琉球大学学術リポジトリ

ラオスにおける細菌感染症の調査成績

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-07-02 キーワード (Ja): キーワード (En): Laos, bacterial infectious disease, diarrheal, epidemiology 作成者: 仲宗根, 昇, Nakasone, Noboru メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016097

ラオスにおける細菌感染症の調査成績

仲宗根　昇

琉球大学医学部細菌学講座

Study of bacterial infections in Laos

Noboru Nakasone

Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa, 903-0215, Japan

ABSTRACT

1) Drug sensitivity and coagulase type of *Staphylococcus aureus* isolated at Mahosoto Hospital, Vientiane, Laos in 1993 and at the Ryukyus University Hospital, Okinawa, Japan in 1992 were compared. MIC90 of erythromycin was 0.4 μg/ml in Lao isolates but 100 μg/ml or more in Japanese isolates. MICs of tetracycline against 58% of Lao isolates and 25% of Japanese isolates were 12.5 μg/ml or more. All Lao isolated were inhibited at 0.8 μg/ml or less of cefdinir, whereas only 37% of Japanese isolates. All Lao isolates were inhibited at 6.25 μg/ml or less of methicillin, but 63% of Japanese isolates were not inhibited at 100 μg/ml of methicillin. The most frequent coagulase type in Lao and Japan was type 5 (54%) and type 2 (53%), respectively.

2) *Staphylococcus aureus* isolated in Laos was examined for the drug sensitivities and coagulase type. A total of 114 strains examined consisted of 32 isolated in 1995 and 47 isolated in 1996 from the infection focus, and 35 isolated from nasal mucosa of non-infected patients and nurses working in the wards. One strain with coagulase type IV was regarded as methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) depending on the minimum inhibitory concentration of the drugs as >100, 100, 100, >100, and 25 μg/ml of methicillin, ampicillin, tetracycline, erythromycin, and cefdinir, respectively. The *mec* A gene was detected in this strain but not in the others. This is the first report of MRSA from Lao PDR.

3) Thirty-four strains of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa isolated in Laos in 1995 were examined for their biological behavior and cholera toxin productivity. Biotyping indicated that the 34 strains belonged to the El Tor biotype. Prophage typing identified 31 strains of the Celebes type, including 3 cured Celebes type, and 3 Ubol type. All the strains produced detectable levels of cholerae toxin: 15 isolates produced more than 100 ng/ml, 10 strains between 10 and 100 ng/ml and 9 strains less than 10 ng/ml, determined by using AKI medium in a stationary test tube. The maximum producing was 200 ng/ml.

4) An epidemic *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis with several occurred in Vientiane, Laos, an inland country in August and September in 1997. Serotype of the 36 isolates from the patients were all O3:K6. The organisms grew in peptone water supplemented with 10% NaCl. All isolates were positive for Kanagawa phenomenon and *tdh* gene, but negative for *trh* gene and urease. Genomic patterns were not completely identical, as determined by pulse-field gel electrophoresis. Although a Kanagawa phenomenon positive *V. parahaemolyticus* strain was isolated from the suspicious food, a papaya salad containing minced and salted fresh water crab, the serotype was O2:K28, tdh and trh were negative.

5) Reversed passive latex agglutination (RPLA) assay for determining the toxigenicity of *Corynebacterium diphtheriae* is presented. Rabbit antitoxin antiserum was raised by using commercially available diphtheria toxoid. This antiserum reacted with the diphtheria toxin,

and it did not cross-react with other extra cellular antigens. Affinity-purified antibodies for latex sensitization were obtained by using HI Trap N-hydroxysuccinimde-activated column. Demonstration of toxin in five of seven clinical isolates was in accordance with the PCR assay and the Vero cell cytotoxicity test. The lowest concentration of diphtheria toxin detectable by the RPLA assay was about 5 ng/ml. The RPLA assay can provide a convenient and reliable method for laboratories involved in the identification of toxinogenic corynebacteria.

6) Etiologic bacteria of 135 cases with diarrheal diseases and the healthy carrier rate in 211 individuals were studied in Laos. Diarrheagenic *Escherichia coli, Shigella* and *Campylobacter* were the predominant pathogens isolated. This country does not face the sea, but *Vibrio parahaemolyticus* was isolated from 2 cases. Healthy carrier rate of enteropathogenic *E. coli* as diagnosed by serogroup Class I was 3 times higher than the detection rate in diarrheal patients (10.9% and 3.7%). Healthy carrier rate of *Shigella* was 4.3%, whereas the detection rate of *Shigella* in diarrheal patients was 15.4%. The isolation frequencies of enterotoxigenic *E.coli* and *Campylobacter jejuni* in the patients and healthy individuals were almost the same. Verotoxin producing *E. coli* was found in one health individual (Toxin type VT1, O-antigen O111). Rotavirus was detected from 2 adult cases out of 32 examined.

