

コンパニオンアニマルの外耳における

***Malassezia* 属菌の保有状況と分離株の分子生物学的解析**

千葉 隆司, 高橋 由美, 宗村 佳子, 和宇慶 朝昭, 水谷 浩志,  
畠山 薫, 山田 澄夫, 仲真 晶子, 甲斐 明美

**Occurrence and Molecular Analysis of *Malassezia* spp. in the External Ear Canal of Companion Animals**

Takashi CHIBA, Yumi TAKAHASHI, Yoshiko SOUMURA, Tomoaki WAUKE, Hiroshi MIZUTANI,  
Kaoru HATAKEYAMA, Sumio YAMADA, Akiko NAKAMA and Akemi KAI

# [ 研究年報 第 61 号 (2010) 正誤表 Errata ]

東京健安研七号年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, 61, 127-132, 2010

コンパニオンアニマルの外耳における

*Malassezia* 属菌の保有状況と分離株の分子生物学的解析

**Occurrence and Molecular Analysis of *Malassezia* spp. in the External Ear Canal of Companion Animals**

Page 132 abstract

[誤 Error]

*Malassezia* spp. were isolated from 75 out of 130 (63.5%) dogs

[正 Correct]

*Malassezia* spp. were isolated from 75 out of 130 (57.7%) dogs

## コンパニオンアニマルの外耳における

### *Malassezia* 属菌の保有状況と分離株の分子生物学的解析

千葉隆司\*, 高橋由美\*, 宗村佳子<sup>2</sup>, 和宇慶朝昭<sup>3</sup>,  
水谷浩志<sup>4</sup>, 畠山薫<sup>5</sup>, 山田澄夫<sup>3</sup>, 仲真晶子\*,  
甲斐明美<sup>6</sup>

*Malassezia* 属菌は、ヒトや動物の皮膚に常在する酵母である。しかし、特定の条件下で過度に菌数が増加した場合などでは、宿主の皮膚等に危害を惹起する。また近年では、本菌のアトピー性皮膚炎への関与や院内感染事例も報告されるようになってきた。そこで今回、コンパニオンアニマルの外耳を対象に *Malassezia* 属菌の保有状況を調査し、分離株について分子生物学的な解析を試みた。その結果、*Malassezia* 属菌は、イヌでは130検体中75検体 (57.7%)、ネコでは110検体中19検体 (17.3%) から検出された。また、分離株のほとんどが動物の常在菌とされる *M. pachydermatis* であったが、ヒトの常在菌とされる *M. japonica* と *M. slooffiae* も検出された。さらに、分離した85株の *M. pachydermatis* について ITS1領域を用いた分子系統樹解析を行った結果、*M. pachydermatis* は5つの遺伝子グループに分かれ、一部の系統には宿主との間に関連性が認められた。

キーワード: *Malassezia* 属菌, コンパニオンアニマル, 担子菌系酵母, ITS1領域, 系統樹解析

#### はじめに

*Malassezia* 属菌は、ヒトや動物の皮膚に常在する担子菌系の酵母である。*Malassezia* 属菌のうち、*M. pachydermatis* 以外の菌種はすべて発育に脂質を要求し、脂質が分泌される皮膚などに常在菌として定着した後、何らかの理由で過度に増加した場合に、炎症等の危害を起こすと考えられている<sup>1)</sup>。本菌による疾病として、ヒトでは脂質要求性菌種である *M. furfur*, *M. obtusa*, *M. sympodialis* などが、でん風やマラセチア毛包炎などの原因菌として知られ、動物では、脂質非要求性菌種である *M. pachydermatis* が、ペット動物 (コンパニオンアニマル) 等での難治性外耳炎や皮膚疾患の起因菌として重要視されてきた<sup>1-3)</sup>。しかし近年、ヒトの常在菌と考えられていた脂質要求性菌種が動物の皮膚炎から分離された事例や、イヌや飼い主を介して病院内に持ち込まれた *M. pachydermatis* による日和見感染事例などが報告されるようになった。さらに、*Malassezia* 属菌がヒトや動物のアトピー性皮膚炎や気管支喘息などへ関与していることが疑われる事例も報告されており、ヒトと動物の濃厚接触により互いの常在菌が交差した結果として、新たな疾病が発生することが懸念されている<sup>2-6)</sup>。

