

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に関する研究

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、鈴木理恵子、石原ともえ、三宅芳枝

要旨

神奈川県内の海水浴場などの海水、砂およびその周辺に生息する貝類と近海で捕獲される魚類における *Vibrio vulnificus*(以下 *V. v*)の生息状況を調査した。海水浴場など 11ヶ所を定点とし、2004年5月から9月まで毎月1回、海水、砂および貝類を採取し、*V. v*および *Vibrio parahaemolyticus*(以下 *V. p*)の分布を調査した。また、2004年6月から9月にかけて、相模湾で捕獲された魚介類から *V. v* および *V. p* の検出を試みた。定点における調査では、*V. v* は6月から検出されるようになり、9月まで9定点で検出されたのに対し、*V. p* は5月から毎月検出された。2定点ではいずれの検体からも *V. v* は検出されなかった。魚類における調査では、*V. v* は6月および7月にアジ類の1検体ずつから検出されたに過ぎなかったが、*V. p* は毎月、種々の魚類から検出された。

A. 研究目的

ビブリオ・バルニフィカス 症は汚染された魚介類を摂取し、あるいは汚染された海水に入ることにより創傷部から菌が進入して起きるとされている。症状は感染した者の状態により異なるとされ、健常者が経口的に摂取した場合には嘔吐、下痢、腹痛といった症状を呈する。慢性肝疾患や糖尿病といった基礎疾患を有し、免疫不全の状態がある者では、菌は血行性に全身に感染して敗血症による発熱、悪寒、血圧低下を呈して、重篤な状態に移行する。このような重篤例では致死率は50～70%の達するとされている。

汚染魚介類の摂食や創傷部からの菌の侵入により当該感染症が発生することから、その予防には、魚介類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、神奈川県内の海水浴場などの海水および海中の砂、貝類、さらに相模湾で捕獲される魚介類から *V. v* の定量培養検査を行い、汚染・分布状況を調査した。

B. 研究方法

1. 調査材料

神奈川県内の海水浴場とその周辺の漁港（計 11ヶ所）を検体採取定点とし、海水、砂

および貝類（イワガキ、ムラサキイガイ、アサリ等）を採取した。採取時期は 2004 年 5 月から 9 月とし、海水浴場では波打ち際の海水、砂および貝類を、漁港では岸壁から海水および貝類を採取した。海水は温度と塩濃度を測定した（表 1）。

魚類を対象とした調査は、2004 年 6 月から 9 月にかけて相模湾産の魚類を市場などから購入し、これらを検体とした。内訳はイワシ類、アジ類サバ、カツオ類、その他の魚類 78 検体であった。

## 2. 調査方法

検体の定量培養検査はアルカリペプトン水培地（OXOID）を用い、MPN3 本法を行った。分離培養には TCBS 寒天培地（栄研）およびクロモアガービブリオ培地（関東化学）を使用した。

海水 500ml を直径 49mm、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  の滅菌混合エステルタイプメンブランフィルターでろ過し、3%NaCl 加リン酸緩衝液に再浮遊し 10 倍濃縮液とした。シラスを除く魚類はエラ部を、シラスはそのものを、貝類はむき身をそれぞれ検体とした。砂および魚介類の検体は 25g を秤量し、3%NaCl 加リン酸緩衝液で 10 倍乳剤とした。

各々の試料は段階希釈してアルカリペプトン水 10ml に 1ml ずつ接種し、36°C、18~24 時間培養した。培養液を TCBS 寒天培地およびクロモアガービブリオ培地に 1 白金耳ずつ塗抹し、36°C、18~24 時間培養した。

TCBS 寒天培地では、*V. v* が疑われる緑色集落と黄色集落と *V. p* 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. v* が疑われる青緑色集落と *V. p* が疑われる紫色集落を釣菌した。生化学的性状試験により *V. v* あるいは *V. p* が確認された試験管数から MPN 値を求めた。

*V. v* と *V. p* の生化学的性状試験では、1%食塩加 TSI、SIM、リジン脱炭酸培地、VP 試験培地を確認培地とし、好塩性試験として 0%、3%、6%、8%および 10%食塩加ペプトン水を用いた。*V. v* を疑う場合には、40°Cにおける発育性、lactose、salicin および cellobiose の糖分解試験を追加して行った。調査において、*V. v* は、生化学的性状を glucose (+)、lactose (-、ただし遅分解) salicin (+)、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°Cでの発育 (+) とした。また、*V. p* は、生化学的性状を glucose (+)、lactose (-)、salicin (-)、cellobiose (-)、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 (+) とした。

