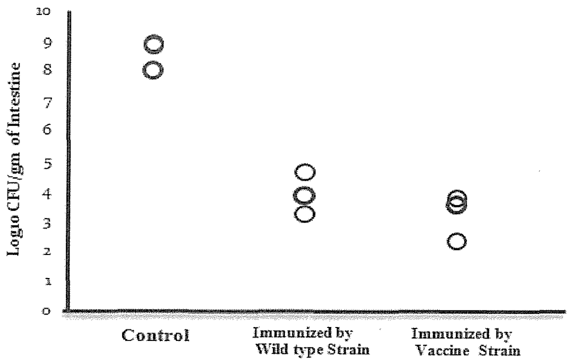

Fig 4: Immunized and non immunized guinea pigs (n=3, each group) were challenged by (A) *Shigella dysentriae Type 1 NT4907* after 24 hrs animals were sacrificed for colonization.

iv) Recovery of challenged strain from the stool of animals:

Results of recovery of the challenged strain NT4907 from the stool of animals of both the immunized and control groups are shown in Fig. From the control group, 24 hr after the challenge on day 28 , a significantly large number of challenged strain NT4907 were recovered.. On the other hand, from the immunized group, a quite significantly low number of the challenged bacteria were recovered both 24 and 48 hr after the challenge.

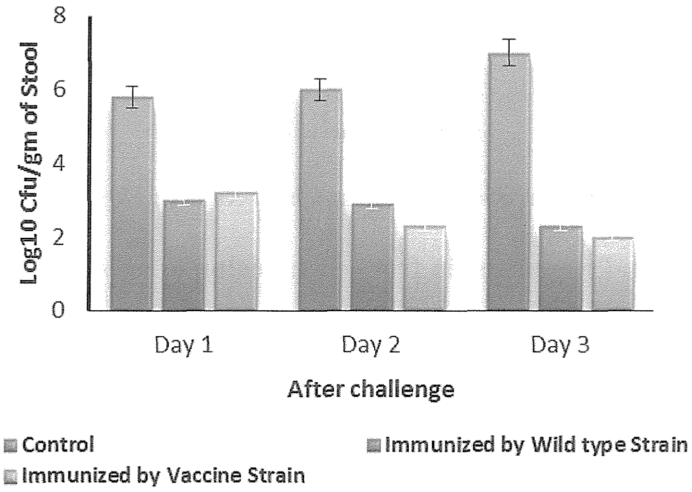

Fig 5. Recovery of challenged strains from stool of immunized and non immunized guinea pigs (n=3, each group) successive three days after challenged by *Shigella dysentriae 1* (1×10^9 cell) ,

v) Histology of colon of animals:

Hemorrhage and inflammatory cells in the surface mucosa, mucosa and submucosal layers and widely dilated crypt lumen were observed at 48-h postinfection of *S. dysenteriae* 1 (NT4907) (Fig. 6,A1) and *S. sonnei* (Fig. 6,B1) in control animals. In immunized animal did not show any damage and inflammatory changes in the colonic mucosa. The surface epithelium including all the layers of the colonic mucosa remained normal.

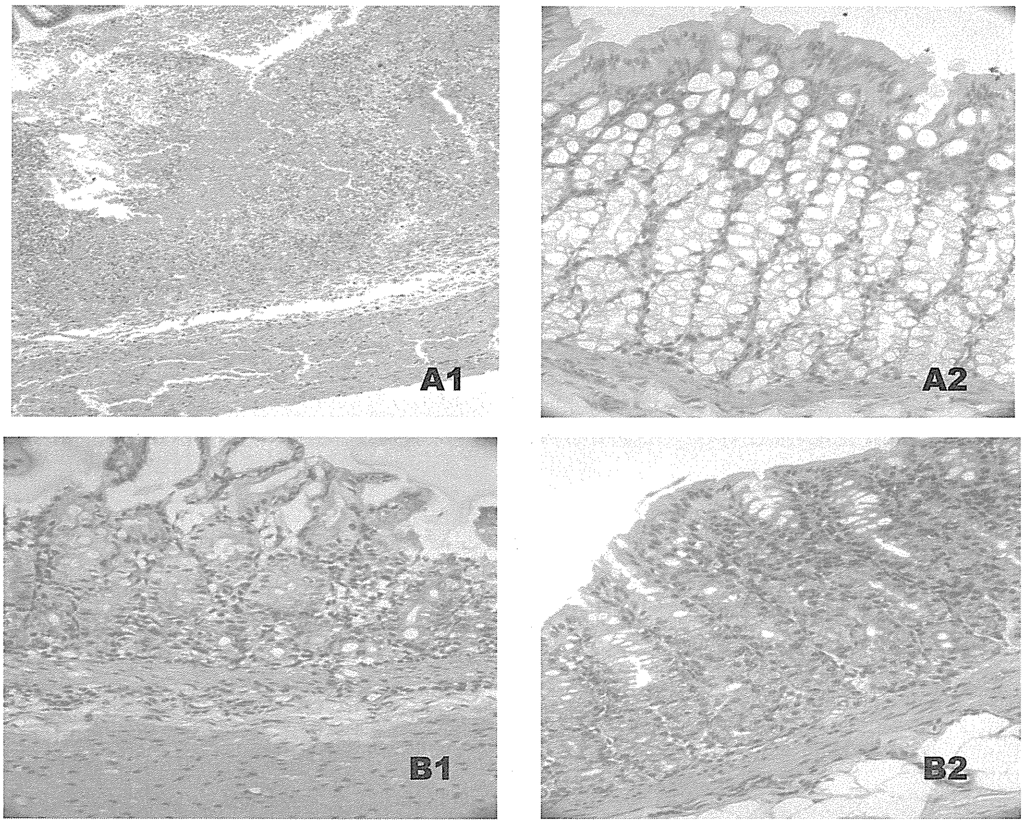

Fig 6: Histological changes in the intestinal tissues. Experimental procedures are as described in the text. Tissues were collected from animals of control group **(A1)** and immunized group **(A2)** challenged with *S. sonnei* on day 28 and killed at 48 hr. Control group **(B1)** and **(B2)** immunized group challenged on day 28 with *S. dysenteriae 1* and killed at 48 hr. Magnification: 40×.

vi) Immunological Study:

a) Serum IgG and IgA against vaccine strain MF 4853:

The anti-bacterial serum IgG and IgA titers of the animals during the course of the experiment were measured against vaccine strain MF 4853. As shown in Figure 2, the serum anti-bacterial IgG and IgA titers of the immunized group increased during the period of immunization, peaked on the 28th day after the initiation of the immunization and remained at the same level until the 35th day. The serum anti-bacterial IgG and IgA titers of the control group were below the limit of the detection during the entire period of the experiment.

