

平成 30 年 4 月 19 日

厚生労働省医薬・生活衛生局
食品基準審査課 御中

一般社団法人日本乳業協会

乳児用液体ミルク（仮称）についての報告

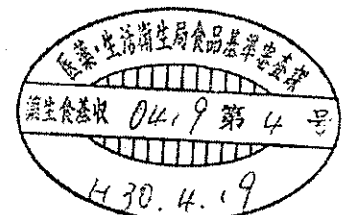
平成 30 年 2 月 28 日付けで提出いたしました標記報告につきまして、下記の箇所を修正しましたので、添付の通り差し替えをお願いいたします。

記

乳児用液体ミルク（仮称）検討データ中

- ・＜微生物管理のデータ＞ ②レトルトパウチ 部分
- ・＜栄養成分に係るデータ＞ (2) 保存中の栄養素の減衰について 部分

以上



<微生物管理のデータ>

②レトルトパウチ

	調合液	製造直後	6ヶ月	11ヶ月
一般細菌数	2.6~4.0×10 ⁵ /g	0	0	0
大腸菌群	陽性	陰性	陰性	陰性
酵母数	陰性	陰性	陰性	陰性
セレウス菌	陽性	陰性	陰性	陰性
サルモネラ属菌	陰性	陰性	陰性	陰性
サカザキ菌	陰性	陰性	陰性	陰性

※11ヶ月後の保存期間後、製品にて、発育し得る微生物「陰性」を確認。

<栄養成分に係るデータ>

(2) 保存中の栄養素の減衰について

①缶

製造直後の製品中の含有量を100%として、その後の時間経過に伴う栄養成分の増減について確認。
特別用途食品の基準の範囲内であることを確認。

成分	製造直後 分析値 (/100g)	6 ヶ月	15 ヶ月
		残存率	残存率
たんぱく質(g)	100%	100%	100%
脂質(g)	100%	100%	100%
炭水化物(g)	100%	99%	99%
水分(g)	100%	100%	100%
ナイアシン(mg)	100%	110%	95%
パントテン酸(mg)	100%	118%	113%
ビオチン(μg)	100%	100%	95%
ビタミン A(μg)	100%	99%	97%
ビタミン B ₁ (mg)	100%	83%	83%
ビタミン B ₂ (mg)	100%	100%	100%
ビタミン B ₆ (mg)	100%	90%	86%
ビタミン B ₁₂ (μg)	100%	109%	100%
ビタミン C(mg)	100%	84%	74%
ビタミン D(μg)	100%	90%	100%
ビタミン E(mg)	100%	100%	100%
葉酸(μg)	100%	94%	88%
イノシトール(mg)	100%	94%	88%
亜鉛(mg)	100%	100%	98%
塩素(mg)	100%	100%	105%
カリウム(mg)	100%	102%	105%
カルシウム(mg)	100%	95%	90%
鉄(mg)	100%	100%	96%
銅(μg)	100%	100%	100%
ナトリウム(mg)	100%	102%	106%
マグネシウム(mg)	100%	100%	104%
リン(mg)	100%	99%	97%
α-リノレン酸(g)	100%	100%	117%
リノール酸(g)	100%	98%	98%
コレステロール(mg)	100%	100%	100%
ビタミン K(μg)	100%	100%	100%
β-カロテン(μg)	100%	100%	100%
セレン(μg)	100%*	100%**	88%**

*定量下限未満であったため、原料からのキャリーオーバー及び配合量の理論値から算出。

**定量下限未満であったため、サンプルを凍結乾燥し濃縮した上で測定。

②レトルトパウチ

製造直後の製品中の含有量を100%として、その後の時間経過に伴う栄養成分の増減について確認。
特別用途食品の基準の範囲内であることを確認。

成分	製造直後	6 ヶ月	11 ヶ月
		残存率	残存率
たんぱく質(g)	100%	—	100%
脂質(g)	100%	—	97%
炭水化物(g)	100%	—	101%
水分(g)	100%	—	100%
ナイアシン(mg)	100%	79%	90%
パントテン酸(mg)	100%	106%	100%
ビオチン(μg)	100%	—	100%
ビタミン A(μg)	Ⓐ100%	Ⓐ99%	99%
	Ⓑ100%	Ⓑ100%	—
ビタミン B ₁ (mg)	Ⓐ100%	Ⓐ83%	83%
	Ⓑ100%	Ⓑ100%	—
ビタミン B ₂ (mg)	100%	100%	100%
ビタミン B ₆ (mg)	100%	92%	90%
ビタミン B ₁₂ (μg)	100%	97%	91%
ビタミン C(mg)	Ⓐ100%	Ⓐ96%	89%
	Ⓑ100%	Ⓑ91%	—
ビタミン D(μg)	100%	100%	100%
ビタミン E(mg)	Ⓐ100%	Ⓐ91%	91%
	Ⓑ100%	Ⓑ100%	—
葉酸(μg)	100%	108%	108%
イノシトール(mg)	100%	—	93%
亜鉛(mg)	100%	—	103%
塩素(mg)	100%	—	100%
カリウム(mg)	100%	—	106%
カルシウム(mg)	100%	—	101%
鉄(mg)	100%	—	96%
銅(μg)	100%	—	100%
ナトリウム(mg)	100%	—	109%
マグネシウム(mg)	100%	—	104%
リン(mg)	100%	—	100%
α-リノレン酸(g)	100%	—	100%
リノール酸(g)	100%	—	100%
ビタミン K(μg)	100%	100%	100%
コレステロール(mg)	100%	—	100%
β-カロテン(μg)	—***	—***	—***
セレン(μg)	100%*	—	94%**

※定量下限未満であったため、原料からのキャリアオーバー及び配合量の理論値から算出。

※※定量下限未満であったため、サンプルを凍結乾燥し濃縮した上で測定。

※※定量下限未満であったため参考

③紙パック

製造直後の製品中の含有量を 100%として、その後の時間経過に伴う栄養成分の増減について確認。
特別用途食品の基準の範囲内であることを確認。

成分	製造直後	3 ヶ月	6 ヶ月	7.5 ヶ月
		残存率	残存率	残存率
たんぱく質(g)	100%	—	—	93%
脂質(g)	100%	—	—	97%
炭水化物(g)	100%	—	—	103%
水分(g)	100%	—	—	100%
ナイアシン(mg)	100%	—	—	97%
パントテン酸(mg)	100%	—	—	109%
ビオチン(μg)	100%	—	—	90%
ビタミン A(μg)	100%	—	—	99%
ビタミン B ₁ (mg)	100%	—	—	82%
ビタミン B ₂ (mg)	100%	—	—	100%
ビタミン B ₆ (mg)	100%	94%	83%	87%
ビタミン B ₁₂ (μg)	100%	95%	82%	77%
ビタミン C(mg)	100%	89%	84%	84%
ビタミン D(μg)	100%	—	—	100%
ビタミン E(mg)	100%	—	—	100%
葉酸(μg)	100%	—	—	100%
イノシトール(mg)	100%	—	—	75%
亜鉛(mg)	100%	—	—	103%
塩素(mg)	100%	—	—	100%
カリウム(mg)	100%	—	—	97%
カルシウム(mg)	100%	—	—	94%
鉄(mg)	100%	—	—	105%
銅(mg)	100%	—	—	100%
ナトリウム(mg)	100%	—	—	94%
マグネシウム(mg)	100%	—	—	100%
リン(mg)	100%	—	—	94%
ビタミン K(μg)	100%	—	—	100%
α-リノレン酸(g)	100%	—	—	100%
リノール酸(g)	100%	—	—	104%
β-カロテン(mg)	100%	—	—	110%

平成30年2月28日

厚生労働省医薬・生活衛生局
食品基準審査課 御中

一般社団法人日本乳業協会

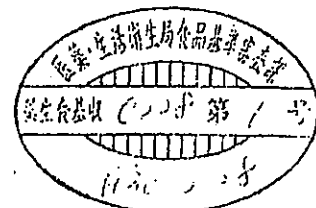
乳児用液体ミルク（仮称）についての報告

平成29年3月31日に開催された薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産食品部会にて、乳児用液体ミルク（仮称）の規格基準の設定に必要とされた微生物増殖や保存試験に関するデータ、情報等を取りまとめましたので、別添資料にて報告いたします。

<別添資料>

- 1、乳児用液体ミルク（仮称）検討データ
- 2、乳児用液体ミルク（仮称）における、常温下での汚染菌増殖動態確認報告
- 3、【論文】調製粉乳（PIF）の調乳および保存方法が、*Enterobacter sakazakii* の生残と増殖に及ぼす影響
- 4、【COMBASE】調製粉乳調乳液における、常温下でのサルモネラ属の増殖報告

