較した。

調査期間中にVvが検出されたMPN管（Vv陽性管）のうちm CPC培地のみでVvを検出したものをCPC、CV培地のみで検出したものをCV、m CPCおよびCV培地両方で検出したものをCPC&CVと３つのグループに分類して表３に示した。Vv陽性MPN管５６本のうち、CPC&CVが３１本（５４％）、CPCが１９本（３４％）、CVが６本（１１％）であった。これを海水、海泥それぞれの希釈倍率ごとにグラフに示したのが図２－１および図２－２である。海水、海泥ともに希釈倍率の低いMPN管（原液、×１０）ではCPC、CVの割合が高く、希釈倍率が上がる（×１００、×１０００、×１００００）に従いCPC & CVの割合が高くなっていた。

また、海泥のVv陽性管においては１０倍希釈の陽性管数（6本）が１００倍希釈（9本）のそれより３本少なかった。これは、Vvが存在するはずの１０倍希釈のMPN管からVvが適切に検出されていないことを示していると考えられる。

4　分離Vv菌株の生化学的性状と血清型別

ツブ貝（エゾボラ属）1件、養殖カキ４件、アサリ１件、海水3件および海泥5件の計14件からVvが検出された。それらの３０菌株について生化学的性状試験、２種類のVv特異遺伝子検査および血清型別を行い、その結果を表４に示した。TCBS培地で緑色発育、６％食塩加ペプトン水発育、８％食塩加ペプトン水非発育の他典型的な生化学性状を示しToxRS遺伝子保有の菌株をVvとした。

8/4の海水、9/8の海水および海泥から白糖分解の菌株、9/8の海泥からはCV培地で白色を呈する菌株が検出され、ToxRSは陽性であったがVV hは陰性であった。他の生化学性状試験の項目ではオルニチン脱炭酸、クエン酸利用、マンニトール利用、サリシン利用で菌株による差が見られたものの、それ以外ではすべて同じ結果であった。

血清型別では、O1が5株、O4が９株、O5が１株、O6が４株、O7が１株、O1～O7以外のUTが10株であった。

5　分離Vv菌株の温度およびｐＨ安定性

Vv、Vpおよび大腸菌を５、１５、２５℃で培養し、１、２、３および７日目に菌数を測定しその結果を図３に示した。

培養温度が１５、２５℃ではVpおよび大腸菌は良好に発育したが、Vvは２５℃では良好であったが１５℃での発育は弱かった。５℃では大腸菌が培養１，２日目に菌数が多少減少したが７日目でも生存していた。しかし、VvおよびVpは減少の経過は異なるものの７日目にはTCBS培地で菌数は測定されなかった。

Vv、Vpおよび大腸菌をｐＨ４～８の培地で培養し、１、２、３および７日目に菌数を測定しｐＨ５、６、７および８の結果を図４に示した。

ｐＨ７、８では３菌種とも発育が良好であった。一方、ｐＨ５では大腸菌は良好な発育を示したがVv、Vpはともに培養１日目から菌数が検出されなかった。

D　考察

Vv による感染は九州地域あるいは東海地域で多く発生し、東北では秋田および青森県で各１名の患者が報告されているだけである。しかし、平成１３年度の調査で、夏季に県内の沿岸部定点（名取市閖上地区）の海水・海泥および県内産アサリから Vv が検出され、宮城県内にも Vv が生息していることが明らかとなり、Vv 感染の危険性があることが示された。

そこで、Vv の魚介類の詳細な生息状況を調査する目的で、平成１５年度は定点での Vv 生息調査と県内産のアサリ等の貝類に限定して Vv 汚染状況調査を実施した。

平成１５年度の夏季は冷夏のため海水温が２０℃を越えたのは７～９月で１３、１４年と比較して１～２ヶ月短く、Vv の検出も海水で７～９の３ヶ月間、海泥で６～１０月の５ヶ月間と前年度より短縮された。しかし、検出された Vv の MPN 値は海水で２４０、海泥で１５００と１３、１４年と比較して高値であった。

Vv による魚介類の汚染状況調査は県内産の５７件について実施した。検査は各検体を APW で１次増菌した後、更に CCP ブロスで２次増菌する A 法と APW の MPN 管で増菌する B 法との２方法で実施し、検出法の比較検討も併せて行った。その結果、アサリからの Vv の検出は１６件中１件（検出率６％）と前回の調査の結果（Vv 検出２０件中３件：検出率１５％）より検出率が低かったが、Vv が検出された魚介類はカキが２０件中４件と最も多く、検出されたカキはいずれも養殖カキであった。養殖カキからの検出率は１６件中４件（２５％）と高い検出率を示した。アサリからは平成１３年度の調査でも検出されていることから、夏季の県内産アサリは Vv で汚染している可能性が高く、今回の結果から養殖カキも高率に汚染されていることが示された。

Vv の検出を A、B の２方法で検討を行った結果、Vv が検出された検体は A 法２件、B 法４件の計６件と検出総数が少なく、異なった検出法での優劣について明確な結論は言えないが、B 法が A 法より高い結果を示した。また、Vv の分離にｍ CPC、CV 培地と今回新たに CB 培地を用いたが、今回の結果からは環境あるいは食品からの Vv の検出に CB 培地が適しているとは考えられなかった。Vv が単独菌であれば CB 培地上で澄んだ黄色のコロニーを形成した他の菌種と明瞭に区別できるが、環境中のビブリオあるいは他の雑菌が多数ある場合には CB 培地による Vv の分離が困難であった。現時点では、食品あるいは環境から Vv を確実に検出するにはｍ CPC、CV 培地各々を単独で使用するのでなく２種の培地を併用する必要があると思われた。

また、海水・海泥からのMPN管法によるVvの検出検査において、Vv検出率は海水では１０倍の希釈系列、海泥では１００倍の系列と、原液などの高濃度より希釈した系列で高かった。これは、Vvが存在する検体から確実に菌検出をするためには検体を１０～１００倍に希釈することで検出率を高められる、ことを示唆している。

