

[技術コーナー]

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鈴木道雄・木村昌伸・今岡浩一・山田章雄
国立感染症研究所獣医科学部

(平成 23 年 2 月 21 日受付, 平成 23 年 8 月 5 日受理)

国内の患者から分離された 12 株を含む計 24 株の *Capnocytophaga canimorsus* および国内の動物由来の 6 株を含む計 7 株の *Capnocytophaga cynodegmi* について、生化学的性状による簡易同定キットである ID テスト・HN ニッスイ-20 ラピッド「ニッスイ」を用いた同定結果を検討した。*C. canimorsus* については、5%ウサギ血液加ハートインフュージョン寒天培地による増菌後の検査では 24 株中 18 株が *C. canimorsus* と同定され、また 5 株で *C. canimorsus* が鑑別候補菌種と判定された。糖の分解能に変異のあった 1 株は *C. cynodegmi* と同定された。24 株中 4 株が β -ラクタマーゼ陽性であった。また、*C. cynodegmi* については、7 株中 5 株が *C. cynodegmi* と同定され、2 株で *C. cynodegmi* が鑑別候補菌種と判定された。*C. canimorsus* および *C. cynodegmi* の菌種レベルでの確実な同定には遺伝子検査が必要であるが、簡易同定キットを用いた生化学的性状検査は検査室で簡便に実施することが可能であり、検査前に適切な増菌培養を行えば、*Capnocytophaga* 属菌をかなり高率に同定できることが示された。

Key words: *Capnocytophaga canimorsus*, *Capnocytophaga cynodegmi*, 簡易同定キット, 5%ウサギ血液加ハートインフュージョン寒天培地, チョコレート寒天培地

Capnocytophaga 属菌は糸状の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すること、栄養要求性が厳しく成育が遅いことが特徴である。現在 8 種が知られており、うち 6 種はヒトの口腔内常在菌で、それら以外の 2 種、*C. canimorsus*、*C. cynodegmi* がイヌ・ネコの口腔内常在菌である。どちらもヒトに対して病原性を有するが、ヒトの重症例のほとんどは *C. canimorsus* 感染が原因である^{1,2)}。われわれが行った調査では、国内のイヌの 74%、ネコの 57% が *C. canimorsus* を保有していた³⁾。

C. canimorsus 感染症は 1976 年にアメリカの Bobo ら⁴⁾ が世界で初めて報告して以来、世界で約 250 例の症例が報告されており、その致死率は約 30% である^{1,2)}。わが国では 1993 年以来、23 例(うち

死亡例 7 例)の文献報告がある¹⁾。デンマーク、オランダでの疫学報告では人口 100 万人あたりそれぞれ 0.5、0.67 人の患者がいると推定されている^{4,5)}。菌の生育が遅く、菌の分離が難しいことなどから、把握できていない症例も一定数あると考えられる。

C. canimorsus の同定に際しては、まず観察・鏡検時の特徴として、菌体の形態、コロニー形状が挙げられる。菌体の形態は糸状ないし紡錘形であり、*Fusobacterium nucleatum* に類似する。*Capnocytophaga* 属菌は滑走能を有することから、生育するにつれて、コロニーの辺縁が周囲へ広がる特徴があるが、これは菌株や培養条件によって差異が大きく、*C. canimorsus* の臨床分離株においてはあまり明瞭に観察されないことが多い。菌体やコロニーの形状で同定することは難しく、菌種レベルでの同定には PCR 法が有用である^{2,3)}。臨床検査室で簡便に実施可能な同定検査としては、生化学的性状検査がある。簡易同定用キットは、各生化学的性状の陽性・陰性パターンにより細菌の属や種を判別するものであり、国内でも多くの種類が市販されている。その中でも ID テスト・HN ニッスイ-20 ラピッド「ニッスイ」(HN ニッスイ-20 ラピッド)

