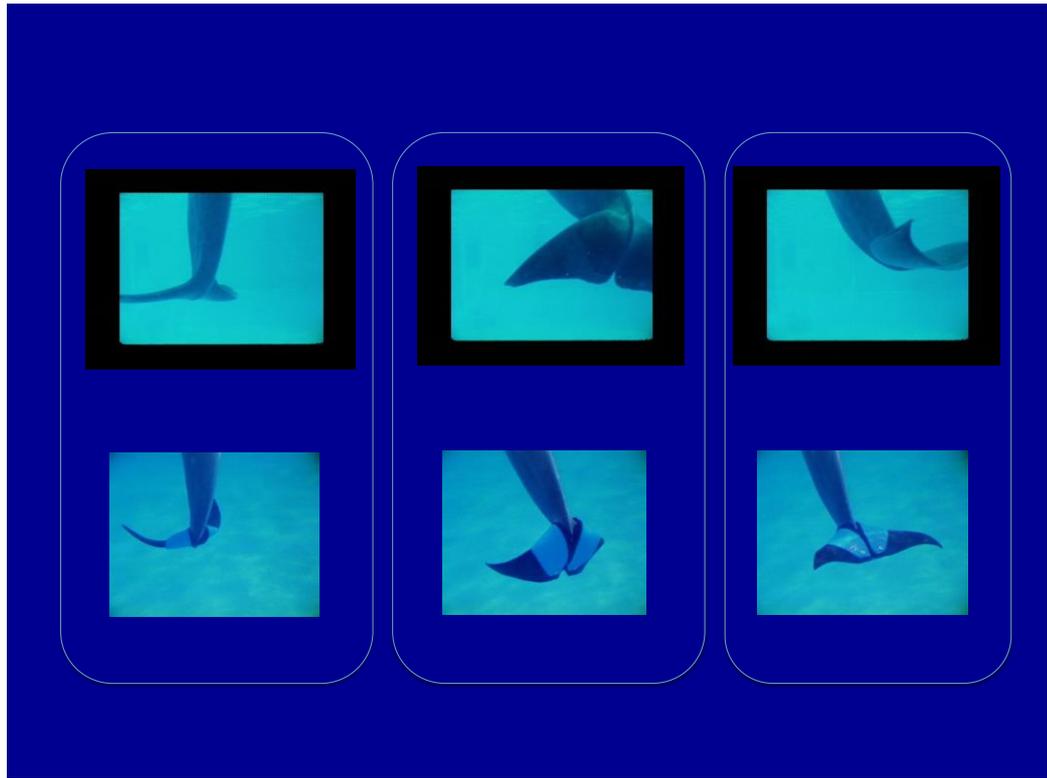


図 112. 健全イルカと人工尾びれの動作比較

上部：健全イルカ，下部：人工尾びれ．しなりの相違が確認出来る



図 112. 人工尾びれ非装着時でのジャンプ

## 考察

遊泳補助具として開発された人工尾びれの有益性を検証するために実施した揚抗力測定においては、形状が同じ尾びれ型を用いて、クロスバンド型とカウリング型との比較をした結果、迎角 20 度以下の範囲において、カウリング型の方がクロスバンド型より約 2 倍の揚抗比を示すことが判明した。これはカウリング型には流体抵抗源になるような突出部が少ないため、カウリング型の方が流体抵抗が小さく、尾びれとして適しているということである。また形状が同じ尾びれ型において、ゴムの硬度の違いの定量的な検討を行った。実験の結果、硬度 40 度品、70 度品、カーボンファイバー性の中芯を埋め込んだ硬度 70 度品の 3 パターンを、同一クロスバンド装着型で比べた場合、揚抗比は 40 度<70 度<70 度+中芯の順となり、尾びれの翼としての性能は硬度の高い方が良いことが明らかとなった。揚抗比は目視による遊泳状況の改善度と相関が高く、この時点で人工尾びれの「補強板（中芯）入りのカウリング型」という基本構造を確定した。

