犬の乾性角結膜炎に対する自家製シクロスポリン 点眼液の臨床評価

片野修一^{1), 2)†}

宮賢次郎²⁾

山我義則³⁾

藤原範子¹⁾

森田剛仁¹⁾

島田章則¹⁾

1) 鳥取大学農学部 (〒680-8553 鳥取市湖山町南4-101)

2) 新潟県 開業 (カタノ動物病院: 〒950-0075 新潟市中央区沼垂東1-5-21)

3) 新潟県 開業 (エルム動物クリニック: 〒950-2055 新潟市西区寺尾上3-10-13)

(2009年1月27日受付・2009年4月22日受理)

要 約

犬の乾性角結膜炎 (KCS) の治療に、シクロスポリンの角膜組織への透過性と溶解度の点から0.025%および0.05%シクロスポリン点眼液 (α -シクロデキストリン含有) を異なる材料と方法で作製し、おのおのKCS罹患犬5症例に臨床応用を試み、その効果を比較検討した。評価項目として、結膜、角膜、角膜輪部、眼脂に区分した眼症状の改善度およびシルマー涙液試験 (STT) を用いて測定した涙液量を指標として臨床評価を行った。その結果、全例に眼症状の改善が認められ、0.025%点眼液より0.05%点眼液のほうが、角膜所見および眼症状の総合所見において有意な ($P < 0.05$) 改善を示した。STT値は、0.025%点眼液で平均 4.5 ± 1.2 mm/分、0.05%点眼液では平均 8.1 ± 2.0 mm/分といずれも増量を示した。また0.05%シクロスポリン点眼液は製剤として沈澱、混濁がなく、均一安定性を示した。以上の成績から、犬のKCS治療に0.05%シクロスポリン点眼液が臨床的に有用であることが示唆された。

——キーワード: 犬, 乾性角結膜炎, シクロスポリン, 自家製点眼液。

----- 日獣会誌 62, 796~801 (2009)

角膜が傷害される代表的疾患である乾性角結膜炎 (KCS) は、涙液の分泌量不足からの涙膜水分層の欠乏および涙液内のムチン産生の異常を伴う進行性の疾患であり [1, 2]、臨床症状としては結膜の肥厚、角膜の血管新生や色素沈着および角膜の重度な乾燥がみられる [3, 4]。免疫介在性炎症に基づく涙腺機能の障害がKCSの一因であることが示唆されている [5]。

シクロスポリン (Cys) は人の臓器移植医療で著しい免疫抑制効果が認められ、眼科領域 [6, 7] においても角膜移植時の拒絶反応や自己免疫疾患の眼症状に対して有効性が報告されている [8, 9]。全身投与における腎・肝機能障害などの副作用を避けるため、人の眼科領域では局所的にCysは使用されてきた [10, 11]。また、獣医界においても0.2% Cys眼軟膏が近年開発された [12]。しかし人では、1989年、Kanai [13] はCysを α -シクロデキストリン (α -CD) 溶液で溶解し、0.025% Cys点眼液を用いた家兎眼の臨床実験では有効であったと報告している。

そこで著者らは、犬のKCSに対して、0.025%および0.05% Cys点眼液を自家作製して治療試験を行い、その効果を比較検討した。

材 料 お よ び 方 法

点眼液の作成方法: 0.025% Cys点眼液: 試薬である α -シクロデキストリン (α -CD: 和光純薬工業(株)または関東化学(株), 東京) を注射用蒸留水で希釈し、10mg/ml溶液を作製した。その溶液にシクロスポリン (Cys: サンデミュン, ノバルティスファーマ(株), 東京) 注射液をCys濃度0.025%となるよう調合した。

0.05% Cys点眼液: 注射用蒸留水80mlに塩化ナトリウム0.66gと α -CD8gを加え溶解し、シクロスポリンA (試薬, 和光純薬工業(株), 東京) 50mgを加え24時間攪拌し、0.1M水酸化ナトリウム適量を加えPH7.0~7.4に調節した。それに注射用蒸留水を加え100mlとし、ボトムトップフィルターでろ過した。なお、作製した0.025%および0.05% Cys点眼液は冷蔵保存した。

† 連絡責任者: 片野修一 (カタノ動物病院)

