シンポジウム■今、注目すべき食品媒介病原体

●Food Pathogens to Be Paid Attention Now

病原性エルシニアの疫学と検査法

Epidemiology of Pathogenic *Yersinia* and Their Detection Method

福島 博

(元 島根県保健環境科学研究所)

Hiroshi FUKUSHIMA

(Shimane Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science,
Nishihamasada, Matsue 690-0122)

1. はじめに

わが国において *Yersinia* が原因菌として確認された最初の集団感染は 1972 年に静岡県で発生した *Yersinia enterocolitica* による食中毒事例⁴⁾である。その後の相次ぐ集団事例の発生により、1982 年に *Y. enterocolitica* は食中毒原因菌に指定されている。これより半世紀前の 1925 年から 1951 年に泉熱²⁴⁾と呼称され発熱と発疹を主徴とする猩紅熱様発疹性疾患の集団事例が全国で多数発生し、その原因は不明のままであった。その後、1977 年から西日本で相次いで発生した *Y. pseudotuberculosis* による集団感染事例との比較研究により泉熱の原因は *Y. pseudotuberculosis* であったことが明らかにされ³⁸⁾、わが国には古くから *Y. pseudotuberculosis* が流行していたことが示唆された。

病原性 *Yersinia* には *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* と *Y. pestis* の 3 菌種が含まれるが、19 世紀後半に微生物学の基本的技術が確立され、ヒトから最初に分離された *Yersinia* は病原性の最も強い *Y. pestis* で第三次ペストパンデミーのおり 1894 年の香港でのことである⁴⁸⁾。*Y. pseudotuberculosis* は 1910 年にヨーロッパで少年の回盲部リンパ節、1913 年にわが国で敗血症による死亡例から分離された。病原性の弱い *Y. enterocolitica* はアメリカ合衆国で 1934 年に農夫の顔面の膿瘍、1939 年に小児の腸炎から分離された。その後多くの非病原性 *Yersinia* が環境材料から分離され、*Yersinia* はその病原性状の脱落により病原性の弱い菌種へ変異したと半世紀以上にわたり信じられていた。しかし、病原性 3 菌種の house-keeping gene の MLST (multilocus sequence typing) 解析により *Yersinia* 属の進化の過程が比較解析され²⁾、*Yersinia* 属の祖先は大腸菌や *Salmonella* とほぼ同時期の 4100 万年～1 億 8600 万年前の白亜紀に腸内細菌科の共通祖先菌から分

化したことが 1999 年に報告された。それによると、地球上に出現した非病原性 *Yersinia* は 40～190 万年前の第四紀に腸管上皮細胞への侵入因子 (*inv*, *ail* 遺伝子) を他菌種から獲得し病原性 *Yersinia* の祖先となる菌群へ進化した。その後、個々に病原性プラスミド (pYV) を獲得することによりマクロファージに抵抗し腸管上皮で増殖できる病原性 *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* へと進化したと考えられている。*Y. pestis* が *Y. pseudotuberculosis* から分化した時期は意外と遅く氷河期後期の 2 万年前と第一次ペストパンデミーでペストの存在が初めて確認された 1500 年前との間であつたろうと推測されている。これは哺乳動物の腸管に定着する *Y. pseudotuberculosis* がノミの腸管に定着できる能力などを獲得し⁸⁾、*Y. pestis* までに進化するのに長い道のりを必要としたことを示している。現在、*Yersinia* 属には病原性 3 菌種と非病原性菌種の *Y. intermedia* と *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. ruckeri*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. aleksiciae*⁴¹⁾, *Y. massiliensis*³¹⁾ の 17 菌種が含まれている。*Yersinia* の進化には生化学的性状や病原性状はもとより宿主動物が密接に関与している。病原性菌種が保有する pYV 上には小腸上皮細胞への接着と侵入に関与する *yadA* 遺伝子等の病原性に関わる遺伝子のほかに、かつて V 抗原と呼ばれ *Yersinia* の感染防御抗原でもある LcrV が存在する。病原性 *Yersinia* に感染 (保菌) した個体には細胞性免疫が成立し、再度暴露されてもその菌種や血清群に関係なく感染することではなく、*Yersinia* 感染は 1 回に限られる。本現象により、病原性 *Yersinia* は自然界においてあたかも“棲み分け”をしているかのように分布しており、*Yersinia* の疫学を理解するのに重要な鍵となる。

2. 病原性 *Yersinia* の性状と病原性

腸内細菌科、*Yersinia* 属 17 菌種のうちヒトに対し病原性を持つ菌種には *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* と *Y. enterocolitica* があり、後 2 菌種は食水系感染症の原

表 1. *Y. pseudotuberculosis* のヒトへの病原性と血清群, 遺伝子型, 自然界の分布

遺伝子型	病原因子保有状況					pYV 保有率	MF ^{a)}	病原性または病原型	血清群の地域分布		極東地域での患者からの分離状況 (血清群)	保菌動物
	HPI	R-HPI	YPMa	YPMb	YPMc				欧米	極東		
1	+	—	+	—	—	56	+	病原性		1b, 3, 5a, 5b, 15	日本 1 株 (3), 韓国 3 株 (1b, 15)	野生動物
2	+	—	—	—	—	49	+	ヨーロッパ胃腸炎型 (極東株を除く)	1a, 1b	1a, 3, 5b, 13, 14	中国 1 株 (3)	家畜, ペット, 野生動物
3	—	—	+	—	—	77	+	極東全身感染型		1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 3, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, 7, 10, 15	日本, 韓国, ロシア 663 株 (1c, 7 を除く)	家畜, ペット, 野生動物
4	—	—	—	+	—	0	—	非病原性 (<i>Y. similis</i>)		1b, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12		モグラ, ノネズミ
5	—	+	—	—	+	89	—	ヨーロッパ弱病原型	3	3	日本 1 株 (3)	家畜 (主にブタ)
6	—	—	—	—	—	50	+	病原性	1b, 2a, 2b, 3, 5a	1b, 2a, 2b, 2c, 3, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, 7, 10, 11, 13, 15	日本 11 株 (2a, 3, 4a, 5b)	家畜, ペット, 野生動物

a) メリビオースの醗酵性

因となり, 感染ノミの吸血により感染するペストの原因菌である *Y. pestis* と区別されている. 両菌種は生化学性状, 血清型と病原因子の保有状況などにより型別される.

