

- Mosli, G.L., Landron, C., Grollier, C., Robert, R., Burucosa, C., 2003. Meningitis due to *Coprocoryphaga animimorsus* after receipt of a dog bite: case report and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 36, e42–46.
- Ota, K., Kazawa, T., Tsubota, A., Suzuki, C., Inaoka, M.K., 2009. An autopsy case involving severe sepsis due to *Coprocoryphaga animimorsus* infection. *Seichishinshokki Zasshi*, 83, 661–664 (in Japanese with English abstract).
- Sarraf, P.S., Mohanty, S., 2001. *Coprocoryphaga cynodermi* cellulitis, bacteremia, and pneumonitis in a diabetic man. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2028–2029.
- Takahashi, H., Deguchi, Y., Abe, M., Yamada, S., Akizuki, N., Kobayashi, T., Nakagawa, T., 2009. A case who survived *Coprocoryphaga animimorsus* sepsis with multiple organ failure. *Nihon Kyuukyoku Igakkai Zasshi*, 20, 228–231 (in Japanese with English abstract).
- van Dam, A.P., van Weert, A., Harmanus, C., Hovius, K.E., Glas, E.C.J., Neubaert, P.A.G., 2009. Molecular characterization of *Coprocoryphaga animimorsus* and other rare human *Coprocoryphaga* spp. and assessment of their genetic relatedness by rFLP-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1213–1217.
- Westwell, A.J., Kay, K., Speer, M.B., Hutchinson, D.N., 1989. DF-2 infection. *BMJ* 298, 116–117.

[症 例]

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

古谷明子¹⁾、吉田里美¹⁾、久保 隼¹⁾、山下麻衣子¹⁾
伊藤達章¹⁾、鈴木道雄²⁾、今岡浩一²⁾、大楠清文³⁾
¹⁾佐世保共済病院中央臨床検査科
²⁾国立感染症研究所獣医学部
³⁾岐阜大学大学院医学系研究科病原微生物学分野

(平成22年2月1日受付、平成22年4月30日受理)

Capnocytophaga canimorsus はイヌやネコの口腔内常在菌であるが、まれに咬傷による敗血症が報告されている。筆者らは、イヌ咬傷により敗血症性ショックに陥った症例を経験した。症例は44歳男性。既往歴は慢性腎臓病、尿路結石である。2008年11月3日、胸いゝに右示指を咬まれ、右示指末節開放骨折を認めたため手術目的で入院となったが経過は順調であった。11月6日に激しい頭痛があり、翌日には食思不振、下痢、呼吸苦、顔面に皮疹、手指に水泡、足底にチアノーゼが出現した。11月8日に静脈血液培養2セットを開始したが、培養3日を経過しても陽性反応がなかった。そこで、直接ポトル内の血液を抜き取りグラム染色を行った結果、ポトル4本中2本で糸状のグラム陰性桿菌を確認した。患者背景より *C. canimorsus* を疑い、血液培養液から直接16S rRNA 遺伝子配列の解析を行い *C. canimorsus* を確認した。後日分離された患者由来菌株および胸いゝの口腔内ぬぐい液検体の16S rRNA 遺伝子配列を決定した結果、いずれも *C. canimorsus* と同定された。

Key words: *Capnocytophaga canimorsus*, 犬咬傷, 血液培養, グラム染色, PCR

序 文

Capnocytophaga 属菌はヒトおよび動物の口腔内に存在する紡錘状のグラム陰性桿菌である。通性嫌気性菌であり、炭酸ガスおよび嫌気培養で発育する。本属には7属種が含まれるが、イヌ、ネコの口腔内常在菌である *Capnocytophaga canimorsus* は、オキシダーゼ陽性、カタラーゼ陽性を示し、ヒト由来の *Capnocytophaga* とは区別される。*C. canimorsus* は、イヌ、ネコ咬傷後または敗血症、髄膜炎などを引き起こし、世界中では200例ほどが報告されており、高齢者、易感染者に重症例が多いとされ、致死率は30%とされ

著者連絡先: (〒857-8575) 長崎県佐世保市島地町10-17
佐世保共済病院
古谷明子
TEL: 0956-22-5136
FAX: 0956-22-6082
E-mail: kensa@kkr.sasebo.nagasaki.jp



図1. A: 右示指咬傷部所見, B: 右示指咬傷部 X 線画像

表1. 入院時(受傷時), 11月8日(受傷5日目) 検査所見

	入院時	11月8日	入院時	11月8日
Blood chemistry			Peripheral blood	
TP (g/dl)	7.2	5.1	WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	896
T-bil (mg/dl)	0.39	4.45	Neut (%)	79.4
D-bil (mg/dl)		3.4	Lymph (%)	46.8
AST (IU/L)	23	373	Mono (%)	0.5
ALT (IU/L)	28	144	Eo (%)	3.8
LDH (IU/L)	179	958	Baso (%)	0.4
ALP (IU/L)	187	323	RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	493.0
γ -GTP (IU/L)	83	212	Hb (g/dl)	13.0
CPK (IU/L)	73	134	Hct (%)	46.2
BUN (mg/dl)	10.5	27.8	Plt ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	34.8
Cre (mg/dl)	0.85	3.98	Coagulation test	
Na (mEq/L)	143.0	139.5	PT (INR)	0.82
K (mEq/L)	3.93	3.67	APTT (sec)	25.1
Cl (mEq/L)	103.9	101.1	Fbg (mg/dl)	71.8
CRP (mg/dl)	0.04	22.26	ATIII (%)	59.6

特に問題なく経過していたが、11月6日夜間激しい頭痛、38.6℃の発熱。頸部硬直はなくCT所見も異常はなかった。翌日頭痛著変なく、食慾不振、夕方より下痢の症状が出現し、その後呼吸苦、四肢のしびれ感が出現し、深夜顔面に皮疹を認めた。11月8日血液検査結果(表2)より播種性血管内凝固症候群(DIC)と診断され、人口呼吸器管理となりDIC加療と抗感染薬は meropenem (MEPM) と clindamycin (CLDM) に変更し投与された。また、右上肢に水泡、足趾末端血行障害と思われるチアノーゼが出現してきた。受傷指は、色調不良で、皮下の治療傾向も乏しく、感染源の可能性も考えられることから、末節骨を第一関節から切断し、切斷術を行い、洗浄後閉鎖した。抗感染薬は、翌日より piperacillin (PIPIC)、さらに11月11日より minocycline (MINO) を追加した。一時状態が増

悪したが、以後は改善傾向となり16日人工呼吸器より離脱となった。

細菌学的検査所見

1. 培養検査

11月8日深夜、静脈血培養2セット採取。好気ポトルは BACTEC PLUS Aerobic/F を、嫌気ポトルは BACTEC PLUS Anaerobic/F を使用し自動血液培養装置 BACTEC9050 にて実施した。培養開始3日目、陽性シグナルは見られなかったが、患者情報を詳しく確認したところ、イヌ咬傷後の敗血症が疑われる症例であることが判明した。そこで、血液培養ポトル4本すべての血液を一部抜き取り、グラム染色を行ったところ、好気ポトル2本について、糸状のグラム陰性桿菌をごく少数認めた(図2)。さらに、11月7日に採血

表2. 臨床経過表

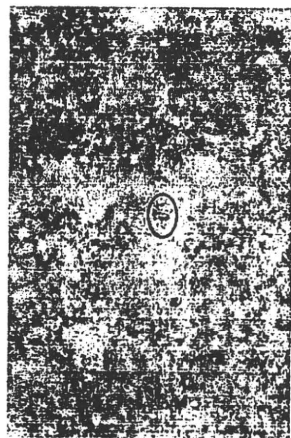
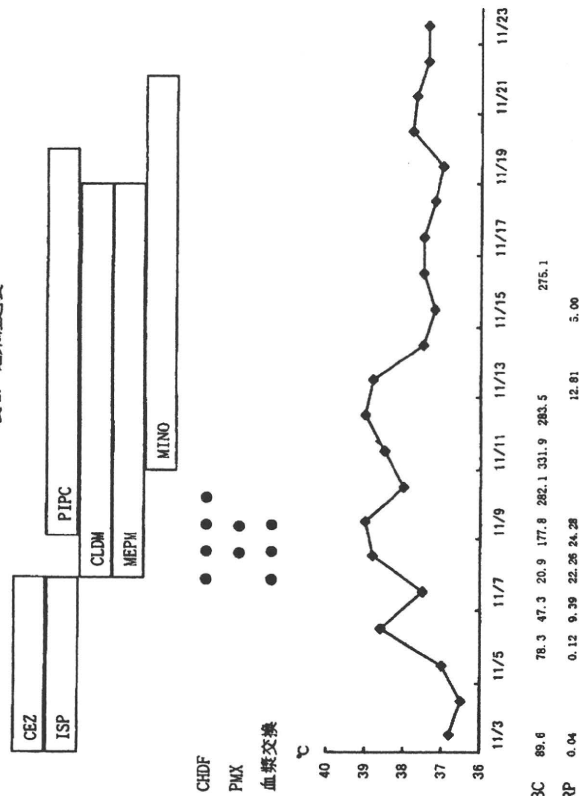


図2. 血液培養ポトル内血液グラム染色像 (×1,000)

されていた血球測定用のEDTA入り血液スミアを調べたところ、グラム染色にて糸状のグラム陰性桿菌がごく少数確認された。血液培養のサブカルチャーは、30℃・5%CO₂培養、BTB乳糖加寒天(栄研)、ブルセラHK半流動培地を35℃・好気培養、ブルセラHK寒天(極東)を嫌気培養した。サブカルチャー4日目にチヨコロト寒天(栄研)、5%ヒツジ血液寒天(栄研)、ブルセラHK寒天(極東)培地上に微小のコ

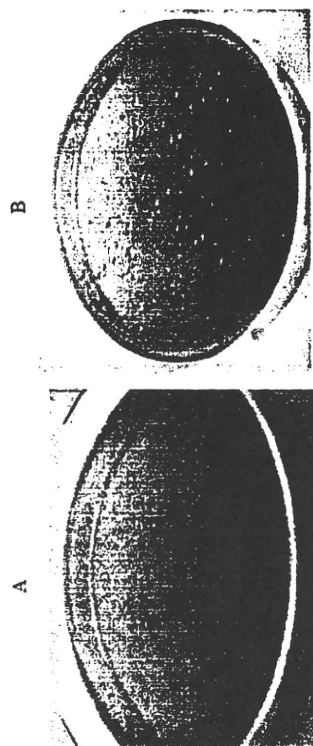


図3. コロニーの性状 A: 嫌気培養6日間 B: さらに5%炭酸ガス培養1日間

表3. 薬剤感受性成績

分類	一般名	略号	感受性
ペニシリン系	Amoxicillin	AMPC	S
	Ampicillin	ABPC	S
	Clavulanic/Amoxicillin	AMPC/CVA	S
	Piperacillin	PIPC	S
	Benzylpenicillin	PCG	S
セフェム系	Cefazolin	CEZ	I
	Cefotaxime	CTX	S
	Ceftriaxone	CTRX	I
	Latamoxef	LMOX	I
カルバペネム系	Imipenem/Cilastatin	IPM/CS	S
	Meropenem	MEPM	S
アミノグリコシド系	Gentamicin	GM	R
	Streptomycin	SM	R
マクロライド系	Azithromycin	AZM	S
	Erythromycin	EM	S
テトラサイクリン系	Tetracycline	TC	S
	Doxycycline	DOXY	S
	Minocycline	MINO	S
キノロン系	Neidixic acid	NA	S
	Ofloxacin	OFLX	S
	Ciprofloxacin	CPFX	S
リンコマイシン系	Clindamycin	CLDM	S
クロラムフェニコール系	Chloramphenicol	CP	S
ポリペプチド系	Polymyxin-B	PL-B	R
抗結核薬	Rifampicin	RFP	S
ST合剤	Sulfamethoxazole/Trimethoprim	ST	S

S: susceptible I: intermediate R: resistant

り¹⁾、今回の症例もそうであった。本邦における報告例はまれであるが、*C. canimorsus* 感染症に対する認知度の低さや菌の増殖が遅いことによる同定の困難さなどがあり、見逃されている可能性も否定できない。医療従事者のイス・ネコ咬傷感染症への認識を深める必要があると思われる。また、欧米に比べ血液培養の頻度が高まるかに少ないことも報告数が少ない要因と考えられる²⁾。