7) The etiological agents of diarrhea in Vientiane, Laos, were studied in the period from October 1996 to August 1997. A total of 880 patients with diarrhea visiting medical facilities were examined for *Shigella, Salmonella,* diarrheagenic *Escherichia coli, Vibrio, Aeromonas, Campylobacter*, and rotavirus. *Shigella spp.*, heat-stable enterotoxin (ST)-producing *E. coli* and serogroup-based enteropathogenic *E.coli* (EPEC) were found to be the main organisms causing diarrhea in Vientiane, with frequencies of 16.8% (148 of 880), 17.2% (111 of 645), and 11.0% (97 of 880), respectively. Relatively low incidences were observed in the cases of *Salmonella* spp., (0.6%; 5 of 880), *Campylobacter* spp. (4.4%;39 of 880), and rotavirus (6.1%; 9 of 148), and no isolates of *V. cholerae* O1 or O139 or *Aeromonas* were recovered. The frequencies of isolation of *Shigella* spp. and heat-labile enterotoxin-producing *E.coli* were significantly higher in those aged 1 to 5 years than in those younger than 1 year of age and those older than 5 years of age ($P<0.0001$ and $P<0.05$, respectively) and that the frequencies of isolation of *Shigella* spp. and ST-producing *E. coli* were significantly higher in the rainy season than in the dry season ($P<0.005$ and $P<0.001$, respectively). Almost all strains of *Shigella* spp. tested were resistant to ampicillin tetracycline, and erythromycin and were susceptible to cefdinir and ofloxacin. This is the first intensive and longitudinal study to define the etiologic agents of diarrheal diseases in Laos. *Ryukyu Med. J., 19(3)145～153, 2000*

Key words: Laos, bacterial infectious disease, diarrheal, epidemiology

緒　言

Lao People's Democratic Republic (Lao PDR : ラオス) はインドシナ半島の中央に位置する内陸の国である．感染症による下痢症，特に小児における下痢症は他の熱帯地区にある発展途上国同様，この国においても重要な疾患の一つである．世界的にみて下痢症による死亡率は年々減少傾向にあるが，それはprimary health care (PHC) 活動における衛生教育の普及や生活環境の改善が大きく貢献している．そのPHC活動の一つである感染症対策の第一歩は，感染症に対する疫学調査である．それは，感染症が気候，地理，社会経済などに依存して変化するからである。ラオスにおける感染症対策の前衛となる機関は，国立衛生疫学研究所 (National Institute of Hygiene and Epidemiology: NIHE) であるが，これまでこのような疫学調査は行われておらず，したがってこの国における感染症の特徴を捉えることができなかった．それは，設備，資金，人材などの不足によるものであるが，ラオス公衆衛生プロジェクトによってこの不足を補ってきた．

本論文は，我々とNIHEのスタッフの協同で行ったラオスにおける細菌感染症の研究及び疫学調査ににについての報告であり，次の順を追って記述する．

1．1992年から1993年におけるラオス･マホソト病院と琉大付属病院で分離した黄色ブドウ球菌の薬剤感受性の比較[1]．
2．1995年から1996年におけるラオスで分離した黄色ブドウ球菌の薬剤感受性試験[2]．
3．ラオスで分離したコレラ菌の性状[3]．
4．内国，ラオスで発生した腸炎ビブリオ食中毒菌の細菌学的研究[4]．
5．逆受け身ラテックス凝集反応によるジフテリア毒素の検出[5]．
6．ラオス国ビエンチャン市の下痢症における腸管病原菌分離と健康人病原菌保菌者の疫学調査[6]．
7．ラオス国ビエンチャン市における下痢症患者の病原細菌学的疫学調査[7]．

Table 1 MIC of ABPC, EM, CFDN, TC, DMPPC

MIC(μg/ml)	ABPC		EM		CFDN		TC		DMPPC	
	L	J	L	J	L	J	L	J	L	J
0.1	11	5	87	44	26	1	43	75	0	0
0.2	0	2	0	0	0	17	0	0	0	0
0.4	0	2	7	0	69	18	0	0	0	0
0.8	6	7	0	0	6	1	0	0	0	1
1.6	11	9	0	2	0	0	0	0	28	30
3.13	35	6	2	2	0	2	0	0	65	3
6.25	28	4	0	0	0	7	0	0	7	1
12.5	0	9	2	0	0	8	24	3	0	0
25	7	48	0	0	0	3	28	1	0	0
50	2	4	0	0	0	5	6	21	0	1
100	0	2	0	16	0	16	0	0	0	5
200	0	0	2	36	0	22	0	0	0	58

Value indicate a percentagae of isolates, ABPC:Ampicillin, EM:Erithromycin, CFDN:Cefinir, TC: Tetracycline, DMPPC: Methicillin, L: Laos, J: Japan

Table 2 Drug sensitivities

MIC(μg/ml)	DMPPC	ABPC	TC	EM	CFDN
<0.2	0	6	9	27	11
0.39	0	0	0	2	16
0.78	0	4	0	0	4
1.56	1	2	0	0	0
3.13	19	12	0	0	0
6.25	12	6	7	0	0
12.5	0	2	8	0	0
25	0	0	8	0	0
50	0	0	0	0	1
100	0	0	0	0	0
>100	0	0	0	3	0

32 isolates from infection focus (1995)

材料および方法

黄色ブドウ球菌，腸炎ビブリオ，コレラ菌，ジフテリア菌は通常の細菌検査法による性状検査により同定した．薬剤感受性試験に使用した薬剤はErythromycin (EM)，Tetracycline (TC)，Ampicillin (ABPC)，Cefdinir (CFDN)，Methicillin (DMPPC)で，MICは平板希釈法を用いて求めた．腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒遺伝子及びジフテリア菌の毒素遺伝子の検出はPCR法で行った．下痢便，健康便からの腸管病原菌の検出は，便を希釈後，TCBS, SS, BTB培地に塗布し，疑わしい集落を5-6個拾い普通寒天培地で再分離後，通常の細菌検査法に従い同定した．腸管病原性大腸菌の血清型は，デンカ生研の下痢原性大腸菌診断血清を使用した．毒素原性大腸菌(ETEC)の易熱性腸管毒(LT)と腸管出血性大腸菌(EHEC)のVero毒素は逆受け身ラテックス凝集(RPLA)キットを用い，ETECの耐熱性腸管毒(ST)はELISAキット(COLIST)を使用した．*Campylobacter* はOxoidのCampylobacter blood-free selective mediumを使い，42℃，48時間，微好気培養した．コアグラーゼ型別はデンカ生検のコアグラーゼ型別キットを使用した．ロタウイルスはRPLAを用いた凝集反応で判定した．

