

# 山梨県におけるバリ島旅行者のコレラ発生について

植松香星 金子通治 矢崎英夫\*

A Case of Bali Island Traveller's Diarrhea Caused by  
*Vibrio cholerae* O1 in Yamanashi Prefecture

Kousei UEMATSU, Michiharu KANEKO and Hideo YAZAKI

近年海外旅行者の増加に伴い、渡航者下痢症の発生が注目されてきている<sup>1)</sup>。それらはサルモネラ、毒素原性大腸菌、赤痢菌、コレラ菌等による下痢症でいわゆる輸入感染症である。そのような状況下、平成7年2月6日山梨県でバリ島旅行者からコレラ患者が発生した。その発生以後全国でバリ島旅行者のコレラ患者の発生が相次ぎ1都1道2府31県にも及んだ。平成7年2月6日から3月20日までに真性211名、疑似31名および保菌者17名の合計259名となった<sup>2)</sup>。以前から海外渡航者コレラについては、無症状者を含め毎年約40名から100名の発生<sup>3)</sup>があり、防疫対策上無視できない現状であった。今回のバリ島旅行者コレラは1994年の海外渡航者コレラ90名<sup>4)</sup>の約3倍の患者数となり、1946年1,250名のコレラ患者発生<sup>5)</sup>に次ぐものである。そこで今回、山梨県が初発事例となったこのバリ島旅行者コレラの発生について疫学的、細菌学的に検討したので報告する。

## 事件の発端

平成7年1月30日から2月4日にかけてインドネシア、バリ島へ旅行した甲府市内の親子2名が、2月4日成田検疫所に下痢である旨を申告した。そのうち娘のA(37歳)の糞便から、エルトル小川型コレラ菌が検出された旨の連絡が2月6日山梨県健康増進課に入った(2月6日成田検疫所分離)。この娘Aは甲府市内に戻ってきており、即日市内の隔離病舎に収容された。このため2月6日所轄の甲府保健所から、一緒に旅行した母親B(60歳)、旅行はしてはいるが娘Aの父親Cおよび患者宅を訪問した知人Dの糞便検査の依頼があった。

\* : 山梨県甲府保健所

## 検査方法

### 1. 検査材料

母親B、父親Cおよび2月5日に患者宅を訪問した知人Dの糞便3検体および娘Aの隔離病舎で分離された1菌株の計4検体である。Bの糞便については、糞便0.1mlを生理食塩水で10倍希釈系列をつくり、それぞれの希釈液0.1mlを標準寒天培地およびTCBS寒天培地に接種して一般生菌数およびコレラ菌数を測定した。

### 2. コレラ菌分離同定法

コレラ菌分離には、「コレラ菌検査のてびき」<sup>6)</sup>により行った。すなわち、増菌培地はアルカリペプトン水を用いて2次増菌まで行い、分離培養にはTCBS寒天培地およびビブリオ寒天培地を用いた。TCBS寒天培地に生じた典型的なコロニーをTSI(栄研化学)、LIM(日水製薬)に植菌し、生化学的性状を確認した。チトクロームオキシダーゼ陽性な株について、好塩性試験および市販簡易キット(バイオテスト1号、栄研化学)による同定を行った。

血清型別は市販抗血清(デンカ生研)およびスライド凝集による市販ラテックス(デンカ生研:コレラ菌AD)を用いた。

アジア型およびエルトル型の生物型別は、ヒツジ赤血球溶血性<sup>7)</sup>、ニワトリ赤血球凝集性<sup>8,9)</sup>、ポリミキシン感受性<sup>10)</sup>およびVP試験(VP半流動培地:栄研化学)を実施した。

### 3. コレラ毒素(CT)産生性試験

菌株をCAYE-L<sup>9)</sup>培地に接種し、35°C18時間静置培養後4°C10,000rpm20分間遠心した上清を粗毒素液とした。

毒素検出は RPLA 法（デンカ生研および栄研化学）により行った。

#### 4. PCR 法によるコレラ毒素遺伝子 (*ctx*) の検出

プライマーは小林らのもの<sup>11)</sup>（和光純薬）を用いた。核酸の抽出は煮沸法により行い、菌の滅菌精製水懸濁液を 100°C 10 分間煮沸し、鋳型 DNA の調整を行った。PCR 反応液は 1 検体当たり次のように調整した。10× reaction buffer 5 μl（バイオテック）、Taq ポリメラーゼ 0.5 μl（バイオテック）、25 mM MgCl<sub>2</sub> 4 μl、dNTP 0.5 μl（和光純薬）、プライマーのセンスおよびアンチセンスをそれぞれ 1 μl、滅菌精製水 33 μl および鋳型 DNA 5 μl の計 50 μl とした。

