

表3 主要な感染経路

A) 家畜ブルセラ菌感染症：輸入感染症としての注意必要

1) 加熱不十分な乳・乳製品，食肉 — 最も一般的
2) 直接接触（感染動物，流産時の汚物，死流産胎子） —ハイリスク者：酪農家，と畜場従業員，獣医師
3) 吸入感染（毛皮，粉塵）
4) 検査室，実験室感染
5) 人-人感染（性交，授乳）—まれ

B) *B. canis* 感染症：国内で感染

1) 直接接触や吸入感染 （流産時の汚物，死流産胎子，膣分泌液，尿，精液） —ハイリスク者：獣医師，ブリーダー，犬取扱・販売業者
2) 感染した犬に顔や目・口の周りをなめさせる。 —ペットオーナーにおける感染リスク。
3) 検査室，実験室感染

犬ブルセラ症

1) 発生状況

*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。特に中南米（メキシコ，ペルー，アルゼンチン）で多く、他に米国，アジア（日本を含む），ヨーロッパの一部（ドイツ，スペイン，イタリアなど）でも報告されている（表4A）<sup>7,10)</sup>。一般に，野犬を含めて犬の密度が高く，繁殖がコントロールされていない地域で，感染率が高くなる。

日本では，1971年に実験用ビーグル犬繁殖施設で初めて，集団感染が報告された<sup>11,12)</sup>。首都圏の某市動物愛護センターにおける我々の調査（2003～2006年）では2.5%<sup>13)</sup>，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，動物愛護相談センターに捕獲・収容される犬の大半が，かつてペットとして飼育されていた犬であり，すなわち，国内の2～5%程度のペット用犬が感染歴を持つと推定される。表4Bに示すように，近年，犬繁殖施設等における集団発生事例が報告されているが，その他にも繁

が最も一般的である（表3A）。流産時の汚物への直接接触，汚染エアロゾルの吸入によっても感染する。授乳や性交による人-人感染も報告されているがまれである<sup>1)</sup>。

*B. canis* 感染犬は，外見上顕著な症状を示さないことが多いが，菌は流産時の汚物・死流産子・膣分泌液・尿（特に雄）などへ排出され，人への感染源となる。直接接触により手指に付着した菌の粘膜を介した感染や，エアロゾルの吸入感染が主である（表3B）<sup>6,7)</sup>。

表4 犬ブルセラ症の発生状況

A) 世界での状況

米国	特に南部（抗体陽性率：8%）
中南米	メキシコ，ペルー（28%），アルゼンチン
ヨーロッパ	ドイツ，スペイン，イタリア，チェコ，ポーランド，ベルギー，フランス
アジア	日本（2～5%），韓国，中国，インド，フィリピン，台湾，トルコ
アフリカ	ナイジェリア

野良犬がいて，犬の生息密度が濃く，繁殖のコントロールがなされていない地域では，感染率高い。

B) 日本の状況

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

（近年の集団発生）

発生年	地区	飼育場・用途	感染犬	陽性犬の処置	感染者の届出
2003	静岡	繁殖施設	51 / 114	不明	なし
2005～2006	沖縄	繁殖施設（2か所）	16 / 83	安楽殺処分または投薬治療	なし
2006～2007	大阪	繁殖施設	139 / 263	安楽殺処分	なし
2008	愛知	ペットショップ・繁殖施設	15 / 37	安楽殺処分	飼育者2名
2008	東京・千葉	ドッグレンタル・ドッグカフェ等	18 / 59	去勢	なし

現在：一般の犬でほぼ2～5%程度の抗体保有率

表5 犬ブルセラ症の薬物治療

2剤併用が原則：テトラサイクリン系 + アミノグリコシド系 / リファンピシン

薬剤	用量 (mg/kg)	方法	間隔 (時間)	期間 (週間)
テトラサイクリン系				
ドキシサイクリン・ミノマイシン	25	経口投与	24	4
	12.5	経口投与	12	4
テトラサイクリン	30	経口投与	12	4
アミノグリコシド系				
ストレプトマイシン	20	筋肉注射・皮下投与	24	2 (1, 4 週目)
ゲンタマイシン	2.5	筋肉注射・皮下投与	12	2 (1, 4 週目)
	5	筋肉注射・皮下投与	24	2 (1, 4 週目)
その他				
リファンピシン	5	経口投与	24	4

