

愛媛県におけるネコのジフテリア毒素原性 *Corynebacterium ulcerans*保有状況

阿部祐樹 木村千鶴子 仙波敬子 青野学 井上智
門多優*1 大饗英章*1 山本真司*1 山下龍*2 滝沢浩司*2 四宮博人

Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* isolated from cats in Ehime

Yuki ABE, Chizuko KIMURA, Keiko SEMBA, Manabu AONO, Satoshi INOUE,
Yu KADOTA, Hideaki OOAE, Masashi YAMAMOTO, Ryo YAMASHITA,
Kouji TAKIZAWA, Hiroto SHINOMIYA

Corynebacterium ulcerans is a zoonotic pathogen that produces diphtheria toxin and causes diphtheria-like symptoms. In recent years, the first case of death due to the infection with *C. ulcerans* was reported in Japan. Therefore, in order to evaluate the risk of infection from cats that carry *C. ulcerans* to human in Ehime, we conducted a survey on the possession status of domestic and stray cats. Pharyngeal swabs were collected from a total of 92 cats that visited veterinary hospitals or were housed in the Ehime Prefectural Animal Welfare Center from August to December in 2018. The toxigenic *C. ulcerans* was detected in 5 of the 92 cats. Molecular epidemiological analysis using multilocus sequence typing (MLST) revealed that the 5 strains belonged to the same ST.

Keywords : *Corynebacterium ulcerans*, zoonosis, Diphtheriae Toxin, phospholipase D, *rpoB* gene, Multilocus Sequence Typing(MLST)

はじめに

*Corynebacterium ulcerans*は、自然界に常在しており、ヒトをはじめとする多くの動物に化膿性炎症を引き起こす細菌である。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(以下、感染症法)において二類感染症に指定されているジフテリア症の起原菌である*C. diphtheriae*に近縁のグラム陽性菌である。*C. ulcerans*は毒素を産生しない場合が多いが、ジフテリア菌とほぼ同じ毒素遺伝子を獲得した菌(毒素原性*C. ulcerans*)は、ジフテリア症に似た症状を引き起こすことがある¹⁾。これまでにヒト、ウシ、イヌ、ネコなど²⁻⁶⁾、様々な動物への感染事例あるいは動物からの分離報告があり、調査の範囲が広がる

につれ、より身近なものになりつつある。

かつてヨーロッパにおいては、乳房炎や関節炎に罹患した牛の生乳からの感染が主に報告されていたが、近年は愛玩動物であるイヌやネコからの感染が確認されるようになった⁷⁾。一方、日本においてはイヌやネコからの感染が多くを占め、平成13年に最初の事例⁸⁾が報告されてから、25件が確認⁹⁾されている。平成28年5月には*C. ulcerans*による国内初の死亡事例¹⁰⁾が確認された。これを受け、平成30年に厚生労働省健康局結核感染症課長通知が発出され、情報提供を求めるとともに注意喚起がなされた⁹⁾。

愛媛県では、県内の愛玩動物からの感染リスクに関する情報を得るため、平成21~22年度愛媛県動物由来感染症予防体制整備事業の一環として、動物愛護センターに収容されたイヌ・ネコ等を対象に*C. ulcerans*の保有実態調査を実施し、いくつかの知見を得ることができた。今回は、国内でネコからの感染が疑われる死亡例が判明した

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234

*1 愛媛県動物愛護センター

*2 愛媛県保健福祉部健康衛生局業務衛生課

表1 本研究に用いた検体及び詳細情報

分類	件数	地区別 ¹⁾ 件数	性別	年齢 ²⁾		体調		風邪様 症状	避妊(去勢)	感染症関連検査情報				飼育環境		多頭飼育 (種別不問)	野良猫 との接触			
										結果	FIV	FeLV	FCoV							
飼育ネコ	32	東予 22	M	11	成	11	良	31	有	3	実施	23	+	1	室内 自由 屋外 不明	21 7 3 1	有	18	有	9
		中予 4			幼	20	やや不良	1		9	未実施	9	-	9						
		南予 6	F	21	不明	1	不良		無	29	不明	不明	不明	22						
東予 11	M	25			成	45	良	43	有	4	実施	4	+		室内 自由 屋外 不明	60	有	60 ³⁾	有	
中予 12			幼	15	やや不良	12	57	未実施		57	-									
南予 37	F	35	不明		不良	5	無	56	不明	3	不明	不明	60	60						
東予 33			M	36	成	56	良	74	有	7	実施	23	+	1	室内 自由 屋外 不明	21 7 3 61	有	78	有	9
中予 16	幼	35			やや不良	13	66	未実施		66	-	9	11							
南予 43	F	56	不明	1	不良	5	無	85	不明	3	不明	不明	82	81						
合計			92																	

