

# 千葉県で発生したハヤシライスの具によるボツリヌス食中毒事例について

内村眞佐子 小岩井健司

A case of foodborne Botulism caused by vacuum-packed hashed meat in Chiba prefecture

Masako UCHIMURA and Kenji KOIWAI

## I. はじめに

ボツリヌス中毒は、ボツリヌス菌が産生する毒素によって引き起こされる神経麻痺症状を主兆とする疾患で、食餌性ボツリヌス症、乳児ボツリヌス症、創傷性ボツリヌス症に分類される。ボツリヌス菌は嫌気性菌で、芽胞を形成し広く土壌中に分布している。食品がボツリヌス菌の芽胞に汚染され嫌気状態で放置された場合、食品中のボツリヌス菌は増殖して毒素を産生する。食餌性ボツリヌス症は、食品中に産生された毒素を摂取することにより発症する。ボツリヌス毒素にはA～G型があり、ヒトの中毒は主にA、B、E、F型による。

1999年8月に柏市においてボツリヌス患者が発生した。患者が発症前日に食した「ハヤシライスの具」が原因食品として疑われ、検査の結果患者および食品からA型ボツリヌス菌が検出された。本事例について、事件の発生状況および原因食品の検査結果について概要を報告する。

## II. 事件の概要

平成11年8月13日、千葉県内の病院から県庁業務課に「入院中の患者がボツリヌス中毒の疑いがあるので、抗毒素の供給方法を問い合わせたい」と電話による問い合わせがあった。この情報を受けて管轄保健所は、担当医師に食中毒患者発生の疑いがあることを確認し、調査を開始した。

患者は11歳の女児で、8月6日朝悪心のため近医を受診したものの症状は改善せず、同日夕方再度受診し、意識混濁、四肢麻痺などの症状で入院した。主治医は当初、ギランバレー症候群を疑い治療を行っていたが、症状の進行の様子や各種テストの結果からボツリヌス中毒を疑い、8月13日東京都立衛生研究所に患者糞便および血清検査を依頼した。検査の結果、翌14日にA型ボツリヌス毒素が確認されたことから担当医師は、ボツリヌス食中毒の発生を保健所に届け出た。その後の検査で、患者糞便からA型ボツリヌス菌が検出された。

医師からの届け出を受けて、柏保健所担当者が患者家族からの喫食状況の聞き取り調査を行った結果、患者は発症前日の8月5日の昼食に「ハヤシライスの具」を喫食していることがわかった。この「ハヤシライスの具」は真空包装された総菜で、7月28日

に冷蔵状態でT市民生協から宅配され、冷蔵保存の表示があったものの、患者宅では喫食した8月5日までの8日間室温で保存されていた。患者宅では、患者の食べ残しあるいは「ハヤシライスの具」のあき袋等はすでに廃棄されていて、直接患者と関連ある検体は入手できなかった。そこで、冷蔵庫内に保存されていた食品を参考として確保すると共に、販売者の協力を得て製造元から患者喫食と同じ「ハヤシライスの具」を取り寄せて検査を行った。さらにT生協とその利用者の協力により、患者が喫食した商品と同日に宅配された「ハヤシライスの具」25検体、および同時期に宅配されたその他のレトルト食品等5検体を回収して検査を行い、回収された「ハヤシライスの具」の1検体からA型ボツリヌス菌を検出することができた。

## III. 材料および方法

1. 検査材料：食品検査材料として、患者宅の冷蔵庫内に保存されていた食品4検体（メロン、タケノコの煮物、ゼリー、カルピ井の具）、製造元に依頼して取り寄せた「ハヤシライスの具」1検体、回収品30検体（「ハヤシライスの具」：25、カルピ井の具：1、中華井の具：2、ジンギスカン：1、味付け牛カルピ：1）を用いた。回収品は、患者が喫食した「ハヤシライスの具」と同日に宅配された真空包装の総菜およびレトルト食品等で、利用者宅に保存されていたものをT生協の協力を得て回収したものである。

2. 食品のボツリヌス検査：食品50gを片側濾紙付きストマッカー袋に秤量し、1%バプト加PBSを50ml加え、1分間ストマッカー処理を行った。濾紙内側から40mlを分取し、3000回転で30分間遠心分離後、上清を毒素検査用試料とした。沈渣は少量の1%バプト加PBSに懸濁し、その全量を0.2%可溶性デンプン、0.3%ブドウ糖添加クックトミート培地(DIFCO)(CMGS培地)2本に分けて接種し、1本はそのまま、1本は80°C10分加熱処理後35°Cで嫌気培養した。培養は10日間行い、ガス産生の有無に関わらず菌の発育が認められた検体についてボツリヌス毒素検査を行った。毒素検査はマウスを用いて行った。ボツリヌス菌分離は、ボツリヌス毒素が陽性となったCMGS培養液を卵黄加CW寒天培地上に塗抹し、35°Cで2日間嫌気培養した。リパーゼ反応が認められたコロニーをCMGS培地で35°Cで3日間嫌気培養し、ボツリヌス毒素産生の確認を行い同定した。

