エンテロトキシンに関する研究

第3報 腸球菌による食中毒

藤原 喜久夫 関谷 武光 番場 和夫

千葉大学医学部衛生学教室 (主任 谷川教授)

〔受付: 12月17日1955年〕

緒 言

ブドウ球菌性食中毒の原因毒物、即ちエンテロトキシンの本体は多糖体及び蛋白体の両分割成分の共存によるものなることが、曩に著者等の実験により報告せられている。更に又、本研究の第2報において、プロテウス菌属の細菌も亦、その株によつては、エンテロトキシン様毒物を産生しうることが述べられた。尚この場合の毒物も、その化学性状はブドウ球菌性エンテロトキシンとその類を同じくするものなることが知られた。本報においては、腸球菌属の細菌によるエンテロトキシン様毒物産生について、若干の実験成績を報告する。

腸球菌属の細菌による食中毒に関する報告は、Linden, Turner & Thom (1926) の例を始めとして、爾来、Aoki & Sakai (1926), Nelson (1928), Cary, Dack & Meyers (1931), Jordan & Burrows (1934), Jordan & Burrows (1935), Cary, Dack & Davison (1938), Surgalla, Segalove & Dack (1944), Getting, Rubinstein & Foley (1944), Sherman, Gunsalus & Bellamy (1944), Buchbinder, Osler & Steffen (1948), Osler, Buchbinder & Steffen (1948), Dack, Niven & Kirsher (1949), Dewberry (1950), 辺野喜, 依田, 松井, (1953) 松井, 川路, 富川, 辺野喜 (1953) 等により、内外共に相当数の記載がみられる。就中、Jordan & Burrows (1935), 辺野喜, 依田, 松井等は動物実験において、又 Cary, Dack & Davison (1938), Dolman (1943), Osler, Buchbinder & Steffen (1949), Dack, Niven & Kirsher (1949) 等は人体実験についてかなり精細な研究を行っている。併し乍ら此等の各報告は、その成績が全く区々であり、従つて、その毒性の本体に関しては、未だ殆ど不明のまゝである。

茲において、上記各報告中の症例について、夫々の症状より種々考察するに、その大部分が無熱性の急性胃腸炎症状を主訴とするものであり、換言すれば、毒素型食中毒を思はしむる点の極めて多いことを知つた。此等の

点に鑑みて、著者等は、この種の食中毒と所謂エンテロトキシン性毒物との関聯性を究明するの必要を感じたので、以下に記す如き実験を行つた。

実験菌株

本実験に使用せる菌株は、腸球菌属のもの2株で、いずれも著者等により、下記の如き方法に従つて、急性胃腸炎症状を呈する患者の糞便より分離せられたものである。尚これらの各菌株は夫々 No. 64 株, SK 9 株と称する記号を附せられている。

1) 分離方法

急性胃腸炎症状を呈する患者50名の糞便について、腸球菌属の細菌の分離を行つた。この実験に用いられた培地はS F培地及び腸球菌属確認培地である。即ち夫々の組成は次の如くである。

S F培地: Polypepton 20 g, Glucose 5 g, K_2HPO_4 4 g, KH_2PO_4 1.5 g, Sodium azide 0.5 g, NaCl 5 g, B.C.P. 0.032 g を蒸留水 1 L 中に溶解せしめ、これを小試験管に分注せる後、15 Lb, 15 分間高压滅菌する。

確認培地: Polypepton 5 g, 酵母エキス 5 g, Glucose 5 g, Sodium azide 0.4 g, 寒天 15 g, Methylene blue 0.01 g を蒸留水 1 L 中に投じ、加熱溶解せる後、これを試験管に分注して、15 Lb, 15 分間高压滅菌を行い、斜面寒天として使用する。

先ず最初に被検試料をS F培地中に投入、37°C, 48時間培養後、その1白金耳をとり、更に確認培地に接種する。以上の操作により、確実に増殖検出せられた菌株を10°C及び45°Cにて更に Bouillon 培養を試みる。その結果両者において明らかに増殖可能のものを選び出し、こ

FUJIWARA Kikuo, SEKIYA Kanemitsu and BAMBIA Kazuo: Studies on the Enterotoxin. III. The production of enterotoxigenic substances by *Streptococcus zymogenes*. Department of Hygiene, School of Medicine, Chiba University. —Jap. J. of Bact., 11 (5) 411-415, 1956.

