

令和元年6月17日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08477

研究課題名(和文) 発展途上国の下痢症アウトブレイク関連大腸菌からの新規下痢因子解明

研究課題名(英文) An outbreak of diarrhea in Mandera, Kenya, due to Escherichia coli serogroup O-nontypable strain

研究代表者

越智 定幸 (Ochi, Sadayuki)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80268705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：2009年12月ケニアのラフェー地区マンデラで原因菌不明の大規模な下痢症のアウトブレイクが発生した。ケニア公衆衛生省から詳細な調査要請を受けた長崎大学熱帯医学研究所ケニア・ナイロビ拠点の研究者と共に原因菌の特定を目指して調査、研究を行った結果、下痢症患者から検出されるEASTECと呼ばれる大腸菌が検出された。また、患者由来EASTECの培養濾液には動物実験において下痢活性が検出されるが、健常者由来EASTECでは下痢活性が認められないことも明らかになった。以上から、原因菌が不明とされた下痢症アウトブレイクは、EASTECが原因となって引き起こされたと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界第5位の死因である下痢性疾患は、今なお深刻な問題の疾患である。私は、ケニアで発生した原因菌不明の下痢症アウトブレイクについて検討し、病原因子として腸管凝集性大腸菌が持つ耐熱性エンテロトキシン1遺伝子のみを保有するEASTECと呼ばれる大腸菌が原因となって下痢症アウトブレイクが引き起こされたことを示した。本研究は、迅速な原因菌の同定が不可欠な下痢症の予防、発生時の流行阻止、そして、適切な治療の領域に貢献すると考える。

研究成果の概要(英文)：In an outbreak of gastroenteritis on 16 December 2009, in Mandera, Kenya, Escherichia coli O-untypable (OUT) strain was isolated from stool specimens of patients (18/24, 75%). The isolates showed the similar DNA banding pattern in pulsed-field gel electrophoresis after digestion with the restriction enzymes NotI or XbaI. The cell-free culture filtrate of EASTEC (E. coli that does not exhibit any diarrheagenic characteristics other than enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin 1 gene) strain isolated from the outbreak case induced a considerable amount of fluid accumulation (FA) in suckling mouse intestine, indicating production of an enterotoxigenic factor(s). These results identify EASTEC as the etiological agent of the diarrheal outbreak in Mandera.

研究分野：細菌学

キーワード：感染症疫学 下痢症 大腸菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

WHO の推定によると、全世界の年間死亡者数の約 30% は感染症による死亡であり、そのうち多くの死者を出す原因となっている感染症は、呼吸器感染症、エイズ (AIDS)、下痢症、結核、マラリアである。これら 5 大疾患の年間死亡数は 1,500 万人を超えるといわれていた。

2. 研究の目的

世界第 5 位の死因である下痢性疾患は、今なお深刻な問題の疾患である。下痢症の予防、発生時の流行阻止、そして、適切な治療には迅速な原因菌の同定が不可欠である。しかしながら、下痢性疾患事例の約 30% は、原因菌が特定できない。私は、これまで下痢症多発地域のインドネシア、ケニア、ブラジルで細菌性下痢症の疫学、そして、その原因菌の分子疫学的検査を行い、下痢症の発生状況と原因菌の動向を調査してきた。これら疫学調査の途中の 2009 年 12 月にケニアのマンデラ県ラフェー地区の住民の間で下痢症が流行した。この年は、ケニア全土でコレラが流行していたため、ケニア公衆衛生省は、マンデラにおいてもコレラの発生を疑った。しかしながら、実施された下痢症サーベイランスではコレラ菌を含む主要な下痢原因微生物は検出されず、原因菌は不明であった。1 ヶ月の間、同地区で小児、成人を問わず、下痢症が蔓延した。この間に 2 名の死者を含む 324 名が下痢を発症し、ケニアでの下痢症規模においても大規模レベルに分類される下痢症アウトブレイクとなった。この下痢症アウトブレイクに対し、ケニア公衆衛生省から詳細な調査要請を受けた長崎大学熱帯医学研究所ケニアプロジェクト拠点の研究者と共に原因菌の分離を行い、下痢原因菌の特徴について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

マンデラ地区の下痢症患者 (24 検体) 及び、健常者 (24 検体) の糞便検体を試料とした。これら検体に対してサルモネラ、シゲラ、ビブリオ、カンピロバクター、アエロモナス属細菌そして、大腸菌の有無は、常法の分離同定法で検査した。

