

- Fujita H, Watanabe Y, Hagiwara T, Takada N. Trombiculid mites and *Orientia tsutsugamushi* in field rodents in the northern part of Fukushima prefecture. *Ann Rep Ohara Hosp* 2000; 43:33–40.
- Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Yamamoto S, et al. Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1637–1640.
- Kelly DJ, Fuerst PA, Ching WM, Richards AL. Scrub typhus: The geographic distribution of phenotypic and genotypic variants of *Orientia tsutsugamushi*. *Clin Infect Dis* 2009; 48(Suppl 3):S203–S230.
- Kollars TM, Jr., Bodhidatta D, Phulsuksombati D, Tippayachai B, et al. Short report: Variation in the 56-kD type-specific antigen gene of *Orientia tsutsugamushi* isolated from patients in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68:299–300.
- Ogawa M, Ono T. Epidemiological characteristics of tsutsugamushi disease in Oita Prefecture, Japan: yearly and monthly occurrences of its infections and serotypes of its causative agent, *Orientia tsutsugamushi*, during 1984–2005. *Microbiol Immunol* 2008; 52:135–143.
- Posada D, Crandall KA. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998;14:817–8.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 2003; 19:1572–1574.
- Sonthayanon P, Peacock SJ, Chierakul W, Wuthiekanun V, et al. High rates of homologous recombination in the mite endosymbiont and opportunistic human pathogen *Orientia tsutsugamushi*. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4:e752.
- Stover CK, Marana DP, Carter JM, Roe BA, et al. The 56-kilodalton major protein antigen of *Rickettsia tsutsugamushi*: Molecular cloning and sequence analysis of the sta56 gene and precise identification of a strain-specific epitope. *Infect Immun* 1990; 58:2076–2084.
- Tabara K, Kawabata H, Ando S, Arai S, et al. Epidemiological study of tsutsugamushi disease in Shimane Prefecture, Japan. *J Jpn Vet Med Assoc* 2012; 65:535–541.
- Tamura A, Takahashi K, Tsuruhara T, Urakami H, et al. Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* antigenically different from Kato, Karp, and Gilliam strains from patients. *Microbiol Immunol* 1984; 28:873–882.
- Tamura A, Yamamoto N, Koyama S, Makisaka Y, et al. Epidemiological survey of *Orientia tsutsugamushi* distribution in field rodents in Saitama Prefecture, Japan, and discovery of a new type. *Microbiol Immunol* 2001; 45:439–446.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:4673–4680.

Address correspondence to:

Satoru Arai  
Infectious Disease Surveillance Center  
National Institute of Infectious Diseases  
Toyama 1-23-1  
Shinjuku, Tokyo 162-8640  
Japan

E-mail: arais@nih.go.jp

## ●症 例

*Capnocytophaga sputigena* による肺化膿症の1例

内藤 亮<sup>a,b</sup> 瀧口 恭男<sup>a</sup> 秋葉 容子<sup>c</sup>  
 駿河 洋介<sup>c</sup> 鈴木 道雄<sup>d</sup> 今岡 浩一<sup>d</sup>

要旨：症例は27歳，男性．海外滞在中に右下葉結節影を指摘され，帰国後の2011年2月に当院受診した．気管支鏡検査では確定診断が得られず，CTガイド下肺生検を施行．吸引液の塗沫では悪性細胞や有意な細菌は認められなかったが，多数の白血球が認められた．その後 *Capnocytophaga* sp. が培養され，16S rRNA 遺伝子解析により *Capnocytophaga sputigena* と同定された．肺化膿症の診断で抗菌薬治療を行い，およそ1年後の胸部CT写真でわずかに瘢痕を残すのみとなった．本菌が呼吸器検体から分離・同定された症例は海外でわずか1例報告されているのみであり，本邦第1例として報告する．

キーワード：肺化膿症, *Capnocytophaga sputigena*

Lung abscess, *Capnocytophaga sputigena*

## 緒 言

*Capnocytophaga* 属菌は動物やヒトの口腔内などに常在する通性嫌気性のグラム陰性桿菌である．本菌属には現在8つの種が含まれており，このうち *Capnocytophaga canimorsus* と *Capnocytophaga cynodegmi* の2菌種は主にイヌやネコの口腔内に常在し，動物咬傷の起炎菌として重要である．一方 *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga granulosa*, *Capnocytophaga haemolytica*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga leadbetteri* の6菌種はヒトの口腔内に常在する<sup>1)</sup>．*C. sputigena* は特に幼少期からヒトの口腔内に常在し歯周病の原因として着目されているほか，易感染宿主での敗血症などの報告が散見される．しかし呼吸器検体から培養された症例は海外でわずか1例報告されているのみで，まれと考え報告する．

## 症 例

患者：27歳，男性．

主訴：胸部異常陰影．

既往歴：特記事項なし．

家族歴：特記事項なし．

生活歴：喫煙 5本/日，16歳～．飲酒 週2日×ビール5本．

職業：自動車整備．

現病歴：2009年1月から，海外ボランティアで自動車整備学校教師としてニカラグアに滞在していた．現地では動物との接触はほとんどなかった．2009年8月の検診では胸部X線写真の異常を指摘されなかったが，2010年9月の検診で胸部異常陰影（右中下肺野結節影）を指摘された．2011年1月に帰国した際の胸部X線写真でも結節影は残存し，2011年2月2日前医受診，精査加療目的に2月14日当院紹介となり，翌日検査目的にて入院となった．

来院時現症：身長172.3cm，体重65.3kg，体温36.4℃，血圧112/57mmHg，脈拍74回/min・整，SpO<sub>2</sub> 99%（room air）．意識清明，GCS E4V5M6．胸部聴診上ラ音や心雑音を聴取せず．腹部に異常所見なし．神経学的異常所見なし．四肢体幹に浮腫・皮疹なし．口腔内に明らかな齲歯や歯槽膿漏を認めず．

来院時検査所見：白血球9,500/μl，CRP 3.3mg/dlと炎症反応の軽度上昇を認めたが，腫瘍マーカーを含め，その他の検査所見で異常を認めなかった．

胸部単純X線写真（Fig. 1A）：右中下肺野に約1cm大の結節影を認めた．

胸部CT写真（Fig. 1B）：右S<sup>9</sup>に径14mmの結節影を認めた．結節影内部の石灰化や縦隔リンパ節腫大は認

連絡先：内藤 亮

〒260-0852 千葉県中央区青葉町1273-2

<sup>a</sup>千葉県立青葉病院呼吸器内科

<sup>b</sup>千葉大学大学院医学研究院呼吸器内科学

<sup>c</sup>千葉県立青葉病院臨床検査科

<sup>d</sup>国立感染症研究所獣医学部第一室

(E-mail: akira\_n\_390@yahoo.co.jp)

(Received 26 Jul 2012/Accepted 21 Aug 2012)

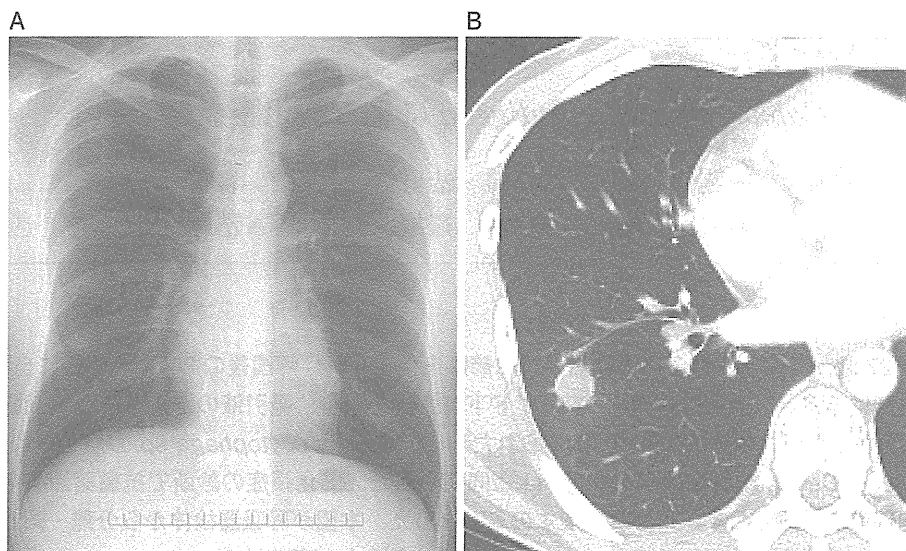


Fig. 1 (A) Chest X-ray film showed a nodular shadow on the right lower part of the lung. (B) Chest CT showed a 14 mm nodular shadow on the right lung (S<sup>9</sup>). Neither calcification of the inner portion of the nodule nor mediastinal lymph node enlargement was observed.

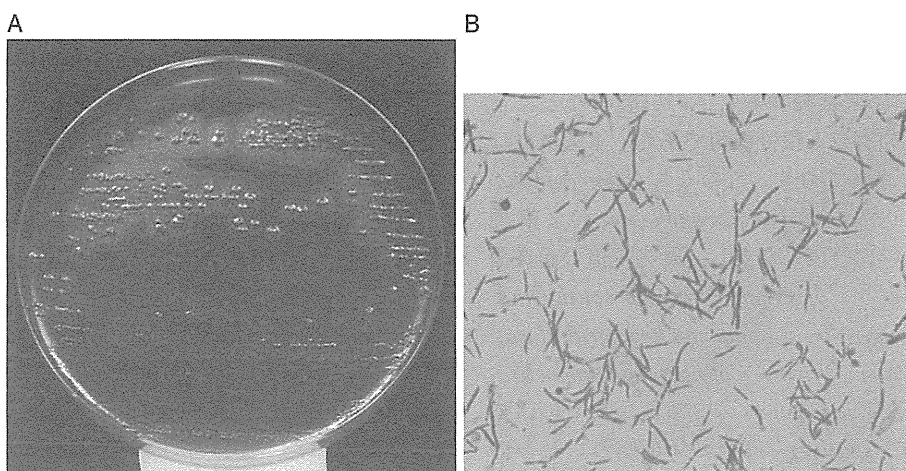


Fig. 2 (A) Gliding colonies were isolated on the 2nd day using blood agar cultures of the aspirated biopsy sample. (B) Gram staining of the bacterial colony showed long and thin spindle-shaped gram-negative bacilli.

