

Table 3 The effect of the hot water temperature and the storage temperature of reconstituted Powdered Infant Formula on survival and growth of *E. sakazakii* ATCC 29004, *E. sakazakii* HT022 and *E. sakazakii* HT 028.

| Strains | Hot water & Strage temperature (°C) | <i>E. sakazakii</i> (log CFU/ml) | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------|-----------|--------------------|-----------|--|
| | | Reconstitution | | | Strage times (min) | | |
| | | Before (0 min) | After (2 min) | 30min | 120min | 300min | |
| <i>E. sakazakii</i> ATCC 29004 | 60°C – 25°C | 6.91±0.28 | 6.54±0.18 | 6.76±0.12 | 6.67±0.41 | 7.32±0.12 | |
| | 70°C – 10°C | 6.95±0.01 | 6.32±0.17 | 6.23±0.05 | 6.14±0.16 | 6.19±0.08 | |
| | 70°C – 25°C | 7.04±0.07 | 6.14±0.09 | 5.93±0.13 | 5.70±0.43 | 5.85±0.11 | |
| | 70°C – 30°C | 6.94±0.10 | 5.68±0.12 | 5.22±0.13 | 5.13±0.23 | 5.16±0.61 | |
| | 80°C – 25°C | 6.96±0.01 | 1.41±0.95 | 1.34±1.07 | 1.73±1.28 | 2.66±1.72 | |
| <i>E. sakazakii</i> HT 022 | 60°C – 25°C | 6.92±0.07 | 6.20±0.02 | 6.27±0.62 | 6.00±0.08 | 6.07±0.26 | |
| | 70°C – 10°C | 6.99±0.09 | 2.57±0.26 | 2.66±0.21 | 2.68±0.18 | 2.77±0.25 | |
| | 70°C – 25°C | 6.99±0.11 | 2.38±0.69 | 2.59±0.64 | 2.92±0.91 | 4.01±0.82 | |
| | 70°C – 30°C | 6.84±0.07 | 0.92±0.31 | 0.84±0.23 | 0.68±0.52 | 2.56±0.59 | |
| | 80°C – 25°C | 6.93±0.01 | 0.16±0.23 | 1.94±0.78 | 2.38±0.71 | 3.62±0.71 | |
| <i>E. sakazakii</i> HT 028 | 60°C – 25°C | 6.27±0.14 | 3.42±0.05 | 2.91±0.59 | 3.20±0.37 | 3.84±0.32 | |
| | 70°C – 10°C | 6.20±0.00 | 2.02±0.33 | 2.60±0.69 | 2.58±0.80 | 2.60±0.79 | |
| | 70°C – 25°C | 6.34±0.14 | ND | 0.47±0.47 | 1.17±0.42 | 1.74±0.22 | |
| | 70°C – 30°C | 6.75±0.16 | ND | 1.15±1.13 | 1.35±0.96 | 1.92±1.71 | |
| | 80°C – 25°C | 6.27±0.14 | ND | 0.30±0.24 | 0.41±0.58 | 0.74±0.74 | |

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

Table 4 The effect of the materials of feeding bottles on survival and growth of *E. sakazakii* ATCC 29004 in Powdered Infant Formula reconstituted with hot water (70°C) and stored at 25 °C.

| Feeding bottles (Materials) | <i>E. sakazakii</i> (log CFU/ml) | | | | | |
|--------------------------------|------------------------------------|----------------|-----------------------|-----------|-----------|--|
| | Reconstitution | | Storage times (min) | | | |
| | Before (0min) | After (2min) | 30min | 120min | 300min | |
| Glass bottle | 7.01±0.06 | 6.14±0.09 | 5.93±0.13 | 5.70±0.43 | 5.85±0.11 | |
| Polypropylene bottle | 7.05±0.10 | 4.94±0.44 | 4.34±0.16 | 4.23±0.17 | 4.64±0.49 | |

Table 5 The effect of pre-heating treatment on survival and growth of *E. sakazakii* ATCC 29004 in reconstitution Powdered Infant Formula

| Preparation conditions | <i>E. sakazakii</i> (log CFU/ml) | | | | | |
|-----------------------------|------------------------------------|----------------|-----------|-----------------------|-----------|--|
| | Reconstitution | | | Storage times (min) | | |
| | Before (0min) | After (2min) | 30min | 120min | 300min | |
| Treatment ^{a)} | 7.13±0.03 | 5.34±0.25 | 4.81±0.34 | 4.70±0.43 | 4.67±0.51 | |
| Non treatment ^{b)} | 7.04±0.11 | 6.14±0.09 | 5.93±0.13 | 5.70±0.43 | 5.85±0.11 | |

Treatment ^{a)} : a glass bottle was pre-heated for 30 sec with 50ml 70 °C hot water, then the hot water was discarded, followed by the reconstitution of Powdered Infant Formula with 100ml 70 °C hot water.

Non treatment ^{b)} : Powdered Infant Formula was reconstituted with 100ml 70°C hot water by mixing for 2 min in a glass bottle which was not pre-heated.

