

ブダイ魚類の毒の性状についても検討を加えた。

(2) 高知県で発生したハタ科魚類による集団中毒の疫学調査

中毒した高知市内の患者11名を対象に疫学調査を行った。2000年10月29日、高知県宿毛市内の漁師から同県柏島沖で採捕された「クエ」と呼ばれる大型のハタ科魚類（体長1.3 m、体重32 kg）を、仲介を通して購入後、9グループで分配し、それぞれの家庭で鍋などにして喫食した33名中11名が発症した。

患者は高知市と土佐市の24歳から57歳までの男女で10月30日～11月4日にかけて喫食し、3～43時間と長い潜伏時間を経て、10月31日～11月5日にかけて発症した。以下に一部の患者の詳細を示す。

40歳男性（患者A）は11月1、2日に内臓全般を食べ、2日 17:00頃から全身の筋肉痛を訴えた。51歳男性（患者B）は11月2日 18:00～19:00頃エラを中心に食べ、3日に肩が痛み出し、翌日両上腕の筋脱力が出現し腕が上がらないほどであった。27歳男性（患者C）は11月2、3日に肝臓を食べ、4日 2:00頃から腰部の激しい筋肉痛を呈した。50歳男性（患者D）は10月31日、11月1、4日に筋肉とあらを食べ、5日11:00頃より背部から鼠径部にかけて痛みが出現した。その後、次第に悪化し、痛みとこわばりとは動けないほどであった。また、57歳女性（患者E）は11月2日に身を食べ、4日の朝から腰痛を呈し、翌日には身動きがとれないほどとなった。これらの患者5名は全員病院で診察を受け、入院した。

患者A～Eの主な症状は、筋肉痛、激しい腰痛、ミオグロビン尿症で本中毒は典型的なアオブダイ様中毒であった。また、患者らの血清CPK値（基準値は成人男性で30～120 IU/l、成人女性で40～200 IU/l）は発症日から異常値を示し、特に患者Cのそれは発症日の翌日に23,800 IU/lと基準値の200倍以上の高い値を示した。患者の血清CPK値が基準値付近まで下がるのに1週間以上を要し、諸症状の回復には1ヶ月以上かかった（表4-1）。

本県では1983年から現在に至るまでアオブダイ中毒が5件発生しているが、地元で採捕されたハタ科魚類によるアオブダイ毒様中毒が発生したのは本件が初めてである。しかし、本県では1971年に小笠原海域で採捕されたハタ科魚類で3件の食中毒が発生していた。その時の中毒原因物質はシガテラが疑われたが、依然として不透明なままで、多くの事例がアオブダイ毒様中毒と分からないまま埋もれていることが推察された。

(3) 三重県で発生したブダイ科魚類による食中毒の疫学調査

中毒患者1名を対象に疫学調査を行った。2000年1月19日、患者は三重県紀伊長島町のスーパーで購入したブダイ科魚類（消化管を除く）を煮付けに調理後、19:30頃に夕食として喫食した。さらに、翌20日、同食品を朝食（8:00頃）と昼食（12:30頃）として喫食したところ、20日 11:00頃、手足の脱力感を呈し、17:00頃には全身の筋肉に激しい痛みを訴え、救急車で市民病院へ搬送された。

患者の主症状は筋肉痛（急性横紋筋融解症）で、血清CPK値は入院直後に21,800 IU/lと基準値の数百倍もの高い値を示した。その後、15,800 IU/l（21日）、6,900 IU/l（22日）、3,900 IU/lと徐々に低下したものの、その値が基準値付近まで回復するのに1週間以上を要した。

本中毒の潜伏時間は4～21時間と推定されるが、この比較的長い潜伏時間はアオブダイ毒様中毒の場合と類似していた。また、患者の血清CPK値の著しい上昇は、主症状である急性横紋筋融解症と強く結びつくとともに、その症状はアオブダイ毒様中毒の典型的な主症状であった。

本中毒の主症状である急性横紋筋融解症は、ウイルス性によるものや高脂血症のコレステロールを下げる医薬品（メバロチン等）の副作用で引き起こされる。しかしながら、中毒患者が高脂血症に関する薬を服用していなかったことから、本症状はブダイ科魚類喫食によるアオブダイ毒様中毒による症状である可能性が強く示唆された。

(4) 高知県産ハタ科魚類（中毒検体）の同定および毒の性状

A. 魚種の同定

前述の疫学調査の結果より、中毒原因魚類はクエであるとされた。しかしながら、わが国においてクエ *Epinephelus bruneus* による食中毒の報告はない。また、本種は市場においても度々入荷し、kg当たり5,000円以上する高級魚として扱われているが、ハタ科やその他の大型魚が通称「クエ」として流通していることもある。そこで、等

電点電気泳動法により、当該魚種の同定を試みた。比較対象魚類には、宮崎県産クエ *E. bruneus* ならびにそれに類似する大型に成長するハタ科魚類として石垣島産アカマダラハタ *E. fuscoguttatus* を用いた。

【方法】各試料の筋肉1 gに5倍量の0.06 M バピタール緩衝液：グリセリン（1:1）を加えて抽出し、遠心分離後の上清を試験液とした。得られた各試験液をPhast Gel IEF 3-9（Pharmacia）に塗布し、高速全自動電気泳動装置PhastsystemTM（Pharmacia）に供した。また、固定液：20%トリクロロ酢酸、洗浄・脱色液：10%酢酸30%メタノール、染色液：0.02% CBB10%酢酸30%メタノールを用い、泳動条件を15℃、3.5 W、2000 V - 2.25分間、200 V - 4.5分間、2000 V - 12.3分間とした。

【結果】ハタ科魚類3種の筋形質タンパクの泳動パターンを図4-1に示す。中性付近において、中毒検体とクエ *E. bruneus* に一致する2つのバンドが認められるものの、アカマダラハタ *E. fuscoguttatus* では3つのバンドがみられた。しかしながら、酸性付近において、中毒検体では1つのバンドしか認められなかったのに対して、*E. bruneus* および *E. fuscoguttatus* では2つのバンドがみられた。つまり、中毒検体の筋形質タンパクの泳動パターンは、*E. bruneus* および *E. fuscoguttatus* のそれらとは一致しなかった。

【考察】筋形質タンパクの泳動パターンの相違から、当該魚種はクエ *E. bruneus* とは異なるハタ科魚類であると推察された。ハ

タ科魚類には良く類似したものが多く、釣り人の多くはクエE. bruneus以外の類似したハタ科魚類を「クエ」と呼ぶことは珍しくない。本中毒についても同様に、当該魚種はクエE. bruneusではなく、地元で呼ばれる通称「クエ」であると考えられた。

B. マウス毒性

中毒検体のハタ科魚類の筋肉から毒を抽出し、マウスに対する毒の性状を調べた。

【方法】 PTXを対象とした抽出法を用いた。試料20 gに3倍量の酢酸酸性75%エタノール (pH 3.5) を加えて5分間ホモジナイズし、2,500 g で15分遠心分離して上清を抽出液とした。残渣については同様の操作を2回繰り返して上清を合一した。抽出液を減圧濃縮後、ジエチルエーテルで2回脱脂した。得られた水層画分を蒸留水と1-ブタノール (1:1) の溶媒分画に付し、1-ブタノール画分を試験液とし、マウス毒性試験に供した。なお、供試マウス (ddY系、雄、17~20 g) 1尾を48時間以内に死亡させる毒量を1 MUと定義した。