このように、*Malassezia* 属菌は公衆衛生上注目されつつある真菌であるが、本菌が有する特殊な生理性状により、

一般的な真菌検査法の適用が難しい。このため、自然界における分布や感染経路、ヒトに対する危害性等、本菌が持つ微生物学的な特徴については未だ十分に解明されていない。そこで今回は、東京都動物愛護相談センターに収容されたコンパニオンアニマルを対象に *Malassezia* 属菌の保有状況と分離株の分子生物学的な解析を行った。

#### 実験方法

##### 1. 調査対象および検体

2007年4月から2009年12月末までに東京都動物愛護相談センターに捕獲および収容されたコンパニオンアニマルのうち、明確な外耳炎を伴わないイヌ130頭およびネコ110頭を調査対象とした。これら対象動物について外耳道内を滅菌綿棒で拭きとり、これを検体とした。

##### 2. *Malassezia* 属菌の分離および同定

###### 1) *Malassezia* 属菌の分離

クロモアガーマラセチア/カンジダ培地(関東化学)を用い、分離培養を行った。培養は、検体を平板に直接塗布した後、30°C、5~10日間行った。培養後、平板上に発育した赤紫色の特徴的なコロニーを *Malassezia* 属菌とした。

\* 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

<sup>2</sup> 東京都動物愛護相談センター城南島出張所

<sup>3</sup> 元東京都健康安全研究センター微生物部

<sup>4</sup> 東京都芝浦食肉衛生検査所

<sup>5</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

<sup>6</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部

2)塩基配列解析法と脂質要求性を利用した分離株の同定  
クロモアガーマラセチア/カンジダ培地から分離した *Malassezia* 属菌について、塩基配列解析法と脂質の要求性を利用した同定を行った。塩基配列解析法は、分離株からDNAを抽出した後、Kurtzmanら<sup>7)</sup>およびMakimuraら<sup>8)</sup>の報告に従いrDNA中のLSU-D1/D2およびITS1に設定したプライマーを用いたPCRを行った。PCRはTaKaRa EX Taq (タカラバイオ) およびDNAサーマルサイクラーGeneAmp 9600 (PerkinElmer) を用いて行い、操作は試薬の添付文書にしたがった。PCRで得られた反応生成物について、Montage PCR Centrifugal Filter (Millipore) により精製した後、BigDye Terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems) によるシークエンス反応を実施し、ABI PRISM 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を取得した。得られた塩基配列について、GenBank/EMBL/DDBJを利用したBLASTによる解析<sup>9)</sup>に加え、*M. pachydermatis* 基準株 (NBRC 10064T)、*M. japonica* 基準株 (NBRC 101613T) および *M. slooffiae* 基準株の塩基配列 (AY743633, AJ249956 : CBS 7956T) との配列の比較により菌種の同定を行った。なお、NBRC 10064T および NBRC 101613T は、独立行政法人製品評価技術基盤機構から分譲された菌株である。

脂質要求性状の確認は、2枚のポテトデキストロース寒天培地 (PDA) (栄研化学) に分離株を接種した後、一方にオリーブオイル (和光純薬) を重層 (PDA/オリーブオイル培地) した。これらの平板を30°C、3~5日間培養し、PDA/オリーブオイル培地にのみ発育した場合を脂質要求性株とした。

### 3) *M. pachydermatis* の分子系統樹解析

分離株のうち、*M. pachydermatis* と同定された85株についてITS1領域の塩基配列データを取得した。これらに対照配列として *M. pachydermatis* の GenBank データ (AY743637, AY387142, AY387140, AY387141, AB118940, AB118939, AB118938, AB118937, FJ545240) と NBRC 10064T から取得したデータを加え、分子系統樹解析を行った。なお、解析はMCL (Maximum Composite Likelihood) モデルによるNJ (Neighbor-Joining) 法を用い<sup>10)</sup>、MEGA4<sup>11)</sup> を使用して行った。

