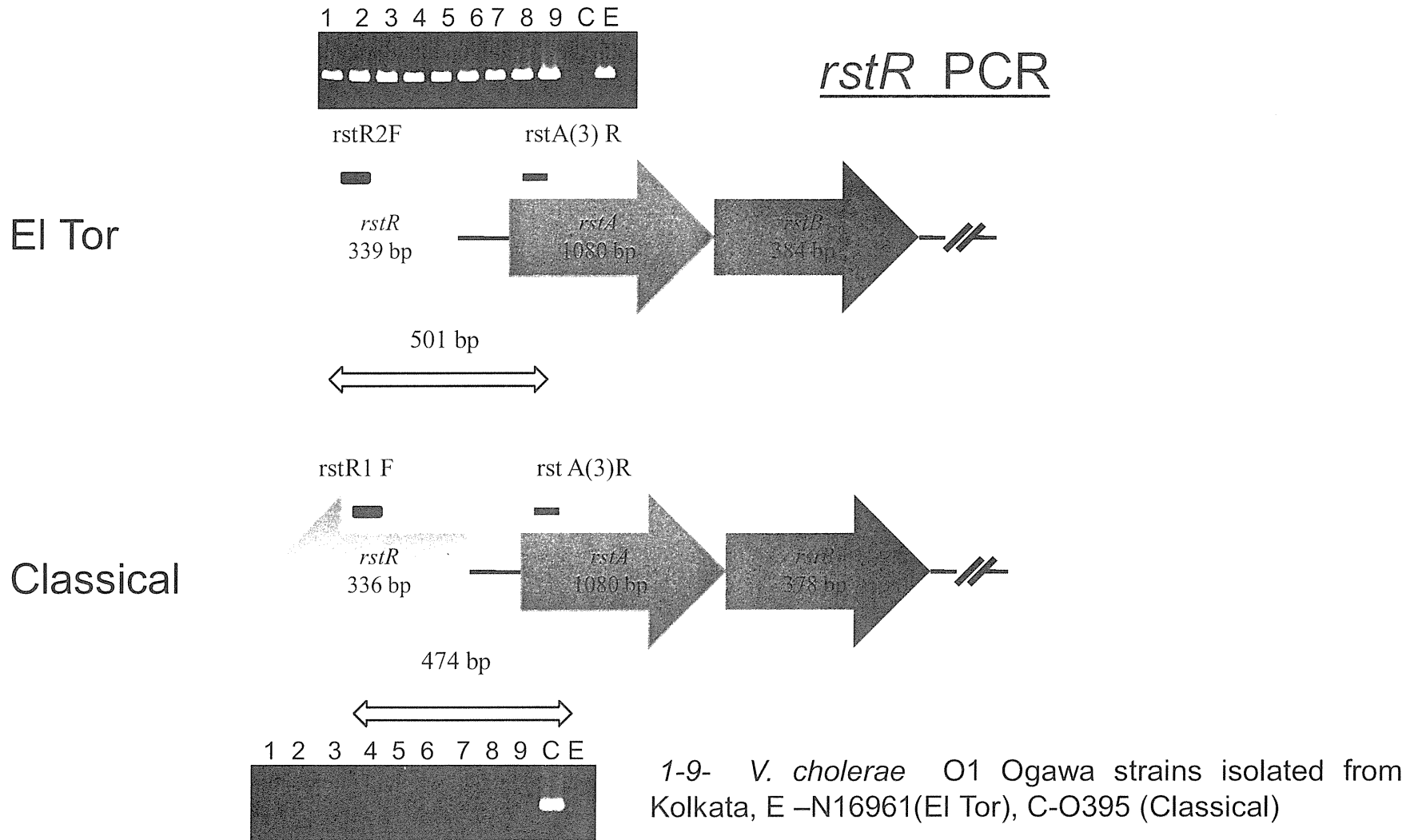


Biotype determination

	No. of strains tested	Matlab variant	Classical strain	El Tor strain	Kolkata Strains
Sensitivity to: Polymyxin B (50 IU)	55	R/S	S	R	R
Voges- Proskauer reaction	50	-	-	+	+

Kolkata strains (1995-2005)

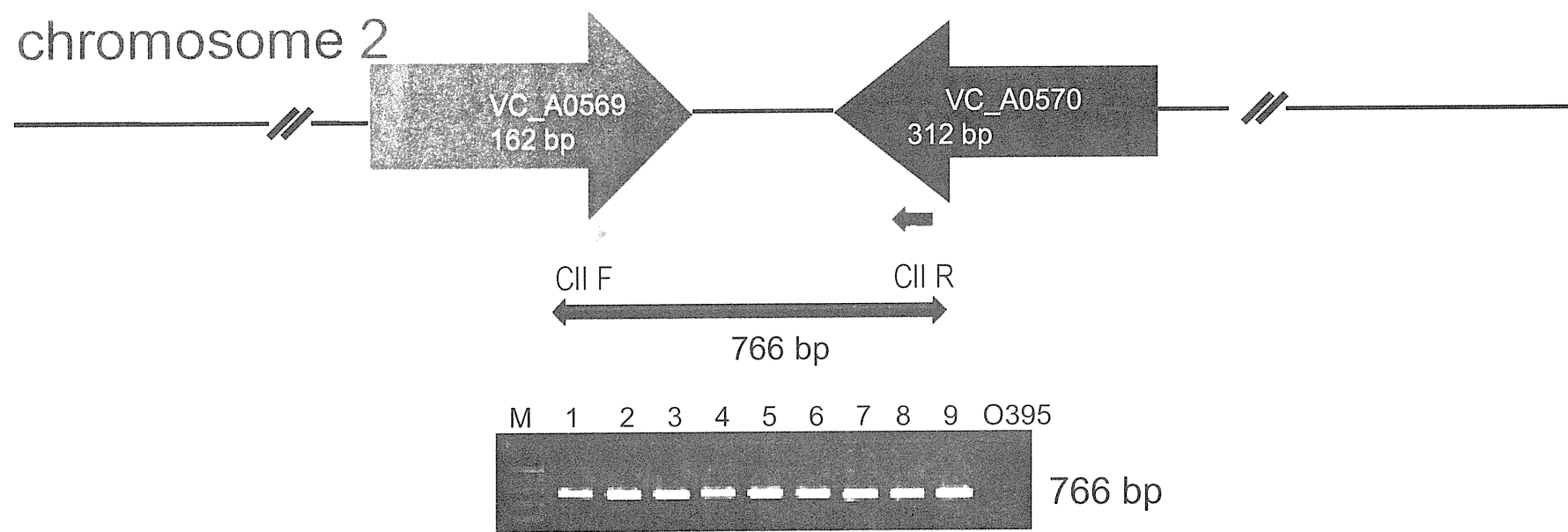
Figure 1



All the tested strains were positive for the El Tor specific *rstR*

Figure 2

PCR based analysis of the strains from Kolkata showed that chromosome II does not contain any CTX prophage



—292—

All the tested strains yielded empty site amplicon indicating that small chromosome is devoid of any CTX prophage

