食品中のブドウ球菌エンテロトキシン 検出法に関する研究

I. CM-Sephadex バッチ法イオン交換の導入

(昭和 47 年 9 月 11 日受理)

原 田 禎 顕*

Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Foods

I. Application of Batch Operation on CM-Sephadex Ion Exchanger

Yoshiaki HARADA

(Substation in Yokohama Quarantine Station, Food Sanitary Section, Ministry
of Health and Welfare: Shinko-cho, Naka-ku, Yokohama)

Procedures were developed for assay of staphylococcal enterotoxins in foods, using micro-slide gel double diffusion test.

(1) Foods were prepared for assay by addition of water (homogenization or mashing in case of cereal foods) adjustment of pH to 7.4-7.6, blending, and centrifugation. The supernatant fluids were then adjusted to pH 4.5 (in case of animal foods) or pH 6.0, and centrifuged. Supernatant fluids taken at pH 4.5 were readjusted to pH 6.0, and centrifuged. From these supernatant fluids, enterotoxins were partially purified by adsorption on CM-Sephadex C-50 equilibrated with 0.01 M sodium phosphate (pH 6.0), washing with 0.01 M sodium phosphate (pH 6.0), then eluted with 0.2 M sodium chloride in 0.1 M sodium phosphate (pH 7.6), and concentrated by dialysis against polyethylene glycol.

Adequate dosage levels of CM-Sephadex in the batch ion exchange for various foods were determined, individually.

(2) By these procedures, enterotoxins were detected in 12 out of 16 foods suspected for cause of poisoning outbreaks. Enterotoxin A (50%) and A+D (33%) were predominant types. Concentrations of enterotoxins detected in foods were ranging up to 0.3 $\mu\text{g/g}$, and estimated at 0.05 $\mu\text{g/g}$ on the average. In 4 outbreaks, neither enterotoxins nor enterotoxin-producing staphylococci were isolated from the suspected foods.

(3) The extract from suspected cream puff containing 4.5 μg of enterotoxin A induced emetic responses in a volunteer by feeding test.

(Received September 11, 1972)

緒 言

食品中のブドウ球菌エンテロトキシン (以下 Ent と略す) を抽出してゲル内沈降反応で検出する方法については、多数の報告があるが、通常の食中毒原因食にみられる微量の Ent の検出には、イオン交換体を使用した高度の濃縮が必要である。この方法として、Hall ら^{1), 2)} は、pH 6.2~6.4 に調整した Amberlite CG 50 のカラムクロマトグラフィーを用い、試料に添加した Ent A を

27%, Ent B を 42% 回収することに成功し、18 検体の食中毒容疑食品中 6 検体に Ent を検出した。これと前後し、Casman ら^{3), 4)} は、0.01 M リン酸緩衝液、pH 6.0 に調整した CM-cellulose (CM 70) カラムクロマトグラフィーにより、Ent A を 9~80%, Ent B を 17.5~72% 回収しており、4 例の食中毒原因食品に Ent A を検出した。この方法は、後に Zehren ら⁵⁾ によりチーズで 16~35%, 国田ら⁶⁾ によりおにぎりでは 22.9~33.3% の Ent A 回収率が得られている。また、Ent C の吸着を促進するため 0.005 M リン酸緩衝液、pH 5.7 に

* 厚生省食品衛生課 横浜検疫所駐在: 横浜市中区新港町

調整した CM-cellulose (CM 22) カラムを用いるよう改められた^{7), 8)}.

このカラム法イオン交換の適用は、食品の種類によって難易があり、特別な前処理を施さなければ流下すら困難な場合も多い。それゆえ、回収率の改善と同時に、前処理法の確立が今後の課題と思われる。

著者^{9)~11)}は、初め乳における Ent の抽出法を検討してきたが、前報¹²⁾では rennet 処理, Sephadex G-25ゲルろ過, CM-Sephadex C-50 (以下 CMS と略す) カラムクロマトグラフィー, polyethyleneglycol による濃縮等の手順で, Ent を抽出できると報告した。この研究にイオン交換容量の大きい CMS を選んだのは、食品成分の干渉による Ent の回収率の低下をカバーするためであった。この方法を軸に、さらに簡略化と適用食品の種類を広げる工夫を試みたところ、イオン交換をバッチ法で実施することにより、前述のカラム法での障害を除くことができ、能率よく抽出を進め得ることを知った。それゆえ、本報では、食品中の Ent をバッチ法で抽出するに必要な諸条件を、人為的に Ent を添加した試料および実際の食中毒推定原因食品等を用いて検討したので、その結果を報告する。

実験材料と方法

免疫血清と毒素：主として米国 Wisconsin 大学の M. S. Bergdoll 博士分与の Ent antiserum A (A-48-PIII), B (B-456-PI), C (C₁-465-PII), および crude Ent A (IW 168-173 A 100), B (IW 180 B S-6), C (IW 17 B B-137) を用いた。また、食中毒事件試料の検索には、米国 FDA の故 E. P. Casman 博士ら分与の anti D serum および reference Ent D を追加使用した。その他、196 E, S-6, 137 の各ブドウ球菌菌株で cellophane-over-agar culture^{13), 14)} を行ない、その濃縮遠心上清を模擬試料の調製に用いた。

Ent antiserum A, B, C は、micro-Ouchterlony 法ではそれぞれ 1:20, 1:100, 1:50 に希釈し、Oudin 法では終末濃度がそれぞれ 1:25, 1:100, 1:50 になるように希釈して使用した。また、micro-Ouchterlony 法の reference Ent の濃度は 1 µg/ml とし、0.37% の割にブレインハートインフュージョンブイオン培地“栄研”を添加した生理食塩水の溶液とした。

