

度であり、組織学的には感染を疑わせる変化が認められた。おそらく野生型の強い炎症から回復した群では血清型に非特異的な食細胞群が増加しており、効果のあったワクチン株の作用にもこのような局所の細胞性免疫が関与していることが予想される。これは、二回目の実験で皮下接種により誘導された液性免疫だけでは有効な効果が得られなかったことから支持されることが考えられる。

抗体の産生量は、培地中に分泌される可溶性の病原蛋白に関する限り、炎症の程度が強い野生型投与群が有意に多いことがELISA法で示されている。ELISAの抗原として用いた *S. sonnei* の分泌蛋白は主としてTTSSのエフェクターであるIpaBCD蛋白群であり、このことはワクチン効果の中心となるprotective antigenが、これまで考えられてきた分泌因子以外の病原蛋白である可能性も考慮する必要があると思われる。こうした結果を踏まえて、今後効果のあったワクチン接種個体で示された抗体の認識する蛋白の局在を調べる予定である。

評価系の問題として症状を数値化することが困難であり、マウスを用いた赤痢菌による肺炎モデルも試行したが、感染域と致死域のばらつきが多く、有意な結果は得られなかった。また、局所の細胞性免疫を含めた免疫系全体が重要であるとする、実際の感染部位と異なる角結膜炎による評価でワクチン効果を判定することは説得力に欠ける。そうしたことから、アジアにおけるラボネットワークを生かし、シメチジン投与モルモットを用いた腸管感染系を開発した、インドNICEDのDr. Hamanta Koleyと共同研究を進めている。

E. 結論

汎赤痢菌群に効果が認められる赤痢ワクチンの候補株として、赤痢菌の病原性発現に関わるRNA結合蛋白遺伝子 *hfq* の欠損変異株を用いて、モルモットの角結膜炎モデルで効果を判定した。*hfq* 欠損株は免疫時の症状が軽く、血清型の違いに関わらず一定のワクチン効果が認められた。再試験では免疫能が不良で再現性が得られなかった。

F. 健康危機情報

緊急性をもって報告すべき内容は特になし。

G. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年等）

1. 論文発表

Mitobe J, Morita-Ishihara T, Ishihama A, Watanabe H. 2009 Involvement of RNA-binding protein Hfq in the osmotic-response regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. BMC Microbiol. 9:110.

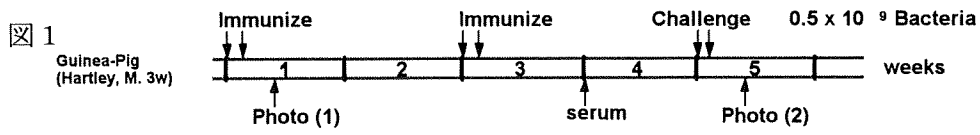
2. 学会発表

平成21年3月12-14日 第82回日本細菌学会総会 名古屋国際会議場

2009, Sept. 12-14, The 44th US-Japan Medical conference Cholera board. San Diego CA, USA

<参考文献>

1. Kotloff, K.L., et al., *Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies*. Bull World Health Organ, 1999. 77(8): p. 651-66.
2. Hartman, A.B., et al., *Small-animal model to measure efficacy and immunogenicity of Shigella vaccine strains*. Infect Immun, 1991. 59(11): p. 4075-83.

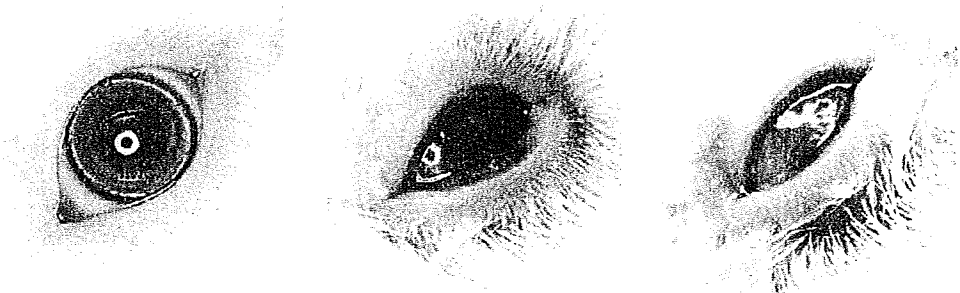


#		
6	Vaccine strain	HW383
6	Wild-type (control)	HW383
3	2457T Δhfq	HW383
3	LB (control)	HW383

Vaccine strain : *S. flexneri* 2a 2457T Δhfq (pACYC177-*ipgC*-*ipaD*)
 Wild-type (control): *S. flexneri* 2a 2457T
 Challenge strain : *S. sonnei* HW383

☒ 2

control Δhfq wild-type



PBS 投与群 *hfq* ワクチン投与群 野生型投与群

☒ 3

Control (PBS) Vaccine Control (野生型)

