

# 井戸水を原因とした乳児ボツリヌス症の発生とその疫学的対応

## Isolation of *C. botulinum* from a Well Water caused Infant Botulism.

畠山 敬 三品 道子<sup>\*1</sup> 高橋 恵美 佐々木美江  
 後藤 郁男 上村 弘 谷津 壽郎 齋藤 紀行  
 葛岡 勝悦<sup>\*2</sup> 斎藤 善則 清野 茂 嵯峨 京時<sup>\*3</sup>  
 高橋 美保<sup>\*4</sup> 岩松 良弘<sup>\*4</sup> 小泉みどり<sup>\*4</sup> 千葉 文明<sup>\*5</sup>  
 大山 英明<sup>\*6</sup> 藤原 公男<sup>\*7</sup> 佐藤 仁一<sup>\*8</sup> 鹿野 和男<sup>\*4</sup>

Takashi HATAKEYAMA, Michiko MISHINA, Emi TAKAHASHI, Mie SASAKI  
 Ikuo GOTO, Hiroshi UEMURA, Juro YATSU, Noriyuki SAITO  
 Syouetsu KUZUOKA, Yoshinori SAITO, Shigeru SEINO, Kyouji SAGA  
 Miho TAKAHASHI, Yoshihiro IWAMATSU, Midori KOIZUMI, Fumiaki CHIBA  
 Hideaki OOHAYAMA, Kimio FUJIWARA, Jinichi SATO, Kazuo SHIKANO

平成18年9月に県内で1ヶ月齢の乳児がボツリヌス症に罹患するという事例が発生した。調査の結果、自宅で飲用に使われている井戸水が原因として疑われたことから、新たなボツリヌス菌の分離方法で検査したところ菌を分離することに成功した。以上から、本事例は感染原因が井戸水であるという国内外でも初めての極めて特異的なケースであることが判明した。

キーワード：乳児ボツリヌス症；井戸水

**Key words** : infant botulism ; well water

### 1 はじめに

乳児ボツリヌス症は、ボツリヌス菌芽胞を生後1年未満の乳児が経口的に摂取した場合にのみ起こり、乳児の未発達な腸管内で増殖したボツリヌス菌の産生する毒素により引き起こされる重篤な感染症である。国内では1986年の初発例以来、20例が報告されているが、その多くは輸入ハチミツに混入した菌が原因であった<sup>1)</sup>。

我々は、県内在住の1ヶ月齢の乳児がボツリヌス症に罹患するという事例に遭遇した。発生当初は感染原因が不明であったため、感染症と食中毒の両面から調査を行ったが、原因が白湯や粉ミルクの調製に使用していた井戸水であるという、国内外でも初めての極めて特異的なケースであることが判明した。また、患者宅周辺地域はほぼ全戸が井戸を保有しているため、同一水源の汚染による拡散被害を防止することを目的として周辺井戸からの菌検出と水質検査等を行った。

### 2 事件の概要とその対応

平成18年9月に、県内の医療機関で治療を受けていた乳児からボツリヌス菌が分離されたとの情報を受け、保健所が患者宅の聞き取り調査を行った結果、患者は母乳、粉ミルクおよび白湯の他に飲食物の摂取歴はなく、粉ミルクの調乳と白湯に自宅井戸水を使用していたことが明らかとなった。そこで、井戸水と患者が使用中の粉ミルクを国立感染症研究所に送付すると同時に、患者宅での実地調査を行い、井戸水、周辺土壌等の採取と調理場内ふき取り検査などを実施した。さらに、患者宅周辺への拡大被害を防止するため、近隣井戸の使用状況調査と井戸水の細菌・水質等の検査を実施し、井戸所有者各戸に対する衛生指導と広報等による啓発を行った。

また、国立感染症研究所の検査で、患者宅の井戸水、および使用中の粉ミルクからボツリヌス菌A型毒素が検出されたことから、厚生労働省食品安全部監視安全課では粉ミルクによる食中毒事件を疑った。しかし、粉ミルクは患者の発症後に開封されたものであり、製造業者から未開封の同一ロット製品等の収去検査を実施した国立食品医薬品衛生研究所の結果では菌および毒素は検出されなかったことから、本事件は患者宅で常に使用している汚染井戸水が感染源であると、粉ミルクは調乳時の二次汚染によるものと断定した。

