

## 2 下痢症原因菌調査

環境由来 *V. cholerae non 0-1* の

エンテロトキシンとヘモリジン検出について

### 【微生物科】

佐々木 陽子・石田 茂・田中 球英

井上 睦子・寺谷 巖

### はじめに

鳥取市街地河川の細菌汚染調査を昭和57年10月から毎月1回継続して行い、下痢症原因菌として *V. cholerae non 0-1* (いわゆるNAGビブリオ、以下NAGビブリオと略す)、サルモネラ、カンピロバクターの検出を行ってきたが、近年NAGビブリオの中にはコレラエンテロトキシンあるいは類似のエンテロトキシンを産生するものがあること、<sup>1)2)3)4)</sup> またエルトル型コレラ菌と同

じヘモリジン産生があることが<sup>5)</sup> 報告されている。今回、市街地河川において常在化してきたNAGビブリオの分離状況と、エンテロトキシン検出をCHO細胞を用いた方法とラテックス凝集によるRPLA法で測定し、ヘモリジンの検出、エンテロトキシン産生培地の検討を合せて行ったので報告する。

### 材料と方法

調査地点：検体採取地点は、鳥取市の市街地を流れ

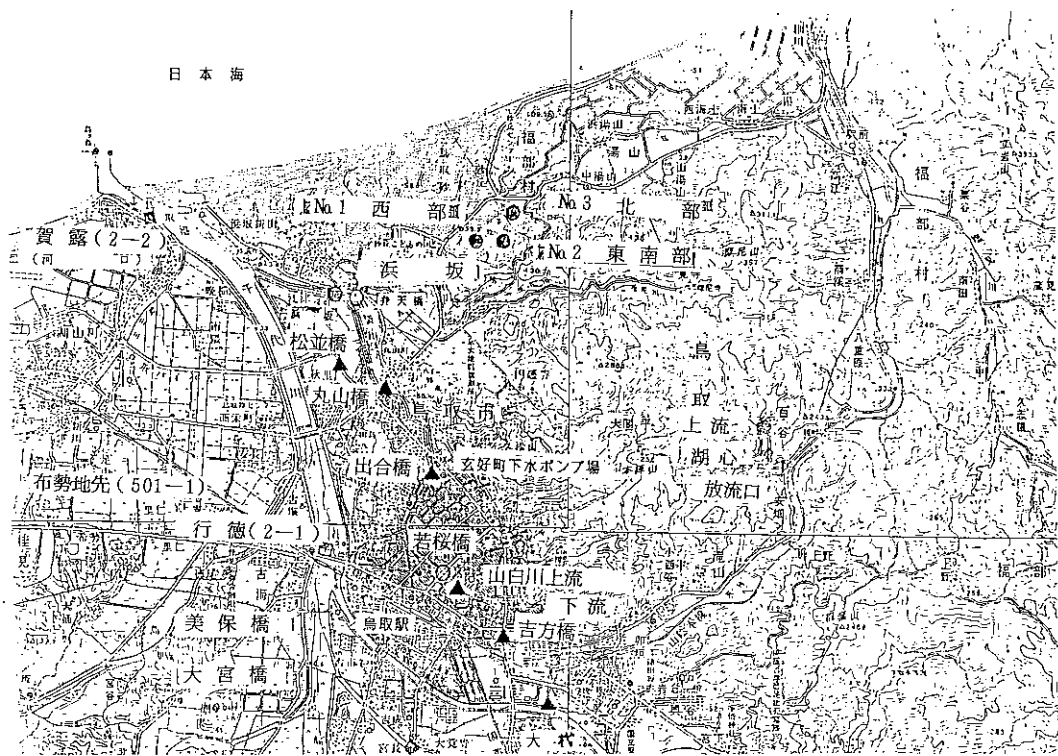


図1 調査地点図

る袋川水系を中心に1.市街地流入前の旧袋川、2.旧袋川吉方橋、3.旧袋川丸山橋、4.狐川松並橋、5.山白川下流の5地点と、6.市営玄好町下水ポンプ場の下水を環境汚染を総括的に把握する目的で処理場流入前に採取計6地点を定点とした。

材料：採取方法とNAGビブリオの検出法は既報（本誌・第26号）のとおりであり、昭和58年6月から昭和60年1月までに得られた123株を材料とした。エンテロトキシン産生培地の検討には、クラシカルコレラ菌、エルトルコレラ菌都衛研分与株を用いた。

