

令和元年6月21日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08662

研究課題名(和文)重症敗血症患者から分離された新規Capnocytophaga属菌に関する研究

研究課題名(英文)Characterization of novel Capnocytophaga spp. isolated from septic patients

研究代表者

鈴木 道雄 (SUZUKI, MICHIO)

国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官

研究者番号：00392324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：2011年以降、国内でネコ咬・搔傷やイヌとの接触による感染が原因と思われる敗血症3例(うち死亡1例)から分離された菌株が、遺伝子解析の結果、2016年に新菌種となったCapnocytophaga canisであることが明らかとなり、その性状を詳細に解析するとともに、C. canisの特異的遺伝子検出法を確立した。さらに保菌率調査を行って、C. canisを1歳以上のイヌの55%、ネコの66%が保菌していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物由来のカブノサイトファーガ感染症は、イヌやネコによる咬・搔傷に伴って感染し、重症化して敗血症に至ると約30%が死亡する。国内では1993年から2017年末までに計93例(うち死亡19例)が確認されている。我々は今回、世界初の報告となるCapnocytophaga canisによる敗血症例3例から分離された菌株を詳細に解析し、C. canisの検査・診断法を確立するとともに、常在菌として保有するイヌ・ネコの保菌率を明らかにした。これらの研究成果は、C. canisの公衆衛生上のリスク分析に貢献するものであり、今後の研究の進展に重要な役割を果たすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：After 2011, we isolated three strains of Capnocytophaga sp. from septic patients in Japan following a cat scratch, cat bite, or close contact with a dog. We demonstrated that these three strains of Capnocytophaga sp. belonged to C. canis, which is novel species reported in 2016. We analyzed these strains of C. canis and established a specific PCR which can specifically detect C. canis. In addition, the prevalence of C. canis in dogs and cats was determined using this PCR method. As a result, C. canis was detected in 55% of dogs and 66% of cats.

研究分野：動物由来感染症

キーワード：新規Capnocytophaga属菌 Capnocytophaga C. canis C. canimorsus イヌ口腔内細菌 ネコ口腔内細菌 薬剤感受性 遺伝子解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) *Capnocytophaga* 属菌のうち、イヌ・ネコの口腔内常在菌である *Capnocytophaga canimorsus* は咬・掻傷感染によってヒトに急激かつ重篤な敗血症を引き起こすが、2011年に *C. canimorsus* 感染疑いの敗血症例から分離された菌株 (HP40001) の 16S rRNA 及び *gyrB* 遺伝子のシーケンス解析をしたところ、基準株との一致率がそれぞれ 97.0%、77.5%と低く、*C. canimorsus* とは遺伝的に異なる新菌種であることが示唆された。さらに2013年と2014年にも、敗血症例2例(うち死亡1例)から、HP40001株と16S rRNA、*gyrB* 遺伝子の一致率がいずれも99%以上と高い菌株 (HP20001、HP33001) が分離され、これら3菌株は同一菌種であると考えられた。

(2) 上記の3菌株は、データベース上の解析では *C. canimorsus* 及び *Capnocytophaga cynodegmi* と最も近縁であることから、新規の *Capnocytophaga* 属菌であると考えられた。この致死性の敗血症を引き起こす病原性を有する新規 *Capnocytophaga* 属菌は、新菌種として提唱されるべきものであり、公衆衛生上も重要な菌種であることから、さらなる詳細な解析が必要と考えられた。

2. 研究の目的

死亡例1例を含む3例の敗血症患者から分離された新規 *Capnocytophaga* 属菌3株について、各種性状を解析した。解析の過程で、スイスで健康なイヌの口腔内から分離され、2016年に新菌種として確立した *Capnocytophaga canis* と同一菌種であることが明らかとなり、以降は世界で初めて敗血症例から分離された *C. canis* 菌株として解析を進め、検査・診断法を確立するとともに、常在菌として保菌していると考えられるイヌ・ネコの保菌率の調査を実施した。さらに病原性や薬剤感受性についても解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 新規 *Capnocytophaga* 属菌の解析

