

2004-00629B

厚生労働科学研究補助金

新興再興感染症研究事業

ビブリオ・ハルニフィクスによる重篤な経口感染症に関する研究

平成14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 山本 茂貴

国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

平成17（2005）年3月

## 目 次

### I. 総合研究報告書

ビブリオ・バルフィウスによる重篤な経口感染症に関する研究	1
主任研究者 山本茂貴	
(資料) 平成14年度総括研究報告書	
(資料) 平成15年度総括研究報告書	
(資料) 平成16年度総括研究報告書	
(資料) 分担・協力研究報告書(平成14年度～平成16年度の3年間まとめ)	
1. <i>Vibrio vulnificus</i> 感染症の臨床的研究	23
分担研究者 小野友道	
2. 熊本県内の <i>Vibrio vulnificus</i> に関する研究	25
研究協力者 宮坂次郎、八尋俊輔、荒平雄二、甲木和子	
3. 熊本県内の <i>Vibrio vulnificus</i> 感染事例(2001～2004年)	39
研究協力者 宮坂次郎、八尋俊輔、荒平雄二、甲木和子	
4. <i>Vibrio vulnificus</i> の検出法の検討及び魚介類や環境中の汚染度の検討	51
研究協力者 福島 博	
5. <i>Vibrio vulnificus</i> の患者株と環境株の遺伝型の比較	55
分担研究者 渡辺治雄	
研究協力者 荒川英二	

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

主任研究者 山本 茂貴 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

平成14年度～平成16年度の3年間に以下の研究を行った。

*Vibrio vulnificus* による重篤な感染症防止対策のための基礎的知見の収集と防止対策を検討する目的で研究し、以下の結果を得た。

1. 臨床・疫学的対応：1) アンケート調査を行い、Vv 感染症の発生状況を調査した。2) Vv 感染症の警告書と診断・治療ガイドラインを作成し、全国約 1000 施設に配布した。
2. 細菌学的対応：1) 全国5カ所（宮城、神奈川、広島、島根、熊本）における定点海域を5月から10月にかけて調査し、海泥では5～9月に、海砂では6～8月に、海水では6～9月に分離された。海水温度は20℃以上で分離された。貝類（アサリ、アオヤギ）は同様の時期に分離された。汽水域のエビ、あなご、すずきからも分離された。食中毒検体を調査したがVvは分離されなかった。2) アサリを $10^3 \sim 10^4$  Vv 添加海水中に20時間浸漬後、滅菌海水中に保存、1, 2, 3, 5日後の菌数を観察した。5℃および15℃保存のいずれも菌数はそれぞれ1%、3%に減少した。3) O1からO16の血清型がすべて分離されたが、特にO1, O4, O6が多く分離された。4) 病原性に関係すると考えられる遺伝子の保持状況を、患者由来株、環境由来株について、PFGE法やPCR-RFLP法を用いて解析した。PFGE法による解析で異なる年代、地域からの患者由来株間で類似のパターンが観察されたが、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が見いだせなかった。PCR-RFLP法ではviuB遺伝子を含めたシデロフォア産生に関わる遺伝子群について患者株間と環境由来株間で比較したところ、患者株において類似したRFLPパターンが確認された。5) マウスを用いた病原性評価法を開発した。

分担研究者

小野友道 熊本大学  
田村和満 国立感染症研究所  
渡辺治雄 国立感染症研究所  
岡部信彦 国立感染症研究所

A.研究目的

ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*; Vv) は、創傷感染による血疱を伴う皮膚炎や敗血症を引き起こす。一方、Vv が経口感染した場合には、一般健康人

では軽度の胃腸炎を起こす程度であるが、肝臓に慢性肝炎、肝硬変等の基礎疾患がある場合には敗血症に陥りその半数以上は死亡する重篤な感染を引き起こす事が知られている。しかしながら、Vv 感染症は届出感染症ではないため、その実態はほとんど知られていない。また、その診断・治療法について救急医療の現場で適応できるマニュアルが整備されていない。細菌学的にも環境中や魚介類での分布状態、病原因子と

肝疾患の有無による重症化の機構について不明な点が多く残されている。そこで平成16年度はVvによる重篤な感染症防止対策のための基礎的知見の収集と防止対策を検討する目的で研究した。

## B.研究方法

1. 臨床的対応：平成15年度の研究によって得られたビブリオ・バルニフィカス感染症患者107人についての個別は検査データおよび臨床像を収集した。71施設中、57施設より回答を得た。その回答結果および文献資料、実際に経験した症例を基に以下の診断と治療のガイドラインを作成した。

2. 細菌学的対応：1) Vvの魚介類および環境中の汚染実態調査本年度も5ヶ所の衛生研究所の協力のもとに5月～10月の期間実態調査をおこなった。2) Vvの血清学的研究：O1からO16までの血清型について患者由来および環境由来について検討した。3) *V. vulnificus*のヒト由来株に特異的遺伝子の検討：病原性遺伝子についてシデロフォア産生遺伝子であるviuB遺伝子について検討した。また、PFGE法で患者株及び環境由来株を解析した。

## C.研究結果

1. 臨床的対応：ビブリオ・バルニフィカス感染症の初発症状で最も多いのは発熱と疼痛であった。皮疹は多彩で、紅斑、紫斑、水疱、血疱、潰瘍などが混在し、また短い時間で皮疹が変化するのが特徴であった。基礎疾患としては、肝硬変を含めた肝機能障害の患者が84例中69例(82.1%)を占め、肝硬変の患者が50例(59.5%)で、内9例(10.7%)が肝癌を有する患者であった。その他の合併症としては糖尿病を有する患者が11例(13.1%)であった。以前の調査で報告したように、肝硬変の患

者、特に肝癌を合併する患者でのビブリオ・バルニフィカス感染症発症リスクは高いものと考えられる。

今回の調査ではその発症状況より、外傷より発症した創傷型の患者が15例確認された。殆どの患者が複数の抗生剤の投与による治療を受けており、89例中30例、約34%の患者がミノサイクリンの投与を受けていた。最も目立った抗生剤の投与法はイミペネム、パニペネム、メロペネムのカルバペネム系抗生剤とミノサイクリンの併用療法であり、一部、クリンダマイシンの投与併用も行われていた。

2. 細菌学的対応：1) アサリ、ハマグリ、カキ、アオヤギなどの二枚貝、汽水域に生息するエビ、アナゴやスズキからVvが分離された。海泥では5月から、海水では20℃を超える6月から9月に分離された。食中毒検体からVvの分離を試みたが分離されなかった。2) Vvの血清学的研究：O1からO16までの血清型が患者由来および環境由来のいずれかで観察された。その中でもO1,O4,O6が多く分離された。

3) *V. vulnificus*のヒト由来株に特異的遺伝子の検討：病原性遺伝子についてシデロフォア産生遺伝子であるviuB遺伝子について検討したところRFLPパターンが患者株間で類似しているものが確認された。また、PFGE法での解析でも患者株間で類似のパターンが観察されたが、環境由来株では類似のパターンが観察されなかった。

