

[短 報]

Dysgonomonas mossii 及び *Dysgonomonas capnocytophagoides* を対象とした
臨床細菌学的検討

太田悠介¹⁾・松本竹久²⁾・春日恵理子²⁾・堀内一樹²⁾
根岸達哉²⁾・矢口ともみ²⁾・高見沢将³⁾・村上将貴⁴⁾

¹⁾ 信州大学大学院医学系研究科保健学専攻

²⁾ 信州大学医学部附属病院

³⁾ 佐久医療センター臨床検査科

⁴⁾ 佐久市立国保浅間総合病院臨床検査科

(平成 26 年 2 月 25 日受付, 平成 26 年 6 月 2 日受理)

当施設にて分離された *Dysgonomonas mossii* と *Dysgonomonas capnocytophagoides* の臨床細菌学的検討を行った。両菌種は、ヒツジ血液寒天培地とチョコレート寒天培地に発育するが、BTB 乳糖加寒天培地では発育が認められず、本属菌の特徴である X 因子要求性が確認された。生化学的性状による同定検査は、菌種間において性状が類似しているため鑑別が困難であり、遺伝子学的同定検査を実施する必要がある。*D. capnocytophagoides* SH2814 は imipenem に対して $>8 \mu\text{g/mL}$ の MIC を示し、カルバペネム系抗菌薬が有効でない可能性が示された。また両菌種とも minocycline と clindamycin に $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ の MIC を示した。*Dysgonomonas* 属菌は免疫能の低下した患者に侵襲的感染を引き起こすが、臨床材料からの分離頻度は稀であり、病原性や細菌学的な性状を明らかにするためにも、正確な菌種同定による症例の蓄積が重要と考えられる。

Key words: *Dysgonomonas*, X 因子, 16S rRNA

序 文

Dysgonomonas 属は、2000 年に菌種登録されたグラム陰性通性嫌気性球桿菌であり、アメリカ疾病予防管理センター (Center for Disease Control and Prevention: CDC) による分類では CDC group DF-3 に属していたが、後に *Dysgonomonas capnocytophagoides* に分類された¹⁾。本属菌は、*Flavobacterium-Bacteroides* 門の *Bacteroides* 属の亜群に属し、*D. capnocytophagoides*, *Dysgonomonas gadei*, *Dysgonomonas mossii*, *Dysgonomonas hofstadii* と *Dysgonomonas oryzae* の 5 菌種が報告されている^{1)~4)}。臨床材料か

らの分離が報告されている菌種として、*D. capnocytophagoides* は主に白血病⁵⁾⁶⁾、低 γ グロブリン血症⁷⁾ や糖尿病⁸⁾ を基礎疾患として持つ免疫不全患者の便より検出され^{7)9)~12)}、尿¹³⁾、皮膚の膿瘍⁵⁾ や血液⁵⁾⁶⁾¹⁴⁾ からの検出例も報告されている。*D. gadei* と *D. mossii* は胆管炎や膀胱癌患者より分離されている¹⁾¹⁵⁾。しかし、本属菌による感染症や分離の報告は極めて稀で、病原性や臨床的意義については未だ解っていない。

今回、当院で臨床材料から分離された *D. mossii* と *D. capnocytophagoides* の臨床細菌学的な検討を行ったので報告する。

材料と方法

1. 対象菌株

臨床材料より分離された *D. mossii* SH1079 と *D. capnocytophagoides* SH2814 を対象とした。*D. mossii* SH1079 は、既往歴として胃癌のある 60 代男性より分離された。腭頭部漿液性嚢胞腺腫を指摘され、腭頭

著者連絡先：(〒390-8621) 長野県松本市旭 3-1-1
国立大学法人信州大学医学部附属病院
松本竹久
TEL: 0263-37-3493
FAX: 0263-37-5316
E-mail: ggatcc@shinshu-u.ac.jp