〒950-0075 新潟市中央区沼垂東1-5-21

☎025-244-4901 FAX 025-244-4902

E-mail: skatano@seagreen.ocn.ne.jp

表1 臨床試験：対象犬の臨床症状

症例 No.	犬 種	年齢	性別	対象眼 左 右	主な臨床症状
0.025% Cys群 (No. 1~No. 5)					
1	シーザー	10	雄	○ ○	角膜血管新生, 角膜色素沈着
2	シーザー	5	雄	○ ○	角膜血管新生, 化膿性角膜炎
3	シーザー	8	雄	○ ○	化膿性角結膜炎, 角膜潰瘍
4	ブルドッグ	3	雌	○ ○	化膿性角結膜炎, 角膜混濁
5	ペキニーズ	8	雄	○ ○	角膜血管新生, 角膜色素沈着
0.05% Cys群 (No. 6~No. 10)					
6	シーザー	12	雄	○ ○	角膜血管新生, 化膿性角結膜炎
7	シーザー	12	雌	○ ○	角膜色素沈着(右), 角膜炎
8	シーザー	12	雌	○ ○	角膜血管新生, 化膿性角結膜炎
9	ヨークシャー テリア	8	雌	○ ○	角膜炎
10	コーギー	3	雌	○ ×	角膜血管新生, 角結膜炎

供試犬：臨床症状よりKCSと診断した10症例の19眼を用いた。この10症例を0.025% Cys点眼液投与群(両眼性KCS5例10眼)と0.05% Cys点眼液投与群(両眼性KCS4例と片眼性KCS1例の計9眼)の2群に分別した(表1)。

診断基準：化膿性角結膜炎、角膜血管新生、角膜色素沈着、眼分泌物過剰、結膜肥厚や角膜乾燥などの臨床症状から角結膜炎の有無を判定した。また、市販のシルマー試験紙(シェリング・プラウ アニマルヘルス(株)、東京)を用い、下眼瞼を下げ耳側約1/3の下眼瞼結膜嚢に先端5mmの折った部分の試験紙が入るように試験紙を置き、1分間の濡れた部分の長さを測るシルマー涙液試験(STT)による涙液量の測定を行い、STT値10mm/分以下である症例をKCSと診断した。その際スリットランプおよび眼底カメラにより角膜や結膜を観察、撮影した。

治療試験方法：自家作製した0.025%および0.05% Cys点眼液を対象眼に1回1滴ずつ、1日2回飼い主に点眼してもらった。化膿性角結膜炎のみられる場合は抗生剤点眼を併用した。原則としてその他の点眼剤の併用は行わなかった。Cys点眼開始後、基本的に2週間後、4週間後、2カ月後に来院してもらい、臨床症状を観察、撮影し、STT値を測定した。

臨床評価項目：乾性角結膜炎の臨床症状である眼球結膜の充血、角膜の炎症、角膜輪部の血管新生、眼脂量の4項目の症状の程度を重症度から3点、2点、1点、0点として扱いスコア化して、初診時および判定時に記録した(表2)。スコアは、項目別および各項目スコアをすべ

表2 臨床症状スコアの判定基準

観察部位・ 項目	症 状	判定基準
眼球結膜	充 血	0=正常(症状の消失) 1=軽度の血管拡張 2=中等度の血管拡張 3=重度の血管拡張
角 膜	角膜炎・混濁	0=正常(症状の消失) 1=軽度の角膜炎 2=中等度の角膜炎 3=角膜混濁
角膜輪部	血管新生	0=正常(症状の消失) 1=軽度の血管新生 2=中等度の血管新生 3=重度の血管新生
眼 脂	眼脂量	0=眼脂なしor 極少量 1=少量の眼脂 2=多量の眼脂 3=多量の眼脂, 開眼不能

て加算した総合スコアで評価した。解析方法として0.025% Cys点眼群と0.05% Cys点眼群の群間比較にはマン・ホイットニ検定を用いた。また、シルマー涙液試験(STT)を用いて初診時および判定時に測定した涙液量を指標として、涙液増加量を群間比較した。

