

27. 大阪市内の愛玩動物における カプノサイトファーガ・カニモルサス保菌状況調査

○梅田 薫（大阪市立環境科学研究所 微生物保健担当）

阿部拓人（大阪市動物管理センター）

畠山理沙（大阪市動物管理センター）

1. 背景・目的

近年の愛玩動物飼育頭数の増加に伴って、イヌやネコを感染源とする動物由来感染症はより身近な問題となっている(1)。カプノサイトファーガ・カニモルサスは、イヌ・ネコの口腔内常在菌であり、咬傷、搔傷を通してヒトに感染する(2, 3)。免疫機能の低下した患者においては急速に全身症状が悪化して、発熱、敗血症、DICなどの重篤な症状を呈することがあり、致死率は30%にもなる。初めて文献的に報告されてからまだ30年ほどの稀少な（世界で250症例程度）感染症であるが国内ではこれまでに30症例（内8症例は死亡例）が報告され(3)、新興の動物由来感染症として注目されている。一方で、本菌の生態学的な特性や、ヒトへの病原性については未解明な部分も多い。本研究では、本菌の動物およびヒト感染症のリスクを評価するため、イヌ・ネコにおける詳細な分布状況および、分離菌の遺伝学的・生物学的特性について調査した。

2. 材料・方法

(1) 調査材料

大阪市動物管理センターに収容されたイヌ109頭、ネコ104頭の歯周スワブを調査材料とした。検体採取は殺処分直後あるいは避妊去勢手術時の麻酔下において実施した。調査個体情報として、性別、概年齢、所有者の有無、栄養状態を記録した。

(2) カプノサイトファーガ・カニモルサス検査分離菌の解析

菌遺伝子検出は、歯周スワブをハートインフュージョン培地（BD Difco）に懸濁後、37℃、5% CO₂存在下で24時間培養し、培養液1mlから熱抽出でテンプレートを作製後、16SrRNAをターゲットにしたカプノサイトファーガ・カニモルサス検出PCR（4）を行い、427bpの増幅産物が確認された場合を菌陽性とした。

(3) 分離菌の解析

菌分離は、歯周スワブを5%ウマ血液加ハートインフュージョン寒天培地に塗抹後、37℃、5% CO₂存在下で2~4日間培養し、白色、半透明で滑走環を有するコロニーを血液寒天培地に釣菌した。37℃、5%CO₂存在下で2~4日間培養後、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性のコロニーについて、前述のPCR法を実施し、分離同定した32株について、以下の解析を実施した。

分離菌のDNAを抽出して16SrRNA塩基配列（約1,160bp）を決定した。GenBankデータベースに登録されている国内外分離株の配列とともに、NJ法を用いた分子系統解析を行った。

制限酵素 *Sma* I を用いた Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) 遺伝子型別の系を構築・型別し、UPGMA 法によりデンドログラムを作成した。菌種同定キット Nissui ID テスト・HN20 ラピッド (Nissui) を用いて各種生化学性状を確認した。

3. 結果

(1) カブノサイトファーガ・カニモルサス保有状況

イヌ 109 頭、ネコ 104 頭の歯周スワブについて、カブノサイトファーガ・カニモルサスの遺伝子検出を行った結果、イヌ 76 頭 (69.7 %)、ネコ 57 頭 (54.8 %) から本菌の遺伝子を検出した (Table 1)。また、個体情報 (性別、概年齢、所有者、栄養状態) 別の検出率についてロジスティック回帰分析による有意差検定を行った結果、イヌではオスがメスよりも有意に保有率が高かった。ネコでは成ネコが他の年齢層よりも有意に保有率が高かった。その他の個体情報では有意な差は検出されなかった (Table 1)。

(2) 分離菌の 16SrRNA 塩基配列系統解析

イヌ分離株 17 株、ネコ分離株 15 株の 16SrRNA 塩基配列を、データベースに登録されている国内外 (アメリカ、スイス、オランダ) のイヌおよびヒト患者分離株の配列と共に系統解析した (Figure 1)。その結果、本菌は 2 つの Group (I および II) に大別された。Group I にはイヌ分離株 8 株および国内外のイヌ分離株が属し、Group II にはイヌ・ネコ分離株 24 株および国外のイヌ分離株が属していた。ヒト患者分離株はすべて Group I に属していた。

