

められ、他菌種由来の*infB*配列 (*E. cloacae*: AJ002736); *Salmonella* Typhimurium: AJ002552; *Klebsiella oxytoca*: AJ002735) とも大きく異なっていた (図3C)。これらの結果は、*infB*配列 (65-bp) が複数の株で増幅されなかった理由として妥当と考えられるとともに、本領域はクラスR株ではいずれも共通に保持されていたことから、熱抵抗性の*E. sakazakii*を検出するためのターゲット遺伝子として有用と考えられた。

D. 考察

本研究では、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 region¹²⁾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、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。

*infB*遺伝子は原核生物の70sリボゾーム複合体の構成タンパクとして翻訳開始因子(IF2)を担っており¹¹⁾、大腸菌ではIF2a, IF2b, IF2?の3種に大別される¹¹⁾。個々のIF2因子は独自に機能していると考えられており、熱抵抗性株および感受性株においても同様にIF2の機能性が大きく異なっていると予想される。本研究において認められた、*E. sakazakii*株間での*infB* mRNAレベルの違いは多くの遺伝子の発現/転写に影響を及ぼしていると考えられるが、まだ本菌の完全ゲノム解読には至っていないため

に、不明である。網羅的な遺伝子情報は熱抵抗性を含めた、食品・環境中の多様なストレス因子に対する本菌の生存戦略 (ストレス応答) を理解する上で必要不可欠であり、同菌の自然界における生態の把握、ひいては食品汚染の予防あるいは制御にもつながると期待される。

最後に、わが国ではまだ*E. sakazakii*感染症の実態は全く明らかにされておらず、ヒト臨床由来の*E. sakazakii*すべてが本研究での結果と同様に、熱抵抗性を示すかについては定かではない。今後は、海外を含めて更に臨床方面からの菌株・情報の収集に努めることで、ヒトへの感染に関連性のある*E. sakazakii*の特性を明らかにしていきたい。

E. 結論

本研究では、以下の結論を得た。

- 1) 生化学・遺伝学的性状より、わが国の食品由来 *Enterobacter sakazakii* 株における多様性を示した。
- 2) 熱抵抗性は大きく3クラスに分類され、対照として用いたヒト由来株はいずれも抵抗性であった。
- 3) 熱抵抗性に関連する遺伝子として、*infB*を同定し、mRNAレベルが高い一群が熱抵抗性であることを示した。
- 4) 上記ターゲット配列はDNAレベルでも、熱抵抗性株・感受性株の間で差異が認められ、感受性株では欠失・変異を認めることを明らかにした。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

Igimi S, Asakura H, Ishihara T, Ishiwa A, Okada Y, Yamamoto S. *Enterobacter sakazakii* in Powdered infant formula and the other food: Hazard Analysis in Japan. FoodMicro 2006, Bologna, Aug, 2006. Italy.

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

I. 引用文献

1. Biering, G., Karlsson, S., Clark, N., Jonsdottir, K., Ludvigsson, P., Steingrimsson, O. 1989. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. J. Clin. Microbiol. 27: 2054-2056.
2. Breeuwer, P., Lardeau, A., Peterz, M., Joosten, H.M., 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. J. Appl. Microbiol. 95: 967-973.
3. Centers for Disease Control and Prevention. 2002. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula -Tennessee, 2001. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 51: 297-300.
4. Drudy, D., Mullane, N.R., Quinn, T., Wall, P.G., Fanning, S. 2006. *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula. Clin. Infect. Dis 42: 996-1002.
6. Edelson-Mammel, S. G., Porteous, M. K., Buchanan, R. L. 2005. Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula. J. Food Prot. 68: 1900-1902.
8. Iversen, C., and Forsythe, S. 2004. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula and related products. Food Microbiol. 21: 771-776.
9. Iversen, C., Lancashire, L., Waddington, M., Forsythe, S., Ball, G. 2006. Identification of *Enterobacter sakazakii* from closely related species: The use of Artificial Neural Networks in the analysis of biochemical and 16S rDNA data. BMC Microbiol. 6: 28.
10. Lai, K.K. 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. Medicine (Baltimore) 80: 113-122.
11. Laursen, B.S., de A Steffensen, S.A., Hedegaard, J., Moreno, J.M., Mortensen, K.K., Sperling-Petersen, H.U. 2002. Structural requirements of the mRNA for intracistronic translation initiation of the enterobacterial *infB* gene. Genes. Cells. 7: 901-910.
12. 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: 21-31.
13. Nazarowec-White, M., Farber, J.M. 1997. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. Lett. Appl. Microbiol. 24: 9-13.
14. 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. J. 9: 447-449.
15. Seo, K.H., and Brackett, R.E. 2005. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. J. Food Prot. 68: 59-63.
16. 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: 398-401.
17. 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: 293-297.