今回検出した菌株のうち３０菌株について諸生化学的性状等を調べた結果、生化学的性状では大差がなかったが、１菌株（VV h非保有）が生化学的性状で典型的なVvの性状を示しTCBS培地で緑色コロニーで、CV培地で白色のコロニーを形成した。Vv特異遺伝子はToxRSとVV hについて確認を行った結果、検出菌３０株全てがToxRS陽性であったが、５菌株がVVh遺伝子を非保有であった。このことから、Vvを適切に検出するためには、両遺伝子の確認が必要であると考えられる。

平成１３年度実施した市販魚介類のVv調査において、市販の県外産魚介類からはVvが全く検出されず、県内産のアサリのみから検出された。これは、遠方から流通する鮮魚貝類の市販品は特に低温に温度管理されており、その低温での管理がVvが検出されなかった理由ではないかと考え、低温におけるVvの安定性を実験的に検証した。その結果、Vvは低温では菌数減少あるいは死滅することが確かめられた。更に、Vvで汚染した魚介類から加工、流通あるいは消費の過程で菌を除去する方法が考案されれば、感染防止の一助になると考え、その第一段階としてｐＨ４～８に調整した各々の培地を作成し、酸あるいはアルカリ性条件下でのVvの発育について検討した。VvはVp同様ｐＨ８で発育が良好であったが、ｐＨ４～５の条件で菌数が減少することが確認された。

これらのことから、Vv感染防止には鮮魚介類の温度あるいはｐＨの管理によって制御できる可能性が示唆された。

E　引用文献

１）齋藤紀行　他：宮城県内の市販魚介類及び海水・海泥からのビブリオ・バルニフィカスの検出、宮城県保健環境センター年報　平成１３年度、６８（２００２）

表1　宮城県内産魚介類からのVv検出

検体番号	採材日	食品名	漁獲地	Vv	A法			B法			MPN
					CB	mCPC	CV	CB	mCPC	CV	
1	5月13日	カキ	松島湾		-			-			<0.3
2	5月13日	カキ	松島湾		-			-			<0.3
3	6月19日	カキ	松島外湾		-	-	-	-	+	-	<0.3
4	6月19日	カキ	松島内湾		-	-	-	-	-	-	<0.3
5	6月19日	アサリ	遠名		-	+	-	-	+	-	<0.3
6	6月25日	アサリ	松島		-	-	-	+	+	-	<0.3
7	6月25日	アサリ	松島		-	+	-	+	+	-	<0.3
8	6月25日	ホタテ	女川		-	+	-	+	+	+	<0.3
9	6月25日	ツブ	七ヶ浜		-	+	-	-	-	-	<0.3
10	6月25日	シャコ	松島		+	-	-	+	+	-	<0.3
11	6月25日	イワガキ	女川		-	+	-	-	+	-	<0.3
12	6月25日	クモダコ	松島		-	+	-	-	+	-	<0.3
13	7月15日	アサリ	名籠		—	+	-	-	+	-	<0.3
14	7月15日	ホタテ	女川		—	+	-	-	-	-	<0.3
15	7月15日	アサリ	ナゴメ	検出	-	-	+	+	+	+	0.3
16	7月15日	シャコ	松島		-	—	-	+	+	-	<0.3
17	7月15日	ツブ	七ヶ浜	検出	-	+	+	-	-	-	<0.3
18	7月15日	ウニ	松島		+	+	-	+	-	-	<0.3
19	7月15日	アサリ	塩釜		—	+	-	+	+	-	<0.3
20	7月15日	アサリ	遠名		+	-	-	+	-	-	<0.3
21	7月15日	カキ	松島外湾	検出	-	-	-	+	+	+	0.3
22	7月15日	カキ	松島内湾	検出	—	+	-	+	+	-	0.92
23	8月20日	アサリ	松島		-	+	-	+	+	-	<0.3
24	8月20日	ホタテ	女川		-	+	-	-	+	-	<0.3
25	8月20日	ホッキ	七ヶ浜		+	-	-	+	+	-	<0.3
26	8月20日	ツブ	七ヶ浜		-	-	-	+	+	-	<0.3
27	8月20日	イワガキ	女川		-	-	-	+	+	-	<0.3
28	8月20日	ツブ	松島		-	-	-	-	-	-	<0.3
29	8月20日	シャコ	松島		+	-	-	+	+	-	<0.3
30	8月20日	カキ	松島外湾		-	-	-	+	+	+	<0.3

検体番号	採材日	食品名	漁獲地	Vv	A法			B法			MPN
					CB	mCPC	CV	CB	mCPC	CV	
31	8月20日	カキ	松島内湾		-	-	-	+	+	-	<0.3
32	9月8日	カニ	閖上		-	-	-				<0.3
33	9月16日	アサリ	閖上		-	-	-	+	-	-	<0.3
34	9月17日	アサリ	松島高城		-	-	-	+	+	-	<0.3
35	9月17日	ツブ	松島		-	-	-	-	-	-	<0.3
36	9月17日	ホタテ	女川		-	+	-	-	+	+	<0.3
37	9月17日	イワガキ	女川		-	-	+	-	+	+	<0.3
38	9月17日	アサリ	鳴瀬		-	+	-	+	+	-	<0.3
39	9月17日	ツブ	松島		-	-	-	-	+	-	<0.3
40	9月17日	カキ	松島外湾		-	+	-	+	+	-	<0.3
41	9月17日	カキ	松島内湾	検出	-	-	-	-	+	+	0.36
42	10月15日	アサリ	磯崎		-	-	-	ND	-	-	<0.3
43	10月15日	アサリ	七ヶ浜		-	-	-	ND	-	-	<0.3
44	10月15日	ツブ	花渕		-	-	-	ND	-	-	<0.3
45	10月15日	ホッキ	花渕		-	-	-	ND	-	-	<0.3
46	10月15日	アサリ	磯崎		-	-	-	ND	-	-	<0.3
47	10月15日	ツブ	塩釜		-	-	-	ND	-	-	<0.3
48	10月15日	ホタテ	女川		-	-	-	ND	-	-	<0.3
49	10月15日	イワガキ	女川		-	-	-	ND	-	-	<0.3
50	10月15日	アサリ	厚岸		-	-	-	ND	-	-	<0.3
51	10月15日	アサリ	厚岸		-	-	-	ND	-	-	<0.3
52	10月17日	カキ	松島内湾		-	-	-	ND	-	-	<0.3
53	10月17日	カキ	松島外湾		-	-	-	ND	-	-	<0.3
54	11月9日	カキ	松島内湾	検出	-	+	-	ND	-	-	<0.3
55	11月9日	カキ	松島外湾		-	-	-	ND	-	-	<0.3
56	12月3日	カキ	松島内湾		-	-	-	ND	-	-	<0.3
57	12月3日	カキ	松島外湾		-	-	-	ND	-	-	<0.3

