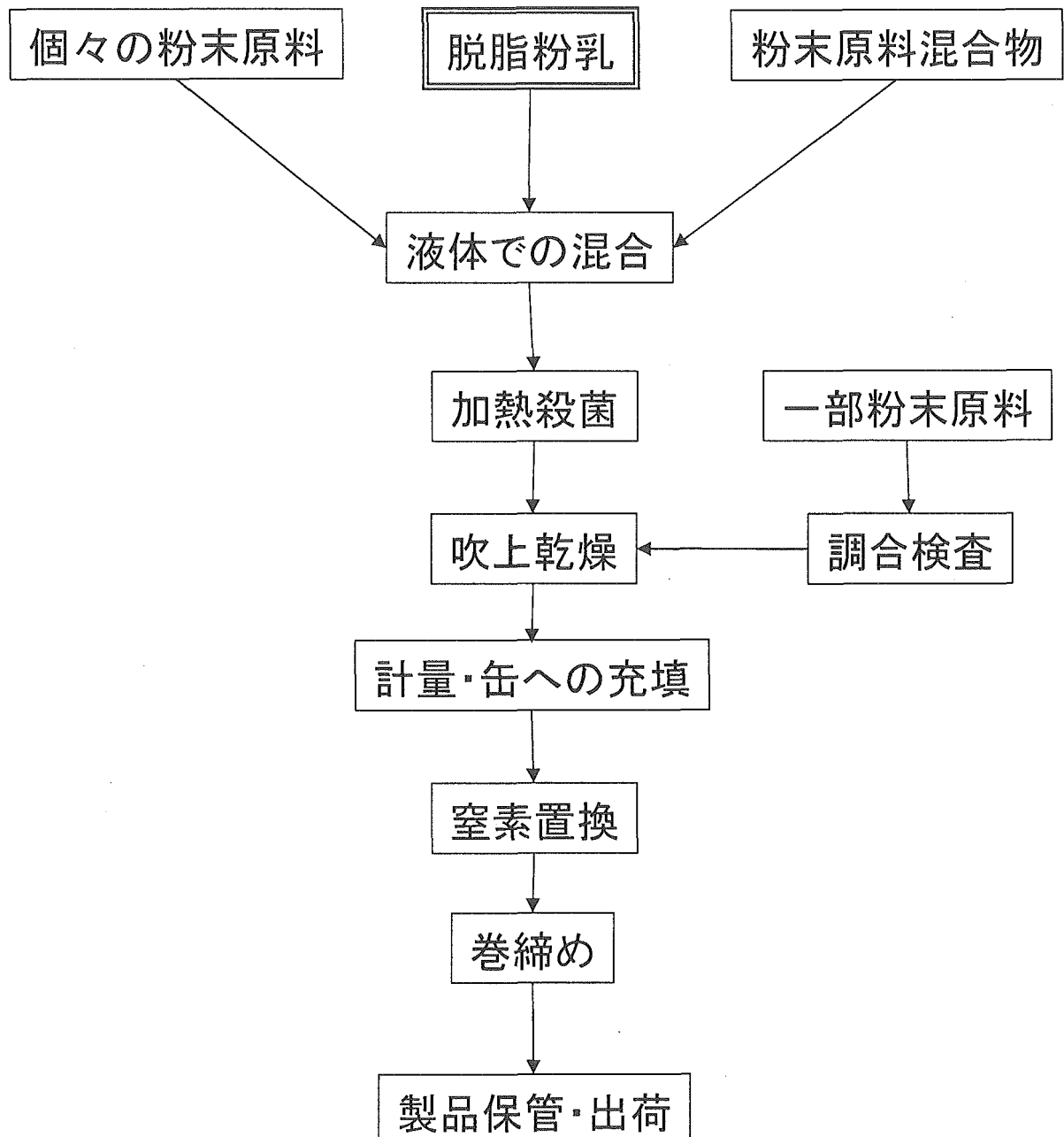


図3. PIF製造工程フロー C



Enterobacter sakazakii 関連の主な文献リスト

1. Adegbola, R.A., and Old, D.C. 1983. Fimbrial haemagglutinins in *Enterobacter* species. J. Gen. Microbiol. 129: 2175-2180.
2. Al-Hadithi, H.T., Al-Edani, T.A.A. 1995. A comparative study on the antibiotic susceptibility of six species of faecal *Enterobacter* isolated from aquatic and clinical sources. Dirasat (Pure Appl. Sci.) 22B, 35-41.
3. Arseni, A., Malamou-Lada, H., Kostalos, C., Sta-I-Kou, A., Koustia, H. 1985. A fatal case of sepsis in a premature newborn baby associated with *Enterobacter sakazakii* bacteremia. Acta Microbiol. Hell. 29: 402-407.
4. Bar-Oz B, Preminger A, Peleg O, Block C, Arad I. 2001. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. Acta Paediatr. 90(3):356-358.
5. Bartolucci, L., Pariani, A., Westfall, F., Gardini, F., Guerzoni, M.E. 1996. Interaction by microbiological processes between water, biofilm and pipe material in water distribution systems. A proposed method for determining bacterial colonization in drinking water pipe networks. Water Supply 14, 457-463.
6. Biering G, Karlsson S, Clark NC, Jonsdottir KE, Ludvigsson P, Steingrimsson O. 1989. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. J Clin Microbiol. 27(9): 2054-2056.
7. Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, Joosten HM. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. J Appl Microbiol. 95(5): 967-973.
8. Buchanan, L.R. 2003. *E. sakazakii* resistance? thermal and other. U.S. Food and Drug Administration, Food Advisory Committee Mtg., March 18-19, Washington, DC.
9. Burdette, J.H., Santos, C. 2000. *Enterobacter sakazakii* brain abscess in the neonate: the importance of neuroradiologic imaging. Pediatr. Radiol. 30: 33-34.
10. Clark NC, Hill BC, O'Hara CM, Steingrimsson O, Cooksey RC. 1990. Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. Diagn Microbiol Infect Dis. 13(6): 467-472.
11. Edelson-Mammel SG, Buchanan RL. 2004. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. J Food Prot. 67(1):60-63.
12. Gakuya FM, Kyule MN, Gathura PB, Kariuki S. 2001. Antimicrobial resistance of bacterial organisms isolated from rats. East Afr Med J. 78(12):646-649.
