

食水系感染症病原体の検査法 - 5

ビブリオ・バルニフィカス

みや さか じ ろう や ひろ しゅん すけ
宮 坂 次 郎¹⁾: 八 尋 俊 輔²⁾
Jiro MIYASAKA Shunsuke YAHIRO

I. 病原体

1. 病原体

Vibrio vulnificus は当初 CDC でヒト由来の *Vibrio parahaemolyticus* として収集されていたが、本菌の乳糖発酵性から Hollis ら¹⁾ により lactose-fermenting vibrio または L+vibrio と記載され、1980 年に Farmer²⁾ によって *Vibrio vulnificus* と命名された (vulnus はラテン語で「傷」を意味する)。*Vibrio vulnificus* はインドール産生性などにより3つの生物型に分けられ、生物型2型はウナギの病原菌でヒトへの感染症は起こさないとされていたが、近年外国ではヒトへの感染報告もされている³⁾。また、生物型3型は、イスラエルの集団発生で分離された ONPG 陰性群である⁴⁾。本菌による感染症は、肝硬変などの基礎疾患を有するヒトが、本菌に汚染された魚介類の生の摂食や菌の増殖した海水や海泥への接触により傷口から感染する日和見感染症で、その病型は敗血症性ショックと壊死性筋膜炎をきたし、急激な経過をたどる。

2. 疫学

Vibrio vulnificus のヒトへの感染症は、1970年に Roland⁵⁾ によって最初に報告され、日本では1978年に河野ら⁶⁾ が報告している。本菌は *Vibrio* 属のグラム陰性小桿菌で一端に鞭毛を持ち活発な運動性を有し、沿岸近くの海水や海泥、そこに生息する魚介類に広く分布している。特に河口の河川水が流入する閉鎖性海域や干拓地の調整池等の塩分濃度の低い汽水域に多く分布している。*Vibrio parahaemolyticus* と同じような海域に生息するが *Vibrio parahaemolyticus* がほとんど生息できない低塩分 (2.0%以下) の海

域でも高率に生息が確認される。海水や海泥、魚介類での消長は、海水温が20℃を上回る日が継続しはじめると急激に菌数が上昇し、*Vibrio vulnificus* 感染症多発海域では、7～9月のピーク時には $10^3 \sim 10^6/100\text{ml}$ となる。また、海泥 (間隙水中) の菌数は、海水の100～1,000倍に達する。有明海、八代海、における500mlからの定性試験 (2001～2004年) では、11.5℃が検出最低水温であった^{7,8)}。

古城ら⁹⁾、小野ら¹⁰⁾、大石ら¹¹⁾ の報告では全国の発症例の40%以上が有明海、八代海沿岸に集中しており、伊勢湾、瀬戸内海、東京湾などの閉鎖性の高い海域がこれに続き、これらを合わせると全体の80～90%を占める。有明海、八代海沿岸は、これらのなかでも最も閉鎖度指標が高く、極端に降雨量が増すと塩分濃度は10～20%前後の状態が2カ月以上継続し *Vibrio vulnificus* の生息に適した環境となる¹²⁾。感染時期は、6～10月がほとんどであり、多発海域では、梅雨期の7月がもっとも多く、発生件数は、年間数例で2001年には9例を確認した。感染経路は、主に魚介類の生食による経口感染 (66～74%) と創傷感染 (8.6～21%) があり経口感染で敗血症に至ると死亡率は67.7～74%を示すと報告されている。

3. 臨床症状

本菌に感染すると多くは数時間～1日の潜伏期間ののち突発的に発症し、初期症状は、ほとんどが疼痛と発熱であり、腹痛、嘔吐、下痢などの消化器症状がある場合もある。また、多くの症例で皮膚症状が認められ主に壊死性筋膜炎を呈し、短期間で急激な敗血症を引き起こす予後不良な感染症である。また、好発年齢が60歳代で圧倒的に男性に感染者が多い。死亡率は、経口感染で7割、創傷感染で3割

