ブドウ球菌食中毒に関する研究 (第3報)

食中毒, 健康人および市販食品由来黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン
産生能とそのコアグラーゼ型について

(昭和 47 年 9 月 7 日受理)

寺 山 武* 五十嵐 英夫*
潮 田 弘* 善 養 寺 浩*

Studies on Staphylococcal Food Poisoning (III) Enterotoxin Productivity and Coagulase Types of Strains of *Staphylococcus aureus* Originated from Food Poisoning Incidents, Healthy Subjects and Commercial Foods

Takeshi TERAYAMA, Hideo IGARASHI, Hiroshi USHIODA
and Hiroshi ZEN-YOJI

(Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health:
24-1, Hyakunin-cho 3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo)

Isolates of *Staphylococcus aureus* from 34 food poisoning incidents in Tokyo during 1969~1970 were examined for their ability to produce enterotoxins A, B, C and D. Enterotoxins were produced in NZ-Amine medium with shaking and the culture supernatants were concentrated to 1/25~1/30 volume by dialysis against equal volume of solution of 50% polyethylene glycol 20,000. Each enterotoxin in the concentrated culture supernatants was detected serologically by slide gel diffusion test.

Enterotoxins A, B, C and D were demonstrated on isolates from 33 out of 34 incidents (97%), and in some instances two enterotoxins were produced by one strain; isolates from 8 incidents produced enterotoxin A, 1 produced enterotoxin B, 7 produced enterotoxin C, 3 produced enterotoxin D and 14 produced enterotoxins A and D. In a result of the survey, enterotoxin A, and enterotoxins A and D were predominant types in the food poisoning.

All of 34 strains of *Staphylococcus aureus* from food poisoning incidents could be typed by means of coagulase typing, viz., 10 as type II, 9 as type III, 7 as type VI and 8 as type VII, respectively.

In addition, a total of 400 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from fingers, noses and feces of healthy subjects, and commercial foods without the association to food poisoning incident, which consisted of each 100 strains per a source, were examined for enterotoxin production and coagulase typing.

Three hundred and sixty-two strains out of them produced enterotoxins A, B, C or D, and some strains had productivity of two, three or four enterotoxins. Out of enterotoxin producing strains, 99 produced enterotoxin D, 90 produced enterotoxins C and D, 48 produced enterotoxins A and C, 39 produced enterotoxins A, C and D, 30 produced enterotoxin C and 16 produced enterotoxin A (see table 2).

Four hundred strains of *Staphylococcus aureus* from the materials not associated with food poisoning incident were also typed by coagulase typing, viz., 10 as type I, 35 as type II, 52 as type III, 95 as type IV, 42 as type V, 33 as type VI and 133 as type VII,

respectively. From the results mentioned above, it was indicated that there was no correlation between enterotoxin types and coagulase in the strains used, while the most number of the strains producing enterotoxin B were typed as coagulase type IV or V.

(Received September 7, 1972)

ブドウ球菌食中毒はコアグラゼ（以下コと略す）II, III, VIおよびVII型の黄色ブドウ球菌（以下黄色ブ菌と略す）によってのみ発生しており、コI, IVおよびV型菌による食中毒事件の発生はこれまでに1例もみられていない¹⁾。しかし、自然界に広く分布する黄色ブ菌はコI型菌がわずかに少ないのを別として、他の6コ型菌の分布に差は認められない²⁾。

そこで自然界に分布する黄色ブ菌のうちで特定のコ型菌とエンテロトキシン（以下Entと略す）産生能との間に密接な関係があるのではないかと推測される。他方、コI, IVおよびV型の黄色ブ菌が食中毒原因にならない理由については解明されていないし、これらのEnt産生能についても検討されていない。もし、すべての黄色ブ菌がEnt産生能を有するとすれば、なぜ、特定のコ型菌のみが食中毒を起こすのかという疑問が生ずる。

以上の問題のうち、本報ではまず最初に、コ型に関係なく黄色ブ菌はEnt産生能を有するか否かを解明するため、食中毒由来株の産生Ent型とコ型、さらに健康人および市販食品由来株のEnt産生能とコ型との各関係を検討した結果について報告する。

