ロシアで再興したジフテリア菌の分子疫学的解析

中 尾 浩 史

国立小児病院小児医療研究センター 感染症研究部
〒154-8509 東京都世田谷区太子堂3-35-31

〔受理：1999年10月15日〕

はじめに

定期的なワクチン接種が開始されるまで、ジフテリアは主要な感染症の一つであった。温帯域では20人に1人以上が一生の間にジフテリアにかかっており、そのうち、5-10%はこの病気により死亡していた(13)。多くの先進諸国において1940-1950年代からワクチン接種が行われるようになると、ジフテリアの報告例は激減し、1980年代にはもはや大きな公衆衛生上の問題ではなくなった。このジフテリア感染症の減少には少なくとも3つの好条件がそろっていた。つまり、自然界においてヒトが唯一の宿主であること、効果的で安全なトキソイドワクチンが開発されたこと、季節的な病気であり、そのため、ジフテリアの伝染を効果的に阻止することができるようになったことがあげられる。しかし、1960年代以降、先進諸国のうち最大のジフテリアの流行がロシアで起こった。1990年に始まり、1993年には15,211例、1994年には39,907例もの報告があった(15, 18, 25-27)。流行はロシア国中に広がったが、1995年以降は減少に転じている(図1)。しかし、1994年末までにジフテリアは旧ソ

ビエト連邦の全ての15諸国に広がり、その流行は未だに続いている(35)。この再流行以前に全世界で報告されたジフテリアの80-90%が発展途上国で報告されたのに対し(11)、1990-1995年には90%以上が旧ソビエト連邦諸国で報告されている(8)。また、これらの国の近隣諸国では、少なくとも20のジフテリア輸入例が報告されている(26)。このため、過去の感染症と考えられていたジフテリアが再び注目を集めており、国際的にも、又、我が国においても今後輸入感染症として問題になる可能性がある。本稿では、ロシアにおけるジフテリアの再流行について分子疫学的な観点から行った解析を中心として紹介する。

1. ロシアにおけるジフテリア

旧ソビエト連邦では、他の先進諸国と同様、1950年代から1970年代中頃までは急激にジフテリア報告例は減少していた(図1)。しかし、1976年頃から再び増加の傾向が見られ、1983-1985年をピークとした最初の流行が起こっている(1400-1600例/年)。報告例の多くはロシアであった(17)。再流行は1990年、モスクワとセントピーターズバーグ(旧レニングラード)から始まり、1994-1995年をピークとして1999年現在では鎮静化に向かっている。再流行では、これら2地域における報告例が最も多く、1993年には10万人当たり30-50例報告されている。致死率は報告例の約3%であった(8)。

ジフテリア患者の年齢に関して興味深い結果が

Hiroshi NAKAO
Molecular Epidemiology of Diphtheria Re-Emerged in Russia
Department of Infectious Diseases Research, National Children's Medical Research Center, 3-35-31 Taishido, Setagaya-ku, Tokyo 154-8509

図1. 旧ソビエト連邦諸国におけるジフテリア患者報告数の推移, 1965–1996年 (文献 (35) より引用)。

得られている。1980年以前は患者は殆ど5歳以上の年齢層に起こっていたが、最初の流行時(1983–1985年)では5歳以下の幼児に顕著な増加が起こった。再流行時(1990–1995年)には、全ての年齢層において増加しているが、特に5–10歳の児童と30–50歳の大人に顕著なピークが認められたのが、再流行の特徴としてあげられている(12, 15, 16, 35)。また、男性(47症例/10万人)よりも女性(82症例/10万人)の方が報告例が多いのも特徴である(36)。1980年代の旧ソビエト連邦において20歳以上の大人の19–66%が感染防御抗体レベルに達しておらず、ジフテリアに感染する危険性が示唆されていた(15, 26)。同様の結果は、他の先進諸国においても報告されている(3, 5, 7, 32)。ジフテリア感染症が少なくなるにつれて自然免疫が無くなること、かつ、ジフテリアワクチンによる免疫は時間とともに衰退していくことが感染防御に必要な抗毒素抗体レベルを維持できなくなってきた理由と考えられる。抗体レベルを維持していくためには10年ごとにブースターを受ける必要がある。1994年からロシアで積極的に大人へのワクチン接種を開始した結果、1992年12月の時点で推定25–30%であったワクチン摂取率が1995年

