

無機ヒ素のPTWIは15 µg/kg体重/week (2.14 µg/kg体重/day)である。平成12年乳幼児身体発育値によると、1歳児の体重は男児で7.6~11.2 kg、女児で7.2~10.5 kgである。JECFAのPTWIをそのまま1歳児にも適用すると、16.3~24.0 µg/1歳男児/day、15.4~22.5 µg/1歳女児/dayと算出される。今回最も高い値を示した乳幼児食（1食あたりの無機ヒ素摂取量22.1 µg）を毎日継続摂取した場合にはほぼPTWIに相当するため、バランスのよい食事を与えることが必要と考えられた。

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。

以上のことから、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

フランの二次生成を避けるため、ヘッドスペースサンプラーのオープン温度設定を60℃にして分析を実施したが、醤油などのように45℃に温度を下げて分析することが必要な試料がみられた。

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、6~22 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、今後の課題である。

高齢者用食品におけるフランの値はND~82 ng/gであり、加熱処理時間が長くなるとフランの値が高くなる可能性が考えられた。病者用食品のうち、減塩しょうゆ3検体のフランの値は60~110 ng/gと高い値であった。また、煮物試料において、フランの最高値290 ng/gが観測された。

以上のように、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、今後の検討課題として残っている。

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。

E. 結 論

①ヒ素

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。

②フラン

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。

F.参考文献

1) FDA:

<http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2004/NEW01065.html>

2) FDA:

<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/furan.html>

G. 研究発表

1. 論文発表

1. M. H. Nagaoka, and T. Maitani : 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., Kaise,T., Decrease of arsenic in edible brown algae

Hijikia fusiforme by the cooking process, *Appl. Organomet. Chem.*, 20, 585-590 (2006)

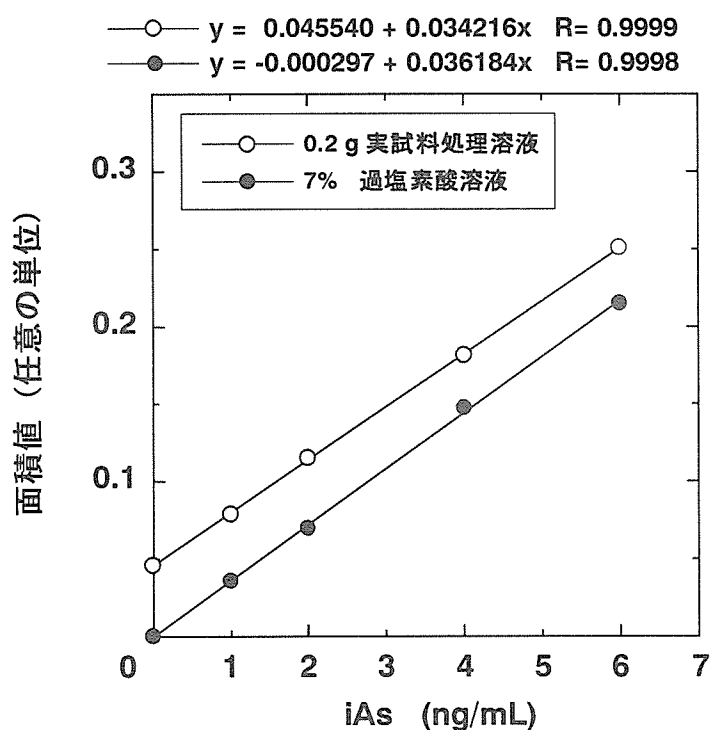
3. 市川覚士, 貝瀬利一, 花岡研一, 長岡(浜野) 恵, 米谷民雄, マウスを用いたヒジキ中ヒ素化合物の代謝, *Trace Nutrients Research* 23, 128-133 (2006)

2. 学会発表

- 1) Nagaoka M. H. Maitani T. : Speciation of arsenic in foods by hydride generation-cold trap-atomic absorption spectrophotometry. *Ninth International Symposia on Metal Ions in Biology and Medicine (ISMIBM) (Lisbon)* p.244 (2006.5)
- 2) 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)
- 3) Megumi Hamano Nagaoka, Tamio Maitani : 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 (Zaragoza)* p.120 (2006.10)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



| 標準溶液 (ng/mL) | 面積値 | |
|-----------------|-----------|---------------|
| | 7% 過塩素酸溶液 | 0.2 g 実試料処理溶液 |
| 0.0 | 0.0000 | 0.0458 |
| 1.0 | 0.0358 | 0.0789 |
| 2.0 | 0.0702 | 0.1151 |
| 4.0 | 0.1475 | 0.1815 |
| 6.0 | 0.2154 | 0.2512 |

図①-1 実試料(No.3 五目炊き込みご飯, iAs: 92 ng/g 含有試料)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 (a, b) No.3 五目炊き込みご飯試料(iAs 92 ng/g)および同試料に 20 ng iAs を添加したときの測定値

(a) 実試料の測定値

| | 試料 (g) | 面積値 | 試料液濃度 (ppb) | 実濃度 (ng/g) |
|----|-----------|--------|----------------|---------------|
| 1 | 0.20094 | 0.0538 | 1.859 | 92.5 |
| 2 | 0.20075 | 0.0474 | 1.629 | 81.2 |
| 3 | 0.20105 | 0.0548 | 1.896 | 94.3 |
| 4 | 0.20107 | 0.0566 | 1.960 | 97.5 |
| 5 | 0.20066 | 0.0524 | 1.810 | 90.2 |
| 6 | 0.20166 | 0.0574 | 1.990 | 98.7 |
| 7 | 0.20111 | 0.0584 | 2.028 | 100.8 |
| 8 | 0.20089 | 0.0538 | 1.859 | 92.5 |
| 9 | 0.20078 | 0.0518 | 1.787 | 89.0 |
| 10 | 0.20076 | 0.0458 | 1.573 | 78.4 |
| | 平均 | 0.0532 | 1.839 | 91.5 |
| | SD | 0.0041 | 0.147 | 7.2 |
| | RSD | 7.7 | 8.0 | 7.9 |

(b) 同試料に iAs 20 ng (100 ng/g 相当)添加したときの測定値

| | 試料 (g) | 面積値 | 試料液濃度 (ppb) | 実濃度 (ng/g) | 回収率 (%) |
|---|-----------|--------|----------------|---------------|------------|
| 1 | 0.20066 | 0.1031 | 3.640 | 181.4 | 89.9 |
| 2 | 0.20022 | 0.0977 | 3.444 | 172.0 | 80.5 |
| 3 | 0.20047 | 0.0955 | 3.366 | 167.9 | 76.4 |
| 4 | 0.20068 | 0.1011 | 3.569 | 177.8 | 86.3 |
| 5 | 0.20072 | 0.1025 | 3.617 | 180.2 | 88.7 |
| | 平均 | 0.1000 | 3.527 | 175.9 | 84.4 |
| | SD | 0.0033 | 0.118 | 5.7 | 5.7 |
| | RSD | 3.3 | 3.3 | 3.3 | 6.8 |

