

謝辞

本稿の執筆にあたりましてご協力をいただきました北海道大学大学院獣医学研究科の高島郁夫教授，北海道大学大学院医学研究科 有川二郎教授，ならびに吉松組子助手に深謝いたします。

【文献】

- 1) 有川二郎, 橋本信夫:腎症候性出血熱. ウイルス 36:223-251, 1986
- 2) Lee HW, Lee PW, Johnson KM: Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. J Infect Dis 137 : 298-308, 1978
- 3) World Health Organization : Haemorrhagic fever with renal syndrome : memorandum from a WHO. Bull WHO 61 : 269-275, 1983
- 4) Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, et al. : Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. Science 262 : 914-917, 1993
- 5) McCormick JB, Sasso DR, Palmer EL, et al. : Morphological identification of the agent of Korean haemorrhagic fever (Hantaan virus) as a member of the Bunyaviridae. Lancet 1 : 765-768, 1982
- 6) Schmaljohn CS, Hastly SE, Harrison SA, et al. : Characterization of Hantaan virions, the prototype virus of hemorrhagic fever with renal syndrome. J Infect Dis 148 : 1005-1012, 1983
- 7) Lundkvist A, Plyusnin A : Molecular epidemiology of hantavirus infections. In The Molecular Epidemiology of Human Viruses ; Leitner, T. ed. Kluwer Academic Publishers. 2002 In Press.
- 8) Antic D, Kang CY, Spik K, et al. : Comparison of the deduced gene products of the L, M and S genome segments of hantaviruses. Virus Res 24 : 35-46, 1992
- 9) Song G, Hang CS, Liao HX, et al. : Antigenic difference between viral strains causing classical and mild types of epidemic hemorrhagic fever with renal syndrome in China. J Infect Dis 150 : 889-894, 1984
- 10) Lee HW, Lee PW, Tamura M, et al. : Etiological relation between Korean hemorrhagic fever and epidemic hemorrhagic fever in Japan. Biken J 22 : 41-45, 1979
- 11) Kawamata J, Yamanouchi T, Dohmae K, et al. : Control of laboratory acquired hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Japan. Lab Anim Sci 37 : 431-436, 1987
- 12) 有川二郎 : わが国の野生げっ歯類におけるハンタウイルス感染の疫学的研究と血清診断. 臨床とウイルス別刷 23 : 12-18, 1995
- 13) Kariwa H, Yoshizumi S, Arikawa J, et al. : Evidence for the existence of Puumala-related virus among Clethrionomys rufocanus in Hokkaido, Japan. Am J Trop Med Hyg 53 : 222-227, 1995
- 14) Kariwa H, Yoshimatsu K, Araki K, et al. : Detection of hantaviral antibodies among patients with hepatitis of unknown etiology in Japan. Microbiol Immunol 44 : 357-362, 2000
- 15) Childs JE, Ksiazek TG, Spiropoulou CF, et al. : Serologic and genetic identification of Peromyscus maniculatus as the primary rodent reservoir for a new hantavirus in the southwestern United States. J Infect Dis 169 : 1271-1280, 1994
- 16) Wells RM, Sosa Estani S, Yadon ZE, et al. : An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina : person-to-person transmission? Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. Emerg Infect Dis 3 : 171-174, 1997
- 17) 松本慶蔵 : ハンタウイルス肺症候群 (ハンタウイルス心臓肺症候群). VIRUS REPORT 2 (1) : 63-71, 2005
- 18) Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshida R, et al. : Production of recombinant hantavirus nucleocapsid protein expressed in silkworm larvae and its use as a diagnostic antigen in detecting antibodies in serum from infected rats. Lab Anim Sci 45 : 641-646, 1995
- 19) Morii M, Yoshimatsu K, Arikawa J, et al. : Antigenic characterization of Hantaan and Seoul virus nucleocapsid proteins expressed by recombinant baculovirus : application of a truncated protein, lacking an antigenic region common to the two viruses, as a serotyping antigen. J Clin Microb 36 : 2514-2521, 1998
- 20) Takakura A, Goto K, Itoh T, et al. : Establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hantavirus antibody of rats using a recombinant of nucleocapsid protein expressed in Escherichia coli. Exp Anim 52 : 25-30, 2003
- 21) Kariwa H, Isegawa Y, Arikawa J, et al. : Comparison of nucleotide sequences of M genome segments among Seoul virus strains isolated from eastern Asia. Virus Res 33 : 27-38, 1994
- 22) Kariwa H, Yoshimatsu K, Sawabe J, et al. : Genetic diversities of hantaviruses among rodents in Hokkaido, Japan and Far East Russia. Virus Res 59 : 219-228, 1999
- 23) Lokugamage K, Kariwa H, Hayasaka D, et al. : Genetic characterization of hantaviruses transmitted by the Korean field mouse (Apodemus peninsulae), Far East Russia. Emerg Infect Dis 8 : 768-776, 2002

1. 日本と極東ロシアのダニ媒介性脳炎ウイルスの 系統解析と病原性

高島郁夫, 早坂大輔, 後藤明子, 好井健太郎, 荻和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科・環境獣医科学講座公衆衛生学教室

北海道と極東ロシアのダニ媒介性脳炎ウイルスの系統解析の結果、北海道株は極東地区において数百年前に出現したと推定された。イルクーツク地区のダニ媒介性脳炎ウイルスはシベリア亜型と同定された。ダニ媒介性脳炎ウイルスのBHK細胞適応変異株はマウスにおける神経侵襲性毒力が低下していた。変異株はエンベロープ蛋白に1ヶ所のアミノ酸置換があり、荷電が陽性に变化する変異であった。変異株はウイルス血症と脾臓でのウイルス価が親株に比べ低下していた。ダニ媒介性脳炎ウイルスの感染性cDNAクローンの作製に成功し、神経毒力の解析を行った。エンベロープ蛋白の1ヶ所とNs5の2ヶ所のアミノ酸変異が相乗的に神経毒力の低下に関与していた。

1. はじめに

ダニ媒介性脳炎はフラビウイルスによる人獣共通感染症でマダニ科Ixodidaeに属する各種のマダニにより伝播される。ダニ媒介性脳炎には致死率30%にも及ぶロシア春夏脳炎と比較的軽症で経過する中央ヨーロッパダニ媒介性脳炎が存在する^{2, 16)}。これまでわが国では長い間ダニ媒介性脳炎の発生報告はなかったが、1993年北海道で本症の患者が発見され、原因ウイルスをイヌ、ノネズミおよびマダニより分離した¹⁷⁻¹⁹⁾。ロシアでは、毎年10,000人前後の本病の流行が報告されている(表1)。我々はこれまで極東ロシアにおいて疫学調査を実施し、ダニ媒介性脳炎ウイルスを分離した。ここではまず日本と極東ロシアのTBEウイルスの系統解析の成績を紹介する。さらに日本のダニ媒介性脳炎ウイルスの病原性について、弱毒変異株および感染性cDNAクローンを用いて解析した成績について紹介する。

2. 日本と極東ロシアのダニ媒介性脳炎ウイルスの 系統解析

北海道のダニ媒介性脳炎ウイルス株の起源を推定するために、極東ハバロフスクにおいてマダニ類を採集してウイルス分離を試み、ウイルスの系統解析を実施した。1998年にハバロフスク地区で採集した550匹のシュルツェマダニから5株のウイルスを分離した⁷⁾。これらの株と北海道分離株のE-タンパク遺伝子の塩基配列を決定し、すでに公表済みのダニ媒介性フラビウイルス各株の塩基配列と比較し、系統樹を作成した(図1)^{4, 7, 14)}。北海道株(Oshima 5-11, I-1, 3-6, 5-10, C-1, A-1)はSofjin株とハバロフスク株(KH98-2, 98-10, 98-5)とともに極東型ウイルスとして同一のクラスターを形成した。次に極東型ウイルス各株の同義置換距離をもとに系統樹を作成した(図2)。これらの株の平均同義置換率を計算したところ、 2.9×10^{-4} となった。この平均同義置換率と同義置換距離をもとに北海道株とハバロフスク株の分岐の年代を計算したところ、これらの株は約260~430年前に分岐したと推定された。従ってダニ媒介性脳炎ウイルス北海道株は極東地区において数百年前に出現したと推定された⁸⁾。

次に近年、シベリア地区に系統樹解析による極東型とヨーロッパ型に加え、第3の亜型のダニ媒介性脳炎の存在が示唆された。そこでイルクーツク周辺において、マダニを採集しウイルス分離を試みた。新たに6株のダニ媒介性脳炎ウイルスを、シュルツェマダニ(*I.persulcatus*)から分

連絡先

〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目
 TEL : 011-706-5211
 FAX : 011-706-5211
 E-mail : takasima@vetmed.hokudai.ac.jp

表1 1992年～2001年のダニ媒介脳炎患者発生状況

	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
オーストリア	84	102	178	109	128	99	62	41	60	51
ドイツ	142	118	306	204	109	168	130	82	155	
エストニア	163	166	177	175	177	403	387		272	
ラトビア	287	791	1366	1341	736	884	1037	352	544	303
リトアニア	17	198	284	426	310	646	584		419	
ポーランド	8	241	181	267	259	200				
ロシア	6301	7520	5593	5982	10298	6702	7520	9955	5931	6399
スウェーデン	83	51	116	68	45	76				
フィンランド	14	25	16	23		20	17			
スイス	66	44	97	60	62	123	68			
スロベニア	210	194	492	260	406	269	136			
クロアチア	27	76	87	91	57	25	32			
チェコ	337	629	619	743	571	415	422	490	7191	623
スロバキア	13	50	58	89	93	77				
ハンガリー	206	329	278	240	253	107	84	51		
イタリア		3	2	5	3		6			
フランス	3	5	4	7	1	1				

表2 研究に使用された極東とシベリア地区からのダニ媒介性脳炎ウイルス

Strain	Year of isolation	Geographical origin	Source	Accession no.	
				Envelope	3'-NCR
VL99-m11	1999	Vladiostok	<i>I. persulcatus</i>	AB049345	AB049393
KH99-m9	1999	Khabarovsk	<i>I. persulcatus</i>	AB049346	—
D1283	1998	Khabarovsk	Human brain	AB049347	—
IR99-1m1	1999	Irkutsk (1)*	<i>I. persulcatus</i>	AB049348	AB049397
IR99-1m4	1999	Irkutsk (1)	<i>I. persulcatus</i>	AB049349	AB049398
IR99-2m3	1999	Irkutsk (2)	<i>I. persulcatus</i>	AB049350	—
IR99-2m7	1999	Irkutsk (2)	<i>I. persulcatus</i>	AB049351	AB049399
IR99-2f7	1999	Irkutsk (2)	<i>I. persulcatus</i>	AB049352	—
IR99-2f13	1999	Irkutsk (2)	<i>I. persulcatus</i>	AB049353	AB049400
Oshima 5-10	1995	Oshima	Dog blood	AB001026	AB049390
Oshima I-1	1996	Oshima	<i>I. ovatus</i>	AB022292	AB049391
Oshima A-1	1995	Oshima	<i>A. speciosus</i>	AB022293	AB049392
KH98-2	1998	Khabarovsk	<i>I. persulcatus</i>	AB022295	AB049394
KH98-5	1998	Khabarovsk	<i>I. persulcatus</i>	AB022296	AB049395
KH98-10	1998	Khabarovsk	<i>I. persulcatus</i>	AB022297	AB049396
Sofjin-HO	1937	Primorsky	Human brain	AB022703	AB049401