結果と考察

(1)1992年から1993年までラオスのMahosoto病院で分離した黄色ブドウ球菌と日本の琉大付属病院で分離した黄色ブドウ球菌の薬剤感受性パターンは明らかに異なっていた(Table 1)．ABPCに対してはラオス株で3.13μg/ml，日本株で25μg/mlに感受性株のピークがみられた．EMに対するラオス株のMIC$_{90}$ 0.4μg/mlで，琉大付属病院で分離した株では100μg/ml以上であった．CFDNに対し，0.8μg/ml以下の濃度で全てのラオス株は感受性を示したが，日本株は37%しか感受性を示さなかった．TCに対しラオス株は感受性が低く，分離株の58%は12.5μg/ml以上のMICを示し，日本分離の株は25%であった．DMPPCに対し全てのラオス株は6.25μg/ml以下の濃度で発育阻止が見られたが，日本株の63%は100μg/mlの濃度にも耐性であった．ラオス株のコアグラーゼ型は54%がtype Vで，日本株は53%がtype IIであった．type IIはMRSAの出現頻度と相関していることが知られており，日本株においてDMPPC耐性菌の分離頻度が高いことと良く一致している．ラオス株でコアグラーゼtype Vが多くみられた理由は不明だが，日本株からのこのタイプの分離頻度は約4%であった．Mahosoto病院は，大きさや機能性からみるとラオスで最も大きな病院であり，そこで使用される抗生剤が，ラオス株の薬剤感受性に大きく影響を与えているという結果が得られた．すなわちABPC，TCは最も多く使用されている薬剤で(アンケート調査による，データ未提出)，MICにおいてもこの2剤に耐性の菌が多くみられる．逆にEMはあまり使用されていないため，耐性菌が少なかった．この年に分離したラオス株においてMRSAはみられなかった．おそらく，MRSA出現の誘因となる第3世代セフェムが，この国ではこの年まではまだ使用されていないためだと思われる．ラオス分離株と日本分離株の薬剤耐性パターンの相違は，日本における抗生物質使用方法の改善を示唆するものであり，またラオスにおける薬剤耐性菌の監視を今後とも続ける必要があることを示している．

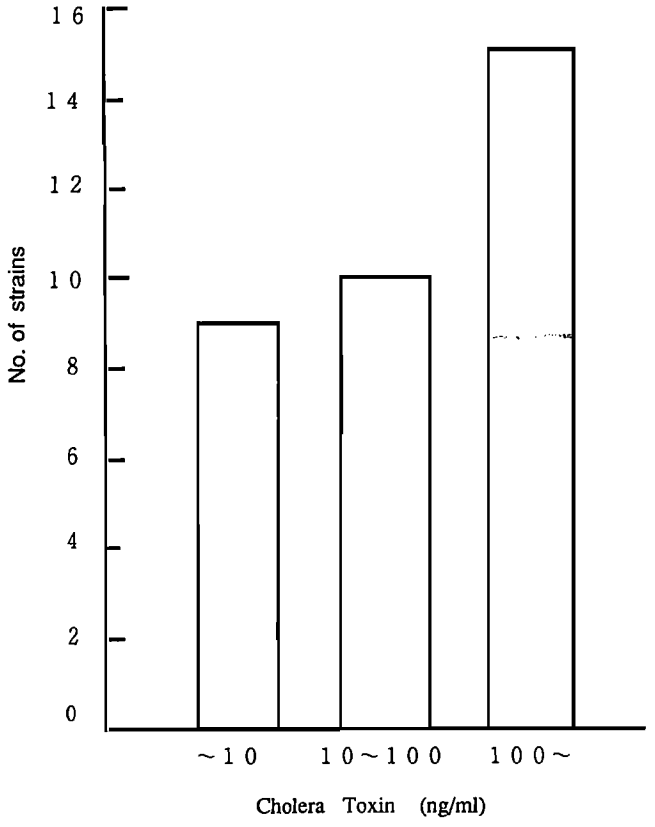

Fig. 1 Cholera toxin production in AKI medium in stationary tube as determined by the reversed passive latex agglutiation (RPLA) method.

Table 3 Drug sensitivities

MIC(μ/g/ml)	DMPPC	ABPC	TC	EM	CFDN
0.2	0	1	24	16	32
0.39	0	0	1	1	14
0.78	0	4	0	23	1
1.56	4	31	0	6	0
3.13	23	8	0	0	0
6.25	19	0	0	0	0
12.5	1	0	5	0	0
25	0	2	10	1	0
50	0	0	7	0	1
100	0	1	0	0	0
>100	0	0	0	3	0

47 isolates from infection focus (1996)