＋：CBで黄色、mCPCで黄色、CVで青のコロニーを検出

表2 県内産魚介類からのVv検出状況

	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	総計
養殖カキ	0/2	0/2	2/2	0/2	1/2	0/2	1/2	0/2	4/16
イワガキ		0/1		0/1	0/1	0/1			0/4
アサリ		0/3	1/4	0/1	0/3	0/5			1/16
ツブ		0/1	1/1	0/2	0/2	0/2			1/8
ホタテ		0/1	0/1	0/1	0/1	0/1			0/5
その他		0/2	0/2	0/2	0/1	0/1			0/8
合計	0/2	0/10	4/10	0/9	1/10	0/12	1/2	0/2	6/57

検出件数/検査件数

表3　選択分離培地別のVv検出状況

	海水	海泥	計
CPC&CV	20	11	31(55%)
CPC	8	11	19(34%)
CV	4	2	6(11%)
計	32	24	56

表4－1 Vv菌株の生化学的性状および血清型別

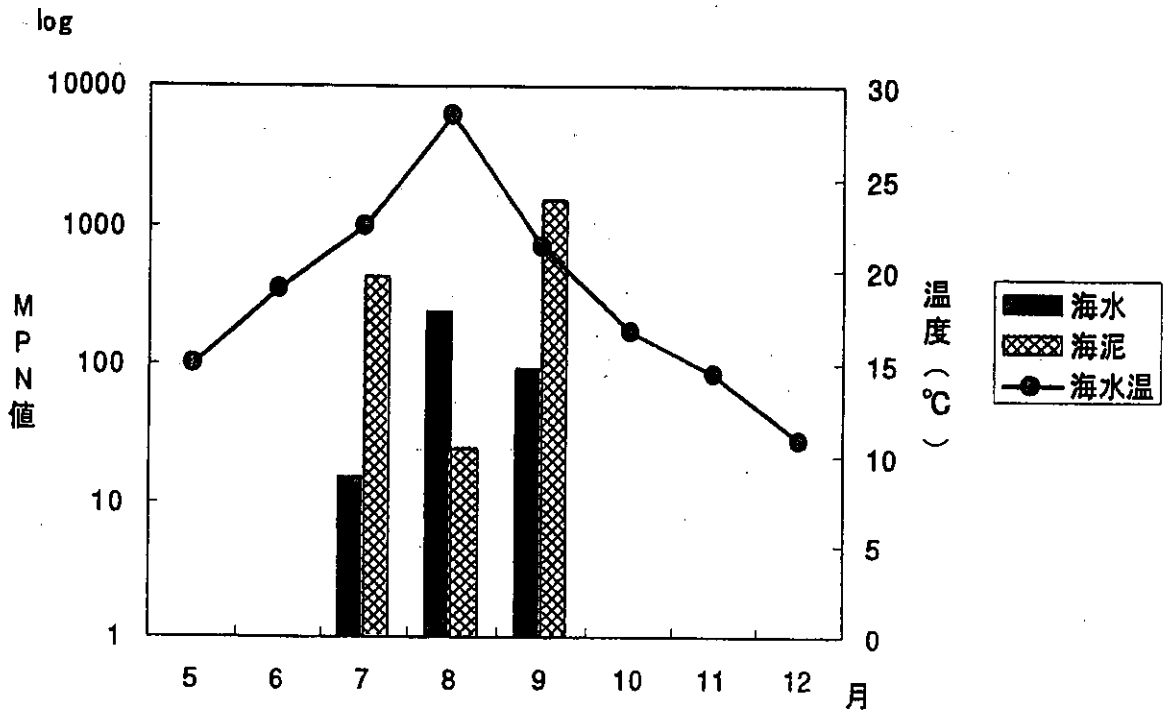
菌株番号	S1-1	S4-1	S2-1	S3-1	S5-2	S6-1	6-1	7-6	7-28	7-29
由　来	ツブ	カキ（内湾）	カキ（外湾）	アサリ	カキ（外湾）	カキ（内湾）	海泥	海水	海泥	海泥
検体採取日	7/15	7/15	7/15	8/20	9/17	11/9	6/16	7/15	7/15	7/15
TCBSにおける発育	緑	緑	緑	緑	緑	緑	緑	緑	緑	緑
CVにおける発育	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青
TSI	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A
LIM:										
リシン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
インドール	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
運動性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nutrient Brothにおける発育:										
0%NaCl	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
6%NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8%NaCl	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
10%NaCl	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
マロン酸	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
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	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
サッカロース	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
イノシトール	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
マンニトール	+	−	+	+	+	−	+	+	−	+
ラフィノース	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
アドニット	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
アラビノース	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
ラムノース	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
サリシン	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+
セロビオース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR:										
ToxRS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VVh	−	+	−	+	+	+	+	−	−	+
血清型	UT	O6	O4	O4	O7	UT	O1	O1	O6	O5

