原　著

Vibrio vulnificus 感染症に関する基礎的研究：海水，海泥およびカキからの本菌分離状況

[1)]麻布大学環境保健学部微生物学研究室，[2)]麻布大学獣医学部微生物学第 2 研究室
大仲　賢二[1)]　古畑　勝則[1)]　井口　光二[1)]
原　　元宣[2)]　福山　正文[1)]

（平成 14 年 1 月 16 日受付）
（平成 14 年 4 月 18 日受理）

Key words：　*Vibrio vulnificus*, sea, oyster

要　旨

自然環境下における海水，海泥およびカキからの *Vibrio vulnificus* の分布を明らかにするため，東京湾内（以下東日本）4 地点と徳島県内（以下西日本）9 地点（カキは 5 地点）の計 13 地点を対象に本菌の検索を行った結果，以下の成績が得られた．

1．海水 146 例について本菌の分離を試みたところ，80 例（54.8%）から本菌が分離された．その内訳において西日本では，海水 46 例中 19 例（41.3%）から，東日本では 100 例中 61 例（61.0%）からそれぞれ本菌が分離された．

2．海泥については東日本で採取した 98 例について分離を試みたところ，40 例（40.8%）から本菌が分離された．

3．カキ 2,165 例について本菌の分離を試みたところ，655 例（30.3%）から本菌が分離された．その内訳において，西日本では 309 例中 30 例（9.7%）から，東日本で 1,856 例中 625 例（33.7%）からそれぞれ本菌が分離された．

4．海水，海泥およびカキについてそれぞれ推定菌量を測定したところ，海水では＜30～1.1×10^{6}MPN/L，海泥では＜0.3～1.1×10^{5}MPN/100g およびカキでは＜0.3～1.1×10^{7}MPN/100g に本菌が認められた．

5．季節別に調査したところ，春期に 713 例中 44 例（6.2%）から，夏期に 620 例中 450 例（72.6%）から，秋期に 510 例中 264 例（51.8%）から，冬期に 56 例中 17 例（3.0%）からそれぞれ本菌が分離された．

〔感染症誌　76：528～535，2002〕

Vibrio vulnificus（*V. vulnificus*）は，海水，汽水を棲息域とする低濃度好塩性のグラム陰性桿菌である．本菌は当初，分類があいまいで *V. parahaemolyticus* と同定されていた．しかし，本菌は乳糖を分解し *V. parahaemolyticus* の性状とは異なることから，1979 年に Farmer[1)]が *V. vulnificus* と命名した．本菌によるヒトの感染症は，1970 年に Roland[2)]が下肢の皮膚滲出物から分離したのが最初である．本菌の特徴は他の *Vibrio* 属菌とは異なり，腸管外感染を起こし，肝臓などに基礎疾患を有するヒトや免疫力の低下したヒトに感染し，重篤な症状を引き起こしている[3)]．また，臨床症状の

別刷請求先：（〒229-8501）神奈川県相模原市淵野辺 1―17―71
麻布大学環境保健学部微生物学研究室
大仲　賢二

違いから原発性敗血症型，創傷感染型，胃腸型に分類されている．わが国では，1978 年に河野ら[4]が敗血症患者から初めて分離して以来，西日本を中心に毎年数例の発生が散発的に見られるに過ぎなかった．ところが，最近高齢化に伴い基礎疾患を有し免疫力の低下したヒト，物流の迅速化，グルメ嗜好や日本人の食性による魚介類の生食から本菌感染症の増加が危惧されている．しかし，本菌の自然環境下における分布調査は必ずしも明らかにされていないのが実情である．そこで，ヒトの本菌感染症の基礎的研究の一環として海水，海泥およびカキにおける本菌の分布状況を検討した．