殖施設や犬を扱っている施設等で流行していると推測されている<sup>6)</sup>。

## 2) 診断

*B. canis* 感染では、外見上これといった異常を示すことは少なく、成犬が死亡することもない。外見上健康な犬が流産をした場合や繁殖施設で流産が多発した場合は *B. canis* 感染が疑われるべきである<sup>7,10)</sup>。

流産胎子や流産時の汚物からは比較的容易に菌が分離されるが、感染動物の血液から菌を分離・培養するのは困難で、時間を要する。そのため、主に抗体検査が診断に用いられる<sup>6,7)</sup>。ブルセラ病診断用菌液 (*B. canis* 死菌液, 北里研究所生物製剤研究所) を抗原に用いた試験管内凝集反応 (TAT) が広く行われている<sup>6)</sup>。ただ、過度に溶血した血清では、疑陽性が出やすいことなどの欠点がある。採血時に溶血しないよう注意する必要がある。抗体検出法として、同じく *B. canis* の死菌体を抗原として用いた間接蛍光抗体法 (IFA) もあるが、こちらの方が、溶血の影響を受けにくい。我々は、犬の抗体検査は、マイクロプレート凝集反応 (MAT) で行っている<sup>13)</sup>。試験管凝集反応と原理は同じだが、96 穴マイクロプレートを用い、より簡便で検体や抗原も少量ですむ。TAT および IFA の結果との整合性が得られている。

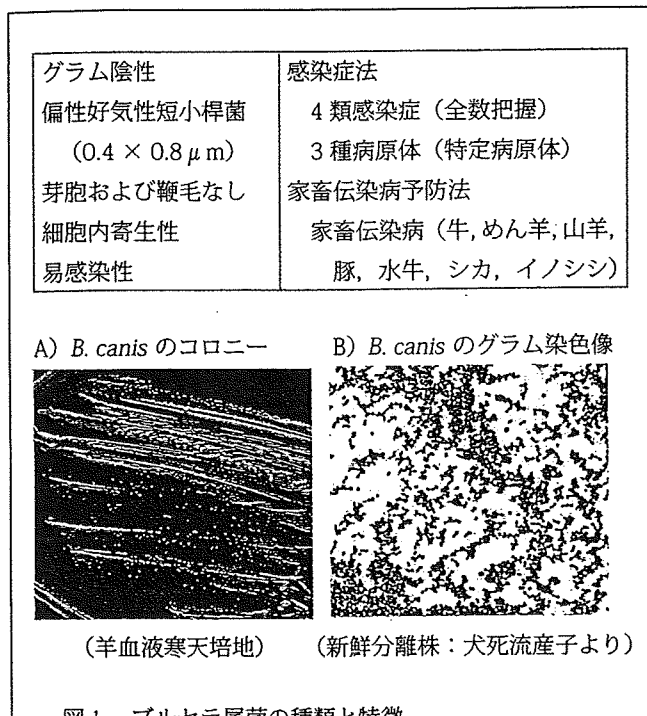
病原体の検出 (菌分離, 遺伝子検出) も可能だが、診断に用いるには注意が必要である。血液は最低 21 日間培養し、週に 2 回程度、分離培地で確認するが、時間がかかり、分離される確率も低い<sup>6,7)</sup>。PCR による血液中の特異的遺伝子検出も、培養と同様に十分な量の菌血症が起きている場合にのみ検出できる<sup>14)</sup>。すなわち、培養も遺伝子検出

も、陰性であっても感染していないことを保証できないため、一次スクリーニングに用いてはならない。あくまでも、感染流行している施設において抗体陰性犬の中に潜む感染犬 (潜伏期間中の犬) を早期にあぶり出す目的や、菌種の同定が目的で行われるべきである<sup>6)</sup>。

## 3) 治療・対応と予防

現在、100%効果のある治療法は確立していない<sup>7,10)</sup>。治療する場合は、抗菌薬が用いられるが、2剤併用、長期間投与が原則である (表5)<sup>7,10)</sup>。単剤投与や短期間の投与は、効果が得られない (治癒しない, 再発する) ことが多い。また、投薬治療は急性期 (感染初期) には効果も期待できるが、慢性化している場合には非常に困難である<sup>7,10)</sup>。去勢・不妊手術は治療効果を高めるとされる。