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）

分担課題名：乳幼児食品中の病原微生物に関する研究
E. sakasakii 菌の乳製品汚染とその対策に関する研究

大阪薬科大学薬学部・教授・天野富美夫

研究要旨

乳製品等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 *Enterobacter sakasakii* (ES) 菌の汚染に関する評価法ならびに病原性等の菌の性質の解明およびその対策に関する研究をするため、本年度は、昨年度の研究成果を基に、ES の標準菌株の乾燥耐性の比較、乾燥耐性獲得における栄養因子の役割、ならびに lactoferrin (LF) および apolactoferrin (apoLF) の添加による乾燥耐性獲得に対する阻害効果の研究を行った。その結果、ES 菌株は乾燥に対する感受性が異なるものがあり、ESC1#1、ESC1#4、および ESC1#5 の 3 株を調べた結果、いずれも saline 中では感受性を示して生残性を消失したが、LB 培地や調整粉乳などの栄養因子存在下では ESC1#1 が最も高い乾燥耐性を獲得することが明らかになった。ESC1#1 株を用いてさらに詳細な検討を行った結果、スキムミルク、コーンポタージュなどの乾燥食品・飲料を溶液にして共存させた場合にも、乾燥耐性を賦与することが示されたが、ミックス果汁では効果が認められなかった。また、LB 培地、調整粉乳の乾燥耐性賦与における至適濃度を調べた結果、それぞれ 20%、および 1 mg/mL 以上、であった。次に、LF および apoLF の ES の乾燥耐性獲得に及ぼす影響を検討した結果、いずれの栄養因子存在下でもこれらはともに強い阻害効果を示したが、後者の方が強い阻害を示した。とくに、20%LB 培地存在下では両者とも 0.01 mg/mL 以上で対照の 1/50 以下に生残性を低下させ、1 mg/mL 調整粉乳存在下では両者とも 1/3 以下に低下させた。調整粉乳での阻害効果が低い理由の一つとして、粉乳に含まれる脂肪分の関与が考えられる。一方、LF および apoLF の ES に対する抑制作用は、ES の乾燥に対して特徴的であり、LB 培地中での液体振とう培養系では増殖に対する効果が見られなかった。以上の結果から、ES の乳製品汚染には、種々の菌株ごとに感受性の違いのある乾燥耐性が関与しており、栄養因子としての乾燥食品の製造過程における管理 (HACCP) が重要であること、および、乾燥の過程で LF や apoLF を低濃度で添加することによって ES の生残性をかなりの程度、低下させることが可能であることが示唆された。

協力研究者

協力研究者名：成瀬友夏里、田村愛

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し、その対策を検討することを目的とする。

B. 研究方法

ES 菌株の標準株、ESC1#1、ESC1#4、および ESC1#5 の 3 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戴いた。

菌の培養： -80℃で保存した菌株を LB 培地中で一晩、振とうしながら 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 分間振とう培養した。

乾燥耐性の評価： ES 菌株を前前培養およびそれに続く対数増殖期までの前培養を行った後、氷冷した生理食塩水 (saline) で 3 回、繰り返し洗浄した。これを氷冷した saline で 1x10⁹ cfu/ml になるように懸濁した。次に、滅菌したマイクロチューブに菌液を最終濃度 1x10⁸ cfu/ml となるように加え、さらに LB 培地、市販の乳幼児用調整粉乳、コーンポタージュスープあるいはミックス果汁等を溶解してろ過滅菌したものを適宜添加して氷冷した。

Lactoferrin (LF) あるいは apolactoferrin (apoLF) (六甲バター株式会社の御恵与による) は上記の滅菌マイクロチューブに添加し、以下の操作に用いた。すなわち、栄養因子等を添加して氷上に置いた菌液から 10 μl ずつを分取し、50 ml の 0.45 μm 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。通常、一晩 (18~24 時間) の乾燥の後、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ていた菌のコロニー数に対する相対値 (%) で示した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

(1) ES 菌株による乾燥耐性の違い： Fig. 1 より、調べた 3 つの菌株はいずれも生理食塩水 (saline) 中では乾燥耐性を示さず、LB 培地、または調整粉乳の存在下で乾燥耐性を示した。一方、lactoferrin 中では最も高い乾燥耐性を示したのは ESC1#1 であった。これに対し ESC1#4 では、どの栄養物質を加えても乾燥耐性はほとんどなかった。ESC1#5 では ESC1#1 と ESC1#4 の中間の作用を持つことが考えられる。また、ESC1#1 に関しては乾燥させなかった菌に対して LB では約 20%、粉乳では 25% の菌が生き残っていることから考えて、乾燥耐性の高い菌株であることが考えられる。以上の結果から、ES 菌が乾燥耐性を得るためには何らかの栄養物質が必要であること、および、ES の菌

株の種類によって乾燥耐性の強弱に差があることが示唆された。

(2)ES 菌の乾燥耐性獲得に及ぼす lactoferrin の影響: 上記の研究で最も高い乾燥耐性を示した ESC1#1 株を用いて、LB 培地中での乾燥時に lactoferrin を添加し、乾燥終了後の菌の生存性を調べた。Fig. 1 に示すように、lactoferrin 自体には ES 菌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のにもかかわらず、lactoferrin の用量依存的に ESC1#1 株の乾燥耐性が低下した (Fig. 2)。これと同様の結果が apolactoferrin の添加によっても観察され、lactoferrin の分子内に結合している鉄イオンの数によらず、ES 菌の乾燥耐性を低下させることが示された。

次に、LB 培地以外の栄養因子の存在下に獲得される ESC1#1 株の乾燥耐性に及ぼす lactoferrin および apolactoferrin の影響を調べた。その結果、Fig. 3 に示すように、LB 以外に、調整粉乳、スキムミルク、コーンポタージュなどの存在下で獲得される乾燥耐性は、いずれも、1 mg/mL の lactoferrin および apolactoferrin によって強く阻害された。なお、阻害の割合は apolactoferrin の方が強かったので、分子内に鉄を結合していないことによって、より強い乾燥耐性の阻害が見込まれる。

D. 考察

調整粉乳などの乾燥食品を含む乳幼児向けの食品の安全管理は、免疫力の十分に発達していない児にとって、極めて重要である。とりわけ、HACCP 等のさまざまな取り組むにもかかわらず ES 菌が高頻度に検出され、乳幼児の下痢、腸炎、あるいは重症化した場合の髄膜炎の原因となっている事態に対して、早急な取り組みが

必要である。

本研究は、使用した ES 菌が標準株であって臨床分離株ではなかった、という制限があるものの、用いた菌株の種類によって乾燥耐性の獲得能が異なること、および、耐性の獲得には栄養因子の存在が重要な鍵を握ること、さらに lactoferrin や apolactoferrin を低濃度でも混合することによって、この乾燥耐性の獲得が著しく抑えられること、が明らかにされた。これらは、現在、および今後の乳児用食品の開発や改良、あるいは保存に対して、重要な示唆を含む。すなわち、可能な限り、lactoferrin を使用し、混合することによって ES 菌の乾燥耐性の獲得を抑制し、食事に供するときには特別な加熱処理等を施さなくても安全な食品を提供することが可能であることを示唆する。今後、実用化に向けた研究を行い、一日も早く ES 菌の感染の脅威のない、安全な乳幼児用の食品による食生活を実現したい。

