

3 調査研究

3・1 報 文

1) 野良ネコにおけるコリネバクテリウム・ウルセランス保有状況調査

森 美聡 梶島翔一郎*¹ 原田誠也 松本一俊*² 八尋俊輔

要 旨

コリネバクテリウム・ウルセランス (*Corynebacterium ulcerans*) は、ジフテリア毒素を産生する人獣共通感染症を引き起こす細菌であり、ジフテリアと類似の症状を引き起こす。国内では 2001 年に初めて報告されてから 2016 年 5 月までにヒトにおける感染が 19 例報告されている。

ヒトへの感染源の一つとして我々の身近な動物であるイヌやネコが挙げられており、今回県内のネコが *C. ulcerans* を保有しているかを把握するため、野良ネコの調査を実施したところ、208 検体中 7 検体から *C. ulcerans* が分離されたことから、県内のネコが *C. ulcerans* を保有していることが明らかとなった。

キーワード : *C. ulcerans*, ネコ, 人獣共通感染症

はじめに

コリネバクテリウム・ウルセランス(以下「*C. ulcerans*」という。)はジフテリア毒素を産生し、人獣共通感染症を引き起こす細菌である。「感染症予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(以下「感染症法」という。)において二類感染症に指定されているジフテリアと類似の臨床所見を示す¹⁾。英国をはじめとした欧州諸国では以前から問題となっていたが、国内でも 2001 年に初めて報告されてから 2016 年 5 月までにヒトでの感染が 19 例報告されている。*C. ulcerans* は自然界に常在しており、ウシの乳房炎をはじめ多くの動物に化膿性炎症を引き起こす菌として知られている。感染動物は、くしゃみや鼻汁等の風邪に似た症状や皮膚病を示すことがあり、動物間で感染が拡大することも報告されている。ヒトへの感染源の一つとして我々の身近な動物であるイヌやネコ等の伴侶動物が挙げられており、国内ではイヌやネコからの感染が疑われる報告が多い。2016 年 5 月には *C. ulcerans* による国内初の死亡例が確認された。これを受け、2018 年に厚生労働省健康局結

核感染症課長通知²⁾が発出され、情報提供を求めるとともに注意喚起がなされた。

これまでに、熊本県内において *C. ulcerans* による感染事例は報告されていない。しかし、国内では伴侶動物からの感染が疑われる事例が多いことから、伴侶動物の *C. ulcerans* 保有状況を把握することは重要と考えられる。そこで本研究では、予防対策や健康被害の未然防止に役立てることを目的に、県内における野良ネコの *C. ulcerans* 保有状況調査を実施した。

材料及び方法

1. 検査材料

県内の動物病院の協力を得て、2018 年及び 2019 年に計 2 回実施された TNR 事業で捕獲された県内の野良ネコ 208 匹の口腔ぬぐい液を検体とした。検体は輸送培地にて冷蔵状態で搬入した。

2. 検査方法

2.1 *C. ulcerans* 分離培養

*1 現健康福祉部健康危機管理課 *2 現食肉衛生検査所

亜テルル酸塩加血液寒天培地(荒川変法培地)に検体を直接塗抹し, 37°C, 24~48 時間好気培養し, *Corynebacterium* 属菌が疑われる黒色コロニーを分離した。純培養は羊血液寒天培地で実施した。

グラム陽性菌は API coryne (ピオメリュー・ジャパン(株)製)を用いて簡易同定をするとともに, Hiss's serum water³⁾による糖分解能試験(Glucose, Maltose, Sucrose, Glycogen)及び *rpoB* 領域の塩基配列から同定した。

2.2 ジフテリア毒素遺伝子検出

Corynebacterium 属菌について, ジフテリア毒素(Diphtheria Toxin: DT) 遺伝子を検出した。アルカリ抽出法で DNA を抽出し, PCR は病原体検出マニュアル⁴⁾に準じて実施した。

