

素濃度、および1食あたりの無機ヒ素と総ヒ素の摂取量を示した。無機ヒ素濃度はすべて0.1 µg/g以下であったが、無機ヒ素摂取量が高いものが一部みられた。このうちNo.32 (2.1 µg/1食)、No.37 (1.9 µg/1食)、No.38 (1.7 µg/1食)には鶏肉が含まれていた。またNo.41 (1.9 µg/1食)には米のみが含まれており、No.33 (1.6 µg/1食)には米と豚肉が含まれていた。一方、総ヒ素摂取量が多いものとしては、No.6 (11.3 µg/1食)、No.22 (45.7 µg/1食)、No.29 (10.0 µg/1食)が見られ、1食あたりの総ヒ素は10 µgを超えた。特にNo.22では45.7 µg/1食と非常に高い総ヒ素摂取量と見積もられた。No.22には米が含まれているが魚は含まれていないことから、ヒ素の供給源として、おそらく、日本で多く流通する短粒米が使用されているのではなく、DMAAの割合が比較的高いことが報告されている長粒米(外国米)が乳幼児食に使われている可能性が考えられた。

また、魚を含むが米を含まないおかずもの13検体の乳幼児食について調べた結果を表①-4に示した。魚を含んでいることから総ヒ素量は高いことが予想されたが、無機ヒ素摂取量は低い値であることが示された。

以上のように、米からの無機ヒ素摂取量は高いことが示されたが、バランスのよい食事をとっている場合には、無機ヒ素摂取量がPTWIに達することはないと考えられた。

②フラン

1) 検量線の作成

フラン標準溶液(1~200 ng)中のフラ

ンと内標準物質のピーク高比により検量線を作成した。得られた検量線は、相関係数が0.999と良好な直線性を示した。

2) 乳幼児食(インスタント食品)中のフランの定量

乳幼児食(インスタント食品)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。

3) インスタント食品(カップ麺及びスープの素)中のフランの定量

インスタント食品(カップ麺及びスープの素)についてフランの定量を行った。その結果を表②-2に示した。

4) 調味料中のフランの定量

調味料についてフランの定量を行った。結果を表②-3に示した。

5) 飲料(果汁及び野菜飲料、茶類および牛乳)中のフランの定量

飲料(果汁及び野菜飲料、茶類及び牛乳)についてフランの定量を行った。結果を表②-4に示した。

D. 考察

①ヒ素

今回検討した、米飯もの魚介類入り36検体、米飯もの魚介類なし42検体、魚介類入りおかずもの13検体の乳幼児食について調べたところ、無機ヒ素摂取量の最高値は2.1 µg/1食であった。

無機ヒ素のPTWIは0.015 mg/kg体重/week (2.14 µg/kg体重/dayに相当)である。平成12年度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。昨年度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が、今回検討した中で、1食あたりの無機ヒ素摂取量は 2.1 µg/1食であり、PTWI に相当することはないと判断された。

②フラン

分析の結果、乳幼児食(インスタント食品)では乾燥ベビーフードで49, 25ppbのフランが検出された(表②-1)。一方、インスタント食品(カップ麺及びスープの素)においても40, 34ppbという濃度が検出された(表②-2)。調味料においては最高値は33ppbであった(表②-3)。

一方、飲料(果汁及び野菜飲料、茶類および牛乳)(表②-4)については、果実ミックスジュース(濃縮還元)で35ppb、麦茶で21ppbの高値が認められたが、牛乳(紙パック)では全て検出下限(0.2ppb)以下であった。

このように、いくつかの品目で若干高いフラン濃度が観測されたが、フランの値が高くなる要因については明確にならず、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た。

なお、フランのリスク評価については、食品安全委員会において現在、「食品に含まれるフランに関する安全性評価に資する情報収集調査」が実施されている。

E. 結 論

①ヒ素

今年度は米・魚介類を多く含む乳幼児食中のヒ素の形態別分析を行い、毒性の高い無機ヒ素量を正確・精密に分析し、摂取量の評価を行った。魚を含む米飯食 36 検体、魚を含まない米飯食 42 検体、魚介類を含むおかずもの 13 検体では 0.1~2.1 µg/1食と、無機ヒ素摂取量は低いことが明らかとなった。

②フラン

食材と加工方法によりフランの生成量に大きな差があるが、原因については今後の課題として残された。3年前に着手した当時はフランが第二のアクリルアミドになる可能性があり、注目されたが、最近では毒性および摂取量がアクリルアミドほどではないと考えられている。しかし、最終的な結論は未だでておらず、国内外で研究データを収集中である。

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 論文

1. I. Yoshida, S. Isagawa, N.Kibune, Hamano-Nagaoka M and T. Maitani: Rapid and improved determination of furan in baby foods and infant formulas by headspace GC/MS. J. Food Hyg. Soc. Japan 48, 83-89 (2007)

2. Nagaoka M.H., Hanaoka K., Usui M., Nishimura T., Maitani T.: Nitric Acid-based Partial-digestion Method for Selective Determination of Inorganic Arsenic in Hijiki and Application to Soaked Hijiki, J. Food Hyg. Soc. Japan, 49, in press (2008)

3. Nagaoka M.H., Nishimura T., Matsuda R., Maitani T.: Evaluation of a Nitric Acid-based Partial-digestion Method for Selective Determination of Inorganic Arsenic in Rice, J. Food Hyg. Soc. Japan, 49, in press (2008)

学会

1. Megumi Hamano Nagaoka and Tamio Maitani: Efficient extraction and determination of inorganic arsenic in baby foods containing seaweed and fish, 3rd. International FESTEM (Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals) Symposium on Trace Elements and Minerals in Medicine and Biology (Santiago, Spain) (2007. 5)