3. 毒素遺伝子のPCR：被検菌をTrypticase™ Peptone Glucose Yeast Extract Broth (TPGY Broth) (5% Bacto Casitone (Difco), 2% Yeast Extract (Difco), 0.5% Peptone,

0.4% Glucose, 0.1% Sodium thioglycollate, pH7.0±0.2) に接種し, 2日間37°Cで嫌気培養した。TEバッファー (10mM Tris, 1 mM EDTA [pH8.0]) 90 μlに培養液10 μlを加え, 100°C, 10分間加熱した後, 12,000回転で2分間遠心分離した上清をテンプレートDNAとして用いた。プライマーおよびPCR条件はTakeshiら<sup>1)</sup>の方法に従い行った。反応終了後, 2%アガロースゲルを用いて電気泳動し, エチジウムブロミド染色後写真撮影を行った。

4. パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE): 被検菌をTPGY Brothに接種し, 2日間37°Cで嫌気培養した。DNAの抽出と試料の調整は, 満田ら<sup>3)</sup>の方法に準じて行った。培養液100 μlを遠心集菌し, 50 μlのSEバッファー (75mM NaCl, 25mM EDTA) と等量の1%低融点アガロース (Bio-Rad) およびリゾチーム (25 mg/ml) を4 μl加え, サンプルゲルブロックを作成した。ゲルブロックを溶菌液 (1 M NaCl, 0.1M EDTA [pH8.0], 0.5% [w/v] Brij-58, 0.2% [w/v] deoxycholate, 0.5% [w/v] sarkosyl, 1 mg/ml リゾチーム) 内で37°C, 1時間反応させ溶菌を行った。次いで, 蛋白分解液 (0.25M EDTA [pH8.0], 1% [w/v] sarkosyl, 0.1mg/ml proteinase K) 中で16~20時間, 50°Cで蛋白消化を行った後, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluorideを含むTEバッファー中で30分間室温放置し, 以後, TEバッファーで4回洗浄した。このゲルを適当な大きさに切断後, 制限酵素で37°C, 18時間処理した。電気泳動は, CHEF-DR III (Bio-Rad) システムで, 0.5xTBEバッファー, 1%アガロースゲルを用い, 200V, 14°Cの条件下, パルスタイム5~20秒で20時間行った。

IV. 結果

食品検査結果を表1に示す。患者宅残品のメロン, タケノコ煮物, フルーツゼリー, カルビ井の具, 製造元から取り寄せた「ハヤシライスの具」は, ボツリヌス毒素およびボツリヌス菌陰性であった。回収品の内の1検体からA型ボツリヌス菌が検出された。ボツリヌス菌は, 80°C, 10分加熱処理CMGS培養液からのみ検出され, 非加熱培養液からは検出できなかった。ボツリヌス菌が検出された「ハヤシライスの具」のボツリヌス毒素検査を行ったが, 食品中のボツリヌス毒素は検出されなかった。

「ハヤシライスの具」由来A型ボツリヌス菌株および患者由来A型ボツリヌス菌株 (東京都立衛生研究所から分与された) についてPCR法による毒素遺伝子検索を行った。結果を図1に示す。食品由来株, 患者由来株はA型毒素遺伝子およびB型毒素遺伝子を保有し, E型およびF型毒素遺伝子の保有は認められなかった。対照として用いた乳児ボツリヌス症患者由来<sup>3)</sup>A型ボツリヌス菌株はA型毒素遺伝子のみが認められた。

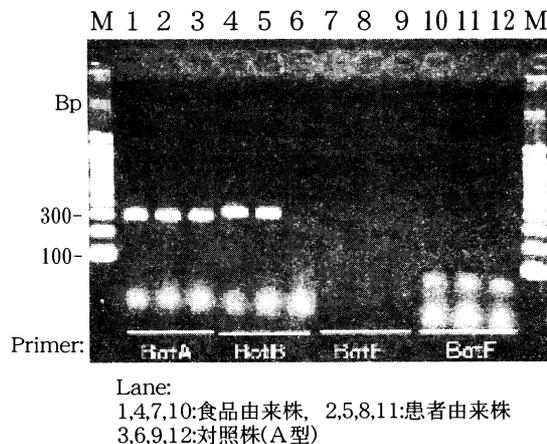
食品由来株および患者由来株の遺伝子解析をする目的でPFGEを行った。結果を図2に示す。制限酵素としてSma I, Nur I, Ksp Iを用いて遺伝子パターンの比較を行ったところ, いずれの酵素を用いた場合も食品由来株と患者由来株は同一の泳動パターンを示し, これらの株が同一のクローン由来であることが示された。

