

Infectious diseases in Asia/ 細菌感染症領域における国際協力

妹尾 充敏¹・森田 昌知²

¹ 国立感染症研究所細菌第二部

² 国立感染症研究所細菌第一部

¹ 〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

[受理：2015 年 1 月]

多くの人々が世界中を往来する現代において、感染症をコントロールするには、全世界における感染症の現状を把握し、対策を講じなければならない。そのためには、正確な情報が必要となるが、日本に入ってくる情報だけでは充分とは言えず、実際に感染症が流行している国の国内情報を得ることが必須である。そのような情報を得るためには、現地の研究機関や大学と共同研究を行うなど、積極的に行動しなければならない。本稿では、アジアの開発途上国の研究機関や大学との共同研究プロジェクト、およびアジアの開発途上国に日本人研究者が常駐し、現地の研究機関と共同研究を行っているプロジェクトについて紹介する。

1. はじめに

近年、多くの日本人が海外旅行を楽しむようになった。また、日本を訪れる外国人の数も多い。さらに、海外在留邦人は年々増加し、2013 年には 120 万人を超えている。このように、多数の人々が日本と諸外国を往来する状況では、日本では流行していない感染症が持ち込まれる可能性は非常に高い。海外旅行に出かける日本人や海外在留邦人を感染症から守るため、また、海外で流行している感染症を日本に持ち込まないためには、諸外国と密接な関係を築き、感染症の情報や試料を入手することが必要不可欠である。そして、最終的には、諸外国において感染症をコントロールし、流行を収束させることが求められる。アジアの開発途上国では、日本で流行していない感染症が数多く存在するため、いくつかの共同研究プロジェクトが立ち上げられており、現状把握や感染対策のための様々な研究が行われている。本稿ではその中から、ベトナムでの小児下痢症の起因微生物、フィリピンでのレプトスピラ症、タイでのコレラの疫学、インドでの VBNC *Vibrio cholerae* について、各共同研究の進捗状況を紹介する。

2. ベトナム—小児下痢症の起因微生物—

文科省委託事業の新興・再興感染症研究拠点形成プログラムの一環として長崎大学熱帯医学研究所とベトナム国立衛生疫学研究所 (National Institute of Hygiene and Epidemi-

ology, NIHE) との協力の下、2006 年 3 月にハノイにある NIHE 内に長崎大学ベトナムプロジェクト拠点が設立された。主に下痢症、蚊媒介性ウイルス感染症、臨床疫学、人獣共通感染症に関する研究活動を行っており、本章では南北ベトナムにおける小児下痢症の起因微生物について概説する。

ベトナムでは小児下痢症が公衆衛生上の重要な問題であるにもかかわらず、その起因微生物、臨床症状、疫学情報を踏まえた体系的な解析が十分に行われていない。そこでベトナム北部のナムディン省小児病院、南部のドンナイ省小児病院に急性下痢症で入院した患者の下痢検体から下痢原性細菌、胃腸炎ウイルス及び下痢原性原虫の検出、同定を試みた。ロタウイルスは ELISA で検出後、G 及び P 遺伝子型を決定した。ノロウイルスは real time PCR で検出した。嫌気性菌を含む腸管病原細菌は従来法で分離同定し、下痢原性大腸菌は病原遺伝子を標的とする PCR で検出した後に同定した。下痢原性原虫は ELISA または PCR で検出した。その結果、南北ベトナムのおよそ 1000 検体のうち、ロタウイルス、ノロウイルス、下痢原性大腸菌がそれぞれ 45%、30%、10% で検出され、気候の異なる南北ベトナム間でその割合に違いが見られた。下痢原性大腸菌以外の腸管病原細菌の分離は低く、コレラ菌及びベロ毒素産生大腸菌は分離されなかった。一方で、下痢原性原虫の検出率が比較的高かった。今後も継続して検出を行うことで広範な小児下痢症起炎微生物情報が得られ、公衆衛生行政に貢献

できると思われるが、小児を持つ母親を対象とした衛生教育、上水道の整備といった衛生環境の改善、及びワクチン接種も公衆衛生対策に重要であると思われる(14, 15)。

