

ビブリオ・バルニフィカスの海水中及び魚介類中の汚染実態調査

研究期間（平成13年度～14年度）

長野英俊 濱崎光宏 村上光一 堀川和美

要 旨

Vibrio vulnificus 感染症予防のため、市販流通魚介類の汚染状況及び県内14カ所の海水中の生息実態を定量的に調査した結果、魚介類75検体中9検体から *Vibrio vulnificus* が検出され、菌数は最大 2.9×10^4 CFU/100 g であった。県内14カ所の海水中の菌数は平均海水温15.5℃では14カ所中1カ所から3.6CFU/100ml、平均海水温が27℃では14カ所中13カ所から検出され、菌数は最大9300CFU/100ml であった。

さらに本菌の主要な virulence factor である cytotoxin (vvhA) 及び protease (vvp) を検出するプライマーを用いて遺伝子の検出を行った結果、環境由来株及びヒト由来株で差は見られずヒト由来株に特異的な因子ではなかった。

【キーワード： *Vibrio vulnificus* 感染症, cytotoxin, protease, 敗血症】

1 はじめに

Vibrio vulnificus は、海水中に常在するビブリオ属の1菌種で、他の病原ビブリオと異なり経口感染を起こすが消化器症状はなく、その病態は創傷感染又は原発性敗血症である。

本菌感染症は、重篤な肝疾患などの基礎疾患を持つ男性に多く見られ、発症すると急激な経過をたどり致死率が高いが、健常者には病原性を示さないことが特徴である。感染症の病態は特徴的で四肢に広範囲な血性水疱、血腫などの皮膚症状を呈することから新聞等で「人喰いバクテリア」と報道された。1970年に Roland によりヒトへの感染事例が報告されて以来、1978年の河野らによる本邦初の感染報告、1996年には本県での感染死亡者の発生、以降全国で感染報告が120例を超える重要な感染症である。さらに本感染症は、6月から10月の夏期に発生し西日本に多く見られる。

感染経路は生鮮魚介類の生食による敗血症及び傷口の海水接触による創傷感染である。そこで本感染症予防のため生鮮魚介類の汚染実態及び海水中の生息実態について調査を行った。さらに本菌感染症の特徴的な皮膚症状を起こす重要な virulence factor で細胞毒性因子の cytotoxin (vvhA) 及び溶血活性、コラーゲン分解活性等を持つタンパク分解酵素の protease (vvp) の検出を PCR で行った。

2 方法

2-1 海水からの検出

海水中の菌数は、図1の A から D の海域から採水した14カ所について5月及び7月の2回測定した。採水時の海水温は5月が平均15.5℃、7月が平均27℃で海水を各10ml、1ml、0.1ml 各3本の APW（アルカリペプトン水）で増菌後、その1ml を鋳型として Hill らが1992年に報告した *Vibrio vulnificus* に特異的な遺伝子を検出するプライマーを用いて PCR-MPN で行い100ml 中の菌数を比較した。

2-2 魚介類からの検出

5月から11月にかけて魚類40検体、貝類35検体の計75検体について検出を行った。検体の10倍希釈乳剤を作製し10ml、1ml、0.1ml を各3本の APW で増菌後、選択分離培地の TCBS、VVM に塗抹培養後、同定を行った。*Vibrio vulnificus* が検出された管数から100g 当たりの菌数を算出した。

2-3 Virulence factor の検出

Cytotoxin (vvhA) は Lee らの¹⁾ 報告した P1及び P2プライマー、及び PCR 条件でおこない、protease (vvp) は Gen Bank に登録されている配列 (ACCESSION084580) から作製した VVPF607及び VVPR1161を用いた(表1)。PCR は、95℃2分の後、95℃30秒、57℃30秒、72℃30秒の35サイクルで行い2%アガロースで泳動後、エチジウムブロマイドで染色し写真撮影を行った。なお protease は目的の遺伝子が増幅していることを、ダイデオキシ法で塩基配列を決定し確認した。



