

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32669

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20618

研究課題名（和文）犬の鼻腔疾患における診断アルゴリズム作成および鼻腔細菌叢解析

研究課題名（英文）Construction of diagnostic algorithm and analysis of nasal flora in canine nasal diseases

研究代表者

藤原 亜紀 (Fujiwara, Aki)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：40709755

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：犬の鼻腔疾患には様々な鼻炎、腫瘍などが存在する。それら疾患を確定するためには全身麻酔下でのMRIやCT検査および同時に生検を行うが全ての症例において実施できるわけではない。そのため本研究においては様々な鼻腔疾患と確定診断された症例において、全身麻酔処置を必要としない非侵襲的な検査データを用いて疾患アルゴリズムを作成し、感度・特異度・陽性的中率を算出した。また犬の様々な鼻腔疾患の病態の一つとして鼻腔細菌叢が関与している可能性を考え、鼻炎の中でももっとも発生が多い非感染性鼻炎、鼻腔腫瘍、正常犬の鼻腔細菌叢を評価し、特定の細菌の変動を得た。今後はそれら細菌が免疫機構にどのように関わるか検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてこれまで確定診断には全身麻酔下の検査が必要であった犬の鼻腔疾患において、非侵襲的な検査結果を用いた診断アルゴリズムを使用することによって全身麻酔下の検査を行うべきかスクリーニングができることが明らかとなった。本研究成果は臨床獣医学において非常に有用であり、臨床応用が期待できる。またさまざまな犬の鼻腔疾患は発生病態が不明であったが、本研究から得られた鼻腔細菌叢の変動は疾患病態に関連していると考えられ、特にもっとも発生の多い非感染性鼻炎においては細菌叢による免疫機構への変化が示唆された。今後原因不明であった非感染性鼻炎の発生病態解明が進むことで、臨床獣医学に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Canine nasal diseases include various types of rhinitis and tumors. To confirm these diseases, MRI and CT examinations under general anesthesia and biopsies are performed, but not all of them can be performed in all cases. Therefore, in this study, diagnostic algorithm was constructed using noninvasive examination data from canine cases with confirmed diagnosis of various nasal diseases, and sensitivity, specificity, and positive predictive value were calculated. In addition, considering the possibility that nasal flora may be involved in the pathogenesis of various nasal diseases in dogs, we evaluated the nasal flora of noninfectious rhinitis, which is the most common form of rhinitis, nasal tumors, and normal dogs. Some variations in specific bacteria among these nasal diseases were obtained. In the future, we will evaluate how those bacteria are involved in the immune mechanism.

研究分野：獣医呼吸器病学

キーワード：犬の鼻腔疾患 鼻腔細菌叢 診断アルゴリズム 非感染性鼻炎 鼻腔腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

日本獣医生命科学大学付属動物医療センター(本学)において呼吸器科への犬の来院頭数は全体の10%と多く、そのうち鼻腔疾患は30%を占め呼吸器疾患の中でも来院頻度が高いが、病態(好発品種や遺伝的背景)などの詳細は知られていない。そのため我々は過去15年において本学医療センター呼吸器科に来院した犬を対象に疫学調査を実施し、複数の品種において呼吸器疾患との関連を認めた(業績1, 2)。そのうちミニチュア・ダックスフンド(MD)においては複数の呼吸器疾患との関連性が認められ、特に非感染性鼻炎であるリンパ球形質細胞性鼻炎(LPR)はオッズ比27.2倍とMDに非常に好発疾患であった。海外ではMDがLPRの好発品種との報告はなく、MDは日本国内における人気品種のためと考えられる。LPRは中年齢以上の犬に発生し、鼻粘膜にリンパ球および形質細胞が著しく浸潤する病理組織像を特徴とする疾患である。原因として自己免疫やアレルギーの関連が示唆されているがその発生病態については明らかとなっていない。その他にも日本国内のMDには複数の免疫疾患が好発することが知られている。これらの疾患においてはこれまで遺伝的背景が疑われ、原因遺伝子の探索も成されているが特定に至っておらず、複数の環境因子も関連していると考えられている。

またLPRの診断についても多くの課題が残されている。一般的に犬の鼻腔疾患は麻酔を用いた内視鏡検査やCT・MRIなどの高度画像を用いないと診断が難しいと考えられており、麻酔を用いないX線検査のみでは検査所見が他の鼻腔疾患に似ることが多いため、他の鼻腔疾患と臨床診断されLPRの正確に診断がされていない症例が存在する。以上より犬の鼻腔疾患における問題点として、比較的発生頻度の高い犬のLPRの発生病態は不明であり、さらに検査の侵襲性などの理由から正確に診断されていない症例が多く存在することである。

