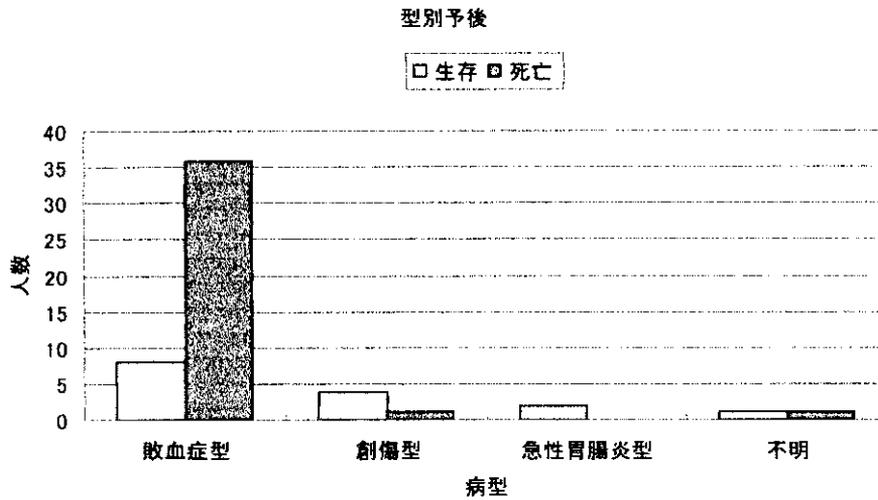


14. 病型別予後

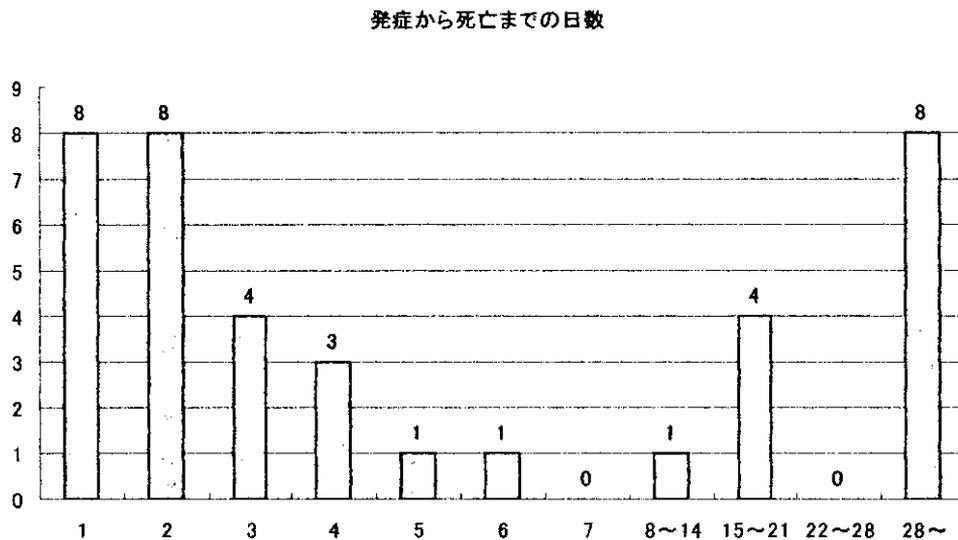
図18. 病型による死亡率



敗血症型の場合の死亡率は81.2%で、創傷型の場合は20.0%であった。

15. 発症から死亡するまでの日数

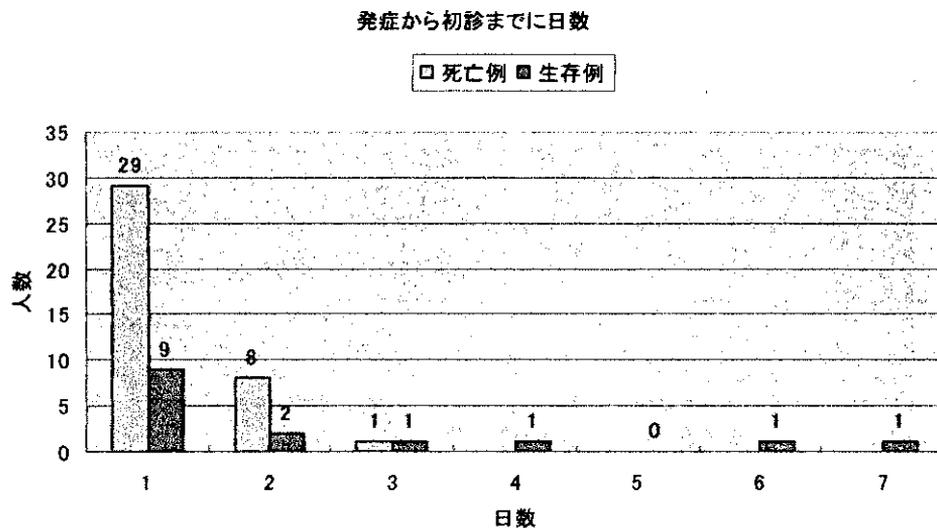
図19. 死亡患者の発症から死亡するまでの期間 (日数)



発症後1ヶ月以降に亡くなった患者も8例(21%)あったが、20例(52.6%)、半数以上の患者が発症後3日以内に亡くなっていた。

### 1.5.発症から初診までの日数

図20. 発症から初診までに要した時間（日数）



発症から初診までかかった日数では殆どの患者が発症後2日以内に病院を受診していた。また、発症から病院を受診するまでに時間を要した患者は生存例に多かった。

### D 考察

今回のビブリオ・バルニフィカス感染症の発生状況についてのアンケート調査（一次アンケート）は全国の皮膚科専門施設、高度救命救急センターを含む複数科を有する総合病院を対象に行い、回収率も60%を超えたことより本邦におけるビブリオ・バルニフィカス感染症にて治療を受けた患者の大部分を網羅していると考えられる。年間16例から24例の発症を確認できた。しかしながら、病気の性格上、確定診断がつかないまま亡くなっている患者や医療機関を受診しないまま亡くなった患者も相当数存在するのではないかと予想され、毎年、相当数の患者が発生し、亡くなっているのではないかと考えられる。調査した5年間については熊本地区で大量発生した2001年を除き、発生するはほぼ一定していた。患者の平均年齢が61歳と他の感染症と比較して若年者に多く発生しているのは肝硬変を基礎疾患として発症する患者が多いためであると予想される。

