

るポリミキシンBの濃度は1 L中25万単位(32.25 μ g/ml)である。また、ポリミキシンはA、B、C、D、Eの5種類があり、*Bacillus polymyxa*が産生するペプチド系抗生物質で、その作用機序は細菌細胞外膜のリン脂質に結合し、ホスホリパーゼを活性化して細菌細胞膜を破壊することである。他方、コリスチンは*Bacillus colistinus*の培養液中から見出された塩基性の環状ペプチド抗生物質で構造的にも、生物学的特性においてもポリミキシンと類似し、ポリミキシンEとも呼ばれていて、細菌毒性は低い。私達はHOIらの報告³⁾に基づき、供試菌のMICを測定し、*V. vulnificus*はコリスチンとポリミキシンBに対するMICの高いことが確認できたが、同時に *V. parahaemolyticus* や *V. cholerae* 01 などの下痢原性ビブリオも高いMICを示していた。次にCCPブロスとCBブロスにコリスチンとポリミキシンBを種々の濃度に加えて供試菌の増殖態度を検討したところ、表3に示すとおりアルカリペプトン水で一次増菌した供試菌は、*V. vulnificus*をはじめ *V. parahaemolyticus* やNAG *Vibrio* などの下痢原性ビブリオを含めて37℃、5～8時間、二次増菌することでCCPブロスおよびCBブロスで十分な増殖が認められた。しかし、CBブロスではその他のビブリオ類似菌までも増殖されたことについては、ポリミキシンBやコリスチンがCBブロス組成中の胆汁酸の界面活性作用のため効果が減弱し、添加濃度より低下したもの³⁾と考えられた。このことから、増菌培地の組成は*V. vulnificus* がセロビオースを利用して増殖し、コリスチンを高濃度(100 μ g/ml以上)に含むが胆汁酸を含まない処方であることから、図1に示すCCPブロスの組成を開発した。

環境および食品検査材料25gをアルカリペプトン水225mlで37℃、16～20時間、一次増菌後、二次選択増菌培地としてコリスチン200 μ g/ml含有CCPブロス10mlに一次増菌培地の表層部分を0.5～1ml加え37℃、5～8時間、二次増菌培養後、選択分離培地として田村らが開発したCB培地と組み合わせることにより、CCPブロスでその他の下痢原性ビブリオが多少増殖してもCB培地上でのセロビオースの分解能の違いによるコロニーの呈色の相違から鑑別が付き、*V. vulnificus* の検出率を上昇させることができる。

このCCPブロスは組成も単純で、経済的にも低廉な選択増菌培地であると考えられる。今後は平成15年度の魚介類の実態調査に組み込み、本格的な評価を実施していく予定である。

引用文献

- 1) 食品衛生検査指針 微生物編：腸炎ビブリオおよびその類縁菌，134-151頁，社団法人日本食品衛生協会，東京，(1990)

- 2) Food and Drug Administration : Bacteriological Analytical Manual.
Chapter 9. 8 th edition. 1996.

- 3) Hoi, L., I. Dalsgaard and A. Dalsgaard. 1998. Improved isolation of *Vibrio vulnificus* from seawater and sediment with cellobiose-colistin agar. Appl. Environ. Microbiol. 64:1721-1724.

表1 供試菌株リスト

一連NO	strain NO	菌種名	
B1		<i>V.vulnificus</i>	O1 血清型別用菌株
B2			O2
B3			O3
B4			O4a
B5			O5
B6			O6
B7			O7
B8			O8
B9			O9
B11			O11
B12			O12
B13			O13
B14			O14
B15			O15
B16			O16
B17	523-01	<i>V.vulnificus</i>	熊本県保健環境科学研究所
B18	524-01		
B19	525-01		
B20	526-01		
B21	527-01		
B22	257-02	<i>V.vulnificus</i>	宮城県保健環境センター
B24	259-02		O1
B25	261-02		O8
B26	266-02		O6
B27	SVV00002	<i>V.vulnificus</i>	島根県保健環境科学研究所
B28	SVV00003		O1
B29	SVV00061		O6
B30	SVV00206		O7
B31	SVV00207		O5
B32	4	<i>V.parahaemolyticus</i>	O3:K6
B33	5		O4:K8
B34	6		O4:K68
B35		<i>V.cholerae</i>	O1 ATCC 14035
B36	8	NAG <i>Vibrio</i>	O206
B37		<i>V.fluvialis</i>	ATCC 33809
B38		<i>V.mimicus</i>	ATCC 33653
B39		<i>V.hollisae</i>	ATCC 33564
B40		<i>V.furnissii</i>	ATCC 35016
B41		<i>A.hydrophila</i>	ATCC 7966

表2 コリスチンに対する*V.vulnificus*とその他の*Vibrio*のMIC分布

菌種	株数	MIC (mg/ml)									
		2.5	1.25	0.63	0.32	0.16	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005 >
<i>V.vulnificus</i>	29		17	9	3						
<i>V.cholerae</i> O1	1			1							
<i>V.parahaemolyticus</i>	3			2	1						
<i>V.cholerae</i> non-O1	1										1
<i>V.fluvialis</i>	1										1
<i>V.mimicus</i>	1										1
<i>V.hollisae</i>	1										1
<i>V.furnissii</i>	1										1
<i>A.hydrophila</i>	1										1