検量線 (0~10 ng/mL): 傾き, 0.027720; 切片, 0.002227; 相関係数 r=0.9994

| No. | 分類 | 名称 | 濃度($\mu\text{g As} / \text{g dry}$) | | | 1食あたりの摂取量 | | 月齢 |
|-----|-------------|-----------------------|---------------------------------------|-------------------|--------------------|----------------------|----------|----|
| | | | iAs | DMAA | Total As | iAs(μg) | Total As | |
| 1 | 米飯もの 魚なし | ひじきごはん | 0.336 \pm 0.011 | 0.087 \pm 0.017 | 1.216 \pm 0.022 | 5.0 | 18.2 | 9 |
| 2 | 米飯もの 魚なし | とりひじきごはん | 0.946 \pm 0.031 | 0.514 \pm 0.017 | 1.553 \pm 0.049 | 9.8 | 16.1 | 9 |
| 3 | 米飯もの 魚なし | 五目炊き込みご飯 | 0.092 \pm 0.007 | 0.600 \pm 0.018 | 0.700 \pm 0.021 | 1.8 | 13.4 | 9 |
| 4 | 米飯もの 魚なし | ひじきの炊き込みご飯 | 0.407 \pm 0.024 | 2.622 \pm 0.104 | 3.299 \pm 0.101 | 3.9 | 31.3 | 9 |
| 5 | 米飯もの 魚なし | ひじきごはん(自家調理品) | 0.363 \pm 0.025 | 0.673 \pm 0.021 | 1.040 \pm 0.042 | 10.9 | 31.3 | 12 |
| 6 | 米飯もの 魚あり | ひじきとほたての釜めし | 0.202 \pm 0.004 | 0.158 \pm 0.008 | 0.515 \pm 0.018 | 1.5 | 3.9 | 12 |
| 7 | 米飯もの 魚あり | たらとひじきの炊き込みごはん | 0.097 \pm 0.005 | 0.353 \pm 0.015 | 0.784 \pm 0.040 | 1.8 | 15.0 | 12 |
| 8 | おかずもの 魚なし | 豆腐と鶏肉の野菜あんかけ | 0.031 \pm 0.006 | 0.042 \pm 0.003 | 0.110 \pm 0.004 | 0.3 | 1.0 | 7 |
| 9 | おかずもの 魚なし | ひじきの煮物(自家調理品) | 2.590 \pm 0.077 | 8.499 \pm 0.905 | 11.135 \pm 0.878 | 13.5 | 57.9 | 12 |
| 10 | おかずもの 魚なし | つくねとひじきのふんわり煮 | 0.890 \pm 0.027 | 0.672 \pm 0.048 | 1.660 \pm 0.042 | 7.7 | 14.4 | 12 |
| 11 | おかずもの 魚なし | 大豆とひじきの五目あんかけ | 0.311 \pm 0.020 | 0.752 \pm 0.055 | 1.152 \pm 0.058 | 4.1 | 15.2 | 12 |
| 12 | おかずもの 魚なし | 野菜たっぷり大豆とひじき入り和風ハンバーグ | 0.134 \pm 0.014 | 0.054 \pm 0.005 | 0.247 \pm 0.036 | 2.3 | 4.3 | 12 |
| 13 | おかずもの 魚なし | 高野豆腐と彩り野菜のふっくら煮 | 0.134 \pm 0.001 | 0.692 \pm 0.026 | 0.931 \pm 0.018 | 0.9 | 6.3 | 7 |
| 14 | おかずもの 魚なし | 根菜の鶏そぼろ煮 ひじき入り | 0.032 \pm 0.002 | 0.255 \pm 0.003 | 1.026 \pm 0.025 | 0.1 | 4.7 | 7 |
| 15 | おかずもの 魚なし | きなこあずきのオートミール | 0.120 \pm 0.007 | 0.332 \pm 0.014 | 0.451 \pm 0.020 | 1.0 | 3.6 | 7 |
| 16 | おかずもの 魚なし | レンジで蒸しパン 黒ゴマ&ひじき | 0.663 \pm 0.060 | 0.293 \pm 0.024 | 0.956 \pm 0.054 | 13.9 | 20.1 | 9 |
| 17 | おかずもの 魚あり | いわしとひじきのうま煮 | 1.022 \pm 0.083 | 1.515 \pm 0.100 | 2.842 \pm 0.225 | 4.8 | 13.4 | 9 |
| 18 | おかずもの 魚あり | かつおとひじきの煮付け | 1.026 \pm 0.026 | 0.588 \pm 0.050 | 1.963 \pm 0.101 | 10.6 | 20.2 | 9 |
| 19 | おかずもの 魚あり | 白身魚と根菜の煮物 | 0.138 \pm 0.010 | 0.504 \pm 0.052 | 1.065 \pm 0.058 | 1.5 | 11.9 | 12 |
| 20 | おかずもの 魚あり | 白身魚とひじきの和風煮 | 2.049 \pm 0.009 | 1.298 \pm 0.076 | 4.305 \pm 0.130 | 22.1 | 46.5 | 12 |
| 21 | おかずもの 魚あり | 鮭と野菜の石狩風煮込み | 0.032 \pm 0.002 | 0.140 \pm 0.013 | 0.232 \pm 0.039 | 0.3 | 2.4 | 9 |
| 22 | おかずもの 魚あり | えびだんごと野菜の茗煮 | 0.411 \pm 0.032 | 0.885 \pm 0.038 | 1.381 \pm 0.079 | 3.3 | 11.1 | 12 |
| 23 | おかずもの 魚あり | 魚だんごと海の野菜 | 0.235 \pm 0.012 | 2.102 \pm 0.123 | 2.715 \pm 0.166 | 0.9 | 10.9 | 9 |
| 24 | おかずもの 魚あり | 海の幸のふりかけ おかかとひじき | 0.831 \pm 0.009 | 0.990 \pm 0.082 | 2.576 \pm 0.075 | 2.4 | 7.5 | 9 |
| 25 | おやつ 米あり 魚なし | ひじきと青のりおせんべい | 0.337 \pm 0.017 | 0.212 \pm 0.018 | 0.551 \pm 0.033 | 1.3 | 2.2 | 6 |
| 26 | おやつ 米あり 魚なし | 元気アップカルシウム ひじきせんべい | 0.400 \pm 0.030 | 0.388 \pm 0.050 | 0.802 \pm 0.076 | 1.7 | 3.4 | 6 |

