

## 2012年における河川からのボツリヌス菌検出状況

渡邊奈々子<sup>1)</sup> 千葉一樹 菅野奈美 二本松久子 小黒祐子 佐藤弘子<sup>2)</sup>  
 微生物課 <sup>1)</sup> 福島県立総合衛生学院 <sup>2)</sup> 前福島県衛生研究所

### 要 旨

県内 2 河川（伊南川，摺上川）の土壌を採取し，それらを用いてボツリヌス菌検査法の再確認及びボツリヌス菌の分離を試みた．その結果，2 河川それぞれの土壌から 2 株ずつ，計 4 株の E 型ボツリヌス菌が分離された．さらに，分離菌について PFGE 法を行った結果，伊南川由来の 1 株は昭和 52 年に発生したボツリヌス食中毒の原因菌と同一パターンを示した．

キーワード：ボツリヌス菌，毒素，河川

#### はじめに

当所は 2007 年度より地方衛生研究所衛生微生物技術協議会北海道・東北・新潟支部ボツリヌス菌レファレンスセンターとなっている．そのため，ボツリヌス菌毒素産生の証明となるマウス試験法については，保存菌株を用いて定期的に試験を行い，手技の確認及び伝達を行ってきた．

一方，福島県では昭和 52 年以降ボツリヌス菌による食中毒が 5 件発生しており，昭和 52，53 年に行われた伊南川流域のボツリヌス菌分布調査では，広域にわたるボツリヌス菌汚染が確認されている<sup>1)</sup>．

今回は，以前の分布調査から 30 年以上経過していることから，実地調査も兼ねて，伊南川及び摺上川の土壌を採取した．それらを用いて，検査法の再確認と検体からのボツリヌス菌の分離を試みたので，その結果を報告する．

#### 材 料

2012 年 7 月，摺上川の 3 地点 A，B，C から採取した川底の土壌 10 検体，及び，伊南川の 3 地点 D，E，F から採取した川底の土壌 10 検体の計 20 検体を用いた．

#### 方 法

##### 1 増菌培養

検体 100g を等量の生理食塩水と十分に混和後，20 分間静置した．上清を 10,000rpm，20

分間遠心し，沈渣を少量の生理食塩水で浮遊させたものを試料とした．

ブドウ糖・澱粉加クックドミート培地 6 本に試料を約 0.5mL ずつ接種し，加熱しないものを 2 本，60℃ 15 分間加熱処理を 2 本，80℃ 30 分間加熱処理を 2 本として，それぞれ 30℃ で 6 日間嫌気培養を行った．

##### 2 PCR法

増殖が認められた増菌培地の深部液を 100μL ずつ採取して，5 検体ごとにまとめた Mix 増菌液を遠心後，沈渣に 0.1% Tween20 加 TE を 100μL 加えた．100℃ 10 分間の加熱処理を行った後，再び遠心してその上清をテンプレートとした．

ボツリヌス菌検出用 Primer Set (TaKaRa) のプロトコールに従って，A～G 型毒素遺伝子の PCR を実施した．

毒素遺伝子が確認された場合，個々の増菌液で再び PCR を行った．

##### 3 分離・同定

PCR 法で毒素が確認された増菌培地の深部液を，卵黄加 GAM・CW 寒天培地に塗抹して 30℃，48 時間嫌気培養した．併せて，深部液にエタノールを等量混合後，25℃ で 1 時間置いたものも同様に嫌気培養を行った．

ボツリヌス菌と疑われるコロニーを釣菌して純培養後，同定キット (RapID ANA II) で判定した．

4 マウス試験法

分離同定したコロニーを増菌培地で嫌気培養し、その増菌液を等量のトリプシン溶液と混和した。37℃で1時間処理後、遠心してその上清を試料とした。

次の3群（1群につきマウス2匹）を用意し、マウスの腹腔内に0.5mLずつ注射して4日間経過観察を行った。

第1群：試料をそのまま注射

第2群：試料を100℃10分間加熱後注射

第3群：試料を等量のE型ボツリヌス菌抗毒素血清（1U/mL）と混和して、37℃で15～30分間反応後注射

沈渣を solution で懸濁し、1.5% SeaKem Gold Agarose を加えてサンプルキャストでプラグを作製した。プラグは lysis buffer で 37℃、18時間処理後、ProK buffer で 50℃、48時間処理した。制限酵素 *SmaI*, *NruI* による酵素処理後、6V/cm、スイッチングタイム 0.5～40秒、19時間、14℃の条件で電気泳動を行った。サイズマーカーは *Salmonella* Braenderup H9812 (*XbaI* 処理) を使用した。