Figure 3

V. cholerae strains circulating in Kolkata during 1995-2005

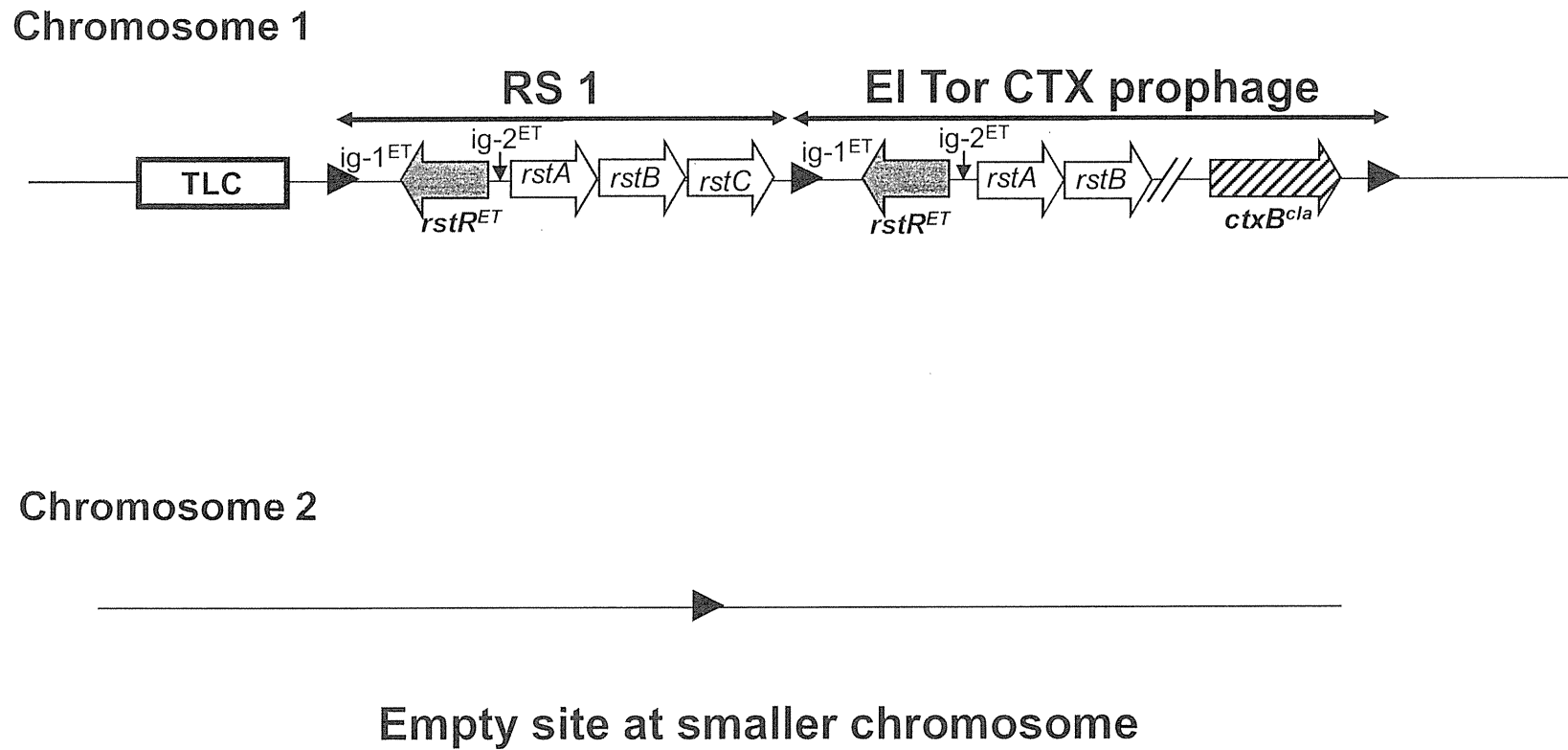


Figure 4

Analysis of promoter region of *ctxA*

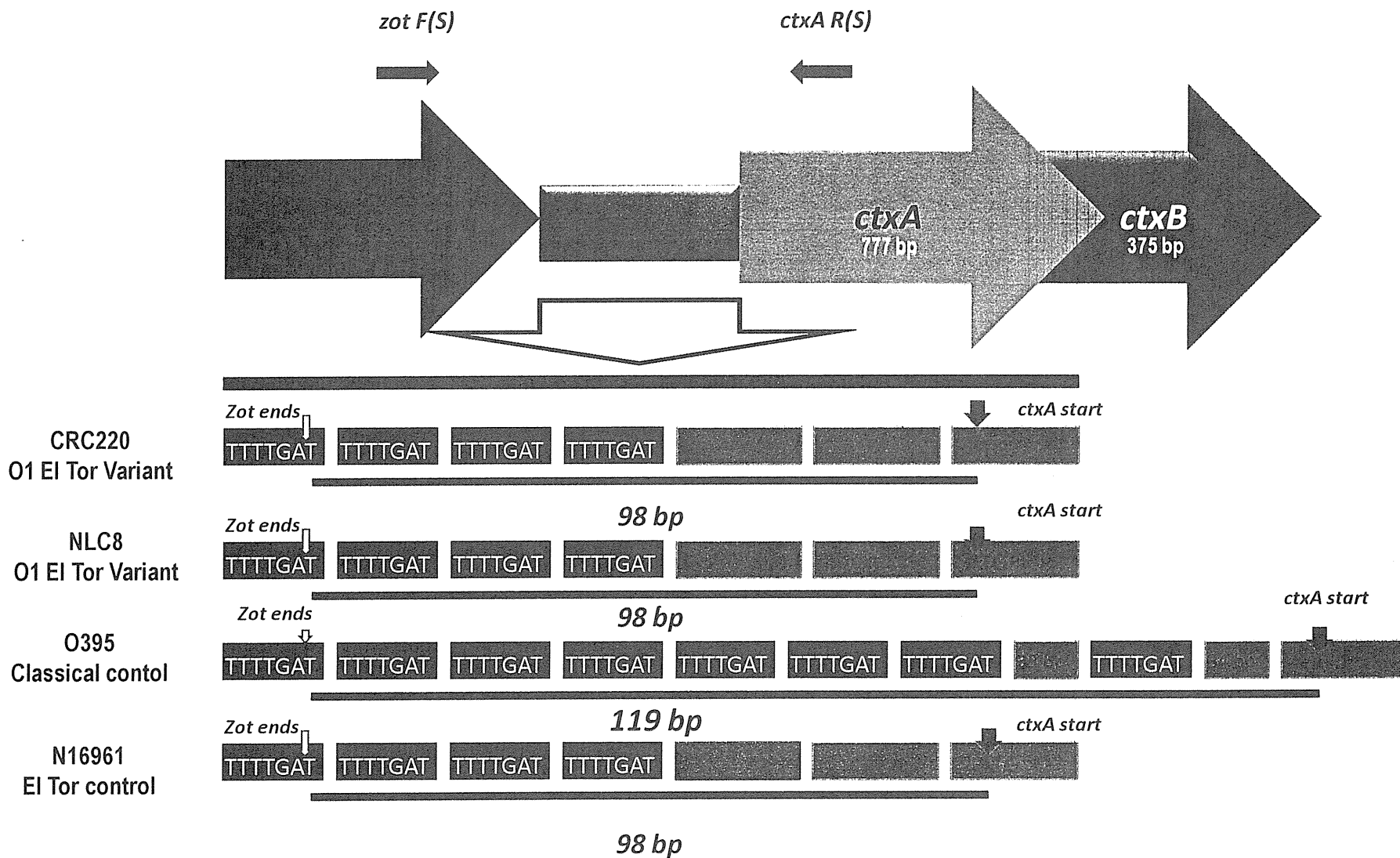


Figure 5

Analysis of promoter region of *tcpPH*, which differs between El Tor and classical in toxin regulation

