



Title	コレラ菌のはなし
Author(s)	小林, 一寛
Citation	makoto. 1991, 74, p. 2-7
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/85955
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

コレラ菌のはなし

大阪府立公衆衛生研究所

小林 一 寛

1. コレラは古くからのヒトの病気である

コレラはもととはといえばインド“ガンジス”河口地帯に風土病的に発生し、西洋には全く知られていない病気でありました。ところが1816年以降1829, 1852, 1863, 1881, 1889, 1960年に始まる7回の世界的流行(パンデミック)を繰り返し、そのたびにヨーロッパ、アメリカ、アジアへとひろがり、ベストとともに恐れられているヒトの病気です。わが国には1822年(文政5)に初めて侵入し大流行を起こし、それ以降たびたび流行がみられています。これらの多くは海外からの船の来航によって長崎に持ち込まれたのち全国に流行し、数年後には治まってまた流行するというものでした。なかでも安政コレラの江戸での大流行は(5年、1858年)まことにすさまじく、発病したらまず助からないというぐらい恐ろしい病気です。“半日あるいは三日ころり”と呼ばれ、多数のヒトが死亡した記録があり、きわめて恐ろしい伝染病でありました。この病気の原因は1883年に、エジプトでのコレラ流行の際にロベルト・コッホによって発見され、現在は学名; *Vibrio cholerae* (ビブリオ・コレレ)、日本名; コレラ菌という細菌です。

2. コレラ菌は弱いが動作は速く、体内に入るとやっかい

この細菌は幅約 $0.5\mu m$ ($0.0005mm$)、長さ約 $1\sim 3\mu m$ ($0.001\sim 0.003mm$)の大きさ(菌体という)で、菌体の一端に一本の長いべん毛とよばれる運動器官があり非常に活発な運動をします。そこでこの細菌は、あちらこちらとよく動き(vibrates)、その形がやや湾曲しコンマ(9)状であることから以前は*Vibrio comma*(ビブリオ・コンマ)といわれていました。ですから患者が発生したときには、その下痢便をそのまま注意深く顕微鏡で観察しますと、視野の中を流れ星のごとく、右に左に活発に泳ぎ回るの

がよくみられます。この運動性を観察することはコレラ菌の検査に重要とされ、現在でも必ず参考にされています。この細菌は $37^{\circ}C$ で酸素の多い(好氣的)、ややアルカリ性(pH 8前後)の条件で旺盛に発育しますが、酸性では弱く昔から流行時には‘梅干し’が予防に役立つといわれました。ごく最近でも、1977年(昭和52年6月)和歌山県有田市のコレラ流行時には大いに食され、売り切れの店が続出し、三食に必ず食べた家庭もあったようです。その効果のほどは分かりませんが、健康な胃をもつヒトでは胃酸が十分に分泌され、それが食品と一緒に侵入した細菌を殺菌し、感染予防に非常に役立っています。また乾燥にも弱く、患者の糞便中でも室温に置けば数時間で死滅するといわれます。ところが冷凍生鮮魚介類や適当な湿度のある冷蔵した野菜、果物に付着したもの、あるいは牛乳などの食品中ではかなり長期間(2週間~数ヶ月)生存しますので注意が必要です。しかし温度に弱く $55^{\circ}C$ 、10分、 $65^{\circ}C$ 、5分以内に死滅しますので、汚染の心配があるようなときには必ず加熱することが大切です。いろいろな消毒薬でも速やかに死滅します。

コレラ菌はヒトにのみコレラという病気をおこす細菌です。どれだけの菌が体内に入ったら発病するのでしょうか。まえに述べたようにコレラ菌は経口的に入っても胃酸によって殺されますが、無酸症や胃酸の少ないヒトではごく少数で感染するといわれています。健康なヒトではどのくらいか、いろいろな説があって決まったものはありませんが、最近のエルトール型菌(後述する)実験ではこれまで考えられていたよりずっと少なく、重曹(胃酸を中和する効果がある)と共に1,000個程度のコレラ菌を志願者6人に与えたところ4人が発病した結果があります。また、菌を水や食品に混合するとより感染しやすかったとしています。これは食品や水が胃酸を中和したり、希釈した結果なのか、食品に吸着した