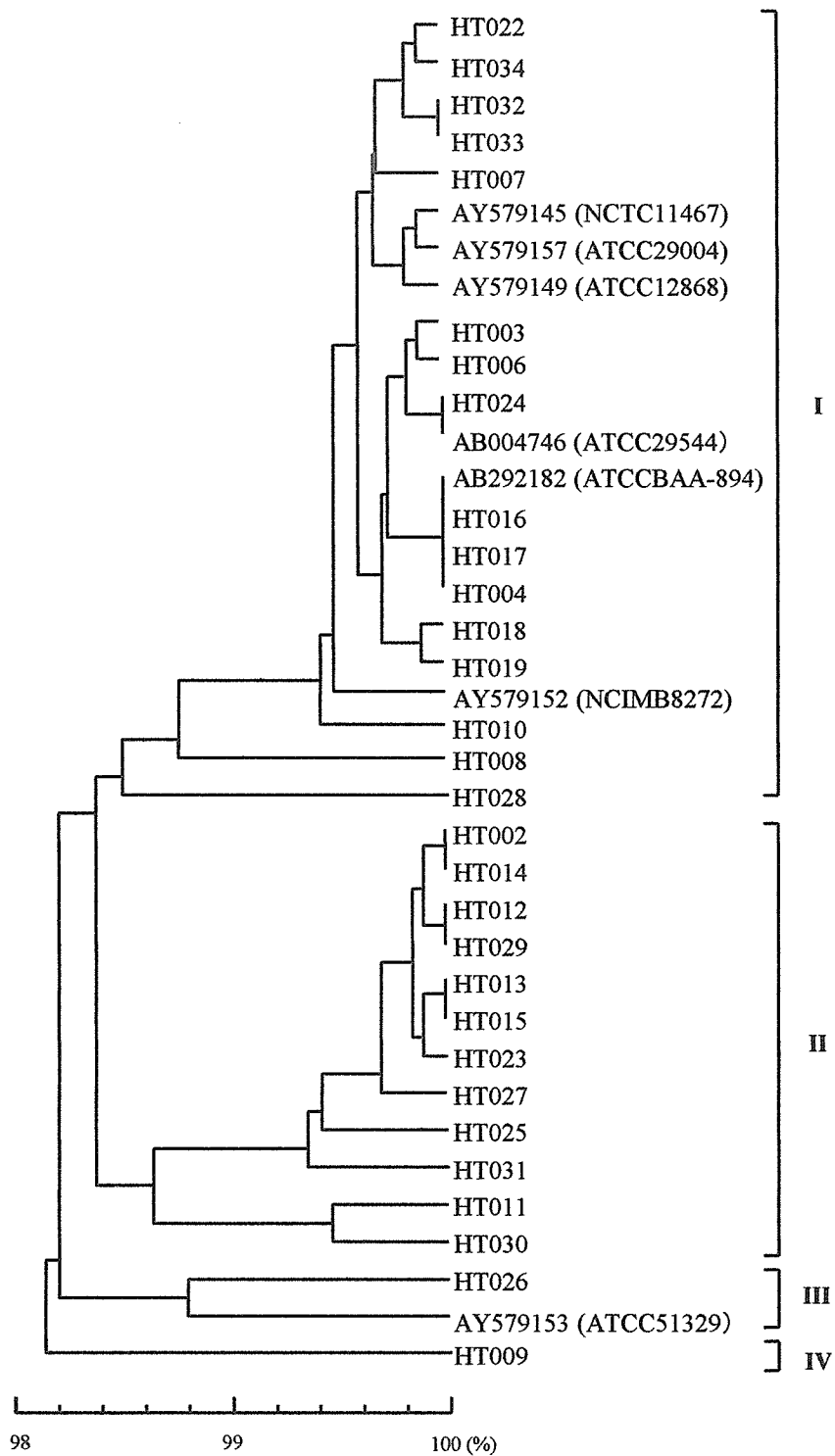


図1. *E. sakazakii* 分離株の系統解析.

各分離株由来16s rRNAより、UPGMA法により系統樹を作成した。データベースに登録されている*E. sakazakii* 由来16s rRNA配列を対照としてアクセッション番号で列記した(括弧内は菌株名)。スケールバーは相同性をパーセント表示している。

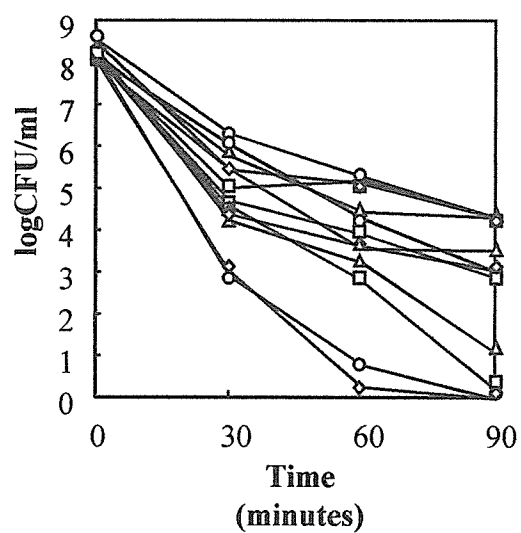
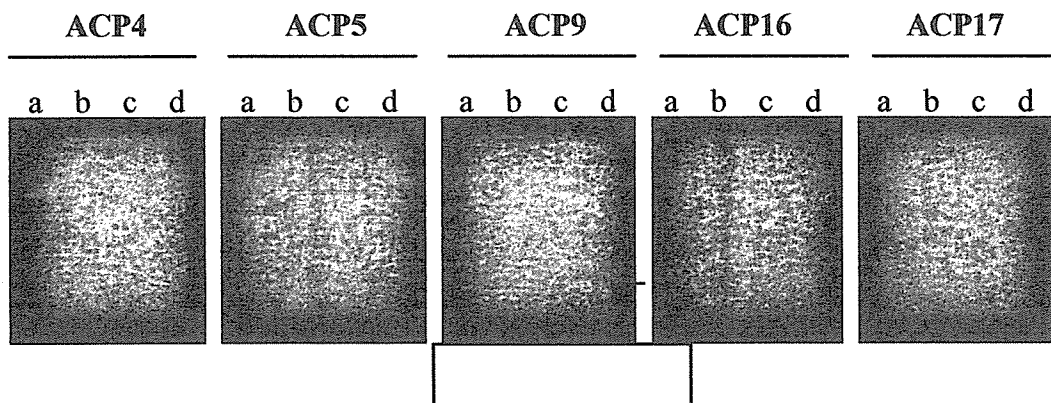


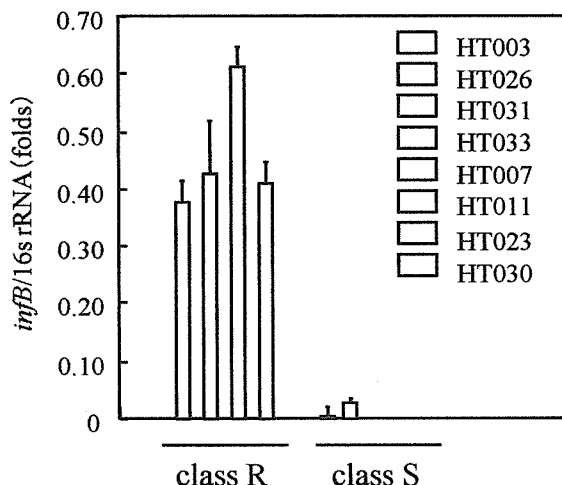
図2. 熱ストレス下における*E. sakazakii*の消長.