*V. v* 株の血清群別は国立感染症研究所細菌第 1 部に依頼した。

## C. 結果

## 1. 海水および砂

調査期間中、海水からは 11 定点で採取した 43 検体中 8 定点の 13 検体から、砂からは 10 定点で採取した 39 検体中 3 定点の 5 検体から *V. v* が検出された（表 2-1、表 2-2 および表 3）。海水から *V. v* が検出されなかった 3 定点（長浜、茅ヶ崎および小田原）では砂からも *V. v* は検出されず、このうち 2 定点（茅ヶ崎および小田原）では貝類を含めたいずれの検体からも *V. v* は検出されなかった。

2004 年 5 月は横浜市金沢区の 4 定点のみで検体を採取し、海水と砂から *V. v* は検出されなかった。2004 年 6 月は 10 定点において検体の採取を行い、海水からは 2 定点で、砂からは 1 定点で *V. v* が検出された。7 月は 11 定点から採取し、それぞれ 4 定点と 2 定点で、8 月はそれぞれ 6 定点と 2 定点で *V. v* が検出された。9 月は 8 定点で採取を行い、1 定点の海水から *V. v* が検出されたが、砂からは検出されなかった。

*V. v* の検出と対比させるために *V. p* の検出も同時に行ったが、ほぼ全ての定点の海水と砂から *V. p* が検出された。

## 2. 貝類

調査を行った 11 定点のうち 10 定点で貝類を採取し、それぞれの定点においてはイワガキは 7 定点中 4 定点から、ムラサキイガイは 4 定点中 1 定点から、アサリは 3 定点中 2 定点から *V. v* が検出された（表 4~6）。海水から *V. v* が検出された 8 定点のうち、貝類を採取した 7 定点では合わせて 5 定点から *V. v* が検出された。長浜では海水および砂からは *V. v* は検出されなかったが、イワガキから *V. v* が検出された。

*V. v* は全ての貝類の 58 検体中 10 検体（17.2%）から検出されたのに対し、*V. p* は 48 検体（82.8%）から検出された。

## 3. 魚類

2004 年 6 月から 9 月にかけて、相模湾で捕獲された魚介類 25 種類の 78 検体から *V. v* および *V. p* の検出を試みた。*V. v* は 6 月と 7 月にアジ類のそれぞれ 1 検体ずつ（3.0MPN/100g）から検出されたに過ぎなかったが、*V. p* は 38 検体から検出された。

## 4. 分離菌の血清群別

各種検体から分離された 70 株の血清群は、1、2、3、4、16 群の 5 血清群にわたり、群別不能株もあった（表 7）。海水からは 5 血清群すべてが検出されたが、O4 群が最も高い頻度であった。貝類でもムラサキイガイとアサリ、カガミガイからは O1 群と O4 群が分離されたが、イワガキから分離されたのは O1 群のみであった。

## D. 考察

神奈川県内の海水浴場などの 11 ヶ所を定点として *V. v* の分布調査を行ったところ、9 定点から当該菌が検出され、広く分布していることが明らかとなった。特に県の東部で検出頻度が高い傾向がみられた。

調査において、海水、砂および貝類では *V. v* の検出頻度は明らかに異なり、砂からの検出は海水および貝類と比較して低かった。すなわち、海水から *V. v* が検出されたのは 11 定点のうち 8 定点からであったのに対し、砂から *V. v* が検出されたのは 10 定点のうち 3 定点であった。また、海水浴場の周辺で採取したイワガキ、ムラサキガイおよびアサリを含めた貝類では、10 定点のうち 6 定点から *V. v* が検出された。したがって、海中の砂の中で *V. v* が定着・増殖するという状況は今回の調査では得られなかった。

貝類から高い頻度で *V. v* が検出されたことから、*V. v* が貝類に付着あるいは体内に取り込まれていることが推測された。これにより、*V. v* の生態において貝類が重要である可能性があり、また、貝類の検査対象としての有用性やピブリオ・バルニフィカス症の発生に関連して貝類に対する注意が魚類と同様に必要であることが示された。本調査では、貝類からの検出頻度が砂よりも高かったのみならず、相模湾で捕獲された魚介類よりも検出頻度が高いことも示された。米国の CDC ではピブリオ・バルニフィカス症の発生は貝類の生食と関連があるとしており、当該菌の感染症発生時の感染経路の調査には貝類の摂食にも注目する必要があると考えられる。