遊泳能力解析については、フジの人工尾びれ装着時は、開始時、中盤、直前でそれぞれ  $3.10 \pm 0.81 \text{ m/s}$ 、 $4.28 \pm 0.57 \text{ m/s}$ 、 $5.33 \pm 0.74 \text{ m/s}$ 、非装着時は  $2.40 \pm 0.89 \text{ m/s}$ 、 $3.87 \pm 0.84 \text{ m/s}$ 、 $5.01 \pm 0.61 \text{ m/s}$  であり、いずれも非装着時に比べて早い。加えてジャンプ直前に非装着時および装着時共に  $5 \text{ m/s}$  に達しているが、装着時には  $3 \text{ m}$  のターゲットに到達したが、非装着時は  $3 \text{ m}$  には到達していない。すなわち、人工尾びれを装着することにより、確実に遊泳及びジャンプ能力が向上したことが証明された。

一方健常イルカではハイジャンプ直前に遊泳速度を上げる傾向があり最高遊泳速度 ( $6.99 \text{ m/s}$ ) もフジの人工尾びれ装着時を上回っている。

またフジと健常イルカのハイジャンプの際の水中動作をビデオ解析した結果、潜水時の加速を得るために、人工尾びれ装着時は尾びれの振幅動作が 1 回 ( $0.5 \text{ 回/s}$ ) であったが、人工尾びれ非装着時には 3 回の尾びれの

振幅動作が必要であった(健常イルカでは1回)。また水中から体躯が完全に空中に出るまでの振幅回数は人工尾びれ装着時には4.5回であった。それに対し健常イルカで3回であった。

人工尾びれ装着時のフジの尾びれと健常イルカの尾びれの振幅動作をハイスピードで撮影して解析した結果、生体に比べて人工尾びれの「しなり」が著しく劣るため、尾柄部の振幅動作と尾びれの先端の動きが精密に連動していないことが判明したが、これらの健常イルカとの遊泳力の差は、飼育下の日常生活において、大きな障害であるとは考えられないため、現状として問題ないと判断した。また2013年11月現在においては、人工尾びれ非装着時においても水面に体躯を出すボウジャンプが可能となっており、他の同居イルカとともに同等のショー種目をこなしている。

QOLの改善の為のリハビリテーションについては、運動機能回復のための補助装具として世界初の試みであるバンドウイルカに対する人工尾びれの研究開発と、人工尾びれ装着訓練等を通じた理学療法を並行して展開した。奇しくもそれらは、人の義肢装具の使用目的である①身体部分の安静、固定や変形矯正などの疾病治療、②失われた身体部分や機能の代償、③心身機能の向上を図るための訓練用となる[20]に相当するアプローチそのものであった。

人工尾びれの開発にあたっては、単なる形状補完ではなく、「遊泳補助具として機能的な尾びれ」の制作を目標とした。すなわち、人工尾びれを装着することにより①フジの遊泳能力が向上すること。②人工尾びれを理学療法のツールとして用い、術後に衰えたフジ自身の遊泳に関わる筋力を回復させることが求められた。遊泳補助具の開発においては、株式会社ブリヂストン社の協力の下、約41ヶ月にわたる試行錯誤の結果、最終的に人工尾びれの形状は正常なバンドウイルカの尾びれをもとにし、水中での抵抗を減らすことを目的として装着方法はカウリング型を採用

した。また十分な強度と「しなり」を得るために中心に補強板を入れ、尾びれ自体のゴムの選定を行い、フジの尾びれと人工尾びれが接する部分には、擦過傷防止のために FPDM (エチレン・プロピレン・ジエンゴム) 製発泡ゴム (ブリヂストン製エバーライトモラン<sup>TM</sup>) を粘着剤で人工尾びれの内部に張り保護層とした。

飼育プールにおける遊泳速度の測定の結果、人工尾びれ装着時には非装着に比べて遊泳速度が速いこと、垂直ジャンプの高さが増加すること、最高スピードを出すまでの尾びれの振幅回数が少ないことが明らかとなった。これらは人工尾びれがフジの遊泳能力を向上させるための補助装具として有益であることを示している。更に、人工尾びれ装着時に健常イルカの遊泳スピード、ジャンプ力には及ばないものの、飼育下で生活する分には全く支障がなく、ツイスト、ボウジャンプ、ハイジャンプなどの尾びれへの負担がかかる種目における動作も獲得できた。

