逆受身赤血球凝集反応による腸炎ビブリオ腸管病原毒素（神奈川溶血素）の検出法，ならびに本法による各種分離株の毒素産生性の再検討

太田 建爾 工藤 泰雄 津野 正朗
坂井 千三 丸山 務 伊藤 武
大橋 誠

東京都立衛生研究所 微生物部
東京都新宿区百人町 3-24-1 〒160
〔受付：5月16日，1979年〕

腸炎ビブリオの産生する腸管病原毒素（神奈川現象にあずかる耐熱性毒素）の検出法として，抗毒素血清より得た特異免疫グロブリンを用いた逆受身赤血球凝集反応法を開発した。本法の毒素検出感度は 1 ng/ml であった。

本法を用いて，各種分離菌株の本毒素産生性について再検討をおこなった結果，ヒト胃腸炎由来菌株では，神奈川現象陰性とされたもの，あるいは溶血が弱く判定が困難であったものの大部分が微量ながら本毒素を産生することが確認された。すなわち，本毒素を産生する菌でも，その量がある程度以上でなければ神奈川現象陽性の結果をうることができないことが明らかにされた。しかし，海産物など自然界由来菌株では，本法を用いても培養上清中に本毒素を証明することはできなかった。

以上の所見より，神奈川現象にあずかる毒素の腸炎ビブリオ腸炎の下痢発現における役割についても論じた。

胃腸炎の原因と目される腸炎ビブリオのほとんどが耐熱性溶血素を産生し，自然界より分離される本菌の大部分はこの毒素を産生しないことはよく知られた事実である^{6,9,14}。そして，このことから腸炎ビブリオの下痢起因性と本溶血素との関係が注目されてきた。また，本溶血素は高度に精製されるに至っている^{3,10,24}。一般に本溶血素の産生性はヒトあるいはウサギ赤血球加我妻培地上における溶血の有無で判定され，このようにして見られる溶血は神奈川現象と呼ばれる。

Zen-Yoji ら^{24,25}は腸炎ビブリオの産生する毒素をマウスに対する致死活性を指標として精製し，その高度精製標品が物理化学的性状および生物学的性状からみて神奈川現象に関与する耐熱性溶血毒そのものであることを報告した。そして，この精製毒素の実験動物腸管に対する毒性が本菌の下痢起因性をよく説明するとして，これを腸管病原毒素（enteropathogenic toxin）と呼んだ*。また，Ohashi ら¹²および Obara ら¹¹は精製耐熱性溶血素（神奈川溶血素）を，乳のみマウスに経口投与した場

合，腸管粘膜に壊死性の変化と炎症反応が起こること，さらに本毒素を産生する生菌を経口投与した場合も同様の変化が見られることを報告した。そして，このことからこの溶血素が本菌によるヒト胃腸炎の症状発現に主役を演じているであろうことを考察した。すなわち，これらの知見によつて，胃腸炎患者から分離される本菌の大部分が神奈川現象陽性であるという観察にしたがつて，本現象が病原性を知る指標となりうることにある程度の理論的根拠が与えられたと考えられる。

しかしながら，善養寺ら^{21,22}は，神奈川現象陰性株が原因であったと考えざるをえない集団下痢症の事例に遭遇し，その詳細を報告している。すなわち，毒素を病原因子と理解する立場からすれば明らかに矛盾する問題点が提起されたことになる。

この点を解明するためには，このような神奈川現象陰性株がはたして毒素を産生しないかどうかを厳密にしらべるための方法論を確立する必要がある。

そこで，まず，われわれは我妻血球寒天平板法よりも

より鋭敏かつ特異的な検出法をもとめ、特異的な抗毒素免疫グロブリンで感作した赤血球を用いた逆受身赤血球凝集反応の応用を試みた。そして、この反応系を用いて各種由来株の毒素産生性を再検討した。

その結果、本法は特異的でしかも鋭敏な方法としてじゅうぶん利用価値があり、またこれによつて再検討してみると食中毒事例由来の神奈川現象陰性株の大部分が微量ながら本溶血素を産生することが確認されたので、以下その概略を報告する。

* 註：著者らは善養寺らのいう腸管病原毒素と神奈川現象にあずかる耐熱性溶血素（あるいは神奈川溶血素）とは同じものであると考えるが、腸炎ビブリオ胃腸炎の発症における本毒素の役割を重視して、本報では善養寺らの呼称を踏襲した。本文中では以下単に毒素と略称する。