繁殖施設等で流産が多発した場合は、すべての犬の抗体検査を実施することになる。現在、ブルセラ症の犬への対処について法的根拠はない。治療、安楽殺処分が考えられるが、現状では犬の所有者が判断する。初回検査陽性の犬は、感染の拡大を防ぐために陰性犬から隔離する必要がある。仮に投薬治療をする場合、可能ならば去勢・不妊手術を行い、投薬終了後、2回目の抗体検査を行う。その後も、1年程度は経時的な抗体検査が必要である<sup>6,7,10)</sup>。陰性値が継続・維持されることにより、治癒を判断する。次に、初回検査陰性の犬は、その中に潜伏期の犬がいる可能性があるため、完全に犬同士を隔離し個別飼育する必要がある。抗体検査は初回検査から1か月後、さらに1か月、2か月の期間を空けて実施する。すべての検査で陰性ならば、非感染と判断される。途中で陽転した場合は、陽性犬として取り扱われる (図2)<sup>6,7,10)</sup>。



個人のペットについては、去勢・不妊手術や管理も比較的容易ではあるが、繁殖施設では、去勢・不妊手術の可否、治療・観察期間の経済的負担や管理（隔離・個別飼育等）など困難な点も多い。ゆえに、繁殖施設では、予防対策が最も重要である。新規に犬を導入する際には、潜伏期を避けるため、最低1か月の期間を空けて2回、抗体検査を行う必要がある（導入前検査）<sup>6, 7, 10)</sup>。また、犬の施設間でのやりとりは、お互いに清浄化が確認されている施設以外では、避ける必要がある。供給元を清浄化することにより、一般のペットの清浄化も可能になる。個人で飼育している犬の検査は、最低1か月の期間を空けて2回実施する。その間は、感染機会（感染犬との接触、交配）がないように管理する必要がある。

### おわりに

国内の家畜は清浄化しており、家畜から家畜ブルセラ菌に感染することはない。一方、*B. canis* は国内に定着しており、近年の犬の飼育形態（室内飼育、接触密度の濃さ）や飼育者の高齢化などを考えると、注意が必要であると思われる。人獣共通感染症予防の第1は感染源動物対策であり、*B. canis* 感染においては感染犬をなくすことである。そのためには、繁殖施設における清浄化と予防対策が必須

完全隔離（他の犬との接触が全くない）が保たれる場合のみ適用

隔離・個別飼育（厳守）			
1 か月間	1 か月間	2 か月間	
経過観察	経過観察	経過観察	経過観察
初回抗体検査 (1)	抗体検査 (2)	抗体検査 (3)	抗体検査 (4)

(陰性)

\* 抗体検査結果 (1) ~ (4) はすべて陰性であること  
\* 途中で陽性となったら、それ以降は陽性犬として対応  
\* 予防投薬を行ってもよい

図2 *B. canis* 感染流行施設における初回抗体検査が陰性犬に対する対処の1例

である。業者は検査と検疫、獣医師は衛生的な飼育の指導が重要である。

### 引用文献

- 1) WHO (2006) : Brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7. ([http://www.who.int/csr/resources/publications/deliberate/WHO\\_CDS\\_EPR\\_2006\\_7/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/deliberate/WHO_CDS_EPR_2006_7/en/)).
- 2) CDC (2008) : Brucellosis. (<http://emergency.cdc.gov/agent/brucellosis/>).
- 3) Pappas,G., Papadimitriou,P., & Akritidis,N. et al. (2006) : *Lancet Infect. Dis.* 6, 91-99.
- 4) Memish,Z.A. & Balkhy,H.H. (2004) : *J. Travel. Med.* 11, 49-55.
- 5) OIE (2004) : Multiannual animal disease status, Bovine brucellosis. Caprine and ovine brucellosis (excluding *B. ovis*). (<http://www.oie.int/hs2/report.asp?lang=en>).
- 6) 今岡浩一 (2009) : 日獣会誌 62, 5-12.
- 7) Greene,C.E. & Carmichael,L.E. (2006) : Canine brucellosis. *In Infectious diseases of the dog and cat*, 3rd ed. (Greene,C.E. ed.), 369-381, Elsevier Inc.
- 8) 西川治良兵衛 (1933) : 東京医事新誌 2843, 23-24.
- 9) 今岡浩一 (2008) : Info Vets 11 (8), 12-16.
- 10) Hollett,R.B. (2006) : *Theriogenology* 66, 575-587.
- 11) 山内忠平, 鈴木達雄, 野村達治ほか (1974) : 日獣会誌 36, 175-192.
- 12) 伊佐山康郎 (1994) : 獣畜新報 47, 97-101.
- 13) Kimura,M., Imaoka,K., Suzuki,M. et al. (2008) : *J. Vet. Med. Sci.* 70, 707-709.
- 14) Imaoka,K., Kimura,M., Suzuki,M. et al. (2007) : *Jpn. J. Inf. Dis.* 60, 137-139.