コレラ菌は酸の影響を受けにくいのかその理由はいろいろですが、これを裏付ける事例が1つあります。エビやカニの体表に付いたコレラ菌は体表のキチン質によって保護され酸性中でもよく生存することが、バングラディッシュの流行の際に確認されました。

3. コレラ菌にもいろいろな仲間がいる

細菌学上コレラ菌は菌体を構成する成分に違いがあって(0抗原といいます)(鞭毛はH抗原といいます)がみんな同じで鑑別に使えません、これまで80以上の型に区別されています。このうちヒトにコレラを起こす危険のあるのは0抗原1だけで、これをもつものを真性コレラ菌(V.cholerae 01)といいます。2以下のものをまとめてV.cholerae non-01と呼びますが、ときどき非凝集性(non-agglutinable)ということからNAG(ナグ)ピブリオとよばれることもあります。この呼び方はわが国だけのもので、この菌は食中毒や急性胃腸炎の原因になります。真性コレラ菌はさらに詳細な0抗原の違いから、小川型、稲葉型、彦島型とよばれる3つの血清型に型別されます。さらに性質の違いからエルトール(eltor)型とクラシカルあるいはアジア型の2つに区分されます(生物型といわれる)。これらの区分は患者発生時やコレラ菌の発生時には、防疫対策実施上役に立つのでわが国では必ず調べています。エルトール型は1902年エジプト・シナイ半島のTor検疫所でメッカへの巡礼者の下痢患者から初めて分離されたもので、症状はそれまでのコレラと全く同じであります。菌のもつ性質が今までと違い、羊の赤血球を溶血し、ニワトリの赤血球を凝集するので、その性質のないクラシカル型と違っていることが判りました(表1)。1960年に始まった第7次世界流行の原因菌はエルトール型ですが、それまでの流行を起こしたクラシカル型はインドあるいはバングラディッシュで地域流行を起こしているのみとなってい

表1 コレラ菌の生物型

生物型	溶血性 (ヒツジ)	ポリミキシンB感受性 (50単位)	ニワトリ赤血球 凝集性	ファージ* 感受性	VP反応
クラシカル型	-	+	-	+	-
エルトール型	+	-	+	-	+

*: ムカージのファージIV

表2 わが国のコレラ発生状況

(集団発生)

発生場所	発生年月	患者	疑患者	保菌者	合計
和歌山県有田市	1977. 6	23	18	58	99
東京都結婚式場	1978.10	18		31	49
名古屋市レストラン	1990. 9	43		1	44
滋賀県甲賀町	1990. 9	7	1		8

(散発発生)

発生年	患者	疑患者	保菌者	合計
1982	15(15)	12(12)	6(6)	33(33)
1983	35(24)	6(3)	2(2)	43(29)
1984	55(53)	36(34)	1(1)	92(88)
1985	34(33)	5(2)	2(2)	41(37)
1986	26(25)	1(1)	1(1)	28(27)
1987	34(29)	3(1)	1(1)	38(31)
1988	19(19)	0	0	19(19)

()は海外旅行再掲
病原微生物検出情報、第9巻、11号、1988年より抜粋

(環境汚染事例)

発生年月	発生場所	汚染場所、物
1978. 4	横浜市、川崎市	鶴見川汚染
1980. 5	那覇市	安謝川汚染
1980. 6	神戸市(神戸検疫所)	輸入エビ汚染
1980. 8	名古屋市	荒子川汚染
1981.10	横須賀市	野比川汚染
1982. 9	大阪市	正蓮寺川汚染

この表以外1981~1983年に毎年冷凍エビや河川の汚染がみられている(腸管感染症、医典社、清水長世がまとめたものより抜粋した)

ます。なぜ流行するコレラ菌が交代したのかよく分かっていませんが、一般にクラシカル型は重症例が多く、エルトール型は軽症例が多いといわれています(重症例:軽症例の割合はクラシカル型1:5~10に対しエルトール型1:25~100といわれる)ので、あまり自覚症状がないエルトール型コレラ菌の保菌者が多数いて、その人たちが感染源になっているのかもしれない。さきの有田市における流行菌はエルトール型であり、保菌者は99人中58人みられました。しかしこの事例の1人を含め、何等かの胃疾患を持っている人ではきわめて重い脱水症状を呈し、死亡した患者もみられますので、必ずしもそうとは言い切れません。

