

# 北海道の各地に発生したボトリヌス食中毒について

北海道立衛生研究所	(所長)	中 村 豊
技 師	中 村	豊
技 師	飯 田 広	夫
技 師	佐 伯 潔	潔
技 師	神 沢 謙 三	三
北海道衛生部環境衛生課	(課長)	時 任 旭)
技 師	古 賀 有 道	道

## 内 容

### 序 言

ボトリヌス中毒はわが国に今までなかつたか、

ボトリヌスについて

症状について

北海道に於て発生した各類例について

第1発生例(岩内郡島野村の例)

昭和27年興部及び女満別に発生したボトリヌス

I. 興部町に発生した例 II. 女満別町に発生した例

女満別のボトリヌスと連関ある遠隔地の中毒発生例

佐呂間町に於ける発生例

“いづし”とボトリヌス

中毒を起した“いづし”的味、臭い及びPHについて

ボトリヌス発生例と“いづし”的状態

ボトリヌス菌及び毒素を有する食品のPHについて

ボトリヌス原因食に於ける毒素の分布

### 検索方法及び成績

岩内株の分離に至るまで

I. 患者のとつた“いづし”からのボ菌E型毒素の証明、毒素証明の順序

a. 動物試験による毒素含有の確認

i. “いづし”浸出液の動物接種 ii. 同材料の経口的投与

b. ボ菌各型抗毒素血清を以てする中和試験による“いづし”中の毒素の型の証明

II. “いづし”からのボトリヌスE型菌の分離

ボトリヌス菌分離の順序

1. “いづし”乳剤の遠心沈渣採取、加熱除菌——増菌培養を行う

2. 動物試験によつて増菌培地の毒素産生の確認——それからの分離

3. Weinberg法を行い深部集落を作らせる——疑わしい集落からの釣菌

4. 或は2.から釣菌して平板培地に塗抹(嫌気性)培養を行い表面集落を作らせる——疑わしい集落の検査

吾々の行つた嫌気性培養について

神沢氏ドライアイス添加培養法

ボトリヌス菌集落の性状  
ボトリヌス菌の所見  
5. 3. 及び 4. の集落の同定  
E型菌の毒素産生について  
佐伯氏魚培地について  
E型菌の毒素産生能に関する変異株の出現について  
分離E型菌株の生物学的性状の検索  
表面蛋白の溶解性  
糖類分解性の検索  
岩内株の熱に対する抵抗性についての実験  
E型菌であることの同定試験——抗毒素血清を以てする交叉的中和試験  
1. 岩内株の同定  
i. A型菌毒素との交叉的中和試験 ii. B型菌毒素との交叉的中和試験 iii. 標準E型株  
毒素との交叉的中和試験  
2. 肝部及び女満別例の分離毒素のE型なることの証明

土(或は砂)からのボトリヌスE型菌の検出

吾々のとつた分離方法

魚とボトリヌスE型菌について

結語

## 序言

最近食中毒の原因として種々なる細菌が挙げられてきたが、これはその検索方法が愈々精緻となり、又菌の性状殊に免疫学上並びに生物学的性状の研究が進歩を来たしたからであろう。このことは食中毒の発生に際し及ぶかぎり高度の科学技術を結集して原因の検索に当らなければならないことを示すものである。

細菌性食中毒としてのボトリスムス症は欧米においては敢えて新しいものではない。然し致命率が高きことと、その予防が困難なることによつて公衆衛生学上極めて重要視されていることは申すまでもない。

殊に罐詰その他の保存食品の製造に際して、万一ボトリヌス菌(腸詰菌)芽胞の混入があつてはならないから、これに対して最大の関心が払われることを考えると、ボトリスムスの問題は一層重要なつてくる。

わが国においては嘗てボトリスムスの報告例がなく、即ち本邦の土壤中にはボトリヌス菌の芽胞はないものと考えられていた。従つて種々なる食品の調製に關してその材料にボトリヌス菌芽胞の混入の可能性などは全く考えられず、食品はボトリヌス毒素に関してはすべて安全なりとされていた。

然るに昭和26年5月本道の日本海に面する岩内町郊外島野村に起つた鯵“いづし”(飯鮎)による食中毒は著者等の細菌学検査によつてボトリヌス中毒であることが明かになつた。同じ“いづし”を家族、親戚、知人の24名が食べて死者4名、重症者3名、軽症者数名を出したこの中毒例の残存食品即ち鯵“いづし”からボトリヌス菌毒素を証明し且つボトリヌス菌 Clostridium botulinum の検出に成功したのである(第1類例)。これに關しては本研究所特報において発表した。<sup>1)</sup>

かくして本邦にも諸外国と同じく、この食中毒があり、それは必然的にわが国の土壤中に該菌の芽胞が存することを物語るものである——このことは北研広木博士が長崎大学青木教授と共に鹿児島県下の土において、また著者等は網走湖畔の砂から検出した。

このボトリヌス食中毒の実在性が、著者等の報告によつて知れ渡るや、著者等の記述に似た症状を呈する食中毒が俄に注目されてきた。即ちその後中毒発生の場合に疑わしき徵候を呈するや、その残存食品が当衛研に送附され、検査の結果、次に述べる発生例がいずれもボトリヌス中毒であると確認されるに至つた。

北海道に於けるボトリヌス中毒発生地略図



- |            |          |
|------------|----------|
| 1. 岩内郡島野村  | 昭和26年5月  |
| 2. 紋別郡興部町  | 昭和27年11月 |
| 3. 網走郡女満別町 | 昭和27年12月 |
| 4. 常呂郡佐呂間町 | 昭和28年10月 |

(後述)。又いざれも自家製品を家族、知人が食べて中毒したのであるから他の一般食中毒と違つて罹患数は少なく、これに反して致死率は高い。この事実もボトリヌスの条件に合致する。

これ等のボトリヌス中毒は悉く著者等の検索の結果E型菌毒素によることが証明せられたことは注目に値する。

ボトリヌス菌にはA, B, C, D及びEの5菌型が知られている。このうち欧米諸国に於て最も多く中毒を起すのはA及びB型菌である。C型及びD型菌は専ら家畜及び家禽を侵すもので、人には病原性がないと考えられ人のボトリヌスとは無関係とされている。

E型ボトリヌス菌は1936年以来知られたが、現在、世界を通じてボトリヌスの7発生例に見出されているに過ぎない。従つて著者等の分離したものは第8, 9, 10番目の菌と云うことになる。尤もロシアにはE型によるボトリヌスが多くあるのではないかと推定されるが、報告がないので不明である。

E型菌について注目すべきことは、米国及びカナダにおいてその中毒を起した食品が1例を除い

この第2類例はオホツク海沿岸の興部町に起つたもので(昭和27年11月)、岩内の例と同じく自家製の“いづし”(鰈いづし)による中毒であつて、重症2名を出した(死亡者はない)。

第3発生例は網走湖畔の女満別で起つた。昭和27年12月中旬鰈及びウグイで作つた“いづし”を食して死者1名、重症2名(うち1名は1ヶ月後死亡)の中毒である。

第4発生例は本年即ち昭和28年10月オホツク沿岸佐呂間湖に近い佐呂間町近郊の知来で鰈“いづし”を12名が食べて1名死亡し、3名が重症、1名が軽症であつた。

これ等の患者の症状は大体において同じで、ボトリヌスの症状に一致する

ては、すべて魚肉を基礎としたものである。Cl. botulinum E型の検索に初めて手を染めた Meyer 等 (1950年) もE型株は魚肉の中毒に見出されることが多いことから、この型と魚とは関係が深いことを述べているが、最近読むことの出来たカナダの医学雑誌において Dolman (コロンビア大学) は<sup>2)</sup> (1950年) E型菌による本症をば Fish borne botulism と称している程魚肉と縁が深い。著者等の証明し得た4発生例からのE型株も全くこれと一致している。即ち悉く魚の生肉を加えて作つた“いづし”によるものである。

換言すれば吾々はわが国においてE型株の連續的検出と云う収穫と共に Meyer<sup>3)</sup> 或は Dolman の云う處をば北海道において連續的に発見した4株の検出菌について裏書して、その確実性を増大したことになる。

またE型の第1番目の発見は Meyer によるシベリアで作られた鮭罐の中毒からであるが、吾々の知見によると、E型株は寒い地方に多く存するのではないかと思う。これを一層支持する事実は後述のように、吾々は網走湖岸の土（砂）からE型株を相当数発見し得たことである。

最近吾々の第4類例と殆ど同じうして秋田県下に於て10月8~9日川鰈“いづし”によるボトリスマスの発生があつた。患者数3名のうち2名の死亡を見たのである。

その場所は八郎潟に近い南秋田郡天王町江川である。報告書を見るとその症状はボトリスマスと同じである。これについて著者が厚生省尾崎食品衛生課長及び国立予防衛生研究所遠山食品衛生部長より直接聞く処によると、本例は秋田県衛生研究所にて著者等の報告に基いての検索によつて直ちに残存の原因食からボトリヌス毒素が証明され、同研究所の手によつて分離された菌株は国立予研に送られて、検索の結果著者等の場合と同じく、E型ボトリヌス菌であることが明かにされた。

かくて北海道のみならず、今や本土に於てもボトリスマスの発生が知られたのである。而も同じく魚を主体として作つた“いづし”が原因であり、その起病細菌はE型ボトリヌス菌であることも符節を合せる如く一致した。

### ボトリヌス中毒はわが國に今までなかつたか

わが国においてボトリスマスは茲に初めて脚光をあびて医学界および公衆衛生の舞台に登場してきた。

元来ボトリスマスは特徴の著しい症状を呈するから医師の診断から漏れることは一応はあり得ない。況んやある食物を食べてその家族の少なくとも2人以上に発病するのであるから、食中毒であることと、特有な症候とを考え合せるならば恐らくその臨床的診断は難事ではない。

然るに実際的にボトリスマスはわが国の医家の死亡診断から漏れていた——尤も吾々の調査で、北海道の僻遠の地に在住のある医師が、その死亡診断にボトリスマスと届出ているのを見出して、敬服させられた——。これは恐らく、わが国に該病がないという見解に支配されて、他の診断をつけたのであろう。

本病が全く新しい疾患であるとする根拠は全然見当らない。

茲において、吾々は本症が発生した地方を中心として、保健所当局の協力を得て、“いづし”による食中毒を焦点におき、最近数ヶ年の食中毒例の調査を行つた。これはなお調査の途上にあるが、それでも疑わしいというよりは寧ろ疑いの濃い、即ち恐らくボトリスマスであろうと信ぜられる発生例を見出した。

1. 昭和20年6月留萌保健所管内の苦前町字三豊(天塙国、日本海沿岸)に於て“鯛いづし”を食して8名のうち3名が死亡し、1名は重症であつたと云う。嘔吐、下痢等の胃腸障害は見られず、視力の低下、嚥下困難等を訴える者が多かつたと。“いづし”の食中毒であつて死亡率の高いこと、視力障害等の症状から見て、恐らくボトリスムスであつたと考えられる。

2. 昭和25年9月オホツク海岸の雄武町(北見国紋別郡)に“いづし”を食べて死者3名を起した食中毒があつた。

紋別保健所の調査によつて明らかになつたのであるが、S氏の家で真鰯の“飯ずし”を作つて食べた。鰯は小さいものを用い、その他人参、キヤベツ、紫蘇と糀を入れて作つたと云う。9月であるからまだ晩夏の候である。

“いづし”を作つてから1週間に食べた。S氏の家族4名が罹患し、うち1人(9才)が死亡、又同じ“いづし”を食べた2名(いずれも58才の男子)が死んだ。

主人のS氏(51才)は罹患したが恢復したのであるが、同氏から聽取した処によると、症状として嘔吐及び視力低下が著しくあつて、その他腹部の膨満鈍痛、便秘、複視及び呼吸困難があつたといふ。死亡者のうちS氏の家族は9月23日に食べて翌日死亡し、他の2名は25日に食べて3日後の28日に死んだ。

なお、他に2名が同じ“いづし”を食したが焼いてたべたので罹患しなかつたそうである。

その他著者等が個人的に道内の医師から聞いたのであるが、魚の“いづし”による中毒殊に急性死を見た場合は2~3ある。

然るに今回秋田県の八郎潟に面する天王町江川で初めて判明したボトリスムス(川鰯“いづし”による)発生の機会に、同県衛生部の調査によると、八郎潟の附近一帯の地方において、本病と疑われる食中毒が時々起つてゐることが明かにされた。秋田県衛生部の報告からこれを抜萃すると次の如くである。

第1表 秋田県に以前に発生したボトリスムス?

発生年月日	場 所	患者数	死 亡 者 数	摂 食 々 品	診 斷 病 名	摘 要
昭和5. 10. 28	船越町仲町	3	1	このしろ・いづし	?	
9. 10. 21	天王町天王	6	1	川さば・いづし	?	
15. 12. 8	天王町渋谷	?	2	さより・いづし	?	
25. 11. 12	天王町塩口	1	1	さより・いづし	食 中 毒	
26. 10. 25	柿戸村	4	2	はぜ・いづし	食 中 毒	眼科では調節マヒ
27. 6. 7	一日市町	7	1	かれい・いづし	食餌性中毒症	眼科では内眼筋マヒ
28. 10. 7	天王町江川	4	2	川鰯・いづし	食 中 毒	

表中の町村は南秋田郡にある。

### ボトリスムスについて

本症はわが国にはないと思われていたので、医学界においてあまり関心が払はれていない。この中毒症状は菌の毒素が脳神経等を侵すことによつて現われるから全く一般食中毒に見るものと異なる。少しく注意を払えば中毒の臨床所見によつてボトリスムスではないかの見当がつく。即ち本症の診断として重要であるから茲に他の説明事項と共に簡単に記述する。

本症はヨーロッパに於て久しい以前から知られていた。初めて報告されたのは1875年である。ボトリスムスなる術語は Botulus=Sausage からきているのであつて、19世紀の初め南独逸の医師が腐敗したソーセージによる中毒の症状に注目して、特有なものであるとして、新しい命名をしたのである。然しこの中毒はソーセージに限らず他の保存食品例えば肉類、魚の燻製、不完全に作られた植物性食品(野菜類、豆類及び果物)或は肉類の罐詰による中毒の場合にも見られた。

初めてボトリスマスの本態がわかつたのは1895年である。Van Ermengemがベルギー国で23名のボトリスマス症状を呈する患者を出したハムによる食中毒の場合、そのハムから1種の嫌気性菌を分離培養することに成功し、本症はその產生する毒素によつて起るものであることを報告した。即ちこの菌の液体培養が強力な毒素を产生し、これを猫に経口的に与えると、原因食のハムを与えたのと同一の症状を以て発することを証明した。彼は本菌をボトリヌス菌（腸詰菌の意）と命名したのである。

### 症 状 に つ い て

これに関する成書の記載に、著者等の見聞した実際の所見を織り込んで述べる。

潜伏期についてであるが、毒素を含んでいる食物を摂取してから症状を発するまでの期間は大凡18~36時間である。

この潜伏期中、多くの患者は全く健康で、平常と異ならずその業務に従事している。

早期症状として悪心、胃部の異常感があり、或は嘔吐を催し、時に下痢を見ることがある。然しこれ等は毒素によるためか、或は寧ろ摂取した食物の微生物による分解産物の刺戟によつて胃腸粘膜が侵されて起るのかも知れない。北海道で起つた例では食品が“いじし”であるせいか、嘔吐を見る場合が多い。下痢もよくあるが早期のみであつて、直ちに頑固な便秘に移行する。とにかくボトリスマスの場合は著明な胃腸炎は起らない。

自覚的に患者を最も苦めるのは、吾々の場合では腹部の膨満感であり、他覚的にもたやすく認められる。又圧痛を訴える。これによつて患者は病床に輻転反側することもある。また鈍痛を伴つて堪えられないこともある。

