Lab. Clin. Pract., **20**(2)：85-88(2002)

第12回　春季大会記録

シンポジウム：大学検査部：特色ある検査と特色ある研究

有明海における *Vibrio vulnificus* の環境調査と細菌学的解析

久留米大学医学部附属病院臨床検査部
佐川　公矯・橋本　好司・近藤　正治

久留米大学医学部ウイルス学講座
豊田　哲也

はじめに

ビブリオ・バルニフィカス(*Vibrio vulnificus*)は腸炎ビブリオ類似性の好塩性ビブリオである．ビブリオ・バルニフィカスによる感染症はまれではあるが，肝硬変症や糖尿病等の免疫機能が低下した患者が，この菌を保有した魚介類を生で食べて感染した場合，四肢の壊死性筋膜炎，敗血症ショック等を引き起こし，発症から数日以内に，7～8割の患者は死亡すると報告されている．一方，迅速な診断と感受性のある抗生剤の迅速な投与により，患者の予後は著しく改善する．

日本では，ビブリオ・バルニフィカス感染症は，経口感染と創傷からの感染例も含めて，現在までに100例余の報告がある．有明海周辺地域はこのビブリオ・バルニフィカス感染症の多発地域であるが，その背景には，この地域には肝硬変症および肝癌患者が多いことが深く関与していると思われる[1)～3)]．

有明海は干満の差が大きく，干潟が広く多いため，四季において魚介類の宝庫である．しかし，近年は有明海周辺の環境変化に伴い，エツ，ムツゴロウ，アサリ貝，おろびタイラギ貝の漁獲量が激減し，生態系が大きく変化している．このような変化は，ビブリオ属の生態系にも大きく影響を与えていると考えられる．

このような時期に，有明海周辺の医療機関で働いている医療人として，有明海の海水，干潟の汚泥，および魚介類を対象として，年間を通じてのビブリオ・バルニフィカスの汚染状況の環境調査を行い，ビブリオ・バルニフィカスの生態系の変化を把握することは重要な責務であると考えた．そして，それらの調査と研究から得られたデータを活用して，今後，地域住民への予防医学的情報提供や，ビブリオ・バルニフィカス感染症の迅速診断法の開発を手掛けることが肝要であると考え，この研究を実施した．

1．材料および方法

a．検体の採取

2001年1月より12月まで，毎月2回，有明海が大潮の日の干潮時，筑後川河口の久間田漁港，矢部川河口の沖の端漁港，および三池海水浴場に出かけ，海水および干潟汚泥を採取した．

また，魚介類は，海水および干潟汚泥の調査日と同日に，有明海四季特有の底もの，エツ，クツゾコ，タイラギ貝，アサリ貝，ワタリガニ，ハゼ，イイダコ等を，柳川市の沖の端漁港の特定の鮮魚店で購入した．

b．最確数

採取した海水については，基礎培地としてアルカリペプトン水を用い，5本法(10ml×5，1ml×5，0.1ml×5)で最確数を求め，ビブリオ・バルニフィカスの汚染度合いを測定した．

c．培養

汚泥は1g，魚介類はその内臓を取り出し，増菌培地としてアルカリペプトン水，分離培地としてTCBS寒天培地を用いた．そして，TCBS寒天

培地で緑色の集落を形成したコロニーの同定検査を行った．

d．同定

スクリーニング検査として，普通寒天，3%，7%，10%NaCl 加血液寒天培地を用いて，±，＋，＋，－というパターンを示した菌を，3%NaCl 加 TSI，サリシン，リジン，アラビノース，0%アルカリペプトン水，および TSI に接種した．そして，サリシン強陽性，リジン陽性，アラビノース陰性，0%アルカリペプトン水陰性という結果を示した菌を，ID32E アピ(日本ビオメリュー)を用いて同定を行い，プテリディン化合物 O129(10μg，150μg，関東化学)で最終確認を行った．

e．パルスフィールド・ゲル電気泳動法による遺伝子解析

汚泥，海水，および魚介類から分離同定されたビブリオ・バルニフィカスと，ビブリオ・バルニフィカス感染症患者から分離されたビブリオ・バルニフィカスとの遺伝子比較をを，パルスフィールド・ゲル電気泳動法によって行った．なお，制限酵素としては，Xba1，および Not1 を用いた．