E. 結論

本研究はおもに3つの結論からなる。

- (1) ES 菌株の種類によって、乾燥耐性の獲得能に差が見られる。
- (2) ES 菌の乾燥耐性の獲得のためには、調整粉乳などのある種の栄養因子が必要である。
- (3) ES 菌の栄養因子依存的な乾燥耐性の獲得に対し、lactoferrin および apolactoferrin は強い阻害効果を示す。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1)天野富美夫 「サルモネラの環境中における

る生残性と病原性発現機構との関連」 J. Veterinary Med. 60 (2007) 589-590.

環境トキシコロジー、2007年10月、大阪市

2. 学会発表

- (1) 天野富美夫 「サルモネラの環境中における生残性と病原性発現機構との関連」 第143回日本獣医学会学術集会ワークショップ「微生物の生残戦略と病原性の関連」 2007年4月、つくば市
- (2) 田村愛、成瀬友夏里、山崎学、五十君静信、天野富美夫 「サルモネラの乾燥耐性を調節する遺伝子ならびに環境因子の研究」 日本薬学会 フォーラム2007：衛生薬学・

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
（予定） 「Lactoferrin あるいはapolactoferrin による乾燥食品の保存における食中毒起因菌の抗菌作用」（六甲バター株式会社；申請準備中）
2. 実用新案登録
3. その他

