

## ***Corynebacterium ulcerans* 遺伝子検査法の検討**

畠山 薫, 橋本 志津, 藤元 琢也, 高橋 正樹, 奥野 ルミ, 長澤 昭範, 貞升 健志, 甲斐 明美

### **Investigation of Genetic Methods for *Corynebacterium ulcerans***

Kaoru HATAKEYAMA, Shizu HASHIMOTO, Takuya FUJIMOTO, Masaki TAKAHASHI  
Rumi OKUNO, Akinori NAGASAWA, Kenji SADAMASU and Akemi KAI

## *Corynebacterium ulcerans* 遺伝子検査法の検討

畠山 薫<sup>\*1</sup>, 橋本志津<sup>\*4</sup>, 藤元琢也<sup>\*1</sup>, 高橋正樹<sup>\*2</sup>, 奥野ルミ<sup>\*1</sup>, 長澤昭範<sup>\*4</sup>, 貞升健志<sup>\*1</sup>, 甲斐明美<sup>\*3</sup>

動物からヒトへ感染が示唆されているジフテリア様毒素産生 *Corynebacterium ulcerans* の遺伝子検査法として、リアルタイムPCR法による *C. ulcerans* の *DLT* 遺伝子, *pID* 遺伝子の検出法を開発した. *DLT* 遺伝子検出リアルタイムPCR法は, *C. ulcerans* の *DLT* 遺伝子ならびに *C. diphtheriae* の *DT* 遺伝子も検出可能であり, ジフテリア様疾患患者発生時には, 迅速な検査対応が可能となった. また, 2009年に, 都内で飼育されているイヌ, ネコ102頭103検体の咽頭スワブ等をリアルタイムPCR法ならびに分離培養法で検査を行ったところ, *C. ulcerans* は検出されなかった.

**キーワード:** *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium diphtheriae*, リアルタイムPCR法, *DLT* 遺伝子, *pID* 遺伝子, イヌ, ネコ

### はじめに

*Corynebacterium ulcerans* は, *Corynebacterium* 属に属するグラム陽性, 好気性桿菌で, 主にウシの乳房炎や各種動物の化膿性炎症を引き起こすことが知られている<sup>1-3)</sup>.

通常, *C. ulcerans* は毒素を産生しないが, ごく一部でジフテリア菌 (*C. diphtheriae*) が産生するジフテリア毒素 (diphtheria toxin : DT) と類似する毒素 (diphtheria like toxin : DLT) を産生する株の存在が知られており, この *DLT* 産生 *C. ulcerans* が人に感染すると咽頭, 喉頭, 鼻などの上気道に偽膜性炎症等のジフテリア様疾患を引き起こすことがある.

*C. ulcerans* による人のジフテリア様疾患は, 欧米諸国で散発患者の報告があり, それらのうち, ウシ, イヌ等の動物からの感染が疑われる症例も報告されている<sup>4-9)</sup>.

日本では, 2001年にジフテリア症状を示した患者の咽頭から, *DLT* 産生 *C. ulcerans* の分離報告<sup>10)</sup> がされて以降, 2010年4月までに合計6事例の患者報告<sup>11,12)</sup> がされている. それらの患者らは, 海外の患者報告同様に動物との接触歴があり, 動物からの感染が疑われていたが, 1例から5事例目までは, 動物の検査は行われていなかった. 2009年1月に東京都内のジフテリア様患者から *C. ulcerans* が分離された6事例目<sup>12)</sup>では, 患者が屋外で飼育していた猫からも *C. ulcerans* が分離されており, 動物からの感染が示唆された国内初の症例であった.

動物の疫学調査では, 国立感染症研究所の高橋らのグループが, 家畜, 犬, 猫等の咽頭からの *DLT* 産生 *C. ulcerans* の保菌調査を行っており, 2007年7月には, 大阪で健康な犬の咽頭から *DLT* 産生 *C. ulcerans* の初めての分離報告がなされている<sup>13)</sup>.

