

瀬戸内海産魚介類における *V.parahaemolyticus* と *V.vulnificus* の季節変動について

Seasonal Variation in the Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from Fish and Shellfish in the Seto Inland Sea

砂原千寿子 多田千鶴子 多田芽生 山西重機
Chizuko SUNAHARA Chizuko TADA Megumi TADA Shigeki YAMANISHI

要 旨

V.vulnificus 感染症は原発性敗血症や創傷感染を起こし、肝硬変等の慢性疾患を有する場合は重篤な症状を引き起こす。環境水や魚介類が感染源といわれているが、瀬戸内海海域の魚介類および海水について *V.parahaemolyticus* と合わせて保菌状況を調査した。魚介類については、*V.parahaemolyticus* は2002年63.9%、2003年100%、*V.vulnificus* は同じく22.2%、22.5%検出された。*V.parahaemolyticus* は水温が下がり始めてもかなり長く検出されるが、*V.vulnificus* は菌の立ち上がりが遅く、水温が22℃前後で検出され始め、水温が低下するとともに急激に減少し、検出されなくなった。海水からの検出は、*V.parahaemolyticus* は0.3~240/100mlで平成4年に調査した結果より低い値となった。*V.vulnificus* は6月から検出され、最高で7月に29/100ml検出したが10月には分離されなくなった。

キーワード：*V.parahaemolyticus* *V.vulnificus* 魚介類

I はじめに

香川県では昭和52年度より腸炎ビブリオ対策事業を実施し、食中毒の防止に努めているが、例年検出され始める時期に多少のずれはあるものの、ほぼ同様の検出状況で推移してきた。しかし、2001年は例年と違って、夏季になっても *V.parahaemolyticus* が増加せず、過去検出が少なかった *V.vulnificus* が多く分離された。また、この年は熊本県内で *V.vulnificus* 感染症患者（感染者8名、内死亡者3名）が相次いで発生したこともあり、患者発生と当所での分離結果に関連があるのではと考えた。*V.vulnificus* 感染症は肝硬変や慢性疾患を基礎疾患として持つ宿主に、原発性敗血症や創傷感染症を起こすが、急激な経過をとり死に至ることが多い。環境水や魚介類がヒトへの感染源といわれているが、今回瀬戸内海産の魚介類の保菌状況を *V.parahaemolyticus* の保菌状況とあわせて調査した。また、瀬戸内海海域の海水についても調査を実施した。

II 材料及び方法

魚市場よりの魚介類（主として上層周遊魚としてコノシロ、底層根付魚としてカレイ）について、2002年5月から12月の期間に72検体、2003年は6月から10月に40検体調査を実施した。

海水については、香川県公共用水域水質測定計画の地点の燧灘東部（1地点）、備讃瀬戸（4地点）東讃海域（1地点）について2003年5月から10月にかけて計36検体調査した。

検査方法は *V.parahaemolyticus* については食品衛生検査指針に基づき食塩ポリミキシンプイオンで培養後、TCBS 寒天培地に塗抹し、MPN100g 3本法で実施した。*V.vulnificus* については食塩ポリミキシンプイオンで培養後 PCR 法により *V.vulnificus* に特異的な cytotoxin haemolysin 遺伝子¹⁾の保有の有無で MPN 値を測定した。一部クロモアガービブリオ寒天、mCPC 培地、VVM 培地等を用いての MPN 値測定及び菌分離も実施した。海水については海水500mlをフィルターろ過し、そのフィルターを50mlの食塩ポリミキシンプイオンで抽出し、

MPN100g 3 本法で魚介類と同様に実施した。腸炎ピブリオ対策事業で調査した2000年(90検体), 2001年(72

検体)の計162検体についても *V.parahaemolyticus* について同様に実施した。

表1-1 魚介類 *V.parahaemolyticus* 検出状況(2002) 皮

MPN	<30	<10 ²	<10 ³	<10 ⁴	<10 ⁵	<10 ⁶	<10 ⁷	10 ⁷	計
5月	4(100)								4
6月	4(50)		2(25)	2(25)					8
7月		1(25)		1(25)	2(50)				4
8月		1(25)	1(25)				2(50)		4
9月					1(25)	1(25)	2(50)		4
10月		1(25)		1(25)	1(25)	1(25)			4
11月	1(25)	3(75)							4
12月	3(75)	1(25)							4
	12(33.3)	7(19.4)	3(8.3)	4(11.1)	4(11.1)		4(11.1)	2(5.6)	36
()	検出%								