# 動物病院勤務者の人獣共通感染症にかかわる健康調査

内田幸憲\*<sup>1</sup> 鎌倉和政\*<sup>1</sup> 後藤郁夫\*<sup>1</sup> 杉本昌生\*<sup>1</sup> 山本和正\*<sup>1</sup>  
丸山総一\*<sup>2</sup> 福士秀人\*<sup>3</sup> 今岡浩一\*<sup>4</sup> 岸本壽男\*<sup>5</sup> 吉川泰弘\*<sup>6</sup>

## 要約

人とペット動物間の共通感染症の実態を明らかにするために、動物病院勤務者の健康調査を行った。北九州市、神戸市、埼玉県西支部の323名から協力が得られた。抗体陽性率は猫ひっかき病11.2%、トキソプラズマ症4.3%、オウム病4.0%、犬ブルセラ症1.2%、Q熱0.7%であり、65名(20.1%)の者が抗体陽性を示した。ペット飼育者、動物病院勤務者の健康管理およびペット取扱衛生管理は十分に行われるべきものと思われた。

## 研究目的

国内におけるペットブームは今も続いており、家庭におけるペット飼育率は40%といわれている。また、多くのペットは伴侶動物として人々の生活に深く関わっているが、人とペット動物間の感染症伝播の実態は明らかになっていない。この状況下で、ペット動物由来感染症に関してハイリスクグループと考えられる動物病院勤務者の健康調査を行った。

## 対象および方法

北九州市、神戸市、埼玉県西支部の獣医師会の了承のもと、健康調査に協力すると意思表示をした動物病院勤務者

を対象とした。この調査は東京大学農学部生命科学研究所倫理委員会の承認のもとに実施され、アンケート調査、血液抗体検査および結果統計処理が行われた。調査研究期間は平成18年1月から平成20年10月に及んだ。アンケートでは、年齢、性別、勤続年数、職種、動物との接触時間、取扱動物種、勤務者の衛生対策、感染経験の有無と対処方法、健康管理の有無、自宅でのペット飼育状況など11項目につき回答を求めた。抗体測定は8項目〔腎症候性出血熱(HFRS)、リンパ球性脈絡髄膜炎(LCM)、レプトスピラ症、猫ひっかき病、トキソプラズマ症、オウム病、犬ブルセラ症、Q熱)を型通りの検査法にて実施した。

## 結果

①調査協力者は323名、男性114名(平均年齢42.1歳±12.0歳)女性209名(平均年齢30.0歳±9.2歳)であった。②職種分類は、獣医師135名、獣医看護師151名、トリマー12名、事務14名、行政関係者7名であった。③調査協力者の79.8%は今回の調査時に自宅でペット飼育中であり、過去・現在ともに自宅でペット飼育の経験が無い者はわずか3.2%であった。④抗体測定の結果は表1に示す。HFRS、LCM、レプトスピラ症の抗体陽性者は皆無であった。地域別、男女別比較では抗体陽性率に差は見られなかった。いずれか一項目が陽性であった者は65名(20.1%)、複数項目が陽性であった者は4名(1.2%)であった。⑤勤続年数につき検討すると、男性獣医師で11年以上の勤務者では抗体陽性率は有意( $p = 0.028$ )に高率であった。⑥動物やケージ等を取り扱う時に、自分自身や動物を守るために実施している衛生処置としては、「手洗い」「爪切り」「使用器具の消毒」が主に実施されており(実施率96%、66%、74%)、帽子をかぶる3%、手袋の着用26%、マスク着用13%、専用履物の使用34%、作業着の着用48%、うがいの実施5%。シャワー浴は2%

\*<sup>1</sup> Yukinori UCHIDA, Kazumasa KAMAKURA, Ikuo GOTO, Masao SUGIMOTO & Kazumasa YAMAMOTO: 厚生労働省神戸検疫所(〒652-0866 神戸市兵庫区矢浜町1-1)

\*<sup>2</sup> Soichi MARUYAMA: 日本大学生物資源科学部(〒252-8510 藤沢市亀井野1866)

