

表 6 平成15年度に島根県で分離された *V. vulnificus* の血清型

材料	採取地	菌株数	血清型													
			1	2	3	4	5	6	8	12	16	UTR				
アジ	境港	1														1
カサゴ	黒木	1														1
エビ	マダガスカル	1													1	
	インドネシア	1													1	
カキ	広島	2					1									1
	能登	1														1
アカガイ	福岡	2	1													1
	有明	1						1								
	岡山	1							1							
アサリ	熊本県	6	1	1	1	1	2									1
	韓国	2						1								1
	中国	2				1			1							
	三重県	6	1		2	1					1					1
アサリ水	韓国	2	1								1					
	中国	1	1													
	三重県	2	2													
	熊本県	3	1	1												1
ハマグリ	中国	6	2		1	1					1					1
サザエ	境港	1	1													
	出雲	1	1													
	大田	1					1									
	松江	3						2			1					
	西郷	1										1				
底泥	大田	2	1													1
	出雲	3			1	1								1		
	松江	9			1	1			1	2	1	1				2
	西郷	3				2							1			
	黒木	4	2			1				1						
	益田、高津川	4				1				2						1
	益田、沖田川	4					1				1		1	1		
	益田、津田川	6					3	1			1					1
	益田、益田川	4	1	1			1				1					
海水	益田、高津川	4	1	1			1									1
	益田、沖田川	4					2				1		1			
	益田、津田川	3						3								
	益田、益田川	3						2	1							
合計		101	17	4	8	29	3	6	9	1	5	10	9			

表 7 島根県の大規模海水浴場における *V. vulnificus* の検出状況と分離菌株の血清型

地域	調査地点	検体数	海水の水温(°C)と塩分濃度(‰)								陽性検体数(PCR法)				PCR MPN /1L	分離菌株の血清型							
			7/12		7/20		7/27		8/3		合計	7/12	7/20	7/27		8/3	1	4	6	12	UT		
			水温	塩分濃度	水温	塩分濃度	水温	塩分濃度	水温	塩分濃度													
西部海岸	波子1	2	24.9	35.3	26.1	34.4	NT	NT	NT	NT	2	1	1	NT					1	1			
	波子2	2	24.8	35.3	26.0	34.4	NT	NT	NT	NT	2	1	1	NT					2				
	国府1	2	25.7	35.3	26.6	35.3	NT	NT	NT	NT	2	1	1	NT					1	1	1		
	国府2	2	25.4	35.3	26.7	34.4	NT	NT	NT	NT	1	0	1	NT					1				
	田の浦1	2	25.4	35.3	26.6	34.4	NT	NT	NT	NT	1	0	1	NT					1	1			
	田の浦2	2	25.0	35.3	26.9	34.4	NT	NT	NT	NT	1	0	1	NT					1				
	持石1	2	25.5	35.3	27.5	34.4	NT	NT	NT	NT	0	0	0	NT									
	持石2	2	25.0	35.3	25.6	35.3	NT	NT	NT	NT	0	0	0	NT									
	岩見海浜公園1	2	24.8	35.3	26.5	35.3	NT	NT	NT	NT	0	0	0	NT									
	岩見海浜公園2	2	25.5	35.3	26.4	35.3	NT	NT	NT	NT	0	0	0	NT									
東部海岸	北浦1	1	NT	NT	NT	NT	29.5	34.4	NT	NT	1			23					1				
	北浦2	1	NT	NT	NT	NT	29.7	33.5	NT	NT	1		1	3									
	古浦1	1	NT	NT	NT	NT	30.5	32.5	NT	NT	1		1	28									
	古浦2	1	NT	NT	NT	NT	30	30.7	NT	NT	1		1	93					1	1			
	おわし1	2	NT	NT	NT	NT	29	33.5	26.3	33.5	0		0	0									
	おわし2	2	NT	NT	NT	NT	29	33.5	26	33.5	0		0	0									
	キララビーチ	2	NT	NT	NT	NT	30	33.5	26	31.6	1		1	0	21				1				
	合計	合計	30									14	3	6	5	0				1	4	6	1

表 8 患者由来株の生化学性状

試験(基質)	反応	試験(基質)	反応
オキシダーゼ	+	炭水化物からの酸産生	
硫化水素	-	ブドウ糖	+
インドール	+	L-アラビノース	-
運動性	+	アドニット	-
Nutrient brothでの発育		L-ラムノース	-
0% NaCl	-	D-マンニトール	+
3% NaCl	+	D-ソルビトール	-
8% NaCl	-	D-セロビオース	+
10% NaCl	-	D-メリビオース	-
VP反応	-	D-マンノース	+
リジン脱炭酸	+	D-マルトース	+
オルニチン脱炭酸	-	トレハロース	+
アルギニン加水分解	-	ラフィノース	-
硝酸塩還元	+	白糖	-
尿素	-		
ONPG	+	<i>vvhA</i>	+
エスクリン加水分解	-	血清型	12

## 協力研究報告書

平成 16 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

#### 広島湾の海水およびアサリからの *Vibrio vulnificus* の検出状況

研究協力者：竹田義弘 松田花子 小川博美  
広島県保健環境センター

#### はじめに

*Vibrio vulnificus* (*V. vulnificus*) は、*Vibrio* 属に属する低濃度好塩性のグラム陰性桿菌で、海水、汽水の自然環境下を生息域としている。本菌による感染症は、海産物の摂取や皮膚の創傷部から感染する日和見感染症である。しかし、肝障害などの基礎疾患を有するヒトや免疫力の低下したヒトには、敗血症と皮膚病変を伴った重篤な全身性疾患を起こすことがあり、発症すると致死率が極めて高い。Tacket ら<sup>1)</sup> は、本症の risk factor として生ガキの摂取歴、肝疾患歴、慢性疾患などを挙げている。本邦における *V. vulnificus* 感染症例は、関東以西に多くみられ、特に九州地方では多く発生している。<sup>2)</sup> また、近年における高齢化に伴い、基礎疾患を有し免疫力の低下したヒトの増加や、刺身など鮮魚介類の摂取を嗜好する日本人の食生活などから、今後、本菌による感染症の増加が危惧される。そのため、ヒトの食生活に密着した魚介類などの生息環境における *V. vulnificus* の汚染実態を把握することは重要である。しかし、これまで瀬戸内海の自然環境下における *V. vulnificus* の分布調査は少ない。今回、広島湾における *V. vulnificus* の分布状況を把握するため、海水およびアサリからの検出状況を検討した。

#### 材料および方法

##### 1 調査材料

1) 海水：2004 年 6 月～10 月までの 5 ヶ月間に、図 1 に示す広島湾の 9 地点 (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9) を定点として毎月海水を採取し、総計 45 検体を調査材料とした。また、検体採取時に海水の水温と塩分濃度を CM-21P (東亜ディーケーケー) を用いて測定した。

2) アサリ：同期間に、広島湾で蓄養されているアサリを毎月購入し検査した。検査には、蓄養アサリを 200 g～300 g に小分した 6 検体 (総重量 1.2 kg～1.5 kg) を 1 回分とし、総計 30 検体を調査材料とした。