- 1) 東予地区(県東部), 中予地区(県中部,松山市を除く), 南予地区(県南部)
- 2) 1歳未満は幼ネコ, 2歳以上は成ネコに分類
- 3) 動物愛護センター収容前は不明, 収容後は猫多数・犬数匹と飼育

表2 ジフテリア毒素及びホスホリパーゼD遺伝子検出用プライマー

Primer name	Target gene	PCR Primer sequence(5'-3')	増幅産物 サイズ(bp)	Reference
DTA-F	<i>dtxR</i>	ATCCACTTTTAGTGCGAGAACCCTTCGTC	248	12)
DTA-R		GAAAACCTTTCTTCGTACCAACGGGACTAA		
PLD-F	<i>pld</i>	AAAGTGTGTTTATTCTTATCAATAATTAT	723	13)
PLD-R1		GTAGYGATTGCCACCCAAAAG		

ことを受け、県内における飼育ネコと野良ネコの本菌の保有実態を改めて明らかにし、予防対策の構築に寄与するため、動物病院を受診したネコと動物愛護センターに収容されたネコを対象に、本菌の保有状況調査を実施したので報告する。

材料と方法

1 検査材料

平成30年8月～12月の間に県内の動物病院を受診したネコ(飼育ネコ)32匹及び愛媛県動物愛護センターに収容されたネコ(野良ネコ)60匹の計92匹から咽頭ぬぐいスワブを採取した。採取にはシードスワブγ2号(栄研化学(株))を使用し、4℃で保存・搬送を行い、検体搬入当日に分離培養検査に供した。また、採取時には性別、年齢、健康状態(体調、鼻汁等の風邪様症状の有無、避妊あるいは去勢手術の有無)、感染症関連検査情報(猫免疫不全ウイルス(Feline immunodeficiency virus, FIV)、猫白血病ウイルス(Feline leukemia virus, FeLV)、猫コロナウイルス(Feline coronavirus, FCoV)、飼育状況(飼育場所、多頭飼育の有無、野良ネコとの接触の有無)、医療機関受診理由などの情報を記録した(表1)。

2 分離培養

既報¹¹⁾に従い、採取したスワブを増菌用液体培地に接種し培養した。増菌培養した培養液は、変法荒川培地

(亜テール酸カリウム添加活性炭末加ヒツジ血液寒天培地)に塗抹し、37℃で2日間好気条件で培養後、*Corynebacterium*属菌が疑われる黒色コロニーを分離した。3 ホスホリパーゼD(Phospholipase D : PLD)遺伝子及びジフテリア毒素(Diphtheria Toxin A subunit : DTA)遺伝子の検出

*C. ulcerans*の検出を目的としてPLD遺伝子を、毒素原性*C. ulcerans*の検出を目的としてDTA遺伝子の検出を試みた。PLD遺伝子及びDTA遺伝子の検出は、既報¹¹⁾に準拠して実施した。すなわち、*C. ulcerans*疑い株を500 μLの5% Chelex100加TE緩衝液に懸濁し、95℃10分間の熱処理後、15,000 rpm 5分間遠心した上清を鋳型DNAとした。DTA遺伝子領域及びPLD遺伝子の増幅産物を得るプライマーは表2に示す。PCR反応液は、10 μL中に1×SapphireAmp Fast PCR Master Mix(タカラバイオ(株))、5 μMプライマー、鋳型DNA 1 μLを含むように調製した。PCR反応にはS1000サーマルサイクラー(BIO-RAD)を使用し、DTA遺伝子検出では、94℃90秒の後、98℃5秒、50℃5秒、72℃10秒を35回繰り返し、最後に72℃2分の伸長反応を行った。同様にPLD遺伝子検出では、94℃90秒の後、98℃5秒、56℃5秒、72℃10秒を35回繰り返し、最後に72℃2分の伸長反応を行った。

