

名古屋市内で飼育されている猫の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調査

はじめに

ジフテリアとは、ジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheriae*)を病原体とするジフテリア毒素によって起こる人の上気道粘膜感染症である。国内のジフテリアは 1945 年に約 9 万人の届出数であったが、最近 10 年間(1996-2005 年)で 6 人になるまで著しく減少した。しかし近年、ジフテリア様の臨床症状を呈する患者から *Corynebacterium ulcerans* (以下 *C. ulcerans*) が分離され新たな問題となっている。

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知られている。本菌にはジフテリア毒素産生能を持ったものがあり、人に感染してジフテリア様疾患を引き起こす場合がある。その感染源のひとつとして我々の身近な動物である犬や猫があげられている。

そこで今回は名古屋市における飼い猫のジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* の保有状況を調べることでヒトへの感染防止策の一助となると考え、調査を実施した。

調査材料および調査方法

1 調査施設

名古屋市内に施設を持つ名古屋市獣医師会会員病院、19 施設に採材を依頼した。

2 調査期間

調査期間は、平成 22 年 8 月 21 日から平成 22 年 10 月 8 日とした。

3 調査材料

各診療施設に来院した飼猫の咽頭ぬぐい液もしくは鼻汁、合計 96 検体。

4 調査方法

検査は *C. ulcerans* の分離培養を一般財団法人阪大微生物病研究会に、毒素原性試験を国立感染症研究所 細菌第二部(高橋 元秀氏)に依頼した。

A. 猫鼻汁および咽頭ぬぐい液からの *C. ulcerans* 分離培養法

1. 採取検体は輸送培地・COPAN で室温にて保存輸送する。
2. 改良変法荒川培地、5%羊血液加 Columbia 寒天培地に、検体を塗布し、白金耳で分離する。
3. 5%CO₂、35℃で 48 時間培養する。
4. 改良変法荒川培地で黒色の集落、5%羊血液加 Columbia 寒天培地で白色の集落を純培養する。
5. 発育した集落をグラム染色する。
6. グラム染色の結果、グラム陽性桿菌であれば Api CORYNE を使用して同定する。

B. *C. ulcerans* の分離培養後のジフテリア毒素原性試験

I. ジフテリア毒素遺伝子を検出する方法 (QIA amp DNA Blood Mini Kit キアゲン(株)Cat. No. 51104を用いた方法)。

1. コロニーから1 μ lループ採取して滅菌精製水1 mlに浮遊させ、5 分間ミキサーにかける。
2. 15,000 rpm, 5 分間 遠心する。
3. 沈渣にTE Buffer (pH8.0) 180 μ lと100 mg/ml Lysozyme 4 μ l を加え、37°C, 1 時間処理する。
4. AL Buffer 200 μ lとProtease 25 μ lを加えて50°C, 2 時間処理する。
5. 95°C, 30 分間加温後、10,000 rpm, 数秒遠心する。
6. 純エタノール210 μ lを加え、ミキサーに数秒かける。
7. キットのカラムに全量移し、9,500 rpm, 1 分間遠心する。
8. AW 1 Buffer 500 μ l加え、9,500 rpm, 1 分間遠心する。
9. AW 2 Buffer 500 μ l加え、9,500 rpm, 1 分間遠心する。
10. 70°CのAE Buffer 200 μ l加え、70°C, 5分加温する。
11. 9,500 rpm, 1 分間遠心する。

得られたDNAテンプレート5~15 μ lを用いて試薬の説明書に従って反応させる。

12. サーマルサイクラーの条件

- ① 95.0 °C, 2 分
- ② 95.0 °C, 20 秒
- ③ 55.0 °C, 30 秒
- ④ 72.0 °C, 1 分
- ⑤ 72.0 °C, 10 分
- ⑥ 4.0 °C, ∞

