

表 2-3(1) ベビーフード中のフラン含有量

	試料名	フラン(ppb)	平均(ppb)	標準偏差	相対標準偏差 (%)
ペットボトル	30%りんご果汁飲料	1.41	1.4	0.060	4.3
		1.46			
		1.34			
	麦茶	3.22	3.1	0.067	2.1
		3.10			
3.11					
スティックパック	果汁入り粉末清涼飲料・もも	22.9	23	0.45	1.9
		23.8			
		23.3			
	果汁入り粉末清涼飲料・プルーン	24.0	25	0.60	2.5
		24.5			
		25.2			
	乾燥野菜スープ	29.6	29	0.30	1.0
		29.3			
		29.0			
レトルトパウチ	つみれと根菜の和風煮	37.6	36	1.2	3.5
		35.8			
		35.2			
	野菜と白身魚の炊き上げ	13.7	13	1.1	8.5
		11.6			
		13.1			
	京風茶碗蒸し	10.3	10	0.15	1.5
		10.2			
		10.5			
	豆腐と鶏肉の野菜あんかけ	12.8	14	0.79	5.8
		14.0			
		14.3			
	完熟トマトとツナのリゾット	17.0	18	0.53	3.0
		18.0			
		17.8			
	大根と豚の角煮	27.9	30	1.6	5.3
		30.9			
		30.3			
	ひらめのリゾット	5.7	5	0.23	4.3
		5.3			
		5.3			
	豆腐ハンバーグ	21.3	20	1.1	5.2
		19.2			
		20.1			
	豚肉と野菜のうま煮どん	31.6	30	1.8	5.8
		30.7			
		28.2			
しらす雑炊	15.8	16	0.64	4.1	
	16.0				
	14.8				

表 2-3(2) ベビーフード中のフラン含有量

	試料名	フラン(ppb)	平均(ppb)	標準偏差	相対標準偏差(%)
レトルトパウチ	野菜の鶏そぼろ煮	24.9	25	0.46	1.8
		25.5			
		24.6			
	いわし団子のあんかけ	89.5	90	0.86	0.96
		90.1			
		91.2			
瓶詰	かぼちゃのグラタン	21.8	21	0.66	3.1
		20.5			
		21.0			
	たらと野菜のみぞれ煮	5.0	5	0.23	4.7
		4.6			
		5.0			
	野菜のクリームシチュー	15.8	16	0.21	1.3
		15.9			
		15.5			
	肉じゃが	38.7	41	1.7	4.2
		42.1			
		40.8			

表②-4 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②-5 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②-6 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			

表②-7 乳幼児食(インスタント食品)のフラン含有量

番号	試料名	フラン (ppb)	平均 (ppb)
1	乾燥スープ	16.4	17
		16.6	
2	粉末ソース	2.5	2
		2.3	
3	粉末清涼飲料	5.5	6
		5.7	
4	粉末だし	16.9	17
		16.4	
5	乾燥スープ(ポタージュ) A	(1.6)	(1.6)
		(1.6)	
6	乾燥ベビーフード A	24.8	25
		25.0	
7	乾燥豆(固形)	2.7	3
		2.5	
8	乾燥スープ(ポタージュ) B	7.4	8
		7.7	
9	乾燥ベビーフード B	51.2	49
		45.9	
10	乾燥野菜・レバー(固形)	10.9	11
		10.5	

() : 検出下限以上定量下限未満

検出下限 0.5 ppb

定量下限 2 ppb

表②-8 インスタント食品(カップ麺, スープの素)のフラン含有量

番号	試料名	フラン (ppb)	平均 (ppb)
11	即席カップめん A	3.2	3
		3.5	
12	即席カップめん B	26.9	24
		21.6	
13	即席カップめん C	38.2	40
		42.6	
14	即席カップめん D	25.9	26
		25.1	
15	即席カップめん E	27.8	28
		27.5	
16	即席カップめん F	20.8	21
		20.4	
17	即席カップめん G	35.3	34
		33.2	
18	即席ワンタン	12.7	13
		12.7	
19	即席カップめん H	10.6	10
		9.0	
20	即席カップめん I	21.8	23
		23.2	
21	乾燥スープ(コンソメ) A	7.3	7
		6.4	
22	乾燥スープ(ポタージュ) A	9.3	9
		9.3	
23	乾燥スープ(ポタージュ) B	10.3	10
		10.6	
24	乾燥スープ(フリーズドライ)	(0.6)	(0.7)
		(0.7)	
25	乾燥スープ(ポタージュ) C	14.0	14
		13.1	
26	乾燥スープ(たまごスープ)	2.3	2
		2.1	
27	乾燥スープ(ポタージュ) D	7.1	8
		8.4	
28	乾燥スープ(ポタージュ) E	4.7	5
		4.9	
29	乾燥スープ(コンソメ) B	12.7	13
		13.5	
30	乾燥スープ(コンソメ) C	22.8	22
		20.4	