O 抗原の特定は、利用可能な O 抗原 (O1-O165) 血清 (デンカ生研) を用いてスライド凝集法の結果を基にして行った。

PCR 法を利用して下痢原性関連遺伝子の存在を試験した。試験菌を Luria-Bertani broth に接種して 37 °C で一晚培養し、遠心して集菌した。菌体を蒸留水に懸濁後、沸騰水浴中で 5 分間加熱し、遠心後の上清を被検試料とした。PCR 条件は既報の方法に従った。増幅断片の有無は、アガロース電気泳動後の DNA バンド発色の有無を基に評価した。

細胞付着試験は、Jenkins C. らの方法に従って行った。24 時間培養された HEp-2 細胞に 1 (w/v)% D-マンノースを含むイーグル培地、そして、一晚培養した被検菌を加え、37 °C で培養した。その後リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄された HEp-2 細胞をギムザ染色し、付着形態を観察した。

被検菌の抗菌薬に対する感受性は、Sensi-Disc を使い、常法に従って試験した。

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) は、Izumiya H. らの方法に従った。制限酵素処理された DNA は、1% アガロースゲルを用いて CHEF Mapper システム (2.91 から 63.8 秒の線形スイッチ時間ランプ、12 °C、200 V) で展開した。

被検菌から精製された DNA を PCR の鋳型 DNA として使い、*astA* 遺伝子を含む DNA 領域を増幅した。精製された増幅断片は ABI BigDye v3.1 を用いて ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer で配列決定した。

培養濾液の下痢原性は、Giannella R.A. の方法に従った。一晚培養した被検菌体の培養濾液を試料として Jel:ICR サックリングマウスに経口投与した。3 時間後にマウスを開腹して腸管を取り出した後に体重と摘出腸管の重量を測定し、腸管摘出後体重と摘出腸管重量の比 (G/B 比) を算出した。G/B 比が 0.083 以上の場合が下痢活性陽性とされた。

本研究におけるすべての動物実験は、「藤田保健衛生大学 (現: 藤田医科大学) における動物実験規程」に従って実施された。

4. 研究成果

2009 年 12 月 15 日、ケニア、ラフェー地区、マンデラ県マンデラで下痢を主症状とする胃腸炎が流行した。約 1 ヶ月の間に同地区では、2 名の死者を含む 324 名の下痢症患者が出た。同年は、ケニア全土でコレラが流行していたため、ケニア公衆衛生省は、マンデラにおいてもコレラの発生を疑ったが、実施された下痢症サーベイランスではコレラ菌を含む主要な下痢原因微生物は検出されず、原因菌は不明であった。短期間で 324 名という大規模クラスの下痢症の流行であったことから、この下痢症アウトブレイクに対し、ケニア公衆衛生省から詳細な調査要請があり、これを受けた長崎大学熱帯医学研究所ケニアプロジェクト拠点の研究者と共に原因調査が開始された。

記述疫学から明らかになった下痢症アウトブレイクの発生の経緯は以下のものである。2009 年 12 月 15 日にラフェー地区内で結婚パーティーが開催された。この結婚式の祝賀会では結婚祝いとして振る舞うためにラクダが解体処理されていた。解体されたラクダは、このパーティーで振る舞うために、特別に隣国ソマリアで調達されて持ち込まれたラクダであった。一方でこのエリアの住民の間では解体された動物の腸管の内容物中に自身の身体の創傷部を挿入して腸管内容物で創傷部を洗うことによって傷が治癒するという「キブ」と呼ばれる伝統療法が

信じられてきた。結婚祝賀パーティーの参加者の中に3ヶ月前に酷い火傷を負った3歳の小児がいた。その父親の話によると、息子は解体されたラクダの腸内の深部に創傷部を挿入するように勧告され、5時間にわたって腸内へ創傷部を挿入した後に、解体肉を煮て作られた肉汁で創傷部が洗われたという。数日後、その息子は、嘔吐と共におびただしい量の下痢症状を呈し、診療所へ運ばれる途中に息を引き取った。これがアウトブレイク全体の最初期の出来事である。数日後には、死亡した小児の兄弟に同様の症状が発症したが、幸いに快復した。これ以降、同地区に多数の下痢症患者の発生報告が相次いだ。

