

## 食水系感染症病原体の検査法 - 13

## コレラ菌とナグビブリオ

おおともよしみつ  
大友良光  
Yoshimitsu Otomo

## I. 病原体

## 1. コレラ菌とナグビブリオ

コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) は  $1.5 \sim 2.0 \times 0.5 \mu\text{m}$  のコンマ状のやや湾曲したグラム陰性桿菌であり (写真1)、菌体表面のO抗原 (リポ多糖体) の違いによって、現在210種類に分けられている。このうちわが国の「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法) で三類感染症コレラの原因菌とされているのはコレラ毒素 (cholera toxin : CT) 産生性の血清型 O1 と O139 (写真2) のコレラ菌であり、わが国では適正な管理が求められる

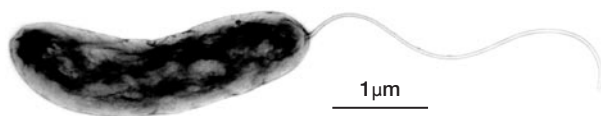


写真1 *Vibrio cholerae* O1 の電子顕微鏡写真<sup>1)</sup>  
菌体はコンマ状で、一本の鞭毛をもつ。

(酢酸ウラニルによるネガティブ染色)

[原図：後藤俊幸、井村俊郎]



写真2 *Vibrio cholerae* O139 の電子顕微鏡写真<sup>2)</sup>

(リンタンングステン酸によるネガティブ染色)

る四種病原体等 (基準の順守) となっている。

他の血清型菌も分類学上は *V. cholerae* であるがナグビブリオ (non-agglutinable *Vibrio cholerae* : NAG *Vibrio*) と称され、食品媒介感染と見られた場合には食品衛生法で食中毒の原因菌とされる。なお、CT産生性 O1 菌は型特異因子により小川型、稲葉型、そして小川型と稲葉型の間中型として彦島型に細分され、さらに生物型としてアジア型 (古典型) とエルトール型に分けられている<sup>3,4)</sup>。

## 2. 疫学

コレラは古くからインドのガンジス川デルタ地帯の風土病であったが、西欧との交易が盛んになった19世紀の初めから世界各地に伝播し、1817～1923年までにアジア型コレラ菌によるとされる6回の世界的流行 (汎発性流行 : pandemic) を起こした。一方、1905年エジプトのシナイ半島のトール検疫所 (El Tor) で患者から分離された溶血性を示す菌はエルトール型コレラ菌と称され、1961年以降に第7次の世界的流行となり現在に至っている<sup>3,4)</sup>。さらに1992年10月にインド東南部マドラスで血清型 O139 のコレラ菌 (Bengal 型)<sup>5)</sup> による下痢患者が多発し急速にインド亜大陸に広がった<sup>6)</sup>。

WHOの最近の報告では<sup>7)</sup> 世界全体としては依然エルトール型コレラ菌によるコレラの発生が続いており、2009年には45カ国で発生し患者221,226名、死者4,649名が報告されているが、実数はこれを上回っていると推察できる。次期パンデミックの原因となる恐れがある O139 コレラ菌による発生は中国と米国で認められており、コレラ菌検査では血清型別試験の実施が奨励されている。2010年10月21日確認されたハイチにおけるコレラは近隣のドミニカ共和国とフロリダに拡大し12月17日までに患者121,518名 (入院63,711名、死者2,591名) を

## 食水系感染症病原体の検査法 - 13

数える<sup>8)</sup>。

わが国ではコレラは「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法)の三類感染症であり、2000～2009年までに13名(2006年)ないし86名(2004年)の患者が発生し、その約75%は輸入感染事例である<sup>9)</sup>。

### 3. 臨床症状

コレラは通常1日以内の潜伏期の後、下痢を主症状とするが、重症の場合には腹部の不快感と不安感に続いて、突然の下痢と嘔吐が始まりショックに陥り、典型的な例では水様便から“米のとぎ汁様(rice water stool)”になり下痢便の量は1日10リットルないし数十リットルに達し、年少者や老人では致命的になることもある<sup>3)</sup>。ナグビブリオ感染症では病原体に汚染された水や食品を経口的に摂取し、平均3日以内の潜伏期を経て腹部不快感で始まり、ついで腹痛、悪心、嘔吐、下痢などの症状が現れる。ナグビブリオによる創傷感染等の腸管外感染症も見られる。