表2-2 Kirby-Bauer法による感受性成績

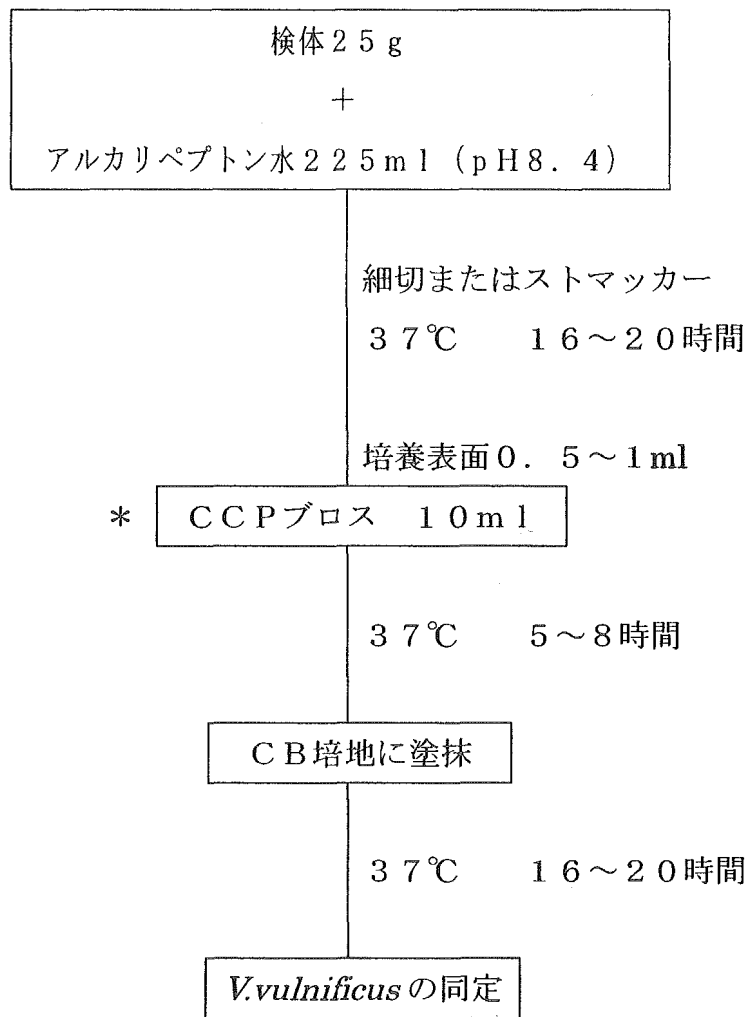
供試菌	センチディスク(阻止円mm)	
	コリスチン10(μg)	ポリミキシンB300(U) (38.7 μg)
B1	R(0)	I(9.4)
B2	R(0)	I(9.1)
B3	R(0)	I(8.4)
B4	R(0)	R(7.8)
B5	R(0)	S(*11.9)
B6	R(7.6)	S(12.4)
B7	R(8.4)	S(12.1)
B8	R(0)	I(9.2)
B9	R(0)	I(9.2)
B11	R(0)	I(9.4)
B12	R(0)	R(0)
B13	R(0)	I(10.3)
B14	R(0)	I(9.7)
B15	R(0)	I(10.5)
B16	R(0)	I(11.5)
B17	R(0)	R(0)
B18	R(0)	R(0)
B19	R(0)	R(7.2)
B20	R(0)	R(0)
B21	R(0)	R(0)
B22	R(0)	I(8.2)
B24	R(0)	I(*8.2)
B25	R(0)	I(8.5)
B26	R(0)	R(0)
B27	R(0)	R(0)
B28	R(0)	R(0)
B29	R(0)	R(0)
B30	R(0)	I(8.4)
B31	R(0)	R(0)
B32	R(0)	S(12.4)
B33	I(11.0)	S(13.7)
B34	R(8.0)	I(11.6)
B35	S(20.2)	S(22.6)
B36	R(7.7)	I(10.7)
B37	S(14.8)	S(15.6)
B38	S(13.8)	S(15.5)
B39	S(20.7)	S(22.8)
B40	S(16.6)	S(18.0)
B41	S(20.1)	S(23.5)

R: 耐性 I: 中間 S: 感受性 *: 突然変異あり

表3 CCPブロスとCBブロスにおける増殖状況

菌株NO	培地 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CCPブロス			CBブロス			
		400	200	100	colistin 200	polymyxin B 200	colistin 200 polymyxin B 200	colistin 100 polymyxin B 100
B1		+	+	+	+	+	+	+
B2		+	+	+	+	+	+	+
B3		+	+	+	+	+	+	+
B4		+	+	+	+	+	+	+
B5		+	+	+	+	+	+	+
B6		+	+	+	+	+	+	+
B7		+	+	+	+	+	+	+
B8		+	+	+	+	+	+	+
B9		+	+	+	+	+	+	+
B11		+	+	+	+	+	+	+
B12		+	+	+	+	+	+	+
B13		+	+	+	+	+	+	+
B14		+	+	+	+	+	+	+
B15		+	+	+	+	+	+	+
B16		+	+	+	+	+	+	+
B17		+	+	+	+	+	+	+
B18		+	+	+	+	+	+	+
B19		+	+	+	+	+	+	+
B20		+	+	+	+	+	+	+
B21		+	+	+	+	+	+	+
B22		+	+	+	+	+	+	+
B24		+	+	+	+	+	+	+
B25		+	+	+	+	+	+	+
B26		+	+	+	+	+	+	+
B27		+	+	+	+	+	+	+
B28		+	+	+	+	+	+	+
B29		+	+	+	+	+	+	+
B30		+	+	+	+	+	+	+
B31		+	+	+	+	+	+	+
B32		-	+	+	±	±	±	±
B33		+	+	+	±	±	±	±
B34		+	+	+	±	±	±	±
B35		-	-	+	±	±	±	±
B36		+	+	+	±	±	±	±
B37		-	-	+	-	+	-	+
B38		+	+	+	±	±	±	±
B39		-	-	-	+	+	-	-
B40		-	-	+	-	-	-	-
B41		-	+	+	+	+	+	+