2.3 毒素産生性試験

DT 遺伝子保有株について, 寒天ゲル内沈降反応法によるジフテリア毒素の検出(Elek 変法)及び培養細胞に対する毒性を指標とした毒素活性の検出(Vero 細胞法)を実施した。いずれもジフテリア予防対策マニュアル⁵⁾に準じて実施した。Vero 細胞法に用いた毒素産生のための液体培地は, ろ過滅菌した Pope 培地を使用した。調整した液体培地に *C. ulcerans* と同定された菌株を接種し, 37°C で 48 時間静置培養し, 培養上清 1mL を 15,000rpm で 10 分間遠心分離し, 上清を 0.22µm フィルターでろ過したものを検体とした。ジフテリア抗毒素は日本国ジフテリア抗毒素(ウマ, ロット 10, 国立感染症研究所)を使用した。

2.4 Multilocus Sequence Typing (MLST)

MLST は Christina らの方法⁶⁾に準じて実施した。*C. ulcerans* が保有する 7 つのハウスキーピング遺伝子(*atpA*, *dnaE*, *fusA*, *odhA*, *rpoB*, *dnaK*, *leuA*)について, それぞれの塩基配列を決定した後, データベースと比較し MLST sequence type (ST) を決定した。

結 果

1. *C. ulcerans* 保有状況

野良ネコ 208 匹のうち 7 匹の口腔ぬぐい液から *C. ulcerans* が分離された。2018 年に実施した 100 匹のうち 6 匹(6.0%), 2019 年に実施した 108 匹のうち 1 匹(0.9%)であった(表 1)。

Corynebacterium 属菌が疑われた 7 株について DT 遺伝子を検索したところ, 7 株すべてから検出された。これら 7 株について, 簡易同定キットによる同定, Hiss's serum water による糖分解能試験及び *rpoB* 領域のシーケンス解析を実施した。

API coryne を用いた簡易同定では, 7 株全てが *C.*

pseudotuberculosis と判定された。さらに, 糖分解能試験では *C. ulcerans* の典型的な糖分解能(グリコーゲン分解)を示す株は 7 株中 3 株であった。

さらに, *rpoB* 領域の塩基配列を決定し, 相同性検索(blast 解析)を実施したところ, *C. ulcerans* と 100% 相同性を示したことから, 最終的に 7 株全てを *C. ulcerans* と同定した。

2. 毒素産生性試験

Elek 変法では, 培養後 1~2 日で白色の沈降線が出現するとジフテリア毒素産生とされるが, 7 株全てで沈降線は確認できなかった。

Vero 細胞を用いた培養細胞法では, 7 株全てで細胞死が確認され, 毒素産生が認められた。

3. MLST

今回分離した *C. ulcerans* 7 株について MLST を実施したところ, 6 株は ST337 を示し, 1 株は ST335 を示した(表 2)。

考 察

今回, 県内の野良ネコ 208 匹のうち 7 匹の口腔ぬぐい液から *C. ulcerans* が分離された。2018 年に実施した 100 匹のうち 6 匹(6.0%), 2019 年に実施した 108 匹のうち 1 匹(0.9%)であった。疫学調査として実施されたイヌ・ネコでの保菌率は 0~10%とされており^{1),7),8)}, 今回の結果もこれらと同様であった。また, 動物間で *C. ulcerans* の水平伝播する可能性が示唆されていることから, 複数匹を飼育する際は十分な対策を講じる必要がある。

ジフテリア毒素産生性については, Elek 変法では確認できなかったが, Vero 細胞法では確認できたことから, PCR 法と複数の方法を併用し確認することが有用である。

分離株の生化学性状は, 典型的な *C. ulcerans* の糖分解能(グリコーゲン分解)を示す株は 7 株のうち 3 株であった。簡易同定キットでは全株が *C. pseudotuberculosis* と同定されており, グリコーゲン分解能が陰性と判定されたことが影響したと考えられた。*rpoB* 領域の遺伝子解析では 7 株すべて *C. ulcerans* と同定されたことから, 生化学性状を確認するとともに *rpoB* 領域の塩基配列を解析する必要がある。

