

図 1 - 1 水素化物変換-コールドトラップ-原子吸光法のシステム概略図

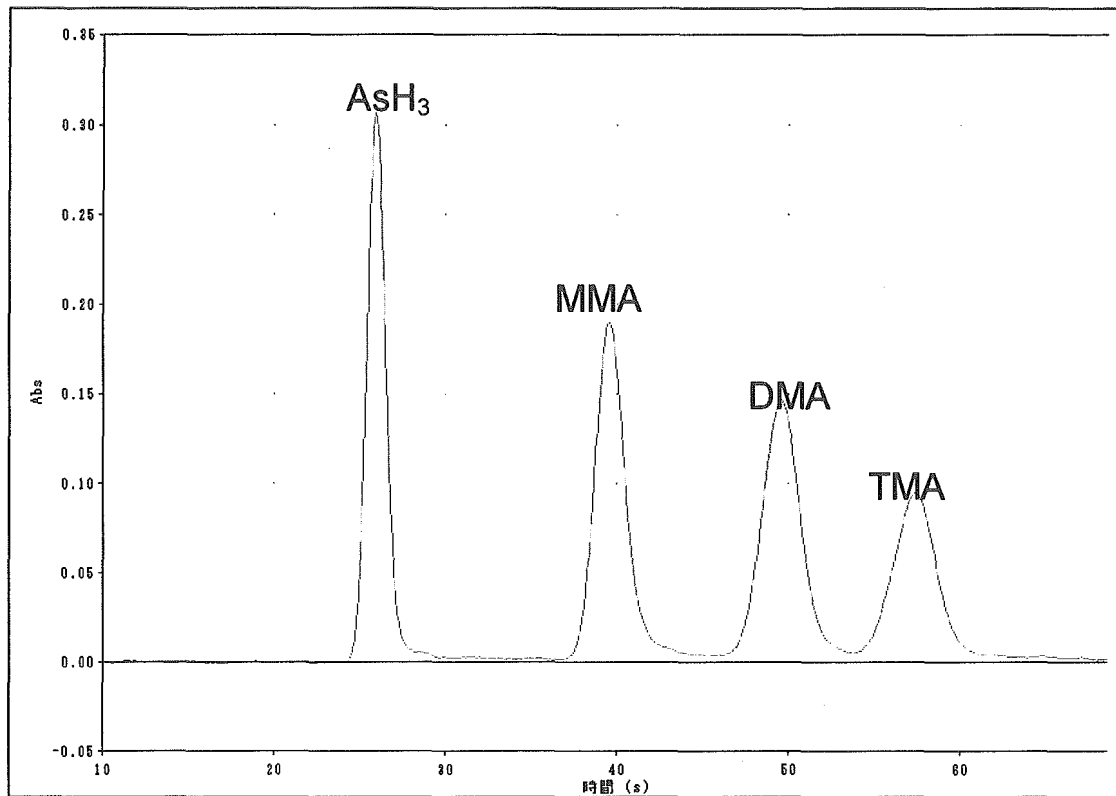


図1-2 試作した石英セル使用時の4種(三酸化ヒ酸、モノメチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸、トリメチルアルシンオキシド、各々ヒ素として10 ppb)標準溶液の測定結果