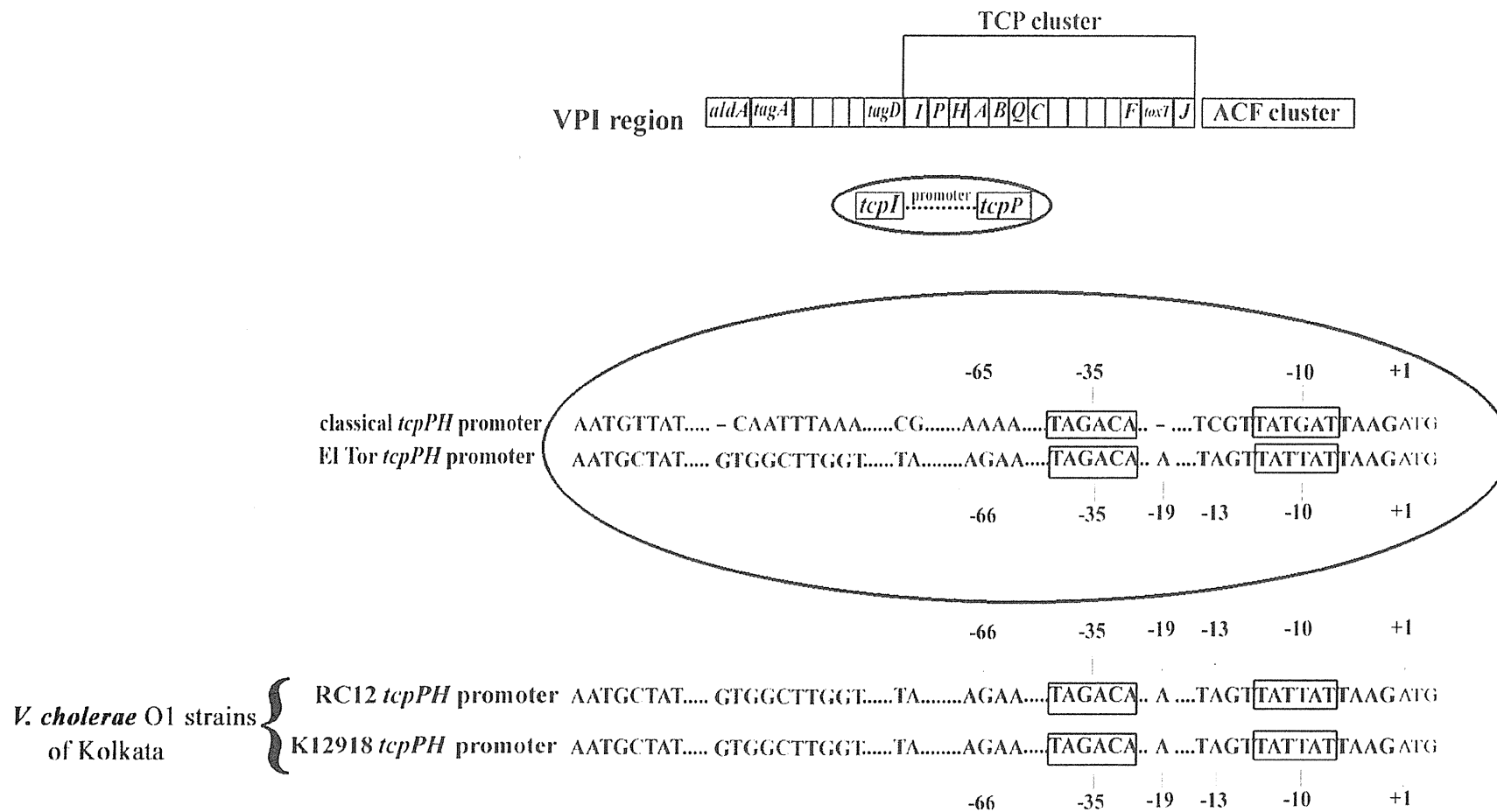


Figure 6

Development and Evaluation of a PCR Assay for Tracking the Emergence and Dissemination of Haitian Variant *ctxB* in *Vibrio cholerae* O1 Strains Isolated from Kolkata, India

AQ: au Arindam Naha,^a G. P. Pazhani,^a Mou Ganguly,^a Santanu Ghosh,^a T. Ramamurthy,^a Ranjan K. Nandy,^a G. Balakrish Nair,^a Yoshifumi Takeda,^b and Asish K. Mukhopadhyay^a

National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Kolkata, India,^a and Collaborative Research Center of Okayama University for Infectious Diseases at NICED, Kolkata, India^b

A PCR-based assay was developed to discriminate the classical, El Tor, and Haitian types of *ctxB* alleles. Our retrospective study using this newly developed PCR showed that Haitian *ctxB* first appeared in Kolkata during April 2006, and 93.3% of strains isolated during 2011 carried the new allele. Dendrogram analysis showed a pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) pattern of the new variant strains isolated recently that was distinct from the PFGE pattern of the strains carrying classical *ctxB* that closely matched the 2006 to 2007 variant strains.

AQ: A Cholera still continues to be an important cause of human infection, especially in developing countries that lack access to safe drinking water and proper sanitation. The recent devastating cholera outbreak in Haiti (13), for the first time in almost a century, placed this ancient disease at the forefront of the global public health agenda. In May 2011, the World Health Assembly recognized the reemergence of cholera as a significant global public health problem and called for the implementation of an integrated and comprehensive global approach to cholera control (17). This dreadful diarrheal disease is caused by the Gram-negative toxigenic bacterium *Vibrio cholerae* (7). To date, more than 200 serogroups of *V. cholerae* are known, but only serogroups O1 and O139 cause epidemic and pandemic cholera (7, 16). To date, the world has experienced seven pandemics of cholera. Among these, the first six were caused by the classical biotype strains, whereas the ongoing seventh pandemic has been caused by the El Tor biotype (16). In recent years, the emergence and dissemination of novel pathogenic variants of *V. cholerae* O1 throughout many Asian and African countries (1, 3, 5, 9, 10, 11, 15) indicated a cryptic change in cholera epidemiology. Our recent study showed that the El Tor variant strains of *V. cholerae* O1 have replaced the prototype El Tor biotype strains in Kolkata, India, since 1995 (15). This report, together with the recent massive cholera outbreak in Haiti, caused by *V. cholerae* organisms with a mutation in the 58th nucleotide of *ctxB* (4), motivated us to investigate the emergence and dissemination of this new variant of *V. cholerae* O1 biotype El Tor strains, if any, in Kolkata.

AQ: B In this study, we have developed a double mismatch mutation assay (DMAMA) to accurately discriminate the classical, El Tor, and Haitian type *ctxB* alleles through a rapid and simple PCR-based assay. A total of 142 *V. cholerae* O1 strains were included in this study. These strains were selected from the repository of the National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Kolkata, India, covering different months of each year from 2004 to 2011. *V. cholerae* O1 strains O395 (serotype Ogawa), N16961 (serotype Inaba), and EL-1786 (Ogawa, El Tor) were used as standard strains for the classical, El Tor, and Haitian type, respectively.

Development of the DMAMA-PCR. All 142 tested strains, along with the control strains, were grown in Luria-Bertani broth

(Becton Dickinson, Sparks, MD) for 18 h and then streaked on Luria agar (LA) plates. In this study, we focused on *ctxB* in *V. cholerae* O1 strains to confirm the strains carrying Haitian, classical, and El Tor alleles in a simple PCR-based assay. Current methods for differentiating the biotype-specific cholera toxin B (CTB) subunit of *V. cholerae* O1 necessitate MAMA-PCR with biotype-specific primers, nucleotide sequencing of the *ctxB* allele, or an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using classical or El Tor CT-specific monoclonal antibodies. Among these, the first has been the method of choice as it is simple and less time consuming. However, reports on influxes of new variant strains of *V. cholerae* O1 with an additional mutation at the 20th amino acid position (58th nucleotide position) clearly point out its limitation in the discrimination of *ctxB* genotypes. The previously published MAMA-PCR (8) is based on two biotype-specific reverse primers, each bearing a mismatch at nucleotide position 203 and, hence, incapable of identifying the Haitian type *ctxB* allele. Therefore, for discriminating the classical, El Tor, and Haitian type *ctxB* alleles, DMAMA-PCR was designed and validated in this study. We designed two allele-specific polymorphism detection forward primers, *ctxB*-F3 and *ctxB*-F4, each bearing a mismatch at its 3' end (Table 1). These allele-specific primers each carry specific nucleotides, A and C, for the Haitian and classical allele, respectively, at the 3' end. Furthermore, we enhanced the 3' mismatch effect by introducing another nucleotide, G (instead of A), at the second nucleotide position (i.e., the 57th nucleotide) from the 3' end of both primers. We used the *ctxB* reverse primer that is specific for the classical biotype (Rv-cla), as described by Morita et al. (8), as the conserved reverse primer. As shown in Fig. 1A, the DMAMA-PCR successfully discriminated the three different allelic subtypes

Received 11 February 2012 Accepted 15 February 2012

Published ahead of print 22 February 2012

Address correspondence to Asish K. Mukhopadhyay, asish_mukhopadhyay@yahoo.com.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

DOI: 10.1128/JCM.00512-12

TABLE 1 Primer sequences, amplicon size, and annealing temperature used in PCR assays

Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Annealing (°C)	Reference
Rv-cla	CCTGGTACTTCTACTTGAAACG			8
<i>ctxB</i> -F3	GTTTACTATCTTCAGCATATGCGA	191	56	This study
<i>ctxB</i> -F4	GTTTACTATCTTCAGCATATGCGC	191	60	This study
<i>ctxB</i> -F	GGTTGCTTCTCATCATCGAACAC	460	55	12
<i>ctxB</i> -R	GATACACATAATAGAATTAAGGAT			

of *ctxB*. *V. cholerae* O1 strains having the *ctxB* allele of genotype 7 yielded a 191-bp fragment of DNA with the primer pair *ctxB*-F3/Rv-cla but not with *ctxB*-F4/Rv-cla. The classical control strain (O395) produced just the opposite result with the same primer sets, and the El Tor strain (N16961) did not show any amplicon in either PCR assay due to the double mismatch in the forward and reverse primers (Fig. 1A).

