

サル類のエルシニア症の発生と予防に関する
病理学的および免疫学的研究

麻布大学大学院獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程 基礎獣医学病態系 病理学

dv0702 中村 進一

平成 22 年度
博士学位論文

サル類のエルシニア症の発生と予防に関する
病理学および免疫学的研究

麻布大学大学院 獣医学研究科 獣医学専攻博士課程

基礎獣医学病態系 病理学研究室

dv0702 中村 進一

目次

諸言	1
第 1 章 我が国の動物園におけるサル類のエルシニア症の発生状況と 病理学的特徴	9
第 1 節 序論	9
第 2 節 材料および方法	9
第 3 節 結果	14
第 4 節 考察	24
図表	43
第 2 章 病原性 <i>Yersinia</i> の感染防御抗原に関する研究	60
第 1 節 序論	60
第 2 節 材料および方法	65
第 3 節 結果	76
第 4 節 考察	89
図表	103

第 3 章 飼育下リスザルに対する <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ワクチンの臨床実験に関する研究	120
第 1 節 序論	120
第 2 節 材料および方法	122
第 3 節 結果	127
第 4 節 考察	134
図表	141
結語	152
謝辞	164
参考文献	165

諸言

Yersinia 属菌は、腸内細菌科に属するグラム陰性、通性嫌気性の桿菌で、ヒト、動物および環境由来の *Yersinia* は、現在 14 菌種に分類されている[121,173,174,178]。そのうち、ヒトと動物に病原性を有するのは、ペストの原因となる *Yersinia pestis*、食中毒起因菌として知られている *Y. enterocolitica* および肝臓や脾臓に結核結節に類似した病変を形成することから、仮性結核菌ともいわれている *Y. pseudotuberculosis* の 3 菌種がある。後二者は、ペストとは区分されて病原性 *Yersinia* と呼ばれており、ヒトや動物に急性腸管感染症を引き起こす人獣共通感染症の原因となる[106]。また、両者による感染症は、総称してエルシニア症と呼ばれている[155]。両菌とも腸内細菌科に属しながら、至適発育温度は 28℃ 付近で、4℃ 以下でも発育可能な低温発育性を有する病原菌として知られている[102]。

Y. enterocolitica は、通常 O 抗原による血清型別がなされ、現在 51 の O 血清群に分けられており、このうちヒトに病原性を示すのは O3、O4/32、O5/27、O8、O9、O13a、O13b、O18、O20 および O21 の 9 血清群が知られている。この中でも特に O3、O5/27、O8 および O9 は、ヒトや動物からの検出頻度が高く、代表的な病原性血清群とされている[44,97,155]。O3、O5/27 および O9 は世界的に広く分布が報告されているのに対し、O8 は近年までほぼ北米に限局して分布が報告され、北米でのみ分離される病原性血清型の O4/32、O13a、O13b、O18、O20、O21 とともに“American strains”と呼ばれている[92,155]。しかし、

1989 年に、日本で捕獲されたノネズミの糞便から分離されて以来、散発的に O8 によるヒトの感染例が報告されており[71,80,81,151]、さらに最近では、ヨーロッパでもヒトの感染例が報告されている[145,157]。O8 は、O3、O5/27 および O9 に比べると病原性が強く、マウスに実験的に経口感染させると、その他の血清型では不顕性感染するだけであるが、O8 ではほぼ 100%近い個体が敗血症を起こし死亡するといわれている[27,119,156]。一方、*Y. pseudotuberculosis* は、1~15 群の血清群に群別され、そのうち 1、2、4 および 5 群はさらに数亜群に分けられており、現在までのところ、21 の血清群が知られている[55,197]。このうち 1~6、10 および 15 群が病原性を有するとされている。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、日本では多様な血清型が分離されており、ヒトからは 4b、5a および 5b が、動物では 1b、2b、3、4b、5a、5b、6 などが分離されている[45,117,197]。

ヒトが病原性 *Yersinia* に感染すると、一般的には発熱、下痢および腹痛などの胃腸炎症状を示すが、病原性 *Y. enterocolitica* のうち、最も強毒な血清型である O8 や *Y. pseudotuberculosis* による感染症では、胃腸炎に留まらず、敗血症のような全身症状を示すことも珍しくない[44,45]。しかし、ヒトの感染例では両菌種とも多彩な臨床症状を示し、年齢や患者の基礎的疾患の有無などの要因により異なることが知られており、一般的に幼児や老人などの免疫が不十分な患者では感受性が高く、症状や病変が重篤になる傾向にある[88]。小児では急性胃腸炎になることが多いが、年齢が上昇するにつれて腸間膜リンパ節炎や回腸末端炎などの回盲部に限局した病変を呈するようにな

る[186,188]。その他、発疹、関節炎、急性腎不全などの原因となることがある[54,196]。動物では感染宿主域が非常に広く、家畜、愛玩動物および野生動物にまでおよび、種類としては哺乳類から鳥類や爬虫類と広域で、現在までに延べ110種類以上の動物種から分離されている[54,59,103,116,159]。しかし、動物では多くが不顕性感染で、発症例は比較的少ない[117]。ヒトおよび動物の感染例では、糞便とともに環境中に排泄された菌が食物や飲み水を汚染し、これを介して経口感染することが多い[51,63,179]。家畜では、ブタから高率に病原性 *Yersinia* が分離され、代表的な保菌動物として知られている[38,46]。1983年から1984年にかけての、全国の食肉衛生検査所での9423頭の腸内容物を調査した研究では、*Y. enterocolitica* は11.8%の陽性率であり、*Y. pseudotuberculosis* も約2%の割合で検出されている[117]。ブタは両菌に感染してもほとんど臨床症状を示さずに不顕性感染を示し、感染後42日間、糞便中への排菌が持続することが報告されている[53]。その他、ヒツジとヤギも病原性 *Yersinia* を保菌することがあり、発症例も散発的に報告されている[140,158,168-170]。また、ヒツジとウシでは、本菌による死流産の報告もみられる[30,31,65,89,110,136,209]。愛玩動物では、イヌとネコが両菌を糞便中に排泄することが知られており、イヌで6~8%、ネコでは1~3%の割合で分離され、ネコの糞便が環境水や土壌を汚染した例も報告されている[15,43,48,52,116,196,211]。野生動物では、アカネズミやヒメネズミ、ヤチネズミなどのノネズミやドブネズミ、クマネズミなどのげっ歯類の保菌率は、調査に差はあるが3~35.2%の割合で両菌が高率

に分離されており、自然界における病原性 *Yersinia* 属菌の主要な保菌動物として知られている[47,49,50,51,71,82,215]。その他の野生動物では、分離頻度はいずれの調査でも5%未満と低いが、サル類、シカ、イノシシ、ノウサギなど多くの動物種から分離されている[44,45,198]。我が国では、タヌキ *Nyctereutes procyonoides* の保有率が高く、Fukushima らの調査では164頭中23頭(14.0%)から *Y. pseudotuberculosis* が分離されており、自然界の重要な保菌動物であることが報告されている[47,50]。また、欧米諸国では、鳥類が野生げっ歯類と並んで *Yersinia* 属菌の代表的な保菌動物とされており、ヨーロッパでは野菜や水を汚染してヒトへの感染源となることが報告されている[18,78,98,99,111,117]。しかし、我が国では、野鳥から *Yersinia* 属菌が分離されることは少なく[117]、アオジ *Emberiza spodocephala*、ハクセキレイ *Motacilla alba lugens* からそれぞれ5.3%、1.4%の割合で *Y. pseudotuberculosis* が分離された例[62]や、カルガモ *Anas poecilorhyncha* からの *Y. enterocolitica* O5/27 の分離例(検出率1.2%)、カモメ *Larus sp.* から *Y. pseudotuberculosis* が分離された例(1.3%)[94]、動物園で捕獲されたカラス *Corvus sp.* から4.8%の割合で *Y. pseudotuberculosis* が分離された報告例[135]など少数があるのみである。また、飼育下鳥類におけるエルシニア症による死亡例も少数報告されている[68,69,153]。

Yersinia の病原因子としては、約45メガダルトン(Md)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が、その病原性は特に病原性プラスミドに規定されており、病

原性プラスミドの自然脱落とともに病原性は失われる[33,44,45]。現在までに明らかになっている病原因子として、病原性プラスミド上では、腸管上皮細胞への付着、マクロファージの食作用の阻害と食細胞内での殺菌作用に対する抵抗性などに関与すると考えられている菌体外膜タンパク質である YadA (*Yersinia Adhesin A*) [35,36]、詳細な作用は未だ不明な部分が多いが、少なくとも 11 種類の *yop* 遺伝子により生成、分泌され、マクロファージによる貪食作用の抑制などに関与する Yops (*Yersinia Outer Membrane Proteins*) [32,101]、Yops の産生やプロセッシング、排泄に関与する Ysc (*Yop secretion*) [34]、Yops の産生を調整するタンパク質である Lcr (*low calcium response*) [175] などがある。一方、染色体 DNA にコードされているものとしては、宿主上皮細胞への接着と侵入に関与する菌体外膜タンパク質である Invasin [22] や Ail (*Attachment invasion locus*) [13]、病原性との関係は詳しく調べられていないが、補体や白血球の活性を阻害することが知られている LPS (*lipopolysaccharide*) [11] などがある。染色体 DNA 上には、これらの他にも *Y. enterocolitica* O8 では、鉄と親和性の高い菌体外膜タンパクの産生性をコードする遺伝子を保有していることが知られており、O8 同様マウスに対して強い病原性をもつ *Y. pestis* と *Y. pseudotuberculosis* にも存在することが知られているが、病原性の弱い O3、O5/27 および O9 にはみられない [24]。また、*Y. pseudotuberculosis* の一部の菌株は、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である *Y. pseudotuberculosis*-derived Mitogen (YPM) を産生することが知られ

ている[3,201]。このような多数の病原因子の発現が、様々に調節、制御され、病原性を発揮すると考えられている。さらに、いくつかの病原因子の発現調節機構は、温度、pH、 Ca^{2+} の存在などによって調節されており、プラスミド性の病原因子は、 37°C で発現するが、 25°C では発現しない[44,45,152]。

動物ではほとんどの種類は不顕性感染するが、サル類は例外的に感受性が高く、特に欧米と日本で多くの集団発生が報告されている[7,12,16,17,19,23,28,39,42,70,75,90,91,100,109,112,118,120,126,141-143,148,154,164,184,202,204,205,208]。感受性を示す種類は極めて多岐にわたり、原猿類のキツネザル類[17]やショウガラゴ(*Galago senegalensis*) [28,112]から、広鼻猿類(新世界ザル)[7,12,16,23,39,141,142,154,184,204]や狭鼻猿類(旧世界ザル)[19,75,91,109,118,120,126,142,148,164]、さらには、類人猿(テナガザル、チンパンジー)[70,126,202]など、多くのサル類が病原性 *Yersinia* に対して感受性を有しており、特に我が国では、*Y. pseudotuberculosis* による感染致死例が、様々な種類の飼育下サル類に多発している[42,70,75,91,100,118,126,154,202,204]。また、多くは動物園での発生であるが、アメリカの霊長類研究センターや大学の繁殖施設でもエルシニア症が流行し、問題となったことがある[7,19,23,148,164,184]。動物園などの飼育施設では、エルシニア症の集団発生により、短期間のうちに複数の種ならびに多数の個体が死亡することがあるため、ときにサル類飼育個体群の維持が困難になることが問題となっている。しかし、サル類のエルシニア症に関する報告は、

単一の飼育施設を対象とした報告や症例報告に留まっており、従来、動物展示施設において、死亡個体の詳細な病理学的および微生物学的な検索が不十分なため、サル類のエルシニア症の病態および発生状況の把握が進んでおらず、適切な対策が立てられていないのが現状である。

動物園などで飼育されているサル類は希少な動物種が多く含まれ、霊長類のすべての種は、「絶滅のおそれのある野生動植物の種の国際取引に関する条約（ワシントン条約）：CITES」の付属書 I または II にリストアップされており、保護対象となっている。また、国際自然保護連合（IUCN）内の種保存委員会（SSC）の Primate specialist group の報告によると、634 種類の種または亜種のうち、303 種類（47.8%）が絶滅危惧種に指定されている[123]。さらに我が国では、「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」により、2000 年以降、サル類の輸入は原則禁止となり、2005 年 7 月からは、厚生労働大臣および農林水産大臣が指定した試験研究機関または動物園のみに輸入が制限され、輸入可能地域も米国、中国、インドネシア、フィリピン、ベトナム、スリナム、ガイアナ、カンボジアの 8 カ国に限定されている[124]。以上のように、サル類は物理的、経済的さらには法的にも入手が困難なことが多いことから、サル類のエルシニア症の発生予防は、動物飼育施設における飼育管理上の喫緊の課題となっている。さらに、エルシニア症は人獣共通感染症であることから、飼育下サル類におけるエルシニア症の発生予防対策を図ることは、公衆衛生上の観点から

も重要な問題であるが、依然として適切な対策が確立されていないのが現状である。

本研究では、我が国のサル類飼育施設におけるエルシニア症の発生予防対策を図る研究の一環として、飼育施設におけるサル類のエルシニア症の発生状況を調査し、その特徴を病理学的および疫学的に明らかにするとともに、その感染防御対策を図る目的で、動物実験および野外臨床実験によって、エルシニア症の予防に有効なワクチンの開発を試みた。第1章では、我が国の飼育施設で発生したエルシニア症により死亡したサル類の病理学的特徴を整理し、その中でも特に症例数が多いリスザルに着目して、病原性と菌種、血清型および保有病原遺伝子との関連を検討した。第2章では、サル類のエルシニア症の発生予防のための有効なワクチン抗原の探索のため、*Y. pseudotuberculosis* の感染防御抗原について検討し、マウスを用いて感染防御実験を行った。第3章では、飼育下リスザルを対象として、*Y. pseudotuberculosis* ワクチンの野外臨床実験を実施し、その有効性や作用機序について検討するとともに、血清調査を行い、リスザルのエルシニア症の流行機序の解明を試みた。

第1章 我が国の動物園におけるサル類のエルシニア症の発生状況と病理学的特徴

第1節 序論

我が国では、これまでに病原性 *Yersinia*、特に *Y. pseudotuberculosis* によるサル類の感染致死例が多数報告されており、サル類飼育管理上の大きな問題となっている [42,70,75,91,100,118,126,154,202,204]。しかし、これらの報告はいずれも症例報告のみで、エルシニア症の病態は詳細に把握されていない。さらに、分離菌の血清型や保有病原因子と病原性との関連についてはほとんど検討されておらず、我が国の飼育下サル類におけるエルシニア症の発生実態は未だに不明な点が多い。

本章では、飼育下サル類のエルシニア症の発生予防対策を図るための研究の一環として、我が国の飼育施設におけるサル類のエルシニア症の発生状況を遡及的に調査し、サル類のエルシニア症の病理学的特徴を整理した。さらに、サル類の種類、年齢、分離菌の菌種、血清型および保有病原遺伝子の種類による病態の相違を明らかにするために、病理学的所見とサル類の種類や年齢、分離菌の菌種、血清型ならびに保有病原遺伝子との関連を検討した。

第2節 材料および方法

2-1 供試検体

2000年1月～2008年9月の間に、国内のサル類を飼育する21施設で死亡し、麻布大学病理学研究室で病性鑑定を行った飼育下サル類390頭（Table 1）を対象とした。なお、リスザルはリスザル属（*Saimiri* spp.）に分類され、コモンリスザル（*S. sciureus*）の他、ボリビアリスザル（*S. boliviensis*）、セアカリスザル（*S. oerstedii*）など計5種が含まれるが、我が国で主として飼育されているリスザルはコモンリスザルとボリビアリスザルの2種である。本研究で供試されたリスザルは、ほとんどがコモンリスザルとボリビアリスザルであったが、一部でコモンリスザルとボリビアリスザルの混血個体が含まれていたため、これらを総称して特に断りのない限り、リスザルと表記した。

2-2 発生状況調査（遡及的研究）

上記期間内における390頭のサル類を対象として、死因を再評価した。肉眼所見と病理組織学的所見から感染症を疑う症例のうち、細菌感染症や敗血症の症例は、さらにエルシニアに対する免疫染色を実施するとともに、特殊染色（グラム染色、ギムザ染色、PAS反応等）により、その他の感染症の有無を確認した。エルシニア症の診断は、サル類のエルシニア症に関する成書または総説の記載に基づき、臨床症状と経過、病理学的検索ならびに微生物学的検索を組み合わせで行った[1,9,10,57,60,78,134]。また、臓器や糞便の採材ができず、ホ

ルマリン固定材料からの病理検査のみとなった症例は、発生状況、肉眼所見、病理組織学的所見ならびに免疫組織化学的検索によって診断した。さらに、各飼育施設における斃死個体の死亡年月日、性別、年齢、体重、臨床症状を調査し、それらとエルシニア症の発生との関連を検討した。

臓器または糞便からの病原性 *Yersinia* の分離、同定は、共同研究者である東京農工大学獣医衛生学教室の林谷秀樹准教授に依頼し、以下に記載した方法で行われた。死亡したサルから無菌的に採材した肝臓、脾臓、小腸、大腸および腸間膜リンパ節などの各臓器あるいは糞便は、9 倍量の滅菌 PBS に懸濁し、Irgasan-Novobiocin (IN) 平板培地 (OXOID Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) に塗抹した。さらに、PBS 懸濁液は 4°C で 3~4 週間低温増菌し、水酸化カリウムを用いたアルカリ処理後に IN 平板培地に塗抹した。IN 平板培地は、いずれも 25°C で 48 時間培養した。さらに、*Yersinia* 属菌を疑うコロニーから釣菌し、それを trypticase soy agar (TSA) 平板培地 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.) を用いて純培養後、TSI 寒天培地 (日水製薬株式会社, 東京, 以下, 日水)、LIM 培地 (日水) および尿素培地 (栄研化学株式会社, 東京) を用いて生化学性状試験を行った。*Yersinia* 属菌と同定された菌株は、Wauters ら[207]の方法に従い、菌種まで同定した。さらに、*Y. pseudotuberculosis* または *Y. enterocolitica* と同定された菌株は、偽結核菌群別用免疫血清またはエルシニア・エンテロコリチカ O 群別用免疫血清 (いずれもデンカ生研, 東京) をそれぞれ用いて、

スライド凝集反応により血清群別を行った。また、リスザルから分離された *Y. pseudotuberculosis* 13 株について、PCR 法を用いた病原遺伝子の検索を、東京農工大学獣医衛生学教室の林谷秀樹准教授に依頼した。Iwata ら[87]の方法に従い、病原性プラスミドのマーカールとして *virF* 遺伝子、染色体 DNA 上に存在し、*Y. pseudotuberculosis* に特異的で、腸管粘膜上皮への侵入に関与する *inv* 遺伝子およびスーパー抗原である *Yersinia pseudotuberculosis* - derived Mitogen (YPM) のサブタイプ YPMa、YPMb および YPMc をそれぞれコードする *ypmA*、*ypmB* および *ypmC* 遺伝子ならびに High - pathogenicity island (HPI) に存在し、鉄規定タンパク質をコードしている *irp2* 遺伝子を標的遺伝子とした。

2-3 病理学的検索

死亡した個体は死後、可能な限り早急に飼育施設あるいは麻布大学病理学研究室へ冷蔵で搬送後、病理解剖による肉眼的観察を行った。剖検時に、腸管（小腸、盲腸、結腸）、パイエル板、腸間膜リンパ節、肝臓および脾臓を含む全身諸臓器を 10% 中性緩衝ホルマリンで 24 時間以上浸漬固定し、常法に従ってパラフィン包埋を行い、3～4 μ m 切片を作成、その後、Hematoxylin-eosin (HE) 染色およびグラム染色を実施した。さらに、免疫組織化学的検索のために、3～4 μ m のパラフィン切片を、剥離防止を目的としてシラン (3-aminopropyl triethoxysilane; 東京化成工業, 東京) コーティングスライドに接着

させ、37℃インキュベーターに 48 時間以上入れ、十分に乾燥させた。切片はキシレンで脱パラフィン後、下降アルコール系列により再水和し、水道水で流水洗後、蒸留水に浸漬した。内因性ペルオキシダーゼを失活させるために 0.3%過酸化水素加メタノールに浸漬し、50%エタノールを通して流水洗した後、蒸留水に浸し、PBS (0.01M Phosphate-buffered saline, pH7.4) で 5 分間、3 回洗浄した。抗原賦活化のために 0.2%トリプシン溶液で 37℃、30 分間処理し、室温に戻した後、PBS で 5 分間、3 回洗浄した。非特異反応阻止のために、湿潤箱中の切片に 5%スキムミルク(和光純薬, 大阪)を滴下し、20 分間処理した。スキムミルクを PBS により除去した後、湿潤箱に切片を静置し、一次抗体として、偽結核菌群別用免疫血清 O1 群、2 群、3 群、4 群、5 群、6 群ならびにカクテル抗体(デンカ生研, 東京)およびエルシニア・エンテロコリチカ O 群別用免疫血清 O1・2 群混合、O3 群、O5 群、O8 群、O9 群ならびにカクテル抗体(デンカ生研, 東京)を用いた。予備試験の結果、抗原性賦活化のための前処理として、37℃のウォーターバスを用いて湿潤箱中のスライドグラスに 0.2%トリプシン溶液 (Trypsin, 和光純薬, 大阪)を滴下し、30 分間反応させ、一次抗体を 1%BSA (ALBUMIN, BOVINE, SIGMA, St. Louis)加 PBS で 400 倍希釈し、湿潤箱中で 4℃、一晩反応させるのが適当と判断されたので、この条件で反応を実施した。翌日、切片を室温に戻した後、PBS で 5 分間、3 回洗浄し、酵素標識二次抗体としてヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI) (ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ポリクローナル抗体 およびペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ポリクローナ

ル抗体，ニチレイ，東京）をマウントし、室温で 60 分間反応させた。PBS で 5 分間、3 回洗浄した後、抗原抗体反応の可視化のために、発色基質に 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH7.6) により希釈した 3-3'ジァミノベンチジン四酸塩に、0.04% 過酸化水素水を加え、室温で 1~5 分間浸漬し、発色させた。発色終了後、切片を水道水で流水洗、蒸留水に浸漬し、対比染色として、マイヤーのヘマトキシリン単染色を施した。陽性対照として、コモンリスザルに *Y. pseudotuberculosis* 血清型 4b および *Y. enterocolitica* 血清型 O8 を実験的に経口感染させて作出した典型的な病原性 *Yersinia* による急性感染症個体の小腸および肝臓の切片を用いた。また、陰性対照には、一次抗体の代わりに PBS を使用した。

第3節 結果

3-1 エルシニア症の発生状況

2000 年 1 月～2008 年 9 月の間に病性鑑定を行った動物飼育施設 21 施設のサル類 390 頭のうち、14 施設で 30 事例のエルシニア症の発生があり、延べ 58 頭のサル類がエルシニア症と診断され、死亡した (Table 2, 3)。その内訳は、類人猿として、ボルネオオランウータン (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) 1 例、アジルテナガザル (*Hylobates agilis*) 2 例、旧世界ザルとして、ブラッサモンキー (*Cercopithecus neglectus*) 2 例、マントヒヒ (*Papio hamadryas*) 2 例、新世界ザルとし

て、シロガオサキ (*Pithecia pithecia*) 2 例、リスザル (*Saimiri sciureus*) 48 例、原猿類としてエリマキキツネザル (*Varecia variegata*) 1 例など、極めて多岐の種類にわたってエルシニア症がみられたが、リスザルが 58 頭中 48 頭 (82.8%) と圧倒的に症例数が多かった。このため、リスザルのエルシニア症を別の項目で詳細に解析した。また、同一施設で反復してエルシニア症が発生している施設もみられ、A 施設では調査期間中に 4 回、B 施設では 6 回、E 施設では 5 回、F および I 施設ではそれぞれ 2 回のエルシニア症の発生があった (Table 3)。さらに、2002 年 12 月から 2003 年 1 月にかけて F 施設ではコモンリスザルとアジルテナガザル、2005 年 1 月には L 施設でマントヒヒとアジルテナガザル、2005 年 3 月には M 施設でエリマキキツネザルとシロガオサキなど、同時期に複数種のサルがエルシニア症で死亡した事例もあった (Table 3)。なお、2003 年 7 月に H 施設で死亡したリスザルでは、微胞子虫である *Encephalitozoon cuniculi* の混合感染事例があったが、その病変は軽度であり、その他の症例では、混合感染はみられなかった。

ボルネオオランウータンからは *Y. pseudotuberculosis* 4b、アジルテナガザルからは *Y. enterocolitica* O8 および *Y. pseudotuberculosis* 3、ブラッサモンキーからは *Y. pseudotuberculosis* 4b および 6、マントヒヒからは *Y. pseudotuberculosis* 3、シロガオサキおよびエリマキキツネザルからは *Y. pseudotuberculosis* 1b、リスザルからは *Y. pseudotuberculosis* 1b、2b、4b、6 および 7、*Y. enterocolitica* O3 と O8 など、複数の菌種および様々な血清型が分離された (Table 3)。エルシニア症発生事例

の国内分布を調査したところ、本州、四国、九州のいずれの地方においても様々な血清型が確認されたが、関東地方では *Y. pseudotuberculosis* 4b が、九州地方では *Y. pseudotuberculosis* 1b が多く分離される傾向にあった (Figure 1)。また、同一の飼育施設でも、流行の時期によって分離される菌種や血清型が異なり、E 施設ではリスザルから *Y. pseudotuberculosis* 1b、4b、7 ならびに *Y. enterocolitica* O3 などが分離された (Table 3, Figure 1)。

3-2 病理学的所見

Table 4, 5 に、サル類のエルシニア症の肉眼所見と病理組織学的所見を整理した。なお、肉眼所見、病理組織学的病変および免疫染色結果は、以下のように評価を行った。肉眼病変と病理組織学的病変は、著変なし(-)、軽度(+)、中等度(++)、高度(+++)の四段階に分類した。また、免疫染色結果は、陰性(-)、弱陽性(+)、中等度の陽性(++)、強陽性(+++)の四段階として評価した。

主たる肉眼病変は、腸管(小腸、盲腸、結腸)、小腸パイエル板や盲腸、結腸の孤立リンパ小節などの腸管関連リンパ組織、腸間膜リンパ節、脾臓および肝臓に認められた。腸病変は、リスザルでは、小腸のパイエル板に一致した病変がみられ、その部位の腫大、出血、粘膜の潰瘍や偽膜形成、ときに結節を形成し、重篤な例では穿孔や周囲の腸管あるいは腸間膜リンパ節との癒着を伴っていた (Figure 2A, 2C)。その他の部位の小腸粘膜にも粟粒大白色病変やび慢性出血が高

頻度で観察された (Figure 2A, 2C)。一方、リスザル以外のサルでは小腸病変はほとんど観察されず、ボルネオオランウータン、アジルテナガザルなどの類人猿では、腸病変は回盲結口部付近の結腸と盲腸に主座しており、孤立リンパ小節に一致したクレーター状の潰瘍形成や出血がみられ、高度な例ではその他の大腸粘膜にも潰瘍が形成され、粘膜は菲薄化し、周囲の腸管や盲腸部リンパ節との癒着を伴って膿瘍を形成していた (Figure 2B, 5D)。一方、旧世界ザルのブラッサモンキー、マントヒヒでは、結腸に軽度の偽膜性病変が観察され、孤立リンパ小節に一致した潰瘍の形成、ときに出血輪を伴っていた。腸間膜リンパ節は、全ての症例で腫大していた (Figure 2C, 2D, 4A)。腸間膜リンパ節の病変の程度は、サル類の種類による差はなく、病変が高度になるにつれて念珠状の腫大、出血、多発性白色結節形成、膿瘍形成がみられ、重篤な例では周囲の腸管と高度に癒着していた。脾臓病変の程度は、種類により様々で、マントヒヒでは肉眼的に目立った変化はみられなかったが、その他のサル類では脾腫がみられ、加えてリスザル、シロガオサキでは針頭大の白色結節形成 (Figure 3A)、ブラッサモンキー、エリマキキツネザルでは針頭大～粟粒大の白色結節形成、ボルネオオランウータンとアジルテナガザルでは、大豆大のより大型化した黄白色結節が多発しており、ときに膿瘍を形成していた (Figure 3B)。しかし、アジルテナガザルの *Y. enterocolitica* O8 感染症では、脾臓は腫大しているだけで、結節性病変はみられなかった。肝臓病変は、マントヒヒ、ブラッサモンキー (2 例中 1 例) では肉眼的に病変は観察されなかったが、ブラッサモンキー (2 例中 1 例)、原猿類のエリマキキ

ツネザル、新世界ザルのリスザルおよびシロガオサキでは腫大がみられ、針頭大～粟粒大の白色結節が全葉に散在あるいは密発しており、類人猿のボルネオオランウータン、アジルテナガザルではより大型の黄白色結節が多発し、結節が癒合して大型の膿瘍を形成していた (Figure 3C, 3D)。 *Y. pseudotuberculosis* 3 と *Y. enterocolitica* O8 が分離されたアジルテナガザルの肝臓病変を比較すると、O8 では膿瘍がより大型で、ゴルフボール大の膿瘍が多数形成されていた (Figure 3D, 5C)。その他の病変として、体表リンパ節 (下顎リンパ節、腋窩リンパ節、浅頸リンパ節、鼠径リンパ節) およびその他のリンパ節 (胃リンパ節、腓十二指腸リンパ節、腎門部のリンパ節) の腫大がみられ、類人猿ではいずれの症例においても黄色透明の腹水の貯留がみられた。

病理組織学的には、上記の臓器に、様々な程度に菌塊を含む大小の壊死巣、好中球やマクロファージの浸潤、高度な例では器質化や膿瘍形成がみられた。肝臓、脾臓は、肉眼的に、大型の結節が形成されていた類人猿では、中心部の壊死が高度で、好中球や核破砕物が大量にみられ、その周囲を取り囲むように多数の菌塊みられた。一方、小型の結節がみられた、その他のサル類では、中心部に菌塊と核破砕物が存在し、周囲に少数の好中球浸潤を伴う比較的小型の壊死巣が多発性に観察された (Figure 6)。脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板および孤立リンパ小節などのリンパ装置では、主としてリンパ洞に病変が観察されるとともに、リンパ濾胞が縮小し、菌塊を含む壊死巣に置換されていた (Figure 6C, 6D, 7)。腸病変は、腸粘膜上皮細胞の壊死、脱落、一部で絨毛の消失がみられ、リスザルでは特にパイエル

板や孤立リンパ小節などのリンパ装置に一致して粘膜の病変がみられた(Figure 7A, 7B)。肝臓、脾臓では菌塊を含む壊死巣の他、マクロファージの浸潤がみられ、ときに肉芽腫の形成が観察された。重篤な症例では、肺や腎臓、骨髄などの臓器でも菌塊を含む壊死巣がみられた。類人猿あるいはその他のサル類でも、成熟した個体では、病変は大型化あるいは陳旧化し、膿瘍を形成する傾向にあった。

O 群別用免疫血清を用いた免疫組織化学的検索の結果、1頭のマントヒヒを除く全ての症例で、微生物学的に分離された菌種や血清型に一致した陽性像が得られた(Figure 7C, 8B)。症例あるいは同一の症例でも臓器によっては、その他の血清型による交差反応性が様々な程度にみられたが、発色強度、発色時間などにより、免疫染色による血清型の判定は可能であった。しかし、2002年12月にB施設で死亡した1頭のコモンリスザル、2005年12月にE施設で死亡した1頭のポリビアリスザルは、ホルマリン固定材料のみの検索であり、さらにホルマリン固定時間が長時間に及んだため、免疫染色の発色が弱陽性であった。2005年1月にL施設で死亡した1頭のマントヒヒでは、病理組織学的に菌数が非常に少量で、臓器の死後変化の進行により、免疫染色結果が不明瞭であった。

3-3 リスザルのエルシニア症の発生状況

サル類のエルシニア症の発生状況を調査した結果、上述のようにリスザルの症例が圧倒的に多かったことから、リスザルに着目して、より詳細

に解析を行った。2000年1月～2008年9月の間に国内飼育施設で死亡し、当研究室で病性鑑定を行ったリスザル240頭について遡及的調査を実施した結果、感染症は105例(43.8%)みられ、その内訳はエルシニア症48例(45.7%)、細菌性肺炎23例(21.9%)、トキソプラズマ症13例(12.4%)、その他の感染症(クレブシエラ、パストツレラ、大腸菌、黄色ブドウ球菌など)21例(20.0%)で、リスザルの感染症のうち、エルシニア症は半数近くを占めていた(Figure 10)。さらに、国内飼育施設18施設のうち、10施設で、25事例のエルシニア症の発生を確認した。エルシニア症の発生時期は10～1月が14例(56.0%)、2～5月が8例(32.0%)、6～9月が3例(12.0%)で、夏季には少なく、春先から冬にかけて発生が集中している傾向にあった(Figure 11)。エルシニア症で死亡した48頭のリスザルのうち、オス23頭(47.9%)、メス24頭(50.0%)、不明1頭(2.1%)で、性差はみられなかった。年齢は1歳未満23例(47.9%)、2～4歳15例(31.2%)、成体7例(14.6%)、不明3例(6.3%)で、4歳未満の若齢個体における発症が圧倒的に多かった(Figure 12)。臨床症状は突然死28例(58.3%)、衰弱13例(27.1%)、食欲低下3例(6.3%)、下痢5例(10.4%)、頸部腫大2例(4.2%)、嘔吐1例(2.1%)、分娩後死亡1例(2.1%)で(Figure 13)、半数以上の症例が突然死であり、衰弱、下痢がみられた個体もほとんどが抗生物質投与、補液、保温等の治療に反応せず、短期間のうちに死亡していた。エルシニア症の原因となった菌種の内訳は、免疫組織化学的検索あるいは微生物学的検索でエルシニア症と診断した25例のうち、23例が *Y. pseudotuberculosis*、2例が *Y.*

enterocolitica であった。血清型の内訳は、*Y. pseudotuberculosis* 1b が 9 例 (36.0%)、4b が 7 例 (28.0%)、6 が 2 例 (8%)、2b および 7 がそれぞれ 1 例 (4%)、不明が 3 例 (12%)、*Y. enterocolitica* は、O3 と O8 がそれぞれ 1 事例 (4%) ずつであった。

PCR 法による病原遺伝子の保有状況調査の結果、リスザルから分離された *Y. pseudotuberculosis* 13 例全例が、血清型に関わらず、病原性プラスミドのマーカである *virF* 遺伝子と腸管粘膜上皮への侵入に關与する *inv* 遺伝子を保有し、12 例では、スーパー抗原活性を有する YPM をコードする *ypmA* 遺伝子を保有していた。しかし、YPM のその他のサブタイプである *ypmB* および *ypmC* 遺伝子ならびに鉄規定タンパクをコードしている *irp2* 遺伝子はいずれの症例からも検出されなかった。

3-4 リスザルのエルシニア症の病理学的所見

リスザルのエルシニア症の病理学的所見を Table 6 に整理した。その結果、脾臓病変は、脾腫が 90.7% (43 例中 39 例)、白色結節形成が 55.8% (43 例中 24 例) みられ、肝臓では腫大が 83.7% (43 例中 36 例)、白色結節形成が 46.5% (43 例中 20 例)、腸間膜リンパ節は腫大が 97.6% (42 例中 41 例)、白色結節形成が 35.7% (42 例中 15 例) みられた。腸病変は、小腸では小腸粘膜の粟粒大白色病変または偽膜形成が 77.5% (40 例中 31 例)、出血あるいは潰瘍が 47.5% (40 例中 19 例)、小腸パイエル板の腫大または白色結節形成が

92.1% (38 例中 35 例)、出血および潰瘍を伴う腫大が 71.1% (38 例中 27 例) みられ、大腸では盲腸・結腸粘膜の粟粒大白色病変または偽膜形成が 26.3% (38 例中 10 例)、出血または潰瘍が 7.9% (38 例中 3 例)、大腸孤立リンパ小節の腫大が 54.1% (37 例中 20 例)、出血および潰瘍を伴う腫大が 37.8% (37 例中 14 例) みられた (Table 6)。その他、体表およびその他のリンパ節の腫大、白色結節形成または膿瘍形成が 7 例、腎臓の白色結節形成または膿瘍形成が 4 例、肺の白色結節形成または膿瘍形成が 2 例みられた。病変と分離された菌種および血清型との関連を検討したところ、*Y. pseudotuberculosis* の各血清型と *Y. enterocolitica* O3 感染症では、諸臓器の結節性病変は、臓器の腫大を伴っていずれも小型で多発しており、病変に差が質的および量的にもみられなかった。さらに、スーパー抗原である *ypmA* 遺伝子が陰性であった 1 例について、その他の 12 例の陽性例と比較した結果、同等の病変が観察され、違いはなかった。しかし、*Y. enterocolitica* O8 感染症では、脾臓、肝臓および腸間膜リンパ節のような好発臓器の他、肺、腎臓にも病変が形成され、*Y. pseudotuberculosis* 感染症と比較すると、結節性病変はいずれも大型で、膿瘍を形成していた。特に、腸間膜リンパ節の膿瘍化が顕著で、周囲の腸管と高度に癒着していた (Figure 4, 5)。さらに *Y. enterocolitica* O8 感染症では、頸部膿瘍を伴う頭頸部リンパ装置 (扁桃、下顎リンパ節など) にも及ぶ病変が 5 例中 3 例でみられた (Figure 4D, 5A, 5B)。

病理組織学的に、*Y. pseudotuberculosis* の各血清型と *Y.*

enterocolitica O3 感染症では、いずれも壊死が強く、多数の菌塊を伴い、好中球等の炎症性細胞反応は軽度で、肉眼所見と同様、菌種や血清型、*ypmA* 遺伝子保有の有無による差はみられなかった。

病変部にみられた菌塊は、H.E.染色では弱好塩基性～塩基性、グラム染色で陰性を示す桿菌で、短径と長径にあまり差がない小桿菌の形態を示した。また、抗酸菌(チールネルゼン)染色では弱抗酸性を示した。また、2003年7月にH施設で死亡した4頭のリスザルでは、病変部に観察された菌体の一部は、弱好塩基性の顆粒状または大型球形～不整形で amorphous な形状を示し、直径4～5 μm 程度のスフェロプラスト様の形態や、幅1～2 μm で、長さ5～40 μm 程度の細長いフィラメント状の形態が観察され、これらと小桿菌との中間的な形態を示す菌体もみられた。これらの菌塊あるいは散在性にみられた菌体は、偽結核菌群別用免疫血清 O1 群を一次抗体として用いた免疫染色で強陽性を示し、微生物学的検索の結果、*Y. pseudotuberculosis* 1b が分離された。しかし、2005年8月にK施設で死亡した1頭のコモンリスザルのように、エルシニア症に典型的な肉眼および病理組織学的所見を示し、病理組織学的にグラム陰性小桿菌の存在が確認できて、さらに免疫染色で抗 *Y. pseudotuberculosis* 1 群免疫血清に陽性であったにも関わらず、微生物学的に菌分離ができなかった例や、2002年12月にB施設で死亡した1頭のコモンリスザルや2005年12月にE施設で死亡した1頭のポリビリスザルのように、免疫染色結果が不明瞭な例も少数みられた。前者は、特に抗生物質を投与された個体でみられ、後者では、

ホルマリン固定液に長期間浸漬あるいは固定の処理が不適切な症例でみられた。

Y. pseudotuberculosis および *Y. enterocolitica* O3 感染症では病理組織学的に、壊死が強く、好中球、マクロファージの浸潤は比較的軽度であったが、*Y. enterocolitica* O8 感染症では好中球の浸潤が高度で、化膿性変化がより強く観察された (Figure 8, 9)。さらに、*Y. pseudotuberculosis* に比べ、*Y. enterocolitica* O8 では大きな菌塊は少なく、リンパ節で比較的多くの菌塊がみられたが、肝臓や脾臓ではほとんど観察されなかった。また、*Y. enterocolitica* O8 では脾臓、腎臓、肺等に観察された大型の結節は膿瘍膜を形成し、膿瘍を形成することが多く、病変は陳旧化していた。さらに、*Y. pseudotuberculosis* 感染症では、扁桃にまで病変が及ぶことはまれであったが、*Y. enterocolitica* O8 では、病理組織学的に検索した全例 (3 例中 3 例) で、扁桃および下顎腺リンパ節などの頭頸部リンパ節にまで及ぶ病変が観察された (Figure 8C, 8D)。

第 4 節 考察

我が国のサル類飼育施設 21 施設で、2000 年 1 月～2008 年 9 月の間に病性鑑定を行った飼育下サル類 390 頭のうち、14 施設で延べ 30 事例のエルシニア症の流行があり、死亡したサル類は 8 種類、58 頭に達した。これらのサル類からは、病原性 *Yersinia* が微生物学的に分離され、病理学的にも以前にエルシニア症と診断されているサル類の

報告例 [1,9,10,57,60,78,134]と所見が一致したため、これらのサルはエルシニア症により死亡したと考えられた。これらのエルシニア症感染事例は、関東から中国地方、四国や九州地方に位置するサル類飼育施設で発生しており、我が国の広い範囲で、飼育下サル類にエルシニア症が流行していることが明らかになった (Figure 1)。また、エルシニア症の発生状況調査の結果、A施設では4回、B施設では6回、E施設では5回、FおよびI施設ではそれぞれ2回の集団発生が反復して発生していたことが確認された (Table 3)。Kageyamaらは、1976年から1999年の24年間に、京都大学霊長類研究所において、*Y. pseudotuberculosis* 感染症の流行が10回発生しており、パタスモンキー *Erythrocebus patas* やアカゲザル *Macaca mulatta* などのサル類5種類8頭が死亡したことを報告している [91]。同様に、Hiraiらは、日本モンキーセンターで、9年間連続してパタスモンキーが *Y. pseudotuberculosis* 1b に感染し、合計41頭が死亡したことを報告している [75]。さらに国外においても、Jersey 動物園では、1981年～2001年の間に、マーモセット科のサル類合計35頭がエルシニア症により死亡していることが報告されており [1]、エルシニア症は国内外問わず、同一の飼育施設で繰り返し流行している。さらに、今回の調査で、反復してエルシニア症が発生している B 施設では、*Y. pseudotuberculosis* 1b、2b および 6 が、E 施設では *Y. pseudotuberculosis* 1b、4b、7 および *Y. enterocolitica* O3 が、F 施設では *Y. pseudotuberculosis* 4b と *Y. enterocolitica* O8 が分離されており、同一施設内においても、流行の時期によって、異なる菌種お

よび血清型によるエルシニア症が発生していることが明らかとなった (Table 3)。この結果は、ヒトのエルシニア症の患者から分離される血清型と一致しており、ヒトにおいても、欧米では *Y. pseudotuberculosis* 1a、3 および *Y. enterocolitica* O9 の分離頻度が高いのに対して、我が国では *Y. pseudotuberculosis* 1b、2b、3、4b、5a、5b など様々な血清型が分離されている[44,45,117,197]。

サル類のエルシニア症の感染源としては様々な要因が考えられるが、エルシニア症の発生には保菌動物との直接的あるいは間接的な接触が必要である[44,45,116,196,214]。多くのサル類飼育施設では、屋外にサルの展示および運動設備を有しており、これらの屋外飼育施設周辺に生息するノネズミやタヌキ、野鳥などの野生の保菌動物から、直接あるいは間接的に病原性 *Yersinia* が感染している可能性が考えられる。12年間に、レッサーガラゴ *Galago senegalensis* やブラッザモンキーなど合計 2 種類 3 頭のサル類がエルシニア症で死亡した王子動物園の調査では、飼育施設内で捕獲したドブネズミ、クマネズミなどのげっ歯類の腸内容物から 45% の割合で *Yersinia* 属菌が検出されており、動物飼育施設内におけるエルシニア症の感染経路として、げっ歯類が重要な役割を有することが指摘されている[125]。さらに、丸山らの報告でも、動物園のサル類に発生した *Y. pseudotuberculosis* 感染症の集団発生において、施設内のげっ歯類がキャリアとして重要な役割を果たしているとは指摘している[118]。本研究では、5 頭のコモンリスザルと 1 頭のアジルテナガザルの *Y. enterocolitica* O8 感染症の集団発生を確認した際に、共同研究者である東京農工大学獣医衛生学

教室林谷秀樹准教授らとともに、飼育施設の疫学調査を実施した。その結果、同一施設内で捕獲したクマネズミ *Rattus rattus* や死亡個体と同居しているサル類の糞便を採材して細菌検査を実施したところ、発症個体と同居しているリスザル 45 頭中 17 頭 (37.8%)、クマネズミ 33 頭中 5 頭 (15.2%) およびリスザル飼育舎から、見物客が通る道路を隔てて約 50m のところで飼育されているその他のサル類 18 種 20 頭中のうち、チンパンジー、サバンナモンキー、ブラッサモンキー、カニクイザルなど 4 頭 (20.0%) から *Y. enterocolitica* O8 が分離された。さらに、これらの分離菌株をパルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed field gel electrophoresis: PFGE)、リボタイピング法、プラスミド DNA の制限酵素切断解析 (Restriction endonuclease analysis of plasmid DNA: REAP) などにより分子遺伝型別を行い、それらの疫学的関連性を検討した結果、飼育下サル類、クマネズミから分離された *Y. enterocolitica* O8 は、いずれも同じ遺伝子型を示し、これらの分離菌株は、1989 年に新潟県の浅草岳で捕獲されたアカネズミ *Apodemus speciosus* やヒメネズミ *Apodemus argenteus* などのノネズミの直腸内容から分離された *Y. enterocolitica* O8 と遺伝子型パターンが類似していた [86]。これらのことから、我が国における飼育下サル類の病原性 *Yersinia* の感染源として、飼育施設周辺に生息するドブネズミ *Rattus norvegicus*、クマネズミあるいはノネズミなどのげっ歯類が重要であると考えられる。さらに、病原性 *Yersinia* は主たる感染経路が経口感染であることから、餌や水が感染源の一つとして重要であり、ヨーロッパでは野鳥の糞便に汚染された野菜の摂食による感染や、その他

の保菌動物の糞便が食品や飲水を汚染してヒトに感染する例が多数報告されている[51,63,111,179]。以上のことから、飼育施設内のげっ歯類が感染源となっている可能性が高く、げっ歯類の糞便中に排泄された菌が、餌や水を二次汚染することが感染経路として重要であると考えられる。いずれにしても、我が国の広い範囲において、飼育施設でサル類のエルシニア症が繰り返し流行しており、また、エルシニア症に感染したサル類は糞便中に多量の菌を排出することが知られているため、施設内を濃厚に汚染し、その他の飼育動物にも感染が広がるのが危惧される[7,204]。特に感受性が高いと考えられるリスザルは、他のサル類より、1つの群における飼育頭数が多い傾向にあり、感染が拡大したときの被害は甚大である。さらに、サル類に限らず、動物園では多種類の動物種で集団発生の報告もあるため[10,134,137,208]、*Yersinia* 属菌の施設内への侵入、蔓延阻止には十分に注意する必要がある。飼育施設のエルシニア症で問題となるのは、自験例においても、飼育施設内の清浄化や保菌動物の侵入防止ならびに餌への二次汚染防止などの発生予防対策を講じてはいるものの、流行が繰り返されている点である。感染源や感染経路を確定することは困難であり、それらを特定した報告例もほとんどないのが現状であるが、有効な対策を立てるためには、速やかな感染源、感染経路の特定が必要である。エルシニア症は人獣共通感染症であることから、公衆衛生学的な観点からも、飼育施設におけるサル類のエルシニア症の発生予防対策を早急に確立することが必要である。