めなかった。

来院後経過：入院後に実施した気管支鏡検査では確定診断は得られず、2月24日CTガイド下肺生検を施行した。同病変より得られた穿刺吸引液の塗抹標本では、悪性細胞および病原性が疑われる細菌、抗酸菌は認めなかったが、多数の好中球が認められた。肺化膿症が疑われたためアモキシシリン/クラバン酸 (amoxicillin/clavulanic acid : AMPC/CVA) 1.125 mg/日にて治療を開始した。その後、CTガイド下肺穿刺の吸引検体の培養2日目に、血液寒天培地において gliding colony が観察され (Fig. 2A)、グラム染色にて紡錘状で細長いグラ

ム陰性桿菌が認められた (Fig. 2B)、集落性状とグラム染色の特徴および RapID ANAII (アムコ) の結果から *Capnocytophaga* sp. と同定され、菌種同定を国立感染症研究所に依頼した。

同研究所でオキシダーゼ試験・カタラーゼ試験を施行したところ、ともに陰性であり、この時点で動物由来菌種である可能性は否定された<sup>2)</sup>。簡易同定キット ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」で *C. sputigena* と判定された (コード番号 7077131)。16S rRNA 遺伝子解析を施行したところ、*C. sputigena* の基準株の塩基配列 (NR026095) と 99.7% の一致率であり、国内分離株<sup>3)</sup> と

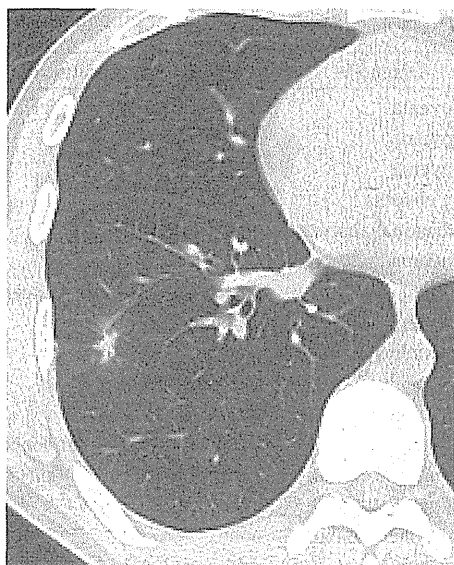


Fig. 3 A follow-up chest CT scan one year after treatment showed only a scar-like lesion.

も99.9%の一致率を認め、本菌株は *C. sputigena* と判定された。なお当院で施行した抗菌薬感受性検査ではアンピシリン (ampicillin), ピペラシリン (piperacillin), セフトキシム (cefotaxime), セフトリアキソン (ceftriaxone), セフジトレン・ピボキシル (cefditoren pivoxil), メロペネム (meropenem), アジスロマイシン (azithromycin), ミノサイクリン (minocycline), クロラムフェニコール (chloramphenicol), レボフロキサシン (levofloxacin: LVFX) に感受性を示し、スルファメトキサゾール・トリメトプリム (sulfamethoxazole-trimethoprim) にのみ耐性を示した。

培養結果を3月14日の外来にて説明し、翌日より入院としてアンピシリン/スルバクタム (ampicillin/sulbactam: ABPC/SBT) 6g/日とクリンダマイシン (clindamycin: CLDM) 1,200mg/日による点滴治療を開始した。3月23日アモキシシリン/クラブラン酸 1,125mg/日+クリンダマイシン 600mg/日の内服に変更し退院。2ヶ月間内服治療を継続した。約1年後の2012年1月に施行した胸部CT写真 (Fig. 3) で、陰影の瘢痕化を確認して終診とした。

## 考 察

*Capnocytophaga* 属菌は1979年に新しい属として確立した、通性嫌気性のグラム陰性桿菌である<sup>4)</sup>。特徴としては発育に5~10%の炭酸ガスを要求し、増殖が遅く集落形成に2~4日を要することがあげられる。本菌属には現在8つの種が含まれており、このうち *C. canimorsus* と *C. cynodegmi* の2菌種は主にイヌやネコの口腔

内に常在し動物咬傷による敗血症の起炎菌として重要である。一方 *C. sputigena*, *C. gingivalis*, *C. granulosa*, *C. haemolytica*, *C. ochracea*, *C. leadbetteri* の6菌種はヒトの口腔内に常在する<sup>1)</sup>。

我々が検索しえた範囲では、本邦報告のヒト由来の *Capnocytophaga* 属菌による感染症 (歯周病を除く) は32例あり、その約半数は易感受性宿主での敗血症である。残りの半数は口腔からの直接波及と思われる頭頸部・下気道感染、オーラルセックスに関連すると思われる妊婦・新生児感染などである<sup>5)6)</sup>。呼吸器感染症としては肺炎が2例、肺化膿症が2例、膿胸が3例みられ、悪性腫瘍や糖尿病を背景にもつ症例がある一方で、基礎疾患が明らかでない症例も認められる。*Capnocytophaga* 属菌による呼吸器感染症 (母子感染による新生児例は除く) は、検索した限りでは国内外で20例の報告がみられた (Table 1)。なかでも *C. sputigena* と同定されたのは、2008年に歯列矯正中の健常13歳男児が肺炎・胸膜炎を発症したフランスからの報告症例1例のみであり<sup>7)</sup>、我が国ではこれまで報告されていない。

本症例は胸部結節影のCTガイド下穿刺吸引液から培養されており、混合感染の可能性は完全には否定できないものの、本菌がこの陰影の起炎菌であったと考えられる。健常人でも睡眠中などの不顕性誤嚥はまれでなく<sup>8)</sup>、それが下気道に定着・緩徐に増殖した結果であると思われる。本症例のように著明な炎症反応を伴わない肺化膿症の症例報告<sup>9)10)</sup>もあることから、今回のような結節影の鑑別診断として *Capnocytophaga* 属菌による呼吸器感染症も念頭に置くべきと考えられた。

*Capnocytophaga* 属菌の抗菌薬感受性に関しては、カルバペネム系、CLDMの感受性が最も良好である。ペニシリン系に関しては近年基質拡張型βラクタマーゼ (extended-spectrum β-lactamase: ESBL) を含めたβラクタマーゼ産生株の報告が多い一方で、βラクタマーゼ阻害薬を併用した場合の感受性は良好であり<sup>11)</sup>、βラクタマーゼ阻害薬を併用したペニシリン系は第一選択と考えられる。一方でセフェム系に関しては *in vitro* でESBL産生を含めた耐性の報告が散見されるため、使用する際には耐性菌の可能性を念頭に置く必要がある<sup>12)</sup>。マクロライド系およびキノロン系、メトロニダゾール (metronidazole) の感受性は報告によって差が大きく、感受性の株もあれば高度耐性の株も見受けられる。特にキノロン系に関しては、1990年代には感受性が良好とした報告が多く見受けられたが、LVFX 予防内服中に発症した敗血症でLVFX 高度耐性であった報告があり<sup>13)</sup>、耐性が誘導された可能性は否定できないと考えられる。アミノグリコシド系やバンコマイシン (vancomycin) は耐性とする報告が多いようである。本症例では、

Table 1 Previous reports of respiratory infections resulting from *Capnocytophaga* spp. derived from human oral cavity

Year	Author	Age	Sex	Cultured bacteria	Diagnosis	Complications
1985	David	18	M	<i>Capnocytophaga</i> sp. + <i>S. aureus</i>	empyema	traumatic esophageal perforation
		19	F	<i>Capnocytophaga</i> sp. + <i>H. influenzae</i>	empyema	multiple birth defects
		66	M	<i>Capnocytophaga</i> sp. + <i>E. corrodens</i>	empyema	lung cancer
		66	M	<i>Capnocytophaga</i> sp.	lung abscess	lung cancer
1986	Mosher	51	F	<i>Capnocytophaga</i> sp.	mediastinal abscess	dental pyorrhea
1986	Hara	72	M	<i>C. ochracea</i>	empyema	none
1987	Ota	73	M	<i>C. ochracea</i> + <i>E. corrodens</i>	empyema	postoperation of lung cancer
		63	M	<i>Capnocytophaga</i> sp.	pneumonia	esophageal cancer
1994	Lorenz	25	M	<i>Capnocytophaga</i> sp.	pneumonia	none
1998	Lin	2	M	<i>Capnocytophaga</i> sp.	pneumonia	tetralogy of Fallot
2000	Fukuoka	48	F	<i>C. gingivalis</i>	lung abscess	none
2000	Hourmont	29	M	<i>Capnocytophaga</i> sp.	empyema	GERD, post-Nissen fundoplication
2001	Geisler	30	M	<i>C. gingivalis</i>	pneumonia, sepsis	AML posttransplantation
2003	Bonatti	46	F	<i>C. ochracea</i> + <i>S. anginosus</i>	empyema	liver cirrhosis (HCV)
2008	Atmani	13	M	<i>C. sputigena</i>	pleuropneumonia	none
2008	Wilde	56	M	<i>Capnocytophaga</i> sp.	pneumonia	AMI post CABG
2009	Satou	58	M	<i>C. leadbetteri</i>	empyema	gastroesophageal junction cancer
2009	Ishiguro	54	M	<i>Capnocytophaga</i> sp. + <i>A. israelii</i>	empyema	diabetes mellitus
2010	Matsumoto	72	M	<i>Capnocytophaga</i> sp.	lung abscess	lung cancer
2012	Raghu	39	M	<i>Capnocytophaga</i> sp.	lung abscess	typical carcinoid

GERD, gastroesophageal reflux disease; AML, acute myelogenous leukemia; HCV, hepatitis C virus; AMI, acute myocardial infarction; CABG, coronary artery bypass graft; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*; *H. influenzae*, *Haemophilus influenzae*; *E. corrodens*, *Eikenella corrodens*; *S. anginosus*, *Streptococcus anginosus*; *A. israelii*, *Actinomyces israelii*.