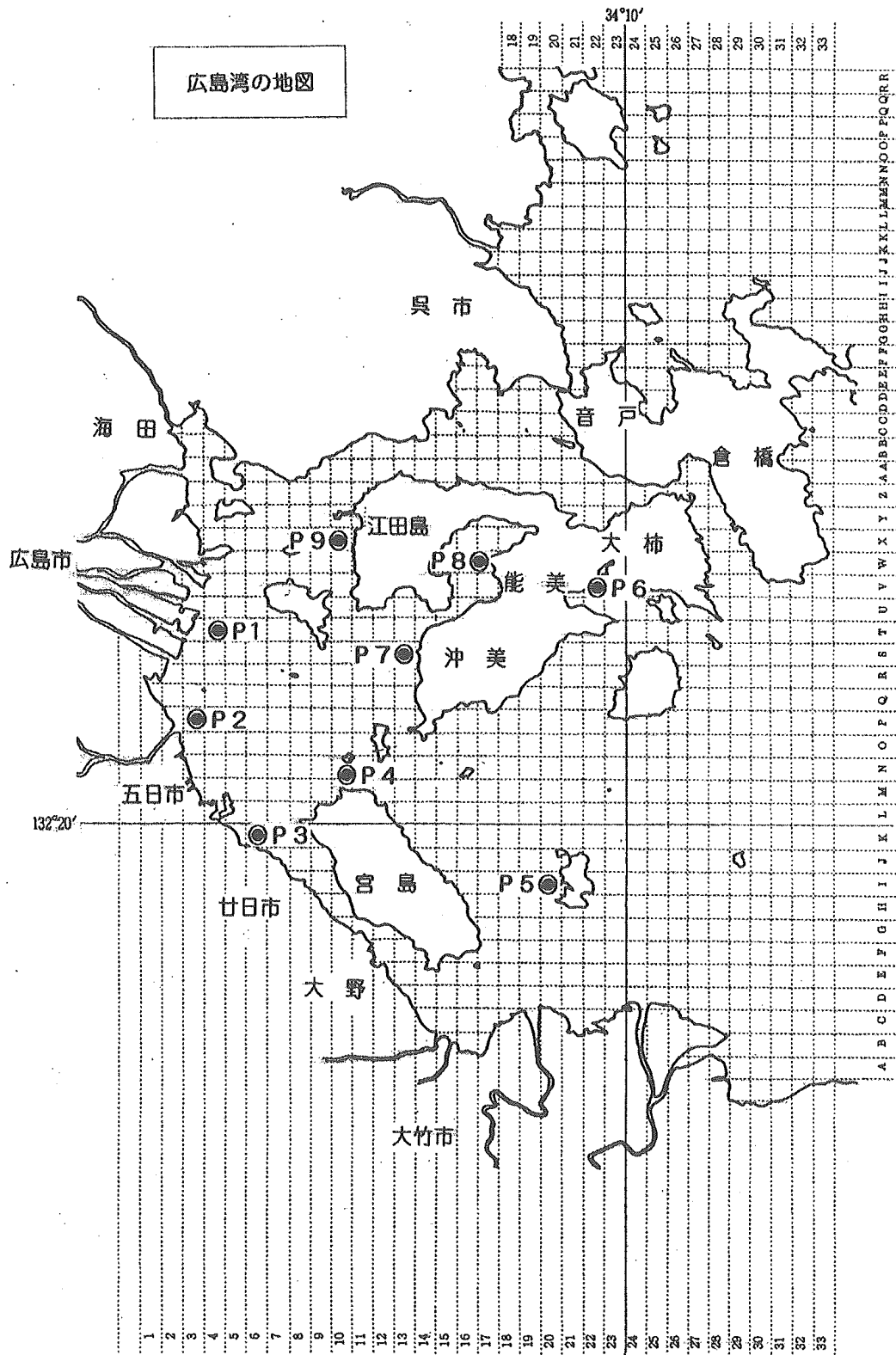


図1 海水の調査地点 (P1~P9)

## 2 *V. vulnificus* の分離・同定および推定菌量の測定

### 1) 海水

海水の 10ml を 3 本の倍濃度アルカリペプトン水（ニッスイ）に接種した。また、1ml およびその 10 倍段階希釈液の各 1ml をそれぞれ 3 本のアルカリペプトン水に接種し、37℃、24 時間培養後、1 白金耳をクロモアガービブリオ寒天培地（CHROMagar）に塗抹し、37℃、24 時間培養後、*V. vulnificus* が疑われる青緑色を帯びた集落を最大 20 集落釣菌した。各平板から分離した菌株は、1%NaCl 加 TSB 寒天培地（BBL）、1%NaCl 加 TSI 寒天培地（ニッスイ）、1%NaCl 加 LIM 培地（ニッスイ）に接種し、37℃、24 時間培養後、チトクローム・オキシダーゼ試験（+）、TSI 寒天培地、LIM 培地が *V. vulnificus* の性状を示す株を *V. vulnificus* と推定した。次いで、簡易同定キットの ID テスト EB20（日水）を用いた生化学的性状試験、1%NaCl 加セロビオース添加 LIG（CLIG）寒天培地（極東製薬）によるセロビオースの分解性および PCR 法で *V. vulnificus* が特異的に保有する cytotoxin-hemolysin gene と *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) の種特異遺伝子である *toxR* gene の有無を確認した。cytotoxin-hemolysin gene は Hill ら<sup>3)</sup> が、*toxR* gene は Kim ら<sup>4)</sup> が報告したプライマーをそれぞれカスタム合成して使用した。それらの試験において *V. vulnificus* の生化学的性状を示し、セロビオース（+）、cytotoxin-hemolysin gene（+）および *toxR* gene（-）の性状を示した株を *V. vulnificus* と同定し、陽性管数より海水 100ml 中の MPN 値を求めた。また、*V. parahaemolyticus* についてもクロモアガービブリオ寒天培地の紫色集落を釣菌して定法<sup>5)</sup>に従って同定し、陽性管数より海水 100ml 中の MPN 値を求めた。

### 2) アサリ

アサリのむき身約 30g をストマッキングした後、その 10g に 3%NaCl 加滅菌リン酸緩衝液（pH7.2）90ml を加えストマッキングし、試料原液とした。この原液の 1ml を 3 本のアルカリペプトン水に接種した。また、試料原液の 10 倍段階希釈液を作成し、その 1ml をそれぞれ 3 本のアルカリペプトン水に接種して 37℃、24 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、37℃、24 時間培養後、*V. vulnificus* が疑われる青緑色を帯びた集落を最大 20 集落釣菌した。各平板から分離した菌株は海水と同様に同定し、アサリ 100g 中の *V. vulnificus* の MPN 値を求めた。また、海水と同様に *V. parahaemolyticus* のアサリ 100g 中の MPN 値を求めた。

