

千葉県で分離された集団コレラ由来株の分子疫学的解析

小岩井健司, 岸田 一則, 内村真佐子, 鶴岡 佳久

Molecular Epidemiologic Analysis of *Vibrio cholerae* O1 Isolates from Two Cholera Outbreaks in Chiba Prefecture by Random Amplified Polymorphic DNA and Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Kenji KOIWAI, Kazunori KISHIDA, Masako UCHIMURA
and Yoshihisa TSURUOKA

1. はじめに

昭和50年代以降, 千葉県では国内発生と考えられる2つのコレラ集団事例を経験している。一つは昭和53年(1978年)東京の結核式場を原因施設とするいわゆる池之端コレラであり, 他の一つは平成3年(1991年)館山保健所管内で発生した事例である。この2つの集団事例で分離されたコレラ菌(*Vibrio cholerae* O1)は, その抗原型, 生物型, ファージ型, 薬剤感受性あるいはその他の生物学的性状から, それぞれ感染源は一つであろうと推定された。

近年, 細菌感染症の疫学的な調査に, パルスフィールド電気泳動(pulsed-field gel electrophoresis以下PFGE)法を用いた染色体DNAの制限酵素切断パターンの比較¹⁾⁻³⁾やPCR法を応用したrandom amplified polymorphic DNA(以下RAPD)法⁴⁾⁻⁷⁾が用いられ, その有用性が報告されている。

今回, 我々はこれらの2つの集団コレラ由来株について, PFGE法およびRAPD法の疫学的調査における有用性を検討したので報告する。

2. コレラ集団事例の発生概要

1) 昭和53年の池之端コレラは報告書^{8),9)}に記した。

2) 平成3年の館山保健所管内の集団コレラ

平成3年8月25日早朝, 「館山保健所管内富山町の民宿K館の宿泊客が集団下痢を起こした」旨の通報が, 館山消防署から保健所であった。同保健所が伝染病と食中毒の両面から疫学調査および検査を開始したところ, 8月23日にK館に宿泊したグループ49名中11名が8月24日午後4時頃から下痢, 腹痛, 発熱などの食中毒症状を呈し, うち2名が入院していることが判明した(最終的には65名が喫食, うち30名が発症)。同保健所は翌26日, 医師の臨床決定による食中毒の届出を受けて, 同日に本件を食中毒事件と決定し, 同施設を食品衛生法により26日から28日まで営業停止処分とした。なお, 館山保健所における検査の結果, 共通食品の一つであるポイルアオヤギと患者1名の便から腸炎ビブリオが検出された。

翌8月26日, 東京都衛生局から県衛生部に「富山町民宿Y荘に

宿泊したグループの中に食中毒症状を呈している者がいる」との報告があった。保健所が調査した結果, 8月24日Y荘に宿泊した19名中10名(その後の調査で発症者は18名となった)が, 8月25日午前11時頃から, 下痢, 腹痛, 発熱などの食中毒症状を呈し, うち6名が医師の治療を受けていたことが判明した。

一方, 29日午後3時半, 館山市のM病院から, 「富浦町に住む海外旅行歴のない女性が, 23日に下痢症状を訴えて入院し, 26日に採便した検体からコレラ様の菌を分離したので同定してほしい」旨の依頼が保健所であった。翌30日午前9時半, コレラ菌混合血清に凝集が認められたため, 県衛生研究所に搬入, 午後2時44分にエルトール小川型菌と決定し, コレラ患者が確認された。なお, この女性は8月28日に死亡していた。また, 富浦町の22才の男性(海外旅行歴はない)が, 25日下痢症状を訴え館山市内の病院に入院していたが, 30日にエルトール小川型のコレラ菌が検出された。

同30日午前11時5分, K館の食中毒患者として検査を行っていた県内の2名の患者便からもエルトール小川型のコレラ菌を検出, 11時45分にはY荘の食中毒患者の検査を行っていた東京都でもエルトール小川型のコレラ菌を検出したため, これらの食中毒はコレラとして取り扱うこととなった。なお, コレラ患者の発生に伴いK館, Y荘に対し伝染病予防法により行政措置(営業停止処分)が実施された。

同日(30日)に富山町のペンションNから保健所に「24日の宿泊客のうち約40名が腹痛, 下痢を呈しているらしいので調査をして欲しい」との連絡がはいった。これを受けて調査した結果, 24日に宿泊した77名のうち46名が下痢等の症状を呈しており, 宿泊者の居住地が東京都, 神奈川県, 埼玉県, 茨城県および千葉県の1都4県に及んでいることが判明した。調査の結果, 千葉県2名, 東京都1名, 埼玉県1名のコレラ患者が発見された。