() : 検出下限以上定量下限未満

検出下限 0.5 ppb

定量下限 2 ppb

表②-9 調味料のフラン含有量

番号	試料名	フラン (ppb)	平均 (ppb)
31	だしの素 A	(0.6)	-
		N. D.	
32	だしの素 B	4.3	4
		3.4	
33	中華だし(調味料) A	32.9	33
		32.1	
34	中華だし(調味料) B	12.0	12
		12.3	
35	液体かつおだし	(1.6)	(1.8)
		(1.9)	

() : 検出下限以上定量下限未満

N. D. : 検出せず(検出限界未満)

検出下限 0.5 ppb

定量下限 2 ppb

表②-10 飲料(果実及び野菜飲料, 茶類, 及び牛乳)のフラン含有量

番号	試料名	フラン (ppb)	平均 (ppb)
36	プルーン飲料	11.8	12
		11.7	
37	ぶどうジュース(ストレート)	1.12	1.1
		1.02	
38	有機オレンジジュース(ストレート)	4.81	4.8
		4.69	
39	果実ミックスジュース(濃縮還元)	35.7	35
		34.6	
40	ぶどうジュース(濃縮還元)	(0.48)	(0.4)
		(0.48)	
41	野菜ミックス濃縮ジュース	9.35	9.0
		8.72	
42	にんじんジュース	6.55	6.6
		6.65	
43	トマトミックスジュース	4.62	4.6
		4.53	
44	にんじんミックスジュース	11.3	11
		10.7	
45	トマトジュース	5.59	5.5
		5.43	
46	紅茶飲料	(0.46)	(0.4)
		(0.44)	
47	緑茶 A	2.26	2.3
		2.38	
48	十六茶	7.54	7.5
		7.47	
49	緑茶 B	2.08	2.1
		2.10	
50	麦茶	21.2	21
		20.5	
51	低温殺菌牛乳 A	N. D.	N. D.
		N. D.	
52	低温殺菌牛乳 B	N. D.	N. D.
		N. D.	
53	低温殺菌牛乳 C	N. D.	N. D.
		N. D.	
54	低温殺菌牛乳 D	N. D.	N. D.
		N. D.	
55	低温殺菌牛乳 E	N. D.	N. D.
		N. D.	
56	高温殺菌牛乳 A	N. D.	N. D.
		N. D.	
57	高温殺菌牛乳 B	N. D.	N. D.
		N. D.	
58	高温殺菌牛乳 C	N. D.	N. D.
		N. D.	
59	高温殺菌牛乳 D	N. D.	N. D.
		N. D.	
60	高温殺菌牛乳 E	N. D.	N. D.
		N. D.	

() : 検出下限以上定量下限未満

N. D. : 検出せず(検出限界未満)

検出下限 0.2 ppb

定量下限 0.5 ppb

平成17～19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）

乳幼児食品中の病原微生物に関する研究

分担研究報告書

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、乳幼児における病原微生物に着目し、その検査法を確立し、乳幼児における病原微生物の暴露に関する危害分析を試みた。

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(*Enterobacter sakazakii*)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 *E. sakazakii* を中心に研究を進めた。平成17年度に検査法検討を行い、市販の乳児用調製粉乳およびその関連食品について、18年度100検体、19年度100検体について定量的に汚染実態調査を行った。18年度4検体、19年度2検体から分離され、いずれもMPN法で0.36/100gの汚染レベルであった。研究により得られた本菌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、本菌が耐熱性に関し3群に分けられることから、そのそれぞれの代表菌株につき、乳児用調製粉乳(PIF)調乳時に70℃以上の高温水使用の有用性を評価した。本菌を原因とする乳児における感染事例一例を確認したが、調製粉乳との関連は確認されず、感染経路は不明であった。