本グラフでは代表株の生存性を示した。各シンボルは以下の菌株を表示している; クラスR: HT003 (■), HT026 (◆), HT031 (▲), HT033 (●); クラスM: HT008 (■), HT010 (◆), HT024 (▲), HT025 (●); クラスS: HT007 (□), HT011 (◇), HT023 (Δ), and HT030 (○).

A



B



C

```
ATCC29554 536: ACAAGCTAAACGCGATGCCGCTGATAAAG-CGAAACGTGAAGCTGCGGAAACGAGCAAAGTGAGCAATCAACAACTGACGAAGTGA-GCAAAGCTGCTCAGGCGGAAAAAGCCCGCCGC 653
ATCC29004 536: ..... 653
HT033 536: ..... 653
HT007 536: .....T..... 653
HT008 536: ..... 653
HT023 536: ..... 653
HT024 536: ..... 653
HT028 536: ..... 653
HT034 536: .....T..T 653
HT011 536: A...G..G..T..C..T..G..A...A..A.....C....A...C...A.....T..T 629
HT030 536: A..G.....T..GCTT..C..CC.....T....C.....AT..T.....CA..CC..G..C....T.....T 654
AJ002736 540: TA...G..G..T..C..G..G..A...A..A.....G....A...C...A..C...A.....T..T 633
AJ002552 483: A...G....T..A..T..G..A...A..A.....G.....TA...C...A..C..C...C.....T 576
AJ002735 537: TA...G....T..A...G..A...A..A.....C....TA...C...A..C..C...T....GCAA.... 630
.....*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*
```

図3. 熱抵抗性に関する遺伝学的検討

A)ディファレンシャルPCR: 熱抵抗性代表株 (HT003 (a), HT033 (b)) および熱感受性株 (HT007 (c) and HT011 (d)) を用いて、遺伝子発現性を比較した結果を示す。それぞれの矢印は表現形質に伴って異なる発現量を示すバンドを示している (1 および 3, *infB* (AB265685); 2, 16s rRNA (AB265686); 4, *groEL* (AB265687); 5, *hmsB* (AB265688))。

B) リアルタイムPCR: クラスR および S 各4代表株における *infB*/16s rRNA の相対定量結果を示した。(C) *infB* 配列のアライメント: リアルタイムPCR における *E. sakazakii* 分離株のターゲット領域を中心とした部分配列について、これと相同性の高い、*E. cloacae* (AJ002736), *S. Typhimurium* (AJ002552), *K. oxytoca* (AJ002735) 配列と比較して表示した。*E. sakazakii* 標準株 (ATCC29544) と相同な塩基についてはドット、全配列で相同な塩基についてはアスタリスクで示した。

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）
（協力研究報告書）

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
協力研究者 天野富美夫 大阪薬科大学薬学部教授

研究要旨

乳製品の汚染によって小児下痢症の原因となる事が知られている *E. sakasakii* (ES) 菌の乳製品汚染に関する評価法ならびに病原性等の菌の性質に関する研究をするため、本年度はESの標準菌株から2株を選び、それらの走査型電子顕微鏡像を撮影するとともにESに関して特に問題となる乾燥耐性に焦点を当てて研究を行った。その結果、ES菌株はいずれも周毛性の鞭毛を持つ桿菌であることがわかった。また、菌株によって乾燥抵抗性が異なり、乾燥に強い抵抗性を示したClone#1株ではLBや乾燥粉乳の添加による影響を余り受けなかったのに対し、乾燥に対して感受性を示したClone#4株では、LBおよび乾燥粉乳の添加によってこの感受性が低下し、乾燥耐性を示すようになった。なお、これらの菌株はいずれも、10 mg/ml の lactoferrin 添加によって乾燥抵抗性が消失もしくは乾燥に対する感受性が増強された。以上の結果から、ESの乳製品汚染、とりわけ小児用の調製粉乳への混入と検出は、物理的なES菌の混入の他、これらの菌株間で見られる乾燥抵抗性の差が重要な因子として検討されるべきである事が示唆された。さらに、ラクトフェリンが非常に強いES乾燥感受性の増強効果を示した事から、従来報告されてきたラクトフェリンのもつ免疫調節活性や直接的な抗菌活性の他に、この性質（ES菌に対する乾燥感受性の増強効果）も、食品衛生と乳製品の保存効果を高める上で重要である事が示唆された。

A. 研究目的

E. sakasakii(ES)菌の乳製品汚染に関する評価法ならびに病原性等の菌の性質を明らかにする。とくに、ES菌の微細形態を明らかにするとともに、乾燥抵抗性に関する研究を行うことを平成18年度の目的とする。

B. 研究方法

ES菌株は、国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部の五十君静信先生から御恵与いただいた。

1. 走査型電子顕微鏡観察： -80℃で保存した菌株をLB培地中で一晚、震盪しながら37℃で前培養し、その一部を新鮮なLB培地中にOD550=0.05となるように播き、37℃で105分間震盪培養した。走査型電子顕微鏡のサンプルとしては、その1mlをとり、氷冷した9mlの

2% paraformaldehyde/PBS 中に静かに加えて固定し、自然落下によってチューブの底部に集まった菌をさらに 1% glutaraldehyde/PBS で固定した。これを脱水、臨界点乾燥、蒸着の順によってサンプル調製し、国立感染症研究所病理部の斉藤典子先生に JEOL の S-5000 で観察していただいた。