この腹部膨満の原因は迷走神經が侵されるため腸の蠕動が阻害され腸内にガスが蓄積するからであろう。これと同一原因によつてボトリスマスの特徴となるのは頑固な便秘である。

腹部の障害が未だ顕著でない時に、患者に眼障害が感ぜられることが多い。患者は眼がかすんで来たと云い、これは視力障害であるが、複視に早く気付く。

他覚的には眼瞼下垂、瞳孔散大、遠近の調節不能、対光反射缺如、時にニスタグムス等が相当に顕著である。

これ等の症状と同時に患者が気付くのは發語障害即ち嗄声或は発声困難、嚥下不能、舌の運動障害等である。また口腔、咽喉の粘膜に分泌異常を来たし、或は甚だしき口渴を訴え或は唾液の分泌がたかまり、流涎が見られる。

その他麁々四肢の一つにマヒが起ることもある。また頭痛、めまいとか身体違和の感とかも免かれ難い。

体温が上昇しないで終始平温であることも他の食中毒と違うところであつてボトリスマスの一つの特徴とされている。

意識も最後まで明瞭である。また特に挙げるべき疼痛もないし、知覚障害もない。

脈搏は初め緩いが、後に早くなる、即ち体温と一致せざる点は注目に値する。

致命率は極めて高く、米国においては60~70%と云われ、欧洲のボトリスマスは低く、25%位であるとされている。吾々の場合は勿論発生例によつて少しく差があるが、約50%と見てよい。

一般に *Cl. botulinum A* 型は毒力が最も強く、B型これに次ぎ、E型は比較的弱い（吾々の実験成績も一致する）が、米国と欧洲のボトリスマスが何故に致命率に於て著しい差異を示すかの理由は不明である。

る。唯々米国の発生は現今専ら自家製の植物性食品の罐詰で起り、欧洲のそれは肉製品殊に燻製、ソーセージ、ハム等による中毒が主のようであつて、その間何等か不明の原因が潛んでいるかも知れない。

北海道或は秋田県下の本病は目下の処では魚を主体とする“いづし”による中毒のみであつて、その病原はE型菌であるが、致命率は欧洲のものよりは高い。

患者が死の転機をとる場合には日数は早い。3乃至7日以内に死す。死の直接の原因は心臓マヒ、或は呼吸困難に陥つてアスフィキシーである。また嚥下筋のマヒにより、嚥下性肺炎を起して死する事もある。なお一般に死亡した患者の剖検所見としては特別な目標となるものはない。

重症と思われる患者も存外治癒する。然し数週或はそれ以上具合が悪く、殊に眼症状とか便秘が永く残る。筋肉の力が恢復し難い事もある。

**要するに**、ボトリヌス毒素の侵襲は脳神経即ちI, II, VII及びVIII神経を除いて他の運動を司る神経が侵され、また四肢の運動神経にも及ぶのである。故にこれによつて眼症状、発語および嚥下困難を来たし、更に迷走神経（副交感神経）のマヒにより腹部膨満、頑固なる便秘を見るものである。

なお、**ボトリヌス毒素の神経侵襲點**については薬理学的に大に研究されているが、神経末梢器官であると云う説に傾いている。近時神経の刺戟効果の伝達について神経終末器官からのアセチールヒヨリンの分泌即ち刺戟の化学的伝達が信じられているが、ボトリヌス毒素は神経終末器官に作用してそのアセチールヒヨリンの分泌異常を来たす結果として筋肉マヒを招来するのであると説く学者が多い。

著者等の検索を行つた患者例の症状について注目に価するものは患者を苦める腹部の膨満と、しきりに訴える口渴である。

腹部膨満に就いては、著者等の知り得た範囲では文献上ボトリヌスの症状にはあまり記載されてない。また口渴についても同様であつて、むしろ流涎が屢々見られるように書かれてある。然るに著者等の患者例ではこの2症状は殆んど必発である。

そこで考えられることは、著者等の患者例は、文献上稀れなるE型菌によつて起るということである。即ちこの2症状はE型菌毒素によつて人が侵された場合に起り、その特徴とすべきものではあるまい。著者等はE型菌毒素による患者を連続的に多数調べているのであつて、腹部膨満と口渴とがE型菌による中毒の特徴であるとすれば、その魚と関係するという点と共に、将来の発生例につきE型菌毒素による中毒を予想せしめることに役立つのではないかと考えている。

最近のDolman等の報告に記述されているバンクーバー市に発生のE型菌毒素によるボトリヌスの2患者の病歴を読むと、やはり口渴と腹部膨満の2症状が書かれている。Dolman等はこれにつき特に注目していないが、著者等は意義を認めるものである。

### 北海道において発生した各類例について

#### 第1発生例（岩内郡島野村の例）

前述のように岩内町郊外島野村に起つた。この発生例はわが国において最初のものであるから患者を診療した医師もボトリヌスであることを全く念頭になく、従つて後からの著者等の質問に対して患者歴を見ながら記憶を辿つて述べられたのである。従つてその症状に関して充分なるものは擧めない程があるが、それでもボトリヌスであることは疑いない。

**第1例：**岩○○ね、54才が時期はそれではあるが鰯“いづし”を作り、それを食して5月29日（昭和26年）発病、即ち腹痛を訴えて医師の往診を乞うた。その時腹部の膨満があり、疼痛を訴えたと云う。然るに翌日患者の容態は急激に悪化し医師が往診した時には既に絶命していたと云う。発病から12時間で死んでいる。

この患者については体温が平常であつたこと、嘔吐を催したこと、視力の低下を訴えたこと、腹部膨満を認めたこと以外には注意が払われなかつた。

その後数日を経て弔問のため隣家及び知人の数名が同家に集まり、その際患者の作つた多量の“いづし”の残りを分けて貰い、うけて帰つた。これが6月5日及び6日のことである。これをそれぞれの家にて食し第2～7例の中毒患者の発生を見た。そのうち佐○家及びK○家では2名宛が中毒のために死亡した。

それ等の病歴及び経過は著者等の前報告<sup>1)</sup>に詳記してあるから、この報告に於ては佐○及びK○家の各1名の患者について記述することにし、ただ全死亡例及び重症例の症状等についての総括した表を再録することに止めた。

**第2例：**佐○○次○、54才、岩○家で作つた“いづし”を6月5日に食べた。その日は平常のように労働に従事した。翌6日早朝吐気を覚え、続いて激しく嘔吐し腹痛も加わつたので稼ぎに出なかつた。正午頃から起きていることが出来なくなつたので臥床した。夜になつて上腹部の膨満感が強くなり非常に苦しんだ。7日に医師の往診をうけ、その所見によると、体温36°C、脉搏整(86)、視力不明瞭、口渴、嘔声、便秘を訴えたと云う。他覚的には腹部の膨満が著しかつたとのことである。患者は胃洗浄などにより一時軽快したようであつたが翌日午前11時死亡した。

第2表 岩内発生例の臨床所見

患 者	年 令	性 別	発 病 月 日	食病 物まで 摂取 よ(時 間) 死(時 間)ま ま	発病 より 死(時 間)ま ま	発病 より 死(時 間)ま ま	臨 床 症 状									
							体	胃腸障害		眼 状 症						
								嘔 吐	腹 部 膨 満	便 秘	瞳 孔 散 大	眼 瞼 下 垂	視 力 視			
1. 岩○○ね	54	♀	29/V	?	12	平常	+	+	?	?	?	低下	?	?	?	
2. 佐○○次○	54	♂	6/VII	25	58	/	+	+	+	-	-	/	?	+	+	+
3. 佐○○よ	41	♀	7/VII	48	恢復	/	+	+	+	-	-	/	+	+	+	
4. 佐○○壽○	20	♂	6/VII	24	/	/	+	+	+	-	-	/	?	+	+	+
5. 武○○ミ	27	♀	6/VII	24	/	/	+	+	+	-	-	/	?	-	-	+
6. K○○○エ	37	♀	7/VII	16	10	/	+	+	?	+	+	/	?	+	+	+
7. K○○幸	16	♂	7/VII	13	9	/	+	+	?	+	+	/	?	+	+	+

備考：この発生例は初めてのことであるから、医師が症状を見落していることが多い。又嚥下困難、唾液分泌異常につき調査したが判明しない。

**第3例、第4例：**は第2例の家族である。その病歴は表に譲る。

**第5例：**武○○ミ、27才（妊娠である）。6月5日朝食時は同じ鰯“いづし”を食べ、翌6日早朝嘔吐、腹部膨満感を覚えた。体温36.3°C、脉搏整(78)、便秘。この患者は左程重態ではなく18日から全く正常状態に復した。妊娠経過にも全く影響がなく21日無事正規の分娩を了つた。

**第6例：**K○○○エ、37才。6日夕食時に“いづし”を食した。翌7日朝のうちは全く健康で出稼ぎに出たのであつたが、昼頃から全身倦怠、軽度の胃痛及び胸内苦悶を覚えて帰宅した。長男（第7例）が苦悶しているのに驚き医師の往診を求めた。その医師に聞くと、体温平常脉搏やや頻度、嘔声、眼瞼下垂、瞳孔散大を認めた。病状は益々悪化し、午後10時半死亡した。口渴を家人に訴えていたと云う。

**第7例：**K○○幸、16才。K○家の長男である。6日夕母と共に“いづし”を食べた。翌日朝家人は両

親とも出稼に出ており、一人で苦しんでいたらしい。昼頃医師の往診をうけた。その所見としては苦悶甚しく腹部膨満がひどい。眼瞼下垂が著明、瞳孔散大し、光に対して反応せず、即ち眼症状が顕著であった。然し体温は平常で、脈搏頻数微弱、一見極めて重篤のようである。急速に症状が悪化し午後4時過ぎ死の転機をとつた。腹声、口渴を訴えていたと云う。

以上のほかに同じ“いづし”を食べたもので軽症で済んだものが7名あり、また全く無症状のも�数名あつた。

### 法医学的屍體解剖

同じ鯉“いづし”を食した人々のうち、俄に4人の死者と、3名の重症者を出したような例は、わが国では珍らしい。又その症状で腹部の膨満が素人でもわかるように一様に起つている。

そこで岩内保健所は北海道大学法医学上野正吉教授を聘して死因を知るべく解剖を行つた。K○○○エについて全身解剖、佐○○次○については主として薬物検査のための肝の局所解剖である。

これに関する上野教授の提出せる鑑定書の抜萃を前報告<sup>1)</sup>に掲げてあるが、要するに解剖所見と、胃腸内容の毒物学的検査の成績から、死因を把握することは出来ないが、中毒の原因食である鯉“いづし”的残部の浸出液には易熱性の毒物がマウスの実験で証明せられること、患者の症状解剖所見及び“いづし”的毒物試験の結果を総合すると、ボトリスマスと考えて差支えないものであると記述している。

因に、この鑑定書は昭和27年3月19日に提出されたものであつて、その頃著者等の検索は相当進行していたのである。

### 昭和27年興部及び女満別に発生したボトリスマス

岩内郊外の発生例は昭和26年5月であつたが、同年の冬期には発生が無かつた。然しそれは気付かれなかつたことにもよるかもしれない。

著者等が検索の結果、それをボトリスマスと決定して、精細な報告を発表したのは<sup>1)</sup>昭和27年8月であるから、それまではボトリスマスについて注目されてなかつたと云える。

昭和27年の冬も近くなり、その11月に以下記述する興部における中毒について、町役場の衛生係主任が、患者の食べた“いづし”的残りを直接に当衛研に送附してきた。これにつき検索の結果ボトリスマスなることを決定した。

また同年12月初旬になつて、女満別町の例が発生した。これも保健所からでなく、患者の入院した網走厚生病院女満別分院の院長が、患者の食べた“いづし”的残りを当衛研に送附してきたのである。

かように“いづし”とボトリスマスという観念が漸次道民の各層に浸潤してきた結果、疑わしい場合に遭遇すると、原因食と思われるものをこの研究所に送つてくるようになつたのである。

#### I. 興部町に発生した中毒例

この例と、次の女満別発生例について患者の症状等は当衛研所報<sup>4)</sup>に掲載したので、要点のみを記述する。

興部町における発生例は4人の中毒患者を出した。

理髪店の家族に起つた食中毒である。その主婦が自ら作つた鯉“いづし”が原因食である。これを家族の8名が食べ2名の重症者と2名の軽症者を出した。以下症状等につき略述する。

**第1例：**重症者の1例即ち主婦(40才)は昭和27年11月19日夜及び翌20日朝食時に“いづし”を食

し、同日午前 10 時頃から悪心、嘔吐があり、午後になつて眼症状に気付き、夜に入つて腹部膨満その他の定型的なボトリスマスの症状が現われた。これ等の諸症状は医師によつて確認された。

この患者は漸次快方に向つたが、便秘は 10 日後に至つても強く、自然排便を見なかつたと云う。

**第2例：**理髪業徒弟の女子（17才）は前例と同日同時に問題の“いづし”をとつた。20 日夕刻まで何等の異状を覚えなかつたが、夜になつて初めて多少腹痛があり、入浴中に眩暈を来たし、数回嘔吐した。翌 21 日朝から眼症状殊に視力障害が起り、次で他のボトリスマスの症状が現われた。医師によれば前患者の場合よりも一般に軽かつたとのことである。

この患者も次第に症状が去り、10 日後には殆ど治癒した。ただ鼓腸及び視力障害はあとまで残つた。

興部のボトリスマスにおいて一層軽症であつた者が 2 名あつたが、“いづし”摂取後 10 時間位で腹痛及び下痢を訴えるに止まつた。

## II. 女満別における発生例

ボトリスマスを起した食物は網走湖でとれた鰈及び“うぐい”的“いづし”である。自家製品で、7 名の全家族のものがすべて食べたが、1 名の死者、2 名の重症者及び 1 名の軽症者を出した。重症者のうち 1 名は後になつて併発症のために死亡し、1 名は秋田県から葬儀に参列した親戚であるが、帰郷の途、車中にて発病し、そのまま秋田県下の家に帰り、そこで入院したものである。

注目すべきことは、“いづし”は同時に 2 斗樽 2 つ作つたのであるが、他の樽の“いづし”からは毒素が証明されなかつたことである。

**第1例：**主人（32才）は軽症であつた。12月 12 日屋頃自家製の“いづし”を食べ、その日の夜から激しい下痢（20 数回）があり、嘔吐も起つた。腹部膨満感、腹痛を覚え、眼がかすんだと云う。然し 2 屋夜で略々恢復した。

**第2例：**父（64才）。12月 11 日夕食時“いづし”をとつた。同夜 10 時頃数回嘔吐した。夜中から苦しみだし、呼吸が困難になり、眼がかすんできた。翌朝眼症状がひどくなり、又口渴を覚えた。この患者は入院したのであるが、医師の検診所見によると、眼瞼下垂、瞳孔散大が明かに認められ、腹部膨満、嚥下困難及び発語障害が顕著であつた。

患者は入院加療中口腔の化膿性炎症を起し、唾液腺化膿、ルードウイヒ・アンギーナ、咽後膿瘍を生じ翌 28 年 1 月 15 日死亡した。

**第3例：**母（59才）はこれより先き、12月 1 日に死しているが、当時同じ“いづし”による中毒であることは氣付かれず、検診した医師はその死因を“急性球マヒ”と診断している。即ちボトリスマスの症状を呈したことがわかる。又家庭のものによく聞いて見ると、第 2 例と全く同じ症状を呈したと云う。