【結果】 マウス毒性試験の結果、筋肉から得られた試験液にマウスを24時間程度で死亡させる毒が0.5 MU/gみられた。マウスの症状は毒を投与して約1時間で四肢の麻痺が始まり、呼吸困難などを呈し、動作が鈍くなり、その後じっとしたまま死亡した。以下、本毒をクエ毒とする。

【考察】 クエ毒を投与されたマウスの症状は、アオブダイ毒ならびに PTX標品を投与

されたマウスの症状によく類似していた。得られたマウスの症状や致死時間から、クエ毒はマウスに対して遅延性致死活性を示す毒 (遅延性毒) であることが示唆された。

C. マウス赤血球に対する溶血活性

マウス赤血球に対するクエ毒の性状を調べた。

【方法】 溶血活性試験はGleibsら³⁾の方法に準拠して行った。試料 (クエ毒) をそれぞれ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} g/mlに調整して試験液とした。0.5 mMホウ酸および1.0 mM CaCl₂を含むダルベッコリン酸緩衝液 (PBS) で3回洗浄したマウス (ddY系、雄、17~20 g) の血液にPBSを加え、0.5%赤血球懸濁液とした。各試験液50 μ lをそれぞれ0.5%赤血球懸濁液950 μ lに添加し、37°Cで1, 4, 6, 8時間インキュベート後、600 g で遠心分離して得られた上清につき、405 nmにおける吸光度を測定した。PTX標品については 10^2 , 10, 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ng/mlの濃度になるよう調整し、インキュベート1, 4時間について同様に試験した。また、0.5%赤血球懸濁液950 μ lに1%サポニン溶液を50 μ l添加し、インキュベート30分後における吸光度を完全溶血100%とし、吸光度の比率から各試験液の溶血率を求めた。

【結果】 クエ毒およびPTX標品のマウス赤血球に対する溶血活性を図4-2に示す。PTXのインキュベート1時間における溶血は、10 ng/ml以下では5%未満であったが、 10^2 ng/mlで最大約40%、インキュベート4

時間における活性は、1 ng/mlで約90%、10 ng/ml以上ではほぼ100%であった。同様にクエ毒の場合、インキュベート1時間における溶血活性は試料濃度 10^{-1} g/mlでもほとんどみられなかったが、インキュベート4, 6, 8時間において次第に高くなり、ほぼ100%の溶血活性を示した。

【考察】クエ毒は、インキュベート1時間において、ほとんど溶血活性がみられなかったのに対し、インキュベート時間を増すに従い高い溶血活性を示したことから、マウス赤血球に対して遅延性溶血活性をもつことが示唆された。

D. 抗PTX抗体添加による溶血活性の変化

クエ毒の遅延性溶血活性が抗PTX抗体により特異的に抑制されるか否かを調べた。

【方法】試料について、抗PTX抗体を用いた溶血活性試験に供した。溶血試験はCで示した方法を用いた。各試料をそれぞれ0.5%赤血球懸濁液もしくは0.2 mg/ml抗PTX抗体 (Ra-Anti-Palytoxin; Dr. L. Levine, Brandeis Universityより供与) を含む0.5%赤血球懸濁液に添加し、37°Cで4時間インキュベートした。

【結果】クエ毒とPTX標品の抗PTX抗体添加によるマウス赤血球に対する溶血活性の抑制を図4-3に示す。PTX標品の場合、抗PTX抗体添加によりPTX濃度100 ng/mlにおいて最大約60%抑制されていた。クエ毒の場合、抗PTX抗体添加によって試料濃度 10^{-2} 、 10^{-1} g/mlで、最大約20%の抑制がみ

とめられた。

【考察】インキュベート4時間におけるクエ毒のマウス赤血球に対する遅延性溶血活性は、抗PTX抗体により特異的に抑制されたことから、本中毒の原因毒はPTXもしくはその類縁体である可能性が強く示唆された。

E. ウアバイン添加によるヒト赤血球に対する溶血活性

クエ毒の遅延性溶血活性がウアバインにより特異的に抑制されるか否かを調べた。

【方法】試料について、ウアバイン (g-ストロンファンチン) を添加し、溶血活性試験を行った。なお、ウアバインはマウス赤血球よりもヒト赤血球に対し、より良く作用することから4)、健康な成人男性から得られた血液を用いて、0.5%赤血球懸濁液を調製した。各試料をそれぞれ0.5%赤血球懸濁液、もしくはウアバインを0.2 mMになるように添加した0.5%赤血球懸濁液に添加し、37°Cで4時間インキュベートした。

【結果】クエ毒とPTX標品のウアバイン添加によるヒト赤血球に対する溶血活性の抑制を図4-4に示す。ウアバイン添加により、PTX標品の場合、PTX濃度10, 10^2 ng/mlにおいて、最大約40%の抑制がみられた。クエ毒の場合、ヒト赤血球に対する活性はウアバイン添加によって、試料濃度 10^{-1} g/mlにおいて、最大約10%の抑制がみとめられた。

【考察】インキュベート4時間におけるク

エ毒のヒト赤血球に対する遅延性溶血活性は、ウアバインにより特異的に抑制されたことから本毒は、PTXもしくはその類縁体である可能性が強く示唆された。

(5) 三重県産ブダイ科魚類の毒の性状

A. マウス毒性

中毒検体が採捕された同海域で同時期に採捕されたブダイ科魚類2検体について、マウスに対する毒の性状を調べた。

【試料】ブダイ科魚類2検体（試料No. 1：体長300 mm、体重790 g、試料No. 2：体長330 mm、体重810 g）を試料とした。

【方法】各試料を腑分け後、筋肉と肝臓について前述の方法で抽出した。試料20 gに3倍量の酢酸酸性75%エタノール（pH 3.5）を加えて5分間ホモジナイズし、2,500 gで15分遠心分離して上清を抽出液とした。残渣については同様の操作を2回繰り返して上清を合一した。抽出液を減圧濃縮後、ジエチルエーテルで2回脱脂した。得られた水層画分を試験液とし、マウス毒性試験に供した。

【結果】試料No. 1の筋肉から得られた試験液を投与されたマウスは、投与数時間後に呼吸が激しくなり、うずくまったまま動かなくなった（有症）が、次第に回復して死には至らなかった（0.5 MU/g未満）。他の部位についても、マウス毒性はみられなかった。

【考察】マウス毒性はみられなかったものの、試料No. 1筋肉には、マウスに対して呼吸困難等を引き起こす何らかの因子が含まれていることが示唆された。

B. マウス赤血球に対する溶血活性

マウス赤血球に対するブダイ科魚類の筋肉および肝臓から得られた抽出物の影響を調べた。

【方法】(4) Cと同様に行った。

【結果】試料No. 1筋肉から得られた試験液およびPTX標品のマウス赤血球に対する溶血活性を図4-5に示す。試料No. 1の筋肉から得られた試験液の場合、インキュベート1時間における溶血活性は、試料濃度 10^{-1} g/mlでもほとんどみられなかったのに対して、インキュベート4時間において、試料濃度 10^{-1} g/mlではほぼ100%の溶血活性を示した。他の試験液は、インキュベート4時間において、試料濃度 10^{-1} g/mlでも20%未満の低い溶血活性しか示さなかった。