②③④を35 サイクル行う。

13. 電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UV トランスイルミネーター上でカメラ撮影し、判定する。(248 bp の位置のバンドが、ジフテリア毒素遺伝子)

II. ジフテリア抗毒素を検出する方法 (培養細胞法 (Vero細胞法))

材料

1. 組織培養用マイクロプレート 平底, 96 wells (上から下にA, B, C, D, E, F 列とする)
2. 3% CS イーグルMEM Medium
3. VERO細胞: 75ml培養ビンにフルシート細胞を使用。(継代培養後4~5日目)
4. 検体: レフレル培養上清 (0.5-1.0ml 回収できる)を 15,000 rpm, 5 ~10 分遠心し、上清を0.22 μ m のフィルターで濾過処理。
5. 陽性コントロール: ジフテリア試験毒素 Lot. M59(1.6×10^5 CD₅₀/バイアル) 3%CS イーグルMEM Medium 10 ml で溶解し、4°Cに保存する。
6. 標準ジフテリア抗毒素 ST-AT Lot. 10 (94 IU/Amp.) 中和試験に用いる。

3%CS イーグル MEM Medium で希釈して、10 IU/ml で使用。

7. 0.01% EDTA in PBS

8. 2.5 % トリプシン in PBS

方法

1. A, C の第 1well に検体 (1x) を 50 μ l ずつ入れる。

2. B, D の第 1well にジフテリア試験毒素 (16 CD₅₀/25 μ l) を 50 μ l ずつ入れる。

3. A, B, C, D の第 2well～第 8well に 3% CS Medium を 25 μ l ずつ入れる。

4. E: 細胞対照の well には、3% CS Medium を 150 μ l ずつ入れる。

5. F: 培地対照の well には、3% CS Medium を 200 μ l ずつ入れる。

6. A, B, C, D の第 1well～第 8well まで、25 μ l の 2 倍連続希釈を行う。

7. A, B の well には、全て 3 % CS Medium を 25 μ l ずつ入れる。

8. C, D の well には、全て標準ジフテリア抗毒素 (10 IU/ml) を 25 μ l ずつ入れる。

すみやかにミキサーに 10 秒位かけて、37℃30 分反応させる。

9. 4 日間培養しておいた VERO 細胞の培養上清を捨て、0.01 %EDTA in PBS 18 ml と、
2.5 %トリプシン in PBS 2 ml を加えて、37℃10 分 静置する。

10. 細胞をピペットではがし、50 ml コニカルチューブ に全量を移し、3%CS Medium
を 20 ml 加えて混和後、1,000 rpm 5 分遠心する。

11. 上清を捨て、3 % CS Medium 10 ml を加えて細胞を再浮遊させる。

12. 3 % CS Medium で、(11) の細胞数を血球計算盤でカウントして、300,000cells/ml
分注になるように (11) 液を 3%CS イーグル MEM Medium で希釈して、50 μ l ずつ分注す
る。更に 3%CS イーグル MEM Medium を 100 μ l ずつ分注して、炭酸ガス培養器で、4～
5 日間培養する。

13. 細胞の生死を判定する。

調査対象件の環境調査

1 飼育動物

① 品種 _____

② 性別 ☐オス ☐メス

③ 年齢 _____歳

④ 健康状態

⑤ 検査情報 FIV FeLV FCoV

⑥ 検体採取部位 ☐咽頭 ☐鼻汁

2 飼育状況

① 飼育場所 ☐室内 ☐屋外 ☐自由

② 他の動物の飼育状況

③ ノラ猫との接触 ☐有（多・少） ☐無

3 飼育者の住居

① 住居区（名古屋市_____区）

② 住居（☐一戸建 ☐マンション・アパート ☐その他）

結果

今回調査を行った 96 検体のうち、1 検体で *C. ulcerans* が分離されたがジフテリア毒素原性試験は陰性であった。

よって、96 検体全てにおいてジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* は検出されなかった。

