

## 粉末状乳幼児食品におけるエンテロバクター・サカザキ（クロノバクター属菌）の消長

中村寛海、安福 潔\*、小笠原 準、大山み乃り、有川健太郎\*\*、長谷 篤

Survival and Growth of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in Powdered Infant FoodsHiromi NAKAMURA, Kiyoshi YASUFUKU\*, Jun OGASAWARA,  
Minori OYAMA, Kentaro ARIKAWA, and Atsushi HASE

## Abstract

*Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) is ubiquitous in nature, residing in the human or animal intestine. *E. sakazakii* is regarded as an opportunistic human pathogen and the etiological agent of life-threatening bacterial infections in infants and neonates. Powdered infant foods have been shown to contain *E. sakazakii*. Powdered infant formula (PIF) has been epidemiologically linked to several clinical cases. The objective of this study was to understand the survival and growth of *E. sakazakii* in powdered infant foods. First, we investigated the contamination of *E. sakazakii* and *Enterobacteriaceae* in 3 PIFs and 11 powdered infant foods. *Escherichia vulneris* was detected in 1 item of powdered infant food. *E. sakazakii* was not detected in any items. Powdered infant foods were inoculated with *E. sakazakii* at  $10^3$  CFU/mL food, immediately mixed with 70 °C water, and stored at 25 °C. PIF was inoculated with *E. sakazakii* at  $10^4$  CFU/mL, reconstituted with 37, 60, 70 and 90 °C water. *E. sakazakii* in PIF survived after reconstitution and increased to  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL after 24 h. The number of *E. sakazakii* in 8 powdered infant foods decreased to  $<0.3$  (MPN in 1mL food), but this organism increased after 24h in 4 items of these foods. The results of these studies show that powdered infant foods can be contaminated by *E. sakazakii*, and it grows in these foods at room temperature. Powdered infant foods should be used immediately after preparation, and should not be stored for a long time.

**Key words:** *Enterobacter sakazakii*, *Cronobacter* spp., powdered infant foods, powdered infant formula, PIF, survival, growth

## I 緒言

エンテロバクター・サカザキ (*Enterobacter sakazakii*, 以下Esと略す)は、通性嫌気性のグラム陰性桿菌で、ヒトや動物の腸管内、環境中に広く存在している。本菌は、かつては黄色コロニー形成 (Yellow-pigmented) *Enterobacter cloacae* と呼称されていたが、1980年に *Enterobacter cloacae* から独立し、Es として再分類された。

Esは新生児の髄膜炎に関係しているとして1958年にイギリスで初めて問題視され、その後2006年までに約70件のEs感染事例が報告されている[1]。Esに感染すると新生児、乳幼児、特に未熟児や免疫不全児、低体重出生児を中心として、敗血症、壊死性腸炎や脳潰瘍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。成人でも発症することはあるが、健常人の場合、本菌にさらされても不顕性で経過することが多く[2]、日和見感染症の原因菌となる。

---

大阪市立環境科学研究所

〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences

8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

\*大阪市保健所 食品衛生監視課

〒545-0051 大阪市阿倍野区旭町1-2-7-1000

Public and Welfare Centers in Osaka City

1-2-7-1000, Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545-0051, Japan

\*\*現 神戸市環境保健研究所

乳児用調製粉乳 (Powdered Infant Formula、以下 PIFとする)は、菌数は低レベルであるものの広くEsに汚染されており[3]、PIFを介したEsの感染例が実際に報告されている[1]。2004年2月と2006年5月に開催された「乳児用調製粉乳中の*Enterobacter sakazakii*に関するFAO/WHO合同専門家会議」では、PIFのEs汚染は乳児の感染および疾患の原因となると結論づけられ、最も有力な感染経路として認識された。