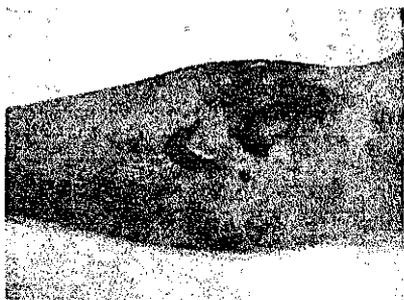
発生地域については以前より指摘されている北部九州の有明海沿岸が最も多く発生しているが、山口から岡山までの瀬戸内海北岸地域と東京、千葉を始めとした東京湾沿岸でも比較的発生数が多いことが分かった。これらの3地域は遠浅の海の近辺であり、広い流域面積を有する一級河川が多く流入しているのが特徴である。有明海や東京湾に匹敵する面積を有、一層温暖な錦江湾（鹿児島湾）周囲においてビブリオ・バルニフィカス感染症の報告がないのは、ビブリオ・バルニフィカスの増殖には水温だけではなく、海水の塩分濃度や富養度が関与するのではないかと考えている。同時に、有明海、八代海以外の地域にお

いても *vibrio vulnificus* 菌の動向を調査する必要があるとも考えている。

ところで、2004年1月に奄美大島においてビブリオ・バルニフィカス感染症の可能性が高い患者を確認した。そこで、共同研究者の宮坂らと冬の奄美大島における *vibrio vulnificus* の検出を試みた。

患者は肝硬変を有する60代の男性で、下肢の疼痛を初発症状とし、近位を受診後2日で亡くなった。臨床経過、症状は典型的なビブリオ・バルニフィカス感染症による壊死性筋膜炎であったが、菌の同定はされなかった。

図21. 奄美大島におけるビブリオ・バルニフィカス感染症疑い例



2004年1月31日から2月1日にかけて奄美大島の河川が流れ込む内湾性の4地点において採取した海水を採取して調査したところ、4地点全てにおいて *vibrio vulnificus* を確認することができた。12月～3月は有明海、八代海ともに *vibrio vulnificus* は確認できない時期である。しかしながら、奄美大島では菌を確認できたより離島においてもビブリオ・バルニフィカス感染症は発生する可能性があると考えられる。さらに、47都道府県中、その発生が確認できたのは24都府県に限られたのは、ビブリオ・バルニフィカス感染症に対する認知度の差による可能性も否定できないと考えている。

以下、二次アンケートの結果より

病型では敗血症型が80%で創傷型が9%であったが、従来本邦では報告のない胃腸炎型が2例確認された。*Vibrio vulnificus* は胃腸障害は起こさないとされるが、初発症状として腹痛や嘔吐などの消化器症状を訴える患者も6例(11.5%)あった。このことから、今後食中毒の原因菌の一つとしても注意が必要と考えられる。

基礎疾患としては全体の80%以上に肝機能障害を認め、60%以上が肝硬変患者であった。ただし、全く基礎疾患がなく発症した患者も2例確認されている。内、一例は自験例であった。生来健康な60代男性が、擦り傷のあった上肢より感染し、壊死性筋膜炎を発症した。病巣のデブリドメンと抗生剤投与にて救命できたが、入院中の精査にて肝機能障害は認めず、特に基礎疾患は発見されなかった。海水への暴露があったことと、同地域においては夏場に大量の *vibrio vulnificus* を確認していることより、ビブリオ・バルニフィカス感染症はその暴露する菌量によっては基礎疾患を有さない健康な人でも発症する可能性があることを示唆しており、危険地域では定期的な菌量の測定が必要であると考えられた。

初診時の皮疹の面積は半数以上が10%未満で、あまり広範囲での発症とは言えない。また、初診時の面積とその予後は相関しないことより、ビブリオ・バルニフィカス感染症は皮疹だけではその重症度を判断できないと考えられた。

初診時の臨床症状では出血傾向40%、意識障害20%、腹水20%と肝硬変の状態としてもあまり重症ではないことが多い。しかしながら、初診時にショック状態にある患者が60%である。このことより、初診時に重症感がなくても、皮疹が狭い範囲に止まっても、嚴重な注意が必要であると言える。

#### E. 結論および健康危険情報

ビブリオ・バルニフィカス感染症に対する警戒が必要な地域は①北部九州の有明海沿岸②東京湾沿岸③瀬戸内海沿岸の3地域である。季節では6月から10月までは注意が必要であるが、亜熱帯地域に入る地域では一年中発生の危険性がある。

肝硬変のある患者は夏場、特に6月から10月にかけては魚介類の生食は避けるべきである。また、菌量によっては健康人であっても海水に長時間浸ることはビブリオ・バルニフィカスに感染する危険性がある。従って、危険地域では定期的な菌数の調査が必要である。

#### D. 研究発表

1. 2003年5月、第101回日本皮膚科学会学術大会において、ビブリオ・バルニフィカス感染症の危険因子として肝硬変の程度が重要である旨を報告した。(東京)
2. 2003年10月、第56回日本皮膚科学会西部支部学術大会において劇症溶連菌感染症と *vibrio vulnificus* 感染症の違いについて発表した。(松山)
3. 2003年11月、*Vibrio Vulnificus* 感染症についてのシンポジウムを開催した。(熊本)
4. 2004年4月、第102回日本皮膚科学会総会学術大会において今回の調査結果を発表する。
5. Infection Technology, トピックス「*Vibrio Vulnificus* 感染症」2004.3月発行
6. An outbreak of *vibrio vulnificus* infection in Kumamoto, Yuji Inoue, Tamano Matui, Tomomichi Ono, Archives of Dermatology ( in print.)

#### E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 平成 15 年度 分担研究報告書の概要

分担研究者：田村和満（国立感染症研究所）

分担研究項目：

***V. vulnificus* (Vv)** の魚介類や環境中での汚染度の実態調査、Vv 検査法としての増菌培地および選択分離培地の評価および血清学的研究

### 1) *V. vulnificus* (Vv) の魚介類や環境中での汚染度の実態調査

平成 14 年度に引き継ぎ平成 15 年度も Vv の魚介類や環境中での汚染度の実態調査をおこなった。本調査の協力研究者はつぎの 5 人の研究者にお願いした。

福島 博 （島根県保健環境科学研究所）  
斉藤紀行 （宮城県保健環境センター）  
宮坂次郎 （熊本県保健環境科学研究所）  
黒木俊郎 （神奈川県衛生研究所）  
小川正之 （川崎市衛生研究所）