材料および方法

1．調査材料

1998 年 10 月から 2000 年 11 月の期間に Fig. 1 に示すように東京湾内の 4 地点（千葉県側：千葉みなと（A），稲毛海岸（B），東京都側：葛西臨海公園（C），お台場海浜公園（D））から海泥計 98 例，海水計 100 例，およびカキ計 2,054 例を採取した．また，徳島県内では 9 地点（津田，松茂，小松島港，鳴門，粟田漁港，大神子，粟津，富岡，亀浦）の海水計 46 例，カキは 5 地点（吉野川河口，新町川河口，粟田漁港，津田港，小松島港）から計 309 例を採取した．

なお，地域の表現は東京湾内を東日本，徳島県内を西日本とした．

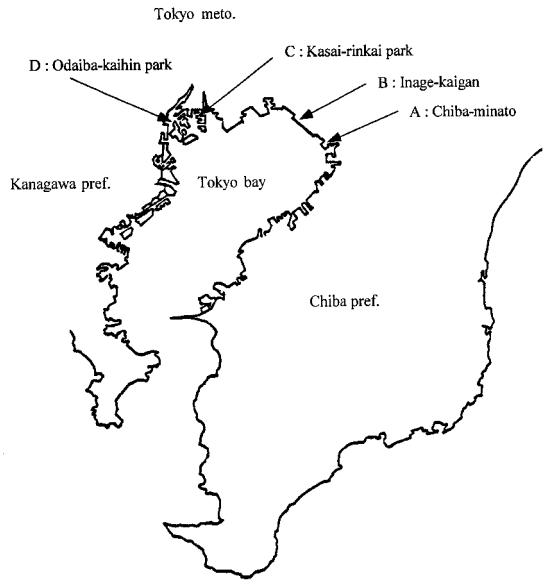
2．分離および同定

1）海水：海水 500ml をミリポア型ろ過器で吸引後，そのフィルター（0.2μm）を 0.08% セロビオース，ポリミキシン B 加アルカリペプトン水（APWPC)[5]50ml の中に入れ，37℃18 時間培養後，1 白金耳量をコリスチン加セロビオース寒天培地（CCA)[6]に塗抹し，37℃18 時間培養後セロビオースを分解した黄色コロニーを 1 平板当り 4 コロニー釣菌し純培養した．

2）海泥：海泥 10g を APWPC 90ml の中に入れ，37℃18 時間培養後，分離培養は上述の方法に準拠した．

3）カキ：カキ 1 に対してその 9 倍量の APWPC を入れ，37℃18 時間培養後，分離培養は上述の方法に準拠した．

Fig. 1　Environmental sampling sites at Tokyo Bay.



菌種同定は，各平板から純培養した菌株について一次鑑別試験として 2%NaCl 加 TSI 寒天培地，2%NaCl 加 LIM 培地，オキシダーゼ試験を行い，ブドウ糖（＋），乳糖・白糖（－），ガス（－），硫化水素（－），リジン（＋），運動性（＋）およびオキシダーゼ（＋）の性状を示したものを *V. vulnificus* と推定した．次に簡易同定キットであるエンテログラム（和光純薬）を用いブドウ糖，硫化水素，マロン酸，硝酸塩，インドール，トリプトファン，リジン，ウレアーゼ，アセトイン，オルニチン，アルギニン，クエン酸，ソルビトール，白糖，イノシトール，マンニット，ラフィノース，アドニット，アラビノース，ラムノースおよびβ-ガラクトシダーゼの各種生化学的性状試験を行った．そこで *V. vulnificus* と同定された菌株について PCR 法[7]を用いて *V. vulnificus* が特異的に保有する cytotoxin-hemolysin 遺伝子の検出を試み同遺伝子の保有の有無を確認後，本菌と同定した．