成 績

眼臨床症状の変化：0.025% Cys点眼液投与群では、症例1の両眼は角膜血管新生や色素沈着が認められ、判定時には、角膜での新生血管は細くなっていた。症例2の右眼には化膿性角膜炎による角膜混濁が、左眼には色素沈着がみられ、両眼ともに角膜血管新生も認められた。2週間後の判定時には右眼の角膜混濁は改善し、左眼の色素沈着の範囲は縮小し、角膜血管新生も消退した。症例3の右眼は、角膜上皮の肥厚、色素沈着を起こし、角膜潰瘍がみられた。2カ月後の判定時には、角膜中央部の透明性が回復した。

症例4、ブルドッグ、3歳齢、雌(図1)では、初診日に1年ほど前から両眼にKCSを発症しており、STT値は右眼で8mm/分、左眼4mm/分を示しており、右眼は角膜全体が混濁し、角膜血管新生が角膜輪部に沿って広範囲にみられた。左眼は化膿性分泌物に覆われ、角膜表面は不整となり、混濁が進行していた。

第30病日にSTT値は右眼13mm/分、左眼8mm/分を計測した。右眼は、一部角膜混濁が残存している。左眼の涙液量は増加し、角膜血管新生が数カ所確認できるが、対光反射が明瞭となった。

症例5では両眼とも角膜血管新生および色素沈着がみられたが、判定時には角膜の新生血管は細くなった。

0.05% Cys点眼液投与群では、症例6では両眼とも角

症例 No. 4 ブルドッグ 3歳齢 雌

図1 0.025% Cys 点眼液投与症例（症例4）．初診日および判定時における眼臨床症状の改善とSTT値の推移．

症例 No. 7 シーズー 12歳齢 雌

図2 0.05% Cys 点眼液投与症例（症例7）．初診日および判定時における眼臨床症状の改善とSTT値の推移．

表3 成績：臨床症状スコア

症例 No.		結 膜		角 膜		輪 部		眼 脂		総 合	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
0.025%Cys群											
1	右	1	1	3	2	1	1	1	1	6	5
	左	1	1	1	1	1	1	1	1	4	4
2	右	2	1	1	0	2	1	2	1	7	3
	左	1	0	1	1	1	0	1	1	4	2
3	右	2	1	3	3	3	2	3	2	11	8
	左	2	2	3	3	3	2	3	2	11	9
4	右	1	1	2	2	3	1	2	1	8	5
	左	2	1	2	2	2	1	2	1	8	5
5	右	1	1	3	1	1	1	2	1	7	4
	左	1	1	2	1	1	0	2	1	6	3
中央値		1.3	1.0	2.2	1.5	1.5	1.0	1.6	1.1	7.0	4.5
0.05%Cys群											
6	右	2	1	2	1	2	1	2	1	6	4
	左	1	0	1	1	1	0	1	0	4	1
7	右	3	1	3	2	3	1	3	2	12	6
	左	2	1	2	0	2	1	3	1	9	3
8	右	1	0	1	1	1	0	1	0	4	1
	左	3	2	2	0	2	1	3	2	10	5
9	右	1	0	1	0	0	0	2	1	4	1
	左	0	0	1	0	1	0	2	1	4	1
10	右	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	左	2	0	2	0	3	1	2	0	9	1
中央値		1.7	0.4	1.6	0.4	1.7	0.6	2.1	0.9	6.0	1.4

Pre：初診時 Post：判定時 —：用いず

膜血管新生および角膜炎がみられたが、2週間後の判定時にはいずれも顕著に改善した。

症例7、シーズー、12歳齢、雌（図2）では、初診日に以前から両眼に眼脂があり、最近特に悪化したということで来院した。STT値は右眼8mm/分、左眼0mm/

分を示していた。右眼は角膜上皮の肥厚や色素沈着を起こしており、角膜中央部に癬痕形成がみられた。左眼は角膜血管新生と重度の角膜炎による角膜混濁がみられた。両眼ともに化膿性分泌物に覆われ、慢性化したKCSと診断した。

表4 成績：0.025% Cys群と0.05% Cys群における各臨床所見スコアの比較

スコア	危険率 (P 値)	
	初診時	判定時
結 膜	0.4773	0.0951
角 膜	0.2590	0.0209*
輪 部	0.8288	0.1379
眼 脂	0.5376	0.2954
総 合	0.7392	0.0419*

※ $P < 0.05$ マン・ホイットニー検定による統計学的解析

第14病日にSTT値は右眼13mm/分、左眼15mm/分を示した。右眼角膜中央部の瘢痕は改善され、角膜面が平滑になった。左眼角膜の新生血管は細くなり、両眼とも眼脂が減少し、眼臨床症状が改善した。

