

動物由来感染症の対応に関する研究

分担研究課題：コリネバクテリウムに関する研究

研究分担者：山本明彦（国立感染症研究所・細菌第二部主任研究官）

研究要旨：ジフテリア様の症状を示すジフテリア毒素産生性の *Corynebacterium ulcerans* (*C. ulcerans*) による感染症について、呼吸器症状を示す新規 2 症例が報告され、同感染症の感染状況によっては、ジフテリア毒素に対する免疫が成立しないことが示唆された。また、キャリアーとなる動物の 9 地域の検索でイヌからは検出されず、ネコの 4.5% から *C. ulcerans* が分離されることから、地域を問わずネコは *C. ulcerans* のキャリアーの一つになっていることが示唆された。感染症法の位置づけが異なる *C. ulcerans*、*Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) および *C. pseudotuberculosis* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から迅速簡易に鑑別診断できる方法として、マルチプレックス PCR 法を開発した。さらに、マウスを用いた *C. ulcerans* 感染モデルを作成した。本実験系によりマウスが *C. ulcerans* の宿主となりうることが示され、菌株間での感染力の相違も本実験系により検出できる可能性が示された。

研究協力者：岡本その子、内藤秀樹、船渡川圭次、佐伯貴之、矢部真人（栃木県保健環境センター）、畠山薫、久保田寛顕、奥野ルミ、貞升健志、井出 治、加藤敦子（東京都健康安全研究センター）、小嶋由香（川崎市健康安全研究所）、古川一郎、石岡慎也、岡本浩介、水谷達二（神奈川県衛生研究所）、瀬戸順次、安孫子千恵子（山形県衛生研究所）、勝川千尋（大阪府立公衆衛生研究所）、梅田薫、阿部拓人、畠山理沙、木村吉秀（大阪市立環境科学研究所）、中嶋洋、狩屋英明、岸本壽男、橋本英典、近

藤真、東正秋、藤原慎一（岡山県環境保健センター）、河野智美、梅原成子、佐野哲也（滋賀県衛生科学センター）、内田順子、有塚真弓、池本龍一、蔦田博也（香川県環境保健センター）、畠山敬、後藤郁男、山口友美（宮城県環境衛生センター）、青木敦子、嶋田直美（埼玉県衛生研究所）、柳井徳磨（岐阜大学）、秋定健、兵行儀、與田茂利、黒川幸徳、山根一和（川崎医科大学）、本間康夫（信楽園病院）、天尾弘実、藤平篤志、望月優（日本獣医生命科学大学）、小宮貴子、岩城正昭、平井明日香、網康至、

須崎百合子、高橋元秀、今岡浩一（国立感染症研究所）

A. 研究目的：

ジフテリアは、ジフテリア毒素を有する *C. diphtheriae* による細菌感染症である。高い死亡率と飛沫感染で広範囲に伝染することから、感染症法の 2 類感染症に分類されている。日本ではこの 10 年間患者の発生はない。この感染症は古くから知られる疾患で、ジフテリア毒素を不活化して作成したワクチン接種による防疫が全世界的に実施されている。2001 年よりジフテリア様の症状を示すジフテリア毒素産生性の *C. ulcerans* による感染症が、本邦でも報告されるようになった（表 1）。ジフテリア毒素を主要な病原因子とする *C. ulcerans* 感染症はヒトを含む哺乳動物が広く罹患する。ECDC の定義では、ヒトに特異的な *C. diphtheriae* 感染症とあわせ「ジフテリア」とされるが、本邦では *C. ulcerans* 感染症は感染症法の対象疾患ではない。患者発生時の迅速な対応が要求される 2 類感染症と分類される *C. diphtheriae* 感染症（ジフテリア）との鑑別診断が公衆衛生上の課題である。そこで、*C. ulcerans*、*C. diphtheriae* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から迅速かつ簡易に鑑別する実験室診断法を開発することにより、行政対応の異なる 2 類感染症のジフテリアとウルセランス感染症との問題の解決を図ることを目指した。