2. 長岡(浜野)恵 米谷民雄: ヒジキを含有する乳幼児食中のヒ素の無機ヒ素の定量. (Efficient extraction and determination of inorganic arsenic in baby foods containing seaweed “hijiki”). 第18回 日本微量元素

学会学術集会 (福井) (2007.7)

3. Megumi Hamano Nagaoka and Tamio Maitani: Efficient extraction and selective determination of inorganic arsenic in rice. Tenth International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers (HTC-10) & Tenth International Symposium on Advances in Extraction Techniques (ExTech (R) 2008)) (Bruges, Belgium)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

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 (*Enterobacter sakazakii*) を主な対象として、市販乳児用調製粉乳の汚染実態調査、ヒトにおける国内臨床事例の情報収集と症例報告、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(PIF)の調乳時における本菌の挙動と安全な調乳方法について考察を行った。

協力研究者

岡田由美子、朝倉宏、石和玲子：国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

荻原博和：日本大学生物資源科学部

天野富美夫、成瀬友夏里、田村愛：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

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

本年度は、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、昨年引き続き国内外の文献調査等により情報収集を行った。有害微生物については、海外文献情報、乳児用調製粉乳中の *Salmonella* および *E. sakazakii* 専門家会合のネットワークを活用して、健康被害の発生状況を調べた。また、EC の食品および飼料中のための RAPID ALERT SYSTEM 情報から *E. sakazakii* に関連した食品の回収情報を調査した。

五十君はカナダで開催された調製粉乳の微生物規格作成に関する CCFH 作業部会に出席し、微生物基準作成に関わるとともに、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。

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、PIFの製造工程における本菌の制御、PIF中の本菌の制御に関する検討を行った。国内の乳児への感染事例に関して、現地調査を行うとともに、確認された症例については担当医師に症例報告を依頼した。PIF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。

*E. sakazakii*の分離株を用いて、PIFの調乳条件を変化させた場合の*E. sakazakii*の挙動を調べ、調乳方法による*E. sakazakii*の制御方法を検討した。粉乳中の*E. sakazakii*の制御に有効と思われるラクトフェリンの効果について評価を行った。

(倫理面への配慮)

今年度の研究では、直接の研究内容としては倫理に関すると思われる研究内容は含まれていないが、ヒトの臨床事例が確認されたため、臨床報告として医師より症例報告をお願いした。細菌性髄膜炎の症例の検討については、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理委員会(疫学関係)の承認を得た。症例報告では、患者個人が特定されるような情報が含まれることの無いよう配慮をお願いした。

C. 研究結果

乳幼児用調製粉乳(PIF)を介する*E. sakazakii*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*E. sakazakii*を加える必要があるという議

論が進められている。五十君は、2007年6月にカナダのオタワで開催された“乳児用調製粉乳の微生物基準作成に関するCodex Committee on Food Hygiene (CCFH)作業部会”に参加し、*E. sakazakii*と*Salmonella*の微生物基準案作成に関わった。豊福は、2007年10月～11月に、インド・ニューデリーにおいて開催されたコーデックス第39回食品衛生部会(CCFH)において、乳幼児用調製粉乳に関する衛生実施規範等に関する文書に関する議論に参加した。

海外における*E. sakazakii*感染事例につき文献調査を続けた。2007年にCDCに報告された*E. sakazakii*の患者は、乳児7人、13ヶ月齢の幼児1人の合計8人であった。このうち乳児では4人が、幼児1人が幼児用調製粉乳(PIF)を飲用していた。4事例について、PIF製品を検査したが、FDAが検査した未開封缶からはすべて*E. sakazakii*は不検出であったが、1事例において、開封済みのPIFから、患者と同じ*E. sakazakii*が検出された。

ドイツにおいて2007年6月、ドイツPIFが*E. sakazakii*汚染により、回収され、アラートが発せられた。また、2007年5月ウガンダから英国へ輸入された大豆ベースのPIFが*E. sakazakii*汚染により、販売ルートから撤去された。

2007年に、インドから2人の乳児の*E. sakazakii*感染が論文として報告された。1人は2002年、早産(34週齢)で生まれた未熟児の低体重児(1.4kg)で、三つ子の1人であり、髄膜炎と敗血症を起こし死亡した。もう1人は2006年、2ヶ月齢の母乳を飲んでいた乳児が敗血症を起こした。抗菌剤の静脈投与により、回復し退院した。

国内で、*E. sakazakii* による多発性脳膿瘍をきたした極低出生体重児の感染事例を確認した。この事例については、症例を担当した医師および病院関係者と面会し、聞き取りによる PIF の管理・調乳状況に関する調査を行った。PIF からの感染の可能性は低く、感染経路は特定されなかった。担当医師には、この事例を症例報告としてまとめていただいた。

2007 年度も、前年度と同様に市販の PIF 及び類似食品で汚染実態調査を行った。100 検体のうち 2 検体から本菌が検出された。2 検体はいずれも検出限界値であった。

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、改善されていた。PIF 各成分を溶解混和後、加熱処理を行った後、乾燥を行っている。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。

各種食品から分離された *E. sakazakii* の昨年度までの細菌学的な解析により、分離株はその特徴により 3 つのクラスターに分けることが出来た。60℃の加熱に比較的抵抗性のあるグループ、中程度、抵抗性が低い 3 つのグループであるが、それぞれの代表株を選び、PIF を調乳する段階の条件について検討を行った。WHO の示している 70℃以上の温水による調乳が有効であることを確認した。詳しいデータは協力研究報告書に示した。