わが国のPIFの衛生確保については、乳及び乳製品の成分規格等に関する省令(乳等省令)で調製粉乳の規格基準が設定されている。しかしながら、Esが検出されたPIFから大腸菌群やサルモネラは検出されておらず、これらをEs汚染の指標菌とすることはできないとの報告がある[2]ため、PIF中のEsを制御するには生菌数と大腸菌群のみの検査では不十分と考えられる。PIFが乳幼児のEs感染リスクの高い食品であると認識される中、厚生労働省は各自治体に対し、「育児用調製粉乳の衛生的取り扱いについて」(平成17年6月)、「乳児用調製粉乳の安全な調乳、保存および取り扱いに関するガイドラインについて」(平成19年6月)を通知した。また、平成17～19年に厚生労働科学研究班が「乳幼児食品中の有害物質および病原微生物」でわが国のPIFの汚染状況について詳細に調査を行った。それによると、国内にEsの感染とPIFが直接的に関連した事例はなかったが、PIFの2～4%にEs汚染が見られ、菌数は333g中に1個と低レベルではあるがEs汚染が存在することが明らかとなった[4]。PIFは乳児にとって母乳に代わる唯一の栄養源であることから、PIFのEs汚染は低レベルであっても重大な危険因子と考えられ、PIFを原因としたEs感染症の発生が懸念される。汚染実態調査の結果[3]からPIFが直接の感染源として重要であることは間違いないが、ミルク溶解調製時の二次汚染と考えられる事例も2001年に報告されている[5]ことから、ミルクを調製する際の適正な取り扱いはEsの感染症発生予防のために重要である。さらに、本研究班によると、PIFに限らず粉末状の形態をとる食品にEs汚染が多いことが実態調査の結果として示されている[6]。市販乳幼児食品(ベビーフード)は離乳期にミルクと併用されることが多く、その利便性から近年多様化しており、ビン詰めやレトルト包装、粉末状のものが販売されているが、これらのうち粉末状のものはPIF同様殺菌処理が行われていないことが予想され、Es汚染の可能性が高いと考えられる。実際に2007年12月には粉末状ベビーフードから大腸菌群が検出され、メーカーが自主回収を行っている[7]。PIF同様、ベビーフードのEs汚染は乳幼児のEs感染に直接結びつく危険性がある。

そこで本研究では、市販のPIFおよび粉末状ベビーフードを用いてこれらにEsを添加し、厚生労働省のガイドラインに示されている70℃の水でこれらを調製した後に室温(25℃)で保管した時のEsの消長について調

べた。また、PIFについては、ミルク調製時の湯温の影響を調べるために、厚生労働省のガイドラインに示されている70℃、電気ポットの調乳モードである60℃および37℃、90℃の水でミルクを調製し、Esの生残について調べたので報告する。

なお、これまでEsには16生物型が存在することが知られており、複数の種を包含する可能性があると考えられてきたが[8]、Iversenらは2007年にこれらを整理する目的でEsを*Cronobacter*属とする新菌属の提案をした[9]。しかしながら、FAO/WHOの専門家会議でリスク評価を行ったEsの範囲が、新菌種・新亜種のいずれに相当するかは現在もまだはっきりとしていないことから[10]、本文中では敢えてEsを*Cronobacter sakazakii*とせず、旧分類のEsもしくは*Cronobacter*属菌と表記することとした。

## II 材料と方法

### 1) 調査期間

平成21年2月から平成22年2月の間に大阪市内でPIFおよび粉末状ベビーフードを購入し、調査した。

### 2) 材料

大阪市内の小売店から購入したPIFおよび粉末状ベビーフードを使用した。これらは、購入後速やかに以下に示す方法でEsおよび*Enterobacteriaceae* (Ent, 腸内細菌科菌群)の検査を行った。検査後のPIFおよび粉末状ベビーフードは添加実験に使用するまで冷蔵で保管した。

### 3) 使用菌株

市販の標準菌株 *Enterobacter sakazakii* ATCC51329 (LYFO DISK)(Microbiologics社)を添加実験に使用した。

### 4) Esおよび*Enterobacteriaceae* (Ent, 腸内細菌科菌群)の検査法

#### (1) PIF中のEsの検出[11]

PIFからのEsの検出は、米国食品医薬品局(FDA)のBacterial Analytical Manual(BAM)[11]に従って行った。すなわち、あらかじめ45℃に温めておいた900 mLの滅菌水を2 Lの三角コルベン3本に用意しておき、ここにPIF 100 gずつを無菌的に投入した。また、10 gおよび1 gのPIFをそれぞれ3枚のストマッカー袋にはかり入れ、45℃に温めておいた滅菌水を90 mLおよび9 mLずつ分注して粉が均一に懸濁するよう攪拌し、これらを36℃で一晩培養した。培養後、90 mLの*Enterobacteriaceae* enrichment broth (EE培地)(Merck)にPIFの懸濁培養液10 mLを加え、36℃で一晩培養した。培養後、一白金耳をVRBG寒天平板培地(BD DIFCO)およびクロモカルトエンテロバクターサカザキ(CES)寒天平板培地

