

発症年月日：2004. 9. 20

感染の推定：9月19日に友人が釣ってきた小アジ及び近隣の鮮魚店で購入のブリの刺し身を食べた。

調査項目：摂食から3日後、地元の鮮魚店で地元産の小アジを購入して検体とした。

検査結果：小アジ	MPN / 1g	7.5
小アジの体表ふき取り	5 検体	全て検出

C 考 察

ヒト由来臨床株の生化学性状試験では、Ornithine decarboxylase、D-Mannitol fermentation、Sucrose fermentation の結果が株により異なった。特に医療機関で行われた簡易同定キットでは、Sucrose 分解性株を *V.v* と判定することができなかった。しかし、我々の調査では Sucrose 分解性株が、環境中に数パーセント存在しているので注意が必要である。

また、劇症型 A 群溶レン菌感染症や *Photobacterium damsela* 感染症は、臨床症状が似ているといわれる。県外から同定を依頼されて検査を行った時、A 群レンサ球菌を検出した事例があったので注意が必要である。我々の調査では、本県内の海水や魚介類からも *Photobacterium damsela* が検出されているので、今後はこれらの病原菌も視野に入れた検索が必要と思われる。

環境中で優位を占める O 血清型は O1、O4、O6、O7 で、ヒト由来臨床株の 80% は O4、O7 であった。また、協力研究所から送られた 471 株を国立感染症研究所で型別した結果、O6 が 23.6%、O1 が 23.5%、O4 が 21.2%で、あわせて全体の 68.3% を占め、本県の傾向と同じであった。一方、大仲ら⁸⁾の国内外のヒト由来臨床株 62 株の型別結果ともほぼ同じ傾向であった (O4 : 43.5%、O7 : 12.9%、O6 : 11.3%、O1 : 8.1%)。

環境株で最も優位であった O1 が、感染症例として少ないことについては、不明である。

2001 ~ 2004 年の間に、本県内で発生した 15 例の *V.v* 感染症のうち、経口感染と推定された 10 例は全て魚介類の生食によるものであるが、食中毒としての届出は 1 例もない。食中毒の定義が、飲食物（食品）を摂食することによって起こる急性の胃腸障害を主症状とする健康被害であるとすれば、現在のところ本県の事例では胃腸障害を主症状とするものはない。また、殆どの健康なヒトに病原性がないことや家族を含め共通食からの集団での発症もないことから、一般の食中毒としては捕ら

えられていない。しかし、初発症状として腹痛や嘔吐などの消化器症状のある例（小野ら²⁾）が報告されている。また、県内事例を含め特記すべき基礎疾患のないヒトでの V.v 感染症が報告されていることから、今後注意を要すると考えられる。

[参考文献]

- 1) WALTER E.HILL, STACYE P.KEASLER, MARY W. TRUCKSESS, PETER FENG, CHARLES A. KAYSNER, AND A. LAMPEL: Appl. Environ. Microbiol., 57, 707 (1991) .
- 2) 小野友道：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 分担研究報告書 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
- 3) 宮坂次郎, 徳永晴樹, 甲木和子：熊本県保健環境科学研究所報, 31, 31 (2001) .
- 4) 宮坂次郎, 徳永晴樹, 荒平雄二, 甲木和子：熊本県保健環境科学研究所報, 32, 37 (2002) .
- 5) 宮坂次郎, 徳永晴樹, 荒平雄二, 甲木和子：熊本県保健環境科学研究所報, 32, 42 (2002) .
- 6) 宮坂次郎, 徳永晴樹, 甲木和子：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 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 *Vibrio vulnificus* の分離法の検討および魚介類や環境中の汚染度の検討 熊本県内の環境及び魚介類中の *Vibrio vulnificus* と *Vibrio parahaemolyticus*
- 7) 宮坂次郎, 荒平雄二, 甲木和子：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 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 *Vibrio vulnificus* の分離法の検討および魚介類や環境中の汚染度の検討 熊本県内の環境及び魚介類中の *Vibrio vulnificus* の動向について
- 8) 大仲賢二, 古畑勝則, 木内明男, 原 元信, 福山正文：*Vibrio vulnificus* 感染症に関する基礎的研究：環境由来株とヒト臨床由来株の血清型別状況および薬剤感受性試験. 感染症誌 2004;78:83-89

表1 *Vibrio vulnificus* 感染症 (2001~2004)

