

lishing such cultured cells. These examples are introduced below.

1) Isolation of a novel gamma-herpesvirus from a horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*

Horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*, is regarded as the natural host of SARS coronavirus. For this reason, we established cultured cell line originating from *Rhinolophus ferrumequinum*, BKT1, which was expected to be useful for isolation and analysis of the viruses originating in *Rhinolophus ferrumequinum*. During the passage culture of the adherent cells originating in the spleen of another *Rhinolophus ferrumequinum*, a cytopathic effect (CPE) was confirmed. Large viruses were found by observation with an electron microscope, and as a result of the genetical analysis using the Rapid Determination of Viral RNA (RDV) method developed by Mizutani et al. (the National Institute of Infectious Diseases) [21], the virus was identified as a novel gamma-herpesvirus. This virus was close to equine herpesvirus 2 carried by horses, which may be because of the close genetic relation between bats and horses (manuscript in preparation).

2) Isolation of a novel adenovirus from Japanese fruit bat, *Pteropus dasymallus yayeyamae*

Fruit bats are the natural hosts of such viruses as Ebola virus, Marburg virus, Nipah virus and Hendra virus. *Pteropus dasymallus yayeyamae* is the only species of fruit bats which inhabits in Japan and has not been designated as endangered species, thus is permitted to be captured. We succeeded in the establishment of the cultured cell, FBKT1, originating in *Pteropus dasymallus yayeyamae*. However, the virus was isolated during the passage culture of the spleen cells, as in the case of Horseshoe bat. As a result of identification, the isolated viruses were confirmed to be a novel adenovirus. The isolation of adenovirus from bats was reported for the first time [22].

3) Isolation of a novel beta-herpesvirus from a bent-winged bat, *Miniopterus fuliginosus*

We also succeeded in the establishment of cultured cells and isolation of a novel beta-herpesvirus from a bent-winged bat, *Miniopterus fuliginosus*. Because we had already found out the presence of adenovirus and herpesvirus in bats, we first tried to detect the both viruses using the consensus primers for adenovirus and that for herpesvirus. However, the isolated virus was PCR-negative, accordingly we next tried to identify the viruses using the above-mentioned RDV-method. As a result, they were identified as a novel beta-herpesvirus [23]. The virus existed in the spleen of 4% of the bats. The virus was detected in kidney, lung, liver and spleen, but not detected in intestines, trachea, urinary bladder and brain. The important point in this survey was that the virus could not be detected by the consensus primers which had been previously considered to be able to detect all kinds of herpesviruses. The similar result was acquired in analyzing

the virus originating in bats in the Philippines [24]. The results of analyses showed the importance of isolation of viruses and genetic identification, and indicated that overconfidence in consensus primers would be risky.

As mentioned above, we succeeded in isolation and identification of novel viruses originating from bats. The possibility may be low that these viruses will cause emerging infectious diseases. However, accumulated knowledge on such viruses infecting bats is anticipated to be useful at the time of outbreak of the emerging infectious diseases originating from bats in the future.

6. A Novel Rhabdovirus Transmittable to Wild boars, Deer, Cattle and Pigs

In the trial to isolate JEV from the serum of wild boars, CPE was recognized in the Vero cell. As a result of identification, rhabdovirus-like particles were found by observation with an electron microscope, and it was proven by the RDV method that the virus was the novel rhabdovirus. According to viral neutralization tests, it was found that more than 50% of wild boars in the area had been infected with the virus, and that there were some positive individuals in deer, cattle and pigs, although the number of individuals were few. The pathogenicity and the infectious cycle of this virus are still unknown, but attention may be needed for infection of humans with the virus, because it has the potential to be transmitted to many animals (manuscript in preparation).

The above finding is an example which indicates that unknown infectious diseases are secretly prevalent in wild animals in Japan. The possibility cannot be denied that new emerging infectious diseases will appear in Japan.

7. Infection of Raccoons with Highly-Pathogenic Avian Influenza Virus

In considering the intrusion route of the viruses to cause highly-pathogenic avian influenza (HPAI) brought from the Eurasian Continent by wild birds into poultry farms, we thought about the possibility of wild animals being the mediators. Focusing on raccoons, which were likely to prey on wild birds on the shore and intrude into poultry farms, we investigated whether or not they had antibodies against HPAI virus [25]. As a result of the survey, HPAI-positive raccoons were found in three prefectures out of four. And in two prefectures out of the three, there had been no report of the outbreak of HPAI so far. The findings of the survey indicate that wild birds infected with the HPAI virus would intrude into Japan with a considerably high frequency and raccoons would prey on them. It remains unknown whether or not these raccoons can become the source of infection with HPAI virus for livestock. However, through the survey on the situation of the antibody-prevalence of raccoons against HPAI virus, it has been made clear that more HPAI virus has intruded into Japan than we expected. According to a study abroad,

it was reported that red foxes which ate the birds infected with HPAI virus excreted the viruses later without showing the symptom of the disease [24]. Raccoons may show the same pattern as red foxes. Although our study focused on raccoons, it may be possible that other wild animals such as weasels, martens and rodents are infected with HPAI virus and that the virus intrudes into poultry farms via such wild animals.

Raccoons are invasive alien species which has recently intruded into Japan. Such alien species may become the natural host of viruses of new emerging infectious diseases, and trigger unexpected spread of such diseases. Especially in Japan, where no large carnivorous animal inhabits, humans are the only natural enemy of the alien species like raccoons. Accordingly, humans should take appropriate measures against the alien species.

The possibility of intrusion of wild animals into pig farms or poultry farms is still unknown. However, by preventing the intrusion of wild animals, we can prevent various kinds of infectious diseases, because wild animals may carry many viruses to cause infectious diseases.

8. Conclusions

We have introduced some viral infectious diseases in wild animals, but these are a tiny part of numerous viruses; there are still many other viruses including unknown ones. It is thought that the measures for wild animals against viral infectious diseases might be not necessary, but prevention of intrusion of wild animals into the breeding site of domestic animals is important. As for rare species of animals, some measures should be taken, because the number of such species can decrease drastically due to the infectious diseases. Humans should avoid approaching wild animals, although in Japan people have little awareness because rabies does not occur. In addition, raw meat of wild animals should not be eaten. The viral infectious diseases originating in wild animals may continue to break out in the future. Thus, it would be desirable to accumulate information on the viruses in wild animals, based on the principle of "One World, One Health."

Acknowledgements

The studies mentioned in this paper were conducted in cooperation with Drs. Tetsuya Mizutani, Koji Sakai and Noriyo Nagata at the National Institute of Infectious Diseases; Dr. Mayumi Yokoyama at the Wildlife Management Research Center, Hyogo Prefecture; Ms. Tomoka Tsuji at the Gifu University; Mr. Kazuo Suzuki at the Tanabe Natural Park Center; Drs. Hiroshi Sato, Masaru Okuda and Hiroyuki Iwata at Yamaguchi University; Dr. Taisuke Horimoto at the University of Tokyo; and Dr. Shunpei Watanabe at Kyushu University and others. And these studies were subsidized by the grant-in-aid for scientific researches of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science & Technology, and the grant for health science of the Ministry of Health, Labor and Welfare.

References:

- [1] T. Nabeshima, H. T. Loan, S. Inoue, M. Sumiyoshi, Y. Haruta, P. T. Nga, V. T. Huong, M. del Carmen Parquet, F. Hasebe, and K. Morita, "Evidence of frequent introductions of Japanese encephalitis virus from south-east Asia and continental east Asia to Japan," *J. of General Virology*, Vol.90, No.4, pp. 827-832, 2009.
- [2] T. Takasaki, T. Kotaki, I. Kurane, K. Sawabe, T. Lin, and M. Kobayashi, "Japanese encephalitis virus detected from wild boars, December 2008 and May 2009 - Hyogo," *Infectious Agents Surveillance Report*, Vol.30, pp. 156-157, 2009.
- [3] Y. Ohno, H. Sato, K. Suzuki, M. Yokoyama, S. Uni, T. Shibasaki, M. Sashika, H. Inokuma, K. Kai, and K. Maeda, "Detection of antibodies against Japanese encephalitis virus in raccoons, raccoon dogs and wild boars in Japan," *J. of Veterinary Medical Science*, Vol.71, No.8, pp. 1035-1039, 2009.
- [4] H. Shimoda, Y. Ohno, M. Mochizuki, M. Okuda, H. Iwata, and K. Maeda, "Dogs as sentinels for human infection with Japanese encephalitis virus," *Emerging Infectious Diseases*, Vol.16, No.7, pp. 1137-1139, 2010.
- [5] H. Shimoda, S. Tamaru, M. Morimoto, T. Hayashi, M. Shimojima, and K. Maeda, "Experimental infection of Japanese encephalitis virus in dogs," *J. of Veterinary Medical Science* (in press).
- [6] T. Kouda et al., in the 129th Annual Meeting of the Japanese Society of Veterinary Science, Tsukuba, 2000.
- [7] H. Y. A. Mahmoud, K. Suzuki, T. Tsuji, M. Yokoyama, M. Shimojima, and K. Maeda, "Pseudorabies virus infection in wild boars in Japan," *J. of Veterinary Medical Science* (in press).
- [8] Y. Furuse, A. Suzuki, and H. Oshitani, "Origin of measles virus: divergence from rinderpest virus between the 11th and 12th centuries," *Virology Journal*, Vol.7, No.52, 2010.
- [9] M. E. Roelke-Parker, L. Munson, C. Packer, R. Kock, S. Cleaveland, M. Carpenter, S. J. O'Brien, A. Pospischil, R. Hofmann-Lehmann, and H. Lutz, "A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*)," *Nature*, Vol.379, pp. 441-445, 1996.
- [10] United States Fish & Wildlife Service, "Endangered and threatened wildlife and plants; listing the San Miguel Island fox, Santa Rosa Island fox, Santa Cruz Island fox, and Santa Catalina Island fox as endangered," *Federal Register* Vol.69, pp. 10335-10353, 2004.
- [11] S. F. Timm, L. Munson, B. A. Summers, K. A. Terio, E. J. Dubovi, C. E. Rupprecht, S. Kapil, and D. K. Garcelon, "A suspected canine distemper epidemic as the cause of a catastrophic decline in Santa Catalina Island foxes (*Urocyon littoralis catalinae*)," *J. of Wildlife Disease*, Vol.45, pp. 333-343, 2009.
- [12] S. Morikawa, S. Fukushi, I. Kurane, K. Sakai, K. Ami, S. Yamada, H. Hasegawa, N. Nagata, T. Sata, S. Matsui, N. Okabe, and K. Nakajima, "Outbreak of deadly canine distemper virus infection among imported cynomolgus (crab-eating) monkeys," *Infectious Agents Surveillance Report*, Vol.29, p. 315, 2008.
- [13] Z. Sun, A. Li, H. Ye, Y. Shi, Z. Hu, and L. Zeng, "Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China," *Veterinary Microbiology*, Vol.141, pp. 372-378, 2010.
- [14] Y. Kameo[†], Y. Nagao[†], T. Nishio, H. Shimoda, H. Nakano, K. Suzuki, Y. Une, H. Sato, M. Shimojima, and K. Maeda, "Epizootic canine distemper virus infection among wild mammals," *Veterinary Microbiology*, Vol.154, pp. 222-229, 2012 ([†]equally contributed).
- [15] T. Watabe and M. Yoshizawa, "The outbreak of death frequent occurrence of the wild raccoon dog by canine distemper," *J. of Environment and Disease*, Vol.15, pp. 11-14, 2006.
- [16] M. Yoshizawa and T. Watabe, "The canine distemper outbreak situation of mammals in Kochi City and the outskirts," *Kagawa Seibutsu* Vol.34, pp. 63-67, 2007.
- [17] M. J. Appel, C. Reggiardo, B. A. Summers, S. Pearce-Kelling, C. J. Maré, T. H. Noon, R. E. Reed, J. N. Shively, and C. Örvell, "Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries)," *Archives of Virology*, Vol.119, pp. 147-152, 1991.
- [18] Y. Nagao, Y. Nishio, H. Shimoda, S. Tamaru, M. Shimojima, M. Goto, Y. Une, A. Sato, Y. Ikebe, and K. Maeda, "An outbreak of canine distemper virus in tigers (*Panthera tigris*): Possible transmission from wild animals to zoo animals," *J. of Veterinary Medical Science* (in press).
- [19] H. Nishihara, M. Hasegawa, and N. Okada, "Pegasoferae, an unexpected mammalian clade revealed by tracking ancient retroposon insertions," *Proc. of the National Academy of Sciences USA*, Vol.103, No.26, pp. 9929-9934, 2006.
- [20] T. Mizutani, D. Endoh, M. Okamoto, K. Shirato, H. Shimizu, M. Arita, S. Fukushi, M. Saijo, K. Sakai, C.K. Limn, M. Ito, R. Nerome, T. Takasaki, K. Ishii, T. Suzuki, I. Kurane, S. Morikawa, and H. Nishimura, "Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses," *Emerging Infectious Diseases*, Vol.13, pp. 322-324, 2007.
- [21] K. Maeda, E. Hondo, J. Terakawa, Y. Kiso, M. Nakaichi, D. Endoh, K. Sakai, S. Morikawa, and T. Mizutani, "Isolation of novel adenovirus from fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*)," *Emerging Infectious Diseases*, Vol.14, No.2, pp. 347-349, 2008.

- [22] S. Watanabe, K. Maeda, K. Suzuki, N. Ueda, K. Iha, S. Taniguchi, H. Shimoda, K. Kato, Y. Yoshikawa, S. Morikawa, I. Kurane, H. Akashi, and T. Mizutani, "Novel betaherpesvirus in bats," *Emerging Infectious Diseases*, Vol.16, No.6, pp. 986-988, 2010.
- [23] S. Watanabe, N. Ueda, K. Iha, J.S. Masangkay, H. Fujii, P. Alviola, T. Mizutani, K. Maeda, D. Yamane, A. Walid, K. Kato, S. Kyuwa, Y. Tohya, Y. Yoshikawa, and H. Akashi, "Detection of a new bat gammaherpesvirus in the Philippines," *Virus Genes*, Vol.39, No.1, pp. 90-93, 2009.
- [24] T. Horimoto, S. Murakami, M. Kiso, K. Iwatsuki-Horimoto, T. Ito, K. Suzuki, M. Yokoyama, K. Maeda, and Y. Kawaoka, "Serological Evidence of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection in feral raccoons in Japan," *Emerging Infectious Diseases*, Vol.17, No.4, pp. 714-717, 2011.
- [25] L. A. Reperant, G. van Amerongen, M. W. G. van de Bildt, G. F. Rimmelzwaan, A. P. Dobson, A. D. M. E. Osterhaus, and T. Kuiken, "Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) infection in red foxes fed infected bird carcasses," *Emerging Infectious Diseases*, Vol.14, No.2, pp. 1835-1841, 2008.



Name:
Hiroshi Shimoda

Affiliation:
D.V.M., Laboratory of Veterinary Microbiology,
Faculty of Agriculture, Yamaguchi University

Address:
1677-1 Yoshida, Yamaguchi 753-8515, Japan.

Brief Career:
2011- The United Graduate School of Veterinary Science, Yamaguchi University

Selected Publications:

- "Dogs as sentinels for human infection with Japanese encephalitis virus," *Emerging Infectious diseases*, Vol.16, pp. 1137-1139, July, 2010.
- "Experimental infection of Japanese encephalitis virus in dogs," *The Journal of Veterinary Medical Science*, Vol.73, pp. 1241-1242, September, 2011.

Academic Societies & Scientific Organizations:

- The Japanese Society of Veterinary Science (JSVS)



Name:
Yumiko Nagao

Affiliation:
D.V.M., Laboratory of Veterinary Microbiology,
Faculty of Agriculture, Yamaguchi University

Address:
1677-1 Yoshida, Yamaguchi 753-8515, Japan

Brief Career:
2011- The United Graduate School of Veterinary Science, Yamaguchi University

Selected Publications:

- "An outbreak of canine distemper virus in tigers (*Panthera tigris*): Possible transmission from wild animals to zoo animals," *Journal of Veterinary Medical Science* (in press).
- "Epizootic canine distemper virus infection among wild mammals," *Veterinary Microbiology*, Vol.154, pp. 222-229, 2012.

Academic Societies & Scientific Organizations:

- The Japanese Society of Veterinary Science (JSVS)



Name:
Masayuki Shimojima

Affiliation:
Associate Professor, Ph.D., D.V.M., Laboratory
of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture,
Yamaguchi University

Address:
1677-1 Yoshida, Yamaguchi 753-8515, Japan

Brief Career:
2005- The University of Tokyo
2010- Yamaguchi University

Selected Publications:

- "Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses," *J Virol.*, Vol.80, pp. 10109-10116, 2006.
- "Experimental infection of Japanese encephalitis virus in dogs," *The Journal of Veterinary Medical Science*, Vol.73, pp. 1241-1242, September, 2011.
- "Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus," *Science*, Vol.303, pp. 1192-1195, 2004.

Academic Societies & Scientific Organizations:

- The Japanese Society of Veterinary Science
- The Japanese Society for Virology



Name:
Ken Maeda

Affiliation:
Ph.D., D.V.M., Professor, Laboratory of Veterinary
Microbiology, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University

Address:
1677-1 Yoshida, Yamaguchi 753-8515, Japan

Brief Career:
1994- Research Fellow of Japan Science Promotion Society
1996- Associate Professor, Yamaguchi University
2009- Professor, Yamaguchi University

Selected Publications:

- "Highly pathogenic avian influenza virus infection in feral raccoons, Japan," *EID*, Vol.17, pp. 714-717, 2011.
- "Dogs as sentinels for human infection with Japanese encephalitis virus," *EID*, Vol.16, pp. 1137-1139, 2010.
- "Isolation of novel adenovirus from fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*)," *EID*, Vol.14, pp. 347-349, 2008.