ペニシリン系を含めたほとんどの抗菌薬に感受性を有しており、臨床的にもペニシリン系とCLDMの併用にて改善を得られた。治療期間に関してはエビデンスが得られておらず、経験的に膿瘍腔の癒着化や消失を目安に少なくとも数週間行われることが多い<sup>14)</sup>が、今後の検討課題と考えられた。

*Capnocytophaga* 属菌は、2008年に新種が加わる<sup>1)</sup>などまだ不確実な点が多く、原因不明の敗血症や膿瘍などの症例にどれくらいの頻度で本菌によるものが含まれているのかも不明である。おそらく検出率の低さから現状では過小評価されていると思われるが、感染症としての全体像を描き出していくためにも、遺伝子解析の可能な施設と適宜連携して一つ一つの症例の起炎菌の同定を丹念に菌種レベルまで行い、知見を積み重ねていくことは重要と考えられた。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関して特に申告なし。

#### 引用文献

- 1) Frandsen EV, Poulsen K, Kononen E, et al. Diversity of *Capnocytophaga* species in children and description of *Capnocytophaga leadbetteri* sp. nov. and *Capnocytophaga* genospecies AHN8471. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008; 58: 324-36.
- 2) Brenner DJ, Hollis DG, Fanning GR, et al. *Capnocytophaga canimorsus* sp. nov. (formerly CDC group DF-2), a cause of septicemia following dog bite, and *C. cynodegmi* sp. nov., a cause of localized wound infection following dog bite. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 231-5.
- 3) 中山麻美, 濱岸真奈美, 新谷知世, 他. *Capnocytophaga* 属菌による敗血症の2例. *医学検査* 2010; 59: 1171-5.
- 4) Leadbetter ER, Holt SC, Socransky SS. *Capnocytophaga*: new genus of gram-negative gliding bacteria. I. General characteristics, taxonomic considerations and significance. *Arch Microbiol* 1979; 122: 9-16.
- 5) Parenti DM, Snyderman DR. *Capnocytophaga* species: infections in nonimmunocompromised and immunocompromised hosts. *J Infect Dis* 1985; 151: 140-7.
- 6) Howlett AA, Mailman TL, Ganapathy V. Early cystic lung disease in a premature neonate with perinatally acquired *capnocytophaga*. *J Perinatol* 2007; 27: 68-70.
- 7) Atmani S, Wanin S, Bellon G, et al. *Capnocytophaga sputigena* pleuropneumonitis: a case report. *Arch Pediatr* 2008; 15: 1535-7.

- 8) Huxley EJ, Viroslav J, Gray WR, et al. Pharyngeal aspiration in normal adults and patients with depressed consciousness. *Am J Med* 1978; 64: 564-8.
- 9) 菅谷将一, 中川 誠, 高間辰雄, 他. 葉間 P3 肺癌との鑑別が困難であった肺膿瘍の1例. *肺癌* 2011; 51: 89-93.
- 10) 神谷一徳, 吉津 晃, 三角祐生, 他. 肺癌との鑑別が困難であった肺膿瘍の1例. *胸部外科* 2011; 64: 1204-7.
- 11) Jolivet-Gougeon A, Buffet A, Dupuy C, et al. In vitro susceptibilities of *Capnocytophaga* isolates to beta-lactam antibiotics and beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3186-8.
- 12) Jolivet-Gougeon A, Tamanai-Shacoori Z, Desbordes L, et al. Genetic analysis of an ambler class A extended-spectrum beta-lactamase from *Capnocytophaga ochracea*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 888-90.
- 13) Geisler WM, Malhotra U, Stamm WE. Pneumonia and sepsis due to fluoroquinolone-resistant *Capnocytophaga gingivalis* after autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 1171-3.
- 14) Bartlett JG. Anaerobic bacterial infections of the lung and pleural space. *Clin Infect Dis* 1993; 16 (Suppl 4): S248-55.

### Abstract

#### A case of lung abscess due to *Capnocytophaga sputigena*

Akira Naito<sup>ab</sup>, Yasuo Takiguchi<sup>a</sup>, Yoko Akiba<sup>c</sup>, Yosuke Suruga<sup>c</sup>,  
Michio Suzuki<sup>d</sup> and Koichi Imaoka<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Department of Respiratory Medicine, Chiba Aoba Municipal Hospital

<sup>b</sup>Department of Respiriology, Graduate School of Medicine, Chiba University

<sup>c</sup>Department of Laboratory Medicine, Chiba Aoba Municipal Hospital

<sup>d</sup>Laboratory of Reservoir Control of Zoonoses, Department of Veterinary Science,  
National Institute of Infectious Disease

The patient was a 27-year-old man, whose chest CT scan showed a nodular shadow on the right lower lobe while he worked as a volunteer in Nicaragua. After he returned to Japan in February 2011, he was admitted to our hospital for further evaluation. Because his bronchoscopic examination did not provide a definitive diagnosis, the patient underwent CT-guided lung biopsy. The aspirated fluid did not show any malignant cells, but it did show large amounts of leukocytes. From the sample cultures, *Capnocytophaga* sp. was isolated, and *Capnocytophaga sputigena* was identified using 16S rRNA gene analysis. The patient was diagnosed with lung abscess caused by *C. sputigena*, and underwent antimicrobial therapy. A follow-up chest CT scan one year later showed only a scar-like lesion. *C. sputigena*, isolated and identified from respiratory specimen culture, has previously been shown in only 1 case in the French literature. This is the first case report in Japan showing a respiratory infection resulting from *C. sputigena*, though we cannot rule out the potential mixed infection with other pathogens. To clarify the pathogenic significance of *Capnocytophaga* spp. in respiratory infections, more cases needed to be analyzed.

# 感染症症候群(第2版)

—症候群から感染性単一疾患までを含めて—

上 病原体別感染症編

## II. 細菌感染症

グラム陰性桿菌感染症

カプノサイトファーガ・カニモルサス感染症

鈴木道雄  
今岡浩一

## II 細菌感染症

グラム陰性桿菌感染症

# カプノサイトファーガ・カニモルサス 感染症

*Capnocytophaga canimorsus* infection

Key words : *Capnocytophaga canimorsus*, イヌ咬傷, ネコ咬・搔傷,  
動物由来感染症, 敗血症

鈴木道雄  
今岡浩一

### 1. 概念・定義

カプノサイトファーガ・カニモルサス感染症は、イヌやネコの口腔内常在菌の一種である *Capnocytophaga canimorsus* を原因菌とする動物由来感染症であり、主にイヌ・ネコによる咬・搔傷に伴って感染・発症する。発症初期には発熱や倦怠感などを主徴とし、重症例では急激に悪化して敗血症に至ることが特徴的である。本症は文献的には、1976年にアメリカで初めて報告されたが<sup>1)</sup>、それ以前は原因病原体こそ明らかになっていなかったものの、*C. canimorsus* が生活に身近な伴侶動物の常在菌であることから、本症自体ははるか以前から存在していたと推測される。ちなみに *C. canimorsus* が分類学上新菌種として認められたのは1990年である<sup>2)</sup>。

### 2. 疫学

1976年以降、これまでに世界で約280例の文献的報告がある。その多くは敗血症を呈した重症例であり、致死率はおよそ30%である。デンマークとオランダの疫学的報告では、患者の発生数はそれぞれ人口100万人あたり0.5人、0.7人と推計されているが<sup>3,4)</sup>、軽症例を含めた、本症との診断に至っていない症例の実数は不明である。

本症の患者の多くは高齢者であり、50-60歳代が最も多い年代で、40歳以上が8割以上を

占める。男女比は約7:3と男性の方が多い。生活習慣病、アルコール依存症などの慢性疾患の罹患者や、脾臓摘出者など免疫力が低下する要因を抱えたいわゆる immunocompromised host が多いが、特記すべき基礎疾患のない患者も少なくない。

これまでの報告は主に欧米諸国や日本の症例であるが、原因菌がイヌ・ネコの常在菌であることを踏まえると、本症は世界中で発生していると推測される。しかしながら、特に発展途上国での本症の発生状況に関しては情報が極めて少なく、実態は不明である。

国内では1993-2012年に、文献的に31例(うち死亡例8例)の報告がある。近年、報告数は増加傾向で、21例が2008年以降の5年間での報告である。これは主に原因菌が同定される機会が増えたことによると考えられるが、国内人口の高齢化も一要因と推測される。患者の年齢分布、男女比とも海外の報告と同様である。国内症例では、現病歴の有無はおおむね半々であり、現病歴の有無による重症度の差異はみられない。

### 3. 病因

イヌ咬傷の15-20%、ネコ咬傷の約半数で、何らかの細菌感染を伴うといわれており、その起炎菌としては *Staphylococcus* 属菌、*Streptococcus* 属菌などのグラム陽性菌、*Pasteurella* 属菌、*Bartonella* 属菌(猫ひっかき病)、そして *Capno-*

Michio Suzuki, Koichi Imaoka: Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases 国立感染症研究所 獣医科学部

0047-1852/13/¥60/頁/JCOPY



表1 *C. canimorsus* 感染症の国内症例の感染経路および主症状

a. 感染経路			b. 主症状		
感染経路	症例数	%	主症状	症例数	%
イヌ咬傷	15(3)	48	敗血症	25(8)	81
ネコ咬傷	4	13	髄膜炎	1	3
ネコ搔傷	6(4)	19	意識障害	1	3
イヌとの密な接触	4(1)	13	頭痛・発熱	1	3
不明	2	7	創部膿瘍・腫脹	3	10

注) 症例数の( )内は死亡例(内数).

*cytophaga* 属菌などのグラム陰性菌, *Fusobacterium* 属菌や *Clostridium* 属菌(破傷風)などの嫌気性菌といった種々の細菌が挙げられる<sup>5)</sup>.

*Capnocytophaga* 属菌は細長いグラム陰性桿菌であり, 二酸化炭素要求性および寒天培地上での滑走能を有し, 栄養要求性が厳しく人工培地での成育が遅いことが特徴である<sup>6)</sup>. 1979年に属として確立し, 現在は8種に分類される. そのうち6種はヒトの口腔内常在菌であり, 歯周病に関連すると考えられているほか, まれに自家感染して敗血症などを起こすことがある<sup>7)</sup>. それ以外の2種, *C. canimorsus*, *C. cynodegmi* がイヌ・ネコの口腔内常在菌である. いずれもヒトに対する病原性を有するが, 重症例のほとんどは *C. canimorsus* 感染による. 国内のイヌ・ネコの調査では, *C. canimorsus* の口腔内保菌率はイヌ74%, ネコ57%<sup>8)</sup>であり, 日常生活で身近な伴侶動物が高率に保菌している.