(2)1995年から1996年にかけ，Mahosoto病院の感染症患者から79株，看護婦および感染症以外の理由で入院している患者の鼻腔から35株の黄色ブドウ球菌を分離し，その薬剤感受性とコアグラーゼ型別を調べた（Table 5）．1996年において，コアグラーゼ型別で，type Vおよびtype II の頻度は感染部位から分離した株で各々63.8%，4.3%で，非感染症者からのものは各々28.6%，25.7%であった．一般的にどの株も調べた薬剤に対しよい感受性を示したが，いくつかの株がEMに高度耐性を示した（Table 2 - 4）．methicillinのMICはほとんどの株が6.25μg/ml以下で，1株が100μg/mlに耐性であった．この株はDMPPC100μg/ml，ABPC 100μg/ml，CFDN 25μg/ml，TC100μg/ml，EM>100μg/mlの多剤耐性を示し，コアグラーゼ型別はtype IVであった．この株の*mec*A遺伝子の存在を調べたところ，遺伝子を持っていた．MRSAは1993年の調査では見つかっておらず，MRSAをラオスにおいて初めて分離した報告である．methicillin のMICは，1993年分離株ではほとんどが3.13μg/mlであるが，1995年分離株では6.25μg/mlの株が37%，1996年分離株では6.25μg/mlの株が42%と，しだいに耐性菌株数が増えてきている．これは1993年以降の抗生剤の使用量が増加していることとも関連していると思われる．今回発見されたMRSAは非感染症患者からのものであり，黄色ブドウ球菌感染症患者からのものではない．おそらく調べた感染症患者数が少なかったためであると思われる．今度の調査でMRSAが分離されたことは，今後とも薬剤耐性菌の監視を強化しなければならないことを示唆している．

(3)1961年から始まった第7次コレラパンデミーはその収束の兆しも見せずにいまだ世界中に広がり続けている．第1次から第6次パンデミーの主役はClassicalコレラ菌であったが，現在流行中のコレラはEl Tor 型コレラ菌によるものである．この突然の変化が何によるものかは不明であるが，過去36年間にEl Tor型菌にも，ファージ感受性や溶血性の変化[8, 9]，さらにEl Tor型の変異株とも思われるO139Bengalによる流行など[10]，いろいろな変化がみられる．このような変化は菌の生態学や疾病の疫学などを考慮しなけらばならず，従って，分離した場所やその年におけるコレラ菌の性状を分析することは非常に重要な意味をもっている．我々は1995年にラオスで分離したコレラ菌34株の性状を調べた．コレラファージIV感受性，El Torファージ5感受性，polymyxin B感受性試験から，分離株全てがEl Tor型で，血清凝集反応からOgawa型であり，Feely and Pittman法およびRPLA法でEl Tor hemolysinを産生していることが判明した．

プロファージ型を調べたところCelebes型が82%，cured Celebes型が9%，Ubol型が27%であった．現在流行している第7次パンデミーの流行株はCelebes型El Torと見なされているので，現状と一致している．AKI medium[11]で毒素産生を調べると，全ての株が毒素を産生しており，その内44%の株が100ng/ml以上の毒素を産生していた（Fig. 1）．AKI medium による毒素産生は通常20-100ng/mlであるので[11]，ラオス株は毒素産生能が高い傾向にあるといえる．この傾向が世界的なものなのか，あるいは地域的なものなのかは，さらに調べなければならないが，分離菌の性状分析は重要であることを示している．WHOのreportによると1994年のラオスでのコレラ患者は9640例で，死亡率6.3%，1995年は1365例で死亡率12.7%である．世界的にみてコレラの死亡率は2.4%であるから，

Table 4 Drug sensitivities

MIC(μg/ml)	DMPPC	ABPC	TC	EM	CFDN
<0.2	1	3	18	30	14
0.39	0	1	0	1	19
0.78	1	5	0	0	0
1.56	3	6	0	0	1
3.13	24	13	1	0	0
6.25	4	3	7	0	0
12.5	1	2	5	0	0
25	0	0	3	0	1
50	0	1	0	0	0
100	0	1	1	1	0
>100	1	0	0	3	0

35 isolates from nasal mucosa (1996)

Table 5 Coagulase type

Coagulase type	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	UT
	No. of strains from								
infection (1995)	0	7	1	1	16	1	5	0	1
infection (1996)	0	2	4	2	30	0	3	1	5
nasal mucosa	0	9	4	2	10	0	5	2	3

UT: untypable

ラオスにおける死亡率は高いと言える．その理由がコレラ菌の毒素産生量と関係があるかもしれない．

(4)腸炎ビブリオは好塩性の食中毒菌で海岸の近くで良く分離される．ヒトはこの菌に汚染された海産物を食することにより食中毒にかかる．ラオスは5ヵ国に囲まれた内陸の国であるが，1997年8月から9月にかけ首都Vientianeで腸炎ビブリオによる食中毒が発生した．4つの病院の患者53人の下痢便のうち36の便から腸炎ビブリオを検出した．患者の年齢は5歳から70歳までで，平均25.6歳，男女比は19:17であった．1993年に分離した株，原因食と思われる食物分離株，各検体分離株，計36株の性状を比較検討した（Table 6）．患者分離の血清型は全てO3:K6であり，原因食と思われる株のそれはO2:K28であった．全ての株は典型的な腸炎ビブリオの性状を示したが，患者分離の株は10％食塩濃度でも弱いながらも発育がみれらた．また分離6ヵ月後でも強いswarmingがみられた．腸炎ビブリオは寒天培養すると，側毛を産生しswarmingするが，今回分離した株は特に側毛産生が強いと思われる．これは，10％食塩でも発育することも含め，今回分離した株の特徴である．ヒト血球を用いたWagatsuma培地では，全ての株で神奈川現象陽性であったが，ヒツジ血球を用いたものでは結果がばらついた．PCRで神奈川現象の原因である溶血毒素の遺伝子（*tdh* 遺伝子）とそれに関連し抗原構造が異なる溶血毒素の遺伝子（*trh* 遺伝子）を調べたところ，推定原因食株を除いて，全ての株が*tdh*遺伝子をもっていたが，*trh*遺伝子は持っていなかった．ureaseは全ての株で陰性であった．患者分離の12株と，1993年株，推定原因食株からDNAを分離し*SfiI*酵素で消化後，PFGEでDNAパターンを解析したところ，1993年株と推定原因食株は全く異なるパターンを示した．患者分離11株は，1株を除き，全て同じパターンを示した．OFLX, ABPC, TC, EM, CFDNに対するMICを求めたところ，OFLXで3.13μg/ml，ABPCで25μg/ml，TCで0.8μg/ml，EMとCFDNで6.25μg/mlに多くの株が分布した．腸炎ビブリオによる食中毒の散発例はラオスにおいてもあるが[6]，詳細に報告したのはこれが初めてである．OkudaらはCalcuttaで腸炎ビブリオO3:K6による食中毒を報告している[12]．この血清型は，近年東南アジアに広がりつつある血清型であり，おそらくラオス株もこれと同じクローンであろうと思われる．

