

別表 8 水俣港内

年/月	塩分 (%)	水温 (°C)	V.v (MPN/100ml)
2002/6	30.1	23.9	6
2002/7	30.5	24.5	4
2002/8	33.5	25.6	3
2002/9	33.1	27.2	15
2002/10	34.0	24.0	20
2002/11	33.9	19.0	<3
2002/12	32.7	16.5	<3
2003/1	33.5	13.5	<3
2003/2	33.1	12.0	<3
2003/3	30.9	14.0	<3
2003/4	33.5	19.5	<3
2003/5	30.9	22.0	<3
2003/6	33.9	20.7	<3

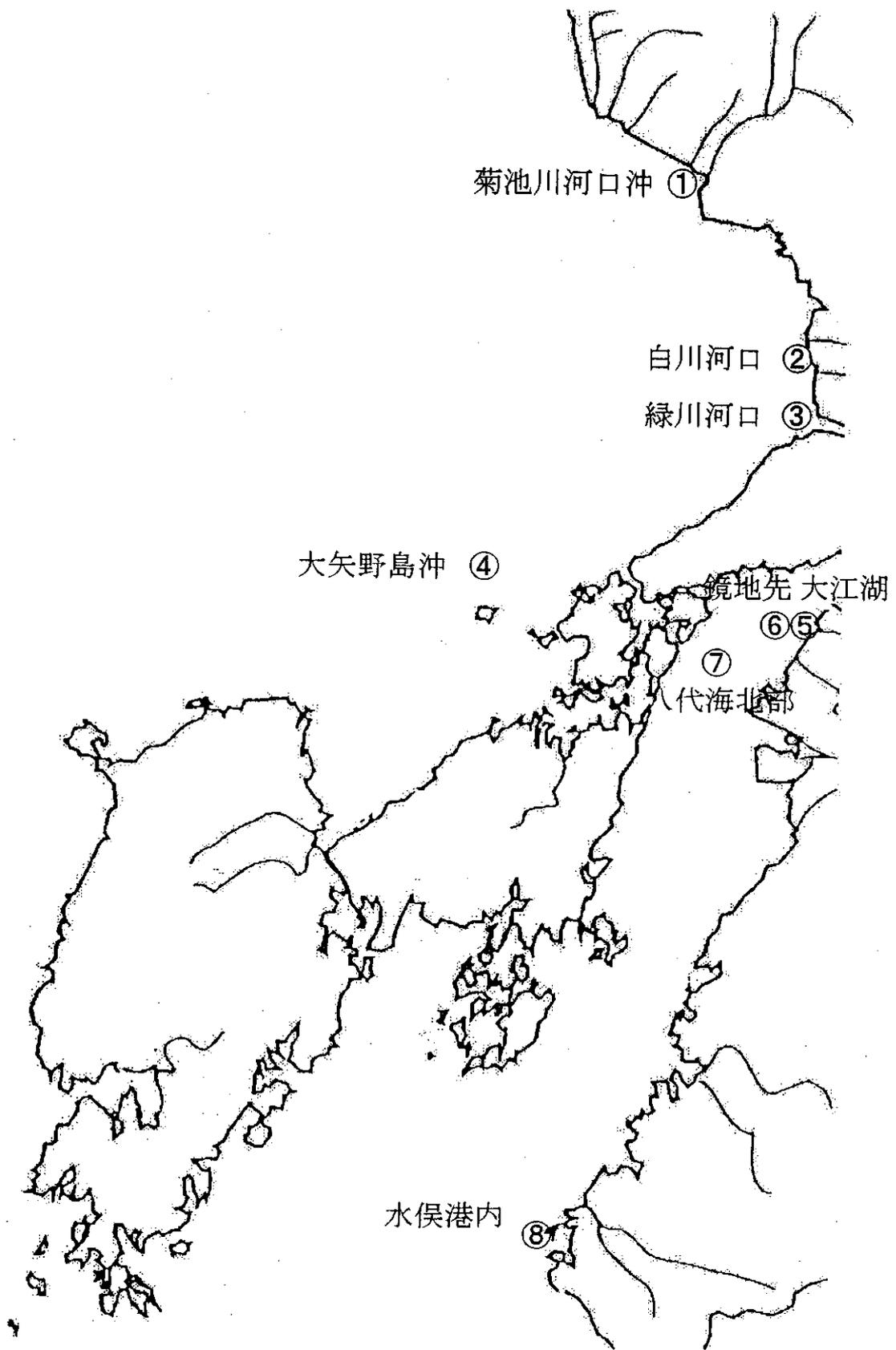


図1 採水地点 (8 定点)