表4－2 Vv菌株の生化学的性状および血清型別

菌株番号	7-31	7-32	8-1	8-3	8-12	8-50	8-51	8-54	9-1	9-3
由　来	海泥	海泥	海水	海水	海水	海泥	海泥	海泥	海水	海水
検体採取日	7/15	7/15	8/4	8/4	8/4	8/4	8/4	8/4	9/8	9/8
TCBSにおける発育	緑	緑	緑	黄	緑	緑	緑	緑	黄	緑
CVにおける発育	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青
TSI	-/A	-/A	-/A	A/A	-/A	-/A	-/A	-/A	A/A	-/A
LIM:										
リシン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
インドール	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
運動性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nutrient Brothにおける発育:										
0%NaCl	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
6%NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8%NaCl	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
10%NaCl	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
マロン酸	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
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	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
サッカロース	−	−	−	+	−	−	−	−	+	−
イノシトール	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
マンニトール	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+
ラフィノース	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
アドニット	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
アラビノース	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
ラムノース	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
サリシン	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+
セロビオース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR:										
ToxRS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VVh	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
血清型	O1	UT	UT	UT	UT	UT	O4	O4	O4	O1

表4－3 Vv菌株の生化学的性状および血清型別

菌株番号	9-6	9-7	9-21	9-34	9-39	9-42	9-50	9-51	9-57	9-58
由　来	海水	海水	海水	海泥	海泥	海泥	海泥	海泥	海泥	海泥
検体採取日	9/8	9/8	9/8	9/8	9/8	9/8	9/8	9/8	9/8	9/8
TCBSにおける発育	緑	緑	緑	黄	緑	緑	緑	緑	緑	緑
CVにおける発育	青	青	青	青	青	青	青	青	青	白
TSI	-/A	-/A	-/A	A/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A
LIM:										
リシン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
インドール	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
運動性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nutrient Brothにおける発育:										
0%NaCl	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
6%NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8%NaCl	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
10%NaCl	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
マロン酸	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
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	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
サッカロース	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−
イノシトール	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
マンニトール	+	+	−	+	+	−	+	+	−	−
ラフィノース	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
アドニット	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
アラビノース	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
ラムノース	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
サリシン	−	+	+	+	+	−	+	−	+	−
セロビオース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR:										
ToxRS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VVh	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
血清型	O4	O4	UT	O4	O1	O6	UT	O4	O6	UT



採取月	5	6	7	8	9	10	11	12
海水	0	0	15	240	93	0	0	0
海泥	0	0.91	430	24	1500	0.36	0	0
海水温	15	19	22.5	28.5	21.3	16.8	14.5	10.8