**第4例：**即ち重症者であつて、秋田県の自宅に帰つた患者については次項述べる。

## 女満別のボトリスマスに連関ある遠隔地の中毒発生

前述第 3 例の葬儀に秋田県から出てきて参列した親戚が 3 名あつたが、それ等から女満別の発生を見た同じ“いづし”でボトリスマスの患者を出した。

この 3 名はいずれも秋田県南秋田郡農川村の人々で、11月 30 日出發し仏事を終えて 12 月 10 日帰宅の途についたのであるが、佐○○豊○氏（前項第 4 例）は汽車中旭川附近で発病した。女満別で問題の“いづし”を食べたのである。他の 2 名の佐○○キ○（52 才）及び宮○鉄○○氏（43 才）等も食べたが発病しなかつた。然し彼等は同じ“いづし”を土産に貰い、それを夫々の家に持ち帰り、その家族がこれを食して中毒者を出した。即ち宮○氏方で 12 月 13 日食べた親戚の佐○○キ○エが翌 14 日発病した。同家で他の人々も食べたが発病せず、佐○○家では誰れも食べずに棄てた。

1. 佐〇〇豊〇 (56才)：発病 11 日午前 2 時 (汽車にて)，潜伏期 9~14 時間，[帰宅後医師の診療をうけ，後に入院す (12月 16 日)]。

郷里の医師等はボトリスマスの経験なきためか診断不明に終つたが、病は快方に向い翌年 1 月 12 日に退院した。しかしその症状として腹部膨満，視力低下，嚥下及び発語障害があり，口渴を訴え，体温は平常であつたことが判つた。眼瞼下垂，便秘はなかつたと云う。

2. 佐〇〇キ〇エ (35才)：発病は 12 月 14 日午前 10 時，潜伏時間 20 時間，17 日医師の診療をうけ，19 日入院す。悪心，嘔吐があり，腹部膨満，眼瞼下垂，瞳孔散大，対光反射減弱，複視，視力低下，嚥下及び発語障害，口渴などのボトリスマスの症状が認められた。発熱もあつたと云う (以上秋田県衛生部からの報告に基いて抜萃した)。

この 2 例とも尿閉が顕著であつたという。これが毒素の作用によるものか，或は他の症状のための二次的の障害であるか不明である。いずれにしても E 型によるボトリスマスの他の例にも尿閉が認められる。

以上の症例の記述でわかるように，中毒を起した“いづし”と同じ樽のものを食べても全く罹患しない健康の人々がある。これは吾々の毒素検索の成績でも知り得た。

即ち“いづし”を樽で作つた場合に毒素が瀰漫して出来ているのではなくて，毒素は樽中の“いづし”的所々に存し，その場所の“いづし”を食べた人が罹患するものと思われる。実際に女満別の例で，吾々が聴取した処では，有毒“いづし”的樽の半分近くまでは家族が食べ進んだが何ともなかつたのである。

### 佐呂間町における発生例

昭和 28 年 10 月初旬佐呂間町字知来の一農家の出来事である。

同じく“いづし”的中毒であるが，魚の材料は砂鰈である。これは 9 月 24 日常呂郡のオホツク海沖で漁獲されたもので，この家の主婦がこれを購入し 5~6 日水に浸し (その間数回水を換えた)，野菜類を加えて型の如く“いづし”を作つた。

10 月 6 日夕刻主婦が先ず試食し匂いも味もよかつたので，翌日から色々な人が食べることになつた。“いづし”は通常 20~50 日漬けてから食べるそうであるが，この場合は僅か 5 日目に試食している。漬ける時期が普通よりも早く，気温の関係で早く食べられるようになつたのであろう。

この“いづし”を食べた人は 12 名であつて，このうち 1 名死亡し，他に 3 名が重症で，1 名が軽症であつた。7 名は何等異常がなかつた。

**第 1 例：**主婦鈴〇〇つ (42 才)。10 月 5 日の夕刻，3~4 切れ位食べたと云う。その後は全然食べていない。然るに翌 6 日は朝から胃部の膨満感があり，午後から悪心を覚え 2 回嘔吐した。7 日には口渴が甚だしく，嚥下困難を訴え次第に視力が低下して字が読みにくくなり，次に複視を呈してきた。声は嗄れたが发声の困難はそれ程感じなかつたと云う。

同日夜医師の診療をうけた。医師の所見としては体温 36°C 脉不整，腹部膨隆があつた。口渴，嚥下障害もある。眼瞼下垂は認められなかつたが，複視と著しい視力低下が見られた。

これ等病状は依然としてつづき，医師の往診が 9 日にあつたが，同様の症状で，その上，手の脱力感を覚え，又尿閉の傾向を訴えた。

10 月 11 日入院。血液所見として白血球数 9,400，口渴甚しく，又便秘がある。その後，舌のもつれる感じがあり又のどがつかえる気持があつてこれ等は比較的長く残つたが，次第に快方に向つた。

**第 2 例：**白〇〇二郎 (51 才)。日をおいて 2 回問題の“いづし”を食べている。死亡例である。

10月6日午後“いづし”を食べたが7日、8日は異常がなかつた。9日午後再び“いづし”を食した。9日夕食後嘔吐1回”その後少しく下痢したが以後秘結している。次第に眩暈、胸内苦悶が加わり、翌10日も自覚的にかのような状態がつづいた。

10日午後5時半医師の往診を乞うた。その所見として体温35.9°C 脈搏は遅く、眼瞼下垂は著明で、瞳孔散大、対光反射遲鈍がある。腱反射も消失していた。筋力衰え起立が不可能で、舌はもつれ発語障害があり、又口渴がひどいが水が呑めない(嚥下障害)。視力障害、複視がある。下腹部は膨隆し、便通なく、尿意はあるが排尿不能であつた。

同日午後8時入院。便秘がひどく浣腸を行つたが排便はなかつた。その後仮睡状態に入り、午後10時胸内苦悶とのどが苦しいことを訴えた。12日午前2時容態は悪化し脉は結縛、呼吸困難が加わり、3時死亡した。

**第3例：宮○の○え(41才)**。10月6日午後4時頃“いづし”を3枚食べたと云う。美味であつたと云うている。翌7日午前9時頃から激しい嘔吐が初まり、夜に至るまで10数回に吐きつけた。夕刻から激しい腹痛を訴え始め、又ひどく喉が乾いた。午後7時頃から嚥下困難が初まり、且胸内苦悶を訴えた。午後8時医師の往診をうけたが、その所見として体温37°C、脉搏頻数、強い腹痛を訴え、腹壁のデファンス等陽性であつたので虫垂炎を疑い、直に入院させたと云う。血液の白血球数13,200。直ちに手術を行い、開腹したが虫垂突起は変化なく正常であつた。

8日になつて胸内苦悶と腹部の膨満感を訴えるが嘔吐はほぼ消失した。発病当初から便秘が著明である。

10日初めて視力減退と複視を自覚、舌がもつれて発語困難を来たした。口渴がつづき、嚥下障害も起つた。然し嘔声はあまり著明でなかつた。左手の軽い脱力感、運動マヒがある。

患者はその後次第に快方に赴き、これ等の症状は恢復したが10月21日になつても小字は読みないと云い、又軽度の嚥下困難が残つた。

なお、この患者の主人は6日かなりの量の酒をのんで、この“いづし”を食べたが全く発症していない。

**第4例：森○○(42才)**。6日正午頃酒をのみながら“いづし”を5~6枚食べた。少し臭いはしたが味は変わらなかつたと云う。

7日に歎がだるく、胃部の膨満感を覚え、恶心があつた。8日朝嘔吐2回、下痢も起つた。頭痛があり又眩暈を感じ、目の前のもののがぼやけて見えたと云う。又舌がもつれ、嘔声となつた。

入院時の所見としては体温36°C、脉搏70~80、眼瞼下垂、瞳孔散大等は認められなかつた。口渴は甚しく、嚥下障害がある。腹部は膨満し、呼吸困難を訴えている。排尿困難があり、又排尿後も残尿感があると云う。治療処置によつて数日以内に恢復したが、21日になつても嘔声だけはとれないと云う。

なお、この患者の弟及び甥がいくらくらい“いづし”を食べているが、弟の方は軽い下痢のみで済み、甥の方は全く発病しなかつた。

### “いづし”とボトリスマス

吾々の知り得た北海道及び秋田県に発生したボトリスマスは悉く“いづし”からきている。そして魚肉と関係の深いボトリスマスE菌型のみを検出している。

この食物は広く北海道の日本海及びオホツク海に面する地帯及び秋田県の海岸北方において冬期間の食物として常用されている。その他道内の他の住民もこれにならつて作り好んで食べている。また小樽市内には数ヶ所の製造所があつて盛に販売していることも判つた。道外即ち東北地方においても恐らく、この製法を知つている人々は自ら作つて愛食しているのに違いない。勿論材料の適度の醸酵が味をつけるのであるから、温暖な地方では作らないであろう。

ボトリスマス菌は外界の諸影響(日光・乾燥・温度等)に対して抵抗の強い芽胞として、至る處の土壤に分布されていることは周知のことである。わが国でも著者等の岩内の中毒例の発表に刺戟されて北研広木博士は長崎大青木教授と共に、嘗て鹿児島県下の土壤から分離したボトリスマス菌を疑

第3表 興部・女満別・佐呂間の発生例一覧表

患 者	年 令	性 別	病 月	潜 伏 時	発 病 時 死 亡 間	病 で よ り 死 亡 間	臨 床 症 状						
							体 温	胃腸障害		眼 症 状		その 他	
								脳 部 膨 脹	腹 下 部 吐 瀉	便 下 部 秘 瀉	眼 瞼 孔 下 垂	視 力 散 大	複 視 下 下
興部の例	第1例 40	♀	19/XI	16	恢復	36.2°	+++ -	++ + +	++ + +	?	+ + -		
	第2例 17	♀	20/XI	24	恢復	平常	++ + -	++ + +	++ + +	?	+ + -		
女満別 の 例	第1例 32	♂	11/XII	6	軽症	平常	++ ? +	?? + ?	?? + ?	- - - -			
	第2例 64	♂	11/XII	4	30日後合併症で死	平常	++ ? -	++ + +	++ + +	++ + +	前例と ? 同症状		
	第3例 59	♂	10/XII	?	死亡急死	?	?	医師による球 マヒなる診断					
女満別と 関係のある秋田の 例	第1例 56	♂	11/XII	9-14	恢復	平常	++ - ?	- + + +	- + + +	++ + +			
	第2例 35	♀	14/XII 以上昭和27年	20	恢復		++ ? ?	++ + +	++ + +	++ + +			
佐呂間の 例	第1例 42	♀	6/X 昭和28	12	恢復	36°	++ + -	- ? + +	- ? + +	- + + +			
	第2例 51	♂	9/X	6	32死亡	35.9°	++ + -	++ + +	++ + +	- + + +			
	第3例 41	♀	7/X	15	恢復	37°	++ + -	- - + +	- - + +	- - + +			
	第4例 42	♂	7/X	22	恢復	36°	++ - +	- - + ?	- - + ?	- - + ?			

われる10株を検索してその4株はボ菌のA型であることを発表している。

著者等も後述するように網走湖岸の砂から相当の頻度においてボトリヌスE型菌の検出に成功した。

これによつて見ると、**“いづし” のボトリヌス毒素及び同菌の汚染は、その材料の魚肉、野菜或は糞がごく微量の土をもつており、その土に芽胞があつたのであると考えるのが妥当である。この材料に初めから毒素が含まれているとはどうしても考えられない。**

次にこれ等材料のうち、どれにボ菌芽胞の汚染があつたかの問題であるが、糞の汚染はひとまず除外してもよいのではなかろうか。その一つの理由として、北海道で冬期の香の物として一般家庭において常用される鯛漬によつてボトリヌス様の中毒が起つたということは全然聞いたことがない。鯛漬と**“いづし”**との違いは魚として生の鯛を使わずに身欠鯛（強く乾したもの）を用いること、飯を使わないことが違う。その他**“いづし”**は乾いた状態で出来あがるが、鯛漬は魚でも野菜でも水を切らないで漬けるから相當に水が出ることも違うが、材料はよく似ている。また糞は必須の材料であるから必ずいれる。即ち鯛漬とボトリヌスの発生を見ないのは生鯛を使うことがなく、強く乾燥したものを以てするためであろう。尤も**“いづし”**は出来るだけ重い石をのせるから嫌気性度が強いとか、水分がないから醣酵もすゝむことが考えられる。なお、鯛漬を食べる範囲は北海道では**“いづし”**とは比較にならない程ひろい。

**ボ菌芽胞が汚染する材料として考えられるものは結局魚と野菜ということになる。そこで野菜の方の可能性は充分にあるが、魚の方はどうか。**

魚は鯛にしても鰯などにてもその地方で多く漁獲される魚であつて、網で砂地を曳きずつて引

きあげられるとか或は海岸に放置されてから配分されることが多い。従つて魚に土とか砂がつくことが考えられる。

“いづし”を作る場合に魚は数日間水に晒すと云われる。即ちきれいに肉が洗われるようと思えるが、この水を綿密に換えるわけでもなく、流水で洗うのでは勿論ないから土や砂が完全に除かれはしないことは明かである。

いずれにしても魚はボトリス菌E型株発育増殖のため養分になるには違いない。これに関する鰯の肉の中にボトリス菌の芽胞を注射しておくと増殖を見るという実験がある。それにしてもボ菌芽胞が魚からくるか、野菜からくるかが問題なのである。

更に、材料と共に“いづし”にはいつた菌の芽胞が毒素を産生するに至るまでには発芽して発育型にならなければならない。これにはその環境の温度が少なくとも $20^{\circ}\text{C}$ に近く上昇することが必要である。

この毒素産生の條件としての温度の上昇について考えられることは、一つは“いづし”を漬けた樽の内部温度が醸酵によつて昇ることの可能性である。も一つは“いづし”を作る時、たきたての暖い飯を入れる。それが間もなくさめるにしても、樽の中層或はそれ以下の部では温度が比較的長く保たれるのであるまい。

“いづし”的内部温度については、他日検定試験を行いこの研究の際測定するつもりである。

重要なことは中毒と季節の関係であるが、酷寒期において食べる“いづし”でボトリスムスを起した例がない。今までの例は5月か10月、11月或は12月初旬に食べた場合のみに発生している。この頃は外の気温の関係で“いづし”的醸酵は早く進行するらしく、5乃至10日間で食べられるようになる。通常“いづし”は11月頃漬けて約1ヶ月おいて年末以後に食べる所以である。

因に、ボトリス菌E型は、A或はB型と違つて低温で増殖し、且つ毒素を産生することは著者等の研究で知られた。即ち $20^{\circ}\text{C}$ で培養され、 $25^{\circ}\text{C}$ で盛に毒素を産生する。

かかるE型株の性状が、魚が加えられて嫌気性状態にて作られる“いづし”において毒素を産生し、これを食した人に中毒を起すに至るのである。“いづし”的内部の嫌気性状態については、ことさらに述べる必要はないと思う。

“いづし”的製造方法は地方によりまた家によつて多少違うということはある。然しそれがどの程度ボトリスムス発生に關係するかは明かでない。

北海道の作り方については前報告<sup>1)</sup>において一応述べているが、興部及び佐呂間町の例でとつた“いづし”について患者或はその家族から聞き得た製法を記述する。

興部の例では自ら作ったものを食べて主婦が重症に陥つたのであるが、その“いづし”的材料は鰯の切身、人参、大根、なんばん（唐辛子）に糀及び米飯を混じこれに酢及び塩の少量を加え樽漬けとし、上から重しをかけて作つたと云う。

佐呂間町の発生例の“いづし”については精して聞くことが出来た。

患者即ち主婦が9月24日近くの常呂郡ポンタマリ沖（オホツク海）の25~30尋の深さの處で捕れた砂鰯を原料として作つた。これは捕れると舟の中で箱に入れられ、常呂港岩壁から直ちにオート三輪車で患者の居住地なる知来の澱粉業の店に運ばれたものである。豚の飼料として買つたものであるが、その主婦の話によれば、いきがよかつたので一部を“いづし”に漬けたとのことである。

