

VI. Publication list for this work

NIL

Development of diagnostic methods for brucellosis and leptospirosis

Chia-Ling Chen¹, Shih-Hui Chiu¹, Koichi Imaoka², Koizumi Nobuo³ and Jung-Jung Mu^{1*}

¹Bacterial Enteric and Emerging Diseases Laboratory, Research and Diagnostic Center, Centers for Disease Control, Taiwan

²Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Disease

³Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Disease

Summary:

In this report, we develop a rapid diagnostic method for early diagnosis of leptospirosis, the LipL32 real-time PCR, by using TaqMan chemistry to detect *Leptospira* LipL32 gene in clinical samples. For epidemiology of Brucellosis, we tried to conduct a serum surveillance of canine Brucellosis using microplate agglutination test to detect antibody in stray and household dogs. These techniques improved diagnosis of leptospira and brucella infection and could help to understand the epidemiology of leptospirosis and brucellosis in Taiwan in the future.

I. Purpose:

The main purpose of this study was to develop a rapid diagnostic method of human leptospirosis in early phase. Considering the advantage of PCR technology, we choose a TaqMan probe based real-time PCR targeted to LipL32 as our first choice. The specificity and sensitivity of our real-time PCR assay was similar to other experiments' data (16, 19, 23, 24). Meanwhile using this real-time PCR assay in 606 plasma samples, 20 samples (3.3%) were positive (average 4.3 days after disease onset), and 14 of 20 showed seroconversion at the convalescent serum samples (average 16.1 days after disease onset). Our experimental data also demonstrated the potential of LipL32 real-time PCR assay for the detection in clinical samples and the subsequent quantification in a single run. The practicability of the method makes it suitable for diagnosis in the early phase of the illness, before antibodies are detectable and several weeks before culture results are available.

Canine brucellosis is a zoonotic disease that can lead to canine reproductive losses and human infection through contact with infected urine or other genitourinary secretions. In this report, we fine-tuned the microplate agglutination test for detection of antibody against

Brucella canis among dogs. This method will apply for surveillance of canine Brucellosis in Taiwan.

II. Methods:

1) DNA extraction from human plasma samples

Total DNA of human plasma (200 uL) was extracted using QIAamp DNA Mini Kit according to the manufacturer's instructions. DNA was eluted in a final volume of 200 uL.

2) Real-time PCR assay

Real-time PCR assay was performed using the Roche LightCycler version 2.0. The PCR mixture was prepared using a ready-made master mix, to give a final concentration of 1 X LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 3mM MgCl₂, 500 nM of each primer (LipL32-F (5'-GAAATGGGAGTTCGTATGATTTCC-3', LipL32-R (5'-GGTTTTGCTTTCGCAGCTT-3') and 200 nM of the TaqMan probe (5'-FAM-TAATCGCCGACATTCTTTCTACACGGATC-3'-BHQ). 10 uL of PCR master mix and 10 uL of DNA extract were loaded into a LightCycler capillary and centrifuged to mix. PCR amplification was performed using the parameters as follows. An initial denaturation/hot-start Taq activation at 95 °C for 8 min, followed by 50 cycles of denaturation at 95 °C for 8 s and annealing/extension at 60 °C for 40 s, and a final cooling step at 40 °C for 30 s. PCR will result in a 194 bp amplicon between position 274 and 467 of the LipL32 coding region.

4) Microplate Agglutination Test for canine Brucellosis

Blocking microplates wells with 125ul of milk or BSA Incubate at room temperature for 1hr and then discard blocking solutions. Positive and negative sera were incubated with heat-inactivated *B. canis* strain QE-13 whole cells in a U-bottom 96 well culture plate. The sealed plate were mixed and incubated at 50°C for 24 hr in a humid atmosphere. An agglutination titer greater than 160 was considered positive.

III. Results:

1) Detection of leptospiral DNA in human plasma samples.

We have established LipL32 real-time PCR assay for detection of leptospira DNA in the first year. To evaluate the LipL32 real-time PCR assay as a potential tool for detection from clinical samples, 606 patient sera were examined by the LipL32 real-time PCR and the positive cases were re-confirmed by either nested PCR or MAT. Twenty plasma samples were tested positive by LipL32 real-time PCR assay with concentration from