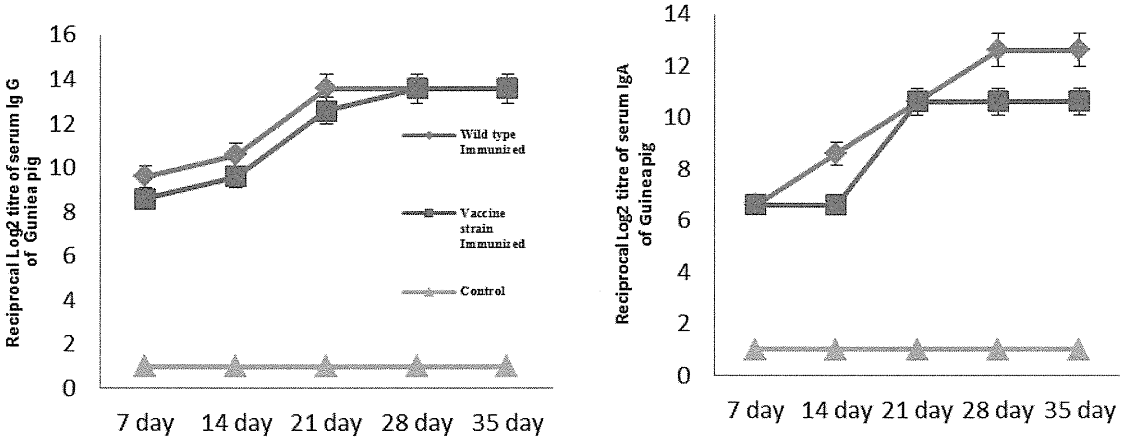

Fig 7: Serum IgG and IgA response after oral immunization with wild type and vaccine strain against wild type Strain *Shigella flexenari 2a* 2457T in Orally Immunized Animals

b) IgA titer against vaccine strain MF 4853 in intestinal lavage:

Anti-bacterial IgA titers of the intestinal lavage of the animals from immunized and control group were measured and the results are shown in fig . The titers of the immunized group challenged on both days 28 was significantly higher than those of the control group (*P* <0.05).

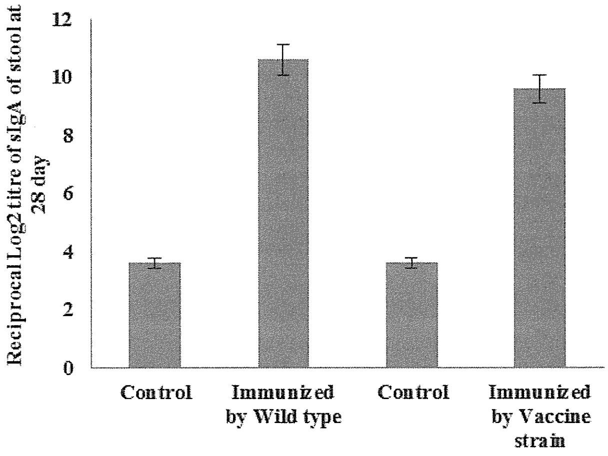

Fig 8 : sIgA Response Against vaccine strain MF 4853 and *Shigella flexenari* 2457T in 28th day Stool of both control and Oral Immunized group animal.

C) Reactogenicity of Vaccine Strain MF 4853:

IL-8 secretion (pg/ml) was noticed only after 4 h of incubation against Wild type Shigella flexenari 2a 2457T and Vaccine strain MF4853 . The concentration of live S. flexneri 2a (2457T) strain and MF4853 vaccine was equal to the infectious dose of the strain (1×10^8 cells/100 μl). The results showed, after 4 h of incubation, wild type strains induced higher levels of IL-8 than Vaccine strain MF4853 (Fig 9).

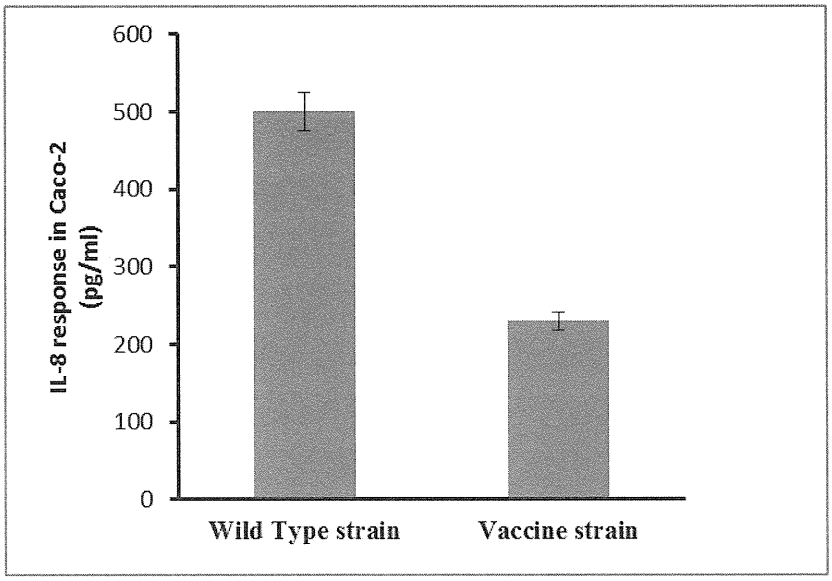

Fig 9: Interleukin-8 expression after 4 hr in Caco-2 cell line with Wild type and Vaccine strain MF 4853.

Future Plan of work:

1. Duration of protections

2. Passive protection studies
3. Heterologous cross protection against other 50 serotypes and subtypes
4. Single dose protection study
5. Heterologous protection other than Shigella (EIEC and other serotypes)

4. Analysis of HLA associated HIV-1 mutations in India and Japan.

The transmission of HIV in Manipur, a north eastern state of India is primarily through Injecting Drug use sharing the needles and syringes. For the last decade, the Injecting drug users also transmit their infection to their non injecting spouses. In order to find out the dynamics of this transmission, a total of 500 IDUs and their spouses were included in the study. HIV seropositivity were determined by the HIV diagnostic kits approved by National AIDS Control Organization, Govt of India.