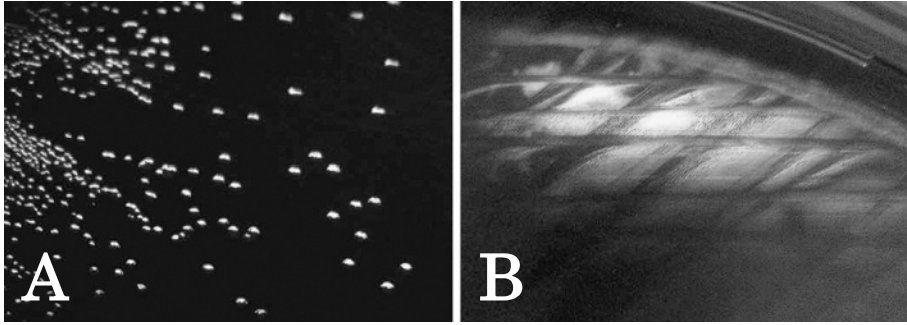


Fig. 1. Macroscopic observation of *D. mossii* SH1079 colonies
A: Sheep blood agar, B: BTB agar

十二指腸切除術及び膵管空腸吻合術施行のため入院となった。血液検査では白血球数は $4700/\mu\text{L}$ 、C-reactive protein (CRP) は 0.01 mg/dL と基準範囲内であったが、腸瘻検体よりグラム陰性通性嫌気性球桿菌が分離された。本菌株分離2週間前に imipenem (IPM) 1 g/day を1週間使用し、分離後は抗菌薬治療を実施していなかった。*D. capnocytophagoides* SH2814 は、既往歴として膀胱癌と腸閉塞がある80代男性より分離された。肝門部胆管癌と閉塞性黄疸が疑われ拡大右葉及び肝外胆管切除のため入院となった。本菌株分離前には vancomycin (VCM) 1 g/day と cefoperazone/sulbactam (CPZ/SBT) 2 g/day を2ヶ月間使用したが、CRPが 1.04 mg/dL と軽度上昇を認め、総胆管胆汁検体よりグラム陰性通性嫌気性球桿菌が分離された。分離後は VCM 1 g/day と cefepime 2 g/day を4日間使用し、炎症反応の改善が認められた。

2. 細菌学的検査

(1) 塗抹鏡検・培養検査

塗抹標本のグラム染色は Bartholomew&Mittwer 変法 (Wako) にて行った。被検菌株をヒツジ血液寒天培地 (BD)、BTB 乳糖加寒天培地 (BD) とチョコレート寒天培地 (BD) に接種し、 35°C 5% 炭酸ガス条件下で24時間培養を行い、同様にアネロコロンビア寒天培地 (BD) に接種後 37°C 嫌気条件下で24時間培養を行った。

(2) 生化学的同定検査

生化学的性状については、IDテスト HN-20 Rapid (ニッスイ) にて検査を実施し、その他カタラーゼ試験、オキシダーゼテスト (栄研) を用いたオキシダーゼ試験、XV ディスク (栄研) を用いた XV 因子要求試験とポルフィリン試験を実施した。

(3) 遺伝子学的同定検査

24時間培養後のチョコレート寒天培地より得られ

たコロニーより DNA 抽出を行い、16S rRNA 遺伝子の DNA シークエンスを行った。得られた DNA 配列を BLAST と Ribosomal Database Project II を用いて基準菌株と比較し、菌種を同定した¹⁶⁾。

(4) 質量分析法による同定検査

48時間培養後のチョコレート寒天培地より得られたコロニーをエタノール・ギ酸抽出法により処理し、MALDI Biotyper 3.1 (BRUKER) を用いて Real Time Classification による同定検査を行った。

3. 薬剤感受性検査

薬剤感受性検査については、微量液体希釈法を実施した。ウマ溶血液加ブルセラブロス (極東) に菌を懸濁させ、オプトパネル MP OP 1 (極東) に培地を分注し 35°C 好気条件下で24時間培養後、ampicillin (ABPC)、ampicillin/sulbactam (ABPC/SBT)、ceftazidime (CAZ)、cefditoren (CDTR)、clindamycin (CLDM)、CPZ/SBT、cefotiam (CTM)、cefotaxime (CTX)、erythromycin (EM)、gentamicin (GM)、IPM、levofloxacin (LVFX)、meropenem (MEPM)、minocycline (MINO)、penicillin G (PCG) と piperacillin (PIPC) について MIC ($\mu\text{g/mL}$) を測定した。

結 果

1. 細菌学的検査

両症例のグラム染色所見は、いずれもグラム陰性の短桿菌もしくは球桿菌状の形態が観察された。*D. mossii* SH1079 は、チョコレート寒天培地とアネロコロンビア寒天培地において直径 $0.5\sim 1\text{ mm}$ の灰色がかった白色コロニーを形成し、ヒツジ血液寒天培地では $0.2\sim 0.4\text{ mm}$ のコロニーを形成したが、BTB 乳糖加寒天培地では菌の発育は観察されなかった (Fig. 1)。*D. capnocytophagoides* SH2814 は、ヒツジ血液寒天培地、チョコレート寒天培地とアネロコロンビア寒天培地に