PIF 中の菌の制御については、LB 培地中での乾燥時に lactoferrin を添加し、乾燥終了

後の菌の生残性を調べた。lactoferrin 自体には *E. sakazakii* の乾燥耐性を補助するような栄養因子的な役割はなかったにもかかわらず、lactoferrin の用量依存的に *E. sakazakii* ESC1#1 株の乾燥耐性が低下した。これと同様の結果が apolactoferrin の添加によっても観察され、本菌の乾燥耐性を低下させることが示された。

D. 考察

2007 年度も海外では、*E. sakazakii* の感染事例の報告があった。CCFH では、PIF の微生物基準の改正が進んでおり、この中に病原微生物として *E. sakazakii* が加えられることがほぼ確定し、具体的な基準値の議論が進められている。

国内で、*E. sakazakii* による多発性脳膿瘍をきたした極低出生体重児の感染事例を確認したが、この事例では PIF の利用が非常にわずかな期間であったこと（PIF 利用は 2 日程度で、母乳を用いていた）、当該病院では PIF は 80℃以上の温水にて調乳を行いその後の管理が徹底されていたことなどから、PIF からの感染の可能性は低く、感染経路は特定できなかった。

国内の市販 PIF の 100 検体を対象とした汚染実態調査では、2 検体から *E. sakazakii* が検出された。2 検体とも、缶入りの PIF で、MPN 法の検出限界値 0.36/100g であった。前年度は 100 検体中 4 検体検出（缶入り PIF1、小袋 PIF1、関連食品 2）されていたことから、全体の検出率は半減した。検出レベルは前年度も検出限界値であったことから、検出された場合の汚染レベルは変わっていない。

調乳に使用する湯温は WHO の推奨する 70℃

以上を保ち調乳することが、*E. sakazakii* の死滅に有効であった。耐熱性の高い菌株で非常に高い菌数の汚染を受けている場合では、70°C調乳で菌をすべての菌を完全に死滅させることは難しいが、汚染実態調査により国内のPIFの汚染レベルは、非常に低いこと（100g中に1個未満）および、高温水を扱うことのやけどによるリスクを考えると70°C調乳は有効なリスク管理オプションであると考えられる。さらに調乳後の保管を行う場合は5°C以下で保存し、長時間の保管は避けることが重要である。

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・サカザキを対象として、文献調査を行い、2007年に海外で新たに複数の事例が報告されていることを確認した。乳幼児食品中の有害微生物として*E. sakazakii*の症例に関する情報収集を続け、国内における1事例の多発性脳膿瘍をきたした極低出生体重児の一例を確認した。この事例ではPIFによる感染の可能性は低く感染経路の特定は出来なかった。本年度も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。分離株を用いたPIFの調乳条件の検討により、WHOガイドラインで推奨されている70°C以上の高温水による調乳は*E. sakazakii*制御

に有効であることが確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Asakura H., Morita-Ishihara T., Yamamoto S., and Igimi S. (2007) Genetic characterization of thermal tolerance in *Enterobacter sakazakii*. *Microbiol. Immunol.* 51(7): 671-677.
2. 五十君静信、朝倉宏. (2007) 乳児用調製粉乳中の *Enterobacter sakazakii* による感染. *食品衛生学雑誌*. 48(3): J-229-233.

2. 学会発表

なし

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

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）

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
協力課題名：乳児用調製粉乳の調乳および保管方法が *Enterobacter sakazakii*
の生残と推移に及ぼす影響

研究協力者 荻原 博和 日本大学生物資源科学部 准教授

研究要旨

近年、乳児用調製粉乳を媒介とする *Enterobacter sakazakii* による健康被害の報告が諸外国で報告されるようになった。*E. sakazakii* は動物やヒト、自然環境に分布する腸内細菌科の細菌で、乳幼児に対して髄膜炎、新生児胃腸炎、敗血症等の感染症を起こす病原菌として知られている。これらの *E. sakazakii* による感染症は乳児用調製粉乳を介して発症するのではないかと推察されている。汚染実態調査によると一部の乳児用調製粉乳から僅かではあるものの本菌による汚染があることも報告されており、一部では広範囲に汚染している可能性も示唆されている。さらに調乳時においても環境からの汚染、特に調乳器具やヒトを介しての二次汚染も原因の一つとして危惧されており、本菌が感染にかかわる経路は多岐にわたっていると考えられる。本研究では調乳時における湯温と保管条件（調製から摂取までの保管温度と時間）を検討することによる乳幼児へのリスクの軽減に寄与することを目的に検討を行った。その結果、調乳では湯温は70℃以上、保管には5℃以下での保存がリスク低減に有効であった。

研究協力者：

露木 朝子 日本大学生物資源科学部
古川 壮一 日本大学生物資源科学部
森永 康 日本大学生物資源科学部

における発症は確認されていないためか、食品の汚染実態や発症に関連する報告は少なく、特に、乳児用調製粉乳の調乳と *E. sakazakii* のリスクとの関連については明らかとなっていない。

A. 研究目的

現在のところ *E. sakazakii* における感染経路は完全に解明されているわけではないが、乳児用調製粉乳を介した感染例が報告されており、この経路が最も重要な感染源として考えられている。わが国においては *E. sakazakii*

そこで、本研究では調乳時における湯温が *E. sakazakii* の殺菌に及ぼす影響と保管する温度が *E. sakazakii* の増殖を抑制する条件を探索することによって乳幼児へのリスクの軽減に寄与することを目的に検討を行った。

