

エンテロトキシンの検出法に関する研究

千葉大学医学部衛生学教室 (主任 谷川教授)
指導 藤原講師)

番 場 和 夫

KAZUO BAMBA

(昭和 32 年 6 月 14 日受付)

目 次

第1章 緒 言	第2節 エンテロトキシン非産生株との比較
第2章 動物実験法の再検討	第4章 エンテロトキシンの検出法
第1節 実験動物の吟味	第1節 実験材料
第2節 実験方法の比較	第2節 実験方法
第3節 エンテロトキシンの動物に対する 毒性	第3節 実験成績
第1項 実験方法	第5章 総括及び考察
第2項 実験成績	結 論
第3章 エンテロトキシンの特異性	文 献
第1節 培地成分との比較	

第 1 章 緒 言

エンテロトキシンの確実な検出方法は、現在いまだに見出されていない。併し乍ら、此の問題の解決は、食中毒対策の実地面に於ける焦眉の問題として、最も強く要求されている処である。即ち今日では、食中毒の原因決定に際し、エンテロトキシン中毒の判定は必ずしも容易ならず、検出ブドウ球菌の生物性状検査成績のみを以つて概ねその判定根拠としているのが現状である。この判定方法では、自然界に存在するブドウ球菌の大部分がエンテロトキシン非産生株であり、しかもエンテロトキシン産生株の生物性状に厳密な特異性の認められないことよりして、その判定結果は可成り信頼度の低いものである。従つてその成績に基いて諸種の衛生対策を企てることは極めて危険なことと考えられる。即ちエンテロトキシンそれ自体の検出が強く望まれる所以がここに存する。

従来エンテロトキシンの検出法として考案されたものは総て動物実験の方法によるものであり、その成績は一般に必ずしも満足すべきものとは云われたい。即ち此等の動物実験による毒性試験の成績と、人体に対する毒性の発現とが一致せざる場合が非常に多く、その為に、その判定結果は不正確たるを免れない。然らば此等の難問の打開策としては、如何なる方向に考を進めるべきであろうか。

茲に於いて先ず第一に考えられることは、上記の動物実験による毒性試験法をより詳細に吟味して、動物と人体に於ける成績の不一致の原因を探求し、出来得ればより適当な動物実験法を考案することである。又若し此等の方法が全く不成功に終るとするならば、次には完全に化学的な手段によるエンテロトキシン毒物検出方法を工夫することである。

此等の問題を解決せんが為に、著者は先ず現在までエンテロトキシン毒性試験に用いられた

諸種動物について吟味を行い、その中今日最も普通に行われている、いわば標準動物実験法とも謂わるべき仔猫試験法について、詳細な検討を試み、更にエンテロトキシン毒物と動物に対する嘔吐催起物質との異同に関して、化学的分割試験を行つた結果、極めて興味ある成績を得た。また、エンテロトキシンの化学的検出法の基礎実験として、Zone-electrophoresis による分離蛋白の沈澱反応試験を行い、若干の認むべき結果を得たので、此等の実験成績を纏めてここに報告する。

第2章 動物実験法の再検討

第1節 実験動物の吟味

エンテロトキシンの毒性試験を行う際に最も普通に用いられる実験動物は猫であり、就中仔猫が最も優秀であるとされており、殆んど世界各国に於いてどの国に於いても、エンテロトキシン毒性試験の基準方式として仔猫試験を採用している。また、この猫についても仔猫以外に、Minett (1938) 等により親猫(体重4kg程度)を被検動物とする方法が報告されている。併し乍ら、此等の猫を扱う場合には著者の経験によると、嘔吐発作の発現率極めて低く、剩え狂暴性を増し取扱の極めて困難な事例に遭遇する事が稀でない。本実験に於いては、他の動物の実験の場合の如く麻酔剤を使用する事が、此の実験の目的よりして不適当なる為に、猫実験に於いては可能なる限り仔猫を用いる事が望ましいと考えられる。然し乍ら、一方仔猫は四季を通じて常に得られないものである事は周知の如くであり、殊に夏季食中毒発生の最も多い時期に、適当な大きさの仔猫を入手する事は甚だ困難と云わなければならない。

茲に於いて八田氏等は仔犬を用いる事の可能性を論じているが、これは著者の実験によれば、余りにその感受性が高過ぎてエンテロトキシンを産生せざる株に於いても、大部分のブドウ球菌株に於いて、その濃液注射により嘔吐発作の発現を認め、エンテロトキシンの検出には余り適当でないものと思われる。