症例	居住区	年齢	性別	病型	採取部位	背景疾病	発症日	喫食状況 ()内は喫食日	O血清型別	備考
1	八代海北部沿岸	61	男	敗血症	血液	アルコール性肝硬変	2001/6/29 (7/20死亡)	生魚(6/28)	O4	
2	有明海沿岸	76	男	敗血症	血液	アルコール性肝炎	2001/7/4	アジ、マグロ、 茹でシヤコ	O7	
3	八代海北部沿岸	60	男	敗血症	血液	アルコール性肝炎、 糖尿病	2001/7/10	シヤク(アナジャコ) みそ(7/8)	O4	
4	八代海北部沿岸	71	男	敗血症	生検組織	肝硬変、肝癌、 C型肝炎、糖尿病	2001/7/10	シヤク(アナジャコ) 醤油漬(7/8)	O4	
5	八代海北部沿岸	56	男	敗血症	生検組織	アルコール性肝炎、 糖尿病	2001/7/12 (7/14死亡)	コチの刺身(7/12)	O4	
6	八代海北部沿岸	42	男	敗血症	創傷部	肝硬変、肝癌、 C型肝炎、糖尿病	2001/7/16 (7/18死亡)	シヤク(アナジャコ) みそ(7/16)	O6	
7	八代海北部沿岸	73	男	創傷型	創傷部	肝硬変、C型肝炎、 糖尿病	2001/7/18	なし	O7	
8	有明海沿岸	67	男	創傷型	血液、生検組織	アルコール性肝炎	2001/8/15 (8/18死亡)	なし	O7	
9	有明海沿岸	76	男	敗血症	血液	肝硬変、肝癌、 糖尿病	2001/10/10	不明	O4	
10	有明海沿岸	63	男	創傷型	創傷部	なし	2002/10/6	なし	O1	
11	有明海沿岸	77	男	創傷型	創傷部	慢性リユーマチ	2003/7/24 (7/24死亡)	なし	O7	
12	有明海沿岸	77	男	創傷型	創傷部	肝硬変	200/8/15	なし	O4	白糖分解株
13	有明海沿岸	70	男	敗血症	創傷部	大酒家	2003/10/9 (10/9死亡)	生あみ、 サバ刺身(10/8)	O4	
14	天草東部沿岸	58	男	敗血症	血液	肝硬変	2004/6/17 (6/19死亡)	コノシロ刺身 (6/15)	UT	
15	天草東部沿岸	66	男	敗血症	創部	B型肝炎、糖尿病	2004/9/20	アジ、ブリ刺身 (9/19)	O4	

表2 ヒト由来臨床株の生化学性状試験、O血清型別、cytotoxin-hemolysin遺伝子の確認

生化学テスト	ヒト由来株														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Oxidase,Kovacs	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrogen sulfide(TSI)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in nutrient broth with:															
0%NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3%NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6%NaCl	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8%NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysin decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose fermentation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose fermentation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose fermentation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose fermentation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose fermentation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannitol fermentation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose fermentation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose fermentation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose fermentation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol fermentation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol fermentation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
myo-Inositol fermentation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol fermentation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin fermentation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Serotype	O4A	O7	O4A	O4A	O4A	O6	O7	O7	O4A	O1	O7	O4A	O4A	UT	O4A
cytotoxin-hemolysin gene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表3 患者由来株の薬剤感受性試験 (2001年7月～2004年12月)

薬剤名	ヒト由来臨床株														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ampicillin(ABPC)	S	S	S	S	I	S	I	R	I	S	S	S	S	S	I
Cefotaxime (CTX)	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
Kanamycin (KM)	S	R	I	S	I	S	I	I	S	S	I	S	I	I	I
Gentamicin (GM)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Streptomycin (SM)	I	S	R	R	R	I	R	S	R	I	I	I	R	R	R
Tetracycline (TC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Chloramphenicol (CP)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacin (CPFX)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Nalidixic acid (NA)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Fosfomycin (FOM)	S	I	I	R	I	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S
ST合剤(SXT)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S:感受性 R:耐性 I:中間

表4 熊本県保健環境科学研究所実施O血清型

由来	O血清型										総計
	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	UT	総計		
アサリ	4			1				5	8	18	
アナジャコ	4		1	2	1	3			6	17	
ウミナナ								1	1	2	
ウミネコ	11		1	7	1	11		2	20	53	
カキ								1		1	
カサゴ	2									2	
カニ卵	3			2						5	
キス				3		3				6	
クマエビ	1			3					2	6	
クロダイ	1					1		1		3	
コチ	35		3	6	1	5		9	40	99	
コノシロ									1	1	
スズキ						2				2	
ボラ						1				1	
ユリカモメ									2	2	
魚介類計	61(28.0%)	0	5(2.3%)	24(11%)	3(1.4%)	26(11.9%)	19(8.7%)	80(36.7%)	218		
海水	19	3	2	5	2	10	9	35	85		
海泥	5			2		5	1	12	25		
海水・海泥計	24(21.8%)	3(2.7%)	2(1.8%)	7(6.4%)	2(1.8%)	15(13.6%)	10(9.1%)	47(42.7%)	110		
総計	85(25.9%)	3(0.9%)	7(2.1%)	31(9.5%)	5(1.5%)	41(12.5%)	29(8.8%)	127(38.7%)	328		