3．推定菌量の測定

海水，海泥およびカキのいずれの場合も，10 倍段階希釈法を用い MPN（3 連法）で菌量を推定した．

平成14年 7 月20日

Table 1 Seasonal frequency of *V. vulnificus* from sea water

Area	Season				Total
	Spring	Summer	Autumn	Winter	
east Japan					
A (Chiba-minato)	1/ 6(16.7)*	5/ 6(83.3)	6/ 7(85.7)	0/ 6(0.0)	12/ 25(48.0)
B (Inage-kaigan)	4/ 6(66.7)	5/ 6(83.3)	6/ 7(85.7)	4/ 6(66.7)	19/ 25(76.0)
C (Kasai-rinkai park)	2/ 6(33.3)	6/ 6(100.0)	5/ 7(71.4)	1/ 6(16.7)	14/ 25(56.0)
D (Odaiba-kaihin park)	3/ 6(50.0)	6/ 6(100.0)	5/ 7(85.7)	1/ 6(16.7)	16/ 25(64.0)
Sub total	10/24(41.7)	22/24(91.7)	23/28(82.1)	6/24(25.0)	61/100(61.0)
west Japan	0/12(0.0)	10/12(83.3)	9/12(75.0)	0/10(0.0)	19/ 46(41.3)
Total	10 36(27.8)	32 36(88.9)	31 40(77.5)	6 34(17.6)	80/146(54.8)

* No. of positive/No. of examined (%)

成　績

1. 海水における本菌の分離状況

海水における本菌の分離状況と季節的分離状況を Table 1 に示した．海水 146 例中 80 例（54.8%）から本菌が分離された．その内訳について，東日本では A 地点が 25 例中 12 例（48.0%），B 地点が 25 例中 19 例(76.0%), C 地点が 25 例中 14 例（56.0%）および D 地点が 25 例中 16 例（64.0%）の計 100 例中 61 例（61.0%）から，西日本では 46 例中 19 例 (41.3%) から，それぞれ本菌が分離された．その地域別において，東日本の方が高い分離率を示し両地域間に差異が認められた（$p<0.01$）．

季節別における本菌の分離状況は，春期に 36 例中 10 例（27.8%）から，夏期に 36 例中 32 例(88.9%)から，秋期に 40 例中 32 例(80.0%)から，冬期に 34 例中 6 例(17.6%)から本菌が分離され，特に夏期と秋期から高率に分離された．その地域別の内訳において，西日本では夏期に 12 例中 10 例 (83.3%) と秋期に 12 例中 9 例 (75.0%) から本菌が分離されたが，春期の 12 例と冬期の 10 例から本菌は 1 例も分離されなかった．一方，東日本では春期に 24 例中 10 例(41.7%)から，夏期に 24 例中 22 例（91.7%）から，秋期に 28 例中 23 例(82.1%) から，冬期に 24 例中 6 例（25.0%）からそれぞれ本菌が分離された．このことから東日本では全季節から本菌が分離されたが西日本では，冬期と春期からは 1 例も分離されず，冬期と春期の間において両地域間で分離率に差異が認められた($p<0.01$)．しかし，夏期と秋期は両地域間で分離率に差異は認められなかった．

東日本において毎月，各調査地点ごとに本菌の推定菌量を測定した成績を Fig. 2 に示した．A 地点では，$<30\sim1.1\times10^{6}$ MPN/L を，B 地点では $<30\sim2.8\times10^{4}$ MPN/L を，C 地点では $<30\sim1.1\times10^{6}$ MPN/L を，D 地点では $<30\sim1.1\times10^{6}$ MPN/L をそれぞれ認めた．なお，水温は Fig. 2 に示すように 1 月から 3 月が最も低く，4 月以降は徐々に上昇し 8 月にピークを示し，9 月以後は徐々に低下する傾向が認められた．また，同一時期に測定した A, B, C および D の 4 地点間の水温に差は認めなかった．さらに，水温と菌量の間には正比例の関係が認められ，水温が上昇するにつれ，菌量の増加が認められた．

2. 海泥における本菌の分離状況

海泥における本菌の分離状況は，Table 2 に示すとおり，東日本の 4 地点から採取した海泥 98 例中 40 例（40.8%）から本菌が分離された．その内訳は，A 地点では 24 例中 6 例（25.0%）から，B 地点では 25 例中 12 例 (48.0%) から，C 地点では 24 例中 12 例 (50.0%) から D 地点では 25 例中 10 例（40.0%）からそれぞれ本菌が分離され，A 地点の分離率は他の地域に比べ低かったが地点別による差は認められなかった．

Fig. 2　Seasonal variation in the occurrence of *V. vulnificus* in sea water at each sampling sites.