図1　海水および海泥における Vv の月別変動と海水温

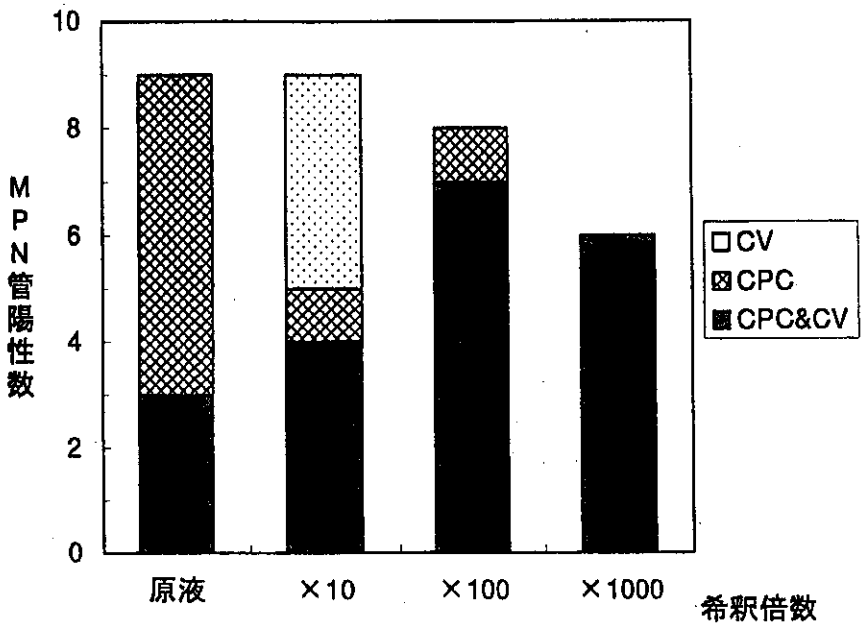


図2－1　海水における MPN 管の希釈倍数別 Vv 検出状況

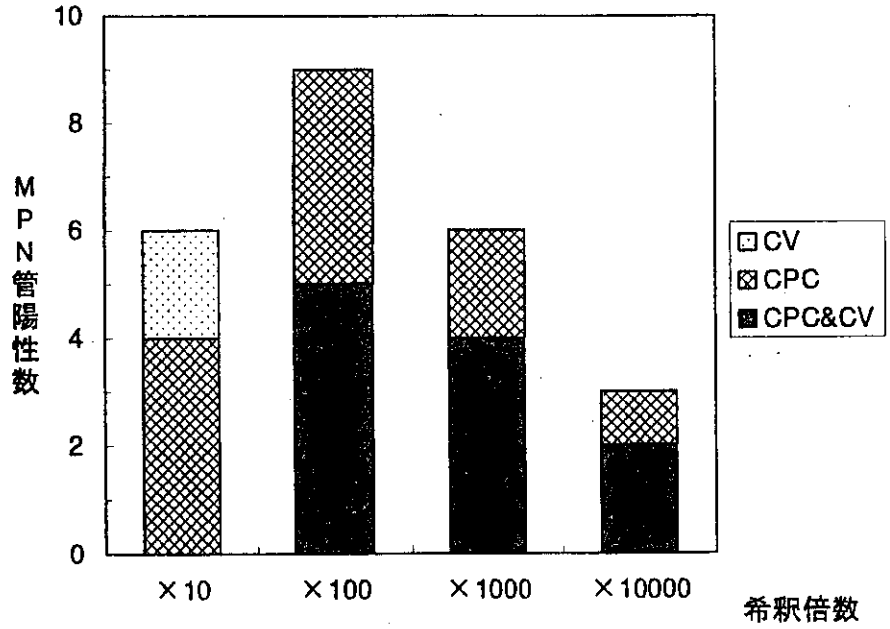
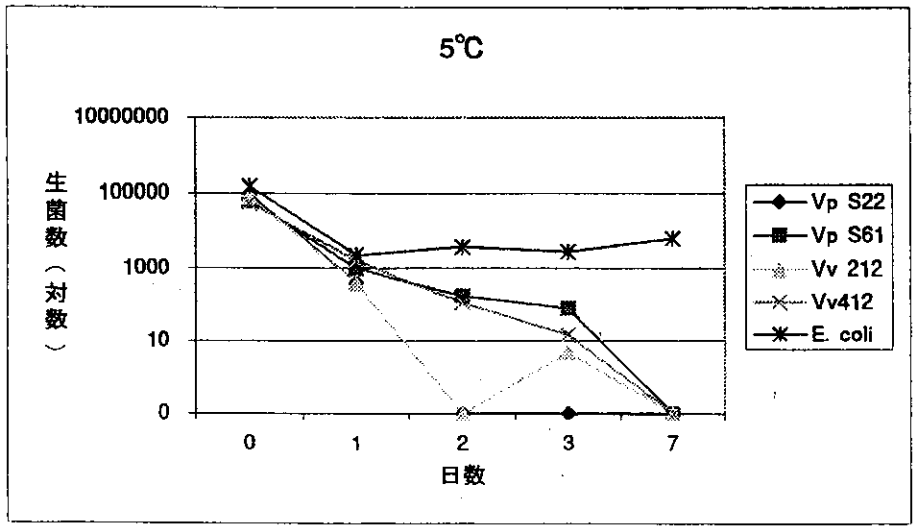
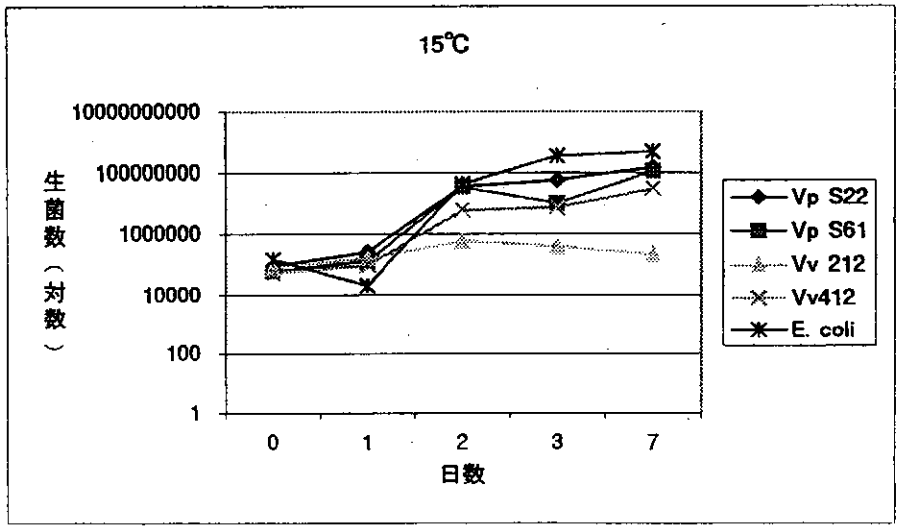