その結果つぎの概要のような調査研究結果が得られた。

海水の温度と Vv の生存率についての調査は平成 14 年度は島根県での詳細な成績が報告されているが、平成 15 年度はさらに宮城県および熊本県でも調査研究がなされた。各地域での調査は数ヶ所の定点で行われた。その結果、Vv の生存は地域に関係なく海水温度が 20°C 以上に上昇すれば検出される。Vv 陽性の MPN/100ml は平均  $10^1 \sim 10^2$  CFU で海水温度が高い時期には  $10^3 \sim 10^5$  CFU が検出された。その検出月は平成 15 年度は冷夏であったためか平成 14 年度より 2 ヶ月遅く 6 月～10 月であった。Vv の生存は *V. parahaemolyticus* (Vp) よりも塩分濃度の薄い汽水域の方が検出率が高いことも再確認された。供試魚介類については平成 14 年度は汚染が高いと思われるアサリおよびアジを中心にその汚染率を調査したが、平成 15 年度は各地域ごとでその食用の頻度および汚染率が高いと思われる魚介類について調査研究した。それらに供試された魚介類は多岐にわたっている。

島根県ではサザエ、ハマグリで Vv の生存が確信され、さらに環境調査の一環として沿岸部に生息するニナガイ、カサガイ、スガイ、イシマキガイ等の貝類の検体についても調査がなされた。アサリについてはその予防対策の一環として流通時の温度条件に関する実験的条件の検討をおこなっている。その結果アサリの長期保存水温を 15°C 以下を推奨している。

宮城県では各シーズンに取れる魚介類について検査し、養殖カキ 16 件中 4 件（25%）、アサリ、ツブ貝から Vv が検出された。またそれら Vv 陽性菌の温度および pH 安定性について検討した。その結果 Vv は低温あるいは酸性条件下では菌数が減少する

ことが示唆された。

熊本県では例年ビブリオ・バルニフィカス感染症が発生しているため、今年度も県 8 定点および夏期の海水浴場 25 地点での詳細な動向調査をおこない、海水や魚介類から Vv が検出された時点およびピーク時には衛生行政機関に注意情報を提供し、その予防対策をおこなって来たが、本年度も 3 例（創傷感染 2 例、経口感染 1 例）の発生があった。これら患者発生事例についての詳細な疫学調査の結果、海水、海泥から高い MPN 値の Vv が生息していたことを確認した。また、患者の発生があった海岸では、漁業者による Vv 感染症に関する注意看板が掲示され、その予防活動がなされている。

神奈川県では市販の魚介類および汽水からの Vv の汚染状況が調査された。供試された検体は貝類はアサリ、シジミ、魚類は生シラス、ワカシ、カツオ、カマス、アジ、イワシで Vv の陽性率は平均数%検出され、その検出月は 7 月および 8 月の検体であった。

川崎市では 5 月～9 月間の河川水や海水の 11 検体、生鮮魚介類やすし種等の食品の 136 検体中における Vv の汚染状況が調査された。その結果、いずれの検体からも Vv は検出されなかった。しかしながら、Vp は検出された検体があった。

わが国の Vv 感染事例は原発性敗血症や創傷感染症のみであるが Johnson ら (1986) は Vv によるものと思われる 3 例の胃腸炎を報告し、その原因食品が生ガキであった報告している。それ以来、欧州では Vv を胃腸炎または食中毒の原因菌としての重要なリスクファクターに上げている。しかしながら、わが国では Vv の類以菌であり、(また魚介類に生息し、) その原因食品が同様に魚介類である Vp の食中毒は毎年数百事例の報告があるが、Vv による食中毒の報告事例は全くない。それらの原因の Vv と Vp が類以菌であるため、菌種の生化学的同定にあたり、誤同定が生じる恐れがないかを確認するため、協力研究者のところで発生した Vp の食中毒事例についての確認同定を厳守した。それらの分離菌の確認は 1999～2003 年間についておこなった。それらの再確認の成績は 3 ケ所からよせられた。また、それらの事例を病原微生物検出情報から引用すると総括的には Vp の検出月は 6 月～10 月であった。その事例数は毎年減少傾向で 3 ケ所と全国の合計事例数とはつぎの通りで 1999 (87/1,960)、2000 (53/698)、2001 (27/651)、2002 (5/427)、2003 (5/255) であった。これらの Vp 事例中には Vv は全く含まれていなかった。したがって、現状ではわが国における胃腸炎または食中毒の原因菌としての Vv の因果関係の解明はできなかった。その要因の一つに平成 15 年度の冷夏による発生数の減少も関与していることと思われる。

## 2) Vv の検査法の評価検討

平成 14 年度に開発した Vv の選択増菌培地であるセロピオース・コリスチン加ペプトン水 (CCP ブイヨン) と選択分離培地である Cellobiose-Bile salt Aga (CB 培地) で実検体を用いた評価実験をおこなった。使用した CCP ブイヨンおよび CB 培地は品質管理の目的で、(株) 関東化学で特注し、同一ロットを協力研究者に配付した。

その結果、細菌汚染の多い環境水や魚介類の検体では CCP ブイヨンおよび CB 培地

の組み合わせでは粘液産生の海水ビブリオ属や *Pseudomonas* 属等の優勢菌のオーバーラップが見られ、目的の Vv の釣菌が困難であった。特に CB 培地は Vp の選択分離培地として開発されたクロモアガー・ビブリオ培地より検出率が低かったとの報告であった。この原因はつぎの理由によるものと思われる。

培地の組成検討の供試菌株は臨床由来の Vv、環境由来の Vv および類似ビブリオ属を用いて培地の組成検討をおこなったが、発育抑制条件で臨床由来の Vv が最も抑制が強かったため、その後の検討はそれを基準にした培地組成となった。したがって、類似ビブリオ属やグラム陽性菌の抑制の選択増菌培地である CCP ブイヨンの併用の検討がなされたのであるが、環境中の汚染菌の抑制の考慮が不十分であるとの結果となった。

したがって、今後 Vv の培地の検討に当っては、臨床由来の Vv は原則的には純培養菌であるため、血液寒天での分離で十分で選択分離培地は必要ない。すなわち選択分離培地の検討は環境由来の Vv、類似ビブリオ属および海水ビブリオ属で検討すべきであると思われた。

### 3) Vv の血清学的研究 (担当: 荒川英二、田村和満、国立感染症研究所)

昨年度まで Vv の O 群は 16 種が研究報告されているが、本研究班には類属反応がない 7 種類の O 群血清を配付して、分離菌株の血清群別をおこなってきた。さらに、既知血清に凝集しない菌株に関してはさらに詳細な血清学的研究を続行中である。詳細な成績は別資料で報告する。

