

博士論文

琵琶湖周辺におけるボツリヌス菌  
に関する生態学的研究

平成4年1月

林 賢一

## 目 次

緒論	1
第1章 琵琶湖流入の河川におけるボツリヌス菌の生態	
I. 緒言	6
II. 材料および方法	
1. 検体の採取場所	7
2. 検体の採取方法	7
3. ボツリヌス菌の検出方法	8
4. ボツリヌス菌の分離方法	10
5. 水質試験	11
III. 成績	
1. 琵琶湖流入河川の中流域土壌におけるボツリヌス菌の分布	11
2. 琵琶湖流入河川の河口域土壌におけるボツリヌス菌の分布	12
3. 知内川の土壌と水におけるボツリヌス菌の分布	12
4. ボツリヌス菌の分離	13
IV. 考察	13
V. 小括	16

第2章 琵琶湖におけるボツリヌス菌の生態	
I. 緒言	27
II. 材料および方法	
1. 検体の採取場所	27
2. 検体の採取方法	30
3. ボツリヌス菌の検出方法	31
4. ボツリヌス菌の分離方法	33
5. 水質試験	34
III. 成績	
1. 琵琶湖北湖におけるボツリヌス菌の分布	34
2. 琵琶湖南湖におけるボツリヌス菌の分布	36
3. ボツリヌス菌の分離成績	38
IV. 考察	38
V. 小括	42
第3章 琵琶湖におけるボツリヌス菌の季節別の生態	
I. 緒言	50
II. 材料および方法	
1. 検体の採取場所	51
2. 検体の採取方法	51

3. ボツリヌス菌の検出方法	52
4. 水質試験	53
III. 成績	
1. 琵琶湖北湖の定点におけるボツリヌス菌の季節別分布	53
2. 琵琶湖南湖の定点におけるボツリヌス菌の季節別分布	55
3. ボツリヌス菌の検出に及ぼす培養温度と日数の影響	57
IV. 考察	58
V. 小括	63
第4章 琵琶湖以外の地域におけるボツリヌス菌の生態	
I. 緒言	73
II. 材料および方法	
1. 検体の採取場所	74
2. 検体の採取方法	75
3. ボツリヌス菌の検出方法	76
4. 水質試験	77
III. 成績	
1. 琵琶湖以外の湖沼におけるボツリヌス菌の分布	77
2. 山、畑および養鶏場におけるボツリヌス菌の検索成績	79

3. 土壌の保存方法と培養前処理の差によるボツリヌス菌の 検出率	80
IV. 考察	81
V. 小括	86
総合考察	94
総括	104
謝辞	106
参考文献	107

## 緒 論

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は、毒力の極めて高い特異的な神経毒素 (ボツリヌス毒素) を産生する偏性嫌気性のグラム陽性桿菌である。菌体の周囲には多数の鞭毛があり、芽胞を形成する。ボツリヌス菌は、産生する毒素の抗原性によってAからGまでの7型に分類され、また生物学的性状とDNA相同性によってI～IVの4群に分けられている<sup>1-3)</sup>。I群にはA型菌とタンパク分解性のB、F型菌、II群にはE型菌とタンパク非分解性のB、F型菌、III群にはC、D型菌、およびIV群にはG型菌が属している。すべてのA型菌とG型菌はタンパク分解性、すべてのE型菌はタンパク非分解性、C型菌とD型菌はタンパク非分解性であるがゼラチンは液化する。

ボツリヌス中毒は、その発病機序により、①食餌性ボツリヌス症 (食中毒)、②創傷性ボツリヌス症、③乳児ボツリヌス症の3型に分類されている<sup>3)</sup>。ボツリヌス中毒はヒトにも動物にも発生し、ヒトの中毒に関係するのは主としてA、BおよびE型菌で、まれにF型菌による事例<sup>3)</sup>も報告されており、ニワトリや野鳥ではC型、家畜ではCおよびD型による中毒が発生する<sup>4)</sup>。

食餌性ボツリヌス症は、食品中でボツリヌス菌が増殖し、産生された毒素を経口的に摂取することによって発症する毒素型食中毒である。1897年、

Van Ermengemによって最初の食中毒事例が報告されて以来、米国、カナダ、ソビエトなど世界各国での食中毒発生が報告されるようになった。ボツリヌス中毒に関する世界的な統計資料はないが、これまでに少なくとも世界24カ国における発生が確認されている<sup>3)</sup>。

日本では1951年、北海道岩内町で発生した鯺の飯ずしを原因食品としたE型中毒<sup>5-6)</sup>が初めての報告である。その後、北海道、東北地方の各県でも確認され、1990年までに101事例が発生し、患者数493名、死者は113名（致死率22.9%）に達している（厚生省統計情報部、食中毒統計資料）。北海道、東北地方で発生した原因食品は自家製の飯ずし、あるいはこれに類似した魚類の発酵食品で、原因毒素型はいずれもE型である。その他の地域では、1969年、宮崎県での輸入キャビアによるB型中毒<sup>7)</sup>、1973年、滋賀県でのハスずしによるE型中毒<sup>8)</sup>、1976年、東京都でのA型中毒（原因食品不明）<sup>9)</sup>、1984年、熊本県産の芥子蓮根によって全国12都府県で死者11名をみたA型中毒<sup>10)</sup>および同年、栃木県で発生したB型中毒（原因食品不明）<sup>11)</sup>などが、主な発生事例である。

一方、日本における動物のボツリヌス症は養殖のミンク<sup>12、13)</sup>、カモなどの野鳥<sup>14、15)</sup>、ブロイラー<sup>16-20)</sup>、養殖のキジ<sup>21)</sup>や養殖のカモ<sup>22)</sup>での事例があり、いずれもC型菌が原因となっている。

ボツリヌス菌は、元来土壤中に芽胞の状態分布する細菌である。自然界におけるボツリヌス菌の分布は、ヒトや動物のボツリヌス中毒の原因食

品への汚染源として深く関わっていると指摘されており<sup>23)</sup>、本中毒多発地域では、古くから環境における調査が行われてきた。

日本では北海道各地の河川<sup>24-26)</sup>、湖沼<sup>25、27)</sup>および海岸<sup>25)</sup>の土壌がE型菌によって濃厚に汚染されていることが明らかにされている。東北地方でも秋田県<sup>28-30)</sup>をはじめ、青森県<sup>31)</sup>、岩手県<sup>32、33)</sup>、山形県<sup>34)</sup>の土壌からE型菌が分離されている。一方、ボツリヌス中毒の発生が少ない地域でも調査が進められており、E型菌は東京都の池<sup>35)</sup>、新潟県<sup>36)</sup>、石川県<sup>37、38)</sup>、富山県<sup>39)</sup>、大阪府の淀川<sup>40)</sup>、山口県<sup>41)</sup>、宮崎県<sup>42)</sup>の河川土壌並びに山陰、北九州および沖縄県の森林土壌<sup>38)</sup>に分布が認められている。A型菌は青森県<sup>31)</sup>、秋田県<sup>28)</sup>、新潟県<sup>36)</sup>、熊本県の阿蘇山外輪山と雲仙岳<sup>43)</sup>および鹿児島県<sup>44)</sup>の土壌における分布が確認されている。また、十和田湖にはE型のほかにF型菌も分布していることが報告されている<sup>45)</sup>。ニワトリや野鳥あるいは家畜のボツリヌス中毒を起こすC型菌やD型菌は、東京都<sup>35、46)</sup>、新潟県<sup>36)</sup>、富山県<sup>39)</sup>、石川県<sup>37、47)</sup>、大阪府の淀川<sup>40)</sup>、岐阜県および愛知県にかかる木曾川<sup>48)</sup>、瀬戸内海<sup>49)</sup>、熊本県<sup>43)</sup>および宮崎県<sup>42、50)</sup>に分布することが認められているが、東京都以北の地域では確認されていない。

琵琶湖は滋賀県の中央部に位置し、南北に長く日本最大の面積（673.8 km<sup>2</sup>）を有する湖で、これは滋賀県の面積の16.1%にあたり、275億トンという豊富な水量をたくわえ、京阪神に貴重な水資源を供給している。琵琶



湖の東西にかかる琵琶湖大橋を境にして、北部は広く深い北湖（主湖盆：面積の約9割）、南部は南湖（副湖盆：約1割）と呼ばれている。北湖には水深50 m以上もある水域が広く存在し、平均水深が41 mであるのに対し、南湖では10 mより深いところがなく、平均水深は4 mである<sup>51)・52)</sup>。琵琶湖には大小113本の河川が流入しており、流出河川としては瀬田川（南下して、宇治川、淀川となる）と京都市内の飲料水として用いられる琵琶湖疎水に限られている。琵琶湖には数十種類の魚介類が棲息しており<sup>51)</sup>、湖周辺にはいくつかの漁港があり、これらの淡水魚介類の捕獲や養殖を業とした漁業も盛んである。また、これらの淡水魚を用いた馴れずし（魚と米飯とを樽に漬けた自然発酵食品）は琵琶湖周辺はもちろん、山間部においても造られている<sup>53)</sup>。

1973年に発生した滋賀県におけるボツリヌス中毒事例<sup>8)</sup>は、琵琶湖の北西部に位置する高島郡マキノ町で、琵琶湖産のハス（*Opsariichthys uncirostris*）を自家発酵させたハスずしの喫食によって発生した患者数3名、死者2名の食中毒である。本中毒は北海道、東北地方以外の地域で発生した初めてのE型菌による中毒事例として注目を集めた。

琵琶湖産の淡水魚を使用した馴れずしの自家調製が盛んな滋賀県、とくに近畿1,300万人の”命の水”を貯える琵琶湖における本菌の生態を明らかにすることは、近畿一円の本食中毒予防の基礎資料となると考え、琵琶湖およびその周辺地域由来の土壌、水、魚介類あるいはプランクトンについ

て、ボツリヌス菌の生態学的研究を行った。また、一部の材料を用いてボツリヌス菌の検出法についても検討した。

## 第1章 琵琶湖流入の河川におけるボツリヌス菌の生態

### I. 緒言

1973年7月、滋賀県高島郡マキノ町字知内においてハスずしを原因食品とするE型ボツリヌス中毒事件が発生した<sup>8)</sup>。その後、本食中毒の予防対策が協議され、ボツリヌス中毒治療用抗毒素血清を県として常備すること、県民に対する衛生教育を実施すること、さらにその基礎資料とするための琵琶湖とその周辺のボツリヌス菌の分布について実態調査が行われることになった。これが滋賀県におけるボツリヌス菌の生態学的研究を行うことになった契機である。

1973年11月、徳地ら<sup>54)</sup>によって、中毒発生地周辺地区に限った調査が行われ、発生地付近を流れる知内川と付近の養魚場および琵琶湖から採取された土壌61検体と淡水魚11検体についてボツリヌス菌の調査が行われた。その結果、知内川から採取した土壌35検体中下流由来の1検体(2.9%)および知内川河口(琵琶湖湖岸)から採取した土壌24検体中13検体(54.2%)からE型ボツリヌス菌が検出され、中毒発生地付近の琵琶湖湖岸にはE型菌が濃厚に分布していることが判明した。

琵琶湖には、大小113の河川が流入しており<sup>51)</sup>、中毒発生地付近を流れる知内川(全長19 km)も琵琶湖に流入する。E型菌の濃厚な分布は、ボツリヌス中毒発生地マキノ町付近の河川に限られるのかどうかを明らかにす

るために、琵琶湖に流入する主要な11河川を無作為的に選び、その中流および河口（琵琶湖）におけるボツリヌス菌の生態について検討した。また、知内川については、ボツリヌス菌が分布するのは河口（琵琶湖）付近に限られるのかどうかについて検討した。

## II. 材料および方法

### 1. 検体の採取場所

1974年7月に、琵琶湖に流入する11河川を対象として、それぞれの中間流域および河口地域（琵琶湖を含む）の土壌を採取した。中流については10河川を対象として1河川あたり5検体を採取したが、そのうち1検体は供試不能になったので計49検体、河口地域については1河川あたり10検体、計110検体を採取し、合計159検体を供試した。採取場所はFig.1に示すような地点の川岸や湖岸の水際、または川底や湖底部である。

知内川については1979年5月、全長19 kmの上流から河口までの8カ所から土壌45検体および流水8検体、計53検体を採取した。

### 2. 検体の採取方法

1) 土壌の採取方法：直接採取可能な地点からは、移植ゴテを用いて表面から約10～15 cm深部の土壌を採取した。また、水深1 m以上の地点からは、エクマンバージ採泥器（A型、離合社、東京）を用いて採取した。採取した土壌は滅菌した広口瓶（500 ml）に入れ、アイスボックスを用いて研究

室に持ち帰り、供試するまで4℃で保存した。

2) 水の採取方法：滅菌した広口瓶を用いて直接採取し、土壌と同様の方法で持ち帰り、直ちに培養に供試した。

### 3. ボツリヌス菌の検出方法

北海道立衛生研究所で用いられた方法<sup>24, 27)</sup>に準じ、材料を毒素産生用培地に接種して培養し、培養上清中にマウス致死活性を有する毒素が検出された場合マウス致死毒素陽性、ボツリヌス毒素が検出された場合ボツリヌス菌陽性とした。また、培養上清からE型毒素が検出された検体のうち、毒性試験で強い毒性が認められた培養液からE型菌の分離を試みた。

1) 土壌の培養方法：滅菌広口瓶に土壌50 mlと等量の滅菌1/15 Mリン酸緩衝液(pH 6.0、以下PBという)を加え、約100回よく振り混ぜ、10分間室温に静置した。上清を、滅菌ステンレス製遠心沈澱管に移し、4℃で10,000 rpm、30分間遠沈した。その沈渣に、1.5 mlのPBを加えて混合し、再浮遊したのち、その1.0 mlを毒素産生用培地(12 ml)に接種した。次いで沈渣浮遊液を接種した培地を、60℃で15分間加熱後直ちに流水中で冷却し、30℃で7日間培養した。土壌の培養方法の概要をFig.2に示す。

2) 水の培養方法：検体量はTable 4に示すように、メンブランフィルター(径47 mm、0.45 μm、ミリポア)を用いてフィルターが目詰まりするまで吸引濾過し、フィルターを細切して毒素産生用培地に接種し、土壌と同様の方法で培養した(Fig.3)。

3) 毒素産生用培地の作製方法：毒素産生用培地としては、自家製の肝片加肝臓ブイヨン（ペプトン(ミクニ)2.0%、ビーフエキス(Difco)1.0%、可溶性デンプン(和光純薬)0.5%、塩化ナトリウム0.5%、新鮮な牛の肝臓30.0%、寒天0.04%、pH 7.6)を用いた。培地の作成方法については、ペプトン、ビーフエキス、可溶性デンプンおよび塩化ナトリウムを精製水に入れて加熱溶解した。その中に約3 cm角に切った牛の肝臓を入れて1時間煮沸し、濾紙（東洋濾紙、No.101、径30 cm）で2回濾過した。次に、濾液を冷却後10%炭酸ナトリウムでpHを7.6に調製し、寒天を加えて加温溶解後、18 x 180 mmの試験管に12 mlずつ分注した。その中に5 mm角に細切した肝臓を5~6個入れ、121 °Cで20分間滅菌した。また、作製後時間の経過した培地は、使用前に10%炭酸ナトリウムでpHを7.6に調整し、沸騰水中に10分間置き、直ちに流水中で冷却して使用した。培地の作製方法の概要をFig.4に示す。

4) 毒性試験：培養液をピペットで静かに混合し、その一部を試験管（13 x 100 mm）に移し、3,000 rpm、20分間遠沈した。その上清にトリプシン（Difco、1:250）をPBに0.2%溶解した溶液を等量に加え、37 °Cで1時間反応させた後、その0.5 mlずつを2匹のマウスの腹腔内に注射し、ボツリヌス毒素による特有の症状（腹壁陥没、呼吸困難）を発現して斃死するか否かについて観察した。注射後、少なくとも5日間観察し、一匹以上のマウスが斃死した場合、マウス致死毒素陽性とした。試験方法の概要をFig.5に

示す。

5) ボツリヌス毒素の検出方法: ボツリヌス毒素による典型的症状を発現してマウスが斃死した場合、トリプシン処理液と20 IU (国際単位) / mlのE型ボツリヌス抗毒素血清 (千葉県血清研究所製) を等量混合し、37 °Cで1時間反応後、その0.5 mlずつを2匹のマウス腹腔内に注射した (ボツリヌス抗毒素接種群)。同時にトリプシン処理液をPBで2倍に希釈した試料 (対照群) およびこれを80 °Cで30分間加熱処理した試料 (加熱による失活試験群) を同様の方法でマウスに注射した。ボツリヌス抗毒素接種試験群および加熱による失活試験群のマウスがすべて生き残り、対照群のマウスが2匹とも斃死した場合、E型ボツリヌス毒素陽性と判定した。また、E型抗毒素血清で中和されなかった場合には、同様の方法でA型、B型あるいはF型の抗毒素血清 (いずれも千葉県血清研究所製) を用いて抗毒素接種試験を行って毒素型を確認した。マウスはddY系で体重20 g前後のものを使用した。検出方法の概要をFig. 5に示す。

#### 4. ボツリヌス菌の分離方法

マウス致死毒素の強い培養液 (試料を腹腔内注射後4時間前後でマウスが斃死するもの) を試料とした。培養液の管底からピペットで少量の菌液をとり、3,000 rpmで20分間遠沈後、その沈渣を肝片加肝臓ブイヨンに接種し30 °Cで2日間培養し、さらに、同様の方法で継代培養を行い、0.3%ブドウ糖および5%ヒツジ血液加ブレインハートインフュージョン寒天培地 (Di-

fco、以下BHI寒天)に塗抹し、ガスパック法(BBL)により30℃で2日間嫌気培養した。寒天平板に発育した集落のうち、β-溶血陽性、偏平で半透明のE型菌と思われる集落を釣菌し、肝片加肝臓ブイヨンに接種し、30℃で2日間培養した。培養液のうちガス産生の著明な培養液については、上述したように、その遠沈上清をトリプシン処理した後0.5 mlをマウス腹腔内に注射し、ボツリヌス毒素による典型的症状を発現してマウスが斃死するかどうかを観察した。マウス致死毒素を確認した培養液については、少量を肝片加肝臓ブイヨンに移し、30℃で24時間培養後、BHI寒天培地に塗抹し、好気的および嫌氣的に培養して菌株を分離した。

#### 5. 水質試験

知内川から採水した水について、水温、pHおよび大腸菌群を調べた。水温については棒状水銀温度計、pHはガラス電極(東和電波、HM-1F型)を用いて、大腸菌群数はBGLB法(環境庁告示第7号)により100 mlあたりのMPN(Most probable number、以下大腸菌群MPNという)で示した。

### III. 成績

#### 1. 琵琶湖流入河川の中流域土壌におけるボツリヌス菌の分布

10河川の中流土壌49検体中2河川由来5検体(10.2%)の培養上清にマウス致死毒素が認められた。そのうち北湖に流入する日野川由来1検体(2.0%)からE型毒素が検出された(Table 1)。その他のマウス致死毒素陽性



の培養上清については、観察できた範囲においてその多くが腹壁陥没あるいは呼吸困難を呈し、すべて80℃30分間の加熱により毒性が失活したが、A、B、EおよびF型の抗毒素血清で中和されなかった。E型毒素の検出地点は川岸であった。

## 2. 琵琶湖流入河川の河口域土壌におけるボツリヌス菌の分布

11河川の河口土壌110検体中9河川由来43検体（39.1%）の培養上清にマウス致死毒素が認められ、6河川由来15検体（13.6%）からE型毒素が検出された（Table 2）。E型毒素が検出された河川は、知内川、犬上川、余呉川、姉川、天野川および日野川で、検出率はそれぞれ80%（8/10）、30%（3/10）、その他10%（1/10）であり、知内川からの検出率がもっとも高かった。E型毒素以外のマウス致死毒素陽性の培養上清については、すべて80℃30分間の加熱により毒性が失活した。しかし、これらの毒素はA、B、EおよびF型の抗毒素血清で中和されなかった。

E型毒素陽性15検体の採取地点は、知内川由来8検体中3検体および日野川由来1検体計4検体は琵琶湖湖岸より10 mから500 m沖の湖底であったが、その多く（11検体）は川岸（波打ち際）であった。

## 3. 知内川の土壌と水におけるボツリヌス菌の分布

1) 土壌の成績：川の上流から河口にいたる8地点の川岸から採取した土壌のうち、6地点由来の土壌45検体中15検体（33.3%）の培養上清中にマウス致死毒素が認められ、5地点由来14検体（31.3%）からE型毒素が検出され

た (Table 3)。E 型菌は、上流地点からは検出されず、下流になるにしたがって検出率が高くなった。

2) 水の成績：8地点由来の8検体を培養したが、培養上清にマウス致死毒性を示した検体は認められなかった (Table 4)。採取した水の水質は、最上流地点ではpHは8.1、大腸菌群MPNは8であったが、下流になるにつれてpHは低下し、大腸菌群数は増加する傾向を示した。

#### 4. ボツリヌス菌の分離

知内川河口土壌2検体および犬上川河口土壌1検体の培養液から、それぞれE型菌の分離を試みた。その結果、知内川河口土壌1検体および犬上川土壌培養液からそれぞれ4株ずつ、計8株のE型菌を分離した。知内川由来株をCBShiga3-1E、CBShiga3-2E、CBShiga3-3E、CBShiga3-4E、犬上川由来株をCBShiga4-1E、CBShiga4-2E、CBShiga4-3E、CBShiga4-4Eとそれぞれ命名した。

#### IV. 考察

琵琶湖に流入する代表的な河川について、その中流域および河口域（琵琶湖）におけるボツリヌス菌の分布を調べたところ、以下の事実が確認された。

第一点は、中流および河口域から検出されたボツリヌス菌はすべてE型であり、A、BおよびF型菌は検出されなかったという事実である。この

成績は滋賀県において、ハスずしによるボツリヌス中毒の原因菌がE型菌であったこと<sup>8)</sup>、および中毒発生直後に行われた発生地付近琵琶湖湖岸の土壤から高率にE型菌が検出されたこと<sup>5,4)</sup>と一致した知見であった。すなわち自然界におけるボツリヌス菌の分布は、原因食品の汚染源として深くかかわっているというMeyer<sup>23)</sup>の指摘どおり、原因食品の材料であるハスを採取した地域および製造場所付近に原因菌のE型菌が濃厚に分布しているという事実が確認されたことである。

