

## [症例報告]

### TCBS 寒天培地に発育不良な非典型的な *Vibrio cholerae* O139 の 1 例

菅野恵未<sup>1)</sup>・森下良美<sup>1)</sup>・中島祐理香<sup>1)</sup>・立石裕子<sup>1)</sup>・小武春花<sup>1)</sup>

宇賀神和久<sup>1)</sup>・田原佐知子<sup>1)</sup>・吉田勝彦<sup>1)</sup>・福地邦彦<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 昭和大学病院臨床病理検査室

<sup>2)</sup> 昭和大学病院臨床病理診断科

(平成 27 年 10 月 9 日受付, 平成 27 年 11 月 10 日受理)

今回我々は非典型的な *Vibrio cholerae* を経験した。症例は 54 歳男性。3 ヶ月間アジア各国を周り帰国後、突然の水様性の下痢と軽度の嘔気を自覚した。腹痛は無かったが全身に筋痙攣を認めたため、当院救急外来を受診した。便培養で、乳糖非分解のグラム陰性桿菌が多数検出された。TCBS 寒天培地での菌の発育は陰性、生化学性状はオキシダーゼ(+), TSI(+/+), ガス産生(+), 硫化水素(-), インドール(+), 運動性(+), IPA(-), CIT(-), VP(+), リジン(+), DNase(+ )であった。自動機器(WalkAway96)と同定キット(api20E)ではそれぞれ *V. cholerae* 94.9% と 99.9% であった。16SrRNA 領域の塩基配列は 99% *V. cholerae* と一致した。抗血清の O139 に凝集を認め、コレラ毒素遺伝子陽性であったことから *V. cholerae* O139 による「コレラ」と確定した。

**Key words:** *Vibrio cholerae*, O139, ベンガル型コレラ, TCBS, 海外旅行者下痢症

## 序 文

感染性腸炎の起原因菌として重要である *Vibrio cholerae* はコンマ状のやや湾曲したグラム陰性桿菌であり、菌体表面の O 抗原 (リポ多糖体) の違いによって、現在 200 以上の種類に分けられている<sup>1)2)</sup>。その中でも特に三類感染症コレラの原因菌とされているコレラ毒素産生性の血清型 O1 及び O139 の *V. cholerae* は、日本での検出は稀だが迅速な同定が必要である<sup>2)</sup>。今回同定に苦慮した非典型的な *V. cholerae* O139 を経験したので報告する。

## I. 症例

患者：54 歳，日本人男性。

既往歴：特記事項なし

現病歴：仕事の関係で約 3 カ月間アジア各国 (バン

グラディシュ, タイ, カンボジア, ベトナム, 中国) を周り帰国した。帰国翌朝より、突然の下痢(水様性, 20~30 回)と軽度の嘔気を自覚し、腹痛は無かったが全身に筋痙攣を認めたため、当院救急外来を受診した。受診時の血液検査では TP 10.2 g/dL, Alb 6.8 g/dL, RBC 720×10<sup>4</sup>/μL, Hb 21.6 g/dL, Ht 60.6% と高度脱水所見を認め、また、CRP 2.86 mg/dL, WBC 19,900 /μL と炎症所見も認めたため、感染性腸炎疑いで当院消化器内科へ転科、入院となった。入院時、下痢・腹痛を自覚し腸管浮腫・液体貯留を認めたため、生食 500 ml×3 の多量補液と Levofloxacin 500 mg/day 内服で治療を開始した。入院後の経過は、第 3 病日より下痢・腹痛が改善傾向を示し、第 4 病日には食事を開始し Levofloxacin の内服を終了した。その後、経過良好であったため第 7 病日で退院となった。

## II. 微生物学的検査

### 1. 分離培養検査

受診時に提出された便について検査を行った。培地はトリ・ソイ血液寒天培地(ヒツジ)(以下血液寒天培地)(極東製薬), BTB 乳糖加寒天培地(以下 BTB 寒天培地)(日本ベクトン・ディッキンソン, 以下日

著者連絡先：(〒142-8666) 東京都品川区旗の台 1-5-8

昭和大学病院臨床病理検査室

菅野恵未

TEL: 03-3784-8477 (直通)