### 3 調査結果

#### 3.1 患者宅環境物のボツリヌス菌調査結果

疫学調査の一環として患者宅の井戸水、調理場拭き取り、調理場側溝の泥、里芋畑の土、大根畑の土、2種類

※1 現 拓桃医療療育センター

※2 現 (財)日本冷凍食品検査協会

※3 現 共和コンクリート工業(株)

※4 大崎保健福祉事務所

※5 現 登米保健福祉事務所

※6 現 食と暮らしの安全推進課

※7 現 仙台保健福祉事務所塩釜総合支所

※8 現 (財)宮城県生活衛生営業指導センター

の使用済み粉ミルク缶，ハウスダスト，ペット飼育水の計9検体を採取して定法<sup>2)</sup>に準じてボツリヌス菌の検査を行った。すなわち，井戸水は1Lをミリポア社製の0.22 $\mu$ mのフィルターでろ過した後にフィルターを8分割し，また，固形材料では等量の生理食塩水で抽出した上清の遠心沈殿(10,000rpm 10分間)を複数本のMERCK社製クックドミート培地にブドウ糖と澱粉を加えた液体培地(10ml)の深層部に接種して各々を非加熱，60 $^{\circ}$ C 15分間過熱，及び80 $^{\circ}$ C 30分間加熱処理した後に30 $^{\circ}$ Cで4日間以上培養した。経時的にそれぞれのクックドミート培地深層部の一部を採取してPCR (primer: BAS-1,2 TaKaRa社製)を行い，陽性の場合には再加熱後に自家調整した卵黄加CW寒天培地に塗抹する方法で菌の分離を試みた。

その結果，井戸水ではPCRにより遺伝子の増幅産物が培養4日目以降から確認され，旧調理場の泥，使用済み粉ミルク缶の一つからも微弱なシグナルが確認された。Applied Biosystem社製ABI PRISM 310 Genetic Analyzerを用いて決定した塩基配列はボツリヌス菌A型神経毒素遺伝子と98%の相同性を持っていたことから，これらの環境物中にはボツリヌス菌毒素遺伝子が存在することが明らかとなった(図1)。

1-TTACAAATCCTGTAAGAAGGAGATTTAAAT  
CCACCACCAGAAGCAAAACAAGTTCCAGTTT  
CATATTATGATTCAACATATATAAGTACAGA  
TAATGAAAAAGATAATTATTTAAAGGGAGTT  
ACAAAATTATTTGAGAGAATTTATTCAACTG  
ATCTTGGAAGAATGTTGTTAACA-177

図1 井戸水由来の遺伝子の塩基配列

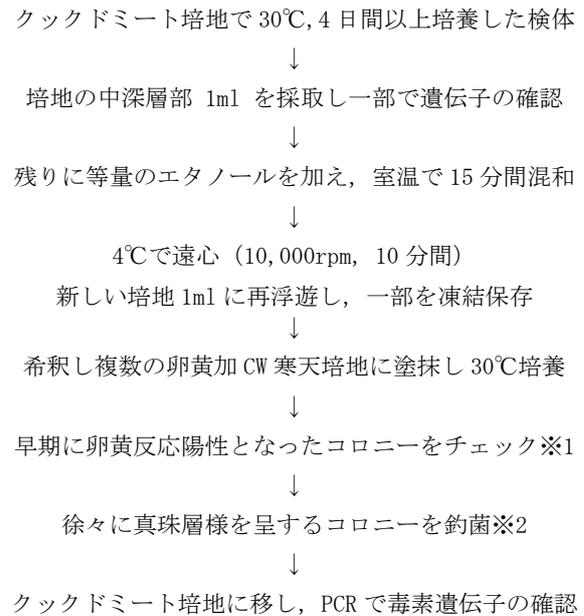
そこで，遺伝子陽性培養液からの菌分離を試みたが，検体中にウエルシュ菌等の雑菌が多量に混在すること，および菌液の80 $^{\circ}$ Cでの再加熱により遺伝子が検出されなくなるなどの理由から前述の方法での菌の単離は不可能であった。そこで，ボツリヌス菌の生物学的性状・芽胞の物理化学的性状等<sup>3,4)</sup>と，「菌の運動性」，「芽胞形成速度」および「特徴的な卵黄反応」というウエルシュ菌との違いに着目して新しい分離方法を検討した(表1)。

表1 ボツリヌス菌等の性状

性状	菌種	ボツリヌス菌	ウエルシュ菌
運動性		+	-
培地中での存在箇所		中深層※1	深層
培地中での芽胞形成		早い	遅い
(芽胞の)耐熱性		不定(株により異なる)	
(芽胞の)エタノール感受性		低い	
菌の増殖及び卵黄反応		遅い	早い
卵黄反応の特徴		真珠層様	淡い乳白色