れを一応腸球菌株とした。

尚この様にして得られた細菌は総てグラム陽性の球菌であつた。

次に此等の腸球菌群菌株について、夫々仔猫嘔吐試験を試みた。即ち上記各菌株を Dolman 半流動培地に接種し、CO₂を20%の割合に含む空気中で48時間培養後、その濾液をとり、100°C30分間加熱せるもの5 cc宛を仔猫の静脈内に注入し、急性胃腸炎症状の発症の有無を観察した。その結果、明らかに下痢、嘔吐等の発症の認められたものとして上記の2株を得た。

尚この実験に使用した Dolman 培地の処方、培養条件、動物実験法等の詳細に関しては、既に第1報に報告せるものと全く同一であるので本報においては省略する。

2) 形態学的性状

2株共にグラム陽性の球菌であり、その大いさは0.8~1.0 μ である。短い連鎖状配列を示し、時には双球菌の観を呈することがある。色素を産生しない。

普通寒天上の集落は小円形、透明にして、孤立性である。

普通 Bouillon 中では10°C、45°C共に良好な発育を示すが、2乃至3日後には沈渣を生じて、その上清は透明となる。又 pH 9.6でも増殖可能である。

2%Glucose 寒天の基礎培地に、40%胆汁、6.5%食塩0.1% Methyleneblue を夫々の割合に加へられた各培地においても、いずれも増殖発育可能である。

3) 生化学的性状

本実験において検討せられた範囲においては、2株共に共通せる性状を示した。即ち、Glucose, Maltose, Saccharose, Lactose, Mannitol, Sorbitol, Glycerin, Esculin を分解するが、澱粉を分解しない。Litmus 牛乳においては酸生成、Casein 凝固及び消化が認められ、特に Litmus は急速に還元される。

山羊血液平板寒天上にて著明な β 溶血を起す。Gela-

tin を液化しない。

以上の諸性状より、此等2菌株はいずれも、Streptococcus zymogenes に属するものと同定された。

被検者摂取試験

21才より31才に至る7名の健康な男子を選んで摂取試験を行つた。全被検者共に著明な既往症はない。尚各人の職業、体重等については第1表に示す如くである。

1) 実験材料

被検菌としてはSK9株を使用した。上記 Dolman 半流動培地に接種し、20%CO₂混合空気中にて37°C48時間培養後、モスリン布により濾過し、その濾液の遠沈上清を100°C30分間加熱する。これを氷室内に一夜放置すると、再び若干の沈澱が生ずるから、更に一夜遠沈してその上清をとり、仔猫嘔吐試験を行う。その結果、強い嘔吐、下痢を起す試料を以て被検者摂取試験の飲用材料とした。

尚対照実験用として、動物実験において嘔吐、下痢を催起せざる Streptococcus zymogenes No. 21 株を用いて、前述と同様の方法により作成された Dolman 加熱濾液を被検者2名に夫々飲用せしめた。又全体の対照として生理的食塩水を1名に飲用せしめた。

2) 実験方法

各被検者共に普通の昼食摂取後、午後1時に、被検試料50~75ccを夫々第1表に示す如き量に混入せる蔗糖入牛乳を飲用せしめた。又対照実験の試料はいずれも75ccである。

飲用牛乳の温度は概ね45°Cとし、冷牛乳による胃腸障害を防いだ。又被検者には対照及び被検試料混入度の多少については、なるべく知らせぬ様注意した。これは先入感による自覚的神経症状の発現を考慮せるためである。又被検試料と牛乳の混合物の総量は全部一定とし、約200ccとした。これを各被検者に2分間以内に飲用せしめ、その後の経過を観察調査を行つた。

3) 実験成績

第1表 人体摂取試験成績

人 名	年齢	性	職 業	体 重 (kg)	種 類	量(cc)	頭 痛	悪 心	嘔 吐	下 痢	腹 痛	脱力感
木 〇	28	男	事務員	50	SK 9	50	+	+	-	+	±	-
佐 〇	26	男	工 員	48	SK 9	50	+	+	-	++	+	-
大 〇	30	男	工 員	52	SK 9	75	-	+	+	++	+	+
渡 〇	21	男	商 業	64	SK 9	75	+	+	-	++	+	-
鈴 〇	28	男	工 員	62	No. 21	75	-	-	-	-	-	-
木 〇	28	男	事務員	50	No. 21	75	-	-	-	-	-	-
石 〇	31	男	商 業	45	食塩水	75	-	-	-	-	-	-

第1表にみられる如く、生理的食塩水、No. 21株の加熱濾液を摂取せる被検者は全例共、無症状に終始したが、SK 9株の加熱濾液飲用者群においては4例共に発症した。即ち腹痛、下痢は殆ど必発の症状であり、又摂取量によつては若干の嘔吐を催す者もあつた。頭痛、悪心等も可成訴へられた。脱力感は75cc摂取者1人においてのみ軽度の発生をみた。

尚以上の諸症状は試料飲用後約6時間位に発現し、24時間後には大体平常に恢復した。又此等の臨床症状はOsler, Buchbinder & Steffen等の文献に現れたものと大体類似せるものである。

以上の実験成績は、腸球菌群の細菌においても、株により、又発育条件により、耐熱性、水溶性の食中毒原因物質を産生しうるものなることを示している。即ち此等の細菌によつても、ブドウ球菌等と全く同様エンテロトキシン様中毒の発生の可能性が充分に考へられる。

毒性物質抽出実験

曩に著者等がブドウ球菌及びプロテウス菌のエンテロトキシン群毒物抽出の際に考案、応用せる方法を、本実においても試みてみた。即ちイオン交換樹脂を利用して、アミン等の塩基性物質を予め除去し、その残液についてアルコール処理を行い、沈澱物として有毒物質を分離した。

1) 実験材料

本実験に用いられた試料は、前記の被検者摂取試験において試飲材料に供せられたものの一部である。即ちSK 9株のDolman培養加熱濾液を原液とした。尚他にNo. 64株により同様の方法で作成された濾液も実験に用いられ、その抽出物の毒性を比較検討された。又対照と

してはNo. 21株の同様な加熱濾液を実験材料とした。

2) 実験方法

此の抽出実験の操作順序は第2表の如くである。即ち先ず予め醋酸緩衝液によりpH 5.0に調整せるイオン交換樹脂Amberlite IRC 50の樹脂柱を作成し、これに前記の培養加熱濾液を注加、通過せしめる。この場合に有機塩基その他の陽イオン物質は此の樹脂柱に残留するが故に、その濾液はHistamin, Tyraminその他の所謂腐敗アミン等の夾雑物は充分除去されている。此の濾液にアルコールを4倍量注加し、約4℃に冷却すると、著明な絮状沈澱を生ずる。尚この沈澱粒子の直径が小さく、そのために比較的沈降し難い時もあるが、この様な時には痕跡程度のNaClを添加することにより、急速に大きな沈澱を発生せしめることが出来る。この沈澱を更にChloroform-gel法により蛋白部及び非蛋白に分割する。即ち上記の沈澱を再び蒸留水に溶解せしめ、Chloroform及び少量のAmyl alcoholを加え充分に振盪せる後、遠心分離を行うと、下層にGel状物質を生ずる。これは蛋白体によるものと考へられ、その上部の透明な水溶液層は非蛋白分割を含むものと思われるので、この分離操作を数回反復する。最早Gelをつくらなくなるに至つたら、それ迄得られた全部のGel状分割をあつめ、これに4倍量のアルコールを加え、遠心分離を行つて灰白色の沈澱を得る。次に此等の各沈澱を純アルコール、エーテル処理により乾燥粉末を得た。

尚一方前記イオン交換樹脂に移行せる分割は1Nの塩酸水溶液により抽出して、毒性試験に供した。又此等各分割の符号は第2表の夫々の位置に記した如くである。

次に此等の各抽出分割について、夫々毒性試験を行つた。即ち上記の各試料を第3表の如き割合に秤量採取しそれらを仔猫に投与して、下痢嘔吐の発現の有無を検べた。尚此の場合の実験条件の詳細に関しては第1報におけると全く同様である。

3) 実験成績

第3表 抽出物毒力

	量	嘔吐	下痢	判定
①	5 cc	++	++	+
②	5 cc	++	++	+
③	5 cc	—	—	—
④	10 mg	++	++	+
⑤	10 mg	—	—	—
⑥	10 mg	±	—	±
⑤+⑥	2+10mg	++	++	+

第2表 毒素抽出法

毒性試験の結果は第3表に示す如くである。即ちその毒性は③のアミン分割には移行せず、④の分割に入る。更に④分割を蛋白部及び非蛋白部に分割すると、その各成分単独では殆ど毒性を現わさない。然るに此等2分割を合併して仔猫に投与する時は、再び④分割と殆ど同様の効力を生ぜしめる。即ち此等の成績より、該毒物がその作用を充分に発現せしむる為には、蛋白体及び非蛋白体の共存を必要とするものなることを知った。

以上の実験成績を通覧するに、腸球菌属の細菌の產生する急性胃腸炎催起物質も亦、著者等が、ブドウ球菌及びプロテウス菌の場合にエンテロトキシン群毒物として抽出せる物質と同一の分割成分より成立つものと見做される。

尚又No. 64株を用いた実験においてもSK9株と全く同様な成績を得たが、No. 21株の場合には此等の各分割成分いずれも毒性を認められなかつた。

抽出毒物の化学性状

先ず最初に、④、⑤、⑥の各分割について定性試験を行つたが、その成績は第4表にみられる如くである。即ち、④、⑤両分割は共に Polypeptide 結合物の存在を示すが、⑥分割は Peptide 反応、還元糖反応いずれも陰性である。

第4表 化学性状

分割 反応	④	⑤	⑤ 水解物	⑥	⑥ 水解物
Fehling	—	—	—	—	+
Nylander	—	—	—	—	+
Biuret	+	+	+	—	—
Xanthoprotein	+	+	+	—	—
Ninhydrin	+	+	+	—	—
			↓		↓
Paperchromatograph		Glycine Alanine Aspartic acid Glutamic acid Methionine Histidine		Glucose Galactose Raffinose	

次に⑤、⑥両分割を夫々10%塩酸及び25%硫酸により各々9時間沸騰水浴中で加水分解を行わしめ、その成績物について、加えられた酸を除去せる後、上記の定性試験を再度試ると、⑥分割には明かに還元糖の存在が認められた。以上の実験成績より、④物質は明かに多糖体及び蛋白体を含むものなることが推定される。

更に上記の加水分解生成物について、Paperchromatographを行つた。此の場合の展開に用いた溶媒は、⑥⑥両分割共に Phenol を用いた。又対照として、他の既

知のアミノ酸類及び糖類を平行して上昇せしめ、その位置の比較を行つた。尚発色用指示薬は⑥分割においては Ninhydrin、⑥分割においては Anilin-phthal 酸を主として使用した。

この実験成績は第4表に示す如くであり、⑥分割の水解物においては、Aspartic acid, Glutamic acid, Glycine, Methionine, Alanine, Histidine等が認められ、又⑥分割の水解物中には、Glucose, Galactose, Raffinose等の存在を確認した。

尚上述の各抽出物中には、未だ相当量の不純物を含むと考えられるが故に、上記の Paperchromatogram に現われた物質は、必ずしもその全部が毒物に由来するものとは考えられない。併し乍ら、此等の腸球菌の培養濾液より抽出された物質と、ブドウ球菌の培養濾液より全く同じ方法により抽出された物質が、その組成において相異なるということは、第1報の成績と比較すれば明かな所であるが、この事実は、此等2群の菌株により產生される毒物は必ずしも同一物質ではないことを一応暗示している様に思われる。

結 論

著者等は急性胃腸炎患者の糞便より、エンテロトキシン様毒物を產生する腸球菌2株を得たが、此等の菌株はいずれも Streptococcus zymogenes に属する。

又此等の菌の產生する毒物の毒性は人体摂取試験により確認された。

尚此等の毒物は蛋白体及び多糖体の両分割を有し、それらの共存によりその毒性を現しうることはブドウ球菌又はプロテウス菌の場合と全く同様である。

終りに本実験に関して、種々御指導を賜つた谷川教授並びに相磯教授に深甚なる謝意を表する次第である。

文 献

- 1) Linden, Tarner and Thom: Pub. Health Rep., 41, 1647 (1926).
- 2) Aoki and Sakai: Centralbl. f. Bact., Abt. 1, 98, 145 (1926).
- 3) Nelson: New England J. Med., 199, 1145 (1928).
- 4) Cary, Dack Meyers: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 29, 214 (1931).
- 5) Jordan and Burrows: J. Infect. Dis., 55, 363 (1934).
- 6) Jordan and Burrows: J. Infect. Dis., 57, 121 (1935).
- 7) Cary, Dack and Davison: J. Infect. Dis., 62, 88 (1938).
- 8) Surgalla, Segalov and Dack: Food Research, 9, 112 (1944).

- 9) Getting, Rubinstein and Foley: Amer. J. Pub. Health., 34, 833 (1944).
- 10) Sherman, Gunsalus and Bellamy: New York State Coll. Agri. Cornell Univ. Agri. Exper. Stat. 116 (1948).
- 11) Buchbinder, Osler and Steffen: Pub. Health Rep., 63, 109 (1948).
- 12) Osler, Buchbinder and Steffen: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 67, 456 (1948).
- 13) Dack, Niven and Kirsher: J. Infect. Dis., 85, 131 (1949)
- 14) Dewberry: Food Poisoning. (1950).
- 15) Dolman: Canad. J. Pub. Health. 34, 97 (1943).
- 16) 藤原, 杉山: エンテロトキシンに関する研究, 日本細菌学雑誌, (第1報) 10, 189 (1955).
- 17) 藤原, 岩田: エンテロトキシンに関する研究(第2報) 日本細菌学雑誌, 11, 315, 1956.