Fig.1 ESの菌株による乾燥耐性の違い

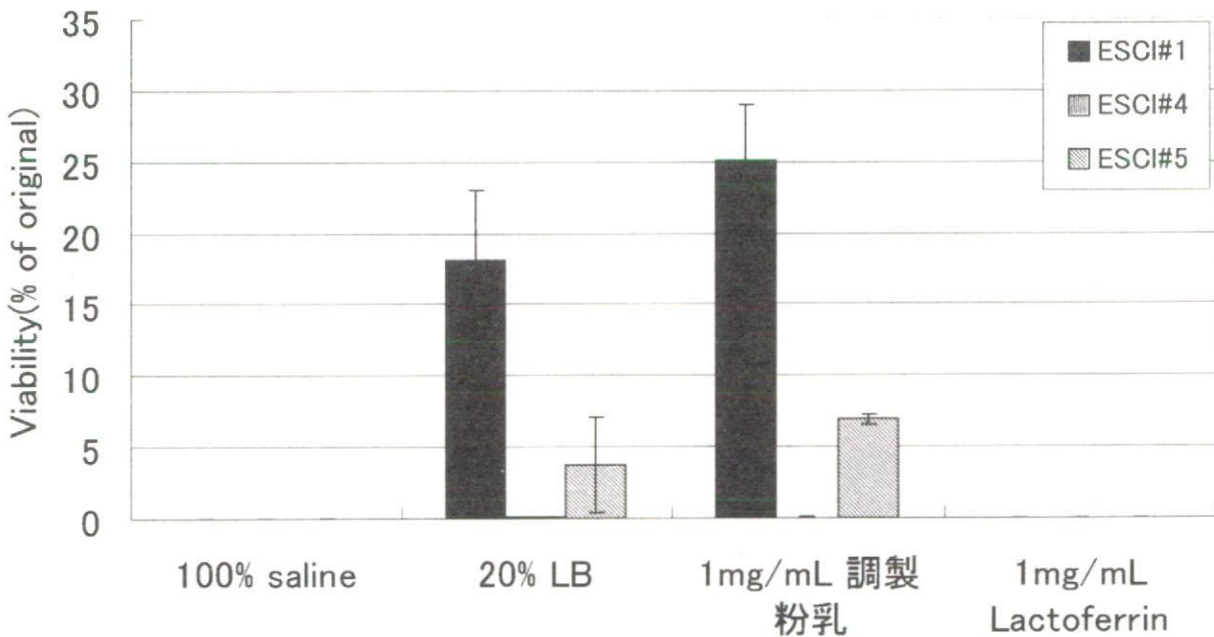


Fig.2 ESCI#1 の LB 培地中での乾燥耐性獲得に及ぼす Lactoferrin と Apolactoferrin の影響

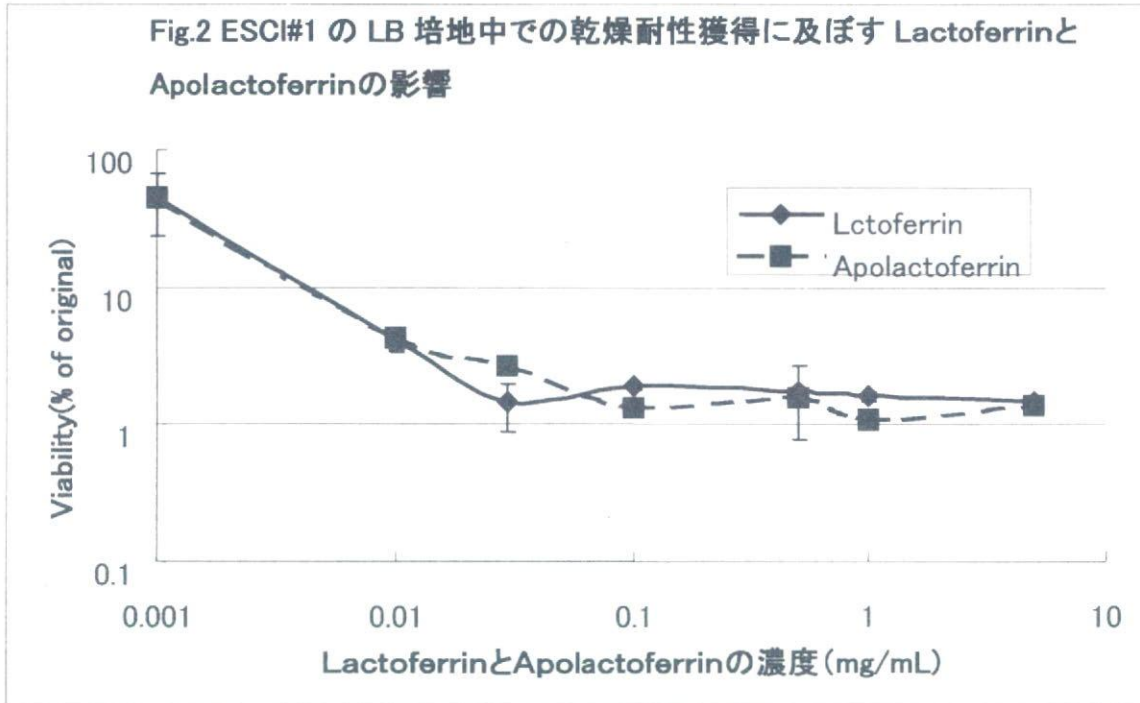
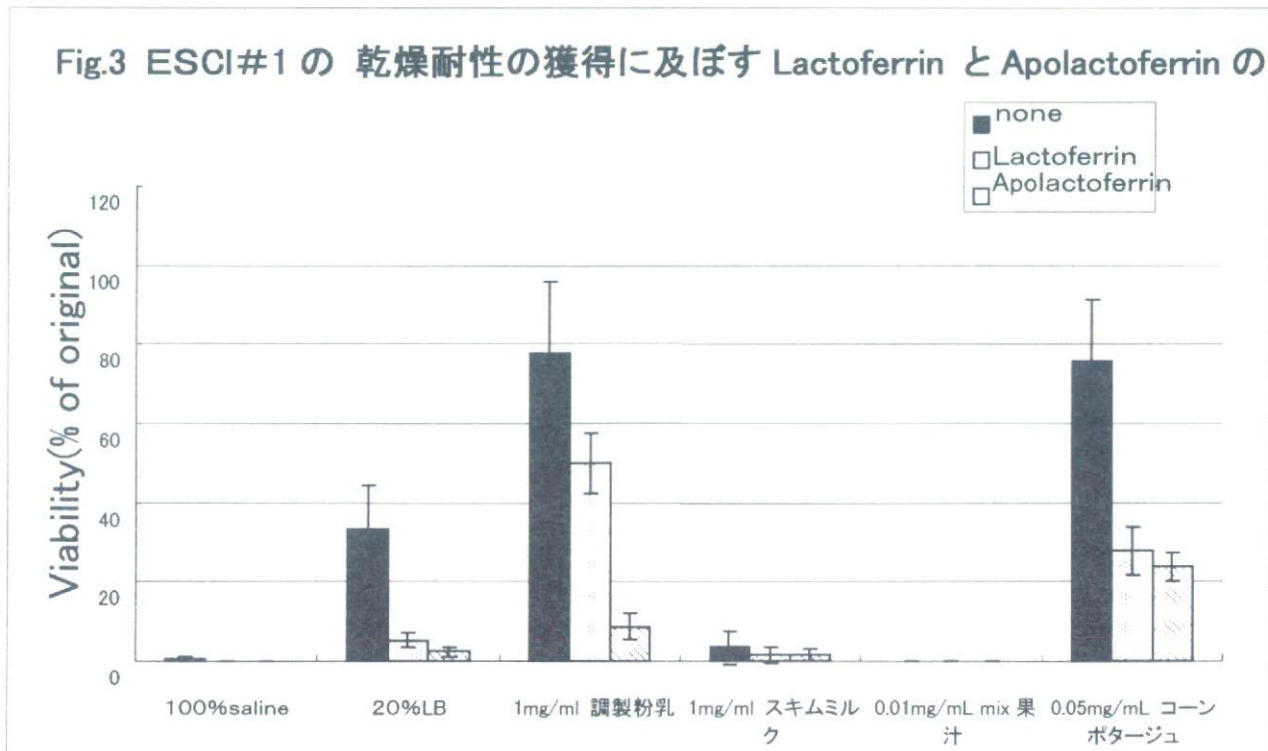


Fig.3 ESCI#1 の 乾燥耐性の獲得に及ぼす Lactoferrin と Apolactoferrin の影響



厚生労働科学研究費補助金（食の安心・安全確保推進研究事業）
（分担研究報告書）

分担課題名：市販乳児用調整粉乳の *E. sakazakii* 汚染実態調査

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 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 影山 亜紀子

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。エンテロバクター・サカザキは新生児・乳幼児に重篤な症状を及ぼす有害微生物として知られており、特に本菌に汚染された乳児用調製粉乳が問題となっている。前年に引き続き、乳児用調製粉乳の汚染実態調査を行うこととし、100 サンプルの乳児用調製粉乳を収集し、エンテロバクター・サカザキの有無を調査した。その結果2サンプルにおいてMPN最高濃度の100g 3検体のうち1検体からエンテロバクター・サカザキを分離したが、10g、1g各3検体からは検出されず、MPN法により菌数は0.36/100gであり、汚染菌数は去年の調査とほぼ同じ結果を示した。

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い。エンテロバクター・サカザキは新生児・乳幼児に髄膜炎などを引き起こすことが知られており、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¹⁾。病院内で発生した新生児の集団感染事例が報告されているが、これらは本菌に汚染された乳児用調製粉乳（powdered infant formula, PIF）との関連性が強く指摘されている^{2,3)}。乳児用調製粉乳へのエンテロバクター・サカザキ汚染経路としては、製造工程におけるものと溶解調整時の汚染が指摘されている。2005年度より3年間にわたり乳児用調製粉乳における汚染実態、分離菌株の解析、乳児用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てきた。今年度も