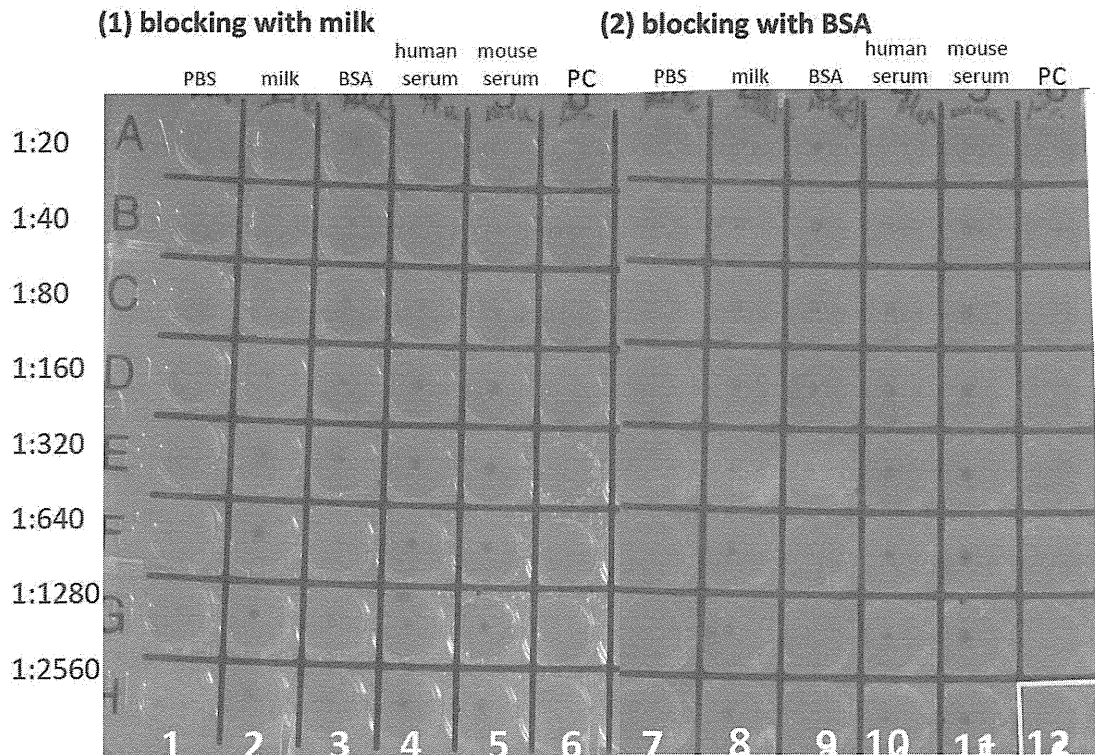
1.60 x 10⁵ to 1.31 x 10³ leptospire/ml of sera. Among the 20 positive cases, MAT seroconversion was observed in fourteen patients (Table 4), no convalescent serum samples were available for 5 patients and no antibody titer rising for 1 patient. Since the PCR signal was invariably positive for the first blood sample, giving unequivocal confirmation of acute leptospirosis. This finding indicates the PCR is suitable for early detection of leptospire in blood.

Table 4. LipL32 real-time PCR assay and serologic results from 20 patients Days of sampling

| Pt. No. | Sex | Age (years) | Days of sampling of acute serum | MAT titers of acute serum | Days of sampling of convalescent serum | MAT titers of convalescent serum | Main serogroup | LipL32 real-time PCR assay (leptospire/ml) |
|---------|-----|-------------|---------------------------------|---------------------------|--|----------------------------------|----------------|--|
| 1 | F | 87 | 9 | <100 | 25 | 200 | Shermani | 5.90 x 10 ³ |
| 2 | M | 59 | 5 | <100 | NA | NA | NA | 6.53 x 10 ³ |
| 3 | M | 63 | 1 | <100 | NA | NA | NA | 6.00 x 10 ³ |
| 4 | F | 65 | 10 | <100 | NA | NA | NA | 5.20 x 10 ³ |
| 5 | M | 32 | 4 | <100 | 10 | 3200 | Shermani | 1.00 x 10 ⁵ |
| 6 | M | 47 | 10 | <100 | 20 | <100 | <100 | 8.26 x 10 ³ |
| 7 | M | 50 | 5 | <100 | 15 | 3200 | Shermani | 5.06 x 10 ⁴ |
| 8 | M | 64 | 5 | <100 | 21 | 800 | Shermani | 1.60 x 10 ⁵ |
| 9 | M | 71 | 4 | <100 | 14 | 6400 | Shermani | 6.46 x 10 ⁴ |
| 10 | M | 71 | 4 | <100 | 14 | 6400 | Shermani | 1.07 x 10 ⁴ |
| 11 | M | 54 | 3 | <100 | 14 | 1600 | Shermani | 5.83 x 10 ³ |
| 12 | M | 41 | 4 | <100 | 21 | 3200 | Shermani | 1.40 x 10 ⁴ |
| 13 | M | 43 | 6 | <100 | 17 | 1600 | Shermani | 8.50 x 10 ³ |
| 14 | M | 26 | 3 | <100 | 17 | 1600 | Shermani | 2.91 x 10 ³ |
| 15 | M | 42 | 1 | <100 | 15 | 6400 | Shermani | 1.31 x 10 ³ |
| 16 | M | 62 | 2 | <100 | 15 | 3200 | Shermani | 1.00 x 10 ⁴ |
| 17 | M | 33 | 5 | <100 | 13 | 12800 | Kennewicki | 5.00 x 10 ³ |
| 18 | M | 52 | 0 | <100 | NA | NA | NA | 2.83 x 10 ³ |
| 19 | F | 61 | 5 | <100 | 14 | 1600 | Shermani | 3.36 x 10 ³ |
| 20 | M | 35 | 0 | <100 | NA | NA | NA | 1.59 x 10 ⁴ |

2) Fine-tuned microplate agglutination test for antibody detection of *B. canis*

Low protein concentration of samples, especially highly diluted ones did not show typical negative pattern (Table 2, columns 1 and 7). Therefore, blocking wells with milk and BSA was used to improve the method (Table 2, columns 2, 8 and 3, 9). Human and mouse serum were used as negative control (Table 2, columns 4,10 and 5, 11) and showed improved results. Blocking with both milk and BSA did not affect the positive control. (Table 2, columns 6 and 12).



IV. Discussion:

In conclusion, we report the development of real-time PCR assay using a fluorogenic TaqMan probe for highly specific detection of pathogenic *Leptospira* in clinical samples. This assay can detect as few as 10 leptospire per reaction. This method is simple, rapid, and has been applied for diagnostic testing in clinical specimens. The microplate agglutination test for antibody against *Brucella canis* was modified and ready to apply for detection of canine sera. We hope both methods can extend to veterinary fields, and outbreak investigation in the future.