(Merck)に塗抹し、VRBG寒天平板培地は36℃で、CES寒天平板培地は44℃で一晩培養した。Esが疑われる典型的コロニーを釣菌してそれぞれのコロニーを1枚のトリプトソーヤ寒天平板培地(TSA培地)(ニッスイ)に広げ、25℃で72時間以上培養した。TSA寒天平板上で黄色色素の産生を確認したコロニーについてオキシダーゼ試験を実施し、TSI培地(ニッスイ)、LIM培地(ニッスイ)、SC培地(ニッスイ)に接種した。一部の菌株については、市販のキットであるAPI20E(シスメックス・ビオメリュー)で同定を行った。37℃で一晩培養後、TSI培地上で高層部および斜面部黄色、硫化水素非産生、LIM培地でリジン脱炭酸酵素陰性、運動性があり、SC培地でクエン酸利用能があることを確認したものについて、アルギニン脱水素酵素、オルニチン脱炭酸酵素の有無および糖分解性状(グルシット、アドニット、ラフィノース、ソルビット、 $\alpha$ -メチル-D-グルコシド、アラビトール)を確認し、Esと同定した。陽性となったサンプルの本数を数えてFDAのBAM(Appendix2; Most Probable Number Determination from serial Dilutions)[12]に従ってMPN値を算出した。

## (2) 粉末状ベビーフード中の Es の検出

粉末状ベビーフードからのEsの検出は、Chapら[13]の方法に準じて行った。すなわち、粉末状ベビーフード25gにBuffered peptone water(BPW)(OXOID)225mLを加え、粉末を均一化し、37℃で一晩培養した。培養後、90mLのEE培地(Merck)に粉末状ベビーフードのBPW培養液10mLを加え、36℃で一晩培養した。培養後、一白金耳をVRBG寒天平板培地およびCES寒天平板培地に塗抹し、VRBG寒天平板培地は36℃で、CES寒天平板培地は44℃で一晩培養した。Esが疑われる典型的コロニーについて、(1)PIF中のEsの検出の項と同様の方法でEsを同定した。

## (3) *Enterobacteriaceae*(Ent,腸内細菌科菌群)の検出

*Enterobacteriaceae*(Ent)の検出は以下に示す方法により行った。すなわち、Es検出の際にVRBG寒天平板上でグルコース利用により紫、赤あるいはピンク色を呈したコロニーが見られた場合、TSA培地に広げてオキシダーゼ試験を実施するとともに、TSI培地、LIM培地、SC培地に接種して37℃で一晩培養後判定した。また、TSA培地からコロニーを掻き取り、市販のキットであるAPI20Eで同定を行った。

## 5) 粉末状ベビーフードへのEsの添加実験

粉末状ベビーフードへ添加する菌液の調製および菌数の計測は以下の要領で行った。すなわち、ATCC51329株をTSBブイオン(BD BBL)に接種し、37℃で一晩培養した。培養液100 $\mu$ Lを900 $\mu$ Lの滅菌生理食塩水で段階希釈して2枚のTSA培地に広げ、

37℃で一晩培養後コロニー数を計測し、添加菌数を算定した。添加菌数は、TSBブイオン培養液を滅菌生理食塩水で100倍希釈した菌液あるいは1000倍希釈した菌液1mLとした。添加実験は以下の要領で行った。すなわち、あらかじめEsおよびEnt陰性を確認した粉末状ベビーフードをスタマッカー袋に無菌的にはかりとり(水100mL相当の量)、菌液を1mL添加した。ここに70℃に保持した滅菌水をそれぞれ99mL加え、試料原液とした。試料原液を混和後、37℃で15分間インキュベートした。これを25℃のインキュベータで保管して6、24、48、72時間後に取り出して滅菌生理食塩水で段階希釈し、希釈液各100 $\mu$ Lずつを2枚のCES培地に広げ、44℃で一晩培養後Esコロニー数を計測した。添加直後の菌数(0時間)は以下に示すMPN法により算出した。すなわち、試料原液各1mLを3本のEE培地9mLに、試料原液1mLの10倍および100倍希釈液を作製し、各希釈液1mLずつを各3本のEE培地9mLに加えて、36℃で一晩培養した。培養後は**4) EsおよびEntの検査法**(1)PIF中のEsの検出の項に従ってEsの同定を行った。平板はVRBG培地のみを使用した。Es陽性となった試験管の本数を数え、FDAのBAM(Appendix2; Most Probable Number Determination from serial Dilutions)[12]に従って粉末状ベビーフード1mLあたりのMPN値を算出した。