## 3 血清型別試験

分離・同定された *V. vulnificus* の O 群血清型別試験は、国立感染症研究所で実施した。

## 結 果

### 1 海水からの *V. vulnificus* の検出状況

各定点における *V. vulnificus* の検出状況を表 1 に示した。調査した海水 45 検体中 20 検体 (44.4%) から *V. vulnificus* が検出された。9 定点のうち 1 定点 (P6) からは 1 回も *V. vulnificus* は検出されなかった。各定点のうち最も *V. vulnificus* の検出回数が多かったのは、P1, P2 の 2 定点で、5 回の調査のうち 4 回検出された。次いで 3 回検出が P3, P8, P9 の 3 定点、1 回検出が P4, P5, P7 の 3 定点と、河口部に近い定点 (P1, P2) からの検出回数が多かった。一方、同時に検査した *V. parahaemolyticus* は、すべての定点から検出され、*V. vulnificus* よりも優性に分布していた。また、月別の検出率は 11.1%~66.7% の範囲で、6 月 (1 定点) が最も検出率が低く、8 月と 10 月 (6 定点) の検出率が高かった。

表 1 海水からの *V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* の検出状況

定 点	6月	7月	8月	9月	10月	検出合計
P1	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	4/5*
P2	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	4/5
P3	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	3/5
P4	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	1/5
P5	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	1/5
P6	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	0/5
P7	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	1/5
P8	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	3/5
P9	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	3/5
検出合計	1/9(11.1%)	4/9(44.4%)	6/9(66.7%)	3/9(33.3%)	6/9(66.7%)	20/45(44.4%)

\* *V. vulnificus* / *V. parahaemolyticus* ( )内は *V. vulnificus* の検出率

#### 1) 海水温との関係

各定点から検出された *V. vulnificus* の MPN 値 (log/100ml) と海水温 (9 定点の中央値: °C) の月別推移を図 2 に示した。検出された *V. vulnificus* の MPN 値は <0.48~3.32/100ml の範囲であった。各定点における *V. vulnificus* の検出状況は、P1 では 7 月~10 月に検出され、8 月が 3.32 /100ml と定点中最も高い MPN 値を示した。P2 では 7 月~10 月に検出され、8 月と 9 月が 1.46 /100ml と高かった。P3 では 8 月~10 月に検出され、8 月が 1.97 /100ml と高かった。P4 では 10 月に 0.79 /100ml が検出された。P5 では 7 月に 0.79 /100ml が検出された。P7 では 8 月に 0.48 /100ml が検出された。P8 では 6 月、8 月および 10 月に検出され、6 月が 0.97 /100ml と高かった。P9 では 7 月、8 月および 10 月に検出され、8 月が 1.04 /100ml と高く、*V. vulnificus* の MPN 値は、定点により異なったが、相対的に海水温の変化とよく相関して推移し、海水温が最も高くなった 8 月に 9 定点中 5 定点 (55.6%) が最も高値を示した。

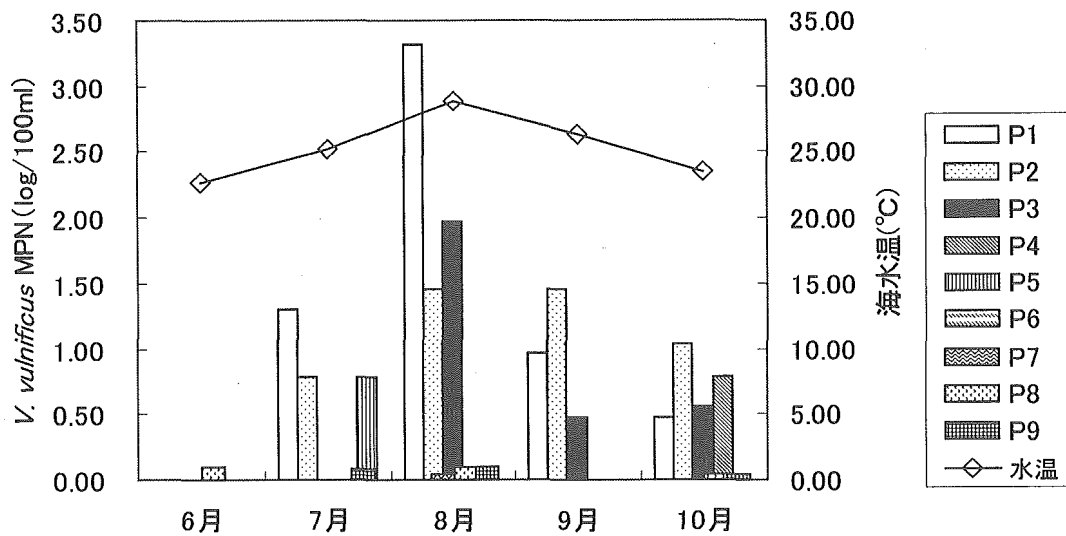


図2 海水中の *V. vulnificus* のMPN値と海水温の月別推移

## 2) 塩分濃度との関係

各定点から検出された *V. vulnificus* の MPN 値 (log/100ml) と塩分濃度 (%) との関係を図 3 に示した。なお、統計処理には、定量下限以下 (MPN<0.48/100ml) の定点は除いた。*V. vulnificus* の MPN 値と塩分濃度には  $y = -1.578x + 5.2215$ ,  $R^2 = 0.4303$  と、塩分濃度と MPN 値とは高い相関関係がみられ、塩分濃度が 3% 以下の低濃度海域に *V. vulnificus* は多いことが判明した。今回調査した 9 定点の塩分濃度は 1.80%~3.12% の範囲で、定点により 1.73 倍の濃度差が認められた。また、河口部 (P1, P2) と市街地に近い沿岸域 (P3) の 3 定点の塩分濃度が、1.80%~2.92% (中央値 2.58%) の範囲であったのに対し、島しょ部の 6 定点 (P4~P9) は 2.33%~3.12% (中央値 2.89%) と高く、*V. vulnificus* は塩分濃度の低い沿岸域に多かった。

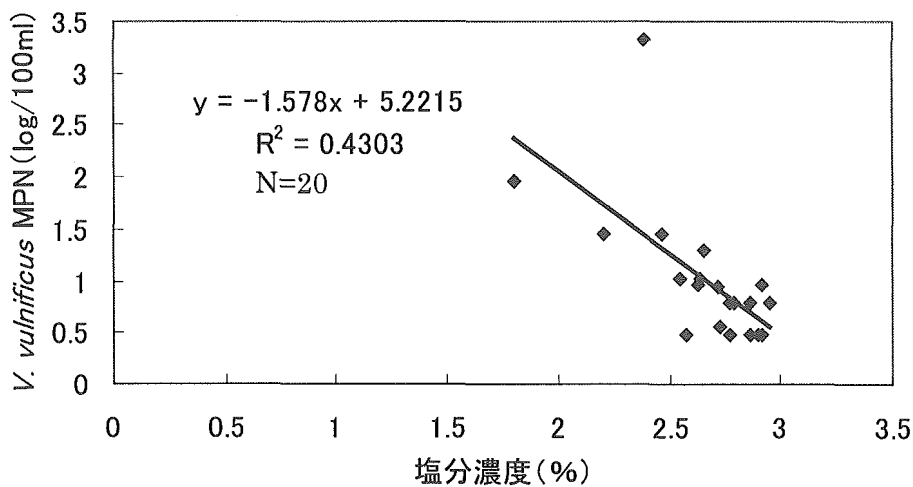


図3 海水中の *V. vulnificus* のMPN値と塩分濃度との関係

### 3) *V. parahaemolyticus* との関係

各定点から検出された *V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* の MPN 値 (log/100ml) の関係を図 4 に示した。なお、統計処理には、定量下限以下 (MPN<0.48/100ml) の定点は除いた。両菌種の MPN 値には  $y=0.413x+0.2061$ ,  $R^2=0.1686$  の関係がみられ、*V. parahaemolyticus* の MPN 値が高くなると *V. vulnificus* も増加傾向を示したが、有意な相関関係は認められなかった。