また人工尾びれ非装着時においても完全なボウジャンプを行うことが出来るようになり、人工尾びれの装着にかかわらず他個体との並泳動作など同居個体との社会生活を取り戻すことが出来たために、訓練強化から能力維持を目的とした対応に移行した。すなわち、回復期リハビリテーションから維持期リハビリテーションへの転換期として、飼育員は他のイルカと同様に日常の飼育管理を行うこととなった。

人工尾びれを遊泳補助具とした理学療法に基づくマネジメントにより、訓練を実施した結果、遊泳意欲、遊泳能力、社会性を再び取り戻すことが出来た。これは水族館で飼育されている障害を負った展示動物であるイルカに対しての QOL の改善を施すという新たな概念を導入することになった。

## 小活

小型歯クジラ類の外科的アプローチに関しては、皮膚の切離や皮膚切開による体内病変の摘出、その後の縫合などの経験を積むことにより、適切な外科的処置による治療の可能性が示された。

また障害を負った展示動物であるイルカに対して、人工尾びれが単なる形状補完としてではなく、遊泳補助具として有益であった。また展示動物のQOLの改善するための手段として「リハビリテーション」という新たな概念を水族館に導入することができた。

## 総括

鯨類や海牛類などの水中生活を営む大型水棲動物は、陸棲動物とは異なる取り扱いの難しさもあり、水族館等の飼育下の動物の疾病に対して行う治療方法としては、経口投与など、内科学的なアプローチに終始することが殆どであった。そのため術後管理にデブリードマンを必要とする外科手術については、検討されることも無く、ましてや術後管理としての理学療法を施して低下した機能改善を試みた例は皆無であった。特に沖縄県以外の水族館では、飼育水温を適正水温である 25℃前後に維持するため冬場に加温しなければならず、頻繁にプールの水を抜いて処置を施すことが難しい。そのため、抗菌剤の投与にあたって、血液等の検査結果を根拠にするのではなく、摂餌が消失する前に抗菌剤をとりあえず投与し、その後検査を行うという方法が主であった。

しかしながら沖縄美ら海水族館は、飼育水として利用出来る豊富な海水を海から直接汲み上げて利用することが出来るため、2-3回/日の頻度で飼育プールの水を抜くことが可能である。そのような恵まれた条件を利用することで、他館では困難であった小型鯨類の臨床に取り組み、特に確定診断に基づいた治療を施してきた。

大型水棲動物は保定や移動など取り扱いが難しい反面、イルカ類にはトレーニングを経て一定の受診動作を獲得させることが可能である。その性質を利用して、保定することなく肛門からプローブを入れて体温測定をすること、尾びれの血管から採血をすることなど、ルーチンの健康チェックができる。一方、血液検査器機の進歩もめざましく、血液検査結果を確認してからの薬剤の投与という治療のセオリーをようやく導入することが出来た。その結果、静脈内投与が治療の中心となり、治療の幅が大きく広がることとなった。それらは現在、大型魚類である板鰓類のジンベエザメの水中静脈内薬剤投与や、ナンヨウマンタの水中超音波

画像診断検査にまで発展させることとなった。

真菌感染症に関しては、飼育個体の約半数のイルカが呼気から病原性酵母を噴出していることが判明した。分離された菌種は、一般的な病原性酵母であったが、稀な菌種として *Pichia rodanensis* と *Candida haemulonii* が含まれていた。今回分離された菌種は、同一個体が同一菌種を保有していることが判明し、これらの菌種と保有状況はイルカの正常叢を反映していることが示唆された。このように個体毎のデータを収集し、解析することにより個体毎の健康管理に役立てることが出来た。

加えて、野生搬入個体においても広く調査をする事により新興真菌感染症の一種であるラカジオーシスを診断することになった。現在までにヒト症例は発生していないものの、ラカジオーシスの病型は軽微な皮膚炎程度から激しいケロイド状の肉芽腫性病巣まで多種に及び、軽微な症例は見逃されてきた可能性は否定できない。本研究を通じてラカジオーシスの分子生物学的診断法に利用可能なプライマーを設計し、その有用性を確かめることが出来た[37]。

我が国は海洋国家であり、海および水産物との接触を持たない国民は皆無であると言っても過言ではない。漁業関係者はもちろんのこと一般人でも海水浴、釣り、ボートなどのマリンレジャーの後だけでなく、海産物の取り扱い、海棲動物の展示施設などで海水と接触した後は、洗い流すなどの注意が必要である。