+:発育あり ±:一部に発育あり -:発育なし



* CCPブロスの組成 (1 L 中)

ペプトン	10.0 g	
肉エキス	5.0 g	
NaCl	20.0 g	
セロビオース	10.0 g	
コリスチン	200 mg	
DW	1000 ml	pH 8.0 ± 0.4

図1 環境および食品材料からの *V.vulnificus* の検出法

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

Vibrio vulnificus の分離法の検討及び魚介類や環境中の汚染度の検討

協力研究者 荒川英二、田村和満(国立感染症研究所)

研究要旨

Vibrio vulnificus 感染症は、致死率の極めて高い細菌感染症である。我が国においては、過去 26 年間に約 100 例の患者の報告がある。しかし、環境調査の結果によれば、夏場の汽水域の海水から *V. vulnificus* が多数検出されることが明らかになっており、すべての菌が原因になっているとは考えにくい。病原因子についても、ヒトに対して直接病原性と明らかな関連性が見られるものは報告されていない。本研究では、患者、あるいは環境中より分離された *V. vulnificus* の疫学的解析を行うため、菌体抗原の血清型別を行い、その分布状況について調査を行った。その結果、患者由来株は血清型 O4a が 14 株中 7 株と半数を占めていた。その他は O1 が 3 株、O7 が 2 株、O5 と O6 が各 1 株であった。一方、魚介類及び環境中から分離された株のうち、血清型別を行った 103 株では、患者由来株で多く見られた血清型 O4a は 26 株と 1/4 程度であった。次いで O1 が 18 株、O5、O6 が 13 株、O3 が 11 株、OUT が 21 株であった。それぞれの血清型の分離株数の頻度には、関連が見られるような結果であった。

A. 研究目的

Vibrio vulnificus 感染症は、主に肝疾患を基礎疾患に持つヒトが魚介類の生食や、外傷から敗血症を起こし、致死率 50% 以上にもなる極めて重篤な疾患である。また、死亡例の約半数は発病から 3 日未満で死に至っている。

劇症型の症状は、ヒトに対してのみ認められるものであり、そのため病原因子の解析は困難な状況である。

V. vulnificus は腸炎ビブリオと生息域がほぼ同じで、その性状も類似している。TCBS 寒天培地上では色調も同じため、分離同定には別の選択分離培地を必要とする。FDA が推奨する mCPC 培地なども開発されているが、発育抑制が強く、原因菌が食品などを汚染している場合でも、保存条件によっては損傷菌となって検出が困難になる可能性がある。

症状の進行が速いため、分離同定が遅れることは、治療の遅れとなって、すなわち患者の生命を脅かすことになる。そのため迅速に菌を検出、同定しなければいけない。

患者材料から病原体が分離された場合、まず病原体の同定が行われる。細菌の場合は、生化学的性状試験が行われ、近年では分子生物学的手法により、病原因子の保有状況などから原因菌としての確認が行われる。同時に、食中毒などでは、原因と思われる食品などから、原因菌の探索が行われる。患者からの聞き取り調査や、原因菌の性状比較により疫学的に原因を追及する。その際、細菌の場合は、菌体表層にあるリポ多糖(LPS)の多型性を利用した O 血清型別というマーカーが多く利用されている。

V. vulnificus においてもこれまでに O1 ~ O7 までの O 血清型が認められている¹⁾。また、他の *Vibrio* 属菌同様、鞭毛抗原に

関しては同一であるため、疫学解析に利用できない。

本研究では、患者由来株と環境由来株の菌体抗原の血清型別 (O 血清型別) を行うことにより、*V. vulnificus* 感染症における菌の血清型分布、およびそれを用いた疫学的解析を目的とする。

B. 研究方法

1. 供試菌株

表 1 に示す血清型参照株と、熊本県、静岡県、岡山県で発生した *V. vulnificus* 感染症の患者より分離された株 14 株、熊本県、島根県、宮城県の沿岸海水、魚介類から分離された株 103 株を使用した。

2. 抗 O 免疫血清の作成

表 1 の参照株をトリプチケースソイ寒天培地 (TSA) 上に発育させ、発育した菌体を綿棒でかき取り、生理食塩水に懸濁させ、100°C 2 時間加熱した後、3,000 rpm 15 分間遠心分離して、表在性の蛋白質や莢膜などを除いた菌体を集める。得られた菌体を 2×10^9 cells/ml になるように生理食塩水で希釈し、抗原とする。

上記加熱抗原を約 2.5 kg の日本白ウサギの耳静脈に 3 から 4 日の間隔で、それぞれ順に、0.5、1.0、2.0、4.0、4.0 ml ずつ投与する。

最後の投与から 7 日後に、麻酔下で頸動脈より全採血する。得られた血液より血清を遠心操作により分離し、抗血清原液とする。抗血清原液を凝集反応力価を考慮して適宜生理食塩水で希釈し、凝集反应用抗血清とする。

3. 凝集反応試験

[2. 抗 O 免疫血清の作成] で作成された血清を用い、試験菌とのスライド凝集試験を

行う。試験菌は、TSA に発育したものを綿棒でかき取り、生理食塩水に懸濁させ、121°C 35 分 (オートクレーブ使用) 加熱後、3,000 rpm 15 分遠心分離し、上清を捨てる。再び生理食塩水に懸濁させ、3,000 rpm 15 分遠心分離し、上清を捨てる。これを生理食塩水に懸濁させたものを抗原液とする。