平成15年度厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業報告書

研究課題:ビブリオ・バルニフィカスによる重篤な経口感染症に関する研究

分担する研究項目: *V. vulnificus* の検出法の検討及び魚介類や環境中の汚染度の検討

## 島根県における貝類の *Vibrio vulnificus* 汚染調査

島根県保健環境科学研究所

感染症疫学科

福島 博

### 1. 目的

平成14年度の市販魚介類における *Vibrio vulnificus* (以下 Vv) の汚染状況調査により、Vv は魚類よりも貝類から高率に検出されることが明らかにされた。研究班における市販貝類の調査では対象としてアサリが指定されていたが、島根県にはアサリやハマグリなどの二枚貝の生産地が少ないため、サザエとカキを対象に調査した。それとともに、沿岸部に生息するニナガイ、カサガイ、スガイ、イシマキガイなどの巻貝と港湾等に生息するカキ、ムラサキガイなどの二枚貝を採集し、これらの小型貝類についての調査で沿岸部における Vv の分布状況を把握できることを指摘した。島根県では主にサザエとアワビが食用として漁獲されているが、昨年の調査ではサザエの検体数が少なかったため、今年度は県内の8地域の漁業協同組合からサザエを購入し、サザエの Vv 感染症の感染源としての意義を把握することを目的とした。島根県においてもアサリやハマグリが市販されているが、これらの多くは中国や韓国で生産されたものが三重県や広島県、熊本県、福岡県などの生産地へ輸入され、そこで蓄養したのちに出荷されている。これらの二枚貝は低温で輸送・保存し市販されるが、Vv は水温が15℃以下に低下すると急速に死滅することが指摘されている。そこで、県外で生産されたアサリ、ハマグリなどの二枚貝における Vv の汚染状況を明らかにすることは、長期低温保存された市販魚介類が Vv 感染症の感染源としてどのような役割を演じているかを解明する上で極めて重要なことである。また、本研究事業(平成14年度)で開発された Vv の選択増菌ブロスと分離培地の評価試験を実施した。

### 2. 材料および方法

#### 2.1. 検査材料

##### 2.1.1. 島根県産サザエ

2003年7月(サザエ漁解禁)から11月にかけて毎月、益田と浜田、大田、出雲、松江(2漁業

協同組合)、西郷、黒木保健所管内の8漁業協同組で漁獲されたサザエ4個ずつを購入し、2個を1検体とし56検体を検査材料とした。保健環境科学研究所への輸送には過度の冷蔵(クール宅配便)によるVvの死滅を避けるため、遠隔地からは少量の保冷剤で冷蔵し、近隣地域からは常温で輸送し、翌朝検査に供した。

#### 2. 1. 2. 市販貝類および輸入エビとウニ

2003年6月から11月に松江市内のスーパーで貝類を購入し、県外産貝類50検体と県内産貝類11検体を検査材料とした。輸入エビは7検体、ウニは1検体を検査材料とした。また、アサリの保存水11検体も検査材料とした。

#### 2. 1. 3. 検体の取り扱い

サザエは2個のエラと口腔、腸管部を、二枚貝は殻をむいた全体を、エビとウニはそのままを検体として用いた。それぞれの検体の11gを1件とし検査に供した。

### 2. 2. 検査法

#### 2. 2. 1. 定量的増菌とCFUの測定

検体11gをストマカー袋に入れ、手で揉みだした後、99ml(約100ml)の自家製アルカリ性ペプトン水(Bacto peptone (Difco) 10g, NaCl 10g, pH 8.6)を加え、激しく振り浮遊液を作成した。この浮遊液の100mlと10mlを37℃一昼夜増菌培養するとともに、クロモアガービブリオ(CHROMagar)培地の3分の2へ浮遊液0.1mlを塗布し、残りの3分の1に浮遊液0.1mlと0.001mlを2箇所ずつにスポットし37℃一昼夜培養し、CFU/gを算出した(培養法1)。クロモアガービブリオに発育した青色のコロニーを釣菌し、TSI寒天培地、SIM確認培地、LIM培地及び0、3、8、10%食塩加Nutrient broth(Difco)に培養し同定を行った。Vvの確認にはHillら<sup>1)</sup>のcytotoxin-hemolysin gene検出プライマーを用いたPCRを併用した。反応は熱変性94℃、8秒間、アニーリング69℃、10秒間、DNAの伸長72℃、20秒間の3ステップを30サイクル繰り返した後、最終伸長を72℃、5分間行った。

#### 2. 2. 2. V.vの培養法の検討

上記培養法と並行して、アルカリ性ペプトン水で37℃一昼夜増菌培養後、増菌液1mlをセロビオース・コリスチン加ペプトン(CCP)ブロス10mlに接種し37℃、6時間増菌したものをセロビオース胆汁酸(CB)培地に塗布し37℃一昼夜培養した(培養法2)。また、CB培地によるCFUの測定をクロモアガービブリオ培地による方法に準じ行った。

## 3. 結果

### 3. 1. V.vの汚染調査

#### 3. 1. 1. 島根県産サザエにおけるVvの汚染調査

7月から11月の毎月、島根県内の8漁業協同組合から購入したサザエ56検体についてVvの汚染状況を調査し、Vvは15検体(27%)から検出された(表 1、2)。Vvは検体10gを増菌培養することにより15検体(27%)から、1gの増菌培養で11検体(19.6%)から検出された。直接定量培養で $10^2$  CUF以上/gが5検体(8.9%)から検出され、 $10^3$  CUF/gが2検体から、 $10^4$  CUF/gが1検体から、 $10^5$  CUF/gが2検体から検出された。表 1 に地域別検出状況を示し、益田漁協で漁獲されたサザエからは検出されなかったが、他の7漁協では17~50%であり、島根県の沿岸の広範な地域に生息するサザエが汚染していることが確認された。

月別検出状況を表 2に示した。V.v は水温が上昇する7月から10月に検出され、水温が高い8月には44%と高い検出率で汚染菌数も $10^3$ ~ $10^5$  CUF/gと多かった。水温が下降する9月からは検出率および汚染菌数も漸減し、水温が $20^{\circ}\text{C}$ 以下に低下する11月には検出されなくなった。

### 3. 1. 2. 市販貝類およびエビ、ウニにおける Vv の汚染調査

6月から11月に松江市内のスーパーで購入した貝類61検体および輸入エビとウニ8検体を購入し、V.vの汚染状況を調査した(表 3)。Vvは貝類31検体(51%)とエビ2検体(29%)から検出された。増菌培養により貝類の検体10gでは31検体(51%)、検体1gでは25検体(36%)から検出され、直接定量培養により $10^2$  CUF以上/gが19検体(28%)から検出され、 $10^2$  CUF/gは10検体(16%)、 $10^3$  CUF/gは6検体(9.8%)、 $10^4$  CUF/gは1検体(1.6%)、 $10^5$  CUF/gは2検体(3.3%)から検出された。貝の種類別では二枚貝からの検出率が高く、アカガイ、アサリ、カキ、ハマグリ、ホタテの順であり、アカガイ1検体とアサリ5検体、ハマグリ2検体からは大量( $10^3$ ~ $10^5$  CUF/g)のVvが検出された。輸入エビ7検体のうち2検体(インドネシア、マダガスカル産)から増菌培養により検出されたが、チリ産のウニからはVvはもとよりビブリオ属は全く検出されなかった。これらの市販貝類のうちサザエ、コトブシ、バイガイ、アサリ(2検体)を除いたものは県外または国外から輸入されたものであった。