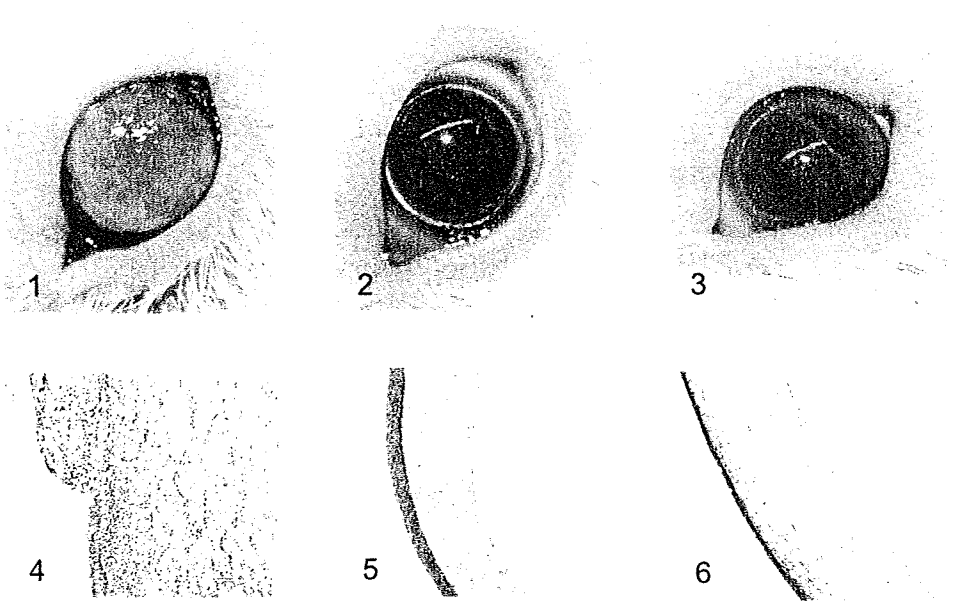


図 4

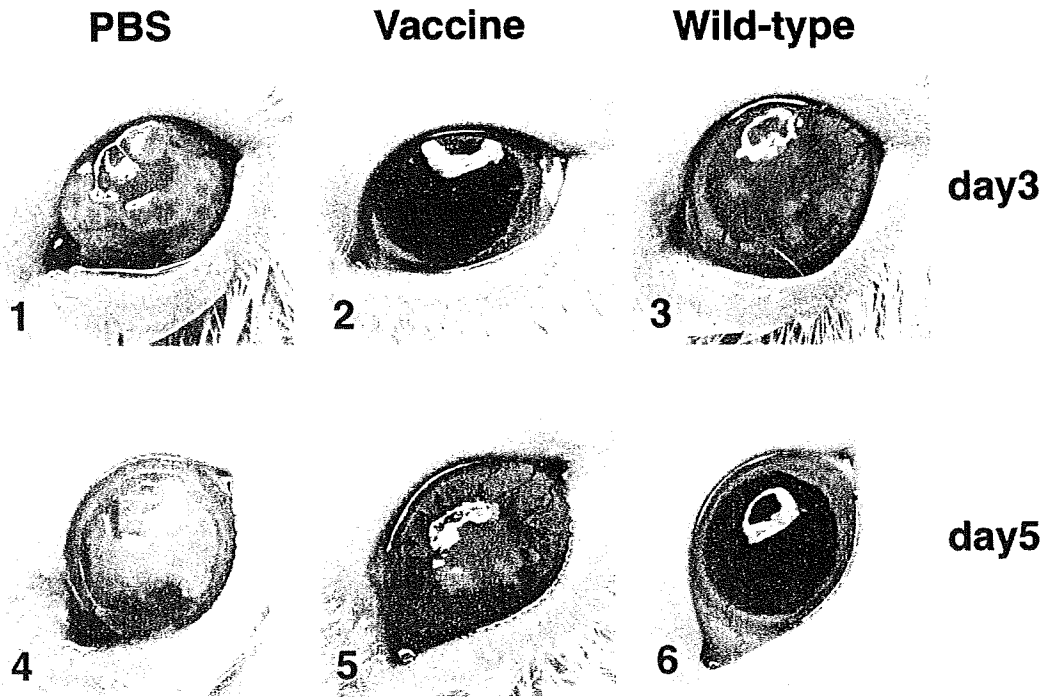
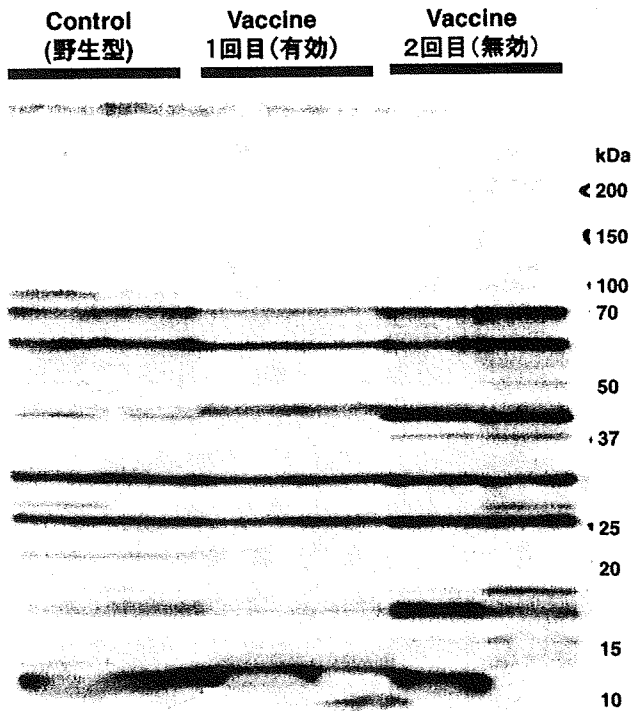


図 5



ワクチン投与モルモット血清によるD群*S. sonnei* (攻撃株)の蛋白に対するウエスタンブロット。

厚生労働科学研究費補助金
平成20年度 分担研究報告書

研究課題名：「アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワーク」

分担研究：「コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* El Tor 01, 0139 株の Integron Island を標的とした PCR-RFLP 解析」報告書

分担研究者 大澤 朗 神戸大学 農学研究科

研究要旨：

前年度研究より明らかとなったコレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* の 01 El Tor 株および 0139 株のゲノム DNA 上に存在する約 120kb の Integron Island 領域の多様性をより詳細に解析するため、この領域を 11 に分割した細分領域について PCR-RFLP 法を用いて解析した。その結果、1983 年以前と 1994 年以後に分離された株間で RFLP パターン違いが見られる領域が認められ、この領域においてさらに詳細な解析を行った結果、1994 年以降に分離された株は総て約 20 kb の DNA を「欠失」していることが明らかとなった。他方、1990 年前後に起ったとされる *ctxB* 遺伝子変異（エルトール型→古典型）の分布について調べた結果、上記 Integron Island における変異とは関連していないことが示された。

A. 研究目的

V. cholerae は現在も世界規模で広く蔓延し、多くの死者を出している腸管病原細菌である。*Vibrio cholerae* による世界的流行は過去に 7 回あり、7 回目の世界流行はコレラ毒素産生性の *V. cholerae* 01 El Tor によって 1961 年から始まり、1992 年に出現した 0139 株による流行も含め現在も継続中である。前年度の研究により我々は、約 120kb の Integron Island 上に散在する「*Vibrio cholerae* repeats」を利用した DNA フィンガープリンティング法を開発し、その結果得られたパターンが 1990 年頃を境に大きく 2 つに分けられることを報告した。歴史的にみて *Vibrio cholerae* に 1990 年前

