

木曾川流域における *C. botulinum* の 分布について

小林とよ子・浅見 望

Distribution of *Clostridium botulinum* type C in the
Kiso River

Toyoko Kobayashi and Nozomu Asami

自然界におけるボツリヌス菌の分布調査はボツリヌス菌の生態学上、またボツリヌス中毒予防の基礎資料を得るため重要である、しかし、その調査地域は限られており、東海地方におけるボツリヌス菌の分布についてはいまだ検討されていない。

著者らは、東海地方におけるボツリヌス菌の汚染状況を把握する目的で、木曾川、長良川、揖斐川の三河川におけるボツリヌス菌の分布について検討している。本報では主として木曾川流域の土壌についてボツリヌス菌の分布を検討したので報告する。

実験材料と方法

I. 検査材料

1. 検査材料の採取時期

土壌サンプルは1978年8月6日から11月19日までに採取した。

2. 土壌の採取地点

検査材料の採取地点は図1に示した。木曾川上流および中流、木曾川、長良川、揖斐川の三

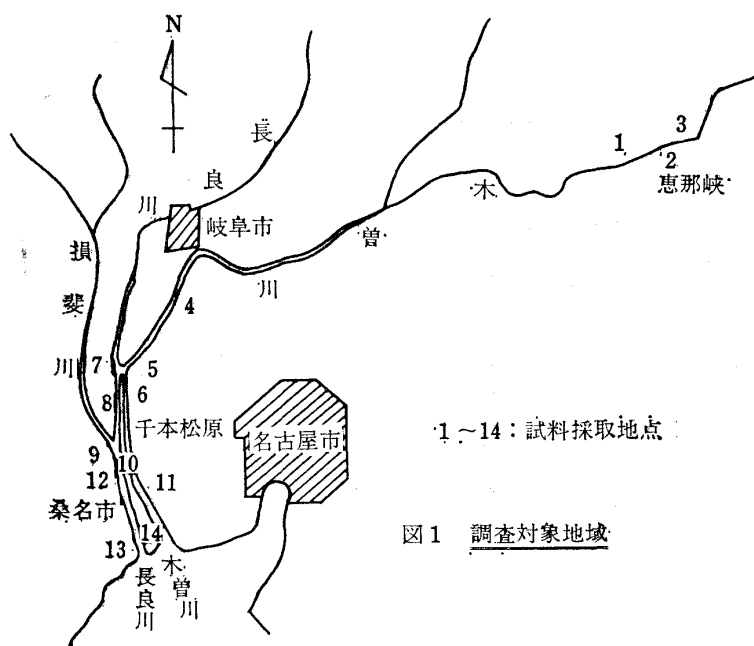


図1 調査対象地域

河川合流点およびその河口流域の土壌を採取した。すなわち、木曾川上流の恵那峡では No. 1～3 地点の22検体、中流の三河川合流点では木曾川沿いの No. 4～6 地点の40検体長良川沿いの No. 7, 8 地点の7 検体揖斐川沿いの No. 9 地点の6 検体、および河口附近の海水流入部では No. 10～14 地点の45検体、合計 14 地点から採取した 120 検体の土壌を用いた。

材料は原則として、同一地点で波打ち際、草の下および水中約 50 cm の3ヶ所の土壌を採取した。いずれも表面から 10～20 cm の土壌を取り除いた下の部分の泥土を採取し、ビニール袋に入れて実験室に持ち帰った。