ここに最近のわが国におけるコレラ菌発生状況をまとめておきます(表2)。

4. コレラとは人体からの水分流出である

典型的なコレラ症状は突然、発熱、腹痛もなく、米のとぎ汁様の白色水様下痢と嘔吐が頻回にみられ、その量は数日で体重の2倍以上にもなるといわれます。従って早急に水分の補給（電解質も）を行わないと脱水症状に陥り、ひどい場合は血液の循環障害や、筋肉のけいれん、意識混濁や尿が出なくなるなど非常に危険な状態になります。わが国のような衛生状態（とくに上下水道）の良い、栄養状態の優れたところではこのような重症例は少なく、すぐに高度な医療が受けられるのでそれほど深刻ではありませんが、そうでない地域、特に開発途上国では、個人の健康状態も良くないことから感染しやすく、抵抗力も弱いののできわめて早く重症になる危険があります。そこでWHOをはじめ各国がその予防に努めていますが、現在でも死亡率の高い重要な感染症であります。

5. 脱水症状はコレラ菌がつくる毒素が原因

コレラ菌に感染するとなぜひどい水様性の下痢がおこるのか？ これまでの多数の研究ではっきりしていて、コレラ菌が小腸内で増殖するときに行き渡るタンパク質（これを私たちはコレラエンテロトキシンまたはコレラ毒素（CT）とよんでいます）の作用によっています¹⁾。このCTは分子量84,000で、熱によって無毒化（易熱性）されます。またサブユニットAとB部分からできており、B部分（以前はコレラジェノイドとよばれた）は腸管上皮細胞に結合する働きがあり、その後A部分が細胞に浸入し作用して、細胞の水分吸収作用を阻害するとともに、細胞内の水分を腸管内に流出させるように代謝を狂わせてしまうため、腸管内に大量の水分とナトリウムなどの電解質が集まり、激しい水様性下痢がみられます。これがコレラ糞便（cholera stool）といわれるものです。ふつうコレラ菌は赤痢菌の場合のように、ヒトの腸管内に長期間保有されないので、健康保菌者が感染源になることはなく、ヒト以外の動物が保菌することもないので、感染は患者の吐物や糞便がなんらかの経路で飲料水や食品を汚染し、経口的に感染します。従って、コレラの感染予防は、他の消化器系伝染病や食中毒の場合と同じでありま

すが、とくに汚染食品の早期発見、患者との接触者の早期健康調査が急がれます。しかしコレラ常在地や流行時には、犬や牛、鶏などの家畜、家禽が保菌することもあります²⁾ので、このような地域を旅行するようなときには注意しなければなりません。なお、コレラの発病までの潜伏期間は約5日（平均3日）といわれています。

6. コレラ菌取り扱い変更のいきさつ

これまでは（昭和63年）、*V. cholerae* 01と決まれば（同定）行政上も細菌学的にもヒトのコレラの原因菌として対応し防疫活動を行っていたのですが、すでに述べましたように「ヒトのコレラは*V. cholerae* 01が産生するコレラエンテロトキシンによっておこる」ことが明らかとなってきたため、今後は「毒素性*V. cholerae* 01のみを法定伝染病の原因として取り扱う」ことが厚生省から全国都道府県、政令市および検疫所に通達（昭和63年9月28日、健医発第1133号）され、医療機関に周知徹底されました。これに至るまでには、ここ10年あまりの間に毒素を産生しない*V. cholerae* 01はおもに沿岸の海水、河川などの環境に広く分布し、また輸入食品などからしばしば検出され、患者からはあまり検出されないことがわかりました（病原微生物検出情報、第9巻、11号、1988）。またコレラ毒素産生の*V. cholerae non-01*が下痢患者から検出された等の報告があり、コレラ菌の取り扱いについて行政上の混乱を招かないため明確にする配慮がなされたためと思われる。

なお、毒素非産生*V. cholerae* 01は伝染病扱いはしなくてもよくなったのですが、米国では激しい腹痛と発熱を伴った、きわめてひどい下痢症を起こしたこのような菌による患者が報告³⁾されており、また、最近コレラ菌に、これまでいわれてきたコレラ毒素（CT）以外に下痢に関係すると思われる毒素がみつけれられています⁴⁾。