死亡例1例を含む3例の敗血症患者から分離された新規 *Capnocytophaga* 属菌3株について、16S rRNA 及び *gyrB* 遺伝子のシーケンス解析及び各種化学的、生化学的性状解析等を実施し、既存菌種との比較検討を行った。これらの菌株が新菌種 *C. canis* と同一菌種であることが明らかになったため、7遺伝子 (*dnaJ*, *fumC*, *glyA*, *gyrB*, *murG*, *trpB*, *tuf*) を連結した Multilocus sequence analysis (MLSA) によって *C. canis* のタイピングを試みた。

(2) *C. canis* 特異的検出法の開発

16S rRNA 及び *gyrB* 遺伝子のシーケンスデータを基にプライマーを設計して、*C. canis* 特異的 PCR 検出系を開発した。

(3) イヌ・ネコの *C. canis* 保有状況調査

確立した特異的 PCR 検出系を用いて、イヌ及びネコの口腔内スワブから *C. canis* の *gyrB* 遺伝子を検出し、保菌率を明らかにした。

(4) イヌ・ネコ由来の *Capnocytophaga* 属菌感染症例の情報収集および分離菌株の解析

イヌ・ネコ由来の *Capnocytophaga* 属菌の感染が疑われる患者の情報を収集するとともに依頼検査も随時実施した。Etest を用いて薬剤感受性試験を行い、最小発育阻止濃度 (MIC) を簡易的に算出した。

(5) *C. canis* 国内分離株の性状解析及びゲノム解析

過去に収集し保管していた菌株のうち、イヌ口腔内分離株1株とネコ口腔内分離株1株が *C. canis* であることが明らかとなった。敗血症例分離株3株とイヌ・ネコ口腔内分離株2株の計5株の全ゲノム解析を行い、得られた配列に対してアノテーションを行った。

(6) *C. canimorsus* の莢膜型タイピング法を用いた *C. canis* のタイピング

各莢膜型特異的 PCR 法を用いた *C. canimorsus* の莢膜型タイピングでは、莢膜型は A~E 型及び Non-type に型別される。本タイピング法によって、*C. canis* 臨床分離株、イヌ・ネコ口腔内分離株計5株のタイピングを行った。

4. 研究成果

(1) 新規 *Capnocytophaga* 属菌の解析

敗血症患者から分離された新規 *Capnocytophaga* 属菌3株について、遺伝子解析及び各種性状解析等を実施した。当初 *C. canimorsus* 及び *C. cynodegmi* と近縁な新菌種と考えられたが、その後2016年に正式に新菌種となった *C. canis* と16S rRNA 及び *gyrB* 遺伝子シーケンスの相同性がそれぞれ99.7~99.8%、99.5%であったことから、同一菌種であることが明らかとなった。*C. canis* はヒトへの病原性が低く、オキシダーゼ陰性とされるが、上記の敗血症患者分離株はいずれもオキシダーゼ陽性であった。MLSAによる分子系統解析の結果、オキシダーゼ陰性の *C. canis* 3株とオキシダーゼ陽性の敗血症患者分離株3株はそれぞれ別の分岐群に分かれた。このことから、*C. canis* には *C. canimorsus* と同様にヒトの敗血症原因菌となり得る病原性を有するタイプと、病原性の低いタイプがあり、MLSAがそのタイピングに有用である可能性が示唆された(図1)。