第二点は、E型菌が検出された地域は、そのほとんどが河口域であったことである。この事実は、知内川の上流から河口までの8地点の調査でも示されたように、河口に近づくにしたがってE型菌の検出率が高くなったことと一致した成績である。河川に流入したE型ボツリヌス菌は流れが穏やかになった河口で蓄積され、濃度が高くなった可能性があること、あるいはボツリヌス菌の増殖場所は琵琶湖であり、琵琶湖に生息する魚の遡上によってボツリヌス菌も河川の上流に運ばれ、河川の中流でも検出されるが、検出率としては琵琶湖よりも低くなるという可能性があることを示している。E型菌の生態についてDolman<sup>55)</sup>は、British Columbia沿岸の海底土壤あるいはこの付近で捕獲された魚の腸内容物からE型菌を分離し、E型菌は北半球の土壤中に広く分布し、これが雨水、河川などによって大海に運ばれ、さらに海流によって広く分布するものと推定している。日本でも神沢<sup>24)</sup>は、主として石狩川流域の土壤についてE型菌の分布を調査し、

10.7% (40/375) にE型菌を証明したことから、本菌が内陸に由来することを推定した。小野ら<sup>25)</sup>も海岸地域の砂よりは内陸の河川や湖沼の土壤中からE型菌を高率に検出し、さらに同じ河川の上流、中流および河口域に分けて調べたところ、地域別による差異はとくに認められなかったと報告している。したがって、本成績もE型菌は元来内陸の土壤中に分布する菌種であり、それが河川やその他の自然界の緒要因によって広く各地に運ばれるという説を否定できない成績であると考ええる。しかしながら、琵琶湖に流入する河川の中流からはE型菌がほとんど検出されず、河口の方が著しく高率であったことは、河川からの蓄積に限らず、E型菌の増殖場所として河口（琵琶湖）の方が適した環境であるという可能性があると考えた。

一方、小野ら<sup>26)</sup>は水域と関連性の少ない植林地の土壤からはE型菌が証明されなかったことから、E型菌が元来内陸の土壤に分布するとしても、その増殖あるいは拡散には水が深い関連性を持つことを示唆している。河川から琵琶湖に流入した水は、すべて南下をたどり、瀬田川に流出する。琵琶湖では還流があり、北湖に流入した水は最初反時計回りに還流し、続いて時計まわりに流れている<sup>56)</sup>。したがって、琵琶湖においても、その還流が琵琶湖一円やその水系にボツリヌス菌の分布を拡大する要因になっていると推測できる。

第三点としてE型菌が検出された地点は、川底（湖底）よりも川岸（湖岸）が多かったことである。検出地点の川岸（湖岸）は、植物も生育し、

しかも水流のゆるやかな環境である。これらの場所は、ボツリヌス菌が蓄積しやすいことやボツリヌス菌が増殖するための環境として適しているものと推定されるが、この点に関しては今後の検討課題である。

今回の調査結果は、E型菌が日本の北部地域北海道、東北地方の土壤中に多く分布する<sup>57)</sup>という従来認識を改め、琵琶湖でもE型菌の濃厚分布地域であることを示した事実として注目される。また、知内川および犬上川河口の土壌各1検体からE型菌8株を分離した。一方、今回の調査ではCおよびD型ボツリヌス抗毒素血清を用いなかったので、これらのボツリヌス菌の分布については不明である。しかし、E型菌陽性例以外でもマウス致死毒素陽性を示した検体が多く認められたこと、また、その多くの例でボツリヌス毒素によると考えられるマウスの腹壁陥没および呼吸困難の症状が認められたことから、これらのボツリヌス菌の存在も強く疑われた。

## V. 小括

1. 琵琶湖に流入する11河川中6河川の河口土壌（琵琶湖湖岸）および1河川の中流土壌からE型ボツリヌス菌が検出されたことから、本菌は中毒発生地に限らず、琵琶湖北湖の湖岸には広く分布している事実が明らかとなった。

2. 琵琶湖に流入する河川の中流よりも河口域においてE型菌の検出率が高かった。

3. 知内川の上流から河口までの8カ所の川の土壌についてボツリヌス菌を調査した結果、最上流ではE型菌は検出されず、河口に近づくにしたがって検出率が高くなった。

4. E型菌は川底よりも川岸から多く検出されたが、これらの場所は水の流れが穏やかであることから、E型菌の増殖場所として川岸や湖岸の環境が適していると考えられた。

5. 知内川および犬上川河口の土壌各1検体からE型菌8株を分離した。

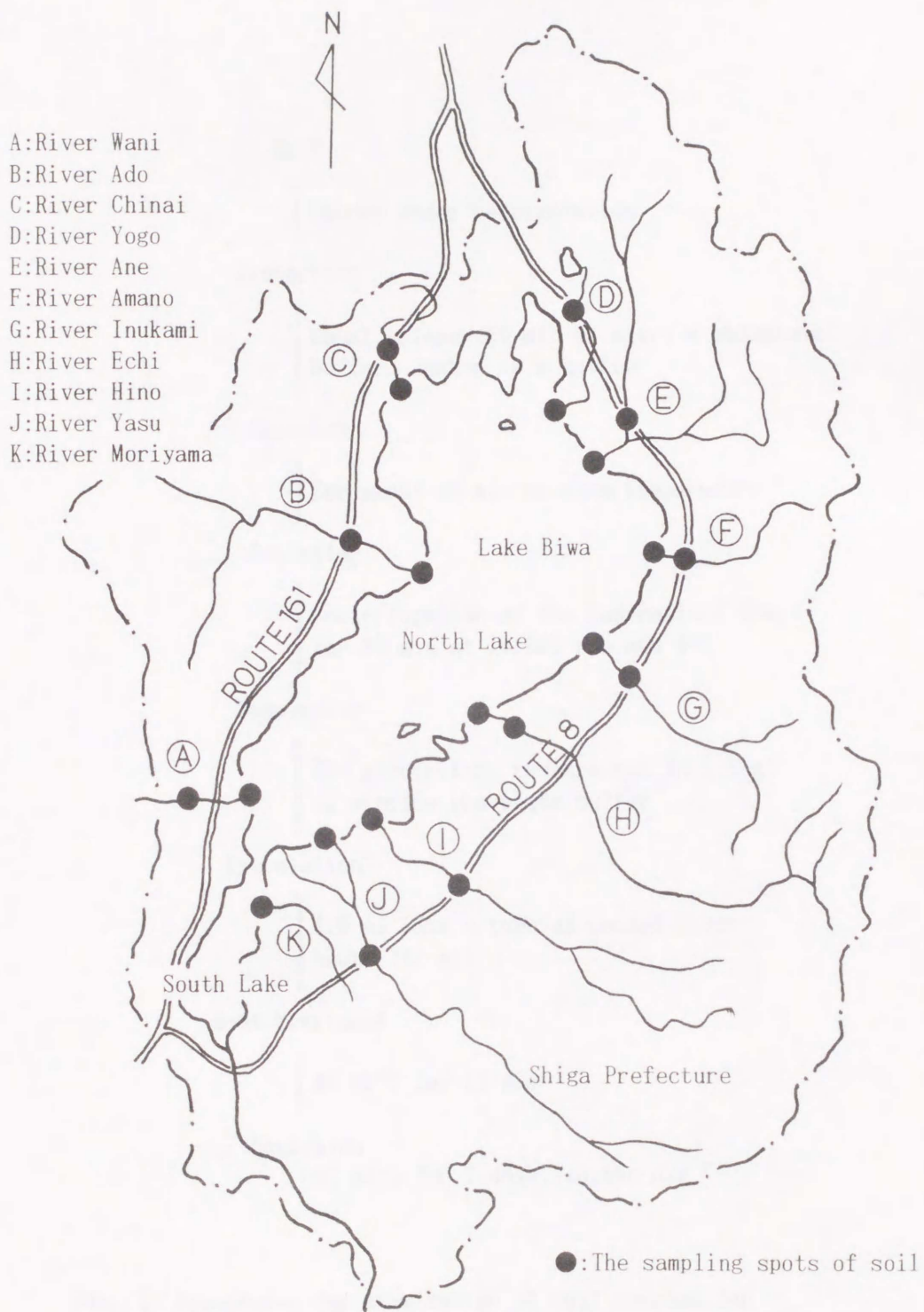


Fig. 1. The rivers flowing into Lake Biwa and the sampling spots

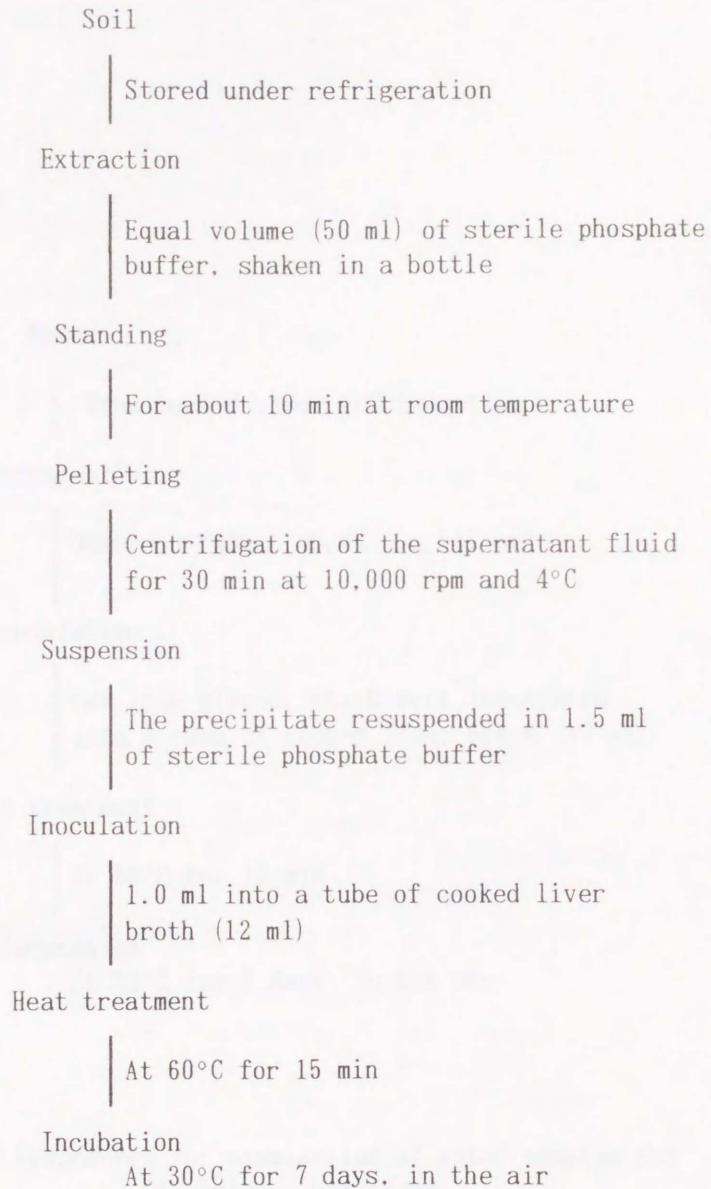


Fig. 2. Procedures for examination of soil samples for Clostridium botulinum



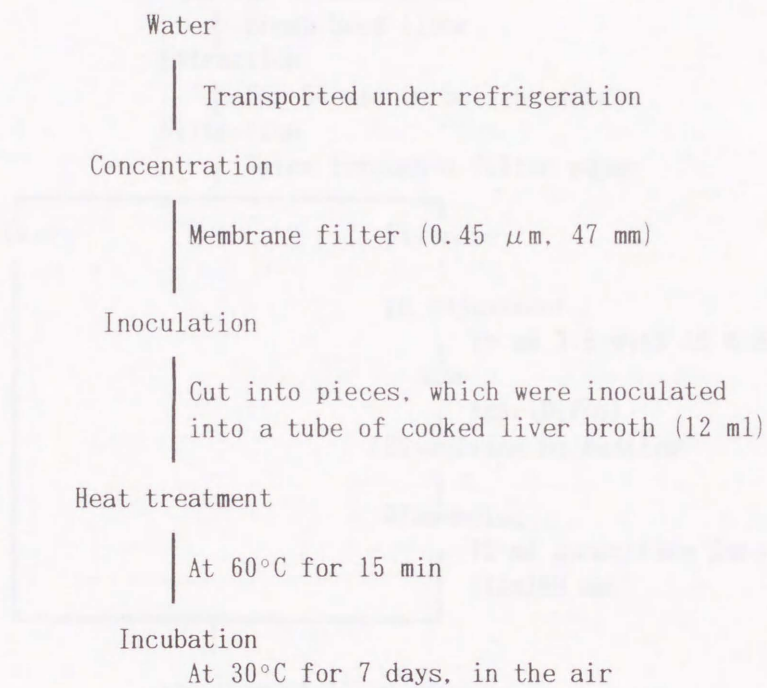


Fig. 3. Procedures for examination of water samples for Clostridium botulinum

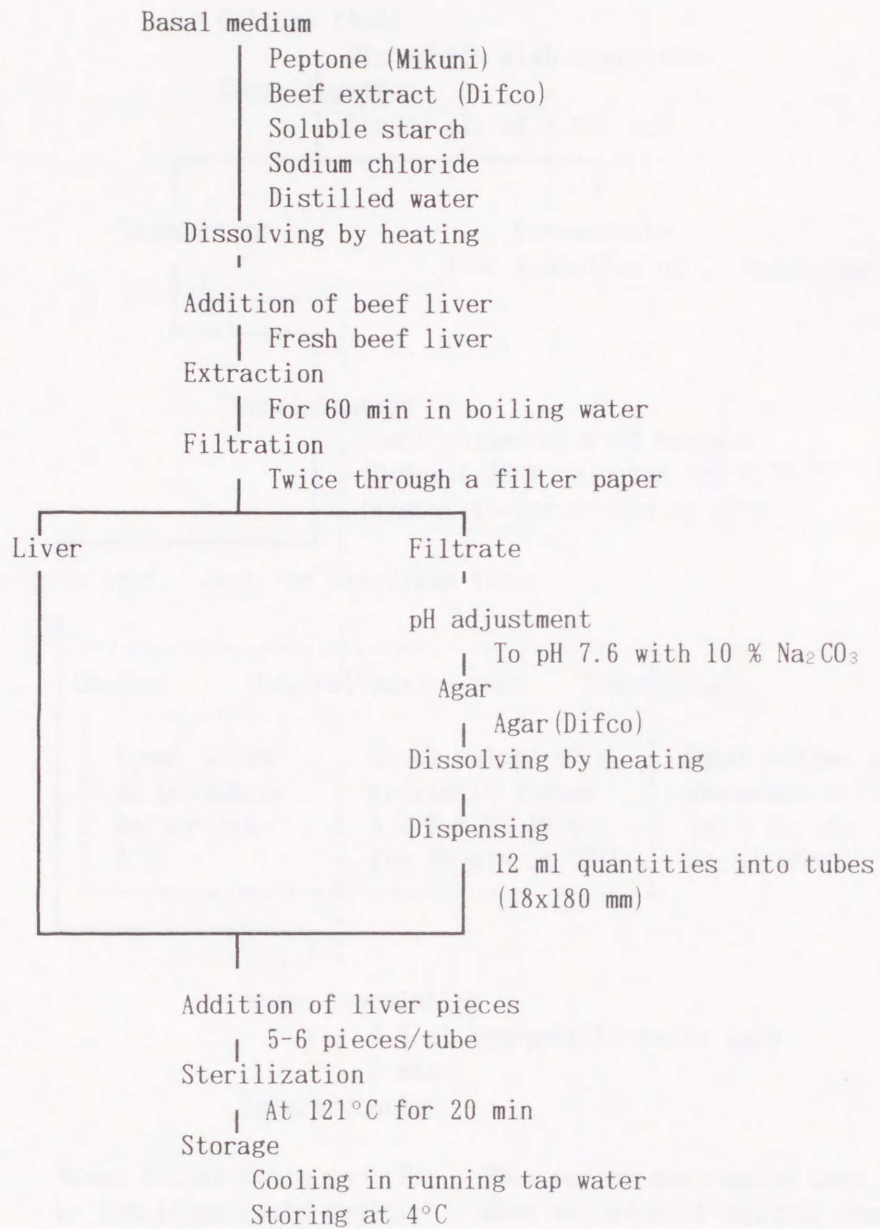
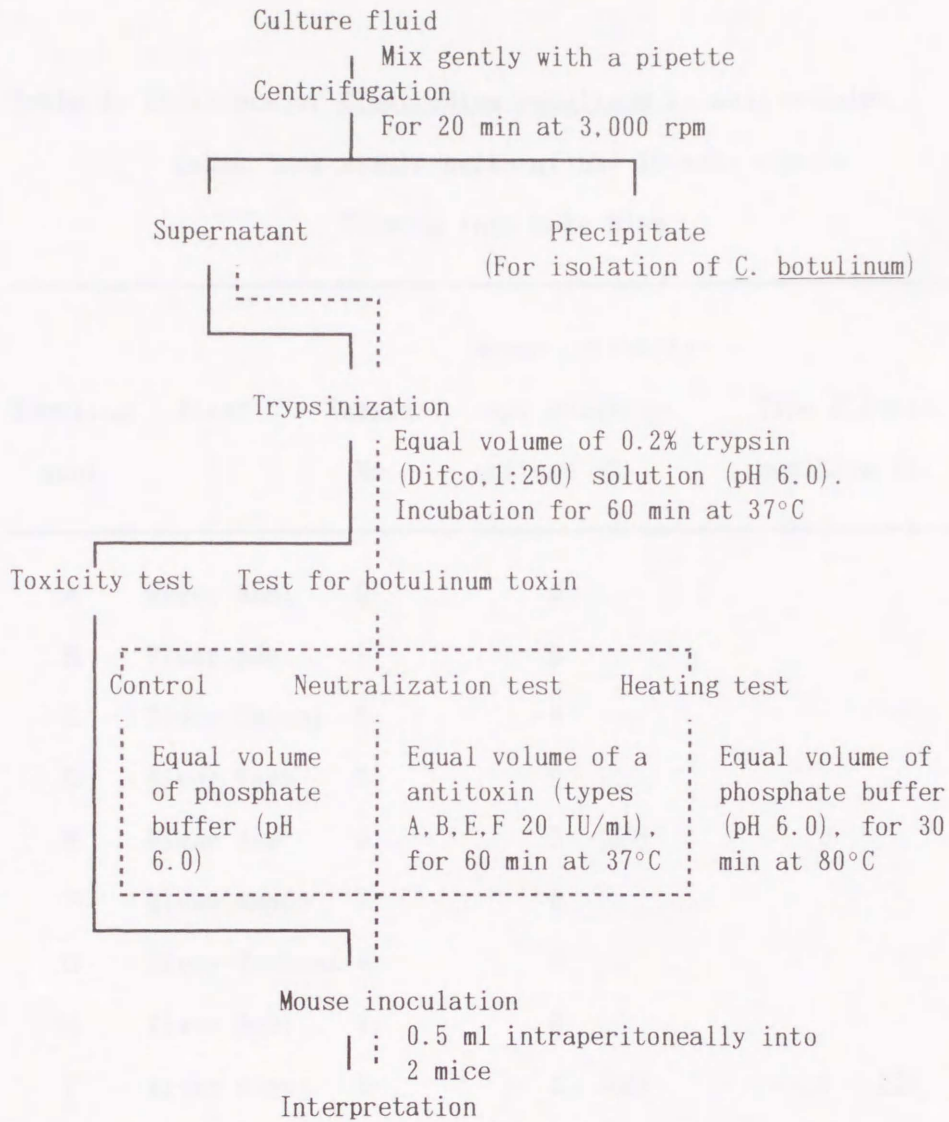


Fig. 4. Procedures for preparation of cooked liver broth



Mouse lethal toxin positive : When one or more mouse died.  
C. botulinum toxin positive : When two mice of control group died and the two mice each of the neutralization test and heating test groups survived.

