岐阜県で発生した下痢性貝毒による食中毒事例

(昭和 58 年 7 月 7 日受理)

野々村文雄*¹ 岩田好博*¹ 中屋謙一*¹
 杉谷 哲*¹ 山田不二造*¹ 近藤和久*²
 円田辰吉*² 臼井宗一*³ 井上 睦*⁴

An Outbreak of Food Poisoning due to Diarrhetic Shellfish Poison in Gifu Prefecture

Fumio NONOMURA,*¹ Yoshihiro IWATA,*¹ Ken-ichi NAKAYA,*¹
 Akira SUGITANI,*¹ Fujizo YAMADA,*¹ Kazuhisa KONDO,*²
 Tatsukichi ENDA,*² Souichi USUI*³ and Mutsumi INOUE*⁴

(*¹Gifu Prefectural Institute of Public Health: 6-3, Noishiki 4-chome, Gifu, Japan;

*²Gifu Prefectural Takayama Public Health Center: 730-2, Kamiokamoto-cho, Takayama, Gifu, Japan; *³Environmental Health Division of Gifu

Prefecture: 1-1, Yabuta, Gifu, Japan; *⁴Department of Veterinary, Faculty of Agriculture, Gifu University:

1-1, Yanagido, Gifu, Japan)

Key words: ホタテガイ scallop; 食中毒 food poisoning; 下痢性貝毒 diarrhetic shellfish poison; ディノフィシストキシン dinophysistoxin

緒 言

近年、東日本太平洋岸の三陸沿岸、陸奥湾、北海道噴火湾等を含む広い海域において、二枚貝（ムラサキガイ、ホタテガイ等）が麻痺性貝毒及び下痢性貝毒により毒化し、その摂食による食中毒が関東地方から東北地方にかけてしばしば発生した^{1)~10)}。特に昭和51年から53年にかけて頻発し、確認された中毒事例は20件を数えた³⁾。そこで中毒が顕在化した昭和53年以降、厚生省や水産庁の指導のもとに、生産地において定期的に貝の毒性検査を実施し、可食部の毒力が 0.05 MU/g を超えるものが出荷されることがないように出荷自主規制措置がとられるようになり、中毒の発生頻度は激減した。

このような状況下で、昭和57年7月、岐阜県においてホタテガイの摂食による食中毒が発生した。疫学的調査、細菌学的検査、及び下痢性貝毒の検査等を行ったところ、本食中毒の病因物質はホタテガイ中腸腺に含まれ

ていた下痢性貝毒であることが判明した。

下痢性貝毒による食中毒例は、文献^{1),3)}によるとそのほとんどが生産県で発生したものであり、生産県より貝が流通販売されたことにより発生した事例は比較的少ない。まして生産地において監視体制がとられるようになってからは極めてまれである。このことと合わせて本事例は毒化ホタテガイが出荷時に混ぜられ、そのまま販売されたことにより発生したものであり、現在の出荷自主規制体制に新たな問題を提起したものと考えられる。そこでその概要及び検査結果について報告する。

中毒発生状況及び疫学的調査

食中毒発生の概要を Table 1 に示した。

昭和57年7月7日夜半から12日にかけて、当県内の16家族又はグループ44名が、下痢・嘔気を主徴とする食中毒症状を呈していることが判明した。患者44名について聞き取り調査を行ったところ、青森県陸奥湾産のホタテガイが患者らの唯一の共通食品であり、またすべての患者が上記ホタテガイをバター焼、フライ等加熱調理後に摂食していることが確認された。

患者の症状は、Fig. 1 に示すように、下痢 (100%)、

*¹ 岐阜県衛生研究所: 岐阜市野一色 4-6-3

*² 岐阜県高山保健所: 高山市上岡本町 730-2

*³ 岐阜県環境衛生課: 岐阜市藪田 1-1

*⁴ 岐阜大学農学部獣医学科: 岐阜市柳戸 1-1

Table 1. Summary of Outbreak of Food Poisoning

Date	July 7, 1982
Location	Gifu city and the adjacent area, Takayama city
No. of consumers	48
No. of patients	44
Suspected foods	Shucked scallops
Causative substances	Diarrhetic shellfish poison
Circulation route of shucked scallops	Fig. 3.