表2-1 魚介類 *V.vulnificus* 検出状況(2002) 皮

MPN	<30	<10 ²	<10 ³	<10 ⁴	<10 ⁵	<10 ⁶	<10 ⁷	10 ⁷	計
5月	4(100)								4
6月	8(100)								8
7月	3(75)	1(25)							4
8月	3(75)		1(25)						4
9月			1(25)		2(50)		1(25)		4
10月	2(50)	1(25)		1(25)					4
11月	4(100)								4
12月	4(100)								4
	28(77.8)	2(5.6)	2(5.6)	1(2.8)	2(5.6)		1(2.8)		36
()	検出%								

内臓

MPN	<30	<10 ²	<10 ³	<10 ⁴	<10 ⁵	<10 ⁶	<10 ⁷	10 ⁷	計
5月	3(75)	1(25)							4
6月	5(62.5)	1(12.5)	2(25)						8
7月	1(25)		1(25)	2(50)					4
8月				1(25)	2(50)	1(25)			4
9月					1(25)		1(25)	2(50)	4
10月			1(25)	1(25)	1(25)	1(25)			4
11月	2(50)	1(25)	1(25)						4
12月	3(75)	1(25)							4
	14(38.9)	4(11.1)	5(13.9)	4(11.1)	4(11.1)	2(5.6)	1(2.8)	2(5.6)	36
()	検出%								

内臓

MPN	<30	<10 ²	<10 ³	<10 ⁴	<10 ⁵	<10 ⁶	<10 ⁷	10 ⁷	計
5月	4(100)								4
6月	8(100)								8
7月	3(75)		1(25)						4
8月	3(75)				1(25)				4
9月	1(25)	2(50)					1(25)		4
10月	1(25)	1(25)					2(50)		4
11月	4(100)								4
12月	4(100)								4
	28(77.8)	3(8.3)	1(2.8)		1(2.8)		3(8.3)		36
()	検出%								

表1-2 魚介類 *V.parahaemolyticus* 検出状況(2003) 皮

MPN	<30	<10 ²	<10 ³	<10 ⁴	<10 ⁵	<10 ⁶	<10 ⁷	10 ⁷	計
6月		1(25)	1(25)	2(50)					4
7月					1(25)	1(25)	2(50)		4
8月					2(50)	1(25)	1(25)		4
9月						4(100)			4
10月				2(50)		1(25)	1(25)		4
		1(5)	1(5)	4(20)	3(15)	7(35)	4(20)		20
()	検出%								

表2-2 魚介類 *V.vulnificus* 検出状況(2003) 皮

MPN	<30	<10 ²	<10 ³	<10 ⁴	<10 ⁵	<10 ⁶	<10 ⁷	10 ⁷	計
6月	4(100)								4
7月			1(25)	1(25)	2(50)				4
8月	3(75)	1(25)							4
9月	4(100)								4
10月	4(100)								4
	15(75)	1(5)	1(5)	1(5)	2(10)				20
()	検出%								

内臓

MPN	<30	<10 ²	<10 ³	<10 ⁴	<10 ⁵	<10 ⁶	<10 ⁷	10 ⁷	計
6月		3(75)	1(25)						4
7月				1(25)		1(25)	2(50)		4
8月							1(25)	3(75)	4
9月					1(25)	1(25)	2(50)		4
10月		1(25)		1(25)	2(50)				4
		4(20)	1(5)	2(10)	3(15)	2(10)	5(25)	3(15)	20
()	検出%								

内臓

MPN	<30	<10 ²	<10 ³	<10 ⁴	<10 ⁵	<10 ⁶	<10 ⁷	10 ⁷	計
6月	4(100)								4
7月	1(25)	1(25)			2(50)				4
8月	3(75)	1(25)							4
9月	4(100)								4
10月	4(100)								4
	16(80)	2(10)			2(10)				20
()	検出%								

表3 海水の検出状況 2003年

V. parahaemolyticus MPN

	5月	6月	7月	8月	9月	10月
高松	<0.3	0.92	1.5	46	2	2
B8	<0.3	0.3	2.9	1.5	2.1	2.1
B9	<0.3	<0.3	7.4	1.5	1.6	0.94
坂出	<0.3	0.3	0.92	0.62	1.5	1.4
燧灘4	<0.3	<0.3	0.62	<0.3	240	<0.3
T7	<0.3	<0.3	<0.3	2.4	1.4	0.94