以上



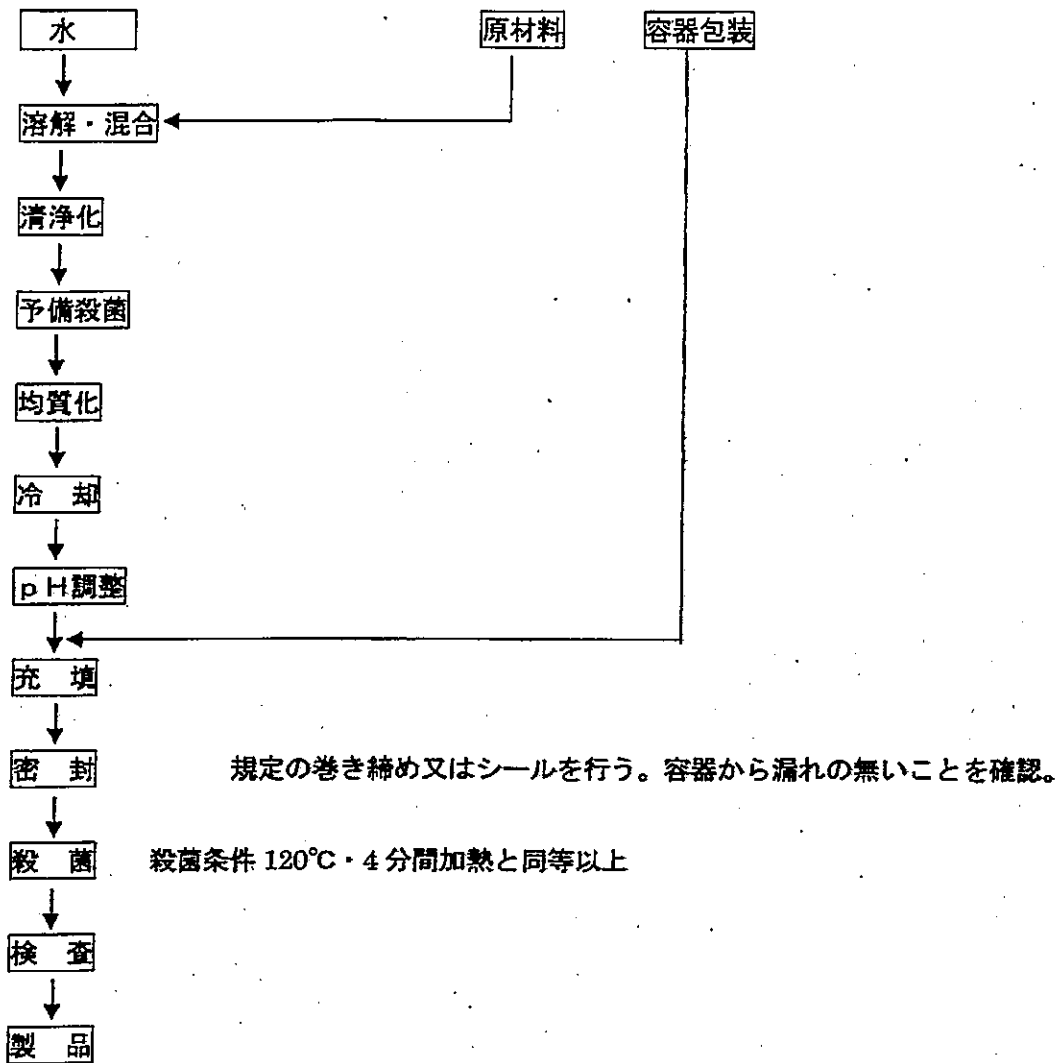
乳児用液体ミルク(仮称) 検討データ

記載事項	内容
製品の名称	乳児用液体ミルク
主な原材料の名称等	<p><食品原材料> 調整食用油脂(大豆油, パーム核油, エゴマ油, アラキドン酸含有油脂等), コレステロール, ホエイパウダー, 乳糖, 脱脂粉乳, たんぱく質濃縮ホエイパウダー, バターミルクパウダー, カゼイン, 乳清たんぱく質濃縮物, ガラクトオリゴ糖, デキストリン, 食塩, 酵母 等</p> <p><食品添加物> レシチン, ビタミンA, ビタミンB1, ビタミンB2, ビタミンB6, ビタミンB12, ビタミンC, ビタミンD3, ビタミンE, β-カロテン, 炭酸カリウム, 炭酸カルシウム, 塩化カリウム, 塩化カルシウム, 塩化マグネシウム, 水酸化カルシウム, クエン酸鉄ナトリウム, イノシトール, タウリン, 5'-アデニル酸, 5'-イノシン酸ナトリウム, 5'-ウリジル酸ナトリウム, 5'-グアニル酸ナトリウム, 5'-シチジル酸二ナトリウム, 硫酸銅, 硫酸亜鉛, ビオチン, 亜セレン酸ナトリウム, ニコチン酸アミド, パントテン酸カルシウム, 葉酸, L-カルニチン 等</p>
使用基準のある添加物と使用基準	<p>亜セレン酸ナトリウム: (対象食品) 母乳代替食品(厚生労働大臣の承認を受けたものを除く)、調製粉乳。 (使用基準) 母乳代替食品(厚生労働大臣の承認を受けたものを除く)にあつては、セレンとして5.5μg/100kcal。</p> <p>ビオチン: (対象食品) 母乳代替食品(厚生労働大臣の承認を受けたものを除く)、調製粉乳、特定保健用食品、栄養機能食品。 (使用基準) 母乳代替食品(厚生労働大臣の承認を受けたものを除く)にあつては、含有量10μg/100kcal。</p> <p>硫酸亜鉛: (対象食品) 母乳代替食品 (使用基準) 母乳代替食品にあつては、標準調乳濃度に調乳したとき、亜鉛として6.0mg/L(厚生労働大臣の承認を受けて調製粉乳に使用する場合を除く)。</p> <p>硫酸銅: (対象食品) 母乳代替食品 (使用基準) 標準調乳濃度に調乳したとき、銅として0.60mg/L(厚生労働大臣の承認を受けて調製粉乳に使用する場合を除く)。</p>
容器包装の材質及び形態 材質: 外側→内面	<p>①缶 材質: (缶胴) スチール/PET、 (缶蓋) アルミ/エポキシアクリル樹脂</p> <p>②レトルトパウチ</p>

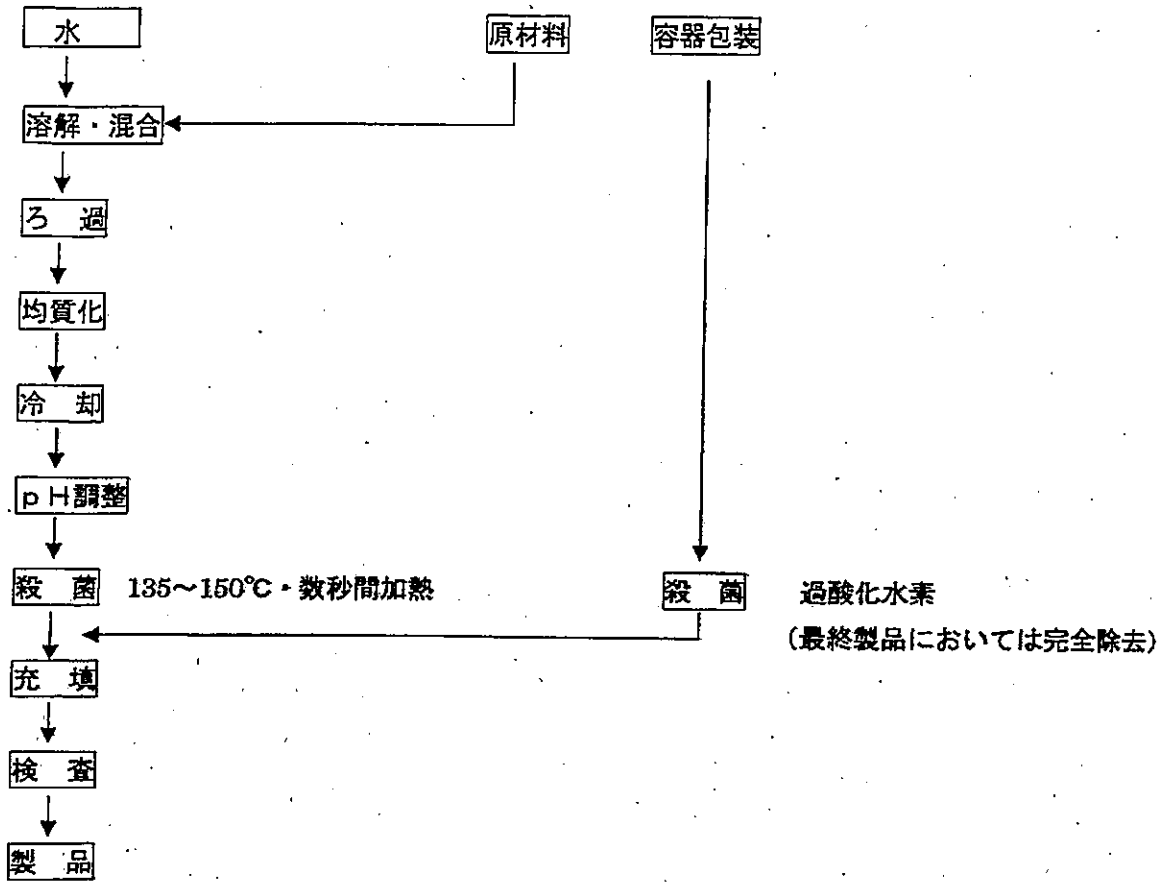
	材質：PET／ナイロン／アルミ／PP ③紙パック 材質：LLDPE／PE／アルミ／LDPE／紙／LDPE テープ：LLDPE／LDPE／接着層／PET／接着層／LDPE／LLDPE
殺菌条件	①120℃・4分間と同等以上 ②120℃・4分間と同等以上 ③135～150℃・数秒
製品の規格	細菌規格：①発育し得る微生物「陰性」 ②発育し得る微生物「陰性」 ③細菌数「0」 製品規格：①特別用途食品に係る必要栄養素の確保 ②特別用途食品に係る必要栄養素の確保 ③特別用途食品に係る必要栄養素の確保
賞味期限及び保存の方法	賞味期限：①②9ヶ月～12ヶ月 ③6ヶ月 保存方法：①②③常温を超えない温度
喫食又は利用の方法	①②③そのまま飲用又は容器を移し替えてから温めて飲用
喫食の対象者	乳児