更にまた米国に於いては、Jordan and McBroom (1931) 以来現在も Dack の研究室に於いては、赤毛猿を多く使用しているが、此の動物は注射でなく経口的に与えて嘔吐発作を生ぜしめ得る点に於いて極めて優秀な実験動物であり、人体実験に替わるものとしては最も適当なものと考えられる。但し、此の場合に於いてもエンテロトキシンを含まない試料により時折嘔吐を起すものがあると云う。更にまた数多くの一般の衛生検査施設に於いて猿を常に飼育保有する事は少くも我国の現状では不可能である。

また蛙を用いて実験を行う方法も Robinton (1949), Eddy (1951) 等により報告されているが、この方法は冬眠その他の季節的条件により必ずしも陽性の反応を示すとは限らず、従つて決定的結論を出す実験に使用する事は出来ない。

また一方家兎の摘出腸管を用いて、その収縮状態の変化を指標として本毒物の有無を判定せんとする方法は Baylis (1940) 以来 Richmond, Reed, Shaughnessy and Michael (1942) 及び Anderson (1953) 等により研究されているが、此の反応はアミン、アルカロイド等の有機塩基の毒性として現われるものであり、Anderson (1953) によれば本反応は Atropin により抑制されると記載されている。併しながら、著者の研究室に於ける従来の実験成績、即ち、エンテロトキシン産生ブドウ球菌の培養濃液加熱物よりイオン交換樹脂 Amberlite IRC 50 によりアミン分割を分離除去せる試料について、この摘出腸管収縮試験を行つた結果によれば、本反応は殆んど認められていない。尙該試料は著明なエンテロトキシン作用を有する。このことは、Anderson (1953) 等の云う摘出腸管収縮増強現象は、エンテロトキシン以外の夾雑物として存在するアミン分割により惹起されるものであり、従つて本反応はエンテロトキシン自体の試験法としては殆んどその意味を有しないものと思われる。

又 Anderson 等の実験に用いられた被検試料は、アミン分割を除去していない標品なることを考え併せる時は更に此の点は明瞭となるであろう。一方著者の経験によれば、エンテロトキシンの毒性は Atropin 添加により抑制されることは全くないと云う事実を確認している。

以上の諸理由により所謂摘出腸管収縮試験はエンテロトキシンの検出方法としては殆んどその価値を認められない。

従つて上記の諸種実験動物を比較するに、尙多くの問題、疑点を残すとは雖も、現在に於いては、動物実験としては仔猫試験が最も一般的と考えられる

が故に、以下該実験動物についてその実験方法を検討する。

第 2 節 実験方法の比較

動物実験により毒性試験を行う場合には一般に経口投与、皮下注射、静脈内注射、腹腔内注射等による投与方法が試みられる。

エンテロトキシンの毒性試験に於いては赤毛猿に限って経口投与に依つてその目的が達せられるが、他種の動物では専ら注射による非経口投与が行われている。特に仔猫に於いては Dolman, Wilson, Crockcroft (1936) 等の仔猫試験の原法は腹腔内注射によるものであり、又 Hammon (1941) により考案された変法は仔猫の股静脈に試料を注入する方法である。此の二つの方法を比較すると、前者は注射針を腹膜を貫通せしめて腹腔内に試料を注入する為に、兎角腹膜刺激症状を惹起せしめ易い。又場合によつては技術の未熟等により内臓諸器官に損傷を与え、その結果これが刺激となり、嘔吐、下痢等の一連の疾病現象が現われ、これを以つてエンテロトキシン陽性なりと見做し、其の判定を誤る可能性も充分考えられる。従つて此等の過誤を可及的に少なくする為に専ら静脈内注入法を試み、血管に注入不能の場合に限って腹腔内注入法を応用する事が望ましい。尚又腹腔内注入の場合には、注入後最小限 20 分経過後に於ける嘔吐発作を以つて反応陽性とみなし、それ以前の諸種の刺激症状は腹膜刺激によることもあり得るので必ずしもエンテロトキシン陽性のものと考えてはならない。

第 3 節 エンテロトキシンの動物に対する毒性

上述の如く実験動物としては仔猫が最も一般的であると考えられ、又その実験方法としては静脈内注入法が比較的正確なものと思われるが、併しこの条件は、被検動物に対する毒物の検出方法として適当かどうかと云う事を検討したものである。即ちこの場合に於いてはエンテロトキシンそれ自体の人体に対する毒性については全然考慮されていない。この事は当然基本的な最も大きな問題として追求すべきものである。即ち上記仔猫試験の場合にもエンテロトキシン以外の諸種の細菌代謝生産物、或は培地成分の分解産物等により明瞭な嘔吐発作を生ぜしめる可能性が少くない。又 Fulton (1943) も述べている如く人体摂取試験により明らかに急性胃腸炎症状を起し得る材料について、動物実験を行つた成績が全く陰性であり、又その反対に動物実験に於いて明瞭な下痢、嘔吐等の症状を現わす材料を人体に試みた場合に、その結果は完全に無害に終ることがある。この事は著者の研究室でも屢々経験された処であり、その大要は第 1 表に示す如くである。即ち自然界より分離せるブドウ球菌並びに食物中毒原因食と推定される材料より分離された同種菌株計 100 株のものについて、その動物実験と人体摂取試験の成績を比較すれば、前者の陽性率は後者の陽性率の 10 倍を現わしている。この実験成績より所謂仔猫嘔吐催起物質と本来の人体に対するエンテロトキシン毒物が必ずしも同一の物質ならざる事が推定され