抗原液約 10 μ l に対し、抗血清約 10 μ l をスライドガラス上に取り、両者をよく混合する。1 分以内に凝集反応が現れた抗血清をその試験菌の O 血清型とする。

C. 研究結果

スライド凝集反応の結果は以下の通りであった。

患者由来株 (株数 (カッコ内はその%)) :

O1	3	(21.4)
O2	0	(0.0)
O3	0	(0.0)
O4a	7	(50.0)
O5	1	(7.1)
O6	1	(7.1)
O7	2	(14.3)
OUT	0	(0.0)
total	14	(100.0)

環境由来株 (株数 (カッコ内はその%)) :

O1	18	(17.5)
O2	0	(0.0)
O3	11	(10.7)
O4a	26	(25.2)
O5	13	(12.6)
O6	13	(12.6)
O7	1	(1.0)
OUT	21	(20.4)
total	103	(100.0)

(OUT: O untypable)

以上のように、患者由来株、環境由来株のどちらも血清型 O4a が最も多かった。

次いで、O1が多い点も同様であった。また、どちらからもO2型は検出されず、環境由来株からはO1～O7の血清には反応しないOUTが多く見られた。

D. 考察

本感染症の原因菌である *V. vulnificus* は汽水域を生息域とし、水温約15°Cを上回る夏場になると増殖し、海水中や魚介類から検出されるようになる。

沿岸海水、あるいは魚介類を対象とした今回の環境調査によれば、患者発生の多い西日本だけでなく、宮城県においても *V. vulnificus* は分離されており、日本各地の沿岸に広く生息していることがうかがえる。しかしながら、国内で確認されている患者数は、1976年の第1例の報告以来およそ100例にとどまっている²⁾。

当研究所感染症情報センターの調査によれば、*V. vulnificus* 感染症を疑われる患者が、我が国でも年間200例に達するのではないかと推定している(図1)。環境からの菌分離率と比較すると、環境分離菌がすべて原因菌になりうるとすれば、発症するヒトがたとえ基礎疾患のあるヒトに限局されるとしても、それでも少ないと言えるほどに、日本沿岸から本菌の分離例は多い。

沿岸海水、あるいは魚介類から分離された *V. vulnificus* と本菌感染症患者から分離された *V. vulnificus* の関係が明らかになれば、感染源の特定が可能になり、汚染沿岸海水や魚介類に対する注意喚起等の予防的対処が容易になるものと考えられる。

このような疫学的解析手法としては、腸内細菌や他の *Vibrio* 属でも確立されている、O血清型別法がある。腸管出血性大腸菌感染症では、O157が世界的に流行を起している株として広く知られており、一般市民でもO157と言えは腸管出血性大腸

菌感染症の原因菌であることが認知されている。また、コレラ菌はインドで新型のO139型が発生するまでは、*V. cholerae* O1によるものだけが国際的にコレラの原因菌として規定されていた。さらに、近年我が国でも事例数、患者数の著しい増加を見せた腸炎ビブリオ食中毒の原因菌は、*V. parahaemolyticus* O3:K6(Kは莢膜抗原型)の急増によるものであった。

病原性と菌体表面の多糖の構造とは本来関係しないものと考えられるが、特定の血清型の菌が病原因子を持つことにより、流行型となって多くの感染者を発生することを、これまでの血清型による疫学調査で明らかにしてきている。このように今日でも血清型別は、様々な病原菌の疫学解析に有効な手段となっている。

本研究で *V. vulnificus* についても免疫血清を作成することにより、そのO血清型別による調査を行い、興味深い結果を得ることが出来た。

患者発生数が少ないため、患者由来株数は少ないが、血清型としてはO4a型が最も多く、半数を占めていた。環境由来株についても、O4a型が多く分離されており、環境汚染菌が患者発生につながっていることを示唆している。次いで多いO1型についても同様で、環境由来株の血清型の偏りが患者由来株のそれと相関することは、両者の関係をより結びつけるものである。しかしながら、患者由来株から2例も分離されているO7型は、環境由来株からはわずか1株しか見られておらず、この型の菌が環境中で少ない理由については、今後さらに調査をしないといけないと思われる。

環境由来株についてはさらに、OUTとされる、これまでに報告されているO1～O7血清¹⁾のどれとも凝集反応を示さない株が多数検出され、新たに参照株と提案さ

れている O8～O16(表1)のいずれかに属するものと考えられ、今後この型に属する株による患者の発生も予想されるため、早急に検討、調査が必要である。

以上のように血清型別による疫学解析は、非常に有効な方法と考えられるが、患者由来株と環境由来株で見られたような O4a 型という同じ血清型株の解析には、より詳細なデータが得られるパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法などの遺伝子型による解析が必要であるものと考えられる。V. cholerae O1 の国内流行ですでにその有効性は確認されており³⁾、今後、これら方法を組み合わせて、環境汚染菌による患者発生の実態を明らかにしていく予定である。

E. 研究発表

1. 学会発表

荒川英二, 田村和満

Vibrio vulnificus の細菌学的検査法について, 第 23 回衛生微生物技術協議会, 2002

F. 参考文献

1. Shimada T, et al.

On the serology of *Vibrio vulnificus*.
Jpn J Med Sci 37: 241-6 (1984)

2. 古城八寿子ら

Vibrio vulnificus 感染症-診断と治療のフローチャートの試み-
日皮会誌 109(6): 875-84 (1999)

3. Arakawa E, et al.

Pulsed-field gel electrophoresis-based molecular comparison of *Vibrio cholerae* O1 isolates from domestic and imported cases of cholera in Japan.
J Clin Microbiol 38(1):424-6 (2000)