方法：エンテロトキシン検出には、Syncase培地で30℃18時間振盪培養を行った遠心上清を試料とし、CHO細胞を用いて37℃5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで1夜培養を行い、細胞の伸長率を求めた。<sup>6)</sup>中和反応は37℃1時間で行った。同時にマイクロプレートを用いたRPLA法で測定を行った。

ヘモリジンの検出は、5%羊血液寒天法、Feeley and Pittmanの変法、<sup>7)</sup>山本らの方法<sup>5)</sup>について検討を行い、エンテロトキシン検出と同様に調整したヘモリジ

ン液1mlに1%羊血球を1ml加え、37℃2時間4℃1夜反応後遠心上清を540nmの吸光度で測定し、1mlの1%赤血球の<sup>1</sup>/<sub>4</sub>を溶血させる活性量を1溶血単位として測定した。

エンテロトキシン産生培地について、従来のSyncase培地とCAYE-3半流動培地の比較検討を行った。

## 結 果

### 1 NAGビブリオの分離状況

NAGビブリオが一定して検出された昭和58年6月から昭和62年1月までの、河川5定点の分離株数と平均水温を図2に示した。水温の変化と相関した値( $r=0.610$ )を示すが、61年、62年の冬期でも分離数の増加がみられる。図には示していないが、人為汚染の少いと思われる袋川上流の中河原地点を昭和58年6月から昭和59年5月までの1年間調査したが、全く分離されなかった。

定点別の分離率と水温の比較を表1に示した。下水の採取は屋内で行う為に水温がかなり高く、表には示していない。水温の低い定点1、2では分離率50%以下

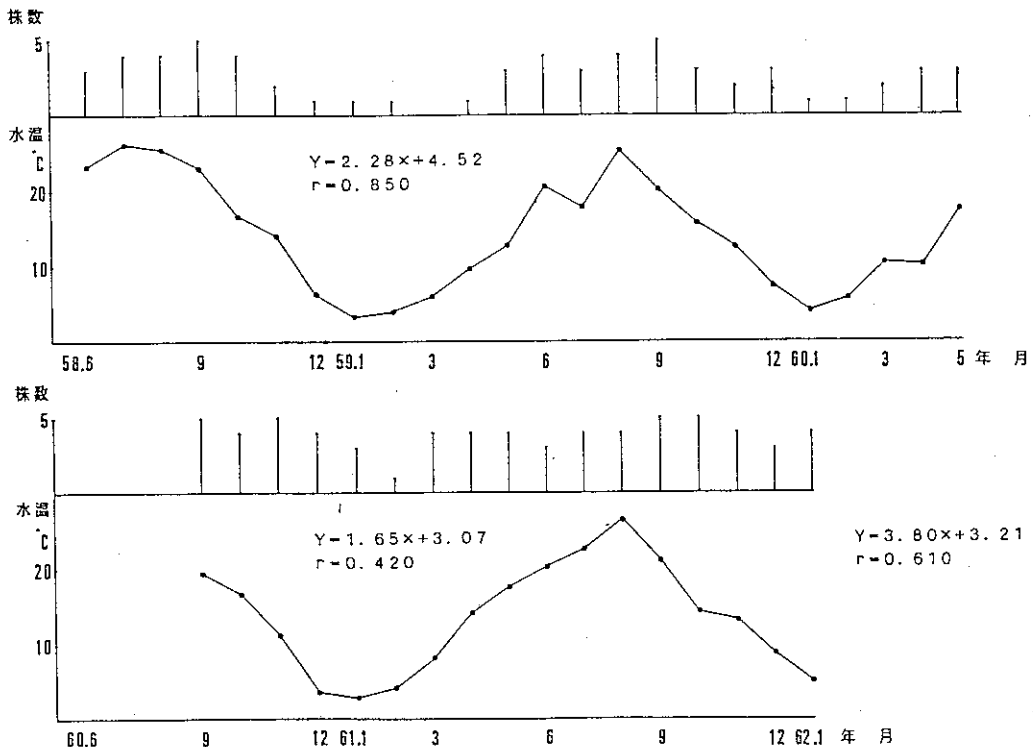


図2 月別分離株数と平均水温

であるが、比較的水温の高い定点3、4、5と下水では高い分離率を示している。

表1 定点別分離率と水温

定点	分離率 (%)	水温 (°C)		
		最高	最低	平均
1	18/41 (43.9)	25.0	2.0	13.0
2	20/41 (48.8)	25.8	3.0	13.2
3	32/41 (78.0)	28.0	2.3	13.9
4	25/41 (61.0)	28.5	3.0	14.9
5	35/41 (85.4)	26.3	3.0	14.3
6	22/28 (78.6)			

