

原 著

種特異的 PCR 法と分離培養法を用いた山口県内の
犬・猫における *Capnocytophaga* 属菌の検出状況

亀山光博¹⁾ 富永 潔^{1)†} 矢端順子¹⁾ 野村恭晴¹⁾
鈴木道雄²⁾ 今岡浩一²⁾

1) 山口県環境保健センター保健科学部 (〒753-0821 山口市葵 2-5-67)

2) 国立感染症研究所獣医科学部 (〒162-8640 新宿区戸山 1-23-1)

(2014年4月23日受付・2014年9月10日受理)

要 約

2011～2012年に、犬120頭及び猫80頭の口腔スワブにおける *Capnocytophaga canimorsus* 及び *C. cynodegmi* 検出状況を、種特異的 PCR 法と分離培養法を用いて調査した。PCR 法では、*C. canimorsus* 遺伝子は犬の62%及び猫の49%から、*C. cynodegmi* 遺伝子は犬の82%及び猫の86%から検出された。また、*C. canimorsus* は犬の4%及び猫の4%、*C. cynodegmi* は犬の38%及び猫の41%から分離された。*C. cynodegmi* 特異的遺伝子が陰性の検体から本菌が分離された検体もあったことから、種特異的 PCR 法と分離培養法を併用することで、口腔スワブサンプルから本菌を確実に検出できるものと推察された。5薬剤による薬剤感受性試験の結果、アンピシリン耐性株が10株、エリスロマイシン、シプロフロキサシン耐性株がそれぞれ1株ずつ認められたことから、治療にペニシリン系抗生物質を使用する際には、 β -ラクタマーゼ阻害剤との合剤を使用する必要があると考えられた。

—キーワード：猫、*Capnocytophaga canimorsus*、*Capnocytophaga cynodegmi*、犬、種特異的 PCR。

-----日獣会誌 67, 929～933 (2014)

Capnocytophaga 属菌は、発育に二酸化炭素を要求する通性嫌気性グラム陰性桿菌で、人や動物の口腔内常在菌である。そのうち *Capnocytophaga canimorsus* と *C. cynodegmi* の2菌種はおもに犬や猫の口腔内に保菌されている [1]。

中でも人に対し強い病原性を示す *C. canimorsus* による感染症は、1976年にアメリカで初めて報告されて以降 [2]、これまで世界で約300症例が報告されている [1, 3]。わが国では1993年以降2012年末までに、9死亡例を含む37例が確認されている [3]。*C. canimorsus* あるいは *C. cynodegmi* の人への感染は、主に保菌動物による咬傷や搔傷が原因であるが、創傷部を保菌動物に舐められることなどによる感染も知られている [4]。本菌に感染しても発症することはきわめてまれであるが [1]、*C. canimorsus* 感染では、きわめて急性経過で敗血症や髄膜炎を起こすことがあり、重症敗血症に至った場合の致死率は約30%に達する [1, 5, 6]。本症

は、糖尿病や肝硬変等の基礎疾患を有する易感染性の状態にある人だけでなく、健常者でも報告されている [3, 4, 7]。

一方、*C. cynodegmi* 感染では、通常は局所症状のみで、全身症状を呈することは少ないが、脾臓摘出患者では敗血症等を呈した症例も報告されている [8]。

このように、*C. canimorsus* 及び *C. cynodegmi* による感染症は重篤な転帰を辿るリスクがある動物由来感染症の一つである。したがって、主な保菌動物である犬及び猫の口腔内における両菌種の保有状況や分離株の抗生物質に対する感受性を把握することは公衆衛生上重要である。しかし、国内の犬・猫の口腔内における両菌種の保有実態については不明な点が多い。これまで本菌の検出には分離培養法が用いられてきたが [9, 10]、口腔内には多くの細菌種が存在するため、正確に本菌を分離・同定することは困難であった。そのため近年、*Capnocytophaga* 属菌の種特異的遺伝子を高感度に検出する

† 連絡責任者：富永 潔 (山口県環境保健センター保健科学部)

