

2. 海水および河川水

検水500mlに倍濃度 AP500mlを加え、1.8～2.0時間前培養し、その後食品と同様にCCP brothによる2次増菌を行いCB培地、TCBS培地、PMT培地に塗抹培養し分離同定した。

3. 便

散発下痢症患者および食中毒患者便については、キャリブレアー培地に採取した下痢便をペプトン水1mlに搾りだし、腸内細菌検索用培地に塗抹、増菌するとともにビブリオ属菌検索には、TCBS培地、PMT培地に直接塗抹と同時に、AP、CCP brothにて16～18時間増菌後、CB培地、TCBS培地、PMT培地に塗抹し分離同定を行った。下痢原性病原菌は常法に従って分離同定した。

健康者便についてはSS培地、マッコンキー・ソルビット培地、CB培地にて直接培養のみを行った。

(結果)

1. 食品および河川水等からの検出状況

食品および河川水等からの検出状況を表1に示した。

5月から9月の間に、貝類41検体、貝類以外の生鮮魚介類95検体、海水および河川水11検体について調査した。

調査期間中においてV.vはいずれからも検出されなかったが、*Vibrio parahaemolyticus* (V.p)は貝類で41検中7件(17.1%)、貝類以外の生鮮魚介類95検体中5件(5.3%)、海水および河川水からは11検体中9件(81.8%)検出された。

2. 食中毒調査検体からの検出状況

4月から10月までに食中毒調査依頼として、便147検体、食品87検体、拭取およびその他89検体の搬入があった。便147検体中*Campylobacter jejuni* (C.j)が7検体から検出され、またV.pが検出された事例が他都市関連調査を含め2事例、2名であり、推定原因食品の4検体からV.pが検出されたがV.vはそれらの検体も含め検出されなかった。(表2)

3. 下痢症患者および健康者からの検出状況

散発下痢症患者からの病原菌検出状況を表3に、健康者からの病原菌検出状況を表4に示した。

散発下痢症患者 371 検体からは、検出率の高い順に、*Campylobacter jejuni* (C.j) 50 件、(13.5%)、*Salmonella* (Sal) 14 件、(3.8%)、*Escherchia coli* (E.c) 13 件、(3.5%)、V.p 5 件、(1.3%)、*Aeromonas* (Aer) 2 件、(0.5%)などの下痢原性細菌が検出されたが V.v は検出されなかった。

また、健康者 700 検体については、10 月に Sal が 1 件検出されたのみであり、V.v を含めてその他の菌は検出されなかった。

(考察)

前年度、検討を行った V.v の選択増菌培地である CCP broth と選択分離培地である CB 培地を用いて、環境、食品、ヒトからの V.v 検出を検討した。

本市内流通の貝類および貝類以外の刺身やすし種などの生鮮魚介類を含め今回検討を行った検体からは V.v はまったく検出されなかった。また、本市に 2ヶ所ある市場食品衛生検査所においても、AP 増菌後 TCBS 培地で分離する従来法により V.v の分離も行っているが、H15 年夏期にはいずれからも検出はされていないとの報告を受けている。当所に搬入される食品はほとんどが消費者がすぐに喫食できる状態になっている食品、つまり貝類ではむき身、その他の食品では刺身やすし種が多くを占めており、また、結果は示していないが同時に行った調理器具の拭取におけるビブリオ属の検査においても V.p をはじめ、下痢原性のビブリオは検出されていなかった。今回の調査期間中は冷夏の影響もあり、ビブリオ属の汚染も低く、また、同調査期間中には、本市内の医療機関からの V.v 感染症の発生報告もなかったことなどから本市内を流通した食品については V.v による汚染はなかったものと考えられる。今後は鮮魚のエラやカラ付き貝などを中心に産地の違いなども考慮に入れ、また、米国では夏期におけるガキの生食による V.v 感染症の発生が問題となっていることから、夏期における生カキなどの検査も含め継続して汚染実態を検討する予定である。