4) VVFP法の開発：ICRマウスのfootpadに*V. vulnificus*(患者株)を接種すると、3時間前後で浮腫が、6時間までに壊死が観察され、12～18時間目に全匹が死亡した。白血球数の減少、HT値の上昇、血中Fe値の上昇、血中菌数の上昇、CPK値の上昇が確認され、死亡直前の12時間目の肝臓にはアポトーシス誘導が確認された。患者株と環境株の病原性：VVFP法で検討した結

果、患者株では 12~18 時間目に全匹が死亡したが、環境株で保存株の場合には壊死発生とマウスの死亡は全く観察されなかった。しかしながら、新鮮分離の環境株を使った場合には、患者同様の死亡が観察される例があった。

#### D. 考察

平成 15 年度の全国調査、その後の追跡調査によって 5 年間に 107 例のビブリオ・バルニフィカス感染症を確認した。平成 16 年度は確認できた症例についての個別データを集積し、それを基に診断と治療マニュアルを作成し、アンケートに協力いただいた全国の約 1000 の病院に対して配布する。

ビブリオ・バルニフィカス感染症の診断においては皮疹が最も重要である。今回の調査では消化器型以外の症例では殆どが皮疹を認めている。ちなみに、初診時の皮疹面積の評価が可能であった 41 症例についての検討では体表面積の 10 %を超える皮疹があった敗血症型 22 症例中、救命できたのは 2 例のみであった。病気の正確上、血液培養や創部培養の結果を待つて抗生物質を投与するのでは手遅れになる可能性が高い。そのため、臨床所見によってビブリオ・バルニフィカス感染症を疑った場合には可及的速やかに抗生物質を投与することが肝要である。

我々は、皮疹を以下の 4 型に分類した。つまり、紅斑型、紫斑型、水疱・血疱型、壊死型である。勿論、病期によって紅斑→紫斑→水疱→壊死と進行していくので、全ての病型をとる症例も少なくない。紅斑型：殆どの症例が紅斑、腫脹で発症している。紫斑型：紅斑と混在することが殆どであるが、早期に静脈系に血栓や塞栓を形成し、広い範囲にリンパ肝炎様の紫斑を認めることがある。水疱・血疱型：ビブリオ・バルニフィカス感染症に最も特徴的な皮疹の 1

つである。鑑別を要する A 群溶連菌や *Aeromonas* 属の壊死性筋膜炎では水疱を認めることは殆どない。ガス壊疽の場合には水疱、膿疱を認めるが、独特の腐敗臭によって鑑別が可能である。特に、敗血症を起こして、菌が全身に散布される時には原発創から離れた部位に張満性水疱を認めることがある。また、この水疱内容液から高率に *Vibrio vulnificus* を培養できる。潰瘍型：紅斑や紫斑の中心部に組織壊死、潰瘍を形成することがある。

施設によって抗生物質の選択法は異なっていたが、70 %以上の症例で 2 剤以上の多剤併用療法を受けていた。抗生物質の違いによる臨床効果の判断には至らないが、*in vitro* において *Vibrio vulnificus* に感受性が高いとされているセフトリアキソン (CTRX) を使用した例は一例しかなかった。また、環境株では耐性菌が目立つホスホマイシン (FOM) を使用された例が 4 例あった。これらは、*Vibrio vulnificus* に対する認知度の低さによるものではないかと考えている。最も多く行われているのが、カルバペネム系抗生剤とミノサイクリンの併用である。これは、皮膚への移行性が良好で、腎排泄のカルバペネムへの期待が大きいことと、海外論文の中にミノマイシンが効果的であるとするものが多いためではないかと思われる。我々も、第一選択はカルバペネム+ミノサイクリンの治療である。

今回の研究によって 46 %の患者がデブ利多メンや下肢切断術の手術を受けていたことが分かった。生命予後は手術を行わなかった方が良好であったが、これは、手術の適応になる患者に重症の患者が多いためと推察される。ビブリオ・バルニフィカス感染症の手術の適応については様々な意見があり、統一された見解はないのが実情である。しかしながら、皮疹が限局された範

囲に止まっている場合や外傷型の場合には積極的に手術療法を考慮する必要があると考えている。その他の補助療法としては、免疫グロブリンや持続的血液濾過透析(CHDF)療法を行った症例が確認できた。我々も、重症の患者に対してはどちらの治療も考えている。しかし、共に高価な治療法であり、その適応を厳密に判断する必要があると考えている。

ビブリオ・バルニフィカス感染症は急激に病変が拡大し、予後不良の疾患である。ただし、菌自体は殆どの抗生物質に高感受性を示す。従って、診断と治療が早い時期であれば、かなりの患者を救命できる可能性がある。以下に2004年度に熊本で発生した2例の経過を示す。

#### 症例1

58歳男性。既往歴：アルコール性肝障害。病歴：2004年6月15日夜にコノシロの刺身を食べた。6月17日朝、玄関先で倒れていたところを隣人が発見し、近医へ搬送した。受診時に下肢に紅斑を認めたので、湿布のみを行い帰宅した。6月18日に再診し、下肢の腫脹と発熱が見られたので、救急病院へ搬送し、熊本大学病院へ転送を試みるも血圧低下のために断念した。抗生物質(IPM,MINO)を投与されるも、6月19日に永眠される。

#### 症例2

66歳男性。既往歴：B型肝炎、糖尿病。病歴：2004年9月19日の夜にアジとブリの刺身を食べた。20日21時頃に発熱した。21日朝に下肢の腫脹に気付き、救急病院を受診した。直ちに、抗生物質(IPM,MINO)の投与を行い、ヘリコプターにて熊本大学病院へ搬送した。13時に熊本大学病院ICUへ入室。以後、抗生物質投与にて回復し、1ヵ月後に退院となった。この2症例については、同じ地域に居住しており、受診した救急病院も同じである。

症例1では、魚の生食より48時間以上、発症から、24時間以上を経て抗生物質を投与されている。それに対して、症例2では魚の生食より36時間、発症より12時間で抗生物質の投与を受けている。基礎疾患の重軽によってビブリオ・バルニフィカス感染症では予後が大きく異なるが、この2症例では症例2の方が、ウイルス性肝炎と糖尿病を有しており、また年齢的にも8歳年長であった。同じ医師(内科医)が診察しているが、症例1受診時にはビブリオ・バルニフィカス感染症に関して、全く認知していなかった。しかしながら、症例2については、初診時よりビブリオ・バルニフィカス感染症を疑い、緊急ヘリの出動を要請している。このことから医師のビブリオ・バルニフィカス感染症に対する認知度を向上させることが、救命率を上げるために、是非とも必要であると考えている。