血清反応：micro-Ouchterlony 法および Oudin 法によるゲル内沈降反応によった。

micro-Ouchterlony 法は、Crowle¹⁵⁾ と Casman ら¹⁶⁾ の2つの方法で実施した。前者は Ent A, B, C の試験に用いることとし 5° で 48±4 時間反応後、後者は主として Ent D の試験に用いることとし室温で3日間反応後、それぞれ染色して顕微鏡用の人工光線をあて黒色板をバックに沈降線を観察した。ただし、染色は原法によらず、template をはがしたスライド表面を水洗し、後者ではそのまま、前者ではさらに 0.03M リン酸緩衝

液, pH 7.4 に一夜浸した後、直接 0.1% azocarmine G または thiazine red R 溶液 (酢酸 1%, グリセリン 0.2%) に 10 分間浸してこれに代えた。

抗原の希釈^{11), 16)}には、液状食品または固型食品のスラリーを pH 4.5 および pH 6.0 で遠心分離して沈殿物を除去して得た上清 (以下酸処理上清と呼ぶ) を用いるか、0.37% の割にブレインハートインフュージョンブイオン培地を添加した生理食塩水を用いた。

Ent の同定は reference line との coalescence によった。

定量は通常 micro-Ouchterlony 法によったが、添加 Ent の抽出処理後の濃度を測定する際は、被検液を算術級数的または幾何級数的に連続希釈して反応を行ない、沈降線が認められる最高の希釈倍数を添加 Ent のそれと比較して算出した。この連続希釈の最大間隔は 12~25% であった。食中毒事件試料の Ent 濃度を測定する際は、沈降線の認められる最小濃度を、Ent A, B, C ではいずれも 0.3 µg/ml (著者成績)、Ent D では 0.4 µg/ml (Zehren ら⁹⁾) とみなして計算した。

Oudin 法は、一部の定量にのみ使用し、micro-Ouchterlony 法と併用した。術式は Read ら¹⁷⁾ と同様にしたが、抗原の希釈は 0.01% の割にチメロサルルを添加した 0.2% ブレインハートインフュージョンブイオン培地水溶液で行なった。検量線は、Ent A, B, C を 80, 40, 20, 10, 5 および 2.5 µg/ml に希釈して反応を行ない、Ent 濃度の対数を縦軸に、migration 距離を横軸にとりプロットして作製した。

供試食品：初め抽出の方法と条件を決定するため、牛乳、加工乳、脱脂粉乳、シュークリーム (5 銘柄)、うぐいす豆 (ばら売り 4 銘柄、ポリ詰め 2 銘柄)、かまぼこ (3 銘柄、5 種)、プレスハム (1 種)、おはぎ、おにぎり、ごはん等を選び、これに一定量の Ent を加えて実験材料とした。添加方法については成績で述べる。

その他、食中毒推定原因食品および容疑食品も供試した。この場合は食品中に含まれる Ent の検出のほか、スタフィロコッカス培地 110 または食塩卵寒天培地による菌数の測定と、分離菌のマニトール分解能、7.5% 食塩耐性、コアグラゼ産生能、Casman ら¹⁸⁾の方法による Ent 産生能等についても試験した。

食品中の Ent 抽出法：概要は Fig. 1 のとおりである。

固型食品は、初め蒸留水を加えてホモジナイザーにかけ均質化するが、乳鉢で十分すりつぶしたものを作るが、一部の試験ではさらにこれに 0.2M 濃度の割に食塩を添加した。これらのスラリーを pH 7.5 に修正し、容量を原食品重量の 4 または 5 倍に補正し、5 分間強く攪拌した。

ついで、一部のものはそのまま、他のものは不溶物を遠心除去した後、pH 4.5 または pH 6.0 に修正し、析

Fig. 1. Extraction of enterotoxins by use of CM-Sephadex

* usually omitted

出する不溶物を遠心除去した。このうち pH 4.5 で処理したものはさらに pH 6.0 に修正し、再び遠心分離を行ない析出物を除去した。

粉乳では重量の 5 倍の水溶液とし、牛乳ではそのまま用い、pH 4.5 ついで pH 6.0 で遠心分離して析出物を沈殿除去した。

このようにして得られた pH 6.0 の遠心上清の一定量をイオン交換に付するのであるが、食塩を添加したスラ

リーから調製したものは、あらかじめ 3~4 時間流水透析して pH 6.0 に再修正するか、あるいは 0.005M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で 20 倍に希釈し、イオン強度を下げて使用することにした。

これらの pH 6.0 の上清にあらかじめ 0.01M リン酸緩衝液、pH 6.0 で平衡にした CMS を加え、約 30 分間、随時振とうして Ent を吸着させ、ついで液分を除去し、CMS を 0.01M リン酸緩衝液、pH 6.0 で洗浄

Fig. 2. Batch-operation apparatus in which shaking, filtration, washing and elution were performed

した。この洗浄は、通常 CMS 0.1 g につき毎回 4 ml の割で 5 回行なうこととしたが、上清が無色透明にならない場合はさらに洗浄を反覆した。ついで 0.2M 濃度の割に食塩を添加した 0.1M リン酸緩衝液、pH 7.6 で Ent を溶出したが、この溶出は CMS 0.1 g につき毎回 4 ml の割で 3 回以上、通常 4 回反覆した。これらの溶出液は口紙でろ過し、セロファンチューブにバックして流水透