検査方法の検討については、細菌汚染の多いと考えられる環境や食品などでは CB 培地での分離に若干の問題がみられた。特に *Pseudomonas* など優勢菌のオーバーラップなどで目的菌の分離が非常に困難であった。今後選択分離培地の選択性能や色調など更なる検討が必要と思われる。今回、我々は、クロモアガー・ビブリオ培地の併用はおこなっていないが、V.p などビブリオ属菌は TCBS 培地に比べ検出率がよいとの報告もあることから、今後はクロモアガー・ビブリオ培地の併用も考慮してい

きたい。

わが国では、H14年に生食用鮮魚貝類の成分規格に腸炎ビブリオの規格基準が設けられたことから、食品衛生監視員などの衛生指導の強化を受けて、生鮮魚介類の取り扱いや保存方法、販売方法が徹底されたことや、10℃以下の保存基準など、増殖温度の影響を受けやすいビブリオ属は全国的にも検出率は減少しており、近年、V.pによる食中毒発生も減少傾向にある。しかし、近年の夏期における岩カキの販売など、今後バルニフィカスによる感染症や食中毒発生も充分考えられることから、本市における実態把握や監視も継続していく必要があるものとする。また、検査法の確立にむけて、さらなるデータの蓄積も必要と思われる。

図 *V. Vulnificus*の検査法

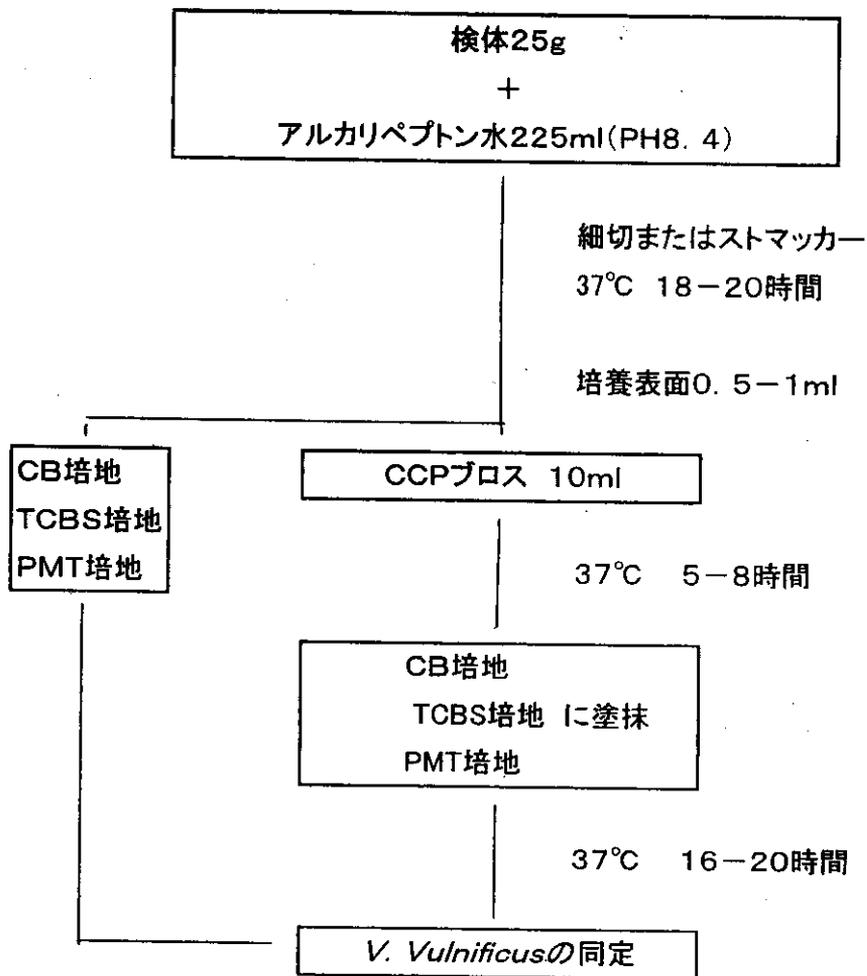


表1 食品および河川水等からの検出状況

月	貝類			貝類以外の食品			海水および河川水		
	検体数	V.para	V.vul	検体数	V.para	V.vul	検体数	V.para	V.vul
5	5	1		6					
6				19	2		1	1	
7	27	2		65	3		2	2	
8	9	4		2			4	2	
9				3			4	4	
計	41	7 17.1%	0	95	5 5.3%	0	11	9 81.8%	0

表2 食中毒依頼検体からの検出状況

月	便		食品		拭取、その他	
	検体数	検出菌	検体数	検出菌	検体数	検出菌
4	13		2			
5	40		1		24	
6	1	V.p(1)				
7	4		1		1	
8	4	Cj(1)	3		6	
9	71	V.p(1)、Cj(3)	72	V.p(4)	42	Sta(1)
10	14	Cj(3)、E.c(1)	8		16	
計	147		87		89	

表3 散発下痢症患者からの病原菌検出状況

月	検体数	検出病原菌					
		V.para	V.vulnificus	Salmonella	E.coli	C.jejuni	Aeromonas
4	46				1	4	1
5	43			3	1	6	
6	35	1			2	5	
7	79	1		1	9	9	1
8	55	2		4		8	
9	73			4		13	
10	40	1		2		5	
計	371	5 1.3%	0	14 3.8%	13 3.5%	50 13.5%	2 0.5%

表4 健康者からの病原菌検出状況

月	検体数	検出病原菌			
		V.para	V.vulnificus	Shigella	Salmonella
4	100				
5	100				
6	100				
7	100				
8	100				
9	100				
10	100				1
計	700	0	0	0	1 0.1%

