

宮城県内の海水および市販貝類からのビブリオ・バルニフィカスの検出

Isolation of *Vibrio vulnificus* from Sea Water and Commercial Shellfish in Miyagi Prefecture

齋藤 紀行 山田 わか 渡邊 節
 小林 妙子 川野 みち 田村 広子
 三品 道子 菅原 直子 佐藤 由美*¹
 畠山 敬 谷津 壽郎 秋山 和夫
 川向 和雄*²

Noriyuki SAITO, Waka YAMADA, Setsu WATANABE
 Taeko KOBAYASHI, Michi KAWANO, Hiroko TAMURA
 Michiko MISHINA, Naoko SUGAWARA, Yumi SATO
 Takashi HATAKEYAMA, Juro YATHU, Kazuo AKIYAMA
 Kazuo KAWAMUKAI

平成13年度～16年度までの4年間、海洋細菌のビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus* : 以下V_vとする) の生息状況調査を実施し、1) 宮城県内の汽水域にもV_vが生息する、2) V_vは海水温が20℃を超える期間に活発に増殖する、3) V_vの汚染調査の対象生物としてアサリが適している、4) 夏季に流通するアサリからV_vが高率に検出される、5) V_v汚染アサリを低温保存することで菌数は経日的に減少する、6) 分離菌のO血清型はO1, O4a, O6が高い割合を占める、ことが明らかになった。

キーワード：ビブリオ・バルニフィカス；海水；市販貝類

Keywords : *Vibrio vulnificus* ; sea water ; commercial shellfish

1 はじめに

重篤な感染を引き起こすV_vは西日本、特に九州地方の沿岸部に生息し、主に魚介類を介してヒトへ感染することが知られている¹⁾。

平成13年度から15年度まで宮城県内の沿岸部汽水域に調査定点(以下定点とする)を設け、海水・海泥におけるV_vの生息状況と市販魚介類のV_v汚染状況を調査してきた。その結果、V_vは宮城県内の汽水域および一部の市販生鮮貝類、特にアサリがV_vで汚染していることが明らかになった^{2,3)}。

熊本県の調査によると、河川の影響を受けやすい海水浴場のV_v菌量(MPN値)は高いと報告されている⁴⁾。V_vは食中毒以外に創傷感染からの重篤な敗血症あるいは中耳炎等の感染症の原因になることから、海水浴による感染の危険性が危惧される。そこで、本年度は、定点でのV_vの生息状況、市販生鮮貝類のV_v汚染実態調査に加え、河川の影響を受けやすい県内の海水浴場についてV_vの検出状況調査を、さらに調査定点に生息する貝類等のV_v汚染実態調査を実施することとした。

一方、我々はV_v菌液を低温あるいは酸性に保持すると菌数が1日目で急激に減少することを昨年度報告した⁵⁾。

V_vで汚染したアサリが市販流通過程で菌数にどのような変化を受けるかを検証する目的で、V_v汚染アサリのモデル実験系を用い、アサリを低温保存した場合にアサリ中のV_vが経日的にどのように変化するかを検討した。

以上についての調査を実施し、得られた結果について報告する。なお、4年間の調査結果についても考察を加えた。

2 方法と材料

2.1 調査期間

平成16年度の定点での海水・海泥、海水浴場及び市販生鮮貝類についての調査は、4月から11月まで実施した。

2.2 調査定点と検体入手

宮城県名取市関上(ゆりあげ)地区の増田川河口の汽水域を定点とし、海水・海泥と生息生物としてミナトガイあるいはイソガニを採集し、検査検体とした。海水浴場は、河川が流入する海水浴場Aを選定し、5月から10月の毎月(6月は除く)採水し、検査検体とした。市販魚介類は地場産品直売所あるいは量販店から検査当日購入した。

2.3 使用培地

V_vのMPN値算定用及び増菌用としてアルカリペプト

* 1 現 がんセンター * 2 現 食と暮らしの安全推進課

ン水（日水製薬：APW），分離用としてmCPC（自家調整）およびクロモアガービプリオ（関東化学：CV）培地，更にV_vの菌数測定用としてCV培地を使用した。

2.4 海水・海泥からのV_v検出

(1) 海水

海水100mlにAPWの粉末3gを添加し，これを原液とした。更に10倍，100倍および1,000倍に希釈し，各希釈濃度の各3本をMPN管とし，37℃で一晩培養後，各MPN管から1白金耳をmCPCおよびCV培地に塗抹培養しV_vの分離を行った。また，各MPN管についてV_vの特異溶血（V_v cytotoxin-hemolysin：V_vh）遺伝子をPCR法により確認し，陽性管の本数から海水1mlあたりのMPN値を算出した（PCR-MPN値）。MPN値0.23以上をV_v陽性検体とした。