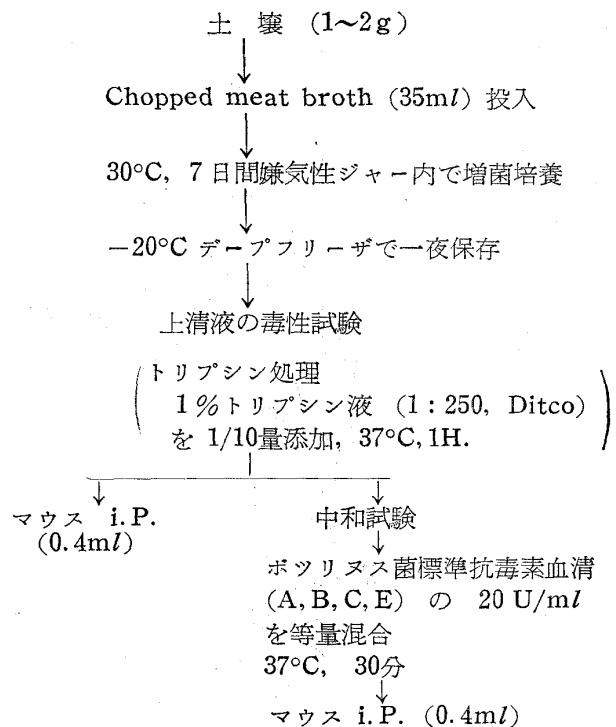
3. ボツリヌス菌用増菌培地

土壌からのボツリヌス毒素の検出には、自家製の Chopped meat broth 増菌培地¹⁾を用いた。Chopped meat broth の作製方法は、蒸留水 1.000 ml に対し、脂肪の少ない良質の牛挽肉 500 g を大型フラスコ中で十分混和後、5°C の冷蔵庫にて一夜浸漬する。次に 100°C 90分間加熱後、濾過を行ない、濾液の pH を 7.4 に調整する。この濾液を 100°C、30 分間再加熱する。ついで、濾液を pH 7.4 に再調整後、この濾液 1000 ml に対し、Proteose Peptone No. 2 (Difco) 1%, NaCl 0.5%, Soluble starch 0.5% および Yeast extract (Difco) 0.3% を加え、加温、十分混和し pH 7.4 に調整する。大型試験管(2.5cm×20cm)に肉汁を作製した時の残りの肉滓約 5 g と大理石片(2～3 g)を加え、上記のブイヨン約30～35 ml 分注後、120°C、15 分間滅菌した。この培地は土壌の増菌培養を行なう 2 日前に、約15分間煮沸して培地の脱気を行ない、急冷後直ちに内部が嫌氣的環境に保持されている。Anaerobic glove box 内に入れ Chopped meat broth 全体を十分嫌氣的に保持した。

4. ボツリヌス菌検出法

土壌からのボツリヌス毒素検索方法を図 2 に示した採取した。土壌 1～2 g を夫々自家製 Chopped meat broth 増菌培地に直接投入し 30°C、7 日間 Anaerobic glove box 内で嫌気培養した。増菌培養した Chopped meat broth 増菌培地は -20°C の deep-freezer の中で一夜凍結保存¹⁾した。ついで、その解凍した各被検材料の培養上清液について、ボツリヌス毒素の証明を行なった。それには、各培養上清液に M/15 リン酸緩液衝 (pH6.0) で溶解した 1% トリプシン液 (1:250, Difco) を 1/10 量加え、37°C で 1 時間処理した。その 0.4ml をマウスの腹腔内に注射し、5 日間観察した。マウスがボ

図 2. 土壌からのボツリヌス菌の検索方法



ツリヌス毒素による特有の麻痺症状を呈した場合、その培養上清液に対してボツリヌスA, B, C, E型の抗毒素血清 20IU/ml (国立予防衛生研究所および千葉県血清研究所より分与)による中和試験を実施した。中和処理を行なった培養液を注射したマウスが生き残り、対象のマウスが斃死した場合、ボツリヌス毒素陽性として毒素型を決定した。

実 験 成 績

土壤採取地の状況とその調査成績を表1に示した。

木曾川流域を対象として、14ヶ所から採取した120検体の土壤についてボツリヌス毒素の証明を行なった結果、120検体中65例(54.2%)の培養上清液にマウス致死毒素が認められた。ボツリヌス抗毒素血清による中和試験では、この65例の培養上清中の毒素はすべてボツリヌスC型の抗毒素血清によって特異的に中和された。しかし、今回の実験では通常の嫌気培養法で、いずれの検体からもボツリヌスC型菌を分離することは出来なかった。

