

## 解説

## 犬、猫由来細菌感染症

今岡浩一\*

国立感染症研究所 獣医科学部 第一室長

感染症法（感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律）に指定されている1～5類99疾患のうち、52疾患が人獣共通感染症であると考えられている。特に1～4類に限れば、じつに58疾患中48疾患で、動物が関与する場合があると考えられている。それらの疾患のうち、実際は動物以外からの感染の方が多いと考えられるデング熱などの疾患を除くと、E型肝炎、エキノコックス症、オウム病、ブルセラ症、野兔病、レプトスピラ症などで国内患者が報告されている（表1）。しかしながら、パストレラ症や猫ひっかき病など、愛玩動物から感染する、感染症法に指定されていない人獣共通感染症もあり、こちらも注意すべき問題となっている。

## (1) 犬、猫から感染する疾患

日本では、愛玩動物として犬、猫、小鳥、観賞魚にとどまらず、いわゆるエキゾチックペットであるサル類、げっ歯目、ハ虫類、両生類など、多種類の動物が飼育されている。愛玩動物から感染する疾患について、表2に示した。エボラ出血熱やマールブルグ病、ラッサ熱、ペストなど1類感染症の感染源動物としては、サルやげっ歯目、コウモリなどが知られているが、これらの動物については、国内への病原体の侵入を阻止するために輸入禁止処置や検疫、届出制度がとられており、国内感染のリスクは少ない。

愛玩動物の中で最も広く飼育されているのが犬、猫である。ペットフード協会の調査によると<sup>1)</sup>、2008年には犬が1,310万頭、猫が1,374万頭飼育されており、近年、増加傾向を示している。古くから飼育されており、その習性も病気もよく知っているように思われるが、犬、猫ともに種々の感染症の原因動物になりうる（表2）。一般的に動物から人への病原体の伝播はその距離が近いほど容易になるので、関係が親密な犬、猫は、実はそれなりの注意が必要な動物でもある。

よく知られている疾患には狂犬病があり、世界中で毎

年5万人以上もの人がなくなっている。日本でも2006年に2例相次いで患者が報告されたが、いずれも海外で感染し国内で発症したもので、現在、国内の犬に咬まれて狂犬病になることはない。

以下、我々の研究室で調査・研究を行っている犬、猫由来細菌感染症について紹介する。

## (2) 犬ブルセラ症

犬のブルセラ症はブルセラ・カニス (*Brucella canis*) による人獣共通感染症であり、近年、犬繁殖施設や犬取扱施設における集団発生が話題になっている（表3A）<sup>2)</sup>。*B. canis* は米国の犬繁殖施設で多発した流産の原因菌として、1968年にLE Carmichaelにより同定・報告された<sup>3)</sup>。日本では、1971年に実験用ビーグル犬繁殖施設での集団感染以降、1970年代に多くの集団発生が報告されたが、この時期の種々の報告による犬の抗体保有率は平均8.8%となっている<sup>4)</sup>。我々は首都圏の某市動物愛護センターの協力を得て、同センターにおける抗体保有状況の調査を行った。その結果、2003～2006年の抗体保有率は2.5%であり、雌雄差は見られなかった（表3B）<sup>5)</sup>。また、東京都による動物愛護相談センターの調査（2001～2006年）でも4.1%の犬が抗体を保有していた。近年では、動物愛護センターに保護・収容される犬のほとんどが、かつてペットとして飼育されていた犬であることから、国内の2～5%程度のペット用犬が*B. canis*に感染歴を持つと推定される。表3Aに近年の集団発生を示してあるが、これ以外にも多くの犬繁殖施設や犬を扱う施設で流行していると思われる。

一方、人のブルセラ症は感染症法により4類感染症に指定されており、届出が義務づけられた1999年4月1日以降、2009年4月30日までに10例（2002年に1例、2005年以降が9例）の*B. canis*感染患者が届け出られている（表3C）<sup>6)</sup>。2008年には施設の犬ブルセラ症流行に伴い、繁殖施設従業員2名がブルセラ症を発症した。感染原因は感染犬の死産仔等を素手で取り扱ったことが考えられている<sup>6)</sup>。一般的に、人への感染は、感染犬の死体や流産時の汚物などに接触することによるため、職業上、犬と接触する機会の多い犬繁殖業者や獣医師がハイリスク集

連絡先：今岡浩一\*

〒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

Tel : 03-5285-1111 (内 2622) ; Fax : 03-5285-1179

E-mail : imaoka@nih.go.jp

表 1 日本における人獣共通感染症患者報告数

	感 染 症	2005 年 (’05.1.3 ~’06.1.1)	2006 年 (’06.1.2 ~’06.12.31)	2007 年 (’07.1.1 ~’07.12.30)	2008 年 (’07.12.31 ~’08.12.28)
2 類	結核@	—	—	20151	27737
3 類	細菌性赤痢@	553	483	450	318
	腸管出血性大腸菌感染症@	3589	3910	4586	4307
4 類	E 型肝炎	42	70	54	43
	エキノコックス症	20	20	16	17
	オウム病	34	22	30	9
	Q 熱	8	2	7	3
	狂犬病	0	2	0	0
	デング熱@	74	57	89	104
	日本紅斑熱	62	45	98	132
	日本脳炎	7	7	10	3
	ブルセラ症	2	5	1	4
	野兎病	0	0	0	5
	ライム病	8	13	12	5
レプトスピラ症	17	24	34	42	
5 類	アメーバ赤痢@	698	738	781	861
	クリプトスポリジウム症@	12	14	6	9
	ジアルジア症@	86	87	56	75

(感染症発生動向調査・感染症週報, 厚生労働省・国立感染症研究所による)

@ 結核, 細菌性赤痢, 腸管出血性大腸菌症, 黄熱, デング熱, アメーバ赤痢, クリプトスポリジウム症, ジアルジア症に関しては, 報告の大部分が動物由来以外の感染と思われる。

\* 表中に記載されていない疾患については, この期間中 (2005~2008 年) の報告はない。

団とされている。しかし, 報告された患者の推定感染経路を見ると, 職業上の感染と考えられるのは 4 例であり, 不明例ではこれらの職業に携わっていないため, 職業上以外の, いわゆるペット用犬との接触などによる感染と推定されるケースも 6 例報告されている (表 3C)。また, 人の *B. canis* 感染症は, 症状が風邪様で気がつかないことも多いとされることから, 潜在的な感染者が他にもいると考えられる。事実, 動物病院勤務者 (獣医師, 獣医看護師等) を調査した我々の結果では, 4/304 (1.3%) が抗体陽性であり, 抗体価も 1:320~1280 と高い値を示したにもかかわらず, これら 4 名の感染歴を持つ者は患者として届け出られるには至っていない。

人, 犬ともに *B. canis* 感染をなくすためには, 何よりも感染犬の供給源と考えられる犬繁殖施設の清浄化が重要である。繁殖業者にとっても施設で犬ブルセラ症が流行した場合, 経済的にも大きな打撃を受ける。したがって, 頻回の検査と, 施設内に新たに犬を導入する際の検疫の実施により, 清浄を保つ努力が必要である。

### (3) 犬, 猫咬傷に伴う感染症

環境省の調査では国内の犬咬傷事故は, 年間 6,300 件ほどとされている。しかし, 日本の約 5 倍 (6,800 万頭) の犬が飼われている米国では, 年間 470 万人が犬にかまれ, 80 万人が医療機関を受診し, 6,000 人が入院するという調査報告がある<sup>7)</sup>。したがって, 実際は日本でもかなり多くの咬傷事故が発生していると推定される。また, 犬や猫にかまれると単に外傷だけではなく, 感染症の病原体に感染することがある。米国において, 猫咬傷は年間 40 万人と犬咬傷よりも少ないが, 感染症に発展する割合は, 犬咬傷 4~20% に比べて, 猫咬傷等では 20~50% と, 高くなっている<sup>8)</sup>。このような犬, 猫咬傷等に由来する感染症としては, 狂犬病が世界中で毎年 5 万人もの死者を出し, よく知られているが, 国内に狂犬病の犬がいない日本では, 注意した方がよい感染症が他にもある。以下に, 犬, 猫の口腔内常在菌による感染症を紹介する。

#### 1) パストレラ症

犬, 猫の口腔内常在菌の 1 つに *Pasteurella multocida* が

表 2 愛玩動物由来感染症

病原体	病名	イヌ	ネコ	鳥類	ウサギ・げっ歯目
ウイルス	ウエストナイル熱*			○	
	狂犬病*	○	○		○
	腎症候性出血熱*				○
	ラッサ熱*				○
リケッチア・クラミジア	オウム病	○		○	
	Q熱	○	○	○	○
細菌	エルシニア症	○	○	○	○
	カプノサイトファーガ症	○	○		
	カンピロバクター症	○	○	○	
	サルモネラ症			○	○
	猫ひっかき病		○		
	パスツレラ症	○	○		
	ブルセラ症	○			
	ペスト*		○		○
	野兎病				○
レプトスピラ症	○	○		○	
真菌	クリプトコックス症			○	
	皮膚糸状菌症	○	○		○
原虫	アメーバ赤痢	○			
	クリプトスポリジウム症	○	○		○
	トキソプラズマ症		○		
寄生虫	糸状虫症	○	○		
	回虫症	○	○		
	エキノコックス症	○			○

\*: 現在, 国内感染のないもの

あるが, これは咬傷による感染症のうち約半数から分離される, 最も代表的なものである<sup>8)</sup>。首都圏の某市動物愛護センターの犬, 猫の口腔内スワブを採取しその保菌状況を PCR により検討したところ, 犬では 27%, 猫は 91% が保菌していた (表 4A)。症状としては局所の傷口が赤く腫れ, 発熱を伴う痛みであるが, 皮下の特徴的な蜂窩織炎や, 近くのリンパ節が腫れることもある。パスツレラ症の場合は, その症状が出るのが早いことが大きな特徴で, 早いときは 1 時間以内に発症する。咬まれること以外にも, 引っかかれたり, なめられたりしても感染することがあり, 犬, 猫由来感染症として注意が必要である。

## 2) カプノサイトファーガ症

なじみのない名前であるが, パスツレラ属菌と同様, 犬の口腔内常在菌であるカプノサイトファーガ属菌による感染症である。カプノサイトファーガ属菌には, *Capnocytophaga gingivalis* や *C. ochracea* など人の口腔内細菌も属す

るが, 犬, 猫の場合は *C. canimorsus*, *C. Cynodegmi* が知られており, *C. canimorsus* 感染の方が臨床的に重要である<sup>9,10)</sup>。