2. 乾燥抵抗性の評価： ES 菌株の前培養およびそれに続く LB 培地中での対数増殖期までの培養は 1. の項目と同じである。乾燥抵抗性は、サルモネラを用いた実験系ができており、それに準拠した。すなわち、対数増殖期の ES 菌を氷冷後、氷冷した生理食塩水で 3 回、洗浄し、これを最終濃度 1×10^8 cfu/ml となるように懸濁した。その際に、生理食塩水に対して LB 培地を 5% あるいは 20% 添加したもの、あるいは 10 mg/ml の市販の M 社の乳幼児用調製粉乳、あるいは 10 mg/ml の lactoferrin (六甲バター株式会社の御恵による) を添加した。次に、これらの菌液を $10 \cdot 1$ ずつ、50 ml の $0.45 \mu\text{m}$ フィルター付きチューブ (FPP 社製) の底部に入れ、直ちに自動乾燥装置 (サンプラテック社製) で乾燥させた。この条件下では、8 時間の乾燥によって液体はすべて蒸発した。なお、乾燥抵抗性の評価は、サルモネラを用いた試験法に準じ、一晚 (18-24 時間) の乾燥を行ったのち、氷冷した 1 ml PBS を添加して Voltex ミキサーで激しく混和し、さらに氷上で 15 分間以上放置した後に再び激しく混和した。これを氷冷した PBS で系列希釈し、LB 寒天培地上に塗布して形成されたコロニー数を計測した。結果は、乾燥させる以前の 0 time の無添加対照に含まれるコロニー数に対する相対値 (%) で示した。

(倫理面への配慮)

今回の実験内容に、該当するものはなかった

C. 研究結果 (実験結果には考察を含む)

1. ES 菌の超微細形態： 用いた 2 種類の菌株とも、大腸菌やサルモネラと同様の形態をした、周毛性の鞭毛を持つ桿菌であることが分かった (電子顕微鏡写真は省く)。これまで、ES 菌の超微細形態に関する資料が少なかったので、本研究の結果は、今後、ES 菌を評価する上で参考になると思われる。

2. 乾燥抵抗性： サルモネラの乾燥抵抗性に関して、対数増殖期の菌を生理食塩水で洗浄後に乾燥させた場合には、病原性の菌株も非病原性の菌株もすべて、一晚の乾燥で生残数が激減して元の 1×10^{-4} 以下になり、ほぼ cfu=0 に近づくことが明らかになった。これに対し、ESclone#1 では、Fig. 1 に示すように、数十分の 1 までしか生残数が低下せず (Fig. 1. +None)、この条件でもかなり乾燥に耐性を示すことが明らかになった。一方、ESclone#4 では、同じ条件下で元の約千分の 1 まで生残数が低下し (Fig. 4. +None)、ESclone#1 とは異なり、乾燥に対する感受性を示した。これらの結果は、サルモネラよりも ES 菌の方が乾燥に対する抵抗性が強いこと、ならびに標準菌株の間でも、乾燥抵抗性に差が見られることを示す。

次に、乾燥時の栄養因子の存在が乾燥抵抗性に及ぼす効果を検討した。サルモネラの病原性菌株では LB 培地の存在下で乾燥すると濃度依存的に乾燥抵抗性を示すようになることが示唆された。これに対し、ESclone#1 では、5 または 20% の LB が存在しても、また、市販の調製粉乳成分が存在しても、数倍の乾燥抵抗性の上昇が認められたものの大きな変化は観察

されなかった (Fig. 1)。一方、ESclone#4 では、これらの栄養因子の存在によって生残性が数十倍に上昇し、乾燥抵抗性の獲得に栄養因子の影響を受けることが示された (Fig. 2)。以上の結果は、乾燥粉乳の中で由来がなかなか分からずに混入が問題となる ES 菌の性質の一つとして、乾燥時の生残性の変動が関与していることを示唆する。特に、菌株の種類によって乾燥抵抗性に差があり、さらに栄養因子の影響の受け方が異なるという結果は、ES 菌の病原性を検討する上で重要な点になると思われる。

このほか、用いた 2 つの菌株とも、乾燥時に 10 mg/ml lactoferrin を添加することによって菌の生残性が激減し、ほぼ検出限界以下にまで低下した (Fig. 1, 2) ことから、ラクトフェリンは ES 菌の乾燥時の生残を阻害する働きがあることが示唆される。この点は、ラクトフェリンの新たな機能の一つとして考慮されるべき事柄の一つであると思われる。今後、ES 菌の液体培養系におけるラクトフェリンの抗菌活性を調べることと同様に、その有効濃度や ES 菌の他の菌株に及ぼす影響等、さらに詳細な検討を加える必要がある。

E. 結論

E. sakasaki は菌株によって乾燥抵抗性が異なる。乾燥に強い抵抗性を示した株では LB や乾燥粉乳の添加による影響を余り受けなかったのに対し、乾燥に対して感受性を示した株では、LB および乾燥粉乳の添加によってこの感受性が低下し、乾燥耐性を示すようになった。これらの菌株はいずれも、10 mg/ml のラクトフェリン添加によって乾燥抵抗性が消失もしくは乾燥に対する感受性が増強された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Terai S, Yasuda M and Amano F. (2006) Regulation of Sep22 expression in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis by culture medium. *Microbe and Environment*. 21:36-43.
2. 天野富美夫、川崎友紀子、野原哲矢。マクロファージへのサルモネラ接着に及ぼすフコイダン含有海藻抽出物の阻害効果について。 *Bacterial Adherence & Biofilm* 印刷中

2. 学会発表

1. 天野富美夫、川崎友紀子、野原哲矢。マクロファージへのサルモネラ接着に及ぼすフコイダン含有海藻抽出物の阻害効果について。第20回 *Bacterial Adherence & Biofilm* 研究会。2006. 8。東京

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

Fig. 1. Dry-resistance of *E. sakasakii* Cl#1 in the presence or absence of nutritional components