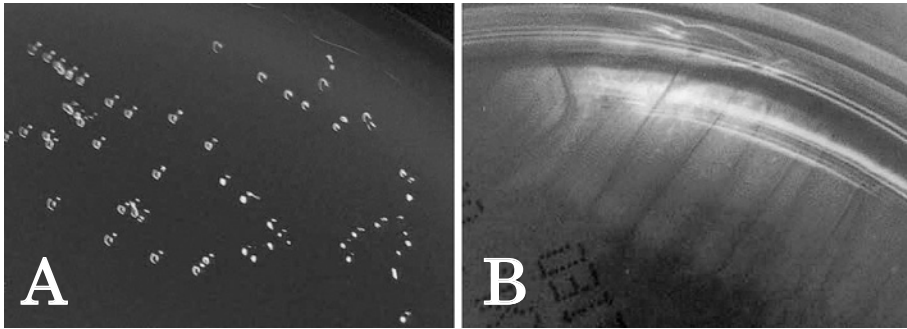


Fig. 2. Macroscopic observation of *D. capnocytophagoides* SH2814 colonies
A: Sheep blood agar, B: BTB agar

Table 1. Biochemical reactions of *D. mossii* SH1079 and *D. capnocytophagoides* SH2814

Biochemical test	A	B	C	D
Alanine aminopeptidase	-	-	+	+
Phosphatase	+	+	ND*	ND
Nitrate reduction	-	-	-	-
Urea hydrolysis	-	-	-	-
Ornithine Decarboxylase	-	-	ND	ND
Indole production	+	-	+	-
Glycosidase	+	+	+	+
Proline aminopeptidase	-	-	-	-
γ -glutamyl transpeptidase	-	+	ND	ND
Glucose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
Fructose	+	+	ND	ND
Mannose	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	+
Trehalose	+	+	-	+
Sucrose	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+
ONPG test	+	+	+	+
Nitrite reduction	-	-	ND	ND
Oxidase	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-

*ND: No data

A: *D. mossii* SH1079, B: *D. capnocytophagoides* SH2814, C: *D. mossii* CCUG 43457, D: *D. capnocytophagoides* CCUG 17966

において直径1~2 mmの灰色がかった白色コロニーを形成し、BTB乳糖加寒天培地では*D. mossii* SH1079と同様に菌の発育は観察されなかった(Fig. 2)。*D. capnocytophagoides* SH2814について、チョコレート寒

天培地で発育したコロニーのみ、ストロベリー様の甘い臭気が確認された。

生化学的同定検査結果について、IDテストHN-20 Rapidでは*D. mossii* SH1079が2417771、*D. capnocytophagoides* SH2814が2057771のプロファイルナンバーとなり該当菌種はなかった。カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験とIDテストHN-20 Rapidによる検査結果について、各々の基準菌株である*D. mossii* Culture Collection, University of Göteborg (CCUG) 43457²⁾と*D. capnocytophagoides* CCUG 17966¹⁾の性状と比較したものをTable 1に示した。XV因子要求試験について、両分離株においてポルフィリン試験ではポルフィリン環が形成されず陰性を示し、X因子とXV因子の周囲でのみ菌発育が認められた(Fig. 3)。

遺伝子学的同定検査では、*D. mossii* SH1079の16S rRNA遺伝子配列は、それぞれ基準菌株である*D. mossii* CCUG 43457と99.4% (1402/1411 bp)、*D. gadei* Y18530と94.5% (1349/1427 bp)、*D. capnocytophagoides* LMG 11519と91.7% (1312/1431 bp)の相同性を示した。*D. capnocytophagoides* SH2814の16S rRNA遺伝子配列は、それぞれ基準菌株である*D. capnocytophagoides* LMG 11519と99.2% (1429/1440 bp)、*D. gadei* Y18530と92.8% (1328/1431 bp)、*D. mossii* CCUG 43457と91.9% (1300/1414 bp)の相同性を示した。

質量分析法による同定検査では、*D. mossii* SH1079は、スコア1.338で*Enterococcus hirae*が挙げられ、*D. capnocytophagoides* SH2814は、スコア2.14で*D. gadei*が挙げられた。