検体結果と飼育状況および環境に関する調査結果は表 1 に示した。

考察

C. ulcerans は 1928 年に Gilbert と Stewart によって発見され、ヒトにはジフテリア様の症状をきたす感染症の原因菌として海外では比較的よく知られている。本菌による症例報告では、人獣共通感染症として、牛や羊との接触や、その非加熱処理の乳製品から感染したものと、感染経路が不明であるとされているものが報告されている。

国内におけるヒトの *C. ulcerans* 感染事例は、2001 年から 2010 年 12 月までに 8 例の報告がある。症状としては、発熱や咽頭痛、咳、偽膜等のジフテリア同様のものが報告されている。2001 年と 2002 年に報告されたものは千葉県の同地区であるが、その他は岡山県、大分県、神奈川県、東京都とさまざまである。これら国内の感染事例では多くが感染経路は不明であったが 2009 年に報告された事例では、患者が発症する以前よりその患者が餌を与えていた野良猫がくしゃみ等の風邪様症状を呈し、その数日後に患者が咽頭炎等を発症した経緯があり、その猫からも患者同様のジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が分離されていることから猫からの感染の可能性が高いと考えられている [1]。

動物に対する調査としては 2008 年に大阪の犬 65 頭に対する調査報告があり、そのうち 1 頭で国内では初めてとなるジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が分離同定されている [2]。また、2009 年大分では犬 5 頭から [3]、愛媛県では犬 1 頭、猫 4 頭から [4]、岡山県では猫 5 頭から [5] ジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が分離同定されている。

今回我々の調査では 96 頭の猫を調査したが、ジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* は検出されなかった。この結果から、名古屋市内における飼い猫のジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* の保菌率は低いとも推測されるが、今回調査された猫の約 64% が室内飼いであり、約 55% が同居動物以外の動物との接触がない。また、約 62% で症状のない健康な猫から検体が採取されていることから、今回のように名古屋市内の動物病院に来院する猫を主体とした調査ではなく、屋外で生活する猫や咳やくしゃみ、鼻汁といった風邪様症状を呈した猫を主体とする調査を行えば今回とは違った調査結果が得られる可能性がある。

よって、今回の調査では全例陰性であったものの、我々獣医師はジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* の存在を十分に認識し、飼い主に対しても啓蒙していく必要があると思われる。

参考資料

- [1] 野口佳裕、角田篤信、喜多村 健、小宮貴子、山本明彦、高橋元秀：
Corynebacterium ulcerans 感染による急性鼻咽頭炎を呈した 1 例、(国立感染症研究所 病原微生物検出情報 Vol. 30 p. 188-189、2009)
- [2] 勝川千尋、河原隆二、井上 清、石井篤嗣、山岸寛明、木田一裕、西野俊治、長濱伸也、小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀：
本邦で初めてイヌから分離されたジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans*、(国立感染症研究所 病原微生物検出情報 Vol. 29 p. 51-51 2008)
- [3] 若松正人、人見 徹、成松浩司、緒方喜久代、小河正雄、小宮貴子：
大分県におけるイヌ・ネコの *C. ulcerans* 保菌状況 (国立感染症研究所 病原微生物検出情報 Vol. 31 p. 204-205 2010)
- [4] 佐々木俊哉、木村琴葉、岩崎 靖、勇 孝徳、望月昌三、豊島千俊、小宮貴子：
愛媛県におけるイヌ・ネコの *C. ulcerans* 保菌状況 (国立感染症研究所 病原微生物検出情報 Vol. 31 p. 205-206 2010)
- [5] 中嶋 洋、大畠律子、石井 学、岸本寿男、木本有美、木口 修、赤木敏文、瀧本良幸、鳥越秀二、勝川千尋、小宮貴子：
岡山県におけるイヌ・ネコの *C. ulcerans* 保菌状況 (国立感染症研究所 病原微生物検出情報 Vol. 31 p. 206-207 2010)

