

乳児用調製粉乳等の衛生管理におけるセンシメディア法の検討

金 井 美恵子

Examination of the SensiMedia Method for hygiene control of Powdered Infant Formula

KANAI Mieko

Abstract:

Historically, outbreaks associated with coliform group contaminated milk products were recognized as early as the 1950

Coliforms bacterial testing is very important when carrying out hygienic quality control of milk and milk products.

In general, for coliform group testing of milk and milk products, the official testing method uses BGLB culture medium and this method is also that which is used during product testing by the manufacturer as well.

However, for this test, at least 2 to 3 days are required to determine the presence or absence of coliform group.

For self-managed hygiene testing of products, and with the purpose of speedy detection of coliform group, the author made a comparative examination of SensiMedia method provided by MicroBio Corporation with BGLB culture method.

The SensiMedia method is designed so that the contamination of coliform group is automatically detected by using enzyme reaction and the degree of coliform group proliferation can be known by graph via connection of the culture apparatus BiomaticTMVDCS to a computer.

The results of examination after the inoculation of the 5 strains of coliform group and *C. sakazakii* that cause problems in milk and milk products were that although a slight difference was seen in the degree of proliferation depending on strain type, even in comparison to BGLB culture medium, the SensiMedia method showed sufficient correlation, and was judged adequate for use in self-managed hygiene control for production lines and finished products.

Key Words : サカザキ菌 (*Cronobacter sakazakii*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、自主衛生管理 (self-managed hygiene control)、乳児用調製粉乳 (Powdered Infant Formula)、センシメディア法 (SensiMedia method)

まえがき

乳等省令に定められた乳および乳製品の微生物学的な規格・基準¹⁾では、生菌数は30,000~50,000 cfu/mlであり、大腸菌群は陰性となっている。牛乳の殺菌温度はNorth²⁾の実験で確認されているように、牛乳の味や風味を損なうことなく病原菌、すなわち連鎖球菌、炭疽菌、ジフテリア菌および結核菌等を殺菌することを目的としており、大腸菌群がその指標となっている。

牛乳および乳児用調製粉乳の製造においては、広域流通と賞味期限の延長化によって、殺菌後の微生物汚染が食品衛生上極めて重要な問題となっている。最近では、乳児用調製粉乳への *Cronobacter sakazakii* (旧 *Enterobacter sakazakii*) 汚染が、未熟児、低体重出生児や免疫不全児に対して重篤な疾患をもたらす³⁾ことが明らかとなっている。国内で販売されている大部分の調製粉乳は、市乳と同様に120~130℃、数秒間の殺菌またはこれと同等の方法による殺菌を行った後、水分を除去して充填しているが、その製品は必ずしも無菌ではなく、流通時あるいは流通後の保存条件が不適切であれば、それによる鮮度低下や疾病がもたらされる。

乳児用調製粉乳の出荷にあたっての大腸菌群検査は、通常、BGLB発酵法⁴⁾が公定法として定められているが、結果を得るまでに2~3日間を要するため、現場では流通面からも迅速検査法が求められている。今回、製品の自主衛生検査(出荷検査)にあたり、速やかな大腸菌群検査を目的に、MicroBio製のセンシメディア法を用いて試験期間の短縮を試みたので報告する。

実験方法

1. 供試検体

乳児用調製粉乳(W社製)、
乳児用調製粉末大豆乳(W社製): ミルク嫌いやミルクのあわない乳児用。

2. 供試菌種

糞便系大腸菌群: *Escherichia coli* IFO3301
大腸菌群:
Cronobacter sakazakii (旧 *E. sakazakii*) GTC336
Enterobacter cloacae GTC9425
Enterobacter agglomerance GTC3821
Enterobacter aerogenes GTC1260

3. 供試培地 (20ml 接種用培地)

センシメディア用培地は、チューブに液体培地とCO₂センサーを入れた非接触・密閉型の検査培地である。菌液あるいは試料液を培地に接種すると、細菌が発生するCO₂をセンサーが吸着してセンサーの色を濃紺から黄色に変化するように作製されたものである。

使用した培地組成は、次のようである。

センシメディア用SML培地 (腸内細菌用) 組成

混合ペプトン	18g
乳糖+マニトール	5g
NaCl	5g
ラウリル硫酸Na	0.3g
発育促進剤	1.2g
VCM	0.02g
BCP (指示薬)	0.013g
蒸留水	1000mL