7. コレラ・ワクチンの開発が急がれている

さきにも書きましたようにコレラは東南アジア、アフリカ、中東地域の開発途上国では今日でも多くの患者発生がみられ、死亡率も高い感染症であります。

この病気の治療法は、激しい下痢によって失われた水分とナトリウム、カリウムなどの電解質を経口的あるいは輸液によって与えることが必要です。そこで世界保健機関（WHO）では経口の治療薬を作成しどれが有効かをテストしていますが、それよりもコレラを予防するにはワクチンが最も効果的であると考えられますのでコレラ・ワクチンの開発を進めています。これまでに有毒なコレラ菌から遺伝子操作によってCTを産生しない無毒のコレラ菌を作成し、それを経口ワクチンとして流行地で効果を確かめているところですが、これまでに数年間の予防効果があることは確認されているようですが、ワクチンだけで軽い下痢が起こることもあり、さらにデータを収集中です。それには上にのべたCT以外の新しい毒素が関係しているのかもしれない。

8. 下痢の原因となる毒素の調べ方

これまでの方法でコレラ毒素産生性を試験するには、分離した*V. cholerae* 01を毒素産生のための培地で培養し、その培養濾液中に毒素が存在するかを調べるのですが、コレラ菌を分離してから、さらに3日以上が必要です。コレラ発生時の二次感染の危険はさきに述べたごとく5日以内であり、検査成績がでるのを待っているのは防疫対策は遅れることにもなりかねません。また近年、海外との交流が盛んになり、とくにわが国の生鮮魚介類の輸入量は著しく増加しており、その検疫にさらに3日以上を要したのでは食品流通上にも重大な問題が生じることになります。そこで私たちは、これまでのコレラ菌決定時間（48時間）内に毒素産生性までを診断できる方法として、遺伝子（DNA）診断法の開発をおこないました^{5,6)}。

CT産生は、コレラ菌が生存していくために不可欠な染色体遺伝子がありますが、その一部に毒素遺伝子を保有しているものにみられます。この毒素はさきに述べたエルトル型とクラシカル型で差はみられず、またその遺伝子の構造（塩基配列）や機能も解明されています。これまでは、この遺伝子の形質発現によって産生された毒素（タンパク質）を別に作製した抗毒素抗体で検出する免疫学的方法（R-PLA）によっていましたが、この方法は時間がか

かるうえ、コレラ毒素とよく似た組成や生物学的作用をもっている大腸菌の易熱性毒素（LT）やコレラ菌と違う細菌にも反応することがあり、もっと正確な検査法が望まれていました。このような状況から私たちは、コレラ菌に特徴的な毒素遺伝子を直接検出することが正確にその性質を診断できると考えました。

9. 新しいコレラ毒素産生性試験法の確立

これまでの研究論文の検討から、次の二つのDNA診断法の開発を目的としました。

- ①コレラ菌毒素遺伝子そのものを使用した診断用プローブの開発。
- ②遺伝子増幅法（PCR）を用いた迅速簡便法の開発

毒素産生性*V. cholerae* 01（569B株、クラシカル、稲葉型）からコレラ毒素遺伝子に関係する部分を取りだし、大腸菌由来の薬剤耐性のプラスミド（菌の生存に必要ではなく、外来の細胞質性に存在する遺伝子。この実験ではベクタープラスミドという）と遺伝子組換えをし、大腸菌の細胞内でプラスミドとして保存します（クローニング）（この操作をすることによって安定に大腸菌の細胞内で存在できる）。これをさらに遺伝子操作によってコレラ毒素のみに特徴的な遺伝子部位に小さくし、さらに別のベクタープラスミドに組み換えて保存します（サブクローニング）。こうして作成したコレラ毒素遺伝子の一部を含むプラスミドは、毒素タンパク質の情報の一部をもっているだけで、完全なCTを産生できません。必要なときにその大腸菌を増殖させ、プラスミドを取り出し、コレラ毒素遺伝子のみを制限酵素（遺伝子操作でのハサミに相当するもので、遺伝子の決まった部分のみを切るための酵素で、現在約100種知られている）を使って切り出し、精製した後、標識物質（放射性同位元素や非放射性物質を用いる）をつけて診断用試薬（DNAプローブ）を作製する。これを用いた方法はDNA交雑法（ハイブリダイゼーション）といわれ、いろいろな感染症や遺伝病の診断などにも広く用いられている方法です。