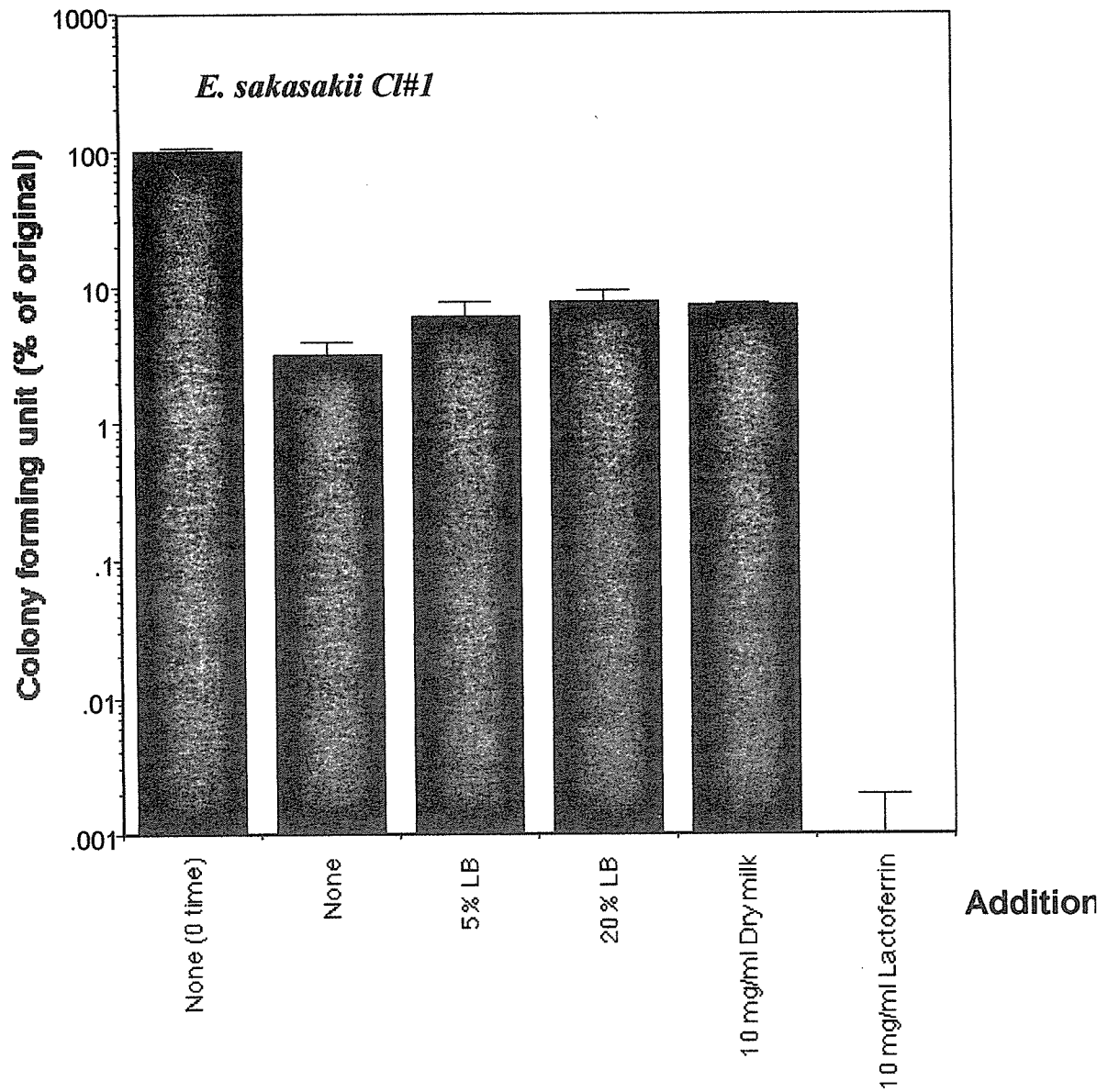
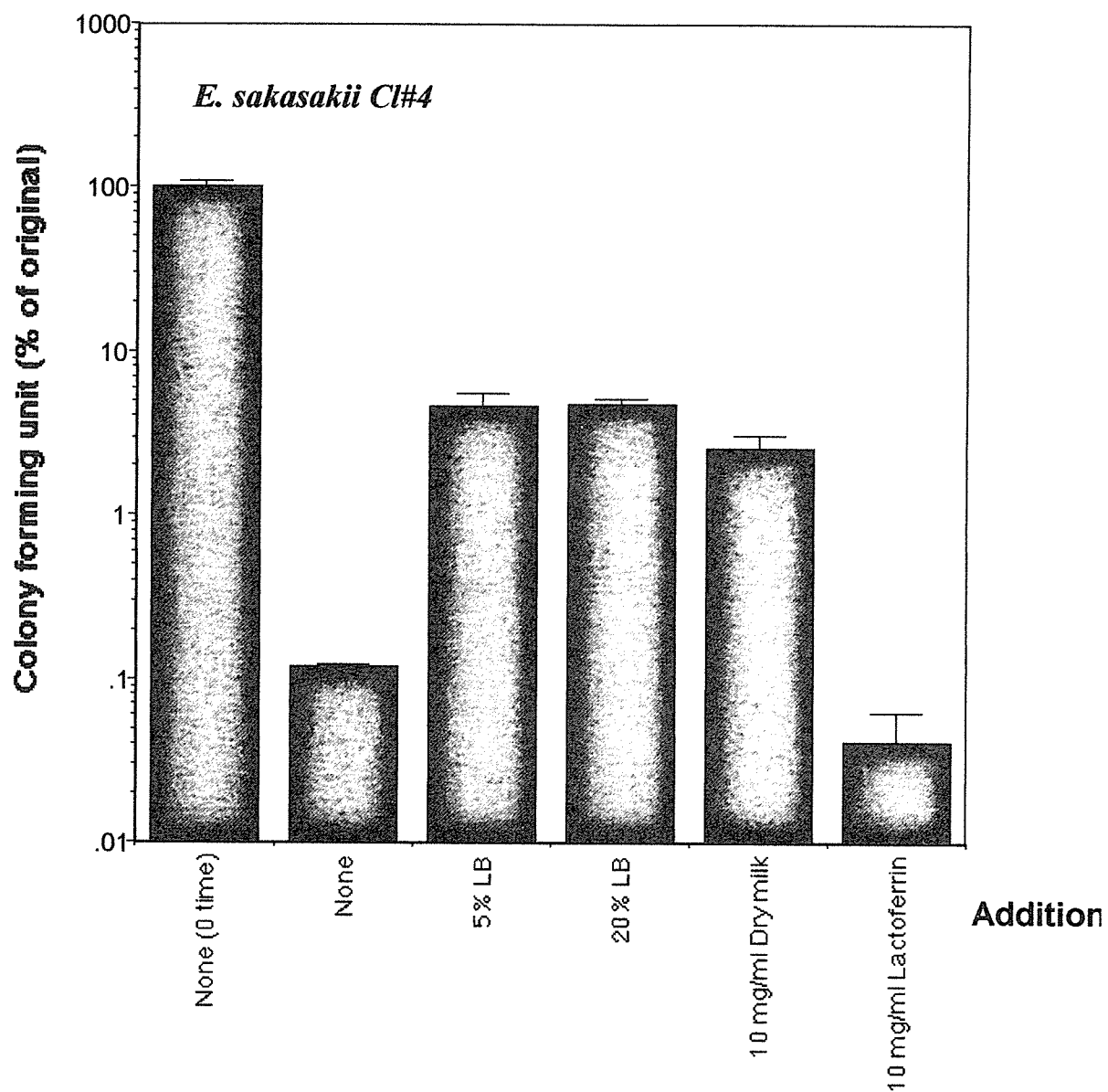


