

# コレラ菌検査・診断マニュアル

平成 27 年 9 月 1 日

## 目次

- I. コレラ菌の概説
- II. コレラ菌検査に関する一般的注意
  - 1. 検査材料の採取及び輸送
  - 2. 検査の判定及び診断基準
- III. 検査方法
  - 1. 病原体分離
    - a. 分離培地、増菌培地及び性状確認培地
      - ① 分離培地
      - ② 増菌培地
      - ③ 性状確認培地
    - b. 検査材料及び検査方法
      - ① 糞便の検査方法
      - ② 食品の検査方法
      - ③ 水や汚泥などの検査方法
    - c. 同定法
      - ① 分離培地上の集落の特徴
      - ② 生化学的性状
      - ③ 血清型別
      - ④ 生物型別
      - ⑤ 毒素産生試験
      - ⑥ 遺伝子検査法
  - 2. 疫学マーカー
  - 3. 菌株の保存方法
- IV. 参考文献
- V. 執筆者一覧

## I. コレラ菌の概説

コレラは *Vibrio cholerae* O1 及び O139 のコレラ毒素 (CT) 産生株で汚染された水や食物を原因とする経口感染症で、激しい水溶性の下痢を主症状とする。

古くからインド東部のガンジス河デルタ地帯の風土病であったコレラは、西欧との通商が盛んになった 19 世紀初めから世界各地に広まったと考えられており、1817 年から 1923 年までに 6 回の世界的な流行を繰り返した。第 6 次までの世界流行の原因菌は古典 (クラシカルまたはアジア) 型であったが、1961 年頃からインドネシアのセレベス島 (現在のスラワン島) で発生したエルトール型により第 7 次流行が起こった。1991 年に、これまでコレラの発生がなかった南米大陸のペルーで大流行が起こり、近隣の中南米諸国にも拡大し、WHO の統計では 1990 年の世界のコレラ患者数は約 7 万人であったものが、1991 年には約 59 万人と急増した。1992 年 10 月には、インド東南部マドラスで新型コレラ菌による下痢患者が多発し、瞬く間に近隣の都市に拡大して多数が死亡した。1993 年にはインド全土に広がり、バングラデシュ、パキスタン、スリランカ、ネパール、中国、タイ、マレーシアでも多数の患者発生があった。この *V. cholerae* は、このときまでに明らかになっていた *V. cholerae* の 138 種類のいずれの O 抗原とも異なり、また最初の分離がベンガル湾沿いであったことから *V. cholerae* O139 Bengal (ベンガル型コレラ菌) と名付けられた。本菌は CT を産生し、O1 コレラ菌と同様に激しい下痢を引き起こすことから、WHO では当該菌による疾病をコレラと認定した。

*V. cholerae* は O 抗原の違いにより現在 210 種類の血清型に分けられている。このうち、「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 CT 産生性の血清型 O1 と O139 コレラ菌であり、適切な病原体管理が求められる特定四種病原体に位置づけられている。O1 コレラ菌はさらに抗原構造の違いにより、稲葉型、小川型、彦島型の 3 つに、また、生物型の違いにより古典型とエルトール型に分けられる。一方、血清型 O1、O139 に凝集しないものは *V. cholerae* non-O1、non-O139 (ナグビブリオ) と呼ばれ、食品媒介による感染症とみ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 を産生しない血清型 O1 および O139 コレラ菌については、ナグビブリオと同様に食中

毒もしくは下痢症の原因菌として扱われる。したがって三類感染症か否かを判断するためには、分離された *V. cholerae* の血清型並びに CT 産生もしくは CT 遺伝子の有無を迅速に確認することが重要である。

なお、コレラ菌の同定は「コレラ防疫対策実施について」(昭和 53 年衛発第 701 号)、「コレラ菌検査の手引き」(昭和 63 年健医感発第 62 号) および「コレラエンテロトキシン非産生性コレラ菌の取り扱い等について」(昭和 63 年健医発第 1133 号、衛第 231 号) の通知に基づき、患者又は無症状病原体保有者としての決定は地方衛生研究所の検査によって行うこととなっている。

コレラ菌の病原因子としてコレラ毒素 (CT)、タイトジャンクション弛緩毒素 (ZOT)、副毒素 (ACE) などの外毒素が知られているが、その他にエルトール型ではヘモリシン (溶血毒)、耐熱性エンテロトキシン (毒素原性大腸菌の ST と相同性を持つ) が知られている。コレラ毒素は腸管上皮細胞内に取り込まれ、A サブユニットの ADP リボシル活性化によって細胞内のアデニル酸シクラーゼを不可逆的に活性化させる。その結果、細胞内 cAMP 濃度が増大し細胞チャンネルの障害が起こり、Na<sup>+</sup>吸収阻害、Cl<sup>-</sup>分泌に伴う細胞外への水分移動により大量の水様便が生じる。

潜伏期間は通常 1 日から 5 日 (平均 3 日以内) で、症状は激しい水様性下痢と嘔吐である。軽症の場合は軟便で便の量は 1 日 1 リットル以下であるが、重症では米のとぎ汁様の水様便を 1 日に 10 リットル排出し、体内から大量の水分とカリウムが失われ、低カリウム血症となり脱水症状が現れ、アシドーシスや腎不全が見られることもある。年少者あるいは老人での脱水症状は致命的ともなるので注意が必要である。