Sequencing analysis to evaluate the PCR-based result. To further confirm our PCR results, 14 representative strains, which yielded positive bands for the Haitian *ctxB* gene by DMAMA-PCR, were selected for DNA sequencing. For sequencing, a separate pair of primers (*ctxB*-F and *ctxB*-R) was used to provide the sequences of the whole *ctxB* genes. Nucleotide sequence analysis of the *ctxB* genes of the 14 representative strains of *V. cholerae* O1

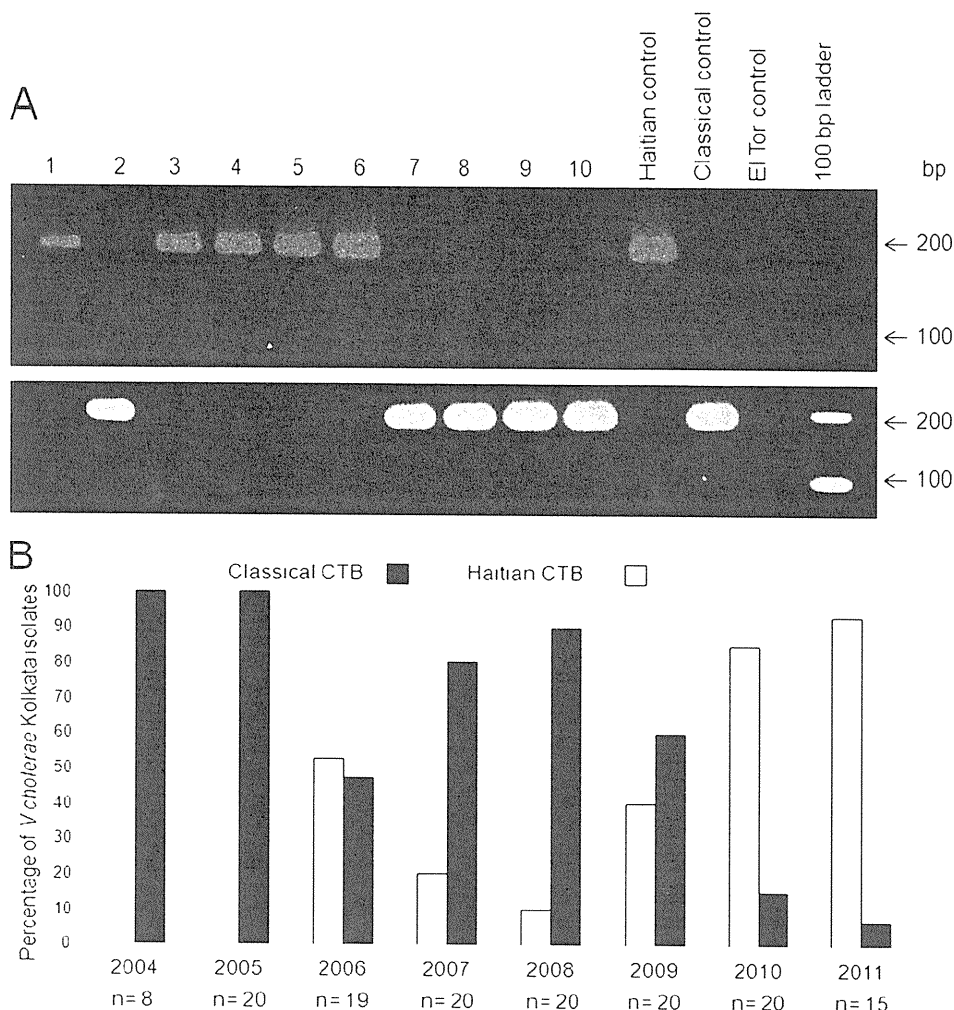


FIG 1 (A) DMAMA-PCR to detect the type of *ctxB* allele in representative *Vibrio cholerae* O1 strains of Kolkata using primers (*ctxB*-F3/Rv-cla) for the Haitian *ctxB* allele (top) and (*ctxB*-F4/Rv-cla) the classical *ctxB* allele (bottom). The extreme right lane contains a 100-bp size ladder. Lane 1, L19089 (*V. cholerae* O1, 2006); lane 2, L4706 (*V. cholerae* O1, 2006); lane 3, M12821 (*V. cholerae* O1, 2007); lane 4, IDH00990 (*V. cholerae* O1, 2008); lane 5, IDH02003 (*V. cholerae* O1, 2009); lane 6, IDH03106 (*V. cholerae* O1, 2010); lane 7, IDH00504 (*V. cholerae* O1, 2008); lane 8, K16492 (*V. cholerae* O1, 2005); lane 9, J25916 (*V. cholerae* O1, 2004); lane 10, IDH03378 (*V. cholerae* O1, 2011); Haitian control, 2010EL-1786; Classical control, O395; El Tor control, N16961. (B) Occurrence of *ctxB* allele type in Kolkata *V. cholerae* O1 strains from 2004 to 2011. A total of 142 strains were tested during the study period; "n" denotes the number of strains tested in each year. A *V. cholerae* O1 strain with Haitian type *ctxB* was isolated in Kolkata for the first time during April 2006.

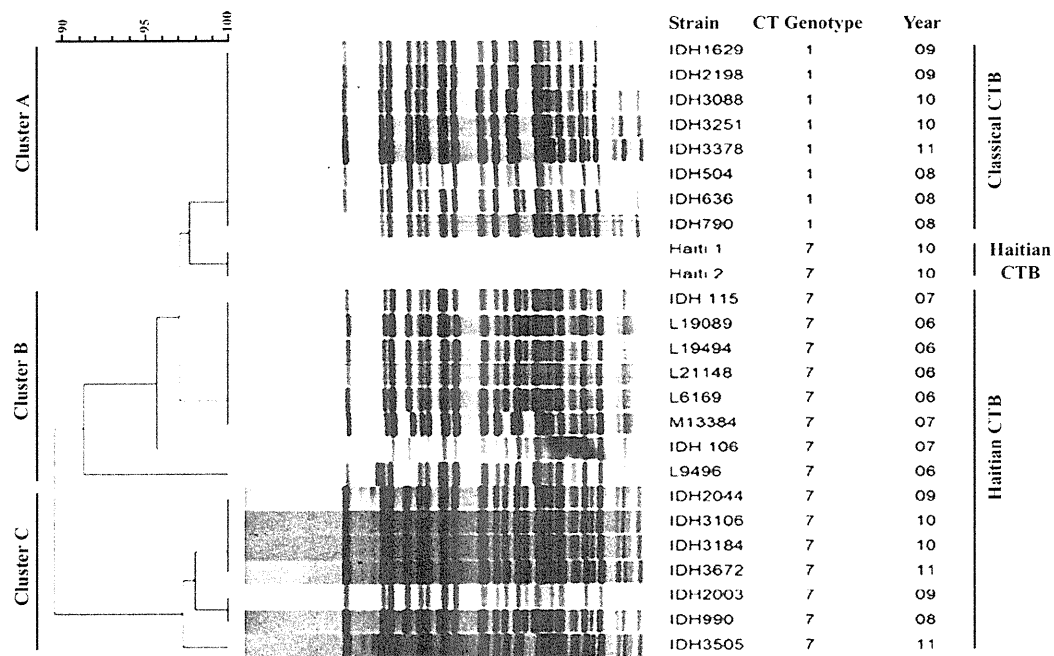


FIG 2 PFGE patterns of the NotI-digested *V. cholerae* strains from Kolkata and Haitian control strains along with the dendrogram analysis using BioNumerics software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Analysis showed 3 distinct clusters, with all the *V. cholerae* strains having classical *ctxB* (genotype 1) clustered together. All the tested isolates with Haitian *ctxB* (genotype 7) from 2006 through 2007 and in 2008 through 2011, however, were found to form two distinct clusters, suggesting considerable diversities in genomic content between them.

revealed that the strains possessed DNA sequences identical to that of the classical type of *ctxB* but with an additional mutation at the 58th position (C to A). The deduced amino acid sequences of all 14 representative strains were aligned with the CTB sequences of the reference strains N16961 (El Tor) and O395 (classical). The amino acid sequences of all strains were found to be identical to the deduced amino acid sequence of the CTB of the O395 classical reference strain except for a histidine-to-asparagine substitution at the 20th position of the sequence encompassing the signal peptide (GenBank accession number JN806157-59). Thus, the result from DNA sequencing of the *ctxB* gene confirmed the results of DMAMA-PCR. We also sequenced the *ctxB* genes from three representative strains that yielded amplicons with the classical specific primers (*ctxB*-F4/Rv-cla). The deduced amino acid sequences of all three strains were found to be identical to that of the classical reference strain, with a histidine at position 39 and a threonine at position 68. Thus, the results from DNA sequencing of *ctxB* genes confirmed the results of DMAMA-PCR.