*V. v* の分布と対比させる目的で *V. p* の検出も同時に行ったが、*V. v* に比べて明らかに高い頻度で *V. p* が各検体から検出された。また、*V. p* の菌数と *V. v* の検出の有無には関連はみられなかった。特に魚介類の調査では、*V. v* はアジ類の 2 検体 (2.6%) から検出されたが、*V. p* の 48.7% と比較するとかなり低い結果であった。*V. v* が検出されたアジ類はマメアジとコアジという品名で販売されていたもので、沿岸に生息していたアジであることが推測された。海中における *V. p* と *V. v* の分布域の違いや分布域における海水温などの環境の違いといった要因が関連していることが予測されたが、これらについてはさらに調査する必要がある。

今回の調査で分離された *V. v* の O 群は、O1、O2、O3、O4 および O16 であった。このうち O4 群の検出頻度が最も高く、O4 群が優勢に分布していることが推測された。これに対して、イワガキからは O1 群のみが検出されたことから、検体数が少ないため今後の調査が必要ではあるが、何らかの選択圧がかかっている可能性が示された。

## E. まとめ

神奈川県内の海水浴場 11 ヶ所を定点として定め、海水、砂および海水浴場やその周辺に生息する貝類における *V. v* の分布状況を、2004 年 5 月から 9 月まで調べた。その結果、9 定点から *V. v* が検出され、神奈川県内の沿岸に *V. v* が広く分布していることが明らかになった。調査の対象とした海水、砂および貝類のうち、海水での検出頻度が最も高く、次

いで貝類であった。また、同期間に相模湾で捕獲された魚介類 78 検体から *V. v* の検出を試み、魚介類における当該菌の分布を調査したところ、アジ類の 2 検体 (2.6%) から検出されたに過ぎなかった。

分離株の O 群は O1、O2、O3、O4、O16 の 5 血清群に分布していたが、O4 群の検出頻度が最も高かった。これに対して、イワガキからは O1 群のみが分布しており、血清群により分布域が異なる可能性が示された。

表1 調査の対象とした検体の概要

検体	検体数
海水	43
砂	39
貝類	
イワガキ	27
ムラサキイガイ	13
アサリ	11
その他	8
魚類	78
計	219

魚類：アジ類、イカ、イサキ、イシモチ、イワシ類、カサゴ、カツオ類、カマス、サバ、トビウオ、メダイ類、その他の魚類（ホウボウ、メジナ、メバル、コチ、カワハギ、タチウオ、ムツ、タイ、ヒラメ、シタビラメ類、ブリ、シイラ、タカベおよびシラス、各1～2検体）

表 2 - 1 海水からの *V. vulnificus* および *V. parahaemolyticus* の検出

定点	調査実施月					
	5月	6月	7月	8月	9月	
横浜金沢 1	V. v <sup>a</sup>	<0.3 <sup>c</sup>	<0.3	0.6	<0.3	<0.3
	V. p <sup>b</sup>	<0.3	1.5	0.6	2.9	2.1
	水温 (°C)	19 <sup>d</sup>	22.5	29.5	28	27
	塩濃度 (%)	ND <sup>c</sup>	3.2 <sup>7</sup>	3.1	2.8	2.3
横浜金沢 2	V. v	<0.3	<0.3	<0.3	0.3	<0.3
	V. p	<0.3	0.9	1.1	2.9	0.4
	水温	21	24.5	30.7	29	28
	塩濃度	ND	3.1	3.0	3.0	2.8
横浜金沢 3	V. v	<0.3	<0.3	<0.3	0.6	0.3
	V. p	0.4	1.3	<0.3	>140	4.4
	水温	21	24.5	34	30	29.5
	塩濃度	ND	3.1	3.0	2.7	2.7
横浜金沢 4	V. v		0.3	<0.3	0.6	<0.3
	V. p		2.9	>140	29	3.6
	水温		22.5	29	26	26.5
	塩濃度		2.9	2.9	2.7	2.7
長浜	V. v		<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
	V. p		0.3	3.6	<0.3	<0.3
	水温		23	27.8	26	24.5
	塩濃度		2.9	3.1	3.0	3.0
森戸	V. v		<0.3	0.3	<0.3	<0.3
	V. p		160	53	3.5	<0.3
	水温		25	27.6	25.5	26.5
	塩濃度		3.1	3.0	3.1	3.2