材料および方法

供試菌株および培養法：都立衛生研究所細菌第一研究科で1965年から1977年までの間に分離された食中毒患者および散発下痢患者由来の115株、および同じく肉肉衛生研究科で魚介類・調理器具などから分離された100株の腸炎ビブリオを溶血素産生性の試験に供した。また、対照として *Vibrio alginolyticus* 2株、および腸炎ビブリオに類似の海水由来ビブリオ4株をも供試した。

500ml 容量の三角コルベンに分注した100mlの5% NaCl 加2%ペプトン水 (Bacto peptone, Difco), pH 7.4 に、供試菌株を接種し、35°C, 18時間、120回/分の条件で振とう培養した後、15,000rpm, 15分間遠心し上清を分離、これを100°C, 10分間加熱して被検材料とした。

神奈川現象検査法：供試菌株の神奈川現象は善養寺の方法²³⁾に準じて検査した。すなわち、採血直後のウサギ赤血球を生理食塩水で3回洗浄した後、神奈川現象検査用・我妻変法培地(日水製薬)に2.5%の割合に添加し平板培地とした。固化後培地表面をじゅうぶん乾燥させ、被検菌の37°C, 18時間培養ブイオン液を直径2mmのループを使用して1ループ接種し、37°C, 24時間培養後、溶血の有無を観察した。

発育菌苔の周辺に明らかなβ溶血環が認められるものを陽性とし、菌苔をかきとつてはじめて溶血が観察できるような場合、あるいは菌苔の周辺にごく弱い溶血が見られる場合を疑陽性と判定した。

供試精製毒素：善養寺ら²⁴⁾の方法に従つて、剖検例由来神奈川現象陽性腸炎ビブリオ中津川株(O2:K3)の培

養液を出発材料とし、70%硫酸アンモニウムによる沈殿分画をDEAE・セルロース、およびDEAE・セファデックスA-50によるカラムクロマトグラフィー、次いでセファデックスG-100ゲル濾過により精製した標品を用いた。

本毒素はゲル内沈降反応、超遠心、およびポリアクリルアミド・ディスク電気泳動の分析においていずれも単一であることが確認され、炭水化物、リピッド陰性の単純タンパクよりなり、その分子量は45,000である²⁴⁾。

特異抗毒素免疫グロブリン：抗毒素免疫グロブリン(以下特異グロブリンと略す)は精製毒素でウサギを免疫して得た抗毒素血清から Cuatrecasas と Anfinsen²⁵⁾の方法にしたがつてアフィニティクロマトグラフィーにより分離精製した。すなわち、その方法は概略次のとおりである。ブロムシアンで活性化したセファロース4B (Pharmacia Fine Chemicals) 1.5gを 10^{-3} M塩酸で膨潤、洗浄した。これに、0.5M NaCl 加0.1M NaHCO₃液4mlに溶解した約3mgの精製毒素を混合し、室温で2時間はげしく振とうし毒素をセファロース4Bに結合させた。ついで、0.5M NaCl 加0.1M NaHCO₃液で洗浄後残存活性基を不活化するため5mlのエタノールアミンを加えて室温で2時間振とうした。最後に、1M NaCl 加0.1M ホウ酸緩衝液 pH 8.0 と1M NaCl 加0.1M 醋酸緩衝液とで交互に各3回洗浄した後、0.1M リン酸緩衝液, pH 7.0(以下PBと略す)に浮遊させ16×30mmのカラムに充填した。

このカラムに抗毒素ウサギ血清2mlを流量40ml/hrの速度で流し、引き続き約35mlの上記PBでカラムを洗浄した。ついで、0.5M NaCl 加0.2M グリシン-醋酸緩衝液, pH 2.3 を用いカラムに結合した特異グロブリンを溶出した。特異グロブリンが酸に侵されるのを防ぐため、溶出画分はあらかじめ10% NaOH, 0.05mlを分注した試験管に受けた。

特異グロブリンの存在は280nmの紫外部吸光度と、精製毒素を抗原としたスライドガラスゲル内沈降反応により確認した。精製毒素と反応する分画を集め、0.01M PB, pH 6.4 で透析後、ダイアフロー膜 XM-50 (アミコン) による限外濾過で原容量(2ml)に濃縮し、特異グロブリンとして使用した。

感作赤血球：赤血球は市販のホルマリン・タンニン酸処理凍結乾燥ヒツジ赤血球、セルゲン(日本バイオテスト)を用いた。

特異グロブリンによるセルゲンの感作の方法は次の通りである。

セルゲン1バイアルに4mlの0.5M PB, pH 6.4を加え室温に1時間静置後, 2,000 rpm, 5分間の遠心で血球を集め, これに0.5M PB, pH 6.4で希釈した各濃度の特異グロブリンを1ml加えて血球を浮遊させ, 37°Cの恒温槽で30分間感作した。感作中3回静かに振とうした。