の12月には88%にまで上昇した(36)。ワクチン接種によって89%の人が感染防御抗体レベル(0.1 IU)以上の抗毒素抗体を獲得しており、ワクチンの有効性が示された(15)。事実、ワクチン接種が広く行われた1995年以降は患者報告例が激減した。ワクチン摂取率の低下と抗毒素抗体保有率の低下が今回の再流行の最大の原因と思われる。ソビエト連邦の崩壊に伴い、衛生環境、経済状況が悪化したこと、ソ連崩壊後、移動する人口が増加したことなどがワクチンの摂取率の低下およびジフテリアが容易に広がる要因となったと考えられている(15)。また、流行中、軍兵の間でも多くの患者が報告されているため、ジフテリアの拡散に軍の移動が関与していたことが示唆されている(12)。

2. 分子疫学的解析

Corynebacterium diphtheriae 分離株の研究室における分析は、流行株の同定とその病原性の定義、集落間–都市間–国家間での伝播の様式と経路の特定などに有益である。従来から用いられている分析手法は、生物型、血清型、フェージ型などである(10)。ロシアの再流行がピークを迎えた1994年前半までには分子疫学的解析法が導入さ

れ、染色体の RFLP 解析 (14) や種々のプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションに基づく方法で行われるようになった。用いられたプローブは rRNA (9), insertion element (30), ジフテリア毒素, β フェージとその結合部位など (6, 23) である。これらの解析は生物型間および毒素産生, 非産生株間の相違を明かにし, 従来用いられていた方法よりも分解能が高いことが証明された。

リボタイピングと multilocus enzyme electrophoresis (MEE) は多くの細菌の疫学的研究に用いられており, *C. diphtheriae* においても有効であることが示されている。CDC のジフテリアグループは1985-1994年にロシア各地の患者及びキャリアーから分離された156株 (138株が毒素産生株, 18株が非産生株) についてこれら2つの方法を用いて解析を行った (24)。154株は20の異なるリボタイプに分類されたが, 残る2株はスメアーな結果しか得られず, タイピングすることは不可能であった。2リボタイプを除いた18リボタイプは mitis 生物型または gravis 生物型のみを含んでいた。ロシアから分離されたほとんどの株は G1, G4 または M1 リボタイプに属し, 特に G1 リボタイプは1990年以後に頻繁に分

離された。これに対し, M1 リボタイプに属する株は流行前ばかりでなく流行中にも一様に分離されていた。その他のリボタイプはそれぞれ, 1-6 株ずつ分離され, 流行前後において大きな分離率の変化はなかった。流行の中心であるブラディミア地域において G1 と G4 はそれぞれ1991年と1987年に初めて分離され, 全リボタイプに占める割合は年々増加していた。流行以前は20% (8/41株) であったのが, 流行が始まると71% (80/115株) にまで増加し, 1994年には約80%を占める様になった (図2A)。

同じ156株を MEE で分析するとより多様性がみられ, 76の ET (electrophoretic type) に分類できた。ほとんどの ET (62の ET) は一株ずつであったが, 残りの88株は14の ET に分類された。MEE の結果を基に系統樹分析を行うと79株 (14の ET) は非常に類似しており, 一つのクロナルグループに分類されることが分かった。この中では ET8 型が最も分離されているのでこのグループは ET8-complex としてまとめられた。ET8-complex は一株の例外を除いて全て gravis 生物型であり, 残りの ET は mitis 生物型が大部分を占めていた (75%)。ET8-complex は一株以外は毒素産生株であったのに対し, 他の ET に

(A) リボタイピング

(B) MEE タイピング

図2. ロシア分離株の *Bst*EII リボタイプ (A) と MEE タイピング (B) による年別比較, 1985-1994年 (文献 (24) を改変)。

ける毒素産生株の割合は若干低かった (78%)。ET8-complex の大部分の株 (71/79株) は再流行中に分離されていた。ロシアにおいて1985年には分離されていなかった ET8-complex が1994年には73%を占めるまで増加していた (図2 B)。

二つの分析方法において、ロシアで分離された株の間にはこのような多様性が見られたにもかかわらず、リボタイプと MEE、毒素産生性の結果には非常に良い相関が得られた。数株の例外を除くと、生物型、毒素産生性に応じて、異なるリボタイプ、ET に分類された。再流行以前はリボタイプピングでは M1 リボタイプが優勢であった。MEE ではこれらの株は27の ET に分類されたが、Genetic distance が0.17以下の一つのクラスターを形成した。再流行中の株に対する2つのタイプピング法の結果はより相関しており、ET8-complex のほとんどの株 (77/79株) は、G1 と G4 リボタイプに属していた。この *C. diphtheriae* の ET8-complex 株はロシアの流行が始まった頃から分離され始めていた。この complex 株はその後の中央ヨーロッパ領域やウラジオストック地域、周辺諸国でも優勢な株であった。

