

氏名(本籍)	伊藤 武 (三重)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第60号
学位授与の日付	昭和48年11月19日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	耐熱性ウェルシュ菌 (<i>Clostridium perfringens</i>) に関する研究—健康人におけるその分布および血清学的型別とそれに起因する食中毒について—
論文審査委員	(主査) 教授 今井 信 実 (副査) 教授 山田 俊 雄 教授 杉浦 邦 紀

論文内容の要旨

「ヒト」のウェルシュ菌食中毒を細菌学的に証明し、その原因菌を決定するにあたって、解明しておかねばならない前提となる基礎的事項について、一連の調査研究を実施し、本菌に起因する食中毒の実験室診断のための細菌学的、血清学的基礎資料を得ることができた。以上実験目的、方法および結果について項を追って概要を述べる。

1. 健康人における耐熱性ウェルシュ菌の分布と排菌の推移

ウェルシュ菌に起因する食中毒を論じるに当って、まず当面する問題は、細菌分類学上本菌種に属する菌が食品をはじめ広く自然界に分布しているばかりでなく、常に「ヒト」の重要な腸内常在菌の一種として存在するという真実であろう。云うまでもなく、腸管常在性ウェルシュ菌には腸炎起病性はないとされていたが、それらの存在がウェルシュ菌食中毒の原因決定に多大の混乱と困難を招来してきた。

1957年にはじめて Hobbs らがウェルシュ菌食中毒の菌学、疫学を確立した報告のなかで、「ヒト」に腸炎起病性を有するウェルシュ菌は、患者ふん便中では 100°C 1～5 時間の加熱に耐える芽胞を形成している“いわゆる耐熱性ウェルシュ菌”(以下、耐ウ菌と略す)であることを指摘している。この報告が契機となり諸外国ならびに我が国においても数多くの本菌食中毒例が報告されるようになったが、耐ウ菌の生態、とくに健康人の排菌をめぐる諸報告に一致をみないために、赤痢菌やサルモネラ菌等の代表的腸管病原菌のごとく、耐ウ菌の存在が直截に腸炎の原因であると結論できるか否かの問題が未解決のまま残されてきた。これまでの諸報告を総合していえることは、健康者の耐ウ菌検出率は、調査地域、年齢、居住環境の違いに左右されるとはいえ、5.2～62.0%と広い範囲を示している。こうした成績は本菌食中毒の菌学的決定に大きな支障となってきた。ここで、食中毒推定の一つの重要な根拠としてあげられるのは、すでに Hobbs らが指摘したように、本菌食中毒発地域健康者の耐ウ菌正常検出率の正確な把握であろう。つまり、Hobbs らが細菌学的に耐ウ菌食中毒を決定する際に不可欠な条件として、食中毒が発生した地域に在住している健康人ふん便からの耐ウ菌検出率を上廻る高率な耐ウ菌の検出が患者ふん便に認められなければならないと指摘している点が第一に重視されなければならない。

以上の理由から、一連の調査の第一段階として、1966～1968年の3年間にわたって、都市環境に生活している健康人の耐ウ菌保有率を検討した。調査対象とした健康人は、1～3才の乳幼児43名、6～11才の小

学校児童 1,080 名, 15~17 才の高等学校生徒 350 名, 20~50 才の成人 145 名および 60~80 才の老人 65 名の 5 つの年齢層からなる計 1,688 名である。健康人から採取されたふん便は, チオグリコロド培地に接種後 100°C で 60 分間加熱し, 冷却後 37°C で 24~48 時間培養したのち, その 2 白金耳を 5% 卵黄加 C W 寒天平板に塗抹し, 嫌気培養を行ない, 出現した疑わしい集落を釣菌し, その生物学的諸性状を調べて型のごとく同定した。その結果, 調査対象 1,688 名中 236 名 (14.0%) が耐ウ菌陽性であることが判明した。これを年齢別にみると, その検出率は 1~3 才の乳幼児では 48 名中 12 名 (25.0%), 6~11 才の学童では 1,080 名中 139 名 (12.9%), 15~17 才の高校生では 350 名中 40 名 (11.4%), 20~50 才の成人では 145 名中 25 名 (17.2%) および 60~80 歳の老人の場合は 65 名中 20 名 (30.8%) と, それぞれ年齢層によりわずかな検出率の差を示した。しかし, 同一年齢層の中でも, 地域の異なる小学校に通学している 6 群の学童で, 耐ウ菌の検出率が最低 6.3% から最高 37.1% と大きなばらつきが認められたことからみて, 以上の年齢層別検出率に有意差を求めることはできなかった。