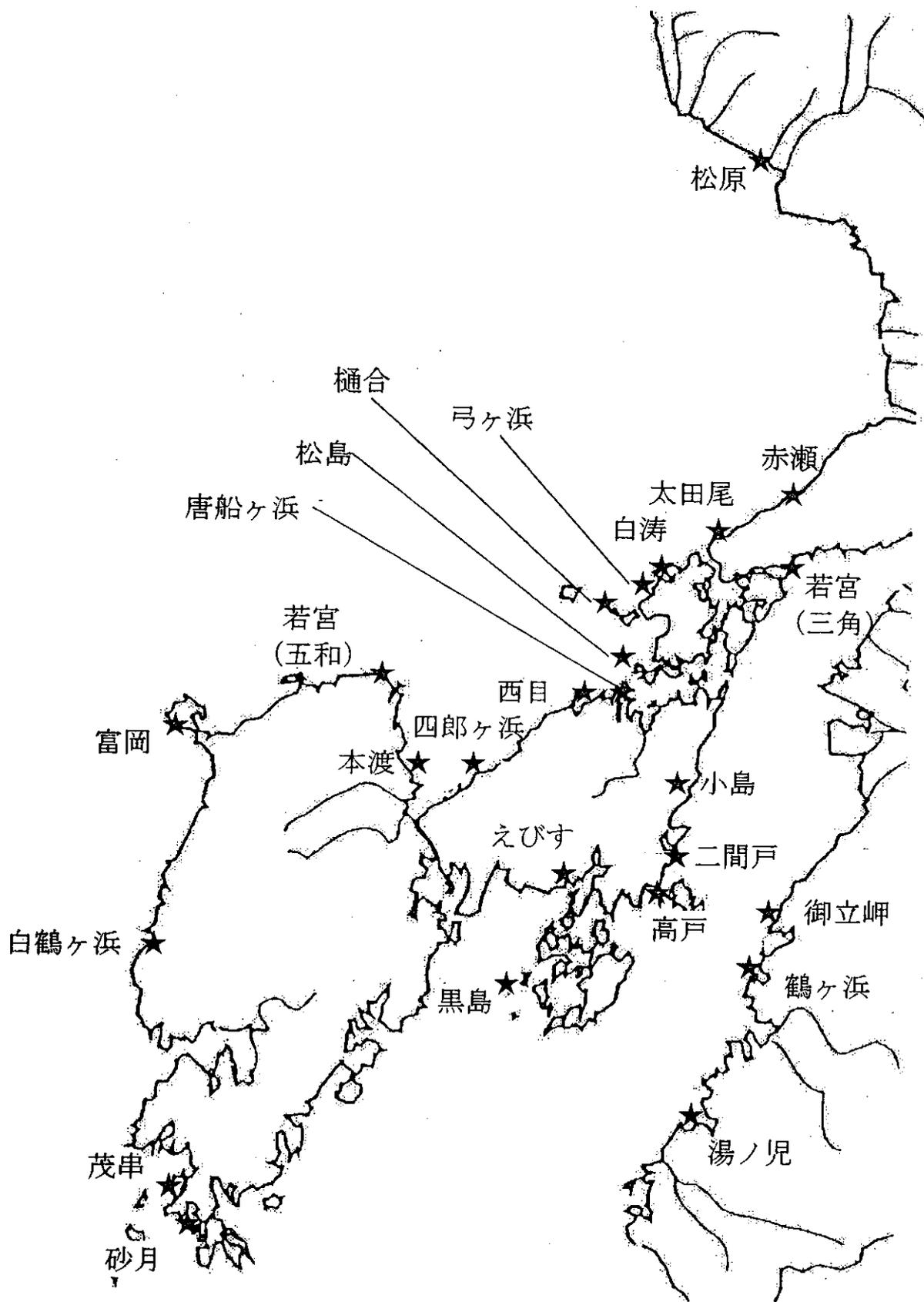


図2 海水浴場採水地点 (25 地点)