表1 食品のボツリヌス毒素およびボツリヌス菌検査結果

検体名	検査数	毒素陽性数	菌陽性数	
			80°C,10分加熱あり	なし
患者宅残品				
メロン	1	0	0	0
タケノコ煮物	1	0	0	0
ゼリー	1	0	0	0
カルビ井の具	1	0	0	0
製造元からの取り寄せ品				
ハヤシライスの具	1	0	0	0
回収品				
ハヤシライスの具	25	ND*	1	0
カルビ井の具	1	ND	0	0
牛井の具	1	ND	0	0
中華井の具	2	ND	0	0
ジンギスカン	1	ND	0	0
味付け牛カルビ	1	ND	0	0

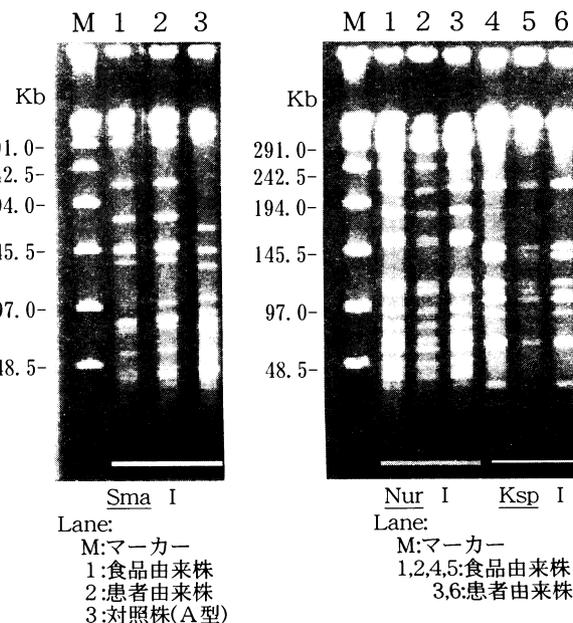
\*:ボツリヌス筋陽性検体については抽出液の毒素検索を実施した。結果は毒素陰性であった。

図1 PCRによるボツリヌス菌毒素遺伝子検出



Lane:  
1,4,7,10:食品由来株, 2,5,8,11:患者由来株  
3,6,9,12:対照株(A型)

図2 食品由来株および患者由来株のPFGE解析



Sma I Lane:  
M:マーカー  
1:食品由来株  
2:患者由来株  
3:対照株(A型)

Nur I Ksp I Lane:  
M:マーカー  
1,2,4,5:食品由来株  
3,6:患者由来株

## V. 考 察

千葉県で発生したボツリヌス食中毒患者および「ハヤシライスの具」から分離されたA型ボツリヌス菌は、A型毒素遺伝子に加えてB型毒素遺伝子も保有する株であった。このようにA型毒素を産生する株で、B型毒素遺伝子を同時に保有する株の割合が多いことはすでに知られており、Giovannaら<sup>9)</sup>は79株のA型ボツリヌス菌のうち43株(54.3%)がA型およびB型毒素遺伝子保有株であることを報告している。わが国においても、1999年3月に広島県で発生した乳児ボツリヌス症患者由来株がA型毒素産生、A、B型毒素遺伝子保有株であったことが報告されている<sup>5)</sup>。