健常人による経口摂取の場合、感染菌量は 10<sup>10</sup> 個といわれている。一方、何らかの胃疾患があり制酸剤を服用している場合、胃酸分泌が少ないあるいは無酸症の場合、胃切除患者の場合などは感染リスクが高いとされている。

世界全体としては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、WHO では、毎年およそ 300~500 万人の患者が発生し、10~12 万人が死亡していると試算している。しかし、WHO に報告されたコレラの患者数は 2004 年から 2013 年の間、101,383 人から 129,064 人で推移している (表 1)。2011 年をピークとする流行は、2010 年に発生したハイチ大地震による生活環境悪化によるものである。一方わが国の発生状況は、感染症法施行後の 2000 年以降、2004 年の 79 例をピークに 2010 年は 11

例、2011年には12例と減少傾向にある（表2）。報告の半数以上が輸入感染事例であり、2007年の検疫法改正により、コレラが検疫疾患でなくなったことが報告数の減少となっている。

治療には、水分および電解質の喪失を補給するための輸液が必要である。抗菌剤による治療は、下痢やコレラ菌の排菌期間を短縮するのに効果的である。第一選択薬としては、ニューキノロン系薬剤、テトラサイクリンやドキシサイクリンがある。もし、これらの薬剤に耐性の場合には、エリスロマイシン、トリメトプリム・スルファメトキサゾール合剤やノフロキサシンなどが有効である。小児でこれらの薬が使えない場合には、WHOはエリスロマイシンを推奨している。いずれにしても脱水症状の治療に成功すれば後遺症なく完治する。

## II. コレラ菌検査に関する一般的注意

### 1. 検査材料の採取及び輸送

検査材料は糞便、食品、水や汚泥などである。

ヒト由来の検体は原則として糞便である。採取は抗菌剤投与前の自然排出便がよい。吐物は糞便に比べ検査材料としての価値は低い。採取後直ちに検査に供することが望ましいが、培養までに時間を要する場合には Cary-Blair 培地等の輸送培地に入れ、室温で保管する。

食品材料は各々100g以上ずつを滅菌容器（蓋付き広口瓶あるいはサンプルパック）に採取し、漏出や破損がないよう細心の注意を払い、速やかに検査機関へ搬入する。直ちに搬入できない場合は、採取材料を低温保存し、乾燥防止にも配慮する。

水や汚泥などの検査材料の採取にあたっては、器具類は良く洗浄（または滅菌もしくは熱湯消毒）したものを使用する。同一器具を繰り返し使用する場合は採水のつど、検水等で共洗いをする。

水は1L以上を滅菌容器（蓋付き）に採取する。

水底泥は100mL以上を採泥器あるいは柄杓を用い、滅菌容器（蓋付き）に採取する。

### 2. 検査の判定及び診断基準

感染症法におけるコレラ患者発生報告のための基準は以下を参照のこと。

○診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、以下の方法によって病原体診断がなされたもの。

(材料) 便など

*V. cholerae* O1 または *V. cholerae* O139 を分離・同定し、かつ、コレラ毒素産生性あるいはコレラ毒素遺伝子 *ctx* の保有が確認された場合とする。抗菌剤の服薬中止後 48 時間以上経過した後に 24 時間以上の間隔を置いた連続 2 回の糞便検査によって、いずれも菌が検出されなければ、菌陰性とみなす。なお、無症状の病原体保有者であっても届出の対象となる。

### III. 検査方法

#### 1. 病原体分離

##### a. 分離培地、増菌培地及び性状確認培地

###### ① 分離培地

糖の分解により判定する培地：TCBS、ビブリオ寒天、PMT 培地など

- TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose) 寒天培地 (栄研化学、日水製薬、極東製薬、BD、MERCK、関東化学など)
- ビブリオ寒天培地 (栄研化学、日水製薬など)
- PMT寒天培地 (日水製薬) : 加温溶解後、約60°Cに冷却した基礎培地1Lあたりに0.1%亜テルル酸カリウム水溶液1.0mLを加えて混和。

糖の分解によらずコレラ菌と判定する培地 (関東化学、日水製薬、シスメックス・バイオメリューなど) : クロモアガービブリオなど

###### ② 増菌培地

- アルカリペプトン水 : 栄研化学、日水製薬など
- 無塩アルカリペプトン水
- Monsur のペプトン水 (タウロコール酸-テルライトペプトン水:TTPW)

###### ③ 性状確認培地

- NaCl 加普通寒天培地 (栄研化学、日水製薬など) : 最終 NaCl 濃度が 1~2%になるように NaCl を加える。
- NaCl 加 TSI (Triple Sugar Iron) 寒天培地 (栄研化学、日水製薬、BD、関東化学、MERCK など) : 最終 NaCl 濃度が 1~2%になるように NaCl を加え、高層斜面培地として使用。
- NaCl 加 LIM (Lysin Indole Motility) 培地 (栄研化学、日水製薬など) : 最終 NaCl 濃度が 1~2%になるように NaCl を加え、高層培地として使用。