## 結果

### 1. 検出された *Malassezia* 属菌と分離株の性状

*Malassezia* 属菌は、イヌでは130検体中75検体 (57.7%)、ネコでは110検体中19検体 (17.3%) から検出された。これら検出された *Malassezia* 属菌は動物の常在菌とされる *M. pachydermatis* がほとんどであり、イヌでは130検体中69検体 (53.1%)、ネコでは110検体中16検体 (14.5%) で、それぞれ分離した *Malassezia* 属菌の92.0%、84.2%を占めていた。また、脂質要求性の *Malassezia* 属菌として、塩基配列により *M. japonica* と推定された株がイヌ6検体、ネコ2検体か

ら分離され、*M. slooffiae* と推定された株がネコ2検体から検出された。なお、*M. slooffiae* が検出されたネコのうち、1検体では *M. japonica* が同時に検出された。

### 2. *Malassezia* 属菌が分離された宿主の特徴

*Malassezia* 属菌の保有状況と宿主の特徴を Table 1に示した。年齢別では、イヌにおいては1才以下が100%の検出率を示し、1才を過ぎると検出率に大きな変動が見られなかったが、ネコでは1才から5才で平均検出率の半分以下に一旦下がった後、加齢と共に検出率が上昇していく傾向が見られた。体重別では、イヌでは5 kg未満と20 kgにおいてそれぞれ80.0%、100.0%と検出率が高く、11 kgから20 kg未満の範囲で若干検出率が低下していた。これに比べ、ネコでは1 kg未満の個体で *Malassezia* 属菌の保有が認められず、1 kg以上の個体では検出率に顕著な差が見られなかった。性別における検出率では、イヌおよびネコ双方で、去勢および避妊処理された個体でやや下がる傾向が見られた。耳の形による *Malassezia* 属菌の検出率は、イヌにおいて立ち耳より垂れ耳の方が明らかに高くなり、およそ2倍の検出率となった。また、収容地域別では、イヌでは区部55.8%、多摩地区59.0%、ネコにおいては区部16.1%、多摩地区18.8%の保菌率であり、コンパニオンアニマルを収容した地域では、本菌の保有率に明確な差異が認められなかった。

なお、脂質要求性の *Malassezia* 属菌が分離された個体については、*M. japonica* が分離されたイヌがすべて雄であったこと以外に、特筆すべき特徴は見られなかった。

### 3. 分子系統樹解析を用いた分離菌株の解析

分離した85株の *M. pachydermatis* について、ITS1領域の塩基配列を取得し、分子系統樹解析を行った。この結果、*M. pachydermatis* は大きく5つの遺伝子グループ (genotype -I ~ V) に分かれた。これらの系統のうち、genotype -I が最も大きいグループを形成し、供試した株の41.2% (35株) の塩基配列が含まれ、本系統には *M. pachydermatis* 基準株配列 (NBRC 10064T および CBS1879T : AY743637) も含まれた。また、genotype -I 以外の系統においては、宿主動物との間に関連性が見られ、genotype -II ~ IV はイヌ由来株のみ、genotype -V はネコ由来株のみで形成されていた。なお、これら同一の系統に含まれた株の宿主であったコンパニオンアニマルは、すべて捕獲の時期や場所が異なる個体であった (Fig. 1)。

## 考察

近年、急速に普及している分子生物学的な解析手法は、微生物の分類や同定に加えて感染経路や病原因子の解析などにも広く応用されている。これらの手法は真菌の解析でも注目されており、特に、発育に脂質を要求する *Malassezia* 属菌のような一般的な培養方法を利用できない真菌の解析には極めて有用と考えられている<sup>12)</sup>。 *Malassezia* 属菌は、分子生物学的な解析手法の普及に伴い、2000年以降、新菌

Table 1. Occurrence of *Malassezia* spp. in the External Ear Canal of Companion Animals.

