

育児用調整粉乳における *Enterobacter sakazakii* 等の 汚染に関する疫学的検討

*Epidemiological examination regarding modified milk powder contamination
with Enterobacter sakazakii*

福山正文, 大仲賢二, 古畑勝則

麻布大学大学院環境保健学研究科

Masafumi Fukuyama, Kenji Oonaka, Katsunori Furuhashi

Graduate School of Environmental Health, Azabu University

Abstract: To clarify the route and source of infection as a basic study of *Enterobacter sakazakii* infection, we investigated the state of contamination with this type of bacteria in modified milk powder for infants, which may be closely associated with infantile infection, and conducted drug sensitivity tests using various antimicrobial agents. The following results were obtained:

1. In 9 (6.6 %) of 149 milk powder samples, this type of bacteria was isolated. They consisted of 4 manufactured in Japan (6.6 %, 4/61) and 5 manufactured in other countries (5.7 %, 5/88).
2. The estimated bacterial amount in milk powder ranged from less than 3 to 3.6 MPN/Kg in the Japanese 4 samples. In the foreign 5 samples, it ranged from less than 3 to 9.1 MPN/Kg.
3. The MIC₉₀ values on drug sensitivity tests were compared. *Enterobacter sakazakii* was highly susceptible to CTX, CTRX, CPZ, CAZ, CPR, CZOP, GM, MEPM, and CPF. It showed an intermediate susceptibility to PIPC, EM, MINO, CP, and RFP. However, it was resistance to ABPC and LCM.

緒言

Enterobacter sakazakii (*E. sakazakii*) は、ヒトや動物の腸管および自然環境下に分布する通性嫌気性グラム陰性桿菌で腸内細菌科に属する¹⁾。本菌は当初、形態学的特徴から黄色色素を産生する *Enterobacter cloacae* と同定されていた。しかし、1976年に Steigerwalt ら²⁾ が色素産生株と非産生株は性状が異なることから同一種でないことを報告し、1980年に Farmer ら¹⁾ が *E. sakazakii* と命名した。本菌によるヒトの感染症は、1958年にイギリスの Urmenyi ら³⁾ が新生児敗血症および髄膜炎から分離したのが最初の報告である。その後、世界各地で乳幼児を中心に敗

血症、壊死性腸炎および脳膿瘍から分離された報告が散見されている⁴⁾。しかし、我が国では乳幼児を含め、本菌による感染症はほとんど報告されていない。また、本菌による感染症が発生している国においても乳幼児への感染源や感染経路が明らかにされていないのが実情である⁴⁾。そこで、上述のことを加味して、今回ヒトの本菌感染症の基礎的研究の一環として、乳幼児への感染が密接に関連性が考えられる乳幼児用調整粉乳（以下粉乳）における本菌の汚染状況と薬剤感受性試験について検討した。

Table 1 Drug list of determination of MIC

Penicillin antimicrobial
Ampicillin (ABPC : Sigma), Piperacillin (PIPC : Sigma)
Cephalosporins antimicrobial
Cefotaxime (CTX : Chugai), Ceftriaxone (CTRX : Roche), Cefoperazone (CPZ : Sigma)
Ceftazidime (CAZ : Tanabe), Cefpirome (CPR : Chugai), Cefuzonam (CZOP : Takeda)
Penem antimicrobial
Meropenem (MEPM : Sumitomo)
Aminoglycoside antimicrobial
Gentamicin (GM : Schering-Plough)
Lincomycin antimicrobial
Lincomycin (LCM : Sigma)
Macrolide antimicrobial
Erythromycin (EM : Sigma)
Tetracyclines antimicrobial
Minocycline (MINO : Sigma)
Chloramphenicol antimicrobial
Chloramphenicol (CP : Sigma)
Quinolone antimicrobial
Ciprofloxacin (CPFX : Bayer)
Rifampicin (RFP : Sigma)