- NaCl 加 VP (Voges Proskauer) 半流動培地 (栄研化学、日水製薬など) : 最終 NaCl 濃度が 1~2% になるように NaCl を加え、高層培地として使用。
- 耐塩性 (salt tolerance) 試験培地 : Nutrient Broth (BD、MERCK など) : 肉エキス 0.3%、ペプトン 0.5%) に NaCl をそれぞれ、無添加 (0%)、3%、6%、8%、10% の割合で加える。本試験に際して接種する菌は NaCl 加普通寒天培地に発育した純培養菌を用い、接種菌量は希釈により濁りが目に見えない程度の少菌量を接種すること。

## b. 検査材料及び検査方法

### ① 糞便の検査方法 (図 1)

急性期の患者下痢便では、TCBS 寒天培地およびビブリオ寒天培地の分離培地に直接塗抹し、35~37°C 16~20 時間培養する。あるいは一部をアルカリ性ペプトン水 (APW) で 14~18 時間の一次増菌を行い、翌日、培地表層部の 1 白金耳を選択分離平板に塗抹する。さらに入念な検査のためには、APW の一次増菌 6~8 時間培養液の表層部の約 0.5~1 mL を APW または Monsur のペプトン水に継代し、35~37°C 6~15 時間の二次増菌培養を行う。二次増菌培地に Monsur のペプトン水を用いた場合は、12 時間以上培養することが望ましい。

TCBS 寒天培地は強い選択性を持つこと、*V. cholerae* の中には胆汁酸塩の入った高アルカリ性培地に発育不良な株も存在することから、検査に当たっては選択培地と弱選択培地 (クロモアガービブリオなど) を併用することが望ましい。

Cary-Blair の輸送培地に入れた綿棒材料は、滅菌生理食塩水または APW 0.5~1mL 中で十分に糞便を絞り出し、分離培養に供することが望ましい。

### ② 食品検査 (図 2、3)

参考となる食品の検査法としては、「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 号厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知) や食品衛生検査指針 微生物編 2015 などがある。

各種の食品は、滅菌容器の中で細切し検体に対し 10 倍量になるように APW を加え、35~37°C 16~20 時間培養した後 (一次増菌)、TCBS 寒天培地またはビブリオ寒天培地、クロモアガービブリオ寒天培地などの分離培地に塗抹する。同時に、その表層部の約 0.5~1mL を他のビブリオの増殖を抑制するため無塩アルカリペプトン水または Monsur のペプトン水で二次増菌し、同様に分離培養を行う。

*V. cholerae* は塩濃度依存性が低く、NaCl 無添加の培地にも増殖可能である。そこで、できるだけ NaCl の濃度を抑え、*V. cholerae* 以外の好塩菌の増殖を抑制することを目的としたアルカリペプトン水を一次増菌、2 次増菌として用い、短い培養時間での植え継ぎなど選択増菌への工夫がなされている (図 3)。

### ③ 水、汚泥など

濾過が容易なものは 0.45 $\mu$ m 以下のポアサイズのメンブランフィルターでそのものを増菌培地に入れ培養を行う。濾過が困難な場合には、等量の 2 倍濃度の増菌培地を直接検体に加え、よく混合して増菌培養を行った後、TCBS 寒天培地やビブリオ寒天培地、クロモアガービブリオなどの分離培地に塗抹する。

## c. 同定法

### ① 分離培地上の集落の特徴

*V. cholerae* は白糖を利用するので TCBS 寒天培地上では 1~2mm 程度の比較的大きい平坦な黄色い集落を、またビブリオ寒天培地上では青みがかった半透明の集落を形成する。TCBS 寒天培地上の集落は粘稠性を帯び、特にビブリオ寒天培地上の菌苔は白金耳でかき取り難く、またスライド凝集テストも行い難い。PMT 寒天培地上では TCBS 寒天培地上の集落よりやや大きいマンノース発酵性の中心部褐色の黄色い集落を形成する。その集落は TCBS 寒天培地やビブリオ寒天培地上の集落とは異なり粘稠性がなく抗血清に凝集しやすい。クロモアガービブリオ寒天培地上では、TCBS 寒天培地上の集落よりやや大きい薄い青色の集落を形成する。酵素基質培地では集落のみが発色するため、培地の pH の変化で見る培地に比べ、培養後 2~3 日経過しても判別が可能である。

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 (この時点では未確定)、同定検査・毒素検出を実施する。

### ② 生化学的性状

疑わしい集落を NaCl 加普通寒天培地などの非選択培地に画線し、35~37 $^{\circ}$ C 4~6 時間培養後、TSI を用いブドウ糖発酵試験及び乳糖又は白糖発酵試験、LIM を用い運動性試験・リジン脱炭酸試験・インドール産生性、耐塩性培地での発育試験、VP 試験、オキシダーゼ試験の各生化学性状試験を実施し、当該菌株が *V. cholerae* の性状を示すことを確認する。*V. cholerae* と類似菌の鑑別を表 3 に示す (以下、+ : 陽性、- : 陰性、d : 菌株により異なる)。



