

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

平成18年度 総括・分担研究報告書

(課題番号：H17-食品-003)

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

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研究班

平成18年度 研究組織

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

分担研究者

米谷 民雄 国立医薬品食品衛生研究所 食品部

吉池 信男 国立健康・栄養研究所 国際産学連携センター

豊福 肇 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

協力研究者

長岡 恵 国立医薬品食品衛生研究所 食品部

伊佐川 聡 (財)日本食品分析センター 大阪支所

吉田 泉 (財)日本食品分析センター 大阪支所

岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

石原 朋子 国立感染症研究所 細菌第一部

天野富美夫 大阪薬科大学 薬学部

窪田 邦宏 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

三好 美紀 国立健康・栄養研究所 国際栄養プロジェクト

堤 ちはる 恩賜財団母子愛育会日本子ども家庭総合研究所

事務および経理担当者

松本 竜希 国立医薬品食品衛生研究所 総務部

吉岡 宏美 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

目 次

I. 総括研究報告書	
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	1
五十君 静信	
総括研究報告書概要版	11
II. 分担研究報告書	
1. 乳幼児食品中の有害化学物質の分析に関する研究	13
米谷 民雄、長岡 恵、伊佐川 聡、吉田 泉	
2. 乳幼児食品中の病原微生物に関する研究	27
五十君 静信、岡田 由美子、朝倉 宏、石原 朋子、 天野 富美夫、豊福 肇	
(1) 食品より分離された <i>Enterobacter sakazakii</i> の熱抵抗性に	35
関する研究	
五十君 静信、朝倉 宏、石原 朋子	
(2) エンテロバクター・サカザキの乳製品汚染とその対策に関する研究 . . .	43
天野 富美夫	
3. 乳幼児における有害微生物の汚染および健康被害情報に関する研究	49
豊福 肇、窪田 邦宏、朝倉 宏	
4. 乳幼児の食品摂取量調査のための基礎研究	61
～乳幼児の人工乳・離乳食等の摂取に関するデータ分析～	
吉池 信男、三好 美紀、堤 ちはる	
III. 参考論文	79

平成18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

総括研究報告書

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

研究要旨：

一般に乳幼児は化学物質や病原微生物に対する感受性が高く、また、成人とは食品摂取内容が異なることから、乳幼児の化学物質や病原微生物への暴露量評価は、成人とは別途行う必要がある。そこで、乳幼児における暴露量評価手法を検討し、分析が必要と考えられるいくつかの有機化合物、無機化合物および病原微生物に着目し、その分析法や検査法を確立し、さらに暴露量評価手法に基づいて、測定や検出を試みた。有機化合物のフランと無機ヒ素を中心に、乳幼児における食品からの化学物質暴露量評価法を検討し、市販の乳児用食品における汚染実態調査を行った。有害微生物としては、近年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、わが国における乳幼児への暴露の実態は不明であるエンテロバクター・サカザキを中心に研究を進めた。検出法の整備を行ったうえで、市販の乳児用調製粉乳およびその関連食品について汚染実態を調査した。本菌の分離菌株の性質を細菌学的、分子遺伝学的手法により解析し、本菌がなぜ乳児用調製粉乳やその関連食品を汚染するかにつき検討した。本研究では、乳幼児食に特化して暴露量評価法や暴露量を求める点に特色があるため、幼児用食品に関する系統的な摂取量調査を行うと共に、乳幼児食品における海外および国内の情報収集を行った。

分担研究者：

米谷 民雄：国立医薬品食品衛生研究所
食品部

吉池 信男：国立健康・栄養研究所
国際産学連携センター

豊福 肇：国立医薬品食品衛生研究所
安全情報部

A. 研究目的

食品からの有害化学物質等の成人の摂取量調査は実施されてきたが、異なる食品摂取をする乳幼児に対して系統的な摂取量調査は行われていない。乳幼児は、一般に化学物質や有害微生物に対する感受性が高く、成人の調査結果を外挿する

ことは適当でない場合が想定される。本研究では、乳幼児における食品からの有害化学物質や有害微生物等の摂取量を把握し、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。

B. 研究方法

有害化学物質の検討

①無機ヒ素

ひじきを含有する市販乳幼児用食品 24 品目を、都内のスーパーにて購入した。また、ひじきを含有する離乳食 2 品（ひじきの炊き込みご飯とひじきの煮物）を調理した。これら 26 品目を凍結乾燥したのち粉砕し、均質化後、分析を行った。使用機器、前処理及び分析方法については、分担報告書に示す。

②フラン

昨年度確立した、検量線法によるヘッドスペース-GC/MS 法により分析した。市販されている特別用途食品の乳児用調製粉乳、妊産婦・授乳婦用粉乳、高齢者用食品、病者用食品、計 45 製品を購入した。使用機器、前処理及び分析方法については、分担報告書に示す。なお、実際の分析は、(財)日本食品分析センターに委託して行った。

有害微生物の検討

③有害微生物情報収集

有害微生物については、エンテロバクター・サカザキ、セレウス、サルモネラ、リステリア、ボツリヌスを対象とし、特に乳児用調製粉乳に関する国内外の文献調査等により情報収集を行った。調製粉乳中のエンテロバクター・サカザキに関する FAO/WHO の会合に出席し、情報交換を行い、疫学的データ、食品及び製造環境中での汚染の実態、調合から喫食までの間の微生物の消長、種々のリスク管理措置によるリスク低減効果の予測、各国が実施しているリスク管理措置等に関する情報収集を行った。また、新生児集中治療室(NICU)を有する医療機関を訪問し、調整粉乳の調整・管理の実態を調査した。

