

最近10年間に千葉県で分離された コレラ菌について (1978-1987)

小岩井健司¹⁾, 三瓶 憲一²⁾, 内村真佐子¹⁾, 矢崎 廣久¹⁾

Bacteriological Studies on 0-1 *Vibrio cholerae* in Chiba Prefecture during the Last 10 Years

Kenji KOIWAI, Kenichi SANBE, Masako UCHIMURA
and Hirohisa YAZAKI

Summary

During the period of 1978-1987, a total of 29 strains of 0-1 *Vibrio cholerae*, that is, 27 from patients and 2 from river water were isolated in Chiba prefecture.

Of the 29 strains, 12 were identified as Ogawa type and the remaining 17 were found to be Inaba type with slide agglutination test.

In further examination, 29 of the cultures were typed by Kappa phage typing test; 16 were Celebes type, 8 were Cured type and 5 were Ubon type, respectively.

Among the isolates, 18 strains were classified as the El Tor cholera, while the rest showed atypical properties on hemolytic or polymyxin B (50U) sensitivity tests.

All of 29 strains were tested for their enterotoxigenicity by reversed passive latex agglutination (RPLA) assay and bead enzyme-linked immunosorbent assay (bead ELISA). In 0-1 *Vibrio cholerae* strains tested, 26 strains (89.7%) produced cholera toxin, but 2 of isolates from river water and 1 of isolates from patients didn't. Classification of nontoxigenic strains with Kappa type phage fell into Ubon type.

I はじめに

わが国において、忘れられた感染症の感があったコレラが再び汚目されたのは、1977年6月の有田市¹⁾および翌年の東京池之端²⁾での流行以降である。これ以後は海外渡航者の激増もあって、毎年コレラ患者の発生が報告³⁾されている。

一方、横浜鶴見川のコレラ菌汚染事件⁴⁾を端緒として、各地で環境の汚染状況が調査されはじめ、河川水あるいは沿岸海水からのコレラ菌の分離の報告も数多くなされている。

千葉県においても、東京池之端の流行で10人(このうち4名は感染経路は不明)の患者発生をみて以来、ほぼ毎年のようにコレラ患者が発見されており、また、コレ

ラ菌による河川水の汚染事例も1979年5月及び8月に経験⁵⁾した。

今回、1978年の東京池之端の流行以降この10年間に、千葉県内のヒトおよび環境から分離されたコレラ菌について、その生物学的性状、コレラ毒素産生性および薬剤感受性等について検討し、近年検出されるコレラ菌の動向や特徴について知見を得たので報告する。

表1. 供試29株の抗原型と銅フェージ型

由	来	抗 原 型	銅フェージ型	
ヒ	小 川	12	Celebes	4
			Cured	5
			Ubon	3
	稲 葉	15	Celebes	12
			Cured	3
			Ubon	0
河 川 水	稲 葉	2	Ubon	2

1) 千葉県衛生研究所

2) 柏保健所

(1988年9月30日受理)

II 材料および方法

1. 供試菌株

1978年から1987年に千葉県内で分離された、表1に示すヒト由来27株、河川水由来2株の計29株である。ヒト由来株の内10株は1978年に発生した東京池之端コレラで分離され、他の17株は東南アジアあるいは西南アジア帰りの旅行者からのものである。

2. 同定および抗原型別

形態学的、生物学的性状およびカップファーゼ型別の検査は成書^{6,7)}によった。また、抗原型別は、コレラ菌免疫血清あるいはコレラ菌AD (いずれもデンカ生研) を用いて行った。

3. コレラ毒素産生試験

コレラ毒素の検出は、逆受身ラテックス凝集法 (RP-LA法; VET-RPLAデンカ生研) とビーズELISA法 (日水製薬) で行った。毒素検出用培地は、RPLA法は、Syncase培地⁸⁾、Casamino acid yeast extract (CAYE) 培地⁹⁾およびAKI培地を用いた。ビーズELISA法はAKI培地で行った。

供試株をペプトン水で37°C, 20時間前培養したのち、Syncase培地およびCAYE培地で30°C, 20時間振とう培養した。AKI培地では37°C, 4時間静置培養したのち、30°Cで16時間振とう培養した。

4. 薬剤感受性試験

Tetracycline (TC), Ampicillin (AP), Chloramphenicol (CP), Kanamycin (KM), Nalidixic acid (NA), Cephaloridin (CER) およびSurufomethopyradin (SA) の7薬剤の最小発育阻止濃度を測定した。測定は日本化学療法学会標準法¹⁰⁾に準拠して行った。培地は 'Iso-Sensitest' Agar (OXOID) を用いた。

III 成績

1. 生物学的性状

供試したコレラ菌29株の生物学的性状は表2に示すとおりで、リシデカルボキシラーゼを除いてすべて同一性状を示した。なお、リシデカルボキシラーゼ陰性株は、いずれも東京池之端コレラ事件に由来するものであった。抗原型についてみると小川型が12株、稲葉型が17株で、河川水由来の2株はともに稲葉型であった (表1)。

2. 生物型別

コレラ菌の生物型の鑑別に必要な性状の検査結果を表3に示した。ニワトリ赤血球凝集性, Voges-Proskauer反応およびファーゼIV感受性は、すべての株がエルト

表2. コレラ菌29株の生物学的性状

性 状	陽性株数	陰性株数
グラム陰性桿菌	29	0
オキシダーゼ	29	0
インドール	29	0
Voges-Proskauer	29	0
リシデカルボキシラーゼ	19	10
オルニチンデカルボキシラーゼ	29	0
アルギニンジヒドロラーゼ	0	29
硫化水素 (TSI)	0	29
炭水化物からの酸産生		
白 糖	29	0
乳 糖	29 (遅れて陽性)	0
マンニット	29	0
イノシット	0	29
マンノース	29	0
アラビノース	0	29
無塩ペプトン水発育	29	0
6%NaCl加 "	29	0
8%NaCl加 "	0	29
42°Cにおける発育	29	0

表3. コレラ菌29株の生物型の鑑別

性 状 試 験	陽性株数	陰性株数
ヒツジ赤血球溶血性		
平 板 法 (BHTCB寒天)	28	1
試験管法 (グリセリン加HIプロス)	28	1
試験管法 (HIプロス)	18	11
ポリミキシン (50U) 感受性	3	26
ニワトリ赤血球凝集性	29	0
Voges-Proskauer	29	0
ファーゼIV感受性	0	29

ル型の性状を示した。ポリミキシンB (50U) に感受性の株は3株認められたが、これらはいずれもHIプロス法で溶血性を示さなかった。

平板法, 試験管法とも溶血性が観察されなかった株は、フィリピンからの帰国者から分離された。しかし、他の生物性状はエルトール型に一致し、非定型菌と考えられた。

HIプロス法で溶血性を示さなかった11株は、1980年から1985年の間に分離されたが、前記したポリミキシンB感受性の3株以外はエルトール型の生物性状であった。なお、その渡航先はフィリピン, 台湾, ネパール, イン

ドネシアと多彩であった。1986年以降に分離された3株は、溶血性は認められたものの試験管法での活性はやや弱いものであった。

3. カッパーフェージ型

29株のカッパーフェージ型は、表1のように16株がCelebes型、8株がCured型、5株がUbon型であった。

4. 毒素産生性

表4、表5は検査したコレラ菌の毒素産生性をみたも

のである。培地による毒素産生性を比較すると、毒素産生株数、毒素産生量ともAKI培地が最もよく、供試29株のうち26株(89.7%)にコレラ毒素産生が認められた。しかし、CAYE培地を使用した場合は、7株(24.1%)が産生しただけであり、毒素産生量もきわめて少量であった。また、Syncase培地においても、22株(75.9%)にコレラ毒素の産生はみられたものの、その量はかなり少なかった。

表4. AKI培地、Syncase培地およびCAYE培地におけるコレラ菌の毒素産生性(RPLA法)

菌 株	由 来	AKI培地	Syncase培地	CAYE培地
1	ヒト	× 1 0 2 4 ¹⁾	× 2	ND ²⁾
2	ヒト	× 1 0 2 4	× 1 6	× 1 6
3	ヒト	× 2 0 4 8	× 2	ND
4	ヒト	× 2 0 4 8	× 6 4	ND
5	ヒト	× 1 0 2 4	× 4	× 1 6
6	ヒト	× 1 0 2 4	× 4	× 4
7	ヒト	× 2 0 4 8	× 1 6	ND
8	ヒト	× 2 0 4 8	× 3 2	ND
9	ヒト	× 5 1 2	ND	ND
10	ヒト	× 2 0 4 8	× 1 6	ND
11	ヒト	× 3 2	× 8	ND
12	ヒト	× 2 0 4 8	× 2	ND
13	ヒト	ND	ND	ND
14	ヒト	× 2 0 4 8	× 8	× 2
15	ヒト	× 2 0 4 8	× 3 2	× 2
16	ヒト	× 8	ND	ND
17	ヒト	× 2 0 4 8	× 8	ND
18	ヒト	× 2 0 4 8	× 2	ND
19	ヒト	× 2 5 6	ND	ND
20	ヒト	× 1 0 2 4	× 3 2	ND
21	ヒト	× 1 0 2 4	ND	ND
22	ヒト	× 2 0 4 8	× 8	ND
23	ヒト	× 5 1 2	× 1 6	× 4
24	ヒト	× 2 0 4 8	× 1 6	ND
25	ヒト	× 2 0 4 8	× 3 2	ND
26	ヒト	× 1 2 8	× 4	ND
27	ヒト	× 1 0 2 4	× 1 6	× 8
28	河川水	ND	ND	ND
29	河川水	ND	ND	ND

1) 数値は凝集を示す最高希釈倍数

2) ND: コレラ毒素不検出

表5. コレラ菌29株の毒素産生性

コレラ毒素検出法	培 地	毒 素 産 生 株	毒 素 非 産 生 株
R P L A 法	AKI培地	2 6	3
	CAYE培地	7	2 2
	Syncase培地	2 2	7
ビーズELISA法	AKI培地	2 6	3

供試株をAKI培地で培養したときに、RPLA法とビーズELISA法で共にまったく毒素産生がみられなかったのは各3株で、同一株であった。由来は河川水2株とヒト1株で、いずれも溶血性があり、そのカッパーフェージ型はUbon型であった。

5. 薬剤感受性

TC, AP, CP, KM, NAおよびCERの各薬剤に対して、いずれの株も感受性であった。SAに対しては、ヒト由来3株が耐性であった。

IV 考察

今回供試したコレラ菌が分離された1978年から1987年までの10年間に、コレラ菌に産する研究は急激な進歩を遂げた。特に、コレラ毒素の検査は、RPLA法の開発によって非常に簡単に行えるようになり、コレラ毒素産生菌と非産生菌の鑑別も容易となった。著者らも、過去10年間に千葉県内で分離されたコレラ菌29株について、RPLA法およびビーズELISA法によって毒素産生性を調査したところ、26株は毒素産生が確認されたものの、河川水由来2株、ヒト由来1株の計3株は、いずれの培地でもコレラ毒素非産生菌であることが認められた。しかしながら、Hondaら¹²⁾はコレラエンテロトキシン以外の下痢因子の存在を報告しており、実際、われわれの行ったウサギ腸管ループ試験では、河川水由来のこの2株は明かな腸管起病性を示した¹³⁾。このようなことから、コレラ毒素の産生が認められない菌株が即非病原株とはいえず、食品衛生等の面でその取扱に十分な注意を払う必要がある。

RPLA法を用いたコレラ毒素検査の場合、毒素産生用培地の選択は非常に重要である。今回の調査では、AKI培地の場合が毒素産生株数、毒素産生量とも最も優れていた。ついでSyncase培地であったが、毒素産生量は少量であった。さらにCAYE培地では、AKI培地に比べ1/4程度の株しか毒素を産生せず、産生する毒素量もSyncase培地よりもさらに少ないという結果であった。培地によるコレラ毒素の産生性については、山口ら¹⁴⁾も同様な成績を報告しているが、コレラ毒素検出には適切な培地と培養方法を用いないと、毒素産生株と非産生株の鑑別を誤る可能性が高いと思われる。今回の結果から著者らは、AKI培地を用いてコレラ毒素の検出を行うことが必要と考える。最近、環境から検出されたコレラ毒素非産生株については、特別の防疫措置をとらない方向にある。この際、適切な判断を行うためにも、培地、培養法の標準化を早急に定めなければならない。

また、最終確認のためには、コレラ毒素遺伝子の検出法の導入も必要と思われる。

コレラ毒素産生性とカッパーフェージ型との関係において、毒素非産生株のほとんどがUbon型であったという報告¹⁵⁾がある。今回検査を行った29株のうち、毒素非産生3株もやはりUbon型であった。コレラ毒素産生性とカッパーフェージ型との関係がなぜこのようになるのか、今後の研究に興味のもたれるところである。

供試した29株のコレラ菌の生物型は、定型的なエルトール型が18株で、残り11株は溶血性あるいはポリミキシンBの感受性試験の結果から非定型菌と判定された。溶血性試験の場合、その検査法¹⁶⁾はいくつか知られているが、今回、試験管法でグリセリンを加えた方法とグリセリン無添加の方法との比較では、10株の溶血性について正反対の結果が得られた。近年分離されるコレラ菌は、その溶血性等に異常性状を示す菌株が多く、アジア型とエルトール型との型別が困難になってきているといわれているが、型別に必要な溶血性試験に関しては統一された検査法が望まれる。

V まとめ

1978年から1987年までの10年間に、千葉県では29株(ヒト由来27株、河川水由来2株)のコレラ菌が分離された。

分離されたコレラ菌の抗原型は小川型12株、稲葉型は17株、また、カッパーフェージ型はCelebes型16株、Cured型8株、Ubon型が5株であった。

29株のうち、定型的なエルトール型が18株、残り11株は溶血性あるいはポリミキシンBの感受性試験の結果、非定型菌であった。

RPLA法およびビーズELISA法を用いてコレラ毒素の検出を試みたところ、29株中26株(89.7%)にコレラ毒素の産生が認められた。

コレラ毒素非産生株は、河川水由来2株、ヒト由来1株の計3株で、そのカッパーフェージ型はUbon型であった。

稿を終えるにあたり、ビーズELISA法のキットを御恵与下さいました日水製薬株式会社の水落明氏に深謝します。

文献

- 1) 厚生省公衆衛生局保健情報課：コレラ防疫の記録一

- 有田市を中心とした集団発生一, 日本公衆衛生協会 (東京), 1978.
- 2) 千葉県衛生部: 昭和53年千葉県に発生したコレラ一池之端文化センターに係るコレラ防疫について一, 1979.
 - 3) 厚生統計協会: 厚生の指標一国民衛生の動向, 35(9): 135, 1988.
 - 4) 武藤哲典, 母里啓子, 柴田幸生, 江口三郎, 北爪晴恵, 相原三紀子, 河村太郎, 松崎邦夫 (1980): 鶴見川水系河川水および底泥中のコレラ菌, 公衛誌, 27: 306-311.
 - 5) 千葉県衛生部: 昭和54年河川から検出したコレラ菌について, 1980.
 - 6) 微生物検査必携, 細菌真菌検査第3版, 日本公衆衛生協会 (東京), 1987.
 - 7) 日本細菌学会教育委員会編: コレラ菌と毒素原性大腸菌の検査法, 菜根出版 (東京), 1981.
 - 8) Finkelstein, R.A., Atthasampunna, P., Chulasamaya, M., and Charunmethee, P. (1966): Pathogenesis of experimental cholera: biologic activities of purified procholera A, J. Immunol., 96: 440-449.
 - 9) Evans, D., Jr., D.G. Evans and S.L. Gorbach (1973): Production of vascular permeability factor enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man, Infect Immun., 8: 725-730.
 - 10) Iwanaga, M. and Yamamoto, K. (1985): New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* 01 biotype El Tor, J. Clin. Microbiol., 22: 405-408.
 - 11) 日本化学療法学会 (1981): 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法 (改訂), Chemotherapy, 29, 76-79.
 - 12) Honda, T. and Finkelstein, R.A. (1979): Purification and characterization of hemolysin produced by *Vibrio cholerae* biotype El Tor: another toxic substance produced by cholera vibrios, Infect Immun., 26: 1021-1027.
 - 13) 小岩井健司, 三瓶憲一, 内村真佐子, 七山悠三 (1980): 市川市真間川および千葉市葭川から分離されたコレラ菌について, 感染症誌, 54, 臨時増刊号: 50.
 - 14) 山口和美, 西川禎一, 来住輝彦 (1988): ヒトおよび環境から分離されたコレラ菌の *in vitro* におけるコレラ毒素産生性, 32: 71-74.
 - 15) 春日 斉 (1986): 輸入魚介類のコレラ菌汚染, 食品衛生研究, 36: 47-53.
 - 16) Sakazaki, R., Tamura, K. and Murase, M. (1971): Determination of the hemolytic activity of *Vibrio cholerae*, Japan. J. Med. Sci. Biol., 24: 83-91.