犬, 猫に咬まれたり, 猫に引っかかれたりしたときに感染し (表 5A), 潜伏期は 2~14 日で, 発症時には傷は痕跡程度のことも多い。発症時には, 局所症状よりも, 進行が早く強い全身症状を示すことが多く (表 5B), 多くのケースで救命救急センターへの搬送となる。世界中で 200 例ほどの患者が報告されているまれな疾患であるが, 敗血症を発症したときの死亡率は 30% と, 非常に危険な感染症である (表 5C)。その他, 髄膜炎を発症することもあるが, この方が予後はよいとされている。患者の血液培養から比較的容易に菌が分離されるが (表 5D), 病状の悪化は, 菌分離・同定の時間を待たず, 早急な処置を必要とする。脾臓摘出者, HIV 感染者, 糖尿病など慢性基礎疾患を持つ者, その他免疫機能の低下している者で感染

表 3 国内のイヌブルセラ症発生状況

1971: 実験動物用ビーグル犬繁殖場で発生  
 70年代: 実験動物用, 訓練学校, ペット用繁殖場などで発生報告  
 70年代後半の抗体保有状況一種々の調査報告の平均8.8%

A) 近年の繁殖施設等における集団発生

発生年	地区	感染イヌ	感染者の届出
2003	静岡	51/114	なし
2005~06	沖縄	16/83	なし
2006~07	大阪	139/263	なし
2008	愛知	15/37	2名(飼育者)
2008	東京・千葉	18/59	なし

B) 首都圏某動物愛護センターにおける抗体保有状況調査結果(2003~06)

	オス		メス		合計
	陰性	陽性	陰性	陽性	
合計	304	8 (2.6%)	165	4 (2.4%)	469
合計	312		169		481

C) 届出られた *B. canis* 感染者の推定感染経路(1999.4.1~2009.4.30)

犬を取り扱う職業 (繁殖業者, 獣医師, トリマーなど)	犬を取り扱う職業 ではない	不明
繁殖犬他	飼い犬	
4名	2	4

表 4 犬, 猫の口腔内細菌の保有状況

A) *Pasteurella multocida*

	検体数	陽性数	陽性率 (%)
犬	325	87	27
猫	115	105	91

B) *Capnocytophaga* spp.

	検体数	陽性数	陽性率 (%)
犬	325	309	95
猫	115	103	90

犬は H16~18, 猫は H19 年度の調査

表 4 犬, 猫の口腔内細菌の保有状況

C) 犬における *C. canimorsus*, *cynodegmi*

<i>C. canimorsus</i>	<i>C. cynodegmi</i>	検体数	%
+	+	48	72
+	-	7	10
-	+	10	15
-	-	2	3
合計		67	

H18年度の調査

表 5 *C. canimorsus* 感染患者の臨床的特徴

A) 感染原因 (n=27)

原因	患者数	%
犬咬傷	17	63
動物との密な接触	3	11
猫ひっかき傷	1	4
不明	6	22

B) 入院時診断 (n=56)

症状	患者数	%
敗血症	18	32
不明熱	7	13
髄膜炎	7	13
蜂窩織炎	6	11
敗血症性ショック	5	9
気道感染	4	7
その他	9	16

C) 転帰 (n=30)

	患者数	%
回復	20	67
死亡	10	33

D) 菌分離の材料 (n=56)

培養材料	患者数	%
血液	49	88
脳脊髄液	4	7
血液と脳脊髄液	2	4
気道	1	2

文献9) より改変

表 6 国内の *C. canimorsus* 感染患者発生状況

年	年齢	感染源動物	感染経路	主たる症状	予後
2002	95	飼い猫	咬傷・搔傷	意識障害	死亡
2004	62	飼い猫	搔傷	敗血症	死亡
2006	75	飼い犬	咬傷	敗血症・DIC	回復
2007	78	飼い犬	咬傷	敗血症・髄膜炎	回復
2008	59	飼い猫	搔傷	敗血症・嘔吐	死亡
	60	飼い犬	咬傷	敗血症・DIC	死亡
	59	飼い犬	咬傷	敗血症・DIC	回復
	44	飼い犬	咬傷	敗血症・DIC	回復
	70	飼い犬	咬傷	発熱・創部発赤	回復
	70	野良猫	搔傷	敗血症	死亡
	71	飼い猫	搔傷	敗血症・DIC	回復

リスクが高いとされている<sup>9,10)</sup>。

我々は、首都圏の某市動物愛護センターの犬, 猫の口腔内スワブを採取しその保菌状況を検討した。従来の報告は、菌分離による報告であり、その分離率, すなわち保菌率は20%前後とされていた。我々の調査でも、菌の分離率はやはり30%ほどであった。しかし、特異的PCR法を確立し、それによる遺伝子検出を実施したところ犬, 猫ともに保菌率は90%以上であり、従来考えられていた以上に感染リスクが高いことが明らかとなった(表4B)。*C. canimorsus* および *C. cynodegmi* 別では、70%が両方ともに保菌しており、感染時に重篤な症状を示す *C. canimorsus* は80%以上が保菌していた(表4C)。

我々が把握している国内の *C. canimorsus* 感染患者11例を表6に示した。患者の年齢は44歳~95歳で、犬咬傷によるものが6例、猫搔傷によるものが5例であった。それぞれ受傷後2~7日で発症しており、傷が軽度であったため医療機関での治療を受けず発症まで放置していたケースが多い。このうち犬咬傷1例、猫搔傷4例の患者が死亡しており、そのうち4例が救急外来到着後1~2日中に死亡していた。また、死亡例も含めて、これらの患者11名は必ずしも、糖尿病や高血圧など基礎疾患を持つ者ばかりではなく、特記すべき基礎疾患のない者も含まれていた。舐める事により、猫の手爪に菌が付着し感染源になると考えられるが、なぜ猫搔傷による死亡者が多いのかは不明である。近年の報告が多いのは、臨床現場で認知されてきているためと思われるが、実患者数の増加の可能性も否定できない。

現在、我々は、その潜在的感染者の調査や、菌と宿主との関係、感染動態などの検討を行っているが、現在、最も注目している犬, 猫由来感染症である。

#### (4) おわりに

近年、犬, 猫等の愛玩動物は、単なるペットとしての役割だけでなく、いわゆるアニマルセラピー(動物介在療法)の担い手としても注目されている。しかしながら、本稿にて紹介したパストレラ症やカプノサイトファーガ症は、医療機関による治療を必要としない程度の咬傷, 搔傷, たとえばふれあいの中で受ける些細な傷, でも感染しうる。一般に、乳幼児, 高齢者, 免疫抑制状態にある者は感染症への抵抗性が低いとされている。今後、さらに高齢化社会が進み、また糖尿病など基礎疾患を持つ者も増加すると考えられているが、高齢者や介護者に対する、犬・猫飼育時の注意点の啓発が必要であると考えられる<sup>11)</sup>。

#### 参考文献

- 1) 一般社団法人ペットフード協会ホームページ (<http://www.petfood.or.jp/topics/topics-new.html>)
- 2) 今岡浩一: 犬ブルセラ症の現状と課題. 日本獣医師会誌, 62, 5-12, 2009.
- 3) Greene, C.E. and Carmichael, L.E.: Canine brucellosis. In: Infectious diseases of the dog and cat, 3rd ed. (C.E. Greene ed.), pp 369-381, Elsevier Inc., Canada, 2006
- 4) 伊佐山康郎: 犬のブルセラ症. 獣医畜産新報, 47, 97-101, 1994.
- 5) Kimura, M., et al: Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis. J. Vet. Med. Sci., 70, 707-709, 2008.
- 6) 今岡浩一: ブルセラ症の最近の話題. モダンメディア, 55 (3), 76-85, 2009.
- 7) CDC: Nonfatal dog bite—Related injuries treated in hospital emergency departments—United States, 2001.

- MMWR, 52, 605-610, 2003.
- 8) Greene, C.E. and Goldstein, E.J.C. : Bite wound infections. In : Infectious diseases of the dog and cat, 3rd ed. (C.E. Greene ed.), pp 495-510, Elsevier Inc., Canada, 2006
- 9) Janda, J.M., et al : Diagnosing capnocytophaga canimorsus infections. Emerg Inf Dis, 12, 340-342, 2006.
- 10) Gastra, W. and Lipman, L.J.A. : Capnocytophaga canimorsus. Vet Microbiol, 2009.
- 11) 愛玩動物の衛生管理の徹底に関するガイドライン 2006 ー愛玩動物由来感染症の予防のためにー. 厚生労働省健康局, 2006 (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/02.html#2>)

Original Article

## Properties of Coryneophage Attachment Site and Molecular Epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* Isolated from Humans and Animals in Japan

Yukiji Seto<sup>1,2</sup>, Takako Komiya<sup>1</sup>, Masaaki Iwaki<sup>1</sup>, Tomoko Kohda<sup>2</sup>, Masafumi Mukamoto<sup>2</sup>,  
Motohide Takahashi<sup>1</sup> and Shunji Kozaki<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011, and <sup>2</sup>Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Science, Osaka Prefecture University, Osaka 599-8531, Japan

(Received October 17, 2007. Accepted January 7, 2008)

**SUMMARY:** Sporadic reports of *Corynebacterium ulcerans* infection in humans and animals have become increasingly common throughout the world. Between 2001 and 2006, five human cases, in addition to isolation of the bacterium from the carcasses of *Orcinus orca* and *Panthera leo*, were reported in Japan. While an isolate from *P. leo* generated only phospholipase D (PLD), the other isolates produced both PLD and diphtheria-like toxin (DLT). Pulsed-field gel electrophoresis analysis showed that isolates from *P. leo* and humans were genetically homologous. Southern blotting found that a human isolate was lysogenized by two corynephages coding DLT. Sequence analysis of the region of the DLT gene revealed that the integration in *C. ulcerans* occurred in the same manner as that in *C. diphtheriae*.

### INTRODUCTION

*Corynebacterium ulcerans* was first isolated from human throat lesions in 1926 (1), and has recently been recognized as a distinct species within the genus *Corynebacterium* by DNA-DNA hybridization (2). *C. ulcerans* can carry the coryneophage that codes for diphtheria toxin gene (*tox*), and toxigenic strains produce diphtheria-like toxin (DLT), which may be associated with classical pharyngeal diphtheria in humans. The organism also causes respiratory symptoms in macaques (3), mastitis in cattle (4), and caseous lymphadenitis in sheep and goats (5). Since there have been some cases in pets, such as chronic labial ulceration and rhinorrhea in dogs (6) and bilateral nasal discharge in cats (7,8), it has been suggested that clinical cases in humans are usually derived from infections in household pets (9). Sporadic cases in humans and animals have recently been reported throughout the world (10-17), and many reports have originated in the United Kingdom (7,19). In Japan, 5 cases in humans were reported between 2001 and 2006 (12,14). During the same period, *C. ulcerans* was identified from the carcass of *Orcinus orca* (killer whale) and *Panthera leo* (lion).