感作した赤血球を生理食塩水で3回洗浄, 最後に0.01%アラビアゴムおよび0.1% Tween 80加0.15Mリン酸緩衝生理食塩水, pH 7.2 (以下希釈液と略す)に1.8%の濃度になるよう浮遊させた。

セルゲンを特異グロブリンを加えることなしに上記と同様に処理, 調整した浮遊液を未感作対照とした。

逆受身赤血球凝集 (RPHA) 反応法: 精製毒素あるいは被検材料をあらかじめ希釈液で3×, 10×, 30×, 100×……と段階希釈し, おおのの0.025mlをマイクロタイター用V型プラスチックトレー (Cook Laboratory Products) に分注した。それぞれの希釈系列を2列用意し, 感作セルゲンと未感作セルゲンとをそれぞれの列に0.025mlあて加えた。被検液・赤血球浮遊液混合液をマイクロミキサーでじゅうぶん攪拌し37°C, 2時間反応させ, 肉眼で明らかに認められる凝集を観察して結果を判定した。

結 果

逆受身赤血球凝集 (RPHA) 反応: まず RPHA 法に用いるセルゲンの感作に適当な特異グロブリンの量を検討した。特異グロブリンは25, 50, 100および200 μg/mlの各濃度に希釈し, それぞれで上述のようにセルゲンを感作した。

各濃度の特異グロブリンで感作した血球と段階希釈した精製毒素との間の凝集反応の結果を表1に示した。25 μg/mlの特異グロブリンで感作した血球は1.0 μg/mlの, 50 μg/ml 感作の特異グロブリンは0.1 μg/mlの毒素濃度まで凝集が認められた。100および200 μg/mlの特異グロブリンで感作した血球では1 ng/mlの毒素量まで凝集が見られた。

表1に示したように, 1 ng/mlの毒素量に対する反応は特異グロブリン200 μg/ml 感作血球の方が100 μg/ml 感作血球に比してより明瞭であつたが, 特異グロブリンを節約する意味で, 以下の実験にはすべて100 μg/mlの特異グロブリンで感作した血球を用いた。

図1に RPHA 反応の結果を写真で示した。

最初の2列は神奈川現象陽性中津川株の培養上清で, 最上列には感作血球, 第2列には未感作血球が加えてあ

Table 1. Determination of coupling dose of specific immunoglobulin to tanned sheep red blood cells

Coupling dose of immunoglobulin (μg/ml)	Concentration of purified toxin (ng/ml)					
	1,000	100	10	1.0	0.1	0.01
0 (Control)	—	—	—	—	—	—
25	+	—	—	—	—	—
50	卅	卅	—	—	—	—
100	卅	卅	卅	+	—	—
200	卅	卅	卅	卅	—	—

—: No agglutination

+~卅: Visible agglutination according to its grade

る。前者では1:10,000の希釈まで明らかな凝集が認められるが, 後者では1:3でも凝集は認められない。

第3および第4列は我妻寒天平板上で神奈川現象陰性と判定された T-77-72 株の培養上清の反応である。感作血球では1:100の希釈まで凝集が観察されるが, 対照系列では凝集が認められない。上述のようにこの反応系の感度が1 ng/mlであるから, 本菌の培養上清中には0.1 μg/mlの毒素が産生されていることになる。

次の第5, 第6列および第7, 第8列も同様に神奈川現象陰性株の培養上清である。前者 T-77-7 株では10倍希釈の段階で感作血球, 未感作血球いずれにも凝集は認められなかつた。後者 ML 110 株では, 感作血球および未感作血球両者に対して1:100の希釈まで凝集が認められた。すなわち, この反応は非特異反応と判定された。

第9, 第10列は上記 ML 110 株の培養上清から非特異反応を取り除くべく, あらかじめ未感作血球と37°Cで30分反応させた後, その上清を供試した結果である。

非特異反応と考えられる未感作血球との間の反応は除去できたが, 感作血球との間にも凝集は認められず陰性と判定された。ただし, 対照実験によつて, このような吸収操作で毒素そのものも多少未感作血球に吸着されと考えられる結果が得られたので, 以下分離菌株の毒素産生性の検討に際してこのような未感作血球に対する非特異反応が見られた場合は, 毒素産生性について結論を出すことをひかえた。

最後の2列は精製毒素を用いた対照系列である。感作血球に対してのみ凝集が認められ, その終末点は前記同様1 ng/mlであつた。

各種材料由来株の毒素産生性: 食中毒事例, 散発下痢

Fig. 1. Microtiter plate showing titration of enteropathogenic toxin (Kanagawa hemolysin) in the culture supernatant of *Vibrio parahaemolyticus* by reversed passive hemagglutination.