Fig. 5. Procedures for testing mouse lethal toxicity and botulinum toxin

Table 1. Incidence of Clostridium botulinum in soil samples  
 taken from middle parts of the 10 main rivers  
 flowing into Lake Biwa

Sampling spot	River	Sample No.	Mouse lethality-	
			test positive culture (%)	Type E toxin positive (%)
A	River Wani	5	0	
B	River Ado	5	0	
C	River Chinai	5	0	
D	River Yogo	5	0	
E	River Ane	5	3 (60)	0
F	River Amano	5	0	
G	River Inukami	5	0	
H	River Echi	4	0	
I	River Hino	5	2 (40)	1 (20)
J	River Yasu	5	0	
Total		49	5 (10.2)	1 (2.0)

Table 2. Incidence of Clostridium botulinum in soil samples taken from the river mouths of the 11 main rivers flowing into Lake Biwa

Sampling spot	River	Sample No.	Mouse lethality-	
			test positive culture (%)	Type E toxin positive (%)
A	River Wani	10	0	
B	River Ado	10	0	
C	River Chinai	10	9 (90)	8 (80)
D	River Yogo	10	8 (80)	1 (10)
E	River Ane	10	4 (40)	1 (10)
F	River Amano	10	5 (50)	1 (10)
G	River Inukami	10	4 (40)	3 (30)
H	River Echi	10	3 (30)	0
I	River Hino	10	4 (40)	1 (10)
J	River Yasu	10	1 (10)	0
K	River Moriyama	10	5 (50)	0
Total		110	43 (39.1)	15 (13.6)

Table 3. Incidence of Clostridium botulinum in soil samples taken from the bed of River Chinai from the upper stream to the mouth flowing into Lake Biwa

Sampling spot	Distance from the mouth	Sample No.	Mouse lethality-	
			test positive culture (%)	Type E toxin positive (%)
C-1	19.0 km	5	1 (20)	0
C-2	14.2 km	5	0	
C-3	10.9 km	5	1 (20)	1 (20)
C-4	8.4 km	5	0	
C-5	4.5 km	5	1 (20)	1 (20)
C-6	2.2 km	5	4 (80)	4 (80)
C-7	0.4 km	5	4 (80)	4 (80)
C-8	0 km	10	4 (40)	4 (40)
Total		45	15 (33.3)	14 (31.1)

Table 4. Incidence of Clostridium botulinum in water samples taken along River Chinai from the upper stream to the mouth flowing into Lake Biwa

Sampling spot	Distance from the mouth	Sample volume (ml)	Mouse	Temp (°C)	pH	MPN of coliforms
			lethality of culture supernatant			
C-1	19.0 km	180	-	13.5	8.1	8
C-2	14.2 km	150	-	16.0	7.9	110
C-3	10.9 km	235	-	18.5	7.4	490
C-4	8.4 km	120	-	22.5	7.1	1,100
C-5	4.5 km	265	-	21.2	7.7	260
C-6	2.2 km	185	-	20.5	7.2	460
C-7	0.4 km	265	-	22.0	7.8	2,300
C-8	0 km	165	-	20.5	8.6	230

## 第2章 琵琶湖におけるボツリヌス菌の生態

### I. 緒言

前章では琵琶湖に流入する河川について、その中流および河口域におけるボツリヌス菌の分布を調べたところ、河川の中流域よりも河口域（琵琶湖湖岸）にE型菌が濃厚に分布していることが判明した。琵琶湖におけるボツリヌス菌の生態を明らかにするためには、河口域以外の土壌や琵琶湖に生息する魚介類および食物連鎖上で魚に摂取されるプランクトンについても検討することが必要であると考え、琵琶湖から種々の材料を採取し、ボツリヌス菌の生態について検討した。前章では、C型およびD型菌については検討していなかったため、今回はA～F型菌すべてを対象に生態調査を行った。

### II. 材料および方法

#### 1. 検体の採取場所

各検体はFig.6に示すように、北湖12カ所および南湖14カ所から採取した。

1) 湖岸土壌：北湖については、1977年10月に3カ所から30検体（B：知内漁港20検体、C：マキノ町キャンプ場付近5検体、D：白髭神社付近5検体）および1987年1月に別の2カ所から10検体（A：知内浜5検体、E：近江舞子水泳場5検体）、計40検体の土壌を採取した。南湖については、1977年5月に



1カ所 (P: 浜大津) から3検体、1978年5月には3カ所から30検体 (M: ホテル井筒付近10検体、O: 柳崎水泳場10検体、Q: 膳所公園10検体) および1978年1月には別の2カ所から10検体 (N: 唐崎5検体、Q: 膳所公園5検体)、計43検体の土壌を採取した。

2) 湖底土壌: 1981年9月に、北湖の5カ所 (水深30~70 m; F: 今津港沖、I: 長浜港沖、J: 愛知川沖、K: 安曇川-彦根中央、L: 安曇川沖) および南湖の5カ所 (水深3~5 m; R: 唐崎沖、S: 唐崎-伊佐々川中央、T: 伊佐々川沖、U: 浜大津港沖、V: 相模川沖) から計10検体の土壌を採取した。

3) 湖岸水: 1978年10月には北湖の3カ所から6検体 (B、CおよびD地点から各2検体)、1978年5月には南湖の3カ所から6検体 (M、OおよびQ地点から各2検体)、計12検体の湖岸水を採取した。

4) 湖中央水: 1980年9月には北湖の1カ所 (G: 今津港-長浜港中央) から2検体 (表層水: 水深0.5 mおよび湖底水: 水深90 m) および南湖の1カ所 (S: 唐崎-伊佐々川中央) から2検体 (表層水: 水深0.5 mおよび湖底水: 水深4.8 m)、1981年5月には北湖の2カ所から3検体 (G: 今津港-長浜港中央の表層水: 水深0.5 mおよび湖底水: 水深90 m、I: 長浜港沖の表層水: 水深0.5 m) および南湖の4カ所から5検体 (R: 唐崎沖の表層水: 水深0.5 m、S: 唐崎-伊佐々川中央の表層水: 水深0.5 mおよび湖底水: 水深4.8 m、T: 伊佐々川沖の表層水: 水深0.5 m、W: 杉江港沖の表層水: 水深0.5 m)、計12検体の湖水を採取した。

5) プランクトン：北湖については1975年12月から1977年9月の間に5カ所から75検体（F：今津港沖19検体、G：今津－長浜中央21検体、H：姉川沖4検体、I：長浜港沖、J：愛知川沖）、南湖については1977年9月から1978年5月の間に4カ所から26検体（S：唐崎－伊佐々川中央8検体、U：浜大津港沖3検体、W：杉江港沖8検体、X：唐橋流心7検体）、計101検体のプランクトンを採取した。

6) エビ類：北湖のA地点（知内浜）から1979年5月に1検体、1980年5月に40検体およびB地点（知内漁港）から1981年9月に4検体、計45検体のスジエビ（*Palaemon paucidens*）を採取した。

7) 貝類：北湖については、1981年9月にB地点（知内浜漁港）からカワニナ（*Semisulcospira bensoni*）6検体およびカラスガイ（*Cristarica plicata spatiosa*）3検体の計9検体、南湖については、Q地点（膳所公園）からカワニナを1980年5月に40検体および1980年8月に20検体、1981年7月にY地点（山田港）からカワニナ1検体および1982年3月にZ地点（堅田港）からカラスガイ4検体の計65検体を採取した。

8) 魚：北湖のA地点（知内浜）で、地元の漁業組合によって漁獲されたハス（*Opsariichthys uncirostris*）のエラおよび内臓を検体とし、1975年7月に48匹、1978年6月に30匹、計78匹から検体を採取した。

9) 死魚：琵琶湖湖岸に打ち上げられた死魚を採取した。北湖については、1981年7月に2カ所から4匹（A：知内浜3匹、B：知内漁港1匹）および1982年

3月にE地点（近江舞子水泳場）から3匹計7匹のフナ（*Carassius auratus*）を採取した。南湖については、1980年5月にQ地点（膳所公園）からフナ1匹、1981年7月にM地点（ホテル井筒付近）から3匹のフナ、Y地点（山田港）から13匹のオイカワ（*Zacco platypus*）を、1981年9月と1982年3月にY地点からそれぞれフナを6匹と3匹、計26検体を採取した。

## 2. 検体の採取方法

湖岸土壌、湖底土壌、湖岸水および湖中央水（表層水）については、第1章に記載した方法によって採取した。

- 1) 湖底水：バンドン型採水器を用いて湖底から採水した。採水後、直ちに別の滅菌ガラス瓶（500 ml）に移し、氷冷しながら研究室に持ち帰った。
- 2) プランクトン：プランクトンネット（丸山式定量用、口径30 cm、網目x17）を湖底近くまで降ろし、一様な速度で引き上げるにより採取した。採取した検体は、50～100 mlの湖水中に濃厚に浮遊したプランクトンであり、これを滅菌ガラス瓶（100 ml）に入れ、氷冷して研究室に持ち帰った。
- 3) エビ類：エビは湖岸の湖底部（10～30 cm深部）から移植ゴテを用いて湖水とともに約5 g（15匹）を1検体として滅菌ガラス瓶（100 ml）にとり、氷冷して研究室に運んだ。
- 4) 貝類：湖岸に棲息する貝類を移植ゴテで採取後、一個ずつポリ袋に入れ、氷冷して研究室に持ち帰った。
- 5) 魚：漁業組合によって採取された直後のハスからエラと内臓を取り出

し、1匹分ごとに別々にポリ袋に入れ、氷冷して研究室に持ち帰った。

6) 死魚：死魚についても魚と同様に採取後別々にポリ袋に入れ、氷冷して持ち帰った。

以上の検体のうち、湖底土壌、湖中央水およびプランクトンは、滋賀県水質調査船「みずすまし」（定員20名、35トン、全長17 m、幅4.2 m、深さ1.9 m、速力20ノット）により、滋賀県立衛生環境センター水質課の職員が水質調査のために検体採取を行った時に同時に採取したものである。

### 3. ボツリヌス菌の検出方法

ボツリヌス菌の検索方法としては、基本的に第1章と同様の方法を用いたが、一部の検体の培養方法については種々の方法を組み合わせて行った。

1) 土壌の培養方法：第1章と同様の方法を用いたが、土壌の抽出溶液および再浮遊溶液には滅菌生理食塩水を使用した。

2) 湖水の培養方法：第1章と同様の方法を用いた。

3) プランクトンの培養方法：プランクトンの濃厚浮遊液を、4℃で10,000 rpm、30分間遠心分離し、沈渣を2 mlの滅菌生理食塩水に再浮遊させ、乳鉢に移して乳濁液とし、1 mlずつを2本の肝片加肝臓ブイヨン（10 ml）に接種し、一方はそのまま、他方は60℃、15分間加熱した後、30℃で7日間培養した。

4) エビ類の培養方法：1検体ごとに、濾紙（東洋濾紙製、No.1）で浮遊水を濾過し、濾紙上のエビを乳鉢で軽く砕きその5 gを肝片加肝臓ブイヨン

(50 ml) に接種し、60 °C、15分間加熱した後、30 °Cで7日間培養した。

5) 貝類の培養方法：貝殻を砕いて肉を取り出し、1~2 gのものはそのまま、2 g以上のものは細切後その2 gを肝片加肝臓ブイヨン (12 ml) に接種し、60 °C、15分間加熱した後、30 °Cで7日間培養した。

6) 魚の培養方法：1975年の48検体については、1匹あたりエラ、消化管内容物とも2~3片 (1~2 g) に細切し (48検体でエラの部分120試料、消化管の部分104試料)、1試料ごとに肝片加肝臓ブイヨン (12 ml) に接種し、60 °C、15分間加熱後、30 °Cで7日間培養した。1978年の30検体については、1匹ずつエラと消化管内容物とに分け、エラは細切後、消化管内容物はそのまま約5 g前後を肝片加肝臓ブイヨン (50 ml) に接種し、60 °C、15分間加熱後、30 °Cで7日間培養した。

7) 死魚：エラおよび消化管部を主として混合し、その5 gを肝片加肝臓ブイヨン (50 ml) に接種し、60 °C、15分間加熱後、30 °Cで7日間培養した。一部の検体については、培養前に加熱しないものおよび80 °C、30分間加熱したものも用意し、同様の方法で培養した。

8) 毒素産生用培地の作製方法：第1章と同様の方法により作製し、検体の種類によって12 mlと50 ml (試験管20 mm x 250 mm) とを作製した。

9) 毒性試験：試験方法は概ね第1章と同様な方法により行ったが、培養液をトリプシン処理する際にDifco (1:250) のトリプシンの代わりに結晶トリプシン (Sigma、type III) を用いた。すなわち、培養液の遠沈上清に結

晶トリプシンをPBに400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に溶解した溶液を等量加え、37  $^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させた。その0.5 mlを2匹のマウスの腹腔内に注射し、ボツリヌス毒素による特有の症状を観察した。1匹以上のマウスが斃死した場合、マウス致死毒素陽性とした。

10) ボツリヌス毒素の検出方法：A、B、C、D、EおよびF型のボツリヌス抗毒素血清（千葉県血清研究所製）を用いて、培養上清中に存在するボツリヌス毒素を調べた。検出方法は第1章に記載した方法と同様であるが、抗毒素血清量をマウス1匹あたり1 IU（D型ボツリヌス抗毒素血清は10 IU）の量を使用した。C型およびD型毒素の検出にあたっては、それぞれの抗毒素の10倍希釈液（マウス1匹あたりC型0.1 IU、D型1 IU）、100倍希釈液（マウス1匹あたりC型0.01 IU、D型0.1 IU）を作製し同様に中和試験を行った。

#### 4. ボツリヌス菌の分離方法

培養上清からボツリヌス毒素が検出された一部の検体について、その培養液からボツリヌス菌の分離を試みた。培養液の2白金耳を肝片加肝臓ブイヨン（10 ml）に接種し、未加熱、60  $^{\circ}\text{C}$ 、15分加熱後および80  $^{\circ}\text{C}$ 、30分加熱した培地を、30  $^{\circ}\text{C}$ で2～3日間培養した。これを0.1%L-システイン塩酸塩（和光純薬）を加えたブレインハートインヒュージョン寒天培地（BBL）あるいはHaqら<sup>58)</sup>の報告に従い、5%卵黄と0.1%L-システイン塩酸塩を加えたGAM寒天培地（日水）に塗抹し、30  $^{\circ}\text{C}$ あるいは37  $^{\circ}\text{C}$ で2～3日間ガ

スパック法（BBL）で嫌気培養した。これらの寒天培地に発育した集落を肝片加肝臓ブイヨンに接種し、30℃で4日間培養した。その培養上清をマウスに接種してボツリヌス毒素が確認された場合、ボツリヌス菌陽性と判断した。そのほか、阪口ら<sup>59)</sup>のパウチ法による分離についても検討した。対照株として、C型菌はCB-19（大阪府立大学阪口玄二教授から分与）、E型菌はCBShiga2E（1973年に滋賀県で発生したボツリヌス中毒患者由来株）を使用した。

#### 5. 水質試験

湖岸水については第1章に記載した方法によって、水温、pHおよび大腸菌群MPNを調べた。

### III. 成績

#### 1. 琵琶湖北湖におけるボツリヌス菌の分布

琵琶湖北湖の12カ所から種々の検体270を採取し、その培養上清にボツリヌス毒素が産生されているかどうかを調べた結果、マウス致死毒素は62検体（23.0%）から、ボツリヌス毒素は50検体（18.5%）から検出された（Table 5）。

検出されたボツリヌス毒素はC型5検体（1.9%）、E型46検体（17.0%）、F型1検体（0.4%）およびC型とD型の区別不能（以下、C×D型という）2検体（0.7%）であり、E型の検出頻度がもっとも高率であった。

一部の検体では1検体からC型とE型の毒素が同時に検出された。

検体別では湖岸土壌からの検出率がもっとも高く（82.5%）、次いで湖岸水（66.7%）、貝類（44.4%）、湖底土壌（20.0%）、プランクトン（17.3%）、エビ類（8.9%）の順で検出されたが、湖中央水、生魚および死魚はすべて陰性を示した。

湖岸土壌では、E型の検出頻度が80%（32/40）と高率であり、調査した5地点すべてから検出されたが、C型はB地点（知内漁港）由来の検体に限って検出された。E型は、湖岸水からも高率に検出され、貝類、湖底土壌（安曇川沖）、プランクトンおよびエビ類からも検出された。C型は、湖岸土壌以外にエビ類からも検出された。プランクトンからはCXD型、E型以外にF型菌が検出され、5地点の中ではI地点（長浜港沖）からの検出率が高かった。

E型菌が検出された湖岸水（採取地点：B、D）の水質は、水温19.0～20.5℃、pH 7.3～8.1、大腸菌群MPN 220～540であった（Table 6）。

プランクトンからのボツリヌス毒素の検出にあたって、培養前に加熱しないものと60℃、15分の加熱をしたものとの比較した結果、加熱しなかった培養液からはE型2検体、F型1検体、60℃、15分間加熱した培養液からはE型1検体、C x D型1検体のボツリヌス毒素が検出された（Table 7）。

湖岸土壌およびプランクトン各1検体の培養上清から検出されたC x D型ボツリヌス毒素とは、C型およびD型ボツリヌス抗毒素血清それぞれ1種の



抗毒素血清で中和され、それぞれの抗毒素血清を希釈しても両者を区別することはできなかったボツリヌス毒素であり、マウスの症状がボツリヌス毒素による典型的症状（腹壁陥没、呼吸困難に続く斃死）を示したこと、80℃、30分の加熱によって毒性が失活したことおよびCあるいはD型以外のボツリヌス抗毒素血清では中和されなかったことから、C型とD型の区別ができないボツリヌス毒素とした（Table 8）。なお、これらはマウスの致死時間が一夜以上要した場合に生じたことから、毒素活性が比較的低い場合に起こるものと推定された。

プランクトンの培養上清でマウス致死毒素が高率に認められたが、その多くは毒性が弱く、保存中に毒力が消失した。また、死魚の培養上清からもマウス致死毒素が検出されたが、これらはボツリヌス毒素による典型的症状を示さなかった。

## 2. 琵琶湖南湖におけるボツリヌス菌の分布

琵琶湖南湖の14カ所から175検体の種々の材料を採取し、その培養上清についてボツリヌス毒素の産生の有無を調べた結果、マウス致死毒素は68検体（38.9%）、ボツリヌス毒素は47検体（26.9%）から検出された（Table 9）。

検出されたボツリヌス毒素型は、C型26検体（14.9%）、D型3検体（1.7%）、E型13検体（7.4%）およびC×D型12検体（6.9%）であり、C型の検出頻度がもっとも高かった。一部の検体では1検体からC型とE型

あるいはD型とE型のボツリヌス菌が同時に検出された。

検体別では、北湖の場合と同様に、湖岸土壌からの検出率がもっとも高く（72.1%）、次いでプランクトン（19.2%）、湖岸水（16.7%）、貝類（16.1%）の順であったが、湖底土壌、湖中央水および死魚からボツリヌス毒素は検出されなかった。

湖岸土壌からは、C型、D型、E型およびC x D型のボツリヌス菌が検出されたが、C型の検出率がもっとも高く、採取した5地点すべてから検出されたが、E型は2地点（QおよびN地点）からのみ検出された。プランクトンからは、C型およびC x D型のボツリヌス菌が検出されたが、E型は検出されなかった。貝類からはC型およびE型のボツリヌス菌が検出された。

ボツリヌス菌が検出された湖岸水の水質は、水温28.5 °C、pH 8.8、大腸菌群MPN 54,000であった（Table 6）。

プランクトンからのボツリヌス菌の検出にあたって、培養前に加熱しないものと60 °C、15分の加熱をしたものとの比較した結果、加熱しなかった培養液からはC型2検体、C x D型1検体、60 °C、15分加熱した培養液からはC型2検体のボツリヌス毒素が検出された（Table 7）。

湖岸土壌10検体、湖岸水1検体およびプランクトン1検体の培養上清から検出されたC型とD型の区別不能ボツリヌス毒素についても、北湖の場合と同様、C型およびD型ボツリヌス抗毒素血清それぞれ単味で中和され、それぞれの抗毒素血清を希釈しても両者を区別できなかつたこと、マウス

の症状がボツリヌス毒素による典型的症状を示したこと、80℃、30分の加熱によって毒性が失活したことおよびC型あるいはD型以外のボツリヌス抗毒素血清では中和されなかったことから、C型とD型の区別ができないボツリヌス毒素とした (Table 8)。

死魚の培養上清からは、マウス致死毒素が高率に検出されたが、ボツリヌス毒素による典型的症状 (腹壁陥没、呼吸困難に続く斃死) を示さず、それぞれの4倍希釈液でマウスは生存した。

### 3. ボツリヌス菌の分離成績

種々の検体の培養上清からC、D、EあるいはF型毒素が検出されたので、これらの培養液からボツリヌス菌の分離を試みた。北湖由来土壌3検体 (E型陽性1検体、CとE型陽性2検体)、水2検体 (E型陽性) およびプランクトン2検体 (E型陽性1検体、F型陽性1検体) ならびに南湖由来土壌12検体 (C型陽性9検体、D型陽性1検体、CとE型陽性1検体、DとE型陽性1検体) およびプランクトン2検体 (C型陽性)、計21検体の培養液からボツリヌス菌の分離を試みたが、菌の分離はできなかった。

## IV. 考察

琵琶湖北湖から採取した種々の検体270例中50検体 (18.5%) から、南湖では175例中47検体 (26.9%) の培養上清からボツリヌス毒素が検出され、琵琶湖にはボツリヌス菌が濃厚に分布していることが判明した。しかしな

がら、検出されたボツリヌス毒素型は、両者の湖では大きく異なり、北湖ではE型毒素の検出率がもっとも高く（17.0%）、次いでC型（1.9%）、C×D型、F型の順であったのに対し、南湖ではC型の検出率がもっとも高く（14.9%）、次いでE型（7.4%）、C×D型、D型の順であった。北湖と南湖とは、面積で9:1（55）と大きく異なり、その環境も異なっている。事実、琵琶湖水質調査報告書<sup>60)</sup>によると、北湖と南湖では水質が大きく異なり、富栄養化の程度を示す窒素、リンの量でも南湖では北湖の約2倍の値を示している。両者の湖の環境の違いについては、琵琶湖湖岸水の大腸菌群MPNが北湖では79~540であったのに対し、南湖では1,300~54,000であったことからもうかがえる。したがって、北湖よりも南湖の方がより富栄養化が進んでいる環境にあり、C型菌は富栄養化が進んだ環境に多く分布することが推測された。

ボツリヌス菌の分布について、前章では河川中流よりも河口域の土壤から検出率が高かった理由として、河川からの濃縮も考えられると考察した。しかし、単に河川からの流入による琵琶湖への蓄積という理由ならば、湖岸よりも湖底土壤の方が検出率が高くなるはずである。しかしながら、湖底土壤からの検出率は北湖で20%、南湖では0%、湖底水では北湖、南湖ともに0%であったのに対し、湖岸土壤では北湖82.5%、南湖72.1%、湖岸水では北湖66.7%、南湖16.7%の成績であった。したがって、湖底よりも湖岸の方が著しくボツリヌス菌の検出率が高く、湖岸地域で増殖できる要因

がなければこのような高い検出率は維持できないと考えられた。ボツリヌス菌は嫌気性菌であり、酸素のない環境でしか増殖できない。しかし、水田では、田面水に溶けた酸素が土壌表面の数ミリを通過する間に、そこにいる微生物によって消費されてしまうので、数ミリ以下は酸素のない土壌となっている<sup>61)</sup>といわれるように、湖岸土壌でも十分に増殖できる環境にあると推測される。一方、琵琶湖水の溶存酸素濃度は水深95 mの湖底では表層の40%であり<sup>62)</sup>、湖水や土壌の酸素濃度は湖岸よりも湖底の方がきわめて少ないことが推測される。しかし、表層では水温が季節により5~30℃と大きく変化しているが、水深95 mでは6.5~7.5℃に保たれているという<sup>62)</sup>。このような低い温度はボツリヌス菌の発育にとってはきわめて不都合な条件である。したがって、湖底が湖岸よりも低い水温であることは湖底からはボツリヌス菌の検出率が著しく低かった要因として考えられる。しかしながら、湖底といっても水深に大きな違いがあり、前章で湖岸から10 m~500 m沖の湖底からE型菌が検出されたことを示したように、湖岸近くの湖底ではボツリヌス菌の増殖が起こっている可能性は否定できない。

魚についてのボツリヌス菌の調査として、児玉ら<sup>29)</sup>は八郎潟から採取した生魚では500匹中2匹からE型菌を検出しているにすぎないが、死魚からは12匹中11匹(92%)ときわめて高率にE型菌を検出している。また、Bottら<sup>63)</sup>はMichigan湖のGreen Bayで採取した魚728匹中416匹(57.1%)にE型菌が検出されたこと、斎藤ら<sup>64)</sup>は東京都内の魚市場に入荷した海産

魚228匹中3匹（1.3%）からC型あるいはE型ボツリヌス菌が検出されたことを報告している。1973年に滋賀県で発生したボツリヌス中毒の原因食品はハスずしであった<sup>8)</sup>。このハス（淡水魚）が琵琶湖産であったことから、琵琶湖産のハス78匹について、Hougtbyら<sup>65)</sup>にならって魚のエラと内臓とに分けてボツリヌス菌を調べたが、すべて陰性であった。しかし、エラは一種の濾過作用を持ち、ボツリヌス菌を集菌する濃縮作用がある<sup>63)</sup>といわれるように、ボツリヌス菌などの細菌を検索する試料としては重要である。死魚についても、北湖の7匹、南湖の26匹について調査したがすべて陰性であった。しかし、死魚についてはマウス致死毒性を示した頻度が南湖由来では61.5%と高く、4倍希釈でこれらの活性は消失したものの、ボツリヌス毒素が含まれていた可能性は否定できないので、死魚からのボツリヌス菌の検出方法については今後検討する必要があると考えている。