<製造工程>

① 缶 ② レトルトパウチ (加圧加熱殺菌)



③ 紙パック (常温保存可能品)



<微生物管理のデータ>

①缶

	調合液	製造直後	6ヶ月	12ヶ月	15ヶ月
一般細菌数	$2.6 \sim 4.0 \times 10^5/g$	0	0	0	0
大腸菌群	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性
酵母数	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
セレウス菌	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性
サルモネラ属菌	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
サカザキ菌	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

※15ヶ月後の保存期間後、製品にて、発育し得る微生物「陰性」を確認。

②レトルトパウチ

	調合液	製造直後	6ヶ月	12ヶ月
一般細菌数	$2.6 \sim 4.0 \times 10^5/g$	0	0	0
大腸菌群	陽性	陰性	陰性	陰性
酵母数	陰性	陰性	陰性	陰性
セレウス菌	陽性	陰性	陰性	陰性
サルモネラ属菌	陰性	陰性	陰性	陰性
サカザキ菌	陰性	陰性	陰性	陰性

※12ヶ月後の保存期間後、製品にて、発育し得る微生物「陰性」を確認。

③紙パック（常温保存可能品）

	調合液	製造直後	3ヶ月	6ヶ月	7.5か月
一般細菌数	$1.2 \times 10^2/ml$	0	0	0	0
大腸菌群	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
酵母数	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
セレウス菌	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
サルモネラ属菌	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
サカザキ菌	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
黄色ブドウ球菌	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
リステリア菌	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

紙パックにおける製造時の微生物管理

	調合液	充填開始直後	30 秒	1 分	2 分
細菌数	$1.2 \times 10^2/\text{ml}$	0	0	0	0

	5 分	10 分	30 分	60 分	90 分
細菌数	0	0	0	0	0

	120 分	150 分	180 分	210 分
細菌数	0	0	0	0

(参考)

紙パックにおける製品への過酸化水素残存

過酸化水素残留試験：残存なし

<栄養成分に係るデータ>

栄養素の減衰について、確認を行ったところ、以下のとおりとなった。

なお、栄養素の確保については製造時の加熱等による減衰や保管時による減衰が認められたが、いずれの減衰を踏まえても、特別用途食品の表示基準値の栄養成分を確保することが可能であることが確認された。

(1) 製造に伴う栄養成分の減衰について

①缶②レトルトパウチ

製造工程での加熱時の栄養成分の変化については、最も影響を受けると考えられるビタミンCを用いて検証した。

ビタミンCの製造工程での減衰率は、20~45%であった。これら減衰率と下記の保存中の減衰率を考慮して栄養成分の配合量を設定することにより、最終製品の栄養成分確保が確認された。

③紙パック

製造工程での加熱による栄養成分の変化については、影響を受けると考えられる栄養素について加熱処理を含む製造直後の残存を検証した。

製造工程では、ビタミンC、ビタミンB6、葉酸、パントテン酸が、数%~5%の範囲で減衰することが確認された。これら減衰率と下記の保存中の減衰率を考慮して栄養成分の配合量を設定することにより、最終製品の栄養成分確保が確認された。

(2) 保存中の栄養素の減衰について

①缶

製造直後の製品中の含有量を 100%として、その後の時間経過に伴う栄養成分の増減について確認。
特別用途食品の基準の範囲内であることを確認。

成分	製造直後	6 カ月	15 カ月 (最終製品)
たんぱく質	100%	97%	97%
脂質	100%	101%	101%
炭水化物	100%	99%	99%
水分	100%	100%	100%
ナイアシン	100%	111%	96%
パントテン酸	100%	118%	112%
ビオチン	100%	101%	95%
ビタミン A	100%	98%	97%
ビタミン B ₁	100%	86%	86%
ビタミン B ₂	100%	101%	101%
ビタミン B ₆	100%	90%	86%
ビタミン B ₁₂	100%	110%	100%
ビタミン C	100%	101%	95%
ビタミン D	100%	97%	104%
ビタミン E	100%	104%	104%
葉酸	100%	88%	85%
イノシトール	100%	89%	85%
亜鉛	100%	101%	98%
塩素	100%	101%	106%
カリウム	100%	102%	105%
カルシウム	100%	95%	90%
鉄	100%	100%	96%
銅	100%	105%	105%
ナトリウム	100%	102%	106%
マグネシウム	100%	100%	104%
リン	100%	98%	97%
コレステロール	100%	104%	104%
ビタミン K	100%	104%	104%
β-カロテン	100%	97%	97%
セレン	100%	133%	120%

②レトルトパウチ

製造直後の製品中の含有量を100%として、その後の時間経過に伴う栄養成分の増減について確認。
特別用途食品の基準の範囲内であることを確認。

成分	製造直後	6 ヵ月	12 ヵ月 (最終製品)
たんぱく質	100%	—	98%
脂質	100%	—	98%
炭水化物	100%	—	101%
水分	100%	—	100%
ナイアシン	100%	79%	89%
パントテン酸	100%	107%	101%
ビオチン	100%	—	98%
ビタミンA	100%	99~100%	98%
ビタミンB ₁	100%	93~100%	89%
ビタミンB ₂	100%	93%	99%
ビタミンB ₆	100%	92%	90%
ビタミンB ₁₂	100%	98%	91%
ビタミンC	100%	91~98%	90%
ビタミンD	100%	97%	103%
ビタミンE	100%	98~100%	94%
葉酸	100%	103%	106%
イノシトール	100%	—	97%
亜鉛	100%	—	104%
塩素	100%	—	101%
カリウム	100%	—	106%
カルシウム	100%	—	101%
鉄	100%	—	96%
銅	100%	—	109%
ナトリウム	100%	—	109%
マグネシウム	100%	—	104%
リン	100%	—	100%
ビタミンK	100%	97%	97%
コレステロール	100%	—	104%
β-カロテン	100%	111%	111%
セレン	100%	—	123%

③紙パック

製造直後の製品中の含有量を100%として、その後の時間経過に伴う栄養成分の増減について確認。
特別用途食品の基準の範囲内であることを確認。

成分	製造直後	3 カ月	6 カ月	7.5 カ月 (最終製品)
たんぱく質	100%			93%
脂質	100%			95%
炭水化物	100%			103%
水分	100%			100%
ナイアシン	100%			97%
パントテン酸	100%			109%
ビタミンA	100%			99%
ビタミンB1	100%			82%
ビタミンB2	100%			100%
ビタミンB6	100%	94%	83%	80%
ビタミンB12	100%	95%	82%	77%
ビオチン	100%			90%
ビタミンC	100%	89%	84%	84%
ビタミンD	100%			98%
ビタミンE	100%			100%
葉酸	100%			100%
イノシトール	100%			75%
亜鉛	100%			103%
塩素	100%			100%
カリウム	100%			97%
カルシウム	100%			94%
鉄	100%			105%
銅	100%			100%
ナトリウム	100%			94%
マグネシウム	100%			100%
リン	100%			94%
ビタミンK	100%			103%
α-リノレン酸	100%			100%
リノール酸	100%			104%
β-カロテン	100%			103%

<容器包装に係るデータ>

①金属缶

乳等省令乳飲料の販売用の容器包装に係る規格基準に適合していることを確認。

(内容)

溶出試験、材質試験

②レトルトパウチ

乳等省令乳飲料の販売用の容器包装に係る規格基準に適合していることを確認。

(内容)

溶出試験、材質試験、強度試験

③紙パック

乳等省令乳飲料の販売用の容器包装に係る規格基準に適合していることを確認。

(内容)

溶出試験、材質試験、強度試験

<沈殿等に係るデータ>

○色調

①缶、②アルミパウチ

製造直後の色調は、調製粉乳を溶解したものと比較してわずかに茶褐色を呈す。

保存中にわずかに褐色の程度が高くなるが、その程度は問題となるレベルではない。

包装形態による大きな差はない。

③紙パック

調製粉乳を溶解したものと比較して色調が濃くなる。保存中にも褐変の進行が見られた。

○風味

①缶、②アルミパウチ、③紙パック

製造直後から賞味期限内のものについては、異常は認められなかった。

○沈殿

①缶、②アルミパウチ、③紙パック

保存中に沈殿が若干認められるが、開封前に振とうすることで容易に分散する。

○外観（膨張、漏れ等の異常）

①缶、②アルミパウチ、③紙パック

いずれも保存中に膨張や漏れ等の異常は認められなかった。

<開封後の微生物増殖について>

○*E.coli* 及び黄色ブドウ球菌

乳児用液体ミルクの研究開発を行っている製造者において、乳児用液体ミルクに *E.coli* 及び黄色ブドウ球菌を接種し常温下における増殖動態を確認した。(別添1)