*C. ulcerans* is a member of the so-called "diphtheria group", which includes *C. diphtheriae* and *C. pseudotuberculosis* (4). Toxigenic strains of these bacteria can produce diphtheria toxin (DT) (*C. diphtheriae*) or DLT (*C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis*). The production of urease and a failure to reduce nitrates are characteristics of *C. ulcerans* that are not shared with other members of the diphtheria group (4). The characteristics of members of the group have been of special interest to those studying the epidemiology of diphtheria, since it was reported that diphtheria-like organisms had been isolated from cases of acute sore throat and from

healthy carriers (4). Diphtheria is an acute infectious disease caused by the toxin-producing *C. diphtheriae*. The disease is typically characterized by local infection of the upper respiratory tract and occasionally the skin. Systemic manifestations can affect, in particular, the heart, kidneys, and peripheral nerves because of DT, which is a cytotoxic protein that inhibits cellular protein synthesis in eukaryotes by inactivating elongation factor 2 through ADP ribosylation (19). *C. ulcerans* also produces phospholipase D (PLD), which is a known virulence factor in *C. pseudotuberculosis* (4,20). Lipsky et al. have shown that there are three toxigenic groups in *C. ulcerans* based on the production of DLT and PLD, in which the three groups respectively produce DLT, PLD, or both (4). Another report indicated that PLD production was a feasible marker for distinguishing between *C. ulcerans* and *C. diphtheriae* (21). However, little recent attention has been directed at PLD production by *C. ulcerans*.

Toxin production by *C. diphtheriae* depends on infection of an organism with a beta coryneophage encoding *tox*. In strains of *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis*, phages are also able to induce the production of DLT. In toxigenic *C. diphtheriae*, site-specific recombination occurs between a phage attachment (*attP*) site and a bacterial attachment (*attB*) site (22). Certain strains of *C. diphtheriae* contain two *attB* sites (*attB1* and *attB2*) in their chromosome, and the coryneophage can integrate into either *attB1* or *attB2* with equal frequency. Lysogens containing two phage copies have also been isolated and were shown to contain either two phages tandemly integrated at the same *attB* site (unstable conformation) or one phage integrated in each of the two *attB* sites (stable conformation). The production of DT by a given lysogen is proportional to the number of prophages integrated into its chromosome (22,23). The sequence homologous to the beta coryneophage integration site in *C. diphtheriae* is conserved in members of the genus *Corynebacterium*. The sequence of the *attB* site was also found in *C. ulcerans* (24,25). Maximescu et al. showed that *C. ulcerans* (strains 40c, A238, 298G, and 9304) could be lysogenized and converted with phage W from *C. diphtheriae* PW8; moreover, *C. ulcerans*

\*Corresponding author: Mailing address: Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Science, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan. Tel: +81-72-254-9504, Fax: +81-72-254-9499, E-mail: kozaki@center.osakafu-u.ac.jp

phage "h" induced the production of DLT in *C. ulcerans* (strains 40 and A238) (26). Although the occurrence of phage conversion and the presence of the *attB* site in *C. ulcerans* have been demonstrated, the details of the relationship between the *attB* site and *tox* in the bacterium are not well understood in comparison with those of *C. diphtheriae*.

The aims of this study were to determine the toxigenicity and genetic relatedness among isolates in Japan using restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes (ribotyping) with *BstEII* and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with *SfiI*. We found a correlation between the *attB* site and *tox* in *C. ulcerans* using Southern blot analysis with specific probes for *tox*, the *attB* site, and the PLD gene (*pld*).

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and DNAs:** We used seven strains isolated from humans and animals (Table 1). Strain 0509 was obtained from a swab from a 57-year-old man, whose chief complaint appeared to develop after the death of his dog. Another strain, 0607, was isolated from swab used to obtain a sample from a 58-year-old woman, who also kept a dog. The immunization status of these persons with diphtheria toxoid was not known. We encountered an isolate of the organism, strain Ran, from a female *O. orca* that had manifestations of decreased appetite and fever at day 4 post-partum, and the animal died the next day. The strain designated O-9 was obtained from the carcass of a male killer whale that had been one-half of a pair of *O. orca* from the same pool. The strain lion was isolated from a blood sample from a female *P. leo*, and the sample was simultaneously contaminated with two *Staphylococcus* spp. and a *Streptococcus* sp. *C. ulcerans* ATCC<sup>®</sup>51799 (identical to CCUG 2708, NCTC 7910, and DSM 46325), and *C. diphtheriae* PW8 and ATCC 700971 were used as reference strains in this study. The total DNA was isolated as described previously by Michel et al. (18) and was used for ribotyping, Southern blotting, and sequence analysis of 16S rRNA, *tox*, *pld* genes, and the *attB* site. For polymerase chain reaction (PCR) diagnosis to detect *tox* and *pld*, DNA was purified using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan).

**Biotyping, toxigenicity testing, and sequencing:** Biotyping of isolates was performed using API *Coryne* (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) according to the manufacturer's instructions. Sequencing of 16S rRNA gene of the isolates was carried out with purified DNA and the following primers:

16S-fD1 (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTGAG-3') and 16S-rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (27). Using a modified Elek test, we also examined the production of DT by the isolates (28) and an in vitro cytotoxicity assay (29,30) was carried out using the culture supernatants of the Elek broth (2% [wt/vol] proteose peptone [Oxoid, Basingstoke, UK], 0.1% [wt/vol] yeast extract [Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan], 0.26% NaCl, pH 7.4) for 24 h at 37°C with shaking (19). The culture supernatants were prepared by removing bacterial cells by centrifugation at 4,000 × g for 10 min. PLD activity was assayed a modified Zaki method (20,31). Briefly, isolates were grown in Brain heart infusion broth (Oxoid) for 24 h at 37°C with shaking. Bacterial cells were eliminated by centrifugation at 4,000 × g for 10 min. Sheep erythrocytes in Alsevers solution were washed three times in 10 volumes of buffer-saline (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.85% [wt/vol] NaCl, 0.1% [wt/vol] bovine serum albumin [Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan], pH 7.3). Dilutions of the culture supernatants in buffer-saline (100 μl) were incubated with 1.5% washed sheep erythrocytes (100 μl) at 37°C for 45 min in a 96-well microtiter plate (Asahi Glass, Co., Ltd., Tokyo, Japan). *Staphylococcal* sphingomyelinase C (Biomol. International, L. P., Pa., USA) (0.01 U/50 μl) was added to each well. After incubation of the plate at 37°C for 60 min, it was allowed to stand on ice for 60 min. Zaki unit values of the samples were calculated from the dilution in which sheep blood cells were no longer protected from lysis by sphingomyelinase C. PCR was performed using TaKaRa *ExTaq* polymerase (Takara, Kyoto, Japan) according to the manufacturer's instructions. For PCR diagnosis, a fragment (248 bps) of *tox* in the isolates was detected by the method of Nakao et al. using the primers Tox1 and Tox2 (32). *C. diphtheriae* PW8 was used as a positive control. As a negative control, no templates were added to the reaction mixture. PCR diagnosis of *pld* was performed with the following primers based on published *pld* sequences (pldFw [5'-AACATCTCTCCGTGAAAAAT-3'; position, -157 to -137 base] and pldRv [5'-AGCTCAATCGCACCGTTGTC-3'; position, 1,165 to 1,180 base]). For the sequencing of *tox*, *pld*, and *attB* site-related genes, we carried out amplification using toxFw (5'-CCATGTAACCAATCTATCAA-3'; position, -179 to -159 base) and toxRv (5'-GTGCGCCCGGAGGGA-3'; position, 1,720 to 1,735 base) based on our sequence data, pldFw and pldRv, and CU-Rfw (5'-CGCGGATCCGCGTACTCTCCGGGCA-3'; position, 833 to 851 base on DLT) and attBRv (5'-CCGCAAGCACGAAGAAAC

Table 1. Clinical isolates of *C. ulcerans* from Japan

Strain	Date of isolation	Age (years)/sex	Source	Clinical details	Reference
Isolated from human					
0102	2001/Feb	52/F	Throat swab	Sore throat	13
0509	2005/Sep	57/M	Throat swab	Fever, partitas	This study
0510	2005/Oct	51/M	Lung	Lung lesion	25
0607	2005/Nov	58/F	Throat swab	Pseudomembrane	This study
Isolated from killer whale					
Ran	2004/Aug	16/F	Blood, Lung	Bacteremia, Purulent pneumonia	This study
O-9	2004/Sep	15-16/M	Blood, Lung	Bacteremia, Purulent pneumonia	This study
Isolated from lion					
lion	2005/Dec	6/M	Blood	Sepsis	This study

F, female; M, male.



CCCAGCCCACA-3'), respectively. The sequence data were analyzed by GENETYX-MAC 10.0 and DNASIS-Mac v3.2.

**Ribotyping and PFGE:** For the detection of genetic correlations, isolates were analyzed by ribotyping (7,33) and PFGE (34,35). For ribotyping, 15 µg of total DNA was cleaved with 40 units of *Bst*EII (New England Biolabs Inc., Beverly, Mass., USA). The digested fragments were subjected to 1% agarose gel electrophoresis for 15 h and the samples were then blotted onto Hybond-N<sup>+</sup> membranes (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) with a Capillary Blotting Unit (Scotlab, Ltd., Strathclyde, UK). The efficiency of DNA transfer was confirmed by staining the gels with ethidium bromide, and the DNA fragments on the membranes were fixed with 0.4 N NaOH. Each membrane was further incubated at 37°C for 30 min with DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan), and hybridization was performed for 15 h at 37°C with fresh DIG-Easy Hyb containing DIG-labeled Oligo5Mix (100 pmol each) (33), 25 mg/ml fish DNA (Roche Diagnostics), 10 mg/ml Poly (A) (Roche Diagnostics), and 5 mg/ml Poly d (A) (Roche Diagnostics). After the samples were rigorously washed twice with 2 × SSC-0.1% SDS for 5 min at room temperature and treated twice with 0.5 × SSC-0.1% SDS for 15 min at 37°C, the bands were visualized with alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (Roche Diagnostics) and detected using CDP-Star (GE Healthcare) and Hyperfilm ECL (GE Healthcare) in a cassette with an enhancing screen. For PFGE, each strain was grown on a sheep-blood agar plate for 24 h at 37°C. The cells were harvested and suspended in 0.5 ml PIV buffer (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, [pH 7.5]). A portion (0.25 ml) of the suspension was mixed with 0.25 ml 1.6% Seakem<sup>®</sup> Gold Agarose (Cambrex Bio Science, Rockland, Maine, USA) at 50°C and then pipetted into a plug mold (Bio-Rad, Hertfordshire, UK). The agarose blocks were incubated overnight at 37°C in lysis buffer (6 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.5% Brij 58 [Sigma-Aldrich Japan], 0.2% deoxycholate [Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Kyoto, Japan], 0.5% sodium lauroyl sarcosine, 1 mg/ml lysozyme [Nacalai Tesque, Kyoto, Japan]), followed by deproteinization in proteolysis buffer (0.5 M EDTA [pH 8.0], 1% sodium lauroyl sarcosine [Sigma-Aldrich Japan], 2 mg/ml Proteinase K [Nacalai Tesque]) for 48 h (35). The DNA in the plug was cleaved with *Sfi*I (New England BioLabs), and PFGE was carried out in 1% agarose gel with 0.5 × Tris-borate-EDTA buffer at 14°C using CHEF Mapper (Bio-Rad). PFGE profiles were analyzed using Fingerprinting<sup>™</sup> II software (Bio-Rad).