UT: 型別不能

表5 国立感染症研究所実施分O血清型

由来	O血清型																総計	
	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16		UT
アザリ			1	1		2												4
アナジャコ						3												3
シオフキ	1			2		1											2	6
ハマグリ	1		1															2
マアジ			7															7
ヤドカリ	1																	1
魚介類計	3(13%)		9(39.1%)	3(13%)		6(26.1%)											2(8.7%)	23
海水	6					10		7				2		1			4	30
海泥	18		2	33		8		1	3			7		1			3	77
海水・海泥計	24(22.4%)		2(1.9%)	33(30.8%)		18(16.8%)		8(7.5%)	3(2.8%)			9(8.4%)		2(1.9%)			7(6.5%)	107
総計	27(20.8%)		11(8.5%)	36(27.7%)		24(18.5%)		8(6.2%)	3(2.3%)			9(6.9%)		2(1.5%)			9(6.9%)	130

UT: 型別不能

表6 環境由来株のO血清型

	O血清型														総計			
	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14		O15	O16	UT
熊本県	85	3	7	31	5	41	29										127	328
感染研	27		11	36		24		8	3			9		2	1		9	130
総計	112(24.5%)	3(0.7%)	18(3.9%)	67(14.6%)	5(1.1%)	65(14.2%)	29(6.3%)	8(1.7%)	3(0.7%)			9(2%)		2(0.4%)	1(0.2%)		136(29.7%)	458

UT:型別不能

表7 由来別O血清型

	O血清型														総計			
	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14		O15	O16	UT
魚介類	64(26.6%)		14(5.8%)	27(11.2%)	3(1.2%)	32(13.3%)	19(7.9%)										82(34%)	241
海水・海泥	48(22.1%)	3(1.4%)	4(1.8%)	40(18.4%)	2(0.9%)	33(15.2%)	10(4.6%)	8(3.7%)	3(1.4%)			9(4.1%)		2(0.9%)	1(0.5%)		54(24.9%)	217
総計	112(24.5%)	3(0.7%)	18(3.9%)	67(14.6%)	5(1.1%)	65(14.2%)	29(6.3%)	8(1.7%)	3(0.7%)			9(2%)		2(0.4%)	1(0.2%)		136(29.7%)	458

UT:型別不能

- 1) 魚介類における *Vibrio vulnificus* の疫学調査 (平成 14 年度)
- 2) 島根県における貝類の *Vibrio vulnificus* の汚染調査 (平成 15 年度)
- 3) 島根県における市販アサリおよび海水浴場における *V. vulnificus* 汚染調査
(平成 16 年度)

研究協力者: 福島 博 (島根県保健環境科学研究所 感染症疫学科)

島根県の宍道湖(汽水湖)と島根半島北岸の日本海に面した恵曇湾との間に運河として掘削された佐陀川の 5 地点において、平成 12~14 年に *Vibrio vulnificus* の生態を継続調査し、以下のことが明らかにされた。Vv は河口付近の汽水域の底泥で越冬し、春になり水温が 15℃以上上昇すると増殖する。初夏になり水温が 20℃以上上昇すると河口付近の汽水域で旺盛に増殖し $10^3 \sim 10^5$ MPN/100ml に達するが、やがて秋になり水温が 15℃以下に下降すると急激に減少する。この知見に基づき、本研究における Vv の汚染調査は海水温が 20℃以上上昇する時期に河口付近の汽水域を中心に実施した。