著者連絡先: (〒162-8640) 東京都新宿区戸山 1-23-1
国立感染症研究所獣医科学部
鈴木道雄
TEL: 03-4582-2751
FAX: 03-5285-1179
E-mail: michios@nih.go.jp

は、結果判定用コードブックに *Capnocytophaga* 属菌が菌種レベルで収載されており、同属菌の菌種同定に有用であると思われたため、今回われわれは、国内の *C. canimorsus* 感染症患者からの臨床分離株および *C. canimorsus*, *C. cynodegmi* イヌ・ネコ分離株について、HN-20 ラピッドを用いて生化学的性状による同定結果を検討した。またその際、*Capnocytophaga* 属菌は栄養要求性が高いことから、*Capnocytophaga* 属菌が良好に発育する5%ウサギ血液加ハートインフュージョン寒天培地 (rb 加 HI 培地) と HN ニッスイ-20 ラピッドの主要な検査対象である *Haemophilus* 属菌および *Neisseria* 属菌などの増菌にも用いられ、臨床検査室でも汎用されているチョコレート寒天培地を用いて、検査結果に及ぼす増菌培地の影響も比較した。

供試菌株

国内の *C. canimorsus* 感染症患者からの臨床分離株 12 株 (H-1~12), イヌ口腔内からの分離株 7 株 (D-1~7), ネコ口腔内からの分離株 4 株 (C-1~4) および ATCC35979 株 (Type strain, A-1) の *C. canimorsus* 計 24 株, 加えて *C. cynodegmi* のイヌ・ネコ口腔内分離株各 3 株 (D-8~10, C-5~7), ATCC49044 株 (Type strain, A-2) の計 7 株, 総計 31 株を用いた (表 1)。供試菌株は、*C. canimorsus*, *C. cynodegmi* 特異的 PCR 検査の結果に基づいて菌種を決定した。また、供試菌株はいずれもオキシダーゼ陽性、カタラーゼ陽性であった。検査前の供試菌株の増菌には、われわれの研究室で分離・増菌培養に用いている、ハートインフュージョン粉末培地 (Difco) とウサギ脱繊維血 (日本

バイオテスト社) を用いて自家で作製した rb 加 HI 培地および市販のチョコレート寒天培地 EX (チョコ培地) (日水製薬) を用いた (表 2)。それぞれの培地で 37°C, 5%CO₂ の培養条件下で 48 時間増菌培養したのち、HN ニッスイ-20 ラピッドに付属の HN ブイヨン

表 3. ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」のテスト項目と点数によるコード化

ALA	アラニン アミノペプチダーゼ	1
PHO	ホスファターゼ	2 7
NIT	硝酸塩還元	4
URE	尿素加水分解	1
ODC	オルニチン デカルボキシラーゼ	2 7
IND	インドール産生	4
GLS	グルコシダーゼ	1
PRO	プロリン アミノペプチダーゼ	2 7
γGA	γ-グルタミル アミノペプチダーゼ	4
GLU	ブドウ糖分解	1
MLT	麦芽糖分解	2 7
FRU	果糖分解	4
MAS	マンノース分解	1
MAN	マンニトール分解	2 7
TRE	トレハロース分解	4
SUC	白糖分解	1
LAC	乳糖分解	2 7
XYL	キシロース分解	4
ONP	β-ガラクトシダーゼ	1 3
NIR	亜硝酸塩還元	2
βLA	β-ラクタマーゼ	— —

表 1. 供試菌株一覧

菌株名			
<i>C. canimorsus</i>	ATCC35979	基準株 (Type strain)	アメリカ ATCC より購入
	H1~H12	ヒト患者分離株	国内分離株 (2004~2010 年)
	D1~D7	イヌ口腔内分離株	国内分離株 (2005~2007 年)
	C1~C4	ネコ口腔内分離株	国内分離株 (2007 年)
菌株名			
<i>C. cynodegmi</i>	ATCC49044	基準株 (Type strain)	アメリカ ATCC より購入
	D8~D10	イヌ口腔内分離株	国内分離株 (2005~2007 年)
	C5~C7	ネコ口腔内分離株	国内分離株 (2007 年)