また水族館で様々な検査、処置やデブリードマンが出来る環境が整ったことにより、外科的治療に取り組むことが可能となり、イルカ類では国内で報告が無かった縫合手術を実施するまでに至った。現在では麻酔を使用したイルカ類の抜歯処置を安全に行えるまでになっている。今後は、全身麻酔を使用した外科的な処置や腹部の外科的手術の実施等が課題である。

イルカをはじめとした水棲哺乳類に対する「リハビリテーション」と

は、疾病や混獲で保護された野生動物を一時的に水族館等の施設で飼育し、栄養補給や病気の治療、あるいは寄生虫の駆除等々、状態の改善を確認した後に再び自然界に戻すことを表し[17]、今回の事例のような補助具を用いたプログラムを作成して理学療法を用いたものを表すものではないとの見解が一般的であった。

失った機能を回復するための補助装具の使用例は、米国でウミガメに人工胸びれを装着した例[6]、キリンに義足をつける試み（大森山動物園）、ペンギンの嘴を人工物で補った例（川崎市夢見台動物園）など、国内外の動物園から極少数の報告があるものの[25]、いずれの事例も形状補完の域を脱しておらず、補助具としての完成度は不十分であると同時に、システムティックな理学療法を施して機能を回復させるまでに至った例は殆ど認められなかった。もちろんイルカに対する遊泳補助具としての人工尾びれを作製した例は全く無かった。他分野である株式会社ブリヂストン社の協力の下、遊泳補助具としての人工尾びれを開発し、理学療法に基づくマネジメントにより訓練を実施した結果、遊泳意欲、遊泳能力、社会性を再び取り戻すことが出来た。

画像診断器機による確定診断、外科手術の実施、人工尾びれの作成とそれを用いた理学療法の実施など、これら全ては水族館に於ける初の試みであった。すなわち、それら一つ一つが、飼育・展示及び研究を目的とする水族館に“新たな概念”を導入することとなったのである[36]。

これまで敬遠されてきた小型歯クジラ類の診断・治療について、陸上動物類似の診断法や治療法の積極的応用の有用性が示された。これらの成果は、水中という特殊環境の中で回復が強く求められる小型歯クジラ類の臨床において極めて重要であり、今後水族館における展示動物の例のみならず、野生動物の保護動物症例に対する応用が十分に期待できる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり酪農学園大学大学院獣医学研究科運動器・神経病治療学 泉澤康晴教授に心より御礼申し上げます。常に有意義な助言を頂いた先生のご配慮が無ければ研究にとりかかることすら出来ませんでした。また、本論文を提出するにあたり、御指導いただいた同獣医放射線生物学 林正信教授，同分子診断治療学 打出毅教授に深く謝意を申し上げます。

本研究の真菌感染症診断治療に関して，琉球大学農学部亜熱帯地域農学科動物生産科学分野家畜衛生学講座佐野文子教授に多大なる御指導をいただきました，厚く御礼申し上げます。

本研究の理学療法に関して，神戸国際大学リハビリテーション学部理学療法学科 村上雅仁教授に多大なる御指導をいただきました，厚く御礼申し上げます。

また人工尾びれ開発にあたり，株式会社ブリヂストンフローテック 加藤信吾氏，ブリヂストン化成品株式会社 齊藤眞二氏，株式会社ブリヂストン 加唐巧氏，原健太郎氏，関互氏，横井隆氏，株式会社ブリヂストンEMK 藤川義則氏，株式会社ブリヂストン社員皆様，飼育動物の健康管理に御指導，御協力をいただいた沖縄美ら海水族館 内田詮三名誉館長，宮原弘和館長，柳澤牧央獣医師，スタッフ各位に心より感謝いたします。