		Dogs			Cats		
		No. of tested	No. of positive	Detection rate(%)	No. of tested	No. of positive	Detection rate(%)
<i>Malassezia</i> spp.		130	75	57.7%	110	19	17.3%
	<i>M. pachydermatis</i>	130	69	53.1%	110	16	14.5%
	other <i>Malassezia</i> spp.	130	6	4.6%	110	3	2.7%
Age	< 1 year	6	6	100.0%	18	3	16.7%
	1-5 years	31	17	54.8%	40	3	7.5%
	6-10 years	48	29	60.4%	34	7	20.6%
	11-15 years	34	17	50.0%	12	3	25.0%
	> 15 years	11	6	54.5%	6	3	50.0%
Weight (Dogs /Cats)	< 5 kg /< 1 kg	10	8	80.0%	6	0	0.0%
	5-10 kg /1-2 kg	48	30	62.5%	22	4	18.2%
	11-15 kg /2-3 kg	47	22	46.8%	38	8	21.1%
	15-20 kg /3-4 kg	17	7	41.2%	28	5	17.9%
	> 20 kg /> 4 kg	8	8	100.0%	16	2	12.5%
Sex	M	74	44	59.5%	34	6	17.6%
	F	36	22	61.1%	36	8	22.2%
	U*	20	9	45.0%	40	5	12.5%
Ear type	stood	86	39	45.3%	110	19	17.3%
	down	44	36	81.8%	0	0	0.0%
Area	Wards	52	29	55.8%	62	10	16.1%
	Tama	78	46	59.0%	48	9	18.8%