(2) 海泥

海泥20gをAPW180mlに加え10倍希釈液とした。これを更に100倍，1,000倍，10,000倍および100,000倍に希釈し，海水の場合と同様にして海泥1gあたりのMPN値を求めた。

2.5 貝類等からのV_v検出

市販生鮮貝類は購入した1包みを1検体としてむき身を取り出し，25gをストマッカー袋に秤量し，これにAPW225mlを添加し手揉みで均一化した。この液を10倍希釈液とし，更に100倍，1,000倍の希釈液を調整し，各希釈濃度の各3本をMPN管とした。各試験管からのV_v検出は海水の場合と同様の方法で行った。また，定点に生息する生物のV_v汚染実態調査には定点で採集した貝あるいはカニを検査材料とし，貝はむき身をカニはそのまま計量し10倍希釈液量のAPWを加えホモジナイズ後，市販貝類の検査と同様にしてV_vの検出を行った。

2.6 分離菌株の同定と血清型

V_vの同定はmCPC培地で黄色，CV培地で青色のコロニーをそれぞれ釣菌し，分離菌株の生化学的性状試験，PCR法によるV_vhの遺伝子を確認してV_vと同定した。血清型別は国立感染症研究所で実施した。

(1) 生化学的性状試験：TSI，LIMでの性状，耐塩性，セルピオース利用能について調べた。

(2) PCR法による遺伝子検査：V_vh遺伝子をPCR法による定法で確認した。

(3) 血清型別試験：国立感染症研究所で作成したO抗原の抗血清（1～16型）により決定した。

2.7 V_v汚染アサリにおける菌消長実験

市販アサリ（V_v不検出）1Kgを滅菌海水4Lに漬け，これに最終菌量が10³～10⁴cfu/mlになるよう調整したV_v菌液50mlを添加，攪拌して15℃の恒温器内に静置した。約20時間後，アサリ（V_v汚染アサリ）を取り出し，滅菌海水ですすぎ，新たな滅菌海水1Lの入った容器2個に分けた。この時，汚染アサリの一部を取り出し，むき身中のV_v菌数測定を行った。容器は5℃と15℃に設定したそれぞれの恒温器内に別々に静置し，

翌日からアサリのむき身と容器の海水中のV_v菌数を希釈法で測定した。即ち，海水は生理食塩水で10倍の段階希釈液を作成，あるいはむき身は生理食塩水で10%けん濁液に調整し更に10倍段階希釈液を作成した。各希釈液をCV培地に塗抹培養し出現コロニー数から，むき身は1g当たり，海水については1ml当たりの菌数（cfu/g or ml）を算出した。

3 研究結果

3.1 定点における海水・海泥のV_v生息状況

平成16年度の定点における海水および海泥のV_v検出状況を定点の海水温とともに図1に示した。海水からは7～9月までの3ヶ月間，海泥からは6～10月までの5ヶ月間V_vが検出された。7，8月は海水，海泥ともにMPN値が高値を示した。