(*)*: Virus isolation point number

離し、エンベロープタンパク遺伝子の系統解析を行った(表2)。エンベロープタンパク遺伝子の塩基配列に基づく系統樹が図3に示されている。系統樹の分岐パターンは、ダニ媒介性脳炎ウイルスの4つのクラスターすなわち、ヨーロッパ亜型、極東亜型、シベリア亜型の3つのダニ媒介性脳炎ウイルスと跳躍病(louping ill)ウイルスに分かれた。ウラジオストックとハバロフスクから新たに分離された株(VL99-m11, KH99-m9とD1283)はOshima株とSofjin株のように、極東亜型と同定されたウイルス株と同一のクラスターを形成した。従ってこれらの分離株はダニ

媒介性脳炎ウイルス極東亜型と分離された。しかし、イルクーツク地区からの分離株はVasilchenko株(シベリア亜型のプロトタイプ)とAina株とクラスターを形成した。従ってこれらの株はシベリア亜型のダニ媒介性脳炎ウイルスと同定された。これらのシベリア亜型のウイルス株は極東亜型とヨーロッパ亜型のウイルスと区別されたが、これらシベリア分離株はヨーロッパ亜型よりは極東亜型により近縁であった。

マウスモデルを用いてイルクーツク分離株(IR99-2f7と2f13)と極東株(VL99-m11, D1283, KH98-5, Ohima5-10)

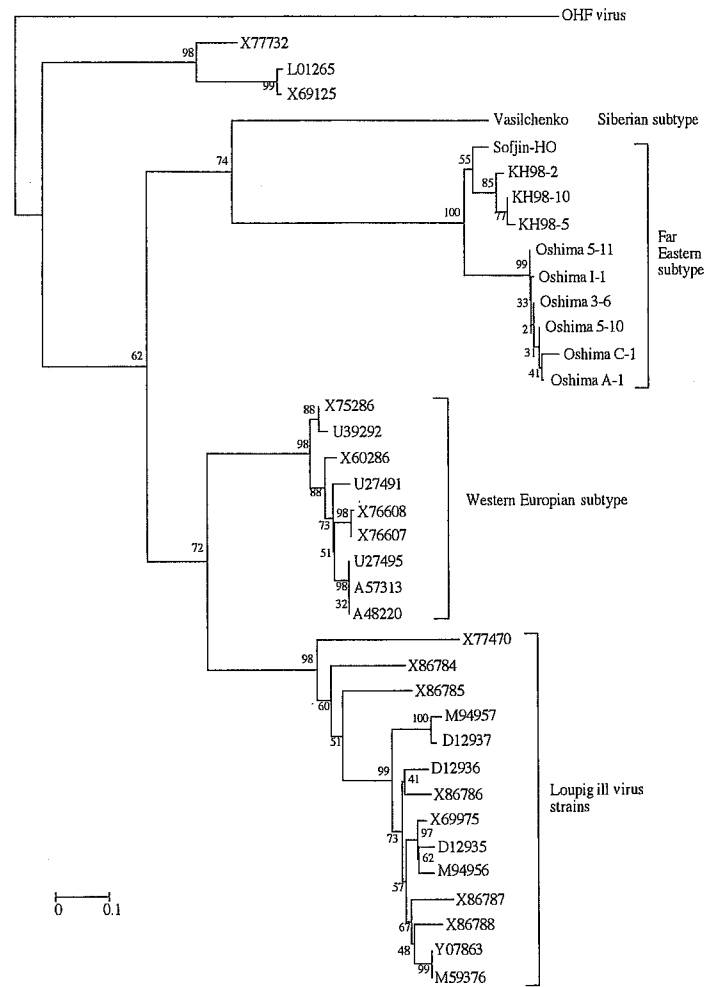


図1 極東亜型、シベリア亜型、西欧亜型ダニ媒介性脳炎ウイルスと跳躍病ウイルスを含めた系統樹

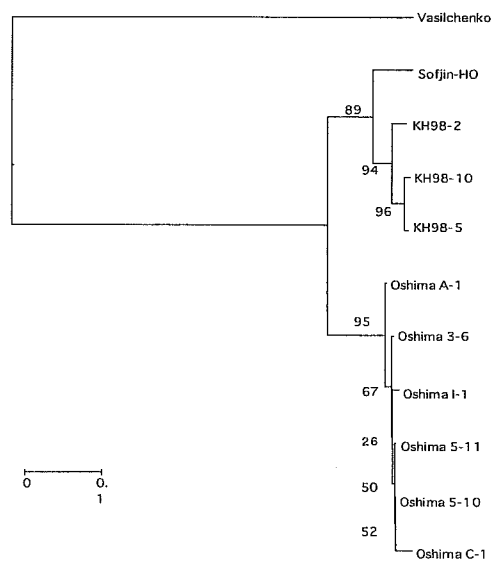


図2 北海道と極東ロシアで分離された極東型ダニ媒介性脳炎ウイルス株の系統樹

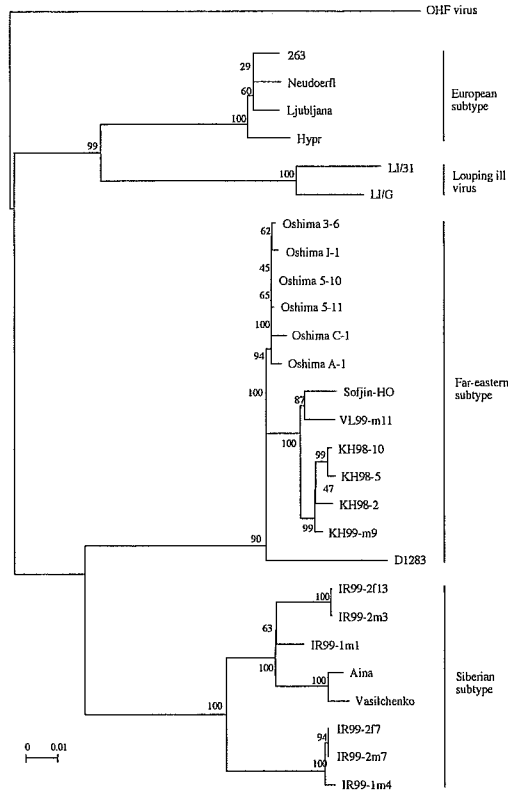


図3 各種ダニ媒介性脳炎ウイルス株とイルクーツク株の系統樹の比較

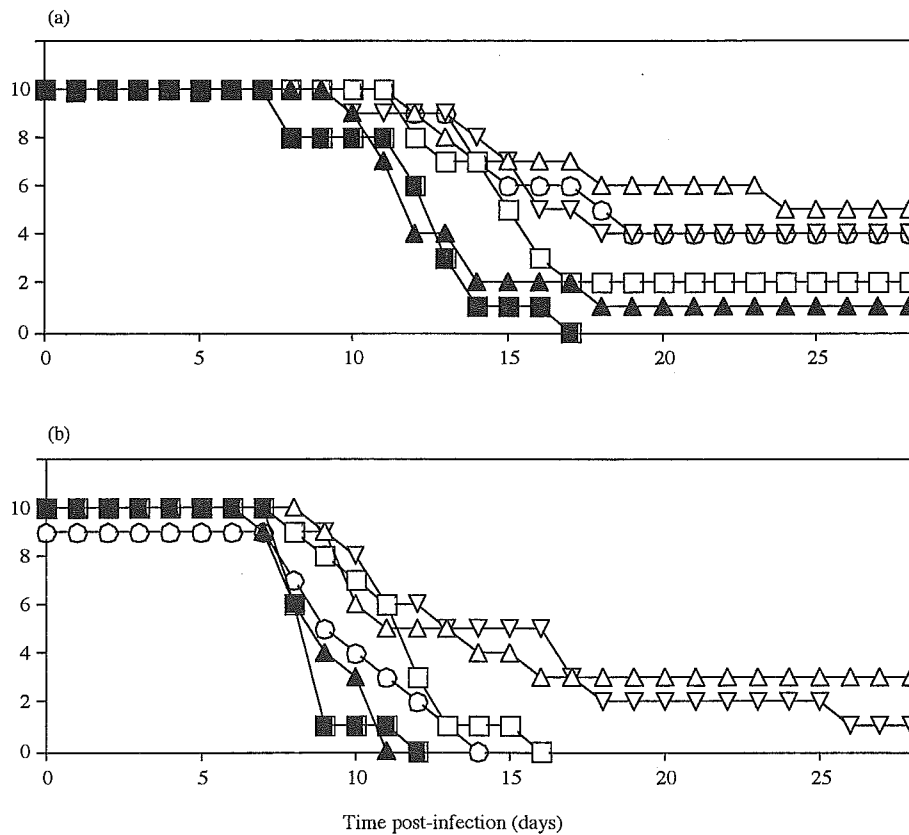


図4 ダニ媒介性脳炎ウイルス株接種後のマウスの生存(a)1000FFUのウイルスを皮下接種, (b)10FFUのウイルスを脳内接種, IR99-2f7(■), IR99-2f13(▲), VL99-m11(□), KH98-5(△), D1283(▽), Oshima 5-10(○)

の病原性を比較した (図 4)。神経侵襲性毒力を調べるために、1,000FFU のウイルスをマウスへ皮下接種し、28 日間生存率を記録した (図 4a)。これらのウイルス株は異なる神経侵襲性を示した。接種後、生存率は IR99-2f7 の 0%、IR99-2f13 の 10%、VL99-m11 の 20%、D1283 と Oshima5-10 の 40%、KH98-5 の 50% であった。イルクーツク分離株を接種したマウスは極東株接種マウスより 3~5 日間早く死亡した。これらのウイルス株の神経毒力を調べるために、各ウイルス株の 10FFU を脳内接種して、マウスの生存率を比較した (図 4b)。IR99-2f7、IR99-2f13、VL99-m11、Oshima5-10 株接種マウスはすべて死亡した。しかし IR99-2f7 と IR99-2f13 接種マウスは VL99-m11 または Oshima5-10 接種マウスより約 2~5 日早く死亡した。D1283 と KH98-5 接種マウスは各々 10%、20% 生存した。これらの成績はイルクーツクに分布するダニ媒介性脳炎ウイルスは極東地区に分布するウイルスと比べ同等かまたはより強い毒力を持つことを示している。