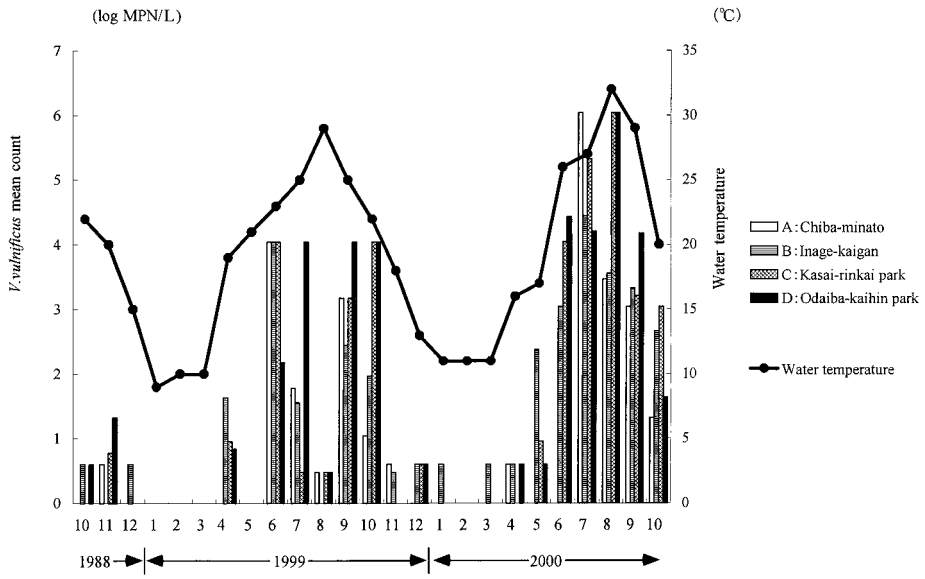


Table 2　Seasonal frequency of *V. vulnificus* from sediment

Season	Area		Total
	east Japan	west Japan	
Spring	2/23(8.7)*	NT **	2/23(8.7)
Summer	19/24(79.2)	NT	19/24(79.2)
Autumn	18/27(66.7)	NT	18/27(66.7)
Winter	1/24(4.2)	NT	1/24(4.2)
Total	40/98(40.8)		40/98(40.8)

* No. of positive/No. of examined(%)
** NT : not test

季節別では春期に 23 例中 2 例（8.7%）から，夏期に 24 例中 19 例（79.2%）から，秋期に 27 例中 18 例（66.7%）から，冬期に 24 例中 1 例（4.2%）からそれぞれ本菌が分離された．海水と同様に夏期と秋期において高率に本菌が分離された．

東日本の各調査地点別に本菌の推定菌量を検討した成績を Fig. 3 に示した．A 地点では，＜0.3～7MPN/100g を，B 地点では，＜0.3～1.1×10^4 MPN/100g を，C 地点では＜0.3～1.1×10^4 MPN/100g を，D 地点では＜0.3～1.1×10^5 MPN/100g をそれぞれ認めた．なお，海水温と菌量の関係は海水と同様な傾向が認められた．

3．カキにおける本菌の分離状況

カキにおける本菌の分離状況を Table 3 に示すとおり，2,165 例中 655 例（30.3%）から本菌が分離された．その内訳において西日本では 309 例中 30 例（9.7%）から，東日本では 1856 例中 625 例（33.7%）からそれぞれ本菌が分離された．