土壤採取地の状況別によるボツリヌスC型毒素の検出例については、水草の下の土壤からの

表 1. 土壤採取地の状況と調査成績

No.	採 取 地 名	採 取 地 の 状 況			ボツリヌス 毒素陽性率
		波打ち際	草 下	水深 50cm	
1	恵那峡 (渡し場)	1/ 3*			1/ 3
2	恵那峡 (砂州)	0/ 3			0/ 3
3	恵那峡 (奥)	3/16			3/ 16
4	千本松原 (木曾川)	3/ 3	16/17		19/ 20
5	千本松原 (木曾川)			0/ 3	0/ 3
6	木曾川河口附近	1/ 3	10/14		11/ 17
7	千本松原 (長良川)		1/ 3		1/ 3
8	長良川河口附近		2/ 4		2/ 4
9	揖斐川分岐点	3/ 4	0/ 2		3/ 6
10	木曾崎村 (輪 中)	0/ 1		0/ 2	0/ 3
11	長嶋温泉 (大橋下)	0/ 2		4/ 7	4/ 9
12	桑 名 (大橋下)	3/ 6			3/ 6
13	桑 名 (提防先端)			2/ 5	2/ 5
14	桑 名 (提防近く古池)	5/ 6	1/16		16/ 22
合	計	19/47	40/56	6/17	65/120

※) 分母：検体数
分子：ボツリヌス毒素陽性例

ボツリヌスC型毒素陽性率は71.4% (56検体中40例)であり、次いで、波打ち際の土壌からは40.4% (47検体中19例)水深50cmの所から採取した土壌ではボツリヌス毒素の検出は最も低く、35.3% (検体中6例)であった。

なお、土壌採取地域別による検出率については、木曾川上流の恵那峡の土壌では18.2% (22検体中4例)がボツリヌスC型毒素陽性であり、中流附近の木曾川、長良川、揖斐川の三河川合流点から採取した土壌では、木曾川流域3地点から75% (40検体中30例)長良川流域2地点から42.9% (7検体中3例)、揖斐川流域1地点から50% (6検体中3例)がボツリヌスC型毒素陽性であったついで、木曾川の伊勢湾への河口附近の土壌から55.6% (45検体中25例)がボツリヌスC型毒素陽性であった。

考 察

ボツリヌスE型菌はバルト海²⁾、五大湖³⁾、北海道沿岸^{4,5)}および東北地方^{6,7)}など北半球の一部の土壌にのみ、濃厚に分布するものと考えられていた、従来全く中毒発症例が報告されていないタイでの大規模な調査結果から、Tanasugarn⁸⁾はタイ湾の水深20mおよび30mの海泥から2.5% (475検体中12例)にボツリヌスE型とD型毒素が見出された事を報告した。さらに徳地^{9,10)}らは、これまでにボツリヌス中毒がないとされていた滋賀県下でのボツリヌス中毒の発生に際して、土壌中のボツリヌス菌の分布を検討した。即ち、琵琶湖とその周辺ならびに主要河川を中心に、ボツリヌス菌の分布調査を行なった結果、琵琶湖の湖泥から54.2% (24検体中13例)11河川の土壌から10.1% (159検体中16例)、および河口地域より13.6% (110検体中15例)にボツリヌスE型毒素を証明した。特に、湖泥中にボツリヌス菌が濃厚に分布していることを報告した。藤井ら¹¹⁾は大阪湾にもボツリヌスE型菌の分布をみとめ、これは琵琶湖からの流入であると考えている。さらに土壌におけるボツリヌスC型菌の分布調査に関しては、芹川ら¹²⁾による石川県内の湖沼からの報告および伊藤ら¹³⁾による東京都内の中川流域の泥土から、第1回調査では53.8% (52検体中28例)ついで第2回目の調査では25.0% (56検体中14例)にボツリヌスC型毒素を証明した。そして坂口ら¹⁴⁾は、大阪府下の淀川、大和田川河畔の土壌中にはボツリヌスC型、D型芽胞が高率に分布していることを報告した。そして、これらのボツリヌスC型、D型菌による河川の濃厚な汚染の原因は、プロイラーの消化管内で増菌されたものが排出され汚染されたものと推測している。このように、本邦でもかなり広範囲にボツリヌスC型、D型、E型菌が分布しているものと考えられる。しかし、多くの地域では未調査であり、その実態は不明である。