ジフテリア感染症は, 感染症法上二類感染症で全数把握疾患である. *DLT* 産生 *C. ulcerans* は, 動物から感染する可

能性が示唆されてはいるものの, ジフテリアの原因菌ではないため, 届出報告義務が無く, 人ならびに動物の疫学情報が乏しい.

このため, 今回, *C. ulcerans* の検査の一助とすることを目的に, *DLT* 産生 *C. ulcerans* の保有する *DLT* 遺伝子, *C. ulcerans* が産生し, 病原因子の一つである phospholipase D (*pID*)<sup>14)</sup> の産生に関与する *pID* 遺伝子を検出する遺伝子検査法を検討したので報告する.

### 材料および方法

#### 1. リアルタイムPCR法の検討

##### 1) *DLT* 遺伝子検出用リアルタイムPCR法

GeneBankに登録されている *C. ulcerans* の *DLT* 遺伝子配列 AB304278, AB304279, AB304280, AB498872, AY141013, AY141014, AY1703827 をもとに Primer Express2.0 (Applied Biosystems:ABI) を用いて, プライマーおよび蛍光プローブ (TaqMan プローブ法) を設計した (表1, 図1).

##### 2) *pID* 遺伝子検出用リアルタイムPCR法

GenBankに登録されている *C. ulcerans* の *pID* 遺伝子配列 AB304281, AB304282, AB304283, AB304284, AB304285, AB304286 をもとに, *C. ulcerans* を特異的に検出するプライマー (SYBR法) を設計した (表1, 図2).

##### 3) 遺伝子抽出方法とリアルタイムPCR法の条件

Brain Heart Infusion Broth (Difco) で37°C, 18時間培養した各菌液を10倍段階希釈し, 原液および  $10^{-1}$ ~ $10^{-7}$  の希釈系列を作成し, 各々の希釈菌液から 100  $\mu$ l ずつ DNA 抽出を行ったものと, 100  $\mu$ l ずつシードスワブ3号 (栄研) に添加浸透させた後に, DNA 抽出を行ったものについて, *DLT* 遺伝子, *pID* 遺伝子の検出をリアルタイムPCR法で行った. DNA 抽出は, Pure Gene (QIAGEN) を用いて行い,

\*1 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

\*2 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

\*3 東京都健康安全研究センター微生物部

\*4 Pet Clinic アニホス

表 1. *C. ulcerans* 検出用リアルタイム PCR 法用プライマーおよび MGB プローブ

遺伝子領域	プライマー, プローブ名	塩基配列 (5'-3')
<i>DLT</i> 遺伝子	CuToxF	5'-CGGGCAGCACATAAAAATTACTG-3'
	CuToxR	5'-ACGTCCAGCTTTCCAGGAATAG-3'
	CuToxT	5'-FAM-TTCCAATCGCGGGTGTCTACTACCG-MGB-3'
<i>pID</i> 遺伝子	UT6P054F	5'-TGTAGGAAATGCGGTACGAAC-3'
	UT6P122R	5'-ACCCGGTGAGCAATCG-3'

```

AB304278 1261 : GCC AGT TGG AAC ACT GTT GAA GAT TCG ATA ATC AAA ACT GGT TTT CAA GGC GAG AGC GGC : 1320
AB304279 1261 : ... .. : 1320
AB304280 1261 : ... .. : 1320
AB498872 1261 : ... .. : 1320
AY141013 1261 : ... .. : 1320
AY141014 1261 : ... .. : 1320
AY703827 1261 : ... .. : 1320

AB304278 1321 : CAC GAC ATA AAA ATT ACT GCT GAA AAT ACC CCG CTT CCA ATC GCG GGT GTC CTA CTA CCC : 1380
AB304279 1321 : ... ..T ... .. : 1380
AB304280 1321 : ... .. : 1380
AB498872 1321 : ... .. : 1380
AY141013 1321 : ... .. : 1380
AY141014 1321 : ... .. : 1380
AY703827 1321 : ... .. : 1380
                CuToxF                                CuToxT

AB304278 1381 : ACT ATT CCT GGA AAG CTG GAC GIT AAT AAG TCC AAG ACT CAT ATT TCC GTA AAT GGT CGA : 1440
AB304279 1381 : ... .. : 1440
AB304280 1381 : ... ..C ... .. : 1440
AB498872 1381 : ... ..C ... .. : 1440
AY141013 1381 : ... .. : 1440
AY141014 1381 : ... .. : 1440
AY703827 1381 : ... .. : 1440
                CuToxR
    
```