図2－2　海泥における MPN 管の希釈倍数別 Vv 検出状況





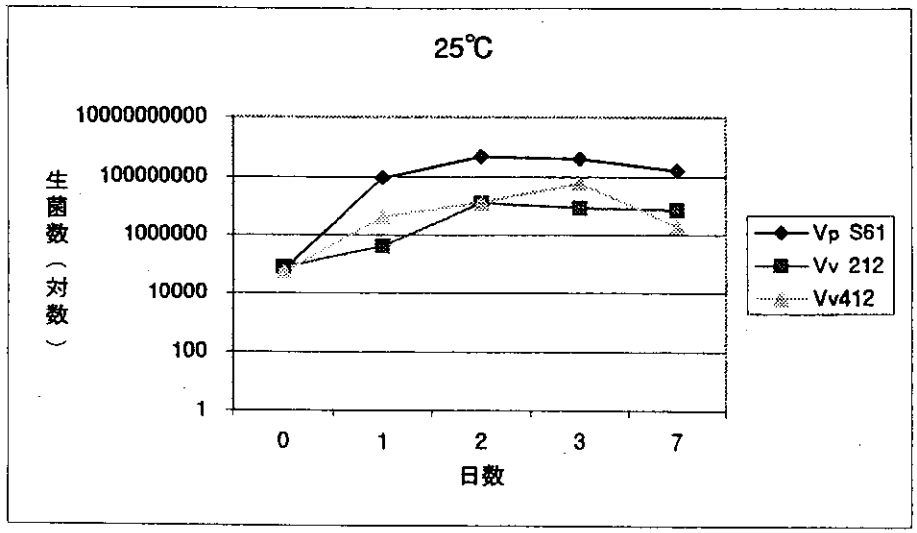


図3　各温度でのVvの発育

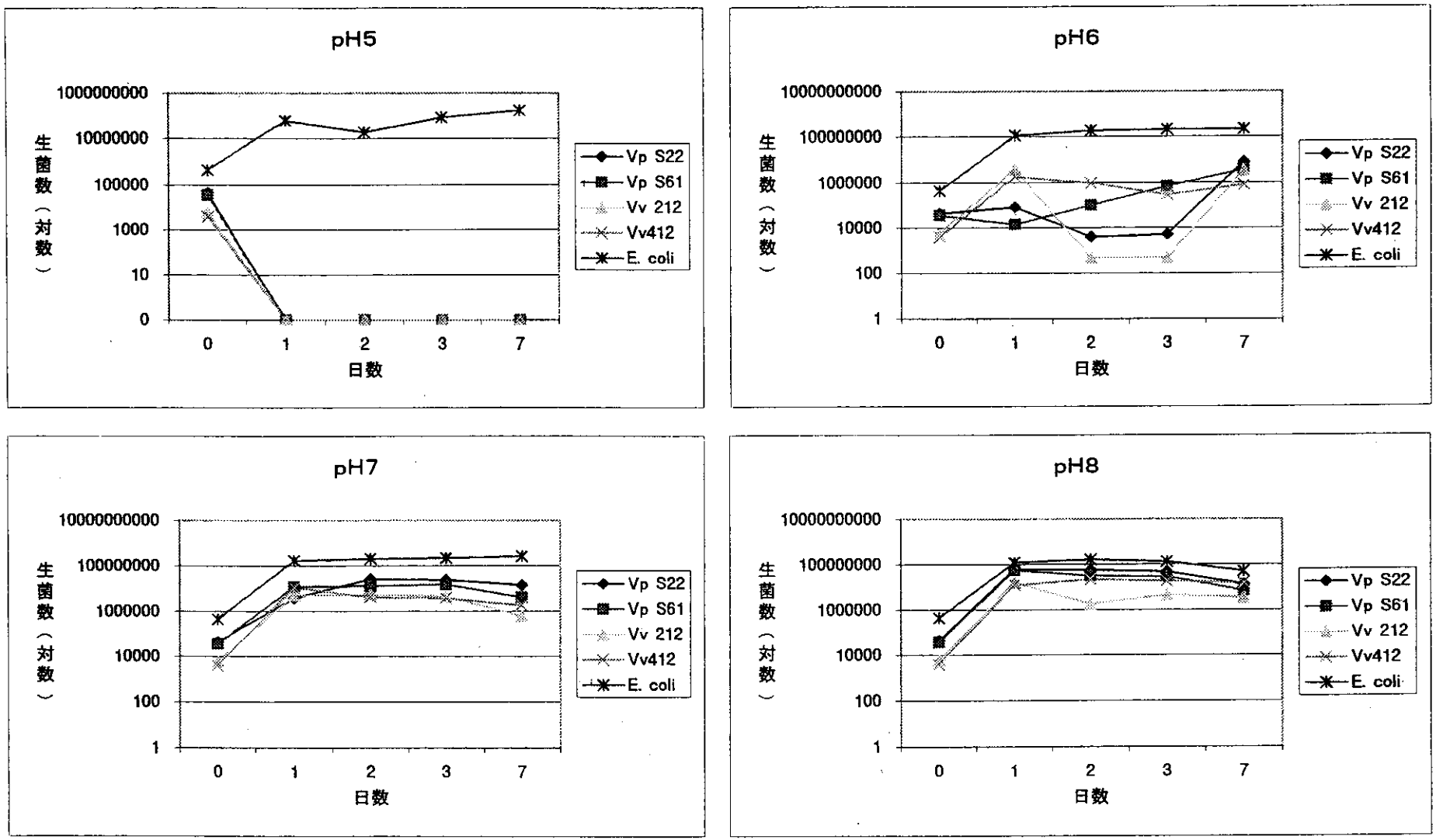


図4　各pH培地でのVvの発育

厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）分担研究報告書

ビブリオ・バルニフィカスによる重篤な経口感染に関する研究

熊本県内の *Vibrio vulnificus* の動向について

研究協力者： 宮坂次郎　荒平雄二　甲木和子

（熊本県保健環境科学研究所　微生物科学部）

［要　　旨］

熊本県内では、2001 年以降 3 年間に *Vibrio vulnificus*（以下 V.v という。）感染症患者が毎年発生している（2001 年 9 名、うち死亡 4 名、2002 年 1 名、2003 年 3 名、うち死亡 2 名）。

今回、県内 8 定点及び夏期の海水浴場 25 地点で V.v の動向を調査し、海域による違いを明らかにした。また、2003 年に患者発生のあった 3 事例について患者周辺の環境調査を行い、接触した可能性のある海水、海泥等に高い MPN 値の V.v が生息していたことを確認した。

［はじめに］

V.v は好塩性のグラム陰性小桿菌で一端に鞭毛を持ち活発に運動し、特に汽水域に多く分布している。我々は、前年度に患者発生地域を中心に魚介類及び海水等における V.v の生息状況を調査し、高い MPN 値の V.v が生息していたことを報告した。

また、2001 年の V.v 患者多発事例に伴い、2001 年 7 月から 2003 年 3 月まで魚介類調査を行ってきた[1), 2)]。今回、2002 年 6 月～ 2003 年 6 月まで県内海域 8 定点に調査範囲を拡大し、また 2003 年 7 ～ 8 月には県内の主要な海水浴場 25 地点で、海水中の V.v の生息状況及び水温、気温、塩分濃度等を調査した。さらに、2003 年 7 ～ 10 月にかけて県内北部で発生した V.v による感染症 3 例（創傷感染 2 例、経口感染 1 例）については海水、海泥、イソガニの卵、アミ等を材料に周辺調査を実施した。なお、分離培地は、当所の従来法及び CCPbroth による 2 次増菌培養を併用した後、CB agar 及び CHROMagar Vibrio を比較検討した。

［材料と方法］

海水は、河川の影響を受けやすい 3 地点（菊池川河口沖、白川河口、緑川河口）、港湾内 1 地点（水俣湾内）、河川の影響を受けにくい 1 地点（大矢野島沖）、2001 年に V.v 感染者が多発した地域の沿岸地 1 地点（鏡地先）と隣接する汽水湖 1 地点（大江湖）、同地点から沖合い 6km 地点（八代海北部）の併せて 8 地点で毎月採水し試

料とした。なお、採水時間はいずれも満潮時前後とした（図１）。

V.v 菌数が最も多くなる 7 ～ 8 月にかけて、県内の海水浴場 25 地点のヒトが泳ぐ程度の水深の海水を試料とした（図２）。

患者発生に際しては、分与を受けた患者株の生化学性状試験等を行うと共に、得られた患者情報から関係すると思われる海域の海水、海泥、魚介類等を試料とした（図３）。

海水は試料 10ml を 2 倍濃度アルカリ性ペプトン水 10ml の 3 本に、1ml を規定濃度アルカリ性ペプトン水 10ml の 3 本に接種し、以下 10^4 まで PBS で 10 倍段階希釈し、各 1ml をアルカリ性ペプトン水 10ml に接種し、35 ± 1 ℃で 18 ± 2 時間培養した。混濁が見られた培養液から 1 白金耳をクロモアガービブリオ寒天培地に塗抹し、35 ± 1 ℃で 18 ± 2 時間培養した。V.v と推定されるコロニーを各種生化学性状試験（オキシダーゼ、2%NaCl 加 TSI、2%NaCl 加 LIM、2%NaCl 加 VP 半流動培地、0、3、8、10%塩分濃度による発育試験）により同定し、V.v 陽性本数を最確数表にあてはめて 100ml 中の MPN 値を算出した。