## 2 エンテロトキシンの検出

CHO細胞を用いたエンテロトキシンの検出は表2のとおりであった。細胞の伸長率10%以下陰性、10%~20%疑陽性、20%以上陽性とし細胞を400個数えた。123株のうち陰性9株(7.3%)、疑陽性10株(8.1%)、陽性4株(3.3%)、細胞毒性により判定不能となったもの100株(81.3%)であった。陽性4株のうち1株は中和抗体による変形阻止が確認された。また、クラシカルコレラ菌はRPLA法で2,048倍、CHO細胞伸長率70%以上であり、エルトールコレラ菌はRPLA法で4倍、CHO細胞伸長率40%と差があることから、伸長率によってクラシカルコレラ菌のエンテロトキシン定量を試みたが、RPLAとCHO細胞法に直線性はみられなかった。

RPLA法での成績は123株全て陰性であった。

表2 CHO細胞によるエンテロトキシン検出

	株数	検出率(%)
細胞伸長率 10%以下(-)	9	7.3
10%~20%(±)	10	8.1
20%以上(+)	4	3.3
細胞毒性 (検出不能)	100	81.3
計	123	100

## 3 ヘモリジンの測定

ヘモリジン産生と細胞毒性の関係を調べるためにヘモリジン産生を5%羊血液寒天とFeeley and Pittman

法により測定したが、血液寒天法で117株、Feeley and Pittman法で114株に溶血性を示し、前者で14株、後者で13株にヘモリジン産生で細胞毒性が認められなかった。そこでヘモリジン産生を1.HI培地37°C静止培養、2.Syncase培地30°C静止培養、3.Syncase培地30°C振盪培養についてエルトールコレラ菌、NAGビブリオのそれぞれについて定量した。エルトールコレラ菌ではHI培地37°C静止培養、Syncase培地30°C振盪培養では溶血活性1単位以下で、Syncase培地30°C静止培養では1単位とSyncase培地による静止培養が良かった。NAGビブリオではHI培地37°C静止培養、Syncase培地30°C静止培養では1単位以下であったのが、Syncase培地30°C振盪培養では2単位であり差が大きかった。Syncase培地30°C振盪培養でのヘモリジン液についてエンテロトキシン測定と同時に溶血活性を測定した成績が表3である。

表3 hemolysinの測定

溶血活性(単位)	株数	細胞毒性
< 1	7	0
1	1	0
2	2	2
3	96	81
4	17	17
計	123	100

一致率87%

易熱性 hemolysin 116株  
腸炎ビブリオ

耐熱性 hemolysin 6株

ヘモリジン産生で細胞毒性のないものが16株あるが、1株は1単位で15株は3単位であった。ヘモリジン産生と細胞毒性の一致率87%であった。検出した116株のヘモリジンは70°C10分の加熱で失活する易熱性ヘモリジンで、そのうち6株に腸炎ビブリオの耐熱性ヘモリジンをRPLA法で検出した。

## 4 培地の検討

ヘモリジン産生が細胞毒性に関係していることが明らかであるが、両者ともSyncase培地での振盪培養が一番検出が良かった。そこでヘモリジン産生が少くエンテロトキシン産生の良い培地であればエンテロトキ

シン検出が向上するのではないかと思われ、従来病原大腸菌検出用培地であるCAYE-3半流動培地の使用を考えた。クラシカルコレラ菌、エルトールコレラ菌を用いて、Syncase培地とCAYE-3培地についてRPLA法でエンテロトキシン定量により比較を行った。

(1) CAYE-3培地リンコマイシン90 $\mu$ g/ml含有を用いて、30 $^{\circ}$ C 24時間、37 $^{\circ}$ C 24時間培養でポリミキシンB処理を行ったところ、30 $^{\circ}$ C 24時間培養では殆んど菌の発育が認められず、クラシカルコレラ菌、エルトールコレラ菌共にエンテロトキシンは検出できなかった。

(2) CAYE-3培地37 $^{\circ}$ C 24時間培養で、リンコマイシン量無添加、90 $\mu$ g/ml、270 $\mu$ g/mlについてポリミキシンB処理をして検討したところ、表4に示すようにクラシカルコレラ菌ではSyncase培地30 $^{\circ}$ C 18時間振盪培養で2,048倍であるのが、CAYE-3培地リンコマイシン不含では4倍、90 $\mu$ g/mlで256倍、270 $\mu$ g/mlでは菌の発育が認められず検出できなかった。