B. 研究方法

供試材料

実験に使用した乳児用調製粉乳（PIF）は市販されている M 社製の調製粉乳を使用した。哺乳瓶は N 社製 120ml 容ガラス製哺乳瓶とポリプロピレン製哺乳瓶を用いた。

供試菌株

供試した菌株は *E. sakazakii* ATCC 29004 株、市販 PIF から検出された *E. sakazakii* HT 022 株、*E. sakazakii* HT028 株の計 3 菌株を使用した。各菌株は TSB 培地を用いて、37°C で 24 時間 2 代継代培養して実験に使用した。

生菌数および *E. sakazakii* 数の計測

市販 PIF からの生菌数の計測は食品衛生検査指針に準じて行った。すなわち PIF 25g をストマフィルターに採取し、225ml の 0.1% ペプトン加生理食塩水を加えてストマッキング処理を行い、懸濁液を適宜希釈して Plate count agar を用いて平板塗抹し、37°C で 48 時間培養後、発育した集落を計測し、生菌数および生残菌数を求めた。接種実験における *E. sakazakii* の計測は、生菌数と同様の条件で行い、発育した黄色の集落を計測した。また、市販 PIF からの *E. sakazakii* の検出および計測は、酵素反応を利用した選択培地である ESA 培地を用いて平板塗抹し、45°C で 48 時間培養後、発色した青色の集落を計測した。

調乳における温度変化の測定

各実験における温度の計測は、デジタル温度計を用いて測定を行った。

実験方法

1. *E. sakazakii* の殺菌および推移に関する基

礎的検討

1) 加熱温度が殺菌に及ぼす影響

滅菌ガラス製哺乳瓶に所定量の PIF を添加し、加温した滅菌精製水を加え攪拌溶解後、電子恒温槽で 55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C に保持した。各設定温度になったことを確認後、*E. sakazakii* を接種し、攪拌しながら 2 分間加熱処理を行い、処理後 PIF を取り出し、残存菌数を計測した。

2) *E. sakazakii* の熱抵抗性（D 値）の検討

食品から検出された HT 028 株は、ガラス製哺乳瓶に所定量の PIF と加温滅菌精製水を加え溶解後、攪拌しながら 52°C の恒温槽に保持した。設定温度を確認後 HT 028 株を接種し、0、1、2、3、4、5 分後に取り出した後、氷水中で急冷し、生残菌数を計測した。ATCC 29004 株と HT 022 株は、60°C の温度を選択し、HT 028 株と同様に菌液を接種し、0、2、4、6、8、10 分の処理を行い、直ちに取り出し氷水中で急冷し、同様に残存菌数を計測した。これらの結果からそれぞれの 3 菌株の D 値を算出した。

3) 保管温度における *E. sakazakii* の推移

調乳後汚染した *E. sakazakii* が環境温度下での推移を検討した。保管温度は 5°C、10°C、25°C の 3 条件に調製した。滅菌ガラス哺乳瓶に所定の PIF を入れ、加温滅菌精製水を加えて溶解後、各保存温度に保存した。設定温度になったことを確認後、*E. sakazakii* を接種し、各保存温度別に保存した。保存開始後 0、4、8、12、16、20、24 時間ごとに取り出し、生菌数を計測した。

2. 調乳温度および調乳後の保管温度が *E.*

sakazakii の推移に及ぼす影響

1) 調乳時の加温による殺菌効果と調乳後の保管温度での推移

実際に使用するガラス哺乳瓶を用いて調乳した際の加温による *E. sakazakii* の殺菌効果と調乳後の各保管温度における推移を検討した。まず、調乳時における環境温度を考慮し、滅菌ガラス哺乳瓶を予め冬期温度 10°C、春秋期温度 25°C、夏期温度 30°C に保温しておき、調乳に用いる湯の温度として 60°C、70°C、80°C の 3 種類の温度帯を選択した。また、調乳後の保管温度としては 10°C、25°C、30°C の 3 条件を設定した。すなわち 10°C、25°C、30°C に保温した哺乳瓶に所定の PIF を添加し、次に *E. sakazakii* の 3 株をそれぞれ接種した後、60°C、70°C、80°C の滅菌精製水を加えて 2 分間攪拌溶解を行った。その後 10°C、25°C、30°C の各温度で 300 分まで保存した。その保管開始 0、30、120、300 分後に取り出して生菌数を計測した。なお、調乳温度と保管温度の組み合わせは、調乳 60°C - 保管 25°C、調乳 70°C - 保管 30°C、調乳 70°C - 保管 25°C、調乳 70°C - 保管 10°C、調乳 80°C - 保管 25°C の 5 条件について検討した。

2) 哺乳瓶容器の素材が殺菌および推移に及ぼす影響

調乳の際に使用する哺乳瓶の材質、すなわちガラス製の哺乳瓶とポリプロピレン製の哺乳瓶が *E. sakazakii* の死滅に及ぼす影響を検討した。各哺乳瓶は 25°C に保温し、所定の PIF を添加後、直ちに 70°C の滅菌精製水と ATCC 29004 株を接種し、2 分間攪拌溶解を行った。溶解後 25°C で 300 分保存した。保管開始 0、30、120、300 分後に取り出し、その間の生菌数を計測した。

3) ガラス製哺乳瓶の予備加熱が *E.*

sakazakii の殺菌に及ぼす影響

25°C に保持したガラス製哺乳瓶に 70°C の滅菌精製水を加え、1 分間攪拌接触させ除去した。直ちに所定の PIF と ATCC 29004 株を接種し、70°C 滅菌精製水を加え 2 分間攪拌溶解を行い、25°C に 300 分保存した。保管開始 0、30、120、300 分後に取り出し、その間の生菌数を計測した。なお、対照として予備加熱しない処理も同様に計測を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