さらに, 富山町に8月11日から29日まで帰省していた船橋市の主婦が9月6日にコレラ患者と診定された。

これらの発生とは別に, 神奈川県においても8月27日に相模原市で, 31日に平塚市で, また, 9月3日, 4日に大和市でコレラ患者が発生した。

本事例のコレラ患者発生は, 千葉県内の宿泊施設および一般家庭から患者がほぼ同時期に発生し, さらに関東地方の他都県でも発生をみるなど, 広域的な集団発生の様相を呈した。最終的には真性19名, 疑似3名, 合計22名(内, 死亡1名)のコレラ患者が発生した。

食品関係の調査では患者全員の共通食品はなかったが、多くの患者の共通食品としてポイルアオヤギ、マグロ、イカが疑われた。しかしながら、マグロとイカについては仕入れ先が別々であり残品、参考品からコレラ菌は検出されなかった。また、ポイルアオヤギについては多数の患者が発生している3宿泊施設の仕入れ先が同一（横浜市内の水産加工業者）であるところから、製造および流通過程のコレラ菌汚染の可能性も検討されたが、ポイルアオヤギからコレラ菌は検出されなかった¹⁰⁾。また、水産加工業者までの流通ルートも複雑で全容の解明には至らなかった。

3. 材料と方法

1) 供試菌株

池之端コレラ：患者由来株10株と患家からのコレラ菌流出があったために、事件以後毎月行っていた環境調査で分離された河川由来1株を使用した。

館山保健所管内集団コレラ：千葉県内患者由来7株、神奈川県内患者由来6株（神奈川県衛生研究所分与株）および患家と館山市内の水産加工品販売店の環境調査を実施した時に2河川から分離された河川由来株2株、計15株を供試した。

なお、569B株（クラシカル型、稲葉型）、CVC15株（1981年タイからの帰国者から分離：エルトール型、小川型）、CVC12株（1978年河川分離株：エルトール型、稲葉型）CVC92001株（1992年八千代市国内散発患者由来株、エルトール型、小川型）およびCVC92002株（1992年館山市国内散発患者由来株、エルトール型、小川型）を対照とした。

2) 生化学性状およびファージ型別

分離菌の生化学性状およびファージ型別は成書^{11),12)}に準じて実施した。

3) 薬剤感受性試験

池之端コレラ由来株の薬剤感受性試験は、アンピシリン（ABPC）、クロラムフェニコール（CP）、カナマイシン（KM）、テトラサイクリン（TC）、ストレプトマイシン（SM）、ナリジクス酸（NA）およびコリスチン（CL）の7薬剤について寒天平板希釈法により実施した。館山保健所管内集団コレラ由来株についてはアンピシリン（ABPC）、セファロリジン（CER）、クロラムフェニコール（CP）、カナマイシン（KM）、テトラサイクリン（TC）、オフロキサシン（OFLX）、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤（ST）、ホスホマイシン（FOM）およびナリジクス酸（NA）の9薬剤についてNCCLSディスク法により行った。

4) RAPD法

牧野ら^{6),7)}の方法に準じた。すなわち、供試菌株をBrain heart infusion培地3mlで37℃、一夜振盪培養後、InstaGene Purification Matrix（BIO RAD）を用いてDNAの抽出を行った。PCRは0.5ml用マイクロチューブで全量25μlで行った。その反応液の組成は抽出したDNA20ng、MgCl₂3mM、20pM primer、d-NTP mixture（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）各250μM、Taq DNA polymerase（Boehringer Manheime）1U、Tris-Cl 10mM、KCl 50mM、TritonX-100 0.1%である。primerとしてAP40、AP42およびAP46^{3),6)}を用いた。

PCRはdenaturation 94℃、2分、annealing 38℃、2分およびelongation 72℃、2分の条件で45サイクル行った。生成産物を1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、写真撮影を行った。

