

機関番号：17301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2010
 課題番号：19406014
 研究課題名（和文） 熱帯地における下痢原因菌の病因論とその疫学的研究
 研究課題名（英文） Etiological and epidemiological analysis of diarrheal diseases in tropical areas

研究代表者
 一瀬 休生（ICHINOSE YOSHIO）
 長崎大学・熱帯医学研究所・教授
 研究者番号：70176296

研究成果の概要（和文）：

ケニアの下痢症等のアウトブレイクについてその流行状況の把握と起因菌分析を行い、2008年末のサウスニヤンザ発生コレラ流行とマンデラ発生小児下痢症の流行の原因の解明を行った。さらに、都市化した地域での5歳以下小児の下痢起因菌の現状を明らかにするために、首都ナイロビ近郊の医療施設で下痢起因細菌の病因学的検索を行なった結果、下痢原因が従来の細菌からロタウイルスへ変化しており、もはや古典的下痢起因細菌は分離されなくなっていることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

We have investigated to know the real situation of diarrheal disease outbreak in Kenya. We studied cholera outbreak started from South Nyanza in 2008 and diarrheal outbreak in Mandella near Somali border. We have also investigated causative agents among pediatric cases less than 5 years of age to evaluate the significance as diarrheagenic agents in the urbanized setting from 2008 to 2009. It reveals that Rota virus is an only major causative agent of diarrheal diseases and classical enteropathogens seemed to be no longer major diarrheagenic agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

研究分野：細菌学、熱帯医学

科研費の分科・細目：細菌学(含真菌学)

キーワード：下痢症、コレラ、疫学、病因学的分析、DSS, マルチプレックス PCR

1. 研究開始当初の背景

細菌性下痢症は途上国では、取り組むべき重要な公衆衛生学的課題の一つであるが、治療

法及び対策が先行し、病因論的検索などの調査は十分には行なわれていないのが実情である。小児の下痢症では病原性大腸菌が重要

な位置を占めるが、0157 腸管出血性大腸菌感染症については、本邦では集団発生以来、大きな社会問題となった。しかし途上国における本菌感染症の実態はあまり知られていない。また病原性大腸菌の診断は専ら血清型診断に依拠しており、この診断法は病原因子の有無を調べる検査法ではないため、十分なものではなかった。今回、5種類の病原大腸菌が保有する病原因子を検出するPCR法を用いて確度の高い検査が可能となり、これまでベールに包まれていた大腸菌感染症の実像を明らかにする必要がある。

2007 年末からスバ地域においてコレラが発生し、我々は衛生行政当局からその制圧にむけた技術的支援を要請され、調査チームを派遣し、原因菌の同定および原因菌の薬剤感受性の結果などを報告した。

当時大統領選挙後の政治的騒動の影響もあり、またビタのラボ整備が思うような進捗を見せず、予想外に時間がかかっている。

2. 研究の目的

本研究は、途上国において、特に乳幼児の高い死亡原因となっている細菌性下痢症の実態を把握するため、都市部はもちろん HIV/AIDS 感染等の種々の感染症が大きな社会問題となっているビクトリア湖周辺地域において、病原性大腸菌を中心とした病因学的調査を実施し、下痢症の罹患率、環境への浸淫状況から、この地域で取り組むべき公衆衛生学的な課題から具体的な方策に至るまで、探るのが目的である。

3. 研究の方法

検体採取と検査の概要

・便、血液などの検体採取と搬送

(車および公的な輸送手段)

・病歴採取—DSSからの情報入手

HIV検査情報と実施

・検体の細菌学的検索

1) 通常の検査

2) 新種の菌の分離の試み

Plesiomonas shigelloides

Providencia 属菌 など

3) Multiplex PCR法を用いた病原大腸菌の

同定 (毒素と線毛などの病原因子をターゲットにする。)

・毒素及び菌体抗原の血清疫学

(遺伝子工学的的手法による精製と抗毒素抗体

の検出系の作成 : 抗 VT1、VT2 抗体

4. 研究成果

(1) 2008年末からタンザニア国境近くのサウスアンザからはじまったコレラはウガンダ国境、中央部のイシオロ、北部国境、モンバサの海岸地域までコレラが流行し、2009年には、ほぼケニア全土に拡大し

た。小流行が発生すると、我々は厚生省当局から制圧にむけた技術的支援の要請を受け、現地へ赴き、検体採取、原因菌の同定、分離菌の薬剤感受性を含めた性状検査などの結果を報告してきた。これまでに150株に上る01コレラ菌を分離し、生物型はクラシック、エルトールハイブリッド型、テトラサイクリンに対してはほとんどが感受性であり、耐性の株の遺伝子はアジア株と同様であった。現在耐性遺伝子の詳細な分析を行っているところである。

また、2009年の年末から2010年の初頭にかけて、隣国ソマリアでの小児を中心とした下痢症の流行に遭遇し、その原因の解明を行っている。当初、コレラ菌による流行と考えられたが、遊牧民のミルクを介した病原大腸菌が原因であることが、明らかとなり現在その詳細を詰めているところ位である。