2.1 *Y. pseudotuberculosis* (表 1)

Y. pseudotuberculosis は *Y. pestis* と遺伝学的には同一の菌種である. *Y. pseudotuberculosis* には O 抗原 33 種が確認され, 1~15 血清群と 6 亜群を含む 21 血清群 (1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 3, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15) に分類される. 主に野生動物に保菌され, 家畜やペットからも分離されることがある. 本菌は後述する病原因子の High-pathogenicity island (HPI), Right hand part of HPI (R-HPI) と *Y. pseudotuberculosis*-derived mitogen (YPM) の YPMa, YPMb, YPMc の組合せにより 6 遺伝子型に分類される²¹⁾.

①遺伝子型 1: YPMa と HPI を保有し, ヒトに病原性を示す. 血清群 1b, 3, 5a, 5b, 15 に属し, 極東アジアに分布する. 患者 4 名からの分離が確認されている.

②遺伝子型 2 (ヨーロッパ腸炎病原型): HPI のみを保有し, 腸炎や腸間膜リンパ節炎を起こす欧米における主要なクローンである. 血清群 1a, 1b に属し, ヨーロッパおよびヨーロッパの住民が移住したオセアニア, 南北アメリカに分布する. 本遺伝子型には極東アジア, 主に中国で分離される血清群 3, 5b の一部と血清群 13, 14 も属し, 数株が確認されている.

③遺伝子型 3 (極東全身性病原型): YPMa のみを保有し, 腸炎や腸間膜リンパ節炎, さらに発疹などの多彩な全身症状を起こす極東アジアにおける主要なクローンである. 血清群 1b, 2a, 2b, 2c, 3, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, 10, 15 に属し, 極東アジアに分布し欧米には分布していない.

④遺伝子型 4: YPMb のみを保有し, ヒトに病原性を示さない. メリビオース非分解性で血清群 1b, 5a, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12 に属し, わが国でモグラなどの野生動物と環境に広く分布している.

⑤遺伝子型 5 (ヨーロッパ弱病原型): R-HPI と

YPMc を保有し, ヒトに対する病原性は弱いが腸炎を起こす. メリビオース非分解性の血清群 3 が属し, 欧米のブタに分布する血清群 3 はすべて本遺伝子型である. わが国でも一部地域のブタに分布し, 患者 1 名が確認されている.

⑥遺伝子型 6: HPI と YPM のいずれも保有しないが, 患者からも分離される. 血清群に関係なく世界的に分布する.

2.2 *Y. enterocolitica* (表 2)

Y. enterocolitica は生物型, 血清型, フェージ型により型別されるが, フェージ型別は一般には用いられない. 生物型は 1A, 1B, 2, 3, 4, 5 に分類される⁴⁵⁾. *Y. enterocolitica* およびその類似菌種には O 抗原 76 種が報告されている. *Y. enterocolitica* の菌型と病原性や地域性には密接な関連があり, 病原性により 5 群に分けられる.

①生物型 1A: 血清型 O1~O76

エスクリンを加水分解しヒトに病原性を示さず, 自然界に広く分布する.

②生物型 1B: 血清型 O8, O4, 32, O13, O18, O20, O21

エスクリンを加水分解せず, リパーゼ, インドール陽性でヒトに病原性を示す. 血清型 O8 とアメリカ合衆国で報告された血清型 O4, 32, O13, O18, O20, O21 などの American strains が含まれる. 生物型 1B は鉄の取り込みに関与する HPI を持つ強毒株で, 菌血症を起こすことがある. 1980 年代にアメリカ合衆国で多くの感染症が報告されたが, 今ではほとんど報告されていない. わが国では 1980 年代後半から東日本で報告が増加し^{23, 39)}, 近年になって全国で発生が報告されるようになった. ブタや野生動物が保菌する. わが国とアメリカ合衆国に分布する菌株の遺伝子型は異なっている²²⁾.

③生物型 2: 血清型 O5, 27, O9

エスクリンを加水分解せず, リパーゼ陰性, インドール陽性でヒトに病原性を示す. 血清型 O5, 27 は主に北米に分布し, わが国でも分離される. インドール産生が

表 2. 病原性 *Yersinia* の確認性状

試験	培地	培養条件	性状, 観察	反 応								
第一次 確認試験	TSI	30℃, 24 時間	斜面/高層 H ₂ S ガス	黄/黄 — —						赤/黄 — —		
	LIM		リシン インドール 運動性	— d d						— — +		
	胆汁エスクリン寒天培地		エスクリン	+	—					—	+	
第二次 確認試験 ^a	PYZ 培地	30℃, 48 時間 25℃と 37℃, 24 時間	ピラジナミダーゼ	+	—					—	—	
	TSB		自発凝集性	—	+					+	+	
菌 種				<i>Y. enterocolitica</i>							<i>Y. pseudotuberculosis</i>	
生物型				1A	1B	2	3	3VP 陰性 変異型	4	3VP 陰性, 白糖陰性	病原 性株	弱, 非病 原性株 (<i>Y. similis</i>)
生物型別テスト	30℃, 48 時間	Lipase インドール キシロース VP 白糖	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
			+	+	(+)	—	—	—	—	—	—	—
			+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
			+	+	+	+	—	+	—	—	—	—
			+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
他菌種との鑑別テスト	ラムノース メリビオース	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	
		—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	
血清型別				O1～ 76	O8	O5, 27 O9	O3	O3	O3	O3	1～6, 10, 15	3 (弱), 1, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 (非)