3. フィリピン—レプトスピラ症—

国立感染症研究所では、アジアで発生している感染症の侵入監視、拡散防止のため感染症に携わる研究機関同士の国際連携を行っている。アジア地域では腸管系下痢症、麻疹、インフルエンザ等の呼吸器系感染症、ベクター媒介性疾患等の新興感染症等、多くの感染症が問題となっているが、本章では病原性レプトスピラの感染によって引き起こされる人獣共通感染症であるレプトスピラ症について、フィリピンにおけるアウトブレイクの発生と実験室診断法の開発について紹介する。

フィリピン・マニラでは2009年10月、台風の影響による洪水の後、死者51人を含む患者数471人のレプトスピラ症のアウトブレイクが起きた。レプトスピラは維持宿主である動物の腎臓に定着後、増殖し尿中に排出される。洪水により、この尿が広範囲に環境を汚染したことがアウトブレイクの要因の一つであると考えられる(1)。

一方、分離菌株の解析では、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が、異なる血清群に属するレプトスピラが同じタイプに分類されるといった問題点があった(2)。*Leptospira interrogans* 分離株の multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) によるクラスター解析を行ったところ、これまでの分子タイピング法よりも解像度が高く、血清型推定にも有用である可能性が示された。また loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いた簡便で感度の高いレプトスピラ DNA 迅速検出法も構築されており、アジア地域におけるレプトスピラ症の実態把握、疫学調査の一助となりレプトスピラの伝播経路の解明につながると期待される(5)。

4. タイ—コレラの疫学—

タイでは、2005年に大阪大学微生物病研究所が Japan-Thailand Research Collaboration Center on Emerging and Reemerging Infections (RCC-ERI) をタイ王国保健省医科学局と共同でバンコク市に設置し、タイ国内や熱帯地方に頻発する細菌感染症やウイルス感染症に関する研究を行っている。タイにおける感染症で最も患者数が多いものが急性下痢症である。本章では、タイにおけるコレラの疫学について紹介する。

タイの年間コレラ患者数は、2004年と2010年に2000例前後、2007年に約1000例が報告されている。しかし、その他の年は数百例に留まっていることから、2から3年ごとにコレラの流行があると考えられる。RCC-ERIの研究グループはターク県ポップブラ郡などに定点を置き、疫

学調査を開始した。その際、培養法とコレラ毒素遺伝子を保有する *V. cholerae* を特異的に検出する LAMP 法(8)を行っている。タイ国内11県のコレラ患者やその家族、または近隣住民の便検体由来328株と環境由来15株、計343株の *V. cholerae* O1 は生化学的性状及び *ctxB* 遺伝子型から、すべての株が生物型はエルトル型であるが、古典型の *ctxB* 遺伝子を保有するエルトルバリエント型であった(9)。Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) と MLVA を用いた解析結果からは、コレラ流行地域における流行株の環境中における変異を伴う循環とその消長が示唆された。古典型とエルトル型以外の新たな型の *V. cholerae* は2002年に初めて報告(6)されて以来、いくつかの報告があり、エルトルバリエント型もそのひとつである(7)。この型は大半のコレラ流行地域で典型的なエルトル型から完全に置き換わっており、タイも例外ではなかったということになる。また、被験株の9割以上がインドの西ベンガル州での流行株と類似性が高かったため、両国のコレラ流行には関連があると考えられる。さらに、被験株は PFGE で10種類、MLVA では44種類に分別された。MLVAの方がPFGEに比べ、分解能が高いことは明白であり、今後、PFGEのようなバンドパターンを比較する型別方法から MLVAのような遺伝子配列を元に比較する方法にシフトしていくことが推測される。すでに、15のハウスキーピング遺伝子配列の比較によって、由来が他の菌株とは異なることを示した報告もあり(10)、遺伝子配列を元にして比較する方法、最終的には全ゲノム配列を元にした型別方法の開発が期待される。今後、さらに詳細なデータが得られ、より正確に原因菌の同定や伝播ルートの調査などが行えるようになり、タイを含むコレラ流行地域での防疫に貢献できると考えられる。

5. インド—VBNC *V. cholerae*—

インドでは、2007年に岡山大学がコルカタ市の National Institute of Cholera and Enteric Diseases (NICED) 内にインド感染症共同研究センターを設置し、コレラなどの腸管感染症に関する研究を行っている。インドには様々な感染症を引き起こす病原体が数多く存在するが、本章では *V. cholerae*、特に Viable but nonculturable (VBNC; 生きていますが培養出来ない) について紹介する。