- NaCl 加 TSI 寒天培地

斜面：白糖を分解するので黄色を呈する。上方が赤変する菌株もある。

高層：ブドウ糖を分解し黄色を呈するが、ガス（－）、硫化水素産生（－）

- NaCl 加 LIM 培地

リジン：高層部まで紫色になる。（＋）

運動性：高層部全体が混濁する。（＋）

インドール：インドール試薬を重層すると数分以内に試薬部分が赤色になる。（＋）

- NaCl 加 VP 半流動培地

A 液（6% α-ナフトールアルコール液）を約 3 滴、B 液（クレアチン加 40% 水酸化カリウム水溶液）約 2 滴を加えると、滴下層が赤色ないし深紅色となる。VP 反応陽性菌の多くは試薬添加後、15 分ぐらいで明瞭な呈色を示すが、最終判定は室温に 1 時間放置した後に行う。（古典型（d）、エルトール型（＋）、O139（＋））

- チトクローム・オキシダーゼ試験

NaCl 加普通寒天培地に発育した菌を用い、チトクローム・オキシダーゼ試験用紙にて、常法により判定する。30 秒以内に青色に着色される。（＋）

- 耐塩性（salt tolerance）試験培地

無塩（0%）・・・・・・・・・・発育（＋）

3%NaCl ・・・・・・・・・・発育（＋）

6%NaCl ・・・・・・・・・・発育（d）

8%NaCl ・・・・・・・・・・発育（－）

10%NaCl ・・・・・・・・・・発育（－）

### ③ 血清型別

血清型 O1 についてはコレラ菌抗原因子に対するモノクロナー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（\*1）とコレラ菌免疫血清「生研」セット（\*2）が、血清型 O139 についてはビブリオコレラ免疫血清 O139 "Bengal"（\*2）が市販されている。

血清型 O1 コレラ菌の O 抗原は 3 種類の部分抗原（A、B、C）からなり、それらの量的な相違により、小川型（AB(C)）、稲葉型（AC）、および彦島型（ABC）に分けられるが、彦島型は小川型に統合されることが多い。B 因子は小川型の特異因子である。稲葉型菌株は O 抗原合成遺伝子の変異により小川型菌株から解離するが、

その逆の小川型菌株から稲葉型菌株への変異はない。血清反応は、それぞれの型に明らかに凝集が見られたものを陽性と判定する。

分離菌株が *V. cholerae* の典型的な生化学的性状を示すにもかかわらず、生菌で当該抗血清に凝集が認められない場合は、加熱菌（加熱時間、温度は添付マニュアルを参考にすること）を用い再び凝集反応を試みる。

血清型 O1 および O139 以外の O 群型別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。

#### 《市販診断用血清》

- \*1 コレラ菌感作ラテックス試薬：コレラ菌感作ラテックスキット（デンカ生研）
- \*2 コレラ菌抗血清：コレラ菌免疫血清 混合、稲葉型、小川型（デンカ生研）、  
ビブリオコレラ免疫血清 O139 "Bengal"

#### ④ 生物型（表 4）

血清型 O1 コレラ菌には古典型とエルトール型の 2 つの生物型が知られている。血清型 O1 コレラ菌が検出された場合には迅速性が要求されるので、実際にはニワトリ赤血球の凝集性と VP 反応で決定することが多い。わが国で検出されるものは大部分エルトール型である。両型の性状には、例外を示すものや弱いものがある。古典型とエルトール型の遺伝子レベルでの差異を利用した PCR を用いて、両生物型を峻別する方法もいくつか開発されており、迅速性、簡便性、確実性においても有効な手法である。

#### ⑤ 毒素産生試験

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 VET-RPLA「生研」（デンカ生研）が市販されている。この方法は、CT を産生させるために培養が必要で迅速性に欠け、免疫反応による非特異的反応もときには認められることに注意が必要である（特に non-O1、non-O139 株ではみられやすい）。また、使用する培地や培養条件によっては CT 産生性が悪い場合があること、さらに免疫学的に類似の大腸菌易熱性エンテロトキシン（LT）にも反応し、菌株からの試験でない場合には注意が必要である。

#### ⑥ 遺伝子検査法

遺伝学的な方法では PCR 法が簡便、迅速で特異性が高い。しかし PCR 法では CT 遺伝子の存在が証明されるのであって、その菌株が培養によって毒素を産生する

かどうか、生きた菌が存在するかは不明である。また、PCR法は非常に感度の高い方法であり、また酵素反応でもあることから、反応試薬へのコンタミネーションや反応阻害物質の混入による擬陽性や擬陰性を排除するため、必ず陽性と陰性の対象菌株を同時に試験しておく必要がある。

### ⑥-1 *V. cholerae* の確認

選択分離培地上に発育したコロニーに対して、*V. cholerae* と類似した菌との鑑別や耐塩性 (salt tolerance) 試験の判断に迷うような場合において PCR 法による確認試験は有用である。すなわち、*V. cholerae* であるか否か、三類感染症対象となるか否かなど、行政上、大いに役立つものである。この PCR の標的遺伝子 *atpA* は、housekeeping 遺伝子の一つで ATP 合成酵素の A サブユニットをコードしている。*V. cholerae* に特異的で、他のビブリオ属菌とは異なっている配列をプライマーとして設計している。