【考察】試料No. 1筋肉には、PTXと同様の遅延性溶血活性をもつ毒が含まれていることが示唆された。

C. 抗PTX抗体添加によるマウス赤血球に対する溶血活性

試料No. 1筋肉の試験液の遅延性溶血活性が抗PTX抗体により特異的に抑制されるか否か調べた。

【方法】(4)Dと同様に行った。

【結果】試料No. 1筋肉から得られた試験液の抗PTX抗体添加によるマウス赤血球に対する溶血活性の抑制を図4-6に示す。本試験液の遅延性溶血活性は抗PTX抗体添加によって試料濃度 10^{-1} g/mlで、若干の抑制がみとめられた。

【考察】試料No. 1筋肉から得られた試験液のマウス赤血球に対する遅延性溶血活性は、抗PTX抗体により特異的に抑制されたことから、本試験液にはPTXもしくはその類縁体が含まれていることが強く示唆された。このことから、三重県で発生したブダイ科魚類による食中毒は、PTXもしくはその類縁体により引き起こされたと推察された。

参考文献

- 1) 野口玉雄 (1996) : アオブダイ中毒とパリトキシン. “フグはなぜ毒をもつのか”, NHKブックス, 東京, pp. 88-91.
- 2) T. Noguchi, D-F. Hwang, O. Arakawa, K. Daigo, S. Sato, H. Ozaki, N. Kawai, M. Ito and K. Hashimoto (1987): Palytoxin as the causative agent in the parrotfish poisoning. In: Progress in Venom and Toxin Research, National University of Singapore, Singapore, pp. 325-335.
- 3) S. Gleibs, D. Mebs and B. Werding (1995): Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef. *Toxicol*, 33 (11), 1531-1537.

- 4) E. Habermann and S. Chhatwl (1982): Ouabain inhibits the increase due to palytoxin of cation permeability of erythrocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Phaemacol*, 319, 101-107.

麻痺性貝毒生物試験 精度管理試験のプロトコール

- 1) 試験前日より精度管理用試料を冷蔵庫で解凍
- 2) サンプル100 g を秤取 (300 ml ガラスビーカー)
- 3) 0.1 N HCl 溶液 90 ml*1 を加える
- 4) pH を 3~4 に調整 (ユニバーサル pH 試験紙でよい)
- 5) 沸騰湯浴中で5分間加熱*2
- 6) 放冷*3
- 7) pH を 2~4 に調整
- 8) 250 ml 共栓付きメスシリンダーを使い、蒸留水で200 ml に定容
- 9) 攪拌後、遠心分離*4
- 10) 上澄液を採取 (試験原液) *5
- 11) マウスアッセイ*6, 7, 8, 9

- 注
- *1 定容するとき、残渣を洗い込むのが困難なため、90 ml とする。
 - *2 加熱は沸騰した湯浴中で内容物が80℃以上になってから5分間行う。内容物が均等に加熱されるように、時々攪拌する。
 - *3 流水で室温まで放冷する。
 - *4 マウスアッセイと、HPLC分析に十分な量、50 ml 程度でよい。
 - *5 残った抽出液は後でHPLC分析に供するために、配布した遠沈管に取り、-20℃で冷凍保管する。
 - *6 冷凍または冷蔵保管による誤差をなくすために、マウスアッセイは試験原液調製日に行う。
 - *7 MU の値をdcSTXによって補正するため、のCF値の測定で用いるマウスと同じロットのマウス (出生日、馴化期間のそろった) を使用する。つまり、CF値のチェックと精度管理用試料の抽出からマウスへの投与までを1日で行う。
 - *8 必要に応じ、0.01 N HCl 溶液で希釈する。投与前に pH 2~4 であることを確認する。
 - *9 使用するマウスの体重が19~21 g であっても、Sommer の体重補正表で補正する。致死時間の中央値から1 g 当たりの毒力 (MU/g) を算出する。CF値のチェックで基準CF値から±20%の範囲に入れば、基準CF値を掛けて、1 g 当たりの STX 相当毒量 ($\mu\text{g/g}$) 計算する。CF値が基準からはずれた場合は、新たに基準CG値を求め、これを用いる。結果が基準毒量から±20%の範囲に入れば、正しく試験が行われていたと判断する。

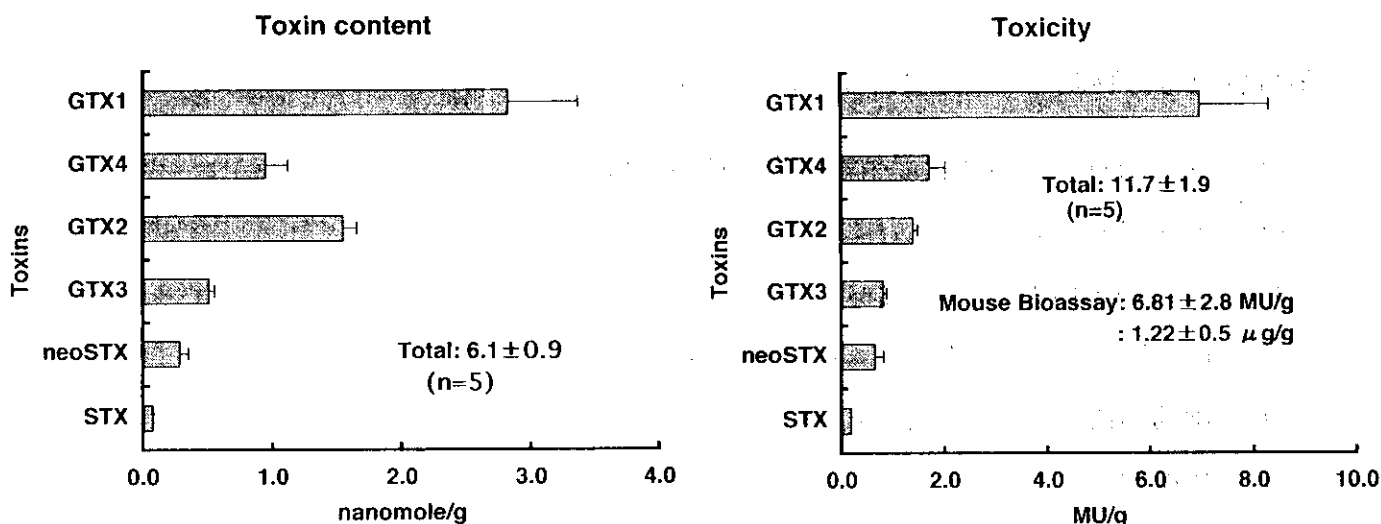


図1-1 標準品として調製したホタテガイ磨碎物の毒組成および毒力。
右側の毒力のグラフにはマウス毒性試験の結果を合わせて記す。

表1. 各検査機関の基準 CF 値

実施機関	実施年月	CF値				Ave	SD	CV
		標準液 希釈 様式						
		7+7.5	7+7	7+6.5	7+6			
仙台市市場検査所	2000年11月	0.201	0.161	0.185		0.182	0.020	11.0
冷食協札幌検査所	2001年1月		0.193	0.201	0.211	0.202	0.009	4.5
冷食協仙台検査所	2001年1月	0.171	0.169	0.165		0.168	0.003	1.8
冷食協神戸検査所	2001年1月	0.174	0.178	0.174		0.175	0.002	1.3
冷食協福岡検査所	2001年1月	0.172	0.175	0.174		0.174	0.002	0.9