表1 O血清型参照株

Vibrio vulnificus

O-血清群	参照株	由来
O1 (type strain)	ATCC27562	血液 (CDC)
O1 (H-血清作成用)	459-95	エビ (デンマーク)
O2	D3894	血液 (CDC)
O3	E240	血液 (CDC)
O4a	1115-80	血液 (東大病院)
O5	E571	血液 (CDC)
O6	91-81	血液 (京都市)
O7	1338-80	アサリ (神戸市)
O8	191-87	カキ (韓国)
O9	189-87	カキ (韓国)
O10	586-88	エビ (インド)
O11	705-88	血液 (韓国)
O12	371-89	血液 (タイ)
O13	W-vv5	膿 (韓国)
O14	C84-7-4-vv1	血液 (韓国)
O15	889-89	ウナギ (ノルウェー)
O16	611-95	海水 (ドイツ)

2001年(平成13年)7月21日 土曜日

夏の海で増殖「人食い菌」

患者、年200人以上か

感染研調査

い糖尿病などで抵抗力が弱っている人がかかりやすいという特徴がある。危険がある人は、夏場、

生魚を避けるなどの注意をすれば予防が可能だ。抗菌剤が効くので、発病しても早く診断できれば、助かる率は高くなると思われる。

小松崎さんは「これまでに被害が過小に評価されていた。医師への知識普及と肝臓病患者への注意喚起が必要だ」と話す。

救急病院に運ばれる。感染研協力研究員の小松崎真医師は、日本救急医学会の会員約9,300人から、無作為に選んだ386人に調査票を送り「昨年、この菌の患者を診たか」と尋ねた。

その結果、8割が回答。12人が患者を診たと答え、重複はしていなかった。小松崎さんはこの結果から、医師が患者を見落とした可能性なども考慮して統計的な手法で全国での発生数を推計。昨年1年間で最低でも200人は患者がいたはず

と分かったという。これまでは、学会などで約20年間に約1,000人が報告されていただけだったため、患者は年間数人だけと考えられていた。12人の患者は、北海道、青森、東京、愛媛、高知、福岡、佐賀、長崎、熊本の9都道県に分布していた。これまでの報告では秋田県が最北だったが、全国で被害が起きていることも分かった。

ヒブリオ・フルニフィカス感染症は、肝臓が悪くなり、大酒のみの人、重

傷、大酒のみの人、重

図1 朝日新聞2001年7月21朝刊の記事

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

Vibrio vulnificus の患者株と環境株の遺伝型の比較

分担研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所 細菌第一部

協力研究者 荒川英二 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨

Vibrio vulnificus 感染症は、致死率の極めて高い細菌感染症である。我が国においては、過去 26 年間におよそ 100 例の患者の報告がある。しかし、環境調査の結果によれば、夏場の汽水域の海水から *V. vulnificus* が多数検出されることが明らかになっているが、すべての菌がヒトへの感染の原因になっているかは不明である。病原因子についても、ヒトへの病原性と明らかな関連性が証明されたものはまだ報告されていない。本研究では、ヒトに対する菌側の病原因子の探索を目的として、患者由来株と環境由来株を遺伝子レベルで比較し、その違いからこの菌の病原性の解明を試みた。すでに報告のある細胞障害性溶血毒については、全ての患者由来株およびほとんどの環境由来株がそれを保有しており、差がみられなかった。このことは、この溶血毒はヒトへの病原性との関連性が低いのか、あるいは全ての環境由来株が特定のヒトに病気を起こす能力があるのか判定が出来ないことを示唆していた。その他の金属プロテアーゼを含む蛋白分解酵素群、鉄獲得能に関連する鉄輸送に関連する遺伝子の PCR 法による検出系の開発を試みた。血清型参照株では、すべての血清群でいずれの遺伝子も検出された。この系を使って患者由来株と環境由来株について、各遺伝子の保有状況をさらに調査する必要がある。

A. 研究目的

Vibrio vulnificus 感染症は、主に肝疾患を基礎疾患に持つヒトが魚介類の生食や、外傷から敗血症を起こし、致死率 50%以上にもなる極めて重篤な疾患である。また、死亡例の約半数は発病から 3 日未満で死に至っている。

劇症型の症状は、ヒトに対してのみ認められるものであり、そのため病原因子の解析は困難な状況である。

これまでに、cytolysin-hemolysin¹⁾や金属プロ

テアーゼ²⁾、ホスホリパーゼ³⁾、siderophore⁴⁾などが関与するとの報告があるが、いずれも直接の作用はわかっていない。

V. vulnificus は腸炎ビブリオと生息域がほぼ同じで、その性状も類似している。TCBS 寒天培地上では色調も同じため、分離同定には別の選択分離培地を必要とする。FDA が推奨する mCPC 培地なども開発されているが、発育抑制が強く、原因菌が食品などを汚染している場合でも、保存条件によっては損傷菌となって検

出が困難になる可能性がある。

症状の進行が速いため、分離同定が遅れることは、治療の遅れとなって、すなわち患者の生命を脅かすことになる。そのため迅速に菌を検出、同定しなければいけない。

培養法による分離同定を待たずとも、検出感度の高い手法によって *V. vulnificus* 特異的な遺伝子、あるいは蛋白質が検出されれば、検体の *V. vulnificus* 汚染を疑うことができる。

今日、PCR法を用いて様々な病原菌を迅速、高感度に検出できるようになってきている。毒素産生性や病原因子の特定されている菌においては、それらの遺伝子が検出されると、原因菌としてまず疑うことが出来る。