V. vulnificus MPN

	5月	6月	7月	8月	9月	10月
高松	<0.3	<0.3	<0.3	0.3	<0.3	<0.3
B8	<0.3	<0.3	0.3	0.72	<0.3	<0.3
B9	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	0.3	<0.3
坂出	<0.3	0.36	2.6	1.1	1.1	<0.3
燧灘4	<0.3	<0.3	29	<0.3	<0.3	<0.3
T7	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3

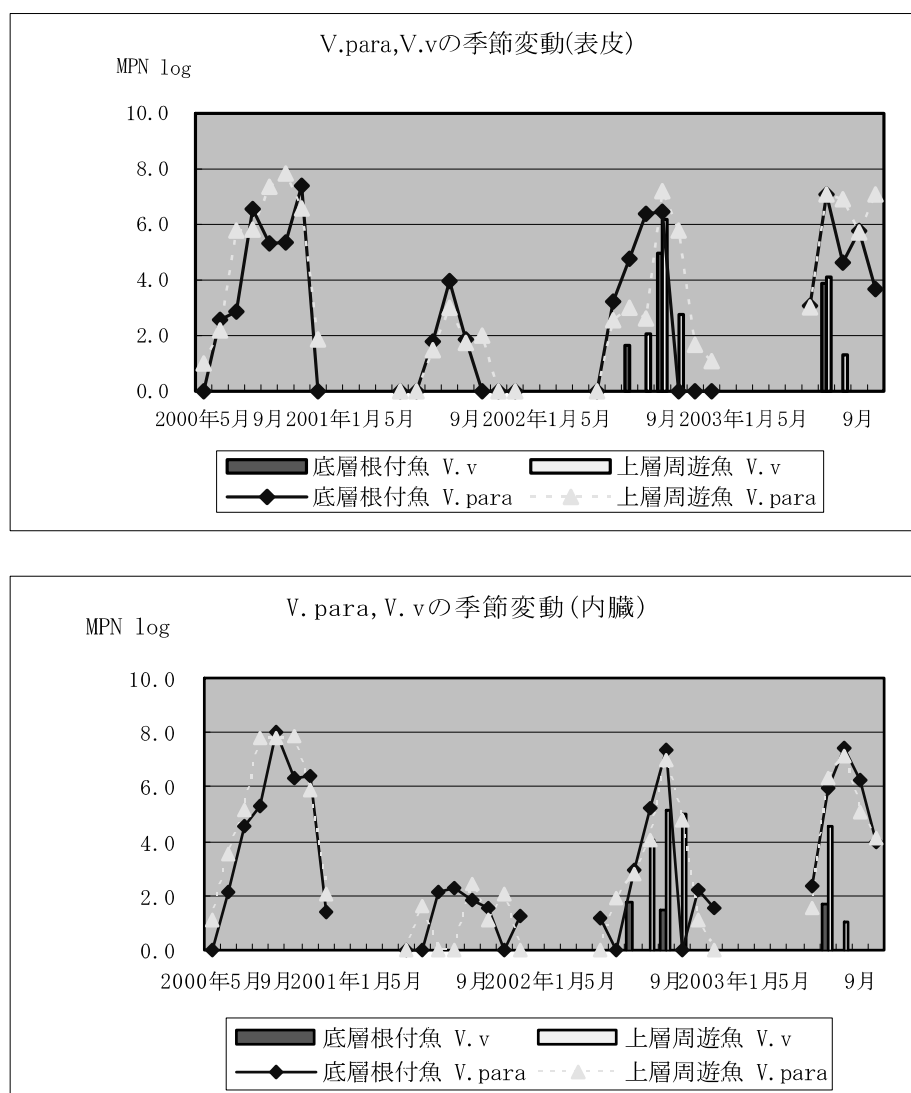


図1 魚介類の年別ビブリオの季節変動

Ⅲ 結果及び考察

1 魚介類検出状況

魚介類については、*V. vulnificus* は2002年72検体中16検体(22.2%)、2003年40検体中9検体(22.5%)から、*V. parahaemolyticus*は2002年46検体(63.9%)、2003年40検体(100%)検出された。海水は36検体

中 *V. vulnificus* が9検体(25%)、*V. parahaemolyticus* が24検体(66.7%)検出された。季節的変動は表1, 2, 3のとおりである。図1に魚介類の年別ビブリオの季節変動, 図2に年別海水温の変化を示す。