第 1 表 食品由来ブドウ球菌のエンテロトキシン産生能

採取材料	菌種	菌株数	人体嘔吐毒		仔猫嘔吐毒	
			産生菌株数	非産生菌株数	産生菌株数	非産生菌株数
シュークリーム	Micrococcus pyog. v. aur.	18	1	17	3	15
	Micrococcus pyog. v. alb.	2	0	2	0	2
アイスクリーム	Micrococcus pyog. v. aur.	21	0	21	4	17
	Micrococcus pyog. v. alb.	3	0	3	1	2
かまぼこ	Micrococcus pyog. v. aur.	16	1	15	4	12
	Micrococcus pyog. v. alb.	4	0	4	2	2
ハム	Micrococcus pyog. v. aur.	12	0	12	5	7
	Micrococcus pyog. v. alb.	7	0	7	1	6
ソーセージ	Micrococcus pyog. v. aur.	16	1	15	9	7
	Micrococcus pyog. v. alb.	1	0	1	1	0
計		100	3	97	30	70

る。

尙此の場合の仔猫及び人体に対する毒性の有無は、次の如き方法により判定された。即ち先ず被検試料としては各菌株の Dolman 培地 (後述のもの) による、30% CO₂ 混合空気中 37°C, 48 時間培養のものに濾液加熱物を用いた。この濾液を仔猫の場合には 2 cc/kg の割に静脈内注入を行い、人体に対しては 1 cc/kg の割に経口投与を試みた。その結果、嘔吐、下痢等の症状の発現する場合に反応陽性とした。

又菌株の種類異なる連鎖球菌 (溶連菌群及び腸球菌群) に於いては、この比率は更に大となる。尤も此等の非ブドウ球菌性の急性胃腸炎催起物質にエンテロトキシンなる名称をブドウ球菌の場合と全く同じ意味で与える事は、議論の余地があるものと思われるが、孰れにせよ細菌により産生される耐熱性急性胃腸炎催起物質を一応エンテロトキシン群物質と考えた、従来の Jordan 等の所謂広義のエンテロトキシン毒物に於いては、その仔猫試験と人体摂取試験の成績の差は更に大なるものと思われる。因に著者等の研究室ではブドウ球菌性の耐熱性食中毒原因物質に対してのみエンテロトキシンなる語を用い、他の菌群により産生される類似毒物に対してはエンテロトキシン様毒物と称し、この両者を合してエンテロトキシン群毒物と名付けている。

かく考えて来ると仔猫嘔吐催起物質とエンテロトキシン、即ち人体に対する急性胃腸炎催起物質とは全く異つたものであるとする見方が寧ろ強い根拠がある様に感ぜられる。

茲に於いて著者は、かくの如き不明瞭な事情を明らかにせんが為、Bergdoll, Lavin, Surgalla, Dack (1952) のエンテロトキシン抽出法に、電気泳動法を組合せた藤原、滝川、番場 (1957) の新分離、精製法を試み、その各分割の抽出物について、それらの毒性を人体摂取試験成績と動物実験成績との両者に於いて比較し、それらの各毒物の本体の異同を検討した。

第1項 実験方法

本実験に使用した菌株は食中毒原因食より分離された明らかな食物中毒株Ⅱ株及び浅草株であり、孰れも国立衛生試験所細菌部より分与を受けた株である。

先ず此等の菌株の 18 時間ブイヨン培養を用いて、Dolman, Wilson (1938) 等の所謂 Proteose pepton 培地に澱粉添加をせる半流動平板培地に接種

し、これを 30% CO₂ 混合空気中にて 37°C, 48 時間培養を行い、そのモスリン濾液を以つて抽出用原液とした。尙此の場合の培地成分は下記の如くである。

Proteose pepton	20.0 g
NaCl	5.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
MgSO ₄	0.2 g
CaCl ₂	0.1 g
可溶性澱粉	10.0 g
粉末寒天	4.0 g