材料および方法

1. 供試材料

2006年11月から2008年2月にかけて一般小売店より購入した149例（国産61例，外国産88例）を供試材料とした。なお，国産についてはロットの異なる18銘柄を選び2～4回繰り返し検査を行った。

2. 分離および同定

本菌の分離，同定および生菌数の測定方法は，米国食品医薬品局法⁵⁾に準拠してMPN法（3連法）を用いて測定した。すなわち，滅菌蒸留水900 mlに粉乳100 g，滅菌蒸留水90 mlに粉乳10 g，滅菌蒸留水9 mlに粉乳1 gをそれぞれ加えたものを各3本ずつ作成し，完全に溶解させた後，37℃一晩放置した。次に，前日放置した試料をEE培地90 mlの中に10 ml加え，37℃一晩培養した。その培養液をそれぞれ白金自量取りVRBG培地とDFI培地に塗抹し37℃一晩培養後，疑わしいコロニーを各平板あたり4コロニー釣菌して純培養を行った。次に，その菌株を用いて一次鑑別試験としてTSI寒天培地，LIM培地およびトリプトソイ寒天培地（オキシターゼ試験用）を用いて各種性状試験を行い，ブドウ糖（+），乳糖・白糖（+），ガス（+），硫化水素（-），リジン

（-），運動性（+）およびオキシターゼ（-）の各性状を示すとともに25℃3日間トリプトソイ寒天培地で培養後，黄色色素の産生が認められた株を本菌と推定した。次に，VITEK2 compact（日本ビオメリュー）を用いて47項目の各種生化学的性状試験を行い，*E. sakazakii*と同定された菌株を用いて，16 s rRNAの高度可変領域の一部の遺伝子配列を解析し，データベースと照合し，最終的に本菌と同定した。

3. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験はCLSI⁶⁾に準拠して寒天平板希釈法で行った。供試薬剤はTable 1に示すとおり，ペニシリン系2剤，セフェム系6剤およびカルバペネム系，アミノグリコシド系，リンコマイシン系，マクロライド系，テトラサイクリン系，クロラムフェニコール系，キノロン系，リファンピシリンの各1剤の計16薬剤を用いた。

成績

1. 粉乳からの本菌の分離状況

粉乳からの本菌の分離状況をTable 2に示した。粉乳149例中9例（6.0%）から本菌が分離された。その内訳において，国産ではA社22例中1例（4.5%），

Table 2 Examination materials with respect to regions of purchase

regions of purchase	company	No. of sample	No. of positive (%)	Quantity of of presumed (MPN / Kg)	
				3.6	9.1
Japan	A	22	1 (4.5)	1	
	B	12	0		
	C	10	2 (20.0)	2	
	D	7	0		
	E	10	1 (10.0)	1	
	sub total	61	4 (6.6)	4	
Foreign					
	Philippines	26	1 (3.8)	1	
	Thailand	23	1 (4.3)	1	
	Korea	15	3 (20.0)	2	1
	U.S.A.	10	0		
	Brazil	4	0		
	Canada	3	0		
	Saudi Arabia	3	0		
	Australia	1	0		
	Cambodia	1	0		
	Hong Kong (China)	1	0		
	Vietnam	1	0		
	sub total	88	5 (5.7)	4	1
total		149	9 (6.0)	8	1

C社10例中2例(20%)およびE社10例中1例(10%)からそれぞれ本菌が分離されたが、B社12例とD社7例からは1例も分離されなかった。外国産ではフィリピン26例中1例(3.8%)、タイ23例中1例(4.3%)および韓国15例中3例(20%)からそれぞれ本菌が分離されたが、米国10例、ブラジル4例、カナダとサウジアラビア各3例、オーストラリア、カンボジア、中国(香港)およびベトナム各1例からは1例も分離されなかった。また、各検体別に本菌の菌量を半定量的に測定したところ、国産では3.6MPN/Kgに4例(100%)、外国産では3.6MPN/Kgに4例(80%)と9.1MPN/Kgに1例(20%)であった。国産の粉乳について継続的に4回の調査を行ったところ、A社とE社では各1回から、C社では1銘柄のみに複数回から本菌がそれぞれ分離された。