It was found that 199 IDU among the 500 were HIV positive (39.8%). 121 spouses of 500 IDUS were also HIV positive. Interestingly, 96 spouses out of 199 HIVseropositive IDUs were HIV positive, thus the HIV concordance became 48.2%.

Next, the genotyping of the HIV positive IDUs were undertaken as reported earlier. Although the majority of IDU samples showed subtype C, a substantial number of samples showed dual/multiple probe reactivity in the Multi region Hybridization Assay (MHA) as reported earlier. Attempt was made to amplify near full length genome of HIV from one such sample, MAN 40 by Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT PCR).

Near full-length genome amplification

Nearly 8.1 kb HIV-1 genome was successfully amplified from the cDNA of the sample MAN 40 with high fidelity proofreading polymerase (Roche, Inc) using nested PCRwith specific primers MSF1- 5 AAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAG 3, OFMR1- 5 TGAGGGATCT CTAGTTACCAGAGTC 3 for the first round, and F2NST- 5 GCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGG3, OFM19 5GCACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGCTTA 3 for the second round.

After enzymatic removal of the primers and dNTPs that remained in solution, purified PCR products were sequenced directly in overlapping segments of 1,100 nt by primer walking using the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing kit and the ABI 377 Sequencer kit (Applied Biosystems).Sequences were corrected and assembled using the BioEdit program (Tom Hall, http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html). To exclude the possibility of PCR-mediated artifacts, breakpoints were confirmed in duplicate PCR amplifications that were carried out separately.

Sequence and recombination analysis

Sequences were screened for the presence of recombination patterns by the boot scanning method. The sequences were aligned using CLUSTAL X software with minor manual adjustments. Phylogenetic neighbor-joining trees were based on Kimura's two-parameter distance matrices with assessment of the consistency of tree topologies.Sites with a gap in any of the sequences were excluded from the analysis. Phylogenetic trees were constructed with MEGA 4.0 by the neighbor-joining method,under the Kimura two-parameter substitution model, with 1,000 bootstrap replications. To analyze the recombination of the MAN40 strain, the sequence was subjected to bootscan analysis as described using default parameters. To identify the mosaicism structure, bootscan analysis of MAN40 sequence was further analyzed using SimPlot (version 3.5.1; S. Ray, Johns Hopkins University,Baltimore, MD; http://sray.med.som.jhmi.edu/RaySoft/SimPlot/) within a gap-stripped, 300-bp sliding window moving in increment steps of 20 bp.

Analysis of the near full-length genome sequence revealed that MAN40 retained intact reading frames for a majority of its genes and no gross deletions or rearrangements were observed. After performing phylogenetic analysis of NFLG of MAN40 along with other global HIV-1 strains, it was observed that this HIV-1 strain formed a separate branch, which justified the strain to be newly evolving URF.

MAN40 exhibited a close relatedness to 07.BC.CN05 XJDC6441 and 07.BC.CN.97.97CN001, the CRFs of China. However, it was quite distantly related to the previously reported locally adapted B/C recombinant strains of India, namely BC.IN.2002.NARI 7-1 and BC.IN.2002.INDNARI 0218440. We endeavored to analyze whether this recombinant strain shared similarity with other BC recombinant strains from the neighboring countries (China, Thailand, and Myanmar). Hence, bootscan analysis was performed to compare the recombination breakpoints of MAN40 with native and global BC recombinant strains (Fig. 1). The bootscan analysis revealed that the breakpoints of MAN40 represented the area where majority of recombination had occurred in case of other BC recombinants as well. However, the simplot and phylogenetic analyses indicated that this recombinant HIV-1 strain seemed to be originated as a result of recombination between Indian subtype C strain (C.IN.93.93.IN905) and Thai-B strain B.TH.99.99TH_C1416.The results confirmed that the genomic structure of MAN40 consisted of subtypes B and C, with C as a backbone. The first and second breakpoints were witnessed in the upstream sequence of the polymerase gene (reverse transcriptase region, 3,026–3,259 bp) by Simplot analysis. The

sequence of MAN40 present in the region II (Fig. 2) clustered with B.TH.99.99TH_C1416 strain in the phylogenetic analysis (Fig. 3). The sequence present in region III clustered with C.IN.93.93.IN905 in phylogenetic analysis

(Fig. 3) . The third breakpoint was found at the downstream sequence of envelope gene (gp41 region, 8,183 bp). The sequence emerged in this region (III) spanned the gp41 and nef gene as shown in Fig.3. From the phylogenetic analysis

it was revealed that the MAN 40 sequence present in the region IV (Fig. 2) aligned with B.TH.99.99TH_C1416 strain. The Simplot analysis clearly demonstrated that the recombinant HIV-1 strain MAN40 harbored recombination

sites in pol and env genes (Fig. 2). Information pertaining to the full-length genome

sequence of HIV-1 in Manipur lacks currently, and hence the present study attempted to address this gap by generating near full-length HIV-1 sequences from the local HIV- 1 isolate MAN40. Sharing of injecting equipments is the daily or the injecting drug users and drug traders as a part of their drug-purchasing behavior, thereby, leaving the doors open for the introduction of different HIV-1 subtypes into circulation. Similar observations were revealed from the studies of HIV-1 epidemic in

Thailand and Myanmar where different subtypes have taken the reins of infection owing to the path paved by heroin trafficking routes . Genetic diversity of

HIV-1 might also be related to cross-border migration and sharing practices of IDUs of different ethnicity. The findings suggest that an IDU posed to the risk behaviors, stands on the brink of getting exposed to different circulating subtypes of HIV-1 and thereby facilitating the development of recombinant strains. It is thus necessary to continuously monitor the evolution of strains in this region since they can be predictive of the phylogenetic nature of future dominating strains in the HIV

pandemic. Highly divergent HIV strains could affect HIV pathogenesis, ease of spread in a population, susceptibility to antiretroviral treatment, or vaccine development strategies. Studies of HIV-1 genetic diversity could have a potential

impact on the diagnosis of HIV infection and could provide useful reference reagents for standardization of assays. For these reasons, it is important to study the evolution

of an HIV-1 recombinant dwelling in these regions as it may potentially become circulating recombinant (CRF) in future.