### 3. 1. 3. アサリおよびハマグリからの検出状況

調査期間に連続して調査することができたアサリとハマグリについて生産地(蓄養地)別検出状況(表 4)および月別検出状況(表 5)を比較した。

#### 生産地別検出状況 (表 4)

アサリのうち島根県産の2検体を除く24検体は三重県または熊本県で生産されたものか、中国や韓国から輸入され三重県、熊本県、福岡県、広島県等で蓄養されたのち出荷されたものであり、生産地(出荷地)は8地域に分けられた。Vvの地域別検出状況を表 4に示したが、三重県(出荷地:広島県)産は12検体であったが、他県産の検体数が少なく地域別検出状況を比較することはできなかった。なお、三重県(出荷地:広島県)産と表示されたアサリの中には中国(出荷地:広島県)産と判別できないものもあった。ハマグリはすべて中国から輸入され三重県などで蓄養されたのち出荷されたものであったが、検出状況はアサリのそれに類似していた。

#### 月別検出状況(表 5)

アサリからの検出率は6月に50%、7月に100%、8月に100%、9月に63%、10月に50%、11月に0%であり、水温および気温の高い6~10月に検出され、水温が20℃以上に上昇する7、8月には100%から検出された。Vvの汚染菌量も温暖な時期に多く、6~9月には $10^2 \sim 10^5$  CUF/g 検出され、6~8月には $10^4 \sim 10^5$  CUF/g の大量菌が検出された。ハマグリからも7~10月の温暖な時期に検出され、8、9月には $10^2$  CUF/g が検出された。

#### 3. 1. 4. アサリおよびハマグリの保存水からのVvの検出

6~8月に検査したアサリ10検体およびハマグリ1検体について、貝とパック内の保存水におけるVvの生菌数を比較した(図 1)。アサリ10検体のうち2検体から増菌培養によりVvが検出され、6検体から直接培養により $10^2 \sim 10^5$  CUF/g のVvが検出された。Vvが検出されたアサリ8検体のうち $10^5$  CUF/g が検出された1検体の保存水からはVvが検出されなかったが、他のVv汚染アサリの保存水からはアサリとほぼ同数の菌数が検出された。

#### 3. 2. V.v の培養法の検討

貝類82検体とアサリの保存水11検体について培養法1と2による検出率を比較し、表 6 に示した。培養法1では貝類とアサリの保存水からの検出率はそれぞれ51%と64%であったが、培養法2では検体量10gと1gを用いた増菌培養では何れの材料からも検出されなかった。この結果はCCPブロスまたはCB培地のVvの選択性が弱く夾雑菌の旺盛な発育によるものと推測された。今回はCCPブロスの選択性を単独に検証しなかったが、CB培地は夾雑菌が少ない検体からのVvの直接培養には適しており、貝類とアサリの保存水のCFUの測定ではVvはそれぞれ7.3%と27%から検出された。CB培地による37℃培養での培養時間は18時間以内が適当であり、それ以上培養すると培地pHの低下による培地とコロニーの赤変により他の菌との鑑別が困難となった。

### 3. 考 察

山陰地方では7月にサザエ漁が解禁され、新鮮な県内産サザエが刺身用として販売される。昨年の調査では、サザエ10検体のうち4検体からVvが検出されたが、その汚染菌数は $10^0$  MPN以下/g と極めて少なかった。本年度は県内の8漁業協同組合で漁獲された56検体について調査し、Vvは15検体(27%)から検出され、陽性検体の三分の一において $10^3 \sim 10^5$  CFU/g の大量菌が計測された(表 1, 2)。Vvは島根県の沿岸部に広範に分布しサザエを汚染しているが、サザエからの検出率と汚染菌数はサザエが漁獲された漁場により相違し、漁場の海水の塩分濃度と密接な関係があることが示唆された。すなわち、出雲保健所管内の島根半島や隠岐島の西郷および黒木保健所管内ではサザエからの検出率は低く、汚染菌数も少なかった。昨年の貝類の調査で、これらの地域の漁場は海岸線まで山が迫る岩礁からなり、大きな河川の流入がないことから海水の塩分濃度が高いため、貝類からのVvの検出率は低く、汚染菌数も少なかった。いっぽう、浜田と県央保健所および松江保健所管内の恵曇および美

保関地域で漁獲されたサザエからはVvが高率に検出され、汚染菌数も $10^3 \sim 10^5$ CFU/gと多かった。これらの地域の漁場や漁港では河川の流入により塩分濃度が低下し、水温が上昇する夏期に環境水中でVvが旺盛に増殖することが確認されている。このような塩分濃度が低い沿岸部に生息する魚介類は大量のVvに汚染されるものと推察される。また、多くの漁協では集荷されたサザエを出荷までイクスなどで飼育することが多く、イクスでの蓄養により二次汚染する機会も多いものと推察される。また、恵曇、美保関地域のサザエからは大量菌が検出されたが、両地域は研究所に近いことから、検体を常温で輸送したこともVv汚染が高かった理由の一つと推察される。