Academic Societies & Scientific Organizations:

- The Japanese Society of Veterinary Science
- The Japanese Society for Virology
- The American Society for Microbiology

血液像所見が早期診断に有効であった *Capnocytophaga canimorsus* 敗血症の一症例

齋藤洋子¹⁾ 丹野大樹¹⁾ 吉田詠子¹⁾ 渡辺洋子¹⁾ 伊藤真弘¹⁾
菅野喜久子¹⁾ 田中京子¹⁾ 大花昇¹⁾ 三浦里織²⁾ 阿部良伸³⁾
山本夏男²⁾ 今福裕司¹⁾²⁾ 鈴木道雄⁴⁾ 今岡浩一⁴⁾ 金光敬二¹⁾²⁾

1) 福島県立医科大学附属病院 検査部

2) 福島県立医科大学 感染制御・臨床検査医学講座

3) 福島県立医科大学附属病院 救急科

4) 国立感染症研究所 獣医科学部第一室

要旨：発熱、倦怠感、めまいを主訴に近医を受診し加療中に敗血症性ショック状態となった患者が緊急搬送された。来院時の血小板数異常低値の確認のための末梢血液像標本において好中球内に細長い桿菌の貪食像がみられた。細菌はグラム陰性桿菌で、症状出現に至った経緯にイヌに咬まれたという背景があった。このことから、*Capnocytophaga canimorsus* 感染症が推測され、最終的に遺伝子学的検査から *Capnocytophaga canimorsus* による敗血症と診断された。血液像所見を臨床にいち早く報告したことが診断に有効であった症例を経験したので報告する。

Key word : *Capnocytophaga canimorsus* イヌ咬傷 末梢血液像 グラム染色
急性期 DIC ハイブリゼップ検査 16SrRNA 遺伝子特異的 PCR

はじめに

Capnocytophaga 属菌はグラム陰性の桿菌で、ヒト、イヌやネコの口腔内常在菌であり、8 菌種が知られている³⁾⁵⁾。これらのうち *Capnocytophaga canimorsus* (以下 *C. canimorsus* と略す) と *Capnocytophaga cynodegmi* (以下 *C. cynodegmi* と略す) はカタラーゼ、オキシダーゼともに陽性でありイヌやネコを宿主としている。近年、これらの動物による咬傷、搔傷から感染し、髄膜炎、播種性血管内凝固症候群 (DIC)、敗血症性ショックなどの重篤な症状を呈する感染症の事例が報告されている¹⁻⁶⁾。*C. canimorsus* による感染症は稀ではあるが、発症した場合には全身状態が急速に悪

化して敗血症性ショックや DIC にいたることが多く、致死率は 30% にも達している¹⁻⁶⁾。今回、我々は、DIC、敗血症性ショック状態となり救急搬送され *C. canimorsus* 敗血症と診断された一症例を経験した。

症例

59 歳 男性

既往歴：特記事項なし。生来健康。

現病歴：自宅で飼育していたイヌに右手背部を咬まれた。イヌは知人から譲り受けたばかりのもので予防接種を受けていたかどうかは不明であった。創部は軽傷であり、医療機関は受診せずに、自宅で処置をした

のみであった。受傷2日後から熱感を自覚するようになった。受傷3日後から全身倦怠感も出現したため、同日近医を受診した。受傷4日後に浮動感を自覚し、同院を再診した。受診時の収縮期血圧は60 mmHgであった。採血データでは、白血球数 4200/ μ l, 血小板数 6000/ μ l, BUN 43.8 mg/dl, Cr 2.97 mg/dl, PT-INR 1.26, FDP 33.2 μ g/ml であり、ショック、腎機能障害、DICと判断され抗菌薬等が投与された。その後当院救急センターに転院搬送となった。咬傷は3か所あり周囲および深部に炎症を示唆する所見はみられなかった(図1)。

来院時検査結果(表1)

生化学検査では、肝機能、腎機能項目のほとんどが基準範囲を上回った高値であり、CRPは43.93mg/dl、BNPは2250pg/ml、フェリチンも2758ng/mlとパニック値であった。血球算定では血小板数が5000/ μ lと極めて低値であった。白血球数は8600/ μ lでその分画では、好中球系優位で桿状核好中球が29%と多く、分葉核好中球27%、後骨髄球21%、骨髄球9%と左方移動を示していた。単球様異常細胞もみられていた。凝固検査では、APTT52.4秒と延長、フィブリノゲン510mg/dl、FDP28.9 μ g/ml、Dダイマー14.1 μ g/ml、TAT34.4ng/mlと高値であった。全身性細菌感染症のマーカーであるプロカルシトニン定性検査も強陽性であった。感染症とDICを強く示唆する検査結果であった。

来院時末梢血液像結果(図2)

末梢血液の塗抹標本を作成しメイ・ギムザ染色を行なった。好中球の細胞質内に細長

い桿状の細菌が多数みられた。好中球の約42%にみられた。自動血球計数器での自動分類では得られない所見であった。

また、空胞変性もあり、好中球以外にも細菌あるいは血球を貪食した異常な単球もみられた。細胞外(背景)に細菌はみられなかった。

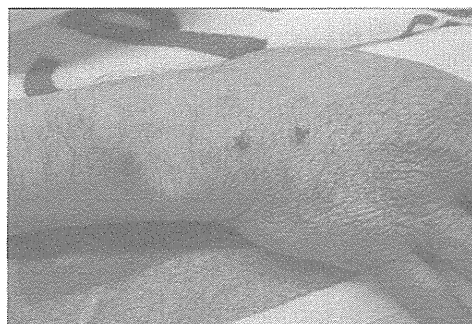
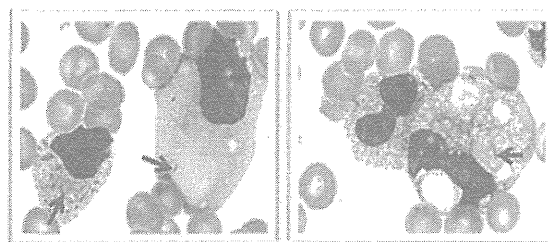


図1 右手背部の咬傷痕

表1

TP	5.7 g/dl	WBC	8.6 $\times 10^3$ / μ l	SEG	27 %
ALB	2.5 g/dl	RBC	3.60 $\times 10^6$ / μ l	BAND	29 %
AST	223 IU/L	HGB	12.8 g/dl	LY	6 %
ALT	74 IU/L	HCT	36.9 %	MO	3 %
LD	670 IU/L	MCV	102.5 fl	EO	0 %
ALP	941 IU/L	MCH	35.6 pg	BA	0 %
γ -GT	185 IU/L	MCHC	34.7 %	Myelo	9 %
TB	1.9 mg/dl	PLT	5 $\times 10^3$ / μ l	Meta	21 %
DB	1.0 mg/dl	RET	11.8 %	ATY-L	1 %
UN	52 mg/dl			MO様異常	4 %
CRE	3.28 mg/dl				
Ca	7.9 mg/dl	PT	69.6 %	FDP	28.9 μ g/ml
CK	259 IU/L	PT-INR	1.17	D-D	14.1 μ g/ml
AMY	38 IU/L	APTT	52.4 秒	TAT	34.4 ng/ml
CRP	43.93 mg/dl	FBG	510 mg/dl	PIC	0.69 μ g/ml
BNP	2250 pg/ml	AT	85 %		
Ft	2758 ng/ml				

プロカルシトニン(定性) 強陽性



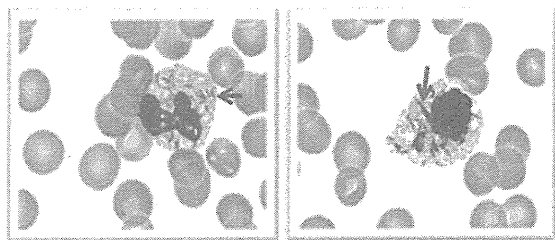


図2 血液像 (メイ・ギムザ染色)

来院時末梢血グラム染色結果 (図3)

細菌の確認のため、末梢血標本のグラム染色を行なった。グラム陰性の桿菌が好中球の細胞質内に認められた。

細菌学的検査結果

1. 血液培養

末梢血に細菌が認められたため、救急搬送当日に、血液培養が実施された。血液培養は自動血液培養装置バクテアラート (シスメックス) とその専用培養ボトルにより行なわれた。通常、血液培養は7日間観察されるが、期間を延長し10日間観察された。これは、*Capnocytophaga* 属菌を推測し臨床から期間の延長の依頼があったためである。*Capnocytophaga* 属菌は発育が遅いと言われている。結果は好気培養、嫌気培養ともに陰性であった。

2. ハイブリゼップ検査

コロニーからの原因菌の特定ができないため、ハイブリゼップ検査が行なわれた。ハイブリゼップ (扶桑薬品工業) は、*in situ* ハイブリゼーション (ISH) 法を原理とし、末梢血中の好中球やマクロファージに食食された細菌 DNA を検出するものである。好中球が細菌を食食するという機能に着目して開発されたもので、白血球に食食された細菌の DNA と特異的に反応するプローブ

を用いて感染症の原因菌を検出するものである。用いたプローブを表2に示す。

結果は11プローブすべてに陰性であった。該当する菌種が得られず敗血症の原因菌を特定することはできなかった。しかし、イヌによる咬傷、グラム陰性桿菌の出現、感染症による急性期 DIC 所見等々から、

Capnocytophaga canimorsus 敗血症が推測された。

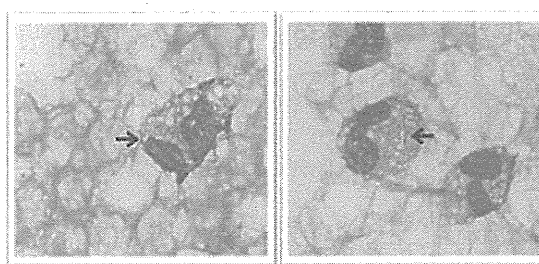


図3 末梢血 (グラム染色)

表2 用いたプローブ

SA	黄色ブドウ球菌の DNA と反応 <i>Staphylococcus aureus</i>
SE	表皮ブドウ球菌の DNA と反応 <i>Staphylococcus epidermidis</i>
PE	緑膿菌の DNA と反応 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EF	腸球菌の DNA と反応 <i>Enterococcus faecalis</i>
EK	大腸菌群の DNA と反応 <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
GB	主要な細菌少なくとも 54 菌種は確認済の DNA と反応
SP	肺炎球菌の DNA と反応 <i>Streptococcus pneumoniae</i>
BF	嫌気性菌の DNA と反応 <i>Bacteroides fragilis</i>