DNAは4種類の核酸（デオキシリボヌクレオチ

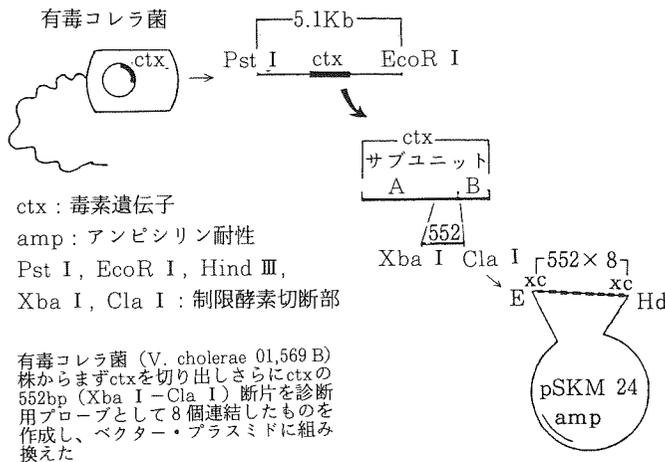


図 1 コレラ毒素診断用プローブの作成

ド) が結合し配列した2本のよじれた糸状の構造をもち、それぞれが相対するヌクレオチドと水素結合をしている(アデニン(A)とチミン(T)、グアニン(G)とシトシン(C))。遺伝情報は3つの配列によって、作られるアミノ酸(タンパク質の組成)を決定している。このDNAは加熱によって離れ一本の直鎖になる。これをそのまま放置して冷せばまたもとの二本鎖に戻る性質がある。即ち、毒素遺伝子の保有を調べたい菌を溶菌し、あるいはDNAを取り出し加熱することによって一本鎖にする。それにコレラ菌の毒素遺伝子の一部からなるDNA(プローブ)を同じく加熱により一本鎖にして反応させると、もし被検菌DNA中にコレラ毒素遺伝子が存在すれば、そのヌクレオチドに対する(相補的な)プローブ(のヌクレオチド)が結合するはずだ。以後余分なものを洗浄して除き、標識物質を確認す

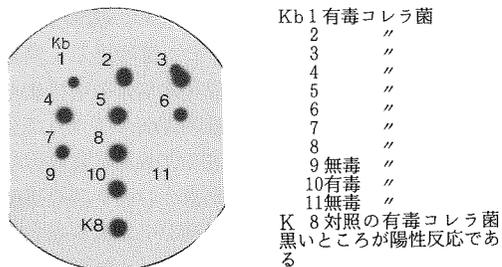


写真 1 コロニーハイブリダイゼーション

ることによって反応したことが判定できます。これまでの研究で、毒素産生性のコレラ菌のみに反応する特異性の高い独自のプローブ(私たちはpSKM24と呼称している)を作製し(図1)、それを使った成績を示しました(写真1)⁵⁾。

第2の遺伝子診断法はポリメラーゼ・チェーン反応(PCR)といわれるもので、DNAポリメラーゼという酵素の反応を使って、被検菌中のコレラ毒素遺伝子の一部を試験管内で増幅させるものです。これには遺伝子増幅の開始点となるプライマーといわれるものが必要です。あらかじめ調べようとするコレラ毒素遺伝

子に特徴的な部分の、ある長さを選び(塩基の数で表し100-500 base pair(bp)程度がよく、私たちは380bpを選んだ)、DNAのそれぞれ1本鎖のヌクレオチド(塩基)配列に相補的な、順方向には逆方向(antisense)、逆方向には順方向(sense)の2種類のヌクレオチド(19と20塩基)をDNA合成