FAX: 03-3784-8481

E-mail: e.sugano@cmed.showa-u.ac.jp

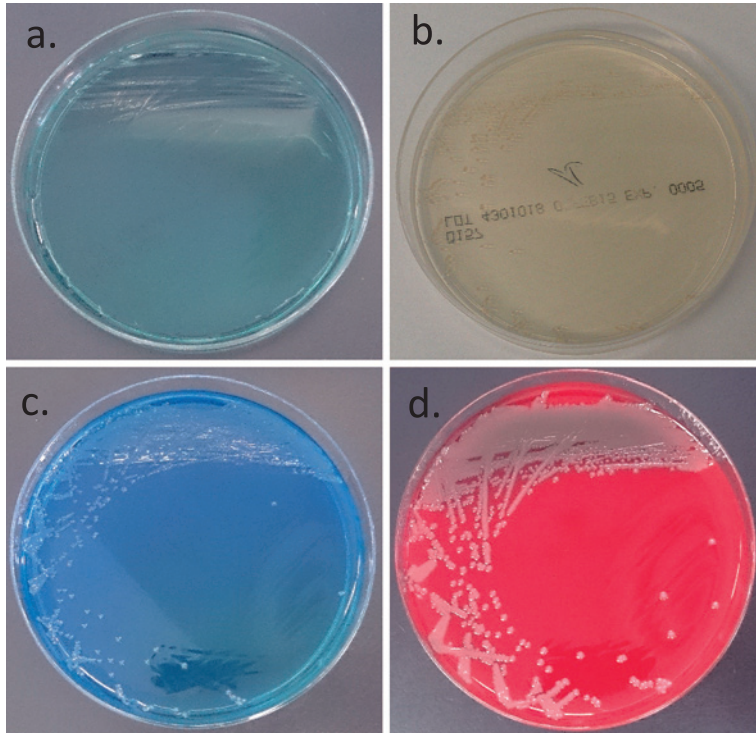


図1. Colonies after 24 hours cultivation  
a. TCBS agar b. CHROMagarO157 c. BTB agar d. Blood agar

本BD), サルモネラ・シゲラ寒天培地 (日本BD), TCBS寒天培地 (日本BD), クロムアガー O157 (日本BD) を用いて 35℃ 好気培養を行い, スキロー寒天培地 (自家調整) を用いて 42℃ 10% 炭酸ガス培養を行った。24 時間培養後, 血液寒天培地, BTB 寒天培地, クロムアガー O157 に菌の発育を多数認めたが, TCBS 寒天培地に菌の発育は認めなかった (図1)。

## 2. 同定検査

血液寒天培地, BTB 寒天培地, クロムアガー O157 に発育した菌の生化学性状は確認培地: Triple sugar iron (TSI) 培地 (極東製薬), Sulfide indole motility (SIM) 培地 (極東製薬), Simmons citrate (SC) 培地 (極東製薬), Voges Proskauer (VP) 培地 (極東製薬), Lysine indole motility (LIM) 培地 (極東製薬), DN エース培地 (栄研化学) による用手法と, MicroScan WalkAway96 (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス, 以下シーメンス), パネル MicroScan Neg Combo 6.11J (シーメンス) による自動分析器 (CLSI: M100-S19 に準拠) 及びグラム陰性桿菌用同定キット api20E (シスメックス・ビオメリユー) を使用して実

施した。結果はガス産生能, VP 試験, リジン脱炭酸試験, DNase が陽性であり, また, チトクローム・オキシダーゼ試験が陽性であったことから同定不能であった (表1)。次に MicroScan では *V. cholerae* (バイオタイプ 60010105) に 94.9%, api20E でも *V. cholerae* (バイオタイプ 5347124) に 99.9% の確率で同定された。しかし, TCBS 寒天培地に発育が無く, ガス産生能, DNase が陽性であったため上記 3 項目について再検査を行ったが, 結果は初検時と変わらなかった。TCBS 寒天培地に発育が無いことに疑問はあったが 2 種の同定法で *V. cholerae* が高確率であったことから抗血清 (コレラ菌免疫血清「生研」(デンカ生研), ピプリオコレラ免疫血清 O139“Bengal” (デンカ生研)) によるスライド凝集法を行ったところ, O1 (混合型・稲葉型・小川型) は陰性, O139 陽性となった。ここで *V. cholerae* O139 として品川区保健所に報告し, 後日保健所の遺伝子検査にてコレラ毒素遺伝子陽性であることが判明した。