Fig. 2. Dry-resistance of *E. sakasakii* Cl#4 in the presence or absence of nutritional components



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
分担研究報告書

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

分担研究者 豊福 肇 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部主任研究官
研究協力者 窪田邦宏 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部研究員
研究協力者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部研究員

研究要旨：

近年、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（*Enterobacter sakazakii*）による健康被害の発生が諸外国で報告されている。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。

乳児ポ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。

A. 研究目的

近年、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（*Enterobacter sakazakii*）による健康被害の発生が諸外国で報告されている。これを受け、WHOとFAOは2004年2月専門家会合を開催し、またCodex委員会において、乳幼児用粉乳のCODEX規格に関して議論が進められている。さらに、2005年5月、

WHO総会は、WHA58.32決議案を採択し、加盟国に対し、早急にこの問題に対する対策、予防措置を講じることを要請するとともに、Codexに対しては乳幼児用調製粉乳に関する規格設定作業を急ぐよう、またFAO及びWHOに対し、PIFの調乳、使用、取扱い及び保管に関するヘルスケア提供者に対するガイドラインを作成するようリクエストしている。

そこで、本研究では、1)昨年度に引き続き世界各国で 2006 年に報告された *E. sakazakii*による疫学情報を調査し、2)同菌のリスクと密接に関連する、PIF の調乳、使用、取扱い及び保管に関する我が国の実態を調査し、Codex 及 FAO 及び WHO が検討している PIF の調乳、使用、取扱い及び保管に関するヘルスケア提供者に対するガイドラインに資するとともに、3) 昨年、我が国で最終的には否定されたが PIF からの感染が疑われた乳児ボツリヌス症の事例があったことから、諸外国における乳児ボツリヌス症と PIF の関連性について文献調査を行った。

B. 研究方法

1)2006年に報告された *E. sakazakii*の事例について、Pubmed、諸外国の疫学担当部局からの報告等で調査した。

2) 東京都内の8カ所の病院の調乳施設を見学し、調乳、使用、取扱い及び保管に関する我が国の実態の予備調査を行った。また、病院で使用される調乳機器を製造販売しているA社の技術担当者からヒアリングを行った。

3) イギリスの食品微生物安全委員会が作成した“Ad Hoc Group on Infant Botulism Report on Minimally Processed Infant Weaning Foods and the Risk of Infant Botulism

“ <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/infantbotulismreport.pdf>、及び Pubmed で検索した論文等から、乳児ボツリヌス症と PIF との関連性について調査した。

C. 研究結果 ならびに D. 考察

C.1 *E. sakazakii*の2006年の症例

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。(An Pediatr (Barc). 2007;66(2):191-200)。この事例は早産(31週)で、1715gで自然分娩で生まれ、出生当初、呼吸器官に異常がなかったが、生後3日目に消化障害がみられ、生後5日目、敗血症の臨床症状が現れ、生後10日目に全身状態が悪化し、呼吸停止、CRP値の上昇(14mg/dl)、貧血(ヘモグロビン値7g/dl)、血小板減少症(14,000/ μ l)の症状が現れた。イミペネムによる抗生物質の経験的治療を開始し、濃厚赤血球液及び濃厚血小板液を投与した。10日間にわたり抗生物質治療を続け、患者の症状は改善に向かい、生後24日目に精密検査の結果が正常となり、退院許可が出た。一連の脳エコー検査の結果は正常であり、生後12ヶ月目の精神運動発達に遅延はみられなかった。この新生児は血液培養にて *E. sakazakii* が分離されたが、血管用カテーテル、大便、尿のいずれも陰性であった。

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。(Personal communication from Anna Bowen CDC, 2007)

また、*E.sakazakii* 感染が届出感染症になっているニュージーランドでは、2006年に届け出はなかった。

C.2 病院での実態調査

8病院とも、専用の隔離された調乳室で調乳が行われ、24時間分を一度に調乳し、その後冷蔵庫内で保管していた。調乳水はいずれの施設でも沸騰させた後、40℃から75℃に保ち使用していた。8病院中6病院で溶解後の殺菌が行われていた。このうち、1施設のみが分注する前の500mlのメジューム瓶のまま殺菌し（沸騰水(99℃)中に30秒漬ける）ていたが、その他の5施設はほ乳瓶に分注後に終末殺菌を行っていた。その条件は次の通り：施設A：75℃110秒保持、施設B：99℃の蒸気中5分保持（殺菌後のミルクの温度88℃）、施設C：80℃2秒（検温用の哺乳瓶のミルク中のセンサー）（）、施設D：80℃達温（調乳担当者の手の感覚）、施設E：80℃30秒（検温用の哺乳瓶のミルク中のセンサー）であった。殺菌後の冷却方法は施設A：ブラストチラーで1時間で10℃まで、施設B：水冷（調査当日水温18.2℃）、施設C：空冷（19分間で80℃から55℃まで）、施設D 流水+氷（分注したミルクは10分で80℃から12.7℃）、施設E：水冷（19分で80℃から18.4℃）であった。施設Cの殺菌から冷却までのミルクの温度

変化を図1に、施設Eの殺菌及び冷却時の温度変化を図2に示した。

殺菌していない2施設のうち施設Gでは40℃の水で溶解後、30分以内にほ乳瓶に分注し、ブラストチラーで20-30分以内に5℃まで冷却し、もう1施設Hでは60℃の水で溶解後、500mlのメジューム瓶に入れ、瓶を30～60分間、氷水につけ、冷却後、5℃の冷蔵庫に保管していた。