a : *V. vulnificus*    b : *V. parahaemolyticus*    c : MPN/100ml

d : 測定せず

表 2 - 2 海水からの *V. vulnificus* および *V. parahaemolyticus* の検出

定点	調査実施月				
	5月	6月	7月	8月	9月
片瀬 1	V. v <sup>a</sup>		0.3 <sup>c</sup>	0.3	<0.3
	V. p <sup>b</sup>		0.9	0.9	0.6
	水温 (°C)		30	25	25
	塩濃度 (%)		3.0	3.0	2.8
片瀬 2	V. v	1.2	0.3	0.3	<0.3
	V. p	>140	0.9	0.3	0.3
	水温	27	30	25	24.5
	塩濃度	2.2	2.7	2.9	3.2
茅ヶ崎	V. v	<0.3	<0.3	<0.3	
	V. p	0.7	<0.3	1.5	
	水温	23.6	28.5	23	
	塩濃度	3.0	2.9	3.1	
大磯	V. v	<0.3	<0.3	0.3	
	V. p	2.7	1.6	1.1	
	水温	23	26.5	22.8	
	塩濃度	3.0	3.1	3.1	
小田原	V. v	<0.3	<0.3	<0.3	
	V. p	0.7	<0.3	<0.3	
	水温	21.5	23.5	23.5	
	塩濃度	2.5	2.8	3.0	

a : *V. vulnificus*      b : *V. parahaemolyticus*      c : MPN/100ml



表3 海水浴場の砂からの *V. vulnificus* および *V. parahaemolyticus* の検出

定点		調査実施月				
		5月	6月	7月	8月	9月
横浜金沢1	V. v <sup>a</sup>	<3 <sup>c</sup>	<3	<3	<3	<3
	V. p <sup>b</sup>	6.2	20	9.3	9.0	6.2
横浜金沢2	V. v	<3	<3	<3	<3	<3
	V. p	<3	19.0	9.2	9.4	15.0
横浜金沢3	V. v	<3	<3	<3	<3	<3
	V. p	6.1	29.0	6.1	29.0	29.0
長浜	V. v		<3	<3	<3	<3
	V. p		<3	3.0	<3	<3
森戸	V. v		<3	<3	<3	<3
	V. p		21	7.2	<3	3.0
片瀬1	V. v			3.0	<3	<3
	V. p			3.0	<3	6.2
片瀬2	V. v		6.2	3.0	3.6	<3
	V. p		1100	3.0	<3	<3
茅ヶ崎	V. v		<3	<3	<3	
	V. p		<3	<3	<3	
大磯	V. v		<3	<3	3.0	
	V. p		<3	3.6	<3	
小田原	V. v		<3	<3	<3	
	V. p		<3	3.0	4.0	

a : *V. vulnificus*    b : *V. parahaemolyticus*    c : MPN/100 g

表4 海水浴場およびその周辺に生息する貝類（イワガキ）からの *V. vulnificus* および *V. parahaemolyticus* の検出

定点		調査実施月				
		5月	6月	7月	8月	9月
横浜金沢3	V. v <sup>a</sup>	<3 <sup>c</sup>	<3	<3	<3	<3
	V. p <sup>b</sup>	6.1	7.3	<3	>1400	19
横浜金沢4	V. v	<3	<3	<3	9.3	9.2
	V. p	<3	20	>1400	15	19
長浜	V. v		<3	<3	3	<3
	V. p		3	6	3	7.2
森戸	V. v		<3	<3	<3	
	V. p		3	<3	3	
片瀬2	V. v		3	6.2	<3	<3
	V. p		>1400	16	3	<3
茅ヶ崎	V. v		<3	<3	<3	
	V. p		6.2	20	<3	
小田原	V. v		<3	<3	<3	
	V. p		9.3	1100	44	

a : *V. vulnificus*      b : *V. parahaemolyticus*      c : MPN/100 g

表5 海水浴場およびその周辺に生息する貝類（ムラサキイガイ）からの *V. vulnificus* および *V. parahaemolyticus* の検出

定点		調査実施月				
		5月	6月	7月	8月	9月
横浜金沢1	V. v <sup>a</sup>	<3 <sup>c</sup>	3	<3	3	<3
	V. p <sup>b</sup>	6.1	20	6	13	16
横浜金沢3	V. v	<3				
	V. p	13				
横浜金沢4	V. v	<3				
	V. p	3.0				
茅ヶ崎	V. v		<3	<3	<3	
	V. p		11.0	6.2	<3	
大磯	V. v		<3	<3	<3	
	V. p		29	6.1	6.2	