\* castrated or contracepted

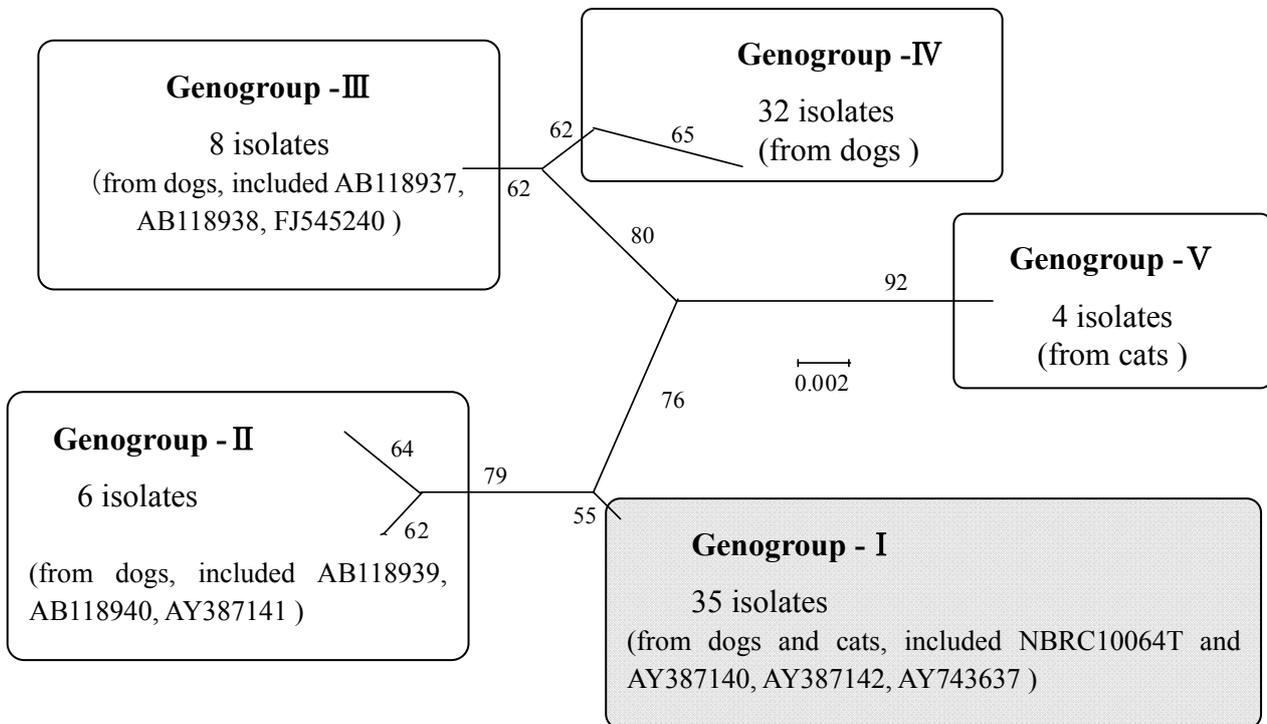


Fig. 1. Phylogenetic Analysis (Neighbor-Joining method) of *M. pachydermatis*, Based on ITS1 Sequences. Bootstrap Percentages at the Respective Node were Derived from 1000 Replicates.

種の発見が相次ぎ、今後も属の拡大が予想されている真菌である<sup>12-14)</sup>。その一方で、本菌はこのような微生物学的な解析が進む過程において臨床検体から分離される機会が増え、その危害性が注目されている<sup>16-20)</sup>。そこで、ヒトとの接触頻度が高いコンパニオンアニマルを対象に、*Malassezia* 属菌の検出と分離株の分子生物学的な解析を試みた。

この結果、*Malassezia* 属菌はイヌでは130検体中75検体 (57.7%)、ネコでは110検体中19検体 (17.3%) から検出された。また、検出された *Malassezia* 属菌のほとんどが動物の常在菌とされる *M. pachydermatis* であった。Crespo らは、スペインで行った外耳炎を伴わないイヌおよびネコの調査において、本菌の保有率が50.0%および17.6%であったことを報告している<sup>17)</sup>。また、著者らが2006年に行った調査でも<sup>21)</sup>、約60%の健康犬から本菌が検出されていた。イヌとネコで本菌の保有率に差がある点、特にイヌで本菌の保有率が高い理由の一つとして、イヌの外耳道内に分泌される脂質との関連が報告されている<sup>22-23)</sup>。以上のことから、健康なイヌの半数程度が *Malassezia* 属菌を保有していると考えられた。これらに加え、*M. pachydermatis* が未熟児や低免疫患者に対して院内感染を起こした事例も報告されている<sup>6)</sup>。このことから、本菌に対して感受性が高い集団においては、イヌの取り扱いに注意する必要がある。

イヌやネコにおける *Malassezia* 属菌の保有率と調査個体の特徴については、年齢との関係が指摘されており<sup>17)</sup>、イヌについては、若年個体で本菌の保有率が高かったことを著者らも報告している<sup>21)</sup>。今回の調査でも、推定年齢が1才未満のイヌにおいて *Malassezia* 属菌の検出率は100%と高く、以降の年齢において検出率が50~60%に減少する傾向が見られた。一方、ネコについては加齢とともに本菌保有率が上昇し、推定年齢15才以上において検出率が50%と最も高くなっていった。また、個体の解剖学的な特徴と *Malassezia* 属菌については、たれ耳の場合で本菌の検出率が高くなるとの報告がある<sup>18)</sup>。そこで耳の形状と本菌の保有率について調査した結果、立ち耳のイヌに比べてたれ耳のイヌの本菌保有率が高かった。以上の結果は、*Malassezia* 属菌の保有率に影響を与える因子として、宿主動物の種類や年齢以外の個体特徴も寄与していることを示唆するものと考えられ、特に、若年かつたれ耳品種のイヌについては、本菌の感染リスクが高いことが推測された。