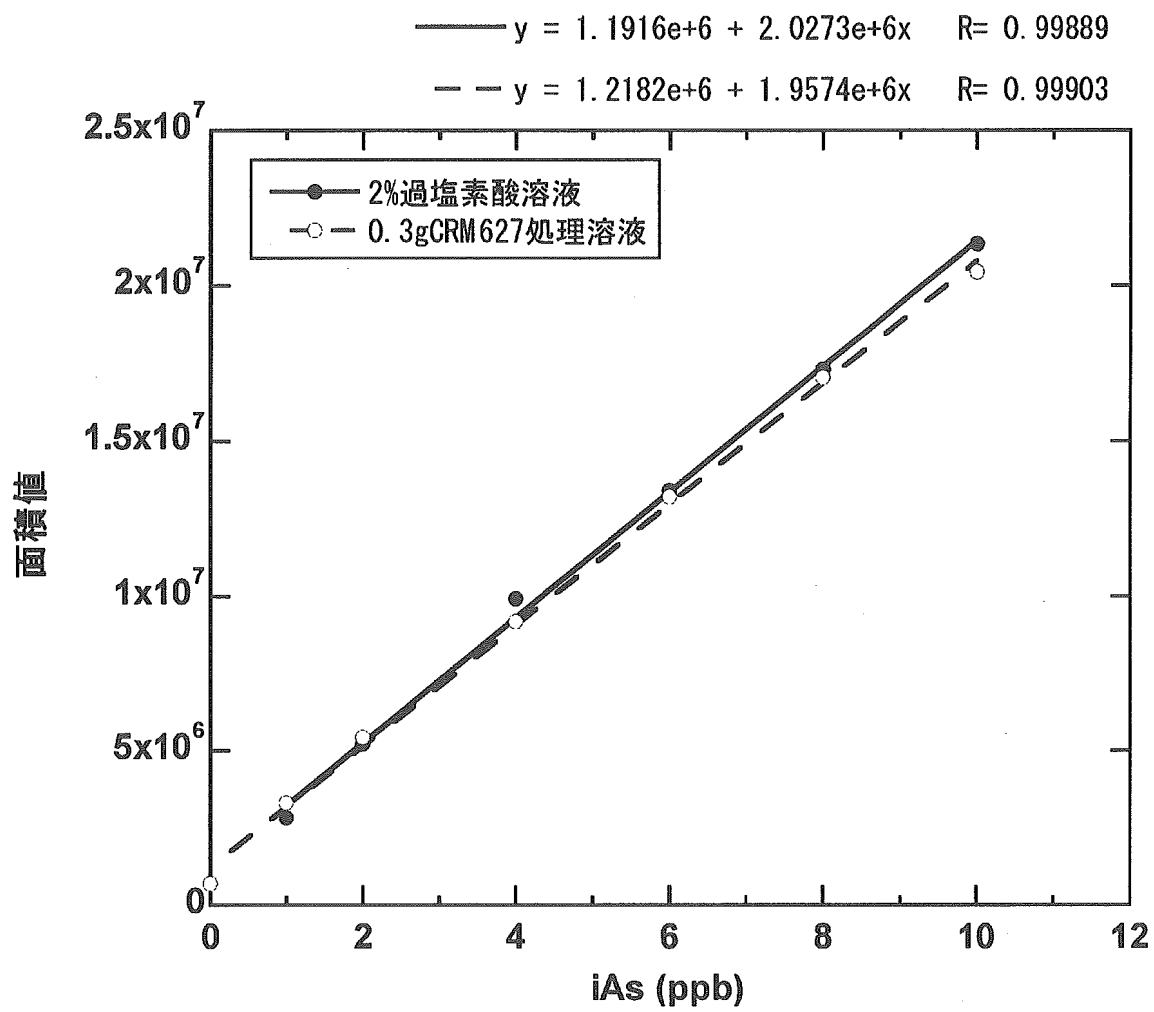


図1-3 CRM627存在による無機ヒ素検量線へのマトリックス効果の有無の検討

表 1 - 1 Rice flour 1568a(NIST)の分析値と文献値

	concentration measured ( $\mu\text{g As/g}$ )			
	iAs	MMA	DMA	total As
3h加熱時 ①	0.082	0.016	0.152	0.25
②	0.082	0.013	0.164	0.26
③	0.086	0.014	0.159	0.26
平均	$0.083 \pm 0.002$	$0.014 \pm 0.002$	$0.158 \pm 0.006$	$0.26 \pm 0.005$
6h加熱時 ①	0.086	0.017	0.157	0.26
②	0.086	0.010	0.150	0.25
③	0.085	0.012	0.166	0.26
平均	$0.086 \pm 0.001$	$0.013 \pm 0.004$	$0.158 \pm 0.008$	$0.26 \pm 0.008$
-----				
文献値				
Amanda et al.(1)*				
TFA法にて抽出	0.087	0.012	0.168	0.267
酵素法抽出	0.107	0.011	0.148	0.266
Sanz et al.(2)*	0.088	0.008	0.135	0.231
Heitkemper et al.(3)	0.092	0.008	0.174	0.274
-----				
認証値	—	—	—	$0.29 \pm 0.03$

\*(1) Environ. Sci. Technol., 39, 5241-5246 (2005)

\*(2) Anal.Chim.Acta, 535, 227-235 (2005)

\*(3) J. Anal. Atom. Spectrom., 16, 299-306 (2001)

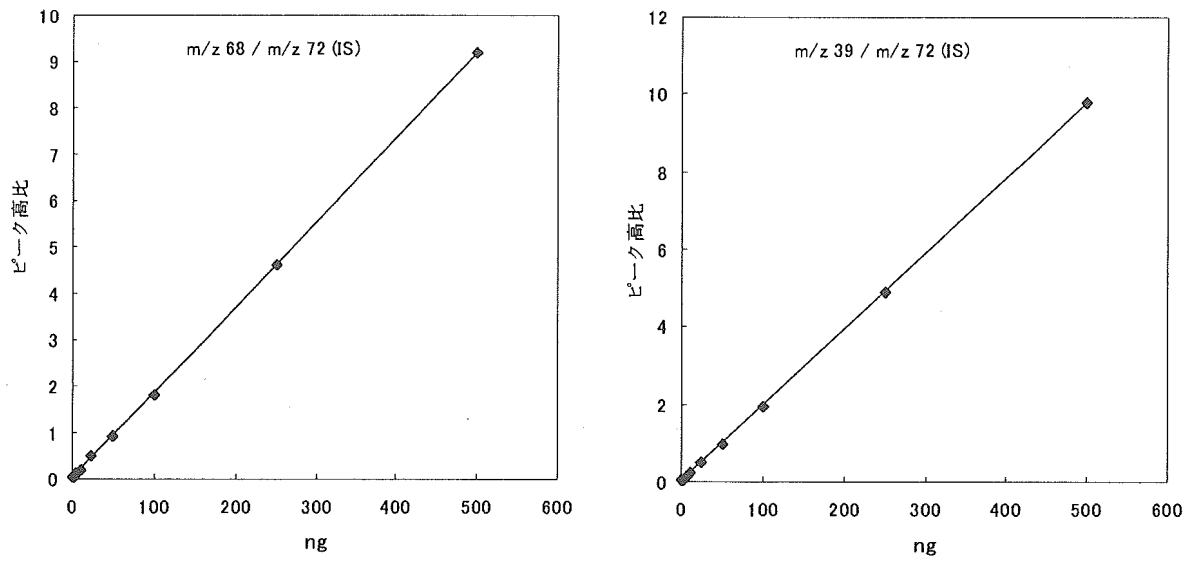


図 2-1 フランの検量線(1~500 ng)