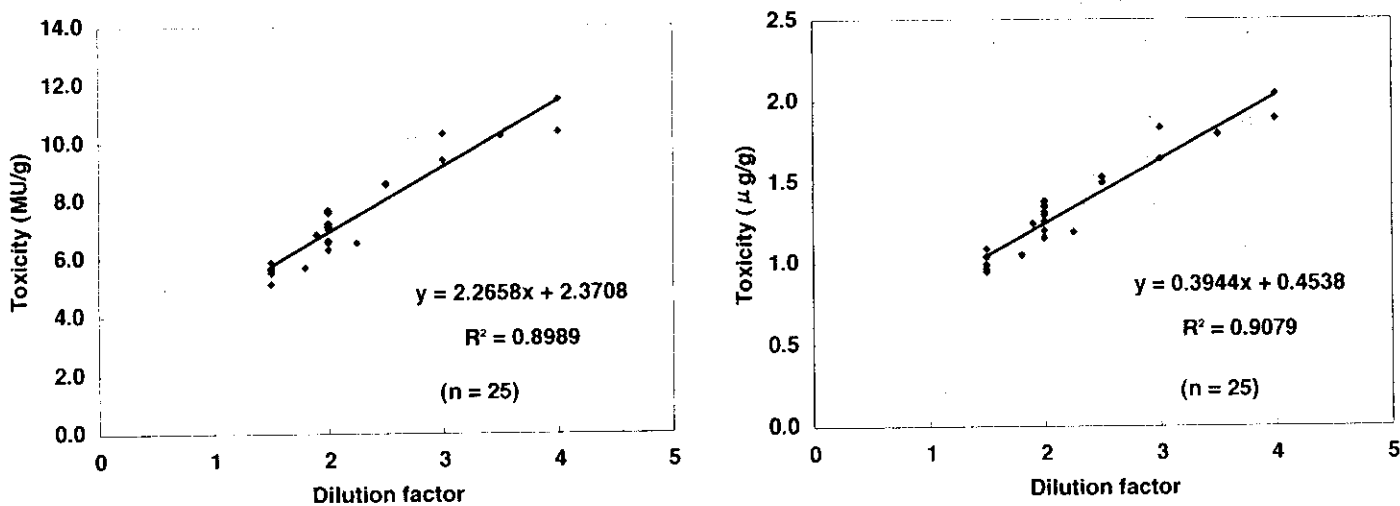


図1-3 マウス毒性試験における検液希釈度と毒力の関係。
左：マウス単位、右：サキシトキシン相当毒力。

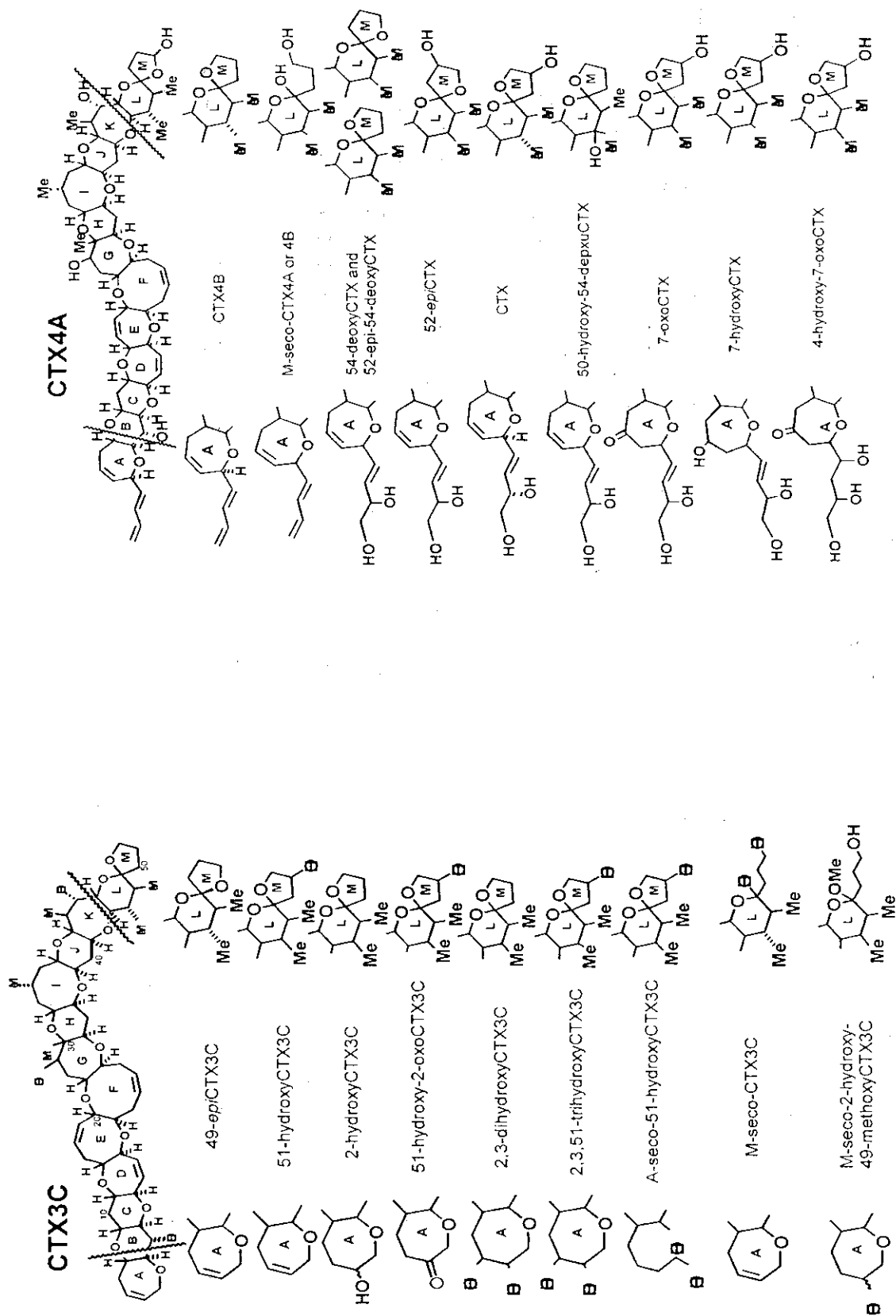


図 2-1 CTX3C 骨格を有する類縁体

図 2-2 CTX 4A 骨格を有する類縁体

表3-1 *Stromateus stellatus* 筋肉から抽出したジアシルグリセリルエーテル (DAGE) の分子種組成

ピーク ナンバー	保持時間 (min)	DAGEの構造	m/z	ECN ^a	(%) ^b
1	13.2	O-14:0-18:1-22:6	881, 581, 536	40	1.8
2	14.3	O-14:0-18:1-20:5	853, 554, 536	40	2.7
3	15.0	O-16:0-18:1-22:6	909, 610, 564	42	7.9
4	16.0	O-18:1-16:0-20:5	883, 610, 564	42	3.2
		O-16:0-16:0-22:6	883, 610, 538	42	
5	17.3	O-18:0-18:1-22:6	937, 638, 592	44	3.6
6	18.7	O-18:0-18:1-20:5	909, 612, 592	44	4.1
		O-18:0-16:0-22:6	911, 638, 566	44	
7	20.3	O-14:0-18:1-18:1	835, 536	46	11.1
8	21.6	O-14:0-16:0-18:1	809, 536, 510	45	4.4
9	22.1	O-18:1-18:1-18:1	889, 590	48	4.7
10	23.7	O-16:0-18:1-18:1	863, 564	48	22.7
11	25.2	O-16:0-16:0-18:1	837, 564, 538	48	6.5
12	27.7	O-18:0-18:1-18:1	891, 592	50	7.6
13	30.1	O-16:0-18:0-18:1	865, 566, 564	50	5.5
		O-18:1-18:1-22:1	945, 646, 590	52	
14	32.6	O-16:0-18:1-22:1	919, 620, 564	52	11.1
15	35.6	O-16:0-18:1-24:1	947, 648, 564	54	0.3
16	38.8	O-16:0-22:1-22:1	975, 620	56	1.2