ハスの摂食行動として、幼魚期には動物プランクトンを取り、成魚になると動物プランクトンを摂食する小アユやエビを食べる<sup>66)</sup>とされている。このように、魚の餌となっているプランクトンやエビについてボツリヌス菌を調査することは重要と考えた。琵琶湖の北湖5地点、南湖4地点を対象にプランクトンについて調査したところ、北湖からはEおよびF型菌、南湖からはC型菌が検出された。北湖でも南湖でも検出地点には偏りが認められ、陽性地点は他と比べて水質の汚染度が高く<sup>60)</sup>、富栄養化が進んでいる地点と考えられる。したがって、大きく南湖と北湖とを比べると南湖の

方が富栄養化が進んでいるが、北湖の中でも富栄養化の地域が部分的に異なっており、プランクトンの調査成績からもボツリヌス菌の生態と富栄養化とは関連性のあることがうかがえた。また、エビや貝類からもE型菌が検出されたことは、これらが佃煮やその他の加工食品として利用されていることから、ボツリヌス中毒予防の基礎資料として重要視していく必要がある。

プランクトンからのボツリヌス菌の検索に際し、培養前の試料の加熱処理を無処理と60℃で15分加熱した方法とを併用したところ、ボツリヌス菌が検出された検体は非加熱の培養液でわずかに多く検出されたが、どちらが効果的であったかについては不明である。しかし、両者の培養方法を併用することはボツリヌス菌の検出率を高めるものと考えられる。一方、プランクトンの培養上清中にマウス致死毒素活性が認められたものでも、中和試験の際に毒力が失活する例が多く認められたことから、プランクトンや死魚の検体については、ボツリヌス菌の検出方法についてさらに検討することが必要であると考えている。

## V. 小括

1. 北湖12カ所から270例および南湖14カ所から175例の種々の検体を採取し、ボツリヌス菌の分布を調べたところ、北湖ではその18.5%、南湖ではその26.9%がボツリヌス菌陽性であり、琵琶湖にはボツリヌス菌が濃厚に

分布していることが判明した。

2. ボツリヌス菌の型別を行った結果、北湖ではE型（17.0%）の検出率  
がもっとも高く、次いでC型（1.9%）、C x D型（0.7%）およびF型  
（0.4%）であったのに対し、南湖ではC型（14.9%）の検出率ももっとも  
高く、次いでE型（7.4%）、C x D型（6.9%）およびD型（1.7%）の順  
であり、北湖と南湖とでは分布している菌型が大きく異なっていた。また、  
富栄養化が進んでいる南湖でC型の検出率が高かったことから、水質の富  
栄養化とボツリヌス菌の分布とは関連性があると考えられた。

3. 検体の種類別では、湖岸土壌、湖岸水、プランクトン、貝類、湖底土  
壌およびエビ類にボツリヌス菌陽性検体が認められ、北湖、南湖を問わず  
湖岸土壌からの検出率ももっとも高く、北湖ではその82.5%、南湖ではそ  
の72.1%がボツリヌス菌陽性であった。この成績から、湖岸地域にはボツ  
リヌス菌が増殖できる要因があるもの推定した。

4. プランクトンからのボツリヌス菌の検出に際し、培養前加熱をしない  
ものと60℃、15分加熱したものとを比較したところ、どちらが効果的か  
については不明であったが、両者を併用すれば検出率がより高くなること  
が判明した。



- A:Chinai beach
- B:Chinai harbor
- C:Makino camping place
- D:Shirahige shrine
- E:Oumimaiko swimming beach
- F:Off Imazu harbor
- G:Off Imazu harbor-Nagahama harbor
- H:Off the mouth of River Ane
- I:Off Nagahama harbor
- J:Off the mouth of River Echi
- K:River Ado-Hikone
- L:Off the mouth of River Ado
- M:Near Hotel Izutsu
- N:Karasaki
- O:Yanagasaki swimming beach
- P:Hamaohtsu harbor
- Q:Zeze Park
- R:Off Karasaki
- S:Karasaki-River Isasa
- T:Off the mouth of River Isasa
- U:Off Hamaohtsu
- V:Off the mouth of River Sagami
- W:Off Sugie harbor
- X:Karahashi
- Y:Yamada harbor
- Z:Katata harbor

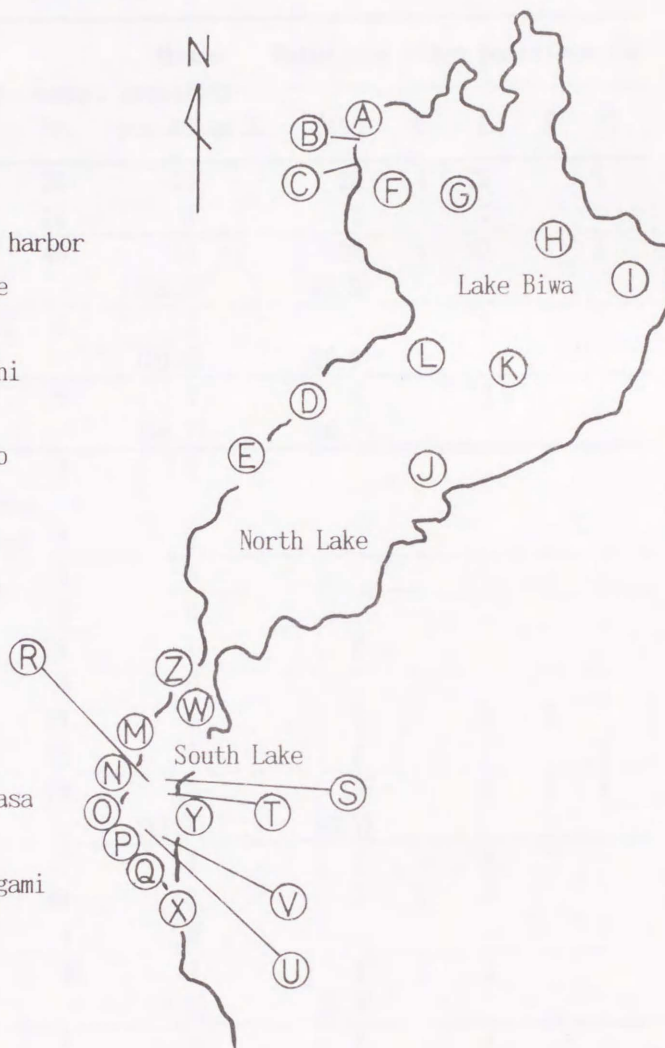


Fig. 6. Sampling spots in Lake Biwa for surveillance of Clostridium botulinum

Table 5. Incidence of *Clostridium botulinum* in the northern part of Lake Biwa

Sample	Sampling date	Sampling spot	Sample No.	Mouse lethality-positives (%)	Botulinum toxin positives (%)				
					Total	C	E	F	UT
Shore soil	1978. 10	B.C.D	30	26	26	4	25		1
	1987. 1	A.E	10	8	7		7		
	Total		40	34 (85.0)	33 (82.5)	4	32		1
Bottom mud	1981. 9	F.I.J.K.L	5	1 (20.0)	1 (20.0)		1		
Shore water	1978. 10	B.C.D	6	4 (66.7)	4 (66.7)		4		
Off-shore water	1980. 9	G.I (Surface)	3	0					
	1981. 5	G (Bottom)	2	0					
	Total		5	0					
Plankton	1975. 12	F	5	0					
		G	21	1	0				
		H	4	0					
		I	19	6	4		3	1	
	1977. 9	J	12	1	1				1
Total		75	13 (17.3)	5 (6.7)		3	1	1	
Crustaceans	1979. 5	A	1	1	1		1		
	1980. 5	A	40	3	2	1	1		
	1981. 9	B	4	0					
Total		45	4 (8.9)	3 (6.7)	1	2			
Shell-fish	1981. 9	B	9	4 (44.4)	4 (44.4)		4		
Live fish	1975. 7	A	48	0					
	1978. 6	A	30	0					
Total			78	0					
Dead fish	1980. 5	A.B.E	7	2	0				
Grand Total			270	62 (23.0)	50 (18.5)	5 (1.9)	46 (17.0)	1 (0.4)	2 (0.7)

UT: Indistinguishable between types C and D.

Table 6. Incidence of Clostridium botulinum in the lake-shore water and water quality

Sampling spot	Sample No.	Sample volume (ml)	Mouse lethal toxicity	Botulinum toxin type	Water temp (°C)	pH	MPN of coliform
B	1	290	+	E	19.5	8.0	400
	2	290	+	E	20.5	8.1	220
	3	430	+	E	19.0	8.1	220
	4	165	-		20.5	8.6	230
-----							
C	5	190	-		19.5	7.5	79
-----							
D	6	390	+	E	19.0	7.3	540
-----							
M	7	250	-		26.0	7.8	7,900
	8	170	-		26.5	7.7	3,300
-----							
O	9	275	-		28.5	8.3	35,000
	10	220	+	UT	28.5	8.8	54,000
-----							
Q	11	260	-		28.0	9.2	1,700
	12	440	-		27.5	8.9	1,300

UT: Indistinguishable between types C and D.

Table 7. Incidence of Clostridium botulinum in plankton samples with or without pretreatment

Heat-treatment before inoculation	Sampling place	Sample No.	Mouse lethality-positives (%)	Botulinum toxin positives					
				Total	C	D	E	F	UT
Nontreated	Northern part	75	8 (10.7)	3			2	1	
	Southern part	26	6 (23.1)	3	2				1
-----									
60°C, 15 min	Northern part	75	5 (6.7)	2			1		1
	Southern part	26	2 (7.7)	2	2				

UT: Indistinguishable between types C and D.

Table 8. Examples of untypable Clostridium botulinum

Mouse lethality after botulinum antitoxin treatment											
Antitoxin	A			B		C		D		E	F
Antitoxin concentration (IU/ml)	4	4	4	0.4	0.04	40	4	0.4	4	4	
Dose injected per mouse (IU)	1	1	1	0.1	0.01	10	1	0.1	1	1	
Outcome of the mouse	D	D	S	D	D	S	D	D	D	D	
	D	D	S	S	D	S	S	D	D	D	

D : Died, S : Survived

Table 9. Incidence of *Clostridium botulinum* in the southern part of Lake Biwa

Sample	Sampling date	Sampling spot	Sample No.	lethality-positives (%)	Botulinum toxin positives (%)				
					Total	C	D	E	UT
Shore soil	1977. 10	P	3	2	2	1	1		1
	1978. 5	M	10	9	9	8			1
	"	O	10	6	6	1			5
	"	Q	10	7	7	4	1	3	3
	1987. 1	Q	5	5	5	4	1	2	
	"	N	5	2	2	1		1	
	Total		43	31 (72.1)	31 (72.1)	19	3	6	10
Bottom mud	1981. 9	R.S.T.U.V	5	0					
Shore water	1978. 5	M.O.Q	6	1 (16.7)	1 (16.7)				1
Off-shore water	1980. 9	R.S.T.W (Surface)	5	0					
	1981. 5	S (Bottom)	2	0					
Plankton	1977. 9	S	8	0					
	"	U	3	1	0				
	1978. 5	W	8	6	4	3			1
		X	7	1	1	1			
	Total		26	8 (30.8)	5 (19.2)	4			1
Crustaceans	1980. 5	Q	40	8	8	2		6	
	1980. 8	Q	20	3	1	1			
	1981. 7	Y	1	1	1			1	
	1982. 3	Z	1	0					
	Total		62	12 (19.4)	10 (16.1)	3		7	
Dead fish	1978. 5	M.Q.Y	26	16 (61.5)	0				
	1982. 3								
Grand Total			175	68 (38.9)	47 (26.9)	26 (14.9)	3 (1.7)	13 (7.4)	12 (6.9)

UT: Indistinguishable between types C and D.

### 第3章 琵琶湖におけるボツリヌス菌の季節別の生態

#### I. 緒言

第2章で述べたように、琵琶湖にはC、D、EおよびF型ボツリヌス菌が分布しており、とくに北湖ではE型、南湖ではC型の検出率が高く、同一の湖であっても北湖と南湖とではこれらボツリヌス菌の生態が異なっていることが判明した。しかし、これらの差が調査時期の違いによる差であるかも知れないと考えられたので、この点を明らかにするために、これまでにボツリヌス菌が検出された琵琶湖の4地点を対象に、季節別の検出状況について検討した。

土壌などの環境材料からボツリヌス菌を検出する手段としては、一般に増菌培養液からボツリヌス毒素を検出する方法が用いられている<sup>67)</sup>。小野ら<sup>25)</sup>は30℃、2日間の増菌培養液からE型毒素を証明する方法を推奨し、阪口<sup>67)</sup>も同じくすべての型のボツリヌス毒素を検出するには30℃の培養が望ましいと報告しており、多くの研究者も同様な方法を用いている。事実、第2章で示したように、30℃で7日間の培養によって、C、D、EおよびF型のボツリヌス毒素を証明できた。しかし、過去に山県<sup>41)</sup>は35℃で5日、小林<sup>34)</sup>は37℃で5日の培養によってそれぞれE型菌を証明している。一方、Notermansら<sup>68)</sup>は、C型菌が存在する土壌では20℃あるいは30℃培養では検出されず、37℃で培養するとその他の培養温度で検出されたA、

BあるいはE型菌は検出されなくなり、一方、E型菌が存在する土壌では30℃より低い温度で培養するとC型菌は検出されなくなると報告した。また、30℃と37℃の培養温度を併用するとボツリヌス菌の検出率が高くなるとも述べている。琵琶湖ではC型もE型も分布しているので、今回の機会に30℃と37℃培養を併用して培養温度およびその時間別のボツリヌス菌の検出状況についても検討した。

## II. 材料および方法

### 1. 検体の採取場所

1980年5月から1982年2月の間に、以前の調査でC型あるいはE型ボツリヌス菌が検出された琵琶湖の北湖の湖岸2地点（A：高島郡マキノ町知内の知内浜、B：坂田郡米原町の天野川河口右岸）と南湖の湖岸2地点（C：大津市の膳所公園、D：草津市の山田港）のそれぞれ波打ち際を定点として検体の採取を行った（Fig.7）。

1980年5月30日、8月27日、11月25日および1981年2月27日には西岸の2地点（AおよびC地点）から、1981年5月21日、8月25日、11月16日および1982年2月15日には東岸の2地点（BおよびD地点）から、それぞれ1回に土壌10検体および湖水4検体を採取した。土壌については20 m間隔に、湖水については40～60 m間隔に採取した。

### 2. 検体の採取方法



土壌および湖水の採取方法は、第1章に記載した方法に従い、湖水は採取直後培養し、土壌は培養するまで室温で保存した。

### 3. ボツリヌス菌の検出方法

1) 土壌の培養方法：第2章と同様、土壌50 mlに等量の滅菌生理食塩水を加えて、十分振盪し、約10分間静置後その上清を10,000 rpmで30分間遠沈した。その沈渣に滅菌生理食塩水2 mlを加え、1 mlずつ2本の肝片加肝臓ブイヨン（12 ml）の底部に接種し、60 °C、15分間の加熱後、一方を30 °C、他方を37 °Cで、いずれも7日間培養した。

2) 湖水の培養方法：第1章と同様の方法によって、採取後直ちに培養した。濾過用のメンブランフィルターは、ミリポア製、径47 mm、0.22 μmを使用し、フィルターが目詰まりするまで吸引濾過後半分に分け、それぞれ細切後肝片加肝臓ブイヨン（12 ml）に接種した。いずれも60 °C、15分間加熱後、土壌と同様の方法で培養した。

3) 毒性試験およびボツリヌス毒素の検出方法：土壌および湖水について、30 °Cおよび37 °C培養とも、培養4日目と7日目の培養上清中のマウス致死毒性とボツリヌス毒素の有無について第2章に記載の方法によって調べた。培養4日目については、試験管の底部を駒込ピペットで緩やかに混合した培養液の2 mlを採取し、7日目には培養液全体を混合し、それぞれ試料とした。ボツリヌス抗毒素血清との中和試験については、最初E型を用い、E型のみで中和されなかった場合、C型、D型、C型およびE型の混合あるいは

C型、D型およびE型の混合血清を用いて中和試験を行った。C型とD型との区別については第2章に記載した方法によって行い、C型とD型との区別不能のボツリヌス毒素についてはC x D型ボツリヌス毒素と表現した。また、C型およびD型のそれぞれ単独のボツリヌス抗毒素血清のみで中和されなかった場合、C型とD型の同時検出とした。

#### 4. 水質試験

湖水について、第1章に記載した方法により、水温、pHおよび大腸菌群MPNを調べた。

### Ⅲ. 成績

#### 1. 琵琶湖北湖の定点におけるボツリヌス菌の季節別分布

西岸の定点（A）および東岸の定点（B）の土壌および湖水の成績をTable 10に、湖水の水質試験の成績については採取地ごとにTable 11およびTable 12に示す。

1) 土壌の成績：A地点では5月には8検体（80%）の培養上清からボツリヌス毒素が検出され、毒素型はC型1検体（10%）、E型7検体（70%）、8、11および2月にはいずれも5検体（50%）から検出され、毒素型はすべてE型であった。B地点では5月に8検体（80%）から検出され、毒素型はC型4検体（40%）およびE型8検体（80%）であり、4検体からはC型とE型が同時に検出された。8月の5検体（50%）と11月の9検体（90%）はいずれ

も E 型であったが、2月の8検体（80％）の毒素型は C 型2検体（20％）、D 型1検体（10％）、E 型8検体（80％）であり、1検体からは C 型と E 型、別の1検体からは C 型、D 型および E 型が同時に検出された。

2) 湖水の成績：A 地点では11月には1検体（25％）、2月には2検体（50％）から、B 地点では5月に1検体（25％）、11月に2検体からボツリヌス毒素が検出され、毒素型はいずれも E 型であった。A 地点では5月および8月、B 地点では8月および2月にはボツリヌス毒素は検出されなかった。

E 型菌が検出された湖水を採取した付近の土壌からは、採取時期に拘らず A、B 地点ともすべて E 型菌が検出された。また、土壌と湖水からの検出菌型の成績から、湖水からの検出菌型はほぼ土壌中の菌型を反映して同じ型のものが検出される傾向があった。

A 地点から採取した湖水は、Table 11に示すように、pHは春期から夏期にかけて高く冬期にかけて低くなり、大腸菌群MPNは水温と平行して出現が変動した。E 型菌は11月および2月の湖水から検出されたが、これらの検体はボツリヌス菌陰性の検体と比べて大腸菌群MPNが33～79とやや少なかった。

B 地点の湖水の水質はTable 12に示すような成績が得られた。pHは春期から夏期には高く冬期にかけて低くなり、大腸菌群MPNも同様の傾向がみられた。E 型菌は、5月および11月の湖水から検出されたが、陰性の検体と比べてとくに特徴は認められなかった。

## 2. 琵琶湖南湖の定点におけるボツリヌス菌の季節別分布

西岸の定点地（C）と東岸の定点地（D）の土壌および湖水の成績を Table 13に、湖水の水質試験の成績については採取地ごとに Table 14および Table 15に示す。

1) 土壌の成績：C地点では5月と8月にはそれぞれ供試数の60%、11月には80%がボツリヌス毒素陽性で、毒素型はいずれもE型であった。2月には90%（9検体）が陽性で、毒素型別の陽性検体数はC型4、E型9およびC×D型1で、4検体からはC型とE型、別の1検体からはC×D型とE型が同時に検出された。D地点では5月には50%が陽性で、毒素型はすべてE型であった。8月には80%（8検体）が陽性で、毒素型別の陽性検体数はC型1およびE型8であり、1検体からはC型とE型が同時に検出された。11月には80%（8検体）が陽性で、毒素型別の陽性検体数はC型6およびE型6であり、4検体からはC型とE型が同時に検出された。2月には90%と陽性率が高く、毒素型別の陽性検体数はC型9およびE型5であり、5検体からはC型とE型が同時に検出された。

2) 湖水の成績：C地点では5月には50%、8月には25%がボツリヌス毒素陽性で、毒素型はすべてE型であった。11月と2月はいずれもすべて（4検体）が陽性で、毒素型別の陽性検体数は11月がD型1とE型3、2月ではすべてE型であった。D地点では5月に75%（3検体）が陽性で、毒素型別の陽性検体数はC型1とE型2であった。8月には1検体からE型が検出された。

11月には75%（3検体）が陽性で、毒素型別の陽性検体数はC型2およびE型2であり、1検体からはC型とE型が同時に検出された。2月には2検体からC型が検出された。

C地点のD型菌が検出された湖水を採取した付近の土壌からはD型菌は検出されなかったが、E型毒素が検出された湖水を採取した付近の土壌からは採取時期に拘らずいずれもE型菌が検出された。D地点のC型菌が検出された湖水を採取した付近の土壌からは必ずしもC型菌は検出されなかった（5月に湖水では陽性であったが、土壌では陰性）が、E型菌が検出された付近の土壌からは採取時期に拘らずすべてE型菌が検出された。また、北湖と同様に、湖水からの検出菌型はほぼ土壌中の状況を反映するような傾向がみられた。

C地点の湖水の水質はTable 14に示すような水温、pHおよび大腸菌群数を示した。全般的に、pHは夏期と冬期とでは著しい変化はみられなかったが、大腸菌群MPNは北湖と同様の傾向が認められた。D型あるいはE型菌が陽性であった湖水は、5月では陰性であった湖水と比べて大腸菌群MPNがやや少なかった（MPN 2,100~2,400）が、その他の時期ではその様な特徴は認められなかった。

D地点の湖水の水温、pHおよび大腸菌群数の成績はTable 15に示すとおりである。pHおよび大腸菌群MPNの季節変動はC地点と同様の傾向が認められた。C型あるいはE型菌が検出された湖水は、水温7.8~24.8℃、pH

7.2～8.8、大腸菌群MPNは33～54,000と様々の成績を示した。C型あるいはE型菌が陽性であった湖水は、陰性の検体と比べてその水温、pHおよび大腸菌群MPNにとくに特徴は認められなかった。