Screening of the Kolkata strains using the DMAMA-PCR. After standardizing the DMAMA-PCR, we used this assay extensively to investigate the emergence and dissemination of the Haitian variant of *V. cholerae* strains in Kolkata. All the tested strains from 2004 through 2005 were positive for the classical type of *ctxB*, indicating that they are El Tor variant strains. The first appearance of Haitian type *ctxB* was noted in Kolkata during April 2006. There was an abrupt decrease in the isolation profile of *V. cholerae* O1 strains with the Haitian *ctxB* allele (CTB genotype 7) during 2007 and 2008. The percentage of the O1 isolates with CTB genotype 7 started to increase from 2009 (Fig. 1B), and more than 93% of Kolkata strains carried the Haitian *ctxB* allele in 2011.

Phylogenetic analysis based on PFGE. The results of DMAMA-PCR and the sequencing data clearly indicated the appearance of

novel variant strains of *V. cholerae* O1 in Kolkata since 2006, which motivated us to take a closer look at the relatedness of these variants with the Haitian isolates. We also analyzed the NotI pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns with representative strains. The PFGE profiles of *V. cholerae* strains from Kolkata were compared using BioNumerics software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) (Fig. 2). The similarity between strains was determined using the Dice coefficient, and cluster analysis was carried out using the unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA). All the tested *V. cholerae* strains with classical *ctxB* (genotype 1) clustered together (Fig. 2, cluster A), with a similarity matrix of >98%. All the tested strains with Haitian *ctxB* (genotype 7) in 2006 and 2007 were also found to be closely related to each other, with a similarity matrix of >97% (Fig. 2, cluster B). Dendrogram analysis showed that clusters A and B were closely related to the Haitian *V. cholerae* strains. Interestingly, all the tested strains with Haitian *ctxB* in 2008 to 2011 formed a distinct cluster (Fig. 2, cluster C), suggesting considerable diversities in genomic content between strains containing Haitian *ctxB* in 2006 through 2007 and 2008 through 2011.

Our results not only signify a cryptic change in the circulating strains in Kolkata but also raise questions about the origin of these variants of *V. cholerae* O1 El Tor. This new type of *ctxB* (genotype 7) was first reported by Goel et al. (5) in *V. cholerae* O1 strains isolated from a cholera outbreak in Kalahandi, Orissa, India, in 2007. But our results clearly show that in Kolkata, genotype 7 prevailed since April 2006. This finding tempted us to speculate that the Haitian type of *ctxB* may have originated from Kolkata and then disseminated to the neighboring regions like Orissa and other places, although confirmation of this hypothesis requires several other epidemiological and experimental validations, and then may have spread via Nepal to Haiti as reported from many

AQ: C

F2

investigations (6, 13). It has been hypothesized that the unique genetic composition of the variant type of strains increases their relative fitness, perhaps as a consequence of increased pathogenicity (4).

Recent reports by several research groups showed a putative link between the strains associated with cholera in Haiti and in Nepal (6, 13), underscoring the speed at which infectious diseases can be transferred globally even to other countries where they are not endemic. Implementing a coordinated, integrated multidisciplinary approach is the only effective way to prevent and contain outbreaks among vulnerable populations living in high-risk areas. Prevention, preparedness, and response depend upon an effective and holistic surveillance system and are linked and interdependent. We strongly believe that the DMAMA-PCR will be an easy and accurate tool for tracking the emergence and dissemination of Haitian variant *ctxB* in *V. cholerae* O1 isolates and, therefore, will help in understanding cholera epidemiology around the globe.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Japan Initiative for Global Research Network on Infectious Diseases (J-GRID) of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and by the Indian Council of Medical Research, Government of India.

REFERENCES

1. Ang GY, et al. 2010. Molecular evidence of cholera outbreak caused by a toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant strain in Kelantan, Malaysia. *J. Clin. Microbiol.* 48:3963–3969.
2. Chatterjee S, et al. 2009. *Vibrio cholerae* O1 clinical strains isolated in 1992 in Kolkata with progenitor traits of the 2004 Mozambique variant. *J. Med. Microbiol.* 58:239–247.
3. Chin CS, et al. 2011. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. *N. Engl. J. Med.* 364:33–42.
4. Ghosh-Banerjee J, et al. 2010. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor and classical biotypes. *J. Clin. Microbiol.* 48:4283–4286.
5. Goel AK, et al. 2008. A new variant of *Vibrio cholerae* O1 El Tor causing cholera in India. *J. Infect.* 57:280–281.
6. Hendriksen RS, et al. 2011. Population genetics of *Vibrio cholerae* from Nepal in 2010: evidence on the origin of the Haitian outbreak. *mBio* 2(●●):e00157–11. doi:10.1128/mBio.00157-11.
7. Kaper JB, Morris JJ, Jr, Levine MM. 1995. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:48–86.
8. Morita M, et al. 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.
9. Nair GB, et al. 2002. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 40:3296–3299.
10. Nair GB, et al. 2006. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 44:4211–4213.
11. Nguyen BM, et al. 2009. Cholera outbreaks caused by an altered *Vibrio cholerae* O1 El Tor strain producing classical cholera toxin B in Vietnam in 2007 to 2008. *J. Clin. Microbiol.* 47:1568–1571.
12. Olsvik Oet al. 1993. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 31:22–25.
13. Piarroux R, et al. 2011. Understanding the cholera epidemic, Haiti. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1161–1167.
14. Raychoudhuri A, et al. 2008. Biotyping of *Vibrio cholerae* O1: time to redefine the scheme. *Indian J. Med. Res.* 128:695–698.
15. Raychoudhuri A, et al. 2009. Classical *ctxB* in *Vibrio cholerae* O1, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.* 15:131–132.
16. Safa A, Nair GB, Kong RYC. 2010. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 18:46–54.
17. World Health Organization. 2011. Cholera 2010. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 86:325–340.

AQ: ref

AQ: D

プロジェクト4：ベトナム

研究課題名：「腸内細菌の molecular typing に関する研究」

研究分担者 泉谷秀昌

国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 本研究は、わが国をはじめアジア各国で発生する種々の細菌感染症に対応するため、主として食水系腸管感染症を対象に遺伝子解析をベースとした疫学指標、診断法の開発、ならびにそれらの有用性についての検討を主眼としている。本年度はベトナム National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) の細菌部門とコンタクトを持ち、コレラ菌を中心とした対象菌種の設定、解析手法の検討などを行った。

A. 研究目的

コレラ菌、赤痢菌、サルモネラといった、食水系腸管感染症起因菌を中心に研究を行う。当該感染症の流行地域であるアジア各国において、流行菌種あるいは菌型を把握するための分子タイピング法の検討を行う。また、必要に応じて、当該国の能力向上を図ることを目的とする。

B. 研究方法

分子タイピング法としてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) および multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) を主として活用する。

C. 研究結果および考察

コレラはコレラ菌（コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* 01/0139）によって発生する経口感染症である。上下水道等、いわゆるインフラ整備が不十分な途上国では、コレラの流行は公衆衛生上の脅威である。本研究の

カウンターパートの一つであるベトナムでは、2007 年ごろから比較的頻繁にコレラの流行が発生している。コレラの流行は当該国において非常な脅威であり、当該国の感染症対策において上位に位置づけられている。また、ベトナムは現在、我が国との交易も盛んな国であることから、当該国でのコレラの流行はわが国にとってもリスクとなりえる。こうした背景から、本研究においてはベトナムにおけるコレラ流行の把握と制御に向けた共同研究を計画している。