3. 培養細胞に適応したダニ媒介性ウイルス変異株の病原性

ダニ媒介性脳炎ウイルス Oshima5-10 株を BHK 細胞に継

代したところ、大きなプラックを形成する培養細胞適応変異株が得られた (図 5a)⁵⁾。この BHK 細胞適応変異株 Oshima Cl-1 株についてマウスにおける病原性と他の生物的性状および遺伝子性状を調べた。Oshima 5-10 株と Oshima Cl-1 株 BHK 細胞での増殖を比較した。Oshima Cl-1 株の培養上清におけるウイルス力価は 9 時間後に増加したが、Oshima5-10 株の力価は 9 時間目まで低く、12 時間後に増加したが Oshima Cl-1 の 1/100 であった (図 5b)。この結果は変異株 Oshima Cl-1 は親株 Oshima5-10 より迅速に増殖することを示す。

ウイルスの神経侵襲性毒力の程度を、マウスの皮下接種の系で調べた。神経毒力の程度を評価するため、マウスへの脳内接種も実施した。各ウイルスを 10,000FFU マウスへ皮下接種したところ、2 株の間に神経侵襲性毒力に有意な違いがあることが明らかになった (図 6a)。Oshima Cl-1 株接種マウスは 80% 生存したのに比べ、Oshima 5-10 株では 30% のマウスが生存した。一方 2 株のウイルスの神経毒力のレベルは 10FFU のウイルスを神経内接種により調べた (図 6b)。両株の間には有意の差は見られなかった。これらの成績から Oshima Cl-1 株の神経侵襲性毒力の程度は Oshima5-10 株より有意に低かったが、神経毒力のレベルは

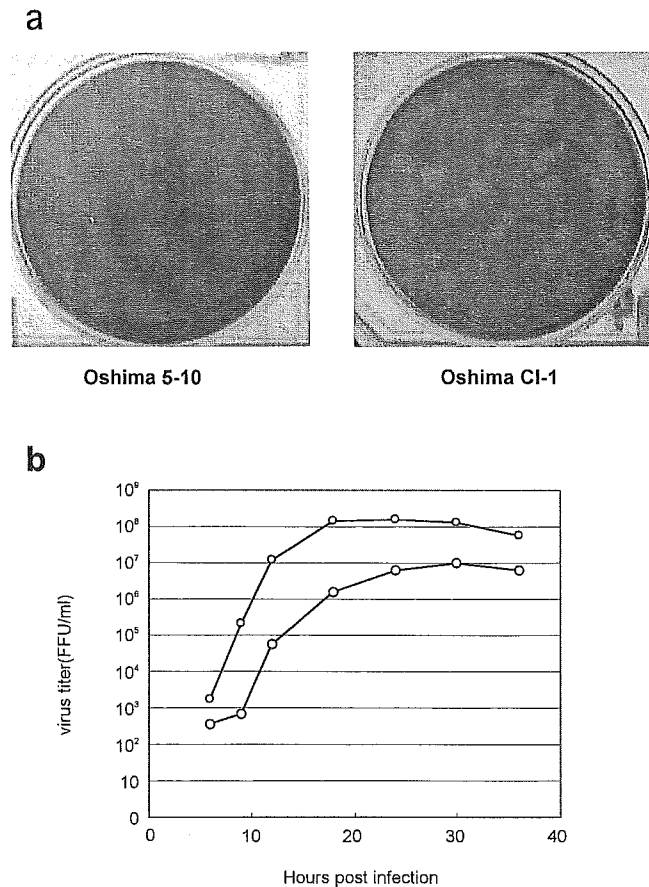


図 5 BHK-21 培養細胞におけるダニ媒介性ウイルスの増殖 (a) Oshima5-10 と Oshima Cl-1 感染 120 時間後の BHK-21 細胞上でのプラックの形態 (b) BHK-21 細胞でのウイルス増殖曲線, MOI1FFU の Oshima Cl-1 (●) または Oshima 5-10 (○) を感染させた。

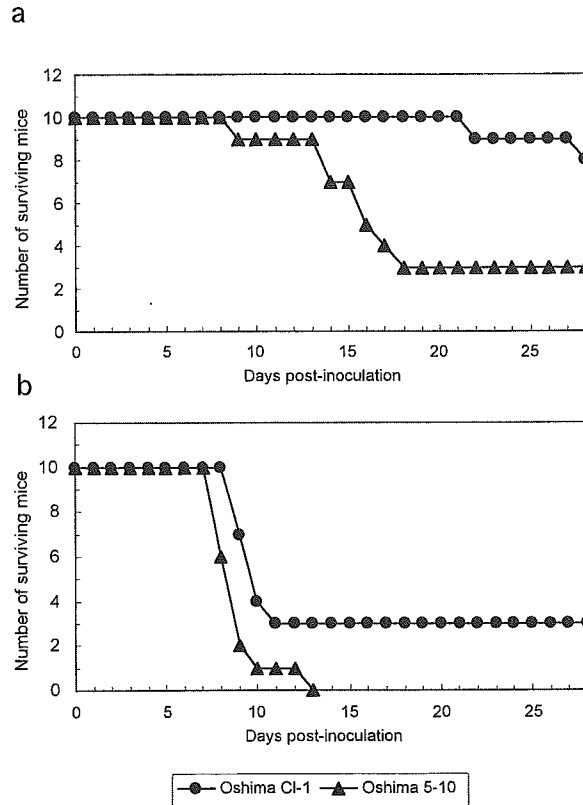


図6 ダニ媒介性脳炎ウイルス接種後のマウスの生存 (a)10,000FFU のウイルスを皮下接種 (b)10FFU のウイルスを脳内接種, Oshima CI-1 (●), Oshima 5-10(▲)

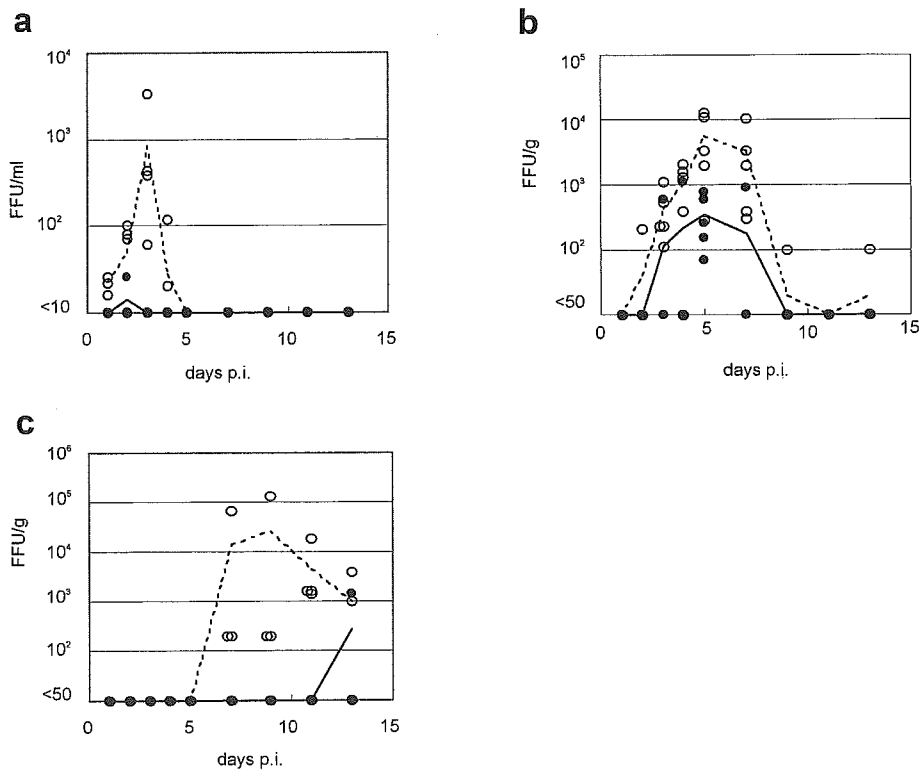


図7 マウスの血液と組織におけるダニ媒介性脳炎ウイルス力価の推移, (a)血液, (b)脾臓, (c)脳, Oshima CI-1 (● — ●), Oshima 5-10(○ - - ○)

両株で差がなかったことが示された。

Oshima CI-1 の低い神経侵襲性毒力が末梢組織におけるウイルスの増殖または拡散が低下し脳内へのウイルス侵入の低下に原因した可能性がある。この点を調査するために、血液、脳および脾臓におけるウイルス増殖のレベルを両ウイルス株を皮下接種したマウスにおいて比較した (図 7)。Oshima 5-10 接種後、ウイルス血症は接種後 1 日目に検出され、3 日後にピーク (1×10^3 FFU/ml) に達し、徐々に減少し 5 日目には検出できなくなった (図 7a)。脾臓においてはウイルスは 2 日目に検出され、5 日目に 5×10^3 FFU/g のピーク値に達した (図 7b)。脳ではウイルスは 7 日目に最初に検出され、9 日目にピークの 2×10^4 FFU/g に達した (図 7c)。他方、Oshima CI-1 接種後、ウイルス血症は 2 日目に検出され (60FFU/ml)、その後減少し、3 日目には検出できなかった (図 7a)。脾臓ではウイルスは 3 日目に最初に検出され、5 日目にピーク (5×10^2 FFU/g) に達した。9 日目に脾臓ではウイルスは検出できなかった。脳においてはウイルスは 11 日目まで検出されず (図 7c)、観察期間中、マウスは臨床的な脳炎症状を示さなかった。まとめると、脾臓と血液での Oshima CI-1 のウイルス増殖は Oshima 5-10 より低く、さらに脳でのウイルス増殖は、Oshima 5-10 は 7 日目に検出されたが、Oshima CI-1 ではほとんど認められなかった。

塩基配列の比較では、Oshima CI-1 は Oshima 5-10 と比べ 3 つの塩基と 2 つのアミノ酸の置換があった。2 つのアミノ酸の置換の 1 つは、NS5 タンパクで検出されたが、タンパクの荷電や極性に影響しない変化であった²⁰⁾。しかし他の置換は、E タンパクにあり、Oshima CI-1 の E タンパクの陽性電荷を増加させた。この置換は E タンパクのドメイン II に位置しており¹⁵⁾、以前の研究でこのドメインの変異は膜融合と赤血球凝集性に影響することが示されていた^{3,10)}。

特定の培養細胞へのウイルスの適応は、グリコサミアミノグルカン (GAGs) へ高い親和性を持つ変異株を選択し、それらの変異株のいくつかは、動物における毒力の低下を来す^{1,11,13)}。そこで、2 株のウイルスの GAGs への親和性を比較するために、異なる GAGs のウイルス感染性の抑制効果を調べた。Oshima 5-10 の BHK-21 細胞への感染性は GAGs によりほとんど阻止されなかった (図 8a)。対照的に Oshima CI-1 の感染性は、試験されたすべての GAGs により抑制され、その抑制は用量依存的であった (図 8b)。

これらの成績はウイルス E タンパクのアミノ酸の置換が、マウスモデルでの神経侵襲性の低下を来したことを示している。その変異によりウイルス血症と末梢でのウイルス増殖が低下し、ウイルスが脳内に侵入できなかったと考えられた。この E タンパクの変異により、ウイルスタンパクの