表①-2 ひじき入り乳幼児食品試料の形態別ヒ素の定量値および1食あたりの形態別ヒ素摂取量

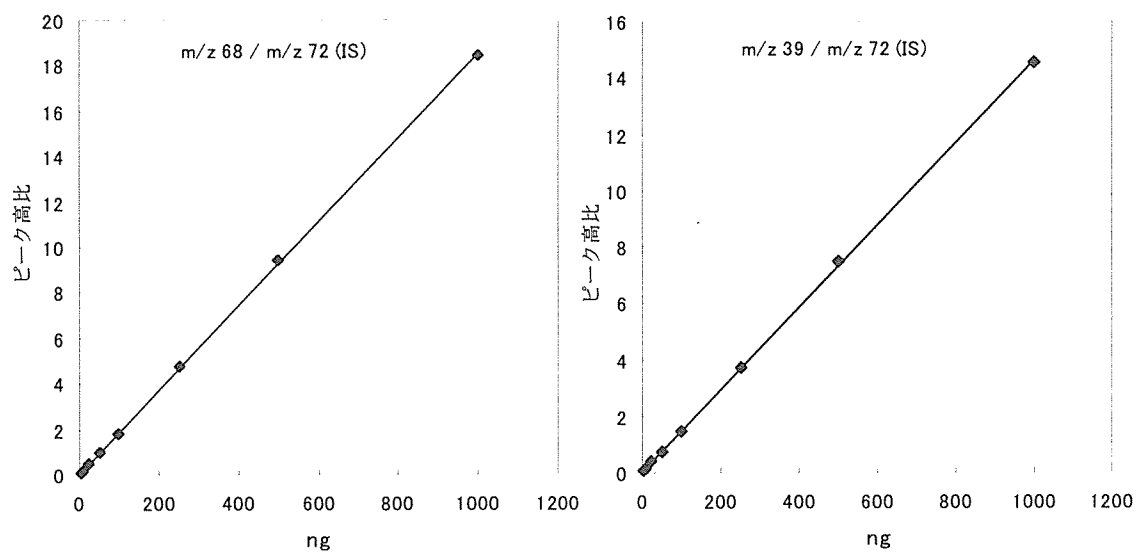


図-②-1 フランの検量線(1~1,000 ng)

表②-1 粉乳（病者用食品・乳児用食品・妊産婦用食品等）のフラン含有量

| 番号 | 試料名 | 特別用途食品種別 | フラン (ppb) | 平均 (ppb) | 標準偏差 | 相対標準偏差 (%) |
|----|-----------------|-----------------------------------|--------------|-------------|-------|---------------|
| 1 | 乳児用調製粉乳 A | 病者用食品 [ミルクアレルギー 除去食品] | 5.9 | 6 | 0.058 | 0.97 |
| | | | 6.0 | | | |
| | | | 5.9 | | | |
| 2 | 乳児用調製粉乳 B | 病者用食品 [無乳糖食品] | 1.6 | 2 | 0.058 | 3.7 |
| | | | 1.5 | | | |
| | | | 1.6 | | | |
| 3 | 乳児用調製粉乳 C | 病者用食品 [ミルクアレルギー除去 食品・無乳糖食品] | 20.8 | 22 | 0.64 | 3.0 |
| | | | 22.0 | | | |
| | | | 21.8 | | | |
| 4 | 乳児用調製粉乳 D | 病者用食品 [ミルクアレルギー除 去食品・無乳糖食品] | 16.3 | 16 | 0.85 | 5.4 |
| | | | 16.0 | | | |
| | | | 14.7 | | | |
| 5 | 乳児用調製粉乳 E | 病者用食品 [牛乳アレルギー除去 食品・無乳糖食品] | 5.4 | 6 | 0.38 | 6.7 |
| | | | 5.5 | | | |
| | | | 6.1 | | | |
| 6 | 乳児用調製粉乳 F | 乳児用食品 [乳児用調製粉乳] | 1.4 | 1 | 0.12 | 8.7 |
| | | | 1.4 | | | |
| | | | 1.2 | | | |
| 7 | 乳児用調製粉乳 G | 乳児用食品 [乳児用調製粉乳] | 1.7 | 2 | 0.15 | 10 |
| | | | 1.5 | | | |
| | | | 1.4 | | | |
| 8 | 乳児用調製粉乳 H | — | N. D. * | N. D. * | — | — |
| | | | N. D. * | | | |
| | | | N. D. * | | | |
| 9 | 乳児用調製粉乳 I | — | 1.6 | 1 | 0.12 | 7.9 |
| | | | 1.4 | | | |
| | | | 1.4 | | | |
| 10 | 妊産婦・授乳婦 用粉乳A | — | 1.6 | 2 | 0 | 0 |
| | | | 1.6 | | | |
| | | | 1.6 | | | |
| 11 | 妊産婦・授乳婦 用粉乳B | — | 1.4 | 1 | 0.10 | 7.1 |
| | | | 1.5 | | | |
| | | | 1.3 | | | |
| 12 | 妊産婦・授乳婦 用粉乳C | 妊産婦用食品 [妊産婦・授乳婦用 粉乳] | 2.3 | 2 | 0.058 | 2.4 |
| | | | 2.4 | | | |
| | | | 2.4 | | | |
| 13 | 妊産婦・授乳婦 用粉乳D | 妊産婦用食品 [妊産婦・授乳婦用 粉乳] | 2.5 | 3 | 0.058 | 2.3 |
| | | | 2.5 | | | |
| | | | 2.6 | | | |
| 14 | 妊産婦・授乳婦 用粉乳E | 妊産婦用食品 [妊産婦・授乳婦用 粉乳] | 2.0 | 2 | 0.058 | 2.8 |
| | | | 2.0 | | | |
| | | | 2.1 | | | |