析 3 時間後、polyethylene glycol 6,000 をふりかけ 5° で濃縮した。ついでチューブ内の濃縮液を取り出し、チューブ内を少量の 0.03M リン酸緩衝液、pH 7.4 で 3 回ゆすいだ洗液と合わせ、遠心分離して沈殿物を除去し、この上清を再び同様にして濃縮したものを血清反応用被検液とした。なお、この被検液の食品に対する濃縮度は、“固型食品のスラリーおよび液状食品の Ent 濃度は、その酸処理上清中の Ent 濃度と等しい”として算出した。

これらの処理を通じ、pH の修正は 85% リン酸および 1 N 水酸化ナトリウムで行ない、遠心分離は 10,000 ~ 12,000 rpm, 10 分とした。また CMS 吸着以後の液相の除去、洗浄、溶出等の処理は、口紙または nylon bolting cloth (NXX 25; 196 × 238 meshes per lineal inch) を通すことにし、本意な CMS の排除や迷入による Ent の損失を防いだ。口紙は基礎実験のみに用いたが、酸性時における Ent の口紙への吸着を考慮し、溶出まで同一口紙上で処理することにした。bolting cloth を用いる時は、Fig. 2 のように漏斗状に削ったロック付きのゴム栓上に bolting cloth を張り、ガラス管にはめ込んだ装置を作り、洗浄、溶出の一連の処理をこの中で進めた。

実験成績

CMS バッチ処理と Ent の吸着

初め、シュークリームに蒸留水を加え 4 倍容に補正して作ったスラリーの酸処理上清に crude Ent B を 1 μg/

Table 1. Recovery of Enterotoxin B from Food Supernatant Fluids by Use of CM-Sephadex

Supernatant fluid extracted from (dilution)	Total food solids (approx. g)/g of CM-Sephadex							
	6	8	10	12	14	16	18	20
Milk ml/g of CM-Sephadex per cent recovery	52.6 100	70.2 100	85.3 100	102 90	119 78	137 78	154 78	
Dry Skimmilk Powder (5-fold) ml/g of CM-Sephadex per cent recovery	31.3 100		52.2 100	62.7 88	73.0 75			
Cream puff (4-fold) ml/g of CM-Sephadex per cent recovery	57.8 100	77.0 100	96.2 100	115 100	135 100	154 100	173 100	192 100
UGUISUMAME *1 (4-fold) ml/g of CM-Sephadex per cent recovery				71.3 100	83.2 100	95.0 100	107 100	119 100
Ham (4-fold) ml/g of CM-Sephadex per cent recovery		78.3 100	97.8 100	117 100	137 100	156 90	176 80	195 74
KAMABOKO *2 (4-fold) ml/g of CM-Sephadex per cent recovery			140 100	168 100	197 74	225 67	253 57	281 50

*1 Sugared green peas

*2 Japanese-style fish cake

ml の割に添加し、この 20, 40 および 80 ml に CMS を 1 g あて加えて振とうしたところ、その遠心上清はいずれも 1/3 容に濃縮しても micro-Ouchterlony 法で Ent が検出されなくなった。一方、CMS から 0.2M 食塩添加の 0.1M リン酸緩衝液、pH 7.6 で溶出した液は強力な Ent の沈降線を生ずることを認めた。それゆえ、さらに詳細に Ent を抽出するに必要な CMS 量を調べることにした。

CMS 使用量と Ent B 回収率

牛乳、粉乳 5 倍水溶液、および 4 倍容に水で補正作製したシュークリーム、うぐいす豆、ハム、かまぼこ等のスラリーの各酸処理上清に crude Ent B を 1 μ g/ml の割に加え、これに CMS を種々の割合に添加して Ent を抽出し、micro-Ouchterlony 法で反応を行ない、抽出前の加毒酸処理上清の反応と比較し、Ent の回収率を測定した。その結果は Table 1 のとおりであった。すなわち、CMS 1 g につき牛乳では 85.3 ml、粉乳では 52.2 ml、ハムでは 137 ml、かまぼこでは 168 ml 以下の酸処理上清を処理する際はほぼ完全に Ent を回収できるが、これを越えると回収率が著明に低下した。シュークリームでは 192 ml、うぐいす豆では 119 ml まで処理上清量を増してもなおほぼ 100% の回収率が得られた。

CMS 使用量の決定

前実験成績を参考にして、同酸処理上清に crude Ent A, B, C をそれぞれ 1 μ g/ml、計 3 μ g/ml あて添加し、

同様にして回収率を測定した。その結果は Table 2 のとおりで、Ent の型により回収様相が異なるが、3 型の Ent がともにほぼ完全に回収される最大の酸処理上清量は、CMS 1 g につき牛乳および加工乳では約 80 ml、粉乳では 35 ml、ハムでは 120 ml、かまぼこでは 120 ml で、シュークリームおよびうぐいす豆では 240 ml まで増量してもなお完全な回収が得られた。

以上の実験でバッチ法によっても一定量以上の CMS を使用すればほぼ完全に含有 Ent を捕集できることが明らかになったので、つぎにこの方法でイオン交換を行なうために最低限必要な食品成分の除去条件を検討した。