本研究では、患者由来株と環境由来株の病原性関連遺伝子の保有状況、あるいはゲノム構造を比較することにより、*V. vulnificus* 感染症における菌側因子の探索、解析、およびそれらを用いた分子疫学的応用を目的とする。

B. 研究方法

V. vulnificus の産生する病原因子または発病因子として、血中での菌増殖に関係する血中遊離鉄の獲得能、細胞障害性から壊死性筋膜炎を引き起こすと考えられる金属プロテアーゼをはじめとする各種蛋白質分解酵素、および cytolysin や hemolysin 等の毒素、また、宿主の殺菌に対する抵抗性として莢膜⁵⁾やリポ多糖(LPS)等の表在物質の産生が挙げられる。

近年細菌においてもゲノム解析が進んでおり、*Vibrio* 属菌でも *V. cholerae*⁶⁾ や *V. parahaemolyticus*⁷⁾ のゲノム塩基配列が完了し

ている。*V. vulnificus* もすでに全塩基配列の解析が明らかになっているが、各遺伝子の詳細な解析はまだ発表されていない。これらゲノム解析やこれまでの分子生物学的研究から明らかになっているそれぞれの病原性に関連する遺伝子を比較し、効率良くそれら遺伝子を検出するための PCR の開発を試みた。

さらに、疫学的解析に利用されている Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) によるゲノム構造比較についても予備実験を行った。

1. BLAST homology 解析

病原性に関連すると考えられる遺伝子として、鉄獲得能(siderophore receptor): *vuuA*、*hupA* 金属プロテアーゼ: *vvpE* リン脂質分解酵素: *vpl* について、他の *Vibrio* 属菌と相同性を調べた。

BLAST search は NCBI の web site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/> を利用した。

2. PCR

[1. BLAST homology 解析] からそれぞれの遺伝子について、他の *Vibrio* 属菌と相同性の高い領域と、*V. vulnificus* 特異的な領域から primer を作成し、以下の反応条件で検出を試みた。

供試菌株は、*V. vulnificus* として ATCC の基準株と、各血清群の標準株 8)、および他の *Vibrio* 属菌(表 1)。

反応液:
<stock mixture>

10 x <i>Taq</i> buffer	250 μ l	5'-gatatggtgaaaatcctccgcc-3'
25 mM MgCl ₂	150 μ l	<i>vvpE</i> :
25 mM dNTP mix	10 μ l	common-F
100 μ M primer-F	10 μ l	5'-atattgcgggtgaagcggcagag-3'
100 μ M primer-R	10 μ l	common-R
distilled water	70 μ l	5'-gtggtcggtttgctgcccgttt-3'
total	500 μ l	specific-F1
		5'-ccgttcaagctcgtagtcttgc-3'
<reaction mixture>		specific-F2
stock mixture	4 μ l	5'-cctcgggaagcagcggccaccaag-3'
template DNA	2 μ l	specific-R1
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.08 μ l	5'-tagcattggcatgcttcaacttg-3'
distilled water	13.02 μ l	specific-R2
total	20 μ l	5'-ccaccgccgtcgattgcgatcg-3'
		<i>vpI</i> :
<primers>		common-F
他の <i>Vibrio</i> 属菌に共通の配列部分を common、		5'-cctatgttcgctgttggtatcg-3'
<i>V. vulnificus</i> に特異性の高い配列部分を		common-R
specific、として primer を設計した。		5'-gcgttaaagatgttcctgtatc-3'
<i>vvhA</i> (Hill et al):		specific-F1
specific-F		5'-agctctctcctgaagcgatcac-3'
5'-ccgcggtacaggttgccgc-3'		specific-F2
specific-R		5'-cacatcacaaaacgtgattaag-3'
5'-cgccaccactttcgggcc-3'		specific-R
<i>vuuA</i> :		5'-cgcccctgcgtcagtgagttg-3'
common-F		
5'-ttgaaagtgcggtaaaagcagg-3'		<反応条件>
common-R		アニーリング温度を <i>vvhA</i> に対しては論文通り
5'-catctgcatactgtcaaaatcg-3'		67°Cとした。それ以外の標的遺伝子に対しての
specific-F		アニーリング温度は 55°Cを設定した。それ以外
5'-aggtacctttctttaggcggcc-3'		の反応サイクルは
specific-R		

94°C	5 min	
94°C	30 sec	↑ 30 cycle ↓
annealing temp.	1 min	
72°C	1.5 min	
72°C	10 min	
4°C	over night	

<増幅産物の確認>

PCR 後、反応液 2 μl に 2 x loading buffer 2 μl を加えて混合し、全量を 1 % DNA agar を支持体とし、1 x TBE buffer、100 V 定電圧で電気泳動を行った。泳動後エチジウムブロマイド染色し、紫外線下で観察、記録としてポラロイド写真を撮影した。

3. パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)

寒天培地上の菌をループにて約 1 μl とり、蒸留水 200 μl に懸濁した。融解した 1 % の低融点アガロースを同量加え、Plug mold (Bio-rad) に約 70 μl ずつ 2 穴分注して固め、ゲルブロックを作成した。ゲルブロックを 1 mg/ml リゾチーム液(0.5 M EDTA, pH 8)に浸漬し、37°C 一晩反応させた。リゾチーム液を捨てて、1 mg/ml プロテイナーゼ K、1 % N-ラウロイルサルコシン液(0.5 M EDTA, pH 8)を加え、50°C 一晩反応させた。1 mM PMSF (10 mM TE, pH 8)で 50°C 1 時間振盪を 2 回行ってゲルブロックを洗浄し、さらに PMSF を除くため 10 mM TE, pH 8 で 50°C 30 分振盪を 2 回行った。制限酵素反应用緩衝液で氷上 30 分 2 回平衡化した後、制限酵素