症例10の左眼には角膜血管新生および角膜炎がみられ、1カ月後の判定時には顕著な改善がみられた。

眼臨床症状の改善度：全対象眼の初診時および判定時のスコアならびに各項目別に0.025% Cys群と0.05% Cys群における初診時および判定時の中央値を表3に示した。すべてのスコア項目の中央値は、両群ともに初診時>判定時であった。すなわち点眼薬投与により、すべての臨床症状のスコアは減少した。

0.025% Cys群と0.05% Cys群間の比較検定結果を項目別に初診時および判定時の危険率 (P) として (表4) に示した。初診時では、すべての項目で0.025%群と0.05%群間に有意差は認められなかった。判定時では、角膜スコア ($P = 0.0209$) および総合スコア ($P = 0.0419$) で有意差 ($P < 0.05$) が認められ、いずれも0.025%点眼群に比べ、0.05%点眼群で低スコアであった。

STT値の変化を (表5) に示した。0.025% Cys点眼群では、初診時、STT値の平均値は右眼 5.0 ± 1.1 mm/分、左眼5例の平均値は 4.8 ± 1.1 mm/分であり、10眼の平均値は 4.9 ± 0.8 mm/分であった。効果判定時、平均STT値は、右眼 10.2 ± 1.1 mm/分、左眼 8.6 ± 2.2 mm/分であり、10眼の平均値は 9.4 ± 1.3 mm/分で、平均増加量は 4.5 ± 1.2 mm/分であった。

0.05% Cys点眼群では、初診時、STT値の平均値は右眼4例 (症例No. 6, 7, 8, 9) 8.0 ± 0.4 mm/分、左眼5例 (症例No. 6 ~ 10) が 1.8 ± 1.2 mm/分であり、9眼の平均値は 4.6 ± 1.3 mm/分であった。効果判定時、平均STT値は、右眼4例は 14.0 ± 1.9 mm/分、左眼5例は 11.6 ± 2.8 mm/分であり、9眼の平均値は 12.7 ± 1.7 mm/分で、平均増加量は 8.1 ± 2.0 mm/分であった。

考 察

犬のKCSは、ジステンパーなどの感染症による涙腺炎、涙腺の先天性無形成および形成不全、薬剤による涙

表5 STT値の変化

症例	n = 10	STT値 (mm/分)		増加STT値 (mm/分)
		初診時	判定時	
0.025%Cys群				
1	R	6	7	1
	L	8	8	0
2	R	4	15	11
	L	6	16	10
3	R	1	7	6
	L	1	2	1
4	R	8	13	5
	L	4	8	4
5	R	6	9	3
	L	5	9	4
平均±SE		4.9±0.8	9.4±1.3	4.5±1.2

症例	n = 9	STT値 (mm/分)		増加STT値 (mm/分)
		初診時	判定時	
0.05%Cys群				
6	R	8	18	10
	L	3	15	12
7	R	8	13	5
	L	0	15	15
8	R	7	9	2
	L	0	18	18
9	R	9	16	7
	L	6	7	1
10	R	—	—	—
	L	0	3	3
平均±SE		4.6±1.3	12.7±1.7	8.1±2.0

SE：誤差 R：右 L：左 —：用いず

腺障害、手術による瞬膜腺の切除、涙腺および瞬膜腺を支配する副交感神経の障害などが原因として考えられていた [4]。また、近年、KCSの発症に、自己免疫性炎症による涙腺の破壊が関与すること、および罹患患者の血清中に涙腺、唾液腺、腭外分泌腺組織に対する自己抗体が存在することが報告された [5, 18]。

KCSの対症療法として、人工涙液や潤滑剤の頻回投与、コリン作動薬の経口投与などが行われてきた。また、角膜色素沈着や角膜血管新生に対してステロイドの点眼も応用されてきた [3, 4]。KCSの発症に、自己免疫性メカニズムの関与が示唆されていること [18-20]、およびCysに免疫抑制効果に加えて涙腺の細胞レベルでの涙液産生を促進する効果があることが知られている [21] ことから、Cysが犬のKCS治療の主流となってきた。