Fig. 1. Symptoms of patients

Fig. 2. Incubation period

嘔気 (70%), 嘔吐・腹痛 (ほぼ 50%) が主で、発熱は全く認められなかった。下痢の回数は 4~10 回 (1 日当たり), 便性は水様性であった。

潜伏時間は、摂食後 4 時間で発症した者が最も多く、また患者の約 90% が 10 時間以内に発症した (Fig. 2)。

調査の結果、上記ホタテガイはすべて、岐阜市中央卸売市場内の M 卸売業者に 7 月 6 日入荷した 15 箱に含まれていたことが分った。そこでこのホタテガイの生産地から消費者までの流通経路を詳しく調べ、Fig. 3 に示した。

青森の Y 加工業者から岐阜市の M 卸売業者にむき身ホタテガイ (中腸腺付き, 1 箱 300 串, 1 串 3 個) が入荷し、そのホタテガイは同日 A~F の 6 仲卸業者に Fig. 3 に記した割合で販売され、さらに各業者から幾つかの小売業者に販売された。なお Fig. 3 には患者の発生が認められた店のみを記載した。

Fig. 3. Circulation route of shucked scallops

貝の毒化期には年変化があるが、一般に「4 月末から毒化が始まり、6~7 月に最高値に達した後、9 月に検出されなくなると言われている¹¹⁾。昭和 57 年陸奥湾においては、ホタテガイの毒化のため 3 月下旬から出荷自主規制の措置をとっていたことが確認された。ところが出荷状況の調査から、Y 加工業者が出荷自主規制中の 6 月下旬に採取したホタテガイ (2 箱分=600 串) と、出荷自主規制前に採取したホタテガイ (13 箱分=3,900 串) とを混ぜ、注文の 15 箱にして出荷したという事実が判明した。一方、ホタテガイの生殖巣は産卵期 (3~4 月) が近づくと大きくふくらみ、その時期を過ぎると小さくなることが分っている。本事例の回収されたホタテガイについて検査したところ、一箱の中に生殖巣の大きいものと小さいものが混じっていることが確認できた。この結果とホタテガイの流通状況と患者の発生状況とから、出荷自主規制中に採取されたホタテガイ 2 箱分 (600 串) は、多くて 7 箱~8 箱に分散して出荷されたものと考えられた。

材料及び方法

検査材料は Fig. 3 に示した a~h の小売店のうち b と f と g の 3 か所から回収したホタテガイ (むき身重量: 2,100 g, 個数: 189 個) と、採取し得た患者 7 名の糞便である。

1. 細菌学的検索

上記の糞便及びホタテガイについて、微生物検査必携¹²⁾、食品衛生検査指針 I¹³⁾に記載された方法により、

既知食中毒起因菌の検索を行った。腸炎ビブリオについては4% ペプトン水と TCBS 培地を用い、病原大腸菌には DHL 培地を、エルシニア及び赤痢菌には SS 培地を、サルモネラには SS, DHL, セレナイト、ラバポート培地を、またブドウ球菌には卵黄加マンニット培地を用いた。なおキャンピロバクターとウェルシュ菌については検査しなかった。

2. 下痢性貝毒の定量

下痢性貝毒の定量は、昭和56年5月19日付厚生省肉肉衛生課長通知環乳第37号の方法¹⁴⁾ によった。

i) 試験溶液の調製

回収されたホタテガイの中腸腺をていねいに切り取りプールする。その25gを1検体とし(11検体が得られた)アセトンで3回ホモジナイズする。このアセトン抽出液を合わせ溶媒を留去する。残留物をジエチルエーテルと少量の水で分液漏斗に洗い込み、軽く振とうした後水層を除く。残った溶媒層を水で2回洗浄した後溶媒を留去し、残留物を1% Tween 60 生理食塩水に懸濁させて目盛付試験管に移し、一定量とする。この懸濁液を適宜希釈し試験溶液としマウス試験に供する。

ii) マウス試験

静岡県実験動物農業協同組合より購入した体重16~20gのddY系雄のマウスを一群3匹とし、上記試験溶液1mlを腹腔内に投与し、24時間後に生死を観察した。1群3匹中2匹以上のマウスが死亡した最小投与量及び最大希釈倍数から毒力を求めた。毒力は、体重16~20gのマウスを24時間で死亡させる毒量を1マウスユニット(MU)と定め、むき身と中腸腺それぞれ1g当たりのMUで表現した。