季節別における分離状況では，春期に 654 例中 32 例（4.9%）から，夏期に 560 例中 399 例（71.3%）から，秋期に 443 例中 214 例（48.3%）から，冬期に 508 例中 10 例（2.0%）からそれぞれ本菌が分離された．その内訳について，西日本では夏期に 62 例中 25 例（40.3%）から，秋期に 48 例中 5 例（10.4%）から分離されたが，春期の 74 例と冬期の 125 例からは 1 例も分離されなかった．東日本では，春期に 580 例中 32 例（5.5%）から，夏期に 498 例中 374 例（75.1%）から，秋期に 395 例中 209 例（52.9%）から，冬期に 383 例中 10 例（2.6%）からそれぞれ本菌が分離された．このことから，東日本において本菌が高率に分布している傾向が認められた．

平成14年 7 月20日

Fig. 3 Seasonal variation in the occurrence of *V. vulnificus* in sea mud at each sampling sites.

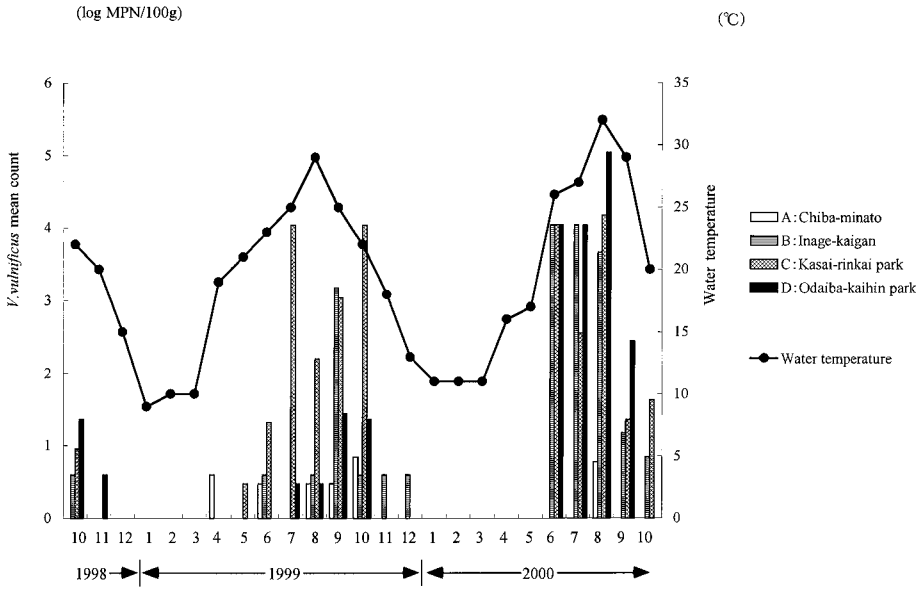


Table 3 Seasonal frequency of *V. vulnificus* from oysters

Season	Area		Total
	east Japan	west Japan	
Spring	32/580 (5.5)*	0/ 74(0.0)	32/654(4.9)
Summer	374/498 (75.1)	25/ 62(40.3)	399/560(71.3)
Autumn	209/395 (52.9)	5/ 48(10.4)	214/443(48.3)
Winter	10/383 (2.6)	0/125(0.0)	10/508(2.0)
Total	625/1,856(33.7)	30/309(9.7)	655/2,165(30.3)