(5)ジフテリア症は，*Corynebacterium diphtheriae*の産生する毒素（ジフテリア毒素：DT）によっておこり，緊急に抗毒素処置をしなければ死に至る疾患である．しかし，その臨床診断は難しく，扁桃炎や連鎖球菌による咽頭炎に間違えられ易い病気でもある．したがって迅速な菌の同定法や毒素の検出法は重要な意味をもっている．毒素の検出法として，これまで様々な方法が考案されているが[13-15]，熟練度を必要とするものや高価な器材を必要とするものが多く，発展途上国では行い難いものが多い．これを解決するため，我々はラテックス粒子と抗DT抗体を反応させ，抗DT抗体感作ラテックスを作成した．この方法（RPLA＝reversed passive latex agglutination）だとDTとラテックスとの反応で起こる凝集を見ることで，数分で毒素検定ができる．1996年にラオスにおいて発生したジフテリア患者から分離した7株を使い，作成した感作ラテックスの特異性を調べた．ジフテリア菌を培養後，培養上清と感作ラテックスを混ぜ，6時間後の凝集反応を調べたところ，7株中5株で陽性反応を示した．反応しなかった2株は毒素を産生していないと思われた．すなわち菌の保存中にcuringしたものと思われる．このことを確認するため，DT遺伝子の存在の有無をPCRで調べた．その結果，毒素遺伝子の結果とラテックス凝集反応の結果は全く一致した．さらにVero細胞を用いた実験においても両者の結果は完全に一致した．作成した感作ラテックスの毒素検出限界は，5 ng/mlであった．この感作ラテックスを用いることにより，ジフテリアを容易にしかも迅速に診断できることが示された．

(6)ラオスにおける下痢症の疫学調査はこれまで行われていない．感染症対策の第一歩が病原菌の疫学調査であることから，今回この調査を行った．Vientiane市内の病院から集めた下痢患者の便135検体の病原菌の検出を行うとともに，市内の保育園の協力を得て健康保菌者の便211検体の調査も行った．Table 7に示すように下痢患者からのものでは，赤痢菌の分離率が最も多く，21の検体から分離された．菌種別ではB群が14株と最も多く，D群，6株，C群，2株であった．次に多いのが腸管病原性大腸菌EPECであるが，EPECの持つ病原因子はまだ確定

Table 6 Characterzation of the isolates

	V. parahaemolyticus strains from		
	outbreaks	suspicious food	patient in 1993
Growth on TCBS	+	+	+
Acid from			
glucose	+	+	+
sucrose	−	−	−
lactose	−	−	−
Decarboxylation			
lysine	+	+	+
ornithine	+	+	+
arginine	−	−	−
Production of			
cytochrome oxidase	+	+	+
Urease	−	−	−
Indol	+	+	+
H_2S	−	−	−
VP	+	+	+
Utilize citrate	+	+	+
Motility	+	+	+
Growth in NaCl			
0%	−	−	−
6%	+	+	+
10%	(+)*	−	−
Kanagawa phenomenon	+	(+)**	+
Serotype	O3:K6	O2:K28	O4:K63

*All isolates from the outbreaks grew in peptone water supplemented with 10% NaCl. That growth ability was maintained for about 6 months after isolation, and then it disappeared.
**Hemolysis on Wagatsuma medium by the strain isolated from the suspected food was weaker than the other strains.

Table 7 Enteropathogens isolated from hospital-visiting diarrheal patients in Vientiane

Isolated pathogens	Case frequency(%)
Shigella spp.	21(15.4)
Salmonella spp.	3(2.2)
EPEC(serogroup Class I)	5(3.7)
EPEC(serogroup Class II)	4(3.7)
EPEC(serogroup others)	7(5.2)
EIEC(serogroup)	3(2.2)
ETEC(LT 4, ST 7)	11(8.1)
EHEC	0
V. parahaemolyticus	2(1.5)
V. hollizae	1(0.74)
Aeromonas spp.	0
Campylobacter jejuni	7(5.2)
Campylobacter coli	2(1.5)
pathogen positive	57(42%)

More than 2 pathogens were isolated from 1 case. Of 65 examined, 2 cases were positive for rotavirus.