サル類は一般的に病原性 *Yersinia* に対して感受性が高く、その種

類も、原猿類のキツネザル類 [17] やショウガラゴ (*Galago senegalensis*) [28,112] から、広鼻猿類 (新世界ザル) [7,12,16,23,39,141,142,154,184,204] や狭鼻猿類 (旧世界ザル) [19,75,91,109,118,120,126,142,148,164]、さらには、類人猿 (テナガザル、チンパンジー) [70,126, 202] など、多岐にわたっている。今回の調査でも同様で、原猿類のエリマキキツネザルから新世界ザルのリスザルやシロガオサキ、旧世界ザルのマントヒヒとブラッサモンキー、さらに類人猿のアジルテナガザルとボルネオオランウータンなど 8 種類 58 頭で、サル類のエルシニア症を確認した。この中ではリスザルが 58 頭中 48 頭を占めていたが、これは、リスザルを飼育する施設数や、1 群あたりの飼育頭数が多いことと関係があるかもしれない。

サルの種類による病理像の違いを検討した結果、腸において最も顕著に、病変の分布とその程度に違いがみられた。腸病変は、新世界ザルのリスザルでは、小腸に主座しており、特にパイエル板に一致した病変がみられた。パイエル板は軒並み腫大して赤色を呈し、粘膜面には白色の偽膜が付着していた。高度な例ではその部位の小腸粘膜が穿孔していた。さらに、パイエル板以外の小腸粘膜にも針頭大～粟粒大の白色病変が多数散在しており、ときに出血を伴っていた。一方、アジルテナガザルやオランウータンなどの類人猿では、小腸に著変はなく、回盲結口部付近の盲腸と結腸に主座していた。盲腸、結腸上部の粘膜は壊死が高度で菲薄化し、膿瘍化した盲腸部の腸間膜リンパ節と高度に癒着していた。旧世界ザルのブラッサモンキーやマントヒヒは類人猿と同様、主病変は結腸にみられたが、壊死の程度はより軽度

で、孤立リンパ小節に一致したクレーター状の潰瘍性病変が散在していた。肝臓と脾臓はいずれの種類でも腫大がみられ、結節性病変が多発していたが、マントヒヒでは微細な病変がみられたのみで明らかな結節はみられなかった。結節性病変の大きさは、新世界ザルのリスザルとシロガオサキでは針頭大、エリマキキツネザルとブラッザモンキーはやや大きくて針頭大～粟粒大で、類人猿のアジルテナガザルとボルネオオランウータンでは、大豆大の大型な黄白色結節が多発しており、特に類人猿では結節の辺縁が不整形で、結節が癒合し、大型の膿瘍を形成していた。腸間膜リンパ節の病変（腫大、結節形成）は、いずれのサル類の種でも病変に差がみられず、リンパ濾胞が縮小しており、主としてリンパ洞内に菌塊を伴う壊死巣が多発していたが、類人猿では、盲腸部の腸間膜リンパ節が膿瘍化して、周囲の腸管と高度に癒着していた。その他、類人猿ではいずれの種類でも黄色透明の腹水が大量に貯留していたが、その他の種類では腹水の貯留はみられなかった。

多数の症例が検索できたリスザルでは、48頭のうち、1歳未満の幼獣が47.9%を占めていた。パイエル板を含む小腸病変は、1歳未満の個体で特に顕著にみられ、パイエル板の高度な出血、小腸粘膜にび慢性白色病変や偽膜がみられた。しかし、リスザルでも年齢が高い個体や抗生物質を投与していた個体では、その他のサル類と同様、小腸病変はほとんどみられず、パイエル板も軽度に腫大して潮紅するのみで、病変は軽度であった。肝臓と脾臓の結節性病変は、1歳未満の若齢個体では針頭大の微細な結節が多発していたのに対し、年齢が高くなるにつれて、粟粒大のより大型で、辺縁が不整形な結節がみら

れた。また、抗生物質を投与していた個体でも同様であった。ヒトのエルシニア症では、*Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* 感染症はほぼ共通した病変を形成するといわれ、多彩な症状を示すが一般的に、①急性胃腸炎型、②回盲部病変型（終末回腸炎、腸間膜リンパ節炎および虫垂炎型）、③結節性紅斑型、④関節炎型、⑤敗血症型の5型に大別されている[132,186-188]。そのうち、年少児は急性胃腸炎型が多いが、年齢が高くなるにつれて回盲部に限局した病変がみられるようになり、肝膿瘍を伴うことが知られている。病原性 *Yersinia* の侵入門戸は主に小腸パイエル板であることから、パイエル板が発達する若齢時では感受性が高いが、加齢とともにパイエル板は退縮することから、成人では抵抗性が強いといわれている。さらに、免疫の幼弱な乳幼児や老人では、敗血症に至ることが多いとされている。サル類の中では、リスザルはほとんどが突然死であり、集団発生も多いことから、特に感受性が高いと考えられ、エルシニア症の病態も、年少児や乳幼児に多い急性胃腸炎型や敗血症型に一致していた。一方、アジルテナガザルやボルネオオランウータンなどの類人猿では、回盲部に限局した病変や肝膿瘍が観察されたことから、その感受性は、比較的抵抗性の強い成人と類似していると考えられた。橋崎らも、チンパンジーの *Y. pseudotuberculosis* 感染症の症例について、成人との類似性を指摘している[70]。また、サルの種類に関係なく、年齢が高くなるにつれて、腸病変は軽度になり、腸間膜リンパ節、肝臓や脾臓に病変が主にみられた。以上のことから、飼育施設数や飼育頭数が多いことを考慮したとしても、リスザルは病原性 *Yersinia* に対して感受性が高いと考

えられた。リスザルが本来生息している南米などの熱帯地域では、もともと病原性 *Yersinia* が分布しておらず、ヒトや動物から分離されることはほとんどないことから[37]、この種のサルは自然界では病原性 *Yersinia* に接触する機会がなかったために、病原性 *Yersinia* に対して抵抗性が低いものと思われた。実際、我が国ではリスザルと同様、マカカ属のニホンザル *Macaca fuscata* が多頭飼育され、飼育施設数、飼育頭数ともに多いが、エルシニア症の発生は我が国で 1 施設の報告があるのみであり[91]、今回の調査でも期間中に 40 例の病性鑑定を行ったが、エルシニア症は 1 例もみられなかった。これらのことから、国内で飼育されているニホンザルについては、今後、血清調査を実施し、*Yersinia* の浸淫状況を調査する必要があると考えられる。一方、リスザルと同様、南米の熱帯地域に生息するマーモセット・タマリン類は、海外ではエルシニア症が多数報告されているが[1,12,16,39,184]、国内では、飼育頭数は比較的多いにも関わらず、これまで報告例はなく、今回の調査でも 21 頭の病性鑑定を実施したが、エルシニア症は確認されなかった。国内で飼育されているマーモセット・タマリン類ではエルシニア症が確認されなかったことから、今後、疫学調査、血清学的検索および病性鑑定を継続していくことにより、この種のサルの感受性について、明らかにしていく必要があると思われた。今回の調査により、サルの種類や年齢によるエルシニア症の病変の違いは、ヒトと同様、免疫能の差に関連するものと考えられたが、今後さらに症例を収集し、検討していく必要があると思われた。

次に、今回の調査で多数の症例を確認したリスザルに着目して、分

離された菌種、血清型ならびに保有病原遺伝子の種類と、病原性との関連を病理学的に詳細に検討した。その結果、*Y. pseudotuberculosis* の各血清型（1b,2b,4b,6,7）および *Y. enterocolitica* O3 感染症では、いずれも小腸パイエル板および盲腸や結腸の孤立リンパ小節の腫大、その部位に一致した粘膜の潰瘍、肝臓と脾臓の腫大および多発性白色結節形成、腸間膜リンパ節の腫大などがみられ、病理組織学的には、それらの臓器に菌塊を含む壊死巣、腸では特にリンパ装置に一致して粘膜の壊死、脱落、潰瘍が観察された。一方、*Y. enterocolitica* O8 感染症では、上記の病変に加え、下顎リンパ節、扁桃などの頭頸部リンパ装置にも及ぶ病変が特徴的で、また脾臓、腎臓、肺など各臓器に形成される結節はより大型で、膿瘍を形成していた。また、病理組織学的にも *Y. enterocolitica* O8 感染症では好中球の浸潤が強く、化膿性変化が *Y. pseudotuberculosis* 感染症よりも高度であった。さらに、*Y. pseudotuberculosis* 感染症は1歳未満の幼獣から成体まで様々であったのに対し、*Y. enterocolitica* O8 感染症の集団発生時には、50頭のうち5頭のリスザルが死亡し、死亡個体はいずれも1歳未満で、体重300g以下の幼獣であった。さらに、*Y. pseudotuberculosis* 感染症では、その半数以上が突然死であり、臨床症状は殆ど観察されなかった。一方で、*Y. enterocolitica* O8 感染症では死亡個体を含め、飼育リスザル50頭中20頭（40.0%）で下痢が観察され、3頭（6.0%）で頸部の腫大が観察された。さらに、*Y. pseudotuberculosis* 3 と *Y. enterocolitica* O8 感染症がみられたそれぞれ1例のアジルテナガザル

の肝臓病変を比較しても、*Y. pseudotuberculosis* 3 よりも *Y. enterocolitica* O8 感染症で死亡した個体の方がより大型の膿瘍を形成していた。以上のことから、サル類に対しては、*Y. enterocolitica* O8 は *Y. pseudotuberculosis* よりも病原性が低い可能性が考えられた。しかし、*Y. enterocolitica* O8 感染症は今回、1回の集団発生が確認されたのみで、動物での発生例はこれまで報告されていないことから、今後、より詳細に検討していく必要があると考えられる。特に、頭頸部リンパ装置に及ぶ病変が特徴的であったことから、侵入門戸としての扁桃の可能性を検討する必要がある。一方、*Y. enterocolitica* の中で O8 よりも病原性が低いとされている O3 の 1 症例では、*Y. pseudotuberculosis* と同等の病変が観察された。しかし、*Y. enterocolitica* O3 の症例は分娩後の衰弱個体における発症例であり、妊娠および分娩による体力消耗と免疫の減弱により、易感染状態にあったと考えられた。このため、エルシニア症の発症や病変の重篤度は、菌種や血清型に加え、個体の免疫力や飼育個体群の免疫状態にも左右されると考えられた。

Yersinia の病原性は、ヒトでも動物でも一般的に、*Y. pseudotuberculosis* のほうが *Y. enterocolitica* よりも若干強いとされているが、*Y. enterocolitica* の中でも O8 は例外で、*Y. pseudotuberculosis* と同等の病原性を有すると言われている[113,177]。我が国で分離される *Y. pseudotuberculosis* のほとんどは、スーパー抗原活性を有する YPM を産生する株であることが知られている[2,55,213]。Yoshino らの患者からの分離株を用いた研究では、極東

ロシアの 100%、日本の 95%の株が YPM を保有していたのに対して、ヨーロッパ由来株は 17%の保有率であった[213]。我が国のヒトにおける *Y. pseudotuberculosis* 感染症は、発疹、結節性紅斑、咽頭炎、莓舌、四肢末端の落屑、リンパ節の腫大、肝機能低下、敗血症など様々な症状の他、川崎病や急性間質性腎炎による急性腎不全の合併など、下痢や腹痛などの胃腸炎症状が主体の欧米の症例と比較して、多彩で複雑な臨床症状を呈し、これらと YPM との関連性が指摘されている[3,201]。細菌が産生する外毒素であるスーパー抗原は、黄色ブドウ球菌の Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) や Staphylococcal Enterotoxin (SE)、連鎖球菌の Streptococcal Pyrogenic Exotoxin (SPE) などの総称で、毒素性ショック症候群や猩紅熱などの原因となり、スーパー抗原を産生する細菌による感染症では、発熱、皮膚の発赤と落屑、多臓器障害などの共通した全身症状がみられる[193]。我が国における *Y. pseudotuberculosis* 感染症の多彩な症状や合併症に、YPM による T 細胞やマクロファージの過剰な活性化、それによるサイトカインの過剰な産生が関与していると考えられている[186,188]。実際、Ueshiba らの調査でも、胃腸炎症状の患者よりも全身症状を示す患者のほうが、YPM 保有率が高かったことを報告しており、Abe らも、胃腸炎症状のみをもつ患者よりも、全身症状を示す患者のほうが、抗 YPM-IgG 抗体価が高く、さらに急性期血清中の IL-12、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 などの炎症性サイトカインの濃度が有意に高値を示し、末梢血で V β 8 陽性 T 細胞が増加していたと報告している[2,203]。さらに、Kano らは、BALB/c マウスに精製した YPM を

静脈内投与すると、24 時間以内に 86%が死亡し、1~4 時間以内の極めて早期から血中の IFN- γ や TNF- α などのサイトカインが上昇することを報告している [96]。今回、リスザル由来 13 株の *Y. pseudotuberculosis* の病原遺伝子保有状況を調査した結果、12 株 (85.2%) が YPM のサブタイプのうち、スーパー抗原活性を有する YPMa をコードする *ypmA* 遺伝子を保有していた。一方、*Y. enterocolitica* は、YPM のようなスーパー抗原を産生することが知られていない。以上のことから、リスザルにおける *Y. pseudotuberculosis* と *Y. enterocolitica* O8 の病原性の違いは、スーパー抗原産生性の有無によるものと考えられた。しかし、YPMa 陰性であったリスザルの 1 症例では、YPMa 陽性の症例と、肉眼および病理組織学的に、病変に違いはみられなかった。我が国のリスザルの *Y. pseudotuberculosis* に対する感受性の高さは、患者の症例と同様に、スーパー抗原である YPM が関与している可能性がある。今後、リスザルのエルシニア症における YPM と臨床症状や病変との関連性について、YPM に対する血清調査や詳細な病理学的検索、微生物学的検索により検討していく必要があると思われた。

Yersinia 属菌はグラム陰性桿菌であり、大きさは $0.5 \sim 0.8 \times 1 \sim 2 \mu\text{m}$ であることから長径と短径の差が小さい小桿菌である [44,45]。そのため、病理組織学的には、菌塊は好塩基性で微細な桿菌の集合として観察される。しかし、今回の調査で、肉眼的には典型的なエルシニア症であるが、病理組織診断が困難な症例がいくつかのリスザルでみられた。そのような症例の病理組織学的病変は、全身諸臓器の壊死性炎が

みられ、肝臓や脾臓の壊死巣の中心部あるいは周辺に弱好塩基性で、微細顆粒状を呈する amorphous な集塊や、大型球形の構造物の集塊がみられた。また、小腸粘膜表面には多数のフィラメント状を呈する、一見真菌様の形態を示す病原体が観察された。これらの病原体はPAS反応に陰性～強陽性と様々であるが、グラム染色ではいずれも陰性を示した。以上のことから、病理組織学的には確定診断ができなかった。最終的にこのような症例は、免疫組織化学的検索および微生物学的検索により *Yersinia* 属が分離されたことから、多様な形態を示す *Y. pseudotuberculosis* がみられたエルシニア症と診断した。ヒトでは、特にβラクタム系抗生物質などの広域スペクトルを有する抗生物質を投与することにより、グラム陰性桿菌がフィラメント化、あるいは風船状球状化(スフェロプラスト化)することが知られている[95]。細菌の細胞膜表面には、細胞壁合成に関与する複数の合成酵素があり、それらを総称してペニシリン結合蛋白 (penicillin-binding proteins:PBPs) と称されている。βラクタム系抗生物質は、グラム陰性菌のPBPsと結合することによって、細胞壁の合成を阻害する。抗生物質投与によるグラム陰性桿菌の形態の多様化は、抗生物質の作用による溶菌過程を反映しており、フィラメント化は細菌の隔壁形成不全により菌体が著しく延長した所見を、スフェロプラスト化は細胞壁の形成不全により菌体が球状化した所見を反映している[95]。今回のリスザルの症例でも、セファゾリンやアモキシシリンなどのβラクタム系抗生物質を投与していたことが明らかとなっており、抗生物質投与により菌の形態が多様化したと考えられた。細菌が抗生物質投与によりスフェロプラストに形態変化を

起こすと、薬剤に抵抗性を有することが知られており、薬剤耐性化が日和見感染症の原因となることが指摘されている[181-183]。さらに、抗生物質の作用で菌体の細胞壁が破壊され、グラム陰性桿菌の菌体表面からエンドトキシン（内毒素）であるリポ多糖（Lipopolysaccharide:LPS）が大量に放出されて、エンドトキシンショックが誘発されることがある[206]。実際、リスザルの症例でも、抗生物質投与歴があり、菌の形態が多様化していた症例では、血腹症や腎臓に点状出血が多発しており、糸球体毛細血管に硝子血栓が多発していたことから、エンドトキシンあるいは敗血症性ショックから播種性血管内凝固症候群（DIC）に陥り、死亡したと思われる症例もみられた。以上のことから、サル類に抗生物質を投与する際には薬剤の効果の判定に注意が必要であるとともに、抗生物質投与歴のあるサル類の病性鑑定を実施するときには、細菌の形態の多様化や日和見感染症、エンドトキシンショックなどを考慮に入れて慎重に病理学的診断を行う必要があると思われる。

今回の調査で、48例のリスザルのエルシニア症のうち1例から、*Y. pseudotuberculosis* 血清群7が分離された。本血清型は、これまでに我が国のイヌ、タヌキ、ノネズミ、ヒミズなどの野生動物や環境水から少数分離されているが、いずれも病原性プラスミドを保有せず、血清群8,9ならびに11~14と同様、非病原性の血清群と考えられてきた[45,49,55,127,213]。しかし、今回の調査により、*Y. pseudotuberculosis* 7による動物の感染致死事例が世界で初めて確認され、7群の一部の菌株も病原性を有することが明らかになった。*Y.*

pseudotuberculosis 7 感染症により死亡したリスザルは、体重 380g、メスの 1 歳未満の個体で、衰弱しているところを発見され、隔離、保温を実施して治療を試みたが翌日死亡した。肉眼所見としては、腸間膜リンパ節、肝臓および脾臓の腫大、脾臓の多発性白色結節形成、パイエル板の軽度の腫大、小腸粘膜に粟粒大の白色結節が確認され、その他の病原性を有する血清型による死亡例と、病変に差はみられなかった。さらに、Iwata らの研究では、本分離菌株も、その他の病原性を有する血清型と同様、病原性プラスミドを保有し、スーパー抗原である YPMa を産生する強毒株であった[87]。これらのことから、今回リスザルから分離された 7 群の菌株は、*Y. pseudotuberculosis* 1b や 4b など、その他のリスザルにおける主要な病原性血清群と同程度の病原性を保有していると考えられた[131]。

さらに今回、*Y. enterocolitica* O3 感染症によりリスザル 1 頭が死亡し、*Y. enterocolitica* O8 感染症により同時期に同じ施設で、リスザル 5 頭とアジルテナガザル 1 頭が相次いで死亡した。*Y. enterocolitica* O3 は、世界的に分布しており、ヒトの患者からの分離頻度は最も高く、*Y. enterocolitica* の中では一般的な血清型である[40,54,116,160]。しかし、*Y. pseudotuberculosis* より病原性は低く、主に幼児が感受性を示し、症状も下痢などの急性胃腸炎症状を示すのみである[44]。動物でも同様に、*Y. enterocolitica* O3 はブタからの分離率が高く、調査によっては 100%の保菌率であったという報告もあるが、ブタは感染しても症状を示さず、豚肉がヒトへの主要な感染源となっている[40,43,54,116]。また、イヌの保菌率も高く、5~6%の保菌率であったと

いう報告もあり、ヒトへの感染源となることが指摘されている[44,52,59,211]。一方、サル類は病原性 *Yersinia* 属菌の中でも弱毒である *Y. enterocolitica* O3 や O5/27 にも感受性を有し、ヨーロッパ諸国やアメリカでは、これらの血清型によるサル類の感染死亡例が報告されているが[17,39,143]、我が国ではサル類における *Y. enterocolitica* 感染死亡例はこれまで 1 例しか報告されておらず、その血清型も明らかになっていない[126]。

一方、*Y. enterocolitica* O8 は、動物からはこれまで、北米の健康なキツネ、ヤマアラシの糞便から分離されているだけで[159]、ヒトの症例も北米を中心に報告されてきた[92,155]。しかし、近年になって我が国においてもヒトの感染例が散発的に報告されており、また健康なノネズミの糞便からも分離されている[71,80,81,151]。さらに、最近になってヨーロッパでもヒトの感染例が報告されている[145,157]。*Y. enterocolitica* O8 は、*Y. enterocolitica* の中で最も病原性の強い血清型で、ヒトに対しては、*Y. pseudotuberculosis* と同等の病原性を有するといわれている[177]。しかし、動物での O8 による感染例、致死例はともにこれまで報告はなく、今回の事例が世界で初めての *Y. enterocolitica* O8 による動物の感染致死事例となった[130]。本研究により、我が国では弱毒な O3 のみならず、強毒な O8 による飼育下サル類の感染死亡例も確認したことから、今後、サル類の飼育にあたっては、*Y. pseudotuberculosis* のみならず、*Y. enterocolitica* によるエルシニア症にも注意を払っていく必要があるとあり、さらに症例を集めて、鑑別診断に有用な病理像を明らかにしていく必要があると思われた。さらに、もはや北

米に限局した分布とは言えなくなった O8 による集団感染例を確認したことから、公衆衛生上の観点からも今後、十分に注意すべき病原体であると考えられる。

サル類のエルシニア症は臨床症状に特異性がなく、多くは突然死で発見されるため、異常に気付かず、診断が遅れることが多い。さらに、感染したサルの糞便から大量の菌が排出され、飼育群の多数の個体に感染が早急に広がる傾向にあるため、気付いたときには手遅れとなることが多いのが現状である。このため、動物園などの飼育施設で飼育されているサル類が死亡し、剖検により小腸パイエル板や盲腸、結腸の孤立リンパ小節の腫大、腸間膜リンパ節の腫大、脾腫、肝臓や脾臓に多発性白色結節などがみられた際は、エルシニア症を疑い、病理組織学的検査および微生物学的検査を実施すべきであり、生存個体についても、糞便検査と行うとともに抗生物質を投与し、飼育施設の消毒を徹底すべきである。通常細菌検査では、37℃で細菌の分離培養がなされることが多いが、病原性 *Yersinia* の場合、発育速度が遅いことから、37℃培養ではその他の細菌の発育によって、*Yersinia* のコロニーが不明瞭になることが多く、*Yersinia* の至適発育温度は 28℃付近である[44,45,54,102]。このため、通常細菌検査では見過ごされる可能性が高い。さらに、抗生物質を投与していると菌分離が困難な例が多く、実際、今回の調査でも病理学的にエルシニア症が疑われたが、微生物学的に病原性 *Yersinia* が分離できなかった事例もあったことから、実際にはより多くのエルシニア症の発生があると考えられる。我が国のサル類から分離される病原性 *Yersinia* の菌種、血清型はヒトと

同様、極めて多様であり、また、病原性とそれらとの関連や YPM などの病原因子との関連も不明な点が多い。また、多くの動物展示施設では、これらのサル類を屋外施設で飼育し、見物客が容易に同一空間で直接あるいは間接的に接触可能なふれあい方式で展示されている施設もあることから、人獣共通感染症の原因となる病原性 *Yersinia* については今後も十分に注意すべき病原体であり、サル類のエルシニア症に対して効果的な感染予防対策を講じていく必要がある。サル類のエルシニア症は、下痢などの臨床症状に乏しく、多くは突然死で発見されること、屋外で飼育されることが多く、保菌動物と考えられるクマネズミやドブネズミ、ノネズミなどの侵入や餌の汚染を防ぐことが非常に困難であることから、サル類のエルシニア症の発生を予防するためには、エルシニア症に対する効果的なワクチンを開発する必要があると思われる。

Table 1. Number of monkeys examined from 2000 to 2008

Suborder	Parvorder	Superfamily	Species of monkey	Number of Samples
Strepsirrhini			Lemur (<i>Varecia</i> spp. and <i>Lemur</i> spp.)	16
			Loris (<i>Nycticebus</i> spp.)	2
Haplorhini	Platyrrhini		Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	207
			Bolivian squirrel monkey (<i>Saimiri boliviensis</i>)	42
			Squirrel monkey (<i>Saimiri</i> spp.)	22
			Marmoset (<i>Callithrix</i> spp. and <i>Saguinus</i> spp.)	21
			White-faced saki (<i>Pithecia pithecia</i>)	2
			Tufted capuchin (<i>Cebus apella</i>)	7
			Spider monkey (<i>Ateles</i> spp.)	4
			Owl monkey (<i>Aotus trivirgatus</i>)	1
	Catarrhini	Cercopithecoide	Japanese monkey (<i>Macaca fuscata</i>)	40
			Crab-eating monkey (<i>Macaca fascicularis</i>)	1
			Hamadryas baboon (<i>Papio hamadryas</i>)	5
			De Brazza's guenon (<i>Cercopithecus neglectus</i>)	2
			Lesser spot-nosed monkey (<i>Cercopithecus petaurista</i>)	2
			Mandrill (<i>Mandrillus sphinx</i>)	1
			Colobus (<i>Colobus</i> spp.)	1
		Hominoidea	Gibbon (<i>Hylobates</i> spp.)	5
			Bornean orang-utan (<i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i>)	1
			chimpanzee (<i>Pan troglodytes</i>)	7
			Western lowland gorilla (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)	1
Total				390

Table 2. Number of monkeys that died of Yersiniosis from 2000 to 2008

Suborder	Parvorder	Superfamily	Species of monkey	Number of deaths due to Yersiniosis
Strepsirrhini			Lemur (<i>Varecia</i> spp. and <i>Lemur</i> spp.)	1
Haplorhini	Platyrrhini		Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	37
			Bolivian squirrel monkey (<i>Saimiri boliviensis</i>)	5
			Squirrel monkey (<i>Saimiri</i> spp.)	6
			White-faced saki (<i>Pithecia pithecia</i>)	2
	Catarrhini	Cercopithecoide	Hamadryas baboon (<i>Papio hamadryas</i>)	2
			De Brazza's guenon (<i>Cercopithecus neglectus</i>)	2
		Hominoidea	Gibbon (<i>Hylobates</i> spp.)	2
			Bornean orang-utan (<i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i>)	1
Total				58

Table 3. Summary of Yersiniosis in monkeys from 2000 to 2008

Case No.	Institutions	Species of monkey	Number of deaths	Date	Yersinia species and serotypes
1	A	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	3	2000 .12	Yp 1 [*]
2	B	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	4	2000. 1	Yp 1b
3	A	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	2	2001. 1	Yp 1 [*]
4	C	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	1	2001. 10	Yp 4b
5	D	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	5	2002. 4	Yp 4b
6	E	Bolivian squirrel monkey (<i>Saimiri boliviensis</i>)	1	2002. 5	Yp 4b
7	B	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	1	2002. 12	Yp [*]
8	F	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	5	2002. 12	Ye O8
		Agile gibbon (<i>Hylobates agilis</i>)	1	2003. 4	Ye O8
9	B	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	1	2003. 4	Yp 6
10	G	Squirrel monkey (<i>Saimiri</i> spp.)	2	2003. 4	Yp 1 [*]
11	E	Bolivian squirrel monkey (<i>Saimiri boliviensis</i>)	1	2003. 6	Yp 7
12	H	Squirrel monkey (<i>Saimiri</i> spp.)	4	2003. 7	Yp 1b
13	I	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	2	2003. 11	Yp 4b
14	J	Bornean orang-utan (<i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i>)	1	2003. 11	Yp 4b
15	K	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	2	2003. 12	Yp 4b
16	G	De Brazza's guenon (<i>Cercopithecus neglectus</i>)	1	2004. 3	Yp 1 [*]
17	I	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	1	2004. 12	Yp 4b
18	B	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	1	2005. 1	Yp 1b
19	L	Hamadryas baboon (<i>Papio hamadryas</i>)	2	2005. 1	Yp 3
		Agile gibbon (<i>Hylobates agilis</i>)	1	2005. 1	Yp 3
20	A	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	2	2005. 2	Yp 1b
21	M	Ruffed lemur (<i>Varecia variegata</i>)	1	2005. 3	Yp 1b
		White-faced saki (<i>Pithecia pithecia</i>)	2	2005. 3	Yp 1b
22	E	Bolivian squirrel monkey (<i>Saimiri boliviensis</i>)	1	2005. 5	Ye O3
23	K	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	1	2005. 8	Yp 1 [*]
24	E	Bolivian squirrel monkey (<i>Saimiri boliviensis</i>)	1	2005. 12	Yp [*]
25	B	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	1	2005. 12	Yp 2b
26	B	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	1	2006. 4	Yp 6
27	E	Bolivian squirrel monkey (<i>Saimiri boliviensis</i>)	1	2007. 2	Yp 1b
28	F	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	2	2007. 5	Yp 4b
29	A	Common squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	2	2008. 1	Yp
30	N	De Brazza's guenon (<i>Cercopithecus neglectus</i>)	1	2008. 9	Yp 6

^{*} Diagnosed by immunohistochemistry without cultivation.

Yp, *Y. pseudotuberculosis*; Ye, *Y. enterocolitica*

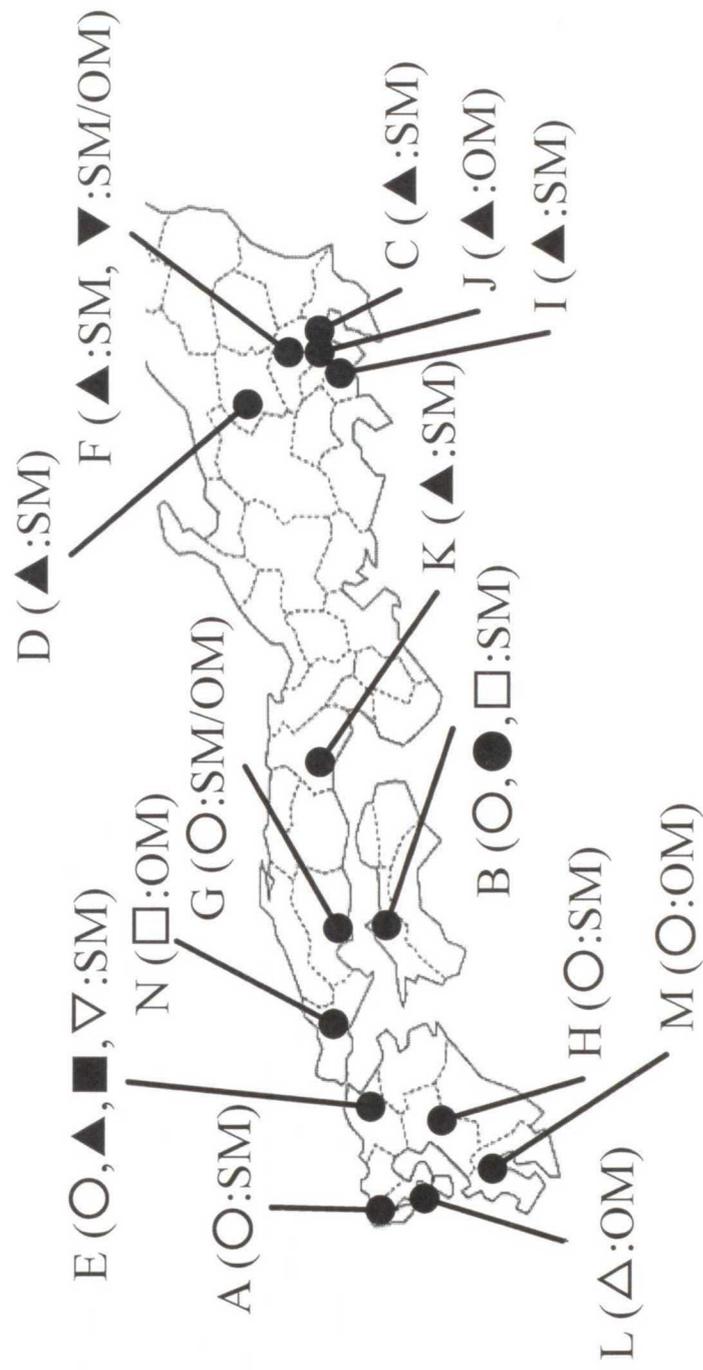


Fig. 1. Regional distribution of Yersiniosis among captive monkeys in Japan..
 Symbols: O, Yp 1b; ●, Yp 2b; Δ, Yp 3; ▲, Yp 6; ■, Yp 4b; □, Yp 7; ▽, Yp O3;
 ▼, Yp O8. SM, Squirrel monkey; OM, other monkeys; Yp, *Yersinia pseudotuberculosis*;
 Ye, *Yersinia enterocolitica*.

Table 4. Summary of gross findings of yersiniosis in 7 monkey species*

Species	Liver	Spleen	Small intestine	Colon	PP/SLN	Mesenteric lymph nodes	<i>Yersinia</i> species and serotypes
Ruffed lemur (<i>Varecia variegata</i>) n=1	++	++	NA	NA	NA	NA	Yp 1b
Squirrel monkey (<i>Saimiri</i> spp.) n=48	++	++	+~++++	-	+~++++	+~++++	Yp 1b, 2b, 4b, 6, 7, Ye O3, O8
White-faced saki (<i>Pithecia pithecia</i>) n=2	-/+	++	-/NA	-/NA	-/NA	+	Yp1b
Hamadryas baboon (<i>Papio hamadryas</i>) n=2	-	-	-	+	-/+	+	Yp3
De Brazza's guenon (<i>Cercopithecus neglectus</i>) n=2	-/+	++	-	++	NA/+	+ /++	Yp4b, Yp6
Agile gibbon (<i>Hylobates agilis</i>) n=2	+++	+++ /+	-	+++	-/NA	++	Yp3, YeO8
Bornean orang-utan (<i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i>) n=1	+++	+++	-	+++	-/NA	+++	Yp4b

*Gross findings were scored on the following scale: no lesion (-), mild (+), moderate (++) , severe (+++). PP, Peyer's patches; SLN, solitary lymphatic follicles; Yp, *Y. pseudotuberculosis*; Ye, *Y. enterocolitica*

Table 5. Summary of histopathological findings of yersiniosis in 7 monkey species[※]

Species	Liver	Spleen	Small intestine	Colon	PP/SLN	Mesenteric lymph nodes	Immunohistochemistry [†]
Ruffed lemur (<i>Varecia variegata</i>) n=1	++	++	NA	NA	NA	NA	+++
Squirrel monkey (<i>Saimiri</i> spp.) n=48	+~++	+~++	+~++	++	+~++	+~++	+~++
White-faced saki (<i>Pithecia pithecia</i>) n=2	++	++	-/NA	-/NA	-/NA	++	+++
Hamadryas baboon (<i>Papio hamadryas</i>) n=2	+	+ / ++	-	++	- / ++	++	+
De Brazza's guenon (<i>Cercopithecus neglectus</i>) n=2	++	++	- / ++	- / ++	- / ++	++	+++
Agile gibbon (<i>Hylobates agilis</i>) n=2	+++	+++	-	+++	+++	++	+ / +++
Bornean orang-utan (<i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i>) n=1	+++	+++	-	+++	+++	++	+

[※]Histopathological findings were scored on the following scale: no lesion (-), mild (+), moderate (++) , severe (+++).

[†]Immunohistochemistry were scored on the following scale: negative (-), weakly positive (+), moderately positive (++) , strongly positive (+++). PP, Peyer's patches; SLN, solitary lymphatic follicles; Yp, *Y. pseudotuberculosis*; Ye, *Y. enterocolitica*

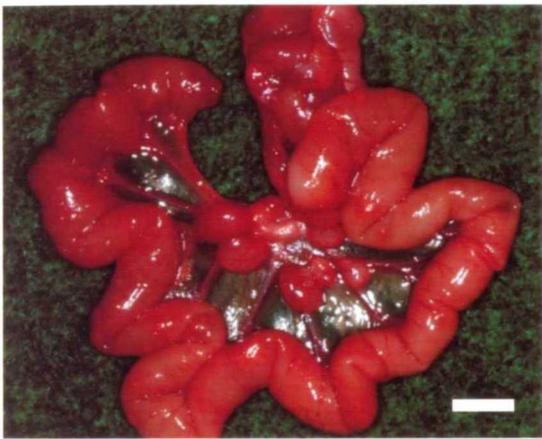
[A]



[B]



[C]



[D]

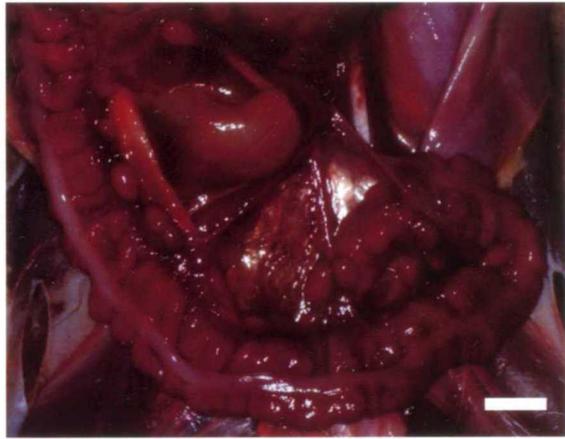
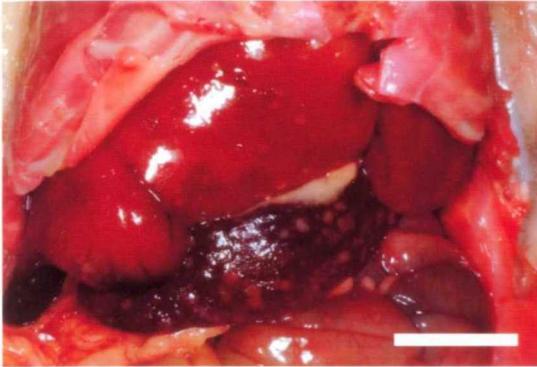


Fig. 2. Gross lesions of the bowel and mesenteric lymph nodes. In squirrel monkeys, bowel lesions are mainly in the small intestine, with swelling and hemorrhage of the Peyer's patches in particular [A]; on the other hand, other monkey species show multiple ulcers mainly in the colon and cecum [B]. Swollen mesenteric lymph nodes are common lesions in all monkey species [C, D]. [A] Small intestine of a squirrel monkey (Yp 6), Bar, 1 cm. [B] Colon mucosa of the agile gibbon (Yp3), Bar, 3 cm. [C] Mesenteric lymph nodes of a squirrel monkey (Yp6), Bar, 1 cm. [D] Mesenteric lymph nodes of the baboon (Yp3), Bar, 1 cm.

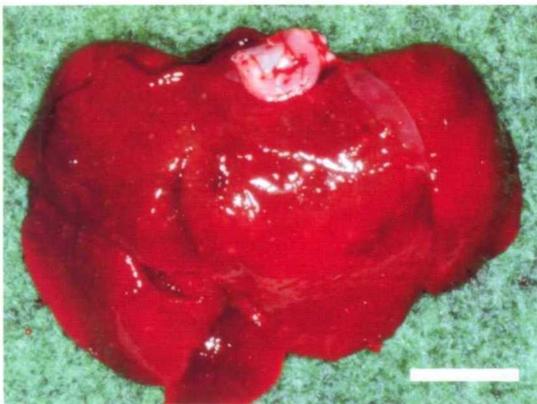
[A]



[B]



[C]



[D]

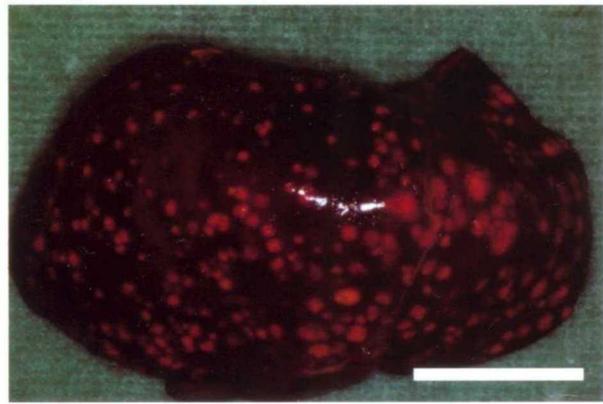


Fig. 3. Gross lesions of the spleen and liver. Multiple white or yellowish nodules are formed in the spleen and liver. Notice that nodules are larger in the agile gibbon and orangutan than in the squirrel monkey. [A] Spleen and liver of a squirrel monkey (Yp 1b), Bar, 2 cm. [B] Spleen of the orangutan (Yp4b), Bar, 3 cm. [C] Liver of a squirrel monkey (Yp6), Bar, 1 cm. [D] Liver of the agile gibbon (Yp3), Bar, 1 cm.

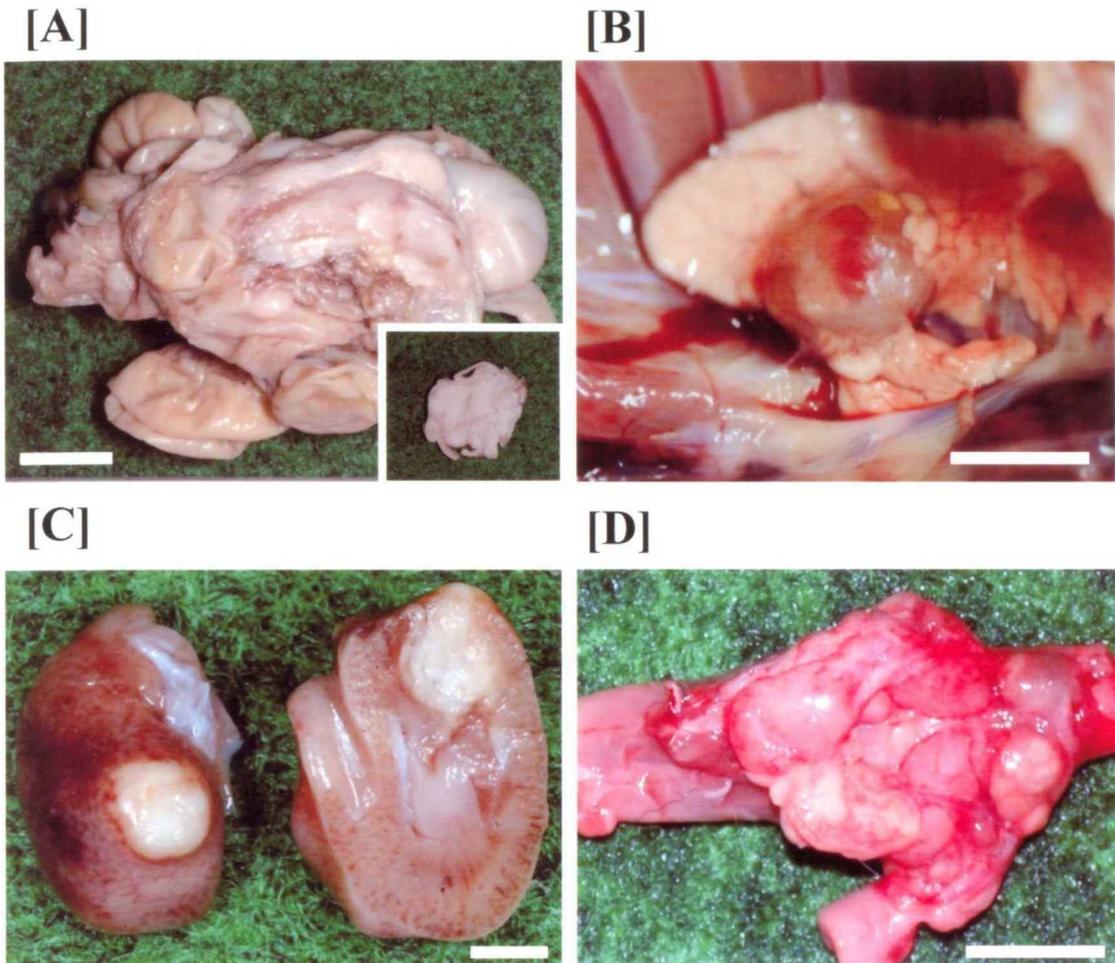


Fig. 4. Gross lesions of Yersiniosis infected by *Y. enterocolitica* O8 in squirrel monkeys. Abscess formation in multiple organs occurs more in *Y. enterocolitica* O8 infection than in *Y. pseudotuberculosis* infection. [A] Mesenteric lymphatic abscess with intestinal adhesion fixed with formalin, Bar, 1 cm, Insert: Cross-section of mesenteric lymph nodes and intestine. [B] Pulmonary abscess, Bar, 1 cm. [C] Renal abscess fixed with formalin, Bar, 0.5 cm. [D] Swellings of lymph nodes in the head and neck area, Bar, 1 cm.