同感染症は、これまでの症例報告から動物

由来感染症であるが、その実態が不明な点がある。そこで、国内の発生患者の症状や患者周辺の動物についての疫学調査を実施した。また、どの動物がその感染源となるのかについて協力研究者を中心に調査を実施した。さらに、実験動物を用いた感染モデルの作成を行ない、*C. ulcerans* 感染の実態解明と、感染源としての動物のリスク評価に役立てることを目的とした。

B. 研究方法：

1) 新規発生患者周辺調査：

今年度ジフテリア様症状を呈した 2 名の患者が医療機関で確認された。医師と患者の同意を得たのち、患者からの病原体確認および患者の環境調査を行なった。さらに、患者および病院を所轄する自治体の衛生研究所との共同調査を実施した。

2) 各地の動物からの菌分離、抗体調査：

1. *C. ulcerans* の菌分離法：

被検体となる動物の口腔、鼻、背、耳、尾、腹部、尻、血液等のスワブを採取し、培養は検体をヒツジ血液寒天培地および亜テルル酸カリウム添加活性炭未加ヒツジ血液寒天培地（以下、荒川変法血液寒天培地）に塗抹、血液寒天培地は 18～24 時間後、荒川変法血液寒天培地は 24 または 48 時間後に疑われる集落について性状を検査した。同定は DSS 培地による糖分解性状のスクリーニング、カタラーゼ試験、ウレアーゼ試験を実施した後、Api coryne(bioMérieux)を

用いて確定した。なお、各衛研の研究協力者の経験的技術と知識の違いにより、出現したコロニーをエーゼで掻き取り（Sweep法）、DNAを抽出しPCRを実施するか、または疑われる黒色コロニーをグループ毎（Mix法）にリアルタイムPCRで毒素遺伝子を検出する方法を組み合わせる場合もあった。菌の毒素原性はジフテリア毒素遺伝子のAサブユニット相当部分の一部を特異的に増幅するプライマーを用いたPCR、寒天内沈降反応のElek法および培養細胞法で確認した。

2. ジフテリア抗毒素価の測定：

各種動物より採取した血液より血清を分離し、一定量のジフテリア試験毒素と2倍段階希釈した血清を等量Vero細胞の培養液に加えて4日間培養し、Vero細胞へのジフテリア毒素の細胞障害性の抑制を観察することで血清中のジフテリア抗毒素価を算出した。既知の標準抗毒素とジフテリア試験毒素との毒素活性中和能と比較して抗毒素価を算出する。毎回の測定時に、ジフテリア試験毒素の細胞障害性と検体となる血清中の細胞障害活性も確認した。

3. 簡易迅速鑑別診断法の開発：

C. ulcerans、*C. diphtheriae*を類縁の*Corynebacterium*属菌から迅速かつ簡易に鑑別する実験室診断法の候補として、*Corynebacterium*属菌の遺伝子診断に用いられているrpoB遺伝子の遺伝子配列から

それぞれ候補配列を選択してprimerを設計し、それを組み合わせることでMultiplex PCR法を作成した。作成したMultiplex PCR法について、その特異性を*C. ulcerans*17株、*C. diphtheriae*10株、*C. pseudotuberculosis*1株について確認し、さらに、*Corynebacterium*属菌16種、*Corynebacterium*属菌以外の39種についても試験した。

4. 感染実験動物モデルの開発：

*C. ulcerans*感染モデルの作成のため、汎用実験動物であるマウスを用いた。供試菌株はジフテリア毒素陰性の*C. ulcerans* ATCC51799株と、またジフテリア毒素陽性の臨床分離0102株、*C. diphtheriae*および*C. glutamicum*を用いた。菌液は 10^6 、 10^7 、 10^8 CFU/50 μ lの濃度に調製し、それぞれ経鼻投与にて接種した。接種後、感染マウスの病態の観察、体重の測定、及び接種後一定期間で採材し、死亡個体については、病理学的検索を行った。肺、肝臓、腎臓、脾臓、血液、盲腸内容物、直腸内容物は、定量的に生菌数を測定した。鼻腔スワブ、口腔スワブ、気管スワブ、眼脂スワブについては、定性的な測定を行った。