④エンテロバクター・サカザキ

エンテロバクター・サカザキについては、国内の乳児用調製粉乳およびその類似食品について FDA 法に準じた方法で定量的な汚染実態調査を行った。国内の汚染を確認し、調製粉乳の製造工程の現地調査を行った。各種食品からの本菌の分離菌株の性質を細菌学的、分子遺伝学的手法により解析し、本菌がなぜ乳児用調製粉乳やその関連食品を汚染するかにつき考察を行った。

摂取量調査

乳幼児が摂取する調整粉乳やベビーフードに加え、その他の食品の摂取状況を把握するため、既発表の調査データなどを整理

の上、検討を行った。離乳食に関する全国実態調査および国民健康・栄養調査のデータを用いた二次解析を行い、各食品の摂取時期および摂取量の分布の特徴を明らかにした。

尚、詳しい研究方法については、各分担報告書を参考にさせていただきたい。

C. 研究結果

有害化学物質の検討

①無機ヒ素

乳幼児食中の無機ヒ素の分析に、昨年度確立した HG-CT-AAS 法による方法を用いることにより、試料前処理の際にヒ素の化学形態に影響を与えることなく、無機ヒ素の正確な定量が可能となった。特に乳幼児食には栄養成分としてひじきや魚介類などが添加されることが多いため、マトリックスの影響について検討した。採用した分析条件は、乳幼児食中のマトリックスによる無機ヒ素定量への影響がほとんどない分析条件であることが明らかになった。

ひじきを含有する乳幼児用食品 26 検体中の無機ヒ素および総ヒ素の分析を行った。まず、ひじきを含有し、かつヒ素摂取に寄与が大きい米を含有する試料 7 品目について調べたところ、無機ヒ素濃度はすべて $1 \mu\text{g/g}$ 以下であり、総ヒ素濃度は No. 4 で $3.3 \mu\text{g/g}$ であった他、3 検体で $1 \mu\text{g/g}$ 以上であった。次に、ひじきを含有し米を含有し

ない、惣菜試料 17 品目について分析した。その結果、無機ヒ素濃度が $1 \mu\text{g/g}$ 以上と比較的高い値のものが 4 検体みられ、これら無機ヒ素濃度 1.02 、 1.06 、 2.05 、 $2.59 \mu\text{g/g}$ の場合、1 食による無機ヒ素摂取量はそれぞれ 4.8 、 10.6 、 22.1 、 $13.5 \mu\text{g}$ と算出された。大部分の試料では無機ヒ素の濃度および 1 食による無機ヒ素の摂取量は低いと考えられた。

②フラン

フラン分析時のヘッドスペースサンプラーのオープン温度設定は昨年度の検討から 60°C とし、加温時間は 30 分とした。しかし、醤油をこの条件で加温すると分析中に新たにフランが生成する可能性が示唆されたため、醤油の分析時には、ヘッドスペースサンプラーのオープン温度設定を 45°C に下げて分析した。

特別用途食品の病者用食品に区分され、「ミルクアレルギー除去食品・無乳糖食品」の表示のある調製粉乳、乳児用食品に区分される乳児用調製粉乳、及び妊産婦用食品に区分される妊産婦・授乳婦用粉乳、並びに特別用途食品の表示はないが特殊ミルクとして市販されている調製粉乳について、フランの定量を行った。

分析の結果、乳児用調製粉乳のうち、ミルクアレルギー除去食品においてはフランの値が高値を示す傾向にあり、 $6\sim 22 \text{ ng/g}$ が観測された。一方、他の乳児用調製粉乳

や妊産婦・授乳婦用粉乳では最高値は 3 ng/g であった。

有害微生物の検討

③有害微生物情報収集

文献調査により、2006 年は、スペインで調製粉乳の摂取歴のない 31 週、1715g で生まれた新生児で感染が報告され、またアメリカでは 2 例の散発例が CDC に報告された。

同菌によるリスクを抑えるには、調製から保管、使用時の取扱い、特に温度管理が重要である。今回、東京都内の 8 施設の病院の調乳施設を見学し、その取扱いに関する予備調査を行ったところ、同菌のリスク因子と考えられる作業工程は認められなかった。

乳児ボツリヌス症と調製粉乳との因果関係を諸外国の報告から調査したが、非常に弱い関連性を示す事例が 1 例イギリスで認められたが、分子型別等の手法を用いた結果、明らかな因果関係は確立されていなかった。

④エンテロバクター・サカザキ

本年度の調査において、微量ではあるものの、PIF 及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 製造工程で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行った。

国内の PIF 製造工場では、それぞれの製造工場により多少異なるが、海外で本菌の混入の原因となると指摘されている、粉と粉を単純に混ぜ合わせ最終製品を作り上げる製造フローは、そのまま使われていなかった。国内製造会社においては、粉と粉を混ぜ合わせるだけで最終製品とする製造方法を改善しており、PIF 各成分を溶解混和後、加熱処理を行った後、乾燥を行っていた。製造工場によっては、一部の原材料を粉として加える工程が残っているが、この場合においても、それぞれの原材料に対する製品管理が徹底されていた。