N. D. : 検出せず(検出下限未満)

* 検出下限 0.4 ppb

表②-2 高齢者用食品中のフラン含有量

| 番号 | 試料名 | 特別用途食品種別 | フラン (ppb) | 平均 (ppb) | 標準偏差 | 相対標準偏差 (%) |
|----|----------------|--------------------------------|-----------|----------|------|------------|
| 15 | ゼリー | 高齢者用食品 [そしゃく・えん 下困難者用食品] | (0.4) | N.D.* | — | — |
| | | | N.D.* | | | |
| | | | N.D.* | | | |
| 16 | おかゆ | 高齢者用食品 [そしゃく・えん 下困難者用食品] | 2.3 | 2 | 0.15 | 6.7 |
| | | | 2.4 | | | |
| | | | 2.1 | | | |
| 17 | 里芋の煮物 | 高齢者用食品 [そしゃく困難者 用食品] | 64.8 | 61 | 3.5 | 5.8 |
| | | | 59.9 | | | |
| | | | 58.0 | | | |
| 18 | 豆腐と野菜の あんかけ | 高齢者用食品 [そしゃく困難者 用食品] | 82.6 | 82 | 1.4 | 1.8 |
| | | | 83.4 | | | |
| | | | 80.6 | | | |
| 19 | 肉じゃが | 高齢者用食品 [そしゃく困難者 用食品] | 58.2 | 58 | 4.4 | 7.5 |
| | | | 62.8 | | | |
| | | | 54.0 | | | |
| 20 | 大根の煮物 | 高齢者用食品 [そしゃく困難者 用食品] | 68.7 | 67 | 4.7 | 7.1 |
| | | | 70.2 | | | |
| | | | 61.4 | | | |
| 21 | 野菜のトマト 煮込み | 高齢者用食品 [そしゃく困難者 用食品] | 26.4 | 27 | 0.35 | 1.3 |
| | | | 26.8 | | | |
| | | | 27.1 | | | |
| 22 | ツナシチュー | 高齢者用食品 [そしゃく困難者 用食品] | 31.7 | 33 | 0.95 | 2.9 |
| | | | 33.6 | | | |
| | | | 32.8 | | | |
| 23 | 麻婆豆腐 | 高齢者用食品 [そしゃく困難者 用食品] | 44.7 | 44 | 0.47 | 1.1 |
| | | | 44.0 | | | |
| | | | 43.8 | | | |
| 24 | 鶏肉の甘酢あ んかけ | 高齢者用食品 [そしゃく困難者 用食品] | 31.0 | 30 | 0.95 | 3.2 |
| | | | 30.0 | | | |
| | | | 29.1 | | | |

(): 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 病者用食品中のフラン含有量

| 番号 | 試料名 | 特別用途食品種別 | フラン (ppb) | 平均 (ppb) | 標準偏差 | 相対標準偏差 (%) |
|----|-------------------------|------------------------------|--------------|-------------|-------|---------------|
| 25 | 減塩しょうゆ A | 病者用食品 [低ナトリウム食 品] | 61.3 | 60 | 0.72 | 1.2 |
| | | | 60.0 | | | |
| | | | 60.1 | | | |
| 26 | 減塩しょうゆ B | 病者用食品 [低ナトリウム食 品] | 103 | 110 | 2.1 | 2.0 |
| | | | 106 | | | |
| | | | 107 | | | |
| 27 | 減塩しょうゆ C | 病者用食品 [低ナトリウム食 品] | 80.7 | 81 | 1.1 | 1.3 |
| | | | 80.6 | | | |
| | | | 82.5 | | | |
| 28 | きのことチキン ボールのシ チュー | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 15.4 | 15 | 0.96 | 6.6 |
| | | | 13.6 | | | |
| | | | 15.1 | | | |
| 29 | 卵スープ | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 4.8 | 5 | 0.32 | 6.9 |
| | | | 4.9 | | | |
| | | | 4.3 | | | |
| 30 | みかんゼリー | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 5.3 | 5 | 0.36 | 6.9 |
| | | | 5.5 | | | |
| | | | 4.8 | | | |
| 31 | 八宝菜 | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 7.4 | 7 | 0.10 | 1.4 |
| | | | 7.2 | | | |
| | | | 7.3 | | | |
| 32 | コーンと卵の スープ | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 6.1 | 6 | 0.27 | 4.1 |
| | | | 6.5 | | | |
| | | | 6.6 | | | |
| 33 | 杏仁豆腐 | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 1.4 | 1 | 0.058 | 4.3 |
| | | | 1.3 | | | |
| | | | 1.3 | | | |
| 34 | 鮭のクリームシ チュー | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 20.4 | 20 | 0.25 | 1.3 |
| | | | 19.9 | | | |
| | | | 20.1 | | | |
| 35 | ミネストローネ | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 23.4 | 22 | 1.3 | 5.8 |
| | | | 20.9 | | | |
| | | | 21.7 | | | |
| 36 | さつまいもの甘 露煮 | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 85.9 | 83 | 2.1 | 2.6 |
| | | | 82.0 | | | |
| | | | 82.4 | | | |
| 37 | 和風ハンバーグ | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 137 | 130 | 7.5 | 5.8 |
| | | | 122 | | | |
| | | | 129 | | | |
| 38 | けんちん汁 | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 67.6 | 68 | 0.45 | 0.67 |
| | | | 67.2 | | | |
| | | | 68.1 | | | |
| 39 | 金時豆 | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 193 | 190 | 3.6 | 1.9 |
| | | | 198 | | | |
| | | | 191 | | | |
| 40 | いか団子のあん かけ | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 60.4 | 61 | 2.2 | 3.6 |
| | | | 63.1 | | | |
| | | | 58.8 | | | |
| 41 | 豚肉と大根の煮 物 | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 296 | 290 | 15 | 5.3 |
| | | | 297 | | | |
| | | | 270 | | | |
| 42 | ひじきと大豆の 煮物 | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 81.8 | 84 | 9.6 | 12 |
| | | | 75.1 | | | |
| | | | 94.1 | | | |
| 43 | 鶏肉のチリソー ス煮 | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 101 | 100 | 3.5 | 3.4 |
| | | | 107 | | | |
| | | | 101 | | | |
| 44 | コーンスープ | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 20.0 | 19 | 0.61 | 3.2 |
| | | | 18.9 | | | |
| | | | 19.0 | | | |
| 45 | ぜんまい煮 | 病者用食品 [糖尿病食調製用 組合わせ食品] | 125 | 110 | 13 | 11 |
| | | | 100 | | | |
| | | | 117 | | | |

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海外でその感染が問題となっているエンテロバクター・サカザキを主な対象として、ヒトにおける国内臨床事例の情報収集、食品からの分離、分離株の細菌学的解析、本菌の制御に関する研究、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考察を行った。

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

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

豊福肇（分担研究者）：国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

本年度も、有害微生物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、昨年を引き続き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・サカザキに関しては重点的に研究を行った。本菌の国内のヒトにおける臨床事例の情報収集、一般食品からの分離、検査法の検討、乳児用調製粉乳(PIF)における汚染実態、分離菌株の解析、調製粉乳の製造工程における本菌の制御に関する検討を行った。調整粉乳の汚染実態調査は、米国FDAの示しているBAM法に従いMPN3本法で定量的に行った。それぞれの詳しい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）

今年度の研究では、ヒトの臨床事例が確認さ

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。

B. 研究方法

れなかったため、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、引き続き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った。2006年は、スペインでPIF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。