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

分担研究者 田村和満 国立感染症研究所 細菌第一部第二室室長

協力研究者 荒川英二 国立感染症研究所 細菌第一部第二室

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。*V. vulnificus* の血清型は、O1～O7 までが報告されているが、未発表の血清型として、O8～O16 までがある。各血清型の交差反応を調べ、抗原構造関係について解析を行った。

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た。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、抗原とした。

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 ずつ投与した。

最後の投与から 7 日後に、麻酔下で頸動脈より全採血した。得られた血液より血清を遠心操作により分離し、抗血清原液とした。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、凝集反応用抗血清とした。

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った。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

沈渣を得た。その沈渣を再び生理食塩水に懸濁させ、3,000 rpm 15 分遠心分離し、上清を除いた。これを生理食塩水に懸濁させたものを抗原液とした。

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、両者を充分混合させ、1 分以内に凝集反応が現れたものを陽性とした。凝集の程度により、-、±、+、++、+++ と判定した。

C. 研究結果

スライド凝集反応の結果は表 2 に示す通りであった。

Vibrio 属菌は O 抗原の変異が起こりやすく、多くの場合 R 型への変異 (O 抗原多糖の発現が見られなくなり、R コアだけになったもの) が起こり、作成された抗血清から R 抗原に対する抗血清成分を除去しなければならない。

今回 O1~O16 のすべての血清型について、参照株の各抗原に対してすべての抗血清との凝集反応を試み、各血清型の抗原関係について明らかにすることが出来た。

すでに報告されている O1~O7 の抗原に対する抗血清は、抗 O3 血清を除きいずれも各抗原に特異的な反応を示し、血清型別にそのまま利用可能であった。未発表の O8~O16 については、O10 以外はすべて交差反応が認められ、そのままでは血清型の特定に支障を来す。しかし、交差反応の見られる抗原で吸収することによって、各抗原に特異的な血清が作成でき、血清型別に供することが出来た。

未発表の O8~O16 について、患者由来株、環境由来株についても血清型別を試みたところ、患者由来株 14 株については O8~O16 に該当する血清型は 1 株も検出されず、環境由来株については 103 株中 20 株が該当したが、その血清型は