具体的にはベトナム国立衛生疫学研究所（National Institute of Hygiene and Epidemiology; NIHE）の細菌部門・コレラセンターと共同して、コレラ菌のサーベイランスシステムの構築を検討する。

本研究においては2つの活動を基点とする。一つは NIHE の能力向上であり、今一つは感染研との共同研究である。ベトナムで流行した、もしくは流行しているコレラ菌の特徴づけを行うべく、感染研と NIHE とで材料およ

び技術をやり取りすることによって2つの活動が回っていくことを期待している。

本年度は、2007年から2009年にベトナムで発生したコレラ菌の分離菌株の一部について MLVA を実施し、その傾向を検討した。

うち、いくつかを選択して供試菌株とした。

MLVA の手法は J. Clin. Microbiol. 45, 736-746, 2007. J. Med. Microbiol. 59, 708-712, 2010. による。

MLVA で得られたデータを Bionumerics ソフトウェアに取り込ませてクラスター解析を行った。結果を図に示す。全体的に供試菌株は類似した MLVA 型を示した。が、一方でマイナーながらバリエーションが見受けられた。バリエーションの中で大きな集団が二つ観察され、一方は2007-2008年の株が、他方は2008-2009年の株が多く見られた。この結果は、2007年から2009年にかけて流行菌型の変化が生じたためと推測される。今後、より詳細な疫学情報を入手し、菌株の情報と

組み合わせていくことが可能かどうか、NIHE と協議していく。そうすることでベトナムにおけるコレラ菌の伝播についてより詳細に把握できると期待される。

D. 結論

コレラ菌を解析していく上で、MLVA の有用性が示唆された。NIHE との共同作業を進めていくことで、まずは PFGE などの基本的な分子タイピングの手法、疫学情報の収集能力の向上を NIHE において進めていく。その上で MLVA などの新規技術を組み合わせていくことでベトナムにおけるコレラの現状を把握できるようになることが期待される。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

特になし

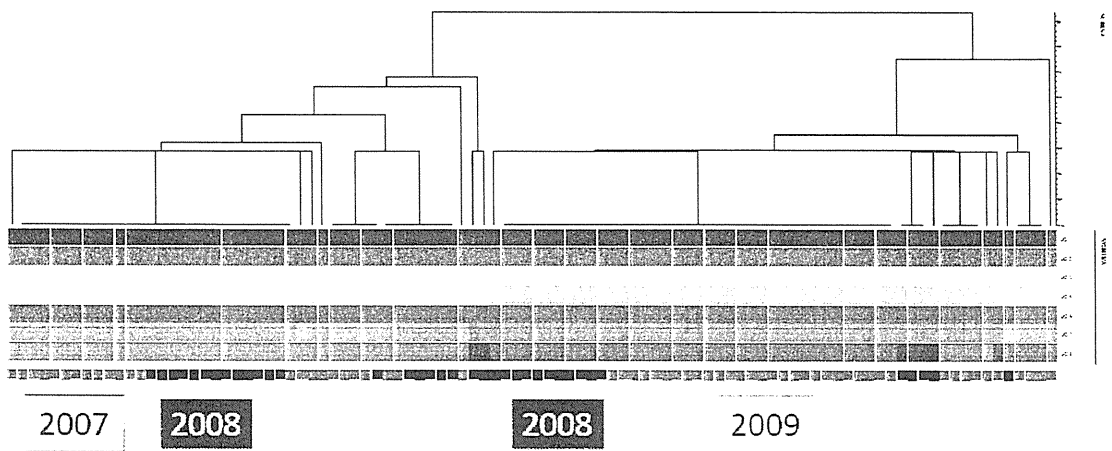


図. 2007-2009年ベトナム コレラ菌01のMLVAクラスター解析。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

アジアの感染症担当研究機関とのレプトスピラ症に関するラボラトリーネットワークの促進と
共同研究体制の強化に関する研究

研究分担者 小泉信夫 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

研究要旨

1. 国内で分離されたレプトスピラ *Leptospira interrogans* の分子タイピングを、multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA)により行った。その結果MLVAにより、これまでの分子タイピング法で同じタイプと分類された異なる血清群分離株を識別することが可能となり、また同じ血清群内の遺伝的多様性が明らかとなった。さらに動物種特異的な血清群の存在が明らかになった。
2. ベトナム北部のレプトスピラ症の現状を明らかにするために、ベトナム国立衛生疫学研究所 (NIHE)およびタインホア省予防医学センターと疫学調査に関する研究打ち合わせを行うとともに、NIHEに LigA-IgM ELISA および *Lepto-rrs* LAMP の技術移転を行った。

研究目的

レプトスピラ症は、病原性レプトスピラ (*Leptospira* spp.)の感染によっておこる人獣共通感染症である。レプトスピラは、血清学的方法により 250 以上の血清型に分類されるが、血清型の同定は非常に煩雑で実施できる機関は限られている。近年、血清学的分類に替わる多くの分子タイピング法が開発されてきた。我々はこれまで国内のレプトスピラ分離株について、*flaB* シーケンスタイピング (*flaB*-ST) および multi locus sequencing typing (MLST)を行ってきたが、異なる血清群に属するレプトスピラが同じタイプに分類されるといった問題点が明らかとなってきた。そこで本研究では、multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA)による国内分離株の解析を行った。

レプトスピラ症はアジアの多くの国で流行

しているが、ベトナムでは南部メコンデルタ地域での患者報告があるものの、国レベルでの実態は明らかになっていない。そこで本研究では、ベトナム北部におけるレプトスピラ症の実態を明らかにするために、ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)にレプトスピラ症実験室診断法の 技術移転を行った。

方法

1. レプトスピラ DNA

2010 年までに国内で分離されたレプトスピラ *L. interrogans* 152 株（分離動物：アカネズミ 21 株、アライグマ 3 株、イヌ 90 株、ドブネズミ 35 株、ヒト 3 株）のゲノム DNA を DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いて抽出した。

2. MLVA

参考文献にある 12 種類のプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物の塩基配列の決定およびアガロースゲル電気泳動により、各 VNTR のコピー数の算定を行った。各分離株の系統解析は、各 VNTR のコピー数をもとに Bionumerics を用いて行い、系統樹は UPGMA 法により作成した。

3. レプトスピラ血清群の同定

96 穴マイクロタイタープレートに、PBS で希釈したレプトスピラ標準抗血清と、レプトスピラ分離株培養液をそれぞれ 25 μ l ずつ加え、37°C、3 時間インキュベートした後、暗視野顕微鏡下で観察を行った。陰性対照と比較して、凝集していないフリーの菌数が 50% 以下になっている場合を陽性とした。

4. LigA-IgM ELISA

96 穴マイクロタイタープレート (Immobilizer Amino, Nunc) の各穴に、100 mM リン酸バッファー (pH 8.0) で 1 μ g/ml に調整したヤギ抗ヒト IgM (Jackson ImmnoResearch) を加え、4°C で 1 晩インキュベートした。ブロッキングは、蒸留水で 5 倍希釈したイムノブロック (DS ファーマバイオメディカル) を各穴に 200 μ l 加え常温で 1 時間行った。ブロッキング後のプレートは、300 μ l の TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5+0.05% Tween 20) で 3 回洗浄し、ELISA バッファー (TBST で 20 倍希釈したイムノブロック) で 100 倍に希釈した患者血清を各穴 50 μ l 加えて常温で 1 時間インキュベートした。上記のとおり洗浄後、LigA/GST or GST 溶液 (4 μ g/ml) を各穴に 50 μ l を加えて常温で 1.5 時間放置インキュベートした。洗浄後、ウサギ抗 GST 抗体 (Santa Cruz, 200 倍希釈) を各穴 50 μ l 加えて常温で 1 時間放置インキュベートした。洗浄後、ヤギ抗ウサギ IgG (Biorad, 5000 倍希釈) を各穴 50 μ l 加えて常温で 1 時間インキュベートした。検出は、o-phenylenediamine

dihydrochloride (OPD) 溶液 (蒸留水 6 ml に溶解した OPD タブレット (Sigma) + 30% 過酸化水素水 4 μ l) で 5 分間反応、1 M 硫酸で反応停止後、492 nm の吸光度の測定により行った。

5. Lepto-rrs LAMP

ブタ尿検体は、遠心分離 (4°C, 13,000 \times g, 10 分) により沈渣を得た。沈渣を TE 20 μ l に溶解し、5 分間煮沸した (DNA 溶液)。Lepto-rrs LAMP 反応液 (25 μ l) の組成は以下のとおりである: 1.6 μ M FIP, BIP, LF, LB プライマー, 0.2 μ M F3, B3 プライマー (プライマー配列未公表), 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 8 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20, 0.8 M betaine, 0.72 mM dNTP, Fluorescent Detection Reagent (栄研化学) 1 μ l, *Bst* DNA polymerase (Lucigen) 8 U, DNA 溶液 2 μ l。DNA 溶液は、反応液に加える直前に 95°C, 2 間加熱・急冷を行った。反応は GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて 65°C, 60 分間行い、その後 95°C, 5 分間で反応を停止させた。判定は UV 蛍光の目視で行った。

参考文献

1. Majed Z et al., J Clin Microbiol. 43:539, 2005.
2. Slack A et al., J Med Microbiol. 55:1549, 2006.
3. Zuerner RL & Alt DP. J Clin Microbiol. 47:1202, 2009.