### 3. ボツリヌス菌の検出に及ぼす培養温度と日数の影響

30℃で4日間と7日間ならびに37℃で4日間と7日間培養した後の培養上清からのボツリヌス毒素の検出状況を、検出パターンごとに分けてTable 16に示す。

以上の4者の組合せによって得られた培養上清からのボツリヌス毒素の検出パターン数は、ボツリヌス菌陰性も含めて26群となった。

E型毒素は、30℃培養4日間および7日間培養とも検出された群（検出群No.1：土壌57検体、湖水11検体）がもっとも多かった。しかし、30℃培養でも37℃培養でも検出された群（検出群No.2、5、15および25）あるいは30℃培養では検出されず、37℃培養に限って検出された群（検出群No.6および20：土壌合計9検体）も認められた。

C型毒素は、30℃培養に限ってE型とともに検出された群（検出群No.3：土壌7検体）がもっとも多かった。しかし、30℃培養に限って単独で検出された群（検出群No.11、12および16）、37℃培養に限って検出された群（検出群No.7、13および17）あるいは30℃でも37℃培養でも検出された群（検出群No.9および10）も認められた。

C型とE型毒素が検出された場合には、30℃培養でE型が検出されても

37℃培養ではE型毒素が検出されなくなった群（検出群No.7、9、17：合計土壌7検体）が多かったが、37℃培養でもE型毒素が検出された群（検出群No.15）も認められた（土壌2検体）。

D型毒素は、30℃培養に限って認められた（検出群No.18、19）。

#### IV. 考察

第2章では琵琶湖の土壌、水、プランクトン、貝類およびエビ類にはボツリヌス菌が分布し、C型菌およびE型菌は高率に検出されることを述べた。しかし、調査時期がまちまちであったことから季節の違いによってボツリヌス菌の検出率および検出菌型が変動するかどうかについて検討した。

E型菌は、琵琶湖の北湖あるいは南湖の地点（4地点）に関係なく土壌から検出され、地点によっては検出率が夏期よりも冬期に高くなったり、冬期よりも夏期に高くなったりしたが、地点あるいは調査時期を問わずE型菌が50%以上から検出されたことから、季節別による変動はとくにみられず、琵琶湖の湖岸土壌（波打ち際）では四季を問わずE型菌が濃厚に分布していることが判明した。

C型菌もE型菌と同様に、北湖あるいは南湖の地点に関係なく土壌から検出されたが、北湖の2地点では8月および11月の検体からはC型菌はまったく検出されなかったが、2月には東岸の20%、5月には西岸の10%、東岸の40%の土壌から検出された。また、南湖では5月にC型菌はまったく検出

されなかったが、西岸では2月に40%、東岸では8月に10%、11月に60%、2月に90%の土壌から検出された。Segnerら<sup>69)</sup>はC型菌の発育には海域由来では15.6℃以上、内陸地由来では12.8℃以上の温度が必要であると報告している。地点によってはC型菌が発育できない2月の低い水温の時期、あるいは水温が低くなる時期に向かっているにも拘らず、C型菌の検出頻度が高くなったことは、秋から冬にかけてシベリアから琵琶湖に飛来する渡り鳥<sup>70, 71)</sup>の影響が関係し、とくに水鳥(野鳥)がC型菌の運搬あるいは増殖に大きく影響を及ぼしていることも考えられた。

E型菌が検出された湖水を採取した付近の土壌検体すべてからE型菌が検出されたが、C型菌あるいはD型菌が検出された湖水付近の土壌からは必ずしもこれらの菌型のボツリヌス菌は検出されなかった。したがって、湖水のボツリヌス菌の調査成績からもE型菌とC型菌の生態は異なることが推測された。しかし、同地点および同時期のボツリヌス菌の検出成績を総合すると、湖岸の水のボツリヌス菌分布を調べることによって、湖岸土壌中のボツリヌス菌の分布を概ね知ることができるといえる。また、湖岸水からC型、D型およびE型菌が高率に検出されたことは、これらのボツリヌス菌が琵琶湖の還流<sup>56)</sup>によって琵琶湖の各地に拡散し、また琵琶湖からの流出水によって瀬田川を経て淀川、大阪湾に運搬されているとも考えられる。事実、淀川の土壌にはC、DおよびE型ボツリヌス菌の分布が明らかにされている<sup>40)</sup>。したがって、湖や河川の流水は、ボツリヌス菌を遠



方まで運搬し、汚染を拡大する役割を担っているといえる。

前章と同様に、水についてボツリヌス菌の検索とともに水温、pHおよび大腸菌群MPNについても調べたが、ボツリヌス菌の分布とこれらの成績とはとくに関係があるとは考えられなかった。しかし、時期によって北湖ではpHおよび大腸菌群MPNが大きく変動し、南湖でも大腸菌群MPNは大きく変動した。pHや大腸菌群MPNには水温が大きく影響し、その結果、プランクトンの異常発生である赤潮の発生<sup>72,73)</sup>につながっている。自然界におけるボツリヌス菌の発育にとっても気温や水温は重要な要因である。E型菌の最低発育温度は3.3℃と報告されている<sup>74)</sup>ことから、温度に関しては時期を問わずE型菌が土壌や水から検出されたことに不思議はない。また、神沢ら<sup>24)</sup>はフナにE型菌を接種し、餌を与えて数週間飼育し、室温に放置したところ、内臓、筋肉などに毒素産生が認められたという。したがって、琵琶湖においては、四季を問わずE型菌が高率に分布する理由としては、E型菌が発育できるような温度や栄養源などの要因が関与していると考えられる。

土壌からのボツリヌス菌の検索に際し、これまで北海道衛研<sup>24,25,27)</sup>の方法に準じた方法をとってきた。すなわち、土壌と等量の滅菌生理食塩水とを混合し、上清を遠心分離後、沈渣を毒素産生用培地に接種して30℃で7日間培養し、培養液からボツリヌス毒素が検出された場合、ボツリヌス菌陽性とする方法である。わが国でも多くの研究者が同様の方法でボツリヌ

ス菌の検索を行っているが、毒素産生用培地、培養温度ならびにその期間が異なっている。北海道衛研<sup>24, 25, 27)</sup>ではカレイブイヨンあるいは肝片加肝臓ブイヨンを用いて、培養前処理を60℃で1時間加熱後25~27℃で10日間培養する方法、青森衛研<sup>31)</sup>では培養前60℃で20分間加熱後、30℃で6日間培養する方法、山口衛研の山県<sup>41)</sup>は肝片加肝臓ブイヨンや市販のクックドミート培地で35℃で5日間培養する方法、北里研究所の小林<sup>34)</sup>は肝片加肝臓ブイヨンに接種後60℃で30分間加熱後37℃で5日間培養する方法によって、それぞれ土壌の培養液からE型ボツリヌス毒素を検出している。オランダのNotermansら<sup>68)</sup>はC型とE型が分布している土壌からの本菌の検索にあたり、C型が存在する土壌では20℃あるいは30℃培養では検出されず、37℃で培養するとC型は検出されたがその他の培養温度で検出されたA、BあるいはE型菌は検出されなくなり、一方、E型が存在する土壌では、30℃より低い温度で培養するとC型菌は検出されなくなると報告した。また、30℃および37℃の培養温度を併用するとボツリヌス菌の検出率が高くなるとも述べている。今回、これまで日本で行われてきた培養方法とNotermansら<sup>68)</sup>の報告を基に、土壌抽出液や水を濾過したメンブランフィルターを肝片加肝臓ブイヨンに接種し、60℃で15分間加熱後、30℃で4日間あるいは7日間、また、37℃で4日間あるいは7日間培養した場合におけるそれぞれのボツリヌス菌の検出頻度を比較した。その結果、E型菌は30℃培養で検出される頻度がもっとも高く、E型菌の発育至適温

度は約30℃であるという<sup>1)</sup> これまでの知見を反映していたが、37℃での培養に限って検出された検体もわずかながら認められたことから、E型菌も菌株によっては種々の発育至適温度を有している可能性があると考えられた。また、C型菌についても同様に、30℃培養で検出される検体が多かったが、37℃培養に限って検出される検体も認められたことから、C型菌についても種々の発育至適温度を有している菌株があることが示唆された。

Hyun & Sakaguchi<sup>75)</sup> は種々の由来のC型菌の発育至適温度を調べたところ、発育至適温度は4群に分けられ、42℃がもっとも多かったが、37℃あるいは30℃が至適温度の菌株も認められたという。Notermansら<sup>68)</sup> のように、30℃培養ではC型菌とともにE型菌も同時に検出されたにもかかわらず、37℃培養ではE型菌は検出されなくなったものが認められたが、逆に、37℃培養ではC型菌が陰性となった場合も認められた。このようなことは、前述したようにC型菌の発育至適温度が種々あることから推測できるが、Smith<sup>76)</sup> の指摘のように、土壌中に混在するウェルシュ菌はボツリヌス菌の菌株によってはその発育と毒素産生を阻害することが報告されていることから、このような混在する菌種の影響が起こっていた可能性も考えられる。しかし、Notermansら<sup>68)</sup> の報告のように、30℃および37℃の培養温度を併用するとボツリヌス菌の検出率が高くなり、種々の材料からボツリヌス菌を検索する場合に有効であることが示唆された。

## V. 小括

1. E型菌は琵琶湖の北湖や南湖の地点、時期に関係なく、土壌から50%以上に検出されたことから、季節別にとくに特異な変動を示しているとは考えられず、琵琶湖の湖岸土壌（水際）では四季を問わず高率にE型菌の検出されることが判明した。
2. C型菌もE型菌と同様に北湖あるいは南湖の地点に関係なく土壌から検出されたが、北湖の2地点では、2月には東岸の20%、5月には西岸の10%、東岸の40%の土壌から検出され、南湖では西岸で2月に40%、東岸で8月に10%、11月に60%、2月に90%の土壌から検出された。C型菌が発育できなくなる2月の低い水温の時期に向かって、土壌からの検出率が高くなったことは、琵琶湖に飛来する渡り鳥の増減する時期と関係し、水鳥（野鳥）がC型菌の運搬あるいは増殖に大きく影響を及ぼしていることが推測された。
3. E型菌が検出された湖水を採取した付近の土壌からは、すべてE型菌が検出されたが、C型あるいはD型が検出された湖水付近の土壌からは必ずしもこれらの菌型のボツリヌス菌は検出されなかったことから、E型菌とC型菌の生態は異なるものと考えられた。
4. 湖岸水からC、DおよびE型菌が高率に検出されたことから、湖水の流れがボツリヌス菌の運搬、拡散に大きな役割りを担っていることが示唆された。
5. 湖水と土壌検体の同地点および同時期におけるボツリヌス菌の検出成

績から、湖岸水のボツリヌス菌の分布を調べることによって湖岸土壌中のボツリヌス菌の分布を概ね知ることができることが判明した。

6. 湖岸水についてボツリヌス菌の分布とともに水温、pHおよび大腸菌群数についても調べたが、ボツリヌス菌の分布とこれらの成績とはとくに関係がみられなかった。

7. E型菌は30℃培養における検出率をもっとも高く、E型菌の発育至適温度は30℃であるという知見を反映していたが、37℃での培養に限って検出された検体もわずかながら認められたことから、E型菌でも種々の発育至適温度を有している菌株があることが示唆された。また、C型菌についても同様に、30℃培養で検出される検体が多かったが、37℃培養に限って検出される検体も認められたことから、C型菌についてもE型菌と同様に種々の発育至適温度を有している菌株があることが判明した。

8. 30℃および37℃の培養温度を併用したところ、土壌や水からのボツリヌス菌の検出率が高くなったことから、ボツリヌス菌の検索にあたって異なる培養温度を併用することが、ボツリヌス菌の検出率を高めるために有効であることが示された。



Fig. 7. Sampling spots in Lake Biwa for surveillance of Clostridium botulinum

Table 10. Incidence of Clostridium botulinum by the season of the year at fixed spots in the northern part of Lake Biwa

Specimen	Spot No.	Sample No.	May		August		November		February	
			Posi- tive No. (%)	Toxin type (No.)	Posi- tive No. (%)	Toxin type (No.)	Posi- tive No. (%)	Toxin type (No.)	Posi- tive No. (%)	Toxin type (No.)
Soil	A*	10	8 (80)	C (1)	5 (50)		5 (50)		5 (50)	
				E (7)		E (5)		E (5)		E (5)
Soil	B**	10	8 (80)	C (4)	5 (50)		9 (90)		8 (80)	C (2)
				E (8)		E (5)		E (9)		E (8)
Lake water	A	4	0		0		1 (25)	E (1)	2 (50)	E (2)
Lake water	B	4	1 (25)	E (1)	0		2 (50)	E (2)	0	

\* Sampled during May, 1980 through February, 1981 at Chinai Beach.

\*\* Sampled during May, 1981 through February, 1982 at the right side of the mouth of River Amano.

Table 11. Quality of water and incidence of Clostridium botulinum at spot A  
(Chinai Beach) of Lake Biwa

Sampling date	Spot No.	Data by test item			
		Water temp (°C)	pH	Coliform MPN	Botulinum toxin (type)
May 30, 1980	1	18.5	7.3	920	—
	2	18.0	7.3	2,400	—
	3	18.0	6.5	350	—
	4	18.0	6.7	350	—
August 27	1	21.0	7.6	11,000	—
	2	22.0	7.4	4,900	—
	3	27.0	8.0	17,000	—
	4	27.0	8.1	7,900	—
November 25	1	13.5	7.3	540	—
	2	13.2	7.3	2,400	—
	3	15.2	7.1	79	+ (E)
	4	15.2	7.1	70	—
February 27, 1981	1	11.2	6.7	49	—
	2	8.8	6.7	170	—
	3	10.5	6.7	33	+ (E)
	4	9.5	6.7	49	+ (E)



Table 12. Quality of water and incidence of Clostridium botulinum at spot B  
(the rightside of the mouth River Amano) of Lake Biwa

Sampling date	Spot No.	Data by test item			
		Water temp (°C)	pH	Coliform MPN	Botulinum toxin (type)
May 21, 1981	1	20.2	9.2	350	+ (E)
	2	20.2	9.1	49	-
	3	19.5	9.1	49	-
	4	21.0	9.1	140	-
August 25	1	28.5	9.8	240	-
	2	28.5	9.8	540	-
	3	27.8	9.2	1,200	-
	4	27.0	9.3	210	-
November 16	1	12.5	7.7	1,600	-
	2	12.5	7.6	170	-
	3	13.5	7.6	220	+ (E)
	4	13.0	8.1	1,600	+ (E)
February 15, 1982	1	6.8	6.8	540	-
	2	6.6	6.8	920	-
	3	6.5	7.1	49	-
	4	6.5	7.1	79	-

Table 13. Incidence of Clostridium botulinum by the season of the year at fixed spots in the southern part of Lake Biwa

Specimen	Spot No.	Sample No.	May		August		November		February	
			Positive No. (%)	Toxin type (No.)	Positive No. (%)	Toxin type (No.)	Positive No. (%)	Toxin type (No.)	Positive No. (%)	Toxin type (No.)
	C*	10	6 (60)		6 (60)		8 (80)		9 (90)	C (4)
				E (6)		E (6)		E (8)		E (9)
										UT*** (1)
Soil	D**	10	5 (50)		8 (80)	C (1)	8 (80)	C (6)	9 (90)	C (9)
				E (5)		E (8)		E (6)		E (5)
Lake water	C	4	2 (50)		1 (25)		4 (100)	D (1)	4 (100)	
				E (2)		E (1)		E (3)		E (4)
	D	4	3 (75)	C (1)	1 (25)		3 (75)	C (2)	2 (50)	C (2)
				E (2)		E (1)		E (2)		

\* Sampled during May, 1980 through February, 1981 at Zeze Park.

\*\* Sampled during May, 1981 through February, 1982 at Yamada harbor.

\*\*\* Type C or D was not identifiable.

Table 14. Quality of water and incidence of Clostridium botulinum at spot C  
(Zeze Park) of Lake Biwa

Sampling date	Spot No.	Data by test item			
		Water temp (°C)	pH	Coliform MPN	Botulinum toxin (type)
May 30, 1980	1	21.0	7.2	2,400	+ (E)
	2	22.0	8.4	2,100	+ (E)
	3	22.0	7.9	7,900	-
	4	22.5	7.6	4,900	-
August 27	1	27.5	7.0	170,000	+ (E)
	2	28.0	7.3	22,000	-
	3	27.5	7.4	54,000	-
	4	28.5	7.3	35,000	-
November 25	1	13.2	7.1	1,300	+ (E)
	2	13.2	7.1	2,200	+ (E)
	3	13.2	7.6	1,700	+ (E)
	4	13.2	7.5	1,400	+ (D)
February 27, 1981	1	3.8	7.3	22,000	+ (E)
	2	4.2	7.1	700	+ (E)
	3	4.5	6.8	700	+ (E)
	4	5.0	7.2	2,800	+ (E)

Table 15. Quality of water and incidence of Clostridium botulinum at spot D  
(Yamada harbor) of Lake Biwa

Sampling date	Spot No.	Data by test item			
		Water temp (°C)	pH	Coliform MPN	Botulinum toxin (type)
May 21, 1981	1	18.5	7.5	5,400	+ (E)
	2	17.5	7.8	5,400	+ (C)
	3	17.8	8.1	1,100	-
	4	17.8	8.1	790	+ (E)
August 25	1	24.5	7.3	17,000	-
	2	24.8	7.2	54,000	+ (E)
	3	26.5	7.2	17,000	-
	4	27.0	7.6	70,000	-
November 16	1	12.5	6.8	9,200	-
	2	12.5	7.5	1,100	+ (C, E)
	3	12.2	7.7	950	+ (E)
	4	12.2	7.9	920	+ (C)
February 15, 1982	1	6.2	8.1	5,400	-
	2	6.2	8.2	2,800	-
	3	7.8	8.5	33	+ (C)
	4	9.5	8.8	79	+ (C)

Table 16. Detection pattern of *Clostridium botulinum* by incubation temperature and period in soil and water taken from Lake Biwa

No. of groups detected	Toxin type by incubation condition				No. of positive samples by specimen		
	30 °C 4 days	30 °C 7 days	37 °C 4 days	37 °C 7 days	Soil n=160	Water n=64	Total n=224
1	E	E	-	-	57	11	68
2	E	E	E	E	10	9	19
3	C, E	C, E	-	-	7		7
4	E	E	+	+	5		5
5	E	E	E	+	3		3
6	-	-	E	E	3		3
7	E	E	C	C	3		3
8	E	C, E	-	-	2	1	3
9	C, E	C, E	C	C	3		3
10	C	C	C	C	3		3
11	C	C	-	-	1	2	3
12	C	C	+	+	2		2
13	-	-	C	C	1	1	2
14	C, E	C, E	+	-	2		2
15	C, E	C, E	E	E	2		2
16	+	C	-	-		1	1
17	E	E	C	+	1		1
18	C, D, E	C, D, E	-	-	1		1
19	D	D	-	-		1	1
20	+	+	E	E	1		1
21	E	E	-	+	1		1
22	E	E	-	UT	1		1
23	+	E	-	-	1		1
24	-	E	-	-	1		1
25	E	E	E	-	1		1
26	-	-	-	-	48	38	86
No. of samples detected by toxin type (%)	C (69.7)	23 (81.8)	12 (36.4)	11 (33.3)	28	5	33
	D (100)	2 (100)			1	1	2
	E (95.2)	120 (96.8)	29 (23.0)	25 (19.8)	105	21	126

-:Toxin negative in culture supernatant. +:Toxin positive in culture but untypable. UT:Indistinguishable between types C and D.