100 サンプルの乳児用調製粉乳についてMPN3法で定量的に調査を行った。

B. 研究方法

1. 乳幼児用調製粉乳の収集法

小売店から時期をずらして、同一ロットを含まないように、5社の乳幼児調製粉乳を購入することとした。幼児調製粉乳には通常の調製粉乳の他に牛乳アレルギー疾患用食品、母乳代替食品、調整粉末大豆乳など存在しており、保存容器も缶入り（320g～930gで各メーカーの同商品において通常大小2種類存在）や小包装タイプが存在しているため、これらを満遍なく購入することとした。

2. 乳幼児用調製粉乳からの検出法

本菌の検出には米国食品医薬局（FDA）の推奨する方法⁴⁾が一般的に普及している。

本法を基本とし、多少改良を加えた方法を用いることとした。すなわち 100 g 検体、10 g 検体、1 g 検体をそれぞれ 3 検体ずつ 9 倍量の PBS (Tris-Buffered Saline) に攪拌し、37°C で静置培養を行い、24 時間後、48 時間後、96 時間後に VRBG (Violet Red Bile agar with Glucose)、DHL (Desoxycholate Hydrogen sulfate Lactose) に 1 白金耳塗抹し 37°C で 24 時間培養後、コロニー成育の有無およびコロニー観察を行った。同時にサンプル添加 PBS の 1/100 量をその 9 倍量の EE broth (Enterobacteriaceae Enrichment broth) に添加し、37°C で静置培養を行い、24 時間後、48 時間後に VRBG および DHL に 1 白金耳塗抹し 37°C で 24 時間培養後、コロニー成育の有無およびコロニー観察を行った。成育したコロニーをクロモアガーおよび TSA (Tryptic Soy Agar) に植継ぎコロニー観察を行い、エンテロバクター・サカザキの疑いを示すかどうか確認した。

3. 乳幼児用調製粉乳から分離されたエンテロバクター・サカザキ様株の同定法

2 の方法により分離されたエンテロバクター・サカザキ様株について培養同定・一般細菌キット API20E (日本ビオメリュー株式会社) を用いて、説明書に従い同定を行った。さらに 16S rDNA 部分塩基配列は Iversen ら⁵⁾ のプライマー配列を用い、Iver-F : 5'-TGGAGAGTTTGATCCTG GCTC AG-3' および Iver-R 5'-TACCGCGG CTGCTGGCAC-3' を合成し、アニーリング 70°C、30 サイクル PCR 反応を行い、増幅産物を用いて塩基配列を決定した。

C. 研究結果

1. 乳幼児用調製粉乳の収集

国内メーカー5社の乳幼児用調製粉乳11種類を2007年6月から8月にかけて計100サンプル購入した。メーカー名をA~E、乳幼児調製粉乳の製品名をa~kで示し、内容を大缶(850g~930g)、小缶(320g~360g)、小包装(12.7g~13.5g×10~18本)の3つで示し、さらに乳幼児用調製粉乳の種類を示した(表1)。

2. 乳幼児用調製粉乳からの検出

100 サンプルについて MPN 3 法で定量的に調査を行ったところ 2 サンプル (サンプル 5 および 8) からエンテロバクター・サカザキが分離同定された。いずれも 100 g 3 検体中の 1 検体から分離され、10 g と 1 g の各 3 検体からは検出されなかった。MPN 法により菌数は 0.36/100 g と算出された。両サンプルは粉乳等溶液から 24 時間培養、48 時間培養、96 時間培養のいずれからも分離され、EE broth 培養においても 24 時間培養、48 時間培養のいずれからも分離された。両分離株は VRBG 培地上ではこげ茶、DHL 培地上では赤紫、クロモアガー培地上では青緑、TSA 培地上では黄色のコロニーであった。これらはエンテロバクター・サカザキのコロニー形態を良く一致していた。表 2 に乳幼児用調製粉乳等の種類によるエンテロバクター・サカザキの検出結果をまとめて示した。

3. 乳幼児用調製粉乳から分離されたエンテロバクター・サカザキ様株の同定

各培地におけるコロニー性状からエンテロバクター・サカザキであることが推測されたが、さらに詳細に同定を行う目的で API20E による同定と 16S rDNA 部分塩基配列の決定を行った。その結果、サンプ

ル5からの分離株はAPI20Eの結果、エンテロバクター・サカザキとの相同性が51.2%id (T=0.092)、サンプル8からの分離株はエンテロバクター・サカザキとの相同性が98.4%id (T=1)であった。さらに16S rDNA部分塩基配列の結果、サンプル5の分離株はエンテロバクター・サカザキATCC 29544と482塩基の比較で99.59%の相同性を示し、サンプル8は99.58%の相同性を示した。これらの結果より両分離株はエンテロバクター・サカザキであると結論付けた。

D. 考察

国内メーカー5社の計11種類の乳幼児用調製粉乳等100サンプルについて調査を行った結果、2サンプルからMPN法で0.36/100gのエンテロバクター・サカザキを検出した。2サンプルはそれぞれ異なるメーカーの調製粉乳であり、いずれも小缶入りタイプのものであった。今回検討している乳幼児用調製粉乳等におけるエンテロバクター・サカザキの検出は、国内の粉乳の規格と比較して1000倍以上という非常に高いレベルでの有無を検査している。今回検出されたエンテロバクター・サカザキは

いずれも非常に低いレベルであり、規格基準違反となるものではなかった。

E. 結論

100サンプル中2サンプルからエンテロバクター・サカザキが検出されたが、非常に低いレベルであった。昨年と比較しても特に増減はなく、各メーカーにおける製造工程の衛生対策は維持されているものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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

I. 引用文献

1. 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.
2. 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.
3. Centers for Disease Control and Prevention. 2002. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee, 2002. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 51: 197-300.
4. 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>
5. 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.