（倫理面への配慮）

人を対象とする調査に関しては、国立感染症研究所医学研究倫理委員会へ「*C. ulcerans*によるジフテリア症の血清疫学と菌分離調査」として審査申請を行い、承認を得た（承認期間～H28年3月31日）。また、感染実

験動物モデルの作成には、国立感染症研究所・動物実験委員会に計画書を提出しその承認（承認番号 113002）を得て実験を行った。

C. 研究成果：

1. 新規発生患者周辺調査：

1) 国内 12 章例目の患者調査：

患者は埼玉県在住で 71 歳の女性、夫と 2 人家族であった。2012（平成 24）年 11 月 12 日より鼻閉、咽頭痛、後鼻漏出現し 11 月 16 日近医受診し、急性副鼻腔炎や急性咽喉頭炎を疑われ朝霞中央病院へ紹介受診した。初診時、多量の水様から膿性鼻汁と後鼻漏があり、鼻咽頭を充満する非常に厚く強固に付着する偽膜形成を認めた。この偽膜の培養から *C.ulcerans* 検出。鼻閉など症状が強く同日に入院となった。抗生物質感受性試験の結果からセフトリアキソン点滴施行し鼻閉も軽快し、同月 19 日退院となった。退院後はレボフロキサシン内服を 11 月 31 日まで行い、自覚症状、局所所見の改善を認め終診となった。

患者宅は埼玉県朝霞市で寺の境内にある。付近に生息する野良猫に餌をやり、自宅でも猫を 4 匹（うち 1 匹に鼻汁など感冒様症状有り）が飼育していた。これら 4 匹のネコより、口腔、目、鼻および耳からスワブを採取し *C.ulcerans* 培養を試みた。その結果 1 匹のネコの口腔と鼻スワブよりジフテリア毒素産生性の *C.ulcerans* が分離された。一方、患者血清のジフテリア抗毒素

価は 8.16IU/mL を示した。

2) 国内 13 章例目の患者調査：

患者は埼玉県在住の 20 歳の女性で、父と母の 3 人家族であった。2013 年 4 月 7 日よりのどの痛み、4 月 9 日嚥下痛と発熱のため診療所を受診した。その際、扁桃から咽頭にかけて広範囲に分厚い偽膜が覆っていた。この偽膜を細菌検査し *C.ulcerans* を分離した。同時に実施した抗生物質感受性試験からエリスロマイシン感受性を確認した。エリスロマイシン投与開始、著効で症状が改善された。この患者は DPT 免疫を行っておらず、来院時及び治療による症状軽快後に採決を実施しジフテリア抗毒素価を測定したが *C.ulcerans* 感染後もジフテリア抗毒素価上昇しなかった。ほぼ 1 年前にも同様の症状を発症して、同じ主治医のところを受信したが、その折は、原因菌検査の前に抗生物質による治療を始めたために原因菌を特定できなかった。

患者宅は埼玉県北本市である。周辺は近郊酪農地帯で家には室内外にネコ 18 匹が飼育されていた。18 匹のネコより、口腔、目、鼻および耳からスワブを採取し *C.ulcerans* 培養を試みた。その結果、*Corynebacterium* 属菌は検出されたが、*C.ulcerans* は分離できなかった。初診時及び治療による症状軽快後の血清について、ジフテリア抗毒素価を測定したところ、いずれも検出レベル以下であった。