○*E.sakazakii* 及び *Salmonella spp*

文献等の調査を行ったところ、乳児用液体ミルクを用いたものではないが調製粉乳を調乳後に *E.sakazakii* 及び *Salmonella spp* を接種したデータ等が確認できたので報告する。

E.sakazakii については、平成 20 年萩原氏らにより、調製粉乳の調乳時に二次汚染を想定した場合の研究がされている。(別添2)

Salmonella spp については、Combase*に蓄積されているデータによると、調製粉乳を調乳後、菌を接種し、その増殖について研究結果の報告がされている。(別添3)

※：種々の食品環境における微生物挙動を 50,000 件以上収録している データベース。微生物挙動データを把握することが可能。(Combase ホームページ <https://www.combase.cc/index.php/ja/>より引用)

以 上

『乳児用液体ミルク(仮称)』における、常温下での汚染菌増殖動態確認報告

(日本乳業協会)

1. 背景 ● 『乳児用液体ミルク(仮称)』の制度化、販売に先立ち、調乳した乳児用調製粉乳と同様に開封した液体ミルクについて、消費者へ安全な取り扱い方法の普及が課題となっている。

2. 目的 今後上市予定の乳児用液体ミルク中の、常温下での汚染菌の増殖動態を確認する。

3. 方法

- 3-1. 供試菌株
1. Staphylococcus aureus 2101株
2. Staphylococcus aureus 2181株
3. Escherichia coli 9167株
4. Escherichia coli 9219株

3-2. 供試サンプル 乳児用液体ミルク(2品A社製及びB社製、以下乳児ミルクと略記)

- 3-3. プロトコール
① 供試菌株をそれぞれ標準寒天培地にて継代後、コロニーを1つ約菌して普通ブイヨン培地で1代の賦活培養に供し、前培養を行った。
② 前培養にて得られた各菌液を遠心分離して上清を廃棄し、乳児ミルクで適宜希釈した菌希釈液を接種後菌数が1E+03 CFU/mlになるように滅菌メジウム瓶中の乳児ミルク100mlに接種し、培養試験(25℃/静置培養)を開始した。
培養試験は、途中で適宜サンプリングを供しながら最長で24時間実施した。
③ サンプリングした培養試験サンプルを希釈し、下記の培地*1)で温置培養した。培養後、算定対象とした平板の集落数を算定し、その集落数に希釈倍率を乗じたものを生菌数とした。

*1 供試培地は以下。

Table with 2 columns: 非選択培地, 菌種特異的選択培地. Rows for S. aureus and E. coli.

4. 結果 試験結果を図1~4に示した(SPC:標準寒天培地, MSA:マンニト食塩添加培地, DESO:デノキシコレート寒天培地, TBX:TBX寒天培地)。

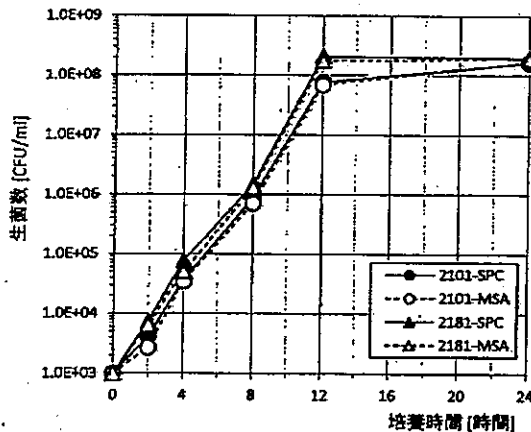


図1. S.aureusの増殖推移(A社品, N=2, duplicate)

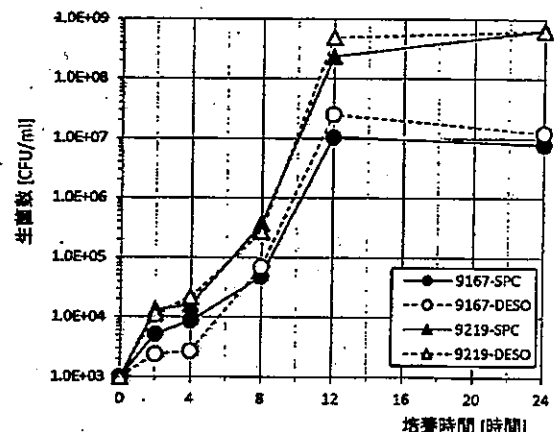


図2. E.coliの増殖推移(A社品, N=2, duplicate)

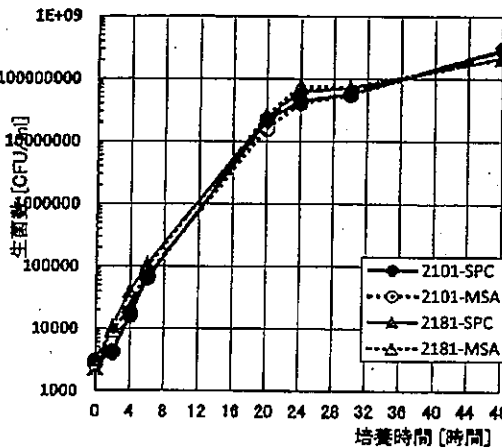


図3. S.aureusの増殖推移(B社品, N=2, duplicate)

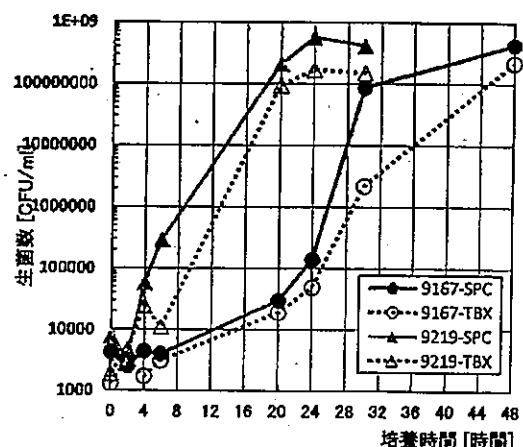


図4. E.coliの増殖推移(B社品, N=2, duplicate)

S. aureus : 2株体の両菌株とも、培養初期から菌数がピークに達する培養後12時間もしくは24時間まで、直線的な増殖が見られた。

E. coli : 9219株においては、菌数がピークに達する培養後12時間もしくは24時間まで、ほぼ直線的な増殖が見られた。

9167株では、4~20時間程度の増殖のタイムラグの後に直線的な増殖が見られる傾向にあった。

乳飲料の一般細菌数規格基準である3E+04 CFU/mlに達する時間は、S. aureusでは4時間程度、E. coliでは4~20時間程度であった。

以上

報 文

乳児用調製粉乳 (PIF) の調乳および保存方法が
Enterobacter sakazakii の生残と増殖に及ぼす影響

(平成 20 年 10 月 31 日受理)

荻原博和^{1,*} 露木朝子¹ 古川壮一¹ 森永 康¹ 五十君静信²

Effects of the Reconstitution and Storage Conditions of Powdered Infant Formula (PIF) on the Survival and Growth of *Enterobacter sakazakii*

Hirokazu OGHARA^{1,*}, Asako TUYUKI¹, Soichi FURUKAWA¹,
Yasushi MORINAGA¹ and Shizunobu IGMI²

¹ Department of Food Bioscience and Biotechnology, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Kameino 1866, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan;

² National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; * Corresponding author

The effect of the reconstruction and storage conditions of powdered infant formula (PIF) on the survival and growth of three *Enterobacter sakazakii* strains, ATCC 29004, HT 022 and HT 028, was investigated. *D* values of *E. sakazakii* ATCC 29004 and HT 022 at 60°C were 3.6 and 1.6 min, respectively, and that of HT 028 at 52°C was 1.6 min. The effect of the temperature of the water used for the reconstruction of PIF on the inactivation of the three *E. sakazakii* strains was also investigated. One to 2 log order inactivation occurred at 70°C, and above 5 log order inactivation at 80°C. Storage tests at 5, 10 and 25°C showed that none of the strains could grow at 5°C, HT 028 grew slightly at 10°C, and at 25°C all three strains started growth after 4 hr incubation and reached up to 8 log CFU/mL after 16 hr incubation. From the above results, it is concluded that a suitable temperature of the hot water for reconstruction of PIF is above 70°C, and the preferred storage temperature of reconstructed PIF, which is recommended to be consumed within 2 hr, is below 5°C.

(Received October 31, 2008)

Key words: *Enterobacter sakazakii*; 乳児用調製粉乳 PIF (Powdered Infant Formula); 調乳, preparing a feed using PIF; *D* 値 *D* values; 保存 storage

結 言

Enterobacter sakazakii は腸内細菌科に属する通性嫌気性のグラム陰性桿菌で¹⁾, ヒトや動物のみならず食品や自然環境などにも広く分布していると考えられている^{2),3)}.