#### E.結論

ビブリオ・バルニフィカス感染症の診断・治療について最も重要なことは早期診断・早期治療である。菌の爆発的な増殖力(ダブルタイム7分)より、抗生剤投与が1~2時間遅れることが致命的な結果に結びつく疾患である。そこで、診察した医師が早期に診断して、適切な処置をとる必要がある。しかしながら、救急医を含めた一般の医師においては、ビブリオ・バルニフィカス感染症に対する認知度が低いのが現実である。ビブリオ・バルニフィカス感染症の発生は九州に多く、特に有明海沿岸に集中している印象がある。気候や環境から考えて、この結果は納得いくものである。しかしながら、類似の地域は全国的にはめずらしくないと考えられる。例えば、山陰の宍道湖、中海周囲は、夏季の海水温は20℃を超え、塩分濃度も1%以下の汽水

域である。実際、海水調査においては、高率に *vibrio vulnificus* が確認されている。しかしながら、臨床研究において、1999年から2003年までに島根県や鳥取県ではその発生が確認できなかった。これは、実際に発生した患者が、診断されないままに治療され、亡くなっている可能性があるのではないかと考えられる。全国的な規模での海水調査がされていないので、*vibrio vulnificus* の分布については不明な点が多いが、夏季には全国の海岸で *vibrio vulnificus* が増殖している可能性が高く、潜在的な患者数は相当数に上るのではないと思われる。これを、是正するためには、皮膚科、救急だけではなく、家庭医も含めた広い範囲の医師に対するビブリオ・バルニフィカス感染症の認知が重要と考えられる。

#### F.健康危険情報

肝臓に基礎疾患のある人は海水温が20℃以上の海域からとれた魚貝類の生食をしないこと

#### G.研究発表

##### 学会発表

1. 井上雄二、福島聡、木下順弘、小野友道 *Vibrio Vulnificus* 感染症の全国的サーベイランスについて第102回日本皮膚科学会総会、2004年4月16日～18日、京都
  2. 井上雄二、福島聡、木下順弘、小野友道 日本における *vibrio vulnificus* 感染症の発生状況について— 1999～2003年の全国アンケート調査を中心に—第38回腸炎ビブリオシンポジウム、2004年11月18日～19日、岡山
  3. 井上雄二<sup>1</sup>、宮坂次郎<sup>2</sup>、甲木和子<sup>2</sup>、古垣斉拵<sup>3</sup>、小野友道<sup>1</sup> 12月の奄美大島で発生した *vibrio vulnificus* 感染症
- と思われる一例日本皮膚科学会第40回沖縄地方会、2005年2月19～20日、那覇
4. 井上雄二 壊死性筋膜炎の早期診断と治療 第103回日本皮膚科学会総会「緊急性皮膚疾患についてのシンポジウム」2005年4月22～24日、横浜

##### 論文発表

1. 小野友道、*vibrio vulnificus* 感染症—肝硬変患者は夏、生の魚介類は避ける—、Medical Practice 21巻7号
2. Yuji Inoue, Tamano Matui and Tomomichi Ono, An outbreak of *Vibrio Vulnificus* Infection in Kumamoto, Japan, 2001 Archives of Dermatology Vol 140 No 7, 888-889, 2004
3. 井上雄二、三宅大我、藤澤明彦、宮坂次郎、甲木和子、小野友道 外傷性 *vibrio vulnificus* 感染症 皮膚病診療 Vol. 26, No.10, 1289-1292, 2004
4. 井上雄二 *Vibrio vulnificus* 感染症 infection and technology Vol 3 15-16, 2004
5. *Vibrio vulnificus* 感染症の診断と治療 マニュアル (印刷中)
6. Yuji Inoue<sup>1</sup>, Jiro Miyasaka<sup>2</sup>, Kazuko Katuki<sup>2</sup>, Narihiro Furugaki<sup>3</sup>, Tomomichi Ono<sup>1</sup>  
A case of suspected *vibrio vulnificus* infection in the winter season (JD 投稿中)

H.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)  
なし

総括研究報告書

研究課題：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

主任研究者 山本茂貴（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部長）

研究要旨

1. *Vibrio vulnificus* (Vv)の臨床疫学的研究

1) Vvの認知度に関する調査研究

Vvの全国的な調査に基づいた公衆衛生上の重要性を評価する目的で緊急医を対象に、アンケート調査を行い、本感染症の認知度、ならびに、年間患者発生数を推定した。医師の認知度が15.7%（95%信頼区間11.3,21.0）、年間推定患者数は259例であった。また、内科医を対象に行った調査では、ハイリスクのグループである慢性肝疾患患者らに対する予防策を指導していたのは18.9%（95%信頼区間13.0、26.1）の医療機関のみであった。本研究によって、本症の重要性が認知され、今後、この感染症の診断と教育に関わる医師とハイリスクグループに対する啓発活動の必要性が示された。

2) 肝機能と疾病の重篤化に関する検討

1992年以降に日本で発症が報告されたビブリオ・バルニフィカス（Vv）感染症の患者151人について、診断治療を行った病院および主治医に対してアンケート調査および追跡調査を行った。特にVv感染症発症時および発症以前の肝機能障害の程度を中心に調査した。151人中72人について解答を得た。72人中、発症時に肝硬変と判定された患者は46人であった。残り26人の中には軽症のアルコール性肝炎と診断された患者も含まれていた。肝硬変患者46人中33人が死亡しており、死亡率は72%であった。初診時に肝硬変との診断がされなかった患者26人中で死亡したのは13人であり、死亡率は50%であった。つまり、肝硬変に陥っていない患者は肝硬変に陥っていた患者と比較すると明らかに予後は良好であった。Vv感染症は基礎疾患として肝機能障害を有する患者が発症する日和見感染であるが、その危険性は必ずしも重篤な肝機能障害に限られるものではない。しかしながら一旦発症した場合にはその予後を決定する重要な因子の一つは肝硬変の有無であることが示唆された。

2. Vvの細菌学的研究

1) Vvの分離法の検討及び魚介類や環境中の汚染度の検討

これまでに、我が国のVvの魚介類や環境中の実態調査は道家ら、大中らの報告があるが、これらは我が国の特定地域での実態調査報告である。これらの報告からはVvがどのような魚介類に汚染しているか、また、Vvの生息環境（塩分濃度、海水温度）等についての総括的な実態調査報告はない。したがって本研究はVvの環境中での実態を全国レベルで把握することを目的としている。

Vvの全国的な分布および検出時期、Vv汚染魚介類を調査した。その結果、(1) Vvは*Vibrio parahaemolyticus* (Vp)と同様に全国的に検出される。(2) Vpよりは塩分濃度の低い近海の汽水域に生息する。(3) 生存温度もVpよりは高く20℃以上の

海水温度で発育することが確認された。また、(4) Vv の検出時期は6月～10月で、(5) 魚種は魚より貝類の検出率が高い傾向が見られた。

#### 2) Vv の検査法の検討

従来より Vv の選択分離培地としては mCPC、SPS 培地または Vp の選択分離培地またはその改良培地が用いられていたが、以前からそれらのどの選択培地も選択抑制剤が含まれており、分離菌株に抑制的に作用する場合があることが知られていた。そこで、仮称 CBagar を開発し、より Vv の分離に適した培地が完成した。