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厚労省の行ったPIFの汚染実態調査のみで、その実態はほとんどわかっていない。研究班の本年度の調査において、微量ではあるものの国内のPIFおよび類似食品で本菌が確認された(表1)。そこで、研究班では国内のPIF製造工場に協力をお願いし、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進めた。

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、昨年度の報告書で示したように、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る。エンテロバクター・サカザキの混入が多いと指摘されている、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A(図1)は、国内ではそのまま使われておらず、何らかの改善が行われている。国内製造会社においては、図2や図3で示すような製造工程フローBやCを採用している。

製造工程フローCでは、一部の原材料を粉として加える工程が残っているが、それぞれの原材料に対する製品管理の徹底を行うことで対応している。研究班の現地調査と情報提供により、本菌の汚染防止にはこれまで以上の高度な衛生管理が必要であることが理解されており、製造工程を含め改善が進められている。平成18年度の汚染実態調査では、100検体中4検体から本菌が検出された(表1)。検出された製品のMPN値はいずれも検出限界値であった。

食品からの分離菌株や臨床由来の基準株についてはエンテロバクター・サカザキのPIF汚染で注目されている乾燥耐性および耐熱性に着目し検討を行った(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続けた。これまでの報告では、髄膜炎の原因細菌として、エンテロバクター・サカザキに関する情報は得られていない。

D. 考察

本年度は、主にエンテロバクター・サカザキについて研究を進めた。文献調査の結果から、2006年に新たに3事例の感染が報告された。スペインの事例ではPIFの摂取歴のない感染で、感染ルートが不明である事例といえる。

国内では、これまでのところヒトにおいてエンテロバクター・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ている。

PIFにおける本菌の汚染実態調査には、米国食品医薬局(FDA)の推奨する方法を用いている。PIFにおける本菌の汚染はごく少数と推察されることから、サンプル量は、わが国の一般の食品衛生検査で適用される25グラムではな

く、検体当たり合計 333 グラムの MPN 法で行っている。国内の粉乳の規格では、粉乳 0.222g 中の大腸菌群陰性が基準であるので、今回検討している PIF におけるエンテロバクター・サカザキの検出は、1000 倍以上高いレベルで菌の有無を調べていることになる。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。今回の検査で検出されている本菌の菌数レベルは非常に低く、国内の乳等省令で定められている規格基準違反となる製品は無かった。

今回の PIF の汚染調査では国内の規格基準のおよそ 1000 倍以上というこれまで検討されなかったことのない微量の菌の検出を試みている。従って、菌が検出されないためには、これまでに比べ遙かに高い精度の衛生管理が求められることになる。PIF を製造している 5 社に協力をお願いし、それぞれの製造工程を検討したところ、いずれの工場においても、原材料の粉同士を単純に混ぜ合わせ最終製品とする製造法では本菌の混入を防げないという認識を持っている。その対策としては原材料を溶解した後加熱により殺菌し、スプレードライする方式を採用する、あるいは工場によっては、一部の材料を乾燥の最終工程に加える方式をとっているが、加える原料の汚染に、十分な注意を払うなどで対応している。いずれの工場でもエンテロバクター・サカザキに対する関心は高く、本菌排除のため製造工程の改善や衛生対策を行っている。

本年度の調査で検出された本菌の菌数は低く、いずれも検査法の検出限界値であり、現在

の乳等省令の規格基準では特に問題とならない。仮に本菌の汚染があっても、現在ハイリスクグループである NICU の新生児における PIF の調整には 70~80°C 以上の調乳と注意喚起が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。

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・サカザキを対象として、文献調査を行い、2006 年に海外で新たに 3 事例が報告されていることを確認した。国内の PIF および類似製品の 100 検体の汚染実態調査から、微量ではあるが本菌の汚染を確認した。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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 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)
3. 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)
4. Asakura H, Morita-Ishihara T, Yamamoto S, and Igimi S: Genetic marker for thermal resistance in *Enterobacter sakazakii*. in press
5. 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. 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（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. 調製粉乳等の種類による *E. sakazakii* 検出結果 (100検体)

| 種類 | 供試検体数 | <i>E. sakazakii</i> 陽性数 | 陽性率 |
|------|-------|-------------------------|-----|
| 調製粉乳 | | | |
| 缶入り | 46 | 1 | 2% |
| 小包装 | 25 | 1 | 4% |
| (小計) | 71 | 2 | 3%) |
| 類似食品 | 29 | 2 | 7% |