今回、著者らは木曾川流域の土壌中におけるボツリヌス菌の分布を調査した結果、全流域においてボツリヌスC型毒素が証明された。しかし、その分布は地区によって異なり、木曾川上流では18.2%中流では67.9%河口附近では55.6%のボツリヌス毒素陽性を示した。これらのボツリヌス毒素はすべてC型と判定され、A、B、E型毒素は証明されなかった。

林ら¹⁰⁾は、琵琶湖に流入する主要河川における土壌中のボツリヌスE型菌の分布を調査し、中流からの検出率は4.1% (49検体中2例)であり、中流での分布は極めて少ないと推定している。しかし、著者らの今回の調査では、木曾川中流におけるボツリヌスC型毒素の検出は高率であった。その理由は不明であるが、琵琶湖の特殊性によるものか、葦等の水草の下からの泥土を採取したためか、あるいはその地点には渡鳥である野鳥が群集したためであるかは明らかでない。併し、著者らは、時期を違えて2回に分けて採取した土壌からボツリヌス毒素が高率に証明したことからも、木曾川流域の土壌中にはボツリヌス菌が渡鳥によって汚染されるのみでなくボツリヌス菌の芽胞が常在しているものと考えたい。しかし、流量、土壌の富養性および採取部位による違いも考慮すべきであり、今後更に東海地方の各河川周辺の土壌、魚類あるいは渡鳥との関連性についても検討したい。

なお、培養上清中にボツリヌス毒素が検出されたものについて、平板培地による菌の分離を試みたが、ボツリヌス菌を分離することは出来なかった。

ま と め

東海地方におけるボツリヌス菌の汚染状態を調べる目的でもって、1978年8月より11月までに木曾川流域14地点から採取した土壌120検体について、自家製 Chopped meat broth 増菌培地を用いてボツリヌス菌の分布調査を行ない、次の結果を得た。

1. ボツリヌス毒素陽性率は54.2% (120検体中65例)であり、その毒素型はすべてボツリヌスC型であった。
2. 試料採取地の状況別によるボツリヌスC型毒素の陽性率は水草の下から、取した土壌が最も高く71.4% (56検体中40例)であり、次いで波打ち際には40.4% (47検体中19例)、水深50cmの所から採取した土壌では35.3% (17検体中6例)であった。
3. 土壌採取地域別による検出率は、木曾川中流から採取した土壌が最も高く67.9% (53検体中36例)、次いで河口附近では55.6% (45検体中25例)、上流から採取した土壌では18.2% (22検体中4例)であった。

終りに、種々な御便宜をはかり、御指導賜わった岐阜大学医学部嫌気性菌実験施設の上野一恵教授に深く御礼申し上げます。なお、ボツリヌス抗毒素血清の分与を受けた千葉県血清研究所近藤久博士および国立予防衛生研究所近藤了博士に謹謝致します。

文 献

- 1) Smith, L.D. S. (1976): The Pathogenic Anaerobic Bacteria, C. C. Thomas, U. S. A.
- 2) Johannsen, A. (1963): J. Appl. Bacteriol., 26; 43.
- 3) Bott, T.L. et al. (1966): J. Bacteriol., 91; 919.
- 4) 中村 豊他 (1954): 北海道衛生研究所報, 3; 1.

6

- 5) 小野悌二他(1967) : 北海道衛生研究所報, 17; 1-12.
- 6) 山本耕一他(1976) : 青森県衛生研究所報, 14; 19-22.
- 7) 石田四郎他(1969) : 岩手県衛生研究所報, 13; 133-135.
- 8) Tanasugarn, L. (1979): *Appl. Environ., Microbiol.*, 37; 194-197.
- 9) 徳地幹夫他(1973) : 滋賀県立衛生公害研究所報, 9; 23-28.
- 10) 林 賢一他(1974) : 滋賀県立衛生公害研究所報, 10; 9-17.
- 11) 藤井謙芳他(1978) : 日本細菌学雑誌 32; 949.
- 12) 芹川俊彦他(1976) : 石川県立衛生公害研究所報, 13; 113-118.
- 13) 伊藤 武他(1978) : 東京都立衛生研究所報, 29-1; 13-18.
- 14) 坂口玄二他(1978) : 日本細菌学雑誌, 33; 673-680.