下痢症状を呈した患者グループのメンバー、及び、同ラフェー地区に居住し、少なくとも2週間以上は下痢経験がない健常者を対象としたインタビューによる調査は、12月26日から開始された。また、12月26日から28日の間に調査班によって採取された糞便検体を試料として用いた。まずは、これら糞便検体試料についてサルモネラ、シゲラ、ピブリオ、カンピロバクター、アエロモナス属菌の検出を行ったが、これら細菌とノロウイルスを含む下痢原因ウイルスのいずれも検出されず、ケニア公衆衛生省の当初の報告に一致する結果であった。また、検出された大腸菌に対しては、腸管凝集性大腸菌(EAEC)、毒素原性大腸菌(ETEC)、腸管病原性大腸菌(EPEC)、腸管侵入性大腸菌(EIEC)、そして、腸管出血性大腸菌(EHEC)の各マーカー遺伝子を検出する病原型別分類PCR法を行ったが、EPEC、EIEC、EHECのマーカー遺伝子は検出されず、EAEC、ETECのマーカー遺伝子は2、または、5検体の患者由来糞便検体の大腸菌から検出されたが、健常者由来検体から検出される大腸菌においても同様の検出率で検出され、患者、健常者間で検出率に有意な差が見られず、下痢症アウトブレイクの原因菌の特定にはつながらなかった。

EAECの一部には耐熱性エンテロトキシン(ST)に高い相同性を示す遺伝子、EAEC耐熱性エンテロトキシン1遺伝子(*astA*)を有する大腸菌の存在が知られている。そこで、*astA*検出プライマーを用いたPCR法で*astA*の有無を調べたところ、患者由来大腸菌では75%、健常者由来大腸菌では8%の*astA*保有率で*astA*保有大腸菌の存在することが判明し、患者糞便検体由来の大腸菌で有意に保有されることが判明した。最近、フレキシネル菌(B群赤痢菌)で3種の新しい赤痢菌エンテロトキシン(ShET-1、ShET-2、Sat)が報告された。また、2つの新しい病原因子、プラスミドエンコード毒素(Pet)、コロニー形成に参与するオートトランスポータータンパク質(Pic)がEAECでも報告されている。そこで、これら病原因子が*astA*を保有する大腸菌(EASTEC)に存在するか否かについてPCR法を用いて調べた。しかしながら、患者由来の全てのEASTECにおいてこれら病原因子遺伝子は検出されなかった。

マンデラ由来EASTECについてPFGEを利用した分子疫学分析を行った。その結果、下痢症アウトブレイク患者由来EASTECにおいて菌株間で同様のDNAバンドパターンが観察され、糞便中に検出されるEASTECが同一菌株であり、下痢症の原因菌となった可能性が考えられた。一方、健常者に由来するEASTECでは菌株間で多様なDNAバンドパターンを示すうえに、患者由来のEASTECで検出されるDNAバンドパターンとも全く異なっていた。このことから、患者、健常者で検出されたEASTECは分子疫学的に全く異なる菌株であることが明らかになった。これらの結果は、制限酵素として*NotI*の代わりに*XbaI*を用いた場合でも同様であった。

患者由来EASTECの*astA*と、これに隣接する上流100塩基、そして、下流30塩基のDNA塩基配列について決定し、*astA*を有するEAEC標準株として知られるO42菌株の*astA*を含む対応領域のDNA塩基配列と比較した。その結果、比較した領域のDNA塩基配列は、全てのアウトブレイクEASTEC菌株とO42菌株の塩基配列が同一であることが判った。O42菌株が有志者実験で下痢原性を示したことに對して、もう一つのEAEC標準株で、*astA*配列にミスセンス変異を有する17-2菌株が下痢原性を示さなかった報告を考え合わせると、マンデラ下痢症アウトブレイク患者由来EASTECが下痢原性を有する可能性が考えられた。

EAECは、腸管上皮細胞へのレンガ状の特徴的な付着形態を示すので、マンデラ下痢症アウトブレイク患者由来EASTECのHEp-2細胞への付着について検討したところ、試験した全てのアウトブレイクEASTEC菌株において、ネガティブコントロールとして用いた大腸菌JM109菌株の場合と同様にHEp-2細胞への付着は観察されなかった。

サックリングマウスを用いた*in vivo*腸管毒性試験を利用し、マンデラ由来EASTEC培養濾液の生物活性を評価した。マンデラ下痢症アウトブレイクEASTEC菌株である0081菌株の培養濾液をサックリングマウスに投与した場合、0.104(±0.04, n=6)のG/B比値が認められた。また、0081菌株以外のアウトブレイクEASTEC菌株においても、0.083以上のG/B比値が検出された。一方、健常者に由来するEASTEC菌株で同様の試験を行ったところ、ネガティブコントロール菌株として用いたJM109菌株の場合のG/B比値(0.058±0.001, n=6)との間に有意な差は認められず、サックリングマウスに液体貯留を引き起こさなかった。