V. Reference list:

NIL

VI. Publication list for this work:

NIL

Genetic diagnosis and molecular epidemiology of *Bordetella pertussis*

Shu-Man Yao, Chuen-Sheue Chiang

Centers for Disease Control, Department of Health, Taipei, Taiwan

Summary:

Bordetella holmesii infection has never been reported in Taiwan. In current surveillance study, only one case of possible *B. holmesii* infection was found among 495 notified cases of pertussis (0.20%) in 2011 and 2012. This possible case was a 12-year-old boy who was notified in May 2011. According to this surveillance results, the prevalence of *B. holmesii* infection in Taiwan was extremely low among patients who had pertussis-like symptoms and were notified. Based on its high sensitivity, the IS481-based PCR was routinely used worldwide by many laboratories, however, it should be done with the awareness of its cross-reactivity. *B. holmesii* has been more and more frequently detected in biological samples from adolescents and adults of pertussis-like symptoms. Although differentiation might not be necessary for treatment, it is valuable in epidemiological settings to distinguish among *Bordetella* species. Improved specificity of detection would provide us an insight into the real burdens of *B. pertussis* and *B. holmesii* infection, and information regarding vaccine failure due to misdiagnosis and possible response strategy. In conclusion, surveillance of *B. holmesii* should be pursued, and correct identification of *Bordetella* species is important for active surveillance of *Bordetella* infections in the whole population, particularly in adolescents and adults.

I. Purpose:

In previous surveillance studies conducted in the USA and Canada, a low positive rate for *B. holmesii* infection (0.1–0.3%) was reported by culture or RT-PCR in patients with coughs (1, 2). In a recent study in France, however, *B. holmesii* DNA was detected in 20% of nasopharyngeal swabs (NPSs) collected from adolescent patients who had previously been diagnosed with *B. pertussis* infection (3). Furthermore, between 2010 and 2011, a pertussis outbreak caused by *B. pertussis* and *B. holmesii* infections occurred in Miyazaki Prefecture, Japan (4). These surveillance data indicated that *B. holmesii* infection has recently spread worldwide and that

accurate diagnosis is needed to distinguish between *B. holmesii* and *B. pertussis* infections. Therefore, the purpose of this surveillance study is to detect *B. holmesii* in NPSs received in our laboratory from all cases who had pertussis-like symptoms and were notified in 2011 and 2012.

II. Methods:

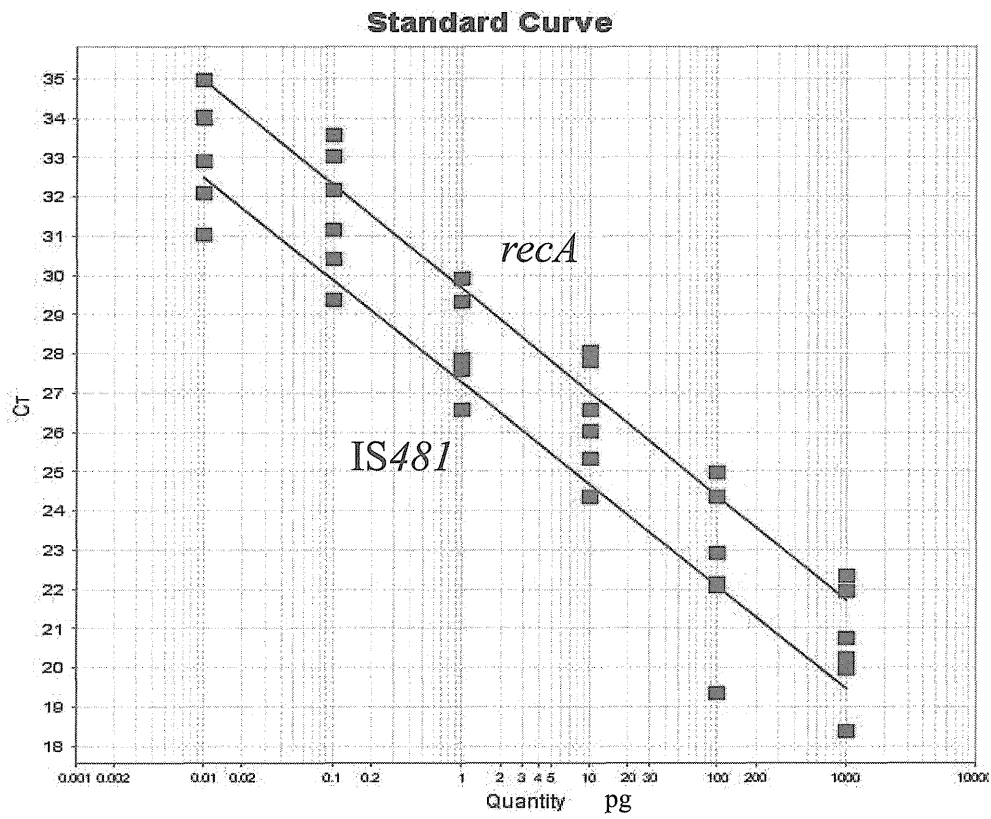
We applied *B. pertussis*-LAMP assay and a novel duplex real-time PCR assay to NPSs from 359 and 136 patients who had pertussis-like symptoms and were notified in 2011 and 2012, respectively. These patients were collected from Taiwan pertussis notified disease surveillance system. We obtained the NPSs using ESwab™ Nylon Flocked Swab and 1mL of modified Liquid Amies (Copan).