実験材料および方法

1) 供試菌株

食中毒由来株：推定原因食品およびその他の関連検査材料から同一コ型の黄色ブ菌が検出された34食中毒事例から代表的1株を選んだ34株である。

健康人由来株：これらの菌株は、健康成人鼻前庭およびふん便、調理者の手指からの各100株、計300株である。すべての菌株は由来ごとに1株あてとした。

食品由来株：市販のサラダ、ハンバーグおよび洋菓子など、比較的直接喫食する食品を主体とした100食品から分離された1株あて、計100株である。

2) 黄色ブ菌の分離培養法

分離培地には3%卵黄加マンニット食塩培地を用い、前報¹⁾と同様に行なった。

3) コ型別法

善養寺ら^{3)~6)}の方法によった。

4) 標準Entおよびその抗血清の調製法

菌株：各型Entの精製に用いた菌株は、Ent Aは大阪府立大学 阪口玄二教授より分与されたNo. 100株、Ent B, C, DはアメリカFDAの故Casman博士より分与されたNo. 243株(Ent B), No. 493株(Ent C), No. 494株(Ent D)である。

Entの精製法と標準Ent：各Entの精製法のうち、Ent BはSchantzら⁷⁾の方法で、Ent A, C, Dは

Igarashi⁸⁾の方法によって行なった。なお、この実験に用いた標準Entは、つぎのようにして決められた。標準菌株から精製されたEnt AがBergdollら（阪口博士の厚意により分与）の特異抗A血清に対し、1本の特異沈降帯のみを形成したものを標準Ent Aとし、その含量は5μg/mlである。Ent B, CおよびDは、同様標準菌株よりのもので、Casmanより分与された抗血清により確認された特異抗原であり、その含量は各々5μg/mlである。

抗血清調製法：各精製Ent 0.3~0.5 mg/mlの1 mlと等量のFreund complete adjuvant (Difco) とを混合乳化したものを、1週間間隔で5回ウサギの筋肉内に注射した。最後の接種から7~10日後に全採血を行ない抗血清を得た。

型別用抗Ent血清：Ent検出のためのSlide gel diffusion法に用いる各型の抗Ent血清は、対応する各型の精製Entの5μg/ml溶液とのゲル内沈降反応により、抗原と抗体の穴の中央に沈降帯が形成されるような濃度とした。その濃度は、抗Ent A血清では20倍、抗Ent B血清42倍、抗Ent C血清24倍、抗Ent D血清20倍であり、生理食塩液でそれぞれの濃度に希釈したものを、検出用特異抗血清として用いた。抗Ent A~Dの混合血清は、各抗Ent血清の最終濃度が上記の抗血清の濃度になるように希釈混合して作製された。

5) 被検菌Entの型別法

抗原Ent液の作製法：500 mlの振とうコルベンに4%NZ-Amine培地⁹⁾を100 ml分注して121°, 15分間滅菌したものに、被検菌株の普通寒天培養菌を1白金耳接種し、37° 24時間振とう培養（100回/分 水平型振とう

Fig. 1. Slide Gel Diffusion Test for Detecting the Enterotoxin

Table 1. Relation between Enterotoxin and Coagulase Types of Strains of *S. aureus* from Food Poisoning Incidents during 1969~1970 in Tokyo

Coagulase type	No. of strain	Enterotoxin type					Not found
		A	B	C	D	AD	
I							
II	10	3	1	1	1	4	
III	9				2	7	
IV							
V							
VI	7			5		2	
VII	8	5		1		1	1
Total	34	8	1	7	3	14	1

One representative strain from each incident was examined.

機)した。この培養液を 12,000 rpm 10分間遠心して、その上清をとり、これをポリエチレングリコール20,000によって原液の1/25に透析濃縮したものを被検菌の抗原 Ent 液とした。

Ent 型別法: スライドグラスを用いた寒天ゲル内沈降反応によった。すなわち、Fig. 1 に示したごとく、通常のスライドグラス上に加熱溶解した1%寒天液 [Special agar noble (Difco): 0.05 M ペロナル緩衝液 pH 7.4] 2.5 ml をのせ、水平に保って凝固させた後、図のごとく、五つの穴をつくり、中央の穴には Ent A~D混合血清を、周囲の穴には被検菌の抗原 Ent 液をおのおの寒天表面に水平になるまで注入し、湿潤箱に入れ、25° 24~48時間反応させ、沈降帯形成の有無を判定した。

Ent A~D混合血清に対し、スライドゲル内沈降反応によって沈降帯を形成した抗原 Ent 液はつぎに、各特異血清による沈降反応により、Ent の型別が行なわれた。各型は、上記同様のスライドゲルを用い、抗原 Ent 液を中央の穴に、抗 Ent A, B, C, D の各特異血清を周囲の穴にそれぞれ注入して、前記同様の条件で反応させ、沈降帯形成により判定された。さらに、抗 Ent A~D のいずれかとの間に沈降帯を形成したものについては、標準 Ent との異同を二重に確認するため、次のようにスライド沈降反応を行なった。この場合は、被検菌 Ent 抗原液と沈降帯を形成した抗血清を中央の穴に置き、その周囲の穴に隣り合わせて被検菌の Ent 液と中央の穴に入れた抗 Ent 血清に対応する標準 Ent を入れ、前記同様の条件で反応させた。その結果、両者で形成される沈降帯が完全に融合したとき、その Ent 型と決定した。