1) *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus は2000年は表皮, 内臓共に5月から菌量は少ないものの検出され, 7月には

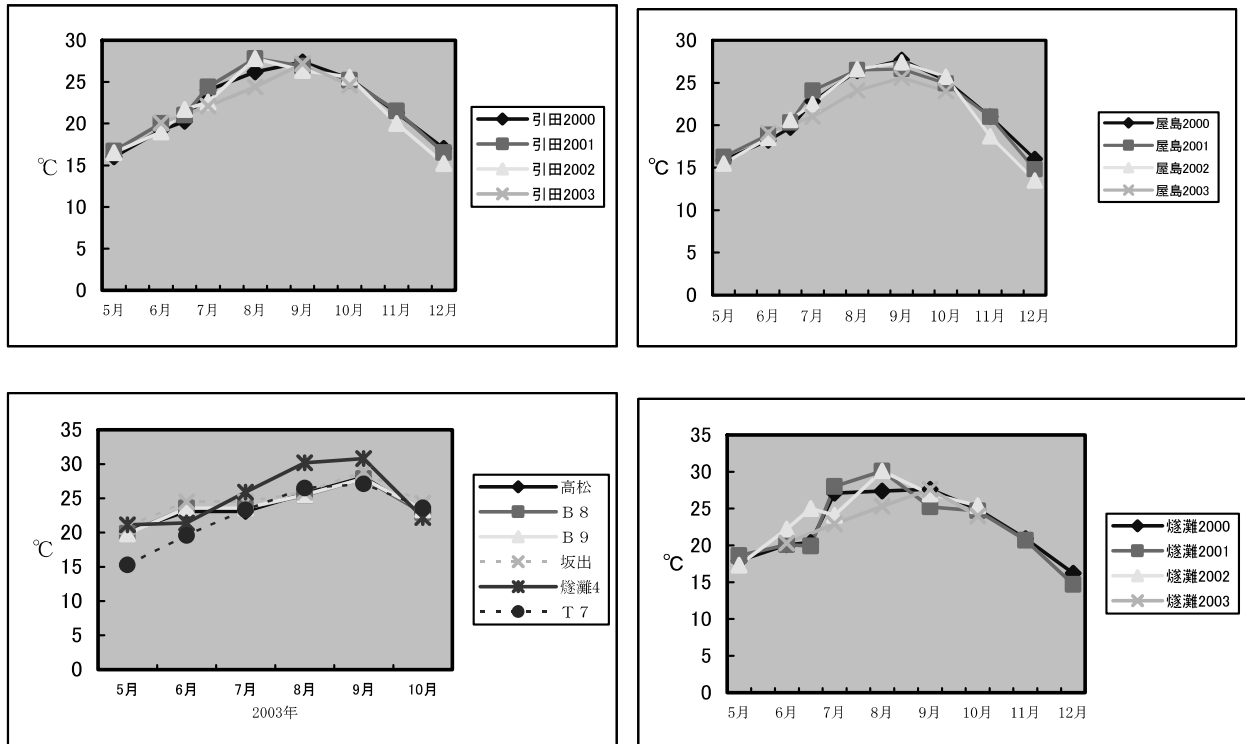


図2 海水温

10⁵台になり、8月から11月まで10⁶~10⁷台で推移した。12月に入っても表皮で80%、内臓では100%の陽性率だった。2001年は6月に内臓から検出されたが、7月に入っても陽性率は表皮75%、内臓50%と増加したものの菌量は10台で、表皮は8月(10³台)、内臓は9月(10²台)が最も菌量が多かったが、例年の10⁶~10⁷台と比べると極端に少なかった。水温は図2に示すように例年と特に際立った違いはみられなかった。内臓からは12月に入っても分離されたが、表皮・内臓共に年間を通して低い菌量で推移した。

ピーク時には表皮から分離される菌量が内臓より多かったが、内臓が6月から12月まで分離されたのに比べ、表皮は7月から10月と菌量が少なかっただけでなく、例年より短期間の検出となった。2002年は内臓で5月から検出され、水温の上昇と共に増加し、表皮・内臓共に9月に検出菌量が最も多く、7、8、9、10月は7月の内臓を除き100%の陽性となった。水温の低下と共に11月は検出率も下がり、菌量も激減した。この年は表皮からの検出菌量が内臓からより多かった。2003年は調査期間が6月から10月と短いので比較しにくいですが、表皮からの検出は7月が最も多く、8、9