HI	インフルエンザ菌の DNA と反応 <i>Hemophilus influenza</i>
GC	主要な <i>Candida</i> 属 (真菌) の DNA と反応

CA	<i>Candida albicans</i> (真菌) の DNA と反応
----	--

3. 16S rRNA 遺伝子特異的 PCR (図 4)

Capnocytophaga canimorsus による感染を疑い、国立感染症研究所において遺伝子レベルの検索が行なわれた。患者検体として、来院時の全血、血液好気培養サンプル、血液嫌気培養サンプルを用い、対照として、*C.canimorsus* 標準株(ATCC35979)、と *C.cynodegmi* 標準株(ATCC49044)、合わせて5つの試料についてPCR検査を行なった。プライマーには、*Capnocytophaga* 属検出用1つ①、*C. canimorsus* 検出用2つ②④、*C. cynodegmi* 検出用2つ③⑤の合計5つを用いた。3種類の患者検体においては *C.canimorsus* 標準株と同様にプライマー①、②、④すなわち *Capnocytophaga* 属プ

ライマーと *C.canimorsus* 検出用プライマーの両者に明瞭な特異的バンドが得られた。しかし、*C.cynodegmi* 検出用のプライマーの一方③に、特異的バンドがみられた。*C.cynodegmi* 標準株は、プライマー③、⑤に特異的なバンドが得られた。*C. canimorsus* と *C. cynodegmi*、これら二の菌は、遺伝的に極めて近縁なため少しの変異で両方のプライマーに陽性になることがあり、患者検体にみられた菌は、*Capnocytophaga canimorsus* の変異株であろうと解析された。少なくとも動物由来の *Capnocytophaga* 属菌であろうことが極めて強く示唆される結果であった。

PCRの結果

(国立感染症研究所にて実施)

プライマー①: *Capnocytophaga canimorsus* 特異的プライマー
 プライマー②: *C. canimorsus* 特異的プライマー-1
 プライマー③: *C. canimorsus* 特異的プライマー-1
 プライマー④: *C. canimorsus* 特異的プライマー-2
 プライマー⑤: *C. canimorsus* 特異的プライマー-2



● *C. canimorsus* 標準株 (ATCC35979)

△ *C. cynodegmi* 標準株 (ATCC49044)

● 全血サンプル

● 血液好気培養サンプル

● 血液嫌気培養サンプル

図 4

さらに、塩基配列の検索がなされ *C. canimorsus* 標準株および過去に *C. canimorsus* と同定されているいくつかの菌との相同性が調べられた。標準株 (ATCC35979) との一致率は 97.8%

(1350/1381 塩基対一致)、国内の臨床分離株の一つである HP28003 とは 97.3% (1346/1383 塩基対一致)、国立感染症研究所での分離株 D-7 との一致率は 98.8%

(1364/1381 塩基対一致)であった(表 3)。この検査における菌種同定では、97%以上の相同性があれば、類縁関係があり、98.5%以上であれば同一菌種であると言ってよいと言われている。

今回の菌株は、一致率がやや低めで、厳密には *Capnocytophaga canimorsus* の定義

の範囲からは、やや外れ気味であるが変異株の一つと位置付けて妥当だろうと解析された。

臨床経過

当院に救急搬送時、体温 38.5 度以上、心拍数 100/分以上、 PaCO_2 25.5mmHg、白血球数 $8600/\mu\text{l}$ であるが幼若細胞の出現が 10% 以上であり SIRS (全身性炎症反応症候群) 診断基準をみたしていた。さらに血小板数 $5000/\mu\text{l}$ 、FDP 28.9 $\mu\text{g/ml}$ 、PT-INR 1.17 で急性期 DIC 診断基準をもみたす重篤な状態であった。入院後血圧の低下がみられ、ノルアドレナリン、塩酸ドパミンが投与され血圧は 100 台に保たれた。その後ノルアドレナリン中止となるが腎機能障害、さらに

肝機能障害みられネオファージェン投与が開始された。血圧 140 台になり塩酸ドパミン中止となる。血球貪食に対しステロイド投与開始。血小板数低値のため血小板輸血実施、抗生剤としてはメロペネム、γグロブリン、アンピシリン等が投与された。第 10 病日頃より血小板数上昇傾向、第 12 病日呼吸状態、循環状態安定し食事開始された。第 16 病日 CRP1.13mg/dl、白血球数 9200/ μ l と炎症反応低下、血小板数 312000/ μ l と急激に改善した。第 17 病日リハビリ目的に転院となった (図 5)。

表 3 *Capnocytophaga canimorsus* 標準株との一致率

<i>Capnocytophaga canimorsus</i> 標準株(ATCC35979)	97.8%
国内の臨床分離株 (HP28003) 兵庫県のネコ咬傷患者からの 分離株	97.3%

国立感染症研究所での分離株 (D-7)	98.8%
---------------------	-------

考察

Capnocytophaga 属菌は通性嫌気性グラム陰性桿菌で、ヒト、イヌやネコの口腔内に常在する。ヒトでは歯周病関連菌として日和見的に感染を起こすことが知られている¹⁾³⁾。中でも、*C. canimorsus* と *C. cynodegmi* はイヌやネコにのみ常在し、これらの動物による咬傷、搔傷により感染すると全身状態が急速に悪化し、敗血症に至る場合が多い。今回の症例においても、イヌによる咬傷があり、受傷 2 日後から症状が出現し、急激に悪化し敗血症性ショック状態となった。*C. canimorsus* 感染症の潜伏期間は 1~14 日、平均 7 日とされている。

Capnocytophaga 属菌の培養には、5~10%の炭酸ガスを必要とし、栄養要求が厳しく、発育が遅いため 4~5 日間は培養する必要がある。

臨床経過

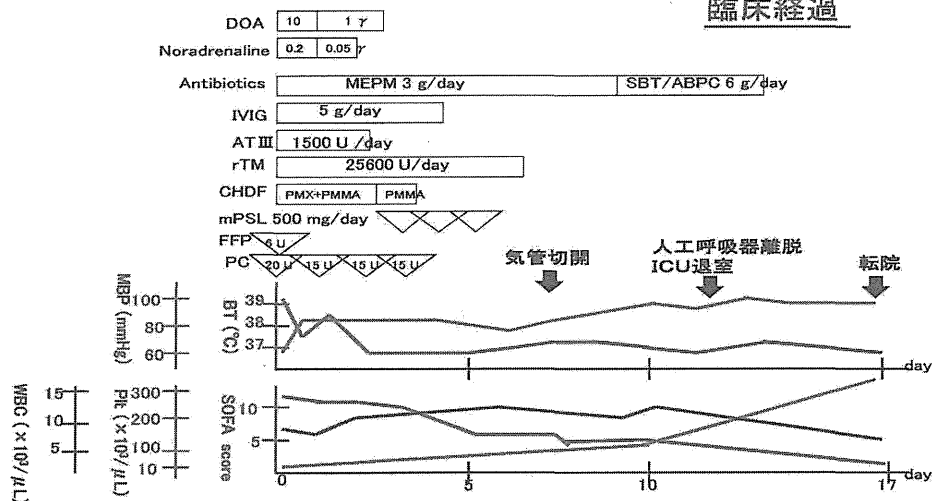


図 5 臨床経過

ある⁵⁾。本症例においては、前医においてショック、腎機能障害、DIC と診断され抗生剤メロペネム、γグロブリン等がすでに

投与されていた。そのためか、培養は陰性でコロニーは得られなかった。血液培養より検出率が良く、短時間 (約 8~9 時間の所

要時間)で行なえ、抗菌薬の影響も受けにくく、採血時に汚染された皮膚常在菌コンタミネーションの影響もないと言われているハイブリゼップ検査⁷⁾は陰性で、敗血症の原因菌を特定することはできなかった。

*C. canimorsus*敗血症は、国内でも2002年から2009年の間に14症例が報告されている¹⁾。また、今回の末梢血液像所見と同様に好中球でのグラム陰性桿菌の貪食像が報告されている²⁾。この像が本疾患に特異的であるとは言いきれないが診断には大変有用であった。本属菌が疑われた場合は、動物との接触歴や患者背景を念頭におきながら検査をすすめることが大切である³⁾。

*Capnocytophaga canimorsus*感染症は、免疫機能の低下した人にみられると思われていたが、特に基礎疾患のない若年者や壮年者にも、割合的には少ないが発症したという報告がある⁴⁾。ペットブームの中、感染の機会の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稀だが、

発症すると全身状態が急激に悪化し、敗血症にいたる場合が多く、発症の致死率は約30%と高い。早期の診断と治療が要求される疾患である。

まとめ

イヌに咬まれたことにより *C. canimorsus*敗血症を発症した症例を経験した。血液像での貪食像所見から敗血症を疑い検査結果を迅速に臨床へ提供したことが診断に有用であった。血液像の目視鏡検の重要性を痛感した一例であった。また、他部門との連携を図り総合的に検査をすすめること、臨床情報を知ることも検査には非常に大切であること等を再認識した。

(本内容は、第52回東北地区医学検査学会において発表した。)

文献

- 1) 鈴木道雄：話題の感染症 イヌ・ネコ咬傷・搔傷と *Capnocytophaga canimorsus* 感染症、モダンメディア、2010;56(4):71-77
- 2) 太田球磨、加澤敏広、津畑千佳子、鈴木道雄、今岡浩一： *Capnocytophaga canimorsus*による敗血症の1剖検例、感染症学雑誌、2009;83(6):661-664
- 3) 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、2010;59(10):1171-1175
- 4) 竹川啓史、江藤正明、崎園賢治、野上美由紀、小谷陽子、富永悦二、三木寛二、大楠清文：イヌ、ネコの咬傷・搔傷による *Capnocytophaga canimorsus*敗血症の4症例、医学検査、2011;60(3):205-208
- 5) 大楠清文：最近話題の細菌トップ12 ② *Capnocytophaga canimorsus*、Medical Technology、2011;39(8):836-842
- 6) 古谷明子、吉田里美、久保綾、山下麻衣子、伊達達章、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、2010;20(3):182-187
- 7) 三浦里織、大花昇、山本夏男、今福裕司

金光敬二：感染症診断における白血球中
細菌核酸同定検査ハイブリゼットの有用
性、臨床病理、2010;58(12). 1221-1229

**A New Loop-Mediated Isothermal
Amplification Method for Rapid, Simple,
and Sensitive Detection of *Leptospira* spp.
in Urine**

**Nobuo Koizumi, Chie Nakajima, Tsunehito Harunari,
Tsutomu Tanikawa, Toshihiro Tokiwa, Eriko Uchimura,
Tokujiro Furuya, Claro Niegos Mingala, Marvin Ardeza
Villanueva, Makoto Ohnishi and Yasuhiko Suzuki**

***J. Clin. Microbiol.* 2012, 50(6):2072. DOI:**

10.1128/JCM.00481-12.