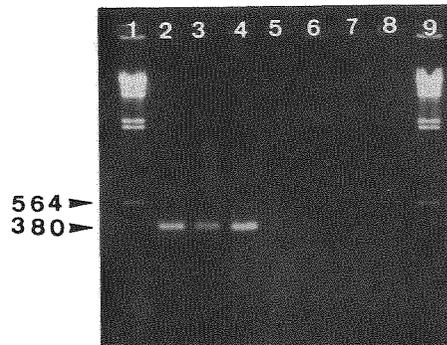


写真 2 増幅後の電気泳動像

lane 1: DNAマーカー (λ Hind III)
2: 有毒コレラ菌 (分離株)
3: " (")
4: " (")
5: 無毒コレラ菌 (分離株)
6: " (")
7: " (")
8: NAGビブリオ (分離株)
9: DNAマーカー (λ Hind III)

左側の数字は分子量の大きさ (bp)。lane 2~4の380bpの白いバンドが目的としたコレラ毒素遺伝子断片である。lane 5~8はコレラ毒素遺伝子を保有していない。

機によって作成します。そしてこれを増幅のための伸長開始のプライマーとして使用します。この2つのプライマーとそれぞれ4種のデオキシリボヌクレオチド、耐熱性DNAポリメラーゼおよび緩衝液、5分間沸騰した被検菌を微量混合し、94°C→55°C→72°Cをそれぞれ30秒づつの温度変換を25-30回繰り返します。この結果、もし被検菌DNA中にコレラ毒素遺伝子があればそれを鋳型としてプライマーで挟まれた目的のDNA断片(380bp)が各サイクルごとに生成され、結果的には約2ⁿ(nはサイクル数)倍に増幅されることになります。この混合液の1μl(1/1000ml)をアガロースゲルを支持体として電気泳動を行いますとDNAは陽極に動き、大きさによってその距離が違うので、あとで臭化エチジウムでDNAを染色して紫外線光(300nm)で観察すると白い帯になって見えます。(写真2の矢印がコレラ毒素遺伝子の380bp断片)。これまでに全国9施設から100株以上のエルトル型、クラシカル型コレラ菌を集めて検査しましたが、結果はこれまでの免疫学的方法と比較してもむしろ感度が良く、迅速簡便で十分検査に使えることがわかりました⁶⁾。この方法は菌の同定から3時間もあれば結果が得られ、培養操作を必要とせず、生きた菌を扱わないため安全で、迅速かつ感度の優れたものでありますので、多くの試験検査室で日常検査に採用できる、新しい有効な診断法と思われます。今後このPCR法は細菌、ウイルスをはじめ多くの他の微生物感染症を診断するのに応用されるものと期待されています。

おわりに

コレラの原因となる毒素産生性コレラ菌の同定は迅速に行われ、その感染予防は迅速な防疫対策の実施と考えられています。ここで述べた2つのDNA診断法は、その目的のため有効な方法ですが細菌を分離しない方法でありますので、後日治療のための薬剤に対する感受性試験やいろいろな生物化学的性状など、例えばフェージ型や溶血性の有無などをみる必要がありますので、これまでの培養法を用いてコレラ菌を分離し、保存することはもちろん必要です。

南米ペルーでは、1991年1月以降これまでに10万

人をこえるコレラ患者が発生し、3月末日現在でも流行がひろがっています。死者も800人以上に達していますが、原因はエルトル、稲葉型といわれています。ペルー政府は生もの、生水を摂取しないように呼びかけています。(WHO weekly recordより)

近年のように海外との交流が盛んになるにつれ、コレラ常在地(熱帯-亜熱帯地方に多い)を旅行する機会が増していますが、わが国の食習慣、特に魚介類を生食したり生水を飲むことなどを旅行先で、そのまま行うことはコレラ菌のみならず赤痢菌や腸チフス菌などの消化器系伝染病や腸炎起病性細菌に感染する危険がありますので注意が必要です。このようなケースは最近増加しています。

参考文献

- 1) Holmgren, J., Nature 292:413-417, 1981
- 2) Sanyal, SC et al., J. Infect. Dis. 130:575-579, 1974
- 3) Morris, JG et al., J. Clin. Microbiol. 19:296-297, 1984
- 4) Sanyal, SC et al., FEMS Microbiol. Letters 50:113-116, 1988
- 5) 勢戸和子、感染症誌 64:1330-1336,1990
- 6) 小林一寛、感染症誌 64:1323-1329,1990