## II. 検査法

ヒトからの血清型 O1 および O139 コレラ菌の検査は、迅速かつ遅滞のない正確な結果が要求されるため、省略できる検査は省略し早期に確度の高い推定を下すことが大切である(詳細は「コレラ菌検査の手引き」(昭和63年9月28日健医感発第62号)参照)。ヒト以外の検体については「魚介類等の食品からのコレラ菌の検出方法について」(平成14年10月21日食監発第1021006号)に示されている<sup>10)</sup>。近年は迅速かつ精度の高い有用なポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法がいくつか開発されている。

なお、患者から血清型 O1 または O139 コレラ菌が分離され、なおかつ CT 産生あるいはその遺伝子(*ctx*)が確認された場合には、感染症法により直ちに保健所への届出と菌株の保持について「10日以内に滅菌等または譲渡」が義務付けられている。食品を介して発病したことが明確な患者から CT 産生 O1 や O139 コレラ菌、並びにナグビブリオが分離された場合には食中毒疑い例として食品衛生法上、

保健所への届出義務がある。

### 1. 培養法

患者糞便材料(当日検査不可の場合には Cary-Blair の輸送培地使用)は採取当日に TCBS 寒天培地(写真3)およびビブリオ寒天培地(写真4)の分離培地で 37℃ 16～24h、アルカリ性ペプトン水(APW)で 16～18h の一次増菌を行う(APW 培養液は翌日寒天培地に培養)。寒天培地上でコレラ菌が疑われる集落はスライド凝集反応により推定的同定を行い(この時点で疑似患者)、下記の同定法・毒素検出を実施する。近年は分離培地として酵素基質培地のクロモアガービブリオ(CHROMagar)(写真5)や X-VP 寒天培地(日水製薬)なども用いられている。酵素基質培地ではコロニーのみが発色するため雑多な

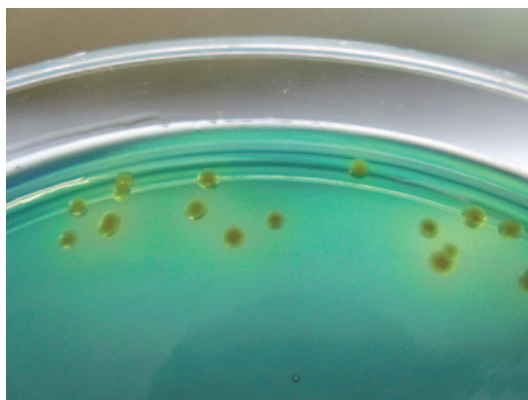


写真3 TCBS 寒天培地

37℃ 18時間培養で直径2mm程度の平坦で中央部分が黄色の集落を形成する。

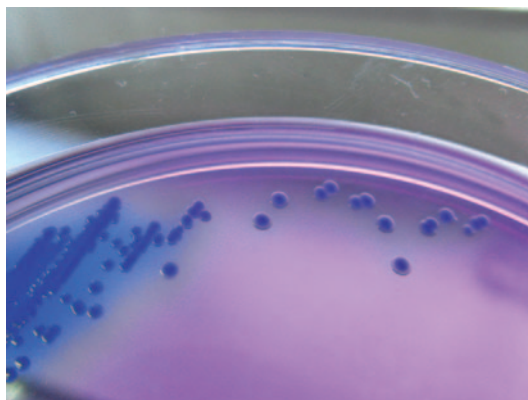
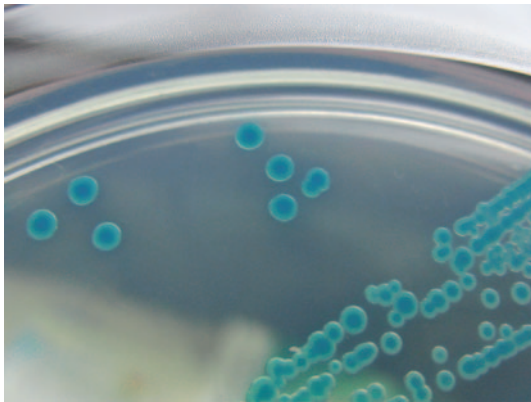