乳児用調製粉乳中のエンテロバクター・サカザキの危害分析を行った。市販調製粉乳から2-4%程度の汚染があり、その汚染レベルは333gあたり1個程度であった。このレベルの汚染であれば、70℃以上の高温水による調乳の徹底が有効であると思われる。

協力研究者：

荻原 博和：国立健康・栄養研究所

岡田由美子、朝倉 宏、石和 玲子、影山

国際産学連携センター

亜紀子：国立医薬品食品衛生研究所

豊福 肇：国立医薬品食品衛生研究所

食品衛生管理部

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

①有害微生物情報収集

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。

乳児用調製粉乳に関する国際的な会議に参加し、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。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。

② *E. sakazakii* 汚染調査

E. sakazakii については、国内の乳児用

調製粉乳およびその類似食品を対象とし、平成 17 年度に検討した FDA 法に準じた方法で定量的な汚染実態調査を行った。市販の乳児用調製粉乳およびその関連食品について、18 年度 100 検体、19 年度 100 検体について定量的に汚染実態調査を行った。18 年度 4 検体、19 年度 2 検体から分離され、いずれも MPN 法で 0.36/100g の汚染レベルであった。

③調製粉乳汚染の制御方法検討

研究により得られた *E. sakazakii* 分離菌株や標準株の性質を細菌学的、分子遺伝学的手法により解析し、本菌が耐熱性に関し 3 群に分けられることから、そのそれぞれの代表菌株につき、乳児用調製粉乳(PIF)調乳時に 70℃以上の高温水使用の有用性を評価した。

C. 研究結果

①有害微生物情報収集

平成 17 年度に行ったリステリア文献調査と新生児感染事例の検討では、乳幼児のリステリア感染は主に母子間の垂直感染が重要であり、PIF からの感染は確認されなかった。

文献での *E. sakazakii* による海外における集団事例の調査では、患者数 73 名（うち死者 27 人）、腸管定着例 9 名が確認された。乳児用調製粉乳によるものは、1986-7：アイスランド（患者 3 名、うち死者 1 名）

1988 : アメリカテネシー州 (患者 4 名)
1990: アメリカメリーランド (同 1 名)
1998: ベルギー (同 12 名、うち死者 2 名)
1999-2000 : イスラエル (患者 2 名)
2001 : テネシー (同 10 名、うち死者 1 名)
2002 : ベルギー (同 1 名、死者 1 名)
2004: ニュージーランド (同 5 名、うち死者 1 名)
2004: フランス (同 4 名、うち死者 2 名)
などが、確認された。

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。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。

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。

② *E. sakazakii* 汚染調査

平成 17 年度に、市販の乳児用調製粉乳からの *E. sakazakii* 分離法を検討し、定量的な検出が可能な FDA 法を採用した。平成 18 年度の市販調整粉乳の汚染実態調査では 100 検体中 4 検体、19 年度は 100 検体中 2 検体から *E. sakazakii* が分離され、いずれも汚染菌数は MPN 法で 0.36/100g であった。検討した合計 200 検体のいずれからも *Salmonella* 属菌は検出されなかった。

③ 調製粉乳汚染の制御方法検討

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。詳しいデータは平成 19 年度の萩原らの協力研究報告書に示した。

D. 考察

①有害微生物情報収集

国外の文献調査の結果から、PIF からの *E. sakazakii* 感染は多数報告されており、FAO/WHO のリスク評価の結果からも本菌の制御は重要であると思われる。

国内で確認された *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においては、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、ほとんどの期間は母乳を用いていた)、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。

②*E. sakazakii* 汚染調査

国内の市販 PIF を対象とした汚染実態調査では、平成 18 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。19 年度は 2 検体から *E. sakazakii* が検出された。2 検体とも、缶入りの PIF であった。全体の検出率は半減した。検出レベルはいずれの場合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。

③調製粉乳汚染の制御方法検討

国内の市販 PIF では菌数は低いながら

2-4%で汚染が確認された。汚染レベルは検出限界値である 0.46/100g (実際には 333g 中 1 個) と低く、健康な乳幼児が摂取したとしても感染のおそれはほとんどないと思われる。ただ、室温に長時間放置し菌数が高まると感染の恐れがある。特に NICU においては注意が必要と思われる。平成 19 年度の検討から、調乳に使用する湯温は WHO の推奨する 70℃以上の高温水で調製することが、*E. sakazakii* の死滅に有効であった。スパイク実験の結果では、耐熱性の特に高い菌株で高い菌数の汚染を受けている場合は、70℃調乳で菌を完全に死滅させることは難しいが、今回の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) から、70℃以上の高温水での調乳により、菌は死滅すると思われる、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℃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