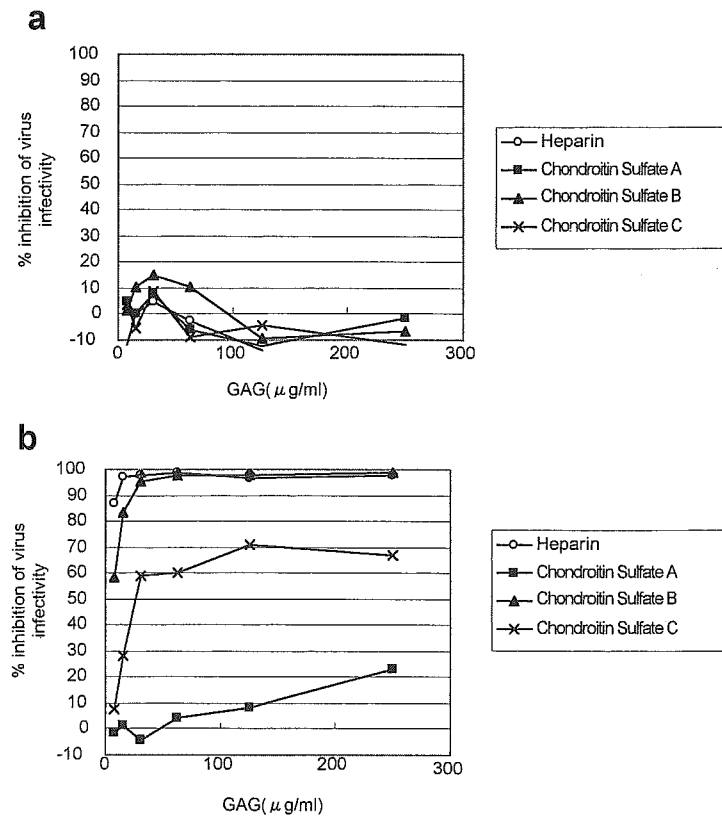


図 8 GAGs による Oshima 5-10 (a) と Oshima CI-1 (b) の感染阻止

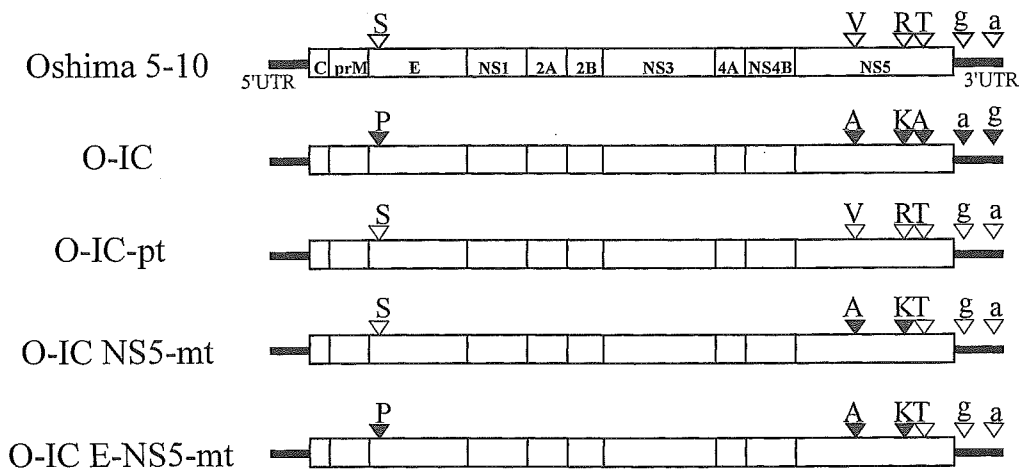


図9 親株と cDNA クローン由来ウイルスの amino 酸の置換△は親株の amino 酸または塩基, ▼は O-IC の amino 酸または塩基

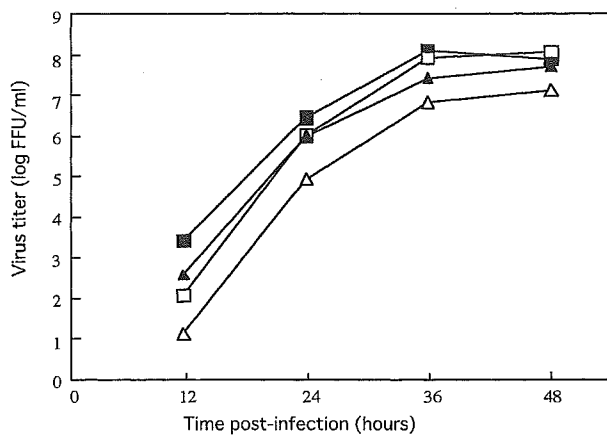


図10 BHK 細胞における親株 Oshima 5-10 と cDNA クローン由来ウイルスの増殖曲線の比較
親株 Oshima 5-10(■), OIC NS5-mt(▲)
OIC-E-NS5-mt(△), OIC-pt(□)

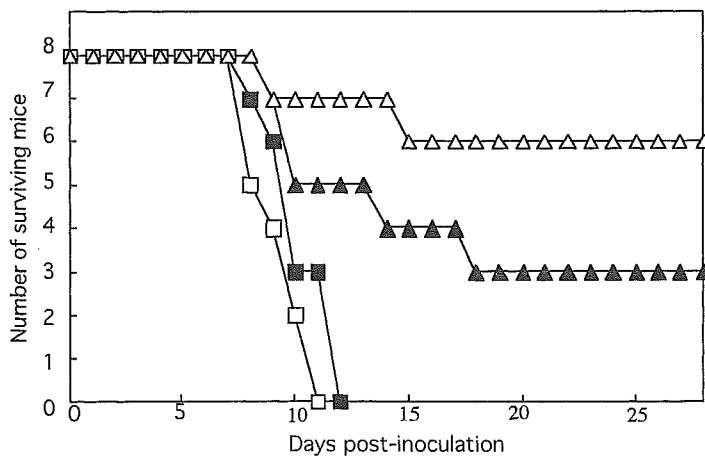


図11 50FFU 脳内接種マウスにおける生存。
親株 Oshima 5-10(■), O-IC NS5-mt(▲)
O-IC-E-NS5-mt(△), O-IC-pt(□)

陽性電荷の程度が増加し、動物体内に一般的に分布する GAGs によりウイルスが捕捉されウイルスの末梢での増殖が低下したためと推定された。

4. 感染性 cDNA クローンを用いた ダニ媒介性脳炎ウイルスの病原性の解析

ダニ媒介性脳炎ウイルスの感染性 cDNA クローンについて、ヨーロッパ亜型の Neudoerfl 株と Hypr 株およびシベリア亜型の Vasilchenko 株についての報告がある^{6, 12)}。そこで極東亜型のダニ媒介性脳炎ウイルス Oshima5-10 株について感染性 cDNA クローンを作成し、病原性の解析に用いた。

Oshima 5-10 株の感染性 cDNA クローンの出発は、long high-fidelity RT-PCR と one-step cloning 法により実施した⁹⁾。最初に得られた感染性 cDNA クローン O-IC は構造タンパクに 4ヶ所のアミノ酸置換と、3' UTR に 2ヶ所の塩基置換を有していた。構造タンパクのアミノ酸置換は E-タンパクに 1ヶ所、Ns5 タンパクに 3ヶ所存在した(図 9)。このアミノ酸と塩基の置換を親株に部分的修復した種々のクローンおよびすべて親株に修復した O-IC-pt を作成した(図 9)。

これらのクローンからウイルスを回収し、BHK 細胞における増殖を比較した(図 10)。親株 Oshima 5-10 と遺伝的に同一の O-IC-pt ウイルスの間に感染後 12 時間で、ウイルス産生量に有意な違いが存在した。これは親株ウイルスストックの集団中に quasi-species の存在によるためかも知れない。4 株のうちで E-タンパクに置換のある P₄₀A₃₇₈K₆₇₄T₇₉₄ (O-IC E-NS5-mt) が他の株に比べウイルス産生が低下していた。

次にこれら 4 株のウイルスのマウスの神経毒力について調べた(図 11)。50FFU のウイルスをマウスの脳内に接種後、親株 Oshima 5-10 と親株と遺伝的に同一の O-IC-pt は、接種後に 12 日以内に 100% の致死率を示した。対照的に O-IC-pt ウイルスと Ns5 遺伝子の 2ヶ所を異にする S₄₀A₃₇₈K₆₇₄T₉₉₄ (O-ICNS5-mt) ウイルスは神経毒力が低下しており、18 日目に 62.5% のマウスを死亡させた。S₄₀A₃₇₈K₆₇₄T₉₉₄ ウイルスと E-タンパクの 1ヶ所のアミノ酸が異なる P₄₀A₃₇₈K₆₇₄T₉₉₄ (O-ICE-NS5-mt) は、最も低い神経毒力を示し、25% のマウスを死亡させた。これらの成績は E タンパクの S40 → P への置換と Hs5-V₃₇₈ → A と Ns5-R₆₇₄ → K への置換が相乗的にウイルスの神経毒力の低下に影響していることを示している。

5. おわりに

ダニ媒介性脳炎の患者数はヨーロッパ諸国とロシアを中心に毎年 10,000 人前後報告されている。ヨーロッパではダニ媒介性脳炎の予防のためワクチン接種を実施している国が多い。毎年 400 万人以上の日本人旅行者がヨーロッパを訪問している。これらの日本人へヨーロッパにおけるダニ

媒介性脳炎の流行情報を正確に提供するとともに、ダニが多数生息する森林や農村地帯に滞在するハイリスクグループの人々にはワクチンの実用化が望まれる。

引用文献

- 1) Bernard KA, Klimstra WB, Johnston RE.: Mutations in the E2 glycoprotein of Venezuelan equine encephalitis virus confer heparan sulfate interaction, low morbidity, and rapid clearance from flood of mice. *Viriligy* 276: 93-103, 2000.
- 2) Calisher C, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE.: Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 30: 37-43, 1989.
- 3) Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM.: Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann Rev Microbiol* 44: 649-688, 1990.
- 4) Gojbori T, Moriyama EN, Kimura M.: Molecular clock of viral evolution, and the neutral theory. *Pro Nat Acad Sci* 87: 10015-10018, 1980.
- 5) Goto A, Hayasaka D, Yoshii K, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I.: A BHK-21 cell culture-adapted tick-borne encephalitis virus mutant is attenuated for neuroinvasiveness. *Vaccine* 21: 4043-4051, 2003.
- 6) Gritsun TS, Gould EA.: Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy. *J Virol Methods* 76: 109-120, 1998.
- 7) Hayasaka D, Suzuki K, Kariwa H, Ivanov L, Volkov V, Demenev V, Mizutani T, Gojbori T, Takashima I.: Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-eastern Russia. *J Gen Virol* 80: 3127-3135, 1999.
- 8) Hayasaka D, Ivanov L, Leonova GN, Goto A, Yoshii K, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I.: Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia. *J Gen Virol* 82: 1319-1328, 2001.
- 9) Hayasaka D, Gritsun TS, Yoshii K, Ueki T, Goto A, Mizutani T, Kariwa H, Iwasaki T, Gould EA, Takashima I.: Amino acid changes responsible for attenuation of virus neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol* 85: 1007-1018, 2004.
- 10) Holzmann H, Stiasny K, Echer M, Kung C, Heinz FX.: Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice. *J Gen Virol* 78: 31-37, 1997.
- 11) Lee E, Lobigs M.: Substitutions at the putative receptor-binding site of an encephalitic flavivirus alter virulence and host cell tropism and reveal a role for glycosaminoglycans in entry. *J Virol* 74: 8867-8875, 2000.
- 12) Mandl CW, Ecker M, Holzmann H, Kunz C, Heinz FX.: Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl

- and high virulence strain Hypr. *J Gen Virol* 78: 1049-1057, 1997.
- 13) Mandl CW, Kroschewski H, Allisan SL, Kofler R, Holzmann H, Meixner T.: Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation in vivo. *J Virol* 75: 5627-5637, 2001.
 - 14) Nei M, Gojobori T.: Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3: 418-426, 1986.
 - 15) Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC.: The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375: 291-298, 1995.
 - 16) Shope RE.: Medical significance of togaviruses: an overview of diseases caused by togaviruses in man and domestic and wild vertebrate animals. PP 47-82 [Schlesinger, R.W. ed] In the togaviruses. Academic Press, New York, 1980.
 - 17) Takashima I, Morita K, Chiba M, Hayasaka D, Sato T, Takezawa C, Igarashi A, Kariwa H, Yoshimatsu K, Arikawa J, Hashimoto N.: A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *J Clin Microbiol* 35: 1943-1947, 1997.
 - 18) Takeda T, Ito T, Osada M, Takahashi K, Takashima I.: Isolation of tick-borne encephalitis virus from wild rodents and a seroepidemiological survey in Hokkaido, Japan. *Am. J Trop Med Hyg*, 60: 287-291 1999.
 - 19) Takeda T, Ito T, Chiba M, Takahashi K, Niioka T, Takashima I.: Isolation of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes ovatus* (Acari: Ixodidae) in Japan. *J Med Entomol* 35: 227-231, 1998.
 - 20) Wallner G, Mandl CW, Ecker M, Holzmann H, Stiasny K, Kunz C.: Characterization and complete genome sequences of high- and low-virulence variants of tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol* 77: 1035-1042, 1996.

Phylogenetic analysis and pathogenicity of tick-borne encephalitis virus from Japan and far-east Russia

Ikuo Takashima, Daisuke Hayasaka, Akiko Goto, Kentarou Yoshii, Hiroaki Kariwa.

Laboratory of Public Health, Department of Environmental Veterinary Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita-18, Nishi-9, Kitaku, Sapporo 060-0818, Japan

Phylogenetic analysis of tick-borne encephalitis (TBE) virus revealed that Hokkaido strain of TBE virus evolved several hundreds years ago in far-east Russia. TBE virus strains in Irkutsk area were identified as Siberian subtype of TBE virus. BHK-cell adapted mutant of TBE virus showed lower neuro-invasive virulence in mice than parent virus. The mutant carried one amino acid substitution in envelope protein which resulted in increase of positive charge of the protein. The mutant-infected mice showed lower virus titers in bloods and spleens than the parent-infected mice. Infectious c-DNA clone of TBE virus Hokkaido strain was successfully generated and was applied to examine the neurovirulence in mice. One amino acid change in envelope protein and 2 amino acid changes in Ns5 protein showed a synergistic effect on reduced neurovirulence in mice.



トラベラーズワクチンの現状と課題



Takashima Ikuo
高島 郁夫*

*北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医学講座公衆衛生学教室

4. ワクチン接種・治療の実際

8) ダニ媒介性脳炎

ダニ媒介性脳炎について

1. 疫学

1) 疾患と媒介マダニ

ダニ媒介性脳炎は、フラビウイルスによる人獣共通感染症で、マダニ科 (*Ixodidae*) に属する各種のマダニにより伝播される。ダニ媒介性脳炎には、ロシアのシベリア地域と極東地域に流行するロシア春夏脳炎と、ヨーロッパに流行する中央ヨーロッパダニ媒介性脳炎の2つの病型が知られている。ともにウイルス保有のマダニの吸血により感染し発症する。ロシア春夏脳炎ウイルスはシュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*)、中央ヨーロッパダニ媒介性脳炎ウイルスは *Ixodes ricinus* により主として媒介される。また、ヤギも感受性を有し、乳腺で増殖したウイルスが乳汁中に移行する。ヒトが汚染したヤギ生乳を飲用すると、しばしば感染・発病する。

2) 世界における患者発生状況

世界におけるダニ媒介性脳炎の患者は、患者数の集計が整った1992年以降、毎年7,000人以上発生している(表1)¹⁾。ロシアにおける患者数は全体の50%以上を占めており、さらに1999年には9,955人、2000年には5,931人、2001年には6,399人と依然多発傾向にある。

3) 北海道におけるダニ媒介性脳炎

これまでわが国ではダニ媒介性脳炎の発生は報告されていなかったが、1993年に北海道で本症の患者が発見された²⁻⁴⁾。その後の疫学調査で、われわれは原因ウ

イルスをイヌ、野ネズミおよびマダニから分離した⁴⁻⁶⁾。分離ウイルスは病原性の高いロシア春夏脳炎型ウイルスと同定された。さらに流行巣が道内各地に分布していることも判明した⁶⁾。これらの成績は、北海道にダニ媒介性脳炎ウイルスの流行巣が存在していることを示しており、他地域での疫学調査と予防対策の必要性を示している。

4) オーストリアにおける日本人の感染・死亡例

2001年6月、61歳の日本人男性が、オーストリアに住む娘を訪ねた際に田舎においてダニに刺された。その後、髄膜炎を発症し、オーストリアで入院した。病状は急速に髄膜脳炎へ進展し、ダニ媒介性脳炎と診断されたが、四肢麻痺、意識障害(会話不可能)を生じ、機械的人工呼吸が必要となり、9月には右大脳半球の出血により死亡した。この死亡例は、ダニ媒介性脳炎の情報なしに、ワクチン接種も受けずに本症流行地域を旅行することの危険性を警告している。

2. 臨床症状と病原性

ロシア春夏脳炎のヒトにおける症状は、頭痛、発熱、悪心および嘔吐に始まり、発症極期には精神錯乱、昏睡、痙攣および麻痺などの脳炎症状が出現することもある。致死率は30%で、回復しても多くの例で麻痺が残る。

中央ヨーロッパ型ダニ脳炎の病型は、ロシア春夏脳炎のそれに非常に似ているが、二峰性の熱型を特徴とし、症状が比較的軽い。

3. 診断

ダニ脳炎の実験室内診断には、酵素抗体法、赤血球凝集抑制反応、補体結合反応、中和反応を用いてウイルス特異的抗体を検出する。特に急性期に特異的な

表1 1992～2001年のダニ媒介性脳炎患者発生状況(人)

	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
オーストリア	84	102	178	109	128	99	62	41	60	54
ドイツ	142	118	306	204	109	168	130	82	155	253
エストニア	163	166	177	175	177	403	387	135	272	215
ラトビア	287	791	1,366	1,341	736	884	1,037	352	544	303
リトアニア	17	198	284	426	310	646	584	171	419	298
ポーランド	8	241	181	267	259	200	208	101	142	
ロシア	6,301	7,520	5,593	5,982	10,298	6,702	7,520	9,955	5,931	6,399
スウェーデン	83	51	116	68	45	76	64	53	130	128
フィンランド	14	25	16	23	10	20	17	12	40	33
スイス	66	44	97	60	62	123	68	108	90	108
スロベニア	210	194	492	260	406	269	136	150	190	
クロアチア	27	76	87	91	57	25	32	26		
チェコ	337	629	619	743	571	415	422	490	719	411
スロバキア	13	50	58	89	93	77	54	57		
ハンガリー	206	329	278	240	253	107	84	51	45	
イタリア		3	2	5	3	6	6	10	15	19
フランス	3	5	4	7	1	1	2	5		

IgM抗体が検出されること、または回復期血清の抗体価が3～4倍に増加することが血清診断の決め手になる。ドイツのPROGEN IMMUNO-Diagnostika社から、ELISA IgG, IgM抗体検出キットが発売されている。

ワクチンによる予防

中央ヨーロッパダニ媒介性脳炎ウイルスから作製した不活性ワクチンが、Baxter社(オーストリア)とChiron社(ドイツ)から販売されている。

1. 接種方法

Baxter社製およびChiron社製も、ともに0.5 mLの1回接種量をシリンジに充填済みの形で販売されている。通常法では、1回目接種後1～3カ月後に2回目、9～12カ月後に3回目、さらに3年後にブースター接種を行う。ワクチンは筋肉内(上腕部が望ましい)に接種する。静脈内接種は避ける。小児用(12歳以下)には、半量の0.25 mLにした製品を用いる。

2. 接種対象

ワクチン接種は、ダニ媒介性脳炎の汚染地域の田園もしくは森林地帯に定住している人、または一時的に滞在する人を対象にする。特に、ダニ類の生息する森や林に入る人は感染の危険性が高いので、ワクチンの接種が推奨される。治療を必要とする急性疾患の人は、完治してから少なくとも2週間までは接種すべきではない。副作用が出現したら、その原因がはっきりするまではワクチンの追加接種をすべきではない。妊娠中

表2 オーストリアにおけるダニ媒介性脳炎：ワクチンの効果

年	患者数 (人)	各集団での発症率 (発症人数/調査人数)			防御 (%)	
		未接種	2回 接種	3回以上 接種	2回 接種	3回以上 接種
1994	172	165/2,340	1/390	6/5,070	96.4	98.3
1995	109	104/2,110	1/460	4/5,230	95.6	98.4
1996	125	114/2,051	0/328	11/5,421	100.0	96.0
1997	99	93/2,161	0/390	6/5,249	100.0	97.5
2000	60	58/1,250		2/6,550		99.3
2001	54	50/1,120	0/160	4/6,720	100.0	98.7

と授乳中の婦人での安全性についての臨床試験は行われていないので、接種は危険性と効果を十分に考慮した上で行うべきである。

3. 効果

3回接種後の防御は、少なくとも3年間は持続する。ドイツを中心としてヨーロッパ4カ国で実施された臨床試験において、379人のボランティアを用いて良好な中和抗体産生性を確認した⁷⁾。また、オーストリアで1994～2001年に実際の脳炎の予防に対するワクチンの効果を野外で判定した成績では、2回または3回以上の接種を受けたヒトで95.6～100%の防御効果があった(表2)⁸⁾。この中央ヨーロッパ型のワクチンは、マウスでの攻撃実験とヒトにおける中和抗体産生から判定して、ロシア春夏脳炎型ウイルスと日本の分離株に対して効果があることが判明している⁹⁾。