表 2. 使用増菌培地

5%ウサギ血液加ハートインフュージョン寒天培地 チョコレート寒天培地 EX	rb 加 HI 培地 チョコ培地	自家調製 日水製薬
------------------------------------------	---------------------	--------------

に、マクファランド3と同じ濃度になるように接種菌液を調製し、試験に供した。37°C好気条件下で4~4.5時間反応後に各テスト項目(表3)の陽性・陰性を判定して、その結果をキットの用法に従って得点化し、7桁のコード番号を作成、コードブック ver. 1.02を参照して菌種の同定を行った。ヒト患者分離株についてはコードブックのAファイル(ヒト検体用)を、イヌ・ネコ口腔内分離株についてはBファイル(ヒト以外の検体用)をそれぞれ参照した。したがって、同じコード番号であってもヒト分離株とイヌ・ネコ分離株では鑑別対象となる菌種が異なる場合がある。また、セフィナーゼディスク(日本ベクトン・ディッキンソン)を用いて、各株のβ-ラクタマーゼ保有の有無を調べた。

C. canimorsus

rb加HI培地で増菌後の試験結果(表4)は、24株中18株が同定確率98%以上で*C. canimorsus*と同定され、2株(H-10, D-2)が*C. canimorsus*あるいは*C.*

*cynodegmi*のいずれかであると同定された。一方残りの4株では、*C. canimorsus*、*C. cynodegmi*に加えてH-7株では*Gardnerella vaginalis*が、H-8株では*Capnocytophaga ochracea*が鑑別候補となった。C-3株では*C. canimorsus*に加えて*Avibacterium paragallinarum*が鑑別候補となった。D-1株はPCR検査では*C. canimorsus*と同定されているが、本試験では確率99%で*C. cynodegmi*と同定された。D-1株では通常*C. canimorsus*では陽性にならないスクロース分解能が陽性であった。一方、チョコ培地で増菌した結果(表4)でも、3株(H-8, D-1, D-4)を除いて、14株が99%以上の確率で*C. canimorsus*と同定され、6株が*C. canimorsus*が2~3種の鑑別候補菌種のうちの1つ(同定確率50~60%)と判定されたが、糖の分解能の項目ではrb加HI培地増菌では陽性だったものがチョコ培地増菌では陰性と判定される場合がしばしば認められた。また、H-7株がチョコ培地増菌ではコード番号表中に該当菌種なしとなり、D-4株は確率