今年度も、市販の PIF 及び類似食品で汚染実態調査を行ったが、微量であるが 100 検体のうち 4 検体から本菌が検出された。各種食品から分離されたエンテロバクター・サカザキの細菌学的な解析により、分離株はその特徴によりいくつかのクラスターに分けることが出来た。粉ミルクを含めた多くの乳幼児用食品で製造段階あるいは喫食前の調整段階で加熱処理が行われることを踏まえ、食品由来株とヒト由来標準株を用いて熱抵抗性に関する研究を行った。熱抵抗性は、菌株により大きく異なっており、3 つのクラスに大別された。その形質は、16 s RNA 配列あるいは生化学性状とは相関性が認め

られなかったが、熱抵抗性株と熱感受性株を用いて、ディファレンシャル PCR 法を行うことで、翻訳開始因子（IF2）をコードする *infB* 遺伝子の発現性が熱抵抗性と相関していることが明らかとなった。検出された遺伝子領域の配列は、熱抵抗性株では共通に保持されていたものの、感受性株では点変異や欠失が認められた。

摂取量に関する調査

離乳食に関する全国実態調査および国民健康・栄養調査のデータを用いた二次解析の結果、各食品の摂取時期および摂取量の分布の特徴が明らかになった。国民健康・調査は 1 歳以上を対象としていることから、“離乳期”の食パターンを 1 歳代の摂取量データから類推した。ヒジキはベビーフードを含めて乳幼児期に多く使われていると予想されていたが、2-14 歳小児と比べて摂取量は多く、体重当たりでは成人の量を超えていることがわかった。

新生児集中治療室（NICU）を有する医療機関を訪問し、調整粉乳の調整・管理の実態について関連情報を収集した。

D. 考察

有害物質の検討

①ヒ素

乳幼児食には、不飽和脂肪酸や鉄などの有用成分を含有させる目的で魚介類やひじ

きなどを加えることが多いが、これらは総ヒ素量が非常に高い。今回、無機ヒ素摂取量に寄与の高いひじきを含有する乳幼児食中の無機ヒ素量を分析した。その結果、26 検体の中には無機ヒ素濃度が高いものも見られたが、大部分は低い値であった。

ひじきを含有していても無機ヒ素濃度は低いものがほとんどであった。このことは、ひじきの調理の下準備である“水戻し操作”が十分に行われていること、あるいは、ひじきの添加量が少ないことが考えられた。

他の分担研究者からの報告によると、乳幼児のひじき摂取量は体重当たり成人の摂取量を越えている。乳幼児について、無機ヒ素摂取による影響を評価する場合、PTWI 値を単純に乳幼児に当てはめることが適当か否かを含め、今後、慎重に検討を進める必要があると考えられた。

②フラン

分析の結果、乳児用調製粉乳のうち、ミルクアレルギー除去食品においてはフランの値が高値を示す傾向にあり、6~22 ng/g が観測された。一方、他の乳児用調製粉乳や妊産婦・授乳婦用粉乳では最高値は 3 ng/g であった。アレルギー除去処理のなされた製品において、どのような加工・処理によりフランが生成するのかは、不明である。製造工程中の加熱などの操作によりフランの値が高くなる傾向が認められたが、フラン生成の機序については、今後の検討

課題である。

なお、フランのリスク評価については、2006年12月11日に開催された食品安全委員会の第3回化学物質専門調査会に提出された資料3-4においては、国際機関の評価とその根拠として、「フランについては、米国で食品中の含有量について研究が進められているが、その健康リスクについては、まだはっきりとした結論が出されていない」と記載されている。また、2007年3月15日開催の第182回食品安全委員会の議事概要においても、「フランについてはファクトシートの作成について検討すること」とされている状態である。

有害微生物の検討

③有害微生物情報収集

2006年の症例としては、Pubmedで検索した結果、検出された *E. sakazakii* の患者報告はスペインから報告された患者1例のみであった。新生児患者は母乳及び早産児用の液体乳から栄養を摂取しており、粉末乳製品は一切摂取していなかった。母親の膣分泌液サンプル、母乳、液体乳を培養したが、結果はいずれも陰性であった。この事例では調製粉乳を摂取していなかったにもかかわらず、*E. sakazakii* に感染した事例で、感染源はわかっていない。

アメリカでは CDC に2例の相互に関連

性のない *E. sakazakii* 症例が報告された。

1例目は低体重の満期産児で、健康であったが、生後1ヶ月で家庭で発症し、髄膜炎及び大きな脳の膿瘍を形成したが、生存した。2例目も健康な満期産児で、生後2週間で髄膜炎を発症し、死亡した。いずれも PIF を飲んでしたが、PIF からは同菌は検出されなかった。しかし、その他の感染源も特定されなかった。

国内では、エンテロバクター・サカザキの乳幼児への暴露や感染の実態は厚労省の調査を除き調べられておらず、その実態ははっきりしていない。これまでの研究により、一般の食品から本菌が分離され、国内の PIF の汚染実態調査においても分離が確認されたことから、国内に於いても本菌が感染する可能性はあると考えられる。一方、本年度もこれまでのところ、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。