5) PEGE法

満田ら¹³⁾が記載した方法に準じて以下のように行った。供試菌株をbrain heart infusion培地3mlで37℃、一夜振盪培養後、その100μlを遠心集菌した。菌体に50μlのSEバッファーと等量の2%低融点アガロース（Bio Rad）およびlysozyme [25mg/ml]を4μlを加え、サンプルゲルブロックを作成した。ゲルブロックをlysis solution（1M NaCl、0.1MEDTA [pH8.0]、0.5% [wt/vol] Brij-58、0.2% [wt/vol] deoxycholate、0.5% [wt/vol] sarkosyl、1mg/ml lysozyme）内で37℃、1時間反応させ溶菌を行った。次いで、タンパク分解液（0.25MEDTA [pH8.0]、1% [wt/vol] sarkosyl、0.1mg/ml proteinase K）中で16~20時間、50℃でタンパク消化を行った後、1mM phenylmethanesulfonyl fluorideを含むTEバッファー（10mM Tris、1mM EDTA [pH8.0]）中で室温30分間放置し、以後、TEバッファーで4回洗浄した。このゲルを適当な大きさに切断後、制限酵素Not I（Boehringer Manheime）で37℃、18時間処理した。電気泳動はCHEF-DR III（Bio Rad）システムで、0.5×TEバッファー、1%アガロースゲルを用い、パルスタイム3秒から40秒、電圧150V³⁾、14℃、22時間行った。泳動後、エチジウムブロマイド染色し、写真撮影を行った。

4. 結果

1) 生物学的性状

供試した26株の生物学的性状を表1に示す。池之端コレラでは、ヒト由来10株はいずれもエルトール稲葉型、カッパファージ型はcelebes型、ファージIVに非感受性であった。生化学的性状ではリジン脱炭酸反応が陰性という特徴をはじめその他の性状も同一であった。環境調査で分離された河川由来株もエルトール稲葉であったが、コレラ毒素遺伝子を保有せず、カッパファージ型（ubon）、リジン脱炭酸試験（陽性）等が異なる株であった。

館山保健所管内の集団コレラに関連する株は、千葉県、神奈川県分離株ともエルトール小川型で、カッパファージ型はcelebes型、プラスミドを保有せず、また、他の生化学的性状も同一であった。一方、河川由来の2株はエルトール小川型であったがコレラ毒素遺伝子非保有株であった。

2) 薬剤感受性

表2に薬剤感受性の結果を示す。池之端コレラ由来株10株は7薬剤に対して、また、館山保健所管内の集団コレラに関連する株は9薬剤に対して全く同一のパターンを示した。

3) RAPD解析

図1から図4に供試株の染色体DNAのRAPD解析の結果を示す。図1は池之端コレラヒト由来株と河川由来株にprimer AP40を使用した場合の結果を示した。ヒト由来株はすべて同一のパターンを示したが河川由来株とレーン15の散発患者由来株は明らかに異なるパターンであった。図には示さなかったがprimer AP42およびAP46を使用した場合も同様な結果であった。

表1 集団コレラ等から分離されたコレラ菌の生物化学性状

テ ス ト	由 来	池 之 端		館 山 関 連			
		ヒ ト	河 川	千 葉	神 奈 川	河 川 O	河 川 H
供 試 株 数		10	1	7	6	1	1
オキシダーゼ		+	+	+	+	+	+
インドール		+	+	+	+	+	+
リシンデカルボキシラーゼ		-	+	+	+	+	+
オルニチンデカルボキシラーゼ		+	+	+	+	+	+
アルギニンジヒドロラーゼ		-	-	-	-	-	-
H ₂ S (TSI)		-	-	-	-	-	-
ガス産生 (TSI)		-	-	-	-	-	-
0%NaCl加ブイオンにおける発育		+	+	+	+	+	+
6%NaCl加ブイオンにおける発育		+	+	+	+	+	+
8%NaCl加ブイオンにおける発育		-	-	-	-	-	-
ONPG		+	+	+	+	+	+
炭水化物からの酸産生							
グルコース		+	+	+	+	+	+
マンニット		+	+	+	+	+	+
マンノース		+	+	+	+	+	+
イノシット		-	-	-	-	-	-
アラビノース		-	-	-	-	-	-
ラクトース		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
サリシン		-	-	-	-	-	-
O129 (10 μg) 感受性		+	+	+	+	+	+
ニワトリ赤血球凝集性		+	+	+	+	+	+
ポリミキシン B (50U) 感受性		-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer		+	+	+	+	+	+
ファージIV感受性		-	-	-	-	-	-
カッパファージ型		celebes	ubon	celebes	celebes	ubon	ubon
抗原型		稲葉	稲葉	小川	小川	小川	小川
コレラ毒素産生性		+	-	+	+	-	-