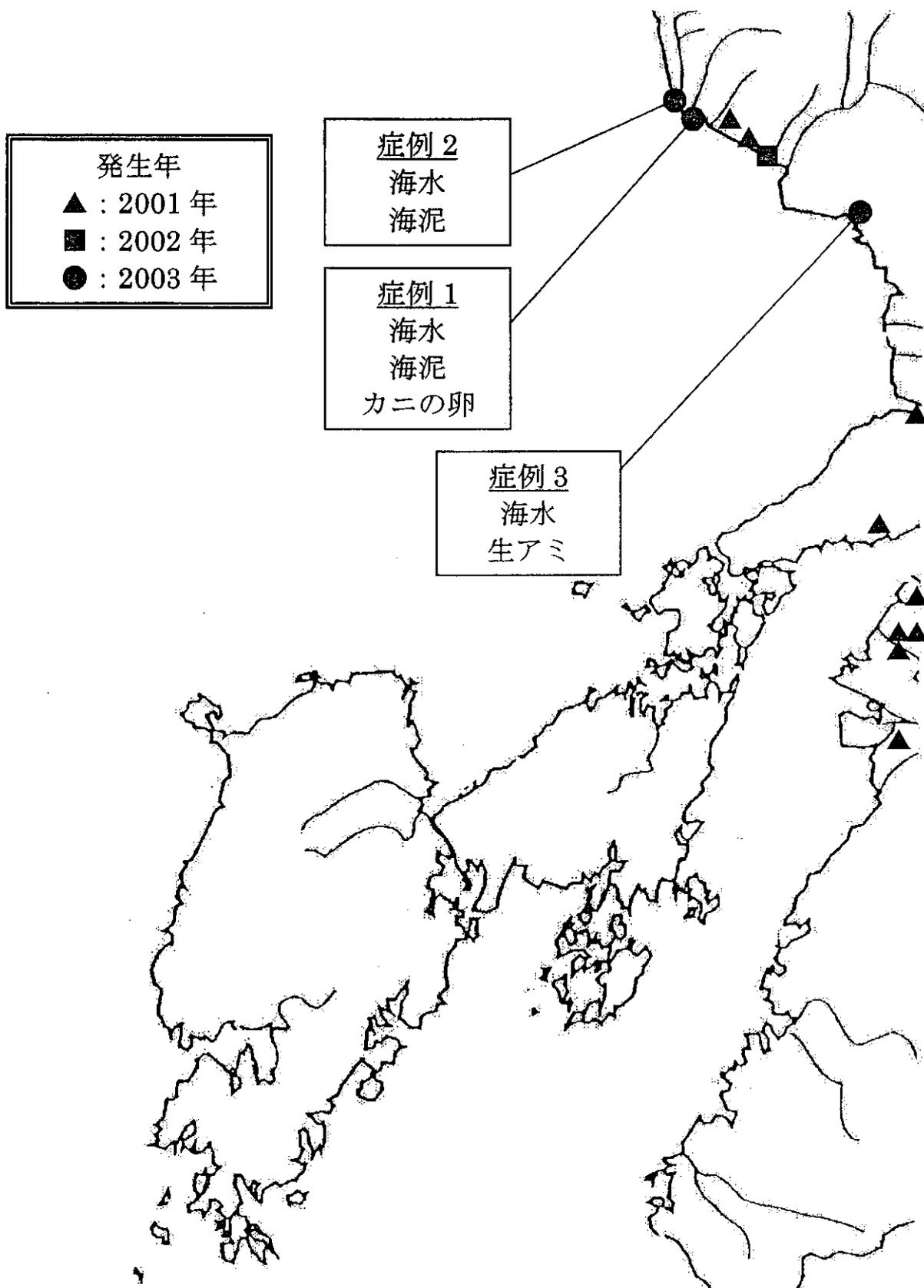


図 3 患者発生地点と試料

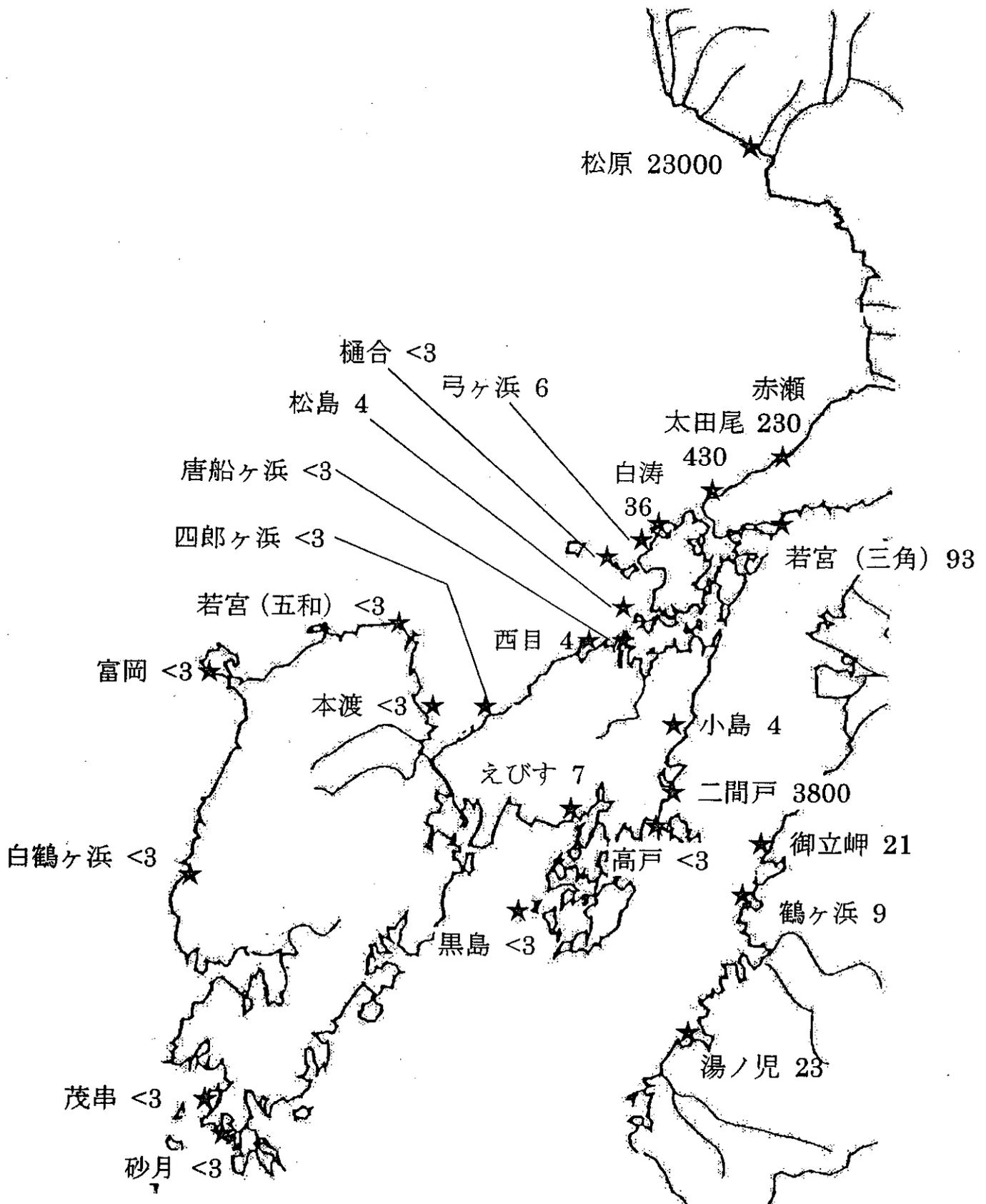


図4 海水浴場 25 地点の結果 (MPN/100ml)