## 第4章 琵琶湖以外の地域におけるボツリヌス菌の生態

### I. 緒言

滋賀県は琵琶湖をはじめ大小の湖沼が多く、水鳥の宝庫となっており、240種以上の鳥類が棲息していることが確認されている<sup>77)</sup>。C型菌のように水鳥の移動によって汚染の拡散する例もみられることから、琵琶湖以外の湖沼におけるボツリヌス菌の分布を知ることは、ボツリヌス菌の生態学的見地からも重要である。

そこで、琵琶湖以外の検体採取場所として、琵琶湖に次いで大きい余呉湖、水鳥の多棲地として有名な三島池、その他の自然池および養魚池を対象として調査を行った。また、水系環境以外の地域として、山や畑についても調査した。さらに、わが国の養鶏場においてもブロイラーのC型中毒例が発生している<sup>16-20)</sup>ことから、滋賀県内の養鶏場の環境材料についても調査した。

ボツリヌス菌の検出方法について第2章では、プランクトンの培養前の加熱処理、ならびに第3章では土壌および水についてその培養温度と時間がボツリヌス菌の検出率に及ぼす影響について検討した。本章では、同様の観点から土壌を採取してから培養までの保存方法、および培養前の加熱処理の差異がボツリヌス菌の検出率に影響を及ぼすかどうかについても検討した。

## II. 材料および方法

### 1. 検体の採取場所

1) 琵琶湖以外の湖沼：伊香郡余呉町の余呉湖（A地点）、坂田郡山東町にある三島池（B地点）および大津市田上町にある魚が棲息している小規模な池（C地点）を対象として各種の検体を採取した。採取場所をFig. 8に示す。

(1) 余呉湖：1974年7月に湖底土壌5検体、1975年11月に湖岸土壌20検体を採取した。

(2) 三島池：1976年11月に土壌27検体、水4検体、池に棲息しているヤマトカワニナ (*Semisulcospira niponica*) 21検体およびマシジミ (*Corbicula japonica*) 23検体、1977年7月に土壌27検体、水5検体、ヤマトカワニナ124検体、マシジミ5検体およびカタハガイ (*Pseudodon omiensis*) 1検体を採取した。また、同年12月に土壌20検体、水5検体、ヤマトカワニナ10検体、およびマシジミ20検体、計292検体を採取した。

(3) 三島池以外の池：1982年7月に自然池Aの土壌10検体と貯水2検体、自然池Bの土壌10検体と貯水2検体、さらに水田を利用してコイを養殖している養魚池1カ所の土壌5検体、流入水1検体および貯水2検体、計32検体を採取した。

2) 湖沼以外の環境材料：東浅井郡伊吹町の伊吹山（標高1377.1 m：D地点）、草津市矢倉町の県種鶏場（養鶏場A：E地点）、東浅井郡びわ町の

養鶏場（養鶏場B：F地点）、B養鶏場付近の畑（畑A：G地点）および大津市唐崎の畑（琵琶湖から約500 mの位置にある、畑B：H地点）を対象として各種の検体を採取した。採取場所をFig.8に示す。

(1) 伊吹山：1979年10月に山頂付近から10検体、中腹から5検体および麓の谷間から5検体の土壌を採取した。

(2) 養鶏場：1982年5月に養鶏場Aの産卵鶏舎（平飼い）の土壌6検体、ブロイラー鶏舎（平飼い）の土壌5検体、場内の排水が流出する小川の土壌9検体と水4検体を、1982年10月には養鶏場Bのブロイラー鶏舎（平飼い）の土壌10検体および鶏舎から5～6 m離れた同養鶏場敷地内の土壌10検体、計44検体を採取した。

(3) 畑：1982年10月に畑AとBから土壌をそれぞれ10および5検体採取した。

## 2. 検体の採取方法

土壌、水および貝類の採取は、第2章と同様の方法で行った。すなわち、湖岸、養鶏場、山の土壌については表面から10～15 cm下の深部から、湖底土壌については採泥器を用いて採取し、培養するまで冷蔵保存した。ただし、1977年に三島池から採取した土壌については、保存方法によるボツリヌス菌の検出率の違いを検討するため同一検体を2分し、それぞれ広口ガラス瓶（500 ml）に入れ、冷蔵保存（3℃）と室温保存とに分けた。室温については、最高最低温度計により記録した。また、異なる温度で保存後、



同一検体は同時に培養を行った。

### 3. ボツリヌス菌の検出方法

土壌、水および貝類からのボツリヌス菌の検出方法（培養方法およびボツリヌス毒素の検出方法）については、第2章と同様の方法を用いた。ただし、1976年および1977年に三島池から採取した土壌と1977年に採取した水の検体については、培養前の加熱処理方法によるボツリヌス菌の検出率への影響について検討した。土壌50 mlと等量の滅菌生理食塩水を混合し、静置後の上清を遠心分離し、その沈渣を2 mlの滅菌生理食塩水に浮遊後、1 mlずつ2本の肝片加肝臓ブイヨン（12 ml、pH 7.6）に接種した。一方を60 °Cで15分間、他方を80 °Cで30分間加熱した。1977年に採取した水については、メンブランフィルター（Millipore、0.45 μm、径47 mm）で目詰まりするまで吸引濾過後、フィルターを細切し、全部を肝片加肝臓ブイヨン（12 ml、pH 7.6）に接種した。水の試料については同一検体を2度（濾過量は同一にした）メンブランフィルターで濾過し、一方を60 °Cで15分間、他方を80 °Cで30分間加熱した。土壌および水ともに、加熱処理後30 °Cで7日間培養した。また、三島池以外の池および養鶏場のボツリヌス菌検索に際しては、第3章に記載した方法により30 °C7日間と37 °Cで4日間培養とを併用した。

培養上清からボツリヌス毒素を検出する場合、余呉湖の検体についてはCおよびD型を検査しなかったが、その他の地域の検体についてはC型と

D型を含むA～F型の各ボツリヌス毒素の検索を行った。

#### 4. 水質試験

1977年に三島池からボツリヌス菌検索のために採取した水、三島池以外の池（3カ所）および養鶏場A由来の水について水質を調査した。

三島池の水については、水温、pH、溶存酸素（DO）、化学的酸素要求量（COD）、硝酸性窒素（NO<sub>3</sub>-N）、亜硝酸性窒素（NO<sub>2</sub>-N）、アンモニア性窒素（NH<sub>3</sub>-N）および大腸菌群MPN、その他の地域の水については水温、pHおよび大腸菌群MPNについて調査した。調査方法は、水温、pHおよび大腸菌群MPNについては第1章に記載の方法、DOおよびCODについてはJIS法、NO<sub>3</sub>-N、NO<sub>2</sub>-NおよびNH<sub>3</sub>-Nについては上水試験法によって行った。

### III. 成績

#### 1. 琵琶湖以外の湖沼におけるボツリヌス菌の分布

余呉湖、三島池およびその他の池についてのボツリヌス菌の検索成績をTable 17に示す。種々の検体349例中38検体（10.9%）の培養上清からボツリヌス毒素が検出された。毒素型別の検出率は、C型4.3%（15検体）、D型6.6%（23検体）、E型1.1%（4検体）およびC x D型0.9%（3検体）であり、C型およびD型の検出率が高かった。調査地域別の成績は以下のとおりである。余呉湖の土壌（25検体）からは、マウス致死毒素が8検体（32.0%）に認められたが、ボツリヌス菌はE型が1検体（4.0%）から検

出されたにすぎなかった。検出場所は湖岸由来であった。そのほかの培養上清からはマウスがボツリヌス毒素による典型的症状を示したにもかかわらず、これらのマウス致死毒素はA、BおよびF型の抗毒素では中和されなかった。

三島池については、3回にわたって調査したところ、292例中33検体（11.3%）にマウス致死毒素が検出されたが、そのほとんどはボツリヌス毒素（32検体、11.0%）であった。また、調査時期にかかわらず、C型が15検体（11.0%）、あるいはD型が19検体（6.5%）と検出されたが、E型はわずか1検体（0.3%）から検出されたにすぎなかった。そのほかC×D型が3検体（1.0%）から検出された。検体別では、土壌からC型、D型およびC×D型、水については1976年の調査では流出水からC型、1977年7月および12月の調査ではいずれも貯水からC型あるいはD型のボツリヌス菌が検出された。しかし、貝類（合計204検体）からはC型1検体（0.5%）とC×D型2検体（1.0%）が検出されたのみであり、土壌あるいは水からの検出率よりも低率であった。

三島池の水のボツリヌス菌検索成績と水質について、1977年7月と12月に行った成績をそれぞれTable 18と19に示す。

まず、7月の成績では貯水からD型菌が検出されたが、流入水および流出水からはボツリヌス菌は検出されなかった。また、12月には同地点からC型菌が検出された。これらC型菌やD型菌が検出された地点の水質は、同

一時期の他の地点と比べてpH、DOおよびCODがやや高い値を示した。

三島池以外の池については、自然池（A、B）2カ所および養魚池1カ所、計3カ所について調査したところ、32例中5検体（15.6%）の培養上清からボツリヌス毒素が検出され、毒素型はD型4検体（12.5%）およびE型2検体（6.3%）であった（Table 17）。3カ所の池の内訳については表に示さなかったが、自然池Bの土壌からのみD型およびE型のボツリヌス菌が検出された。自然池Bに限ると、ボツリヌス菌の検出率は土壌では10例中5検体（50.0%：D型40%、E型20%）と高率であった。地域を問わず、水ではボツリヌス菌は陰性であった。自然池Aの貯水（2カ所）では水温27.0と27.2℃、pH 6.9と7.0、大腸菌群MPN 2,200と3,500、自然池Bの貯水（2カ所）では水温は27.5と27.7℃、pHは7.2と7.3、大腸菌群MPNは1,700～9,200、養魚池の流入水では水温は22.0℃、pHは6.9、大腸菌群MPNは790、貯水（2カ所）では水温は25.0と27.0℃、pHはいずれも6.7、大腸菌群MPNは3,500～9,200であった。

## 2. 山、畑および養鶏場におけるボツリヌス菌の検索成績

伊吹山、養鶏場（2カ所）および畑（2カ所）についてのボツリヌス菌の検索成績はTable 20に示すように、土壌75検体および水4検体のいずれの検体からもボツリヌス菌は検出されなかった。

養鶏場Aの利用水が流出する川の上流域（2カ所）では水温は23.5と24.2℃、pHはいずれも6.7、大腸菌群MPNは350と2,200、下流域（2カ所）

ではいずれも水温は22.2℃、pHは6.6、大腸菌群MPNは7,000と17,000であった。

### 3. 土壌の保存方法と培養前処理の差によるボツリヌス菌の検出率

1976年に三島池から採取した土壌27検体について、培養前の加熱を60℃で15分間（以下、加熱処理Ⅰという）と80℃で30分間（以下、加熱処理Ⅱという）とを併用したところ、加熱処理ⅠではD型菌が2検体から、加熱処理Ⅱの方法ではC型菌が2検体、D型菌が1検体から検出されたが、それぞれ別の検体であった。

1977年7月および12月に三島池から採取した土壌47検体について、検体を冷蔵あるいは室温保存した場合、さらにこれらの検体を加熱処理ⅠあるいはⅡの方法で加熱した場合のボツリヌス菌の検出状況を検討した。すべての検体を処理するまでに、7月に採取した検体では75日間、12月に採取した検体では100日間を経過しており、その間の室温の変化はそれぞれ25～38℃、10～30℃であった。

Table 21に示すように、7月の例では、冷蔵保存では加熱処理Ⅱ（7.4%）よりも加熱処理Ⅰ（14.8%）が、室温保存では加熱処理Ⅰ（14.8%）よりも加熱処理Ⅱ（22.2%）の方がボツリヌス菌の検出率が高かった。12月の成績では、同一保存方法をとった検体では加熱処理の別によってボツリヌス菌の検出率に著しい差異は認められなかった。これらの4種類の方法を組み合わせた場合、同一検体から同一方法の培養によってC型とD型が検出

されたものが認められた。また、冷蔵保存ではC型とD型、室温保存ではC型が検出されたり、加熱処理ⅠによりC型、ⅡによりCとD型が検出された場合が認められた。このような例では、同一検体からCおよびD型が検出されたものとして統計処理したが、同一検体で加熱処理ⅠでC x D型、加熱処理ⅡでD型と同定されたものについてはD型の検出とした。これらを保存方法別にボツリヌス菌の検出率を集計すると、冷蔵保存では38.3%、室温保存では27.7%となり、前者の方が著しくボツリヌス菌の検出率が高くなり、菌型別ではD型の検出率が高くなった。一方、培養前の加熱処理方法別に集計すると、加熱処理Ⅰでは27.7%、加熱処理Ⅱでは36.2%となり、後者の方が著しくボツリヌス菌の検出率が高くなり、菌型別ではC型およびD型の検出率が高くなった。E型は、12月に採取した1検体から保存方法にかかわらず検出されたが、加熱処理Ⅱの方法では陰性であった。

三島池以外の池および養鶏場の土壌および水からのボツリヌス菌の検索に際し、30℃で7日間培養する方法と37℃で4日間培養する方法とを併用し、ボツリヌス菌の検出率について比較したところ、自然池Bの土壌に限って10中5検体(50.0%)からD型(4検体)とE型(2検体)が検出された。1検体からはD型とE型とが検出されたが、いずれもD型は37℃培養から、E型は30℃培養からのみ検出された。

#### IV. 考察

これまでの章では琵琶湖の土壌、水、プランクトン、貝類およびエビ類にはボツリヌス菌が分布しており、地域、季節を問わず、湖岸土壌あるいは湖岸水にC型菌あるいはE型菌が濃厚に分布していること、またこれら以外のD型菌およびF型菌も分布していることを述べてきた。これらの濃厚なボツリヌス菌の分布は、琵琶湖以外の湖沼や池において、また水系環境以外の場所においてはどのような状態にあるのかを検討した。

E型菌は琵琶湖以外の余呉湖および三島池にも分布しており、その検出率は前者では4%、後者では0.3%であり、琵琶湖と比べると低率であったが、規模の小さい自然池の一つの土壌では20%の検出率であり、濃厚に分布している例もみられた。E型菌の分布について、小野ら<sup>25)</sup>は、内陸の河川、湖沼にはE型菌が濃厚に分布するが、水と関連性が少ない植林地からは証明されなかったという。したがって、その増殖および拡散には、水が重要な役割を果たしていることを示唆している。Huss<sup>78)</sup>もデンマークにおける調査で同様な成績を報告している。この点に関しては、著者の調査でも琵琶湖の水からC型、D型およびE型ボツリヌス菌を検出しており、水がボツリヌス菌の運搬や拡散に大きくかかわっていることを実証した。

さらに、三島池からC型とD型、またE型が高率に検出された池からD型が高率に検出され、鳥類の棲息するこれらの池には琵琶湖と同様にC型やD型が高濃度に分布していることが確認された。調査した三島池は、マガモなどの水鳥の宝庫として有名な池で、冬期には常時200~300羽の水鳥

がみられるが、夏期には越夏マガモやカイツブリだけで、1日平均2～4羽であるという<sup>79)</sup>。また、この池は元来農業用の貯水池であり、5～8月には貯水されるが、それ以外の時期は自然流水のみで底土が露出しているところも認められる。このように、夏期と冬期とでは池の様相が変化する。この池を対象とした3回の調査によって、時期を問わずC型菌およびD型菌が検出され、調査時期によって貯水や流出水からC型あるいはD型が検出されたのに対し、流入水では検出時期を問わず陰性であったことから、C型やD型のボツリヌス菌は確実にこの池に分布し、濃縮され、さらには増殖している可能性があるとして推測された。1976年の冬期、1977年の夏期および冬期と連続して調査を行ったが、1977年の調査では、2度とも同一の検索方法をとった。そこで、これらの成績からボツリヌス菌の検出率を比較すると、冬期の方が夏期と比べて検出率が高いことになる。このような所見は第3章でも述べたように、C型菌の検出率が水鳥の個体数が多くなる時期と平行して高くなっていることである。芹川ら<sup>47)</sup>もC型菌の検出率については同様の所見を報告している。したがって、C型やD型が高率に検出される要因としては、鳥類の体表や消化管内に本菌が保菌されており、そのことが土壌から検出される原因であるとも考えられた。しかし、三島池に冬期に飛来する冬鳥の94%はマガモであり<sup>79)</sup>、日本に飛来するマガモは大部分がシベリアから飛来するとされている<sup>80)</sup>。Kravchenkoら<sup>81)</sup>の調査によると、ソビエトの土壌から検出されるボツリヌス菌は、E型の頻度が高く(62.2



%)、B型(28.1%)、A型(8.3%)、C型(2.1%)、D型(0.2%)の順であり、とくにシベリア地方ではE型とA型で、C型あるいはD型は陰性であったと報告している。渡り鳥がシベリアからボツリヌス菌の運搬の役割を果たしているとする、A型やB型も三島池や琵琶湖から検出されてしかるべきであろう。しかしながら、A型やB型はみられず、検出されたのはC、DおよびE型であった。したがって、鳥類の多くなる時期とC型菌やD型菌の検出率が高くなることとは関連性があると推測できるが、鳥類がどのような役割を果たしているかについてはまだ満足すべき説明ができない。いずれにしても、三島池から流出する水からボツリヌス菌が検出されたことは、その流域にボツリヌス菌を拡散することになり、水がボツリヌス菌の拡散の媒体としてかかわっていることは確実である。

三島池の水質について検討した結果、ボツリヌス菌が検出された地域の水はすべてアルカリ性を示し、DOおよびCODは他の地点よりも高い値を示した。この所見は、DOが高いことにより植物の繁殖が高いことを示し、炭酸同化作用によりpHは上昇し、さらにCOD値が高いことは有機物が多いことを示している。すなわち、この池は富栄養化しているといえる。このことは琵琶湖の富栄養化とボツリヌス菌の検出成績と一致した所見である。

水系以外の地域については山、畑あるいは養鶏場から採取した材料からはボツリヌス菌は検出されなかった。この成績は芹川ら<sup>37)</sup>が石川県の湖沼や河川からC型は高率に検出されたが、畑や宅地(80検体)ではすべて陰

性であったという報告と一致した。したがって、E型が水系地域に多いという小野ら<sup>25)</sup>およびHuss<sup>78)</sup>の所見と同様に、C型やD型も水域環境に広く分布するボツリヌス菌であると考えられる。

土壌からのボツリヌス菌の検索にあたっては、多くの研究者が北海道衛研<sup>24, 25, 27)</sup>の方法に準じた方法を用いている。すなわち、土壌と等量の滅菌生理食塩水とを混合し、上清を遠心分離後、沈渣を毒素産生用培地に接種し30℃で7日間培養し、培養液からボツリヌス毒素が検出された場合をボツリヌス菌陽性とする方法である。また、阪口<sup>67)</sup>は培養前に加熱をするとボツリヌス菌の発芽が促進され、その加熱はE型菌芽胞が死滅しない程度の60℃、15分間が適当であると述べている。これらの報告を参考に今回の検索を行ってきた。しかしながら、第3章でも述べたように、毒素産生用培地、培養前の加熱処理、培養温度あるいはその期間が研究者によって異なっている。例えば、培養前の加熱処理としては北海道衛研<sup>24, 25, 27)</sup>では60℃で1時間、山県ら<sup>41)</sup>は60℃で30分あるいは青森衛研<sup>31)</sup>では60℃、20分と色々な方法によってE型菌を検出している。しかし、E型以外のボツリヌス菌を検出する場合の加熱処理の影響については余り明確でない。そこで従来用いてきた60℃、15分間加熱後培養する方法と80℃、30分間加熱する方法とを併用してボツリヌス菌の検索を行った。その結果、培養前の加熱はC型やD型の分布を知るためには80℃、30分の加熱が検出率を高めることが判明した。一方、この加熱方法ではE型は検出されなかった

ことから、60℃、15分間の加熱と80℃、30分間の加熱を併用することが、C型、D型あるいはE型菌の検出率を高めるために有効であることが判明した。

一方、土壤材料のように、一度に多く採取しても、採取後すぐに培養できない場合もあり、その時の保存方法がボツリヌス菌の検出率に影響を及ぼしているかもしれない。そこで、土壤を長期間保存する方法について検討したところ、冷蔵保存の方で検出率が高かったことから、採取後すぐに培養できないときには冷蔵保存が望ましいと考えられた。

## V. 小括

1. E型菌は、余呉湖、三島池および自然池から検出され、検出率はそれぞれ4.0%、0.3%、20%と大きく異なっていた。そのほかまったく検出されない自然池もあったことから、同じ水域環境であってもE型菌の検出率は地域によって著しく異なっていることが判明した。

2. 水鳥が棲息している三島池から、C型やD型が高率に検出されたが、流入水からは検出されず、貯水や流出水から検出されたことから、ボツリヌス菌は貯水に分布し、流出水はこれらの菌の運搬役となっていることが示唆された。

3. 三島池に棲息する水鳥の個体数は、夏期には少ないが冬期には著しく多くなり、C型菌やD型菌の検出率も冬期の方が高かったことから、水鳥

の棲息とC型菌やD型菌の分布とは関連性があるものと考えられた。

4. ボツリヌス菌が高率に検出された三島池の水質は有機質が多く、したがって富栄養化とCあるいはD型のボツリヌス菌の分布とは関連性があるものと考えられた。

5. 山、畑あるいは養鶏場からはボツリヌス菌は検出されず、水域環境以外の地域ではボツリヌス菌は分布が少ない傾向がみられた。

6. C型やD型が濃厚に分布する三島池の土壌47検体を材料として、採取後の土壌の保存方法がボツリヌス菌の検出率に及ぼす影響について検討した。その結果、ボツリヌス菌の検出率は冷蔵保存では38.3%、室温保存では27.7%であり、冷蔵保存の方がボツリヌス菌の検出率が高くなり、とくにD型菌の検出率が高かった。

7. 培養前の加熱処理がボツリヌス菌の検出率に及ぼす影響について検討した結果、60℃、15分間よりも80℃、30分間の加熱処理の方がC型菌やD型菌の検出率が高くなった。一方、60℃、15分間の加熱処理によってE型菌が検出される例もあることから、これらの方法を併用することがボツリヌス菌の検出率を高めるためにもっとも効果的であることが判明した。

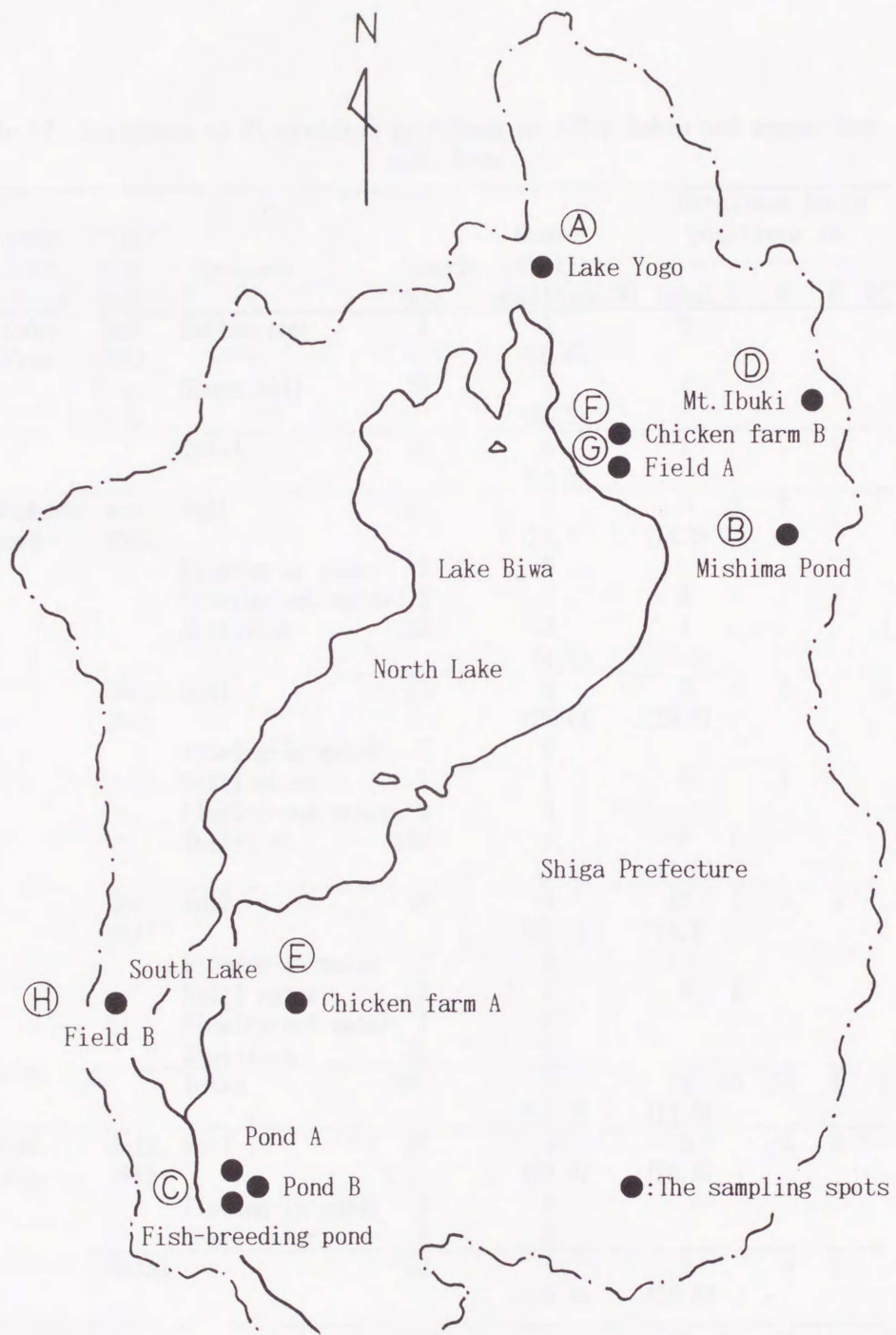


Fig. 8. Sampling spots in the area other than Lake Biwa for surveillance of Clostridium botulinum

Table 17. Incidence of Clostridium botulinum in other lakes and ponds than Lake Biwa

Spot No.	Samp- ling place	Samp- ling date	Specimen	Sample No.	Mouse lethality positives (%)	Botulinum toxin positives (%)							
						Total	C	D	E	UT*			
A	Lake Yogo	July, 1974	Bottom mud	5	1 (20.0)	0							
		Nov., 1975	Shore soil	20	7 (35.0)	1			1				
			Total	25	8 (32.0)	1			1				
B	Mishima pond	Nov., 1976	Soil	27	5 (18.5)	5	2	3					
			Flowing-in water	3	0								
			Flowing-out water	1	1	1	1						
			Shellfish	44	2 (4.5)	1 (2.3)				1			
		July, 1977	Soil	27	8 (29.6)	8	4	5		1			
			Flowing-in water	2	0								
			Still water	1	1	1		1					
			Flowing-out water	2	0								
		Dec., 1977	Soil	20	13 (65.0)	13	6	10		1			
			Flowing-in water	2	0								
			Still water	2	1	1	1						
			Flowing-out water	1	0								
C	Three ponds	July, 1982	Soil	25	5 (20.0)	5		4	2				
			Flowing-in water	1	0								
			Still water	6	0								
			Total	32	5 (15.6)	5		4	2				
		Grand Total					349	46 (13.2)	38	15	23	4	3

UT: Indistinguishable between types C and D.