表2 集団コレラ等から分離されたコレラ菌の薬剤感受性

由 来	供 試 株 数	薬 剤										
		ABPC	CER	CP	KM	TC	SM	OFLX	ST	FOM	NA	CL
池 之 端	10	S	・	S	S	S	S	・	・	・	S	S
池之端関連河川	1	S	・	S	S	S	S	・	・	・	S	S
館山(千葉県)	7	S	R	S	S	S	・	S	S	R	S	・
館山(神奈川県)	6	S	R	S	S	S	・	S	S	R	S	・
館山関連河川O	1	S	R	S	S	S	・	S	S	R	S	・
館山関連河川H	1	S	R	S	S	S	・	S	S	R	S	・

・=実施せず

図2 (primer A P42) は館山保健所管内集団コレラの千葉県内患者由来5株と河川由来2株の結果である。ヒト由来株は同一パターンであったが、防疫対策の一環として行った河川調査で分離された河川由来株はヒト由来株とは異なる型であった。また、図3 (primer A P46) に示すように他の散発例由来株とも明らかに異なった。

primer A P42を用いた場合の神奈川県分離株の結果を図4に示すが、千葉県の患者分離株と同一パターンを示す結果であった。primer A P40およびA P46も同様な結果であった。(図は示してない)。

4) PFGE解析

PEGE法による染色体DNAの解析は館山保健所管内集団コレラ由来株について行った。その結果を図5に示す。図は千葉県

分離3株と神奈川県分離4株の結果であるが、いずれも同一のパターンを示す株であった。

5. 考 察

以前から細菌感染症の疫学マーカーとして生化学性状、血清型、ファージ型、毒素産生性、毒素型、薬剤感受性あるいはプラスミドプロファイル等が用いられてきたが、分析しようとする菌によっては、菌株間の差異が少なく十分な疫学調査結果が得られないことも多い。コレラ菌もこれらのマーカーだけでは菌株間の違いが余り明確ではない菌の一つである。

昭和50年代以降、千葉県で発生した2つのコレラ集団事例のうち、池之端コレラはリジン脱炭酸試験が陰性というコレラ菌には

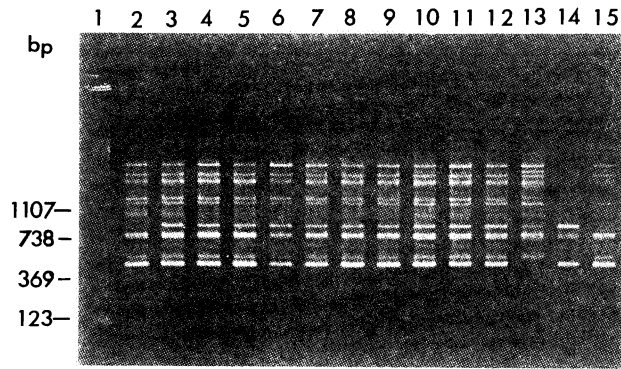


図1 池之端コレラ由来株のRAPDパターン
(primer AP40)
 レーン1 : 123bpラダー
 レーン2 : 569B
 レーン3-12 : 池之端コレラ由来株
 レーン13 : CVC12
 レーン14 : CVC13
 レーン15 : CVC15

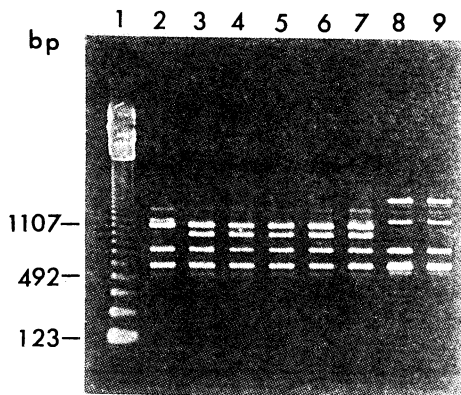


図2 館山保健所管内コレラ由来株のRAPDパターン
(primer AP42)
 レーン1 : 123bpラダー
 レーン2 : 569B
 レーン3-7 : 館山コレラヒト由来株 (千葉県分離)
 レーン8-9 : 館山コレラ河川由来株