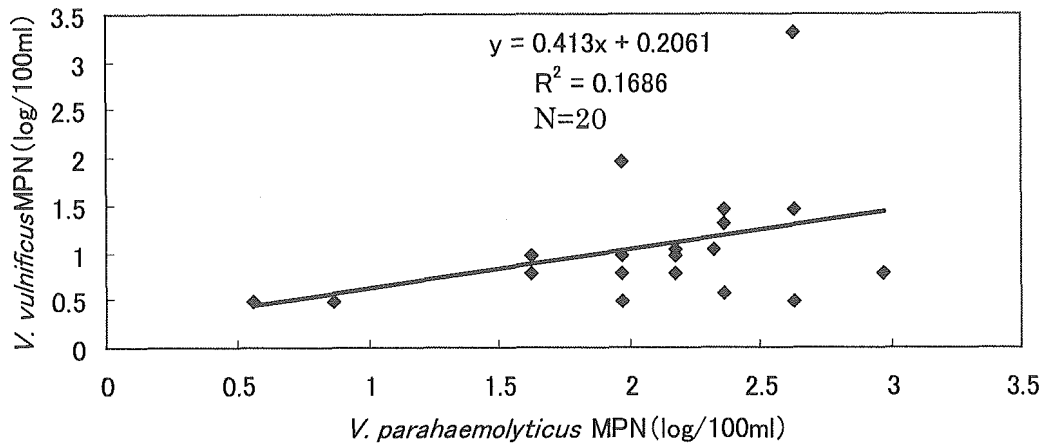


図4 海水中の *V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* の MPN 値の関係

### 2 アサリからの *V. vulnificus* の検出状況

各検体における *V. vulnificus* の検出状況を表 2 に示した。調査したアサリ 30 検体中 25 検体 (83.3%) から *V. vulnificus* が検出された。月別にみた *V. vulnificus* の検出率は、66.7%~100%の範囲で、6月~8月は検出率が低く、検体間の汚染状況にばらつきが認められた。9月~10月はいずれもすべての検体から *V. vulnificus* が検出され、汚染率が著しく高かった。一方、同時に検査した *V. parahaemolyticus* はすべての検体から検出され、*V. vulnificus* よりも優性に分布していた。

表2 アサリからの *V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* の検出状況

検体番号	6月	7月	8月	9月	10月	検出合計
1	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	4/5*
2	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	4/5
3	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	4/5
4	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	5/5
5	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	4/5
6	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	4/5
検出合計	5/6(83.3%)	4/6(66.7%)	4/6(66.7%)	6/6(100%)	6/6(100%)	25/30(83.3%)

\* *V. vulnificus* / *V. parahaemolyticus* ( )内は *V. vulnificus* の検出率



1) *V. vulnificus* の MPN 値と海水温との関係

アサリから検出された *V. vulnificus* の MPN 値 (6 検体の中央値: log/100g) と海水温 (9 定点の中央値: °C) の月別推移を図 5 に示した。検査した 30 検体のアサリから検出された *V. vulnificus* の MPN 値は <2.48~3.88 の範囲であった。月別の検出状況は、6 月は <2.48~2.78/100g の範囲で中央値は 2.52/100g であった。7 月は <2.48~2.96/100g (中央値 2.71/100g), 8 月は <2.48~2.86/100g (中央値 2.56/100g), 9 月は 3.04~3.64/100g (中央値 3.24/100g), 10 月は 2.56~3.88/100g (中央値 3.11/100g) と、海水と比べて検出菌量は多く、アサリに濃縮される傾向が認められた。また、6 月~7 月は、海水温の上昇に伴い MPN 値は増加したが、海水温が最も高くなった 8 月 (28.9°C) は減少した。しかし、海水温が下降した 9 月にはふたたび増加し、MPN 値は最も高くなった。

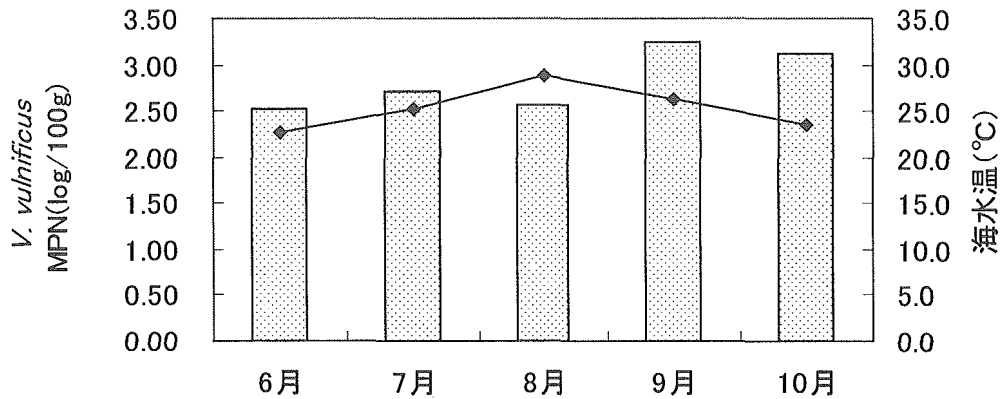


図5 アサリから検出された *V. vulnificus* の MPN 値と海水温の月別推移

2) *V. parahaemolyticus* の MPN 値との関係

アサリから検出された *V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* の MPN 値 (6 検体の中央値: log/100g) の月別推移を図 6 に示した。*V. parahaemolyticus* の MPN 値は 3.80~5.18/100g の範囲で、*V. vulnificus* の 2.52~3.24/100g と比べ  $10 \sim 10^2$  オーダ以上高かった。また、*V. vulnificus* と同様に 9 月が最も高値を示した。