Table 18. Incidence of Clostridium botulinum in water of Mishima pond and quality of its water (I) (Jul., '77)

Test item	Data by sample				
	Flowing-in	Flowing-in	Still	Flowing-out	Flowing-out
	water A	water B	water A	water A	water B
Botulinum toxin	—	—	D	—	—
Water temp (°C)	22.5	22.2	28.7	27.5	27.8
pH	7.3	7.3	8.0	7.6	7.6
DO (ppm)	8.46	6.72	13.13	10.99	10.43
COD (ppm)	2.45	4.67	7.76	4.67	4.90
NO <sub>3</sub> -N (ppm)	0.13	0.23	0.04	0.12	0.04
NO <sub>2</sub> -N (ppm)	0.003	0.002	<0.001	0.003	0.0025
NH <sub>3</sub> -N (ppm)	0.13	0.10	0.12	0.10	0.10
Coliform MPN	2,300	79,000	4,600	49,000	172,000

Table 19. Incidence of Clostridium botulinum in water of Mishima pond and quality of its water (II) (Dec., '77)

Test item	Data by sample				
	Flowing-in	Flowing-in	Still	Still	Flowing-out
	water A	water B	water A	water B	water A
Botulinum toxin	—	—	C	—	—
Water temp (°C)	9.6	11.6	11.2	11.6	11.1
pH	9.0	7.5	7.9	7.6	8.3
DO (ppm)	11.26	6.98	11.05	10.31	11.08
COD (ppm)	1.98	1.03	4.71	3.37	0.60
NO <sub>3</sub> -N (ppm)	0.27	0.34	0.06	0.06	0.19
NO <sub>2</sub> -N (ppm)	<0.001	0.002	0.006	0.003	<0.001
NH <sub>3</sub> -N (ppm)	0.07	0.12	0.40	0.35	0.07
Coliform MPN	3,300	46,000	170	130	1,300



Table 20. Incidence of Clostridium botulinum in soil samples taken from mountain, cultivated fields and chicken farms in Shiga Prefecture

Sam- pling spot	Sam- pling place	Sampling date	Specimen	Sample No.	Mouse lethality positives
D	Mt. Ibuki	Oct., 1979	Soil from the top	10	0
			Soil from half-way down	5	0
			Soil from the vally	5	0
E	Chicken farm A	May, 1982	Soil from a hen house (layers)	6	0
			Soil from a hen house (broilers)	5	0
			Soil from a ditch outside a hen house	9	0
			Water from a ditch outside a hen house	4	0
F	Chicken farm B	Oct., 1982	Soil from a hen house (broilers)	10	0
			Soil from outside a hen house	10	0
F	Field A	Oct., 1982	Near chicken farm B	10	0
G	Field B	Jan., 1987	300 m distant from Lake Biwa	5	0
Total				79	0

Table 21. Effects of storage and pre-treatment of soil samples on detection of *Clostridium botulinum*

Sampling date (1977)	Sample No.	Storage conditions	Heat treatment before incubation	Mouse lethality positives (%)	Botulinum toxin positives (%)						
					Total	C	D	E	UT*		
July	27	Refrigeration (3°C)	60 °C, 15 min	4 (14.8)	4	2	3		1		
			80 °C, 30 min	2 (7.4)	2		1		1		
			Total	6 (22.2)	6	2	4		2		
			Room temp (25-38°C)		60 °C, 15 min	4 (14.8)	4	2	1		1**
			80 °C, 30 min	6 (22.2)	6	3	4				
		Total	7 (25.9)	7	4	4					
		December	20	Refrigeration (3°C)	60 °C, 15 min	8 (40.0)	8	2	7	1	
					80 °C, 30 min	9 (45.0)	9	6	6		
					Total	12 (60.0)	12	6	9	1	
					Room temp (10-30°C)		60 °C, 15 min	4 (20.0)	4	1	3
80 °C, 30 min	5 (25.0)				5	4	4				
Total	6 (30.0)			6	4	4	1				
Total by storage condition (n=47)				Refrigeration	18 (38.3)	18	8	13	1	2	
				Room temp	13 (27.7)	13	8	8	1		
Total by pre-culture treatment (n=47)				60 °C, 15 min	13 (27.7)	13	4	8	1	2	
				80 °C, 30 min	17 (36.2)	17	9	11		1	
		Total	30 (63.5)	30	13	23	2	3			

\* Indistinguishable between types C and D.

\*\*Toxin type of one sample was UT by heat treatment at 60°C, 15 min., but at 80°C, 30 min was type D. For that reason, toxin type totaled D.

## 総合考察

A型およびB型ボツリヌス菌は1920年代に調査が行われ、欧州や北アメリカの東部にはB型菌が濃厚に分布するが、北アメリカの西部にはA型菌が多く分布すること、また、未開拓地の山地や森林地帯にも分布していることが知られていた。しかしながら、わが国でもA型菌に関する調査が行われてきたが、欧米と比べると陽性率はきわめて低い<sup>28, 31, 36, 43, 44)</sup>。

E型菌は、アメリカ<sup>63, 82)</sup>、北欧<sup>83, 84)</sup>、カナダ<sup>85)</sup>、ソビエト<sup>81)</sup>や、日本でも北海道<sup>24-25)</sup>や東北地方<sup>28, 32)</sup>に分布することが知られていたが、以前は、E型菌は北緯40°以北のみに分布するという考えもあった<sup>86)</sup>。しかしながら、滋賀県でE型中毒が発生し<sup>8)</sup>、発生直後の調査では中毒発生地付近の河川にE型菌が分布することが報告された<sup>54)</sup>。このことを契機に、著者らは琵琶湖（北緯35~36°）をはじめとする滋賀県におけるE型ボツリヌス菌の生態調査をはじめたものである。著者らの琵琶湖におけるE型菌の濃厚汚染を報告<sup>87)</sup>して以来、E型中毒が発生していない東京都の池<sup>35)</sup>、石川県の河川<sup>37)</sup>、大阪府の淀川<sup>40)</sup>、宮崎県の河川<sup>42)</sup>および山陰、北九州および沖縄県の森林<sup>38)</sup>にもE型菌が分布することが報告されている。しかしながら、これらの地域では琵琶湖北湖のように濃厚汚染の成績が確認されておらず、常在しているかどうかは不明である。琵琶湖周辺の河口域、湖岸、湖底の土壌、プランクトン、湖岸の水、エビ類および貝類からE型

菌が検出された。また、季節別の調査でも琵琶湖の湖岸土壌から50%以上の陽性率でE型菌が検出されたことから、琵琶湖周辺にはE型菌が常在していることが明らかとなった。さらに、琵琶湖に流入する河川の中流域よりも河口域（琵琶湖湖岸）の方が著しくE型菌の検出率が高かったこと、知内川の調査成績では上流では検出されないが河口域に近づくにしたがって検出率が高くなった。また、琵琶湖でも北湖と南湖とでは検出率が異なり、前者の方の汚染が濃厚であったこと、湖底よりは湖岸の土壌の方が検出率が高かったことから、琵琶湖では主として北湖の湖岸土壌中に濃厚に分布していることが明らかとなった。しかしながら、このような濃厚汚染をもたらした原因については明らかにすることはできなかった。このようなE型菌の由来としては、神沢<sup>24)</sup>が指摘するように元来土壌中に分布するE型菌が河川の上流から水とともに運ばれ河口域（琵琶湖湖岸）で濃縮された可能性があることである。あるいは、琵琶湖湖岸やその周辺にはアユやニジマスなどの養魚場があり、その餌として使用されている人工飼料や魚粉を介して本菌が琵琶湖に持ち込まれた可能性である。県内の養魚池におけるボツリヌス菌の分布について、徳地ら<sup>54)</sup>は中毒発生地付近の1カ所を、著者は大津市内の1カ所を対象に調査したが、ボツリヌス菌は検出されなかった。しかしながら、県内にはそのほかにも多くの養魚場があり、場所によっては飼育形態が大きく異なっていると推測されるので、県内の養魚場のボツリヌス菌の分布実態については十分な調査とはいえない。例え

ば、北海道十勝川水系の蓄養池では、50～80%の検出率でE型菌が検出され<sup>26)</sup>、岩手県でも養魚池の土壌と珪藻からE型菌が検出されている<sup>33)</sup>ことから、この点に関しても汚染源としての可能性は残っている。次に考えられることは、琵琶湖周辺の自然環境の保全対策、利水対策として琵琶湖総合開発法が1972年に成立し<sup>88)</sup>、琵琶湖周辺の河川改修や湖岸の整備などのために、E型菌が濃厚に分布している地域の土壌を琵琶湖に持ち込んだことによる可能性である。しかしながら、E型菌の由来は別としても、本菌の濃厚な分布は、湖岸などにおける増殖なくしては考えられない。その要因として死魚を想定し、琵琶湖湖岸から死魚を採取してボツリヌス菌を調べたが、その培養上清の多くはマウスに致死毒性を示したものの、ボツリヌス毒素は証明できなかった。神沢<sup>24)</sup>は自然界におけるE型菌の増殖場所として魚を考え、実験的にフナおよびマウスにE型菌を投与し室温放置したところ、これらの死体からE型毒素が検出されたという。また、秋田県の調査<sup>28)</sup>では、死魚から高率にE型が検出された。したがって、E型菌を増殖させる要因としては、魚や動物の死骸が考えられる。また、琵琶湖のプランクトンからは高率にE型菌が検出されたことから、プランクトンも関与している可能性があると考えている。

C型やD型については、琵琶湖とその周辺の水鳥が多く棲息する三島池についての成績から、これらの地域にはC型やD型が濃厚に分布し、かつ季節別の検出状況から、水鳥個体数の増加とこれらのボツリヌス菌の分布

とは関連性があることが判明した。Smithら<sup>83)</sup>は、水鳥のボツリヌス中毒はほとんどがC型菌によることと関連し、断続的な温暖な気候、水が流れない浅瀬があること、アルカリ性、淡水系の無脊椎動物が豊富なこと、植物の腐敗にともなう酸素の消費などがC型菌を増殖させる条件として指摘している。事実、琵琶湖や三島池からC型が検出された場所の水質はアルカリ性で、かつ富栄養化しており、C型菌が増殖できるこれらの要因は満たされていたといえる。一方、Graham<sup>89)</sup>は、C型はハエの幼虫であるウジの中で増殖でき、毒素を産生すると報告した。したがって、ウジが水鳥に摂取され、ふん便とともに環境中に排出され、その結果C型菌による濃厚な汚染が起こる可能性も推測できる。また、阪口ら<sup>16)</sup>は、鶏のC型ボツリヌス症は鶏の消化管でC型菌が増殖し、排出されたふん便を餌とともに摂取することによって本症が増幅すると報告している。C型菌は水鳥の消化管内でも増殖する可能性があるので、鳥の分布とは関連性があるのは当然のことといえるかも知れない。しかし、北海道の水鳥の棲息地を対象とした調査ではE型は検出されたものの、C型はまったく検出されなかったという<sup>90)</sup>。このことは、Smithら<sup>83)</sup>の指摘のように、寒冷な地域ではC型の検出率は低いということを物語っている。したがって、琵琶湖やその周辺の地域におけるC型の分布については、水鳥の棲息と関連し、鳥の消化管で増殖し、また排出されたふん便や環境中のウジなどでも増殖し、これを鳥が摂取することの繰り返しによることも推定された。さらに、冬期およ

び早春期にも水鳥のC型ボツリヌス中毒事例が発生している<sup>91)</sup>ことから、これらの時期にも鳥の消化管内や環境中でのC型菌が発育できる温度、時間、嫌气的条件などの条件が整えば、C型菌は増殖して汚染を拡大できることを示唆している。

三島池はその水系として姉川に通じ、姉川は琵琶湖に通じる。また、琵琶湖は、瀬田川に通じ、淀川を経て大阪湾に至る。三島池の貯水や流出水からC型あるいはD型が検出され、その流域である琵琶湖からこれらの菌型のボツリヌス菌が検出された。また、琵琶湖の水からC型、D型およびE型菌が検出され、その流域である淀川からも同様な菌型のボツリヌス菌が検出されている<sup>40)</sup>。このように、同一水系では、その上流に分布するボツリヌス菌が下流にも分布していることが実証された。したがって、流水はボツリヌス菌の運搬、拡散に重要な役割を果たしているといえる。

琵琶湖やその周辺地域では、アユ、モロコ、フナなどの養殖が盛んに行われており、これらは琵琶湖や河川に放流されるものも含まれるが、北海道から九州までほとんどの都道府県にアユ苗として出荷されている<sup>92)</sup>。福島県では、琵琶湖産の稚アユが毎年県内の河川に放流されていることから、福島県内の河川におけるE型菌の由来を知るために、琵琶湖産の稚アユ90検体およびその輸送水8検体についてボツリヌス菌の検索が行われた<sup>93)</sup>。その結果、すべてが陰性であったという。したがって、福島県の河川のE型の分布について、稚アユを介しての琵琶湖からの持込みによるという経

路は実証されなかった。しかし、県内の養魚場のボツリヌス菌の分布実態が不明確な状況であることから、このような可能性をまったく否定することはできないと考えられる。つまり、琵琶湖の濃厚なボツリヌス菌汚染が、他の地域への拡散の要因になる可能性があると考えられることである。このことに関して、琵琶湖に棲息する水鳥や魚など、琵琶湖由来のすべてのものがその要因となりうる可能性がある。

琵琶湖およびその他の湖、池、河川など水域と関係する各地域からはボツリヌス菌が検出されたが、山、畑あるいは養魚場からはボツリヌス菌は検出されなかった。著者と同様に、芹川ら<sup>37)</sup>は石川県の畑や宅地80検体、伊藤ら<sup>35)</sup>は東京都内の耕地、公園、山林など272検体について調査したがボツリヌス菌はまったく検出されなかったという。このことについて、小野<sup>25)</sup>やHuss<sup>78)</sup>はE型菌の分布について考察するにあたり、同様の所見を示している。したがって、E型菌に限らず、C型およびD型菌などは水域環境と深く関係するボツリヌス菌であると考えられる。

1973年7月に滋賀県で発生したE型ボツリヌス中毒の原因食品は、琵琶湖産のハスを材料としたハスずしであった<sup>8)</sup>。ハスずしやフナずしのような琵琶湖産の魚を用いた発酵食品は、県下の広い地域で製造されている<sup>53)</sup>。したがって、琵琶湖産の魚介類におけるボツリヌス菌の分布状況を調査しておくことは、本食中毒の予防上重要である。琵琶湖産のハス78匹の内臓とエラについて、ボツリヌス菌を調べたが、すべて陰性であった。魚から



のボツリヌス菌の検出事例としては、青森県<sup>31)</sup>の調査では淡水産魚介類の1.3%からA型、E型あるいはF型菌、海産魚介類の0.3%からF型菌がそれぞれ検出されたという。また、秋田県<sup>29)</sup>の調査では魚類の0.17%からE型が検出され、東京都の調査<sup>64)</sup>では魚市場に搬入された魚の1.3%からC型あるいはE型が検出されているように、魚にはボツリヌス菌が分布していることが確認されている。著者は琵琶湖産の魚からはボツリヌス菌を検出できなかったが、ハスなどの魚の食物連鎖上で重要なプランクトンには高率にE型が分布していること、エビ類や貝類にもE型とC型が分布していることを実証したことから、これらを原料とする加工食品の製造にあたっては、ボツリヌス菌が存在する可能性があることを十分認識しておく必要があり、食品衛生対策上重要な知見であると考えている。

琵琶湖ならびに三島池の土壌や水から、C型と同時にD型も高率に検出された。これらの菌の証明にあたって、培養上清からC型抗毒素血清でもD型抗毒素血清でも中和される毒素が少なからずの検体に認められた。

Jansen<sup>94)</sup>はC型菌にはC $\alpha$ 菌とC $\beta$ 菌とがあり、前者はC1、C2およびD型の毒素を産生し、後者はC2毒素のみを産生すること、D型菌はC1毒素とD型毒素とを産生することを報告した。また、これらをソーセージ中で発育させるとC $\alpha$ 菌はC2毒素を産生しなくなったという。したがって、環境中にもC $\alpha$ 菌やC $\beta$ 菌あるいはD型菌とがそれぞれ混在して分布し、その結果C型とD型との抗毒素血清で中和されるような状態が起こっている

ものと考えられる。

ボツリヌス菌の検出方法については、北海道衛研<sup>24、25、27)</sup>で行われている方法に準じて、培養上清からのボツリヌス毒素を検出する方法によって確認してきた。本方法によってボツリヌス菌の分布を知ることは、実際にボツリヌス菌を分離して、ボツリヌス菌陽性とするよりもはるかに効率的である。しかし、この方法の中で検討を要すると思われた点が幾つかあったことから、ボツリヌス菌の検出率と菌型との関係について検討を行った。

第1点としては、採取した材料を一度に培養できないときの保存の問題である。そこで、冷蔵保存と室温保存の場合とでは、ボツリヌス菌の検出率にどのような差異が生じるかについて検討した結果、CあるいはD型菌が優位に分布する土壌では、冷蔵保存の方がボツリヌス菌の検出率が高くなると考えられた。

第2点は、培養前の加熱処理の方法である。培養前の加熱については、阪口<sup>67)</sup>が指摘している方法であり、E型菌芽胞の発芽を促進するために、すべての材料について培養前に60℃、15分間の軽度の加熱をする方法で行った。ただし、プランクトンについては、培養前に加熱をしない方法でも行って比較した結果、加熱の有無にかかわらずC型あるいはE型が検出され、検出率もそれほど差がみられなかったことから、加熱の必要性は示されなかった。さらに、土壌については、培養前に80℃、30分加熱したものとの比較を行った結果、60℃、15分の処理よりもC型やD型の検出率が高くな

ったが、E型芽胞は80℃、20分間の加熱でも死滅する<sup>95)</sup>ので、E型菌の検出には60℃、15分間の加熱が適当である。したがって、このような場合には両者の温度処理を併用することによってC、DおよびE型菌の検出率を高めることができると考えられた。

第3点としては、培養温度とその時間の関係である。阪口<sup>67)</sup>は、すべての型のボツリヌス毒素の検出を行うには、30℃培養が適当であると指摘していることから、すべての検体について30℃、7日間の培養を行ってきた。しかし、過去には35℃<sup>41)</sup>や37℃<sup>34)</sup>の培養によってE型菌を検出したという報告があること、さらにNotermansら<sup>68)</sup>はC型菌が存在する土壌を37℃で培養すると、A、BあるいはE型菌は検出されなくなると報告していることから、今回は30℃と37℃とを併用し、それぞれ4日目と7日目にボツリヌス毒素を調べて、本菌の検出率と検出菌型との関係について検討した。その結果、C型、E型ともに、30℃、7日間培養からの検出率ももっとも高い成績が得られた。このような成績から、もしどちらかの培養条件を選ぶとするならば30℃、7日間の培養がボツリヌス菌の検索のために適していると考えられる。しかし、C型やE型陽性例で、37℃の培養に限って検出されたもの、どちらの培養温度でも検出されたものも認められたことから、これらのボツリヌス菌には種々の発育至適温度を有する菌株があることを示唆しているものと考えられる。また、Notermansら<sup>68)</sup>の指摘同様、C型を含む土壌では30℃培養ではE型が検出されたが、37℃培養で

は検出されなくなったものも認められた。逆に、37℃培養ではC型が陰性になった検体も認められた。前述したように、C型菌にも種々の発育至適温度のあることが推測されることから、このようなことが生じても当然のことと考えられる。また、Notermansら<sup>68)</sup>と同様に30℃と37℃培養とを併用すると、ボツリヌス菌の検出率が高くなる成績も得られた。今回の試験ではE型菌の分離には成功しているが、C型、D型あるいはF型菌の分離はできなかった。これらのボツリヌス菌を分離し、発育温度などの性状を調べることによって、ボツリヌス菌の生態がさらに明確になるものと考えている。

1989年7月、滋賀県内で2例目のボツリヌス中毒が発生した<sup>96)</sup>。発生地も原因食品も1例目と同様で、高島郡マキノ町でハスずしを食べた4名のうち3名が発症した。今回の成績以外に、著者らは1回目の中毒以降、実験的にハスずし製造行程中でE型菌が増殖し、毒素産生が起こることを報告<sup>97)</sup>し、また中毒発生地域を対象としてハスずしなどの製造実態調査<sup>98)</sup>、馴れずしなどの県内で製造された食品についてボツリヌス菌の汚染実態調査<sup>99)</sup>を行うなど、ボツリヌス中毒予防対策を図ってきた。もし、このような成績を基に予防対策が行われてこなかったならば、滋賀県におけるボツリヌス中毒はさらに多発していたかもしれない。E型菌は琵琶湖に常在し、ハスずしは琵琶湖周辺の広い地域で造られている。したがって、滋賀県におけるボツリヌス中毒予防対策は今後とも積極的に押し進めていくことが絶対必要であると考えている。