4 生化学的性状の確認及び同定

(1) 生化学的性状等の確認

表3 飼育ネコ及び野良ネコからの *C. ulcerans* 検出結果

分類 (検体採取機関)	地区	月別					検出数/検査数(%)	
		8月	9月	10月	11月	12月	合計	
飼育ネコ (動物病院)	東予	0/5	0/5	0/4	1/6	0/2	1/22	(4.5)
	中予 ^{*)}	0/0	0/0	0/2	0/0	0/2	0/4	(0.0)
	南予	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/6	(0.0)
	計	0/6 (0.0)	0/6 (0.0)	0/7 (0.0)	1/7 (14.3)	0/6 (0.0)	1/32	(3.1)
野良ネコ (動物愛護 センター)	東予	0/2	0/2	0/2	0/3	0/2	0/11	(0.0)
	中予 ^{*)}	0/2	0/6	0/2	0/1	0/1	0/12	(0.0)
	南予	1/11	0/5	0/6	2/7	1/8	4/37	(10.8)
	計	1/15 (6.7)	0/13 (0.0)	0/10 (0.0)	2/11 (18.2)	1/11 (9.1)	4/60	(6.7)
合計	1/21 (4.8)	0/19 (0.0)	0/17 (0.0)	3/18 (16.7)	1/17 (5.9)	5/92	(5.4)	

*) 松山市を除く

DTA遺伝子陽性株について、既報¹¹⁾に従い生化学的性状等の確認を行った。

グラム染色、アピコリネ(シスメックス・バイオメリュー(株))による簡易同定を実施すると共に、Hiss's serum water¹⁴⁾による糖分解能試験(Glucose, Maltose, Sucrose, Glycogen, Trehalose)及び*rpoB*領域のシーケンス解析を実施して塩基配列の決定を行った。

(2) 毒素産生性試験

毒素産生のための液体培地はElekらの報告¹⁵⁾に準拠して調製した。すなわち、ペプトン 20 gを1 Lの精製水に溶解し、40%水酸化ナトリウム溶液 3.25 mLを加えた。これをろ過した後、90%乳酸溶液 0.7 mL及びマルトース 3.0 gを加えてpH7.8に調整した。さらに塩化ナトリウム5.0 g加えた後、121°Cで15分間高圧蒸気滅菌した。

調製した液体培地に*C. ulcerans*と同定された菌株を接種し、37°Cで一晩培養した。培養液上清1 mLを分取後、15,000 rpmで10分間遠心分離し、さらに上清を0.22 µmフィルターでろ過したものを被験毒素液とした。

毒素産生性試験は、ジフテリア予防対策マニュアルの培養細胞法(Vero細胞法)(国立感染症研究所感染症情報センター)¹⁶⁾に準拠した。すなわち、段階希釈した被験毒素液25 µLを組織培養用マイクロプレートに入れ、3%新生仔ウシ血清を含有するイーグルMEM培地(日水製薬(株))(以下、3%CS MEM)25 µLを加えた。これを37°Cで30分間保温した後、3%CS MEM 100 µL及び1.5×10⁵のVero細胞を含む50 µLの3%CS MEMを加え、シーリングフィルムをして37°Cで4日間培養した。細胞の形態観察

によって細胞死が確認された検体を毒素陽性とし、当該菌株を毒素産生性と判定した。

また、ジフテリア抗毒素を添加した被験毒素液について同様の操作を行い、抗毒素により毒素が中和され、細胞死が見られなくなることを確認した。ジフテリア抗毒素には、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。

5 Multilocus Sequence Typing(MLST)

*C. ulcerans*が保有する7つのハウスキーピング遺伝子(*atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA*, *rpoB*)の塩基配列を決定し、これらを*atpA-dnaE-dnaK-fusA-leuA-odhA-rpoB*の順に連結した3,282 bpの塩基配列を用いて系統樹解析を行った。

ハウスキーピング遺伝子の塩基配列の決定は、Katsukawaらの方法¹⁷⁾に従って行った。鋳型DNAは熱処理で調製し、PCR反応液は、25 µL中に1×EX Taq Buffer, 0.2 mM dNTP Mixture, 5 µMプライマー, 1.25 U TaKaRa EX Taq HS, 鋳型DNA 1 µLを含むように調製した。PCR反応にはS1000サーマルサイクラー(BIO-RAD)を使用し、94°C1分の後、94°C10秒, 55°C30秒, 72°C40秒を30回繰り返し、最後に72°C5分の伸長反応を行った。