表4. *C. canimorsus* 検査成績

菌株*	5%ウサギ血液加ハートインフュージョン寒天培地				チョコレート寒天培地 EX					
	コード	同定菌名	確率	同定菌名	確率	コード	同定菌名	確率	同定菌名	確率
H-1	3010001	<i>C. canimorsus</i>	>99%	—	—	3010001	<i>C. canimorsus</i>	>99%	—	—
H-2	3013121	<i>C. canimorsus</i>	98%	—	—	3010001	<i>C. canimorsus</i>	>99%	—	—
H-3	3010001	<i>C. canimorsus</i>	>99%	—	—	3010001	<i>C. canimorsus</i>	>99%	—	—
H-4	3001121	<i>C. canimorsus</i>	99%	—	—	3000001	<i>C. canimorsus</i>	>99%	—	—
H-5	3001121	<i>C. canimorsus</i>	99%	—	—	3000001	<i>C. canimorsus</i>	>99%	—	—
H-6	3013121	<i>C. canimorsus</i>	98%	—	—	3011101	<i>C. canimorsus</i>	99%	—	—
H-7	3017161	<i>C. canimorsus</i>	62%	<i>C. cynodegmi</i>	31%	3010041	該当なし	—	—	—
H-8	3037121	<i>C. ochracea</i>	53%	<i>C. canimorsus</i>	29%	3037121	<i>C. ochracea</i>	53%	<i>C. canimorsus</i>	29%
H-9	3013121	<i>C. canimorsus</i>	98%	—	—	3017121	<i>C. canimorsus</i>	64%	<i>C. cynodegmi</i>	32%
H-10	3017121	<i>C. canimorsus</i>	64%	<i>C. cynodegmi</i>	32%	3017121	<i>C. canimorsus</i>	64%	<i>C. cynodegmi</i>	32%
H-11	3013121	<i>C. canimorsus</i>	98%	—	—	3010001	<i>C. canimorsus</i>	>99%	—	—
H-12	3010001	<i>C. canimorsus</i>	>99%	—	—	3010001	<i>C. canimorsus</i>	>99%	—	—
D-1	3037171	<i>C. cynodegmi</i>	99%	—	—	3037171	<i>C. cynodegmi</i>	99%	—	—
D-2	3017121	<i>C. canimorsus</i>	67%	<i>C. cynodegmi</i>	33%	3017161	<i>C. canimorsus</i>	67%	<i>C. cynodegmi</i>	33%
D-3	3013121	<i>C. canimorsus</i>	99%	—	—	3010001	<i>C. canimorsus</i>	54%	<i>A. paragallinarum</i>	46%
D-4	3013121	<i>C. canimorsus</i>	99%	—	—	1010001	<i>A. paragallinarum</i>	>99%	—	—
D-5	3013121	<i>C. canimorsus</i>	99%	—	—	3013121	<i>C. canimorsus</i>	99%	—	—
D-6	3013121	<i>C. canimorsus</i>	99%	—	—	3010001	<i>C. canimorsus</i>	54%	<i>A. paragallinarum</i>	46%
D-7	3050001	<i>C. canimorsus</i>	>99%	—	—	3050001	<i>C. canimorsus</i>	>99%	—	—
C-1	3053121	<i>C. canimorsus</i>	99%	—	—	3053121	<i>C. canimorsus</i>	99%	—	—
C-2	3013121	<i>C. canimorsus</i>	99%	—	—	3013121	<i>C. canimorsus</i>	99%	—	—
C-3	3010001	<i>C. canimorsus</i>	54%	<i>A. paragallinarum</i>	46%	3010001	<i>C. canimorsus</i>	54%	<i>A. paragallinarum</i>	46%
C-4	3013121	<i>C. canimorsus</i>	99%	—	—	3013121	<i>C. canimorsus</i>	99%	—	—
A-1	3013121	<i>C. canimorsus</i>	98%	—	—	3010001	<i>C. canimorsus</i>	>99%	—	—

*: H-1-12: ヒト由来, D-1-7: イヌ由来, C-1-4: ネコ由来, A-1: ATCC35979株(Type strain)
3番目の候補菌種は表中省略(本文参照)

99%で *Avibacterium paragallinarum* と同定された。しかしながらこの計2株も、*C. canimorsus* と同定される、あるいは *C. canimorsus* が鑑別候補菌種となるコード番号とは1テスト項目 (H-7: キシロース, D-4: ホスファターゼ) の陽性/陰性の違いであった。D-1株はチョコ培地増菌, rb加HI培地増菌ともに同じコード番号となり、*C. cynodegmi* と同定された。上記の結果をまとめると、rb加HI培地増菌で *C. canimorsus* と同定されるか、*C. canimorsus* が鑑別候補菌種の一つとなったのは24株中23株であった。この中でチョコ培地増菌ではrb加HI培地増菌とは異なるコード番号となった12株のうち、2株はチョコ培地増菌では該当菌種なし (H-7)、あるいは他の菌種 (D-4) であると判定された。 β -ラクタマーゼ試験では、イヌ由来株の2株 (D-2, D-5) およびネコ由来株の2株 (C-2, C-4) の計4株は β -ラクタマーゼ陽性を示し、ヒト分離株12株を含めた他の20株は陰性であった。HN ニッスイ-20 ラピッドで β -ラクタマーゼ陽性となった4株は、セフィナーゼディスクによる検査でも陽性を示し、また他の20株はいずれもセフィナーゼディスクによる検査でも陰性であり、両試験の判定結果は完全に一致した。