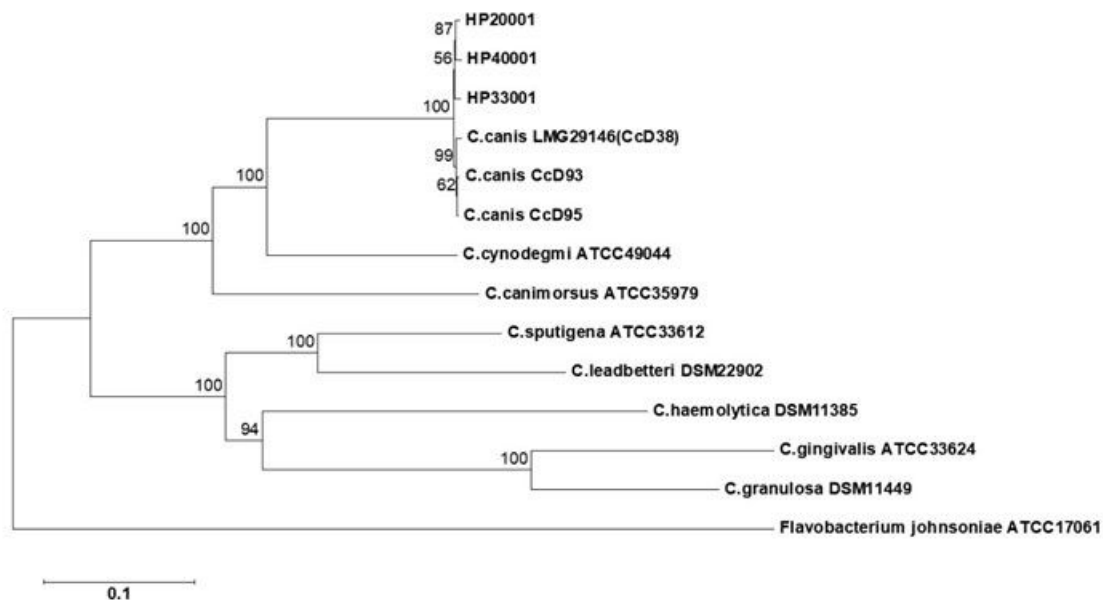


図 1. MLSA による分子系統解析

(2) *C. canis* 特異的検出法の開発

16S rRNA 遺伝子と *gyrB* 遺伝子をターゲットとした *C. canis* 特異的 PCR 検出法を確立した。

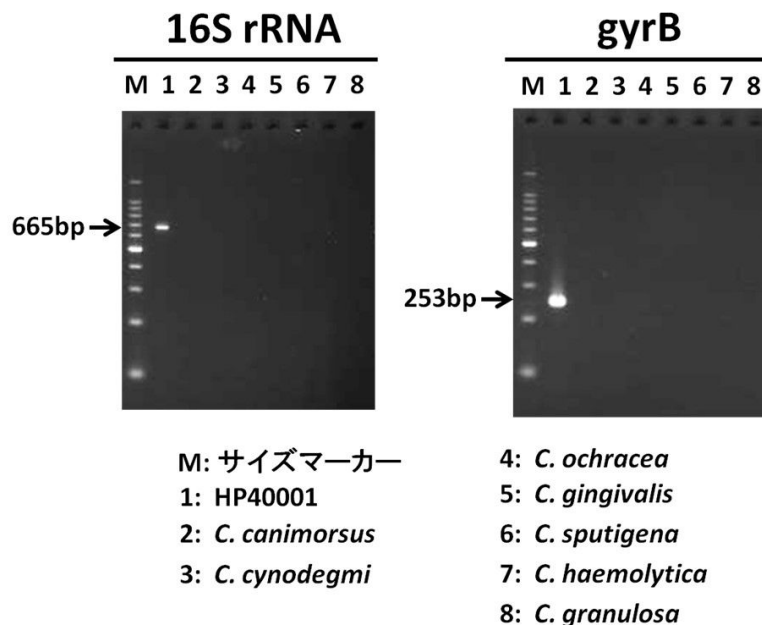


図 2. *C. canis* 特異的検出 PCR

(3) イヌ・ネコの *C. canis* 保有状況調査

イヌ・ネコの *C. canis* 保菌率について PCR 法を用いて調査した結果、1 歳以上のイヌ 80 頭中 44 頭が PCR 陽性であり、保菌率は 55.0%であった。またネコの調査では、1 歳以上のネコ 154 頭中 101 頭が PCR 陽性であり、保菌率は 65.6%であった。イヌ及びネコともに *C. canis* を高率に保菌していることが明らかとなった。