結果および考察

1. 国内で分離された *L. interrogans* の MLVA

2010 年までに国内で分離された *L. interrogans* の血清群は、標準抗血清との反応性から Australis, Autumnalis, Canicola, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae,

Pomona と同定された。既報の 12 種類のプライマーを用いて得られた各 VNTR のコピー数は 2~14 となり、系統解析はコピー数が 2 だった VNTR11 を除く 11 の VNTR のコピー数をもとに行い、UPGMA 法で系統樹を作成した (図)。これまでに国内のイヌ分離株の分子タイピングを *flaB*-ST および MLST で行った場合に、血清群が異なる分離株が同じタイプに分類されることがあった。しかしながら MLVA では、*flaB*-ST および MLST で同じシーケンスタイプだった血清群の異なる分離株を、血清群ごとに分類することができた。したがって、MLVA により、少なくとも国内に存在するレプトスピラの血清群の推定を行えることが示唆された。また血清群 Pomona を除く 5 血清群の遺伝的多様性が明らかとなり、さらに Autumnalis, Canicola, Hebdomadis は複数の分岐群が明らかとなった。これら分岐群が血清型の違いによるものかどうかを今後明らかにする必要がある。また血清群 Autumnalis はアカネズミおよびイヌに特異的な分岐群があることが分かった。国内ではヒトの血清群 Autumnalis 感染が発生しており、これまでネズミがその原因と考えられてきたが、イヌが原因動物となっている可能性も示唆された。今回の結果から、MLVA は MLST よりも解像度が高いタイピング法であることが明らかとなった。今後、沖縄県および台湾での分離株との比較を行い、東アジアにおけるレプトスピラ分布、保有動物とレプトスピラ分子タイプの関係性を明らかにしていく。

一方、国内では *L. interrogans* 以外にもネズミから *L. borgpetersenii* が分離されている。そこで、全ゲノムが明らかとなっている *L. borgpetersenii* Hardjobovis L550 株のゲノム配列から Tandem Repeats Database (<http://minisatellites.u-psud.fr/>)により 15 種類の VNTR を選定し、それを増幅するためのプライマーを設計した。PCR、その増幅産物

のシーケンシングあるいは電気泳動により国内分離 *L. borgpetersenii* の各 VNTR コピー数を算定したが、コピー数は 1~3 と *L. interrogans* に比べて非常に少なかった。したがって、*L. borgpetersenii* の分子タイピングには MLVA は適当でないことが強く示唆された。

2. ベトナム北部におけるレプトスピラ症疫学研究

ベトナムでは、南部メコンデルタ地帯でレプトスピラ症の蔓延が報告されているが、北部におけるレプトスピラ症の発生実態はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、タインホア省の病院で病原体診断がなされない発熱疾患にレプトスピラ症がどれほど含まれているかを明らかにすること、また感染原因となる保有動物を明らかにすることを目的とした。そのため、本年度は NIHE およびタインホア省予防医学センターと不明熱患者および野生動物、家畜のレプトスピラ症実験室診断を行うための研究打ち合わせを行った。また NIHE への技術移転の一環として、ブタ 5 頭から採尿を行い、尿からのレプトスピラ DNA 検出を LAMP 法で行ったが、結果は陰性だった。またレプトスピラ血清診断法として、LigA-IgM ELISA の技術移転を行った。その結果、バックマイ病院で採取された発熱患者血清 180 検体中 15 検体が陽性となった。したがって、ベトナム北部でもレプトスピラ症が発生していることが明らかとなった。今後タインホア省での疫学調査を進め、レプトスピラ症の発生実態を明らかにしていく。

MLVA を行うにあたってご協力いただいた泉谷秀昌博士 (国立感染症研究所・細菌第一部) に深謝いたします。

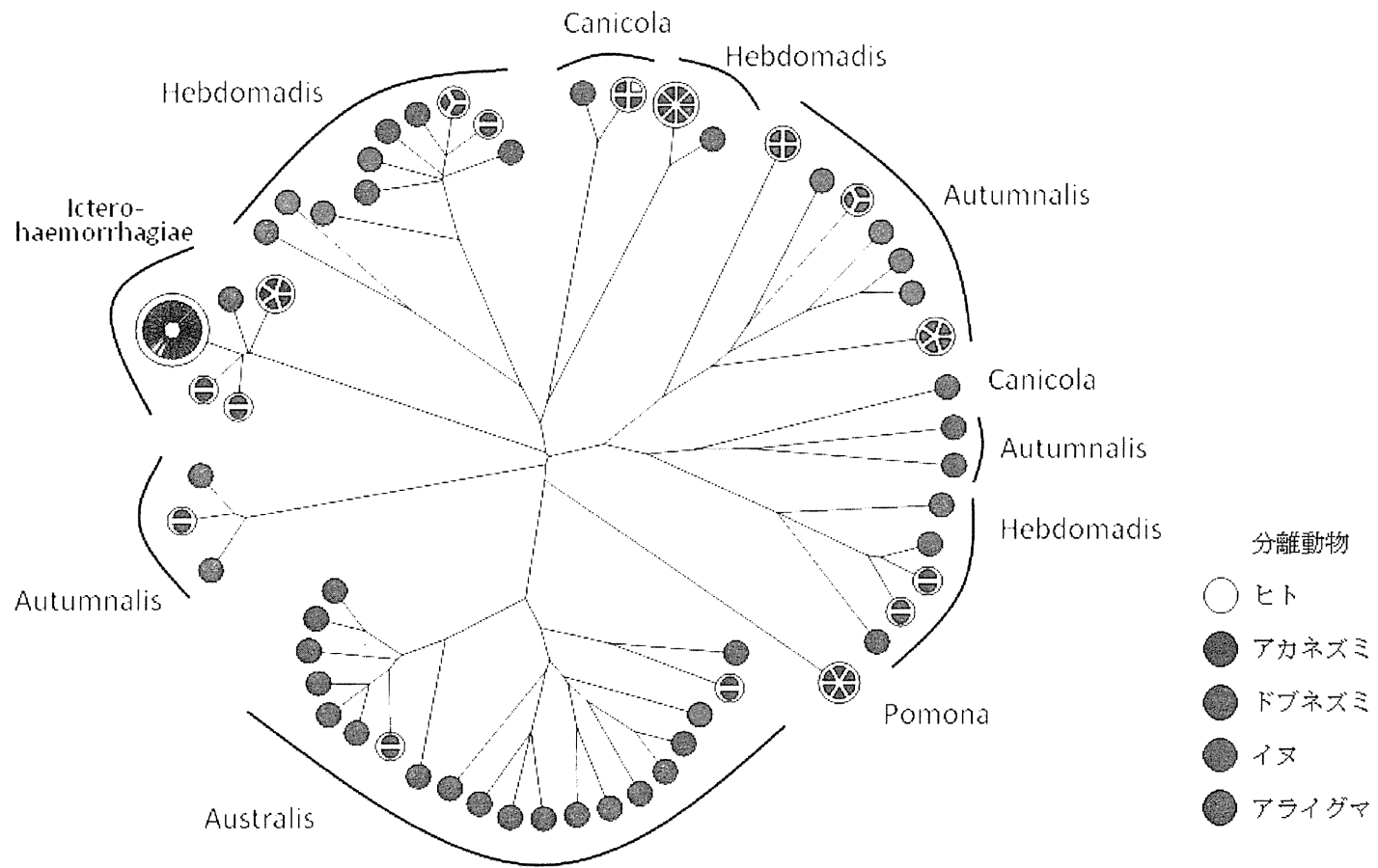


図. MLVAによる*L. interrogans*分離株の系統樹

厚生労働科学研究費補助金

平成23年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 (アジア指定研究)