センシメディア用に調製したBGLB培地 (pH7.2) 組成

ペプトン	10g
牛胆汁沫	20g
乳糖	10g
ブリリアントグリーン	0.0133g
蒸留水	1000mL

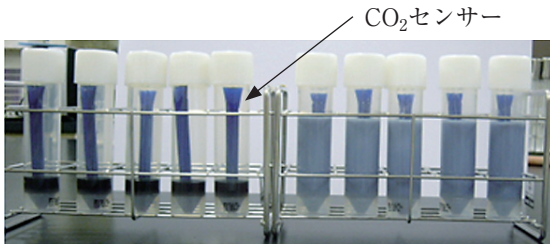


図1-1. センシメディア用SML培地
左：接種前 右：調製粉乳接種後（15ml）

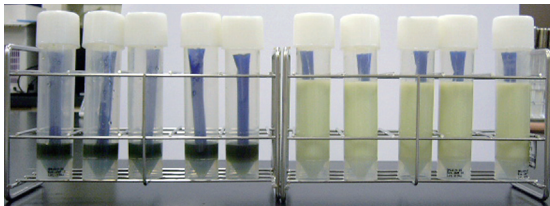


図1-2. センシメディア用に調製したBGLB培地
左：接種前 右：調製粉乳接種後（15ml）

4. 検出装置

Microbio社製 Biomatic™VDCS

この機器は、ビデオモニター型検出機能を取り入れたもので、1分ごとにカメラで画像を撮影して、そのデータをコンピュータに転送して自動解析するように作られたものである。

あらかじめTryptose phosphate broth (pH7.2) にて前培養した供試大腸菌群の各々を、最終菌量が1 ml中、 10^6 、 10^4 、 10^2 、 10^1 、1 cfuになるように、10倍希釈した乳児用調製粉乳および乳児用調製粉末大豆乳に接種した。この乳剤をSML培地およびBGLB培地に15mlずつ接種後、Biomatic™VDCSにて35℃培養し、CO₂センサーが黄色に変化した時間を大腸菌群検出時間として判定した。また、確認のために、接種時の*E. coli* および*C.sakazakii*、*E.cloacae*、*E.agglomerance*、*E.aerogenes*数をXM-G培地にて混釈し、35℃、24時間培養後、出現した典型的なcolony数をもって菌数を算定した。なお、検体として用いた乳児用調製粉乳等については、大腸菌群陰性のものを使用した。



図2-1. Biomatic™VDCS内部（接種直後）



図2-2. Biomatic™VDCSにて
培養後の状況（SML培地）
陽性：黄色 陰性：濃紺

実験結果

糞便系大腸菌群 (*E.coli*) および大腸菌群 (*C.sakazakii*、*E.cloacae*、*E.agglomerance*、*E.aerogenes*) の計5菌株について、SML培地およびBGLB培地中の菌の増殖特性を予試験後、それぞれを 10^6 、 10^4 、 10^2 、 10^1 、1 cfu/mlになるよう培地に接種した。その結果は、表1及び図3-1～7-2に示した。

表 1. 乳児用調製粉乳および乳児用調製大豆乳中での大腸菌群の増殖特性 (35℃培養)

		SML培地 (腸内細菌用) (CFU/mL)					BGLB培地 (CFU/mL)				
		10 ⁶	10 ⁴	10 ²	10	1	10 ⁶	10 ⁴	10 ²	10	1
<i>E. coli</i> IFO3301	調製粉乳	6:00	8:40	11:25	13:00	15:00	6:05	8:55	11:55	13:30	15:25
		6:25	9:20	12:30	13:50	15:20	6:50	9:45	12:50	14:25	16:00
		6:15	9:25	12:00	13:50	15:30	6:50	9:35	12:45	14:20	15:50
	調製大豆乳	6:00	9:00	12:00	13:40	15:00	6:30	9:35	12:35	14:00	15:50
		6:05	9:00	11:55	13:20	14:55	7:00	9:55	12:45	14:15	16:00
		6:20	9:20	12:00	13:30	15:05	7:10	9:45	12:40	14:05	15:50
<i>E. aerogenes</i> GTC1260	調製粉乳	5:25	8:35	11:55	14:00	15:50	6:40	9:55	13:10	14:55	17:00
		5:30	9:00	12:05	14:00	16:00	6:55	9:50	13:30	15:25	17:10
		5:30	9:00	12:15	14:35	16:00	6:50	9:50	13:10	15:10	17:05
	調製大豆乳	5:50	9:10	13:20	15:10	17:10	6:00	9:55	13:50	15:50	17:25
		6:00	9:50	13:35	15:30	17:40	6:05	10:20	14:20	16:00	18:05
		6:10	10:00	13:45	15:40	17:15	6:15	10:00	14:15	16:00	18:15
<i>E. cloacae</i> GTC9425	調製粉乳	6:05	9:05	12:55	14:45	16:35	6:45	10:00	13:10	15:00	16:55
		6:25	9:30	13:00	14:50	16:45	6:30	9:45	13:35	15:10	17:00
		6:20	9:15	12:55	14:50	16:40	6:40	10:00	13:20	15:10	17:10
	調製大豆乳	6:40	10:00	13:20	15:10	17:10	7:05	10:55	14:30	16:20	18:45
		6:20	9:50	13:00	14:55	17:00	7:35	10:45	14:20	15:55	18:05
		6:30	9:55	13:25	15:10	17:25	7:20	10:15	14:15	16:10	18:30
<i>E. agglomerance</i> GTC3821	調製粉乳	6:40	10:00	13:10	14:50	16:45	7:50	11:05	14:30	16:20	18:45
		6:15	9:45	12:55	14:00	16:30	7:20	10:25	13:45	15:30	18:10
		6:35	10:10	13:10	14:55	16:35	7:35	10:30	14:00	16:05	18:35
	調製大豆乳	6:10	9:10	12:50	14:55	17:00	7:00	10:20	13:55	15:50	18:00
		6:20	9:20	13:00	15:20	17:35	7:20	10:35	14:20	16:00	18:20
		6:30	10:00	14:00	15:50	18:00	7:45	10:55	14:45	16:30	18:40
<i>C. sakazakii</i> GTC336	調製粉乳	6:25	8:45	11:25	13:20	15:05	7:50	11:15	15:45	17:45	21:00
		6:20	8:30	11:30	12:55	15:15	7:30	11:10	15:10	18:00	20:20
		6:10	8:20	11:15	12:55	15:05	7:45	11:00	15:00	17:20	20:30
	調製大豆乳	6:15	8:40	11:40	13:15	15:30	7:15	11:00	15:50	18:30	21:20
		6:05	8:40	11:30	13:00	15:05	7:05	11:20	16:20	19:00	22:00
		6:10	8:35	11:35	13:00	15:20	7:35	11:50	16:30	19:00	22:10