*C. canimorsus* は主に咬・搔傷部位から, あるいは傷口を舐められることなどによって感染する. 感染経路の内訳はイヌ咬傷が61%, ネコ咬・搔傷が8%, イヌ・ネコと濃厚な接触が16%, 不明15%である<sup>9)</sup>. これまでにヒト-ヒト感染の報告はない.

欧米の成書などでは本症は 'Dog bite infection' として紹介されていることが多いが, 国内症例ではネコ咬傷・搔傷による症例が10例(32%)と欧米の報告に比べて高い割合を占めており, ネコもイヌとともに主要な感染源動物である. なかでもネコ搔傷による感染では6例中4例が死亡しており致死率が高い(表1-a).

*C. canimorsus* の有する病原因子および患者

側の危険因子に関してはいまだ不明な点が多く, 咬・搔傷事例数に比して本症の患者数が極めて少ない一方で, 発症すると急速に重症化するメカニズムについては今後の解明がまたれる.

しかしながら, アメリカの統計によれば, イヌ・ネコ咬・搔傷事例の半数以上は20歳以下の若年齢者であるのに対して<sup>10)</sup>, 本症では40歳以上が患者の8割を占め, 患者の平均年齢が60歳前後であることから, 高齢は重要なリスク要因である.

#### 4. 病 態

潜伏期間は1-14日, 国内症例では2-3日が多い. 発症初期には患者は発熱, 悪寒, 吐き気, 腹痛, 下痢, 筋肉痛, 意識混濁などの症状を示す. 受診時には既に重症化が進行しており, 敗血症の症候が認められるケースも多い. 全身症状が現れると短時間のうちに敗血症性ショック, 播種性血管内凝固症候群(DIC), 更には多臓器不全など救命救急治療の必要な重篤な状態に陥る傾向がある. 国内症例では8割以上が敗血症例で(表1-b), 急激かつ著しい血小板減少がみられることが多いのが特徴的である. 通常胸部・腹部の実質臓器に感染巣は認められない. 末梢血中の好中球内にしばしば菌を認める.

急性感染性電撃性紫斑病(AIPF), 溶血性尿毒症症候群(HUS)や血小板減少性紫斑病(TTP)を発症する場合もある<sup>11,12)</sup>.

咬・搔傷部位局所に明瞭な病変形成が認められることは少なく, 傷自体も外科的治療を必要としない程度の小さな傷からの感染例も多い.

## 5. 診断と鑑別診断

まずイヌ・ネコ咬・搔傷感染症と他の感染症の鑑別として、イヌやネコとの接触歴の有無についての問診が重要となる。それとともに、免疫力の低下要因となる糖尿病などの慢性疾患や脾摘の有無を確認する。同じイヌ・ネコ咬・搔傷感染症であるパスツレラ症や猫ひっかき病では、受傷部位や近傍リンパ節の腫脹・疼痛など、それぞれの疾患に特徴的な局所病変、症状があるのに対して、本症の場合は前述したように、目立った局所病変を認めないことが多い。また、受傷部局所の傷が小さいために、受傷直後には医療機関を受診していない症例が多く、その後全身症状が発現して受診したときには、既に傷が治癒している場合もある。この点からも問診から得られる情報は非常に重要である。

また受傷部の炎症を伴う敗血症例の場合、局所病変からは起炎菌として *Staphylococcus* 属菌や *Pasteurella* 属菌などの菌のみが分離され、血液培養からは *C. canimorsus* が検出されるというケースもあるため、イヌ・ネコ咬・搔傷に伴う全身感染症では、受傷部局所からの分離培養と血液培養の結果は一致しないこともあることに留意する。

確定診断には、血液培養などによる *C. canimorsus* の検出・同定が最も有用である。局所病変を形成することが少なく、いきなり全身症状が発現することが多い本症の性質を反映して、分離菌はおよそ9割が血液培養由来であり、受傷部位からの分離はわずか数%である。

本菌は発育が遅く、検出が難しいため、臨床と検査室との連携が重要で、必要に応じて血液培養期間の延長、血液培養検体の鏡検やPCR法による遺伝子検査など、用いる様々な方法を併用して菌の検出・同定に努めることで検出率が高まる。分離培養には炭酸ガス培養が必須で、微好気培養や嫌気培養を併用することも有用である<sup>9,13)</sup>。

患者の血液培養検体の鏡検では、好中球の細胞質内に本菌の貪食像を認めることがしばしばあり、本症の特徴の一つである<sup>9,13)</sup>。 *Capnocy-*

*tophaga* 属菌は一般的な検査システムでは属レベルまでしか同定できないことも多いが、分離培養での生育が良好であれば、市販の検査キットでも菌種までおおむね同定できる<sup>14)</sup>。追加検査として、*C. canimorsus* はオキシダーゼテストおよびカタラーゼテストがともに陽性であることが、ヒト由来の *Capnocytophaga* 菌種との鑑別点である<sup>6,9,14)</sup>。

遺伝子検査ではPCR法を用いた菌種特異的な検出が可能である<sup>9)</sup>。PCR法は血液などの検体から直接的に *C. canimorsus* 特異的遺伝子を検出することも可能で、本症を疑うも菌分離ができない症例にも適用できる。血清学的診断法は確立されていない。

## 6. 治療と予後

イヌ・ネコによる咬・搔傷を受けた際には、必要に応じて抗菌薬の予防的な投与が行われる。*C. canimorsus* を含む種々の細菌が起炎菌となりうるので、抗菌スペクトルが十分に広い抗菌薬を選択する。β-ラクタマーゼ阻害薬とペニシリン系抗菌薬の合剤であるアモキシシリン/クラバン酸の経口投与が第一選択として推奨される<sup>15)</sup>。破傷風トキソイドの接種や、海外での受傷の場合は狂犬病の予防処置も必要に応じて行う。

重症例では敗血症による全身症状の悪化が急激に進行することが多いため、起炎菌の同定を待たずに、抗菌薬や昇圧剤の投与、血漿交換など敗血症に対する対症療法を迅速に行う必要がある。

*C. canimorsus* は多くの抗菌薬に感受性であるが、アミノグリコシド系に耐性、ペニシリン系、マクロライド系やリンコマイシン系には耐性株があり、治療時の抗菌薬としては、上記のβ-ラクタマーゼ阻害薬配合ペニシリン系(アンピシリン/スルバクタムなど)のほか、テトラサイクリン系、第3世代セフェム系あるいはカルバペネム系などが有効である<sup>9)</sup>。

受診時に既に敗血症の症候を認めた症例では、入院後24時間に満たない時間で死亡した症例が複数あり、我が国のように救急医療システム

の恩恵を比較的受けやすい環境においても、重症例の予後には受傷あるいは自覚症状発現から受診に至るまでの時間経過が大きく影響する。

本症の患者が適切な予防、治療機会を得るためにも、本症に対する、またイヌ・ネコ咬・搔傷感染症についての知識をもつことが重要である。

## ■ 文 献

- 1) Bobo RA, et al: A previously undescribed gram-negative bacillus causing septicemia and meningitis. *Am J Clin Pathol* **65**: 564-569, 1976.
- 2) Brenner DJ, et al: *Capnocytophaga canimorsus* sp. nov. (Formerly CDC Group DF-2), a cause of localized wound infection following dog bite. *J Clin Microbiol* **27**: 231-235, 1989.
- 3) Pers C, et al: *Capnocytophaga canimorsus* septicemia in Denmark, 1982-1995: review of 39 cases. *Clin Infect Dis* **23**: 71-75, 1996.
- 4) van Dam AP, Jansz A: *Capnocytophaga canimorsus* infections in The Netherlands: a nationwide survey. *Clin Microbiol Infect* **17**: 312-315, 2011.
- 5) Madoff LC: 咬傷および熱傷による感染性の合併症. *ハリソン内科学*(福井次矢, 黒川 清監), p846, *メディカル・サイエンス・インターナショナル*, 2003.
- 6) Gaastra W, et al: *Capnocytophaga canimorsus*. *Vet Microbiol* **140**: 339-346, 2010.
- 7) 古西清司, 大橋敏雄: *Capnocytophaga* 属. *臨床歯科エビデンス 歯周病と微生物学のビジュアルラーニング*(古西清司, 申 基詰編著), p48, 南山堂, 2007.
- 8) Suzuki M, et al: Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in dogs and cats determined by using a newly established species-specific PCR. *Vet Microbiol* **144**: 172-176, 2010.
- 9) 鈴木道雄, 今岡浩一: *Capnocytophaga canimorsus* による人獣共通感染症. *皮膚病診療* **32**: 1345-1351, 2011.
- 10) Centers for Disease Control and Prevention(CDC): Nonfatal dog bite-related injuries treated in hospital emergency departments—United States, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **52**: 605-610, 2003.
- 11) Deshmukh PM, et al: *Capnocytophaga canimorsus* sepsis with purpura fulminans and symmetrical gangrene following a dog bite in a shelter employee. *Am J Med Sci* **327**: 369-372, 2004.
- 12) Ma A, Goetz MB: *Capnocytophaga canimorsus* Sepsis with Associated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Am J Med Sci* **345**: 78-80, 2013.
- 13) 大楠清文: *Capnocytophaga canimorsus*. *今知りたい臨床微生物検査実践ガイド*, p17-24, 医歯薬出版, 2013.
- 14) 鈴木道雄ほか: *Capnocytophaga canimorsus* および *Capnocytophaga cynodegmi* 国内分離株の簡易同定キットを用いた同定法の検討. *日臨微生物誌* **21**: 276-280, 2011.
- 15) 細川直登: カプトサイトファーガ感染症を含む犬・猫咬傷時の対応. *獣医畜新報* **64**: 563-567, 2011.