以上に水を加えて 1 L とし、pH 7.4 に修正し、15 Lb, 15 分高压滅菌を行う。

次に此の濾液を 4000 r. p. m. 40 分遠心分離し、その上清を取り更に 100°C 30 分加熱せる後一夜氷室に保存する。再び前同様遠心分離を行い、凝固蛋白を除去し熱非凝固性物質のみを分離する。この上清について第 2 表の如き分離精製を試みる。即ち先ず硫酸安門を 64% (重量%) の割に加えて塩析せしめ、一夜放置後濾紙濾過によりその沈澱部を分別採取し、これを蒸溜水中に再溶解せしめ、その際生ずる不溶性物質を 4000 r. p. m. 30 分遠心分離により除去し、その上清を取りセロファン嚢を用いて一夜流水中に透析する。翌日内液を取り塩酸で pH 3.5 に調整する。尙此の時の液温は 2°C より上昇せぬ様予め氷、NaCl 混合物等により温度調節準備をしておく。pH 調整後氷室内に 1 時間放置し、その後遠心分離を行い沈澱を取る。又この場合の遠心分離操作は全てドライアイス、Aceton を用いて 0°C~2°C に冷却しながら行う。茲に得られた沈澱を可及的少量の生理食塩水に溶解せしめ、炭酸ソーダを用いて pH 6.8~7.2 に中和する。これに相当量のクエン酸磷酸塩緩衝液 ($\mu=0.02$, pH 6.3) を加え氷室内に於いて冷却 (0°C~1°C) して置く。同時に別に直径 2 cm 長さ 20 cm のクロマトグラフ用吸着管の底に脱脂綿を装置せるものに、Hyflosupercel (精製珪藻土) を 10 g 宛上記の緩衝液に懸濁せしめたものを投入濾過せしめ、その液の上面が吸着剤の上端より僅かに上になる程度に止めて置く。尙この吸着管には、周囲に更に直径の大きなガラス円筒が装置してあり、その底部を気密として、吸着管とこの外筒との間に氷、NaCl を入れ、吸着管の内液は 0°C~5°C に調節されている。此の column に前述の被検液 50 cc ずつを約 2 時間に亘つて通過吸着せしめる。内液の通過完了後吸着管の内容を容量 500 cc のビ

第 2 表 エンテロトキシン抽出法

(I) 原液 (2.5 L)	
+ (NH ₄) ₂ SO ₄ 64% 一夜放置 濾過	
沈 澱	濾 液
+ 溜水 250 cc 遠心分離 4000 r. p. m. 30'	
上 清	沈 澱
流水透析 内 液	
+ HCl pH 3.5 (0°C~2°C) 1 時間放置 遠心分離	
(II) 沈 澱 (約 1 g)	上 清
0.85 NaCl (30 cc) 溶解 Na ₂ CO ₃ 中和 pH 6.8~7.2 + クエン酸磷酸塩緩衝液 (μ=0.02, pH 6.3) 85 cc Hyflosupercel 20 g 吸着 (0°C~1°C) (II)F	
	透 析 Alcohol, Ether 処理 粉 末(約 7.5 g)
Hyflosupercel	濾 液
+ クエン酸磷酸塩緩衝液 (μ=0.12, pH 7.8) 200 cc 1 時間溶出 Buchner 濾過	
濾 液	Hyflosupercel
+ (NH ₄) ₂ SO ₄ 64% 一夜放置 濾 過	
沈 澱	濾 液
+ 溜水 50 cc 遠心分離	
上 清	沈 澱
+ Alcohol 200 cc (-3°C) 遠心分離	
沈 澱	上 清
Alcohol, Ether 処理	
(III) 粉 末 (約 150 mg)	
電気泳動, 抽出 透 析 Alcohol, Ether 処理	
② 粉 末 (約 20 mg)	

カー中に投じ、これにクエン酸磷酸塩緩衝液 (μ=0.12, pH 7.8) 100 cc を加えて充分攪拌せる後 1 時間放置する。溶出後ブナーの吸引濾過装置を用いて Hyflosupercel を除去し、その濾液に硫酸安門を 64% の割に加えて該毒物を塩析せしめ、一夜放置後に再び濾紙濾過を行いその沈澱部を分離する。これを再び蒸溜水に溶解し不溶部を遠心分離