1. *E. sakazakii* の殺菌および推移に関する基礎的検討

1) 湯温の加熱温度が殺菌に及ぼす影響

調乳に用いる湯温の殺菌効果を調べるために、55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C を設定し、*E. sakazakii* に対する死滅効果を Table 1 に示した。ATCC 29004 株では湯温 80°C、75°C、70°C・2 分処理では検出されず、65°C では 3.04 log CFU/ml、60°C で 6.31 log CFU/ml、55°C では 6.84 log CFU/ml 検出された。次に HT022 株では、80°C から 65°C では検出されず、60°C で 2.91 log CFU/ml、55°C で 6.10 log CFU/ml 検出された。さらに HT 028 株については、今回設定した温度帯で最も低い湯温 55°C でのみ検出された。以上の結果より、加熱温度が低くなるにつれて菌数は残存する傾向が認められた。ATCC 29004 株が最も耐熱性が高く、次いで食品から検出された HT 022 株、最後に HT 028 株となった。特に HT 028 株は他の 2 菌株に比べ耐熱

性が低い傾向がみられた。

2) *E. sakazakii* の D 値の測定

食品の製造で加熱殺菌の指標となる D 値について検討を行った。(Fig.1~3) D 値は一定の温度において微生物が 1/10 に減少するのに要する時間を示す指標である。今回、ATCC 29004 株と HT022 株は加熱温度 60°C で、HT 028 株は 52°C を採用して検討を行った。その結果 ATCC 29004 株では D 値が 60°C で 3.6 分、HT 022 株では 60°C において 1.9 分であった。HT 028 株では他の 2 菌株に比較して耐熱性が低く、D 値は 52°C で 1.6 分となった。

3) 保管温度における *E. sakazakii* の推移

調乳後に *E. sakazakii* の残存や二次汚染があった場合を想定して保管温度における PIF 中の *E. sakazakii* の推移を検討した。その結果を Table 2 に示した。ATCC 29004 株と HT 022 株は、5°C および 10°C で増加が認められなかった。一方、耐熱性の低い HT 028 株では他 2 菌株同様 5°C では増殖が認められなかったものの、10°C 保存では増加する傾向が認められた。室温を想定した 25°C では供試した 3 菌株とも、保存 4 時間後には増殖が観察され、保存 8 時間後には 1~2 log CFU/ml の増加が認められ、保存 16 時間後には 8 log CFU/ml に達した。以上の結果より、*E. sakazakii* を 25°C に放置した場合には確実に増加することがあきらかとなった。さらに HT 028 株については 10°C でも増加する可能性が示唆された。

2. 調乳温度ならびに調乳後の保管温度が *E. sakazakii* の推移に及ぼす影響

1) 調乳による死滅とその推移

調乳の湯温が *E. sakazakii* の殺菌に及ぼす影響と調乳後の保管温度が菌数の推移に及ぼす

影響を検討した。その結果を Table3 に示した。

ATCC 29004 株では、湯温 60°C と保存温度 25°C の場合には湯温による殺菌効果はあまりみられず 6.91 から 6.54 log CFU/ml に僅かに減少したのみであったが、その後の 25°C 保存では急激な増加は認められなかった。湯温 70°C では殺菌効果はやや高まるものの、有効な殺菌効果は確認できなかった。しかし、保存温度に関しては、10°C、25°C、30°C でも菌数の増加は認められなかった。湯温 80°C の加熱処理では 5 log 減少し、有効な殺菌効果が認められものの、25°C 保存では菌数が増加する傾向が認められた。次に食品から検出された HT 022 株では、湯温 60°C での殺菌および保存中の増殖はみられなかった。70°C では 60°C よりも殺菌効果が認められ、4~5 log の死滅が確認された。しかし、保存試験において 10°C では菌数の増加が認められなかったのに対して、25°C および 30°C では菌数が増加する傾向が認められた。湯温 80°C では 70°C よりもさらに殺菌効果が認められたものの、保存試験においては菌数が増加する傾向が観察された。HT028 株では、湯温 60°C でも 2 log の減少が認められたものの、保管期間中増加する傾向が認められた。湯温 70°C では良好な菌数の減少が認められ、いずれも 4~6 log の殺菌効果が認められたものの、保管試験では保存 10°C を除き、25 °C および 30°C では菌が増加する傾向を示した。さらに湯温 80 °C では検出されなかったものの、調乳後時間の経過とともに検出されるようになり、保管の経過とともに増加する傾向が認められた。

以上のことから、調乳時の湯温が高いほど殺菌効果が認められた。なかでも湯温 80°C では 5 log 以上の良好な殺菌効果が認められた。調乳後の保管温度については、多くは 10 °C では増

加を抑制する傾向が認められたのに対して、25℃および30℃では増加する傾向が認められた。

さらに保管期間における哺乳瓶中の温度の推移を Fig.4 に示した。調乳後の温度は湯温 60℃と保存 25℃の組み合わせでは 48.3℃、湯温 70℃と保存 10℃では 55.5℃、湯温 70℃と保存 25℃では 58.1℃、湯温 70℃と保存 30℃では 58.7℃、湯温 80℃と保存 25℃では 60.2℃を示した。湯温が高いほど調乳後の温度は高い傾向が認められた。保存温度は 80 分~120 分経過後に設定温度に達した。

