特集・食品衛生の将来展望

食中毒の病因究明における細菌学の今後の役割

藤 原 喜 久 夫*

The Future Role of Bacteriology in the Investigation of
Pathogenic Agents Causing Food Poisoning

Kikuo FUJIWARA

(Institute of Community Medicine, The University of Tsukuba:
Sakura-mura, Nihari-gun, Ibaraki)

I. 緒 言

昭和54年の我が国における食中毒統計¹⁾をみると、届出総件数は1,168件であるが、その中297件、すなわち25.4%は病因物質不明となっている。勿論この中には検査用検体の入手不能な場合など、最初から病因物質究明の不可能なものも含まれているであろうが、その他にも、実際は細菌性食中毒であったにもかかわらず、その決定ができずに病因物質不明となっているものも少なからずあるものと想像される。元来、食中毒原因菌はその種類も極めて多種にわたり、又その限界も不明りょうであり、更に自然界に普遍的に分布している菌種がはなはだ多いので、たとえ、病原性を疑われる細菌を検体から分離し得ても、その菌株の食中毒病原性を決定することは必ずしも容易ではない。端的にいうと、食中毒原因細菌は、現在なお、未検討、未確認のものがかなり残されている可能性が考えられ、したがって、この問題を十分に検討することは、今後の細菌学のこの領域において果すべき重要な役割の一つと思われるので以下にこの点に関して若干の考察を試み大方のご批判を仰ぎたい。

II. 食中毒原因細菌の分離

一般に食中毒原因検査用の検体には、患者由来のものにせよ、検査用の保存食品にせよ、かなり多種類の微生物が含まれているのが自然であり、特に摂取残品を収集してきたような検体においては、腐敗菌などの旺盛な増殖のため、本来の食中毒原因菌が見失われる可能性さえ起こりうる。したがって、このような検体について食中毒原因菌の分離を行うに際しては、従来から、種々の選択培地、増菌培養などが工夫、利用され、さらに、嫌気培養その他種々の特殊な培養条件も検討されてきているが、しかし、それでもなお、比較的最近まで、いくつかの食中毒原因菌が見落とされていた。たとえば、*Campylobacter jejuni*²⁾や*Yersinia enterocolitica*³⁾ではそれぞれの発育至適温度により、42°、25°が分離

培養の好適条件となっており、したがって、従来一般に食中毒検索時に行われてきている、培養温度はこの種の菌の分離には不適當であったことになる。このように、最も簡単な温度条件をはじめとして、種々の微生物にはそれぞれ特有な生理的、生化学的諸因子があるので、食中毒検体の検索においても、これらの基本的生物学的諸条件を十分究明し、考慮に入れ、さらに新しい、食中毒原因菌種をとり落とすことのないような分離検出法を開発することは、今後の細菌学の最初に努力すべき問題点と思われる。なお、エルトル・コレラ菌の場合にε-ファージが汚染の推定手段として論じられているが、この類の研究は将来食中毒菌の領域においても有意義であろう。

III. 分離菌株の食中毒病原性の確認

既知の食中毒原因菌を検出することはできないが、ある特定の種の細菌が患者材料および推定原因食の両者から大量に分離され、あるいは純培養状に検出される場合、その菌は当然、その食中毒の原因として検討されなければならない。

一般に微生物の病原性を論議するに際して、まず最初に念頭におかねばならないことは、その生菌としての生体への侵入経路、あるいはその微生物の産生する毒素の導入経路の問題である。食中毒を考える場合は、必ず、経口的に侵入、または導入されて発症させるものでなければならない。したがって、生菌あるいは毒素を動物の腹腔内又は静脈内に注入して異常を起こし得たとしても、そのみでは必ずしも食中毒原因菌とは断定され得ず、最終的には経口投与による起病性を証明する必要がある。勿論ボツリヌス菌毒素のように、腹腔内注射でも経口投与と同様に毒性を現わしうるものもあるが、一般的には、このような経路の毒性試験のみでは病原性を決定できない。他方、周知のごとく、食中毒の場合においても、他の細菌性疾患と同様に、人体と動物とでは、病原微生物あるいは毒素に対する感受性に著しい差異の