また、PIF調製時のEsに対する湯温の影響は以下の方法で調べた。すなわち、あらかじめEs陰性を確認したPIFを4つのスタマッカー袋に無菌的にはかりとり(水100mL相当の量)、菌液1mLを添加し、37、60、70、90℃に保持した滅菌水をそれぞれ99mL加え、試料原液とした。試料原液を混和後、37℃で15分間インキュベートした。試料原液各1mLを3本のEE培地9mLに、試料原液の10~100000倍希釈液を作製し、希釈液各1mLずつを各3本のEE培地9mLに加えて、36℃で一晩培養した。培養後は**4) EsおよびEntの検査法**(1)PIF中のEsの検出の項と同様の手順でEsの同定を行い、ミルク1mLあたりのMPN値を算出した。

## 6) Esが回収されなかった粉末状ベビーフードの増菌培養によるEsの生死確認

Esの添加実験で72時間後もEsが検出限界以下となった粉末状ベビーフードについては、生きてはいるけれども培養できない、いわゆるviable but non-culturable(VNC)状態となっている可能性がある。Esが検出限界以下で存在している、あるいはVNC状態であるかどうかを知る目的で、72時間保管後に増菌培養を行いEsの生死を確認した。すなわち、Es添加後72時間保管したベビーフード25gにEE培地225mLを加えて36℃で一晩培養した。以下、**4) EsおよびEntの検査法**(1)PIF中のEsの検出の項と同様の方法でEsの同定を行った。

### Ⅲ 結果

今回実験に使用したATCC51329株の性状を表1に示した。FDAのBAMによると、Esはズルシット陰性、 $\alpha$ -メチル-D-グルコシド陽性であるが、本菌株はズルシット陽性、 $\alpha$ -メチル-D-グルコシド陰性であった。しかしながら、TSA培地のコロニーについて直接API20Eで同定を行ったところ、本菌株はEsと同定されたことから、ズルシット陽性、 $\alpha$ -メチル-D-グルコシド陰性のEsとした。

表1 *Enterobacter sakazakii*の生化学性状

	<i>E. sakazakii</i> <sup>*1</sup>	ATCC51329
アミノ酸利用能		
リジン脱炭酸酵素	—	—
アルギニン脱水素酵素	+	+
オルニチン脱炭酸酵素	+	+
糖分解性状		
シュクロース	+	+
ズルシット	—	+
アドニット	—	—
D-ソルビット	—	—
ラフィノース	+	+
$\alpha$ -メチル-D-グルコシド	+	—
D-アラビトール	—	—
黄色色素	+	+

\*1 Bacterial Analytical Manual (FDA) [11]による

表2に今回実験に使用したPIFおよび粉末状ベビーフードの詳細と各食品におけるEsおよびEntの検査結果を示した。これら14種類の食品全てEsは陰性であった。Entは、「鶏レバーと緑黄色野菜」を除きすべて陰性

表2 使用した粉末状乳幼児食品と*Enterobacter sakazakii*および*Enterobacteriaceae*(腸内細菌科菌群)の検査結果

食品 No.	ベビーフード名称 (メーカー)	主原料(分類)	内容量	<i>E. sakazakii</i> (25g中) <sup>*1</sup>	<i>Enterobacteriaceae</i> (腸内細菌科菌群)
1	粉ミルク(A社)	調製粉乳	300g	陰性 <sup>*1</sup>	陰性
2	粉ミルク(B社)	調製粉乳	850g	陰性 <sup>*1</sup>	陰性
3	粉ミルク(C社)	調製粉乳	850g	陰性 <sup>*1</sup>	陰性
4	米がゆ(A社)	米でん粉	60g (15g×4包)	陰性	陰性
5	パンがゆ(D社)	小麦粉・脱脂粉乳	60g (12g×5袋)	陰性	陰性
6	とろみのもと(A社)	さつまいもでん粉	28g (2.8g×10包)	陰性	陰性
7	ほうれん草と小松菜(A社)	野菜	25.6g (3.2g×8包)	陰性	陰性
8	野菜スープ(B社)	野菜	20g (2g×10袋)	陰性	陰性
9	りんご果汁(A社)	果物	50g (5g×10包)	陰性	陰性
10	鶏レバーと緑黄色野菜(A社)	レバー・野菜	36g (4.5g×8包)	陰性	陽性 ( <i>Escherichia vulneris</i> )
11	さかな野菜(D社)	魚・大豆タンパク・野菜	32g (4g×8袋)	陰性	陰性
12	和風だし(B社)	魚・昆布	30g (3g×10袋)	陰性	陰性
13	和風だし(E社)	魚	50g	陰性	陰性
14	野菜スープ(E社)	野菜	50g	陰性	陰性