**Southern blotting:** *Bam*HI-digested DNA fragments were applied directly to 1.0% agarose gel and electrophoresis was performed with 1 × Tris-acetate-EDTA buffer for 14 h. The fractionated DNA was then transferred to a Hybond-N<sup>+</sup> membrane as described above. The membrane was incubated at 37°C for 30 min with DIG Easy Hyb, and hybridization was performed at 37°C for 15 h with fresh DIG-Easy Hyb (Roche Diagnostics) containing 20 ng/ml DIG-labeled probes. After the membrane was washed, bands were detected with alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody. The *tox*, *pld*, and *attB* site probes were obtained from a DIG PCR synthesis kit (Roche Diagnostics) using *C. diphtheriae* PW8 with Tox1 and Tox2 primers, strain ATCC<sup>®</sup>51799 with *pld*Fw and *pld*Rv primers, and strain ATCC<sup>®</sup>51799 with *att*BFw (5'-GCGCC CGTAGCTCAACGGATAGAGCA-3') and *att*BRv primers, respectively.

## RESULTS

**Biotyping, sequencing of DLT and PLD, and toxigenicity:** Isolates from Japan were identified as *C. ulcerans* using the API *Coryne* system (API code 0111326). Biochemical characteristics of the isolates were also confirmed by partial sequencing of the 16S rRNA gene, which was almost identical (99.9%) to that of strain ATCC<sup>®</sup>51799 (GenBank accession no. X84256) (27). To determine the toxigenicity of the isolates, we performed a diagnostic PCR using primers Tox1 and Tox2 for the detection of *tox*. Strains ATCC<sup>®</sup>51799 and lion did not harbor *tox* (nontoxigenic strains); however, strains 0102, Ran, O-9, 0509, 0510, and 0607 retained *tox* (toxigenic strains). We also determined the DLT production of the isolates using an Elek test and a cytotoxicity assay using Vero cells, and the results were consistent with the PCR findings (Table 2). Diphtheria antitoxin completely neutralized the culture supernatants of strains 0102, Ran, O-9, 0509, 0510, and 0607 (data not shown). We then sequenced the complete *tox* genes (1,683 bp) of strains Ran, O-9, 0509, 0510, and 0607, and compared these sequences with that of *tox* from strains 0102 (GenBank accession no. AB304278), A6361 (GenBank accession no. AY141014) (37), and *C. diphtheriae* (GenBank accession no. K01722) (36) (Table 3). Strains Ran and O-9 possessed identical *tox* sites (GenBank accession no. AB304279). The *tox* genes of strains 0509 and 0606 were

Table 2. Toxigenicity of *C. ulcerans* and *C. diphtheriae*

Strain	DLT			PLD	
	PCR	Cytotoxicity <sup>1)</sup> (CD <sub>50</sub> /25 µl)	Elek test	PCR	Zaki assay <sup>2)</sup> (U/ml)
<i>C. ulcerans</i>					
ATCC <sup>®</sup> 51799	-	ND	-	+	20
0102	+	362	+	+	40
Ran	+	256	+	+	20
O-9	+	362	+	+	20
lion	-	ND	-	+	160
0509	+	512	+	+	40
0510	+	512	+	+	80
0607	+	256	+	+	320
<i>C. diphtheriae</i>					
PW8	+	3,200	+	-	ND
ATCC700971	+	128	+	-	ND

<sup>1)</sup> Cytotoxicities of culture supernatants measured by pH color change methods.

<sup>2)</sup> *Staphylococcal* sphingomyelinase C inhibition activity in cultured supernatants.

+, positive; -, negative; ND, not detected.

Table 3. Nucleotide sequence and deduced amino acid residue homology of diphtheria-like toxin produced from *C. ulcerans*

Isolate	% Homology for nucleotide (roman) and deduced amino acid ( <i>italic</i> ) sequence <sup>1)</sup>				
	<i>C. ulcerans</i>				<i>C. diphtheriae</i>
	0102	O-9	0510	A6361	DT
0102		<i>100.0</i>	<i>99.10</i>	<i>100.0</i>	<i>95.00</i>
O-9	<i>99.70</i>		<i>99.10</i>	<i>100.0</i>	<i>95.00</i>
0510	<i>98.57</i>	<i>98.51</i>		<i>99.10</i>	<i>94.82</i>
A6361	<i>100.0</i>	<i>99.70</i>	<i>98.57</i>		<i>95.00</i>
DT	<i>95.18</i>	<i>95.24</i>	<i>95.18</i>	<i>95.18</i>	

<sup>1)</sup> Sequences were aligned using GENETYX-MAC 10.0, and percent identities were determined by DNASIS-Mac v3.2 without gaps as the denominator.

Table 4. Nucleotide sequence and deduced amino acid residue homology of phospholipase D produced from *C. ulcerans*

Isolate	% Homology for nucleotide (roman) and deduced amino acid ( <i>italic</i> ) sequence <sup>1)</sup>						
	ATCC <sup>®</sup> 51799	0102	O-9	lion	0510	0607	ATCC739
ATCC <sup>®</sup> 51799		99.69	97.39	99.02	97.72	99.02	98.04
0102	98.05		96.74	99.67	97.72	99.67	98.04
O-9	96.75	96.96		97.06	98.37	97.06	96.74
lion	98.16	99.89	97.07		98.74	100.0	98.37
0510	96.96	97.18	98.18	97.29		98.74	98.37
0607	99.05	99.78	96.96	99.89	97.18		98.37
ATCC739	97.40	96.86	96.10	96.96	98.26	96.86	

<sup>1)</sup> Sequences were aligned using GENETYX-MAC 10.0, and percent identities were determined by DNASIS-Mac v3.2 without gaps as the denominator.

GenBank accession nos. ATCC<sup>®</sup>51799, AB304281; 0102, AB304282; O-9, AB304283; lion, AB304284; 0510, AB304285; 0607, AB304286.

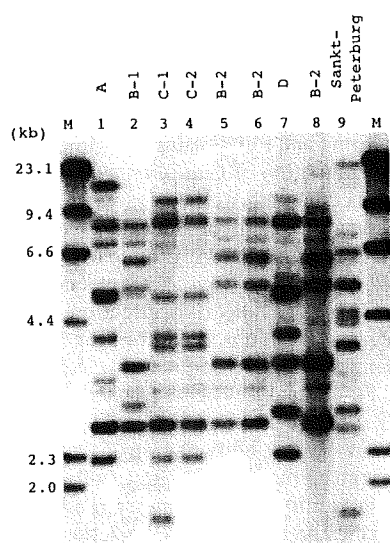


Fig. 1. *BstEII* rRNA gene profiles of isolates and ATCC strains. M, molecular size standard (sizes are indicated on the left); lane 1, ATCC<sup>®</sup>51799; lane 2, 0102; lane 3, Ran; lane 4, O-9; lane 5, lion; lane 6, 0509; lane 7, 0510; lane 8, 0607; lane 9, *C. diphtheriae* ATCC 700971.

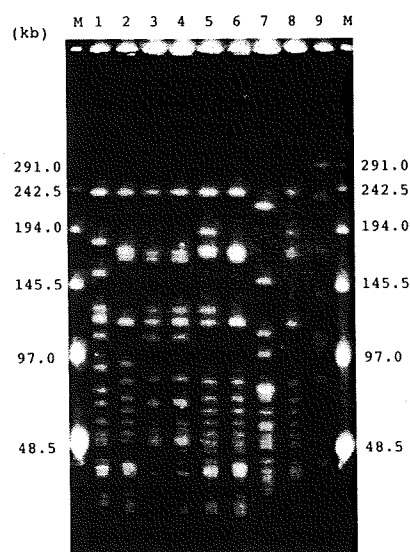


Fig. 2. *SfiI* PFGE profiles of *C. ulcerans* isolates from Japan and ATCC strains. M, lambda concatemer as a size standard (sizes are indicated on the left); lane 1, ATCC<sup>®</sup>51799; lane 2, 0102; lane 3, Ran; lane 4, O-9; lane 5, lion; lane 6, 0509; lane 7, 0510; lane 8, 0607; lane 9, *C. diphtheriae* ATCC 700971.

indistinguishable from that of strain 0102; however, that of strain 0510 (GenBank accession no. AB304280) differed by 5 amino acid residues from that of strain 0102. Although the majority of *C. ulcerans* strains possess the PLD gene, confinement data on the PLD production of isolates were not available. When we determined by PCR analysis that the isolates in Japan had *pld* and that they yielded PLD in the Zaki assay (Table 2), strains 0102, Ran, O-9, 0509, 0510, and 0607 were found to produce both DLT and PLD, whereas strain lion generated PLD only, as seen in strain ATCC<sup>®</sup>51799. We sequenced the *pld* gene of the isolates in order to examine their similarity, because they could potentially be of use as a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. The sequences closely resembled (over 95% similarity) that of *C. ulcerans* ATCC 739 (GenBank accession no. L16585) (20) (Table 4).

**Ribotyping and PFGE analysis:** We determined the genomic relationship of isolates using ribotyping and PFGE. Figure 1 shows that six ribotype patterns (ribotype A, B-1, B-2, C-1, C-2, and D) were identified among the nine strains; ribotype B-1 was identical to ribotype B-2, with the excep-

tion of one band, and ribotype C-1 contained one band more than ribotype C-2. Ribotype groups B (B-1 and B-2) and C (C-1 and C-2) exhibited high similarity, despite their different sources. There were two unique ribotypes in the reference strain ATCC<sup>®</sup>51799 (ribotype A) and strain 0510 (ribotype D). PFGE using *SfiI* was performed in order to further discriminate between ribotypes (Fig. 2). Four types (P1, P2, P3, and P4) of PFGE pattern were found among the nine strains using cluster analysis (Fig. 3). P2 consisted of a cluster and was classified as ribotype group B. There was high (97.5%) relatedness between strains Ran and O-9 (P3). The PFGE patterns of strains ATCC<sup>®</sup>51799 (P1) and 0510 (P4) were distinct from each other, as were the ribotype patterns. Ribotype and PFGE type had the same groupings as those of the nine strains.