Table 8 Healthy carrier of enteropathogens

solated pathogens	Number examined-age		
	Total:211	<6y:185	>20y:26
Shigella spp.	9	8	1
Salmonella spp	0	0	0
EPEC(Class I)	23	19	4
EPEC(Class II)	5	5	0
EPEC(others)	15	15	0
EIEC(serogroup)	6	5	1
ETEC(LT 2, ST 16, LT/ST 2)	20	20	0
EHEC(VT1)	1	1	0
Vibrio spp.	1	1	0
Aeromonas caviae	1	1	0
Campylobacter jejuni	11	11	0
Campylobacter coli	6	6	0
Rotavirus	0	0	0
pathogen positive	83(36%)	77(42%)	6(23%)

More than 2 pathogens were isolated from 16 cases. Serogroup of EHEC was O111.

していない．現在行われている血清型による分類方法に問題がないわけではないが[16]，Levineの分類方法[17]に従いClass I, Class II，その他に分け，Table 7のような結果になった．毒素産生大腸菌のETECでST産生4株，LT産生株7株であった．腸管凝集性大腸菌EAggECは適切な同定法が確立していないので，今回は同定しなかった．Table 8には健康人からの分離頻度を示している.最も分離頻度が高いのはEPEC Class Iで下痢患者のものより多い．さらに211検体中9人の便から赤痢菌が検出され，C群4株，D群3株，B群2株であった．この9人は下痢を含めた赤痢の症状を示しておらず，1ヵ月後の再調査では全て陰性になっていた．他のアジア諸国での赤痢患者は5％以下で，健康保菌者は2％以下である[18-20]．したがって今回分離した赤痢菌の頻度は高いといえる．赤痢が典型的な糞口感染であることを考えると，この地域社会において衛生状態がまだ十分ではないことを示唆している．同様なこと

Table 9 Incidence and age distribution of enteropathogens isolated from patients presenting at hospitals or clinics in Vientiane Lao PDR

Pathogen	No. isolates in patients of the following ages			
	<1yr (n=226)	1-5yr (n=446)	>5yr (n=208)	Total (n=880)
Shigella spp.	21	105	22	148
Salmonella spp.	0	2	3	5
EPEC class I	16	36	12	64
EPEC class II	9	19	5	33
ETEC				
LT producing(n=841)[a]	3	18	2	23
ST producing(n=645)[b]	21	65	25	111
LT and ST producing (n=645)	0	1	2	3
EIEC	5	24	8	37
EHEC	1	0	0	1
V. parahaemolyticus	0	0	2	2
Other *Vibrio* spp.	0	3	0	3
C. jejuni	10	9	2	21
C. coli	6	9	3	18
Total[c]	79	223	77	379

[a]: A total of 841 specimens were tested for LT; 211 specimens were from those younger than 1 year of age, 429 were from those aged 1 to 5 years, and 201 were from those older than 5 years of age.
[b]: A total of 645 specimens were tested for ST; 157 specimens were from those younger than 1 year of age, 324 were from those aged 1 to 5 years, and 164 were from those older than 5 years of age.
[c]: Multiple pathogens isolated from specimen were counted as one. Of 148 specimens examined, 9 specimens were positive for rotavirus: 3 to 31 from those younger than 1 year of age, 4 or 49 from those 1 to 5 years of age, and 2 of 68 from those older than 5 years of age.

Table 10 Incidence and seasonal variation of enteropathogens isolated from patients presenting at hospitals or clinics in Vientiane, Lao PDR

Pathogen	No. of isolates in the following season:		
	Dry (n=265)	Rainy (n=615)	Total (n=880)
Shigella spp.	31	117	148
Salmonella spp.	4	1	5
EPEC class I	12	52	64
EPEC class II	11	22	33
ETEC			
LT producing(n=841)[a]	8	15	23
ST producing(n=645)[b]	24	87	111
LT and ST producing (n=645)	1	2	3
EIEC	9	28	37
EHEC	0	1	1
V. parahaemolyticus	2	0	2
Other Vibrio spp.	0	3	3
C. jejuni	12	9	21
C. coli	3	15	18
Totoal[c]	97	262	379

[a]: A total of 841 specimens were tested for LT; 233 were tested in the dry season and 608 were tested in the rainy season.
[b]: A total of 645 specimens were tested for ST; 233 were tested in the dry seaon and 412 were tested in the rainy season.
[c]: Multiple pathogens isolated from a sepecimen were counted as one. Of 148 specimens examined, 9 specimens were positive for rotavirus; dry seaon, 7 of 93 specimens; rainy seson, 2 of 55 specimens.