また、当所に保存してある E 型ボツリヌス菌 1 株（昭和 52 年分離、いずし由来）も同時に泳動した。

結果及び考察

1 増菌培養

加熱なし、60℃15分間加熱の増菌培地は、すべて何らかの増殖を認めた。80℃30分間加熱の増菌培地では、1/4 程度の試験管で増殖の不明なものがあつた。よつて、60℃15

5 PFGE法

分離同定したコロニーを Eric A. Johnson らの文献<sup>2)</sup> を参考にして PFGE 法を行った。

TPGY で嫌気培養後、培養液に 4%ホルマリン液を加えて 30 分間処理した。遠心後、

表1 各試験結果（PCR法・分離培養・同定）

検体 No.	PCR(増菌液)	分離培地*				同定	採取場所
		GAM1	GAM2	CW1	CW2		
1	-						
2	+(E型)	+	2+	+	2+	99.9% <i>C.botulinum</i> II	摺上川 A
3	+(E型)	-	2+	-	2+	99.9% <i>C.botulinum</i> II	
4	-						
5	-						摺上川 B
6	-						
7	-						
8	-						摺上川 C
9	-						
10	-						
11	-						
12	+(E型)	+	2+	-	+	99.9% <i>C.botulinum</i> II	伊南川 D
13	-						
14	-						
15	-						伊南川 E
16	+(E型)	+	2+	-	2+	99.9% <i>C.botulinum</i> II	
17	-						
18	-						伊南川 F
19	判定保留(E型)		2+		2+	99.9% <i>C.botulinum</i> II	
20	-						

\* +: リパーゼ反応陽性コロニー有り, -: リパーゼ反応陽性コロニー無し

GAM1・CW1: 増菌液の塗抹結果, GAM2・CW2: エタノール混合増菌液の塗抹結果

表2 毒素試験結果（マウス試験・PCR）

検体 No.	マウス試験*			判定	PCR (E型・コロニー)	
	第1群	第2群	第3群		1回目	2回目
2	—	—	—	E型毒素の産生なし	—	+ (6/6)
3	d	—	—	E型毒素の産生あり	+	
12	d	—	—	E型毒素の産生あり	+	
16	d	—	d	抗毒素の力価が不十分	+	
19	実施せず					— (0/7)

\* d：腹壁の陥没，麻痺，呼吸困難等のボツリヌス毒素による特有症状後，死亡  
—：症状無し

分間加熱の増菌培地を PCR 法に使用した。

結果，すべて 99.9 % *C.botulinum* II となった。

## 2 PCR法

表1に示すとおり，摺上川由来の検体については検体 No.2, 3 から E 型毒素遺伝子が確認された。

伊南川由来の検体については，検体 No.12, 16 から E 型毒素遺伝子が確認された。検体 No.19 については薄いバンドが確認されたため判定保留とし，検体 No.2, 3, 12, 16 とともに分離培養へ進むことにした。

また，プライマーの種類によってはエキストラバンドが多数現れるものがあり，判定に苦慮することもあった。場合によっては PCR の反応条件を検討する必要があると思われる。

## 3 分離培養

表1に示すとおり，検体 No.2, 3, 12, 16, 19 のすべての検体からボツリヌス菌を疑うコロニー（リパーゼ反応陽性）が分離された。

この分離培養では，エタノールを等量混合した増菌液からの塗抹・培養が非常に有効であった。増菌液だけの場合，夾雑菌が優位に検出されてしまい，ボツリヌス菌が見つからない培地もあったが，エタノールを等量混合した増菌液からの培地は夾雑菌が有意に減少した。

分離したコロニーを同定キットで判定した

## 4 マウス試験法

結果を表2に示す。

検体 No.3, 12 については第1群のみが死亡し，E型毒素の産生が認められた。

検体 No.16 については第1群だけでなく第3群も死亡したため，試料中の毒素量に対して抗毒素の力価が不十分であった可能性が考えられた。

検体 No.2 についてはすべての群が生存し，E型毒素の産生が認められなかった。そこで，マウス試験で使用したすべてのコロニーを PCR で確認した結果，No.2 のコロニーは E 型毒素遺伝子を保有していなかった（PCR 1回目）。そのため，分離培地から複数のコロニーを釣菌し，再度 PCR を行った結果，E型毒素遺伝子を保有するコロニーが見つかった（PCR 2回目）。