2) 哺乳瓶の材質が *E. sakazakii* の殺菌に及ぼす影響

調乳に用いる哺乳瓶の材質が *E. sakazakii* の殺菌および調乳後保管中の菌数の推移に及ぼす影響について検討を行った。その結果を Table 4 に示した。最も多く使用されるガラス哺乳瓶について 70℃・2 分間処理した結果では、当初 7.04 log CFU/ml が処理後には 6.14 log CFU/ml に 1 log オーダーの減少を示した。これに対してポリプロピレン製哺乳瓶では 7.08 log CFU/ml から 4.94 log CFU/ml と 2 log CFU/ml の減少が得られた。したがってガラス製に比較してポリプロピレン製は 1 log 程良い殺菌効果が得られた。

ガラス製哺乳瓶を用いた調乳後の温度は 57.9℃、ポリプロピレン製哺乳瓶では 61.5℃とガラス製哺乳瓶より 4℃程度高く、この温度差が殺菌効果の差になったものと推察された。これはガラス製哺乳瓶が湯温の熱を吸収し、温度が低下してしまったのに対して、ポリプロピレン製は湯温の温度低下が少なかったためにより高い殺菌効果が認められたものと考えられ

た。一方、保管期間中両瓶での菌数の増加は認められず違いは認められなかった。

3) 哺乳瓶の予備加熱が *E. sakazakii* の死滅に及ぼす影響

ガラス哺乳瓶を 70℃・50ml のお湯で予備加熱処理したものとし、しないものを比較した

(Table 5)。予備加熱処理を行った場合には 5.34 log CFU/ml、未処理の場合には 6.14 log CFU/ml となり、予備加熱処理を行うことで 1 log 程度の殺菌効果が得られた。調乳直後の品温は予備加熱を行った場合 62.7℃、予備加熱を行わない場合は 58.1℃と予備加熱していないものの方が 5℃程度低く、これらの温度差が殺菌効果の差になったものと推察された。保存試験では両処理とも保存期間中菌数は増加せず推移した。したがって、ガラス哺乳瓶で調乳する際には、一度お湯でガラス瓶を温めておいてから PIF を溶解させた方が *E. sakazakii* の殺菌効果がより得られるものと考えられた。

D. 考察

わが国では *E. sakazakii* は日和見感染菌として知られていたものの、乳幼児の感染に関しては注目されていなかった。近年、“乳児用調製粉乳中の *E. sakazakii* に関する FAO/WHO 合同専門家会議”が開催され、*E. sakazakii* の PIF からの感染のリスクに関する科学的な検討が行われ、PIF の *E. sakazakii* による汚染は乳児の感染および疾患の原因となると勧告された。このような背景から日本でも PIF における *E. sakazakii* の汚染実態の把握や感染防止対策の検討が必要となってきた。*E. sakazakii* はグラム陰性の桿菌で食品や環境に広く分布しているが、食品における分布や汚染菌数などについて

ての我が国での情報は少ない。特に *E. sakazakii* は成人に対する感染力は弱いことから、問題となるのは PIF を利用する乳児における感染と考えられる。

一方、PIF は乳製品という特性からすべての微生物を除去することは困難なため、*E. sakazakii* や他の病原菌による汚染リスクを常に想定されなければならない。しかしながら、汚染菌数や発症に必要な菌数も把握されていないため、*E. sakazakii* については調乳および保管時の温度管理や衛生管理などで予防しなければならないのが現状である。新生児、特に早産、未熟児、免疫障害児におけるリスクが高いために、*E. sakazakii* の汚染は低レベルであっても重大な危険因子と考えられている。さらに現在の技術では粉乳の完全無菌化は不可能といわれているため、保管・調乳・授乳時においてリスクを効果的に減少させる対策を講じる必要もあると思われる。

今回、PIF の調乳後の取り扱いにおける *E. sakazakii* のリスク低減のための対策について検討を試みた。その結果、供試した菌株の耐熱性は ATCC 29004 株が最も高く、次いで HT 022 株、HT 028 株の順であった。D 値については ATCC 29004 株と HT 022 株は 60℃ で 3.6 分と 1.9 分となり、HT 028 株は 52℃ において 1.6 分であった。*E. sakazakii* は菌株による熱抵抗性は菌株より違いが大きい点が注意を要する。

次に実際の PIF 調乳の湯温における殺菌効果を検討した結果、菌株によって差はみられるものの、いずれも 80℃ の湯温では 5 log 以上の高い殺菌効果がみられ、特に耐熱性の低い HT 028 株では効果が顕著であった。しかし、70℃ の湯を用いた場合でも ATCC 29004 株では 1 log CFU/ml ほどの死滅効果しか得られなかつ

た。PIF の汚染菌数は非常に低いことから、70℃ 以上の温度であればかなり効果があると思われるが、より安全性を求めるには殺菌効果が高い 80℃ の湯温が有効と思われた。

さらに実際の調乳では、溶解させる湯温や保管温度のみならず、取り扱う器具の材質も温度変化に影響することが考えられた。そこでまず哺乳瓶の材質に注目して検討を行ったところ、ガラス製哺乳瓶を使用しての PIF の調製は、60℃ の湯温では哺乳瓶に熱が吸収されるために *E. sakazakii* の有効な死滅効果が認められなかった。70℃ でも効果は高まるものの菌株によっては効果が得られなかった。これに対してポリプロピレン製哺乳瓶の場合は有意に殺菌効果が向上した。さらにガラス製哺乳瓶でも予め加熱しておくことで殺菌効果を高めることが確認され、哺乳瓶の予備加熱は有効な処理と考えられた。調乳後の保管温度については保存 25℃ および 30℃ では数時間で菌数が増加する傾向が認められ、さらに菌株においては 10℃ でも増加する傾向が認められたので、調乳後の PIF を保管する場合は 10℃ よりも 5℃ での保存が望ましいことが確認された。Nazarowec-White らは IPF 中での *E. sakazakii* の最低発育温度を検討しており、臨床株では最低発育温度が 5.5～8.0℃、食品由来株では 5.5～7.5℃ であることを報告している。これらの結果からも調整後の PIF の保管は 5℃ の保存が望ましいと考えられた。