^a ECN, equivalent carbon number

^b DAGEの分子種組成 (%)は示差屈折計によるクロマトグラムの面積から算出した。

表3-2. ジアシルグリセリルエーテル (DAGE) およびその加水分解物のマウス急性毒性

脂質	投与量 (体重比)	死亡数	全死亡率 (%)	症状*	肛門からの 脂質の漏出	投与24時間後 の体重変化
DAGE	1/40	4/7	26% (5/19)	+++	++	-4.7±1.7
	1/80	0/6		+++		-2.7±0.5
	1/160	1/6				-3.7±0.9
DAGE+TAG (1:1)	1/40	6/6	56% (10/18)	+++++	+++++	-4.5±0.4
	1/80	4/6		+++++	++	-4.0±1.2
	1/160	0/6				-3.9±1.4
MAGE	1/160	1/6	11% (2/18)	+++++	++++	-3.1±3.1
	1/320	1/6		+++	++	-3.5±2.6
	1/640	0/6		++++	++	-3.0±2.6
GE	1/40	4/5	94% (17/18)	+++++	+++++	-4.8±0.8
	1/80	7/7		+++++	+++++	-4.5±0.7
	1/160	6/6		+++++	+++++	-4.4±0.9
	1/320	3/7	+++++	+++	-2.4±2.9	
	1/640	0/6	22% (4/18)	+		-0.9±2.9
	1/1280	1/5		++		-3.2±3.0