また，検体 No.19 についてはマウス試験は実施せず，複数のコロニーを PCR で確認したが，E型毒素遺伝子を保有するコロニーは見つからなかった（PCR 2回目）。

検体 No.2 の最初のコロニー及び No.19 のコロニーは，分離培地の形状や同定キットの結果ではボツリヌス菌と思われたが，毒素を保有していなかった。自然界の土壌等には無毒のボツリヌス E 型菌類似菌（生化学的性状等がボツリヌス E 型菌と類似している，

以下“類似菌”とする)の存在が確認されており<sup>3)</sup>、今回のコロニーも類似菌であった可能性が考えられた。もし検体中に類似菌が含まれていたとしても、ボツリヌス症疑いの患者が発生した場合の最初に行うマウス試験については、検体そのものを使用するため問題とはならない。しかしボツリヌス菌の分離を試みる場合は、分離したコロニーについてPCRで毒素遺伝子を確認してからマウス試験に臨む必要があると考える。

## 5 PFGE法

結果を図1に示す。

摺上川由来の検体 No.2, 3 は同一のパターンを示した(レーン 1, 2)。

伊南川由来の検体 No.12, 16 は異なるパターンを示した(レーン 3, 4)。この2株は採取場所が異なるためパターンも異なった可能性が高いが、伊南川流域では少なくとも2種類のE型ボツリヌス菌が存在することがわかった。また、その一つである検体 No.16 は昭和52年、旧南郷村で発生したボツリヌス食中毒の原因菌(レーン 5)と同一パターンを示した。

### まとめ

伊南川及び摺上川の土壌を採取し、それらを用いてボツリヌス菌検査法の再確認及びボツリヌス菌の分離を行った。その結果、伊南川由来の検体から2株、そして摺上川由来の検体からもE型ボツリヌス菌が2株分離された。

今回の検査では、菌株ではなく実際に検体を扱うことで、新たな注意点や有用性などを確認することが出来た。また、PCRについてはプライマーや反応条件の検討と併せ、時間短縮のため MultiplexPCR についても検討すべきと思われた。

ボツリヌス症は発生自体は希であるが致死率が高い疾患である。今回の調査で、県内の河川には依然としてボツリヌス菌が分布していることを確認した。よって、河川の魚介類についてはボツリヌス菌に汚染されている可能性を考えて取り扱う必要がある。

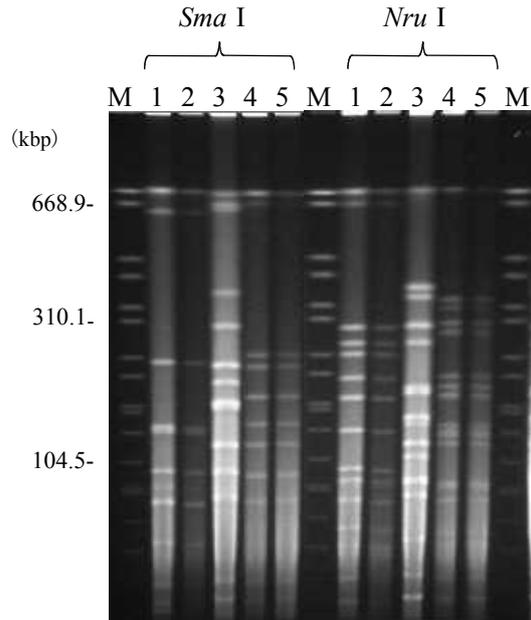


図1 PFGE結果

レーン1 : 検体No. 2  
 レーン2 : 検体No. 3  
 レーン3 : 検体No. 12  
 レーン4 : 検体No. 16  
 レーン5 : 食中毒原因菌(昭和52年)  
 M : DNAサイズマーカー

### 謝辞

ご助言をいただきました国立感染症研究所細菌第二部 加藤はる先生、見理剛先生、国立大学法人 弘前大学大学院 大友良光先生に深謝いたします。

### 引用文献

- 1) 福島県保健環境部環境衛生課. ボツリヌス食中毒に関する調査報告書. 1981 ; 27-32.
- 2) Eric A. Johnson, William H. Tepp, Marite Bradshaw, et al. Characterization of *Clostridium botulinum* Strains Associated with an Infant Botulism Case in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology* 2005 ; 43( 6 ) ; 2602-2607.
- 3) NIID 国立感染症研究所 病原体検出マニュアル ボツリヌス症  
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>  
 2012/12/7