食品不溶物の除去 pH と上清中の Ent 濃度

牛乳、粉乳 5 倍水溶液、および 4 倍容に水で補正作製したシュークリーム、うぐいす豆、かまぼこ等のスラリーに crude Ent A, B, C を 5 または 1.5 μ g/ml の割に加え、pH 4.5 に修正して遠心分離を行ない、その上清を pH 6.0 に修正して再び遠心分離した上清の Ent 濃度を添加 Ent 濃度と比較した。この試験における Ent の定量は、牛乳、粉乳およびかまぼこの試液では micro-Ouchterlony 法と Oudin 法の両者で実施し、シュークリームおよびうぐいす豆の試液では micro-Ouchterlony 法のみで実施した。対照はそれぞれの食品の酸処理上清に Ent を一定量添加した溶液とした。

その結果は Table 3 のとおりで、牛乳、粉乳、シュ

Table 2. Recovery of Enterotoxins A, B and C from Food Supernatant Fluids by Use of CM-Sephadex

Supernatant fluid extracted from	ml of supernatant fluid per g of CM-Sephadex	Recovery rate (%)		
		Enterotoxin A	Enterotoxin B	Enterotoxin C
Milk	60	100	100	100
	80	100	100	100
	100	67	100	75
Enriched milk	80	100	100	100
Skimmilk (5-fold diluted)	35	100	100	100
	40	83	100	83
Cream puff (cream only) (4-fold diluted)	200	100	(100)	100
	240		100	
UGUISUMAME (in bulk) (4-fold diluted)	200	100	(100)	100
	240		100	
UGUISUMAME (vacuum-packed) (4-fold diluted)	200	100	100	100
	240	100	100	100
Pressed ham (4-fold diluted)	120	100	100	100
	140	71	100	75
	160	< 60	100	50
KAMABOKO (4-fold diluted)	120	100	100	100
	140	83	100	100
	160	56	100	75
	160		(100)	

Table 3. Recovered Enterotoxins A, B and C in the Supernatant Fluid of Food or Food Slurry Prepared by Successive Centrifugations at pH 4.5 and then at pH 6.0

Food	Recovery rate (%)		
	Enterotoxin A	Enterotoxin B	Enterotoxin C
Milk	100	100	100
Skim milk powder	100	100	100
Cream of cream puff (F) " (A)	100 100		100
UGUISUMAME(S)	133		< 67
KAMABOKO (K-1) " (K-2)	100 100	100	100

ークリーム およびかまぼこでは試料に添加した Ent 濃度と遠心処理後の Ent 濃度との間に差が認められなかった。これに反し、うぐいす豆では、Ent C の回収率は 67% 以下であった。また、この Ent A の検出濃度は添加 Ent 濃度の 133% という例外的な成績が得られたが、その原因は追求しなかった。

この実験で一部の食品に共沈が関与してくることが明らかになったので、次にその出現状況につき詳細に検討することにした。

共沈現象の検討

シュークリームの場合： クリームを用いる場合と全体を用いる場合とでは異なった成績が得られる可能性がある。それゆえ、3 銘柄のシュークリームを用いてこの両者の蒸留水でのスラリーを作り、Ent C が 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように濃縮培養上清を加え、pH 7.4 で遠心分離した上清、および pH 4.5 で遠心分離した上清を pH 6.0 で再び遠心分離した上清の両 Ent 濃度を、添加 Ent 濃度と比較した。その結果は Table 4 のとおりであった。

Table 4. Recovered Enterotoxin C in the Supernatant Fluid of Food Slurry Prepared by Successive Centrifugations at pH 4.5 and 6.0 and again at pH 7.4

Cream puff		Recovery rate (%)	
Maker	Sample	pH 4.5-6.0	pH 7.4
(H)	Whole Cream	100	80
		100	87
(F)	Whole Cream	100	93
		100	73
(M)	Whole Cream	100	100
		100	100

すなわち、クリームで作ったスラリーでも、全体で作ったスラリーでも、ほぼ同様な成績が得られ、pH 4.5 および pH 6.0 で遠心分離した上清中の Ent 濃度は対照とよく一致する成績が得られた。pH 7.4 で遠心分離した上清中の Ent 濃度は、対照と同程度ないしやや低く、100~73% の値が得られた。

かまぼこ、ハム、うぐいす豆、おはぎの場合： 各試料に水を加えて 4 倍容のスラリーを作り、Ent A および C がそれぞれ 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように濃縮培養上清を加え、pH 4.5 ついで pH 6.0 で遠心分離して沈殿を除き、上清中の Ent 濃度を添加 Ent 濃度と比較した。その結果は Table 5 のとおりで、かまぼこ、ハムでは

Table 5. Recovered Enterotoxins A and C in the Supernatant Fluid of Food Slurry Prepared by Successive Centrifugations at pH 4.5 and then at pH 6.0

Food	Maker & Brand	Recovery rate (%)	
		Enterotoxin A	Enterotoxin C
KAMA-BOKO	H-YAKI K-AJI	100	≥ 60
		100	100
Pressed ham	I-2	100	100
UGUISU-MAME	H, in bulk	< 17	< 10
	A, "	< 17	< 10
	K, vacuum packed	< 17	< 10
	T, "	< 17	< 10
OHAGI*	M	< 17	< 10

* A rice cake covered with bean paste

前回の実験成績と同様、遠心処理後の上清は対照と差が認められなかった。一方、うぐいす豆およびおはぎでは著明な減少が認められ、Ent A および C の残留濃度はそれぞれ対照の 17 および 10% 以下の成績が得られた。