13. Gallagher PG, Ball WS. 1991. Cerebral infarctions due to CNS infection with *Enterobacter sakazakii*. Pediatr Radiol. 21(2): 135-136.
14. Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fennewald M, Nordmann P. 2001. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum

- beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol.* 39(1): 175-182.
15. Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., Klopper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895-914.
 16. Hamilton JV, Lehane MJ, Braig HR. 2003. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Emerg Infect Dis.* 9(10): 1355-1356.
 17. Hawkins RE, Lissner CR, Sanford JP. 1991. *Enterobacter sakazakii* bacteremia in an adult. *South Med J.* 84(6):793-795.
 18. Himelright, I., Harris, E., Lorch, V., Anderson, M. 2002. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula? Tennessee, 2001. *J. Am. Med. Assoc.* 287: 2204-2205.
 19. Iversen C., Druggan P., and S. Forsythe. 2004. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study *Int.J.Food Microbiol* 96(2): 133-139.
 20. Iversen, C., Forsythe, S., 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Technol.* 14, 443-454.
 21. Iversen, C., Forsythe, S. 2004. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered formula milk and related products. *Food Microbiol.* 21: 771-777.
 22. Iversen C, Lane M, Forsythe SJ. 2004. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett Appl Microbiol.* 38 (5): 378-382.
 23. Iversen C, Waddington M, On SL, Forsythe S. 2004. Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* Species. *J Clin Microbiol.* 42(11): 5368-5370.
 24. Joker, R.N., Norholm, T., Siboni, K.E., 1965. A case of neonatal meningitis caused by a yellow *Enterobacter*. *Danish Med. Bull.* 12: 128-130.
 25. Keller R, Pedroso MZ, Ritchmann R, Silva RM. 1998. Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. *Infect Immun.* 66(2): 645-649.
 26. Kleiman MB, Allen SD, Neal P, Reynolds J. 1981. Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by *Enterobacter sakazakii*. *J Clin Microbiol.* 14(3): 352-354.
 27. Kuzina LV, Peloquin JJ, Vacek DC, Miller TA. 2001. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Curr Microbiol.* 42(4):290-294.
 28. Lai, K.K. 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and