a : *V. vulnificus*      b : *V. parahaemolyticus*      c : MPN/100 g

表6 海水浴場およびその周辺に生息する貝類（アサリなど）からの *V. vulnificus* および *V. parahaemolyticus* の検出

定点	調査実施月				
	5月	6月	7月	8月	9月
アサリ					
横浜金沢1	<i>V. v</i> <sup>a</sup> <3 <sup>c</sup>				
	<i>V. p</i> <sup>b</sup> 3.0 <sup>4</sup>				
横浜金沢2	<i>V. v</i> <3	3.0	<3	<3	<3
	<i>V. p</i> <3	7.4	9.4	11	<3
横浜金沢3	<i>V. v</i> <3	<3	<3	<3	3.0
	<i>V. p</i> 7.3	24	16	6.2	>1400
カガミガイ					
横浜金沢2	<i>V. v</i> <3	<3		<3	<3
	<i>V. p</i> 9.1	9.3		<3	3.0
横浜金沢3	<i>V. v</i> <3		<3		
	<i>V. p</i> <3		3.6		
バカガイ					
横浜金沢3	<i>V. v</i>		<3		
	<i>V. p</i>		13.0		
ホラガイ					
森戸	<i>V. v</i>				<3
	<i>V. p</i>				<3

a : *V. vulnificus*    b : *V. parahaemolyticus*    c : MPN/100 g

表7 神奈川県内の調査定点から分離された *V. vulnificus* の血清群の分布

検体	定点	血清群					
		1	2	3	4	16	UT
海水	横浜金沢2				+		
	横浜金沢3				+	+	
	横浜金沢4	+	+		+		
	森戸		+				
	片瀬1				+		+
	片瀬2		+	+	+		
	大磯				+		
砂	横浜金沢3				+		
	片瀬1						+
	片瀬2	+	+				+
	大磯						+
イワガキ	横浜金沢3	+					
	横浜金沢4	+					
	長浜	+					
	片瀬2	+					
ムサシガイ	横浜金沢2				+		
	アサリ				+		
	横浜金沢3	+					
カミガイ	横浜金沢1				+		

平成16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)  
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、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。患者由来株と環境由来株の染色体構造を比較することにより、患者由来株の特徴を明らかにできるものと期待される。制限酵素切断パターンにより染色体DNAの全体像をとらえられるパルスフィールド電気泳動(PFGE)法を用い解析を行ったところ、患者由来株間において類似のパターンが、異なる分離年、分離地でも認められたことから、感染性の高い株と考えられるものが存在する可能性を示唆していた。しかし、環境由来株には患者由来株と類似のパターンを示すものは見いだせなかった。

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-hemolysin<sup>1)</sup>や金属プロテアーゼ<sup>2)</sup>、ホスホリパーゼ<sup>3)</sup>、siderophore<sup>4)</sup>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。

本研究班の報告によれば、日本沿岸の汽水域など環境中からは夏場を中心として *V. vulnificus* が多数分離されている。環境の汚染度に対する患者の発生率は、同じ

汽水域を生息域としている腸炎ビブリオと比較しても極めて少ないといえる。環境中から分離される *V. vulnificus* がすべて病原性を持っているかどうかは、病原性が明らかとなっていないため現時点では知ることができない。

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。

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、血中での菌増殖に関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<sup>5)</sup>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*<sup>6)</sup> や *V. parahaemolyticus*<sup>7)</sup> 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<sup>8)</sup>、病原因子の特定には至っていない。したがって、ゲノム構造そのものを対象として患者由来株と環境由来株を比較し、患者由来株すなわち病原性株の特徴を探るべくパルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis; PFGE) 法により解析を行った。

### 1. 供試菌株

供試菌株は、*V. vulnificus* の ATCC の基準株と、各血清群の標準株<sup>9)</sup>。患者由来株 23 株、環境由来株 21 株 (表 1)。

### 2. PFGE

#### <plug mold の作成>

各菌株を trypticase soy agar に植え、単独集落を選択した。200  $\mu$ l の蒸留水に約 1  $\mu$ l ルーペ一杯分の菌を懸濁し、同量の 1% SeaKem Gold agarose と良く混和し、plug mold (Bio-Rad) に流し込み成形させた。