異なった pH での遠心分離を組み合わせた際の上清の Ent 濃度

シュークリーム、うぐいす豆、おはぎ、おにぎり、ごはん等に水を加えて 4 倍容のスラリーを作り、Ent A および B が 3 $\mu\text{g/ml}$ になるように濃縮培養上清を加え、pH 7.5 で遠心分離した上清、pH 7.5 の遠心分離上清をさらに pH 6.0 で遠心分離した上清、pH 7.5 の遠心分離上清を pH 4.5 ついで pH 6.0 で遠心分離して沈殿物を除去した上清、ならびにスラリーを直接 pH 4.5 ついで pH 6.0 に修正して沈殿物を除去した上清の 4 種を作り、Ent の残留濃度を測定して当初の添加濃度と比較した。その結果は Table 6 のとおりで、穀類食品では概して Ent の共沈する傾向が強かった。すなわち、うぐいす豆では直接 pH 4.5 に修正して遠心分離すると残留率 50% 以下となるが、あらかじめ pH 7.4 で食品不溶物を除いておくと pH 4.5 および pH 6.0 で遠心分離しても残留率 100% の成績が得られた。おはぎでは pH 4.5 で遠心分離するとあらかじめ pH 7.4 で不溶物を除去しておいても残留率 50% 以下となるが、pH 7.5 で不溶物を遠心除去した上清を pH 6.0 に修正して遠心分離した上清の Ent 残留率は 100% を示した。この上清は低温で次第に沈殿

を生じ、Ent はこれに吸着され、その上澄の Ent 濃度は添加濃度の 60% 以下を示すに至るが、これを pH 7.5 に修正すると Ent は溶解し、上澄の Ent 濃度の復元が認められた。ごはんでは pH 7.5 で遠心分離しても上清の Ent 濃度の減少が認められ、残留率 89% 以下の成績が得られたが、おにぎりでは減少が認められず、pH 7.5 および pH 6.0 で遠心分離して沈殿を除去した上清中の Ent 残留率は 100% を示した。この両者の成績の差は試料中の食塩の有無によることは明らかである。また、この実験においてもシュークリームでは共沈は認められなかった。

食中毒推定原因食品ならびに容疑食品の Ent 抽出試験成績

Table 7 (I), (II) は動物質食品および動物質に富む食品で、Table 8 は穀類食品で、それぞれ実施した成績を表にまとめたものである。この実験でも、実施条件の影響を知るために、食品の不溶物の除去は種々の pH の組合せで行なった。CMS の使用量は前述の酸処理上清での実験で求められた Ent をほぼ完全に回収するに必要な最少量とした。一部の試験では、この使用量の適否を再確認するため、CMS で吸着後の廃液と洗液をプールし、これに新しい CMS を加えて未吸着の Ent を捕集し、検出を試みたものもある。同表には、検出 Ent の型と量のほか、スラリーの製法、スラリーに食塩を添加して抽出を進めたものはイオン交換前のイオン濃度の引き下げの方法、供試食品の菌数と分離菌の Ent 産生能等も付記しておいた。

事件別、食品別の Ent 検出数：シュークリームでは 5 件中 2 件が A 型、1 件が AD 型、1 件が AB 型であった。不検出の 1 件は、1 例の嘔吐、下痢患者の申し出により調査したものであるが、容疑食品として供試した患者の食残し、ならびに同時製造の店頭陳列品にはブドウ球菌は検出されず、また他に同様な患者の発生も見なかった。焼き魚 1 件は AD 型であり、つみれ 1 件は Ent、ブドウ球菌とも検出されなかった。このつみれは神奈川県衛生研究所よりブドウ球菌不検出の容疑食品として分与されたものである。卵焼 1 件は A 型であった。すし玉 1 件は、Ent antiserum A で沈降反応を認めたが、reference line と典型的な coalescence を示さず、Ent 不検出と判定された。また、この試料の分離ブドウ球菌は Ent A-D 非産生であった。おにぎり 2 件は AD 型および AC 型、のりまき 1 件は A 型、ひがんだんご 2 件中 1 件は A 型、他の 1 件は Ent 不検出であった。この不検出の検体は横浜市衛生研究所より容疑食品として分与されたもので、Ent 産生ブドウ球菌も検出されなかった。うぐいす豆 2 件は A 型および AD 型であった。

Ent 検出濃度：定量試験で検出した食中毒原因食品の Ent 含有濃度は、僅微なものから 0.3 $\mu\text{g/g}$ のものまでまちまちであったが、その平均値は大約 0.05 $\mu\text{g/g}$

Table 6. Recovered Eenterotoxins A and B in the Supernatant Fluid of Food Slurry Prepared by Successive Centrifugations at Various pH Values

Food	Centrifuged at pH	Recovery rate (%)	
		Enterotoxin A	Enterotoxin B
Cream puff (Whole, A)	7.5	≥ 90	100
	7.5-6.0	100	100
	7.4-4.5-6.0	100	100
	4.5-6.0	100	87, 100
UGUISU-MAME (A)	7.4-6.0	100	100
	7.4-4.5-6.0	100	100
	4.5-6.0	< 50	< 30
OHAGI (M)	7.5	100	100
	7.5-6.0	100 $\rightarrow$ < 56	100 $\rightarrow$ < 60
	7.4-4.5-6.0	< 50	< 30
	4.5-6.0	< 50	< 30
ONIGIRI*1	7.5	100	100
	7.5-6.0	100	100
Rice	7.5		< 89
	7.5-6.0	< 75*2	< 89
	4.5-6.0	< 75*2	< 89

*1 Slightly salted rice ball

*2 Enterotoxin C was used

Table 7. Detection of Enterotoxins in Foods Involved in Food Poisoning Outbreaks

(I)

