

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 年 ～ 2011 年

課題番号：22710252

研究課題名（和文） LAMP 法を用いた効果的なコレラ流行制御法の確立

研究課題名（英文） Effective prevention and control of cholera using LAMP method

研究代表者

岡田 和久(OKADA KAZUHISA)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教

研究者番号：40420434

研究成果の概要（和文）：

コレラ菌(コレラ毒素遺伝子)に対する迅速遺伝子検査(LAMP)法を用いた新規のコレラ流行制御法をタイ国境付近で実践した。619 名の被験者を対象とし 48 名のコレラ菌疑保菌者を見出し、現地保健所に通報し、直ちに抗菌薬投与を行った。その結果、コレラ発生件数の減少が認められたことから一定の効果が示唆された。また、タイのコレラ菌については系統的な分子疫学的解析がなされていなかったが、本研究による病原関連遺伝子群の解析などにより、タイとアジアの関連性やタイ国内のコレラの発生と消長、および拡散パタンの一端が解明され、今後のコレラ流行の阻止・防止のための一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

Using the rapid gene detection method (LAMP) for cholera toxin gene, it was possible to identify cholera-infected persons (48 positive cases out of 619 subjects) in remote area of Thailand. We reported these findings to the local public health office, and local medical officers provided medicine with the residents showing positive reaction as a quick countermeasure. It turned out to be effective in suppressing cholera from the area. Our molecular epidemiology studies of *V. cholerae* O1 isolates provide insight into the genetic background and divergence of recent isolates in Thailand and other Asian countries. Results also showed the emergence, year-long survival, and disappearance of particular isolates spatially and temporally. These contribute to a strategy for the prevention and control of cholera outbreaks.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：地域研究・地域研究

キーワード：Vibrio cholerae, コレラ流行制御

1. 研究開始当初の背景

申請者は情報が殆ど存在しなかったタイのコレラについて調査・解析を進めてきた(本研究業績・図書 1 参照)。その結果、タイ北部 Tak 県にはコレラが頻発する地域がある事を

明らかにした。この地域では感染者の多くは外国人(ミャンマー人や少数民族)であり、かつ難民労働者である。彼らの多くは劣悪な環境下で暮らしており、衛生教育の問題も抱えていることから一旦コレラが集落に持ち込

まれると、コレラ菌に汚染された飲料水や食物などを介して急速に蔓延する。さらに、現在の El Tor 型コレラ菌による感染は古典型コレラ菌に比べ重篤なコレラ症状を伴うケースは少なく、むしろ無症候か比較的軽い下痢症状にとどまる例が多い。この事がコレラの発見を遅らせ、その伝播を容易にしていると思われる。そこでコレラの蔓延に先立って、コレラ患者の発見に努め、可及的速やかにその患者の接触者、周辺住人及びその環境を鋭敏な検査法で調査し、コレラ菌保菌者及び汚染されている場所を突きとめ、適切な処置を施す事はコレラの拡大を最小限にする上で重要であると考えられる。そこで我々はコレラ菌のコレラ毒素遺伝子に対する迅速検査法、LAMP 法を確立した。この方法を用いれば、約 90 分以内で多数の検体を野外で検査することが可能である。さらにこの検査法は 1 反応液中に 1 個のコレラ菌(ゲノム)があれば検出できるため、無症候コレラ菌保菌者群も的確に見出すことが出来る。

2. 研究の目的

上記 LAMP 法を用いてコレラの流行の制御の可否を現場で実践し、検証する。また、分離したコレラ菌の分子疫学解析及びその病原性解析を行い、タイにおけるコレラの現状・理解を世界に発信し、情報の共有化を図る。

3. 研究の方法

本研究を遂行するために、毎年コレラが流行し、現地の保健所及び病院と緊密に連携が取れる地域で、さらに我々が対応できる広さの地域として、Tak 県 Phob phra 郡をモデル地域に指定した。手順としてモデル地域の初発コレラ発生を病院または保健所より連絡を受けた後、直ちに現場へ急行し、現地の Surveillance and Rapid Response Team (SRRT) と連携して積極的調査を開始した。LAMP 法を用いながら保菌者及び汚染源を調査し、それらの結果を直ちに保健所に通報する。と共に、SRRT は直ちに抗菌薬を LAMP 陽性者に投与した。また、汚染が認められた場所には、塩素消毒散布などの対策を講じた。これらの迅速対応の効果を追跡評価した。

分離したコレラ菌株については、過去に申請者がタイ国内で分離・入手したものも含む多数の株を用いて、分子疫学解析(PFGE や MLVA 法)及び病原性解析を行い、タイ国内及び他国のコレラ菌株を含めた比較解析した。