イス、ネコ咬傷から感染症を起こす起病菌として、黄色ブドウ球菌、連鎖球菌、*Pasteurella*、種々の嫌気性菌が知られている。なかでも *Pasteurella multocida* は、*C. canimorsus* 同様グラム陰性桿菌であるが、糸状の形態の *C. canimorsus* に対して、*Haemophilus influenzae* 様の短桿菌を呈している。また *P. multocida* は、受傷後 24 時間以内に激しい局所の腫脹が現れる³⁾ のに対し、*C. canimorsus* は潜伏期が 2~14 日と長く、局所症状よりも全身症状が現れることが多い、などの違いからの鑑別も可能である⁴⁾。

今回の症例では、受傷後 3 日目に頭痛などの症状が開始しているがその時点で血液培養は施行されていない。DIC 状態となったため、血液ポトル 2 セット採取されたが、自動血液培養は陽転することなく経過していた。患者の詳しい情報を得たのが培養 3 日目であり、その時点で血液培養ポトル内の血液を直接抜き取り、グラム染色を行い、菌を確認するに至った。イヌ咬傷など特徴的な患者背景があり、明らかに敗血症が疑われる症例において、臨床とのコミュニケーションを密に取ることが、原因菌の検索に重要であると認識した。

Capnocytophaga 属菌は多くの抗菌薬に感受性を示すため、今回のように培養施行前に抗菌薬の投与がなされた場合、薬剤により強くダメージを受けている検出率が低下する可能性もある⁵⁾。当院では、血液培養期間を 7 日間に設定しているが、血液中の菌量が非常に少なかったことから菌が十分に増殖せず、自動機器が陽性と感知できなかった可能性も考えられる。菌の増殖能などから、血液培養期間の延長も考慮することが必要であると思われる。今回、血液培養が陽性シグナルを呈さない時点で、直接血液スメアをグラム染色することが迅速診断につながった。さらに、血液培養液から直接遺伝子解析することで迅速な治療方針の決定が可能であった。これらの方法は適切な治療方針を決定するうえでたいへん有用であった。

結語

今回筆者らは、自動血液培養で陽性シグナルを呈さ

内血液より後日分離された 3 株について、DNA を抽出し PCR 検査を行った。

C. canimorsus および *Capnocytophaga cynodegmi* の 16S rRNA 遺伝子に対する特異的プライマーを用いた検査では、3 株ともその双方に陽性を示した。16S rRNA 遺伝子シーケンスを解析の結果、本分離株ではゲノム内に複数存在すると示唆される 16S rRNA 遺伝子オペロンの塩基配列に多型が認められ、そのため用いた双方のプライマーに陽性反応を示したものと考えられた。しかしながら *C. canimorsus* に特異的な *gyrB* 遺伝子の PCR 検査で陽性を示したことから、本分離株は *C. canimorsus* と考えられた。また、咬傷の原因となった飼育犬の口腔内ぬぐい液については、分離株が得られなかったため詳細な解析はできなかったが、培養液から抽出した DNA を用いた PCR 検査では *C. canimorsus* および *C. cynodegmi* 双方に陽性を示した。このことから、咬傷原因となった飼育犬が口腔内に *C. canimorsus* を保有していることが示唆された。

また、これらの菌株は、いずれもオキシダーゼ陽性、カタラーゼ陽性であり、同定キット ID Test HN-20 (日本製薬) においても *C. canimorsus* (プロファイル No. 3010001)、同定確率 100%) と同定された。

3. 薬剤感受性試験 (表 3)

5% ヴァナジウムペプターゼ加ハートインフュージョン寒天を使用し、センシティブ法 (日本ベクトン・ディッキンソン社) で行った。35℃・5% CO₂ 条件下で 48 時間培養後、阻止円を計測し、センシティブの感受性判定表の数値および対照菌株 *Staphylococcus aureus* および *Escherichia coli* の同条件での結果を参考に阻止円の十分大きいものを感性 (S) とし、全く阻止円のないものを耐性 (R) とし、その中間を (I) と判定した。ペニシリン系、テトラサイクリン系薬剤には感性を示したが、セフェム系では中間、アミノグリコシド系には耐性であった。今回、DIC 後に使用された薬剤に対しては、すべて感性であった。

考 察

C. canimorsus はイス、ネコの口腔内常在菌であり、イス、ネコの咬傷や密な接触により感染し、まれに易感染者に対して敗血症、腎不全、髄膜炎や DIC を起こして死に至る例もあると報告されている。敗血症を発生したときの死亡率は 30% と報告されており、進行が速く非常に危険な感染症である¹⁾。そのため敗血症に対する迅速な救命医療を行う必要がある。また、高齢者や易感染状態にない健康人の重症例の報告もあ

ない換体から直接グラム染色を行うことにより *C. canimorsus* 同定につながった症例を経験した。

文 献

- 1) Janda, J. M., et al. 2006. Diagnosing *Capnocytophaga canimorsus* infections. *Emerg. Inf. Dis.* 12: 340-342.
- 2) Gaasta, et al. 2009. *Capnocytophaga canimorsus*. *Vet. Microbiol.* doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.040
- 3) 今岡浩一. 2009. 犬、猫由来細菌感染症. 獣医疫学雑誌 13(1): 65-70.
- 4) 新他一美, 他. 2005. *Capnocytophaga canimorsus* による菌血症の 1 症例. 日本臨床微生物学会

- 5) 誌 15: 9-14. 高橋存樹, 他. 2009. *Capnocytophaga canimorsus* による敗血症・多臓器不全の 1 報告例. 日救急医学誌 20: 226-231.
- 6) 竹川啓史, 他. 2008. *Capnocytophaga canimorsus* による敗血症 4 例の検討. 日本臨床微生物学会誌 18: 148.
- 7) 太田求雄, 他. 2009. *Capnocytophaga canimorsus* による敗血症の 1 例報告. 感染症学雑誌 83: 661-664.
- 8) 今岡浩一. 2007. 意外と知らない感染症. チャイルドヘルス 10(11): 768-771.
- 9) 小林郁夫. 2006. 全自動血液培養検査装置 BD バクテック TM 9000 シリーズの特長と測定原理. 臨床と微生物 33: 61-65.

Positive Gram's Stain of Blood Culture without Positive Signals on BACTEC9050

Akiko Furutani,¹⁾ Satomi Yoshida,¹⁾ Aya Kubo,¹⁾ Maiko Yamashita,¹⁾ Tatsuaki Itoh,¹⁾ Michio Suzuki,²⁾ Koichi Imaoka,²⁾ Kiyofumi Ohkusu³⁾

¹⁾ Department of Clinical Laboratory, Sasebo Kyosai Hospital
²⁾ Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases
³⁾ Department of Microbiology, Gifu University Graduate School Medicine

Capnocytophaga canimorsus is capnophilic, slow-growing, filamentous, facultative aerobic, Gram-negative bacteria and is found in the oral cavity of dogs and cats. *C. canimorsus* sometimes causes septicemia, endocarditis and meningitis in people after dog or cat bite and fatality rate due to septicemia is estimated up to 30%. We encountered the case of septicemia due to *C. canimorsus* infection by a pet dog bite. After 3 days blood culture, any positive signals were not observed on BACTEC9050, however we performed Gram's stain and PCR of blood samples from culture bottles and obtained positive staining and specific amplification of 16S rRNA gene of *C. canimorsus*. Thereafter, isolated bacterial strains from subcultures of blood culture and wound tissues were also determined as *C. canimorsus* by PCR, genome sequencing analysis and biochemical test. This study suggests that early detection of bacteria by Gram's stain and PCR of the blood culture is helpful for the determination of primary causative organism and treatment of septic patient, even if positive signal is not observed on automated blood culture microbial detection system.

Capnocytophaga canimorsus 感染症

鈴木道雄 木村昌伸 今岡浩一 山田章雄

要約

Capnocytophaga canimorsus 感染症は犬・猫咬傷・掻傷に伴う感染症の1つである。発症は稀であるが、発症すると急激に敗血症に至る場合が多く、死亡率は約30%とされる。国内の犬・猫のC. canimorsus 保有状況は不明であったが、我々の調査では犬の74%、猫の57%が同菌を保有していた。C. canimorsus 感染が疑われる際にはオーグメンチン、メロベネムなどの抗生物質の使用が推奨される。

目的

Capnocytophaga 属菌は人や犬・猫の口腔内に常在するグラム陰性桿菌であり、犬・猫はC. canimorsus とC. cynodegmi の2種を保有している。いずれも犬・猫による咬傷・掻傷に伴う感染症の原因菌となるが、重篤例、死亡例の大半はC. canimorsus 感染による。感染しても発症することは稀であるが、発症すると症状が急激に悪化し敗血症に至る場合が多く、死亡率は約30%とされる¹⁾。

国内での発生状況についてはほとんど情報がなかったが、近年、症例報告等を通じて国内症例についての知見も徐々に集まりつつある²⁻⁵⁾。海外では犬・猫のC. canimorsus 保有率は24~60%とする報告があるが⁶⁾、国内での状況は不明のため、今回我々は特異的PCR法を開発して犬・猫のCapnocytophaga 属菌の保有状況を調査した。また、人の症例に関して情報をまとめるとともに、

Michio SUZUKI (写真・コメント), Masanobu KIMURA, Koichi IMAOKA & Akio YAMADA
国立感染症研究所獣医学部
〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

6年前に感染症に罹患し、犬・猫咬傷感染の原因菌の1つであるCapnocytophaga 属菌についての研究を始めました。一般の知名度も低く、専門的な情報も少なく、手探り状態でのスタートでしたが、その実感が少しずつ明らかになってきました。



臨床分離株等の薬剤感受性を検討した。

材料と方法

犬325頭、猫115頭の口腔内スワブについて、我々が開発したC. canimorsus とC. cynodegmi の16S rRNA遺伝子に対する特異的PCR法を用いて検査を行った。また、国内のC. canimorsus 感染症例の情報を収集するとともに各機関から患者分離株8株の分与を受け、これと犬・猫からの分離株11株およびATCC標準株1株を合わせて計20株の薬剤感受性をディスク拡散法によって検討した。

結果

犬の92%、猫の86%がCapnocytophaga 属菌を保有しており、そのうちC. canimorsus の保有率は犬で74%、猫で57%であった(表1)⁶⁾。国内での症例は11例(うち死亡5例)を把握し、うち8症例から患者分離株の分

表1-2 犬・猫のCapnocytophaga 属菌保有率

種	検体数	保有率(%)
犬		
C. canimorsus	240	74
C. cynodegmi	279	86
C. canimorsus のみ	21	6
C. cynodegmi のみ	60	18
C. canimorsus and C. cynodegmi	219	67
C. canimorsus and/or C. cynodegmi	300	92
合計	325	
猫		
C. canimorsus	66	57
C. cynodegmi	97	84
C. canimorsus のみ	2	2
C. cynodegmi のみ	33	29
C. canimorsus and C. cynodegmi	64	56
C. canimorsus and/or C. cynodegmi	99	86
合計	115	

表2 C. canimorsus 感染症国内症例報告

発症年	年齢	感染源	主な臨床症状	予後
2002	90代	猫	咬傷・掻傷	死亡
2004	60代	猫	掻傷	死亡
2006	70代	犬	咬傷	回復
2007	70代	犬	咬傷	回復
	50代	猫	咬傷・嘔吐	死亡
2008	60代	犬	咬傷	死亡
	50代	犬	咬傷	回復
	40代	犬	咬傷	回復
	70代	犬	咬傷	回復
	70代	野良猫	発熱・創部発赤	回復
	70代	猫	咬傷	死亡
	70代	猫	咬傷	回復

表3 C. canimorsus の薬剤感受性

分類	一般名	感受性
ペニシリン系	アモキシシリン	△
	アンピシリン	△
	オーガメンチン	○
	ヒペラシリン	○
セフェム系	セフトリアキソン	△
	セフトリアキソン	△
	モキサラクタム	△
カルバペネム系	イミペネム	○
	メロベネム	○
アミノグリコシド系	ゲンタマイシン	×
	ストレプトマイシン	×
マクロライド系	アジスロマイシン	△
	エリスロマイシン	△
	テトラサイクリン	○
キノロン系	ナリジクス酸	△
	オフロキサシン	○
リンコマイシン系	シプロフロキサシン	○
	クリンダマイシン	△
クロラムフェニコール系	クロラムフェニコール	○
	ポリミキシンB	×
抗結核薬	リファンピシン	○
	SXT	△