**Southern hybridization and sequencing of the *attB* site of isolates:** To determine the location of *tox* and the *attB* site in the isolates, we performed a Southern blot analysis with *tox* and *attB* sites probes. *BamHI*-digested DNA was used because the *tox* genes did not contain any *BamHI* sites. Of the eight strains tested, only strain 0102 contained two frag-

ments hybridizing with *tox*-probe (*tox* fragment). The other toxigenic strains had one *tox* fragment, and, as expected, no reactive bands were observed in strains ATCC<sup>®</sup>51799 and lion (Fig. 4A). One *attB* homologous site was present in the nontoxigenic strains; however, 2 or 3 *attB* homologous sites were present in toxigenic strains (Fig. 4B). Southern blotting was also carried out with a *pld*-specific probe, which demonstrated that each strain possessed a single *pld* copy (Fig. 4C). The toxigenic strains had one or two bands that reacted with both the *tox* and *attB* site probes; however, no *pld* genes were collocated with any *attB* homologous regions.

The Southern blots indicated that both the *tox* gene and *attB* site were located together in single *Bam*HI-digested fragments. PCR analysis with the primers attBRv and CU-Rfw was performed to clarify the relevance of these sequences. These primers amplified a region of 635 bps in all toxigenic strains (data not shown). Figure 5 shows the alignment of regions downstream of the *tox* and *attB* sites of strains 0102, O-9, 0510, known *attB*-related sites of *C. ulcerans* and *C. diphtheriae*, and the *attP* site of corynebophage. The regions of strains 0102 and O-9 were identical to those of strains 0509

and 0607, and that of strain Ran, respectively. There were major portions of the *attP/attB* common core, which was created by site-specific recombination between the *attP* and *attB* sites (24), located 83 bps after the *tox* stop codon. The regions were more similar to the *attP* site than to the *attB*-related site.

## DISCUSSION

We described here the first cases of *C. ulcerans* isolated from *O. orca* and *P. leo*, the utility of ribotyping and PFGE for epidemiological surveillance, the similarity of *tox* and *pld* sequences between these strains, and the properties of the corynebophage attachment site.

Although person-to-person spread of toxigenic *C. ulcerans* was not detected, it is thought that diseased animals were associated with the *C. ulcerans* infection of patients in some cases (12). To clarify the source of the bacterium, epidemiological surveillance is needed. The utility of subtyping of *C. ulcerans* has not been investigated in nearly as much detail as has that of *C. diphtheriae*. Subtyping methods include serotyping, phage typing, ribotyping, and PFGE (38-42). We carried out ribotyping and PFGE using the same protocols as those used for examination of *C. diphtheriae*. Interestingly, the lion strain and certain other clinical isolates (strains 0509 and 0607) shared similar ribotypes and PFGE type patterns. It is possible that the isolates were genetically homologous. The data indicated the possibility of the association of some diseases in animals with *C. ulcerans* infection in humans in Japan, which has also been observed in European countries. Moreover, *tox* and *pld* gene sequencing, Southern blot, ribotyping, and PFGE analyses demonstrated that two of the isolates from *O. orca* corresponded to a single strain. This finding pointed out the possibility of ease of transmission due to close contact with animals. Strains Ran, O-9, and lion were isolated from one facility. This finding suggested that there were both toxigenic and nontoxigenic bacteria present at the same facility. Because we were unable to use European strains in this study, there are no definite conclusions regarding differences between Japanese and European strains. However, these isolates in Japan are likely to be characteristic of those previously observed in Japan based on comparisons with

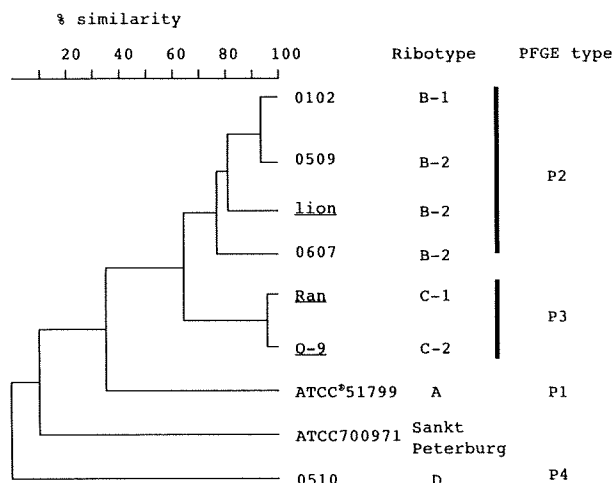


Fig. 3. Dendrogram showing the genetic relationships of *C. ulcerans* isolates in Japan. The isolates obtained from animals are underlined.

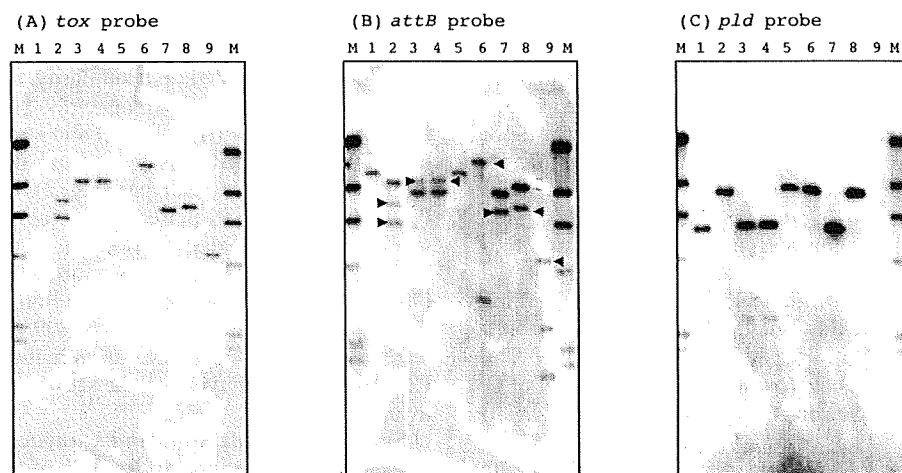


Fig. 4. Southern blot analysis of *C. ulcerans* and *C. diphtheriae* genomic DNA with DIG-labeled (A) *tox*, (B) *attB* site, and (C) *pld* specific probes. M, DIG-labeled molecular standard marker; lane 1, ATCC<sup>®</sup>51799; lane 2, 0102; lane 3, Ran; lane 4, O-9; lane 5, lion; lane 6, 0509; lane 7, 0510; lane 8, 0607; lane 9, *C. diphtheriae* ATCC 700971. Arrows indicate the bands that are the same in *tox* fragments.

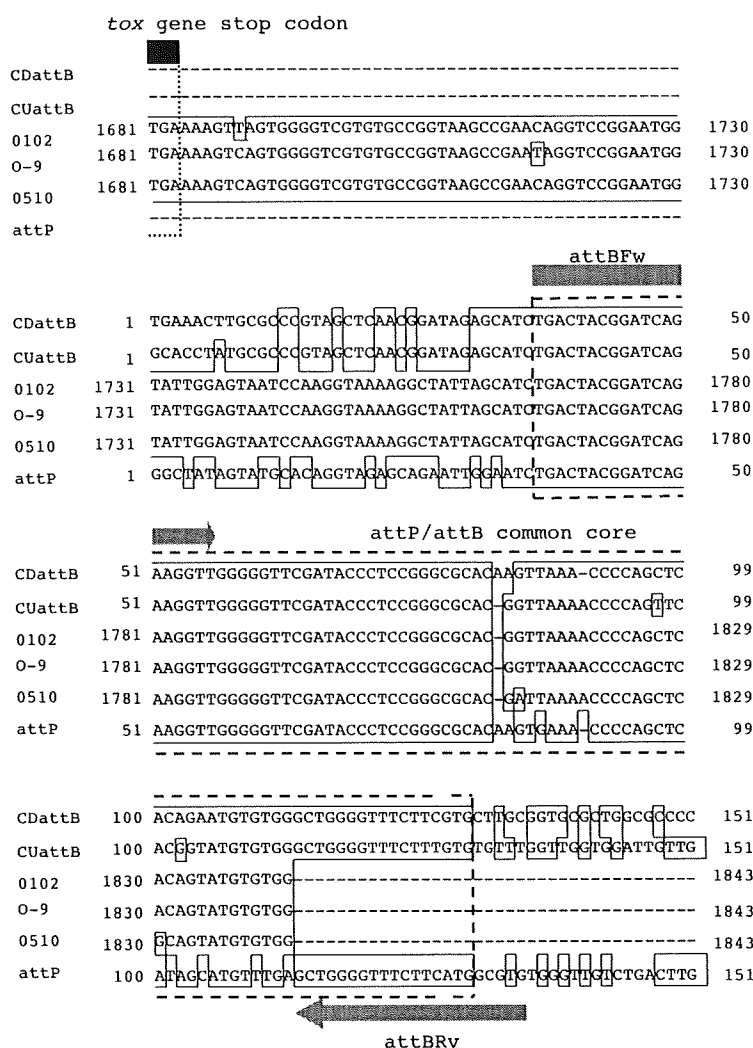


Fig. 5. Alignment of the deduced nucleotide sequences of attachment site homologous genes from *C. ulcerans* strains 0102, O-9, 0510, *C. ulcerans* attB-related site, *C. diphtheriae* attB-related site, and coryneophage-gamma DNA for the attP site.

the ribotyping data from UK-derived isolates (7). The dendrogram derived from the PFGE pattern was same as that obtained from the ribotype grouping in our study. However, a larger number of isolates will be needed to determine the comparative usefulness of molecular epidemiological typing in *C. ulcerans*.

The results of the Southern blot analysis revealed that the *tox* genes were close to the *attB* sites in these isolates. Strain 0102 was a tandem double lysogen (unstable conformation) and the other strains were single lysogens. The production of DT by *C. diphtheriae* was shown to be proportional to the number of prophages integrated into its chromosome. The culture supernatant of strain 0102 had equivalent cytotoxic activity to that of the single lysogen strains under the conditions used here. We also demonstrated that the *attP/attB* common core was located downstream of the *tox* gene. The present results suggest that the number of *attB* sites in *C. ulcerans* differs from that in *C. diphtheriae*; however, the integration system appears to function in the same manner.