〒753-0821 山口市葵 2-5-67 ☎ 083-922-7630 FAX 083-922-7632

E-mail : tominaga.kiyoshi@pref.yamaguchi.lg.jp

犬・猫の *Capnocytophaga* 属菌保有状況

表1 犬・猫の *Capnocytophaga* 属菌検出状況

対象動物	検体数	増菌液中の特異的遺伝子陽性数 (%)			計	菌分離陽性数 (%)				計
		C. ca	C. cy	(C. ca+C. cy) ¹⁾		分離株数	C. ca	C. cy ²⁾	中間型	
犬	120	74 (61.7)	98 (81.7)	67 (55.8)	105 (87.5)	62	5 (4.2)	46 (38.3)	11 (9.2)	58 (48.3)
猫	80	39 (48.8)	69 (86.3)	36 (45.0)	72 (90.0)	37	3 (3.8)	33 (41.3)	1 (1.3)	37 (46.3)
計	200	113 (56.5)	167 (83.5)	103 (51.5)	177 (88.5)	99	8 (4.0)	79 (39.5)	12 (6.0)	95 (47.5)

1) C. ca と C. cy 遺伝子が同時に検出された検体

2) 犬の4検体及び猫の4検体は、増菌液中の特異的遺伝子が陰性の検体から分離

C. ca : *Capnocytophaga canimorsus* C. cy : *Capnocytophaga cynodegmi*

PCR法が開発され、その保有調査に用いられるようになった [11]。本研究では、種特異的PCR法と分離培養法を併用し、山口県内でペットとして飼育されている犬・猫における、*Capnocytophaga* 属菌の検出状況並びに分離株の薬剤感受性を検討した。

材料及び方法

供試検体：2011～2012年に、山口県内の動物病院10施設に来院した犬120頭及び猫80頭から綿棒（BD BBLカルチャースワブ プラスチャコールシングル、日本ベクトン・ディッキンソン(株)、東京）を用い、口腔内スワブを採取した。検体は検査を実施するまで3～7日間、4℃で保存した。1検体につきスワブは2本ずつ採取し、1本は遺伝子検査用、他の1本は培養用とした。また、飼育状況調査票から対象動物の性別、年齢及び飼育環境（屋内、屋外飼育）を確認した。

検体からの *Capnocytophaga* 属菌特異的遺伝子の検出：遺伝子検査用スワブを10mlのHeart Infusion broth (Becton Dickinson and Company, U.S.A., 以下HIB)に接種し、37℃で48時間、嫌気条件下で増菌培養した（アネロパック・ケンキ、三菱ガス化学(株)、東京）。培養液の1.2mlをマイクロチューブに採取後、10,000gで5分間遠心分離した。上清を捨て、沈渣に200μlのdiethylpyrocarbonate (DEPC)処理水（ナカライテスク(株)、京都）を加えて懸濁した後、市販のキット（QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen Sciences, U.S.A.）を用いてDNAを抽出した。C. canimorsus及びC. cynodegmiの16S rRNA遺伝子を標的としたPCR法により [11]、種特異的遺伝子検出を実施した。

***Capnocytophaga* 属菌の分離・同定**：菌分離用スワブを5%馬血液加Heart Infusion寒天培地（以下HHIA, 基礎培地：Heart Infusion Agar, Becton Dickinson and Company）にゲンタマイシン（ゲンタシン注10, MSD(株)、東京）を20μg/mlの割合に添加した分離用培地に直接塗抹し [9]、37℃で3～5日間、嫌気培養した。培養後、*Capnocytophaga* 属菌を疑うコロニーを釣菌し、HHIA上に塗抹後、37℃で3～5日間、5%炭酸ガス条件下（アネロパック・CO₂, 三菱ガス化学(株)、東京）で

純培養した。純培養菌株は、グラム染色性、形態、カタラーゼ及びオキシダーゼ反応を確認後、同定キット（IDテストHN-20ラピッド、日水製薬(株)、東京）を用い、解析プロファイル第2版（日水製薬(株)）により属レベルの同定を行った。さらに、分離株からDNAを抽出し、前述のPCR法により菌種を同定した。なお、本研究ではC. canimorsusとC. cynodegmi双方の遺伝子が検出された株を中間型とした。