表 2-1 MDL及びMQL

		フラン
側 定 値 (ppb)	n=1	1.134
	n=2	1.311
	n=3	1.237
	n=4	1.196
	n=5	1.290
	n=6	1.164
	n=7	1.356
平均(ppb)		1.241
SD		0.08159
MDL(ppb)		0.3170
MQL(ppb)		0.9512

表 2-2(1) 粉ミルク中のフラン含有量

	試料名	フラン(ppb)	平均(ppb)	標準偏差	相対標準偏差 (%)
スティック クパック	調製粉乳 A	N.D.*	N.D.*	—	—
		N.D.*			
		N.D.*			
	調製粉乳 B	(0.4)	N.D.*	—	—
		N.D.*			
		(0.4)			
	調製粉乳 C	N.D.*	N.D.*	—	—
		N.D.*			
		N.D.*			
	調製粉乳 D	1.6	2	0.058	3.5
		1.7			
		1.7			
	調製粉乳 E	1.5	2	0.10	6.7
		1.6			
		1.4			
調製粉乳 F	(0.6)	<1 (0.6)	(0.06)	(9)	
	(0.7)				
	(0.6)				
調製粉乳 G	(0.5)	<1 (0.5)	(0)	(0)	
	(0.5)				
	(0.5)				
調製粉乳 H	1.5	1	0.15	11	
	1.3				
	1.2				
缶入	調製粉乳 I	(0.7)	<1 (0.6)	(0.1)	(20)
		(0.6)			
		(0.5)			
	調製粉乳 A	(0.4)	N.D.*	—	—
		N.D.*			
		(0.4)			
	母乳代替食品 無乳糖食品	4.7	5	0.29	5.9
		4.7			
		5.2			
	調製粉乳 B	(0.4)	N.D.*	—	—
		N.D.*			
		N.D.*			
	調製粉乳 C	(0.6)	<1 (0.5)	(0.1)	(20)
		(0.6)			
		(0.4)			

( ): 検出下限以上定量下限未満

N.D.: 検出せず(検出下限未満)

\* 検出下限 0.4 ppb

表 2-2(2) 粉ミルク中のフラン含有量

	試料名	フラン(ppb)	平均(ppb)	標準偏差	相対標準偏差 (%)
缶入	調製粉乳 J	1.6	1	0.15	10
		1.5			
		1.3			
	牛乳アレルギー疾患用食品	37.0	36	0.87	2.4
		35.8			
		35.3			
	調製粉末大豆乳	2.2	2	0.12	5.1
		2.2			
		2.4			
	調製粉乳 F	(0.7)	<1 (0.7)	(0)	(0)
		(0.7)			
		(0.7)			
	調製粉乳 G	(0.5)	<1 (0.5)	(0.06)	(10)
		(0.5)			
		(0.4)			
	調製粉乳 K	(0.4)	N.D.*	—	—
		N.D.*			
		(0.4)			
調製粉乳 L	(0.6)	<1 (0.6)	(0.06)	(10)	
	(0.5)				
	(0.6)				

( ): 検出下限以上定量下限未満

N.D.: 検出せず(検出下限未満)

\* 検出下限 0.4 ppb

表 2-3(1) ベビーフード中のフラン含有量

	試料名	フラン(ppb)	平均(ppb)	標準偏差	相対標準偏差 (%)
ペット ボトル	30%りんご果汁飲料	1.41	1.4	0.060	4.3
		1.46			
		1.34			
	麦茶	3.22	3.1	0.067	2.1
		3.10			
		3.11			
スティックパ ック	果汁入り粉末清涼 飲料・もも	22.9	23	0.45	1.9
		23.8			
		23.3			
	果汁入り粉末清涼 飲料・プルーン	24.0	25	0.60	2.5
		24.5			
		25.2			
	乾燥野菜スープ	29.6	29	0.30	1.0
		29.3			
		29.0			
レトルトパウ チ	つみれと根菜の 和風煮	37.6	36	1.2	3.5
		35.8			
		35.2			
	野菜と白身魚の 炊き上げ	13.7	13	1.1	8.5
		11.6			
		13.1			
	京風茶碗蒸し	10.3	10	0.15	1.5
		10.2			
		10.5			
	豆腐と鶏肉の 野菜あんかけ	12.8	14	0.79	5.8
		14.0			
		14.3			
	完熟トマトと ツナのリゾット	17.0	18	0.53	3.0
		18.0			
		17.8			
	大根と豚の角煮	27.9	30	1.6	5.3
		30.9			
		30.3			
	ひらめのリゾット	5.7	5	0.23	4.3
		5.3			
		5.3			
	豆腐ハンバーグ	21.3	20	1.1	5.2
		19.2			
		20.1			
	豚肉と野菜の うま煮どん	31.6	30	1.8	5.8
		30.7			
		28.2			
	しらす雑炊	15.8	16	0.64	4.1
		16.0			
		14.8			



表 2-3(2) ベビーフード中のフラン含有量

	試料名	フラン(ppb)	平均(ppb)	標準偏差	相対標準偏差 (%)
レトルトパウチ	野菜の鶏そぼろ煮	24.9	25	0.46	1.8
		25.5			
		24.6			
	いわし団子のあんかけ	89.5	90	0.86	0.96
		90.1			
		91.2			
瓶詰	かぼちやのグラタン	21.8	21	0.66	3.1
		20.5			
		21.0			
	たらと野菜のみぞれ煮	5.0	5	0.23	4.7
		4.6			
		5.0			
	野菜のクリームシチュー	15.8	16	0.21	1.3
		15.9			
		15.5			
	肉じゃが	38.7	41	1.7	4.2
		42.1			
		40.8			