There have been few investigations of the pathogenicity of PLD production by *C. ulcerans*. We cannot exclude the possibility that differences in toxin production may exert an influence on *C. ulcerans* infection. Due to PLD production

and the high level of similarity between *pld* genes among the isolates, PLD may be useful as a marker of *C. ulcerans* (21). It was moreover noteworthy that the DLT sequences of four toxigenic strains were identical to that of a German isolate, A6361 (Table 3). The identity of these DLT sequences suggests that there is a high degree of conservation in DLT. We are currently investigating differences in the immunological and cytotoxic activities of DLT and DT.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was in part supported by the grant for research on emerging and re-emerging infectious disease from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

#### REFERENCES

- Gulbert, R. and Stewart, F.C. (1926): *Corynebacterium ulcerans*: a pathogenic microorganism resembling *C. diphtheriae*. J. Lab. Clin. Mcd., 12, 756-761.
- Riegel, P., Ruimy, R., de Briel, D., et al. (1995): Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov. nom. rev. FEMS Microbiol. Lett., 126, 271-276.
- Bergin, I.L., Chien, C.C., Marini, R.P., et al. (2000): Isolation and characterization of *Corynebacterium ulcerans* from cephalic implants

- in macaques. *Comp. Med.*, 50, 530-535.
4. Lipsky, B.A., Goldberger, A.C., Tompkins, L.S., et al. (1982): Infections caused by nondiphtheria corynebacteria. *Rev. Infect. Dis.*, 4, 1220-1235.
  5. Tejedor, M.T., Martin, J.L., Lupiola, P., et al. (2000): Caseous lymphadenitis caused by *Corynebacterium ulcerans* in the dromedary camel. *Can. Vet. J.*, 41, 126-127.
  6. Lartigue, M.F., Monnet, X., Le Fleche, A., et al. (2005): *Corynebacterium ulcerans* in an immunocompromised patient with diphtheria and her dog. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 999-1001.
  7. De Zoysa, A., Hawkey, P.M., Engler, K., et al. (2005): Characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains isolated from humans and domestic cats in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 4377-4381.
  8. Wellingshausen, N., Sing, A., Kern, W.V., et al. (2002): A fatal case of necrotizing sinusitis due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 292, 59-63.
  9. Taylor, D.J., Efstratiou, A. and Reilly, W.J. (2002): Diphtheria toxin production by *Corynebacterium ulcerans* from cats. *Vet. Rec.*, 150, 355.
  10. Dewinter, L.M., Bernard, K.A. and Romney, M.G. (2005): Human clinical isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* collected in Canada from 1999 to 2003 but not fitting reporting criteria for cases of diphtheria. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 3447-3449.
  11. de Carpentier, J.P., Flanagan, P.M., Singh, I.P., et al. (1992): Nasopharyngeal *Corynebacterium ulcerans*: a different diphtheria. *J. Laryngol. Otol.*, 106, 824-826.
  12. Hatanaka, A., Tsunoda, A., Okamoto, M., et al. (2003): *Corynebacterium ulcerans* diphtheria in Japan. *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 752-753.
  13. Kaufmann, D., Ott, P. and Ruegg, C. (2002): Laryngopharyngitis by *Corynebacterium ulcerans*. *Infection*, 30, 168-170.
  14. Nureki, S., Miyazaki, E., Matsuno, O., et al. (2007): *Corynebacterium ulcerans* infection of the lung mimicking the histology of Churg-Strauss syndrome. *Chest*, 131, 1237-1239.
  15. Sing, A., Bierschenk, S. and Heesemann, J. (2005): Classical diphtheria caused by *Corynebacterium ulcerans* in Germany: amino acid sequence differences between diphtheria toxins from *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. *Clin. Infect. Dis.*, 40, 325-326.
  16. von Hunolstein, C., Alfarone, G., Scopetti, F., et al. (2003): Molecular epidemiology and characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains isolated in Italy during the 1990s. *J. Med. Microbiol.*, 52, 181-188.
  17. Wagner, J., Ignatius, R., Voss, S., et al. (2001): Infection of the skin caused by *Corynebacterium ulcerans* and mimicking classical cutaneous diphtheria. *Clin. Infect. Dis.*, 33, 1598-1600.
  18. Michel, J.L., Rappuoli, R., Murphy, J.R., et al. (1982): Restriction endonuclease map of the nontoxigenic corynephage gamma c and its relationship to the toxigenic corynephage beta c. *J. Virol.*, 42, 510-518.
  19. Efstratiou, A., Engler, K.H., Dawes, C.S., et al. (1998): Comparison of phenotypic and genotypic methods for detection of diphtheria toxin among isolates of pathogenic corynebacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 3173-3177.
  20. McNamara, P.J., Cuevas, W.A. and Songer, J.G. (1995): Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. *Gene*, 156, 113-118.
  21. Barksdale, L., Linder, R., Sulea, I.T., et al. (1981): Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. *J. Clin. Microbiol.*, 13, 335-343.
  22. Rappuoli, R., Michel, J.L. and Murphy, J.R. (1983): Integration of corynebacteriophages beta tox+, omega tox+, and gamma tox- into two attachment sites on the *Corynebacterium diphtheriae* chromosome. *J. Bacteriol.*, 153, 1202-1210.
  23. Rappuoli, R. and Ratti, G. (1984): Physical map of the chromosomal region of *Corynebacterium diphtheriae* containing corynephage attachment sites attB1 and attB2. *J. Bacteriol.*, 158, 325-330.
  24. Cianciotto, N., Serwold-Davis, T., Groman, N., et al. (1990): DNA sequence homology between attB-related sites of *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium glutamicum*, and the attP site of gamma-corynephage. *FEMS Microbiol. Lett.*, 54, 299-301.
  25. Cianciotto, N., Rappuoli, R. and Groman, N. (1986): Detection of homology to the beta bacteriophage integration site in a wide variety of *Corynebacterium* spp. *J. Bacteriol.*, 168, 103-108.
  26. Maximescu, P., Oprisan, A., Pop, A., et al. (1974): Further studies on *Corynebacterium* species capable of producing diphtheria toxin (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. ovis*). *J. Gen. Microbiol.*, 82, 49-56.
  27. Pascual, C., Lawson, P.A., Farrow, J.A., et al. (1995): Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 724-728.
  28. Engler, K.H., Glushkevich, T., Mazurova, I.K., et al. (1997): A modified Elek test for detection of toxigenic corynebacteria in the diagnostic laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 495-498.
  29. Miyamura, K., Nishio, S., Ito, A., et al. (1974): Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. I. Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration. *J. Biol. Stand.*, 2, 189-201.
  30. Miyamura, K., Tajiri, E., Ito, A., et al. (1974): Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. II. Comparison with the rabbit skin method and practical application for seroepidemiological studies. *J. Biol. Stand.*, 2, 203-209.
  31. Hodgson, A.L., Bird, P. and Nisbet, I.T. (1990): Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 172, 1256-1261.
  32. Nakao, H. and Popovic, T. (1997): Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 1651-1655.
  33. Regnault, B., Grimont, F. and Grimont, P.A. (1997): Universal ribotyping method using a chemically labelled oligonucleotide probe mixture. *Res. Microbiol.*, 148, 649-659.
  34. De Zoysa, A., Efstratiou, A., George, R.C., et al. (1995): Molecular epidemiology of *Corynebacterium diphtheriae* from northwestern Russia and surrounding countries studied by using ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 1080-1083.
  35. Murray, B.E., Singh, K.V., Heath, J.D., et al. (1990): Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 2059-2063.
  36. Ratti, G., Rappuoli, R. and Giannini, G. (1983): The complete nucleotide sequence of the gene coding for diphtheria toxin in the corynephage omega (tox+) genome. *Nucleic Acids Res.*, 11, 6589-6595.
  37. Sing, A., Hogardt, M., Bierschenk, S., et al. (2003): Detection of differences in the nucleotide and amino acid sequences of diphtheria toxin from *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* causing extrapharyngeal infections. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 4848-4851.
  38. Efstratiou, A., Engler, K.H., Mazurova, I.K., et al. (2000): Current approaches to the laboratory diagnosis of diphtheria. *J. Infect. Dis.*, 181 (Suppl. 1), S138-145.
  39. Popovic, T., Kim, C., Reiss, J., et al. (1999): Use of molecular subtyping to document long-term persistence of *Corynebacterium diphtheriae* in South Dakota. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1092-1099.
  40. Sulakvelidze, A., Kekelidze, M., Gomelauri, T., et al. (1999): Diphtheria in the Republic of Georgia: use of molecular typing techniques for characterization of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 3265-3270.
  41. Popovic, T., Mazurova, I.K., Efstratiou, A., et al. (2000): Molecular epidemiology of diphtheria. *J. Infect. Dis.*, 181 (Suppl. 1), S168-177.
  42. Titov, L., Kolodkina, V., Dronina, A., et al. (2003): Genotypic and phenotypic characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated from patients in Belarus during an epidemic period. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 1285-1288.

ジフテリア毒素非産生 *C. diphtheriae* が検出された 3 症例の検討

本間 康夫<sup>1)</sup>, 吉井 裕子<sup>1)</sup>, 小宮 貴子<sup>2)</sup>, 高橋 元秀<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 信楽園病院検査科, <sup>2)</sup> 国立感染症研究所細菌第二部

序 文

*Corynebacterium diphtheriae* はジフテリア毒素を産生し、偽膜形成を伴う上気道炎から呼吸困難、心筋炎、神経麻痺など重篤な症状を呈するジフテリア症の原因菌である。感染症法では 2 類感染症に指定されているが、わが国においては 1999 年以降、感染症法としての届出はない<sup>1)</sup>。しかし、世界的には東南アジアを始めとする発展途上国や欧米で散発的な発生が見られ、1990 年代ソビエト連邦崩壊による混乱の中、旧ソ連圏においてジフテリアが大流行し 1990 年から 6 年間で 12 万人以上の患者発生と 4 千人以上の死亡が確認されている<sup>2)</sup>。また英国においては近年ジフテリア毒素非産生 *C. diphtheriae* による感染症が多数発生し<sup>3)</sup>、欧米においても報告が見られる。今回、半年間に 3 例のジフテリア毒素非産生 *C. diphtheriae* を分離したので細菌学的検討とともに報告する。