リボタイプピングと MEE は *C. diphtheriae* の分析に大変有用であることが分かったが、これらの方法は労力と時間を要するのでより簡単に迅速な分析法の開発が必要であった。そこで、random amplified polymorphic DNA (RAPD) を用いた方法を応用することを考えた。種々検討の結果、再現性、簡便性、分離能がよかった Ready-To-Go RAPD analysis beads (Pharmacia) を用い、プライマーは #3 と #4 の2種を用いることとした (20)。

RAPD の分離能をリボタイプピングの結果と比較するために、19のリボタイプ標準株と既にリボタイプピングされている26株について、2つのプライマーを用いて分析した。これら45株はプライマー #3 と #4 によってそれぞれ、19、24の RAPD パターンに分類することができた (図3)。プライマー #4 はリボタイプ G1 と G4、M9 と M12 を除き、15の異なるリボタイプに属する株を分類することができた。リボタイプ M9 と M12 はプライマー #3 により区別することができたが、リボタイプ G1 と G4 は2つのプライマー

を用いても区別することはできなかった。リボタイプピングにおいて、リボタイプ G1 と G4 はたった一つのバンドのサイズが異なっているだけであり、また、MEE ではこれらの株は ET8-complex に属しており、非常に近縁の株であることが示されている。前述の2つの分析法に必要な労力と時間 (約1週間) を考えると、1日で分析できる RAPD は迅速に流行株の解析ができるという利点がある。さらに、RAPD はリボタイプピングでは G2、M1、M13 に分類されていた株をそれぞれ、2、5、2種のパターンにさらに細分化することができた。この結果より、RAPD は疫学的調査に有益であると考え、他の分離株に対しても応用した。

ロシアからの分離株に加えて、カザフスタン、ジョージア共和国、アメリカ合衆国から分離された株を新たに RAPD で分析した。ロシアの流行時に分離されたほとんどの株はリボタイプ G1/G4 と同一なパターンを示した。新しいパターンは一株だけであった。カザフスタンから分離された40株のうち、10株はリボタイプ G1/G4 と同一なパターンを示し、16株はロシアで見られたうちの3つのパターンに分類されたが、16株は14の新しいパターンを示した。ジョージア共和国から分離された17株のうち、10株はリボタイプ G1/G4 であり、2株はロシア、4株はカザフスタンで見られたパターンと同じであった。又、1つの新しいパターンも見られた。アメリカ合衆国から分離されたほとんどの株 (31/32株) がロシアなどで分離された株とは全く異なるパターンを示した。

RAPD では、分離株が少ない場合は電気泳動の結果を肉眼で確認することにより、*C. diphtheriae* の流行株と土着株を識別することは可能であった。しかし、分析する株が多くなるにつれて、新しいパターンや肉眼では識別困難な類似したパターンが現れたため、UPGMA 法 (Unweighted Pair Group Method of Averages) を用いて系統的な分析を行った (図4)。今回分析した211株は二つのプライマー (#3 と #4) を用いた結果、6つのクラスターに分類することができた。ロシアでの流行株 (リボタイプ G1 と G4、または MEE ET8-complex) はほとんどがクラスター1

図3. リボタイプ標準株の RAPD パターン (文献 (20) を改変)。

各レーンのリボタイプ：左から (A) G1/G4, G3, G3 & G4v, G1/G4, G4v, M1 (5 株), M1v (3 株), M2, M3 (2 株), M4, M5 (2 株), M6, M7, M8, M8/M9, M10, M11, M12, M13 (2 株), M14; (B) G1/G4, G3 (2 株), G1/G4, G4v, M1 (5 株), M2, M3 (2 株), M4 (2 株), M5 (2 株), M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13 (2 株), M14

に分類された。1990年以前から分離されているほとんどの株はクラスター2, 3に分類され、少数の株はクラスター5, 6に分類された。カザフスタンとジョージア共和国から分離された株はロシア株とほぼ同様であった。アメリカ株は少数の株がクラスター2に、それ以外のほとんどの株はクラスター5に分類された。以上の結果より、RAPD によりロシア及びその近隣諸国で流行したほとんどの株を分析かつ分類することが可能であった。RAPD は *C. diphtheriae* の迅速、簡便かつ再現性の高いサブタイピング法として大変有益な方法であり、*C. diphtheriae* の分子学的

疫学を行うための一つの選択肢になりうると思われる。

3. 毒素遺伝子の多様性

ロシアで再流行が始まったころ、その原因は明らかではなく、前述したような理由の他に菌側の要因、特に主病原因子のジフテリア毒素の抗原性または産生量が変化したことにより、ワクチンの効力が弱くなった可能性も考えられた。このような変化が起こっているならば、その遺伝子変異を疫学に応用することも可能と思われた。遺伝子変異の検出には1989年に Orita ら (22) が報告し