\*<sup>3</sup> Hideto FUKUSHI: 岐阜大学応用生物科学部(〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)

\*<sup>4</sup> Koichi IMAOKA: 国立感染症研究所獣医科学部(〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1)

\*<sup>5</sup> Hisao KISHIMOTO: 国立感染症研究所ウイルス第一部

\*<sup>6</sup> Yasuhiro YOSHIKAWA: 東京大学大学院農学生命科学研究科(〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1)

表1 抗体陽性率 (項目別・地域別)

	埼玉 (n=163)			神戸 (n=90)			北九州 (n=70)			総計 (n=323)	陽性率 (%)
	男性	女性	合計	男性	女性	合計	男性	女性	合計		
B. Henselae 抗体	6	10	16	4	8	12	1	7	8	36	11.15
Toxoplasma 抗体	8	0	8	1	1	2	0	4	4	14	4.33
オウム病	1	5	6	3	2	5	1	1	2	13	4.02
犬ブルセラ	0	1	1	1	1	2	0	1	1	4	1.24
Q熱*	0	0	0	1	0	1	1	0	1	2	0.66

\*Q熱のみ 19名 (神戸: 女性 6名, 北九州: 男性 2名, 女性 11名) のデータが欠損

いずれか 1つ以上の抗体が陽性: 65名 (20.12%), うち複数の抗体が陽性: 4名 (全体の 1.24%)

と低率であった。これら衛生処置の実施の有無と各種抗体価の陽性者との間には統計学的関連性は見いだせなかったが、「手袋の着用」「うがいの実施」「帽子着用」まで実施している動物病院勤務者の抗体陽性率は有意に低値であった。(p = 0.46) ⑦診療動物による咬傷、ノミ刺傷の体験者は獣医師で 126名 (93.3%), 獣医看護師 126名 (91.4%), トリマー 11名 (91.7%) とほとんどの勤務者が咬傷・刺傷の体験者であった。この体験時に病院を受診した者は、獣医師 27.7%, 獣医看護師 37.7%, トリマー 54.5% にとどまっていた。動物病院勤務者自身で自己診断治療を行ったことがある者は 72.4% に及んでいた。されど、動物咬傷経験と抗体陽性者との間には統計学的に有意な関連性はみられなかった。⑧自己の健康管理に関して、健康診断・人間ドッグの受診率は 31.0% にとどまっていた。

## 考 察

北九州市, 神戸市, 埼玉県西部の 3 地域において, 323 名の動物病院勤務者の健康調査が行えた。対象者数としてはやや少ないかもしれないが, 九州地区, 関西地区, 関東地区での地域性の偏りも含め検討できたかと思われる。地域差の確認ができたのは, 犬, 猫以外のエキゾチックアニマルがいずれの地域でも飼育されているが, 動物病院での診療比率は埼玉西部, 神戸市, 北九州市の順に有意に高いものであった。10 年前に吉川らの行ったエキゾチックアニマルの診療実態では, 都市部と地方とは差が見られないとの結果であったが, 現状では 3 地域での診療比率は埼玉西部で有意に高率で北九州市では低率であった。しかしながら, 診療対象動物としての地域差, 診療体制, 衛生処置, 動物咬傷・ノミ刺傷経験, 自己の健康管理, 動物との接触時間, 自宅でのペット飼育には 3 地域における地域差は見られず, おおむね同一条件下での健康状態の比較検討ができたものと思われる。

この状況下, 調査対象とした動物病院勤務者は患獣との接触リスクが高いグループと想定して血清抗体価陽性の有無との関連につき検討を行ったが, 対象とした動物病院勤務者は自宅でのペット飼育率が 79.8% 以上と高率であり, 動物病院での感染リスクばかりではないグループの健康調査になったかもしれない。このような人獣共通感染症のハイリスクグループにおける 8 項目に及ぶ血清抗体価測定をそれぞれの専門機関において行い, アンケートの回答とをあわせ統計学的解析を行った。その結果, 猫ひっかき病, トキソプラズマ症, オウム病, 犬ブルセラ症, Q熱の 5 項目で 65 名 (20.1%) がいずれかの項目で陽性であった。