- adults: case reports and a review of the literature. *Med. Baltimore* 80: 113-122.
29. Leuscher, R.G.K., Baird, F., Donald, B., Cox, L.J., 2004. A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Food Microbiol.* 21, 527-533.
 30. Liu Y, Cai X, Zhang X, Gao Q, Yang X, Zheng Z, Luo M, Huang X. 2006. Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J Microbiol Methods.* 65(1):21-31.
 31. Monroe PW, Tift WL. 1979. Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow, pigmented *Enterobacter cloacae*). *J Clin Microbiol.* 10(6): 850-1.
 32. Muytjens HL, Kollee LA. 1990. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role of formula? *Pediatr Infect Dis J.* 9(5): 372-373.
 33. Muytjens HL, Roelofs-Willemsse H, Jaspar GH. 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 26(4):743-746.
 34. Muytjens HL, Zanen HC, Sonderkamp HJ, Kollee LA, Wachsmuth IK, Farmer JJ. 1983. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J Clin Microbiol.* 18(1):115-120.
 35. Nazarowec-White, M., Farber, J.M., 1997. Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J. Food Prot.* 60: 226-230.
 36. Nazarowec-White M, Farber JM. 1997. *Enterobacter sakazakii*: a review. *Int J Food Microbiol.* 34(2):103-113.
 37. Nazarowec-White M, Farber JM. 1997. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried infant formula. *Lett Appl Microbiol.* 24(1): 9-13.
 38. Nazarowec-White M, Farber JM. 1999. Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. *J Med Microbiol.* 48(6):559-567.
 39. Noriega, F.R., Kotloff, K.L., Martin, M.A., Schwalbe, R.S., 1990. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. *Pediatr. Infect. Dis.* 9: 447-449.
 40. Oliver, E.D. 1997. Atypical, non-lactose fermenting isolates shown to be total coliforms by the h-galactosidase (ONPG) reaction. *Proc. Water Qual. Technol. Conf.*, 225-231.
 41. Ongradi J. 2002. Vaginal infection by *Enterobacter sakazakii*. *Sex Transm Infect.* 78(6):467.
 42. Pagotto FJ, Nazarowec-White M, Bidawid S, Farber JM. 2003. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production *in vitro* and *in vivo*. *J Food Prot.* 66(3): 370-375.
 43. Piyasena, P., Liou, S., McKellar, R.C. 1998. Predictive modeling of inactivation of *Listeria* spp. in bovine milk during HTST pasteurization. *Int. J. Food Microbiol.* 39: 167-173.

44. Sakazaki R. 1974. *Enterobacter cloacae*. In: Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (Eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, p.325.
45. Schindler, P.R., Metz, H. 1990. Coliform bacteria in rinsed beer mugs: identification with the API 20E system and resistance behavior. *Offentliche Gesundheitswesen* 52, 592-597.
46. Seo KH, Brackett RE. 2005. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. *J Food Prot.* 68(1):59-63.
47. Simmons BP, Gelfand MS, Haas M, Metts L, Ferguson J. 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 10(9): 398-401.
48. Urmenyi AMC, Franklin AW. 1961. Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet.* 1961. 1:313-315.
49. U. S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition July 2002. Isolation and Enumeration of *Enterobacter sakazakii* from Dehydrated Powdered Infant Formula. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>
50. van Acker J, de Smet F, Muyldermans G, Bougatef A, Naessens A, Lauwers S. 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J Clin Microbiol.* 39(1):293-297.
51. Weir E. 2002. Powdered infant formula and fatal infection with *Enterobacter sakazakii*. *CMAJ.* 166(12):1570.
52. Williams TL, Monday SR, Edelson-Mammel S, Buchanan R, Musser SM. 2005. A top-down proteomics approach for differentiating thermal resistant strains of *Enterobacter sakazakii*. *Proteomics.* 5(16): 4161-4169.
53. Willis, J., Robinson, J.E. 1988. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 7: 196-199.

平成 17 年度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）

分担課題名：乳幼児食品中の病原微生物に関する研究

食品より分離された *Enterobacter sakazakii* の性状と細菌学的分類に関する検討

主任研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

協力研究者 朝倉宏 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨：

わが国における食品における *E. sakazakii* の分布状況は不明である。そこで、食品からの分離を試みると共に、食品より分離された *E. sakazakii* について遺伝学的性質を明らかにし、菌株間の相関につき検討を行った。

A. 研究目的

わが国における *E. sakazakii* の実態はほとんどわかっていないため、食品における本菌の分布ならびに、分離された株の遺伝学的性質を明らかにし、その制御に向けた基礎データとする。

B. 研究方法

1. 食品からの *E. sakazakii* 分離

食品検査段階において、大腸菌群検査を行う中で、トリプトソイ寒天培地（TSA）上で黄色を呈するコロニーを釣菌し、生化学性状試験により、本菌の同定を行った。菌の分離にあたっては、財団法人日本食品分析センターにご協力いただいた。

2. *E. sakazakii* 分離株における 16s rDNA 配列の決定

分離菌株は、TSA 寒天平板上より 1 コロニ

一を釣菌し、TE バッファー 50ul 中に懸濁した。100℃で 5 分間加熱した後、2 μl を鋳型として、16s rDNA 特異的なプライマーセットを用いた PCR 法により同遺伝子の増幅を行った。遺伝子の増幅は 1%アガロースゲル電気泳動により確認し、PCR purification kit（キアゲン）を用いて、増幅 DNA を精製した。遺伝子配列の決定には、BigDye Terminator v. 3.1 を用いたサイクルシーケンス法により標識を行い、ABI3700 を用いて解析を行った。決定配列に基づく遺伝学的同定は、Blast 検索を用いて行い、系統樹作成に当たっては UPGMA 法を用いた。