○：全株感受性, △：一部の株が感受性, ×：全株耐性

与を受けた。各種株の薬剤感受性試験の結果、ペニシリン系、セフェム系、テトラサイクリン系等の多くの抗菌剤に感受性を示したが、アミノグリコシド系に対しては耐性であった。また一部の菌株はβラクタマーゼを有しておりペニシリン系の一部に耐性を示したほか、マクロライド系、リンコマイシン系等の抗生物質に対しても耐性を示す菌株がみられた(表2)。

考察

国内の犬・猫もC. canimorsus を高率に保有していることが明らかになった。国内でも動物から分離した敗血症患者から同菌が検出・同定される症例の報告が近年増えており、犬・猫咬傷・掻傷時に留意すべき感染症の1つである。C. canimorsus 感染が疑われる際の抗菌剤としては、オーグメンチンなどのβラクタマーゼに阻害されにくいペニシリン系やテトラサイクリン系、カルバペネム系等の抗生物質を選択することが望ましいと考えられる。

引用文献

- 1) Gastra W. & Lipman L.J.A. (2010): Vet. Microbiol 140, 339-346.
- 2) 今岡浩一 (2009): 獣医学雑誌 13, 65-70.
- 3) 菊池一美, 江原和志, 宮坂淳子ほか (2005): 日獣獣生誌 15, 9-14.
- 4) 太田理恵, 加藤敏広, 津畑千佳子ほか (2009): 感染症誌 83, 661-664.
- 5) 高橋孝雄, 出口善純, 阿部 朋ほか (2009): 日獣急症誌 20, 226-231.
- 6) Suzuki M, Kimura M, Imaoka K, et al.: Vet. Microbiol. doi:10.1016/j.vetmic.2010.01.001.

特集

子どもと動物との暮らしを考える

犬を飼うときに気をつけたい感染症



今岡浩一 (いまおかこういち) 国立感染症研究所獣医科学部第一室

はじめに

◆ 今、日本では、全世帯数の約19%にあたる943万世帯で、1,310万頭以上の犬がペットとして飼われています(ペットフード協会, 2008年調べ)。

他の動物に比べてもっとも早く家畜化された犬は、現在では、単に番犬としてではなく、もっとも身近な伴侶動物として、人に心の安らぎや喜びを与え、命の大切さを教えてくれる存在になっています。ただ、つきあいが深いからといって、その習性や病気についてきちんと理解できていないのでしょうか。近年の少子高齢化や核家族化、室内飼育犬の増加は、ますます犬と人の距離を縮めています。一般的に、動物から人への病原体の伝播は、その距離が近いほど容易になります。あらためて、犬から感染する可能性のある病気について、知っておく必要があるのではな

いでしょうか。犬から感染することがあるおもしろな感染症について、要1にまとめました。

◆ 咬傷・掻傷やなめられることによる感染

動物咬傷の60%が犬によるといわれます。犬にかまれた場合、成人では手足をかまれることが多いのに対して、幼児では頭や首をかまれることが多く、感染症を発症しなくても重篤な外傷を負うこともありま

す。犬咬傷の4~20%で、傷口から侵入した病原体により感染症を発症するといわれています。もちろん、ブドウ球菌など人の皮膚に常在している菌によることも多いのです。それ以外の代表的なものとして、犬の口腔内常在菌であるパストレルラ菌によるパストレルラ症があります。おもしろな症状は傷口の発赤、腫脹、痛みですが、皮下に特徴的な蜂窩織

がまされたときには、傷口を奥の方まで流水でよく洗います。傷が大きいときはや深いときは医療機関を受診します。同じく犬の口腔内常在菌であるカブノサイトファーガ菌による感染症もありますが、こちらは40歳代以上に患者が多く、乳幼児では非常にまれです。名前からよく知られている狂犬病は、世界中で毎年5万人以上も死亡しており、海外では非常に問題になっていきます。ただ現在、犬を含めて国内に狂犬病に感染している動物はいません。2006年に2名の患者報告がありました。どちらもファイリピンで狂犬病の犬にかまれ、国内で

表1 犬から感染することがあるおもしろな感染症

Table with 10 columns: 感染症 (Infection), 病原体 (Pathogen), 感染経路 (Transmission route), 症状 (Symptoms), 治療 (Treatment), 予防 (Prevention), 備考 (Remarks). Rows include Parvovirus, Rabies, Microsporium, Toxocara, etc.

発症したケースです。したがって、もし国内の犬にかまれても狂犬病の危険はありません。

◆ 皮膚に由来する感染症

皮膚糸状菌症(白癬)は、犬小胞子菌や毛嚢菌など真菌類による感染症です。犬では脱毛、発疹、フケの

付着など皮膚病変が現れる場合と、単に被毛に真菌が付着している場合があり。犬小胞子菌による感染シブをすることで人は感染します。頭部白癬(しらくも)は子ども

獣医学部 野村 162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1 国立感染症研究所獣医科学部第一室

に多く、毛髪に覆われる部分にかゆみをとともなう、フケの付着した円形の脱毛斑がみられます。体部白癬(ゼニタムシ)は、体や四肢、顔面に周辺の上り上がった、かゆみをとともなう環状の皮疹を示します。まれですが、ひどい場合には頸部深在性白癬としてケルルス兆量になることがあり、患者は子どもが多く、発赤、腫脹、痛みをともなう膿疱が多発出現し、やがて脱毛してかさぶたが覆われます。犬を清潔に保ち、皮膚病の症状がみられたら、動物病院で治療します。感染動物には接触しないこと、接触した場合は手などをさわったところをよく洗うことが重要です。発症した場合はすぐに医療機関を受診します。

◆ 排泄物に汚染されたものによる経口感染

カンピロバクター菌やエルシニア菌は、犬も高率に腸内に保菌しており、糞便中に排出されます。そのため、これに汚染された食品の喫食や感染犬に接触して菌が手指に付着し、口や食べ物をさわることで経口的に感染します。発熱、下痢、腹痛を示します。大回虫は、妊娠中に母犬の胎盤を通過して子犬に感染します。成虫は生後2~3か月の子犬に多くみられます。糞便中に排出され1週間程度経過後、幼虫を中に含んだ回虫卵を経口的に採取することで人は感染します。感染後、幼虫が眼に移行し、

糞便の処理など、飼育環境を清潔に保つことが必要です。東洋眼虫症は、体長3~4mm程度のハエの一種「メマトイ」がベクターになります。成虫は動物の眼の結膜部に感染し、涙液中に子虫を生み出します。メマトイは涙をなめるときに子虫を体内に取り込み、子虫はメマトイの体内で発育し、感染性の幼虫になります。幼虫を搾ったメマトイが、人の眼に飛び込んだり、涙をなめたりしたときに感染します。患者は、メマトイを自分で追い払えない乳児や高齢者に多く、目やに、鼻汁、感染すると、異物感や結膜炎の症状を示し、結膜下に成虫がみられます。犬、人ともにメマトイとの接触を避けるようにします。

◆ ベクターを介した感染

感染源動物から病原体を人に運ぶ無脊椎動物をベクターといいます。犬糸状虫症は蚊がベクターとなっており、感染犬の血を吸った蚊が、人を吸血することで感染します。胸痛、肺虚寒を起すことが多く、咳、胸検査で肺ガンと間違われて発見されることが多いようです。犬に対して、感染しないように予防薬を使用すること、ベクターである蚊の駆除や、蚊に刺されないようにすることが有効です。

まれですが、ウリザネ糸虫症は、とくに「はいはい」を始めた乳幼児で気をつけたい病気です。犬の腸に感染しているウリザネ糸虫の卵が糞と一緒に排出され、これを食べたノミの体内で幼虫になります。手指についたノミを飲み込んだり、ノミや幼虫を口のまわりにつけたり、口のまわりをなめられたりして感染します。食欲不振や腹痛、下痢を示します。卵は人への感染力はありません。ベクターであるノミの駆除や

・群れ(家庭内)での順位づけをはっきりさせる(子どものほうが犬よりも上位である)。
・ワクチンや予防薬を使用し、犬の病気を予防する。

2) 感染経路

- ・トイレのしつづけをきちんとし、室内で糞尿をさせない。
- ・食べ残しのえさ、落ちた犬の毛などはすぐに掃除して、飼育場所を清潔に保つ。
- ・他の動物やベクターが外部から侵入するのを防ぐ。

3) 人

- ・乳幼児だけを犬と一緒にしない(とくに2~6歳くらいまでは、必ず大人がそばにつきそう)。
- ・知らない犬、様子のおかしい犬には近づかない、手を出さない。
- ・犬を驚かせないようにすること、いやがることや、じゃまをしない(えさを食べている、寝ている、子犬の世話をしているときなど)。
- ・過剰なスキンシップはやめる(口のまわりをなめさせる、口移しの

えさ、食器の共用、一緒に寝る、一緒に入浴するなど)。

・さわった後は、手指をきちんと洗う。

・日頃から自分たちの健康にも気をつけて、感染症に抵抗力のある体をつくる。

以上、犬由来感染症を防ぐための犬を飼育するうえでの基本的なマナーや、その習性を理解したうえで

の養い方を考え、感染症を防ぐことができれば、お互いに幸せに過ごすことができます。

◆ 犬のわりに

近年は、家庭でも簡単にインターネット経由でいろいろな情報を手に入れることができます。犬だけでなく、動物一般からの感染症(動物由来感染症)についてもいろいろな情報が得られます。ただ、なかには誤った情報も見受けられますので、国立感染症研究所 (<http://www.niid.go.jp/niid/index.html>)、検疫所 (<http://www.forth.go.jp/>)、動物衛生研究所 (<http://nih.aaffrc.go.jp/index.html>)、米国CDC (<http://www.cdc.gov/healthypeople/>)などの公的機関や、その病気にまついて実際に調査・研究している大学や研究所の先生方が書かれたページを参考にされるといいでしょう。

◆ 参考文献

- ・今岡浩一：犬にかまれた！ どうしよう、チャイルドヘルス 10:768-771, 2007
- ・今岡浩一：犬、猫由来感染症。獣医学雑誌 13: 65-70, 2009
- ・岸本寿男, 山田章雄 (監修)：ズーノーシスハンドブック。メデイカルサイエンス, 2009
- ・神山隆夫, 高山直秀 (編)：子どもにうつる動物の病気。真実発見, 2005
- ・厚生労働省健康局：愛玩動物の衛生管理の徹底に関するガイドライン 2006. (<http://www.mhlw.go.jp/bun-ya/kenkou/kekaku-kansenshou1/02.html#2>)
- ・環境省自然環境院：人と動物の共通感染症に関するガイドライン, 2007 (http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/sjgo/2_dana/pamphi.html)

実験動物の感染症

Capnocytophaga canimorsus 感染症

今岡 浩一, 鈴木 道雄
国立感染症研究所獣医学部

イヌ咬傷の4~20%, ネコ咬傷の20~50%で、傷口から侵入した病原体により感染症を発生すると言われている。もちろん、ブドウ球菌や連鎖球菌などヒトの皮膚などに常在している菌によることも多いが、それら以外に、イヌ・ネコの口腔内細菌であるパストレル菌 (*Pasteurella* spp.), 猫が保有するバルトネラ菌 (*Bartonella henselae*), また今回取り上げるカブノサイトフアガ・カニモルスス (*Capnocytophaga canimorsus*) による人獣共通感染症もある¹⁾。

Capnocytophaga 属菌はヒトや動物の口腔内、とくに歯根部に常在し、現在8菌種が知られている。特徴は二酸化炭素要求性のほか、鞭毛を持たないが寒天培地上で滑走能を示すこと、栄養要求が厳しく、増殖が遅いことが挙げられる。グラム染色では糸状のグラム陰性桿菌として認められる²⁾。ヒトの保有する *C. ochracea* を始めとする6菌種は、歯周病に関係するほか、ごくまれに日和見的に全身感染を起こし、心内膜炎、敗血症などをもたらすことがある。イヌ・ネコは *C. canimorsus*, *C. cynodegmi* の2種を口腔内に保有しているが、ヒトの臨床的には *C. canimorsus* 感染が重要である³⁾。主に、イヌ・ネコから咬傷、搔傷を受けた際に受傷部位から感染する。我々が首都圏の動物愛護センターのイヌ・ネコを対象に行なった調査では、イヌ74%, ネコ57%が *C. canimorsus* を保有していた⁴⁾。また、品種、性別、年齢による保菌率に明らかな差は認められなかった。動物間では、互いに接触することにより感染すると考え