\*1 粉ミルクは333gについて*Enterobacter sakazakii*の検査を行った

であった。「鶏レバーと緑黄色野菜」からはEntである*Escherichia vulneris*が検出された。Entが検出された「鶏レバーと緑黄色野菜」、同じ種類が重複している2検体(野菜スープと和風だし)を除く異なる8種類のベビーフードと1種類のPIFについてEsの消長を調べた結果を表3に示した。粉末状ベビーフード、PIFともに実験に使用した粉末量は水100mLあたり5.2g(パンがゆ)～20.2g(さかな野菜)であった。これらの食品1mLあたり $10^3$  CFUとなるようにEsを添加して70℃の温水で調製し、Esの消長を調べた。その結果、PIFは調乳直後もEsが生残り、24時間後には $2.0 \times 10^7$  CFU/mLに達した。また、8種類の粉末状ベビーフードは全てMPN法の検出限界未満(食品1mLあたり<0.3)となったが、24時間後にはこれらのうち4種類でEsの増殖が認められ、「ほうれん草と小松菜」で食品1mLあたり $6.9 \times 10^3$  CFU、「パンがゆ」で $5.8 \times 10^4$  CFU、「野菜スープ」で $1.6 \times 10^6$  CFU、「さかな野菜」で $2.9 \times 10^6$  CFUであった。72時間後もEsが検出されなかった4種類のベビーフード(「米がゆ」、「とろみのもと」、「りんご果汁」、「和風だし」)については、保管後増菌培養を行いEsの生死を確認した。その結果、いずれのベビーフードからもEsは検出されなかった。

PIF調製時の湯温の影響を調べるため、ミルク1mLあたり $3.1 \sim 4.0 \times 10^4$  CFUのEsを添加し、あらかじめ異なる温度(37℃、60℃、70℃、90℃)で保持した滅菌水を加えてEsの生残を調べた結果を表4に示した。

37℃ではミルク1mLあたりのMPN値が $4.3 \times 10^3 \sim$

表3 粉末状乳幼児食品を25°Cで保管したときの*Enterobacter sakazakii*菌数の経時変化

食品 No.*1	ベビーフード名称	調製した粉末量(g)*2	添加菌数 (cfu/mL food)	CFU or MPN 値*3 /mL food				
				0 h*3	6 h	24 h	48 h	72 h
1	粉ミルク	13.1	1.2×10 <sup>3</sup>	2.3	6.5×10	2.0×10 <sup>7</sup>	1.4×10 <sup>9</sup>	2.1×10 <sup>9</sup>
4	米がゆ	5.4	3.5×10 <sup>3</sup>	<0.3	<10	<10	<10	<10
5	パンがゆ	5.2	2.2×10 <sup>3</sup>	<0.3	<10	5.8×10 <sup>4</sup>	8.5×10 <sup>7</sup>	1.5×10 <sup>8</sup>
6	とろみのもと	7	1.2×10 <sup>3</sup>	<0.3	<10	<10	<10	<10
7	ほうれん草と小松菜	16.2	3.5×10 <sup>3</sup>	<0.3	<10	6.9×10 <sup>3</sup>	4.6×10 <sup>7</sup>	1.5×10 <sup>8</sup>
8	野菜スープ	6.7	2.2×10 <sup>3</sup>	<0.3	7.5×10	1.6×10 <sup>6</sup>	2.8×10 <sup>8</sup>	1.6×10 <sup>8</sup>
9	りんご果汁	12.6	1.2×10 <sup>3</sup>	<0.3	<10	<10	<10	<10
11	さかな野菜	20.2	3.5×10 <sup>3</sup>	<0.3	<10	2.9×10 <sup>6</sup>	2.6×10 <sup>8</sup>	9.6×10 <sup>8</sup>
13	和風だし	8.3	2.2×10 <sup>3</sup>	<0.3	<10	<10	<10	<10

