

乳児ボツリヌス症の原因食品に関する調査 ハチミツのボツリヌス菌汚染について

内村真佐子, 三瓶 憲一, 小岩井健司, 高木 謙二, 矢崎 広久

Infant Botulism : A Survey of Honey for Clostridium Botulinum Spores.

Masako UCHIMURA, Kenichi SANBE, Kenji KOIWAI
Kenji TAKAGI and Hirohisa YAZAKI

I はじめに

1986年6月, 千葉県船橋市内の病院を受診した乳児が, ボツリヌス症と診断された。これは, わが国で始めて確認された乳児ボツリヌス症例である。

乳児ボツリヌス症は, 生後3週から8ヶ月の乳児が, ボツリヌス芽胞を含む食品を経口的に摂取することにより生じる疾病である。

本症は1976年, アメリカで発見された新しいタイプのボツリヌス中毒である。現在までにアメリカ, イギリス, オーストラリアにおいて500以上の症例が認められており, 患者の多くは, ハチミツを介してボツリヌス菌を摂取していたと報告されている¹⁾。今回千葉県で確認された症例においても, 患者が飲用していたハチミツから, 患者便中より分離されたものと同じA型ボツリヌス菌が検出された。このことから, 本事例の原因食品はハチミツであろうと推定された。²⁾³⁾

ハチミツのボツリヌス菌汚染については, すでにアメリカにおいて多くの調査がなされており, 市販ハチミツの約10%がボツリヌス菌で汚染されているという報告がある⁴⁾。一方わが国においては, ハチミツの細菌汚染に関する調査は少なく, その実態が十分明らかとなっていないとはいえない。⁵⁾⁶⁾

そこで著者らは, 県内産及び輸入ハチミツのボツリヌス汚染状況を知る目的で, 市販品, バルク及び製品ロットについて調査を行ったので結果について報告する。

II 材料及び方法

1) 被検ハチミツ: 市販ハチミツ9検体, 県内産製品

17検体, 1984年8月から1986年6月の間に輸入されたバルク24検体, 及び1986年3月から6月に製造された製品(出荷前に工場で収去した製品)5検体の合計55検体について検査を行った。

2) ハチミツの検査法: ハチミツからのボツリヌス菌分離は, Midraらの方法⁷⁾に準拠し, クックトミート培地(以下CMと略)(Difco)を用いて行った。培養は, 30°C, 嫌気条件下で行った。培養のためのハチミツの前処理は, 次に示す4つの方法で行った。

方法A: 10gのハチミツを30mlの1%ペプトン水で希釈したものを1検体当たり5本ずつ作製し, 8,000rpm, 30分間遠心分離した。上清を取り除いて得られた沈渣を1mlのペプトン水に再浮遊し, それぞれ15mlのCM培地に接種後培養を行った。

方法B: 50gのハチミツに, あらかじめ温めておいた蒸留水200mlを加えよく攪拌した後, 方法Aと同様に遠心分離し, 沈渣を1本のCM培地(15ml)に接種した。

方法C: 100gのハチミツを用い, 方法Bと同様に操作を行った。

方法D: ハチミツ40gに温めた蒸留水200mlを加え, 混和・遠心分離後, 沈渣を4mlの蒸留水に再浮遊した。その原液及び10倍希釈液の1mlをそれぞれ4本の, 0.5%可溶性でんぷん及び0.3%ブドウ糖加CM培地(10ml)に接種した。各濃度の試料を接種したCM培地の2本は80°C15分加熱処理し, 他の2本はそのまま培養した。

3) ボツリヌス毒素の検査法: 培養開始後5日目, 7日目及び10日目に培養上清の一部を取り, 3,000rpm, 15分間遠心分離した上清をゼラチン希釈液(0.4% Na₂HPO₄, 0.2%ゼラチン, pH6.2)で5倍希釈し, 0.5mlずつをマウス腹腔に接種した。1検体当たり2匹のマウスを使用し, ボツリヌス特異症状の有無及び生死を4日間観察した。マウスがボツリヌス症状を呈して死亡した試料については, A~F型単価の抗毒素血清(血清研究