し、その上清をセロファン囊に入れ流水中にて一夜透析する。

この内液を取り 4 倍量の Alcohol を加えて生ずる沈澱を集める。この Alcohol 温度は -5°C~-7°C である。茲に得られた沈澱を Alcohol, Ether 処理の反覆操作により充分脱水乾燥せしめると灰白色の粉末が得られる。次にこの粉末 100 mg を約 3 cc の $\frac{1}{20}$ N の Veronal 塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解せしめ、更に馬鈴薯澱粉を適量加えてペースト状とする。一方 Zone-electrophoresis の装置は合成樹脂の長さ 40 cm, 巾 3 cm, 高さ 1.5 cm の泳動部を有し、その内に馬鈴薯澱粉ペースト ($\frac{1}{20}$ N Veronal 塩酸緩衝液 pH 8.0 を含むもの) を詰める。尙このペースト中、陰極部より 15 cm の処に予め体積約 3 cc の合成樹脂片を挿入しておく。全体のペーストが安定状態になった時、この合成樹脂片を取りその空間に前記の試料ペーストを満す。次に此等全体のペーストの表面を平滑となし、合成樹脂の蓋を覆い、更に固定装置により堅く締める。この泳動部の両端にガーゼを装置しこれを電極槽中に垂らし、両電極槽中にも前記の緩衝液を 1 L 宛入れる。次にこの両電極槽中にそれぞれ陰極、陽極の白金板を入れ、各電極を直流可変圧電源に接続する。尙この場合の電源装置は最高 100 V, 50 mA の容量を持つものである。本装置組立完了後、電流を通じ、泳動部の電流を 8 mA に調整して 20 時間通電する。尙この時の電圧は 200 V である。通電終了後、原点より陰極寄り 6 cm の処を中心とし左右 5 mm の巾でペーストを取り出し、10 cc の生理食塩水中に投入する。充分攪拌溶出後更に 2 回同量の生理食塩水にて澱粉粒子を洗滌し、その抽出液を合併しセロファン囊を用いて一夜透析する。透析終了後内液に前述と同様 Alcohol, Ether, 処理を施し、最後の粉末を得る。この場合の収量は概ね原液量 1 L に対して 10 mg 程度である。尙以上の抽出分離操作中の各過程に於ける夫々の分劃の符号は第 2 表に示す如くである。

次に上記の方法により得られた各分劃について、夫々の毒性を仔猫試験と、人体摂取試験によつて比較した。人体摂取試験の方法は第 3 表に示す如き割合の試料を牛乳約 200 cc に混じ、これを 2 分以内に飲ませた。飲用牛乳の温度は概ね 45°C とし、冷牛乳による下痢等の発生を予防した。又被検試料混入度の多少については、被検者に判らぬ様配慮した。

動物実験法については既述せる如く、生後 1 カ月

前後の仔猫、就中 400~500 g の体重のものを選んで実験に供する様にした。投与方法としては仔猫の股静脈内に極めて徐々に注入を行つた。この試料注入後 2 時間観察を続け、その間に下痢、嘔吐、脱力等の 1 群の所謂エンテロトキシン中毒症状を認める場合を陽性と決定した。但し、軽度の嘔吐のみを起す場合があるがこれも陽性とした。併しながらその他の症状即ち下痢、脱力等のみにては不確定なるため一応陰性とした。

第 2 項 実験成績

第 3 表、第 4 表、第 5 表に見られる如くであり、材料原液の加熱濾液 (I) は、食 II 株、浅草株共に 1 cc/kg 程度の人体摂取試験により著明な嘔吐、下痢を起しうる毒力を有している。次に (II), pH 3.5 で沈澱する分劃を検べると、食 II 株と浅草株共に人体摂取試験成績は陽性であるが、仔猫試験に於いては、食 II 株では陰性となり、浅草株では尙毒力を保有している。又 (II) F 分劃、即ち pH 3.5 塩酸溶解

第 3 表 抽出物の人に対する毒性 (食 II 株, 浅草株)

種類	量	原液換算量	毒性
(I)	50 cc (1 cc/kg)	50 cc (1 cc/kg)	+
(II)	20 mg (0.4 mg/kg)	50 cc (1 cc/kg)	+
(II) F	150 mg (3 mg/kg)	50 cc (1 cc/kg)	-
	300 mg (6 mg/kg)	100 cc (2 cc/kg)	-
(III)	20 mg (0.4 mg/kg)	330 cc (6.6 cc/kg)	+
②	3 mg (0.05 mg/kg)	350 cc (6 cc/kg)	+

第 4 表 抽出物の仔猫に対する毒性 (食 II 株)

種類	量	原液換算量	動物の 毒性 体重
(I)	1.0 cc (2 cc/kg)	1.0 cc (2 cc/kg)	+ 500 g
(II)	0.4 mg (0.8 mg/kg)	1.0 cc (2 cc/kg)	- 480 g
	1.2 mg (2.4 mg/kg)	3.0 cc (6 cc/kg)	- 500 g
(II) F	3 mg (6 mg/kg)	1.0 cc (2 cc/kg)	+ 510 g
	6 mg (12 mg/kg)	2.0 cc (4 cc/kg)	+ 470 g

第 5 表 抽出物の仔猫に対する毒性 (浅草株)