注) 表中数値は、陽性時間を示す。

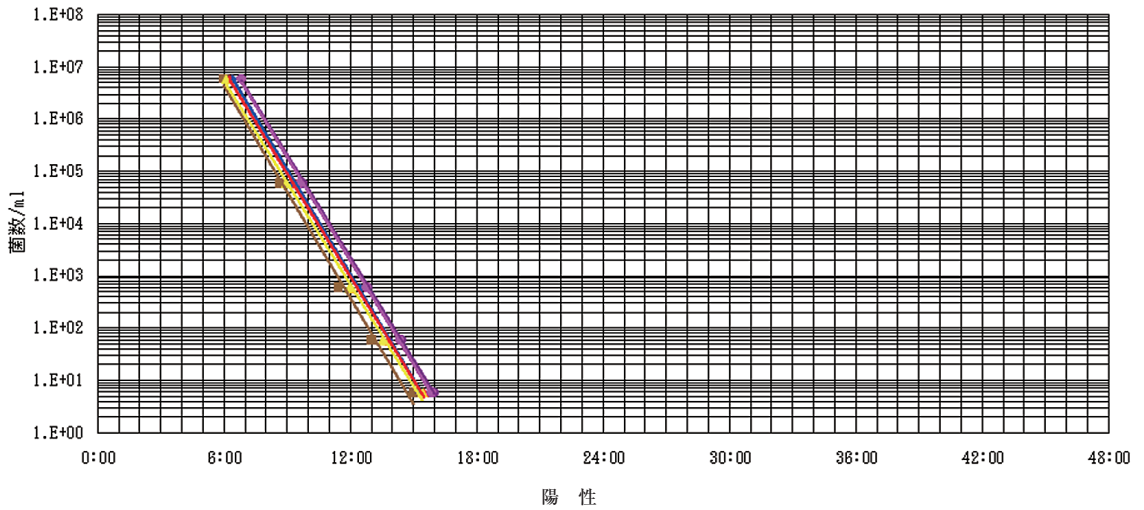


図3-1. 乳児用調製粉乳に接種した *E.coli* IFO3301 (35℃培養) の消長

■ SML(1) ◆ SML(2) ▲ SML(3) ▲ BGLB(1) ● BGLB(2) ● BGLB(3)

