腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒・ ブドウ球菌エンテロトキシン混合物による 致死性中毒に対する実験治療的研究

Experimental Therapy of Lethal Poisoning Due to
Combination of *Vibrio* Thermostable Direct Hemolysin
and Staphylococcal Enterotoxin

筑波大学社会医学系

小 池 和 子・藤 原 喜 久 夫

Kazuko Koike and Kikuo Fujiwara

Institute of Community Medicine, The University of Tsukuba, Ibaraki

Inhibitory action of some chemicals and antiserum on the enhanced lethal toxicity due to the combination of thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus* and staphylococcal enterotoxin was investigated with animal experiments.

No inhibition was found with calcium chloride, epinephrin, dopamine, β -methasone and theophyllin administrated to rats either singly or by mixture.

However, the lethal toxicity was repressed with antiserum for the *Vibrio* thermostable direct hemolysin after injection of the toxins; one rat in six survived with treatment with 0.5 mg/kg of the antiserum and three out of six were left alive with 1 mg/kg administered treatment.

Furthermore, the effect of antiserum was increased by adding theophyllin and no rat died in the case treated with 1 mg/kg of antiserum and 40 mg/kg of theophyllin.

Key words: *Vibrio* thermostable direct hemolysin, Staphylococcal enterotoxin, Food poisoning, Antiserum, Theophyllin, Experimental therapy of food poisoning.
腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒, ブドウ球菌エンテロトキシン, 食中毒, 抗血清,
テオフィリン, 食中毒実験治療

緒 言

腸炎ビブリオ食中毒の集団発生例において、ブドウ球菌等の他種の食中毒原因菌が同時に検出される事例に、死亡例が多く見られ、それらの致命率が、同年の腸炎ビブリオ食中毒の平均致命率の10倍以上に達することが、藤原により指摘されている¹⁾。

このような現象は、腸炎ビブリオの産生する毒素の毒力が、他種の細菌の毒素の共存により増強されることによるのではないかと考え、著者らは、これらの毒素混合物の毒性試験を試みた。その結果、腸炎ビブリオ耐熱性

溶血毒がブドウ球菌エンテロトキシンあるいはボツリヌス毒素と共存する時に、その毒力が著しく増強され、その単独投与では致死性を示さない量においても、これらの混合投与により、実験動物は斃死することを認めた^{2,3)}。著者らはさらに、これらの混合毒素投与動物に、2, 3の薬物および腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒抗毒素血清を使用して実験治療を試み、若干の興味ある結果を得たので本報で報告する。

実験材料および実験方法

1. 使用毒素

腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒は、三輪谷教授らによる精製毒素であり、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン(A型)は、Bergdoll 教授により分与された精製毒素である。

2. 実験動物

ラット：体重約200 g の Wister 系，雄の SPF 動物

マウス：体重約20 g の ddy 系，雄の SPF 動物

3. 使用薬物および抗毒素血清

麻酔用薬剤：市販のネプタール注射液（ペントバルビタールナトリウム 5% 溶液；Abbott Laboratories 社製）

投与薬物：塩化カルシウム；2% 注射液（大塚製薬製），エピネフリン；0.1% 注射液（第一製薬製），ドーパミン塩酸塩；2% 注射液（協和発酵製），リン酸ベータメサゾンナトリウム塩；ベータメサゾンとして 0.4% 注射液（シオノギ製薬製），テオフィリン；化学用試薬（和光純薬製）

抗毒素血清：腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒に対するウサギ免疫血清；三輪谷研究室より分与を受けた真空凍結乾燥標品

4. 実験方法

1) 耐熱性溶血毒抗毒素血清標品の力価検定方法

腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒の精製毒素および、抗毒素血清のそれぞれ一定量を混合し、滅菌した生理食塩水に溶解した。直ちに、37°C で 30 分間反応させ、反応物をマウスの尾静脈内に注入後、48 時間観察して、その致死率より、中和抗体価を算出した。

2) 各種薬物の投与実験

ラットを、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg の割合) により、腹腔内注射にて麻酔し、固定した。次いで、ラットの四肢に脳波針を装着し、心電計（フクダ電子製，New Cardiac Crown DU-3 S）に接続し、第 I 誘導，第 II 誘導および第 III 誘導を装置した。つづいて、ラットの左下肢の総腸骨静脈内に、腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒 5.0 μ g/体重 kg および、ブドウ球菌エンテロトキシン 25 μ g/体重 kg の混合物を、カニューレにより注入した。その後、被験薬物等を適宜、静注あるいは腹腔内注射により投与し、48 時間にわたり肉眼的あるいは心電図により経過を観察した。たとえばテオフィリンについては、その投与量が多量のため、腹腔内注射とした。なお、前述の各薬物は、今回の実験における最大使用量においても、薬物だけの投与では、実験動物に、致死的变化を起させないことをあらかじめ確認してある (Table 1)。

実験結果

1. 各種薬物の致死抑制効果

腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒 5 μ g/kg および、ブドウ球菌エンテロトキシン 25 μ g/kg は、ラットに対して、静注の結果、いずれも単独では致死性を示さないが、両者を混合すると 100% の致死を示すことが著者らにより認められている³⁾ので、この毒素量の組み合わせを、実験治療の条件とした。なお、この場合の心電図変化の 1 例は、Fig. 1 のようであり、混合毒素の投与後、5 時間 30 分で斃死している。

Table 1 には、各薬物の致死毒性に対する影響の概要を示してある。まず、塩化カルシウムによる効果は、5 mg/kg 投与の場合ですら、致死作用に対して延命効果をもたらすことは出来ず、全例とも斃死した。

次いで行ったエピネフリン 0.05 mg/kg の投与結果も完全な毒性を示し、全例とも斃死した。

さらにまた、 β -メサゾンも、0.4 mg/kg の投与によっても致死阻害効果は認められなかった。

テオフィリンの 120 mg/kg 腹腔内注射による治療の結果は、その 1 例を Fig. 2 に示すように、約 6 時間後には斃死した。

次いで、これらの薬物を組み合わせて投与し、その致死抑制効果を検討した。すなわち、Table 1 に示すように、塩化カルシウム、エピネフリンおよびドーパミンの組み合わせ、あるいは塩化カルシウム、ドーパミンおよび β -メサゾンの組み合わせなどの投与を試みたが、いずれの場合においても致死率には変化がなく、心電図上においても毒性が明瞭で、短時間で斃死した。

なお、 β -メサゾン 0.4 mg/kg およびテオフィリン 120 mg/kg の組み合わせの場合、Fig. 3 のように、一時的に脈拍数の増加が確認されたが、7.5 時間後には斃死した。

2. 腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒抗毒素血清の効果

まず、耐熱性溶血毒に対するウサギ免疫抗毒素血清の中和抗体価検定を行った。その結果は、Table 2 に示すごとくである。すなわち、マウス 5 頭を 1 群として、毒素の LD₅₀ に近似した毒素量 0.07 mg/kg に対し、抗毒素 0.625 mg/kg、および 1.25 mg/kg では、中和現象を認めることは出来なかったが、2.5 mg/kg で完全に毒力を中和することが出来た。さらに、毒素量 0.09 mg/kg の投与に対しては、5.0 mg/kg の抗毒素でさえ、2/5 の致死率であり、10.0 mg/kg で完全に中和することが可能となった。

その抗毒素の、混合毒素を投与されたラットに対する

Fig.1 Electrocardiogram of rat injected with the mixture of *Vibrio* thermostable direct hemolysin and staphylococcal enterotoxin. Rat was injected intravenously with 5 μ g/kg of thermostable direct hemolysin and 25 μ g/kg of enterotoxin at 0 time.

Table 1 The effects of chemicals on lethal toxicity of mixed toxins^{a)} in rats^{b)}.

Hemolysin (μ g/kg)	Enterotoxin (μ g/kg)	CaCl ₂ *	Epinephrine* (mg/kg)	Dopamine*	β -Methasone*	Theophyllin**	Death rate ^{c)}
0	0	5.0	0.05	0.5	1.0	0.4	0/5
							0/5
							0/5
							0/5
		5.0	0.05	1.0	0.4	0.8	0/5
							0/5
							0/5
							0/5
5	25	5.0	0.05	1.0	0.4	40	0/5
						240	0/5
							5/5
							5/5
							5/5
5	25	5.0	0.05	1.0	0.4		5/5
							5/5
							5/5
5	25	5.0	0.05	1.0	0.4	120	5/5
							5/5

a) Mixture of 5.0 μ g (*Vibrio* thermostable direct hemolysin) + 25 μ g (staphylococcal enterotoxin)/kg. b) The rats (Wister, 8 weeks old, SPF, male) were treated with chemicals after injection of mixed toxins. c) The effects were determined at 48 hours after injection. *; injected i. v. **; injected i. p.

Fig. 2 Electrocardiogram of rat treated with theophyllin after injection of mixed toxins. Rat was injected intravenously with $5.0 \mu\text{g}$ of hemolysin + $25 \mu\text{g}$ of enterotoxin/kg. The theophyllin of 40 mg/kg was administered (i.p.) 3 times (1 min, 30 min and 2 h) after injection of toxins.

Fig. 3 Electrocardiogram of rat treated with theophyllin and β -methasone after injection of mixed toxins. Rat was injected intravenously with $5.0 \mu\text{g}$ of hemolysin + $25 \mu\text{g}$ enterotoxin/kg. Theophyllin of 120 mg/kg (i.p.) and β -methasone of 0.4 mg/kg (i.v.) were administered 4 times (1 min, 30 min, 1 h and 3 h) after injection of toxins.

Table 2 Neutralization of the lethal toxicity with the antiserum for the thermostable direct hemolysin in mice^{a)}.

Hemolysin (mg/kg)	Antitoxin (mg/kg)	Death rate ^{b)}
0.07	0	2/5
	0.625	1/5
	1.25	1/5
	2.5	0/5
	5.0	0/5
	10.0	0/5
0.09	0	3/5
	2.5	4/5
	5.0	2/5
	10.0	0/5
	15.0	0/5

a) ddy strain mice (4 weeks old, SPF, male) were used. b) The result was determined at 48 hours after injection.

Table 3 The effects of anti-hemolysin and theophyllin on the lethal toxicity of mixed toxins^{a)} in rats^{b)}.

Theophyllin (mg/kg) (i.p.)	Anti-hemolysin (mg/kg) (i.v.)	Death rate ^{c)}
40		6/6
120		6/6
240		6/6
	0.25	6/6
	0.5	5/6
	1.0	3/6
	2.0	6/6
40	0.25	6/6
40	0.5	3/6
40	1.0	0/6

a) Mixture of 5.0 μ g/kg (*Vibrio* thermostable direct hemolysin) + 25.0 μ g/kg (staphylococcal enterotoxin). b) Wister, 8 weeks old, SPF, male (ca. 200 g). c) The result was determined at 48 hours after injection.

治療効果は、以下のものであった (Table 3)。すなわち、抗毒素血清0.25 mg/kg の割合に投与した場合は、全例斃死であったが、0.5 mg/kg に増量すると生残例が見られ、1.0 mg/kg 投与を行うと、50%の生残率を確認することが出来た。この場合は、毒素注入後30秒および30分に、半量ずつ分割投与したものである。この例のラッ

トの心電図によれば、毒素投与の20～30分後に、ある程度の徐脈化が進んだが、40分後には回復し、生残した。抗毒素をさらに2.0 mg/kg と増量した場合は、逆に致死率が上昇した。

3. 腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒抗毒素血清およびテオフィリンの併用効果

混合毒素の静注30秒後に、0.25 mg/kg の抗毒素を投与し、30分後にテオフィリン40.0 mg/kg を腹腔内注入した場合、全例斃死した。次に、抗毒素量を0.5 mg/kg に増量させた場合、50%を生残させることが出来た。さらに、抗毒素血清を1.0 mg/kg として30秒後に投与し、テオフィリンを同量腹腔内に注入した結果、全動物を生残させることが可能となった。その1例の心電図上における観察では、Fig. 4に見られるように、テオフィリン注入前に若干の徐脈が見られたが、テオフィリンの注入によりその後回復し、正常に復している。

考 察

腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒およびブドウ球菌エンテロトキシン (A 型) の共存によるラットの中毒死に対して、循環系に薬理効果のある種々の薬剤、塩化カルシウム、エピネフリン、ドーパミン、 β -メサゾンおよびテオフィリンを用いて、その致死率の低下効果を検討した。その結果、これらの薬剤の単独投与においては、テオフィリンのみが、徐脈化傾向に対して幾分効果的であるかに見えたが、最終的にはすべて、斃死を免れることは出来なかった。次いで、これらの薬剤を組み合わせで投与したが、この場合もいずれも救命には至らなかった。そこで、耐熱性溶血毒に対する抗毒素血清を使用した結果、ある程度、致死率の低下を認めることが出来た。さらに、抗毒素血清に加えて、テオフィリンを腹腔内注射した結果、被験動物が、全例生残可能な組み合わせ濃度を得ることが出来た。

この実験においては、抗毒素血清濃度の最適値は、1.0 mg/kg であり、これより大量では再び致死毒力が増強することを知った。このことは、本抗毒素血清標品中に、何らかの他の毒性物質が混在していること、あるいは、抗毒素量の中和最適比の問題等によることも考えられる。

テオフィリンの細菌毒素中毒に対する抗致死効果に関しては、Howards ら⁴⁾、あるいは佐藤ら⁵⁾による報告があり、ボツリヌス毒素と、テオフィリンを混合してマウスに投与した場合に、毒素のみによる致死時間を延長する効果があった、と述べている。また、Gill & King⁶⁾ は、ハト赤血球において、コレラトキシンの作用を、テオ

Fig. 4 Electrocardiogram of rat treated with anti-hemolysin and theophyllin after injection of mixed toxins. Rat was injected intravenously with $5.0 \mu\text{g}$ of hemolysin + $25 \mu\text{g}$ of enterotoxin/kg. The antitoxin of 1.0 mg/kg (i.v.) and theophyllin 40 mg/kg (i.p.) were administered at 30 s and 30 min respectively after injection of toxins.

イリンが阻害したとも報告している。これらは、NAD あるいは、Cyclic-AMP などのようなヌクレオチドと関連があるのではないかと考えられているが、腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒の場合におけるメカニズムは明らかではない。

いずれにしても、実験条件その他に、未解決の問題は多く、今後にまたなければならないが、この研究結果より、少なくともヒトの食中毒事例における腸炎ビブリオ混合汚染型重症例の治療に、何らかの死亡阻止への手がかりが与えられれば幸いと思われる。

要 約

腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒および、ブドウ球菌エンテロトキシンの共存時における致死毒性の発現に対して、その救命方策を求めて、ラットを用いた治療実験を行った。

耐熱性溶血毒 $5 \mu\text{g/kg}$ およびエンテロトキシン $25 \mu\text{g/kg}$ 混合投与時のラットは全例斃死し、塩化カルシウム、エピネフリン、ドーパミン、 β -メサゾンあるいはテオフィリンの、どの薬剤の単独あるいは組み合わせにおいても、致死率を低下させることは出来なかった。

耐熱性溶血毒ウサギ免疫抗毒素血清を、毒素注入後、比較的早期に静注することにより、抗毒素 0.5 mg/kg で、6頭中1頭を、抗毒素 1.0 mg/kg 投与で6頭中3頭の生残を得ることが出来た。

また、抗毒素 0.5 mg/kg に加えて、テオフィリン 40 mg/kg を腹腔内注射すると、50%の生残を見ることが出来、抗毒素 1 mg/kg およびテオフィリン 40 mg/kg を投与すると、全例の生残を認めた。

謝 辞

稿を終るにあたり、腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒および抗毒素血清を分与頂いた、大阪大学微生物病研究所、三輪谷俊夫教授、東京大学医科学研究所、竹田美文教授、ならびに、ブドウ球菌エンテロトキシンを分与下さった Wisconsin 大学、Bergdoll 博士に深謝致します。

文 献

- 1) 藤原喜久夫：食中毒原因菌の混合感染に関する考察，食品衛生研究，27，577-587 (1977)。
- 2) 藤原喜久夫，三沢章吾，土屋滋，小池和子，三輪谷俊夫，竹田美文，阪口玄二，久我哲郎，飯田広夫：

病原微生物の混合汚染による病原性増強に関する研究，食品衛生研究，**29**，919-932 (1979)。

- 3) 小池和子，土屋滋，三沢章吾，藤原喜久夫：腸炎ビブリオの混合汚染時における病原性増強に関する研究（投稿中）。

- 4) Howard, B.D., Wu, W.C-S and Gundersen, C.B. Jr.: Antagonism of Botulinus toxin by Theophylline, Biochemical and Biophysical Research Communications, **71**, 413-415 (1976).

- 5) 佐藤成美，長野すが，高岡栄二：ボツリヌス毒素と Theophylline 誘導体との関係について，I. Theophylline の毒素に対する延命効果について，日本細菌学雑誌，**35**，419-422 (1980)。

- 6) Gill, D.M. and King, C.A.: The mechanism of Action of Cholera Toxin in Pigeon Erythrocyte Lysates, The Journal of Biological Chemistry, **250**, 6424-6432 (1975).

(受付 1984年5月14日)