Published Ahead of Print 14 March 2012.

Updated information and services can be found at:
<http://jcm.asm.org/content/50/6/2072>

These include:

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material

REFERENCES

This article cites 19 articles, 6 of which can be accessed free at:
<http://jcm.asm.org/content/50/6/2072#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new
articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Journals.ASM.org

A New Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid, Simple, and Sensitive Detection of *Leptospira* spp. in Urine

Nobuo Koizumi,^a Chie Nakajima,^b Tsunehito Harunari,^c Tsutomu Tanikawa,^c Toshihiro Tokiwa,^d Eriko Uchimura,^e Tokujiro Furuya,^f Claro Niegos Mingala,^g Marvin Ardeza Villanueva,^g Makoto Ohnishi,^a and Yasuhiko Suzuki^h

Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Disease, Tokyo, Japan^a; Division of Global Epidemiology, Hokkaido University Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido, Japan^b; Ikari Corporation, Chiba, Japan^c; Section of Environmental Parasitology, Graduate School of Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan^d; Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center, Kagoshima, Japan^e; Pfizer Japan Inc., Tokyo, Japan^f; and Animal Health Unit, Philippine Carabao Center National Headquarters and Genepool, Nueva Ecija, Philippines^g

We developed a new loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method to detect *rrs*, a 16S rRNA gene of pathogenic *Leptospira* spp. in urine. The method enables detection of two leptospiral cells per reaction mixture following boiling of urine specimens. The sensitivity of this method is higher than that of culture or of *flaB* nested PCR.

Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by infection with pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*. *Leptospira* spp. colonize the proximal renal tubules of maintenance hosts, natural carrier animals of a particular leptospiral serovar, and are excreted in the urine. Transmission of leptospirosis in humans and non-maintenance host animals occurs incidentally by exposure to water or soil contaminated by the urine of infected animals or by direct contact with infected animals. Leptospirosis is a significant public health problem in developing countries in the tropics, particularly Asia and Latin America (2, 11, 19). Its nonspecific and varied presentation in the early phase hampers clinical diagnosis and can lead to misdiagnosis as many other infectious diseases, including dengue fever or dengue hemorrhagic fever, malaria, and scrub typhus (9, 15, 20). Early diagnosis is essential because antibiotic treatment is most effective during the initial course of the disease (5, 21). Therefore, availability of a rapid and accurate point-of-care diagnostic test is required to identify leptospirosis; however, current diagnostic methods are not useful for early diagnosis (e.g., culture and microscopic agglutination test) or are not widely applicable in developing countries (e.g., PCR) (18).

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), unlike PCR, amplifies a target DNA sequence under isothermal conditions for approximately 1 h with high specificity and efficiency, and the results can be assessed with the naked eye (12). Thus, LAMP has potential applications as a diagnostic method in resource-limited countries. Two LAMP methods for leptospiral DNA detection have been published (10, 14). One method targets *lipL41* and detects leptospiral DNA by using purified DNA from mouse kidneys, but it has a detection limit of only 100 genome equivalents per reaction mixture (10). The other method comprises primers that target leptospiral *rrs*, a 16S rRNA gene (14). *rrs* LAMP and *lipL41* LAMP were evaluated using DNA samples extracted from sera of febrile patients. The results indicated that the specificity of *rrs* LAMP is lower than that of *lipL41* LAMP, and this hinders the clinical utility of *rrs* LAMP (14).

Leptospiral DNA has been detected by PCR during the chronic phase in urine of carrier animals and during the early phase in patients with leptospirosis (1, 3, 6, 13). Because urine collection is easy and less invasive than blood collection, we attempted to establish a new LAMP method, Lepto-*rrs* LAMP, which uses simplified sample processing to detect leptospiral DNA in urine.

Lepto-*rrs* LAMP primers were designed using Primer-

Explorer V4 software (<https://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>) and manually modified (see the methods described as well as Fig. S1 in the supplemental material). The reaction mixture (25 μ l) for the Lepto-*rrs* LAMP contained 1.6 μ M each primer (FIP, 5'-TAGTTTCAAGTGCAGGCTGCGAGGCGGACATGTAAGTCAGG-3'; BIP, 5'-GGAGTTTGGGAGAGGCAAGTGGGCCACTGGTGTTCCTCCA-3'; LF, 5'-GTTGAGCCCGCAGTTTTTCAC-3'; LB, 5'-AATTCCAGGTGTAGCGGTGA-3') and 0.2 μ M other primers (F3, 5'-TCATTGGGCGTA AAGGGTG-3'; B3, 5'-AGTTTATAGCCAGCAAGTCG-3'), in addition to 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 8 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20, 0.8 M betaine, 0.72 mM each deoxynucleotide triphosphate, 1 μ l of a fluorescent detection reagent (Eiken Chemical Company, Tochigi, Japan), 8 U of *Bst* DNA polymerase (Lucigen, Middleton, WI), and 2 μ l of DNA template. DNA templates were heated to 95°C for 2 min, followed by rapid cooling on ice before addition to the LAMP reaction mixture. LAMP reactions were performed at 65°C for 60 min, followed by termination at 95°C for 5 min using the GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Positive and negative results were distinguished by UV fluorescence (17). The Lepto-*rrs* LAMP primer set amplified the target sequences of all 14 pathogenic and intermediate *Leptospira* spp. (4). Conversely, none of the sequences of the six nonpathogenic *Leptospira* spp. or other bacterial species was amplified, even when 5 ng of purified DNA (10⁶ genome equivalents) was used in each reaction mixture (Table 1). The lower detection limit when using purified DNA was determined to be 2 genome equivalents per reaction mixture under heat-denaturing conditions (see Fig. S2 in the supplemental

Received 21 February 2012. Returned for modification 2 March 2012.

Accepted 6 March 2012.

Published ahead of print 14 March 2012.

Address correspondence to Nobuo Koizumi, nkoizumi@nih.go.jp.

N.K. and C.N. contributed equally to this study.

Supplemental material for this article may be found at <http://jcm.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00481-12

TABLE 1 Bacteria used to determine the specificity of Lepto-*rrs* LAMP

Species (DNA group ^a)	Serovar	Strain
<i>L. alexanderi</i> (P)	Yunnan	A 10
<i>L. alstonii</i> (P)	Pinchang	80-412
<i>L. borgpetersenii</i> (P)	Javanica	Veldrat Batavis 46
<i>L. borgpetersenii</i> (P)	Sejroe	M 84
<i>L. interrogans</i> (P)	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i> (P)	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i> (P)	Copenhageni	Fiocruz L1-130
<i>L. kirschneri</i> (P)	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. kirschneri</i> (P)	Cynopteri	3522 C
<i>L. kmetyi</i> (P)	Malaysia	Bejo-Iso
<i>L. noguchii</i> (P)	Panama	CZ 214
<i>L. santarosai</i> (P)	Shermani	1342 K
<i>L. weilii</i> (P)	Celledoni	Celledoni
<i>L. broomii</i> (I)	Undesignated	5399
<i>L. fainei</i> (I)	Hurstbridge	BUT 6
<i>L. inadai</i> (I)	Lyme	10
<i>L. licerasiae</i> (I)	Varillal	VAR 010
<i>L. wolffii</i> (I)	Korat	Korat-H2
<i>L. biflexa</i> (NP)	Patoc	Patoc I
<i>L. meyeri</i> (NP)	Semarang	Veldrat Semarang 173
<i>L. terpestrae</i> (NP)	Hualin	LT 11-33
<i>L. vanthielii</i> (NP)	Holland	Waz Holland
<i>L. wolbachii</i> (NP)	Codice	CDC
<i>L. yanagawae</i> (NP)	Saopaulo	Sao Paulo
<i>Borrelia burgdorferi</i>		B31
<i>Legionella pneumophila</i>		Clinical isolate
<i>Leptonema illini</i>		3055
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		Clinical isolate
<i>Staphylococcus aureus</i>		Clinical isolate
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		Clinical isolate
<i>Turneriella parva</i>		H
Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>		Clinical isolate
<i>Vibrio cholerae</i>		Clinical isolate

^a P, pathogenic species; I, intermediate species; NP, nonpathogenic species (as per 16S rRNA gene sequence analysis).

material) and 10 genome equivalents per reaction mixture under nondenaturing conditions (data not shown).