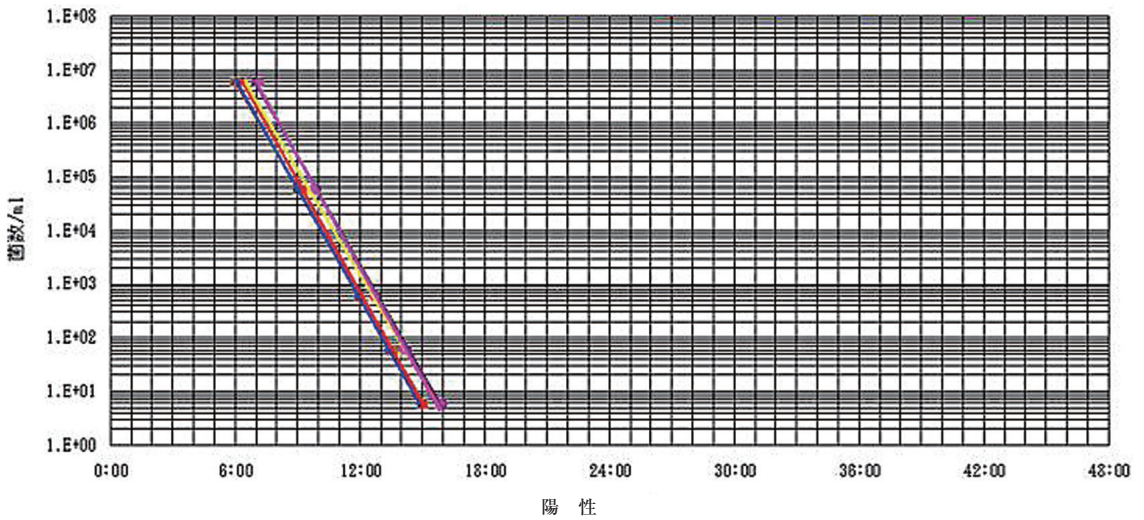


図3-2. 乳児用調製粉末大豆乳に接種した *E.coli* IFO3301 (35℃培養)

■ SML(1) ◆ SML(2) ▲ SML(3) ▲ BGLB(1) ● BGLB(2) ● BGLB(3)

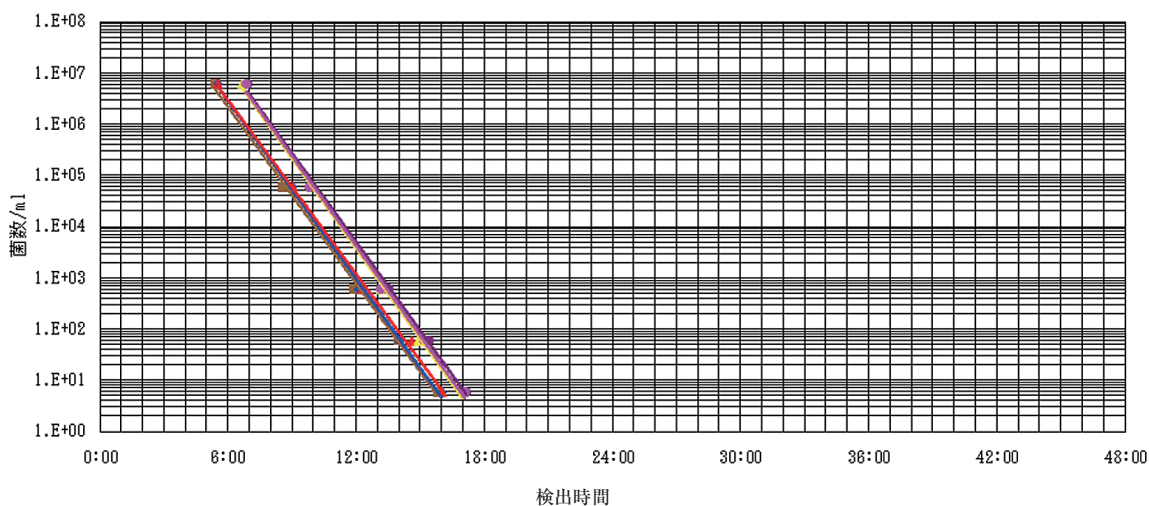


図4-1. 乳児用調製粉乳に接種した *E.aerogenes* GTC1260 (35℃培養) の消長

■ SML(1) ◆ SML(2) ▲ SML(3) ▲ BGLB(1) ● BGLB(2) ● BGLB(3)

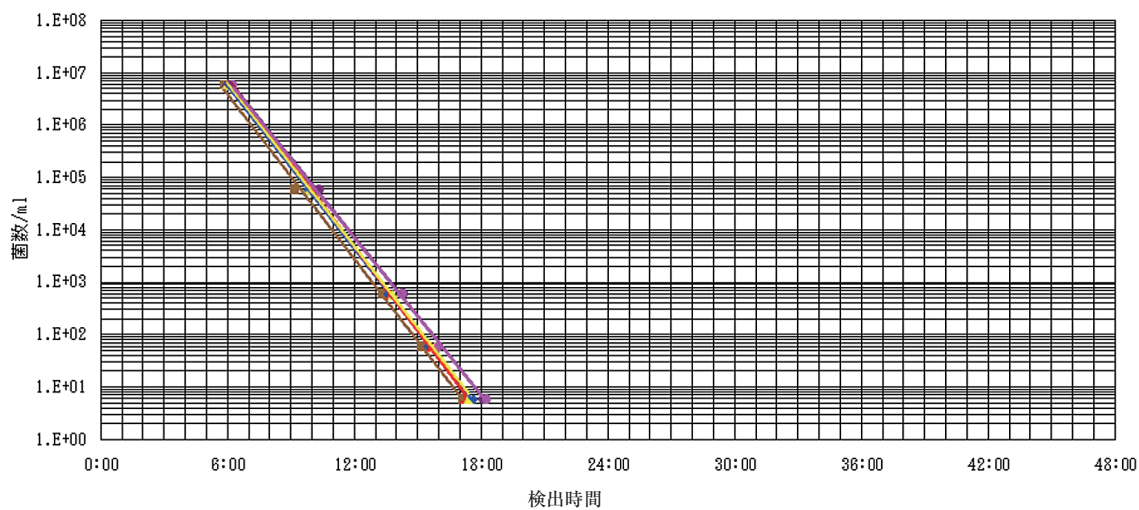


図4-2. 乳児用調製粉末大豆乳に接種した *E.aerogenes* GTC1260 (35℃培養) の消長

■ SML(1) ◆ SML(2) ▲ SML(3) ▲ BGLB(1) ● BGLB(2) ● BGLB(3)