4. 研究成果

2010 年 6 月、我々はコレラ患者発生の連絡

を Tak 県 Phob Phra 郡保健所より受け、直ちに現場へ赴きコレラ流行制御を実施した。コレラ患者接触者及びその周辺住人から直腸スワブ検体を採取し、5 日間で 619 名を LAMP 法で検査した。その結果、計 48 名の疑似感染者を特定した(以後判明した病院での培養検査結果とほぼ一致し、43 名のスワブ検体よりコレラ菌 O1 稲葉型を分離した)。

LAMP 法の結果は直ちに現地の保健所職員へ通報し、2 次感染を防ぐための抗菌薬投与や衛生教育などの対応を行った。その結果、約 2 週間は新たなコレラ感染者は確認されず、一定の効果が認められた。しかし、その後徐々に感染者が出現し、8 月の感染者は 57 名(病院での検出例 28 名、野外での検出例 29 名)を数えた。

完全に感染が阻止できなかった理由としては、初発患者が入院して現地の病院検査でコレラと診断されるまでに、6 日間を要していた事、我々の介入前には既にコレラが拡散してしまっていた事、及びモデル地域全住民を調査しきれなかった事が理由として挙げられる(自覚症状のない人を集めて検査を受けてもらう事は容易ではなく、また多くがミャンマーからの不法移民労働者である事も困難にさせる)。しかし、一時用意したミャンマー人向けの娯楽番組(音楽やドラマ)の放映は対象住人を効果的に集め、本活動の意義を多くの住人に説明することが出来、その後、皆が積極的に検査を希望したことから、非常に役立った。以後、この様な方法も盛り込み、本国境地域での流行制御は取り組まれるべきだと思われる。

モデル地域において流行を起こしたコレラ菌は、この地域特有の PFGE/MLVA 型を常に示した。即ち、この株は非流行期を挟みながら 3 年間、同郡で繰り返し流行を引き起こしていることが明らかにされた。そこで、保健所の統計を基に同地域において過去にコレラ患者が多く発生した集落を絞り込み、その住人及び環境から定期的に検体を採取し、感染源の検索に努めた。その結果、数箇所の地点でコレラ菌の汚染を認めたので、現地保健所職員により次亜塩素酸カルシウムなどの散布と共に不潔な水路の埋め立てを行った。この様な対応により、最終年度には、モデル地域でコレラ流行は発生しなかった。

2007 年から 2010 年までにタイ北部、北東部、中部、南部のコレラ発生地域から分離した 343 株の *V. cholerae* O1 の比較解析を行った。その結果、全ての分離株は El Tor 型に特徴的な性状を示したが、その大多数のコレラ毒素遺伝子が古典型という、いわゆる非定型 El Tor コレラ菌であることを明らかにした(図 1)。このことは 1961 年以降の第 7 次世界パンデミックに認められた典型 El Tor

から、非定型 E1 Tor にシフトしていたことを意味する。このシフトは他のアジア及びアフリカ地域で認められる現象と類似した。

Province	Year of isolation	Source	No. of isolates	Serotype	ctx B	rst R	rtx C	ace C	zot A	tcp A	tox R	omp U	Type
Lamphun	2007	Human	1	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Khon Kaen	2007	Human	6	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Udonthani	2007	Human	4	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Samutsakorn	2008	Human	1	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Tak	2008	Human	1	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Prachuapkirikhan	2009	Human	2	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Samutsakorn	2009	Human	5	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Tak	2009	Human	6	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Songkla	2009	Human	7	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Pattani	2009	Human	25	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Pathahalg	2009	Human	4	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Narathiwat	2009	Human	2	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Samutsakorn	2010	Human	11	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Tak	2010	Human	83	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Tak	2010	Env	3	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Tak (import)	2010	Human	3	Ogawa	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(i)
Rachaburi	2008	Human	1	Inaba	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(ii)
Tak	2008	Human	98	Inaba	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(ii)
Tak	2008	Env	8	Inaba	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(ii)
Tak	2009	Human	29	Inaba	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(ii)
Tak	2009	Env	2	Inaba	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(ii)
Samutsakorn	2010	Human	8	Inaba	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(ii)
Samutsakorn	2010	Env	2	Inaba	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(ii)
Narathiwat	2010	Human	1	Inaba	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(ii)
Tak	2010	Human	28	Inaba	Cl	E1	+	+	+	+	E1	+	(ii)
Tak	2008	Human	1	Ogawa	E1	E1	+	+	+	+	E1	+	(iii)
Tak	2010	Human	1	Ogawa	-	-	-	-	-	-	E1	+	(iv)

図1 タイ分離コレラ菌 01 株の特徴

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による解析では、計 10 の PFGE 型のバリエーションが認められ、小川型株では 69% (114/165) が A4 型、21% (35/163) が A1 型を示し、一方、稲葉型株では 99.4% (177/178) が B1 型を示した。非定型の E1 Tor コレラ菌が示した 9 つの PFGE 型は約 88% の類似性を示した (図 2)。