この砂鰯に自家近くの畑からとつた人参、大根、キヤベツ等を一旦塩もみにしてから加え、更に塩、酢、

米飯に少量の糀を加えて八升樽に半分足らず漬けたものである。樽にはかなりの重しをかけた。

又鰯は買つてから5~6日水につけたと云うが、この間数回水をかえたのみらしい。

この“いづし”は9月30日に漬けて、10月5日に主婦が試食し、匂いも味もよかつたので翌日からいろいろな人が食べたと云う。

然し、この附近では通常“いづし”は20~25日位漬けたものを食べるそうであるから、この場合僅か5日目のものを食べている。

**秋田県の患者が発生した地方の“いづし”的法**について同県衛研のある技師から聞いたところでは、大体に於て北海道の作り方と同じであるが、糀は加えず、樽の内側に藁を入れると云う。又魚肉と野菜を一と並び入れると、その上に笹の葉を敷き、それから魚肉野菜を入れ又葉をしいてかさねるようにして漬けるようである。

次に秋田県衛生部のボトリスムス発生に関する報告書には、今回の発生した地方に於ける“いづし”に関する聞きとり事項が記録されているが、そのうち興味がある処を取りあげて見る。

1. 生魚を水浸する期間中、水が充分に交換されない場合は中毒する。
2. 暖かい時期に長く水浸しすぎると中毒する。
3. 水浸に使用する容器に金属属性のものを使うと中毒する。
4. 漬けこみ桶は丈夫なものを使用し、重しの石は出来るだけ重いものを使用するとよい。
5. 暖い時に漬込んだものに中毒が多い。

以上の記録から考えると、とにかく“いづし”によつて屢々中毒が起ることがうかがわれる。但し、その中毒にはボトリスムスによるもの以外のものが含まれていることは勿論である。

要するに“いづし”は各種の生魚で作られること、愛好者が多く、それ等の人々には美味なる寒地用の保存食品であることが察せられる。

### 中毒を起した“いづし”的味、臭い及びPHについて

著者等の検出した“いづし”によるボトリスムスの原因菌はすべてE型菌であるが、この菌は他のボトリス菌と異り、蛋白質分解性能が弱い。従つてそれが“いづし”の中に増殖しているにしても——実際に岩内の例などについて考えると相当に殖えていたと思われる——その中の魚肉片を溶解するようなことはない。また腐敗臭が強ければ食べずに棄てるわけであるが、それ程強くないから、“いづし”本来の臭いにごまかされてしまうようである。更に蛋白分解が強く進んでいれば味も変るわけであるが、それもE型の場合にはさほどでないようである。

### ボトリスムス発生例と“いづし”的状態

参考までに著者等の取扱つたボトリスムス各発生例において患者のとつた“いづし”的状態について述べる。

#### 1. 岩内例の“いづし”

刺戟的な酸臭を放つて一見腐敗を思わせた。浸出液のPHは5.0であつた。

但し瓶上の所見は吾々の検索当時のものであつて、岩内例の最初の患者が摂食したのは29/Vであり、中毒であると騒ぎ出したのは6月初旬で、吾々は6月下旬に検索を行つたのであるから、温暖な季節にて患者が食した時から、相当の時日の経過を見ている。それ故腐敗が進行していることが考えられる。それでもボ菌は多数に殖えており(培養所見からの推定)、毒素は相当強力であつた。なおこの場合の多くの患者が摂食した当時の“いづし”も多少臭気はあつたが、味はよかつたと云う。

#### 2. 興部の発生例の“いづし”

著者等の検索当時のPHは5.0であつた。この“いづし”について患者について聞いたが、別にかわつたことは認めていなかつた。

この“い・ずし”は患者の発病が通常の中毒と違うので、直ちに吾々の手元に附されてきたのであつた。

### 3. 女満別の発生例の“い・ずし”

検索のさいこの“い・ずし”的浸出液のPHを検したが、4.8であつた。この“い・ずし”も患者が発病してから間もなく当衛研に送られたものである。この“い・ずし”も別状ではなく、秋田県からきた親戚が自ら食べたり、土産として秋田県の家に持ち帰つたほどであるから、味がよかつたのであろう。

### 4. 佐呂間の発生例の“い・ずし”

患者発生後間もなく、その“い・ずし”的残りが検索のため送られてきた。

この浸出液のPHは4.3であつて相当な酸性である。然し強い毒性を示した事実から見るとボトリヌス毒素はPH4.3で影響をうけないことがわかる。

この“い・ずし”も自ら作つて発病した主婦の話では変つた味はなくて美味であつたそうである。

#### 食品のボトリヌス菌汚染による変化に関する文献上の記述について

わが国に於てこれまでボトリヌスの報告は無く、又全くないものと信じられていたのであるから、この題の記述は参考になるのではないかと思う。それでボトリヌスに関して高い水準にある米国における大家である Dack の著書<sup>5)</sup>及び Meyer<sup>3)</sup>の文献からこれに関する叙述を掲げる。

Dack はまず食品の酸度と養分の度合がボトリヌス菌の増殖に対して大切であることを述べた後、ボトリヌス菌が発育した食物が酸性でないもの (non acid foods) で不快な悪臭を発するような場合は食べようとする人が棄てて顧みないから、注意を払う必要がない。殊に肉類の罐詰にボ菌が発育すると不快な悪臭を発する。

酸が加えられている食物 (more acid foods) でボ菌に対して養分に乏しいものであれば不快な悪臭は発しない。例えば隱元豆 (String beans) の罐詰の場合がその例である。

更に Dack はボトリヌスの発生例について、その原因となつた次のような自家製の食品の状態について述べている、これ等はE型菌によるものではない。

i. トマトの罐詰を食べてボトリヌスが起つた例では、家婦が罐を開けたら少し悪臭があつた。この罐はトマトの汁と種子があつて円形のトマトの部分は多少崩れていた。臭気は酢酸のにおいであつた。そしてこの罐詰からB型毒素が検出された。

ii. 梨の罐詰でボトリヌスが起つた3例については次のように変つていたことが気付かれた。第1例では梨がガス立つていて、味は鋭敏であつた。第2例は梨が特殊な味をもつていた。第3例では臭いが異常であり、味は甚だすっぱかつた。

iii. あんずの罐詰による発生例の場合については、第1例は味が刺すように辛かつた。第2例では特殊の味であつた。第3例は普通の味ではないと云うことが気付かれた。

iv. トマト、玉葱、唐辛ソースの自家製罐詰で起つた1発生例の場合は、その味は辛く (acrid taste) であつて、臭気がひどかつた。

この項の結論として Dack は次のように述べている。即ち明かに多くの人は食物が不快な臭氣や悪い味をもつてゐる時は食べない。それでもその程度によつて人によつては食べる。それは腐敗した食物に対して人は耐える能力 Tolerance が違うからである。それ故腐敗 Spoilage があるからと云つてボトリヌスを防ぐことにはならない。加之、ボトリヌスが発生した場合にその食物の腐敗がないことも見られるのである。

ボトリヌス菌の方から云つて、ヨーロッパのB型菌株の多くのもの及び E型株 は蛋白非分解性である。また食物が煮るとか焼かれれば、冷えたままのものを食べる時よりも腐敗によつて生ずる揮発性の物質がたやすく認知される。

食品が明かに腐敗していることを知つていながらそれを平気で食べる人がよくある。そしてそれからボ

トリスムスに罹ることがある。即ち隠元豆の自家製の罐詰を食べて4人の中毒死を見た例では、下女がその豆は少し泡立つており明かに悪い臭いがするからやめようかと云つたし、それを渡された1人は悪臭を認めたので食べなかつたので助かつた。

Meyer & Eddie の論文にのつているボトリスムスの例も参考になる。それはパンに塗つて食べるチーズ (Spread cheese) による発生例の場合である。これはB型菌の毒素によるものであつたが、菌はB型とA型株とが証明された。

このチーズは酢酸臭が固有のチーズの臭いに混つていた、然し大した臭いはなかつたと云う。

#### ボトリス菌及び毒素を有する食品の PH について

“いじし”或は広い意味での保存食品例えは罐詰などで、予めボトリスムスを防ぐ意味で、そのPHを測定することは価値がないかどうかの問題は屢々起つてくる。これでその食品が危険かどうかが判れば簡単な操作でこの中毒を防ぎ得るから極めて重要である。

又“いじし”によつて屢々ボトリスムスが起るから、この製造の際酢を多く加えたならば或はボトリス菌の発育増殖を阻止することが出来て安全ではないかというような問題も考えられてくる。

著者等は前述のように、ボトリスムスを起すに至つた“いじし”は各発生例とも検索前にPHを測定してきた。更に Dack の著書或は Dolman の報告についてボトリスムスと関係ある食物のPHにつき記述している処を注目し、これと著者等の場合と比較考察して、食品のPHとボトリスムス毒及び菌のこれに対する態度について調べた。

著者等の場合は岩内例はPH 5.0、興部例はPH 5.0、女満別例はPH 4.8、佐呂間の例はPH 4.3であつた。

Dack の著書を見ると、ボトリスムスの研究室的診断 Laboratory diagnosis として、罐詰の内容が臭氣を放つとか或はその外觀でボ毒素が出来ていることを予想することは不可能であるが、そのPHを検することは一応賢明な策であると云つている。それはあるPHがボトリス菌の発育を阻止するということが屢々云われているからである。即ちPH 5.4或はそれ以下の酸性であればボ菌の発育が不確実になると云われる（尤もその食物にボ菌の養分が充分あるかどうかに関するが）。

然し著者等の検索の結果からすると、このDackの云う処は信じ得ない。

既に吾々の佐呂間の例の“いじし”はPH 4.3であつたが、毒素はたやすく証明された。

Dolman の発表で、バンクーバー市に発生した酢漬鯖 Pickled herring によるボトリスムスの例を見ると、患者を解剖してその胃及び空腸からボトリス E型菌を検出し得たのであるが、胃の内容はPH 3.3であると記載されている（胃内容からの毒素の証明については書いていない。空腸内容はPH 5.5で、これからは菌も毒素も検出されている）。

以上から考察してボトリス E型菌はPHの酸性域においてなかなか抵抗が強く、その毒素と同様であると考える。

“いじし”に酢を加えたらどうかとの問題について考えて見るのに、既に著者等の例においても少量の酢が加えられている場合もある。また Dolman のバンクーバー市の発生例についてもその原因となつた食物は鯖の酢漬けであつて、これは相当量に酢が加えられて作つたものである。彼れ

は酢を入れると PH が 4.5 になるが、毒素はこわれないと書いている。

それ故、味を損することのない程度に酢を加えても、その食品はボトリスマスの予防にはならないのではなかろうか。

### ボトリスマス原因食における毒素の分布

著者等の女満別の例でもわかるように同じ材料で同時に漬けた2樽の“いづし”のうち、1樽の方は全然毒素が証明されなかつた。またボトリスマスを起した方の樽の“いづし”もその上から半分ほどは食べても何ともなかつたのであつた。

又 Meyer & Eddie の報告<sup>3)</sup>に述べられているチーズからのボトリスマスの場合のやわらかいチーズ (Spread cheese — Pasty cheese) についても、彼等の記載によると、毒素は平等に含まれてはいないようである。この場合にチーズの上層に毒素が証明されたが、下層は陰性であつた（家庭でチーズを作る場合には醸酵のため容器をカンバスで蔽つて土中に埋めておくと云う）。

毒素の产生はボトリスマス菌の発育に好条件の部分々々に限られるようである。

この事実は同じ食物を食べた人のうち、ある人は罹患しないことのある理由の一部を物語つている。然しかかる人の全部があだかも毒素のない部分を食べたからであるとは考えられない。恐らくその理由の一つとして、ボ毒素に対する個性的の感受性の差異も考えなければならないであろう。

### 附、“いづし”と唐辛子の問題

唐辛を“いづし”に入れたならば、ボトリスマス菌の発育を阻げて、かような“いづし”は安全なのではないかと云う考えは当然起つてくる。朝鮮の漬物はよく唐辛を入れて作られ、それが味をよくしており、わが国でも家庭によつてはこのことが漬物作りに利用されている。

唐辛がどの程度殺菌的に作用するか、まだ文献を搜し得ないが、恐らくボトリスマス菌芽胞なり菌自体に對してはさほど殺菌力はあるまいと思える。

既に著者等の発生例の原因となつた“いづし”的製法の處で述べているように、これ等の“いづし”的には恐らく少量ではあろうが唐辛を入れている。それを食べてボトリスマスを起している。

元来“いづし”でも鯉漬けでも醸酵によつて風味がつくものであつて、唐辛が殺菌力を強く働かせるとすれば醸酵が起ないことになるわけである。又實際唐辛が入れてあつても、鯉漬などは暖い季節になれば醸酵が進んで酸味が強くなる。ただ唐辛によつて醸酵が緩徐になることは云われている。即ち微生物に対する殺菌作用はその辛い味とは不平行であつて、あまり強くないことがわかる。それにボトリスマス菌芽胞は抵抗が最も強い菌のうちに數えられているのであるから恐らく唐辛を入れてもボ菌の発育に影響はないであろう。

Dack の著書に載つているボトリスマスの例でトマト、玉葱、唐辛、ソース (Tomato-onion chilli sauce) を食べて罹患している。Chilli sauce 云うのは唐辛入りのソースであろう。そして恐らく相当量に加わつているのではないかと思われるが、それでボトリスマスが起つているのである。

### 検索方法及び成績

#### 岩内株の分離に至るまで

吾々の最初の例である岩内郡島野村の中毒事件について、それが通常の食中毒発生例と違つて、罹患者が同一の鯉“いづし”を食した少數の人に限つてゐること、それにしては致死率が高いこと

を第1に着眼し、次に患者の材料及び“いづし”についてのサルモネラ菌の検査が陰性なることに鑑みて、著者等の1人なる飯田が万が一ボトリスム中毒でないかと疑い、患者のとつた“いづし”的残りについて検索を行つたのである。

今までわが国にボトリスムスがあつたならば患者を診察した医師は食物の中毒でこの特徴ある症状を見のがす筈ではなく、一応本病が疑われるべきであるが、この場合は後からわかつた初発例であるから医師は気付かなかつた。

かくしてボトリスムス毒素の検索が成功し、動物試験による毒素の椰出が陽性であつたので、同じ材料からボトリスムス菌の分離培養を行つてボトリスムス菌の純粹培養を得るに至つた。

これと同時に、国立予防衛生研究所食品衛生部長遠山祐三博士に要請し、同所に保存のボトリスムス菌A, B, C, D型株を入手し、更に伝染病研究所細谷教授からA型の分譲を得て、これ等の諸型菌と岩内株との細菌学的性状を比較検討した。

著者等はこの検索に着手するや直ちにボトリスムス菌の菌型決定には各型の免疫血清即ち抗毒素血清が最も必要であることを知り、以上の菌型株を液体培養して毒素を得て、それをフォルマリンを以て処理してトキソイドを作り、これを以て家兎を免疫して各型の抗毒素血清を得た。即ち菌の產生する毒素と抗血清との中和試験によつて初めて、分離せるボトリスムス菌の菌型が決定されるからである。

著者等の分離に成功した岩内株は確かにマウスに注射して定型的のボトリスムス死を起す——岩内株の毒素の毒力は弱いので、経口的賦与によつてはボトリスムス死を起し難かつた——毒素を產生する。これは易熱的毒素である。またこの毒素のトキソイドは家兎を免疫し得て、その毒素を中和する抗毒素が得られる。即ち岩内株はボトリスムス菌であることは確実である。

然るに岩内株の毒素はA, B型株の產生する毒素を中和しない。

ここにおいて岩内株は世界に稀れとされているE型株ではないかという疑問が起つた。然しこれによるボトリスムスは最近の文献を調べてもその例が極めて少ない。果してさようなものが、わが国における最初の例に見られるのであろうか。

そこで著者等は再び遠山博士に依頼しカリフォルニア大学 Hooper foundation 所長 Meyer 教授に要請しE型株の分与方を得たのでこれと比較しうるに至り、遂に岩内株がこのE型標準株と全く一致することを確認した。