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 (*Enterobacter sakazakii*) 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った *E. sakazakii* を中心に研究を進めた。平成 17 年度に検査法検討を行い、市販の乳幼児用調製粉乳およびその関連食品について、

18年度100検体、19年度100検体について定量的に汚染実態調査を行った。18年度4検体、19年度2検体から分離され、いずれもMPN法で0.36/100gの汚染レベルであった。研究により得られた本菌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、本菌が耐熱性に関し3群に分けられることから、そのそれぞれの代表菌株につき、乳児用調製粉乳(PIF)調乳時に70°C以上の高温水使用の有用性を評価した。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。

*E. sakazakii*を原因とする乳児における感染事例一例を確認したが、乳児用調整粉乳との関連は確認されず、感染経路は不明であった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 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・講演等発表

- (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. 29 Aug - 02 Sept 2006, Alma Mater Studiorum, Bologna, Italy
- (2) 五十君静信。乳製品の微生物コントロールについて。日本国際酪農連盟微生物・衛生専門部会。2006.12.14。東京
- (3) 五十君静信。乳児用調製粉乳における *Enterobacter sakazakii*。ILSI Japan 微生物部会セミナー。2007.7.30。東京千代田区
- (4) Igimi S, Kageyama A, Morita-Ishihara T, and Asakura H. Isolation and Genetic Characterization of *Enterobacter sakazakii* in Japan. UJNR meeting. 2007.11.06. Tokyo.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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）
（分担研究報告書）

分担課題名：E. sakasaki 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 sakasaki* (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、ES の標準菌株をウサギを免疫し、抗体の作成を試みた。その結果、用いた 5 株の標準株に対し、いずれもマイクロスライド凝集法で 1/160 希釈以上陽性の力価の抗血清が得られ、そのうち ESC1#4 と ESC1#47-1 が強い交叉反応性を示したが、他の菌株間の交叉反応性は低かった。また、菌株の抽出液を調製して SDS-PAGE/Western blotting による解析を行った結果、ESC1#1 に対する抗体はすべての菌株抽出物に共通の分子量約 75kDa の抗原を検出したことから、この抗原は ES の検出用の共通抗原として利用可能である可能性が示唆された。次に、ES において問題となる乾燥耐性の評価のための測定系を *in vitro* において確立した。乾燥耐性は ES 菌株ごとに異なり、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示した。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が賦与されたが、ミックス果汁では無効であった。また、LB 培地、調整粉乳の至適濃度は、それぞれ 20%、および 1 mg/mL 以上、であった。つづいて乾燥耐性獲得に対する lactoferrin および apolactoferrin の添加効果を調べた。その結果、上記のいずれの栄養因子存在下でも lactoferrin、apolactoferrin はともに、ES の乾燥耐性獲得に対する強い阻害効果を示したが、後者の方がより強く阻害した。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。以上の結果から、ES の乳製品汚染として乾燥ベビーフード等に lactoferrin や apolactoferrin を添加して乾燥食品からの生菌数の回復を阻害することが有効であることが示唆される。

協力研究者

協力研究者名：成瀬友夏里、田村愛

A. 研究目的

本研究は、食品、とくに粉ミルク等に混入し、乳幼児の下痢症の原因となる腸球菌 (*Enterococcus sakasakii*; ES) の検出ならびに診断を行うため、これらの菌体に対する抗体を作成して免疫学的検出法を開発し、さらに抗体を用いた迅速診断法を開発することを目的とする。従来、ES の検出と診断に関しては、PCR 法による 16S ribosome RNA の診断、ならびに菌の培養とそれにつづく生理学的性状解析が主体であった。しかし、前者は、PCR の実施のための器具および測定機器が必要であるばかりではなく、細菌の生死にかかわらず遺伝子を診断するため、生きている菌の検出とは一致しない。また、後者は、培養に時間がかかるだけでなく、生物学的な試験法であるため、菌の確定までの操作が煩雑である。それらに対して、免疫学的な検出法は、SE 菌体に対する特異的な抗体を得ることが可能であれば、簡便で迅速な検出法になることが期待される。さらに、現在は、食中毒の原因菌にとって重要な、「病原性 SE 菌株」の検出に必要な病原因子の同定には至っていない。そこで、本研究では、まず SE の標準株 (Reference strains) をウサギに免疫して抗血清を調製し、それらの ES 抗原に対する反応性の検討を行う。

