

秋田県に於ける土壤中

Clostridium botulinum の再度分布調査

秋田県衛生科学研究所 小林 運 蔵

金 鉄三郎

児 玉 栄一郎

緒 言

秋田県下に於けるボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*, 以下ボ菌と呼ぶ) の疫学的調査ならびに, 土壤中に於ける分布調査は1953年旧八郎潟沿いの南秋田郡天王町の一農家において, ボ菌E型による食中毒が発生して患者4名に2名の死亡者が出たことに由来する。その後1954年~1964年において児玉, 藤沢ら^{1,2)}は, 県内日本海岸線一帯及び, 雄物川, 米代川, その他主要河川の流域や湖沼周辺の土壤を, およそ7500検体を採取検索したが, その結果ボ菌E型29株, ボ菌A型4株を分離したことを報告している。

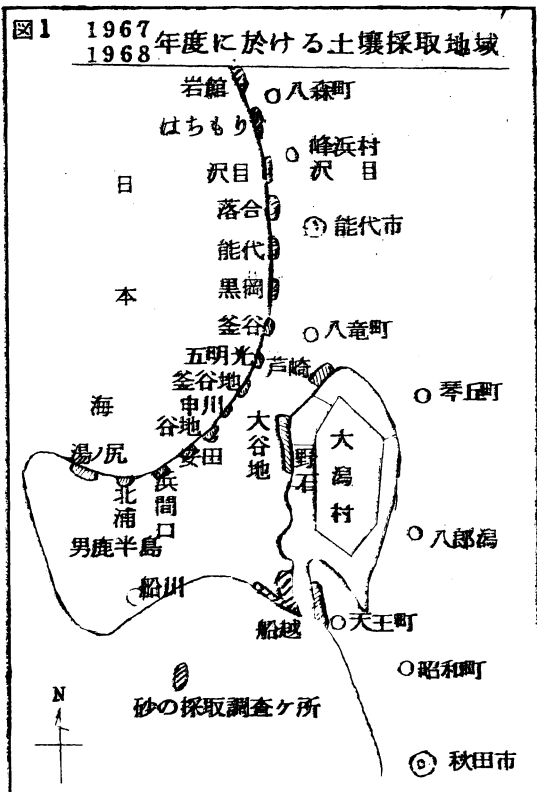
近年県内におけるボ菌による食中毒の発生は, 1961年仙北郡南外村の「さんま飯ずし」による患者16名の内12名の死亡(死亡率75%)事件以来今日まで発生がない。然しながら旧八郎潟の周辺および男鹿半島周辺の海岸線はもとより本県日本海沿岸においてもボ菌が分布していることは文献に明らかなところである。

我々は1965年以降も引き続き調査を行ない, 1965年には土壤1200検体より8株, 1966年には1000検体より22株のボ菌E型を検出したことを報告した。その後我々は1967年から1968年の2ヶ年間に日本海および大潟村周辺の土壤1500検体についてボ菌の分布を調査した結果を報告したい。

I 調査実験の方法

1. 検体の採取地域及び方法

日本海沿岸の男鹿半島北端湯ノ尻より以北



青森県境に至る山本郡八森町岩館海岸までの海岸地帯および男鹿市船越海岸、船越水道両河岸旧八郎潟残存湖岸の一部、主として漁港や船着場附近の土壌を採取した。採取方法は約2m²の範囲を一区画とし、地表より約10~20cm下層数ヶ所から約100gをポリエチレン袋に採取し、これを1検体として、1地域50から100検体を採取した。このようにして図に示した19地域から計1500検体を採取して、検査の対象とした。

2 培養方法

採取した検体は殆んど砂質土壌で、 P^H は概ね5.8~6.8の酸性土壌であつた。これらの各検体約5~7gあて、Bacto Pepton(Difco)加、肝タビオン培地2本に取り60℃に1時間加熱した後急冷して、30℃5日間培養観察後毒素試験を行なつた。

3 毒素試験

① 定性試験

増菌培養した検体5件を1プールとし、その培養液を3500rpm 20分間遠心沈殿その上澄液を体重約20gのマウス2匹におのおの0.5ml宛腹腔内に接種し、3日間観察毒素の有無を判定した。

マウスを斃死させた毒素産生プール菌株は更に単独にProteose pepton(Difco)加、肝タビオンに移植し、30℃5日間培養した後、ボ菌抗毒素血清により中和試験を行なつた。

② 中和試験

前記培養菌液を用い、ボ菌抗毒素血清A・B・Eによる中和試験を行なつた。即ち、ボ菌抗毒素血清A・B・Eの各血清0.3mlに対して等量の培養毒素液を加え、37℃に20分間静置した後、その0.5mlをマウス腹腔内に接種し3日間観察、中和の有無を調べた。

更に中和したボ菌毒素については80℃20分間水浴中に熱を加え、易熱性を確認した。

中和試験の対照としてボ菌E型は天王株を、

AおよびB型は国立予研より分与された株を用いた。

4 分離培養

ボ菌毒素産生株およびボ菌症として疑はしいものについて、更に血液加(綿羊)Brain-Heart Infusion(以下B.H.Iと呼ぶ)寒天培地にボ菌培養液を塗抹、Novy's Jar法により30℃48時間の嫌気性培養を行なつた。