* 筑波大学社会医学系：茨城県新治郡桜村

認められることが多い。故に、完全な病原性再現試験を実施しようとするならば、人体に経口的に試料を与えて発症の有無を調べるより他に方法はないことになる。ここにおいて、従来のほとんどすべての食中毒原因菌、あるいはその産生する毒素は、最初から企画されたものか、または、偶然結果的にそうなったものかは別としていずれにせよ、人体に摂取されてその人体に対する病原性を確認されたものである。しかしながら、これからはそのような人体実験の実施は極めて困難となる傾向にあり、したがって、人体に代るべき何らかの動物に経口投与試験を試みて結論を出すようにしなければならない。すなわち、質的にも量的にも人体と同様な感受性を示すような実験動物をみつけないければならなくなるのであるが、すべての既知の食中毒原因菌に対して、人体と全く同様に反応して発症するような動物は現在まだ見いだされていない。比較的人体に類似せる動物として、しばしばアカゲザルを代表とするサル類が用いられているが、例えば、ブドウ球菌エンテロトキシンAに対する感受性についてみても、アカゲザルは体重割にしてヒトの10倍以上の毒素を投与しなければ発症しないことが知られている。このような実状を考える時、食中毒の病因究明において、適当な実験動物の選定は最も重要な課題の一つといえよう。

ついで、検討されるべき問題は実験方法に関するものである。すなわち、理論上は、経口投与試験によるべきことは勿論であるが、上述のように、その感度は必ずしも満足すべきものではないので、この対策として、著者らはセロトニンの後投与を試みているが、この方式もなお種々問題を含んでいる。たとえばアカゲザルに腸炎ビブリオを投与する時、その発症率はかなり低く、人体に対して激しい臨床症状を生ずる菌株でも、経口投与により実験動物に発症させることは極めて困難であり、全動物が下痢、嘔吐などを起こさず、無症状に終る場合が多い。しかし、このような動物においては血中セロニンレベルが、生菌投与により著しく低下することが認められる。そこで、被検菌の経口投与後1時間後にセロニン 100 μg を静注すると、かなり高率に2~6時間後に水様性の下痢を起こすことが認められたので、中毒株のスクリーニングに著者らはこの方法を提案したことがある。なお、セロニンレベルを維持させる目的で、モノアミンオキシダーゼ阻害剤である、イプロニアジット 1 mg を静注⁵⁾しても、やはり発症がみられる。しかしながら、セロトニンは、この程度の量の静脈内注射では、腸炎ビブリオ食中毒原因菌を経口的に投与された実験動物の血中セロニン値に著しい増加を起こさないことが証明されているとはいっても、やはり、本来、消化管の運動促進物質であることを考える時、このような生物活性物質を使用することにはかなりの抵抗が感じられる。ここにおいて、食中毒病原性確認試験の確立のために

は、原因菌あるいは毒素侵入時における宿主側の発症抵抗因子をメディエーター代謝の面から十分に検討し、実験動物の発症阻害要因を調整して、適正な反応準備状態を作り出す研究が必要と考えられる。一般に、食中毒においてはその最終的標的臓器としては消化器が主要なものとなることは勿論であるが、しかし、その前に、まず病原に対する全身の対応があり、種々の代謝機構が作動して、発症を阻止する努力がなされ、それでもなお、発症を防御しきれなくなった時にはじめて典型的症状が発現するものと思われる。ちなみに、学校給食による食中毒においても、その発症率は通常 30% 以下であることを考えると、少なくとも過半数においては発症阻止の代謝機構が効を奏しているものと想像される。動物実験において、人体と比べて発症率が著しく低くなる一因として、このような防御代謝機構に関する大きな差異が考えられるので、適当な方法によりこのレベルを調整して、実験動物と人体をほぼ同一条件にすれば、食中毒病原性確認試験は可能となるであろう。

IV. 一般環境微生物の検討

従来、他の一般の感染症と同様に、食中毒においても、その原因菌としては、特定の種に限られた細菌のみが取り上げられていたが、近來の研究の結果、このような厳格な区分は必ずしも適当でないことが知られてきた。すなわち、古くから、土壌その他一般環境由来の腐敗細菌として知られていた *Bacillus cereus* の中に、死亡者を出すほどの強毒な食中毒原因菌の存在することが認められ、最近の食中毒研究領域における大きな話題となっている。しかし、このような場合には、その病原性を吟味するに際して極めて困難な問題に遭遇する。すなわち、同種の細菌が広く一般環境に分布しており、食品などの腐敗細菌としての *Bacillus cereus* と食中毒原因菌株とを簡単に区別することは不可能であり、したがって、食中毒検体からの分離株であっても、はたして、それが食中毒病原性を有するか否かは速断できない。勿論、*Salmonella typhimurium* と同定できれば、すべて食中毒原因菌の仲間に入れられると同様に、*Bacillus cereus* も全部食中毒原因菌とみなされるのならば、その取扱いは容易であるが、この場合にはそうではなく、この種の細菌の内、特定のものに限って食中毒病原性を有するのであるから、一株ごとに慎重な検討を要することになる。そこで、前章に述べたような病原性確認試験が必要となるのであるが、この場合にすべての菌株を経口投与実験で検討することは不可能であり、したがって、これに代わるべき、より簡単な方法によってスクリーニングを行わねばならない。