4. 副作用

接種部位周辺の一過性の発赤，腫脹や痛みなどの局所反応と，近隣のリンパ節の腫脹がときどき起こり，肉芽腫がまれに出現する．特に，1回目の接種後に38℃以上の発熱，頭痛，知覚異常，嘔気と嘔吐が起こるかもしれない．一般的に症状は72時間以内に消失し，その後の接種時にはほとんど出ない．

5. 価格

ダニ媒介性脳炎ワクチンは国内での使用が認可されていないため，輸入代理店を通して医師の責任のもとに製造メーカーからの輸入手続きが必要となる．Chiron社製のワクチンでは，1本当たり本体価格4,643円，手数料3,500円，送料その他2,749円で計10,892円となる(2005年11月時点)．

おわりに

ダニ媒介性脳炎は，シベリアと極東ロシアを中心にヨーロッパ各国を含め毎年1万人前後の患者発生が報告されている．近年，日本とロシアの交流が活発になる中，ロシアを訪問する日本人が増加している．さらに，ヨーロッパ各地の流行地にも多くの日本人が滞在したり旅行している．これらの日本人の大部分は，ワクチンの接種を受けておらず，感染・発症が懸念される．さらに，わが国でも北海道においてダニ媒介性脳炎の患者が発生し，ダニ媒介性脳炎ウイルスが分離された．このような状況下で，国外の流行地に旅行する日本人および国内の流行地の住民を対象とした，ダニ媒介性脳炎予防のためのワクチンの接種が緊急の課題

となっている．

文献

- 1) Kunz C: Epidemiology of tick-borne encephalitis and the impact of vaccination on the incidence of disease. Symposium in Immunology 5 (Eibl MM, Peter HH, Wahn U, eds), Springer Verlag, Berlin, 1996; pp. 143-149.
- 2) 森田公一，五十嵐章，佐藤達郎ほか：北海道で発生したダニ脳炎と考えられる1例．病原微生物検出情報 1994; 15: 273-274.
- 3) 竹澤周子，佐藤達朗，水谷保幸ほか：ロシア春夏脳炎の一例．神経内科 1995; 43: 251-255.
- 4) Takashima I, Morita K, Chiba M, et al: A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the the virus. J Clin Microbiol 1997; 35: 1943-1947.
- 5) Takeda T, Ito T, Chiba M, et al: Isolation of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes ovatus* (Acari: Ixodidae) in Japan. J Med Entomol 1998; 35: 227-231.
- 6) Takeda T, Ito T, Osada M, et al: Isolation of tick-borne encephalitis virus from wild rodents and a seroprevalence survey in Hokkaido, Japan. Am J Trop Med Hyg 1999; 60: 287-291.
- 7) Harabacz I, Bock H, Jungst C, et al: A randomized phase II study of a new tick-borne encephalitis vaccine using three different doses and two immunization regimens. Vaccine 1992; 10: 145-150.
- 8) Kunz C: TBE vaccination and the Austrian experience. Vaccine 2003; 21 (Suppl 1): S50-S55.
- 9) Chiba N, Osada M, Komoro K, et al: Protection against tick-borne encephalitis virus isolated in Japan by active and passive immunization. Vaccine 1999; 17: 1532-1539.

Tick-borne Encephalitis

Ikuo Takashima*

*Laboratory of Public Health, Department of Environmental Veterinary Sciences,
Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University

Tick-borne encephalitis (TBE) is prevalent in Europe and Far-East Russia and about 10,000 cases were reported annually. In Hokkaido, Japan, a TBE patient was found in 1993 and TBE virus was isolated from ticks, sentinel dogs and wild rodents. The results provided evidence that TBE is endemic in Hokkaido. In 2001, a Japanese traveler suffered TBE in Austria and died. TBE vaccine of Central European TBE virus is available from two companies, Baxter and Chiron. Both of the vaccines are effective to TBE virus Far-East type strain and Hokkaido strain. It is needed to have vaccination to Japanese oversea travelers to endemic countries and residents in endemic areas in Japan.

話題の感染症

Yersinia pseudotuberculosis 感染症 (仮性結核)*Yersinia pseudotuberculosis* infection

はやし だに ひで き いわ た たけ とし
林 谷 秀 樹 岩 田 剛 敏
Hideki HAYASHIDANI Taketoshi IWATA

はじめに

仮性結核菌として知られる *Yersinia pseudotuberculosis* は *Y. enterocolitica* とともにエルシニア症の原因菌として知られている。ここでは、*Y. pseudotuberculosis* に関して、最新の知見をまじえながら紹介する。

I. 病原体

Y. pseudotuberculosis は、腸内細菌科 *Yersinia* 属に属する芽胞や莢膜を形成しないグラム陰性通性嫌気性桿菌である。本属菌には現在 11 菌種があり、このうち、人や動物に病原性を示すものとして、本菌の他、*Y. enterocolitica* とペストの病原体として知られる *Y. pestis* が含まれる。本菌は至適発育温度が 28℃ 付近で、4℃ 以下でも発育可能な低温発育性の病原菌として知られている。なお、*Y. pseudotuberculosis* と *Y. pestis* は、DNA の相同性が 80% 以上あり、分類学的には同じ菌種であるが、大腸菌と赤痢菌の関係のように、*Y. pestis* の重要性に鑑み、別の菌種に分類されている^{20,28)}。

Y. pseudotuberculosis は O 抗原により、現在、1～15 の血清群に型別され、さらに血清群 1, 2, 4 および 5 はさらに数亜群に分けられており、現在までのところ、21 血清群が知られている (表 1)³⁵⁾。このうち、人には血清群 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3, 4b, 5a, 5b, 6, 10 および 15 群が病原性を示すことが知られている^{11,21,35)}。また、われわれは 7 群に

よるリスザルの感染致死例を確認しており、7 群も病原性を有するものと思われる。

表 1 *Yersinia pseudotuberculosis* の抗原表³⁵⁾

血清群	亜群	O 抗原	H 抗原
1	1a	2, 3, 23	a, c
	1b	2, 4, 23	a, c
	1c	2, 4, 17, 24	b, c, d
2	2a	5, 6, 16	a, d
	2b	5, 7, 16, 17	a, d
	2c	5, 7, 11, 18	a, d
3		8, [15]	a
4	4a	9, 11	b; a, b
	4b	9, 12	a, b, d
5	5a	10, 14, 32	a; a, e, (b)
	5b	10, 15, 33	a
6		13, [19], 26	a
7		19, [13]	a
8		20 (R 抗原)	a
9		25, [10]	a, b, d
10		26	a, d
11		27, 4, 14, 15	b, d
12		28	a, d
13		29	-
14		30	a, b, d
15		31, 2, 10, 32, 33	-

[] : 菌株により異なる。

II. 病原因子

本菌の病原因子としては 70～75kbp の病原性プラスミド DNA にコードされているものと染色体 DNA にコードされているものがある。

病原性プラスミドにコードされているものとして、
1) YadA (*Yersinia* adherence A) : 腸管上皮細胞への付着・侵入や補体の抗菌作用への抵抗性などに

関与すると考えられており, *yadA* 遺伝子により 37°C 培養時に Ca^{2+} にかかわりなく菌体表面に産生されるスパイク状の菌体外タンパクである³⁴⁾。

2) Yops (*Yersinia* Outer Membrane Protein) : 37°C 培養時, Ca^{2+} が制限された状況で産生される菌体外タンパクであり, 今までのところ 11 種類の *yop* 遺伝子が知られている。マクロファージの食作用の阻害や食細胞内での殺菌作用に対する抵抗性に関与すると考えられている⁷⁾。また, プラスミド上にはこれら Yops の産生や調整にかかわる病原因子として, Lcr や Ysc があり, *virF* 遺伝子はこれらの遺伝子を活性化させる役割を持つ³⁷⁾。

染色体 DNA にコードされているものとして,

1) INVASIN : *inv* 遺伝子によりコードされており, 腸管上皮細胞への接着・侵入に関与する菌体外膜タンパクである¹⁹⁾。

2) YPM (*Y. pseudotuberculosis* derived mitogen) : T-細胞の過剰活性化やサイトカインの過剰産生を誘導するスーパー抗原 (YPM) の産生性に関与し, 発疹や結節性紅斑などの全身症状の発現に関与していると考えられている。YPM には YPMa, YPMb および YPMc の 3 つが知られ, このうち, YPMa だけがスーパー抗原活性を持つ^{1,6,24)}。

3) 鉄取り込みタンパク : HPI (High-pathogenicity island) に存在する *fyuA* および *irp2* 遺伝子にコードされており, 鉄と親和性の高い菌体外膜タンパクである^{5,29)}。

Fukushima ら¹¹⁾ は *Y. pseudotuberculosis* を病原因

子である HPI, YPMa, YPMb および YPMc の保有状況で型別した結果, 6 つの亜型に分かれることを明らかにし, 欧米由来株の多くは HPI を持つが YPMa を持たないのに対し, 日本, 韓国, 中国, ロシア沿海州などの極東地域由来株では HPI は持たないが, YPMa を持つスーパー抗原陽性の菌株が多いことを指摘している。

Ⅲ. 疫学

1) ヒトでの発生状況 : *Y. pseudotuberculosis* は, 1883 年に初めて髄膜性感染患者から発見された¹⁸⁾。世界的には, ヨーロッパでの感染患者の報告が多いが, 南北アメリカ, アフリカ, オセアニアの他, 中国, 韓国, 極東ロシアなどにおいても患者が報告されている。特に, 極東ロシアでは極東しょう紅熱症候群 (Far-East scarlet fever-like syndrome) と呼ばれる感染症が 1980 年代まで汚染野菜を原因として集団発生していたことが報告されている³²⁾。わが国では 1913 年に初めて人の敗血症例から分離され, その存在が明らかになった²⁵⁾。その後, 1981 年になり岡山県で *Y. pseudotuberculosis* の集団感染例がわが国で初めて確認され, この事例の調査研究から, それまで泉熱と呼ばれていた発熱・発疹を主症状とする原因不明の感染症は *Y. pseudotuberculosis* の感染によるものであることが明らかになった²⁶⁾。現在までに, 泉熱とされていたものも含め, 集団感染例が 15 例確認されており (表 2), また,

表 2 *Y. pseudotuberculosis* による集団感染例 (日本)