次に, 上記の健康人のうち, 同じ生活環境で, 同一の食事を取って集団生活をしている人達の耐ウ菌排菌状況の推移を調べるために, 上記健康人のうち, 都内某乳児院に収容されている乳幼児 48 名および某養老院生活者 65 名を選び, 隔月および逐月に連続 3 回本菌の検索を行ない, その検出率は調査時点により 10.4~30.8% と大きく変動することが知られた。さらに, これら検出菌株について, Hobbs 型 1~13 の抗血清を用いて型別を行なってみた結果, 同一個人から時期をへだてて採取した検体から 3 回連続して同一血清型の耐ウ菌を検出することのできた例は全く認められず, 健康人の耐ウ菌の帯留は一過性のものであろうと結論された。

ただ, この調査を通じて得られた菌株 772 株中既知の Hobbs 型 1~13 (この調査の時点では 13 型迄しか確立されていなかった) のいずれかの血清型に型別されたものは 304 株 (39.4%) にすぎず, 残りの 468 株 (60.6%) が型別不能であり, これら耐ウ菌の病原的役割の解明の必要に迫られた。しかし, その実験的追究は现阶段では不可能に近いので, それらの型別の確立, その腸炎への応用を企図した。

2. Hobbs 型に属さない耐熱性ウェルシュ菌の血清学的型別

上記のごとく, 健康人ふん便由来耐ウ菌の約 60% が Hobbs 型抗血清により型別不能であったことから, それらの血清型別を試みるためにそのなかから最初に 20 菌株を任意に選り出し, Hobbs らの方法に準じてそれぞれの抗血清を作成した。得られた 20 の抗血清は交叉吸収, 凝集反応により異同をたしかめ, これらの抗血清により型別不能の菌株からさらに任意の菌株を選り出し, 同様な方法で抗血清を作り, 未型別菌株を得て, さらに同じ方法をくり返すという順序で耐ウ菌株を型別し, 最終的に Hobbs の 1~17 型に該当しない健康人由来株を新たに 56 抗原型に型別することができた。この 56 の抗原型に対応する各血清型を TW 型 1~56 と仮称することとした。

以上の TW 血清型が明らかになった時点で, その抗血清を用い, 主として, Hobbs 型に属さない耐ウ菌の分布状況を把握する目的で第二回目の調査を, 1969~1970 年の 2 ケ年にわたって, 前回同様合計 1,091 名の健康人から得られたふん便について実施した。対象健康人の内訳は, 6~11 歳の小学校児童 362 名, 15~17 歳の高等学校生徒 350 名および 20 歳以上の成人 172 名であり, 耐ウ菌型別対象株は本菌が検出された 161 件。ふん便からそれぞれ 5 個づつの集落を釣菌した計 805 株である。これら 805 株中 318 株 (39.5%) は既知の Hobbs 型 1~17 のいずれかに型別されたので, 残り 487 株について TW 型血清による型別を試みた。そ

の型別状況を供試菌株の由来別にみると、学童ふん便由来株 168 株中 163 株 (97.0%)、高校生ふん便由来株 147 株中 128 株 (87.1%) および成人ふん便由来株 172 株中 155 株 (90.1%) が TW 型 1—5 のいずれかに型別された。

すなわち、今回 TW 型別の対象とした 487 株中 446 株 (91.6%) が TW 型 1—5 のいずれかに型別され、残りの 41 株 (8.4%) がこれらの新しい TW 型別法によっても型別不能であった。なお比較的高頻度に検出された TW 型菌は、1, 5, 6, 11, 20, 21, 31, 44 および 52 などであった。

3. 東京都内に発生した TW 型耐熱性ウエルシュ菌に起因する食中毒の疫学ならびに細菌学的検討

Hobbs 型耐ウ菌の腸炎起病性については、広く承認されているが、反面、これらに型別されないために、耐ウ菌食中毒でありながら原因不明とされてきた事例の存在する可能性は否定できないであろう。上述の TW 型別の食中毒原因究明への菌学的应用は Hobbs 型菌以外の耐ウ菌の腸炎起病性の確認するうえで重要な手段となるといえる。ここでは TW 型に属する菌に起因した食中毒事例の発生の概要を述べ、これらの腸炎起病性への疑問の解答を与えることとした。

