

## 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

Isolation of *Vibrio vulnificus* from Sea-food, Sea-water and Sea-mud in Miyagi Prefecture

齋藤 紀行 佐々木 美江 山口 友美  
畠山 敬 渡邊 節 白石 廣行\*

Noriyuki SAITO, Mie SASAKI, Yumi YAMAGUCHI  
Takashi HATAKEYAMA, Setsu WATANABE, Hiroyuki SHIRAISHI

キーワード：ビブリオ・バルニフィカス，市販魚介類，海水・海泥

Key Word : *Vibrio vulnificus* , Sea-food , Sea-water , Sea-mud

基礎疾患を有するヒトへ重篤な感染を起こすビブリオ・バルニフィカスの宮城県内の生息状況と流通魚介類汚染実態を明らかにするため、県内沿岸部1定点の海水・海泥を定期的に採取、また魚介類を定期的に購入し菌検出を行った。その結果、定点では7月から9月の海水・海泥から、また県内産のアサリ3件からVvが検出され、宮城県内の沿岸部にもVvが生息することが確認された。

### 1 はじめに

ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus* : Vv) は腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus* : Vp) と同じビブリオ属に分類される海洋細菌である。Vvによる感染症はVpと同様、魚介類の喫食により発症し、重篤な場合は急激な壊死性筋膜炎から敗血症を起こし死に至る。我が国での患者発生は過去20年間で約100件と少ないが、韓国では年間約35件<sup>1)</sup>、米国では年間約90件の発生が報告されている<sup>2)</sup>。昨年、熊本県内で7月から10月にかけて魚介類の生食を原因とするVv感染患者が8名発生し3名が死亡<sup>3)</sup>、また静岡県内でも1名の患者が発生し死亡している。Vv感染のハイリスク群として肝疾患あるいは糖尿病等の基礎疾患保有者が挙げられており、前述の死亡患者はいずれも肝臓障害の持病を持っていた。我が国には、ハイリスク群となるC型肝炎ウイルス感染者100~200万人、B型肝炎ウイルス感染者120~140万人、糖尿病患者700万人、大量飲酒者200万人、がいると推計されている<sup>4,5)</sup>。また、日本人の食習慣に魚介類の生食があることからVv感染症が発生する可能性はこれまで確認された数字より高いと考えられる。

そこで、宮城県内におけるVv感染症の発生予防の資料に供すること目的として、県内の沿岸部のVv生息状況を定期的に1定点の海水・海泥について、また市中流通魚介類のVv汚染状況調査を市販魚介類についてVv検索を実施した。なお、Vpの検出状況についても同時に調査した。

\* 現 宮城県公衆衛生協会

### 2 方法と材料

#### 2.1 調査期間

調査は平成13年4月から平成14年3月まで行った。ただし、食品についてのVv検査は6月から、海水・海泥についてのVv検査は7月から実施した。

#### 2.2 調査材料

##### (1) 海水・海泥

宮城県名取市閉上の汽水域(増田川河口)を検査定点とし、月に1度、海水約500ml、海泥約100gを採取しこれを検体とした。

##### (2) 市販魚介類食品

月に1度、小売店よりアジ2件、アサリ2件、県内産海産物(ホタテ、ホヤ等)1件を購入し検査対象食品とした。更に、Vp食中毒事例等で搬入された県内産の魚介類の一部についても検査対象検体とした。

#### 2.3 検査方法

- (1) 使用培地：海水・海泥の増菌用としてアルカリペプトン水培地(APW)、分離用としてTCBS、mCPC(Cellobiose-PolymyxinB-Colistin 変法寒天、日水製薬)培地を、確認用として3%食塩加TSI及びLIM、0、6、8、10%食塩加ペプトン水(食塩耐塩試験)、及びアラビノース培地を用いた。
- (2) 海水：海水100mlにAPW粉末2gを加えこれを原液とし、原、10倍、100倍(場合によっては1000、10000倍)希釈液について各3本をMPN管で培養した。翌日、各MPN管からTCBS及びCPC培地でVv及びVpを分離し、菌株の生化学的性状確認を行った結果を基に100ml当