3.2 市販流通貝類におけるV_vの検出状況

貝類のV_v汚染調査は主に市販生鮮アサリについて実施した。表1に検体購入日（検査実施日），漁獲地，

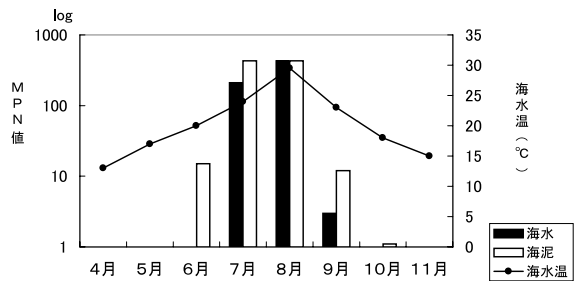


図1 定点における海水・海泥からのV_v検出状況

表1 市販貝類からのV_v検出状況

検体番号	採材日	食品名	漁獲地	MPN 値	V _v 分離
1	6/16	アサリ	県内	< 0.3	×
2	6/16	ツブ	県内	< 0.3	×
3	6/16	かき	県内	< 0.3	×
4	6/16	ホッキ	県内	< 0.3	×
5	6/16	アサリ	県内	0.36	×
6	6/23	アサリ	県内	0.36	×
7	6/23	アサリ	県内	< 0.3	×
8	7/6	アサリ	県内	< 0.3	×
9	7/6	アサリ	県内	< 0.3	×
10	7/6	アサリ	県内	24	×
11	7/6	アサリ	県内	< 0.3	×
12	7/12	アサリ	福島県	12	×
13	7/12	アサリ	愛知県	0.36	×
14	7/12	アサリ	県内	2.3	×
15	7/12	アサリ	県内	< 0.3	×
16	7/26	アサリ	愛知県	< 0.3	×
17	7/26	アサリ	愛知県	2.3	×
18	7/26	アサリ	福島県	> 140	×
19	7/26	アサリ	愛知県	0.36	×
20	8/31	アサリ	愛知県	< 0.3	×
21	8/31	アサリ	愛知県	< 0.3	×
22	8/31	アサリ	愛知県	9.1	×
23	8/31	アサリ	県内	< 0.3	×
24	8/31	アサリ	県内	0.36	×
25	9/29	アサリ	千葉県	9.1	×
26	9/29	アサリ	愛知県	< 0.3	×
27	9/29	アサリ	愛知県	150	×
28	9/29	アサリ	北海道	< 0.3	×
29	10/12	かき	県内	< 0.3	×
30	10/12	かき	県内	< 0.3	×
31	10/12	かき	県内	9.1	×
32	10/18	アサリ	県内	0.23	×
33	10/18	かき	県内	43	×
34	10/18	かき	県内	93	×
35	10/18	かき	県内	15	×
36	11/8	かき	県内	< 0.3	×
37	11/10	かき	県内	< 0.3	×
38	11/17	かき	県内	< 0.3	×
39	11/17	かき	県内	< 0.3	×

：菌分離できたもの

×：菌分離できなかったもの

表2 市販貝類のVv検出率

検体名	検体数	Vv 検出件数	検出率 (%)
アサリ	26 (13)	14 (8)	53.8 (61.5)
かき	11	4	36.4
その他	2	0	0
合計	39	18	46.2

()は県内産アサリ

VvのPCR-MPN値, Vv分離状況を示した。貝類39件中18件がPCRでVv陽性となったが、菌が分離できたのは7件であった。PCRで陽性となった検体をVv検出検体とし、検出状況を月別、食品別に分類して表2に示した。Vvは6月から10月の食品検体で県内産26件中10件(検出率: 38.5%), 県外産13件中8件(検出率: 61.5%)の総計39件中18件(検出率: 46.2%)から検出された。食品別ではアサリからの検出率が53.8%と高く、特に7月の福島県産及び9月の愛知県産アサリは1g当たりのMPN値が100以上と高値を示した。

3.3 定点に生息する貝あるいはカニにおけるVv検出状況

定点に生息する生物のVv汚染状況調査を5月から11月まで、毎月定期的に定点の貝(ミナトガイ: 5, 6月)あるいはカニ(イソガニ: 7~11月)を採集し、Vv検査を実施した。月別のVv検出状況をVvのMPN値で表し海水温度と共に図2に示した。海水温が20を超える7月から9月に採集したカニからMPN値100を超える高値のVvが検出された。

3.4 海水浴場におけるVvの生息状況

海水浴場AにおけるVvの生息状況調査の結果を海水温と共に図3に示した。海水温度が20を超える6月から9月はVvが検出され、特に海水浴シーズンとなる7月はMPN値110と高値を示した。海水温度が20以下となる5月、10月はVvは検出されなかった。