#### <溶菌反応>

菌体が包埋された agarose plug を 1 mg/ml リゾチームの 0.5 M EDTA (pH 8.0)

溶液 1 ml に入れ、37°C で 4 時間以上穏やかに振盪しながら反応させた。

リゾチーム液を捨て、1 mg/ml proteinase K の 0.5 M EDTA (pH 8.0) 溶液 1 ml を加え、50°C 一夜穏やかに振盪しながら反応させた。反応後の plug mold の入った反応液をそのまま 4°C で保存した。

#### <制限酵素反応>

Agarose plug を 1 mM PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) の TE buffer (pH 8.0) 1 ml に入れ、50°C で 1 時間穏やかに振盪しながら 2 回洗浄した。さらに PMSF の含まれていない TE buffer (pH 8.0) 1 ml で 50°C で 30 分穏やかに振盪しながら 2 回洗浄した。

Agarose plug を酵素反応用の buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0) 200  $\mu$ l に入れ、0°C で 30 分穏やかに振盪しながら 2 回平衡化した。0.01% BSA を含む同様の buffer に制限酵素 *NotI* を 20 units (40 units/ $\mu$ l) を加え、37°C で一夜反応させた。

#### <電気泳動>

1% SeaKem Gold agarose を支持体とし、50  $\mu$ M チオ尿素を含む 0.5 x TBE buffer、CHEF DRIII (Bio-Rad) 電気泳動槽を用い 6 V/cm 定電圧、通電角度 120 度、14°C で電気泳動を行った。Pulse time は 4.0 秒 - 8.0 秒を 9 時間、その後 8.0 秒 - 50 秒を 11 時間で行った。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* の病原性は菌の産生する溶血毒やプロテアーゼ等が関係しているとされているが、いまだ直接的作用が明らかになっているものはない。

患者から分離された株と環境から分離された株の染色体構造を調べることにより、ヒトに感染あるいは本感染症の発症等に関連する遺伝子領域に差異が見られるのではないかと予想される。

本研究では、近年、細菌感染症の疫学解析に広く利用されるようになったパルスフィールドゲル電気泳動(pulsed-field gel electrophoresis; PFGE)法を用い、ゲノム構造の解析および比較をそのバンドパターン(restriction fragment length polymorphism; RFLP)を元に行った。

2001年より2004年までに感染研に送付された患者由来株は27株あり、その半数が熊本での発生(14株)で、それ以外では新潟、岡山、静岡、東京、島根での分離株であった。

その血清型は、04が14株と半数を占め、次いで、07が6株、01が4株、05、06、012がそれぞれ1株ずつであった。

環境由来株は、およそ1,500株の中から患者由来株に多かった04、01を中心に22株を選択した。

参照株は、患者由来株に多い01~07を対象とした(表1)。

制限酵素は部分消化が出にくく、切断断片数も少ない*NotI*のみを使用した。

#### <参照株>

参照株のバンドパターンを見てわかるように(図1)、大腸菌や腸炎ビブリオでも明らかになっているように、血清型が異なると、PFGEのバンドパターン(RFLP)も異なるという点に関しては、*V. vulnificus*でも同様であった。

#### <血清型04株>

血清型04株について制限酵素*NotI*によるPFGE-RFLPを見てみると(図2)、526-01と527-01はバンド2本ほどの差であり、同じ菌による感染であることが示唆される。また、523-01も526-01と比較して、バンド7本ほどの差はあるもののかなり似たパターンであるといえる。これらは同一年(2001年)の同一地域(熊本県)での発生であることから、由来の同じ株であることが強く示唆される。589-02株は岡山県での分離株であるが、526-01株とバンド4本ほどの差であり、ゲノム構造は

かなり類似しているものと考えられる。よく似た株が患者から多く分離されるということは、これらはヒトに対する感染性の高い株である可能性を強く示唆するものであった。

526-01株とはかなりパターンは異なるが、525-01と256-02も分離年は異なっているが、バンド4本ほどの差であり、同じ由来の株である可能性が高い。

その他の患者由来株にはこれらと類似パターンを示すものはなかった。

また、環境由来株には患者由来株のどの株とも類似のパターンを示すものはなかった。267-02と269-02は完全に一致したパターンを示したが、両者は同一地域(宮城県)で同じ日の同じ材料から分離したものであり、同じ菌による汚染材料と思われる。