表 1. 検査した市販乳幼児用調製粉乳等の一覧

| 試料 番号 | 製造 | 製品名 | 賞味期限 | 内容量 | その他 |
|----------|----|-----|----------|-----|--------------|
| 1 | A | a | 08.11.15 | 大缶 | 調製粉乳、ペプチドミルク |
| 2 | B | b | 08.09.22 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 3 | C | c | 08.08.06 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 4 | D | d | 08.08.15 | 小缶 | 調製粉乳 |
| 5 | E | e | 08.09.14 | 小缶 | 調製粉乳 |
| 6 | A | f | 08.09.16 | 大缶 | 牛乳アレルギー疾患用食品 |
| 7 | E | e | 08.10.21 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 8 | A | g | 08.08.02 | 小缶 | 調製粉乳 |
| 9 | A | a | 08.10.18 | 大缶 | 調製粉乳、ペプチドミルク |
| 10 | A | f | 08.10.11 | 大缶 | 牛乳アレルギー疾患用食品 |
| 11 | C | c | 08.06.04 | 小缶 | 調製粉乳 |
| 12 | A | g | 08.09.06 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 13 | A | a | 08.07.13 | 小缶 | 調製粉乳、ペプチドミルク |
| 14 | A | f | 08.02.22 | 小缶 | 牛乳アレルギー疾患用食品 |
| 15 | E | e | 08.10.13 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 16 | A | f | 08.06.12 | 小缶 | 牛乳アレルギー疾患用食品 |
| 17 | D | d | 08.11.23 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 18 | A | a | 08.08.14 | 小缶 | 調製粉乳、ペプチドミルク |
| 19 | E | e | 08.11.14 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 20 | A | f | 07.07.26 | 小缶 | 牛乳アレルギー疾患用食品 |
| 21 | B | b | 08.10.09 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 22 | D | d | 08.09.15 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 23 | C | c | 08.09.05 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 24 | D | d | 08.09.19 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 25 | A | a | 08.11.16 | 大缶 | 調製粉乳、ペプチドミルク |
| 26 | D | d | 08.11.21 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 27 | A | g | 08.08.03 | 小缶 | 調製粉乳 |
| 28 | B | b | 08.09.09 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 29 | A | a | 08.10.10 | 小包装 | 調製粉乳、ペプチド |
| 30 | C | h | 08.08.22 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 31 | D | i | 08.07.22 | 小缶 | 母乳代替食品 |
| 32 | B | b | 08.04.27 | 小缶 | 調製粉乳 |
| 33 | A | a | 08.11.18 | 大缶 | 調製粉乳、ペプチドミルク |
| 34 | C | c | 08.09.06 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 35 | D | j | 08.10.03 | 大缶 | 母乳代替食品 |
| 36 | B | k | 09.03.22 | 小缶 | 調製粉末大豆乳 |
| 37 | A | a | 08.10.19 | 小缶 | 調製粉乳、ペプチドミルク |
| 38 | C | c | 08.10.09 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 39 | D | d | 08.09.23 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 40 | B | b | 08.12.05 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 41 | A | g | 08.11.09 | 小缶 | 調製粉乳 |
| 42 | E | e | 08.11.16 | 大缶 | 調製粉乳 |

| | | | | | |
|----|---|---|----------|-----|--------------|
| 43 | C | c | 08.08.14 | 小缶 | 調製粉乳 |
| 44 | D | j | 08.12.04 | 大缶 | 母乳代替食品 |
| 45 | B | b | 08.11.24 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 46 | A | g | 08.11.18 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 47 | C | h | 08.08.23 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 48 | A | f | 08.12.13 | 大缶 | 牛乳アレルギー疾患用食品 |
| 49 | C | c | 08.10.10 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 50 | A | a | 08.10.20 | 小缶 | 調製粉乳、ペプチドミルク |
| 51 | A | g | 08.11.23 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 52 | B | b | 08.10.16 | 小缶 | 調製粉乳 |
| 53 | A | g | 08.11.15 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 54 | C | c | 08.12.06 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 55 | E | e | 08.11.27 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 56 | B | k | 09.03.21 | 小缶 | 調製粉末大豆乳 |
| 57 | D | i | 08.08.27 | 小缶 | 母乳代替食品 |
| 58 | A | g | 08.11.21 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 59 | C | c | 08.10.24 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 60 | A | a | 08.12.19 | 大缶 | 調製粉乳、ペプチドミルク |
| 61 | D | d | 08.12.07 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 62 | B | b | 08.12.06 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 63 | E | e | 08.10.12 | 小缶 | 調製粉乳 |
| 64 | D | d | 08.09.28 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 65 | B | k | 09.03.23 | 小缶 | 調製粉末大豆乳 |
| 66 | A | g | 08.12.06 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 67 | D | d | 08.09.10 | 小缶 | 調製粉乳 |
| 68 | C | c | 08.12.07 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 69 | E | e | 08.12.01 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 70 | A | g | 08.12.13 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 71 | C | c | 08.10.23 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 72 | D | d | 08.12.26 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 73 | B | b | 08.10.17 | 小缶 | 調製粉乳 |
| 74 | E | e | 08.12.22 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 75 | C | c | 08.12.21 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 76 | A | a | 08.12.20 | 大缶 | 調製粉乳、ペプチドミルク |
| 77 | D | d | 08.10.06 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 78 | C | h | 08.11.22 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 79 | E | e | 08.11.02 | 小缶 | 調製粉乳 |
| 80 | A | a | 08.12.12 | 小包装 | 調製粉乳、ペプチド |
| 81 | B | b | 08.12.19 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 82 | A | g | 08.12.05 | 小缶 | 調製粉乳 |
| 83 | E | e | 09.01.04 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 84 | D | d | 08.12.19 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 85 | C | c | 08.12.20 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 86 | A | g | 08.12.22 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 87 | E | e | 08.12.23 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 88 | D | d | 08.10.10 | 小包装 | 調製粉乳 |

| | | | | | |
|-----|---|---|----------|-----|--------------|
| 89 | A | f | 09.01.03 | 大缶 | 牛乳アレルギー疾患用食品 |
| 90 | D | d | 09.01.06 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 91 | B | b | 08.12.20 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 92 | A | g | 08.11.14 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 93 | E | e | 09.01.05 | 大缶 | 調製粉乳 |
| 94 | A | f | 09.02.01 | 大缶 | 牛乳アレルギー疾患用食品 |
| 95 | C | c | 09.01.02 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 96 | D | d | 08.10.24 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 97 | E | e | 09.01.04 | 小包装 | 調製粉乳 |
| 98 | A | a | 09.01.11 | 小包装 | 調製粉乳、ペプチド |
| 99 | D | d | 08.10.21 | 小缶 | 調製粉乳 |
| 100 | C | c | 08.10.04 | 小缶 | 調製粉乳 |