マンデラ下痢症アウトブレイクEASTEC菌株のO抗原型を調べた。しかしながら、用いたO1からO165の全ての血清に対して凝集は認められず、O抗原型別不能(OUT)と判定された。

以上から、2009年12月にケニア、ラフェー地区マンデラ県マンデラで発生した下痢症アウトブレイクは、*astA*遺伝子を有する大腸菌、EASTEC OUT菌株が原因となって引き起こされたと推察された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Nobumitsu Hanioka, Susumu Ohkawara, Takashi Isobe, Sadayuki Ochi, Toshiko Tanaka-Kagawa and Hideto Jinno, Regioselective glucuronidation of daidzein in liver and intestinal microsomes of humans, monkeys, rats, and mice, Arch. Toxicol., 92(9), 2809-2817 (2018)

Takashi Isobe, Susumu Ohkawara, Sadayuki Ochi, Toshiko Tanaka-Kagawa, Hideto Jinno and Nobumitsu Hanioka, Naringenin glucuronidation in liver and intestine microsomes of humans, monkeys, rats, and mice, Food Chem. Toxicol., 111, 417-422 (2018)

Masaya Takehara, Teruhisa Takagishi, Soshi Seike, Masataka Oda, Yoshihiko Sakaguchi, Junzo Hisatsune, Sadayuki Ochi, Keiko Kobayashi and Masahiro Nagahama, Cellular entry of *Clostridium perfringens* iota-toxin and *Clostridium botulinum* C2 toxin, Toxins (Basel), 9(8), E247 (2017)

Sadayuki Ochi, Mohammad Shah, Erick Odoyo, Martin Bundi, Gabriel Miringu, Sora Guyo, Ernest Wandera, Cyrus Kathiiko, Samuel Kariuki, Mohamed Karama, Takao Tsuji and Yoshio Ichinose, An outbreak of diarrhea in Mandera, Kenya, due to *Escherichia coli* serogroup O-nontypable strain that had a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1, Am. J. Trop. Med. Hyg., 96(2), 457-464 (2017)

Masahiro Nagahama, Sadayuki Ochi, Masataka Oda, Kazuaki Miyamoto, Masaya Takehara, Keiko Kobayashi, Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin, Toxins (Basel), 7(2), 396-406 (2015)

〔学会発表〕(計6件)

磯部 隆史、片岡 祐太、村上 雄大、加藤 輝隆、越智 定幸、埴岡 伸光、ビリルビン濃度で薬物放出量が変化するアルギン酸ゲルビーズの調製条件に関する検討、日本薬学会第 139 年会、2019

香川(田中)聡子、大河原 晋、百井 夢子、磯部 隆史、青木 明、植田 康次、岡本 誉士典、越智 定幸、埴岡 伸光、神野 透人、室内環境化学物質による侵害刺激の相乗作用、第 45 回 日本毒性学会学術年会、2018

磯部 隆史、小島 健太郎、大河原 晋、越智 定幸、香川(田中)聡子、神野 透人、埴岡 伸光、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール ジイソブチラートの肝ミクロゾームによる加水分解反応の種差、日本薬学会第 138 年会、2018

加藤 嵐、磯部 隆史、大河原 晋、加藤 輝隆、越智 定幸、香川(田中)聡子、神野 透人、埴岡 伸光、薬物放出量を決定するインテリジェント製剤へのアルギン酸ゲルビーズの利用、日本薬学会第 138 年会、2018

Sadayuki Ochi, Mohammad Shah, Erick Odoyo, Martin Bundi, Gabriel Miring'u, Sora Guyo, Ernest Wandera, Cyrus Kathiiko, Samuel Kariuki, Mohamed Karama, Takao Tsuji and Yoshio Ichinose, An outbreak of diarrhea in Mandera, Kenya due to *Escherichia coli* serogroup O-nontypable strain that had a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1, The 3rd Africa International Biotechnology and Biomedical Conference, 2017

Yoshio Ichinose, Sadayuki Ochi, Erick Odoyo, Martin Bundi, Gabriel Miringu, Sora Guyo, Samuel Kariuki, and Shah Mohammad, An outbreak of diarrhea in Madera, Kenya due to *Escherichia coli* serogroup O-untypable strain that had a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1, 4th international Conference on Tropical Medicine Infectious Diseases & Public Health, 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：一瀬 休生

ローマ字氏名：Ichinose Yoshio

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。