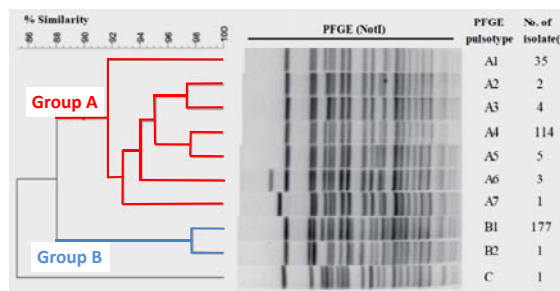


図2 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) の結果

リボタイピングの結果を含め、これらの PFGE 型はインドで報告されている優勢株と一致または酷似している事がわかった (図 3)。また、タイ分離株が示したリボタイプ III 及び IV は 2007 年以前にはタイで認められていない事から、近年タイに導入され拡散したものと推測される。

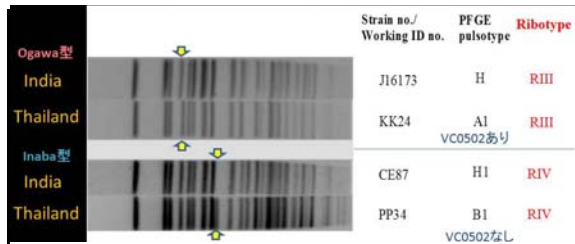


図3 タイ及びインド(優性型)由来のコレラ菌 01 の PFGE、Ribotype、VC0502 の比較

一方、Multilocus-variable number tandem repeat analysis (MLVA) を行ったところ、計 44 の型が認められた。MLVA プロファイルのクラスター解析では、2 つの主要なクラスターに分別され、PFGE の主要 2 クラスターと対応した。

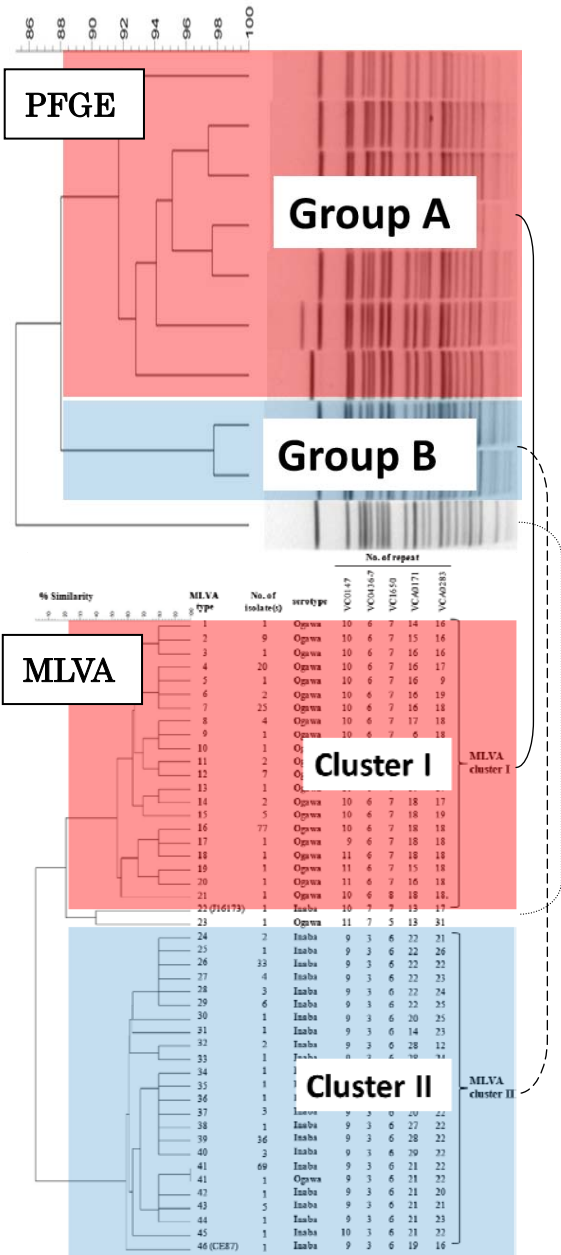


図4 PFGE 及び MLVA の関連

MLVA はタイ各地において特定の MLVA を持つコレラ菌 O1 群の出現、消失及び汚染地域を示唆している(図 5)。例えば、2008 年の Tak 県の 2 郡(Tha Song Yang 郡及び Mae Sot 郡)では MLVA26 型、29 型、39 型が優勢に確認されていたが、2009 年以降は検出されなくなり、2010 年には 16 型が出現し、大きな流行を引き起こした。しかし、Phob Phra 郡においては、他の地域と異なり 3 年間同一型のコレラ菌が認められていることから、当該地域においては固有の感染源がある可能性を示した。