O8	3	(15.0)
O9	3	(15.0)
O10	0	(0.0)
O11	1	(5.0)
O12	5	(25.0)
O13	0	(0.0)
O14	3	(15.0)
O15	1	(5.0)
O16	4	(20.0)
total	20	(100.0)

であった。O12とO16が比較的多く検出されてはいるが、顕著に多い血清型は認められなかった。

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⁾。

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と言えれば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は荚膜抗原型)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。

患者由来株からは、これまでに報告されているO1～O7の血清型のいずれかの血清型しか認められなかったが、環境由来株では、昨年度の報告ではOUTとしていたが、未発表のO8～O16の各抗血清で血清型別を試みると、いずれも凝集反応が見られ、交差反応が複雑であった1株を除き、すべて型別することが出来た。顕著に分離数の多い血清型の菌株は認められなかったものの、O10、O13を除くすべての血清型が検出され、環境中には様々な血清型の菌が存在することが明らかとなった。

また、患者由来株からO8～O16の血清型菌が検出されなかったということは、これらO8～O16の血清型菌はヒトに対する病原性が低い、あるいは無いのかもしれない。病原性を考えるうえでも重要な知見で

あると考えられる。

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、血清型では O1～O16 までにしか分類できず、病原性との関連も確かとは言えない。患者由来株と環境由来株で多数見られた O4a 型という同じ血清型株の解析には、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。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。

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)

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)

表2 *V. vulnificus* 抗O血清交差反応

		抗原 (121°C、35分)															
		O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16
抗血清	O1	+++															
	O2		++								+						
	O3			+++			+										
	O4				+++								+++				
	O5					+++											
	O6						+++										
	O7							++									
	O8*								+++								+
	O9**									+++							
	O10										++						
	O11											+++					+
	O12*												++				++
	O13													+++			
	O14														++		
	O15															+++	
	O16																+++

すべての抗血清はR抗原で吸収済

*: O7抗原で吸収済

** : O8抗原で吸収済

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 細菌第一部部長

協力研究者 荒川英二 国立感染症研究所 細菌第一部第二室

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、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は患者由来株ではその遺伝子がすべてから検出され、環境由来株でもほとんどが遺伝子を保有していた。すなわち、この溶血毒は病原性との関連性が低いことが示唆される。そこで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。血清型参照株および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調査した。患者由来株に比べて環境由来株で鉄獲得能に関する遺伝子の検出率が高かった。

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。

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。

また環境中では生育していても、人工合成培地上では必ずしも菌の発育に最適条件であるとはいえず、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菌を分離すること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した。

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、血中での菌増殖に關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⁸⁾、病原因子の特定には至っていない。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。

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、表 2 に示す病原因子候補について他の *Vibrio* 属菌との相同性を調べた。

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⁹⁾、および他の *Vibrio* 属菌 (表 1)。患者由来株 23 株、環境由来株 21 株。

反応液：

<stock mixture>

10 x Taq buffer	250 μ l
25 mM MgCl ₂	150 μ l
25 mM dNTP mix	10 μ l
100 μ M primer-F	10 μ l
100 μ M primer-R	10 μ l
distiled water	70 μ l
total	500 μ l

<reaction mixture>

stock mixture	4 μ l
template DNA	2 μ l
Taq DNA polymerase	0.08 μ l
distiled water	13.02 μ l
total	20 μ l

<primers>

他の *Vibrio* 属菌との共通の配列部分を common、*V. vulnificus* に特異性の高い配列部分を specific、として primer を設計した (表 3)。

<反応条件>

アニーリング温度を *vvhA* に対しては論

文通り 67°C とした。それ以外の標的遺伝子に対するのアニーリング温度は 55°C を設定した。それ以外の反応サイクルは

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 μ l に 2 x loading buffer 2 μ l 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。