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
（分担研究報告書）

分担課題名：乳幼児食品中の病原微生物に関する研究

五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

一般に乳幼児は病原微生物に対する感受性が高く、感染を起こした場合、成人に比べ重篤化し、生命にかかわることが多い。そこで、本年は乳幼児食品中の有害微生物としてエンテロバクター・サカザキ、リステリアを対象として、これらの病原微生物の乳幼児への感染の可能性について文献調査を行い、その結果から、それぞれの菌の重要性について考察した。特に、乳幼児用調製粉乳を介するエンテロバクター・サカザキによる健康被害の発生が諸外国で報告されており、エンテロバクター・サカザキに関しては、文献調査により、その重要性は極めて高いと判断した。そこで、国内事例の情報収集、食品からの分離、分離株の疫学的解析、乳幼児用調製粉乳の製造工程における本菌の挙動について検討を行った。リステリアでは、文献調査から周産期リステリア症では母親の感染による母子の垂直感染と思われる事例が多く見られたが、粉乳および市販離乳食が原因と見られる感染例は国内外共に報告されていなかった。従って乳幼児食品を介したリステリアによる感染のリスクはあまり高くないと思われた。

協力研究者

岡田由美子、朝倉宏：国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

久保ゆかり：日本食品衛生協会

天野富美夫：大阪薬科大学 薬学部

感染の可能性を把握し、乳幼児が摂取する食品の安全対策を進めるための基礎的データの収集を目的とする。

A. 研究目的

乳幼児は、一般に有害微生物に対する感受性が高く、その制御に当たっては成人における食品を介した感染に関するデータをそのまま外挿することは適当でないと思われる。そこで、乳幼児における食品を介した病原微生物等の

B. 研究方法

本年度、微生物はエンテロバクター・サカザキとリステリアを対象とし、国内外の文献調査等により情報収集を行った。文献調査は、インターネットを利用したPubMedによる検索と当該菌に関する総説から必要と思われる原著論文を集め行った。エンテロバクター・サカザキについては、国内事例の情報収集、一般食品

からの分離、検査法の検討、食品における汚染実態、菌株の解析、調製粉乳の製造工程の現地調査を行った。それぞれの研究方法については、協力研究報告書に示す。

(倫理面への配慮)

今年度の研究内容には、倫理に関すると思われる研究内容は含まれていない。

### C. 研究結果

乳幼児用調製粉乳(PIF)を介するエンテロバクター・サカザキによる健康被害の発生が諸外国で報告されており、Codex 委員会では PIF の規格にエンテロバクター・サカザキを加える必要があるという議論が進められている。そこで、海外におけるエンテロバクター・サカザキ感染事例につき文献調査を行い感染の実態についてまとめた。主な乳幼児感染事例を表 1 に示す。

一方、わが国における本菌の乳幼児への暴露や感染の実態はこれまで調べられておらず、その実態は不明であった。今年度の厚労省の調査において、微量ではあるものの、PIF および類似食品で本菌が確認された。この調査結果を受け、研究班では国内の PIF 製造工場に協力をお願いし、PIF 製造工程の見学を行い、本菌がどのような経路から汚染する可能性があるのか、どのような対策が取りうるかについて検討を開始した。

国内の PIF 製造工場の製造工程は、それぞれの製造工場により多少異なるが、一般的には図 1~3 に示すような工程を経て製造されていた。海外でエンテロバクター・サカザキの混入として最も指摘されている、粉と粉を混ぜ合わせ最終製品を作り上げる工程がある製造フロー A

(図 1) は、実際にそのまま使われておらず、改善されていた。多くの国内製造会社において

は、図 1 製造工程フロー A に示すような、粉と粉を混ぜ合わせ最終製品を作る工程をほぼ無くしており、図 2 や図 3 で示すような製造工程フロー B や C を採用していた。製造工程フロー C に近いが、一部の原材料を粉として加える工程が残っている場合も、それぞれの原材料に対する製品管理が徹底されていた。厚労省の調査の対象となった製品が製造された当時と比べ、製造工程を見直し改善している工場も見られた。

エンテロバクター・サカザキの迅速検査用に複数の菌株をウサギに免疫し、免疫抗血清の作成を行い、その性能評価を行った(協力研究報告書参照)。

一般の食品検査において、大腸菌群検査を行った約 4,000 検体から、エンテロバクター・サカザキが検出されているか調べた。得られた 19 株の分離株については細菌学的な解析を進めた。分離株はその特徴からいくつかのクラスターに分けることが出来た(協力研究報告書参照)。

本菌の感染事例に関する情報収集は、国立感染症研究所感染症情報センター及び地方衛生研究所等を通じ調査を開始した。これまでの報告では、髄膜炎の原因細菌として、リステリアは確認されたが、エンテロバクター・サカザキに関する情報は皆無であった。

リステリアは、文献調査により、母子間の垂直感染が重要であると思われた(協力研究報告書参照)。

### D. 考察

本年度は、主にエンテロバクター・サカザキとリステリアについて研究を行ったが、文献調査の結果から、乳幼児用食品を介した感染につ

いて、両者の傾向は異なっていた。エンテロバクター・サカザキが、PIFからの感染が多数確認されているのに対し、リステリアではこのような感染に関する報告は確認できず、むしろ新生児における母子間の垂直感染が重要であると思われた。