(2) 都市化の進行した地域での下痢起因菌の現状を明らかにするために、ケニアの首都ナイロビ近郊地域であるキアンプ地域の2医療施設 (キアンプ県立病院、カルリヘルセンター) から5歳以下の小児を対象にして下痢起因細菌の病因学的検索を行ってきた。下痢患者が出れば、そのサブロケーションから年齢、性が同じ健康小児から採便し、下痢起因菌の病因学的分析を行った。古典的病原菌については通常の細菌分離を行い、病原大腸菌については1症例から3コロニーの大腸菌を分離し、マルチプレックスPCRシステムによって検出を行なった。同時に、カンピロバクター、エロモナス、プレジオモナスシゲロイデスなどの下痢起因菌についても同様の検索を進めた。ロタウイルスについては下痢症例、健康者グループ間の分離率をMacNemarの方法でその病原的意義について分析した。その結果、合計595のペア検体を採取でき、細菌学的、分子生物学的方法で検索した。赤痢菌、サルモネラ菌、コレラ菌は分離することはできなかった。ロタウイルスは下痢症例、健康小児からそれぞれ169 (28.4%)、1 (0.17%) が検出された。病原大腸菌については病原大腸菌、毒素原性大腸菌、腸管凝集性大腸菌が下痢症例、健康小児グループからの分離頻度はそれぞれ14 (2.4%)、16 (2.7%)、37 (6.2%)、38 (6.3%)、88 (14.8%)、111 (18.7%)であった。

McNemar testによる分析の結果、ロタウイルスが下痢症発生と密接な関係を示唆し、その病原的意義の裏付けとなることが判明したが、病原大腸菌についてはその病原的意義を示すことはできなかった。したがってナイロビなどの近郊地域ではもはや古典的下痢起因菌は分離されることは少なく、もっぱらロタウイルスなどが下痢を起

こす主体であるということが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

①. Akihiro Wada, Makoto Hasegawa, Pooi-Fong Wong, Emi Shirai, Nobuaki Shirai, Li-Jing Tan, Rafael Llanes, Hironobu Hojo, Eiki Yamasaki, Akitoyo Ichinose, Yoshio Ichinose, and Masachika Senba, Direct binding of gangliosides to *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) neutralizes its toxin activity
Glycobiology, Vol, 28, 2010 査読有

②. Sadayuki Ochi, Tohru Shimizu, Kaori Ohtani, Yoshio Ichinose, Hideyuki Arimitsu, Kentaro Tsukamoto, Michio Kato and Takao Tsuji
Nucleotide Sequence Analysis of the Enterotoxigenic Escherichia coli Ent Plasmid, DNA Research
16(5) 2009 Oct. 299-309 査読有

③. Shimada M, Ichinose Y, Kaneko S and Minakawa N
Profile of the Nagasaki University Kenya Research Station and Activities
Tropical Medicine and Health (35), 29-31, 2007、査読有

④. Ichinose Y., Establishment of Bio-medical Laboratories in the Kenya Research Station and a Diarrheal Disease Research Project in Kenya
Tropical Medicine and Health, (35), 33-36, 2007 査読有

[学会発表] (計 20 件)

①. 越智定幸、有満秀幸、塚本健太郎、大谷郁、Neri Paola、佐々木 慶子、加藤道夫、一瀬休生、清水徹、辻孝雄 毒素原性大腸菌 H10407 株 Ent プラスミドの機能領域配列解析、第83回日本細菌学会総会 2010年、3月27-29日、横浜、パシフィコ横浜

②. 和田昭裕、一瀬休生 ガングリオシド樹脂を用いた細菌毒素の同定方法の検討、第83回日本細菌学会総会、2010年、3月27-29日、横浜、パシフィコ横浜

③. Chika Narita, Sora Suka, Amina Galata, Victor Ager, Mwajuma Abubakar, Gabriel Miringu, Martin Bundi, Masaaki Shimada, Mohamed Karama, Shingo Inoue, Yoshio Ichinose A Study on Effect of Education on Biosafety Technique in

NUITM-KEMRI Laboratory

1st Annual Biological Safety Conference, African Biological Safety Association, 8-12March, 2010, KEMRI Training Centre Nairobi, Kenya

④. 越智定幸、有満秀幸、塚本健太郎、大谷 郁、佐々木慶子、加藤道夫、一瀬休生、清水徹、辻孝雄 毒素原性大腸菌 H10407 株 Ent プラスミドの接合伝達領域、第46回日本細菌学会中部支部総会、2009年10月23、24日 名古屋、名城大学薬学部ライフサイエンスホール

⑤. 一瀬休生、江原雅彦、堀尾政博、荻野倫子、越智定幸、辻孝雄、嶋田雅暁、Mohamed Karama, Victor Okoth, Angella Makumi
西ケニアのコレラ流行とその起因菌の性状について、第50回日本熱帯医学会総会
2009年10月22、23日、沖縄、沖縄コンベンションセンター