実験成績

1. 食中毒事件由来株の Ent 型とコ型

34事例の食中毒由来黄色ブドウ球菌の Ent 型とコ型との関

係を Table 1 に示した。これら事件由来の34株のうち、33株が Ent A~D のいずれか、あるいは A・D 両者を産生したが、1株は Ent A~D の抗血清では Ent が検出、証明できなかった。Ent 型別ができた33株のうち、Ent A・D 産生株が14株 (41.2%) でもっとも多く、ついで Ent A が8株 (23.5%) であり、この Ent A の関連した両者を合わせると65%にも達し、食中毒由来株の中には Ent A の関連したものが多いのが特徴であった。Ent A について、Ent C が7株 (20.5%)、Ent D が3株 (8.8%) であり、Ent B は1株だけであった。

コ型については表のごとく、II, III, VIおよびVII型に限定されており、この成績からは Ent 型とコ型との間にとくに相関は認められなかった。

2. ヒトおよび食品由来株の Ent 産生能とその型別

健康人の鼻前庭、ふん便、手指および市販食品由来黄色ブドウ球菌の Ent 産生能および Ent 型を Table 2 に示した。各材料由来別黄色ブドウ球菌の Ent 産生株の割合は鼻前庭由来株97%、手指由来株93%、ふん便由来株89%、市販食品由来株83%といずれも高い陽性率を示し、全体の Ent 産生株の割合は90.5%であった。

これら黄色ブドウ球菌の産生する Ent 型は材料別には大差はないが、全体的には Ent D, A・D, C・D, A・C・D といった D を中心としたものが高率であり、Ent D 産生株が27.3%、Ent C・D が24.8%、A・D が13.2%、A・C・D の混合産生が10.8%である。これに対し、Ent C の産生率は8.3%とやや低率で、また、その他の型は合わせて15.4%にすぎなかった。これを食中毒由来株の産生 Ent 型の比率と対比してみると、食中毒株に比較的多い Ent A および C の単独産生株が以上の菌株では概して低率であって、食中毒株と自然界由来株との産生 Ent 型に差異のあることがうかがわれた。なおここでも、Ent A~D 非産生株が9.5%に存在した。

Table 2. Enterotoxigenicity of Strains of *S. aureus* from Feces, Nasal and Finger Swabs of Healthy Subjects and Commercial Foods, and their Enterotoxin Types

Source	No. of strain	No. of strains producing enterotoxin	Enterotoxin type													Not found	
			A	B	C	D	AB	AC	AD	BC	BD	CD	ABD	ACD	BCD		ABCD
Swabs; Nasal cavity Finger Feces Foods	100	97	6	2	3	24	1	1	15		6	27	1	10	1		3
	100	93	5	4	9	23	2	3	9	3	2	20		11	1	1	7
	100	89	3	2	15	23		3	12		1	18	1	11			11
	100	83	2		3	29		3	12		2	25		7			17
Total (%)	400	362	16 (4.4) *	8	30 (8.3)	99 (27.3)	3	10	48 (13.2)	3	11	90 (24.8)	2	39 (10.8)	2	1	38

* Numbers in parentheses are percentages equivalents of each serotype against number of strains producing enterotoxin.

Table 3. Relation between Enterotoxin and Coagulase Types of *S. aureus* from Feces, Nasal and Finger Swabs of Healthy Subjects and Commercial Foods

Coagulase type	No. of strain	Enterotoxin type													Not found
		A	B	C	D	AB	AC	AD	BC	BD	CD	ABD	ACD	BCD	
I	10	2			4						2		1		1
II	35			1	11			3			8		7		4
III	52	4			28			11			1				7
IV	95	2		12	20			10			24		6	6	12
V	42	1	6	2	8					3	5	2	5		5
VI	33	1		4	4	3		5			1		10		4
VII	133	6		11	24			19			2		10		5
Total	400	16	8	30	99	3	10	48	3	11	90	2	39	2	38