#### 3) Vv の血清学的研究

Vv の疫学解析のために従来より O 抗原による O 群別法が用いられている。この O 抗原は現在 1～16 まで分かれているが、今日まで重篤な敗血症からの分離菌はすべて 1～7 の O 抗原に該当していた。一方、魚介類からの分離菌はそれ以外の血清型のものも認められた。

#### 4) Vv の分類学的再検討

Vv は乳糖を分解し Vp とは性状が異なることから、1979 年に Farmer が *V. vulnificus* と命名した。その後、本菌には 3 種類の亜種が報告されている。これらの亜種間及びその他のビブリオ菌種との同定のための鑑別性状は必ずしも明快ではない。新菌種が提案される場合、数値分類と遺伝学的分類の両手法の分類学的考察の一致によって行われる必要がある。現在、40 菌株を用い検討を進めている。

#### 5) 病原因子の検討

Vv の環境調査によると夏場の汽水域の海水から Vv が多数検出されることが明らかとなっている。しかしながら、検出された Vv がすべてヒトへの感染の原因になっているかは不明である。また、病原因子についても、ヒトへの病原性と明らかな関連性が証明されたものはまだ報告されていない。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については、すべての患者由来株およびほとんどの環境由来株がそれを保有しており、差が見られなかった。このことは、この溶血毒はヒトへの病原性が低いのか、あるいはすべての環境由来株が特定の人に病気を起こす能力があるのか判定ができないことを示唆していた。その他の金属プロテアーゼを含むタンパク分解酵素群、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。血清型参照株では、すべての血清群でいずれの遺伝子も検出された。この系を使って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さらに調査する必要がある。

#### 研究組織

##### 分担研究者

小野友道 (熊本大学・教授)

岡部信彦 (国立感染症研究所・センター長)

渡辺治雄 (国立感染症研究所・部長)

田村和満 (国立感染症研究所・室長)

#### A. 研究目的

ビブリオ・バルニフィカス感染症の原因菌である *Vibrio vulnificus* (以下 Vv) は、腸炎ビブリオと同じ *Vibrio* 属に属するグラム陰性桿菌で、好塩性で汽水域に生息する。Vv の病原性は弱く、健康人に感染症を起こすことは通常ないが、慢性肝疾患患

者や免疫不全者には致死的な感染症を起こしうる。感染経路は、1) 経口感染：Vv に汚染された海産物を生食すること、2) 創傷感染：創傷部を Vv の生息する汽水海水に曝すこと、の2つで、ヒト-ヒト感染はしない。発熱や激痛を伴う皮膚の紅斑や皮膚潰瘍で発症し、その後急激に進行して敗血症に至る。敗血症に至った場合の死亡率は 50 ~ 70%とエボラ出血熱並みに高率であるが、発症 24 時間以内に治療を開始することで死亡率を半減できる。しかし、進行が急激であることから、的確に対応するためには緊急治療用マニュアルが必要である。また、感染対策上のポイントは、発症の予防、すなわち、慢性肝疾患患者や免疫不全者らに、Vv が良く繁殖する夏期に、海産物の生食や創傷の汽水海水への暴露を控えさせることが肝要と考えられる。一方、魚介類を汚染する Vv のヒトへの病原性に関して十分な情報が得られていないため、予防的情報を発信するためにも魚介類など環境由来株の病原性を検討する必要がある。

以上のことから、本研究の目的は、(1) 疫学情報を整理すること、(2) 肝疾患と Vv 感染症の重篤化の関連性を明らかにすること、(3) 治療マニュアルを作成すること、さらに、細菌学的検討として (4) 分離培養法を検討すること、(5) 環境由来株と臨床由来株において病原因子の比較を行い、Vv による重篤な経口感染症を予防することとした。

## B. 研究方法

### 1. 臨床疫学的研究

1) Vv の認知度に関する疫学調査：全国の救急医師 8324 名から 386 名を無作為に抽出し、認知度並びに患者数の推計を行った。

2) 肝機能と疾病の重篤化に関する検討：

1992 年以降に日本で発症が報告された Vv 感染症患者 151 人について、診断治療を行った病院および主治医に対してアンケート調査および追跡調査を行った。

### 2. 細菌学的研究

1) 分離培地の検討：仮称 CBagar を作成し、選択増菌培地の性能について検討した。  
2) Vv 汚染状況の検討：平成 13 年 4 月から平成 15 年 2 月までの間に宮城、神奈川、島根、熊本の 4 カ所で行った。海水・海泥および市販魚介類としてアジ、アサリ、ホタテなどを対象としてそれぞれ 3 - 5 匹、20 個、2 個をプールして毎月 2 件ずつ Vv および *Vibrio parahaemolyticus* (以下 Vp) の汚染状況を調査した。また、海水については温度も測定した。使用した培地はアルカリペプトン水培地、TCBS、mCPC 等を用いた。訂正解析のみならず、MPN 法による定量解析も行った。分離菌株については O 抗原 1 - 7 型の血清型を調べた。

3) 病原因子の解析：Vv の産生する病原因子を遺伝学的に解析した。(1) BLAST homology 解析として鉄獲得能に関連する遺伝子 *vuuA*、*hupA*、金属プロテアーゼ *vvpE*、リン脂質分解酵素 *vpl* について他の *Vibrio* 属菌との相同性を検討した。上記の遺伝子領域からプライマーを設計し PCR 法で遺伝子の有無を検討した。予備的に PFGE の検討も行った。

## C. 研究結果

### 1. Vv の臨床疫学的研究

1) Vv の認知度に関する調査研究

Vv の全国的な調査に基づいた公衆衛生上の重要性を評価する目的で緊急医を対象に、アンケート調査を行い、本感染症の認知度、ならびに、年間患者発生数を推定した。医師の認知度が 15.7% (95%信頼区間 11.3, 21.0)、年間推定患者数は 259 例であ

った。また、内科医を対象に行った調査では、ハイリスクのグループである慢性肝疾患患者らに対する予防策を指導していたのは18.9% (95%信頼区間 13.0、26.1)の医療機関のみであった。本研究によって、本症の重要性が認知され、今後、この感染症の診断と教育に関わる医師とハイリスクグループに対する啓発活動の必要性が示された。

## 2) 肝機能と疾病の重篤化に関する検討

1992年以降に日本で発症が報告されたビブリオ・バルニフィカス (Vv) 感染症の患者151人について、診断治療を行った病院および主治医に対してアンケート調査および追跡調査を行った。特にVv感染症発症時および発症以前の肝機能障害の程度を中心に調査した。151人中72人について解答を得た。72人中、発症時に肝硬変と判定された患者は46人であった。残り26人の中には軽症のアルコール性肝炎と診断された患者も含まれていた。肝硬変患者46人中33人が死亡しており、死亡率は72%であった。初診時に肝硬変との診断がされなかった患者26人中で死亡したのは13人であり、死亡率は50%であった。つまり、肝硬変に陥っていない患者は肝硬変に陥っていた患者と比較すると明らかに予後は良好であった。Vv感染症は基礎疾患として肝機能障害を有する患者が発症する日和見感染であるが、その危険性は必ずしも重篤な肝機能障害に限られるものではない。しかしながら一旦発症した場合にはその予後を決定する重要な因子の一つは肝硬変の有無であることが示唆された。

