

Ecological Studies on Clostridium botulinum in Ishikawa Prefecture

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8304

石川県におけるボツリヌス菌の生態学的研究

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 中村信一教授)

吉 村 清 人

(平成4年1月13日受付)

石川県の耕作地 (水田, レンコン田, 畑地), 手取川水系, 白山山岳部の土壌におけるボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) の分布, 家畜 (ウシ, ブタ) のボツリヌス菌の保有状況を検討した。ボツリヌス菌の存在の有無は試料をグルコース加肉カス培地で培養し, 培養液中の毒素を検索することにより行った。耕作地土壌においてはC型毒素が, 水田では33試料中2試料 (6.1%), レンコン田では21試料中3試料 (14.3%), 畑地では33試料中3試料 (9.1%) に検出された。また, 畑地ではC型毒素が検出された3試料中1試料においてE型毒素が同時に検出された。手取川では上・下流域共にE型毒素が高頻度に検出され, 下流域では7試料中3試料 (42.9%), 上流域では31試料中10試料 (32.3%) に検出された。C型毒素はわずか1試料 (2.6%) に検出されたにすぎなかったが, B型毒素が3試料 (7.9%) で検出された。山岳部土壌については15試料中3試料 (20%) にE型毒素が検出された。土壌からボツリヌスB, E型毒素産生菌の分離を試みた結果, 定型的な蛋白非分解性B型菌, E型菌が分離された。健康なウシ75頭, ブタ100頭の肝組織を検討した結果, ウシではボツリヌス毒素は検出されなかったが, ブタでは8頭 (8%) にC型毒素が検出された。C型菌保菌ブタが一過性に存在したのか否かを検討するため, C型菌保菌ブタが存在した5養豚場のうちの1つについて, 約2年間にわたり20頭のブタについて調査した。被験20頭全ての肝組織および16頭の盲腸内容物にC型菌の存在が示された。またその養豚場の環境試料 (床堆積物, 汚泥, 敷地内土壌, 隣接水田土壌) にも高率 (62.5%) にC型菌が検出された。以上の結果, 石川県においては湖沼のみならず, 耕作地にもC型菌が広く分布していること, 蛋白非分解性B型菌が水系の土壌において我が国に存在すること, またE型菌の自然環境における増幅については, 海洋説とともに内陸説をも考慮すべきであることが示唆された。さらに, C型菌保菌健康ブタもまた自然環境におけるC型菌の汚染・増幅の一因となっていることが示唆された。

Key words *Clostridium botulinum*, cultivated field, domestic animal, terrestrial theory, type B

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は, 極めて強力な神経毒素を産生することより, ヒトに致命率の高いボツリヌス中毒を引き起こす¹⁾。神経毒素はその抗原性の違いによりA~Gの7型に型別され, 菌自体もその産生する毒素型によりA~Gの7型に分類されている²⁾。

或る地域で発生するボツリヌス中毒の原因菌型は, その地域の土壌に分布している菌型と基本的には一致している³⁾。それ故, ボツリヌス菌の土壌における分布については, 世界を通じて広く検索され, 北米では米国にはA, B型, カナダにはE型, ヨーロッパではA, B型, 中国では新疆地方にはA, B型, チベット地方にはE型が広く分布していることが明らかにされている^{3)~5)}。

我国においては1951年に北海道で「いずし」によるE型ボツリヌス中毒が報告⁶⁾されて以来, E型菌は水系の菌であるところから海岸を含めた河川下流域, 湖沼土壌を中心に本菌の分布が検索され, E, C型が広く存在することが明らかにされた³⁾⁵⁾。石川県の土壌におけるボツリヌス菌の分布については, 湖沼について詳細に検討され, C型菌が極めて濃厚に存在すると報告されている⁸⁾。しかしながら, 石川県をも含めて, 河川上流域, 耕作地土壌におけるボツリヌス菌の存在については充分

な解明がなされないまま取り残されている。

ボツリヌス菌の自然界における汚染・増幅については, 土壌中における増殖に加うるに, 動物の腸管内で増殖し, 排泄され, 土壌に蓄積されることが考えられ, CおよびD型菌については鳥が原因動物と考えられている^{3)8)~10)}。

以上の点を鑑み, 更にE型菌が河川下流域, 湖沼に多いのは内陸部に存在するE型菌が水流により運ばれ蓄積したことによるという考え (E型菌内陸説)¹¹⁾をも考慮し, 本研究では畑地, 水田等の耕作地, 河川上流域, 山岳部土壌におけるボツリヌス菌の分布を検索した。また, ボツリヌス菌の自然界における汚染・増幅における鳥以外の動物の意義を明らかにすることを目的とし, ウシ・ブタの肝臓, 腸管およびその周辺土壌におけるボツリヌス菌の存在について検討した。

材料および方法

I. 土壌および動物試料

1. 土壌試料

表層より10cmの深さの土壌約100gを滅菌ポリ容器に採取し, 4℃で保存した。耕作地土壌は, 1984年4月に石川県内各々10km~20km離れた33地点において水田および畑地より

Abbreviations: CMG, chopped meat-glucose medium; IU, international unit; MLD, minimum lethal dose; PBS, phosphate-buffered saline

採取した(図1)。また、1984年6月熊本県産辛子レンコンによるA型ボツリヌス中毒が発生¹²⁾したため、1984年8月、金沢市内のレンコン田地域から21個の土壌試料を数100m間隔で採取した。

河川土壌は、1986年から1988年にかけて、手取川の下流域(鶴来町より下流)7地点、上流域(鶴来町より上流)の本・支流の31地点より採取した(図2)。各地点間の距離は数km~10kmであり、水際より数m離れた場所の土壌を採取した。

山岳土壌として手取川水系の水源である白山山岳部の土壌を別当出合から山頂に至るまで数100m~数km間隔で採取した。1988年8月、白山(標高2,702m)の標高1,000mから2,700mの12地点および白山の前峰である砂御前山(標高1,326m)の3地点より採取した。

2. 動物試料

1) 被験動物

1986年12月から1987年1月に石川県金沢食肉流通センターへ搬入された石川県産の健康なウシ75頭、およびブタ100頭について検討した。ウシは18農場で、ブタは36養豚場で飼育されていたものであった(図3)。ウシ、ブタともに一農場当たり1~7頭を検討した。