## 3. 16SrRNA 解析

非典型的な *V. cholerae* であったため, 菌種同定の目的で 16SrRNA 領域の塩基配列解析を行った。PCR

表 1. Biochemical and physiological characteristics

test	Reaction (days of incubation)
Oxidase	+
Slant/Butt (TSI)	+ / +
H <sub>2</sub> S (TSI)	-
Gas (TSI)	+
Lysine (LIM)	+
Indole (SIM)	+
Motility (SIM)	+
IPA (SIM)	-
Voges-Proskauer	+
Simmons Citrate	+
Urease	-
DNase	+
Growth on Nutrient Broth	
0% NaCl	+
3% NaCl	+
5% NaCl	-
7% NaCl	-
10% NaCl	-
Monoclonal Antibody	
Anti A	-
B	-
C	-
O139	+
Cholera Toxin	+

表 2. Result of antimicrobial susceptibility test

Antimicrobial agents	MIC (μg/ml)
Ampicillin	< = 4
Piperacillin	< = 8
Cefazolin	< = 4
Cefotiam	< = 8
Cefotaxime	< = 8
Ceftazidime	< = 1
Cefpirome	< = 8
Cefaclor	< = 8
Cefpodoxime proxetil	< = 4
Cefmetazole	< = 4
Flomoxef	< = 8
Imipenem/Cilastatin	< = 1
Aztreonam	< = 8
Cefcapene pivoxil	< = 0.25
Sulbactam/Cefoperazone	< = 16
Gentamicin	2
Amikacin	< = 4
Minocycline	> 8
Levofloxacin	< = 1
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	> 2
Fosfomycin	16
Clavulanic acid/Amoxicillin	< = 8

according to CLSI document: M100-S19

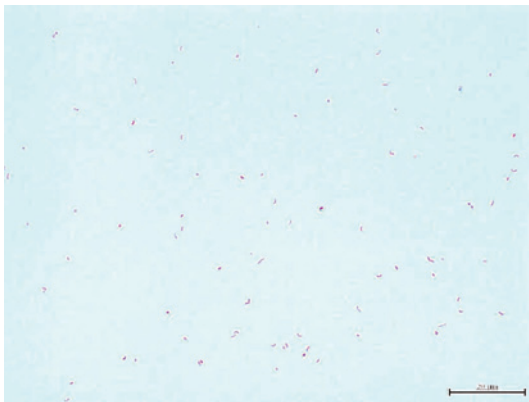


図 2. Gram staining (×1000)

nator を使用して決定した。得られた塩基配列を data base と alignment したところ, *V. cholerae* ATCC 14035 の rRNA と 99% 一致した。また, rRNA 領域内 1 か所に 2 重ピークが認められたため, PCR 産物を pGEM に TA cloning を行い, 複数 clone の全長の塩基配列を決定した。*V. cholerae* 由来の rRNA 領域 DNA について 2 種の clone を得, LC011480 と LC011481 として登録した。

#### 4. 追加検査

追加検査として NaCl 加ペプトン水での発育性 (0%, 3%, 5%, 7%, 10%) とグラム染色像を確認した。0% 及び 3% NaCl のみ発育がみられ, グラム染色では典型的なコマ状のやや湾曲した形態であった (図 2)。なお, 他社の TCBS 寒天培地 (2 社: 極東製薬, 栄研化学) を用い培養を行ったが, どちらも菌の発育を認めなかった。

#### 5. 薬剤感受性検査

パネル MicroScan Neg Combo 6.11J での薬剤感受性試験では, 多くの薬剤の MIC 値が低値となったが, Minocycline, Sulfamethoxazole/Trimethoprim に高値を示した (表 2)。

には, 約 1500 bp の全体を増幅する primer set Forward : 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG, Reverse : 5' TACGGTTACCTTGTTACGA を設定した。得られた PCR 産物を 1% アガロースで精製後, 全長の塩基配列を primer walking により, Big Dye termi-

### III. 考察

*V. cholerae* は200以上のO抗原が知られているが、ヒトに「コレラ」を起こすのはO1とO139の2種類に限定されている<sup>1)</sup>。従来からO1血清に凝集しないものはnon-agglutinable *Vibrio cholerae* (NAGビブリオ)と言われ、O1コレラ菌のように流行を起こすことは少なく行政上は食中毒菌として扱われてきた<sup>1)</sup>。しかし、1992年にインド南東部でコレラ症状を呈した患者から分離された *V. cholerae* はO139というこれまでに見られなかった血清型であり、この菌による劇症コレラの大流行が勃発した<sup>3)</sup>。このO139は成人にも典型的なコレラ症状を発現させることから第二のコレラ原因菌として、最初に分離された地名を付してBengal (ベンガル) 型コレラ菌と命名された<sup>13)</sup>。ヒトに「コレラ」を起こす原因はコレラ毒素であり、このベンガル型コレラ菌もO1コレラ菌と同様に、コレラ毒素を産生するものが「コレラ」とされている<sup>1)</sup>。日本では1999年4月1日以降、この *V. cholerae* O139 “Bengal” も「コレラ」の原因菌として認められた<sup>4)</sup>。