また、*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ため、本菌の特徴である乾燥耐性について調べ、それを減弱させるための方法についても検討を加える。

B. 研究方法

(1) 使用した菌株： ES 菌株の標準株、ESC1#1、ESC1#4、ESC1#5、ESC1#8、および ESC1#47-1 の 5 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。

(2) 菌の培養： -80°C で保存した菌株を LB 培地中で一晩、振とうしながら 37°C で前培養し、その一部を新鮮な LB 培地中に $\text{OD}_{550}=0.05$ となるように播き、 37°C で 105 分間振とう培養した。

(3) 菌の免疫： 一晩培養した ES 菌を $3,500\text{ rpm}$ 、20 分間、 4°C で遠心し、沈殿に回収された菌体を氷冷した PBS で 2 回、洗浄した。最終的な沈殿を、1%ホルマリンを含む PBS に $1 \times 10^9\text{ cfu/ml}$ となるように懸濁し、使用時まで 4°C で保存した。固定した菌体は、用時、それぞれの菌株について $1 \times 10^9\text{ cfu}$ ずつ懸濁して取り出し、これを氷冷した PBS で 5 回、 $15,000\text{ rpm}$ 、 4°C で遠心しながら洗浄した。最終的に回収された菌体を 1 ml の PBS に懸濁し、抗原溶液とした。次に、この抗原と同量の Freund' s complete adjuvant を用い、o/w の安定なエマルジョンができるまで注射等を用いて両者を混和した。このエマルジョンを日本白ウサギ (Japanese White, male, 2kg, Nihon SLC) の 1 羽ずつにそれぞれ皮下注射した。2 週間後、上と同様にして、 $1 \times 10^9\text{ cfu}$ の菌体を今度は同量の Freund' s incomplete adjuvant と混合してエマルジョンを作成し、2 回目の皮下投与を行った。その 10 日目からウサギの耳介静脈より部分採血を行い、抗血清の力価を判定しながら数回の採血を行った。力価の判定は、次項に示す菌体のマイクロ凝集法によって行った。最終的に、それぞれのウサギから約 100 ml の血清を得ることができた。

(4) ミクロ凝集法： 抗血清の力価および菌体表面の抗原に結合して凝集する能力 (中和抗体価) を調べるため、スライドガラスを用いたミク

ロ凝集法を行った。顕微鏡観察に用いる通常のスライドガラスにパップペンを用いて四角の枠を4つずつ描き、この枠にそれぞれのウサギから得られた血清を10・1ずつ入れ、その上に洗浄したホルマリン固定菌体の 1×10^9 cfu/mlを10・1ずつ添加した。スライドガラスを前後に動かしながら血清と菌液をよく混合し、数分間の後に菌体の凝集が起こるか否かを目視によって判定した。さらに顕微鏡下で観察して確認した。

(5) SDS-PAGE/Western blotting 法: 一晚培養した ES 菌体を PBS で洗浄後、菌体の破砕機 (Cell beater; BIO-101) を用いてガラスビーズで破菌し、菌体抽出物を回収した。菌体抽出物のタンパク定量を行った後、それぞれ 20・g のサンプルを SDS sample buffer で処理し、5-20% gel (PAGEL™, Atto) で電気泳動してその後 PVDF 膜 (Immobilon P™, Millipore) にプロットしたのち、それぞれのウサギから得られた血清の 1/1000 (菌株#1 に対する抗血清) あるいは 1/500 (菌株#1 以外の株に対する抗血清) と反応させた。フィルター上の免疫複合体は、HRP を結合した抗ウサギ IgG (Cell Signaling) と反応させた後、酵素が産生する化学発光をバイオイメージアナライザー (LAS1000, Fuji Film) で検出した。なお、対照として、非免疫ウサギから得られた血清を用いて同様の反応操作を行い、実験群との比較検討を行った。

(6) 乾燥耐性の評価: ES 菌株のうち、ESC1#1、ESC1#4、および ESC1#5 を一晚の前前培養と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 1×10^9 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 1×10^8 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 あるいは apolactoferrin (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・1 ずつを分取し、0.45・m フィルター付き 50 ml チューブ (FPP 社製) の底部に入れ、直ちに自動乾燥装置 (サンブラテック社製) で乾燥させた。この条件下では、8 時間の室温での乾燥によって液体はすべて蒸発した。通常、一晚 (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)