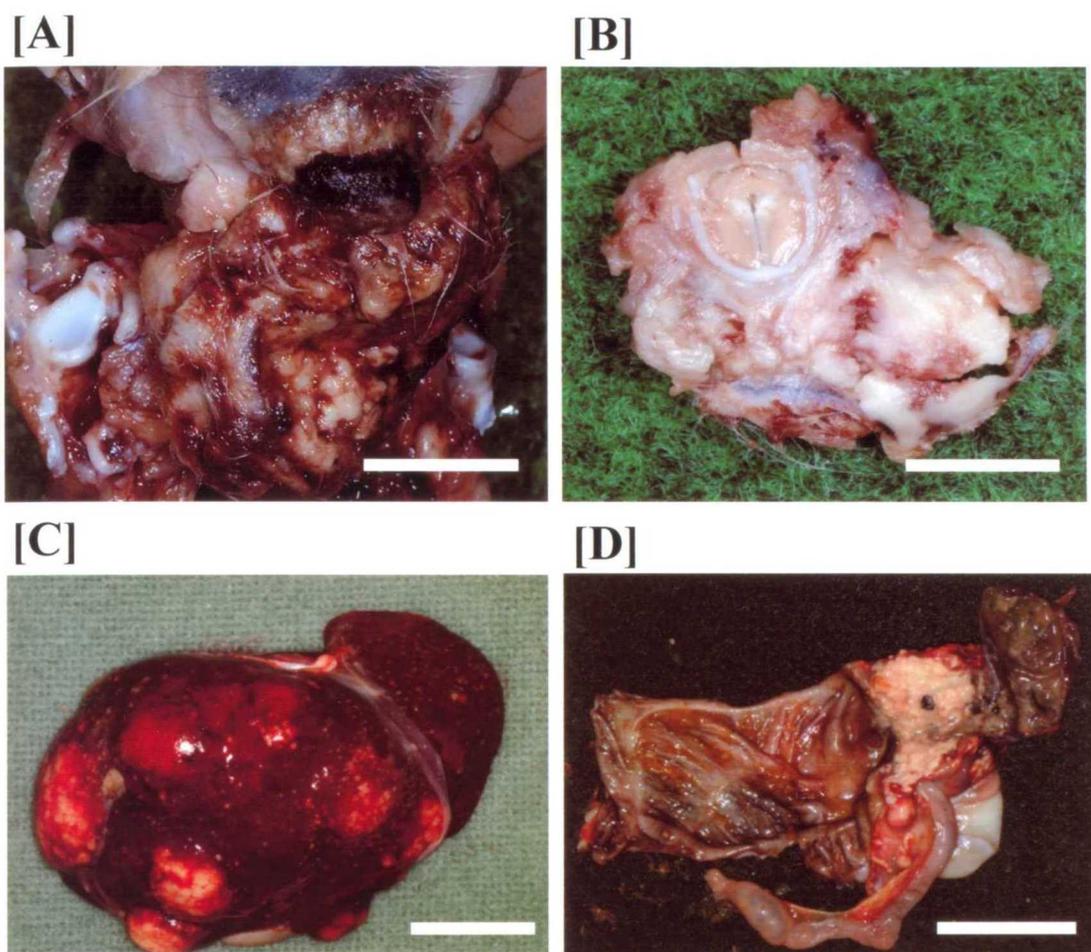
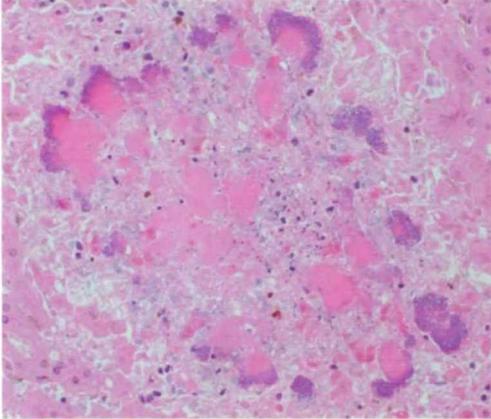
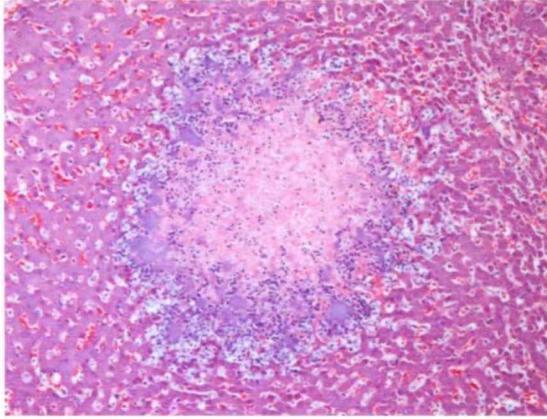


Fig. 5. Gross lesions of Yersiniosis infected by *Y. enterocolitica* O8 in the squirrel monkey and agile gibbon. Abscess formation throughout the lymph nodes in the head and neck area is predominant. Similarly, abscesses are much larger in *Yersinia enterocolitica* O8 infection than in *Y. pseudotuberculosis* infection in the agile gibbon. [A] Head and neck area fixed with formalin, Bar, 1 cm. [B] Cut surface of [A], Bar, 1 cm. [C] Liver of the agile gibbon, Bar, 3 cm. [D] Ileocecal area of the agile gibbon, Bar, 3 cm.

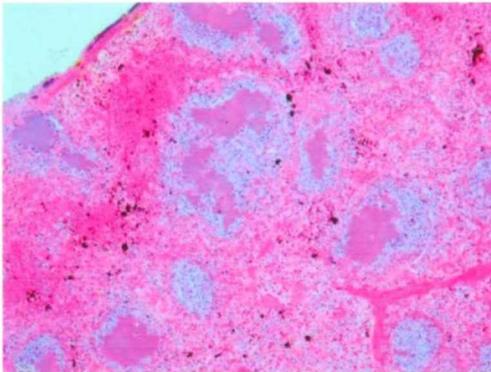
[A]



[B]



[C]



[D]

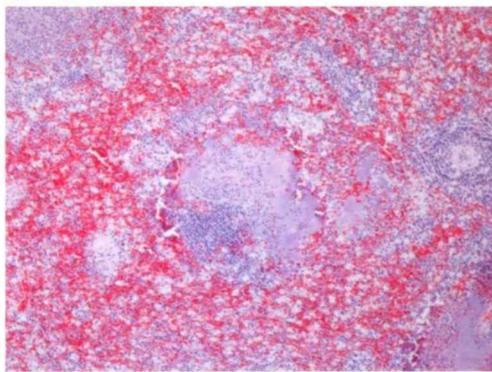
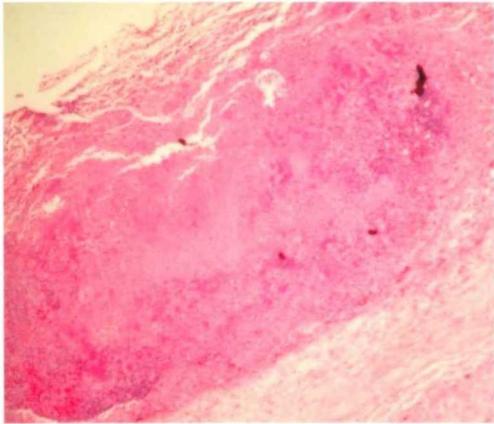
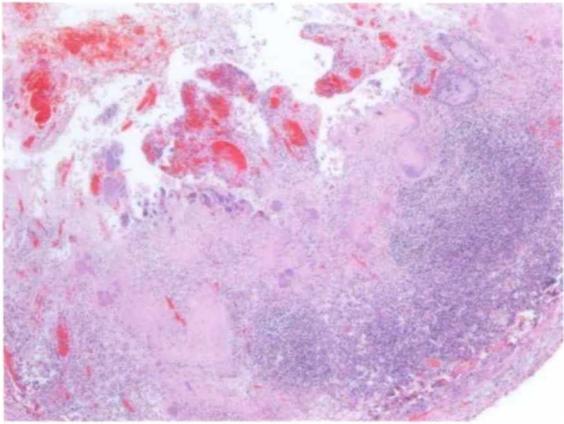


Fig. 6. Histopathological lesions of Yersiniosis infected by *Y. pseudotuberculosis* of the liver and spleen. There is multifocal necrosis with large bacterial colonies, and few neutrophils infiltrate into the liver and spleen. [A] Hepatic focal necrosis of the orangutan (Yp4b), HE, $\times 200$. [B] Hepatic focal necrosis of a squirrel monkey (Yp4b), HE, $\times 100$. [C] Splenic focal necrosis of the ruffed lemur (Yp1b), HE, $\times 40$. [D] Splenic focal necrosis of a squirrel monkey (Yp4b), HE, $\times 100$.

[A]



[B]



[C]

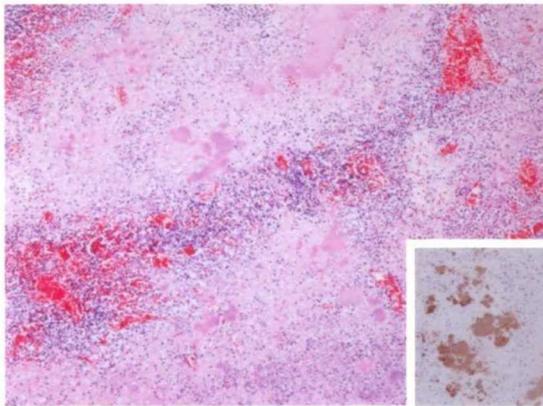


Fig. 7. Histopathological lesions of the intestine and mesenteric lymph nodes in Yersiniosis infected by *Y. pseudotuberculosis*. Major intestinal lesions in apes are found in the colon and cecum near the ileocecal area. On the other hand, in squirrel monkeys, they are found in the small intestine, especially associated with Peyer's patches. [A] Colon of the agile gibbon (Yp3), HE, $\times 40$. [B] Peyer's patches in the ileum of a squirrel monkey (Yp6), HE, $\times 40$. [C] Mesenteric lymph nodes of a squirrel monkey (Yp4b), HE, $\times 40$, Insert: Immunohistochemistry to *Y. pseudotuberculosis* using anti-*Y. pseudotuberculosis* sera.

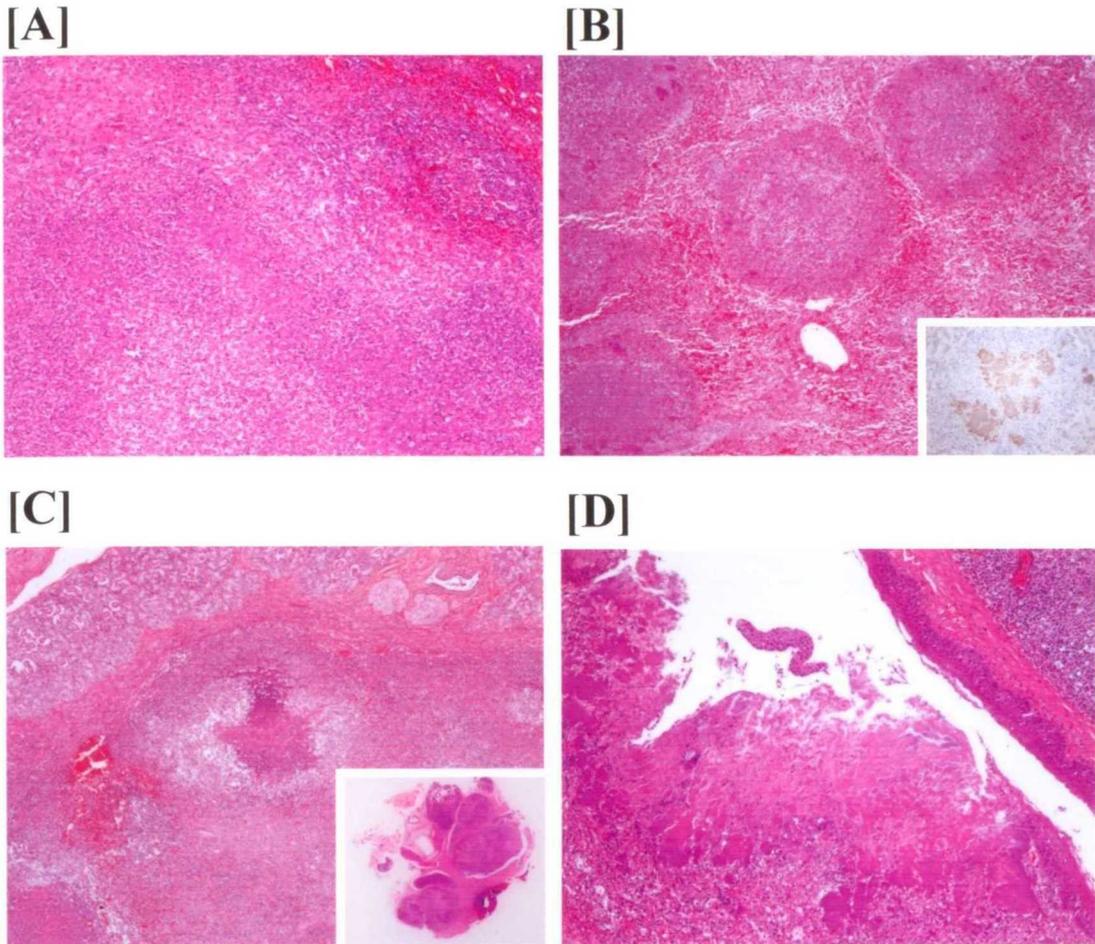


Fig. 8. Histopathological lesions of Yersiniosis infected with *Y. enterocolitica* O8. Areas of multifocal necrosis in *Y. enterocolitica* O8 infections are more intensive suppurative changes than in *Y. pseudotuberculosis*. Moreover, it is pathognomonic throughout the lymph nodes in the area of head and neck. [A] Liver of a squirrel monkey, HE, $\times 100$. [B] Liver of the agile gibbon, HE, $\times 40$, Insert: Immunohistochemistry to *Y. enterocolitica* O8 using anti-*Y. enterocolitica* O8 sera. [C] Mandibular lymph node of a squirrel monkey, HE, $\times 40$, Insert: Laryngopharynx including the mandibular lymph node of a squirrel monkey, HE, loupe. [D] Tonsils of a squirrel monkey, HE, $\times 100$.

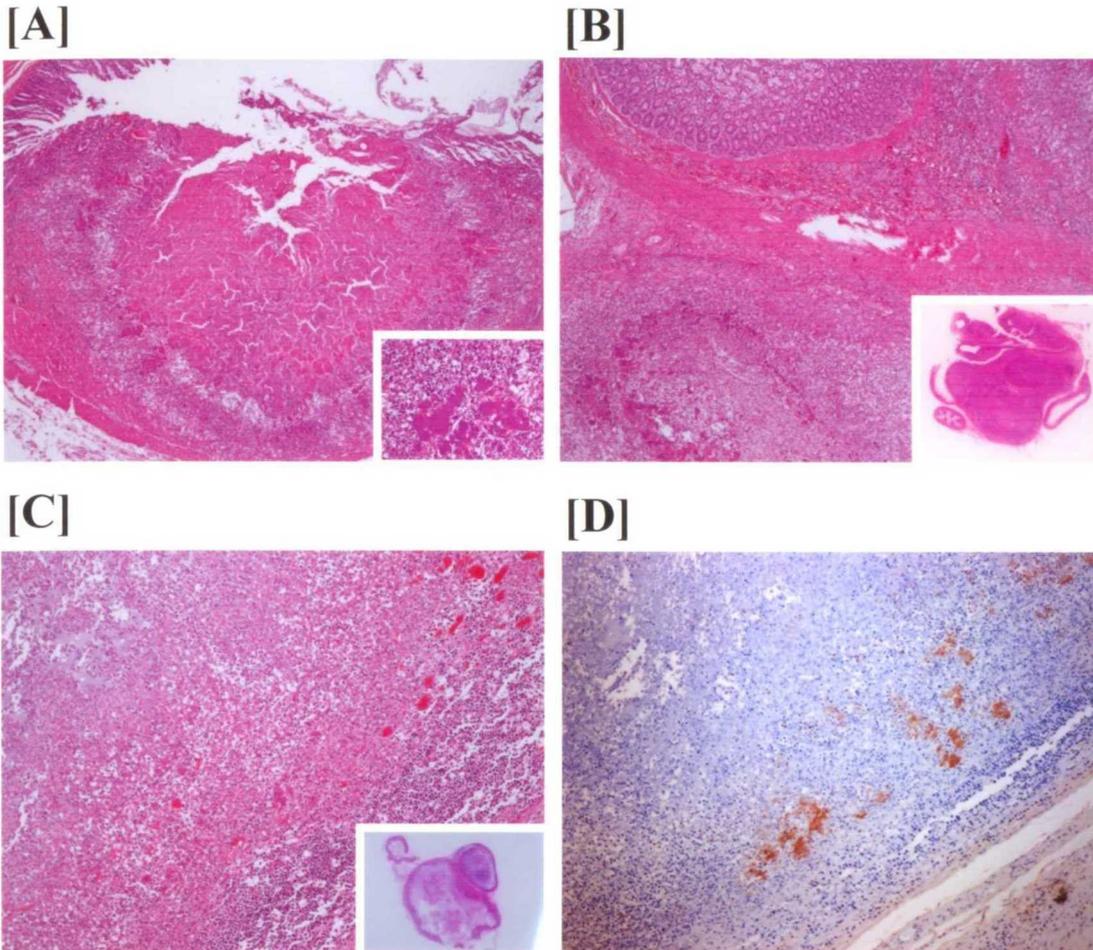


Fig. 9. Histopathological lesions of Yersiniosis infected with *Y. enterocolitica* O8 in the intestine. Neutrophil infiltrations are more predominant than in *Y. pseudotuberculosis*. Intestinal mucosa is necrotic to all layers. [A] Ileum of a squirrel monkey, HE, $\times 100$, Insert: Higher magnification of the bacterial colonies. [B] Cecum and neighboring lymphatic organs of a squirrel monkey, HE, $\times 100$, Insert: Adhesive mesenteric lymphadenitis involving the intestine, HE, loupe. [C] Cecum of the agile gibbon, HE, $\times 100$, Insert: Adhesive enteritis in the ileocecal area, HE, loupe. [D] Immunohistochemistry to *Y. enterocolitica* O8 using anti-*Y. enterocolitica* O8 sera of [C], $\times 100$.

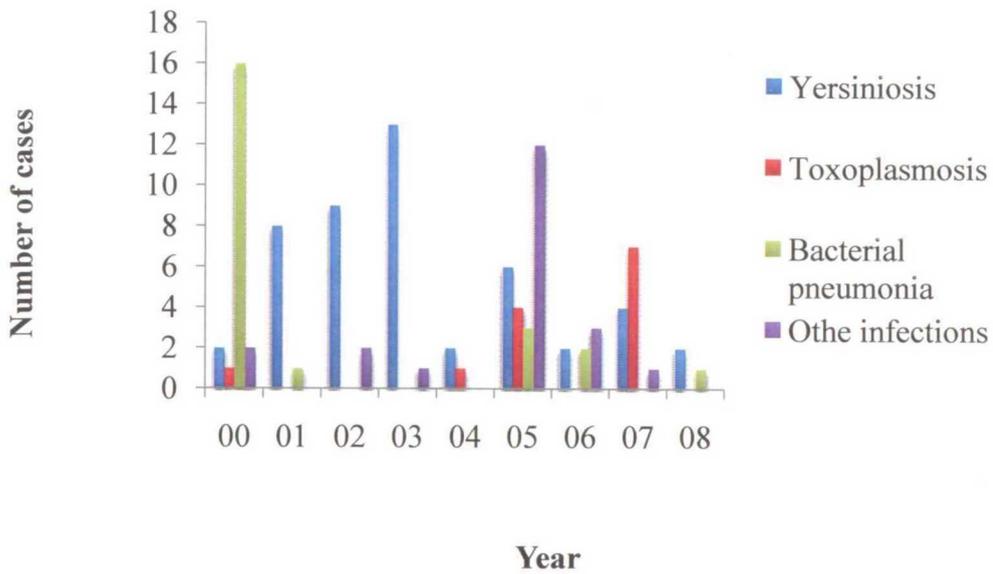


Fig. 10. Frequency of deaths from infectious disease in squirrel monkeys by year.

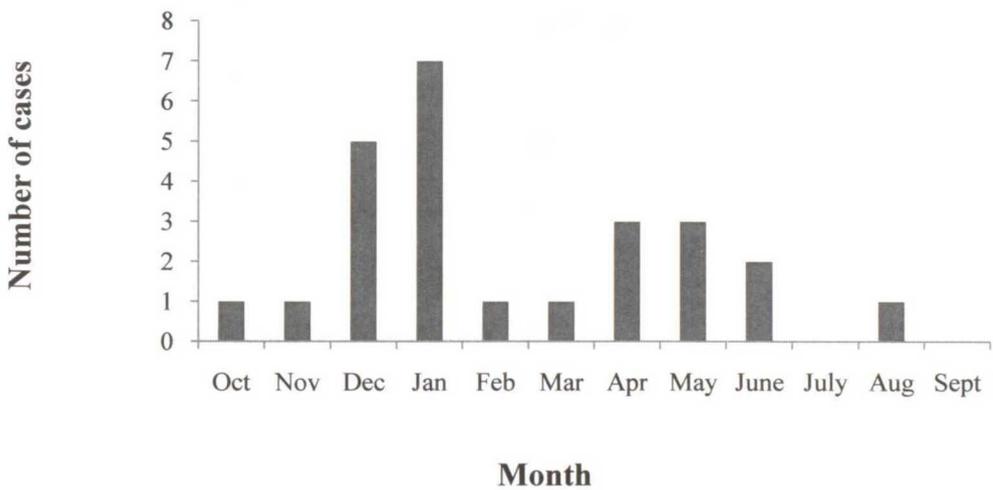


Fig. 11. Frequency of deaths from Yersiniosis in squirrel monkeys by month.

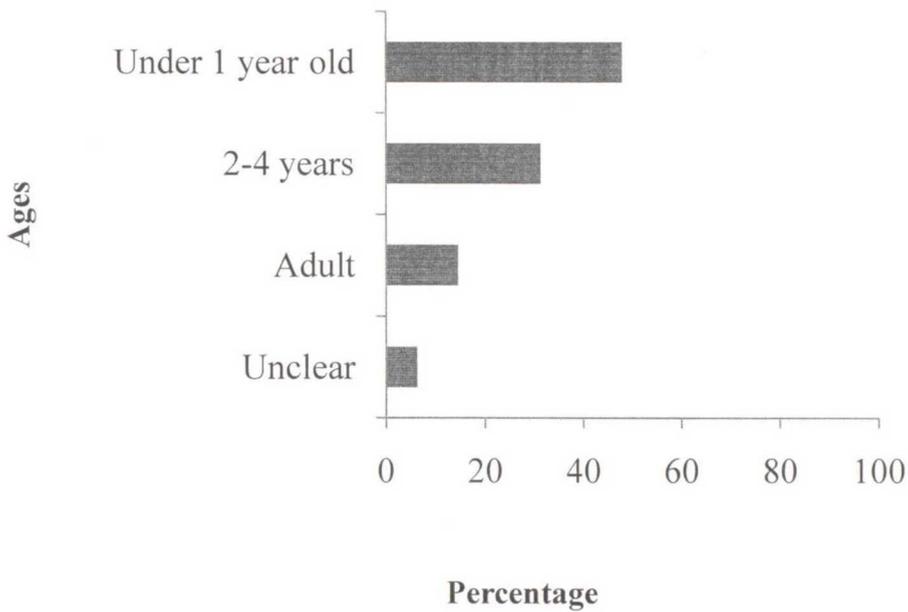


Fig. 12. Distribution of deaths by age from Yersiniosis in squirrel monkeys.

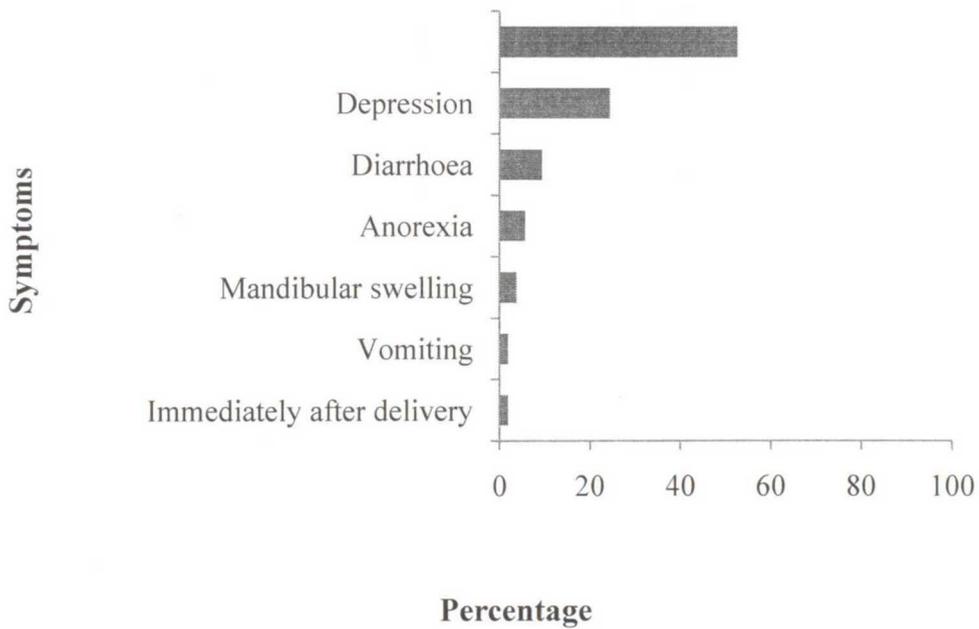


Fig. 13. Frequency of symptoms in Yersiniosis among squirrel monkeys.

Table 6. Distribution of Yersiniosis lesions in squirrel monkeys (*Saimiri* spp.) by *Yersinia* species and serotypes.*

	Spleen		Liver		Mesenteric lymph nodes		Small intestine		Peyer's patches		Colon		Solitary lymphatic follicles	
	Swelling	Nodules	Swelling	Nodules	Swelling	Nodules	Pseudomembrane	Hemorrhage	Swelling	Hemorrhage	Pseudomembrane	Hemorrhage	Swelling	Hemorrhage
	(n=)	(n=)	(n=)	(n=)	(n=)	(n=)	(n=)	(n=)	(n=)	(n=)	(n=)	(n=)	(n=)	(n=)
Yp 1b (n=14-20)	20/20 (100)	12/20 (60.0)	17/20 (85.0)	7/20 (35.0)	18/18 (100)	5/18 (27.8)	14/17 (82.4)	10/17 (58.8)	15/15 (100)	12/15 (80.0)	5/15 (33.3)	3/15 (20.0)	7/14 (50.0)	7/14 (50.0)
Yp 2b (n=1)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	0/1 (0.0)	0/1 (0.0)	0/1 (0.0)	0/1 (0.0)
Yp 4b (n=14)	10/14 (71.4)	6/14 (42.9)	13/14 (92.9)	7/14 (50.0)	14/14 (100)	3/14 (21.4)	11/14 (78.6)	3/14 (21.4)	12/14 (85.7)	8/14 (57.1)	5/14 (35.7)	0/14 (0.0)	12/14 (85.7)	7/14 (50.0)
Yp 6 (n=2)	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	1/2 (50.0)	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)
Yp 7 (n=1)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	0/1 (0.0)	0/1 (0.0)	1/1 (100)	0/1 (0.0)
Ye O3 (n=1)	1/1 (100)	0/1 (0.0)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	0/1 (0.0)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	0/1 (0.0)	0/1 (0.0)	0/1 (0.0)	0/1 (0.0)
Ye. O8 (n=4-5)	3/4 (75.0)	2/4 (50.0)	1/4 (25.0)	1/4 (25.0)	4/5 (80.0)	4/5 (80.0)	1/4 (25.0)	1/4 (25.0)	3/4 (75.0)	2/4 (50.0)	0/4 (0.0)	0/4 (0.0)	0/4 (0.0)	0/4 (0.0)
Total (n=37-43)	39/43 (90.7)	24/43 (55.8)	36/43 (83.7)	20/43 (46.5)	41/42 (97.6)	15/42 (35.7)	31/40 (77.5)	19/40 (47.5)	35/38 (92.1)	27/38 (71.1)	10/38 (26.3)	3/38 (7.9)	20/37 (54.1)	14/37 (37.8)

*No. (%) of squirrel monkeys positive

Yp, *Yersinia pseudotuberculosis*; Ye, *Yersinia enterocolitica*;

第 2 章 病原性 *Yersinia* の感染防御抗原に関する研究

第 1 節 序論

第 1 章の調査成績から、病原性 *Yersinia* が我が国のサル類飼育施設において、全国的に広く浸淫しており、多くの施設では、反復してエルシニア症が飼育下サル類に流行していることが明らかになった。病原性 *Yersinia* は、極めて多くの種類の家畜や愛玩動物、野生動物に保菌されており、さらに、河川水や井戸水などの環境中にも広く分布することが知られている[54,55,59,103,116,159]。特に、我が国においては、ノネズミやクマネズミ、ドブネズミなどの野外に生息するげっ歯類が、病原性 *Yersinia* の重要な保菌動物となっていることが報告されている[47,49,50,51,71,82,215]。第 1 章の調査成績でも、*Y. enterocolitica* O8 感染症の集団発生の際に、リスザルやアジルテナガザルから分離された菌株と同じ遺伝子型を示す菌株が、施設内のクマネズミから分離されたことから、今回の調査におけるサル類のエルシニア症の事例でも、げっ歯類が飼育施設内での病原性 *Yersinia* の伝播に関わっている事例があったことが示された。多くの飼育施設では、サル類は夜間を除いて、日中は屋外の放飼場で飼育されていることが多いため、保菌動物となるげっ歯類の侵入阻止や餌への二次汚染を完全に防止することは困難で、さらに、ほとんどの事例で感染源が特定されることはないことから、飼養管理を徹底することだけでは、サル類のエルシニア症の発生を予防することはできないと考えられる。実際、第

1 章のエルシニア症の発生状況調査において、サル類のエルシニア症が流行している施設では、上記の飼育管理対策に加え、施設内の清浄化の徹底や、定期的な抗生物質の投与などを実施しているにも関わらず、依然としてエルシニア症が流行しているのが現状である。サル類のエルシニア症は、臨床症状に特異性がなく、ほとんどが突然死で発見されることから、異常の発見が遅れることが多く、さらに、発症したサルから排泄された糞便を介して他個体への伝播が急速に進行することから、サル類のエルシニア症を効果的に予防するには、有効なワクチンを用いてサル類の病原性 *Yersinia* に対する感受性を低下させることが最も効果的と考えられる。

Y. pseudotuberculosis あるいは *Y. enterocolitica* を用いたワクチンに関する報告はいくつかみられるが、その多くは、*Yersinia* 属菌の交差抗原性を利用した、ペストの原因である *Y. pestis* に対するワクチン開発に関する研究や[14,190,191]、*Yersinia* の組織侵入性を利用して、*Yersinia* の病原因子である Yops を宿主細胞に注入するための装置であるⅢ型分泌装置 (Type III secretion system: TTSS) に外来抗原遺伝子を挿入した、外来抗原に対するワクチンに関する研究がほとんどである[5,171,194,195]。また、*Yersinia* のワクチンに関する研究のほとんどは、病原性プラスミドである pYV を脱落した株や、Yops や TTSS に変異を有する株を用いた弱毒生ワクチンを使用したものである[8,21,108,128,129,150,161,194,195]。しかし、弱毒化した生ワクチンを使用した場合、病原性が復帰する危険性があり、また、免疫力の低下した個体への接種は不可能であり、十分な個体管理が必要で、さらに、

ワクチンの保存方法に注意が必要である[41]。多頭飼育されることが多い飼育下サル類に対して野外で用いるには、個々の個体管理が十分に行えない状況が多いことから、保存に安定性があり、免疫力が低下した個体に対しても安全な、死菌あるいはサブユニットワクチンなどの、不活化ワクチンを使用することが望まれる。

病原性 *Yersinia* の死菌を用いたワクチンに関する実験としては、Uchidaら[200]や Kanekoら[93]による、加熱死菌やホルマリン不活化死菌を用いたマウスに対する実験があり、死菌接種後に生菌を経口接種することで、糞便中への排菌を阻止したという報告はあるが、感染致死を阻止する、効果的で実用的なワクチンの報告はない。サル類に対しては、Bielliら[12]による *Y. pseudotuberculosis* の死菌を用いた、シルバーマーモセット (*Callithrix argentata*) やジェフロワマーモセット (*Callithrix geoffroyi*)、ゲルディモンキー (*Callimico goeldii*) などに対する、動物園におけるワクチネーションの報告があるが、抗体産生を促したという記載があるのみで、エルシニア症の流行を阻止する十分な効果が得られていない。

当研究室における予備的研究で、馬場らは、*Y. pseudotuberculosis* 4b から精製した Yops と、25℃で培養後、ホルマリンで不活化した死菌(25℃死菌)を免疫原として、それぞれ1頭ずつのリスザルに皮下接種および経口接種した後に、*Y. pseudotuberculosis* 4b の生菌を経口接種した結果、Yops に対する血清抗体価の上昇はみられたものの、いずれの個体も生菌接種後7～11日の間に死亡した[6]。感染実験に使用した頭数が少なかったも

の、リスザルでは、通常の培養温度である 25℃では病原性プラスミドが発現しないことから、25℃死菌や Yops では、*Yersinia* 感染による死亡を阻止できない可能性が示唆された[6]。また、共同研究者である岩田ら[84]の実験では、YadA を免疫原として、マウスに皮下接種した結果、YadA を菌体表面に強く発現させたホルマリン不活化死菌を皮下接種したマウスでは、26 匹中 19 匹 (73.1%) が、YadA を強く発現した菌体を超音波破碎、超遠心することで精製した YadA を含む膜分画を皮下投与したマウスでは、7 匹中 7 匹 (100%) が、病原性 *Yersinia* の経口感染から耐過生残し、YadA が *Y. pseudotuberculosis* の重要な感染防御抗原となっている可能性が示唆された[84]。

病原性 *Yersinia* は、ヒトや動物に経口感染し、小腸粘膜のパイエル板上の特殊な上皮である濾胞被蓋上皮間に散在する、M 細胞と呼ばれる特殊な上皮細胞に接着し、そこからパイエル板内に侵入して増殖することが知られている[67]。YadA は、病原性 *Yersinia* の外膜に存在する線毛タンパク質であり、宿主上皮細胞への接着と侵入に関与する付着因子で、感染の初期段階において重要な役割を果たしている。さらに、パイエル板や腸間膜リンパ節、脾臓ならびに肝臓などの臓器に侵入後も、これらの感染組織において補体の殺菌作用や食細胞の食菌作用への抵抗性に関与し、菌の組織内への侵入を促進するだけでなく、病変形成にも関与している多機能タンパク質である[35,36]。細菌が宿主細胞に接着、定着するための病原因子である接着因子は、グラム陰性菌である *E. coli* の PapG や *Haemophilus*

influenzae の HifE、グラム陽性菌である *Staphylococcus aureus* の FndA や FndB、*Streptococcus pneumoniae* の PsaA など、様々な細菌が保有する重要なタンパク質であり、宿主へ感染する初期段階に作用することから、ワクチン候補物質として、注目されている[104,105, 212]。YadA は、感染の初期段階において重要な役割を果たす病原因子であり、YadA が発現し、宿主細胞へ接着することによってはじめて、Yops やその他の病原因子が、宿主細胞内へ注入されることが可能となる。さらに、YadA は好中球の貪食作用および補体の殺菌作用に対する抵抗性や、自己凝集性を有している多機能タンパク質であることから、YadA に対する抗体が産生されることにより、病原性 *Yersinia* の初期の侵入や増殖のみならず、パイエル板や腸間膜リンパ節、脾臓および肝臓などの感染組織における炎症反応の抑制に対する効果も期待され、病原性 *Yersinia* の感染防御抗原として重要であると考えられる[36]。しかし、YadA の機能は詳細に明らかにされておらず、実際に感染防御効果を詳細に検討した報告は見当たらない。

本章では、サル類のエルシニア症のコントロールを目的とした有効なワクチンの開発ならびにワクチン開発のための基礎的研究として、病原性 *Yersinia* に対して、実験動物の中では比較的感受性が高く、容易にエルシニア症を発症し、死亡することが知られているマウスを用いて、*Y. pseudotuberculosis* の感染防御抗原について病理学および免疫学的に検討した。

なお、本章におけるマウスを用いた動物実験は、麻布大学動物実験委員会の承認を得て行った(承認番号 100506-1)。

第2節 材料および方法

2-1 供試菌株

供試菌株として、後述する YadA を菌体表面に強く発現した死菌の作製および SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングによる YadA の発現の確認には、エルシニア症により死亡したリスザルから分離された *Y. pseudotuberculosis* 血清群 4b NP011001 株を用いた。また、マウスを用いた感染実験には、大阪大学微生物病研究所から分与された、*Y. pseudotuberculosis* 血清群 4b RIMD 2503048 株を用いた。使用した菌株は、Iwata ら[84]の方法を参考にして PCR を行い、病原性プラスミドのマーカである *virF* 遺伝子、腸管粘膜上皮への侵入に関与する *inv* 遺伝子ならびにスーパー抗原活性を有する YPMa をコードする *ypmA* 遺伝子を保有する強毒株であることを確認した。

2-2 YadA を強く発現した培養菌のホルマリン不活化全菌体死菌 (YadA 死菌) の作製

YadA 死菌の作製は、堀坂 [77] および岩田 [84] の方法に従い、以下のように行った。供試菌株を、BHI 液体培地 10ml に接種して 25℃ で 24 時間前培養した後、その培養液 10ml を RPMI 1640 液体培地 (日水, 東京) 500ml に接種し、37℃ で 18 時間振盪培養した。あわせ

て、菌の培養温度による YadA 発現の程度を比較するため、25℃で振盪培養を行った。その後、ホルムアルデヒドの濃度が1%となるように、培養液にホルムアルデヒド液（和光純薬，大阪）を加え、室温で24時間反応させて菌を不活化した後、8,000rpm で遠心分離し、滅菌生理食塩水に浮遊させる作業を3回繰り返すことにより菌体を洗浄し、YadA 死菌を得た。

2-3 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびウェスタンブロットティングによる YadA 発現の確認

上記に記載した方法で作製した YadA 死菌を、10μg/ml となるように電気泳動用のサンプル調整用バッファー (EzApply; ATTO, 東京) に懸濁し、沸騰温浴中で5分間加熱することにより、菌体からタンパク質を抽出した。YadA を含むタンパク質抽出液は、ポリアクリルアミド・プレキャストゲル (e-PAGEL; ATTO, 東京) に 5μl ずつアプライし、20mA、80分間、室温の条件で、ミニスラブ電気泳動装置 (パジェラン; ATTO) を用いて SDS-PAGE を行った。電気泳動後、0.25% Coomassie brilliant blue R-250 (和光純薬, 大阪) を含む染色液を用いてタンパク質染色を行い、バンドの確認をした。なお、分子量マーカーとして SDS-PAGE 用マーカーである SeeBlue Plus2 Pre-stained Standard (Invitrogen, U.S.A.) を用いた。さらに、電気泳動が終了したゲルは、mini trans-blot electrophoretic transfer cell (Bio-Rad, 東京) を用い、氷水中にて 0.05A、30V で1晩反応させ、

polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (NEN Life Science Product, U.S.A.) に転写させた。転写膜は 10% スキムミルクを含む TBS-T (20mM Tris-HCl [pH 7.6], 135mM NaCl, 0.1% Tween 20) を用い、軽く振盪しながら室温で 1 時間ブロッキングし、次いで TBS-T で希釈した一次抗体を加え、室温で 1 時間、ローテーターを用いて回転させながら反応させた。なお、一次抗体として、*Y. pseudotuberculosis* 4b に経口感染させ、血清抗体価の上昇を確認したラット (F344/N) の血清と糞便、YadA 分画を皮下投与することにより免疫したウサギ抗血清、さらに抗血清から精製したウサギ IgG を用いた。ウサギ抗血清からの IgG の精製は、Affi-Gel Protein A MAPS II Kit (Bio-Rad, 東京) を用いて、製品の使用説明書に従い、アフィニティクロマトグラフィーによって精製した。一次抗体の希釈は予備実験により、血清は 4,000 倍、糞便は 9 倍量の PBS-T で懸濁して 3000rpm、20 分間遠心した上清を、0.45 μ m のメンブレンフィルターで濾過して用いた。その後、転写膜は TBS-T で 10 分間、3 回洗浄し、TBS-T で希釈した二次抗体を加えて 1 時間、ローテーターで回転振盪しながら室温で反応させた。二次抗体は、一次抗体にラットの血清を用いた場合は、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ラット IgG 抗体 (KPL, U.S.A.)、ラットの糞便を用いた場合はペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ラット IgA 抗体 (KPL, U.S.A.)、ウサギに対してはペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (KPL, U.S.A.) を、それぞれ 4,000 倍、2,000 倍、4,000 倍に希釈して用いた。二次抗体を反応させた転写膜は TBS-T でさらに 10 分間 3 回洗浄後、化学発光検出試薬 (ECL plus; GE ヘルスケア・ジャパン, 東京) を用

い、製品の使用説明書にしたがって、化学発光法により、YadA タンパク質を検出した。

2-4 供試動物

供試動物として、病原性 *Yersinia* の感染実験に用いられることが多く、典型的な *Y. pseudotuberculosis* による急性感染症の病変を再現しやすい SPF、3 週齢のマウス (BALB/c)、雄 (日本 SLC, 浜松) を用いた。各マウスは、オートクレーブにより滅菌したソフトチップ (日本 SLC, 浜松) を床敷にしたマウス用プラスチックケージで飼育し、1 週間の検疫ならびに馴化期間を設け、1 日 1 回ないし 2 回、異常の有無を観察した。1 ケージにつき 5 匹のマウスを収容し、それぞれのマウスに、オートクレーブで滅菌した固形飼料 (実験動物用飼料 MF; オリエンタル酵母, 東京) と滅菌蒸留水を不断給与し、また、検疫期間中に全てのマウスについて、糞便中に *Yersinia* 属菌が存在しないことを、CIN 寒天培地で確認した。

2-5 免疫原接種と感染実験プロトコール

YadA の感染防御効果を検討するために、以下の 3 通りの実験を実施した。

【実験 1】

YadA 死菌を含む様々な免疫原を接種した後に、生菌を経口接種

することで、それぞれの感染防御効果について比較した。病原性 *Yersinia* の重要な病原因子である YadA や Yops などをコードしているプラスミド性の病原因子は、37℃で発現し、*Yersinia* 属菌の通常の培養温度である 25℃では発現しないことが知られている[44,45,152]。そのため、免疫原として、1. 菌体表面に YadA を強く発現した死菌 (YadA 死菌)、2. 通常の液体培地を用いて、37℃で培養した死菌 (YadA 低発現; 37℃死菌)、3. 25℃で培養した死菌 (25℃死菌) ならびに 4. 粗精製 Yops を用い、陰性対照群として免疫原の代わりに、5. PBSを投与した。YadA 死菌は、上述の方法で作製し、37℃死菌および 25℃死菌は、以下に記載した方法で作製した。供試菌株を、BHI 液体培地 10ml に接種して 25℃で 24 時間前培養した後、その培養液 10ml を BHI 液体培地 500ml に接種し、37℃死菌は 37℃で、25℃死菌は 25℃で 18 時間振盪培養した。その後、ホルムアルデヒドの濃度が 1%となるように、培養液にホルムアルデヒド液 (和光純薬, 大阪) を加え、室温で 24 時間静置して菌を不活化した後、8,000rpm で遠心分離し、滅菌生理食塩水に浮遊させる作業を 3 回繰り返すことにより菌体を洗浄し、それぞれ 37℃死菌と 25℃死菌を得た。また、Yops は下記の方法で精製した。Heesemann らの方法 [72] を参考にし、供試菌を Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地 (BD, U.S.A.) に接種し、25℃で 24 時間振盪培養 (120rpm) による前培養後、20 倍量の BHI 液体培地に接種した。BHI 液体培地は 37℃で 90 分振盪培養 (120rpm) 後、0.45 μ m メンブレンフィルター (Millipore, U.S.A.) で濾過滅菌した Ethylene glycol-bis (β -aminoethylether)

-N,N,N¹,N¹-tetraacetic acid (EGTA; 和光純薬, 大阪)を 10mM になるように添加し、さらに、37°Cで 90 分間振盪培養(120rpm)後、2,000 rpm で 30 分遠心分離し、その上清を 0.45µm メンブレンフィルターで濾過した。濾過上清は硫酸アンモニウム(和光純薬, 大阪)を 40mg/ml になるように添加してよく混合した後、2,000 rpm で 30 分間遠心分離し、上清を捨てて沈殿物を得た。沈殿物は蒸留水に溶解し、Spectra/PoraCE Membrane MWCO:10000 (Spectrum[®] Laboratories Inc., Rancho Dominguez, California, U.S.A.)で一晩透析後、真空凍結乾燥装置を用いて 24 時間凍結乾燥した。

YadA 死菌、37°C死菌および 25°C死菌は、抗原の濃度が、皮下接種は 100mg/ml、経口接種は 500mg/mlとなるように滅菌生理食塩水で調整した。一方、Yops は、抗原であるタンパク質を濃縮して精製しているため、死菌の 10 分の 1 量とし、皮下接種は 10mg/ml、経口接種は 50mg/ml となるように滅菌生理食塩水で調整した。一方、陰性対照群には免疫原の代わりに PBS を投与した。マウスの導入から 1 週間の検疫、順化期間を設け、その 1 週間後に免疫原を接種した。それぞれの免疫原を、5 匹ずつのマウスに 1 週間間隔で 2 回、皮下接種および経口接種し、さらにその 1 週間後に、*Y. pseudotuberculosis* 4b 生菌を経口接種した。生菌の接種は、供試菌株を TSA 平板培地により 25°Cで 24 時間静置培養し、投与菌数が 10⁹/0.2ml となるように PBS (pH7.2)で調整した菌液 0.2ml を、胃ゾンデを用いて胃内に接種した。免疫原初回接種時、免疫原接種から 1 週間後ならびに 2 回目の接種から 1 週間後に、マウスの尾静脈より採血を行い、血清を遠心分離

により採材し、使用するまで -80°C で凍結保存した。血清は、後述する方法により ELISA を実施し、各免疫原接種後の YadA 死菌ならびに Yops に対する血清抗体の推移を観察した。生菌接種後は1日2回、臨床徴候の観察を行い、死亡の有無を確認した。死亡個体については、ただちに病理解剖を行い、肉眼観察のあと、病理組織学的検索のために全身諸臓器を10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬固定した。その後、第1章2-3に記載したように HE 切片を作成し、あわせて、*Y. pseudotuberculosis* 4b に対する免疫染色を実施し、病変を観察するとともに菌の増殖を病理組織学的に観察した。

【実験 2】

YadA 死菌を免疫原として接種することで、*Y. pseudotuberculosis* 感染症による死亡を阻止できるのかをより詳細に観察するために、マウスを各群10匹ずつとし、以下のように4つのグループに分け、それぞれに免疫原として YadA 死菌を、陰性対照群には PBS を投与した。1. YadA 死菌単回皮下接種群、2. YadA 死菌2回皮下接種群、3. YadA 死菌2回経口接種群、4. PBS 皮下投与群(陰性対照群)。マウスは、導入から1週間の検疫、順化期間を設け、その1週間後に免疫原を接種した。YadA 死菌は、皮下接種群は100mg/ml、経口接種群は500mg/mlの濃度になるように滅菌生理食塩水で希釈し、その0.2mlをマウスに接種した。2回接種群はさらに1週間後に再度 YadA 死菌を接種し、最終の免疫から1週間後に、*Y. pseudotuberculosis* 4b 生菌を経口接種した。生菌の接種は、供試菌株を TSA 平板培地により 25°C で24時間静置培養し、投与菌数が

10⁹/0.2ml となるように PBS (pH7.2) で調整した菌液 0.2ml を、胃ゾンデを用いて胃内に接種することにより行った。生菌接種後 3 日、7 日、14 日および 14 日目以降は 7 日ごとに、糞便を採材し、排菌量を経時的に計測した。採取した各糞便は、9 倍量の滅菌 PBS に入れ、マイクロチューブ用ホモジナイザーペッスル (テックジャム, 大阪) を用いて懸濁した後、PBS により 10 倍段階希釈して、YERSINIA Selective Supplement (OXOID, England) を添加した CIN 平板培地に接種し、菌の定量を行った。さらに、生菌の経口接種後 0 日、7 日および 7 日以降は 7 日ごとに体重を測定して体重の推移を確認するとともに、1 日 2 回、臨床徴候の観察を行い、死亡の有無を確認した。死亡個体は、ただちに病理解剖を行い、肉眼観察のあと、病理組織学的検索のために全身諸臓器を 10% 中性緩衝ホルマリン液に浸漬固定した。さらに、非免疫群のマウスが半数死亡した時点で、各 YadA 死菌接種群のマウスのうち半数を、イソフルランの吸入による深麻酔下で全採血を行い、安楽死後に剖検を実施し、実験 1 と同様に病理組織切片を作成し、病変の比較を行った。

【実験 3】

YadA 死菌を免疫原として接種した後に、*Y. pseudotuberculosis* 4b 生菌を経口接種して、経時的に各臓器における病変および菌量の比較を行い、YadA の感染防御効果を観察するために、マウスを以下のように各 15 匹ずつ、3 つのグループに分け、それぞれに YadA 死菌あるいは PBS を投与した。1. YadA 死菌皮下接種群、2. YadA 死菌経口接種群、3. PBS 皮下投与群 (陰性対照群)。マウスは、導入から