For the spiking assay, 1×10^8 *L. interrogans* serovar Pomona (strain Pomona) and *L. fainei* serovar Hurstbridge (strain BUT 6) cells, which were enumerated using a counting chamber of 0.010-mm depth (Nitirin, Tokyo, Japan) under dark-field microscopy, were centrifuged ($4,000 \times g$, 15 min), resuspended in 1 ml of urine obtained from a healthy man, and then serially diluted 10-fold. The diluted samples were boiled for 10 min, and the supernatant was used as a template for Lepto-*rrs* LAMP. Positive results

were obtained in samples of up to 10^3 cells/ml, indicating that the lower detection limit was 2 leptospiral cells per reaction mixture.

LAMP was then applied to detect leptospiral DNA from urine of carrier animals. First, Lepto-*rrs* LAMP and *flaB* nested PCR were performed using urine samples from Norway rats (*Rattus norvegicus*), whose kidney tissues were then cultured. The Norway rats were captured using live traps or sticky traps for vermin control in Tokyo. Voided urine was collected, following which the kidneys were excised under anesthesia and cultured in liquid modified Korthof's medium with 10% rabbit serum at 30°C, as described previously (7). The urine samples were processed using two procedures. In the first procedure, 20 μ l of the urine sample was boiled for 10 min (boiled urine sample), whereas in the second procedure, 50 to 800 μ l of the urine sample was centrifuged ($16,000 \times g$, 10 min) and the resulting pellet was resuspended in 20 μ l of 10 mM Tris-1 mM EDTA (TE; pH 8.0) and then boiled (urine pellet samples). The supernatant of the boiled sample was used as a template for Lepto-*rrs* LAMP and *flaB* nested PCR. *flaB* nested PCR was performed using previously described primers and conditions (8) with minor modifications: the reaction volume was 20 μ l and contained 2 μ l and 1 μ l of the DNA template in the first and second PCRs, respectively. Lepto-*rrs* LAMP detected leptospiral DNA in 11 of 12 culture-positive boiled urine samples and 10 of 11 culture-positive urine pellet samples. These results were superior to those of the *flaB* nested PCR (Table 2). Intermittent excretion as well as a variable number of leptospores in urine have been demonstrated in carrier animals (13, 16), which may contribute to the failure of *rrs* detection using the LAMP method in culture-positive urine samples. Thus, repetition of nucleic acid amplification tests is recommended when urine samples are used. In addition, it is also advisable to immediately process collected urine (preferably within 2 h) or make it alkaline, because survival of leptospores in voided acid urine is limited (5, 21). Lepto-*rrs* LAMP detected leptospiral DNA in two culture-negative samples. DNA sequencing of each product revealed that these sequences belonged to pathogenic *Leptospira* spp. (data not shown). It is generally accepted that culturing of leptospores is difficult and has low sensitivity (2). Furthermore, as shown in our previous study (7), Norway rats in Tokyo carry an extremely fastidious *L. interrogans* strain (*flaB* sequence type; see RnTKD-2 and RatST3 in Fig. S3 of the supplemental material). These facts strongly suggest that the sensitivity of Lepto-*rrs* LAMP is higher than that of culture, and its specificity is also higher than that obtained in this study (66.7% compared with that of culture, which is regarded as the gold standard).

Next, Lepto-*rrs* LAMP and *flaB* nested PCR were performed using urine samples from field rats captured in Tokyo (different

TABLE 2 Comparison of results from Lepto-*rrs* LAMP and *flaB* nested PCR using urine samples from Norway rats and cultures of Norway rat kidney tissues

Culture result	Boiled urine ^a (n = 18)				Urine pellet ^b (n = 16 ^c)			
	Lepto- <i>rrs</i> LAMP		<i>flaB</i> nested PCR		Lepto- <i>rrs</i> LAMP		<i>flaB</i> nested PCR	
	No. positive	No. negative	No. positive	No. negative	No. positive	No. negative	No. positive	No. negative
Positive	11	1	6	6	10	1	9	2
Negative	2	4	0	6	2	3	1	4

^a Each urine sample (20 μ l) was boiled for 10 min, and 2 μ l of the boiled urine sample was then used as the template.

^b Urine samples were centrifuged ($16,000 \times g$, 10 min), the resulting pellets were resuspended in 20 μ l TE, boiled for 10 min, and 2 μ l of the boiled urine sample was then used as the template.

^c The volumes of 2 of the 18 urine samples were sufficient only for preparation of boiled urine samples.

TABLE 3 Detection of leptospiral DNA in urine samples from field rats and from farmed pigs and buffaloes using *Lepto-rrs* LAMP and *flaB* nested PCR

Test method	Norway rats (Japan) ^a (n = 16)		Pigs (Japan) (n = 29)		Buffaloes (Philippines) (n = 51)	
	Boiled urine ^b	Urine pellet ^c	Boiled urine	Urine pellet	Boiled urine	Urine pellet
<i>Lepto-rrs</i> LAMP	10	13	0	5	0	10
<i>flaB</i> nested PCR	0	8	0	5	0	2

^a Country names in parentheses indicate the place where the urine samples were collected.

^b Each urine sample (20 μ l) was boiled for 10 min, and 2 μ l of the boiled urine sample was then used as the template.

^c Urine samples were centrifuged (16,000 \times g, 10 min), the resulting pellets were resuspended in 20 μ l TE, boiled for 10 min, and 2 μ l of the boiled urine sample was then used as the template.

individuals from those in Table 2) and farmed pigs and buffaloes, which appeared healthy and had never been identified as carriers (Table 3). Urine samples (150 μ l to 1.9 ml from rats, 2.0 ml from pigs, and 1.5 to 2.0 ml from buffaloes) were processed as described above. The numbers of positive samples detected by *Lepto-rrs* LAMP in boiled urine and urine pellets from rats and urine pellet samples from buffaloes were higher than that detected by *flaB* nested PCR. All the urine samples from pigs and boiled urine samples from buffaloes were found to be negative by both the methods. All the positive samples identified by *Lepto-rrs* LAMP were sequenced and found to belong to pathogenic *Leptospira* spp. (data not shown). All the negative samples identified by *Lepto-rrs* LAMP were also found to be negative by *flaB* nested PCR (data not shown). Based on *flaB* sequences, the *Leptospira* spp. identified in this study were *L. interrogans* and *L. borgpetersenii* (see Fig. S3 in the supplemental material).

We succeeded in detecting leptospiral DNA in carrier animals by using *Lepto-rrs* LAMP. In incidental infections, significant leptospiuria is infrequent at the early stage and is assumed to start during the second week of illness (5). Moreover, the *Leptospira* type (species and/or serovar) and infection dose influence the clinical outcome, which may result in excretion of varied numbers of leptospires in urine. However, leptospiral DNA has been detected by PCR in urine samples collected from patients in the acute phase with a higher sensitivity than that in blood samples (1, 3, 6). Although further clinical validation is required, we also detected leptospiral *rrs* in urine from humans and dogs with acute leptospirosis (data not shown), indicating the applicability of *Lepto-rrs* LAMP for early diagnosis of leptospirosis.

In conclusion, we developed a new LAMP method, *Lepto-rrs* LAMP, which utilizes a simple DNA preparation step, to detect pathogenic *Leptospira* spp. in urine. In contrast to previously developed LAMP methods that use purified DNA samples from kidney tissues or sera (10, 14), this method can amplify the target DNA without DNA purification; boiled urine or urine pellet samples are sufficient to prepare the DNA template. This LAMP method also demonstrated a better detection sensitivity limit (2 genome equivalents per reaction mixture) than those demonstrated by previous methods, i.e., 100 genome equivalents per reaction mixture (10) and 10 genome equivalents per reaction mixture (14). In addition, this method is faster than *flaB* nested PCR and more sensitive for testing clinical samples. Moreover, *Lepto-*

rrs LAMP guarantees high performance at a low cost. It has the potential to be used not only as a screening test for epidemiological studies and management and control of farmed animals but also as a point-of-care test for diagnose of acute leptospirosis in resource-limited settings where leptospirosis is endemic.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Y. Fukushima, M. Muto, N. S. Abes, and C. A. Gutierrez for their technical assistance.

This work was supported in part by a grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (MEXT) for the Joint Research Program of the Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, a Health Sciences Research Grant-in-Aid for Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (H21-Shinkou-Ippan-004) from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan to N.K., and the Japan Initiative for Global Research Network on Infectious Diseases (J-GRID) and the Global Center of Excellence (GCOE) Program from MEXT to Y.S.

REFERENCES

- Bal AE, et al. 1994. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 32:1894–1898.
- Bharti AR, et al. 2003. Leptospirosis a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* 3:57–71.
- Brown PD, et al. 1995. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J. Med. Microbiol.* 43:110–114.
- Cerqueira GM, Picardeau M. 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect. Genet. Evol.* 9:760–768.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis, 2nd ed. MediSci, Melbourne, Australia.
- Fonseca CA, et al. 2006. *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. *J. Infect.* 52:15–22.
- Koizumi N, et al. 2009. Human leptospirosis cases and prevalence of rats harboring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan. *J. Med. Microbiol.* 58:1227–1230.
- Koizumi N, et al. 2008. Investigation of reservoir animals of *Leptospira* in the northern part of Miyazaki Prefecture. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61:465–468.
- LaRocque RC, et al. 2005. Leptospirosis during dengue outbreak, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* 11:766–769.
- Lin X, Chen Y, Lu Y, Yan J, Yan J. 2009. Application of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of pathogenic *Leptospira*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 63:237–242.
- McBride AJL, Athanzio DA, Reis MG, Ko AI. 2005. Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 18:376–386.
- Mori Y, Notomi T. 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.* 15:62–69.
- Rojas P, et al. 2010. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29:1305–1309.
- Sonthayanon P, et al. 2011. Accuracy of loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of human leptospirosis in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84:614–620.
- Suputtamongkol Y, et al. 2004. An open, randomized, controlled trial of penicillin, doxycycline, and cefotaxime for patients with severe leptospirosis. *Clin. Infect. Dis.* 39:1417–1424.
- Thiermann AB. 1982. Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup. *Am. J. Vet. Res.* 43:780–784.
- Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.* 3:877–882.
- Toyokawa T, Ohnishi M, Koizumi N. 2011. Diagnosis of acute leptospirosis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 9:111–121.
- Victoriano AFB, et al. 2009. Leptospirosis in the Asia Pacific region. *BMC Infect. Dis.* 9:147. doi:10.1186/1471-2334-9-147.
- Wongsrichanalai C, et al. 2003. Co-infection with malaria and leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68:583–585.
- World Health Organization. 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance, and control. WHO, Geneva, Switzerland.