(3) PFGE 型別

制限酵素 *Sma* I を用いた PFGE 像およびデンドログラムを示す (Figure 2)。26 株は多様なバンドパターンを示した。デンドログラムでは一部の例外を除いて Group I に属する株と Group II に属する株とは、別クラスターに分類された。Group II が属するクラスターにおいて、イヌ分離株とネコ分離株とは系統的な差異は認められなかった。

(4) 生化学性状比較

分離株 32 株および標準株 ATCC35979 株の生化学性状一覧を示す (Table 2)。基本性状および Nissui ID テスト・HN20 ラピッドでの主要な糖分解パターン、酵素の有無は共通していた。6 つの性状で多様性が認められ、Group I と Group II に属する株とで顕著に異なる性状は γ -glutamyl aminopeptidase (アミノペプチダーゼ A) 活性の有無であった。

4. 考察・まとめ

(1) 調査対象とした大阪市内のイヌ 69.7%・ネコ 54.8%が *C. canimorsus* を保有していた。既報の国内他地域での調査結果 (イヌ 74%、ネコ 57%) (4) とほぼ同等であったことから、国内のイヌ・ネコ保菌率には地域差は見られないと考えられる。

(2) 個体情報による保有率の差異が認められた。ネコよりもイヌの保菌率が高く、イヌとネコでは個体情報と保有率の関連性に共通項が認められなかったことから、本菌の分布様式は両宿主で異なると考えられた。

(3) イヌ・ネコ分離株にデータベースに登録されている 16SrRNA 塩基配列を加えた系統解析から、*C. canimorsus* は 2 つの Group (I, II) に大別されることが分かった。Group I にはイヌ分離株 8 株および、国内外のイヌ分離株が属し、Group II にはイヌ・ネコ分離株 24 株および、国外のイヌ分離株が属していた。ヒト患者分離株が Group I に偏在することから、本菌には、ヒトに病原性を発揮する系統群とそうでない系統群が存在する可能性が示唆された。

(4) *C. canimorsus* の分子型別法として *Sma* I を用いた PFGE の系を構築した。PFGE バンドパターンおよびデンドログラムから、Group I と Group II の遺伝的な分離および、分離菌株が多様な遺伝学的背景を有することが明らかになった。

(5) 生化学的性状の比較から、Group I と Group II に属する株とでは、 γ -glutamyl aminopeptidase 活性の有無が異なることが分かった。これが単なるマーカーであるのか病原性に影響するのかは今後の検討課題である。

5. 参考文献

(1) 動物由来感染症ハンドブック 2011. 厚生労働省健康局結核感染症課.(2) カプノサイトファーガ・カニモルサス感染症に関する Q&A. 厚生労働省 HP (3) 鈴木道雄. イヌ・ネコ咬傷・搔傷と *Capnocytophaga canimorsus* 感染症. モダンメディア 56: 71-77, 2010. (4) Suzuki M., Kimura M., Imaoka K., and 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.

6. 謝辞 本研究の機会を与えていただきました大同生命厚生事業団に深謝いたします。

7. 経費使途明細

ミニ遠心機 (佐久間製作所 MCF-1350)	105,000 円
菌分離用培地 (血液寒天・チョコレート寒天)	36,000 円
培地用、同定用試薬 (抗生物質、脱繊維血等、グラム染色キット)	31,000 円
DNA 精製キット (Qiagen)	54,000 円
PCR 試薬類 (Takara, Qiagen)	72,000 円
通信費・文具類・消耗品	2,000 円
合計	300,000 円