3. 下痢性貝毒の分離と精製

本事例より得た毒化ホタテガイの中腸腺を試料とし、安元らの方法⁵⁾に従って毒素の分離精製を行った。

i) 試 薬

カラムクロマトグラフィーには、Mallinkrodt 社製 Silicic Acid・100 mesh (Powder) をアルカリ処理した後、120°で1夜活性化したものを用いた。

ゲルろ過には Pharmacia Fine Chemicals 社製、Sephadex LH-20・25~100 μ m を用いた。

エーテル、ベンゼン、メタノールは和光純薬(株)製の試薬特級を用いた。

ii) カラム管

ケイ酸クロマトグラフィー用: 長さ350mm, 内径42mm, コック付のガラス管。

ゲルろ過用: 長さ100cm, 内径25mm, のガラス管。

iii) 分離精製法

試料のアセトン抽出物をエーテルと水で分配し、エー

テル層を水で3回洗浄した後、溶媒を留去し、残留物を少量のエーテルで溶解しケイ酸カラムに負荷した。カラムからの溶出は①エーテル-メタノール(40:1), ②エーテル-メタノール(1:1), ③メタノールの順で行い、溶媒の量はカラム bed volume の3倍を用いた。②で得た画分(下痢性貝毒画分)の1部を取り、マウス致死試験により毒量を測定した後、溶媒を留去し、残留物を少量のベンゼンに溶解、再びケイ酸カラムに負荷した。次いで④ベンゼン-メタノール(85:1), ⑤ベンゼン-メタノール(9:1), ⑥メタノールの順に溶出を行った。⑥で得た画分(下痢性貝毒画分)の一部を取り同様に毒量を求めた後、溶媒を留去し、残留物を少量のベンゼン-メタノール(1:1)混液に溶解して Sephadex LH-20 カラムに負荷し、同混液を用いて溶出速度1.5ml/minで、ゲルろ過を行った。溶出液は5mlずつ分画採取し、各溶出画分についてマウス致死試験を行い、毒量(MU)を求めた。

4. 貝毒投与マウスの病理組織学的検索

下痢性貝毒を投与したマウスのへい死直後、直ちに剖検し、全身諸臓器を全て10%ホルマリン溶液で固定、パラフィン包埋を行い、ヘマトキシリン・エオジン染色並びに脳・神経系のために Klüber・Barrera 染色を施して、病理形態学的に精検した。

結果及び考察

1. 細菌学的検索

ホタテガイ2検体及び患者糞便7検体のいずれからも、既知食中毒起因菌は検出されなかった。

2. 下痢性貝毒の定量

3か所(b, f, g)の小売店から回収されたホタテガイについてのマウス致死試験の結果をTable 2に示した。

得られた下痢性貝毒のむき身換算毒量は、0.8 MU/g~1.6 MU/gであった。現在厚生省は、むき身1g当りの毒量が0.05 MUを超える貝の出荷を停止する規制措置をとっているが、本事例ではその規制値の16~32倍という非常に高い毒量であった。またこの毒量は今までに報告された中毒事例に比べて、かなり高い値であった。

3. 患者の推定摂取毒量

Table 2に示した中腸腺1g当りの下痢性貝毒の毒量や、患者からの聞き取り調査で得た摂食個数等に基づいて、患者個人別に推定摂取毒量を算出し、Table 3に示した。

調べ得た患者20名のうち、最も少ない人で18 MU、最も多い人で164 MUの毒量を摂取したものと推定された。

一般に、下痢性貝毒によるヒトの最少発症量は12 MUとされている^{3), 6)}が、この毒量はムラサキイガイの食中毒事例から算出された値であり、ホタテガイの場合にそのまま適用するには疑問が残る。事実、ホタテガイ