なお、91-04、92-04は同一患者からの検体の別集落の菌株であるためバンドパターンは完全に一致していた(バンドパターンは割愛)。これらのことは逆にPFGE-RFLPが極めて再現性の良く菌株同士を型別するために応用可能かを示している。

#### <血清型04以外の分離株>(図3)

血清型01、07は複数の株が分離されていたので、それぞれを比較することは可能であったが、341-03と342-03が完全に一致したパターンを示していた以外はバンドパターンはそれぞれかなり異なっていた。341-03、342-03は患者由来としか情報がないため、別患者で同一菌株由来の感染であるかはわからない。

バンドパターンの違いを見るとバンド位置の異なっている部分が多いので、菌株としては近縁とは言えないかもしれないが、バンド位置が一致している部分に着目すると、14-03と529-01は血清型が異なっているにも関わらず(それぞれ01と07)、比較的類似したパターンを示していた。

環境由来株は1株を除きスメアとなり解析不能であった(「D.考察」参照)。

#### <ゲノム解析完了株>



*V. vulnificus* はすでに 2 株の臨床株が韓国と台湾のグループによりそれぞれ全ゲノムの塩基配列が解読されている。その塩基配列を元に *NotI* で酵素切断パターンを図示してみた (図 4)。血清型別はされていないので、血清型は不明であるが、それぞれに全く異なった PFGE-RFLP パターンとなった。また、今回行った実検体のパターンともバンドサイズを元に比較してみたが、類似のパターンのもの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<sup>10)</sup>。

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* 属菌で見ると、*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。

本研究では、患者由来株と環境由来株のゲノム構造を解析すべく、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法を用いて、それぞれのバンドパターン (RFLP) に類似性がないかを解析した。

血清型参照株について見てみると、大腸菌や腸炎ビブリオの結果から予想されたように、血清型の異なる菌株についてはその PFGE-RFLP パターンも異なっていた。したがって、PFGE-RFLP による解析を行う場合は同一血清型内で比較を行わないといけない。

本感染症は基礎疾患を持つヒトにしか発症しないためか、いわゆる集団発生といわれる事例はこれまで見られたことがない。個々の事例が異なるため同一菌株による発症事例は少数であるかもしれないが、腸炎ビブリオ 03:K6 株や大腸菌 0157:H7 株などのように流行株では、散发例においても分離株はほとんど同一、あるいは極めてよく似た PFGE-RFLP パターンを示す。患者由来株、計 27 株の半数は血清型 04 で占められており、病原性株が特定の血清型に偏る傾向は *V. vulnificus* においても存在するのかもしれない。しかし、血清型 04 の PFGE-RFLP パターンが同一あるいは極めてよく似た株は同一患者の別集落の株 (91-04、92-04) 以外には認められなかった。また、環境由来株にも患者由来株と PFGE-RFLP パターンが同一あるいは極めてよく似た株は認められなかった。

*V. vulnificus* 感染症は宿主の基礎疾患の有無に影響される部分が強いと考えられることから、由来を同じくするある特定の菌株による流行ではなくて、宿主側の要因によるものとも考えられる。健康な人では経口的に入った病原体は下痢を発症することもないことから、腸管での増殖や腸

管への侵襲が起こらず、なんら症状を示さないが、肝疾患患者では腸管内での *V. vulnificus* の動態が異なっていることが考えられる。

病原体側から見てみると、この菌自体の変異が早く、PFGE-RFLP パターンに多くの差異が出現するのかもしれない。あるいは、元々病原性株が多種類存在し環境を汚染していたとも考えられる。コレラ菌や腸炎ビブリオの流行株に極めて変異が少ないことを考えると、同じ *Vibrio* 属の *V. vulnificus* だけが変異しやすいとする前者の仮定は考えにくい。後者の場合においては、病原因子の有無が原因となるかどうかを規定することになるが、病原性が明らかになっていないため病原性に基づく菌の探索はできない。

病原因子は明らかとなっていないが、病原性を司る領域が保存、保持されていると考えて、PFGE-RFLP パターンで違いのある部分ではなく、共通性のある部分に着目して見直してみた。526-01 を基準として PFGE-RFLP パターンの類似する菌株を見てみると、523-01、527-01 は同一時期、同一地域の分離なので同一の汚染に由来すると考えることもできるが、589-02 は分離年も分離地域も異なっており、異なった環境に由来する菌株である。また、525-01 と 256-02 は分離地域は同じであるが、分離年が異なっている。同じ由来の菌が長く存在していたにしても、冬季間は環境中から *V. vulnificus* が検出されないことを考えると、耐寒性のある菌であるとも考えられない。