魚介類については平成13年度に、島根県の沖合いで漁獲されるアジ等の海洋産魚類、沿岸で漁獲されるサザエ、カキ等の貝類および宍道湖で漁獲されるフナ、ボラ等の汽水産魚類における Vv の汚染状況を調査した。Vv は貝類と汽水産魚類から高率に検出されたが、海洋産魚類のアジからの検出率は低かった。汚染菌数は汽水産魚類で $10^2 \sim 10^5$ MPN/g であったが、貝類と海洋産魚類では ≤ 10 MPN/g と少なかった。このように、Vv の汚染率は海洋産魚介類のうち魚よりも貝類で高かったことから、平成 14 年 6、7 月に島根県沿岸の河口付近の汽水域 30 地点で環境と貝類における汚染状況を調査した。島根県にはアサリの生産地がないため、貝類については岩礁や港で採集したニナガイ、カサガイ、スガイ、カキ、ムラサキガイ等を試料とした。Vv は貝類の 66%から検出された。貝類を採集した 28 地点中 25 地点のうち塩分濃度が 5~25%の海岸に生息する貝類のほとんどから Vv が検出され、その汚染菌数は多いものでは 10^4 MPN/g であったが、この塩分濃度外の海岸に生息する貝類からは検出されないことが多かった。これらの結果から、Vv の生息に至適な塩分濃度の海岸で漁獲されるサザエ等の生食用貝類は Vv の感染源となる可能性が示唆された。

平成 15 年度には島根県内の 8 漁業組合で漁獲されたサザエと市販貝類(アサリ、ハマグリ、カキ、アカガイ等)について汚染状況を調査した。Vv は河口付近などの塩分濃度が低い海岸で漁獲されたサザエから検出されることが多く、島根半島や隠岐島などの大型河川が流入していない海岸のサザエからは検出されず、Vv の貝汚染は海水の塩分濃度と密接な

関係にあることが確認された。サザエ56検体中15検体(27%)、アサリ、ハマグリ等の市販貝類61検体中31検体(51%)から検出され、汚染菌数は陽性検体の1/3において $10^3\sim 10^5$ CFU/gであった。これらの成績は、サザエ等の刺身がVv感染症の感染源となる可能性を強く示唆するとともに、アサリやハマグリなどの貝類やエビなどによりVvが県外や外国から持ち込まれていることを示している。また、これらの魚介類の多くは加熱処理され摂取されるが、他の食品を二次汚染し感染源となる可能性を見逃すことはできないと思われる。

平成16年度には市販アサリからのVvの分離法の改良を行うとともに、分離菌株の血清型を行った。また、島根県の海水浴場におけるVvの分布状況とVvの血清型を調査した。アサリからのVvの分離は昨年まではAPWによる増菌培養によっていたが、2%NaCl加BPWによる前増菌培養を行うことにより、分利率は昨年よりも15%高い77%に向上した。さらに、貝を30°Cに3時間放置することによる貝の体内の自然な状態で増殖を促す方法を導入することにより87%から分離することができた。特に、30°Cへの放置は低温により損傷した少数菌を増菌するのに効果があることが示された。Vvの分離率は今年の調査と同様に生産地に関係なく温暖な時期に生産、販売されたものにおいて高く、その汚染菌数は月平均で $10^{0.8\sim 1.9}$ MPN/gであった。この汚染菌数は熊本県での漁獲後の汚染菌数 $10^{0.9}$ MPN/gとほぼ同様であり、アサリを汚染したVvは低温流通過程においてもほとんど死滅することなく生残り、消費地へ運ばれることを示唆している。

市販アサリから分離された菌株は血清型O1とO3、O4、O5、O6、O8、O9、O12、O14、O16、型別不能およびrough型に、市販輸入エビ由来株は血清型O3とO4に、島根県沿岸の海水浴場の海水由来株は血清型O1とO4、O6、O12、型別不能株に型別された。これまでにわが国でVv感染症の患者から分離された菌株は血清型O1、O4、O5、O6、O7に属しているが、本研究期間中の平成16年8月に島根県の山間地域で刺身の摂取によると思われるO12型による感染症が発生した。このことは、これまでわが国で患者の発生が確認されていない血清型O2とO3やO8～O16による感染症も発生する可能性を示唆している。O12型感染事例における感染源と感染経路ならびに汚染魚介類の購入先は明らかにされなかったが、Vv感染症が山間地域で市販されている刺身を介し発生したことが示された。このことは、これまで居住地周辺の汽水域で魚介類が漁獲される地域で行われてきたVv感染症の予防対策を、Vv感染症の発生がない地域においても実施する必要があることを示している。これは、Vvはこれまで考えられていたよりも魚介類の体内では低温で長期間生残することからも極めて重要なことである。

発表論文

- 1) Fukushima, H and Seki R.: Ecology of *Vibrio vulnificus* and *V. parahaemolyticus* in Brackish Environments of the Sada River in Shimane Prefecture, Japan. FEMS Microbiology Ecology, (2003)