*5 安元健ら: 昭和58年度日本水産学会春季講演要旨集 p. 218 (1983)

Table 2. Toxicities of Diarrhetic Shellfish Poison of Scallops caused by Food Poisoning

Retail store	Sample	MU/g•shucked shellfish	MU/g•hepatopancreas
b	1	1.6	13.4
	2	1.6	13.5
	3	1.2	10.3
f	4	1.2	10.2
	5	1.2	10.3
	6	1.2	10.3
	7	1.6	13.5
g	8	0.8	7.0
	9	0.8	7.1
	10	0.8	7.0
	11	1.2	10.3

Table 3. Correlation of Human Illness with Toxicity to Mice

Retail store	Individual (Age, Sex)	Number of scallops eaten	Average weight of the hepatopancreas of scallops (g)	Toxicity in MU		Main symptoms (): frequency
				per g	total eaten	
b	42 M	9	1.36	13.4	164	diarrhea (30)
	20 M	9			164	" (10), nausea
	43 M	5			91	" (5)
	73 F	6			109	" (8), vomiting (3)
	6 M	1			18	" (3)
f	25 F	3	1.19	7.1	25	diarrhea (4), vomiting (3)
	21 F	4			34	" (6), nausea
	19 F	4			34	" (5), "
g	58 M	7	1.31	10.3	94	diarrhea (9), abdominal pain
	52 F	6			81	" (8), "
	23 M	5			67	" (6), "
	33 F	6			81	" (4), "
	38 M	2			27	" (4), nausea
	9 M	6			81	" (7), vomiting (4), nausea
	8 F	2			27	" (1), abdominal pain
	47 M	5			67	" (5), nausea
	42 F	5			67	" (5), vomiting (10), nausea
	66 F	5			67	" (5), " (4), "
	45 M	6			81	" (7), nausea, abdominal pain
	64 F	4			54	" (6)

の下痢性貝毒による食中毒事例でわずかに1例ではあるが19 MUで発症した記録があり⁹⁾, 本事例の18 MUと良く一致している。しかし, 一方小室らはミニホタテガイによる食中毒事例において, 最少発症量12.0 MUを記録している⁸⁾ことから, ホタテガイの下痢性貝毒量とヒトの発症との関係については議論の余地がある。

二枚貝の種類により, マウスに対する毒力に差があること, 毒の主成分が異なること等から, ヒトの最少発症量にも差が現われることが考えられる。この点について

は, 中毒事例に際して, さらに密な疫学的調査と動物実験による毒力の測定などの研究が必要であろう。

4. 下痢性貝毒の分離, 精製

貝毒に関するここ数年の研究の進展により, 下痢性貝毒の本体はディノフィシトキシン (DTX と略) であることが判明し, さらに DTX₁ から DTX₄ までの4成分が単離され, 個々の性状等も明らかにされている^{6), 11), 15)}。そこで本事例で得た毒化ホタテガイについて, 安元らの方法に従い, 下痢性貝毒の分離, 精製を行

Fig. 4. Sephadex LH-20 gel filtration profile of a purified toxin

—: toxicity (MU),: elution weight (mg)

った。

ケイ酸カラムクロマトグラフィーによって得た下痢性貝毒画分を、Sephadex LH-20 カラムでゲルろ過した結果を Fig. 4 に示した。

毒成分の決定については、著者らの得た、Fraction No. 4~8 の溶出区及び Fraction No. 11~12 の溶出区それぞれが、安元らの得た溶出パターンと同じ挙動を示したことで、前者を DTX_3 溶出区、後者を $DTX_{1,4}$ 溶出区とした。毒成分のうち、 DTX_3 の毒量が全体の約 90% を占め、残りのほぼ 10% が $DTX_{1,4}$ であると推定できた。なお、安元らは、ムササギガイの毒の主成分は DTX_1 であり、ホタテガイのそれは DTX_3 であると報告している^{6), 11)}。