薬剤感受性試験：*Capnocytophaga* 属菌が分離された1検体から1株、複数の菌種が分離された検体はそれぞれ1株を選択し、前述の条件によりHHIAで純培養した。この純培養株をMueller Hinton broth (Becton Dickinson and Company)にMcFarland 3の濃度になるよう浮遊後、HHIA全面に塗抹し、薬剤感受性試験ディスク（センシディスク、日本ベクトンディッキンソン(株)、福島）を用いたKirby-Bauer法を実施した。供試薬剤は、アンピシリン（ABPC）、セフトキシム（CTX）、エリスロマイシン（EM）、ミノサイクリン（MINO）及びシプロフロキサシン（CPFX）の5種類を用いた。判定は37℃で48時間、5%炭酸ガス培養後に行った。本法は培地、培養条件等が標準試験法（CLSI法）に準拠していないため、培養後、ディスク周囲に阻止円がまったく形成されなかった場合のみを耐性と判定した。

統計処理：動物種別及び菌種別陽性率について、χ²検定により有意差の有無を解析した。

成 績

犬・猫の *Capnocytophaga* 属菌検出状況（表1）：HIB増菌培養液から*Capnocytophaga* 属菌の種特異的遺伝子検出を試みた結果、C. canimorsusが犬の61.7%（74/120）及び猫の48.8%（39/80）から、C. cynodegmiが犬の81.7%（98/120）及び猫の86.3%（69/80）から検出された。なお、犬の55.8%（67/120）と猫の45.0%（36/80）からはC. canimorsusとC. cynodegmi両方の遺伝子が検出された。

分離培養法では、C. canimorsusが犬の4.2%（5/120）及び猫の3.8%（3/80）から、C. cynodegmiが犬の38.3%（46/120）及び猫の41.3%（33/80）から、中

表2 性, 年齢, 飼育環境別 *Capnocytophaga* 属菌検出状況

項目	% (陽性数/検体数)*	
	犬	猫
性		
雄	88.2 (45/51)	97.4 (37/38)
雌	92.8 (64/69)	92.9 (39/42)
年齢 (年)		
<1	87.0 (20/23)	94.4 (34/36)
1-5	92.5 (37/40)	89.5 (17/19)
6-10	93.4 (30/32)	100 (14/14)
11 ≤	87.0 (20/23)	100 (8/8)
飼育環境		
屋内	88.6 (78/88)	93.2 (55/59)
屋外	100 (16/16)	100 (6/6)
屋内外	85.7 (6/7)	100 (9/9)

*陽性数は種特異的 PCR 法と分離培養法の総陽性数

間型が犬の 9.2% (11/120) 及び猫の 1.3% (1/80) から分離された。これら中間型株について、釣菌の際に *C. canimorsus* と *C. cynodegmi* 両菌種が混在していた可能性を疑い、再度 HHIA でコロニーを単離した後に PCR を実施したが、12 株すべてが両菌種の遺伝子陽性であった。なお、増菌培養液から *C. cynodegmi* の特異的遺伝子が検出されなかったにも関わらず、本菌が分離された検体が犬・猫でそれぞれ 4 検体認められた。

種特異的 PCR 法と分離培養法により、犬の 90.8% (109/120) 及び猫の 95.0% (76/80) から *Capnocytophaga* 属菌が検出された。*C. canimorsus* は、犬の 61.7% (74/120) 及び猫の 48.8% (39/80) から検出され、検出率は犬でやや高い傾向にあった。*C. cynodegmi* は、犬の 85.0% (102/120) 及び猫の 91.3% (73/80) から検出され、犬と猫で同等の検出率であった。

犬・猫の性別, 年齢, 飼育環境別 *Capnocytophaga* 属菌保有状況: 犬・猫の *Capnocytophaga* 属菌の保有率に、性差、年齢差及び飼育環境による差は認められず、また犬・猫ともに 1 歳未満の若齢個体においても 80% 以上が陽性を示した (表 2)。