Upper and lower rows for each strain represent the reactions with sensitized and non-sensitized SRBC, respectively. The reactions given by the culture supernatant of strain ML 110 was considered to be non-specific, because it was disappeared by a previous absorption with non-sensitized SRBC.

患者ふん便，魚介類および調理器具などの各種材料から分離された菌株について，神奈川現象を調べるとともに，毒素産生性を RPHA 法によつて検討した。

まず，患者由来の 115 株についての結果を表 2 に示した。

供試株 115 株中 41 株は神奈川現象陽性株，11 株は本現

象陽性・陰性いずれかを判定し難い，疑陽性というべき株であり，63 株は陰性株であつた。

神奈川現象陽性株の培養上清では，すべてが 1:1,000 以上の希釈で凝集を示した。すなわち，毒素濃度に換算すると 1μg/ml あるいはそれ以上の毒素が培養上清中に産生されているという結果であつた。

Table 2. Production of enteropathogenic toxin by the cultures of *V. parahaemolyticus* isolated from feces of human cases

Kanagawa phenomenon	Number of culture tested	Toxin producibility (RPHA test)			
		Positive		Negative	Non-specific reaction
		$>1,000 \times$ *	$300-10 \times$		
Positive	41	41	—	—	—
Questionable	11	8	2	1	—
Negative	63	1	31	28	3
Total	115 (100%)	50 (44%)	33 (29%)	29 (25%)	3 (2.6%)

* Dilution of culture supernatant

神奈川現象判定困難な11株では、8株が1:1,000以上の希釈で凝集を示し、残り3株のうち2株はそれぞれ1:300,および1:10の希釈で凝集を示し、産生量は神奈川現象陽性株に比して少ないものの、毒素産生性であると判定された。残りの1株の培養上清中には毒素を検出することができなかつた。

神奈川現象が陰性であつた63株では、32株において毒素が検出された。そのうち1株では1:1,000希釈で、他の31株では1:300から1:10の希釈で凝集が認められた。残り31株中28株では1:3希釈においても毒素を検出しえなかつた。他の3株では非特異反応が観察された。

表3には魚介類および調理器具などから分離した100株について毒素産生性を検討した結果を示した。

Table 3. Production of enteropathogenic toxin by the cultures of *V. parahaemolyticus* isolated from sea fishes, shellfishes and swabs of cooking utensils

Kanagawa phenomenon	Number of culture tested	Toxin producibility (RPHA test)		
		Positive $>10 \times$ *	Negative $<10 \times$	Non-specific reaction
Questionable	4	—	4	—
Negative	96	—	71	25
Total	100	—	75	25

* Dilution of culture supernatant

神奈川現象は、陽性・陰性の判定が困難であつたものが4株で、残りの96株はすべて陰性であつた。

神奈川現象判定困難な4株すべての培養上清にはRPHA法によつても毒素は検出できなかった。陰性株96株中、71株の培養上清は感作血球と反応せず毒素非産生と判定された。残り25株では非特異反応が認められ、毒素産生性について結論がえられなかつた。

なお、表には示さなかつたが、対照として用いた類縁ビブリオ6株はすべてRPHA法によつても毒素産生性が認められなかつた。

前記(表2)のヒトふん便由来株の成績のうち、集団食中毒事例で原因菌が神奈川現象陰性と考えられるものについての成績を事例ごとにまとめてみたのが表4である。

第1事例は1965年に東京都品川区で発生した「ゆでたこのさしみ」によると推定される集団発生で、原因菌は血清型O6:K46,神奈川現象陰性と同定された。36名の患者中16名のふん便から分離された菌16株を今回の試験の対象としたが、いずれも神奈川現象陰性で、そのうち12株の培養上清からRPHA法で毒素の検出をみた。ただし、その力価は比較的低く、1:300~1:10で陽性(0.3~0.01 $\mu\text{g/ml}$ 相当)の程度であつた。

第2から第6例までの5事例は、東京都文京区、新宿区、中央区、台東区、田無市でいずれも1969年に発生した事例である。分離株はすべてO4:K12と同定され神奈川現象陰性であつた。

供試菌株数はあまり多くないが、合計して12株中8株はRPHA法によつて毒素産生性を確認しえた。産生毒素量は0.3~0.01 $\mu\text{g/ml}$ 相当であつた。