角膜の上皮および内皮は親油性であるが、角膜実質は親水性であるため、水に溶けにくいCysは角膜実質組織および眼内組織への透過性が悪く、高濃度のCys点眼剤が使用されていた。Kanaiら [13]、Albaら [15] は各種溶解剤を用いてCysの角膜透過性について家兎眼で実験し、 α -シクロデキストリン (α -CD) で溶解したCys点眼液が低濃度で角膜透過性がよいこと、最大限0.075%までしかCysが溶解しないこと、0.075%点眼

液の頻回点眼で角膜表層に軽度の組織傷害が生じたことを報告した。溶解剤として用いた α -CDは、有機および無機化合物をゲストとして取り込み、物理的、化学的、生理的性質を変化させることが知られており[17]、 α -CD溶液にCysを混和すると、親水性を示すため、角膜実質組織への移行濃度が増加する。 α -CDそのものは生体には無害な環状オリゴ糖であり、眼刺激症状は認められなかった。また、高野ら[16]、秋山ら[14]は、兎の角膜同種または異種移植での0.025% Cys点眼液(α -CD溶解)の拒絶反応抑制効果を検討し、有用であったと考察している。獣医領域で用いられている濃度は0.2% Cys含有で、人の0.05~0.1% Cys含有より濃度が高い。そこで筆者らは、犬のKCSの治療に0.025%および0.05% Cys点眼液を作製・応用し、臨床試験を行った。今回の臨床試験では、0.025% Cys点眼液で5症例10眼、0.05% Cys点眼液では5症例9眼を対象とした。眼臨床症状の改善度を効果判定時で比較すると、角膜所見および総合所見で有意差が認められ、0.025% Cys点眼群より0.05% Cys点眼群の方が低スコアであった。またSTT値の推移では0.025% Cys点眼群で平均増加量 4.5 ± 1.2 mm/分で、0.05% Cys点眼群では 8.1 ± 2.0 mm/分と顕著な増量がみられた。よって0.05% Cys点眼液は角膜病変および涙液量の改善効果において0.025% Cys点眼液より優れており、また沈澱、混濁がなく、均一で安定性があり、臨床的に有用であると考えられた。