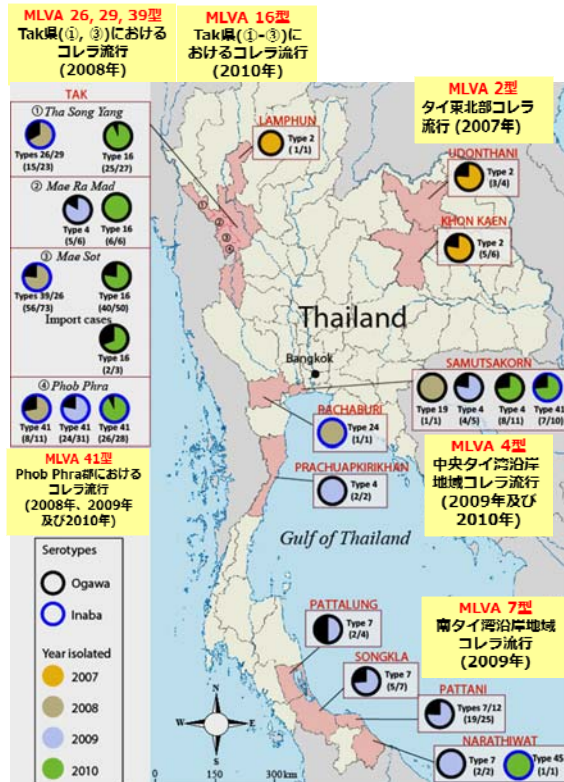


図 5 MLVA 型から見たタイ国内におけるコレラ菌 O1 の地理的分布と経時的変化 (2007 年-2010 年)

大規模な菌株間の詳細なゲノム構造の比較解析データ及び疫学データの蓄積は、コレラ発生/拡散パターンを理解し、コレラ流行の阻止・防止のために役立つものと考えられる。

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 2 件)

1. Okada K, Roobthaisong A, Nakagawa I, Hamada S, Chantaroj S (2012) Genotypic and PFGE/MLVA analyses of

Vibrio cholerae O1: geographical spread and temporal changes of isolates during the 2007-2010 cholera outbreaks in Thailand. PLoS One 7: e30863. (査読有)

2. Okada K, Chantaroj S, Roobthaisong A, Hamada S, Sawanpanyalert P (2010) A Cholera Outbreak of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor Variant Carrying Classical CtxB in Northeastern Thailand in 2007. Am J Trop Med Hyg 82: 875-878. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. 岡田和久 *Vibrio cholerae* O1 の遺伝子型と PFGE/MLVA 解析: 地理的拡散と経時的変化. 第 85 回日本細菌学会総会、長崎、日本、2012 年 3 月 27-29 日(口頭)
2. Okada K. Rapid detections, Quick countermeasures and Investigations for *Vibrio cholerae* O1 in Thailand. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemrging Infections, Kobe, Japan, 11-12 Jan. 2012 (Invited, Oral).
3. Okada K. LAMP/CHOLERA collaborative study. The 19th Annual Conference of the Medical Sciences, Thailand, 17-19 Aug. 2011 (Invited, Oral).
4. Okada K, Chantaroj S, Roobthaisong A, Hamada S, Sawanpanyalert P. An attempt of prevention and control for propagation of cholera in Thai-Myanmar border area during 2008-2010. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemrging Infections 2010, Hanoi, Vietnam, 11-12 November 2010 (Oral).
5. Roobthaisong A, Chantaroj S, Okada K, Hamada S, Sawanpanyalert P. Multilocus-Variable Number Tandem Repeat Analysis of *Vibrio cholerae* O1 Isolates in Thailand. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemrging Infections 2010, Hanoi, Vietnam, 11-12 November 2010.

6. Nagai Y, Okada K, Hayashizaki Y, Horii T. Technology Innovation in Pathogen Identification in the Asian-African Research Network for Infectious Diseases. InCoB, Tokyo, Japan, 26 September 2010.
7. Okada K. LAMP for Cholera, seminar/workshop. National Institute of Health, Nonthaburi, Thailand, 25 March 2010 (Oral).

[図書] (計1件)

1. Okada K, Roobthaisong A (2011) タイにおけるコレラの現状. 病原微生物検出情報(IASR) 32: 102-104. 国立感染症研究所・感染症情報センター発行

[その他]

1. 2011年8月に開催されたタイ保健省医科学局主催の国際会議にゲストスピーカーとして招かれ、本研究成果であるコレラ流行制御に関する内容とタイのコレラの分子疫学解析の結果を発表し、チュラボン王女 (HRH Princess Chulabhorn) より顕彰された。

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
岡田 和久 (OKADA KAZUHISA)
大阪大学・微生物病研究所・特任助教
研究者番号：40420434