1 週間の検疫、順化期間を設け、その 1 週間後に免疫原を接種した。YadA 死菌の濃度は実験 1, 2 と同様、皮下接種群は 100mg/ml、経口接種群は 500mg/ml の濃度になるように滅菌生理食塩水で希釈し、その 0.2ml をマウスに接種した。皮下接種群は、初回の接種から 21 日後に YadA 死菌を再度接種し、経口接種群は、初回の接種から 1 週間ごとにさらに 2 回経口接種した。最終の免疫から、皮下接種群は 21 日後、経口接種群は 28 日後に *Y. pseudotuberculosis* 4b 生菌を経口接種した。なお、陰性対照群は YadA 死菌の代わりに PBS を投与した。生菌は、実験 2 と同様の方法で、投与菌数が $10^9/0.2\text{ml}$ となるように PBS (pH7.2) で調整した菌液 0.2ml を、胃ゾンデを用いて胃内に接種した。生菌の経口接種から 8 時間、24 時間、3 日、5 日、7 日後に、それぞれ 3 匹ずつのマウスを、イソフルランの吸入による深麻酔下で全採血を行い、安楽死後に剖検を実施した。剖検時に糞便、パイエル板、腸間膜リンパ節、脾臓および肝臓を採材し、9 倍量の滅菌 PBS に入れ、マイクロチューブ用ホモジナイザーペッスルを用いて懸濁した後、PBS により 10 倍段階希釈して、CIN 平板培地に接種し、菌の定量を行った。YadA 死菌初回接種時、1 週間後ならびに 2 回目の接種の 1 週間後に、尾静脈より採血を行い、血清を採取した。また、生菌接種後は、剖検時に採取した全血を用いて、遠心分離によって血清を採取し、使用するまで -80°C に保存した。さらに、YadA 死菌の初回接種から 0 日、7 日、14 日、28 日、42 日および生菌接種 7 日後に糞便を採材し、使用するまで -80°C に保存した。糞便は、それぞれのマウスをオートクレーブ滅菌したケージに入れ、排泄した糞便を採

取した。凍結保存した血清と糞便は、以下に記載した方法で ELISA を行い、抗体の測定を実施した。また、剖検時に、脾臓、肝臓、小腸、盲腸、結腸、パイエル板および腸間膜リンパ節を含む全身諸臓器を採材して、実験 1 と同様の方法で HE 切片の作成および免疫染色を行い、病変の経時的な比較および菌の動態を観察した。

2-6 ELISA による血清ならびに糞便中の抗体測定

上記の実験 1 で採材し、凍結保存した血清および実験 3 で採材した血清と糞便を用いて、ELISA により経時的に抗体を測定した。抗原として、血清は YadA 死菌と Yops、糞便については YadA 死菌を用い、血清は IgG、糞便は IgA を測定した。YadA 死菌は、上記に記載した方法で作製し、予備試験の結果、 $160\mu\text{g/ml}$ が最も適当な抗原濃度であると判断したため、 0.05M 炭酸緩衝液 ($\text{pH}9.2$) で希釈した。Yops は、上述した方法で精製し、抗原量は、 $250\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように 0.05M 炭酸緩衝液 ($\text{pH}9.2$) で希釈した。

ELISA は、以下に記載した通りに行った。希釈した抗原液は、ELISA 用 96 穴マイクロプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) の各ウェルに $50\mu\text{l}$ ずつ分注し、 4°C で 24 時間静置し、ウェルに抗原を吸着させた。次に、各ウェルの抗原液を除去し、被検溶液中の蛋白質が非特異的にプレートに結合するのを阻止するため、 10% BSA Diluent/Blocking Solution (KPL, U.S.A.) を蒸留水で 10 倍に希釈して各ウェルに $300\mu\text{l}$ ずつ分注し、室温で 15 分間反応させた後、

反応液をウェルより除去した。

供試血清は、56℃で30分間処理して非動化し、予備試験の結果、40倍希釈が最も適当だと判断されたので、この濃度になるように Wash solution (KPL, U.S.A.)で希釈した。次に、抗原を吸着させたマイクロプレートに、供試血清を各ウェルに50μlずつ入れ、室温で1時間反応させた。その後反応液を捨て、Wash solution (KPL, U.S.A.)で4回洗浄した。なお、供試血清は1検体につき4ウェルを用いた。糞便は、9倍量の Wash solution (KPL, U.S.A.)で希釈後、プロテアーゼインヒビターである Halttm Protease Inhibitor Single-Use Cocktail (サーモフィッシャーサイエンティフィック, U.S.A.)を添加し、2,000rpmで30分遠心した上清を、0.45μm メンブレンフィルターを用いて濾過滅菌してから使用した。糞便は血清と同様に、1検体につき50μmずつ4ウェルに分注し、室温で1時間反応させ、Wash solution (KPL, U.S.A.)で4回洗浄した。その後、固相化抗原プレートの各ウェルに、血清の場合は10% BSA Diluent/Blocking Concentrateで1,000倍希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (AbD, U.K.)を、糞便の場合はペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgA 抗体 (サーモフィッシャーサイエンティフィック, U.S.A.)を50μlずつ加え、室温で1時間反応させた後、反応液を捨て、Wash solutionで5回洗浄した。次に、発色基質として ABTS (2·2'-azino-di [3-ethylbenzthiazoline sulfonate]) 溶液 (KPL, U.S.A.)を50μlずつ分注し、20分間室温で静置後、MTP-120 マイクロプレートリーダー (コロナ電気株式会社, 茨城)を用いて、波長405nmでの吸光度を Optical Density (OD)値と

して測定した。供試血清および糞便の OD 値は、4 ウェルの OD 値の平均値を用いた。

2-7 病理学的検索

全てのマウスについて、病理解剖による肉眼的観察を行った。剖検時に、腸管（小腸、盲腸、結腸）、パイエル板、腸間膜リンパ節、肝臓および脾臓を含む全身諸臓器を、病理組織学的検索のために 10% 中性緩衝ホルマリンで浸漬固定し、第 1 章 2-3 に記載した方法でパラフィン切片を作成、その後、H.E. 染色を実施した。さらに、偽結核菌群別用免疫血清 O4 群を一次抗体として、免疫染色を行った。

2-8 統計学的解析

2 群間の平均値の差の検定は、Microsoft Office Excel 2007 を用いて、Student の t 検定を行った。なお、有意水準は 5% とした。

第 3 節 結果

3-1 YadA を菌体表面に強く発現した菌の作製

SDS-PAGE により、YadA の分子量である約 150kDa 付近に強いバンドを確認した (Figure 1A)。さらに同バンドは、ウェスタンブロッティングに

より、*Y. pseudotuberculosis* 4b 感染ラットの血清と糞便、YadA 分画で免疫したウサギの抗血清およびアフィニティー精製した YadA に対するウサギ IgG に陽性を示した (Figure 1)。なお、ラットの血清と糞便、ウサギ血清を用いた場合は、YadA 以外のタンパク質に対しても陽性がみられたが、アフィニティー精製したウサギの IgG では、YadA に対するシングルバンドのみが検出された。また、菌の振盪培養温度条件による YadA 発現の比較では、25℃よりも 37℃で振盪培養した方が、より強くバンドが検出された (Figure 1)。

3-2 生菌接種後の臨床徴候および死亡状況 (実験 1, 2)

実験 1 では免疫原として、1. YadA 死菌、2. 37℃死菌、3. 25℃死菌、4. Yops ならびに 5. PBS (陰性対照群) を各 5 匹ずつのマウスに皮下接種あるいは経口接種した後、*Y. pseudotuberculosis* 4b の生菌を経口接種して、臨床徴候および死亡状況を観察した。その結果、生菌接種後、3 日目から全体に毛並みの悪化が観察され、軟便を排泄する個体が見られた。毛並みの悪化は Yops 接種群と陰性対照群で特に高度であった。しかし、動きは全体に活発であった。その後、経時的に動きが悪化し、6 日目に Yops を皮下接種したマウスのうち 1 匹 (20.0%) が死亡した (Figure 2)。7 日目には、37℃死菌を皮下接種したマウスの 1 匹が死亡した。この時点で、他の全ての生残マウスは、いずれの群も毛並みが悪く、軟便または下痢を排泄し、動きも不活発でうずくまる状態が多かった。8 日目には、陰性対照群の 3 匹 (60.0%)、

Yops 皮下接種群の 2 匹 (40.0%)、25℃死菌経口接種群の 2 匹 (40.0%) が死亡した。9 日目は、陰性対照群の 2 匹が死亡し、陰性対照群は 100% が死亡した。同様に、10 日目までには Yops 皮下接種群と 25℃死菌経口接種群の全てのマウスが死亡した。さらに、11 日目までには 37℃死菌経口接種群と 25℃皮下接種群のマウスが全て死亡した。また、14 日目までには Yops 経口接種群のマウスが全て死亡した。YadA 死菌を接種したマウスでは、経口接種したマウスが 9 日と 12 日目にそれぞれ 1 匹死亡したが、皮下接種したマウスは全匹が耐過した。なお、死亡したマウスはいずれも、死亡する直前まで毛並みが悪く、うずくまる状態が多く、動きはほとんど観察されなかった。最終的に、耐過生残したマウスは YadA 死菌皮下接種群 5 匹中 5 匹 (100%)、YadA 死菌経口接種群 5 匹中 3 匹 (60.0%)、37℃死菌皮下接種群 5 匹中 2 匹 (40.0%) となった (Figure 2)。15 日目の時点で、YadA 死菌皮下接種群のマウスは食欲が回復し、動きも活発であったが、YadA 死菌経口接種群および 37℃死菌皮下接種群の生残マウスは、毛並みが悪く、動きも鈍い状態であった。

次に、実験 2 において、1 群 10 匹ずつのマウスにそれぞれ、YadA 死菌単回皮下接種、2 回皮下接種、2 回経口接種により免疫を賦与した後、 10^9 の *Y. pseudotuberculosis* 4b の生菌を経口接種して、臨床徴候の観察と死亡状況を比較した。生菌接種の 2 日後までは、いずれの群のマウスにも異常はみられなかったが、3 日後からいずれの群においても、やや軟便を示す個体がみられはじめた。4、5 日後からは全体に食欲が低下し始め、毛並みが悪い個体が目立ちはじめた。6 日

後は、さらに動きが鈍くなり、特に PBS を投与した陰性対照群で顕著であった。さらに 7 日後、陰性対照群の 1 匹が死亡した。その他の生存個体も、摂餌、飲水はほとんどなく、糞便の排泄は少量で、動きも鈍く、うずくまっていた。その他の免疫原接種群のマウスもやや動きが鈍く、食欲も低下傾向にあった。8 日目、陰性対照群の 2 匹と単回皮下接種群の 1 匹が死亡し、9 日目はさらに陰性対照群の 4 匹が死亡した。生菌接種 11 日後から、陰性対照群以外のマウスでは食欲が戻り始め、動きが活発になり始めた。一方、陰性対照群は全体に毛並みが悪く、食欲もほとんどなかった。15 日後、陰性対照群の 1 匹が死亡した。18 日目以降は、陰性対照群の生存個体 (2 匹) も毛並みが良くなり、食欲、動きも回復し始めた。それ以降は、いずれの群のマウスも、異常はみられなかった。感染に耐過生残したマウスは、2 回皮下接種群と 2 回経口接種群で 10 匹中 10 匹 (100%)、単回皮下接種群で 10 匹中 9 匹 (90%)、陰性対照群で 10 匹中 2 匹 (20%) となった (Figure 5)。

3-3 生菌接種後の体重の推移と糞便への排菌状況 (実験 2)

1 群 10 匹ずつのマウスにそれぞれ、YadA 死菌を単回皮下接種、2 回皮下接種および 2 回経口接種により免疫を賦与した後に、 10^9 の *Y. pseudotuberculosis* 4b の生菌を経口接種し、0 日、7 日、14 日、21 日、28 日後に体重を測定した。あわせて、3 日、7 日、14 日、21 日、28 日、35 日後にそれぞれ糞便を採取し、糞便中への排菌状況を観

察した。その結果、体重の推移はいずれの群のマウスも同様の傾向を示し、生菌接種の7日後には体重が減少し、14日後まで低かったが、14日以降は増加傾向にあった。しかし、陰性対照群の体重の減少が最も顕著で、単回皮下接種群と2回経口接種群は中程度、2回皮下接種群は最も軽度であった(Figure 6)。7日目以降、28日目まで、陰性対照群はその他いずれの免疫原接種群よりも有意に体重が減少した($p < 0.05$)。免疫原接種群では、7日目の時点で、単回皮下接種群は、2回皮下接種群および経口接種群に比べて有意に体重が減少したが($p < 0.05$)、2回皮下接種群と経口接種群では有意な差はなかった。また、14日以降28日目までは、2回皮下接種群は、2回経口接種群および単回皮下接種群よりも有意に体重が増加したが($p < 0.05$)、単回皮下接種群と2回経口接種群では有意な差はみられなかった。生菌接種後の糞便中への排菌は、3日から14日後にかけては、いずれの群のマウスも大量の排菌($7.1 \sim 7.5 \log \text{ CFU/g}$)がみられ、有意な差はみられなかった(Figure 7)。陰性対照群は、21日後においても大量の排菌がみられたが($7.3 \log \text{ CFU/g}$)、単回皮下接種群と2回経口接種群の排菌量はやや減少し始め($6 \sim 7.2 \log \text{ CFU/g}$)、2回皮下接種群では有意に減少していた($p < 0.05$; $5.3 \sim 6 \log \text{ CFU/g}$)。28日後には、2回皮下接種群の全てのマウスの排菌が終了し、2回経口接種群では5匹中3匹、単回皮下接種群では5匹中2匹の排菌の終了を確認した。一方、陰性対照群の生存した2匹のマウスは、28日後においても $7.3 \log \text{ CFU/g}$ の排菌がみられた。35日後には、単回皮下接種群、2回経口接種群の全てのマウスの排菌

が終了し、陰性対照群のマウスはそれぞれ 6.2、6.3 log CFU/g の排菌がみられ、42 日後には陰性対照群のマウスも排菌が終了した。

3-4 生菌接種後の各臓器における菌数の経時的変化(実験 3)

YadA 死菌を皮下接種、経口接種ならびに PBS を投与した各群 15 匹ずつのマウスに、免疫原を接種して免疫を賦与後、*Y. pseudotuberculosis* 4b 生菌を経口接種し、経時的に脾臓、肝臓、腸間膜リンパ節、パイエル板および糞便を採取して、各臓器の菌数を測定した(Figure 8-12)。パイエル板、糞便からは、いずれの群においても、生菌接種 8 時間後から菌が検出されたが、陰性対照群が最も菌量が多く、YadA 死菌皮下接種群が最も少量であった。また、YadA 死菌経口接種群は、その中間であった。パイエル板では、8 時間後においては、皮下接種群と経口接種群は陰性対照群と比較して有意に菌量が少なかったが($p < 0.05$)、経口接種群は、皮下接種群よりも有意に菌量が多かった($p < 0.05$)。24 時間、3 日および 5 日後では、皮下接種群と経口接種群で有意な差はなかった。糞便においては、5 日目まではいずれの群でも有意な差は認められなかったが、7 日後からは、皮下接種群と経口接種群で菌数の減少を確認し、一方で、陰性対照群では菌数に変化はなく、多量の菌数を確認した($p < 0.05$; Figure 11, 12)。腸間膜リンパ節では、陰性対照群では 8 時間後から菌が検出されたが、皮下および経口接種群では 3 日後から検出された。3 日目の時点では、いずれの群でも菌量に有意な差はみられなかつ

た。免疫原接種群における菌数は、特に経口接種群よりも皮下接種群において、5日後をピークに7日後には減少したが、陰性対照群は7日後まで菌数が増加していた($p < 0.05$; Figure 10)。肝臓と脾臓では、免疫群接種群は24時間後まで菌が検出されなかったが、陰性対照群からは24時間後から菌を確認した。また、免疫群接種群では、5日後をピークに7日後には減少していたが、陰性対照群では7日後まで増加していた(Figure 8, 9)。脾臓では、3日目において、陰性対照群よりも皮下および経口接種群で有意に減少していたが($p < 0.05$)、皮下接種群と経口接種群では有意な差はみられなかった。しかし、5日および7日目では、皮下接種群は経口接種群よりも有意に菌数が減少した($p < 0.05$)。肝臓では、3日および5日目の時点で、皮下接種群は経口接種群と陰性対照群よりも有意に菌数が少量であったが($p < 0.05$)、経口接種群と陰性対照群では菌数に差はみられなかった。7日目では、経口接種群は陰性対照群よりも有意に菌数が減少した($p < 0.05$)。

3-5 YadA 死菌および生菌接種後の血清 IgG と糞便中 IgA の経時的変化 (実験 1, 3)

実験 1 では、免疫原として 1. YadA 死菌、2. 37°C 死菌、3. 25°C 死菌、4. Yops ならびに 5. PBS (陰性対照群) を各 5 匹ずつのマウスに 1 週間間隔で 2 回皮下接種ならびに経口接種した。免疫原初回接種時、1 週間後および免疫原の再接種から 1 週間後に、血清を採取し、

ELISAによりYadA死菌ならびにYopsに対する血清抗体を測定した。その結果、YadA死菌に対する血清IgG値は、YadA死菌を皮下接種したマウスで最も高く、37℃死菌を皮下接種したマウスでは中程度であった(ともに $p<0.05$)。また、YadA死菌経口接種群、37℃死菌経口接種群、25℃死菌皮下接種群では軽度の反応がみられた($p<0.05$)。一方、Yops皮下接種群、Yops経口接種群ならびにPBSを投与した陰性対照群では、YadA死菌に対する血清IgGは検出されなかった(Figure 3)。Yopsに対する血清IgGは、Yopsを皮下接種したマウスでのみ検出され、その他のマウスでは、いずれの群もYopsに対する血清IgGはほとんど検出されなかった(Figure 4)。

次に、実験3のマウスについて、YadA死菌を接種してから、生菌接種後7日目まで、経時的に血清と糞便を採材し、ELISAにより抗体の測定を行った。抗原として、血清についてはYadA死菌とYops、糞便についてはYadA死菌を用い、血清はIgG、糞便はIgAを測定した。YadA死菌に対する血清IgGは、免疫原を接種した群ではいずれもYadA死菌接種後、漸増し、生菌の経口接種後も軽度に上昇した。陰性対照群では、生菌接種後に軽度の上昇を確認したが、その程度は免疫原接種群よりもわずかであった(Figure 13)。YadA死菌皮下および経口接種群は、免疫原接種から7日後、陰性対照群では、生菌接種8時間後から、未処置対照群のマウスより有意に抗体の上昇を確認した($p<0.05$)。また、その程度は、皮下接種群が最も有意に上昇し、次に経口接種群、陰性対照群の順であった。Yopsに対する血清IgGは、いずれの群においても、YadA死菌接種後は上昇しな

ったが、生菌の接種 7 日後から有意に上昇した ($p < 0.05$; Figure 14)。なお、陰性対照群は 7 日までに全て死亡したため、7 日後の血清 IgG は測定できなかった。YadA 死菌に対する糞便中 IgA は、免疫原接種群ではいずれも YadA 死菌接種から 7 日後には上昇し、その程度は皮下接種群よりも経口接種群で有意に高かった ($p < 0.05$)。生菌接種後は、陰性対照群を含む全ての群で、糞便 IgA の上昇を確認した (Figure 15)。

3-6 YadA 死菌および生菌接種後の病理学的変化 (実験 2, 3)

実験 2 で、1 群 10 匹ずつのマウスにそれぞれ、YadA 死菌単回皮下接種、2 回皮下接種および 2 回経口接種により免疫を賦与し、陰性対照群には PBS を投与した後に、 10^9 の *Y. pseudotuberculosis* 4b の生菌を経口接種し、経過を観察した結果、9 日目に陰性対照群の半数のマウスが死亡したため、生菌接種 10 日後に、各 YadA 死菌接種群のマウスの半数ずつを解剖し、病変の比較を行った。その結果、脾臓、パイエル板、腸間膜リンパ節の腫大が全ての群のマウスでみられた (Figure 16)。陰性対照群では、死亡した全てのマウスの肝臓と脾臓に、多発性白色結節の形成を認めた (Figure 16A)。YadA 死菌経口接種群では、5 匹中 4 匹 (80%) の脾臓、2 匹 (40%) の肝臓に多発性白色結節形成がみられた (Figure 16B)。単回皮下接種群では、4 匹中 1 匹 (25%) の肝臓と脾臓に多発性白色結節形成がみられた。一方、2 回皮下接種群では、結節性病変はいずれの臓器にもみられ

なかった(Figure 16C)。肉眼で観察された結節性病変は、病理組織学的に、大型の菌塊を多数含む壊死巣であった。陰性対照群の死亡したマウスは、いずれの個体もパイエル板は、菌塊を含む壊死組織によってほぼ置換されており、その他の小腸、盲腸および結腸の粘膜上皮細胞も壊死、剥脱し、粘膜固有層にも好中球の浸潤や壊死巣がみられた。脾臓、腸間膜リンパ節では、リンパ濾胞は高度に縮小してリンパ球数は減少し、肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節では、菌塊を含む高度な壊死巣が多数みられた。YadA 単回皮下接種群、2 回皮下接種群および経口接種群では、肉眼で観察された結節性病変以外には、病理組織学的に、病変に違いはみられなかった。これらの免疫原接種群では、諸臓器に好中球の浸潤を伴う大小の壊死巣がみられたが、菌塊はほとんどみられず、免疫染色で数個の菌が病変内に確認されるのみであった。その他、糞便中への排菌状況を確認していた、免疫原接種群各 5 匹、陰性対照群 2 匹の生存個体については、42 日後に糞便への排菌が全個体で終了したことから、その 1 週間後に安楽殺を行い、肉眼観察および病理組織学的に検索した。その結果、YadA 死菌単回皮下接種群の 1 匹を除く全ての個体で、肉眼および病理組織学的に、いずれの臓器にも著変はみられなかった。しかし、単回皮下接種群の 1 匹では、肝臓に約 4mm 大の、周囲組織との境界明瞭な白色結節がみられた。病理組織学的には、中心部に壊死組織と菌塊、その周囲に好中球とマクロファージ、ときに多核巨細胞が少数散在し、さらにその周囲を、紡錘形の核を有する線維芽細胞および膠原線維が被包化し、膿瘍を形成していた(Figure 17)。

実験 3 では、YadA 死菌を皮下接種、経口接種ならびに PBS を投与した各群 15 匹ずつのマウスに、免疫原を接種して免疫を賦与後、*Y. pseudotuberculosis* 4b 生菌を経口接種し、8 時間、24 時間、3 日、5 日および 7 日後にそれぞれ 3 匹ずつ剖検を行い、病理組織学的検索を行うとともに、抗 *Y. pseudotuberculosis* 4 群抗体を用いた免疫染色により菌の動態を観察した。その結果、全体を通して、YadA 死菌接種群、陰性対照群ともにほぼ同時期に、*Y. pseudotuberculosis* 感染による病変の形成、諸臓器における菌の増殖を認めたが、その程度は YadA 死菌皮下接種群、経口接種群、陰性対照群の順に軽度であった。いずれの群においても、生菌接種 8 時間後から、パイエル板を構成する粘膜上皮細胞（濾胞被蓋上皮）および上皮直下の固有層において、核濃縮や核崩壊などのアポトーシス像がみられ、経時的に病変の程度が強くなっていた (Figure 18)。抗 *Y. pseudotuberculosis* 4 群免疫血清を用いた免疫染色では、YadA 皮下接種群の 3 匹中 1 匹を除くその他の全個体で、粘膜上皮内および上皮直下の固有層に 1～数個の菌の侵入が確認できた (Figure 18)。生菌接種 24 時間後には、皮下接種群の 3 匹中 2 匹を除く全個体の濾胞被蓋上皮直下の固有層において、比較的小さな菌塊がみられ、その周囲を好中球と少数のマクロファージが囲んでいた。また、YadA 死菌経口接種群の 3 匹中 1 匹と陰性対照群の全ての個体で、濾胞被蓋上皮の軽度の崩壊、脱落が観察され、経時的に病変は悪化した (Figure 19)。腸間膜リンパ節は、いずれの個体も濾胞が発達し、リンパ洞内にリンパ球、形質細胞およびマクロファージが中程度浸

潤し、少数の好中球がみられた。免疫染色では、陰性対照群の3匹中1匹の肝臓と脾臓および腸間膜リンパ節に、少数の菌がみられた。生菌接種3日後は、パイエル板濾胞被蓋直下にみられた菌塊を含む壊死巣が大型化し、好中球、マクロファージなどの浸潤数が増加し、より高度な病変を形成していた。パイエル板の病変は、YadA死菌皮下接種群よりも、経口接種群と陰性対照群で特に高度であった(Figure 20)。また、パイエル板以外の小腸粘膜固有層にも、菌塊を含む壊死巣がみられ、固有層にはび漫性に、少数のリンパ球、形質細胞および好中球が浸潤していた。さらに、経口接種群と陰性対照群のそれぞれ1匹ずつの結腸孤立リンパ小節に、菌塊を含む壊死巣がみられた(Figure 20)。腸間膜リンパ節では、皮下接種群の1匹を除く全ての個体で、好中球の浸潤を伴う菌の増殖が確認され、経口接種群と陰性対照群では、壊死巣の形成を認めた(Figure 21)。脾臓の病変は、皮下接種群と経口接種群では赤脾髄に好中球の浸潤が少数みられるだけであったが、陰性対照群は全ての個体で、菌塊を含む、フィブリンの析出を伴う微小な壊死巣がみられた。肝臓は、皮下接種群と経口接種群では病変がみられなかったが、陰性対照群の3匹中2匹に少数の菌を含む壊死巣がみられた(Figure 21)。生菌接種5日後では、皮下接種群のパイエル板にみられた菌塊の大きさは縮小していたが、経口接種群と陰性対照群は3日目と変わらず、大型の菌塊がみられた(Figure 22)。皮下接種群では、腸間膜リンパ節と脾臓に少数の菌を含む壊死巣がみられ、肝臓にも微小壊死巣が散見された。免疫染色では、肝臓の壊死巣内にも少数の菌が確認できた。

その他、結腸や盲腸の粘膜固有層に微小な壊死や好中球の浸潤がみられた。経口接種群と陰性対照群の腸間膜リンパ節、脾臓および肝臓でも比較的小型の菌塊を含む壊死巣がみられ、その程度は皮下接種群と同程度か、やや高度であった(Figure 22)。免疫染色では、腸間膜リンパ節、脾臓および肝臓で、皮下接種群よりも経口接種群と陰性対照群において、より多数の菌を確認した。また、陰性対照群では、肝細胞にび漫性の脂肪変性がみられた。生菌接種 7 日後、皮下接種群のパイエル板では、壊死性病変はみられず、免疫染色でも菌は確認されなかった。また、アポトーシスや好中球の浸潤の程度も軽減された(Figure 23)。腸間膜リンパ節には全ての個体で壊死巣がみられたが、肝臓と脾臓では 3 匹中 2 匹で、好中球や壊死巣が縮小し、菌もほとんどみられなかった。経口接種群では、パイエル板の菌塊を含む壊死巣は 3 匹中 1 匹にみられるのみであったが、肝臓と脾臓、腸間膜リンパ節には全ての個体で菌塊を含む壊死巣がみられた(Figure 23)。陰性対照群は、7 日目に 3 匹全てが死亡したため、死後に病理組織学的検索を実施した。陰性対照群では、小腸はパイエル板を中心に大型の菌塊を伴う高度な壊死がみられた。特にパイエル板は、壊死組織によってほぼ置換されていた。肝臓、腸間膜リンパ節にも菌塊を含む高度な壊死巣がみられ、腸間膜リンパ節と脾臓はリンパ濾胞が縮小してリンパ球数が減少し、それぞれリンパ洞、赤脾髄内に大量の菌塊がみられた(Figure 24)。その他、肺や腎臓の間質の毛細血管内に、菌塊が鑄型のように充満していた。また、全身諸臓器に高度なうっ血がみられた。

第4節 考察

病原性 *Yersinia* が共通して産生する菌体外膜タンパク質である YadA を強く発現する *Y. pseudotuberculosis* 4b を培養して、SDS-PAGE およびウェスタンブロット法により、YadA タンパク質の検出を行った。SDS-PAGE では、RPMI 1640 液体培地で 37°C 振盪培養を行うことで、YadA の分子量である約 150kDa 付近に強くバンドが強く検出され、以前の報告と一致した[77]。今回、25°C で振盪培養を実施した結果、25°C の温度条件でも、YadA が少量ではあるが発現していることが明らかになった。また、ウェスタンブロットティングにより、YadA 分画で免疫したウサギ抗血清と、アフィニティー精製したウサギ IgG を一次抗体として YadA タンパク質を検出した結果、YadA 特異的なバンドが検出された。さらに、*Y. pseudotuberculosis* 4b に実験感染させたラットの血清と糞便を用いてウェスタンブロットティングを行った結果、それぞれ YadA を認識する IgG 抗体および IgA 抗体を検出できた。YadA は、病原性 *Yersinia* を 37°C で培養した時に、その菌体表面に強く産生されるスパイク状の線毛タンパク質であり、頭部 (head domain)、頸部 (neck domain) および脚部 (stalk domain) の 3 つの領域から成る、いわゆる“棒付きキャンディー”状の構造をしており、150~240kDa の 3 量体ポリマーを形成している[36,76]。それぞれの単量体は、40~50kDa より成っているため、今回の実験でも、SDS-PAGE およびウェスタンブロットティングにより、150kDa 部分のみならず、40~50kDa 付近にも

複数のバンドが検出された。また、今回の実験により、*Y. pseudotuberculosis* 4b に実験感染させたラットの血清と糞便から、それぞれ YadA に対する IgG および IgA を検出することができたことから、*Y. pseudotuberculosis* 4b 感染症の際には、全身免疫のみならず、腸管における局所免疫も誘導されていることが明らかとなった。

今回の実験ならびに堀坂ら[77]の以前の実験から、病原性 *Yersinia* に YadA を強く発現させるには、RPMI 1640 液体培地を用いて、37°C で振盪培養した時に強く発現することが分かった。25°C 培養では発現が弱く、37°C でも静置培養では YadA はほとんど発現しない。YadA は、病原性 *Yersinia* が宿主細胞内に侵入、増殖する時に重要な役割を果たしているが、宿主である哺乳類の細胞の培養に適した培地である RPMI 1640 液体培地で、さらに宿主の体温に近い 37°C で振盪培養した時に最も強く発現されるという現象は、病原性 *Yersinia* の経口感染における YadA の役割のみならず、*Yersinia* の生体内での増殖機序や感染様式などを解明していく上で興味深い知見であり、今後、そのメカニズムの解明を図る必要があると考えられる。

さらに、本章では、病原性 *Yersinia* が共通して産生する病原因子であり、接着因子として知られている YadA に着目し、YadA が感染防御抗原として機能しているかについて、マウスを用いて検討した。免疫原として、YadA を菌体外膜表面に強く発現したホルマリン不活化死菌をマウスに皮下、あるいは経口接種して免疫を賦与した後、*Y. pseudotuberculosis* 4b の生菌を経口接種し、経過を観察して、YadA 死菌が感染防御に働くのかを観察した。

はじめに、実験 1 では、免疫原として、1. YadA 死菌、2. 37°C 死菌、3. 25°C 死菌、4. Yops ならびに 5. PBS (陰性対照群) を各 5 匹ずつのマウスに皮下接種ならびに経口接種した後、*Y. pseudotuberculosis* 4b の生菌を経口接種して、臨床徴候および死亡状況を観察した。その結果、6 日目に Yops を皮下接種したマウスのうち 1 匹 (20.0%) が死亡し、7 日目には、37°C 死菌を皮下接種したマウスの 1 匹 (20.0%) が死亡した。8 日目には、陰性対照群の 3 匹 (60.0%)、Yops 皮下接種群の 2 匹 (40.0%)、25°C 死菌経口接種群の 2 匹 (40.0%) が死亡した。9 日目は、陰性対照群の 2 匹が死亡し、陰性対照群は 100% が死亡した。同様に、10 日目までには Yops 皮下接種群と 25°C 死菌経口接種群の全てのマウスが死亡した。さらに、11 日目までには 37°C 死菌経口接種群と 25°C 皮下接種群のマウスが全て死亡した。また、14 日目までには Yops 経口接種群のマウスが全て死亡した。YadA 死菌を接種したマウスでは、経口接種したマウスが 9 日と 12 日目にそれぞれ 1 匹死亡したが、皮下接種したマウスは全匹が耐過した。最終的に、耐過生残したマウスは YadA 皮下接種群 5 匹中 5 匹 (100%)、YadA 経口接種群 5 匹中 3 匹 (60.0%)、37°C 皮下接種群 5 匹中 2 匹 (40.0%) となった (Figure 2)。15 日目の時点で、YadA 皮下接種群のマウスは食欲が回復し、動きも活発であったが、YadA 経口接種群および 37°C 死菌皮下接種群の生残マウスは、毛並みが悪く、動きも鈍い状態であった。しかし、耐過生残したマウスでも、生菌接種 21 日目では全ての個体が糞便中に排菌しており、35 日目でも排菌をしている個体がみられたことから、糞便への排菌は長期間みられることが明らかとな

った(データなし)。以上の実験結果から、YadA 死菌の皮下接種により、*Y. pseudotuberculosis* 4b 感染による致死を 100%阻止できることが明らかとなった。また、YadA 死菌の経口接種では、5 匹中 2 匹 (40.0%) が死亡したことから、経口接種では効果が不十分であることが分かった。また、病原性プラスミドが発現する 37°C で培養した死菌では、皮下接種では 5 匹中 3 匹 (60.0%) が死亡し、経口接種では 100% が死亡したことから、YadA を強く発現させたほうが、*Y. pseudotuberculosis* 4b 感染による致死に対して有効であることが確認できた。さらに、25°C で培養した死菌と精製した Yops では、皮下接種でも経口接種でも、いずれも 100% のマウスが死亡したため、これらの免疫原では *Y. pseudotuberculosis* 4b 感染による致死を阻止できないと思われた。

次に、実験 2 において、マウスを YadA 単回皮下接種群、2 回皮下接種群、2 回経口接種群および陰性対照 (非免疫) 群に分け、YadA 死菌 (陰性対照群は PBS) を 1 週間間隔で 2 回ないし 1 回接種した 1 週間後に、生菌を経口接種し、臨床症状、糞便への排菌、体重の推移および死亡率を比較した。その結果、生菌接種後、陰性対照群では 7 日～15 日の間に 10 匹中 8 匹 (80%) のマウスが死亡したのに対して、免疫原接種群では、8 日目に YadA 単回皮下接種群の 10 匹中 1 匹 (10%) が死亡したのみで、2 回皮下接種および経口接種したマウスは全匹死亡しなかった (Figure 5)。しかし、臨床徴候の発現は、いずれの群のマウスにも同様に観察され、食欲低下、軟便または下痢、動きの減退、毛並みの悪化などがみられた。体重の減少は全て

の群で同様の推移を示したが、その程度は陰性対照群が最も有意に減少しており、単回皮下接種群、2回経口接種群は中程度、2回皮下接種群が最も軽度であった(Figure 6)。一方、糞便への排菌は、3日～14日の間は、いずれの群のマウスも大量の排菌(7.1～7.5 log CFU/g)がみられた(Figure 7)。その後、徐々に糞便への排菌量が減少していったが、2回皮下接種群が最も早くて28日、単回皮下接種群と2回経口接種群では35日、陰性対照群は42日目に排菌が終了した。以上の結果から、YadA死菌の皮下あるいは経口接種においても、*Y. pseudotuberculosis*の感染を完全には免れることはできないと考えられた。しかし、陰性対照群と比較すると、体重の減少の程度は軽度で、早期に糞便への排菌が終了したことから、YadA死菌を接種することによって、腸管から菌がより早期に排除され、全身に移行する菌が減少することにより、重篤な*Yersinia*感染による死亡を免れたと考えられた。Kaneko[93]およびUchida[199,200]らは、*Y. enterocolitica*のホルマリン死菌をマウスに経口接種した後に、生菌を経口接種することで、糞便への排菌を減少させ、腸管定着を抑制したと報告している。それらは、今回の実験結果と一致しており、以前の報告では、腸管定着の阻止に未知の抗原が関与しているとされていたが[93]、今回の実験結果によって、YadAを強く発現した死菌を免疫原として接種すると、糞便への排菌がより早期に終了したことから、腸管への定着阻止に、YadAが機能している可能性が考えられた。*Y. pseudotuberculosis*は経口感染することから、YadA死菌の皮下接種によって全身免疫を誘導するよりも、経口接種によって腸管局所の粘

膜免疫と全身免疫の双方を誘導させたほうが、感染に対して有効に作用すると考えられたが、今回の実験の結果では、経口接種群よりも皮下接種群のほうが、体重の減少は緩やかで、糞便への排菌量も少なく、より早期に排菌が終了した。そのため、今回の実験結果からは、皮下接種のほうが有効であると思われた。一般的に、死菌やサブユニットワクチンなどのような不活化ワクチンの経口接種では、胃や腸の胃酸や消化酵素による消化作用を受けて抗原が変性し、免疫性が低下あるいは消失するという欠点があることが知られている[122]。そのため、今回の実験では、皮下接種よりも経口接種の抗原濃度を高くした(それぞれ、100mg/ml、500mg/ml)が、それでも腸管局所に到達できる有効な抗原としては不十分であったと考えられた。今後は、抗原濃度をより詳細に検討して、皮下および経口接種を行うとともに、腸管ループ法などを用いて、YadA死菌が胃酸や消化酵素による作用を受けないように、パイエル板に直接的に免疫を賦与して、詳細に観察する必要があると思われる。

陰性対照群の半数(10匹中5匹)以上のマウスが死亡した時点で、免疫原接種群のマウスの半数を解剖し、病変の比較を行った結果、脾臓、パイエル板、腸間膜リンパ節の腫大は全ての群でみられた。結節性病変は、死亡した陰性対照群の肝臓と脾臓では全ての個体で観察されたが、YadA死菌経口接種群では、5匹中4匹(80%)の脾臓と2匹(40%)の肝臓に、単回皮下接種群では、4匹中1匹(25%)の肝臓と脾臓にみられた。一方、2回皮下接種群では、結節性病変はいずれの臓器にもみられなかった。病理組織学的に、これらの結節

性病変は、大型の菌塊を多数含む壊死巣であり、陰性対照群の死亡したマウスは、いずれの個体もパイエル板は、菌塊を含む壊死組織によってほぼ置換されており、その他の小腸、盲腸および結腸の粘膜固有層にも好中球の浸潤や壊死がみられた。脾臓、腸間膜リンパ節では、リンパ濾胞は高度に縮小してリンパ球数は減少し、肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節では、菌塊を含む高度な壊死巣が多数みられた。一方、YadA 単回皮下接種群、2 回皮下接種群および経口接種群では、肉眼で観察された結節性病変以外には、病理組織学的に、病変に違いはみられず、これらの免疫原接種群では、諸臓器に好中球の浸潤を伴う大小の壊死巣がみられたが、菌塊はほとんどみられず、免疫染色で数個の菌が病変内に確認できるのみであった。死亡した陰性対照群のマウスでは、全身諸臓器における菌塊を伴う壊死性病変が顕著で、肺や腎臓の毛細血管内にも菌塊が鑄型のように充満していたことから、諸臓器で増殖した菌が血中に移行し、敗血症を起こして死亡したと考えられた。以上の結果から、YadA 死菌の接種によって、全身感染は阻止できないが、諸臓器における菌の増殖を抑制し、それによって重篤な感染による死亡を免れることができると考えられた。また、YadA 死菌は、経口よりも皮下接種のほうが有効で、さらに 1 回よりも 2 回接種したほうがより効果があることが明らかとなった。

次に、全ての個体について、糞便への排菌の終了を確認した 42 日後から 1 週間後に、全ての耐過生残マウスの安楽殺を行い、肉眼観察および病理組織学的に検索した結果、YadA 死菌単回皮下接種群の 1 匹を除いて、陰性対照群の 2 匹を含む全ての個体で、肉眼お

よび病理組織学的に、いずれの臓器にも病変はみられなかった。しかし、単回皮下接種群の1匹では、肝臓に約4mm大の白色結節がみられ、病理組織学的には、中心部に壊死組織と菌塊、その周囲に好中球とマクロファージ、ときに多核巨細胞が少数散在し、さらにその周囲を、紡錘形の核を有する線維芽細胞および膠原線維が被包化し、膿瘍を形成していた。以上の結果から、YadA死菌の接種により、*Y. pseudotuberculosis* 感染による致死は阻止できるが、ときに肝臓などの臓器に膿瘍を形成することにより、長期間菌を保菌する可能性があることが示唆された。

次に、実験1において、免疫原として1. YadA死菌、2. 37°C死菌、3. 25°C死菌、4. Yopsならびに5. PBS(陰性対照群)を1週間間隔で2回皮下接種ならびに経口接種し、ELISAによりYadA死菌ならびにYopsに対する血清抗体を測定した。その結果、YadA死菌に対する血清IgG値は、YadA死菌を皮下接種したマウスで最も高く、37°C死菌を皮下接種したマウスでは中程度の上昇が観察された。また、YadA死菌経口接種群、37°C死菌経口接種群、25°C死菌皮下接種群では軽度の上昇がみられた。一方、Yops皮下接種群、Yops経口接種群ならびにPBSを投与した陰性対照群では、YadA死菌に対する血清IgGは検出されなかった(Figure 3)。YadA死菌を皮下接種したマウスでは100%耐過生残し、YadA死菌経口接種、37°C死菌皮下接種群ではそれぞれ60.0%、40.0%が耐過した。その一方で、その他の免疫原を接種したマウスは100%死亡したが、これらの群ではいずれも、YadA死菌に対する血清IgGの反応が乏しかったことから、*Y.*

pseudotuberculosis 4b 感染による死亡を阻止するためには、十分な量の YadA に対する血清 IgG が産生されている必要があると考えられた。Yops に対する血清 IgG は、Yops を皮下接種したマウスで高い上昇が観察されたが、その他のマウスでは、いずれの群も Yops に対する血清 IgG はほとんど上昇しなかった (Figure 4)。以上のことから、Yops に対する血清 IgG は、*Y. pseudotuberculosis* 4b 感染の死亡を阻止するのに重要でない可能性が示唆された。

次に、YadA 死菌を 2 回皮下および経口接種することでそれぞれ免疫を賦与した後に、*Y. pseudotuberculosis* 生菌を経口接種してから、8 時間、24 時間、3 日、5 日、7 日ごとにマウスを安楽殺し、経時的に各臓器における菌量、血清および糞便中抗体の推移、病理学的変化を観察した。その結果、YadA 死菌に対する血清 IgG の推移は、YadA 死菌を接種した 7 日目から増加を確認してその後、漸増したが、その程度は経口接種群よりも、皮下接種群で顕著であった。陰性対照群では、生菌接種 24 時間後から徐々に上昇したが、わずかに上昇したのみであった (Figure 13)。Yops に対する血清 IgG は、YadA 死菌を接種した後は上昇しなかったが、生菌接種 7 日目に上昇した (Figure 14)。YadA 死菌に対する糞便中 IgA は、YadA 死菌を接種したマウスでは、いずれも 7 日後から上昇し、その程度は皮下接種群よりも経口接種群で高かった。また、生菌接種後は、陰性対照群を含む全ての群で、糞便中の IgA の上昇を確認した (Figure 15)。以上の結果から、YadA 死菌の皮下あるいは経口接種により、YadA 死菌に対する血清 IgG と糞便 IgA が産生されていることが確認された。また、

YadA 死菌の接種によっては、Yops に対する血清抗体は産生されないことが明らかとなった。

各臓器における経時的な菌数の変化は、はじめにパイエル板から菌が検出され、次に腸間膜リンパ節で増殖後、肝臓と脾臓で菌が検出され、その傾向はいずれの群においても同様であったが、各臓器における菌量はいずれも陰性対照群で最も多く、経口接種群は中程度、皮下接種群は最も少なかった。また、観察期間において、陰性対照群は各臓器の菌量が減少することはなかったが、YadA 死菌を接種した群では、パイエル板、腸間膜リンパ節、脾臓、肝臓ともに 3 日あるいは 5 日に菌量のピークに達した後、7 日目には減少していたが、減少の程度は経口接種群よりも皮下接種群で顕著であった (Figure 8-12)。これらの結果は、経時的な病理学的変化とも一致していた。病理組織学的にも同様に、いずれの群においても全体を通して、*Y. pseudotuberculosis* 感染による病変の形成、諸臓器における菌の増殖を認めたが、その程度は YadA 死菌皮下接種群、経口接種群、陰性対照群の順に軽度であった。病理組織学的には、生菌接種 8 時間後から、パイエル板を構成する濾胞被蓋上皮への菌の侵入を確認し、粘膜上皮細胞や上皮直下の固有層の細胞に、アポトーシス像がみられた。その後、腸間膜リンパ節、脾臓、肝臓の順番に菌の増殖、病変の形成がみられたが、壊死巣や菌塊の大きさはいずれも YadA 死菌を接種したマウスでは陰性対照群よりも小型であった。さらに、陰性対照群の死亡したマウスでは、これらの病変に加え、肺や腎臓などの毛細血管内にも菌が鑄型のように増殖しており、全身の血管内に好

中球が多数観察されたことから、敗血症により死亡したと考えられた。

これらの結果から、上記の実験2の結果と合わせると、YadA死菌の接種により、パイエル板、腸間膜リンパ節、脾臓、肝臓における菌の増殖を阻止することはできないが、その増殖を抑制することで、菌をより早期に排除することができ、死亡を免れたと考えられた。YadA死菌の皮下接種により、糞便への排菌がみられたことから、腸管感染を阻止することはできないが、死亡は100%免れることが明らかとなったので、今後、ワクチンとして有効に活用できる可能性が示された。YadAがどの程度感染防御に関わっているかについては、今後さらに、YadAを精製してより詳細に検討する必要があると思われる。YadAの精製については、Heesemann[72]および岩田[84]らが、菌体を超音波により破砕後、超遠心により、YadAを含む膜分画の回収を行っているが、ワクチンの抗原として有効な量を精製するには、菌を大量に培養する必要があるため、より効率の良い精製方法を検討する必要があると考えられる。YadAタンパク質を精製する方法として、今後、大腸菌を用いたタンパク質発現系や、コムギ胚芽を用いた無細胞タンパク質合成系などを用いて、効率良くYadAを精製する方法を検討し、YadAの詳細な役割を解明するとともに、YopsやYPMなど、その他の重要な病原因子との関連も明らかにしていく必要がある。

病原性 *Yersinia* は様々な病原因子を保有しているが、ワクチンとして有効な感染防御抗原として、Yopsの分泌に関わるⅢ型分泌装置の一部を構成するLcrVが重要な役割を果たしていることを指摘する報告が、主として *Y. pestis* に関連してみられる[4,107,147]。しかし、大

腸菌を用いてリコンビナント合成した LcrV を実験的にマウスに投与すると、マクロファージ表面の Toll-like receptor (TLR)-2 を介して Interleukin (IL-10) の産生を誘導するとともに、TNF- α の産生を抑制することにより、宿主の免疫機能が抑制されることが報告されており、LcrV をワクチンとして使用する場合には、副作用が懸念される [20,162,163]。一方、YadA には、LcrV の免疫抑制作用のような副作用の報告はみられず、今回の実験で、マウスに YadA 死菌を皮下あるいは経口接種しても、臨床徴候に異常はみられなかった。また、YadA と同様、宿主細胞への接着に関与する病原因子である Invasin の発現は、肝臓と脾臓における菌の増殖を抑制するが、その程度は低く、病変形成はほとんど抑制しないことが報告されている [79]。さらに、馬場らのリスザルを用いた実験では、Yops を免疫原としてリスザルに皮下接種してもエルシニア症の発症を抑えることができなかった [6]。YadA は、感染の初期段階において重要な役割を果たす病原因子であり、YadA が発現されることによっではじめて Yops やその他の病原因子が、宿主細胞へ注入されることが可能になり、さらに、YadA は好中球の貪食作用や補体の殺菌作用に対する抵抗性や自己凝集性など多くの機能を有していることから、YadA に対する抗体が産生されることにより、病原性 *Yersinia* の初期の侵入や増殖のみならず、パイエル板、腸間膜リンパ節、脾臓および肝臓などの感染組織における炎症反応の抑制および菌の増殖に対する効果も期待され、YadA は病原性 *Yersinia* の感染防御抗原として重要であると考えられる [36]。

近年の研究では、細菌感染症を予防する効果的なワクチン抗原の

候補の一つとして、感染の初期段階すなわち、宿主細胞への付着と増殖の段階における防御が重要であると考えられており、病原性 *Yersinia* の YadA のような細菌の接着因子を標的としたワクチン開発が研究されている[212]。しかし、現在明らかになっている YadA の生物学的な役割に関する知見の多くは、*Y. enterocolitica* によるものがほとんどであり、*Y. pseudotuberculosis* の YadA については、*Y. enterocolitica* と同様の多機能を有する病原因子であることは知られているが、詳細は不明な点も多く[36]、一方、*Y. pestis* の YadA は、その遺伝子が存在するものの、フレームシフト変異によって、機能していない偽遺伝子であることが分かっている[149,167]。YadA と Invasin を欠損した変異株を用いた以前の研究では、*Y. enterocolitica* の double mutant 株は非病原性であったが、*Y. pseudotuberculosis* の double mutant 株は野生型よりも病原性が強かったという報告がある[149]。一方、Han らは、*Y. pseudotuberculosis* の double mutant 株の病原性は、野生型と同等であったと報告しており、YadA や Invasin とは異なる病原因子が関与していると考えられている[64]。岩田らの実験では、*Y. pseudotuberculosis* 1b と 4b ならびに *Y. enterocolitica* O8 の 3 菌株から作製した YadA 膜分画を、それぞれワクチンとしてマウスに皮下投与し、他の菌株との間で交差免疫が成立するかを検討した結果、供試した菌株間では強い交差免疫が認められたとしている[84]。さらに、堀坂らの研究でも、*Y. enterocolitica* O8 の YadA 分画から作製したウサギ抗血清を用いたウェスタンブロッティングの結果、他の血清型や菌種に対しても、交差反応性が観察されている[77]。一方、病原性 *Y.*

enterocolitica の複数の血清型について、YadA に対するモノクローナル抗体やポリクローナル抗体を作製して交差反応性を検討した結果、各血清型の YadA は、血清群特異的であったとする報告もみられる [166,171]。YadA の疎水性領域である head domain の構造は、菌種や血清型間でほぼ同一であるが、親水性領域である stalk domain は菌種や血清型により多様な構造を示すことが知られている [36,166]。YadA の head domain は、菌種や血清型でほぼ同一の構造であり、岩田や堀坂らの研究により、YadA の共通抗原としての可能性が示唆された [36,77,84]。また、病原性 *Yersinia* の感染の際に、YadA に対する血清抗体が産生されていることも報告されている [56, 67,165]。以上のことから、YadA は病原性 *Yersinia* の感染防御抗原となっている可能性が示唆され、エルシニア症の予防に有効なワクチンを開発するためには、YadA に着目して、今後さらに検討していく必要があると考えられた。

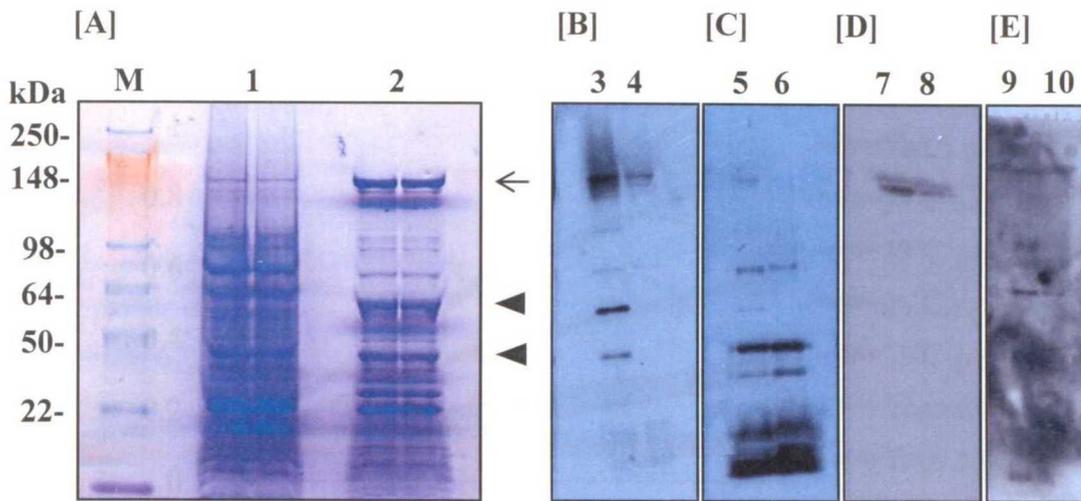


Fig. 1. [A] SDS-PAGE (gradient 4-20% polyacrylamide gel) and Western-blot of [B] rat serum infected by *Y. pseudotuberculosis* 4b, [C] rabbit antiserum immunized by YadA fraction, [D] affinity-purified antibody of [C] and [E] extracted rat feces infected by *Y. pseudotuberculosis* 4b. Lanes 1, 4, 6, 8, and 10, YadA-expressed whole cell lysate of *Y. pseudotuberculosis* 4b grown at 25° C; Lanes 2, 3, 5, 7, and 9, YadA-expressed whole cell lysate of *Y. pseudotuberculosis* 4b grown at 37° C, respectively. Molecular weight markers (kDa) are shown in lane M.