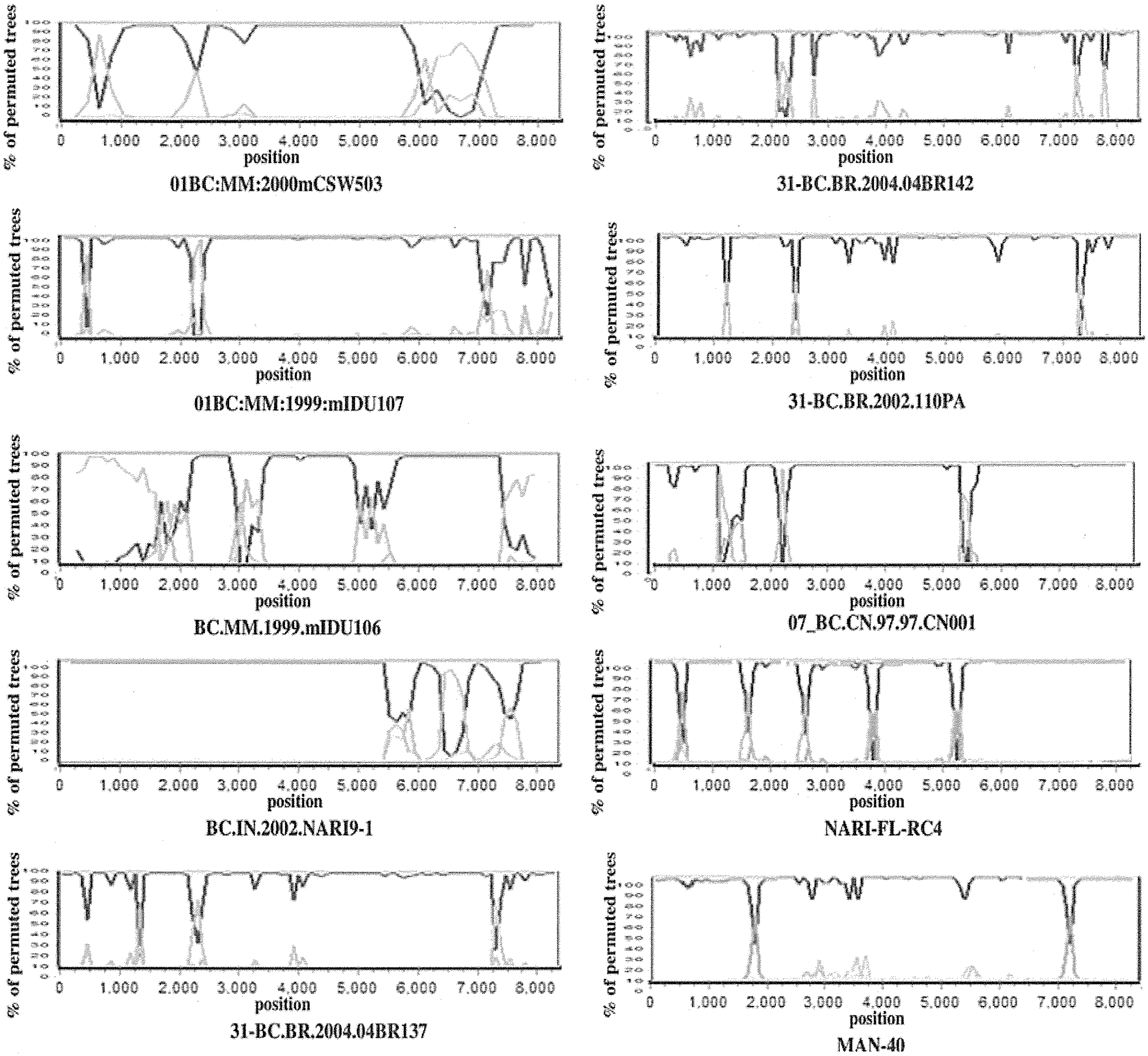

Fig. 1. Comparision of bootscan analysis of near full-length sequence of MAN40with otherBCrecombinant viruses-01BC:MM:2000mCSW503, 31-BC.BR.2004.04BR142, 01BC:MM:1999:mIDU107, 31-BC.BR.2002. 110PA,BC.MM.1999.mIDU106, 07_BC.CN.97.97.CN001, BC.IN.2002. NARI9-1, NARI-FL-RC4, and 31-BC.BR.2004.04BR137. The horizontal axis represents nucleotide distance of the midpoint of the window from the 5 end of the query sequence. The vertical axis represents the percentage of trees (using 100 bootstrap replicates) that support branching with the consensus subtype reference sequence. A 300 nt window advanced in 20 nt increments was used. Sequences were gap-stripped, transversion to transition ratio was set to 2 ± 0, distances were calculated according to Kimura's two-parameter model and trees were constructed with the neighbor-joining algorithm