コレラは感染症法にて三類感染症に指定されていること、また重症の場合には下痢の量が1日10リットルないし数十リットルに達し、年少者や老人では致命的になることもあるため、血清型O1およびO139コレラ菌の検出には迅速かつ遅滞のない正確な結果が要求される<sup>2)</sup>。それ故、コレラ菌が疑われる集落が出現した場合には詳細な生化学性状検査よりも、まず血清型O1およびO139を確認しコレラ毒素の検出を行う必要がある<sup>2)</sup>。しかし、糞便の様な常在菌が多量に存在する材料の培養検査では、病原菌の検索に各種選択分離培地が必須であり、選択培地による菌の発育が同定の大きな手がかりとなる。コレラ菌を疑い検査を進めていく上でも *Vibrio* 属の選択分離培地であるTCBS寒天培地への発育性が重要となる。しかし、今回の症例ではTCBS寒天培地に発育不良であり、また、生化学性状も一般的なもの<sup>5)</sup>と異なっていた為、同定に苦慮し、*V. cholerae* と報告するまで時間を要してしまった。TCBS寒天培地に発育しなかった理由として選択物質による影響が唆されるが、今回の検討では原因の究明はできなかった。生化学性状の不一致はManual of Clinical Microbiologyによる *V. cholerae* の生化学性状結果の陽性率によると、ガス産生性は0%であり<sup>6)</sup>、非常にまれなタイプであった。(DNaseについてはデータ無し) 迅速な報告ができなかったことは反省すべき点だが、選択分離培地のみを用いている施設では今回の *V. cholerae* を検出できなかった可能性も唆される。便検体に使用する培地は

選択分離培地だけでなく血液寒天培地、BTB寒天培地等を併用することが重要であることを改めて認識した。

日本におけるコレラの報告は少なく、2007年4月の感染症法と検疫法の改正前までは、年間50例近くの報告数があったが、改正後は年間30例以下となった<sup>7)</sup>。また、国内でのベンガル型コレラ報告数は1993年から2010年までの18年間で12例と少数である<sup>8)</sup>。このように近年日本におけるコレラ菌の分離症例数の減少に伴い、細菌検査室にて本菌を分離経験する機会はほとんどない。当検査室も例外ではなく現スタッフが臨床材料からコレラ菌を検出するのは初めてであった。また、O1とO139の抗血清は別売りであり、O139は報告数も少ないことから本抗血清を所持していない施設も多いと推測される。*V. cholerae* の生化学性状については現在も不明な点があり、今回の様な非典型的な性状を示す場合、経験のないスタッフによる検査で報告が遅延する可能性がある。また、O139の抗血清を所持していない施設では、更に報告が遅れることが危惧される。

今回の症例では培養菌からのグラム染色像で *Vibrio* 属に典型的なコマ状の形態が確認できた。同定当初はBTB寒天培地上の所見で典型的なグラム陰性桿菌様のコロニーであったためグラム染色を省略していたが、同定手段としてグラム染色を早期に行っていれば *Vibrio* 属の推定が可能であったとも考えられる。当院では便培養依頼時、システム上塗抹鏡検を依頼することができないため、便のグラム染色は通常行っていないが、今回のような感染性腸炎を強く疑う症例の場合の同定手段として検体からのグラム染色も有用であったと考える。

コレラ菌は日本での感染は稀であり海外での感染が主なため<sup>9)</sup>、迅速な同定の為には海外渡航歴の情報が重要である。今回の症例も臨床からの情報として海外渡航歴の情報はあったが、コレラ菌の検出自体が日本では稀であることと、検査依頼時の目的菌が腸管出血性大腸菌でありペロ毒素の同時検査依頼もあったこと、そして何よりTCBS寒天培地に菌の発育が無かったことより、コレラ菌を推定することが遅くなってしまった。患者背景や臨床像などを考慮した上での、迅速かつ慎重な同定が必要であった。今後はTCBS寒天培地に発育しない *V. cholerae* が存在することも視野に入れ、必要に応じて16SrRNA領域の解析による同定を行うことが重要である。