また1987年2月から1988年11月の間に特定養豚場(Tおよび

K養豚場)から搬入された健康なブタ計30頭についても検討した。

これらのウシは18~28月齢、体重650~750kg、ブタは6~7月齢、体重約80kgであった。

2) 被験試料

ウシでは屠殺後30分以内に、ブタでは10分以内に肝臓(ウシは右葉、ブタは外側右葉)を摘出し、火焰滅菌したステンレスバット内で滅菌ナイフとピンセットにて肝表層部を無菌的に取り除いた後、組織を約2cm角に細切し、その約10gを滅菌ポリ容器に採取した。盲腸内容物は、滅菌採便管に約10g採取した。被験試料は-80℃で凍結保存した。

3) 養豚場の環境試料

動物試料と共に養豚場環境中の試料も採取した。1989年2月および11月にTおよびK養豚場にて計56試料を採取した。採取試料は、豚房(飼育室)の床堆積物、豚房からの排水路汚泥、養豚場敷地内の深さ15cmの土壌および養豚場敷地に隣接する水田の深さ15cmの土壌(敷地の端より5m離れた地点)である。

II. 毒素産生用培地および培養

被験試料中のボツリヌス菌の証明は、Yamakawaら⁵⁾の方法に従い試料をグルコース加肉カス培地(chopped meat-glucose medium, CMG培地)¹³⁾で培養し、培養液中のボツリヌス毒素を検出することにより行った。CMG培地は、牛肉抽出液に20%(v/v)肉カス、3%トリプテケースペプトン(Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, USA)、0.5%酵母エキス(Difco Laboratories, Detroit, USA)、0.5%KH₂PO₄、0.05%システインー塩酸一水化物、0.0005%ヘミン溶液(和光、大阪)、0.0001%ビタミンK₁(和光)、0.01%レサズリン(和光)を添加

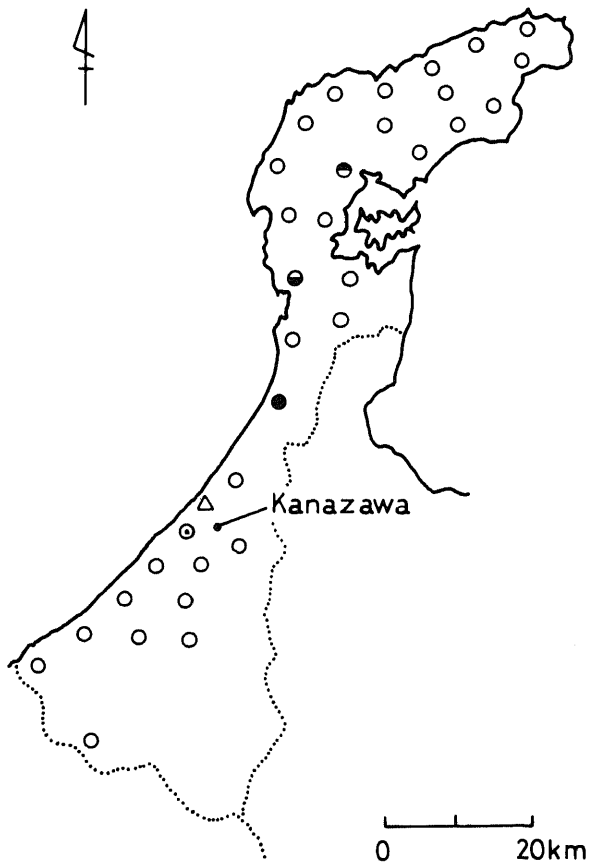


Fig. 1. Location of sampling sites of cultivated fields. ○, botulinum toxin-negative site in both fields of rice and other crops; ⊙, C₁ toxin-positive site in rice field; ⊕, C₁ and C₂ toxin-positive site in field of other crops; ⊖, C₁ and type E toxin-positive site in field of other crops; ●, C₁ toxin-positive site in both fields of rice and other crops; △, area of lotus field.

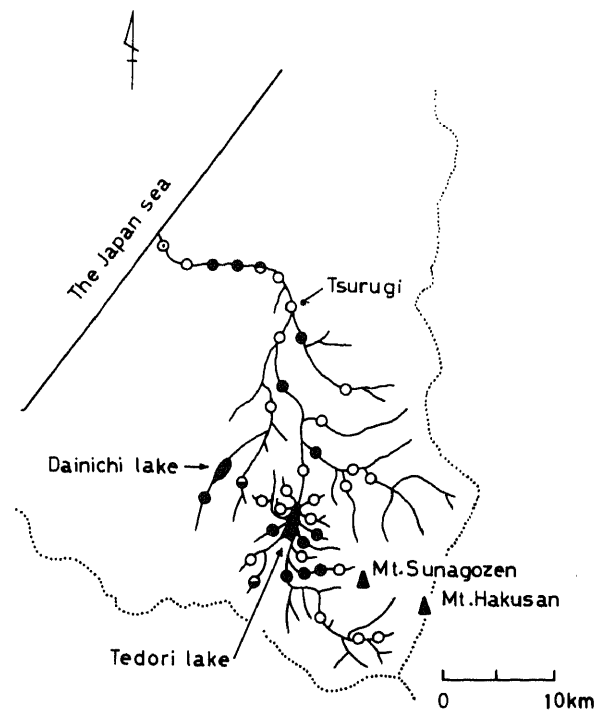


Fig. 2. Location of sampling sites of the Tedoru river system. ○, botulinum toxin-negative site; ⊙, C₁ toxin-positive site; ⊕, types B and E toxin-positive site; ⊖, type B toxin-positive site; ●, type E toxin-positive site.

し、pH 7.0に調整した後、10ml ずつ試験管 (16×160mm) に入れ、気相を窒素ガスに置換した後ブチルゴム栓をして高圧蒸気滅菌 (121℃, 15分) した。グルコースは被験試料の接種直前、炭酸ガス噴射下で終濃度0.5%になるように加えた。

被験試料 1g を炭酸ガス噴射下で CMG 培地に接種した。土壌試料、床堆積物試料、汚泥試料は加熱することなく (非加熱培養)、動物試料 (肝臓、盲腸内容物) は非加熱および60℃, 30分間加熱後 (加熱培養)、30℃, 5日間培養を行った。

Ⅲ. ボツリヌス毒素の検出

ボツリヌス毒素の検出は、マウス (ddY, オス, 4週齢) (日本エスエルシー, 静岡) を用い、致死毒性試験および毒素中和試験により行った⁹⁾。即ち、培養液を一夜凍結 (-20℃) 後室温で融解し、5,000xg, 10分間遠心して得られた上清を被験液とした。

被験液を、0.25ml ずつ2匹のマウスに腹腔内注射し、3日以内にマウスが斃死した場合、致死毒性陽性とした。致死毒性陽性の被験液については、50mM 磷酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2) (phosphate-buffered saline, PBS) で10倍段階希釈の後、マウスに接種し最小致死量 (minimum lethal dose, MLD)/ml を求めた。被験液のトリプシン処理は、被験液と等量の0.5%トリプシン溶液 (トリプシン 1:250 (Difco Laboratories) を pH 6.5の PBS に溶解した) を混合し、37℃, 30分間インキュベーションすることにより行った。また、トリプシン処理被験液 0.5ml を

マウス腹腔内に注射することにより致死毒性を調べた。MLD は、被験液をトリプシン処理後、トリプシン無処理の場合と同様、pH 7.2 の PBS で10倍段階希釈して求めた。

被験液に含まれるボツリヌス毒素の血清型の決定は、ボツリヌス A, B, C (C₁ および C₂), D, E, F 型特異的抗毒素血清 (千葉県血清研究所, 千葉) による中和試験により行った。中和試験は、抗毒素血清 4 国際単位 (international unit, IU)/ml (D 型のみ 40IU/ml) と被験液を等量混合し、37℃, 30分間保温後マウス腹腔内に混合液 0.5ml を注射し、マウスの生死を観察することにより行った。マウスが5日間生存した場合、被験毒素を中和したと判定した。単独の抗毒素血清によって中和されない場合には、複数の抗毒素血清を組み合わせて再試験した。トリプシン処理被験液の場合は、被験液 0.4ml に1%トリプシン溶液 0.2ml を加え、37℃, 30分間保温後、抗毒素血清 (8IU/ml) 0.2ml と混合し、更に37℃, 30分間保温後その 0.5ml をマウス腹腔内に注射した。

中和試験によりボツリヌス毒素の存在が証明された試料についてはボツリヌス毒素、ボツリヌス菌陽性と判定した。

Ⅳ. 蛋白非分解性ボツリヌス菌の分離

蛋白非分解性 B 型ボツリヌス菌および E 型ボツリヌス菌の分離は、以下の方法で行った。土壌試料 1g を B 型菌の場合には D-サイクロセリン (250 μg/ml) (Sigma, St. Louis, USA) を含む CMG 培地に、E 型菌の場合には D-サイクロセリンを含まない CMG 培地に接種し、30℃, 5日間培養した後、培養菌液を還元後滅菌した希釈液¹⁰⁾ (pre-reduced anaerobically sterilized diluent) にて 10⁵ 倍および 10⁶ 倍希釈し、その 0.1ml を卵黄加普通寒天平板に塗布した。卵黄加普通寒天平板は、嫌気ジャーで一夜保存したものをを用いた。植菌した平板は、少量のシリカゲルと共に嫌気ジャーに入れ気相を80%水素ガス・20%炭酸ガスの混合ガスに置換し、25℃で3~4日間嫌気培養した。培養後、集落の周辺にレンチネース環と真珠層をもつ蛋白非分解性ボツリヌス菌様集落を肝片加肝ブイオンに釣菌し、25℃, 2日間培養した。肝片加肝ブイオン培養において、ガスを発生した菌株は、CMG 培地に植菌し30℃, 3日間培養した後ボツリヌス毒素産生の有無を検討した。

Ⅴ. 生化学性状試験

分離菌株の糖分解性状は Nakamura ら¹⁰⁾ の方法により行った。基礎培地 (2%プロテアーゼペプトン No. 2 (Difco Laboratories), 0.5% NaCl, 0.05%システイン塩酸塩一水化物, 0.1%寒天, pH 7.2) に被験糖を1%に加えた後、肝片加肝ブイオンで16時間前培養した菌液 0.1ml を植菌した。37℃, 7日間培養後、培養液の pH を測定して糖分解性を判定した。

ゼラチン液化能は Nakamura ら¹⁰⁾ の方法、またカゼイン消化能、牛乳消化能、肉片消化能、インドール産生能、硝酸還元能、エスクリン水解能、デンプン水解能、代謝脂肪酸の解析は Holdeman ら¹⁰⁾ の方法に従った。

成 績

Ⅰ. 石川県の土壌におけるボツリヌス菌の分布

石川県の耕作地、河川、山岳土壌におけるボツリヌス菌の分布を検討した (表 1)。各土壌試料共、5本ずつ培養を行い、いずれかの培養にボツリヌス毒素が証明された時その土壌試料についてはボツリヌス毒素陽性と判定した。

1. 耕作地 (図 1)

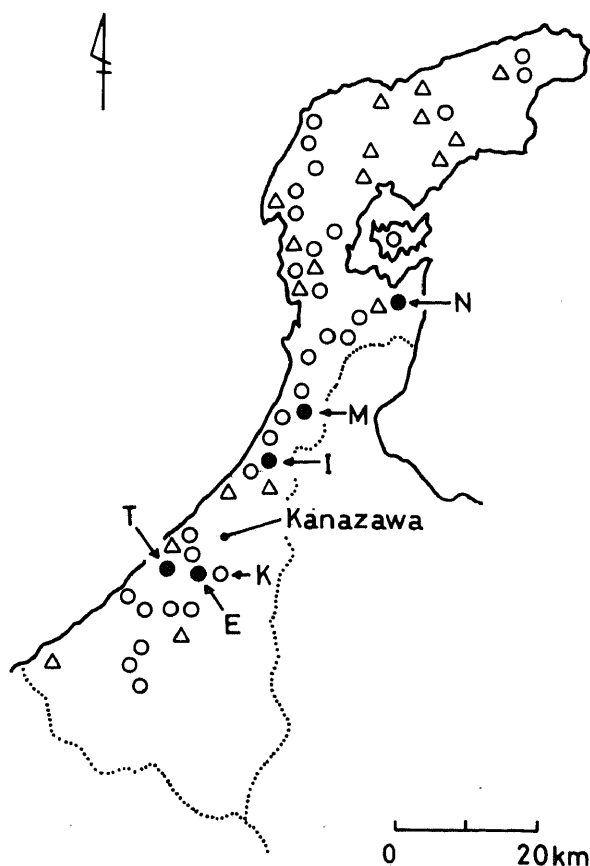


Fig. 3. Location of farms of swine (O, ●) and cattle (△). Swine from farms (●) T, E, I, M and N carried *C. botulinum* type C in their liver and those from the others (O) did not. An additional study was conducted on farms T and K.

Table 1. Distribution of *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) in Ishikawa Prefecture

Source of soil specimen	Number of soil specimens tested	Number (%) of specimens with botulinum toxin ^{a)} of type					
		B	B & E	C ₁	C ₁ & C ₂	C ₁ & E	E
Cultivated field							
Rice field	33	0	0	2(6.1)	0	0	0
Lotus field	21	0	0	3(14.3)	0	0	0
Field of other crops	33	0	0	1(3.0)	1(3.0)	1(3.0)	0
The Tedor river ^{b)}							
Lower part	7	0	1(14.3)	1(14.3)	0	0	2(28.6)
Upper part	31	2(6.1)	0	0	0	0	10(32.2)
Mountainous district							
Mt. Hakusan	12	0	0	0	0	0	1(8.3)
Mt. Sunagozen	3	0	0	0	0	0	2(66.7)

a) Five 1-g portions from each specimen were cultivated without pre-heating and tested for botulinum toxins.

b) Lower part, between Tsurugi and the mouth of the river; upper part, upper reaches from Tsurugi.

水田土壌33試料, レンコン田土壌21試料においては C₁ 毒素のみが各々 2 試料 (6.1%), 3 試料 (14.3%) に検出された。他の作物の畑地土壌 (33試料) では C₁ 毒素に加うるに C₂ 毒素, E型毒素が検出された。即ち C₁ 毒素が検出された 3 試料 (9.1%) 中各々 1 試料において C₂ 毒素・E型毒素が同時に検出された。

2. 河川土壌 (図 2)

石川県を流れる最大の河川である手取川の本・支流から採取した土壌38試料について検討した。13試料 (34.2%) より E型毒素が検出され, 3 試料 (7.9%) より B型毒素, 1 試料 (2.6%) より C型毒素 (C₁ 毒素) が検出された。

E型毒素陽性試料は, 手取川の本・支流を問わず広く分布していた。手取川の下流域では 7 試料中 3 試料 (42.9%) で, 上流域では 31 試料中 10 試料 (32.3%) で E型毒素が検出された。E型毒素が検出された最上流地点は, 標高 1,000m の山岳部の渓流であった。

B型毒素が検出された土壌は, 上流域の 2 試料および下流域の 1 試料であったが, いずれの試料においても毒素の検出にはトリプシン処理が必要であった。なお, B型毒素が検出された下流域の 1 試料では, E型毒素も同時に検出された。

C型毒素が検出された土壌は手取川の河口まで約 1 km の場所から採取したものであり被験土壌中河口に最も近い所に位置していた。

3. 山岳部土壌

手取川の水源地である白山の 12 試料, 砂御前山の 3 試料, 計 15 試料について検討したところ, 白山の 1 試料 (標高 1,750m) および砂御前山の 2 試料 (いずれも標高 1,000m) 計 3 試料 (20%) より E型毒素が検出された。

II. 河川土壌からのボツリヌス B型菌および E型菌の分離

B型毒素の検出された手取川上流域の 1 土壌試料から B型菌の分離を試みた。まずボツリヌス菌は孢子形成菌である点を利用して, 土壌中の孢子非形成菌を殺菌し, 孢子を選択すべく土壌を 60℃, 30分間加熱した後培養を行った。しかしながらこの培養法では B型毒素は検出されなかった。即ち, 土壌中に存在

Table 2. Cultural and biochemical properties of the isolates from soil specimens in the Tedor river

Property	<i>C. botulinum</i> isolate	
	Type B (3) ^{a)}	Type E (4)
Lecithinase production	3 ^{b)}	4
Lipase production	3	4
Toxicity (MLD/ml)	10 ⁵	10 ² —10 ⁴
Motility	3	4
Gelatin liquefaction	2% 10%	3 4 0
Digestion of		
Casein, milk, meat	0	0
Indol production	0	0
Nitrate reduction	0	0
Sugar fermentation		
Adonitol, dextrin, fructose, glucose, glycerol, maltose, mannose, ribose, sorbitol, starch, sucrose, trehalose	3	4
Glycogen	3	3
Inositol	0	3
Arbutin, cellobiose, melezitose, salicin	0	1
Other 13 sugars ^{c)}	0	0
Hydrolysis of		
Esculin, starch	0	0

a) Number of isolates tested.

b) Number of reaction-positive isolates.

c) Amygdalin, arabinose, dulcitol, erythritol, esculin, galactose, inulin, lactose, mannitol, melibiose, raffinose, rhamnose and xylose.

するB型毒素産生菌は、耐熱性の弱い孢子を形成する菌であることが示唆された。以上の孢子の性状、および前述の如く毒素はトリプシンにより活性化されることなどから、土壌中のB型毒素産生菌は蛋白非分解性B型菌であることが示唆されたので本菌の分離を試みた。土壌1gをD-サイクロセリン加CMG培地で非加熱培養したところ、培養液は、トリプシン処理後400MLD/mlの毒性を示した。この毒性は、毒素中和試験によりB型毒素であることが分った。この培養菌液を卵黄加普通寒天平板で培養後、蛋白非分解性ボツリヌス菌様集落を54個釣菌した。このうち肝片加肝ブイオンにおいてガスを発生した36株について毒素産生性を検討したところ、5株がB型毒素を産生することが分った。なお蛋白分解性ボツリヌス菌様集落(レンチネース環を欠く集落)は卵黄加普通寒天平板上に認められなかった。

E型毒素が培養により検出された土壌試料のうち手取川上流域および下流域で採取されたそれぞれ1土壌試料を選びE型菌の分離を試みた。B型菌分離の方法に準じ(但しCMG培地は、D-サイクロセリンを含まないものを使用した)蛋白非分解性ボツリヌス菌様集落を分離した。上流域からの1試料では、肝片加肝ブイオンにおいてガスを発生した18株のうち14株が、また下流域の1試料においては、同じく16株のうち1株がE型毒素を産生した。

ボツリヌスB型およびE型毒素産生分離菌株の培養、生化学性状を表2に示した。これらの分離株は $10^2 \sim 10^5$ MLD/ml(ト

リプシン処理後)の致死毒性を示した。またいづれの分離株も、カゼイン水溶性、牛乳消化能、肉片消化能は陰性であり、また代謝脂肪酸の産生パターンも分離株全て同一であり、酢酸および酪酸を産生した。ゼラチン水溶性は弱陽性であった。他の性状においては、糖分解性状においてE型分離株がイノシトール分解陽性(4株中3株が陽性)を示した以外はほとんど相違は認められなかった。

Ⅲ. 家畜におけるボツリヌス菌の検索

1. 健康なウシ、ブタの肝臓中のボツリヌス菌

石川県産の健康なウシ75頭およびブタ100頭の肝臓におけるボツリヌス菌の存在について検討した。各肝組織の1gは非加熱培養し、別の1gは加熱培養した。

ウシ肝組織においては、加熱培養、非加熱培養を問わずいづれの試料からもボツリヌス毒素は検出されなかった。ブタの肝組織においては、加熱培養において毒素は検出されなかったが、非加熱培養において8頭(8%)においてC型毒素が検出された。即ち、C₁毒素が3頭に、C₂毒素が5頭において検出された。C₁毒性は、3頭ともに16MLD/mlを示し、トリプシン処理により不活化された。C₂毒性は、トリプシン処理をしない場合は極めて低値か、検出されなかったが、トリプシン処理をすることにより40~4,000MLD/mlの毒性を示した。

C型菌を保有した8頭のブタは調査した36養豚場のうち5養豚場に分布していた(図3)。その詳細は、T養豚場で被験6頭中4頭、E養豚場では6頭中1頭、I、M、N養豚場では、そ

Table 3. Demonstration of *C. botulinum* in liver and caecal contents of healthy swine of farms T and K

Farm	Date of sampling	Number of swine tested	Number of swine having type C organism in				
			Liver		Caecal content		
			C ₁ & C ₂	C ₂	C ₁ & C ₂	C ₁	C ₂
T	Feb., 1987	5	3	2	1	0	2
	Jun., 1987	5	0	5	1	0	3
	Jun., 1988	5	3	2	2	0	3
	Nov., 1988	5	0	5	1	1	2
K	Feb., 1987	5	0	0	0	0	0
	Jul., 1988	5	0	0	0	0	0

Table 4. Demonstration of *C. botulinum* type C in environmental specimens of farms T and K

Farm	Specimen	Date of sampling	Number of specimens tested	Number of type C toxin ^{a)} -positive specimens		
				C ₁ & C ₂	C ₁	C ₂
T	Floor deposits	Feb., 1989	9	5	2	1
	Sewage	Feb., 1989	8	1	1	1
	Soil of premises	Feb., 1989	6	0	5	0
		Nov., 1989	6	0	4	0
	Soil of adjacent rice field	Feb., 1989	11	0	2	3
K	Soil of premises	Nov., 1989	4	0	0	0
	Soil of adjacent rice field ^{b)}	Nov., 1989	12	0	0	0

a) Five 1-g portions from each specimen were cultivated without pre-heating and tested for botulinum toxins.

b) Type E toxin was detected in one specimen.

それぞれ3頭中1頭がC型菌を保有していた。

2. 特定養豚場におけるC型菌の保有状況

C型菌を保有する豚の存在がその養豚場における一過性の現象か否かを検討した。C型菌の高度な汚染が示唆されたT養豚場、C型菌陽性の豚が存在しなかったK養豚場を被験養豚場として選び、1987年から約2年間にわたりTおよびK養豚場のそれぞれ20頭、10頭のブタの肝組織および盲腸内容物についてC型菌の存在を検討した。肝組織については、先の実験において加熱培養はC型毒素の検出に有用でないことが示されたので、非加熱培養のみを行った。培養は1gの肝組織を5本行った。盲腸内容物については1gの培養を加熱培養で5本、非加熱培養で5本行った。

T養豚場で飼育されたブタについては、いずれの時期のブタにもその肝組織には、全例にC型毒素が検出された。即ち、6頭よりC₁およびC₂毒素が、14頭より、C₂毒素が検出された(表3)。盲腸内容物においては、16頭(80%)にC型毒素が検出された。即ち、C₁およびC₂毒素、C₁毒素、C₂毒素がそれぞれ5頭、1頭、10頭において検出された。培養前の盲腸内容物の加熱処理は、肝組織の場合と異なり毒素の検出に有効であった。毒素陽性の16頭の盲腸内容物については、C型毒素は加熱培養では15頭(93.8%)で検出されたが、非加熱培養では8頭(50%)で検出されたにすぎなかった。

K養豚場で飼育されたブタについてはT養豚場とは対照的であり、被験10頭のいずれにおいても肝組織および盲腸内容物からは毒素は全く検出されなかった。

環境由来の試料については、1gの非加熱培養を計5本行った。T養豚場において1989年2月に採取した床堆積物、排水路汚泥、敷地内土壌、隣接水田土壌のいずれからもC型毒素が検出され、合計34試料のうち21試料(61.8%)にC₁およびC₂、C₁、あるいはC₂毒素が検出された(表4)。被験6試料中5試料にC₁毒素が検出された養豚場敷地内土壌試料については、1989年11月に再度採取し検討したが、6試料中4試料に引き続きC₁毒素が検出された。K養豚場に関しては、養豚場敷地内土壌、隣接水田土壌について検討したが、ボツリヌス毒素は検出されなかった。

考 察

ボツリヌス菌は産生する毒素の型によってA～G型の7型に分類されており、ヒト、鳥類、家畜等各種の動物にボツリヌス症を引き起こす¹⁾。

ヒトのボツリヌス症は発症機序により、食餌性ボツリヌス症、乳児ボツリヌス症、創傷性ボツリヌス症、分類不能ボツリヌス症の4型に分類されるが、後2者は希である¹⁾。

最も古くから知られている普通の型は食餌性ボツリヌス症であり、食品の保存中に産生された毒素の摂食で起こる。本症においては、A、B、E、F型菌が起因菌であると一般には考えられている²⁾。C型菌に関しては本菌が疑われた症例も希ではあるが報告されており、C型菌もまた食餌性ボツリヌス症を引き起こす可能性が考えられる^{15)~17)}。我国においては1951年北海道で「いずし」によるE型中毒が報告⁹⁾されて以来、主として「いずし」によるE型中毒がしばしば発生している¹⁸⁾。

乳児ボツリヌス症は1976年米国で発見された病型である¹⁹⁾。経口摂取されたボツリヌス菌胞子が乳児の腸管内で発芽・増殖し、産生された毒素による中毒である。判明した唯一の原因食

品は蜂蜜であり、ほとんどの症例はA型かB型菌である^{20)~22)}。我国においては1986年に初めての症例が千葉県で確認された²³⁾。その後10例余が報告されているが、最近C型菌による症例が報告され²⁴⁾、C型菌もまた本症の原因となり得ることが示唆された。

ボツリヌス症の原因菌型は基本的には本症発生地域の土壌中に存在する菌型と一致する¹⁾。我国においては「いずし」のE型菌による汚染をもたらした原因は魚であることから、海岸(海底)、湖沼、河川下流域を中心にボツリヌス菌の検索が広く行われてきた。その結果、北海道、東北地方の海岸(海底)、湖沼、河川にE型菌、関東、近畿ではC型菌、琵琶湖北部にはE型菌が分布する等、我国の水系土壌にはC、E型菌が広く存在することが明らかとなった^{25)~27)}。

石川県の土壌におけるボツリヌス菌の分布については、湖沼について詳細に検討され、C型菌が濃厚に存在すると報告されている⁹⁾。最近、芹川ら²⁸⁾は浅野川、犀川の中流域にはE型菌が存在したと報告している。

E型菌が海岸(海底)、湖沼、河川下流域の土壌に高率に検出されることについては、その存在場所の土壌(泥)中や魚の体内で増殖したとする考え(海洋説)^{29)~31)}と内陸部に存在するE型菌が水流により運ばれ蓄積したとする考え(内陸説)^{31)~32)}が唱えられている。また、C型菌の自然界における増幅については鳥が重要な役割を果たしていると考えられている³³⁾。

以上の鑑点から、本研究では石川県の耕作地、手取川、白山の土壌、家畜(ウシ、ブタ)におけるボツリヌス菌の存在について検討した。

耕作地としては、水田、レンコン田、畑地土壌各々33、21、33試料について検討した。C型毒素が水田、レンコン田、畑地土壌各々2(6.1%)、3(14.3%)、3試料(9.1%)に検出され、石川県においてはC型菌による汚染は湖沼のみならず、耕作地にまで及んでいることが明らかとなった。また畑地土壌については1試料にE型毒素が検出され、水系の菌と一般に考えられているE型菌は畑地にも広く分布している可能性が示唆された。

手取川の土壌については河口近くから、水源に近い上流域の本・支流に至る合計38試料について検討した。E型毒素が下流域・上流域を問わず高率に検出され、検出率は34.2%であった。この結果はE型菌の内陸説を支持するように思われた。従来の内陸説では内陸部の水系土壌にE型菌の増幅の場を求めるものであり、この際魚の屍体等がE型菌の増幅に重要な役割を演ずるものと考えられる。著者は内陸説に関し、水棲動物以外にE型菌の増殖の場がある可能性を考え白山山岳部の土壌の検索を行なった。その結果山岳部土壌においても20%の割合にE型毒素が検出された。肥料を与えられていない土壌においてはE型菌は増殖しない¹⁾、あるいはマウスの屍体においてはE型菌胞子が発芽・増殖²⁷⁾することなどから、ネズミその他の陸棲小動物の屍体が内陸地域におけるE型菌の増幅に主要な役割を演じているものと考えられる。結局、E型ボツリヌス菌は内陸陸上地域においては陸棲小動物、内陸水系地域においては魚等を増殖の場とし、水流と共に、海、湖沼に流れ込み、さらに泥、魚等で増殖し、その結果海岸(海底)、湖沼が高度にE型菌により汚染されるものと考えられる。

本研究において手取川の河川土壌よりB型毒素が検出され、蛋白非分解性B型菌の分離に成功した。先述の如く我国の土壌

にはC, E型は広く分布しているが, その他の型については数試料にA型菌, F型菌が検出されたにすぎず²⁰⁾, 土壌よりのB型毒素の検出および菌の分離は, これまでに例がない. 蛋白非分解性B型菌の生態は世界的にも全く知られていないが, 河川土壌よりE型菌と共に分離されたことから, E型菌と類似した水系土壌の菌として存在している可能性がある. この様な蛋白非分解性B型菌の分布が手取川に特有なものなのか今後他の河川においても検討が必要である.

従来ボツリヌス毒素を産生する菌はボツリヌス菌のみであるとみなされていたが, 最近E型毒素を産生する *Clostridium butyricum*³⁰⁾, F型毒素を産生する *Clostridium barati*³¹⁾が報告された. そこで, 本研究においてE型毒素, B型毒素がその培養液中に検出された土壌から各毒素を産生する菌の分離を試みた. 最初, 蛋白分解性A・B型菌の分離法⁵⁾に準じて, 土壌を直接卵黄加普通寒天平板に塗布することにより分離を試みたが分離できなかった. そこでCMG培地にて増殖させた後に卵黄加普通寒天平板に塗布した結果, E型菌は分離できた. しかしながらB型菌については不成功に終わった. A, B, F, G型菌の糞便からの分離にはサイクロセリン, スルファメトキサゾール, トリメトプリム添加培地が有効であるとの報告³²⁾に基づき, サイクロセリン添加CMG培地にて増殖させた後に卵黄加普通寒天平板に塗布した結果, B型菌を分離することができた. 分離B, E型毒素産生菌の性状は成書²¹⁾記載の蛋白非分解性B, E型ボツリヌス菌の性状と一致し, 石川県土壌中にはB, E型ボツリヌス菌が存在することが確認された.

健康な家畜の肝臓においては, C型菌は極めて希にしか存在しないとされている. Müller³³⁾は, デンマークで飼育された健康なウシ, ブタそれぞれ100頭の肝組織を培養法により検索し, ウシ, ブタそれぞれ4%, 3%の割合でC型毒素を検出した. 本研究において著者は, 健康なウシ75頭, ブタ100頭の肝組織について検討した. C型毒素はウシでは検出されなかったが, ブタでは8頭(8%)に検出された. 本研究においては, わずか1gの肝組織しか用いていないことを考慮すれば, 本研究で対象としたブタにおけるC型菌の保有率は, デンマークの成績と較べかなり高いものであると思われる. Serikawaら⁸⁾の研究, および本研究で示された如く石川県の土壌には耕作地を含めC型菌が広く存在することが考えられ, このことが上記結果の主要な原因であると思われる.

デンマークの耕作地土壌では, C型およびD型菌の検出率はわずか2%であるのに対し, B型菌は30%である³⁴⁾. しかし肝臓中に証明されるボツリヌス菌はC型菌のみであった³⁵⁾. また, 本研究において肝臓中にC型菌を保有するブタのほとんどが同時に腸管にもC型菌を保有することが分かった. これらのことはC型菌はブタでは消化管から肝臓まで達しやすいことを示唆しているように思われる.

最初の検索でC型菌を保有しているブタが高率に存在したT養豚場については, さらに2年間にわたり検討した結果, 被験20頭のブタ全てにおいてC型毒素が検出された. また, その養豚場の床堆積物, 敷地内土壌, 隣接水田土壌にもC型菌の存在が示された. 一方, C型菌を保有しているブタが存在しなかったK養豚場については, その環境にもC型菌は存在しなかった. 以上の所見は, ブタ腸管内のC型菌は糞便中に排泄され豚舎内を汚染し, 再びブタに摂食されるという増幅サイクルが起こっていることを示唆している. また, このようなC型菌の増

幅サイクルが養豚場環境の土壌のC型菌による汚染の原因となり, さらに汚染が広がって行くものと考えられる. 即ち, 鳥に加うるにC型菌保菌健康ブタもまた自然界におけるC型菌の汚染・増幅の一因となっていることが考えられる.

結 論

石川県の耕作地(水田, レンコン田, 畑地), 河川(手取川), 山岳部(白山)土壌, 家畜(ウシ, ブタ)の肝臓, および養豚場環境におけるボツリヌス菌の存在について培養法により検討を行い, 以下の結果を得た.

1. 水田土壌33試料, レンコン田21試料, 畑地土壌33試料においてC型毒素が各々2(6.1%), 3(14.3%), 3(9.1%)試料に検出された. また畑地土壌1試料においてE型毒素がC型毒素と共に検出された.

2. 手取川の本・支流から採取した土壌38試料中13試料(34.2%)にE型毒素が検出された. E型毒素陽性試料は河口から水源近くまで広く分布していた. また, 3試料(7.9%)よりB型毒素, 1試料(2.6%)よりC型毒素が検出された.

3. 山岳部土壌15試料中3試料(20%)よりE型毒素が検出された.

4. 河川土壌からボツリヌスB型毒素, E型毒素産生菌を分離し, その性状を検討した結果, 各々蛋白非分解性B型, E型ボツリヌス菌であることが分かった.

5. ウシ75頭, ブタ100頭の肝臓を検討した結果, ウシではボツリヌス毒素は検出されなかったが, ブタ8頭にC型毒素が検出された.

6. C型菌を保有するブタの存在する養豚場について2年間にわたりブタのC型菌保有状況を検討した結果, 被験20頭全てにC型菌の存在を認めた.

7. また, C型菌を保有するブタの存在する養豚場環境には, 高濃度にC型菌が存在することが分かった.

以上の結果は, 石川県においては湖沼のみならず, 耕作地にもC型菌が広く分布していること, 蛋白非分解性B型菌が水系の土壌において我国に存在すること, また, E型菌の自然環境における増幅については, 海洋説とともに内陸説を考慮すべきであることを示唆している. さらに, C型菌保菌健康ブタもまた自然環境におけるC型菌の汚染・増幅の一因となっていることを示唆している.

謝 辞

稿を終るに臨み, 終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜りました恩師中村信一教授に深甚なる謝意を表します. また実験の遂行にあたり多大な御協力を戴いた微生物学教室山川清孝講師をはじめ微生物学教室の諸先生方に深謝いたします. さらに, 動物試料の採取に御協力いただいた金沢市食肉検査所の先生方に深く感謝いたします. 白山国立公園特別保護地域内土石の採取については, 環境庁との協議(昭和63年7月15日付け環自中許第290号)を経ており, 付記して感謝いたします.

文 献

- 1) Smith, L. DS.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria, 2nd ed., p203-229, Charles C Thomas Publisher, Springfield, 1975.
- 2) Cato, E. P., George, W. L. & Finegold, S. M.: *Clostridium*. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriol-*

- ogy, vol.2, p1141-1200, Williams & Wilkins, Baltimore, 1986.
- 3) Smith, L. D.S.: Botulism, p91-112, Charles C Thomas Publisher, Springfield, 1977.
 - 4) Gao, Q. Y., Huang, Y. F., Wu, J. G., Liu, H. D. & Xia, H. Q.: A review of botulism in China. Biomed. Environ. Sci., 3, 326-336 (1990).
 - 5) Yamakawa, K., Kamiya, S., Nishida, S., Yoshimura, K., Yu, H., Lu, D. & Nakamura, S.: Distribution of *Clostridium botulinum* in Japan and in Shinking district of China. Microbiol. Immunol., 32, 579-587 (1988).
 - 6) 中村 豊, 飯田広夫, 中尾良吉: ボツリヌスの疑い濃き食中毒例について. 食品衛生研究, 2, 7-12 (1952).
 - 7) Azuma, R. & Itoh, J.: Botulism in water fowl and distribution of *C. botulinum* type C. In M. W. Eklund & V. R. Dowell (eds.), Avian Botulism, p167-187, Charles C Thomas Publisher, Springfield, 1987.
 - 8) Serikawa, T., Nakamura, S. & Nishida, S.: Distribution of *Clostridium botulinum* type C in Ishikawa Prefecture, and applicability of agglutination to identification of nontoxigenic isolates of *C. botulinum* type C. Microbiol. Immunol., 21, 127-136 (1977).
 - 9) Bott, R. L., Jonson, J., Foster, E. M. & Sugiyama, H.: Possible origin of the high incidence of *Clostridium botulinum* type E in an inland bay (Green Bay of Lake Michigan). J. Bacteriol., 95, 1542-1547 (1968).
 - 10) Kelly, J. E., Keene, J. E. & Holtman, D. F.: *Clostridium botulinum* in Tennessee Valley Authority lakes. J. Tenn. Acad. Sci., 45, 12-18 (1970).
 - 11) Johannsen, A.: *Clostridium botulinum* in Sweden and the adjacent waters. J. Appl. Bacteriol., 26, 43-47 (1963).
 - 12) 道家 直: からし蓮根を原因食とするボツリヌス中毒. 食衛誌, 26, 536-537 (1985).
 - 13) Holdeman, L. V., Cato, E. P. & Moore, W. E. C.: Anaerobe Laboratory Manual, 4th ed., p79-149, The Virginia Polytechnic Institute and State University Anaerobe Laboratory, Blacksburg, 1977.
 - 14) Nakamura, S., Shimamura, T., Hayase, M. & Nishida, S.: Numerical taxonomy of saccharolytic clostridia, particularly *Clostridium perfringens*-like strains: descriptions of *Clostridium absonum* sp. n. and *Clostridium paraperfringens*. Int. J. Syst. Bacteriol., 23, 419-429 (1973).
 - 15) Maupas, R., Lamagnere, J. P., Lamise, F. & Laugier, J.: Botulisme de type C. Interet de la recherche de la toxémie. Med. Mal. Infect., 6, 207-210 (1976).
 - 16) Meyer, K. F., Eddie, B., York, G. K., Collier, C. P. & Townsend, C. T.: *Clostridium botulinum* type C and human botulism. Proc. VI Congr. Int. Microbiol., 2, 276 (1953).
 - 17) Prevot, A. R., Tattasse, J., Daumail, J., Cavaroc, M., Riol, J. & Sillio, S.: Existence en France du botulisme humaine de type C. Bull. Acad. Natl. Med. (Paris), 139, 335-358 (1955).
 - 18) 阪口玄二: 世界におけるボツリヌス中毒の原因と発生概要. 食品衛生研究, 35, 525-533 (1985).
 - 19) Pickett, J., Berg, B., Chaplin, E. & Brunstetter-Shafer, M.: Syndrome of botulism in infancy: clinical and electrophysiologic study. N. Engl. J. Med., 295, 770-772 (1976).
 - 20) Midura, T. F., Snowden, S., Wood, R. M. & Arnon, S. S.: Isolation of *Clostridium botulinum* from honey. J. Clin. Microbiol., 9, 282-283 (1979).
 - 21) Sugiyama, H. & Mills, D. C.: Intraintestinal toxin in infant mice challenged intragastrically with *Clostridium botulinum* spores. Infect. Immun., 21, 59-63 (1978).
 - 22) 阪口玄二: 蜂蜜とボツリヌス症. 食品と微生物, 5, 3-9 (1988).
 - 23) Noda, H., Sugita, K., Koike, A., Nasu, T., Takahashi, M., Shimizu, T., Ooi, K. & Sakaguchi, G.: Infant botulism in Asia. Am. J. Dis. Child., 142, 125-126 (1988).
 - 24) Oguma, K., Yokota, K., Hayashi, S., Takeshi, K., Kumagai, M., Itoh, N., Tachi, N. & Chiba, S.: Infant botulism due to *Clostridium botulinum* type C toxin. Lancet, 336, 1449-1450 (1990).
 - 25) 大友良光, 豊川安延: 青森県におけるボツリヌス中毒とボツリヌス菌の分布. p14-37, 青森県衛生研究所, 青森, 1981.
 - 26) 阪口玄二: ボツリヌス中毒. 食品衛生研究, 35, 5-14 (1985).
 - 27) 神沢謙三: *Clostridium botulinum* type E の生態学的研究. 一北海道における本菌の土壌中の分布を中心として. 北海道衛研所報, 11, 161-173 (1960).
 - 28) 芹川俊彦, 相川恵子, 木村晋亮: 金沢市内の2河川における *C. botulinum* の分布. 石川衛公研年報, 26, 504-505 (1989).
 - 29) Dolman, C. E. & Chang, H.: The epidemiology and pathogenesis of type E and fish-borne botulism. Can. J. Public Health, 44, 231-244 (1953).
 - 30) Aureli, P., Fenicia, L., Pasolini, B., Gianfranceschi, M., McCroskey, L. M. & Hatheway, C. L.: Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy. J. Infect. Dis., 154, 207-211 (1986).
 - 31) Hall, J. D., McCroskey, L. M., Pincomb, B. J. & Hatheway, C. L.: Isolation of an organism resembling *Clostridium barati* which produces type F botulin toxin from an infant botulism. J. Clin. Microbiol., 21, 654-655 (1985).
 - 32) Dezfulian, M., McCroskey, L. M., Hatheway, C. L. & Dowell, Jr. V. R.: Selective medium for isolation of *Clostridium botulinum* from human feces. J. Clin. Microbiol., 13, 526-531 (1981).
 - 33) Müller, J.: On the occurrence of *Clostridium botulinum* type C beta in the livers of slaughter animals in Denmark. Bull. Off. Int. Epizoot., 67, 1473-1478 (1967).
 - 34) Huss, H. H.: Distribution of *Clostridium botulinum*. Appl. Environ. Microbiol., 30, 764-769 (1980).

Ecological Studies on *Clostridium botulinum* in Ishikawa Prefecture Kiyoto Yoshimura, Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **101**, 138—146 (1992)

Key words *Clostridium botulinum*, cultivated field, domestic animal, terrestrial theory, type B

Abstract

Soils of cultivated fields (fields of rice, lotus and other crops), the Tedoru river system and the mountainous district of Mt. Hakusan in Ishikawa Prefecture, and domestic animals bred in the prefecture were examined for *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*). The presence of *C. botulinum* in a specimen was demonstrated by cultivating aliquots in chopped meat-glucose medium and detecting botulinum toxins in the cultures. In soils of cultivated fields, type C toxin was detected in 2 (6.1%) of 33 specimens from rice fields, 3 (14.3%) of 21 specimens from lotus fields, and 3 (9.1%) of 33 specimens from fields of other crops. In a type C toxin-positive specimen from a field of other crops type E toxin was also detected. In the Tedoru river system, type E toxin was detected at extremely high rates in upper reaches as well as in lower reaches of the river; detection rates were 42.9% (3 of 7 specimens) in the latter and 32.3% (10 of 31 specimens) in the former. Type C toxin was found only in one specimen (2.6%). However, type B toxin was detected in 3 specimens. In the mountainous district, type E toxin was found in 3 specimens (20%). Isolation of botulinum type B or E toxin-producing bacteria was carried out, and typical non-proteolytic *C. botulinum* types B and E strains were isolated. Liver specimens from 75 healthy cattle and 100 healthy swine were examined for the presence of *C. botulinum*. In cattle, none of the cultures yielded the toxin. In swine, however, type C toxin was demonstrated in 8 (8%) specimens. At one of the five farms where the carrier-state swine were present, 20 swine were surveyed for about 2 years to determine whether the carrier-state was transient or resident. *C. botulinum* type C was found in livers of all swine tested and in caecal contents of 16 swine. In addition, *C. botulinum* type C was found at an extremely high rate (62.5%, 25 of 40 specimens) in environmental specimens (floor deposit, sewage, soil of premises and soil of adjacent rice fields) from the farm. These results suggest that *C. botulinum* type C may well be distributed widely in cultivated fields as well as lakes and marshes in Ishikawa Prefecture, that *C. botulinum* non-proteolytic type B probably exists in water-related soil in our country, and that terrestrial theory as well as marine theory should be considered for the multiplication of *C. botulinum* type E in the natural environment. Furthermore, it was suggested that healthy swine carrying *C. botulinum* type C might play some role in the contamination and multiplication of the organism in the natural environment.