2. 薬剤感受性検査

薬剤感受性検査の結果をTable 2に示した。

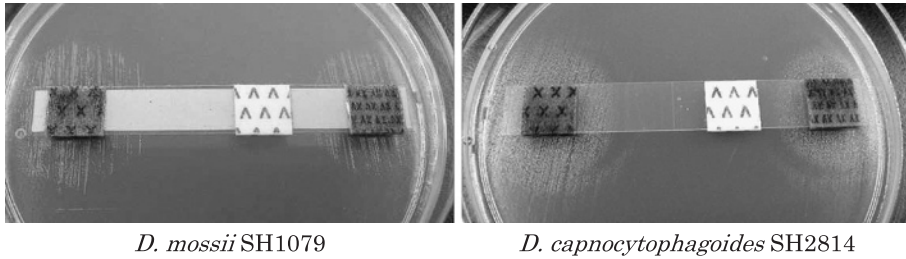


Fig. 3. X-factor auxotrophic tests in Mueller Hinton agar of *D. mossii* SH1079 and *D. capnocytophagoides* SH2814

Table 2. Antimicrobial susceptibility results of *D. mossii* SH1079 and *D. capnocytophagoides* SH2814

Antimicrobial agent	SH1079 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	SH2814 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
ABPC	8	>8
ABPC/SBT	1/0.5	>8/4
CAZ	>16	>16
CDTR	4	>4
CLDM	0.25	≤ 0.12
CPZ/SBT	16/8	>32/16
CTM	>8	>8
CTX	16	>32
EM	2	>2
GM	>32	>32
IPM	0.5	>8
LVFX	8	1
MEPM	≤ 0.12	>8
MINO	≤ 0.25	≤ 0.25
PCG	>4	>4
PIPC	32	>64

考 察

Dysgonomonas 属菌は、X 因子要求性が認められ、BTB 乳糖加寒天培地に発育しないことから *Haemophilus* 属との鑑別が必要となるが、V 因子非要求性であること、オキシダーゼ試験とカタラーゼ試験が陰性である点で鑑別が可能と考えられる。同様に鑑別が必要と考えられる菌として、発育が緩徐で栄養要求性の高い菌グループである HACEK が挙げられる。これらとの鑑別については X 因子要求性という点で *Eikenella corrodens* 以外の HACEK とは鑑別可能であり、またオキシダーゼ試験が陰性である点で、*E. corrodens* と鑑別可能と考えられる。以上の菌種との鑑別性状を Table 3 に示した¹⁷⁾。また同定補助手段として、チョコレート寒天培地で培養した際に *D. capnocytophagoides* の産生するストロベリー様の甘い臭気が

上記の菌との鑑別に寄与すると考えられる。*D. mossii* SH1079 は、アラニンアミノペプチダーゼについて、*D. capnocytophagoides* SH2814 は、アラニンアミノペプチダーゼ、マンニトールとトレハロースについて従来の報告¹²⁾と異なる検査結果を示しており、これらの性状については多様性があると考えられる。ID テスト HN-20 Rapid を使用した生化学的同定検査結果は両菌種とも類似し、生化学的性状が報告されている項目のうち唯一インドール反応の結果に相違が認められたが、*D. capnocytophagoides* にはインドール反応陽性例も報告されており¹⁾、生化学的性状による鑑別は困難であると考えられる。同様に両菌種間で γ -グルタミルトランスペプチダーゼの結果に相違が認められたが、本項目の性状についてはこれまでに報告されておらず、現時点での評価は困難であるが、今後両菌種の鑑別点となる可能性がある。Rapid ID 32A (シスメックス・バイオメリュー) を用いた生化学的同定検査では、グルタミルグルタミン酸アリアルアミダーゼについて *D. mossii* は陰性を示し、*D. capnocytophagoides* は陽性を示すと報告されており、両菌種の鑑別に寄与すると考えられる¹²⁾。また現在のところ市販されている各種同定キットにおける同定可能菌に本属菌が挙げられているものはない。

16S rRNA 遺伝子を用いた同定検査は、*D. mossii* SH1079 では各々の基準菌株である *D. mossii* と 99.4%、*D. gadei* と 94.5%、*D. capnocytophagoides* と 91.7% の相同性を示し、*D. capnocytophagoides* SH2814 は各々の基準菌株である *D. capnocytophagoides* と 99.2%、*D. gadei* と 92.8%、*D. mossii* と 91.9% の相同性を示し、菌種同定が可能であった。