この 15 年間, これらの項目の疾病に関する個別症例報告はあっても, 本報告のような疫学調査報告はなく, 今回の調査結果のような抗体陽性率の高さをどの様に評価するかは難しいものがある。しかしながら, 本研究における血清抗体価の測定は最も信頼できる研究機関での確実な検査法に基づいた結果であり, それぞれ個別の抗体陽性率は表 1 に示すように納得できる値である。このことを踏まえれば, 動物病院勤務者の抗体陽性率が 20% は納得できるもののように思われる。また, 抗体陽性率の地域差に有意差はみられず, 国内全域において同様な傾向がみられるものと推測される。今後の疫学調査, 健康管理の対策検討の参考に活用されることを願いたい。

さらに, 動物病院勤務年数が長くなるほど抗体陽性率が高くなる傾向があり, 特に勤続 11 年以上の男性獣医師の抗体陽性率は有意に高率であったこと, そして動物病院勤務者の多くが動物咬傷等の体験を持つにもかかわらず, 自己診断・自己治療で事を済ませていることは由々しきことと思われる。状況を踏まえ, 医療機関での診療が望まれるが, 抗体検査はじめ, 正確な検査法がルーチン検査として確立されることが望まれる。

2006 年, 我が国ではようやく輸入ペット動物の届出制

度が確立され、野生ペット動物の輸入には大きく制約がかけられたとはいえ、「人と動物の共通感染症」は決して減少せず、むしろ、これからの地球上での新たな発生が危惧されている。動物病院勤務者においても、自宅でのペット飼育者においても、衛生管理や動物との接し方に十分な注意を払うことは重要なことである。人もペット動物もともに健康でいられてこそ、意義のある生活が保たれるものと思われる。



謝 辞 この度の動物病院勤務者の健康調査において、気持ちよくご協力いただいた北九州市獣医師会、神戸市獣医師会、埼玉県獣医師会西支部の皆様にご心から感謝いたします。

本研究は厚生労働科学研究「動物由来感染症のコントロール法の確立に関する研究」（班長：吉川康弘東大教授）の平成 18, 19, 20 年度の研究費補助金により行われた。

## 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、野兎病、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, 獣医看護士等)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査の実施により, 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) パストツレラ症

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	○	○	○	○
	カブ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) カブ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ブノサイトファーガ属菌による感染症である。カブ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・同定の時間を待ってくれず, 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	304	165	469
陽性	8 (2.6%)	4 (2.4%)	12 (2.5%)
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) <i>Pasteurella multocida</i>			
	検体数	陽性数	陽性率(%)
犬	325	87	27
猫	115	105	91
B) <i>Capnocytophaga</i> 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
	59	飼い猫	搔傷	敗血症・嘔吐	死亡
2008	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両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 —愛玩動物由来感染症の予防のために—. 厚生労働省健康局, 2006 (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/02.html#2>)

## Original Article

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

Yukiji Seto<sup>1,2</sup>, Takako Komiyama<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 corynephage 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 corynephage 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 corynephage 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 corynephage 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 *Bst*II and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with *Sfi*I. 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'Etoile, 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-rD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-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 Asevers 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 (*pld*Fw [5'-AACATCTCTCCGTGAAAAT-3'; position, -157 to -137 base] and *pld*Rv [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 *tox*Fw (5'-CCATGTAACCAATCTATCAA-3'; position, -179 to -159 base) and *tox*Rv (5'-GTGCGCCCGGAGGGA-3'; position, 1,720 to 1,735 base) based on our sequence data, *pld*Fw and *pld*Rv, and CU-Rfw (5'-CGCGGATCCGCGTACTCTCCGGGGCA-3'; position, 833 to 851 base on DLT) and *att*BRv (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, partitis	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 *pldFw* and *pldRv* primers, and strain ATCC<sup>®</sup>51799 with *attBFw* (5'-GCGCC CGTAGCTCAACGGATAGAGCA-3') and *attBRv* 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	99.70		<i>99.10</i>	<i>100.0</i>	<i>95.00</i>
0510	98.57	98.51		<i>99.10</i>	<i>94.82</i>
A6361	100.0	99.70	98.57		<i>95.00</i>
DT	95.18	95.24	95.18	95.18	

<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*51799	0102	O-9	lion	0510	0607	ATCC739
ATCC*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\*51799, AB304281; 0102, AB304282; O-9, AB304283; lion, AB304284; 0510, AB304285; 0607, AB304286.