なお、本論文の要旨は第26回日本臨床微生物学会

総会（東京，2015年1月）において発表した。

**謝辞：**本症例報告にあたり，分離菌のコレラ毒素遺伝子を検査していただいた品川区保健所に深謝致します。

**利益相反：**申告すべき利益相反なし

## 文 献

- 1) 小林一寛. 2001. *Vibrio cholerae* O139 感染症（ベンガル型コレラ）. 総合臨床 50: 509-515.
- 2) 大友良光. 2011. コレラ菌とナグビブリオ. モダンメディア 57: 273-276.
- 3) 島田俊雄, 荒川英二, 竹田美文. 1995. 新型コレラ菌 *Vibrio cholerae* O139 Bengal によるコレラの流行. 日本細菌学雑誌 50: 1005-1017.
- 4) 厚生労働省国立感染症研究所感染症情報センター. 2002. コレラ 2002年8月現在. The Topic of This Month 23: 219-220. <http://idsc.nih.gov.jp/iasr/23/271/tpc271-j.html>
- 5) 小栗豊子, 西山宏幸, 永沢義三. 2011. 細菌の同定法 グラム陰性桿菌の同定. p. 111-126, 臨床微生物検査ハンドブック（小栗豊子編, 第4版）, 三輪書店, 東京.
- 6) Tarr, C.L., C.A. Bopp, J.J. Farmer III. 2015. *Vibrio* and Related Organisms. p. 762-772, In: Manual of Clinical Microbiology (J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, K.C. Carroll, et al ed., 11th ed), American Society for Microbiology, Washington, D.C..
- 7) 厚生労働省国立感染症研究所感染症情報センター. 2011. コレラ 2006~2010年. The Topic of This Month 32: 95-96. <http://idsc.nih.gov.jp/iasr/32/374/tpc374-j.html>
- 8) 厚生労働省国立感染症研究所感染症情報センター. 2009. 国内発生第2例目のコレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* O139 感染事例一堺市. The Topic of This Month 30: 241-242. <http://idsc.nih.gov.jp/iasr/30/355/kj3551.html>
- 9) 竹田美文. 2000. 感染症の話 2000年第1週. [http://idsc.nih.gov.jp/idwr/kansen/k00-g15/k00\\_01/k00\\_01.html](http://idsc.nih.gov.jp/idwr/kansen/k00-g15/k00_01/k00_01.html)

## Identification of an atypical strain of *Vibrio cholerae*

Emi Sugano<sup>1)</sup>, Yoshimi Morishita<sup>1)</sup>, Yurika Nakajima<sup>1)</sup>, Yuko Tateishi<sup>1)</sup>,  
Haruka Kotake<sup>1)</sup>, Kazuhisa Ugajin<sup>1)</sup>, Sachiko Tahara<sup>1)</sup>, Katsuhiko Yoshida<sup>1)</sup>, Kunihiko Fukuchi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, Showa University Hospital

<sup>2)</sup>Department of Pathology, Showa University Hospital

We identified a strain of *Vibrio cholerae* that showed atypical characteristics. This strain was isolated from a 54-year-old male who presented to the Emergency department of our hospital with muscle spasms throughout his entire body. The patient had watery diarrhea and nausea after returning from a 3-month trip throughout Asia. Stool cultures revealed that a significant number of non-lactose fermenting Gram-negative rods grew on a Drigalski plate, but not on a TCBS agar plate. The biochemical and physiological characteristics of the isolate were as follows; oxidase production: positive, Triple sugar iron agar: positive/positive, gas production from glucose: positive, hydrogen sulfide production: negative, indole production: positive, motility: positive, indolepyruvate production: negative, citrate utilization: negative, Voges-Proskauer test: positive, lysine decarboxylase: positive, and DNase: positive. The isolate was identified as *V. cholerae* by Walkaway96 with an identification probability of 94.9% and by api with 99.9%. The DNA sequence of the 16S rRNA region was 99% identical to that of the ATCC 14035 strain of *V. cholerae*. The strain agglutinated with anti-*V. cholerae* O group 139 and was positive for the cholera toxin gene. Thus, we identified the strain as *V. cholerae* O139.