表4 enterotoxin産性培地の検討

培地	classical	eltor
Syncase	× 2048	× 4
CAYE-3		
LCM不含	× 4	(-)
LCM 90 $\mu$ g/ml	× 256	× 4
LCM 270 $\mu$ g/ml	(-)	(-)

エルトールコレラ菌では、Syncase培地で4倍であったのが、CAYE-3培地リンコマイシン90 $\mu$ g/mlで同等の4倍を検出した以外、不含と270 $\mu$ g/mlでは検出できなかった。これらの結果は数回くり返し行った実験で同様の成績が得られ、クラシカルコレラ菌では従来のSyncase培地が最良であったが、エルトールコレラ菌ではCAYE-3培地で同等あるいはSyncase培地より1管差の8倍を示した。これらは全てポリミキシンB処理を行ったが、処理を行わないものはリンコマイシン不含と同程度の成績で検出は著しく低いものであった。

(3) NAGビブリオ123株についてCAYE-3培地によるCHO細胞法でエンテロトキシンの検出を検討した。

リンコマイシン感受性34株は菌が生えず検査できなかったが、このうち33株はSyncase培地で細胞毒性のみられたものであり1株は陰性であった。細胞毒性の認められないものは23株でSyncase培地での成績と同じであったが、15株は菌の生えが若干悪く細胞での判定が可能であったのは8株であった。8株のうち陰性2株、疑陽性4株、陽性2株であり1株は中和試験で確認できSyncase培地でも陽性であった。

## 考 察

1. 鳥取市街地河川においてNAGビブリオの分離数は、水温の上昇する夏期に多く水温の低い冬期に少く水温の変化と相関した値を示しているが、61年、62年の冬期でも分離数が高くなり年間を通して分離率が高くなる傾向にある。袋川上流の中河原地点では、昭和58年6月から昭和59年5月までの1年間の調査で全く分離されなかったが、調査地点1の市街地流入前の旧袋川の分離状況をみると、昭和58年6月から昭和59年5月までは分離率33%であるが、昭和59年6月から昭和62年1月までの分離率をみると52%と増加しており、さらに上流での汚染も考えられた。

2. エンテロトキシン検出をSyncase培地30 $^{\circ}$ C振盪培養によりCHO細胞法とRPLA法を検討した。工藤ら<sup>1)</sup>のNAGビブリオのエンテロトキシン産生性の報告では、環境由来43株は全て毒素非産生であったが、CHO細胞法でのみ1株陽性であった。このことはCHO細胞法がRPLA法より感度が良いためと考えられた。しかし、CHO細胞による定量は不可能であり、細胞の判定基準、実験毎の同一条件の設定、細胞の継代による感度の劣化等の問題が考えられた。

3. ヘモリジン産生株は116株あり、ヘモリジン産生と細胞毒性は一致率87%と工藤ら<sup>1)</sup>の報告と同様高い相関がみられたが、伸長率測定の下条件下でヘモリジン測定を行えばより高い相関となるのではないかと考えられた。また、NAGビブリオのヘモリジン産生は山本ら<sup>5)</sup>の報告によるS7株を用いた実験ではSyncase培地30 $^{\circ}$ C静止培養が最良であったが、我々の用いた株ではSyncase培地30 $^{\circ}$ C振盪培養が最も高い値であった。このことは、エンテロトキシン検出と同様の条件下でヘモリジン産生が最高となり、CHO細胞でのエンテロトキシン検出の妨げになると考えられた。検出した陽

性1株はヘモリジン非産生であったが、ヘモリジン非産生のために細胞毒性がみられず検出可能となったと思われるが、あるいはエンテロトキシン産生株にヘモリジン非産生株若しくは産生量が少いことも考えられた。しかし、ヘモリジン液を希釈してエンテロトキシン検出を試みる等の方法を実施していないので明らかでない。ヘモリジン非産生株でCHO細胞での測定が疑陽性あるいは陽性範囲にある株の検出が近年増加していることは、今後の分離状況に注目する必要があると思われる。また、腸炎ビブリオの耐熱性ヘモリジンがRPLA法で6株に認められたが、中和による確認が出来ていないものの非特異凝集は認められなかった。