1) 熊本県食肉衛生検査所 微生物検査室
☎861-1344 熊本県菊池市七城町蘇崎 1341

2) 熊本県保健環境科学研究所 微生物科学部
☎869-0425 熊本県宇土市栗先町 1240-1

1) Kumamoto Prefectural Meat Inspection Office
(1341 Sozaki, Shichijo-machi, Kikuchi-gun, Kumamoto)

2) Kumamoto prefectural Institute of Public-Health and Environmental Science
(1240-1 Kurisaki-machi, Uto-shi, Kumamoto)

食水系感染症病原体の検査法-5

といわれ、病型はわが国では経口感染が圧倒的に多いが、アメリカでは創傷感染が約5割を示す。肝機能障害のあるヒトに *Vibrio vulnificus* 感染症が多発することについては、Kuppfer細胞のクリアランス能低下、腸管からの endotoxin 吸収の増加、トランスフェリンの生産低下による血清遊離鉄の上昇による細菌の増殖などが考えられている¹³⁾。また、菌側の病原因子としては *Vibrio vulnificus* の貪食細胞への抵抗性、溶血毒素やタンパク質分解酵素などの外毒素による急激な組織壊死が考えられている。

II. 検査法

1. 培養法

臨床由来の *Vibrio vulnificus* 分離は、血液、血疱、創部材料を検体として血液寒天培地による分離で十分あるが、創部検体ではその他の海水由来菌の混入に注意を要する。なお、本菌は死滅しやすいので迅速な検査が必要で、輸送する場合は Cary-Blair の輸送培地を使用する。また、症状の進行がきわめて速いため、検体の直接塗抹鏡検（グラム染色、位相差顕微鏡観察）による検査は、培養法と併せて行うことが重要である。

環境中や魚介類からの分離では、増菌培養と分離培地による培養が一般的であるが、競合するその他の海洋細菌と比較してさまざまな抑制因子に対する抵抗力が弱く、最適な増菌と分離法は確立していない。

以下、海水、魚介類の定量検査について、一般的な培養法を述べる。

増菌培養は、菌数の減少を避けるため選択増菌は行わずアルカリ性ペプトン水を使用する。選択分離培地としては、従来から mCPC 寒天培地や SPS 寒天培地が使用されているが、これらの培地は抑制が強いため、菌数が少ない検体では現在のところクロモアガービブリオ寒天培地（関東化学）や TCBS 寒天培地が有利である。

増菌温度は 35℃で行うが、培養時間は 12～16 時間以内で止める。増菌培養時間をそれ以上長くすると増殖の旺盛な他の菌がかぶさり、分離できるコロニーは確実に減少する。分離培養では、環境中に

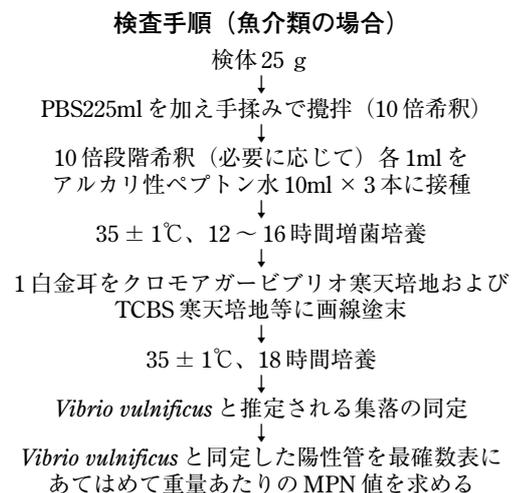
最も多いタイプ（90%以上）は、クロモアガービブリオ寒天培地で緑色に近い青色のコロニー（TCBS では青緑色）を形成するが、白糖分解性の株は青色（白色輪郭）のコロニー（TCBS では黄色）を形成する。また、環境中には、クロモアガービブリオ寒天培地で白色（TCBS では青緑色）や白色中心部淡い青色（TCBS では黄色）の株も存在しているので、コロニーの微妙な変化の観察には、肉眼観察に加え斜光法による実体顕微鏡観察が有効である。菌の同定は、複数の分離培地による確認（図1）と平行して生化学性状試験および遺伝子検査法などを行う必要がある。なお、簡易同定キットでも環境中に最も多いタイプの株の判定は可能であるが、白糖やマンニトール分解性、オルニチンデカルボキシラーゼの反応は株によって異なるため判定できない例もある。