MLST 解析では, 今回分離された 7 株のうち 6 株は ST337 に, 1 株は ST335 を示したことから, 県内にも均一な ST が浸潤していることが示唆された。

ま と め

今回、県内の野良ネコの *C. ulcerans* 保有状況を調査したところ、208 匹中 7 匹から検出され、*C. ulcerans* 保有率は 3.4%であった。*C. ulcerans* は動物間で水平伝播する可能性が示唆されていることから、複数頭を飼育する際は十分な対策を講じる必要がある。さらに、動物からヒトへの感染が危惧されており、他の人獣共通感染症と同様に、適切な環境で飼育し、加えて飼育動物との過度な接触を避けるとともに、動物と触れ合った際は手指洗浄を励行する必要がある。また、日頃から飼育動物の健康状態を観察することも感染症の予防対策につながると思われる。

謝 辞

C. ulcerans の検査及び解析に関して、御助言いただきました国立感染症研究所 細菌第二部 岩城正昭先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 高橋元秀：ジフテリア毒素原性 *Corynebacterium ulcerans* の感染症, 日獣会誌, 63, 813-818 (2010).
- 2) 平成 30 年 1 月 10 日付厚生労働省健康局結核感染症課長通知 (健感発 0110 第 2 号).
- 3) Knapp A. : *J.Med. Res.*, 12 (4), 475-478 (1904).
- 4) 病原体検出マニュアル：国立感染症研究所.
https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Diphtheria2_0201106.pdf
- 5) ジフテリア予防対策マニュアル：国立感染症研究所情報センター.
- 6) Christina Konig, . Dominik M. Meinel, Gabriele Margos, Regina Konrad, Andreas Sing : *J.Clim.Microbiol.*, 52, 4318-4324 (2014).
- 7) Chihiro Katsukawa, Takako Komiya, Hiroaki Yamagishi, Atsushi Ishii, Shunji Nishino, Shinya Nagahama, Masaaki Iwaki, Akihiko Yamamoto, Motohide Takahashi : *J.Med. Microbiol.*, 61, 266-273 (2012).
- 8) 阿部祐樹ほか：愛媛県立衛生環境研究所年報, 21, 1-7 (2018).

表 1 *C. ulcerans* 分離株の生化学性状

No.	DT	<i>rpoB</i> seq	API Coryne	糖分解試験*				毒素産生	
				GLU	SUC	MAL	GLYG	Elek	Vero
1	+	<i>C.ulcerans</i>	<i>C.pseudotuberculosis</i>	+	-	+	+	-	+
2	+	<i>C.ulcerans</i>	<i>C.pseudotuberculosis</i>	+	-	+	+	-	+
3	+	<i>C.ulcerans</i>	<i>C.pseudotuberculosis</i>	+	-	+	-	-	+
4	+	<i>C.ulcerans</i>	<i>C.pseudotuberculosis</i>	+	-	+	-	-	+
5	+	<i>C.ulcerans</i>	<i>C.pseudotuberculosis</i>	+	-	+	-	-	+
6	+	<i>C.ulcerans</i>	<i>C.pseudotuberculosis</i>	+	-	+	+	-	+
7	+	<i>C.ulcerans</i>	<i>C.pseudotuberculosis</i>	+	-	+	-	-	+

*GLU : Glucose, SUC : Sucrose, MAL : Maltose, GLYG : Glycogen

表 2 *C. ulcerans* 分離株の MLST 解析

No.	アレルプロファイル							ST
	<i>atpA</i>	<i>dnaE</i>	<i>dnaK</i>	<i>fusA</i>	<i>leuA</i>	<i>odhA</i>	<i>rpoB</i>	
1	41	34	140	49	45	47	63	337
2	41	34	140	49	45	47	39	337
3	41	34	79	49	45	47	39	337
4	41	34	140	49	45	47	39	337
5	41	34	79	49	45	47	62	337
6	44	38	82	51	-	43	42	335
7	41	34	140	49	45	47	39	337