C. 研究結果

1. 食品中における *E. sakazakii* 検出率と分布

2005 年度において、約 4,000 検体の食品について大腸菌群検査をおこなった際、TSA 寒天培地上で黄色を呈するコロニーについて生化学性状試験を実施したところ、計 19 菌株の *E. sakazakii* が分離された。分離食品の内訳については表 1 に示した。このうち、12 株の由来食品はいずれも粉末状の形態をとっていた。

2. 16s rDNA 配列による *E. sakazakii* 分離株の系統解析

E. sakazakii 19 株について 16s rDNA 配列を決定し、日本 DNA データバンク (DDBJ) に登録を行った。Blast 検索による遺伝学的同定の結果、分離 19 株はいずれも *E. sakazakii* と同定された。また、UPGMA 法を用いた系統解析の結果、分離株間の相同性は 97% 以上であったが、ミツバチ花粉および麦茶由来の HT1・HT5 株の同配列は 100% 一致していた。

D. 考察

約 4,000 の食品における本菌の汚染割合は約 0.5% であったが、中でも粉末様形態をとる食品からの分離が多かったという事実は本菌の汚染実態を知る上で興味深い。*E. sakazakii* による汚染食品として最も注視されているのは粉末調整乳であるが、当該食品においても、製造段階で使用される攪拌機から本菌が分離されたという報告は複数あり、粉末への加工

工程が本菌の汚染に関与しているのかもしれない。

また、系統解析より得られたデータのうち、100% 一致した 16s rDNA 配列を有していた HT1 株と HT5 株はいずれもその他の株とは異なり、ラフ型のコロニー形態を示していた。本菌の粉末調整乳中での耐熱性には多糖類などの関与が示唆されているが未だ明らかでない。耐熱性と 16s rDNA 配列そして、コロニー形態との関連性について今後検討すべきと思われる。

E. 結論

約 4,000 の食品における本菌の汚染割合は約 0.5% であったが、中でも粉末様形態をとる食品からの分離が多かった。16s rDNA 配列による系統解析より、分離菌株の相関関係を調べたところ、図 1 に示すような結果が得られ、いくつかのクラスターが認められた。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