(表1)飼育状況ならびに環境に関する調査一覧

飼育猫														飼育状況			飼育者		結果	
	種類	性別	年齢	健康状態	検査情報	検体採取部位	飼育場所	他の動物	野良猫との接触	住居区	住居	分離培養	毒素原性試験							
1	雑種	オス	2歳	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内	猫2	有 少	千種	一戸建	陰性								
2	アメリカンショートヘア	メス	15歳	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内	猫1犬4インコ	無	千種	一戸建	陰性								
3	雑種	オス	13歳	良	FIV(+)-FeLV(-)	咽頭	室内	猫2	有 少	千種	一戸建	陰性								
4	雑種	オス	4歳	良	FIV(-)FeLV(-)	鼻汁	室内	猫12犬2	有 多	千種	一戸建	陰性								
5	雑種	メス	4歳	良	FIV(-)FeLV(-)	鼻汁	室内	猫1犬4	有 少	千種	一戸建	陰性								
6	雑種	オス	2ヶ月	不良		鼻汁	室内		有 少	東	一戸建	陰性								
7	スコティッシュホールド	オス	1歳	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内	猫5	無	北	一戸建	陰性								
8	雑種	メス	2歳	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内	猫3犬1	無	北	一戸建	陰性								
9	雑種	オス	10歳	不良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内	犬1	無	北	一戸建	陰性								
10	アメリカンショートヘア	オス	14歳	良		咽頭	自由		有 少	西	一戸建	陰性								
11	雑種	オス	10歳	良		咽頭	自由	猫1犬2	無	西	一戸建	陰性								
12	雑種	メス	4歳	良	FIV(-)FeLV(-)	鼻汁	室内	猫13	無	西	アパート・マンション	陰性								
13	雑種	オス	11歳	良		咽頭	室内		無	西	一戸建	陰性								
14	雑種	メス	10歳	やや不良		鼻汁	室内	猫13	無	西	アパート・マンション	陰性								
15	雑種	オス	5ヶ月	良	FIV(-)FeLV(+)-FCoV(400倍)	鼻汁	室内	猫1	無	西	アパート・マンション	陰性								
16	雑種	オス	6ヶ月	良		咽頭	室内	犬1	無	西	一戸建	陰性								
17	雑種	オス	4ヶ月	良		鼻汁	室外		有 多	西	一戸建	陰性								
18	雑種	オス	3歳	良	FIV(-)FeLV(-)	鼻汁	室内	猫1犬1	有 少	中村	一戸建	陰性								
19	雑種	メス	15歳	良		咽頭	室内	猫多数	無	中村	一戸建	陰性								
20	雑種	オス	14歳	良		鼻汁	室内		無	中村	アパート・マンション	陰性								
21	雑種	メス	10歳	良	FIV(-)FeLV(-)	鼻汁	室内		無	中村	一戸建	陰性								
22	雑種	オス	9歳	良	FIV(+)-FeLV(-)	鼻汁	自由	猫5	有 多	中村	一戸建	陰性								
23	雑種	オス	1.5ヶ月	良	FIV(-)FeLV(-)	鼻汁	室内	猫1	無	中	アパート・マンション	陰性								
24	雑種	メス	1歳	良	FIV(-)FeLV(-)-FCoV(-)	鼻汁	室内	猫1犬1	無	中	アパート・マンション	陰性								
25	雑種	オス	3ヶ月	やや不良		鼻汁	室内	猫1	無	中	アパート・マンション	陰性								
26	雑種	メス	3ヶ月	やや不良		鼻汁	室内	猫1	無	中	アパート・マンション	陰性								
27	雑種	オス	8歳	良		咽頭	室内		無	昭和	一戸建	陰性								
28	雑種	メス	10歳	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内		無	昭和	一戸建	陰性								
29	雑種	メス	10歳	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内		無	昭和	一戸建	陰性								