## 2. Vvの細菌学的研究

### 1) Vvの分離法の検討及び魚介類や環境中の汚染度の検討

これまでに、我が国のVvの魚介類や環境中の実態調査は道家ら、大中らの報告が

あるが、これらは我が国の特定地域での実態調査報告である。これらの報告からはVvがどのような魚介類に汚染しているか、また、Vvの生息環境(塩分濃度、海水温度)等についての総括的な実態調査報告はない。したがって本研究はVvの環境中での実態を全国レベルで把握することを目的としている。

Vvの全国的な分布および検出時期、Vv汚染魚介類を調査した。その結果、(1)Vvは*Vibrio parahaemolyticus* (Vp)と同様に全国的に検出される。(2)Vpよりは塩分濃度の低い近海の汽水域に生息する。

(3)生存温度もVpよりは高く20℃以上の海水温度で発育することが確認された。また、(4)Vvの検出時期は6月～10月で、(5)魚種は魚より貝類の検出率が高い傾向が見られた。

### 2) Vvの検査法の検討

従来よりVvの選択分離培地としてはmCPC、SPS培地またはVpの選択分離培地またはその改良培地が用いられていたが、以前からそれらのどの選択培地も選択抑制剤が含まれており、分離菌株に抑制的に作用する可能性があることが知られていた。そこで、仮称CBagarを開発し、よりVvの分離に適した培地が完成した。

### 3) Vvの血清学的研究

Vvの疫学解析のために従来よりO抗原によるO群別法が用いられている。このO抗原は現在1～16まで分かれているが、今日まで重篤な敗血症からの分離菌はすべて1～7のO抗原に該当していた。一方、魚介類からの分離菌はそれ以外の血清型のものも認められた。

### 4) Vvの分類学的再検討

Vvは乳糖を分解しVpとは性状が異なることから、1979年にFarmerが*V. vulnificus*と命名した。その後、本菌には3種類の亜種が報告されている。これらの

亜種間及びその他のビブリオ菌種との同定のための鑑別性状は必ずしも明快ではない。新菌種が提案される場合、数値分類と遺伝学的分類の両手法の分類学的考察の一致によって行われる必要がある。現在、40菌株を用い検討を進めている。

#### 5) 病原因子の検討

Vv の環境調査によると夏場の汽水域の海水から Vv が多数検出されることが明らかとなっている。しかしながら、検出された Vv がすべてヒトへの感染の原因になっているかは不明である。また、病原因子についても、ヒトへの病原性と明らかな関連性が証明されたものはまだ報告されていない。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については、すべての患者由来株およびほとんどの環境由来株がそれを保有しており、差が見られなかった。このことは、この溶血毒はヒトへの病原性が低いのか、あるいはすべての環境由来株が特定の人に病気を起こす能力があるのか判定ができないことを示唆していた。その他の金属プロテアーゼを含むタンパク分解酵素群、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。血清型参照株では、すべての血清群でいずれの遺伝子も検出された。この系を使って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さらに調査する必要がある。

### D. 考察

#### 1. 臨床疫学的研究

1) 古城らの Vv 感染症本邦報告例のまとめによれば、Vv 感染症の死亡率は 68% (63/96) で、うち 56% (35/63) が発症後 3 日以内に死亡している。Vv はこのように死

亡率が高いが、発症後 24 時間以内に抗生物質を投与するなど適切な治療が行われた場合、Klontz らは、死亡率を半減 (65.6% から 33.3%) することができると報告している。

Vv の鑑別には劇症型溶血連鎖球菌症が挙げられる。Vv にはセフェム系やテトラサイクリン系抗生物質がより有効である、魚介類の生食や慢性肝疾患の有無を問診し、可能な限りグラム陰性桿菌の確認が有効である。

今回の調査で Vv 感染症の認知度は 15.7%であった。救急医を対象とした調査なので一般の医師の認知度はさらに低いと考えられた。

2) 発生が7月から9月に集中していた。男性が 80%を占め、肝硬変の後発年齢である 50 代にピークがあることから、肝障害が Vv 感染症の発症に大きく影響していると考えられた。基礎疾患としては、肝炎、特にウイルス性肝炎もリスクファクターと考えられた。

熊本と佐賀で全国の患者の 50%を占めていた。また、九州以外では三重県、岡山県、千葉県、栃木県で複数の患者を認めている。このことは内海において発生する可能性が高いことを示唆している。また、大雨は海水の塩分濃度を下げ Vv の増殖を促進する可能性がありリスクファクターの一つと考えられた。

#### 2. 細菌学的研究

1) 宮城県、神奈川県、島根県、熊本県のいずれも汽水域に Vv の生息が確認された。また、流通市販品からも Vv が検出された。今後これらの病原性に関して検討が必要と考えられた。

2) vvh、vvuA、vvpE、vpl 遺伝子はすべての株が保有しており、環境由来株と患者由来株の間で差は見いだせなかった。

## E. 結論

1) 医師に対する Vv 感染症の啓発活動が必要である。

内科医師などを通じて、Vv 感染症ハイリスク者への予防指導を徹底する必要がある。

Vv 感染症の感染源、ハイリスク者をより明確にする必要がある。

2) Vv 感染症は北海道を除くほぼ全国で確認されたが、ほとんどは九州、とりわけ有明海、八代海などの内海周囲で発生していた。患者のほとんどが肝障害などを有する日和見感染症である。しかしながら、その肝障害の程度としては肝硬変を合併するような重篤なものだけではなく、軽症な肝障害を有する患者においてもその発症が確認された。ただし、いったん発症した場合の予後は肝機能障害によるところが大きいと考えられた。

3) 調査した海域および魚介類に Vv 汚染を認めた。

4) 選択分離培地である仮称 CBagar を開発した。

5) 病原因子に環境由来株と患者由来株間で差がなかった。

## F. 健康危機情報

夏場において、Vv 感染症を引き起こす可能性があることから、肝疾患を有する患者が魚介類を生食するのは控えるべきである。内海で、大雨の降った後にとれた魚介類は特に注意が必要である。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Yuji Inoue, Tamano Matui, Tomomichi Ono. An outbreak of *Vibrio vulnificus* infection in Kumamoto, Japan. 2001. *Archive of Dermatology*.