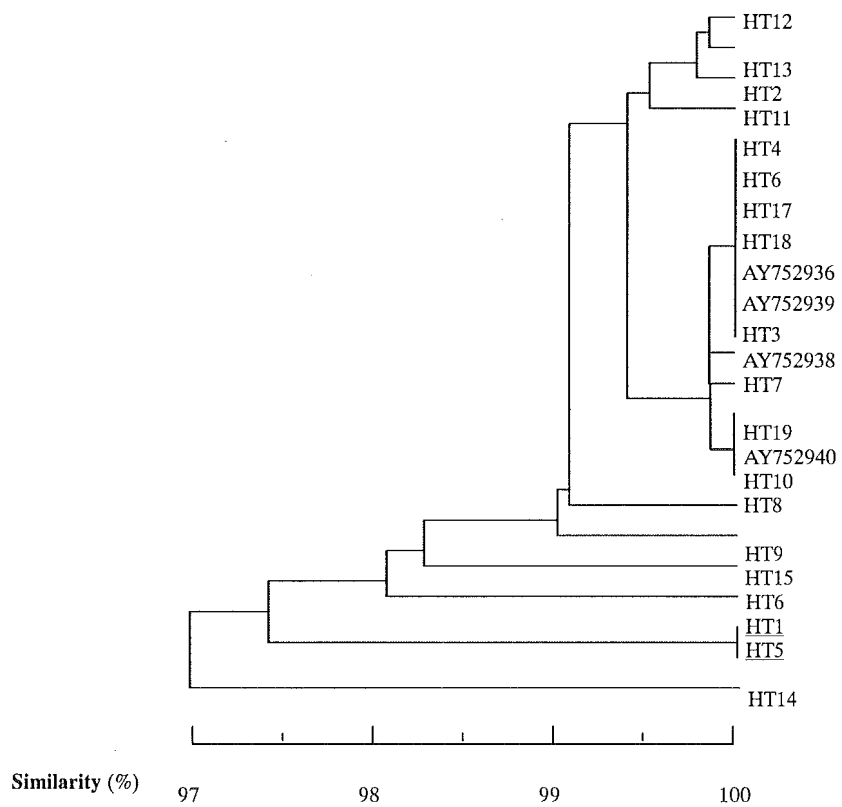


図1 16s rDNA配列に基づく*E. sakazakii*分離株の系統樹

表 1 *E. sakazakii* が分離された食品

菌株	由来
HT1	ミツバチ花粉
HT2	無洗米
HT3	山芋
HT4	粉末寒天
HT5	麦茶
HT6	コンドロイチン硫酸ナトリウム
HT7	菜種種子
HT8	小麦粉
HT9	冷凍パン
HT10	唐辛子
HT11	ナットウキナーゼ
HT12	液体酵素
HT13	粉末グルテン
HT14	桑の葉粉末
HT15	米カルシウム (健康食品)
HT16	カイワレ
HT17	大麦若葉粉末
HT18	粉末寒天
HT19	豆タンパク

平成 17 年度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）

乳幼児食品中の有害物質及び病原微生物の暴露調査に関する基礎的研究

分担課題名：乳幼児食品中の病原微生物に関する研究

Enterobacter sakasakii の免疫学的検出法の開発に関する研究

協力研究者 天野 富美夫 大阪薬科大学 薬学部

研究要旨：

粉ミルク等に混入し、乳幼児の髄膜炎の原因となる *Enterobacter sakasakii* ES の検出法を開発するため、今年度は非病原性の分離株を用い、ウサギに免疫して抗血清を調製した。その結果、用いた 5 株の分離株に対し、いずれもマイクロスライド凝集法で 1/160 希釈以上陽性の力価の抗血清が得られた。次に同法により、1/20 希釈した抗血清を用いてそれぞれの菌株に対する交叉反応性を調べた結果、菌株#4 と菌株#47-1 が互いに強い反応性を示したが、他の菌株間の交叉反応性は低かった。また、これらの抗体の性質を調べるため、それぞれの菌株の抽出液を調製し、SDS-PAGE/Western blotting における交叉反応性をみた。その結果、菌株#1 に対する抗体はすべての菌株に共通の分子量約 75kDa の抗原を検出した。一方、菌株#4 および菌株#47-1 に対する抗体は、それぞれ菌株#1、#4、#8 に共通の数本の抗原のバンドを示したが、マイクロスライド凝集法の結果とは異なり、いずれも菌株#47-1 の抗原に対する反応性は低かった。さらに、菌株#5 に対する抗体は菌株#5 の抽出液に選択的な抗原を検出した。以上の結果から、ウサギに免疫して得られた抗体は、ES の免疫学的検出法の開発に使用することが可能であることが示唆された。次年度以降、これらの抗体が認識する抗原の同定と、病原性の ES 菌株との反応性等について、さらに検討する必要がある。

A. 研究目的

本菌の食品における分布、臨床への関与を効率よく簡便に確認するには、本菌を特異的に認識する抗体の取得と、それ

を用いた検出法の開発が望まれる。さらに得られた抗体を用いて菌体の表層の解析を行うことにより、本菌の特色について検討を試みる。

B. 研究方法

(1) ES の培養と菌体の固定： 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部の五十君博士より分与されたESの標準株、#1、#4、#5、#8、および#47-1の5株をLB培地中で37℃、一晚、150 strokes/minで振とう培養した。氷冷して培養を停止し、3,500 rpm、20分間、4℃で遠心し、沈殿に回収された菌体を氷冷したPBSで2回、洗浄した。最終的な沈殿を、1%ホルマリンを含むPBSに 1×10^9 cfu/mlとなるように懸濁し、使用時まで4℃で保存した。

(2) ES 菌体の免疫と抗血清の採取：

(1)で固定した菌体をそれぞれの菌株について 1×10^9 cfuずつ懸濁して取り出し、これを氷冷したPBSで5回、15,000 rpm、4℃で遠心しながら洗浄した。最終的に回収された菌体を1 mlのPBSに懸濁し、抗原溶液とした。次に、この抗原と同量の Freund' s complete adjuvant を用い、o/w の安定なエマルジョンができるまで注射等を用いて両者を混和した。このエマルジョンを日本白ウサギ (Japanese White, male, 2kg, Nihon SLC) の1羽ずつにそれぞれ皮下注射した。2週間後、上と同様にして、 1×10^9 cfuの菌体を今度は同量の Freund' s incomplete adjuvant

と混合してエマルジョンを作成し、2回目の皮下投与を行った。その10日目からウサギの耳介静脈より部分採血を行い、抗血清の力価を判定しながら数回の採血を行った。力価の判定は、次項に示す菌体のミクロ凝集法によって行った。最終的に、それぞれのウサギから約100 mlの血清を得ることができた。