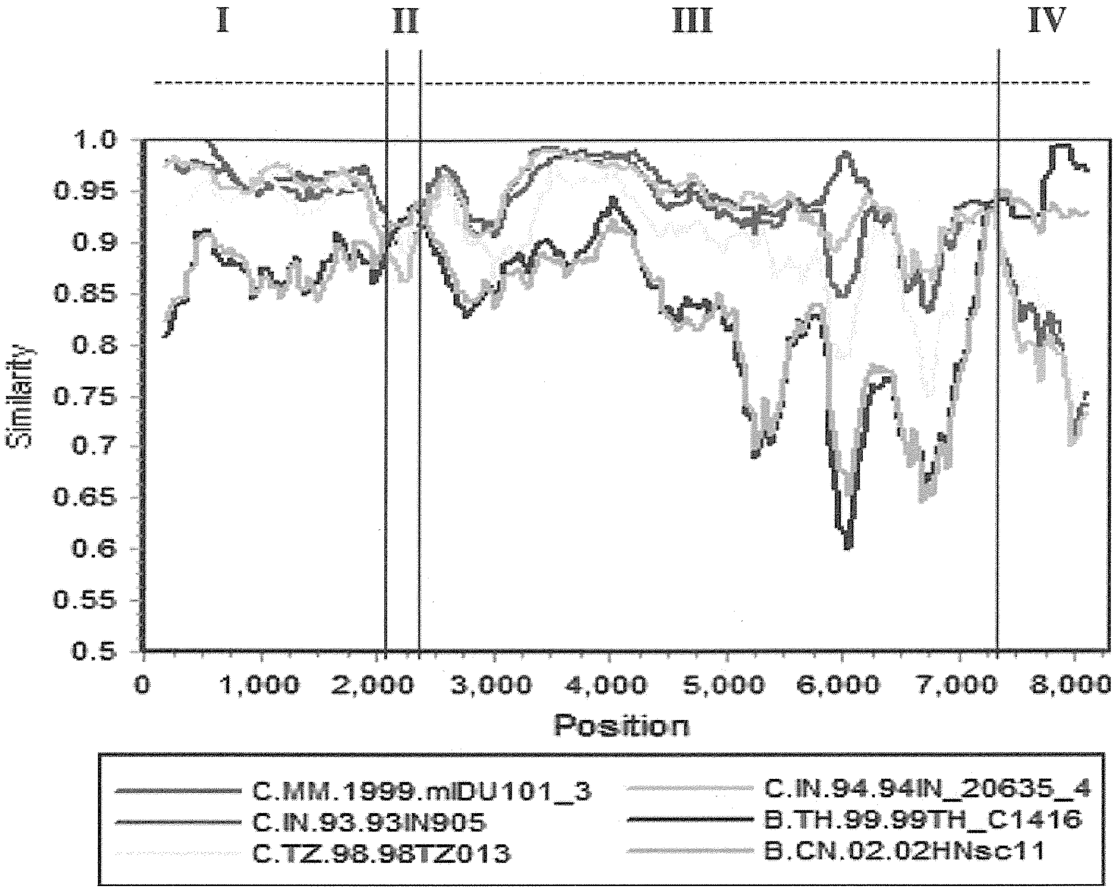

Fig. 2 Simplot analysis of (MAN40) HIV-1 strain isolated from an injecting drug user of Manipur. The HIV-1 strains included are C.IN.93.93IN905, C.IN.94.94IN_20635_4, B.TH.99.99TH_C1416, B.CN.02.02.HNsc11, C.MM.99.mIDU101_3, 07_BC.CN.97.97.CN001, 07_BC.CN.05XJDC6441, and BC.MM.1999.mIDU106. Recombinant viruses are indicated by the subtype designation followed by the name of the isolate. Bootstrap values 70 %, based on 100 replicates, of some key nodes are shown. The Breakpoint positions were obtained using Simplot 3.5.1 and numbered according to HXB2 references

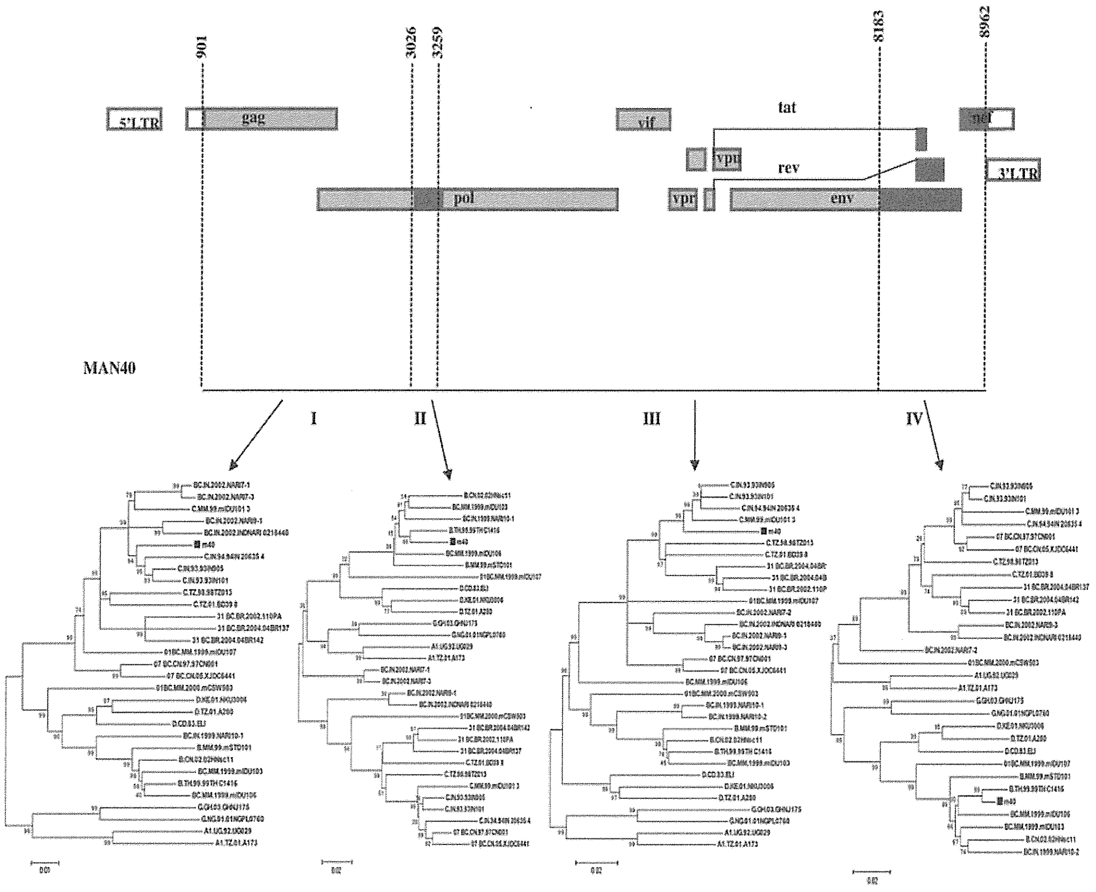

Fig. 3 The schematic drawing showing the mosaic recombination pattern of MAN40 HIV-1 genome. Subtype C and subtype B region are shown in green and red colors. The phylogenetic analysis of the Ist, IInd, IIIrd, and IVth fragments of MAN40 denoted as 'jm40' with HIV-1 sequences from other global HIV-1 strains are shown below the recombinant structure indicated with arrows

プロジェクト４：ベトナム

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）

平成25年度　分担研究報告書

研究課題名：「腸内細菌のmolecular typingに関する研究ーベトナム」

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、主として食水系由来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。本年度はベトナム国立衛生疫学研究所（National Institute of Hygiene and Epidemiology, NIHE）の腸内細菌部門と共同してVibrio choleraeの解析などを行った。

Molecular typing of enteric pathogens

Hidemasa Izumiya

Molecular epidemiological analyses were performed for *Vibrio cholerae* isolates of 2007-2010 from Vietnam in collaboration with National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam. The resulting data revealed the relatedness among isolates. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis identified 24types which were linked with each other by single locus variations. The analysis suggests that 2010 isolates were more similar to 2007 isolates than to 2009 isolates.