ビブリオ属の菌の多くは環境温度が低下すると「生きているけれども培養できない状態」(Viable but nonculturable, VNC)に陥り、その生菌数は急速に減少することが報告されている<sup>2)</sup>。Vvは水温が $20^{\circ}\text{C}$ 以下になると徐々にVNCへ移行し、 $10^{\circ}\text{C}$ 以下では検出されなくなることから、魚介類を汚染しているVvも低温保存により速やかに減少すると考えられている。このような理由から、平成14年度の調査は研究分担県で漁獲され市販される魚介類、特にアジとアサリを中心にVvの汚染状況を把握することを目的に行われた。島根県にはアサリ生産地がほとんどなく県内産アサリの流通が少ないためアサリを調査対象としなかったが、県内産の市販サザエとカキ、アジからVvが検出された。これらの結果から、島根県沿岸にもVvが分布し、低温で輸送・保存し市販された魚介類もVvに汚染されていることが示された。また、平成14年度の宮城県と神奈川県調査で市販アサリからVvが検出されており、島根県で市販されている県外産アサリもVvに汚染している可能性が示唆された。そこで、今年度は国外または県外で生産され低温で輸送・保存し市販されるアサリやハマグリ、エビなどについてVvの汚染状況を調査した。表3に市販魚介類からのVvの検出状況を示した。県内産アサリとサザエ、コブシの一部からも $10^3$ CFU以下/gのVvが検出されたが、国外と県外産アカガイとアサリ、カキ、ハマグリ、ホタテ、エビからは高率かつ大量のVvが検出された。表4にアサリとハマグリの生産地別検出状況を示したが、アサリとハマグリの約60%からVvが検出され、 $10^3$ CFU以上/gの汚染がアサリ5検体とハマグリ2検体でみられた。特に県外産アサリ2検体からは $10^5$ CFU/gと大量のVvが検出された。市販貝類のほとんどは県外で生産されたものであり、生産直後のVv汚染菌数と比較することができず、貝類の輸送と保存期間中における低温がVvに及ぼす影響を評価することはできなかった。しかし、本調査で低温で輸送・保存された市販貝類からVvが高率かつ大量に検出されたことは、貝類などの体内に存在するVvに対する低温の影響は環境水中のVvに対するよりも少ないものと推察され、Vvは貝類の体内で長期間生存できることを示唆している。島根県で市販される二枚貝のうちアサリとハマグリのほとんどは広島県と三重県、福岡県、熊本県などから輸入されているが、アサリの多くは中国と韓国からアサリ生産県へ輸入されたのち、消費県へ出荷されたものである。アサリのなかには輸入県で蓄養したのち出荷されるものもあり、生産地:三重県(出荷地:広島県)や生産地:中国(三重県蓄養)(出荷地:広島県)などと表示されたアサリの中には形体が類似し生産地を特定できないものもあった。このように、貝類のうちアサリは複雑な流通経路や蓄養場所、蓄養条件を経て市販されており、今後、アサリの流通過程や蓄養地などにおけるVvの汚染状況を詳細に把握し、市販魚介類のVv汚染の防止に役

立てる必要が指摘された。

今回の調査に用いたアサリは保存水とともにビニールまたはセルロイド製のパックに入れ市販されていた。アサリ 11 検体についてアサリと保存水における汚染菌数の関係を調査した(図 1)。Vv はアサリ 11 検体中 8 検体から検出され、陽性検体の保存水 8 検体中 7 検体から Vv が検出された。アサリから Vv が  $10^5$  CFU/g が検出されたが、その保存水からは検出されなかった 1 検体を除く 7 検体において、アサリと保存水からほぼ同数の Vv が検出された。この結果はアサリからパック内へ Vv が絶えず排泄されているか、排泄された Vv は保存水中で低温にもかかわらず長期間生存できることを示唆している。また、保存水を検査することによりアサリにおける汚染状況を把握できることが示された。

Vv 感染症の感染菌量は極めて少量であり、iron-dextran 処理マウスに対する 50% 致死量は 10 CFU 以下であると報告されている<sup>3)</sup>。今回調査した貝類のうち刺身として生食されるサザエの 27% から Vv が検出され、その汚染菌数は多いもので  $10^6$  CFU/g であった。島根県ではこれまでに Vv 感染症は報告されていないが、Vv 感染症のハイリスク群が存在することと、また県内沿岸部で漁獲されるサザエ、アワビなどの貝類の生食の習慣があることから、Vv 感染症患者発生の可能性が充分であると推測され、Vv 感染症についての啓蒙が必要である。また、市販アサリからは高率に Vv が検出されたが、多くの場合、アサリは加熱調理されることから直接ヒトへの感染源となることは少ないと推測される。しかし、今回の調査でアサリの中には大量の Vv に汚染されたものもあり、アサリや保存水による二次汚染による感染の可能性も示唆されることから、Vv 感染症の疫学調査等においては感染源として留意する必要があると思われる。

Vv の分離培養法について市販魚介類とアサリの保存水を用い検討した。本研究で考案された APW で増菌培養後、CCP プロスで二次増菌し、CB 培地で分離培養する方法は魚介類等の夾雑菌が混在する検体からの Vv の検出には適さず、Vv の分離には従来から使用されている APW で増菌培養後クロモアガービブリオで分離培養する方法が優れていた。APW で増菌培養後クロモアガービブリオで分離培養する方法よりも優れた分離培養法を考案するにはより選択性を向上させた選択増菌培地と選択分離培地の開発が必要であると思われる。

#### 引用文献

- 1) Hill et al.: Appl. Environ. Microbiol. 57:707-711 (1991)
- 2) Oliver et al. Appl. Environ. Microbiol. 57:2640-2644 (1991)
- 3) Starks et al.: Infect. Immun. 68:5785-5793 (2000)

表1 島根県の沿岸で漁獲されたサザエからの *V. vulnificus* の地域別分離状況

地域	検体数	合計	%	陽性検体数						
				増菌培養		定量培養(log10/g)				
				10g	1g	2	3	4	5	
益田	4	0	0							
浜田	6	1	17	1	1		1			
県央	4	2	50	2	1		1			
出雲	8	1	13	1	1					
恵曇	6	3	50	3	2					1
美保関	10	4	40	4	4				1	1
西郷	8	2	25	2						
黒木	10	2	20	2	2					
合計	56	15	27	15	11	0	2	1		2

表2 島根県の沿岸で漁獲されたサザエからの *V. vulnificus* の月別分離状況

月	検体数	合計	%	陽性検体数						
				増菌培養		定量培養(log10/g)				
				10g	1g	2	3	4	5	
7	14	2	14	2						
8	16	7	44	7	7		1	1		2
9	14	4	29	4	2		1			
10	6	2	33	2	2					
11	6	0	0							
合計	56	15	27	15	11	0	2	1		2

表3 市販貝類からの *V. vulnificus* の分離状況

検体名	生産地	検査月	検体数	合計	%	陽性検体数					
						増菌培養		定量培養(log10/g)			
						10g	1g	2	3	4	5
貝類	アカガイ	福岡県、岡山県	9-11	4	3	75	3	3	2	1	
	アサリ	中国、韓国、広島県、福岡県、三重県、島根県	6-11	26	16	62	16	12	4	2	1
	カキ	広島県、石川県、岩手県、韓国	9-11	9	5	56	5	3	3		
	ハマグリ	中国	6-11	8	4	50	4	4		2	
	ホタテ	宮城県、青森県	6-9	5	1	20	1				
	サザエ	島根県	6-8	7	1	14	1	1		1	
	コトブシ	島根県	7	1	1	100	1	1	1		
	バイガイ	島根県	6	1	0	0					
	小計			61	31	51	31	24	10	6	1
その他	エビ	マレーシア、インドネシア、タイ、マダガスカル、カナダ	6-8	7	2	29	2	1			
	ウニ	チリ	6	1	0						
	小計			8	2	25	2	1			