### 学会発表

1. 小松崎眞、坂野晶司 救急医のビブリオバルニフィカス感染症に対する認知度調査、第 29 回日本救急医学会総会、2002

2. 井上雄二、松井珠乃、小野友道 *Vibrio vulnificus* 感染症患者の肝機能評価—アンケート調査を中心に—第 102 回日本皮膚科学会学術大会、2003 年 5 月東京

3. 荒川英二、田村和満 *Vibrio vulnificus* の細菌学的検査法について、第 23 回衛生微生物技術協議会、2002

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

総括研究報告書

研究課題：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

主任研究者 山本茂貴（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部長）

研究要旨

1. 臨床疫学的対応：1998年から2003年までの5年間におけるビブリオ・バルニフィカス感染症のサーベイランスを行った。皮膚科専門医施設および高度救急救命センターを含む全国の1693の医療施設に対してアンケート調査を行い、患者の情報を収集し、分析した。ビブリオ・バルニフィカス感染症の発生数は一年間で16例から24例と、年による大きな変動はなかった。発症は6月から10月までの5ヶ月間に限られ、冬場の発生報告はなかった。しかしながら、2004年1月に、奄美大島においてビブリオ・バルニフィカス感染症疑い例が確認された。そこで、奄美近海における *Vibrio vulnificus* の有無を調査し、奄美大島では冬場でも *Vv* が存在することが確認された。今回のサーベイランスにより、ビブリオ・バルニフィカス感染症発生危険地域として有明海沿岸の北部九州、東京湾沿岸、瀬戸内海北岸が考えられた。

2. 細菌学的対応：1) *Vv* の魚介類および環境中の汚染実態調査：本年度も4ヶ所の衛生研究所の協力のもとに5月～12月の期間実態調査をおこなった。また、今年度 *Vv* 感染が6例発生した熊本県保健環境科学研究所の調査ではその原因因子の疫学的解析、また魚介類が原因と推測された物についてはその後の追跡調査も合わせて継続調査した。島根県、宮城県及び熊本県で調査した結果、*Vv* の生存は定点場所に関係なく海水温度が20℃以上に上昇すれば検出され、*Vv* 陽性のMPN/100mlは平均 $10^1 \sim 10^2$ CFUで海水温度が高い時期では $10^3 \sim 10^4$ CFUが検出された。平成15年度の検出月は6月～10月であった。*Vv* の生存は *V. parahaemolyticus* よりも塩分濃度の薄い方が検出率が高かった。アサリ、シジミ、サザエ、ハマグリ、ニナガイ、カサガイ、スガイ、イシマキ貝、ツブ貝、生シラス、ワカシ、カツオ、カマス、アジ、イワシで検出された。しかしながら、本年度もわが国では *Vv* 食中毒事例としての報告がなかった。

2) *Vv* の検査法の確立：魚介類から *Vv* 単独の菌分離法の開発研究の一環として、昨年度は *Vv* の特異的な選択増菌培地および選択分離培地を開発したが、今年度はその2種類の培地を実検体で5回評価実験をおこなった。使用培地はその品質管理条件を同一にするため、培地会社に外注し用いた。しかしながら、今回の使用培地での検査法では、その他の海水ビブリオ属の発育抑制が弱く、また目的の菌の色調が不鮮明のため、実施した4ヶ所とも *Vv* の検出率は従来の検査法より低く、更なる開発研究が必要であることが判明した。

3) *Vv* の血清学的研究：昨年度まで血清型が確立されている16種類については協力研究者にその希釈血清を配付し、分離菌株の血清型別をおこなった。患者由来株では

O1 ～ O7 まで確認されたが、O8 ～ O16 は検出されなかった。環境由来株では、O8,9,11,12,14-16 が検出された。検出頻度に大きな差は認められなかった。

4) *V. vulnificus* のヒト由来株に特異的遺伝子の検出：病原性に関係すると考えられる遺伝子候補として、wza (capsular polysaccharide synthesis)、mshD(mannose-sensitive hemagglutinin)、vvpD (type 4 prepilin peptidase)、ela (elastase)、viuB (vulnivactin utilization protein)、4-hppd (4-hydroxyphenylpyruvate dioxigenase)、hupA (heme receptor)、mnt (manganasetransport protein)を選別し、それらの保持状況を、患者由来株、環境由来株について、PCR 法を用いて調べた。その結果、vuuA (ferric vulnibactin receptor)遺伝子は患者由来株よりも環境由来株に高い頻度で検出されたが、それ以外の遺伝子は、患者由来株および環境由来株ともに同じ割合で検出され、両者で分離頻度の差異は認められなかった。これらの結果から、vuuA 遺伝子は菌の環境中における生存あるいは適応に何らかの関与があることが示唆された。

## 研究組織

### 分担研究者

小野友道 (熊本大学・教授)

岡部信彦 (国立感染症研究所・センター長)

渡辺治雄 (国立感染症研究所・部長)

田村和満 (国立感染症研究所・室長)

### A. 研究目的

ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*; Vv) は、創傷感染による血癍を伴う皮膚炎や敗血症を引き起こす。一方、Vv が経口感染した場合には、一般健康人では軽度の胃腸炎を起こす程度であるが、肝臓に慢性肝炎、肝硬変等の基礎疾患がある場合には敗血症に陥りその半数以上は死亡する重篤な感染を引き起こす事が知られている。しかしながら、Vv 感染症は届出感染症ではないため、その実態はほとんど知られていない。また、その治療法について救急医療の現場で適応できるマニュアルが整備されていない。細菌学的にも環境中や魚介類での分布状態、病原因子と肝疾患の有無による重症化の機構について不明な点が多く残されている。そこで平成 15 年度は以下の項目について検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 臨床疫学的研究

1998年から2003年までの5年間におけるビブリオ・バルニフィカス感染症のサーベイランスを行った。皮膚科専門施設および高度救急救命センターを含む全国の1693の医療施設に対してアンケート調査を行い、患者の情報を収集し、分析した。

#### 2. 細菌学的研究

1) Vv の魚介類および環境中の汚染実態調査：本年度も4ヶ所の衛生研究所の協力のもとに5月～12月の期間実態調査をおこなった。また、今年度Vv感染が6例発生した熊本県保健環境科学研究所の調査ではその原因因子の疫学的解析、また魚介類が原因と推測された物についてはその後の追跡調査も合わせて継続調査した。

2) Vv の検査法の確立：魚介類からVv単独の菌分離法の開発研究の一環として、昨年度はVvの特異的な選択増菌培地および選択分離培地を開発したが、今年度はその2種類の培地を実検体で5回評価実験をおこなった。使用培地はその品質管理条件を同一にするため、培地会社に外注し用いた。

3) Vv の血清学的研究：昨年度まで血清型が確立されている16種類については協力研究者にその希釈血清を配付し、分離菌

株の血清型別をおこなった。

4) *V. vulnificus* のヒト由来株に特異的遺伝子の検出：病原性に関係すると考えられる遺伝子候補として、*wza* (capsular polysaccharide synthesis)、*mshD* (mannose-sensitive hemagglutinin)、*vvpD* (type 4 prepilin peptidase)、*ela* (elastase)、*viuB* (vulnivactin utilization protein)、*4-hppd* (4-hydroxyphenylpyruvate dioxigenase)、*hupA* (heme receptor)、*mnt* (manganasetransport protein) を選別し、それらの保持状況を、患者由来株、環境由来株について、PCR法を用いて調べた。