5 抗血清凝集試験

血液寒天分離培養48時間で発育したボ菌落数個から釣菌して、A・B・E抗血清を用い、スライド法で凝集試験を行なつた。

使用抗血清は本県で分離したE天王株、F30株、775株と、北海道衛研から分与されたE211株及びE341株で家兎を免疫した自家製抗血清を用いた。

II 実験成績

採取した土壌1500検体は殆んど砂質で、 P^H は概ね5.8~6.8の酸性土壌であつた。Bacto Pepton加、肝タビオンに増菌の培養上清の毒素実験においてマウスを倒した毒素(+)は64株あり、その中でボツリヌス特有の発症でマウスを斃死せしめたものは23株であつた。然しボ菌抗毒素血清A・B・Eによる中和試験の結果は、E型血清で中和されたもの15株であつたがAおよびB血清で中和されるものは認められなかつた。E型毒素(+)の15検体は80℃20分水浴中加熱により無毒化することが確認された。嫌気性分離培養では前記のボ菌症状でマウスを倒した23件と、(E型抗毒素血清で中和の15株を含む)ボ菌様症状で発症するも、後、消退した7件計30検体は、スライドグラス上でのA・B・E各型抗血清による凝集試験の結果、E型毒素を証明した15例の内9件と毒素産生の認められなかつた4件がいつれも、E型菌抗血清天王株で著明に凝集が認められた。これらについては更にProteose Pepton加、肝タビオンに純粋培養を行なつて毒素産性を確認したが、後者の4株は

表 1 土壌検体採取地域およびボ菌の検出状況

(1967, 1968年)

検体採取場所	検査成績 検体数	増菌培 養上清 毒そ(+)	ボ症特 有発症 でマウ ス致死 例	ボツリ ヌス菌 E型毒 そ中和 件数	ボツリヌスE型陽性株内訳			
					E毒そ(+) E型菌(+)	E毒そ(+) E型菌(-)	E毒そ(-) E型菌(+)	E型(+) 計
山本郡八森町 岩館海岸	50	0						
" 八森 "	50	1						
山本郡峰浜村 沢目 "	50	0						
能代市 落合 "	50	0						
" 能代 "	50	0						
" 黒岡 "	50	0						
山本郡八竜町 釜谷 "	50	2	2					
" 芦崎残存湖	50	7					1	1
南秋田郡琴浜村 五明光海岸	50	0						
" 釜谷地海岸	50	2						
" 申川海岸	50	0						
" 谷地海岸	50	1						
" 大谷地残存湖	50	6	5	1		1	2	3
" 野石残存湖	100	3	1	1	1			1
男鹿市 安田海岸	50	1						
" 浜間口海岸	50	1						
" 北浦海岸	250	6	1	1		1		1
" 湯ノ尻海岸	150	4	1					
" 船越海岸	100	11	4	4	2	2		4
船越水道 東河岸	100	14	6	8	6	2		8
西河岸	50	5	1				1	1
計	1500	64	23	15	9	6	4	19

マウスを倒さず、これらは無毒のボ菌E型と推定された。

これらのE型毒素陽性株の地域的分布状態は表1に示したが、男鹿半島北浦より北方の日本海岸

沿いの地域ではボ菌は認められなかったが、男鹿市北浦海岸に1件、船越海岸4件、船越水道両河岸で9件のボ菌E型を認め、又旧八郎潟残存湖岸では南秋田郡琴浜村に4件、八竜町芦崎に1件が

いづれもボ菌E型であつた。

※ 生物学的性状検査などの成績は引続き検査中のため後日の発表にゆずる。

Ⅲ 考 察

本調査は採取土壤を検体として直接培養を行ない、その上清について毒素産生試験および分離培養を実施したのであるが、ボ菌E型毒素の産生が認められてもE型菌の分離できなかったものもあり、又E型菌と同定されても毒素産生の無い、いわゆる無毒の株もかなり認められた。最初の増菌培養に際して雑菌除去の目的で60℃1時間の加熱処理を行なつたにも拘わらずマウスをたおすものがあつた。これはボ菌以外の嫌気性菌が、或いは数種の雑菌混在の毒素によるものか、あるいはまた土壤中の有害な化学的物質等の影響を受けるものか、いろいろ考えられる。このようなボツリヌス菌以外の毒素でマウスを斃死させた49検体については今後更に検討する予定である。

Ⅳ む す び

採取土壤1500検体中はじめの増菌培養上清でマウスを倒した毒素株は64件あつたが、その後ボ菌抗毒素血清に対する中和試験および嫌気性

分離培養後の抗血清による凝集試験などで、E型菌と同定されたものは19株であつた。又E型菌の地域的分布をみると旧八郎潟周辺残存湖岸の地域で5株であり、船越水道東河岸では最も多く8株が検出された。対岸西河岸では1株であつた。船越海岸では4株、北浦海岸に1株で計19株が検出され、検出率は12.7%であつた。

本県に於けるボツリヌス菌による食中毒のすべてがE型毒素によるものであるが、その原因は本県の各地土壤中にボツリヌス菌があり、それが専らE型菌であるところから、E型菌による中毒が多いと思われる。

我々は今後も更に詳細な分布調査を行ないたい

文 献

- 1) 児玉, 藤沢, 坂本, 秋田県衛生科学研究所報, 8, 15, 1963
- 2) 藤沢, 金, 伊藤, 秋田県衛生科学研究所報 10, 17, 1965
- 3) 児玉, 藤沢, 秋田県衛生科学研究所報, 6 64, 1962
- 4) 秋田県公衆衛生課, 秋田県仙北郡南外村に発生したボツリヌスE型菌毒素による食中毒について, 1963
- 5) 藤沢, 小林, 金, 秋田県衛生科学研究所報 11, 55, 1966