DNA の増幅は Thermal Cycler（PERKIN-ELMER CETUS 社製）を用いた。

温度条件は DNA の変性 94°C 1 分、アニーリング 55°C 2 分、DNA 伸長 72°C 2 分を 1 サイクルとし、25 サイクル行った。増幅 DNA の検出は 3% アガロース電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により行った。

#### 5. 薬剤感受性試験

NCCLS 法<sup>12)</sup>に準拠したセンシディスク（BBL）を用いて行った。使用薬剤は SA（スルフィソキサゾール）、SM（ストレプトマイシン）、TC（テトラサイクリン）、CP（クロラムフェニコール）、KM（カナマイシン）、ABPC（アンピシリン）、CET（セファロチン）、CFX（セフォキシチン）、LMOX（ラタモキシフ）、NA（ナリジクス酸）、NFLX（ノルフロキサシン）および CL（コリスチン）の 12 薬剤である。

## 結 果

### 1. 疫学的調査結果

A、B 親子の行動は表 1 および表 2 に示した。現地での食事や行動は同一ツアー者とは異なっていた。

1 月 30 日

成田 11 時発 JAL 725 便に搭乗。20 時 25 分にデンパサル空港に到着。夕食はホテル側が用意したフルーツおよびジュース（氷の有無は不明）を喫食。

1 月 31 日

朝食は、ホテル内のレストランで喫食、昼食は食べず、買物のため外出。夕食は午後 4 時頃のルームサービスであった。この時までには 2 名とも健康状態は良好であった。

2 月 1 日

母親 B の体調が悪いため、親子 2 名とも終日ホテルにて休養。B の症状は下痢、腹痛、嘔吐で食欲が無く、B は夕食のサンドウィッチを喫食せず。A の健康状態は

良好。

2 月 2 日

朝食は、ホテル内のレストラン、昼食はホテルの自室で娘 A のみ喫食。夕食は市中レストランであった。

A の症状は午後から 10～15 回の下痢になり、B は軟便程度程度の軽い症状であった。

2 月 3 日

朝食はホテル内のレストラン、昼食はホテル内の和風レストランで喫食。夕食はホテルのレストランが調製したサンドウィッチを空港の待合室で喫食。2 名の症状は A が 10 回程度の下痢があり、B は軟便程度であった。

2 月 4 日

A および B は成田空港の検疫において、症状がある旨を申告した。親子共に問診を受けたが、B は症状が落ち着いていたためか、検疫所の判断で糞便検査が省略された。A の症状は 10～15 回の下痢（白い水様便）、B は軟便のみの軽い症状であった。

2 月 5 日

この日は 2 名とも外出せず、在宅。A の症状に変化無く、下痢の状態が 6 日まで続いた。B についても症状の変化はみられなかった。この日の夜、成田検疫所から、患者の自宅にコレラの疑いがあるので外出自粛要請があった。

2 月 6 日

検疫所から山梨県健康増進課を通して A がコレラである旨の連絡が甲府保健所に入った。同日、当衛生公害研究所には保健所からコレラ患者接触者の検便依頼の連絡が入った。A の症状は依然として水様性の下痢（9 回/日）が続き、甲府市内の伝染病隔離病舎に隔離された。これと同時に自宅の消毒が行われた（甲府市対応）。

2 月 7 日

保健所から母親 B および接触者の糞便が当所に搬入された。この時の B の糞便は粘液便であった。

2 月 9 日

B がコレラ菌陽性であったことを保健所に報告。B は甲府市内の隔離病舎に隔離され、自宅の消毒がされた（甲府市対応）。

2 月 21 日

排菌が無いことが確認され A、B 共に退院。その後県内でのバリ島渡航者の発生は無いものの、全国的にその発生はまだ続いていた。その発生状況<sup>13)</sup>を図 1 に示した。

### 2. 細菌学的検査結果

市販のコレラ菌検出キットであるコレラ菌 AD を用い、3 名の糞便から直接コレラ菌 O 抗原検出を試みた。その結果、B の糞便のみから小川型のコレラ菌である感作ラテックス A および B に凝集がみられた。