1) 材料の処理法

魚類はえらや内臓、筋肉の細切、貝類はむき身の細切、甲殻類は全体の細切、海水はそのまま試料とする。

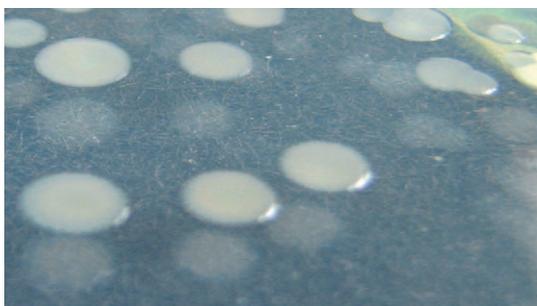
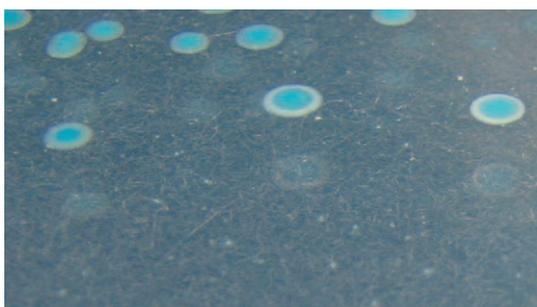
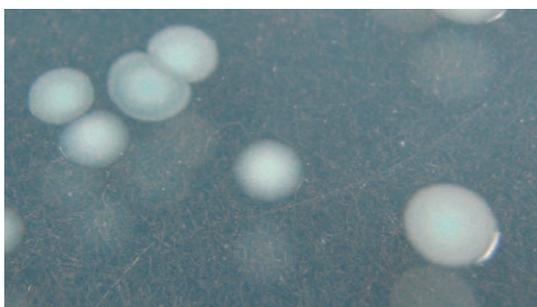
海水以外の材料は、それぞれ 25g を秤量し、ストマッカー用の袋に入れる。甲殻類はストマッカーにかけると袋が破損するため手揉みによる。

なお、菌数定量のための検体の搬送は困難であり、特に海水の搬送は採水時の温度に保ち数時間以内に検査を開始する必要がある、低温（10℃以下）輸送では *Vibrio vulnificus* の菌数は減少する。以下に検査フローを示す。



※海水の場合は採水した容器をよく攪拌して、海水10mlを10mlの倍濃度アルカリ性ペプトン水3本に接種、次に1mlを10mlの規定濃度アルカリ性ペプトン水に接種、予想される菌数に応じて段階希釈する。

【クロモアガービブリオ寒天培地】

白糖非分解株1 最も環境に多いタイプ
(ヒト由来) [緑色に近い青色で輪郭は半透明]白糖非分解2 (二枚貝：シオフキ由来)
[白色]白糖分解株1 (ヒト由来)
[青色で不透明白色の輪郭]白糖分解株2 (二枚貝：ハマグリ由来)
[白色中心部に淡い青色]

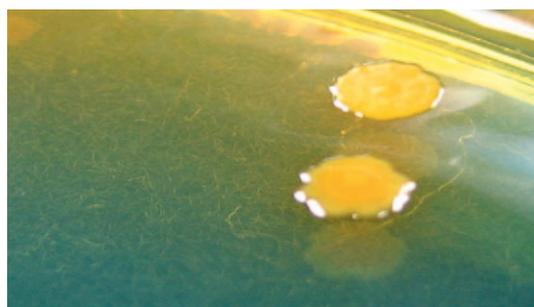
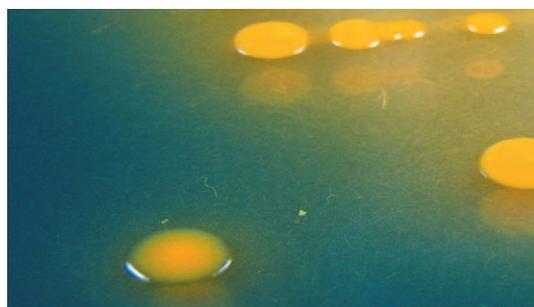
【TCBS 寒天培地】