症 例

症例 1 : 60 歳女性

主訴 : 呼吸困難

既往歴 : 1995 年より筋萎縮性側索硬化症 (ALS) で当院に長期入院。

現病歴 : 一時退院後、再入院 4 日目の 2007 年 5 月 9 日に呼吸困難と SpO<sub>2</sub> の低下が見られた。肺炎疑いで吸引痰の培養を行い、グラム陽性桿菌が、ほぼ純培養状に分離され *C. diphtheriae* と同定された。また検体の塗抹標本でも白血球に貪食されたグラム陽性桿菌が多数見られた。医師より保健所に届出を行い、新潟県保健環境研究所ならびに国立感染症研究所で精査した結果、ジフテリア毒素非産生 *C. diphtheriae* (以下、毒素非産生株と記載) と確認され 2 類感染症には該当しなかった。患者血清中のジフテ

リア毒素抗体価も検出限界以下の低値であった。PAPM/BP の投与で菌の消失と症状の改善が認められたが同年 9 月に再び肺炎を併発し前回と同様の菌が検出された。IPM/CS で菌の消失と症状の改善が認められた。

症例 2 : 72 歳女性

主訴 : 発熱

既往歴 : 2006 年 7 月糸球体腎炎, 2006 年 12 月血痰, 胸部 X 線・CT 画像で多発結節影を認める。2007 年 3 月ウェジナー肉芽腫疑い, 3 月 12 日 HD 開始, 3 月 28 日からステロイド使用。

現病歴 : 2007 年 8 月 14 日, 肺炎の診断で緊急入院。BT38.4℃, CRP5.56mg/dl, WBC2200/mm<sup>3</sup>, β-D-glucan99.55pg/ml, CT 画像でスリガラス様陰影が認められた。入院時の喀痰培養で口腔内常在菌とともに *C. diphtheriae* が少数検出され精査の結果, 毒素非産生株であった。患者はステロイド使用中で白血球数減少及び β-D-glucan が高値のため, ニューモシスチス肺炎あるいは真菌症の可能性も考慮した治療を行ったが 8 /27 に永眠された。原因究明のため解剖を検討したが遺族の承諾は得られなかった。起炎菌は不明であるがジフテリア菌は Colonization と思われた。患者血清中のジフテリア毒素抗体価は検出限界以下であった。

症例 3 : 76 歳女性

主訴 : 発熱

既往歴 : 1996 年 6 月よりアルツハイマー型痴呆症, 2007 年 5 月と 7 月に両側化膿性耳下腺炎のため他院で入院治療。特別養護老人ホーム入所中。

現病歴 : 2007 年 9 月 26 日, 嚥下性肺炎にて当院紹介入院。BT38.9℃, CRP13.61mg/dl, WBC20060/mm<sup>3</sup>,

CT画像で両下葉の背側部分に浸潤影が認められた。入院当日の喀痰より口腔内常在菌および*C. diphtheriae*が検出され、毒素非産生株であった。患者血清中のジフテリア毒素抗体価は検出限界以下であった。

SBT/ABPCで治療を行い、肺炎は軽快し10月18日退院。

### 細菌学的検討

#### 塗抹及び培養検査

痰の前処理（洗浄）後、検体塗抹標本のグラム染色（フェイバー法）、および培養をおこなった。培養はトリ・ソイ血液寒天培地（ヒツジ）No.2（極東）、およびチョコレート寒天培地 No.2（極東）を用い炭酸ガス（ローソク）培養を行った。

1症例目の検体は膿性痰で、グラム染色では多くの好中球とともに長めで細く、やや湾曲したグラム陽性桿菌が多数見られた。また食食像も顕著に認められた。（9月の再発時のグラム染色でも同様の所見が見られた。）（図1）

2症例目の塗抹標本では有意な菌は見られなかったが、3症例目の標本では誤嚥性の炎症を示唆する所見の中に1症例目と同様なグラム陽性桿菌が雑多な菌とともに多数見られた。

3例とも一夜培養後、血液寒天培地上に透過光による観察で確認できる程度の弱いβ溶血を示す0.5mm程度の小さな白色コロニーが発育した。これらの菌株をRapID CB Plus（アムコ）で検査を行い、3菌株とも*C. diphtheriae*（コード5304511、確率99.89%）と同定された。

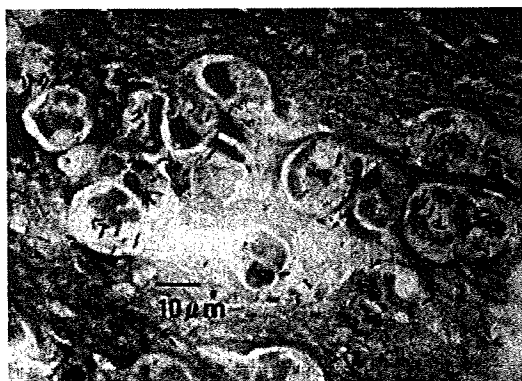


図1 喀痰の直接塗抹標本（グラム染色）×1000

荒川培地と同等の濃度（0.04%）になるよう亜テレル酸Kを添加したハートインフュージョン寒天培地に一夜培養した分離菌のコロニーでは、亜テレル酸Kの還元による黒色のスムーズ型のコロニーが観察された（図2）。菌株のナイセル染色では異染小体が認められた（図3）。

DNase試験（塩酸法）はDNA培地（栄研）に一夜培養後、1N塩酸を培地全体に注ぎ反応させたのち判定した。各症例から分離された3株とも発育した菌の周辺部に透明帯が確認され、陽性であった（図4）。

これらの菌株は国立感染症研究所で精査し、16s rRNAによる遺伝子解析を行うとともに生物学的性状（表1）から*C. diphtheriae*（生物タイプ mitis型）であることが確認された。

また分離菌株のジフテリア毒素遺伝子の有無（図5）と、ジフテリア毒素産生能の検査、および患者血中ジフテリア抗体価（抗毒素価）を測定した結果、



図2 亜テレル酸K加ハートインフュージョン寒天培地

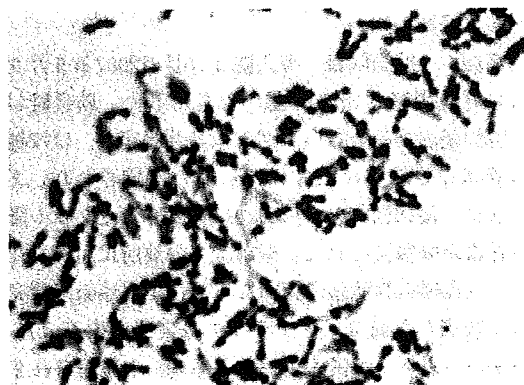


図3 ナイセル染色

3例の分離菌株は、いずれも毒素非産生株と確認された。

抗菌薬感受性試験はドライプレート（栄研）に、ストレプトヘモサプリメントを添加したミュラーヒントンブロスを用い35℃、20時間培養後判定。CPFV, LVFXについてはミュラーヒントンSヒツジ血液寒天培地（栄研）を用い、E-testによる感受性試験を追加した。

β-ラクタム薬、ミノサイクリン、アミノグリコシ

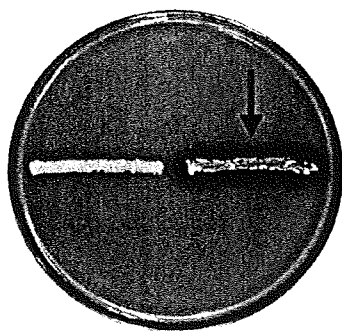


図4 DNA培地

左：陰性対照 *C. striatum* 陰性  
 右：分離菌株 陽性  
 菌を接種し、35℃、24時間培養後、1N塩酸を培地全体に注ぐ。  
 陰性対照は培地が白濁するが、分離菌株は、DNaseによって、コロニーの周囲に透明帯が見られた。

表1 生物学的性状と毒素産生の有無

検査項目	結果
グラム染色	陽性 桿菌
異染小体染色 (ナイセル染色)	陽性
レフレル培地	増殖 (+)
チンスタール培地	増殖 (+) 黒色コロニー
エレク試験	陰性
アピコリネ同定試験	<i>C. diphtheriae</i> mitis コード 0010324 確率 99.4%
ジフテリア毒素活性 (培養細胞法)	陰性
ジフテリア毒素遺伝子 PCR (248bp)	陰性

ド、などには低いMIC値を示したが、フルオロキノロンのCPFV, LVFXは共に >32 μg/mlと高いMIC値を示した。

また、2症例目および3症例目の菌株では、EMやCLDMでも高いMIC値を示した（表2）。

上記3症例から分離された3菌株についてパルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子解析を行ったところ2症例目と3症例目の泳動パターンが一致した。また1症例目については別の泳動パターンを示した（図6）。

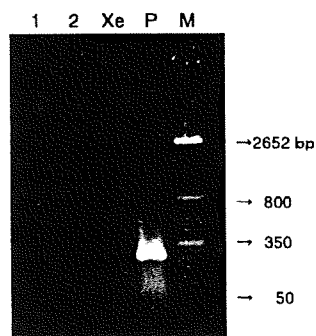


図5 ジフテリア毒素遺伝子 PCR

結果  
 1：レフレル培養株 陰性  
 2：ハートインフュージョン培養株 陰性  
 Xe：陰性コントロール *Corynebacterium xerosis*  
 P：陽性コントロール *Corynebacterium diphtheriae* PW8  
 M：50bp DNA ラダーマーカー

表2 薬剤感受性成績 MIC μg/ml

	1 症例目	2 症例目	3 症例目
SBT/ABPC	≤0.06	0.12	0.12
CEZ	≤0.12	0.25	0.25
IPM	≤0.06	≤0.06	≤0.06
MEPM	≤0.06	≤0.06	≤0.06
EM	≤0.06	4	4
CLDM	0.25	> 4	> 4
MINO	≤0.06	≤0.06	≤0.06
VCM	≤0.5	≤0.5	≤0.5
TEIC	≤0.5	≤0.5	≤0.5
FOM	>16	>16	>16
TFLX	>32	>32	>32
LVFX	>32	>32	>32



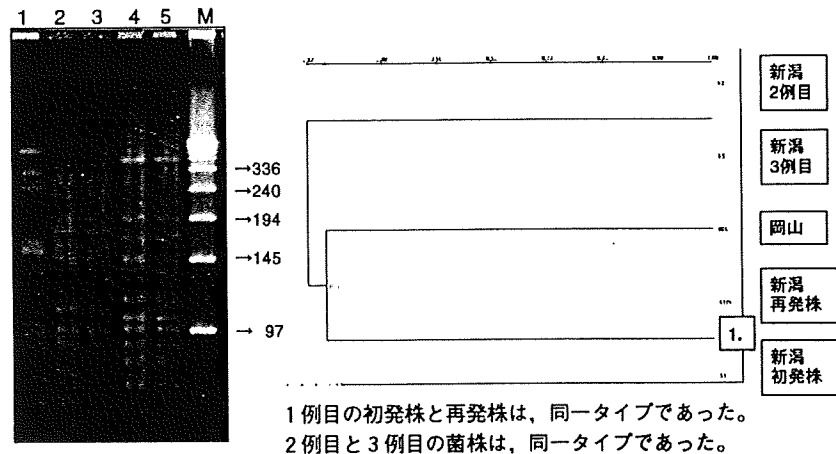


図6 PFGE 解析結果 (UPGAMA 法)