月と暫時減少したが10月は増加が見られた。内臓は8月が最も多く、9、10月と減少した。

図1に見るように、2001年の検出状況は例年と大きく異なった結果となった。

魚種別に見ると内臓では2001年を除き底層根付魚と上層周遊魚に差はあまりみられなかった。表皮はややばらつきが見られ、2002年は底層根付魚の菌量の増加が上層周遊魚より早くみられ、10月は底層根付魚の検体がなかったため不明だが、11月には分離されなくなった。上層周遊魚は立ち上がりは遅かったが、12月に入っても分離が見られた。2001年は表皮のほうが底層根付魚と上層周遊魚のばらつきが少なく、内臓では上層周遊魚は7、8月の夏季に分離されなかった。

2) *V.vulnificus*

2001年はまだ *V.vulnificus* について調査を始めていなかったが、参考までに8月の検体について、食塩ポリミキシンブイヨンで培養後、TCBS寒天培地に塗抹し、白糖非分解集落を2%食塩加TSI、LIMでの性状、オキシターゼ試験、ONPG試験、食塩発育試験を実施し、MPN100g 3本法で実施した結果、表皮で9,500~240,000/100g(平均119,875)、内臓で16,000~290,000/100g(平均

100 250) と *V.parahaemolyticus* と比べて高い分離結果となった。

2002年はPCR法によるMPNを実施し、5、6月には検出されず、7月に入って25%の陽性率になった。*V.parahaemolyticus*と同様9月に菌量のピークが見られ、表皮では100%の陽性率になり、菌量も 10^6 台となった。内臓も 10^5 台と最も多く検出され、次いで10月が菌量が多かった。内臓は7、8、10月と表皮よりも多く分離された。11月には表皮、内臓とも検出されなくなった。菌の立ち上がりは*V.parahaemolyticus*より遅く、検出されなくなるのは早かった。2003年も7月に入って検出され、表皮では100%、内臓で75%の検出となった。ピークは7月で表皮・内臓共に 10^4 台だった。8月は25%の検出率で、菌量も減少し、10台となり9月になると検出されなくなった。

魚種別では*V.vulnificus*は*V.parahaemolyticus*より差が見られた。2002年は表皮では立ち上がりは底層根付魚が早かったが、菌量は上層周遊魚が多かった。内臓では顕著な差が見られた。立ち上がりは表皮と同じく底層根付魚が早かったが、ピークが無いままに終焉を迎え、上層周遊魚は8~10月は 10^4 ~ 10^5 台に上昇し、その後急激に減少し、11月は分離されなかった。*V.parahaemolyticus*ではこのような顕著な差は見られなかった。2003年は底層根付魚は表皮・内臓共に7月のみの分離で、菌量も表皮では上層周遊魚とほぼ同じだったが、内臓では上層周遊魚と比べるとかなり低い菌量だった。

2 海水検出状況

表3に見るように、*V.parahaemolyticus*については6月に3地点で検出され、10月に入っても分離された。最確数は $<0.3 \sim 240/100ml$ で63年から平成4

表4 海水塩分濃度 ‰

	5月	6月	7月	8月	9月	10月
高松	18.0	18.0	17.5	17.0	17.0	17.2
B8	18.2	18.0	17.5	17.0	17.1	17.3
B9	18.1	18.0	17.7	17.2	17.1	17.4
坂出	17.9	18.1	17.2	17.0	16.5	17.4
燧灘4	18.4	17.8	17.3	17.6	18.0	17.9
T7	18.4	18.0	17.5	17.2	17.4	17.6

年に調査した結果(5月から11月平均で $670/100ml$ 、最高は 10^5 オーダー)より低い値となった。*V.vulnificus*も6月から検出され6検体中1検体分離された。最確数は $0.36/100ml$ であった。7月3/6(最確数は $<0.3 \sim 29/100ml$)、8月3/6(最確数は $<0.3 \sim 1.1/100ml$)、9月2/6(最確数は $<0.3 \sim 1.1/100ml$)の分離で10月には分離されなくなった。地点では備讃瀬戸海域のB8、坂出港2での検出率が高かった。*V.vulnificus*の検出と塩分濃度は関連が高いといわれているが²⁾、6地点の塩分濃度を表4に示す。16.5~18.4‰で各地点での塩分濃度には大差が無く、また分離された両菌の菌数も少なかったため、今回の調査では関連は見られなかった。福島は両菌種とも塩分濃度8~10‰の河口付近の汽水域で旺盛に繁殖したと報告している。²⁾採水地点が河口からやや離れた地点だったためか、海水からの分離は他での報告より低い値となった。