分離された4検体は、いずれも推定菌数0.0036MPN/gであった。

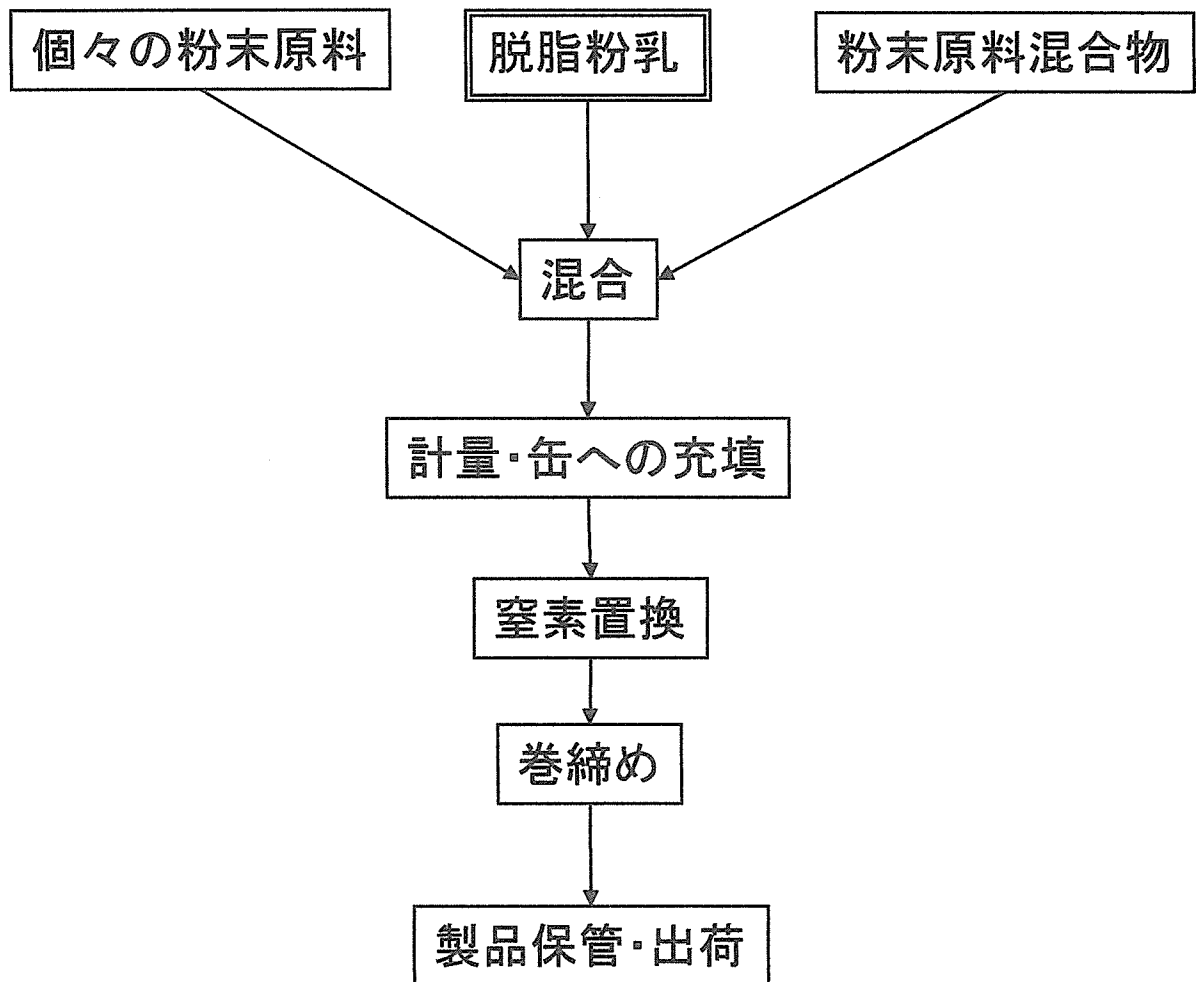


図1. PIF製造工程フロー概略 A

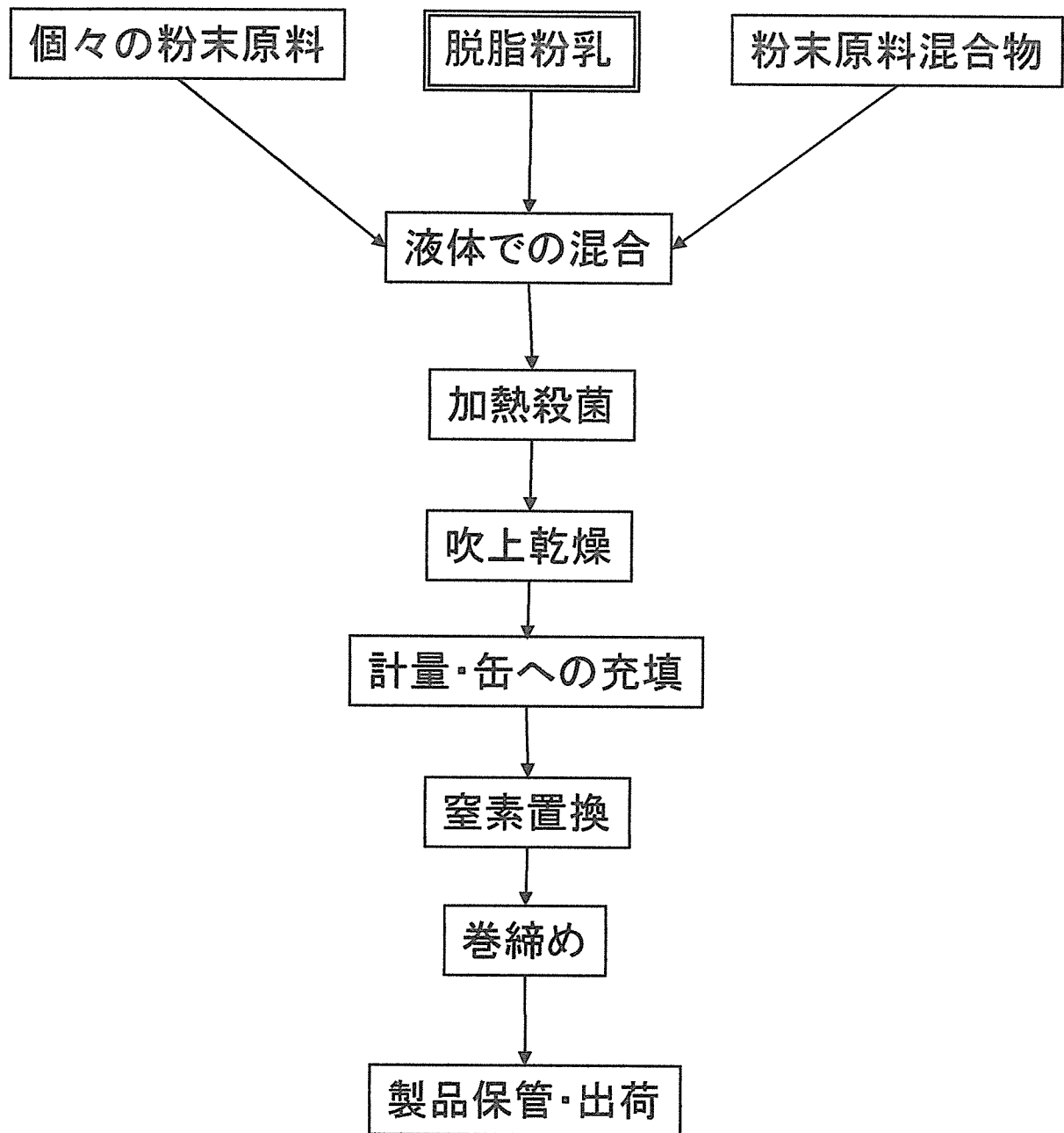


図2. PIF製造工程フロー概略 B

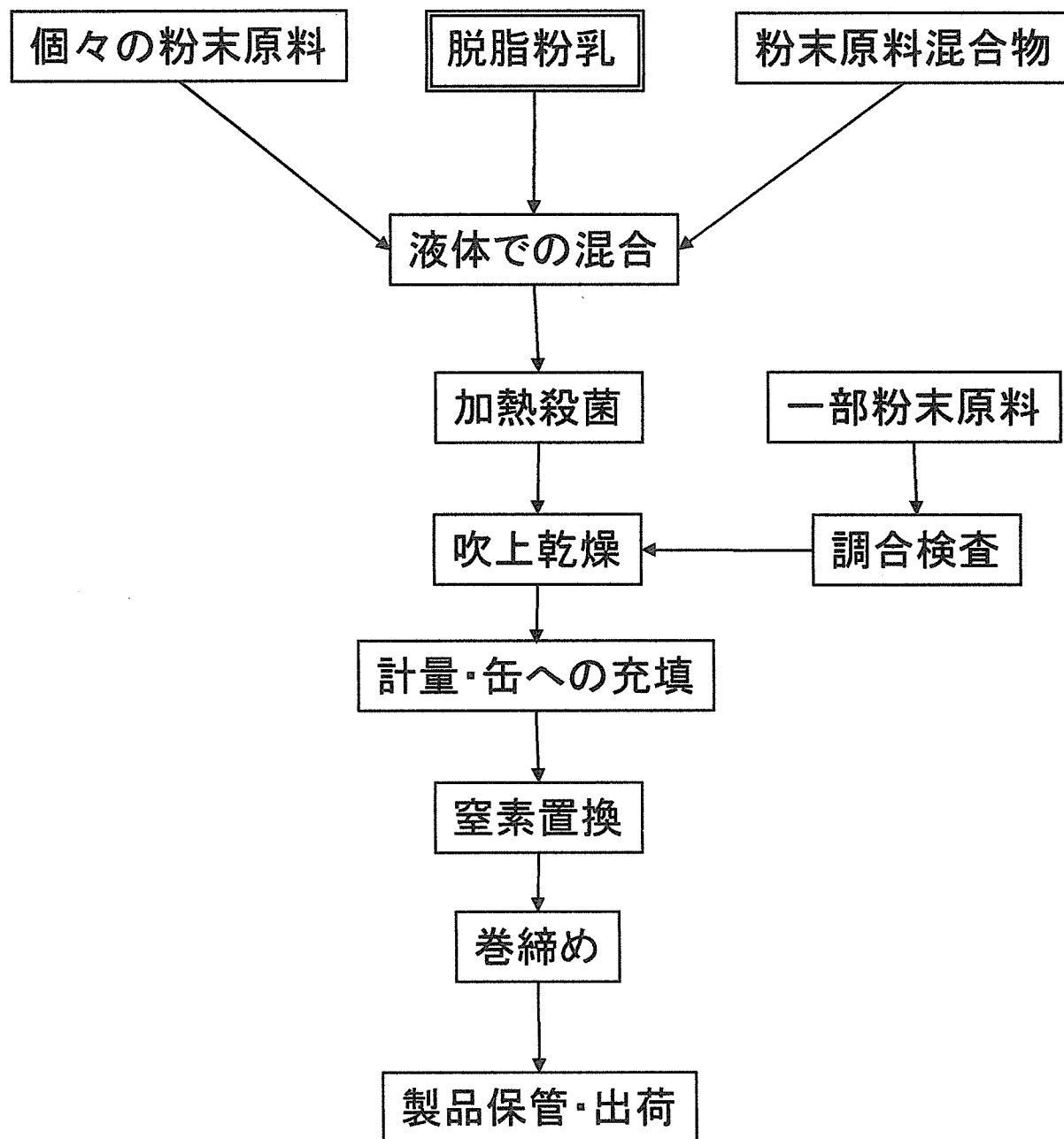


図3. PIF製造工程フロー概略 C

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

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
(H17-食品-一般-003)

食品より分離された *Enterobacter sakazakii* の熱抵抗性に関する研究

| | | | |
|-------|--------------|-------------|--------|
| 主任研究者 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品衛生管理部 第1室 | 五十君 静信 |
| 研究協力者 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品衛生管理部 第1室 | 朝倉 宏 |
| | 国立感染症研究所 | 細菌第1部 | 石原 朋子 |

研究要旨

Enterobacter sakazakii は乳幼児に髄膜炎や壊死性腸炎などを引き起こす腸管病原体である。本研究では、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、16s 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ており、熱抵抗性の *E. sakazakii* を検出するターゲットとして有用と考察された。

A. 研究目的

Enterobacter sakazakii は新生児・乳幼児に髄膜炎、敗血症、壊死性腸炎などを引き起こすグラム陰性桿菌であり、未熟児や低体重出生児、および生後 28 日齢以下の乳児が最もリスクが高いとされている⁴⁾。本症により髄膜炎を発症した場合の致死率は 33%-80%と非常に高く¹⁰⁾、生存しえた場合にも多くの場合で、重篤な神経症状（癲癇、脳腫瘍、脳水腫、発達傷害）を併発することが多い。