3. ヒトおよび食品由来株の Ent 型とコ型

上記と同じヒト、食品由来黄色ブドウ菌 400 株の Ent 型とコ型との関係を示したのが Table 3 である。まだ分布の低いコ I 型菌が 10 株であるのに比し VII 型菌が 133 株と、各コ型ごとの菌株数にかなりのひらきがあるので、コ型と産生 Ent 型との相関性について結論を求めることはできないかも知れないが、この調査の範囲では、同じコ型に属する菌株でも異なった型の Ent を産生するものがあり、菌株のコ型と産生 Ent 型との間には関連は認められなかった。ただ、コ V 型菌で Ent を産生する 37 株中には Ent B または B との混合産生型が 19 株 (51%) も存在するのに反し、その他のコ型菌で Ent 産生性の 325 株では Ent B もしくは B 混合産生型がわずかに 11 株しか存在しなかった。なお、Ent B もしくは B 混合型の菌株 30 株中 26 株はコ IV または V 型に属しており、Ent B または B 混合型の産生菌株はコ IV および V 型菌にとくに多く認められている。

考 察

長い歴史を有しながらもブドウ球菌食中毒は依然漸増の傾向を辿り、食中毒のなかでとくに重要なものの一つとなっている。その主要な理由は、ブ菌の生態に深い関連をもっていると結論できよう。つまり、ブ菌はヒト、動物から食品などにわたり広く自然界に分布し、調理食品を汚染する機会が高く、散発あるいは集団的な患者発生をひき起こしている。とくに、調理者の鼻前庭保菌や手指の汚れは直接調理食品の汚染に結びつき、重要な食中毒源とみなされる。ただし、ここにこうした自然界分布菌のすべてが同様に Ent 産生能を有するか否かの問題が未解決のまま残されている。もし、ある特定の菌型株のみがこの毒素産生能を有するとすれば、調理者保菌株や食品汚染株のこの点の検討は予防対策の一つの重要な手がかりを与えるであろう。これに関連して、これまでに食中毒原因となりうる菌株はある菌群に限られる傾向の顕著なことが食中毒原因株の検討成績から経験的に指摘されてきた。いうまでもなく食中毒起因性菌株は黄色ブ菌に一応限定されている。その中で、著者ら¹⁾のコ型別法による調査成績では、食中毒原因株はコ II, III, VI および VII 型の 4 型に型別される菌株に限られていた。これはコ型とファージ群との関連性からみれば、すでに報告¹⁰⁾されているように食中毒起因株はファージ III 群菌に集中するという結果に一致する。これからすれば、特定の菌型株が Ent 産生能を有すると推測され、この点の真偽を明らかにすることが本報の主題の一つであった。

その目的に沿って、まず確実に食中毒原因となった菌株の Ent 産生能を確認するとともに、起因株のコ型とそれらの産生する Ent 型との関連を検討する一方、Ent A~D 型のうちいずれの型がもっとも原因となる頻度が高いかを知らうとした。この調査に供された菌株は 1969~70 年の間東京都内で発生した典型的本菌食中毒

34 事件由来の 34 株である。これら菌株のうち 1 株を除くすべてのものが A~D のいずれかの Ent を産生することが実証された。さらにこれらの産生 Ent 型の中で、主位を占めるものは A 型もしくは A と他の型との混合型で、22 菌株 (65%) がこれらを産生し、これにつぐのが C 型の 7 株 (20.5%)、D 型の 3 株で、B 型産生は 1 株にすぎなかった。この成績は、英国での食中毒由来株 36 株中 26 株が Ent A 産生であるという Simkovicová and Gilbert¹¹⁾ の報告とかなりの一致を示している。

A 型 Ent 産生株が食中毒の主体であるとすれば、自然界分布黄色ブ菌も Ent A を産生する菌株が多数を占めるはずであるし、また、あるコ型菌株と Ent A 産生株との間の関連性の成立がうかがえる。そこで、健康人あるいは食品由来の 400 菌株中 Ent 産生 362 株についてこれらの点の検討を行なったが、推測に反し、もっとも検出頻度の高かったのは D との混合産生型が 290 株と主位を占め、C または C 混合型が 175 株とこれに続き、A 型関連株は 119 株と全体の 33% にすぎなかった。ただ、この場合も Ent B 産生株は 30 株と著しく低率に終わった。

食中毒由来でない動物やヒト由来株の Ent 産生能については、すでに、ウシの乳房炎株の 27.8% が Ent A~D のいずれかを産生するという Olson ら¹²⁾ の報告があるし、Hallander and Körlof¹³⁾ のヒト臨床材料由来株についての成績では 38.3% が A~C のいずれかの Ent を産生したという。また、Simkovicová and Gilbert¹¹⁾ の結果も Hallander and Körlof¹³⁾ のそれと同様であった。これらに比較して著者らの上記食中毒非関連株についての成績では、Ent 産生株の比率は著しく高く、90.5% に達した。この違いは恐らく、検出精度の差異と、とくに特異抗 D 血清⁹⁾の使用とによるものであろう。因みに、著者らの経験でも、上記菌株の培養上清を 1/10 濃縮したものでは Ent 産生を認めることのできたのは約 30% にすぎず、上述の諸報告と同様な結果であった。