E. sakazakii は健康な人にとって発症するリスクは少ないものの, 乳幼児, 特に未熟児や免疫不全児, 低体重出生児では感染すると敗血症や壊死性腸炎を発症することがあり, 重篤な場合には髄膜炎を併発することも知られている⁴⁾. 現在, *E. sakazakii* の感染経路については十分に解明されていないものの, 乳児用調製粉乳 (Powdered Infant Formula; PIF) を媒介とした感染例が報告^{5),6)}されており, PIF は最も有力な感染源の1つとして認識され

ている^{7),8)}. 他の感染例では, PIF を溶解する際のブレンダーやスプーンなどを介した二次汚染例も報告されており⁹⁾, さらに調乳段階で環境からの汚染や人を介した人為的な汚染の可能性も考えられている.

一方, PIF への *E. sakazakii* の汚染は製造工程において二次汚染の可能性も高く, 本菌の感染にかかわる経路は多岐にわたると考えられる. 特に PIF の製造において, 生産コストを前提とした製造技術では *E. sakazakii* および他の病原細菌の完全な除去は難しく, 常に汚染リスクが想定され, さらに発症菌数なども十分に把握されていないことから, 調乳環境における温度管理や衛生管理の徹底などで予防しなければならぬのが現状である. また, 低レベルの汚染であっても乳幼児に対しては重大な危険因子と考えられるので, 保管・調乳・授乳時におけるリスクを効果的に減じる手立てが必要と思われる.

わが国における PIF の調乳に関連する研究報告は, 古くは吉岡ら¹⁰⁾, 松山ら¹¹⁾ による報告があるが, *E. saka-*

* 連絡先

¹ 日本大学生物資源科学部食品生命科学科: 〒252-8510 神奈川県藤沢市地井野 1866² 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

zakii を対象とした調乳方法とリスク低減に関する報告は見当たらない。今回このような背景から、PIFに基づく *E. sakazakii* の発症リスクの軽減を目的として、調乳の際に用いる湯温が *E. sakazakii* の死滅に寄与しているのか、さらに調乳後に残存や汚染があった場合に、保存温度が *E. sakazakii* の増殖にどのような影響を与えるかについて検討を行った。

材料および方法

供試材料

実験に使用した乳児用調製粉乳 (PIF; Powdered Infant Formula) は M 社製の調製粉乳 900 g を使用した。哺乳瓶は N 社製 120 mL 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 (ATCC 株)、Asakura らにより PIF から分離された *E. sakazakii* HT 022 株 (HT 022 株)、*E. sakazakii* HT 028 株 (HT 028 株) の計 3 菌株¹⁾ を使用した。各菌株は Trypticase Soy Broth (TSB 培地; BD 社製) を用いて、37°C で 24 時間、2 代継代培養したものを使用した。

生菌数および *E. sakazakii* 数の計測

PIF からの生菌数の測定は食品衛生検査指針²⁾ に準じて行った。すなわち PIF 25 g をストマフィルターに採取し、225 mL 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った。懸濁液は適宜希釈して Plate count agar (PCA; BD 社製) に塗抹し、37°C で 48 時間培養後、発育した集落を計測して、生菌数および生菌数を求めた。接種実験における *E. sakazakii* の計測は、生菌数と同様の方法で行い、発育した黄色の集落を計測した。また、PIF からの *E. sakazakii* の検出および計測は、ESA 培地 (Merck 社製) を用いて平板塗抹し、45°C で 24 時間培養後、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測定は、デジタル温度計・SK-1250 MCIIIa と THERMAL PRINTER・DFU-414 (SATO KEIRYOKI 社製) を用いて計測した。

1. *E. sakazakii* の殺菌に関する基礎的検討

1) 湯温温度が殺菌効果に及ぼす影響

ガラス製哺乳瓶に所定量の PIF を添加し、加温した 99 mL の滅菌精製水 (SDW) を加えスターラーで攪拌溶解後、オートマチック電子恒温槽 (T-105・トーマス科学機器社製) を用いて 55, 60, 65, 70, 75, 80°C に保持した。各設定温度を確認後、*E. sakazakii* (供試 3 菌株) を最終菌量 6~7 log CFU/mL になるように菌液 1 mL を接種し、攪拌しながら 2 分間加熱処理を行った。処理後試料を取り出し、残存菌数を計測した。

2) 熱抵抗性 (D 値) の検討

ガラス製哺乳瓶に所定量の PIF と SDW を加え溶解後、PIF を攪拌しながら 60°C の恒温槽に保持した。設定温度

を確認後、ATCC と HT 022 株を 1.1) と同様に接種し、0, 2, 4, 6, 8, 10 分後に試料を取り出し直ちに氷水中で急冷後、生菌数を計測した。HT 028 株については 52°C の温度を選択し、同様に処理および菌液を接種し、0, 1, 2, 3, 4, 5 分加熱後、氷水中で急冷し同様に残存菌数を計測した。これらの結果から供試 3 菌株の D 値を算出した。

2. *E. sakazakii* の増殖に及ぼす保存温度の影響

保存温度下での *E. sakazakii* の増殖を検討した。保存温度の条件はインキュベーター (CR-14C・(株)日立製) で 5°C (冷蔵庫)、10°C (冷蔵庫の上限)、25°C (室温) を設定した。ガラス哺乳瓶に所定量の PIF と SDW を加えて溶解後、設定温度を確認後、供試 3 菌株を 2~3 log CFU/mL なるように接種し各温度に保存した。保存開始後 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 時間ごとに試料を取り出し、生菌数を計測した。

3. 調乳の湯温ならびに調乳後の保存温度が *E. sakazakii* の消長に及ぼす影響

1) 湯温と保存温度が及ぼす影響

ガラス哺乳瓶を用いて、調乳する際の湯温による *E. sakazakii* の殺菌効果と調乳後の保存温度における増殖を検討した。まず、調乳時の環境温度を考慮し、ガラス哺乳瓶を冬期温度 10°C、春秋期温度 25°C、夏期温度 30°C に保温した。調乳に用いる湯温は 60, 70, 80°C の 3 温度を選択した。さらに調乳後の保存温度は 10, 25, 30°C を設定した。すなわち、10, 25, 30°C に保持した哺乳瓶に所定の PIF と供試 3 菌株を 1.1) と同様に接種した後、99 mL (60, 70, 80°C) の SDW を加えて 2 分間攪拌溶解を行った。その後 10, 25, 30°C で 300 分まで保存し、保存開始 0, 30, 120, 300 分後に試料を取り出し生菌数の計測を行った。なお、調乳の湯温と保存温度の組み合わせは、湯温 60°C + 保存 25°C、湯温 70°C + 保存 10°C、湯温 70°C + 保存 25°C、湯温 70°C + 保存 30°C、湯温 80°C + 保存 25°C の 5 条件について検討した。

2) 哺乳瓶容器が及ぼす影響

哺乳瓶の材質、すなわちガラス製とポリプロピレン製の哺乳瓶が湯温における *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、所定量の PIF と ATCC 株を 1.1) と同様に接種し、さらに 70°C の SDW 99 mL を分注し、2 分間攪拌溶解を行った。攪拌溶解後 25°C で 300 分保持した。保存開始 0, 30, 120, 300 分後に試料を取り出し、その間の生菌数を計測した。

3) 哺乳瓶の予備加熱が及ぼす影響

哺乳瓶の材質がガラスの場合、分注した際に湯温が低下するので、ガラス哺乳瓶をあらかじめ保温した状態での殺菌効果について検討した。すなわち、25°C に保温した哺乳瓶に 70°C の SDW 50 mL を加え、1 分間攪拌後取り除き、哺乳瓶に所定量の PIF と ATCC 株を 1.1) と同様に接種した。次に 70°C SDW を 99 mL 加え、2 分間攪拌溶解した。溶解後 25°C で 300 分間保存し、保存開始 0, 30, 120, 300 分後に試料を取り出し、生菌数を計測し

た。なお、予備加熱しない処理も同様に行った。

結果

1. *E. sakazakii* の殺菌に関する基礎的検討

1) 湯温温度が殺菌効果に及ぼす影響

加熱温度が *E. sakazakii* に対する殺菌効果を Table 1 に示した。PIF に各菌を接種し、加熱による菌数の減少を検討したところ、ATCC 株では 55°C で 0.16 log CFU/mL、60°C で 0.69 log CFU/mL、65°C で 3.96 log CFU/mL と菌数の減少が認められた。温度が高い湯温 70、75、80°C 処理では殺菌効果が高くいずれも平板に検出されなかった。次に HT 022 株では、55°C で 0.80 log CFU/mL、60°C で 3.99 log CFU/mL と菌数の減少が見られたが、65~80°C 処理ではいずれも検出されなかった。さらに HT 028 株については、55°C の湯温でのみ検出されたのに対して、60°C 以上の温度条件ではいずれも検出されなかった。これらのことより、加熱温度が高くなるにつれて菌数は減少し、70°C 以上で有効な殺菌効果が認められた。耐熱性は菌株により異なり、ATCC 株が最も強く、次いで HT 022 株、HT 028 株の順で、HT 028 株は他の菌株に比べ耐熱性が低かった。なお、供試した市販 PIF からは *E. sakazakii* は検出されなかった。

2) 熱抵抗性値 (D 値) の測定結果

食品製造で加熱殺菌の指標となる D 値について、哺乳瓶を用いた条件での結果を Fig. 1 に示した。 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、供試菌株はあらかじめ 50~80°C の条件で予備実験を行い、ATCC と HT 022 株については加熱温度 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 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。

