

## *Vibrio cholerae*（三類感染症「コレラ」）の検査法

### 1. はじめに

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）において三類感染症に分類され、激しい水様性の下痢を主症状とする感染症である。コレラ菌（*Vibrio cholerae*）はO抗原の違いにより200種類以上の血清型に分けられるが、感染症法においてコレラの原因菌とされているのは、便から分離されたコレラ毒素産生性又はコレラ毒素遺伝子陽性の血清型 O1 又は O139 の *V. cholerae* である。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* の血清型及びコレラ毒素産生性又はコレラ毒素遺伝子の有無を迅速に確認することが重要となる。コレラは世界的に流行しているが、近年の日本では輸入感染症として発見されるのがほとんどである。そのため、全国の年間届出数は平成24年以降、10例を下回っており、愛知県においても届出が1例あるかないかである（表1）。患者の減少に伴い、地方衛生研究所においても *V. cholerae* の検査経験が減少している。今回、コレラ毒素遺伝子検査法及びコレラ毒素産生性試験についてまとめたので紹介する。

### 2. コレラ毒素遺伝子検査法

コレラ毒素は、Aサブユニット1つとBサブユニット5つからなっている。コレラ毒素遺伝子検査では、コレラ毒素Aサブユニット遺伝子（777bp）及びコレラ毒素Bサブユニット遺伝子（375bp）を標的としたPCR法が用いられており、簡便、迅速で特異性が高い。コレラ毒素遺伝子検査に汎用されるプライマーの例を表2に、プライマーの位置を図1に示した。表2に示したプライマーは全てコレラ毒素Aサブユニット遺伝子を標的としている。PCR法はコレラ毒素遺伝子の存在を証明するものであって、対象の菌株が必ずしも毒素を産生しているとは限らないことを理解しておく必要がある。

子（375bp）を標的としたPCR法が用いられており、簡便、迅速で特異性が高い。コレラ毒素遺伝子検査に汎用されるプライマーの例を表2に、プライマーの位置を図1に示した。表2に示したプライマーは全てコレラ毒素Aサブユニット遺伝子を標的としている。PCR法はコレラ毒素遺伝子の存在を証明するものであって、対象の菌株が必ずしも毒素を産生しているとは限らないことを理解しておく必要がある。

### 3. コレラ毒素産生性試験

コレラ毒素産生性を確認するキットとして、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ー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。コレラ毒素産生性は、コレラ毒素産生性試験用培地の組成や培養条

表1 三類感染症「コレラ」届出数

西暦	元号	全国	愛知
2011年	平成23年	12	1
2012年	平成24年	3	0
2013年	平成25年	4	0
2014年	平成26年	5	1
2015年	平成27年	7	0
2016年	平成28年	9	1
2017年	平成29年	7	1
2018年	平成30年	4	0
2019年	令和元年	5	1
2020年	令和2年	1	0
2021年	令和3年	0	0

表2 コレラ毒素遺伝子検出検査に使用されるプライマー

Primer 名	塩基配列 (5'-3')	PCR 産物 サイズ (bp)	アニーリング 温度	参考文献
CT-up	ACAGAGTGAGTACTTTGACC	308	55°C	参考文献 6
CT-down	ATACCATCCATATATTTGGGAG			
CT-1	TCAAACATATATTGTCTGGTC	380	50°C	参考文献 7
CT-2	CGCAAGTATTACTCATCGA			
コレラ毒素検出用 Primer Set VCT-1 & 2		304	55°C	TaKaRa 市販品

(..1568114)ATGGTAAAGATAATATTTGTGTTTTTATTTTCTTATCATCATTTCATATGCAAATGATGATAAGTTATATCGGGCAG  
**CT-up**  
 ATTCTAGACCTCCTGATGAAATAAAGCAGTCAGGTGGTCTTATGCCAAGAGG**ACAGAGTGAGTACTTTGACC**GAGGTAACAAT  
 GAATATCAACCTTTATGATCATGCAAGAGAACTCAGACGGGATTTGTTAGGCACGATGATGGATATGTTTCCACCTCAATTAGTT  
**CT-1**  
 TGAGAAGTGCCCACTTAGTGGG**TCAAACATATATTGTCTGGTC**ATTCTACTTATTATATATATGTTATAGCCACTGCACCCAACATG  
 TTTAACGTTAATGATGTATTAGGGGCATACAGTCCTCATCCAGATGAACAAGAAGTTTCTGCTTTAGGTGGGATTCCATA**CTCCCA**  
**CT-down**  
**AATATATGGATGGTAT**CGAGTTCATTTGGGGTGCTTGATGAACAATTACATCGTAATAGGGGCTACAGAGATAGATATTACAGT  
 AACTTAGATATTGCTCCAGCAGCAGATGGTTATGGATTGGCAGGTTTCCCTCCGGAGCATAGAGCTTGAGGGAAGAGCCGTGGA  
**CT-2**  
 TTCATCATGCACCGCCGGTTGTGGGAATGCTCCAAGATCA**TCGATGAGTAATACTTGCG**ATGAAAAACCCAAAGTCTAGGTGT  
 AAAATTCCTTGACGAATACCAATCTAAAGTTAAAAGACAAATATTTTCAGGCTATCAATCTGATATTGATACACATAATAGAATTAA  
 GGATGAATTATGA(1567338..)