## 総 括

1. 従来、E型ボツリヌス菌は、北緯40°以北に限って分布すると考えられていたが、それより南である北緯35~36°に位置する琵琶湖にもE型菌が濃厚に分布していることを明らかにした。
2. 琵琶湖に流入する河川の中流域よりも河口域（琵琶湖湖岸）の土壤から、また湖底土壤よりは湖岸土壤から高率にE型菌が検出され、琵琶湖沿岸土壤中には広域にE型菌が分布することが判明した。
3. 琵琶湖にはE型のほかに、C型、D型およびF型のボツリヌス菌が分布し、とくに北湖ではE型の検出率をもっとも高く、次いでC型、C×D型、F型であったのに対し、南湖ではC型の検出率が最も高く、次いでE型、C×D型、D型の順であった。北湖より富栄養化が進んでいる南湖でC型の検出率が高かったことから、C型の分布と湖の富栄養化とは関連があるものと推定された。
4. 琵琶湖沿岸4地点の土壤から、季節に関係なくE型菌がいずれも50%以上の陽性率で検出されたことから、E型菌は琵琶湖に常在していることが明らかとなった。
5. 琵琶湖では水鳥の個体数が増加する秋から冬にかけてC型の検出率が高くなったこと、さらに水鳥の棲息地として著明な三島池では、C型やD型が濃厚に分布していたことから、水鳥の棲息とC型およびD型

の分布とは関連のあることが示された。

6. 琵琶湖の湖岸水および池の流出水からC型、D型、あるいはE型のボツリヌス菌が検出されたことから、流水はボツリヌス菌を遠方に運搬し、拡散する役割を果たしていることが明らかとなった。
7. 土壌からのボツリヌス菌の検索にあたり、採取後すぐに培養できないときには冷蔵保存し、培養前に60℃、15分および80℃、30分の加熱処理による培養方法を併用することによって、C型、D型およびE型のボツリヌス菌の検出率を高めることができた。
8. 30℃培養と37℃培養とを併用し、4日目と7日目の成績を比較したところ、C型、E型とも、30℃7日間培養における検出率をもっとも高かったことから、この条件はこれらの組合せのなかではもっとも適当なボツリヌス菌の培養条件であると考えられた。さらに、30℃と37℃培養とを併用すると、ボツリヌス菌の検出率がより高くなる成績も得られた。

## 謝 辞

本研究論文をまとめるにあたり、終始御懇切な御指導と御教示を賜りました広島大学生物生産学部 食品衛生学教室 橋本秀夫教授、また、本研究をすすめるにあたり、終始多大な御指導と御教示を賜りました元大阪府立大学農学部 獣医公衆衛生学教室 阪口玄二教授、ボツリヌス抗毒素血清の分与を賜りました元千葉県血清研究所 近藤 久氏に深く感謝の意を表します。

さらに、多大な御助言と激励を賜りました滋賀県立衛生環境センター歴代所長 富田憲之亮氏、寺元 薫氏、（故）中川文一氏、現所長 本郷節哉氏、（財）日本食品分析センター大阪支所 阪口澄子氏、大阪府立大学農学部獣医公衆衛生学教室 小崎俊司講師、鎌田洋一助手、獣医疫学教室 大石 巖助教授、滋賀県食肉衛生検査所長 安藤 實氏に深く感謝の意を表します。

最後に、多大な御協力を賜りました（財）滋賀県保健衛生協会 徳地幹夫、元滋賀県立衛生環境センター専門員 榊原春司、滋賀県立衛生環境センター 大野達雄、田中勝美、山口朝生、若林徹哉、園 正、滋賀県健康福祉部健康対策課 中村昇一、滋賀県八幡保健所 木下庸子の諸氏をはじめ、滋賀県公衆衛生課、滋賀県今津保健所、滋賀県立衛生環境センター水質担当課、坂田郡山東町立大東中学校の皆様にご深く感謝いたします。

## 参 考 文 献

1. Smith, L. D. S. (1977), Botulism : The organism, its toxins, the disease. p.1-236, C. C. Thomas. Springfield, USA
2. Cato, E. P., George, W. L. and Finegold, S. M. (1986), Genus Clostridium Prazmowski 1880, 23<sup>AL</sup>, In Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. p.1141-1200, Williams & Wilkins, Baltimore
3. Hauschild, A. H. W. (1989) Clostridium botulinum. In Doyle, M. P. (ed.), Food Borne Bacterial Pathogenes, p.111-189, Marcel Dekker, New York and Basel
4. 阪口玄二 (1974), 動物のボツリヌス中毒. 日獣会誌, 27 : 158-163
5. 中村 豊, 飯田廣夫, 中尾良吉 (1951), ボツリヌススの疑い濃き食中毒例について. 北海道衛研所報, 2 : 29~34
6. 中村 豊, 飯田廣夫, 佐伯 潔 (1952), 岩内郡島野村に起ったボツリヌス中毒について. 北海道衛研所報, 特報, 1-18
7. Fukuda, T., Kitao, T., Tanikawa, H. and Sakaguchi, G. (1970), An outbreak of type B botulism occurring in Miyazaki prefecture. Jpn. J. Med. Sci. Biol., 23 : 243-248



8. 徳地幹夫, 山元なをみ, 榊原春司, 笈 福子, 木下庸子 (1973), 滋賀県マキノ町で発生したボツリヌス食中毒について. 滋賀衛公研所報, 9 : 23-28
9. 坂井千三, 伊藤 武, 斎藤香彦, 稲葉美佐子 (1977), 東京都内で発生したボツリヌスA型菌による食中毒について. 食品衛生研究, 27 : 17-23
10. 道家 直 (1985), ボツリヌス菌-広域に発生したボツリヌス中毒の一事例とその背景. 臨床と微生物, 12 : 237-242
11. Takahashi, M., Tokumaru, Y., Yamamoto, M., Shimizu, T., Kondo, H., Ishihara, N., Okubo, T., Sato, T. and Sakaguchi, G. (1986), A case report on human type B botulism. Jpn. J. Med. Sci. Biol., 39 : 29-33
12. 唐島田隆, 小野悌二, 飯田広夫, 安藤芳明, 阪口玄二, 阪口澄子, 籠田勝基 (1965), ミンクのボツリヌス中毒. 北海道衛研所報, 15 : 17-23
13. 伊藤 武, 坂井千三, 田淵 清, 今井信実, 江本敬之 (1976), 北海道のミンク養殖場で発生したボツリヌスC型菌による中毒斃死例について. Bull. Azabu Vet. Coll., 1 : 29-35
14. 坂井千三, 伊藤 武, 岡沢久美子, 善養寺浩, 辺野喜正夫 (1975), 東京都内の中川流域で発生したカモのボツリヌス中毒に関する疫学的な

- らびに細菌学的検討. 東京衛研年報, 26-1 : 14-19
15. 小久保彌太郎, 丸山 務, 金子誠二, 神崎政子, 松本昌雄, 増井光子, 平松 廣, 野瀬修央, 田代和治 (1987), 東京都上野不忍池で発生した C 型ボツリヌス菌による水禽類の集団斃死例. 日獣会誌, 40 : 113-117
  16. 阪口玄二, 梶 玲子 (1980), 鶏ボツリヌス症. 鶏病研究会報, 16 : 37-49
  17. 山部邦展, 古閑雄二郎 (1982), ブロイラーに見られた Clostridium botulinum C 型菌によるボツリヌス症. 鶏病研究会報, 18 : 21-24
  18. 梶尾規一, 大村康治, 山田淳一, 山本 明, 溝口 徹, 伊東孝祐, 椎原 隆 (1982), ブロイラーに発生した Clostridium botulinum C 型菌によるボツリヌス症. 鶏病研究会報, 18 : 126-130
  19. 山内靖隆, 八木 充, 広瀬英美 (1982), ブロイラーにおけるボツリヌス症の一発生例. 鶏病研究会報, 18 : 173-176
  20. 増田季志子, 佐藤弘, 小山順之 (1984), ブロイラーにおける Clostridium botulinum C 型感染症の発生. 鶏病研究会報, 20 : 39-41
  21. Kurazono, H., Shimosawa, K., Sakaguchi, G., Takahashi, M., Shimizu, T. and Kondo, H. (1985), Botulism among penned pheasants and protection by vaccination with C<sub>1</sub> toxoid. Res. Vet.

Sci., 38 : 104-108

22. 中林 大, 米山雪生, 本間穂積, 梅田雅夫, 石田秀史, 鍋屋政広, 遠藤恭介, 石川正男, 古川岩雄, 栗山茂衛 (1984), 養殖カモに発生した Clostridium botulinum C型菌によるボツリヌス症. 鶏病研究会報, 20 : 207-210
23. Meyer, K. F. (1956), The status of botulism as a world health problem. Bull. Wld. Hlth. Org., 15 : 281-298
24. 神沢謙三 (1960), E型ボツリヌス菌の生態学的研究. 北海道衛研所報, 11 : 161-172
25. 小野悌二, 唐島田隆, 亀山邦男, 佐藤 彰, 神沢謙三, 飯田広夫 (1967), 北海道におけるボツリヌスE型菌の分布に関する研究. 北海道衛研所報, 17 : 1-12
26. 安藤芳明, 唐島田隆, 猪股 寛, 沢辺幸雄, 田中泰雄 (1976), 十勝川水系におけるE型菌の分布調査. 北海道衛研所報, 26 : 110
27. 中村 豊, 飯田広夫, 佐伯 潔, 神沢謙三, 古賀有道 (1954) 北海道各地で発生したボツリヌス食中毒について. 北海道衛研所報, 特報3 : 1-37
28. 児玉栄一郎, 藤沢宗一, 坂本昭男, 浅野宏治 (1961), 秋田県下の土壌より検出したA型ボツリヌス菌について. 秋田衛研所報, 6 : 64-67
29. 児玉栄一郎, 藤沢宗一, 坂本昭男 (1964), 秋田県におけるボツリズム

- の疫学的研究並びに土壌調査成績. 秋田衛研所報, 18 : 15-27
30. 小林運蔵, 金鉄三郎 (1970), 十和田湖湖畔周辺土壌および同湖生息魚類についてのClostridium botulinumの分布調査. 秋田衛研所報, 15 : 55-59
  31. 青森県衛生研究所 (1981), 青森県におけるボツリヌス中毒とボツリヌス菌の分布. p.14-34, 青森県
  32. 石母田四郎, 佐々木武夫, 佐々木久栄 (1969), ボツリヌス菌の分布調査について. 岩手衛研年報, 13 : 133-135
  33. 金田一達男 (1980), Clostridium botulinumの分布に関する調査. 岩手衛研年報, 23 : 52-53
  34. 小林三郎 (1961), 東部日本に於けるClostridium botulinumの地理的分布に関する調査研究. 弘前医学, 12 : 682-694
  35. 伊藤 武, 斎藤香彦, 稲葉美佐子, 柳川義勢, 甲斐明美, 坂井千三, 駒井嘉明, 篠原 楷, 山岸 宏, 府川克二, 加藤喜市 (1981), ボツリヌス菌の生態学的研究: 東京都内の河川, 池および東京湾の泥土と耕地などの土壌における本菌の分布調査. 東京衛研年報, 32-1 : 7-11
  36. 上村 桂, 石月要平, 武田 卯, 岩沢 信 (1983), 新潟県におけるボツリヌス菌の分布調査. 新潟県医師会報, No.398 : 55
  37. 芹川俊彦, 木村晋亮 (1979), 石川県におけるClostridium botulinumの分布. 石川衛研所報, 16 : 167-171

38. Yamakawa, K., Kamiya, S., Nishida, S., Yoshimura, K., Yu, H.,  
Lu, D. and Nakamura, S. (1988), Distribution of Clostridium  
botulinum in Japan and in Shinkiang district of China.  
Microbiol. Immunol., 32 : 579-587
39. 刑部陽宅, 林美千代, 児玉博英 (1989), 富山地方の土壤などにおける  
ボツリヌス菌の分布. 食品と微生物, 6 : 87-90
40. 藤井謙芳, 大石巖, 阪口玄二 (1977), 淀川河川土壤中のボツリヌス菌  
分布について. 日細菌誌, 32 : 949
41. 山県 宏 (1963), 食中毒起因嫌気性菌の土壤内分布に関する調査研究.  
山口衛研業績報告, 1 : 101-106
42. 武田 攻, 津曲洋明 (1987), 宮崎県の環境中におけるボツリヌス菌の  
分布に関する研究 (第1報) 宮崎県の河川土壤におけるボツリヌス菌  
の検索について. 食品と微生物, 4 : 127-131
43. 道家 直, 戸泉 彗, 梅田哲也, 武田哲郎, 本田れい子, 松岡由美子,  
江藤睦子 (1984), ボツリヌス菌の環境中分布. 熊本衛研所報, 14 :  
19
44. Wakamatu, T. (1953), Ecological study of Clostridia in Kyusyu,  
especially in its southern part. Kitasato Arch. Exp. Med.,  
XXV : 163-186
45. Yamamoto, K., Kudo, H., Asano, H., Seito, Y., Nobeya, S.,

- Horiuchi, Y. and Awasa, K. (1970), Examen du Cl.botulinum dans les echantillons prelevés au lac Towada. Hirosaki Med. J., 22 : 92-96
46. 伊藤 武, 斎藤香彦, 稲葉美佐子, 坂井千三 (1978), 東京都内の中川流域の泥土および淡水魚におけるボツリヌスC型菌の分布. 東京衛研年報, 29-1 : 13-18
47. 芹川俊彦, 山田邦代, 木村晋亮 (1976) Clostridium botulinum C型菌に関する研究 (第1報) -河北潟における分布について-. 石川衛公研所報, 13 : 113-118
48. 小林とよ子, 浅見 望 (1979), 木曾川流域におけるC. botulinumの分布について. 東海学園女子短期大学紀要, 14 : 19-24
49. Venkateswaran, K., Nakano, H., Okabe, T., Takayama, K., Matsuda, O. and Hashimoto, H. (1989), Occurrence and distribution of Vibrio spp., Listonella spp., and Clostridium botulinum in the Seto Inland Sea of Japan. Appl. Environ. Microbiol., 55 : 559-567
50. 武田 攻, 津曲洋明 (1989), 宮崎県の環境中におけるボツリヌス菌の分布に関する研究 (第2報) 宮崎県の海岸・池・湖沼におけるボツリヌス菌の検索について. 食品と微生物, 6 : 103-106
51. 滋賀県立琵琶湖文化館編 (1986), 湖国びわ湖の魚たち, p.1-10, 第一

- 法規出版, 東京
52. 友田淑郎 (1989), 地球の歴史を探る 7 琵琶湖のいまとむかし,  
p.3-172, 青木書店, 東京
  53. 滋賀県教育委員会編 (1979), 滋賀県民俗地図－滋賀県緊急民俗文化財  
分布調査報告書－, p.17, 滋賀県
  54. 徳地幹夫, 山元なをみ (1974), 滋賀県におけるボツリヌス菌の分布調  
査 (第1報) 知内地区 (ボツリヌス中毒発生地区) 周辺におけるE型  
菌の分布. 滋賀衛公研所報, 10 : 5-8
  55. Dolman, C. E. (1957), Type E (fish-borne) botulism. Jpn. J.  
Med. Sci. Biol., 10 : 383-395
  56. 岡本 巖 (1971), 琵琶湖の還流. 琵琶湖国定公園学術調査報告書,  
p.177-213, 滋賀県
  57. 安藤芳明 (1972), 水産食品とE型ボツリヌス中毒 (1) わが国におけ  
る中毒例・分布・生態. ジャパンフードサイエンス, 5 : 49-54
  58. Haq, I. and Sakaguchi, G. (1980), Prevalence of Clostridium  
botulinum in fishes from markets in Osaka. Jpn. J. Med. Sci.  
Biol., 33 : 1-6
  59. 阪口玄二, 大石 巖 (1975), ボツリヌス菌の簡易検査法. 食品衛生研  
究, 25 : 775-785
  60. 滋賀県, 近畿地方建設局琵琶湖工事事務所, 滋賀県立衛生環境センタ

- (1976), びわ湖水質調査報告書. p.38-39, 滋賀県
61. 西尾道徳 (1989), 土壤微生物の基礎知識. p.36-37, (社)農山漁村文化協会, 東京
62. 野村 潔 (1981), 琵琶湖の水質と堆積物について. 水, 23 (10) : 93-95
63. Bott, T. L., Deffner, J. S., McCoy, E. and Foster, E. M. (1966), Clostridium botulinum type E in fish from the Great Lakes. J. Bacteriol., 91 : 919-924
64. 斎藤香彦, 伊藤 武, 稲葉美佐子, 坂井千三 (1979), ボツリヌス菌の生態学的研究: 東京都内の魚市場泥土および市場入荷魚介類における本菌の分布. 東京衛研年報, 30-1 : 7-11
65. Houghsby, G. A. and Kaysner, C. A. (1969), Incidence of Clostridium botulinum type E in Alaska salmon. Appl. Microbiol., 18 : 950-951
66. 宮地傳三郎, 川那部浩哉, 水野信彦 (1976), 原色日本淡水魚類図鑑, p.142-144, 保育社, 大阪
67. 阪口玄二 (1974), ボツリヌス毒素とボツリヌス菌の検索法. 食品衛生研究, 24 : 447-457
68. Notermans, S., Dufrenne, J. and van Schothorst, M. (1979), Recovery of Clostridium botulinum from mud samples incubated



- at different temperature. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 6 : 403-407
69. Segner, W. P., Schmidt, C. F. and Boltz, J. K. (1971),  
Minimal growth temperature, sodium chloride tolerance, pH sensitivity, and toxin production of marine and terrestrial strain of Clostridium botulinum type C. *Appl. Microbiol.* 22 : 1025-1029
70. 中井一郎, 口分田政博, 岡田登美男, 細井 忠, 山崎 享, 井上剛彦, 山崎 匠, 北川恵子, 片岡仁志男編 (1982), 滋賀の自然と野鳥. 滋賀県の野鳥, p.1-15, 滋賀県
71. 滋賀県生活環境部自然保護課 (1990), 鳥類関係統計 (平成元年度分集計). p.20-22, 滋賀県
72. 若林徹哉, 一瀬 諭 (1977), 1977年琵琶湖で発生した淡水赤潮について. 滋賀衛環セ所報, 13 : 163-164
73. 一瀬 諭, 若林徹哉 (1978), 1978年琵琶湖で発生した赤潮の分布について. 滋賀衛環セ所報, 14 : 141-145
74. Schmidt, C. F., Lechowich, R. V. and Folinazzo, J. F. (1961),  
Growth and toxin production by type E Clostridium botulinum below 40°F. *J. Food Sci.*, 26 : 626-630
75. Hyun, S. H. and Sakaguchi, G. (1987), Cell-bound toxin of

- Clostridium botulinum type C and its pathogenic significance.  
Jpn. J. Vet. Sci., 50 : 495-501
76. Smith, L. D. (1975). Inhibition of Clostridium botulinum by strains of Clostridium perfringens isolated from soil. Appl. Microbiol., 30 : 319-323
77. 滋賀県生活環境部 (1988), 自然保護計画の概要. 滋賀の自然－自然保護計画のあらまし－, p.1-6, 滋賀県
78. Huss, H. H. (1980). Distribution of Clostridium botulinum. Appl. Environ. Microbiol., 30 : 764-769
79. 山東町立大東中学校科学部 (1976), 三島池の科学, p.1-2, 大東中学校, 滋賀県
80. 小林桂助 (1970), 原色日本鳥類図鑑, p.87, 保育社, 大阪
81. Kravchenko, A. T. and Shishulina, L. M. (1967). Distribution of Cl. botulinum in soil and water in the USSR, In Ingram, M. and Roberts, T. A. (eds.), Botulism 1966, p.13-20, Chapman and Hall, London
82. Smith, L. D. (1977). The occurrence of Clostridium botulinum and Clostridium tetani in the soil of the United States. Hlth. Lab. Sci., 15 : 74-80
83. Smith, G. R. and Moryson, C. J. (1977). A comparison of the

- distribution of Clostridium botulinum in soil and lake mud.  
J. Hyg. Camb., 78 : 39-41
84. Johansen, A (1963), Clostridium botulinum in Sweden and the adjacent water. J. Appl. Bacteriol., 26 : 43-47
85. Laylock, R. A. and Loring, D. H. (1972), Distribution of Clostridium botulinum type E in the gulf St. Lawrence in relation to the physical environment. Can. J. Microbiol., 18 : 763-773
86. Dolman, C. E. (1960) Type E botulism ; A hazard of the north. Arctic, 13 : 230-256
87. 林 賢一, 徳地幹夫 (1975) 滋賀県におけるボツリヌス菌分布調査 (第2報) -琵琶湖に流入する主要河川(中流・河口) 土壤における分布について. 第34回日本公衛学会総会, 横浜
88. 滋賀県企画部水政室 (1983), 琵琶湖総合開発100問, p.48-49, 滋賀県
89. Graham, J. M. (1978), Clostridium botulinum type C and its toxin in fly larvae. Vet. Rec., 102 : 242-243
90. 砂川紘之, 亀山邦男 (1980), 札幌市近郊の水鳥生息地及びミンク飼育場におけるボツリヌスC及びD型菌の検索. 北海道衛研所報, 30 : 83-84
91. Graham, J. M., Smith, G. R., Borland, E. D. and MacDnald, J.

- W. (1978), Avian botulism in winter and spring and the stability of Clostridium botulinum type C toxin. Vet. Rec., 102 : 40-41
92. 滋賀県 (1991) 滋賀の水産, p.1-116
93. 宇寿山満, 立野昌子, 蓬田美知子, 菅井正子, 佐久間文久 (1979), ボツリヌス中毒の発生と関連調査. 福島衛公研研究報告, 28 : 25-28
94. Jansen, B. C. (1971), The toxic antigenic factors produced by Clostridium botulinum types C and D. Onderstepoort. J. Vet. Res., 38 : 93-98
95. 阪口玄二 (1987), ボツリヌス菌. 厚生省監修, 微生物検査必携, 細菌・真菌検査, 第3版, p.D178-189, 日本公衆衛生協会, 東京
96. 笈 福子, 杉山信子, 安田和彦 (1990), 滋賀県に発生したボツリヌス中毒事例. 滋賀衛環セ所報, 25 : 82-83
97. 林 賢一, 徳地幹夫 (1974), 「ハズズシ」におけるボツリヌスE型菌の毒素産生に関する実験的研究. 滋賀衛公研所報, 10 : 18-21
98. 林 賢一, 徳地幹夫, 荘原誠一 (1976), マキノ町知内における熟れずしの製造に関する実態調査とその一部製品のボツリヌス菌の検索について. 滋賀衛環セ所報, 13 : 29-36
99. 林 賢一 (1986), 真空包装「辛子蓮根」からのA型ボツリヌス菌の検出と市販食品中のボツリヌス菌汚染についての検討. 滋賀衛環セ所報, 21 : 101-105