表 4 市販アサリ、ハマグリからの *V. vulnificus* の生産地別分離状況

種類	生産地(出荷地)	陽性検体数								
		検体数合計 (%)			増菌培養		定量培養(log10/g)			
		10g	1g	10g	1g	2	3	4	5	検査月
アサリ	島根県	2	1	50	1	1		1		6,7
	熊本県	3	3	100	3	3	1		1	1 6-8
	熊本県(広島県)	1	1	100	1	1				9
	三重県(広島県)	12	7	58	7	4	2	1		1 6-11
	中国(広島県) (蕃養地:三重県)	3	2	67	2	2	1			8,9
	中国(熊本県)	2	0	0						10,11
	韓国(福岡県)	1	1	100	1	1				7
	韓国(熊本県)	2	1	50	1	1				9
	小計	26	16	62	16	13	4	2	1	2
ハマグリ	中国(三重県)	7	5	71	5	4		2		6
	中国(広島県)	1	0							6-11
	小計	8	5	63	5	4		2		

表 5 市販アサリ、ハマグリからの *V. vulnificus* の月別分離状況

種類	検査月	陽性検体数								
		検体数合計 (%)			増菌培養		定量培養(log10/g)			
		10g	1g	10g	1g	2	3	4	5	
アサリ	6	4	2	50	2	2	1			1
	7	4	4	100	4	4	1	1		1
	8	3	3	100	3	3		1	1	
	9	8	5	63	5	4	2			
	10	4	2	50	2					
	11	3	0	0						
小計	26	16	62	16	13	4	2	1	2	
ハマグリ	6	2	0	0						
	7	1	1	100	1					
	8	1	1	100	1	1		1		
	9	2	2	100	2	2		1		
	10	1	1	100	1	1				
	11	1	0	0						
小計	8	5	63	5	4		2			

表 6 培養法による *V. vulnificus* の分離状況

検体名	増菌法	分離培地	検体数	陽性検体数							
				増菌培養				定量培養(log10/g)			
				合計 (%)		10g	1g	2	3	4	5
魚介類	APW	CHROMagar Vibrio	82	42	51	42	33	7	7	4	4
	APW→ CCPプロ	CB培地	82	6	7	0	0	3	1		2
アサリ保存水	APW	CHROMagar Vibrio	11	7	64	7	6	2	1	1	
	APW→ CCPプロ	CB培地	11	3	27	0	0	2	1		

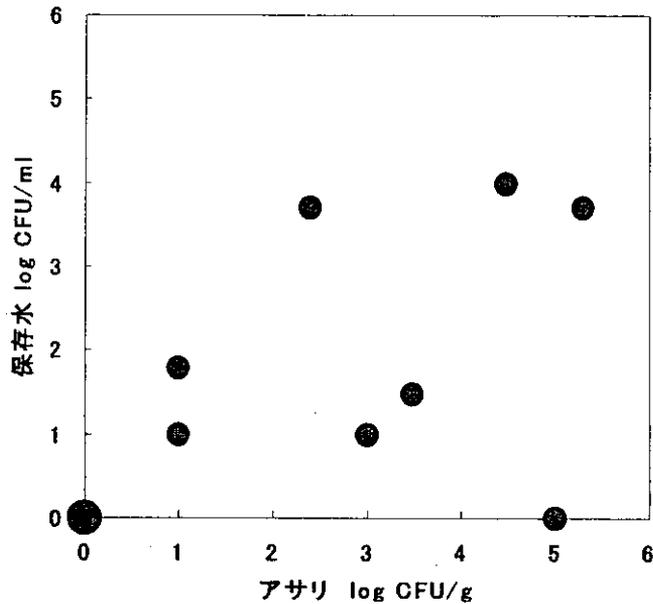


図1 アサリの汚染菌数とパック容器中の保存水における *V. vulnificus* の菌数の関係

## 協力研究報告一2

平成15年度厚生労働科学研究補助金

新興・再興感染症研究事業

分担研究報告書：ビブリオ・バルニフィカスに関する研究

研究協力者：齋藤紀行 名村真由美 渡邊節 川野みち 田村広子  
佐々木美江 山口友美 畠山敬 御代田恭子  
秋山和夫 鈴木隆（宮城県保健環境センター）

研究趣旨：ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*: Vv) は創傷あるいは経口感染により重篤な感染症を引き起こす。

平成13年度より宮城県内の沿岸部汽水域に定点を設け海水・海泥における Vv の生息状況と市販魚介類の Vv 汚染状況調査を実施した。その結果、Vv は宮城県内の汽水域に生息すること、また一部の市販貝類が Vv で汚染していることを明らかにした。

平成15年度は、定点における Vv の生息状況の継続調査、県内産魚介類の Vv 汚染状況調査と検出 Vv 菌株の詳細な生化学性状試験について行った。また、Vv の温度および pH 安定性についても検討した。

平成15年は定点の海水温度が平年より低かったため、Vv が検出される期間は13、14年度より1～2ヶ月短縮された。県内産魚介類について Vv 検査の結果、検査した養殖カキ16件中4件（25%）から Vv が検出された。

Vv の分離菌株を用いた温度あるいは pH を変動させた条件での菌発育を検討した基礎的な実験結果から、Vv は低温あるいは酸性条件下では菌数が減少することが示された。

### A 研究目的

重篤な感染を引き起こす Vv は西日本、特に九州地方の沿岸部に生息し、主に魚介類を介してヒトへ感染することが知られている。平成13年度から宮城県内の沿岸部汽水域に定点を設け、海水・海泥における Vv の生息状況と市販魚介類の Vv 汚染状

況を調査してきた。その結果、Vv は宮城県内の汽水域および一部の市販の貝類、特に県内産のアサリが Vv で汚染していることが明らかになった。そこで、宮城県内沿岸部汽水域の定点における Vv の生息状況についての継続調査と、県内産貝類に限定して Vv 汚染状況を調査した。

また、Vv の分離用として優れた選択培地がないことから、適切な分離培地を得る目的で昨年研究班で開発したセルビオース・ビル・食塩 (CB) 培地の有用性についての検討を併せて実施した。

Vv 患者の発生は、夏期の Vv 生息沿岸部に集中し、魚介類を新鮮なうちに生で喫食して発症するケースが多い。しかも、魚貝類の新鮮なものからの Vv 検出率は高く、冷凍もの、あるいは冷蔵で長期保存されたものでは検出率が低くなる傾向にある。このことから、Vv は低温で菌減少あるいは死滅する可能性が考えられたことから、Vv 感染防止対策の一助とすることも考慮し、Vv の温度および pH 安定性について検討した。