この検討は 1968 年以降、東京都内に発生した集団食中毒を対象に加えられた。その結果、著者が明らかにした TW 型 4 ならびに TW 型 6 による各 1 事例、さらに TW 型 4 と 45 および Hobbs 型 11 と 15 の 4 者の混合感染と推定される 1 事例を明らかにすることができた。

その 3 事例の疫学ならびに細菌学的成績の概要は次のごとくである。

事例 1 は、1968 年 6 月 19 日、都内の某旅館に発生した集団食中毒である。原因追求の結果、耐ウ菌 TW 型 4 に起因する食中毒と推定された。原因食品は「鶏肉煮付」で、それを喫食した 328 名のうち 156 名が発病し、発病率は 47.6% である。

この事例の平均潜伏時間は 16.4 時間で、主症状は腹痛 (85.3)、水様性下痢 (55.1%)、倦怠感 (37.8%)、頭痛 (33.3%) および悪感 (23.1%) である。少数例に発熱、嘔吐がみられた。

細菌学的検査は原因食の残品および患者ふん便を対象に実施された。

まず、原因食品からは、非加熱直接分離培養で食品 1 g 当り 3.7×10^3 個のウエルシュ菌が検出され、それらの菌株の血清型別により、食品 1 g 当り TW 型 4 が 2.6×10^3 個、型別不能株が 1.1×10^3 個と算定された。Hobbs 型菌は検出されていない。

患者の場合は、採取可能であった 2 病日患者便 7 件について 100°C 1 時間加熱後耐ウ菌の検索を行ない、6 例から TW 型 4 を検出した。この型の菌は同じふん便の非加熱分離培養でも純培養状に検出された。すなわち、患者ふん便中には原因食品検出菌と同一菌型の耐ウ菌が多数排菌されていることが判明した。平行して行なった既知病原菌は陰性に終わっている。

事例 2 は、1970 年 2 月 18 日、都内某小学校において給食の「鯨肉煮付」を原因食として発生した食中毒である。本例は結果的には耐ウ菌 TW 型 4、45 と Hobbs 型 11、15 の混合感染によるものと推定された。

同時喫食者 640 名中 196 名 (発病率 30.7%) が発病し、平均潜伏時間は 15.3 時間、主症状は、水様性下痢 (96.2%) と腹痛 (75.6%) で、嘔気、嘔吐はなく、少数例に発熱が認められた。

原因食の残品と患者ふん便について実施した菌学的原因追求において、原因食品の「鯨肉煮付」からは、非加熱直接分離培養で食品 1 g 当り 1.7×10^5 個のウエルシュ菌が検出され、それらの菌株から任意に選んだ 20 菌株について血清型別を行なった結果、20 菌株中 10 株が Hobbs 型 11、6 株が Hobbs 型 15 で、TW 型

4および45がそれぞれ2株ずつであった。

患者については、192名の3～5病日ふん便が採取され病原菌の検索が実施され、うち178件(92.7%)が耐ウ菌陽性であり、他に既知病原菌は検出されていない。耐ウ菌陽性ふん便を検出菌型別に分けた成績では、Hobbs型11のみが検出されたふん便は23件、Hobbs型15が64件、TW型4が28件、TW型45が19件、Hobbs型11と15が共に検出されたもの12件、Hobbs型15とTW型4の両検出便15件、Hobbs型15とTW型45が5件、Hobbs型11とTW型4および45の3型陽性が2件、またHobbs型11と15およびTW型4の3者検出便が1件であった。

この成績は患者ふん便検出菌型と原因食検出菌のそれとの間に極めてよく一致していることを示している。

事例3は、1970年5月16日、都内某会社において社内給食の「ランチ」を原因食にして発生した食中毒で、原因菌の検索結果から耐ウ菌TW6型に起因すると推定された。

推定原因食の内容はポークカツ、スパゲティー、いり卵、八宝菜および米飯である。

「ランチ」喫食者213名中166名(発病率77.9%)が発病し、潜伏時間は平均12.3時間、主症状は下痢(94.6%)、腹痛(71.7%)で、そのほか少数例のものが倦怠感、嘔気、嘔吐、頭痛および発熱を訴えている。

原因菌の検索は、原因食品の残品および患者ふん便について実施され、原因食の「ランチ」からは、非加熱直接分離培養で食品1g当り 3.5×10^3 個のウェルシュ菌が検出された。それらの検出菌株の血清型はTW型6であった。