E. 結論

以上のことから、調乳に使用する湯温は 70℃ 以上を保ち、できれば 80℃ で調製することが、*E. sakazakii* の死滅に有効であったことから、調乳のリスクを低減することのできる最

善の予防策と考えられた。さらに調乳後の保管は5℃以下で保存し、数時間以上の保管は避けることが *E. sakazakii* のリスクを軽減するために重要であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 日本食品衛生学会での投稿予定

2. 学会発表

(1) 日本食品衛生学会への発表予定

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

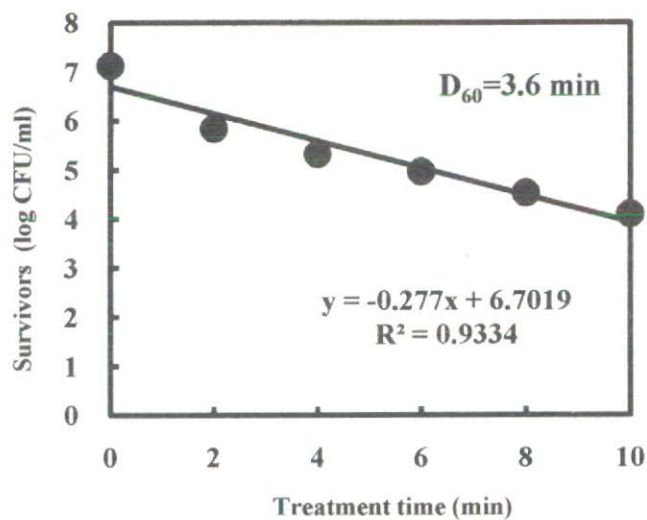
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ATCC	0	2	4	6	8	10
min						
2回目	7.08	5.69	5.26	4.90	4.32	3.95
3回目	7.15	6.04	5.46	5.20	4.79	4.41
4回目	7.15	5.79	5.26	4.81	4.49	3.95
ave	7.13	5.84	5.33	4.97	4.53	4.10



D value
3.610108

Fig.1 Thermal inactivation of *E. sakazakii* ATCC 29004 in reconstituted Powdered Infant Formula at 60 °C.

022		0	2	4	6	8	10
min							
1回目		7.11	6.36	5.00	3.32	4.65	2.85
2回目		7.11	5.98	5.00	3.91	3.20	1.30
4回目		7.00	6.15	4.85	3.90	1.53	1.45
ave		7.07	6.16	4.95	3.71	3.13	1.87

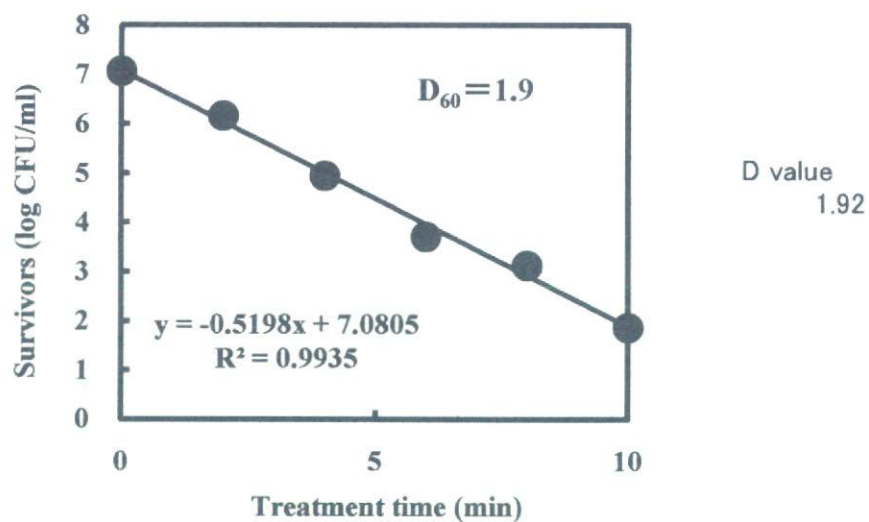


Fig. 2 Thermal inactivation of *E. sakazakii* HT 022 in reconstituted Powdered Infant Formula at 60 °C.

sec	0	60	120	180	240	300
1回目	6.55	5.99	5.73	4.32	4.08	3.62
2回目	6.55	6.38	6.18	5.23	4.51	3.43
3回目	6.55	5.91	5.74	5.04	4.48	3.30
ave	6.55	6.09	5.88	4.86	4.36	3.45
min	0	1	2	3	4	5
ave	6.55	6.09	5.88	4.86	4.36	3.45