動物種	検体数/ 個体数 (%)	個体情報別 検体数/個体数(%)									
		性別		概年齢 ¹⁾			栄養状態			所有者	
		オス	メス	若	成	老	削瘦	普通	肥満	有	不明
イヌ	76/109 (69.7)	48/68 (70.6)	28/41 (68.3)	—	35/47 (74.5)	14/62 (66.1)	6/11 (54.5)	64/89 (71.9)	6/9 (66.7)	49/72 (68.1)	22/37 (73.0)
ネコ	57/104 (54.8)	19/35 (54.3)	38/69 (55.1)	4/14 (28.6)	46/68 (67.6)	7/22 (31.8)	8/13 (61.5)	43/74 (58.1)	6/17 (35.3)	27/54 (50.0)	30/50 (60.0)

1) 若:3ヶ月齢未満、成:3ヶ月齢~10歳、老:10歳以上
P:ベイズ推定に基づくP値 □:保有率が有意に高い群

Table 1. イヌ・ネコにおけるカプノサイトファーガ・カニモルサス保有状況.

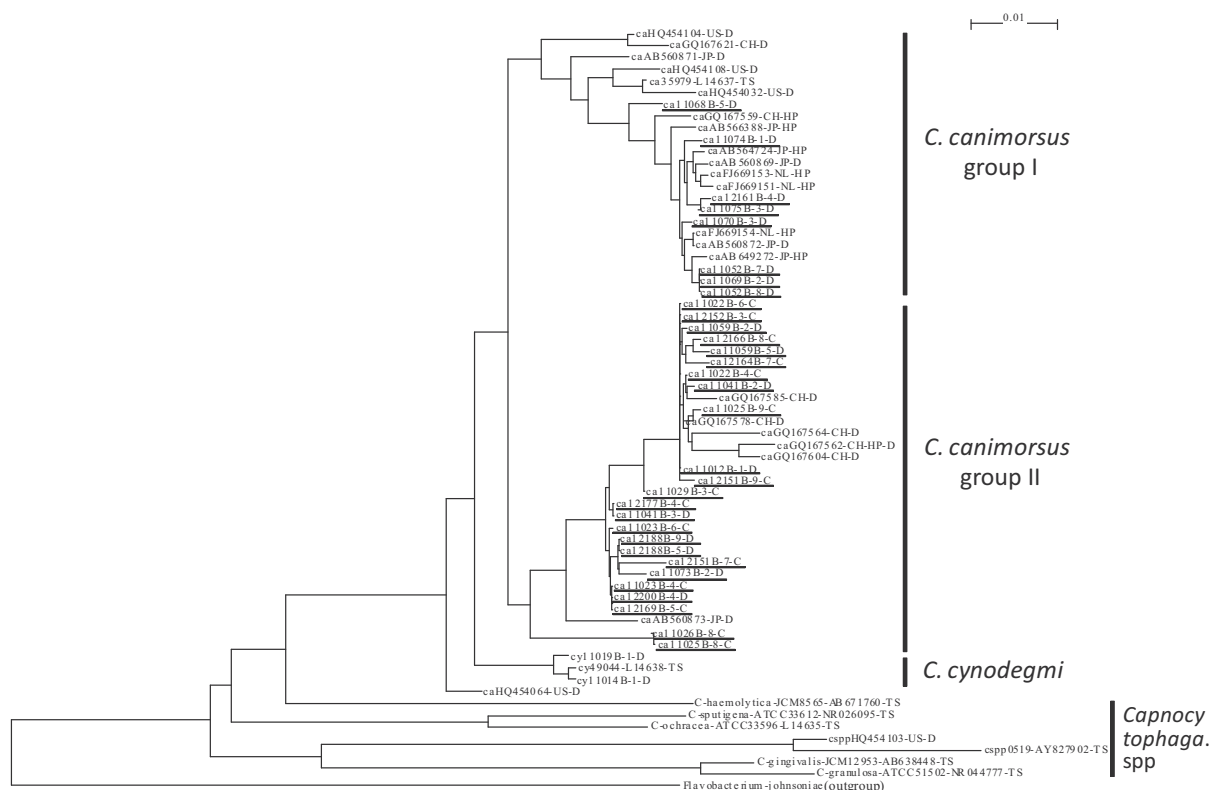


Figure 1. カプノサイトファーガ・カニモルサス 16SrRNA 塩基配列系統解析.