2. 分離菌株の薬剤感受性試験

分離した9株に対する各種薬剤のMIC分布をTable 3に示した。ペニシリン系抗菌剤ではABPCが16~128 μg/mlに、PIPCが2~32 μg/mlに、セフェ

Table 3 MIC distribution of *E. sakazakii* isolated from milk powder and MIC₉₀

Drug	MIC (μg/ml)		
	range		MIC ₉₀
ABPC	16 — 128		128
PIPC	2 — 32		32
CTX	0.03 — 1		1
CTRX	0.03 — 2		2
CPZ	0.5 — 2		2
CAZ	0.06 — 0.25		0.25
CPR	0.03 — 0.12		0.12
CZOP	0.06 — 0.12		0.12
MEPM	≤ 0.008 — 0.03		0.03
GM	0.25 — 0.5		0.5
LCM	128 — 128 <		128 <
EM	16 — 64		64
MINO	0.5 — 4		4
CP	4 — 16		16
CPFY	≤ 0.008 — 0.015		0.015
RFP	2 — 8		8

ム系抗菌剤ではCTXが0.03～1 µg/mlに、CTRXが0.03～2 µg/mlに、CPZが0.5～2 µg/mlに、CAZが0.06～0.25 µg/mlに、CPRが0.03～0.12 µg/mlに、CZOPが0.06～0.12 µg/mlに、ペネム系抗菌剤のMEPMでは≤0.008～0.03 µg/mlに、アミノグリコシド系抗菌剤のGMでは0.25～0.5 µg/mlに、リンコマイシン系のLCMでは128～128< µg/mlに、マクロライド系のEMでは16～64 µg/mlに、テトラサイクリン系抗菌剤のMINOでは0.5～4 µg/mlに、クロラムフェニコール系のCPでは4～16 µg/mlに、キノロン系抗菌剤のCPFXでは≤0.008～0.015 µg/mlに、RFPでは2～8 µg/mlにそれぞれMICが分布していた。

MIC₉₀の比較では、CTX 1 µg/ml、CTRXとCPZ各2 µg/ml、CAZ 0.25 µg/ml、CPRとCZOP各0.12 µg/ml、GM 0.5 µg/ml、MEPM 0.03 µg/mlおよびCPFX 0.015 µg/mlと高い感受性を、PIPC 32 µg/ml、EM 64 µg/ml、MINO 4 µg/ml、CP 16 µg/mlおよびRFP 8 µg/mlと中間の感受性をそれぞれ示したが、ABPC128 µg/mlとLCM128< µg/mlは耐性を示した。

考 察

*Enterobacter sakazakii*による感染症が欧米を中心に粉乳等を授乳した乳幼児を中心に散見され注目されている。一方、我が国では乳幼児を含め、本菌による感染症はほとんど報告されていない。しかし、2007年5月に厚生労働省の所管課長から「育児用調整粉乳の衛生的取り扱いについて」の注意事項の通達が出されて注目されている。今回著者らは、*E. sakazakii*感染症に関する基礎的研究の一環として、粉乳から本菌の分離を行い、粉乳6.0%から本菌を分離した。粉乳について、Kongoら⁷⁾は28.6%、Kandhaiら⁸⁾は20.6%からそれぞれ分離している。これらの成績と比較すると著者らに比べ、3～4倍位高い分離率を示し、著者らとの間に差が認められた。しかし、個別では、国内のC社由来が20.0%、国外の韓国由来が20.0%から分離され、KogoらやKandhaiらと同様の成績が認められるものもあったことから、生産工場の汚染状況より分離率に差が出たものと考えられた。また、Iversenら⁹⁾は49例の粉乳について2種類の分離培地を用いて調査したところ、VRBGでは6.1%から、DFIでは10.2%からそ