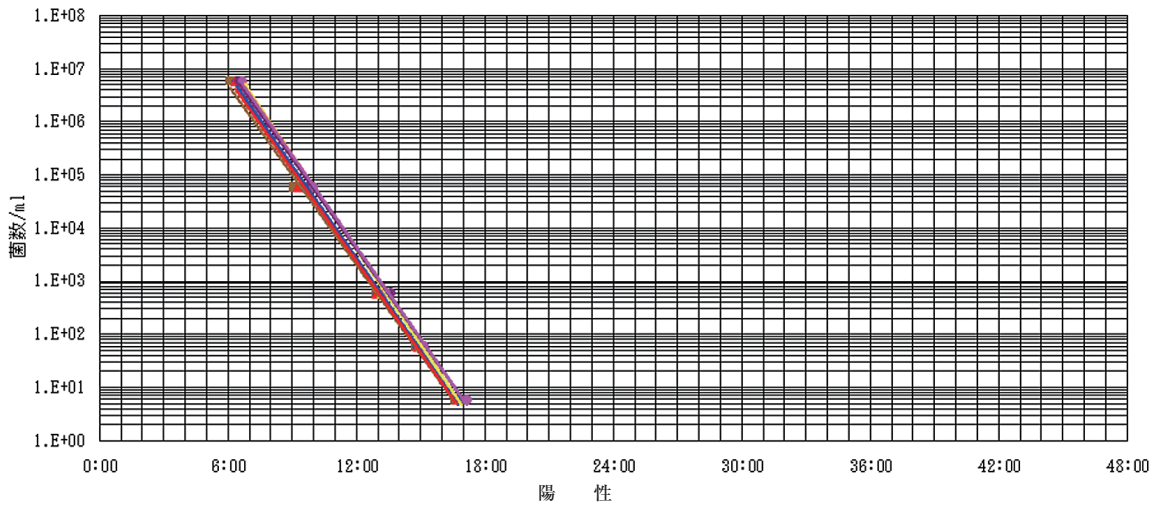


図 5-1. 乳児用調製粉乳に接種した *E.cloacae* GT9425 (35℃培養) の消長

■ SML(1) ◆ SML(2) ▲ SML(3) ▲ BGLB(1) ● BGLB(2) ● BGLB(3)

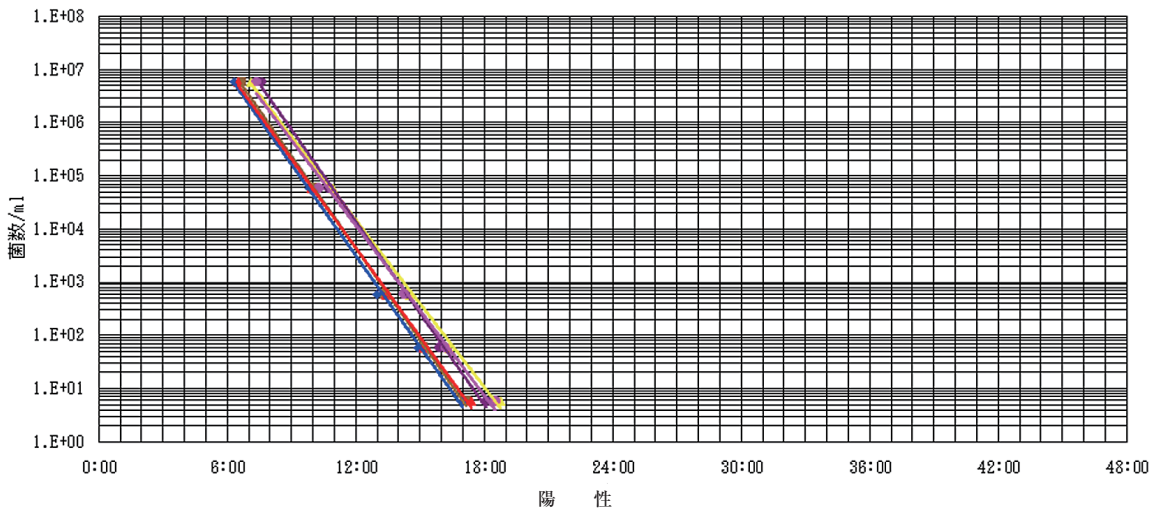


図 5-2. 乳児用調製粉末大豆乳に接種した *E.cloacae* GT9425 (35℃培養) の消長

■ SML(1) ◆ SML(2) ▲ SML(3) ▲ BGLB(1) ● BGLB(2) ● BGLB(3)