後で起こった主な事象は、コレラ毒素産生性の血清型 0139 株の流行、コレラ毒素をコードするエルトール型 *ctxB* 遺伝子が古典型に「変異」した 01 El Tor variant 株の出現、多剤耐性株の増加などが挙げられる。本研究では、Integron Island 領域においてどの部位にどのような変異が起こったのかを明らかにするため、この領域を 11 の細分領域に分けて PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 解析を行った。さらにその多様性と分離年や分離地といった疫学情報との関係、加えて上記の *ctxB* 遺伝子の変異との関連についても検証した。

B. 研究方法

1) 供試菌株：1971 から 2006 年に分離された毒素産生性 01 EL Tor 株を 70 株、1993 から 2006 年に分離された 0139 株を 18 株、計 88 株（内 37 株は国立感染症研究所保存株、51 株は大阪府立公衆衛生研究所保存株）より抽出、精製された DNA 試料を供試した (Table 1)。01 型株は 1971 年から 2004 年の間にアジアや南米諸国から分離され、0139 型株は 1993 年から 2006 年までにアジアや欧州のデンマークから分離された株を含んでいる。

2) Long-PCR 領域の選定：N16961 株の塩基配列情報を基に Integron Island (約 120 kb) 内で任意選択した遺伝子群についてその保有を PCR にて上記菌株を供試して確かめた。次に全株で保有が確認された 7~17 kb の遺伝子間を「挟み込む」PCR プライマーセット (Table. 2) を作成し、全領域を 11 領域 (I - XI) に分割した (Fig. 1)。

3) 代表 10 株を供試しての予備実験：分離地、分離年の異なる代表 10 株の選択を行った (Table 1 において星印をつけた株)。これを用いて上記 11 領域に対する long PCR を行い、全 10 株で増幅産物が得られた領域について HaeIII 処理による RFLP 解析を行った。

4) 全株 (88 株) を供試しての IV、VI 領域における PCR-RFLP 解析：明らかなパターンの違いが見られた領域について前項 10 株を含む全 88 株を用いて PCR-RFLP 解析を行った。

5) VI 領域における更なる解析：全塩基配列の決定されている 2 株を用いて

の Integron Island 領域の配列比較：全塩基配列の決定されている N16961 株と MJ-1236 株について GenomeMatcher 1.332 (Copyright (c) 2007 Y. Ohtsubo, W. Ikeda-Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda) を用いて *in silico* の比較解析を行った結果、1990 年以後に分離された株 MJ-1236 株で約 20 kb の欠失が起こっていることが予測された。これを全株で確かめるために、予測欠失領域上に増幅産物が得られるようなプライマーセットを作成し (Fig. 2)、さらにこの領域外から先のプライマーセットのうち一方との間で同じく増幅産物が得られるようなプライマー (Fig. 2) を作成し追補の PCR を行った。

6) *ctxB* 遺伝子の変異との比較：PCR-RFLP で認められた 1990 年を境とする Integron Island 領域における変異と *ctxB* 遺伝子の変異との関係を調べるために、Morita ら¹⁾ によって開発された MAMA-PCR を行い、供試菌株におけるエルトール型 *ctxB* 遺伝子と古典型 *ctxB* 遺伝子の分布を調べた。

C. 研究結果

1) 代表 10 株を供試しての予備実験：10 株での解析の結果、III、VII、VIII を除く 8 領域において全株で増幅産物が得られた (Table 3)。

2) 上記 PCR 産物の RFLP 解析の結果、上記 8 細分領域中 I・IV・V・VI・X、特に IV と VI 領域において RFLP パターンに違いが見られた (Fig. 3)。

3) 全株 (88 株) を供試しての IV、VI

Table 1 本研究に供試した菌株とIntegron Island細分領域 IVおよびVIのRFLPパターンおよびMAMA-PCRによるctxB遺伝子型別の結果