## 2. 研究の目的

上記の問題点を解決するために、本研究では犬の鼻腔疾患に対し1:非侵襲的な診断法の開発、2:LPRの環境因子面からの病態解明を行うことを目的とする。犬の鼻腔疾患には腫瘍のほか、LPRが含まれる非感染性鼻炎、アスペルギルス感染性鼻炎、細菌性鼻炎、異物性鼻炎などが含まれるが、特に犬のLPRにおいては環境因子の一つとして鼻腔細菌叢に着目する。これまで犬の鼻腔細菌叢に関する報告は少なく、特に鼻炎を原因によって正確に細分化して解析しているものは存在しない

## 3. 研究の方法

目的1:犬の鼻腔疾患における非侵襲的診断法(アルゴリズム)の開発

方法:鼻腔疾患を疑って本学呼吸器科を受診し、X線検査および麻酔下MRIもしくはCT検査を実施し確定診断をされた犬100症例を対象とする(1.アルゴリズム作成)。シグナルメント・問診・身体検査所見、X線検査所見を詳細に調査する。各調査項目を麻酔下MRIやCTによる確定診断名を基に分類・傾向を調査し、各鼻腔疾患に特徴的な項目を組み合わせた場合の確定診断に対する感度・特異度を算出する。過去の症例を用いる場合には必要な情報が十分に行っていることを条件とする。これら100症例で作成したアルゴリズムにおける正確性を検討するために、別の50症例のデータを用いて感度・特異度を算出する(2.アルゴリズム検討)。さらに、検討群のデータを内科専門医によってブラインドで診断を行い、アルゴリズムを用いた場合と正確性を比較する(3.専門医による評価との比較)。

目的2:犬の鼻腔疾患における細菌叢の評価

方法:鼻腔スワブサンプルは、本学呼吸器科を受診し、疾患群はLPR10症例、疾患対照群は鼻腔腫瘍10症例、正常対照群は鼻腔徴候を有さない犬10頭から採取する。異物性鼻炎、歯根膜炎由来の鼻炎などは明らかに他の原因が存在し、それらは原因を治療することにより治癒が望まれるため除外する。鼻腔スワブは3種の採取方法を用い、犬が覚醒している状態で外鼻孔経由、また診断のための内視鏡検査を行う際に麻酔下で鼻腔の深部から(1.採取方法による違い)、生理食塩水による鼻腔洗浄後の鼻腔から(2.鼻腔洗浄による違い)実施する。また一般的な細菌培養(好気・嫌気性菌)と薬剤感受性検査、およびIDEXX Laboratory社の犬呼吸器疾患パネルのためのスワブもこの状態で採取する(3.コマーシャル一般検査との比較)。これら二つの検査は臨床現場において広く鼻腔の感染を評価するための検査ツールとして用いられており、呼吸器疾患パネルは12項目の一般的に犬の呼吸器感染の原因となりうる細菌やウイルスが含まれている。各スワブからDNAを抽出後、16S rRNA遺伝子解析を実施し、疾患間の細菌叢構成の比較および同一個体においても採取部位や洗浄の有無による影響を評価する。

## 4. 研究成果

目的1:犬の鼻腔疾患における非侵襲的診断法(アルゴリズム)の開発

鼻腔疾患アルゴリズム作成については、鼻腔疾患として鼻腔腫瘍、鼻炎として非感染性鼻炎、細菌性鼻炎、異物性鼻炎、アスペルギルス感染性鼻炎などの犬が研究対象となった。アルゴリズム作成群として103頭のデータを用いてアルゴリズムを作成した。それらアルゴリズムの性能を

評価するためにアルゴリズム検証群として 54 頭のデータを用いた。各群それぞれにおいてアルゴリズムの感度・特異度を算出した。鼻腔腫瘍・アスペルギルス感染性鼻炎についてはアルゴリズム作成群での感度・特異度は 93.3%。78.6%であり、アルゴリズム検証群での感度・特異度は 90.9%。83.3%であった。非感染性鼻炎・歯根膜炎由来の鼻炎についてはアルゴリズム作成群での感度・特異度は 90.0%。87.8%であり、アルゴリズム検証群での感度・特異度は 81.8%。90.9%であった。異物性鼻炎についてはアルゴリズム作成群での感度・特異度は 87.5%。94.5%であったが、アルゴリズム検証群では異物性鼻炎を有する症例数が少なく検証できなかった。これら研究成果は The 8th meeting of Asian Society of Veterinary Internal Medicine (ASVIM) 2022 および第 164 回日本獣医学会学術集会にて発表した(業績 3, 4)。より正確にアルゴリズムの正確性を検証するために、症例数を追加して検証群を 86 頭として再検証を行なった。またアルゴリズム作成に関してはこれまでは各疾患における特徴的な複数の項目から手動で作成していたが、ロジスティック回帰分析を用いて自動でも作成した。これら追加のデータをまとめ、現在論文投稿中である。