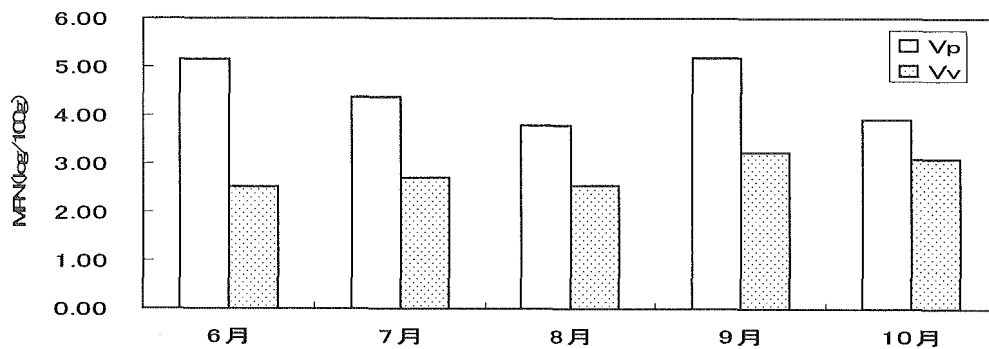
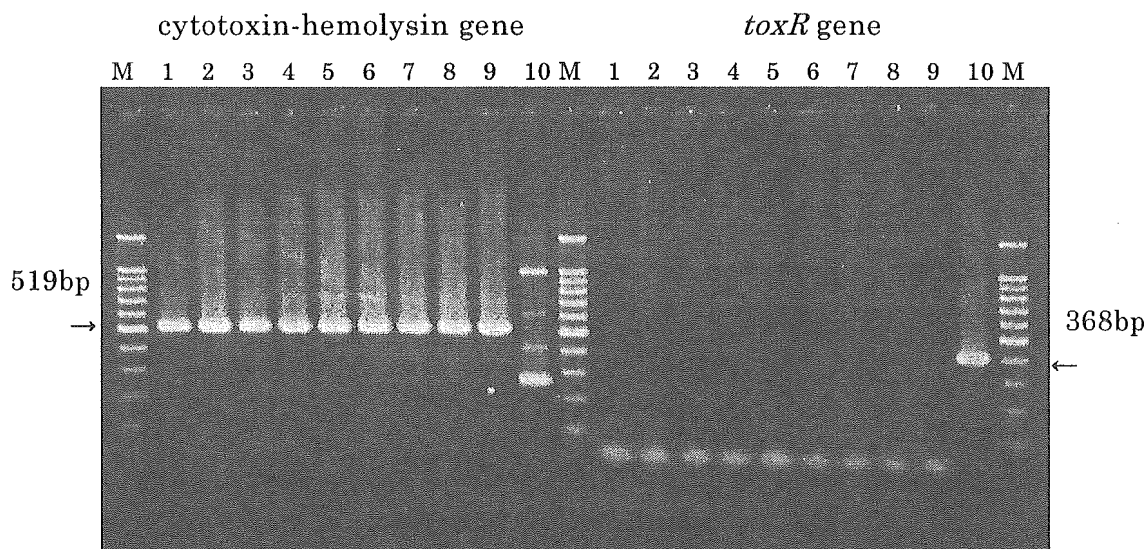


図6 アサリから検出された *V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* の MPN 値の月別推移

### 3 *V. vulnificus* 分離株の性状

1) セロビオースの分解性, cytotoxin-hemolysin gene および *toxR* gene の保有状況

クロモアガービブリオ寒天培地から釣菌した集落のうち, 濃い青色~青緑色集落株は, いずれもセロビオース(+), cytotoxin-hemolysin gene(+), *toxR* gene(-)の性状を示し *V. vulnificus* と同定された。一方, 乳白色がかった青色集落株は, いずれもセロビオース(-), cytotoxin-hemolysin gene(-), *toxR* gene(-)で *V. vulnificus* とは同定されなかった。図7に *V. vulnificus* から検出された cytotoxin-hemolysin gene と *V. parahaemolyticus* から検出された *toxR* gene のPCRの泳動像を示した。*V. vulnificus* はいずれも cytotoxin-hemolysin gene (増幅DNA 519bp)を保有していたが, *toxR* gene (増幅DNA 368bp)は保有していなかった。一方, 対象とした *V. parahaemolyticus* は, *toxR* geneを保有していたが, cytotoxin-hemolysin geneは保有していなかった。



- |                                  |                                    |
|----------------------------------|------------------------------------|
| 1 <i>V. vulnificus</i> O1群 (アサリ) | 6 <i>V. vulnificus</i> O6群 (アサリ)   |
| 2 <i>V. vulnificus</i> O2群 (アサリ) | 7 <i>V. vulnificus</i> O8群 (アサリ)   |
| 3 <i>V. vulnificus</i> O3群 (海水)  | 8 <i>V. vulnificus</i> O12群 (海水)   |
| 4 <i>V. vulnificus</i> O4群 (アサリ) | 9 <i>V. vulnificus</i> O14群 (アサリ)  |
| 5 <i>V. vulnificus</i> O5群 (アサリ) | 10 <i>V. parahaemolyticus</i> (海水) |
- M : 100bp DNA Ladder

図7 PCR法で *V. vulnificus* から検出された cytotoxin-hemolysin gene と *V. parahaemolyticus* から検出された *toxR* gene

### 2) 分離株の血清型

血清型別された *V. vulnificus* 128株は, OUT (O群型別不能)株を含め10種類に分類された。表3にその血清型と株数を示した。そのうち最も多かった血清型は, 海水およびアサリともに O6群で, 海水から34株, アサリから18株の計

52株が分離され、全体の40.6%を占めた。次いでO1群の44株(34.4%)とO4群の13株(10.2%)が多く、この3血清型で全体の85.2%(109株)を占めた。また、O群型別された9種類の血清型のうち、海水からは7種類が検出された。そのうちO3群およびO12群はアサリからは検出されなかった。また、O6群が9定点のうち4定点(P2, P7, P8, P9)から検出され、最も広く分布していた。アサリからは7種類の血清型が検出され、そのうちO2群およびO5群は海水からは検出されなかった。

表3 海水およびアサリから分離された *V. vulnificus* の血清型

検体の種類	血清型										合計
	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O8	O12	O14	OUT	
海水	34		1	8		34	2	2	2		83
定点別 (P1)	17								2		19
(P2)	10					2					12
(P3)							2	2			4
(P4)											
(P5)				8							8
(P6)											
(P7)						2					2
(P8)						29					29
(P9)	7		1			1					9
アサリ	10	3		5	3	18	1		1	4	45
合計	44	3	1	13	3	52	3	2	3	4	128

## 考 察

広島湾は市街地に近く、多くの島が存在し、波も穏やかで栄養豊富な漁場として古くからカキの養殖や漁業が営まれ、ヒトの食生活に深く関与している。今回、2004年6月～10月までの広島湾における海水と畜養されたアサリからの *V. vulnificus* の検出状況について検討した。海水の調査では9定点のうち8定点から本菌が検出された。また、アサリからも本菌が検出され、広島湾にも *V. vulnificus* が分布していることが明らかとなった。広島湾における *V. vulnificus* の分布は、海水の調査から河口部と市街地に近い沿岸域に多く、島しょ部には少ない傾向が認められた。Kelly<sup>6)</sup> は、*V. vulnificus* は、水温が高く比較的塩分濃度の低い環境を好むと報告している。今回の調査においても、河口部と市街地に近い沿岸域の3定点の塩分濃度(1.80%～2.92%：中央値2.58%)と島しょ部の6定点の塩分濃度(2.33%～3.12%：中央値2.89%)には差がみられ、沿岸域は河川水の流入による影響を受けて塩分濃度が低くなり、*V. vulnificus* に適した生息環境になっていると考えられた。また、海水中の *V. vulnificus* の菌数(MPN値)は、海水温の上昇に伴って相対的に増加し、海水温が最も高くなった8月にピークに