質量分析装置による同定検査法である MALDI Biolyser は、データベースに登録されている菌種のマスペクトルとの相同性をスコアとして示し、スコアが 2.0 以上であると菌種レベルで信頼性が高い結果であることを示し、スコアが 1.7 以上 2.0 未満であると属

Table 3. Characteristics for differentiating *D. mossii* and *D. capnocytophagoides* from HACEK group

Biochemical test	A	B	C	D	E	F	G	H
Requirement for X-factor	+	+	-	-	+	+	-	-
Requirement for V-factor	-	-	+	D	-	-	-	-
catalase	-	-	D	-	+	-	-	-
oxidase	-	-	+	D	D	+	+	+

A: *Dysgonomonas mossii*, B: *Dysgonomonas capnocytophagoides*, C: *Haemophilus parainfluenzae*, D: *Aggregatibacter aphrophilus*, E: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), F: *Cardiobacterium hominis*, G: *Eikenella corrodens*, H: *Kingella* sp.

レベルで信頼性が高い結果であることを示すが、被検菌株のマススペクトルパターンと類似する波形がデータベース上に存在しない場合スコアが1.7未満となり no reliable identification と判定される。MALDI Biotyper を用いた両菌種の同定検査結果は、*D. mossii* SH1079 ではスコアが1.338で *E. hirae*, *D. capnocytophagoides* SH2814 ではスコア2.14で *D. gadei* が挙げられ、*D. capnocytophagoides* について属レベルでの同定は可能であったが、菌種レベルでは誤同定される可能性がある。MALDI Biotyper の同定菌データベースには *D. gadei* しか登録されておらず、現状の MALDI Biotyper では *D. mossii* や *D. capnocytophagoides* の同定はできなかった。

以上より本属菌は ID テスト HN-20 Rapid による生化学的同定検査、質量分析法による同定検査は現状困難であり、Rapid ID 32A を用いた生化学的同定検査、遺伝子学的同定検査を実施する必要があると考えられる。

薬剤感受性検査について、本属菌の検査方法及び薬剤感受性結果の判定基準は CLSI 文書に記載されていないが、ウマ溶血ブルセラプロスを用いて感受性検査を実施した結果、*D. capnocytophagoides* SH2814 は IPM に対して $>8 \mu\text{g/mL}$ の MIC を示し、カルバペネム系抗菌薬が有効でない可能性が示された。一方で両菌種とも MINO と CLDM に $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ の MIC を示した。血液から *D. capnocytophagoides* が分離され抗菌薬により症状が改善した2症例では、それぞれ CPZ/SBT による治療と、piperacillin/tazobactam (PIPC/TAZ), GM, VCM と metronidazole の併用による治療を行い、炎症反応の改善が認められていた^{5,6)}。しかし、前者では CPZ/SBT に対する MIC が $16 \mu\text{g/mL}$ であったにも拘わらず、抗菌薬の投与により症状の改善が認められた等の所見から分離菌は感染症の原因菌ではなかったと考察されている⁶⁾。一方、

後者では PIPC/TAZ の MIC が $24 \mu\text{g/mL}$ であり、抗菌薬による治療効果が得られたと考察されている⁵⁾。

Dysgonomonas 属菌は免疫能の低下した患者に侵襲的感染を引き起こし得るが、臨床材料からの分離は稀であり、病原性や細菌学的な性状を明らかにするためにも正確な菌種同定による症例の蓄積が重要と考えられる。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- Hofstad, T, I Olsen, ER Eribe, et al. 2000. *Dysgonomonas* gen. nov. to accommodate *Dysgonomonas gadei* sp. nov., an organism isolated from a human gall bladder, and *Dysgonomonas capnocytophagoides* (formerly CDC group DF-3). Int J Syst Evol Microbiol 50: 2189-2195.
- Lawson, PA, E Falsen, E Inganäs, et al. 2002. *Dysgonomonas mossii* sp. nov., from human sources. Syst Appl Microbiol 25: 194-197.
- Kodama, Y, T Shimoyama, K Watanabe. 2012. *Dysgonomonas oryzae* sp. nov., isolated from a microbial fuel cell. Int J Syst Evol Microbiol 62: 3055-3059.
- Lawson, PA, P Carlson, S Wernersson, et al. 2010. *Dysgonomonas hofstadii* sp. nov., isolated from a human clinical source. Anaerobe 16: 161-164.
- Hansen, PS, TG Jensen, B Gahrn-Hansen. 2005. *Dysgonomonas capnocytophagoides* bacteraemia in a neutropenic patient treated for acute myeloid leukaemia. APMIS 113: 229-231.
- Michitaka, H, Y Kunikazu, I Miki, et al. 2008. Characterization and Antimicrobial Susceptibility of *Dysgonomonas capnocytophagoides* Isolated from Human Blood Sample. Jpn. J. Infect. 61: 212-213.