幼児ボツリヌス症と調製粉乳との関連性について検討を行った。976年に最初の乳児ボツリヌス症がアメリカで報告されて以来、わが国を含む世界中で1,500例以上の報告がある。そのおよそ90%はアメリカから報告されているが、これは内科医の認識度が高いことによる。乳児ボツリヌス症はアメリカでは最も頻繁に報告されるボツリヌス症の形であり、年間

80-100名の患者が報告されていたが、実際にはアメリカだけで250名以上の患者が発生していると推定される。乳児ボツリヌス症のもっとも多く報告されている感染源は、はちみつ、ハウスダストであるが、ほとんどの症例（およそ85%）で感染源は不明である。

④エンテロバクター・サカザキ

わが国の食品中から分離された *E. sakazakii* の熱抵抗性に関して、その多様性を示すとともに、これに関連する遺伝子の特定を行なった。海外のみならず、食品中には多くの *E. sakazakii* が分布していることは、食品検査などを通じて明らかとなってきたが、*E. sakazakii* に特異的な検出法としては、リアルタイムPCR法を用いた報告が2報あるのみである。これらのターゲットには高分子合成オペロン(MMS)をコードする rpsU-dnaG 遺伝子群 15) や 16-23S rRNA spacer region 12) が用いられているが、いずれも熱抵抗性との関連性については言及されていない。本研究において示した、*infB* 配列多形を軸としたサブタイピング法は、食品や環境から熱抵抗性の *E. sakazakii* を選択的に検出するために有用と思われる、その応用はPIF製造・調整段階における環境からの汚染経路の追跡・特定へとつながると期待される。

摂取量に関する調査

乳幼児における離乳食の摂取実態を定量的に把握することは技術的に難しく、国内外においても発表されている調査データは限られている。そのため、多くの国において、離乳期を中心とした各月齢におけるエネルギーや栄養素摂取量の情報が不足している。

このような状況を踏まえ、本年度は、わが国を代表する栄養調査である国民健康・栄養調査が1歳以上を対象としていることから、その二次解析により離乳期の食パターンを（他の年代グループとの比較検討を通して）1歳代の摂取量データから類推することを試みた。また、他の研究班による離乳食に関する調査におけるデータの二次解析により、主要な食品の摂取時期の分布を求めたが、本データと「改訂 離乳の基本（1995年）」を活用することによって摂取量の推定が可能と考えられた。

また、本年度はNICUを含めた新生児医療施設における調整粉乳の調乳・管理の実態についての情報収集も行った。今回、事例として取り上げたA病院は徹底した品質管理・衛生環境のもとで調乳が実施されており、*E. sakazakii* に関しても、厚労省からの通知「育児用調整粉乳の衛生的取り扱いについて」（平成17年）やQ&A等の情報を臨床栄養科が良く把握し、

すでに必要な対応を行っていたが、医療機関によっては十分に周知されていない可能性も指摘された。

E. 結論

有害化学物質の分析では、ヒ素については、昨年度検討した米・魚介類を含む乳幼児食に適用できる無機ヒ素定量法について改良を行い、また、無機ヒ素摂取量に寄与が大きいひじきを含有する乳幼児食について、無機ヒ素量を分析した。その結果、26検体のうち無機ヒ素濃度が高いものも見られたが、大部分は低い値であった。1食当たりの無機ヒ素摂取量が多くなる試料が1検体見られたが、そのみを継続摂取することは考えにくいと思われた。

フランでは、昨年度、食材と加工方法によりフランの生成量に大きな差があり、特定の成分に着目した研究が必要と考えられたが、今年度は微生物の分担課題とターゲットを合わせるため、アレルギー除去乳児用調製粉乳を中心に、市販の特別用途食品についてフランの定量を行った。その結果、ミルクアレルギー除去乳児用調製粉乳において、フラン濃度が比較的高い値であった。特別用途用の製造工程での加熱操作などによりフランが生成する可能性が考えられたが、原因については今後の課題として残された。

乳幼児食品中の有害微生物としてエンテ

ロバクター・サカザキの症例に関する情報収集を続けた。市販の乳児用調製粉乳の汚染実態調査では、わずかではあるが本菌が検出された。国内における本菌による感染症例はまだ確認されていない。本菌の分離株の細菌学的検討により、熱抵抗性に関わる因子が特定されたことは、食品や環境から熱抵抗性の *E. sakazakii* を選択的に検出するために有用である。

摂取量に関する調査では、離乳食に関する全国実態調査および国民健康・栄養調査のデータを用いた二次解析の結果、各食品の摂取時期および摂取量の分布の特徴が明らかになった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nagaoka M H, and Maitani T: Analysis of inorganic arsenic in foods by hydride generation-cold trap-atomic absorption spectrophotometry. *Metal Ions in Biology and Medicine*, 9:75-77 (2006)
- (2) Ichikawa S, Kamoshida M, Hanaoka K, Hamano M, Maitani T, and Kaise T: Decrease of arsenic in edible brown algae *Hijikia fusiforme* by the