かかる検索を行いつゝある間に、常に予研遠山博士と連絡し、同博士から Meyer 等の報告別冊或は Dolman 等の報告のコピー入手、最近のE型ボトリスムス菌についての文献を読み得て、益々確信を得たのである。

著者等は本件に関する発表について常に慎重なる態度を持し、最初は“ボトリスムスの疑い濃き例症”として報告し、諸般の研究が進行したる後、確定的にボトリスムスとして発表した。

以下、諸検索の方法及び成績について一括して述べることにする。

方法はⅠ、原因食“いづし”浸出液からボトリスムスE型菌毒素を証明する。次にⅡ、“いづし”からのボトリスムス菌（E型株）の分離を行うにある。

## I. 患者のとつた“いじし”からのボ菌 E 型毒素の證明

毒素の検出によつて1—2日うちにボトリスムスの診断が決定する。若し研究室にボ菌各型の抗毒素血清がなければ続いての検索は出来ない。疑わしいと思われる菌を分離して設備ある処に送つて決定して貰うことになる。

### 毒素証明の順序

#### a. 動物試験による毒素含有の確認

通常2接種法が行われる。

i. “いじし”浸出液の動物接種。ii. 同材料の経口的投与により、動物の病状に注目する。

b. ボトリス菌各型抗毒素血清を以てする中和試験による“いじし”毒素の型の証明

#### a. 動物試験による毒素含有の確認

原因となつた“いじし”を乳鉢中ですりつぶして食塩水を加え乳剤とし、これを遠心沈澱する。

上清（常にそのPHを測定しているがそれについては前記した）を2分し、一方はその儘、他方は80°C 30分間加熱して夫々0.5cc宛それぞれ2疋マウスの腹腔内に注射する。

岩内、興部、女満別及び佐呂間の4例とも、上清をそのまま注射した方のマウスは18~20時間でボトリス死に特有な著明な腹壁の陥凹を呈して斃れた（このマウスの病状については写真参照）。80°C 30間加熱した上清を注射したマウスは何等異常を呈しなかつた。

これは食品中に含まれる毒性アミンとの鑑別ともなるもので、毒状アミンはこの程度の加熱では破壊されないが、ボトリス毒素は他の菌体外毒素の如く易熱性であるから破壊されてしまうのである。

“いじし”浸出液上清の0.2ccマウス経口的投与では3例とも何等の症状を呈しなかつた。

この経口的投与による動物の発症死亡は同じく菌体外毒素であつてもボトリス毒素がデフテリア或は破傷風毒素と異なる性状であつて、つまりボ毒素の特徴としてこれを確証することになるのである。

然し著者等の場合はE型菌毒素であるから、毒性が弱く、或は上清中の毒素量が少ないと動物に何等の変化を起さなかつたものと考えられる。実際に著者等が岩内菌株の純培養で液体培地中に產生せしめた毒素を以て行つた経口的投与ではマウスも海猿も定型的のボトリス死を起した。

要するに著者等はボトリスムス症状を呈して死者或は重軽症者を生じた岩内、興部、女満別及び佐呂間の例において、その原因となつた“いじし”の浸出液について動物試験を行つて、たやすくボトリス毒素を証明した。即ちこれ等中毒はボトリスムスであることを明かにした。

#### b. “いじし”上清中の毒素がボ菌 E 型毒素なることの證明

前実験a. によつてボトリスムスを起した食物中にボトリス毒素が含まれていることが既に翌日にわかる。

然れば同じ“いじし”的上清について、予め作つておいたA型、B型及びE型菌の抗毒素血清を以て中和試験を行う。これによつてその毒素が如何なる型菌の毒素であるかが判明する。これも次の日に決定する。

岩内例の場合にはE型抗毒素血清を作製するに時間を費したために“いじし”上清について中和試験を実施し得なかつた。岩内例がE型毒素によるものであることは分離した菌についての検索でわかつた（後

述参照)。

興部例、女満別例及び佐呂間例について、既に各型の抗毒素血清を作つてあつたので、夫々の“いづし”の上清について直ちに中和試験を行うことが出来た。即ちいずれも E型毒素を含むことを証明した。

**方法**：各例の原因食物であつた“いづし”的前記のような上清に A型、B型及びE型毒素の免疫血清即ち抗毒素血清を加えて混合し、37°C 30分間放置し、それを2匹ずつマウス腹腔内に注射して発病死の有無を観察した。

著者等の得た各型菌株毒素の毒力について云えば、A型株は液体培養10日間でその濾過して得た毒素の毒力は10,000倍稀釋でマウスを斃した。B型株の毒素の毒力は1,000倍稀釋で斃した。E型株(Meyerから得た標準株)毒素はMLD 1,000倍である。但しE型株の毒素を1,000倍に強めるのは容易でなかつた。

なお、これ等の標準株が正確な菌株であることは以下の実験例及びその対照試験の成績並びに後述する生物学的性状を見ればわかる。

**抗毒素血清を作る方法**は菌の液体培養(肝々ブイヨン)凡そ9日間で得た毒素にフォルマリンを1%の割に加え37°Cに14日間おき、動物試験によつて無毒トキソイド化されたことを確認した上、家兎の皮下に1週間の間隔にて数回注射、試血によつて血清の抗毒素がかなり高くなつてゐることを認めたならば、毒素を1回静脈内注射する。かような免疫方法で抗毒素血清を得た。

**中和試験の方法**は毒素即ち上清及び抗毒素血清の原液或は稀釋液(これについては各表に示してある)の各0.25ccを合せて、室温30分間おき、これをマウスの腹腔内に注射し、生死或はその病状を観察した(各表参照)。

第4表 興部の例に於ける中和試験

血 清	上 清	原 液	10 倍
抗A型毒素血清 (2倍)	● ●	● ○	
抗B型毒素血清 (2倍)	● ●	○ ○	
抗E型毒素血清 (2倍)	○ ○	○ ○	

第5表 女満別の例に於ける中和試験

血 清	上 清	原 液	2 倍
抗A型毒素血清 (2倍)	● ●	● ●	
抗B型毒素血清 (2倍)	● ●	● ●	
抗E型毒素血清 (2倍)	○ ○	○ ○	

第6表 佐呂間の例に於ける中和試験

血 清	上 清	原 液	2 倍
抗A型毒素血清 (2倍)	● ●	● ●	
抗B型毒素血清 (2倍)	● ●	● ●	
抗E型毒素血清 (2倍)	○ ○	○ ○	

以上の表中●はマウスの中毒死。○は無症状を示す。

なお、原因食“いづし”について著者等が施行したと同じ試験が死亡患者の解剖が行われた場合には、胃或は腸管内容について試みられる。然し著者等の例ではその機会がなかつた。なお、ボトリヌス菌の分離も解剖が行われれば、患者の種々なる材料について行わるべきはである。

#### “いづし”からのボトリヌス E型菌の分離

原因食“いづし”から全例においてボトリヌス毒素を証明し、更にそれがE型菌毒素であること

を確認したので、その“いじし”からボトリヌス菌を分離し更にそれがE型株かどうかを検索した。

### ボトリヌス菌の分離その他検索の順序

1. “いじし”の乳剤の遠心沈渣を2分し、一方はそのまま、他方は加熱して出来るだけ混在菌を除いてから増菌培養を行う。

2. 増菌培地に毒素が出来ているか否かを動物試験によつて知る。

加熱した沈渣を培養した方に毒素が証明されれば、他方は捨てて直ちにこれから菌の分離を試みる（この方が雑菌が少ないので分離は容易である）。若しも加熱した沈渣を増菌培養したものに毒素が証明されない時は、もう一方の加熱しない沈渣を増菌培養したものから分離を試みるより外はない。

3. 菌の分離には Weinberg 法を行つて深部の集落を観察し、疑わしい集落を釣菌するか。

4. 若くは Zeissler 血液寒天平板に塗つて嫌気的に培養し、疑わしい集落を釣菌する。

#### 5. これらの集落の同定

この集落から釣菌したものをお液体培養して毒素を産生せしめ、各型抗毒素血清を加えて中和試験を行つてボトリヌス菌なることと同時にその菌型を決定する。

#### 1. “いじし”の乳剤からの目的菌増菌培養

岩内例においてはE型菌の存在を始めは予想しなかつたので、沈渣を一方は80°C 1時間加熱してから他方はそのまま肝臍ブイヨンに投じて培養した。然し前者において毒素の産生を証明し得たのでこれから菌を分離することに成功した。興部及び女溝別の例における“いじし”については、その乳剤の遠心沈渣を60°C 1時間加熱して——80°C 加熱を行わなかつたのはこの場合は主にE型であるかも知れぬことを予想したので、その熱に対する抵抗性が弱いことを慮つたからである一芽胞のみを残しこれを肝臍ブイヨンに植えて増菌した。勿論加熱しない沈渣も同時に増菌培養を行つたが、両例とも加熱した沈渣を増菌したものに毒素を証明し得たので、これから分離を試みたのである。なお、この増菌培地として魚肉培地（著者等の1人佐伯の考案）を用いたこともある（これに関しては後に詳述する）。

#### 2. 増菌培地に毒素が生じているか否かを検して分離培養に進む

中毒発生例の検索の場合は上述したように材料を加熱したものとしないものとに分けて増菌法を行い、次で菌の分離に進む訳であるが、例えば土壤からの菌の分離のように検査すべき材料が多数あり、且つその中のボ菌が芽胞の状態で存在することが予想されるような場合には始めから加熱増菌の方法のみをとつた方が容易である。この方法で増菌培養に毒素の証明されたもののみについてその後の検索を続行してゆくのである。著者等はかような方法をとつた。

増菌培養に毒素が産生されているか否かを検するのは、上清をとつてマウス腹腔内に接種してボトリヌスの病状を呈して斃れるのを目標とする。

#### 3. Weinberg 法を行つて独立した深部集落を作らせる——その観察と疑わしい集落の釣菌

方法は細長い試験管に培地を入れたものの中に菌を植えて培養して深部集落を作らせるのであ

る。稀釋培養が行えるから独立集落を生じ、その観察もたやすい。この方法は嫌気性菌の分離に便利である。

**方法：**大きさ 7—9 mm、長さ 15 cm の細長い試験管を注文して作らせ、0.2%，ブドウ糖加 V. F 寒天培地を容れ、綿栓して滅菌。

用に臨んでこれを加熱で溶かし、50°C に保たしておく。前述の毒素を有する増菌培地を遠心沈殿し、沈殿の部へ、先端を融封した硝子毛細管（これは予め数本を大試験管に入れて滅菌しておく）のその端を浸け、培地内にさしこんで攪拌混和し、その毛細管を換えないで、次々と 7 本の培地へ同じ硝子毛細管で攪拌しながら、稀釀するようにして植えてゆく。

以上 7 本の培地を 2 日乃至 4 日間 25°C で培養する。然れば No. 6 とか No. 7 に於て独立した大きな集落が出来る。

V. F 培地は Weinberg 法を使って資料からボ菌を分離するのに優秀であることは著者等が経験上からも云える。かかる肉消化液を有する培地は嫌気性菌の増殖によい。

**V. F 培地の作り方：**成書に記載されているが、牛肉 500 g、牛肝 100 g を挽肉とし、これに純ペプシン 1 g、濃塩酸 20 cc、水 2 l を加え、それを 43°C 24 時間加熱し、次で 80°C に加熱して消化を止める。これを濾過した後ブドウ糖 0.2%，寒天 2% の割合に加え、pH 7.8 に修正、100°C 30 分間 2 日滅菌。これを Weinberg の試験管にいれるのである。

多くのボトリヌス菌は 48 時間培養で目立つ集落を発生するが、標準株 E 型は発育が違い。要するに培養時間は立派に独立した集落が見られる時間でよい。

かくして各培地に独立して生じた深部集落は型の如く観察して、疑わしい集落を捜す。

著者等がボトリヌス菌の深部集落とするのは次のようなものである。

**ボ菌深部集落：**丸いレンズ状で中心部が隆起しているような集落である。又この集落の近くにはガス発生によつて培地に亀裂が生じていることも目標になる。

Weinberg 法に見出された疑わしい深部集落を釣菌する法は、外から細長い試験管に標をつけておき、アルコールでよく試験管壁を消毒し、集落のある処を鏝で切りとつて、滅菌シャーレにとり集落に白金耳を刺して釣菌するのである。

かくてボトリヌス菌の集落かと疑われるものを見出したならば、釣菌して再び液体培地に植えて培養してその集落の毒素産生の有無を確め、その毒素の型を決定する。またこれを次のように表面集落を作らせて観察したり、或は染色標本を作つて菌の形態を検したりする。

#### 4. Zeissler 血液寒天平板培地による分離—その表在性集落の観察、疑わしい集落の釣菌

分離の段階の 2、即ち“いづし”浸出液の遠心沈殿の加熱除菌後の増菌培養において毒素の証明が陽性であつたならば、3、の深部培養を行わずに、その増菌培地から釣菌して Zeissler 血液寒天平板培地に塗抹して、嫌気性培養法を行い表在性菌集落を作らせることも施行した。

この場合にボ菌を疑われる集落を見出したならば、染色して検査を行つた上、肝アブイヨン或は魚培地に液体培養して、毒素産生の有無を確めて、その毒素の型を中和試験により決定する。

#### 吾々の行つた嫌気性培養法について

嫌気性培養法については種々なる方法が挙げられているが、実際に行つて見ると嫌気性菌の表在性集落がなかなか出来てこない。

ところが、著者等の 1 人である神沢は簡単な工夫で優れた嫌気性培養法を考案した。

#### 神澤氏 ドライアイス添加培養法

初めドライアイスの少量を嫌気性装置内の目的菌をうえたシャーレの上におくことにより、その蒸発により CO<sub>2</sub> ガスが、残存している空気を駆逐し、嫌気性状態を完全にするのであろうとの考え方で試みた。

嫌気性装置はピロガロール法を行う真空乾燥器でも、好気性菌との共生を利用する辻式装置でも、又真空乾燥器の空気を除去する装置でもよい。

いずれにしても菌を植えた Zeissler の平板をその中にかさねてその最上部のシャーレの上に親指大のドライアイスを置きそれぞれの嫌気性にする手段を行つて、容器を密閉して 3 日間ほど孵卵器に収めて培養すればよい。たやすく立派な表面集落を生じている。

ドライアイスは病理の凍結標本用の圧搾 CO<sub>2</sub> ボンベがあれば、この位の量はすぐ作られる。

後に考えられてきたが、この場合の CO<sub>2</sub> の作用は恐らく、これが嫌気性菌の養分としての炭素源になるので、菌の発育が促進されるのではないかと思う。

細菌の培養に CO<sub>2</sub> を用いることは、ブドウ球菌（毒素を作らせる場合）及び淋菌の培養に利用されているが、嫌気性菌の培養については殆ど行つていない。唯 Rockwell (1924) (7) が CO<sub>2</sub> 使って優れた培養成績を示している。神沢は簡易な方法で CO<sub>2</sub> を利用して成功を収めたわけである。

### 黄焼式嫌気性培養装置の実施

わが国産の嫌気性装置として表題のものがあるが、評判がよかつたのでこれを用いてみたところ操作が簡単であつて優れた成績を示した。それでこの装置を使つて表在性集落を作らせた場合も多い。培養温度 28°C, 48—72 時間培養した。

### *Clostridium botulinum* の集落の性状

Zeissler ブドウ糖血液寒天平板培地の表面に生えた菌の集落の所見は、標準 E 型、岩内株及び著者等が砂地より分離した 211 株いずれも略々同様であつて、表面は滑沢、形態は円形のものもあり、多少不正形をとるものもある（写真参照）。直径は約 2—3 mm のものが多い。灰白色で、滑沢、半透明、明かに溶血を認めるが、その溶血帶は極めて狭い。培地に水分が残つていると集落は互に融合し易い。