塩基配列の決定は、(1) *rpoB*領域の塩基配列解析と同様の方法で行った。系統樹は、MEGA6ソフトウェアを使用し、近隣結合法により作成した。

結果

1 DTA遺伝子及びPLD遺伝子検出による*C. ulcerans*の

表4 *C. ulcerans* 分離株の生化学的性状

No.	採取日	分類	詳細な検体情報			遺伝子検出		グラム染色	アピコリネ (第一候補)	糖分解試験 ^{*)}					<i>rpoB</i> 塩基配列	毒素 産生
			性別	年齢	地区	DTA	PLD			GLU	MAL	SUC	GLYG	TRE		
1	8/24	野良ネコ	M	成猫	南予	+	+	G(+) 桿菌	<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	+	-	-	+	<i>C. ulcerans</i>	+
2	11/1	飼育ネコ	M	12才	東予	+	+	G(+) 桿菌	<i>C. ulcerans</i>	+	+	-	+	+	<i>C. ulcerans</i>	+
3	11/7	野良ネコ	F	成猫	南予	+	+	G(+) 桿菌	<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	+	-	-	+	<i>C. ulcerans</i>	+
4	11/16	野良ネコ	F	成猫	南予	+	+	G(+) 桿菌	<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	+	-	-	+	<i>C. ulcerans</i>	+
5	12/7	野良ネコ	F	成猫	南予	+	+	G(+) 桿菌	<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	+	-	-	+	<i>C. ulcerans</i>	+

*) GLU:Glucose, MAL:Maltose, SUC:Sucrose, GLYG:Glycogen, TRE:Trehalose

表5 *C. ulcerans* 分離株の MLST 解析

採取年	由来(地区)	DTA	糖分解試験					Allelic profile						MLST ST型	
			GLU	MAL	SUC	GLYG	TRE	<i>atpA</i>	<i>dnaE</i>	<i>dnaK</i>	<i>fusA</i>	<i>leuA</i>	<i>odhA</i>		<i>rpoB</i>
2009	ネコ(不明)	+	+	+	-	+	+	1	1	1	1	1	1	1	1
	ネコ(不明)	+	+	+	-	-	+	1	1	1	1	1	1	1	1
	イヌ(東予)	+	+	+	-	-	+	1	1	1	1	1	1	1	1
	イヌ(東予)	+	+	+	-	-	+	1	1	1	1	1	1	1	1
	イヌ(南予)	+	+	+	-	-	+	1	1	1	1	1	1	1	1
2010	ネコ(南予)	-	+	+	-	-	+	1	1	1	1	1	1	1	1
	ネコ(南予)	+	+	+	-	-	+	1	1	1	1	1	1	1	1
	ネコ(中予)	+	+	+	-	+	+	1	1	1	1	1	UA	1	UA
	ネコ(東予)	+	+	+	-	+	+	1	1	1	1	1	1	1	1
	ネコ用ケージ床	+	+	+	-	+	+	UA	UA	1	UA	4	UA	UA	UA
2018	野良ネコ(南予)	+	+	+	-	-	+	1	1	1	1	1	1	1	1
	飼育ネコ(東予)	+	+	+	-	+	+	1	1	1	1	1	1	1	1
	野良ネコ(南予)	+	+	+	-	-	+	1	1	1	1	1	1	1	1
	野良ネコ(南予)	+	+	+	-	-	+	1	1	1	1	1	1	1	1
	野良ネコ(南予)	+	+	+	-	-	+	1	1	1	1	1	1	1	1

MLST : multilocus sequence typing

UA : Unassigned

分離結果

飼育ネコ及び野良ネコから採取した咽頭ぬぐいスワブからの*C. ulcerans*の分離結果を表3に示す. 92件中5件(5.4%)からDTA遺伝子及びPLD遺伝子陽性*C. ulcerans*が検出された. 内訳は, 飼育ネコが32件中1件(3.1%), 野良ネコが60件中4件(6.7%), であった.