B. pertussis-LAMP assay (detection of *ptxP*): A 25 μ L reaction mixture containing 40 pmol (each) of BP-FIP and BP-BIP primers, 5 pmol (each) of BP-F3 and BP-B3 primers, 20 pmol (each) of BP-LF and BP-LB primers, 2X reaction mixture (12.5 μ L), *Bst* DNA polymerase (1 μ L), and template DNA (2 μ L) was used. The mixture was incubated at 65°C for 40 min (for clinical specimens) and then heated at 80°C for 2 min to terminate the reaction. All oligonucleotides (high-performance liquid chromatography purification grade) for the LAMP primers were obtained from Invitrogen Taiwan Ltd. The LAMP amplification was confirmed with real-time monitoring of the increase of turbidity using LA-320C (Eiken Chemical Co., Ltd.) (5).

Novel duplex real-time PCR assay (detection of *IS481* and *BHrecA*): The duplex PCR master mix consisted of 1X Premix master mix (Premix EX Taq, RR039A, Takara), 0.8 μ M (each) *BHrecA* forward and reverse primers, 0.4 μ M *BHrecA* probe, 1 μ M (each) *IS481* forward and reverse primers, 0.25 μ M *IS481* probe, 2 μ L of template DNA, and enough sterile nuclease-free water to bring the total reaction volume to 20 μ L. The samples were subjected to an initial amplification cycle of 95°C for 30s, followed by 40 cycles at 95°C for 5s and 60°C for 34s. Two microliters of *B. holmesii* ATCC51541 (500 pg/ μ L) with 6 series of 10-fold dilution was used as a positive PCR control; the negative control was 2 μ L of sterile H₂O. Amplification, detection, and data analysis were performed with an Applied Biosystems 7500 real-time PCR system and the 7500 software v2.0 (1).

III. Results:

1) Detection Limit of the novel duplex real-time PCR assay



Detection limits are 0.01pg DNA for IS481 and 0.1pg DNA for *recA* at threshold cycle (Ct) of 32 ± 1.0 .

2) Results of real-time PCR using IS481, BHrecA and ptxP (LAMP) for NPSs in 2011-2012

| Target | Target organism | 2011 | | 2012 | |
|------------------------|---------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|
| | | No. of specimens | % of total specimens | No. of specimens | % of total specimens |
| IS481* without BHrecA | <i>B. pertussis</i> | 60 | 16.7 | 30 | 22.1 |
| IS481 and BHrecA | <i>B. holmesii</i> | 1 | 0.3 | 0 | 0 |
| ptxP (LAMP) | <i>B. pertussis</i> | 47 | 13.1 | 25 | 18.4 |
| Total specimens tested | | 359 | | 136 | |

B. holmesii DNA was detected only in one case notified in May 2011. This case was a 12-year-old boy. Positive rate of *B. pertussis* using IS481-based PCR was 16.7% and 22.1% in 2011 and 2012, respectively. Positive rate of *B. pertussis* using ptxP-based PCR was 13.1% and 18.4% in 2011 and 2012, respectively.

IV. Discussion:

Surveillance result of *B. holmesii* infection in Taiwan revealed that there was only one possible case, a 12-year-old boy, in May 2011. This result indicated that the prevalence of *B. holmesii* infection in Taiwan was very low among patients who had pertussis-like symptoms and were notified. Whether this case was a real case of *B. holmesii* infection was not certain. Although the duplex real-time PCR gave a positive result, sequencing of the DNA product was not successful because the *B. holmesii* DNA content in the specimen was too low.

From studies worldwide, most cases from whom *B. holmesii* was detected were adolescents and adults, especially significant occurrence in adolescents, but not in infants. However, the age distribution of our cases was 55.1% and 48.5% among infants less than 1 year old in 2011 and 2012, respectively, and 12.7% and 12.5% among children aged 10-19 years in 2011 and 2012, respectively. There might not be sufficient specimens from adolescents in our study, thus, leading to low prevalence. Nevertheless, *B. holmesii* was indeed present and associated with pertussis-like symptoms in patients, indicating that surveillance of *B. holmesii* infection is important.

Based on its high sensitivity, the IS481-based PCR was routinely used worldwide by many laboratories, however, it should be done with the awareness of its cross-reactivity. *B. holmesii* has been more and more frequently detected in biological samples from adolescents and adults of pertussis-like symptoms. Although differentiation might not be necessary for treatment, it is valuable in epidemiological settings to distinguish among *Bordetella* species. Improved specificity would advance our understanding of burdens from *B. pertussis* and *B. holmesii*, reduce concerns arising from apparent vaccine failures due to misdiagnosis, and might provide information on which vaccine-based outbreak response strategies can be based (6). In conclusion, surveillance of *B. holmesii* should be pursued and correct identification of *Bordetella* species is important for active surveillance of *Bordetella* infections in the whole population, particularly in adolescents and adults.