## Molecular and serological investigation of *Leptospira* and leptospirosis in dogs in Japan

Nobuo Koizumi,<sup>1</sup> Maki Mizutani Muto,<sup>1</sup> Shigehiro Akachi,<sup>2</sup> Shou Okano,<sup>3</sup> Seigo Yamamoto,<sup>4</sup> Kazumi Horikawa,<sup>5</sup> Seiya Harada,<sup>6</sup> Sadayuki Funatsumaru<sup>7†</sup> and Makoto Ohnishi<sup>1</sup>

### Correspondence

Nobuo Koizumi  
nkoizumi@nih.go.jp

<sup>1</sup>Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

<sup>2</sup>Section of Microbiology, Mie Prefecture Health and Environment Research Institute, 3684-11 Sakura-cho, Yokkaichi-shi, Mie 512-1211, Japan

<sup>3</sup>Department of Biological Sciences, Okinawa Prefectural Institute of Health and Environment, 2085 Ozato, Ozato, Nanjo-shi, Okinawa 901-1202, Japan

<sup>4</sup>Department of Microbiology, Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment, 2-3-2 Gakuen-Kibanadai-Nishi, Miyazaki-shi, Miyazaki 889-2155, Japan

<sup>5</sup>Division of Pathology and Bacteriology, Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, 39 Mukaezono, Dazaifu-shi, Fukuoka 818-0135, Japan

<sup>6</sup>Department of Microbiology, Kumamoto Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, 1240-1 Kurisaki-machi, Uto-shi, Kumamoto 869-0425, Japan

<sup>7</sup>Saga Prefectural Institute of Public Health and Pharmaceutical Research, 1-20 Hacchonawate-machi, Saga-shi, Saga 849-0925, Japan

Canine leptospirosis, which is caused by infection with pathogenic *Leptospira* species, occurs worldwide, but information regarding the causative *Leptospira* serotypes and genotypes and their effects on virulence in dogs remains limited. Monitoring acute leptospirosis in dogs as sentinels can also aid in estimating the risk of human leptospirosis, particularly when the disease is rare, as it currently is in Japan. Among 283 clinically suspected cases of leptospirosis diagnosed from August 2007 to March 2011 in Japan, 83 cases were laboratory diagnosed as leptospirosis by blood culture, a rise in antibody titres in paired sera using a microscopic agglutination test (MAT) and/or DNA detection using *flaB*-nested PCR. The infected dogs comprised hunting dogs (31 dogs) and companion animals (50 dogs) and two unknown; 63.4% of the infected dogs were males. The mortality rate was 53.2%. A rise of at least fourfold in MAT titre was detected in 30 dogs whose paired serum samples were obtained, and the predominant reactive serogroup was Hebdomadis (53.3%), followed by Australis (16.7%) and Autumnalis (16.7%). *Leptospira interrogans* was isolated from 45 dogs of the following serogroups: Australis (16), Autumnalis (six), Canicola (one), Hebdomadis (21) and Icterohaemorrhagiae (one). All of these serogroups caused lethal infections (57.1–100%). Genetic heterogeneity was demonstrated in serogroups Australis, Autumnalis and Hebdomadis by multilocus sequence typing (MLST) and/or RFLP analysis based on PFGE. In serogroup Hebdomadis, each genotype determined by MLST had a unique mortality rate in the infected dogs. Although classic canine leptospirosis is associated with serovars Canicola and Icterohaemorrhagiae, serogroup Hebdomadis has become the predominant serogroup causing high mortality in Japan. This study suggests that the virulence of members of serogroup Hebdomadis in dogs may be associated with the genotypes in this serogroup.

Received 19 July 2012

Accepted 21 December 2012

†Present address: Saga Prefectural Meat Inspection Office, 4127 Shimotaku, Minamitaku-machi, Taku-shi, Saga 846-0024, Japan.

Abbreviations: EMJH, Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris; MAT, microscopic agglutination test; MLST, multilocus sequence typing; ST, sequence type.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the *flaB* sequences of canine *Leptospira interrogans* isolates determined in this study are AB700138–AB700210.

A supplementary figure is available with the online version of this paper.

## INTRODUCTION

Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by infection with pathogenic *Leptospira* species, affecting almost all mammals (Bharti *et al.*, 2003; Faine *et al.*, 1999). Canine leptospirosis is widespread throughout the world, and dogs serve as both incidental hosts for various leptospiral serovar strains and maintenance hosts for serovar Canicola (Sykes *et al.*, 2011). Monitoring acute infection of leptospirosis in dogs as sentinels can also aid in estimation of the risk to humans in specific areas (Martins *et al.*, 2012). In accidental infections, dogs exhibit acute or subacute hepatic and renal failure, which historically is associated with serovars Canicola and Icterohaemorrhagiae (Goldstein, 2010). However, the widespread use of bivalent vaccines comprising these serovars and the increased contact between dogs and wildlife reservoirs in expanding suburban environments are likely to result in changes of the prevalent *Leptospira* serovars or the emergence of new serovars in the USA and Europe (Ellis, 2010; Gautam *et al.*, 2010; Stokes *et al.*, 2007). Although there are numerous reports on serological investigation of canine leptospirosis, characterization of *Leptospira* isolates causing clinical disease in dogs is limited (Suepaul *et al.*, 2010; Sykes *et al.*, 2011). No recent information on leptospiral species and members of serogroups (serovars) causing clinical disease in Japan has been reported.

In human leptospirosis, it was considered previously that distinct clinical syndromes were associated with specific serogroups, especially serogroup Icterohaemorrhagiae, but this has now been refuted (Levett, 2001). In contrast, it has been suggested recently that a specific clone in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni was related to severe pulmonary haemorrhage syndrome (Gouveia *et al.*, 2008). A specific clone [a genotype defined by multilocus sequence typing (MLST)] of *L. interrogans* serovar Autumnalis was associated with outbreaks of leptospirosis in Thailand (Thaipadungpanit *et al.*, 2007). A serological study indicated that members of serogroup Pomona caused more severe renal disease and were associated with a worse outcome in dogs than disease caused by serogroup Autumnalis or Grippityphosa (Goldstein *et al.*, 2006); however, the differences in the virulence of different *Leptospira* genotypes in dogs remain unknown.

In this study, we performed laboratory diagnoses, including culture, antibody detection using the microscopic agglutination test (MAT), and DNA detection by *flaB*-nested PCR, of clinical specimens collected from dogs clinically suspected of leptospirosis in ten prefectures in Japan. We characterized leptospiral isolates by serological and molecular methods such as MLST and RFLP analysis based on PFGE, and examined the association of *Leptospira* serogroups and genotypes with the outcome of infected dogs.

## METHODS

**Clinical sample collection.** Clinical samples of blood, serum and urine were collected from dogs that exhibited: (i) at least two of the

four symptoms of leptospirosis – fever, vomiting, hyperaemia and haemorrhage of the mucous membranes, and jaundice; and/or (ii) acute renal involvement (abnormal values in creatinine and/or blood urea nitrogen) of unknown origin; and/or (iii) acute hepatic involvement (abnormal values in alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and/or alkaline phosphatase) of unknown origin, in ten prefectures of Japan (Ibaraki, Chiba, Mie, Fukuoka, Saga, Nagasaki, Kumamoto, Miyazaki, Kagoshima and Okinawa) from August 2007 to March 2011.

**Isolation of leptospires from dogs clinically suspected of having leptospirosis.** To isolate leptospires, two drops of blood were inoculated into 4 ml liquid Korthof's medium containing 10% rabbit serum and liquid Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris (EMJH) medium (Faine *et al.*, 1999), and cultivated at 30 °C for 3 months. The cultures in which no leptospires were observed under dark-field microscope during the 3-month incubation period were deemed negative.

**Antibody detection from dogs clinically suspected of having leptospirosis.** A MAT was performed to detect anti-*Leptospira* antibodies in patient serum samples (Faine *et al.*, 1999) using a battery of previously described reference strains (Koizumi *et al.*, 2008). Briefly, 25 µl of twofold serially diluted serum samples was incubated with the same volume of leptospiral cultures for 3 h at 30 °C. The end point was determined by the presence of ~50% free, unagglutinated leptospires compared with the control suspension (Levett, 2001). At least a fourfold increase in antibody titre between acute and convalescent serum samples was judged as positive. These reference strains were cultivated in liquid modified Korthof's medium as described above.

**Identification of the serogroups of dog isolates.** The serogroups of the isolates were identified by MAT using a panel of anti-*Leptospira* rabbit sera for serovars Australis, Autumnalis, Bataviae, Canicola, Castellonis, Cynopteri, Djasiman, Grippityphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Mini, Pomona, Pyrogenes, Sejroe, Sarmin and Tarassovi.

**DNA detection from dogs clinically suspected of having leptospirosis.** DNA was extracted from blood or sediment from plasma, serum or urine after centrifugation (16 000 g, 10 min) using a DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen). Extracted DNA was subjected to nested PCR to detect the leptospiral *flaB* gene, as described previously (Koizumi *et al.*, 2008), with slight modifications. The reaction volume of the first PCR mixture, which contained 5 µl DNA template, was 50 µl. Next, 1 µl first PCR product was added to 19 µl second PCR mixture. DNA sequencing of the amplicons was performed using a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) with the second PCR primers (L-*flaB*-F2; 5'-TGTGACAAGACGATGAAAGC-3', L-*flaB*-R2; 5'-AACATTGCCGTACCACTCTG-3').

***flaB* sequencing.** DNA was extracted from the *Leptospira* isolates, and leptospiral *flaB* was amplified using the first PCR primers (L-*flaB*-F1; 5'-CTCACCGTTCTCTAAAGTTCAAC-3', L-*flaB*-R1; 5'-TGAATTCGGTTTCATATTTGCC-3'), after which the nucleotide sequences of the amplicons were determined as described above.

**MLST.** MLST of the isolates was performed according to Thaipadungpanit *et al.* (2007). Sequence types (STs) were assigned through the MLST database (<http://leptospira.mlst.net/>). The new STs obtained in this study (ST118 and ST119) have been deposited in this database. The concatenated sequences were aligned in MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) using CLUSTAL W, and phylogenetic distances were calculated in MEGA4 using the neighbour-joining method.