なお、冬季の 11 月以降は上記に加え、試料 500ml を吸引ろ過したメンブランフィルター（0.45μm）を 40ml のアルカリ性ペプトン水に入れ、35 ± 1 ℃で 18 ± 2 時間培養し、定性試験とした。

海泥は、干潮時の表層（5cm 程度）を約 500g 採取し、ストマッカー用袋に入れ密封してクーラーボックスで搬送した。海泥を手揉みで均一にし、25g をシャーレに薄く広げて風袋ごと秤量した後、110 ℃で 2 時間乾燥後さらに、デシケータ内に 40 分放置後秤量し、間隙水量を求めた。新たに海泥 25g をストマッカー用袋に秤量し、先に求めた間隙水量の 9 倍量の PBS を加えて 10 倍希釈試料とし、この 10ml を 2 倍濃度アルカリ性ペプトン水 10ml の 3 本に、1ml を規定濃度アルカリ性ペプトン水 10ml の 3 本に接種し、以下上記に準じて V.v を同定し、間隙水 100ml 中の MPN 値を算出した。

アミ及びカニの卵はそれぞれ 25g を細切し、PBS225ml を加えて手揉みで 10 倍希釈試料としてその 10ml を 2 倍濃度アルカリ性ペプトン水 10ml の 3 本に接種し、以下上記に準じて V.v を同定し、1g 中の MPN 値を算出した。

なお、それぞれの検体の混濁を生じた試験管からは *cytotoxin-hemolysin* 遺伝子をターゲットとする PCR 法[3), 4)] を併用した。

分離培地の検討は、アルカリ性ペプトン水までは上記に準じて行い PCR 法でスクリーニングした後、以下の 3 つの方法で行った。即ち、同一検体から①混濁が見られた培養液の 1 白金耳をクロモアガービブリオ寒天培地に塗抹し、35 ± 1 ℃で 18

±2時間培養した。②培養液1mlをCCPブロスに接種し、35±1℃で7時間培養後、1白金耳をクロモアガービブリオ寒天培地に塗抹し、35±1℃で18±2時間培養した。③②に準じてCCPブロスで培養後、1白金耳をCB寒天培地に塗抹し、35±1℃で18±2時間培養した。それぞれの分離培地に発育したV.vと推定されるコロニーを上記に準じて同定し、V.vと確定したコロニー数を算定した。

[結　果]

定点8地点の海水中のV.vのMPN値、水温、塩分濃度を別表1～8及び別図1～8に示した。V.vは、八代海北部と大矢野島沖を除き、6～10月までほぼ毎月検出された。特に鏡地先及び大江湖では、8～10月はMPN／100ml値が10^2～10^5を示し、他の地点より高い傾向がみられた。汽水湖である大江湖は16回の調査で10回V.vが検出され他の地点に比べて検出月、菌数共に最も多かった。鏡地先から約6km沖合いの八代海北部では、8月及び6月の2回のみ検出され、MPN値も低かった。水俣湾内では、6～10月まで検出され10^0～10^1であった。河口周辺地点については、菊池川河口沖で6月、7月、10月に10^0～10^3、白川河口で7～9月及び翌年6月に10^0～10^1、緑川河口で7～9月及び翌年5～6月に10^1～10^2、V.vを検出した。この中では、緑川河口が検出率、MPN値共に高い傾向がみられた。河川水の影響を受けにくい大矢野島沖では、年間を通じて検出されなかった。

7月24日～8月31日に実施した県内海水浴場25地点のV.v調査結果では、検出限界以下が11地点で、他の14地点のMPN/100ml値は10^0～10^4であった。調査した7～8月は熊本地方の降水量が例年に比べて多く、7月589mm、8月362mmであった。各地点はその影響を受け、特にV.vのMPN値の高かった4地点の塩分濃度は19.6～26.8‰と低かった（表1及び図2）。

患者発生に伴う周辺調査結果は以下のとおりであった。玉名郡長洲町の例では7月23日転倒して左前腕に創傷を負った。同日、自宅近くの海岸で飼育している金魚の餌とするためイソガニの卵を採取した。24日午前2時発症同25日死亡。海岸での創傷感染が推測された、10日後の同地点の海水のMPN/100ml値は1,100、患者が接触した可能性があり家庭で10日間冷凍保存してあったカニの卵のMPN/1g値は230であった（表2）。荒尾市牛水の例では8月14日昼食と夕食にイカ、マグロの刺し身を食べた。また、8月10、11、12、14日に近くの海岸でアサリ貝を採取していた。8月15日午後発症、救命。左下腿に長靴で擦れた様な痕があり、左下腿からの創傷感染が推測された。4日後の同海水でMPN値430（表3）。玉名郡天水町の例では10月8日にサバ及び生アミの生食をした。9日早朝発症、同日死亡。生アミからの経口感染と推定された。13日後のアミ漁獲場所付近の海水でMPN値15。18日

後に採取した生アミからは検出されなかった（表４）。なお、長洲町及び荒尾市牛水で、9月10日に海泥の調査を行った結果、間隙水100ml中のMPN値はそれぞれ10^6、10^5と高い数値を示した。

患者株の生化学性状試験等は、表５に示した。

分離培地の検討では、当所で行っていた従来法であるアルカリ性ペプトン水からクロモアガー・ビブリオ寒天培地で分離する方法と比較して、アルカリ性ペプトン水からCCPブロスで2次増菌培養後、クロモアガー・ビブリオ寒天培地で分離する方法が高率にV.vを分離できた。CB寒天培地については、他の雑菌の増殖が抑制できず、V.vコロニーが埋もれている状態が多かった（表６）。