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 23 株のすべてが *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。任意に選んだ環境分離株 21 株についてもすべてが *vvh* 陽性であった。逆に、*vvh* の陽性率が高く、その特異性も高いため *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、ヘモリシン、シデロフォア、ホスホリパーゼ、莢膜、線毛について、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 ゲノム上の病原因子候補 (表 2) 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、*V. cholerae*、*V. parahaemolyticus* ゲノム中の相同性の高い遺伝子を求めた。

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 (表 3)。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。血清型用参照株および、患者由来株、環境由来株について、患者由来株のみが保有している遺伝子であれば、ヒトに対する病原性に強く関連することが予想される。

血清型用参照株の PCR の結果を表 4 に示した。*vvpE*、*vpl*、*vvpD*、*ela* については、すべてが陽性であった。環境由来株でのみ陰性となった遺伝子は存在しなかったが、*4-hppd* については、患者由来株のいくつかに陰性が見られたものの、環境由来株のすべてが陰性であった。それ以外の遺

伝子については、菌株の由来との相関は認められなかった。

感染研に送付されたすべての患者由来株と環境由来株から任意に選んだ株について、同様に各遺伝子の PCR による検出を試みた (表 5)。

患者由来株では、*vuuA*、*mshD*、*4-hppd*、*hupA*、*mntH* 以外はすべての菌株で陽性であった。

環境由来株では、*vuuA*、*vvpE*、*wza*、*4-hppd*、*hupA*、*mntH* 以外はすべての菌株で陽性であった。

患者由来株、環境由来株の両者ですべて陰性となった遺伝子はこれらには存在しなかった。すなわち、患者由来株ですべて陽性、環境由来株で多くが陰性という病原性との関連を強く示唆する遺伝子は認められなかった。逆に *vuuA*、*mntH* に関しては、環境由来株の方が陽性率が高かった。

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環境調査によれば、患者発生の多い西日本だけでなく患者発生の見られない、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⁾。

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* 属菌で見ても、*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現し、ヒト体内で増殖して組織に障害を与え、また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。

そこで本研究では、病原性と関連すると考えられる遺伝子に関して、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、その遺伝子が存在すれば検出できるように設計したもの。それと、*V. vulnificus* 特異的な配列の領域を用いて、菌種特異的な遺伝子として検出できるかどうかを検討するために設計したもので実験を行った。

まず、血清型の参照株を用いて検討を行ったが、含まれている患者由来株、環境由来株との間には、病原性との関連に直接結びつくような傾向は認められなかった。ヘモリジンである *4-hppd* 遺伝子に関しては、環境由来株がすべて陰性であったが、患者由来株でも陰性株が存在していた（表 4）ので、病原性に必須の因子とは言えない。

血清型の参照株は長期保存株であるため、血清型 O3 の E240-1 株の *vvh* ように、*4-hppd* 遺伝子が脱落した可能性も否定できない。

そこで、患者由来株、環境由来株の新鮮分離株について、これまでの primer セットと新たに設計した primer セットで各遺伝子の検出を試みた。

血清型の参照株で差の見られた *4-hppd* 遺伝子は、患者由来の新鮮分離株でもその検出率は低く、環境由来株ではさらに陽性率が低いとは言え、病原性との関わりは低いものと考えられた（表 5）。

新鮮分離株の結果においても、すべての患者由来株で検出されて、環境由来株からはあまり検出されないような遺伝子は今回調べた中には存在しなかった。しかしながら、逆の例、環境由来株で検出率が高く、患者由来株では低いというのが、*vuua*、*mntH* で見られた。これらはどちらも菌の鉄獲得能に関連する遺伝子で、環境中における微量鉄の獲得による菌の生存に関連するのではないかと考えられる。

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、その発症機序が宿主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。すなわち肝疾患患者の血液中では *V. vulnificus* は鉄の能動的輸送は関与せず、環境中での発育に鉄の取り込みを必要としているのかもしれない。