#### (1) テンプレート DNA の作成

- NaCl 加普通寒天培地に発育した純培養菌を少量、滅菌水 50 $\mu$ L に懸濁する。
- 100 $^{\circ}$ C 10 分加熱し、12,000 回転 5 分遠心した上清をテンプレート DNA として使用する。(精製 DNA を用いても可)

#### (2) PCR プライマー

プライマー	標的遺伝子	塩基配列 (5'-3')	増幅される断片のサイズ(bp)
VCatpA-F VCatpA-R	<i>vcatpA</i>	AATGGGTCCATACGCGGAT TGGTGAAGTYTGTTTTGCACC	160bp

#### (3) PCR 反応液の調製

	$\mu$ L	最終濃度
10 倍濃度添付バッファー	5.0	0.3 $\mu$ mol / L
dNTP 混合液 (各 2.5mM を含む)	4.0	
VCatpA-F (20 $\mu$ M)	0.75	
VCatpA-R (20 $\mu$ M)	0.75	
テンプレート DNA 溶液	5.0	
滅菌精製水	34.2	
耐熱性 DNA ポリメラーゼ (5U/ $\mu$ L)	0.3	

計	50	
---	----	--

(4) PCR の条件

予加熱	95℃, 2分	} 30 サイクル
熱変性	95℃, 20秒	
アニーリング	65℃, 20秒	
伸長反応	68℃, 1分	

(5) 電気泳動

通常のアガロース (2~4%) ゲル電気泳動で当該サイズの増幅産物を確認する。

⑥-2 O1、O139、CT の確認

コレラ菌関連遺伝子 (O1 特異遺伝子、O139 特異遺伝子、コレラ毒素遺伝子) の有無を確認する。

(1) テンプレートの作成は⑥-1 の (1) による。

(2) PCR プライマー

プライマー	標的遺伝子	塩基配列 (5'-3')	増幅される断片のサイズ(bp)
O1-up O1-down	O1	GTTTCACTGAACAGATGGG GGTCATCTGTAAGTACAAC	192bp
O139-up O139-down	O139	AGCCTCTTTATTACGGGTGG GTCAAACCCGATCGTAAAGG	449bp
CT-up CT-down	CT	ACAGAGTGAGTACTTTGACC ATACCATCCATATATTTGGGAG	308bp

(3) PCR 反応液の調製

	μL	最終濃度
10 倍濃度添付バッファー	3.0	
dNTP 混合液 (各 2.5mM を含む)	2.4	
O1-up (10μM)	1.5	0.5μmol / L
O1-down (10μM)	1.5	0.5μmol / L
O139-up (10μM)	0.8	0.27μmol / L
O139-down (10μM)	0.8	0.27μmol / L
CT-up (10μM)	0.5	0.17μmol / L
CT-down (10μM)	0.5	0.17μmol / L
テンプレート DNA 溶液	3.0	
滅菌精製水	15.85	
耐熱性 DNA ポリメラーゼ (5U/μL)	0.15	
計	30	

(4) PCR の条件

予加熱	94°C, 5 分	} 35 サイクル
熱変性	94°C, 1 分	
アニーリング	55°C, 1 分	
伸長反応	72°C, 1 分	
最終伸長	72°C, 7 分	

(5) 電気泳動

通常のアガロース (2~4%) ゲル電気泳動で当該サイズの増幅産物を確認する。

⑥-3 生物型の確認

コレラ菌の生物型を古典型、エルトール型のヘモリシン遺伝子(*hlyA*)配列の違いによって峻別できる。生化学的性状試験において、生物型の判断に迷うような場合において PCR 法による確認試験は有用である。

(1) テンプレートの作成は⑥-1 の (1) による。

## (2) PCR プライマー

プライマー	標的遺伝子	塩基配列 (5'-3')	増幅される断片のサイズ(bp)
489F	hlyA	GGCAAACAGCGAAACAAATACC	481bp(ET) 738/727bp(ET/CL)
744F		GAGCCGGCATTTCATCTGAAT	
1184R		CTCAGCGGGCTAATACGGTTTA	

## (3) PCR 反応液の調製

	$\mu\text{L}$	最終濃度
10 倍濃度添付バッファー	2.5	
dNTP 混合液 (各 2.5mM を含む)	0.5	
489F (20 $\mu\text{M}$ )	1.0	0.8 $\mu\text{mol} / \text{L}$
744F (20 $\mu\text{M}$ )	1.0	0.8 $\mu\text{mol} / \text{L}$
1184R (20 $\mu\text{M}$ )	1.0	0.8 $\mu\text{mol} / \text{L}$
テンプレート DNA 溶液	2.5	
滅菌精製水	16.375	
耐熱性 DNA ポリメラーゼ (5U/ $\mu\text{L}$ )	0.125	
計	25	

