エンテロトキシン産生ウエルシュ菌のヒト、食品、 および土壌における分布

(昭和 50 年 6 月 4 日受理)

安 川 章* 岡 田 陽 一*
北 瀬 照 代* 宮 本 三 郎*

Distribution of Enterotoxin-producing Strains of *Clostridium perfringens* Type A in Human Beings, Foods and Soils

Akira YASUKAWA, Yoichi OKADA, Teruyo KITASE
and Saburo MIYAMOTO

(Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences:
21, Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka)

On the isolation frequency of enterotoxin-producing strains of *Cl. perfringens*, a significant difference was existed between the isolates from food poisonings and those from natural environments, that is, enterotoxinogenic strains were found in 77.3% of the isolates from food poisonings caused by the organism and in 0.8% of those from natural environments.

Percentage of enterotoxin-producing strains in *Cl. perfringens* isolates from natural environments was as follows; 0.8% of the strains from human feces, 0.8% of the strains from foods, 7.7% of the strains from swabs in cooking establishments, 0% of the strains from river water and 0% of the strains from soils.

Spore formation was found in 100% of enterotoxin-positive strains and in 67.5% of enterotoxin-negative strains.

(Received June 4, 1975)

はじめに

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*, 以下ウ菌と略す) 食中毒は大量のウ菌で汚染された食品を摂食することで起こり、12時間前後の潜伏期をおいて下痢と腹痛を主症状とする。このようなウ菌のヒトに対する食中毒起病性については Dische ら¹⁾の新鮮培養ウ菌の人体投与実験などから、感染型食中毒であると考えられてきた。しかし最近 Hauschild ら^{2), 3)}はヒツジの結紮腸管内に投与したウ菌が芽胞を形成し、それに伴って液体の貯留を引き起こすこと、Duncan ら^{4), 5)}はウサギを使って、結紮腸管の膨脹作用や下痢の原因となる因子が芽胞形成時に存在すること、また Strong ら⁶⁾はウサギの結紮腸管の膨脹作用に関与するウ菌の培養ろ液がヒトに対しても下痢を起こさせることを証明した。さらに Hauschild ら^{7), 8)}は芽胞形成時に産生されるある物質が

ヒツジやウサギの結紮腸管の膨脹作用を有し、それがウ菌の産生する既知毒素のどれとも異なる抗原性をもつ易熱性高分子物質であることを明らかにし、その物質をウ菌エンテロトキシン (以下 ET と略す) と報告した。そこで著者らはウ菌の食中毒起病性とウ菌 ET 産生能の関連を明らかにするためウ菌 ET を精製し、それによって得た抗毒素血清を用いて、昭和41年以降大阪市内で発生したウ菌食中毒分離株^{9), 10)}と自然界 (食品、ヒト糞便、土壌) 分離株のウ菌 ET 産生能について比較検討したのでその結果を報告する。

実験方法

1. ウ菌分離方法

1.1 食品からのウ菌分離

食品約 1g を TGC 培地 (fluid thioglycollate 培地、日水製) 10 ml に投入し、37°, 18~24時間培養した。次いでその培養液の一白金耳をカナマイシン含有

* 大阪市立環境科学研究所: 大阪市天王寺区東上町 21

CW 寒天平板培地 (以下 KM 加 CW 培地と略す) に塗抹し, 37°, 18~24 時間嫌気培養後¹³⁾, レシチナーゼ C による白濁を生ずるコロニーを 1 平板当たり 3 個釣菌し, それらを分離菌株として用いた. なお菌種の同定は Willis の方法¹³⁾に準じて行った.

1.2 土壌からのウ菌分離

土壌約 1 g を TGC 培地 10 ml に投入し, 37°, 18~24 時間培養した. 以下食品からのウ菌分離の方法に準じて菌種を同定した.

1.3 ヒト糞便からのウ菌分離

非加熱分離の場合, 便の少量をガラス棒で KM 加 CW 培地に直接塗抹した. 加熱分離の場合, 約 1 g の便塊を TGC 培地 10 ml に懸濁させ, コッホ蒸気釜中で 60 分加熱した後冷却し, そのままフラン器に収め, 37°, 18~24 時間増菌培養した. 次いでその培養菌液の一金耳を KM 加 CW 培地に塗抹し, 以下食品からのウ菌分離の方法に準じて菌種を同定した.