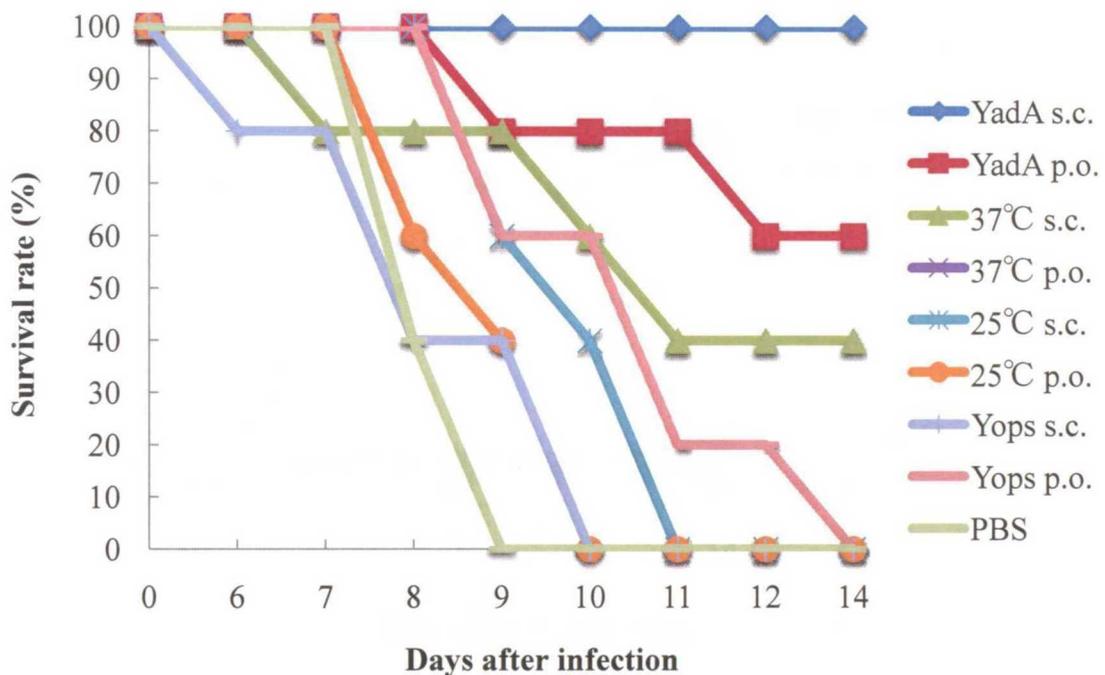


Fig. 2. Changes in the survival rate of vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b. YadA, YadA-expressed formalin fixed cells; 37° C, formalin fixed cells at cultivation temperatures of 37° C; 25° C, formalin fixed cells at cultivation temperatures of 25° C; s.c., subcutaneous administration; p.o., oral administration.

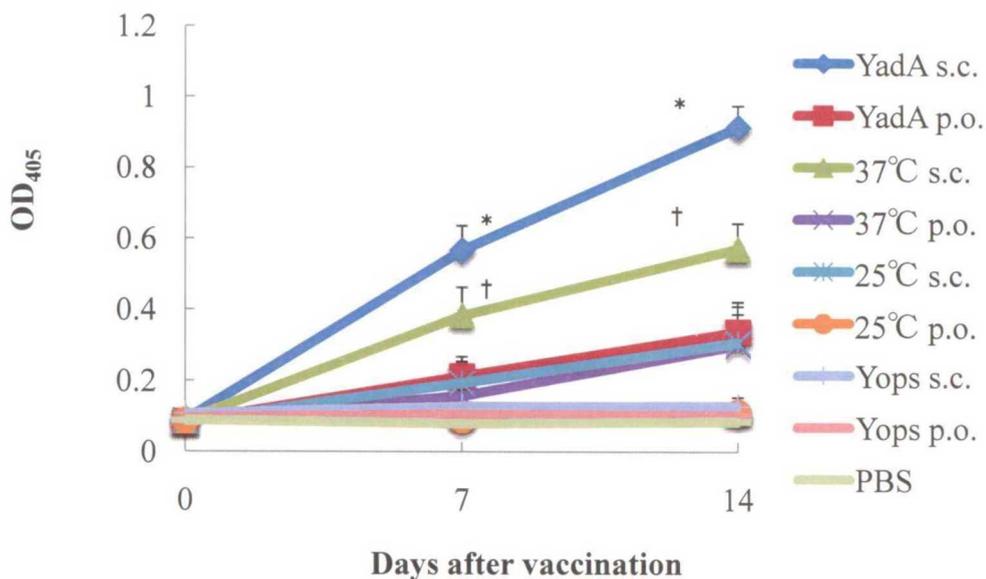


Fig. 3. Changes in serum IgG antibody responses to YadA-expressed formalin fixed cells in vaccinated and negative control mice. *P<0.05 compared to other mice, †P<0.05 compared to other mice except YadA s.c. YadA, YadA-expressed formalin fixed cells; 37° C, formalin fixed cells at cultivation temperatures of 37° C; 25° C, formalin fixed cells at cultivation temperatures of 25° C; s.c., subcutaneous administration; p.o., oral administration.

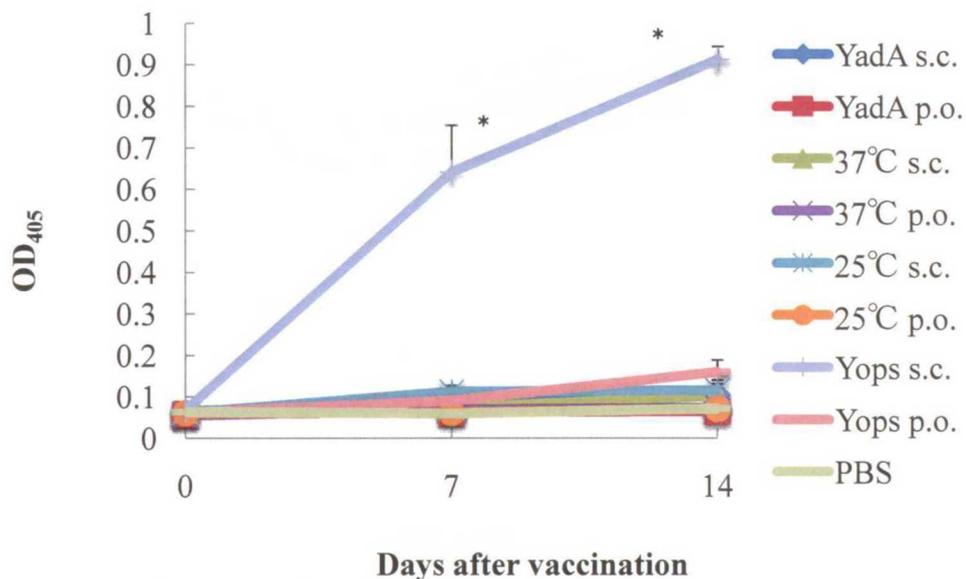


Fig. 4. Changes in serum IgG antibody responses to Yops in vaccinated and negative control mice. *P<0.05 compared to other mice. YadA-expressed formalin fixed cells; 37° C, formalin fixed cells at cultivation temperatures of 37° C; 25° C, formalin fixed cells at cultivation temperatures of 25° C; s.c., subcutaneous administration; p.o., oral administration.

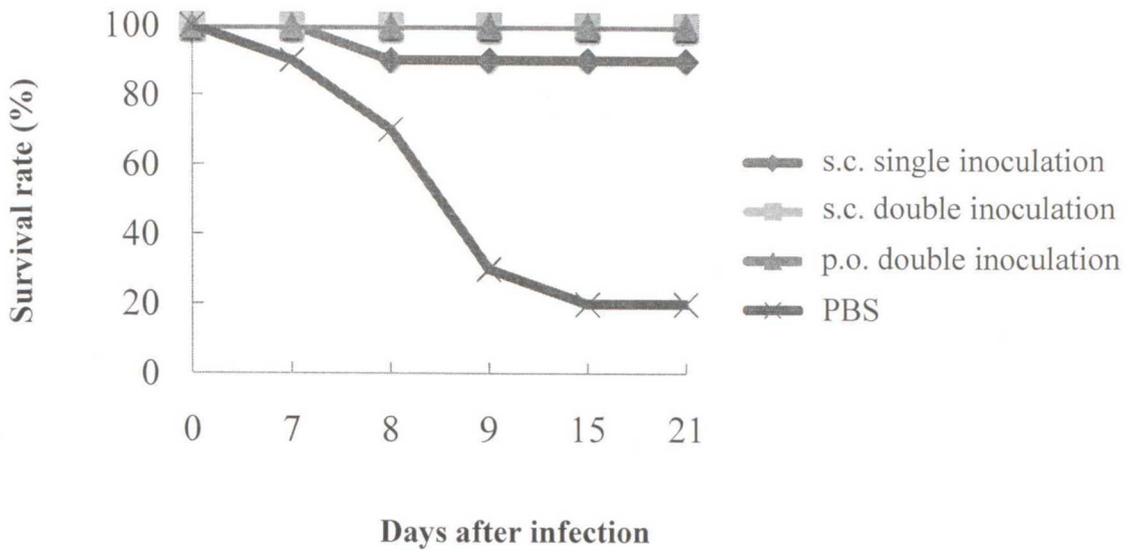


Fig. 5. Changes in the survival rate of YadA-vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b. s.c., subcutaneous administration; p.o., oral administration.

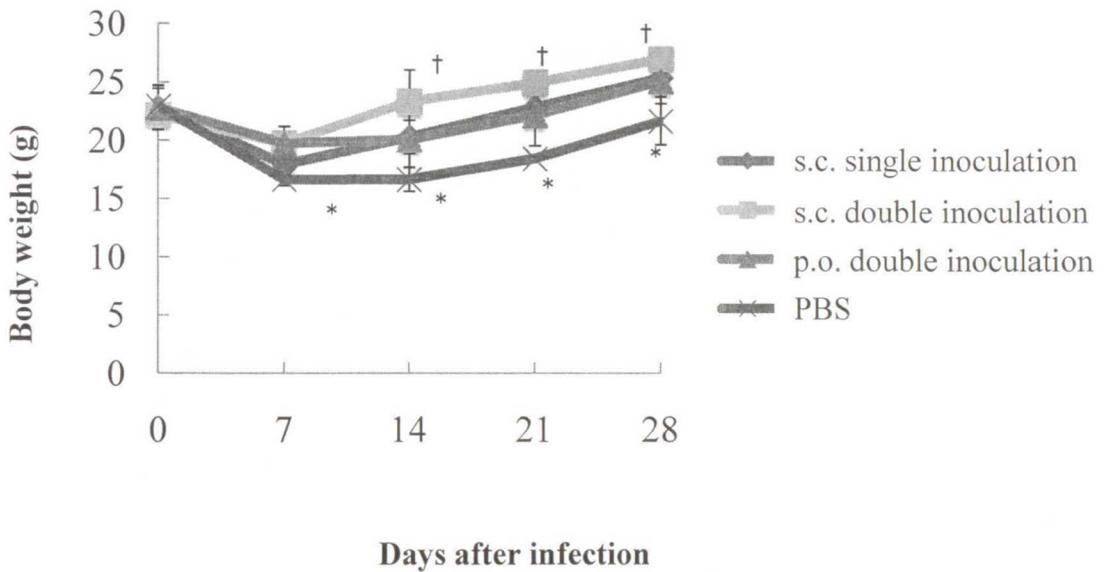


Fig. 6. Changes in the body weight of YadA-vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b. *P<0.05 compared to other mice, †P<0.05 compared to other mice. s.c., subcutaneous administration; p.o., oral administration.

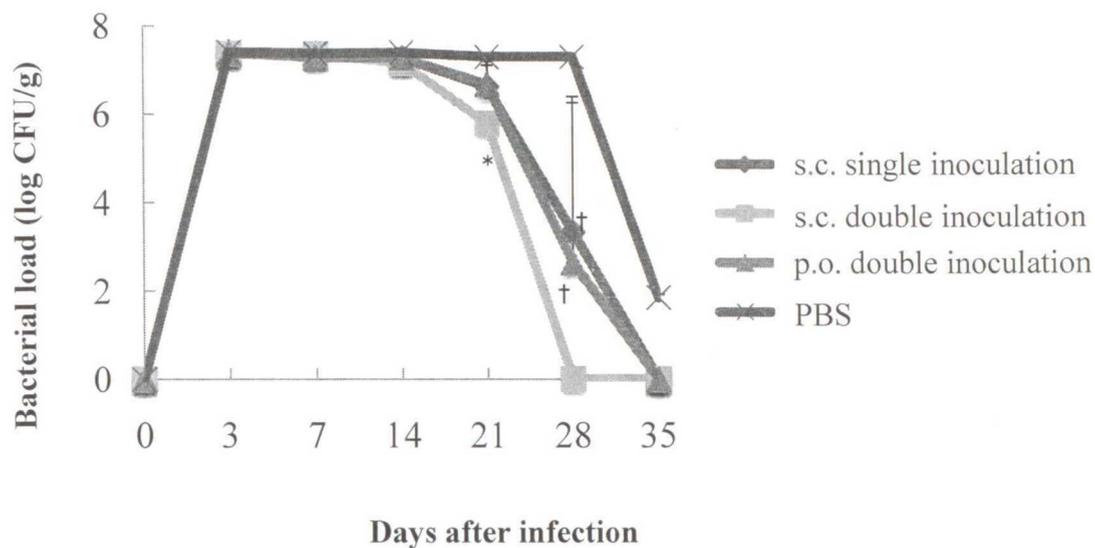


Fig. 7. Bacterial load in the feces of Yada-vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b. *P<0.05 compared to negative control in s.c. double inoculation, †P<0.05 compared to negative control in s.c. single and p.o. double inoculation. s.c., subcutaneous administration; p.o., oral administration.

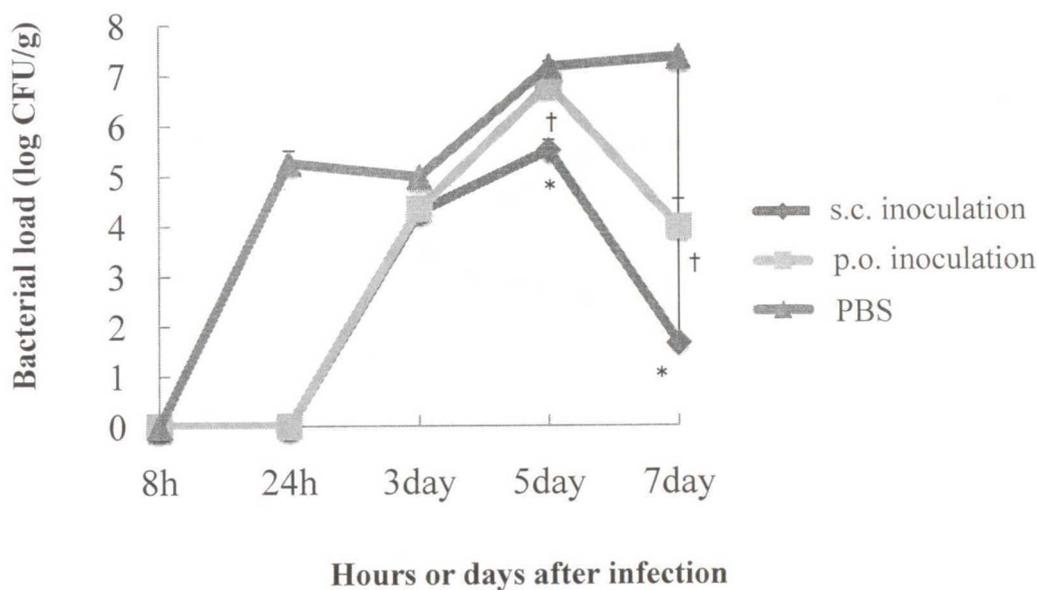


Fig. 8. Bacterial load in the spleen of Yada-vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b. *P<0.05 compared to p.o. inoculation and negative control in s.c. inoculation, †P<0.05 compared to negative control in p.o. inoculation. s.c., subcutaneous administration; p.o., oral administration.

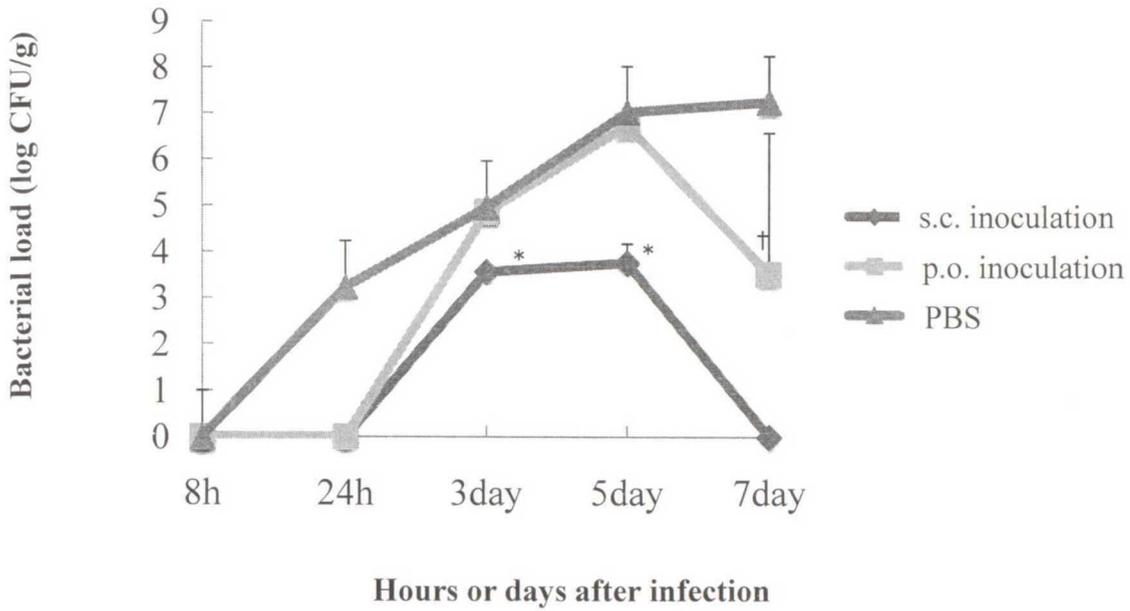


Fig. 9. Bacterial load in the liver of YadA-vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b. * $P < 0.05$ compared to p.o. inoculation and negative control in s.c. inoculation, † $P < 0.05$ compared to negative control in p.o. inoculation. s.c., subcutaneous administration; p.o., oral administration.

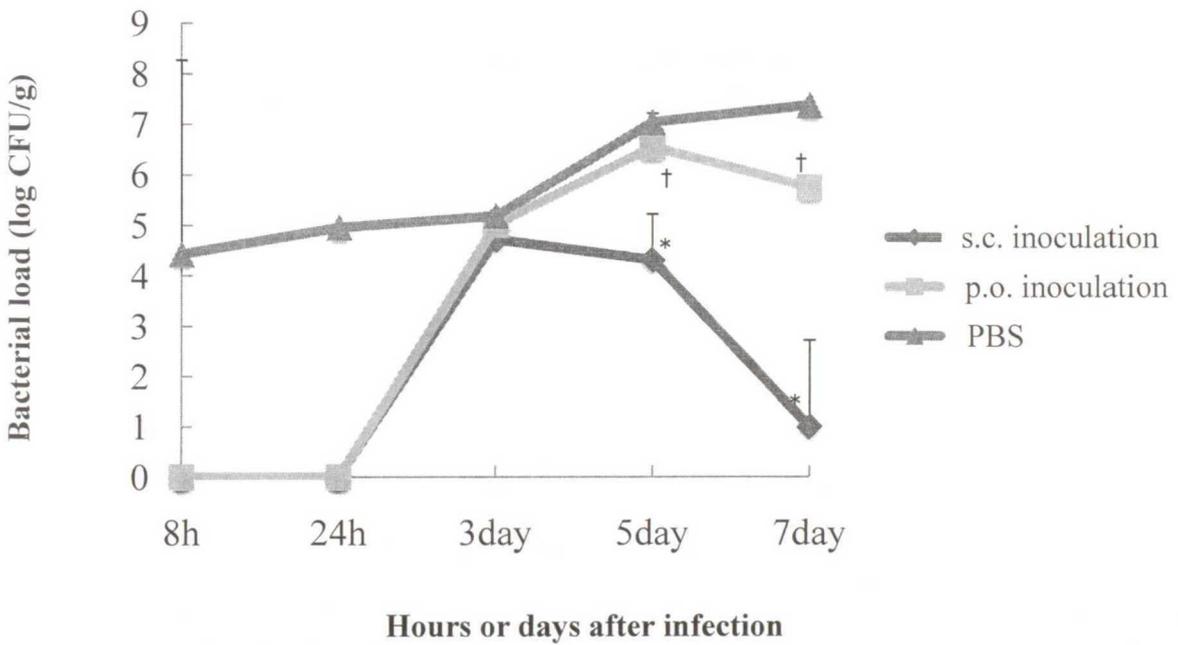


Fig. 10 Bacterial load in the mesenteric lymph nodes of YadA-vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b. * $P < 0.05$ compared to p.o. inoculation and negative control, † $P < 0.05$ compared to negative control. s.c., subcutaneous administration; p.o., oral administration.

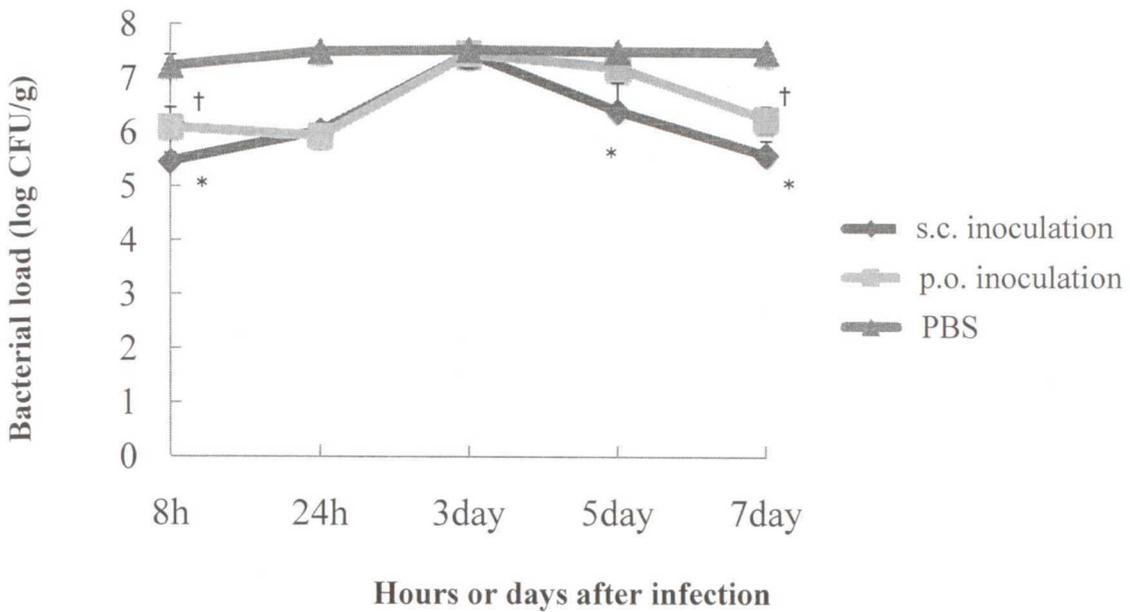


Fig. 11. Bacterial load in the Peyer's patch of YadA-vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b. *P<0.05 compared to p.o. inoculation and negative control in s.c. inoculation, †P<0.05 compared to negative control in p.o. inoculation. s.c., subcutaneous administration; p.o., oral administration.

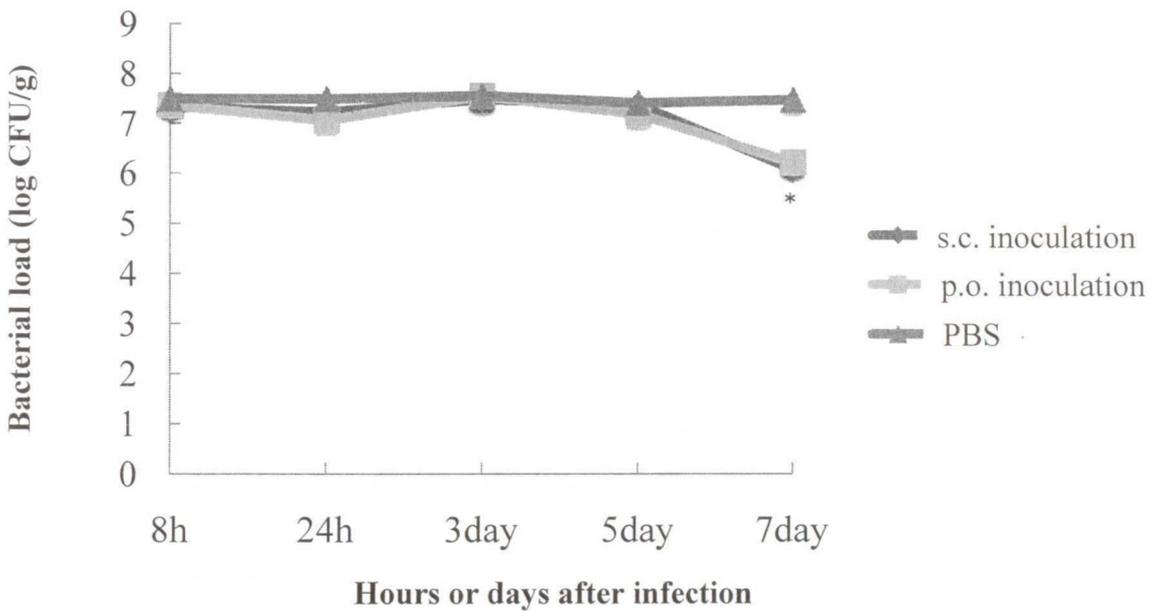


Fig. 12 Bacterial load in the feces of YadA-vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b. *P<0.05 compared to negative control in s.c. and p.o. inoculation. s.c., subcutaneous administration; p.o., oral administration.

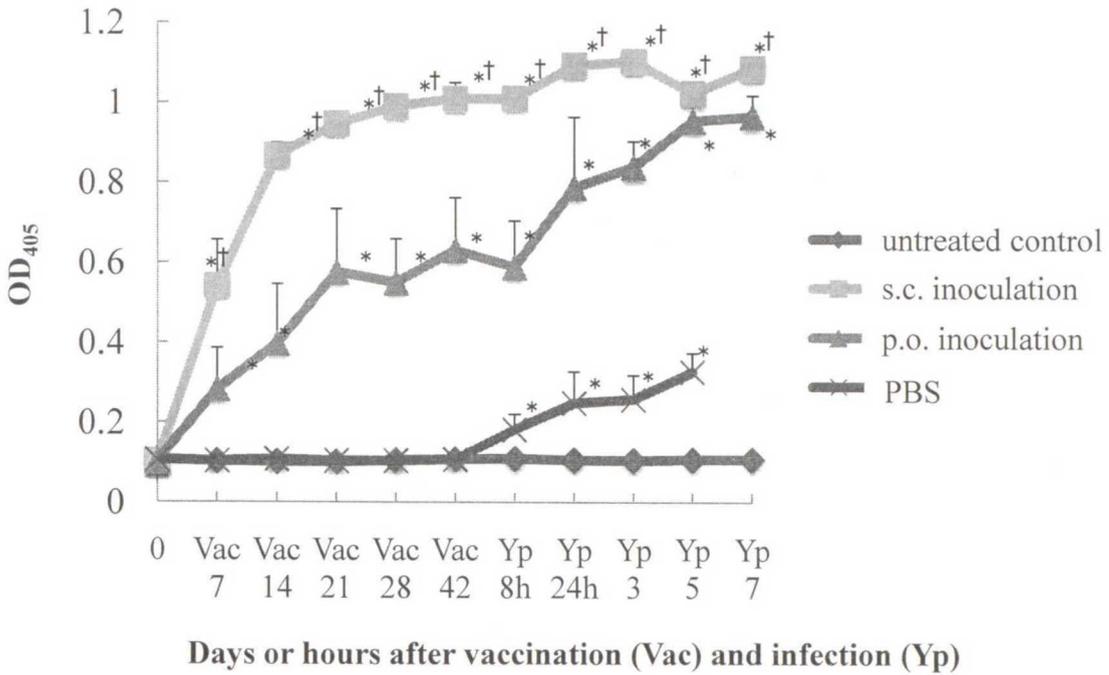


Fig. 13. Changes in serum IgG antibody responses to YadA-expressed formalin fixed cells (YadA-fixed cell) in mice vaccinated with YadA-fixed cell or negative control and infected by *Y. pseudotuberculosis* 4b. * P<0.05 compared to untreated control in s.c. or p.o. inoculation and negative control, †P<0.05 compared to YadA p.o. inoculation in s.c. inoculation. s.c., subcutaneous administration; p.o., oral administration.

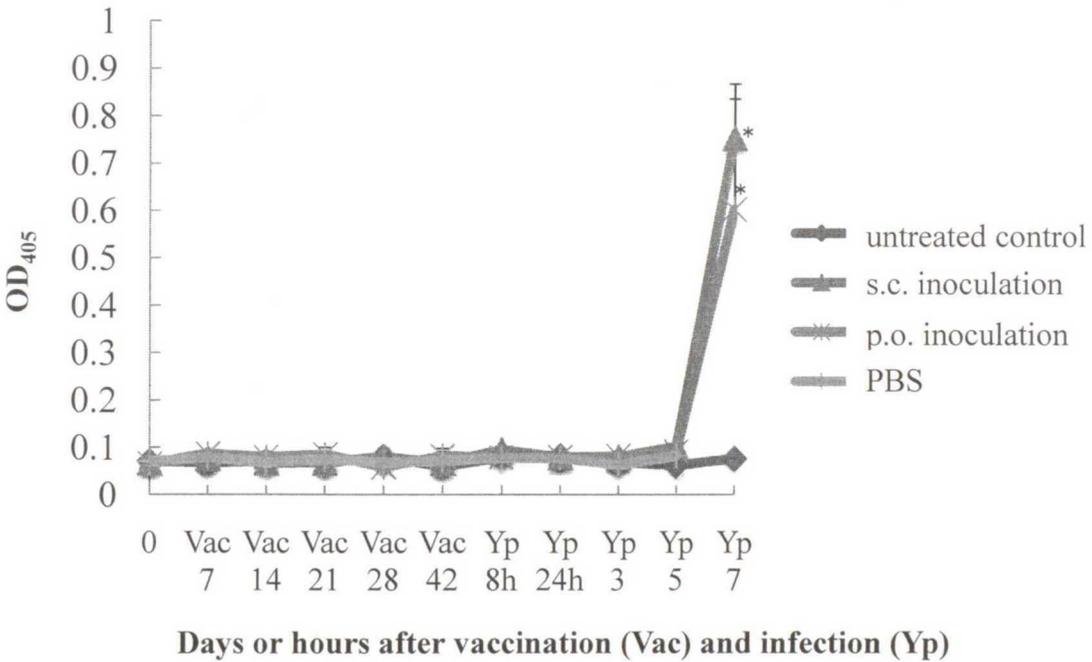


Fig. 14. Changes in serum IgG antibody responses to Yops in mice vaccinated with YadA-expressed formalin fixed cells or negative control and infected by *Y. pseudotuberculosis* 4b. * P<0.05 compared to untreated mice in s.c. or p.o. inoculation. s.c., subcutaneous administration; p.o., oral administration.

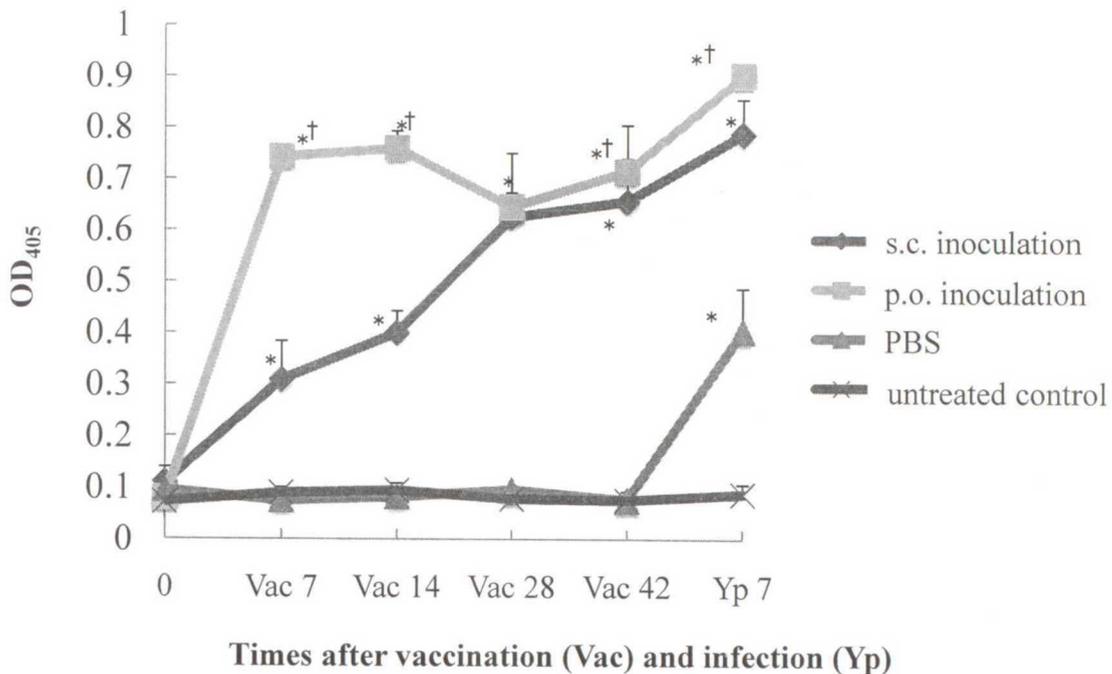


Fig. 15. Changes in fecal IgA antibody responses to YadA-expressed formalin fixed cells (YadA-fixed cell) in mice vaccinated with YadA-fixed cell or negative control and infected by *Y. pseudotuberculosis* 4b. *P<0.05 compared to untreated control in s.c. or p.o. inoculation and negative control, †P<0.05 compared to YadA s.c. inoculation in p.o. inoculation. s.c., subcutaneous administration; p.o., oral administration.

[A]



[B]



[C]

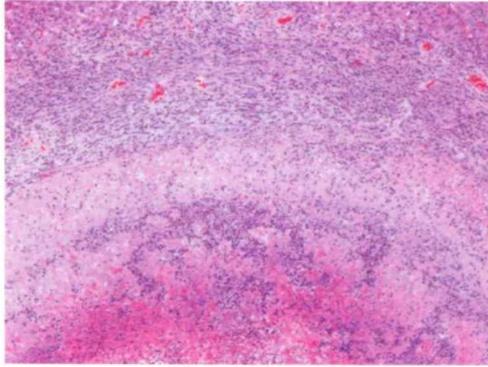


Fig. 16. Gross lesions of YadA-vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b. [A] negative control (died at day 8), Insert: Spleen, [B] YadA p.o. inoculation, [C] YadA s.c. double inoculation.

[A]



[B]



[C]

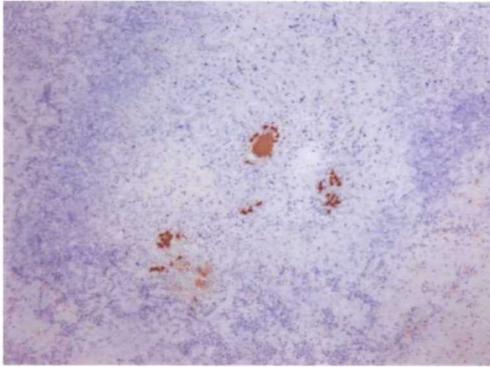


Fig. 17. Liver abscess formation in a YadA single s.c. inoculation mouse. [A] Lower magnification, HE, × 40. [B] Higher magnification of [A], HE, × 100. [C] Immunohistochemistry to central bacterial colonies using anti-*Y. pseudotuberculosis* sera, × 100.

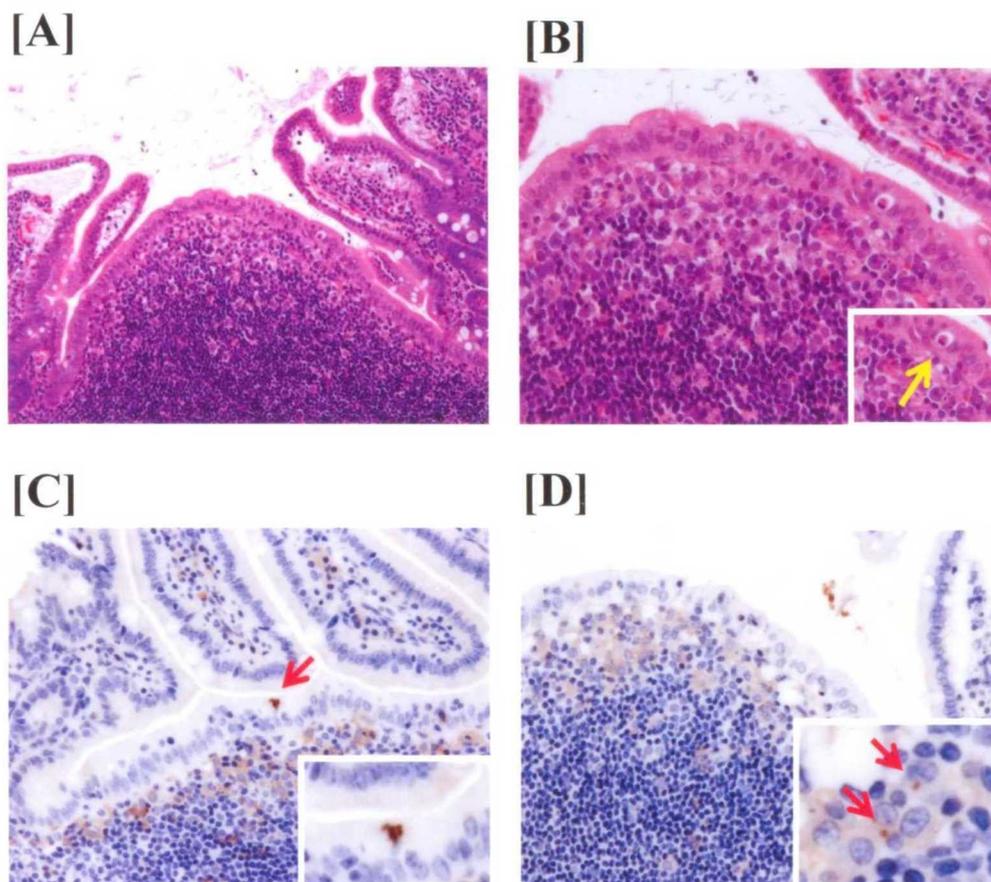
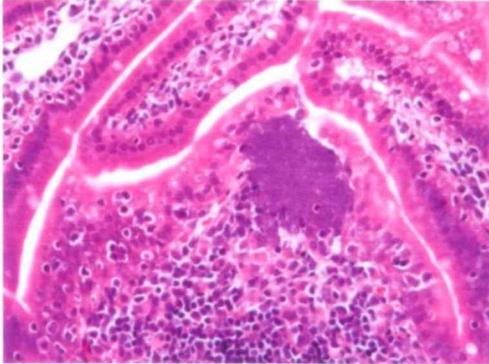
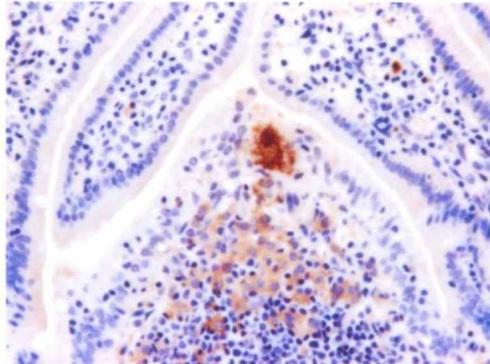


Fig. 18. Histopathological lesions of the Peyer's patches in YadA-vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b after 8 hours. [A] Peyer's patches of negative control, HE, $\times 200$. [B] Higher magnification of [A], HE, $\times 400$, Insert: Higher magnification of the apoptotic body. [C] Immunohistochemistry to the bacilli within a follicle-associated epithelium (arrow) using anti-*Y. pseudotuberculosis* sera of a YadA s.c. mouse, $\times 400$, Insert: Higher magnification of a few bacilli. [D] Immunohistochemistry to bacilli in the subepithelium of follicle-associated epithelium using anti-*Y. pseudotuberculosis* sera of a YadA s.c. mouse, $\times 400$, Insert: Higher magnification of bacilli (arrows).