NotI(37°C)、または *SmaI*(50°C)で一晩処理し DNA を切断した。

1 % PFGE 用アガロース(Bio-rad)のウェルにゲルブロックを埋め込み、CHEF-DR II (Bio-rad)を用い、0.5 x TBE、6 V/cm、4-8 秒/9 時間-8-50 秒/11 時間、約 10°C で電気泳動を行った。泳動後エチジウムブロマイド染色により観察した。

C. 研究結果

V. vulnificus の産生する病原因子または発病因子としては、血中での菌増殖に関係する血中遊離鉄の獲得能や壊死性筋膜炎を引き起こす細胞障害性が考えられる。

これまでに報告されているこれら病原因子の候補から、細胞障害性溶血毒(*vvh*)¹⁾について、患者由来株、環境由来株について PCR による遺伝子の保有状況を調べたところ、供試した患者由来株 22 株(参照株を含む)のすべてが *vvh* 陽性であった。一方、環境由来株については、島根県保健環境科学研究所の調査によれば、450 株の分離株のうち 90%以上が *vvh* 陽性であった。逆に、*vvh* の陽性率が高いため、*vvh* 陽性をもって *V. vulnificus* とするというように、環境分離株などの同定の補助的役割を担うほどである。

本研究では、*vvh* 以外に病原性に関係すると考えられる金属プロテアーゼ、シデロフォア、ホスホリパーゼについて、それらをコードしている各遺伝子を他の *Vibrio* 属菌、特にゲノム解析が完了している *V. cholerae*、*V. parahaemolyticus* ゲノムから相同性の高い遺伝

子を検索し、それぞれ primer を設計して PCR を試みた。

1. BLAST homology 解析

V. vulnificus のシデロフォア(受容体)をコードしている *vuuA* と *hupA*、金属プロテアーゼ *vvpE*、ホスホリパーゼ *vpl* を元にそれぞれがコードするアミノ酸配列をデータベースで検索し、相同性の高い遺伝子を求めた。

VuuA(686 アミノ酸残基)は *V. cholerae* の ferric vibriobactin receptor *ViuA* と 74 %の相同性があった(図 1)。

VvpE(610 アミノ酸残基)は *Vibrio anguillarum* の vibriolysin と 70 %の相同性を示した。*V. cholerae* の HA/ protease (vibriolysin) と 68 %、*Vibrio fluvialis* の metalloprotease と 67 %の相同性があった(図 2)。

HupA(727 アミノ酸残基)は *V. anguillarum* *HupA* protein と 63 %、*V. cholerae* の heme transport protein *HutA* と 49 %の相同性があった(図 3)。

Vpl(418 アミノ酸残基)は *V. harveyi* の hemolysin と 75 %、*V. parahaemolyticus* の thermolabile hemolysin (phospho-lipase A2)と 72 %、*V. cholerae* の cithinase と 63 %の相同性があった(図 4)。

2. PCR

1で得られた相同性データを元に、他の *Vibrio* 属菌と相同性の高い領域と、*V. vulnificus* に特異性の高い領域を選び、その核酸配列から PCR 用の primer を設計した。それぞれの

primer の組み合わせで *V. vulnificus* 血清型の参照株について PCR を行った。血清型用参照株は、患者由来株、環境由来株を含んでいるので(表 1)、患者由来株は保有しているが、環境由来の O1、O7-O10、O15、O16 の株(特に O16 の海水由来株)が保有していない遺伝子であれば、ヒトに対する病原性に強く関連することが予想される。

vvhA(Hill et al): O3(E240-1)、O10(後述)を除き、すべて陽性であった。

vuuA: *V. cholerae* の ferric vibriobactin receptor *ViuA* と相同性が高い領域の common primer では、*V. cholerae* と *V. vulnificus* に予想される 1,011 bp の増幅産物が観察された。他の *Vibrio* 属菌では、*V. fluvialis* にサイズの異なる弱いバンドが認められた(図 5A)。特異的な specific primer では、O1(ATCC 株)、O6、O7、O12、O14、O15 には、はっきりとした、また O9、O16 には弱い予想サイズ 400 bp の増幅産物が見られた。しかし、*V. vulnificus* でも他の血清型株では小さいサイズの増幅産物か、あるいは全くバンドが認められなかった(図 5B)。そこで、common primer で全血清型株の PCR を行ったところ O10(後述)を除き、すべて陽性であった(図 5C)。

vvpE: *Vibrio anguillarum* の vibriolysin、*V. cholerae* の HA/ protease (vibriolysin)、*Vibrio fluvialis* の metalloprotease と 相同性の認められる領域の common primer では、*V. cholerae* O1、*Vibrio fluvialis*、*V. vulnificus* に予想される 581 bp の増幅産物が観察された。他の *Vibrio* 属菌では、*V. cholerae* O20、*V.*

parahaemolyticus にサイズの異なる弱いバンドが認められた(図 6A)。 *vvpE* に特異的な specific primer は、forward1 (f1)、2 (f2) と reverse1 (r1)、2 (r2) の組み合わせから、f1-r1、f1-r2、f2-r2 の 3 通りについて PCR を行ったところ、f1-r1、f1-r2 では、 *V. vulnificus* にのみ予想される 287、1,445 bp の増幅産物がそれぞれ観察された。 f2-r2 では、 *V. cholerae* O20 に明瞭ではあるがサイズの異なるバンドが、 *V. parahaemolyticus*、 *V. fluvialis* にはサイズは同じだが弱いバンドが認められた(図 6B)。そこで、specific primer の f1-r1 を用いて、全血清型株の PCR を行ったところ O10(後述)を除き、すべて陽性であった(図 6C)。