- No.
- 1 岡山県2006年分離株 (gravis 型)
  - 2 新潟県 初発株 (mitis 型)
  - 3 新潟県 再発株 (mitis 型)
  - 4 新潟県 2 症例目 (mitis 型)
  - 5 新潟県 3 症例目 (mitis 型)
- M DNA ラムダラダーマーカー  
1.5% ゲル  
BIO-RAD CHEF DR II 泳動装置  
14°C  
5 - 20秒 18時間  
1 - 5 秒 14時間  
制限酵素: Sfi I

### 考 察

3 症例とも毒素非産生株であったことや、患者血清のジフテリア毒素抗体価が低値であることから、患者はジフテリア毒素に感作されていないと思われた。

*C. diphtheriae* のおもなバイオタイプ (gravis, mitis, intermedius) は、Anderson らにより1931年に記載されており<sup>5)</sup> その後、多くの著書にその特徴が記載されている<sup>6)7)</sup>。

今回の分離菌は血液寒天上でのβ溶血やスムーズ型のコロニー、生化学的性状などからバイオタイプは mitis 型に分類された。

Diamond らは、*C. diphtheriae* が DNase 陽性、他の *Corynebacterium* spp. は陰性であることを報告<sup>8)</sup> している。また *C. diphtheriae* と DNase の関係を示した論文・著書も多い<sup>9)10)11)</sup>。今回分離された菌株も DNase 陽性であった。

ジフテリア症状がある場合や *C. diphtheriae* を強く疑う場合は DNase 試験の結果にかかわらず詳細な検討が必要と思われるが、毒素非産生株などジフテリア症状を呈しない感染や保菌者などのスクリーニングとして、DNase 試験は安価で簡便な方法であり、どこの検査室でも実施可能なため同定試験のひとつとして有用な検査法と思われた。

*C. diphtheriae* に対する薬剤感受性試験では、各系統の薬剤で感性が保たれている菌株が多いものの、一部にマクロライド、ミノサイクリンなどに耐性化 (MIC 値の上昇) が見られるとの海外の報告がある<sup>12)13)14)15)</sup>。

今回の分離菌について3菌株ともフルオロキノロン系抗菌薬である CPFX, LVFX の MIC 値が高く、2 症例目、3 症例目の菌株ではさらにエリスロマイシン、クリンダマイシンにも高い MIC を示したこと

から抗菌薬選択に注意が必要と思われた。

我が国ではトキソイドワクチンの普及によりジフテリア症、ならびに *C. diphtheriae* に遭遇する機会はほとんどなくなっている。

しかしジフテリアトキソイドワクチンは接種後10年余りで抗体価が低下するといわれており<sup>16)</sup>、国立感染症研究所などの調査でも日本人成人での抗体価の低下が指摘されている<sup>17)</sup>。

2007年5月から10月までの半年間に3例の *C. diphtheriae* が分離されたことは、国内においても *C. diphtheriae* が潜在的に増加している可能性があると思われた。

国外においては、1990年代にロシアをはじめとする旧ソ連圏の各国でジフテリア症の大流行が発生している。また現在でも東南アジアでは多くの感染が報告<sup>18)</sup> されており、その他、世界各地で発生が見られている。

さらに毒素非産生株による感染例も英国など世界各地から多数報告され<sup>4)15)19)</sup>、ウィルソンらはジフテリア菌の増加に警鐘を鳴らしている<sup>20)</sup>。

我が国においても2006年1月、岡山県で血液培養から毒素非産生株が検出されている<sup>21)</sup>。

今回分離された菌株のパルスフィールドゲル電気泳動では、2症例目と3症例目からの菌株で泳動パターンが一致した。しかし2人の患者間に共通の接点がなく、1症例目の菌株では異なる泳動パターンを示したこともあり感染経路は不明であった。今後は疫学調査を含めた対応が必要と思われた。

また現時点では2類感染症に指定されていないが、ジフテリア症状を呈する diphtheria-like toxin 産生 *C. ulcerans* による感染例が国内において2001年～2006年の間に5例発生している<sup>22)</sup>。

このことから *C. diphtheriae* や人畜共通感染症としての *C. ulcerans* などについて医療機関での検査体制を含め、再認識することが必要と思われた。

## 文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター 病原微生物検出情報 (Vol.27 p331-332 : 2006年12月号)
- 2) WHO. Weekly Epidemiological Record (WER) 16 August 1996, Vol. 71, No. 33, (245-252)
- 3) 国立感染症研究所感染症情報センター 感染症発生

動向調査週報 (2002年第14週号)

- 4) Reacher, M., M.Ramsay, J. White, et al. 2000. Non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*: An Emerging Pathogen in England and Wales?. Emerging Infectious Diseases. Vol. 6, No. 6 (640-645)
- 5) Anderson, J. S., F. C.Happold, J. W. McLeod, et al. 1931. on the existence of two forms of diphtheria bacillus-*B. diphtheriae gravis* and *B.diphtheriae mitis*-and a new medium for their differentiation and for the bacteriological diagnosis of diphtheria. J. pathol. 34 : 667-681
- 6) 工藤肇 訳. 1980. 第10章グラム陽性桿菌. コリネバクテリア. p.405-412, グラッドウォール臨床検査学 第IV巻 微生物学 (松本慶蔵. 間守守男 監訳, 第1版), 医歯薬出版, 東京
- 7) 占部薫, 松尾吉恭, 斉藤肇. 1974. 第13章コリネバクテリウム属. p.342-351, 戸田新細菌学 (戸田忠雄, 武谷健二 編, 第26版). 南山堂. 東京
- 8) Diamond, B. E., J. M. Judson. 1967. deoxyribonuclease activity of corynebacterium diphtheria and its relation to toxigenicity. Public Health Lab. 25 : 193-195
- 9) Messinova, O.V., D.V. Yusupova, N.S. Shamsutdinov. 1963. desoxyribonuclease activity of *Corynebacterium* and its relation to virulence. Fed. Proc., 22, T1033-T1035
- 10) Neal B. Groman and Cynthia K. Dean. Toxinogeny in *Corynebacterium diphtheriae* After Loss of Catalase, Cystinase, or Deoxyribonuclease Activity. Infect. Immun. 1973. 8: 442-445.
- 11) 藪内英子, 三輪谷俊夫 監訳. 1985. 第10章デオキシリボヌクレアーゼ (DNase) とサーモヌクレアーゼテスト. p.81-95, 病原細菌の生化学的検査 (第1版). 医学書院. 東京
- 12) Von Hunolstein C, Alfaron G, Scopetti F, Patarachia M, La Valle R, Franchi F, Pacciani L, Manera A, Giammanco A, Farinelli S, Engler K, De Zoysa A, Efstratiou A. Molecular epidemiology and characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains isolated in Italy during the 1990s. *Journal of medical microbiology*. 2003; 52 (Pt. 2) :181-188.
- 13) Coyle MB, Minshew BH, Bland JA, Hsu PC. Eryth-

- romycin and clindamycin resistance in *Corynebacterium diphtheriae* from skin lesions. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979 Oct; 16 (4): 525-527.
- 14) Rockhill RC, Sumarmo, Hadiputranto H, Siregar SP, Muslihun B. Tetracycline resistance of *Corynebacterium diphtheriae* isolated from diphtheria patients in Jakarta, Indonesia. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982 May; 21 (5): 842-843.
- 15) Funke, G., M. Altwegg, L. Frommelt, and A. Von Graevenitz. 1999. Emergence of related nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* biotype *mitis* strains in Western Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 477-480.
- 16) 中尾 浩史. 1999. 細菌感染症, ジフテリア. p 127-133. 最新医学, 54巻 3月増刊号. 最新医学社. 大阪
- 17) 東京都感染症情報センター 東京都微生物検査情報 (第27巻, 2006年12号)
- 18) WHO. vaccine-reventable diseases: monitoring system 2006 global summary (12-13)
- 19) Romney, M. G., Roscoe, D. L., Bernard, K., Lai, S., Efstratiou, A., Clarke, A. M. (2006). Emergence of an Invasive Clone of Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in the Urban Poor Population of Vancouver, Canada. *J. Clin. Microbiol.* 44: 1625-1629
- 20) Wilson APR. The return of *Corynebacterium diphtheriae*: the rise of non-toxigenic strains. *J Hosp Infect* 1995; 30 Suppl: 306-12.
- 21) 国立感染症研究所感染症情報センター 病原微生物検出情報 (Vol.28 p201-202 : 2007年 7月号)
- 22) 国立感染症研究所感染症情報センター 病原微生物検出情報 (Vol.27 p339-340 : 2006年12月号)

## Laboratory and Epidemiology Communications

### A Case of Afebrile Pneumonia Caused by Non-Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*

Yasuo Honma, Yuko Yoshii, Yumiko Watanabe, Nobuki Aoki, Takako Komiya<sup>1</sup>, Masaaki Iwaki<sup>1</sup>,  
Hiroyuki Arai<sup>2</sup>, Yoshichika Arakawa<sup>1</sup>, Motohide Takahashi<sup>1\*</sup>, and Hirokazu Kimura<sup>3</sup>

*Shinrakuen Hospital, Niigata 950-2087; <sup>1</sup>Department of Bacteriology II and <sup>3</sup>Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011; and <sup>2</sup>Department of Geriatrics and Gerontology, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Miyagi 980-8575, Japan*

Communicated by Kazuo Kobayashi

(Accepted July 1, 2009)

Afebrile pneumonia is a relatively unusual disease and may be caused by certain pathogens such as *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, respiratory syncytial virus, and *Pneumocystis jirovecii* (1,2). However, the specific causative agents of afebrile pneumonia have not yet been fully identi-

fied to date. Non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and toxigenic *C. diphtheriae* are partly responsible for respiratory infections including pneumonia, although the incidence of these infections may be very low (3,4). Here, we describe a case of afebrile pneumonia caused by non-toxigenic *C. diphtheriae*.

A 60-year-old Japanese female had been diagnosed with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) at the age of 47 years. Two years after onset, she underwent tracheotomy and was provided with a mechanical ventilator. Aside from an occa-

---

\*Corresponding author: Mailing address: Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan. Tel: +81-42-561-0771, Fax: +81-42-565-3315, E-mail: motohide@nih.go.jp