地区別の*C. ulcerans*検出率を比較すると, 飼育ネコでは, 東予地区で4.5%(1/22)から検出され, 中予(4件)・南予地区(6件)からは検出されなかった. また, 野良ネコでは, 東予(11件)及び中予地区(12件)からは検出されず, 南予地区で10.8%(4/37件)が検出された. 飼育ネコでは東予地区のみ, 野良ネコでは南予地区のみから検出されたが, いずれも地区間で検体数に差があり, 地区による有意な差は認められなかった.

*C. ulcerans*の月別検出率を比較した. *C. ulcerans*が検出されたのは, 8月 4.8%(1/22件), 11月 16.7%(3/18件),

12月 5.9%(1/17件)であり, 11月の検出率が高かったものの, 有意な差は認められなかった.

2 *C. ulcerans*分離株の生化学的性状等

DTA遺伝子及びPLD遺伝子の保有が確認された5株について, グラム染色, 簡易同定キットによる同定, Hiss's serum waterによる糖分解試験(Glucose, Sucrose, Maltose, Glycogen, Trehalose)及び*rpoB*領域のシーケンス解析及び毒素産生性試験を実施した(表4).

アピコリネを用いた簡易同定検査では, *C. ulcerans*と判定されたのは5株中1株のみであり, その他4株は*C. pseudotuberculosis*と判定された. さらに, Hiss's serum waterを用いた糖分解試験では, *C. ulcerans*の典型的な糖分解(Glycogen及びTrehalose分解)を示したのは, アピコリネで*C. ulcerans*と判定された1株のみであり, *C. pseudotuberculosis*と判定された4株は Trehalose分解能を有しており, 典型的な*C. ulcerans*の糖分解能ではなかつ

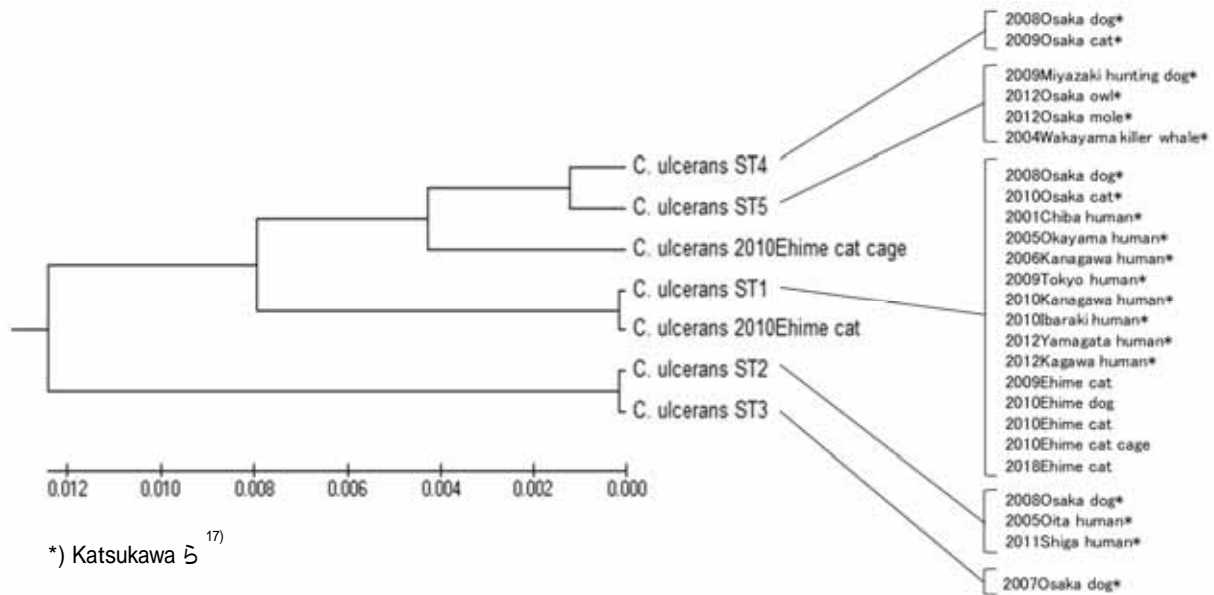


図1 *C. ulcerans* 分離株の系統樹解析

たものの、*C. ulcerans*と判定可能であった。

さらに、同5株について*rpoB*領域の塩基配列を決定し、GenBankに登録されている塩基配列と比較した結果、今回分離した5株はいずれも*C. ulcerans*と100%一致した。