2. 各地の動物調査結果

8 都道府県 9 地域について、動物からの菌分離及び血清ジフテリア抗毒素価の調査を行った。

1) K 県：

K 県内 5 動物病院について、患畜所有者に調査協力の説明後血清採取をお願いし、ジフテリア抗毒素価の測定を行った。犬の調査総数 109 頭中、1 頭より 0.0407IU/mL の抗体価の検出がみられた。該当犬より *C.ulcerans* 培養を試みるため、主治医および、飼い主に依頼し、スワブ検体の採取を行った。採取部位は、口腔、鼻、背、耳、尾、腹部、尻、血液等 11 検体であった。結果はすべてウルセランス培養陰性であった。

また、同居のイヌに皮膚病巣があったため、その部位を含め、スワブ 11 検体、および血液、便を採取し培養を試みたが、いずれも *C.ulcerans* は陰性であった。このイヌの血清を再度、抗毒素価を測定したところ、前回同様 0.0407IU/mL であった。なお、同居のイヌは検出レベル以下であった。

2) K 市：

市内の動物愛護センターの協力を得て、搬入されるネコより咽頭、口腔、鼻腔、肛門、眼漏、皮膚潰瘍部よりふき取りを行って、*C.ulcerans* 培養を試みた。さらにジフテリア毒素遺伝子を PCR 法にて検出した。その結果、57 頭のネコから、菌分離はできなかったが、ジフテリア毒素遺伝子陽性が 3 検体検出された。

3) S 県：

動物保護管理センターおよび県内の動物病院に検体の採材を依頼して調査を実施した。動物保護管理センターに収容されたイヌおよびネコ合計 75 検体を検査した結果、ジフテリア毒素遺伝子は検出されず菌も分離されなかった。また、動物病院を受診したイヌおよびネコ合計 22 検体を検査した結果、1 検体からジフテリア毒素遺伝子が検出され、*C. ulcerans* が分離された。菌が分離された猫と同居するネコ 6 検体と飼い主 1 検体について検査したところ、ネコ 2 頭からジフテリア毒素遺伝子が検出された。これら 2 検体について、現在菌を分離中である。

4) M 県：

M 県では、愛護センターの協力を得てイヌ、ネコの咽頭スワブより *C. ulcerans* の分離を目指した。イヌ 55 検体、ネコ 48 検体について調査したところ、ネコ 4 検体より *C. ulcerans* が分離された。

5) O 市：

O 市内の動物管理センターの協力を得てイヌ 14 検体とネコ 25 検体の咽頭スワブより、*C.ulcerans* 培養を試みたが、イヌ、ネコどちらの検体からも菌分離はできなかった。同市内で、硬膜下血腫のため寝たきりとなり、胃ろうにて栄養摂取していた 55 歳女性が発熱、痰が認められたために喀痰の菌培養を行ったところ、ジフテリア毒素陰性の *C. diphtheriae* が分離された。

6) O 府：

O 府内では、主に都市近郊に生息する肉

食鳥類とその捕食動物からの *C. ulcerans* の分離を目的として調査を行った。肉食鳥類としてはフクロウ、コゲラ、ヒヨドリを 20 羽、その捕食動物としてアカネズミ、コウベモグラ、アズマモグラを 8 検体より *C. ulcerans* の分離を目指したがいずれも陰性であった。

7) T 都 :

T 都内の動物病院の患畜所有者に調査協力の説明後鼻汁採取をお願いした。採取した鼻汁 22 検体のうち 1 検体より *C. ulcerans* が分離された。

8) H 地方 :

H 地方について、岐阜大学柳井教授と猟友会の協力を得て、クマ、シカ、鳥などを狩猟対象とする猟犬で年齢が 1 歳から 15 歳までに範囲の 36 頭より採血し、そのジフテリア抗毒素価を測定した。採取血液量が少ないために測定できなかった 3 頭分除く 33 頭の血清を測定したが、測定結果はすべて検出レベル以下であった。

9) O 県 :