## C. 研究結果と D. 考察

### 1. Vv の臨床疫学的研究

ビブリオ・バルニフィカス感染症の発症数は一年間で16例から24例と、年による大きな変動はなかった。発症は6月から10月までの5ヶ月間に限られ、冬場の発症報告はなかった。しかしながら、2004年1月に、奄美大島においてビブリオ・バルニフィカス感染症疑い例が確認された。そこで、奄美近海における *Vibrio vulnificus* の有無を調査し、奄美大島では冬場でも Vv が存在することが確認された。今回のサーベイランスにより、ビブリオ・バルニフィカス感染症発生の危険地域として有明海沿岸の北部九州、東京湾沿岸、瀬戸内海北岸が考えられた。肝臓の基礎疾患についてはさらに検討が必要と考えられた。

### 2. 細菌学的研究

1) Vv の魚介類および環境中の汚染実態調査：島根県、宮城県及び熊本県で調査した結果、Vv の生存は定点場所に関係なく海水温度が 20℃以上上昇すれば検出され、Vv 陽性の MPN/100ml は平均  $10^1 \sim 10^2$  CFU で海水温度が高い時期では  $10^3 \sim 10^5$  CFU が検出された。平成 15 年度の検出

月は6月～10月であった。Vv の生存は *V. parahaemolyticus* よりも塩分濃度の薄い方が検出率が高かった。アサリ、シジミ、サザエ、ハマグリ、ニナガイ、カサガイ、スガイ、イシマキ貝、ツブ貝、生シラス、ワカシ、カツオ、カマス、アジ、イワシで検出された。しかしながら、本年度もわが国では Vv 食中毒事例としての報告がなかった。

2) Vv の検査法の確立：回の使用培地での検査法では、その他の海水ビブリオ属の発育抑制が弱く、また目的の菌の色調が不鮮明のため、実施した4ヶ所とも Vv の検出率は従来の検査法より低く、更なる開発研究が必要であることが判明した。

3) Vv の血清学的研究：患者由来株では O1～O7 まで確認されたが、O8～O16 は検出されなかった。環境由来株では、O8,9,11,12,14-16 が検出された。検出頻度に大きな差は認められなかった。

4) *V. vulnificus* のヒト由来株に特異的遺伝子の検出：*vuuA* (ferric vulnibactin receptor) 遺伝子は患者由来株よりも環境由来株に高い頻度で検出されたが、それ以外の遺伝子は、患者由来株および環境由来株ともに同じ割合で検出され、両者で分離頻度の差異は認められなかった。これらの結果から、*vuuA* 遺伝子は菌の環境中における生存あるいは適応に何らかの関与があることが示唆された。

## E. 結論

1) ビブリオ・バルニフィカス感染症発生の危険地域として有明海沿岸の北部九州、東京湾沿岸、瀬戸内海北岸が考えられた。

2) 肝硬変等の肝臓疾患のある人に重症な急性感染症が起こることが明かとなった。

3) 患者由来株では O1～O7 まで検出されたが、O8～O16 は検出されなかった。環境由来株では O8,9,11,12,14-16 が

検出された。

4) *vuuA* (ferric vulnibactin receptor)遺伝子は患者由来株よりも環境由来株に高い頻度で検出された。

#### F. 健康危機情報

肝臓に肝硬変等の基礎疾患がある人は海水温度が 20 °Cを超えた場合、生の魚介類を摂食しない養警告すべきである。

#### G. 研究発表

論文発表

1)Okura,M., Osawa,R., Iguchi,A., Arakawa,E., Terajima,J., and Watanabe,H. Genotypic analysis of *Vibrio parahaemolyticus* and development of pandemic group specific multiplex PCR assay. J. Clinic. Microbiol. 41: 4676-4682. 2003.

2)Yuji Inoue, Tamano Matui, Tomomichi Ono, An outbreak of *vibrio vulnificus* infection in Kumamoto, Archives of Dermatology (2004, in print.)

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

主任研究者 山本 茂貴 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

*Vibrio vulnificus* による重篤な感染症防止対策のための基礎的知見の収集と防止対策を検討する目的で研究し、以下の結果を得た。

1. 臨床的対応：Vv 感染症の警告書と診断・治療ガイドラインを作成し、全国約 1000 施設に配布した。

2. 細菌学的対応：1) 全国 5 カ所（宮城、神奈川、広島、島根、熊本）における定点海域を 5 月から 10 月にかけて調査し、海泥では 5～9 月に、海砂では 6～8 月に、海水では 6～9 月に分離された。海水温度は 20℃以上で分離された。貝類（アサリ、アオヤギ）は同様の時期に分離された。汽水域のエビ、あなご、すずきからも分離された。食中毒検体を調査したが Vv は分離されなかった。2) アサリを  $10^3 \sim 10^4$  Vv 添加海水中に 20 時間浸漬後、滅菌海水中に保存、1, 2, 3, 5 日後の菌数を観察した。5℃および 15℃保存のいずれも菌数はそれぞれ 1%、3%に減少した。3) O1 から O16 の血清型がすべて分離されたが、特に O1, O4, O6 が多く分離された。4) 病原性に関係すると考えられる遺伝子の保持状況を、患者由来株、環境由来株について、PFGE 法や PCR-RFLP 法を用いて解析した。PFGE 法による解析で異なる年代、地域からの患者由来株間で類似のパターンが観察されたが、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が見いだせなかった。PCR-RFLP 法では *viuB* 遺伝子を含めたシデロフォア産生に関わる遺伝子群について患者株間と環境由来株間で比較したところ、患者株において類似した RFLP パターンが確認された。5) マウスを用いた病原性評価法を開発した。

分担研究者

小野友道 熊本大学医学部

田村和満 国立感染症研究所

渡辺治雄 国立感染症研究所

A. 研究目的

ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*; Vv) は、創傷感染による血疱を伴う皮膚炎や敗血症を引き起こす。一方、Vv が経口感染した場合には、一般健康人では軽度の胃腸炎を起こす程度であるが、肝臓に慢性肝炎、肝硬変等の基礎疾患があ

る場合には敗血症に陥りその半数以上は死亡する重篤な感染を引き起こす事が知られている。しかしながら、Vv 感染症は届出感染症ではないため、その実態はほとんど知られていない。また、その診断・治療法について救急医療の現場で適応できるマニュアルが整備されていない。細菌学的にも環境中や魚介類での分布状態、病原因子と肝疾患の有無による重症化の機構について不明な点が多く残されている。そこで平成 16 年度は Vv による重篤な感染症防止対策のための基礎的知見の収集と防止対策を検

討する目的で研究した。

## B. 研究方法

1. 臨床的対応：平成 15 年度の研究によって得られたビブリオ・バルニフィカス感染

症患者 107 人についての個別は検査データおよび臨床像を収集した。71 施設中、57 施設より回答を得た。その回答結果および文献資料、実際に経験した症例を基に以下の診断と治療のガイドラインを作成した。