一般に、動物から分離される *Malassezia* 属菌は脂質非要求性の *M. pachydermatis* であると考えられてきた。しかし近年、皮膚疾患の動物からヒトの常在菌と考えられていた脂質要求性の *M. furfur*、*M. obtusa*、*M. sympodialis* がイヌやネコ、ウシ、ウマなどの外耳炎や皮膚炎から分離された事例が報告されている<sup>4, 15-18)</sup>。今回の調査では、健康なイヌやネコから脂質要求性の *M. japonica* や *M. slooffiae* が検出され、ヒトと動物、特にヒトとの接触の機会が多いと考えられるコンパニオンアニマルとの間で、常在菌としての *Malassezia* 属菌の交差汚染が進行していることが示唆された。また、*M. slooffiae* については、外耳炎のネコから

分離された事例が報告されている<sup>24)</sup>が、健康なネコから *M. japonica* や *M. slooffiae* が分離された事例は報告されていない。これらの *Malassezia* 属菌が、動物に対してどのような危害性を有するののかについては十分に解明されていないが、脂質要求性の *Malassezia* 属菌についてはヒトに対する健康危害も想定されることから、今後も注意深く監視していく必要がある。

*Malassezia* 属菌の一部において、特定の塩基配列に種内多型が存在するとの指摘がある<sup>12, 25)</sup>。また、著者らが2006年に行った解析<sup>21)</sup>においても、*M. pachydermatis* のITS1領域に多型が認められている。そこで今回は、解析対象株数をさらに増やして *M. pachydermatis* のITS1領域を解析した。この結果、*M. pachydermatis* のITS1領域は大きく5つの遺伝子グループに分けることが可能であり、最も大きな系統には、*M. pachydermatis* 基準株が含まれていた。また、一部の系統では宿主動物との間に関連が認められ、イヌ由来株やネコ由来株のみで形成される系統が存在した。ITS領域を含め、機能タンパク質などをコードしていない領域では保存性や選択性が低いと考えられる。このため、同一種内においても塩基置換速度にバラツキが生じ、結果として多型を形成すると考えられている<sup>24)</sup>。今回の解析では、捕獲時期や場所が異なる個体から得られた株間において、ITS1領域に同一の塩基多型パターンが認められた。また、一部の系統においては、これらの多型と宿主動物との間に関連も認められており、それぞれの遺伝的系統が宿主となる動物の種類によって選択されている可能性も推測される。以上の結果から、*M. pachydermatis* のITS1領域多型は本菌の株レベルでの識別に利用できることが示唆され、さらには宿主間における交差感染や自然界における分布調査など、幅広い疫学的解析への応用が可能であると考えられた。

## まとめ

ヒトや動物の皮膚常在菌である担子菌系酵母 *Malassezia* 属菌について、東京都動物愛護相談センターに収容されたコンパニオンアニマル (イヌ130頭およびネコ110頭) の外耳における保有状況を調査し、あわせて、分離菌株の分子生物学的解析を試みた。

その結果、*Malassezia* 属菌は、イヌでは130検体中75検体 (57.7%)、ネコでは110検体中19検体 (17.3%) から検出された。検出された *Malassezia* 属菌の菌種は、動物の常在菌とされる *M. pachydermatis* がほとんどであったが、ヒトの常在菌と考えられている脂質要求性の *Malassezia* 属菌も検出された。

さらに、コンパニオンアニマルから分離した *M. pachydermatis* 85株は、ITS1領域を用いた分子系統樹解析により5つの遺伝子グループに分かれた。これらの系統のうち、一部は宿主の動物種との間に関連性が認められた。