宮坂らの報告では2002年6月から1年間調査した結果、2地点を除き、6月から10月までほぼ毎月検出され、河川の影響を受けやすい河口周辺では 10^0 から 10^3 検出し、河川の影響を受けにくい地点では年間を通じて検出されなかったとある。³⁾大畑らは、海水における13年6月から14年2月までの調査で6地点の内2地点から検出し、平均検出菌量は各々 $8,300/100ml$ 、 $250/100ml$ と報告している。⁴⁾

また、塩分濃度はあまり影響がなく、水温が大きく関係しているとの報告もあり、水温が20℃を上回って数週間経ったころは*V.vulnificus*感染症患者発生に注意を払う必要があると報告されている。⁵⁾

3 その他の検討

*V.parahaemolyticus*の分離培地はTCBS培地、クロモアガービブリオ培地がよく用いられており、市販されている。これらは*V.vulnificus*の選択培地としても使用できるが、集落の色調ではTCBS培地では*V.parahaemolyticus*と区別ができずまたクロモアガービブリオ培地でも青色集落を作り、紫の集落の*V.parahaemolyticus*と違いはみられるが特定はできない。コリスチンとポリミキシンBを添加し選択性を高めセロピオースの分解性を利用したmCPC培地、CPC培地、VVM培地、ポリミキシ

ンBを添加していないCC培地等が *V.vulnificus* の選択培地として用いられている。今回 TCBS 培地、クロモアガービブリオ培地、mCPC 培地、CPC 培地、VVM 培地を使用して検討した。mCPC 培地、CPC 培地、VVM 培地は選択性は強く優位に *V.vulnificus* が分離され、多くのビブリオ属は抑制されて発育しないとあるが、セロピオースを分解する他の菌種(同定はしていない)もかなり発育した。これらの菌の多くは TCBS での発育は見られなかった。今回、TCBS 培地は集落数を数多く拾わないと *V.vulnificus* が分離できないものの、集落も大きく結果として一番検出率が高かった。mCPC 培地、CPC 培地、VVM 培地では検出率が悪く、選択培地については今後の検討が必要である。*V.vulnificus* に特異的な cytotoxin haemolysin 遺伝子の保有の有無による MPN 値と通常の方法での MPN 値は、検討した検体については PCR 法が1オーダー程度高い結果となった。

IV まとめ

昭和55年から継続して調査しているが、2001年の結果は例年にない結果となった。

今回調査した結果では、魚介類、海水共に検出される菌量は *V.parahaemolyticus* が多く、検出される期間も長い。*V.vulnificus* は水温が22 前後で検出され始め、上昇した水温が25 を切りはじめると急激に減少し、検出されなくなる結果となった。

夏季には魚介類の75%以上から *V.vulnificus* が検出されたことから、肝硬変等の基礎疾患を有する患者、免疫抑制剤の使用患者等素因がある人は創傷感染や、魚介類の生食には注意を払う必要があると考えられた。

水温の他にも環境中の菌の競合等複雑な要因が関与しており、*V.parahaemolyticus* より *V.vulnificus* はそれらの影響に左右されやすい結果となった。

V 文献

- 1) Hill WE, et al: Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters, *Appl Environ Microbiol*, 57, 707 - 711, (1991)
- 2) 福島 博: 島根県における腸炎ビブリオおよびビブリオ・バルニフィカス感染症予防に関する研究 I. 佐陀川における生態調査および島根県東部で漁獲された魚介類における分布調査, 島根県保健環境科学研究所所報, 44号, 73 - 82, (2002)
- 3) 宮坂次郎他: 環境中の *Vibrio vulnificus* と *Vibrio parahaemolyticus* - 県内8地点海水の1年間の菌数変動と冬季における海鳥糞便中の検索 -, 熊本県保健環境科学研究所報, 32号, 31 - 36, (2002)
- 4) 大畑克彦ら: 食品や海水からの耐熱性溶血毒(TDH)産生腸炎ビブリオおよびビブリオ・バルニフィカスの検出状況について, 静岡県環境衛生科学研究所報告, No44, 1 - 4, (2001)
- 5) L Høi, et al: Occurrence of *Vibrio vulnificus* Biotypes in Danish Marine Environments, *Appl Environ Microbiol*, 64, 7 - 13, (1998)