V. Reference list:

1. Guthrie JL, Robertson AV, Tang P, Jamieson F, Drews SJ. Novel duplex real-time PCR assay detects *Bordetella holmesii* in specimens from patients with Pertussis-like symptoms in Ontario, Canada. *Journal of clinical microbiology*. 2010 Apr;48(4):1435-7.
2. Yih WK, Silva EA, Ida J, Harrington N, Lett SM, George H. *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerging infectious diseases*. 1999 May-Jun;5(3):441-3.
3. Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *Journal of clinical microbiology*. 2011 Dec;49(12):4347-8.
4. Kamiya H, Otsuka N, Ando Y, et al. Transmission of *Bordetella holmesii* during pertussis outbreak, Japan. *Emerging infectious diseases*. 2012 Jul;18(7):1166-9.
5. Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Toda K, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *Journal of clinical microbiology*. 2006 May;44(5):1899-902.
6. Rodgers L, Martin SW, Cohn A, et al. Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis*--Ohio, 2010-2011. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013 Feb;56(3):322-31.

VI. Publication list for this work:

NIL

プロジェクト3：インド

分担研究課題名：コレラ菌のゲノム進化と病原性

| | | | |
|-------|------|----------|-------|
| 研究分担者 | 森田昌知 | 国立感染症研究所 | 細菌第一部 |
| 研究協力者 | 泉谷秀昌 | 国立感染症研究所 | 細菌第一部 |
| | 大西 真 | 国立感染症研究所 | 細菌第一部 |

研究要旨

コレラ流行地における *Vibrio cholerae* の変遷について基盤情報を得るため、multilocus variable number tandem repeat analysis による分子疫学解析を行った。インド国立コレラ及び腸管感染症研究所より提供された供試菌株は全て El Tor variant 型 *V. cholerae* であったが、MLVA によるクラスター解析では比較的高い遺伝的多様性を示した。しかしながら、他のアジア各国由来の菌株との比較ではインド由来株でクラスターを形成し、コレラ流行株に地域性があることが示唆された。

A. 研究目的

Vibrio cholerae は 200 以上の血清群に分類され、自然環境中では淡水、海水、汽水域と広く分布している。それらの中でコレラの流行を引き起こす原因菌は、血清群 O1 及び O139 の *V. cholerae* に限定されており、コレラの典型的な症状を引き起こす主要な病原因子はコレラ毒素であることが知られている。また *V. cholerae* O1 には生化学的性状の違いから classical 型と El Tor 型の生物型が存在する。1961 年にインドネシア、スラウェシ島を発端とする El Tor 型 *V. cholerae* によるコレラの流行は世界中に広がり、現在の世界のコレラはすべて El Tor 型による。

しかしながら 1990 年代以降、アジア地域で分離されるほとんど全ての El Tor 型 *V. cholerae* が、コレラ毒素 B サブユニット遺伝子 (375 bp) の 115 番目と 203 番目の塩基に変異のある El Tor 型 *V. cholerae* (El Tor variant 型 *V. cholerae*) であることが明らかとなり、流行株の遷移が確認された。さらには、2010 年に起きたハイチにおけるコレラの流行を契機に上記 2 カ所の変異に加え、58 番目の塩基に変異のある El Tor 型 *V. cholerae*

(Haitian variant 型 *V. cholerae*) が発見された。その後の研究により Haitian variant 型 *V. cholerae* は 2000 年代に出現したことが明らかとなり、現在アジア地域においては El Tor variant 型 *V. cholerae* と Haitian variant 型 *V. cholerae* の両者が分離されている。

このように世界流行の最中において *V. cholerae* O1 は変異を繰り返しており、今後も新たなコレラ流行株の出現が予想される。コレラの世界流行の中心はベンガル湾であることを鑑みると、インド国立コレラ及び腸管感染症研究所 (National Institute of Cholera and Enteric Diseases、NICED) で保存されている *V. cholerae* の分子疫学解析は重要である。そこで本研究課題では NICED より提供された *V. cholerae* のゲノム DNA を用いて、ゲノム情報を元にした分子疫学解析手法を確立するとともに、コレラ流行株の進化系統を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1994 年から 2004 年にインドで分離された 42 株の *V. cholerae* O1 のゲノム DNA を NICED より

提供してもらい、実験に用いた。PCR により *ompW* 遺伝子と *ctxAB* 遺伝子の増幅が確認された試料について、7 遺伝子座を用いた multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) を行い、Bionumerics ソフトウェアによる分子疫学解析を行った。また、シーケンスにより *ctxB* の遺伝子型を決定した。

C. 研究結果

提供を受けた 42 株のゲノム DNA にうち、*ompW* 遺伝子と *ctxAB* 遺伝子の増幅が確認されたものは 29 株であった。*ctxB* 遺伝子型別の結果、全ての菌株が El Tor variant 型 *V. cholerae* であり、El Tor 型 *V. cholerae* 及び Haitian variant 型 *V. cholerae* は無かった。29 株のクラスター解析の結果を図 1 に示す。供試菌株は単一の MLVA 型を示さず、遺伝的多様性は比較的高かった。

また当研究所に保存されている日本国内で分離されたアジア各国からの輸入事例に由来する *V. cholerae* 菌株を含めたクラスター解析結果を図 2 に示す。NICED より提供された菌株を含むインド関連の菌株は遺伝的に多様性があるものの、他のアジア各国に関連する菌株とは異なるクラスターを形成した。

D. 考察

V. cholerae は自然環境中において溶原性ファージや自然形質転換を介した遺伝子の水平伝播により、病原性に関わる因子や環境中での生存に有利な因子のやりとりをしている。その過程において、新たなコレラ流行株が出現したことが考えられる。今回は流行株として、1994 年から 2004 年にインドで分離された El Tor variant 型 *V. cholerae* を用いた。アジア地域におけるコレラの現状を把握し、流行株の変遷を明らかにするためには、以前の流行株である El Tor 型 *V. cholerae*、近年出現したと考えられている Haitian variant 型 *V.*

cholerae も同様に解析し、コレラ流行株の分子疫学情報を蓄積し、データベース化する必要がある。

本研究課題では NICED との国際的な共同研究を行い、中長期的な連携体制を築くことを目指している。今後も継続して NICED から研究試料の提供を受け、コレラ流行株の分子疫学情報を共有することで、ラボラトリーネットワークを強化し、アジア地域における新規コレラ流行株の監視体制を整えたい。