※ PCRにより確認

すなわち，遺伝子が確認された増菌培地の中間部から深層部の間を採取してエタノール処理を行い，遠心した後に上清を捨て，沈渣を適度に希釈して卵黄加CW寒天培地に塗抹・培養した。早期に卵黄反応が陽性となったコロニーはウエルシュ様菌とし，その後徐々に真珠層様反応を呈してくるコロニーのみを釣菌するという方法を実施した(図2)。その結果，井戸水からボツリヌス菌の分離に成功した(図3)。



※1・2: 赤丸内はボツリヌス菌。それ以外はウエルシュ様菌

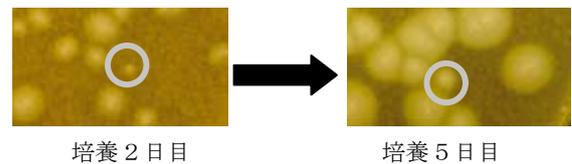


図2 新しい分離プロトコール

分離した菌株について再度A, B, E, F型毒素遺伝子を確認したところ，菌株はA型の他にもB型毒素遺伝子を保有しており，動物実験の結果ではA型毒素のみを産生しB型毒素が検出されなかったことから，本菌株はAb型毒素菌であることが判明した。

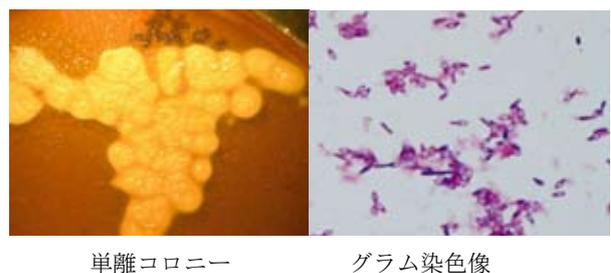


図3 単離したボツリヌス菌

### 3.2 周辺井戸の調査結果

患者宅近隣の井戸水についてもボツリヌス菌による汚染が危惧されたため、患者宅を含めた15戸の井戸について使用状況を調査すると同時に細菌検査および水質検査（一般細菌、大腸菌、濁度、ボツリヌス菌、食中毒菌）を実施した。その結果、常時飲用、あるいはお茶として飲用している民家が数戸あり、水質検査では、前述の飲用に使っている民家を含む9戸の井戸水が、水道法を準用した場合に飲用基準を満たしていないことが判明した。また、7戸の井戸からウエルシュ菌、10戸からエロモナス菌等の食中毒菌が分離されたが、患者宅井戸水以外からボツリヌス菌は検出されなかった（表2）。

### 4 事件の周知と地域住民への衛生指導

この事例の発生を受けて、厚生労働省健康局水道課長、食品安全部監視安全課および雇用均等・児童家庭局母子保健課長から12月8日付けで関係自治体に対し「井戸水を原因食品とする乳児ボツリヌス症の報告について」の通知が行われた。また、県および管轄保健所では患者宅に対して「当該井戸の閉鎖」、近隣の井戸所有者には「食品の調理や飲用には既設の上水道を利用し、井戸水を用いないこと」を指導した。さらに、新生児を持つ保護者に対しては管轄市町を通じ検診等の機会を利用して乳児ボツリヌス症予防の啓発を行うとともに、広報誌により広く地域住民に注意を喚起した。

表2 近隣井戸水の調査結果

井戸番号	一般細菌数 (ml)	大腸菌	濁度	食中毒菌			備考
				ウエルシュ菌	Aeromonas 菌	ボツリヌス菌	
①	< 30	-	<0.1	-	-	-	
②	600	陽性	1.6	-	陽性	-	
③	440	-	0.1	陽性	陽性	-	常時飲用
④	151	-	1.1	陽性	陽性	-	飲 用
⑤	370	-	0.1	-	陽性	-	
⑥	270	陽性	1.7	陽性	陽性	陽性	常時飲用 患者宅
⑦	74	-	0.1	-	-	-	飲 用
⑧	37	-	0.1	-	-	-	
⑨	650	-	1.0	陽性	-	-	
⑩	<30	-	0.2	-	陽性	-	
⑪	293	-	0.1	-	陽性	-	
⑫	158	-	>2	陽性	陽性	-	飲 用
⑬	93	-	0.4	陽性	-	-	
⑭	56	-	0.4	陽性	陽性	-	
⑮	107	-	>2	-	陽性	-	