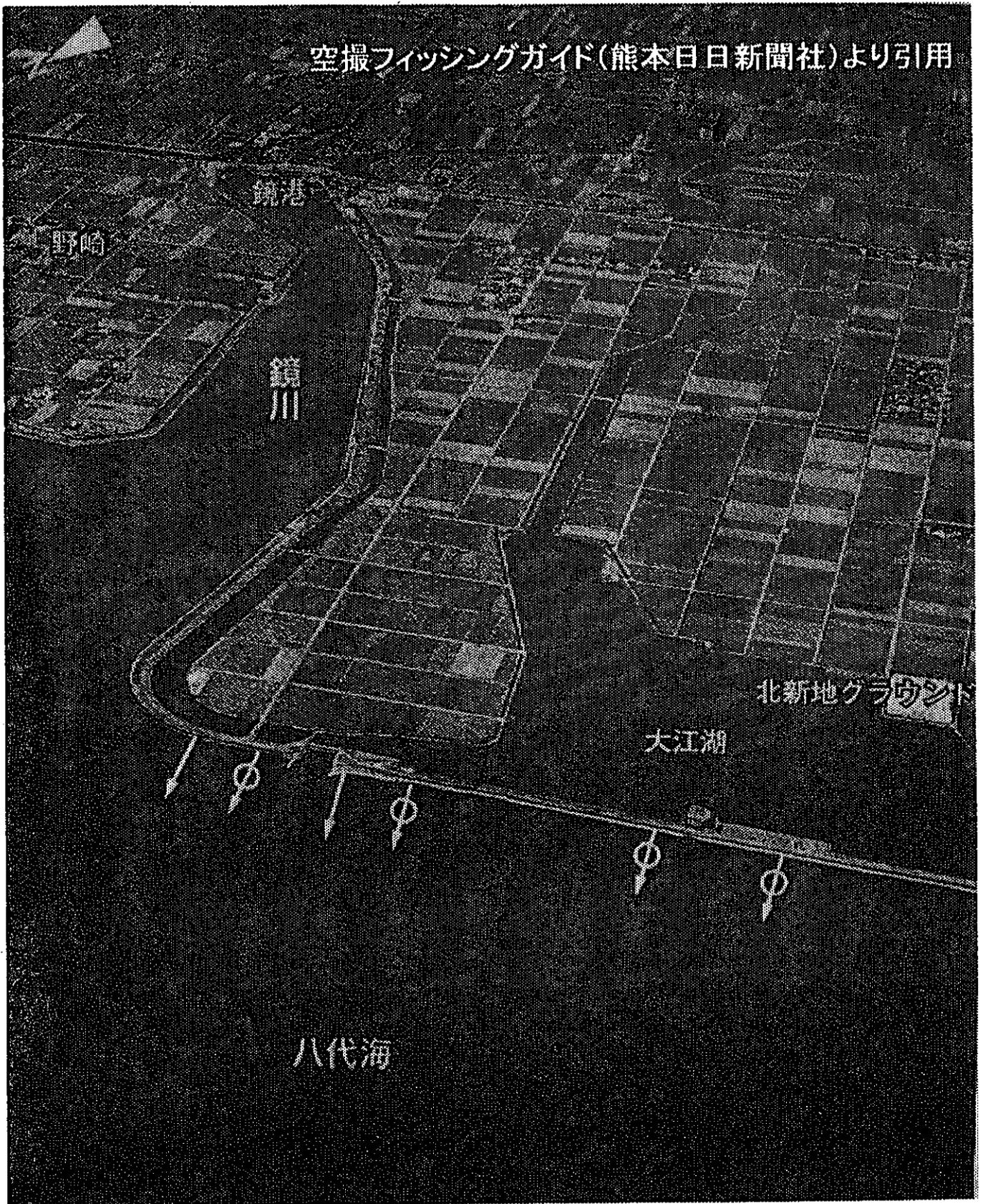


図5 干拓地末端部の遊水池

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
ヒブリオ・バルニフィカスによる重篤な経口感染に関する研究

分担研究報告書

魚介類および環境における *Vibrio vulnificus* の定量的解析に関する研究

研究協力者 神奈川県衛生研究所 黒木俊郎
神奈川県衛生研究所 鈴木理恵子

要旨

V. vulnificus 感染症の予防には、食品における当該菌の汚染状況や環境における分布状況を把握することが重要である。これらの状況を調査するために、市販の魚介類および汽水から当該菌の検出を試みた。貝類はアサリ 8 検体、シジミ 5 検体の計 13 検体、魚類は生シラス 12 検体、ワカシ 3 検体、カツオ 2 検体、カマス 1 検体、アジ 1 検体およびイワシ 1 検体の計 20 検体、環境由来検体は汽水 4 検体を調べた。このうち、*V. vulnificus* は貝類の 1 検体と魚類の 2 検体から検出された。

A. 研究目的

V. vulnificus は、汚染された魚介類などの食品の摂食や環境中の菌が創傷部から侵入して感染し、致死的な感染症を引き起こすことが知られている。感染は日和見感染症であり、基礎疾患に伴う免疫不全状態にあるような易感染性宿主で重篤な疾患となる。日本では魚介類を生食することが習慣的に行われているため、食習慣上も感染のリスクが高い。

V. vulnificus 感染症を予防するためには、*V. vulnificus* の魚介類の汚染状況および環境における分布状況を把握することが重要である。そこで本研究は、神奈川県で市販されている魚介類および県内の汽水での *V. vulnificus* の汚染・分布状況を調査して、*V. vulnificus* 感染症の予防施策の策定に資する情報を提供することを目的に行った。

B. 研究方法

1. 調査試料

貝類は、神奈川県内の小売店で市販されているアサリおよびシジミを7月23日と9月8日に購入して調査材料とした。アサリ8検体の産地は三重県、愛知県、千葉県、静岡県、シジミ5検体の産地は青森県、三重県、茨城県と表示されており、いずれも神奈川県以外の産地で採取されたものであった。

魚類は、神奈川県内の魚市場で水揚げされたシラス（生）12検体、ワカシ3検体、カツオ2検体、カマス1検体、アジ1検体およびイワシ1検体を8月19日、9月16日、10月15日および11月12日に購入した。産地はいずれも神奈川県近海であった。

汽水は、魚類購入日の同日に各1検体（計4検体）を相模川河口で採取した。

2. 分離培養

増菌培養には1次増菌用としてアルカリペプトン水（OXOID）、2次増菌用としてCCP培地、分離培養にはTCBS寒天培地（日水）、クロモアガービブリオ培地（関東化学）および本研究班で*V. vulnificus*分離用に開発したCB寒天培地を使用した。

貝類は、むき身の1g、10gおよび25gを秤量し、それぞれアルカリペプトン水10ml、100mlおよび250mlに接種した。シラスは25gを秤量し、それ以外の魚類はエラ部を25gずつ採取し、10倍量のアルカリペプトン水の225mlに接種した。汽水500mlは滅菌メンブランフィルター（径0.45 μ m）でろ過し、フィルターをアルカリペプトン水50mlに再浮遊して10倍濃縮液とした。各々の検体を接種したアルカリペプトン水は36 \pm で18~24時間培養した。2次増菌を行う場合は1次増菌培養液の1mlをCCP培地に接種して、さらに18~24時間培養した。1次および2次増菌培養液をTCBS寒天培地、クロモアガービブリオ培地およびCB寒天培地に1白金耳ずつ塗抹し、36 \pm で18~24時間培養した。

TCBS寒天培地では、*V. vulnificus*および*V. parahemolyticus*が疑われる緑色集落を釣菌した。クロモアガービブリオ培地では、*V. vulnificus*が疑われる青緑集落と*V. parahemolyticus*が疑われる紫色集落を、CB寒天培地では*V. vulnificus*が疑われる黄色集落を釣菌した。