2. *E. sakazakii* の増殖に及ぼす保存温度の影響

調乳後において *E. sakazakii* の二次汚染を想定し、保存温度における *E. sakazakii* の増殖を検討した (Fig. 2)。

冷蔵庫内の温度に相当する 5 と 10°C 保存では、ATCC と HT 022 株の増加は認められなかった。一方、耐熱性

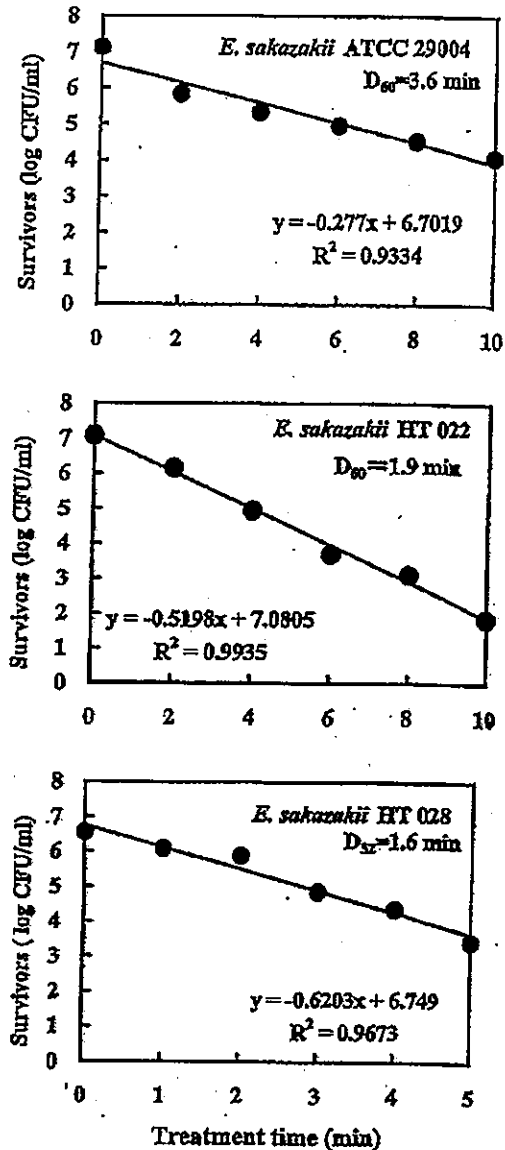


Fig. 1. Thermal inactivation of *E. sakazakii* in reconstituted PIF

Table 1. Survival of *E. sakazakii* ATCC 29004, *E. sakazakii* HT 022 and *E. sakazakii* HT 028 after reconstitution of powdered infant formula (PIF) with hot water at different temperatures

Temperature (°C) of hot water added to PIF	<i>E. sakazakii</i> ATCC 29004		<i>E. sakazakii</i> HT 022		<i>E. sakazakii</i> HT 028	
	Before (0 min)	After (2 min)	Before (0 min)	After (2 min)	Before (0 min)	After (2 min)
55°C	7.00±0.11	6.84±0.10*	6.90±0.14	6.10±0.07	6.39±0.20	0.67±0.19
60°C		6.31±0.10		2.91±0.11		ND
65°C		3.04±0.29		ND		ND
70°C		ND**		ND		ND
75°C		ND		ND		ND
80°C		ND		ND		ND

*: log CFU/mL

** : ND, not detected; <1 CFU/mL of PIF by direct plating on plate count agar.

の低い HT 028 株では、5°C 保存においては他 2 菌株と同様に増殖が認められなかったのに対して、10°C 保存では保存 16 時間以降に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 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 5~6 log CFU/mL に、さらに保存 16 時間後には 3 菌株とも 8 log CFU/mL に増加した。特に HT 028 株については 10°C でも増殖する可能性が示唆され、25°C 保存では供試 3 菌株とも急激な増加が確認された。

3. 調乳の湯温ならびに調乳後の保存温度が *E. sakazakii* の消長に及ぼす影響

1) 湯温と保存温度が及ぼす影響

調乳の湯温が *E. sakazakii* の殺菌に及ぼす影響と調乳後の保存温度が菌数の増減に及ぼす影響を Table 2 に示した。

湯温 60°C 処理における ATCC と HT 022 株では、殺菌効果は 1 オーダー以下しか認められないのに対して、HT 028 株では 2.85 log CFU/mL と菌数の減少が見られた。次に 70°C 湯温と保存温度 (10, 25, 30°C) での調乳後の殺菌効果は、ATCC 株では 0.63~1.26 log CFU/mL、HT 022 株で 2.37~5.92 log CFU/mL、HT 028 株で 4.18~6.75 log CFU/mL の範囲で殺菌効果が認められ、湯温 60°C 処理よりも良好な殺菌効果が確認された。さらに湯温 80°C 処理では、いずれの菌株も 5 オーダー以上の有効な殺菌効果が得られた。

保存試験については、ATCC 株では湯温 80°C + 保存 25°C 条件のみに増加が観察されたものの、他の条件ではいずれも増殖が抑制された。次に HT 022 株では湯温 60°C + 保存 25°C と湯温 70°C + 保存 10°C 条件でのみ増殖が抑制された。さらに HT 028 株では湯温 70°C + 保存

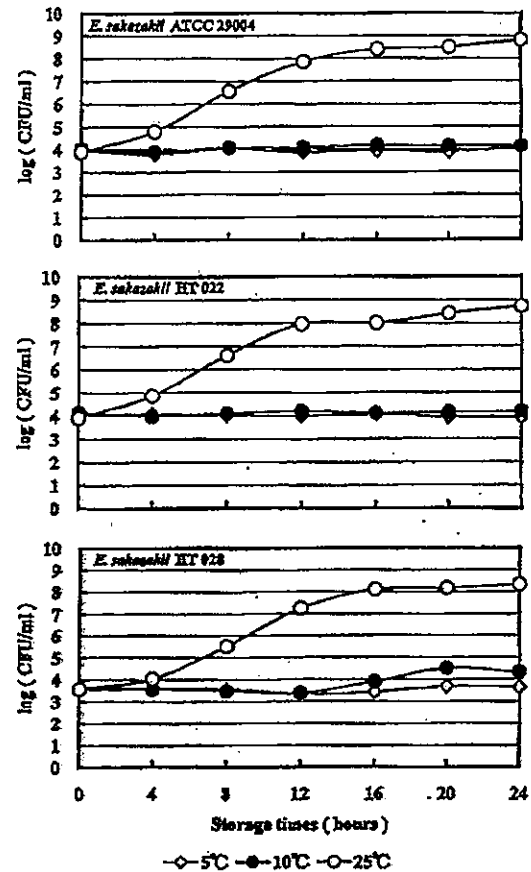


Fig. 2. The relationship between storage temperature and the growth of *E. sakazakii* in reconstituted PIF

Table 2. Effect of the hot water temperature and the storage temperature of reconstituted PIF on survival and growth of *E. sakazakii* ATCC 29004, *E. sakazakii* HT022 and *E. sakazakii* HT 028

Strain	Temperature (°C) Hot water & Storage	Reconstitution		Storage time (min)		
		Before (0 min)	After (2 min)	30 min	120 min	300 min
<i>E. sakazakii</i> ATCC 29004	60°C-25°C	6.91±0.26*	6.54±0.18	6.76±0.12	6.67±0.41	7.92±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	6.61±0.09	4.24±0.22	4.04±0.19	4.14±0.26	3.83±0.69
	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	0.63±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

*: log CFU/mL

** : ND, not detected; <1 CFU/mL of PIF by direct plating on plate count agar.

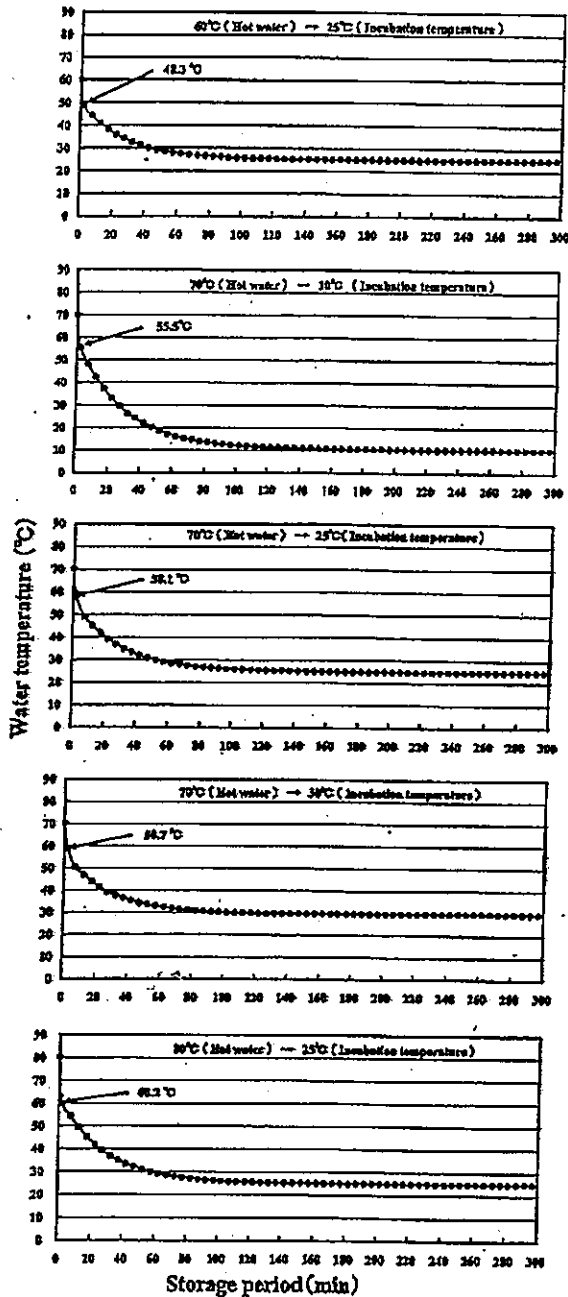


Fig. 8. Temperature profile of PIF reconstituted with hot water at 60, 70 and 80°C, followed by storage at 10, 25 and 30°C for 300 minutes

10°C 条件のみが *E. sakazakii* の増殖を抑制した, したがって, 調乳に用いる湯温 60°C では殺菌効果が弱いため, 70°C 以上がより殺菌効果が得られるものと考えられた. 菌株についての殺菌効果は, HT 022 株 > HT-028 株 > ATCC 株の順であった. 保存試験については保存 10°C 条件のみが供試 3 菌株の増殖を抑制した.