られている。実験用イヌについての調査報告はないが、同様に保菌していると考えておく方がよい。

イヌ咬傷に伴う感染症で代表的なパスツレラ症は感染部位が早期に強く腫脹するケースが多く、そのため明らかに感染を確定・同定でき、すみやかに処置をとりやすい。ネコ搔傷では、猫ひっつき病 (*B. henselae*) が重要であるが、こちらも局所から所属リンパ節の炎症・腫脹が認められることが多い。それらに対して *C. canimorsus* 感染症は、局所症状を欠くことも多く、発熱、頭痛、腹痛、倦怠感などの一般的な症状から、重症例では急激に敗血症や髄膜炎に進展することがあり、さらに播種性血管内凝固症候群 (DIC) や敗血症性ショック、多臓器不全が進行すると生命にかかわる⁵⁾。病状の悪化は、菌の分離・同定にかかる時間を待たず、早急な処置を必要とする。潜伏期は1~14日でパストレルラ症よりもやや長く、傷口がすでに治癒している場合もあり、イヌ・ネコ咬傷、搔傷との関連がわかりにくいことがある⁶⁻⁸⁾。

C. canimorsus 感染症が最初に米国で報告された⁹⁾ 1976年以後、世界中で約250症例が報告されている。まれな感染症ではあるが、敗血症を発生したときの死亡率は約30%にのぼる¹⁰⁻¹²⁾。髄膜炎を発生する場合もあるが、こちらの方が予後は良いようである。ただ、報告の大半は重症例であり、軽症者を含めた実感染者数は、もともと多いと思われる。最初に文献報告されてから、まだ30余年ほどしかたっていないことから、新しい感染

表1 C. canimorsus 感染患者の特徴

A) 感染原因		患者 (n=102)	%
原因	患者 (n=102)		
イヌ咬傷	60	59	
動物との密な接触	16	16	
ネコ咬傷・搔傷	9	9	
- 不明	17	17	

B) 入院時診断		患者 (n=74)	%
症状	患者 (n=74)		
敗血症	32	43	
不明熱	7	9	
髄膜炎	7	9	
蜂窩織炎	6	8	
敗血症性ショック	5	7	
気道感染	4	5	
その他	13	18	

症であると思われるが、単に原因菌が特定されるようになっただけのことであり、ヒトがイヌ・ネコとともに暮らすようになってきたのはるか昔から疾患は存在していたと考えられる。感染経路はイヌ咬傷59%, ネコ咬傷・搔傷9%となっている。しかし、皮膚・粘膜にあった傷や潰瘍を認められ感染した症例や、動物との接触歴はつきりしない症例も見受けられる。患者の約73%が男性であり、年齢別では50~60歳代をピークとして、40歳以上が約80%を占め、20歳未満は2.6%程度と、中高年齢者に多い (表1)。患者には、糖尿病、アルコール依存症など慢性疾患の罹患者、脾臓摘出者、高齢者など、免疫機能の低下しついで immunocompromised host¹³⁾が多いが、とくに基礎疾患のない患者も存在する⁶⁻⁸⁾。

我々が文献的に調査をした範囲では、国内では1993年のイヌ咬傷から感染した敗血症例を最初として、これまでに18例が報告されている。そのうち16例が重篤な症状を示し、6例が亡くなっている。男女比や年齢構成は世界のそれに等しいが、ネコからの感染が7例と多いのが日本の特徴のようである¹⁴⁾。12例が2007年以降の発生と、近年の報告が多いのは、臨床現場で認知されてきてい

C) 性別・年齢別患者構成

年齢	性別		全体 (n=153)	%
	男 (n=112)	女 (n=41)		
0	1	1	2	1.3
10	1	1	2	1.3
20	11	1	12	7.8
30	9	8	17	11.1
40	17	5	22	14.4
50	28	11	39	25.5
60	27	4	31	20.3
70	14	7	21	13.7
80	4	2	6	3.9
90	0	1	1	0.7
%	73.2	26.8		

文献6~8他より作成

るためと思われるが、実患者数の増加の可能性も否定できない。厚生労働省は本年5月21日に情報提供として「カブノサイトフアガ・カニモルス感染症に関するQ&A」を各自治体 (管内医療関係者への周知を含む) や日本獣医師会など関係各局に通知するとともに、厚生労働省ウェブサイト [http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou18/capnocytophaga.html] への掲載を行った。

診断は、一般的には血液や脳脊髄液を用いた菌分離・同定により行なわれるが、生育は遅い。その他の検査法としては、血液培養サンプルのグラム染色により、血中や好中球内に糸状のグラム陰性桿菌が認められることもある¹⁵⁾。また、遺伝子診断として、培養サンプルを用いて、直接、16S rRNA遺伝子をユニバーサルプライマーで増幅した後、塩基配列を解析する方法などがある。我々は *C. canimorsus*, *C. cynodegmi* 特異的PCRを開発し、特異的遺伝子検出や菌の同定を行なっている¹⁶⁾。

実際には *C. canimorsus* 感染症例は、すでに敗血症を含め全身症状を発生している段階で受診することが多いため (表1)、治療法としては抗菌薬の投与のほか、敗血症に対する様々な対症療法が実

施される。治療には、ペニシリン系の抗菌剤が効果を示す。ただし、 β -ラクタマーゼを産生することもあるため、 β -ラクタマーゼ阻害剤との合剤（オージェンチン、ユナシン）が第一選択となる。これはカブプロサイトファーマーが症に限らず、イヌ咬傷時の第一選択薬でもある⁹⁾。臨床分離株、イヌ・ネコ分離株を用いた我々の調査では、テトラサイクリン系、カルバペネム系にも感性である一方、ゲンタマイシンなどアミノグリコシド系には耐性であり、セフェム系、マクロライド系やリンコマイシン系に対しては耐性を持つ株も認められた。予防投薬については、深い貫通性の傷、静脈やリンパ管のあるところ、骨や関節に近接もしくは達する傷、外科的処置を必要とする傷、免疫抑制者、などが適応となる⁹⁾。それ以外のケースについては適宜判断することになる。

C. canimorsus 感染症に関する状況が少しずつ明らかになってきたが、感染・発症機序、あるいは疫学については依然として未知の部分が多い。これまでは、日本を含め世界で、敗血症など重症化した症例のみが報告されている^{2,4-6)}。しかしながら、重症化しなかった、いわゆる報告するに至らなかった患者もかなりの数いると考えられ、それらを含めると、実際には致死率に関しては見かけほど高くはないと考えられる。事実、オランダで2003～2005年に確認された患者26名のうち、ICUは9名、死亡3名にとどまっている¹⁰⁾。また、患者数については、調査の進んでいるオランダやデンマークではそれぞれ年間、人口100万人対0.67、0.5人との報告がある^{8,10)}。したがって、それを日本の人口1.27億人に当てはめると、年間60～80人前後の報告されようる症状を示す患者がいると推定される。

いずれにしてもイヌ・ネコの口腔内常在菌で除

菌法も確立しておらず、かつ、ワクチンもない以上、感染予防のための一般的な心得として、動物取り扱いや時に感染リスクを減少させる注意、自身の健康を維持する努力、が大切になる。また、咬傷・掻傷後に体調に異常を感じたらすぐに医療機関を受診し、咬傷・掻傷歴を申告することが重要である^{1,9)}。

参考文献

- 1) 今岡浩一. 犬, 猫由来細菌感染症. 獣医学雑誌, 13 (1):65-70, 2009.
- 2) Gastra W. and Lipman. L. J. A. *Capnocytophaga canimorsus*. *Vet. Microbiol.*, 140:339-346, 2010.
- 3) 鈴木道雄. イヌ・ネコ咬傷・掻傷と *Capnocytophaga canimorsus* 感染症. モダンメディア, 56 (4):71-77, 2010.
- 4) Suzuki M., Kimura M., Imaoka K., et al. Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodermi* in dogs and cats determined by using a newly established species-specific PCR. *Vet. Microbiol.*, 144:172-176, 2010
- 5) Bobo R. A. and Newton E. J. A. previously undescribed Gram-negative bacillus causing septicemia and meningitis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 65:564-569, 1976.
- 6) Janda J. M., Graves M. H., Lindquist D., et al. Diagnosing *Capnocytophaga canimorsus* infections. *Emerg. Infect. Dis.*, 12:340-342, 2006.
- 7) Lion C., Escande F., Burdin J. C. *Capnocytophaga canimorsus* infections in human: review of the literature and cases report. *Eur. J. Epidemiol.*, 12 (5):521-33, 1996.
- 8) Fers C., Gahrn-Hansen B., Frederiksen W. *Capnocytophaga canimorsus* septicemia in Denmark, 1982-1995: review of 39 cases. *Clin. Infect. Dis.*, 23 (1):71-5, 1996.
- 9) 細川直登. 犬咬傷による敗血症. アポット感染症アワー, ラジオNIKKEI2009年4月24日放送. [http://radio848.rjsp.net/abbott/html/20090424.html]
- 10) van Dam A. P. and Jansz A. *Capnocytophaga canimorsus* infections in the Netherlands: a nationwide survey. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2010 Feb 17. [Epub ahead of print]

Capnocytophaga canimorsus による人獣共通感染症

鈴木 道雄* 今岡 浩一*

Key words

Capnocytophaga canimorsus 感染症, イヌ咬傷, ネコ咬傷, 掻傷, 敗血症

I. *Capnocytophaga canimorsus* 感染症とは
Capnocytophaga canimorsus 感染症 (以下, *C. canimorsus* 感染症) の症例については, 近年, 国内学会・学術誌などでも報告されるようになってきており, 医療関係者, あるいは一般の人々の間でもその認知度, 関心が徐々に高まってきている。2010年5月には, 厚生労働省のwebサイトでも「カプトサイトファーガ・カニモルサス感染症に関するQ&A」が公表された¹⁾。*C. canimorsus* 感染症はイヌ・ネコの口腔内常在菌を原因とした, イヌ・ネコ咬傷・掻傷感染症の一種である。同じくイヌ・ネコ咬傷・掻傷感染症であるパストレルラ症や猫ひっかき病で比較的多くの症例が知られているのに対し, *C. canimorsus* 感染症についてはこれまで世界での文献的症例報告が約250例と, その数は限られている。しかしながら, これらの報告例の多くが敗血症に至った重症例で占められており, 致死率は約30%にのぼる。以下に*C. canimorsus* 感染症の概説および国内での状況を述べる。

II. イヌ・ネコ咬傷・掻傷に伴う感染症

アメリカの統計データによると, アメリカでは年間に約470万人のイヌ咬傷事故があり, そのうち約80万人が医療機関を受診し, さらにそのうちの約6,000人が入院加療を受けるとされる²⁾。わが国では年間約5,000件という報告があるが(環境省調べ)³⁾, この数字には事故のごく一部しか反映されておらずと考えられ, 国内での実際の件数はこ

れを相当数上回ると推測される。世界で年間約5万人が死亡している狂犬病は, 国内では1957年以降, 海外で感染して帰国後に発症した, いわゆる輸入症例3例を除いてヒト・イヌともに発症例はない。したがって現在, 国内ではイヌ咬傷によって狂犬病に感染するリスクはないと考えられるが, 咬んだ動物の口腔内や皮膚常在菌, また受傷者自身の皮膚常在菌, あるいは土壌菌など種々の細菌に感染・発症することがある。たとえば, *Staphylococcus* 属菌, *Streptococcus* 属菌などのGram陽性菌や *Pasteurella* 属菌, *Bartonella* 属菌などのGram陰性菌, *Fusobacterium* 属菌などの嫌気性菌がこれらの代表的なものである⁴⁾。イヌでは咬傷の15~20%, ネコ咬傷では半数近くでなんらかの感染を伴うとされるが⁵⁾, その多くは創部に限局的なものである。しかしながら, *C. canimorsus* 感染症は症例数は少ないものの, 敗血症など全身症状を示す割合が高い。