患者の場合は、病原菌の検索のため2～4病日の患者便16件が採取され、うち13件(81.3%)から耐ウ菌が検出された。この事例では陽性件13中件12から原因食検出菌株の血清型と同じTW型6が分離されている。

本事例も、事例1の場合と同様に患者ふん便中の排菌状態を検討した結果、単一菌TW型6の排菌量の優位性が認められた。

今回経験したTW型に起因すると推定された食中毒は、著者の血清型別を応用して明らかにされたものである。また、比較的短い調査期間でありながら、3例のTW型耐ウ菌食中毒が認められたことは、Hobbs型以外の耐ウ菌食中毒の発生頻度もかなり高いことが示唆される。

4. 食中毒事例由来ウェルシュ菌の耐熱性芽胞形成能について

一般に、細菌性食中毒の原因菌決定に際して必要な条件は、食中毒に罹患した患者のふん便から、「ヒト」に腸炎起病性のある細菌を分離同定すると同時に、推定原因食となった食品から、患者ふん便から検出されたものと同一の菌が分離されたことを確認することが、他の疫学的傍証と共に必要不可欠の条件である。ところが、耐ウ菌食中毒の場合には、ややその趣を異にし、推定原因食品から、耐ウ菌を検出するために、その食品乳剤を単にテオグロコロート培地に接種し、患者ふん便からの菌分離の際と同様に、100°Cに1時間加熱したのち菌分離を試みたのでは、耐ウ菌の存在を証明することができないという難点がある。つまり、遺伝学的に耐熱性芽胞形成菌であっても、通常食品中に混在しているときは、必ずしも芽胞形成菌の形で存在せず大部分が栄養型の形をとっている。そのため食品を耐ウ菌分離の常法にしたがって直接加熱した場合には、それらの菌が死滅してしまい、その存在を証明することは不可能に近く、原因を明らかにしえない。

そこで著者は、食品からの耐ウ菌の証明には、加熱を行なわない検体からの分離菌について、それらが遺伝的に耐熱性芽胞を形成する能力があるかどうかを証明する必要があると考え、次の実験を行った。

食中毒事例からの分離菌を用いた実験に先立って、Hobbs 型 1~17 型別参考菌株について現在ウエルシュ菌芽胞形成培地として報告されている Ellner の培地、Kim らの培地、Dancan らの培地、Angelotti らの SEC ブイヨンおよび西田らの肉カスブイヨンの 5 種類の培地の耐熱性芽胞形成能を比較検討した。各型別参考菌株を接種し、37°C で 48 時間培養した上記 5 種類の芽胞形成培地を、100°C 60 分間加熱し、冷却後その 1 白金耳を 5% 卵黄加 C W 寒天平板に塗抹して、上記の加熱条件に耐える芽胞を形成していたか否かを検討した。その結果、Kim らの培地が最もすぐれ、Dancan らの培地がこれについて良い成績を示すことが判明した。この成績に基づいて、以下各種条件で分離された食中毒患者および健康人由来、また推定原因食品由来の研究室保存株について耐熱性芽胞形成能を Kim らの培地および Dancan らの培地を併用して比較検討した。

その結果、われわれの研究室で経験した 8 事例のウエルシュ菌食中毒の原因食品から、非加熱で分離された 53 菌株について耐熱性芽胞の形成能を調べたところ、50 菌株 (94.4%) に耐熱性芽胞形成能が認められた。

これに反し、健康人ふん便から非加熱直接培養で分離された 96 菌株のいずれもが耐熱性芽胞形成能を示さなかった。このことは、一見さきに示した健康人ふん便からの耐ウ菌検出の事実と矛盾するようであるが健康人の腸管常在性ウエルシュ菌の大部分は 80°C 30 分の加熱で死滅する熱抵抗性の弱い芽胞形成性のウエルシュ菌で占められており、たとえ耐ウ菌が混在していても、その菌量は極めて少量であるため、健康人の非加熱ふん便から直接分離した菌株の中に耐ウ菌が混入してくる確率が極端に低いことを示したものであると考えた。

一方、上記 8 事例の患者ふん便から非加熱で分離された 39 菌株のウエルシュ菌の場合には、非加熱の状態 で分離された菌株であるにもかかわらず、その全株が耐熱性芽胞形成能を持った菌であり、耐ウ菌食中毒の場合には、腸管常在ウエルシュ菌のそれをはるかに上回る状態になるため、前記健康人ふん便からの分離菌の場合とは逆に、耐ウ菌のみが検出されたものである。