\*1 表2で示す食品No.に対応する

\*2 メーカーの調製法に従った水100 mLあたりの粉末量

\*3 添加直後(0 h)のみMPN法で菌数を計測した

表4 異なる温度の水でミルクを調製したときの*Enterobacter sakazakii*の菌数変化

食品 No.*1	添加菌数 (cfu/mL milk)	MPN 値/mL milk			
		37°C	60°C	70°C	90°C
1	4.0×10 <sup>4</sup>	1.1×10 <sup>4</sup>	2.4×10 <sup>2</sup>	9.3	<0.3
2	3.1×10 <sup>4</sup>	4.6×10 <sup>4</sup>	9.3×10 <sup>2</sup>	<0.3	<0.3
3	4.0×10 <sup>4</sup>	4.3×10 <sup>3</sup>	2.4×10 <sup>3</sup>	4.3	<0.3

\*1 表2で示す食品No.に対応する

4.6 × 10<sup>4</sup> となり、菌数の減少はほとんど認められなかった。60°Cでは 2.4 × 10<sup>2</sup>~2.4 × 10<sup>3</sup> となり、1~2オーダーの菌数の減少が認められた。70°Cでは、No.2のミルクが検出限界以下となったが、No.1と3では 4.3~9.3の菌が生残した。90°Cでは、いずれのミルクにおいてもEsは検出限界以下となった。

今回、Es検出および添加実験に選択分離培地としてFDAのBAMで使用することになっているVRBG寒天平板培地に加えて、Esの選択分離培地であるCES寒天平板培地を併用した。これら2種類の培地間にEs検出における差は認められなかった。

## VI 考察

今回実験で使用したATCC51329株は*Enterobacter sakazakii*の標準菌株として購入したものであるが、Iversenら[9]の新分類によると、本菌株は旧Esに含まれる新菌種の一つである*Cronobacter muytjensii*である。*Cronobacter muytjensii*はズルシット陽性でメチル-α-D-グルコシド陰性であることが報告されており[9]、当研究所で行った同定試験結果に問題はないと考える。今回は添加した菌株を回収したので、通常とは異なる生化学性状を有する株であってもEsと同定することは可能であったが、Iversenら[9]の新分類に従うと、Esが示す多様な生化学性状は汚染された検体からEsを分離し、生化学性状のみで同定することの困難さを示している。実際に最終判断は16SリボゾームRNA配列で遺伝学的に行われることがあり[2,4]、今後はPCR法での確認試験も検討したい。

市販のPIF3検体およびベビーフード11検体についてEsおよびEntの汚染状況を調べた結果、Esは14検体

全てで陰性であった。ベビーフードの1検体(「鶏レバーと緑黄色野菜」)でEntである*Escherichia vulneris*(Ev)が検出された。Evが検出された1検体、同じ種類が重複している2検体(野菜スープと和風だし)を除く異なる8種類のベビーフードと1種類のPIFを用いEsの添加実験を行った。その結果、添加実験を行った8種類のベビーフードのうち4種類でEsが増殖した。これらのうち3種類のベビーフードの原材料として小麦粉が含まれていた。Chap[13]らは、Es(*Cronobacter*属)は小麦、米、ハーブや香辛料などの植物性食品から分離されることが多く、小麦や米由来のでんぷんが食品への汚染源となると述べている。また、EsはPIF中で25°C24時間後には 10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup> CFU/mLに増殖することが報告されているが[14]、ベビーフードも調製後に菌が生残した場合、PIFと同様の挙動でEsが増殖する危険性があることが確認された(図1)。PIF同様、ベビーフードも調製後は速やかに使用するべきである。

Kim[15]らは2005年に野菜あるいは果物のジュースに*Cronobacter sakazakii*(Cs)を添加し、25°Cにおける増殖を調べたところ、りんご、イチゴ、キャベツジュースではCsの増殖が見られなかったとしているが、2009年には、カットしたりんごを用いると25°CでCsは増殖すると報告している[16]。今回72時間後もEsが回収されなかったベビーフードについては、検出限界以下で存在している、あるいは生きてはいるが培養できない、いわゆるviable but non-culturable (VNC)状態となっている可能性が考えられることから、生死を確認する目的で72時間保管後の検体の増菌培養を試みたが、Esは検出されなかった。このことから、りんごに含まれる成分によりEsの発育・増殖が抑えられたのではなく、ベビーフー