* 症状は、目の状態、下痢、毛並みなどから総合的に判断した。

DAGE:ジアシルグリセリルエーテル、TAG:スケツウタラ肝油、MAGE:モノアシルグリセリルエーテル、GE:グリセリルエーテル

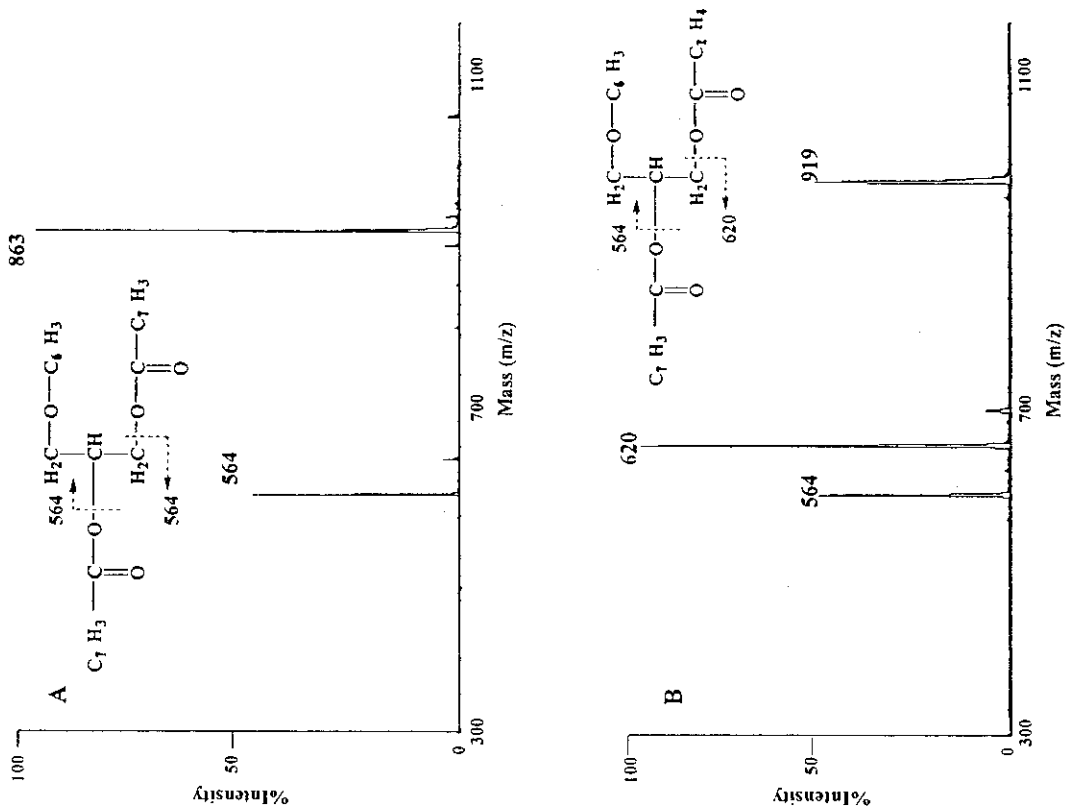


図 3-2. DAGE のピーク 10 (A) およびピーク 14 (B) のマススペクトル

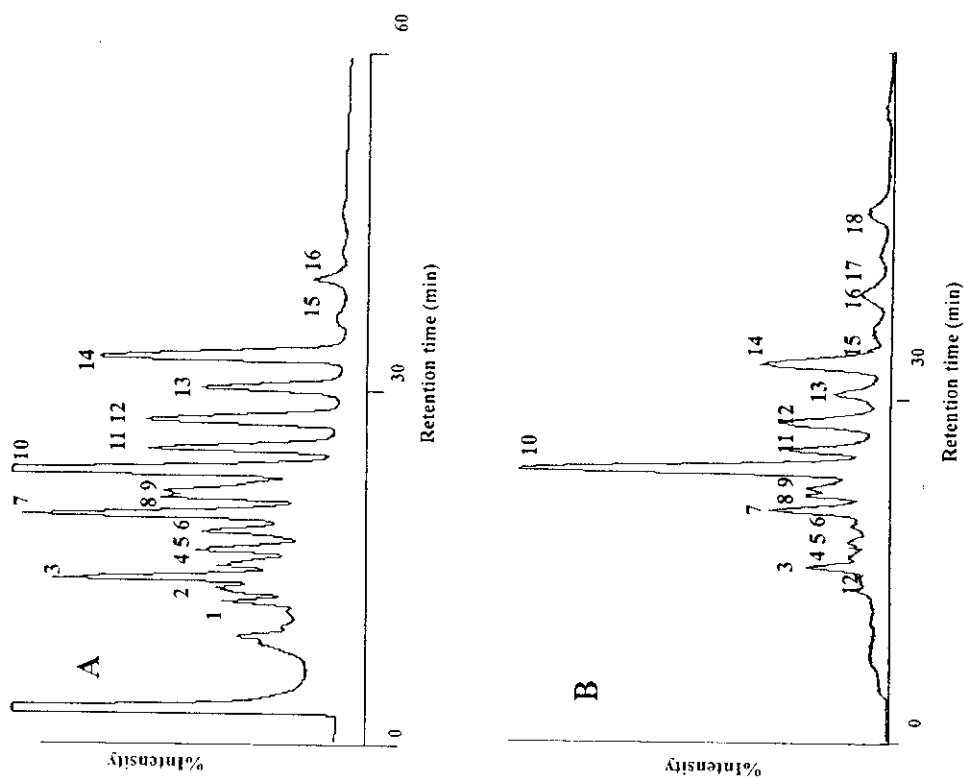


図 3-1. *Siromateus stellatus* 筋肉中のジアシルグリセリルセリルエーテルの高速液体クロマトグラム

A. 示差屈折計による検出 B. 総イオン量による検出
 B. のピークナンバーは表 4-1. のナンバーに一致している。

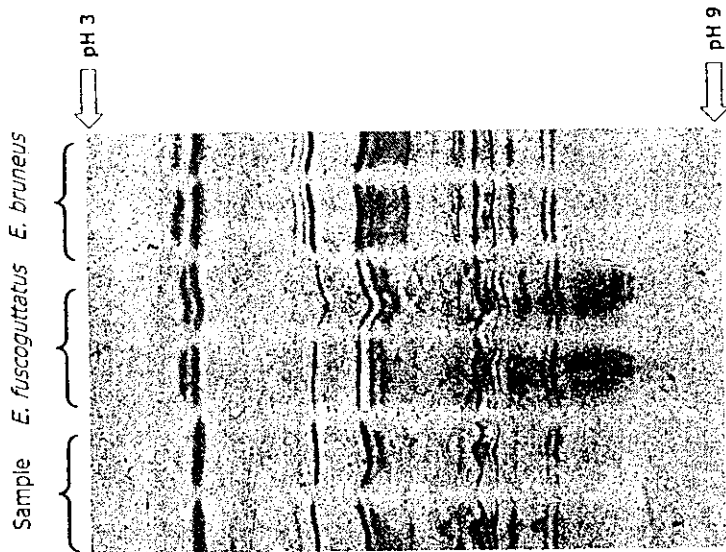


図4-1 魚肉の電気泳動像。中毒試料 (左)、*E. fuscoguttatus* (中央)、*E. bruneus* (右)

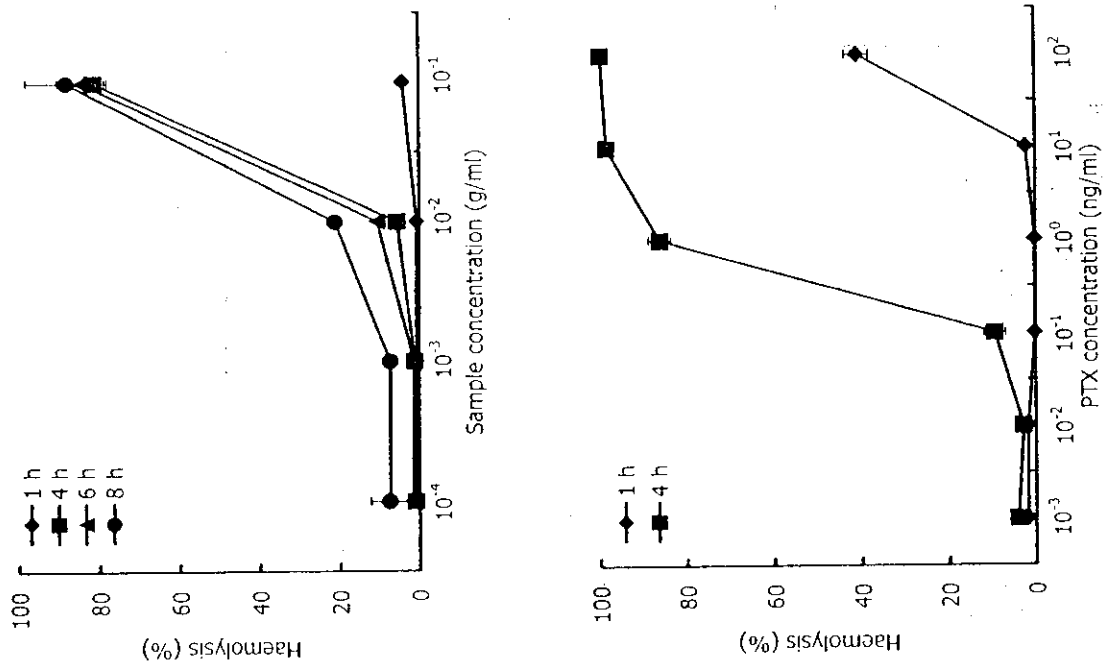


図4-2 濃度およびインキュベーション時間による溶血の変化 (マウス血球)。

上：クエ毒、下：パリトキシン標品

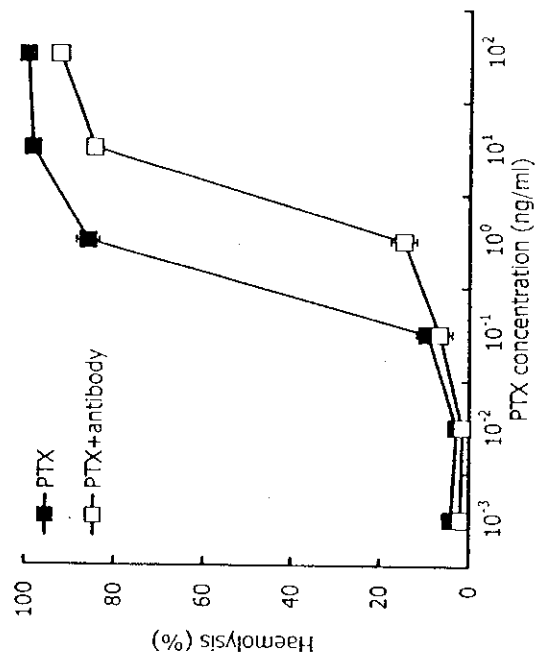
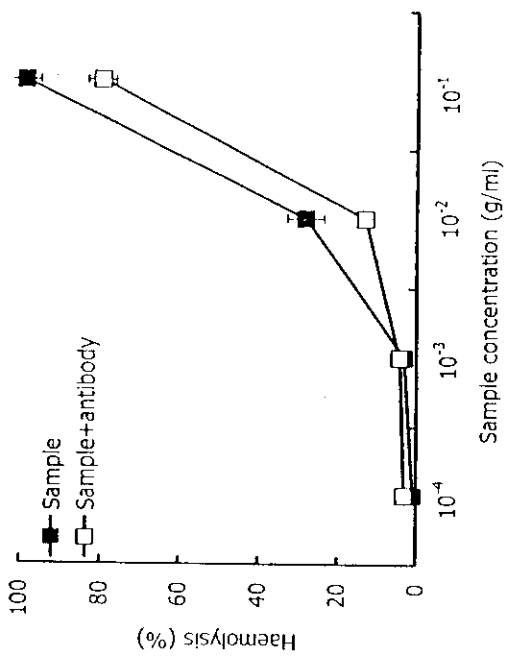