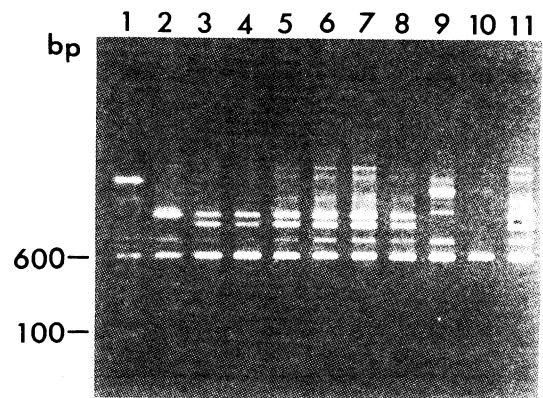


図4 館山保健所管内コレラ由来株のRAPDパターン
(primer AP42)
 レーン1 : 100bpラダー
 レーン2 : 569B
 レーン3-8 : 館山コレラ由来株 (神奈川県分離)
 レーン9-10 : 館山コレラ河川由来株
 レーン11 : 館山コレラ由来株 (千葉県分離)

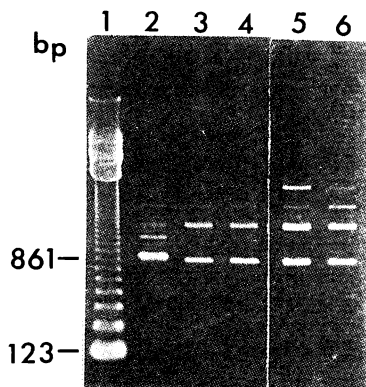


図3 館山保健所管内コレラ由来株のRAPDパターン
(primer AP46)
 レーン1 : 123bpラダー
 レーン2 : 569B
 レーン3-4 : 館山コレラ由来株 (千葉県分離)
 レーン5 : CVC92001
 レーン6 : CVC92002

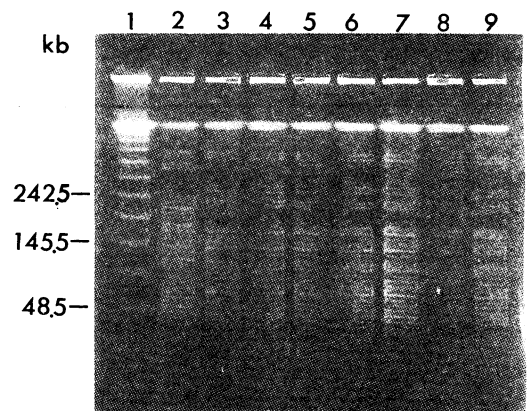


図5 館山保健所管内コレラ由来株のPFGEパターン
 レーン1 : Lambdaラダー
 レーン2 : 569B
 レーン3-5 : 館山コレラ由来株 (千葉県分離)
 レーン6-9 : 館山コレラ由来 (神奈川県分離)

非常に稀な性状を示した^{8),9)}ため、この事が疫学的な指標として非常に有用であった。

一方、館山保健所管内で発生した集団コレラは、患者が複数の民宿に宿泊したグループから別々に発生していたこと、これらの患者とは全く別に千葉県および神奈川県で散発的に患者が発生している事例があったことから、菌株の共通性と患者の喫食した食品の共通性を調査した。共通食品として自宅で発症した千葉県内の患者1名を除き、横浜市の水産加工業者が出荷したアオヤギを喫食していたという調査結果が出された（横浜市の調査ではその水産加工業者からコレラ菌は検出されなかった¹⁰⁾）。食品に共通性があったことから、次に患者から分離されたコレラ菌について生化学性状、血清型、ファージ型、毒素産生性、薬剤感受性等を調査した。その結果、これらの性状は菌株間で違いがみられず、感染源が同一であろうと推定されたが、他の散発例から分離された菌株でも同様な性状を持つ菌が認められたため、より詳細な検討が必要となった。

Kaper¹¹⁾はコレラ染色体DNAの制限酵素切断パターン等がコレラ菌の比較に有用であることを報告し、森ら¹²⁾はその方法を名古屋市で発生したコレラ集団例に応用している。我々も制限酵素Hind IIIによるコレラ菌の染色体DNAの切断パターンについて検討したが、明確な結論が出せる結果を得るには至らなかった。（結果未公表）

そこで、最近その有用性が報告されているRAPD法およびPFGE法を集団コレラ由来の菌株に用いて、菌株の共通性を調べた。池之端コレラの場合、原因となったコレラ菌はリジン脱炭酸反応が陰性という性状であったため、この性状から原因が同一菌株によるものと推定されていた。今回コレラ菌に特有の増幅パターンが得られると報告⁷⁾されている3種類のprimerを用いてRAPD法を行ったところ、ヒト由来の10株は同一のRAPDパターンを示し、同一菌による発生であることがより明確となった。