調査で得られた調乳から使用までの温度と時間の関係から、FAO/WHO 専門家会合で行った *E.sakazakii* の相対リスクの推計と照らしあわせ、定性的に相対リスクの推定を試みた。A施設は75℃で溶解、分注後も75℃110秒の終末殺菌、さらに1時間以内に10℃まで冷却していることから、リスクはほとんど無視できる程度と考えられた。施設Bも溶解から分注終了まえ20-30分、その後終末殺菌で中のミルクが88℃まで達し、水冷により14分で18℃まで冷却され、その後冷蔵庫保存していたことから、リスクはほとんど無視できる程度と考えられた。施設Cは非常に大規模施設で、長い場合に溶解後殺菌されるまでの間、3時間程度室温に放置されていた。FAO/WHOの相対リスクによると、30℃で4時間放置した場合、20分放置にくらべ、リスクは381倍増加するが、その後中心温度80℃2秒で殺菌することで、-100,000以上リスクが小さくなること、さらにその後16分で55℃まで、さらに1時間以内に5℃まで冷却していることから、この施設のリスクも無視できる程度と考えられた。

施設Dは溶解から分注終了まえ20-30分、その後終末殺菌で中のミルクが80℃まで達し、水冷により20分で10℃まで冷却さ

れ、その後冷蔵庫保存していたことから、リスクはほとんど無視できる程度と考えられた。ただ、予備用のミルクを 500ml のメディウム瓶で殺菌、冷却しており、これを 80℃まで殺菌するのはかなりの時間を要した。

施設 E は溶解から分注終了まえ 20-30 分、その後終末殺菌で中のミルクが 80℃30 秒、その後水冷により 19 分で 20℃まで冷却され、その後冷蔵庫保存していたことから、リスクはほとんど無視できる程度と考えられた。

分注する前に 500ml 蓋付きメディウム瓶のまま殺菌していた施設 F では、低体重児用は 78℃。普通用は 75℃で溶解し、(溶解後温度は 60℃) さらに 500ml の瓶 1 本当たり、30 秒間、沸騰水につけて殺菌していた。この 30 秒間の殺菌で 500ml のメディウム瓶内部のミルクがどの程度温度が上昇するのかは見学時には確認できなかった。当研究所において同じような条件を実験室内で再現したところ (500ml メディウム瓶使用、スタート時のミルクの温度 60℃で。しかし瓶の肉厚、蓋の閉め方の細部は不明)、30 秒加熱で 61.5℃、1 分加熱で 67.1℃、2 分加熱で 71.7℃、3 分加熱で 77.7℃、3 分 30 秒加熱で 80.1℃までの上昇が確認された (図 3 参照)。この実験から推定すると、施設 F における 500ml の瓶での殺菌効果はほとんど認められないと考えられた。施設 F ではその後水冷し、15 分間で 30℃まで冷却し、その後は冷蔵庫に保管されていた。その後の分注は病棟で行われて、実際の取り扱いは確認できなかったが、FAO/WHO の専門家会合では 70℃の湯で溶解した場合、その後の取扱いにかかわら

ず、-100,000 以上リスクが小さくなること、リスクは無視できる程度と考えられた。

終末殺菌を行っていない施設 G では 40℃に冷やしたぬるま湯で溶解し、溶解後 30 分以内に分注を終え、ブラストチラーで 20-30 分で 5℃まで冷却し、その後冷蔵庫で保管していることから、このリスクは小さいと考えられた。

もう 1 つの殺菌を行っていない施設 H では 60℃のお湯で溶解 (1, 2 分)、500ml のふたつきメディウム瓶に分注 (1-2 分) し、その後氷水で冷却 (30 分~1 時間) さらに 5℃の冷蔵庫で保管していた。分注は病棟で (病棟の情報は入手できる) この場合のリスクも小さいと考えられた。

今回調査した施設において、*E.sakazakii* 及びサルモネラに関して、リスク因子につながるような作業は認められなかった。

なお、病院での調乳機器類を製造販売している A 社から聴取した限りでは、関東から東日本は終末殺菌が一般的で、関西では殺菌せず、できるだけ汚染を抑えるよう取扱い、冷却する管理が多いとのことであった。また、現在の調乳用水の供給機械は 80℃の湯を供給することは可能、また終末殺菌機はミルク中に差し込んだセンサーの温度で 80℃を感知し、制御することは可能とのことであった。

C.3 乳児ボツリヌス症

1976 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。アメリカでもカリフォルニア、ユタ、ペンシルバニアの 3 州が最も多く、カリフォルニア州だけでほぼ半数の報告がある。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。Brook(Journal of Perinatology, 27, 175-180, 2007)によると世界各国の入院事例 75 中、28 例 (35%) で発症前の蜂蜜への暴露が確認されていた。オーストラリアでは庭の土及び飲料水による感染源として報告されている。フィンランドでは(Nevas et al., Journal of Clinical Microbiology, 2005, Vol43, 511-513) 蜂蜜を摂取した履歴がない乳児ボツリヌス症患者の糞便と掃除機のダストから PRGE 及び RAPD で非常に類似した遺伝子型の B 型ボツリヌス菌が分離されたことから、乳児の周辺を空气中に浮遊していたボツリヌスの芽胞が感染源であると示唆された。

英国では 1978 年以降、次の 6 人の確認された乳児ボツリヌス症の報告があった。

1978 年の 1 例目：蜂蜜を喫食していたが、残品を検査できず

1987 年の 2 例目：蜂蜜を喫食していない。

1989 年の 3 例目；イエメンで蜂蜜を喫食していたが、残品から *C. botulinum* の芽胞検出できず

1993 年の 4 例目：蜂蜜を喫食していない。

1994 年の 5 例目：蜂蜜を喫食していたが、残品を検査できず。喫食したはちみつから 30 分後に加工したジャーから *C. botulinum*

芽胞検出されず。

2001 年の 6 例目：蜂蜜を喫食していない。乳児用調製粉乳を喫食していて、同一バッチの未開封缶 5 缶のうちの 1 缶から *C. botulinum* のトキシン B 型の菌が分離されたが（患者もトキシン B ではあった）、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 及び PFGE によって、乳児の糞便から分離された *C. botulinum* と、調製粉乳から分離された菌は区別することができた（=違う菌パターンだった）