E. 健康危機情報

特に無し。

F. 研究発表

特に無し。

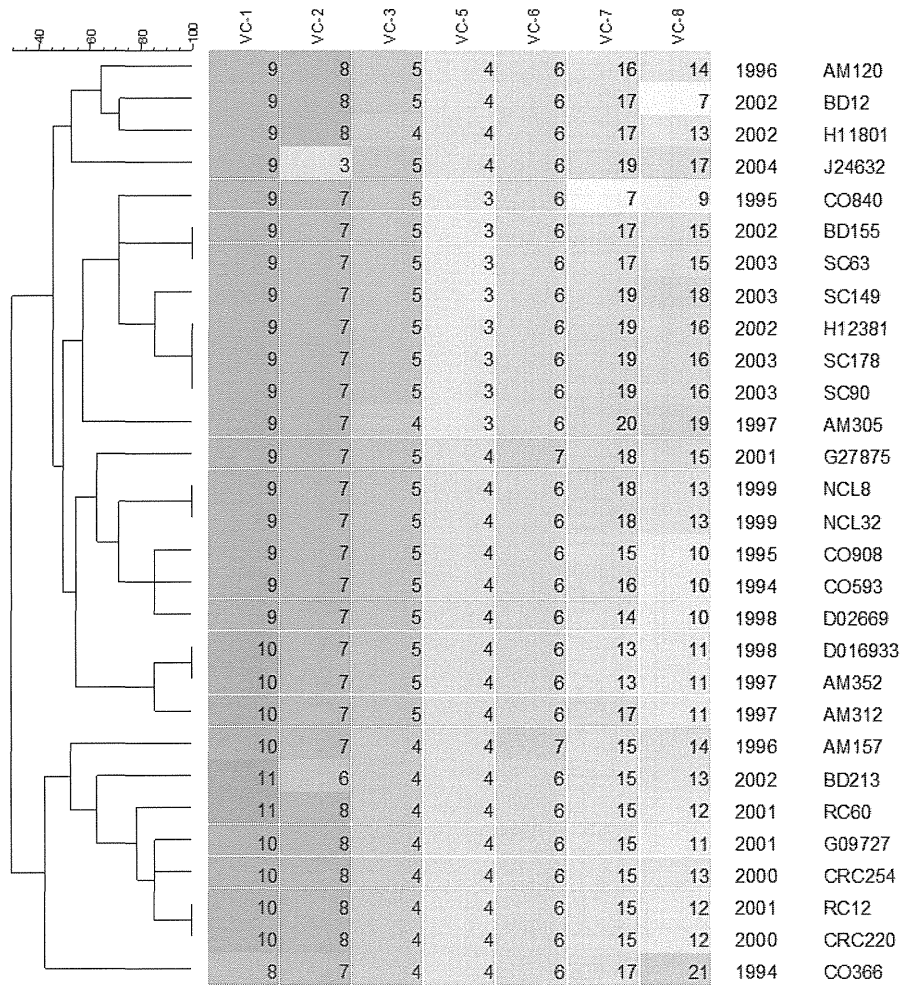


図1 Niced より提供された *V. cholerae* 29 菌株の MLVA クラスター解析。各遺伝子座 (VC-1、VC-2、VC-3、VC-5、VC-6、VC-7) のリピート数、分離年及び菌株名を示す。

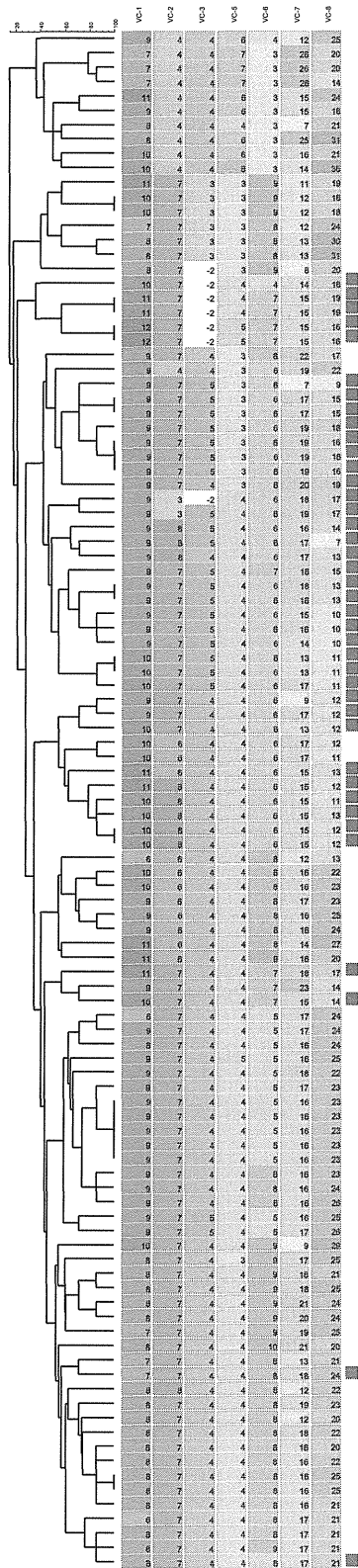


図2 アジア地域由来 *V.cholerae* の MLVA クラスタ解析。NICED より提供された菌株を含むインド由来の菌株を四角で示す。

分担課題名：汎赤痢菌群に対するユニバーサル・ワクチンの共同研究

研究事業名：「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」(H23-新興-指定-020)