[A]



[B]



[C]

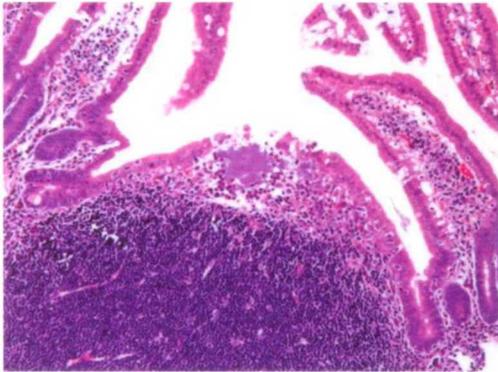
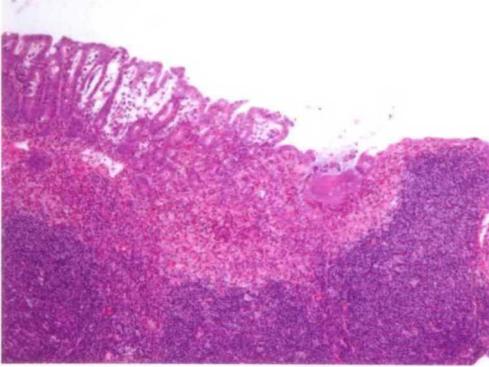
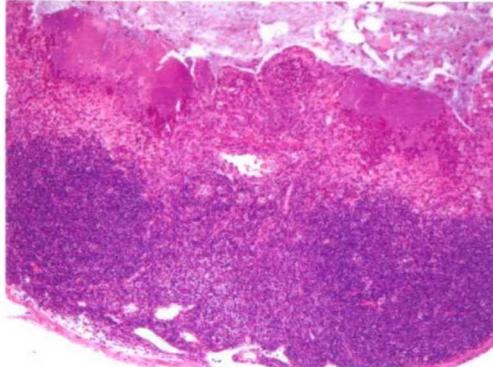


Fig. 19. Histopathological lesions of the Peyer's patches in YadA-vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b after 24 hours. [A] Peyer's patches of a YadA s.c. mouse, HE, $\times 400$. [B] Immunohistochemistry to bacterial colonies in the subepithelium of follicle-associated epithelium using anti-*Y. pseudotuberculosis* sera of [A], $\times 400$. [C] Bacterial colonies with epithelial desquamation in Peyer's patches of a YadA p.o. mouse, HE, $\times 200$.

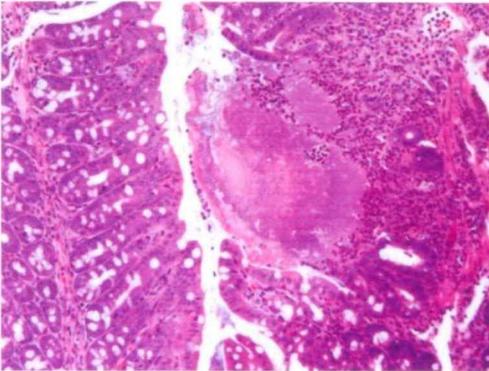
[A]



[B]



[C]



[D]

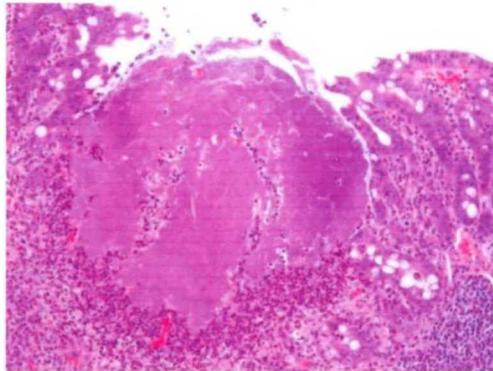


Fig. 20. Histopathological lesions of the intestine in YadA-vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b after 3 days. [A] Peyer's patches of a YadA s.c. mouse, HE, $\times 100$. [B] Peyer's patches of a negative control, HE, $\times 100$. [C] Small intestine of a negative control, HE, $\times 200$. [D] Solitary lymphatic nodule in the colon of a YadA p.o. mouse, HE, $\times 200$.

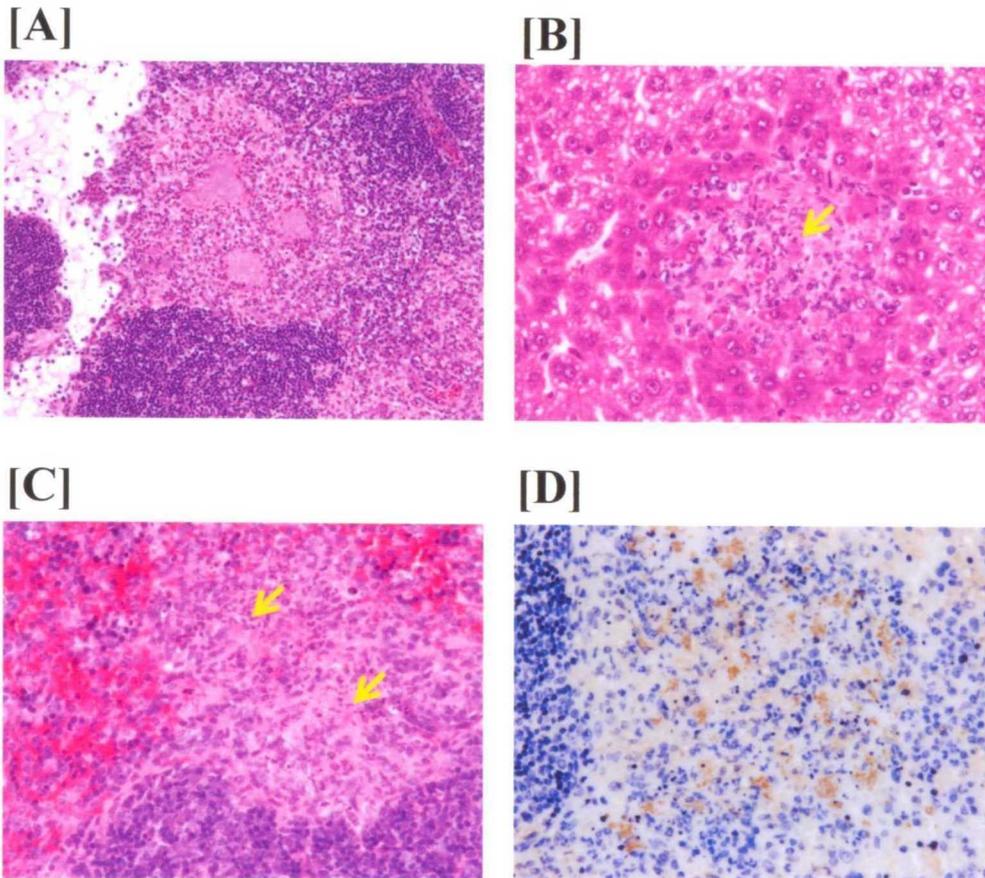
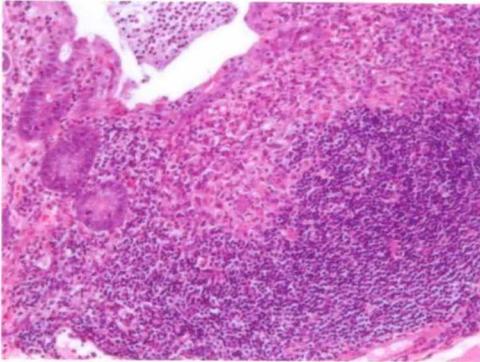


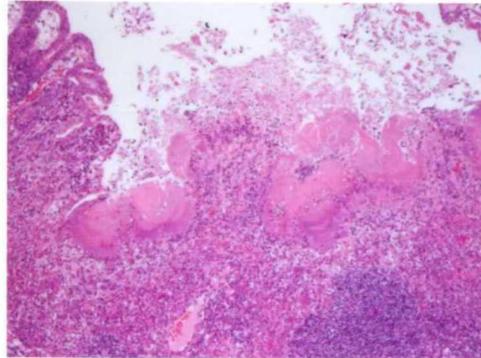
Fig. 21. Histopathological lesions of other than intestinal organs in YadA-vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b after 3 days.

[A] Focal necrosis with bacterial colonies in the mesenteric lymph nodes of a YadA p.o. mouse, HE, × 200. [B] Focal necrosis in the liver with small bacterial colonies (arrow) of a negative control, HE, × 400. [C] Focal necrosis with bacilli (arrows) in the spleen of a negative control, HE, × 400. [D] Immunohistochemistry to bacterial colonies in the spleen using anti-*Y. pseudotuberculosis* sera of [C], × 400.

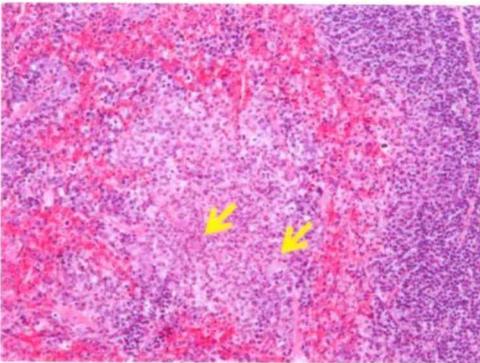
[A]



[B]



[C]



[D]

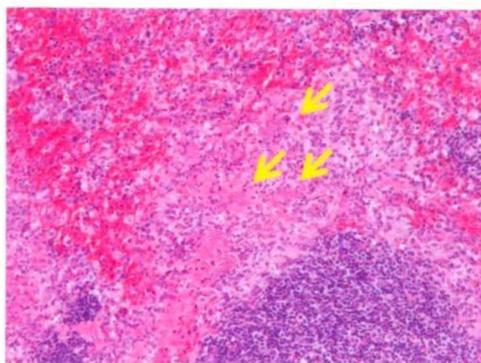


Fig. 22. Histopathological lesions in YadA-vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b after 5 days. [A] Peyer's patches of a YadA s.c. mouse, HE, × 200. [B] Peyer's patches of a negative control, HE, × 100. [C] Focal necrosis with small bacterial colonies (arrows) in the spleen of a YadA s.c. mouse, HE, × 200. [D] Focal necrosis with bacterial colonies (arrows) in the spleen of a negative control, HE, × 200.

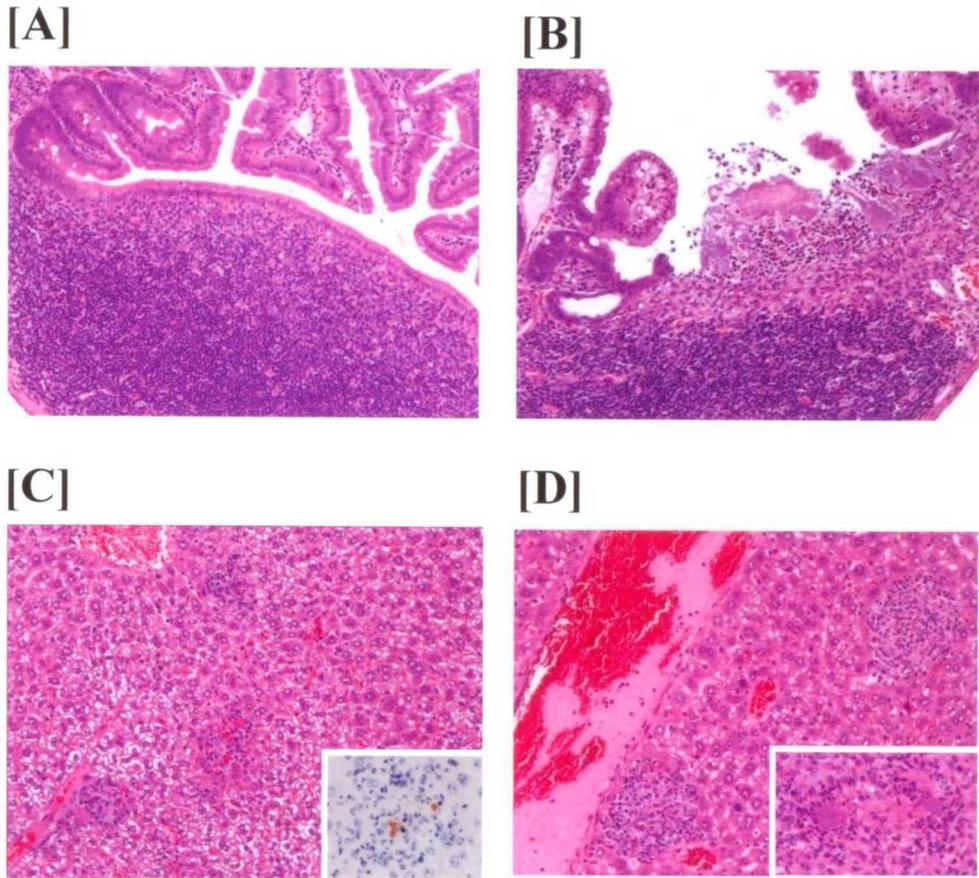
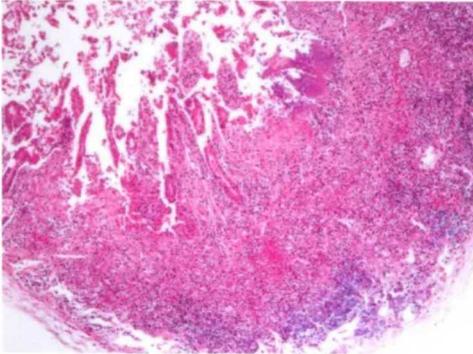
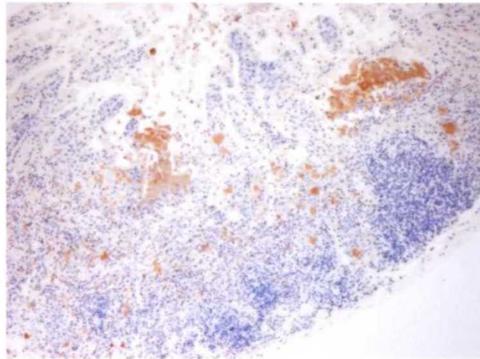


Fig. 23. Histopathological lesions in YadA-vaccinated and negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b after 7 days.
[A] Peyer's patches of a YadA s.c. mouse, HE, × 200. [B] Peyer's patches of a YadA p.o. mouse, HE, × 200. [C] Focal necrosis in the liver of a YadA s.c. mouse, HE, × 200, Insert: Immunohistochemistry to bacterial colonies in the spleen using anti-*Y. pseudotuberculosis* sera, × 400. [D] Focal necrosis in the liver of a YadA p.o. mouse, HE, × 200, Insert: Higher magnification of focal necrosis with bacterial colonies in the liver.

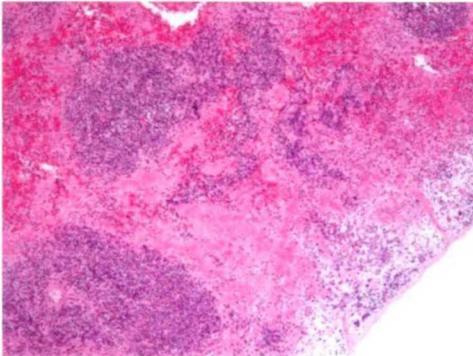
[A]



[B]



[C]



[D]

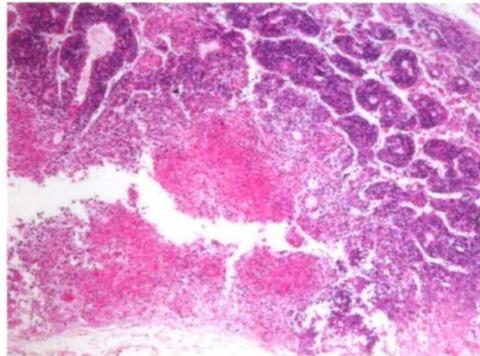


Fig. 24. Histopathological lesions in negative control mice following oral administration of *Y. pseudotuberculosis* 4b after 7 days.

[A] Peyer's patches, HE, × 100. [B] Immunohistochemistry to bacterial colonies in the Peyer's patches using anti-*Y. pseudotuberculosis* sera, × 100. [C] Severe necrosis with large bacterial colonies and reduction of lymphatic follicles in the spleen, HE, × 100. [D] Severe necrosis with bacterial colonies and reduction of lymphatic follicles in the mesenteric lymph nodes, HE, × 100.

第 3 章 飼育下リスザルに対する *Yersinia pseudotuberculosis* ワクチンの臨床実験に関する研究

第 1 節 序論

第 1 章の調査成績から、病原性 *Yersinia* が我が国のサル類飼育施設に広く浸淫しており、また、多くの施設では反復してエルシニア症が流行し、エルシニア症によるサル類の感染致死例が多発していることが明らかになった。そして、エルシニア症により死亡したサル類 58 頭中 48 頭がリスザルであり、リスザルの感染症の症例 105 頭のうち 45.7% がエルシニア症であったように、我が国ではリスザルが病原性 *Yersinia* に対して特に感受性が高く、全国的にエルシニア症が流行している。

リスザルは、真猿亜目 Haplorhini 広鼻下目 Catarrhini オマキザル科 Cebidae に属する新世界ザルで、南米のボリビア、ペルー、ブラジルのアマゾン川上流から中流およびコロンビアのオリノコ川上流域、パナマからコスタリカに至る中央アメリカの熱帯降雨林に群れを形成して生息している[180]。その愛らしい容姿と行動、温和な性格から、動物園における展示用や愛玩用として我が国では広く飼育されている。動物園では、10 数頭～100 頭以上で多頭飼育されることが多く、また、来客者がリスザルと接触が可能なふれあい方式で展示されていることもある。エルシニア症の発生には、保菌動物との何らかの直接的あるいは間接的な接触が必要であるが、リスザルの飼育形態として一般的に、夜間を除いて、日中は屋外の放飼場で飼育されていることが多く、飼育施

設の構造上、病原性 *Yersinia* を保菌すると考えられる鳥類やげっ歯類が侵入しやすく、糞便などの感染源による汚染を防ぐのも困難である。リスザルは本来、南米の熱帯地域に生息することから、冬期には寒冷対策が必要で、寒冷に暴露されると、ストレスにより抵抗力の低下が生じ易い[126]。加えて、この時期、低温増殖菌である *Yersinia* 属菌は、長く感染性を有して環境中に生息することが可能であるため、感染の危険性が高くなる[102]。

リスザルのエルシニア症は、ほとんどが突然死であり、臨床症状に特異性がなく、異常を確認した時点ですでにかなり重篤化しており、治療の猶予のない場合が多い。さらに、リスザルに病原性 *Yersinia* が感染すると、糞便中に大量の菌が排菌されるため、一度エルシニア症が発生すると集団感染を起こし、かつ致死率が高いため被害が甚大になる。エルシニア症が流行している飼育施設では、施設内の清浄化を徹底し、保菌動物の侵入および汚染物質（保菌動物の糞、糞に汚染された食物や水）の混入の阻止、さらに飼育動物に定期的に抗生物質の投与も行っているが、エルシニア症は依然として流行している。このため、サル類のエルシニア症を効果的に予防するには、有効なワクチンを用いて、サル類の病原性 *Yersinia* に対する感受性を低下させることが最も効果的と考えられる。そして、ヨーロッパの動物園では、サル類に、*Y. pseudotuberculosis* の死菌を用いたワクチネーションを試みているが、エルシニア症の予防に有効ではなかった[12]。

以上のことから、リスザルのエルシニア症をコントロールするためには、感染予防に効果的なワクチン開発が欠かせないと考えられる。そこで、

第2章の実験結果および共同研究者である東京農工大学獣医衛生学研究室の林谷秀樹准教授らの実験より、病原性 *Yersinia* が共通して産生する菌体外膜タンパク質である *Yersinia adhesin A* (YadA) が、*Y. pseudotuberculosis* の重要な感染防御抗原となっており、ワクチンとして有効である可能性が示唆されたので、YadA 死菌を免疫原とした臨床実験を計画した。

本章では、飼育施設におけるリスザルのエルシニア症の流行を抑えることを目的として、YadA を菌体表面に強く発現した *Y. pseudotuberculosis* ホルマリン不活化全菌体抗原 (YadA 死菌) をワクチンとしてリスザルに皮下接種する臨床実験を行った。あわせて、血清調査により、我が国の飼育下リスザルにおける病原性 *Yersinia* の浸淫状況を明らかにするとともに、血清抗体の経時的な推移や、ワクチン接種前後のエルシニア症の発生状況などから、YadA 死菌のワクチンとしての有効性を検討し、さらに、リスザルのエルシニア症の流行機序の解明を試みた。

なお、調査の実施にあたっては、事前に飼育施設に対して、調査研究のための協力依頼をし、承諾を得た上で実施した。

第2節 材料および方法

2-1 動物

我が国でリスザルを飼育している施設のうち、エルシニア症が流行して

いる 8 施設ならびにこれまでエルシニア症の発生がない 3 施設で飼育されているリスザル、さらに、リスザルの原産国の一つである南米のスリナム共和国から輸入され、法定検疫直後のリスザル飼育群を対象とした (Table 2)。

2-2 ワクチンの作製

リスザルに接種するワクチンは、YadA を菌体表面に強く発現した *Y.pseudotuberculosis* 4b のホルマリン不活化全菌体 (YadA 死菌) を用いた。ワクチンの作製は、第 2 章 2-2 に記載した方法で行い、100mg/ml (wet weight) の濃度になるように滅菌生理食塩水で希釈した。

2-3 ワクチン接種および採血

麻酔による嘔吐を防ぐために、ワクチンを接種する前日は、できる限りあらかじめ絶食を行った。リスザルを捕獲後、イソフルランによる吸入麻酔下で、ワクチンである YadA 死菌を 0.2ml 皮下接種した。その際に、マイクロチップリーダーによる個体判別を行うとともに外景検査を実施し、特に削瘦や下痢の有無などを確認した。また、大腿静脈から採血を行うとともに、シードスワブ γ 1 号 (栄研化学, 東京) を用いて直腸から便を採取した。さらに、マイクロチップが挿入されていない個体については、個体識別のため背部肩甲骨付近の皮下にマイクロチップの挿入

を行った。採取した血液は遠心分離により血清を採取し、使用するまで -80°C で保存した。

2-4 ELISA による血清抗体価の測定

ワクチン接種時に採取した血清あるいは冷凍保存されていたリスザルの血清を用いて、2002年～2009年の間に、12施設で飼育されている合計1387頭のリスザルについて、Yops に対する血清抗体を測定した (Table 1)。後述するカットオフ値にもとづいて施設ごとの血清抗体の保有状況を明らかにし、エルシニア症の流行施設と非流行施設での血清抗体保有率を比較した。また、個体情報が把握されており、年齢が明らかな E 施設と A 施設のリスザルについては、年齢別に血清抗体保有状況を調査した。さらに、エルシニア症の流行している E 施設とエルシニア症がこれまで流行していない P 施設の一部のリスザルについては、YadA 死菌に対する血清抗体を測定し、ワクチン接種後の血清抗体の経年的推移を観察した。E 施設は、2003年生まれの5頭ならびに2004年生まれの6頭の、2003年～2009年までの血清を検査対象とした。なお、このうち2頭については2008年に、貧血により黄疸を呈して分娩後に死亡したので、2009年の血清は9検体となった。P 施設は、成体5頭の2005年～2007年と2009年の血清および2006年生まれの1個体については2007年と2009年、2007年生まれの1個体については2009年の血清を対象とした。また、成体の1頭が2008年に死亡しているので、2009年の血清は合計6検体となった。

ELISA は、いずれも、第 2 章 2-6 に記載した方法で実施し、波長 405nm での吸光度を Optical Density (OD) 値として測定した。なお、YadA 死菌は 160 μ g/ml の濃度になるように 0.05M 炭酸緩衝液 (pH9.2) で希釈し、Yops は 250 μ g/ml の濃度になるように PBS (pH7.2) で希釈した。二次抗体として、1,000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識 Protein G (KPL) を用いた。また、供試血清の OD 値は、1 検体につき 3 ウェルの OD 値の平均値を用いた。

2-5 カットオフ値の算出

病原性 *Yersinia* が分布していない地域である、南米のスリナム共和国から輸入された直後のリスザル血清 93 検体を陰性対照として用い、Yops および YadA に対するカットオフ値を算出した。カットオフ値は、Iwata ら[85]の方法を参考にして、OD 値の平均値および標準偏差を算出し、平均値に標準偏差の 3 倍を加えた値をカットオフ値とした。そして、カットオフ値より高い OD 値を示した供試血清を抗体陽性、低い OD 値を示した血清を抗体陰性と判定した。

2-6 糞便からの *Yersinia* 属菌の分離

ワクチン接種時にシードスワブ γ 1 号 (栄研化学) を用いて採材した直腸便から、*Yersinia* 属菌の分離、培養を試みた。なお、2004 年から 2007 年までのスワブについては東京農工大学獣医衛生学教室の林

谷秀樹准教授に依頼し、2008年以降のスワブについては、麻布大学病理学研究室で実施した。

直腸便中の *Yersinia* 属菌の確認は、第1章 2-2 に記載した方法で実施し、スワブを IN 培地に直接塗布し、25℃で48時間、静置培養を行った。さらに、スワブを PBS (pH7.2) 中に懸濁して、4℃で3~4週間低温増菌し、水酸化カリウムを用いたアルカリ処理後に IN 平板培地に塗布した。IN 培地上に *Yersinia* 属菌を疑うコロニーの発育が認められた場合は、第1章 2-2 に記載した方法で菌種の同定と血清型別を実施した。

2-7 エルシニア症の発生状況調査

YadA 死菌をワクチンとして接種した 11 のリスザル飼育施設について、ワクチン接種後の死亡個体を検索し、エルシニア症の発生の有無を観察した。病理解剖により、エルシニア症の他、感染症を疑う肉眼所見がみられた場合は、小腸、パイエル板、腸間膜リンパ節、肝臓、脾臓および直腸内容等を採材し、微生物学的に検索を行うとともに、病理組織学的検索および免疫染色により、エルシニア症かどうかを確認した。

さらに、エルシニア症が反復して流行しており、その対策に苦慮している E 施設ならびに A 施設を対象として、これまでににおけるエルシニア症の詳細な発生状況の聞き取り調査を実施し、ワクチンの効果について検討した。

2-8 統計学的解析

2 群間の平均値の差の検定は、Microsoft Office Excel 2007 を用いて、Student の t 検定を実施した。なお、有意水準は 5%とした。

第3節 結果

3-1 ワクチン接種状況

リスザルへの YadA 死菌の皮下接種は、飼育施設によってワクチンを接種した年に違いはあるが、1 年のみの接種から、6 年間毎年 1 回の接種を実施した施設まで、2004 年～2009 年で合計 1092 頭に達した (Table 2)。

3-2 スリナム共和国から輸入された直後のリスザルの Yops ならびに YadA に対する抗体保有状況およびカットオフ値

Figure 1 と 2 に、スリナム共和国から輸入した直後のリスザル血清 93 検体の、OD 値の分布を示した。OD 値は、いずれも低い値で、Yops は 0.023～0.156、YadA は 0.029～0.101 の範囲に分布し、それぞれ平均値は 0.052、0.069 となり、標準偏差は 0.023、0.013 と算出された。

したがってカットオフ値は、Yops は 0.121、YadA は 0.108 となった。よって、Yops に対する血清抗体は 0.121 以上が抗体陽性、0.121 未満を抗体陰性とし (Figure 1)、YadA は 0.108 以上が抗体陽性、0.108 未満を抗体陰性とした (Figure 2)。

3-3 飼育下リスザルの Yop 抗体保有状況

ワクチン接種時に採取した血清あるいは冷凍保存されていたリスザルの血清を用いて、2002 年～2009 年の間に、12 施設で飼育されている合計 1387 頭のリスザルの Yops に対する OD 値を測定した。我が国で飼育されているリスザルの Yops に対する OD 値を飼育施設別にみると、エルシニア症の経験のある 8 施設ではいずれも OD 値は高く、カットオフ値以上であった (Figure 3)。一方、南米スリナムから輸入された直後のリスザル群 (R) を含む、エルシニア症の経験のない 4 つの施設では OD 値は全体的に低く、P 施設を除いていずれもカットオフ値以下であった。各飼育施設における抗体陽性率は、エルシニア症の経験のある施設では 62.5～100% と高い陽性率であったのに対して、エルシニア症の経験のない施設は 0～36.4% であり、Yops 抗体陽性率は、エルシニア症の経験のある 8 施設よりも有意に低かった ($p < 0.05$; Table 3)。

3-4 年齢別による Yop 抗体保有状況

飼育頭数が多く、個体識別により飼育群の年齢が把握できている E

施設と A 施設のリスザルにおける、年齢別の Yops に対する抗体保有状況を調査した。その結果、E 施設では 2005 年～2009 年の間に、抗体陰性個体は 10.5～38.9%の割合で推移し、そのうち 1 歳未満の幼若個体の占める割合は成体よりも有意に多く、36.0～100%で、全体では 71.0%であった (Figure 4)。また、成体における抗体陽性率は 71.0%～100%の割合で推移し、1 歳未満の個体と比較して抗体陽性率は有意に高かった ($p < 0.05$)。以上のことから、E 施設では 1 歳未満の幼若個体における抗体陽性率は低いが、成体になると陽性率が高くなることがわかった。

また、その傾向は A 施設でも同様で、2005 年～2009 年の間に、抗体陰性個体は 2.9～29.2%の割合で推移し、そのうち 1 歳未満の個体の占める割合は 71.4～100%で、全体では 80.0%であった (Figure 5)。一方、成体における抗体陽性率は 97.6～100%で、E 施設と同様、1 歳未満の個体では有意に抗体陽性率が低く、成体における抗体陽性率が高かった ($p < 0.05$)。

3-5 E 施設におけるリスザルの Yop 抗体の経年的推移

個体情報が把握されており、飼育頭数も多く、毎年継続して Yops に対する抗体価が測定できた E 施設に着目して、Yop 抗体価の経年的な推移を観察した。その結果、2003～2009 年までの間に、Yops に対する血中抗体を陽性のまま維持した個体は 64.8～84.1%の割合で見られ、陰性から陽転した個体は 2.4～28.2%、陰性を維持した個体

は 2.4～22.4%、陽性から陰転した個体は 1.2～3.7%の割合でみられた (Figure 6)。全体を通して、陽性から陰転する個体はほとんどみられなかった。また、陰性から陽転する個体が多い年は、陰性を維持する個体が少なく、陽転する個体が少ない年は、陰性を維持する個体が多くみられた。

上記 3-4 の結果と合わせると、成体では、ほとんどの個体が血清抗体陽性であり、一方、1 歳未満における抗体陰性率は高いが、多くの個体は、2 歳以上になると血清抗体が陽転することが明らかとなった。また、一度陽性になると陰性になることは少なく、Yops に対する血清抗体は長期間維持されている可能性が示唆された。

3-6 E 施設と P 施設における Yops および YadA に対する血清抗体の経年的推移

エルシニア症の発生のある E 施設と発生のない P 施設のリスザルについて、Yops ならびに YadA に対する血清抗体価を測定し、ワクチン接種後の抗体の推移を比較した。

その結果、E 施設ではいずれの個体も、ワクチン初回接種時の 1 歳未満の時点では Yops ならびに YadA 抗体は保有していなかった (Figure 7)。しかし、ワクチン抗原である YadA に対する抗体は、いずれもワクチンを接種した翌年の 2 歳以降から陽性に転じた (Figure 7)。一方、Yops に対しては、個体によるばらつきが大きいですが、ワクチン接種開始 2 年目の時点で、11 頭中 7 頭は陰性であった。しかし、4 年目以

降は、いずれの個体も陽性となった(Figure 7)。

P 施設においても、ワクチン初回接種時はいずれの個体も Yops と YadA に対する抗体は保有していなかった(Figure 8)。YadA に対する抗体は、1 個体を除き、2 年目に陽性に転じ、2 年目に陰性だった個体も 3 年目には陽性となった(Figure 8)。Yops に対しては、個体によるばらつきが大きい、1 頭を除き、2005 年～2007 年まではいずれの個体も陰性であったが、2009 年ではすべての個体が陽性となった(Figure 8)。

3-7 各飼育施設におけるワクチン接種前後のエルシニア症の発生状況と直腸からの *Yersinia* 属菌の分離状況

エルシニア症が流行している 7 施設と、エルシニア症が発生したことのない 4 施設について、飼育施設によってワクチンを接種した年に違いはあったが、2004 年～2009 年の間に延べ 1092 頭のリスザルに YadA 死菌をワクチンとして皮下接種した。その結果、ワクチネーション開始後は、エルシニア症の発生は激減し、エルシニア症流行群の 7 施設中 4 施設と、すべての非流行施設で、エルシニア症の発生はみられなかった。ワクチネーション後にエルシニア症のみられた 3 施設(A, E, F)においても、エルシニア症の発生回数と罹患頭数は激減したが、E 施設と A 施設については後述する。また、F 施設については、2007 年に 2 頭のリスザルがエルシニア症により死亡した。しかし、これらのサルはいずれもワクチン未接種で、Yops に対する血清抗体陰性の個体であった。

調査期間中に、直腸スワブから *Yersinia* 属菌の分離を試みた結果、E 施設と A 施設を除き、いずれの施設からも *Yersinia* 属菌は分離されなかった。

E 施設と A 施設におけるエルシニア症の発生状況および直腸スワブからの *Yersinia* 属菌の分離状況は、以下の通りである。

【E 施設】

E 施設は約 100 頭前後のリスザルを飼育している。E 施設では、1983 年から 2004 年までの 22 年間に、細菌検査によってエルシニア症と確定診断された事例は、リスザルを含む各種飼育動物において、過去 6 回発生している。さらに、剖検所見に基づいてエルシニア症を疑う症例を加えると、ほぼ毎年のようにエルシニア症が流行していると推察される (Figure 9)。2002 年 5 月に成体の 1 頭が死亡し、*Y. pseudotuberculosis* 4b が分離されている。また、2003 年 6 月には 1 歳未満の個体がエルシニア症で死亡し、*Y. pseudotuberculosis* 7 が分離されている[131]。なお、この個体の 2003 年の Yop 抗体価は 0.005 で、抗体陰性であった。

この施設では 2004 年からワクチン接種を開始し、それ以降毎年、ワクチン接種を行っている。なお、頭数が多く、ワクチンの作製量に限界があるため、この施設では前年の抗体調査で抗体価の低い個体と、前年に生まれた 1 歳未満の幼若個体にワクチンを接種している。

ワクチン接種を開始した 2004 年以降は、2005 年～2007 年の間にそれぞれ 1 頭ずつがエルシニア症により死亡した (Figure 9)。2005 年の

死亡個体は成体で、分娩直後の衰弱個体での感染致死例であり、*Y. enterocolitica* O3 が分離された。2006年の死亡個体は1歳未満（ワクチン未接種）で、*Y. pseudotuberculosis*（細菌培養実施せず、免疫染色で判定）、2007年の死亡個体は1歳未満（ワクチン未接種）で、*Y. pseudotuberculosis* 1b が分離された。また、2009年の調査時には、96頭中10頭（10.4%）の直腸スワブから *Y. enterocolitica* O5 が分離され、これらの菌株は 37℃培養時に自己凝集性を有し、さらに、病原性プラスミドのマーカである *virF* 遺伝子を標的遺伝子とした PCR 法によって、病原性プラスミドを保有する病原性株であることが分かった（Figure 10）。また、分離された10頭のうち、4頭は1歳未満、3頭は2～4歳の若齢個体、3頭は成体で、成体の1頭は前年の Yops に対する血清抗体は陰性であった（Table 4）。リスザルの糞便から病原性を有する *Y. enterocolitica* O5 が分離されたことから、全頭に抗生物質を予防的に投与するとともに経過を観察したが、下痢などの症状を示す個体はみられず、エルシニア症で死亡した個体も確認されなかった。

【A 施設】

およそ50頭前後のリスザルが飼育されている。この施設では1985年頃にエルシニア症の集団発生がみられ、それ以降、断続的に発生している。そのため、定期的に抗生物質を投与している。1999年12月まで定期的に実施していた抗生物質の投与を一旦中止した際、その3ヶ月後の2000年3月（6か月齢）、6月（2歳）と12月（年齢不明）に、

エルシニア症によりそれぞれ 1 頭が死亡した。さらに、2001 年 1 月にも 2 頭 (3 歳、5 か月 齢) がエルシニア症で死亡した。その後、2005 年からワクチン接種を開始したが、2005 年のワクチン接種の際にも、調査の時期と重なってエルシニア症の集団発生がみられた。2005 年 2 月の調査の際には、飼育リスザル 46 頭中 8 頭 (17.4%) の直腸スワブから *Y. pseudotuberculosis* 1b が分離され、うち 2 頭 (1 歳未満と成体) が死亡した。2006 年、2007 年および 2009 年にエルシニア症で死亡したリスザルはみられなかったが、2008 年 1 月と 5 月にエルシニア症でそれぞれ 1 頭 (いずれも 1 歳未満でワクチン未接種) が死亡した。

第 4 節 考察

我が国のサル類飼育施設におけるリスザルのエルシニア症の流行を抑えることを目的として、病原性 *Yersinia* が共通して産生する菌体外膜タンパク質である YadA を菌体表面に強く発現した *Y. pseudotuberculosis* 4b のホルマリン不活化全菌体抗原 (YadA 死菌) を作製し、そのワクチンとしての有効性を明らかにするために、2004 年～2009 年の間に延べ 1092 頭の飼育下リスザルを対象として YadA 死菌ワクチンの野外臨床実験を実施した。さらに、飼育施設におけるリスザルに対する病原性 *Yersinia* の浸淫状況およびエルシニア症の流行メカニズムを明らかにし、ワクチンの効果を評価するため、延べ 1387 頭のリスザルの血清を用いて、病原性 *Yersinia* に対する血清抗体調査を実施した。

はじめに、リスザル飼育施設における病原性 *Yersinia* の浸淫状況を明らかにするために、病原性 *Yersinia* が共通して産生する病原因子である Yops に対する血清抗体を測定し、抗体保有状況を調査した。なお Yops は、ヒトや動物において、病原性 *Yersinia* に対する抗体を広く検出でき、かつ検出感度や特異性が高い抗原であることが既に報告されている[73,144,146,176,192]。さらに、病原性 *Yersinia* に感染している患者では、その菌種や血清型の種類に関わらず、血清中に、Yops に対する抗体を検出できることが報告されている[115]。リスザルにおける血清抗体調査の結果、エルシニア症の発生経験をもつ 8 施設では、いずれも血清抗体保有率は高く(62.5~100%)、一方、これまでエルシニア症が発生したことのない 4 施設では、全体に Yops に対する OD 値は低く、ほとんどがカットオフ値以下であった。また、ELISA に使用している Yop 抗原は、*Y. pseudotuberculosis* 4b から精製して抗原としているが、エルシニア症が流行している施設で、*Y. pseudotuberculosis* 4b が分離されたことのない A 施設(1b)、B 施設(1b、2b、6)および H 施設(1b)でも、Yop 抗体を検出することが可能であった。エルシニア症の流行がない O、P、Q および R の 4 施設で飼育されているリスザルのうち、Yops に対する抗体を保有していたのは、O、P および Q 施設で飼育されている、それぞれ 3 頭(27.3%)、8 頭(36.4%)、2 頭(18.2%)であり、R 施設は南米のスリナム共和国から輸入された飼育群であるが、この施設では Yop 抗体を保有する個体はみられなかった。O 施設で抗体陽性を示した 3 頭のうち、2 頭はエルシニア症が流行している E 施設から以前に導入した個体であり、1 頭は同様に K 施設

から導入された個体であった。また、P と Q 施設で陽性を示した個体はいずれも成体であった。

以上のことから、Yops を用いた ELISA による血清検査は、リスザルに対しても、病原性 *Yersinia* に対する抗体を広く検出でき、以前に病原性 *Yersinia* に感染したことがあるかどうかを判定するのに有用であると考えられた。

E 施設と A 施設のリスザルについて、年齢別に Yops 抗体の保有状況および経年的な変化を調査した結果、いずれの施設でも、1 歳未満の個体で抗体陰性率が高く、2 年目以降に多くは陽転する傾向にあり、成体における抗体陽性率が高かった。1 歳未満の幼若個体で抗体保有率が低いことは、病原性 *Yersinia* に対する感受性が高い事実を支持する結果であった。以上のことから、エルシニア症の発生を阻止するためには、1 歳未満の幼若個体へ、ワクチンによって免疫を賦与することが特に重要であると考えられた。YadA 死菌の皮下接種により、有効な抗体価がどの程度の期間維持されるのかは、今後検討していく必要があると思われる。

エルシニア症の発生のある E 施設と発生のない P 施設のリスザルについて、Yops ならびに YadA に対する血清抗体価を測定し、ワクチン接種後の抗体の推移を比較した結果、いずれの施設においても、ワクチン初回接種時では Yops および YadA に対する血清抗体はともに陰性であったが、ワクチンとして接種している YadA に対する血清抗体は、ワクチンを接種した翌年には、P 施設の 1 頭を除いていずれの個体も陽性に転じた。一方、Yops に対する血清抗体は、個体により様々であっ

たが、E 施設では 2 年目に 11 頭中 4 頭が陽転し、4 年目には全頭が陽性となった。P 施設では、2005 年～2007 年までは 1 頭を除いて Yops 抗体は陰性であったが、2009 年には全頭が陽性となった。P 施設では、これまでリスザルにエルシニア症の流行はなかったが、1992 年にシロテテナガザルとブラッサモンキーに *Y. pseudotuberculosis* 感染症が発生している[126]。さらに、本施設において 1990 年に村田らによって実施された調査では、飼育施設内で捕獲したドブネズミ、クマネズミなどのげっ歯類の腸内容物から 45%の割合で *Yersinia* 属菌が検出されており、動物飼育施設内におけるエルシニア症の感染経路として、げっ歯類が重要な役割を有することを指摘している[125]。そのため、P 施設でも野生げっ歯類等が病原性 *Yersinia* を保菌しており、2008 年～2009 年の間にリスザル飼育群に暴露されていた可能性が考えられた。

エルシニア症の流行を阻止するために、施設内の清浄化や抗生物質の予防的投与を実施しているにもかかわらず、リスザルにエルシニア症が発生して対策に苦慮している E 施設と A 施設について、ワクチン接種後におけるエルシニア症の発生状況を調査した結果、ワクチンを接種してからは、エルシニア症の発生回数および罹患頭数は激減し、死亡個体も、1 歳未満のワクチン未接種個体や分娩等による衰弱した個体に限られていた。さらに、これまでエルシニア症が発生していたその他の 4 施設でも、ワクチン接種後はエルシニア症が発生することはなかった。以上のことから、YadA は病原性 *Yersinia* の感染防御抗原となっており、エルシニア症による感染致死を防御するのに有効であると

考えられた。E 施設における血清調査の結果から、ワクチンとして接種している YadA に対する血清抗体は、ワクチン接種後陽性となるが、病原性 *Yersinia* の感染を広く検出する Yops に対する血清抗体は、YadA の接種によって上昇せず、個体により時期は様々であるが、成体になると殆どの個体が陽性となった。さらに、2009 年の調査時に、E 施設のリスザル 96 頭中 10 頭 (10.4%) から、病原性プラスミドを保有する *Y. enterocolitica* O5 が分離されたにも関わらず、下痢などの症状を呈する個体はみられず、エルシニア症の流行もなかった。また、第 2 章において、マウスに対して YadA 死菌を用いて実施した感染防御実験でも、YadA 死菌による皮下接種によって免疫を賦与しても、生菌の経口接種から 28 日後の時点でも糞便中に排菌を認めた。以上のことから、YadA の皮下接種により、病原性 *Yersinia* の感染による症状の発現や死亡を阻止することはできるが、病原性 *Yersinia* の主たる感染経路は経口感染であることから、YadA 死菌の皮下接種では、腸管における十分な局所免疫が誘導できず、腸管感染は阻止できないと考えられた。リスザルから分離された *Y. pseudotuberculosis* は、92.3% が YPM を産生する強毒株であったが、我が国の環境中には、YPM を産生しない、病原性の低い *Y. pseudotuberculosis* も広く分布していることが報告されている[55]。また、リスザルの糞便から、病原性 *Yersinia* の中でも弱毒とされている *Y. enterocolitica* O5 が 10.4% の割合で分離されたが、発症例、致死例ともにみられなかった。以上のことから、YadA 死菌をワクチンとして皮下接種したリスザル飼育施設では、YadA 死菌の接種により、病原性 *Yersinia* の感染による症状の発現や死亡

を防ぐとともに、病原性の低い弱毒の *Yersinia* の自然感染が繰り返し発生することによって免疫が強化され、重篤な感染によるエルシニア症の発症を防御するために有効な YadA 抗体が維持されている可能性が示唆された。

エルシニア症が流行している E 施設や A 施設では、ワクチン接種後、エルシニア症の発生は激減し、YadA 死菌はワクチンとして有効であると考えられるが、1 歳未満のワクチン未接種個体には、依然としてエルシニア症が発生し、死亡している。また、現在のところ、リスザルに YadA 死菌を皮下接種するために、リスザルを捕獲して、吸入麻酔などの処置を行う必要があり、捕獲や麻酔等により事故死する事例もあることから、今後はワクチンの接種がより簡便で、安全性が高い経口ワクチンの開発が望まれる。現在、従来の皮下あるいは筋肉内投与する注射型ワクチンよりも、鼻に噴霧あるいは経口的に接種することにより、呼吸器あるいは消化管の粘膜を介して効果的に吸収される粘膜ワクチンが世界的に注目され、研究されている[133,189]。従来の注射型ワクチンは、全身投与であることから、全身免疫のみしか誘導されないが、経口あるいは経鼻投与による粘膜ワクチンの場合、粘膜の局所免疫と全身免疫を双方に誘導できる二段構えのワクチンとして、今後開発が期待されている[185]。特に、腸管感染症や肺炎などのような粘膜感染を引き起こす感染症に対しては、粘膜ワクチンの開発が望まれている。しかし、死菌あるいはサブユニットワクチンなどのような不活化ワクチンの場合、抗原として認識され、樹状細胞のような抗原提示細胞に取り込まれる前に、消化酵素や粘液などの作用によって不活化されることが問題と

なり、効果的な粘膜ワクチン開発の障壁となっている[122]。第 2 章においてマウスを用いた感染防御実験でも、YadA 死菌の皮下接種と経口接種を比較した結果、皮下接種のほうが体重の減少の程度、全身諸臓器における菌の増殖や病変形成の程度は軽度であったことから、経口接種の場合、十分な量の抗原を接種しても、効果が不十分であると考えられる。そこで、粘膜局所における抗原特異的 IgA の誘導を効果的に増強する粘膜免疫活性化因子として、コレラ毒素や大腸菌の易熱性毒素などのような粘膜アジュバントなども開発され、研究されている[29]。さらに近年、このような粘膜ワクチンとして、遺伝子組み換え技術を応用し、ワクチン抗原を米などのような植物に発現させた植物生産型ワクチンが注目されている[58,216]。今後は、リスザルに対しても、エルシニア症の流行を防止するために、安全で効果的な粘膜ワクチンを開発していく必要があると考えられる。

Table 1. Number of animals in which antibody titers to Yops were measured

Institution ^a	Number of squirrel monkeys measured the antibody titers to Yops								Total
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	
E	ND ^b	103	106	113	113	111	105	96	747
A	ND	ND	ND	46	34	33	48	55	216
D	15	19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	34
K	ND	ND	ND	7	8	12	12	12	51
I	ND	ND	ND	ND	ND	13	ND	ND	13
F	ND	ND	26	27	27	ND	ND	ND	80
H	ND	ND	19	ND	ND	ND	ND	ND	19
B	14	ND	14						
O	ND	ND	ND	ND	11	ND	ND	ND	11
P	ND	ND	ND	5	5	6	6	6	28
Q	ND	ND	ND	11	ND	ND	ND	ND	11
R	ND	ND	ND	93	70	ND	ND	ND	163
Subtotal	29	122	151	302	268	175	171	169	1387

^aInstitutions E, A, D, K, I, F, H, and B had episodes of yersiniosis in the past, whereas institutions O, P, Q, and R had no yersiniosis. Institution R is a squirrel monkey colony just after importation from Suriname.