結論として、チルド及び冷凍ベビーフードの喫食と乳児ボツリヌス症のリンクを示す証拠はなかったとしている。(para 2, 19) これら 6 例のうち、1 つのケースだけが、1 つの特定の食品と弱くリンクしていたと記載されていた。(パラ 6.12) また、12D の加熱を受けていない乳児用食品の喫食による患者報告がないことと 1978-2004 年の間に喫食されたそれら食品の喫食頻度を考えた場合、これらの食品の喫食による乳児ボツリヌス症のリスクは低いと示唆されたとしている。(パラ 6.12)

なお、6 例目を報じたオリジナルの論文によると、(Brett et al., J. Med Micro 2005, 54, 767-776) には、次のような詳細な菌の検索情報が記載されていた。(別表 x) この著者らは開封済み PIF の場合は患者と同じ AFLP パターンの株が得られたが、未開封の同一バッチ PIF から得られたものとは違ったとし、結論としては、PIF からの感染が疑われる事例の報告はあったが、はっきりとした関連性が示された例は認められなかった。初めて乳児ボツリヌス症の患者と蜂蜜以外の食品から、同一トキシンタイプの *C. botulinum* が分離された症例、

また、患者から同一タイプであっても、複数の株が患者及び開封済みPIFから分離されたという点でも初めての報告としている。

同じ事例を扱った Joranson et al (J. Clin Microbiol, Vol.43(6), 2005, 2602-7) によると患者宅から回収された開封済み調製粉乳から分離されたボツリヌス菌は患者の乳児の糞便から分離された菌と PFGE パターンが一致したこと及び未開封缶から分離した菌はユニークな PFGE パターンを示し、患者便および開封済み缶から分離された菌のパターンと異なっていたことから、この乳児の感染源は証明されていないとしている。家庭内、家庭周辺の検体を調査しなかったため、開封済み調製粉乳がどのように汚染したのか、また乳児がどのように暴露したかは明らかではない。

当初、未開封調製粉乳缶からボツリヌス菌が分離されたことから、この調製粉乳が感染源と疑われたため、大規模な回収が行われた。この調製粉乳のバッチは 1998 年に製造された 122,388 缶であり、3 年間の賞味期限内に約 30,000 人の乳児が摂取したと考えられ、同バッチが同菌に汚染されていた場合、乳児ボツリヌス症の報告が起きた可能性があるが、実際には報告はなかった。この乳児ボツリヌス症の事例と商業的に販売されている未開封の調整粉乳との関連性は認められなさそうとされたものの、この事例は乳業界が製品中から発芽できるボツリヌス菌の芽胞汚染を予防するための、対策を講じるきっかけとなったとしている。

なおこれらの 2 つの報告は 2006 年 1 月に開催された FAO/WHO の専門家会合でも検討され、2004 年の同会合でボツリヌス菌を

カテゴリ C (因果関係はあまりもってもらいなく、また証明もされていないもの) と分類した判断をこの 1 件の患者のケースだけで、変更する根拠にはならないとした。

E. 結論

2006 年には E. sakazakii による PIF の摂取によるアウトブレイクは世界中で報告されなかった。しかし、アメリカ 2 例、スペイン 1 例で E. sakazakii の感染報告があったが、PIF の摂取との関連性はあきらかではない。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

豊福 肇 乳児用調製粉乳の調製、調整後の保管及び取扱いによる *Enterobacter sakazakii* の相対リスクの比較、食品衛生研究, 56 (2006), 9-22

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、国立一医薬品食品衛生研究所報告第 124 号 74-79

2. 学会発表

①豊福肇 平成 18 年度コーデックス委員会活動報告会 第 38 回食品衛生部会
2007 年 3 月

②豊福 肇

コーデックス及び世界の動向

国立保健医療科学院 平成 18 年度特別課程食品衛生管理コース

2007年2月

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

表1 イギリスの2001年の事例におけるボツリヌス菌のタイプ、AFLPパターン

	トキシンタイプ	AFLPパターン	検査したカルチャー数
患者の直腸洗浄	B	1	2
患者糞便	B	1	6
同	B	3	1
患者宅にあった開封PIF	B	1	1
同	B	2	1
同	B	3	10
同	B	4	1
未開封PIF（同一バッチ）	B	5	3

Brett et al., J. Med Micro 2005, 54, 767-776) から引用

図1 施設Cにおける殺菌から冷却時までのミルクの温度変化

殺菌と冷却時のミルクの温度変化(施設C)

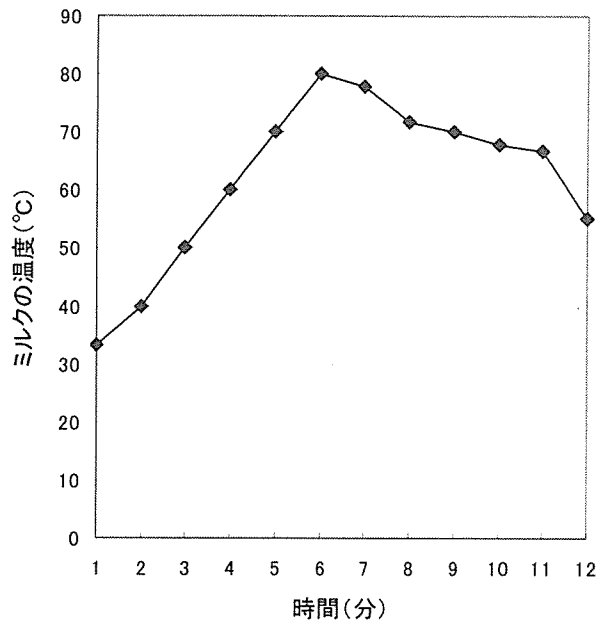


図2：施設Eにおける殺菌時と水冷時のミルクの温度変化