第7例は1967年に東京都練馬区で発生した集団食中毒事例で、分離菌の血清型はO3:K7,神奈川現象陰性であつた。本事例由来の分離菌株7株を供試したが、全株が毒素産生性であり、そのうち1株は1 $\mu\text{g/ml}$ 、他の6株は0.3~0.01 $\mu\text{g/ml}$ の産生量であつた。

毒素産生量と我妻培地上での溶血の程度との関係:以上のように、RPHA法によれば神奈川現象陰性株の中にも前記液体培地中では毒素を産生することが確認される場合があることがわかつたので、種々の毒素産生量の菌株が我妻血球平板培地上で、それぞれどの程度の溶血を示すかをしらべた。

結果は図2に示したとうりで、1 $\mu\text{g/ml}$ 以上の毒素を産生する菌株の大部分では発育菌苔の周囲に明らかな β 溶血環が認められ、毒素産生量に比例して溶血環の直径は大きい。一方、RPHA法によつても毒素産生が認め

Table 4. Enteropathogenic toxin producibility of the cultures from outbreak cases due to Kanagawa phenomenon negative *V. parahemolyticus*

Outbreak No.	Date and place of occurrence	Number of patient	Characteristics of isolate		Number of culture tested	Toxin producibility (RPHA test)		
			Kanagawa phenome- non	Serotype		Positive		Negative
						>1,000×*	300-10×	
1	September, 1965 Shinagawa, Tokyo	36	—	O6:K46	16	—	12	4
2	July, 1969 Bunkyo, Tokyo	9	—	O4:K12	3	—	—	3
3	August, 1969 Shinjuku, Tokyo	34	—	O4:K12	3	—	2	1
4	August, 1969 Chuo, Tokyo	25	—	O4:K12	3	—	3	—
5	August, 1969 Taito, Tokyo	22	—	O4:K12	1	—	1	—
6	September, 1969 Tanashi, Tokyo	7	—	O4:K12	2	—	2	—
7	September, 1976 Nerima, Tokyo	13	—	O3:K 7	7	1	6	—
	Total				35	1	26	8

* Dilution of culture supernatant

Fig. 2. Kanagawa phenomenon shown by the representative cultures of *V. parahemolyticus* which produced various amounts of the enteropathogenic toxin. The photograph was taken after the incubation at 37 C for 24 hr. On the right column, the colony masses were removed immediately before the observation.

*(): Amount of the toxin estimated by RPHA test.

られなかつた菌株ではもちろん、産生量が $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度の菌株でも明らかな溶血環は認められない。

菌苔をかきとつて観察すると、明らかな溶血環の認められなかつた菌株でも菌苔の下に弱い溶血が見られる。この場合 RPHA 法によつて $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度の毒素産生が証明された菌株と、毒素非産生と判断された菌株との間に、その溶血の程度に明確な違いは認められず、判定は非常に困難であつた。

考 察

神奈川現象は現在腸炎ビブリオ分離菌株の病原性の有無を判定する方法として広く利用されているが、Sakurai¹⁷⁾、柳ヶ瀬ら¹⁹⁾、Yanagase ら²⁰⁾も報告しているように、本菌は神奈川現象に関与する毒素以外にも性質を異にする溶血素を産生することが知られており、そのために本現象の結果判定が困難な場合にしばしば遭遇する。

本現象の検査にあつては、ヒトあるいはウサギ赤血球を加えた平板の他に、この毒素に感受性のないウマ赤血球加平板を併用し、前者で溶血がみられ、後者ではみられないことを確認することがすすめられているゆえんである²³⁾。また、本現象の判定にあつては、溶血環が大きくない場合、陽性・陰性のいずれとも判定し難いことがあり、検査者の主観に大きく左右されるむきがある。

これらの難点を解消するために、かつて太田¹³⁾は、腸管病原毒素検出法として、抗精製毒素血清を用いる Oudin 法を開発した。この方法は高度に精製した毒素に対する抗血清を用いているので、特異性の点では神奈川現象試験より明らかにすぐれている。そして、神奈川現象陰性と判定された菌株では本法を用いても毒素産生性は認められず、両者による結果には大方の一致を見た。このことは Oudin 法の感度が $1\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、この感度は本報で明らかにされた神奈川現象発現に必要な最低量に相当することから当然の帰着といえる。したがつて、緒言で述べたように分離株が厳密な意味で本毒素を産生するかどうかを判定することを目的とする場合には、感度においておのずから限界があつたわけである。これに対して今回開発した RPHA 法の感度は $1\text{ng}/\text{ml}$ であり、Oudin 法では不能であつた微量の毒素検出が可能になり、本毒素の産生性をより厳密に検討する目的をじゅうぶん満たすものであつた。