最後に、菌株のコ型と産生 Ent 型との関連を食中毒非関連株についての成績からみると、両者の間にはなんらの相関性も存在しないと結論される。このことは、コ型あるいはファージ群別とは無関係に、ほとんどすべての黄色ブ菌が Ent 産生能をもつものであることを示唆し、本食中毒予防には、黄色ブ菌であればいずれもその対象となることを強く指示している。この反面、なぜ特定のコ型菌のみが現実には食中毒原因となっているのかという問題が新たに提起される。この点の追究は、食品内での Ent 産生条件の解明ひいては予防につながる貴重な鍵となり、この面の今後の発展の礎となる。

本報では Bergdoll ら¹⁴⁾によって報告された Ent E については検討していない。今後この特異抗血清が得られた段階で、さらに興味ある知見が加えられるものと思う。

結 論

食中毒および自然界由来の黄色ブ菌の Ent 産生能および菌株のコ型と産生する Ent 型との関係を検討して以下の成績を得た。

1. 1969~1970年に東京都で発生したブ菌食中毒34事件の各例から1株あて集めた34原因菌株の産生 Ent 型はA・D型14件 (41.2%), A型8件 (23.5%), C型7件 (20.5%), D型3件, B型1件および不明なもの1件であった。

2. 食中毒由来黄色ブ菌のコ型と産生 Ent 型との間には相関性は認められなかった。

3. 健康人の鼻前庭, ふん便, 手指および市販食品の各100件の1検体当たり1株あて集めた合計400株の黄色ブ菌のうち, Ent 産生菌の割合は, それぞれ97%, 89%, 93%, 83%であり, 全体では90.5%であった。

4. 以上の Ent 産生362株の Ent 型別にみた菌株数はA型16株 (4.4%), B型8株 (2.2%), C型30株 (8.3%), D型99株 (27.3%) および 2つの混合産生型が165株 (45.6%), 3つの型の混合型43株 (11.8%) であり, A・B・C・D4型の Ent を産生したものが1株 (0.3%) であった。

5. ヒトおよび食品由来の以上の菌株のコ型と産生 Ent 型との間にも相関性は認められなかった。しかし, BまたはB混合型 Ent 産生菌30株のうち, コIV型菌が7株, コV型菌が19株あり, 残り4菌株が他のコ型菌に分布しているにすぎなかった。

文 献

1) 善養寺 浩, 寺山 武, 潮田 弘, 五十嵐英夫,

丸山 務, 坂井千三: 食衛誌. 12, 311 (1971).

2) 善養寺 浩, 寺山 武, 潮田 弘, 五十嵐英夫, 丸山 務: 同上. 12, 501 (1971).

3) Zen-Yoji, H., Terayama, T., Benoki, M., Kuwahara, S.: Jap. J. Microbiol. 5, 237 (1961).

4) Zen-Yoji, H., Terayama, T., Benoki, M., Kuwahara, S.: ibid. 5, 367 (1961).

5) Zen-Yoji, H., Terayama, T., Benoki, M., Kuwahara, S.: ibid. 6, 59 (1962).

6) 善養寺 浩, 寺山 武: モダンメディア 12, 500 (1966).

7) Schantz, E. J., Roessler, W. G., Wagman, J., Spero, L., Dunnery, D. A., Bergdoll, M. S.: Biochemistry 4, 1011 (1965).

8) Igarashi, H.: Jap. J. Microbiol. 16, 483 (1972).

9) Kato, E., Khan, M., Kujovich, L., Bergdoll, M. S.: Appl. Microbiol. 14, 966 (1966).

10) 善養寺 浩, 寺山 武, 潮田 弘, 工藤泰雄, 坂井千三: 都衛研年報. 19, 49 (1967).

11) Simkovicová, M., Gilbert, R. J.: J. Med. Microbiol. 4, 19 (1971).

12) Olson, J. C., Casman, E. P., Baer, E. F., Stone, J. E.: Appl. Microbiol. 20, 605 (1970).

13) Hallander, H. O., Körlof, B.: Acta Path. Microbiol. Scand. 71, 359 (1967).

14) Bergdoll, M. S., Borja, C. R., Robbins, R. N., Weiss, K. F.: Infect. Immun. 4, 593 (1971).