^bND, Not Done.

Table 2. Number of animals in which YadA-expressed formalin fixed vaccines were immunized

Institution ^a	Number of squirrel monkeys immunized with vaccines						Total
	Year						
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	
E	42	68	70	98	82	96	456
A	ND ^b	46	34	33	48	55	216
D	13	14	15	ND	ND	ND	42
K	ND	7	8	12	12	12	51
I	9	11	21	13	9	ND	63
F	25	27	30	32	ND	ND	114
H	19	ND	ND	ND	ND	ND	19
O	ND	ND	11	11	ND	ND	22
P	ND	5	5	6	6	6	28
Q	ND	11	ND	ND	ND	ND	11
R	ND	ND	ND	70	ND	ND	70
Subtotal	108	189	194	275	157	169	1092

^aInstitutions E, A, D, K, I, F, and H had episodes of yersiniosis in the past, whereas institutions O, P, Q, and R had no yersiniosis. Institution R is a squirrel monkey colony just after importation from Suriname.

^bND, Not Done.

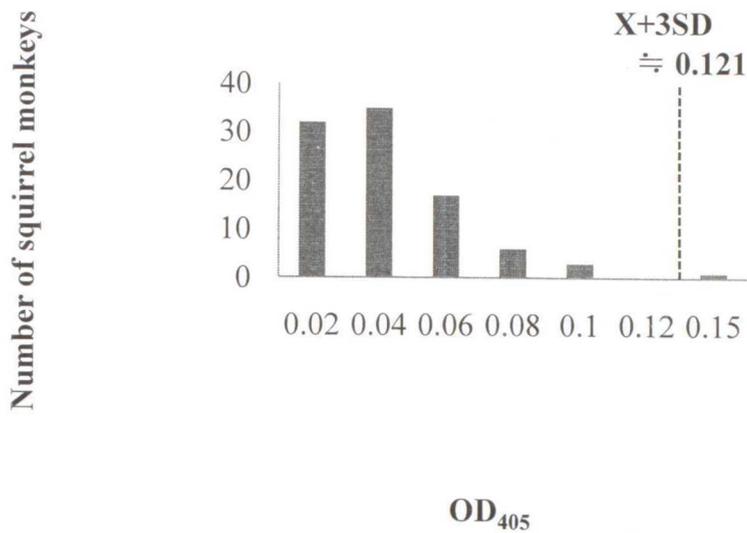


Fig. 1. Antibody titers to Yops of 93 animals just after importation from Suriname. The vertical dashed line represents the cut-off point, which was calculated as 3 standard deviations (SD) from the mean of this group.

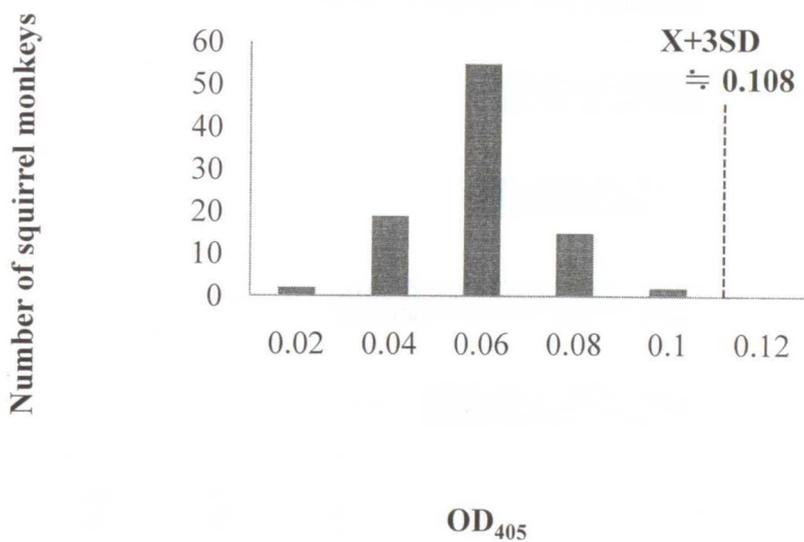


Fig. 2. Antibody titers to YadA of 93 animals just after importation from Suriname. The vertical dashed line represents the cut-off point, which was calculated as 3 standard deviations (SD) from the mean of this group.

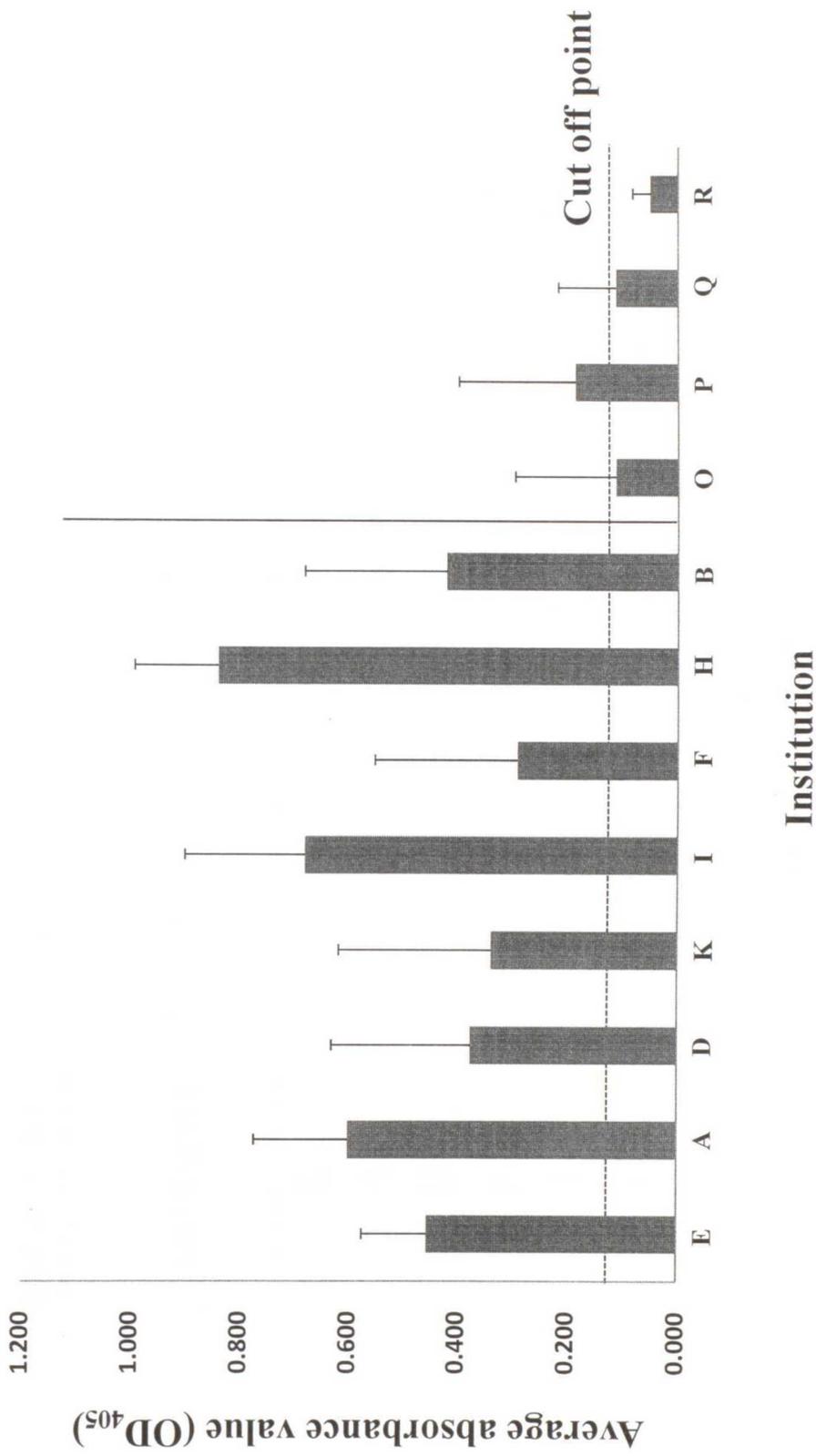


Fig. 3. The average of antibody titers to Yops of each institutions. Institutions E, A, D, K, I, F, H, and B had episodes of yersiniosis in the past, whereas institutions O, P, Q, and R had no yersiniosis. Institution R is a squirrel monkey colony just after importation from Suriname.

Table 3. Prevalence of serum antibody to Yops in animals from 12 institutions in Japan

Institution	No. of positive samples/ No. of samples tested	
		(%)
E	529 / 747	(70.8)
A	185 / 216	(85.7)
D	23 / 34	(67.6)
K	39 / 51	(76.5)
I	12 / 13	(92.3)
F	50 / 80	(62.5)
H	19 / 19	(100)
B	11 / 14	(75.6)
O	3 / 11	(27.3)
P	8 / 22	(36.4)
Q	2 / 11	(18.2)
R	0 / 163	(0)

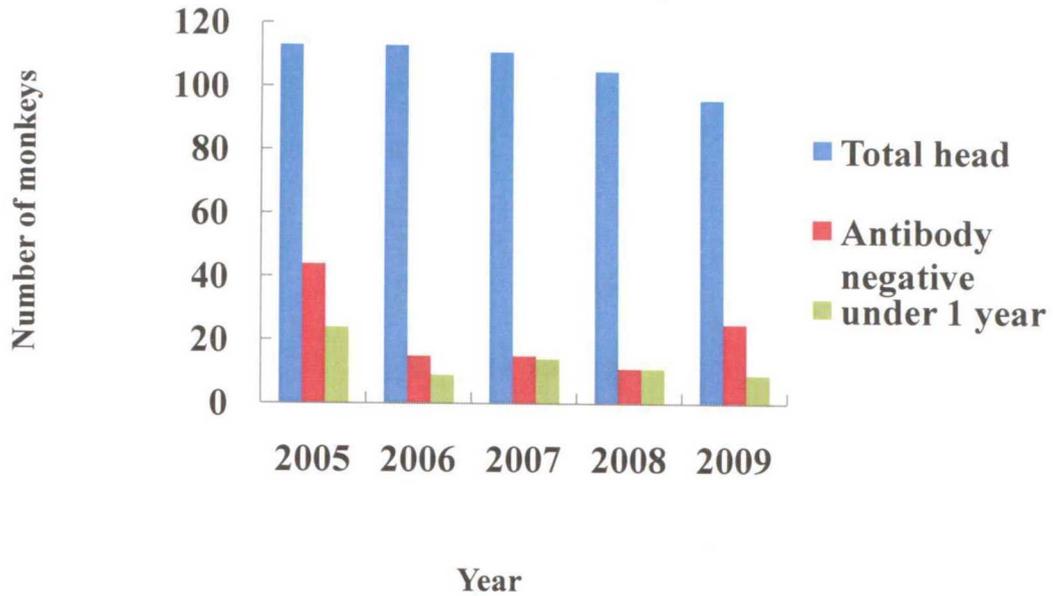


Fig. 4. Prevalence of serum antibody to Yops in animals of institution E.

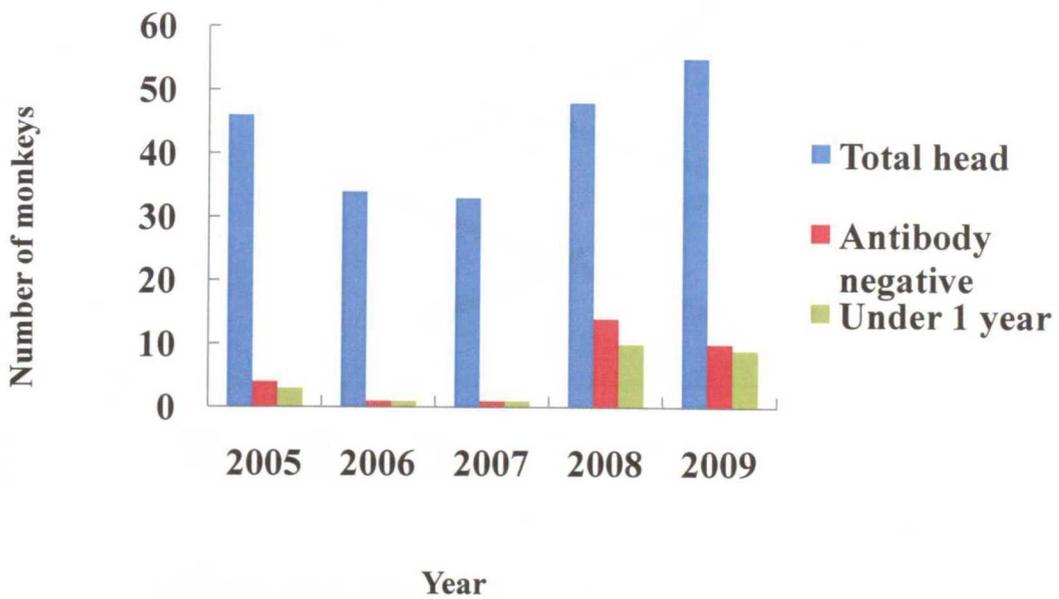


Fig. 5. Prevalence of serum antibody to Yops in animals of institution A.

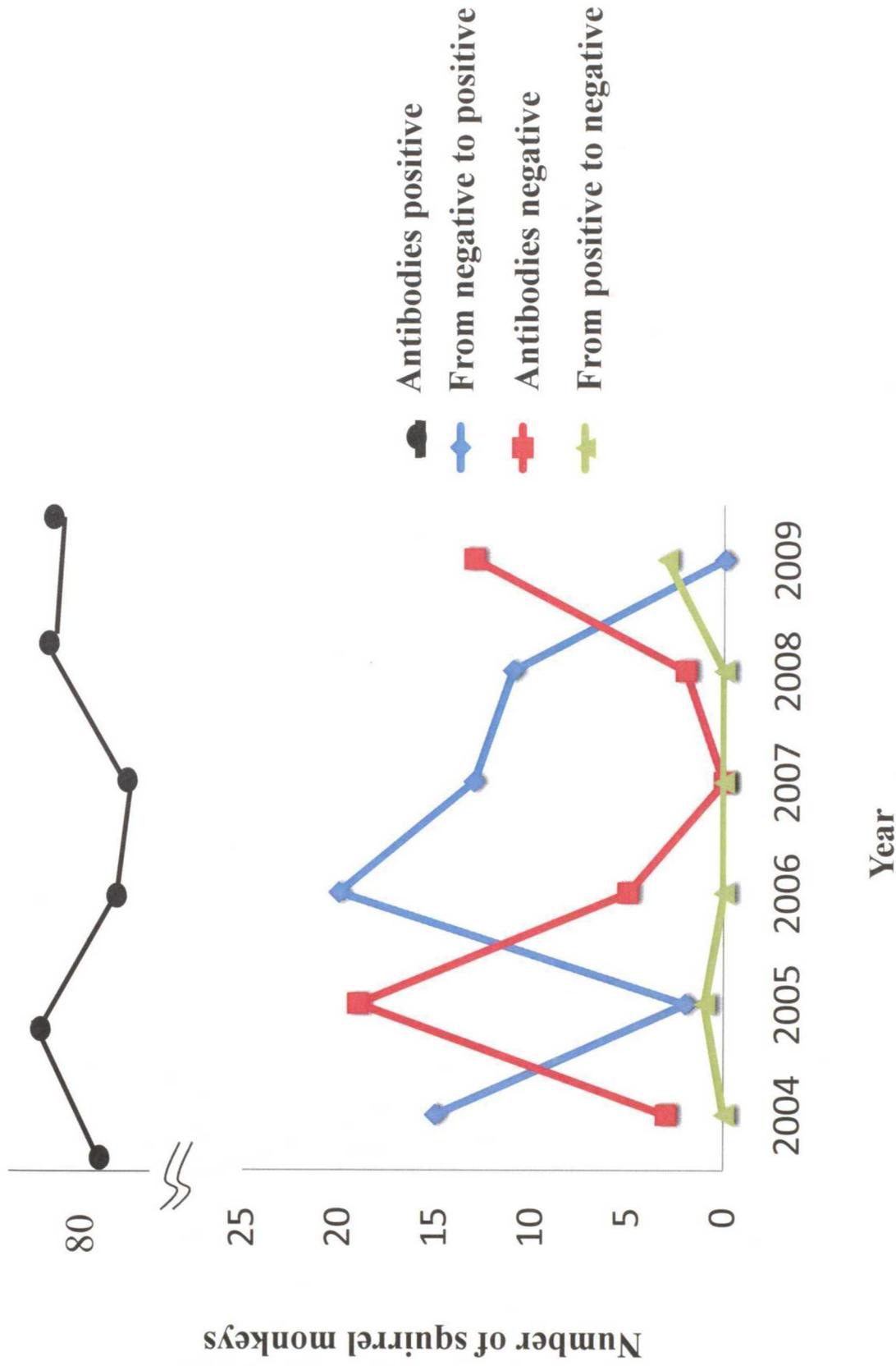


Fig. 6. Changes in Yops antibody titer by year in animals of institution E.

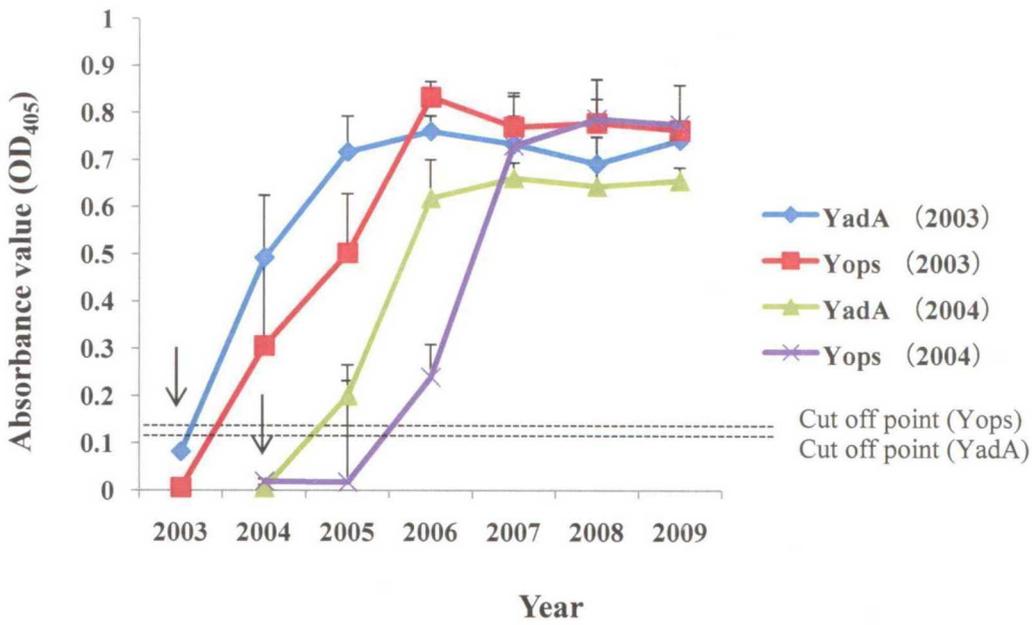


Fig. 7. Changes in YadA and Yops antibody titers by year in animals born in 2003 or 2004 at institution E. Arrows show time of vaccination.

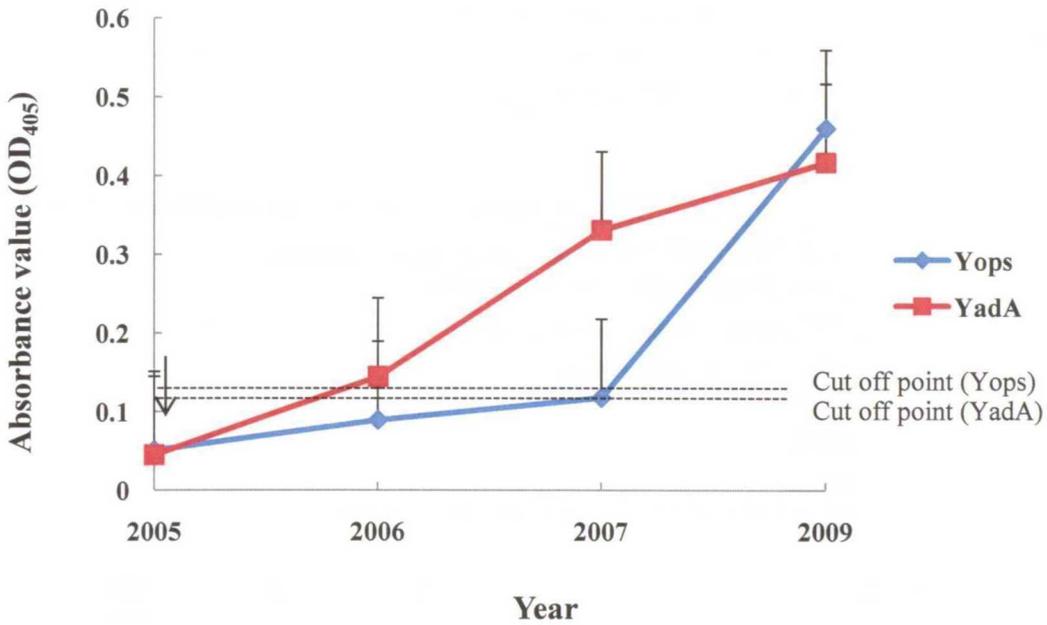


Fig. 8. Changes in YadA and Yops antibody titer by year in animals at Institution P. Arrows show time of vaccination.

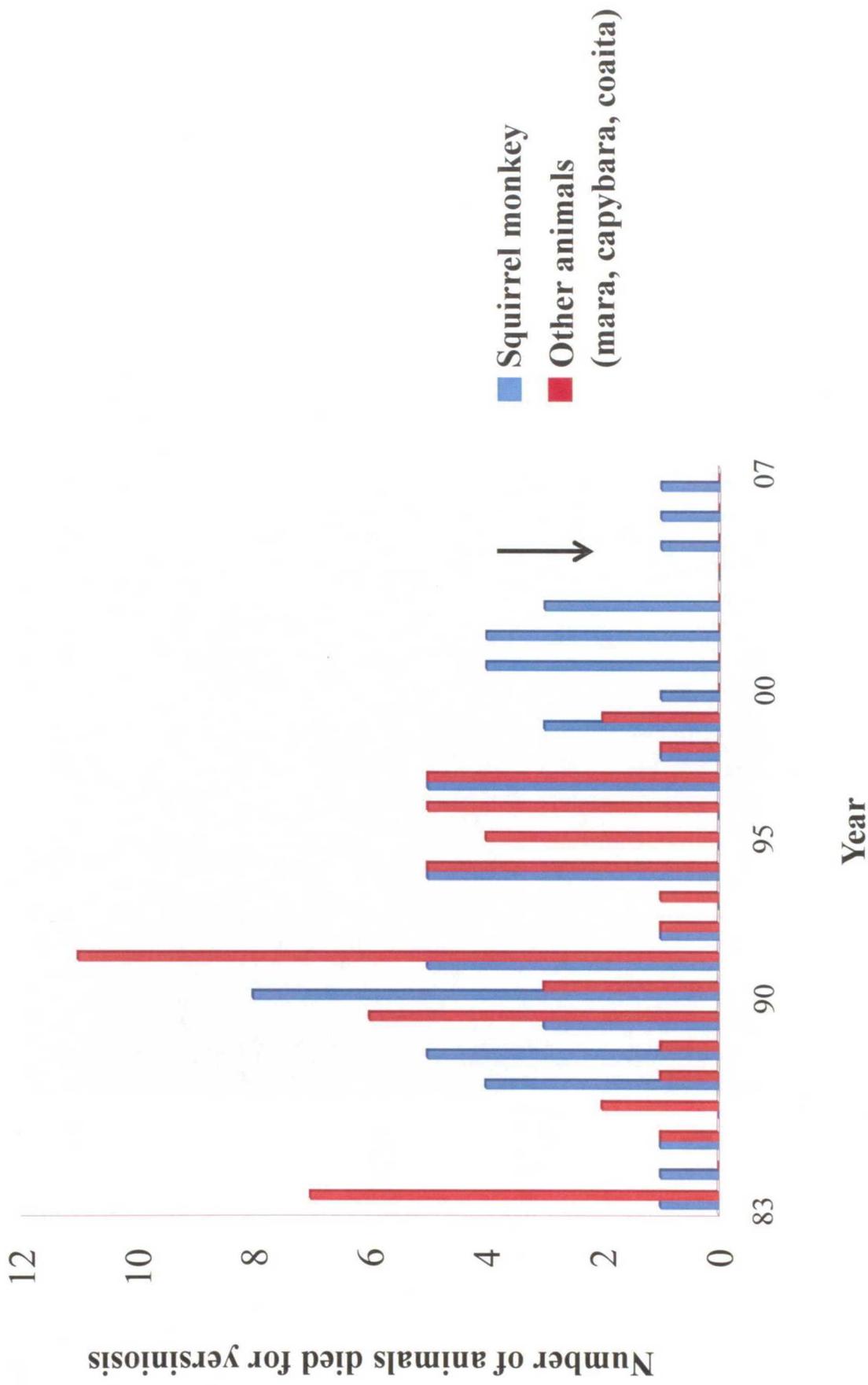


Fig. 9. Number of animals that died from yersiniosis from 1983 to 2007 in Institution E. Vaccination started in 2004 (Arrow).

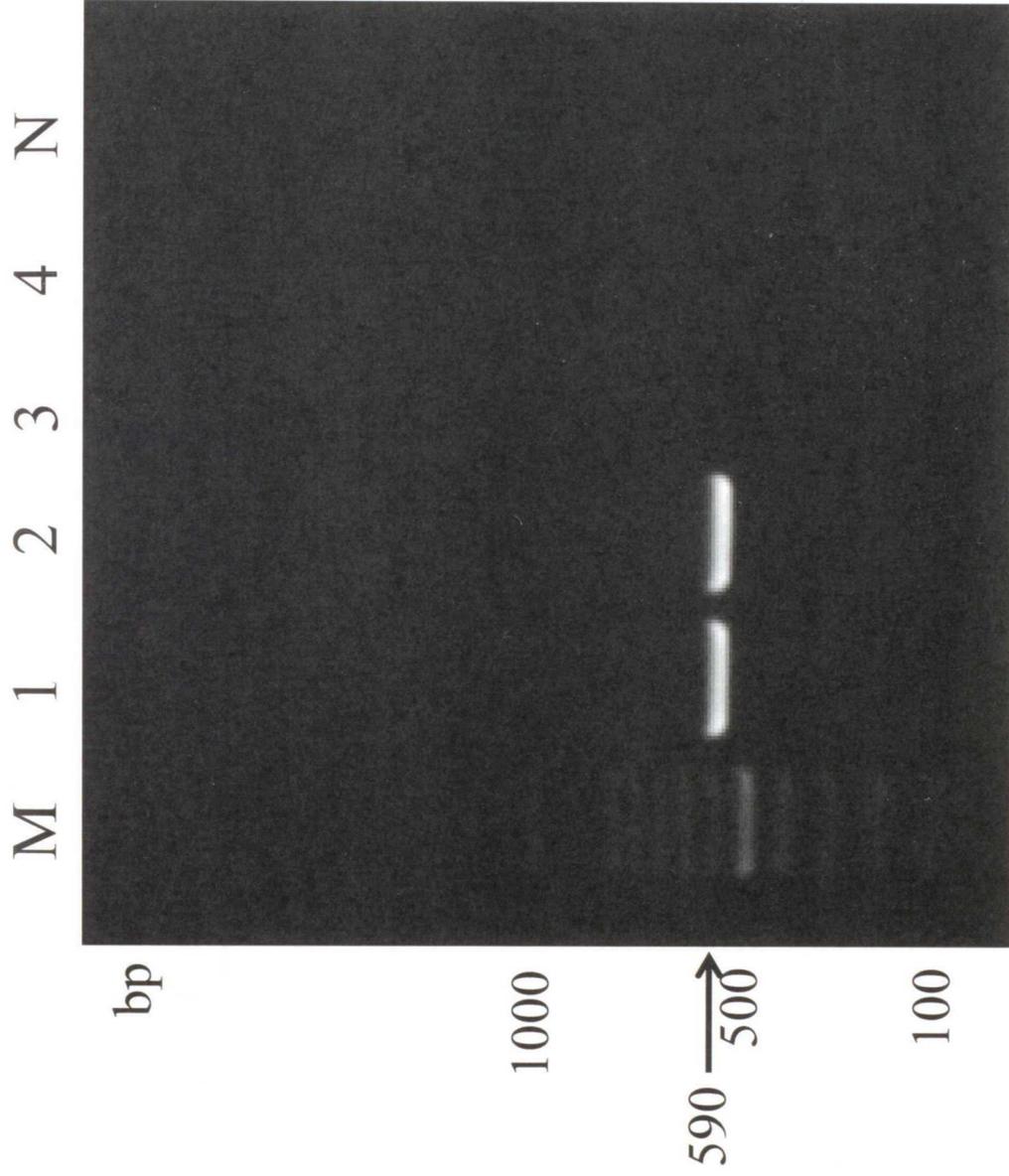


Fig. 10. PCR for *Y. enterocolitica* O5 isolated from the feces of squirrel monkeys (No. 29, 33) in 2009. Lanes: M, molecular weight marker; 1, 2, *virF* gene from No. 29, 33, respectively; 3, 4, *irp2* gene from No. 29, 33, respectively and N, negative control.

Table. 4. 10 squirrel monkeys from whom *Y. enterocolitica* O5 was isolated from the feces.

Animal No.	Age (year)	Yops antibody
29	under 1	ND
33	2~4	positive
41	adult	negative
44	2~4	ND
45	adult	positive
55	under 1	Negative
67	2~4	ND
82	under 1	negative
85	adult	positive
92	Under 1	negative

ND, not done

結語

動物園などの動物展示施設では、様々な動物、特にサル類に、人獣共通感染症であるエルシニア症 (*Yersinia pseudotuberculosis* および *Y. enterocolitica* による感染症) が多発し、動物飼育管理上のみならず公衆衛生上の重要な問題となっているが、従来、我が国の動物展示施設において、死亡個体の詳細な病理学的および微生物学的検索が不十分なため、サル類のエルシニア症の病態および発生状況の把握が進んでおらず、適切な対策が立てられていないのが現状である。そのため本研究では、飼育施設におけるエルシニア症の発生予防対策を図る研究の一環として、サル類のエルシニア症の発生実態を病理学的および疫学的に明らかにするとともに、その流行阻止のためのワクチン開発を目的として、マウスを用いて感染防御実験を行った。さらに、飼育施設におけるエルシニア症の感染予防対策を図る目的で、複数の飼育施設で飼育されているリスザルを対象として、*Yersinia pseudotuberculosis* ワクチンの野外臨床実験を実施し、以下の成績を得た。

第1章では、2000年1月～2008年9月の間に、我が国のサル類を飼育する21施設において死亡し、麻布大学病理学研究室で病性鑑定を行った飼育下サル類390頭を供試検体として、エルシニア症の発生状況を遡及的に調査し、サル類の種や年齢による病変の比較および分離菌の菌種や血清型、保有病原遺伝子と病原性との関連について検討し、病理学的特徴を明らかにした。その結果、調査期間中

に、サル類飼育施設 14 施設において、8 種類 58 頭のサルがエルシニア症で死亡した。種の内訳は、類人猿のボルネオオランウータン、アジルテナガザル、旧世界ザルのブラッサモンキー、マントヒヒ、新世界ザルのシロガオサキ、リスザル、原猿類のエリマキキツネザルなど、多岐の種類にわたってエルシニア症がみられたが、58 頭中 48 頭 (82.8%) はリスザルであった。これらのサル類は、延べ 30 回のエルシニア症流行事例により死亡し、そのうち 28 回は *Y. pseudotuberculosis*、2 回は *Y. enterocolitica* によるものであった。微生物学的に菌種、血清型が明らかとなった 22 事例の内訳は、*Y. pseudotuberculosis* 4b が 8 例 (36.4%)、*Y. pseudotuberculosis* 1b が 6 例 (27.3%)、*Y. pseudotuberculosis* 6 が 3 例 (13.6%)、*Y. pseudotuberculosis* 2b、3、7 および *Y. enterocolitica* O3 と O8 がそれぞれ 1 例 (4.5%) ずつであった。この結果は、欧米と比較して、我が国のヒトの患者から分離される多様な血清型と一致していた。*Y. pseudotuberculosis* 7 は、これまで非病原性の血清群とされていたが、今回、7 群による動物の感染致死事例が世界で初めて確認し、今回分離された 7 群がその他の病原性血清群と同等の病原性を保有していることが明らかになった。さらに、*Y. enterocolitica* O3 によるサル類の死亡例を国内で初めて確認し、また、*Y. enterocolitica* O8 による動物の感染、致死事例を世界で初めて確認した。

サル類のエルシニア症の共通した病変として、腸間膜リンパ節の腫大、脾腫および多発性白色結節形成が観察され、サルの種類に関わらず、年齢が高くなるにつれて病変は大型化、陳旧化し、膿瘍を形成

する傾向にあった。腸病変は、新世界ザルのリスザルでは、パイエル板の腫大を伴う小腸病変が顕著であり、類人猿では、盲腸部リンパ節の膿瘍化を伴い、回盲結口部付近の盲腸と結腸に主座していた。また、旧世界ザルのマントヒヒやブラッサモンキーでは、結腸に軽微な病変が観察されたのみであった。肝臓と脾臓は、リスザルでは小型の針頭大白色結節が多発していたが、類人猿の結節性病変はより大型で、膿瘍を形成していた。また、旧世界ザルではほとんど著変はみられなかった。以上の病変は、リスザルでは、感受性が高いヒトの乳幼児や年少児の病態と類似し、類人猿はより抵抗性が強い、成人にみられる肝膿瘍を伴う回盲部病変型と一致していた。一方、旧世界ザルのマントヒヒやブラッサモンキーでは病変は目立たず、結腸にクレーター状の潰瘍性病変が少数観察されるのみで、肝臓と脾臓の結節性病変もほとんど観察されなかった。また、リスザルでも抗生物質を投与していた個体では、パイエル板の病変は、わずかに腫大し潮紅するのみで、典型的なエルシニア症の病変を形成しない症例もみられた。抗生物質を投与していた個体からの *Yersinia* 属菌の分離はときに困難で、肉眼および病理組織学的にエルシニア症を疑い、免疫染色で *Yersinia* を検出しても、微生物学的に *Yersinia* 属菌が分離されない事例もあったことから、実際には、我が国の飼育施設に、さらに広く病原性 *Yersinia* が浸淫していると考えられる。以上のことから、斃死サルに腸間膜リンパ節の腫大や脾腫がみられたときには、エルシニア症を疑い、慎重に診断を行う必要があると考えられる。

菌種、血清型ならびに保有病原遺伝子の種類による病変の相違

を検討した結果、*Y. pseudotuberculosis* の各血清型（1b、2b、3、4b、6 および 7）と *Y. enterocolitica* O3 では病変に違いはみられなかった。しかし、*Y. pseudotuberculosis* 感染症と比べて、*Y. enterocolitica* O8 感染症では、化膿性変化が強く、頸部膿瘍を伴う大型の膿瘍を諸臓器に形成していた。また、前者では下痢などの症状が観察されることは少なく、半数以上の症例が突然死であるのに対して、後者の例では、リスザル 50 頭中 20 頭（40.0%）で下痢が確認されたことから、サル類に対しては、*Y. enterocolitica* のうちで最も強毒とされる O8 よりも *Y. pseudotuberculosis* の方が、病原性が強いと思われた。また、その要因として、我が国を含む極東地域で分離される *Y. pseudotuberculosis* が保有しているスーパー抗原である YPM 産生性の違いによる可能性が示唆された。しかし、*Y. enterocolitica* のうちで弱毒である O3 の 1 症例は、*Y. pseudotuberculosis* 感染症と同等の病変が観察された。O3 の症例は、分娩直後の衰弱状態での発症であったことから、妊娠により免疫が低下していたために、容易に発症しやすい状態であったと考えられる。リスザルから分離された *Y. pseudotuberculosis* について、PCR 法により病原遺伝子の保有状況を調査した結果、13 株中全例が、病原性プラスミドの *virF* 遺伝子と腸管粘膜上皮への侵入に関与する *inv* 遺伝子を保有し、12 株では、スーパー抗原活性を有する YPMa をコードする *ypmA* 遺伝子を保有していた。スーパー抗原である YPMa は、我が国を含む極東地域で分離される *Y. pseudotuberculosis* から高率に分離される一方、ヨーロッパではその分離率は低い。ヒトの症例では、欧米と比較して我が国のヒト

のエルシニア症が、胃腸炎に留まらずに多彩な症状を呈することに、YPMa が関与していることが指摘されている。しかし、*ypmA* 陰性であった 1 例のリスザルでは、*ypmA* 遺伝子を保有するその他の 12 症例と同等の病変が観察され、病変に違いはみられなかった。以上のことから、サル類のエルシニア症の発症は、菌種や血清型ならびに *ypmA* 遺伝子の有無による相違だけでなく、サル類の種や年齢、個体の状態や基礎的疾患の有無などによる免疫能の差にも左右されるものと考えられた。

今回の調査の結果、リスザルは病原性 *Yersinia* に対して特に感受性が高いことが明らかとなった。リスザルは、飼育施設数および 1 群あたりの飼育頭数がともに多いこととも関連があるかもしれないが、リスザルと同様、我が国で多数飼育されているニホンザルでは、エルシニア症の報告はこれまで 1 例しかなく、自験例でも 40 頭の病性鑑定を実施したが、エルシニア症は確認されなかった。また、欧米諸国ではリスザルと同様、新世界ザルのマーモセットやタマリン類も感受性が高く、多くの感染例が報告されているが、今回の調査では、これらのサル類にエルシニア症は確認されなかった。以上のことから、サル類の種や年齢によって病原性 *Yersinia* に対する感受性は異なり、また複数の菌種および様々な血清型が分離され、またその病原遺伝子の保有状況も様々であることから、今後も症例を蓄積し、サル類の種による感受性の違いおよびその病態の比較、分離菌の菌種、血清型および保有病原因子による病変の違いを明らかにしていく必要がある。さらに、飼育下サル類のエルシニア症の感染メカニズムを解明するために、疫学調査を継続してい

く必要がある。

第 2 章では、サル類のエルシニア症のコントロールを目的とした、有効なワクチンの開発ならびにワクチン開発のための基礎的研究として、病原性 *Yersinia* が共通して産生する菌体外膜タンパク質である *Yersinia Adhesin A* (YadA) に着目して、YadA が病原性 *Yersinia* の感染防御抗原として機能しているかどうかについて、マウスを用いて感染防御実験を行って検討した。

まず、3 週齢の雄、BALB/c マウスに免疫原として、1. Yops、2. 37°C 培養死菌 (YadA 低発現)、3. 25°C 培養死菌 (YadA、Yops 発現なし)、4. YadA 死菌 (YadA 強発現)、5. PBS (陰性対照群) を 1 週間間隔で 2 回、皮下あるいは経口接種 (各群 5 匹) し、さらにその 1 週間後に 10^9 の *Y. pseudotuberculosis* 4b 生菌を経口接種した。その結果、9 日目に陰性対照群、10 日目に Yops 皮下接種群と 25°C 死菌経口接種群、11 日目に 37°C 死菌経口接種群と 25°C 死菌皮下接種群、14 日目に Yops 経口接種群の全頭が死亡した。一方、YadA 死菌皮下接種群 5 匹中 5 匹 (100%)、YadA 死菌経口接種群 5 匹中 3 匹 (60%) ならびに 37°C 死菌皮下接種群 5 匹中 2 匹 (40%) が感染に耐過し、生残した。免疫原接種後の血清抗体の測定の結果、YadA 死菌に対する血清 IgG は、YadA 死菌皮下接種群、37°C 死菌皮下接種群、YadA 死菌経口接種群と 37°C 死菌経口接種群および 25°C 死菌皮下接種群の順に、経時的に血清抗体の上昇が確認されたが、Yops 経口および皮下接種群と陰性対照群では血清抗体は検出されなかった。Yops に対する血清 IgG は、Yops 皮下接種群でのみ

検出された。以上の結果から、YadA 死菌を免疫原として皮下接種することで、*Y. pseudotuberculosis* 感染による死亡を 100%免れることが明らかとなった。また、死亡を阻止するには、YadA 死菌に対する血清抗体が上昇している必要があり、Yop 抗体のみでは死亡を阻止できないことが明らかとなった。*Y. pseudotuberculosis* は経口感染することから、免疫原を皮下接種することにより全身免疫を誘導するよりも、経口接種することで、腸管の局所免疫と全身免疫の双方を誘導させたほうが効果的であると考えられたが、YadA 死菌の経口接種では、効果が不十分であった。その原因として、胃酸や消化酵素により、抗原認識部位であるパイエル板に到達する抗原量が少なくなったと考えられた。

次に、YadA 死菌に着目してより詳細に感染防御実験を行った。マウスを各群 10 匹ずつ、1. YadA 死菌単回皮下接種、2. YadA 死菌 2 回皮下接種、3. YadA 死菌 2 回経口接種および 4. 陰性対照群 (PBS 投与) に分け、単回接種群は死菌接種 1 週間後に生菌接種、2 回接種群は 1 週間間隔で 2 回接種し、その 1 週間後に生菌を経口接種した。その結果、陰性対照群の 10 匹中 8 匹 (80%)、単回皮下接種群の 10 匹中 1 匹 (10%) が死亡したが、2 回皮下接種群および 2 回経口接種群は 100%耐過生残した。対照群の半数が死亡した時点で、各免疫原接種群の半数ずつを解剖し、病変を比較した結果、パイエル板、腸間膜リンパ節および脾臓の腫大はいずれの群でも全例で確認されたが、結節性病変は、対照群全例の肝臓と脾臓、単回皮下接種群 4 匹中 1 匹 (25%) の肝臓と脾臓、2 回経口接種群 5 匹中 4 匹 (80%) の脾臓および 5 匹中 2 匹 (40%) の肝臓にみられた。

一方、2回皮下接種群では、結節性病変はいずれの臓器にも観察されなかった。生菌接種後、3日目から全ての群のマウスに毛並みの悪化、軟便あるいは下痢の排泄が認められたが、体重の減少および糞便中への排菌量は、2回皮下接種群、2回経口接種群と単回皮下接種群、陰性対照群の順に軽度であった。以上の結果から、YadA死菌の皮下接種では、100%死亡を免れることができ、肝臓や脾臓に結節性病変が観察されなかったが、体重の減少や糞便中への菌の排泄は認められたことから、感染を完全には阻止できないと考えられた。その原因として、YadA死菌は皮下接種であることから、腸管局所における粘膜免疫の誘導が不十分であると考えられる。

次に、YadA死菌を2回皮下あるいは経口接種により免疫を賦与後、生菌を経口接種して、経時的(8h、24h、3日、5日、7日)に各臓器における病変、菌の動態ならびに菌数の推移を観察した。その結果、病変形成、菌の動態、菌数の推移は、いずれの群でも同様の経過で観察されたが、その程度は、YadA皮下接種群、YadA経口接種群、陰性対照群の順に軽度であった。生菌接種7日目では、YadA死菌皮下接種群では病変が軽減され、菌もほとんど検出されなかったが、YadA死菌経口接種群と陰性対照群では、病変が観察され、菌も多数検出された。以上の結果から、YadA死菌の皮下接種により、*Y. pseudotuberculosis*の経口感染による死亡を100%阻止できることが明らかとなり、YadA死菌の有効性が示された。しかし、皮下接種による全身投与であることから、腸管での局所の感染は阻止できず、毛並みの悪化、体重減少、食欲低下、下痢などの臨床症状が観察され、陰

性対照群と比較して軽度ではあったが、パイエル板を含む腸管、腸間膜リンパ節、脾臓および肝臓に菌塊を含む壊死性病変が観察された。しかし、YadA 死菌の皮下接種により、上記の臓器から、より早期に菌を排除することで病変が軽減され、重篤な感染による死亡を免れたと考えられた。今後は、YadA による感染防御効果をより詳細に観察するため、YadA を効果的に精製する方法を検討していく必要がある。さらに、皮下接種では腸管局所の感染を完全には防御できないことから、腸管局所ならびに全身免疫における二段構えの免疫を誘導できる、効果的な経口ワクチンを開発していく必要があると考えられる。

第3章では、YadA 死菌をワクチンとして用いて、飼育下リスザルを対象に、複数の飼育施設において *Y. pseudotuberculosis* ワクチンの野外臨床実験を実施した。2004年～2009年の間に、エルシニア症が流行している7施設と発生のない4施設のリスザル延べ1092頭に、年1回ワクチンを皮下接種した。あわせて、血清調査により、飼育下リスザルにおける病原性 *Yersinia* の浸淫状況を明らかにするとともに、血清抗体の経時的な推移や、ワクチン接種前後のエルシニア症の発生状況などから、YadA 死菌のワクチンとしての有効性を検討し、さらに、リスザルのエルシニア症の流行機序の解明を試みた。

はじめに、リスザル飼育施設における病原性 *Yersinia* の浸淫状況を明らかにするために、病原性 *Yersinia* が共通して産生する病原因子である Yops に対する血清抗体を測定し、抗体保有状況を調査した。その結果、エルシニア症の発生経験をもつ8施設では、いずれも血清抗体保有率は高く(62.5～100%)、一方、これまでエルシニア症が

発生したことの無い4施設では、いずれも Yops に対する OD 値は低く(0～36.4%)、抗体保有率は、エルシニア症流行施設よりも有意に低かった($p < 0.05$)。

次に、エルシニア症流行施設である E 施設と A 施設のリズガルについて、年齢別に Yop 抗体の保有状況および経年的な変化を調査した結果、いずれの施設でも、1歳未満の個体で抗体陰性率が高く、2年目以降に多くは陽転する傾向にあり、成体における抗体陽性率は1歳未満の個体に比べて、有意に高かった($p < 0.05$)。エルシニア症が流行している E 施設と流行のない P 施設のリズガルについて、Yops ならびに YadA に対する血清抗体価を測定し、ワクチン接種後の抗体の推移を比較した結果、いずれの施設においても、ワクチン初回接種時では Yops および YadA に対する血清抗体はともに陰性であったが、YadA に対する血清抗体は、ワクチンを接種した翌年には、P 施設の1頭を除いていずれの個体も陽性に転じた。一方、Yops に対する血清抗体は、個体により上昇する時期や値が様々であり、E 施設では2年目に11頭中4頭が陽転し、4年目には全頭が陽性となった。P 施設では、2005年～2007年までは1頭を除いて、成体を含めて Yops 抗体は陰性であったが、2009年には全頭が陽性となった。

ワクチン接種を開始した結果、エルシニア症が流行している7施設のうち4施設と全ての非流行群では、エルシニア症の発生はなかった。また、エルシニア症の発生があった3施設でも発生回数および罹患頭数は激減し、発症個体は、分娩直後の衰弱個体の1頭を除いて、1歳未満のワクチン未接種あるいは血清抗体陰性の個体に限られてい

た。また、E 施設では、2009 年のワクチン接種時に、リスザル 96 頭中 10 頭 (10.4%) から、病原性プラスミドを保有する *Y. enterocolitica* O5 が分離されたにも関わらず、下痢などの症状を呈する個体はみられず、エルシニア症の流行もなかった。

以上の結果から、YadA 死菌は、飼育下リスザルのエルシニア症の発生を予防するのに有効であると考えられた。第 2 章の実験結果とあわせると、ワクチンは皮下接種であるため、病原性 *Yersinia* の全身感染による致死を防ぐことはできるが、主たる感染経路は経口感染であることから、腸管における局所免疫は十分に誘導されず、腸管感染は完全には阻止できないと考えられた。リスザルから分離された *Y. pseudotuberculosis* は、92.3% が *ypmA* 遺伝子を保有する強毒株であったが、我が国の環境中には、*ypmA* 遺伝子を保有しない、病原性の低い *Y. pseudotuberculosis* も広く分布していることが知られており、本研究でも、ワクチンを接種している 1 施設でリスザルの糞便から、病原性 *Yersinia* の中でも弱毒とされている *Y. enterocolitica* O5 が 10.4% の割合で分離されたが、発症例、致死例ともにみられなかった。以上のことから、YadA 死菌をワクチンとして皮下接種したリスザル飼育施設では、YadA 死菌の接種により、病原性 *Yersinia* の重篤な感染による敗血症化および致死を防ぐとともに、病原性の低い弱毒の *Yersinia* の自然感染によって、エルシニア症の発症を防御するために有効な血清抗体が維持されている可能性が示唆された。本研究により、YadA 死菌が、リスザルに対する病原性 *Yersinia* のワクチンとして有効であることが示されたが、飼育施設におけるワクチネーションを実施す

るためには、サル類を捕獲して、吸入麻酔などの処置を行う必要があり、捕獲や麻酔等により事故死する危険性がある。今後はワクチンの接種がより簡便で、安全性が高い経口ワクチンの開発が望まれる。

本研究では、現在ほとんど研究されていない我が国の飼育施設におけるサル類のエルシニア症の発生実態を、病理学的、疫学的および免疫学的に明らかにして、その基礎的な知見を集積し、飼育下リスザルのエルシニア症の発生予防に有効なワクチンの開発を試みた。飼育下サル類のエルシニア症は、サル類飼育管理上の重要な問題であるのみならず、公衆衛生上の観点からも看過できない問題であり、本研究で得られた成果は、動物だけでなく、ヒトのエルシニア症の感染予防対策を確立する上でも貴重な知見を提供しうるものであると考える。

謝 辞

本研究において、終始懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました麻布大学獣医学部病理学研究室 宇根有美教授、代田欣二教授、野村靖夫名誉教授、上家潤一講師、麻布大学獣医学部小動物臨床研究室 斑目広郎教授、また実験の遂行や論文作成に当たり、実験場所の提供や適切なお助言を賜った東京農工大学農学部獣医学科獣医衛生学研究室 林谷秀樹准教授、麻布大学獣医学部公衆衛生学第二研究室 加藤行男准教授ならびに岡谷友三アレシャンドレ講師、論文作成に当たり、適切なお助言を賜った麻布大学病理学研究室共同研究員の後藤俊二先生また本研究を遂行するに当たり全面的にご協力をいただいた各動物園の獣医師、飼育係、その他の関係者の方々に深甚なる謝意を表します。最後に、研究生活を通して常にあたたかく励ましていただき、ご協力をいただいた麻布大学獣医学部病理学研究室の学生各位に深謝いたします。

参考文献

1. Allchurch, A. F. 2003. Yersiniosis in all taxa. In: *Zoo and wild animal medicine*, 5th Edit., ME Fowler and RE Miller, Eds, Saunders, Philadelphia, pp. 724-727.
2. Abe, J., Onimaru, M., Matsumoto, S., Noma, S., Baba, K., Ito, Y., Kohsaka, T., Takeda, T. 1997. Clinical role for a superantigen in *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *J. Clin. Invest.* **99**:1823-1830.
3. Abe, J., Takeda, T., Watanabe, Y., Nakao, H., Kobayashi, N., Leung, D. Y., Kohsaka, T. 1993. Evidence for superantigen production by *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Immunol.* **151**:4183-4188.
4. Anderson, G. W. Jr., Leary, S. E., Williamson, E. D., Titball, R. W., Welkos, S. L., Worsham, P. L., Friedlander, A. M. 1996. Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by F1-capsule-positive and -negative strains of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* **64**:4580-4585.
5. Autenrieth, S. E., Autenrieth, I. B. 2008. *Yersinia enterocolitica*: subversion of adaptive immunity and implications for vaccine development. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**:69-77.