図 1. リアルタイム PCR 法用プライマー, プローブの位置 (*DLT* 遺伝子)

```

AB304281 1 : ATG AAG AAA AAA GTT GTT TTA TTC TTA TCT ATA ATT ATG GGA ATC TTA CTT CCT GTA GGA : 60
AB304282 1 : ... .. : 60
AB304283 1 : ... .. : 60
AB304284 1 : ... .. : 60
AB304285 1 : ... .. : 60
AB304286 1 : ... .. : 60

AB304281 61 : AAT GCG GTA GCA ACG CCT GTT TCA CAT GAC GCA GCT TCC ACA GGA AAC CGA CCC GTT TAT : 120
AB304282 61 : ... .. : 120
AB304283 61 : ... .. : 120
AB304284 61 : ... .. : 120
AB304285 61 : ... .. : 120
AB304286 61 : ... .. : 120
                UP6T054

AB304281 121 : GCG ATT GCT CAC CGG GTC CTC ACT ACC CAA GGC GTA GAC GAT GCA GTC GCA ATT GGC GCG : 180
AB304282 121 : ... .. : 180
AB304283 121 : ... .. : 180
AB304284 121 : ... .. : 180
AB304285 121 : ... ..A ..T ... .. : 180
AB304286 121 : ... .. : 180
                UP6T122
    
```

図 2. リアルタイム PCR 法用プライマーの位置 (*pID* 遺伝子)

表 2. 供試した *Corynebacterium* 属菌株

菌株番号	菌名	毒素産生
2009050176	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	+
JCM10387	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	-
TB-6	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (gravis)	+
TB-11	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (mitis)	-
JCM9389	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	-

表 3. リアルタイム PCR 法による *C.ulcerans* 関連遺伝子の検出感度

使用菌株	DLT 遺伝子		pID 遺伝子	
	菌液	スワブ	菌液	スワブ
200905176	$6.8 \times 10^2$ cfu/ml	$6.8 \times 10^4$ cfu/ml	$6.8 \times 10$ cfu/ml	$6.8 \times 10^3$ cfu/ml
JCM10387	—	—	$4.7 \times 10^2$ cfu/ml	$4.7 \times 10^3$ cfu/ml
TB-6	$2.5 \times 10^2$ cfu/ml	$2.5 \times 10^6$ cfu/ml	—	—
TB-11	—	—	—	—
JCM9389	—	—	—	—

DLT 遺伝子検出リアルタイムPCRには、抽出液 100  $\mu$ l 中 3  $\mu$ l を、pID 遺伝子検出リアルタイムPCRには抽出液 100  $\mu$ l 中 2  $\mu$ l のDNA抽出物を鋳型として用いた。また、リアルタイムPCR 法は PRISM7900HT (ABI)を用い、50°C 2 分、95°C 10 分の後、95°C15秒、60°C 1 分の PCR 反応を 35 サイクルおこなった。SYBR 法は PCR 反応後、融解曲線を求め、増幅産物の確認を行った。

#### 4) リアルタイムPCR法の検出感度の比較

表 2 に示した DLT 産生 *C.ulcerans* (2009050176), DLT 非産生 *C.ulcerans* (JCM10387), DT 産生 *C.diphtheriae* (TBR6), DT 非産生 *C.diphtheriae* (TBR10) ならびに *C.pseudotuberculosis* (JCM9389) の 5 株の培養菌液の原液ならびに段階希釈菌液を用いて、リアルタイム PCR 法の検出感度の比較を行った。