たりのMPN値を算出し、菌数とした。

- (3) 海泥：海泥20gをAPW180mlに加えこれを10倍液とし、100倍、1000倍の希釈液を調整し、海水と同様にしてVv、Vpの1g当たりの菌数(MPN値)を求めた。
- (4) 食品：それぞれの検体(アジのエラ、アサリのむき身、ホタテの中腸腺、ホヤのむき身)25gをPBS 225mlに添加し袋の上から手揉みにより混和させ、これを10倍希釈液とした。更にアルカリ性ペプトンで希釈を行い海水と同様にしてVv、Vpについての1g当たり菌数(MPN値)を求めた(生食用魚介類の成分規格規準による)。
- (5) 菌種の同定：分離した菌株はそれぞれの確認培養での生化学的性状試験よりVv、Vpの菌種を確認し、Vpは市販抗血清(デンカ生研)でO、K抗原を、Vvは国立感染症研究所より分与された血清でO抗原型を決定した。
- (6) 遺伝子検索：PCR法によりVvの菌株はVv特異溶血毒素遺伝子Vvh<sup>6)</sup>を、Vpは特異遺伝子LDH<sup>7)</sup>の確認を行った。

### 3 結 果

#### 3.1 食品からのVvの検出状況

市中に流通しているアジ、アサリ及びその他の食品についてVp及びVvの汚染状況調査を行いMPNの結果を表1に示した。また、食品別のVp及びVvの検出状況を表2・表3に示した。アジはいずれも県外産で、Vpは8~11月に検査した8検体のうち5検体から検出されたが、MPN値は3.6~15と低値であった。一方、Vvはいずれのアジ検体からも検出されなかった。アサリは主に県内産であり、Vpは7~9月の6検体全てから検出され、そのうち9月の1検体はMPN値が240と高値を示した。一方、Vvは県内産の7月の1検体と9月の2検体から検出された。次に、県内産海産物を中心に20検体について調査を行った結果、Vvは全く検出されなかった。しかし、7月に発生した食中毒事件の原因食品であった「タコ」のVpMPN値が93で、TDH陽性の血清型O3：K6が検出された。更に、10月に食中毒関連食品として調査した「かき」3検体のうち、1検体からMPN値460と高値を示すTDH陽性のO3：K6株が検出された。

表2 魚介類からのビブリオ・バルニフィカスの月毎検出状況

	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	総計
アジ	0/2	0/1	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/19
アサリ	0/2	1/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	3/20
その他	0/1	0/2	0/3	0/6	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/20
合計	0/5	1/5	0/7	2/10	0/7	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	3/59

表1 魚貝類のビブリオ・バルニフィカス及び腸炎ビブリオ汚染状況

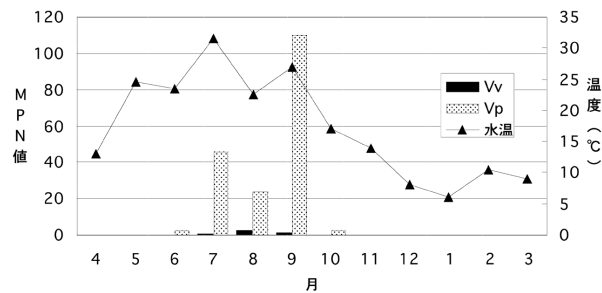
検体採取日 平成13~14年	検体種類	Vv (MPN) (MPN/g)	Vp (MPN) (MPN/g)
6月	アジ	< 3	< 3
	アジ	< 3	< 3
	アサリ	< 3	< 3
	アサリ	< 3	< 3
7月	ホタテ	< 3	< 3
	たこ	< 3	93
	アサリ	< 3	14
	アサリ	9.1	23
	アサリ	< 3	< 3
8月	イシモチ	< 3	< 3
	ホタテ	< 3	3.6
	ホタテ	< 3	< 3
	ホタテ	< 3	< 3
	アジ	< 3	3.6
	アジ	< 3	9.1
9月	アサリ	< 3	3.6
	アサリ	< 3	23
	アサリ	< 3	< 3
	ホヤ	< 3	< 3
	ホタテ	< 3	0.72
	ホタテ	< 3	0.3
	ホタテ	< 3	3.9
10月	ホタテ	< 3	0.36
	ホタテ	< 3	0.91
	アジ	< 3	< 3
	アジ	< 3	3.6
	アサリ	3.6	240
	アサリ	6.2	93
	アサリ	< 3	3.6
	ホタテ	< 3	3.6
11月	アジ	< 0.3	< 3
	アジ	< 3	15
	アサリ	< 3	< 3
	アサリ	< 3	< 3
	かき	< 3	93
	かき	< 3	460
12月	かき	< 3	93
	アジ	< 3	< 3
	アジ	< 3	9.1
	アサリ	< 3	< 3
1月	アサリ	< 3	< 3
	アサリ	< 3	< 3
	アサリ	< 3	< 3
	かき	< 3	< 3
2月	アサリ	< 3	< 3
	アサリ	< 3	< 3
	アサリ	< 3	< 3
	かき	< 3	< 3
3月	アサリ	< 3	< 3
	アサリ	< 3	< 3
	アサリ	< 3	< 3
	ホタテ	< 3	< 3