図4. RAPD(プライマー3と4)による *C. diphtheriae* の樹形図 (文献 (20) より引用)。

た Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) を応用した。多くのサブタイピング法は病原株を分離し、純化する必要があるが、SSCP は PCR と組み合わせることにより、患者検体より菌を分離することなしに直接的に分析することが可能である。PCR-SSCP を用いてジフテリア毒素遺伝子およびその発現抑制遺伝子 (*dtxR*) に多様性が存在することを明らかにし、さらに、*C. diphtheriae* のサブタイピング法として用いることができることを示した (21)。PCR-SSCP の標準株は、ジフテリアワクチンの製造に用いられている *C. diphtheriae* Park-Williams No.

8 (PW8) 株とした。PCR-SSCP によって突然変異を検出しやすいのは用いる DNA 断片が 400 bp 以下であるため、ジフテリア毒素遺伝子 *tox*, および制御遺伝子 *dtxR* に対してそれぞれ 8 組, 4 組のプライマーを作成し検討した。これらのプライマーはプロモーター領域 (リボソーム結合領域, DtxR 結合領域など) を含むものであった。泳動後のゲルを銀染色し、増幅された DNA 断片のパターンを PW8 と比較した。

ロシアおよびウクライナ由来の株および CDC に保存されている標準株の計 80 株について SSCP サブタイピングを行なった。*tox* では、増幅に用

(A) *tox* (B) *dtxR*

図 5. PCR-SSCPによって検出された *tox* (A) および *dtxR* (B) の変異 (文献 (21) を改変)。

いた 8 の領域 (Dipht 1~8) のうち 3 の領域でいくつかの SSCP パターンが確認された (図 5 A)。Dipht 1, Dipht 2, Dipht 4, Dipht 5, Dipht 7 ではすべての株の SSCP パターンは PW8 とまったく同一の SSCP パターンを示した。以下の SSCP パターンについて、標準株 PW8 と同じ SSCP パターンを 1 型と記述することとする。Dipht 3 領域ではただ一株のみが PW8 と異なっていた。Dipht 6 領域は 3 種類 (1~3 型) の SSCP パターンが観察された。2 型が最も多く、39 株に見られた。1 型は 34 株、3 型は 4 株において観察された。Dipht 8 領域は 3 種類 (1~3 型) の SSCP パターンが観察され、ほとんどの株 (66 株) は 3 型であった。1 型および 2 型はそれぞれ、3 株、2 株において観察された。以上の結果より、Dipht 3, Dipht 6 と Dipht 8 領域で観察された SSCP パターンの組み合わせによって、*tox* 遺伝子領域は 6 種類の異なる SSCP タイプに分類されることが分かった。*dtxR* 遺伝子においては、4 つの領域すべてにいくつかのパターンが確認された (図 5 B)。DtxR 1 領域では 2 種類 (1~2 型) の SSCP パターンが観察された。ほとんど

の株 (69 株) は 1 型であり、2 型は 11 株において観察された。DtxR 2 領域では 4 種類 (1~4 型) の SSCP パターンが観察された。1 型が 53 株と最も多かった。ついで、2 型、3 型がそれぞれ 15 株、11 株観察された。4 型は 1 株にのみ認められた。DtxR 3 領域では 3 種類 (1~3 型) の SSCP パターンが観察された。2 型が 47 株と最も多く、ついで、1 型が 32 株であった。3 型は 1 株にのみ観察された。DtxR 4 領域では 4 種類 (1~4 型) の SSCP パターンが観察された。1 型が 43 株と最も多く、ついで、3 型、2 型がそれぞれ 24 株、12 株観察された。4 型は 1 株にのみ観察された。以上の結果より、*dtxR* 遺伝子の 4 つの領域で観察された SSCP パターンの組み合わせによって、*dtxR* 遺伝子領域は 12 種類の異なる SSCP タイプに分類されることが分かった。

PCR-SSCP により多くの変異が *tox* および *dtxR* 遺伝子に起こっている可能性が示唆されたため、これらの変異がワクチンの効力に及ぼす影響を明らかにするためにこれらの遺伝子の塩基配列を決定した (19)。DNA 塩基配列の結果は