［考　　察］

県内8定点の海水中のV.vの菌数変動を、最確数法で測定した。2003年4月、水温17.0℃の鏡地先ではじめてV.vを検出し、MPN/100ml値は3であった。この月の平均気温は19.1℃で、前月の平均水温12.5℃から一気に6.6℃上昇した。5月は20.1℃となり、3地点でV.vを検出、6月は21.8℃で、5地点で検出した。これらのことから水温17.0℃前後が出現の境界とみられる。

V.vの最確数法による最後の検出は11月（平均水温15.4℃）で、12.5℃の大江湖であった。なお、定性試験でも同じく12月の大江湖で、水温11.0℃であった。
大江湖は汽水湖であり、調査地点の年平均塩分濃度は3.0‰であった。年間のV.v調査でも8～10月にかけて10^3～10^5と、他の地点と比較して非常に高い数値を示した。このような汽水湖は、干拓地の沿岸末端部各地に多数の農業用水路から淡水が集まり、遊水池として存在している。この遊水池には自由開閉式の水門から海水が混じり、低い塩分濃度を保っている。このような環境条件を有するところでは、同様の状況が起こることが推測された（図５）。

海水浴場25地点の調査では14地点でV.vを検出した。特に河川の影響を受けやすい松原ではMPN/100ml値は10^4と高い数値を示した。湾内の海水浴場の二間戸では10^3であったが、ここは2つの河川が流れ込む環境のためと思われた。一方、外洋に面する天草西海岸及び海流が常に移動するような環境の海水浴場では全て検出限界以下であった。

海水浴場での創傷感染は発生していないが、2002年1名、2003年2名が海中や海岸での作業中に創傷感染を発症していることから、V.v菌数の多い海域では注意が必要である。

V.v患者株の生化学性状試験では、3例中1株は白糖分解性であった。TCBS寒天培地上のコロニーが通常のV.vとは違い黄色であったため、当初医療機関では疑問

視された。我々の経験では、環境中に同性状を示す V.v は、数%は存在するとみられるので注意を要する。

我々は V.v の調査を開始して以来、毎年、海水や魚介類から V.v が検出されはじめた時点及びピーク時と思われる時点で、衛生行政機関に注意情報を提供している。また、2003 年には患者発生のあった海岸で、漁業者による V.v 感染症に関する注意看板が掲示された（図６）。

海水中にどれくらい V.v が生息すると創傷感染が成立するのか、現在までその指標となる数値はない。しかし、我々の今回の調査によれば、少なくとも MPN 値 10^2 台で感染が成立していると推測された。今回の経口感染については、アミが漁獲された海域は MPN 値 15 であったが、生アミそのものからは検出限界以下であったことを考えると、患者がアミを生食したとき残存した海水中のごく僅かな菌数で発症した可能性がある。

［参考文献］

１）宮坂次郎，徳永晴樹，甲木和子：熊本県保健環境科学研究所報，**31**，31（2001）.

２）宮坂次郎，徳永晴樹，荒平雄二，甲木和子：熊本県保健環境科学研究所報，**32**，37（2002）.

３）Waltre E.hill, Stacye P.keasler, Mary W.teucksess, Peter feng, Charles A.kay sner, and A.lampel：Appl.Environ. Microbiol., **57**, 707（1991）.

４）佐藤　征，三浦富智，斎藤雅明，月足正辰，本郷俊治，戸羽隆宏：日本感染症誌，**75**，307（2001）.

表 1 海水浴場検査結果

No	地点名	市町村名	採水日		調査項目					
			年	月	気温(℃)	水温(℃)	天候	塩分濃度(‰)	pH	V.v※
1	松原	岱明町	2003	7	31.0	29.5	曇	19.6	8.2	23000
2	本渡	本渡市	2003	7	31.5	25.5	曇	31.3	8.4	<3
3	若宮	五和町	2003	7	29.5	25.0	曇	30.8	8.4	<3
4	えびす	倉岳町	2003	7	30.0	26.5	曇	30.0	8.5	7
5	松島	松島町	2003	7	32.0	29.5	晴	25.3	8.6	4
6	黒島	御所浦町	2003	7	28.5	25.0	曇	31.8	8.6	<3
7	樋合	松島町	2003	7	30.0	29.0	晴	26.1	8.4	<3
8	西目	松島町	2003	7	31.0	28.0	晴	26.1	8.6	4
9	二間戸	姫戸町	2003	7	29.5	27.5	曇	22.1	8.8	3800
10	高戸	龍ヶ岳町	2003	7	31.0	27.0	晴	24.0	8.8	<3
11	小島	姫戸町	2003	7	29.5	27.0	曇	21.4	8.8	4
12	弓ヶ浜	大矢野町	2003	7	27.0	23.8	曇	31.3	8.2	6
13	白涛	大矢野町	2003	7	27.0	23.8	曇	31.9	8.1	36
14	唐船ケ浜	大矢野町	2003	7	27.0	23.8	曇	31.7	8.2	<3
15	砂月	牛深市	2003	7	29.0	24.8	曇	33.7	8.2	<3
16	茂串	牛深市	2003	7	27.0	23.8	曇	33.5	8.2	<3
17	富岡	苓北町	2003	7	27.0	23.8	曇	32.7	8.3	<3
18	湯ノ児	水俣市	2003	8	27.5	26.5	雨	31.6	8.0	23
19	御立岬	田浦町	2003	8	26.0	26.0	雨	30.3	8.1	21
20	鶴ケ浜	芦北町	2003	8	26.0	25.0	雨	31.6	7.9	9
21	若宮	三角町	2003	8	24.5	25.0	雨	25.8	8.0	93
22	太田尾	三角町	2003	8	24.0	24.0	雨	24.1	8.0	430
23	赤瀬	宇土市	2003	8	24.0	24.0	雨	26.8	8.0	230
24	白鶴ケ浜	天草町	2003	8	31.5	28.5	晴	33.0	8.1	<3
25	四郎ケ浜	有明町	2003	8	32.0	28.0	晴	32.7	8.1	<3

※ MPN/100ml