弱く生物型 3 に分類される菌株には L-トリプトファンを増量し試験するとよい。血清型 O9 は中国やヨーロッパに多く分布するが、近年わが国でも患者から分離されている³²⁾。ヨーロッパでは胃腸炎のほかに関節炎の原因として注目されたことがある。主にブタが保菌する。

④生物型 3, 4: 血清型 O3

エスクリンを加水分解せず、リパーゼ、インドール陰性でヒトに病原性を示す。胃腸炎を起こし、主にブタが保菌する。血清型 O3 のうち欧米に分布するキシロース陰性の生物型 4 は欧米から豚肉とともにわが国に輸入され、1980 年代前半まで広く分布した。いっぽう、中国大陸に分布するキシロース陽性の生物型 3VP 陰性変異型もほぼ同時期に台湾から豚肉とともに輸入され、その後徐々に分布を拡大し、1980 年代後半には血清型 O3 の大半を占めるに至った^{16, 29)}。また、その起源は明らかでないが簡易同定キットで *Y. kristensenii* と誤同定されやすい生物型 3VP 陰性・白糖陰性の血清型 O3 が 1990 年代に入り分離されるようになった^{17, 30)}。1980 年代に多く発生した集団事例の多くは生物型 4 による。

⑤生物型 5: 血清型 O2, 3

エスクリンを加水分解せず、硝酸塩還元、オルニチン陰性でフランスでノウサギから分離されたが、ヒトへの感染は報告されていない。

3. 発症機序と病原因子^{6, 42)}

経口的に摂取された *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* は、小腸に達するとパイエル板の M 細胞へ接着、侵入し速やかに粘膜下に侵入、基底膜に達する。これには染色体上の *inv* および *ail* 遺伝子によりコードされた Invasin および Ail (Attachment-invasion locus) と pYV 上の *yadA* 遺伝子によりコードされた YadA (*Yersinia* adherence A) などの外膜蛋白が関与する。マクロファージによる食菌を受けるが、TNF- α などのサイトカイン産生抑制によって殺菌作用に抵抗、増殖し、回腸末端炎を起こす。腸粘膜基底部の Ca²⁺ に乏しい環境 (37°C) で増殖した菌は pYV 上の少なくとも 11 種類の *yop* 遺伝子により産生される Yops (*Yersinia* outer membrane proteins) を菌体外へ放出する。そのうち YopE は宿主細胞やマクロファージを破戒する細胞毒を生成し、YopH と同様にマクロファージの貪食作用に抵抗するが、やがて好中球により殺菌され、健常者では限局性炎症で自然治癒することが多い。それを回避し抗貪食作用が続く間は組織や血中で増殖する。特に、パイエル板が密集する回腸末端部ではその炎症に加え、隣接する腸間膜リンパ節の炎症を起こし、しばしば虫垂炎と誤診される。感染から発症までの潜伏期間は長く 3~7 日である。免疫機能に異常のない健常者では限局

性炎症で自然治癒することが多いが、エイズのような免疫機能低下者（特に *Y. pseudotuberculosis*）では血中に流入し菌血症を起こすこともある。

Yops の産生を調整する蛋白質のうちの Lcr (low calcium response) V はかつて V 抗原と呼ばれ Yops の産生に必須な因子で、*Yersinia* の感染防御抗原でもある。*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* および *Y. enterocolitica* に感染した個体は再度 *Yersinia* の病原株に暴露されてもその菌種や血清群に関係なく感染は阻止され、*Yersinia* 感染は 1 回に限られる。この再感染阻止の現象は、マウスおよびラット、ノネズミ、飼育豚を用いた実験ならびに飼育豚の観察で確認されている^{3, 14, 43)}。

Y. pestis, *Y. pseudotuberculosis* の欧米株と *Y. enterocolitica* 生物型 1B 血清群 O8 は HPI を持つ強毒 *Yersinia* で、HPI を構成する *fyuA* と *irp2* 遺伝子は感染過程に必要な鉄イオンの菌体内への取り込みに関与する。HPI 保有株はしばしばヒトに敗血症を引き起こす⁷⁾。

わが国を含む極東アジアに分布する *Y. pseudotuberculosis* 遺伝子型 1 と 3 はスーパー抗原活性を持つ YPM を産生し、T 細胞の過剰活性化およびサイトカインの過剰産生を促し、発疹、結節性紅斑、関節炎、急性腎不全などの全身症状の発現に関与する^{1, 44)}。YPM はスーパー抗原活性を持つ YPMa と持たない YPMb および YPMc に分けられ、それぞれ *ypmA*, *ypmB*, *ypmC* 遺伝子にコードされている。*ypmA* 遺伝子はわが国や極東ロシアで分離された菌株に確認されるが、欧米株は保有しない²¹⁾。

4. *Yersinia* の疫学と生態

わが国における *Yersinia* 感染症は図 1 に示すように、*Y. enterocolitica* 血清型 O3 感染症は地域に関係なく広範に発生しているが、*Y. enterocolitica* 血清型 O8 感染症は東日本で、*Y. pseudotuberculosis* 感染症は西日本で多く見られ、それぞれの地域における野生動物における保菌状況と密接な関係がある。