No.	発生年月	発生場所	推定原因食品	患者数	血清型
1	1977 年 4 月	広島県 中学校	不明	57 人	5b
2	1977 年 10 月	岐阜県 幼稚園	不明 (水?)	82 人	1b
3	1981 年 2 月	岡山県 小学校	野菜ジュース	535 人	5a
4	1982 年 1 月	岡山県 山間部住民	谷川水	268 人	4b と 2c
5	1982 年 2 月	岡山県 市街地住民	サンドイッチ	61 人	5b
6	1984 年 7 月	三重県 中学校	焼肉 (飲食店)	35 人	5a
7	1984 年 7 月	三重県 家庭	焼肉 (飲食店)	4 人	5a
8	1984 年 11 月	和歌山県 小学校・保育園	井戸水, 谷川水	63 人	3
9	1984 年 11 月	岡山県 山間部住民	谷川水	11 人	4b
10	1985 年 4 月	島根県 小学校・幼稚園	不明	8 人	4b
11	1985 年 4 月	新潟県 小学校	不明	60 人	4b
12	1986 年 3 月	千葉県 小学校	不明	651 人	4b
13	1987 年 5 月	広島県 山間部住民	井戸水	5 人	3
14	1988 年 5 月	長野県 山間部住民	湧き水	31 人	3
15	1991 年 6 月	青森県 小・中学校	不明	732 人	5a

(福島博ほか, 日獣誌 42: 829-840, 1989 を元に作成)

毎年西日本を中心に散発例が報告されている。本菌感染患者の発生は、*Y. enterocolitica* とは異なり、秋から春にかけての寒冷期がほとんどで、夏季にはほとんどみられない⁸⁾。患者の年齢分布は2～3歳をピークとする幼児に多く、成人ではまれである²⁷⁾。また、病原性株はヨーロッパでは1aおよび3の分離頻度が高いのに対して、わが国では多様な血清型が分離され、人からは4b, 5aおよび5bの分離頻度が高い。

2) ヒトでの臨床症状：人における *Y. pseudotuberculosis* 感染症は、臨床症状として一般的には下痢、腹痛などの胃腸炎症状を示すが、その他に発疹、結節性紅斑、咽頭炎、毒舌、四肢末端の落屑、リンパ節の腫大、肝機能低下、腎不全、敗血症など多様な症状を呈することが多い^{16,26,27)}。しかし、わが国の本菌感染事例ではこのような多様な症状を示し、重篤となることが多いのに対し、ヨーロッパにおける事例では、胃腸炎症状にとどまることがほとんどである。わが国の感染患者に観察されるこの多様な症状は、前述したように *Y. pseudotuberculosis* が産生するスーパー抗原に起因するものと推察されている。また、本菌感染症例の中には川崎病の診断基準を満たすものもあり、その関連が議論されている^{3,27)}。

3) 保菌動物：産業動物では、ブタやヒツジが *Y. pseudotuberculosis* の保菌動物として知られている。特にブタは本菌の代表的な保菌動物として知られ、比較的高率に本菌が分離される¹⁷⁾。ブタは本菌に感染しても全く臨床症状を示さず、不顕性感染する。また、ヒツジ³⁰⁾も *Y. pseudotuberculosis* の保菌動物であり、ヒツジとウシでは本菌による死・流産の報告がみられる^{23,38)}。ウマ、ニワトリからは両菌とも通常分離されない。伴侶動物であるイヌとネコも本菌の保菌動物であり、イヌとネコから数%程度の割合で分離される。イヌおよびネコとも本菌に対し不顕性感染する²⁸⁾。野生動物では、ノネズミが *Y. pseudotuberculosis* を高率に保有しており、特に、わが国ではアカネズミやヒメネズミなどのノネズミが本菌の自然界における主たる保菌動物と目されている¹⁰⁾。しかし、これらのノネズミにおける本菌の分布は西日本と北海道にほぼ限られており、本州の東日本では *Y. enterocolitica* 血清型 O8 が分布している^{12,14)}。また、本菌はサル、シカ、イノシシ、ノウサギなど多種の野生動物から分離され、特にわが国

ではタヌキは本菌を高率に保菌し自然界における主要な保菌動物と考えられている^{9,33)}。また、野鳥も *Y. pseudotuberculosis* の保菌動物であり、ヨーロッパでは血清型 1a の主要な保菌動物として知られているが、わが国では野鳥における *Y. pseudotuberculosis* の保菌率は低い。

食品における *Y. pseudotuberculosis* の分離報告は、食肉、特に生の豚肉に限られており、豚肉からは比較的高率に分離される^{28,31)}。また、沢水や井戸水から本菌は分離され、本菌の主要な感染源の1つになっている¹⁵⁾。

4) 感染経路：*Y. pseudotuberculosis* では、集団感染事例では本菌に汚染された豚肉や食品の摂取による場合も報告されているものの、わが国における散発事例の多くは本菌に汚染された沢水や井戸水の摂取による水系感染によるものと考えられている。また、保菌動物であるイヌやネコとの接触による感染事例も報告されている。

5) 動物での臨床症状

動物では、多くの場合不顕性感染するが、時に腸炎ならびに腸間膜リンパ節、肝、脾などに壊死巣を形成し、敗血症を起こして死亡する例が、サル、ウサギ、モルモット、鳥類など多くの動物で報告されている。特に、わが国では、毎年展示動物施設でリスザルなどのサル類に本菌による感染死亡例が多発し、飼育上の大きな問題となっている³⁶⁾。われわれは、2001～2005年の間に、サル展示施設11カ所において、リスザル、クモザル、キツネザルなど8種のサル類において計15回の本菌の流行を確認している。これらの感染致死個体から分離された菌株の血清型は4bが7例で最も多く、次いで1bが5例、3, 6および7がそれぞれ1例であり、分離株は4bの2例を除き、いずれもYPMaを保有するスーパー抗原陽性株であった。写真1は *Y. pseudotuberculosis* に感染し、死亡したリスザルの剖検写真である。肝臓と脾臓に針頭大～小豆大の多発性白色結節が観察される。リスザルなどの南米やアフリカなどからの輸入ザルに本菌感染事例が多発する理由は、これらのサルの原産地にはYPMを保有する *Y. pseudotuberculosis* が分布しておらず、これまでに病原性の強い *Y. pseudotuberculosis* の感作を受けたことがないため、これらの菌株に感受性が高いものと思われる。実際、わが国の展示施設では日本原産

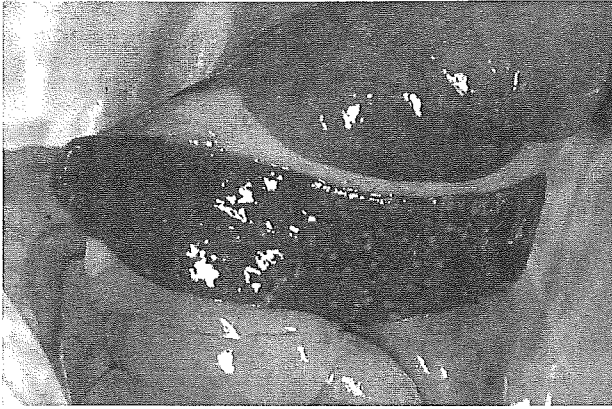


写真1 *Y. pseudotuberculosis* に感染・死亡したリスザルの肝臓と脾臓
肝臓と脾臓に針頭大～小豆大の多発性白色結節が観察される
(麻布大学獣医病理学研究室 宇根有美博士提供)

のニホンザルの飼育頭数は多いにもかかわらず、ニホンザルにおける本菌感染例は少ない。

IV. 診断と予防

人では *Y. pseudotuberculosis* に感染した場合、臨床症状は上述したように感染型食中毒の症状を示すことが多いため、臨床症状から診断をすることは難しく、確定診断には感染患者の糞便からの菌検出が必要である。通常、糞便からの菌分離には、選択平板培地として CIN (cefsrodin-irgasan-novobiocin) 寒天培地が頻用されている。また、適切な増菌培地がないため、菌数の少ない材料からの菌分離には M/15 リン酸緩衝液に検体を加え、4℃で3週間程度培養する低温増菌培養法が実施されており、さらに検出感度を高めるために、*Yersinia* 属菌がアルカリに耐性を持つことを利用し、0.04%の KOH を作用させ、河川、食品ならびに低温増菌培養液など他の菌が混在する検体から本菌を選択的に分離するアルカリ処理が併用される²⁾。遺伝子診断としては、染色体上の *inv* 遺伝子と病原性プラスミド上の *virF* 遺伝子を標的とした PCR 法が一般的に普及している²²⁾。われわれは、近年開発された迅速かつ高感度な遺伝子診断法である LAMP 法を応用し、*inv* 遺伝子を標的遺伝子とした本菌の検出法を開発した¹³⁾。われわれの開発した LAMP 法は、*Y. pseudotuberculosis* の 21 の血清型すべてがほぼ 30 分以内に検出可能であり、実験的には菌量が 10^0 まで検出

可能で、PCR 法に比べて極めて迅速で特異性が高く、高感度なものであった。写真2は、*Y. pseudotuberculosis* または病原性 *Y. enterocolitica* に自然感染して死亡したサル肝臓を用いて、*inv* を標的遺伝子として LAMP 法を行った結果を示したものである。*Y. pseudotuberculosis* 感染によって死亡した10頭のサルの肝臓のみ DNA ラダーが観察され、DNA の増幅が確認されたが、*Y. enterocolitica* O:8 感染によって死亡したサルおよび *Yersinia* 感染以外の理由で死亡したサルの肝臓からは、DNA の増幅はみられなかった。

Y. pseudotuberculosis の血清型別には、診断用抗血清 (デンカ生研) が市販されているが、血清型 1～6 群までしか用意されていないため、7～15 群や 1, 2, 4 および 5 群の亜群の型別はできない。近年、Bogdanovich ら⁴⁾ は *Y. pseudotuberculosis* の O 抗原をコードしている遺伝子を解析し、その塩基配列から、*Y. pseudotuberculosis* のすべての血清型を PCR 法により型別することができるプライマーを開発した。本法によれば、*Y. pseudotuberculosis* のすべての亜型まで PCR 法により型別可能である。また、血清学的診断として、*Y. enterocolitica* または *Y. pseudotuberculosis* に対する抗体価 (血中凝集素価) を測定し、急性期と回復期のペア血清で抗体価の4倍以上の上昇または 160 倍以上の抗体価が認められた場合にエルシニア感染症を疑う。なお、*Y. pseudotuberculosis* 血清群 2 と 4 はそれぞれ *Salmonella* O 群 4 ならびに O 群 9 と 14 と共通抗原を持つため、注意が必要である。

Y. pseudotuberculosis はマクロライド系以外のほとんどの抗生物質に対して高い感受性を示す。しかし、敗血症以外、抗生物質の臨床的效果は不明なことが多いので、人での本菌感染事例の治療には対症治療を中心に行うべきである。また、動物でも、敗血症が疑われるような事例において抗生物質の投与を行うべきである

人での *Y. pseudotuberculosis* 感染症の予防は、一般的な食中毒の予防法に準じるが、特に沢水や井戸水を介した水系感染を防ぐため、これらを飲用する際は、加熱・消毒されたものにする。イヌやネコなどの保菌動物と接触した後は、手洗いを心がける。