No	Strain	Serogroup	Origin	Year	IV領域RFLPパターン		MAMA-PCR		Year	Origin	Serogroup	Strain	VI領域RFLPパターン		MAMA-PCR	
					IV領域RFLPパターン	VI領域RFLPパターン	E*	E ^b					Year	Origin	Strain	VI領域RFLPパターン
1*	N16961	O1(Inaba)	Bangladesh	1971	A	A	E*	NIID ^c	1993	Japan	O1(Ogawa)	5H176	A	A	E	OPI
2	52H15	O1(Ogawa)	Japan	1977	A	A	E	OPI ^d	1993	India	O139	21-93	E	B	E	NIID
3*	1001	O1(Ogawa)	Japan	1977	C	A	E	NIID	1993	India	O139	63-93	E	B	E	NIID
4	53H54	O1(Ogawa)	Japan	1978	A	A	E	OPI	1994	Denmark	O139	1010-94	E	B	E	NIID
5	53H55	O1(Ogawa)	Japan	1978	A	A	E	OPI	1994	Japan	O139	294-94	E	B	E	NIID
6	63H189	O1(Ogawa)	Japan	1978	A	A	E	OPI	1994	Thailand	O139	298-95	E	B	E	NIID
7*	1002	O1(Inaba)	Japan	1978	B	A	E	NIID	1994	Korea	O139	387-94	E	B	E	NIID
8	53H164	O1(Ogawa)	Japan	1979	A	A	E	OPI	1994	Japan	O139	435-94	E	B	E	NIID
9	56H43	O1(Ogawa)	Japan	1981	A	A	E	OPI	1994	Japan	O139	895-94	E	B	E	NIID
10	56H90	O1(Inaba)	Japan	1981	A	A	E	OPI	1994	Japan	O1(Ogawa)	5H237	E	B	E	OPI
11	56H92	O1(Inaba)	Japan	1981	A	A	E	OPI	1994	Japan	O1(Ogawa)	5H332	A	A	E	OPI
12	63H192	O1(Ogawa)	Japan	1981	A	A	E	OPI	1994	Japan	O1(Ogawa)	6H58	A	B	C	OPI
13	63H193	O1(Ogawa)	Japan	1982	A	A	E	OPI	1995	Japan	O1(Ogawa)	7H285	A	B	C	OPI
14	63H194	O1(Ogawa)	Japan	1982	A	B	E	OPI	1995	Japan	O1(Ogawa)	7H449	A	B	C	OPI
15	57H193	O1(Ogawa)	Japan	1983	A	A	E	OPI	1995	Indonesia	O1(Ogawa)	1008	A	B	C	NIID
16	58H164	O1(Ogawa)	Japan	1983	A	A	E	OPI	1996	Mongol	O1(Ogawa)	1011	A	B	C	NIID
17	59H179	O1(Ogawa)	Japan	1984	A	A	E	OPI	1996	China	O139	1008-96	E	B	E	NIID
18	63H196	O1(Ogawa)	Japan	1984	A	A	E	OPI	1996	Japan	O1(Ogawa)	8H215	A	B	C	OPI
19	63H197	O1(Inaba)	Japan	1984	A	B	E	OPI	1997	Singapore	O1(Ogawa)	39	A	B	C	NIID
20	63H198	O1(Inaba)	Japan	1984	A	A	E	OPI	1997	China	O1(Ogawa)	19	A	B	C	NIID
21	63H200	O1(Ogawa)	Japan	1984	A	A	E	OPI	1997	Philippines	O1(Ogawa)	58	A	B	C	NIID
22	63H199	O1(Ogawa)	Japan	1984	A	A	E	OPI	1997	Thailand	O1(Ogawa)	9H235	A	B	C	OPI
23	59H290	O1(Inaba)	Japan	1985	A	A	E	OPI	1997	Thailand	O1(Ogawa)	14	A	B	C	NIID
24	63H201	O1(Ogawa)	Japan	1985	F	A	E	OPI	1997	Thailand	O1(Ogawa)	5	A	B	C	NIID
25	63H202	O1(Ogawa)	Japan	1985	G	A	E	OPI	1997	Thailand	O1(Ogawa)	81	A	B	C	NIID
26	63H203	O1(Ogawa)	Japan	1985	A	A	E	OPI	1998	India	O139	199-98	E	B	E	NIID
27	61H151	O1(Inaba)	Japan	1986	A	A	E	OPI	1998	Japan	O1(Ogawa)	10H1	A	B	C	OPI
28	63H206	O1(Ogawa)	Japan	1987	A	A	E	NIID	1998	Japan	O1(Ogawa)	10H53	A	B	C	OPI
29	1003	O1(Inaba)	Japan	1989	A	A	E	NIID	1998	Japan	O1(Ogawa)	10H169	A	B	C	OPI
30	Q5	O1(Inaba)	Japan	1989	A	B	E	NIID	1999	Japan	O1(Ogawa)	10H664	A	B	C	OPI
31	1010	O1(Inaba)	India	1991	A	B	E	NIID	1999	Japan	O1(Ogawa)	10H664	A	B	C	OPI
32	1004	O1(Ogawa)	Japan	1991	A	B	C ^b	NIID	1999	Japan	O1(Ogawa)	11H215	A	B	C	OPI
33	1009	O1(Ogawa)	India	1991	A	B	E	NIID	2000	Japan	O1(Ogawa)	11H558	A	B	C	OPI
34	2H284	O1(Inaba)	Japan	1991	A	A	E	OPI	2001	Japan	O1(Ogawa)	13H59	A	B	C	OPI
35	1005	O1(Ogawa)	Peru	1992	D	A	E	NIID	2001	Japan	O1(Inaba)	13H82	A	B	C	OPI
36	1006	O1(Ogawa)	Bolivia	1992	D	A	E	NIID	2001	Japan	O1(Inaba)	13H173	A	B	C	OPI
37	4H77	O1(Ogawa)	Japan	1992	A	B	E	OPI	2001	Japan	O1(Inaba)	13H183	A	B	C	OPI
38	1056-93	O139	Japan	1993	E	B	E	NIID	2001	Japan	O1(Ogawa)	13H257	A	B	C	OPI
39	1180-93	O139	Japan	1993	E	B	E	NIID	2004	Japan	O139	234	E	B	E	NIID
40	184-93	O139	Bangladesh	1993	E	B	E	NIID	2004	Japan	O1(Inaba)	15H245	A	B	C	OPI
41	236-93	O139	Japan	1993	E	B	E	NIID	2004	Japan	O1(Inaba)	15H438	A	B	C	OPI
42	495-93	O139	Japan	1993	E	B	E	NIID	2005	Japan	O1(Ogawa)	17H16	A	B	C	OPI
43	515-95	O139	Bangladesh	1993	E	B	E	NIID	2006	Japan	O139	252	E	B	E	NIID
44	5H172	O1(Ogawa)	Japan	1993	A	B	C	OPI	2006	Japan	O1(Ogawa)	18H24	A	B	C	OPI

*: PCR-RFLPに先立つ予備実験に供試した10株 * E/EI Tor. C: classical. ^bNIID: National Institute of Infectious Diseases Osaka Prefectural Institute of Public Health

Table.2 PCR-RFLP解析に用いたプライマーの配列の一覧

領域	標的遺伝子(領域)	プライマー配列	相同領域(N16961)	推定産物長(kbp)
I	VC_A0291-0301	TGGGCTTAAACACCGCTTG ACCACCGGCTAAATCCAGAA	309765-309784 316842-316823	7.1
II	VC_A0301-0313	GCTCAAAACGGTTTTCCG GTGTAACGCCCAAATGTTCCCTT	316168-316186 323890-323868	7.7
III	VC_A0313-0337	ATCATCTAGCGATGGCTGTCGTA TGCTTTTACCCAACGATCTTC	323512-323534 337029-337009, 396243-396223	13.5
IV	VC_A0341-0359	GTCACCTTGATCATTTGGTTCTG GAAACCATTTAATCTTACCGTCGC	329881-329903, 338994-339016, 412384-412406 349926-349903	10.9
V	VC_A0359-0387	TATTGGGTTACATCCATGCTCT TAAAGCGACTCTACGTTAAGCG	349641-349663 366677-366655	17
VI	VC_A0387-0406	GAAGATATTGCGGGCATTACCGACATCTTT GCTGCTGAACGTAATGAGCCGATTTGTAT	366195-366224 325735-325706, 344507-344478, 378593-378564, 399155-399126	12.4
VII	VC_A0406-0417	TGAATGGTTGCTTGGGCA CTCTCGGATAAAACGGACA	378120-378137, 325262-325279 325073-325054, 384453-384434	6.3
VIII	VC_A0417-0447	GGCTTCGTTCACTGAAGTGG AGCTGCAATTAAGTTGAGCC	324577-324597, 383957-383977 400973-400953, 618-598	17
IX	VC_A0447-0470	GTTAGGTTATGCGTTTCCCTCG CTGGGTTACTCGAACTGTTGTACG	400358-400379 416145-416122	15.8
X	VC_A0470-0490	CGATTACAACGAAGTGATTGC CAGACTCACTTACACCCGACA	415748-415768 427281-427261	11.5
XI	VC_A0490-0496	GTTGCGCTATCATCTCGAGCTT TGTGGTTCTGAAACGGCTACTC	426363-426384 430843-430822	4.5