達する定点が多かった。また、アサリは海水温が少し下降した9月にピーク(MPN中央値)となった。大仲ら<sup>7)</sup>は、海水、海泥およびカキについて調査し、*V. vulnificus*の分離率には季節的変動がみられ、夏期に最も高くなったことを報告している。今回の海水調査においても各定点からの検出率は、6月(11.1%：1定点)と8月(66.7%：6定点)では有意な差が認められ、海水温の高い8月～9月は広島湾においても広い範囲に*V. vulnificus*が分布していると考えられた。また、海水と比べ、アサリから検出された*V. vulnificus*の菌数は多く、アサリは高濃度に本菌に汚染されていることが判明した。一方、同時に検査した*V. parahaemolyticus*は、海水およびアサリのすべての検体から検出され、菌数も多く、*V. vulnificus*と比べ優勢に分布していた。

分離された*V. vulnificus*は、いずれもクロモアガービブリオ寒天培地で青緑色集落を形成し、セロビオースを分解した。今回の調査ではセロビオースの分解試験に、病原性大腸菌O157の性状検査に用いられるCLIG培地に食塩(1%)を添加して使用した。本培地ではセロビオースと乳糖の分解性が試験できるため、一般的な*Vibrio*属の分離培地であるTCBS培地を用いて*V. vulnificus*を分離するとき、本菌の殆どが*V. parahaemolyticus*と同じ緑色集落を形成<sup>8)</sup>することから、平板上の集落をスクリーニングするには、簡易で有用な培地と思われた。また、セロビオース陽性株について、PCR法で*V. vulnificus*が特異的に保有するcytotoxin-hemolysin geneと*V. parahaemolyticus*の種特異遺伝子である*toxR* geneの有無を確認することにより、本菌は種々の生化学的性状試験を実施しなくても迅速に*V. parahaemolyticus*と区別・同定ができると思われた。また、国立感染症研究所において型別された分離株の血清型は、型別不能(UT)を含めて10種類に分類された。そのうち、O1群、O4群およびO6群の3血清型が全体の85.2%を占めた。特に、O6群は全体の40.6%を占め最も多かった。また、これらの血清型は、海水およびアサリから検出されたことから、広島湾に広く分布していることが示唆された。しかし、これらの血清型と患者との関係は、広島県内では2例の患者が発生<sup>2)</sup>しているが、いずれも患者株が当センターで入手されておらず、血清型との関係を明らかにできなかった。また、山口から岡山にかけての瀬戸内海沿岸では患者発生も多い<sup>2)</sup>ことから、今後、流通している魚介類の汚染状況や、広島湾における年間を通じた分布状況を把握し、患者株との疫学的関連性を検討する必要があった。

#### 参考文献

- 1) Tacket C.O. et al: Clinical Features and an Epidemiological Study of *Vibrio vulnificus* Infection. *J.Infect.Dis.*, 149: 558-561, 1984.
- 2) 小野友道: ビブリオ・バルニフィカス感染症についての全国サーベイランス、厚生労働科学研究費補助金 新興再興感染症研究事業 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 平成 15 年度 総括・分担研究報告書, 5-22, 2004.

- 3) Hill W.E. et al : Polymerase Chain Reaction Identification of *Vibrio vulnificus* in Artificially Contaminated Oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 : 707-711, 1991.
- 4) Kim Y.B. et al : Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Strains at the Species Level by PCR Targeted to the *toxR* Gene. *J. Clin. Microbiol.*, 37 : 1173-1177, 1999.
- 5) 坂崎利一 : *Vibrio vulnificus*. 改訂 食水系感染症と細菌性食中毒, 中央法規出版, 東京, 168-179, 2000.
- 6) Kelly M.T. : Effect of Temperature and Salinity on *Vibrio (Beneckea) vulnificus* Occurrence in a Gulf Coast Environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 : 820-824, 1982.
- 7) 大仲賢二 他 : *Vibrio vulnificus* 感染症に関する基礎的研究 : 海水, 海泥およびカキからの本菌分離状況. *感染症学雑誌*, 76, 528-535, 2002.
- 8) 齋藤紀行 他 : ビブリオ・バルニフィカスに関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 新興再興感染症研究事業 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 平成 15 年度 総括・分担研究報告書, 37-54, 2004.

## 協力研究報告

平成16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 山田わか 渡邊節 小林妙子 川野みち  
田村広子 三品道子 菅原直子 佐藤由美 畠山敬  
谷津壽郎 秋山和夫 川向和雄（宮城県保健環境センター）

研究主旨：ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*：以下 Vv とする) 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調査定点を設け海水・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結果、宮城県内の汽水域にも Vv が生息すること、また一部の市販貝類が Vv で汚染していることが明らかになった。

更に今年度の調査から、海水・海泥から検出される Vv の菌数は海水温が20℃を超える時期に高いこと、また、市販アサリからは7～9月に Vv が高率に検出されることを確認した。このことから、Vv の汚染調査の対象生物としてアサリが適していると思われた。さらに、汚染アサリのモデル実験系から低温保存によりアサリ中の Vv は経日的に減数することが確認された。

分離菌株の O 血清型は O1、O4、O6 が高頻度で出現したが、他の調査機関の結果と同様の傾向を示した。

### 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15年度まで宮城県内の沿岸部汽水域に調査定点（以下定点とする）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生鮮貝類、特にアサリが Vv で汚染していることが明らかになった。

平成16年度は、定点における Vv の生息状況、アサリを主とした市販生鮮貝類の Vv 汚染実態調査に加え、海水浴場における Vv の生息状況、定点に生息する貝類等

の Vv 検出状況を調査し、Vv 汚染実態を更に明確にする。

また、我々は Vv は低温あるいは酸性条件下では菌数が急激に減少することを昨年示した。今年度は Vv 汚染アサリのモデル実験系を用い、低温保存した場合にアサリ中の Vv が経目的にどのように変化するかを検討する。

以上についての結果に基づいて、Vv 感染症の予防策の構築を目的とする。

## B 研究方法

### 1 調査期間

定点での海水・海泥及び市販生鮮貝類についての調査は、平成16年4月から11月まで実施した。

### 2 調査定点と検体入手

宮城県名取市閑上（ゆりあげ）地区の増田川河口の汽水域を定点とし、海水・海泥と生息貝あるいはイソガニを採集し検査検体とした。県内産のアサリ等は地場産品直売所からまた県外産アサリは市内の量販店から検査当日購入した。