30	雑種	メス	16歳	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内		無	昭和	一戸建	陰性								
31	雑種	メス	10歳	やや不良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内		無	昭和	一戸建	陰性								
32	ベンガル	メス	1歳	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内		無	昭和	一戸建	陰性								
33	雑種	オス	8歳	やや不良		鼻汁	自由		有 少	瑞穂	一戸建	陰性								
34	雑種	オス	15歳	不良		鼻汁	自由	猫1	有 少	瑞穂	一戸建	陰性								
35	雑種	オス	4歳	良		咽頭	室外	猫多数	有 多	瑞穂	アパート・マンション	陰性								
36	雑種	オス	12歳	不良		鼻汁	室内	猫多数	有 多	瑞穂	アパート・マンション	陰性								
37	雑種	オス	2歳	不良		鼻汁	室内	猫1	無	瑞穂	一戸建	陰性								
38	雑種	オス	12歳	良		鼻汁	室内	猫3	無	瑞穂	一戸建	陰性								
39	雑種	メス	4ヶ月	良		咽頭	室内	猫3	無	熱田	一戸建	陰性								
40	雑種	オス	6ヶ月	良		咽頭	室内	猫9犬2	無	熱田	一戸建	陰性								
41	雑種	メス	1歳	良		咽頭	自由	猫9犬3兎鶏	有 多	熱田	一戸建	陰性								
42	雑種	メス	1歳	良		咽頭	室内	猫1	無	熱田	一戸建	陰性								
43	チンチラ	メス	11歳	不良		咽頭	室内		無	熱田	アパート・マンション	陰性								
44	日本猫	メス	6ヶ月	良		咽頭	室内		無	熱田	アパート・マンション	陰性								
45	雑種	オス	不明	良	FIV(-)FeLV(-)	鼻汁	室外	犬1	有 多	中川	一戸建	陰性								
46	雑種	オス	5ヶ月	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	自由	猫10	有 多	中川	一戸建	陰性								
47	雑種	オス	5ヶ月	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内	猫2	有 少	中川	一戸建	陰性								
48	雑種	メス	4歳	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内	猫2	有 少	中川	一戸建	陰性								
49	雑種	オス	15歳	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内		無	中川	一戸建	陰性								
50	雑種	メス	10歳	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内	猫2犬1	無	中川	一戸建	陰性								
51	ロシアンブルー	オス	6ヶ月	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内		無	港	一戸建	陰性								
52	スコティッシュホールド	メス	11歳	良		咽頭	室内	猫1	無	港	一戸建	陰性								
53	雑種	オス	不明	良		咽頭	室外	猫多数	有 多	港	一戸建	陰性								
54	雑種	オス	3ヶ月	良		鼻汁	室内	猫1	無	港	一戸建	陰性								
55	雑種	メス	不明	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室外	猫1	有 多	港	一戸建	陰性								
56	ロシアンブルー	メス	7ヶ月	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室外	猫1	無	港	アパート・マンション	陰性								
57	雑種	オス	6ヶ月	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内	猫11犬2	有 少	港	一戸建	陰性								
58	雑種	オス	11歳	やや不良	FIV(+)-FeLV(-)	鼻汁	室内	猫5	有 少	港	一戸建	陰性								