6. 馬場智成 . 2004. リスザル (*Saimiri sciureus*) の *Yersinia pseudotuberculosis* 感染症に対するワクチン開発に関する基礎的研究. 麻布大学獣医学科卒業論文.
7. Baggs, R. B., Hunt, R. D., Garcia, F. G., Hajema, E. M., Blake, B. J., Fraser, C. E. O. 1976. Pseudotuberculosis (*Yersinia enterocolitica*) in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *Lab. Anim. Sci.* **26**:1079-1083.
8. Balada-Llasat, J. M., Panilaitis, B., Kaplan, D., Mecsas, J. 2007. Oral inoculation with Type III secretion mutants of *Yersinia pseudotuberculosis* provides protection from oral, intraperitoneal, or intranasal challenge with virulent *Yersinia*. *Vaccine.* **25**:1526-1533.
9. Baskin, G. B. 1980. Comparative aspects of *Yersinia pseudotuberculosis* infection in animals. In: *The comparative pathology of zoo animals : proceedings of a symposium held at the National Zoological Park, Smithsonian Institution, October 2-4, 1978.*, OC Montali, Eds, Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 219-229.
10. Baskin, G. B., Montali, R. J., Bush, M., Quan, T. J., Smith, E.

1977. Yersiniosis in captive exotic mammals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **171**:908-912.
11. Bengoechea, J. A., Najdenski, H., Skurnik, M. 2004. Lipopolysaccharide O antigen status of *Yersinia enterocolitica* O:8 is essential for virulence and absence of O antigen affects the expression of other *Yersinia* virulence factors. *Mol. Microbiol.* **52**:451-469.
 12. Bielli, M., Lauzi, S., Pratelli, A., Martini, M., Dall'Ara, P., Bonizzi, L. 1999. Pseudotuberculosis in marmosets, tamarins, and Goeldi's monkeys (Callithrichidae/Callimiconidae) housed at a European zoo. *J. Zoo Wildl. Med.* **1**:532-536.
 13. Bliska, J. B., Falkow, S. 1992. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**:3561-3565.
 14. Blisnick, T., Ave, P., Huerre, M., Carniel, E., Demeure, C. E. 2008. Oral vaccination against bubonic plague using a live avirulent *Yersinia pseudotuberculosis* strain. *Infect. Immun.* **76**:3808-1816.
 15. Bourdin M. 1979. Pseudotuberculosis in man: possible

- epidemiological role of the cats. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **1**:243-251.
16. Brack, M., Gatesman, T. J. 1991. *Yersinia pseudotuberculosis* in new world monkeys. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **104**:4-7.
17. Bresnahan, J. F., Whitworth, U. G., Hayes, Y., Summers, E., Pollock, J. 1984. *Yersinia enterocolitica* infection in breeding colonies of ruffed lemurs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **185**:1354-1356.
18. Brittingham, M. C., Temple, S. A., Duncan, R. M. 1988. A survey of the prevalence of selected bacteria in wild birds. *J. Wildl. Dis.* **24**:299-307.
19. Bronson, R., T., May, B. D., Ruebner, B. H. 1991. An outbreak of infection by *Yersinia pseudotuberculosis* in nonhuman primates. *Am. J. Pathol.* **69**:289-308.
20. Brubaker, R. R. 2003. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to *Yersinia*: roles of Yops and LcrV (V antigen). *Infect. Immun.* **71**:3673-3681.

21. Bubeck, S. S., Dube, P. H. 2007. *Yersinia pestis* CO92 delta yopH is a potent live, attenuated plague vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* **14**:1235-1238.
22. Bühler, O. T., Wiedig, C. A., Schmid, Y., Grassl, G. A., Bohn, E., Autenrieth, I. B. 2006. The *Yersinia enterocolitica* invasin protein promotes major histocompatibility complex class I- and class II-restricted T-cell responses. *Infect. Immun.* **74**:4322-4329.
23. Buhles, W. C., Vanderlip, J. E. Jr., Russell, S. W., Alexander, N. L. 1981. *Yersinia pseudotuberculosis* infection: study of an epizootic in squirrel monkeys. *J. Clin. Microbiol.* **13**:519-525.
24. Carniel, E. 1999. The *Yersinia* high-pathogenicity island. *Int. Microbiol.* **2**:161-167.
25. Carter, P. B. 1975. Animal model of human disease. *Yersinia* enteritis. Animal model: oral *Yersinia enterocolitica* infection of mice. *Am. J. Pathol.* **81**:703-706.
26. Carter, P. B. 1975. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. *Infect. Immun.* **11**:164-170.

27. Carter, P. B., Varga, C. F., Keet, E. E. 1973. New strain of *Yersinia enterocolitica* pathogenic for rodents. *Appl. Microbiol.* **26**:1016-1018.
28. Chang, J., Wagner, J. L., Kornegay, R. W. 1980. Fatal *Yersinia pseudotuberculosis* infection in captive bushbabies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **177**:820-821.
29. Chen, W., Patel, G. B., Yan, H., Zhang, J. 2010. Recent advances in the development of novel mucosal adjuvants and antigen delivery systems. *Hum. Vaccin.* **6**. [Epub ahead of print].
30. Corbel, M. J., Brewer, R. A., Hunter, D. 1990. Characterisation of *Yersinia enterocolitica* strains associated with ovine abortion. *Vet. Rec.* **127**:526-527.
31. Corbel, M. J., Ellis, B., Richardson, C., Bradley, R. 1992. Experimental *Yersinia enterocolitica* placentitis in sheep. *Br. Vet. J.* **148**:339-349.
32. Cornelis, G. R. 2002. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J. Cell Biol.* **158**:401-408.

33. Cornelis, G. R., Boland, A., Boyd, A. P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M. P., Stainier, I. 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**:1315-1352.
34. Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U., Cornelis, G. R. 2010. Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J.* **29**:1928-1940.
35. Eitel, J., Dersch, P. 2002. The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed. *Infect. Immun.* **70**:4880-4891.
36. El Tahir, Y., Skurnik, M. 2001. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int J Med Microbiol.* **291**:209-218.
37. Falcão, J. P., Falcão, D. P., Pitondo-Silva, A., Malaspina, A. C., Brocchi, M. 2006. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. *J. Med. Microbiol.* **55**:1539-1548.

38. Fredriksson-Ahomaa, M., Korkeala, H. 2003. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**:220-229.
39. Fredriksson-Ahomaa, M., Naglic, T., Turk, N., Seol, B., Grabarević, Z., Bata, I., Perkovic, D., Stolle, A. 2007. Yersiniosis in zoo marmosets (*Callitrix jacchus*) caused by *Yersinia enterocolitica* 4/O:3. *Vet. Microbiol.* **121**:363-367.
40. Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., Siitonen, A., Korkeala, H. 2006. Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O : 3 originate mainly from pigs. *J. Med. Microbiol.* **55**:747-749.
41. Frey, J. 2007. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine.* **25**:5598-5605.
42. 深谷裕子, 木村智子, 秋葉容子, 清宮庸子, 山口マリ子, 石川允郎, 大道正義, 2002. 飼育ザルに認められた *Yersinia pseudotuberculosis* 感染例. 第14回地方衛生研究会全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会.

43. 福島博. 1987. 家畜および愛玩動物におけるエルシニア属菌の保菌実態. 獣医畜産新報. **796**:694-698.
44. 福島博. 2009a. *Yersinia enterocolitica*. 仲西寿男, 丸山務編. 食品由来感染症と食品微生物. pp.315-334. 中央法規出版, 東京.
45. 福島博. 2009b. *Yersinia pseudotuberculosis*. 食品由来感染症と食品微生物. pp.335-346. 中央法規出版, 東京.
46. Fukushima, H. 1985. Direct isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:710-712.
47. Fukushima, H., Gomyoda, M. 1991a. Intestinal carriage of *Yersinia pseudotuberculosis* by wild birds and mammals in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1152-1155.
48. Fukushima, H., Gomyoda, M., Ishikura, S., Nishio, T., Moriki, S., Endo, J., Kaneko, S., Tsubokura, M. 1989a. Cat-contaminated environmental substances lead to *Yersinia pseudotuberculosis* infection in children. *J. Clin. Microbiol.* **27**:2706-2709.
49. Fukushima, H., Gomyoda, M., Kaneko, S. 1990. Mice and moles

- inhabiting mountainous areas of Shimane Peninsula as sources of infection with *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2448-2455.
50. Fukushima, H., Gomyoda, M., Kaneko, S. 1991b. Wild animals as the source of infection with *Yersinia pseudotuberculosis* in Shimane Prefecture, Japan. *Contrib Microbiol Immunol.* **12**:1-4.
51. Fukushima, H., Gomyoda, M., Shiozawa, K., Kaneko, S., Tsubokura, M. 1988. *Yersinia pseudotuberculosis* infection contracted through water contaminated by a wild animal. *J Clin Microbiol.* **26**:584-585.
52. Fukushima, H., Nakamura, R., Iitsuka, S., Tsubokura, M., Otsuki, K., Kawaoka, Y. 1984a. Prospective systematic study of *Yersinia* spp. in dogs. *J. Clin. Microbiol.* **19**:616-622.
53. Fukushima, H., Nakamura, R., Ito, Y., Saito, K., Tsubokura, M., Otsuki, K. 1984b. Ecological studies of *Yersinia enterocolitica*. II. Experimental infection with *Y. enterocolitica* in pigs. *Vet.. Microbiol.* **9**:375-381.

54. 福島博, 丸山務, 金子賢一, 井上正直.. 1989b. エルシニア感染症およびエルシニアの生態. 日獣会誌. **42**:829-840.
55. Fukushima, H., Matsuda, Y., Seki, R., Tsubokura, M., Takeda, N., Shubin, F. N., Paik, I. K., Zheng, X. B. 2001. 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.
56. Gaede, K., Mack, D., Heesemann, J. 1992. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rats: analysis of the immune response to plasmid-encoded antigens of arthritis-susceptible Lewis rats and arthritis-resistant Fischer rats. *Med. Microbiol. Immunol.* **181**:165-172.
57. Gasper, P. W. and Watson, R. P. 2000. Plaque and Yersiniosis. In: Infectious diseases of wild mammals, 3rd Edit., ES Williams and IK Barker, Eds, Wiley-Blackwell, Hodoken, pp. 313-328.
58. Gómez, E., Chimeno, Zoth. S., Carrillo, E., Estela, Roux. M., Berinstein, A. 2008. Mucosal immunity induced by orally administered transgenic plants. *Immunology.* **213**:671-675.

59. Greene, C. E. 1998. Yersinosis. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 2nd Edit., CE Green, Eds, Saunders, Philadelphia, pp. 241-242.
60. Griner, L. A. 1980. Bacterial diseases of zoo animals: A need for improved diagnosis. In: *The comparative pathology of zoo animals : proceedings of a symposium held at the National Zoological Park, Smithsonian Institution, October 2-4, 1978.*, RJ Montali, Eds, Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 195-217.
61. Grützkau, A., Hanski, C., Hahn, H., Riecken, E. O. 1990. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut*. **31**:1011-1015.
62. Hamasaki, S., Hayashidani, H., Kaneko, K., Ogawa, M., Shigeta, Y. 1989. A survey for *Yersinia pseudotuberculosis* in migratory birds in coastal Japan. *J. Wildl. Dis.* **25**:401-403.
63. Han, T. H., Paik, I. K., Kim, S. J. 2003. Molecular

- relatedness between isolates *Yersinia pseudotuberculosis* from a patient and an isolate from mountain spring water. *J Korean Med Sci.* **18**:425-428.
64. Han, Y. W., Miller, V. L. 1997. Reevaluation of the virulence phenotype of the *inv yadA* double mutants of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* **65**:327-330.
65. Hannam, D. A. 1993. Bovine abortion associated with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Vet. Rec.* **133**:372.
66. Hanski, C., Kutschka, U., Schmoranzler, H. P., Naumann, M., Stallmach, A., Hahn, H., Menge, H., Riecken, E. O. 1989. Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect. Immun.* **57**:673-678.
67. Hanski, C., Naumann, M., Hahn, H., Riecken, E. O. 1989. Determinants of invasion and survival of *Yersinia enterocolitica* in intestinal tissue. An in vivo study. *Med. Microbiol. Immunol.* **178**:289-296.

68. Hanssen, I. 1982. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in captive black grouse (*Tetrao lyururus*) and willow ptarmigan (*Lagopus l. lagopus*). *Acta Vet Scand.* **23**:622-623.
69. Harcourt-Brown, N. H. 1978. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in birds. *Vet. Rec.* **102**:315.
70. 橋崎文隆, 田坂清, 平松廣, 七里茂美, 矢部知子, 神埼政子. 1993. 多摩動物公園のチンパンジーに発生した *Yersinia pseudotuberculosis* 感染症. 動水誌. **34**:71-79.
71. Hayashidani, H., Ohtomo, Y., Toyokawa, Y., Saito, M., Kaneko, K. 1995. Potential sources of sporadic human infection with *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 in Aomori Prefecture, Japan. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1253-1257.
72. Heesemann, J., Gross, U., Schmidt, N., Laufs, R. 1986. Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect. Immun.* **54**:561-567.
73. Heesemann, J., Schroder, J., Ulrich, M. 1988. Analysis of the class-specific immune response to *Yersinia*

- enterocolitica* virulence-associated antigens in oro-gastrically infected rabbits. *Microb. Pathog.* **5**:437-447.
74. Heesemann, J., Sing, A., Trülzsch, K. 2006. *Yersinia*'s stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:55-61.
75. Hirai, K., Suzuki, Y., Kato, N., Yagami, K., Miyoshi, A., Mabuchi, Y. 1974. *Yersinia pseudotuberculosis* infection occurred spontaneously in a group of Patas monkeys (*Erythrocebus patas*). *Jap. J. Vet. Sci.* **36**:351-355.
76. Hoiczky, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A., Heesemann, J. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.* **19**:5989-5999.
77. 堀坂知子. 2004. 病原性 *Yersinia enterocolitica* および *Yersinia pseudotuberculosis* の迅速検出法の開発. 岐阜大学大学院連合獣医学研究科博士論文.
78. Hubbert, W. T. 1972. Yersiniosis in mammals and birds in the United States: case reports and review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **21**:458-463.

79. Hudson, K. J., Bouton, A. H. 2006. *Yersinia pseudotuberculosis* adhesins regulate tissue-specific colonization and immune cell localization in a mouse model of systemic infection. *Infect. Immun.* **74**:6487-6490.
80. Ichinohe, H., Yoshioka, M., Fukushima, H., Kaneko, S., Maruyama, T. 1991. First isolation of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **29**:846-847.
81. Iinuma, Y., Hayashidani, H., Kaneko, K., Ogawa, M., Hamasaki, S. 1992. Isolation of *Yersinia enterocolitica* serovar O8 from free-living small rodents in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **30**:240-242.
82. Inoue, M., Nakashima, H., Mori, T., Sakazaki, R., Tamura, K., Tsubokura, M. 1991. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in the mountain area. *Contrib Microbiol Immunol.* **12**:307-310.
83. Isberg, R. R., Voorhis, D. L., Falkow, S. 1987. Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell.*

50:769-778.

84. 岩田剛敏. 2008. 飼育サルにおけるエルシニア症の疫学とその予防に関する研究. 岐阜大学大学院連合獣医学研究科博士論文.
85. Iwata, T., Une, Y., Lee, K., Nakamura, S., Taniguchi, T., Hayashidani, H. 2010. Seroepidemiological survey of pathogenic *Yersinia* in breeding squirrel monkeys in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **72**:981-984.
86. Iwata, T., Une, Y., Okatani, A. T., Kaneko, S., Namai, S., Yoshida, S., Horisaka, T., Horikita, T., Nakadai, A., Hayashidani, H. 2005. *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 infection in breeding monkeys in Japan. *Microbiol. Immunol.* **49**:1-7.
87. Iwata, T., Une, Y., Okatani, A. T., Kato, Y., Nakadai, A., Lee, K., Watanabe, M., Taniguchi, T., Elhelaly, A. E., Hirota, Y., Hayashidani, H. 2008. Virulence characteristics of *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from breeding monkeys in Japan. *Vet. Microbiol.* **129**:404-409.

88. 泉川公一, 河野茂. 1999. エルシニア感染症. 臨床と研究. **76**:84-87.
89. Jerrett, I. V., Slee, K. J. 1989. Bovine abortion associated with *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Vet. Pathol.* **26**:181-183.
90. Kageruka, P., Mortelmans, J., Vercruyssen, J. and Beernaert-Declercq, C., 1976. Pseudotuberculosis in the Antwerp zoo. *Acta. Zool. Pathol. Antwerp.* **66**:111-120.
91. Kageyama, T., Ogasawara, A., Fukuhara, R., Narita, Y., Miwa, N., Kamanaka, Y., Abe, M., Kumazaki, K., Maeda, N., Suzuki, J., Gotoh, S., Matsubayashi, K., Hashimoto, C., Kato, A., Matsubayashi, N. 2002. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in breeding monkeys: detection and analysis of strain diversity by PCR. *J. Med. Primatol.* **31**:129-135.
92. 金子誠二. 1987. *Yersinia enterocolitica* および *Yersinia pseudotuberculosis* の培養特性と病原性状. 獣医畜産新報告. **796**:678-682.
93. Kaneko, K., Hashimoto, N. 1983. Cross-resistance to

- fecal excretion of *Yersinia enterocolitica* in mice by oral vaccination of killed cells. *Infect. Immun.* **40**:1223-1225.
94. Kaneuchi, C., Shibata, M., Kawasaki, T., Kariu, T., Kanzaki, M., Maruyama T. 1989. Occurrence of *Yersinia* spp. in migratory birds, ducks, seagulls, and swallows in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* **51**:805-808.
95. 菅野治重. 2009. 微生物検査 検査と技術. **37**:922-926.
96. Kano, H., Ito, Y., Matsuoka, K., Nakajima, T., Iwata, T., Kohsaka, T., Saito, H., Abe, J. 2004. Critical role of T cell migration in bacterial superantigen-mediated shock in mice. *Clin. Immunol.* **110**:159-171.
97. Kapperud , G. 1991. *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. *Int J Food Microbiol.* **12**:53-65.
98. Kapperud ,G., Olsvik, O. 1982. Isolation of enterotoxigenic *Yersinia enterocolitica* from birds in Norway. *J. Wildl. Dis.* **18**::247-248.
99. Kapperud, G., Rosef, O. 1983. Avian wildlife reservoir of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, *Yersinia* spp., and *Salmonella* spp. in Norway. *Appl Environ Microbiol.* **45**:375-380.

100. 片山望, 岸浩, 岡崎義三, 上田武利. 1968. 徳山市立動物園における仮性結核菌症の発生について. 動水誌. **11**:1-4.
101. Köberle, M., Klein-Günther, A., Schütz, M., Fritz, M., Berchtold, S., Tolosa, E., Autenrieth, I. B., Bohn, E. 2009. *Yersinia enterocolitica* targets cells of the innate and adaptive immune system by injection of Yops in a mouse infection model. *PLoS Pathog.* **5**:e1000551.
102. Kot, B., Blaszczyk, K., Kulawiec, U. 2005. The influence of environmental factors on survival of *Yersinia enterocolitica* O:3. *Polish J. Environ. studies.* **14**:371-374.
103. Kwaga, J., Iversen, J. O. 1993. Isolation of *Yersinia enterocolitica* (O:5,27 biotype 2) from a common garter snake. *J. Wildl. Dis.* **29**:127-129.
104. Langermann, S., Möllby, R., Burlein, J. E., Palaszynski, S. R., Auguste, C. G., DeFusco, A., Strouse, R., Schenerman, M. A., Hultgren, S. J., Pinkner, J. S., Winberg, J., Guldevall, L., Söderhäll, M., Ishikawa, K., Normark, S., Koenig, S. 2000. Vaccination with FimH adhesin protects cynomolgus monkeys from

- colonization and infection by uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **18**:774-778.
105. Langermann, S., Palaszynski, S., Barnhart, M., Auguste, G., Pinkner, J. S., Burlein, J., Barren, P., Koenig, S., Leath, S., Jones, C. H., Hultgren, S. J. 1997. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science.* **25**:607-611.
106. Lawrenz, M. B., Miller, V. L. 2007. Comparative analysis of the regulation of *rovA* from the pathogenic yersiniae. *J. Bacteriol.* **189**:5963-75.
107. Leary, S. E., Williamson, E. D., Griffin, K. F., Russell, P., Eley, S. M., Titball, R. W. 1995. Active immunization with recombinant V antigen from *Yersinia pestis* protects mice against plague. *Infect. Immun.* **63**:2854-2858.
108. Leibiger, R., Niedung, K., Geginat, G., Heesemann, J., Trülzsch, K. 2008. *Yersinia enterocolitica* Yop mutants as oral live carrier vaccines. *Vaccine.* **26**:6664-6670.
109. MacArthur, J. A. and Wood, M.. 1983. Yersiniosis in a breeding unit

- of *Macaca fascicularis* (cynomolgus monkeys). *Lab. Anim.* **17**:151-155.
110. Macleod, N. S., Patterson, I.A., Rogerson, F. 1992. *Yersinia pseudotuberculosis* and ovine abortion. *Vet. Rec.* **131**:84
111. Mair, N. S. 1973. Yersiniosis in wildlife and its public health implications. *J. Wildl. Dis.* **9**:64-71.
112. Mair, N. S., White, G. D., Schubert, F. K., Harbourne, J. K. 1970. *Yersinia enterocolitica* infection in the bush-baby (Galago). *Vet. Rec.* **86**:69-71.
113. Mäki, M., Vesikari, T., Rantala, I., Sundqvist, C., Grönroos, P. 1983. Pathogenicity of 42-44 Mdal plasmid positive and negative *Yersinia pseudotuberculosis* I and *Yersinia enterocolitica* 0:8 and 0:9 studied in the guinea pig eye model (Serény test). *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. B.* **91**:241-244.
114. Marra, A., Isberg, R. R. 1997. Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infect. Immun.* **65**:3412-3421.

115. Martinez, R. J. 1983. Plasmid-mediated and temperature-regulated surface properties of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **41**:921-930.
116. 丸山務. 1982. 人畜共通伝染病としてのエルシニア症. 日獣会誌. **35**:2-8.
117. 丸山務. 1987. 病原性エルシニア菌の生態とその感染症. 獣医畜産新報. **796**: 675-678.
118. 丸山務, 神崎政子, 田辺興記, 川崎泉, 平松廣, 斉藤和夫, 増井光子. 1983. 動物園のサルに発生した *Yersinia pseudotuberculosis* による集団感染例. 東京衛研年報. **34**:65-68.
119. Maruyama, T., Une, T., Zen-Yoji, H. 1979. Observations on the correlation between pathogenicity and serovars of *Yersinia enterocolitica* by the assay applying cell culture system and experimental mouse infection. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **5**:317-23.
120. McClure, H. M., Weaver, R. E., Kaufmann, A. F. 1971. Pseudotuberculosis in nonhuman primates: infection with organisms of the *Yersinia enterocolitica* group. *Lab. Anim.*

Sci. **21**:376-382.

121. Merhej, V., Adékambi, T., Pagnier, I., Raoult, D., Drancourt, M. 2008. *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**:779-84.
122. Mestecky, J., Nguyen, H., Czerkinsky, C., Kiyono, H. 2008. Oral immunization: an update. *Curr Opin Gastroenterol.* **24**:713-719.
123. Mittermeier, A. R., Wallis, J., Rylands, B. A., Ganzhorn, U. J., Oates, F. J., Williamson, A. E., Palacios, E., Heymann, W. E., Kierulff, M. C., Yongcheng, L., Supriatna, J., Roos, C., Walker, S., Cortes-Ortiz, L., Schwitzer, C. 2009. Primates in Peril: The world's 25 most endangered primates 200-2010. *Primate Conserv.* **24**:1-57.
124. 宮下実, 芦田貴雄. 2010. 動物園における展示動物の輸入条件とそれに関わる諸問題. 第19回サル類疾病ワークショップ講演要旨集.
125. 村田浩一. 1990. 動物園動物ならびに捕獲ネズミ類のエルスニア属菌保有状況調査. 動水誌. **3**:57-59.

126. 村田浩一, 浜夏樹. 1992. 飼育下のシロテナガザルとブラッザモンキーに認められた *Yersinia pseudotuberculosis* 感染例. 動水誌. **3**:58-61.
127. Nagano, T., M. Tsubokura. 1996. Serogroup of *Yersinia pseudotuberculosis* and related some problems. *J. Jap. Vet. Med. Assoc.* **49**:509-515.
128. Najdenski, H., Golkocheva-Markova, E., Kussovski, V., Vesselinova, A., Garbom, S., Wolf-Watz, H. 2008. Attenuation and preserved immunogenic potential of *Yersinia pseudotuberculosis* mutant strains evidenced in oral pig model. *Zoonoses Public Health.* **56**:157-168.
129. Najdenski, H., Vesselinova, A., Golkocheva, E., Garbom, S., Wolf-Watz, H. 2003. Experimental infections with wild and mutant *Yersinia pseudotuberculosis* strains in rabbits. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* **50**:280-288.
130. Nakamura, S., Hayashidani, H., Iwata, T., Namai, S., Une, Y. 2010. Pathological changes in captive monkeys with spontaneous yersiniosis due to infection by *Yersinia enterocolitica* serovar O8. *J. Comp. Pathol.* **143**:150-156.

131. Nakamura, S., Hayashidani, H., Iwata, T., Takada, M., Une, Y. 2009. Spontaneous Yersiniosis due to *Yersinia pseudotuberculosis* serotype 7 in a squirrel monkey. *J. Vet. Med. Sci.* **71**:1657-1659.
132. Naktin, J., Beavis, K. G. 1999. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Clin. Lab. Med.* **19**:523-536.
133. Nochi, T., Yuki, Y., Matsumura, A., Mejima, M., Terahara, K., Kim, D. Y., Fukuyama, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Kawaoka, Y., Kohda, T., Kozaki, S., Igarashi, O., Kiyono, H. 2007. A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses. *J. Exp. Med.* **12**:2789-2796.
134. Obwolo, M. J. 1976. A review of yersiniosis (*Yersinia pseudotuberculosis* infection). *Vet. Bull.* **46**:167-171.
135. Otsuka, Y., Okada, Y., Makino, S., Maruyama T. 1994. Isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* from city-living crows captured in a zoo. *J. Vet. Med. Sci.* **56**:785-786.
136. Otter, A. 1996. Ovine abortion caused by *Yersinia pseudotuberculosis*. *Vet. Rec.* **138**:143-144.

137. Parsons, R. 1991. Pseudotuberculosis at the Zoological society of London (1981 to 1987). *Vet. Rec.* **128**:130-132.
138. Pepe, J. C., Miller, V. L. 1993a. The biological role of invasin during a *Yersinia enterocolitica* infection. *Infect Agents Dis.* **2**:236-241.
139. Pepe, J. C., Miller, V. L. 1993b. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:6473-6477.
140. Philbey, A. W., Glastonbury, J. R., Links, I. J., Matthews, L. M. 1991. *Yersinia* species isolated from sheep with enterocolitis. *Aust. Vet. J.* **68**:108-110.
141. Pierce, R. L., Vorhies, M. W., Bicknell, E. J. 1973. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in a siberian tiger and a spider monkey. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **163**:547.
142. Plesler, R., Claros, M. 1992. A spontaneous *Yersinia pseudotuberculosis*-infection in a monkey-colony. *Zentralbl Veterinarmed B.* **39**:201-208.

143. Poelma, F. G., Borst, G. H. A., Zwart, P. 1977. *Yersinia enterocolitica* infections in non-human primates. *Acta Zool. Pathol. Antwerp.* **69**:3-9.
144. Rastawicki, W., Jakubczak, A. 2007. Serum immunoglobulin IgG subclass distribution of antibody responses to Yop proteins and lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* in Patients with Yersiniosis. *Polish J. Microbiol.* **56**:233-238.
145. Rastawicki, W., Szych, J., Gierczyński, R., Rokosz, N. 2009. A dramatic increase of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:8 infections in Poland. *Eur. J. of Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**:535-537.
146. Robins-Browne, R. M., Bordun, A. M., Slee, K. J. 1993. Serological response of sheep to plasmid-encoded proteins of *Yersinia* species following natural infection with *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. *J. Med. Microbiol.* **39**:268-272.
147. Roggenkamp, A., Geiger, A. M., Leitritz, L., Kessler, A., Heesemann, J. 1997. Passive immunity to infection with

- Yersinia* spp. mediated by anti-recombinant V antigen is dependent on polymorphism of V antigen. *Infect. Immun.* **65**:446-451.
148. Rosenberg, D. P., Lerche, N. W., Henrickson, R. V. 1980. *Yersinia pseudotuberculosis* in a group of *Macaca fascicularis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **177**:818-819.
149. Rosqvist, R., Skurnik, M., Wolf-Watz, H. 1988. Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. *Nature.* **334**:522-525.
150. Rüssmann, H., Gerdemann, U., Igwe, E. I., Panthel, K., Heesemann, J., Garbom, S., Wolf-Watz, H., Geginat G. 2003. Attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* carrier vaccine for simultaneous antigen-specific CD4 and CD8 T-cell induction. *Infect. Immun.* **71**:3463-3472.
151. Sakai, T., Nakayama, A., Hashida, M., Yamamoto, Y., Takebe, H. 2005. Outbreak of food poisoning by *Yersinia enterocolitica* serotype O8 in Nara prefecture: the first case report in Japan. *Jap. J. Infect. Dis.* **58**:257-258.

152. Salyers, A. A. and Whitt, D. D. 2002. *Yersinia pestis*, the cause of Plague, and its relatives. In: *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*, 2nd Edit., AA Salyers and DD Whitt, Eds, ASM Press, Washington, D. C. pp. 202-201.
153. Sanekata, T., Yoshikawa, N., Otsuki, K., Tsubokura, M. 1991. *Yersinia pseudotuberculosis* isolation from cockatoo. *J. Vet. Med. Sci.* **53**:121-122.
154. 佐々木綾, 島田章則, 栗倉毅, 梅村孝司, 永野哲司, 實方剛, 坪倉操. 1996. リスザルにおける *Yersinia pseudotuberculosis* 血清群 6 自然感染例の病変. 日獣会誌. **49**:819-821.
155. Schiemann, D. A. 1989. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In: Doyle, M. P. Ed, *Foodborne bacterial pathogens*, Marcel Dekker, New York, NY., pp.601-672.
156. Schiemann, D. A., Devenish, J. A., Toma, S. 1981. Characteristics of virulence in human isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **32**:400-403.
157. Schubert, S., Bockemuhl, J., Brendler, U., Heesemann, J. 2003. First isolation of virulent *Yersinia*

- enterocolitica* O8, biotype 1B in Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**:66-68.
158. Seimiya, Y. M., Sasaki, K., Satoh, C., Takahashi, M., Yaegashi, G., Iwane, H. 2005. Caprine enteritis associated with *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *J. Vet. Med. Sci.* **67**:887-890.
159. Shayegani, M., Stone, W. B., Deforge, I., Root, T., Parsons, L. M. 1986. *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from wildlife in New York State. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:420-424.
160. 塩沢寛治. 1987. 食品、水、環境における *Yersinia enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* の汚染実態. 獣医畜産新報. **796**:703-707.
161. Simonet, M., Berche, P., Mazigh, D., Veron, M. 1985. Protection against *Yersinia* infection induced by non-virulence-plasmid-encoded antigens. *J. Med. Microbiol.* **20**:225-231.
162. Sing, A., Reithmeier-Rost, D., Granfors, K., Hill, J.,

- Roggenkamp, A., Heesemann, J. 2005. A hypervariable N-terminal region of *Yersinia* LcrV determines Toll-like receptor 2-mediated IL-10 induction and mouse virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:16049-16054.
163. Sing, A., Rost, D., Tvardovskaia, N., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Kirschning, C. J., Aepfelbacher, M., Heesemann, J. 2002. *Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J. Exp. Med.* **196**:1017-1024.
164. Skavlen, P. A., Stills, H. F., Jr., Steffan, E. K., Middleton, C. C. 1985. Naturally occurring *Yersinia enterocolitica* septicemia in patas monkeys (*Erythrocebus patas*). *Lab. Anim. Sci.* **35**:488-490.
165. Skurnik, M. 1985. Expression of antigens encoded by the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* under different growth conditions. *Infect. Immun.* **47**:183-190.
166. Skurnik, M., el Tahir, Y., Saarinen, M., Jalkanen, S., Toivanen, P. 1994. YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal

- submucosa. *Infect. Immun.* **62**:1252-1261.
167. Skurnik, M., Wolf-Watz, H. 1989. Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol. Microbiol.* **3**:517-529.
168. Slee, K. J., Button, C. 1990a. Enteritis in sheep, goats and pigs due to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Aust. Vet. J.* **67**:320-322.
169. Slee, K. J., Button, C. 1990b. Enteritis in sheep and goats due to *Yersinia enterocolitica* infection. *Aust. Vet. J.* **67**:396-398.
170. Slee, K. J., Skilbeck, N. W. 1992. Epidemiology of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* infections in sheep in Australia. *J. Clin. Microbiol.* **30**:712-715.
171. Sory, M. P., Hermand, P., Vaerman, J. P., Cornelis, G. R. 1990. Oral immunization of mice with a live recombinant *Yersinia enterocolitica* O:9 strain that produces the cholera toxin B subunit. *Infect. Immun.* **58**:2420-2428.

172. Sory, M. P., Tollenaere, J., Laszlo, C., Biot, T., Cornelis, G. R., Wauters, G. 1990. Detection of pYV+ *Yersinia enterocolitica* isolates by P1 slide agglutination. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2403-2408.
173. Sprague, L. D., Neubauer, H. 2005. *Yersinia aleksiciae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**:831-835.
174. Sprague, L. D., Scholz, H. C., Amann, S., Busse, H. J., Neubauer, H. 2008. *Yersinia similis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **58**:952-8.
175. Straley, S. C., Plano, G. V., Skrzypek, E., Haddix, P. L., Fields, K. A. 1993. Regulation by Ca^{2+} in the *Yersinia* low- Ca^{2+} response. *Mol Microbiol.* **8**:1005-1010.
176. Strobel, E., Heesemann, J., Mayer, G., Peters, J., Müller-Wehrich, S., Emmerling, P. 2000. Bacteriological and serological findings in a further case of transfusion-mediated *Yersinia enterocolitica* sepsis. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2788-2790.
177. 杉山芳宏. 1987. 動物に対するエルシニア属菌の病原性. 獣医畜産新報. **796**:691-693.

178. Sulakvelidze, A. 2000. *Yersinia* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. *Microbes Infect.* **2**:497-513.
179. Sunahara, C., Yamanaka, Y., Yamanishi, S., 2000. Sporadic cases of *Yersinia pseudotuberculosis* serotype 5 infection in Shod island, Kagawa prefecture. *Jpn J Infect Dis.* **53**:74-75.
180. 鈴木照雄. 1977. 小型サル - リスザル -. 田嶋嘉夫編. 実験動物学. 朝倉書店. pp. 347-354.
181. 多田宜文, 山口淳二. 1985. *Serratia marcescens* による日和見感染症の細菌学的成因. 医学のあゆみ. **133**:693-694.
182. Tada, Y., Yamaguchi, J. 1987. Spheroplast induction in clinical isolates of *Serratia marcescens* in the presence of Ca^{2+} or Mg^{2+} . *J. Clin. Microbiol.* **25**:2154-2158.
183. 多田宜文, 山口淳二. 1991. Ca^{2+} または Mg^{2+} 存在下での β -ラクタム剤によるグラム陰性菌臨床分離株のスフェロプラスト形成. 感染症学雑誌. **65**:1304-1308.

184. Taffs, L. F. and Dunn, G.. 1983. An outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* infection in a small indoor breeding colony of red-bellied (*Saguinus labiatus*) tamarins. *Lab. Anim.* **17**:311-320.
185. Takahashi, I., Nochi, T., Yuki, Y., Kiyono, H. 2009. New horizon of mucosal immunity and vaccines. *Curr Opin Immunol.* **21**:352-358.
186. 武田修明. 2001a. エルシニア感染症. 小児科診療. 64:70-75.
187. 武田修明, 田中陸男. 1987. 人におけるエルシニア感染症の臨床. 獣医畜産新報. **796**:17-20.
188. 武田修明, 吉村真一郎, 木元康生, 西田吉伸, 藤原充弘, 渡部晋一, 脇研自, 佐々木博, 新垣義夫, 亀山順治, 馬場清, 田中陸男. 2001b. エルシニア感染症における回盲部病変と腸重積症. 小児科. **42**:1779-1783.
189. Tanaka, N., Fukuyama, S., Fukuiwa, T., Kawabata, M., Sagara, Y., Ito, H. O., Miwa, Y., Nagatake, T., Kiyono, H., Kurono, Y. 2007. Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine.* **14**:2680-2687.

190. Taylor, V. L., Titball, R. W., Oyston, P. C. 2005. Oral immunization with a dam mutant of *Yersinia pseudotuberculosis* protects against plague. *Microbiol.* **151**:1919-1926.
191. Tinker, J. K., Davis, C. T., Arlian, B. M. 2010. Purification and characterization of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis* LcrV-cholera toxin A(2)/B chimeras. *Protein Expr Purif.* **74**:16-23.
192. Tomaso, H., Mooseder, G., Dahouk, S. A., Bartling, C., Scholz, H. C., Strauss, R., Treu, T. M., Neubauer, H. 2006. Seroprevalence of anti-*Yersinia* antibodies in healthy Austrians. *Eur J Epidemiol.* **21**:77-81.
193. Torres, B. A., Kominsky, S., Perrin, G. Q., Hobeika, A. C., Johnson, H. M. 2001. Superantigens: the good, the bad, and the ugly. *Exp Biol Med (Maywood).* **226**:164-176.
194. Trülzsch, K., Geginat, G., Sporleder, T., Ruckdeschel, K., Hoffmann, R., Heesemann, J., Rüssmann, H. 2005. *Yersinia* outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. *J. Immunol.* **174**:4244-4251.
195. Trülzsch, K., Sporleder, T., Leibiger, R., Rüssmann, H.,

- Heesemann, J. 2008. *Yersinia* as oral live carrier vaccine: influence of *Yersinia* outer proteins (Yops) on the T-cell response. *Int J Med Microbiol.* **298**:59-67.
196. 坪倉操. 1987. 仮性結核菌とその感染症. 日獣会誌. **40**:317-323.
197. 坪倉操, 永野哲司. 1997. 仮性結核菌の血清群とそれに関連するいくつかの何故? 坪倉操, 平棟孝志, 金子賢一編. 微生物の世界. pp.57-76. 養賢堂, 東京.
198. Tsubokura, M., Otsuki, K., Sato, K., Tanaka, M., Hongo, T., Fukushima, H., Maruyama, T., Inoue, M. 1989. Special features of distribution of *Yersinia pseudotuberculosis* in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **27**:790-791.
199. Uchida I, Kaneko K, Hashimoto N. 1982. Cross-protection against fecal excretion of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in mice by oral vaccination of viable cells. *Infect. Immun.* **36**:837-840.
200. Uchida I, Kaneko K, Hashimoto N. 1982. The effect of oral and parenteral immunization with killed vaccines on the fecal shedding of mice fed *Yersinia enterocolitica*. *Jpn. J. Vet. Sci.* **44**:539-542.

201. Uchiyama, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kato, H., Fujimaki, W., Imanishi, K., Yan, X. J. 1993. Superantigenic properties of a novel mitogenic substance produced by *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from patients manifesting acute and systemic symptoms. *J. Immunol.* **151**:4407-4413.
202. 鵜殿俊史, 江見美子, 田上哲也, 早坂郁夫, 宇根有美, 柳井徳磨, 吉川泰弘. 2002. チンパンジーのエルシニア症. 第8回日本野生動物医学会.
203. Ueshiba, H., Kato, H., Miyoshi-Akiyama, T., Tsubokura, M., Nagano, T., Kaneko, S., Uchiyama, T. 1998. Analysis of the superantigen-producing ability of *Yersinia pseudotuberculosis* strains of various serotypes isolated from patients with systemic or gastroenteric infections, wildlife animals and natural environments. *Zentralbl Bakteriol.* **288**:277-291.
204. 宇根有美, 磯部杏子, 馬場智成, 林谷秀樹, 野村靖夫 2003. リスザルのエルシニア症 (*Yersinia pseudotuberculosis* 感染症). 日本野生動物医学会雑誌. **8**:19-26.
205. Vandamme, L. R., Vandepitte, J., Piot, P., Vandijck, E. 1978. Isolation of *Yersinia enterocolitica* serotype 0: 3

from captive monkeys and domestic pigs in Zaire. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **58**:341-345.

206. van Langevelde, P., Kwappenberg, K. M., Groeneveld, P. H., Mattie, H., van Dissel, J. T. 1998. Antibiotic-induced lipopolysaccharide (LPS) release from *Salmonella typhi*: delay between killing by ceftazidime and imipenem and release of LPS. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:739-743.
207. Wauters, G., Janssens, M., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J. 1988. *Yersinia mollaretti* sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov., formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A and 3B. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:424-429.
208. Welsh, R. D., Ely, R. W., Holland, R. J. 1992. Epizootic of *Yersinia pseudotuberculosis* in a wildlife park. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **201**:142-144.
209. Welsh, R. D., Stair, E. L. 1993. *Yersinia pseudotuberculosis* bovine abortion. *J. Vet. Diagn. Invest.* **5**:109-111.

210. Wiedig, C. A., Kramer, U., Garbom, S., Wolf-Watz, H., Autenrieth, I. B. 2005. Induction of CD8+ T cell responses by *Yersinia* vaccine carrier strains. *Vaccine*. **23**:4984-4998.
211. Wilson, H. D., McCormick, J. B., Feeley, J. C. 1976. *Yersinia enterocolitica* infection in a 4-month-old infant associated with infection in household dogs. *J Pediatr*. **89**:767-769.
212. Wizemann, T. M., Adamou, J. E., Langermann, S. 1999. Adhesins as targets for vaccine development. *Emerg. Infect. Dis.* **5**:395-403.
213. Yoshino, K., Ramamurthy, T., Nair, G. B., Fukushima, H., Ohtomo, Y., Takeda, N., Kaneko, S., Takeda, T. 1995. Geographical heterogeneity between Far East and Europe in prevalence of ypm gene encoding the novel superantigen among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **33**:3356-3358.
214. Zen-Yoji, H. 1975. Bacteriology, ecology and infections of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*.

Nippon Saikingaku Zasshi. **30**:571-581.

215. Zen-Yoji, H., Sakai, S., Maruyama, T., Yanagawa, Y.
1974. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from swine, cattle and rats at an abattoir.
Jpn J Microbiol. **18**:103-105.
216. Zhang, X., Yuan, Z., Duan, Q., Zhu, H., Yu, H.,
Wang, Q. 2009. Mucosal immunity in mice induced by orally
administered transgenic rice. *Vaccine*. **27**:1596-1600.