### 3 使用培地

Vv の MPN 値算定用及び増菌用としてアルカリペプトン水（日水製薬：APW）、分離用として m CPC（自家調整）およびクロモアガービブリオ（関東化学：CV）培地、更に Vv の菌数測定用として CV 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 1,000 倍に希釈し、各希釈濃度の各 3 本を MPN 管として 37℃ で一晚培養後、各 MPN 管から 1 白金耳を m CPC および CV 培地に塗抹し培養し Vv の分離を行った。また、各 MPN 管について Vv の特異遺伝子— cytotoxin-hemolysin (Vvh) 遺伝子を PCR 法により確認し、陽性管の本数から海水 1 ml あたりの MPN 値を算出した。

#### （2）海泥

海泥 20 g を APW 180 ml に加え 10 倍希釈液とした。これを更に 100 倍、1,000 倍、10,000 倍および 100,000 倍に希釈し、海水の場合と同様にして海泥 1 g あたりの MPN 値を求めた。

### 5 貝類等からの Vv 検出

市販生鮮貝類は量販店別、産地別の 1 パックを 1 検体としてむき身を取り出し、25 g をストマッカー袋に秤量し、これに APW 225 ml を添加し手揉みで均一化した。この液を 10 倍希釈液とし、更に階段希釈し、100 倍、1,000 倍の希釈液

を調整し、各希釈液について各3本をMPN管とした。37℃で一晩培養した後、各試験管からmCPC及びCV培地を用いてVvの検出を試みた。MPN値は各試験管についてVvh遺伝子をPCR法で確認して陽性管の本数から算出した（PCR-MPN値）。また、定点に生息する生物におけるVv汚染実態調査には定点で採集した貝あるいはイソガニを検査材料とし、貝はむき身をカニはそのまま計量し10倍希釈液量のAPWを加えホモジナイズ後、貝類の検査と同様にしてVvの検出を行った。

## 6 分離菌株の同定と血清型

Vvの同定は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Vvhの遺伝子を確認して決定した。

(1) 生化学的性状試験：TSI、LIMでの性状、耐塩性、セルビオース利用を調べた。

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

(3) 血清型別試験：国立感染症研究所でO抗原の抗血清（1～16型）により決定した。

## 7 Vv汚染アサリにおける菌消長実験

市販アサリ（Vv不検出）1Kgを滅菌海水4Lに漬け、これに最終菌量が $10^3 \sim 10^4$  cfu/mlになるように調整したVv菌液50mlを添加、攪拌して15℃の恒温器内に静置した。約20時間後、アサリ（Vv汚染アサリ）を取り出し、滅菌海水ですすぎ、新たな滅菌海水1Lの入った容器2個に分けた。この時、汚染アサリの一部を取り出し、むき身中のVv菌数を測定した。それぞれの容器は5℃と15℃に設定したそれぞれの恒温器内に静置し、翌日からアサリのむき身と容器の海水中のVv菌数を測定した。菌数測定は海水あるいはむき身10%けん濁液を生理食塩水で階段希釈し、各希釈液をクロモアガービブリオ培地に塗抹培養し出現コロニーを数え、むき身は1g当たり、海水については1ml当たりの菌数（cfu/g or ml）を算出した。

## C 研究結果

### 1 定点における海水・海泥のVv生息状況

平成16年度の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。7、8月は海水、海泥ともにMPN値が高値を示した。更に、平成13年度から16年度の4年間の菌検出状況を図2に示した。20℃を超える月はVvが高率に検出された。平成15年度は冷夏のため20℃を超える期間が平年より短かったが、Vvが検出される期間は変わらなかった。



## 2 市販流通貝類における Vv の検出状況

貝類の Vv 汚染調査は主に市販生鮮アサリを用いて実施した。APW を用いて作製した貝のむき身の MPN 管を 37℃ で培養し、翌日各 MPN 管の培養液を PCR 法で Vvh 遺伝子を確認し、陽性管数から MPN 値を求め、更に各 MPN 管から Vv の検出を試みた。表 1 に Vv の検出状況を示した。なお、MPN 値 0.23 以上を Vv 陽性検体とした。PCR で Vv 陽性となった管から Vv が分離できなかった検体もあった。表 2 に Vv 検出状況を月別、食品別に分類して示した。Vv 検出は県内産 26 件中 10 件（検出率：38.5%）、県外産 13 件中 8 件（検出率：61.5%）の総計 39 件中 18 件（検出率：46.2%）から検出された。また、Vv は 6 月から 10 月の毎月の食品検体から検出され、アサリからの検出率は 53.8% と高く、特に 7 月の福島県産及び 9 月の愛知県産アサリは 1 g 当たりの MPN 値が 100 以上と高値を示した。

## 3 定点に生息する貝あるいはカニにおける Vv 検出状況

定点に生息する生物における Vv 汚染状況を把握する目的で、5 月から 11 月まで、毎月定期的に定点に生息する貝（ミナトガイ：5、6 月）あるいはイソガニ（7～11 月）を採集し、それぞれについて MPN 管法で Vv を検出定量した。月別の Vv 検出を Vv の MPN 値で表し海水温度と共に図 3 に示した。海水温が 20℃ を超える 7 月から 10 月に採集したカニから MPN 値 100 を超える高値の Vv が検出された。

## 4 海水浴場における Vv の生息状況

本年度は県内の海水浴場における Vv の生息状況を A 海水浴場について実施した。即ち、5 月から 10 月まで（6 月は測定せず）海水を定期的に採取し Vv の MPN 値を求め、海水温と共に図 4 に示した。海水温度が 20℃ 以下となる 5 月及び 10 月は Vv は検出されなかったが、海水温度が 20℃ を超える 6 月から 9 月は Vv が検出され、特に海水浴シーズンとなる 7 月は MPN 値 110 と高値を示した。

## 5 分離 Vv 菌株の生化学的性状と血清型別

平成 16 年度分離した 26 菌株について生化学的性状試験、特異遺伝子検査および血清型別を行い、その結果を表 3 に示した。26 菌株は全て同じ性状を示した。

血清型別では、O1 が 5 株（19.2%）、O3 が 4 株（15.4%）、O4 が 5 株（19.2%）、O6 が 2 株（7.7%）、O8 が 2 株（7.7%）、O14 が 5 株（19.2%）、O16 が 1 株（3.8%）、O1～O16 以外の UT が 2 株（7.7%）であった。

## 6 Vv 汚染アサリからの菌消長実験

Vv に汚染したアサリが生産地から消費者へ流通する過程で、アサリ中の Vv 菌数が経日的にどのように変動するかを明らかにする目的で、人為的に Vv 汚染アサリを作製した。これを 5℃ 及び 15℃ にそれぞれ保存して経日的な菌数変動を調べた。即

ち、海水1ml当たり $7.1 \times 10^3$  cfu量のVvを添加した滅菌海水にアサリを15℃で約20時間浸し汚染させた。むき身には1g当たり $2.2 \times 10^3$  cfu量のVvが取り込まれた。これを5℃及び15℃の恒温器内にそれぞれ静置し、1、2、3及び5日目に海水及びアサリむき身についてそれぞれのVvの菌数を測定し、その結果を図5-A(5℃)、B(15℃)に示した。むき身に取り込まれた菌数を100%とすると1、2、3及び5日目には、15℃でそれぞれ27%、34%、11%及び1%に、5℃ではそれぞれ127%、60%、32%及び3%と5日目には明らかな減数が認められた。保存温度が5℃あるいは15℃での減数の動態を比較すると、5℃の減数割合は15℃より小さいが5日目には両者とも3%以下となった。一方、結果は示していないが汚染アサリを作製するために菌を添加した場合、添加直後は菌が検出されるが20時間後にはむき身から菌が検出されるが海水からは菌が検出されなかった。