Environmental research was performed for water samples collected from environments in Hanoi and neighboring provinces. Most probable number combined with PCR method (MPN-PCR) was applied to estimate the distribution of *V. cholerae*. Some seasonal variations were suggested though more successive research would be required.

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。

環境調査においては、生活水路等から採水し供試検体とする。検体をMPN（最確数）-PCR法により試験し、検体中の*Vibrio cholerae*の菌数を推定する。

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* O1/O139）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であるベトナムでは、しばらくの休眠期間の後、2007年から2010年にかけてコレラの流行が発生した。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遂行している。

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）の腸内細菌部門・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している。

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、2010年に発生したコレラ流行に関して、当該菌株の分子疫学解析を行った。そして、これまでに試験した2007-2009年分離株との関連性を調べた。図1に、7遺伝子座を用いたMLVAの解析結果をMinimum Spanning Treeにて表示した結果を表す。

供試菌株（約190株）は24の型に分類された。それぞれの型は1遺伝子座の違い（single locus variant, SLV）によってつなげることができ、流行時の菌の伝播とともにバリアントが派生していることが窺えた。

なお、PFGEに関しても比較的マイナーなバリエーションが見られ、年によって大きなクラスターが形成された（図2、A1, B1, D）。

2010年分離株は、MSTからすると2007年株より派生していることが窺えた（図 1）。MLVAで使用している7つの遺伝子座のうち2遺伝子座は *V. cholerae* が保有する大小2つの染色体のうち、小染色体にあり、これらはより不安定でバリアントが出やすい（表 1）ことから、大染色体の5遺伝子座のみを使ってMSTを描いたところ、2010年株は2007年株と同じクラスターに分類された。このことは、2010年株が2009年株よりも2007年株に近いことを示唆しており、2010年株が2007年株から派生してきた可能性が示唆された。

実際、2007-2009年はベトナム北部を中心に流行があり、2010年は南部から始まって北部に至ったとされており、2010年が2009年の続きにあるというよりは、近縁だが別の新たな流行波で2010年の流行が生じた可能性が考えられた。

コレラの流行に対応するために環境中の *V. cholerae* の動向を調査することは重要である。流行期間でない時期にはいわゆるコレラ菌ではなく、毒素産生のない *V. cholerae* がほとんど大勢を占めるが、環境調査を行うことで、環境中のリスク要因あるいはポイントの検討および流行発生時の調査を円滑に実

施できる体制整備につながる。

本調査は NIHE 腸内細菌部門で継続的に実施されていたが、定量性を加味するために MPN-PCR 法の導入を行った。2013 年 3-8 月の間に、約 100 検体を試験し、20 検体が陽性であった。それらの MPN 値の最低および最高値を図 3 に示す。5-7 月にかけては菌数が低く、3,4 月および 8 月には菌数が高かったことから、*V. cholerae* 分布に関する季節変動の可能性が示唆された。本結果については、ポイントの整理などを行い、また継続して調査を行うことで *V. cholerae* の消長が定期的に発生するかどうかを見ていく必要がある。

D. 結論

2007 年から 2010 年にかけてベトナムで発生したコレラの流行に関し、関連菌株を用いた分子疫学解析を通じて互いの関連性および近縁性を明らかにすることができた。

環境調査を定量的に実施することで、環境中の *V. cholerae* の分布および消長をより高い精度で把握することが可能である。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

Yamamoto S, Mitobe J, Ishikawa T, Wai SN, Ohnishi M, Watanabe H, Izumiya H. Regulation of natural competence by the orphan two-component system sensor kinase ChiS involves a non-canonical transmembrane regulator in *Vibrio cholerae*. Mol Microbiol. 2014 Jan;91(2):326-47.