現在までに複数の集団感染事例が新生児を対象に病院内で発生しており、本菌に汚染された粉ミルク（powdered infant formula, PIF）との関連性が強く指摘されている^{1,3)}。PIF への *E. sakazakii* 汚染経路としては、製造工程におけるもの¹⁶⁾と、匙やブレンダーなど溶解調整時の汚染が指

摘されており、実際にこうした調整用具から原因菌が分離されている¹⁴⁾。

本菌は双方の経路から伝播すると考えられているが、いずれもその過程には加熱工程（製粉時および温水での溶解調整時）が含まれている。多くの *Enterobacter* 属菌は PIF より分離されている^{6, 13, 17)}ことから、熱抵抗性は本感染症の重要なリスク因子となると考えられ、食品衛生上その特性を明らかにすることは必要と考えられた。

2006 年 6 月から 10 月にかけて、我々は約 2000 検体の食品より 30 株の *E. sakazakii* 様分離株を得た（表 1）。本研究では、分離株の特性を明らかにするため生化学性状および遺伝子系統解析を用いて菌株の同定を行うと共に、熱抵抗性の特徴を明らかにするためにディファレンシャル PCR 法を用いた遺伝子発現解析により候補となる遺伝子の同定を行った。熱抵抗

性と本遺伝子の相関性を遺伝子多形性ととも考察したので、報告する。

B. 研究方法

1. 菌株、培地および生化学性状試験

本研究では計 33 株の *E. sakazakii* を用いた(表 1)。23 種の食品項目より 30 株、ヒト由来の ATCC 株 (29004, 29544, および BAA-894)をコントロールとして併せて用いた。本菌の培養にはトリプトソイブロス (TSB, Becton Dickinson) およびトリプトソイ寒天培地(TSA, BD)を用いた。生化学性状試験には API20E キット(BioMérieux, France)を用いた。

2. 16s rRNA配列の決定および系統解析

528-bp の 16s rRNA 配列をプライマーセット (5'-TGGAGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3', 5'-TACCGCGGCTGCTGGCAC-3') を用いて増幅⁸⁾、BigDye Terminator (Applied Biosystems)を用いてダイレクトシーケンズを行なった。得られた配列は日本 DNA データバンク (DDBJ) にアクセッション番号 AB274273- AB274302, および AB292182 として登録した。系統解析については Genetyx を用い、UPGMA 法により作成した。