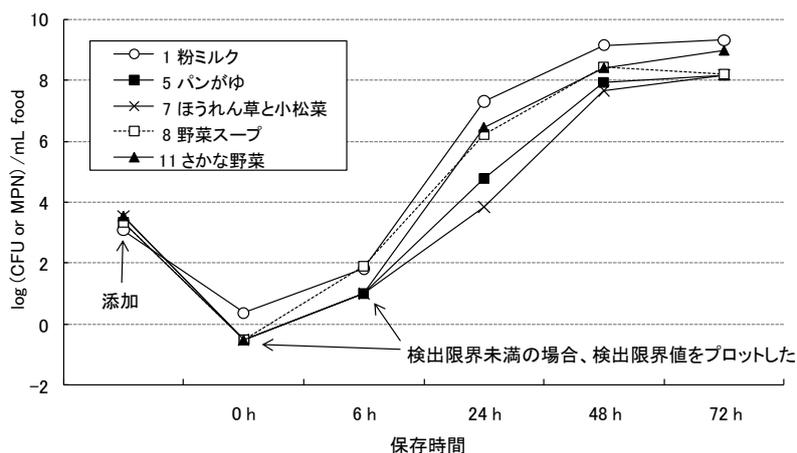


図1 粉末状乳幼児食品中での*Enterobacter sakazakii*の増殖曲線

ドを調製する際にEsが死滅した可能性が高いと考えられた。今回、りんご果汁以外でEsの増殖が確認されなかった3種類のベビーフード(「米がゆ」、「とろみのもと」、「和風だし」)については、生菌を添加して増殖することを確認していないが、りんご果汁と同様Esは検出されなかったことから、これらの食品についても調製時に死滅した可能性が高いと考えられる。

平成19年6月に通知された「乳児用調製粉乳の安全な調乳、保存および取り扱いに関するガイドラインについて」によれば、ミルクの調製は70℃以上の湯で行うことが推奨されている。しかしながら、今回の実験結果から、汚染菌数が高い場合、70℃の調乳ではEsは完全に死滅せずに生残することがわかった。実際にPIFを汚染しているEsは極微量であり、わが国における調査結果からも汚染菌量は333g中1個程度[4]とされていることから $10^3 \sim 10^4$ 程度のEsが存在するケースはほとんどないと思われるが、70℃ではEsが完全に死滅しないことを認識する必要がある。また、今回実験に用いた標準菌株ATCC51329は、野性株に比べて20倍熱に弱いことが報告されている[3]。野生株はこれよりもさらに熱抵抗性を示す可能性があり、免疫不全児などリスクの高い乳児が対象となる場合は、商業的滅菌済みの液体ミルクを使用するか90℃以上の温水で調乳するのが望ましいと思われる。

わが国では現在、腸管系食中毒菌の衛生指標菌として大腸菌群が使用されているが、ヨーロッパ連合(EU)で2006年から施行されている食品の微生物規格では、大腸菌群にかわり、Entが使用されている。乳糖利用能のみで評価する大腸菌群に比べて、Entは乳糖非分解である赤痢菌やサルモネラを含めて評価しようとするものであり、わが国でも今後、大腸菌群にかわる衛生指標菌となることが予想される[17]。EsおよびEvはEntであり、なおかつ大腸菌群に含まれる菌種である。すなわち、今回市販のベビーフードからEvが検出されたことは、これらの食品もPIF同様、Esに汚染される可能性があるこ

とを示唆するものである。実際にCsが検出された乳児用食品から同時にEvが検出されたという報告もある[13]。

以上より、粉末状ベビーフードはPIF同様、Esに汚染される可能性があること、また、これらの食品にEs汚染があった場合、調製後のベビーフードを室温で放置すればEsが増殖することが確認された。PIF同様、ベビーフードも調製後は速やかに使用するべきである。

今回我々が行った実験結果では、PIF中のEs検出に



図2 *Enterobacter sakazakii* (ATCC51329)のクロモカルトエンテロバクターサカザキ(左)およびVRBG(右)寒天平板培地上でのコロニー

におけるVRBGとEsの選択分離培地であるCES寒天平板培地間に差は認められなかった。使用したPIFは増菌培養液を塗抹してもいずれの培地上にもコロニーの発育がみられなかったことから、夾雑菌の少ない食品と考えられた。添加実験でもEsの検出において、分離平板による違いは認められなかった。しかしながら、VRBG培地上のEsのコロニーはムコイドを形成し、BAMで示されているようなコロニーの色調および周囲の混濁帯が判定しづらく、コロニーの単離が困難であるのに対し、CES培地はコロニーの色がわかりやすく容易に単離できた(図2)。CES培地は夾雑菌の多い食品からのEsの検出に威力を発揮すると期待される。