カプノサイトファーガ・カニモルサス 感染症

いまおか こういち
 今岡 浩一*

すすき みちお
 鈴木 道雄*

要旨

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、イヌ・ネコ咬搔傷により感染する。世界でも報告は300例ほどとまれではあるが、その大半が敗血症や髄膜炎といった重症例であるため、死亡率は約30%におよんでいる。基礎疾患をもつ者だけでなく、健常者でも感染・発症している。ただ、年齢構成は男女ともに40歳代以上に多く、小児での報告は少ないことから、加齢が重要なリスク因子の一つと考えられる。また、男女比は3:1と男性が多い。筆者らの調査ではイヌの74%、ネコの57%と大半が保菌していたが、本疾患の認知度はまだまだ低く、報告されていない軽症者を含めた実感染者数はもっと多いと思われる。

はじめに

日本では、約1,200万頭のイヌと1,000万匹のネコが飼育されているといわれている¹⁾。米国では日本の約5倍(約6,000万匹)のイヌが飼われているが、年間470万人がイヌに咬まれ、80万人が医療機関を受診し、6,000人が入院するという報告がある²⁾。日本では、環境省によると、年間咬傷事故は6,300件ほどとなっているが、報告されていない事故もあるので、実際はより多くの咬傷事故が発生していることに疑いの余地はない。事実、筆者らの実施した20歳以上を対象とした50,000人規模のインターネットアンケート調査では、全体の34.2%が過去5年以内にイヌやネコを飼育しており、全体の28%(13,983名)がイヌ・ネコ咬搔傷を経験し、3.52%(1,761名)が発熱、倦怠感、患部の腫脹など何らかの症状を示していた³⁾⁴⁾。米国の調査では、イヌに咬まれる人の半数は子ども

(14歳以下)で、とくに5~9歳の男児が多い。日本でもイヌ咬傷は男児が多いが、ネコ咬搔傷については、20~40歳代の女性が多いとされる。受傷部位は、年齢が低くなるほど、頭・首をかまれる割合が高く、年齢が上がるとともに四肢(手足)の割合が高くなる²⁾。

イヌ・ネコは他の愛玩動物に比べてつきあいの歴史が古く、飼育上の問題もあまりないように考えられがちだが、実は多くのイヌ・ネコ由来感染症が知られている(表1)。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症するといわれている⁵⁾。もちろん、咬傷動物やヒトの皮膚に常在するブドウ球菌やレンサ球菌などによることが多いが、それ以外に、イヌ・ネコの口腔内常在菌であるパスツレラ菌、ネコが保菌するバルトネラ菌がよく知られている。その他、フソバクテリア、破傷風菌など嫌気性菌に対する注意も必要とされている(表1)^{4)~7)}。本稿で取り上げるカプノサイトファーガ・カニモルサス(*Capnocytophaga canimorsus*)も、イヌ・ネコ

* 国立感染症研究所獣医科学部
 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

表1 イヌ・ネコ由来感染症

細菌	パスツレラ, バルトネラ, レプトスピラ, カプトサイトファーガ, イヌブルセラ, ブドウ球菌, レンサ球菌, フソバクテリア, バクテロイデス, サルモネラ, エルシニア, 破傷風菌
ウイルス	狂犬病 (日本にはない)
リケッチア	コクシエラ
原虫	トキソプラズマ, ジアルジア
寄生虫	(内部) エキノコックス, 回虫, イヌ糸状虫, ウリザネ条虫, 東洋眼虫 (外部) ノミ, ダニ
真菌	皮膚糸状菌

咬搔傷により感染するイヌ・ネコ口腔内常在菌の一つである。

I Capnocytophaga 属菌とイヌ・ネコの保菌状況

Capnocytophaga 属菌はヒトや動物の口腔内、とくに歯根部に常在する通性嫌気性、グラム陰性桿菌で、現在 8 菌種が知られている (表 2)⁸⁾。Capnocytophaga の Capno は capnophilic (CO₂ 要求性) に由来し、1979 年に属として独立した⁹⁾。特徴には、二酸化炭素要求性のほか、鞭毛をもたないが寒天培地上では滑走能を示し、栄養要求が厳しく増殖が遅いことがあげられる。C. sputigena をはじめとする 6 菌種は、ヒトの口腔内常在菌であり歯周病に関連するとされるが、まれに日和見的に、誤嚥や歯の治療後に自家感染を起こし、電撃性紫斑病、心内膜炎、敗血症など重篤な全身症状をもたらすことがある。

イヌ・ネコでは C. canimorsus, C. cynodegmi の 2 菌種が知られている¹⁰⁾。C. canimorsus は 1976 年に米国でイヌ咬傷後に髄膜炎・敗血症を発症した患者から分離された菌として最初に報告された¹¹⁾。しかし、米国 CDC にはそれ以前から CDC group DF (dysgonic fermenter)-2 として同種の菌が収集されており、その後、敗血症患者由来の DF-2 とイヌ咬傷の関連が次々と明らかになっていった。したがって、

C. canimorsus 感染症は、近年新しく興った感染症ではなく、ヒトがイヌ・ネコとつきあい始めた太古の昔から存在していた感染症であると考えられる。1989 年に、DF-2 は C. canimorsus, DF-2 like は C. cynodegmi とそれぞれ命名された¹⁰⁾。どちらもヒトに対して病原性もつが、敗血症などの全身症状を呈する重症例のほとんどは C. canimorsus 感染によるものである。

筆者らが首都圏の動物愛護センターに収容されたイヌ (n=325)・ネコ (n=115) を対象に行った調査では、イヌ 74%, ネコ 57% が C. canimorsus を口腔内に保菌していた¹²⁾¹³⁾。動物間では、互いに接触することにより保菌すると考えられるが、保菌率に性差、年齢差、犬種差はみられなかった。ただ、他の機関の調査ではイヌの 90% 以上から検出したとの報告もあり、公衆衛生上のリスクを考える上では、すべてのイヌが C. canimorsus を保菌していると考えておくほうがよいと思われる。

II 症状と患者発生状況

たとえば、イヌ咬傷に伴う感染症で代表的なパスツレラ症は受傷・感染部位が早期に強く腫脹するケースが多い。ネコ搔傷では、猫ひっかき病が重要であるが、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、倦怠感などから、急激に敗血症や髄膜炎に進展し、さらに播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation: DIC) や敗血症性ショック、多臓器不全へと増悪すると生命にかかわることになる。髄膜炎を発症する場合もあるが、こちらのほうが予後はよいようである。また、ひっかき傷や咬傷部が小さい場合は、傷口がすでに治癒している場合もあり、イヌ・ネコ咬搔傷との関連がわかりにくいことがある^{8)14)~17)}。C. canimorsus は、主にイヌ・ネコに

表2 *Capnocytophaga* 属菌の自然宿主, 性状, 病原性

グラム陰性桿菌

滑走性 (+), 鞭毛を欠く

菌種名	自然宿主	病原性	カタラーゼ・オキシダーゼ
<i>C. ochracea</i> <i>C. gingivalis</i> <i>C. sputigena</i> <i>C. haemolytica</i> <i>C. granulosa</i> <i>C. leadbetteri</i>	ヒト	歯周病に関連? まれに自家感染による心内膜炎・敗血症など	どちらも陰性
<i>C. canimorsus</i> <i>C. cynodegmi</i>	イヌ・ネコ	まれに敗血症, DIC など重篤な症状 まれに局所感染	どちらも陽性

咬搔傷を受けた部位から感染する。ただ、その他、皮膚・粘膜の傷をなめられることや食事中の箸の共用によると思われる症例、また、動物との濃厚な接触歴がはっきりしない症例もあることから、感染の機会には咬搔傷のみに限らない^{14)~17)}。

文献的には、1976年の最初の症例報告¹¹⁾以降、世界では約300例が報告されている^{4)8)14)~18)}。まれではあるが、これらはいわゆる臨床的に報告に値すると判断された重症例であり、敗血症・敗血症性ショックが約半数、その他、髄膜炎、電撃性紫斑病など全身症状を示す患者で占められ、死亡率も30%に上っている。ただ、報告されていない多くの軽症者や原因不明の敗血症とされているものもあると考えられ、実際の患者数はもっと多く、かえって死亡率はそれほど高くはないと推定される。患者の年齢、性別には顕著な特徴が認められ、20歳未満は2.4%程度にすぎず、40歳以上が患者の80%を占め、男女比も3:1と明らかに中高齢の男性が多い。一方、イヌ咬傷受傷機会が多いとされる乳幼児や小児については、本症はきわめてまれである^{4)18)~21)}。小児の受傷の場合、すぐに医療機関を受診することが多いこともその一因かもしれない。本感染症における一番のリスク因子は高齢およびそれに伴う免疫機能の低下