写真4 ビブリオ寒天培地

37℃ 18時間培養で直径2mm程度の平坦で中央部分が濃い青色の集落を形成する。



**写真5** クロモアガービブリオ寒天培地  
37℃18時間培養で直径2mm程度の平坦で  
中央部分が薄い青色の集落を形成する。

菌が多い食品や環境の試料の場合には培地 pH の変化で見る従来法に比べ培養後2～3日経過しても判別が可能である。

食品（魚介類）は25g、水は1Lを濾過したフィルター、水底泥は100mLを試料とし、それぞれAPW 225mL、100mL、1,000mLに接種して37℃18h一次増菌し、その培養液の表層部約0.5～1mLを二次増菌し（APWでは6～18h、Monsurのペプトン水では18h）、両増菌培地ともPCR法でCT遺伝子の検出を行う。二次増菌液はTCBS寒天培地およびPMT寒天培地（日水）に塗布し、糞便同様の検査を行う。

## 2. 同定法

コレラ菌が疑われる集落が出現した場合には詳細な生物化学的性状検査よりも先ず血清型 O1 および O139 を確認し CT の検出を行う。

一方、この検査と並行して、

- ①普通寒天培地又はアルカリ性普通寒天斜面培地、
- ②TSI寒天培地、
- ③インドール試験用培地、
- ④運動性試験用半流動寒天培地、
- ⑤リジン脱炭酸試験用培地に培養する。

通常は③と④にはSIM培地、③～⑤にはLIM培地が用いられる。これらの試験から、グラム染色-陰性、オキシダーゼ試験-陽性、ブドウ糖からのガス産生-陰性、インドール-陽性、リシン脱炭酸-陽性、塩化ナトリウム無添加 Nutrient Broth（日本BD（Difco）

での発育-陽性を確認する。4時間で同定可能なラピッド20E（bioMérieux）などの使用も有効である。次のO血清型別試験と毒素産生試験（CT遺伝子検出を含む）によりコレラか、食中毒の起原因かを判定する。

生物型別は溶血性（ヒツジ）、ニワトリ赤血球凝集性、VP反応、ポリミキシンB（50u）感受性、クラシカルファージIV感受性、エルトールファージV感受性について検査され、エルトール型の基本は順に+++--+であるが、後三者以外は明確でない場合が多い。

## 3. 血清型別

血清型 O1 型についてはコレラ菌抗原因子に対するモノクローナル抗体を感作したラテックス粒子によるスライド凝集反応法（コレラ菌AD「生研」とコレラ菌免疫血清「生研」セットが、血清型 O139 についてはビブリオコレラ免疫血清 O139 “Bengal” が市販されている（デンカ生研）。血清型 O1 および O139 以外の O 群については国立感染症研究所細菌第一部で実施している。

## 4. 毒素検出法

逆受身ラテックス凝集反応によるコレラ菌エンテロトキシン-大腸菌易熱性エンテロトキシン検出用キットのVET-RPLA（VET-RPLA「生研」）が市販されている。

## 5. 遺伝子検出法

最も多くの検査室に導入されている手法は、PCR産物を電気泳動法などによって検出する従来からのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法である。市販品のキットあるいは既出論文を参考にした合成プライマーが使用されている。コレラや食中毒の行政対応のためには迅速な検査が要求されているため、種（*V. cholerae*）の同定、血清型 O1 および O139 の鑑別、そしてCT検出について有用なマルチプレックスPCR（M-PCR）法が開発されている。以下にそのプライマーとPCR産物を記す。

- ①種特異外膜タンパク OmpW 遺伝子（*ompW*）とCTサブユニットA（*ctxA*）検出<sup>11)</sup>

## 食水系感染症病原体の検査法 - 13

PCR 条件：94℃ 5分の前加熱後 94℃ 30秒、64℃ 30秒、72℃ 30秒を 35回。

- ・ *ompW* 検出プライマー (PCR 産物；588bp)

*ompWF* : 5'-CACCAAGAAGGTGACTTTATTG  
TG-3' (24-mer)