はETEC やEHECの検出結果にも言える．公衆衛生活動をさらに押し進める必要があろう．

(7)これまでの報告は3ヵ月の短期の調査であったが，年間を通じてこの国の雨期と乾期における感染症の疫学調査も重要な意味を持つ．我々は1996年の10月から1997年の8月まで，Vientiane市内の病院から下痢便を集め，下痢原因菌の調査に当たった．全880の患者の便を調査した．患者の年齢を便宜上，1歳以下（226人），1から5歳まで（446人），5歳以上（208人）にわけた．男女比は1：0.95であった．年齢別の病原菌の分離結果をTable 9に，季節ごとの結果をTable10に示した．赤痢菌，ST-産生毒素産生大腸菌，血清型別腸管病原大腸菌が主に検出され．分離頻度は各々16.8%，17.2%，11.0%であった．分離頻度の低いものは*Salmonella* 菌種（0.6%），*Campylobacter*種（4.4%）とロタウイルス（6.1%）であった．腸管病原菌の年齢および季節変動をみると，*Shigella* spp.，LT産生*E.coli*が1から5歳までの子に多く，*Shigella* spp. とST産生*E.coli*は乾期より雨期に多かった．*Shigella* spp.の全ての株はampicillin，tetracycline，erythromycinに耐性で，cefdinir，ofloxacinには感受性であった．ラオスにおける長期間の病原菌の調査は本報告が初めてである．*Shigella* spp.の分離頻度が他の熱帯地の頻度より多く[21-23]，通常加齢と共に分離頻度が高くなるものであるが[23-25]，ラオスにおいては1歳から5歳までの子に多いのが特徴である．1歳以下の子をさらに5ヵ月以下と6から11ヵ月に分け分析すると，5ヵ月の子で2.9%，6から11ヵ月の子で12.2%で，Vientianeにおいては6ヵ月から11ヵ月の間に初期感染が起こりやすいことがわかった．ST-産生*E.coli*の分離頻度（81%）も他の国より多い[22, 24, 26, 27]．EPECの分離頻度（11.0%）はChile（38.3%）[28]やSao Paulo, Brazil（34.0%）[29]より低く，Somalia（4.0%）[24]より高い．今回の調査では年齢で分けた3グループに分離頻度に差はなかった．これはEPEC が乳幼児の下痢にあまり関与していないせいか，あるいは，EPECを血清型で分類していることから，別の血清型による下痢が起こっているのかもしれない．ロタウイルスの分離頻度（6%）はタイ国（18%）[25]や他の国[24, 30]に比べ低い．swabによる検体の数が多く，下痢便からの検査が少なすぎたせいかも知れない．*Shigella* spp.やETECが雨期に多く検出されたことは他の熱帯地域でも同様な傾向にある[23, 31]．2種以上の腸管病原菌が検出されたものでは，各年齢グループで最も多く分離された病原菌による組み合わせのものが多い．熱帯地区で1歳以下の乳幼児でよくみられるETECとEPECの組み合わせは，今回は認められなかった．混合感染の頻度は雨期（22.3%）と乾期（24.7%）で差は認められなかった．*Shigella* spp.の薬剤感受性試験の結果から，Vientiane において大人の赤痢の治療にはNalidixic acidが，1-5歳までの幼児にはcefdinirが勧められるが，他の薬剤耐性の傾向を見る限り，薬剤使用における基本的方針を立てておく必要があろう．下痢患者の便の58%は，腸管病原体を検出できなかった．おそらく今回調べていない寄生虫によるものか，あるいはロタウイルス以外の下痢原性ウイルスによるものであろう．

今回はラオスの首都Vientianeを中心に感染症の疫学調査をおこなったが，他の熱帯国と異なった特徴を持っていた．腸管感染症発症の頻度は生活環境の整備と衛生教育に大きく依存することから，さらに公衆衛生活動を強く進める必要があるだろう．

文　献

1) Higa, N., Noikaseumsy S. and Iwanaga, M.: A comparative study on *Staphylococcus aureus* isolated in Lao PDR and in Japan. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 22: 129-131, 1994

2) Iwanaga, M., Sisavath, L., Higa, N., Honma, Y. and Kakinohana, S.: Emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Laos. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 25: 103-106, 1997

3) Toma, C., Sisavath, L., Higa, N. and Iwanaga, M.: Characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolated in Lao people's democratic republic. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 25:85-87, 1997.

4) Yamashiro, T., Insisiengmay, S., Honma, Y., Higa, N., Enami, M. and Iwanaga, M.: Bacteriological study on *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the outbrakes of diarrhea in Laos, an inland country. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 26: 319-322, 1998.

5) Toma, C., Sisavath, L. and Iwanaga, M.: Reversed passive latex agglutination assay for detection of toxigenic *Corynebacterium diplitheriae*. J. Clin. Microbiol. 35: 3147-3149, 1997.

6) Insisiengmay, S., Munnalath, K., Sithivong, N., Sisavath, L., Panthouamas, B., Chomlasak, K., Higa, N., Yamashiro, T. and Nakasone, N. Etiology of diarrheal diseases and the healthy carrier of enteropathogens in Vientiane, people's democratic republic of Lao. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 25: 89-93, 1997.

7) Yamashiro, T., Nakasone, N., Higa, N., Iwanaga, M., Insisiengmay, S., Phounane, T., Munnalath, K., Sithivong, N., Sisavath, L., Phanthauamath, B., Chomlasak, K., Sisulath, P. and Vongsanith, P.: Etilogical study of diarrheai patients in Vientiane, Lao people's democratic republic. J. Clin. Microbiol. 36: 2195-2199, 1998.

8) Iwanaga, M., Nakamura, S. and Kuyyakanond, T. : Hemolytic *Vibrio cholerae* O1 that is sensitive to Mukerjee's cholera phage IV and the phage produced by the hemolytic vibrio lysogenized with the infection of Mukerjee's cholera phage IV. Microbiol. Immunol. 33:609-618, 1989

9) Nakasone, N., Iwanaga, M. and Roger, E.: Characterization of *Vibrio cholerae* O1 recently isolated in Bangladesh. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 81: 876-878, 1987

10) Ramamurthy, T., Garg, S., Sharma, R., Bhattacharya, S.K., Nair, G.B., Shimada, T., Takeda, T., Karasawa, T., Kurazono, H., Pal, A. and Takeda, Y.: emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. Lancet, 341: 703-704, 1993.

11) Iwanaga, M. and Yamamoto, K.: New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. J. Clin. Microbiol. 22: 405-408, 1985.

12) Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T.,

Takeda, Y., Mukhopadhyay, A.K., Gary, S., Bhattacharya S.K., Nair, G.B. and Nishibuchi, M.: Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. J. Clin. Microbiol. 35:3150-3155, 1997.

13) Engler, K.H., Glushkevich, T., Mazurova, I.K., George, R.C. and Efstratiou.: A modified Elek test for detection of toxigenic corynebacteria in the diagnostic laboratory. J. Clin. Microbiol. 35:495-498, 1997

14) Laird, W. and Groman, N.: Rapid, direct tissue culture test for toxigenicity of *Corynebacterium diphtheriae*. Appl. Microbiol. 25:709-712, 1973.

15) Nielsen, P.B., Koch, C.,Friis, H., Heron, I., Plag, J. and Schmidt, J.: Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxin-producing *Corynebacterium diphtheriae*. J. Clin. Microbiol. 25:1280-1284, 1987.

16) Sunabe, T. and Honma, Y.: Relationship between O-serogoup and presence of pathogenic factor genes in *Escherichia coli*. Microbiol. Immunol. 42: 845-849, 1998.

17) Levine, M.M.: *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. 155: 377-389, 1987.

18) Aihara, M., Sakai, M. Iwasaki, M., Shimakawa, K., Kozaki, S., Kubo, M. and Takahashi, H.: Isolation of enteropathogenic microorganism from patients with infection of the digestive tract during 1976 to 1988 in Tenri Hospital. J. Jpn. Assoc. Infect. Dis. 65: 864-874, 1991

19) Iwanaga, M., Nakasone, N., Nakamura, S., Wasito, E.B., Soeparto, P., Sudarmo, S.M., Soewandojo, E. and Ranuh, U.G.N.G.: Etiologic agents of diarrheal diseases in Surabaya, Indonesia. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 21: 143-147, 1993.

20) Kain, K.C., Barteluk, R.K., Kelly, M.T., Xin, H., Hua, G.D., Yuan, G., Proctor, E.M., Byrne, S. and Stiver, G.: Etiology of childhood diarrhea in Beijing, China. J.Clin. Microbiol. 29:90-95, 1991.

21) Baqui, A.H., Sack, R.B., Black, R.E., Haider, K., Hossain, A., Alim, A.R.M.A., Yunus, M., Chowdhury, H.R. and Siddique, A.K.: Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladeshi children <5 years of age. J. Infect. Dis. 166: 792-796, 1992.

22) Echeverria, P., Taylor, D.N., Lexsomboon, U., Bhaibulaya, M., Blacklow, N.R., Tamura, K. and Sakazaki, R.: Case-control study of endemic diarrheal disease in Thai children. J. Infect. Dis. 159:543-548, 1989.

23) Germani, Y., Morillon, M., Begaud, E., Dubourdieu, H., Costa, R. and Thevenon, J.: Two-year study of endemic enteric pathogens associated with acute diarrhea in New Caledonia, J. Clin. Microbiol. 32: 1532-1536, 1994.

24) Casalino, M., Yusuf, M.W., Nicoletti, M., Bazzicalupo, P., Coppo, A., Colonna, B., Cappelli, C., Bianchini, C., Falbo, V., Ahmed, H.J. Omar, K.H., Maxamuud, B. and Maimone, F.: A two-year study of enteric infections associated with diarrhoeal diseases in children in urban Somalia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82: 637-641, 1988.

25) Echeverria, P., Orskov, F., Orskov, I., Knutton, S., Scheutz, F., Brown, J.E. and Lexomboon, U.: Attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* as a cause of infantile diarrhea in Bangkok. J. Infect. Dis. 164: 550-554, 1991.

26) Albert, M., Faruque, S.M., Faruque, A.S.G., Neogi, P.K.B., Ansaruzzaman, M., Bhuiyan, N.A., Alam, K. and Akbar, M.s.: Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. J. Clin. Microbiol. 33: 973-977, 1995.

27) Paniagua, M., Espinoza, F., Ringman, M., Reizenstein, E., Svennerholm, A.-M. and Hallander, H.: Analysis of incidence of infection with enterotoxigenic *Escherichia coli* in a prospective cohort study of infant diarrhea in Nicaragua. J. Clin. Microbiol. 35: 1404-1410, 1997.

28) Levine, M.M., Prado, V., Robins-Browne, R., Lior, H., Kaper, J.B., Moseley, S.L., Gicquelais, K., Nataro, J.P., Vial, P. and Tall, B.: Use of DNA probes and HEp-2 cell adherence assay to detect diarrheagenic *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 158: 224-228, 1988.

29) Gomes, T.A.T., Rassi, V., MacDonald, K.L. Ramos, S.R.T.S., Trabulsi, L.R., Vieira, M.A.M., Guth, B.E.C., Candeias, J.A.N., Ivey, C., Toledo, M.R.F. and Blake, P.A.: Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo, Brazil. J. Infect. Dis. 164: 331-337, 1991.

30) Toledo, M.R.F., Alvariza, M.D.C.B. Murahovschi, J. Ramos, S.R.T.S. and Trabulsi, L.R.: Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. Infect. Immun. 39:586-589, 1983

31) Adkins, H.J., Escamilla, J., Santiago, L.T., Ranoa, C., Echeverria, P. and Cross, J.H.: Two-year survey of etiologic agents of diarrheal disease at San Lazaro Hospital, Manila, Republic of the Philippines. J. Clin. Microbiol. 25: 1143-1147, 1987.