O 県内では、と畜場の協力を得て牛の血清ジフテリア抗毒素価の調査を実施した。

112 検体より採血し、そのジフテリア抗毒素価を測定した。112 頭の血清を測定したが、測定結果は 1 検体で 0.0576IU/mL を示す陽性であった。

また、O 県の川崎医科大学秋定教授、山根准教授との協力で川崎医科大学附属病院及び川崎病院の来院する患者より分離された菌株及び咽頭スワブからの菌分離を行

ったところ、分離菌では 50 株中 41 株が *Corynebacterium* 属菌であったが、*C. ulcerans* 菌は分離されなかった。呼吸器症状を示す来院患者 2 名の咽頭スワブのうち 1 検体からは、*Corynebacterium* 属菌であったが、*C. ulcerans* 菌は分離されなかった。

3. 簡易迅速鑑別診断法の開発 :

C. diphtheriae, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* および、DT (DLT) 遺伝子を同時に検出する Multiplex PCR 法を構築した。特異性の試験結果として表 2 に示し、その検出感度は表 3 に示した。*C. ulcerans* 17 株、*C. diphtheriae* 10 株、*C. pseudotuberculosis* 1 株について 100% の一致を確認した。さらに、*Corynebacterium* 属菌 16 種では 2 種で標的遺伝子異なるサイズの弱い増幅が見られた。また、*Corynebacterium* 属菌以外の 39 種では、1 種で標的遺伝子異なるサイズの弱い増幅が見られた。この研究成果は主に O 市の梅田先生中心に進められた。

4. 感染実験動物モデルの開発 :

C. diphtheriae および *C. glutamicum* 接種マウスは全く症状を示さないが、*C. ulcerans* 接種マウスは、立毛、削瘦、連続的な体重減少を呈し、多くの臓器に接種菌が分布して全身感染を確認した。また、投与菌数に依存して死亡した。*C. ulcerans* 接種マウスでは、ジフテリア毒素産生性の臨床分離株が 10^6 CFU 投与で半数致死量であり、非産生株に比べて約 2 倍高い死亡率であった。経鼻

接種した個体よりの採材では、肺、腎、脾臓などから菌が分離され、その分時期は、肺から脾臓、腎臓経日的な移行が観察された。ところが、盲腸内容物、直腸内容物では、まったく接種菌が回収されなかった。死亡個体の肺から脾臓、腎臓の各臓器には壊死性結節性病変が認められ、病変部の中心に接種菌の存在が確認された。スワブ採取による定性的な測定結果から、上気道から生菌が持続的に分離された。

D. 考察：

2例の新規 *C. ulcerans* 感染症罹患者の調査で、12例目の患者は呼吸器症状を示す今までの *C. ulcerans* 感染症の典型的な症状を示した(表1)。さらに、患者の飼育するネコから同菌が分離されたことは、この飼い猫も家の内外を自由に出入りすることで、野良猫との接触の機会もありキャリアーとして働いた可能性が示唆された。この点は、これまでに報告された症例 6,7,8 と同様の結果であった。これまでに報告された11症例の内、5症例までは *C. ulcerans* 感染症の医療関係者における認知度が低く、患者発生の第一報が大変遅れていた。6症例目から実質的な患者周辺調査が実施されるようになった。すなわち、患者が飼育する動物、患者の周辺にいて接触のあった動物を特定して調査が可能となった。これで、患者の周辺にいる動物のうち、ネコが50%の割合で *C. ulcerans* を保菌していたことになる。一方、13例目の患者は同じく呼吸器症状を

示したが、1年前にも同様の症状を示したことから、主治医が疑問を持ち *C. ulcerans* 感染症を疑ったために同菌の分離まで至った。患者調査でDPT免疫を行っていないことが判明し、*C. ulcerans* 感染の前後でジフテリア抗毒素価が全く検出されなかったことはこのことを裏付けた。さらに、同感染症の感染状況によっては、ジフテリア毒素に対する免疫が成立しないことが示唆された。これは、今までの症例では見られなかった事実であるので、さらに今後も調査に際し注意すべき点である。また、本邦ではDPTワクチンは高い接種率を有するが、本症例のようにワクチン未接種者にとっては、*C. ulcerans* 感染の再感染が起きることが証明されたことで、罹患患者についても今後の監視をする必要性が示唆された。