Outbreak	Sample	Slurry-fold dilution	Centrifuged at pH	ml of supernatant fl./g of CM-Sephadex	Concentration -fold	Detected enterotoxin $\mu\text{g/g}$	Staphylococci/g & Produced enterotoxin
Sept., 1968 KOBE C.	Cream puff (Cream)	4	4.5-6.0	240 Effluent 960	50 150	A (0.04) —	4×10^7 AD
Feb., 1969 KOBE C.	Cream puff (Cream)	4	4.5-6.0	200	32	—	$< 10^2$
	(Cream, Patient)	"	"	"	46	—	$< 10^2$
	(Cream, Shop)	"	"	"	"	"	"
June, 1969 KOBE C.	Cream puff (Cream)	4	4.5-6.0	200	72	A (0.3) B (0.01)	4×10^8 — (two strains)
1970 YOKOHAMA C.	Cream puff (Whole)	10 "	7.4-4.5-6.0 4.5-6.0	586 580	> 19 > 27	A B —	52×10^2 —
Oct., 1971 KANAGAWA Pref.	Cream puff (1, Whole)	4	4.5-6.0	240	> 18	A (+)	10^8 A B (one strain)
	"	"	7.6-4.5-6.0	"	> 25	A ($\pm$)	
	"	"	7.6-6.0	"	> 25	A (H)	
	"	"	"	" *2	> 19	A (+)	
	(2, Whole)	4(0.2M NaCl) 8(0.2M NaCl)	7.6-4.5-6.0	480*2	> 19	A (H)	
	"	"	7.6-6.0	" *2	> 25	A (H)	
	(3, Cream)	4	7.5-6.0	200	72	A (0.02)	
	"	"	4.5-6.0	"	78	A (0.02)	
	(3, Whole)	"	7.5-6.0	"	78	A (0.015)	
	"	"	4.5-6.0	"	71	A (0.015)	
	"	8(0.2M NaCl)	7.5-6.0	" *1	101	A (0.004)	
	"	"	"	Effluent 200*1	67	A ($\pm$)	
	(4, Whole)	4	7.5-6.0	240	59.7	A (0.03)	
	"	"	4.5-6.0	"	51.4	A (0.03)	
	"	4(0.2M NaCl)	7.5-6.0	" *2	50.8	A (0.03)	

*1 Ionic strength was lowered by dilution with 0.005 M sodium phosphate (pH 6.0).

*2 Ionic strength was lowered by dialysis against tap water.

—: enterotoxin not detected $\pm$, +, H, H#: very faint, faint, medium or heavy lines of precipitation, respectively

(II)

Outbreak	Sample	Slurry -fold dilution	Centrifuged at pH	ml of supernatant fl./g of CM-Sephadex	Concentration -fold	Detected enterotoxin $\mu\text{g/g}$	Staphylococci/g & Produced enterotoxin
June, 1969 OSAKA Pref.	Roasted fish	4	4.5-6.0	120 Effluent 240	> 41 41	A (< 0.07) D (0.09)	10^8 A (one strain)
Sept., 1969 KANAGAWA Pref.	TSUMIRE*1	5	4.5-6.0	150 Effluent 510	88 142	— —	$< 10^2$ —
May, 1971 KANAGAWA Pref.	TAMAGO YAKI*2	5	4.5-6.0	125	30	A (0.01)	10^8 AD
Dec., 1971 YOKOHAMA C.	SUSITAMA*3	4(0.2M NaCl)	7.5-6.0	120 Effluent 120	92 85	— —	98×10^7 —
		4(0.2M NaCl)	7.5-6.0	120 Effluent 120	79 101	— —	
		4	4.5-6.0	120 Effluent 120	81 85	— —	
		4	4.5-6.0	120	75	—	
		"	"	"	"	"	

*1 Japanese-style soft fish cake

*2 Fried egg

*3 Sour egg cake

—: Enterotoxin not detected

Table 8. Detection of Enterotoxins in Foods Involved in Food Poisoning Outbreaks

Outbreak	Sample	Slurry -fold dilution	Centrifuged at pH	ml of supernatant fl. /g of CM-Sephadex	Concentration -fold	Detected enterotoxin $\mu\text{g/g}$	Staphylococci/g & Produced enterotoxin
July, 1969 KANAGAWA Pref.	ONIGIRI	5(mashed)	(7.4)-4.5-6.0	300 Effluent 300	46 107	A (0.05) D (0.035) —	5×10^8 AD, A
Aug., 1969 KANAGAWA Pref.	ONIGIRI	5(mashed)	(7.4)-4.5-6.0	300 Effluent 300	69 121	A C —	3×10^8 ABC
Sept., 1970 YOKOHAMA C.	NORIMAKI*1	10 "	7.4-4.5 4.5	463 489 Effluent 897	47 58 88	A (0.01) — —	$< 30 \times 10^2$ —
Sept., 1970 YOKOHAMA C.	HIGAN-DANGO*2 (Patient)	10	4.5-6.0	583	60	A ($\pm$)	8×10^7 A D
	(Shop)	8	7.4-4.5-6.0	447	40	—	6×10^8 A D
	"	"	4.5-6.0	449	80	—	
	"	"	"	Effluent 898	55	—	
	"	5	7.4	250 Effluent 1200	> 82 290	A —	
1971 YOKOHAMA C.	HIGAN-DANGO*2	5	7.5	250	70	—	10^7 , molded — (9 strains)
Sept., 1968 OSAKA Pref.	UGUISU-MAME (Patient)	4(mashed)	(7.4)-4.5	240 Effluent 960	42 68	A (0.06) A (0.01)	3×10^8 A
	(Shop)	4(mashed)	(7.4)-4.5	200	108	A (0.005)	9×10^4
May, 1971 KANAGAWA Pref.	UGUISU-MAME (Box Lunch)	5	4.5	221	23	A (0.013)	10^8-10^9
	(3)	4	4.5	197	> 49	A	A D
	(7)	5	4.5	226	60	A (0.008)	
	(8)	4	4.5	189	> 47	D (0.01) A	