2. ウ菌の Hobbs 血清型別および耐熱性

分離ウ菌の Hobbs 血清型別は市販の耐熱性 A 型ウ菌診断用免疫血清 (東芝化学(株)製) によるスライド凝集反応によった. 分離ウ菌の耐熱性試験は TGC 培地 12 時間培養ウ菌 1 ml を Angelotti の培地¹⁴⁾ 15 ml に移植し, 37°, 24 時間培養した. 次いでその培養液 2 ml を小試験管に移し, 沸とう水中で 10 分加熱後冷却, この菌液 1 ml を直ちに TGC 培地 10 ml に加え, 37°, 48 時間

Isolated strain

F. T. medium*

16 hr

C. M. medium**

24 hr

Heating at 75°C for 20 min

F. T. medium

7 hr

F. T. medium

16 hr

D. S. medium***

7 hr

Sporulating culture

Washing by centrifugation
Suspending in 2 ml of saline
Sonication

Sample

All incubation were done at 37°C

* Fluid thioglycolate medium

** Cooked meat medium

*** Duncan—Strong medium

Scheme 1. Preparation of sample to detect *Cl. perfringens* enterotoxin.

Fig. 1. Precipitation bands in agar gel of sonic cell-extract, crude enterotoxin and purified enterotoxin against antiserum prepared with purified enterotoxin.

S, antiserum prepared with purified enterotoxin; C, crude enterotoxin; P, purified enterotoxin; E, sonic cell-extract (NCTC 8239).

Fig. 2. Precipitation bands in agar gel of sonic cell-extracts against antiserum prepared with purified enterotoxin.

S, antiserum prepared with purified enterotoxin; P, purified enterotoxin; 1, 2, 3, 4, sonic cell-extract of isolated strains.

培養してその耐熱性の有無を判定した。

3. ウ菌 ET の精製

植村らの方法¹⁴⁾に基づいて行った。ET 陽性 A 型ウ菌 (*Cl. perfringens* NCTC8239) を Duncan-Strong 培地¹⁵⁾で 37°, 8 時間培養し芽胞形成菌を集菌洗浄, その濃厚懸濁菌液を音波処理 (10 kc/sec, 3 分間) して得られた可溶性抽出物を 40% 飽和硫酸アンモニウム溶液で塩析濃縮したものを粗毒素とした。毒素の精製は粗毒素をセファデックス G-100 (2.5×90 cm) で 2 回ゲルろ過して行った。

4. ウ菌 ET の抗毒素血清の作成

タンパク量として 200 µg/羽の精製毒素を 4 週間隔で 100 µg/羽ずつ 2 回に分け, Freund のコンプリートアジュバントとともに家兎に筋肉内注射を行った。最終免疫 1 週間後に得られた抗毒素血清は寒天ゲル内沈降反応において, 芽胞形成菌の音波処理抽出液 (NCTC8239), 粗毒素並びに精製毒素との間に, 互いに完全に融合する 1 本の特異沈降線のみを生じた (Fig. 1)。

5. ET 産生ウ菌の検出方法

Scheme 1 に示す方法で得た試料について, 直径 5 mm の Well を 4 mm の等間隔で Fig. 2 のように配列した Ouchterlony 法による寒天平板ゲル内沈降反応を行い, 24 時間後にウ菌 ET に特異的な 1 本の沈降線を生じ

たものを ET 産生株と判定した。著者らのこの方法での ET 検出感度は, 精製毒素を用いると約 0.5 µg (14 µg/ml) であった。

6. ウ菌芽胞形成の有無

芽胞形成の有無および孢子形成率を知るため, Scheme 1 に示す方法で得た芽胞形成培養液について Wirtz の方法¹⁶⁾によって孢子染色を行った。光学顕微鏡下, 1 視野中の総菌数に対する孢子数の百分率を求め孢子形成率とした。

