原 著

Vibrio cholerae serovar 6 によると思われる 集団下痢症について

長野県衛生公害研究所

村松 紘一 和田 正道 小林 正人

国立予防衛生研究所

島 田 俊 雄 坂 崎 利 一

(昭和55年 7 月 15 日 受付)

(昭和55年 10 月 14 日 受理)

Key words: Vibrio cholerae, NAG, Food-borne Infection, Diarrheal disease

要 旨

V. cholerae, NAG による下痢症は、わが国においては散発例に限られていたが、1978年 7 月長野県軽井沢町においてわが国では初めてと思われる集団下痢症が発生し、その原因食はサンミが推測された。患者数は18名で、その臨床症状は腹痛、水様下痢(1~6回)、発熱(37.1~37.8°C)を主徴とし、約半数に嘔吐、悪感もみられたが、コレラ様下痢というよりもむしろ急性胃腸炎であつた。分離菌株の生化学的性状はすべて *V. cholerae* の定義に一致した。マンノースは非発酵、血清型はすべてO6であつた。

分離株の腸管起病性について検討し、腸管ループテストでは生菌および培養濾液とも陽性反応が得られ、腸管起病性が示唆された。培養濾液の Y1 細胞に対する反応では供試株全株が CPE を示し、ある種の細胞毒の産生が示唆されたが、この反応はコレラ抗毒素では中和されなかつた。モルモット皮膚テストでは出血または出血を伴う青斑が認められたが、この反応もコレラ毒素で免疫したモルモットでも明らかに認められた。以上のことは分離株がコレラ毒素とは異なるある種の細胞毒を産生していることを示唆している。

近年、海外渡航歴に関係なく *V. cholerae* による下痢症が発生しているので、今後は散発例、集団事例を問わず、下痢症の日常検査には *V. cholerae* の検査を含める必要がある。

緒 言

NCV (Non-cholera vibrio) あるいは NAG (Non-agglutinable) ビブリオと呼ばれているコレラ菌以外の *Vibrio cholerae* は、おもにコレラ流行地において下痢症患者から単独に、あるいはコレラ菌 (*V. cholerae* O1) と共に分離される場合が多い。O1 以外の *V. cholerae* (以下 *V. cholerae*, NAG と呼

ぶ) が原因となつた下痢症については McIntyre et al. (1965)¹⁾ の東パキスタンにおけるコレラ類似患者19名からの分離例、Aldová et al. (1968)²⁾ のチェコスロバキアにおけるフレンチポテトを推定原因食とした胃腸炎の記載があり、また Zinnaka (1965)³⁾ および Kamal (1971)⁴⁾ はスーダンにおいて井戸水が原因とされた *V. cholerae*, NAG によるコレラ類似症の大流行例を報告している。一方、わが国における *V. cholerae*, NAG 下痢症は、以前は東南アジアおよびインドからの帰国者に限ら

別刷請求先: (〒 380) 長野市大字安茂里字米村
1978 長野県衛生公害研究所

村松 紘一

れていたが(坂井ら⁵⁾, 1978; 村松ら⁶⁾, 1979), 最近では海外渡航歴のまつたくない下痢患者からしばしば本菌が分離されるようになってきた。しかし, それらはいずれも散発例であつたのに対し, われわれは1978年, 長野県軽井沢町において, わが国では初めてと思われる *V. cholerae*, NAG による集団下痢症に遭遇し, その細菌学的および疫学的検討を加えたので報告する。

材料および方法

本事例発生の探知は1978年7月31日, 軽井沢町K病院から, 同町K荘宿泊客12名を食中毒の疑い患者として診察, 治療中との届出によつた。所轄保健所では, 原因として7月30日の夕食を疑い, 摂食状況, 発病時間および症状等の調査を行つた。検査材料は患者9名および従業員32名の糞便ならびに検食として冷蔵保存してあつた30日夕食(マグロのサシミ, 中華風酢物, マスのムニエル, ゆでそば, ローストチキン, カニコロッケ, スパゲッティ, 漬物)で, またK荘付近の河川水, 底泥を採取して, 病原菌検索を行つた。細菌検査はおもに微生物検査必携⁷⁾に準じ, 腸炎ビブリオ, 黄色ブドウ球菌, サルモネラ, 病原大腸菌, ウェルシュ菌, セレウス菌および *Yersinia enterocolitica* を対象として行つた。増菌培養にはEEM 培地, Hajna テトラチオン酸塩培地, TGC 培地および食塩ポリミキシンブイオンを用い, また分離培地には DHL 寒天, SS 寒天卵黄加マンニット食塩寒天, MLCB 寒天, ブリリアントグリーン寒天, 卵黄加 CW 寒天, TCBS 寒天, ビブリオ寒天および血液寒天を使用した。河川水および底泥は *V. cholerae* の検索のみを目的としてアルカリ性ペプトン水(pH 8.8)で一次増菌後, Monsur のペプトン水で二次増菌を行い, TCBS 寒天およびビブリオ寒天で分離を試みた。*V. cholerae* の生化学的性状のテストおよび血清型別は Sakazaki et al.^{8,9)}, Shimada & Sakazaki¹⁰⁾ に準じた。また, 抗生物質感受性テストは1濃度ディスク法(昭和)によつて行つた。