*1 seasoned rice rolled in layer *2 A rice cake covered with bean paste

—: enterotoxin not detected ($\pm$): very faint line of precipitation

であった。

CMS 処理廃液中の Ent 残存: CMS 処理廃液に残存する Ent の再捕集実験では、うぐいす豆での 1 例に総量の約 1/7 の Ent の残存を認めたが、この検体は供試時やや乾燥していた。その他の例ではほとんど残存を認めなかった。

抽出物の毒性: 食中毒原因食品の本法抽出物の毒性については、1971 年 10 月関東一円に多数の患者を出したベビーシュクリームを用いて試験した。供試された Table 7 (I) 下端に記載のシュクリーム No. 4 は 0.03 $\mu\text{g/g}$ の Ent A が検出されたが、この試料 150 g 分に相当し、Ent A 4.5 μg の含有が確認された抽出物を流水で 3 時間透析後、牛乳 180 ml とともに成人 1 名が飲用した。その結果、摂取 3 時間 40 分後より頭痛、悪心を起し、時とともに次第にその強さを増し、時折軽い嘔

気を催し、4 時間 25 分後 3 回激しく嘔吐した。その後、頭痛は急速に軽減したが、8 時間 20 分後軟便を排し、9 時間 20 分後水様の下痢を起した。

考 察

食品中の Ent を抽出するに際して特に留意すべきことは、イオン交換体の使用量が不足して Ent の回収率が激減することである。これは試料中に多量に含まれる食品成分によるものであるが、この傾向は一般に動物性食品に強く、穀類食品に弱い。本研究では、この減収を避けるために必要な CMS の最低の使用量を食品別に明らかにした。

これと同様に Ent の回収率を大きく左右する因子として食品の不溶物を遠心除去する際に起る共沈現象がある。この対策として Casman ら¹⁰⁾ は 0.2M 食塩水で食品中の Ent を抽出することにしたが、その後の処理

を簡略にするためできるだけ水で抽出することにし、共沈を回避できない場合に限り加塩する方が得策と考える。

すなわち、穀類食品の場合は概して共沈が起こりやすく、特別な配慮を要するが、動物質食品および動物質に富む食品では蒸留水でスラリーを作ってもほとんど支障は認められない。

さらに、穀類食品に蒸留水を加えてスラリーを作った場合でも、ごはんは例外であるが、通常食中毒が多発するおにぎり、おはぎ、うぐいす豆では、pH 7.5 で遠心分離して沈殿を除去し、ついで pH 6.0 で遠心分離して得た上清を直ちにイオン交換に付するようにするか、冷蔵中に析出した沈殿を pH 7.5 で除去するようにすれば、この間における共沈は避けられるようである。

食中毒原因の疑いがかけられた穀類食品で行なった実験 (Table 8) のうち、ホモジナイザーでスラリーを作製して抽出を進めた例は、概して微弱な Ent しか検出されていない。もしこれが共沈の影響であるのなら、前述の方途により解決されると思う。一方、試料を乳鉢で磨砕して抽出を進めた例は、検出 Ent 量が大きく、動物性食品の成績 (Table 7) と差がなかったため、穀類食品は、ホモジナイザーで処理するより、凍結保存などによってデンプンを β 化し、乳鉢ですりつぶして溶出する方が無難と考えている。

食中毒事件由来の供試食品の事件別 Ent 検出数は、A 型 6 件、AD 型 4 件、AC 型 1 件、AB 型 1 件で、A 型と AD 型で大部分を占めていた。この割合は、Casman¹⁹⁾、Šimokovičová ら²⁰⁾、寺山²¹⁾、Burbianka²²⁾ が食中毒事件例の分離ブドウ球菌で調査した Ent 型別成績とほぼ一致している。

これに比し、事件別の Ent 産生ブドウ球菌の検出数は、A 型 2 件、AD 型 5 件、ABC 型 1 件、AB 型 1 件でかなりの差があり、Ent 産生ブドウ球菌検出率 (56%) は食品の Ent 検出率 (75%) より低かった。これは菌検索を従とし、かなり遅れて菌分離を試みたことが主因と思うが、ブドウ球菌の検出にたよる食中毒原因の追求が原因菌の食品中での宿命的な消滅や他種菌との競合、その他の原因で失敗に終りやすいことを側面的に示しているものと思う。

抽出条件の模索や良否の確認を同時に試みるため、本研究における Ent の抽出はまちまちの方法がとられ、必ずしも最良の条件で行なわれてはいないが、定量的に検出した食中毒原因食品の Ent 濃度は、最高 0.3 $\mu\text{g/g}$ で、平均 0.05 $\mu\text{g/g}$ であった。

Casman ら⁴⁾ は、ブドウ球菌のブレインハートインフュージョンブイヨン曝気培養における菌数と Ent A の産生量との関係がそのまま成り立つなら、通常の食中毒原因食に含まれる Ent 濃度は 0.01~0.04 $\mu\text{g/g}$ になると述べている。またブドウ球菌を種々の食品に接種して