## 目的 2：犬の鼻腔疾患における細菌叢の評価

症例収集は昨年から継続とし、鼻腔スワブサンプルは 2021 年 4 月から 2022 年 8 月に本学に来院し、麻酔下 MRI 検査および病理組織検査で確定診断を行った鼻腔疾患を有する犬 14 頭から採取した。対照は正常犬 11 頭から鼻腔スワブを採取した。鼻腔疾患 14 頭の内訳は非感染性鼻炎 6 頭、鼻腔腫瘍 8 頭であった。採取したスワブから DNA を抽出後、16S rRNA 遺伝子解析を実施し、シグナルメント・採取方法および疾患間による細菌叢構成の比較を行った。

多様性については、年齢が 9 歳以上で、また疾患の違いでは非感染性鼻炎において種の多様性が増加していた。多様性については、各疾患における差は認められなかった。細菌科レベルでの疾患間における違いとしては、採取方法における結果から、正常では Moraxellaceae が鼻腔細菌叢の大半を占めそのほかの菌種が少数認められた。非感染性鼻炎においては Moraxellaceae が減少し、そのほか少数の菌種が増加していた。腫瘍においては Moraxellaceae が減少し、Neisseriaceae、Pasteurellaceae、Weeksellaceae の増加が目立った。これら成果は American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) Forum 2022 および第 19 回日本獣医内科学アカデミー学術大会にて発表し(業績 5, 6)、現在論文投稿中である。

非感染性鼻炎においては Moraxellaceae の減少が、腫瘍においては Moraxellaceae が減少し Neisseriaceae、Pasteurellaceae、Weeksellaceae の増加が病態に関連していると考え、今後は末梢血単核球を用いた細菌に対する反応性の評価を RNA Sequence を用いて行う予定である。

業績 1：中澤優太、藤原亜紀ら、呼吸器徴候を主訴に来院した犬 1050 頭の回顧的研究(2005 年～2020 年)、第 163 回日本獣医学会学術集会、2020(口頭発表)

業績 2：Nakazawa Y., Ohshima T., et al., Retrospective study of 1050 dogs with respiratory symptoms in Japan (2005-2020). *Veterinary Medicine and Science* 9(2) 638-644, 2023

業績 3：Nakazawa Y., Ohshima T., et al., Construction of diagnostic algorithms for canine nasal diseases using less-invasive examinations without anesthesia, The 8th meeting of Asian Society of Veterinary Internal Medicine, 2022(口頭発表)

業績 4：中澤優太、藤原亜紀ら、犬の鼻腔疾患における診断アルゴリズムの作成、第 164 回日本獣医学会学術集会、2021(口頭発表)

業績 5：Nakazawa Y., Kibe R., et al., Study of Nasal Microbiome in Dogs with Nasal Diseases and Healthy Dogs, American College of Veterinary Internal Medicine Forum, 2022(口頭発表)

業績 6：中澤優太、木邊量子ら、健常および鼻腔疾患を呈する犬の鼻腔細菌叢の研究、第 19 回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2023(口頭発表)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 藤原亜紀	4. 巻 27(161)
2. 論文標題 飼い主と獣医師のためのインフォームドコンセントガイド リンパ球形質細胞性鼻炎	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 SA Medicine	6. 最初と最後の頁 82-85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤原亜紀	4. 巻 134(23)
2. 論文標題 診断に導く思考回路 頻呼吸・呼吸困難 総論 総合内科医の視点	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 SA Medicine	6. 最初と最後の頁 6-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤原亜紀	4. 巻 3(9)
2. 論文標題 咽喉頭疾患を安全に診断・治療する 総論	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 咽喉頭疾患を安全に診断・治療する 総論	6. 最初と最後の頁 6-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中澤 優太, 藤原 亜紀, 金本 英之, 佐々木 悠, 大島 嵩史, 長谷川 大輔, 藤田 道郎
2. 発表標題 犬の鼻腔疾患における診断アルゴリズムの作成
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuta Nakazawa, Takafumi Oshima, Hideyuki Kanemoto, Yu Sasaki, Yudai Ishikawa, Michio Fujita, Aki Fujiwara-Igarashi
2. 発表標題 Construction of diagnostic algorithms for canine nasal diseases using less-invasive examinations without anesthesia
3. 学会等名 The 8th meeting of Asian Society of Veterinary Internal Medicine (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原亜紀
2. 発表標題 副腎皮質ステロイド剤の使い方 呼吸器疾患
3. 学会等名 第18回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原亜紀
2. 発表標題 上気道の画像診断
3. 学会等名 第68回日本獣医画像診断学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪野雅俊, 中澤優太, 金本英之, 佐々木悠, 石川雄大, 濱本裕仁, 藤田道郎, 藤原亜紀
2. 発表標題 猫の鼻腔・鼻咽頭内疾患における診断アルゴリズムの作成
3. 学会等名 第18回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 分担執筆：藤原亜紀	4. 発行年 2022年
2. 出版社 文永堂出版	5. 総ページ数 1172
3. 書名 獣医内科学 第3版 第3章呼吸器・胸腔疾患(鼻腔の疾患、咽頭と喉頭の疾患、縦隔気腫)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	木邊 量子 (Kibe Ryoko)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------