分離株の薬剤感受性: *C. canimorsus* の全株は、供試した 5 種類の薬剤すべてに感受性であったが、*C. cynodegmi* の 11 株 (13.9%) 及び中間型の 1 株 (9.1%) が供試したいずれか一つの薬剤に耐性を示した (表 3)。そのうち、*C. cynodegmi* の 9 株と中間型 1 株は ABPC に耐性であり、また犬由来 *C. cynodegmi* 2 株のうち 1 株は EM に、他の 1 株は CPFX にそれぞれ耐性を示した。CTX と MINO に対しては全株が感受性であった。

考 察

本研究の結果、山口県内でペットとして飼育されてい

表3 分離株の薬剤感受性

菌種	動物	株数	耐性株数 (%)	耐性パターン (株数)
<i>C. canimorsus</i>	犬	5	0	
	猫	3	0	
	計	8	0	
<i>C. cynodegmi</i>	犬	46	7 (15.2)	ABPC (5), EM (1), CPFX (1)
	猫	33	4 (12.1)	ABPC (4)
	計	79	11 (13.9)	
中間型	犬	11	1 (9.1)	ABPC (1)
	猫	1	0	
	計	12	1 (8.3)	

ABPC: アンピシリン EM: エリスロマイシン
CPF: シプロフロキサシン

る犬の 90.8% 及び猫の 95.0% から *Capnocytophaga* 属菌が検出された。過去の犬・猫の *Capnocytophaga* 属菌検出状況は、海外の犬で 35.6~58.1%, 猫で 24.4% [9, 10], 国内の犬で 92.3%, 猫で 86.1% と報告されている [11]。今回研究対象とした犬・猫の頭数、実施時期、採材手技、検出方法等が既報と異なっていたにも関わらず、検出率は既報のそれとほぼ同様であった。また、検出率に性差、年齢差は認められず、飼育環境との間にも関連はみられなかった。以上から、わが国の犬・猫の 9 割程度はその口腔内に本菌を保有していると考えられたが、今後全国的な調査を実施し、より詳細な情報を集積する必要があると考えられた。

今回の調査から、既報 [11] と同様に犬・猫ともに *C. canimorsus* に比べ *C. cynodegmi* の検出率が高い傾向にあった。*C. cynodegmi* による感染症は軽症のことが多いが、ごくまれに重症化する例も報告されていることから [8], *C. cynodegmi* も人の本感染症の原因菌種として軽視してはならないと思われる。また、*C. cynodegmi* の検出率は犬と猫で同程度であったが、*C. canimorsus* の値は犬の方が高い傾向にあった。Suzuki ら [11] は、国内の犬及び猫の *C. canimorsus* 検出率はそれぞれ 73.9% (240/325), 57.4% (66/115) であったと報告しており、本研究と同様の傾向が認められている。しかしながら、国内の *C. canimorsus* 感染患者における死亡例は、猫を感染源とした事例の方が多いことから [3], 猫は犬に比べ本症の感染源としてより注意すべき動物種であることを示している。

本研究では、16S rRNA 遺伝子を標的とした種特異的 PCR 法と、菌の分離培養法を併用することによって *Capnocytophaga* 属菌の検出を行った。PCR 法による本菌の検出率は犬で 87.5%, 猫で 90.0% であったのに対し、分離培養法ではそれぞれ 48.3% 及び 46.3% であっ

た。両菌の分離率が低かった原因として、口腔内には多種の菌が存在しており、有効な選択分離培地がないため、培地上の *Capnocytophaga* 属菌の検出が難しいこと、あるいは、検体採取から培養開始までの保管中（3～7日間）に当該菌の衰弱や死滅が生じた可能性が考えられる。Mally ら [9] は、犬の唾液検体を採取後 24 時間以内に培養を行った結果、*C. canimorsus* の分離率は 58.1%（61/105）であったと報告していることから、検体採取後速やかに培養を開始することが *Capnocytophaga* 属菌の分離率の向上につながると考えられた。また、今回用いた PCR 法で、*C. cynodegmi* の遺伝子が陰性であった検体から本菌が分離された例があった。本研究では 1 検体につき遺伝子検査用と分離培養用に 2 本の口腔スワブを別々に採取したが、これらのスワブ間で付着した菌の程度が異なっていたため、検出状況に差異が生じた可能性が考えられた。また、サンプル中に存在したさまざまな夾雑物質により DNA 抽出または PCR 反応が阻害された可能性も考えられた。したがって、種特異的 PCR 法と分離培養法を併用することにより、口腔スワブ等の臨床検体から本菌を確実に検出できるものと推察された。