図1 コレラ毒素遺伝子検出用プライマーの位置

同一色ハイライトはプライマーペアを示す（詳細は表2）。部分塩基配列（1568114～1567338）は NCBI：ACCESSION ID NC\_002505 から取得した。

件によって、その産生能が変わることが知られている。これは、*V. cholerae* が生物学的性状の違いにより古典型とエルトル型に分類されること、さらに古典型とエルトル型の間でコレラ毒素Bサブユニットの遺伝子配列（115番目及び203番目）にアミノ酸の違いを生じる1塩基多型が存在していることに起因していると考えられている。

コレラ毒素産生性試験に使用される培地の例を表3に示した。エルトル型の *V. cholerae* は VET-RPLA「生研」の添付文書に記載の Syncase 培地においてコレラ毒素産生能が低いとの報告もあるため、それ以外のコレラ毒素

産生性試験用培地についても知っておく必要がある。培養温度（30°C又は37°C）及び培養条件（静置又は振とう）によっても、コレラ毒素産生能が変化することにも留意しなければならない。

#### 4. 終わりに

国内におけるコレラ届出数の減少とともに、地方衛生研究所において *V. cholerae* の検査を経験したことの無い職員が増えている。平成27年に厚生労働科学研究費補助金 健康安全確保総合研究分野 健康安全・危機管理対策総合研究「地方衛生研究所における病原微生物検査の

表3 コレラ毒素産生性試験に使用される培地の組成

	Syncase 培地	CAYE 培地	AKI 培地
	g/L		
カザミノ酸	10	20	-
バクトペプトン	-	-	15
イーストエキス	-	6	4
NaCl	-	2.5	5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	-	-
NH <sub>4</sub> Cl	1.18	-	-
MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	0.042	0.005	-
FeCl <sub>3</sub> ・6H <sub>2</sub> O	0.005	0.005	-
白糖	5	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	8.71	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.089	-	-
MnCl <sub>2</sub> ・4H <sub>2</sub> O	0.004	-	-
MgSO <sub>4</sub>	-	0.005	-
NaHCO <sub>3</sub>	-	-	3*
pH	7.2	8.5	記載なし

\*濾過滅菌後、後から基礎培地と等量混合する

外部精度管理の導入と継続的実施のための事業体制の構築に関する研究（H26-健危-一般-001）」において実施されたアンケートでは、74施設 133名の検査担当者のうち、約3割にあたる42名が*V. cholerae*の検査経験がないと回答している。その後、COVID-19の流行により海外渡航が激減したことや、かつて*V. cholerae*の検査を経験したベテラン職員が退職したことにより、検査経験のない職員がさらに増えている可能性も考えられる。

*V. cholerae*の同定は「コレラ防疫対策実施について」（昭和53年8月11日付け衛発第701号）、「コレラ菌検査の手引き」（昭和63年9月28日付け健医感発第62号）及び「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9月28日付け健医発第1133号、衛検第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決定する検査を地方衛生研究所で実施することとなっている。コレラは特定の職業への就業によって集団発生を起こしうる感染症であり、*V. cholerae*の検査は依然として地方衛生研究所の重要な業務の一つである。そのため、厚生労働省外部

精度管理事業等を活用した*V. cholerae*の定期的な精度管理の実施が必要であると思われる。

## 5. 参考文献

- 1) 国立感染症研究所. コレラとは <https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanasahi/402-cholera-intro.html>
- 2) 国立感染症研究所. 発生動向調査年別一覧（全数把握）<https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/11649-ydata2021-1.html>
- 3) 厚生労働省. 感染症法に基づく医師及び獣医師の届出について、コレラ <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-03-01.html>
- 4) 愛知県衛生研究所. 感染症の発生状況 <https://www.pref.aichi.jp/eiseiken/kansentop.html>
- 5) IASR 現在のコレラ流行株について（Vol. 32 p.99: 2011年4月号）
- 6) 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル「コレラ菌検査・診断マニュアル 令和4年11月 第2版」
- 7) 小林一寛ほか. 遺伝子増幅法によるコレラ

- ラ毒素遺伝子の迅速診断法, 感染症学雑誌 64(10), 1323-1329 (1990)
- 8) Heidelberg, J.F., et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*, Nature 406 (6795), 477-483 (2000)
- 9) 松本昌門ほか. NTT 名古屋会館におけるコレラ集団発生由来株の毒素産生性について, 感染症学雑誌 65(7), 788-793 (1991)
- 10) 佐多徹太郎ほか. 厚生労働科学研究費補

助金 健康安全確保総合研究分野 健康安全・危機管理対策総合研究「地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的实施のための事業体制の構築に関する研究」(H26-健危-一般-001) 平成 27(2015)年度総括・研究分担報告書

(文責: 生物学部 細菌研究室)

---

愛知衛研技術情報 第47巻第1号 令和6年(2024)年 3 月 4 日

照会・連絡先 愛知県衛生研究所

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流7番6号

愛知県衛生研究所のウェブサイト【 <https://www.pref.aichi.jp/eiseiken/> 】

総務課:	052-910-5618	生物学部	052-910-5654
企画情報部		ウイルス研究室:	052-910-5674
健康科学情報室:	052-910-5619	細菌研究室:	052-910-5669
		医動物研究室:	052-910-5654
		衛生化学部	052-910-5638
		医薬食品研究室:	052-910-5639
		生活科学研究室:	052-910-5643

代表電話: 052-910-5618

代表 FAX: 052-913-3641

---