3. 生化学的性状試験

V. vulnificus と *V. parahemolyticus* との生化学的性状試験では、1%に食塩を加えた TSI、SIM、リジン脱炭酸培地、VP 試験培地を確認培地とし、0%、3%、6%、8%および 10%食塩加ペプトン水に対する好塩性試験を行い定法により同定を行った。*V. vulnificus* ではさらに、40_hにおける発育性、Lactose および Cellobiose の糖分解試験を行った。

4. 特異遺伝子の検出

微量の菌体を精製水 100_I に浮遊し、100_U で 10 分間して鋳型 DNA とし、*V. vulnificus* の鑑別には、16S-23S rDNA 間の菌種特異的な塩基配列および *V. vulnificus* が有する cytotoxin-hemolysin mDNA 遺伝子、*V. parahemolyticus* は菌種特異的遺伝子 *toxR*、腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒遺伝子 (*tdh*) および耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子 (*trh*) を標的とし、PCR 法による遺伝子検出を行った。

5. 血清型別

V. vulnificus の血清型別は、O1~O7 群の 7 種の抗血清を用いて 121₃₅ 分の加熱抗原によるスライド凝集反応を行った。*V. parahemolyticus* の血清型別は市販血清（腸炎ビブリオ型別用免疫血清：デンカ生研）を用い、添付の説明書に従って実施した。

C. 結果

1. 魚介類および環境材料からの検出

調査において、*V. vulnificus* は、生化学的性状を glucose (+)、lactose (-) および cellobiose (+)、リジン脱炭酸 (+)、インドール (+)、運動性 (+)、3%および 6%食塩加ペプトン水で発育、40_hでの発育 (+) とし、16S-23S rDNA 間の *V. vulnificus* に特異的な塩基配列および *V. vulnificus* が有する cytotoxin-hemolysin mDNA 遺伝子が PCR 法により検出された株とした。また、*V. parahemolyticus* は、生化学的性状を glucose (+)、lactose (-)、リジン脱炭酸 (+)、インドール (+)、運動性 (+)、3%、6%および 8%食塩加

ペプトン水で発育 (+) した *toxR* 遺伝子保有株とした。また、*tdh* および *trh* 遺伝子の保有株を病原株とした。

1) 貝類

貝類としてアサリ 8 検体、シジミ 5 検体から *V. vulnificus* および *V. parahemolyticus* の検出を試みた。このうち、7 月 23 日に購入した三重県産のアサリの 1 検体 (アサリ検体の 12.5%、貝類検体の 7.7%) から *V. vulnificus* が検出された。それぞれの検体は貝のむき身を 1g、10g および 25g ずつ秤量して前培養培地に接種したが、検出されたアサリは、1g をアルカリペプトン水に接種して前培養したもののみからの検出であった。*V. vulnificus* の分離培養には TCBS 培地、クロモアガービブリオ寒天培地および CB 培地を用いたが、いずれの培地でも *V. vulnificus* が検出された。

V. parahemolyticus は、13 検体中 11 検体 (84.6%) から検出され、高い頻度で分布していることが明らかとなった。アサリは全検体から検出されたが、シジミは 5 検体中 3 検体から検出された。

2) 魚類

魚類の検体は、1 次増菌としてアルカリペプトン水を、2 次増菌として CCP 培地を用いた。生シラス 12 検体、ワカシ 3 検体、カツオ 2 検体、カマス 1 検体、アジ 1 検体およびイワシ 1 検体から *V. vulnificus* の検出を試みたところ、8 月 19 日に購入したシラス 1 検体 (8.3%) およびワカシ 1 検体 (33.3%)、合わせて 2 検体 (10.0%) から *V. vulnificus* が検出された。シラスは、アルカリペプトン水から直接接種した TCBS 培地とクロモアガービブリオ培地から *V. vulnificus* が検出され、CCP 培地で 2 次増菌した後に分離用寒天平板に接種しても検出できなかった。ワカシでは、1 次増菌および 2 次増菌した場合のどちらでも *V. vulnificus* は検出された。

シラスおよびワカシから分離された菌株はいずれの型の免疫血清にも凝集せず、型別不能であった。

3) 環境

環境由来検体として汽水 4 検体を調べた。調査した 4 検体のいずれからも *V. vulnificus* あるいは *V. parahemolyticus* は検出されなかった。

2. CB 培地の性能

貝類からの *V. vulnificus* の分離に CB 培地を用いた。CB 培地は選択性が弱いために、前培養した試料を接種して培養すると、*V. vulnificus* 以外の多くの菌が盛んに増殖し、目的菌の増殖が妨げられ、あるいは目的菌を釣菌することが困難であった。

D. 考察

V. vulnificus は汚染された魚介類を摂食する、あるいは汚染された海水に触れて創傷部から感染することが知られている。感染した場合の症状は感染者の状態により異なり、健常者が経口的に摂取すると嘔吐、下痢、腹痛といった症状を呈するとされている。慢性肝疾患や糖尿病などに起因した免疫不全などによる易感染性の患者では、菌は血行性に全身に感染して敗血症による発熱、悪寒、血圧低下を呈し、皮膚には発赤、腫脹などがみられる。このような重篤例では致死率は 50~70% に達するとされている。

V. vulnificus 感染症の感染とその病態には、易感染性宿主と魚介類の生食という 2 つの要因が深くかかわっている。医学の発展により様々な医療技術が急速に発達し、各種の慢性疾患罹患者の延命が可能となっている。このことは裏を返せば慢性疾患に伴う免疫不全といった新たな疾病状態を生むという負の効果もある。易感染性宿主は感染症に罹患しやすい状態にあり、こうした患者が急激に増えている。もう一方の、感染に関連した要因である、魚介類を生まで食するという食習慣は、古くから受け継がれている日本の文化であり、ごく一般的に行われていることである。この食習慣と易感染性宿主の増加という 2 つの要素が重なって、*V. vulnificus* 感染症が重篤な感染症であり、公衆衛生上の重大な問題であると認識されている。