## 2. イヌ, ネコ からの *C. ulcerans* の検出

### 1) 検査対象

2009 年 5 月から 7 月に、都内動物病院で採取したイヌ 71 頭 72 検体, ネコ 31 頭 31 検体の合計 102 頭 103 検体を対象に、*C.ulcerans* の分離ならびに遺伝子検出を試みた。咽頭ぬぐい液は、シードスワブ 3 号を用いて採取した。また、口腔内に潰瘍等を認めたものは、その部位のぬぐい液も同様に採取した。

### 2) 分離培養法

*C.ulcerans* の分離は、5%羊脱繊維血液加 Brain Heart Infusion 寒天 (BHIA) 培地 (Difco), 2%亜テルル酸 5%羊脱繊維血加 Brain Heart Infusion 寒天 (TBHIA) 培地を用いた。検体スワブを塗布後、BHIA 培地は 37°C24 時間、TBHIA 培地は 48~72 時間培養を行った。BHIA 培地、TBHIA 培地で *Corynebacterium* 属菌を疑うコロニーは、グラム染色、各種性状確認試験を行った。グラム陽性桿菌で、オキシダーゼ陰性、カタラーゼ陽性、5%羊脱繊維血液加血液寒天 (BA) 培地 (OXID) で  $\beta$  溶血を示すコロニーは、アピコリネキット (シスメックス・ビオメリユー) で同定を行うと同時に、リアルタイム PCR 法で DLT 遺伝子、pID 遺伝子の検出を行った。

### 3) 遺伝子抽出方法と検出

シードスワブならびに分離された菌株は Pure Gene を用いて、DNA の抽出を行い、リアルタイム PCR 法により、

DLT 遺伝子、pID 遺伝子の検出を行った。

## 結 果

### 1. リアルタイム PCR 法の検出感度の比較

#### 1) DLT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法の検出感度

DLT 遺伝子検出リアルタイム PCR では、DLT 産生 *C.ulcerans* (200905176) は  $6.8 \times 10^2$  cfu/ml, DT 産生 *C.diphtheriae* (TBR-6) は  $2.5 \times 10^2$  cfu/ml で検出可能であった。また、スワブ検体の検出感度では、DLT 産生 *C.ulcerans* は、 $6.8 \times 10^4$  cfu/ml, DT 産生 *C.diphtheriae* は  $2.5 \times 10^6$  cfu/ml であり、菌液とスワブで 2 オーダー以上の検出感度の差がみられた。また、それ以外の菌株で DLT 遺伝子は検されなかった。(表 3)。

#### 2) pID 遺伝子検出リアルタイム法検出感度

DLT 産生 *C.ulcerans* は  $6.8 \times 10$ cfu/ml, DLT 非産生 *C.ulcerans* (JCM10387) は  $4.7 \times 10^2$ cfu/ml であった。また、シードスワブ検体からの検出感度の比較では、DLT 産生 *C.ulcerans* は  $6.8 \times 10^3$  cfu/ml, DLT 非産生 *C.ulcerans* は  $4.7 \times 10^3$  cfu/ml と菌株とシードスワブで検出感度に差がみられた。また、それ以外の菌株では、pID 遺伝子は検出されなかった (表 3)。

### 2. イヌ, ネコからの *C.ulcerans* の検出

検査対象とした 102 頭にくしゃみ、鼻水等の風邪様症状やジフテリア症状を示すものではなく、咽頭ぬぐい液および口腔内潰瘍ぬぐい液の DNA 抽出物から、DLT 遺伝子ならびに pID 遺伝子は検出されなかった。

分離培養法では、103 検体中、*C.ulcerans* を疑うものは 8 検体 8 株認めた。アピコリネキットの同定で、3 株が *Crynebacterium* 属菌であったが、*C.ulcerans* ではなかった。5 株は、アピコリネキットでは同定できず、また、8 株全てからは DLT 遺伝子、pID 遺伝子は検出されなかった。

## 考 察

2009 年に東京都で発生した *C.ulcerans* 感染症事例<sup>12)</sup> では、患者が飼育していたネコが、くしゃみ、鼻汁等の風邪様症状を呈しており、その鼻汁等から *C.ulcerans* が分離されている。一方で大阪府では健康なイヌから *C.ulcerans* が分離されている<sup>13)</sup>。これらのことから、動物も *C.ulcerans* 感染し呼吸器症状を示す場合と、無症状保菌動物となり得