- 7) Wagner, DK, JJ Wright, AF Ansher, et al. 1988. Dysgonic fermenter 3-associated gastrointestinal disease in a patient with common variable hypogammaglobulinemia. *Am J Med* 84: 315-318.
- 8) Bangsborg, JM, W Frederiksen, B Bruun. 1990. Dysgonic fermenter 3-associated abscess in a diabetic patient. *J Infect* 20: 237-240.
- 9) Heiner, AM, JA DiSario, K Carroll, et al. 1992. Dysgonic fermenter-3: a bacterium associated with diarrhea in immunocompromised hosts. *Am J Gastroenterol* 87: 1629-1630.
- 10) Blum, RN, CD Berry, MG Phillips, et al. 1992. Clinical illnesses associated with isolation of dysgonic fermenter 3 from stool samples. *J Clin Microbiol* 30: 396-400.
- 11) Blum, RN, CD Berry, MG Phillips, et al. 1992. Clinical illnesses associated with isolation of dysgonic fermenter 3 from stool samples. *J Clin Microbiol* 30: 396-400.
- 12) Melhus, A. 1997. Isolation of dysgonic fermenter 3, a rare isolate associated with diarrhoea in immunocompromised patients. *Scand J Infect Dis* 29: 195-196.
- 13) Schønheyder, H, T Ejlersen, W Frederiksen. 1991. Isolation of a dysgonic fermenter (DF-3) from urine of a patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10: 530-531.
- 14) Rene, G, Z Reinhard, R Christian, et al. 1991. Septicemia Caused by Dysgonic Fermenter 3 in a Severely Immunocompromised Patient and Isolation of the Same Microorganism from a Stool Specimen. *J Clin Microbiol* 37: 1617-1618.
- 15) Matsumoto, T, Y Kawakami, K Oana, et al. 2006. First isolation of *Dysgonomonas mossii* from intestinal juice of a patient with pancreatic cancer. *Arch Med Res* 37: 914-916.
- 16) 松本竹久, 松田和之, 本田孝行. 2010. 16S rRNA 遺伝子配列を利用した菌種同定. *検査と技術* 11: 1053-1058.
- 17) Versalovic, J, K C Carroll, G Funke, et al. 2011. *Manual of clinical microbiology*. vol. 1, (10th ed), p. 610-615, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

The bacteriological investigation of *Dysgonomonas mossii* and *Dysgonomonas capnocytophagoides*

Yusuke Ota¹⁾, Takehisa Matsumoto²⁾, Eriko Kasuga²⁾, Kazuki Horiuchi²⁾, Tatsuya Negishi²⁾, Tomomi Yaguchi²⁾, Masaru Takamizawa³⁾, Masaki Murakami⁴⁾

¹⁾Department of Health and Medical Sciences, Shinshu University, Nagano, Japan

²⁾Department of Laboratory Medicine, Shinshu University Hospital, Nagano, Japan

³⁾Department of Laboratory Medicine, Saku General Hospital, Nagano, Japan

⁴⁾Department of Laboratory Medicine, Asama General Hospital, Nagano, Japan

This paper describes the bacteriological investigation of *Dysgonomonas mossii* and *Dysgonomonas capnocytophagoides* isolated at Shinshu University Hospital in Nagano. Both isolates were revealed to be facultatively anaerobic Gram-negative coccobacilli and were able to grow in the presence of X-factor. *D. mossii* and *D. capnocytophagoides* were difficult to identify in biochemical tests by reason of these strains were similar in biological properties, precise identification of these bacteria required the analysis of homology of the 16S rRNA gene. Antibiotic susceptibility tests of *D. capnocytophagoides* showed MIC >8 µg/mL for carbapenem. Isolation of *D. mossii* and *D. capnocytophagoides* from clinical samples are uncommon cases, accumulation of the case reports with the isolation of these species is inevitable for giving an account of the infections due to *D. mossii* and *D. capnocytophagoides*.