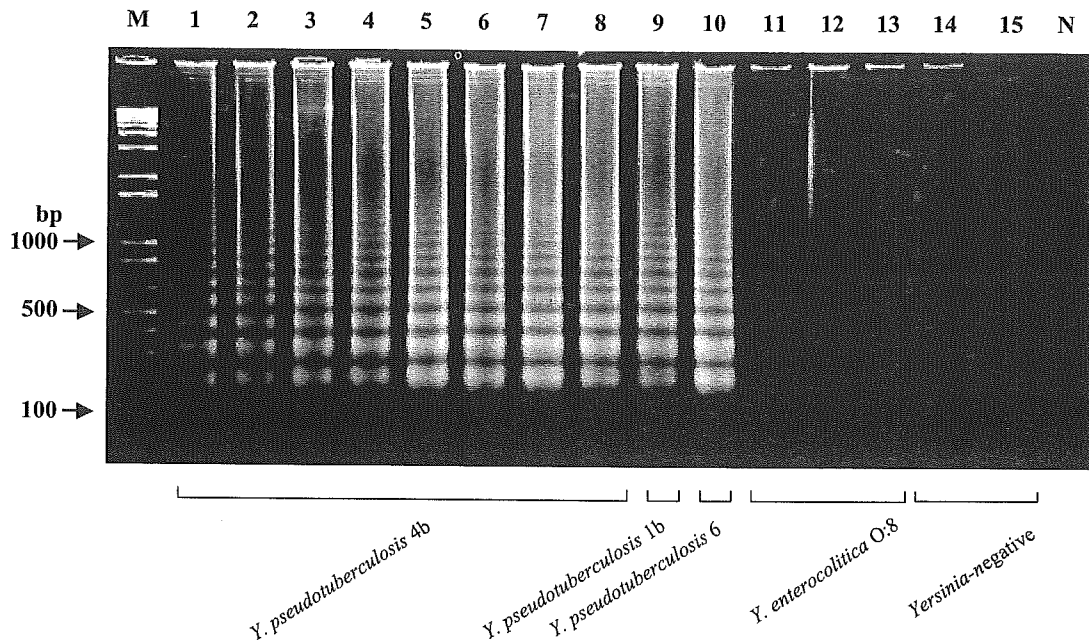


写真2 LAMP 法による *Yersinia pseudotuberculosis* に感染したサル肝臓からの *inv* 遺伝子の検出
lanes 1～7, 血清型 4b に感染したリスザル; lane 8, 血清型 1b に感染したオランウータン;
lane 9, 血清型 1b に感染したリスザル; lane 10, 血清型 6 に感染したリスザル; lanes 11
～13, *Y. enterocolitica* 血清型 O8 に感染したリスザル (11, 12) とアジルテナガザル (13);
Lanes 14～15, *Yersinia* に感染していないリスザル; Lane N, 陰性コントロール; Lane M,
DNA size marker.

おわりに

Y. pseudotuberculosis 感染症は、感染症法や食品衛生法に規定されていないため、ヒトにおける発生実態は必ずしも明らかではないが、現在も西日本を中心に散発的に発生が起きている。また、動物園などの動物展示施設においては、前述したような、リスザルなどのサル類だけでなく、鳥類やげっ歯類など他の動物にも本菌による感染致死事例が多発しており、動物飼育上のみならず公衆衛生上からも看過できない問題となっている。したがって、本感染症の発生動向については今後とも十分な注意を払っていくべきであり、将来的には感染症法の対象疾病にすることを検討する必要があるだろう。

文 献

- 1) Abe, J., Takeda, T., Watanabe, Y., Nakao, H., Kobayashi, N., Leung, D. Y., Kohsaka, T.: Evidence for superantigen production by *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Immunol.* 151:4183-4188, 1993.
- 2) Aulisio, C. C. G., Mehlman, I. J., Sanders, A. C.: Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 135-140, 1980.
- 3) Baba, K., Takeda, N., Tanaka, M.: Cases of *Yersinia pseudotuberculosis* infection having diagnostic criteria of Kawasaki disease. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 12:292-296, 1991.
- 4) Bogdanovich, T., Carniel, E., Fukushima, H., Skurnik, M.: Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5103-5012, 2003.
- 5) Carniel, E.: The *Yersinia* high-pathogenicity island. *Int. Microbiol.* 2: 161-167, 1999.
- 6) Carnoy, C., Simonet, M.: *Yersinia pseudotuberculosis* superantigen toxins. *Bacterial protein toxins: A comprehensive sourcebook*, 2nd ed., ed. Alouf, J. E., and Freer, J. H., Academic Press, London, 611-622, 1999.
- 7) Cornelis, G. R., Boland, A., Boyd, A. P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.-P., Stainier, I.: The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1315-1352, 1998.
- 8) 福島博: わが国におけるエルシニア感染症の発生頻度, *メディアサークル* 36: 360-365, 1991.
- 9) Fukushima, H., Gomyoda, M.: Intestinal carriage of *Yersinia pseudotuberculosis* by wild birds and mammals in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1152-1155, 1991.

- 10) Fukushima, H., Gomyoda, M., Kaneko, S.: Mice and moles inhabiting mountainous areas of Shimane Peninsula as sources of infection with *Yersinia pseudotuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 28: 2448-2455, 1990.
- 11) Fukushima, H., Matsuda, Y., Seki, R., Tsubokura, M., Takeda, N., Shubin, F.N., Paik, I.K., Zheng, X.B.: Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen, and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. J. Clin. Microbiol. 39:3541-3547, 2001.
- 12) Hayashidani, H., Ohtomo, Y., Toyokawa, Y., Saito, M., Kaneko, K., Kosuge, J., Kato, M., Ogawa, M., Kapperud, G.: Potential sources of sporadic human infection with *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 in Aomori prefecture, Japan. J. Clin. Microbiol. 33: 1253-1257, 1995.
- 13) Horisaka, T., Fujita, K., Iwata, T., Nakadai, A., Okatani, A.T., Horikita, T., Taniguchi, T., Honda, E., Yokomizo, Y., Hayashidani H.: Sensitive and specific detection of *Yersinia pseudotuberculosis* by loop-mediated isothermal amplification. J. Clin. Microbiol. 42:5349-5352, 2004.
- 14) Inuma, Y., Hayashidani, H., Kaneko, K., Ogawa, M., Hamasaki, S.: Isolation of *Yersinia enterocolitica* serovar O8 from free-living small rodents in Japan. J. Clin. Microbiol. 30: 240-242, 1992.
- 15) Inoue, M., Nakashima, H., Ishida, T., Tsubokura, M., Sakazaki, R.: Isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* from water. Zbl. Bakt. Hyg. B 186:338-343, 1988.
- 16) Inoue, M., Nakashima, H., Ueba, O., Ishida, T., Date, H., Kobashi, S., Takagi, K., Nishu, T., Tsubokura, M.: Community outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis*. Microbiol. Immunol. 28:883-891, 1984.
- 17) Laukkanen, R., Niskanen, T., Fredriksson-Ahomaa, M., Korkeala, H.: *Yersinia pseudotuberculosis* in pigs and pig houses in Finland. Adv. Exp. Med. Biol. 529:371-373, 2003.
- 18) Mallassez, L., Vignal, W.: Tuberculosis zoogéique (forme ou espèce de tuberculose sans bacilles). Arch. Physiologie. 2:369-412, 1883.
- 19) Miller, V.L., Falkow, S.: Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. Infect. Immun. 56: 1242-1248, 1988.
- 20) Munnich, S. A., Smith, M.J., Weagant, S.D., Feng, P.: *Yersinia*, Foodborne Disease Handbook Vol1: Bacterial pathogens, 471-514, ed Hui, Y.H., Pierson, M.D., and Gorham, J.R., Marcel Dekker, New York, 2001.
- 21) 永野哲司, 清原知子, 鈴木清美, 實方剛, 坪倉操, 大槻公一: 中国および韓国における *Yersinia pseudotuberculosis* の分布. メディアサークル 41: 31-36, 1996.
- 22) Nakajima, H., Inoue, M., Mori, T., Itoh, K., Arakawa, E., Watanabe, H.: Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. J. Clin. Microbiol. 30: 2484-2486, 1992.
- 23) Otter, A.: Ovine abortion caused by *Yersinia pseudotuberculosis*. Vet. Rec. 138:143-144, 1996.
- 24) Ramamurthy, T., Yoshino, K., Abe, J., Ikeda, N., Takeda, T.: Purification, characterization and cloning of novel variant of the super antigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen. FEBS Lett. 413: 174-176, 1997.
- 25) Saisawa, K.: Über die Pseudotuberkulose beim Menschen. Zschr. Hyg. Infektionskr. 73: 353-354, 1913.
- 26) 佐藤幸一郎: *Yersinia pseudotuberculosis* 感染症の臨床所見および疫学像, 特に泉熱との関連について. 感染症学雑誌 61: 746-762, 1987.
- 27) Sato, K., Ouchi, K., Taki, M.: *Yersinia pseudotuberculosis* infection in children, resembling Izumi fever and Kawasaki syndrome. Pediatr. Infect. Dis. 2:123-126, 1983.
- 28) Schiemann, D.A.: *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, Foodborne bacterial pathogens, ed. Doyle, M.P., Marcel Dekker, New York, NY., 601-672, 1989.
- 29) Schubert, S., Rakin, A., Heeseman, J.: The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. Int. J. Med. Microbiol. 294: 83-94, 2004.
- 30) Severini, M., Ranucci, D., Miraglia, D., Cenci Goga, B.T.: Pseudotuberculosis in sheep as a concern of veterinary public health. Vet. Res. Commun. 27 Suppl 1:315-318, 2003.
- 31) Shiozawa, K., Hayashi, M., Akiyama, M., Nishina, T., Nakatsugawa, S., Fukushima, H., Asakawa, Y.: Virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from pork and from the throats of swine. Appl. Environ. Microbiol. 54:818-821, 1988.
- 32) Somov, G.P., Martinevsky, I.L.: New facts about pseudotuberculosis in the USSR. Contrib. Microbiol. Immunol. 2:214-216, 1973.
- 33) Suzuki, A., Hayashidani, H., Kaneko, K., Ogawa, M.: Isolation of *Yersinia* from wild animals living in suburbs of Tokyo and Yokohama. Contrib. Microbiol. Immunol. 13: 43-45, 1995.
- 34) Tahir, Y.E., Skurnik, M.: YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. Int. J. Med. Microbiol. 291: 209-218, 2001.
- 35) 坪倉操, 永野哲司: 仮性結核菌の血清群と, それに関連するいくつかの何故?, 微生物の世界, 坪倉操, 平棟孝志, 金子賢一編, 養賢堂, 東京, 57-70, 1997.
- 36) 宇根由美, 磯部杏子, 馬場智成, 林谷秀樹, 野村靖夫: リスザルのエルシニア症 (*Yersinia pseudotuberculosis* 感染症). 日本野生動物医学学会雑誌 8: 19-26, 2003.
- 37) Wattiau, P., Cornelis, G. R.: Identification of DNA sequences recognized by VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia yop* regulon. J. Bacteriol. 176: 3878-3884, 1994.
- 38) Welsh, R. D., Stair, E.L.: *Yersinia pseudotuberculosis* bovine abortion. J. Vet. Diagn. Invest. 5: 109-111, 1993.