VBNC 菌の存在については、1982年に Xu らが *Escherichia coli* と *V. cholerae* について初めて報告(16)して以来、多くの細菌が VBNC 状態になることが報告され、現在では50種を超える病原性細菌が VBNC 状態になるということが明らかになっている。VBNC 菌に関する研究は様々な側面から行われており、VBNC 状態から培養可能状態への復帰もその一つである。1985年にウサギの腸管内で、1996年にボランティアの体内で VBNC *V. cholerae* が培養可能状態へ復帰したことが報告されている(3, 4)。また、*V. cholerae* や *V. parahaemolyticus*, Enterohemorrhagic *E. coli* などの腸管病原細菌の VBNC 菌を真核細胞と共培養するこ

とにより、培養可能状態へ転換することが報告されている(11, 12)。これらの報告から、VBNC 菌が哺乳動物の体内において、培養可能状態へ復帰することにより、増殖を開始し、感染症を引き起こす可能性が考えられる。また、インドでは現在もコレラが流行しているにも関わらず、通常の培養方法で環境水中から *V. cholerae* が分離されることは稀であることもその可能性を示唆している。これまで、環境中の VBNC 菌の存在は、主に遺伝子検出により証明されてきた。しかし、環境水中の VBNC *V. cholerae* を培養可能状態に転換させ、分離した報告がある(13)。環境水中の VBNC *V. cholerae* を分離するために、培養細胞抽出液を加えた Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) 寒天培地に、コルカタ市の池や川の水を塗抹したところ、細胞抽出液を加えていない TCBS 培地に比べ、コレラ毒素遺伝子を保有する *V. cholerae* のコロニー数は 20 倍であった。この結果は、コルカタ市の環境水中にはコレラの原因となりうる *V. cholerae* が VBNC 状態で多数存在し、コレラの感染源になっていることを強く示唆している。今後の調査によって得られる VBNC *V. cholerae* の新たな知見が、コルカタ市のようなコレラ流行地域でのコントロールに有益な情報になることを期待する。

6. おわりに

昨今の移動手段の発展により、今では 48 時間あれば世界中のどこへでも行くことができる。しかし、その便利さ故に、ある地域で発生した感染症が凄まじい速さで広まり、パンデミックを引き起こす可能性がある。また、風土病の原因微生物がその垣根を超え、世界中に広まることも考えられる。このような事態を考えると、感染症をコントロールするためには日本国内だけでなく、全世界の現状を把握し、対応しなければならない。今回紹介したアジアの国々との共同研究は、数多く存在する共同研究プロジェクトの中の一部ではあるが、いずれの共同研究もその国で問題となっている感染症をテーマに挙げており、原因微生物の解明、診断法の開発や疫学調査など、対象とした感染症の情報収集、治療や感染対策に貢献するものばかりである。これらの結果は現地との密接な関係が築かれ、研究者同士の信頼関係があるからこそ得られた成果であり、日本国内だけで研究していても決して得ることはできない。このような貴重な情報が現地に赴く日本人の予防などの感染症対策に有益であることは言うまでもない。感染症をコントロールするためには、諸外国との共同研究が必須であり、今後とも継続する必要がある。

謝 辞

本稿は、第 87 回日本細菌学会総会のシンポジウム “Infectious diseases in Asia/ 細菌感染症領域における国際協力” において発表された講演内容を元にした。当該シンポジウムで発表して下さった National Institute for Communicable Diseases Control and Prevention の Dr. Xu Jianguo、長崎大

学の時沢亜佐子先生、竹村太地郎先生、山城哲先生、京都大学の中口義次先生、国立感染症研究所の小泉信夫先生、大阪大学の岡田和久先生、岡山大学の水野環先生に深謝致します。