表 1. ジフテリア菌の *dtxR* の SSCP パターンと点変異

(A) *dtxR* 領域 3

SSCP パターン	Position 440/147	(Nucleotide/Amino acid)			
		514-516/172	519/173	535/179	544/182
C7(-)	C/Ala	TTT/Phe	A/Gln	T/Phe	C/Leu
1030(-)	C/Ala	TTC/Phe	A/Gln	T/Phe	C/Leu
Pattern 1	C/Ala	TTT/Phe	A/Gln	T/Phe	C/Leu
Pattern 2	T/Val	TTC/Phe	A/Gln	T/Phe	C/Leu
Pattern 3	T/Val	TCC/Ser	C/His	C/Leu	T/Ser

(B) *dtxR* 領域 4

SSCP パターン	Position 607/202	(Nucleotide / Amino acid)		640/214	652-654/218
		613/205			
C7(-)	A/Thr	A/Ser		C/Leu	GCT/Ala
1030(-)	A/Thr	C/Arg		T/Tyr	ACT/Thr
Pattern 1	A/Thr	A/Ser		C/Leu	GCT/Ala
Pattern 2	A/Thr	A/Ser		C/Leu	GCT/Ala
Pattern 3	A/Thr	A/Ser		A/Ile	GCC/Ala
Pattern 4	G/Ala	C/Arg		A/Ile	ACT/Thr

(A) 生物型

gravis 生物型 (No.=53)

mitis 生物型 (No.=19)

(B) ロシア分離株とウクライナ分離株

ロシア分離株 (No.=48)

ウクライナ分離株 (No.=24)

% of patterns

図 6. 生物型 (A) 及び分離された国 (B) と SSCP パターンの相関 (文献 (21) を改変)。

SSCP の分析結果に一致しており, SSCP が点変異を確実に検出できることを示した。*tox* 遺伝子では 5 の点変異が 39 株 (79 株中) から見つかった。

4 つの ORF 内の変異のうち 3 変異が wobble base に起こっていた。これらの変異によりアミノ酸変異を起こしているものはなかった。*dtxR*

遺伝子では37の点変異が見つかり、そのうち35が ORF 内であった。PW8 と同じ DNA 塩基配列を持っている株は15株であり、同じアミノ酸配列を持っている株は29株であった。27の点変異が wobble base に起こっていた (表1)。

tox 遺伝子で見られた多様性は毒素の A, B サブユニット間で大きく異なっていた。*tox*A (A サブユニット遺伝子) とそのプロモーター領域には、DtxR 結合部位 (33) や C ドメイン (触媒ドメイン) (1) が存在する。この毒素活性に不可欠な領域は高度に保存されていた。T ドメイン (膜通過ドメイン) と R ドメイン (受容体結合ドメイン) の存在する *tox*B (B サブユニット遺伝子) (4, 31) と、その下流領域では68株中39株の ORF 内に点変異が見つけた。39株中33株は1233の位置に点変異 (G→A) を持っていた。この点変異は *mitis* 生物型 (4/14株) よりも *gravis* 生物型 (29/50株) に、そしてロシア (17/42株) よりもウクライナから分離された株 (16/22株) に多く見られた (図6)。また、この変異は再流行前 (5/15株) よりも流行中の株 (28/52株) に多く見られた。これらの点変異はいずれもアミノ酸置換変異を伴わず、又、Elek 試験によって毒素産生性であることを確認した。そのため、DNA レベルで多くの変異が *tox*B に存在したにもかかわらず、アミノ酸レベルでは高度に保存されていると考えられる。

dtxR 遺伝子の ORF はより多様性に富んでいた。この遺伝子は少なくとも3つのドメイン (DNA 結合モチーフ、金属結合モチーフ、蛋白/蛋白相互作用モチーフ) からなる (37)。DtxR は2価の金属カチオンによって活性化され、安定な二量体となり、*tox* などの遺伝子のプロモーターに結合して転写を阻害する (34)。DNA 塩基配列決定を行った79株のうち、29株は PW8 と同じアミノ酸配列を持っていた。22株は一つのアミノ酸のみが PW8 と異なっていた (A147V)。22株は2つのアミノ酸置換が起こっていた (A147V, L214I)。C 末端側領域 (*dtxR* 領域3と4) により多くの点変異が見つかり、その9のアミノ酸置換全てが C 末端側領域に起こっていることが分かった。Boyd らは *C. diphtheriae* 1030 (−) の C 末端側領域に6つの