表 2. 乳児用調整粉乳等の種類によるエンテロバクター・サカザキの検出結果

| 種類 | 供試検体数 | 陽性数 | 陽性率 |
|------|-------|-----|-------|
| 調製粉乳 | | | |
| 缶入り | 58 | 2 | 3.4% |
| 小包装 | 27 | 0 | 0% |
| (小計) | 85 | 2 | 2.4%) |
| 類似食品 | 15 | 0 | 0% |

調査方法

海外文献情報、2007年の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。さらに Codex の食品衛生部会における乳児用調製粉乳に関する微生物規格策定作業の経緯を注視した。

結果

1) 2007年における健康被害

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。(Personal Communication, Anna Bowen, 2008)

2) 2007年の製品の回収状況

ドイツにおいて 2007年 6月 12日、ドイツ製乳児用調製粉乳が *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 7日ウガンダから英国へ輸入された大豆ベースの乳児用調製粉乳が *E. sakazakii* 汚染により、販売ルートから撤去された。いずれも製品の名称等は不明である。また、これらの製品による健康被害は報告されていない。(Personal communication, Forcyte, 2007)

3) 文献情報

2007年には、新たにインドから 2 人の乳児の *E. sakazakii* 感染が報告された。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し死亡した。この新生児は NICU で調製粉乳をチューブで給餌されていた。もう 1 人は 2006 年、2 ヶ月齢の母乳を飲んでいて乳児が敗血症を起した。Ceftriazone-sulbactam の静脈投与により、回復し、退院した。(Ray, et.al. 2007. Indian Journal of Medical Microbiology, Vol25(4):408-10)

4) Codex 食品衛生部会の状況

2007年 10月 30日(火)～2007年 11月 4日(日)まで、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原案、乳幼児用調製粉乳、医療用の乳児用調製粉乳及び母乳強化剤に関する *Salmonella* と *Enterobacter Sakazakii* の微生物規格および工程管理規格を定めた付属文書 I、また、モニタリング計画策定に関するガイダンスを示した付属文書 III をステップ 5/8 に進めることとされた。

乳幼児用調製粉乳、医療用の乳児用調製粉乳及び母乳強化剤の病原微生物に関する規格

| Microorganism | n | c | m | Class plan |
|---------------------------------|----|---|--------|------------|
| <i>Enterobacter sakazakii</i> * | 30 | 0 | 0/10 g | 2 |
| <i>Salmonella</i> ** | 60 | 0 | 0/25 g | 2 |

.Where n = number of samples that must conform to the criteria: c = the maximum allowable number of defective sample units in a 2-class plan. m = a microbiological limit which, in a 2-class plan, separates good quality from defective quality

*The mean concentration detected is 1 cfu in 340g (if the assumed standard deviation is 0.8 and probability of detection is 95%) or 1 cfu in 100g (if the assumed standard deviation is 0.5 and probability of detection is 99%)

**The mean concentration detected is 1 cfu in 526g (if the assumed standard deviation is 0.8 and probability of detection is 95%)

E. sakazakii および *Salmonella* の検査法：それぞれ ISO/TS22964:2006 及び ISO 6579,

工程の衛生管理に関する規格

| Microorganism | n | c | m | M | Class plan |
|-----------------------------|----|---|--------|----------------|------------|
| Mesophilic Aerobic Bacteria | 5 | 2 | 500/ g | 5000/g | 3 |
| Enterobacteriaceae** | 10 | 2 | 0/10 g | Not applicable | 2 |

Where n = number of samples that must conform to the criteria: c = the maximum allowable number of defective sample units in a 2-class plan or marginally acceptable sample units in a 3-class plan: m = a microbiological limit which, in a 2-class plan, separates good quality from defective quality or, in a 3-class plan, separates good quality from marginally acceptable quality: M = a microbiological limit which, in a 3- class plan, separates marginally acceptable quality from defective quality.

なお、12ヶ月齢以下の乳児を対象としたフォローアップミルクを付属文書 I の対象に含むか否かで長時間議論されたが、フォローアップミルクと医療用の幼児用調製粉乳については付属文書 II としてステップ 2 に戻した上で、FAO/WHO に対し、6-12ヶ月齢の乳児のリスクについて、改めて評価を依頼し、この結果に基づき、カナダを議長とする電子的作業部会で原案を作成し、さらに次回会合の前日の作業部会で検討することとされた。

これとは別に、韓国は 2007 年 1 月、6ヶ月以下の乳児用製品に対して *E. sakazakii* の微生物規格を「不検出」と新設すると発表した。

分担研究報告書

乳幼児の食品摂取量調査のための基礎研究 ～NICUにおける乳児用粉乳の調整・管理の現状分析～

(分担研究者) 国立健康・栄養研究所国際産学連携センター 吉池信男
(研究協力者) 国立健康・栄養研究所国際栄養プロジェクト 三好美紀
国立健康・栄養研究所国際産学連携センター 石脇亜紗子

研究要旨

本分担研究ではこれまで乳幼児が日常的に摂取する調製粉乳やベビーフード、その他の食品の摂取状況を把握することにより、各食品の個別的な暴露量試算を行うための基礎データを提供した。更に、乳幼児における暴露評価にあたって、乳児用調製粉乳摂取の状況に着目することは重要である。そこで、医療機関における調整粉乳の調整・管理の実態を把握するために全国の新生児集中治療室(NICU)を有する施設を対象にアンケート調査を行った。その結果、施設によって調乳に関わる品質管理・衛生環境の推奨基準にかかわる状況にばらつきのあることがわかった。また、2007年にWHOが刊行した「乳児用調製粉乳の安全な調乳、保存及び取扱いに関するガイドライン」の周知・活用状況も十分とはいえない。乳幼児における食品安全の観点からも、調乳の系統的なシステムづくり強化が必要であると考えられた。