2．結　　果

ビブリオ・バルニフィカスの最確数の季節変動を**図1**に示した．2001 年 1 月から 5 月まで，最確数は少ないが，三池海水，および沖の端海水より検出されている．6 月より徐々に最確数は増加し，7 月，8 月，9 月にピークに達した．そして，10 月より徐々に減少した．しかし，最確数が 0 の月はなかった．

汚泥からのビブリオ・バルニフィカスの最確数は，検査した汚泥の量が 1g と少なかったためか，散発的にしか検出されなかった．しかし，傾向として，季節に片寄ることなく年間を通じて分離同定された．

魚介類の内臓からのビブリオ・バルニフィカスの分離同定は，**表1**に示したように，調査したほとんどの魚介類から陽性であった．

表2には，魚介類別の月別の分離状況を示した．夏期にビブリオ・バルニフィカスが分離される頻度が高いが，夏期以外の季節でもビブリオ・バルニフィカスが分離された．

パルスフィールド・ゲル電気泳動法による遺伝子解析では，制限酵素 Xba1 を用いた倍はすべてが smear となり，解析できなかった．制限酵素 Not1 を用いた場合は，測定可能であったが，患者およエツから 7 月に分離されたビブリオ・バルニフィカスは依然として smear となり，測定ができなかった．

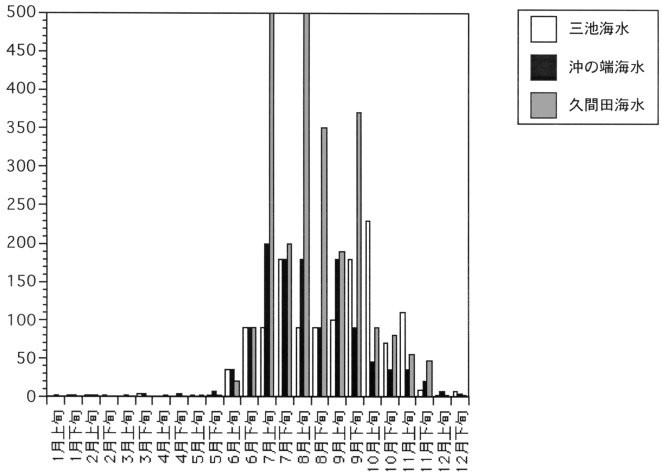

図1　最確菌数

表1　1年間に魚介類から分離された *V. vulnificus*

魚介類	検出回数/検査回数	検出数/検体数	採取場所
ワタリガニ	9/24	13/72	市場
イイダコ	4/22	4/66	〃
クツゾコ	12/23	21/69	〃
アカニシ	8/17	13/51	〃
アサリ	5/13	9/39	〃
メカジャ	10/18	15/54	〃
ウミタケ	5/ 7	7/21	〃
ワラスボ	4/10	6/30	〃
エツ	4/ 9	7/26	〃
マジャク	3/ 8	3/24	〃
コノシロ	7/ 8	10/24	〃
ハゼクチ	3/ 5	4/15	〃
マテ貝	2/ 4	5/15	〃
アナゴ	2/ 3	2/ 9	〃
カキ	0/ 3	0/ 9	〃
タイラギ	1/ 4	1/12	〃
ムツゴロウ	1/ 1	1/ 3	〃
サザエ	0/ 1	0/ 3	〃
コチ	1/ 1	2/ 3	〃
スズキ	1/ 1	2/ 5	釣果(筑後川下流)
計		125/550(22.7%)	