所製造)を用いて型別を行った。

4) ボツリヌス菌の分離: ボツリヌス毒素が確認された検体のCM培養液を、5%卵黄加GAM寒天平板培地(日水製薬)に塗抹し、30°Cで2日間嫌気培養を行った後、卵黄反応及びリパーゼ陽性(パーリー・レイヤー陽性)コロニーを分離した。

III 結果

1) 検査方法の比較: 55検体のハチミツについて、検査法A・B・Cのいずれか1つとD法を組み合わせ、合計2回の検査を行った結果、3検体(5.5%)からボツリヌス菌を検出した。検査法別の菌陽性数の内訳を表1に示す。

表1 ハチミツからボツリヌス菌検出検査法別の検出率の比較

検査方法	検査数	陽性数(%)
A	10	1(10)
B	17	0(0)
C	29	0(0)
D	52	2(3.8)

試料10gについて、4~5本ずつ培養するA法及びD法を用いた場合、陽性率はそれぞれ10%及び3.8%であった。一方、50~100gのハチミツを一本の培地で培養するB法及びC法では、全ての検体がボツリヌス菌陰性であった。ボツリヌス菌陽性となった3検体の検査法ごとの比較を表2に示す。検体No.5はA法で、5本のうち1本からF型菌が分離されたが、D法では分離されなかった。また、D法で陽性を示したNo.8及びNo.40は、いずれも原液非加熱培養の1本のみからF型菌が検出されたが、No.8はA法で陰性でありNo.40はC法で陰性であった。No.40からはC法で、破傷風菌が分離された。

表2 ハチミツからのボツリヌス毒素検出法の比較

検体番号	由来	検査方法			
		A	B	C	D
5	市販(中国, アルゼンチン)	+1/5(F)	ND	ND	-
8	市販(中国, アルゼンチン)	-	ND	ND	+1/8(F)
40	製品(中国, アルゼンチン)	ND	ND	-*	+1/8(F)

* Cl.tetanii+

2) 産地別のハチミツの汚染状況: 表3に示すように、千葉県産を含む国産品18検体は、すべてボツリヌス菌陰性であった。ボツリヌス菌が検出された3検体は、いずれもアルゼンチン及び中国からの輸入品を混合して製造

されたもので、No.5及びNo.8は市販品、No.40は製品であった。

表3 蜂蜜のボツリヌス菌による汚染実態調査

産地(国名)	陽性数/検体数	陽性率(%)	毒素型
国内			
千葉県内	0/17	0	
県外	0/1	0	
外国			
中国	0/14	0	
アルゼンチン	0/2	0	
アメリカ	0/3	0	
メキシコ	0/1	0	
ニュージーランド	0/2	0	
ハンガリー	0/2	0	
ソ連	0/2	0	
*アルゼロチン+中国	3/9	33.3	F型3
不明	0/4	0	
合計	3/55	5.5	

IV 考察

ハチミツからボツリヌス菌を分離するためすでに種々の方法が試みられているが、同一検体における繰り返し試験において結果が一定しない場合があることが、多くの調査により指摘されている^{4,9,10,11)}。著者らの試験においても、検査法を違えて検査を繰り返し行ったところ、得られた結果に再現性は認められなかった。(表2)

繰り返し検査結果が一致しにくい原因の一つとして、ハチミツは粘度が高いため芽胞等の微粒子が混入していても均一に分布しないことがあげられるので、ハチミツの細菌検査には、適当な温度を加えて粘度を低くしたり、よく混和しながら検体を採取し、検査のくり返し数を多くするなどの工夫が必要である。

ハチミツは水分活性が低くpHが低いため、その中にはほとんどの細菌は生育も生残もできない。しかし、芽胞は存在し続けることができ、適当な培地に移すことにより栄養型菌として増殖してくる。またハチミツ中には、ボツリヌス菌以外にも好気性芽胞菌のBacillus属や嫌気性芽胞菌のClostridium属が数多く存在している⁵⁾。今回の著者らの調査においても、土壌細菌である破傷風菌が検出されている。