3. *E. sakazakii*株の熱抵抗性に関する検討

*E. sakazakii*の熱抵抗性についてはBreeuwerらの方法²⁾に準じて検討した。*E. sakazakii*をTryptic soy broth (TSB, Becton Dickinson)中で20時間培養し、滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、最終濁度がOD₆₀₀で0.25となるよう10mlのPBSで再懸濁した(約10⁷ CFU/ml)。これを60°Cで90分間加熱した。この間、30分毎に懸濁液および同希釈液100-μlをTSAに接種し、CFU値を算出した。

4. デイファレンシャルPCR法

同法には GeneFishing DEG101 system (Seegene)を用いた。TSB 中で OD₆₀₀= 0.40-0.45 にまで *E. sakazakii* 株を増殖させ、全 RNA を抽出した。これを dT-ACP1 primer (5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATCC

CCC(T)₁₈-3')を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成後、各 50-ng を用いて arbitrary ACP primers (A1 through A20)と the anchor dT-ACP2 primer (5'-CTGTGAATGCTGCG ACTACGATXXXX(T)₁₅-3')を用いて、PCR 反応を行なった。

5. リアルタイム RT-PCR

DEG 配列より Primer Express ver.3.0 (Applied Biosystems)により、ターゲット検出用のプライマーセットを以下のように設定した:*infB* (5'-GCTGCGGAAACGAGC AA-3', 5'-TCCGCCTGAGCAGCTTTG-3'), 16s rRNA (5'-TCCCCTACGGTTACCTTGT TTC-3', 5'-GCGCTTGCCACTTTGTGA-3'), *groEL* (5'-TGTTGCTGCGCCTACTTTCA-3', 5'-AGGAACGCGTAGCGAAACTG-3'), *hnsB* (5'-GCAATGGCGCGTGACTTC-3', 5'-CGTAACGATGCGGAATTTCT C-3')。反応液には SYBR Green Master mix を用い、LightCycler 480 (Roche)により検出を行った。

6. その他

近傍領域のDNA配列決定に際しては、先述と同様にDirect sequencingにより行なった。用いたプライマー配列は以下の通りである (5'-GCGTAATAAACTGTAGCAGGA A-3', 5'-CGTTCTCTTCAGCCATACGAC -3')。

C. 研究結果

1. 食品由来 *E. sakazakii* 様菌株の同定および遺伝学的多形性

約 2000 検体の食品について、一般細菌検査を行った中で、*E. sakazakii* 様のコロニーが複数認められたことから、生化学性状に基づく細菌学的同定を行った。最終的に、食品由来株はいずれも *Enterobacter* 属菌として同定されたが(表 1)、複数の *E. sakazakii* 株が *E. cloacae* など類縁菌と生化学性状のみでは識別不能であることも報告されていることから⁹⁾、16s rRNA 配列にもとづく遺伝子同定法を併用してより詳細な同定を試みた。

16s rRNA 配列を決定し、データベース上に登録されている様々な菌種由来の同配列と比較した結果、食品分離株はいずれも *E. sakazakii* 標準株である ATCC29544 株と 98.17%以上の相同性を示した。これらの結果から、食品由来 30 株はいずれも *E. sakazakii* として同定された(表 1)。

UPGMA 法を用いた系統解析から、供試株は 93.86%以上の Criteria で 4 グループに大別された(図 1)。最も多くの菌株はグループ I に分類された(PIF 由来の HT032-HT034 株,その他食品由来 13 株, および ATCC ヒト由来 3 株)(図 1)。その他の食品由来株は、HT026 と HT009 株を除いてグループ II に分類された。HT026 株は別の Reference 配列(AY579153)と共にグループ III に分類され、HT009 はグループ IV へと分類された。これらの結果は、本邦に分布する *E. sakazakii* も海外での分布⁹⁾と同様に遺伝学的多様性を有していることが示唆された。

また、汚染を受けている食品種としては 23 種であったが、粉末状の食品の割合が非常に高いことが特徴であった(表 1)。

2. 熱抵抗性について

代表株についての熱抵抗性試験の結果を図 2 に示した。60°C で 90 分加熱後の生存菌数を菌株間で比較したところ、約 10^4 倍の差異が認められ、ATCC3 株(29004, 29544, and BAA- 894) については 10^4 CFU/ml 以上の生菌が検出されたが、食品由来株である HT023 および HT030 はコロニーが検出されなかった(図 2)。この結果より、我々は計 33 供試菌株を 3 クラスに分類した; クラス R, 熱抵抗性 (10^4 CFU/ml 以上); クラス S, 熱感受性 (10^2 CFU/ml 以下); クラス M (10^2 - 10^4 CFU/ml)。これによりグループ I に分類された食品由来 13 株のうち、8 株 (61.5%), およびグループ II の食品由来 12 株のうち 2 株 (16.7%) がクラス R (熱抵抗性) であることが明らかとなった(表 1)。

3. 熱抵抗性株と感受性株を用いた遺伝子発現比較解析

熱抵抗性および遺伝子多形性を受けて、我々は熱抵抗性株と感受性株の間には遺伝子発現にも有意な差が認められるのではないかと考えた。これを検証するため、クラス R およびクラス S よりそれぞれ代表 2 株をランダムに選択し(クラス R: HT003, HT033; クラス S: HT007, HT011)、ディファレンシャル PCR 法による遺伝子発現比較をおこなった。明らかに転写の確認された、発現量の異なると目される遺伝子バンドとして、16s rRNA, the heat-shock protein *groEL*, translation initiation factor *infB*, および histone-like protein *hnsB* が同定された(図 3A)。

4. リアルタイム RT-PCR を用いた候補遺伝子の発現解析

ディファレンシャル PCR 結果の検証ならびに候補遺伝子に関する相対定量解析を行なうために、2-ステップリアルタイム PCR を行なった。各 4 代表株(クラス R: HT003, HT026, HT0031, HT033; クラス S: HT007, HT011, HT023, HT030) を用いて各ターゲット遺伝子の発現定量をおこなった結果、クラス R もしくは S における *groEL* または *hnsB* の高発現レベルはそれぞれのクラスに特異的なものではなく(データ未載)、ディファレンシャル PCR におけるバンドは非特異的な検出であると考えられた。一方、*infB* 遺伝子の発現はいずれのクラス R 株でクラス S に比べて高い値を示した(図 3B)。

5. *infB* 遺伝子における多形性と特異性

リアルタイム PCR で用いたプライマーセットを用いて全供試株について *infB* 遺伝子を PCR により検出しようとして試みたが、複数の株で検出されなかった(表 1)。このことから、*E. sakazakii* 株間においても本領域は多様であること示唆された。これを検証するため、我々はこれを含めた 876-bp の近傍領域について PCR 増幅を行い、全ての株において増幅が確認された。相同性解析により、上述のリアルタイム PCR におけるターゲット領域は菌株間で変異・欠失が多く認