- cooking process. Appl. Organomet. Chem., 20:585-590 (2006)
- (3) Igimi S, Yamasaki M, Yamamoto S and Amano F: An anti-Salmonella antibody prevents *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from infecting a human intestinal epithelial cell line, Caco-2, by interacting with flagella. Bioscience & Microflora. 25:117-119 (2006)
- (4) Asakura H, Kawamoto K, Igimi S, Yamamoto S, and Makino SI: Enhancement of mice susceptibility to infection with *Listeria monocytogenes* by the treatment of morphine. Microbiol. Immunol. 50: 543-547 (2006)
- (5) Asakura H, Morita-Ishihara T, Yamamoto S, and Igimi S: Genetic marker for thermal resistance in *Enterobacter sakazakii*. in press
- (6) 市川覚士, 貝瀬利一, 花岡研一, 長岡(浜野) 恵, 米谷民雄: マウスを用いたヒジキ中ヒ素化合物の代謝, Trace Nutrients Research 23, 128-133 (2006)
- (7) 豊福肇, 窪田邦宏, 森川馨: 乳児用調製粉乳 (Powdered Infant Formula) の摂取による乳児の *Salmonella* アウトブレイク、国立医薬品食品衛生研究所報告 第 1 2 4 号 74-79 (2007)
- (8) 豊福肇: 乳児用調製粉乳 (PIF) の調製、調整後の保管及び取り扱いにおける相対リスクの比較— joint FAO/WHO Expert Meeting における approach—食品衛生研究 56(12):9-22 (2006)
- (9) 五十君静信、朝倉宏: 乳児用調製粉乳中の *Enterobacter sakazakii* による感染。食品衛生学雑誌。in press

2. 学会発表

- (1) 市川覚士、貝瀬利一、花岡研一、長岡(浜野) 恵、米谷民雄: マウスを用いたヒジキ中ヒ素化合物の動態。第 91 回日本食品衛生学会学術講演会(東京) 講演要旨集 p.55 (2006.5)
- (2) Nagaoka M. H. Maitani T. : Speciation of arsenic in foods by hydride generation-cold trap-atomic absorption spectrophotometry. 10th ISMIBM (Lisbon) Abstract p 244 (2006.5)
- (3) 市川覚士、貝瀬利一、花岡研一、長岡(浜野) 恵、米谷民雄: マウスを用いたヒジキ中ヒ素化合物の動態。微量栄養素シンポジウム(京都) 講演要旨集 p16-17 (2006.6)
- (4) 長岡(浜野) 恵、米谷民雄: 水素化物変換-コールドトラップ-原子吸光法および HPLC/ICP-MS 法を用いた食品中無機ヒ素の分別定量法に関する研究。日本

- 分析化学会第 55 年会(大阪)(2006.9)
- (5) Nagaoka MH, Maitani T: Analysis of Inorganic Arsenic in Samples of Seaweed, Rice and Infant Foods by Hydride Generation – Cold Trap – Atomic Absorption Spectrometry. 12th Symposium on Sample Handling for Environmental and Biological Analysis (Zaragosa, Spain) (2006.10)
- (6) Igimi S., Asakura, H., Ishiwa, A., Morita-Ishihara, T., Okada, Y., Yamamoto, S: Isolation and Genetical Characterization of *Enterobacter sakazakii* in Japan. FoodMicro2006, The 20th International ICFMH Symposium food safety and food biotechnology: diversity and global impact. (Bologna, Italy) (2006.9)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

総括研究報告書概要版（webにて公開）

研究年度：平成18(2006)年度

研究課題：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

文献番号：200636021A

研究分野名：健康安全確保総合研究

研究事業名：食品の安心・安全確保推進研究

主任研究者氏名：五十君 静信

所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究目的：

食品からの有害化学物質等の成人の摂取量調査は実施されてきたが、異なる食品摂取をする乳幼児に対して系統的な摂取量調査は行われていない。乳幼児は、一般に化学物質や有害微生物に対する感受性が高く、成人の調査結果を外挿することは適当でない場合が想定される。本研究では、乳幼児における食品からの有害化学物質や有害微生物等の摂取量を把握し、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。

研究方法：

化学物質は、前年度検討した分析法を用いて、有機化合物のフランは市販乳児用調整粉乳(PIF)を、無機ヒ素についてはヒジキを含有する市販ベビーフードを対象に分析を行った。

微生物は、エンテロバクター・サカザキ、サルモネラを対象とし、PIFに関する国際的な会議に参加し議論に加わると共に、国内外の文献調査等により情報収集を行った。エンテロバクター・サカザキについては、市販 PIF の汚染実態調査を行った。

暴露評価を目的として、乳幼児のベビーフード等の摂取実態に関して、既発表の調査データ、関連データベース等を参照し、個別食品の摂取量分布を解析した。

研究結果と考察：

乳幼児は食品摂取の内容が成人とは大きく異なることから、乳幼児に対しては別途暴露量を把握しておく必要がある。ヒジキを含有する市販ベビーフードの無機ヒ素の分析結果

では、多くの製品は低値であった。フランは、市販 PIF を対象として分析を行った。乳幼児栄養調査等のデータを参照にベビーフードの使用頻度、ベビーフードを含む食品成分表のデータ等の情報を整理し、個別食品について詳細解析を開始した。ヒジキについて測定したデータを基に解析を行った。

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 の規格の議論が進められている。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不明であった。今年度の市販 PIF の汚染実態調査において、微量ではあるものの、PIF 及び類似食品で本菌が確認された。本菌の感染事例に関する調査を継続し、PIF の製造工程における有害微生物汚染の可能性につき検討を進めた。新生児医療施設における PIF の使用実態につき聞き取り調査を行った。