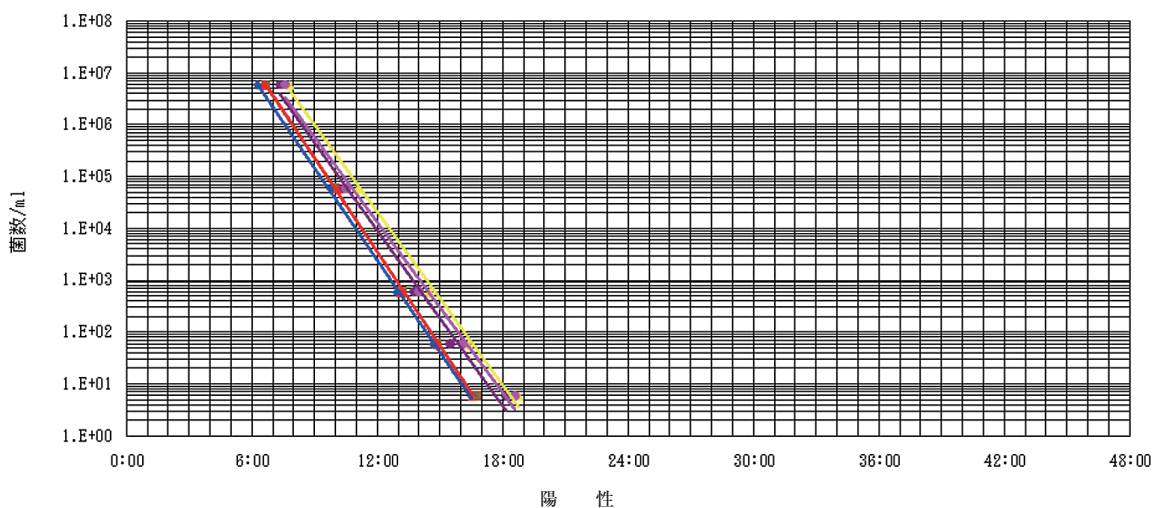


図 6-1. 乳児用調製粉乳に接種した *E.agglomerance* GTC3821 (35℃培養) の消長

■ SML(1) ◆ SML(2) ▲ SML(3) ▲ BGLB(1) ● BGLB(2) ● BGLB(3)

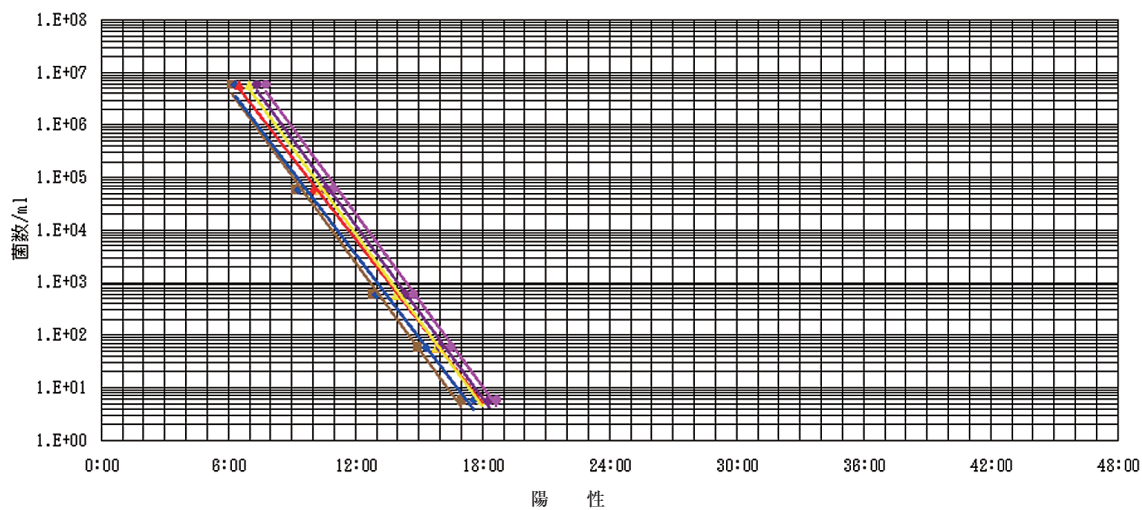


図 6-2. 乳児用調製粉末大豆乳に接種した *E.agglomerance* GTC3821 (35℃培養) の消長

■ SML(1) ◆ SML(2) ▲ SML(3) ▲ BGLB(1) ● BGLB(2) ● BGLB(3)