患者は自らの家庭で飼育するイヌ・ネコから感染しているケースが多いが, 郵便, 新聞, 宅配便などの配達, あるいは介護サービスなどで多くの家庭を訪問することを仕事としている人も感染の機会が多い。また, 獣医師, 獣医療補助者や動物取扱者もハイリスクグループと考えられる。

III. *Capnocytophaga* 属菌の特徴

Capnocytophaga 属菌は通性嫌気性のGram陰性桿菌であり, 1979年に新しい属として確立⁶⁾,

* Suzuki, Michio (主任研究官) / Imaoka, Koichi (第一書表) 国立感染症研究所獣医学部(〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1)

表1 Capnocytophaga属の自然宿主、性状、病原性

菌種名	常在する宿主	カタラゼ	オキシダーゼ	病原性
<i>C. ochracea</i>				
<i>C. gingivalis</i>				
<i>C. sputigena</i>	ヒト	陰性	陰性	歯周病、ときに心内臓炎など
<i>C. haemolytica</i>				
<i>C. granulosa</i>				
<i>C. leadbetteri</i>				
<i>C. canimorsus</i>	イヌ・ネコ	陽性	陽性	敗血症、DIC、発症はまれだが重症度高い
<i>C. cynodegmi</i>				咬傷部位の局所感染が主、まれに全身感染

表2 イヌ・ネコのCapnocytophaga属菌保有率

	イヌ	ネコ
<i>C. canimorsus</i>	74	57 (%)
<i>C. cynodegmi</i>	86	84
<i>C. ca and/or C. cy</i>	92	86

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

現在は8菌種となっている(表1)。*C. ochracea*をはじめとする6種は、ヒトの口腔内常在菌であり、歯周病の病巣から検出されることが多いことから、歯周病関連菌として位置づけられているが⁹⁾、まれに日和見的に全身感染をおこし、電撃性紫斑病、心内臓炎など重篤な症状をもたらし得る⁹⁾。

イヌ・ネコは*C. canimorsus*と*C. cynodegmi*の2種を保有している(表2)。以前は、前者がDF-2(Dysgonic Fermenter-2)、後者がDF-2-likeと呼ばれていたが、1990年に現在の分類が確立した⁹⁾。*"canimorsus"*と*"cynodegmi"*は、前者がラテン語、後者がギリシャ語で、いずれも「イヌ咬傷」の意味であるが、イヌのほかにネコの口腔内にも常在している。両菌種ともヒトに病原性を有するが、敗血症などの全身症状を呈する重症例、死亡例のほとんどは*C. canimorsus*感染によるものである。

*Capnocytophaga*属菌の特徴は二酸化炭素要求性を有すること、鞭毛をもたないが寒天培地上で滑走能を示すこと、栄養要求が厳しく、増殖が遅いことである。Gram染色による直接鏡検では糸状のGram陰性桿菌として認められる(図1)。生化学的にはヒトに常在する6菌種はオキシダーゼ試験、



図1 *C. canimorsus*のGram染色像(写真中のスケールバーは10μm)

カタラゼ試験ともに陰性であるが、イヌ・ネコが保有する2菌種はオキシダーゼ試験、カタラゼ試験ともに陽性である⁹⁾。*C. canimorsus*と*C. cynodegmi*のコロニーは淡黄白色、淡灰白色あるいは淡紫白色で、コロニーが成長するとその辺縁に不規則な縁が認められる。これは菌の滑走能による特徴的な形態であるが、菌株や培養条件によって滑走を示す程度には差異がある(図2)。培養条件は35~37℃、5% CO₂培養あるいは嫌気培養、培地はブルセラHK寒天培地などの血液寒天培地で生育するが、中でも5%ウサギ(ウマ)血液加ハートインフュージョン寒天培地での発育が良好である。*C. canimorsus*と*C. cynodegmi*はコロニー形状や生化学的性状も類似していることから、鑑別には菌種特異的プライマーを用いたPCR検査が用

いられる¹⁰⁾。

IV. イヌ・ネコのCapnocytophaga属菌保有率

本感染症の原因菌、*C. canimorsus*がイヌ・ネコに常在することの特徴は、これらの動物が多くの家庭で飼育されていることである。国内ではイヌ1,200万頭、ネコ1,000万頭(いわゆるわゆる外ネコを除く)が飼育されていると推計されている¹¹⁾、われわれが2004年から2007年にかけて行った調査の結果、*C. canimorsus*はイヌ74%、ネコ57%が保有しており、また*C. cynodegmi*はイヌ86%、ネコ84%が保有していた¹⁰⁾。

V. *C. canimorsus*感染症例の特徴

*C. canimorsus*感染症は、ヒトがイヌ・ネコと関わり合うようになつた、かなり以前から存在していたのではないかと考えられるが、病原体が見出されていなかつたため、その実態は明らかでなかつた。そのため、1976年に報告された敗血症・髄膜炎例¹²⁾が、文献的に最初の症例とされており、それ以後30余年の間に、世界で約250例の症例が報告されている。ただし、報告されない症例や原因の特定に至らなかつた症例も相当数あると考えられるが、どの程度か推測はむずかしく、実際の症例数は不明である。いずれにしても感染機会が多さに比べて感染成立率は低く、たとえ感染しても発症することは非常にまれであると考えられる。疫学的に、発症の割合は人口100万人あたり0.5人(デンマーク)、あるいは0.67人(オランダ)と推計されている^{13,14)}。しかしながら、発症すると全身症状が急激に悪化し、短期間に敗血症など重篤な病態へと進行する場合は多い。感染源はイヌ・ネコであり、咬傷・掻傷部位からの感染が主である(表3-I)¹⁵⁻¹⁷⁾。しかしながら皮膚・粘膜にもともと傷や潰瘍があつた場合に、その部位を掻められることによつて感染した症例もあり^{15,16)}、また動物との濃厚な接触歴がない(はききりしない)症例もあるため¹⁶⁻¹⁷⁾、感染の機会咬傷・掻傷のみに限らないと考えられている。また、たとえばバスタツレラ症では早ければ数時間で受傷部に発熱や疼



図2 血液寒天培地上の*C. canimorsus*のコロニー

痛を伴う腫脹が認められたり¹⁸⁾、猫ひっかき病では受傷した手足の付け根のリンパ節が顕著に腫脹するなど¹⁹⁾、それぞれの起炎菌に特徴的とされる局所病変があるが、*C. canimorsus*感染症の場合は、受傷部位局所に目立った病変を形成するケースは多くないようである。筆者がいくつかの文献を累計したデータでは、医療機関受診時に受傷部に蜂窩織炎がみられた症例は約9%となつている(表3-II)。

本感染症の潜伏期間は1~14日、平均的には7日程度である。患者は発熱、悪寒、吐き気、筋肉痛、腹痛、意識混濁などの症状を示す^{13,20)}。受傷後、自身で簡易に消毒して済ませていたような小さな傷から感染した例も多い。重症例では受診時にすでに敗血症の症候がみられることが多く、発症すると播種性血管内凝固症候群(DIC)や敗血症性ショック、多臓器不全など救命治療の必要な重篤な症候に短時間で至る傾向がある(表3-II)。10例以上の症例をまとめている欧米諸国の疫学的報告では致死率はそれぞれ12~33%であり^{13,14,16,17)}、これまで報告された症例の致死率は約30%である(表3-III)²⁰⁾。髄膜炎を主症状とする症例の予後は比較的よく、致死率は約5%である²⁰⁾。極めてまれな感染経路としては、角膜炎をおこした例が報告されている²⁰⁾。

患者は免疫機能が低下している、いわゆる immunocompromised hostが多く、基礎疾患とし

表3 C. canimorsus感染症例の疫学的予一タ

I) 感染原因 (n=118)		患者数	%
原因			
イヌ咬傷		72	61
動物との密な接触		19	16
ネコ咬傷・掻傷		9	8
不明		18	15

II) 入院時診断 (n=70)		患者数	%
症状			
敗血症		29	41
不明熱		7	10
髄膜炎		7	10
蜂窩織炎		6	9
敗血症性ショック		5	7
気道感染		4	6
その他		12	17

III) 転帰 (n=129)		患者数	%
回復		92	71
死亡		37	29

IV) 年齢・性別		全体 (n=153)	%
年齢 (代)			
0	1	2	1.3
10	1	2	1.3
20	11	12	7.8
30	9	17	11.1
40	17	22	14.4
50	28	39	25.5
60	27	41	26.8
70	14	21	13.7
80	4	6	3.9
90	0	1	0.7
%	73.2	26.8	

※文献13,14,16,17および表4に示した症例から集計

では、糖尿病、肝炎、アルコール依存症などの慢性疾患、腫瘍、脾摘などがあげられる^{14,15,20}。これまでの報告例では、性別は男性が7割以上を占め、年齢分布では大半が40歳以上である¹⁵⁻¹⁷。アメリカの統計によるイヌ咬傷事件数は20歳未満の患者約半数を占めるが²¹、本感染症の20歳未満の患者は極めて少数である(表3-IV)ことから、高齢は重要なリスク因子であると考えられる。一般に重

症敗血症の発症頻度や致死率は年齢とともに高くなり、致死率は30%程度(40歳で約25%、70歳で約30%)であることから²²、*C. canimorsus*感染症報告例における致死率30%という数字はこれららの傾向、数字と重なるものと考えられることができる。なお、本感染症のヒト-ヒト感染の報告はない。

VI. 国内の*C. canimorsus*感染症例報告

国内における文献的報告は、1993年に原因菌を*Capnocytophaga* spp.として報告されている、イヌ咬傷による敗血症例が最初である²³。その後しばらく報告がなかったが、2002年にはネコ咬傷によって感染した女性の国内初の死亡例が報告された²⁴。これまでに計18例の文献的報告があり、うち死亡例は6例となっており、受傷後2~7日で発症しているケースが多い。患者の年齢は22~95歳で、60歳以上の患者が半数超の10例を占め、現病歴については、半数超が腫瘍、肝炎、糖尿病など罹患歴を有しているが、とくに記載のない症例も少なくない。感染原因はイヌ咬傷が9例、ネコ咬傷・掻傷が7例、原因不詳が2例となっている(表4)。海外の報告では大半がイヌ咬傷例であり、ネコ咬傷・掻傷例が半数近くを占めていることは、国内の年間ほどの間に多く、一見すると症例が増加している印象を与えるが、実際には、これまでなかなかむすかしかった起炎菌の同定ができるようになったことで、症例報告が増えたという面が大きいのではないかと思われる。近年、国内で各施設の臨床検査室における血液培養の検体数が増えていることも、*C. canimorsus*の検出数の増加に寄っていると推測される²⁵。

VII. *C. canimorsus*感染症の診断

イヌ・ネコ咬傷・掻傷の有無、日常的な動物との接触の状況は重要な情報である。また、潜伏期間が長い場合、発症までの間に受傷部はおおむね治癒していたり、もともと傷口が甘咬み程度の小さな傷であることもあるため、咬傷・掻傷歴については患者からの申告が重要となる。また、受傷

部に腫脹などがあったり、受傷部局所からは*Pasteurella*属菌、*Staphylococcus*属菌などが分離されるが*Capnocytophaga*属菌は分離されず、全身症状を呈して後に血液培養から*C. canimorsus*が分離されるケースなどもあるので、重篤な全身症状が現れた際は受傷部局所の起炎菌に捉われすぎないほうがよい。局所感染の陰に全身感染の萌芽が隠れている場合もあることにも注意を要する。

*C. canimorsus*の分離・同定のためには、一般的に血液や脳脊髄液を培養して菌分離を試みる。受傷部位から菌が分離されることもある(表5)。しかしながら、本菌は生育が遅いため、通常の培養期間では菌の検出に至らないことも考慮し、イヌ・ネコ咬傷・掻傷の履歴がある場合はその旨を検査室に伝え、培養期間を延長することで検出率を高めることができる²⁶。また、*C. canimorsus*感染が疑われる際には自動培養装置による検出のみならず、塗抹の鏡鏡や遺伝子検査を併用すること

で検出につながることもある。たとえば、血液培養サンプルのGram染色による検鏡によって、血中や好中球の細胞質内に本菌が認められることがあり²⁷、また、PCR法を用いて培養サンプルから直接的に遺伝子検出を試みることで検出・同定に成功した例もある²⁸。PCR法には特異的プライマーが利用できるほか¹⁰、16S rRNA遺伝子をユニバーサルプライマーで増幅した後、その増幅産物の塩基配列を解析する方法などがある²⁹。血清学的診断法は確立していない。