同時に B、父親 C および訪問者である知人 D の 3 名の



表1 A, B 2名の喫食状況

日 時	日 内	容 容
1月30日	昼 食	機内食
	夕 食	バナナ, リンゴ, トロピカルジュース
1月31日	朝 食	コーヒー, パン, ソーセージ, メロン, スイカ
	昼 食	なし
	夕 食	スープ (マッシュルームのクリーム煮風, 海鮮トマト風味), チャーハン, 肉の串焼き, 野菜サラダ, ケーキ
朝昼夕の区別無し: ミネラルウォーター, 缶ジュース, バナナ, リンゴ		
2月1日	朝 食	前日の残ったパン, 缶ジュース, ミネラルウォーター
	昼 食	同上
	夕 食	サンドウィッチ (Aのみ喫食, 具はチーズ, ハム, ベーコン, 鶏肉, ジャガイモ), 紅茶
2月2日	朝 食	卵料理, パン, メロン, 紅茶
	昼 食	パン (前日のルームサービスの残り), 氷入りジュース (Aのみ喫食)
	夕 食	小海老の揚げ物, チャーハン, 野菜炒め, 肉と卵のスープ, ロブスター
2月3日	朝 食	スクランブルエッグ, 野菜サラダ (キュウリ, レタス), 紅茶
	昼 食	うどん
	夕 食	サンドウィッチ (ホテル内のレストラン調製)

糞便検査を行った。父親C, 訪問者Dはコレラ菌は分離されなかったが, BからはTCBSおよびビブリオ寒天培地の直接分離培養で白糖分解による典型的なコレラ菌のコロニーが分離された。このコロニーの性状は, チトクロームオキシダーゼ (+), TSI (A/A), リジン (+), インドール (+), 運動性 (+) であった。詳細な生化学的性状を表3に示したが, 典型的なコレラの性状であった。また, RPLA法によるコレラ毒素産生性試験を実施したところ, コレラ毒素は陽性であり, コレラ菌と同定された。さらに血清型別およびヒツジ赤血球溶血性 (+), ニワトリ赤血球凝集性 (+), ポリミキシン感受性 (-) およびVP (+) であることからエルトル小川と決定した。また, Bの糞便中の菌数算定をしたところ, 一般生菌数は $1.6 \times 10^8$  個/ml, コレラ菌数は $2.3 \times 10^6$  個/mlであった (表4)。

隔離された患者A由来株は, Bと同じエルトル小川, 毒素産生性のコレラ菌であった。薬剤感受性試験の結果においてもB由来株と同じ耐性パターンを示し, SA, SM および CL の耐性株であった。

### 3. PCR法による *ctx* 遺伝子の検出結果

PCRの結果を図2に示した。レーン1, 2はAおよびB由来の菌のDNAで380bpの大きさに増幅されていた。これは既知の *ctx* 遺伝子の大きさと同じであり, RPLA法の結果と一致した。レーン3は陰性コントロール, レーン4は陽性コントロールである。

## 考 察

1961年から始まったエルトルコレラの第7次パンデミーは今でも東南, 西南アジアを中心に続いている。南米においては1991年コレラの流行がみられた<sup>13,14)</sup>。わが国でも昭和30年代から全国的にその影響を受け, 散発的に渡航者コレラの発生がみられた。山梨県においても昭和38年5月 (イギリス人1名, インド渡航歴あり)<sup>15)</sup>, 昭和59年3月 (県内在住者1名, 海外渡航歴なし), 平成2年8月 (神奈川県在住者1名, インドネシア渡航) および今回の平成7年2月 (県内在住者2名, インドネシア渡航) とこの32年間に4事例の発生がみられた。

今回の事例は県内在住者の海外渡航による患者2名の発生であった。腹痛, 下痢の症状が渡航先で既にあり, 2名とも成田の検疫所で自己申告しているものの, 検疫所において細菌学的検査を実施したのはAのみであった。この時, 2名同時に検査を実施してあれば, 防疫対策はさらに容易であったであろうと思われる。

この事例を疫学的に検討してみると, コレラの潜伏期間 (1~5日間) から国内感染もありうるが, バリ島への旅行をしていない家族が感染していないことや, 県内での発生が無いことから国内での感染はなかったものと思われる。AおよびBは同一の行動をとり, ほぼ同一のものを喫食していること, およびこの親子コレラ患者発