我が国における食餌性ボツリヌス食中毒事例は、1977年から1998年までの21年間に36件発生しており、毒素型別ではE型が28件、A型が5件、B型が2件、型別不明が1件である<sup>6)</sup>。E型ボツリヌス菌による食中毒が「いずし」を原因食品として主に東北、北海道で発生している一方で、A型およびB型ボツリヌス菌による事例は地域的特徴はなく、その原因食品はカラシレンコ<sup>7)</sup>、缶詰の里芋<sup>8)</sup>(A型事例)、イタリア産グリーンオリーブ<sup>9)</sup>(B型事例)と多彩である。本事例の原因食品の「ハヤシライスの具」は総菜に分類され、気密性のある袋入りの要冷蔵食品で「要冷蔵」「10℃以下保存」の表示がされていた。「ハヤシライスの具」は宅配された後8日間室温で保存され、患者が喫食した時すでに袋は膨張しており、調理法として袋に”煮沸したお湯の中で3分間温めてから食べる”と例示されていたが、患者は2袋同時に鍋に入れ、煮沸後約30秒で取り出し喫食したようである。A型ボツリヌス菌は、pHが中性域では水分活性0.96以上で発育可能で、増殖至適温度は37℃である<sup>10)</sup>。製造元から取り寄せた「ハヤシライスの具」の水分活性は0.979であった。ボツリヌス菌を含んでいる当該食品が、夏期に室温で8日間保存されている間に菌が増殖し、食品中にボツリヌス毒素が産生されていたことは十分考えられる。一方A型ボツリヌス毒素は易熱性であり数分間の煮沸で失活する。患者は喫食前に約30秒間の煮沸加熱をしていたが、食品の内部まで熱が伝わるには加熱時間が不十分であったと思われる。「ハヤシライスの具」は、タマネギスライス<sup>11)</sup>を10℃、牛肉を30秒ポイルしてドミソースと混合後袋に充填し、90℃で1時間加熱した後冷却し出荷まで冷凍保存されていた。これらの状況は、阪口<sup>12)</sup>が食餌性ボツリヌス食中毒の発生要因として挙げている5条件、つまり①ボツリヌス菌芽胞が食品に混入する、②ボツリヌス菌と競争する雑菌を減少させる操作を施す、例えば不十分な加熱、脱水、薫製、真空パックなど、③食品が毒素産生に十分な栄養を供給し、他の物理的条件(pH、水分活性)が十分である、④毒素産生に必要な温度で十分な期間保存される、⑤その中で毒素が産生された食品を、加熱調理しないで食べる、を十分満たしているといえる。1984年に11名の死者を含む36名の患者発生をみた「辛子蓮根」による食中毒事例では、辛子蓮根の製造過程における不完全な加熱行程と真空パックされた商品を長期間常温保存していたことが原因と結論されている<sup>7)</sup>。阪口<sup>12)</sup>は

「辛子蓮根」事件の経験から、レトルト食品と区別が付きにくい真空包装食品の危険性を指摘している。食品の包装、貯蔵法の進歩と共に様々な形態の食品が流通し、その利用方法が複雑になっている現在、レトルト食品と真空包装食品の違い等の知識を一般に普及させると共に、食品メーカーは高齢者や子供にもわかりやすい表示法を工夫することが重要な課題といえる。

## VI. 文 献

- 1) Kouichi Takeshi, Yukako Fujinaga, Hiroshi Nakajima, Keiji Oguma, Tetsuya Ueno, Hiroyuki Sunagawa, and Tohru Ohyama (1996): Simple Method for Detection of Clostridium botulinum Type A to F Neurotoxin Genes by Polymerase Chain Reaction, Microbiol. Immunol., 40(1), 5-11.
- 2) 満田年宏, 荒井一二, 川本進, 横田俊平 (1995): パルスフィールドゲル電気泳動法による感染症の分子疫学的解析, 日細菌誌: 1077-1086.
- 3) 野田宏昌, 那須 武, 小池明美, 杉田克生 (1986): 「乳児ボツリヌス症」の本邦第一例, 病原微生物検出情報, 7, 163.
- 4) Giovanna Franciosa, Joseph L. Ferreira, and Charles L. Hatheway (1994): Detection of type A,B,and E botulism neurotoxin genes in Clostridium botulinum and other Clostridium species by PCR:evidence of unexpressed type B toxin genes in type A toxigenic organisms, J. Clin.Microbiol., 32: 1911-1917.
- 5) 竹田義弘, 東久保 靖, 井上佳織, 小川博美, 岡田 賢, 佐藤 貴 (2000): 広島県で発生したボツリヌス毒素遺伝子A・B型保有株による乳児ボツリヌス症, 日本食品微生物学会雑誌, 17: 143-147.
- 6) 〈特集〉ボツリヌス症, 病原微生物検出情報, 21,49-50 (2000).
- 7) 中嶋 茂(1985): わが国におけるA型ボツリヌス食中毒事件, 微生物, 1: 43-49.
- 8) 八柳 潤, 遠藤守保, 斎藤志保子, 佐野 健, 森田盛大 (1993): 県内初のA型ボツリヌス食中毒の概要と当所の検査対応-秋田県, 病原微生物検出情報, 14, 171-172.
- 9) 門間千枝, 柳川義勢, 諸角 聖, 松村美由紀, 岩田 誠, 菊池賢, 志関雅幸, 戸塚恭一(2000): 東京都内で発生したグリーンオリーブの塩漬けによるB型ボツリヌス食中毒事例(2)-検査結果, 病原微生物検出情報, 21: 53.
- 10) 伊藤 武, 坂井千三(1985): ボツリヌス食中毒の予防, 微生物, 1: 31-42.
- 11) 阪口玄二(1981): 「ボツリヌス菌」食中毒(坂崎利一編)中央法規出版, 358-408.
- 12) 阪口玄二 (1988): 辛子蓮根中毒の教訓, 化学と生物, 26: 203-206.