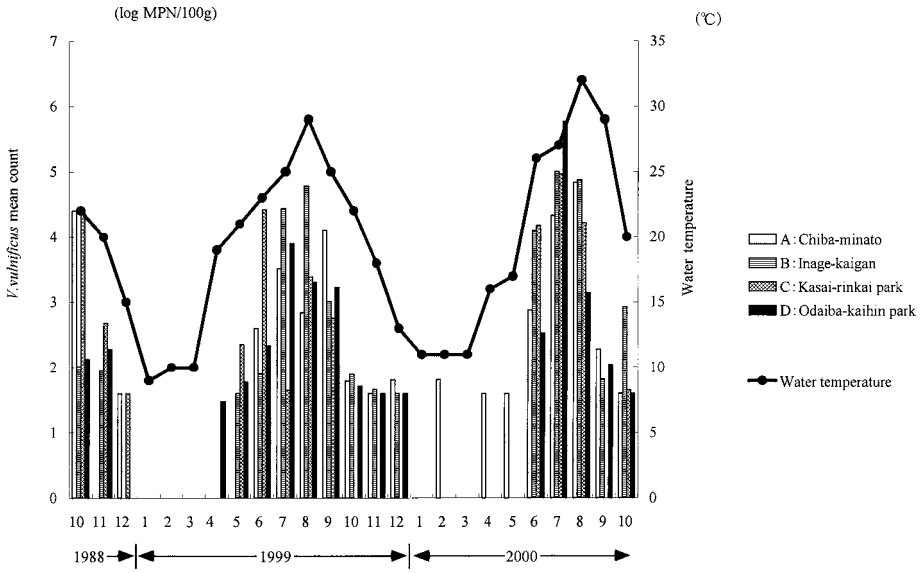
* No. of positive/No. of examined(%)

カキにおける本菌の地点別推定菌量について，東日本の4地点で検討した．A地点では＜0.3～1.1×10^6MPN/100gで平均5.3×10^3MPN/100g，B地点では＜0.3～1.1×10^5MPN/100gで平均1.2×10^4MPN/100g，C地点では＜0.3～1.1×10^6MPN/100gで平均7.3×10^3MPN/100g，D地点では＜0.3～1.1×10^7MPN/100gで平均2.5×10^4MPN/100gの菌量をそれぞれ認め，4地点における差異は認められなかった．なお，Fig. 4には1998年10月から2000年10月にかけて採取した，各地点別における推定菌量の推移を平均値で各月別に棒グラフで示した．また，水温と菌量の関係は，海水や海泥と同様に正の相関が認められた．

考　察

ヒトの感染症から *V. vulnificus* が初めて分離されたのは，1970年にRoland[2]が，海へ行き貝採取時に創傷感染を受け，左下肢壊疽とエンドトキシンショックを起こした患者の下肢から分離し，当初 *V. parahaemolyticus* と同定した．1976年にHollisら[8]が，乳糖を分解し，8%NaCl存在下では発育が認められない乳糖陽性(L(＋)) *Vibrio* 属が存在することを明らかにした．その後1979年にFarmer[1]がL(＋) *Vibrio* を *V. vulnificus* と命名し注目されるようになった．しかし，本菌の自然環境下の分布調査についての報告は少なく，Kelly[9]が海水から *V. vulnificus* の分布調査を行い，本菌は水温が高く比較的塩分濃度の低い環境を好むと報告している．また，Tamplinら[10]は，海水および貝類について分布調査を行い海水45.8%，貝類35.4%から本菌を分離し，本菌の分布は季節的に変動することを報告した．一方，わが国では道家ら[11]が夏期に汽水およびカキについて本菌の分布調査を行い全例から本菌を分離した．著者らは今

Fig. 4　Seasonal variation in the occurrence of *V. vulnificus* in the oysters at each sampling sites.