結論：

乳幼児における食品からの有害化学物質や有害微生物等の摂取量を推定するための基礎的データの取得を行った。

研究主分野	0706	社会基盤	有害危険・危惧物質等安全対策
研究副分野	0103	ライフサイエンス	食料科学・技術
"	2	0605	製造技術
			品質管理・製造現場安全確保
研究キーワード1	0 2 4	食品	
"	2	0 1 4	微生物
"	3	0 3 3	感染症
"	4	0 8 2	有害化学物質

応用研究

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

乳幼児食品中の有害化学物質の分析に関する研究

分担研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

研究要旨：乳幼児は化学物質への感受性が高く、また、成人とは食品摂取の内容も大きく異なることから、乳幼児に対しては成人とは別に曝露量を把握しておくことが望ましい。そこで、無機化合物として無機ヒ素を、有機化合物としてフランを取り上げ、昨年度実施した分析法の改良や実試料の分析を行った。無機ヒ素の分別定量には水素化物変換－コールドトラップ－原子吸光法を採用し、ヒ素摂取の寄与が高いと考えられるひじきを含む乳幼児食 26 検体を検討した結果、一部で高い濃度のものがみられたが大部分は低い値であった。フランについては、特別用途の乳児用調製粉乳、妊産婦・授乳婦用粉乳、高齢者用食品、病者用食品(低ナトリウム食品、糖尿病食調製用組合わせ食品)につき分析を行った。その結果、乳児用調製粉乳ではミルクアレルギー除去食品・無乳糖食品において、他より高い濃度が検出された。高齢者用食品と病者用食品では広い範囲の濃度でフランが検出されたが、最高値は 290 ppb であった。

研究協力者

長岡 恵 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官

伊佐川 聡 (財)日本食品分析センター
大阪支所

吉田 泉 (財)日本食品分析センター
大阪支所

の評価法を検討し、さらに、最近問題となっている化学物質のいくつかについて、実際に曝露量の評価を行うことにした。

対象としては、無機化合物として JECFA が PTWI を設定しており、最近ヒジキで問題となった無機ヒ素、有機化合物として米国 FDA が健康影響を調査すると発表¹⁾したフランを取り上げた。昨年度に確立した分析法を改良し、かつ実試料として、無機ヒ素の場合はひじきを含む乳幼児用食品について、フランの場合は、特別用途の乳児用調製粉乳、妊産婦・授乳婦用粉乳、高齢者用食品、病者用食品につき、分析を行った。

A. 研究目的

有害化学物質の曝露量については国民平均の値としては従来から調査されてきている。しかし、乳幼児は化学物質への感受性が高く、また、成人とは食品摂取の内容も大きく異なることから、乳幼児に対しては別途、曝露量(摂取量)を把握しておく必要がある。そこで、乳幼児における食品からの有害化学物質曝露量

B. 研究方法

①無機ヒ素

1) 装置

形態別ヒ素分離システム：島津 ASA-2sp、原子吸光分光光度計：サーモエレメンタル SOLAAR M5

2) 試料

ひじきを含有する市販乳幼児用食品 24 品目を、都内のスーパーにて購入した。また、ひじきを含有する離乳食 2 品（ひじきの炊き込みご飯とひじきの煮物）を調理した。これら 26 品目を凍結乾燥したのち粉碎し、均質化後、分析を行った。

3) 分析方法

乳幼児食からの無機ヒ素抽出の際、食品中の有機ヒ素が無機ヒ素にまで分解されないよう、以下の通りに前処理を行った。

米試料 0.2 g を 100 ml トールピーカーに採り、高純度濃硝酸（TAMAPURE AA-100、68%）5 ml を添加し、時計皿で覆い、2 時間加熱した。溶液の色が透明あるいは薄黄色であることを確認し、液量が約 1 ml になるまで時計皿を外して加熱を続けた（目安として約 10 min）。ついで過塩素酸を 1 ml 添加して加熱を続け、液量が 1 ml になるまで加熱し（目安として約 30 min）、十分に過塩素酸の白煙を確認した後、再び過塩素酸を 1 ml 添加して、硝酸が完全に残存しなくなる液量が約 1 ml になるまで加熱した。冷後、milliQ 水で 10 ml に定容として分析用溶液とした。なお、硝酸のみで加熱する際の加熱装置の温度は 150℃ に設定した（実際のピーカー中の溶液の温度は 110–120℃ であった（硝酸の沸点は 122℃））。過塩素酸（沸点は 203℃）添加時の加熱装置の温度は 130℃（実際のピーカー中温度は約 110℃）に設定し、加熱中の溶液の温度が

110℃ を超えないように注意した。

ヒ素の分別定量には水素化物変換—コールドトラップ—原子吸光法（HG-CT-AAS 法）を用い、総ヒ素（Total As）の値は、無機ヒ素（iAs）、モノメチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸（DMAA）、トリメチルアルシンオキシドの各ピーク面積の総和として求めた。

② フラン

昨年度確立した、検量線法によるヘッドスペース—GC/MS 法により分析した。また、フランの二次生成を防ぐために、ヘッドスペースサンプラーのオープン設定温度を 60℃、あるいは試料によっては 45℃ に下げ、以下の方法により分析を実施した。なお、実際の分析は、（財）日本食品分析センターに委託して行った。