V. vulnificus の感染経路が経口的摂取あるいは創傷部から侵入であることから、当該感染症の予防には、食品の汚染状況あるいは海水などの環境における分布状況を精査し、把握することが重要である。そこで、神奈川県内で市販されている、あるいは近海で捕獲される魚介類と県内各地の汽水から *V. vulnificus* の検出を試み、汚染・分布状況を調査した。

今回の調査では、貝類では 13 検体中アサリの 1 検体 (7.7%) から、魚類では 20 検体中シラスとワカシの 2 検体 (10.0%) から *V. vulnificus* が検出された。貝類は 7 月 23 日と 9 月 8 日に購入し、魚類は 8 月 19 日、9 月 16 日、10

月 15 日および 11 月 12 日に購入した。このうち、*V. vulnificus* が検出されたのは 7 月 23 日に購入したアサリと 8 月 19 日に購入したシラスおよびワカシであった。*V. vulnificus* は気温が上昇する夏期において環境中で急激に増殖し、魚介類を汚染する頻度が増えるとされ、これまでの本研究班の結果も同様であった。今回の神奈川県における調査でも、7 月と 8 月に購入した魚介類から *V. vulnificus* が検出されており、夏期に魚介類が *V. vulnificus* に汚染される頻度が増えることを示した。

検体数は少ないが、検体の種類により検出率が異なっていた。すなわち、シラスは 12 検体中 1 検体から、ワカシは 3 検体中 1 検体から検出された。魚類の種類により汚染状況が異なるか否かは、検体数を増やすとともに、季節の要因を取り除くために、夏期に集中して調査を行う必要がある。来年度は夏期に多くの検体を対象に調査を行う予定である。

細菌の汚染・生息状況の調査では、調査の対象とする菌の定義を定めておくことが重要であるが、*V. vulnificus* については定義が必ずしも明確ではない。定義が不明確であれば、リスク評価の結果は真の現象を捉えておらず、過小評価あるいは過大評価をすることになる。*V. vulnificus* は、まず臨床分離株と環境由来株が同じ性状（例えば病原性）を持つ菌であるかどうかが明らかになっていない。

V. vulnificus の分布状況を調査するにあたり、2 つの仮説を考えることができる。第 1 に、環境中には多数の *V. vulnificus* が分布しているが、そのごく一部が病原性を有し、たまたまヒトに感染して病原性を発揮するとする。第 2 の仮説として、環境中に分布する *V. vulnificus* は、ほとんどの株がヒトに対する病原性を有しており、臨床分離株と環境由来株は同一の性状を有する、と仮定する。いずれの仮説が正しいかを明らかにするには、分離菌株の性状を詳細に解析しなければならない。しかし、比較の手法が確立されていないために assay 法により結果が異なり、臨床分離株と環境由来株は異なるという報告がある一方で、由来により差はみられないとも報告されている。すなわち、Starks らは、マウスを使った実験により、臨床分離株と牡蠣由来株の病原性は異なるという結果を得ている。また Nilsson らは、16S rDNA の塩基配列により臨床分離株と環境由来株を分けることが可能であるとしている。これに対して Nordstrom らは、マウスを用いて病原性を調べたところ、臨床分離株と環境分離株は病原性の点ではほぼ同じであったとの結果を報告している。

V. vulnificus の分類上の位置についても他菌種との関係が不明確な部分があり、当該菌の鑑別を困難にしている。この点で、さらに生化学的性状などを詳細に検討し、種としての定義を確立しなければならない。魚介類を含めた環

境における当該菌の分布状況の調査するにあたり、類似の性状を持つ *Vibrio* 属菌が分離され、*V. vulnificus* とするか否かの疑問に直面する。このようにして得られた結果では、正しいリスク評価を行うことは困難である。また、他の研究者が実施した調査の結果との整合性を取ることができず、比較することができない。

貝類の検体では、*V. vulnificus* とともに *V. parahaemolyticus* の検出を試みた。両種の細菌の検出率はまったく異なり、*V. vulnificus* の検出率が 7.7%であったのに対し、*V. parahaemolyticus* のそれは 84.6%であった。この結果は、*V. parahaemolyticus* が *V. vulnificus* よりも優勢に分布していることを示し、両種は近縁の細菌であるが、環境における生態は大きく異なることが示唆されている。

本研究班で *V. vulnificus* 分離用に開発した CB 寒天培地は、*V. vulnificus* の魚介類や環境からの分離には適していなかった。CB 寒天培地における *V. vulnificus* の発育性は充分であったが、選択性が弱いために、食品や環境由来検体のように共存菌が多い検体では共存菌が平板上で優位に発育してしまい、分離の目的である *V. vulnificus* の集落が見つけにくい状態となってしまった。*V. vulnificus* の発育性を維持しながら共存菌の発育を抑制するように改良されることが望まれる。

今回の調査では、*V. vulnificus* の検出にアルカリペプトン水による 1 次増菌と CCP 培地による 2 次増菌を組み合わせた。増菌法の検討において、*V. vulnificus* は 2 検体から分離されたが、*V. vulnificus* はどちらの検体でもアルカリペプトン水から検出されたが、CCP 培地では 1 検体のみからしか分離されなかった。検体数は少ないが、CCP 培地による 2 次増菌の必要性は得られなかった。

E. まとめ

魚介類および環境（汽水）における *V. vulnificus* の分布状況を調べたところ、および から *V. vulnificus* が検出された。

本調査を進めるにあたり、*V. vulnificus* の分類学上の定義および調査対象としての定義の設定において問題点が認められた。

今後の調査では、*V. vulnificus* の種としての定義を明確にする必要がある。さらに、臨床分離株と環境由来株の病原性の相違を検討し、環境中に分布する病原性保有株の存在の頻度を把握することが重要と考える。来年度は、これら

に焦点を絞って調査を進めなければならないと思われる。

F. 参考文献

Starks AM, Schoeb TR, Tamplin ML, Parveen S, Doyle TJ, Bomeisl PE, Escudero GM, Gulig PA: Pathogenesis of infection by clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infect Immun*. 2000 Oct;68(10):5785-93.