食中毒病原性スクリーニングの方式として現在行われているものに、マウス腹腔内注射試験、結紮腸管ループ試験⁶⁾、Adenylate cyclase 活性試験⁷⁾、皮膚末梢血管透過性亢進試験⁸⁾ などがあるが、サルの経口投与試験成

績⁹⁾と比較してみると、最後の血管透過性試験が最も広範囲に食中毒病原株に陽性を示すことが知られている。

しかしながら、上述のスクリーニングテストも、*Bacillus cereus* の場合には、一応その食中毒病原株の推定に応用されうるが、他の菌種においては常に通用するとは限らず、血管透過性亢進作用の全く認められない食中毒原因毒素も多数存在する。したがって、このような、一般環境に分布する各種の微生物の全体に共通して実施可能な食中毒病原性スクリーニング方式の開発が望まれる。また、同時に現在試みられているスクリーニング方式によってでも、可能な限り広範囲に、一般環境微生物の食中毒病原性を再検討し、その中の疑しいものについては、動物に対する経口投与試験などにより、その病原性を確認する必要がある。なお、その結果により未知の食中毒原因菌種が一般環境微生物の中から見いだされる可能性も考えられる。

他方、*Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* のように本来、ウシ、ヒツジなどの病原菌とみなされていたものの中にも、人体に病原性を現わす菌種があり、動物と人体の感受性の差異は必ずしも顕著ではないことがあるので、動物に対する病原菌についても、一応、人体の食中毒病原菌としての立場から、環境微生物の一部として再検討する必要がある。上述の *Campylobacter* などは、氷山の一角であり、多数の動物病原菌の中には、この他にもかなり食中毒原因菌が含まれている可能性がある。ちなみに、*Salmonella* もネズミチフス菌をはじめとして、多くのものが動物病原菌である。

V. 食中毒原因菌の混合汚染

細菌性食中毒において、その検体から2種類以上の既知の病原微生物が見いだされることがあるが、特に重症例、死亡例の場合にしばしばこのような結果が得られている。広く知られている例としては、死者3名を出した、昭和50年の山形県酒田市における駅弁中毒事件¹⁰⁾があり、この事例の検体からは、腸炎ビブリオ、ブドウ球菌、*Bacillus cereus* が分離されている。なお、この事件の致死率は2.3%となっており、腸炎ビブリオ食中毒における一般の致死率に比べてかなり高くなっている。ちなみに昭和54年の我が国の腸炎ビブリオ食中毒の届出患者総数は11,213名であり、そのうち死者は3名となっており、その致死率は0.03%以下である。このような傾向は大阪府枚方市の折詰弁当による食中毒の集団発生に際しても認められる。

この問題を実験的に解明しようとして、著者ら¹¹⁾は、まずこれらの患者分離菌株の培養混合物をアカゲザルに経口投与し、その発症状況を追究した結果、各菌の培養単独では比較的弱い毒性を示すにすぎないが、混合投与群においては、いずれも、下痢、嘔吐などかなり激しい症状を呈した。さらに家兎、モルモットを用いて、皮膚血管透過性亢進作用を調べた結果も、混合物を注射した

動物群は単独投与群に比べて、その反応が増強されることを認めた。またさらに、精製エンテロトキシン、サルモネラ粗毒と腸炎ビブリオ粗毒の混合物の家兎に対する血管透過性亢進作用を検討¹²⁾し、上記の実験と同様に、混合物の毒性増強現象を観察した。

他方、三輪谷らの研究において腸炎ビブリオによる食中毒時の直接死因として、この菌により産生される耐熱性溶血毒の心筋毒性が取り上げられている。そこでこの点に着目して、腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒精製物およびブドウ球菌エンテロトキシンA精製物の混合物をラットの静脈内に注入し、心電図により経過を観察しながら生死の判定を試みた結果¹³⁾、これらの毒素の混合による致死性の増強効果が明らかに認められた。これらの各被検動物は死後剖検の結果、心筋間質に高度の浮腫、出血などが確認されている。ちなみに、腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒の単独投与群ではこれらの病変は比較的軽度であり、ブドウ球菌エンテロトキシンAでは浮腫も生ぜず、中等度のうっ血が認められるにすぎない。また、腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒精製物とボツリヌス菌毒素A精製物との混合投与実験¹⁴⁾においても、致死性を増強することが証明されている。

以上の一連の実験結果より、食中毒原因菌の混合汚染は、それぞれの毒力を増強させる可能性が考えられるので、食中毒の細菌学的検討に際しては、単一の病原微生物にとどまらずできる限り、多種の細菌を広く分離し、それらの病原性について総合的に追及することが必要と思われる。この場合、*Bacillus cereus* のような例もあるので、必ずしも従来の食中毒原因菌の概念に拘束されずに一般環境微生物についても十分検討することが肝要であろう。