4.1 *Y. pseudotuberculosis*

わが国には中国、韓国、極東ロシアなどに分布する遺伝子型 3（極東全身性病原型）のさまざまな血清群が山間部の野生動物に広く分布し、家畜、ペットからも分離される。これらの菌群は氷河期にユーラシア大陸東岸からの動物の移動により持ち込まれたと考えられており、ヨーロッパに分布する遺伝子型 2（ヨーロッパ腸炎病原型）は分布していない。*Y. pseudotuberculosis* には多くの哺乳類および鳥類が感染するが、本菌による感染症が確認されたのは 1913 年に Saisawa が敗血症による死亡例から本菌を分離し、世界で最初に本菌がヒトに感染することを証明したときである。本菌感染症の報告が多い西日本の山間部では秋から春にかけての寒冷な時期にノネズミの約 3%、小型野生動物を捕食するタヌキの 15~33% から分離され¹³⁾、ヒトへはこの時期に野生動物

の糞便に汚染された環境水等を介し感染する（図 2）。本菌感染症は回腸末端炎、下痢症などの腸管感染、敗血症、結節性紅斑など多彩な病像を示すが、水系感染による集団発生では猩紅熱様の発熱と発疹を主徴とし、1925 年から 1951 年の間には泉熱と呼称された集団感染がほぼ全国で 94 例報告され総患者数 4,751 名にも及んだ。1977 年から 1991 年の間には井戸水などの未殺菌水や学校給食を原因とした 15 集団事例が報告され総患者数 2,603 名に及んだが、その後は報告されていない。小児下痢症からの分離率は地域によって異なるが、山間地域における上水道の普及と過疎化や少子高齢化により減少している。1980 年代に多くの症例が報告された倉敷中央病院における検査データでも 1981 年からの 14 年間における検出率は 2.6% であるが、1995 年以降は 0.4% に激減している（図 3）。

わが国では第三次ペストパンデミーの 1890 年から 1921 年の間に香港からの 37 隻のペスト船の入港に伴いペスト感染ネズミが港湾都市へ上陸し³³⁾、1899 年から 1926 年の 28 年間にペスト患者が 2,905 名（死者 2,420 名）発生し、ペスト感染ネズミは 24,528 匹を数えたが、ペストの流行は神戸、横浜などの港湾都市の周辺に限られ、日本全土へは拡大しなかった。これは山間部に生息するげっ歯類が *Y. pseudotuberculosis* に感染し、*Yersinia* に対する免疫を獲得していたことによると考えられる。しかし、アメリカ合衆国西海岸へ到達した *Y. pestis* はプレリードッグなどの野生動物に感染し定着した。これは野生動物に広く分布していた *Y. enterocolitica* 生物型 1B 血清型 O8 の LcrV の構造が他の菌型とは異なり *Y. pestis* の感染を阻止できなかったことによる。

4.2 *Y. enterocolitica*¹¹⁾

Y. enterocolitica は 1934 年にアメリカ合衆国で初めて発見されたが、その菌型は現在世界に広く流行している血清型 O3 ではなく、生物型 1B 血清型 O8 であった。本菌型のアメリカ合衆国での流行は 1970 年代前半まで見られた。ヨーロッパ諸国では 1960 年代に入り生物型 4 血清型 O3 による胃腸炎が流行した。これは冷蔵庫の普及とほぼ一致し、本菌感染症の増加は冷蔵庫などの低温環境でも増殖する本菌の生物学的特性や冷蔵生野菜を用いたサラダなどの食習慣の普及によるところが大きいと考えられている³⁴⁾。*Y. enterocolitica* は病原性 3 菌種のうちで病原性が最も弱く、動物のうち主にブタに不顕性感染し、汚染豚肉や二次汚染した食品などを介しヒトに感染する。ヒトへの感染は年間を通じ見られるが夏期に多い（図 2）。本菌は食肉に供される約 6 カ月齢のブタの腸内容や扁桃の約 20% から検出されるが⁴⁰⁾、養豚場における本菌の分布はこれをはるかに上回る。本菌は養豚場で豚房の床などを介しブタに感染し、感染豚群からは十数週間にわたり糞便とともに排泄するが、感染豚の腸管内における *Yersinia* に対する免疫の成立と

図1. わが国の5検査機関におけるエルシニアの検出状況
(患者検査データの一部は江東微生物研究所微生物検査室, 弘前市医師会健診センター, 倉敷中央病院検査科からの提供)

もに排泄されなくなる¹⁹⁾。感染が養豚場で若齢豚に起こった場合には本菌は出荷時の約6カ月齢のブタの体内からは除去されと畜場ではほとんど検出されないが、感染が出荷間近いブタに起こった場合には感染豚が出荷され、食肉の汚染源となる。ペット動物も本菌を保菌し、1970～80年代の保菌調査ではイヌの5～6%およびネコの1～2%からの分離が報告されたが^{18, 47)}、ペットフードが普及したここ20年間のデータはほとんどな

い。生物型1B血清型O8は野生動物からも検出され、*Y. pseudotuberculosis*と同様に野生動物の糞便に汚染された環境水等を介しヒトへ感染する²²⁾。

生物型4血清型O3はヨーロッパとヨーロッパ諸国の人々が家畜を伴い移住した南北アメリカ大陸、南アフリカ、オーストラリア大陸に広く分布している。特に有袋類が生息していたオーストラリアやニュージーランドへは18世紀後半から19世紀前半にかけてのヨーロッパ