図4-3 パリトキシン抗体による溶血の抑制。(マウス血球)。

上: クエ毒、下: パリトキシン標品

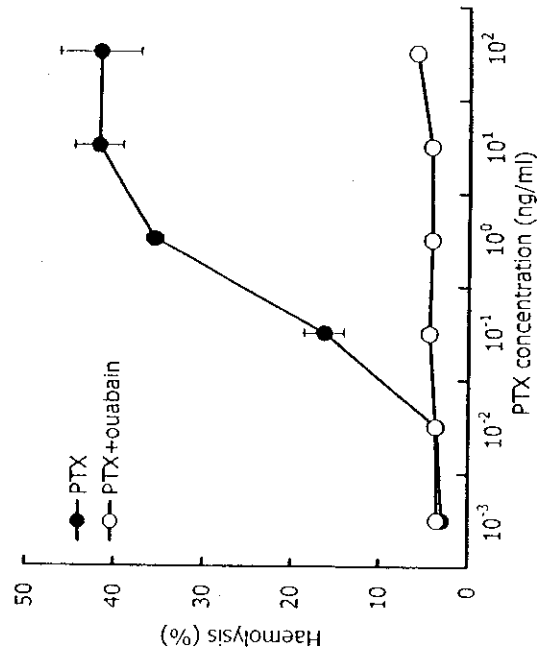
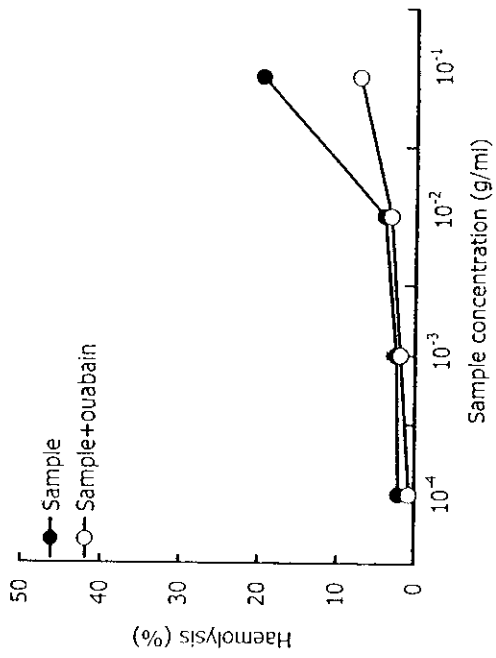


図4-4 ウワバインによる溶血の抑制。(ヒト血球)

上: クエ毒、下: パリトキシン標品

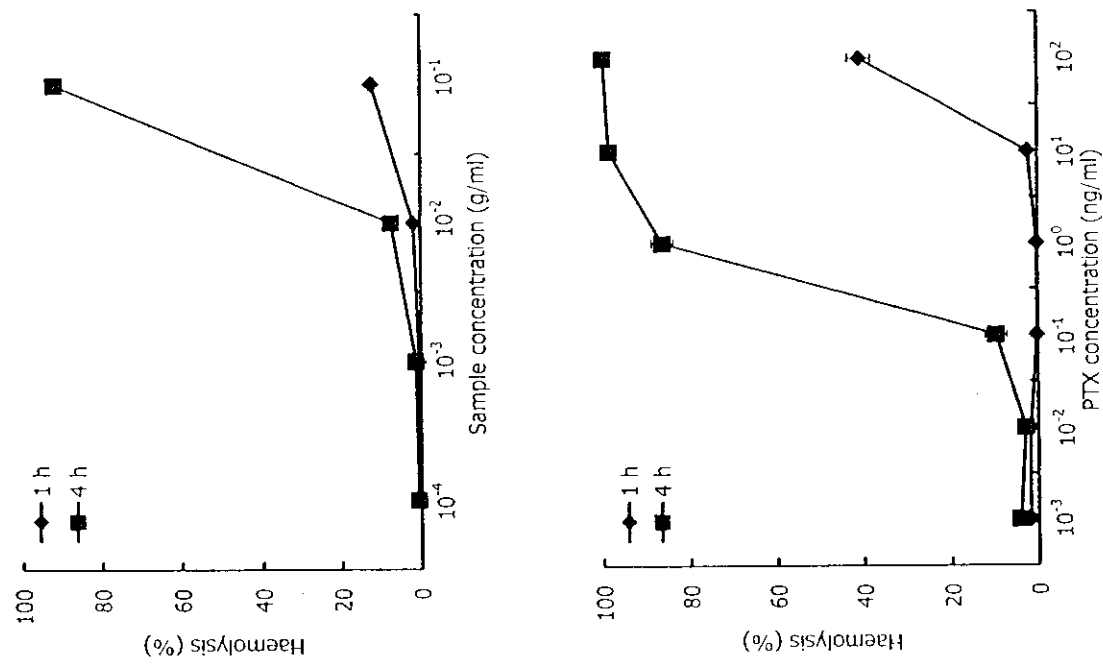


図4-5 濃度およびインキュベーション時間による溶血の変化。
(マウス血球)
上：ブタイ科魚類 (試料No.1) 筋肉抽出物、
下：パリトキシニン標品

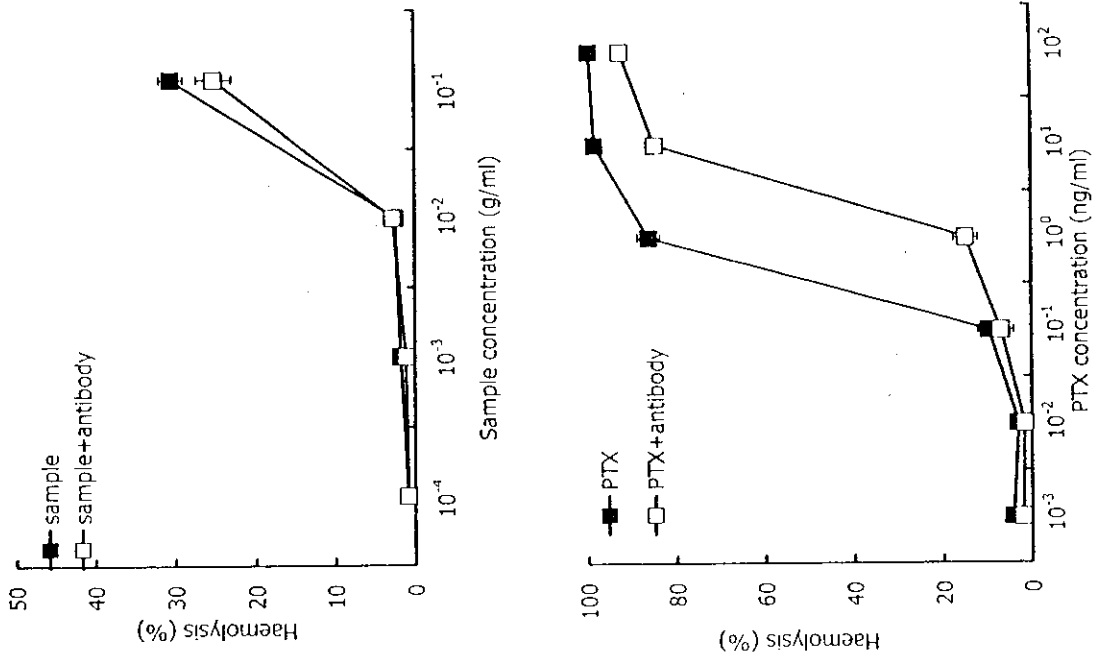


図4-6 パリトキシニン抗体による溶血の抑制。(マウス血球)。
上：ブタイ科魚類 (試料No.1) 筋肉抽出物
下：パリトキシニン標品

表-1 高知県で発生したハタ科魚類による食中毒における患者のCPK値

Patient	Sex	Age	Day of ingestion	Onset day of symptom	Latency period	CPK level of patients during lapse (day) after onset of symptom					
						0	1	2	3	4	5
A	Male	40	2, Nov., '00	2, Nov.	> 3 h	22500			13800		3300
B	Male	51	2, Nov., '00	3, Nov.	> 6 h			12400	7100		1100
C	Male	27	3, Nov., '00	4, Nov.	> 6 h	9600	23800	14200		3300	700
D	Male	50	4, Nov., '00	5, Nov.	> 12 h	10600	9100		2500		
E	Female	57	2, Nov., '00	4, Nov.	> 36 h		1400	2100	1100		