国内では、これまでのところエンテロバクター・サカザキによる感染事例は、確認されていない。引き続き情報収集を続ける予定である。

厚労省の調査結果を受けて、PIFを製造している5社に協力をお願いし、製造工程を確認したところ、いずれの工場においても、海外で本菌の汚染の危険性が高いと指摘されている原材料の粉同士を混ぜ合わせ最終製品とするような工程に対する本菌の汚染の可能性の認識を持っており、このような工程に対する対策を既にとっている工場があった。上述の工程自体を無くしている工場も見られた。以前はそのような工程に対する認識がない工場もあったようであるが、調査時点では改善されていた。工場によっては、一部の材料を加熱乾燥の最終工程に加えていたが、加える原料の汚染に関しては、十分な注意が払われていた。厚労省の調査後、エンテロバクター・サカザキに関する重要性は徹底され、これに伴い製造工程の改善や対策が進んでいることが確認できた。一方、厚労省の調査で検出された菌数は、かなり低く、現在の乳等省令の規格基準に合格しており、ハイリスクグループであるNICUの新生児における調乳には既に注意喚起も徹底されていることから、国内の本菌に対する対策は高いレベルにあると思われる。厚労省の調査当時から製造工程を改善している工場もみられることから、再度汚染実態調査を行い、現状の汚染実態を確認する必要があると思われる。一方、PIF類似食

品については、乳等省令に含まれないためPIFと同様な管理の徹底は難しい。来年度には、研究班として市販PIFおよび類似食品の汚染実態調査を行い、汚染に関する検証を行う予定である。

文献調査から、*Enterobacter sakazakii* 感染症の現時点でのリスクプロファイルを作成した。ほぼ全てのデータは海外の文献を基にしているため、この内容には国内のデータはまだ含まれていない。感染事例はそのすべてが海外の事例であるため、国内に於いて本症が発症しているかを確認することは重要であると思われる。引用文献リストは本報告書の文末に加えてある。

リスクプロファイル(2005年版)

#### 1) 病原体と疾病の特徴

エンテロバクター属菌 (*Enterobacter spp.*) は、通性嫌気性のグラム陰性桿菌で、ヒト・動物の腸管内や環境中に広く分布している。本属菌のうち、エンテロバクター・サカザキ (*Enterobacter sakazakii*, 以下 *E. sakazakii*) は、形態学的特長から、かつては Yellow-pigmented *Enterobacter cloacae* として呼称されていた(44)が、現在では *E. cloacae* と識別した形で分類されている。健常人では本菌に曝されても不顕性で経過することがほとんどであるが、乳幼児、特に未熟児や免疫不全児、低体重出生児を中心として、敗血症や壊死性腸炎を発症することもあり、重篤な場合には髄膜炎を併発する(3, 4, 6, 9, 10, 13, 24, 26, 28, 31, 34, 39, 47, 48, 50, 51, 53)。

本菌は、生化学性状のみでは確定できないことも多く、16s リボゾーム配列を基軸とした遺伝学的分類が望ましい。本菌の 16s リボゾーム RNA 配列は、*Enterobacter cloacae* と約 97.0%

一致するが、一方で *Citrobacter koseri* とも 97.8% と高い相同性を有しており (23)、今後も本菌の細菌学的分類は議論の対象となりうると思われる。

本症の感染経路については未だ明らかとはなっていないが、粉末調整乳を介した感染例が多数報告されており、最も有力な感染経路として認識されている。

## 2) 動物・環境中における分布

*E. sakazakii* は動物に不顕性感染を生じるのみで、発症例はこれまでに報告されていない。本属菌は土壌、水、動物、汚水、ヒト糞便等から高頻度に検出される (44) が、トウモロコシ、キュウリ、レモンなどといった果実・野菜からしばしば検出される (15)。このことから、同じ腸内細菌科に属する大腸菌とは異なり、本菌は植物や環境をレゼルボアとして存在していると考えられている (22)。これまでに本菌が分離された動物としては、ラット (12) やハエ (16, 27) が挙げられるが、ウシなど家畜からの検出に関する報告は少なく、一概に感染源として特定はできない状況にある。一方で、ハエ (*Stomoxys calcitrans*) は動物の血液を給餌しており、重要な伝播体として関与しているとも推察される。すなわち、こうした節足動物が物理的に本菌を媒介することで食品汚染を引き起こし、これを喫食することで感染・発症している可能性も一つの感染経路として想定される。

## 3) ヒトにおける疾病

本感染症による新生児髄膜炎は 1958 年にイギリスで初めて発生が確認された (48)。その後、カナダ、ベルギー、デンマーク、アイスランド、ドイツ、ギリシャ、イスラエル、オランダ、スペイン、アメリカなど世界各国で、主に

散発性ではあるが、敗血症、壊死性腸炎、脳膿瘍を呈した症例が報告されている (代表的事例については表 1 に記した)。発症数を年齢別に見ると、明らかに新生児・乳幼児の発生が多いが、成人においても発生は認められており (17, 41)、稀な例としては膣感染を起こした症例もある (41)。幼児における感染リスクは、免疫不全、未熟児、2.5kg 以下での低体重出生などのファクターにより高まる。一方で、これらの疫学的知見については情報が乏しく、感染制御を行う上で国内外における発生状況の把握、そして食品汚染に関する定量的汚染分析は、予防・治療へ直結することから早急に解決すべき課題である。