vpl: *V. harveyi* の hemolysin、 *V. parahaemolyticus* の thermolabile hemolysin (phospholipase A2)、 *V. cholerae* の cithinase と相同性の認められる領域の common primer では、供試したすべての *Vibrio* 属菌に予想される 354 bp の増幅産物が見られた。そこで *vpl* に特異的な specific primer、forward1 (f1)、2 (f2) と reverse (r) の組み合わせから、f1-r、f2-r の 2 通りについて PCR を行ったところ、 *V. vulnificus* のみに予想される 760、549 bp の増幅産物がそれぞれ観察された(図 7A)。そこで、specific primer の f2-r を用いて、全血清型株の PCR を行ったところ O10(後述)を除き、すべて陽性であった(図 7B)。

3. PFGE

血清型の発表されている参照株 O1-O7 までと患者分離株(血清型 O1)について、PFGE

を行ったところ、コレラ菌の解析で有効であった制限酵素 *NofI* あるいは *SfiI* 消化、コレラ菌の解析と同じ泳動条件で解析可能なバンドパターンが得られた⁹⁾。泳動像は他の *Vibrio* 属菌あるいは腸内細菌でも明らかになっているように、血清型の異なる株同士はその PFGE パターンが異なっていた(図 8)。また、O5 では完全に、O4A では部分的にバンドパターンが現れずスメアになってしまった。患者分離株でも同様にスメアとなってしまった。これは、電気泳動中に泳動緩衝液から発生するラジカルによる DNA の切断のためと考えられ、泳動緩衝液にチオ尿素を添加して再実験を行う必要がある。

D. 考察

本感染症の原因菌である *V. vulnificus* は汽水域を生息域とし、水温約 15°C を上回る夏場になると増殖し、海水中や魚介類から検出されるようになる。

沿岸海水あるいは魚介類を対象とした環境調査によれば、患者発生の多い西日本だけでなく、宮城県においても *V. vulnificus* は分離されており、日本各地の沿岸に広く生息していることがうかがえる。しかしながら、国内で確認されている患者数は、1976 年の第 1 例の報告以来およそ 100 例にとどまっている¹⁰⁾。

当研究所感染症情報センターの調査によれば、 *V. vulnificus* 感染症を疑われる患者が、我が国でも年間 200 例に達するのではないかと推定している(図 9)。環境からの菌分離率と比較すると、環境分離菌がすべて原因菌になりうるとすれば、発症するヒトがたとえ基礎疾患のあ

るヒトに限局されるとしても、それでも少ないと言えるほどに、日本沿岸から本菌の分離例は多い。

同じ *Vibrio* 属菌で見ると、*V. cholerae* や *V. parahaemolyticus* にはそれぞれコレラ毒素 (CT) や耐熱性溶血毒 (TDH) といった、はっきりとした病原因子があり、その疾患の患者からはこれら病原因子を保持した株が必ず分離される。環境由来株からは、これら病原因子を保有した株はほとんど検出されず、環境中ではヒトに対する病原因子は、これらの菌の生存にとって必要ではないため、保持していない株の方が大勢を占めるようになる。わずかに存在する、病原因子を持つ株により汚染された食品がヒトに摂取された場合、ヒトの体内で病原性を発揮し、体内からの排除に抵抗できるものと考えられる。

V. vulnificus については、このような病原因子の存在が明らかではなく、また、本感染症のモデル実験もないため、いくつかの病原因子の候補はあるものの、その関連性についても明らかになっていない。

そこで、すでに候補として考えられている病原因子について、患者由来株と、環境由来株とがそれら病原因子を保有しているかどうかを調査し、患者由来株に必ず認められ、環境由来株には稀にしか見当たらないものであれば、CT や TDH 同様、病原因子としての可能性が高いものと推察される。

魚介類の生食による *V. vulnificus* 感染は、その 80% 以上が肝臓病や血液関連の基礎疾患を持つ患者に限られており、その発症機序が宿

所側の肝機能と極めて相関性の高いことが考えられる。肝疾患患者の血液中の遊離鉄イオンの上昇が *V. vulnificus* 感染症の発症機序に重要な役割を担っている。

ヒトの体液中の遊離鉄イオン濃度は低く保たれているが、肝疾患などによってその濃度が上昇すると、*V. vulnificus* はこれを効率よく吸収して活発に増殖する。本菌は鉄獲得に特異的キレート化合物の siderophore である vulnivactin を産生していることが明らかになっている。他の細菌や *Vibrio* 属菌の鉄吸収に関係する遺伝子群と相関性の高い遺伝子が vulnivactin 以外にも存在することから、その他にも複数の鉄獲得機構があるものと考えられる。すなわち、これら鉄利用系も本菌の病原性に深く関係するものと考えられる。

また、本菌感染症で見られる筋組織の融解壊死による壊死性筋膜炎には、*V. vulnificus* の産生する金属プロテアーゼやその他のプロテアーゼ、cytolysin- hemolysin による細胞障害性が関係しているものと考えられている。

そこで本研究では、これら因子に注目し、患者由来株、環境由来株における保持状況を調べるため、報告されている遺伝子配列から homology 解析により、類縁菌との反応性も考慮して、PCR primer を設計し、その遺伝子の検出を試みた。

cytolysin-hemolysin (*vvh*) についてはすでに報告があるものを利用したが、それ以外のものについては、報告が無いため、遺伝子の多型性があることも考えられる。そこで、保存性が高い領域、すなわち、菌種間の差が少なく、その