患者由来株およびサシミ由来株の腸管起病性および毒素原性テストはウサギ腸管ループ法(De &

Chatterjee¹¹⁾), モルモット皮膚接種法(Craig¹²⁾)および培養細胞法によつた。腸管ループテストにはブレインハートインヒュジョンの30°C, 6時間振盪培養生菌および30°C, 18時間振盪培養の上清濾液を凍結乾燥により約1/5に濃縮したものを用い, モルモット皮膚反応では, Evans 培地振盪培養上清濾液の接種で生じる血管透過性の変化による青斑を測定した。Y1 Adrenal 細胞による毒素原性テストは, Evans 培地振盪培養上清濾液を用い, Sack & Sack¹³⁾ の方法に準じて行つた。テストには対照としてコレラ菌 569B 株粗毒素およびコレラ抗毒素血清を使用した。

結果および考察

集団下痢症発生事例の概要:本事例の概要をTab. 1に示す。7月30日の宿泊客は170名であつたが, それらのうち7月30日以前からの客で当日の献立が異なり, 発病者も認められなかつた35名

Table 1 Outline of food-borne outbreak of *V. cholerae* infection

Date of outbreak	31, July, 1978
Place of outbreak	K. Hotel(Karuizawa Town)
Presumable vehicle	Sashimi (Tunny)
No. of persons exposed	135
No. of patients	18
Attack rate	13.3%
Incubation period	4.5—13 hours (mean 8.5)
Main symptoms	Abdominal pain 18 Diarrhea 17 Mild fever 12 Hospitalization 12 Vomiting 9 Chill 7

は本事例の調査から除外した。摂食者135名中, 発病者は18名(発病率13.3%)で, 潜伏時間は平均8時間30分であつた。各患者の臨床症状はコレラ様下痢というよりもむしろ急性胃腸炎で, 主な症状は, 腹痛, 水様下痢(1~6回), 発熱(37.1~37.8°C)を主徴とし, また約半数に嘔吐(1~5回)および悪感が認められた。

Table 2 Isolation of *V. cholerae* from different samples

Sample	No. of samples	No. of positive
Patient's feces	9	8
Foods ^{a)}	7	2 ^{b)}
Kitchen utensils	2	0
River water and mud	26	0
Hotel employee's feces	32	0

a) Supper: 30, July, 1978

b) Sashimi, Roast chicken

菌分離状況：各種検査材料からの *V. cholerae* 分離状況を Tab. 2 に示す。下痢便の検査を患者9名について行つたところ、いずれからも既知食中毒原因菌は分離されなかつたが、8名から TCBS 寒天および血液寒天の直接培養で *V. cholerae* が検出された。原因食は7月30日夕食の摂食状況の χ^2 検定からは推定できず、またそれらからは既知食中毒原因菌も分離されなかつたが、サシミおよびローストチキンから食塩ポリミキシンブイヨン増菌培養によつて *V. cholerae* が分離された。調理の状況から考察して、ローストチキンからの *V. cholerae* の検出は調理後、サシミからの二次汚染によるものと推測され、本事例の感染源はサシミと考えられた。調理器具、河川水および底泥から *V. cholerae* は分離されなかつた。施設従業員についても調査したが、いずれも健康状態に異常なく、また海外渡航経験者も存在せず、*V. cholerae* に対する検便はすべて陰性であつた。

分離菌株の性状：患者8名および2食品からの分離株の生化学的性状はすべて同一で、*V. cholerae* の定義 (Hugh & Sakazaki¹⁴⁾) に一致した (Table 3 参照)。マンノースはいずれの菌株によつても発酵されなかつた。

現在、*V. cholerae* は Sakazaki et al.⁹⁾ および Shimada & Sakazaki¹⁰⁾ により60種類の血清型に分けられているが、分離株はすべて血清型6に該当した。

分離株は、アンピシリン、スルベニシリン、セファロジン、カナマイシン、ゲンタミシン、ナリジキシン酸、テトラサイクリン、クロラムフ

Table 3 Biochemical and physiological characteristics of isolates (10 strains)