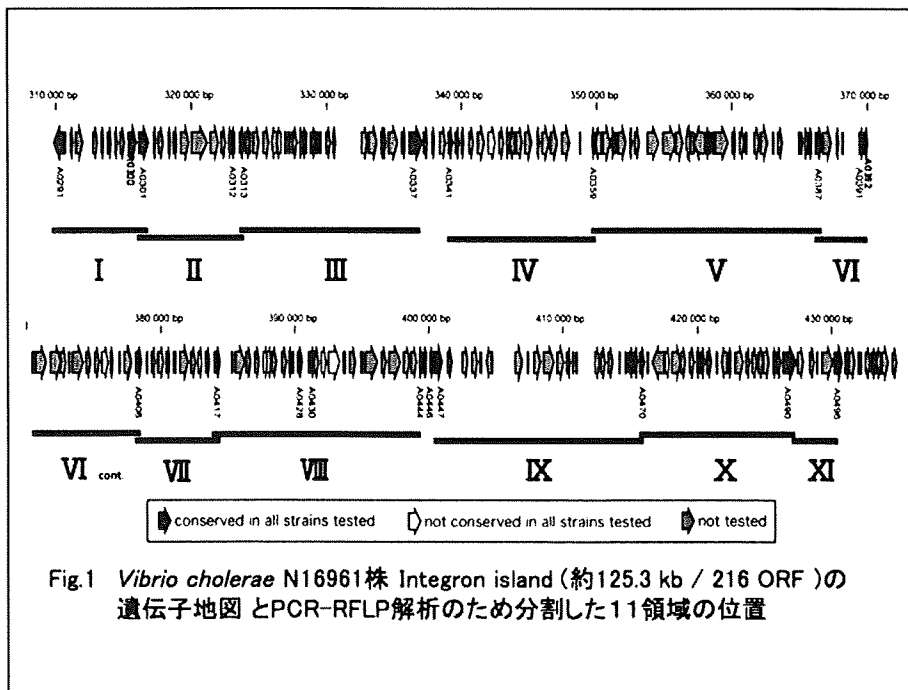


Fig.1 *Vibrio cholerae* N16961株 Integron island (約125.3 kb / 216 ORF) の遺伝子地図とPCR-RFLP解析のため分割した11領域の位置