9 地域の動物の保菌状況を調査した結果、イヌからは検出されず、ネコの4.5%から *C. ulcerans* が分離されることから、地域を問わずネコは *C. ulcerans* のキャリアーの一つになっていることが示唆された。この点は、前段の新規患者の周辺調査結果とよく符合する。また、ウシも頻度は低いが同菌の汚染が存在し環境中の暴露を受けていることが示唆された。肉食鳥類やその糞菌動物の調査は、検体数が十分とは言えずキャリアーとしての可能性を言及すべき状況ではないので、今後対象動物数を増やして検索を行う必要がある。また、本年度の調査では、イヌから本菌が分離されない結果となったが、動物愛護センターのイヌから

5～10%の割合で *C. ulcerans* が検出されたという勝川氏の報告もあることから、イヌがキャリアーの候補から外れると結論付けることはできない。また、O 県で行われている来院患者の調査で、多くの *Corynebacterium* 属菌が分離される事実は、同種菌が環境中と人との間を行き来する可能性を示した。今後 *C. ulcerans* 菌感染との関連性をさらに追求してゆく必要性が示唆された。

C. ulcerans、*C. diphtheriae* および *C. pseudotuberculosis* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から迅速簡易に鑑別診断できる方法として開発した Multiplex PCR 法は特異性、検出感度ともに高かった（表 2、3）。今のところ、この方法を用いることで、ジフテリアのような 2 類感染症と他の 2 菌の感染症のように感染症法の規定のないものと、地方自治体がコリネバクテリウムによる感染症への対応で大きく位置づけが異なる感染症に対して混乱を起こすことなく行政検査・臨床検査に応用できる可能性がある。そのためには、今後、臨床検体検査、動物検体検査、菌株同定（型別）検査等に使用し、従来法の結果との比較、使用における問題点について、複数の試験者、複数の実験室にて、同様の成績が出るようにするための条件を検討する必要があるが、現状では未知数である。来年度よりこの点を実施してゆく予定である。

マウスを用いた *C. ulcerans* 感染モデルを作成した。本実験系によりマウスが *C.*

ulcerans の宿主となりうることが示され、また *C. ulcerans* 菌株間での感染力の相違を本実験系により検出できる可能性が示された。*C. ulcerans* はマウスに対して病原性を持ち、一定以上の濃度の経鼻腔投与により宿主に対して致死的な病原性があることが明らかになった。また、菌株によってマウスに対する病原性が異なり、*C. ulcerans* はネズミコリネ菌 (*C. kutscheri*) のようには腸内に分布しないことが判明した。この世にして、マウスを用いて人と類似の増殖部位を持つ上気道感染モデルが完成した。この感染モデルを用いて、今後 *C. ulcerans* 感染症について、より詳細な解析を行ってゆく予定である。

E. 結論

1. ヒトからジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* 感染による呼吸器症状を示した 12、13 例目の症例が埼玉県で報告され、同感染症の感染状況によっては、ジフテリア毒素に対する免疫が成立しないことが示唆された。
2. 9 地域の動物の保菌状況を調査した結果、イヌからは検出されず、ネコの 4.5% から *C. ulcerans* が分離されることから、地域を問わずネコは *C. ulcerans* のキャリアーの一つになっていることが示唆された。
3. *C. ulcerans*、*C. diphtheriae* および *C. pseudotuberculosis* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から迅速簡易に鑑別診断できる方法として、マルチプレックス PCR 法を開発した。

4. マウスを用いた *C. ulcerans* 感染モデルを作成した。本実験系によりマウスが *C. ulcerans* の宿主となりうることが示され、また *C. ulcerans* 菌株間での感染力の相違を本実験系により検出できる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

1) Y. Yoshimura, N. Tachikawa, T. Komiya, A. Yamamoto : A case report and epidemiological investigation of axillary lymph node abscess caused by *Corynebacterium ulcerans* in an HIV-1-positive patient. *Epidemiology and Infection*, 2013, 20 September p1-4.