- 2) 福島博：島根県における腸炎ビブリオ及びビブリオ・バルニフィカス感染症予防に関する研究 I. 佐陀川における生態調査及び島根県東部で漁獲された魚介類における分布調査 島根県保健環境科学研究所報、44. 73-82. (2003)
- 3) 福島博：島根県における腸炎ビブリオ及びビブリオ・バルニフィカス感染症予防に関する研究 II. 島根県沿岸における腸炎ビブリオ及びビブリオ・バルニフィカスの分布調査 島根県保健環境科学研究所報、45. 51-62. (2004)
- 4) 福島博：島根県における腸炎ビブリオ及びビブリオ・バルニフィカス感染症予防に関する研究 III. 島根県沿岸における TDH および TRH 産生性腸炎ビブリオの分布調査 島根県保健環境科学研究所報、45. 63-72. (2004)

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年間に約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。細胞障害性溶血毒や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。また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-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

素、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⁾ のゲノム塩基配列解読が完了している。*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。また、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. PCR

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 を作成し検出を試みた。

2. PFGE

制限酵素に *NotI* を使用し、CHEF DRIII (Bio-Rad) 電気泳動槽を用いて電気泳動を行い、バンドパターンの解析を行った。

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、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* とするということに、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。

さらに、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。

1. PCR

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 1)。

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 2)。

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。

2. PFGE

<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 (図 2)。

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>

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 (図 3)。

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。

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。

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。

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と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⁸⁾。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。

そこで本研究では、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、散発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。

病原体側から考察してみると、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

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 以外の血清型の株についても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。

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¹¹⁾¹²⁾。

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。

E. 研究発表

1. 学会発表

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

荒川英二

Vibrio vulnificus 感染症について, 平成16年度希少感染症診断技術研修会, 2005

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.
Appl Environ Microbiol 70(9): 5153-58 (2004)
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): 3572-80 (1996)
12. Wong H-C, et al.
Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis of *Vibrio vulnificus* Strains Isolated from Taiwan and the United States.

表1 病原性関連遺伝子検出用PCRプライマーセット

Primers gene	5'-3'	
	forward	reverse
<i>vvhA</i> (Hill et al):	specific	reverse
<i>vuuaA</i> :	common	reverse
<i>vvpE</i> :	common	reverse
<i>vpl</i> :	common	reverse
<i>vpl</i> :	specific	reverse
<i>mshD</i> :	common	reverse
<i>vvpD</i> :	common	reverse
<i>vvpD</i> :	specific	reverse
<i>viuB</i> :	common	reverse
<i>viuB</i> :	specific	reverse
<i>htpD</i> :	common	reverse
<i>htpD</i> :	specific	reverse
<i>wza</i> :	common	reverse
<i>wza</i> :	specific	reverse
<i>hupA</i> :	common	reverse
<i>hupA</i> :	specific	reverse
<i>ela</i> :	common	reverse
<i>ela</i> :	specific	reverse
<i>mntH</i> :	common	reverse
<i>mntH</i> :	specific	reverse

表2 患者由来株、環境由来株の病原性関連遺伝子PCR

Vibrio vulnificus 患者由来株												
PCR												
O-serogroup	No. of isolates	(%)	vvh	vuua	vvpE	vpl	wza	mshD	vvpD	ela	viuB	4-hppd hupA mntH
O1	6	26.1%	6/6	1/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	2/6 0/6 5/6
O4	12	52.2%	12/12	2/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	5/12 7/12 6/12
O5	1	4.3%	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1 0/1 1/1
O6	1	4.3%	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1 1/1 1/1
O7	3	13.0%	3/3	0/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3 (3)/3
Total	23	100.0%	23/23	3/23	23/23	23/23	23/23	22/23	23/23	23/23	23/23	11/23 11/23 16/23
(positive%)			(100%)	(13%)	(100%)	(100%)	(100%)	(96%)	(100%)	(100%)	(100%)	(48%) (48%) (70%)

環境由来株												
PCR												
O-serogroup	No. of isolates	(%)	vvh	vuua	vvpE	vpl	wza	mshD	vvpD	ela	viuB	4-hppd hupA mntH
O1	6	28.6%	6/6	6/6	3/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6 0/6 6/6
O3	1	4.8%	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1 0/1 1/1
O4	6	28.6%	6/6	(4)/6	6/6	6/6	5/6	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6 2/6 6/6
O6	2	9.5%	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2 2/2 2/2
O8	2	9.5%	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2 2/2 2/2
O14	1	4.8%	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1 1/1 1/1
O16	2	9.5%	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2 2/2 2/2
R	1	4.8%	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1 0/1 1/1
Total	21	100.0%	21/21	18/21	18/21	21/21	18/21	21/21	21/21	21/21	21/21	6/21 9/21 21/21
(positive%)			(100%)	(86%)	(86%)	(100%)	(86%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(29%) (43%) (100%)

() 内はバンドは検出されたものの、サイズが異なっていたものが含まれている