表3 魚介類からの腸炎ビブリオの月毎検出状況

	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
アジ	0/2	0/1	2/2	1/2	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	4/19
アサリ	0/2	1/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	5/20
その他	0/1	1/2	0/3	6/6	3/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	10/20
合計	0/5	2/5	4/7	9/10	3/7	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	19/59

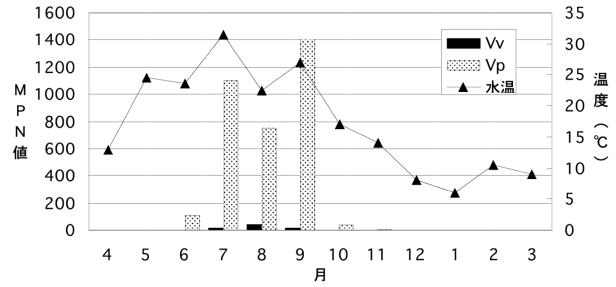
3.2 海水・海泥におけるVp及びVvの生息状況

平成13年4月から平成14年3月までの定点における気温及び海水温を折れ線グラフで、海水(100ml当たり)及び海泥(1g当たり)中のVpとVvのMPN値を棒グラフで図1・図2に示した。調査地点は小河川の河口で入り江になったところで海水温は気温に左右される場所であった。同年7月の気温は8月より暑い日が続き海水温も7月が最高温度を示した。VpのMPN値は海水・海泥とも9月がピークで海水温は27であった。海水温が14以下になる11月以降は海泥のVpを除いて菌は検出されなかった。Vpは海水中には4月から12月まで、海泥には4月から11月までと3月に検出された。海水におけるVpの最大MPN値/gは9月の110、海泥では最大値は9月の1400以上であった。一方、Vvは7月から9月の海水及び海泥から検出され、最大MPN値は8月の海泥の44であった。



月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
Vv	NT	NT	NT	0.61	2.8	1.3	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
Vp	<0.03	<0.03	2.4	46	24	110	2.4	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
水温	13	24.5	23.5	31.5	22.5	27	17	14	8	6	10.5	9

図1 海水中のVp及びVvの月別MPN値 (MPN/100ml) 変動と海水温



月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
Vv	NT	NT	NT	20	44	19	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
Vp	3.8	0.4	110	1100	750	1400	46	9.3	<0.3	<0.3	<0.3	0.36
水温	13	24.5	23.5	31.5	22.5	27	17	14	8	6	10.5	9

図2 海泥中のVP及びVvの月別MPN値 (MPN/g) 変動と海水温

3.3 検出菌株の性状

食品、海泥等から分離したVv 8菌株と対照のVp 1菌株の生化学的性状を表4に示した。Vvは表に示したように多くの生化学的性状がVpと酷似しているが、食塩耐塩試験の8%食塩培地での発育とアラビノースの利用能の点で両者は明らかに異なっている。mCPC培地で扁平な黄色コロニーの形態をとり、表のような性状を示した菌株をVvと推定し、最終的な菌種の決定はPCR法によるVv特異溶血毒素遺伝子VVhの有無で行った。

4 考察

昨年、国内でVv感染によって死亡した患者はいずれも魚介類を喫食して発症している。Vvは海水に生息する海洋微生物であるが、我が国での海水・海泥の生息状況あるいは魚介類における汚染実態についてはこれまで明らかにされていないため、市販魚介類のVv汚染実態調査を厚生科学研究の1課題として全国的に実施することになった。我々は、市販魚介類のVv汚染実態調査に加えて県内沿岸部1定点の海水・海泥におけるVv生息調査とVpの検出状況調査を同時に実施した。