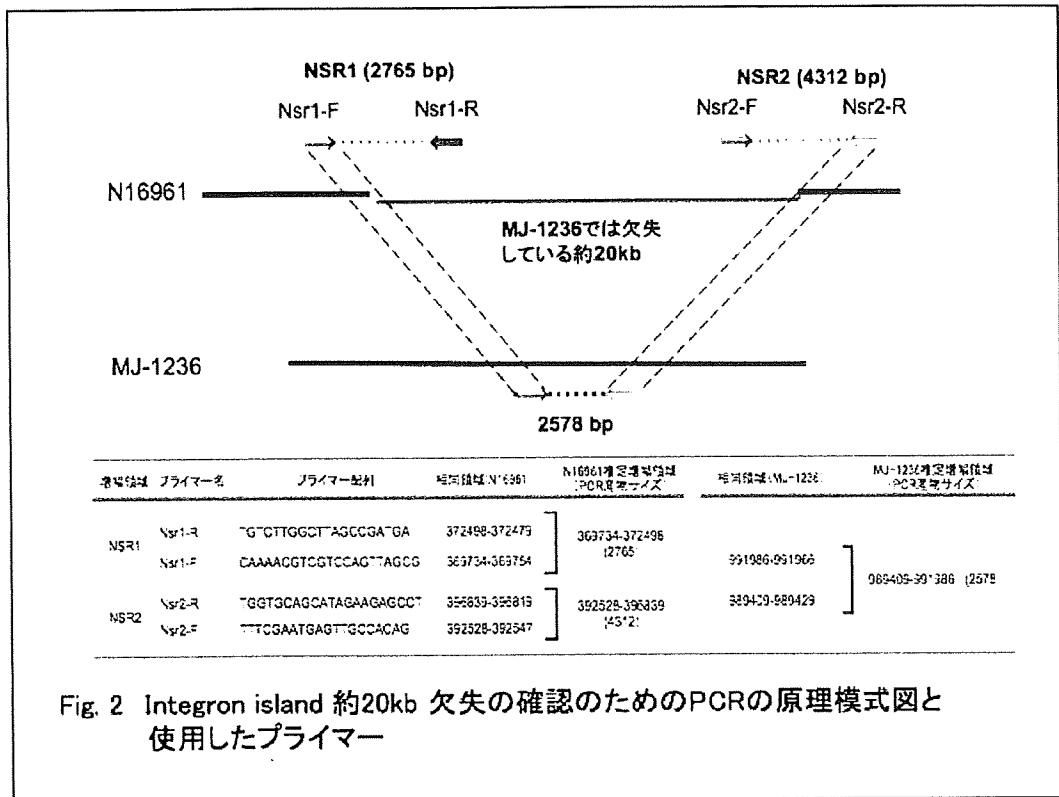
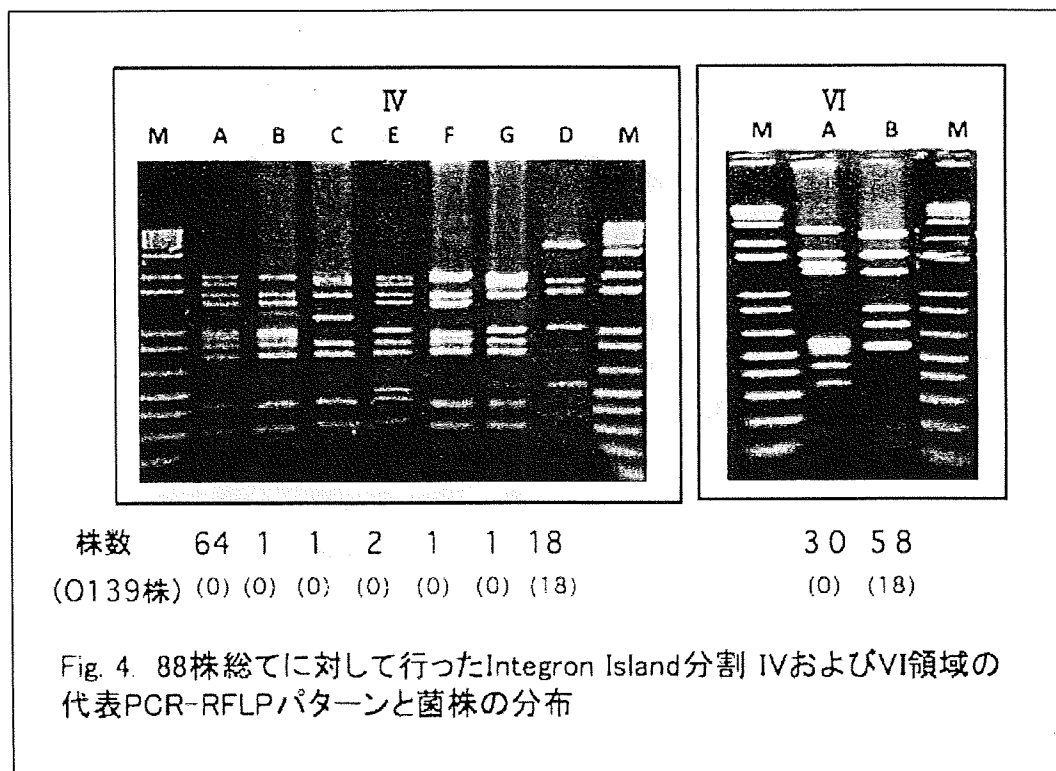
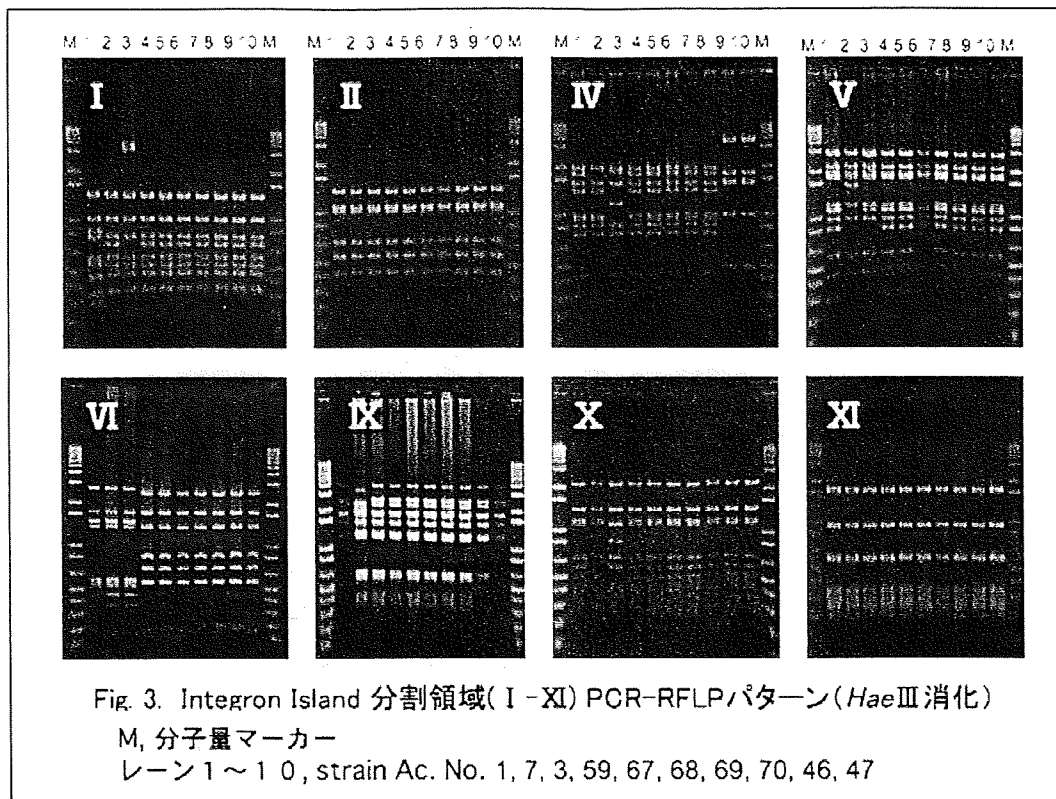


Table.3 N16961のIntegron Island 分割領域 I ~XIに相当する領域の有無暫定確認PCRの結果

Strain Ac. No.	Integron Island 分割領域番号										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	[+]	+	+	[+]	+	+	+	+	+	[+]	+
7	[+]	+	+	[+]	+	+	+	+	+	+	+
46	[+]	+	-	+	+	[+]	-	-	+	+	+
47	[+]	+	-	+	+	[+]	-	-	+	+	+
59	[+]	+	+	+	+	[+]	-	-	+	+	+
67	[+]	+	+	+	+	[+]	-	-	+	+	+
68	[+]	+	+	+	+	[+]	-	-	+	+	+
69	[+]	+	+	+	+	[+]	-	-	+	+	+
70	[+]	+	+	+	+	[+]	-	-	+	+	+

[+]: N16961株と異なるサイズの増幅産物が得られた



領域における PCR-RFLP 解析：明らか
なパターンの違いが見られたIV・VI領
域において残りの供試菌株 78 株を加
えて同様の解析を行った。その結果、
IV領域では 0139 全株が共通のパター
ンとなり、他方、VI領域では2つのパ
ターン (A, B) がみられ (Fig. 4)、1971
年～1982 年の分離株は総て A パター
ン、1983 年～1994 年の分離株では両
パターンが混在し、1995 年以後の分離
株では総てが B パターンを示した。
0139 株は総て B パターンを示した
(Table 1)。なお、上記の RFLP パタ
ーンと菌株の分離地との関連はまっ
たく認められなかった。