## B 研究方法

### 1 調査期間

定点での海水・海泥及び県内産魚介類についての調査は、平成15年5月から12月まで行った。

### 2 調査定点と検体入手

宮城県名取市関上（ゆりあげ）地区の増田川河口の汽水域を海水・海泥の検体採取定点とした。魚介類は松島・塩釜地区の地場産品直売所から検査当日直接購入した。

### 3 使用培地

Vv および腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*: Vp) の増菌用、食品からの菌分離の1次増菌用、MPN 値算定用および温度安定性試験用としてアルカリペプトン水 (日水製薬: APW)、2次増菌用として CCP ブロス (自家調整)、Vv 分離培地として TCBS (栄研化学)、m CPC (自家調整)、クロモアガービブリオ (関東化学: CV) および CB (関東化学) 培地、Vv・Vp の菌数測定用として TCBS 培地、大腸菌の菌数測定用としてトリプトソイ寒天 (TSA) 培地を使用した。

大腸菌の増菌用としてはトリプトソイブロス (TSB) を使用した。

pH 安定性試験用として、pH を 4、5、6、7 および 8 に調整したリン酸緩衝液にペプトン 1%、食塩 1% の割合で添加した培地 (pH 培地) を使用した。

### 4 海水・海泥からの Vv 検出

#### (1) 海水

海水 100 ml に APW の粉末 3 g を加え原液とした。これを更に 10 倍、100

倍および1000倍に希釈し、各希釈濃度の3本をMPN管として37℃で一晩培養後、各MPN管から1白金耳をTCBS、mCPCおよびCV培地に塗抹し培養した。TCBS培地で緑色、mCPC培地で黄色、CV培地で青色のコロニーを釣菌し、生化学的性状およびPCR法によりToxRS遺伝子を確認してVvと同定し、Vvが検出されたMPN管の本数から海水1mlあたりのMPN値を算出した。

## (2) 海泥

海泥20gをAPW180mlに加え10倍希釈液とした。これを更に100倍、1000倍、10000倍および100000倍に希釈し、海水の場合と同様にして海泥1gあたりのMPN値を求めた。

## 5 県内産魚介類からのVv検出

貝類からのVvの検出はA、Bの2方法で実施した。貝類はむき身25gをストマッカー袋に秤量し、APW225mlを添加してストマッキングした。この液を10倍希釈液とし、更に10倍に希釈し、100倍希釈液を調整した。

(1) A法：ストマッキングした後、ストマッカー袋ごと37℃で18～20時間培養した。培養後、培養液表面の1mlをCCPブロス10mlに添加し37℃で6時間培養し、培養液からCB、mCPC及びCV培地に塗抹し37℃で一晩培養してVvの検出を行った。

(2) B法：10倍、100倍、1000倍希釈濃度の各3本をMPN管とし37℃で一晩培養した後、各試験管からCB、mCPC及びCV培地を用いてVvの検出を行った。

## 6 分離菌株の性状試験と同定

Vvの同定はCB培地で黄色、mCPC培地で黄色、CV培地で青色のコロニーを釣菌し、更にそれぞれの分離菌株についての生化学的性状試験、PCR法によるVvの特異遺伝子の確認、血清型別試験で行った。

(1) 生化学的性状試験：TSI、LIMでの性状、耐塩性、マロン酸利用、硝酸塩還元、ウレアーゼ、VP、オルニチン脱炭酸、アルギニン加水分解、ソルビトール分解、サッカロース利用、イノシトール利用、マンニトール利用、ラフィノース利用、ラムノース利用、サリシン利用、セルビオース利用

(2)、PCR法による遺伝子検査：Vv特異溶血毒素遺伝子(VVh)、ToxRS遺伝子(ToxRS)をPCR法の定法で確認した。

(3) 血清型別試験：国立感染症研究所より分与されたO抗原の抗血清(1～7型)で決定した。

## 7 Vvの温度及びpH安定性

食品から分離したVv2菌株(Vv212、Vv412)について5、15および25℃の

温度での発育と pH 4、5、6、7 および 8 の培地での発育について検討した。対照として腸炎ビブリオ (Vp) 2 菌株 (VpS22、VpS61) と大腸菌 1 株を用いた。

(1) 温度安定性試験：Vv と Vp の各菌株は APW で、大腸菌は TSB 培地で一晚培養し、これを最終濃度  $10^4 \sim 10^5$  cells/ml になるように希釈し、培養希釈液  $100 \mu\text{l}$  を  $10\text{ml}$  の APW に添加し、各温度に設定した培養器で培養した。翌日から定期的に適量を取り希釈法により Vv と Vp は TCBS 培地、大腸菌は TSA 培地を用いて菌数測定を行った。

(2) pH 安定性試験：温度安定試験の場合と同様に各菌液を調整し、培養希釈液  $100 \mu\text{l}$  を各 pH の培地  $10\text{ml}$  に添加し  $37^\circ\text{C}$  で培養した。翌日から希釈法により菌数測定を行った。

## C 研究結果

### 1 海水・海泥における Vv 生息状況

調査定点における海水および海泥の Vv 検出状況と定点の海水温を図 1 に示した。海水からは 7～9 月までの 3 ヶ月間、海泥からは 6～10 月までの 5 ヶ月間 Vv が検出されたが、6 月および 10 月の海泥の MPN 値は  $1\text{g}$  当たり 1 未満とごくわずかであった。海水温が  $20^\circ\text{C}$  以上となった 7～9 月は海水、海泥ともに MPN 値が高値を示した。

### 2 魚介類からの Vv の検出状況

宮城県内産の魚介類 57 件について Vv の検出を A 法および B 法で行い、その検出状況を表 1 に示した。Vv は A 法では 2 件、B 法では 4 件からそれぞれ検出されたが、両方法で重複しては検出されなかった。

一方、検出に使用した培地別の Vv 検出状況は、CB 培地が 2 件、m CPC 培地が 4 件、CV 培地が 2 件であった。重複して検出された検体は 2 件で、1 件は CB と m CPC 培地から、残りは m CPC と CV 培地から Vv が検出された。3 種類の培地全てで検出された検体はなかった。

Vv の月別、食品別検出状況を表 2 に示した。月別では、7 月は 10 件中 4 件 (検出率：40%)、9 月は 10 件中 1 件 (同：10%)、11 月は 2 件中 1 件 (同：50%) の検出状況であった。Vv 検出食品は、7 月の養殖カキ 2 件中 2 件、アサリ 4 件中 1 件、ツブ貝 1 件中 1 件、9 月のカキ (養殖カキ 2、天然カキ 1) 3 件中 1 件、11 月の養殖カキ 2 件中 1 件であった。

### 3 海水・海泥からの選択分離培地別の Vv 検出状況

海水・海泥を MPN 管 (APW 使用) で一晚増菌培養した後、各管から m CPC および CV 培地へ塗抹して Vv の分離を行い、MPN 管ごとの両培地での Vv 検出状況を比