A. 目的

乳児用調製粉乳(PIF)の製造過程において混入する恐れのある *Enterobacter sakazakii* に対して、それによる感染リスクを最小限に抑える手法を含め、2007年に“Safe preparation storage and handling of powdered infant formula Guidelines”がWHOから刊行された。わが国では、厚生労働省が平成19年6月に日本語訳「乳児用調製粉乳の安全な調乳、保存及び取扱いに関するガイドライン」を作成し、都道府県、医師会等を通じて各医療機関に情報提供を行っている。

本分担課題は乳幼児が摂取する調製粉乳やベビーフード、その他の食品の個別的な暴露量試算を行うための基礎データを提供することを目指している。乳幼児における暴露評価にあたって、PIFの製造過程に着目することは重要である。そこで、医療機関における調整粉乳の調整・管理の実態および上記ガイドラインの認知度を把握するために全国の新生児集中治療室(NICU)を有する施設を対象にアンケート調査を行った。また、乳幼児に与える個々の食品としては、特にひじきに注目して、摂取量分布に関する詳細な分析を行った。

B. 研究方法

1) NICU全国調査

新生児医療連絡会に加盟する全国主要NICU 202施設に、依頼文書、質問紙および返信用封筒を送付し、郵送により回答を得た(2008年2月実施)。質問紙(附表)の内容は、1) 前述ガイドライン等に記載されている *Enterobacter sakazakii* 等の混入に対して、未熟児等のハイリスク児での感染リスクを最小限に抑えるための各種手技に関して、その実施状況、2) WHOガイドラインの周知・使用状況、3) 施設概要、に関する設問で構成した。今回の調査では、回答に施設名・回答者名は記入せず、施設を特定しない形で集計を行った。本調査実施に先立って、独立行政法人国立健康・栄養研究所研究倫理委員会(疫学関係)の承認を得た。また、依頼文書に質問紙への回答と返信をもって調査協力に同意したものとみなす旨を記載した。

2) 個別食品の摂取量解析

対象者は、1季節で3日間の食事調査を終了した1～5歳児279名(男121名、女158名)とした。そのうち、1～2歳児は99名(男45名、女54名)であった。調査地区は平成16年～18年に調査協力が得られた

19 都道府県 21 の市町村であり、各地域で 25～30 世帯を調査世帯とした。各年ともに平日 2 日と休日 1 日を含む連続しない 3 日間を 5～6 月(春)、8～9 月(夏)、11～12 月(秋)、2～3 月(冬)の 1 年 4 季節で調査を実施した。調査方法は国民健康・栄養調査に準じたもの(世帯に対する秤量記録、比例案分法)であるが、本研究は個々の食品についての詳細な摂取量データが必要であるため、保育所給食については、調査当日の献立表等を収集し、調査員が実際に摂取した内容を把握した上で、調査票に記録した。

各 1 日間の食事調査データから、ひじきの総摂取量を求めた。その算出方法は、食事調査データからひじきの食品番号[9031(乾)・89901(戻し)]を括り、戻し重量として換算したのち、個人の総摂取量を算出した。解析は、3 日間の食事調査データのうち、ひじきを摂取している日数から、摂取していない(0 日摂取者)、1 日間摂取者、2 日間摂取者、3 日間摂取者の 4 群で各々の人数を求めた。また、3 日間平均の摂取者におけるひじきの粗摂取量、体重 kg あたりの摂取量分布の検討を行った。

C. 研究結果

1) NICU 全国調査

①対象施設の特性

質問紙を送付した 202 施設のうち、102 施設から回答が得られた(回答率:50.5%)。解析対象となった施設の NICU の概要および管理栄養士の人数を表 1 にまとめた。

表 1. 対象施設の概要 (n=102)

| 変数 | 施設数 |
|------------------------|-----|
| 1) NICU 内病床数 | |
| 0-9 | 14 |
| 10-19 | 23 |
| 20-29 | 27 |
| 30-39 | 24 |
| 40-49 | 10 |
| 50- | 4 |
| 2) 1)のうち、NICU 認可ベッド(%) | |
| < 20 | 7 |
| 20- | 12 |
| 30- | 41 |
| 40- | 21 |

| | |
|-----------------------|----|
| 50- | 21 |
| 3) NICU 入院数(年間) | |
| < 100 | 4 |
| 100- | 25 |
| 200- | 36 |
| 300- | 17 |
| 400- | 13 |
| 500- | 7 |
| 4) 3)のうち、1500g 未満児(%) | |
| < 10 | 19 |
| 10- | 21 |
| 15- | 23 |
| 20- | 20 |
| 25- | 10 |
| 30- | 8 |
| 5) 病院全体の管理栄養士数 | |
| < 2 | 4 |
| 2 | 11 |
| 3 | 13 |
| 4 | 5 |
| 5 | 19 |
| 6-9 | 22 |
| 10-14 | 10 |
| 15- | 4 |
| 未回答 | 14 |

NICU 内病床数は 10-29 床の施設が半数を占めた。このうち、NICU 認可ベッドが占める割合が 3 割～4 割の施設が最も多かったが、認可ベッドなしも 7 施設あった。NICU に入院する乳児数は NICU の規模に左右されるが、年間約 200-300 人の施設が最も多く、また入院児のうち 1500g 未満の未熟児の割合が 15%以上の施設が 6 割を占めた。また、病院全体の管理栄養士数は 5 人以下の施設が過半数であった。

②乳児用調製粉乳(PIF)の調乳・管理に関する現状

NICU における PIF の使用状況は、「母乳が利用できない場合に限定」する施設と「低出生児体重用ミルクを含めてよく用いる」施設とに大きく分かれ、前者が 60.8%、後者が 35.3%であった(図 1)。