1) 装置及び器具

ヘッドスペースサンプラー：
7694(Agilent)、ガスクロマトグラフ—質量分析計：

6890N/5973N(Agilent)

2) 試料

市販されている特別用途食品の乳児用調製粉乳、妊産婦・授乳婦用粉乳、高齢者用食品、病者用食品、計 45 製品を購入した。

3) 分析方法

3-1) 試薬

フラン標準品(ALDRICH)、フラン-d₄ (C/D/N ISOTOPES)、メタノール（残留農薬・PCB試験用）(和光純薬(株))

3-2) 標準溶液の調製

ヘッドスペース用バイアルにメタノールを 20.0 ml 採取してセプトラムで密栓した

後、秤量した。次いで、マイクロシリ
ンジを用いてセプタムからフラン標
準品を50 µl注入し秤量した。これらの
秤量値の差を全液量20.05 mlで除した
値を求め、得られた濃度を2.5 mg/ml
標準原液の正確なフラン濃度とした。
ヘッドスペース用バイアルに精製水
20.0 mlを採取して密栓した後、フラン
標準原液をセプタムから40 µl注入し、
5 µg/mlのフラン標準溶液を調製した。
標準溶液の正確な濃度は標準原液か
らのフラン採取量(µg)を全液量20.04
mlで除した値より求めた。5 µg/mlのフ
ラン標準溶液をヘッドスペース用バ
イアル内で精製水を用いて希釈し、密
栓して0.5 µg/mlのフラン標準溶液を調
製した。

また、内標準物質のフラン-d₄を用い
て同様に操作し、2.5 mg/mlの内標準原
液及び5 µg/mlの内標準溶液を調製し
た。

3-3) 検量線の作成

ヘッドスペース用バイアルに塩化
ナトリウム4 gを入れ、110℃で30分以
上加熱後、汚染のない場所で冷却した。
このバイアルに精製水10 mlを加え、セ
プタムで密栓した後、5 µg/mlの内標準
溶液を10 µlずつセプタムからマイク
ロシリンジで注入した。次いで、0.5
及び5 µg/mlのフラン標準溶液の2～
200 µlを注入し、1～1,000 ngの標準溶
液を調製した。

各標準溶液についてその気相部分
をヘッドスペース-ガスクロマトグラ
フ-質量分析計(以下[HS-GC/MS]と略
す)に注入した。得られたフラン及びフ

ラン-d₄のピーク高比と標準溶液中のフ
ラン重量の関係から検量線を作成した。

3-4) 分析操作

試料はあらかじめ4時間以上冷蔵庫で
冷却したものを使用した。

不均質な固体試料については氷冷下で
ホモジナイザーを用いて均質化した。た
だし、氷冷下でのホモジナイズ時間は1
分以内とし、秤量直前に行った。

ヘッドスペース用バイアルに塩化ナト
リウム4 gを入れ、110℃で30分以上加熱
後、水中で冷却した。このバイアルに冷
却した試料1～3 gを秤量し、精製水を加
えて10 mlとして、素早くセプタムで密栓
した。試料秤量後から密栓するまでは、
バイアルを水中に置いて操作した。次い
で、5 µg/mlの内標準溶液を10 µlずつセ
プタムからマイクロシリンジで注入し試
験溶液とした。

各試験溶液についてその気相部分を
HS-GC/MSに注入した。得られたフラン
及びフラン-d₄のピーク高比と3-3)で得ら
れた検量線から試料中のフランを定量し
た。

3-5) HS-GC/MS操作条件

ヘッドスペースサンプラー操作条件
オープン温度：60℃または45℃、バイア
ル加熱時間：30 min、ループ温度：100℃、
トランスファーライン温度：130℃、加圧
時間：0.3 min

GC/MS操作条件

カラム：TC-WAX(ジーエルサイエンス、
φ0.25 mm×60 m)、膜厚 0.25 µm、導入
系：スプリット(1:40)、温度：試料注入口
200℃、カラム 40℃、ガス流量：ヘリウ
ム(キャリアーガス) 1 ml/min、イオン源温

度：230℃、イオン化電圧：70 eV、イオン化法：EI、設定質量数： m/z 68、39、 m/z 72(内標準物質)

C.研究結果

①無機ヒ素

乳幼児食中の無機ヒ素の分析に、昨年度確立した HG-CT-AAS 法による方法を用いることにより、試料前処理の際にヒ素の化学形態に影響を与えることなく、無機ヒ素の正確な定量が可能となった。

今回採用した方法ではヒ素化合物が無機ヒ素にまで分解されないようにするため、110℃以下で試料調製を行った。この場合、必然的に未分解の有機物が多く残り、ヒ素の分析を妨害する可能性が考えられる。特に乳幼児食には栄養成分としてひじきや魚介類などが添加されることが多いため、マトリックスの影響について検討した。すなわち、ヒ素摂取に寄与が大きい、ひじきと米を含む五目炊き込みご飯の試料溶液に無機ヒ素を添加して検量線を作成し、マトリックス効果を検討した。その結果、図①-1 に示すように、無機ヒ素の分析値に対するマトリックスの影響はほとんど見られなかった。このように、採用した分析条件は、乳幼児食中のマトリックスによる無機ヒ素定量への影響がほとんどない分析条件であることが明らかになった。