## 4) 病原性・発症菌数に関する知見

本菌の病原性については、未だ明らかとなっていないが、*E. cloacae* ではこれまでに外毒素、エアロバクチン、ヘマグルチニンなどが主な病原因子として報告されている (25)。また、Pagotto ら (42) は乳のみマウスを用いて食品由来 8 株、臨床患者由来 9 株および標準株 (ATCC29544) について経口・腹腔内感染時の致死活性ならびにエンテロトキシン産生量を検討し、菌株間でのエンテロトキシン産生と細胞毒性 (CHO, Vero, Y-1) に有意な差異があることを示している。また、著者らは経口感染による最少致死菌数は  $10^8$  個であったことから、新生児の最少致死菌数は非常に高く、極めて高濃度の汚染を受けた粉末調整乳を長時間、増殖可能な温度域で放置するといった、衛生上の不備により本症が発生していると結論づけている (42)。

これまでに新生児、乳幼児における *E. sakazakii* 感染事例は 76 症例以上報告されているが、ヒトにおける感染菌数についての知見

は得られていない。Iversonらは、髄膜炎という臨床症状を判断材料として *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b, *Neisseria meningitidis* などの感染菌数である  $10^3$  個程度ではないかと考察しているが(69)、細菌学的確証はない。

#### 5) 熱抵抗性

調整粉乳は温水を用いて溶解することから、本菌の耐熱性に関して複数の検討がなされている。*Enterobacter* 属菌は相対的に耐熱性が高いとの報告もある(8, 37, 50)が、加熱殺菌処理を通じて本菌が生存しているかについては疑念も提唱されている(7, 11, 36, 38)。

Nazarowec-White と Farber らは、粉末調整乳中での本菌の加熱抵抗性について初めて検討を行っている。彼らは食品由来5株と臨床由来5株の計10株を粉末調整乳1mlあたり  $10^7$  個となるよう接種し、52~60°C 加熱下でのD値が54.8分から2.5分に相当し、 $10^{6-7}$  個の殺菌には60°Cで15-17.5分の加熱が必要と算出している(36)。また、Iversenらは粉末調整乳中でのD値を54~62°Cで16.4~0.3分と算出している(22)。*E. sakazakii* でも菌株による熱抵抗性の違いは約20倍にも及び、標準株(ATCC 51329)は最も熱に弱く、臨床由来株が最も熱抵抗性を示すことが知られている(11)。本菌は代表的な乳製品汚染菌である *Listeria monocytogenes* に比べると熱抵抗性は強いといわれているが(43)、他の *Enterobacter* 属菌とは同様のものであり、一般的な加熱殺菌処理および高温短時間殺菌(HTST, 71.2C, 15秒)(38)によって十分死滅しうる。

#### 6) 薬剤耐性

タイでの薬剤耐性調査によると、β-ラクタム系薬剤に対する耐性インテグロンが *E.*

*sakazakii* ゲノム上に座位することも報告されている(14)。本菌はヒトの腸管内にも日和見感染菌として頻繁に通過することから、薬剤耐性の伝播源として留意する必要があると思われる。

#### 7) *E. sakazakii* の粉ミルク汚染実態

*E. sakazakii* 感染の発生には不適切な温度管理や衛生上の不備などが根源にあると考えられている。Muytjensらは、35カ国で製造された粉ミルク計141検体を収集し、52.5%で腸内細菌の汚染があり、このうち20検体(14.2%)より *E. sakazakii* を検出している(33)。Leuscher(2004)らの報告においても58検体中8検体(13.8%)から *E. sakazakii* は検出されており(29)、本菌は粉ミルクを広く汚染していると思われる。一方で、汚染菌数については100gあたり0.36-66個と極めて低い(33, 35)。こうした低い汚染菌数に加え、1回に摂取する調整乳量が粉乳18gに相当することから試算すると、幼児一人が哺乳期間中に6000個の菌暴露を受けるには、少なくとも14世代の増殖が粉ミルク若しくは調整乳中で必要になる。これを本菌の増殖時間から求めると、37°Cで7時間、21°Cで17.9時間、18°Cで1.7日、10°Cで7.9日、そして8°Cでは9日を要することになる(20)。しかしながら、この計算は理論値であり、ボトル内の調合乳がどの段階で汚染を受けているかによって大きく変化する。また、本菌の繊毛はヘマグルチニン活性と関連していることが知られているが(1)、繊毛の保有は菌株によってまちまちであるため、菌株側のファクターとあいまって、容器素材なども増殖変動に大きく影響すると思われる。

#### 8) その他の食品・環境での汚染実態

*E. sakazakii* は、発酵パン、発酵飲料、レ

タス、香辛料、米、チーズ、ミンチ肉、ソーセージ (21, 36) など多岐にわたる食品から分離されている。Iversen らは粉末乳 82 検体及びその他の食品 404 検体について調査を行い、複数の *E. sakazakii* を検出しているが、いずれも大腸菌群、サルモネラ属菌は検出されておらず、これらを汚染指標菌とした *E. sakazakii* の制御は不可能と結論づけている (21)。また、粉末乳はその汚染実態から感染源として重要性であることは先に述べたとおりであるが、溶解調整時の 2 次汚染による事例も 2001 年に報告されている。(18, 51)。実際に粉末乳自体は *E. sakazakii* の汚染を受けていないにもかかわらず、調整に用いたブレンダーから本菌が検出された報告もある (39)。従って本菌の食品汚染は製造環境あるいは調整工程における二次汚染がかなりの部分を占めている可能性が高い。実際に、新生児髄膜炎症例において本菌はスプーンや洗浄スポンジから検出されている (34)。その他、水、パイプ、バイオフィルム、ピアマグに至るまで、本菌が感染に関わる経路は多岐にわたっている (2, 5, 40, 45)。従って、調整時の衛生管理も本症を予防するために重要なファクターとなる。