動物実験に関しては、大阪薬科大学実験動物倫理委員会の審査を受けて承認された。その他は該当するものは無い。

C. 研究結果

(1) ミクロ凝集法による抗 ES 抗体の検出:

それぞれの ES 菌株をウサギに免疫して得られた血清に抗体が含まれているか否かを検出するため、ミクロ凝集法によって菌体の凝集活性を測定した。その結果、Table I に示すように、それぞれ有意に凝集する血清が得られた。その力価は、いずれも 1/80 希釈以上で、菌株#1 および#47-1 に対しては 1/160 まで凝集活性が認められた。なお、表には示さないが、抗血清の

無添加対照群としてもちいた PBS 投与群、および、非免疫ウサギ血清では、すべての希釈度においていずれの ES 菌株も凝集が見られなかった。これらの結果から、ES 菌株と反応する多価の抗体が作成されたこと、およびその凝集活性を ES 菌体の検出に使用することができる可能性が示唆された。

(2) ミクロ凝集法による抗 ES 抗体の交叉反応性: 得られた抗血清中の抗体の特異性を調べるため、ミクロ凝集法を用いて、それぞれの ES 菌株に対する凝集の交叉反応性を試験した。それぞれの抗血清を 1/20 希釈し、すべての菌株と凝集反応を行った結果、Table II に示すように、菌株#1 に対する抗血清は菌株#4 および#5 と弱い反応を示したが、菌株#8 や#47-1 に対しては全く反応しなかった。これと同様に、菌株#5 および#8 に対する抗血清も、他の菌株との反応は弱かったが、菌株#4 と菌株#47-1 の抗血清は、それぞれ互いに強い交叉反応性を示し、顕著な凝集塊を形成した。以上の結果より、これらの抗体はミクロ凝集反応で見る限り、いずれもそれぞれの菌株に対する特異性が高いこと、および例外的に菌株#4 と#47-1 の間には相互の交叉反応性があることが示された。

(3) Western blotting による抗原の検出: それぞれの菌株に対して得られた抗血清を用いて、5 種類の菌株から得られた菌体抽出物と反応させ、菌体成分中の抗原を検出した。その結果、Fig. 1 に示すように、それぞれの抗体に特徴的な反応産物のパターンが得られた。抗体#1 ではすべての菌株に共通の分子量約 75 kDa の抗原が主に検出された。抗体#4 では菌株#1、#4、および#8 に共通したいくつかの抗原が、抗体#5 では#5 に特有で#47-1 にも比較的共通した抗原が、また抗体#8 では#1、#4 および#8 に共通の抗原が、さ

らに抗体#47-1 では#1、#4 および#47-1 に共通の抗原が、それぞれ比較的強く検出された。なお、図には示さないが、対照の非免疫ウサギ血清では、このような反応産物は検出できなかった。以上の結果より、Table II で得られたミクロ凝集法の交叉反応性とは異なり、Western blotting に特有の共通抗原が存在して反応することが示唆された。

(4) ES 菌株による乾燥耐性の違い: Fig. 2 より、調べた 3 つの菌株 (ESC1#1、ESC1#4、および ESC1#5) 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 存在下で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 においては、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たことから考えて、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。

(5) 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残性を調べた。Fig. 2 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. 3)。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で獲得される 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. 4 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 の方が強かったため、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みにもかかわらず 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、ES 菌の検出に使用可能な抗体を作成することに成功し、共通抗原として認識される候補の 75 kDa 分子の存在を明らかにした。また、ES の微生物学的統御に関連して、ES 菌は菌株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 を低濃度であっても混合することにより、この乾燥耐性の獲得を著しく抑えられること、が示された。これらは、

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、lactoferrin も apolactoferrin も基本的には食材として安全なものなので、可能な限り lactoferrin、apolactoferrin を食品に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 ES 菌に関しては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と考える。

E. 結論

本研究はおもに 5 つの結論からなる。

(1) ES 標準株 5 株に対する抗体をウサギで作成することに成功した。

(2) ミクロ凝集法での交叉反応性、および SDS-PAGE/Western blotting 法による反応性の結果、すべての ES 菌株に共通の抗原の 75 kDa の候補分子が存在することが示唆された。

(3) 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。

(4) 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。

(5) 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 が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生残性と病原性発現機構との関連」 J.

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・環境トキシコロジー、2007年10月、大阪市

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