館山保健所管内の集団コレラについては、RAPD法に加えてPFGE法による比較も行った。その結果、民宿およびペンション由来株、千葉県内で散発的に発生した患者由来株さらに神奈川県内で散発的に発生した患者由来株のRAPDパターンとPFGEパターンには差がみられず、本集団コレラは同一菌による感染であったことが示唆された。また、他の散発患者由来株や環境由来株のRAPDパターンとは明らかに異なることを確認することが可能であった。

以上のように、コレラ菌のような生物学的な性状だけでは菌株間に十分な違いが見出せないような菌に対して、PAPD法とPFGE法はそれぞれコストや迅速性に長所短所があるものの、非常に有用な疫学的な指標となるものと考えられた。

6. まとめ

疫学の指標としてその有用性が報告されているRAPD法およびPFGE法を集団コレラ由来の菌株に用いて、菌株の共通性を調べた。

その結果、池之端コレラはRAPDパターンが、また、館山保健所管内の集団コレラはRAPDパターンとPFGEパターンが同一であり、2つの集団コレラはそれぞれ同一菌による感染であっ

たことが示唆された。

コレラ菌のように生物学的な性状だけでは菌株間に十分な違いが見出せないような菌に対して、PAPD法とPFGE法はコストや迅速性に長所短所があるものの、非常に有用な疫学的な指標となった。

謝辞 稿を終えるに当り、菌株を分与して下さった元神奈川県衛生研究所滝沢金次郎先生、ならびにRAPD法についてご指導いただいた埼玉県衛生研究所倉園貴至先生に深謝申し上げます。

7. 文 献

- 1) DANIEL N. CAMERON, FARUKH M. KHAMBATY, I. KAYE WACHSMUTH, ROBERT V. TAUXE, AND TIMOTHY J. BARRETT (1994): Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, *J. Clin. Microbiol.*, 32: 1685-1690
- 2) HIRISTO NAJDENSKY, ISABELLE ITEMAN, AND ELISABETH CARNIEL (1994): Efficient subtyping of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, *J. Clin. Microbiol.*, 32: 2913-2920
- 3) 刑部陽宅, 細呂木志保, 島田俊雄 (1995): *Vibrio cholerae* O139 に関する分子疫学的検討, *感染症誌*, 69: 501-505
- 4) UDO KRAUSE, FIONA M. THOMSON-CARTER, AND T. HUGH PENNINGTON (1996): Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157: H7 by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing, *J. Clin. Microbiol.*, 34: 959-961
- 5) NATALIA AKOPYANZ, NICKOLAI O. BUKANOV, T. ULF WESTBLOM, STEPHEN KRESOVICH AND DOUGLAS E. BERG (1992): DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected PCR-based RAPD fingerprinting, *Nuc. Acids Res.*, 20: 5137-5142
- 6) SOU-ICHI MAKINO, YUMIKO OKADA, TSUTOMU MARUYAMA, SEIJI KANEKO, AND CHIHIRO SASAKAWA (1994): PCR-based Random Amplified Polymorphic DNA fingerprinting of *Yersinia pseudotuberculosis* and its practical applications, *J. Clin. Microbiol.*, 32: 65-69
- 7) 牧野壮一 (1995): RAPD-DNAフィンガープリンティング法—その原理と細菌学への応用—, *モダンメディア*, 41: 16-24
- 8) 千葉県衛生部: 船橋市八木ヶ谷に発生したコレラ防疫について, 1979
- 9) 千葉県衛生部: 昭和53年千葉県に発生したコレラ—池之端文化センターに係わるコレラ防疫について—, 1979
- 10) 武藤哲典, 山田三紀子, 北爪晴恵, 鈴木正弘, 荒井一二 (1992): 1991年に千葉県を中心としたコレラ患者発生時の細菌学的関連調査, *横浜衛研年報*, 31: 125-130

- 11) 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
- 12) 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
- 13) 満田年宏, 荒井一二, 川本進, 横田俊平 (1995): パルスフィールドゲル電気泳動法による感染症の分子疫学的解析, 日細菌誌, 50: 1077-1086
- 14) JAMES B. KAPER, HENRY B. BRADFORD, NELL C. ROBERTS, AND STANLEY FALKOW (1982): Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* in U.S. Gulf Coast, J. Clin. Microbiol., 16: 129-134
- 15) 森正司, 安形則雄, 村瀬嘉孝, 太田美智男 (1991) 1989年に名古屋市で発生したコレラ集団事例とコレラ散発事例により分離されたコレラ菌の分子疫学的解析, 感染症誌, 65: 833-837