種類	量	原液換算量	動物の 毒性 体重
(I)	1.0 cc (2 cc/kg)	1.0 cc (2 cc/kg)	+ 500 g
(II)	0.4 mg (0.8 mg/kg)	1.0 cc (2 cc/kg)	+ 500 g
	0.8 mg (1.6 mg/kg)	2.0 cc (4 cc/kg)	+ 500 g
(II) F	4.5 mg (6 mg/kg)	1.5 cc (2 cc/kg)	- 750 g
(III)	0.2 mg (0.4 mg/kg)	3.3 cc (6.6 cc/kg)	+ 500 g
	0.5 mg (0.6 mg/kg)	8.0 cc (11 cc/kg)	+ 750 g
②	0.08 mg (0.1 mg/kg)	10.0 cc (12 cc/kg)	- 800 g
	0.03 mg (0.06 mg/kg)	3.8 cc (7.5 cc/kg)	- 500 g
	0.02 mg (0.04 mg/kg)	2.5 cc (5 cc/kg)	- 500 g

部をとり中和、透析後 Alcohol, Ether 処理により粉末とせるものは、人体摂取試験に於いては、両菌株共に陰性なるも、仔猫試験に於いては、両菌株全くその成績は反対となる。(III) 分劃即ち Hyflo-supercel クロマトによる分離分劃は、人体摂取試験成績は両菌株共に陽性であるが、仔猫試験では浅草株のみ陽性で、食 II 株は陰性である。最後の分劃、即ち電気泳動により分けられた ② 分劃に於いては両菌株共に人体摂取試験は陽性であり、仔猫試験では陰性である。

以上の実験成績を通覧するに、人体に対する毒物は食 II 株、浅草株共に ② 分劃に移行するが、仔猫嘔吐催起物質は、此等 2 株同一分劃には移行せず、即ち猫毒は必ずしも同一種の毒物ではないものと考えられる。又 ② 分劃の仔猫試験に於いては、原液量換算で 12 cc/kg と云う大量の試料を注入したにも関わらず動物は何等反応を示さない事により、浅草株に於いては、電気泳動時に際し人体に対する本来のエンテロトキシン毒物と仔猫に対する嘔吐催起物質とは完全に分離されたものと認められる。

第 3 章 エンテロトキシンの特異性

上述の実験成績より Zone-electrophoresis を応用して、人体に毒性を示すエンテロトキシンの分離可能なることが知られたが、更に著者はこの分劃が果してエンテロトキシン産生株に特異的なものなりや否やについて実験を試みた。

第 1 節 培地成分との比較

全く細菌を培養せざる上記の可溶性澱粉加 Dolman 半流動培地より、前述と同じ方法で (III) 分劃を作成し、その材料を用いて電気泳動実験を試みると、原点より陰極寄り 6 cm の処には色素の泳動帯は認められず、5 cm の処に色素分布を特徴とする分劃が検出される。即ち原点より陰極寄りに移動する分劃が食 II 株、浅草株と同様に存在する事は明らかに推定されるのであるが、その易動度はお互いに相異なるものである事が知られる。更に浅草株及び Dolman 培地を用いて作成された電気泳動澱粉柱について、原点より陰極寄りに夫々 6 cm と 5 cm の所を中心にして 1 cm の巾でペーストを抜き取り、生理食塩水により各々抽出液を作成し、上記と同様の方法により Alcohol, Ether 処理を行うと、浅草株に於いては 6 cm の所の抽出液にのみ沈澱を生じ、Dolman 培地を用いたものでは 5 cm の所の抽出液にのみ

沈澱が認められる。尙原点より陽極寄りにも色素帯が現われるが、それらの泳動帯の抽出物は人体摂取試験の結果全く無反応であり、本実験の目的に無関係である事が判明したので、詳細なる比較検討は試みなかつた。

第2節 エンテロトキシン非産生株との比較

エンテロトキシン非産生株の代表として209P株を用いた。本菌株は従来我国に於いて使用されている代表的黄色ブドウ球菌株であり、本実験に際しては教室保存株を用いた。

又この菌株の培養濾液加熱物について上述の人体摂取試験を試みた結果、全くその毒性を現わさない事を確認した。この菌株を用いて第1節と同様の実験方法により(III)の電気泳動を試みその結果を比較すると、その陰極寄りの泳動色素帯は原点より7.8cmの所を中心とし、その部分の抽出液透析内液よりはAlcohol沈澱を得られるが6cmの所の抽出液よりは沈澱を生じない事を知つた。即ちエンテロトキシン非産生株に於いては、エンテロトキシン産生株の場合と同様の易動度を示す色素帯は見られず、又エンテロトキシン毒物の存在と易動度の等しい物質は認められない。尙エンテロトキシン非産生株の使用菌株の少い事は、本実験に於いて統計学的検討を行う場合には尙一層の吟味を要するものと思われるが、一応上記の成績より、エンテロトキシンを含む分劃は電気泳動的に特異的易動度を示すものと推定される。