## (4) PCR の条件

予加熱	94°C, 2 分	} 30 サイクル
熱変性	94°C, 30 秒	
アニーリング	60°C, 1 分	
伸長反応	72°C, 1 分	
最終伸長	72°C, 10 分	

## (5) 電気泳動

通常のアガロース (2~4%) ゲル電気泳動で当該サイズの増幅産物を確認する。古典型では 727bp に一本の明瞭なバンドが見られ、エルツール型では 481bp と 738bp に 2 本のバンドが見られるが、738bp のバンドはやや薄く出る傾向がある。

## 《結果の解説》

確認試験において典型的な *V. cholerae* の生化学的性状を示し、抗血清凝集試験で O1 あるいは O139 抗血清に凝集、もしくは、PCR 法で O1 あるいは O139 の特異的遺伝子の保有が認められ、かつ、逆受身ラテックス凝集反応によるコレラ毒素の産生、もしくは、PCR 法で CT 遺伝子の保有が確認できた場合、コレラ菌陽性と判断する。

## 2. 疫学マーカー

エルトール型コレラ菌のファージ型別には Mukerjee の方法があるが、殆どの分離株は 4 型であり、疫学マーカーとしてあまり有用でない。現在、疫学マーカーとしてはパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による遺伝子解析が一般的に行われており、またリボタイピングも利用されている。

## 3. 菌株の保存方法

血清型 O1 や血清型 O139 コレラ菌を含むビブリオの保存には、1%NaCl 加酵母エキス・カジトン半流動培地による室温保存が汎用されている。しかし、保存中にプラスミドなどは脱落しやすいので、それらの保存を目的とする場合には、凍結保存（高圧滅菌した 10%スキムミルクに菌を濃厚に懸濁し、 $-80^{\circ}\text{C}$ あるいは液体窒素タンクでの凍結保存）が勧められる。

## IV. 参考文献

1. 津野正朗ら：厚生省監修、微生物検査必携、細菌・真菌検査 第3版、日本公衆衛生協会、D83-D97、1987
2. 渡邊治雄ほか編：食中毒予防必携 第2版、日本食品衛生協会、182-186、2007
3. 島田俊雄、荒川英二ら：仲西寿男、丸山 務監修、食品由来感染症と食品微生物、225、中央法規出版、2009
4. 北村治志：食品と微生物、2、57、1985
5. Hidemasa Izumiya *et al.* : Molecular and Cellular Probes, 25、174-176、2011
6. 大友良光：モダンメディア 食水系感染症病原体の検査法-13、57 (9)、273-276、

2011

7. 食品衛生検査指針 微生物編 2015、日本食品衛生協会、463-477、
8. 横山栄二ら：感染症学雑誌、79、5、307-313、2005
9. 倉園貴至：防菌防黴、38、401-408、2010

## V. 執筆者一覧

国立感染症研究所細菌第一部 荒川英二、森田昌知、泉谷秀昌、大西真

公益社団法人 大分県薬剤師会検査センター 緒方喜久代

富山県衛生研究所 磯部順子、佐多徹太郎

北海道立衛生研究所 森本洋

埼玉県衛生研究所 倉園貴至

大阪府立公衆衛生研究所 勢戸和子



表1 世界のコレラ患者数  
(WHO,2004-2013)

年	患者数	死亡者数
2004	101,383	2,345
2005	131,943	2,272
2006	236,896	6,311
2007	177,962	4,031
2008	190,130	5,143
2009	221,226	4,946
2010	317,534	7,543
2011	589,854	7,816
2012	245,393	3,034
2013	129,064	2,102

表2 わが国のコレラ発生状況

年	患者報告*				病原体報告			
	総数	国内	国外	国内	<i>V. cholerae</i> CT+報告数			
				国外	地研		検疫所	
				不明	国内**	国外		
2000	35	10	25	-	6	7	5	
2001	37	10	27	-	6	8	6	
2002	34	16	16	2	9	6	5	
2003	15	2	13	-	-	3	4	
2004	78	10	67	1	7	22	17	
2005	46	10	35	1	5	12	6	
2006	34	6	28	-	4	19	6	
2007	12	4	8	-	3	3	1	
2008	45	23	22	-	14	10	-	
2009	16	-	16	-	-	7	-	
2010	11	2	9	-	-	1	-	
2011	12	1	11	-	1	3	-	
2012	3	-	3	-	-	3	-	
2013	4	-	4	-	-	3	-	

\*患者&無症状病原体保有者(疑似症を除く) : *V. cholerae* O1&O139 CT+

\*\*国内/国外不明も含む。

患者報告は感染症発生動向調査(2015年7月8日現在報告数)

病原体報告は病原微生物検出情報(2015年7月8日現在報告数)