図2. 下痢症患者からのエルシニアの月別検出状況

図3. わが国における下痢症患者からのエルシニアの検出率の推移

や南アフリカからの移民によりヒトや家畜、愛玩動物とともに持ち込まれた。北アメリカへも同様にして伝播され、アメリカ合衆国では1970～1980年代に養豚の振興のためヨーロッパから多くのブタが輸入され、ヨーロッパ型のフェージ8を持つ生物型4血清型O3がブタに広く分布した。このころから生物型1B血清型O8による感染症が減少していった。その後、1980～1990年代にカナダから肉豚や肥育豚が大量に輸入されることにより、カナダ型のフェージ9Bを持つ生物型4血清型O3が飼育豚に広まった⁶⁾。このように、*Y. enterocolitica*の生誕地から他の地域への伝播には豚肉やブタの輸出が大きく関わっており、わが国においても例外ではない。

わが国における豚肉輸入とブタおよび患者から分離される*Y. enterocolitica*の菌型の推移を図4に示す。わが国においても1950年以降に欧米からの種豚輸入の再開により養豚業の振興が図られ、豚肉の国内生産量は増加したが、食糧事情の好転に伴う豚肉消費量の増加に追いつかず1968年には北アメリカ、1972年には北欧、台湾からの豚肉の輸入が開始された。輸入開始3年後の1971年には生物型4血清群O3による感染症が初めて

報告され、1972年には集団食中毒事例が相次いで発生した。1980年代に入ると台湾からの豚肉の輸入量の増加に伴い、台湾に分布する生物型3VP陰性変異型・血清型O3のブタと患者から分離頻度が増加し、1990年代にはわが国で分離される本菌の大半を占めるに至った。ところが、1997年の台湾での口蹄疫の発生による台湾からの豚肉輸入の中止に伴う欧米からの輸入量の増加により2000年以降生物型4血清型O3による感染症が増加の傾向にある。

生物型2血清型O5, 27は世界に広く分布しているが、特に北アメリカにおけるブタにおける保菌率が高く、1990年代にはアメリカ合衆国で*Y. enterocolitica*感染症の約20%を占めたと報告されている⁶⁾。アメリカ合衆国からの輸入豚肉から分離されたこともある。ヨーロッパや日本ではブタの保菌率は低く、感染症の発生頻度は極めて低い。

生物型2血清型O9は主にヨーロッパと中国に分布する。当初から北ヨーロッパを中心に報告され、1980年代に入り中部ヨーロッパでも感染症が増加し、イギリスでは本菌感染症に占める割合が1983年の2%から

図4. わが国における豚肉輸入とブタおよび患者から分離される *Y. enterocolitica* の菌型の推移

1988年には44%までに増加した³⁷⁾。1984年には中国から神戸港に輸入され、プルセラ抗体陽性を示したラクダの糞便から分離された。1985～1987年の中国における *Y. enterocolitica* に関する全国調査で本血清型は主に中国の内陸部でブタとイヌ、ネズミ、トリから分離され、多くの小児下痢症の散発事例および集団発生事例が報告されている²⁸⁾。1997～1999年の中国内陸部の寧夏回族自治区における調査では漢民族の農村で古くから飼育されている在来種のブタ、農家周辺に生息する小型齧歯類とイヌから分離された。わが国においては本血清型による小児下痢症患者が1974年に最初に報告され、その後、患者とブタ、豚肉、イヌから数株ずつ分離されたが、近年になって患者からの分離頻度が増加の傾向にある。飼育豚が保菌する *Y. enterocolitica* の菌型の変遷は畜産物生産国からのブタや豚肉の輸入に大きく影響されてきたが、2002～2003年には西日本の養豚場で一過性に本血清型が分離され、中国からの農産物や稲藁などの輸入により持ち込まれた可能性が示唆された。

生物型1B血清型O8による感染症は青森県弘前地方で1990年に最初に報告されたが²³⁾、その後の報告により1987年にはすでに症例が確認され、東日本を中心に多くの患者が発生していることが明らかになった³⁹⁾。血清型O8が流行する青森県の山間部におけるノネズミの調査では、6、8月の温暖な季節にノネズミが血清型O8に感染していることが確認されており、ヒトへの感染は主に温暖な時期に野生動物の糞便に汚染された沢水などの未滅菌水を介し起こっていると考えられる²²⁾。近年では奈良県でのリンゴサラダによる集団食中毒、沖縄での

川での水遊びによる感染等、全国で発生が報告されるようになった。本血清型の病原性は他の菌型よりも強く、野ネズミなどの野生動物にも感染し、*Y. pseudotuberculosis*と同様に野生動物の糞便に汚染された環境水を介しヒトへ感染する。

5. 検査方法

5.1 菌分離方法

5.1.1 臨床検体

下痢便やその他の臨床材料からの分離培養は日常の糞便検査に用いられるDHL寒天、SS寒天で十分である。しかし、一般の腸内細菌と異なり37℃での1夜培養ではほとんどの菌株は微小集落しか形成しないので、見逃されやすい。もし1夜培養で他の病原菌らしいものがないときは、さらに培養を続けて48時間後に観察する。食中毒検査では *Y. enterocolitica* の選択性を高めたセフスロジン-イルガサン-ノボビオシン (CIN) 寒天が広く使用されている。37℃で培養された菌では病原性プラスミドが脱落することがあり、原因菌の病原性の確認には25～30℃培養で分離された菌株を用いる。

5.1.2 食品および環境検体

5.1.2.1 直接培養

食品等の夾雑菌が混在する試料から *Yersinia* を効率的に分離するには、食品、ふき取り液、水、糞便の試料液を直接アルカリ処理した後、選択分離培地に塗布する⁹⁾。アルカリ処理法は、*Yersinia* が他のグラム陰性桿菌よりもアルカリに強く抵抗する性状を利用した選択方法である⁵⁾。特に *Pseudomonas* が多く存在する試料では