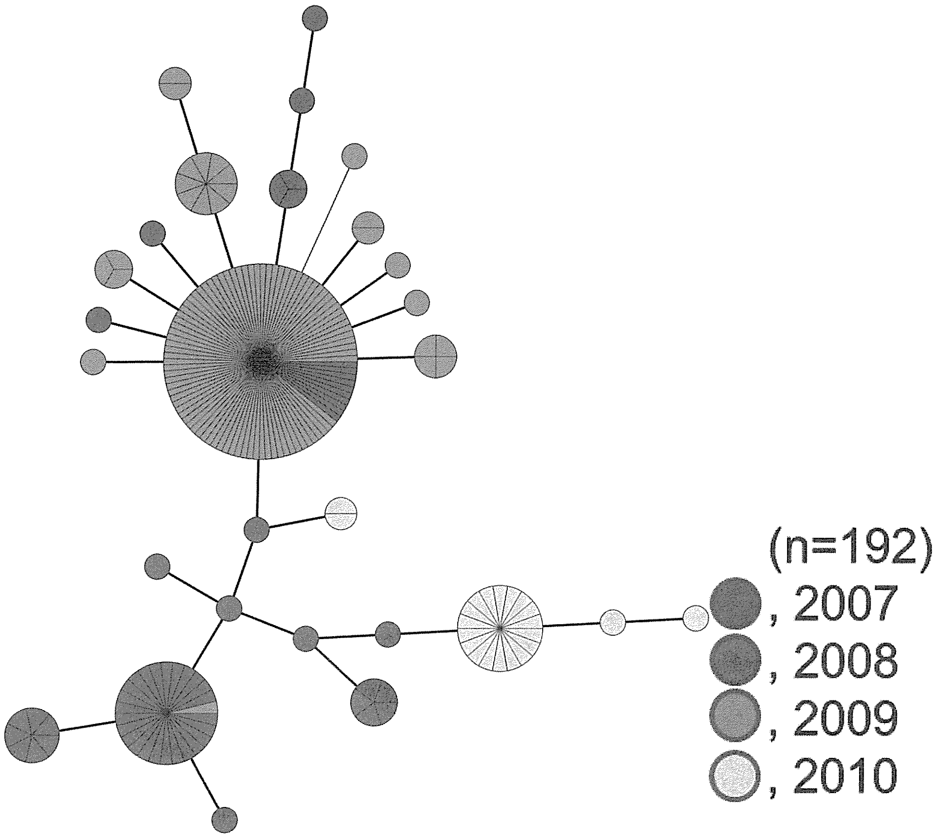

図１．2007-2010 年コレラ流行株の MLVA による MST 解析

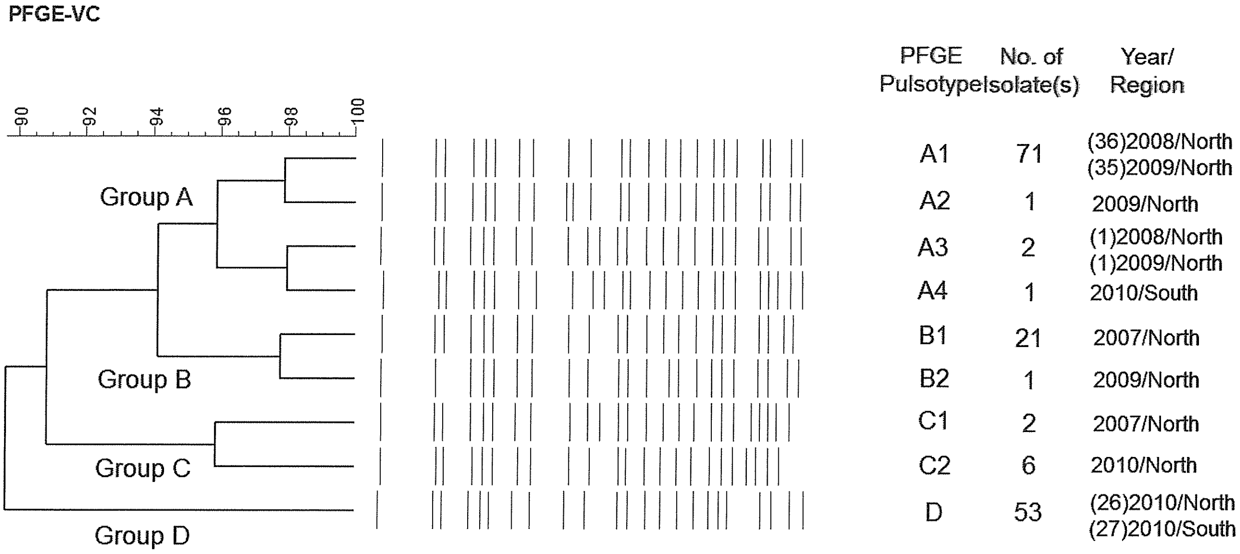

図２．2007-2010 年コレラ流行株の PFGE によるクラスター解析

Chromosome	locus	# allele	Diversity
Large	VC-1	3	5.1
	VC-2	1	0
	VC-3	1	0
	VC-5	3	47
	VC-6	1	0
Small	VC-7	7	56.1
	VC-8	8	64.1

表 1. MLVA の各遺伝子座において観察されたアリル数および分解能 (Diversity)

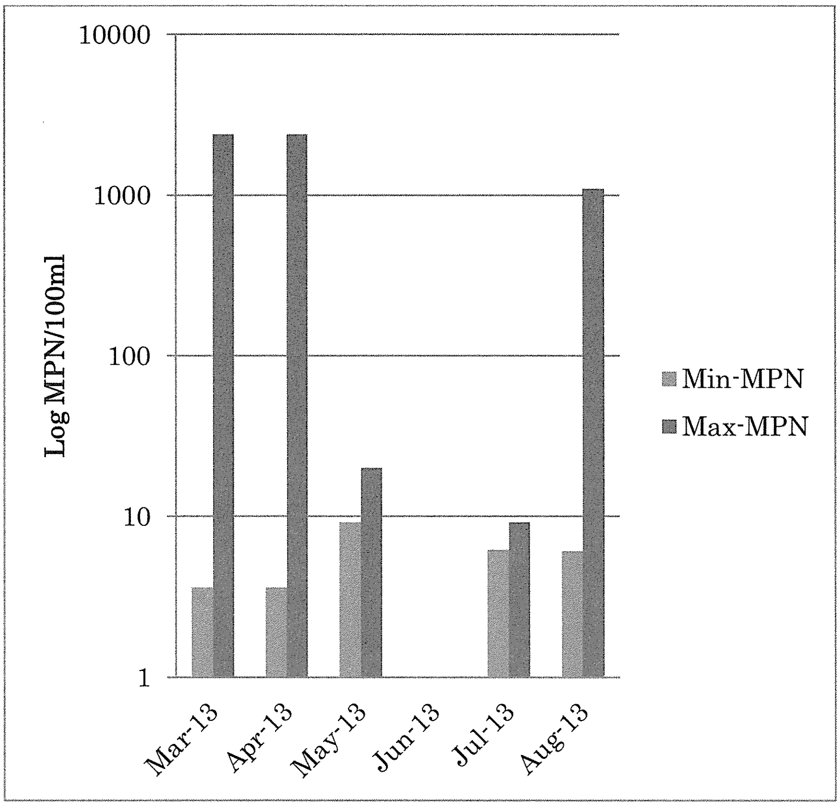

図 3. ハノイおよび周辺の province における環境調査。検出された MPN 値の最低値および最高値を表す。

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

Collaborative study on leptospirosis with Taiwan CDC and Vietnam NIHE

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
Nobuo Koizumi: Senior Researcher, Department of Bacteriology I, NIID
Jung-Jung Mu: Chief, Bacterial Enteric and Emerging Diseases Laboratory, Center for Research, Diagnostics and Vaccine Development, Taiwan CDC
Hoang Thi Thu Ha: Chief, Bacteriology Department, National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam

研究要旨

台湾の小型哺乳動物から分離されたレプトスピラ 20 株の性状解析を行った．*flaB* 部分塩基配列決定および標準抗血清との反応性から，分離株は *L. borgpetersenii* serogroup Javanica および *L interrogans* serogroup Australis および Bataviae と同定された（血清群未同定 1 株）．Multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) による *L. interrogans* 分離株の分子タイピングによって，Bataviae はフィリピン，ベトナム株と遺伝的に同一であり，Australis は沖縄県の患者から分離された株と近縁であることが明らかとなった．また *L. interrogans* 基準株 51 株の MLVA を行い，これらとの比較の結果，沖縄県の患者から分離された血清群 Icterohaemorrhagiae の血清型は Naam と推定された．

Serological and molecular characterization of leptospires isolated from small mammals in Taiwan was performed in this study. The isolates were identified as *L. borgpetersenii* serogroup Javanica and *L interrogans* serogroup Australis and Bataviae (Serogroup of one strain of the *L. interrogans* isolates was unidentified). Multiple locus variable-number tandem repeats analysis revealed that the Bataviae isolates of Taiwan were genetically identical to those of Philippines and Vietnam isolates and the Australis isolates were genetically similar to those of human isolates in Japan. Fifty-one *L. interrogans* reference strains were subjected to MLVA and the serovar of *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae isolated from human patients in Okinawa was deduced to be Naam.