表3 *V. cholerae* と類似菌の鑑別

性状 菌種名	TSI 寒天 (高層部)			オキシダーゼ	インドール	NaCl 加ブロスでの 発育					リジン	TCBS 寒天で の発育	発酵	
	酸	ガス	硫化水素			0 %	3 %	6 %	8 %	10 %			マンニット	イノシット
<i>V. cholerae</i>	+	-	-	+	+	+	+	d	-	-	+	Y	+	-
<i>V. fluvialis</i>	+	-	-	+	d	-	+	+	d	-	-	Y	+	-
<i>V. furnissii</i>	+	+	-	+	d	-	+	+	d	-	-	Y	+	-
<i>V. alginolyticus</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	Y	+	-
<i>V. anguillarum</i>	+	-	-	+	d	-	+	d	d	-	d	Y/G	+	-
<i>Aeromonas</i>	+	d	-	+	d	+	+	-	-	-	d	-	+	-
<i>Plesiomonas</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
腸内細菌	+	d	d	-	d	+	+	d	d	d	d	-	d	d

表 4 *V. cholerae* O1 の生物型と *V. cholerae* O139 の性状

		溶血性 (ヒツジ)	ニワトリ 赤血球 凝集性	ポリミキシン B (50u) 感受性	VP 反応	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
O1	古典型	-	-a)	+	-b)	+	-
O1	エルトール型	+c)	+a)	-	+	-	+
O139		+a)	+	-	+	-	-