(3) ミクロ凝集法： 抗血清が得られているか否かを簡便に判定し、さらに、それらが菌体表面の抗原に結合して凝集する能力を持つか否かを調べるため、スライドガラスを用いたミクロ凝集法を行った。顕微鏡観察に用いる通常のスライドガラスにパップペンを用いて四角の枠を4つずつ描き、この枠にそれぞれのウサギから得られた血清を10 μ lずつ入れ、その上に(2)項と同様に洗浄したホルマリン固定菌体の 1×10^9 cfu/mlを10 μ lずつ添加した。スライドガラスを前後に動かしながら血清と菌液を混合し、数分間の後に菌体の凝集が起こるか否かを目視によって判定した。さらに顕微鏡下で観察して確認し、判定の参考にした。

(4) SDS-PAGE/Western blotting 法：

(1)項に示した方法で一晩培養したES菌体を、PBSで洗浄後、菌体の破砕機 (Cell beater; BI0-101) を用いてガラスビーズ

で破菌し、菌体抽出物を回収した。菌体抽出物のタンパク定量を行った後、それぞれ 20 · g のサンプルを SDS sample buffer で処理し、5-20% gel (PAGE LTM, Atto) で電気泳動してその後 PVDF 膜 (Immobilon PTM, Millipore) にブロッティングしたのち、それぞれのウサギから得られた血清の 1/1000 (菌株#1 に対する抗血清) あるいは 1/500 (菌株#1 以外の株に対する抗血清) と反応させた。フィルター上の免疫複合体は、HRP の結合した抗ウサギ IgG (Cell Signaling) と反応させた後、酵素が産生する化学発光をバイオイメージアナライザー (LAS1000, Fuji Film) で検出した。なお、対照として、非免疫ウサギから得られた血清を用いて同様の反応操作を行い、実験群との比較検討を行った。

C. 研究結果

(1) ミクロ凝集法による抗 ES 抗体の検出： それぞれの ES 菌株をウサギに免疫して得られた血清に抗体が含まれているか否かを検出するため、ミクロ凝集法によって菌体の凝集活性を測定した。その結果、Table I に示すように、それぞれの菌体を有意に凝集する血清が得られた。その力価は、いずれも 1/80 希釈以上で、

菌株#1 および#47-1 に対しては 1/160 まで凝集活性が認められた。なお、表には示さないが、抗血清の無添加群としてもちいた PBS 投与群、および、非免疫ウサギ血清では、すべての希釈度においていずれの ES 菌株も凝集が見られなかった。これらの結果から、ES 菌株と反応する多価の抗体が作成されたことが示唆され、その凝集活性を ES 菌体の検出に使用することができる可能性が示唆された。

(2) ミクロ凝集法による抗 ES 抗体の交叉反応性： 得られた抗血清中に含まれる抗体の特異性を調べるため、ミクロ凝集法を用いて、それぞれの ES 菌株に対する凝集の交叉反応性を試験した。それぞれの抗血清を 1/20 希釈し、すべての菌株と凝集反応を行った結果、Table II に示すように、菌株#1 に対する抗血清は菌株#4 および#5 と弱い反応を示したが、菌株#8 や#47-1 に対しては全く反応しなかった。これと同様に、菌株#5 および#8 に対する抗血清も、他の菌株との反応は弱かったが、菌株#4 と菌株#47-1 の抗血清は、それぞれ互いに強い交叉反応性を示し、顕著な凝集塊を形成した。以上の結果より、本研究で作成した抗体は、ミクロ凝集反応で見える限り、それぞれの菌株に対する特異性が高いことが示されたが、

例外的に菌株#4 と#47-1の間には相互の交叉反応性が見られた。

(3) Western blotting による抗原の検出：それぞれの菌株に対して得られた抗血清を用いて、#1～#47-1の5種類の菌株から得られた菌体抽出物と反応させ、菌体成分中の抗原を検出した。その結果、Fig. 1に示すように、それぞれの抗体に特徴的な反応産物のパターンが得られた。抗体#1ではすべての菌株に共通の分子量約75 kDaの抗原が主に検出された。抗体#4では菌株#1、#4、および#8に共通したいくつかの抗原が、抗体#5では#5に特有で#47-1にも比較的共通した抗原が、また抗体#8では#1、#4および#8に共通の抗原が、さらに抗体#47-1では#1、#4および#47-1に共通の抗原が、それぞれ比較的強く検出された。なお、図には示さないが、対照の非免疫ウサギ血清では、このような反応産物は検出できなかった。以上の結果より、Table IIで得られたミクロ凝集法の交叉反応性とは異なり、それぞれの抗血清にはWestern blottingに特有の抗原の交叉反応性が存在することが示唆された。