上述の 3 つの E 型株のうち、標準 E 型株は最も発育が悪く、また集落も小さい。

Dolman は血液寒天平板培地として人或は綿羊の血液寒天を用いている。又血液寒天平板が充分に乾いていなければ生じた集落は不規則な枝を出すような形となり易く、これは樹木状、葉状乃至星状になつていく。平板が非常に湿つていた時には、そのような状態の発育が速に融合し薄いフィルムとして拡がり、時には培地の全表面を蔽つてしまうと云つている。

表在性集落を作つて見て貴重な経験を得た。それは Weinberg 法で生じた集落がボトリヌス菌のみの純粹なものではなく、時に枯草菌のような芽胞を作る菌を混在していることである。尤もこの混在菌は培養が嫌気的の深部培養であるために、極度に発育が悪く、従つて深部集落は発育のよいボ菌に圧倒されており、ボ菌のみの純粹集落の感を呈するのである。

表在性集落を作らせて、これを釣菌、染色して検すると、ボ菌以外の菌が混じっていることに気付く。

なお茲に Dolman が E 型株の分離に使用した培地を参考までに記載する。

### Dolman がとつたボ菌 E 型株分離方法

前に記載したバンクーバーで起つた中毒例の原因となつた鯨の小片を Ground meat を加えた Peptone beef-infusion broth (Dolman はこの培地を菌の保存及び毒素产生に好適なものとして推奨している) に植え 37°C に数日培養し、それを煮沸している重湯煎中で 3 分間煮沸してから人血を以てした血液寒天

平板に塗抹培養した。この平板を完全な嫌気性状態の下で2—3日培養し、疑わしい集落を釣菌したと云うている。

なお、彼は最後のE型菌の分離はその芽胞が比較的熱に抵抗が弱いことと、枯草菌その他多くの好気性及び嫌気性芽胞菌（その大部分はピツクリにするために用い香料由来する）が同時に存在するため厄介であつたと付け加えている。

### ボトリヌス菌の所見

著者等のボ菌が培養状態で明かなように嫌気性菌であることは云うまでもないが、普通の培養では生えないことも行つている。

塗抹標本を作つて鏡検すると、大きな両端鈍円の桿菌であつて、グラム陽性である。但しグラム陰性に変りやすい。若い菌は陽性であるが、古い菌は陰性になり勝ちである。また鞭毛を有するが数本しか見られない。

芽胞は Zeissler 平板培地に生えた集落の菌ではなかなか生じてこないが、肝アブイヨン培養菌ではたやすく且つ多数に認め得る。卵円形であつてその大多数は偏在性であり、菌体よりは少しく膨隆している。但し菌体の中心部に占居するもの、或は游離しているものも少数に認められる。  
(写真参照)なお、ボトリヌスE型菌は各種の培地で盛んにガスを発生する。臭気は酢酸様である。

### 5. 分離ボトリヌス菌集落の同定—抗毒素血清を以てする産生毒素の中和試験

前述のような手段でとらえ得た集落の同定即ちこれを形成する菌がボ菌であることの決定と、更にそれがE型菌であることの確定である。

ボ菌であることの決定には集落の性状(嫌気性菌であることは云うまでもない)、その菌の形態、鞭毛の有無(運動性)芽胞形成の状態等が大きな参考になる。また後述する生物学的性状を検することも忘れてはならない。

本菌の決定点として最も重要なことは、分離菌を液体培養して毒素を産生せしめ、これを動物試験によつて証明するにある。

殊に血液寒天平板に生じた菌の集落の決定は中毒の診断の根拠であるし、その純培養を得る前階梯の手段である。

菌の菌型決定は各型の抗毒素血清を以てする中和試験(糖分解試験も相当信頼出来るが)による。要するに菌から毒素を作らせることが先決問題である。

### E型菌の毒素産生について

分離したボ菌と思われる菌について毒素を産生させることは、A、B型ではたやすいが、毒素産生能力の弱いE型株では相当に困難である。これは著者等が日常経験している処であるが、E型株による中毒例の場合に原因食品からの毒素の証明はたやすく行われるが、その食品からE型菌を検出することは容易でない。吾々の例で興部及び女満別の発生例がそれに相当している(これについては後述する)。

Meyer の報告を見てもこのことがうかがわれる。即ち 1950 年 8 月白鯨の肉を食べてのボトリヌスの例で、その食物から毒素は証明されたが(E 菌)、菌の検出は不成功であつたと云つている。

分離菌の毒素産生はどうして行うか。著者等は肝々ブイヨンに9日間(25°Cにて)培養して、その上清をとり、種々なる稀釋をそれぞれマウスに注射して検した。その方法は前述の食品からの毒素の証明と同じである。

この毒素は易熱性であること、後述のようにE型株抗毒素血清によつて中和され、無毒となること、及び1%の割合にフォルマリンを加えて長く放置すればトキソイド化して無毒となることによつて菌体外毒素であることは云うまでもない。注意すべきことはボトリヌスE型菌は弱い毒素を产生するに拘らずその人を侵しての致死率は高く、A型によるものと殆んど違わないことはMeyer等の云う処である。

### 佐伯氏魚培地に就いて

E型菌株の毒素産生能を昂めることは、その分離菌株の同定に役立つばかりでなく、抗毒素製造上の免疫用抗原として重要である。

著者等の1人である佐伯は、E型菌が殆んどすべて魚を主体とする食物にて増殖してボトリヌスを起すことに注目し、E型菌を魚肉使用の液体培地に培養して、その毒素産生を検した。予想したように、佐伯の作った魚肉消化液に魚肉エキスを等量加えた培地にE型菌を培養(25°C)し10日に及ぶと、対照とした肝々ブイヨンの培養よりも10乃至100倍毒素の產生がよいことがわかつた。但し菌の発育はさほどよくない。

これに關しては佐伯が近く詳報するが、その培地について略記すると、

1. カレイのペプシン消化液：鰓(骨とも)500gに濃塩酸及び純ペプシン、水1,000ccを加え、50°Cに1夜おき(時々振盪)、煮沸してからPH4.8として濾紙で濾過、濾液をPH7.0に修正、煮沸濾過(以上前述のVF培地に準ずる)。

2. カレイ浸出液：鰓(肉のみ)500gに1,000ccの水を加えて煮沸して浸出した濾液(PH7.0に修正)である。

この1、と2とを等量にとり更にブドウ糖を2%の割合に加え流動パラフィンを重層した培地である。

### E型菌の毒素産生能に関する變異株の出現について

吾々が當面しているボトリヌスE型菌は、食物等からの分離は出来ても、その分離菌の同定が困難なるために、色々な事実を経験しているが、屢々それについて説明が下し難い問題にぶつかつている。

E型菌によるボトリヌスの材料から菌の分離を試みるに当つて、偶然としか考へられないが、E型菌が極めて多く一即ちその増殖がよく一旦その毒力が相当に強い場合にぶつかる時がある。丁度吾々が最初の例として取扱つた岩内の発生例における“いぢし”的な場合である。かかる材料からの検出は比較的たやすい。また著者中村が予研食品衛生課の坂口技師から直接聞き得た処では、秋田県天王町の例の“いぢし”についても同様であつたようである。

然るに吾々の検索した例で、興部、女満別及び佐呂間のボトリヌスの原因食の“いぢし”では未だ確実に毒素を産生するE型株の分離は成功していないのである。即ちこの3例の“いぢし”はいずれも浸出液はE型毒素をもつている(前表参照)し、その遠心沈渣を肝々ブイヨンに植えた培養液もE型毒素が証明されるし、更にそれからWeinberg法で深部集落が得られ、それからのZeissler血液寒天平板上の表在性集落も得られて、その菌の生物学的性状はボトリヌス菌E型と一

致する。

然るにそれを毒素産生の液体培地に培養しても、現在の処では毒素の產生がない。“いざし”沈渣の肝タブイヨン（数本保存している）は常にE型毒素を証明するが、それからなかなか毒素を产生するE型株をとらえ難い。

著者等の考えでは興部、女満別及び佐呂間のボトリヌス菌（E型）の表面培養の集落の菌の大多数が毒素產生能を失つており、恐らく毒素產生株から非產生株への変異が速かに起るものと推測される。岩内株はかようなことがなく、今までの処、継続培養した菌株は常に相当に毒力を出している。即ち非產生株への変異は生じ難い。それ故興部株等も或は安定な菌株が得られるかも知れない。

Meyer によると、ボトリヌス菌ではかような変異を見ると云う。A型菌ではかかる変異は少なくB型菌がこれに次ぎ、C型菌はかなり変異しやすいとされているが、E型菌もまたこの変異が速に起るものと思われる。

毒素產生能の変異の問題は現在の処では想定にすぎない。興部株等はそれと思っているが、とにかく他の性状は正常株と変わらない。殊に次に述べる糖分解能のような菌の微妙な生物学的作用も全く変化がない。また集落の溶血についても同じである。

#### 分離 E 型菌株の生物学的性状の検索

ボトリヌス菌について、よく論じられている生物学的性状は、凝固蛋白溶解性、糖類分解能、及び熱に対する抵抗性等である。

##### 凝固蛋白の溶解性

固体蛋白の分解、消化による液化である。嫌気性菌は一般に蛋白質を分解する作用が強いが、ボトリヌス菌も強く、殊にA型菌は凝固蛋白即ち凝固牛乳、血清、卵白を消化して溶解してしまうことが特徴の一つである。A型菌は牛乳培地を凝固させてから溶解する。

B型菌はアメリカの菌株は蛋白溶解性を示すが欧洲の菌株はその大部分が陰性であるとされている。

第7表 分離菌の凝固蛋白溶解性・

	岩	興	女	佐	標	A
	内	満	昌	呂	準	
	部	別	間	E		
凝 固 卵 白	-	-	-	-	-	卅
〃 血 清	-	-	-	-	-	卅
肝タブイヨンの肝片	-	-	-	-	-	卅
ゲ ラ チ エ 溶 解 性	+	+	+	+	+	卅
イ ン ド ル 反 応	-	-	-	-	-	-

E型菌はボトリヌス菌のうちで最も蛋白分解性が弱く、従つて凝固蛋白を溶解しない。著者等の分離した菌株も第7表に示すように、すべて凝固蛋白を液化しない。また牛乳培地を凝固させない。

ゲラチン液化性：これもA型及びB型ではその増殖と共に速かに認められるが、E型では遅い。著者等の分離した菌株もこれに一致する。

インドール産生に関しては著者等の分離菌株はペプトン水培養について反応を検しても、陰性であつて、文献の記述と合致する。

##### 糖類分解性の検索

ボトリヌス菌のE型株はA型及びB型とは糖類を分解する態度を異にする (Dack の著書<sup>5)</sup>による)。尤もE型株は世界でまだ稀であるから (後述E型株についての項参照) 現在まで少数の菌株について検せられているに過ぎない (Dack)。

著者等の考えでは、E型の糖類分解に関する性状が、その菌株間に変動がないとすれば、E型株の鑑別及び同定に対して相当に意義ある目標となると信ずる。それは、E型株は著者等が前述したように毒素の產生が弱くまた毒素非產生株を生ずるから、毒素による同定が屢々困難な場合を見るからである。

ボトリヌス菌の糖類分解性について、型の差を問わず全ての菌株は Dextrose, Levulose, Maltose 及び Glycerol を分解してガスを產生するが、その他の糖類の分解はA型及びB型で異り、またこの両型菌間にも菌株によつて多少の変動があると云う (Dack)。

E型株は Dack の記載では (少数しかテストされてないと云つているが) A型株では分解しない (例外はあるが) Inositol, Adonitol 及び Sucrose を分解してガスを產生すると云う (Galactose, Lactose, Mannitol, Dulcitol 及び Inulin については記載がない)。

著者等も岩内株の検出に當つて直ちにその糖類分解性について検査し、これを前報告において發表した。これは液体培地として肝々ブイヨンに糖類を加えたものを用いて、それで標準E型株のそれと一致した成績を得たのであつた (第8表参照)。

然しその後著者等の分離した興部株及び女満別株 (毒素產生はなかつた) について同じ培地を使用して糖類分解性を検した処が、一定の成績を示さなかつた。

ところが、その後の研究によつて培地を変えて検査を行つたところ、一定の結果を得るに至つたのである。

**糖類分解性検査用培地：**ペプトン水に 0.1 % の割にチオグリコール酸ソーダを加え、それに各糖類を 1 % の割合に添加したものである (37°C 5 日間培養して観察)。

第8表 分離 E型株糖類分解性試験

炭水化物	菌株	岩 興 女 満 別 E A					炭水化物	菌株	岩 興 女 満 別 E A				
		内 部	別	E	A	内 部			内 部	別	E	A	
Dextrose		+	+	+	+	+	Mannose		+	+	+	-	
Levulose		+	+	+	+	+	Sorbitol		+	+	+	-	
Maltose		+	+	+	+	+	Mannitol		-	-	-	-	
Sucrose		+	+	+	+	-	Dulcitol		-	-	-	-	
Arabinose		-	-	-	-	-	Inositol		-	-	-	-	
Xylose		-	-	-	-	-	Dextrin		-	-	-	-	
Lactose		-	-	-	-	-	Inulin		-	-	-	-	
Galactose		-	-	-	-	-	Glycerol		-	-	-	-	
Raffinose		-	-	-	-	-	Salicin		-	-	-	+	
Rhamnose		-	-	-	-	-							

十は酸及びガス形成を示す

第8表で明かのように、著者等の行つた試験成績では、岩内株、興部株及び女満別株は全く同一結果を示し、それは標準E型株と一致している。

要するにE型株は Dextrose, Levulose, Maltose, Sucrose, Mannose, Sorbitol を分解してガスを產生している。

これに反してボトリヌスA型株は Dextrose, Maltose, Levulose 及び Salicin を分解してガスを生ずるが, Sucrose, Mannose 及び Sorbitol は分解しない。

以上の成績が更に繰返しての試験にて常に constant に現わるとすれば, E型株の同定は糖類分解性の検査によつても行われると云えよう。これについては更に報告する考えである。殊に著者等の成績と Dack の記載とではE型の Inositol の分解が陰性なる点, A型の Glycerol を分解しない点が違つてゐることについて, 何れが正しいか再試験の必要を感じる。

その後最近著者等が読み得た Dolman の報告のうちに, 糖類分解性の試験について, 同じくチオグリコール酸ソーダ培地を使用したと云う記述を見出した。それは Phenolred を標示薬として加えた Thio-glycollate 半固形培地である。

なお, Dolman はこの培地を用いてE型パンクーバー株の糖分解性を検している。それは次の通りである。

Dextrose, Levulose, Maltose, Sucrose, Glycerol は分解してガス発生。

Arabinose, Xylose, Lactose, Mannitol, Dulcitol は陰性。

Dolman はこの反応はE型の培養に characteristic であるように思えると云つている。他の糖類の分解も検したがそれ等は少しく inconstant であつたことを附け加えている。又彼はパンクーバー株と "Nanaimo" 株との間には Galactose と Salicin の分解について不一致を見たと云う。

要するに本問題は多くのE型株について検索する必要を認める。幸いに著者等は自ら分離し得た3菌株につき検索し、この生物学的性状に重要性を加えることが出来た。なお、著者等は土（或は砂）から分離し得た数株について試み、更に知見を加えたいと思う。

#### 岩内株芽胞の熱に対する抵抗性についての小実験

ボトリヌス菌芽胞は一般に熱に対して抵抗力が強いことで、その食品への混入が恐れられていることは周知の通りである。A型及びB型の芽胞は耐熱性が殊に強い。

Dack の記載によれば豆のペプシン消化培地 (PH 8.0) で増殖させたボ菌の芽胞を PH 7.0 の磷酸緩衝液に浮遊させたものについて熱耐性度の最大値平均は 100°C で 330 分, 110°C で 32 分, 120°C で 4 分であると云う。