#### 9) 食品からの検出法

本菌の検出には、米国食品医薬局 (FDA) の推奨する方法 (49) が一般的に普及している。先述の通り、本菌の汚染菌数は少数と推察されることから、サンプリング量は、わが国の食品衛生検査で一般的に適用される 25 グラムではなく、333 グラムとしている。増菌培地には *Enterobacteriaceae* enrichment broth (EE 培地) を用い、選択培地である VRBG 寒天培地に直接塗抹する。疑わしいコロニーが出現した場合には少なくとも 5 個を釣菌し、トリプトソイ

寒天培地に塗抹し、黄色のコロニーであった場合には生化学試験を実施して菌種の同定を行う。また同時に最確数法により汚染菌数を算出する。

以上が FDA マニュアルの概要であるが、本法では複数の類縁菌も分離され、同定には生化学性状試験によってのみ行われることから、時間・労力・コストを要する。こうしたことから、選択培地の開発は必須の課題である。昨年、海外のメーカーにより培地の比較試験が行なわれ、*E. sakazakii* に特異性の高い酵素基質培地 (DFI 培地) も開発されている (19)。また、リアルタイム PCR 法を用いた遺伝子検出法も検討されており (30, 46)、今後、本菌を標的とした食品検査への応用が期待される。パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法を用いた遺伝子解析も本菌において実施されており、感染源の特定に結びつく解析手法として有用と思われる (38)。更に、菌体タンパクの網羅的発現解析 (プロテオーム解析) により、臨床患者由来株で顕著に発現するタンパク因子も同定されている (52)。当該因子をコードする遺伝子の定量的特異検出が可能となれば、病原性のある菌株の選択的検出にも応用できるかもしれない。

#### 10) 国際的動向と予防策

粉乳は乳製品という特性から滅菌製品ではなく、*E. sakazakii* による汚染リスクは常に想定される。しかしながら、発症に必要な菌数は把握されておらず、温度管理や調理環境の衛生管理の徹底などでしか予防は講じ得ないのが現状である。粉末調整乳における感染リスク低減の試みとして、アメリカでは 2001 年にガイドラインが発行され、施設における粉末調整乳の調整、給乳方法などについて勧告して

いる(18)が、これらは調整を行う病院など施設に対するものであり、家庭向けではない。2005年2月には粉末調整乳中の *E. sakazakii* など微生物に関する FAO/WHO 合同ワークショップが開催され、*E. sakazakii* とサルモネラによる粉末調整乳汚染は乳児の感染及び疾患の原因となると結論づけられたが、他の微生物との明確な関連付けは行なわれなかった。*E. sakazakii* はあらゆる年齢の小児に疾患を引き起こすが、新生児、特に早産、未熟児、免疫障害児に最も危険性が高く、HIV 陽性の母親から生まれた小児は特に調整乳を必要とする為、危険である。現在の技術では粉末調整乳の完全滅菌は不可能であり、汚染の可能性が残ることから、殺菌工程以降の汚染を予防することが重要といえる。コーデックスによるサルモネラの規格は、25 グラムずつ 60 検体を検査し、全て陰性であることであるが、*E. sakazakii* に特化した規格基準は現行のコーデックスコードには含まれていない。*E. sakazakii* 汚染は低レベルであっても重大な危険因子と考えられ、予備的リスクアセスメントに基づき、保管・調合・授乳時において種々の介入手段によりリスクを効果的に減じるようにしなければならない。それらの手段として、冷凍および短期間保存による本菌の増殖抑制(47)、粉乳の調整段階で使用する器具・保存容器の煮沸消毒の徹底、調整後の冷蔵保存、給与直前の電子レンジ加熱などが推奨される。その他、温水浴槽は重要な汚染源となりうることから(32)、清潔な管理を徹底する必要がある

#### E. 結論

乳幼児食品中の有害微生物としてエンテロバクター・サカザキとリステリアを対象として、

これらの病原微生物の乳幼児への感染の可能性について文献調査を行い、その結果から、それぞれの菌の重要性について考察した。特に、PIF を介するエンテロバクター・サカザキによる健康被害の発生が諸外国で報告されており、エンテロバクター・サカザキに関しては、文献調査により、その重要性は極めて高いと判断した。そこで、国内事例の情報収集、食品からの分離、分離株の疫学的解析、乳幼児用調製粉乳の製造工程における本菌の挙動について検討を開始した。リステリアでは、文献調査から周産期リステリア症では母親の感染による母子の垂直感染と思われる事例が多く見られたが、PIF および市販離乳食が原因と見られる感染例は国内外共に報告されていなかった。従って乳幼児食品を介したリステリアによる感染のリスクはあまり高くないと結論した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) 五十君静信、岡田由美子。2005。食品を介したリステリア症。化学療法の領域。21 巻 No. 4 : 475-481.
- (2) 五十君静信。2005。リステリアの食品汚染とリスク管理。食品衛生学雑誌。46(4) : J237-239.