伊藤春香博士には，鯨類に関する色々な知見をご教授頂き，また本論文を執筆するにあたり多くの励ましとご助言を頂きました。ここに深謝いたします。

日本大学生物資源科学部海洋生物資源学科 鈴木美和専任講師には，本論文を執筆するにあたり多くの励ましとご助言を頂きました。ここに深謝いたします。

らむかな製作所及びおやつ工房には，本論文に関わる画像データの処理に関してのPCのご協力を頂きました．看板犬のししまるを含め，ここに感謝します．

最後に長期に渡り経済的ならびに精神的に支えてくれた妻と二人の娘達，そして両親をはじめ兄弟に多大なる感謝の意を表します．

## 引用文献

1. Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Guarro J, Haase G, Kibbler CC, Meyer W, O' Donnell K, Petti CA, Rodriguez-Tudela JL, Sutton D, Velegraki A and Wickes BL (2009) Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory. *J Clin Microbiol*, 47:877-84.
2. Dalton, L.M. and Robeck, T.R. (1998) Florfenicol Serum levels in beluga whales (*Delphinapterus Lucas*) and bottlenose dolphins (*Trusiops truncatus*). *IAAAM Proceedings*, 29: 37-38.
3. Dalton, L.M., Robeck, T.R. and Campbell, T.W. (1995) Azithromycin serum levels in cetaceans. *IAAAM Proceedings*, 26: 23.
4. Endo, S., Komori, T., Ricci, G., Sano, A., Yokoyama, K., Ohori, A., Kamei, K., Franco, M., Miyaji, M. and Nishimura, K (2004) Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *FEMS Microbiology Letters*, 234:93-97.
5. 泉澤康晴, 高瀬奈美, 植田啓一, 柳澤牧央, 宮原弘和, 内田詮三 (2005) 小型齒鯨類における丈夫消化管内視鏡検査. *獣医畜産新報*, 58(1):74-78.
6. ジェシーホワイト, 神谷敏郎訳 (1993) マナティ, 海に暮らす. 講談社, 東京:100-103.
7. Jeanmougin F, Thompson JD (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 403-405.

8. 加藤信吾 (2008) 人工尾びれの開発. 日本ゴム協会誌, 78(9):336-339.
9. 加藤信吾, 関 互, 横井 隆, 斉藤真二, 植田啓一 (2005) バンドウイルカの人工尾びれの開発. 日本ゴム協会誌, 78(9):336-339.
10. 黒澤亮助, 酒井 保 (1993) 第7章 縫合法:135-158. 増訂改版 手技図解 家畜外科診療 第8版. 養賢堂, 東京.
11. 神部 勉 (1977) 動物の流体力学的運動. 日本航空宇宙学会誌, 25(277):53-62.
12. 神部 勉 (1978) 動物の運動と流体力学. 科学(岩波), 48(8):464-473.
13. Leslie A. Dierauf (1990) Surgery:225-231.in: HANDBOOK OF MARINE MAMMAL MEDICINE Health, Disease, and Rehabilitation, CRC PRESS, Inc.
14. Linnehan, R. M., Ulrich, R. W. and Ridgway, S. 1999. Enrofloxacin serum bioactivity in bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, following oral administration of 5 mg/kg in whole fish. J. Vet. Pharmacol. Ther. 22(3):170-173.
15. 松本修治, 高橋幹雄, 吉田元信, 小松忠人, 北代典幸, 堀井佳広, 片江宏巳 (1997) 犬および猫におけるオルビフロキサシンの血漿中および組織中濃度ならびにその排泄. 日本獣医師会雑誌, 50(8):470-474.
16. 松本修治, 中井正博, 吉田元信, 片江宏巳 (1998) 豚および牛におけるオルビフロキサシンの体内動態. 日本獣医師会雑誌, 51(1):13-18.
17. Mignucci-Giannoni AA (1998) Marine Mammal Captivity in the Northeastern Caribbean, with Notes on the Rehabilitation of stranded Whale, Dolphins, and Manatees. Caribbean journal of science, 34(3-4):191-203.

18. Murata, Y., Sano, A., Ueda, Y., Inomata, T., Takayama, A., Poonwan, N., Nanthawan, M., Mikami, Y., Miyaji, M., Nishimura, K., Kamei, K (2007) Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan. *Med Mycol*, 45(3):233-247.
19. 村山 司, 祖一 誠, 内田詮三 (2010) 総論. 海獣水族館. 東海大学出版会, 東京:12-27.
20. 日本整形外科学会, 日本リハビリテーション医学会 (2007) 第II章 義肢装具のための運動学:18-40. 義肢装具のチェックポイント第7版. 医学書院, 東京.
21. Ramos-e-Silva M, Aguiar-Santos-Vilela F, Cardoso-de-Brito A, Coelho-Carneiro S (2009) Lobomycosis: Literature review and future perspectives. *Actas. Dermosifiliogr.* 100: Suppl1: 92-100.
22. Robeck, T.R., Dalton, L.M., and Young, W.G. (1996) Single daily dosing of amikacin in two beluga whales and an Asian small clawed otter. *IAAAM Proceedings*, 27: 19-21.
23. Roderic D. M. Page, Glasgow, Scotland, UK, 1998;  
<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html> 17
24. 関 互, 加藤信吾, 斉藤真二, 横井 隆 (2006) イルカ人工尾びれの開発. *生物の科学 遺伝*, 61(1):33-37.
25. 産経新聞 夕刊 2007年6月6日.
26. 真菌症フォーラム 第10回学術集会プログラム  
[http://www.mycoses.jp/forum/program10/program\\_P-05.html](http://www.mycoses.jp/forum/program10/program_P-05.html)
27. Schroeder JP (1983) Apparent toxicity of ketoconazole for *Tursiops truncatus* during treatment of lobomycosis. *Proceedings of the International Association for Aquatic Animal Medicine*, 14:3.

28. Suzuki, M., Hirako, K., Saito, S., Suzuki, C., Kashiwabara, T., Koie, H. 2008. Usage of High-performance Mattresses for Transport of Indo-Pacific Bottlenose Dolphin. *Zoo Biology*, 27:331-340.
29. Sweeney JC, Ridgway SH. (1975) Procedures for the clinical management of small cetaceans. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 167(7): 540-555
30. Swofford, D. L. PAUP\*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*And Other Methods)* (version 4.0). Sunderland, Mass: Sinauer Associates, 2001.16
31. 佐野文子, 柳澤牧央, 安里 歩, 植田啓一(2013) *Fusarium* 属菌種 (*Fusarium solani* complex) によるマナティの皮膚感染症. *獣医畜産新報*. 66(3):194-200.
32. Taborda PR, Taborda VA and McGinnis MR (1999) *Lacazia loboi* gen. nov., comb. nov., the etiologic agent of lobomycosis. *Journal of clinical microbiology*:2031-2033.
33. Takahashi H, Ueda K, Itano-Nakagawa E, Yanagisawa M, Murata Y, Murata M, Yaguchi T, Murakami M, Kamei K, Inomata T, Miyahara H, Sano A, Uchida S (2010) *Candida albicans* and *C. tropicalis* Isolates from the Expired Breaths of Captive Dolphins and Their Environments in an Aquarium. *Veterinary Medicine International*. Volume 2010, Article ID 349364, 12 pages ( <http://dx.doi.org/10.4061/2010/349364>).
34. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: CLUSTAL W (1994) improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22: 4673-4680.

35. 植田啓一，横井 隆，関 互，加藤信吾，斉藤真二，宮原弘和，内田詮三．（2005）イルカ人工尾びれプロジェクト．日本造船学会，第18回海洋工学シンポジウム，Jan:27-28.
36. Ueda K, Murakami M, Kato J, Miyahara H, Izumisawa Y (2013) Intervention to improve the quality of life of a bottlenose dolphin that developed necrosis on the tail flukes. *Journal of Physical Therapy Science* 25:1201-1207.
37. Ueda K, Sano A, Yamate, Itano-Nakagawa E, Kuwamura M, Izawa T, Tanaka M, Hasegawa Y, Chibana H, Izumisawa Y, Miyahara H, Uchida S (2013) Two Cases of Lacaziosis in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) in Japan. *Veterinary Medicine* 2013: Article ID 318548, 9 pages (<http://dx.doi.org/10.1155/2013/318548>).
38. 植田啓一，柳澤牧央，高瀬奈美，渡辺紗綾，宮原弘和，内田詮三，泉澤康晴，嘉陽宗史，上江洲安弘（2006）鯨類の外科学．第3回日本獣医内科学アカデミー学術集会プロシーディング:282-283.
39. 山口英世（2003）IV章 真菌症の検査と診断：61-93．病原真菌と真菌症 改訂2版．南山堂，東京．
40. 米澤正夫（2003）鯨類の病気．新・飼育ハンドブック水族館 編:175-179. 1 繁殖・餌料・病気．（社）日本動物園水族館協会，東京．