Gram's stain	Negative, asporogenous rod
Motility	+
Indophenol oxidase	+
Nitrate reduction	+
Hydrogen sulfide	—
Urease	—
Indole	+
Acetoin	+
Phenylalanine deaminase	—
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	+
Arginine dihydrolase	—
Gelatin liquefaction	+
Hemolysis	+
β -Galactosidase	+
Gas from glucose	—
Fermentation of:	
Arabinose	—
Lactose	(+)
Mannose	—
Sucrose	+
Mannitol	+
Inositol	—
Raffinose	—
Rhamnose	—
Trehalose	+
Xylose	—
Adonitol	—
Dulcitol	—
Sorbitol	—
Salicin	—
Sensitivity to:	
Novobiocin (10 μ g)	+
Polymyxin B (50 U)	—
Growth in 0% NaCl	+
Growth in 6% NaCl	+
Growth in 8% NaCl	—

Remarks: + = Positive, — = Negative
(+) = Delayed reaction

ニコールおよびノボビオシン (NB) には感受性で、ポリミキシン B (PB) に耐性であつた。

分離菌株の腸管起病性の検討：分離菌株の腸管ループレテストの成績は Tab. 4 に示すとおりで、生菌では供試菌の全株で血液を混入した漿液の貯溜、腸壁の充出血など強度の陽性反応が得られ、また培養濾液でもその反応の強さは生菌に劣つた。

Table 4 Reactivity of ligated gut loops in rabbits to living cells and culture filtrates of isolates

Strain	Source	Living cell	Filtrate	Control
NAG-1	Patient	5/5 ^{a)}	4/5	0/5
NAG-2	Patient	5/5	5/5	0/5
NAG-3	Patient	3/3	3/3	0/3
NAG-9	Sasimi	3/3	1/3	0/3

a) The dominator indicates the number of tested : the numerator indicates the number of positive strains

とはいえ、陽性と認められる所見を呈した。Tab. 5 には Y1 細胞およびモルモット皮膚反応を用いたエンテロトキシン産生性テストの成績を示す。表に明らかなように、Y1 細胞には供試菌全株が CPE を示し、ある種の細胞毒の産生が示唆されたが、その反応はコレラ抗毒素では中和されなかつた。モルモット皮膚テストでは出血（直径 7～8mm）または出血を伴う青斑（10～11mm）が認められたが、出血反応はコレラ毒素で免疫したモルモットの皮膚テストでも明らかに見られた。これに対し、対照として用いたコレラ粗毒素による陽性反応（青斑および出血）は、後者のモルモットではまったく認められなかつた。以上の成績は分離菌株が腸管病原性を持ち、かつコレラ毒素とは異なるある種の毒素を産生することを示唆し

ている。O1以外の *V. cholerae* の産生するエンテロトキシンについては、Ohashi et al.¹⁵⁾ および Zinnaka & Carpenter¹⁶⁾ の研究があり、彼らは“NAG プベリオ”のエンテロトキシンにはコレラ抗毒素によつて完全に中和される 569B 型と部分的に中和される S2 型とがあることを報告している。一方、Honda & Finkelstein¹⁷⁾ はエルトールコレラ菌の産生する溶血素には細胞毒性があることを認めたが、溶血素は菌の病原性とは無関係であろうと推測した。われわれの分離菌の産生する毒素がコレラ菌のエンテロトキシンと異なることは明らかであるにしても、後者の細胞毒との関連性についてはまだ不明である。また、その毒素は実験的には腸管ループレテストで陽性反応を与えたが、それがヒトの腸管内でどのようにして発症に関連するかはまったくわかっていない。これらについては今後の研究を必要とする。

前述のように、近年は海外渡航歴の有無に関係なく *V. cholerae* による下痢症が発生しており、またここに報告した集団下痢もおこりうるので、今後は散発例、集団事例を問わず、下痢症の日常検査には *V. cholerae* の検査を含める必要がある。

結 語

1978年7月、長野県軽井沢町でわが国では初めてと思われる *V. cholerae* serovar 6 による集団下痢症を経験し、その原因食はサンミと推測され

Table 5 Reactivity of Y1 adrenal cell and guinea pig skin by filtrates of isolates

Strain	Y1 adrenal cell		Guinea pig skin reaction		
	Untreated	After neutralization with anti-cholera toxin	Permeability factor	Hemorrhagic factor	Immunized guinea pig with cholera toxin
NAG-1	CPE ^{a)}	CPE	—	+	Hf ^{b)}
NAG-2	CPE	CPE	+	+	Hf
NAG-3	CPE	CPE	+	+	Hf
NAG-9	CPE	CPE	+	+	Hf
<i>V. cholerae</i> 569B	+	—	+	—	—

a) Cytopathic effect : Different from that due to cholera enterotoxin

b) Hemorrhagic factor

た。分離菌株はウサギ腸管ループテストで生菌および培養濾液ともに陽性反応を示し、腸管起病性のあることが示唆されたが、培養濾液中にみられた毒性成分はコレラ菌エンテロトキシンとは異なり、一種の細胞毒であった。