Nilsson WB, Paranjypte RN, DePaola A, Strom MS. : Sequence polymorphism of the 16S rRNA gene of *Vibrio vulnificus* is a possible indicator of strain virulence. *J Clin Microbiol*. 2003 Jan;41(1):442-6.

DePaola A, Nordstrom JL, Dalsgaard A, Forslund A, Oliver J, Bates T, Bourdage KL, Gulig PA.: Analysis of *Vibrio vulnificus* from market oysters and septicemia cases for virulence markers. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Jul;69(7):4006-11.

Arias CR, Garay E, Aznar R.: Nested PCR method for rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* in fish, sediments, and water. *Appl Environ Microbiol*. 1995 Sep;61(9):3476-8.

Hill WE, Keasler SP, Trucksess MW, Feng P, Kaysner CA, Lampel KA: Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. *Appl Environ Microbiol*. 1991 Mar;57(3):707-11.

図1 貝類からの *Vibrio vulnificus* および *V. parahaemolyticus* の分離方法

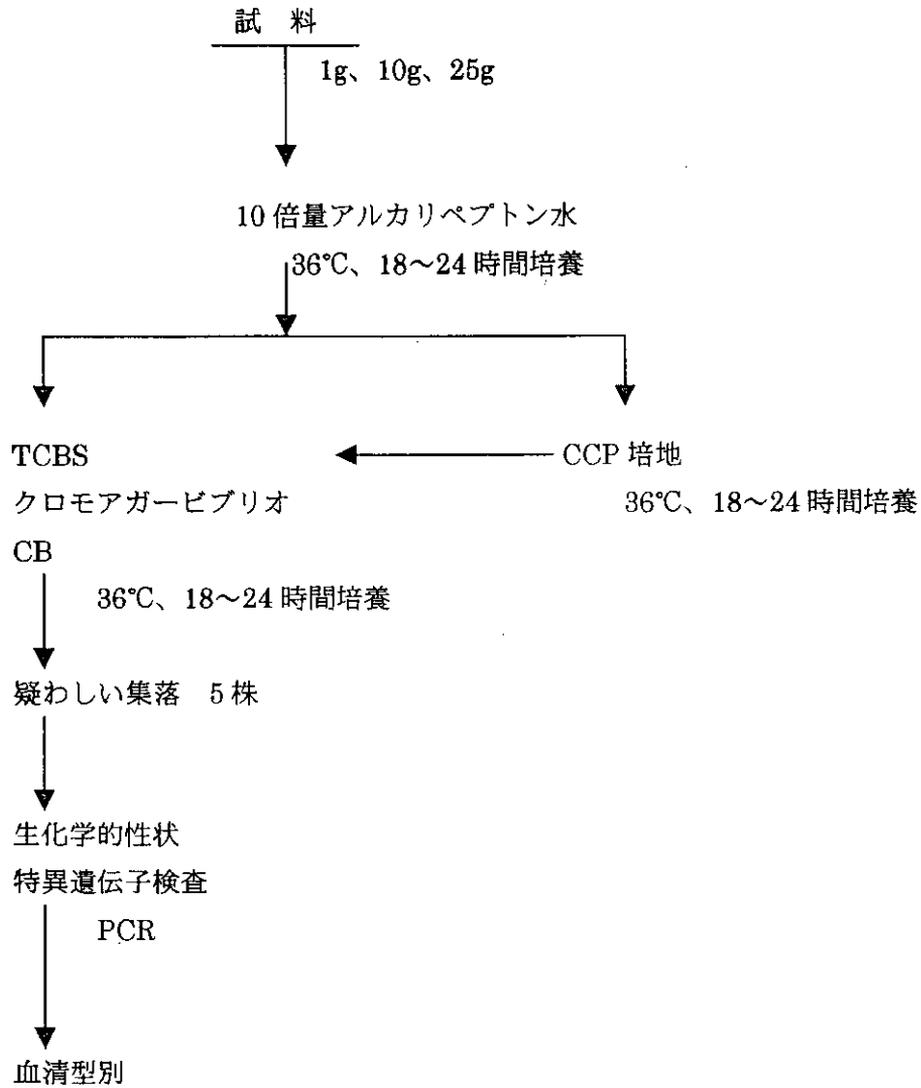


図2 魚類および環境材料からの *Vibrio vulnificus* の分離方法

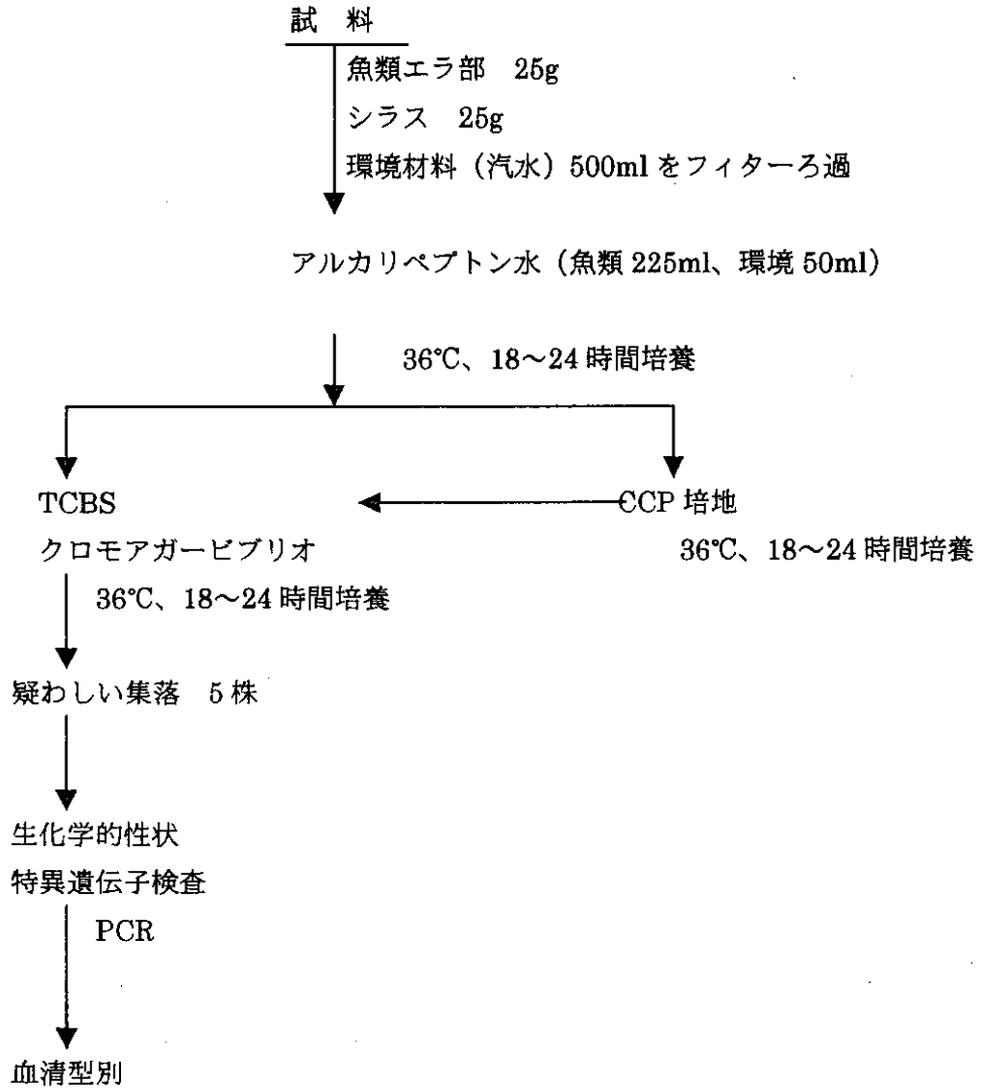


表1 貝類検体における *V. vulnificus* および *V. parahemolyticus* の検出状況

検体名	産地 (県名)	購入日	<i>V. vulnificus</i>		<i>V. parahemolyticus</i>	
			TCBS	加モアガ-ヒゲアリ	CB	
アサリ	三重	7/23	+	+	+	+
シジミ	青森	7/23	-	-	-	+
アサリ	愛知	7/23	-	-	-	+
アサリ	千葉	7/23	-	-	-	+
シジミ	青森	7/23	-	-	-	+
アサリ	千葉	9/8	-	-	-	+
アサリ	愛知	9/8	-	-	-	+
シジミ	青森	9/8	-	-	-	-
シジミ	三重	9/8	-	-	-	+
アサリ	千葉	9/8	-	-	-	+
シジミ	茨城	9/8	-	-	-	-
アサリ	愛知	9/8	-	-	-	+