3.5 分離Vv菌株の生化学的性状と血清型別

平成16年度分離した26菌株について生化学的性状試験, 特異遺伝子検査および血清型別を行い, その結果

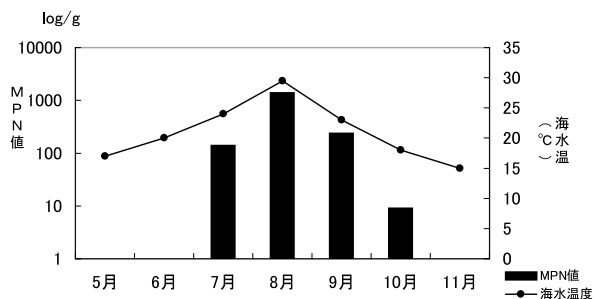


図2 貝またはカニからのVv検出状況

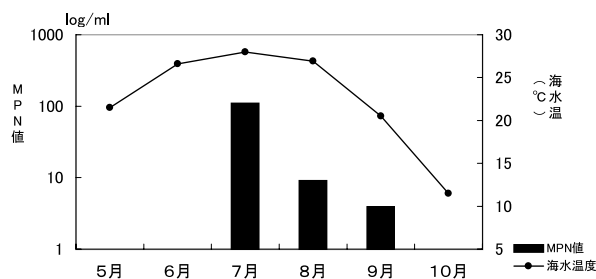


図3 海水浴場におけるVv検出状況

を表3に示した。26菌株は全て同じ性状を示した。

血清型別では, O1が5株(19.2%), O3が4株(15.4%), O4aが5株(19.2%), O6が2株(7.7%), O8が2株(7.7%), O14が5株(19.2%), O16が1株(3.8%), O1~O16以外のUTが2株(7.7%)であった。

3.6 Vv汚染アサリからの菌消長実験

Vv菌量を 7.1×10^3 cfu/mlに調整した滅菌海水にアサリを浸し, 15で約20時間汚染させた。アサリむき身には1g当たり 2.2×10^3 cfu量のVvが取り込まれた。これを5及び15の恒温器内に別々に静置した。1, 2, 3及び5日目に海水及びアサリむき身についてVv菌数を測定し, その結果を図4-A(5), B(15)に示した。むき身に取り込まれた菌数を100%とすると, 1, 2, 3及び5日目には, 5ではそれぞれ127%, 60%, 32%及び3%と, 15でそれぞれ27%, 34%, 11%及び1%となった。減数の変動を5と15と比較すると, 5の減数割合は15より小さいが5日目には両者とも3%以下と明らかな減数が認められ

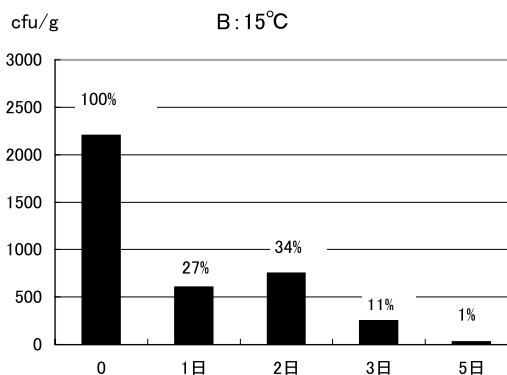
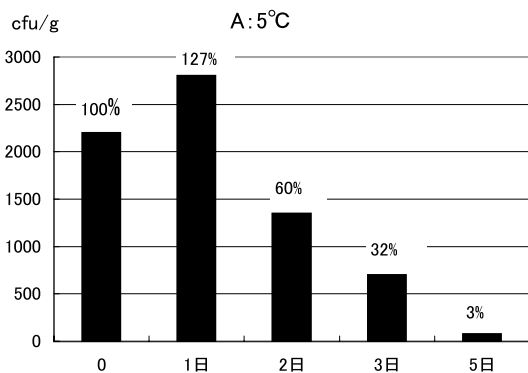


図4 Vv汚染アサリからのVv消長

表3 Vv菌株の生化学的性状および血清型別

菌株番号	41-3	41-4	102-5	102-6	145-2	145-3	169-3	205-1	205-3	214-1	218-2	227-1	229-1
由 来	貝 (閉上)	貝 (閉上)	アサリ (名籠)	アサリ (名籠)	アサリ (名籠)	アサリ (名籠)	アサリ (福島産)	かに (閉上)	かに (閉上)	海水浴場	海水浴場	海水浴場	海水浴場
検体採取日	6/7	6/7	6/23	6/23	7/6	7/6	7/12	7/12	7/12	7/13	7/13	7/13	7/13
mCPCにおける発育	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄
CVにおける発育	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青
TSI	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A
LIM :													
リシン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
インドール	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
運動性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
食塩耐塩性試験													
0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
セロピオース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR Vvh	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
血清型	O1	O14	O4	O4	O14	O14	O14	O3	O3	O1	UT	O4	O3