E型菌ではこの芽胞の耐熱性は弱いと云われている。同じく Dack の記載では、ある菌株は 80°C に 10 分間耐え、他のものは芽胞 5 百万個を PH 7.4 の緩衝液 1 cc に浮遊させたものについての試験では 100°C なれば 5 分後, 80°C なれば 40 分間後に死滅したとある。然し食品中にあるものは莢雑物が多いうちに混じているから、簡単な滅菌では死なないであろう。それは罐詰でE型菌による中毒があるのでわかる。

著者等も岩内株について簡単な熱耐性の試験を行つてみた。1 cc 1 千万乃至 1 億個の芽胞を含む食塩水浮遊液を 1 cc ずつアンプレに封入し、温浴槽中に浸して各時間毎にとり出し、直ちに冷却して VF 高層寒天に 0.1 cc ずつを植え、生じた集落数を検した。

その成績は 60°C では 7 時間後もなお無数の集落を生じ、80°C では約 3 時間で死滅が見られ、100°C では 5 分間で全く死滅することを知つた。

その他の分離菌株につき詳細な報告は他日に譲る。

## E型菌であることの同定試験——抗毒素血清を以てする交叉的中和試験

本菌はその集落及び菌の性状並びに前述の生物学的性状によつて殆んど決定されるが、それ等の成績では何となく信頼度がうすい感がある。即ち菌及びその型の最後の決定は、分離菌によつて毒素を産生せしめて、これについて各型の抗毒素血清を以て中和試験を行つてその結果によつて決定するのが最も重要である。

既に *Clostridium botulinum* の各型の鑑別は凝集反応その他の免疫反応では不可能であつて、この中和試験によつてのみ可能であることは学者の一一致せる見解である。

著者等は岩内株、興部株及び女満別株について施行した。

中和試験の方法は“いづし”浸出液の毒素について行つたものと同一であるから省略する。

### 1. 岩内株の同定

この菌株は前述のように比較的たやすく毒素産生能のあるものが分離された。その產生する菌体外毒素の毒力については前述した。これにより家兎免疫抗毒素血清を得た。

著者等はこの菌株が最初に得られたものであるから、この菌株の產生毒素の中和試験には綿密な対照交叉的中和試験を行つた。

#### i. ボトリヌスA型菌毒素との交叉的中和試験

A型菌はボ菌中で最も強い毒素を産生し、また中毒症も多くはこの菌によることが知られているから、ボ菌の代表的のものと見てよい。

岩内株及びそのA型菌株で前述の方法により抗毒素血清を作つたので交叉的中和試験を行つた。この試験は最初の試みであつたので岩内株抗毒素血清は原液そのまま使用した。その結果は第9表の如く岩内株毒素はA型抗毒素によつて中和されない。即ちA型であることは否定される。

第9表 ボトリヌス菌 A型株毒素との交叉中和試験

抗 毒 素	毒 素	A型毒素 (1,000倍稀釋)	岩内株毒素 (100倍稀釋)
A型抗毒素血清 (原液)		○ ○ ○	● (7時間) ● (〃) ● (7.5時間)
岩内株抗毒素血清 (原液)		● (4時間) ● (5時間) ● (〃)	○ ○ ○
対 照 (健康血清) (原液)		● (4時間) ● (〃) ● (5時間)	● (6時間) ● (7時間) ● (〃)

○は健全 ●は斃死を示す(以下の表に於ても同じ) A毒素はマウスを1万倍稀釀にて斃す。岩内株毒素は1,000倍。

又この結果から見ても岩内株毒素は特異的な抗毒素を作ることがわかる。

#### ii. B型菌毒素との交叉中和試験

続いてB型菌を液体培養して毒素を得て、家兎を免疫して抗毒素血清を作り、中和試験を行つた。

第10表の成績で明かなように、岩内株はB型菌でもない。即ち岩内株の毒素は独自の抗毒素を作り、それとのみ中和試験が成立することを示す。

第10表(甲) B型菌毒素との交叉中和試験

抗毒素	B型毒素(200倍)	岩内株毒素(2倍)
B型抗毒素血清	2倍 { ○ ○	● (5.5時間) ● (5.5時間)
	5倍 { ○ ○	● (5.5時間) ● (6時間)
	10倍 { ○ ○	● (5.5時間) ● (6時間)
岩内株抗毒素血清	2倍 { ● (5時間) ● (8時間)	○ ○
	5倍 { ● (8時間) ● ("")	○ ○
	10倍 { ● (8時間) ● ("")	○ ○

B型毒素は1,000倍稀釀でマウスを斃す(下表参照)。

第10表(乙) 対照試験

B型毒素	岩内株毒素
200倍 { ● (5.5時間) ● (8時間)	2倍 { ● (5.5時間) ● (6時間)
500倍 { ● (12時間) ● ("")	5倍 { ● (12時間) ● ("")
1,000倍 { ● (16時間) ● (18時間)	10倍 { ● (12時間) ● (16時間)
2,000倍 { ○ ○	20倍 { ● (16時間) ● ("")

### iii. 標準E型株毒素との交叉中和試験

岩内株がA型でもB型でもないことがわかつたのでE型ではないか(C型, D型は人を侵さないことが知られているので)を決定する中和試験を行つた。

これは標準E型株があるので、それで毒素を産生せしめて、その毒素に岩内株毒素で作つた岩内株抗毒素血清と中和試験を行い(第11表)，更に反対に岩内株毒素に対して標準E型株抗毒素血清を加えて中和試験を行うのである(第12表)。

第11表 標準E型株毒素と岩内株抗毒素との中和試験

E型毒素 岩内株 抗毒素	2倍	10倍	20倍	E型毒素 岩内株抗毒素	2倍	10倍	20倍	40倍
2倍 { ○ ○ ○ ○ ○ ○	20倍 { ● 3時間 ● 3.5時間 ● 5時間	○ ○ ○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	
	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	
	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	
10倍 { ● ● ● ● ● ●	対照 { ● 3時間 ● 3.5時間 ● 5時間	● 3時間 ● 3.5時間 ● 5時間	● 3.5時間 ● 5時間 ● 6時間	● 3時間 ● 5時間 ● 6時間	● 3時間 ● 5時間 ● 6時間	● 3時間 ● 5時間 ● 6時間	● 5時間 ● 6時間	○ ○
	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	
	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	

この試験に用いるための標準E型株毒素は40倍稀釀でマウス3疋中2疋を斃す程度のものであつた。

第11及び第12表の結果で明かなるように両中和試験とも成立するのであつて、標準E型株の毒素と岩内株の毒素とは、それぞれの抗毒素と互によく結合して中和され無毒となる。

かくして、岩内株はA型でもB型でもなく、E型株であることが積極的に同定されたわけである。

第12表 岩内株毒素と標準E型株抗毒素との中和試験

E型 抗血清	岩内株 毒素	2倍	4倍	10倍	E型 抗血清	岩内株 毒素	2倍	4倍	10倍
2倍	{	○ ○ ○			20倍	{	○ ○ ○		
10倍	{	○ ○ ○			対照	{	● ● ● 5時間 6時間 〃	12時間 〃	20時間 ○ ○

## 2. 興部及び女満別例“いづし”からの分離菌毒素のE型株毒素なることの證明

著者等はE型株には毒素非產生の変異株が生じてくるのではないかと云う想定を前述したが、それは興部及び女満別例の“いづし”から分離した菌株についてである。

これ等の菌株から著者等は未だ純粹培養の状態で毒素產生能を示すE型菌株を得ていない。それ故これ等については岩内株で行い得たような完全な中和試験は行い得ないでいる。

然し著者等がこれ等両例の“いづし”から分離した菌は確かにボトリヌス菌としての純粹培養菌であつて（塗抹染色して検しても同一菌のみである）、毒素產生株と非產生株の混つているものにつかんでいるのである。つまりそれ等から確実に毒素產生菌だけの表在性集落を作るものを捕え得ないのである。即ち前述したように現在の段階ではそれ等から表在性菌集落を作らせて見ると、その菌は毒素を生じないのである（然し生物学的性状はE型菌と一致する）。

従つてここではボ菌の純粹培養ではあるが非產生株と產生株の混つているままの液体培養液の毒素を用いて、標準E型菌抗毒素血清との中和試験を行つた。つまりこの毒素と云うのは“いづし”的浸出液（加熱して非芽胞性混在菌を除く）遠心沈渣を液体培養して得たものである。

その結果は第13表及び14表で示すように、興部及び女満別の両例とも標準E型抗毒素によつて明かに中和される。即ちこの両例ともボトリヌスE型株の毒素であることが証明される。なお著者等はこれ等の“いづし”浸出液の材料から毒素產生能のあるE型株を得んとしている。

第13表 興部の例についての中和試験

標準E型抗毒素	毒素	原液	毒素対照
原液	○ ○	原液	● ●
5倍	○ ○	5倍	● ●
10倍	○ ○	10倍	○ ●

第14表 女満別の例についての中和試験

標準E型抗毒素	毒素	原液	毒素対照
原液	○ ○	原液	● ●
5倍	○ ○	5倍	● ●
10倍	○ ○	10倍	○ ○

佐呂間の例の“いづし”については、その浸出液の毒素の証明は前述のようにた易く成功したこの材料から純粹培養のE型菌と思われる株（生物学的性状はE型に一致するが毒素非產生の株）を得ている。

## 土（或は砂）からのボトリヌス菌 E型の分離

著者等は岩内のボトリヌスから更に興部及び女満別における同じ中毒症の発生を見るや北海道内各地の土を探取してボトリヌス菌の分離検出を企図した。昭和28年7月初旬からである。更にE型菌は魚類と関係の深いことを慮つて北海道沿海にて漁獲された魚類の臓器についてE型菌を検

せんと努力を払つた。

## 資料について

土の検査の第1期の分としては

採取地区	採取試験管本数	採取地区	採取試験管本数
岩内町及び近郊	100	留萌地区	11
網走市縫詰工場附近	4	興部町	50
室蘭地区	9	女満別近郊	50
函館地区	15		
深川地区	8	計	247

魚内臓の検査は各種について行つたが、これをその産地別にすれば次の如くであつた。

産地	魚の数	産地	魚の数
小樽	50	鹿部	1
余市	3	北見紋別	270
釧路	5		
石狩	11	計	340

魚の種類としては宗八鱈(106尾)とアサバ鱈(130尾)が主で他はヒラメ、ソイ、キンキン、鯛、スズキ、ホツケ等である。

著者等の検出を狙つたのはE型菌であつて、これはA或はB型と違つて熱に対する抵抗力が弱いから、加熱分離法を行う場合に、高熱を加えることをさし控えなければならない。従つて材料中に混在する雑菌が死滅され難く、その分離証明は困難である。

そのため吾々の第1期の土及び魚内臓からの検出は殆ど不成功に終つた。勿論この成功か否かは術者の手技の熟練、検査に専心する技術者の數及び裏付けになる経費或は検査期間の長短の如何に關係する所が大きい。E型株は毒素產生を目標にして分離が行われるのでマウスを使用することが多く、吾々は前記の土及び魚肉臓の検査で培地を約5,000本、マウス略2,000匹を使用している。

土についてのボトリヌス菌の検出は吾々にとつて初めての経験であるので、その手技の原則はわかつても、実際に手落の点があつたことは後になつて分つて来た。又材料たる土は、地表からどの位の深度のものを採取すべきであるかについても全く見当がつかなかつた。

前記の資料についての検索が7月初旬から行われたが、漸次経験をつみつつその最終の資料について検索が及んだ頃になつて、遂に1E型株を分離し得るに至つた。それは9月になつて女満別の中毒患者を出した家の近くの網走湖畔の砂からである(この方法については次項において述べる)。

## 第2期の資料としての網走湖周辺の砂からの検出

吾々は網走湖畔の砂から初めてE型株を分離検出し得たので、第2期の検索目標を網走湖周辺の土(或は砂)とした。

網走湖は周囲12里弱に及ぶが、その周辺24ヶ所を選んで各所から(土或は砂)を40本の試験管にとり、総計約1,000本に及ぶサンプルを採取して、それからボトリヌスE型菌を検出して、ボ菌の分布状態を知らんとした。これ等について一時に検索を行うことは吾々の事情が許さないことは明かである。

先ず湖岸の女満別の砂約800本について鋭意検索を行つた。

それは次に述べる方法によつて前述の魚培地に砂を入れて培養し、その各をマウスに接種して毒

性を検し、毒性のあるものを選び出して、それについてのみ検索を続行すると云う手段をとつてゐる。かくして800本のうち毒性を示したのが50本であつた。これについてE型抗毒素血清による中和試験を行い、中和が成立した培地にはE型菌が存すると考えられるので、それから菌の分離を行うことになる。

この検索は目下継続中であるが、今までにE型株の分離に成功したのは3株である。従つて著者等は既に砂からE型菌4株を分離している（この分離株の数は検索の進行と共に増していく）。

要するに砂のサンプル800本を検して相当数のE菌株分離が予想せられる。

#### 著者等のE型菌の土（或は砂）からの分離方法

現在実施しつつある方法は次の如くである。

地表から凡そ10cm位の土を採取する。その5—10gをとり2倍量の生理的食塩水を加えてよく振盪或は攪拌し、菌を土の顆粒から放す。これを5分間位放置して土の顆粒を沈澱させる。菌は上清に浮遊すると考えられるから、ガーゼにて濾過しつゝ上清をとり、遠心沈澱を行つて集菌する。即ち上清を棄て、沈渣をとり、これにブイヨン1ccを加えてよく混和した後、前記の毒素産生用魚肉培地に接種する。これを60°C 1時間加熱してから、25°Cで10日間培養する。

#### アメリカにて行われている方法

参考までに文献にて知られる方法を紹介する。

500cc位の大試験管で培菌培養を行うのであるが、土のやム多量をとり、食塩水を加えて、振盪してその上清を——菌はこのうちに浮遊している——80°C 30間加熱して混在菌を滅菌し、予め大試験管に作つてある肝々ブイヨン（MeyerはBoiled beef heart medium）に投入して培養する。それから1部をとつて平板培地に植えて嫌気性培養する、1部はマウスに注射してボトリヌス毒素の証明を行う。

#### 魚とボトリヌスE型菌について

著者等のボトリヌス中毒患者の原因食なる“いずし”から分離したボトリヌス菌はすべてE型株であつて魚と関係が深い。

該菌E型は先覚者 Meyer 或は Dolman の云う如く Fish borne botulism の原因菌であることを如実に証拠立てている。

該菌E型と魚との関係について著者等は最近 Dolman の報告を読むことが出来た。これについては既に Meyer & Eddie の発表にも記述されているが両者を総合することによつてE型によるボトリヌスの全貌がうかがわれる。

これ等によると、E型該菌によるボトリヌスは世界において1952年までに7例が挙げられているのみである。これについて概略を記述する。

E型菌によるボトリヌスは1936年までは知られていなかつた。同年ロシア Doniepopetrovsk の細菌学研究所の Prof. Bier から Meyer に鑑定を乞うたため送つてきた菌株に初まる。これは鰈鮫 Sturgeon の筋肉及び腸管から分離されたものだそうであるが、恐らくボトリヌス発生に関係がある魚からであろうと想像される。Meyer一門の検索で、この菌株はA, B, C, Dのいずれにも属さない Cl. botulinum であることがわかり、Meyer はE型であると決定した。

続いてE型株によるボトリヌスは紹介で2発生例が発見された。

第 15 表 世界に於ける E 型ボトリスムス発生例

年代	報告者	発生場所	原因食品	患者数	死亡
1936 以前	Gunnison, Cummings & Meyer (1936)	ロシア國ウクライナ	鱈鮭の肉と腸	不明	不明
1934	Hazen (1937)	紐育州	罐詰小鱈(独乙製)	3	1
1934	Hazen (1938)	紐育州	燻製鮭	3	1
1941	Geiger (1941)	サンフランシスコ	キノコのソース	3	1
1944	Dolman and Kerr (1947)	Nanaimo カナダ	鮭罐(自家製)	3	3
1949	Dolman, Chang, Kerr & Shearer (1950)	バンクーバー カナダ	酢ずけ鮭(自家製)	2	1
1950	Meyer の報告にあるが、1950年8月(場所不明)白鯨の脂の油ずけを食べて家族5名が軽症のボトリスムスを発し、その食品から菌は分離されなかつたが、E型毒素を証明したとある。この鯨は陸上げされて海岸の岩の上に放置されたと云う。				