Vero細胞を用いた培養細胞法による毒素産生性試験では、被験毒素液5件ともに細胞死が確認された。一方、培養液上清にジフテリア抗毒素を添加すると細胞死は見られなくなり、細胞死がジフテリア毒素によるものであることを確認し、分離株5株すべての毒素原性が確認された。

3 MLST解析

今回分離した*C. ulcerans* 5株についてMLST解析を実施し、Katsukawaらの報告¹⁷⁾と比較した結果、これらはすべてST1であった(表5)。

さらに、過去の調査において本県で分離された*C. ulcerans*株^{11, 18)}のうち、採取時期や採取場所等を考慮して選択した11株(表5)についてMLST解析を実施し、系統樹を作成した(図1)。過去に分離された菌株11株中、ジフテリア毒素非産生株1株を含む9株はST1であったが、中予地区のネコ由来株1株では*odhA*の1領域が、動物愛護

センター内ネコ用ケージ由来株1株では*atpA*, *dnaE*, *fusA*, *leuA*, *odhA*, *rpoB*の6領域が異なり、3つの異なるST型に分類された。

考察

本調査では、ネコから採取した咽頭ぬぐい液92件のうち5件(5.4%)から*C. ulcerans*が分離された。当該菌が分離されたのは、飼育ネコが32件中1件(3.1%)、野良ネコが60件中4件(6.7%)であった(表3)。平成21年度～22年度に本県で実施した同様の調査^{11, 18)}では、平成21年度にはイヌ50件中1件(2.0%)、ネコ51件中4件(7.8%)、平成22年度にはイヌ124件中3件(2.4%)、ネコ124件中8件(6.5%)から*C. ulcerans*が分離されている。今回の調査においてもネコにおける*C. ulcerans*の保菌率は5.4%であり、平成20年度以降もネコにおいては一定程度の*C. ulcerans*保有率が維持されていることが判明した。さらに、国内で調査された同様の調査^{1, 20-23)}においても、ネコの*C. ulcerans*保有率0～10%との報告があり、全国的にも*C. ulcerans*の保有率はある程度一定で、過去の報告時から本調査時ま

表6 *C. ulcerans* が検出された検体(ネコ)の詳細情報

No.	採取年月	分類	詳細情報										
			地区	性別	年齢	健康状態	風邪様症状	飼育場所	野良ネコとの接触	他動物の飼育状況	その他		
1	2018.8	野良ネコ	南予	M	成猫	良好	無						
2	2018.11	飼育ネコ	東予	M	12才	良好	有	屋内外自由	なし	ネコ3匹	FIV, FeLV, FCoV:不明 受診理由:歯石除去, 口腔クリーニング		
3	2018.11	野良ネコ	南予	F	成猫	良好	無						
4	2018.11	野良ネコ	南予	F	成猫	良好	無						
5	2018.12	野良ネコ	南予	F	成猫	良好	無						

でそれは変わっていないと推測された。

季節性を確認すると、平成22年度は5～12月の初夏から冬にかけて継続調査を実施したが、県内イヌ・ネコの*C. ulcerans*保有率に季節性は見いだせていない。今回の調査でも、8～12月にかけてネコの*C. ulcerans*保有調査を実施したが、検出率に有意差は認められなかった。既報の同様の調査においても、調査時期が春～夏、夏～冬、1年間と様々ではあるが、*C. ulcerans*は年間を通して分離されていた。また国内の過去の発生事例⁹⁾では、6月と8月を除くほとんどの月で発生していたことから、国内のイヌ・ネコは一定程度*C. ulcerans*を保有し、ヒトへの感染源となる可能性が危惧される。

地域性を確認すると、今回の調査結果だけでなく平成22年度調査でも同様に、*C. ulcerans*保有率に有意差は確認できなかった。国内における過去の発生事例⁹⁾では、関東以南が多いものの、山形県や北海道でも患者発生が確認されており、*C. ulcerans*は全国の環境中に分布していると考えられる。