表4 *C. canimorsus*感染症国内症例

発症年	年齢	性別	感染源	感染経路	主な臨床症状	予後
1993	40代	男	イヌ	咬傷	敗血症・DIC・四肢動脈塞栓症	回復
2002	90代	女	ネコ	咬傷・掻傷	意識障害	死亡
2004	60代	男	ネコ	掻傷	敗血症	死亡
	40代	男	ネコ	咬傷	敗血症	回復
	30代	女	ネコ	咬傷	創部腫脹・膿瘍	回復
2006	70代	女	イヌ	咬傷	敗血症・DIC・多臓器不全	回復
	60代	男	不明	不明	敗血症・DIC	回復
2007	70代	女	イヌ	咬傷	敗血症・髄膜炎	回復
	50代	女	ネコ	掻傷	敗血症・嘔吐	死亡
	50代	女	イヌ?	不明	電撃性紫斑・DIC	回復
2008	60代	男	イヌ	咬傷	敗血症・DIC・黄疸・多臓器不全	死亡
	50代	男	イヌ	咬傷	敗血症・DIC	回復
	40代	男	イヌ	咬傷	敗血症・DIC	回復
	70代	男	イヌ	咬傷	発熱・創部発赤	回復
	70代	男	ネコ	掻傷	敗血症	死亡
	70代	男	ネコ	掻傷	敗血症・DIC	回復
2009	20代	男	イヌ	咬傷	敗血症	回復
	60代	男	イヌ	咬傷	敗血症・DIC・電撃性紫斑	回復

表5 *C. canimorsus*の分離された検体

培養材料	患者数	%
血液	97	86.6
脳脊髄液	5	4.4
血液と脳脊髄液	4	3.6
受傷部位	2	1.8
血液と受傷部位	1	0.9
気道	1	0.9
その他	2	1.8

※文献13,14,16,17および表4に示した症例から集計

VIII. *C. canimorsus*感染症の治療

イヌ・ネコ咬傷・掻傷時には、必要に応じて抗菌薬の予防的な投与を行うが、その際には*C. canimorsus*だけでなく、さまざまな細菌が起炎菌である可能性を考慮して、Gram陽性菌、陰性菌の広い範囲をカバーする、抗菌スペクトルの広い抗菌薬を投与することが大切である。イギリスの文献ではアモキシシリン/クラブラブラン酸(オーグメン

表6 C. canimorsusの薬剤感受性

分類	一般名	感受性
ペニシリン系	ペニシリン	△
	アンピシリン	△
	アモキシシリン	△
	オーグメンチン	○
	ピペラシリン	○
セフェム系	セファゾリン	△
	セフトラクタム	△
	セフトリアキソン	△
	セフトキシム	○
カルバペネム系	イミペネム	○
	メロペネム	○
アミノグリコシド系	ゲンタマイシン	×
	ストレプトマイシン	×
マクロライド系	アジスロマイシン	△
	エリスロマイシン	△
テトラサイクリン系	テトラサイクリン	○
	ドキシサイクリン	○
	ミノサイクリン	○
キノロン系	ナリジクス酸	△
	オフロキサシン	○
ニューキノロン系	シプロフロキサシン	○
	クロラムフェニコクローラムフェニコール	○
ポリペプチド系	ポリミキシンB	×
	リファンピシン	○
抗結核薬	SXT	△

・ディスク拡散法による。○：全株感受性、△：一部の株が感受性、×：全株耐性

チン)の経口投与が推奨されており、傷口からの破傷風感染防止のため破傷風トキソイドの接種を併せて行うことも奨められている²⁰⁾。海外での事例においては狂犬病に対する予防処置も必要に応じて実施される。

発症して重症化する場合は、その進行が急激で、起炎菌の同定を待たずに敗血症に対する迅速な救命治療が必要とされることが多い。治療法としては抗菌薬の投与のほか、昇圧剤の投与、血漿交換療法などさまざまな対症療法が実施される。

C. canimorsusの薬剤感受性については、まとめ

て表6に示した。ペニシリン系、テトラサイクリン系、第3世代セフェム系、ニューキノロンなどの多くの抗菌薬に感受性であったが、β-ラクタマーゼを産生し、ペニシリンなどには耐性を示す菌株もあった。マクロライド系、リンコマイシン系などにも一部耐性の株があった。アミノグリコシド系には耐性であった²¹⁾。したがって、本感染症の予防・治療に用いる抗菌薬の選択として、ペニシリン系の抗菌薬を用いる際にはβ-ラクタマーゼ阻害薬との合剤であるアモキシシリン/クラヴァン酸(オーグメンチン)やアンピシリン/スルバクタム(ユナシン)を用いることが望ましい。そのほか、ミノサイクリン、ドキシサイクリン、セフトキシム、シプロフロキサシンなどが有効である。

おわりに

C. canimorsus感染症の感染・発症メカニズムには未解明の点が多い。これまでに報告された症例数も限られており、実際の症例数、重症例以外に軽症例がどれほどあるかなど、疫学的情報も十分ではない。今後、より多くの症例の情報を収集し、感染・発症のリスク因子についてさらに明らかにしていく必要がある。

わが国では今後も人口の高齢化が進み、本感染症に対するハイリスクグループに属する人々が増加することが予想される。医療関係者や一般の人々に対して、イヌ・ネコ咬傷・掻傷感染症の1つとしてのC. canimorsus感染症についての啓発を地道に、継続的に行っていくことが重要である。

最後に、本研究を進めるにあたり、国内の症例に関する情報提供ならびに臨床分離菌株の分与にご協力いただいた各医療機関の先生方に深謝いたします。

<文 献>

- 1) 厚生労働省webサイト: <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansen/hou1/capnoctytophaga.html>
- 2) Centers for Disease Control and Prevention (CDC): MMWR Morb Mortal Wkly Rep 52: 605, 2003
- 3) 環境省webサイト: <http://www.env.go.jp/council/1/kanimal/Y14026/mat01.pdf>
- 4) Talan, D. A. et al.: N Engl J Med 340: 85, 1999
- 5) 福井次矢ほか監修: ハリソン内科学, メディカル・サイエ

ンス・インターナショナル, 東京, p.846, 2003

- 6) Leadbetter, E. R. et al.: Arch Microbiol 122: 9, 1979
- 7) 古西清司ほか編著: 臨床微生物学 細菌病と微生物学のビジュアル dictionary, 南山堂, p.48, 2007
- 8) Desai, S. S. et al.: J Infect 54: e107, 2007
- 9) Brenner, D. J. et al.: J Clin Microbiol 27: 231, 1989
- 10) Suzuki, M. et al.: Vet Microbiol 144: 172, 2010
- 11) 一般社団法人ペットフード協会ウェブサイトを <http://www.petfood.or.jp/data/char2009/>
- 12) Bobo, R. A., Newton, E. J.: Am J Clin Pathol 65: 564, 1976
- 13) Pers, C. et al.: Clin Infect Dis 23: 71, 1996
- 14) van Dam, A. P., Jansz, A.: Clin Microbiol Infect 2010[Epub ahead of print]
- 15) Vallonen, M. et al.: Eur J Clin Microbiol Infect Dis 14: 520, 1995.
- 16) Lion, C. et al.: Eur J Epidemiol 12: 521, 1996

- 17) Janda, J. M. et al.: Emerg Infect Dis 12: 340, 2006
- 18) Holst, E. et al.: J Clin Microbiol 30: 2994, 1992
- 19) 丸山俊一: Modern Media 50: 203, 2004
- 20) Gastrua, W., Lipman, L. J.: Vet Microbiol 140: 339, 2010
- 21) Le Moal, G. et al.: Clin Infect Dis 36: e42, 2003
- 22) de Smet, M. D. et al.: Am J Ophthalmol 109: 240, 1990
- 23) 舟田 久編: 敗血症の解剖と治療戦略, 医文社ジャーナル社, 大阪, p.32, 2006
- 24) 田中利明ほか: ICUとCCU 17(臨時増刊): 266, 1993
- 25) 菊池一英ほか: 日臨検生物誌 15: 9, 2005
- 26) 竹川啓史ほか: 新臨検生物誌出情報 31: 109, 2010
- 27) 高見真美ほか: 医学検査 58: 511, 2009
- 28) 古谷明子ほか: 日臨検生物誌 19: 148, 2009
- 30) Morgan, M., Palmer, J.: BMJ 334: 413, 2007
- 31) 鈴木道雄ほか: 臨床毒物学 63: 217, 2010



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Research article

Multi-locus sequence analysis reveals host specific association between *Bartonella washoensis* and squirrelsKai Inoue^a, Hidenori Kabeya^a, Keiko Hagiya^a, Michael Y. Kosoy^b, Yumi Une^c, Yasuhiro Yoshikawa^d, Soichi Maruyama^{a,*}^a Laboratory of Veterinary Public Health, Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences, Nihon University, 1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan^b Bartonella Laboratory, Division of Vector-Borne Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, CO, USA^c Laboratory of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine, Azabu University, Kanagawa, Japan^d Department of Biomedical Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 January 2010

Received in revised form 8 August 2010

Accepted 16 August 2010

Keywords:

Bartonella washoensis

Genetic diversity

Multi-locus sequence analysis (MLSA)

Phylogenetic relationship

Sciuridae

Squirrel

ABSTRACT

To clarify phylogenetic relationships and genetic diversity among *Bartonella washoensis* strains obtained from squirrels, multi-locus sequence analysis (MLSA) with the 16S rRNA, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *ribC*, and *rpoB* genes was applied for 20 strains of *B. washoensis* isolated from five genera of squirrels (*Tamias*, *Tamiasciurus*, *Glaucomys*, *Sciurus*, and *Spermophilus*) within the family Sciuridae. Sequence similarities in the concatenated sequences of *B. washoensis* strains from squirrels of different genera ranged from 94.7% (*Sciurus* vs. *Spermophilus*) to 98.4% (*Tamiasciurus* vs. *Glaucomys*). Phylogenetic trees based on the concatenated sequences revealed that *B. washoensis* strains formed five distinct clades and each clade correlated with the genus of squirrel from which the strains were originally obtained. The discrimination was supported by 100% bootstrap values and posterior probabilities, respectively. These results suggest that *B. washoensis* strains may have co-specified with their squirrel hosts and provide new insights into the application of the MLSA to identify sources of *B. washoensis* infection with accuracy.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bartonella washoensis is Gram-negative, fastidious, facultative intracellular bacteria and was first isolated from a human patient with fever and myocarditis in Washoe County, Nevada in 1995 (Kosoy et al., 2003). Subsequently, the organism was found in California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*) with a high prevalence of infection (>17%) in the same county (Kosoy et al., 2003). The partial DNA sequences of the 16S rRNA, *gltA*, and *groEL* genes of *B. washoensis* strains obtained from ground squirrels were identical to those from the human patient, suggesting that the organism is zoonotic and the

ground squirrels are the natural reservoirs of the pathogen in western USA (Kosoy et al., 2003). In the same year, *B. washoensis* was isolated from a dog with mitral valve vegetative endocarditis and the sequences of several genes of the strains were identical to those of *B. washoensis* from the human and the California ground squirrels (Chomel et al., 2003). Thus, *B. washoensis* is suggested to be able to infect several species of mammals.

It has been reported that squirrels in various areas have been infected with *B. washoensis* (Bown et al., 2002; Kosoy et al., 2003; Jardine et al., 2005; Bai et al., 2008; Inoue et al., 2009b). However, the phylogenetic relationships and the genetic diversity of *B. washoensis* strains of among various genera of squirrels have not been investigated to date.

In the present study, we analyzed 20 *B. washoensis* strains from 5 genera of squirrels by using multi-locus sequence analysis (MLSA) of 6 housekeeping genes to

* Corresponding author. Tel.: +81 466 84 3386; fax: +81 466 84 3386.
E-mail address: maruyama.soichi@nihon-u.ac.jp (S. Maruyama).

clarify the relationship between genetic diversity of the isolates and host squirrels.