実験成績

1. ET 産生ウ菌の分布

ウ菌食中毒分離株 66 株および自然界分離株 347 株計 413 株について ET の検出を行った。その結果は Table 1 に示すとおりである。

ウ菌食中毒分離株のうち 77.3% (51/66) が, 自然界分離株のうち 0.8% (3/347) が ET 陽性株であった。ウ菌食中毒分離株および自然界分離株を Hobbs 型と型別不能, 耐熱性 (糞便の場合, 100°, 60 分加熱) と非耐熱性 (糞便の場合, 非加熱分離) に分け, ET 陽性株の分布状況を比較した結果は Table 2 に示すとおりである。

自然界分離ウ菌の由来別にみた ET 陽性株の検出率はヒト糞便 0.8% (1/117), 食品 (主に冷凍食品) 0.8%

Table 1. Isolation Frequency of Enterotoxin Producing *Cl. perfringens*

Source	No. of strains isolated	No. of strains positive for enterotoxin	Percent positive for enterotoxin
Food poisoning	66	51	77.3
Natural environment	347	3	0.8
Total	413	54	13.1

Table 2. Isolation Frequency of Enterotoxin Producing *Cl. perfringens* in Various Strains

Source	Hobbs' typeable		Hobbs' antypeable		Total
	Heat-resistant*	Heat-sensitive	Heat-resistant*	Heat-sensitive	
Food poisoning	35/46** (76.1)		16/20 (80.0)		51/66 (77.3)
Human feces	0/26	0/5	0/35	1/51 (1.9)	1/117 (0.8)
Food	1/14 (7.1)	0/22	0/24	0/60	1/120 (0.8)
Soil	0/3	0/4	0/17	0/61	0/85
River water		0/1	0/9	0/2	0/12
Swabs from cooking establishment		0/7	1/1 (100)	0/5	1/13 (7.7)

* Human feces, heating at 100°C for 60 min; Other sources, Heating at 100°C for 10 min.

** No. enterotoxin positive/No. tested.

(), percentage of enterotoxin producing strains.

Table 3. Enterotoxin Producing Ability of the Isolates from the Fecal Specimens and the Incriminated Foods of *Cl. perfringens* Food Poisoning in Osaka

Case	Date	Incriminated food	Hobbs serotype	Nonheat treated feces	Heat treated feces	Food	Total
1	June, 1966	Lunch	1		10/13 (76.9)	3/3 (100)	13/16 (81.2)
2	June, 1967	Cooked whale meat	1		4/7 (57.1)		4/7 (57.1)
3	Dec., 1968	Kama-meshi	6	2/4** (50.0)	8/9 (88.8)		10/13 (76.9)
4	Apr., 1970	Bara-sushi	UT*	9/11 (81.8)	7/9 (77.7)		16/20 (80.0)
5	Feb., 1971	Lunch	6	1/1 (100)	6/6 (100)	1/3 (33.3)	8/10 (80.0)

* UT, untypeable.

** No. enterotoxin positive/No. tested.

(), percentage of enterotoxin producing strains.

Table 4. Comparison of Sporulation Frequency between Enterotoxin Producing and Nonproducing *Cl. perfringens*

Sporulation frequency	<1%	1~20%	20~60%	>60%
No. of strains positive for enterotoxin		16 (29.6)	11 (19.6)	27 (48.2)
No. of strains negative for enterotoxin	116 (32.4)	99 (27.7)	64 (17.9)	78 (21.8)

Sporulation frequency was shown by a ratio of total spores to total cells in one microscopic field.

(), percentage of sporulation frequency.