以上要約するに、健康人ふん便中に、「ヒト」の食中毒起因菌と同じ性状を持った耐ウ菌が広く分布していること、および血清学的には、それらからの分離耐ウ菌の約 40% が、従来から知られている Hobbs の 1~17 型菌で、残りの約 60% が今回著者が明らかにした TW 1~56 型菌から成り立っていたことを述べた。同時に、1968 年から 1970 年に至る 3 年間の比較的短い期間に、今回著者が健康人のふん便中に存在することを明らかにした TW 型菌と全く同一の抗原型を有する耐ウ菌に起因する集団食中毒事例が 3 例東京都内に発生したことを、それらの疫学的調査結果をも含めて詳細に述べた。

さらに、従来、耐ウ菌食中毒事件の解明の際に、推定原因食品と患者発生の因果関係を証明することが困難であるとする原因の、食品中の耐ウ菌の証明を、非加熱食品の乳剤をいったん芽胞形成培地に接種して培養したのち、その耐熱性芽胞形成能を調べて間接的に耐ウ菌が存在したことを証明する方法を確立し、耐ウ菌食中毒の日常検査を容易にすることができた。

論文審査の結果の要旨

人の細菌性食中毒は各種の細菌に原因するが、本論文のように特定な血清型の耐熱性ウェルシュ菌に起因する食中毒の事例は従来その発見が可成り困難のようであった。著者はその理由として、もっぱらこのような嫌気性菌の検出方法の不備をあげ、従って単に食中毒患者のふん便とか原因食について原因菌の検索を行なうにしても、その可検材料から分離されてくるウェルシュ菌が極めて特異的なものであって、すなわち、その特徴として主題記載のように耐熱性ウェルシュ菌と称されるものであり、このような特殊な細菌の検出状況を徹底的に追究した点が本論文の新知見と見なされる。

以下、著者の研究項目について、その材料や方法を中心として、その研究成果につき概説する。すなわち、研究項目は次のとおりである。

I 健康人における耐熱性ウェルシュ菌の分布と排菌の推移

II Hobbs 型に属さない耐熱性ウェルシュ菌の血清学的型別

III 東京都内に発生した Hobbs 型に該当しない耐熱性ウェルシュ菌に起因する食中毒の疫学ならびに細菌学的検討

IV 食中毒事例由来、ウェルシュ菌の耐熱性芽胞形成能について

研究成績：

今回の耐熱性ウェルシュ菌（以下、耐ウ菌と略記）検出のための基本的な手技としては、可検材料をあらかじめ増菌用培地（チオグリコロート）に投入し、それを 100°C 、1時間加熱の前処理をしてから冷却し、以後、一旦、 37°C 18～48時間培養し、ついで集落分離用の選択培地（CW培地）に塗抹培養した。

I 健康人における耐熱性ウェルシュ菌の分布と排菌の推移

1957年に英国の London 市において、Hobbs が集団食中毒の発生事例の原因として、耐ウ菌の存在を確認し、しかもその菌の血清学的型別を提唱して以来多くの学者がこの知見を追認することになったが、このような耐ウ菌は必ずしも食中毒患者ばかりでなく、健康人のふん便からも往々検出される事実もまた見受けられることになった。なお、Hobbs の規定した耐ウ菌の血清型とは1型から17型にまで分類されているものである。従って、従来の食中毒事例の原因菌としては、大方この17血清型の何れかに一致することが判明していた。しかし、一方において、Hobbs の血清型の何れにも該当しない耐ウ菌が高率に健康人の腸管内に分布する事実が、今回の著者の調査結果として確認された。本論文には、このような耐ウ菌の検出率につき Hobbs 型と、またそれ以外の分類型（すなわち著者独自の考案による血清型）とが、各年齢層や地域別に健康人を対象として、如何ような分布状態にあるのかを調査した成績を記述したのである。

1. 健康人のふん便

1966～1968年の3年間に東京都内居住の年齢層の異なる5群の健康人のふん便約1gを、グリセリン保存液4mlに収納し、可検材料とした。

- | | |
|--------------------------|---------|
| a. 某乳児院に収容されている1～3歳の乳幼児： | 48名 |
| b. A～Fの6小学校の6～11歳の在学児童 | ：1,080名 |
| c. 某高校の15～17歳の在学生徒 | ：350名 |
| d. 某ホテルの20～50歳の従業員 | ：145名 |
| e. 某养老院に居住の60～80歳の老人 | ：65名 |