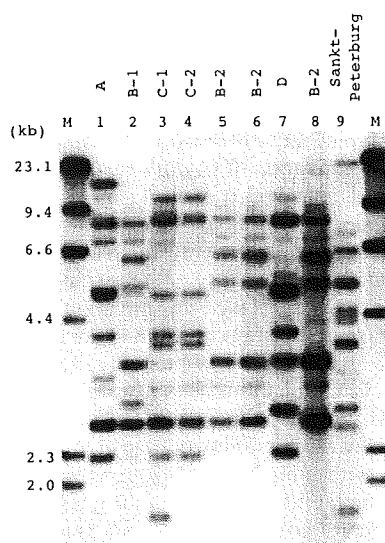


Fig. 1. *BsrEII* rRNA gene profiles of isolates and ATCC strains. M, molecular size standard (sizes are indicated on the left); lane 1, ATCC\*51799; lane 2, 0102; lane 3, Ran; lane 4, O-9; lane 5, lion; lane 6, 0509; lane 7, 0510; lane 8, 0607; lane 9, *C. diphtheriae* ATCC 700971.

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\*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-

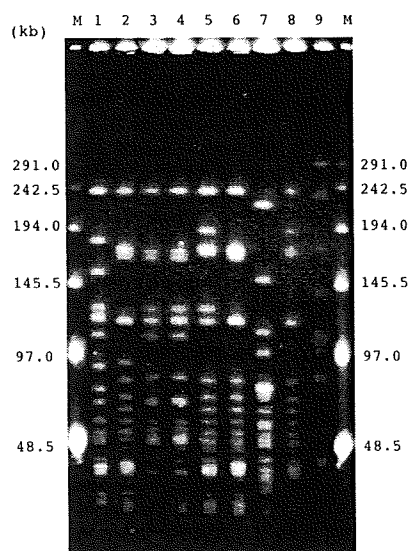


Fig. 2. *SfiI* PFGE profiles of *C. ulcerans* isolates from Japan and ATCC strains. M, lambda concatemer as a size standard (sizes are indicated on the left); lane 1, ATCC\*51799; lane 2, 0102; lane 3, Ran; lane 4, O-9; lane 5, lion; lane 6, 0509; lane 7, 0510; lane 8, 0607; lane 9, *C. diphtheriae*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

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\*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\*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. *Bam*HI-digested DNA was used because the *tox* genes did not contain any *Bam*HI 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 coryneophage. The regions of strains 0102 and O-9 were identical to those of strains 0509

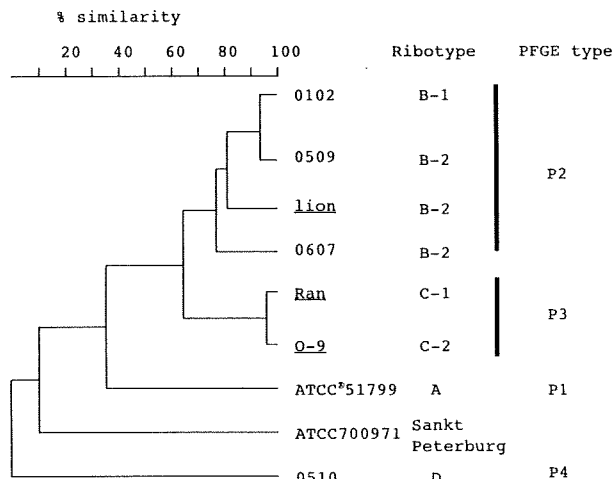


Fig. 3. Dendrogram showing the genetic relationships of *C. ulcerans* isolates in Japan. The isolates obtained from animals are underlined.

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 coryneophage 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