本論文の要旨は第53回日本感染症学会（1979年、東京）において発表した。

文 献

- 1) McIntyre, O.R., Feeley, J.C., Greenough, W.B., Benenson, A.S., Hanssan, S.I. and Saad, A.: Diarrhea caused by non-cholera vibrios. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 114: 412—418, 1965.
- 2) Aldová, E., Lázníčková, K., Stěpánková, E. and Lietava, J.: Isolation of nonagglutinable vibrio from an enteritis outbreak in Czechoslovakia. *J. Infect. Dis.*, 118: 25—31, 1968.
- 3) Zinnaka, Y.: Characterization of vibrios isolated from the cases of cholera-like diarrhoeal disease in the Sudan. *J. Egypt. Health Ass.*, 46: 161—174, 1971.
- 4) Kamal, A.M.: Outbreak of gastroenteritis by non-agglutinable (NAG) vibrio in Republic of the Sudan, October-November, 1968. *J. Egypt. Publ. Health Ass.*, 46: 125—152, 1971.
- 5) 坂井千三, 太田建爾, 工藤泰雄, 津野正朗, 松下 秀, 大橋 誠: 東京都における海外旅行者下痢症の細菌学的検討 (1977年), 東京都衛研年報, 29—1: 1—5, 1978.
- 6) 村松紘一, 小林正人, 和田正道: 東南アジア旅行者から分離した腸管系病原菌, 日感染学誌, 53: 628—633, 1979.
- 7) 厚生省監修: 微生物検査必携, 細菌・真菌検査 (第2版), 日本公衆衛生協会, 東京, 1978.
- 8) Sakazaki, R., Gomez, C.Z. and Sebal, M.: Taxonomical studies of the so-called NAG vibrios. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 20: 265—280, 1967.
- 9) Sakazaki, R., Tamura, K., Gomez, C.Z. and Sen, R.: Serological studies on the cholera group of vibrios. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 23: 13—20, 1970.
- 10) Shimada, T. and Sakazaki, R.: Additional serovars and inter-O antigenic relationships of *Vibrio cholerae*. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 30: 275—277, 1977.
- 11) De, S.N. and Chatterjee, D.N.: An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *J. Pathol. Bacteriol.*, 66: 559—562, 1953.
- 12) Craig, J.P.: The effect of cholera stool and culture filtrates on the skin of guinea pigs and rabbits, Inproceedings of the cholera symposium, 153—158, U.S. Government printing office, Washington, D.C., 1965.
- 13) Sack, D.A. and Sack, R.B.: Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y1 adrenal cells in miniculture. *Infect. Immun.*, 11: 334—336, 1975.
- 14) Hugh, R. and Sakazaki, R.: Minimal number of characters for the identification of *Vibrio* species, *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Publ. Health Lab.*, 30: 133—137, 1972.
- 15) Ohashi, M., Shimada, T. and Fukumi, H.: In vitro production of enterotoxin and hemorrhagic principle by *Vibrio cholerae*, NAG. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 25: 179—194, 1972.
- 16) Zinnaka, Y. and Carpenter, C.C.J.: An enterotoxin produced by noncholera vibrios. *Johns Hopkins Med. J.*, 131: 403—411, 1972.
- 17) Honda, T. and Finkelstein, R.A.: Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio cholerae* biotype E1 tor: Another toxic substance produced by cholera vibrios. *Infect. Immun.*, 26: 1020—1027, 1979.

A Food-borne Outbreak of Infection Possibly with *Vibrio cholerae* serovar 6

Koichi MURAMATSU, Masamichi WADA and Masato KOBAYASHI

Nagano Prefecture Research Institute for Health and Pollution, Komemura, Amori, Nagano

Toshio SHIMADA and Riichi SAKAZAKI

National Institute of Health, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo

A food-borne outbreak of infection presumably due to eating Sashimis (sliced raw fish meat) occurred in Karuizawa, Nagano prefecture, in July 1978. In the outbreak, *Vibrio cholerae* serovar 6 was the only suspect etiological agent isolated. This is the first report of outbreak of infection due to this organism in Japan.

The isolates produced positive reaction in ileal loop tests in rabbits with live cells and culture filtrates, suggesting enteropathogenicity of the organisms. In the culture filtrates, however, a cytotoxin different from cholera toxin was demonstrated.