4) VI領域における追補 PCR によつて
B パターンを示す株はこの領域の一部
を含む約 20 kb が欠失していることが
確認された。

5) 供試したすべての *V. cholerae*
0139 株はエルトール型 *ctxB* 遺伝子を
有していた。*V. cholerae* 01E1 Tor
株については、1990 年以前に分離され
た株はすべてエルトール型 *ctxB* 遺伝
子を保有していた。1991 年～1993 年
において古典型 *ctxB* 遺伝子を保有し
る株が出現し、1994 年以降では古典型
ctxB 遺伝子を保有する菌株が大勢を
占めた。

D. 考察

前年度の研究にて国立感染症研究
所に保存されている *V. cholerae* の 37
株について行われた Integron Island
を標的とした DNA フィンガープリン
ティングによって、1990 年を境に系統的

な違いが確認され、この時期に
Integron Island に何らかの変異が起
ったことが示唆された。そこで本年度
研究では上記の 37 菌株の DNA 試料に
加え、大阪府立公衆衛生研究所より提
供された 51 株の DNA 試料について、
Integron Island を 11 に分割した領域
について RFLP 解析を行いさらに詳細な
「変異」箇所の特定を試みた。その結
果上記分割された 6 番目の領域、VI領
域に RFLP パターンの変異 (A→B) が
認められた。この変異は 1983 年から
1993 年の 10 年間で漸次 A から B に
「変遷」するかたちで認められ、前年
度研究にて示唆された 1990 年以前と
以後に分離された菌株間の Integron
Island 遺伝子配列の差異が、この領域
の変異によるものである可能性が示
された。さらにこの Integron Island
における「変異」は *ctxB* 遺伝子のエ
ルトール型→古典型への「変異」と合
致しなかった。すなわち、前者と後者
は「連動」したのではなく、前者は
後者に「先立って」起ったことが示唆
された。

上記の VI 領域で何が起こったのか
を予想するべく、全塩基配列が利用可
能な 2 株を用いてインテグロン領域の
in silico 配列比較を行った。その結
果、1990 年以前に分離された N16961
株を含む毒素産生性 *V. cholerae* 01
E1 Tor 株に特異的な領域が判明した。
VI領域においてみられた 1994 年以降
に分離された PCR-RFLP パターンの違
いは、約 20 kb の「欠失」によるも
のであった。Genbank のデータベース

によると当該の約 20kb には 4 つの acetyltransferase putative gene と 1 つの lipoprotein 構築に係る gene を含む 42 の open reading frame が存在するとされているが、残り 37 個の orf は機能未知の hypothetical protein である。これらの hypothetical protein 群に *V. cholerae* の病原性や生態的に有利となるように働く遺伝子を抑制する遺伝子が含まれていれば、その欠失は新たな病原性の発現につながり、それによって 1990 年以降の世界的流行を説明することができるかもしれない。したがって今後は、約 20 kb 領域にコードされる遺伝子の欠失による表現型（薬剤耐性、ファージ感受性等）や病原性（接着性、毒素産生性等）への影響について検証する予定である。

他方、そのこの「欠失」を検出するべく本年度の研究によって開発された PCR 法は、今後流行しうる“新型”菌株を早期、簡便に検知する上で有用であると考えられる。

E. 結論

コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* の 01 El Tor 株および 0139 株のゲノム上に存在する Integron Island の PCR-RFLP 法を用いて解析を行った結果、1994 年以後に分離され株総てに 20 kb の「欠失」が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tokunaga, A., Yamaguchi, H., Morita,

M., Arakawa, E., Izumiya, H., Watanabe, H., Osawa, R. (in press): Novel PCR-based genotyping method, using genomic variability between repetitive sequences of toxigenic *Vibrio cholerae* 01 El Tor and 0139. Mol. Cell. Probes.

2. 学会発表

1) Osawa, R.: Novel PCR-based DNA fingerprinting, using genomic variability between repetitive sequences of toxigenic *Vibrio cholerae* 01 El Tor and 0139 strains, The 13th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, in Kolkata, India (2009. 4).

2) 山口博史, 井口純, 森田昌知, 勢戸和子, 渡辺治雄, 大澤朗: 「コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* エルトール 01, 0139 株の Integron Island を標的とした PCR-RFLP 解析」日米コレラ関西支部会(2009. 7)

3) 山口博史, 井口純, 森田昌知, 勢戸和子, 渡辺治雄, 大澤朗: 「コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* エルトール 01, 0139 株の Integron Island を標的とした PCR-RFLP 解析」第 43 腸炎ビブリオシンポジウム (2009. 11)

G. 参考文献

1) Morita M, Ohnishi M, Arakawa E, Bhuiyan NA, Nusrin S, Alam M, Siddique AK, Qadri F, Izumiya H, Nair GB, Watanabe H. (2008).

Development and validation of a mismatch amplification mutation PCR assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. Microbiol. Immunol. 52: 314-317

Title: annual report of PulseNet China

The serotype-converting phages of *Shigella flexneri*

Name of researcher: Jianguo Xu

Affiliation: State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention.

Objective: To study the contributions of the serotype-converting phages to the serotype shifting and emerging of new serotype of *Shigella flexneri* in China

Achievements:

Bacillary dysentery caused by *Shigella* is one of the major infectious diseases in developing countries. Shigellosis in China has been one of the top four notifiable infectious diseases, with close to half a million cases each year as reported by the Chinese Internet-based Reporting System of Notifiable Infectious Diseases which began operation in 2005. The predominant *Shigella* species in developing countries such as China where the sanitation and hygiene are not well practiced is *S. flexneri* and the distribution of *S. flexneri* serotypes varies geographically and temporally. Statistically

significant shifts of *S. flexneri* serotypes were observed in several developing countries including Indonesia, Bangladesh, Pakistan and China. Epidemiological studies consistently showed that certain serotypes are predominant and responsible for the majority number of cases. This suggests that some serotypes are more likely to cause epidemics than others. In other words, certain serotypes may have stronger epidemic strength than others. The phenomenon has not been well clarified.