2. Materials and methods

2.1. *B. washoensis* strains and growth conditions

A total of 20 *B. washoensis* strains were analyzed in this study. Nineteen strains were isolated from wild squirrels that had been imported as pets into Japan from China or North America between June 2004 and October 2007 (Inoue et al., 2009b). Three strains from three individuals of six squirrel species, i.e. the Richardson's ground squirrel (*Spermophilus richardsonii*), the Columbia ground squirrel (*Spermophilus columbianus*), the Daurian ground squirrel (*Spermophilus dauricus*), the American red squirrel (*Tamiasciurus hudsonicus*), the Southern flying squirrel (*Glaucomys volans*), and the Siberian chipmunk (*Tamias sibiricus*), and a single strain that had been isolated from a Hokkaido squirrel (*Sciurus vulgaris orientis*) were used in this study. The 19 strains were confirmed to form a cluster with *B. washoensis* strain nvh1 from a human patient in the phylogenetic analysis based on a portion of the *gltA* gene (Inoue et al., 2009b). Also included in this study was *B. washoensis* strain Sb944nv, which was isolated from a California ground squirrel (*Spermophilus beecheyi*) in the USA (Kosoy et al., 2003) and had 16S rRNA, *gltA*, and *groEL* gene sequences identical to those from *B. washoensis* strain nvh1 (Table 1).

The cultures were grown on heart infusion agar plates (DIFCO, MI, USA) containing 5% defibrinated rabbit blood. The plates were incubated at 35 °C in a 5% CO₂ atmosphere for 14 days and harvested bacteria were used for DNA extraction.

2.2. DNA extraction and PCR amplification

Genomic DNA was extracted from each strain using an Instagene Matrix (Bio Rad, CA, USA). Partial 16S rRNA, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *ribC*, and *rpoB* genes were amplified by PCR. The specific primers used and the PCR conditions for 16S rRNA (Heller et al., 1997), *ftsZ* (Zeaiter et al., 2002b), *gltA* (Norman et al., 1995), *groEL* (Zeaiter et al., 2002a), *ribC* (Inoue et al., 2009a) and *rpoB* (Renesto et al., 2001) amplification were described previously.

2.3. DNA sequencing and phylogenetic analysis

The PCR products were purified using a Spin Column PCR Product Purification Kit (Bio Basic, Ontario, Canada) and were sequenced directly using specific sequencing primers for 16S rRNA (Heller et al., 1997), *ftsZ* (Zeaiter et al., 2002b), *gltA* (Norman et al., 1995), *groEL* (Zeaiter et al., 2002a), *ribC* (Inoue et al., 2009a) and *rpoB* (Renesto et al., 2001). All novel sequences were submitted to GenBank and accession numbers were obtained (Table 1).

The DNA sequence datasets of the six loci (16S rRNA, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *ribC*, and *rpoB*) of all of the *B. washoensis* strains and those of other known rodent-associated *Bartonella* spp., including *B. birtlesii* CIP106294^T (AF204274, AF467762, AF204272, AF355773, AY116632, and AB196425), *B. doshiae* NCTC12862^T (Z31351, AF467754, Z70017, AF014832,

AY116627, and AF165991), *B. elizabethae* ATCC49927^T (L01260, AF467760, Z70009, AF014834, AY116633, and AF165992), *B. grahamii* NCTC12860^T (Z31349, AF467753, Z70016, AF014833, AY166583, and AF165993), *B. phoceensis* CIP107707^T (AY515119, AY515135, AY515126, AY515129, AB298328, and AY515132), *B. rattimassiliensis* CIP107705^T (AY515120, AY515133, AY515124, AY515127, AB298327, and AY515130), *B. taylorii* CIP107028^T (Z31350, AF467756, Z70013, AF304017, AY116635, and AF165995), *B. tribocorum* CIP105476^T (AJ003070, AF467759, AJ005494, AF304018, AB292600, and AF165996), *B. vinsonii* subsp. *arupensis* ATCC700727^T (AF214558, AF467758, AF214557, AF304016, AY116631, and AY166582), and *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* ATCCVR-152^T (M73230, AF467757, Z70015, AF014835, AY116636, and AF165997), were aligned using Clustal X version 2.0 (Larkin et al., 2007) and were combined. The phylogenetic analyses were performed with the maximum likelihood method (ML), neighbor-joining method (NJ), and Bayesian analyses based on the concatenated sequences of the six loci. *Bartonella bacilliformis* ATCC35685^T (Z11683, AB292602, AB292601, AY664491, AJ236918, and AF165988) was chosen as an out-group reference in each analysis. The ML tree was constructed using PAUP* 4.0β10 (Swofford, 2002). The Tamura and Nei model (Tamura and Nei, 1993) with the assumption that some sites are invariable and others are variable following a discrete gamma distribution (TrN+I+Γ model) was selected for appropriate substitution model by Modeltest 3.7 (Posada and Crandall, 1998) based on hierarchical likelihood ratio tests (hLRT). Heuristic searches were executed using the tree-bisection-reconnection (TBR) branch-swapping algorithm for 10 random additions of taxa. Bootstrap analysis was carried out on 1000 replications of the heuristic search with the TBR branch-swapping algorithm (Felsenstein, 1985). The NJ tree (Saitou and Nei, 1987) was constructed with the Jukes-Cantor parameters model (Jukes and Cantor, 1969) using PAUP* 4.0β10. Bootstrap analysis was carried out on 1000 replications of the dataset. Bayesian inference was conducted using MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003). The General Time Reversible (GTR) model + I + Γ (Yang, 1994) was selected by MrModeltest 2.2 (Nylander, 2004) based on hLRT. Four chains of Markov Chain Monte Carlo algorithms were performed for 3,000,000 generations, sampled every 100 generations, and the first 25% (750,000 generations) of the trees were discarded as burn-in. The remaining generations were used to construct a 50% majority-rule consensus tree and to calculate posterior probabilities for each node in the Bayesian tree. In the ML and NJ trees, we consider nodes with >70% bootstrap as well supported (Hillis and Bull, 1993). In the Bayesian tree, only nodes with >95% posterior probabilities are considered significant.

3. Results

The 20 analyzed *B. washoensis* strains were classified into 8, 15, 16, 18, 18, and 17 genotypes for 16S rRNA, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *ribC*, and *rpoB*, respectively (Table 2). The sequence similarities between the examined strains and other known rodent-associated *Bartonella* spp. ranged 98.5–99.2% for 16S

Table 1
Origins of 20 *B. washoensis* strains used for MLSA and the Genbank accession numbers of six housekeeping genes.

Strain	Origin		GenBank accession nos.					
	Host animal	Geographical location	16S rRNA	<i>ftsZ</i>	<i>gltA</i>	<i>groEL</i>	<i>rflC</i>	<i>tpoB</i>
SB944nv	<i>Spermophilus beecheyi</i>	North America	AB292597	AB292598	AF470616	AF484066	AB292599	AB292596
RJ21-1	<i>Spermophilus richardsonii</i>	North America	AB519060	AB519067	AB444959	AB519081	AB519098	AB519115
RJ30-1			Identical to RJ21-1	Identical to RJ21-1	AB444955	AB519082	AB519099	AB519116
RJ33-1			Identical to RJ21-1	Identical to RJ21-1	AB444960	AB519083	AB519100	Identical to RJ30-1
CJ22-1	<i>Spermophilus columbianus</i>	North America	Identical to RJ21-1	AB519068	AB444956	AB519084	AB519101	AB519117
CJ23-2			Identical to RJ21-1	AB519069	AB444961	AB519085	AB519102	AB519118
CJ25-1			Identical to RJ21-1	AB519070	AB444957	AB519086	AB519103	AB519119
DR1-1	<i>Spermophilus dauricus</i>	China	AB519061	AB519071	AB444962	AB519087	AB519104	AB519120
DR3-1			AB519062	AB519072	Identical to DR1-1	AB519088	AB519105	AB519121
DR10-1			Identical to DR1-1	AB519073	Identical to DR1-1	AB519089	AB519106	Identical to DR3-1
SR22-1	<i>Tamias sibiricus</i>	China	AB519063	AB519074	AB444968	AB519090	AB519107	AB519122
SR24-1			AB519064	AB519075	AB444965	AB519091	AB519108	AB519123
SR25-1			AB519065	Identical to SR24-1	AB444964	AB519092	Identical to SR24-1	AB520713
AR2-2	<i>Tamiasciurus hudsonicus</i>	USA	Identical to RJ21-1	AB519076	AB444970	AB519093	AB519109	AB519124
AR4-1			Identical to RJ21-1	AB519077	AB444971	AB519094	AB519110	AB519125
AR15-2			Identical to RJ21-1	AB519078	Identical to AR4-1	AB519095	AB519111	AB519126
AM2-1	<i>Glaucomys volans</i>	USA	Identical to SB944nv	AB519079	AB444972	AB519096	AB519112	AB519127
AM5-1			Identical to SB944nv	Identical to AM2-1	Identical to AM2-1	Identical to AM2-1	AB519113	Identical to AM2-1
AM9-1			Identical to SB944nv	Identical to AM2-1	AB444973	Identical to AM2-1	Identical to AM5-1	AB519128
ER14-3	<i>Sciurus vulgaris orientis</i>	China	AB519066	AB519080	AB444974	AB519097	AB519114	AB519129

Table 2
Sequence similarity of six housekeeping genes and the concatenated sequence between 20 *B. washoensis* strains and known rodent-associated *Bartonella*.

Gene	Length (bp)	No. of genotype	Sequence similarity (%) by:	
			Inter-species of rodent-associated <i>Bartonella</i>	Intra-species of <i>B. washoensis</i>
16S rRNA	1350	8	98.5–99.2	99.2–100
<i>ftsZ</i>	788	15	88.1–93.3	93.8–100
<i>gltA</i>	328	16	86.3–93.3	91.2–100
<i>groEL</i>	1185	18	86.3–92.9	93.6–100
<i>ribC</i>	618	18	80.4–88.5	88.2–100
<i>rpoB</i>	825	17	87.3–91.2	92.4–100
Concatenated	5092	20	89.8–93.1	94.7–99.9

rRNA, 88.1–93.3% for *ftsZ*, 86.3–93.3% for *gltA*, 86.3–92.9% for *groEL*, 80.4–88.5% for *ribC*, and 87.3–91.2% for *rpoB*, respectively. The sequence similarities within examined strains of *B. washoensis* showed similarities ranging from 99.2–100% for 16S rRNA, 93.8–100% for *ftsZ*, 91.2–100% for *gltA*, 93.6–100% for *groEL*, 88.2–100% for *ribC*, and 92.4–100% for *rpoB*, respectively. The sequence similarities of the concatenated sequence (5092 bp) of the six loci between *B. washoensis* strains and other known rodent-associated

Bartonella spp. ranged from 89.8% to 93.1% and all 20 strains were individually discriminated in the range from 94.7% to 99.9% similarities (Table 2).