以上のことから、本事例の毒化ホタテガイに含まれていた下痢性貝毒の主たる毒成分は DTX_3 であると推定された。

5. 貝毒投与マウスの病理組織学的検索

現在、下痢性貝毒の検査は、マウス致死試験が唯一の方法である。そこでマウス致死試験でへい死したマウスのうち 5 匹について死後剖検を行った。その結果、肉眼剖検上並びに病理組織学的にも、全例とも、強い全身性うっ血を示したほか、著変は全く認められなかった。形態学的変化を欠くところの、いわゆる「陰性剖検所見」と言い得た。この所見と下痢性貝毒の症状発現機序との関連性については今後の研究にまきたい。

結 語

昭和57年7月7日から10日にかけて、岐阜県内で発生した食中毒事例についてまとめると、以下のとおりである。

1) 本事例は下痢性貝毒により毒化したホタテガイが、出荷時に混入し、そのまま販売されたことにより発生したものである。

2) 患者の主な症状は、下痢・嘔気・嘔吐等で、便は水様便であった。潜伏時間は、患者の大部分が 4~10

時間であった。

3) 食中毒の原因食品であるホタテガイから、むき身 1g 当り 0.8~1.6 MU の下痢性貝毒を検出した。この値に基づいて算出した患者の推定摂取毒量は、18~164 MU であった。

4) 本事例で得た毒化ホタテガイについて、下痢性貝毒の分離・精製を行った結果、毒素 DTX は、約 90% が DTX_3 、約 10% が $DTX_{1,4}$ という成分比であった。

5) マウス致死試験でへい死したマウス 5 匹について、死後剖検及び病理組織学的検査を行ったところ、全例とも、強い全身性うっ血を示した以外に著変は全く認められなかった。

終りに臨み、種々御教示をいただいた東北大学農学部 安元 健教授、及び教室の方々に謝意を表します。

本報の要旨は、日本食品衛生学会第44回学術講演会(1982年11月、福岡)において発表された。

文 献

- 1) Yasumoto, T., Ohshima, Y., Yamaguchi, M.; Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 44, 1249~1255 (1978).
- 2) Taylor/Seliger ed.: "Toxic Dinoflagellate Blooms" p. 395~398 (1979), Elsevier, North Holland, New York.
- 3) 安元 健: 食品衛生研究 30, 571~584 (1980).
- 4) 田口博人: 同上. 29, 703~709 (1979).
- 5) 日本水産学会編: "有毒プランクトン—発生・作用機構・毒成分" p. 73~87 (1982) 恒星社厚生閣.
- 6) 日本水産学会編: 同上. p. 102~111 (1982) 恒星社厚生閣.
- 7) 浜野米一, 浅尾 努, 井上 清, 小田美光, 山本博之, 木下喜雄, 新原富夫, 国田信治: 大阪府立公衛研所報. 食品衛生編, 第 10 号 5~8 (1979).
- 8) 小室道彦, 山本和則, 野原雅雄, 掛札しげ子, 村松良尚, 高井勝美: 茨城衛研年報. 18, 17~23 (1980).
- 9) 須藤輝行, 森 善宣, 桜井憲三, 森 峰, 山田隆雄, 増田直樹, 伊藤文雄, 野村新爾, 西岡治子, 宇佐美英郎: 三重県衛生研究所年報 24, 17~20 (1978).
- 10) 小鹿 晋, 秋山由美子, 宮田淳子, 古川章子, 小林英一, 柞木田むつみ, 宮下光子, 石田邦夫, 上野昭二: 食衛誌. 23, 507~508 (1982).
- 11) 安元 健: 日獣会誌. 35, 265~270 (1982).
- 12) 厚生省監修: "微生物検査必携・第2版" p. 164~276 (1978) (財) 日本公衆衛生協会.
- 13) 厚生省環境衛生局監修: "食品衛生検査指針 I" p. 123~138 (1973) (社) 日本食品衛生協会.
- 14) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課通知: 下痢性貝毒検

-
- 査法 p. 1~11 (1981).
- 15) Murata, M., Shimatani, H., Sugitani, Y., Ohshima, Y., Yasumoto, T.: Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48, 549~552 (1982).