図1採水地点

表1 使用プライマー

Primer	Sequence (5' -3')
P1	5' -GACTATCGCATCAACCG-3'
P2	5' -AGGTAGCGAGTATTACTGCC-3'
VVPF607	5' -GGACCTGGAGGCAACAGTAA-3'
VVPR1161	5' -CCAGTCAACACTGCCTTTCA-3'

3 結果及び考察

3-1 海水中の菌数

平均海水温が15.5℃では、調査した14カ所の内1カ所から検出され菌数は3.6CFU/100mlであったが、平均海水温が27℃では14カ所中13カ所から検出され菌数は最大9300CFU/100mlに増加した。大仲ら²⁾による東京湾及び徳島県での調査で検出された菌数と今回の調査ではほぼ同様の菌数であった。このことから *Vibrio vulnificus* は地域性を問わず広く海水中に分布していることが判明した。

3-2 魚介類からの検出結果

魚類40検体中スズキ、グチの2検体から検出され菌数は20-91CFU/100gであった。*Vibrio vulnificus* は鱗やえらの部分から高頻度検出される報告があるが今回の調査では可食部を中心に調査を行ったことから低い検出率であったと考えられる。貝類35検体では10検体から検出され、あさり貝で29000CFU/100g、カキから7300CFU/100g、その他シジミ、タイラギからも検出された。貝類から多く検出されたことは貝類の生物濃縮作用が関与していると考えられる。大仲らはカキを調査し検出率が30%であったと報告している。我々の調査では菌数は比較的低いが約16%の陽性率であった。

表2 魚介類からの検出結果

	検体数	検出された主な魚介類
魚類	40検体	スズキ グチ
貝類	35検体	アサリ、カキ、シジミ トコブシ、タイラギ

3-3 Virulence factorの検出結果

Cytotoxin (vvhA) 及び protease (vvp) の検出をヒト由来株2株、海水由来11株、食品由来株42株について行った結果、55株すべてからこれらの因子が検出された。ヒト由来及び環境由来株すべてがこれらの因子を保有しておりヒト由来株に特有な因子ではなかった。

Protease (vvp) は、三好³⁾がヒト由来の *Vibrio vulnificus* から単離し性状を精査している。この protease は動物の結合組織を構成するコラーゲンを分解する性状を持ち血管透過性の亢進、出血作用をもつ金属 protease で本菌の特徴的な皮膚症状の血性水泡形成に関与していると報告している。しかし菌株の由来に関係なくこれらの因子を保有していたことが、直ちにすべての菌株に病原性があると判断できないが、感染症の特徴である健常者には病原性を示さず重篤な肝疾患などの基礎疾患を持つヒトが発症しやすいことから、肝疾患などの危険因子保有者は海水への接触をさせ、魚介類の生食を控えることが重要であると考えられる。

魚介類の生食習慣のある本邦において本菌感染症は今後、重要な感染症になる可能性があることから、夏期の海水中に広く生息すること、生鮮魚介類中には菌数の差はあるが汚染されていることなどの情報提供を積極的に行うことが重要である。

5 行政的意義、貢献

Vibrio vulnificus 感染症予防のため、感染経路である海水及び生鮮魚介類中の汚染実態を調査した。積極的な情報提供のための基礎的なデータとして活用できると考える。

文 献

- 1) Lee, S. E et al. : 1998, Direct identification of *Vibrio vulnificus* in Clinical Specimens by Nested PCR. J. Clin Microbiol, Vol. 36, 2887-2892
- 2) 大仲賢二ら : 2002, *Vibrio vulnificus* 感染症に関する基礎的検討 : 海水、海泥及びカキからの本菌の分離状況. 感染症誌, Vol. 76, 528-534
- 3) 三好伸一 : 1999, *Vibrio vulnificus* の亜鉛金属プロテアーゼに関する研究. 細菌学雑誌, Vol. 54, 763-772