There are 15 known serotypes of *S. flexneri* has. In a previous study we found nine serotypes including 1a, 2a, 2b, 3a, 4a, 5b, X, X variant and Y were present China over a nine-year surveillance and we further showed that 95% of the *S. flexneri* infections in China were caused by a single epidemic clone namely sequence type 91 including all the 9 serotypes found. Those findings suggest that the serotypes switch frequently in a similar, if not identical, genetic background.

In this study we report for the first time that epidemic strength of a *S. flexneri* serotype reflected by prevalence in clinical isolation is determined by bacteriophages. The strains of *S. flexneri* carrying high epidemic strength phages, such as SfX, SfII and Sfl, are prevalent and epidemic. And, nine epidemic-associated genes on the phage were identified.

From a total of 1608 isolates of *S. flexneri* studied, the most prevalent serotypes are X variant (37.1%), 2a (20.8%), X (16.7%), 1a (14.5%) and 2b (7.3%), and the three most prevalent phages are SfX, SfII and Sfl, present in 996 (61.9%), 451 (28%) and 233 (14.5%) isolates respectively. The phage Sfl successfully converted a serotype X strain to a novel serotype, 1:X, which has not been detected in nature. When compared with genome sequence of 402 dsDNA phage genomes available, phage SfX was found to be phylogenetically related to the O antigen modification phage P22, which is widespread in *Salmonella*. The two phages share uniquely 9 genes including three for virion assembly, two for integration and excision, two for immunity and two with unknown functions.

It has long been observed that certain serotypes of *S. flexneri* are more prevalent than others. Historically serotype 2a has been regarded as the leading serotype but recently a number of other serotypes including serotype X variant we reported previously have become frequent. These serotypes are often involved in epidemics and their isolation reflects how many people they infect and thus we called those serotypes with high isolation rate as epidemic serotypes, while those with low isolation rate as nonepidemic serotypes. Based on our analysis of nine-year data in China, five

serotypes, X variant, V, 2a, 1a, 2b are epidemic serotypes.

We have shown previously that a single clone of *S. flexneri* defined by MLST as ST91 is predominant and frequent serotype switching occurs with the clone. This lead us to conclude that the epidemic strength of certain serotypes is due to their serotype-converting phages which determine the serotype specificity, converting serotype frequency to phage frequency using the known relationship allowed us to identify the three most prevalent serotype-converting phages in China: SfX, SfII and Sfl, which were present in 97% of the 1608 isolates studied, with the other three phages, SfIV, Sf6 and SfV, together being represented by a mere 3%. Clearly, the phages SfX, SfII and Sfl have a high epidemic strength.

From comparison of SfX and P22, both of which are serotype-converting phages with high epidemic strength with other phages of low epidemic strength, we identified nine highly homologous genes shared only by these two phages as high epidemic strength genes. Apart from the two genes of unknown function, the other seven genes are related to phage functions with three in virion assembly, two in integration and excision and two of immunity. These genes are not obviously related to epidemic strength. However these genes play a critical role in the life cycle of a phage. A phage

that is readily inducible from its host, survives better in the environment and has less restrictive receptor requirements which can be considered as having a higher fitness will reach higher frequency and lead to increased frequency of a serotype carrying such a phage. Thus phage fitness determines the epidemic potential of a phage. Further studies are required to dissect the precise mechanisms.

Publication:

C. Ye, R. Lan, S. Xia, J. Zhang, Q. Sun, S. Zhang, H. Jing, L. Wang, Z. Li, Z. Zhou, A. Zhao, Z. Cui, J. Cao, D. Jin, L. Huang, Y. Wang, X. Luo, X. Bai, Y. Wang, P. Wang, Q. Xu, and J. Xu. Emergence of a new multidrug-resistant serotype X variant in an epidemic clone of *Shigella flexneri*. *J.Clin.Microbiol.* 48 (2):419-426, 2010.

STUDY TITLE: Organization of PFGE Workshop for Training and
Technology transfer for Asia Pacific countries/ areas
in February 2010

STUDY FACILITY:
(Name and
address of
institute) Public Health Laboratory Centre, 7/F,
382 Nam Cheong Street, Shek Kip Mei,
Kowloon, Hong Kong.

STUDY DIRECTOR:
(name of the
research
director) Dr. Kai Man KAM, M.D.
Signature, date

Project leader: Haruo Watanabe, M.D. Ph.D.
Deputy Director-General
National Institute of Infectious Diseases
Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku
Tokyo 162-8640, Japan
:

Issue Date: February 28, 2010.

1) **OBJECTIVE:**

- (1) To organize a Workshop to enhance the laboratory capacity of countries/ areas in Asia and Pan Pacific region in performing PFGE in February 2010;
- (2) To train up key laboratory personnel so they acquire the ability to build up the laboratory capacities in their own country/ area;
- (3) To build up a network of trainer and trainees that have shared experiences in PFGE laboratory work, and which can work together in partnership during outbreak investigations.

2) **STUDY DESIGN:**

- (1) Organization of Workshop in the Public Health Laboratory Centre in Hong Kong for training of laboratory personnel in the Asia Pacific Region in February 23-26, 2010.
- (2) Co-organizers were: NIID, Japan; CDC, USA.
- (3) The Public Health Laboratory Centre in Hong Kong was responsible for the use of fund monies of 2,000,000 yen in the overall organization of the Workshop.
- (4) The Workshop took place in the Public Health Laboratory Centre in Hong Kong.
- (5) The Workshop lasted 4 days and covered the setting up of PFGE laboratory data analysis software, requisite computer technique, commonly encountered problems, quality control/quality assurance issues, and network requirements.

3) **RESULTS:**

- (1) Participants of the Workshop had hands-on experience in performing PFGE data analysis and management. (listed Appendix I)
- (2) PFGE Data input and analysis in relation to outbreak investigations were also covered in the Workshop. (Schedule in Appendix II)
- (3) Key trainers from advanced institutions (including NIID, Japan and CDC, USA) were invited to participate in the Workshop.
- (4) Evaluation of the Laboratory Workshop by participants were done to gather experiences for development of future work in the Asia Pacific Region. (Appendix III)
- (5) A report was generated after the Workshop.