茲でロシアに於けるボトリスムスについて Meyer 及び Dolman の記述から概略的に述べる。

古くからロシアに於てもボトリスムスの報告がよく見られる。ロシアの人々はその環境上魚を食べる人が多いから、魚によつて起るボトリスムスがよくあるようである。この魚の種類は鱈鮭 Sturgeon とか鱈であることが多い。Matview (1949) の單行本はロシア国内に起つた魚中毒の全文献を集めているが、Sturgeon の汚染は主として A 型菌であると指摘している。然し Matview の記載中に E 型菌株と思われる菌を分離していることが書いてある。即ちその菌はボ菌と一致する諸性状を示すが、その毒素が A 型及び B 型の混合多価血清によつて中和されないと云う。とにかく Matview の廣汎な論文中に E 型菌のことは全く書いてない。

かような事情であるが、著者等は北海道とよく似た環境なるシベリヤ地方をもつロシア国には E 型菌によるボトリスムスが相當に発生しているのではないかと想像する。

なお、E 型菌が魚以外の食品(白鯨はここでは魚と見なすとして)からくることも稀れにあることがわかる。表中のキノコの場合(これはユーロースラビア産で、カリフォルニアで罐詰としたものであると云う)の外に、表中のバンクーバーの発生例で、同じ家で鱈と同時に作つた鶏の罐詰(この家の鶏小屋の土からも E 型株が見出されている)からである。

**魚と他の型のボトリスムス菌:** ボトリスムスの統計は米国においてよく整備されている。それは Meyer 及び Dack など大家の存在と、公衆衛生殊に食品衛生の發達のためであろう。これ等の調査によると、北米合衆国においては 1897 年から 1949 年までにボトリスムスは総計 477 発生例(1,281 名が死んでいる)であるが、そのうち魚或は海産物によるものは 27 発生例に過ぎない。

米国に起つた魚等による 27 例のボトリスムスはその 7 例が鮭、7 例は鯖(Tuna)、5 例は蛤、4 例は鱈、他の 4 例は鱈などそれぞれ 1 例宛である。これ等は A 型及び B 型による。

独逸では魚の食品殊に燻製の魚類を食してボトリスムスを起した例は相当にあると思われているが、A 型或は B 型株によるのであつて、未だ E 型株の検出はない。

Wasmuth<sup>6)</sup> は最近キール港及びその附近に戰後発生した略々 30 名のボトリスムス(8 名死亡)について報告している。その大部分は明らかに薄い酢についた鱈によるものである。これら等の全部からではないが A 型菌が死者の腸とか魚から検出されている。

### 結語

1. われ等は昭和 26 年 5 月北海道岩内町郊外島野村で発生した鱈“いづし”による異例の食中毒を端緒として、興部町、女満別町及び佐呂間町に起つたものが、わが国において未だ知られていない。

なかつた嫌気性菌ボトリヌス菌の毒素によるものであることを証明した。この毒素はガ菌5菌型のうちE型菌の菌体外毒素である。

岩内の発生例において、この中毒が一般の食中毒と違つて罹患者数が少なく、これに反して致命率の高いことに着眼して、ボトリヌス毒素及び菌に関する検索の手段をつくして成功を見たのである。

2. これ等の中毐原因食品は悉く北海道において海岸地方の住民によつて広く愛用されている生魚肉を主体として各家庭で作る“いづし”である。このことは計らずもわれわれの分離したボトリヌス菌の菌型と密接なる関係を有するものであつた。

3. われ等は、網走湖岸の砂から同じ菌型のボトリヌス菌4株を分離し得た。

この事実から本中毒は原因となつた“いづし”中にこの菌の芽胞が汚染して容器内において毒素を产生するためであることは想像に難くない。

4. 原因食“いづし”からたやすくボトリヌス毒素を証明し、且つこれが如何なるボトリヌス菌の菌型からのものであるかを明かにした。

5. “いづし”からわれわれが分離した菌株はすべてE型菌である。即ち中毒を起した“いづし”から3株であつて、砂から分離したE型株を加えると7株を現在持つている。

ボトリヌスE型菌の毒素による食中毒の報告は未だ少なく、われわれの発生例は世界的にみて第8, 9, 10及び11例である。また諸外国におけるE菌株の検出例も7株か或はそれ以下である（なお、予研では秋田県の発生例からのE型菌株1を分離している）。

それ故同じ国と同じ地方から連續的にE型菌によるボトリヌスを認めたことは注目に値する。殊に食品衛生上重要な事実であつて単にいづしに関するばかりでなく影響する処が大きい。

6. これ等多数のE型菌株を以てその生物学的性状を研究することは、同定の困難なるE型菌について毒素抗毒素中和試験による以外に、他の信頼すべき方法を見出しうることを予想させる。

7. ボトリヌス菌E型菌は魚と親和性が強いと云われているが、著者等はこのことを連續的の発生例の検索によつて証拠立てている。

8. 昭和28年11月秋田県下八郎潟沿岸の地に同じく“いづし”によるE型ボトリヌス毒素によるボトリヌス（この検索は秋田県衛研及び国立予研にて行われた）の発生の機会に調査を行つた処、本道においても既に以前から本病があつたことが明かになつた（秋田県にても同じことが知られた）。

9. 以上についてのわれわれの検索において、毒素の証明法、“いづし”からのボトリヌスE型菌の分離、同定法、砂からの菌の検出法について詳述した外、ボトリヌスE型菌の疫学特に“いづし”と菌との関係、E型菌によつて起る患者症状の特徴、E型菌の生物学的性状の重要点、簡易にして優秀なる嫌気性培養法、E型菌の毒素非產生変異株の可能性、毒力増強培地としての魚肉培地の考案等について記述した。

本研究について厚生省科学研費の一部を受けたことについて感謝する。又国立予防衛生研究所遠山祐三所長及び坂口技官の御援助並びに尾崎厚生省食品衛生課長の督励に対して深甚の謝意を表すると共にこの調査研究について種々の便宜を与えられ熱心に協力された道衛生部及び関係保健所、市町村の各位並び

に北厚連女満別厚生診療所長桐谷秀雄氏に対し衷心感謝の意を表するものである。

## 追記

本報告の印刷の初校を行つている時、兼ねてE型ボトリスムスについて書信の交換をしていたバンクーバーの Dolman 教授から Dolman and Chang : The epidemiology and pathogenesis of type E and fish-borne botulism. Canad. J. of Publ. Health. July, 1953. の別冊を受領した。この最新の文献を見ると、"Known isolation of Cl. botulinum type E" の表に吾々の岩内株が第11番目に載つており、更にこれに続いて第12番目に Denmark にて発生した鱈酢漬による中毒患者6名(死亡なし)の例(Pederson & Freund. 1951)と第13番目カナダの British Columbia の Natal に起つたその土地の川で釣つた鱈の酢漬(自家製罐詰)による1死亡例(Dolman, 1953)が加わつてゐる。

なお、吾々の本報告に於ける"世界に於けるE型ボトリスムス発生例"の表(第15表)は Dolman の前述の最新文献を見ると訂正すべきものがある。即ち3番目までは正しいが第4番には 1937(?) Kushnir (ロシア)の報告によるアゾフ海の Red-fish による発生例(患者及び死者数不明)、第5番目に 1940. Zavadovskaya の例——レーニングラードに発生した鱈の燻製により1名の死者のみを出した例——がはいることになり、従つて Geiger の例は第4番であつたのが第6番目となる。又訂正さるべき表では第10番目に 1951. Prévot and Huet (フランス)の例(患者及び死者数は不明)がはいる。

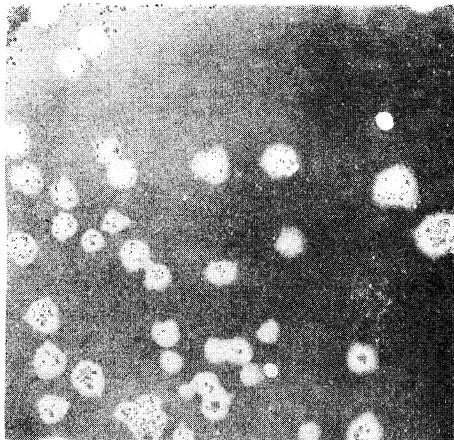
更に追記すべきことは、吾々の岩内株が Dolman 教授の許に Meyer 所長から交付されたと見えて、これについてテストして確認していることである。即ち "From the incriminated food-stuff, Nakamura, Iida and Saeki<sup>17)</sup> isolated a strain of Cl. botulinum type E, which they identified through type cultures sent to Dr. Yuzo Tohyama, Chief, Food Control Division, National Institute of Health, Tokyo, by Dr. K. F. Meyer of San Francisco, who kindly drew our attention to this outbreak. Through the courtesy of Dr. Tohyama, we received a subculture of this Japanese strain, and have verified its type E characteristics." と記述している。

## 引用文献

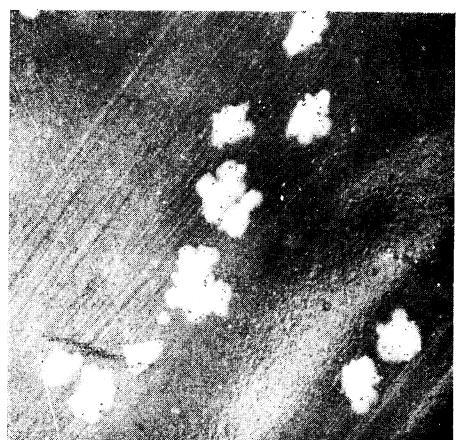
- 1) 中村豊、飯田広夫、佐伯潔：岩内郡島野村に起つたボトリヌス中毒について。北海道立衛生研究所報特報昭和27年3月
- 2) Dolman, Helen Chang, Kerr and Shearer: Fish-borne and Type E Botulism: Two cases due to home-pickled herring. Canad. J. Publ. Health, 41, 215—229, 1950
- 3) K. F. Meyer & B. Eddie : Perspectives concerning botulism. Zeitschr. f. Hygiene. Bd. 133, s. 225—229, 1950
- 4) 中村豊、飯田広夫、佐伯潔、神沢兼三、唐島田隆、古賀有道：その後見られたボトリヌス中毒発生例の検索について。北海道立衛生研究所報第5集昭和28年3月
- 5) Dack : Food poisoning, 1949. chapter VI. Botulism, R 42—79
- 6) Wasmuth : Deutsch. med. Woch. 1943, 73, 636 (Dolman より引用)
- 7) Rockwell : J. Infect. Dis. 35, 1924, 581



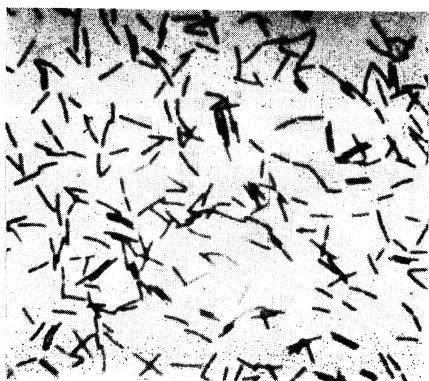
ボトリムス発症のマウス（腹壁の陥凹著明）



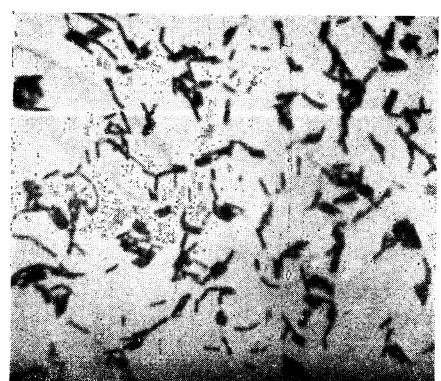
標準 E 型 株 の 集 落  
(Zeissler 血液寒天平板, 37°C. 48 時間培養)



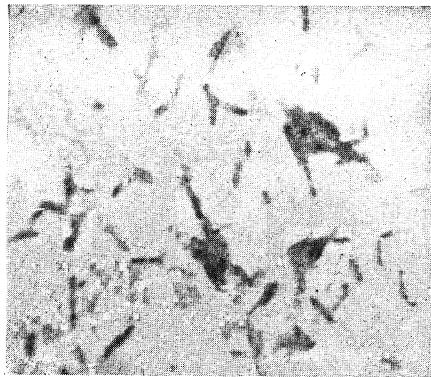
岩 内 株 の 集 落  
(Zeissler 血液寒天平板, 37°C. 48 時間培養)



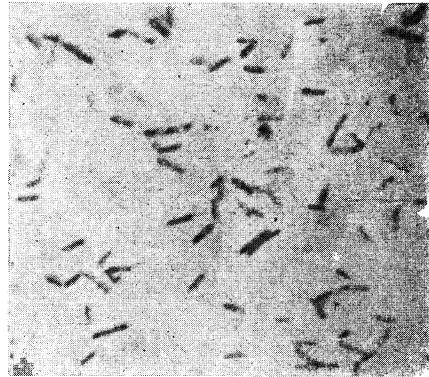
標準 E 型 株



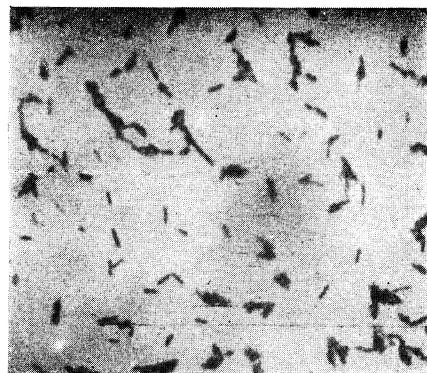
岩 内 株



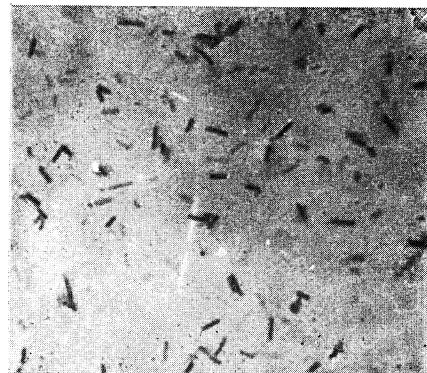
標準 E 型 株  
(古い培養で芽胞を形成せるもの)



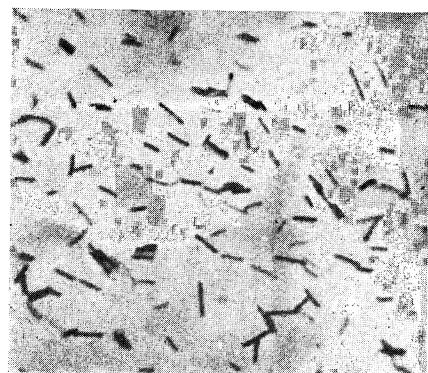
岩 内 株  
(古い培養で芽胞を形成せるもの)



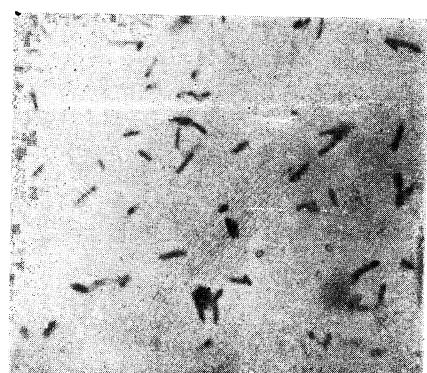
女 満 別 株



佐 呂 間 株



211 株 (土壤より分離せる菌株)



341 株 (土壤より分離せる菌株)