分担研究者 三戸部治郎 国立感染症研究所・細菌第一部

協力研究者 小泉信夫、志牟田健、寺嶋淳 国立感染症研究所・細菌第一部
Hemanta Koley インド国立コレラ腸管感染症研究所・細菌部

研究要旨：

細菌に対するワクチンは、毒素を免疫原としたトキシノイドを除いて、血清型特異的な防御効果を主体としたものが多く、多様な血清型で構成される菌群全てに効果のあるものは開発されていない。担当者は赤痢菌の病原性発現機構の基礎研究の応用として血清型を超えた防御効果を示すワクチン候補の開発を行っている。赤痢はこれまで適当な動物実験モデルがないことが研究上のネックになっていた。本研究では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を活用し、モルモットを用いた新しい腸管感染モデルを開発したインド国立コレラ・腸管感染症研究所との共同研究を進めた。

A. 研究目的

細菌性赤痢は東南アジアを中心に年間9千万人近くが罹患し、小児を中心に約40万人が犠牲になっていると推定されている。赤痢に対して、種々のワクチン候補が開発され、トライアルが行なわれている。これらのワクチン株は赤痢菌に代謝系の変異を導入して弱毒化したものか、大腸菌に赤痢菌の病原遺伝子群をプラスミドで導入したものであるが、一般的な細菌ワクチンと同様にワクチン株と同じ血清型の菌には防御効果は認められるものの、血清型が異なる赤痢菌に対しては無効で、汎赤痢菌群に有効なワクチンは開発されていない[1]。

その理由として血清型特異的な表面抗原に対する抗体価は上昇するが、赤痢菌群に共通な病原蛋白抗原は宿主の免疫から逃れている

機構が考えられる。実際、幾つかの赤痢菌の病原蛋白は宿主細胞細胞へ侵入した後にしか発現しないことが報告されている。

ワクチン開発という側面からもこうした赤痢菌の病原性発現機構の基礎的な解析は重要である。担当者は細菌のRNA結合蛋白として知られているHfqが赤痢菌の病原性発現調節に重要な役割を果たしていることを報告した。赤痢菌で*hfq*遺伝子の欠損株を作製したところ、その病原性に必須なType III Secretion system (TTSS)の発現が脱抑制され、TTSSが発現しない低温や低浸透圧の条件でもその発現が起こることが分かった。また、通常TTSSが発現する高温(37℃)ではその発現が増大することで、HeLa細胞に対する侵入性が野生型の5～30倍以上に増加することが示された[2]。

一方、Hfqは細菌のストレス応答遺伝子群の制御因子でもあり、赤痢菌以外の病原細菌で

あるサルモネラ、コレラ、レジオネラの hfq 欠損株では動物に対する病原性が低下することが報告されている。これは病原性よりもストレス条件下の生存性が低下していることが原因と考えられ、赤痢菌の hfq 欠損株も同様に動物実験における病原性が低下していた[2]。このように、病原性蛋白の発現量が増加するにも関わらず、生存性が低下している hfq 欠損株は、貧食細胞で殺菌されやすく、免疫担当細胞に提示される抗原量が多いため、生ワクチンとして効果が高い可能性がある。

分担者はこれまで、*S. flexneri*血清型2aの hfq 欠損株を用いて*S. sonnei*に対するワクチン効果をモルモットの角結膜炎モデルで評価し有意な防御能を認めた。一方、感染の場が腸管である赤痢菌に対して眼球の感染で評価することは限界があると考えられた。赤痢菌はこれまで、腸管感染の動物実験系が確立していなかったが、近年、胃酸を抑制し、盲腸を結索することでモルモット腸管でも赤痢を発症させることができることが報告されている[3]。当研究ではこの方法を開発したインド国立コレラ・腸管感染症研究所と共同研究を開始し、予備実験を行った。

B. 研究方法

ワクチン候補株とコントロールの野生型株2457Tは、細菌第一部よりインド国立コレラ腸管感染症研究所(NICED)に分与した。実験に先立って、NICEDの実験動物倫理審査委員会の審査を受け承認された。実験はNICEDの動物実験施設のP2A区画で飼育、感染実験を行った。

3群計18匹の6週齢モルモットに、ワクチン候補株である*S. flexneri* 2a 2457T株の

hfq 欠損変異株(6頭)、コントロールとして野生型2457T株(6頭)、およびPBS(6頭)を二週間隔で 1×10^9 個を計4回、鎮静下で左眼球に投与した(図1)。4週目、鎮静下で右眼球にSd1株 1×10^9 個を計2回、投与したのち、6日間症状を観察した。

C. 研究結果

平成23年度にNICEDで行われた複数の予備実験の結果を検討したところ、ワクチン効果が一定の頻度でばらついていることが判明した。そこで平成24年度初頭(5月末)に渡印し、ワクチン株の検査を行った。

ワクチン株となる*S. flexneri* 2aの hfq 欠損変異株は野生型2457T株と比較し生育が遅い。LB平板にストリークした時に現れる大多数の小型のS型のコロニーは、病原性プラスミドを保持しており、病原遺伝子とそのレギュレータ、*ipaB*, *virF*, *invE*が増幅されるが、比較的高い頻度で出現する大型のR型のコロニーは病原性プラスミドを失うことがこれまでの経験から知られている。