#### D 考察

Vv感染症は、海洋微生物Vvに汚染された海水・海泥を介した創傷感染あるいは鮮魚介類の生食による経口感染で発症しヒトに重篤な症状を引き起こすことがある。Vv感染は主に九州地域、特に熊本県での発生が多く、東北では秋田県および青森県で各1名の患者発生が報告されている。

熊本県の報告によると、Vv感染症が発生する地域は汽水湖が多く点在する特異的な地形的であり、更に塩分濃度が低い汽水域では高濃度のVvが検出される。このように、Vvが生息する地域は、地形的要因に関係があるように思われた。

そこで、本県のVv調査定点として小河川が海に流れ込む汽水域を選定し、平成13年度から16年度まで4年間、定点での海水・海泥中のVvの生息状況調査した。図2に示したように、海水・海泥からのVv検出パターンは毎年同じような動態を示し、海水温度が20℃を超える時期(概ね6月～9月)は高濃度のVvが検出された。検出されるVv菌数は海水より海泥のほうが多くかつ検出される期間も長い。しかし、海水温度が10℃以下になる時期(概ね12月～3月)には海水・海泥からVvは検出されない。即ち、Vvの増殖には生息地の海水温度が大きく影響することは明白である。また、海水の温度の昇降によりVvが検出されない時期、検出される時期が交互に出現することから、検出されない時期にも菌は完全に死滅していないと思われる。ビブリオ属菌は生きていますが培養できない状態(VNC)になりやすいことから、海水温が低温となる時期には一部のVvはVNCになり、通常の検出法では菌が検出されない可能性がある。

初年度の調査で、宮城県内でも海水・海泥にVvが生息することが明らかになった

ことから、平成16年度は、定点の海水・海泥中の Vv 調査に併せ、そこに生息する生物における Vv の保有状況を調査した。当初、アサリ等の貝類を対象生物と考えたが、定点では通年採集できなかつたため、採材当日採集できた貝（ミナトガイ）およびイソガニについて MPN 法で Vv の検出を実施した。Vv は6月から10月までの検体から検出され、特に8月に採集したイソガニの MPN 値は1400と高値を示した（図3）。Vv の生息が確認された汽水域の生息生物から高濃度の Vv が検出されたことから、本県においても Vv 感染の危険性がないとは言えない。

Vv は食中毒以外に創傷感染からの重篤な敗血症あるいは中耳炎の原因になることから、海水浴による感染の危険性が危惧される。熊本県では、河川の影響を受けやすい海水浴場での Vv の MPN 値は高い数字になると報告されている。そこで本県においても河川の影響を受ける A 海水浴場について5月から10月まで（6月は実施せず）、月に一度、海水浴場水中の Vv の MPN 値を測定して Vv の調査を実施した。その結果、7月から10月の海水中から Vv が検出され、特に海水浴シーズンである7月の MPN 値は110と比較的高い値であった。

一方、熊本で発生した事例の Vv 感染者の多くは地元の鮮魚介類の生食が原因と考えられていることから、平成13年度、市販生鮮魚介類について Vv の汚染実態調査を宮城県、神奈川県、島根県及び熊本県で実施した。その結果、Vv の汚染は魚類よりアサリなどの貝類で高い傾向を示すことが明らかになった。更に、15年度の我々の調査の結果から、貝類の鮮度が高いほど Vv の検出率、MPN 値が高くなる傾向であることが示唆された。我々は、平成16年度も引き続き市販貝類39件についての Vv 汚染実態調査を実施し、18件から Vv を検出した（検出率：46.2%）。特に、アサリからは53.8%と高い検出率であった。そこで、平成13年度、15年度及び16年度に実施した市販貝類の Vv 調査結果を7月から9月に実施したアサリに限定し、MPN 値別に分類し、表4に示した。検体総計35件中14件（検出率40%）から Vv 検出が検出され、これを県内産、県外産とに分けると県内産では検出率は30%、県外産では53.3%、また検出された Vv の最大 MPN 値は県内産では24、県外産では150と県外産が高値を示した。県内産、福島県、千葉県、愛知県あるいは三重県産のアサリから高頻度に Vv が検出されたことから、Vv は全国の沿岸に生息する可能性があり、またヒトへの感染の危険性も危惧される。しかし、通常アサリを生で喫食することはないので直接ヒトへ経口感染する危険性は低いと考えられる。

Vv 汚染アサリからの Vv の消長実験で示したように、アサリに取り込まれた Vv は5℃あるいは15℃で保存すると経日的に減数することから、低温保存されている市販アサリの Vv 菌量は漁獲された時点より少ない数になると考えられた。即ち、Vv 調査で菌量が高値を示したアサリは、漁獲して間もないものか、あるいは更に高い値

の菌数で汚染されていた可能性が考えられた。

本年度の調査で分離された菌株は典型的な Vv の性状を示すものだけであった。昨年度までの菌分離には TCBS、CV、CB 及び m CPC 培地を併用していたが、Vv 分離に使用される m CPC は選択性が高い反面、Vv の発育も抑制され、Vv の検出率が低くなる。そこで、今年度は Vv の検出をあげるためコリスチン、ポリミキシンを 1/5 量にした。今回、分離した菌株の血清型は O1、O4、O14 がそれぞれ 5 株で全体の 58% を占めていた。平成 13 年度からの分離菌 80 株についての血清型別では O1、O4 及び O6 がそれぞれ 17.5%、22.5%、及び 11.3% と高頻度に検出されたが、この傾向は他の研究機関での検出状況と同じであった。

4 年間の調査から、1) 宮城県内の汽水域にも Vv が生息する 2) 海水温が 20 度を超える期間に活発に増殖する 3) 夏季に流通するアサリからは Vv が高率に検出されことから、Vv の汚染調査の対象生物としてアサリが適している 4) 低温保存により Vv 汚染アサリの菌数は経日的に減数する 5) 分離菌の O 血清型は O1、O4、O6 が高頻度で出現することが明らかになった。

以上のことから、患者が発生していない地域でも Vv 感染予防のため Vv 調査を継続して実施することは重要である。

## 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)
- 2) 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 (第 2 報)、宮城県保健環境センター年報 平成 15 年度、130-134 (2004)
- 3) 渡邊節 他：腸炎ビブリオ、ビブリオ・バルニフィカスの酸性条件下での安定性 宮城県保健環境センター年報 平成 15 年度、135-139 (2004)
- 3) M. L. Mothes et.al: Influence of Water Temperature and Salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast Oysters (*Crassostrea virginica*), *Applied and Environmental Microbiology*, 1459-1465, 1998
- 5) 平成 14 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 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
- 6) 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 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