**PFGE.** RFLP analysis of the genomes of *Leptospira* isolates was conducted by PFGE using the restriction enzyme *NotI*, as described previously (Koizumi *et al.*, 2009).

**Statistical methods.** Each serogroup of *Leptospira* isolates, Australis ( $n=14$ ), Autumnalis ( $n=6$ ) and Hebdomadis ( $n=21$ ), was tested for serogroup-specific correlation with mortality rate. For the Hebdomadis serogroup, except in one case of mixed infection with ST37 and ST119, each ST, ST37 ( $n=8$ ), ST118 ( $n=5$ ) and ST119 ( $n=6$ ), was tested for genotype-specific correlation with mortality rates. Associations with dead/alive data were tested using a  $2 \times 3$  Fisher's exact test.

## RESULTS

### Features of laboratory-confirmed leptospirosis in dogs

Of the 283 clinically suspected cases, 83 were laboratory diagnosed as leptospirosis by blood culture, antibody detection (at least a fourfold increase in MAT titre in acute and convalescent serum samples) and/or DNA detection, and leptospirosis was detected in dogs from all prefectures surveyed. Blood cultures were performed for 243 animals, and leptospire were isolated from 45 animals. Paired serum samples were obtained from 58 animals, of which a significant increase in antibody titre was detected in 30 serum samples. Blood and/or urine samples for DNA detection were collected from 236 animals and subjected to *flaB*-nested PCR. Leptospiral *flaB* was detected in 44 animals. There were 14, three and nine dogs that were positive for culture and DNA detection, culture and antibody detection, and DNA and antibody detections, respectively, and five dogs were positive for all three tests. Culture, MAT using paired serum samples and DNA detection were performed in 76, 33 and 71 of the 83 positive animals, respectively, and positive results were obtained in 45, 30 and 44 animals, respectively. Thus, the sensitivity of these tests was 59.2% for culture, 90.9% for antibody detection and 62.0% for DNA detection.

The ages of the infected animals ranged from 5 months to 13 years (median 5 years), and 63.4% were males. The infected dogs consisted of hunting dogs (31 dogs) and companion animals (50 dogs) (two were unknown). All the animals routinely went outside. Of the 82 positive animals with a recorded vaccination history, 24 (29.3%) were vaccinated. We obtained information on the outcome of 79 of the 83 laboratory-diagnosed animals 3 months after the first visit. The mortality rate among them was 53.2%. The clinical manifestations of the laboratory-confirmed dogs at the initial visit were fever (13.3%), vomiting (71.1%), hyperaemia and haemorrhage of the mucous membranes (41.0%) and jaundice (78.3%).

### Detection of anti-*Leptospira* antibodies and leptospiral *flaB* in dogs clinically suspected of having leptospirosis

Thirty dogs were serologically confirmed to have leptospirosis using paired serum samples, although convalescent

sera was obtained only from 58 of 271 dogs whose acute serum samples were collected. The predominant reactive serogroup was Hebdomadis (53.3%), followed by Australis (16.7%) and Autumnalis (16.7%) (Table 1). Although definitive diagnosis was made using paired serum samples, it was assumed that a high MAT titre ( $\geq 800$ ) in a single sample to a non-vaccinal serovar, accompanied by clinical signs of leptospirosis, is highly suggestive of active infection (Goldstein, 2010). There were 29 dogs whose single serum sample showed a reciprocal MAT titre  $\geq 800$  (Table 1). Combined with the results from paired serum samples, the predominant reactive serogroups were Hebdomadis (57.6%) and Australis (20.3%), which were detected in eight of the ten prefectures and five of the ten prefectures, respectively (Table 1). In contrast, antibodies against members of serogroups Canicola and Icterohaemorrhagiae, which are generally associated with canine leptospirosis, were detected in only 6.8 and 0% of the samples tested, respectively. Leptospiral *flaB* was detected in 44 animals: 23 in blood samples, 16 in urine samples and five in both blood and urine samples. Based on *flaB* sequences, all the *Leptospira* species were *L. interrogans* (data not shown).

### Molecular and serological characterization of *Leptospira* isolates

Leptospire were isolated from 45 animals, and 73 positive cultures were obtained from cultures using Korthof's and/or EMJH medium in seven prefectures (Table 2). The serogroups of the isolates were identified as Australis (16), Autumnalis (six), Canicola (one), Hebdomadis (21) and Icterohaemorrhagiae (one) by reactivity with the reference antisera (Table 2). Based on *flaB* sequences, the species of all the isolates were *L. interrogans*. MLST analysis revealed that all serogroup Australis isolates belonged to ST37, whereas serogroups Autumnalis and Hebdomadis isolates comprised three and four STs including new STs, ST118 and/or ST119, respectively (Fig. 1, Table 3). ST37 was detected in serogroups Australis, Autumnalis, Canicola and Hebdomadis, and ST118 was detected in serogroups Autumnalis and Hebdomadis. Although only one ST (ST37) was detected in serogroup Australis by MLST, PFGE using the restriction enzyme *NotI* demonstrated genetic heterogeneity in the serogroup Australis (Supplementary Fig. S1 available in JMM Online). Genetic heterogeneity was also observed in each ST of the serogroups Autumnalis and Hebdomadis (data not shown).

### Influence of the infecting serogroup and ST on the outcomes of infected dogs

Members of all five serogroups of *Leptospira* isolates caused lethal infections in dogs (57.1% in Hebdomadis, 78.6% in Australis and 100% in Autumnalis, Canicola and Icterohaemorrhagiae) (Table 3), and there was no statistically significant difference in the mortality rate among the serogroups ( $P=0.11$ ). In the Hebdomadis serogroup isolates, the mortality rates varied among the STs detected: 0% in ST103, 28.6% in ST119, 77.8% in ST37 and 80.0%

**Table 1.** Detection of anti-*Leptospira* antibodies by MAT in dogs clinically suspected of having leptospirosis

None of the samples tested was specific for serogroup Icterohaemorrhagiae.

Prefecture	Serum sample (no. positive animals)*	Serogroup					
		Australis	Autumnalis	Ballum	Canicola	Hebdomadis	Pomona
Ibaraki	Paired (2)	0	0	0	0	2	0
	Single (0)	0	0	0	0	0	0
Chiba	Paired (4)†	0	0	3	3	0	0
	Single (0)	0	0	0	0	0	0
Mie	Paired (2)	0	0	0	0	2	0
	Single (1)	0	1	0	0	0	0
Fukuoka	Paired (0)	0	0	0	0	0	0
	Single (3)	2	0	0	0	1	0
Saga	Paired (2)	1	0	0	0	1	0
	Single (4)‡	0	1	0	0	3	1
Nagasaki	Paired (0)	0	0	0	0	0	0
	Single (2)	2	0	0	0	0	0
Kumamoto	Paired (1)	0	0	0	0	1	0
	Single (1)	0	0	0	1	0	0
Miyazaki	Paired (10)†	1	3	0	0	6	2
	Single (14)‡	2	2	0	0	11	1
Kagoshima	Paired (9)	3	2	0	0	4	0
	Single (3)	1	0	0	0	2	0
Okinawa	Paired (0)	0	0	0	0	0	0
	Single (1)	0	0	0	0	1	0
Total	Paired (30)	5 (16.7 %)	5 (16.7 %)	3 (10.0 %)	3 (10.0 %)	16 (53.3 %)	2 (6.7 %)
	Single (29)	7 (24.1 %)	4 (13.8 %)	0	1 (3.4 %)	18 (62.1 %)	2 (6.9 %)
	Paired+single (59)	12 (20.3 %)	9 (15.3 %)	3 (5.1 %)	4 (6.8 %)	34 (57.6 %)	4 (6.8 %)

\*For single samples, a positive result was a reciprocal MAT titre  $\geq 800$ .

†There were four dogs (Chiba: two; Miyazaki: two) that exhibited equal titres of multiple serogroups.

‡There were three dogs (Saga: one; Miyazaki: two) that exhibited equal titres of multiple serogroups.

in ST118 (Table 3), but there was no statistically significant difference in the mortality rate among the STs ( $P=0.063$ ).

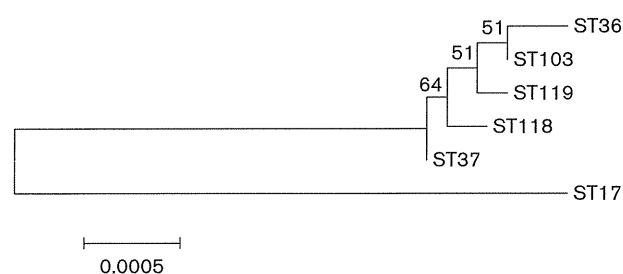
## DISCUSSION

Canine leptospirosis occurs worldwide and there are numerous reports on serological investigations on canine leptospirosis, but information on the causative *Leptospira* serotypes and genotypes and their effects on virulence in dogs remain limited. In human leptospirosis, although an

association between clinical severity and specific leptospiral serogroups has been refuted (Levett, 2001), it has been suggested that a specific clone or genotype can be associated with enhanced virulence (Gouveia *et al.*, 2008; Thaipadungpanit *et al.*, 2007). In canine leptospirosis, a serological study indicated differences in the outcomes of dogs infected with leptospires belonging to different serogroups (Goldstein *et al.*, 2006). However, the differences in virulence of *Leptospira* genotypes among infected dogs remain unknown. In this study, all five serogroups of

**Table 2.** Serogroups of *Leptospira* isolates obtained in this study

Prefecture	Serogroup (no. animals from which <i>L. interrogans</i> was isolated)
Chiba	Icterohaemorrhagiae (1)
Mie	Australis (1)
Fukuoka	Australis (1)
Kumamoto	Hebdomadis (2)
Miyazaki	Australis (14), Autumnalis (5), Canicola (1), Hebdomadis (15)
Kagoshima	Autumnalis (1), Hebdomadis (3)
Okinawa	Hebdomadis (1)



**Fig. 1.** Phylogenetic tree based on the concatenated sequences of *Leptospira* isolates. The sequences were aligned in MEGA4 using CLUSTAL W, and phylogenetic distances were calculated in MEGA4 using the neighbour-joining method. Numbers on the nodes indicate the bootstrap support after 1000 replicates. Each ST is based on partial nucleotide sequences of seven housekeeping genes and assigned by the MLST database (<http://leptospira.mlst.net/>). Bar, 0.0005 nucleotide substitutions per site.