上記の実験における哺乳瓶中の温度の変化を Fig. 8 に示した. 攪拌調乳後の温度を測定した結果, 湯温 60°C + 25°C では 48.3°C, 湯温 70°C + 保存 10°C で 55.5°C, 湯温 70°C + 保存 25°C で 58.1°C, 湯温 70°C + 保存 30°C で 58.7°C, 湯温 80°C + 保存 25°C で 60.2°C を示し, 調乳後は緩やかな温度低下が観察され, 100~160 分でほぼ設定した温度に達した.

2) 哺乳瓶容器が及ぼす影響

哺乳瓶の材質が *E. sakazakii* の殺菌と保存中の増殖に及ぼす影響について検討を行った (Table 3). 25°C に保持したガラスおよびポリプロピレン製哺乳瓶に所定量の PIF と ATCC 株を L1) と同様に接種し, 湯温 70°C の SDW 99 mL を加え, 2 分間攪拌処理を行った. その結果, ガラス製哺乳瓶では 0.87 log CFU/mL の減少であったのに対して, ポリプロピレン製哺乳瓶では 2.11 log CFU/mL の減少が得られ, ガラス製に比較してポリプロピレン製の哺乳瓶では 1 log ほど高い殺菌効果が得られた. 処理時のガラス製哺乳瓶中の PIF 温度は 57.9°C, ポリプロピレン製では 61.5°C とガラス製より 4°C ほど保持温度が高い結果であった. 保存試験については両哺乳瓶で菌数の増加は認められなかった.

3) 哺乳瓶の予備加熱が及ぼす影響

ガラス哺乳瓶をあらかじめ加熱処理した後に, 所定量の PIF と ATCC 株を L1) と同様に接種し, 湯温 70°C で調乳した際の殺菌効果を Table 4 に示した. 未処理で調乳をした際の殺菌効果は 0.90 log CFU/mL であったのに対して, 予備加熱処理後では 1.79 log CFU/mL と菌数の減少が認められ, 予備加熱処理を行うことで未処理よりも 1 log 程度の高い殺菌効果が得られた. 処理時の温度は未処理で 58.1°C, 予備加熱処理で 62.7°C と予備加熱したほうが 5°C ほど高い結果であった. なお, 保存試験では両処理とも保存期間中菌数の増加は見られなかった.

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, 近年では乳幼児の重篤な感染症を引き起こ

Table 3. Effect of the materials of feeding bottles on survival and growth of *E. sakazakii* ATCC 29004 in PIF reconstituted with hot water (70°C) and stored at 25°C

Feeding bottle (Material)	Reconstitution		Storage time (min)		
	Before (0 min)	After (2 min)	30 min	120 min	300 min
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

*: log CFU/mL

Table 4. Effect of pre-heating treatment on survival and growth of *E. sakazakii* ATCC 29004 in reconstituted PIF

Preparation conditions	Reconstitution		Storage time (min)		
	Before (0 min)	After (2 min)	30 min	120 min	300 min
No treatment ^{a)}	7.04±0.11*	6.14±0.09	5.93±0.13	5.70±0.43	5.85±0.11
Treatment ^{b)}	7.13±0.03	5.34±0.25	4.81±0.34	4.70±0.43	4.67±0.51

* log CFU/mL

^{a)} PIF was reconstituted with 100 mL of hot water at 70°C by mixing for 2 min in a glass bottle.^{b)} The glass bottle was pre-heated for 30 sec with 50 mL of hot water at 70°C, then the hot water was discarded, and the PIF was reconstituted with 100 mL of hot water at 70°C.

す原因菌としても注目されている。FAO/WHOは2004年および2006年に“乳児用調製粉乳中の *E. sakazakii* に関するFAO/WHO合同専門家会議”を開催し、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ことを勧告し、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、*E. sakazakii* の汚染は低レベルであっても重大な危険因子であると報告している^{14,15)}。そこでFAO/WHOは *E. sakazakii* の対策と感染リスク低減のためのガイドラインを発表している¹⁶⁾。2008年にはコーデックスのPIFの規格にも取り入れられた。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に対する対策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、わが国の食品における分布や汚染菌数などについての情報は十分ではなく、五十君らの報告¹⁷⁾ があるに過ぎない。現在の食品製造技術では乳製品であるPIFの完全無菌化は商業的に困難といわれているため、*E. sakazakii* や他の病原菌による汚染リスクは常に懸念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十分に把握されていないため、調乳および保存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。

今回、*E. sakazakii* における感染リスク低減の対策の一つとして、PIFの調乳における殺菌効果とその保存における *E. sakazakii* の増殖を検討し、調乳における *E. sakazakii* のリスク低減の検討を試みた。供試した *E. sakazakii* の耐熱性は55°Cから80°Cの範囲で2分間の加熱処理を行ったところ、ATCC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、HT 028株の順であった。さらに食品の加熱の指標とされているD値については、ATCC株とHT 022株は60°Cで3.6分と1.9分となり、HT 028株は52°Cにおいて1.6分であった。Nazarowec-Whiteら¹⁸⁾ は食品と臨床由来の *E. sakazakii* 株を用いてPIF中でのD値を検討しているが、52~60°CでのD値は54.8~2.2分の範囲で、臨床菌株のほうが食品由来株より耐熱性が高いと報告している。Breeuwerら¹⁹⁾ も58°CでのD値を測定しているが、0.27~0.50分であったと報告している。また、Iversenら²⁰⁾ もD値は

54~62°Cで16.4~0.3分と算出している。われわれの結果からも、菌株によって耐熱性が異なることが明らかとなった。*E. sakazakii* は菌株による熱抵抗性の違いが大きい点が殺菌するうえで注意を要するものと考えられた。

次に実際のPIF調乳に用いられる湯温の殺菌効果を検討したところ、菌株による差が認められ、25°Cに保持した哺乳瓶と60°Cの湯温を用いた場合には、供試したATCC株およびHT 022株では有効な殺菌効果は見られなかった。70°Cの湯温では耐熱性のATCC株でも1 log CFU/mLほどの殺菌効果が得られ、さらに食品から検出されたHT 022株およびHT 028株では4~6 log CFU/mL以上の有効な殺菌効果が得られた。さらに80°Cの湯温では、供試菌株ではいずれも5 log以上の高い殺菌効果が認められた。実際のPIF汚染菌数^{17,18)} は非常に低いことから、湯温が70°C以上であれば有効な殺菌効果が得られるものと思われた。一方、湯温を80°Cにした場合本菌に対する殺菌効果は増大するものの、乳幼児への火傷のリスクが増大することも考慮する必要がある。

次に、哺乳瓶の材質が調乳時の湯温に影響を及ぼすことが考えられたので、哺乳瓶の材質について検討を行った。その結果、ガラス製哺乳瓶を使用時のPIFの調製は、60°Cの湯温ではガラスに熱が吸収され、*E. sakazakii* の死滅に有効な温度を維持できなかったのに対して、70°Cの湯温では比較的高い温度が保持され有効な殺菌効果が得られた。ポリプロピレン製哺乳瓶の場合では、ガラス製に比べて材質の特徴から比較的湯温の温度低下が少ないために、高い殺菌効果が得られたものと考えられた。したがって、ガラス哺乳瓶で調乳する際には、お湯であらかじめ温めておいてからPIFを溶解させたほうが *E. sakazakii* の殺菌効果がより得られるものと考えられた。

調乳後の保存温度については、保存25°Cおよび30°Cでは時間の経過とともに菌数増加の可能性が明らかにされた。さらに10°C保存でも菌株によっては保存中に増加する傾向も認められるので、安全性を考慮すると調乳後のPIFを保存する場合は10°Cよりも5°Cでの保存が望ましいことが確認された。Gurtlerら²¹⁾ も還元乳に *E. sakazakii* を接種して各温度での発育を検討しているが、12, 21, 30°Cでは増殖が認められたものの、4°Cでは増殖が抑制されることを確認し、直ちに供与しない場合は