上記対象のうち、小学校児童およびホテル従業員以外は、何れもそれぞれの同一施設において完全給食を受けていた。

2. 耐ウ菌の分離培養および同定法

可検ふん便材料のチオグリオレート投入後に100°C、1時間加熱後、流水にて冷却し、37°Cに18~48時間培養し、培養後の培地の混濁とガス産生を認めた場合に、その2白金耳量を分離用平板培地（すなわちCW培地）に塗抹し、嫌気ジャー内に収めて、ジャー内の酸素を除去してから水素ガスで置換し、18~24時間嫌気培養した。分離菌株の同定にはグラム染色法、インドール試験、牛乳凝固試験、レンチナーゼ試験、炭水化物発酵試験、好気培養試験などを行なった。

3. 凝集反応による血清学的型別

免疫用抗原：Hobbs型別参考菌株をZeisslerのブドウ糖血液寒天に分離培養し、S型集落をチオグリオレート培地に鈎菌移植し、37°Cに18~24時間培養した。この培養菌液0.2mlを前記ブドウ糖血液寒天に新たに全面に塗布し、37°C、15~18時間嫌気培養後に発育した菌苔をかき集めて、0.6%ホルマリン加生理食塩液に浮遊させて、37°Cに48時間放置した。次に500rpmに20分間遠心沈澱を行ない、生理食塩液で3回洗浄し、最後に0.6%ホルマリン加生理食塩液で5mg/mlの濃度に再浮遊させたものを免疫用抗原とした。

なお、上記Hobbsの型1~13の各型別参考菌株はCentral Public Health Laboratory (London)のHobbs博士から分与されたものである。

抗血清：家兎に4日間隔で上記抗原を0.5, 1.0, 2.0, 3.0mlの順に静脈内注射し、さらに最終回に4mlを注射し、以後7日目に試採血し血清の抗体価を測定した。免疫用抗原に対する凝集素価が1:640以上に上昇していれば、直ちに正式に採血し、分離した血清を56°C、30分間非働化してのち使用した。このような抗血清は-20°Cに凍結保存した。

分離菌株の型別：

被検菌株の血清型は、それぞれの菌液による初め「のせガラス」上の凝集反応を試み、凝集の確められた際に、改めて当該抗血清との定量凝集反応を行なって決定された。なお、定量凝集反応の術式としては、0.5%、Tween 80加生理食塩液で倍数希釈した抗血清に1mg/mlの濃度の菌液を等量に加え、50°C 16~18時間の感作後に肉眼で反応を判定した。その結果、被検菌株が当該抗血清（各型血清）の固有凝集素価と同程度に凝集した場合に、同一抗原型と決定した。

以上の術式に従って、調査対象1,688名につきふん便からの耐ウ菌検出成績を総合したところ、236名(14.0%)が耐ウ菌陽性と判明した。これを年齢別に見ると、その検出率は前記(a)が12/48(25.0%)、(b)が139/1080(12.9%)、(c)が40/350(11.4%)、(d)では25/145(17.2%)、(e)では20/65(30.8%)と、それぞれ年齢層により僅かな検出率上での差異を示した。しかし、同一年齢層の中でも、地域の異なる小学校に通学する6群の学童で、耐ウ菌の検出率が最低6.3%から最高37.1%と大きなばらつきが認められたことから見て、以上の年齢層別の検出率には有意差を求めることができなかった。

なお、上記の健康人のうち、同一環境に、同一の食事を取って集団生活中の人々の耐ウ菌排出状況の推移を調べるため、これらの人々として(a)の48名と(e)の65名を選び、隔月および逐月に連続3回本菌の検索を行ない、その検出率は調査時点により10.4~30.8%と大きく変動することがわかった。さらに、これら検

出菌株について、Hobbs 型 1-13 の抗血清を用いて型別を試みた結果、同一個人から時期を隔てて採取した検体から 3 回連続して同一血清型の耐ウ菌を検出することのできた例は全く認められず、健康人の耐ウ菌の滞留は一過性のものであろうと推論された。但しこのような耐ウ菌の分布が判明するに要した菌株数としては、健康人由来の 772 株から、Hobbs の血清型の何れかに型別されたものは 304 株 (39.4%)、残りの 468 株 (60.6%) は型別不能であった。