菌株番号	252-1	254-1	271-1	271-3	281-2	282-2	331-2	331-3	362-4	391-3	401-2	425-4	447-1
由 来	アサリ (福島産)	アサリ (福島産)	海水浴場	海水浴場	かに (閉上)	かに (閉上)	海水浴場	海水浴場	アサリ (三河湾産)	かに (閉上)	アサリ (千葉産)	アサリ (愛知産)	海水浴場
検体採取日	7/26	7/26	7/28	7/28	8/9	8/9	8/25	8/25	8/31	9/6	9/29	9/29	9/29
mCPCにおける発育	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄
CVにおける発育	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青
TSI	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A
LIM :													
リシン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
インドール	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
運動性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
食塩耐塩性試験													
0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
セロピオース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR Vvh	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
血清型	O4	O4	O8	UT	O1	O8	O1	O1	O14	O3	O6	O6	O16

た。一方、結果は示していないが添加直後の滅菌海水からは菌が検出されるが、20時間後には菌が検出されなかった。

4 考 察

我が国において、Vv感染患者発生は熊本県で多い。熊本県の研究によると、Vv感染症が発生する地域は汽水湖が多く点在する特異的な地形的であり、また高濃度のVvが検出される汽水域では塩分濃度が低い、と報告されている⁴⁾。このように、Vvが生息する地域は、地形的に特徴的な要因と関連性があるように思われた。そこで、本県のVv調査地点として小河川が海に流れ込む汽水域を定点に選定し、海水・海泥中のVvの生息状況を調査した。平成13年度から16年度の4年間の菌検出状況を図5に示した。Vvは毎年海水温が20 を超える月から15 になる月まで検出された。海水・海

泥からのVv検出パターンは毎年同じような動態を示し、海水温度が20 を超える時期(概ね6月~9月)は高濃度のVvが検出された。検出されるVv菌数は海水より海泥のほうが多くかつ検出される期間も長い。しかし、海水温度が10 以下になる時期(概ね12月~3月)には海水・海泥からVvは検出されない。即ち、Vvの増殖には海水温度が大きく影響することは明らかである。また、海水温度の昇降によりVvが検出されない時期、検出される時期が交互に出現することから、検出されない時期にも菌は完全に死滅していないと考えられる。ビブリオ属菌は生きているが培養できない状態(Viable but nonculturable: VNC)になりやすいことから⁶⁾、海水温が低温となる時期にはVvはVNCとなり、通常の検出法では菌が検出されていない可能性がある。

Vvは経口感染だけでなく創傷からの感染も引き起こ

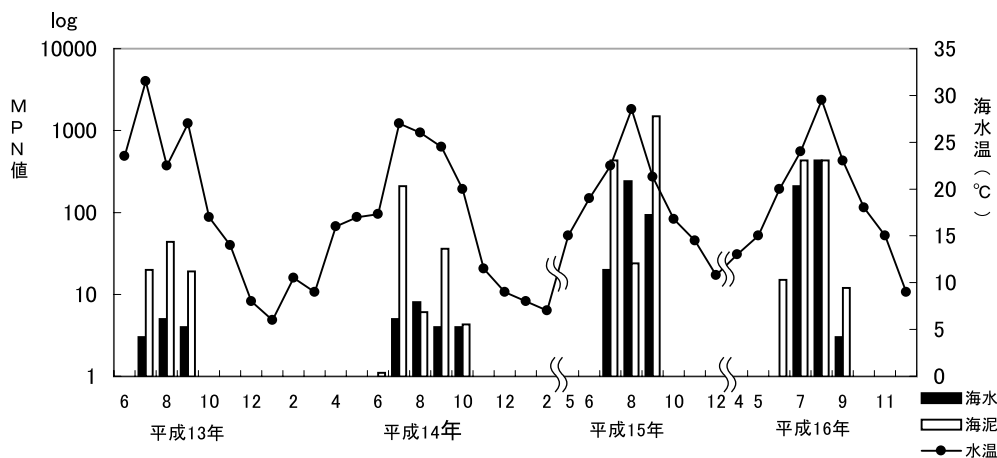


図5 定点の海水・海泥における4年間のVv検出状況

すことから、Vvに汚染した河川水或いは海水が感染源となり、海水浴等によって感染する危険性も危惧される。本県においても河川の影響を受ける海水浴場Aについて5月から10月まで(6月は実施せず)月に一度、海水浴場水中のVv菌数(MPN値)を測定した。その結果、7月から10月の海水からVvが検出され、特に海水浴シーズンである7月のMPN値は110と比較的高い値であった。