C. canimorsus と *C. cynodegmi* は、コロニー形状や生化学的性状のみで鑑別することは困難であることから、種特異的 PCR 法による遺伝子検査が両菌種の鑑別に有用である [3, 11]。本研究では Suzuki ら [11] の PCR 法を用いた結果、分離した 99 株のうち 87 株は鑑別可能であったが、残り 12 株は PCR 法で両菌種の遺伝子が陽性を示した。このような株の存在は他でも認められており [9, 12]、古谷ら [12] はゲノム内に複数存在する 16S rRNA 遺伝子オペロンの塩基配列に多型がある可能性を示唆している。今後、他の遺伝子を対象とした詳細な解析を行い、このような株の同定を行う必要があると思われた。

増菌培養液から本菌の種特異的遺伝子の検出を試みた結果、犬の 55.8%（67/120）及び猫の 45.0%（36/80）から両菌種の遺伝子が同時に検出された。しかしながら、*C. canimorsus* と *C. cynodegmi* が同時に分離された検体は認められなかった。両菌種の遺伝子が検出された理由として、その検体中に両菌種が混在していたか、中間型が含まれていたが、分離培養時に死滅していた可能性が考えられた。

Capnocytophaga 属菌は、通常 GM 等のアミノグリコシド系抗生物質には耐性で、その他の薬剤には感受性を示すため、*Capnocytophaga* 感染症の治療には、ペニシリン系やテトラサイクリン系抗生物質の使用が推奨されている。本研究では、分離株 99 株のうち 10 株は ABPC に耐性、2 株は EM あるいは CPMX に耐性であった。本菌の中には β -ラクタマーゼ産生株も存在することか

ら [13]、今回分離された ABPC 耐性株もその可能性がある。したがって、本症の治療に際しペニシリン系抗生物質を使用する場合には、 β -ラクタマーゼ阻害剤との合剤（オージェメンチン等）を使用することが望ましい。

Capnocytophaga 感染症は、人のもっとも身近な伴侶動物である犬や猫による咬傷等により引き起こされる感染症である。本研究により、犬・猫はその口腔内に高率に本菌を保有していることが明らかとなった。今回の調査成績をふまえ、今後は飼育者等に対し、犬・猫の *Capnocytophaga* 属菌の保有実態や本症の病原性等について広く周知するとともに、動物と触れ合った後や受傷後には十分な手洗いや傷口の洗浄、消毒を確実に実行する等の感染予防対策を啓発していくことが公衆衛生上重要であると考えられる。

本研究は、2011～2012 年に実施された「山口県動物由来感染症予防体制整備事業」の一環として行われたものである。

引用文献

- [1] Gaastra W, Lipman LJA : *Capnocytophaga canimorsus*, Vet Microbiol, 140, 339-346 (2010)
- [2] Bobo RA, Newton EJ : A previously undescribed gram-negative bacillus causing septicemia and meningitis, Am J Clin Pathol, 65, 564-569 (1976)
- [3] 鈴木道雄, 今岡浩一 : カブノサイトファーガ・カニモルサス感染症, 感染症内科, 2, 177-184 (2014)
- [4] Pers C, Gahrn-Hansen B, Frederiksen W : *Capnocytophaga canimorsus* septicemia in Denmark, 1982-1995: Review of 39 cases, Clin Infect Dis, 23, 71-75 (1996), (online), (<http://cid.oxfordjournals.org/content/23/1/71.full.pdf+html>), (accessed 2014-03-10)
- [5] Macrea MM, McNamee M, Martin TJ : Acute onset of fever, chills, and lethargy in a 36-year-old woman, Chest, 133, 1505-1507 (2008), (online), (<http://journal.publications.chestnet.org/data/Journals/CHEST/22072/1505.pdf>), (accessed 2014-03-10)
- [6] van Dam AP, Jansz A : *Capnocytophaga canimorsus* infections in The Netherlands: a nationwide survey, Clin Microbiol Infect, 17, 312-315 (2011), (online), (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2010.03195.x/pdf>), (accessed 2014-03-10)
- [7] Janda JM, Graves MH, Lindquist D, Probert WS : Diagnosing *Capnocytophaga canimorsus* infections, Emerg Infect Dis, 12, 340-342 (2006), (online), (<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/2/pdfs/05-0783.pdf>), (accessed 2010-07-15)
- [8] Khawari AA, Myers JM, Ferguson Jr DA, Moorman JP : Sepsis and meningitis due to *Capnocytophaga cynodegmi* after splenectomy, Clin Infect Dis, 40, 1709-1710 (2005), (online), (<http://cid.oxfordjournals.org/content/40/11/1709.full.pdf+html>), (accessed 2014-03-10)
- [9] Mally M, Paroz C, Shin H, Meyer S, Soussoula LV, Schmieidiger U, Saillen-Paroz C, Cornelis GR : Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* in dogs and