2) A. Hirai-Yuki, T. Komiya, Y. Suzaki, Y. Ami, C. Katsukawa, M. Takahashi, A. Yamamoto and Y. K. Yamada: Isolation and characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* from two closed colonies of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) in Japan. *Comparative medicine* June 2013, Vol 63, p1-7.

2 和文発表

1) 廣瀬知子、寺田裕美、河野智美、石川和彦、山本明彦、小宮貴子：滋賀県で初めて確認されたジフテリア症状が認

められたジフテリア毒素産生

Corynebacterium ulcerans 感染症例、IASR Vol. 34 p. 143、2013.

2) 堀 志郎、有塚真弓、池本龍一、山本明彦、小宮貴子：香川県で初めて確認されたコリネバクテリウム・ウルセランス感染による腋下膿瘍の1症例、IASR Vol. 34 p. 71-72: 2013。

3) 仲田拓人、嶋田直美、青木敦子、山本明彦、小宮貴子：本邦12例目となる *C. ulcerans* ヒト感染症例、IASR Vol. 34 p. 381-382: 2013。

3 著書

1) 山本明彦：感染症症候群(第2版)上 病原体別感染症編 II 細菌感染症 グラム陽性桿菌感染症 ジフテリア菌感染症(ジフテリア)、日本臨床 p.75-79、2013.

4 学会発表

1) T. Sekizuka, A. Yamamoto, T. Komiya, T. Kenri, F. Takeuchi, K. Shibayama, M. Takahashi, M. Kuroda and M. Iwaki : *Corynebacterium ulcerans* 0102 carries the gene encoding diphtheria toxin on a prophage different from the *C. diphtheriae* NCTC 13129 prophage. *European. Workshop on Bacterial Protein Toxins. (ETOX16)*, Freiburg im Breisgau, Germany, 2013.

2) 河野智美、佐野哲也、須藤正之、山本明彦、小宮貴子、梅原成子、青木佳代、

石川和彦、林賢一： 滋賀県内のイヌ・ネコにおけるジフテリア毒素産生性コリネバクテリウム・ウルセランスの保菌状況、獣医学術近畿地区学会、2013年10月、泉佐野市。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

番号	発生年	患者年齢、性別と発生地域	症状	備考	分離菌でのジフテリア毒素活性の有無	周辺動物からの <i>C. Ulicerans</i> 分離の有無
1	2001年2月	52歳、女性、千葉県旭市	呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等	猫を20匹飼育、1匹の猫が皮膚炎で死亡後に本人が発症	toxigenic	NT
2	2002年10月	54歳、男性、千葉県旭市	同上	1例目の患者と同地区に住居	toxigenic	NT
3	2005年9月	58歳、男性、岡山県	左耳下腺部腫脹、軽度の咳等	飼育犬は慢性の皮膚疾患で死亡後に患者が発症	toxigenic	NT
4	2005年10月	51歳、男性、大分県	肺に多発性空洞病変、咳、痰、発熱等	猫を12匹飼育	toxigenic	NT
5	2006年7月	57歳、女性、神奈川県	呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等(腸癌及び関節リウマチ)	インコを飼育していたが、今事例における直接の因果関係は不明	toxigenic	NT
6	2009年1月	57歳、女性、東京都葛飾区	咽頭痛、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等(関節リウマチ)	自宅に集まる野良猫5匹中2匹から菌分離陽性。家内外に飼育している犬2匹及び猫4匹は陰性	toxigenic	+
7	2010年7月	55歳、男性、神奈川県横浜市	ピンポン玉大の腋下膿瘍。その穿刺液より菌分離。(HIV感染症治療中)	猫10匹を屋内外で飼育。1匹から菌分離	toxigenic	+
8	2010年10月	51歳、女性、茨城県行方市	呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等	猫1匹飼育。この猫の眼やにから菌分離	toxigenic	+
9	2011年4月	57歳、女性、滋賀県大津市	同上	猫14匹、犬7匹、ヤギ2匹飼育。	toxigenic	-
10	2011年12月	38歳、女性、山形県鶴岡市	ピンポン玉大の右肘膿瘍。その穿刺液より菌分離。	猫6匹飼育。	toxigenic	-
11	2012年1月	33歳、男性、香川県高松市	ピンポン玉大の腋下リンパ節膿瘍。その穿刺液より菌分離。	妻の実家で犬3匹飼育。	toxigenic	-
12	2012年11月	71歳、女性、埼玉県朝霞市	呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等	自宅に飼育している猫4匹は中1匹から菌分離陽性。毒素産生性	toxigenic	+
13	2013年4月	20歳、女性、埼玉県桶川市	呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等	猫18匹飼育。9匹は室内飼育、9匹は屋外ベランダで飼育	toxigenic	-
NT: 試験せず						
toxigenic: ジフテリア様毒素産生性						