分離効果が著しく高まるが、*Y. enterocolitica* の病原株と非病原株を選択することはできない。検体 0.3 ml に 0.75% KOH 加生理食塩液（または 0.5% 食塩水溶液）を 0.3 ml 加えて 30 秒間混和後、その一白金耳を分離培地に塗布する。ただし、30 秒以上の処理は *Yersinia* の死滅をもたらすので、注意を要する。

5.1.2.2 増菌培養

病原性 *Yersinia* を選択的に増菌する方法はいまだ確立されていないが、*Yersinia* の低温増殖性を利用した低温増菌法が広く用いられている。検体に M/15 リン酸緩衝液 (PBS) を 10 倍量加え、冷蔵庫 (4~9℃) で 3~4 週間おく低温増菌法である³⁶⁾。特に、水やふき取り液のように栄養分の少ない試料には 0.25% ペプトン・0.25% マンニトール添加 PBS (PMP) などの発育支持物質を添加した増菌培地が用いられる¹⁵⁾。選択増菌法について室温増菌法や 2 段階増菌法などが検討されているが、非病原株の旺盛な増殖を抑制し病原 *Yersinia* を選択的に増菌する確実な方法はいまだない。したがって、食中毒発生の際の原因追及や疫学調査には PBS による低温増菌法を用い、1 週ごとに増菌液をアルカリ処理し分離培養する。

5.1.2.3 分離培養

Yersinia の分離培地としてはマンニトールの発酵を指標とした CIN 寒天が広く用いられるが、病原株と非病原株の鑑別は難しく、変法 VYE (Virulent *Yersinia enterocolitica*) 寒天¹⁰⁾の併用が好ましい。変法 VYE 寒天は CIN 寒天 1L にエスクリン 0.5 g と 5% クエン酸鉄アンモニウム水溶液 10 ml を添加し調製する。試料および増菌培養のアルカリ処理液の一白金耳を寒天平板に塗布し、30℃、24 時間培養する。食中毒事例の検査には標準菌株を両培地に対照培養し、比較釣菌することが大切である。CIN 寒天培地にはすべての *Yersinia* がマンニット発酵性の赤色集落を形成するため非病原性 *Yersinia* との鑑別は難しい。変法 VYE 寒天では病原性 *Y. enterocolitica* はエスクリン非分解性の赤紫色でやや隆起した直径 1 mm 程度の集落、*Y. pseudotuberculosis* はエスクリン分解性の暗褐色の露滴状集落を形成するが、非病原性 *Yersinia* はエスクリン分解性の暗褐色を帯びた比較的大きい集落を形成し鑑別は容易である。*Y. kristensenii* はエスクリン非分解性の赤紫色集落を形成するので鑑別培養を必要とする。食品を汚染する菌種のうち *Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia* などの菌種がこれらの培地に発育するが、これらは CIN 寒天でピンクから白色の大きな集落を形成する。また、これらの多くはアルカリ処理により除去される。しかし、*Yersinia* の非病原株はアルカリ処理により除去されることがなく、変法 VYE 寒天で暗褐色を帯びた大きい集落を形成し、培地全体が暗褐色となり病原株を分離できなくなるので、増菌培養液は薄めに塗布することが大切である。したがって、CIN 培地にマンニトール発酵性の赤色集落と変法

VYE 寒天にエスクリン非分解性の赤紫色集落が発育した際には病原性 *Y. enterocolitica* を疑い、これらの集落を対象とし 1 平板当たり少なくとも数個ずつ釣菌して確認培養する。

5.2 同定

Yersinia の同定は生化学性状検査によって行う。病原性 *Yersinia* の同定手順を表 3 に示す。*Yersinia* の同定では第一次確認試験の LIM 培地でのリシン陰性が最も重要なカギとなる。リシン陰性で TSI 寒天の斜面部が黄色を呈する菌群のうちエスクリン陰性のものは病原性 *Y. enterocolitica* と判定する。TSI 寒天の斜面部が赤色を呈する菌群のうちエスクリン陰性のものには *Y. enterocolitica* 生物型 3VP 陰性・白糖陰性、血清群 O3 が含まれる。なお、*Y. enterocolitica* 生物型 3VP 陰性・白糖陰性は簡易同定キットで *Y. kristensenii* と誤って同定されるので注意が必要である。第二次鑑別試験で pyrazinamidase 陰性と自発凝集性陽性の菌株は病原性 *Y. enterocolitica* と判定する。Pyrazinamidase の酵素活性は *Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica* では陰性、非病原株では陽性となる。このテストは染色体性の病原性と相関があることから、*Y. enterocolitica* の生物型にも採用されるほど重要な性状で、*Yersinia* の検査には欠くことができない。病原性 *Yersinia* の新鮮分離株の多くは約 45 MDa の病原プラスミドを保有し、液体培地で 37℃ 培養すると外膜蛋白を産生し自発凝集することから、プラスミド性病原因子の決定には簡単にできる自発凝集性の試験が広く用いられている²⁶⁾。しかし、長期間保存した株や 37℃ 培養した菌株では病原プラスミドが脱落し、凝集しないことがある。病原性 *Y. enterocolitica* と同定された菌株はリパーゼ、VP 反応、キシロース、白糖分解能などを追加し生物型別を行う。なお、生物型 2 にはインドール産生が弱いものがあり、LIM 培地に L-トリプトファンを 2 g/L 添加し試験する。pyrazinamidase 産生テスト用培地²⁵⁾に接種し、28~30℃ で 48 時間培養後、1% 硫酸第一鉄アンモニウム 1 ml 加え、15 分後に赤褐色を呈するものを陽性とする。