第4章 エンテロトキシンの検出法

第2章に述べた如く仔猫試験による毒性試験成績が、本来のエンテロトキシンの存在と無関係なる事が判明した以上、何らかのこれに代るべき方法を求めなければならない。即ち仔猫と人間に対する夫々の毒物の本体が互に相異なる以上、仔猫試験を如何に工夫しても、これを以つて本来のエンテロトキシンの検出に用いる事は不可能と云う事になる。茲に於いて著者は、前章に記した如き電気泳動に於けるエンテロトキシン分劃の特異性を指標として、エンテロトキシンを化学的に検出せんと試みた。

第1節 実験材料

食中毒原因株として食II株、浅草株及び松山株を用いた。尙松山株は浅草株と同様に食中毒原因菌株として国立衛生試験所細菌部より分与されたもので、著者等の研究室に於いて人体摂取試験を行い著明なるエンテロトキシンの産生を認められた菌株である。又エンテロトキシン非産生株としては209P

株、マヨ株を使用した。而して此等菌株培養物より前述の(III)分劃を作成し被検試料とした。尙培地成分より得られた(III)分劃を対照試験材料とした。

第2節 実験方法

第2章第3節第1項に述べた如き電気泳動の条件下に於いて、原点より陰極寄り6cmの点を中心に巾5mmの帯状に澱粉ペーストを抜き取り、これを生理食塩水10ccにて溶出し流水中にて一夜透析を行う。透析終了後、その内液に4倍量のAlcoholを加え更に5mg程度のNaClを投入し、その際に生ずる沈澱の有無を比較し、その沈澱の生ずるものを以つて陽性反応と見做した。

第3節 実験成績

実験成績は第6表の如くである。即ち食II株、浅草株及び松山株に於いては著明なる白濁を生じ、約30分後にはそれ等は相寄つて絮状沈澱となり容器の下部に集積沈澱するが、他のDolman培地及び209P株、マヨ株等の(III)物質に於いては、その抽出液中に4倍量のAlcoholを加えても沈澱物質は認められない。

第6表 電気泳動試験成績

菌株名	食II株	浅草株	松山株	209P株	マヨ株	Dolman培地
泳動物の沈澱反応	+	+	+	-	-	-
人体に対する毒性	+	+	+	-	-	-

以上の成績より、エンテロトキシンを産生する菌株を電気泳動の易動度の特性と80%Alcoholに対する沈澱性とを併用する事により、その存在を一応推定する事は可能なる如く思われる。

第5章 総括及び考察

エンテロトキシン存在の証明法の一つとして、従来より各種の動物実験による毒性試験法が行われているが、その成績は非常に区々であり、即ち極めて不確実のものであり、殆んど無意味に近いものが多い。先ずかくの如き実験成績の混乱の生ずる所以を、分析的に追求を試み、種々検討せる結果次の如き成績を得た。

1) 著者の研究室に於ける従来成績を総合すると、自然界のブドウ球菌100株中その培養加熱濾液で動物に嘔吐を惹起せしめ得るものは30株を認めうるも、人体摂取試験の結果陽性の反応を示すものは僅かに3株にすぎない。即ち仔猫に毒性を有するもの総てが人体に有毒とは限らない。

2) 硫酸安門塩析, pH 3.5 沈澱, 珪藻土吸着溶出, Zone-electrophoresis 等の併用により, エンテロトキシンを含む分割を求め, 明らかに人体に対し急性胃腸炎症状を催起せしむる能力ある事を確認したが, 該分割は仔猫に対しては全く毒性を現わさないことを知った。この事は, 仔猫に対する嘔吐催起物質と, 人体に対する本来のエンテロトキシン毒物とは明らかに相異なるものなる事を証明し得たものと考えられる。

3) 仔猫に対する毒物を, 食II株及び浅草株の2中毒株について比較すると, 前者はpH 3.5で沈澱物とならないが, 後者に於いては沈澱部に移行することが認められる。即ち此等両菌株間に於いても, 夫々の菌株により産生される猫毒は互に相異なる性質を有する物質なることが推定される。此の実験成績より, 所謂仔猫毒なるものは, その産生される菌株により可成りその性状の異なる可能性が考えられる。従つて, 此等の仔猫毒が, エンテロトキシンと随伴して産生されうる確率も亦可なり不確定なるものと思われる。又従来の仔猫試験方法の適用可能な範囲は, 此等仔猫毒とエンテロトキシンとが共存する場