II Hobbs 型に属さない耐熱性ウェルシュ菌の血清学的型別

上記により、健康人のふん便由来の耐ウ菌の約 60% が Hobbs 型抗血清により型別不能であったことからそれらの血清型別を試みるためにその中から最初に 20 菌株を任意に選び出して、Hobbs らの方法に準じてそれぞれの抗血清を作成した。その結果、その 20 株の抗血清を交差吸収によって凝集反応の結果、異同を確かめ、もし、これらの抗血清でも型別不能の菌株が残れば、さらに新たに別の菌株と同様に抗血清を調製し、このようにして未型別菌株の同定をどこまでも続行して、最終的に Hobbs の 1-17 型に該当しない健康人由来株を新たに 56 抗原型に型別することができた。この 56 の抗原型に対応する各血清型を著書は TW 1-56 と仮称することにした。この知見が今回の研究の最重要な点であり、所論が十分に評価されるべきところであろう。

以上の TW 血清型が明らかになった時点で、その抗血清を用い、主として Hobbs 型に属さない耐ウ菌の分布状況を把握する目的で第 2 回目の調査を 1969~1970 年の 2 ケ年にわたって前回同様総員 1091 名の健康人に由来するふん便について実施した。対象健康人の内訳は、6~11 歳の小学校児童 362 名、15~17 歳の高校生 350 名および 20 歳以上の成人 172 名とした。耐ウ菌型別対象株は、本菌が検出された 161 件のふん便からそれぞれ 5 個ずつの集落を釣菌した計 805 株である。これら 805 株のうち 318 株 (39.5%) は既知の Hobbs 型 1~17 の何れかに型別されたので、残り 487 株について TW 型血清による型別を試みた。その結果、今回 TW 型別の対象とした 487 株のうち 446 株 (91.6%) が TW 1~56 型の何れかに型別され、残りの 41 株 (8.4%) がこれらの新しい TW 型別法によっても型別不能であった。なお、比較的高頻度に検出された TW 型菌は 1, 5, 6, 11, 20, 21, 31, 44 および 52 などであった。

III 東京都内に発生した TW 型耐熱性ウェルシュ菌に起因する食中毒の疫学ならびに細菌学的検討

Hobbs 型耐ウ菌の腸炎起病性については、広く承認されているが、反面これらが型別されないために、耐ウ菌食中毒でありながら原因不明とされてきた事例の存在する可能性は否定できないであろう。上述の TW 型別の食中毒原因究明への菌学的応用は、Hobbs 型菌以外の耐ウ菌の腸炎起病性を確認する上で重要な手段となるといえる。ここでは TW 型に属する菌に起因する食中毒事例の発生の概要を述べ、これらの細菌 (耐ウ菌) の腸炎起病性への疑問の解答を与えることとした。

この検討は、1968 年以降東京都内に発生した集団食中毒を対象に加えられた。その結果、著者が明らかにした TW 型 4 ならびに TW 型 6 による各 1 事例、さらに TW 型 4 と 45、および Hobbs 型 11 と 15 の 4 者の混合感染と推定される 1 事例を明らかにすることができた。これらのうちの食中毒事例の一つを紹介すると次の通りである。

1968 年 6 月 19 日、東京都内の某旅館において集団食中毒が発生したが、その原因追求の結果、耐ウ菌 TW 型 4 に起因する食中毒と推定された。すなわち、原因食品は (鶏肉煮付) で、これを喫食した 328 名のうち 156 名が発病し、発病率は 47.6% である。その平均潜伏期は 16.5 時間で、主症状は腹痛 (85.3%)、水

様性下痢 (55.1%), 倦怠感 (37.8%), 頭痛 (33.3%) および悪感 (23.1%) である。少数例に発熱, 嘔吐が見られた。

細菌学的検査は原因食の残品および患者ふん便を対象に実施された。すなわち, 原因食品からは非加熱直接分離培養で食品 1 g 当り 3.7×10^3 個のウェルシュ菌が検出され, それらの菌株の血清型別により, 食品 1 g 当り TW 型 4 が 2.6×10^3 個, 型別不能株が 1.1×10^3 個と算定された。Hobbs 型菌は検出されていない。

一方, 患者について, 採取可能であった 2 病日患者の便 7 件について, 100°C , 1 時間加熱後耐ウ菌の検索を行ない, 6 例から TW 型 4 を検出した。この型の菌は同じ便の非加熱のままの分離培養でも純粋培養に検出された。すなわち, 患者ふん便の中には原因食品検出菌と同一菌型の耐ウ菌が多数排出されていることが判明した。なお, 同時に平行して検索した既知病原菌は陰性に終わっている。