4. エンテロトキシン産生をRPLA法によりCAYE-3培地で検討したが、クラシカルコレラ菌では従来のSyncase培地30℃18時間振盪培養が最も適し、エルトールコレラ菌はCAYE-3培地37℃24時間(リンコマイシン90 $\mu$ g/ml含有、ポリミキシンB処理)でもSyncase培地と同等若しくはそれ以上の成績であり有用性が示された。また、CHO細胞法でCAYE-3培地を用いることによってヘモリジン産生による細胞毒性の出現が抑えられるのではないかと考えたが、細胞毒性がみられない株は23株とSyncase培地と同数であった。リンコマイシン90 $\mu$ g/mlに感受性が34株あったがSyncase培地で細胞毒性のみられたものが殆んどであり、溶血活性3単位以上で菌の発育の悪いものと2単位以下で発育の良いものは74%あり、ヘモリジン産生株にリンコマイシン感受性の傾向がみられた。

CAYE-3培地でのCHO細胞法は、Syncase培地と比べ陽性、陰性が明確に判定し易いように思われ、陽性1株はどちらの方法でも検出され、CAYE-3培地の方が振盪培養、高速遠心が不用で省力化になると思われた。また、岩永ら<sup>8)</sup>の報告したAKI培地は、エルトールコレラ菌の微量なエンテロトキシンを数倍も産生させるものであったが、今回実験に用いたエルトールコレラ菌ではAKI培地の効果がみられず、むしろSyncase培地の成績の方が良いものであり、NAGビブリオについて検討を行わなかったため検討する必要がある。

## ま と め

1. 河川からのNAGビブリオの分離は水温の上昇

により高くなるが、近年、年間を通して分離率が高くなる傾向にある。

2. 環境由来123株についてエンテロトキシン検出をCHO細胞法とRPLA法で試みたが、CHO細胞法でのみ1株陽性であった。

3. 123株のうち116株に易熱性ヘモリジンを検出し、このうち6株に腸炎ビブリオの耐熱性ヘモリジンが認められ、ヘモリジン産生に相関してCHO細胞に細胞毒性が認められた。

4. エンテロトキシン産生培地は、クラシカルコレラ菌はSyncase培地30℃18時間振盪培養が一番良く、エルトールコレラ菌はCAYE-3培地37℃24時間ポリミキシンB処理でも同様の成績が得られ、NAGビブリオのCHO細胞による検出も可能であり省力化と有用性が示された。

今後、CHO細胞でのみエンテロトキシン陽性株と腸炎ビブリオの耐熱性ヘモリジン産生6株の検討を行いたい。

報文の概要は、第57回日本感染症学会西日本地方総会(昭和62年11月、宮崎)において発表した。

## 文 献

- 1) 工藤泰雄、松下 秀、山田澄夫 他: NAGビブリオ(0-1以外の*V. cholerae*)のエンテロトキシン産生性、日本細菌学雑誌、35(1)、149、1980.
- 2) 島田俊雄、坂崎利一、小迫芳正: Non-01 *Vibrio cholerae*の分布(1976-1981)およびその毒素産生性について、感染症学雑誌、56(10)、1017-1024、1982.
- 3) KOICHIRO YAMAMOTO、YOSHIFUMI TAKEDA、TOSHIO MIWATANI、AND JOHN P. CRAIG: Purification and some Properties of a Non-01 *Vibrio cholerae* Enterotoxin That Is Identical to cholera Enterotoxin、INFECTION AND IMMUNITY、39(3)、1128-1135、1983.
- 4) KOICHIRO YAMAMOTO、YOSHIFUMI TAKEDA、TOSHIO MIWATANI、AND JOHN P. CRAIG: Evidence That a Non-01 *Vibrio cholerae* Produces Enterotoxin That Is Similar but Not Identical to

- Cholera Enterotoxin, INFECTION AND IMMUNITY, 41 (3), 896-901, 1983.
- 5) 山本耕一郎、マリハ・アルーオマニ、本田武司、竹田美文、三輪谷俊夫：NAG ビブリオの産生する hemolysin の精製とその性状、日本細菌学雑誌、38 (1), 240, 1983.
  - 6) 三輪谷俊夫、神中 寛、竹田美文、工藤泰雄：コレラ菌と毒素原生大腸菌の検査法、菜根出版、66-70, 1981.
  - 7) 竹田美文、三輪谷俊夫：ビブリオ感染症、医歯薬出版株式会社、135-136, 1982.
  - 8) 岩永正明、田辺将夫、山本耕一郎、仲宗根昇：コレラ菌の毒素産生を促進させる新型培地の提案、日本細菌学雑誌、40 (1), 189, 1985.