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究

Epidemiology and molecular characteristics of the hand, foot, and mouth disease in the North of Vietnam

北部ベトナムにおける手足口病の疫学とウイルス遺伝子解析

研究分担者： 清水博之

国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究分担者： Nguyen Thi Hien Thanh

National Institute of Hygiene and Epidemiology

研究要旨

ベトナムでは、2005年以來、死亡例・重症例を含む手足口病あるいはエンテロウイルス71 (EV71) 感染症の流行が報告されている。2011年には、150例以上の手足口病死亡例が発生し、公衆衛生上の大きな問題となっている。ベトナム NIHE と感染研ウイルス第二部とのあいだの疫学および実験室診断技術に関する情報共有を基盤として、ベトナムで近年伝播している EV71 分離株の分子疫学的解析を行ったところ、2011年の EV71 株の多くが、ベトナム固有の遺伝子型 C5 ではなく遺伝子型 C4 に属することが明らかとなった。ベトナムでは、近年、主要な EV71 遺伝子型が C5 から C4 に入れ替わった可能性が示唆された。ベトナムで伝播している EV71 遺伝子型の推移と重症例を含む手足口病大流行との関連について、今後も注視が必要である。

A. 研究目的

手足口病は、発疹を特徴とした発熱性疾患で、一般的には、予後の良い一般的なエンテロウイルス感染症のうちの1つである。しかし、1990年代後半以降、とくに東アジア地域で、エンテロウイルス71 (EV71) による小児の急性死症例を含む重症エンテロウイルス感染症の大規模な流行が多発し、大きな社会問題となっている。1990年代後半には、マレーシアおよび台湾で EV71 脳炎による多数の死亡例を伴う大規模な手足口病流行が発生し、2000年代に入ってから、シンガポール、オーストラリア、香港、ベトナム、日本等アジア各国で、EV71 等による手足口病流行が報告されている。ベトナムでは近年、重症例・死亡例を含む手足口病流行が報告されている。とくに、2011年には、南部を中心に150例以上の死亡例が報告されており、公衆衛生上の大きな問題となっている。

カプシド VP1 領域の塩基配列をもとにした分子系統解析によると、近年、東アジア地域で分離された EV71 は、すべての分離株が、2種類の遺伝子型である genogroup B および genogroup C に大きく分かれ、さらに B1~B5 および C1~C5 に細分類される。1990年代後

半以降、おもに、B3 および B4、C1 および C2 が、東アジアの多くの地域で分離されており、1997年のマレーシア、1998年の台湾における EV71 脳炎をともなう大規模な手足口病流行では、それぞれ、B3 および C2 が主要な流行株であった。ベトナムでは、地域固有の EV71 遺伝子型として遺伝子型 C5 が報告されているが、ベトナム北部で伝播している EV71 の分子疫学的解析は、ほとんど報告されていない。

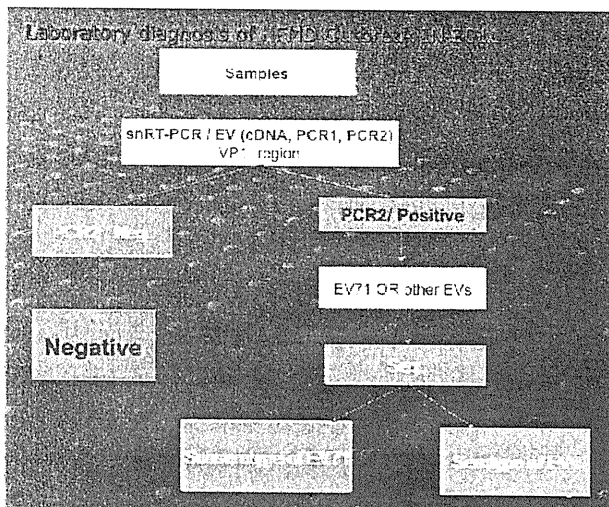
東アジアの多くの地域からは、多様な遺伝子型を有し、かつ、他の地域で分離されるウイルスと分子疫学的関連性の高い EV71 が多く分離されている。EV71 分離株の分子系統解析によると、特定の EV71 遺伝子型と疾患の重篤化との明確な関連性は認められていないが、2011年に重症例・死亡例を伴う大規模な手足口病流行が発生したベトナムで分離された EV71 分離株の分子疫学的解析およびウイルス学的解析は重要である。本研究では、ベトナム National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) および感染研ウイルス第二部とのあいだの疫学および実験室診断技術に関する情報共有を基盤として、ベトナム北部における手足口病の疫学的解析および EV71 分離株の分子疫学的解析を行う。

B. 研究方法

ベトナムにおける手足口病流行およびエンテロウイルス病原体サーベイランスに関する最新情報は、ベトナム NIHE 側研究分担者である Dr Nguyen Thi Hien Thanh から情報提供を受けた。

ベトナムでは、重症例を含む手足口病疾患サーベイランス体制は確立されておらず、疾患サーベイランスも基づく実験室診断体制が十分に整備されていない。NIHE では、ハノイを含む北部ベトナムの手足口病症例に由来する臨床検体を用いた遺伝子検出およびシーケンス解析によるエンテロウイルス同定および分子疫学的解析が行われている。ベトナムにおける手足口病実験室診断フローの概要を以下に示す(図1. Dr Nguyen Thi Hien Thanh 提供資料)。

図1



NIHE において、主として 2011 年の手足口病患者から検出されたエンテロウイルス VP1 領域の塩基配列解析によりウイルス型別を同定し、一部の EV71 株について分子系統解析を行った。

感染研ウイルス第二部では、以前、ベトナムで分離され、分子系統解析によりベトナム固有の遺伝子型 C5 と同定された分離株について、遺伝子解析とウイルス学的解析を行った。また、ベトナム固有の遺伝子型 C5 株を含む、これまで報告されている全ての遺伝子型の EV71 株を含む EV71 標準株パネルを作成し、遺伝子解析およびウイルス学的性状の解析を行った。

C. 研究結果

1) ベトナム NIHE 担当者との共同研究打合せの実施

2011 年 11 月 21 日に、ベトナム NIHE を訪問し、Hien 所長および NIHE 側の研究代表者である Dr Nguyen Thi Hien Thanh と、2011 年にベトナムで発生した手足口病流行現状および本年度以降の共同研究についての研究打合せを実施した。2011 年は、ベトナム全土で大規模な手足口病流行が発生し、北部 28 州のうち 23 州で手足口病流行の発生をみた。

2) WHO 手足口病ガイドラインの作成・公開

1990 年代後半より、東アジア地域では、手足口病および EV71 感染によるものと考えられる中枢神経合併症重症例が頻発しているが、手足口病および重症例の症例定義、および、症例定義に基づく疾患および病原体サーベイランスが、かならずしも標準化されておらず、諸外国との疫学情報の比較は困難であった。そのため、WHO 西太平洋地域事務局、中国 CDC、台湾 CDC ベトナム パスツール研および NIHE (研究分担者である Dr Thanh が参加) 等からの専門家の協力の下、手足口病ガイドライン” A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD) ”を作成した。本ガイドラインは、2011 年に公開され、手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症の症例定義や標準的な実験室診断手法等に関する基盤情報の共有が可能となった。

3) ベトナムで分離されたエンテロウイルス型別と遺伝子解析 (ベトナム NIHE)

ベトナムの手足口病患者に由来する臨床検体から検出された遺伝子の塩基配列解析から、ウイルス型別を同定した。2011 年の手足口病流行時の臨床検体の 26% から EV71 が検出され、39%の検体から他のエンテロウイルスが同定された。同定可能であった他のエンテロウイルスの中では、CA16 および CA6 の頻度が高かった。検出された EV71 株について VP1 領域の塩基配列解析を