また、明らかに神奈川現象陽性と判定されるのは本報で述べた培養条件下で産生される毒素量が $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の菌株であり、より少量の毒素産生菌では陰性と判定さ

れることが確認された。しかしながら本研究に供試した神奈川現象陰性株のうち 1 株は RPHA 法により $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の毒素を産生することが認められた。この菌株についてさらに詳細な検討は加えていないが、我妻培地のような固型培地上と本法で用いた液体培地中での毒素産生性の差を反映しているのかも知れない。

RPHA 法を用いて細菌毒素を検出する試みは、すでにブドウ球菌食中毒における推定原因食品中のエンテロトキシンの検出¹⁸⁾、ウェルシュ菌食中毒における患者ふん便からのエンテロトキシンの検出⁵⁾、抗コレラ毒素グロブリンを利用した易熱性大腸菌エンテロトキシンの検出⁷⁾などに応用されており、それぞれ有用性が認められている。これらの応用においても毒素検出感度はいずれも $1\text{ng}/\text{ml}$ 前後であり、本報で述べた腸炎ビブリオの腸管病原毒素に対する感度も同程度であつた。

RPHA 法による腸管病原毒素産生性の再検討の結果、神奈川現象陽性株はすべて $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の毒素を産生しており、神奈川現象疑陽性株でも約 91% の株が本毒素産生能を有していることが明らかになった。さらに神奈川現象陰性株でも、ヒト胃腸炎由来株ではかなりのものが微量ながら毒素を産生することが確認された。このことは、本毒素が胃腸炎症状発現に重要な役割を果しているであろうとする考え方を支持するものとして興味深い。

Sakazaki ら^{15,16)}は、神奈川現象陰性株でもウサギ小腸結紮ループに液体貯留をひき起こしうることから、本菌の病原性を支配する因子は本毒素のみではないであろうことを考察している。また、Honda ら⁴⁾は、本菌の培養上清から本毒素とは別に、チャイニーズ・ハムスター卵巣腫瘍細胞にコレラ毒素の場合と同じような形態変化をひき起こす因子を分離したと報告し、これを下痢起因物質として重視している。

著者らは、必ずしも腸管病原毒素を本菌による胃腸炎発現に関与する唯一無二の因子と考えるわけではないが、上述の坂崎らの実験結果の評価にあつては、神奈川現象陰性菌であつても、ある種の菌株はやはり腸管病原毒素を微量ながら産生しているという事実を加味して、再考察してみるべきであると考え。いかに感度の高い特異的な検出法を用いたといつても、培養条件だけでは試験管内での毒素産生性は大中に異なることは、細菌毒素一般についていえることであり、本菌の場合はすでに太田によつても観察されているところである¹³⁾。Chun ら¹⁾もまた、神奈川現象検査にあつては、基礎培地に添加する糖の種類によつて結果が大いに影響され

ることを観察している。このことは、単にある培養条件が当該毒素の産生をよく支持するかどうかだけの問題ではなく、Kusama ら⁸⁾がコレラ菌のエンテロトキシン産生性において指摘したように、培養中に同時にみずからが産生するタンパク分解酵素が当該毒素を分解するというような場合も想定しなければならない。また、伊藤ら⁹⁾が食中毒由来の一部のウェルシュ菌で観察したように、試験管内では毒素産生条件を確立することは困難であるが、ウサギ結紮腸管など生体内では検出可能な量の毒素の産生が見られるような場合もある。腸炎ビブリオにおいても、試験管内では一見毒素を産生しないように見えても生体内では産生することがあるのかも知れない。

Honda らの報告したコレラエンテロトキシン様の下痢因子の存在についても、われわれは相当数の神奈川現象陽性あるいは陰性株についてその検出を試みた経験がある。しかし、これを追試確認することができなかつた(未発表成績)。彼らの報告によれば、この因子は培養上清から直接検出できるほどの量のものではなく、濃縮精製によつてはじめて検出可能な程度であるという。下痢発現にどれほど関与しうるものであるかについてはさらに検討を要するのではなからうか。

海水など自然環境から分離される腸炎ビブリオの大部分は神奈川現象陰性株であるという観察は、より敏感な検出法を用いた本研究によつても再確認された。このような菌では毒素産生性が遺伝学的に欠如しているのかどうか、また、自然界において非産生株から産生株への移行が起こりうるかどうかの問題は、従来から多くの研究者の興味の焦点であつたが、今なおその解明には至っていない。この問題に取り組むためにも今回用いた検出法は有用な手段となりうると考えられる。ただし、一部の被検材料と未感作血球との間に認められた非特異反応については今後も検討をつづける必要がある。おそらく、この反応はある菌株ではレクチン様の代謝産物が産生されるためのものと思われる。一つには、このような非特異反応に影響されない反応系を求めての改良が必要であろうし、また、一方このような反応は海水など環境由来の株に集積して見られることも興味深く、今後の検討方向の一つであろう。