(1/120), 調理施設拭取水7.7% (1/13), 河川水0% (0/12), 土壌0% (0/85) であった。Hobbs 型と型別不能, 耐熱性と非耐熱性に分けて ET 陽性株の検出状況を比較すると Hobbs 型耐熱性ウ菌のうち 40.4% (36/89) が, Hobbs 型非耐熱性ウ菌のうち 0% (0/39) が, Hobbs 型別不能耐熱性ウ菌のうち 16.3% (17/106) が, Hobbs 型別不能非耐熱性ウ菌のうち 0.8% (1/179) が ET 陽性株であった。

昭和41年度から昭和46年度までの6年間に大阪市内で発生したウ菌による食中毒は, 昭和44年を除き各年度1事件例であった。これら5事件例よりのウ菌食中毒由来分離株について ET 産生の有無を調べた結果は Table 3 に示すとおりである。

ET 陽性株の検出率は昭和41年度で 81.2% (13株/16株), 昭和42年度で 57.1% (4株/7株), 昭和43年度で 76.9% (10株/13株), 昭和45年度で 80.0% (16株/20株), 昭和46年度で 80.0% (8株/10株) といずれの年度においても同じような ET 陽性株検出率が認められた。

2. ウ菌 ET 産生と芽胞形成

寒天ゲル内沈降反応によって確認した ET 陽性株 54

株および ET 陰性株 357 株についてその芽胞形成能を調べた結果は Table 4 に示すとおりである。

表から明らかなように ET 陽性株のすべてが 1% 以上の芽胞形成能を示した。ET 陰性株においても 241 株/357 株 (67.5%) が 1% 以上の芽胞形成能をもち, 特に 78 株 (21.8%) は高い芽胞形成能が認められた。

考 察

ウ菌 ET の検出方法としてモルモットの皮膚内の毛細血管透過性を利用して発赤反応を調べる皮膚テスト¹⁷⁾, ウサギ結腸腸管法¹⁸⁾, などがあるがいずれも多数の分離菌株を迅速に処理するには不適と考えられる。著者らは精製したウ菌 ET のウサギ免疫血清を用いて寒天ゲル内沈降反応でウ菌 ET を検出した。

この方法はごく少量の抗血清 (0.04 ml) ですみ, 操作が簡単でウ菌 ET の判定にルーチンワークとして十分適用できる。

芽胞形成とウ菌 ET 産生の経時変化について Duncan¹⁹⁾ はウ菌芽胞が 3~4 時間目から増加し, 6~8 時間で最高に達し, それに平行して芽胞菌音波処理抽出液中の ET も増加するが 12 時間以後になると次第に減少す

ること、一方、培養上清中の ET は 8 時間目頃から増加し始め、24 時間で最大に達すると報告している。著者らは 8 時間培養芽胞菌音波処理抽出液および 24 時間培養芽胞菌液の培養上清のウ菌 ET 産生について比較検討した。その結果、培養上清の場合、濃縮を必要とするので抗原試料調整に長時間を要し、かつ音波処理抽出菌液を抗原とした場合と比べて ET 陽性株検出に差は認められなかった。そこで今回の実験では、寒天ゲル内沈降反応の抗原試料として 8 時間培養芽胞菌音波処理抽出液を用いた。

自然界には多数のウ菌が存在しているが、ET 産生ウ菌の分布状況についてはよく知られていない。著者らが行った調査で、自然界分離ウ菌のうち ET 産生ウ菌の検出率は 0.8% で、ヒト糞便（非加熱分離）、食品（焼ぎょうざ）、調理施設拭取水（包丁）から各々 1 件、計 3 株が検出されたにすぎず、自然界に分布する ET 産生ウ菌の比率は非常に低いものであった。一方、ウ菌食中毒分離株の ET 産生は 77.3% という高い検出率を示した。このことは、ヒト腸管を含めて自然界に幅広く分布するウ菌のうち食中毒原因菌となり得るウ菌は ET 産生能を有する限られた菌株であることを示唆するものであり、かつウ菌 ET がヒトの下痢を起こす原因物質であるとする Strong ら²⁰⁾ の報告を支持するものであると考えられる。

従来から、ウ菌食中毒の原因菌検索の指標として Hobbs 血清型別が用いられている。著者ら¹⁰⁾ が昭和 45 年に分離したウ菌食中毒株は Hobbs 型別不能であったが、その ET 陽性株の検出率は 80% (16 株/20 株) という高い値を示した。このことからウ菌食中毒の原因菌検索には Hobbs 血清型別に加えて、ET 産生の有無を検討することが重要であると考えられる。