合に限られるが故に, かくの如く仔猫毒の産生状態が不定なることに思いを致せば, 当然仔猫試験の成績と人体摂取試験のそれとが一致せざる所以も明らかとなるであろう。

4) Zone-electrophoresis に於ける易動度の差を利用して, エンテロトキシン分割と, 他の蛋白分割等との分離を試みると, 8 mA, 200 V, 20 時間の通電により, 原点より陰極寄り 6 cm の点を中心とする部分に該毒物の泳動することが知られるが, エンテロトキシン非産生菌株を用いて同様の実験を試みた場合及び培地成分のみによる試験の結果は, 全く異り 6 cm 附近の所には抽出物を認めず, 夫々 7.8 cm, 5 cm 等の所に泳動している事を知った。即ちエンテロトキシン分割の易動度は特異的のものと考えられる。

5) 上記の実験成績を基礎とし, 即ち特異的易動度と, 該毒物の 80% Alcohol 沈澱性とを利用して, エンテロトキシンの化学的検出法に誘導せんと試みた結果, 被検菌株数尙少しと雖も著者の実験の範囲内では, 或る程度認むべき成績を得られた。

結 論

著者は食中毒原因ブドウ球菌の産生するエンテロトキシンの各種検出法を検討し, 仔猫試験と人体摂取試験の成績が必ずしも一致せざる原因について, 分析的に追求せる結果, その理由は, 夫々の毒性物質が互いに全く相異なるものなることを認めた。尚此等仔猫毒と雖も, 夫等の産生される原因株により, その毒物の性状は必ずしも一致せず, 一定の分割には属さない。

又人体に嘔吐, 下痢等の急性胃腸炎症状を惹起せしむる本来のエンテロトキシンは, Zone-electrophoresis の応用により化学的に検出され得る可能性が見出された。

(本論文の要旨は昭和32年6月第10回日本細菌学会関東支部会例会に於て報告した。)

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲の労を賜りました恩師谷川教授に衷心より感謝の意を表し, 併せて種々御指導をいただいた藤原講師に深謝します。尚滝川学士の御助言を感謝します。

文 献

- | | |
|--|--|
| 1) Anderson: Brit. J. exp. Path., 34, 548. 1953. | 1952. |
| 2) Baylis, M.: J. exp. Med., 72, 669, 1940. | 5) Dolman, C. E., Wilson, R. J. & Crockett, W. H.: Canad. Pub. Health J., 27, 489, 1936. |
| 3) Bergdoll, M. S., Kadavy, J. L., Surgalla, M. J. & Dack, G. M.: Arch. Biochem., 33, 259, 1951. | 6) Dolman, C. E.: Canad. Pub. Health J., 27, 494, 1936. |
| 4) Bergdoll, M. S., Lavin, B., Surgalla, M. J. & Dack, G. M.: Science, 116, 633, | 7) Dolman, C. E., Wilson, R. J.: Canad. Pub. Health J., 29, 35, 1938. |

- 8) **Dolman, C. E., Wilson, R. J.:** *J. Immunol.*, **35**, 13, 1938.
 - 9) **Dewbery:** *Food Poisoning*, 1950.
 - 10) **Eddy, C. A.:** *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.*, **78**, 131, 1951.
 - 11) **Favorite, G. O., Hammon, W. M.:** *J. Bact.*, **41**, 305, 1941.
 - 12) **Fulton, F.:** *Brit. J. exp. Path.*, **44**, 65, 1943.
 - 13) 藤原・滝川・番場：第9回日本細菌学会関東支部会例会発表，昭31（1956）
 - 14) 藤原・滝川・番場：第10回日本細菌学会関東支部会例会発表，昭32（1957）
 - 15) **Hammon, W. M.:** *Amer. J. Pub. Health*, **31**, 119, 1941.
 - 16) 八田・鈴木・中島・西田：日衛生誌，**8**，46，昭28（1953）
 - 17) **Jordan, E. O., McBroom, J.:** *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.*, **29**, 161, 1931.
 - 18) **Minett:** *J. Hyg.*, **38**, 623, 1938.
 - 19) **Richmond, Reed, Shaughnessy & Michael:** *J. Bact.*, **44**, 201, 1942.
 - 20) **Robinton, E. D.:** *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.*, **72**, 296, 1949.
 - 21) **Robinton, E. D.:** *Yale J. Biol. & Med.*, **23**, 94, 1950.
 - 22) **Surgalla, M. J., Bergdoll, M. S. & Dack, G. M.:** *J. Immunol.*, **69**, 357, 1952.
 - 23) **Surgalla, M. J., Bergdoll, M. S. & Dack, G. M.:** *J. Lab. & Clin. Med.*, **41**, 782, 1953.
 - 24) **Surgalla, M. J., Bergdoll, M. S. & Dack, G. M.:** *J. Immunol.*, **72**, 398, 1954.
-