## V 結論

市販の乳児用調製粉乳(PIF)3検体および粉末用乳幼児食品(ベビーフード)11検体についてエンテロバクター・サカザキ(Es)および*Enterbacteriaceae*(Ent,腸内細菌科菌群)の汚染状況を調べた結果、Esは14検体全てで陰性であった。ベビーフードの1検体でEntである*Escherichia vulneris*(Ev)が検出された。これらのうち1種類のPIFおよび8種類のベビーフードにEsを添加し、これらの食品中でのEsの消長を調べた。さらに、PIFについては、温度の異なる温水で調乳し、Esの生残を調べた。その結果、 $10^3$  CFU(食品1 mLあたり)のEsを添加したPIFは調乳直後でもEsが生残し、24時間後には $2.0 \times 10^7$  CFU/mLに達した。8種類の粉末状ベビーフードは調製直後速やかに検出限界未満となったが、これらのうち4種類については24時間後にEsの増殖が見られた。Esは汚染菌数が高い場合、わが国のガイドラインで示されている70°Cでは完全に死滅しないことがわかった。以上より、粉末状ベビーフードもPIF同様、Esに汚染される可能性があること、室温放置によりEsが増殖することがわかった。これらの食品は、調製後速やかに使用するべきである。

**謝辞** 本研究の遂行にあたり、当研究所管理課企画調整グループの松岡秀明氏、北口智一氏に大変お世話になりました。ここに深謝致します。

(本研究は、平成20～21年度健康福祉局生活衛生課特別調査研究「既製食品の汚染源追究調査」として実施されたものである。)

## 参考文献

- 1) Drudy D, Mullane NR, Quinn T, Wall PG, and Fanning S. *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula. Clin. Infect. Dis., 2006; 42: 996-1002.
- 2) 五十君静信, 朝倉 宏. 乳児用調製粉乳中の *Enterobacter sakazakii*による感染. 食品衛生学雑誌, 2007; 48: J-229-233.
- 3) Gurtler JB, Kornacki JL, and Beuchat LR. *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. Int. J. Food Microbiol. 2005; 104: 1-34.
- 4) 五十君静信, 朝倉 宏. CODEXで、乳児用調製粉乳の微生物規格に加えられたエンテロバクター・サカザキ. 病原微生物検出情報. 2008; 29: 223-224.
- 5) Himelright I, Harris E, Lorch V, and Anderson M. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee, 2001. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 2002; 51: 297-300.
- 6) 五十君静信, 朝倉 宏. 食品より分離された *Enterobacter sakazakii*の性状と細菌学的分類に関する検討. 厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業 乳幼児食品中の有害物質及び病原微生物の暴露調査に関する基礎的研究 平成17年度総括・分担研究報告書. 2005; 45-48.
- 7) 和光堂ホームページ, ベビーフード「手作り応援5品」自主回収について. [http://www.wakodo.co.jp/company/release/20071203\\_bf.html](http://www.wakodo.co.jp/company/release/20071203_bf.html) (2011/7/11)
- 8) 泉谷秀昌, 渡邊治雄, *Enterobacter sakazakii*の再分類について. 病原微生物検出情報. 2009; 30: 135-136.
- 9) Iversen C, Lehner A, Mullane N, Bidlas E, Cleenwerck I, Marugg J, et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonicus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. BMC Evol. Biol., 2007; 7: 64.
- 10) 五十君静信. 新しい食中毒菌 *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). 2010; 27: 75-79.
- 11) U.S. Food and Drug Administration. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114665.htm> (2011/7/11)
- 12) U.S. Food and Drug Administration. Most probable number from serial dilutions. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm> (2011/7/11)
- 13) Chap J, Jackson P, Siqueira R, Gasper N, Quintas C, Park J, et al. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. Int. J. Food Microbiol. 2009; 136: 185-8.
- 14) 荻原博和, 露木朝子, 古川壮一, 森永 康, 五十君静信. 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. 食品衛生学雑誌. 2009; 50: 109-116.
- 15) Kim H and Beuchat LR. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* on fresh-cut fruits and

- vegetables and in unpasteurized juices as affected by storage temperature. J. Food Prot. 2005; 68: 2541-2552.
- 16) Beuchat LR, Kim H, Gurtler JB, Lin L-C, Ryu J-H, and Richards GM. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. Int. J. Food Microbiol. 2009; 136: 204-213.
- 17) 浅尾 努. 日本の衛生指標菌試験法のあるべき姿. 日本食品微生物学会雑誌. 2009; 26: 163-167.