IV 食中毒事例由来ウェルシュ菌の耐熱性芽胞形成能について

一般に, 細菌性食中毒の原因菌決定のための必要条件としては, 患者のふん便から, 人体での腸炎起病性の細菌を分離同定すると同時に, 推定原因食となった食品から, 患者ふん便から検出されたものと同一の菌が分離されたことを確認することが, その他の疫学的傍証と共に必要不可欠な条件である。ところが, 耐ウ菌による食中毒の場合には, ややその趣きを異にして, 推定原因食品から耐ウ菌を検出する目的でその食品乳剤を単にチオグリコロート培地に培養し, 患者ふん便からの菌分離の際と同様に 100°C , 1 時間加熱したのちに菌分離を試みたのでは, 耐ウ菌の存在を証明することができないという難点がある。つまり, 遺伝学的に耐熱性芽胞形成菌の形で存在せずに大部分が栄養型の形をとっている。そのため食品を耐ウ菌分離の常法に従って直接加熱した場合には, それらは死滅してしまい, その存在を証明することは不可能に近く, 原因を明らかになし得ない。

そこで著者は, 食中毒例からの分離菌を用いた実験に先立って, Hobbs 型 1—17 型別参考菌株について, 現在ウェルシュ菌芽胞形成培地として報告されている Ellner 培地, Kim らの培地, Dancan 培地ら 5 種類の培地の耐熱性芽胞形成能を比較検討した。すなわち, 各型別菌参考菌株をこれらの増菌用培地に培養し, 37°C , 48 時間培養後に, その培養を 100°C , 60 分間加熱し, 冷却後その 1 白金耳を 5% 卵黄加 CW 寒天平板に塗抹して, 上記の加熱条件に耐える芽胞を形成していたかを検討した。その結果, Kim らの培地が最もすぐれていた。

そこで改めて, 食中毒患者や健康人由来の耐ウ菌および推定原因食由来の耐ウ菌につき耐熱性芽胞形成能を Kim らの培地で試験した。その結果, 当研究室が体験した 8 事例のウェルシュ菌食中毒の原因食品から非加熱で分離された 53 株について, 耐熱性芽胞の形成能を調べたところ 50 株 (94.4%) に耐熱性芽胞の形成能のあることが判明した。これに反して, 健康人のふん便由来の非加熱直接培養で分離された 96 株の何れもが耐熱性芽胞の形成能を示さなかった。このことは, 一見, 既述の健康人ふん便由来の耐ウ菌検出率の事実と矛盾するようであるが, 健康人の腸管常在性のウェルシュ菌の大部分は 80°C , 30 分の加熱で死滅する熱抵抗性の弱い芽胞形成性のウェルシュ菌で占められており, たとえ耐熱性ウェルシュ菌が混在していても, その菌量は極めて少量なために, 健康人の非加熱ふん便から直接分離した菌株の中に耐ウ菌が混入してくる確率が極端に低いことを示したものと考えられる。

結論: 以上を要約すると, 健康人ふん便中に, 人の食中毒起因菌と同じ性状を有する耐ウ菌が広く分布

していること、および血清学的にはそれらからの分離耐ウ菌の約40%が、従来から知られている Hobbs の 1~17 型菌で、残りの約60%が今回著者が明らかにした TW 1~56 型から成立していることを述べた。

同時に、1968 から 1970 年に至る 3 年間に、著者が今回、健康人のふん便中にも存在することを明らかにした TW 型菌と全く同一の抗原型を有する耐ウ菌に起因する集団食中毒事例が 3 例東京都内に発生したことを、それらの疫学的調査結果をも含めて記述した。

さらに、従来、耐ウ菌食中毒事件の解明の際に、推定原因食と患者発生の因果関係を証明することが困難であるとする原因の、食品中の耐ウ菌の証明を、非加熱食品の乳剤を一旦、芽胞形成培地に接種して培養したのち、その耐熱性芽胞形成能を調べて間接的に耐ウ菌が存在したことを証明する方法を確定し、耐ウ菌食中毒の日常検査を容易にすることができた。

以上、著者の本研究は、人の食中毒の原因として耐熱性ウェルシュ菌なるものの存在を強調した成績であるが、これは独り学術的興味のものであるばかりでなく、実地食品衛生の業務を担当する技術者に多大の示唆を与えるところであり、獣医学博士の学位を受けるのに相応しい業績であると評価する。