- occurrence of potential virulence factors, *Microbes Infect*, 11, 509-514 (2009)
- [10] Westwell AJ, Kerr K, Spencer MB, Hutchinson DN : DF-2 infection, *BMJ*, 298, 116-117 (1989), (online), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1835410/pdf/bmj00214-0058d.pdf>), (accessed 2014-04-02)
- [11] Suzuki M, Kimura M, Imaoka K, Yamada A : Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in dogs and cats determined by using a newly established species-specific PCR, *Vet Microbiol*, 144, 172-176 (2010)
- [12] 古谷明子, 吉田里美, 久保 綾, 山下麻衣子, 伊藤達章, 鈴木道雄, 今岡浩一, 大楠清文 : 自動血液培養で陽性シグナルを呈しなかった *Capnocytophaga canimorsus* による敗血症の一症例. *日本臨床微生物学雑誌*, 20, 182-187 (2010)
- [13] 中山麻美, 濱岸真奈美, 新谷知世, 早川 敏, 石井潤一, 都築基弘, 大楠清文 : *Capnocytophaga* 属菌による敗血症の2例, *医学検査*, 59, 1171-1175 (2010)

Investigation of the Prevalence of *Capnocytophaga* spp. in Dogs and Cats Raised in Yamaguchi Prefecture Using Species-Specific PCR and Culture Methods

Mitsuhiro KAMEYAMA¹⁾, Kiyoshi TOMINAGA^{1)†}, Junko YABATA¹⁾, Yasuharu NOMURA¹⁾, Michio SUZUKI²⁾ and Koichi IMAOKA²⁾

1) *Department of Health Science, Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment, 2-5-67 Aoi, Yamaguchi, 753-0821, Japan*

2) *Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, 162-8640, Japan*

SUMMARY

The prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* and *C. cynodegmi* in the oral cavities of 120 dogs and 80 cats was investigated using species-specific PCR and culture methods between 2011 and 2012. The PCR detected the *C. canimorsus* gene in 62% of the dogs and 49% of the cats, whereas the *C. cynodegmi* gene was detected in 82% of the dogs and 86% of the cats. *C. canimorsus* was isolated from 4% of the dogs and 4% of the cats, whereas *C. cynodegmi* was isolated from 38% of the dogs and 41% of the cats. *Capnocytophaga* spp. from oral swab samples was correctly identified using both the species-specific PCR and culture methods; however, *C. cynodegmi* was not detected by only the species-specific PCR in some samples. The antimicrobial susceptibility profiles of the isolates to five drugs were examined, with 10 strains showing resistance to ampicillin, one strain showing resistance to erythromycin and one strain showing resistance to ciprofloxacin. Accordingly, penicillin-based antibiotics with a β -lactamase inhibitor are recommended for antimicrobial treatment for *Capnocytophaga* infections. — Key words : cat, *Capnocytophaga canimorsus*, *Capnocytophaga cynodegmi*, dog, species-specific PCR.

† *Correspondence to : Kiyoshi TOMINAGA (Department of Health Science, Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment)*

2-5-67 Aoi, Yamaguchi, 753-0821, Japan

TEL 083-922-7630 FAX 083-922-7632 E-mail : tominaga.kiyoshi@pref.yamaguchi.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 67, 929~933 (2014)