C. cynodegmi

7株いずれもrb加HI培地による増菌とチョコ培地による増菌で判定結果のコード番号が一致した (表5)。7株中5株は *C. cynodegmi* と同定され、2株 (C-5, C-6) は *C. cynodegmi* あるいは *C. canimorsus* が鑑別候補菌種であると同定された。 β -ラクタマーゼ試験で陽性を示した菌株はなかった。

C. canimorsus および *C. cynodegmi* の各菌株について、rb加HI培地とチョコ培地の2種類の培地を用いて増菌培養を行い、HN ニッスイ-20 ラピッドを用いた生化学的性状検査による同定結果を検討した。ど

ちらの培地を用いた試験でもおおむね良好な結果を得たが、生育が比較的遅い菌株の場合、チョコ培地での48時間培養では増殖がやや不十分であるためか、一部の菌株では正確な同定結果が得られなかった。*C. canimorsus* には元来の性質として糖の分解能の乏しい菌株も存在するため、糖の分解能のテスト項目が陰性化しても同定結果自体には直接影響しない場合が多い。しかしながら、rb加HI培地増菌では *C. canimorsus* と同定されたにもかかわらず、チョコ培地増菌では他属の菌や該当なしと同定された2株は、フォスファターゼが陰性化したケースと、糖の分解能の陽性パターンがイレギュラーに変化したケースであった。また、H-7株のように、同じ *Capnocytophaga* 属菌のうち、ヒトに常在する菌種とイヌ・ネコに常在する菌種の双方が候補菌種となることがあったが、ヒト保有菌種ではカタラーゼ・オキシダーゼともに陰性、イヌ・ネコ保有菌種ではどちらも陽性であるため、これらの追加検査を行うことによって、鑑別が可能である。臨床分離株はイヌ・ネコ分離株と比較して、糖の分解能に乏しい株が認められる傾向があったが、これは本来の宿主および常在部位でないヒトの末梢血中から分離されたことによる影響なのか、ヒトに病原性を有するタイプの菌株がもともと持っている性質であるのかは不明である。*C. cynodegmi* の各菌株では2種類の増菌培地を用いた試験結果の間に違いが認められなかったが、このことは *C. cynodegmi* が *C. canimorsus* よりも一般的に生育が良好で、チョコ培地上でも各株とも十分に生育したためと思われる。イヌ・ネコの保有する2菌種である *C. canimorsus* と *C. cynodegmi* は遺伝学的にも極めて近縁で、生化学的性状も類似している。しかし、適切な増菌培養を行ったのちにHN ニッスイ-20 ラピッドによる検査を行えば、両種をかなり高率に同定することが可能であることが示され

表5. *C. cynodegmi* 検査成績

菌株*	5%ウサギ血液加ハートインフュージョン寒天培地					チョコレート寒天培地 EX				
	コード	同定菌名	確率	同定菌名	確率	コード	同定菌名	確率	同定菌名	確率
D-8	3017131	<i>C. cynodegmi</i>	>99%	—	—	3017131	<i>C. cynodegmi</i>	>99%	—	—
D-9	3017131	<i>C. cynodegmi</i>	>99%	—	—	3017131	<i>C. cynodegmi</i>	>99%	—	—
D-10	3017131	<i>C. cynodegmi</i>	>99%	—	—	3017131	<i>C. cynodegmi</i>	>99%	—	—
C-5	3017121	<i>C. canimorsus</i>	67%	<i>C. cynodegmi</i>	33%	3017121	<i>C. canimorsus</i>	67%	<i>C. cynodegmi</i>	33%
C-6	3017121	<i>C. canimorsus</i>	67%	<i>C. cynodegmi</i>	33%	3017121	<i>C. canimorsus</i>	67%	<i>C. cynodegmi</i>	33%
C-7	3017131	<i>C. cynodegmi</i>	>99%	—	—	3017131	<i>C. cynodegmi</i>	>99%	—	—
A-2	3017131	<i>C. cynodegmi</i>	>99%	—	—	3017131	<i>C. cynodegmi</i>	>99%	—	—