2. 細菌学的対応：1) Vv の魚介類および環境中の汚染実態調査本年度も 5 ヶ所の衛生研究所の協力のもとに 5 月～10 月の期間実態調査をおこなった。2) Vv の血清学的研究：O1 から O16 までの血清型について患者由来および環境由来について検討した。3) *V. vulnificus* のヒト由来株に特異的遺伝子の検討：病原性遺伝子についてシデロフォア産生遺伝子である *viuB* 遺伝子について検討した。また、PFGE法で患者株及び環境由来株を解析した。

## C. 研究結果

1. 臨床的対応：ビブリオ・バルニフィカス感染症の初発症状で最も多いのは発熱と疼痛であった。皮疹は多彩で、紅斑、紫斑、水疱、血疱、潰瘍などが混在し、また短い時間で皮疹が変化するのが特徴であった。基礎疾患としては、肝硬変を含めた肝機能障害の患者が 84 例中 69 例 (82.1 %) を占め、肝硬変の患者が 50 例 (59.5 %) で、内 9 例 (10.7 %) が肝癌を有する患者であった。その他の合併症としては糖尿病を有する患者が 11 例 (13.1 %) であった。以前の調査で報告したように、肝硬変の患者、特に肝癌を合併する患者でのビブリオ・バルニフィカス感染症発症リスクは高いものと考えられる。

今回の調査ではその発症状況より、外傷

より発症した創傷型の患者が 15 例確認された。殆どの患者が複数の抗生剤の投与による治療を受けており、89 例中 30 例、約 34 % の患者がミノサイクリンの投与を受けていた。最も目立った抗生剤の投与法はイミペネム、パニペネム、メロペネムのカルバペネム系抗生剤とミノサイクリンの併用療法であり、一部、クリンダマイシンの投与併用も行われていた。

2. 細菌学的対応：1) アサリ、ハマグリ、カキ、アオヤギなどの二枚貝、汽水域に生息するエビ、アナゴやスズキから Vv が分離された。海泥では 5 月から、海水では 20 °C を超える 6 月から 9 月に分離された。食中毒検体から Vv の分離を試みたが分離されなかった。2) Vv の血清学的研究：O1 から O16 までの血清型が患者由来および環境由来のいずれかで観察された。その中でも O1, O4, O6 が多く分離された。

3) *V. vulnificus* のヒト由来株に特異的遺伝子の検討：病原性遺伝子についてシデロフォア産生遺伝子である *viuB* 遺伝子について検討したところ RFLP パターンが患者株間で類似しているものが確認された。また、PFGE法での解析でも患者株間で類似のパターンが観察されたが、環境由来株では類似のパターンが観察されなかった。

4) VVFP 法の開発：ICR マウスの footpad に *V. vulnificus* (患者株) を接種すると、3 時間前後で浮腫が、6 時間までに壊死が観察され、12～18 時間目に全匹が死亡した。白血球数の減少、HT 値の上昇、血中 Fe 値の上昇、血中菌数の上昇、CPK 値の上昇が確認され、死亡直前の 12 時間目の肝臓にはアポトーシス誘導が確認された。患者株と環境株の病原性：VVFP 法で検討した結果、患者株では 12～18 時間目に全匹が死亡したが、環境株で保存株の場合には壊死発生とマウスの死亡は全く観察されなかった。しかしながら、新鮮分離の環境株を使

った場合には、患者同様の死亡が観察される例があった。

#### D. 考察

平成 15 年度の全国調査、その後の追跡調査によって 5 年間に 107 例のビブリオ・バルニフィカス感染症を確認した。平成 16 年度は確認できた症例についての個別データを集積し、それを基に診断と治療マニュアルを作成し、アンケートに協力いただいた全国の約 1000 の病院に対して配布する。

ビブリオ・バルニフィカス感染症の診断においては皮疹が最も重要である。今回の調査では消化器型以外の症例では殆どが皮疹を認めている。ちなみに、初診時の皮疹面積の評価が可能であった 41 症例についての検討では体表面積の 10 %を超える皮疹があった敗血症型 22 症例中、救命できたのは 2 例のみであった。病気の正確上、血液培養や創部培養の結果を待つて抗生物質を投与するのでは手遅れになる可能性が高い。そのため、臨床所見によってビブリオ・バルニフィカス感染症を疑った場合には可及的速やかに抗生物質を投与することが肝要である。

我々は、皮疹を以下の 4 型に分類した。つまり、紅斑型、紫斑型、水疱・血疱型、壊死型である。勿論、病期によって紅斑→紫斑→水疱→壊死と進行していくので、全ての病型をとる症例も少なくない。紅斑型：殆どの症例が紅斑、腫脹で発症している。紫斑型：紅斑と混在することが殆どであるが、早期に静脈系に血栓や塞栓を形成し、広い範囲にリンパ肝炎様の紫斑を認めることがある。水疱・血疱型：ビブリオ・バルニフィカス感染症に最も特徴的な皮疹の 1 つである。鑑別を要する A 群溶連菌や *Aeromonas* 属の壊死性筋膜炎では水疱を認めることは殆どない。ガス壊疽の場合には水疱、膿疱を認めるが、独特の腐敗臭に

よって鑑別が可能である。特に、敗血症を起こして、菌が全身に散布される時には原発創から離れた部位に張満性水疱を認めることがある。また、この水疱内容液から高率に *Vibrio vulnificus* を培養できる。潰瘍型：紅斑や紫斑の中心部に組織壊死、潰瘍を形成することがある。

施設によって抗生物質の選択法は異なっていたが、70 %以上の症例で 2 剤以上の多剤併用療法を受けていた。抗生物質の違いによる臨床効果の判断には至らないが、*in vitro* において *Vibrio vulnificus* に感受性が高いとされているセフトリアキソン (CTRX) を使用した例は一例しかなかった。また、環境株では耐性菌が目立つホスホマイシン (FOM) を使用された例が 4 例あった。これらは、*Vibrio vulnificus* に対する認知度の低さによるものではないかと考えている。最も多く行われているのが、カルバペネム系抗生剤とミノサイクリンの併用である。これは、皮膚への移行性が良好で、腎排泄のカルバペネムへの期待が大きいことと、海外論文の中にミノマイシンが効果的であるとするものが多いためではないかと思われる。我々も、第一選択はカルバペネム+ミノサイクリンの治療である。

今回の研究によって 46 %の患者がデブドリドメンや下肢切断術の手術を受けていたことが分かった。生命予後は手術を行わなかった方が良好であったが、これは、手術の適応になる患者に重症の患者が多いためと推察される。ビブリオ・バルニフィカス感染症の手術の適応については様々な意見があり、統一された見解はないのが実情である。しかしながら、皮疹が限局された範囲に止まっている場合や外傷型の場合には積極的に手術療法を考慮する必要があると考えている。その他の補助療法としては、免疫グロブリンや持続的血液濾過透析