表2　月別に魚介類から分離された *V. vulnificus*

	ワタリガニ	イイダコ	クツゾコ	アカニシ	アサリ	メカジャ	ウミタケ	ワラスボ	エツ	マジャク	コノシロ	ハゼクチ	マテ貝	アナゴ	カキ	タイラギ	ムツゴロウ	サザエ	コチ	スズキ
1月	0/2	0/2	2/2	—	0/1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0/1	0/2	—	—	—	—
2月	0/2	0/2	0/2	—	0/1	—	—	—	—	—	—	0/1	—	—	0/1	2/2	—	—	—	—
3月	0/2	0/2	0/2	0/1	0/2	1/1	1/1	0/1	—	—	—	—	—	—	0/1	—	—	—	—	—
4月	0/2	0/2	0/1	2/2	0/2	0/2	0/1	0/2	2/2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5月	0/2	0/2	2/2	0/2	2/2	2/2	—	2/2	0/2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6月	0/2	0/1	0/2	2/2	1/1	0/2	—	0/2	2/2	0/2	—	—	0/1	0/1	—	—	1/1	—	—	—
7月	2/2	2/2	2/2	2/2	1/1	2/2	2/2	—	2/2	2/2	—	—	2/2	—	—	—	—	—	—	—
8月	2/2	2/2	2/2	0/2	—	2/2	2/2	—	—	1/1	2/2	—	0/1	—	—	—	—	0/1	—	—
9月	2/2	0/2	2/2	1/1	—	2/2	1/1	2/2	—	2/2	2/2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10月	2/2	2/2	2/2	0/1	—	2/2	—	—	—	0/1	1/1	1/1	—	—	—	—	—	—	1/1	1/1
11月	2/2	2/2	2/2	2/2	1/1	1/1	—	1/1	—	—	2/2	2/2	—	1/1	—	—	—	—	—	—
12月	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	—	—	1/1	—	1/1	1/1	—	1/1	—	—	—	—	—	—

—：検査せず，分母数：検査回数，分子数：陽性回数

3. 考　　察

ビブリオ・バルニフィカスは海水温度の高くなる夏期に，海水，干潟汚泥，および魚介類から分離同定される頻度が高かった．しかし，すべての時期において，量的には減少するが，分離同定された．このことは，有明海の環境にビブリオ・バルニフィカスが定住して，季節の変化とともに増減を繰り返していることを示している．

しかし，本稿ではデータとしては示さなかったが，海水温度の低い時期(1月～4月上旬，11月下旬～12月)に分離同定されたものと，海水温度の高い時期(4月下旬～11月上旬)に分離同定されたものとは，細菌学的性状が異なり，高い時期のものは0.5%NaCl加培地でも増殖した．

パルスフィールド・ゲル電気泳動法による解析でも，より酵素活性が強いものと強くない，少なくとも2種類のビブリオ・バルニフィカスが有明海には存在していることを示している．

これらの結果を総合すると，夏期には，より毒性の強いビブリオ・バルニフィカスが有明海に増加し，その結果，有明海に住む魚介類の内臓にも，より毒性の強いビブリオ・バルニフィカスが増加すると考えられる．

したがって，海水温度の上昇する夏期には，肝硬変などのリスクのあるヒトは，魚介類を生で食べることは危険であるいえる．さらに，われわれの研究結果からは，夏期以外でも，危険度は相対的には下がるが，依然として，リスクのあるヒトにとって魚介類の生食は危険であるをいわざるをえない．

今後，これらの成績を基に，有明海周辺住民への予防医学的啓蒙活動を行いたいと考えている．

また，毒性の強いビブリオ・バルニフィカスと，弱いビブリオ・バルニフィカスについて，その根本的な差はどこに由来するのか，研究を継続していきたい．

なお，本稿の内容は，原著論文として投稿予定である．

文　　献

1) 田中基彦, 他: Vibrio vulnificus 感染症の検討, 特に臨床的特徴と肝疾患との関連について. 肝臓, **34**, 644-648(1993)
2) 野村節三: 魚類せっそう病菌, ビブリオ病菌, およびカラムナリス病菌とその病原因子. 日本細菌学雑誌, **52**, 393-416(1997)
3) 三溝慎次, 他: Vibrio vulnificus による壊死性筋膜炎 11 症例の検討. ICU と CCU, **25**, 857-861(2001)