アミノ酸置換変異が存在するが、これらの変異は DtxR の活性に影響を及ぼさなかったと報告している (2)。DtxR の DNA 結合モチーフと金属結合モチーフが N 末端側領域に存在している (37) ことから今回見つかったアミノ酸置換が DtxR に影響していない可能性もある。これらの株の毒素産生量とアミノ酸置換については現在検討中である。C 末端側領域が PW8 と同一であった18株のうち14株は WHO の標準株と再流行前にロシアから分離された株であり、残りの4株は流行初期に分離された株であった。興味深いことにウクライナ株の多く (21/24株) が10カ所に同一の点変異を持っていた。ロシアから分離された株で同様な変異を持つ株は1株だけであり、ウクライナとロシアの国境近くのペンザから分離されている。

SSCP (DNA 塩基配列) の結果と生物型の間の相関が *dtxR* の C 末端側領域、特に領域3に認められた (図6)。*mitis* 生物型では1型が、*gravis* 生物型では2型が優勢であった。56株のリボタイプと MEE の結果を比較した場合、全ての G1 と G4 リボタイプ (または ET8-complex) の *tox* は領域6で2/3の株が PW8 と異なっていた以外は全て PW8 と同一なパターンを示した。残りのリボタイプ (7種類のリボタイプ、*mitis* 生物型) の領域6は2/3が PW8 と同一パターンであった。また、*dtxR* の領域3において G1 と G4 リボタイプの株はほとんどの株 (34/35株) が2型であったのに対し、他のリボタイプの株は2株しか (18株中) 同じ型を示さなかった。この型はロシアにおける流行株の分子マーカーとして有用であると考えられる。

tox または *dtxR* に起こった変異は毒素産生量に影響を及ぼしている可能性が考えられた。特に *tox* の変異はワクチンの免疫原性および効果に影響を及ぼし、今回のロシアにおける再流行に関与したことが推測された。しかし、変異毒素は見つからず、再流行は毒素変異によるワクチン効果の低下ではなく、ワクチン摂取率の低下などその他の因子によるものであることが明らかとなった (19)。興味深いことは10株全ての非毒素産生株も *dtxR* を持っていたことである。このことは *tox* を獲得することにより、DtxR 制御を受ける (正

常に発現する) 毒素産生株に変わる可能性があることを意味する。つまり、自然に存在している機能的な *dtxR* を持つ非毒素産生株は *tox* のリザーバーとなりうる。ジフテリアの疫学をするうえにも重要なことである。

終 わ り に

Rappuoli らが指摘したように、スウェーデンで1984-1985年に起こったジフテリアの流行は同一クローンによって引き起こされており、この株は従来の株に比べて、病原性、感染性などいくつかの有利な点があった (29)。このクローンは1983年にデンマークで初めて分離されており、スウェーデンに輸入されたと考えられる。今回のロシアの流行株 ET8-complex の中で主流なタイプである ET8 は1987年にブラディミア地域から初めて分離されている。スウェーデンやデンマークの分離株とは明らかに異なる MEE タイプに属しており、スカンジナビアにおける1980年代初期の流行と今回のロシアでの流行とは何も関係がないと思われる (24)。前述の分析方法を用い、流行株を解析することにより、それぞれの DNA 型と毒素または他の病原因子との関連について分析することが可能となった。*C. diphtheriae* の株を地球規模で集め解析することにより、流行株の地理的な起源、流行株とその場所に固有の株との関連についての情報を供給することができると考えられる。

最後に、我が国でもジフテリアワクチン接種が始まった1950-1960年代よりジフテリア報告例は激減しており、ここ10年 (1988~1997年) は33人の患者が報告されているのみである (28)。先進諸国においてはジフテリア毒素抗体価が年齢の上昇とともに低下しており、ワクチンブーストの必要性が指摘されている。実際スウェーデンにおける流行は多くの人々における毒素抗体価が0.01 IU 以下であったことが原因の一つとしてあげられている (29)。ロシアにおけるジフテリア再流行の主要原因がワクチン摂取率の低下と考えられる以上、流行地へ行く旅行者のワクチンブーストも必要であるが、国内でジフテリアワクチンの摂取率を高く維持していくことも不可欠である。興味深いことに、我が国においては、50歳以上

の年齢でも持続的に抗毒素抗体を保有していることから、市中に毒素産生菌が存在し持続的な暴露が起こっている可能性が指摘されている (28)。このことはワクチンの必要性を否定するものではなく、感染する機会が多い (危険性が高い) と考えるべきである。まれではあるが、近年、毒素非産生性 *C. diphtheriae* がイギリスやオーストラリアで咽頭炎や心内膜炎を引き起こしたことが報告されている (38)。臨床的に毒素産生性 *C. diphtheriae* によるジフテリアと殆ど区別することができない。毒素による免疫は毒素非産生菌による感染や拡散には影響を及ぼさず、抗毒素抗体による治療もできない。前述したように毒素非産生性 *C. diphtheriae* は *tox* のリザーバーとなる可能性もあること、また、国内での抗毒素抗体価が高いことから毒素産生能を問わず *C. diphtheriae* の国内分布状況を把握する必要がある。