昨年度の結果から、この方法での検出下限(以下 MDL)及び定量下限(以下 MQL)は、それぞれ 3.3、10.0 ng/g と設定された。次に、五目炊き込みご飯試料(No.3)について、 $n=10$ の分析および添加回収試験を行った。表①-1 に示すように、No.3

の試料(iAs 92 ng/g)を $n=10$ で測定した場合の RSD は、8%と良好な結果が得られた。また、同試料に iAs を 20 ng (100 ng/g 相当)添加し、 $n=5$ で分析した場合、回収率は $84\pm 6\%$ と良好な回収率が得られた。また、表には示していないが、おかげ試料についても同様に検討した結果、同様な RSD 値と回収率が得られたことから、今回の分析法において、マトリックスの影響はほとんどないことが示された。

表①-2 に、ひじきを含有する乳幼児用食品 26 検体中の無機ヒ素および総ヒ素の分析結果を示す。まず、ひじきを含有し、かつヒ素摂取に寄与が大きい米を含有する試料 7 品目について調べたところ、無機ヒ素濃度はすべて $1\ \mu\text{g/g}$ 以下であり、総ヒ素濃度は No.4 で $3.3\ \mu\text{g/g}$ であった他、3 検体で $1\ \mu\text{g/g}$ 以上であった。次に、ひじきを含有し米を含有しない、惣菜試料 17 品目について分析した。その結果、無機ヒ素濃度が $1\ \mu\text{g/g}$ 以上と比較的高い値のものが 4 検体みられ、これら無機ヒ素濃度 1.02、1.06、2.05、2.59 $\mu\text{g/g}$ の場合、1 食による無機ヒ素摂取量はそれぞれ 4.8、10.6、22.1、13.5 μg と算出された。大部分の試料では無機ヒ素の濃度および 1 食による無機ヒ素の摂取量は低いと考えられた。

②フラン

1) 検量線の作成

フラン分析時のヘッドスペースサンプラーのオープン温度設定は昨年度の検討から 60°C とし、加温時間は 30 分とした。

しかし、醤油をこの条件で加温すると分析中に新たにフランが生成する可能性が示唆されたため、醤油の分析時には、

ヘッドスペースサンプラーのオープン温度設定を45℃に下げて分析した。フラン標準溶液(1~1,000 ng)中のフラン及び内標準物質のピーク高比より検量線を作成し、図②-1に示した。得られた検量線は、45℃・30分間加温条件下においても相関係数が0.999と良好な直線性を示した。

醤油以外の試料については、60℃加温条件下でも、分析中に新たなフランの生成は認められなかった。そのため、固形物からの抽出率のことを考慮して、加温温度は従来通り60℃とした。

2) 検出下限と定量下限

検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)は、昨年度の検討から、粉ミルクに関しては、MDLは0.4 ng/g、MQLは1 ng/gと設定した。したがって、特別用途食品を含む今回の分析結果についても、MDLを0.4 ng/g、MQLを1 ng/gと設定した。

3) 調製粉乳中のフランの定量

特別用途食品の病者用食品に区分され、「ミルクアレルゲン除去食品・無乳糖食品」の表示のある調製粉乳、乳児用食品に区分される乳児用調製粉乳、及び妊産婦用食品に区分される妊産婦・授乳婦用粉乳、並びに特別用途食品の表示はないが特殊ミルクとして市販されている調製粉乳について、フランの定量を行った。その結果を表②-1に示す。

4) 高齢者用食品中のフランの定量

特別用途食品の高齢者用食品に区分される、そしゃく困難者用食品及びそしゃく・えん下困難者用食品につい

て、フランの定量を行った。その結果を表②-2に示す。

5) 病者用食品中のフランの定量

特別用途食品の病者用食品に区分される低ナトリウム食品及び糖尿病食調製用組合わせ食品について、フランの定量を行った。その結果を表②-3に示す。

D. 考察

①ヒ素

乳幼児食には、不飽和脂肪酸や鉄などの有用成分を含有させる目的で魚介類やひじきなどを加えることが多いが、これらは総ヒ素量が非常に高い。今回、無機ヒ素摂取量に寄与の高いひじきを含有する乳幼児食中の無機ヒ素量を分析した。その結果、26検体の中には無機ヒ素濃度が高いものも見られたが、大部分は低い値であった。

米飯もの試料の場合に、無機ヒ素濃度が比較的高いNo.2(市販品)とNo.5(自家調理品)では、1食あたりの無機ヒ素摂取量が10~11 µg/gと算出された。また、米飯もので、魚を含有するものと含有しないものを比較したが、いずれにおいても無機ヒ素濃度は低く、1食あたりの無機ヒ素摂取量も低いことがわかった。以上のように、ひじきを含有していても無機ヒ素濃度は低いものがほとんどであった。このことは、ひじきの調理の下準備である“水戻し操作”が十分に行われていること、あるいは、ひじきの添加量が少ないことが考えられた。

惣菜もの試料17検体について調べたところ、無機ヒ素濃度が2 µg/g以上や1~2 µg/gと比較的高い値のものがそれぞれ2検体ずつあり、1食あたりの無機ヒ素摂取量の最高値は22.1 µgと算出された。