本研究は、文部省科学研究費、および日米医学協力計画コレラ専門部会の研究費により一部援助された。

なお、研究成果の一部は、日米医学協力計画コレラ専門部会第13回合同会議(1977年9月、米国、アトランタ)および第51回日本細菌学会総会(1978年4月、米子)にお

いて発表した。前者における発表要旨は Proceedings of the 13th Conference on Cholera, The US-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel, 1977, (National Institutes of Health, USA) に記載されている。

本研究の供試菌株の一部を分与された当研究所生活科学部乳肉衛生研究科の関係各位に深謝の意を表する。

文 献

- 1) Chun, D., Chung, J.K., Cho, D.T., Seol, S.Y., and Tak, R. (1977): Effect of carbohydrate source on Kanagawa-type hemolysis of *Vibrio parahaemolyticus*. J. Microbiol., 5, 385-386.
- 2) Cuatrecasas, P., and Anfinsen, C. B. (1971): Affinity chromatography. In Jackoby, W. B. (ed.) Methods in enzymology, vol. 22, pp. 345-378. New York. Academic Press.
- 3) Honda, T., Taga, S., Takeda, T., Hasibuan, M.A., Takeda, Y., and Miwatani, T. (1976): Identification of lethal toxin with the thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus*, and some physicochemical properties of the purified toxin. Infect. Immun., 13, 133-139.
- 4) Honda, T., Shimizu, M., Takeda, Y., and Miwatani, T. (1976): Isolation of a factor causing morphological changes of chinese hamster ovary cells from the culture filtrate of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect. Immun., 14, 1028-1033.
- 5) 伊藤 武, 斎藤香彦, 稲葉美佐子, 坂井千三, 植村 興, 坂口玄二: 東京都内に発生したウェルシュ菌食中毒患者ふん便からのエンテロトキシン検出, 日感染学誌, (投稿中)。
- 6) 加藤貞治, 小原 寧, 一戸治江, 山井志朗, 長島喜美子, 坂崎利一 (1966): 腸炎ビブリオの溶血能と毒性について, 日細菌誌, 21, 442-443.
- 7) 工藤泰雄, 松下 秀, 山田澄夫, 大橋 誠 (1978): 大腸菌エンテロトキシンに関する研究 (5) 抗コレラ毒素を用いた RPHA 法による各種由来大腸菌の易熱性毒素の検出, 日細菌誌, 33, 87.
- 8) Kusama, H., and Craig, J. P. (1970): production of biologically active substances by two strains of *Vibrio cholerae*. Infect. Immun., 1, 80-87.
- 9) Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K., and Yamai, S. (1969): In vitro hemolytic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*: Its close correlation with human pathogenicity. J. Bacteriol., 100, 1147-1149.
- 10) Nikkawa, T., Obara, Y., Yamai, S., and Miyamoto, Y. (1972): Purification of a hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. Japan.