5.3 血清型

Y. enterocolitica と同定された菌株は市販の診断用抗血清（デンカ生研）を用いてスライド凝集反応で型別を行う。診断用抗血清には病原血清群がセットされているが、これらの血清に凝集が見られても、病原性に関わる生化学性状を示さないものは病原性 *Y. enterocolitica* としない。

Y. pseudotuberculosis と同定された菌株は、必要に応じて市販診断用血清（デンカ生研）で血清群を決定する。市販血清には血清群 1, 2, 3, 4, 5, 6 がセットされており、血清群 7~15 の型別と血清群 1, 2, 4, 5 の垂型の型別はできない。

5.4 迅速検査法

Yersinia の病原因子は染色体および pYV にコードさ

れているが、pYV が脱落した菌株は病原性を欠くことから、PCR による迅速検査法の標的遺伝子としては pYV 上の *yadA* 遺伝子が広く用いられている^{20, 27, 35, 46)}。

謝 辞

貴重な患者検査データの提供をいただいた(株)江東微生物研究所微生物検査室、弘前市医師会健診センター、倉敷中央病院検査科の諸先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) Abe, J., Takeda, T., Watanabe, Y., Nakao, H., Kobayashi, N., Leung, D. Y. M. and Kohsaka, T.: Evidence for superantigen production by *Yersinia pseudotuberculosis*. J. Immunol., **151**, 4183-4188 (1993).
- 2) Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A. and Carniel, E.: *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **96**, 14043-14048 (1999).
- 3) Alonso, J. M., Vilmer, E., Mazigh, D. and Mollaret, H. H.: Mechanisms of acquired resistance to plague in mice infected by *Yersinia enterocolitica* O3. Current Microbiol., **4**, 117-122 (1980).
- 4) Asakawa, Y., Akahane, S., Kagata, N., Noguchi, M., Sakazaki, R. and Tamura, K.: Two community outbreaks of human infection with *Yersinia enterocolitica*. J. Hyg., **71**, 715-723 (1973).
- 5) Aulisio, C. C., Mehlman, I. J. and Sanders, A. C.: Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods. Appl. Environ. Microbiol., **39**, 135-140 (1980).
- 6) Bottone, E. J.: *Yersinia enterocolitica*: The charisma continues. Clin. Microbiol. Rev., **10**, 257-276 (1997).
- 7) Carniel, E.: The *Yersinia* high-pathogenicity island. Int. Microbiol., **2**, 161-167 (1999).
- 8) Carniel, E.: Evolution of pathogenic *Yersinia*, some lights in the dark. Adv. Exp. Med. Biol., **529**, 3-11 (2003).
- 9) Fukushima, H.: Direct isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from meat. Appl. Environ. Microbiol., **50**, 710-712 (1985).
- 10) Fukushima, H.: New selective agar medium for isolation of virulent *Yersinia enterocolitica*. J. Clin. Microbiol., **25**, 1068-1073 (1987).
- 11) 福島 博: *Yersinia enterocolitica*. 食品由来感染症と食品微生物. 中西寿男, 丸山務 (監修), p. 315-334, 中央法規出版, 東京 (2009).
- 12) 福島 博: *Yersinia pseudotuberculosis*. 食品由来感染症と食品微生物. 中西寿男, 丸山 務 (監修), p. 334-346. 中央法規出版, 東京 (2009).
- 13) Fukushima, H. and Gomyoda, M.: Intestinal carriage of *Yersinia pseudotuberculosis* by wild birds and mammals in Japan. Appl. Environ. Microbiol., **57**, 1152-1155 (1991).
- 14) Fukushima, H., Ito, Y. and Saito, K.: Ecological study of *Yersinia enterocolitica*. III. Cross- protection against fecal excretion between *Y. enterocolitica* serovars 3 and 5, 27 in pigs. Vet. Microbiol., **9**, 383-389 (1984).
- 15) Fukushima, H., Saito, K., Tsubokura, M. and Otsuki, K.: *Yersinia* spp. in surface water in Matsue, Japan. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B, **179**, 235-247 (1984).
- 16) Fukushima, H., Tsubokura, M., Otsuki, K. and Kawaoka, Y.: Biochemical heterogeneity of serotype O3 strains of 700 *Yersinia* strains isolated from humans, other mammals, flies, animal feed, and river water. Current Microbiol., **11**, 149-154 (1984).
- 17) Fukushima, H., Maruyama, K., Omori, I., Ito, K. and Kaneko, S.: Isolation of sucrose-negative *Yersinia enterocolitica* biotype 3 serotype O3 strains and their pathogenicity. Current Microbiol., **17**, 199-202 (1988).
- 18) Fukushima, H., Nakamura, R., Iitsuka, S., Ito, Y., and Saito, K.: Presence of zoonotic pathogens (*Yersinia* spp., *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Leptospira* spp.) simultaneously in dogs and cats. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B, **181**, 430-440 (1985).
- 19) Fukushima, H., Nakamura, R., Ito, Y., Saito, K., Tsubokura, M. and Otsuki, K.: Ecological study of *Yersinia enterocolitica*. I. Dissemination of *Y. enterocolitica* in pigs. Vet. Microbiol., **8**, 469-483 (1983).
- 20) Fukushima, H., Kawase, J., Etoh, Y., Sugama, K., Yashiro, S., Iida, N. and Yamaguchi, K.: Simultaneous screening of 24 target genes of foodborne pathogens in 35 foodborne outbreaks using multiplex real-time SYBR green PCR analysis. Int. J. Microbiol., Article ID 864817 (2010).
- 21) Fukushima, H., Matsuda, U., Seki, R., Tsubokura, M., Takeda, N., Shubin, F. N., Paik, I. K. and Zheng, X. B.: Geographical heterogeneity between Far East and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. J. Clin. Microbiol., **39**, 3541-3547 (2001).
- 22) Hayashidani, H., Ohtomo, Y., Toyokawa, Y., Saito, M., Kaneko, K., Kosuge, J., Kato, M. and Ogawa, M.: Potential source of sporadic human infection with *Yersinia enterocolitica* O8 in Aomori Prefecture, Japan. J. Clin. Microbiol., **33**, 1253-1257 (1995).
- 23) Ichinohe, H., Yoshioka, M., Fukushima, H., Kaneko, S. and Maruyama, T.: First isolation of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 in Japan. J. Clin. Microbiol., **29**, 846-847 (1991).
- 24) 泉 仙助, 矢ヶ崎徳蔵, 杉下延郎: 最近金沢市内に流行せる一種の猩紅熱様発疹性熱性病に就いて. 児科雑誌, **347**, 667-689; **348**, 862-882 (1929).
- 25) Kandolo, K. and Wauters, G.: Pyrazinamidase activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms. J. Clin. Microbiol., **21**, 980-982 (1985).
- 26) Laird, W. J. and Cavanaugh, D. A.: Correlation of autoagglutination and virulence of yersiniae. J. Clin. Microbiol., **11**, 430-432 (1980).