今回、愛媛県における飼育ネコの*C. ulcerans*保有状況調査を初めて実施し、32件中1件(3.1%)から*C. ulcerans*が確認された。当該ネコは、歯石除去、口腔クリーニングのために動物病院を受診しており、屋内外の出入りが自由な飼育環境で、検体採取時には風邪様症状があった(表6, No.2)。当該ネコが*C. ulcerans*に感染した原因として、他に飼育しているネコ3匹からの感染の可能性が最も考えられる。その他の原因として、飼い主は野良ネコとの接触はないと認識していたが、屋内外の出入りが自由な飼育環境下では、*C. ulcerans*保有ネコとの直接的な接触による感染は否定できない。平成22年度の調査において、飼育中の犬房床やネコ用ケージの拭き取りから*C. ulcerans*が分離されており、感染動物の分泌物との接触により感染が成立する可能性を確認している。このことから、*C. ulcerans*を保有している野良ネコの生活圏内と当該飼育ネコの生活圏が交差していた場合、間接的な接触による感染の可能性も考えられた。

ジフテリア毒素遺伝子は溶原化したバクテリオファージ内に存在して菌から菌へ伝播する²⁴⁾。そのため、*C. ulcerans*がバクテリオファージ感染により、ジフテリア毒素遺伝子を獲得して毒素原性*C. ulcerans*となることから、平成21、22年度調査では、*C. ulcerans*の検出は増菌培養法で、毒素原性*C. ulcerans*の検出はDTA遺伝子スクリーニングで検出した。今回の調査では、*C. ulcerans*を確実に検出することを目的として、DTA遺伝子に加えてPLD遺伝子の検出を並行して実施し、ジフテリア毒素原性*C.*

*ulcerans*及び*C. ulcerans*の保有調査を実施した。その結果、PLD及びDTA遺伝子を共に保有するジフテリア毒素原性*C. ulcerans*は5株分離されたものの、PLD遺伝子のみを保有するジフテリア毒素非産生株は分離されなかった。PLD遺伝子は、*C. ulcerans*及び*C. pseudotuberculosis*は保有しているが、*C. diphtheriae*は保有していないと考えられている。そのため、PLD遺伝子検出単独では、*C. ulcerans*検出法としては特異性が低く、さらに詳細な性状解析等が必要であるが、ジフテリア毒素非産生*C. ulcerans*スクリーニング法としては有用であると思われる。

5頭のネコから分離された当該菌の生化学的性状は、飼育ネコ由来株と野良ネコ由来株で一部異なっていた。飼育ネコ由来株は典型的な*C. ulcerans*の糖分解能(グリコーゲン分解、トレハロース分解)であったが、野良ネコ由来株4株は、トレハロースは分解するもののグリコーゲン非分解であり、非典型的な糖分解能を示した(表4)。この非典型的な糖分解能(グリコーゲン非分解)は、平成21～22年度の動物愛護センター収容イヌ・ネコを対象として実施した調査で分離された*C. ulcerans* 23株中17株と同様であった。非典型的な糖分解能(グリコーゲン非分解、トレハロース分解)株の検出率は、過去調査及び今回の調査を比較してみると共に70～80%を占めており、非典型的な糖分解能の*C. ulcerans*がこの程度の割合で県内に拡がっていると推測された。

7つのハウスキーピング遺伝子(*atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA*, *rpoB*)をターゲットとしたMLST解析では、今回分離した株はすべてST1となった。ST1は日本で初めて報告されたヒトに感染した事例から分離されたものを含め、国内で広く分離されているST型である(図1)。一方、平成22年度の調査で分離した11株のうち9株はST1であったが、中予地区のネコ由来株1株では1領域が、動物愛護センター内ネコ用ケージ由来株1株では6領域が異なる3つのST型に分類された。特にネコ用ケージ由来株は他とは大きく異なる塩基配列を有しており、本県では確認できていないものの、ST1以外のST型の異なる株が拡がっている可能性も示唆される。今回、他施設との比較が容易であるMLST解析を実施したが、ジフテリア毒素の有無や、糖分解性の差異によらず同一のST型となった。このことから、今後、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を含めた他の分子疫学的解析手法の結果も含めてさらに検討する必要があると思われる。また、*C. diphtheria*については、MLSTプロトコールが公開(<https://pubmlst.org/cdiphtheriae/>)されていることから、MLST解析結果の集約が進んでいるが、*C. ulcerans*についてはKonigら²⁵⁾によ