(4) イヌ・ネコ由来の *Capnocytophaga* 属菌感染症例の情報収集および分離菌株の解析

研究期間中に計 42 例のイヌ・ネコ由来の *Capnocytophaga* 属菌感染症例を把握した。うち 40 例が *C. canimorsus* の感染、2 例が *C. cynodegmi* の感染であり、*C. canis* 感染例はなかった。MALDI-Biotyper を用いて質量分析法による菌種同定について検討した結果、*C. canimorsus* の 23/24 株及び *C. cynodegmi* の 5/5 株が菌種レベルで正しく同定された。*C. canis* は *C. canimorsus* 及び *C. cynodegmi* との鑑別は可能であったが、データベースに *C. canis* が未収載のため、菌種は同定不能となった。薬剤感受性試験では、ペニシリン G の MIC が 8µg/mL 以上を示した株が *C. canimorsus* 3 株、*C. cynodegmi* 1 株の計 4 株、セフトリアキソンの MIC が 3µg/mL 以上を示した株が *C. canimorsus* のみ 3 株あったが、*C. canis* 3 株はいずれも特記

すべき薬剤耐性を有していなかった。

(5) *C. canis* 国内分離株の性状解析及びゲノム解析

C. canis 基準株はオキシダーゼ陰性であるが、国内で分離された *C. canis* 計 5 株（臨床分離株 3 株、イヌ口腔内分離株 1 株、ネコ口腔内分離株 1 株）はいずれもオキシダーゼ陽性であった。これら 5 株のドラフトゲノム配列をアノテーションした結果、病原性に関わる可能性のある遺伝子として、9 型分泌装置関連遺伝子群や hemolysin などが同定された。

(6) *C. canimorsus* の莢膜型タイピング法を用いた *C. canis* のタイピング

C. canimorsus の莢膜型タイピング法を用いて、*C. canis* についてもタイピングを試みたが、ヒト臨床分離株 3 株、イヌ・ネコ口腔内分離株 2 株のいずれも同法で型別できる莢膜型 A~E には当てはまらず、Non-type となった。一方、*C. canimorsus* のヒト臨床分離株計 61 株を解析した結果、約 93% が莢膜型 A~C のいずれかに分類された。このことから、*C. canimorsus* と *C. canis* はともにヒトに敗血症を引き起こすが、その莢膜型は共通していないことが示唆された。

C. canis HP40001 株を理研 BRC とドイツ DSMZ に寄託し、それぞれ JCM31246 株、DSM103082 株として公開された。

厚生労働省 web サイトに掲載されている「カプノサイトファーガ感染症に関する Q & A」が大幅改訂されるにあたり、本研究課題によって得られた成果が内容に反映された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Michio Suzuki, Koichi Imaoka, Yumi Haga, Masahiro Mohri, Ayako Nogami, Yoshio Shimojima, Yoshimi Irie, Satoru Sugimura and Shigeru Morikawa, Characterization of three strains of *Capnocytophaga canis* isolated from septic patients, *Microbiology and Immunology*, 査読有, 62 巻, 2018, 567-573

鈴木 道雄、カプノサイトファーガ感染症について、獣医公衆衛生研究、査読無、2019、11-15

〔学会発表〕(計 5 件)

鈴木 道雄、カプノサイトファーガ感染症の現状と課題～動物由来感染症としてのカプノサイトファーガ感染症、平成三十年年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会、2019

鈴木 道雄、今岡 浩一、*Capnocytophaga canimorsus* 国内臨床分離株の莢膜型遺伝子タイピング、第 30 回日本臨床微生物学会総会、2019

鈴木 道雄、今岡 浩一、森川 茂、*Capnocytophaga canis* のイヌにおける保有状況、第 161 回日本獣医学会学術集会、2018

鈴木 道雄、芳賀 由美、廣永 道隆、野上 綾子、入江 由美、今岡 浩一、*Capnocytophaga canis* : イヌ・ネコ咬搔傷による敗血症の原因となり得る新菌種、第 29 回日本臨床微生物学会総会、2018

鈴木 道雄、今岡 浩一、森川 茂、*Capnocytophaga canimorsus* 感染症、第 56 回日仏獣医学会研究例会、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

カプノサイトファーガ感染症に関する Q & A

<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou18/capnocytophaga.html>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：今岡 浩一

ローマ字氏名：IMAOKA KOICHI

研究協力者氏名：木村 昌伸

ローマ字氏名：KIMURA MASANOBU

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。