a) 例外がある。

b) 時に弱く陽性。

c) 検査方法により陰性の場合がある。

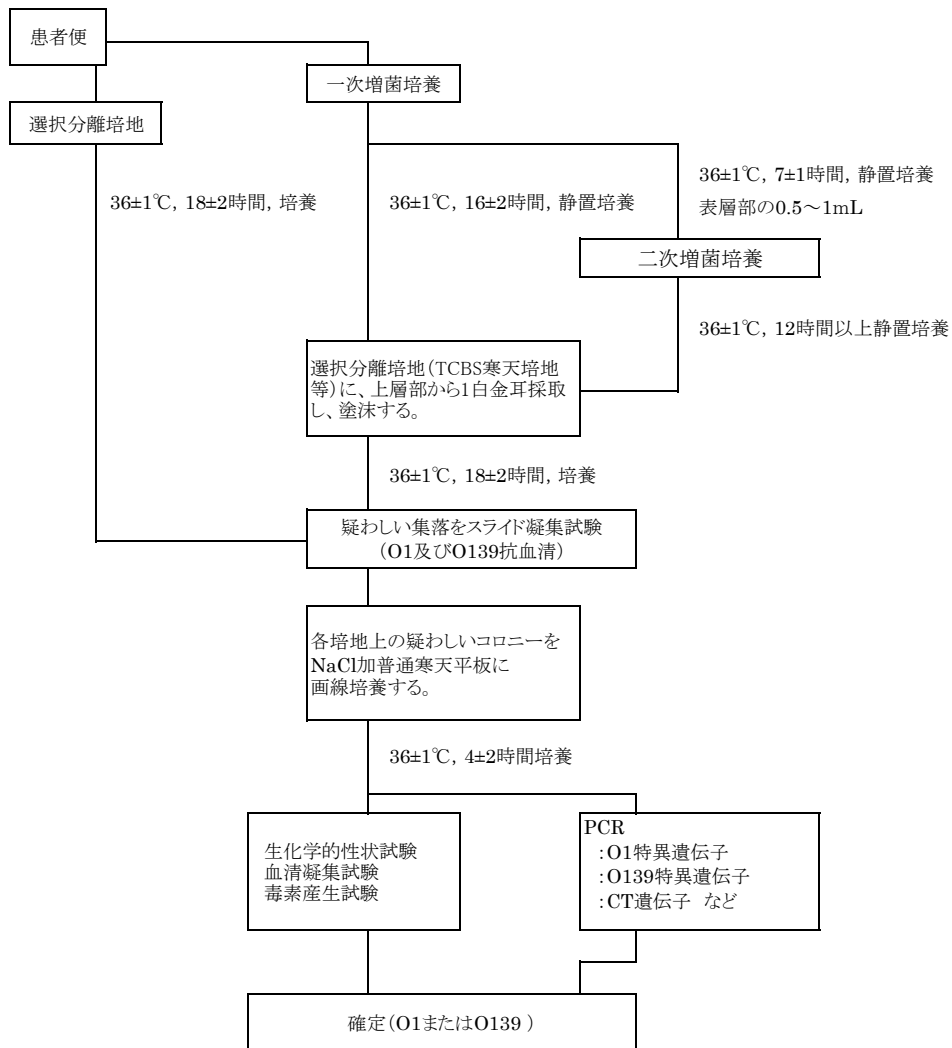


図1 便からのコレラ菌検査手順

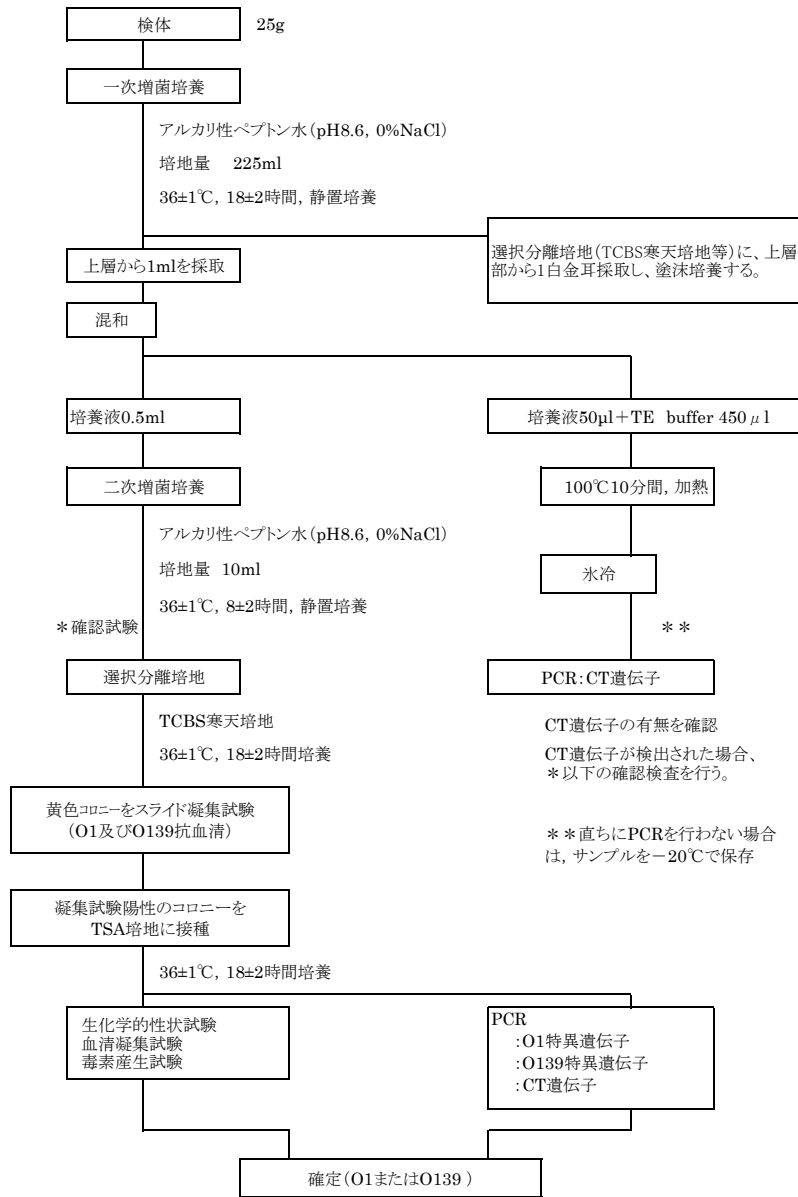


図2 食品からのコレラ菌検査手順

(「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)

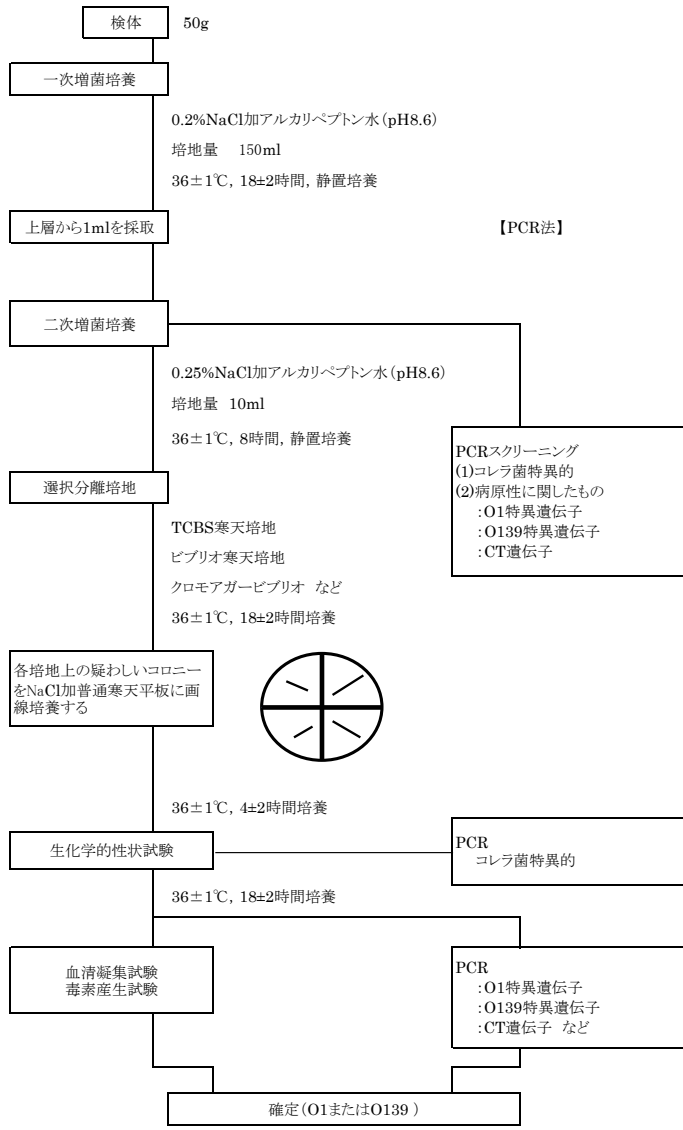


図3 変法 食品からのコレラ菌検査手順