引用文献

- [1] Moore CP: 涙液性状からみた涙膜疾患, The Veterinary Clinic of North America, 古川敏紀訳, 20, 15-28, 学窓社, 東京 (1992)
- [2] 海老原伸行: ドライアイ・アレルギー・コンタクトレンズのGoblet細胞をめぐる微妙な関係, あたらしい眼科, 22, 323-328 (2005)
- [3] Petersen-Jones SM, Crispin SM: 涙膜と結膜および角膜の疾患, 小動物の眼科マニュアル, 印牧信行訳, 116-119, 学窓社, 東京 (1996)
- [4] Peiffer RL Jr: 小動物の眼科学, 朝倉宗一郎監訳, 209-213, 文永堂出版, 東京 (1993)
- [5] Kaswan RL, Salisbury MA: イヌ乾性角結膜炎に関する新しい試み, The Veterinary Clinic of North America, 古川敏紀訳, 20, 29-55, 学窓社, 東京 (1992)
- [6] 深川和己: アレルギー性結膜疾患, あたらしい眼科, 20, 37-47 (2003)
- [7] 海老原伸行: カルシニューリン阻害薬(シクロスポリン, タクロリムス)によって変わる春季カタルの治療, あたらしい眼科, 25, 137-141 (2008)
- [8] Shepherd W, Coster D, Fook T, Rice N, Jones B: Effect of cyclosporine A on the survival of corneal graft in rabbits, Br J Ophthalmol, 64, 148-153 (1980)
- [9] Nussenblatt R, Palestine A, Rook A, Irwin S, Waldon B, Iga I G: Treatment of intraocular inflammatory disease with cyclosporine A, Lancet, II, 235-238 (1983)
- [10] Landsberg D, Rae A, Chiu A, Werb R, Taylor P, Chan-Yan C: The effect of triple therapy on cyclosporine nephrotoxicity and hypertension in renal transplantation, Transplant proc, 21, 3323-3324 (1980)
- [11] Eid A, Perkins J, Rakela J, Krom R: Conversion from standard cyclosporine to low-dose cyclosporine in liver transplant recipients: effect on nephrotoxicity and hypertension beyond one year, Transplant proc, 21, 2238-2239 (1989)
- [12] 印牧信行, 山川裕子, 小又千枝, 山本紀子, 小野 啓, 恩田 賢, 和田恭則: 犬の乾性角結膜炎におけるシクロスポリン眼軟膏の涙液分泌に及ぼす影響, 日獣会誌, 54, 105-108 (2001)
- [13] Kanai A, Alba RM, Takano T, Kobayashi C, Nakajima A, Kurihara K: The effect on the cornea of alpha cyclodextrin vehicle for cyclosporine eye drops, Transplant proc, 21, 3150-3152 (1989)
- [14] 秋山修一, 横山利幸, 高野俊之, 小林千博, 金井 淳: シクロスポリン点眼の角膜移植への応用, 日眼会誌, 97, 378-382 (1993)
- [15] Alba RM Jr, Kanai A, Takano T, Kobayashi C, Nakajima A: The effect on the cornea of various vehicles for cyclosporine eye drops, Folia Ophthalmol, 40, 902-908 (1989)
- [16] 高野俊之, 小林千博, Alba RM, 金井 淳: 0.025% シクロスポリン点眼(アルファシクロデキストリン溶解)の家兎角膜移植での免疫抑制効果, 日眼会誌, 96, 834-840 (1992)
- [17] 村 信之: 用途広がるサイクロデキストリン, Bio Industry, 2, 261-271 (1985)
- [18] Kaswan RL, Maetin CL, Dawe DL: Keratoconjunctivitis sicca: immunological evaluation of 62 canine cases, Am J Vet Res, 46, 376-383 (1985)
- [19] Dos Reis G, Shevach E: Effect of cyclosporine A on T-cell function in vitro: the mechanism of suppression of T-cell proliferation depends on the nature of the T-cell stimulus as well as the differentiation state of the responding T-cell, J Immunol, 129, 2360-2367 (1982)
- [20] Dongworth D, Klaus G: Effect of cyclosporine A on the immune system of the mouse. I. Evidence for a direct selective effect of cyclosporine A on B-cells responding to anti-immunoglobulin antibodies, Eur J Immunol, 12, 1018-1022 (1982)
- [21] Yoshida A, Fujihara T, Nakata K: Cyclosporine A increases tear fluid secretion via release of sensory neurotransmitters and muscarinic pathway in mice, Experimental Eye Research, vol68, Issue5, 541-546 (1999)

Clinical Evaluation of Handmade Ophthalmic Solution Containing Cyclosporine
on the Keratoconjunctivitis Sicca in Dogs

Shuichi KATANO^{*†}, Kenjiro MIYA, Yoshinori YAMAGA, Noriko FUJIWARA,
Takehito MORITA and Akinori SHIMADA

* Katano Animal Clinic, 1-5-21 Nuttari higashi, Chuo-ku, Niigata, 950-0075 Japan

SUMMARY

Ophthalmic solutions containing 0.025% cyclosporine or 0.05% cyclosporine in α -cyclodextrin were prepared, followed by the clinical application of the ophthalmic solution to each of five dogs affected with keratoconjunctivitis Sicca (KCS). An evaluation of improvements in clinical findings was carried out based on the ophthalmic findings in the conjunctiva, cornea, corneal limbus, exudation and amount of tear examined using the Schirmer tear test (STT). Treatment by a solution containing 0.05% cyclosporine showed significantly ($P < 0.05$) better results in the findings of cornea and total ophthalmic findings. The mean value of STT of dogs treated with a 0.025% solution and a 0.05% solution was $4.5 \text{ mm} \pm 1.2 \text{ mm/min}$ and $8.1 \text{ mm} \pm 2.0 \text{ mm/min}$, respectively. An ophthalmic solution containing 0.05% cyclosporine was stable and clean in the texture. These results suggest that a handmade ophthalmic solution containing 0.05% of cyclosporine is useful in treating KCS in dogs. — Key words : Cyclosporin, Dog, Handmade Ophthalmic Solution, Keratoconjunctivitis Sicca.

[†] Correspondence to : Shuichi KATANO (Katano Animal Clinic)

1-5-21 Nuttari-higashi, Chuo-ku, Niigata, 950-0075, Japan

TEL 025-244-4901 FAX 025-244-4902 E-mail : skatano@seagreen.ocn.ne.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 62, 796 ~ 801 (2009)