厚生科学研究（生活安全総合研究事業）分担研究

Coxiella burnetii 死滅温度に関する実験的研究

分担研究者 山本茂貴（国立感染症研究所）

研究協力者 長岡宏美（静岡県環境衛生科学研究所）

研究協力者 春日文子（国立感染症研究所）

平成10年度は、生乳の汚染状況および種々の殺菌温度の市販乳における *Coxiella burnetii* の生残状況について調査研究を行った。その結果、62℃30分および63℃30分殺菌市販乳においてマウスを用いた *C. burnetii* 分離を試みたところ、限られた製造元での調査ではあったが、*C. burnetii* が分離された。そこで、平成11年度は、*C. burnetii* に汚染されていない生乳に菌を添加し、加熱致死温度について検討した。その結果、65℃30分加熱では *C. burnetii* が死滅するが、63℃30分では2/15（3回の実験）と割合は低いものの *C. burnetii* が生残することが確認された。実験室で行った加熱方法は、目的温度までの上昇が速やかに起こっていることが、温度記録から明らかとなった。このことから、単に目的温度で30分加熱するだけでは不十分な事が明らかとなった。一方、通常のバッチ式加熱方式では温度の上昇は緩やかであると考えられ、目的温度以下での加熱時間が加わることが *C. burnetii* を完全に死滅させるのに必要である可能性が考えられた。そこで、今年度は、加熱温度である63℃に達するまでの時間を変化させて検討した。その結果、15分で63℃に達したのち30分加熱した場合、1/10が生残した。20分で63℃に達し

た後 30 分加熱した場合、0 / 10 で死滅させることができた。このことから、63℃に達するまでに 20 分以上の時間をかけた後、63℃で 30 分間の加熱を行うと *C. burnetii* は完全に死滅させられることが明らかとなった。

A. 研究目的

平成 10 年度は、生乳の汚染状況および種々の殺菌温度の市販乳における *Coxiella burnetii* の生残状況について調査研究を行った。その結果、62℃ 30 分および 63℃ 30 分殺菌市販乳においてマウスを用いた *C. burnetii* 分離を試みたところ、限られた製造元での調査ではあったが、*C. burnetii* が分離された。そこで、平成 11 年度は、*C. burnetii* に汚染されていない生乳に菌を添加し、加熱致死温度について検討した。その結果、65℃ 30 分加熱では *C. burnetii* が死滅するが、63℃ 30 分では 2 / 15 (3 回の実験) と割合は低いものの *C. burnetii* が生残することが確認された。実験室で行った加熱方法は、目的温度までの上昇が速やかに起こっていることが、温度記録から明らかとなった。一方、通常のバッチ式加熱方式では温度の上昇は緩やかであると考えられ、目的温度以下での加熱時間が加わることにより、*C. burnetii* を完全に死滅させることが可能になると考えられた。そこで、今年度は、加熱温度である 63℃に達するまでの時間を変化させて検討した。

B. 研究方法

生乳：マウス接種で3代継代しても *C. burnetii* が確認されなかった製造工場
の原乳を用いた。

C. burnetii 株：Nine Mile 菌相菌を BGM 細胞で増殖させ、細胞ごと回収し
て菌液として用いた。原液を 100 倍希釈して PCR が陰性となる菌量の物を *C.*
burnetii 液とした。この菌液には少なくとも 10^6 / ml の *C. burnetii* が含まれ
ていると推定された。

加熱処理：密封付き 4 ml のガラスバイアルに生乳 0.9 ml を入れ、*C. burnetii*
液 0.1 ml を添加し、プログラム式ウォーターバス（サーモエリート、ヤマト
科学株、東京）に浸漬し、4℃から 63℃到達まで15分または20分（立ち
上がり時間）に設定し、その後 63℃で30分間加熱した。加熱温度は熱伝対
式記録温度計（温度センサー SE5951、データコレクター AM-7002(K)、安
立計器（株）、東京）で菌未添加生乳 1 ml の温度を実験群の代わりに測定し、
所定の温度に上昇してから時間の計測を始めた。温度記録の一部を図 1 に示し
た。熱電対式温度計の検証は検定付き棒状精密温度計（（株）東亜計器製作所、
東京）を用いて行った。

マウス接種実験：サイクロフォスファミド 4 mg を前処置した A/J 系 5 週
齢の雌マウスを実験群（*C. burnetii* 添加加熱処理）5 匹、陽性対照（*C. burnetii*
添加未加熱）3 匹、陰性対照（*C. burnetii* 未添加加熱処理）3 匹、およびマウ
ス陰性対照（免疫抑制剤のみ接種）2 匹としてそれぞれ用いた。P3 施設内で 3
週間飼育し、その間 5 日間隔でサイクロフォスファミド 5 mg を腹腔内注射し
た。その後、エーテル麻酔下で血清と脾臓を採取し、脾臓スタンプ標本のギム
ザ染色、IF 抗原試験、Nested PCR、および血清抗体価の測定を行った。す

すべての項目が陽性となったものを *C. burnetii* 分離陽性と判定した。

なお、63℃30分加熱実験は4℃から63℃に達する時間を15分と20分に設定し、それぞれ2回繰り返した。

C. 結 果

63℃30分加熱実験で立ち上げ時間15分実験群の1回目0/5、2回目1/5で *C. burnetii* が分離された。立ち上げ時間20分実験群は2回の実験とも0/5で *C. burnetii* は分離されなかった。これらのことから、63℃30分の加熱でも63℃への到達時間が15分の場合には *C. burnetii* が生残することが明らかとなった。

D. 考 察

今回の結果から、63℃30分加熱でも63℃への到達時間が15分では1/10と割合は低いものの *C. burnetii* が生残することが確認された。一方、63℃への到達時間が20分では63℃30分加熱で *C. burnetii* が死滅したことから、加熱条件に4℃から63℃への到達時間を20分以上かける必要があると考えられた。特にプレート式もしくはスパイラルチューブ式などの急速に温度上昇する加熱方式は63℃への到達時間が20分となるような予備加熱が必要であることが考えられた。

表 1 目的温度への到達時間が異なる生乳中の *C. burnetii* 加熱致死試験

加熱温度条件	マウスにおける <i>C. burnetii</i> 分離成績 (陽性数/接種数)
目的温度への到達時間 15分	
63℃、30分実験群	0/5
陽性対照群	3/3
陰性対照群	0/3
マウス陰性対照群	0/2
63℃、30分実験群	1/5
陽性対照群	3/3
陰性対照群	0/3
マウス陰性対照群	0/2
目的温度への到達時間 20分	
63℃、30分実験群	0/5
陽性対照群	3/3
陰性対照群	0/3
マウス陰性対照群	0/2
63℃、30分実験群	0/5
陽性対照群	3/3
陰性対照群	0/3
マウス陰性対照群	0/2

実験群、*C. burnetii* 添加加熱；陽性対照群、*C. burnetii* 添加未加熱；陰性対照群、*C. burnetii* 未添加加熱；マウス陰性対照群、サイクロフォスファミドのみ処置