D. 考察

本年度の研究の結果、新たに、ウサギに

免疫したES菌株の標準株5種において、それぞれと強く反応して菌体を凝集させる抗血清を得ることができた。この結果は、本年度の研究目的の一部を達成したことを示す。なお、ES菌株すべてに共通して凝集反応を起こす抗血清は得られなかったため、今後、ES菌株に共通の抗原を見出し、それに対して凝集反応あるいは結合反応を起こす抗体を作成する必要がある。これと同様に、SDS-PAGE/Western blotting法による検出でも、すべての菌株に共通の抗原を検出する抗体として、菌株#1に対する抗体が75 kDaの抗原を検出した以外には、候補となる抗原と抗体の組み合わせが見出さなかった。この75 kDaの抗原がESの共通抗原か否かについては、次年度以降、さらに検討を加え、研究を進展させたい。また、なるべく早い時期に病原性のES菌株を入手し、それらに共通の抗原を同定してそれに対する抗体を作成し、本研究の目的とするESの免疫学的検出法の開発を推進したい。

E. 結論

(1) ES標準株5株に対する抗体をウサギで作成することに成功した。

(2) ミクロ凝集法での交叉反応性、およびSDS-PAGE/Western blotting法によ

る反応性の結果、すべての ES 菌株に共通の抗原の候補が存在することが示唆された。しかし現在得られている抗体の反応性からは、免疫学的検出法に使用するのに十分な抗体とはいえ、今後、ES 菌株に共通の抗原の同定とそれに対する抗体の作成が必要である。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table I. Titers of antisera raised against *E. sakasaki* isolates assayed by micro-agglutination method with formalin-fixed bacteria.

E. Sakazaki ミクロ凝集反応

血清希釈 菌体	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
# 1	++++	++	++	+	—	—
# 4	++++	+++	++	±	—	—
# 5	+++	++	++	±	—	—
# 8	+++	++	++	±	±	±
#47-1	++++	++++	+++	+	±	±

Table II. Cross-reactivity of antisera raised against *E. sakazakii* isolates assayed by micro-agglutination method.

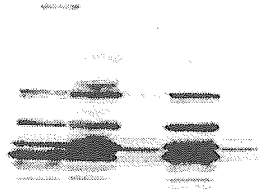
E. Sakazaki 交差凝集活性					
血清 菌体	# 1	# 4	# 5	# 8	#47-1
# 1		±	±	—	—
# 4	—		—	±	++++
# 5	±	±		±	—
# 8	±	±	—		—
#47-1	—	+++	—	±	

一次抗体 #1



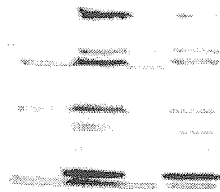
1 4 5 8 4
7
1

一次抗体 #4



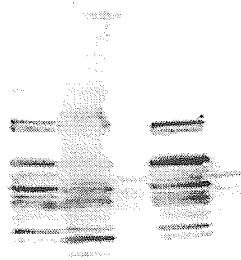
1 4 5 8 4
7
1

一次抗体 #5



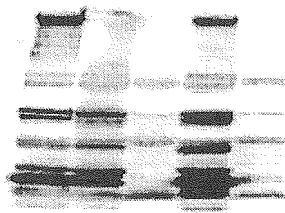
1 4 5 8 4
7
1

一次抗体 #8



1 4 5 8 4
7
1

一次抗体 #47-1



1 4 5 8 4
7
1

Fig. 1. Western blot analysis of antisera raised against *E. sakasakii* isolates toward the bacterial extracts.

平成17年度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）

乳幼児食品中の有害物質及び病原微生物の暴露調査に関する基礎的研究

協力研究報告書

粉ミルク及び市販離乳食由来のリストERIA症に関する文献調査

協力研究者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨：

乳幼児の粉ミルクおよび市販離乳食摂取によるリストERIA症感染リスクを明らかにするための一助として、文献調査を行った。国内外の論文を検索した結果、子供のリストERIA症事例の大半は胎児期から生後1か月齢までの新生児期にみられるものであった。これら周産期リストERIA症では母親によるリストERIA汚染食品摂取が原因の経胎盤または経産道感染と思われるものが多く見られたが、無症状の母親の母乳を介した感染例も見られた。一方、国内における乳幼児リストERIA症の症例報告では、原因食品に関する言及は見られなかった。学童で原因食品が明らかにされている報告はいくつかみられたが、明らかに粉ミルク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おらず、これらによる本症の感染リスクは低いと推察された。