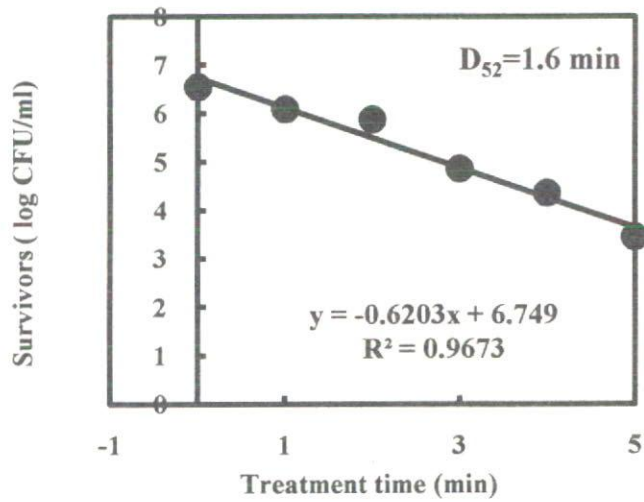
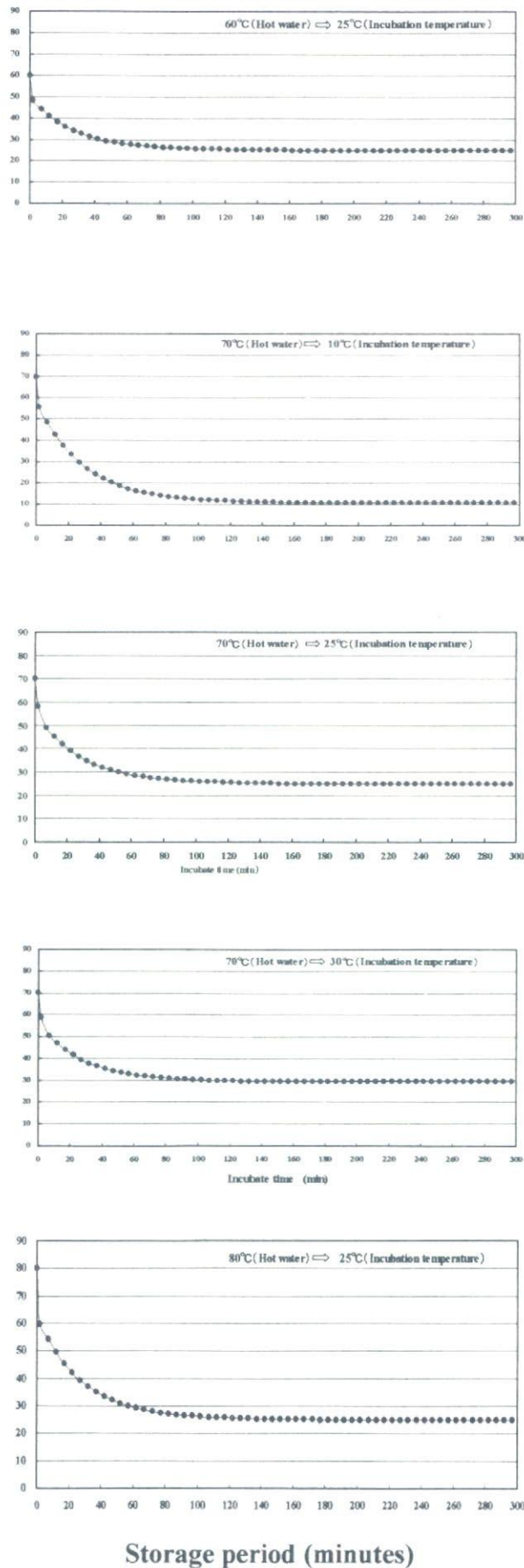


Fig. 3 Thermal inactivation of *E. sakazakii* HT 028 in reconstituted Powdered Infant Formula at 52 °C

Water temperature (°C)



Storage period (minutes)

Fig. 4 Temperature profile of reconstituted Powdered Infant Formula followed by thermal treatment at 60°C, 70°C and 80°C during storage at 25°C for 300 minutes.

Table 1 Survival of *E. sakazakii* ATCC 29004, *E. sakazakii* HT 022, *E. sakazakii* HT 028 after reconstitution of Powdered Infant Formula with hot water at different temperatures

Temperature (°C) of hot water added to Powdered Infant Formula	<i>E. sakazakii</i> (log CFU/ml)					
	<i>E. sakazakii</i> ATCC 29004		<i>E. sakazakii</i> HT 022		<i>E. sakazakii</i> HT 028	
	Before	After	Before	After	Before	After
80°C	7.00±0.11	ND	ND	ND	6.39±0.20	ND
75°C		ND	ND	ND		ND
70°C		ND	ND	ND		ND
65°C		3.04±0.29	6.90±0.14	ND		ND
60°C		6.31±0.10		2.91±0.11		ND
55°C		6.84±0.10		6.10±0.07		0.67±0.19

ND, None detected : <1 CFU/ml of Powdered Infant Formula by direct plating on plate count agar

Table 2 The relationship between storage temperature and growth of *E. sakazakii* ATCC 29004, *E. sakazakii* HT022, *E. sakazakii* HT 028 in reconstituted Powdered Infant Formula

Strain	Storage temperature (°C)	Storage times (hours) / <i>E. sakazakii</i> (Log CFU/ml)						
		0	4	8	12	16	20	24
<i>E.sakazakii</i> ATCC 29004	5 °C	3.98	3.79	4.04	3.88	3.94	3.89	4.08
	10°C	4.04	3.89	4.08	4.08	4.18	4.15	4.15
	25°C	3.89	4.79	6.56	7.86	8.41	8.49	8.81
<i>E.sakazakii</i> HT 022	5°C	4.04	4.08	4.04	4.00	4.08	3.93	3.92
	10°C	4.15	3.99	4.11	4.18	4.11	4.15	4.18
	25°C	3.91	4.87	6.61	7.96	8.00	8.41	8.72
<i>E.sakazakii</i> HT 028	5°C	3.59	3.59	3.56	3.36	3.43	3.68	3.65
	10°C	3.56	3.56	3.48	3.40	3.90	4.51	4.34
	25°C	3.58	4.04	5.52	7.26	8.11	8.17	8.34