発表内容に関連し、開示すべき COI 関係にある企業などは無い。

文 献

- 1) Amilasan, A.S., Ujiie, M., Suzuki, M., Salva, E., Belo, M.C., Koizumi, N., Yoshimatsu, K., Schmidt, W.P., Marte, S., Dimaano, E.M., Villarama, J.B., Ariyoshi, K. (2012): Outbreak of leptospirosis after flood, the Philippines, 2009. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 91–94.
- 2) Boonsilp, S., Thaipadungpanit, J., Amornchai, P., Wuthiekanun, V., Bailey, M.S., Holden, M.T., Zhang, C., Jiang, X., Koizumi, N., Taylor, K., Galloway, R., Hoffmaster, A.R., Craig, S., Smythe, L.D., Hartskeerl, R.A., Day, N.P., Chantratita, N., Feil, E.J., Aanensen, D.M., Spratt, B.G., Peacock, S.J. (2013): A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e1954.
- 3) Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Roszak, D.R., Huq, S.A., Palmer, L.M. (1985): Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implication for release of genetically engineered microorganisms. *Biotechnology* **3**, 817–820.
- 4) Colwell, R.R., Brayton, P.R., Heerington, D., Tall, B.D., Huq, A., Levine, M.M. (1996): Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a culturable state in human intestine. *World J. Microb. Biotechnol.* **12**, 28–31.
- 5) Koizumi, N., Nakajima, C., Harunari, T., Tanikawa, T., Tokiwa, T., Uchimura, E., Furuya, T., Mingala, C.N., Villanueva, M.A., Ohnishi, M., Suzuki, Y. (2012): A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of *Leptospira* spp. in urine. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2072–2074.
- 6) Nair, G.B., Faruque, S.M., Bhuiyan, N.A., Kamruzzaman, M., Siddique, A.K., Sack, D.A. (2002): New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 3296–3299.
- 7) Nair, G.B., Qadri, F., Holmgren, J., Svennerholm, A.M., Safa, A., Bhuiyan, N.A., Ahmad, Q.S., Faruque, S.M., Faruque, A.S., Takeda, Y., Sack, D.A. (2006): Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 4211–4310.
- 8) Okada, K., Chantaroj, S., Taniguchi, T., Suzuki, Y., Roobthaisong, A., Puiprom, O., Honda, T., Sawanpanyalert, P. (2010): A rapid, simple, and sensitive loop-mediated isothermal amplification method to detect toxigenic *Vibrio cholerae* in rectal swab samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **66**, 135–139.
- 9) 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 during the 2007–2010 cholera outbreaks in Thailand. *PLoS One* **7**, e30863.
- 10) Okada, K., Roobthaisong, A., Swaddiwudhipong, W., Hamada, S., Chantaroj, S. (2013): *Vibrio cholerae* O1 isolate with novel genetic background, Thailand-Myanmar. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 1015–1017.
- 11) Senoh, M., Ghosh-Banerjee, J., Ramamurthy, T., Colwell, R.R.,

- Miyoshi, S., Nair, G.B., Takeda, Y. (2012): Conversion of viable but nonculturable enteric bacteria to culturable by co-culture with eukaryotic cells. *Microbiol. Immunol.* **56**, 342–345.
- 12) Senoh, M., Ghosh-Banerjee, J., Ramamurthy, T., Hamabata, T., Kurakawa, T., Takeda, M., Colwell, R.R., Nair, G.B., Takeda, Y. (2010): Conversion of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to the culturable state by co-culture with eukaryotic cells. *Microbiol. Immunol.* **54**, 502–507.
- 13) Senoh, M., Ghosh-Banerjee, J., Mizuno, T., Shinoda, S., Miyoshi, S., Hamabata, T., Nair, G.B., Takeda, Y. (2014): Isolation of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 from environmental water samples in Kolkata, India, in a culturable state. *Microbiologyopen* **3**, 239–246.
- 14) Takanashi, K., Chonan, Y., Quyen, D.T., Khan, N.C., Poudel, K.C., Jimba, M. (2009): Survey of food-hygiene practices at home and childhood diarrhoea in Hanoi, Viet Nam. *J. Health Popul. Nutr.* **27**, 602–611.
- 15) Thiem, V.D., Schmidt, W.P., Suzuki, M., Tho, le, H., Yanai, H., Ariyoshi, K., Anh, D.D., Yoshida, L.M. (2012): Animal livestock and the risk of hospitalized diarrhoea in children under 5 years in Vietnam. *Trop. Med. Int. Health* **17**, 613–621.
- 16) Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J., Colwell, R.R. (1982): Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* **8**, 313–323.

Infectious diseases in Asia/International collaboration in bacterial infectious diseases

Mitsutoshi SENOH¹ and Masatomo MORITA²

¹*Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases*

²*Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases*

Proactive approaches to collect precise information are necessary to control infectious diseases in the whole world. A collaborative research for infectious diseases with institute or university of countries that infectious diseases occur is one of the good approaches. In this paper, we introduce collaborative researches on infectious diseases with Asian countries, such as Vietnam, Philippines, Thailand, and India.