Ent A の産生量を測定しているが、この成績より同様に推論すれば、菌数 10⁶/g 台の通常の食中毒原因食に含まれる Ent 濃度は 0.02~0.12 $\mu\text{g/g}$ ということになる。また、Zehren ら⁵⁾ は食中毒原因となったチーズに 0.12 $\mu\text{g/g}$ の Ent A を検出している。本研究における Ent 実測値は、これらの推測値や業績と大差なかった。

検出 Ent 濃度の病因上の意義は食品の摂取量との関連で決るが、本研究で 0.03 $\mu\text{g/g}$ 検出し、総量 4.5 μg の Ent A を含むことが判明した食中毒原因シュークリーム 150 g、すなわち普通サイズのシュークリーム 2 個半分の抽出物の摂取で、ヒトに典型的な Ent 中毒症状を起こし得たことは、これらの測定値のレベルが実際に発症と結びつくことを示すものと考ええる。

ヒトの Ent での発症量については、従来一般に低く見積られ 15~20 μg と考えられていたが、Zehren ら⁵⁾ は 0.12 $\mu\text{g/g}$ の Ent A を検出したチーズ 60 g を摂取して 4 人中 2 人が嘔吐したことを報告し、大約 7.2 μg で発症することを暗示した。著者はさらに少量の 4.5 μg で発症することを明らかにした。

結 論

1. 食品に蒸留水を加えホモジナイズ (穀類食品では乳鉢で磨砕) して pH 7.4~7.6 でかく拌し、その遠心分離上清を動物質食品では pH 4.5 および pH 6.0 で、穀類食品では pH 6.0 で、それぞれ遠心分離して沈殿を除去し、CMS でパッチ法により Ent を吸着、捕集し、洗浄、溶出後、polyethyleneglycol で濃縮する方法により、広範囲の食品から Ent を抽出できる。これを抗原として micro-Ouchterlony 法ゲル内沈降反応により Ent を検出した。

この抽出に必要な CMS 量を食品別に決定した。

2. 食中毒事件 16 例のうち 12 例の供試食品に Ent を検出したが、その型は A および AD で 83% を占めた。検出 Ent 濃度は最高 0.3 $\mu\text{g/g}$ 、平均 0.05 $\mu\text{g/g}$ であった。

不検出の 4 例の試料には、ブドウ球菌または Ent 産生ブドウ球菌を検出しなかった。

3. 食中毒原因シュークリームの本法抽出物で Ent A を 4.5 μg 含有する試料を、1 例のヒトに飲用させたところ、典型的な Ent 中毒症状を起こした。

稿を終るに臨み、貴重な抗血清および reference toxin の分与を賜った米国 FDA の故 E. P. Casman 博士および Research Microbiologist R. W. Bennett 氏、ならびに米国 Wisconsin 大学教授 M. S. Bergdoll 博士に深甚なる謝意を表します。なお、本報の成績は昭和 44 年 11 月 13 日第 24 回日本細菌学会関東支部総会および昭和 47 年 5 月 20 日第 45 回日本細菌学会総会で発表した。

文 献

- 1) Hall, H. E., Angelotti, R., Lewis, K. H.: Pub. Health Rep. 78, 1089 (1963).

- 2) Hall, H. E., Angelotti, R., Lewis, K. H.: Health Lab. Sci. **2**, 179 (1965).
- 3) Casman, E. P., McCoy, D. W., Brandly, P. J.: Appl. Microbiol. **11**, 498 (1963).
- 4) Casman, E. P., Bennett, R. W.: *ibid.* **13**, 181 (1965).
- 5) Zehren, V. L., Zehren, F.: J. Dairy Sci. **48**, 411 (1965).
- 6) 国田信治, 加藤亮智, 中原正良, 品川邦汎, 阪口玄二: 食衛誌. **13**, 223 (1972).
- 7) Casman, E. P.: Health Lab. Sci. **4**, 199 (1967).
- 8) Casman, E. P.: FDA Pap. **3**, 15 (1969).
- 9) 原田禎顕: 長崎医学会誌. **38**, 807 (1963).
- 10) 原田禎顕: 同上. **38**, 835 (1963).
- 11) 原田禎顕: 同上. **39**, 827 (1964).
- 12) 原田禎顕: 同上. **43**, 473 (1968).
- 13) Hallander, H. O.: Acta Pathol. Microbiol. Scand. **63**, 299 (1965).
- 14) Jarvis, A. W., Lawrence, R. C.: Appl. Microbiol. **19**, 698 (1970).
- 15) Crowle, A. J.: J. Lab. Clin. Med. **52**, 784 (1958).
- 16) Casman, E. P., Bennett, R. W., Dorsey, A. E.: Health Lab. Sci. **6**, 185 (1969).
- 17) Read, R. B., Pritchard, W. L., Bradshaw, J., Black, L. A.: J. Dairy Sci. **48**, 411 (1965).
- 18) Casman, E. P., Bennett, R. W.: J. Bacteriol. **86**, 18 (1963).
- 19) Casman, E. P.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **128**, 124 (1965).
- 20) Šimokovičová, M., Gilbert, R. J.: J. Med. Microbiol. **4**, 19 (1971).
- 21) 寺山 武: 日本細菌学雑誌 **26**, 611 (1971).
- 22) Burbianka, M.: Przegl. Epidemiol. **25**, 257 (1971).