*Leptospira* isolates caused mortalities in dogs, and there was no statistically significant difference in the mortality rate among the serogroups (Table 3). Conversely, the nearly significant differences in mortality rates among STs of serogroup Hebdomadis defined by MLST ( $P=0.063$ ) suggested that the virulence of Hebdomadis in dogs may be associated with the genotypes in this serogroup. This

statistical value may be attributable to the small sample numbers in this study, and a larger sample size may be needed to verify the correlation between *Leptospira* genotypes and virulence. Reduced virulence in a specific genotype has never been reported, and a new insight into leptospiral virulence could be obtained through a comparative genomic analysis of strains of the serogroup Hebdomadis (Gulig *et al.*, 2010; Nash *et al.*, 2010).

Classically, *L. interrogans* serovars Canicola and Icterohaemorrhagiae have been associated with clinical leptospirosis in dogs worldwide. However, the incidence of infection caused by these two serovars has decreased, and other serovars have become prevalent in the USA and Europe, probably due to the widespread use of bivalent vaccines of Canicola and Icterohaemorrhagiae, as well as increased contact between dogs and wildlife reservoirs caused by expanding suburban environments (Ellis, 2010; Gautam *et al.*, 2010; Stokes *et al.*, 2007). In the present study, the most common *Leptospira* serogroup responsible for acute disease in Japan was *L. interrogans* Hebdomadis, followed by Australis and Autumnalis (Tables 1 and 2). Although there is no information on the proportion of each serovar, one review article described that serovars Australis, Canicola, Copenhageni and Icterohaemorrhagiae have been isolated from dogs in Japan (Yanagawa, 1992). Bivalent vaccines have been used in Japan since the 1970s, and members of serogroups Autumnalis and Hebdomadis

**Table 3.** Serogroups and STs of *Leptospira* isolates and their influence on the outcomes of infected dogs

Serogroup	ST (no. of animals)	Mortality rate (%)	Outcome*	Vaccination		
				No	Yes	Unknown
Australis	ST37 (14)†	78.6	D: 11	10	1	0
			R: 3	2	0	1
Autumnalis	ST36 (4)	100	D: 4	3	1	0
	ST37 (1)	100	R: 0	0	0	0
	ST118 (1)	100	D: 1	1	0	0
Canicola	ST37 (1)	100	R: 0	0	0	0
			D: 1	1	0	0
Hebdomadis	ST37 (9)‡	77.8	R: 0	0	0	0
	ST103 (1)	0	D: 7	5	2	0
	ST118 (5)	80	R: 2	1	1	0
	ST119 (7)‡	28.6	D: 0	0	0	0
	R: 1	0	1	0	0	
Icterohaemorrhagiae	ST17 (1)	100	D: 4	3	1	0
			R: 1	1	0	0
			D: 2	2	0	0
			R: 5	4	1	0
			D: 1	1	0	0
			R: 0	0	0	0

\*D, Death; R, recovery.

†The outcome of two of 16 dogs from which *L. interrogans* serogroup Australis was isolated was unknown.

‡One dog that died had a mixed infection with ST37 and ST119.



were isolated from mice captured in Miyazaki Prefecture, which was one of the investigation sites in this study (Koizumi *et al.*, 2008). Therefore, it is strongly suggested that the cause of the emergence of new serogroups (Autumnalis and Hebdomadis) in Japan is the same as that of the emergence of new serovars in other foreign countries. In contrast to this study, Iwamoto *et al.* (2009) indicated recently that antibodies against Icterohaemorrhagiae were commonly detected in healthy unvaccinated dogs throughout Japan. Subclinical disease is common in dogs, and differences in clinical outcomes among leptospiral serogroups have been suggested (Goldstein *et al.*, 2006). Therefore, the serogroup Icterohaemorrhagiae strains present in Japan may cause subclinical infection more often than the serogroups detected in this study. Furthermore, cross-reactions and even paradoxical reactions are often observed in leptospiral infections (Levett, 2001), which may also explain the discrepancy between the previous work by Iwamoto *et al.* (2009) and the results of this study.

MLST has been widely employed for bacterial genotyping (Maiden, 2006) including *Leptospira* species (Ahmed *et al.*, 2011; Thaipadungpanit *et al.*, 2007). MLST is a simple molecular technique and can generate reliable, reproducible and easy-to-interpret results that are widely exchangeable compared with the results of PFGE. In the present study, MLST detected more STs than *flaB* sequencing (data not shown), but the same STs, i.e. ST37 and ST118, were found in more than one serogroup (Table 3). Thus, MLST is suitable for intra-serogroup genotyping but not for serogroup identification, at least for Japanese isolates. Moreover, PFGE using the restriction enzyme *NotI* demonstrated genetic heterogeneity in the same ST in the same serogroup (ST37 in serogroup Australis; Fig. S1), indicating that MLST has less discriminatory power than PFGE in *Leptospira* genome analysis.

The present study indicates that canine leptospirosis occurs in various areas of Japan. Both hunting and companion dogs were infected with leptospires, suggesting that infection with leptospires occurred in the living environments of humans, in addition to specific environments such as forests. Acute canine leptospirosis occurs in prefectures such as Ibaraki and Fukuoka where human leptospirosis has not been reported. As fewer than 50 human leptospirosis cases are reported annually, our results strongly suggest that human leptospirosis is under-reported in this country. Dogs can also be asymptomatic carriers of leptospires after recovering from acute infection. Subclinical disease is common in both experimental infections (Greenlee *et al.*, 2004, 2005) and natural infections (Stokes *et al.*, 2007). Both dogs and humans were infected with members of the same serogroups in some areas where this study was conducted (Koizumi *et al.*, 2008). Thus, there is a possibility that dogs serve as source of infection for humans. To confirm this possibility, further studies, including the identification of asymptomatic carriers and characterization of their isolates, need to be conducted.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the veterinary clinics and veterinary medical associations in Ibaraki, Chiba, Mie, Fukuoka, Saga, Nagasaki, Kumamoto, Miyazaki, Kagoshima and Okinawa for sample collection. We thank M. Suzuki, M. Nakamura, K. Taira, M. Hamasaki, S. Yahiro, K. Matsumoto and H. Osako for their assistance. This work was supported by a Health Sciences Research Grant-in-Aid for Emerging and Re-emerging Infectious Diseases from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan (H18-Shinkou-8 and H21-Shinkou-Ippan-004).

## REFERENCES

- Ahmed, A., Thaipadungpanit, J., Boonsilp, S., Wuthiekanun, V., Nalam, K., Spratt, B. G., Aanensen, D. M., Smythe, L. D., Ahmed, N. & other authors (2011). Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1374.
- Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., Levett, P. N., Gilman, R. H., Willig, M. R. & other authors (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3, 757–771.
- Ellis, W. A. (2010). Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *Vet Rec* 167, 602–605.
- Faine, S., Adler, B., Bolin, C. & Perolat, P. (1999). *Leptospira* and Leptospirosis, 2nd edn. Melbourne: MediSci.
- Gautam, R., Wu, C. C., Gupta, L. F., Potter, A., Moore, G. E. & Moore, G. E. (2010). Detection of antibodies against *Leptospira* serovars via microscopic agglutination tests in dogs in the United States, 2000–2007. *J Am Vet Med Assoc* 237, 293–298.
- Goldstein, R. E. (2010). Canine leptospirosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40, 1091–1101.
- Goldstein, R. E., Lin, R. C., Langston, C. E., Scrivani, P. V., Erb, H. N. & Barr, S. C. (2006). Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *J Vet Intern Med* 20, 489–494.
- Gouveia, E. L., Metcalfe, J., de Carvalho, A. L. F., Aires, T. S. F., Villasboas-Bisneto, J. C., Queirroz, A., Santos, A. C., Salgado, K., Reis, M. G. & Ko, A. I. (2008). Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis* 14, 505–508.
- Greenlee, J. J., Bolin, C. A., Alt, D. P., Cheville, N. F. & Andreasen, C. B. (2004). Clinical and pathologic comparison of acute leptospirosis in dogs caused by two strains of *Leptospira kirschneri* serovar grippotyphosa. *Am J Vet Res* 65, 1100–1107.
- Greenlee, J. J., Alt, D. P., Bolin, C. A., Zuerner, R. L. & Andreasen, C. B. (2005). Experimental canine leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovars pomona and bratislava. *Am J Vet Res* 66, 1816–1822.
- Gulig, P. A., de Crécy-Lagard, V., Wright, A. C., Walts, B., Telonis-Scott, M. & McIntyre, L. M. (2010). SOLiD sequencing of four *Vibrio vulnificus* genomes enables comparative genomic analysis and identification of candidate clade-specific virulence genes. *BMC Genomics* 11, 512.
- Iwamoto, E., Wada, Y., Fujisaki, Y., Umeki, S., Jones, M. Y., Mizuno, T., Itamoto, K., Maeda, K., Iwata, H. & Okuda, M. (2009). Nationwide survey of *Leptospira* antibodies in dogs in Japan: results from microscopic agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Med Sci* 71, 1191–1199.
- Koizumi, N., Muto, M., Yamamoto, S., Baba, Y., Kudo, M., Tamae, Y., Shimomura, K., Takatori, I., Iwakiri, A. & other authors (2008).