これらの PFGE-RFLP パターンに共通性を持つ株には病原性においても何らかの共通性があるものと考えられ、患者からの分離率が高い、すなわちより感染性が高いのではないかと推察される。PFGE-RFLP パターンでの共通バンドにその病原性を担う領域があるのではないかと考えられる。

04 以外の血清型の患者由来株の PFGE-RFLP パターンにおいても、同一あるいは極めてよく似た株は見られなかった (341-03、342-03 は同一のパターンであ

ったが患者情報などの詳細不明)。環境由来株については、1 株以外はスメアとなり、患者由来株との比較はできなかった。

04 血清型の株同様に共通性という観点から PFGE-RFLP パターンを見てみると、14-03 と 529-01 に共通バンドが認められた。両者は分離年も分離地域も異なっているだけでなく、血清型も 01 と 07 で異なっていた。新興型腸炎ビブリオと呼ばれる血清型 03:K6 株は、その後に発生した 04:K68 等とは PFGE-RFLP パターンがほとんど同一か極めて類似のパターンを示しており、*V. vulnificus* においても同様の現象が見られるのかもしれない。

今回、環境由来株のいくつかは PFGE-RFLP 解析ではバンドパターンの見られないスメアとなってしまった。これは高電圧による電気泳動中にバッファーにラジカルが発生し、DNA がそのラジカルによって分解を受けやすくなっている事によっても起こる。今回はそれを防止するためにチオ尿素を添加してあったが、バンドパターンの見られる株すべてにおいても低分子領域にスメアが重なった (図 1、2、3)。ラジカルの発生を抑制してもスメアになったのは、電気泳動以前にすでに分解していたものと考えられ、染色体 DNA 調製時に菌が持つ DNA 分解酵素によって消化を受けたものと推察される。

以上のように、PFGE-RFLP 解析によって患者由来株と環境由来株との病原性に関連する差異を見いだすことはできなかったが、患者由来株には共通性が見られる株の存在することが明らかとなり、病原性との関連を強く示唆しているのではないかと考えられた。共通性のある部分をより詳細に調べることにより、*V. vulnificus* の病原性を探る手がかりが得られるものと期待される。

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、肝疾患と重症化には因果関係が推察される。

しかしながら、本感染症が他の細菌感染症と異なるのは *V. vulnificus* が経口的に摂取された後、健康なヒトには下痢症状すら示さないのに、肝疾患を持つヒトが感染すると多くが四肢の壊死を伴う敗血症に移行する点である。すなわち、*V. vulnificus* 固有の作用があるものと考えられる。

今回の PFGE-RFLP パターンの比較によって患者由来株同士でも類似性の低いことがわかり、環境由来株との間には類似性を示すものは見られなかった。米国や台湾のグループの報告でも PFGE-RFLP 解析で各株間の類似性は低く、相同性が 75% 以上の株は全体の 2 割にも満たない<sup>11)12)</sup>。

腸炎ビブリオでの O3:K6 等と同様に *V. vulnificus* にも莢膜が存在しているので、菌体抗原 (O 抗原) だけでなく、莢膜抗原 (K 抗原) による血清型の組み合わせを用いれば、血清型を限定した詳細な解析ができるのかもしれない。

本研究班の環境調査によると、汽水域から *V. vulnificus* が多数分離されているとの報告があるが、環境中の菌がヒトに感染性を持つかどうかについては、病原因子が明らかでないため特定をすることができない。また、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。すなわち、患者由来株で見られた PFGE-RFLP パターンでの共通バンドに病原性を担う遺伝子がコードされていることが考えられる。

今後 PFGE-RFLP 解析で得られた患者由来株に見られた共通バンドを詳細に調べることにより、病原性の解明に結びつくものと期待される。

## 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 the rmlysin 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)

11. Tamplin ML, et al.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis and  
Ribotype Profiles of Clinical and  
Environmental *Vibrio vulnificus*  
Isolates.

Appl Environ Microbiol 62(10): 3572-8  
0(1996)

12. Wong H-C, et al.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis  
Analysis of *Vibrio vulnificus* Strains  
Isolated from Taiwan and the  
United States.

Appl Environ Microbiol 70(9): 5153-58  
(2004)