謝 辞

本研究を行うに当たり数々のご助言、ご協力を頂きました Centers for Disease Control and Prevention, DBMD, MSPBのDr. Tanja Popovic, Dr. Charles Vitek, Dr. Michael W. Reeves, Dr. Melinda Wharton, Dr. I. Kaye Wachsmuth, Ms. Chung Kim および国立小児医療研究センター竹田多恵感染症研究部長に深く感謝いたします。また、執筆の機会を与えてくださった名古屋大学医学部太田美智男教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Blanke, S.R., Huang, K., Wilson, B.A., Papini, E., Covacci, A., Collier, R.J. (1994): Active-site mutations of the diphtheria toxin catalytic domain: role of histidine-21 in nicotinamide adenine dinucleotide binding and ADP-ribosylation of elongation factor 2. *Biochemistry* **33**, 5155-5161.
- 2) Boyd, J.M., Hall, K.C., Murphy, J.R. (1992): DNA sequences and characterization of *dtxR* alleles from *Corynebacterium diphtheriae* PW8 (-), 1030 (-), and C7hm723 (-). *J. Bacteriol.* **174**, 1268-1272.
- 3) Cellesi, C., Zanchi, A., Michelangeli, C., Giovannoni, F., Sansoni, A., Rossolini, G.M. (1989): Immunity to diphtheria in a sample adult population from central Italy. *Vaccine* **7**, 417-420.

- 4) Choe, S., Bennett, M.J., Fujii, G., Curmi, P.M., Kantardjieff, K.A., Collier, R.J., Eisenberg, D. (1992): The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature (Lond.)* **357**, 216–222.
- 5) Christenson, B., Bottiger, M. (1986): Serological immunity to diphtheria in Sweden in 1978 and 1984. *Scand. J. Infect. Dis.* **18**, 227–233.
- 6) Coyle, M.B., Groman, N.B., Russell, J.Q., Harnisch, J.P., Rabin, M., Holmes, K.K. (1989): The molecular epidemiology of three biotypes of *Corynebacterium diphtheriae* in the Seattle outbreak, 1972–1982. *J. Infect. Dis.* **159**, 670–679.
- 7) Crossley, K., Irvine, P., Warren, J.B., Lee, B.K. (1978): Tetanus and diphtheria immunity in urban Minnesota adults. *JAMA* **242**, 2298–2300.
- 8) Dittmann, S. (1997): Epidemic diphtheria in the Newly Independent States of the former USSR: Situation and lessons learned. *Biologicals* **25**, 179–186.
- 9) Efstratiou, A., George, R.C., Begg, N.T. (1993): Non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* var *gravis* in England. *Lancet* **341**, 1592–1593.
- 10) Efstratiou, A., Maple, P.A. (1994): *C. diphtheriae*: Manual for the laboratory diagnosis of diphtheria. Reference no. ICP-EPI 038 [C]. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- 11) Galazka, A.M., Robertson, S.E. (1995): Diphtheria: changing patterns in the developing world and the industrialized world. *Eur. J. Epidemiol.* **11**, 107–117.
- 12) Galazka, A.M., Robertson, S.E., Oblapenko, G.P. (1995): Resurgence of diphtheria. *Eur. J. Epidemiol.* **11**, 95–105.
- 13) Griffith, A.H. (1979): The role of immunization in the control of diphtheria. *Dev. Biol. Stand.* **43**, 3–13.
- 14) Hallander, H.O., Haeggman, H., Lofdahl, S. (1988): Epidemiological typing of *Corynebacterium diphtheriae* isolated in Sweden 1984–1986. *Scand. J. Infect. Dis.* **95**, 225–231.
- 15) Hardy, I.R., Dittmann, S., Sutter, R.W. (1996): Current situation and control strategies for resurgence of diphtheria in newly independent states of the former Soviet Union. *Lancet* **347**, 1739–1744.
- 16) MacQueen, S. (1997): Diphtheria: a changing pattern. *Nursing Times* **93**, 57–62.
- 17) Markina, S.S., Tymchakovskaja, I.M., Maksimova, N.M., Sukhorukova, N.L. (1989): Epidemic process of diphtheria infection in the RSFSR under epidemiological surveillance. *J. Microbiol. Epidemiol. Immunol.* **5**, 38–42.
- 18) Markova, S. (1994): Diphtheria incidence in Russia in 1993. *Monthly Inform. Bull. (Moscow)* no. 11/20.
- 19) Nakao, H., Mazurova, I.K., Glushkevich, T., Popovic, T. (1997): Analysis of heterogeneity of *Corynebacterium diphtheriae* toxin gene, *tox*, and its regulatory element, *dtxR*, by direct sequencing. *Res. Microbiol.* **148**, 45–54.
- 20) Nakao, H., Popovic, T. (1998): Use of random amplified polymorphic DNA for rapid molecular subtyping of *Corynebacterium diphtheriae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **30**, 167–172.
- 21) Nakao, H., Pruckler, J.M., Mazurova, I.K., Narvskaja, O.V., Glushkevich, T., Marijevski, V.F., Kravetz, A.N., Fields, B.S., Wachsmuth, I.K., Popovic, T. (1996): Heterogeneity of diphtheria toxin gene, *tox*, and its regulatory element, *dtxR*, in *Corynebacterium diphtheriae* strains causing epidemic diphtheria in Russia and Ukraine. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1711–1716.
- 22) Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. (1989): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2766–2770.
- 23) Pappenheimer, A.M., Murphy, J.R. (1983): Studies on the molecular epidemiology of diphtheria. *Lancet* **2**, 923–926.
- 24) Popovic, T., Kombarova, S.Y., Reeves, M.W., Nakao, H., Mazurova, I.K., Wharton, M., Wachsmuth, I.K., Wenger, J.D. (1996): Molecular epidemiology of diphtheria in Russia, 1985–1994. *J. Infect. Dis.* **174**, 1064–1072.
- 25) Centers for Disease Control and Prevention (1993): Diphtheria outbreak-Russian Federation, 1990–1993. *MMWR* **42**, 840–841.
- 26) Centers for Disease Control and Prevention (1995): Diphtheria epidemic-New Independent States of former Soviet Union. *MMWR* **44**, 177–181.
- 27) Centers for Disease Control and Prevention (1996): Update: Diphtheria epidemic-New Independent States of the former Soviet Union, January 1995–March 1996. *MMWR* **45**, 693–697.
- 28) 国立感染症研究所 (1998): ジフテリア. *IASR* **19**, No. 224.
- 29) Rappuoli, R., Pergini, M., Falsen, E. (1988): Molecular epidemiology of the 1984–1986 outbreak of diphtheria in Sweden. *N. Engl. J. Med.*