*: D-8-10: イヌ由来, C-5-7: ネコ由来, A-2: ATCC49044株 (Type strain)

た。細菌検査室においては一般的にヒツジ血液寒天培地が用いられることが多いと思われるが、われわれが国内で市販されている数種類のヒツジ血液寒天培地を *Capnocytophaga* 属菌の増菌培養に用いたところ、成分として、ハートインフュージョンベースで作られたものでは比較的良好に生育した。しかしながら、その他トリプテケースソイベースのものなどでは、今回用いたチョコ培地と同じかやや良好な生育しか認められず、特に一部の菌株では十分な増菌が得られないものもあった。すなわち、一口にヒツジ血液寒天培地といっても、その成分の違いにより、生育に大きな違いが見られ、使用には注意を必要とすることがわかった。HN ニッスイ-20 ラピッドを用いた同定では、正確な結果を得るには48時間以内の培養時間でマクファランド3相当の菌液を調整できる菌量を得る必要がある。生育の遅い菌株の場合には今回のチョコ培地と同様、正確な同定結果が得られない場合もあることから、各検査室で使用している培地の特性に留意する必要がある。さらに、HN ニッスイ-20 ラピッドには、菌種同定用のコード番号として表される19種類のテスト項目のほかに、 β -ラクタマーゼ保有の有無についての項目がある。イヌ・ネコ口腔内分離株の計11株のうち、イヌ・ネコ口腔由来の4株は β -ラクタマーゼ陽性を示したが、ヒト患者由来の12株はいずれも β -ラクタマーゼ陰性であった。また、別途実施したセンシディスク（日本ベクトン・ディッキンソン）を用いた薬剤感受性試験では、これら4株はペニシリン系の抗菌薬であるペニシリン、アンピシリンおよびアモキシシリンに耐性であった（データ未公表）が、 β -ラクタマーゼ阻害剤との合剤であるオグメンチンには感性であった。このことから、本キットはペニシリン系抗菌薬に対する薬剤感受性の簡易的なチェック

にも有用であると考えられる。

イヌ・ネコが高率に保有する *C. canimorsus* がヒトに重篤な感染を起こしうる病原性を、一般的、基本的性質として有するのか、何らかの病原因子などを有する一部の菌株に限ってヒトに重篤な症状を引き起こすのかは現在のところ不明である。現在、生化学的性状を含めた各種性状と病原性との関連性についても解析を進めている。

謝 辞 臨床分離菌株の分与にご協力いただいた各医療機関の先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) 鈴木道雄, 今岡浩一. 2010. *Capnocytophaga canimorsus* による人獣共通感染症. 皮膚病診療 32: 1345-1351.
- 2) Gaastra, W., L. J. A. Lipman. 2010. *Capnocytophaga canimorsus*. Vet. Microbiol. 140: 339-346.
- 3) Suzuki, M., M. Kimura, K. Imaoka, et al. 2010. 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.
- 4) Bobo, R. A., et al. 1976. A previously undescribed Gram-negative bacillus causing septicemia and meningitis. Am. J. Clin. Pathol. 65: 564-569.
- 5) Pers, C., et al. 1996. *Capnocytophaga canimorsus* septicemia in Denmark, 1982-1995: Review of 39 cases. Clin. Infect. Dis. 23: 71-75.
- 6) van Dam, A. P., A. Jansz. 2011. *Capnocytophaga canimorsus* infections in the Netherlands: A nationwide survey. Clin. Microbiol. Infect. 17: 312-315.