In the phylogenetic tree based on the concatenated sequences, similar tree topologies of 20 *B. washoensis* strains and other known rodent-associated *Bartonella* spp. were obtained by ML, NJ, and Bayesian analyses, respectively. All *B. washoensis* strains formed a large clade separated from other known rodent-associated *Bartonella*

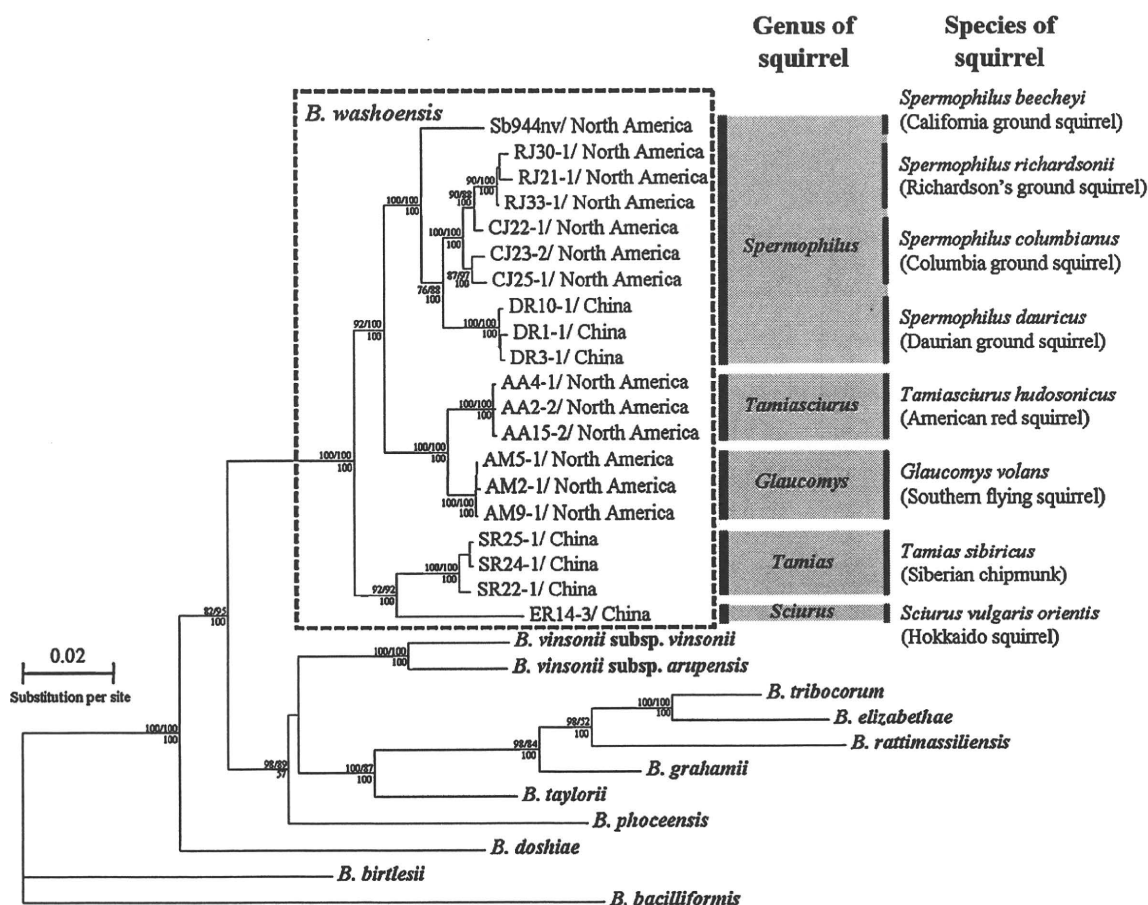


Fig. 1. The ML tree based on the aligned 5092 bp of concatenated sequence of six housekeeping genes, including 16S rRNA, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *ribC*, and *rpoB* from 20 *B. washoensis* strains and known rodent-associated *Bartonella* spp. For the *B. washoensis* strains examined in this study, the strain name followed by the country name from which it was derived was indicated. The *Bartonella bacilliformis* strain ATCC35685^T sequences were used as an out-group. Numbers above the branches indicate the bootstrap values (1000 replications) based on ML/NJ analyses and the numbers below branches are Bayesian posterior probabilities.

Table 3
Sequence similarity matrix based on the concatenated sequence of six housekeeping genes among 20 *B. washoensis* strains by squirrel genus.

Genus of squirrel (No. of strains)	Percent sequence similarity (No. of bp differences) with:			
	<i>Spermophilus</i>	<i>Tamiasciurus</i>	<i>Glaucomys</i>	<i>Tamias</i>
<i>Spermophilus</i> (n = 10)	97.1–99.8 (11–148) ^a			
<i>Tamiasciurus</i> (n = 3)	96.0–96.3 (186–204)	99.9 (6–7)		
<i>Glaucomys</i> (n = 3)	96.2–96.6 (175–195)	98.4 (80–83)	99.9 (3–6)	
<i>Tamias</i> (n = 3)	95.7–96.1 (199–221)	95.5–95.6 (223–229)	95.8–95.9 (211–214)	99.5–99.9 (6–26)
<i>Sciurus</i> (n = 1)	94.7–95.1 (248–269)	94.9–95.0 (256–260)	94.9–95.0 (255–258)	96.2 (192–194)

^a The percentage of sequence similarity in gray cells indicates the intra-species sequence similarity for the genus of squirrel.

spp. and the discrimination was supported with 100% bootstrap values (BV) in ML and NJ analyses and 100% Bayesian posterior probabilities (BPP), respectively (Fig. 1).

In the clade of *B. washoensis*, the strains formed five distinct clades that correlated with the genus of the host squirrel from which the strains were originally obtained, representing clades for *Spermophilus*, *Tamiasciurus*, *Glaucomys*, *Tamias*, and *Sciurus*. These discriminations were also supported by 100% BV in ML and NJ analyses and 100% BPP. Strain ER14-3, which was obtained from *Sciurus vulgaris orientis*, formed a large clade with those from *Tamias sibiricus* with 92% BV in ML and NJ analyses and 100% BPP. Strains from four species of *Spermophilus*, including *Sp. beecheyi*, *Sp. richardsonii*, *Sp. columbianus*, and *Sp. dauricus* consisted of a large clade. Although strain CJ22-1, which was obtained from *Sp. columbianus*, formed a clade with strains from *Sp. richardsonii*, most strains formed sub-clades with the relevant host squirrel species (Fig. 1).

The sequence similarity of the concatenated sequence of *B. washoensis* within the five genera ranged from 97.1–99.8% (*Spermophilus*) to 99.9% (*Glaucomys*) and the similarity of *B. washoensis* between the genera ranged from 94.9–95.0% (*Sciurus* vs. *Glaucomys*) to 98.4% (*Glaucomys* vs. *Tamiasciurus*) (Table 3).

B. washoensis strains except those from the genus *Spermophilus* were also classified by the clade of their host genus and geographic origins, i.e. *Tamiasciurus* and *Glaucomys* squirrels in North America and *Tamias* chipmunks and *Sciurus* squirrels in China. On the other hand, all of the strains derived from the genus *Spermophilus* formed a large clade, although the host animals of the genus *Spermophilus* originated from two different areas, i.e. North America and China (Fig. 1).

4. Discussion

To analyze the relationships between the genetic diversity of *B. washoensis* strains and host squirrels, MLSA with the 16S rRNA, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *ribC*, and *rpoB* genes were applied for 20 *B. washoensis* strains, which were isolated from five different genera of squirrels, including *Tamias*, *Tamiasciurus*, *Glaucomys*, *Sciurus*, and *Spermophilus*. These strains formed a large clade with *B. washoensis* strains nvh1 from a human patient in the phylogenetic tree analysis based on the *gltA* gene (Inoue et al., 2009b). However, the strains were not discriminated at the species level of the organisms by the sequence similarity of 16S rRNA, *gltA*, and *ribC* genes, because the similarities between *B. washoensis* strains and other known rodent-associated *Bartonella* spp.

showed higher than those within *B. washoensis* strains. On the other hand, the sequence similarities (89.8–93.1%) based on the concatenated sequence of six loci between *B. washoensis* strains and other known rodent-associated *Bartonella* spp. were significantly lower than those (94.7–99.9%) within *B. washoensis* strains examined. In addition, all 20 strains examined were discriminated by the concatenated sequence. These results suggest that multi-gene analyses have higher discrimination power and should be a useful tool for further epidemiological investigation of *B. washoensis*.

In the phylogenetic trees based on the analysis of the concatenated sequence, *B. washoensis* strains formed a large clade apart from any of the other known rodent-associated *Bartonella* spp. Interestingly, *B. washoensis* strains formed five distinct clades by the genus of squirrels, i.e. clades *Spermophilus*, *Tamiasciurus*, *Glaucomys*, *Tamias*, and *Sciurus*, supported by 92–100% BV in ML and NJ and 100% BPP, respectively. The similarities of the concatenated sequences among the genus of squirrels were individually discriminated within the range from 94.9% to 98.4%, suggesting that *B. washoensis* is classified by the genus of the host squirrels. Based on the trees, all strains except those from squirrels of the genus *Spermophilus* were also classified by geographic origin, as the geographic distribution of *Tamiasciurus hudsonicus* and *Glaucomys volans* is limited to North America and that of *Tamias sibiricus* and *Sciurus vulgaris orientis* is in Eurasia. These results suggest that *B. washoensis* may have co-specified with their host squirrels.

On the other hand, the clade of *Bartonella* strains obtained from *Spermophilus* species formed four sub-clades correspondent to squirrel species, including *Sp. beecheyi*, *Sp. richardsonii*, *Sp. columbianus*, and *Sp. dauricus*. The clades include the strains from two different continents, i.e. North America and Eurasia. This result may indicate that a phylogenetic relationship of *B. washoensis* strains obtained from the genus *Spermophilus* is mainly associated with the genus of squirrel hosts rather than with their geographic origins. Although most *B. washoensis* strains from the squirrels formed sub-clades by the species of squirrel, strain CJ22-1 from *Sp. columbianus* formed a clade with the strains from *Sp. richardsonii*. This result may explain that the habitat of *Sp. columbianus* and *Sp. richardsonii* are overlapped in North America (Nowak, 1999) and may be infected with related strains from common sources by some arthropod vectors.

In conclusion, MLSA based on the concatenated sequences of six genes is a useful tool for the discrimina-

tion of *B. washoensis* at the strain level. The strong host specificity of *B. washoensis* strains could allow to trace the source of *B. washoensis* infection in humans and animals by using MLSA.

Acknowledgements

This work was supported in part by a Grant for Strategic Research Base Development Program, international research on epidemiology of zoonoses and training for young researchers, from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, and also supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

References

- Bai, Y., Kosoy, M., Martin, A., Ray, C., Sheff, K., Chalcraft, L., Collinge, S.K., 2008. Characterization of *Bartonella* strains isolated from black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 1–5.
- Bown, K.J., Ellis, B.A., Birtles, R.J., Durden, L.A., Lello, J., Begon, M., Bennett, M., 2002. New world origins for haemoparasites infecting United Kingdom grey squirrels (*Sciurus carolinensis*) as revealed by phylogenetic analysis of bartonella infecting squirrel populations in England and the United States. *Epidemiol. Infect.* 129, 647–653.
- Chomel, B.B., Wey, A.C., Kasten, R.W., 2003. Isolation of *Bartonella washoensis* from a dog with mitral valve endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5327–5332.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Heller, R., Artois, M., Xemar, V., De Briel, D., Gehin, H., Jaulhac, B., Monteil, H., Piemont, Y., 1997. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1327–1331.
- Hillis, D.M., Bull, J.J., 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42, 182–192.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Inoue, K., Kabeya, H., Kosoy, M.Y., Bai, Y., Smirnov, G., McColl, D., Artsob, H., Maruyama, S., 2009. Evolutional and geographical relationships of *Bartonella grahamii* isolates from wild rodents by multi-locus sequencing analysis. *Microb. Ecol.* 57, 534–541.
- Inoue, K., Maruyama, S., Kabeya, H., Hagiya, K., Izumi, Y., Une, Y., Yoshikawa, Y., 2009. Exotic small mammals as potential reservoirs of zoonotic *Bartonella* spp. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 526–532.
- Jardine, C., Appleyard, G., Kosoy, M.Y., McColl, D., Chirino-Trejo, M., Wobeser, G., Leighton, F.A., 2005. Rodent-associated *Bartonella* in Saskatchewan, Canada. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5, 402–409.
- Jukes, T.H., Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro, H.N. (Ed.), *Mammalian Protein Metabolism*, vol. 3. Academic Press, New York, pp. 21–132.
- Kosoy, M., Murray, M., Gilmore Jr., R.D., Bai, Y., Gage, K.L., 2003. *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient. *J. Clin. Microbiol.* 41, 645–650.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Norman, A.F., Regnery, R., Jameson, P., Greene, C., Krause, D.C., 1995. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1797–1803.
- Nowak, R.M., 1999. *Walker's Mammals of the World*, 6th ed., vol. 2. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 1254–1258.
- Nylander, J.A.A., 2004. MrModeltest v2. Program Distributed by the Author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.
- Renesto, P., Gouvenet, J., Drancourt, M., Roux, V., Raoult, D., 2001. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *J. Clin. Microbiol.* 39, 430–437.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Swofford, D.L., 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526.
- Yang, Z., 1994. Estimating the pattern of nucleotide substitution. *J. Mol. Evol.* 39, 105–111.
- Zeaiter, Z., Fournier, P.E., Ogata, H., Raoult, D., 2002. Phylogenetic classification of *Bartonella* species by comparing *groEL* sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 165–171.
- Zeaiter, Z., Liang, Z., Raoult, D., 2002. Genetic classification and differentiation of *Bartonella* species based on comparison of partial *ftsZ* gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3641–3647.

侵入・不許可動物等に関する研究G

深瀬 徹／明治薬科大学
浦口 宏二／北海道立衛生研究所
井上 智／国立感染症研究所