回，西日本（徳島県内）と東日本（東京湾内）の海水，海泥およびカキを対象に本菌の分布状況について調査を行い，海水 54.8%，海泥 40.8% およびカキ 30.3% から本菌を分離し，自然環境下に本菌が広く分布していることを明らかにし，東日本に多く分布していることが示唆された．この成績を季節的に比較したところ著者らは，春期 6.2%，夏期 72.6%，秋期 51.8%，冬期 3.0% からそれぞれ本菌を分離し，冬期と春期に分離率が低い傾向が見られた．これらの成績を Tamplin ら[10]と比較すると，春期と冬期は同様の傾向を示したが，夏期はやや高く，秋期は低い傾向を示した．しかし，夏期に調査を行った道家らの成績と比較すると低い傾向であった．また，菌種は異なるが畠山ら[15]は *V. parahaemolyticus* の分布調査の中で，海水温の温度差が激しいと海泥中に存在する *V. parahaemolyticus* の生存に影響する可能性があることを示唆していることから，国内と海外の地理的な差異による海水温の変化が本菌の分布に影響していることも考えられた．さらに，自然環境下の海泥中には河川から有機物が多量に流出され，海底に沈殿し，本菌の栄養源となり海水温が高くなる夏期から秋期にかけてこの有機物を利用し，本菌が増殖している可能性も考えられた．

海水における本菌の推定菌量について，著者らは＜30～1.1×10^5MPN/L を認めた．O 'neill ら[12]は＜2～1.2×10^4MPN/100ml を，Tamplin らは＜0.3～4.6×10^4MPN/100ml をそれぞれ認め，著者らの成績と類似していた．一方，Hoi[13]らは＜0.3～1.9×10MPN/ml を認めているが，著者らの成績に比べ菌量が少ない傾向であった．この菌量の異なった要因として，菌量を測定した培地や生息環境の違いが考えられた．また，菌量の季節的変動については東日本と西日本の間では特に差異は認められなかった．

海泥については，40.8% から本菌を分離し，海泥中にも本菌が高率に生息していることが明らかとなった．しかし，同一地域でも採取時期によっては本菌が分離されないこともあり，海泥中の本菌の分布も海水と同様に水温による影響が考えられた．海泥における本菌の推定菌量は＜0.3～1.1×10^5MPN/100g を認めた．Wright ら[14]は，Chesapeake 湾流域沿岸の海泥から本菌の調査を行い，0～9.9×10^3/g の菌量を認め，著者らの成績に比

平成14年 7 月20日

べ，やや多い傾向であった．

カキにおける本菌の分布調査について，アメリカでは本菌感染症患者の多くが，夏期にカキの生食により発症していることから，カキにおける本菌の分布調査が勢力的に行われ，Motes ら[16]は＜0.3～4.3×10^4MPN/g を，Tapmlin ら[10]は＜0.3～1.1×10^6MPN/100g を，Wright ら[14]は＜0.3～4.6×10^5/g をそれぞれ認めている．今回著者らは＜0.3～1.1×10^7MPN/100g を認め，Wright らとはほぼ同程度の菌量であったが Motes らや Tapmlin らに比べ，2～10 倍位多くの菌量が見られ差異が認められた．これらの差については，調査地点に本菌が増殖しやすい何らかの環境要因があったものと推察される．

以上のことから，海水，海泥およびカキに本菌が高率に分布していることを明らかにした．今後は自然界に分布する本菌とヒト感染症由来株との関連を疫学的手法を用い検討する予定である．