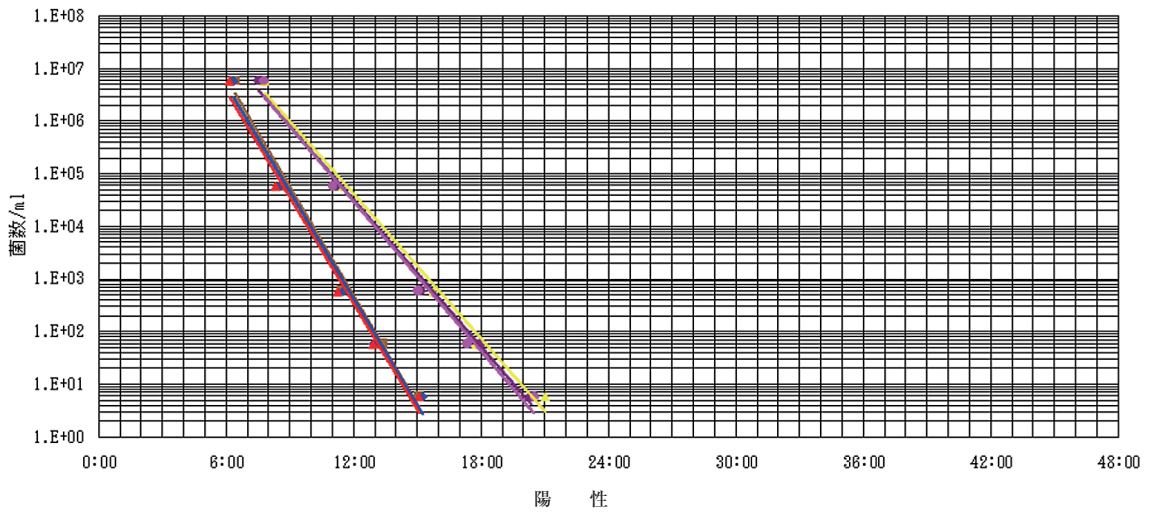


図 7-1. 乳児用調製粉乳に接種した *C.sakazakii* GTC336 (35℃培養) の消長

■ SML(1) ◆ SML(2) ▲ SML(3) ▲ BGLB(1) ● BGLB(2) ● BGLB(3)

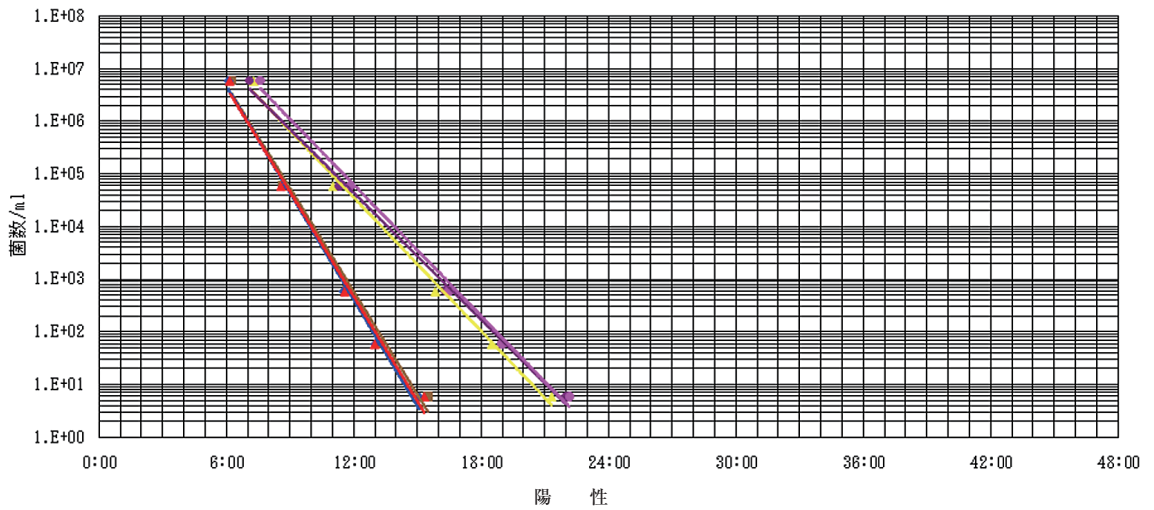


図 7-2. 乳児用調製粉末大豆乳に接種した *C.sakazakii* GTC336 (35℃培養) の消長

■ SML(1) ◆ SML(2) ▲ SML(3) ▲ BGLB(1) ● BGLB(2) ● BGLB(3)

糞便系大腸菌群および大腸菌群を接種した乳児用調製粉乳および乳児用調製粉末大豆乳中に1 cfu/mlを接種した際の検出結果をみたところ、公定法であるBGLB培地を用いた場合は*E.coli*は約16時間、*E.aerogenes*と*E.cloacae*は約17時間半で陽性となった。*E.agglomerance*および*C.sakazakii*は菌数が少なくなるにしたがってその増殖度は遅延し、前者は19時間以内、後者は約21時間でCO₂センサーは黄色となった。これに対し、センシメディア法の腸内細菌用SML培地では*E.coli*、*C.sakazakii*が約15時間半、*E.aerogenes*、*E.cloacae*および*E.agglomerance*は17時間以内と、BGLB培地より早い時間で陽性結果が得られた。