表 2. 開発した Multiplex PCR 法の感受性

Species, I. D.	4plex PCR amplification					DT (248 bp)
	C. U (110 bp)	C. P (204 bp)	C. D (434 bp)	DT (303 bp)	Nonspecific (bp)	
<i>C. diphtheriae</i>						
66	-	-	+	+	-	+
TO-15	-	-	+	+	-	+
RT-17	-	-	+	-	-	-
PW8	-	-	+	+	-	+
CD1994-1	-	-	+	+	-	+
2013-1	-	-	+	-	-	-
ATCC13812	-	-	+	+	-	+
ATCC11051	-	-	+	+	-	+
RIMD0343044	-	-	+	+	-	+
ATCC11049	-	-	+	+	-	+
<i>C. ulcerans</i>						
ATCC10387	+	-	-	-	-	-
11021A	+	-	-	+	-	+
11022A	+	-	-	+	-	+
11030A	+	-	-	+	-	+
11031A	+	-	-	+	-	+
12109A	+	-	-	+	-	+
2009-81	+	-	-	+	-	+
2008-64	+	-	-	+	-	+
2008-168	+	-	-	-	-	-
2008-169	+	-	-	-	-	-
2008-191	+	-	-	+	-	+
2010-018	+	-	-	+	-	+
2008-144	+	-	-	+	-	+
2009-047	+	-	-	+	-	+
2007-030	+	-	-	+	-	+
2010-020	+	-	-	+	-	+
2012-044	+	-	-	+	-	+
<i>C. pseudotuberculosis</i>						
ATCC9389	-	+	-	-	-	-

C.U.: *C. ulcerans*, C.P.: *C. pseudotuberculosis*, C.D.: *C. diphtheriae*, DT: Diphtheria Toxin, DT(248 bp):
ジフテリア毒素の単独 PCR による検出

表3 . Multiplex PCR の感度

Strain I. D.-DNA fragment	Amount of DNA/reaction					
	100pg	10pg	1pg	100fg	10fg	1fg
<i>C. diphtheriae</i> ATCC13812						
C. D (434 bp)	+	+	+	+	-	-
DT (303 bp)	+	+	+	+	-	-
<i>C. diphtheriae</i> 2013-1						
C. D (434 bp)	+	+	+	+	-	-
<i>C. ulcerans</i> 11021A						
C. U (110 bp)	+	+	+	-	-	-
DT (303 bp)	+	+	+	-	-	-
<i>C. ulcerans</i> 10387						
C. U (110 bp)	+	+	+	-	-	-
<i>C. pseudotuberculosis</i> 9389						
C. P (204 bp)	+	+	+	+	-	-

