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²Effects of the Reconstitution and Storage Conditions of Powdered Infant
Formula (PIF) on the Survival and Growth of *Enterobacter sakazakii*Hirokazu OGIHARA^{1,*}, Asako TUYUKI¹, Soichi FURUKAWA¹,
Yasushi MORINAGA¹ and Shizunobu IGIMI²¹ 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

緒 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^{2), 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ないのが現状である. 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学科: 〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 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¹²⁾ を使用した。各菌株は Trypticase Soy Broth (TSB 培地; BD 社製) を用いて、37℃ 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¹³⁾ 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℃ で 48 時間培養後、発育した集落を計測して、生菌数および生残菌数を求めた。接種実験における *E. sakazakii* の計測は、生菌数と同様の方法で行い、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℃ 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・DPU-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℃ 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℃ 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、生残菌数を計測した。HT 028 株については 52℃ 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℃ (冷蔵庫), 10℃ (冷蔵庫の上限), 25℃ (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℃, 春秋期温度 25℃, 夏期温度 30℃ に保温した。調乳に用いる湯温は 60, 70, 80℃ の 3 温度を選択した。さらに調乳後の保存温度は 10, 25, 30℃ を設定した。すなわち、10, 25, 30℃ 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℃) の SDW を加えて 2 分間攪拌溶解を行った。その後 10, 25, 30℃ 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残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℃ + 保存 25℃, 湯温 70℃ + 保存 10℃, 湯温 70℃ + 保存 25℃, 湯温 70℃ + 保存 30℃, 湯温 80℃ + 保存 25℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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、その間の生残菌数を計測した。

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℃ に保温した哺乳瓶に 70℃ 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℃ SDW を 99 mL 加え、2 分間攪拌溶解した。溶解後 25℃ 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、生残菌数を計測し

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℃ で 0.16 log CFU/mL, 60℃ で 0.69 log CFU/mL, 65℃ 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℃ 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℃ で 0.80 log CFU/mL, 60℃ で 3.99 log CFU/mL と菌数の減少が見られたが, 65~80℃ 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℃ の湯温でのみ検出されたのに対して, 60℃ 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℃ 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℃ 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℃ で, HT 028 株は 52℃ を採用して検討を行った. その結果 ATCC 株では *D* 値が 60℃ で 3.6 分, HT 022 株では 60℃ 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℃ 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℃ 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℃	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℃		6.31±0.10		2.91±0.11		ND
65℃		3.04±0.29		ND		ND
70℃		ND**		ND		ND
75℃		ND		ND		ND
80℃		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℃ 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℃ 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℃ 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℃ でも増殖する可能性が示唆され、25℃ 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℃ 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℃ 湯温と保存温度 (10, 25, 30℃) 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℃ 処理よりも良好な殺菌効果が確認された。さらに湯温 80℃ 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℃ + 保存 25℃ 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℃ + 保存 25℃ と湯温 70℃ + 保存 10℃ 条件でのみ増殖が抑制された。さらに HT 028 株では湯温 70℃ + 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℃-25℃	6.91±0.28*	6.54±0.18	6.76±0.12	6.67±0.41	7.32±0.12
	70℃-10℃	6.95±0.01	6.32±0.17	6.23±0.05	6.14±0.16	6.19±0.08
	70℃-25℃	7.04±0.07	6.14±0.09	5.93±0.13	5.70±0.43	5.85±0.11
	70℃-30℃	6.94±0.10	5.68±0.12	5.22±0.13	5.13±0.23	5.16±0.61
	80℃-25℃	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℃-25℃	6.92±0.07	6.20±0.02	6.27±0.62	6.00±0.08	6.07±0.26
	70℃-10℃	6.61±0.09	4.24±0.22	4.04±0.19	4.14±0.26	3.83±0.69
	70℃-25℃	6.99±0.11	2.38±0.69	2.59±0.64	2.92±0.91	4.01±0.82
	70℃-30℃	6.84±0.07	0.92±0.31	0.84±0.23	0.68±0.52	2.56±0.59
	80℃-25℃	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℃-25℃	6.27±0.14	3.42±0.05	2.91±0.59	3.20±0.37	3.84±0.32
	70℃-10℃	6.20±0.00	2.02±0.33	2.60±0.69	2.58±0.80	2.60±0.79
	70℃-25℃	6.34±0.14	ND**	0.47±0.47	1.17±0.42	1.74±0.22
	70℃-30℃	6.75±0.16	ND	1.15±1.13	1.35±0.96	1.92±1.71
	80℃-25℃	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. 3. 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

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

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に、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. 3 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 1.1) 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 1.1) 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 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に、*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想定されなければならない。しかしながら、汚染菌数や発症に必要な菌数も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^{5), 7), 8)} 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しての 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℃ 以下で保存することを推奨している。Nazarowec-White²²⁾ 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℃、食品由来株では 5.5~7.5℃ であることを報告している。これらのことから、調製後の PIF の長時間保存は 5℃ 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℃ 以下での保存を勧告している¹⁶⁾。

以上のことから、調乳に用いる湯温は 70℃ 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℃ 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℃ で 3.6 分、HT 022 株が 60℃ で 1.9 分、HT 028 株が 52℃ 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℃ では有効な殺菌効果は見られないのに対し、70℃ では 1~2 log CFU/mL の死滅効果が得られた。さらに 80℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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., **116**, 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, I., 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) Muytjens, H. L., Roelofs-Willemsse, H., Jaspars, 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., Kotloff, K. L., Martin, M. A., Schwalbe, R. S. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* 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**, 63-73 (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) Breeuwer, 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).