- J. Med. Sci. Biol., 25, 197-200.
- 11) Obara, Y., Yamai, S., Nikkawa, T., Miyamoto, Y., Ohashi, M., and Shimada, T. (1974): Histopathological changes in the small intestine of suckling mice challenged orally with purified hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. In Fujino, T., Sakaguchi, G., Sakazaki, R., and Takeda, Y. (eds.), International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. pp. 253-257, Tokyo, Saikon Publishing Co.
 - 12) Ohashi, M., Shimada, T., Obara, Y., Yamai, S., Nikkawa, T., and Miyamoto, Y. (1974): Histopathological changes in the small intestine of suckling mice evoked by peroral challenge with a hemolysin elaborated by *Vibrio parahaemolyticus*. In Proceedings of the 9th Joint Cholera Research Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel, pp. 261-267. Department of State Publication 8762, Bureau of International Scientific and Technological Affairs, USA.
 - 13) 太田建爾 (1975): 腸炎ビブリオ腸管病原毒素の産生条件の検討と毒素の熱安定性 1. 産生毒素の定量的測定法と毒素の産生条件について, 日感染学誌, 49, 825-833.
 - 14) Sakazaki, R., Tamura, K., Kato, T., Obara, Y., Yamai, S., and Hobo, K. (1968): Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. III. Enteropathogenicity. Japan. J. Med. Sci. Biol., 21, 325-331.
 - 15) Sakazaki, R., Tamura, K., Nakamura, A., Kurata, T., Ghoda, A., and Kazuno, Y. (1974): Enteropathogenic activity of *Vibrio parahaemolyticus*. In Fujino, T., Sakaguchi, G., Sakazaki, R., and Takeda, Y. (eds.), International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. pp. 231-235, Tokyo, Saikon Publishing Co.
 - 16) Sakazaki, R., Tamura, K., Nakamura, A., Kurata, T., Ghoda, A., and Kazuno, Y. (1974): Studies on enteropathogenic activity of *Vibrio parahaemolyticus* using ligated gut loop model in rabbits. Japan. J. Med. Sci. Biol., 27, 35-43.
 - 17) Sakurai, J., Matsuzaki, A., Takeda, Y., and Miwatani, T. (1974): Existence of two distinct hemolysins in *Vibrio parahaemolyticus*. Infect. Immun., 9, 777-780.
 - 18) Yamada, S., Igarashi, H., and Terayama, T. (1977): Improved reversed passive hemagglutination for simple and rapid detection of staphylococcal enterotoxins A-E in food. Microbiol. Immunol., 21, 675-682.
 - 19) 柳ヶ瀬康夫, 天野恒久, 井上公蔵 (1969): 腸炎ビブリオのレンチナーゼに関する研究, 日細菌誌, 24, 515-516.
 - 20) Yanagase, Y., Inoue, K., Ozaki, M., Ochi, T., Amano, T., and Chazono, M. (1970): Hemolysins and related enzymes of *Vibrio parahaemolyticus*. 1. Identification and partial purification of enzymes. Biken J., 13, 77-92.
 - 21) 善養寺浩, 坂井千三, 工藤泰雄, 伊藤 武 (1969): いわゆる神奈川現象陰性腸炎 ビブリオ 食中毒の一集団発生例について, モダン・メディア, 15, 218-219.
 - 22) 善養寺浩, 坂井千三, 工藤泰雄, 伊藤 武, 丸山 務 (1970): 神奈川現象陰性腸炎ビブリオ O4: K12 と推定される食中毒について, メディア・サークル, 15, 82-86.
 - 23) 善養寺浩 (1973): 感染モデルの組み方, (腸管感染研究会編), 251-256頁, 東京, 近代出版.
 - 24) Zen-Yoji, H., Kudoh, Y., Igarashi, H., Ohta, K., and Fukai, K. (1974): Purification and identification on enteropathogenic toxins "A" and "A'" produced by *Vibrio parahaemolyticus* and their biological and pathological activities. In Fujino, T., Sakaguchi, G., Sakazaki, R., and Takeda, Y. (eds.), International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. pp. 237-243, Tokyo, Saikon Publishing Co.
 - 25) Zen-Yoji, H., Kudoh, Y., Igarashi, H., Ohta, K., Fukai, K., and Hoshino, T. (1976): Further studies on characterization and biological activities of an enteropathogenic toxin of *Vibrio parahaemolyticus*. In Osaka, A., Hayaishi, K., and Sawai, Y. (eds.), Animal, plant, and microbial toxins, vol. 1, pp. 479-498, New York, Plenum Publishing Corporation.

Development of a Sensitive Serological Assay Based on Reversed Passive Hemagglutination for Detection of Enteropathogenic Toxin (Kanagawa Hemolysin) of *Vibrio parahaemolyticus*, and Re-evaluation of the Toxin Producibility of Isolates from Various Sources

Kenji OHTA, Yasuo KUDOH, Masaaki TSUNO, Senzo SAKAI,
Tsutomu MARUYAMA, Takeshi ITOH and Makoto OHASHI

Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research
Laboratory of Public Health, Shinjuku-ku, Tokyo 160

Based on reversed passive hemagglutination, a sensitive and specific serological assay was developed for detection of enteropathogenic toxin produced by *Vibrio parahaemolyticus*. It was so sensitive as to make the detection of 1 ng/ml of the toxin practicable.

By using the assay, vibrios isolated from various sources were examined for toxin-producibility. Kanagawa phenomenon-positive isolates of human origin produced more than 1 $\mu\text{g/ml}$ of the toxin. Most of the Kanagawa-negative and Kanagawa-questionable isolates from fecal specimens of gastroenteritis patients produced a smaller amount of the toxin. Those obtained from seafish, shellfish or their cooking utensils did not produce any detectable amount of the toxin. Based on these findings, the role of the toxin was discussed in causing diarrhea in the case of gastroenteritis due to Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus*.