Vv感染は、患者発生地元産の生鮮魚介類の生食による場合が多いことから、Vvの生息調査は海水・海泥の他に、そこに生息する生物のVv保有状況についての把握が重要であると考え、定点での海水・海泥調査に加え生息生物についてのVv汚染調査を実施した。当初、アサリ等の貝類を対象生物と考えたが、通年の採集が困難なため、採材当日採集できたミナトガイおよびイソガニについてVv菌数測定を実施した。その結果、Vvは6月から10月までの検体から検出され、特に8月に採集したイソガニのMPN値は1400と高値を示した(図2)。このように、Vv生息が確認された汽水域に生息する生物から高濃度のVvが検出されたことから、本県においてもVv感染の危険性がないとは言えない。

市販流通の生鮮魚介類のVv汚染実態調査を宮城県、神奈川県、川崎市、鳥根県及び熊本県の各衛生研究所で平成13年度から実施した。その結果、様々な産地の魚介類からVvが検出されたことからVvは全国の沿岸に生息し定着し、特に魚類よりアサリなどの貝類が高頻度でVv汚染していることが明らかになった^{1,4)}。更に、15年度の我々の調査の結果から、貝類の鮮度が高いほどVvの検出率、MPN値が高くなる傾向であることが示された³⁾。本年度は貝類39件について汚染実態調査を実施し、18件からVvを検出した(検出率:46.2%)。アサリからは53.8%と高い検出率であった。そこで、Vv患者が発生する時期(7月~9月)についてアサリからのVv検出状況を、検出菌量(MPN値)別及び産地別に分類し、表4に示した。Vv検出陽性は35件中14件(検出率40%)、県内産では検出率は

表4 県内・県外産アサリのVv菌数別の検出
(H.13~H.16)

産地別	検体数	菌数(MPN/g)			
		< 0.3	0.3~	10~	100~
県内	20	14	5	1	
県外	15	7	5	1	2

30%、県外産では53.3%であった。陽性のうち12件はMPN値が100以下であったが、2件(ともに県外産)が100を超した。しかし、通常アサリを生で喫食することはないので直接ヒトへ経口感染する危険性は低いと考えられる。

Vvに汚染された貝類が流通する場合、流過程で菌数が増加すれば流通品が感染源となる可能性もあるので、流過程における菌の増減(消長)を把握することは感染予防上重要である。そこで、Vv汚染アサリを人為的に作製し、低温保存した場合のアサリ中のVv菌数変動を経日的に調べた。その結果、アサリに取り込まれたVvは5、15での保存で経日的に減数することから、低温保存され流通しているアサリのVv菌量は、漁獲された時点より少ない菌数になると考えられた。即ち、Vv調査で菌量が高値を示したアサリは、漁獲して間もないものか、あるいは更に高い値の菌数で汚染されていた可能性が考えられた。

一方、昨年度までの菌分離にはTCBS、CV、CB及びmCPC培地を併用していたが、Vv分離に使用されるmCPCは選択性が高い反面、Vvの発育も抑制され、Vvの検出率が低くなる。そこで、今年度はVvの検出をあげるためコリスチン、ポリミキシンを1/5量にしたが、分離された菌株は典型的なVvの性状を示すものだけであった。

本年度に分離した菌株の血清型はO1、O4、O14がそれぞれ5株で、合計が全体の58%を占めていた。4年間に分離した80菌株の血清型別はO1、O4及びO6がそれぞれ17.5%、22.5%、及び11.3%と高頻度に検

出されたが、この傾向は他の研究機関での検出状況と同じであった。

以上のことから、患者が発生していない地域でもVv感染予防のためVv調査を継続して実施することは重要であると思われた。

参 考 文 献

- 1) 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報告書：ピブリオ・バルニフィカスによる重篤な経口感染症に関する研究 (2003)
- 2) 齋藤紀行, 佐々木美江, 山口友美, 畠山敬, 渡邊節, 白石廣行: 宮城県保健環境センター年報 20, 68 (2002)
- 3) 齋藤紀行, 名村真由美, 渡邊節, 川野みち, 田村広子, 佐々木美江, 山口友美, 畠山敬, 御代田恭子, 秋山和夫, 鈴木隆: 宮城県保健環境センター年報 22, 130 (2004)
- 4) 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報告書：ピブリオ・バルニフィカスによる重篤な経口感染症に関する研究 (2004)
- 5) 渡邊節, 名村真由美, 川野みち, 齋藤紀行: 宮城県保健環境センター年報 22, 135 (2004)
- 6) M. L. Mothes et.al: *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1459 (1998)