表2 A, Bの健康状態と日程

	A		B		日 程
1月30日	良	好	良	好	20:25 デンパサル空港到着
1月31日	良	好	良	好	プラザパリに買物
2月1日	良	好	下 腹	痢 痛	終日自室
2月2日	下 (午 後)	痢 後)	軟	便	スタービーチ ケチャックダンス見学
2月3日	下	痢	軟	便	ガリレアショッピングセンターに買物 21:45 デンパサル空港出発
2月4日	下	痢	軟	便	8:20 成田空港到着 検疫所に症状の自己申告
2月5日	下	痢	軟	便	自宅
2月6日			軟	便	Aは隔離, Bは自宅
2月9日			軟	便	Bの隔離
2月21日					2名とも退院

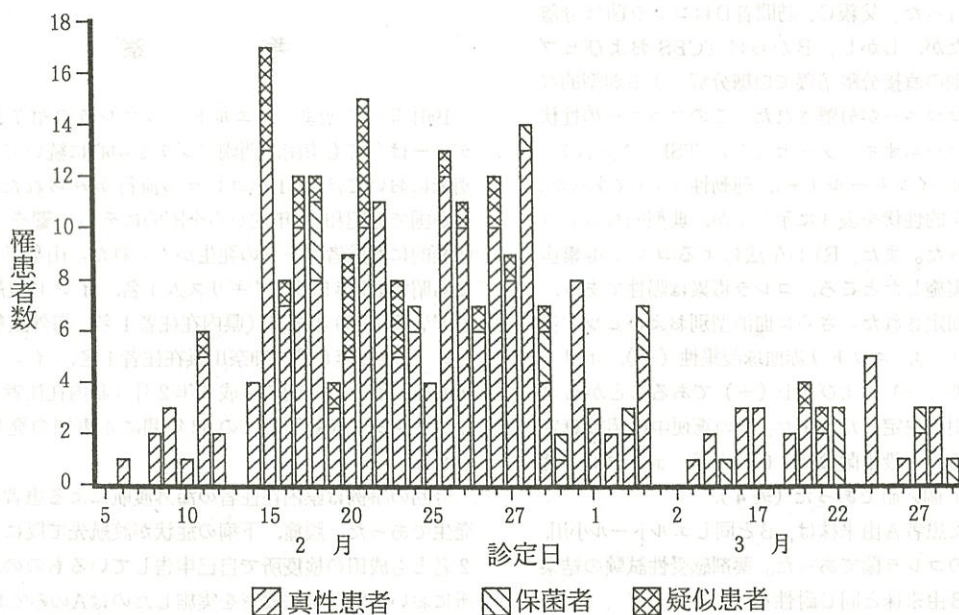


図1 バリ島旅行者コレラ発生状況

生以後から全国的にバリ島旅行者のコレラの発生が続いたことから、海外旅行中に感染した可能性が高いと考えられる。2名の発症時間に差があるが、これは一つには、AはBから直接感染を受けたということが考えられる。またもう一つの考え方は2人とも同時に感染したが、菌

量の違いや宿主側の抵抗力などにより、その結果発症時間に差異がみられたということである。海外での発症であり、どちらであるかの推定は難しい。原因食については、母親Bが2月1日から発症していることから、それ以前から喫食しているトロピカルジュース、カットフルー



表3 分離されたコレラ菌の生化学的性状（2株とも同一性状）

チトクロームオキシダーゼ	+	乳糖	(+)
カタラーゼ	+	白糖	+
インドール	+	麦芽糖	+
Voges-Proskauer テスト	+	アラビノース	-
クエン酸塩 (Simmons)	+	セロビオース	-
硫化水素 (T S I)	-	マンノース	+
硝酸塩還元	+	ラムノース	-
ゼラチン液化	+	トレハロース	+
ウレアーゼ	-	キシロース	-
フェニールアラニンデアミナーゼ	-	マンニット	+
リジンデカルボキシラーゼ	+	アドニット	-
オルニチンデカルボキシラーゼ	+	ズルシット	-
アルギニンジヒドロラーゼ	-	イノシット	-
ブドウ糖からのガス産生	-	ソルビット	-
糖分解 (酸)	+	サリシン	-
ブドウ糖	+	ONPG	+