*ompWR* : 5'-GGTTTGTGCGAATTAGCTTCAC  
C-3' (22-mer)

- ・ *ctxA* 検出プライマー (PCR 産物；301bp)

*ctxAF* : 5'-CTCAGACGGGATTTGTTAGGCAC  
G-3' (24-mer)

*ctxAR* : 5'-TCTATCTCTGTAGCCCCTATTAC  
G-3' (24-mer)

- ② 抗原遺伝子 (*rfb*) 検出による血清型 O1 と O139 の鑑別と *ctxA* 検出<sup>12)</sup>

PCR 条件：94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を 35回、最終 72℃ 1分。

- ・ O1-*rfb* 検出プライマー (PCR 産物；308bp)

O1F2-1 : 5'-GTTTCACTGAACAGATGGG-3'  
(19-mer)

O1R2-2 : 5'-GGTCATCTGTAAGTACAAC-3'  
(19-mer)

- ・ O139-*rfb* 検出プライマー (PCR 産物；449bp)

O139F2 : 5'-AGCCTCTTTATTACGGGTGG-3'  
(20-mer)

O139R2 : 5'-GTCAAACCCGATCGTAAAGG-3'  
(20-mer)

- ・ *ctxA* 検出プライマー (PCR 産物；192bp)

VCT1 : 5'-ACAGAGTGAGTACTTTGACC-3'  
(20-mer)

VCT2 : 5'-ATACCTACCATATATTTGGGAG-3'  
(22-mer)

- ③ 市販のプライマーセット

- ・ コレラ菌易熱性毒素遺伝子検出用 Primer Set VCT-1, -2 (タカラバイオ)

PCR 条件：94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を 35回、PCR 産物：307bp。

## 6. 簡易検査法

通常の病院等の医療機関では国の示した「コレラ菌検査の手引き」で行うこととなり、急性期のコレラ患者の糞便からコレラ菌の疑似判定まで少なくとも 24 時間以内の判断が要求される。一層の短縮には、先ず下痢便の位相差顕微鏡による観察は重要である。特有の流れ星 (shooting star) 様運動が観察できればそれ以降の検査の臨戦態勢が可能となる。コレラ感染が疑われる水様便を直接『コレラ菌 AD「生研」』で検査も可能である。行政検査機関では PCR 機器での検出が試みられるであろう。特に本文の遺伝子検出法②では下痢便患者材料の 250μL を 10 分煮沸してその原液と 10 倍希釈液について M-PCR 法を行い、検体搬入後数時間で種だけでなく、血清型、CT 産生まで確認可能で、しかも培養法を上回る成績を示している<sup>12)</sup>。

## 文 献

- 1) 日本細菌学会細菌学教育用映像素材集, 2003 年版。
- 2) 大友良光, 他, 青森県環境保健センター, 6: 11-13, 1995.
- 3) 竹田美文, 感染症発生動向調査週報 (IDWR)「感染症の話 2000 年第 1 週 (1 月 3 日～1 月 9 日)」、感染症情報センター。
- 4) 食品微生物学辞典, 日本食品微生物学会, 中央法規出版株式会社, 2010.
- 5) T. Shimada, et al., Lancet, 341 : 1347, 1993.
- 6) GB. Nair, et al., J. Infekt. Dis., 169 : 1029-1034, 1994.
- 7) MMWR 24 Dec ; 59 (50), 1637-1641, 2010 (<http://www.cdc.gov/haiticholera/mmwr.htm>). (アクセス 2010.1.25)
- 8) WHO, Weekly epidemiological record, No.31, 85 : 293-308, 2010.
- 9) 感染症情報センター, 国立感染症研究, コレラ 2009 (2010. 4.6), (<http://idsc.nih.go.jp/disease/cholera/IDWR1014.html>). (アクセス 2010.1.25)
- 10) 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針 微生物編, (社) 日本食品衛生協会, 東京, 2004.
- 11) B. Nandi, et al., J. Clin. Microbiol. 38 : 4145-4151, 2000.
- 12) K. Hoshino, et al., FEMS, Immunol. Med. Microbiol. 20 : 201-207, 1998.