る場合があることが示唆される。しかし、どのような場合に人への感染源となりうるのか、これらの動物はどこから感染したか等の環境を含めた疫学情報は極めて乏しいため、今後データを蓄積していく必要がある。

今回、供試したイヌ、ネコの咽頭スワブからは、*C.ulcerans* は検出されなかったため、臨床スワブ検体からの *C.ulcerans* の検出感度を求めることはできなかった。しかしながら、*DLT* 遺伝子、*DT* 遺伝子のどちらの毒素遺伝子も高感度に検出可能なことから、これらの方法を組み合わせることで、ヒトにおけるジフテリア様疾患患者発生時には、迅速な検査対応が可能となった。

今後、今回検討した遺伝子検査法をヒトと動物、環境にわたる疫学調査等に活用できるよう更なる検討を行う必要がある。

#### 文献

- 1) Hommes, J., Devriese, L.A., Vanechoutte, M., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 954-957, 1999.
- 2) Tejedor, M.T., Martin, J. L., Lupiola P., *et al.*: *Can. Vet. J.*, **41**, 126-127, 2000.
- 3) Morris, W., Uzal, F., and Cipola, A.: *Vet. Rec.*, **156**, 317-318, 2005.
- 4) Hunolustein, C., Alfaroni, G., Scopetti, F., *et al.*: *J. Med. Microbiol.*, **52**, 181-188, 2003.
- 5) Lartigue, M. F., Monnet, X., Fleche, A. L., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 999-1001, 2005.
- 6) DeWinter, L.M., Bernard, K.A., and Romney, M.G.: *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 3447-3449, 2005.
- 7) Tiwari, T. S. P., Golaz, A., Yu, D.T., *et al.*: *CID*, **46**, 395-401, 2008.
- 8) Mattos-Guaraldi, AL., Sampaio, J., Santos, C.S., *et al.*: *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, **103**, 396-400, 2008.
- 9) Bonmarin, I., Guiso, N., Fleche-Mareos, A., *et al.*: *Vaccine*, **27**, 4196-4200, 2009.
- 10) Hatanaka, A., Tsunoda, A., Okamoto, M., *et al.*: *Emerg. Infect. Dis.*, **9**, 2003.
- 11) Nureki, S., Miyazaki, E., Matsuno, O., *et al.*: *Chest*, **131**, 1237-1239, 2007.
- 12) 野口佳裕, 角田篤信, 喜多村 健, 他: 病原微生物検出情報, **30**, 188-189, 2009.
- 13) Katsukawa C., Kawahara R., Inoue K., *et al.*: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **62**, 171-172, 2009.
- 14) Seto, Y., Komiya, T., Iwaki, M., *et al.*: *Jpn. J. Infect.*, **61**, 116-122, 2008.

**Investigation of Genetic Methods for *Corynebacterium ulcerans***

Kaoru HATAKEYAMA\*, Shizu HASHIMOTO\*\*, Takuya FUJIMOTO\*, Masaki TAKAHASHI\*  
Rumi OKUNO\*, Akinori NAGASAWA\*\*, Kenji SADAMASU\* and Akemi KAI\*

Real-time polymerase chain reaction (PCR) assays have been developed for detection of the diphtheria-like toxin (DLT) produced by *Corynebacterium ulcerans*. These methods detected the genes *DLT* and *pID* in *C.ulcerans*, and could also detect the *DT* gene of *C.diphtheriae*. These genes are useful for diphtheria diagnosis.

We also investigated 103 throat swabs of dogs and cats bred in Tokyo in 2009 using real-time PCR and standard culture methods. *C.ulcerans* was not detected by either method in these specimens.

**Keywords:** *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium diphtheriae*, *DLT* gene, *pID* gene, real-time PCR, Dog, Cat

---

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

\*\* Pet Clinic Anihos