て報告されている方法や今回用いたKastukawaraらの方法等、様々報告されているものの国際的に標準化されておらず、今後MLST解析方法の標準化及び解析データの収集・蓄積が望まれる。

動物由来感染症を予防するため、所有者不明のイヌやネコなどと接触した際には、手指の洗浄や消毒を行うことが励行されている⁹⁾。本調査において、飼育ネコから*C. ulcerans*が分離されたことは注目に値する。当該ネコについては、適切な投薬治療を実施し、約2カ月後にフォローアップ検査を実施して陰性であることを確認している。ネコを飼育する場合には、完全屋内飼育にするなどの飼育環境を適正に保つこと、飼育ネコと触れ合った直後にも手指洗浄を励行する必要があると考えられた。また、常に自身の所有する愛玩動物の健康状態に気を配り、必要に応じて動物病院を受診することで、飼育ネコだけでなくヒトに対する*C. ulcerans*感染予防対策に繋がると考えられる。

まとめ

- 1 平成30年度愛媛県動物由来感染症予防体制整備事業において、動物病院を受診した飼育ネコと動物愛護センターに収容された野良ネコを対象に*C. ulcerans*の保有状況を調査した結果、92件中5件(5.4%)から毒素原性*C. ulcerans*が分離された。
- 2 本県で飼育ネコを対象とした調査は初めてであり、32件中1件(3.1%)から毒素原性*C. ulcerans*が分離された。
- 3 分離された5株のMLSTによる分子疫学解析の結果、今回愛媛県で分離された菌株は、全て日本全国で見られるST1であった。
- 4 飼育ネコが屋外環境との接触により、本菌を保有するに至った可能性が示唆された。
- 5 本菌の感染予防のためには手指の洗浄等を行うとともに、愛玩動物の行動や健康状態を注視することも重要である。

本調査は、平成30年度愛媛県動物由来感染症予防体制整備事業における病原体保有状況調査の一環で実施された。

文献

- 1) 高橋元秀: 日獣会誌, 63, 813-818(2010)
- 2) Homme J et al: J Clin Microbiol, 37, 954-957(1999)
- 3) Fox JG et al: Lab Anim Sci, 24, 820-822(1974)
- 4) Tejedor MT et al: Can Vet J, 41, 126-127(2000)
- 5) Seto Y et al: Jpn J Infect Dis, 61, 116-122(2008)
- 6) Katsukawa C et al: BMC Res Notes, 9, 181-186(2016)
- 7) Zakikhany K et al: Future Microbiol, 7, 595-607(2012)
- 8) 畑中ら: 病原微生物検出情報, 23(3), 61-61(2002)
- 9) 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)
- 10) Otsuji K et al: JMM Case Reports (2017) doi: 10.1099/jmmcr.0.005106
- 11) 浅野由紀子ほか: 愛媛県立衛生環境研究所年報, 12, 1-7(2009)
- 12) Nakao H et al: J Clin Microbiol, 35, 1651-1655(1997)
- 13) Komiya T et al: J Med Microbiol, 59, 1497-1504(2010)
- 14) Knapp A et al: J Med Res, 12(4), 475-478(1904)
- 15) Stephen D Elek: J clin path, 2, 250-259(1949)
- 16) 国立感染症研究所感染症情報センター: ジフテリア予防対策マニュアル, <http://idsc.nih.go.jp/disease/diphtheria/manual.html>
- 17) Katsukawa C et al: Microbiol Immunol, 60, 177-186(2016)
- 18) 鳥谷竜哉ほか: 愛媛県立衛生環境研究所年報, 13, 1-6(2010)
- 19) 若松正人ほか: 病原微生物検出情報, 31(7), 204-205(2010)
- 20) 中嶋洋ほか: 病原微生物検出情報, 31(7), 206-207(2010)
- 21) Katsukawa C et al: J Med Microbiol, 61, 266-273(2012)
- 22) 下野生世ほか: 徳島県立保健製薬環境センター年報, 2, 11-14(2012)
- 23) 梅田薫ほか: 日獣会誌, 68, 765-769(2015)
- 24) 国立感染症研究所: ジフテリアとは, IDWR 第14号(2002)
- 25) König C et al: J Clin Microbiol, 52, 4318-4324(2014)