謝辞：稿を終えるに当たり，実験に協力頂きました麻布大学環境保健学部微生物学研究室々員各位に感謝いたします．

文　献

1) Farmer JJ：*Vibrio*（*"Beneckea"*）*vulnificus*,the bacterium associaed with sepsis, septicemia, and the sea. Lancet 1979；2：903.
2) Roland FP：Leg gangrene and endotoxin shock due to *Vibrio parahaemolyticus*－an infection acquired in New England Coastal Waters. N Engl J Med 1970；282：1306.
3) 藤山重俊，田中基彦：*Vibrio vulnificus* 感染症．日内誌　1998；87：934－40.
4) 河野　茂，松尾　武，池田高良，猿渡勝彦，二ノ宮日出世：激烈な経過をとって死亡した好塩性ビブリオ敗血症の1剖検例．最新医学　1978；6：1243－8.
5) Has W-Y, Wei C-I, Tamplin ML：Enhanced broth media for selective growth of *Vibrio vulnificus*. Appl Environ Microbiol 1998；64：2701－4.
6) Hoi L, Dalsgraard I, Daslsgaard A：Improved isolation of *Vibrio vulnificus* from seawater and sediment with cellobiose-colistin agar. Appl Environ Microbiol 1998；64：1721－4.
7) Coleman SS, Melanson DM, Biosca EG, Oliver JD：Detection of *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2 in eel and oysters by PCR amplification. Appl Environ Microbiol 1996；62：1378－82.
8) Hollis DG, Weaver RE, Baker CN, Thornsberry C：Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. J Clin Microbiol 1976；3：425－31.
9) Kelly MT：Effect of temperature and salinity on *Vibrio*（*Beneckea*）*vulnificus* occurrence in a Gulf coast environment. Appl Environ Microbiol 1982；44：820－4.
10) Tamplin M, Rodrick GE, Blake NJ, Cuba：Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from Florida estuaries. Appl Environ Microbiol 1982；44：1466－70.
11) 道家　直，戸泉　慧，梅田哲也，東　逸男，藪内英子：4）*Vibrio vulnificus* の環境・貝類中の分布．熊本県衛生公害研究所報　1981；11：20
12) O 'neill KR, Jones SH, Grimes DJ：Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great bay estuary of New Hampshire and maine. Appl Environ Microbiol 1992；58：3257－62.
13) Hoi L, Larsen JL, Dalsgaard I, Dalsgaard A：Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. Appl Environ Microbiol 1998；64：7－13.
14) Wright AC, Hill RT, Johnson JA, Roghman MC, Colwell RR, Morris JG Jr：Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake bay. Appl Environ Microbiol 1996；62：717－24.
15) 畠山　敬，山口友美，斎藤紀行，秋山和夫，白石廣行，小笠原久夫：宮城県における腸炎ビブリオ調査．宮城県保健環境センター年報　2000；18：56－60.
16) Motes ML, Depaola A：Offshore suspension relaying to reduce levels of *Vibrio vulnificus* in oysters（*Crassostrea virginica*）. Appl Environ Microbiol 1996；62：3875－7.

Basic Studies on *Vibrio vulnificus* Infection：Isolation of *V. vulnificus* from Sea Water, Sea Mud, and Oysters

Kenji OONAKA[1)], Katsunori FURUHATA[1)], Kouji IGUCHI[1)],
Motonobu HARA[2)] & Masafumi FUKUYAMA[1)]
[1)]Department of Microbiology, [2)]Departmet of Vetrinary Microbiology II, Azabu University

To clarify the environmental distribution of *Vibrio vulnificus*,sea water, sea mud, and oysters were examined at 13 sites, i.e. 4 sites in the Tokyo Bay (eastern Japan) and 9 sites (5 sites for oysters) in Tokushima Prefecture（western Japan).

1. *V. vulnificus* was isolated from 80 (54.8%) of the 146 samples of sea water examined. It was isolated from 19（41.3%）of the 46 samples from western Japan and 61（61.0%）of the 100 samples from eastern Japan.

2. It was isolated from 40（40.8%）of the 98 samples of sea mud obtained in eastern Japan.

3. It was isolated from 655（30.3%）of the 2,165 samples of oysters. They were 30（9.7%）of 309 samples from western Japan and 625（33.7%）of 1,856 samples from eastern Japan.

4. The density of *V. vulnificus* was 0.3～1.1×10^6MPN/L in seawater, 0.3～1.1×10^5MPN/100g in sea mud, and 0.3～1.1×10^7MPN/100g in oysters.

5. Seasonally,*V. vulnificus* was isolated from 44（6.2%）of the 713 samples in spring, 450（72.6%）of the 620 samples in summer, 264（51.8%）of the 510 samples in fall, and 17（3.0%）of the 56 samples in winter.

Thus, the isolation rates of *V. vulnificus* from sea water and oysters tended to be higher in eastern Japan than in western Japan and to be highest in summer, then, in fall.

平成14年 7 月20日