であると推測される。

筆者らは、国内の発生状況について、文献調査や医療機関より情報収集を行っている。その結果、1993年のイヌ咬傷による敗血症例を最初の報告⁴⁾¹⁸⁾²²⁾として、2011年末までに31名の患者情報を得た²³⁾。うち死亡者は8名で、死亡率は25.8%にのぼる(表3-a)。患者のうち26名は2006年以降であり、これは徐々に本感染症が認知されてきて医療機関における原因菌の分離・同定が広く行われるようになってきたためとも思われるが、患者が増加してきている可能性も否定できない。患者の年齢・性別は、世界のそれと同じく、40歳代以上が93%を占め、男性が74%と中高齢の男性に患者が多い(表3-b)。主症状は、敗血症が24名と大半を占め、うち7名が死亡している(表3-c)。その他、髄膜炎、電撃性紫斑を加えた重度の全身的症状が多く、創部膿瘍・腫脹、頭痛・発熱といった局所症状の段階で報告される例は少ない。

感染経路は、イヌ咬傷が17名、ネコ咬搔傷が10名と、世界のそれと比べてネコの占める割合が高く、これは日本の特徴といえるかもしれない(表3-d)。とりわけ、ネコはグルーミングにより爪に保菌するため、咬傷よりもむしろ搔傷による報告例が多い。ネコ搔傷では4/7名が死亡しているが、咬傷よりも搔傷のほうが傷とし

表3 国内患者一覧（～2011年12月）

a : 患者発生状況		b : 日本国内（～2011年12月）					c : 主症状		e : 現病歴	
発生年	人数 (死亡)	年齢	男	女	全体	%	主症状	人数 (死亡)	現病歴	人数 (死亡)
1993*	1	0	0	0	0	0.0	敗血症	24 (7)	あり	17 (5)
2002	1 (1)	10	0	0	0	0.0	髄膜炎・意識障害	2 (1)	なし	13 (3)
2004	3 (1)	20	1	0	1	3.2	頭痛・発熱	1	不明	1
2006	2 (1)	30	0	1	1	3.2	創部膿瘍・腫脹	3		
2007	3 (1)	40	5	0	5	16.1	電撃性紫斑	1		
2008	7 (2)	50	4	2 (1)	6 (1)	19.4				
2009	2	60	9 (5)	1	10 (5)	32.3				
2010	5 (1)	70	3 (1)	3	6 (1)	19.4				
2011	7 (1)	80	1	0	1	3.2				
		90	0	1 (1)	1 (1)	3.2				
		合計	23 (6)	8 (2)	31 (8)					
		%	74.2	25.8	100					

d : 感染経路		
感染経路	人数 (死亡)	
イヌ咬傷	17 (3)	
ネコ咬傷	3	
ネコ搔傷	7 (4)	
不明	4 (1)	

f : 潜伏期間		
原因	期間 (日)	人数 (死亡)
イヌ	1～2	9 (1)
	3～5	5 (1)
	不明	3 (1)
ネコ	2～5	6 (3)
	6<	3 (1)
	不明	1
不明	不明	4 (1)

* : 1993 年は報告年

() 内はうち死亡例

ては軽微に考えられがちで、医療機関を受診しない、もしくは受診が遅れてしまうことによると思われる。感染経路が不明な4名中2名ではイヌを飼育しており、本人がそれとは気がつかない傷や甘噛み、なめられることなどによる感染が疑われる。

一般にどのような感染症でも、免疫機能を低下させる疾患はもちろん、何らかの現病歴をもつ者はハイリスクである。ただ国内の状況をみる限り、糖尿病、悪性腫瘍、高血圧などの基礎疾患をもたない者でも感染・発症している（表3-e）ことから、高齢がやはり重要なリスク因子であることが推測される。潜伏期間は長いといわれているが⁸⁾、たしかにパスツレラ症に比べると長いものの、国内の症例では、イヌ咬傷では1～5日とくに1～2日の例が多く、それほど長いともいえない。一方、ネコ搔傷では2～7日とばらつきがある（表3-f）。

Ⅲ 典型症例の紹介

以下に、典型的と思われる国内症例と小児の海外症例を紹介する。国内では小児の症例はまだ報告されていない。

症例1²⁴⁾ : 60歳, 男性

飼い犬に親指を咬まれ、消毒して放置。5日後の朝、四肢にしびれ。夜、疼痛出現。未明、症状が悪化し自力歩行困難となり救急搬送。搬送時には意識混濁、結膜黄疸、体幹・四肢に網状紫斑、白血球・CRP高値、血小板・フィブリノゲン減少。重症敗血症およびDICと診断され、敗血症に対する治療を実施するも、入院6時間後には急激に意識状態が悪化し死亡。剖検の結果、敗血症のリスクとなり得る病変は確認されなかったが、入院時の血液培養より培養3日（死後）、サブカルチャー5日目に *C. canimorsus* を分離。また、入院時の血液塗抹で好中球内に桿菌を確認した。

症例2¹⁹⁾ : 4歳, 少女

野良犬に左右の頬を咬まれる。近医を受診し、破傷風、狂犬病ワクチンの接種。ペニシリンとサルファ剤にアレルギーがあるとの申告によりエリスロマイシンの経口投与を行った。2週間後、傷の治癒は順調だったが、一部で血液性浸出液を認める。39℃の発熱と体幹・四肢に点状出血、口腔内に潰瘍。白血球・好中球数正常、軽度の血小板減少。イヌ咬傷歴から血液培養を実施し、*C. canimorsus* を分離。最終的に

オーグメンチン®の使用により寛解した。

症例 3²⁰⁾ : 4 カ月, 男児

イヌに背中, 首, 頭を咬まれる。救急受診。傷の縫合とセファロスピリンの経口投与を行った。翌朝, 左側の強直間代性発作を呈しフェノバルビタールにより収まるが, 39.3°Cの発熱。白血球数やや高値。腰椎穿刺により髄液中に好中球を主とする白血球の増加。頭蓋骨骨折もみられることにより転院し, オキサシリンとクロラムフェニコールの投与。血液培養開始。3日後には解熱し髄液も正常化。培養5日目に *C. canimorsus* を分離。クロラムフェニコールの静注により寛解した。

その他, 生後12日齢の乳児で, 偶然, イヌの歯に頭部皮膚が接触し, 薄く削られたような傷ができ, その後発症した例が報告²¹⁾されている。

IV 診断

イヌ・ネコ咬傷の有無, 日常的な動物との接触の状況は重要な情報である。潜伏期間は1週間以内の症例が多いが, 発症後の症状の悪化が早いことから, イヌ・ネコ咬傷後は体調の変化に気をつけておく必要がある。とくに, 掻傷や甘噛み程度の軽微な咬傷では, 潜伏期間中にほとんど傷が目立たなくなるケースも考えられる⁸⁾¹³⁾。そのため, 本人や周りの者が咬傷の事実をしっかりと認識しておき, 医師に伝えることがその後の診断・治療に重要である。初発症状では敗血症の前駆症状として発熱, 腹痛, 下痢, 倦怠感や, 髄膜炎につながる発熱, 頭痛などがあげられており, その後, 急激に敗血症, DIC や敗血症性ショック, 多臓器不全に進行している。また, 受傷部に腫脹などがあり, 受傷部局所からはパストレラ菌やブドウ球菌などが分離された場合でも *C. canimorsus* は分離されないことが多いため, 重篤な全身症状が現れた際は, 受傷部局所の起炎菌のみに捉われ過ぎないほうがよい⁸⁾¹³⁾¹⁷⁾。

血清学的診断法は確立しておらず, 血液や脳脊髄液を培養して *C. canimorsus* の分離・同定を行う。血液培養は 35~37°C, 5% CO₂あるいは嫌気条件下で行う⁸⁾¹³⁾¹⁷⁾¹⁸⁾が, 本菌は生育が遅いため, 通常より培養期間を延長する必要がある。サブカルチャーは, 市販の5%ヒツジもしくはウマ血液加寒天培地が使用できるが, ハートインフュージョンベースのほうが発育がよい²⁵⁾。コロニーは淡黄白色あるいは淡灰白色で, 成長するとその辺縁に不規則な広がり認められる。ヒト口腔内に常在する *Capnocytophaga* 属菌もまれに自家感染による敗血症を起こすが, 生化学的にヒトの6菌種はオキシダーゼ, カタラーゼともに陰性であり, イヌ・ネコが保有する2菌種はいずれもオキシダーゼ, カタラーゼとも陽性であることから鑑別が可能である¹⁰⁾¹⁸⁾。また, 市販の生化学的性状による簡易同定検査キットも, *Capnocytophaga* 属菌の生育に適した培地を用いることで, 大部分は判定が可能である²⁵⁾。

さらに, 咬傷の事実などから *C. canimorsus* 感染が疑われる際には, 培養結果を待つだけでなく, 血液や培養液塗抹のグラム染色, 遺伝子検査を適宜併用することが望ましい。血液や培養サンプルのグラム染色により, 血中や好中球内に本菌が認められた例²⁴⁾²⁶⁾や, PCR法により培養サンプルから遺伝子検出・同定に至った例²⁷⁾もある。PCR法には, 特異的プライマーや16S rRNA 遺伝子に対するユニバーサルプライマーを用いて, その増幅産物の塩基配列を解析する方法などがある。筆者らは *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っている¹²⁾。

V 治療と予防

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症している段階で受診することが多いため, 菌の分離・同定を待た