乳児ボツリヌス症は、食品中で増殖したボツリヌス菌が産生した毒素を摂取して発病する“食餌性ボツリヌス症”とは感染様式が異なり、摂取された芽胞が腸管内で発芽・増殖しながら産生する毒素により中毒を起こす“生体内毒素型食中毒”の範疇に入る。生後3週から8カ月の乳児のみが“生体内毒素型ボツリヌス中毒”を起こす原因は明らかではない。現在のところ、生後8カ月

を過ぎると常在細菌が腸管に定着するため、経口的に摂取されたボツリヌス菌は腸管に定着し増殖することができないのであろうと推測されている¹²⁾。今回の著者らの調査では、県内産ハチミツ17検体はすべてボツリヌス菌陰性であった。しかし、最近行われた大規模な調査の結果、国内産ハチミツは輸入ハチミツ同様、その約5%はボツリヌス菌陽性であることが報告されている⁹⁾。従って、国内産・輸入品を問わずハチミツなど、多種の細菌が混入しているが殺菌が不可能な食品類は、8カ月未満の乳児には与えないことが望ましい。

V まとめ

ハチミツに混入しているボツリヌス菌の分離を、4種の方法を用いて試みた。その結果、50~100gを1本の培地に入れて培養する方法に比べ、10gを1検体につき数本ずつ培養する方法が、ボツリヌス陽性率が高い結果が得られた。

ハチミツ55検体のうち、3検体(5.5%)からボツリヌスF型菌が検出された。いずれも、アルゼンチン及び中国からの輸入品であった。今回の調査では、国産ハチミツはボツリヌス菌陰性であった。

本稿を終るにあたり、ボツリヌス菌の分離同定にご指導をいただきました阪口玄二教授(大阪府大)および高橋元秀先生(千葉県血清研究所)に深謝いたします。

VI 文献

- 1) Arnon, S.S., Midura, F., Daumas, K., Thompson, B., Wood, R.M. and Chin, J.(1979) : Honey and other environmental risk factors for infant botulism. *Journal of Pediatrics*. 94 : 331.
- 2) Noda, H., Sugita, K., Koike, A., Nasu, T., Takahashi, M., Shimizu, T., Ooi, K. and Sakaguchi, G. : The first case of infant

botulism in Japan. *American Journal of Disease of Childrem.* (in press)

- 3) 高機元秀, 清水朋子, 大井清, 野田弘昌, 阪口玄二(1987) : 乳児ボツリヌス症(本邦初発例)における毒素及び菌の検出。日本細菌学雑誌。42 : 144.
- 4) Sugiyama, H., Mills, D.C. and Cathy Kuo L.J.(1978) : Number of Clostridium botulinum Spores in Honey. *Journal of Food Protection*. 41 : 848-850.
- 5) 三田村弘, 亀山邦男, 安藤芳明(1979) : ハチミツ中の有芽胞細菌について。北海道衛生研究所報。29 : 16-19.
- 6) 小久保弥太郎, 神保勝彦, 金子誠二, 松本昌雄(1984) : 市販ハチミツの芽胞菌汚染の実態。東京衛研年報。35 : 192-196.
- 7) Midura, T.F., Snoeden, S., Wood, R.M. and Arnon, S.S.(1979) : Isolation of Clostridium botulinum from Honey. *Journal of Clinical Microbiology*. 9 : 282-283.
- 8) 三田村弘(1987) : 食品及び環境のボツリヌス菌汚染。衛生微生物技術協議会, 第8回研究会講演抄録。30.
- 9) Guilfoyle, D.E. and Yagar, J.F.(1983) : Survey of Infant Foods for Clostridium Botulinum Spores. *Journal of The Association of Official Analytical Chemists*. 66 : 1302-1304.
- 10) Kautter, D.A., Lily, T.Jr., Solomon, H.M. and Lynt, R.K.(1982) : Clostridium butulinum Spores in Infant Foods : A Survey. *Journal of Food Protection*. 45 : 1028-1029.
- 11) Huhtanen, C.N., Knox, D. and Shimanuki, H.(1981) : Incidence and Origin of Clostridium botulinum spores in Honey. *Journal of Food Protection*. 44 : 812-814.
- 12) 阪口玄二(1980) : 乳幼児ボツリヌス症。モダンメディア。26 : 254-262.