## 文献

- 1) 清 佳浩 : 真菌誌, **47**, 75-80, 2006.
- 2) Sugita, T., Tajima, M., Amaya, M., *et al.* : *Microbiol. Immunol.*, **48**, 755-759, 2004.
- 3) Sei, Y., Hamaguchi, T., Ninomiya, J., *et al.* : *J. Dermatol.*, **21**, 334-340, 1994.
- 4) Batra, R., Boekhout, T., Gueho, E., *et al.* : *FEMS Yeast Res.*, **5**, 1101-1113, 2005.
- 5) Belkum, A. V., Boekhout, T. and Bosboom, R. : *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2528-2532, 1994.
- 6) Chang, H. J., Miller, H. L., Watkins, N., *et al.* : *N. Engl. J. Med.*, **338**, 706-711, 1998.
- 7) Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. : *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1216-1223, 1997.
- 8) Makimura, K., Mochizuki, T., Hasagawa, A., *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2629-2633, 1998.
- 9) Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., *et al.* : *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410, 1990.
- 10) Tamura, K., Nei, M., Kumar, S.: *Proc Natl Acad Sci USA.*, **101**, 11030-11035, 2004.
- 11) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. *et al.*: *Mol Biol Evol.*, **24**, 1596-1599, 2007.
- 12) 杉田 隆 : 真菌誌, **48**, 179-182, 2007.
- 13) Sugita, T., Takashima, M., Kodama, M., *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4695-4699, 2003.
- 14) Hirai, A., Kano, R., Makimura, K., *et al.* : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 623-627, 2004.
- 15) Hirai, A.: *ViVeD interzoo*, **2**, 199-202, 2006.
- 16) Chen, T. A. and Hill, P. B. : *Vet. Dermatol.*, **16**, 4-26, 2005.
- 17) Crespo, M. J., Abarca, M. L. and Cabañas, F. J. : *Medical Mycology*, **40**, 115-121, 2002.
- 18) Cafarchia, C., Gallo, S., Capelli, G., *et al.* : *Mycopathologia*, **160**, 143-149, 2005.
- 19) Yamasaki, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS)*, **106**, 1897-1902, 2009.
- 20) Kaneko, T., Makimura, K., Onozaki, M., *et al.*: *Med. Mycol.*, **43**, 699-704, 2005.
- 21) 千葉 隆司, 畠山 薫, 水谷 浩志 他 : 東京健安研七年報, **58**, 49-52, 2007.
- 22) Marcon, M. J., Powell, D. A. : *Clin. Microbiol. Rev.*, **5**, 101-119, 1992.
- 23) Masuda, A., Sukegawa, T., Mizumoto, N., *et al.* : *J. Vet. Med. Sci.*, **62**, 1177-1182, 2000.
- 24) Shokri, H., Khosravi, A., Rad, M., *et al.* : *J. Vet. Med. Sci.*, **72**, 293-296, 2009.
- 25) 横山 耕治 : 真菌誌, **46**, 151-156, 2005.

**Occurrence and Molecular Analysis of *Malassezia* spp. in the External Ear Canal of Companion Animals**

Takashi CHIBA\*, Yumi TAKAHASHI\*, Yoshiko SOUMURA\*\*, Tomoaki WAUKE\*, Hiroshi MIZUTANI\*\*\*,  
Kaoru HATAKEYAMA\*, Sumio YAMADA\*, Akiko NAKAMA\* and Akemi KAI\*

*Malassezia* spp. are yeasts found in normal skin flora of human and animals. However, overgrowth of these yeasts can cause skin disease under specific conditions. In addition, atopic dermatitis and hospital-acquired infection of *Malassezia* spp. has been reported. We investigated the prevalence and molecular characterization of *Malassezia* spp. isolated from the ear canal of companion animals.

*Malassezia* spp. were isolated from 75 out of 130 (63.5%) dogs and 19 out of 110 (17.3%) cats, and most of the isolated strains were *M. pachydermatis*, which is assumed to be the normal flora of animals. Some *Malassezia* spp. isolated were *M. japonica* and *M. slooffiae* assumed to be normal flora of human. These 85 *M. pachydermatis* isolated were classified into 5 genogroups using molecular phylogenetic analysis of the internal transcribed spacer 1 (ITS1) region. Some of these groups were found to be related to host animals.

**Keywords:** *Malassezia* spp., companion animals, basidiomycetous yeasts, internal transcribed spacer region 1 (ITS-1), phylogenetic analysis

---

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

\*\* Jyounanjima Sub-Branch Office, Tokyo Metropolitan Animal Care and Consultation Center

\*\*\* Tokyo Metropolitan Shibaura Meat Sanitary Inspection Station