Vvの生息場所はVpと同じであり、また生化学的性状も

表4 分離菌株の生化学的性状及び諸性状

番号	菌株名	由来	培地での発育		オキシダーゼ	TSI	LIM	食塩加ベプトン水での発育				尿素分解	アラビノース	特異遺伝子		血清型
			TCBS	CPC				0	6	8	10			LDH	VV	
1	Vv-1	海泥	緑色コロニー	黄色コロニー	陽性	-/A	+++	-	+	-	-	-	-	-	+	O3
2	Vv-2	海泥	緑色コロニー	黄色コロニー	陽性	-/A	+++	-	+	-	-	-	-	-	+	OUT
3	Vv-3	海泥	緑色コロニー	黄色コロニー	陽性	-/A	+++	-	+	-	-	-	-	-	+	O1
4	Vv-4	海泥	緑色コロニー	黄色コロニー	陽性	-/A	+++	-	+	-	-	-	-	-	+	OUT
5	Vv-5	海泥	緑色コロニー	黄色コロニー	陽性	-/A	+++	-	+	-	-	-	-	-	+	O1
6	Vv-6	アサリ	緑色コロニー	黄色コロニー	陽性	-/A	+++	-	+	-	-	-	-	-	+	O6
7	Vv-7	アサリ	緑色コロニー	黄色コロニー	陽性	-/A	+++	-	+	-	-	-	-	-	+	O4
8	Vv-8	アサリ	緑色コロニー	黄色コロニー	陽性	-/A	+++	-	+	-	-	-	-	-	+	O6
9	Vp-1	タコ	緑色コロニー	黄色コロニー	陽性	-/A	+++	-	+	+	-	-	+	+	-	O3: K6

Vpと酷似していることから菌の分離及び同定は困難である。そこで我々は、mCPC培地で菌を分離したのうち特異的なVvの生化学的性状を示す菌株を選択し、更にPCR法で、VVh遺伝子の確認を行い菌種を決定した。

定点調査での結果、Vpは海水・海泥中に5～8ヶ月間継続して検出されたが特に海水温が高くなる7～9月の海水・海泥中から高い菌数が検出された。Vvは7月～9月の宮城県内の海水・海泥中から少ない菌数であるが検出された。一方、魚介類食品においては、Vpは高率に検出されるが、Vvはほとんど検出されず7月（検出率：50%）と9月（検出率：100%）に流通していた宮城県産のアサリから検出された。このことからVvは県内のアサリが生息する沿岸部あるいは汽水域に生息し、7～9月に旺盛に増殖すると思われる。Vvが検出された検体からは必ずVpも検出されるが、多量の菌数のVpが検出される検体からVvが検出されない場合もあり、VvとVpの生息に相関性は確認できなかった。

今回、菌検出用として培地として使用したmCPC培地にはVv以外のビブリオあるいは腸内細菌の発育を抑制するために高濃度のコリスチン、ポリミキシンBが添加されている。しかし、阻止剤の濃度が高いためVvの発育が強く抑制されることから、測定された菌数は実際の生息数より低く測定されている可能性があり、県内の沿岸部には測定値より高値のVvが生息していると思われる。

これまで県内でVvの患者発生は確認されていないが、県内にVvのハイリスク群が数多くいること、また県内沿岸部でVvの生息あるいはVv汚染食品の流通が確認されたことから、Vv感染症患者発生の可能性が充分あると考えられる。今後、Vv感染症の発生動向に注意を払うと共にVvの生息調査を継続して行う必要があると思われる。

### 参 考 文 献

- 1) Communicable Diseases Monthly Report, 12 (2001)
- 2) Mead PS, et al: Eerg Infect Dis 5, 607 (1999)
- 3) 宮坂次郎 他: Vibrio vulnificus感染症事例と食品・環境調査について, 衛生微生物技術協議会 第23回研究会講演抄録集, p39 (2002)
- 4) 厚生省の指標 国民衛生の動向 (2001)
- 5) 岡谷明 他: 糖尿病有病率に関する疫学データの収集, 健康日本21糖尿病分科会 (1999)
- 6) 佐藤征 他: 中耳炎および敗血症例から分離された Vibrio vulnificusのPCR, 感染症学雑誌, 75, 307～312 (2001)
- 7) Taniguchi H et al: Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostabledirect hemolysin and the thermolabile hemolysin from Vibrio parahaemolyticus. Microb. Pathog., 1, 425～432 (1986)