59	日本猫	オス	4歳	良	FIV(-)FeLV(-)-FCoV(400倍)	咽頭	自由	猫6	有 多	南	一戸建	陰性								
60	日本猫	オス	19歳	良		咽頭	自由		有 多	南	一戸建	陰性								
61	日本猫	オス	10歳	良	FIV(-)FeLV(+)-FCoV(800倍)	咽頭	自由		有 多	南	一戸建	陰性								
62	日本猫	オス	7歳	良	FIV(-)FeLV(+)-FCoV(400倍)	咽頭	自由	猫7	有 多	南	一戸建	陰性								
63	日本猫	オス	4歳	良	FIV(-)FeLV(-)-FCoV(100倍)	咽頭	自由	猫7	有 多	南	一戸建	陰性								
64	日本猫	メス	4歳	良	FIV(-)FeLV(-)-FCoV(100倍)	咽頭	自由	猫7	有 多	南	その他	陰性								
65	雑種	メス	不明	良		咽頭	室外		有 多	南	一戸建	陰性								
66	雑種	メス	1歳	良		咽頭	室内		無	南	アパート・マンション	陰性								
67	雑種	メス	不明	良		咽頭	室外		有 多	南	一戸建	陰性								
68	雑種	オス	6ヶ月	良		咽頭	室内		無	南	一戸建	陰性								
69	雑種	オス	6ヶ月	良		咽頭	室内		無	南	一戸建	陰性								
70	雑種	オス	15歳	良		咽頭	室内	猫2	無	南	一戸建	陰性								
71	雑種	メス	1歳	良		咽頭	室内	猫3犬4	無	緑	一戸建	陰性								
72	雑種	メス	1歳	良		咽頭	室外		有 多	守山	一戸建	陰性								
73	チンチラ	オス	13歳	良		咽頭	自由		有 少	守山	一戸建	陰性								
74	雑種	オス	19歳	良		咽頭	室内		無	守山	一戸建	陰性								
75	雑種	オス	14歳	良		鼻汁	自由		無	守山	一戸建	陰性								
76	雑種	メス	4ヶ月	良		咽頭	室外		有 多	守山	アパート・マンション	陰性								
77	雑種	メス	20歳	不良		鼻汁	自由		有 少	守山	一戸建	陰性								
78	雑種	メス	3歳	良	FIV(-)FeLV(-)	鼻汁	室内	猫3	無	名東	一戸建	陰性								
79	雑種	メス	10歳	良	FIV(-)FeLV(-)	咽頭	室内	猫3	無	名東	一戸建	陰性								
80	雑種	メス	2ヶ月	良		鼻汁	自由	犬1	有 多	名東	アパート・マンション	陰性								
81	雑種	メス	10歳	良		鼻汁	室内	犬1	無	名東	アパート・マンション	陰性								
82	雑種	メス	7歳	良		鼻汁	室外	猫5	有 多	名東	一戸建	陰性								
83	雑種	メス	3歳	良		鼻汁	室外	猫5	有 多	名東	一戸建	陰性								
84	雑種	オス	6ヶ月	良		咽頭	室内		無	名東	一戸建	陰性								
85	雑種	オス	1歳	良		咽頭	室内	猫1	無	名東	アパート・マンション	陰性								
86	雑種	メス	1.5歳	良		咽頭	室内		無	名東	アパート・マンション	陰性								
87	日本猫	オス	18歳	良		鼻汁	室内		無	名東	アパート・マンション	陰性								
88	雑種	オス	15歳	良		鼻汁	室内		無	名東	アパート・マンション	陰性								
89	雑種	メス	4ヶ月	良		咽頭	室外		有 多	名東	一戸建	陰性								
90	雑種	メス	6ヶ月	良		咽頭	自由	猫1犬1	有 少	名東	一戸建	陰性								
91	日本猫	オス	8歳	不良	FIV(-)FeLV(-)	鼻汁	自由	猫2	有 多	天白	一戸建	陰性								
92	ベルシャ	メス	16歳	良	FIV(-)FeLV(-)	鼻汁	室内		無	天白	一戸建	陽性	陰性							
93	日本猫	メス	9歳	不良	FIV(+)-FeLV(+)	鼻汁	自由	猫1	有 少	天白	一戸建	陰性								
94	日本猫	メス	6歳	良		咽頭	室内		無	天白	アパート・マンション	陰性								
95	日本猫	オス	9歳	良		鼻汁	自由	猫2	有 少	天白	一戸建	陰性								
96	日本猫	メス	5歳	良		咽頭	自由		有 少	天白	一戸建	陰性								