現地で -80°C で保存されていたワクチン株は20%のグリセロールを含むストックにシャーベット状に保存されており、LBプレート上でコロニーを生育させると小型のS型のコロニーがほとんど出現せず大多数が大型のR型のコロニーを形成した。また、保存株から直接、*ipaB*, *virF*, *invE*遺伝子群に対するコロニーPCRを行ったが野生型と比べて、ごく弱いシグナルしか得られず、最終的にストック株から正しいワクチン株を分離するのは不可能であった。

以上のことより、これまで得られた予備実

験の信頼性に疑問が生じたため、急遽ワクチン株を再送し、送付した株を用いて再実験を行う必要が生じた。そこで感染研よりワクチン候補株を再分与し、それを用いた免疫後の感染実験に立ち会うスケジュール(図1)で免疫してもらい、11月末に再度渡印し、自らワクチン効果を判定した。

* * *

再実験は、志賀菌(Sd1)に対する効果を判定するため、眼球へのワクチネーションとSd1によるチャレンジを再度行った。これまでの予備実験から眼球へのワクチネーションは動物個体に強い免疫を与えることが明らかであり、左眼球に2週間おきに2回ワクチネーションを行い、4週後、右眼球にSd1をチャレンジした。

初回免疫後、野性型菌は強い病原性を示し、3日以内に全てが角結膜炎を発症した。予想外に、6頭のうち1頭は全身に感染が拡大し2週間後に死亡した。他の3頭は完全に回復し2回目の免疫時の症状は軽微であった。残り2頭は4週間後のチャレンジまで左目の症状が持続した。

ワクチン投与群も角結膜炎を発症したが、野性型と比較して症状は非常に軽微であり、6頭全てで角膜炎の形成と膿汁を含む流涙は認められず、2回目の免疫時には症状は認められなかった。免疫群計11頭の観察では左目から右目への感染の拡大は見られなかった。

分担者も参加したSd1による防御効果判定では、PBS投与群は3日以内に6頭すべてが角結膜炎を発症した。野性型投与群は残った5頭中2頭に軽微な結膜炎が認められた。左目に角結膜炎が持続している2頭を含む残り3

頭には肉眼的な症状は認められなかった。ワクチン投与群は6日間に及ぶ観察期間中、6頭全てに肉眼的な症状は認められなかった(図2)。

D. 考察

ワクチン株が保存中に変質したことに対しては、今後薬剤耐性マーカーを病原性プラスミドに挿入するなどの対策が必要だと考えられた。ただし、NICEDでのワクチン株の保存並びに平板培地からの釣菌は、当初こちらが指示したマニュアルが守られておらず、また、高濃度のグリセロールストックは一般的にプラスミドが落ちやすいことが周知の事実となっていることを説明し、小型のS型コロニーから新たに多数のシードストックを作ることでも対処した。

ワクチン効果の判定では、以前に行った実験と同様に、明らかに*hfq*変異株は病原性が減弱していることが示された。また、血清型が異なる志賀菌Sd1に対しても同様なワクチン効果があることが示された。

さらに今回は左目に免疫して右目で判定を行なうことで、強い液性免疫が誘導されていることが示された。これについては血清に加えて動物の涙液も採取して分泌型のIgAの測定を行う予定である。

左目と右目を分けたため、感染研で行った両目に免疫した実験のように、免疫後に症状の持続している個体への介入的治療(テトラサイクリンの点眼)は行わなかった。その結果、野生型投与群では予想以上に症状が重く、1頭は死亡し2頭は感染が持続した。感染が持続していた関係もあったためか、Sd1が感染し

た症状は明らかに軽微であった。野生型を感染させた群は*S. sonnei*で判定した第一回目の実験も症状が明らかに軽く、野生型の感染にはワクチンほど完全ではないものの、何かしらの免疫効果はあるものと考えられた。これは基本的に相同性の高いIII型分泌装置遺伝子を持つ赤痢菌群同士では感染後に相互免疫を誘導するポテンシャルが高い可能性を示している。

E. 結論

汎赤痢菌群に効果があるワクチンの候補として、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。過去に行われた角結膜炎モデルと同様に*hfq*欠損株は免疫時の症状が軽く、血清型が異なる志賀菌Sd1に対してワクチン効果が再現された。

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 なし

2. 学会発表

○Mitobe J, Yamamoto S, Watanabe H, and Ohnishi M. 第85回日本細菌学会総会ワークショップ 細菌における遺伝子発現制御の普遍性と特異性 2012年3月27日長崎ブリックホ

ール：

Bacterial cytoskeleton RodZ and virulence gene expression of *Shigella* type III secretion system

2012 Dec.12-14 US-Japan Cooperative Medical Science Program. 47 th Conference. Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Chiba Univ. Chiba Japan: Multimer formation of bacterial cytoskeletal protein RodZ. ○Mitobe J, Itaru Yanagihara I, Ohnishi K, Yamamoto S, Watanabe H and Ohnishi M,

<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. Mitobe, J., et al., *Involvement of RNA-binding protein Hfq in the osmotic-response regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*.* BMC Microbiol, 2009. 9: p. 110.
3. Barman, S., et al., *Development of a new guinea-pig model of shigellosis.* FEMS Immunol Med Microbiol, 2011. 62(3): p. 304-14.