##### 2. 学会発表

- (1) 五十君静信。国内のリステリア症の現状とその制御に向けて。第26回日本食品微生物学会学術総会シンポジウム “*Listeria monocytogenes* の研究動



向” 2005年11月

(2) Igimi S, Morisaki N, Asai M, Kubo Y,  
Asakura H and Yamamoto S. *Enterobacter*  
*sakazakii* in powdered infant formula:  
Hazard analysis in Japan. 40th Toxic  
Microorganisms Joint Panel, UJNR  
Scientific Session. 2005.11

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

表 1. *E. sakazakii* による乳幼児感染事例 (抜粋)

発生年	国名	感染源	患者数	死亡者数	文献
1958	イギリス	不明	2	2	48
1965	デンマーク	不明	1	0	24
1979	アメリカ	不明	1	0	31
1981	アメリカ	不明	1	0	26
1983	オランダ	粉末乳の疑い	8	0	34
1985	ギリシャ	不明	1	0	3
1986-87	アイスランド	粉末調整乳	3	1	6, 10
1987	アメリカ	不明	2	0	53
1988	アメリカ	粉末調整乳	4	0	47
1990	アメリカ	ブレンダー	1	0	39
1990	アメリカ	不明	1	0	13
1995-96	アメリカ	不明	5	3 (成人のみ)	28
1998	ベルギー	粉末乳の疑い	12	2	50
2000	アメリカ	不明	1	0	9
1999-2000	イスラエル	粉末調整乳	2	0	4
2001	アメリカ	粉末乳	10	1	18, 51

図1. PIF製造工程フロー A

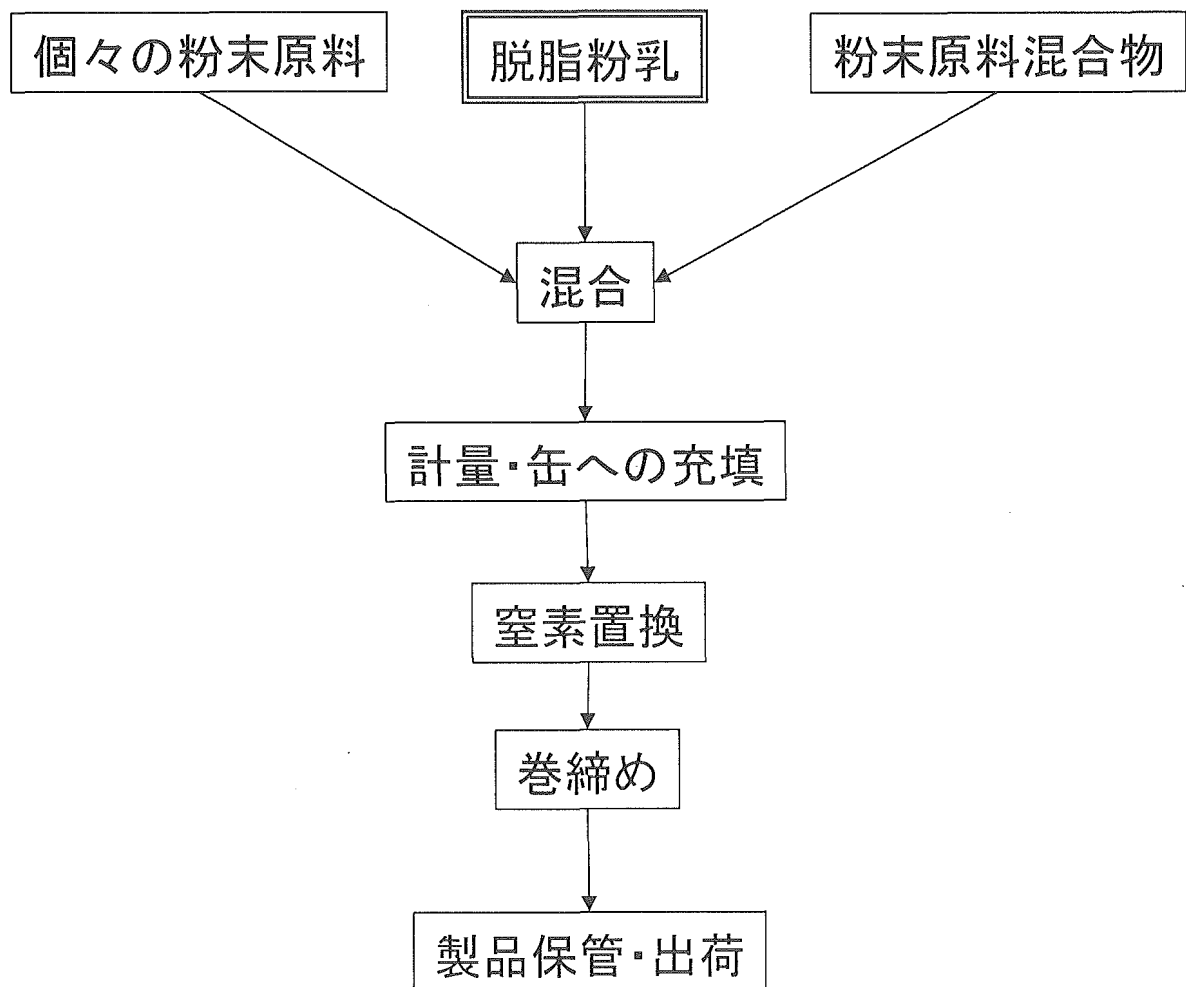


図2. PIF製造工程フロー B