- 318, 12-14.
- 30) Rappuoli, R., Perugini, M., Ratti, G. (1987): DNA element of *Corynebacterium diphtheriae* with properties of an insertion sequence and usefulness for epidemiological studies. *J. Bacteriol.* **169**, 308-312.
- 31) Silverman, J.A., Mindell, J.A., Zhan, H., Finkelstein, A., Collier, R.J. (1994): Structure-function relationships in diphtheria toxin channels. I. Determining a minimal channel-forming domain. *J. Membr. Biol.* **137**, 17-28.
- 32) Simonsen, O., Kjeldsen, K., Bentzon, M.W., Heron, I. (1987): Susceptibility to diphtheria in populations vaccinated before and after elimination of indigenous diphtheria in Denmark. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [C]* **95**, 225-231.
- 33) Tao, X., Murphy, J.R. (1992): Binding of the metalloregulatory protein DtxR to the diphtheria *tox* operator requires a divalent heavy metal ion and protects the palindromic sequence from DNase I digestion. *J. Biol. Chem.* **267**, 21761-21764.
- 34) Tao, X., Zeng, H.Y., Murphy, J.R. (1995): Transition metal ion activation of DNA binding by the diphtheria *tox* repressor requires the formation of stable homodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6803-6807.
- 35) Vitek, C.R., Wharton, M. (1998): Diphtheria in the former Soviet Union: reemergence of a pandemic disease. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 539-550.
- 36) Vitek, C.R., Brisgalov, S.P., Bragina, V.Y., Zhilyakov, A.M., Bisgard, K.M., Brennan, M., Kravtsova, O.N., Lushniak, B.D., Lyeria, R., Markina, S.S., Strebel, P.M. (1999): Epidemiology of epidemic diphtheria in three regions, Russia, 1994-1996. *Eur. J. Epidemiol.* **15**, 75-83.
- 37) Wang, Z., Schmitt, M.P., Holmes, R.K. (1994): Characterization of mutations that inactivate the diphtheria toxin repressor gene (*dtxR*). *Infect. Immun.* **62**, 1600-1608.
- 38) Wilson, A.P.R. (1995): The return of *Corynebacterium diphtheriae*: the rise of non-toxigenic strains. *J. Hosp. Infect.* **30** (Supplement), 306-312.