また、患者宅と同一の水源を持つ井戸の分布を調べるため、上記の細菌・水質検査に水質化学分析の結果（本年報 資料 P147～148 参照）を加えて解析を行った。その結果、この地域は大きく3種類の水源に分けられることが明らかとなり、患者宅の井戸と同様の性状を持つ井戸が他にも4戸存在することが判明した（図4）。

### 5 考 察

国内で発生した乳児ボツリヌス症の多くは輸入ハチミツ等に混入したボツリヌス菌が原因であったが、本事例ではそれらの喫食歴はなく発生当初は感染原因が不明であった。さらに、粉ミルクと井戸水から毒素が検出されたことは、粉ミルクを原因とする食中毒事件を疑うのに十分な状況であったと考えられる。従来、環境物からのボツリヌス菌の分離は成功率が低いと言われており、その多くは感染経路不明として取り扱われることが少なかつた<sup>1)</sup>。しかし、今回の事例ではPCRを用いての徹底した遺伝子スクリーニングと、新しい分離プロトコルで対処することにより、井戸水からボツリヌス菌を分離し感染原因を特定することに成功した。

また、農業地帯である患者宅周辺はほぼ全戸が井戸を保有しているため、「患者宅のプライバシーを守りつつ当該井戸あるいは同一水源から近隣への拡散汚染を調査する」という難しい状況での疫学対応であった。結果として、周辺井戸からは遺伝子は検出されず菌も分離されなかったが、逆に「なぜ患者宅の井戸からのみボツリヌス菌が分離されたのか」が疑問として残された。患者の母及びその兄弟も乳児の頃から自宅井戸水を使用しており、過去にも家族が感染する機会は患者と同等か、あるいはそれ以上に高かったものと思われる。聞き取りによ

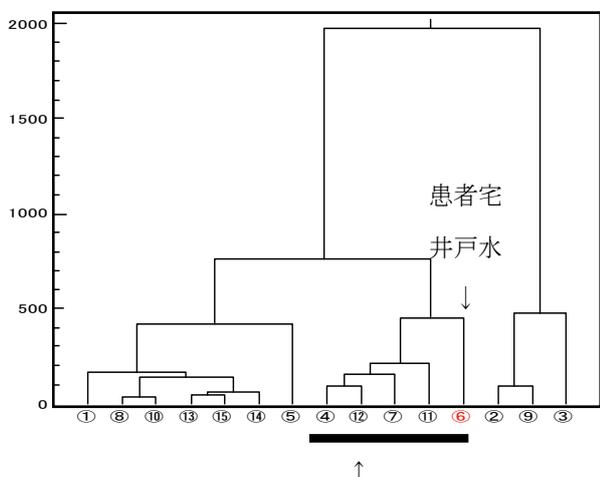


図4 水質化学分析による井戸水の解析

れば、患者宅の井戸は約 10 年前に 17m まで井戸の掘り下げを行っており、周辺の地質状況からは有機物に富む 2 層のスクモ（泥炭）層に挟まれた部分に現井戸の汲水口が存在することが推察される<sup>5)</sup>。

また、当該井戸は老朽化が進み壁面に亀裂が入っているなど、井戸周辺土壌からの汚染の可能性も疑われる。しかし、井戸が閉鎖されてしまった現在、貴重な症例の汚染経路に関する詳細な疫学的追求ができなかったことは非常に残念である。

## 謝 辞

本調査を行うにあたり、ボツリヌス菌の疫学的な知見のご教授、並びに菌の分離方法等に関する詳細なご指導を賜りました国立感染症研究所細菌第二部第三室長の高橋元秀先生をはじめ、見理剛先生、岩城正昭先生、山本

明彦先生に深く感謝いたします。

## 参考文献

- 1) 国立感染症研究所 感染症情報センター：病原微生物検出情報（2007）
- 2) 国立感染症研究所 地方衛生研究所全国協議会編：乳児ボツリヌス症、「病原体検査マニュアル」（2003）
- 3) Barrow, G. I. : Cowan and Steel's manual for identification of medical bacteria 3 rd ed., Cambridge University Press (1993)
- 4) Jonston, R. et al: Method to facilitate the isolation of Clostridium botulinum type E., Bacteriol., 88. 1521-1522 (1964)
- 5) 宮城県企画部土地対策課：土地分類基本調査 一古川一，宮城県（1981）