以上のように、これまでのところ、患者由来株と環境由来株の間に違いは見られていないが、前述の通り、環境からの本菌の分離数の多さと患者数とを比較すると、環境由来株のすべてが、病原性株とは考えにくい。菌側には特定の病原因子がなく、肝疾患などの患者側の因子が重要であることも充分考えられるが、菌側にも発症の引き金となる因子が存在するものと考えられる。

V. vulnificus の場合は、前述の通り、病原因子にまだ不確定な部分があり、それらを標的とした PCR が陽性になったからといって、原因菌であるとは言い切れない面が残る。しかし PCR 法を用いて毒素産生性や病原因子の遺伝子が検出されれば、同定を待たずとも原因菌としてまず疑うことが出来る。症状の進行の早い本菌感染症においては、PCR 法の開発によって迅速、高感度に、病原性のある *V. vulnificus* を検出できることが期待され、臨床においても、環境中の汚染実態調査においても有効な方法になるものと思われる。

今回検討した遺伝子については、病原性との関連性が見いだせなかったものの、ゲノム解析からはヘモリジンなどの病原性に関連すると考えられる遺伝子に類似の配列を持つ遺伝子が、100 近く見いだされている⁹⁾。患者由来株と環境由来株の比較を行うことで、病原性と密接に関係する因子が

求められるものと期待される。

患者由来株と環境由来株の比較を行う方法として、今後 PFGE 法を応用し、血清型の同じ患者由来株と環境由来株についてゲノム構造を比較検討することで、その差異から患者由来株の特徴を求めていく予定である。

F. 参考文献

1. Hill WE, et al.

Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters.

Appl Env Microb 57(3): 701-11 (1991)

2. Miyoshi S, et al.

Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the thermolysin family.

Infect Immun 66(10):4851-5 (1998)

3. Testa J, et al.

Extracellular phospholipase A2 and lysophospholipase produced by *Vibrio vulnificus*.

Infect Immun 45(2):458-63 (1984)

4. Webster AC, et al.

Cloning and characterization of *vuuA*, a gene encoding the *Vibrio vulnificus* ferric vulnibactin receptor.

Infect Immun 68(2):526-34 (2000)

5. Powell JL, et al.

Release of tumor necrosis factor alpha in response to *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide in *in vivo* and *in vitro* models.

Infect Immun 65(9):3713-8 (1997)

6. Heidelberg JF, et al.

DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*.

Nature 406(6795):477-83 (2000)

7. Makino K, et al.

Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*.

The Lancet 361: 743-9 (2003)

8. Chen CY, et al.

Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen.

Genome Research 13: 2577-2587(2003)

9. Shimada T, et al.

On the serology of *Vibrio vulnificus*.

Jpn J Med Sci 37: 241-6 (1984)

10. 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)

表1 参照菌株

<i>Vibrio vulnificus</i>		
O-serogroup	reference strain	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)
O3	E240-1(vvh -)	
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)
他の <i>Vibrio</i> 属菌または類縁菌		
Species	strain No.	remarks
<i>Vibrio cholerae</i>	ATCC14035	O1 ctx +
<i>Vibrio cholerae</i>	10332-62	O20 nag-st +
<i>Vibrio fluvialis</i>	ATCC33809	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> K7		O3:K6(神奈川)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC7966	

表2 病原性関連遺伝子候補

<i>wvhA</i>	cytolysin - hemolysin
<i>vuuA</i>	ferric vulnibactin receptor
<i>vvpE</i>	metalloprotease (elastase)
<i>vpl</i>	phospholipase
<i>wza</i>	capsular polysaccharide synthesis
<i>mshD</i>	mannose-sensitive hemagglutinin
<i>vvpD</i>	type 4 prepilin peptidase
<i>ela</i>	elastase
<i>viuB</i>	vulnibactin utilization protein
<i>4-hppd</i>	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (<i>vII</i>)
<i>hupA</i>	heme receptor
<i>mntH</i>	manganese transport protein (NRAMP family)