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，交差凝集素吸収試験により 250 以上の血清型に分類されるが，本試験法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 *L. interrogans* の分子タイ

ピングとして multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) の有用性を明らかにしてきた．今年度の研究では台湾のげっ歯類から分離されたレプトスピラの遺伝学的および血清学的な解析を行った．

方法

1. レプトスピラ DNA

台湾のげっ歯類から分離されたレプトスピラ 20 株および *L. interrogans* 基準株 51 株のゲノム DNA は DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて抽出した．

2. レプトスピラ分離株の種・血清群同定

レプトスピラ分離株の種同定は *flaB* 遺伝子の部分塩基配列の決定により行った（参考文献 1）．また血清群の同定は，レプトスピラ標準抗血清を用いた MAT により行った（参考文献 2）．

3. MLVA

参考文献 3～5 にある 11 種類のプライマーを用いて PCR を行った．PCR 産物のアガロースゲル電気泳動および DNA シーケンシングにより，各 VNTR のリピート数の算定を行った．各分離株のクラスター解析は，各 VNTR のリピート数をもとに Bionumerics を用いて行い，系統樹は UPGMA 法により作成した．

参考文献

1. Koizumi N et al., Jpn J Infect Dis. 61:465, 2008.
2. Faine S et al. *Leptospira* and leptospirosis, 2nd edn. MediSci. 1999.
3. Majed Z et al., J Clin Microbiol. 43:539, 2005.
4. Slack A et al., J Med Micriobiol. 55:1549, 2006.
5. Zuerner RL & Alt DP. J Clin Microbiol. 47:1202, 2009.

結果および考察

1. 台湾の小型哺乳動物から分離されたレプトスピラの種および血清群同定

台湾の小型哺乳動物から分離されたレプトスピラ 20 株は，*flaB* 部分塩基配列の比較から，*L. borgpetersenii* 13 株および *L. interrogans* 7 株と同定された（表 1）．*L. borgpetersenii* の塩基配列はすべて同一で，*L. interrogans* の塩基配列は 2 種類であった（データ未掲載）．標準抗血清との反応性から *L. borgpetersenii* 分離株の血清群はすべて Javanica と同定された．一方 *L. interrogans* の血清群は Bataviae（*flaB* 塩基配列が同一の 4 株）および Australis（*flaB* 塩基配列が同一の 2 株）と同定された（1 株は複数の抗血清と弱い反応を示したため未同定）．

2. *L. interrogans* の MLVA

L. interrogans 台湾分離株および基準株の 11 種類の VNTR のリピート数をアガロース電気泳動および DNA シーケンシングにより算定した (MLVA)．台北市のドブネズミから分離された血清群 Bataviae の 11 VNTR のコピー数は 4 株とも同一で，フィリピンおよびベトナムのドブネズミから分離された Bataviae および血清型 Bataviae 基準株と同一であり，東アジアにおいて広くドウブネズミに保有されていることが明らかとなった（表 2）．一方，日本のドブネズミが保有レプトスピラとは血清学的・遺伝学的に大きく異なっている（昨年度報告書）．今後東アジアおよびその他の地域のドブネズミ分離株を解析することで，ドブネズミの拡散経路に関する新たな知見が得られる可能性が示唆された．

血清群 Australis 2 株の 11 VNTR のコピー数は同一で，また血清群の未同定の 1 株も遺伝的に近縁であることが明らかとなった．これら 3 株は沖縄県の患者分離株と同一のクラ

スターを形成し，本州のイヌおよびアカネズミから分離された血清群 Australis とは異なるクラスターであった（図 1）．これまで沖縄県における本血清群の保有動物は明らかになっていない．コキバラネズミは日本に存在しないものの，ジャコウネズミは沖縄県に広く存在することから本動物が保有動物の可能性が示唆された．

L. interrogans 各血清型基準株の MLVA を行った結果，MLVA タイプの異なる本州と沖縄県の血清群 Icterohaemorrhagiae は，それぞれ血清型 Icterohaemorrhagiae および Naam であると推測された（表 3）．この他にも上述の血清群 Bataviae 分離株，フィリピンの血清群 Pyrogenes 分離株は，それぞれ血清型 Bataviae および Manilae と MLVA タイプが同一であった（表 2 およびデータ未掲載）．一方で，その他血清群分離株と同一あるいは近縁の MLVA タイプは今回タイピングを行った基準株から見いだされなかった．このことはこれら分離株の血清型が新規の血清型であることを示唆しているのかもしれない．あるいは同じ血清型が異なる分子タイプ群から構成されている可能性も考えられる．今後，他の地域の分離株の解析を通して血清学的分類と分子タイピングの関連性（普遍性あるいは多様性）をさらに明らかにしていく必要がある．

今回解析を行った台湾の *L. borgpetersenii* 血清群 Javanica 分離株の *flaB* 塩基配列は，日本およびフィリピンの小型哺乳動物から分離された *L. borgpetersenii* 血清群 Javanica 分離株と同一であった（データ未掲載）．

MLVA を行うにあたってご協力いただいた泉谷秀昌博士（国立感染研症研究所）に深謝いたします．

論文発表

1. 小泉信夫, 大西真．レプトスピラ症．小児科. 54:43-48, 2013.
2. 小泉信夫, 岡野祥, 大西真．レプトスピラ症．化学療法の領域. 29:670-678, 2013.
3. 小泉信夫, 大西真．レプトスピラ感染症（レプトスピラ症，ワイル病）．別冊　日本臨牀　新領域別症候群シリーズ　No. 24 感染症症候群（第 2 版）（上）病原体別感染症編. 257－260, 2013.

学会発表

小泉信夫. スリランカ・フィリピンにおけるレプトスピラ症の現状．第 87 回日本細菌学会総会. 2014 年 3 月．