+ : 陽性 (+) : 遅れて陽性 - : 陰性

ツ、野菜サラダが原因として考えられるが、調理場所が外国のことであり、また時間がかなり経過していることもあって原因食追求は不可能であった。

疫学調査、薬剤感受性試験、細菌学およびPCR法検査の結果から、AおよびBから分離されたコレラ菌は同一である可能性が高い。山田ら<sup>2)</sup>はバリ島旅行者由来のコレラ菌について薬剤感受性を実施している。それによるとSM耐性株と感受性株の2種類に分類されるといふ。山田が分離したSM耐性菌と、われわれが分離した菌が起源が同一かどうか興味深い。

コレラ毒素の検出法は今回PCR法およびRPLA法を併用して行った。PCR法はRPLA法の結果確認の意味で行ったが、この2法の結果が一致しうまう行えたので「コレラ菌検査の手引き」<sup>6)</sup>に記載されていない方法であるが今後実施していく必要がある。PCR法はRPLA法と比較してCAYE-Lの培養時間が無いだけ1日判定時間が短い。それだけ早く防疫体制を整えられる利点がある。DNAのコンタミネーションにより疑陽性になる欠点があるので、ディスポ手袋の使用、飛沫の防止、DNA汚染区域と低汚染区域の使い分け、陽性コントロールおよび陰性コントロールを置くなどのコンタミネーション防止<sup>16)</sup>の基本的なPCR法の注意点を考慮に入れ慎重に取り扱う必要がある。

今後ともコレラ対策を強化する上で、海外渡航者への事前の衛生教育が大切であり、症状が軽微であっても検査を実施する必要がある<sup>17)</sup>。成田航空検疫所においては、海外旅行者向けに次の3点を呼びかけている。

1 現地での飲食物について十分注意すること。生水、水、生鮮食品（魚介類、すし、刺身、カットフルーツ）などは特に危険である。

表4 Bの糞便の細菌学的検査結果

一般生菌数	1.6×10 <sup>8</sup> 個/ml
コレラ菌数*	2.3×10 <sup>6</sup> 個/ml

\* : エルトール小川, CT産生



M : マーカー ( $\phi$ x174/*Hinf* I)  
 1 : A子由来株  
 2 : B子由来株  
 3 : VTEC (0157:H7)  
 4 : *V.cholerae* 0139

図2 PCR法によるctx遺伝子の検出結果

2 旅行先でも十分な睡眠をとり、体力の維持に努めること。

3 手洗いを励行すること（特に食事前、排便後など）さらに症状がある旅行者へは、申告の推進を呼びかけている。バリ島旅行者のコレラは終息していると思われるが、今後もコレラをはじめとした渡航者下痢症の監視が必要である。

謝 辞

最後に疫学的調査をしていただいた山梨県甲府保健所  
大澤かおり主任に深謝いたします。

文 献

- 1) 宮田義人ら：大阪府立公衛研年報 公衆衛生編, 32, 1~20 (1994)
- 2) 山田澄夫：東京都微生物検査情報, 16, 11 (1995)
- 3) 山田澄夫：東京都微生物検査情報, 15 (8), 1 (1994)
- 4) 厚生省エイズ結核感染症課：病原微生物検出情報, 16, 106~107 (1995)
- 5) 桑原章吾：モダンメディア, 41 (5), 25~32 (1995)
- 6) 厚生省保健医療局疾病対策課結核・感染症対策室長：コレラ菌検査の手引き, 昭和 63 年 9 月 28 日

- 7) Sakazaki, R., et. al. : Jpn. J. Med. Sci. Biol., 24, 83~91 (1971)
- 8) Finkelstein, R. A., et. al. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 112, 355~359 (1963)
- 9) Zinnaka, Y., et. al. : Jpn. J. Microbiol., 8, 97~103 (1964)
- 10) Gan, K. H., et. al. : Am. J. Hyg., 77, 184~186 (1963)
- 11) 小林一寛ら：感染症誌, 64, 1323~1329 (1990)
- 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards, 4, (1984)
- 13) 山田澄夫：東京都微生物検査情報, 12 (2), 1 (1991)
- 14) 山田澄夫：東京都微生物検査情報, 12 (10), 1 (1991)
- 15) 小沢尚夫：山梨衛研所報, 6, 18~20 (1963)
- 16) 国立予防衛生研究所細菌部：腸管出血性大腸菌迅速検査法技術研修会マニュアル, 15~16 (1991)
- 17) 厚生省公衆衛生局長通達：コレラ汚染地域より来航する船舶等に対する検疫上の取扱いについて, 昭和 52 年 7 月 26 日

M A S I M