イヌ・ネコ分離株 32 株の配列を、データベースに登録されている国内(JP), 国外(US, NL, CH)の、ヒト患者分離株(HP)、イヌ(D)、ネコ(C)分離株、標準株(TS)、他のカプノサイトファーガ属菌の配列と共に clustal X software(NJ 法)を用いて系統解析を行った。

Figure 2. 分離株の制限酵素 *Sma* I を用いた PFGE 像 (A) およびバンドパターンから作成したデンドログラム (B). TS: ATCC35979 株. (B)の点線はクラスターの分離を示す。

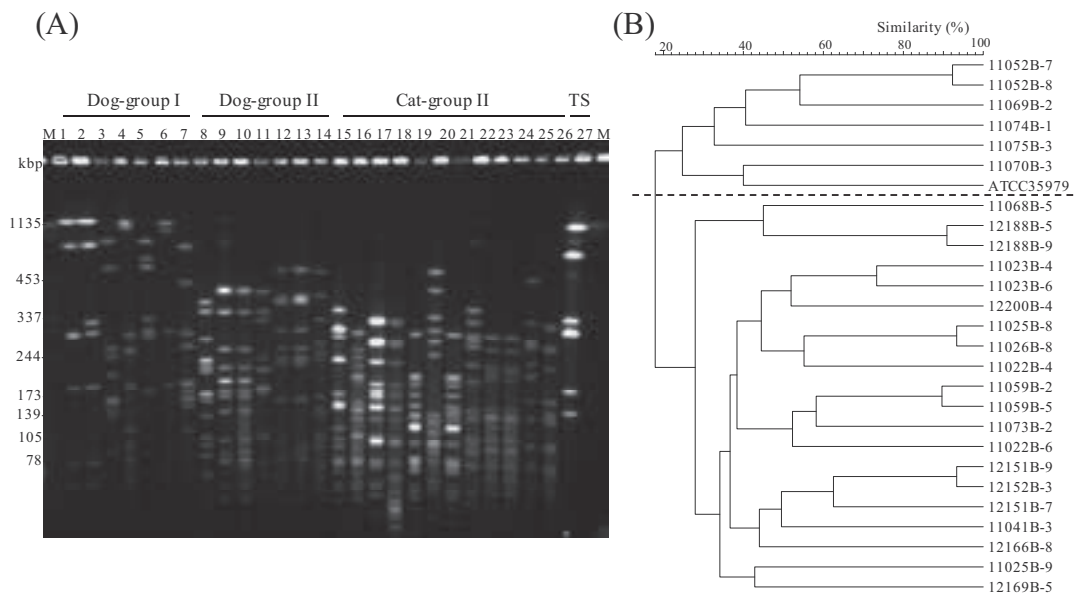


Table 2. 分離株 (Group I, II) および標準株 (ATCC35979) の生化学的性状比較. Group I と II とで顕著に異なる性状を下線で示す。

共通した性状		多様性が認められた性状						
		分離株 32 株		Group I (8株)		Group II (24株)		TS
基本性状								
血寒上発育: 湿潤、滑走環	+							
LB培地発育	-							
Gram陰性、糸状桿菌	+							
Catalase	+							
Oxidase	+							
Nissui HN-20 ラピッド								
Alanine aminopeptidase	+							
Phosphatase	+							
Nitrate reductase	-							
Urease	-							
Ornithine	-							
Indole	-							
Glucosidase	+							
Glucose	+							
Maltose	+							
Mannose	+							
Mannitol	-							
Trehalose	-							
Lactose	+							
β -galactosidase	-							
β -lactamase	-							
		Nissui HN-20 ラピッド						
		Proline aminopeptidase	3 29	2 6	1 23			+
		<u>?-glutamyl aminopeptidase</u>	22 10	0 8	22 2			-
		Fructose	13 19	2 6	11 13			-
		Sucrose	3 29	0 8	3 21			-
		Xylose	2 30	1 7	1 23			-
		Nitrite reductase	24 8	6 2	18 6			+