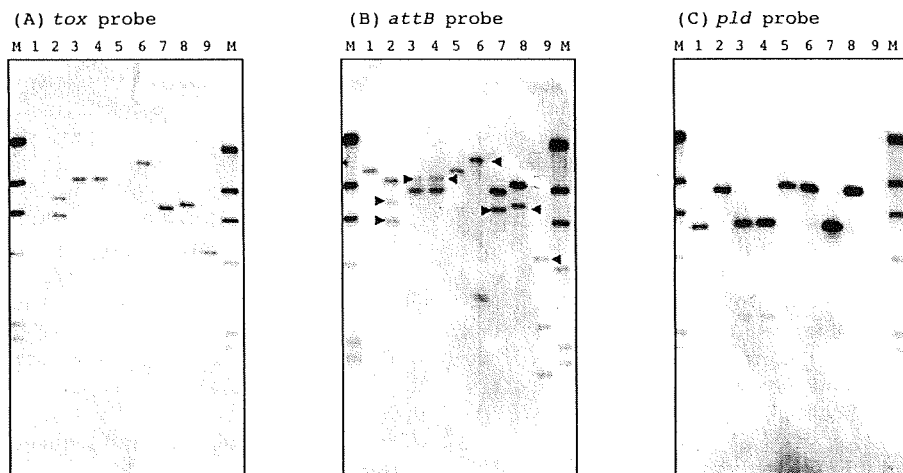


Fig. 4. Southern blot analysis of *C. ulcerans* and *C. diphtheriae* genomic DNA with DIG-labeled (A) *tox*, (B) *attB* site, and (C) *pld* specific probes. M, DIG-labeled molecular standard marker; lane 1, ATCC<sup>®</sup>51799; lane 2, 0102; lane 3, Ran; lane 4, O-9; lane 5, lion; lane 6, 0509; lane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

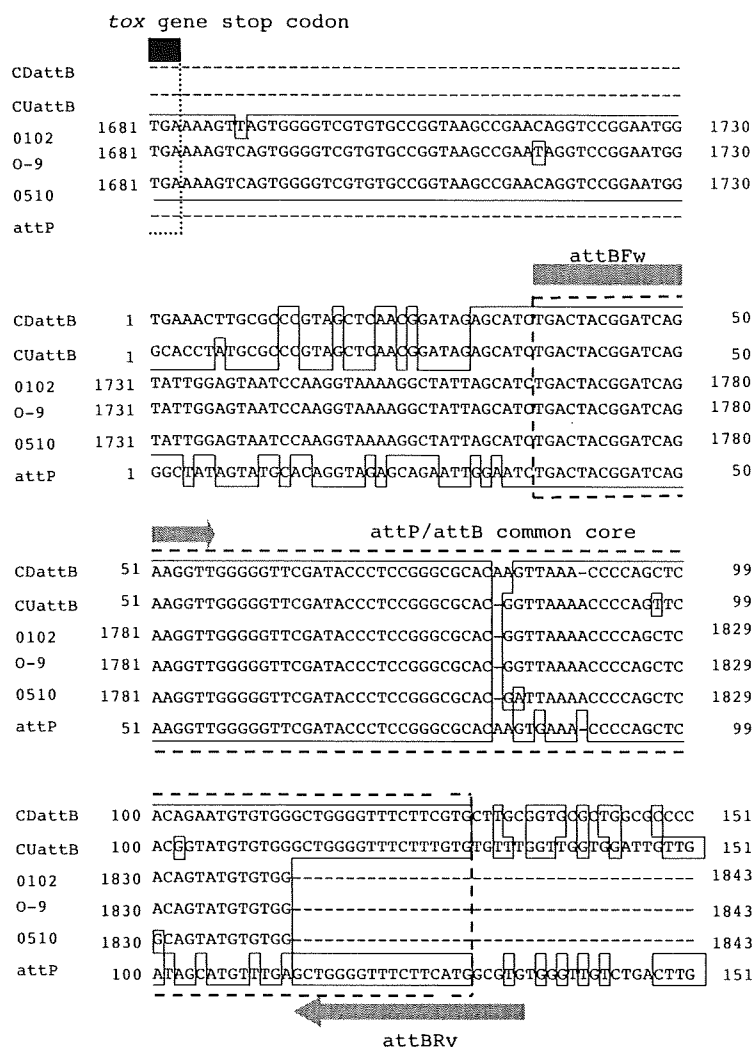


Fig. 5. Alignment of the deduced nucleotide sequences of attachment site homologous genes from *C. ulcerans* strains 0102, O-9, 0510, *C. ulcerans* attB-related site, *C. diphtheriae* attB-related site, and corynephage-gamma DNA for the attP site.

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

1. Gulbert, R. and Stewart, F.C. (1926): *Corynebacterium ulcerans*: a pathogenic microorganism resembling *C. diphtheriae*. J. Lab. Clin. Med., 12, 756-761.
2. 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.
3. 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. Wellinghausen, 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 Rcilly, 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., Bierschen, 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 coryneophage gamma c and its relationship to the toxigenic coryneophage 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 coryneophage 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-coryneophage. *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 Gianini, G. (1983): The complete nucleotide sequence of the gene coding for diphtheria toxin in the coryneophage omega (tox+) genome. *Nucleic Acids Res.*, 11, 6589-6595.
  37. Sing, A., Hogardt, M., Bierschen, 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., Gomclauri, 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)3)</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>4)</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>,