アサリ	静岡	9/8	-	-	-	+

表2 魚類および汽水からの *V. vulnificus* の検出状況

検体名	購入日 (採取日)	<i>V. vulnificus</i>	
		APW	CCP
シラス	8/19	-	-
シラス	8/19	+	-
ワカシ	8/19	+	+
カツオ	8/19	-	-
汽水	8/19	-	-
シラス	8/19	-	-
シラス	9/16	-	-
シラス	9/16	-	-
カマス	9/16	-	-
ワカシ	9/16	-	-
汽水	9/16	-	-
シラス	9/16	-	-
シラス	10/15	-	-
シラス	10/15	-	-
汽水	10/15	-	-
カツオ	10/15	-	-
ワカシ	10/15	-	-
シラス	10/15	-	-
シラス	11/12	-	-
シラス	11/12	-	-
アジ	11/12	-	-
イワシ	11/12	-	-
汽水	11/12	-	-
シラス	11/12	-	-

分離培地は TCBS、クロモアガーピブリオおよび CB を使用した。

協力研究報告一5

研究報告書；小川正之、岡田京子、小嶋由香（川崎市衛生研究所）
田村和満（国立感染症研究所）

V.v の検査法の検討および散発下痢症患者と健康者における V.v の検出状況

（目的）

本年度は、前年度に本研究班で検討を行った *Vibrio vulnificus*（以下 V.v）の選択増菌培地であるセロビオース・コリスチン加ペプトン水（CCP broth）と選択分離培地である Cellobiose-Bile salt Agar（CB 培地）を用いて、河川水などの環境、生鮮魚介類やすし種などの食品中における V.v の汚染状況を検討するとともに、散発下痢症患者、食中毒患者および健康者（給食従事者、食品取扱者）から V.v 検出を試み、下痢症における感染状況および健康者における保菌状況を検討した。

（材料）

- 生鮮魚介類、市販食品類など； H15 年 5 月から 9 月に当所に搬入されたスーパー・小売店など市内流通の生鮮魚介類、飲食店などのすし種および川崎港にて採取した魚など計 136 検体であり、その内訳は貝類 41 検体、貝類以外の刺身やすし種などの食品 95 検体。
- 海水および河川水； H15 年 6 月から 9 月に多摩川・鶴見川および川崎港より採取した海水および河川水（汽水）11 検体。
- その他； H15 年 4 月から 10 月に当所に搬入された、散発下痢症患者便 371 検体、健康者便 700 検体、食中毒調査検体（便 147 件、食品 87 件、拭取その他 89 件）323 検体など合計 1,541 検体を検査材料とした。

（検査方法）

1. 食品および拭取など

図に示した様に検体 25 g にアルカリペプトン水（AP）225 ml を加え、18－20 時間前培養後、直接 CB 培地、TCBS 培地、PMT 培地に塗抹するとともに、CCP broth 10 ml に 0.5－1 ml 接種し、5－8 時間、2 次増菌後同様に CB 培地、TCBS 培地、PMT 培地に塗抹後分離培養を行い同定した。また拭取については 1.0 倍試料液 1 ml を AP 10 ml にて前培養後上記と同様に行った。