4°C 以下で保存することを推奨している。Nazarowec-White²³⁾ も、PIF 中での *E. sakazakii* の増殖最低温度を検討しており、臨床株では 5.5~8.0°C、食品由来株では 5.5~7.5°C であることを報告している。これらのことから、調製後の PIF の長時間保存は 5°C 以下で行うことが望ましいと考えられた。なお、WHO と FAO による安全な調乳、保存および取り扱いのガイドラインでも 5°C 以下での保存を勧告している¹⁹⁾。

以上のことから、調乳に用いる湯温は 70°C 以上が推奨され、*E. sakazakii* を死滅させるに有効で感染防止に貢献できるものと考えられた。調乳後の保存は 5°C 以下で行い 2 時間以上の保存を避けることが *E. sakazakii* の感染リスクを低減するために重要であると推察された。

要 約

E. sakazakii における感染リスク低減の対策として、PIF の調乳における湯温の殺菌効果とその保存温度における増殖を検討した。

その結果、供試した *E. sakazakii* 菌株の中では、ATCC 株が最も耐熱性が高く、次いで HT 022 株、HT 028 株の順であった。さらに D 値は、ATCC 株が 60°C で 3.6 分、HT 022 株が 60°C で 1.9 分、HT 028 株が 52°C で 1.6 分であった。なお、菌株によって耐熱性が異なることが明らかとなった。調乳の湯温については、60°C では有効な殺菌効果は見られないのに対し、70°C では 1~2 log CFU/mL の死滅効果が得られた。さらに 80°C では供試 3 菌株とも 5 log 以上の殺菌効果が得られた。調乳後は 5°C に保存することにより供試 3 菌株の増殖を抑制した。

以上のことから、調乳に使用する湯温は 70°C 以上を用いることが、*E. sakazakii* の感染防止に有効な対策と考えられた。さらに調乳後は 5°C 以下で保存することが *E. sakazakii* の感染リスク低減には有効と考えられた。

文 献

- 1) Yoshizaki, Y. *Enterobacter sakazakii*. Medical Technology Jpn., 10, 255-258 (1982).
- 2) Iversen, C., Forsythe, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. Trends in Food Science & Technology, 14, 443-454 (2003).
- 3) Friedemann, M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages. (Other than infant formula and milk powder.) Int. J. Food Microbiol., 118, 1-10 (2007).
- 4) Igimi, S., Asakura, H. A brief review of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), 48, 229-233 (2007).
- 5) Simmons, B. P., Gelfand, M. S., Haas, M., Metts, L., Ferguson, J. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. Infect. Control Hosp. Epidemiol., 10, 398-401 (1989).
- 6) Himelright, L., Harris, E., Lorch, V., Anderson, M. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula-tennessee, 2001. J. Am. Med. Assoc., 287, 2204-2205 (2002).
- 7) Muyltjens, H. L., Roelofs-Willems, H., Jaspar, G. H. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae. J. Clin. Microbiol., 26, 743-746 (1988).
- 8) Iversen, C., Forsythe, S. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products. Food Microbiol., 21, 771-777 (2004).
- 9) Noriega, F. R., Kottloff, K. L., Martin, M. A., Schwalbe, R. S. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Louconostoc masenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. The Pediatric Infectious Disease Journal, 9, 447-449 (1990).
- 10) Yoshioka, T., Murata, B., Ozawa, A., Ozeki, M. Sterilization and preservation of formulas for infants. Shouni Hoken Kenkyu (The Journal of Child Health. Jpn.), 25, 69-73 (1967).
- 11) Matsuyama, M., Funaki, M. The influences of the preparing methods of milk formula using modified milk powder on the nutritional and bacteriological storage life. Shouni Hoken Kenkyu (The Journal of Child Health. Jpn.), 25, 289-298 (1967).
- 12) Asakura, H., Morita-Ishihara, T., Yamamoto, S., Igimi, S. Genetic characterization of thermal tolerance in *Enterobacter sakazakii*. Microbiol. Immunol., 51, 671-677 (2007).
- 13) 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針微生物編, 日本食品衛生協会, p.116-145 (2004).
- 14) Food and Agriculture Organization of the United Nation and World Health Organization. Joint FAO/WHO workshop on *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant. Meeting Report, 2004.
- 15) Food and Agriculture Organization of the United Nation and World Health Organization. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula. Meeting Report, 2006.
- 16) World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nation. Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula guidelines. (<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif-guideline.pdf>)
- 17) 五十君静信, 朝倉 宏. 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. 平成 17 年度厚生労働省研究費, 総括・分担研究報告書, p.45-48 (2006).
- 18) Nazarowec-White, M., Farber, J. M. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. Lett. Appl. Microbiol., 24, 9-13 (1997).
- 19) Bresuwer, P., Lardeau, A., Peterz, M., Joosten, H. M. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. J. Appl. Microbiol., 95, 967-973 (2003).
- 20) Iversen, C., Lane, M., Forsythe, S. J. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *En-*

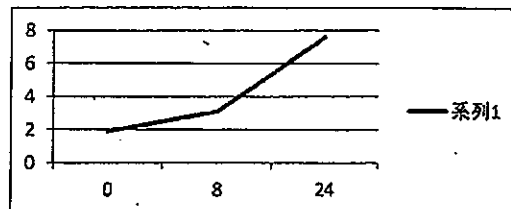
- terobacter sakazakii* grown in infant formula milk. Lett. Appl. Microbiol, 38, 378-382 (2004).
- 21) Gurtler, J. B., Beuchat, L. R., Growth of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula as affected by composition and temperature. J. Food Prot., 70, 2095-2103 (2007).
- 22) Nazarowec-White, M., Farber, J. M. Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. J. Food Prot., 60, 226-230 (1997).

Combase ホームページより: <https://www.combase.cc/index.php/ja/>
検索キーワード「Salmonella」、「Infant and water」、「25°C」

①ComBase ID
Organism
Matrix
Temperature(℃)
Aw
pH
Max.rate(logc.conc/h)
Logcs:

CA_1211
Salmonella spp
Infant_food (In: infant formula hydrated with water)
25
0.964
6.66
Fit data

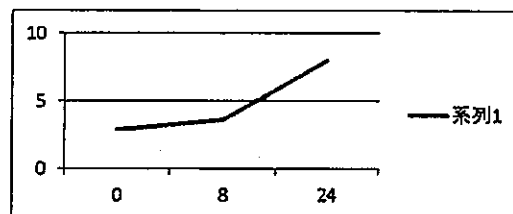
Time (h)	0	8	24
Logc	1.9	3.1	7.6



②ComBase ID
Organism
Matrix
Temperature(℃)
Aw
pH
Max.rate(logc.conc/h)
Logcs:

CA_1238
Salmonella spp
Infant_food (In: infant formula hydrated with water)
25
0.964
6.66
Fit data

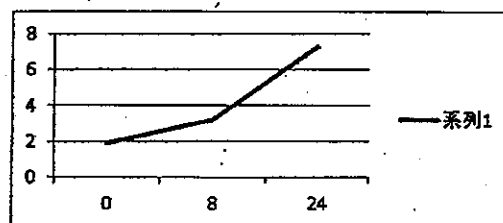
Time	0	8	24
Logc	2.9	3.6	8



③ComBase ID
Organism
Matrix
Temperature(℃)
Aw
pH
Max.rate(logc.conc/h)
Logcs:

CA_1202
Salmonella spp
Infant_food (In: infant formula hydrated with water)
25
0.964
6.68
Fit data

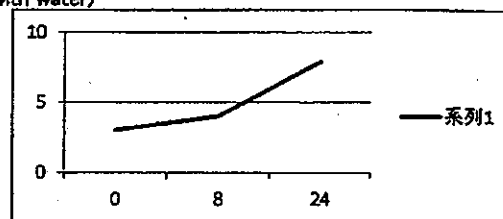
Time	0	8	24
Logc	1.9	3.2	7.3



④ComBase ID
Organism
Matrix
Temperature(℃)
Aw
pH
Max.rate(logc.conc/h)
Logcs:

CA_1229
Salmonella spp
Infant_food (In: infant formula hydrated with water)
25
0.964
6.68
Fit data

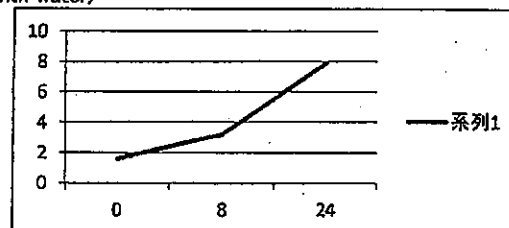
Time	0	8	24
Logc	3	4	7.9



⑤ComBase ID
Organism
Matrix
Temperature(℃)
Aw
pH
Max.rate(logc.conc/h)
Logcs:

CA_1193
Salmonella spp
Infant_food (In: infant formula hydrated with water)
25
0.964
7.08
Fit data

Time	0	8	24
Logc	1.6	3.2	7.9



⑥ComBase ID
Organism
Matrix
Temperature(℃)
Aw
pH
Max.rate(logc.conc/h)
Logcs:

CA_1220
Salmonella spp
Infant_food (In: infant formula hydrated with water)
25
0.964
7.08
Fit data

Time	0	8	24
Logc	2.3	3.8	8