ET 産生と芽胞形成について ET 産生ウ菌のすべてが 1% 以上の芽胞形成を示した。このことはウ菌 ET 産生には芽胞形成を必要とする Duncan¹⁹⁾ の報告と一致するものである。

一方、ET 陰性ウ菌で 1% 以上の芽胞形成能をもつ株は 67.5% もあり、ウ菌の芽胞形成能が必ずしも ET 産生能を意味しないことを示している。

結 論

ウ菌の食中毒起病性解明の一端としてウ菌 ET を精製し、その抗血清を用いてウ菌食中毒分離株および自然界分離株のウ菌 ET 産生能について比較検討した。

1) 芽胞形成ウ菌の音波処理抽出液を抗原試料として Ouchterlony 法による寒天ゲル内沈降反応によってウ菌 ET を検出した。

2) ウ菌食中毒株のうち 77.3% (51/66) が、自然界分離株のうち 0.8% (3/347) が ET 陽性株であった。なお自然界分離株の由来別 ET 産生ウ菌の検出率はヒト糞便 0.8% (1/117)、食品 0.8% (1/120)、調理施設拭取水

7.7% (1/13)、河川水 0% (0/12)、土壌 0% (0/85) であった。

3) ET 陽性ウ菌のうち 100% (54/54) に、ET 陰性ウ菌のうち 67.5% (241/357) に芽胞形成 (1% 以上) が認められた。

終りに臨み、懇切なご指導、ご校閲をいただきました大阪市立環境科学研究所所長大和田国夫博士に深甚の謝意を表します。また NCTC8239 株およびその ET 抗血清を分与下された大阪府立大学農学部獣医公衆衛生学教室植村興博士並びにウ菌食中毒株分離にご協力いただいた当研究室外村佳子氏に感謝します。

なお本論文の要旨は第 28 回 (1974 年、長崎) 日本食品衛生学会において発表した。

参考文献

- 1) Dische, F. E., Flek, S. D.: Lancet., 2, 71 (1957).
- 2) Hauschild, A. H. W., Niilo, L., Dorward, W. J.: Appl. Microbiol., 16, 1235 (1968).
- 3) Hauschild, A. H. W., Niilo, L., Dorward, W. J.: Can. J. Microbiol., 16, 339 (1970).
- 4) Duncan, C. L., Strong, D. H.: ibid., 15, 765 (1969).
- 5) Duncan, C. L., Strong, D. H.: J. Bacteriol., 100, 86 (1969).
- 6) Strong, D. H., Duncan, C. L., Perna, G.: Intec. Immun., 3, 171 (1971).
- 7) Hauschild, A. H. W.: Can. J. Microbiol., 16, 651 (1970).
- 8) Hauschild, A. H. W., Niilo, L., Dorward, W. J.: ibid., 17, 987 (1971).
- 9) 安川 章ほか 9 名: 日本公衛誌, 14, 129 (1967).
- 10) 安川 章ほか 10 名: 生活衛生, 15, 163 (1971).
- 11) 安川 章, 飯田才一: 栄養食糧発酵水質外国文献会誌, 18, 1207 (1967).
- 12) Willis, A. T.: J. Pathol. Bacteriol., 75, 299 (1958).
- 13) Angelotti, R., Hall, H. E., Foter, M. J., Lewis.: Appl. Microbiol., 10, 193 (1962).
- 14) 植村 興, 坂口玄二, 山本博之: 日細誌, 28, 47 (1973).
- 15) Duncan, C. L., Strong, D. H.: Appl. Microbiol., 16, 82 (1968).
- 16) 伝染病研究所学会友: “細菌学実習提要” 126 (1958) 丸善.
- 17) Stark, R. L., Duncan, C. L.: Intec. Immun., 5, 147 (1972).
- 18) Hauschild, A. H. W., Hilsheimer, R., Rogers, C. G.: Can. J. Microbiol., 17, 1475 (1971).
- 19) Duncan, C. L.: J. Bacteriol., 113, 932 (1973).
- 20) Strong, D. H., Duncan, C. L., Perna, G.: Intec. Immun., 3, 171 (1971).