- 27) Lantz, P. G., Knutsson, R., Blixt, Y., Abu Al-Soud, W., Borch, E. and Radstrom, P.: Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a multiplex PCR: A study of sample preparation and PCR-inhibitory components. *Int. Food Microbiol.*, **45**, 93-105 (1998).
- 28) 陸 桂珍, 賈 明和, 李 功惠, 張 見秋, 蔡 潤河: 我國耶氏菌基本特性和病原性研究. 小腸結腸耶氏菌科學論文匯編, p. 113-117, 全國小腸結腸耶氏菌科研協作組 (1985-1987).
- 29) Maruyama, T.: *Yersinia enterocolitica* infection in humans and isolation of the microorganism from pigs in Japan. *Contr. Microbiol. Immunol.*, **9**, 48-55 (1987).
- 30) 東出正人, 行方千佳, 金子誠二: 糞便由来 *Yersinia enterocolitica* 血清型 O3 菌の各種性状. 日本臨床微生物學雜誌, **8**, 16-20 (1998).
- 31) Merhej, V., Adékambi, T., Pagnier, I., Raoult, D. and Drancourt, M.: *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58**, 779-784 (2008).
- 32) Moriki, S., Nobata, A., Shibata, H., Nagai, A., Minami, N., Taketani, T. and Fukushima, H.: Familial outbreak of *Yersinia enterocolitica* serotype O9 biotype 2. *J. Infect. Chem.*, **16**, 56-58 (2010).
- 33) 森田秀實: 日本の検疫所におけるペスト防疫の歴史. メディヤサークル, **40**, 9-16 (1995).
- 34) Mollaret, H. H.: Fifteen centuries of yersiniosis. *Contr. Microbiol. Immunol.*, **13**, 1-4 (1995).
- 35) Nakajima, H., Inoue, M., Mori, T., Itoh, K., Arakawa, E. and Watanabe, H.: Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2484-2486 (1992).
- 36) Paterson, J. S. and Cook, R.: A method for the recovery of *Pasteurella pseudotuberculosis* from feces. *J. Path. Bacteriol.*, **85**, 241-242 (1963).
- 37) Prentice, M. B., Cope, D. and Swann, D. A.: The epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infection in British Isles 1983-1988. *Contrb. Microbiol. Immunol.*, **12**, 17-25 (1991).
- 38) Sato, K., Ouchi, K. and Taki, M.: *Yersinia pseudotuberculosis* infection in children, resembling Izumi fever and Kawasaki syndrome. *Pediat. Infect. Dis.*, **2**, 123-126 (1983).
- 39) 齋藤雅明, 山口美佳子, 豊川安延, 大友良光, 金子誠二, 丸山 務: 青森県弘前地区における *Yersinia enterocolitica* 血清型 O8 感染症 (1984~1991). 感染症学雑誌, **68**, 960-965 (1994).
- 40) Shiozawa, K., Akiyama, M., Sahara, K., Hayashi, M., Nishina, T., Murakami, M. and Asakawa, Y.: Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 3B and 4, serotype O3 isolates from pork samples and humans. *Contr. Microbiol. Immunol.*, **9**, 30-40 (1987).
- 41) Sprague, L. D. and Neubauer, H.: *Yersinia aleksiciae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 831-835 (2005).
- 42) Salyers, A. A. and Whitt, D. D.: *Yersinia* infections. Bacterial Pathogenesis: A molecular approach. p. 213-228, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C. (1994).
- 43) Uchida, I., Kaneko, K. and Hashimoto, N.: Cross-protection against fecal excretion of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in mice by oral vaccination of viable cells. *Infect. Immun.*, **36**, 837-840 (1982).
- 44) Uchiyama, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kato, H., Fujimaki, W., Imanishi, K. and Yan, X. J.: Superantigenic properties of a novel mitogenic substance produced by *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from patients manifesting acute and systemic symptoms. *J. Immunol.*, **151**, 4407-4413 (1993).
- 45) Wauters, G., Janssens, M., Steigerwalt, A. G. and Brenner, D. J.: *Yersinia mollaretii* sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov., formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A and 3B. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **38**, 424-429 (1988).
- 46) Wren, B. W. and Tabaqchali, S.: Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction. *Lancet*, **336**, 693 (1990).
- 47) Yanagawa, Y., Maruyama, T. and Sakai, S.: Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from apparently healthy dogs and cats. *Microbiol. Immunol.*, **22**, 643-646 (1978).
- 48) Yersin, A.: La peste bubonique a Hong-kong. *Ann. Inst. Pastur.*, **2**, 428-430 (1894).