⑥. Sheru Waanyua, Mohamed, Karama, Ibrahim Kiche, James K' Opiyo, Yoshio Ichinose, Satoshi Kaneko, Water sources, treatment and storage at the household level in Suba district, The Association of public health officers (Kenya) 13th-15th October 2009, Kisumu, Kenya

⑦. Nguyen Dong Tu, 岩見守、一瀬休生、江原雅彦、Characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in northern Vietnam in 2007-2009、第62回日本細菌学会九州支部総会、2009年9月4、5日、佐賀、佐賀大学医学部臨床大講義堂

⑧. 一瀬休生、江原雅彦、越智定幸、辻孝雄、西ケニアのコレラ流行とその起因菌の性状について、第57回日本化学療法学会、2009年 6月3、4、5日、東京、ホテル日航東京

⑨. 久保亨、一瀬休生、森田公一
ケニア共和国における黄熱ウイルス感染症の ELISA 法を用いた血清疫学とその他の蚊媒介性熱帯ウイルス感染症の血清学的解析
第83回日本感染症学会総会 4月23、24日、2009年、東京、京王プラザホテル

⑩. Yoshio Ichinose et al., Phenotypic and molecular typing of *Vibrio cholerae* O1 isolated in Western Kenya, 3rd East African Health & Scientific Conference, March 25-27, 2009, Nairobi, Kenya

⑪. 一瀬休生 他 西ケニアで流行した O1 コレラ菌株の性状について第82回日本細菌学会総会、3月12-14日 2009年、名古屋

⑫. 江原雅彦他 Characterization of *Vibrio cholerae* O1 strain isolated in Vietnam in 2007-2008 第82回日本細菌学会総会3月12-14日 2009年、名古屋

⑬. 吳 吞 都 他 Vibriophages in the northern province in Vietnam、第 82 回日本細菌学会総会、3 月 12-14 日 2009 年、名古屋

⑭. Masahiko Ehara et al., Characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in 2007-2008 in Northern Vietnam, US-Japan Cholera Panel, Nov.17-19, 2008, Fukuoka

⑮. 氏家無限 他 長崎大学熱研内科での国際医療活動実施のための取組み-ケニア・ナイロビでの臨床医療活動の経験を通して- 第 23 回日本国際保健医療学会大会、10 月 25-26 日、2008 年、東京

⑯. 一瀬休生 他 西ケニアで流行した O1 コレラ菌株の性状について 第 61 回日本細菌学会九州支部総会、10 月 3-4 日、2008 年、熊本

⑰. Masahiko Ehara et al., Vibriophages in the northern provinces in Vietnam, Joint Forum Hanoi, Vietnam, 6 Hanoi, Vietnam 6th OCT 2008

⑱. 江原雅多 他 2007-2008 年にベトナムで分離されたコレラ菌の性状について第 61 回日本細菌学会九州支部総会、10 月 3-4 日、2008 年、熊本

⑲. Yoshio Ichinose et al., Phenotypic and molecular typing of *Vibrio cholerae* O1 isolated in Western Kenya, ICTM, 30th Sep. - 3rd Oct. 2008, Cheju, Korea,

⑳. Satoshi Kaneko, Mohamed Karama, Noboru Minakawa, Yoshio Ichinose, Rashid Agolla, Emmanuel Mushinzimana, James K'opiyo, Kazuhiko MOJI, Masaaki Shimada DSS site in Suba and method of data collection. DSS site in Suba and method of data collection. 29-31 August, 2007 Embassy of Japan, Nairobi, Kenya

〔図書〕(計 3 件)

①. 一瀬休生、医学書院、「コレラ」、今日の診断指針第 6 版、総編集：金澤一郎・永井良三、2010 年 1 ページ 1290 頁

②. 一瀬休生、「アメーバ性大腸炎・他の腸管寄生原虫による疾患 Amebic colitis and other intestinal protozoan infections」今日の消化器疾患治療指針第 3 版、幕内雅敏、菅野健太郎、工藤正俊編、2010 年

③. 一瀬休生、新興・再興感染症とは？ 国際貢献 ―医療に携わる人たちのために― 大塚吉兵衛編、HYOURON, 121-132, 2008

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 1 件)

名称：病原性グラム陰性細菌由来脂質小胞の検出方法および検出システム

発明者：長谷川慎、和田昭裕、一瀬休生、白井伸明、武居修

権利者：長浜バイオ大学 (50%)、長崎大学 (15%)、滋賀県工業技術総合センター (15%)、(株) ライフテック (20%)

種類：特許権

番号：特願 2010-035441

出願年月日：2010 年 1 月

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一瀬 休生 (ICHINOSE YOSHIO)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：70176296

(2) 研究分担者

金子 聡 (KANEKO SATOSHI)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：00342907

辻 孝雄 (TSUJI TAKAO)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：60171998

(3) 連携研究者

なし