[青緑色]



[青緑色]

[黄色] 48時間後には、両培地ともに
辺縁は波状コロニーとなる。

[黄色]

図1 *Vibrio vulnificus* (生物型1) 分離培地上の比較 (35℃24時間培養)

食水系感染症病原体の検査法-5

2) 生化学性状試験 (生物型1)

Vibrio vulnificus が疑われるコロニーで、オキシダーゼ (+)、1%NaCl 加 TSI で斜面 (±)、高層 (+)、H₂S (-)、1%NaCl 加 LIM でリジン (+)、インドール (+)、運動性 (+)、1%NaCl 加 VP (-)、0、3、8、10%NaCl 加 ブイヨン (発育試験) で 3% のみ (+)、ONPG (+)、サリシン (+)、セロビオース (+) を *Vibrio vulnificus* とし、必要に応じて株により性状が異なるオルニチンデカルボキシラーゼ、白糖、マンニトール等を確認する。

2. 遺伝子検査法

近年、積極的に遺伝子検査法が導入され、菌の検出、同定に遺伝子検査法が広く用いられている。*Vibrio vulnificus* の検査においても菌の同定には hemolysin¹⁴⁾ あるいは *toxR* 遺伝子¹⁵⁾ を用いた PCR 法がよく用いられている。以下に著者らが検査に通常使用している方法を紹介する。

1) DNA 抽出

① 増菌培養液からの DNA 抽出

培養液 1ml を遠心チューブにとり、10,000rpm で 2 分間遠心分離後、上清を捨てる。沈さに滅菌精製水 100 μ l を加え、混和後 95 $^{\circ}$ C 5 分加熱、12,000rpm で 30 秒遠心分離後、上清を検体として使用する。

② コロニーからの DNA 抽出

100 μ l の、滅菌精製水にコロニーを白金耳で少量懸濁し、95 $^{\circ}$ C 5 分加熱、12,000rpm で 30 秒遠心分離後、上清を検体として使用する。

2) PCR

Hill ら¹⁴⁾ が報告している Primer を用い、PCR を実施する。なお、試薬や検査時間を考慮して、反応液組成、反応時間等は変更し実施している。

① Primer

VVp1 : 5'-CCGCGCGTACAGGTTGGCGC-3'

VVp2 : 5'-CGCCACCCACTTTCGGGCC-3'

② 反応液

試薬は TaKaRa Ex Taq HS (TaKaRa) を用い、反応液組成は次のとおり。

10 × PCR buffer	1 μ l
dNTP Mixture	0.8 μ l
VVp1	0.1 μ l
VVp2	0.1 μ l
Ex Taq HS	0.05 μ l
DW	5.95 μ l
Template DNA	2 μ l
計	10 μ l

③ PCR 条件

PreDenature	94 $^{\circ}$ C	2min	} 30cycles
Denature	94 $^{\circ}$ C	8sec	
Annealing	69 $^{\circ}$ C	10sec	
Extension	72 $^{\circ}$ C	20sec	
Final Extension	72 $^{\circ}$ C	5min	

3) 電気泳動

2%アガロースで電気泳動し、519bp の増幅産物を確認する。

検体から直接遺伝子を検出する方法も多く報告されている。特に臨床検体からの遺伝子検出は、本病態からみても有用である。最近、PCR の他に LAMP 法を用いた臨床検体からの *Vibrio vulnificus* の検出も報告されている¹⁶⁾。環境検体からは *toxR* 遺伝子を標的とした real-time PCR で定量する報告¹⁵⁾ もある。また、環境検体からの定量には工藤ら¹⁷⁾ の報告した MPN-PCR 法も有用である。