VI. 疫学的検討

食中毒に際して、その病因究明に当たって、食品を検査する場合には、その検体の由来について、十分な情報が必要とする。すなわち、その食品の材料およびその生産地、流通過程、輸送方法、ならびに調理、加工方式、保存条件、摂取方法などに関して、可能な限り詳細、正確に調査されなければならない。

近年特に増加してきた生鮮魚介類、肉類などの輸入品について考えてみると、従来本邦に存在しなかったような種の微生物がこれらの生食品とともに国内に入ってきており、したがって細菌検査の対象としても、在来菌種の他に各種の国外に常在する微生物も見落さぬように配慮されることが必要となる。この傾向は我が国における *Salmonella* の菌型分布の変遷をみても十分理解されるところであろう。外来性の微生物を考慮する時、特にコレラ類似菌 (NAG *Vibrio* を含む) については慎重な検討を要するところである。実際に輸入食品よりコレラ菌そのものを検出したという報告もあり、これらの鑑別は極めて重大な問題である。また、外国で加工され輸入

されている食品については、その加工場の衛生条件を十分考慮する必要がある、いったん加工場などで汚染された食品は冷凍輸送されても、容易に殺菌されず、最後まで生残するものがかなり多いので、その食品の生菌数その他の細菌検査成績から逆にその加工処理場などの衛生状況を推測しうることもある。いずれにせよ国際流通食品については、簡単に生産地を調査することができないので慎重な検査が必要である。

次に大きな問題となるのは最近における、新しい調理、加工、製造の方式である。すなわち、乳類の加熱殺菌法（ロングライフ）をはじめとして、近来、各種の新しい方式による食品の加工、調理が行われるようになっており、それに伴い、それらの食品中の微生物の菌叢のパターンにも変遷が生ずることになる。他方、保存食品としても、冷凍食品、レトルト食品など種々の形態で長期保存されたものが近来多量に市場に出回っており、これらについても従来の保存食品、たとえば塩乾物などとは異なった菌叢となっているので、このような食品を利用して調理された食品の検査においては、それぞれの特性をあらかじめ十分検討しておく必要がある。

ちなみに、阪口らの報告によれば無加熱摂取用冷凍食品94検体中34検体に *Bacillus cereus* を検出しているが、もしこの中に上述のような食中毒原因菌が存在する時は、解凍後摂取までの時間が7時間以上経過する場合は食中毒を起こしうる可能性が考えられる。

VII. 結 語

食中毒の病因を細菌学的に究明するには、その原因菌の分離、同定からはじめて、最後にはその病原性確認まで行わなければならないが、その間に一貫して考えられねばならぬことは、食中毒はあくまでも食品を介して発生する疾患であり、したがって、その食品汚染から人体における発症まで、実際の食品の採取、調理、摂食などが一般生活環境の中で行われているということである。

したがって、その汚染細菌も、本質的には環境微生物に由来するものであり、具体的には土壌、海水などの中に分布するあらゆる菌種が検討の対象となりうると考えられる。ゆえに、今後の細菌学が食中毒の病因論的研究において果たすべき新しい役割は、一般環境微生物の総合的、毒性論的検討であろう。

文 献

- 1) 東島弘明：食品衛生研究，**30**，778～805（1980）。
- 2) 吉崎悦郎，坂崎利一：食品衛生研究，**30**，93～100（1980）。
- 3) 柳沢謙編：“細菌・真菌検査” p. 241～249（1978），（社）日本公衆衛生協会。
- 4) 藤原喜久夫，桑原祥浩：食衛誌，**11**，342～346（1970）。
- 5) 藤原喜久夫：日本医師会雑誌，**66**，807～813（1971）。
- 6) Spira, W. M., Goepfert, J. M.: Appl. Microbiol. **24**, 341～348（1972）。
- 7) Turnbull, P. C. B.: J. Clin. Path. **29**, 941～948（1976）。
- 8) Glatz, B. A., Spira, W. M., Goepfert, J. M.: Infect. Immunity, **10**, 229～303（1974）。
- 9) Melling, J., Gapel, B. J., Turnbull, P. C. B., Gilbert, R. J.: J. Clin. Path. **29**, 938～940（1976）。
- 10) 山形県衛生部環境衛生課：食品衛生研究，**26**，110～120（1976）。
- 11) 藤原喜久夫：食品衛生研究，**27**，577～587（1977）。
- 12) 藤原喜久夫：食品衛生研究，**28**，541～549（1978）。
- 13) 藤原喜久夫：厚生省委託研究報告書（昭和53年度）。
- 14) 藤原喜久夫：厚生省科学研究費研究報告書（昭和54年度）。