- Investigation of reservoir animals of *Leptospira* in the northern part of Miyazaki Prefecture. *Jpn J Infect Dis* **61**, 465–468.
- Koizumi, N., Uchida, M., Makino, T., Taguri, T., Kuroki, T., Muto, M., Kato, Y. & Watanabe, H. (2009). Isolation and characterization of *Leptospira* spp. from raccoons in Japan. *J Vet Med Sci* **71**, 425–429.
- Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* **14**, 296–326.
- Maiden, M. C. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**, 561–588.
- Martins, G., Penna, B. & Lilenbaum, W. (2012). The dog in the transmission of human leptospirosis under tropical conditions: victim or villain? *Epidemiol Infect* **140**, 207–208, author reply 208–209.
- Nash, J. H., Villegas, A., Kropinski, A. M., Aguilar-Valenzuela, R., Konczyk, P., Mascarenhas, M., Ziebell, K., Torres, A. G., Karmali, M. A. & Coombes, B. K. (2010). Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics* **11**, 667.
- Stokes, J. E., Kaneene, J. B., Schall, W. D., Kruger, J. M., Miller, R., Kaiser, L. & Bolin, C. A. (2007). Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovars in healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc* **230**, 1657–1664.
- Suepaul, S. M., Carrington, C. V. F., Campbell, M., Borde, G. & Adesiyun, A. A. (2010). Serovars of *Leptospira* isolated from dogs and rodents. *Epidemiol Infect* **138**, 1059–1070.
- Sykes, J. E., Hartmann, K., Lunn, K. F., Moore, G. E., Stoddard, R. A. & Goldstein, R. E. (2011). 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med* **25**, 1–13.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596–1599.
- Thaipadungpanit, J., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Smythe, L. D., Petkanchanapong, W., Limpiboon, R., Apiwatanaporn, A., Slack, A. T., Suputtamongkol, Y. & other authors (2007). A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis* **1**, e56.
- Yanagawa, R. (1992). [Animal leptospirosis]. *Kagaku Ryocho no Ryoiki* **8**, 673–678 (in Japanese).

## 第1節 感染症

### 10. 愛玩動物の感染症の簡易迅速診断

#### 1. 猫ひっかき病

##### 1.1 疾病の概要

グラム陰性細菌の *Bartonella henselae* が原因である。我が国では、猫ひっかき病は若齢者に多発する傾向が見られる。

我が国の飼育猫の2～20%が *B. henselae* に感染しており、特に若齢猫、ノミが寄生しているネコ、室外飼育のネコ、さらに温暖な地域のネコでは高い感染率を示す。

ヒトは、特に若齢のネコやネコノミが多数寄生したネコに引掻かれるか咬まれたりして感染することが多い。また、感染猫との接触や、その血液を吸血したネコノミから感染する可能性もある。ネコ間ではげんかによる創傷や、感染猫の血液を吸血したネコノミにより感染が広がる。

ヒトが *B. henselae* に感染した場合、3～10日(まれに数週間)の潜伏期を経た後、発症する。定型的な猫ひっかき病では、原因菌の侵入部位(通常、手指や前腕)に虫さされに似た病変が見られ、丘疹から水疱に、また一部では化膿や潰瘍を形成する場合もある。初期病変から1～2週間後、主に鼠径部、腋窩あるいは頸部リンパ節に腫脹が現れ、数週から数ヵ月間持続する。多くの症例で、発熱、悪寒、倦怠、食欲不振、頭痛等を示す。耳周囲のリンパ腺炎、眼瞼性結膜炎、脳炎、骨溶解性の病変、心内膜炎、肉芽腫性肝炎等がまれに発生する。

*B. henselae* に感染したネコは、ほとんど臨床症状は示さず、数ヵ月以上持続する菌血症を起こす。

#### 1.2 検査法

##### 1.2.1 遺伝子診断法

市販のDNA抽出キットを用い、患者リンパ節あるいは感染初期の血液からDNAを抽出する。Jensenら<sup>1)</sup>の16S-23S rRNA intergenic region (ITS) 領域を標的としたPCR法では、ヒトに病原性を有する主要な *Bartonella* 属菌種を検出することができる。*B. henselae* は172 bp、*B. clarridgeiae* は154 bp、*B. quintana* は157 bpにそれぞれバンドが現れる。

ただし、PCR法には特殊なDNA増幅装置を必要とするため、一般に普及するまでには至っていない。

##### 1.2.2 血清診断法

間接蛍光抗体法により抗 *B. henselae*、抗 *B. quintana* のIgG測定用抗原スライドキットが、海外では市販されている(図1, Focus technologies, Cypress, California, USA)。この検査キットでは、ペア血清による検査を推奨している。急性期と回復期血清のIgG抗体価に4倍以上の差が見られたもの、あるいは回復期血清のIgG抗体価が1:256以上で強い蛍光を示すものを陽性と判定する。特に、急性期血清のIgG抗体価が、1:256以上で強い蛍光を示した場合、直近の感染である可能性を示す。

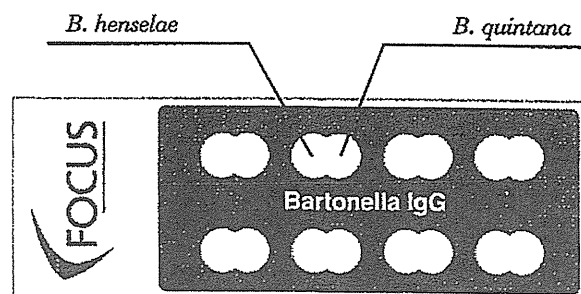


図1 市販のバルトネラ抗体検査キット  
(Focus社, USA)

#### 2. Q熱

##### 2.1 疾病の概要

偏性細胞内寄生細菌の *Coxiella burnetii* が原因の感染症である。ヒトは、主に本菌を保有する家畜からの殺菌不十分な乳を飲んだり、排泄物によって汚染された粉塵やエアロゾルを吸引して感染する。まれに、感染猫の流産胎児や胎盤が感染源になることがあるので、その取り扱いには注意が必要である。

ヒトが感染した場合、急性例では14～26日の潜伏期を経た後、インフルエンザに類似した症状、すなわち発熱、頭痛、胸痛、筋肉痛、関節痛、悪寒、発汗などから気管支炎、肺炎、肝炎、髄膜炎、腎臓障害などを

起こす。一般に予後は良好で、多くは2週間以内に回復するが、急性から慢性に移行した例では、肝炎、心内膜炎、心筋炎、心外膜炎、壊死性気管支炎、骨髄炎などを引き起こし、治療が遅れると死亡することもある。

イヌは感染しても無症状から微熱を出す程度であるが、乳汁中に30日間、尿中に70日間も本菌を排出するといわれている。ネコでは、微熱が2、3日続いたり、長期間の菌血症、死産・流産を起こすことがある。

## 2.2 検査法

間接蛍光抗体法により抗コクシエラ抗体(IgG)を測定用の抗原スライドキットが、海外では市販されている(図2, Focus technologies, Cypress, California, USA)。この抗原スライド上には、*C. burnetii*のI相およびII相菌が固相化されている。急性期の感染では、II相菌に対する抗体価がI相菌に対する抗体価より高くなる。これに対し、慢性感染あるいは回復期では、I相菌に対する抗体価がII相菌に対する抗体価より高くなる。このスライドキットでは、I相菌、II相菌に対する抗体価がいずれも1:16の場合、Q熱の感染を強く疑う。また、II相菌抗原のみに強く反応した場合(1:256以上)、直近の感染あるいは活動性の感染を疑う。

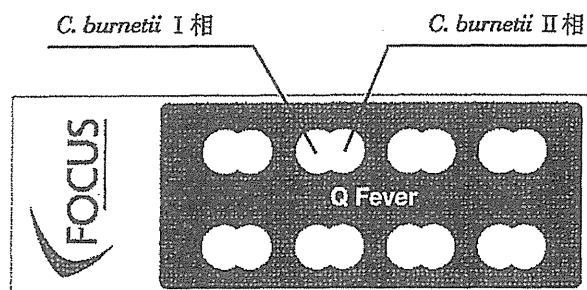


図2 市販のQ熱抗体検査キット  
(Focus社, USA)

## 3. 犬ブルセラ症

### 3.1 疾病の概要

イヌを自然宿主とするグラム陰性細菌の*Brucella canis*が原因である。我が国では、飼い犬あるいは野犬の3~4%が*B. canis*に感染しているといわれている。

ヒトは、感染犬との接触や本菌が原因の早産・流産を介助することにより感染する。イヌは感染個体の尿、流産胎児、悪露等により汚染されたエサや飼育環境などから感染する。潜伏期は1~3週間程度である。軽症例では、風邪に似た症状を示し、一定の発熱期と微

熱あるいは平熱期を交互に繰り返す、いわゆる波状熱を示す。便秘、頭痛、悪寒、関節痛、筋肉痛、心内膜炎、肺炎、髄膜炎、リンパ節、脾臓、肝臓の腫脹、男性では精巣炎なども見られる。

*B. canis*に罹患したイヌの多くは無症状であるが、長期間にわたり菌血症が続き、尿中に排菌するようになる。発症したイヌでは、発熱、瘦削、関節炎のほか、妊娠末期に死産や流産を起こしたり、オス犬では精巣上体炎、精巣の萎縮などが見られる。

## 3.2 検査法

ブルセラ・カニス凝集反应用菌液(北里第一三共ワクチン株式会社)が市販されている(図3)。この診断液は*Brucella canis*(QE-13B株)を加熱不活化後、リン酸緩衝食塩液で濃度調整したもので、防腐剤としてチメロサルを含有している。

【例】市販の凝集反应用菌液(北里第一三共ワクチン株式会社)を用いた抗ブルセラ・カニス抗体検出法

- (1) リン酸緩衝食塩液をあらかじめ用意した9本の小試験管に第1管には0.9 mL、第2管~第9管には0.5 mLずつを分注する。
- (2) 被検血清0.1 mLを第1管に加えて混合した後、0.5 mLを次の管に移し、第8管まで倍数希釈する。
- (3) 各希釈血清に凝集反应用菌液を0.5 mLずつ加えて混合したものを50℃の恒温槽内で24時間静置する。
- (4) 以下にしたがって判定する。

- ① 静置後24時間目までに、希釈血清の凝集度と濁度とを別途作製した標準混濁管のものと比較し、各希釈血清の凝集度を肉眼で判定する。
- ② 終末血清希釈倍数が160倍以上で50%凝集を示す血清を陽性とする。

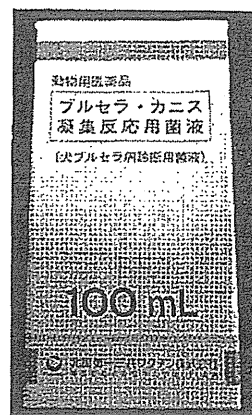


図3 ブルセラ・カニス凝集反應用菌液  
(北里第一三共ワクチン株式会社)