また、乳児用調製粉末大豆乳では*E.coli*を除き、調製粉乳より若干増殖が遅れる傾向にあったが、極端な違いはみられず、SML培地における1 cfu/mlでは18時間、BGLB培地においてもほぼ24時間以内に検出が可能であった。

考 察

2004年2月および2006年5月に、WHO本部（スイス・ジュネーブ）において、乳児用調製粉乳に関するFAO/WHO合同専門家会議が開催され、微生物規格やガイドライン⁵⁾について検討がなされた。これまでに乳児用調製粉乳で問題となった主な集団発生は、*Salmonella*属菌と*C.sakazakii*によるものである。サルモネラ症はオーストラリア（1977）、イギリス（1985）、アメリカおよびカナダ（1993）、スペイン（1994）、韓国（2000）、フランス（2005）など7事例が報告⁶⁾されているが、サカザキ菌を原因としたものは、海外において73事例、死亡者27名の報告がなされていた。

サカザキ菌は、かつて*Enterobacter*属の1菌種として分類されていたが、遺伝学的配列等の検討により、2008年に*Cronobacter*属が設けられ、*C.sakazakii*と命名⁷⁾されるようになった。本菌は腸内細菌科であり、大腸菌群と同様にヒトや動物の腸管内、土壌、汚水等自然界に広く分布していることから野菜や環境中からもしばしば検出されている。

サカザキ菌の感染は、成人に対しては不顕性感染となるケースが高いが、乳幼児、特に未熟児や免疫

不全児、低体重出生児の場合は、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が報告³⁾されている。本菌による新生児髄膜炎のはじめての発症はイギリスにて1958年に確認⁸⁾された。その後も散発的ではあるが、世界各国で敗血症、壊死性腸炎、脳膿瘍の症例が報告されるようになった。Muytjensら⁹⁾は、35カ国で製造された乳児用調製粉乳141検体を収集し、74検体（52.5%）から腸内細菌科の汚染を認めており、このうち20検体（14.2%）より*C.sakazakii*を検出していた。また、Leuscher（2004）らの報告¹⁰⁾においても58検体中8検体（13.8%）から*C.sakazakii*を検出しており、このことからサカザキ菌に対しては、乳児用調製粉乳は十分注意が必要な食品といえる。

乳児用調製粉乳は、現在の製造技術では完全に無菌にすることは困難である。製造にあたっては、原材料、製造工程や環境から、最終製品への有害菌の混入を防ぐために適切な殺菌方法が必要であり、サカザキ菌をはじめとする大腸菌群等の検査は重要検査項目である。現在、調製粉乳の大腸菌群検査は、食品衛生検査指針⁴⁾に準じて行われているが、公定法であるBGLB発酵法は結果を得るまでに2～3日間を要し、出荷までに長期間を有するため、メーカーでは流通上からも短期間で正確な検査法が望まれている。今回用いたセンシメディア法の結果は、5菌種とも公定法であるBGLB発酵法の結果と一致しており、試料中に存在する1 cfuの菌数を検出することが可能と考えられた。また、陰性判定および推定陽性判定を得るまでに、BGLB発酵法より検査時間を短縮でき、サカザキ菌をはじめとする大腸菌群の検査方法として有用と思われ、製造ラインや最終製品の自主衛生管理として導入することは十分可能と判断された。

参考資料

- 1) 乳・乳製品の規格・基準：食品衛生学雑誌、**52**(1)、J-135～J-138（2011）
- 2) North,C.E., and Park,W.H.: *Amer. J. Hyg.*, **7**,147～173（1927）
- 3) 厚生労働省：乳幼児用調製粉乳の安全な調乳、保存及び取扱に関するガイドラインについてFAO/WHO共同作成版（2007, 6）

- 4) 厚生労働省監修；食品衛生検査指針（微生物編）、p129～p145（2004）
- 5) Codex, RECOMMENDED INTERNATIONAL CODE of HYGINIC PRACTICE for FOOD for INFANTS and CHILDREN CAC/RCP 21-1979（URL:http://www.codexalimentarius.net/download/standard/297/CXP_02e.pdf, May 2006）
- 6) 豊福 肇、窪田 邦宏、森川 馨：*Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **124**, 74～79（2006）
- 7) Iversen,C., Mullane,N., McCardell,B., Tall,B.D., Lehner,A.,Fanning,S.,Stephan,R., and Joosten,H.：*J. Syst. Evol. Microbiol.*,**58**,1442 ～1447(2008)
- 8) Urmenyi, A.M.C. and Franklin,A.W.；*Lancet*. **1**, 313-315（1961）
- 9) Muytjens, H.L.,Roelofs,W.H., and Jasper,G.H.J；*J. Clin. Microbiol.*, **26**, 743-746（1988）
- 10) Leuscher, R.G.K., Baird,F.,Donald,B., and Cox,L. J.；*Food Microbiol.*, **21**, 527-533（2004）