A. 研究目的

動物の腸管内や河川水等、自然界に広く分布することが知られているリストERIA症の原因菌 *Listeria monocytogenes*（以下リストERIA）は様々な食品からも分離が報告されており、特に動物性食品がその感染源として知られている。本菌は低温増殖能や高食塩濃度耐性等の高度なストレス抵抗性を示し、芽胞を形成しないにも関わらず微生物にとって生存困難な環境で生残することができる。市販

の粉ミルクや離乳食は、感染症に対する抵抗力の弱い乳幼児を対象としているため、衛生的に製造されているが、近年これらの食品に起因したエンテロバクターサカザキ菌やサルモネラによる新生児の感染症に関していくつかの国から報告がなされている。そのため厚生労働科学研究においても、国内の市販粉ミルクにおけるこれらの菌の汚染状況に関する調査が行われてきた。また、2001年には我が国において初めて確認された食品媒

介リステリア症の集団事例が報告されている。今回我々は、食品媒介感染症の中でも特に強い環境抵抗性を持つリステリアについて、乳幼児の粉ミルクおよび市販離乳食摂取によるリステリア症感染リスクを明らかにするために文献調査を行った。

B. 研究方法

PubMed 及び医学中央雑誌を用いて、乳幼児におけるリステリア症感染事例、粉ミルク及び市販離乳食からの微生物検出に関する文献を検索した。

C. 研究結果

胎児期及び新生児期におけるリステリア症の集団症例は数多く報告されており、それらは母親のリステリア汚染食品喫食による垂直感染であった(文献1-6)。喫食食品の例としては、未殺菌乳と有機野菜(血清型1/2a、オーストリア、文献1)、低温殺菌乳(血清型4b、アメリカ合衆国、文献2)、薫製の貝(血清型1/2a、ニュージーランド、文献3)、食肉加工品(血清型4b、フランス、文献4)、フレッシュチーズ(血清型4b、アメリカ合衆国、文献5)等であった。また、極めて稀な例ではあるが無症状の母親の母乳から感染した例も見られた(文献7)。一方、生後1ヶ月から2歳未満までの感染例は非常

に少なく、アメリカCDCによる1995年のアメリカ合衆国内における細菌性髄膜炎の症例数に関する報告でも、人口10万人に対する症例数が1ヶ月齢以下では39.2、1ヶ月齢から2歳前までは0、2から29歳までが0.04となっていた(文献8)。1-2歳児のリステリア症の感染例は国内でもいくつか報告されているが(文献9-11)、いずれも散发例であり、またその感染源は不明であった。2歳以降では成人と同じものを喫食することによる集団感染例が見られた(文献12-14)。原因食品は冷薫されたニジマス(3歳児、血清型1/2a、フィンランド、文献12)、コーンサラダ(6-10歳の学童、血清型4b、イタリア、文献13)、チョコレートミルク(2、5、6歳児、血清型1/2b、アメリカ合衆国、文献14)等であった。また、粉ミルク及び離乳食からの感染事例及び微生物検出に関する論文はエンテロバクターサカザキ菌(文献15-17)、ボツリヌス菌(文献18)、セレウス菌(文献19)、サルモネラ(文献20)がみられたが、リステリアに関するものは見られなかった。

D. 考察

文献調査の結果、乳幼児のリステリア症感染に関し以下のことが明らかになった。

(1) 乳幼児におけるリステリアによる

髄膜炎感染は周産期を中心とする新生児期（1か月齢以下）が圧倒的に多く、1か月齢から2歳前までは症例が極めて稀になり、2歳以降に見られるが多くはなかった。

（2）周産期リステリア症の主な原因としては、妊産婦によるリステリア汚染食品の喫食による経胎盤・経産道感染が主であった。

（3）1か月齢から2歳未満までのリステリア症例は極めて稀であり、そのどれもが散発例で原因は特定されていなかった。

（4）2歳以降のリステリア症は成人と同じリステリア汚染食品を喫食することによる感染であった。

（5）粉ミルク及び市販離乳食からの感染症罹患例及び病原体検出例はエンテロバクターサカザキ菌、ボツリヌス菌、セレウス菌及びサルモネラで見られたが、リステリアではみられなかった。

これらの結果から、リステリアによる市販粉ミルク及び離乳食による乳幼児リ

ステリア症の感染リスクは低いと考えられた。

E. 結論

乳幼児における市販粉ミルク及び離乳食に由来するリステリア症の感染リスクを明らかにする一助として国内外の関連文献を調査した結果、これらの食品に由来する感染事例及びこれらの食品からの検出事例はみられず、その感染リスクは低いと考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし