

千葉県で分離された *Vibrio cholerae* 01, *Vibrio cholerae* non-01および *Vibrio mimicus* のコレラ毒素遺伝子の検出

小岩井健司, 鶴岡 佳久

Detection of Cholera Toxin Genes from *Vibrio cholerae* 01,
Vibrio cholerae non-01 and *Vibrio mimicus*
Isolated in Chiba Prefecture

Kenji KOIWAI and Yoshihisa TSURUOKA

はじめに

近年、微生物の病原性因子をDNAレベルで診断する技術が急速に進歩し、*Vibrio cholerae* 01（以下コレラ菌）にはコレラ毒素（以下CT）遺伝子 ctx を保有する株と保有しない株が存在し、 ctx を欠く株はCTを産生しない¹⁾ことなどが明らかになってきた。

今回、CT検出用のプローブDNAを用いて千葉県内で分離されたコレラ菌のCT遺伝子の保有状況を調査し、前報²⁾で報告したCT産生性との関連を検討した。また、CT様毒素を産出する株があることが報告³⁾されている *Vibrio cholerae* non-01と *Vibrio mimicus*についてもCT様毒素産生性とCT遺伝子の保有状況を調査したので、その結果と合わせて報告する。

II 材料と方法

1. 供試菌株

コレラ菌は前報²⁾で用いたヒト由来27株、河川水由来2株の計29株と、それ以後県内で分離された海外旅行者由来の6株を供試した。*Vibrio cholerae* non-01と *Vibrio mimicus*は、1980年から1989年に千葉県内で分離された海外旅行者由来のそれぞれ22株と4株を用いた。

2. CT検出用プローブDNA

CT検出用プローブDNAは国立予防衛生研究所渡辺治雄博士から分与を受けた。

3. 染色体DNAの分離とCT遺伝子の検出

供試株の染色体DNAの抽出は成書⁵⁾によった。

ハイブリットの検出は、Boehringer Mannheim社製のDNA Labeling and Detection Kitを使用した。

即ち、抽出後加熱処理したDNAをニトロセルロースフィルターにプロットし、80°Cで2時間ベーキング後、68°C、2時間プレハイブリダイゼーションを、68°C、10~12時間ハイブリダイゼーションを行った。次いでメンブランフィルターを2×SSC-0.1%SDSで室温、15分2回、さらに0.1×SSC-0.1%SDSで68°C、2回振盪しながら洗浄した。次に、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体でメンブランフィルターを30分間インキュベートし、フィルターを洗浄後、nitroblue tetrazolium (NBT) と5-brom-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) で暗所で20分間反応を行い、青色を呈したものを陽性とした。

4. CT産生性試験

前報²⁾の他に下記の方法でも行った。すなわち、被検菌を1%NaCl加ペプトン水で37°C、20時間培養したのち、リンコマイシン加Casamino acid yeast extract (CAYE-L) 培地に接種し、30°C、20時間静置培養した。その培養液を遠心分離した上清と、培養液をポリミキシンB処理後遠心分離した上清について、逆受身ラテックス凝集反応 (VET-RPLA; デンカ生研) によりCTの検出を行った。

Vibrio cholerae non-01と *Vibrio mimicus*のCT様毒素産生試験も同様に実施した。

III 成績

1. コレラ菌のCT遺伝子の保有状況とCT産生性
コレラ菌35株のCT遺伝子の保有状況とCT産生を

千葉県衛生研究所
(1990年12月20日受理)

Table 1 に示した。ヒト由来33株のうち32株はCT遺伝子を保有し、CTを産生した。しかし、1981年にタイから帰国した旅行者から分離されたCT非産生のコレラ菌 (CVC81-1株) は、CT遺伝子を保有していなかった。

また、1979年に市川市真間川 (CVC79-1株) および千葉市葭川 (CVC79-2株) から分離された河川水由来の2株も、CT産生、CT遺伝子とも陰性であった。

2. *Vibrio cholerae* non-01 と *Vibrio mimicus* のCT遺伝子の保有状況とCT様毒素産生性

Table 2 に示すように海外旅行者由来 *Vibrio cholerae* non-01 22株と *Vibrio mimicus* 4株は、全株ともCT遺伝子を保有せず、また、CT様毒素も陰性であった。

Table 1 CT gene reservation and CT production in *Vibrio cholerae* 01 strains isolated in Chiba prefecture

Strain	Source	Biotype	Serotype	CT gene	CT production
CVC78-1	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC78-2	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC78-3	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC78-4	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC78-5	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC78-6	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC78-7	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC78-8	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC78-9	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC78-10	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC79-1	River Water	El Tor	Inaba	-	-
CVC79-2	River Water	El Tor	Inaba	-	-
CVC80-1	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC80-2	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC81-1	Human	El Tor	Ogawa	-	-
CVC81-2	Human	El Tor	Ogawa	+	+
CVC81-3	Human	El Tor	Ogawa	+	+
CVC83-1	Human	El Tor	Ogawa	+	+
CVC84-1	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC84-2	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC84-3	Human	El Tor	Ogawa	+	+
CVC85-1	Human	El Tor	Ogawa	+	+
CVC85-2	Human	El Tor	Ogawa	+	+
CVC85-3	Human	El Tor	Ogawa	+	+
CVC85-4	Human	El Tor	Ogawa	+	+
CVC85-5	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC86-1	Human	El Tor	Ogawa	+	+
CVC87-1	Human	El Tor	Ogawa	+	+
CVC87-2	Human	El Tor	Ogawa	+	+
CVC89-1	Human	El Tor	Inaba	+	+
CVC89-2	Human	El Tor	Ogawa	+	+
CVC89-3	Human	El Tor	Ogawa	+	+
CVC90-1	Human	El Tor	Ogawa	+	+
CVC90-2	Human	El Tor	Ogawa	+	+
CVC90-3	Human	El Tor	Inaba	+	+

Table 2 Detection of CT gene and CT like enterotoxin production in *Vibrio cholerae* non-01 and *Vibrio mimicus* strains isolated in Chiba prefecture

Organism	Source	No. of examined	CT gene	CT like enterotoxin
<i>Vibrio cholerae</i> non-01	Oversea traveller	22	—	—
<i>Vibrio mimicus</i>	Oversea traveller	4	—	—

IV 考察

供試したコレラ菌のうち、ヒト由来 1 株は CT 遺伝子を保有しない株であった。また、河川水由来 2 株も CT 産生、CT 遺伝子とも陰性であった。しかし、ヒト由来株は海外旅行者から分離され、10 回前後の水様下痢があったことが記録されている。また、河川水由来の 2 株の腸管起病性も既に報告⁶⁾した。これらのことからこの 3 株には CT 以外の何らかの病原因子が存在するものと思われる。コレラ菌が *Vibrio cholerae* non-01 の産生する ST 毒素と同様の毒素遺伝子を持つことも報告⁷⁾されており、今後これら 3 株の CT 以外の病原因子について明らかにしていきたいと考えている。

Vibrio cholerae non-01 および *Vibrio mimicus* は CT と同一の毒素を産生する株があることが報告³⁾⁴⁾されている。今回海外旅行者由来 26 株について CT 遺伝子、CT 様毒素産生性を調査したが全株とも陰性であった。

1988 年の厚生省通達⁹⁾により、コレラ菌は CT 産生の有無によって防疫対策が大きく変わることとなった。また、コレラの国内初発患者または保菌者としての確認も、従来の国立予防衛生研究所に代わり、地方衛生研究所の検査によって行われることになったため、地方衛生研究所の検査結果が行政上非常に重要となった。

現在、被験菌の CT 産生性の検査は、その培養上清について、逆受身ラテックス凝集反応あるいはビーズエリサ法等の免疫学的な方法で行われているのが一般的である。しかし、CT 産生用培地、培養温度あるいは培養方法によりその結果が異なることが指摘されており、著者らも報告²⁾した。今回実施したコレラ菌 35 株では、CT 遺伝子の存在と免疫学的方法による CT 産生の結果は全株が一致した。しかしながら、前述の様にコレラ菌が分離された場合の防疫上の取り扱いが、CT 産生の有無によって異なることから、衛生研究所で行われる検査は、CT 遺伝子の形質発現としての CT 産生の結果が培養条件

等により異なる検査法よりも、CT 遺伝子の存在を直接確認する方法がより確実に望ましいものと思われる。ただ、今回行なった遺伝子検出法は、菌分離の翌日でなければ検査結果が得られず、迅速性に難点があるといえる。小林ら⁹⁾が報告している PCR 法の導入やより簡便なキットの開発が必要である。

謝辞

本調査を行うにあたり、CT 検出用プローブ DNA を分与いただいた国立予防衛生研究所渡辺治雄博士、島田俊雄博士に深謝いたします。

文献

- 1) Kaper, J.B., Moseley, S.L., and Falkow, S. (1981) : Molecular Characterization of environmental and nontoxigenic strains of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, 32 : 661-667.
- 2) 小岩井健司, 三瓶憲一, 内村真佐子, 矢崎廣久 (1988) : 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), 千葉衛研報告, 12 : 16-20.
- 3) Yamamoto, K., Takeda, Y., Miwatani, T., and Craig, J.P. (1983) : Purification and some properties of a non-01 *Vibrio cholerae* enterotoxin that is identical to cholera enterotoxin. *Infect. Immun.*, 39 : 1128-1135
- 4) Spira, W.M. and Fedorka-Cray P.J. (1984) : Purification of enterotoxins from *Vibrio mimicus* that appear to be identical to cholera toxin. *Infect. Immun.*, 45 : 679-684.
- 5) Ausubel, F.W., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.: Current protocols in molecular biology, Volume I, Green publishing associates and

wiley-interscience. 1987

- 6) 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.
- 7) 小川 哲, 加藤潤一, 渡辺治雄, Peina, Y., 土肥 関子, 竹田多恵 (1990): *Vibrio cholerae* non-01 の産生するST毒素遺伝子, 第64回日本細菌学会関東支部総会, 51.
- 8) 厚生省保健医療局長, 厚生省生活衛生局長, 健医発 第1133号, 衛検第231号, 昭和63年9月28日: コレラエンテロトキシン非産生コレラ菌の取り扱い等について, 1988.
- 9) 小林一寛, 勢戸和子, 上口美弥子, 牧野正直, 石橋正憲, 赤坂 進, 山本和生 (1989): Polymerase chain reaction法を用いたコレラ毒素遺伝子の迅速診断法, 医学のあゆみ, 150: 509-510.