文 献

- Hollis DG, Weaver RE, Baker CN, Thornsberry C : Halophilic vibrio Species isolated from blood culture. J Clin Microbiol 1976 ; **3** : 425-431.
- Farmer JJ : *Vibrio* ("Benecka") *vulnificus*. The bacterium associated with sepsis, septisemia and the sea. Lancet 1978 ; Oct : 27.
- Amaro C, Biosca EG : *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans. Appl Environ Microbiol 1996 Apr ; **62** (4) : 1454-1457.
- Bisharat N, Agmon V, Finkelstein R, Raz R, Ben-Dror G, Lerner L, Soboh S, Colodner R, Cameron DN, Wykstra DL, Swerdlow DL, Farmer JJ 3rd.: Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. Israel Vibrio Study Group. Lancet 1999 Oct 23 ; **354** (9188) : 1421-1424.
- Roland FP : Leg gangrene and endotoxin shock due to

- vibrio parahaemolyticus*-an infection acquired in New England coastal waters, N Engl J Med 1970 ; **282** (23): 1306.
- 6) 河野 茂, 松尾 武, 池田高良, 猿渡勝彦, 二宮日出世: 激烈な経過をとって死亡した好塩基性ビブリオ敗血症の1解検例, 乳糖分解性ビブリオ敗血症本邦第1例. 最新医学 1978 ; **33** : 1243-1248.
 - 7) 宮坂次郎, 徳永晴樹, 荒平雄二, 甲木和子: 熊本県で発生した *Vibrio vulnificus* 感染症事例の細菌学的検討. 熊本県保健環境科学研究所報 2002 ; **32** : 31-36.
 - 8) 宮坂次郎, 八尋俊輔, 荒平雄二, 濱州大輔, 甲木和子, 徳永晴樹: 熊本県内の *Vibrio vulnificus* の環境分布と *Vibrio vulnificus* 感染症発生状況 (2001 ~ 2004 年). 熊本県保健環境科学研究所報 2004 ; **34** : 37-43.
 - 9) 古城八寿子, 城野昌義, 中川敬一, 小野友道: *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 1999 ; **6** : 875-884.
 - 10) 小野友道, 山本茂貴: 厚生労働科学研究費補助金 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 平成 15 年度総括・分担研究報告書 2004 ; 5-22.
 - 11) 大石浩隆, 浦由紀子, 三溝慎次, 中嶋幹夫: わが国における *Vibrio vulnificus* 感染症患者誌上調査. 感染症誌 2006 ; **80** : 680-689.
 - 12) 宮坂次郎, 八尋俊輔, 中島龍一, 工藤由起子, 高鳥浩介: 厚生労働科学研究費補助金 細菌性食中毒の予防に関する研究 平成 18 年度総括・分担研究報告書 2007 ; 110-118.
 - 13) 藤山重俊, 田中基彦: *Vibrio vulnificus* 感染症. 日内科誌 1998 ; **87** : 150-156.
 - 14) Hill WE, Keasler SP, Trucksess MW, Feng P, Kaysner CA, Lampel KA : Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. Appl Environ Microbiol 1991 Mar ; **57** (3): 707-711.
 - 15) Takahashi H, Hara-Kudo Y, Miyasaka J, Kumagai S, Konuma H : Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction targeted to the *toxR* for detection of *Vibrio vulnificus*. J Microbiol Methods 2005 Apr ; **61** (1): 77-85.
 - 16) 根本次郎, 小島 禎, 草場耕二, 永沢善三, 大石浩隆, 中嶋幹夫: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いた *Vibrio vulnificus* の迅速検出. 感染症誌 2008 ; **82** : 407-413.
 - 17) 工藤由起子, 三輪憲永, 山崎省吾, 八柳 潤, 岩出義人, 高橋肇, 宮坂次郎: 魚介類からの *Vibrio vulnificus* の定量検出方法の検討. 感染症誌 2005 ; **79** : 931-936.