れぞれ本菌を分離している。これらの成績との比較では著者らもほぼ同様な成績であった。菌量については、Muytjensら¹⁰⁾は世界各国の粉乳の調査を行い14.2%から本菌を分離し、その菌量は0.36～66CFU/100gを認めている。著者らの成績との比較ではMuytjensらが調査した粉乳の一部は同様の成績であったが、多いものでは約10倍高い汚染菌量が認められた。この要因としては、供試した培地や増菌培養の有無、測定方法、原材料の由来、工場内の汚染状況などの違いによる影響も考えられた。

分離菌株について薬剤感受性試験を行い、MIC₉₀で比較したところ、CTX、CTRX、CPZ、CAZ、CPR、CZOP、GM、MEPMおよびCPFXに高い感受性を、PIPC、EM、MINO、CPおよびRFPに中間の感受性をそれぞれ示したが、ABPCとLCMに耐性を示した。Muytjensら¹¹⁾は、PIPC、CTX、CTRX、CPZ、CAZ、GMおよびCPFXに感受性を示し、ABPCとCPに耐性を示すことを、Stockら¹²⁾はPIPC、CTX、CTRX、CPZ、CAZ、GM、MEPM、MINOおよびCPFXに感受性を示し、LCMとEMに耐性を示すことを報告している。これらの成績と比較すると、著者らの成績も他の報告と同様であった。

以上のように、今回供試した粉乳6.0%から*E. sakazakii*が分離されたことから、市販されている粉乳が低率ではあるが本菌に汚染されていることが明らかになった。また、薬剤感受性試験においてABPCやLCMに対して耐性を示すことが明らかになった。

謝 辞

菌株の同定にあたりVITEK2 compactを貸与していただきました日本ビオメリュー社に深謝いたします。また、サンプル採取に協力いただきました関係各位、実験に協力いただきました麻布大学環境保健学部微生物学研究室々員各位に深謝します。

要 旨

*Enterobacter sakazakii*感染症に関する基礎的研究の一環として感染経路や感染源を解明するため、乳幼児への感染源として密接に関連性が考えられる育児用調整粉乳（以下粉乳）における本菌の汚染状況と各種抗菌剤の薬剤感受性試験を行ったところ、以下

の成績が得られた。

1. 粉乳から本菌の分離を試みたところ、149例9例(6.6%)から本菌が分離された。その内訳において、国産では61例中4例(6.6%)から、外国産では88例中5例(5.7%)からそれぞれ分離された。
2. 本菌が分離された粉乳の推定菌量は、国産では4例とも3.6 MPN / Kgであった。外国産では5例中4例が国産と同様に3.6MPN/Kgであったが、残りの1例は9.1 MPN / Kgと高い菌量であった。
3. 薬剤感受性試験におけるMIC₉₀値の比較では、CTX, CTRX, CPZ, CAZ, CPR, CZOP, GM, MEPMおよびCPFXの9薬剤に高い感受性を、PIPC, EM, MINO, CPおよびRFPの5薬剤に中間の感受性をそれぞれ示したが、ABPCとLCMの2薬剤は耐性を示すことが明らかになった。

文 献

- 1) Farmer, J. J., Asbury, M. A., Hickman, F. W., and Brenner, D. J., *Enterobacter sakazakii*: a new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30, 569-584 (1980)
- 2) Steigerwalt, A.G., Fanning, G.R., Fife-Asbury, M.A., Brenner, D.J., DNA relatedness among species of *Enterobacter* and *Serratia*. *Can. J. Microbiol.*, 22, 121-37 (1976)
- 3) Urmenyi, A. M., Franklin, A. W., Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet.*, 11, 313-5 (1961)
- 4) Nazarowec-White, M., Farber, J. M., *Enterobacter sakazakii*: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 34, 103-13 (1997)
- 5) FDA, Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula (serial online) Available from <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. sixteenth informational supplement, 26, M100-S16 (2006)
- 7) Kongo, J.M., Gomes, A.P., Malcata, F.X., Monitoring and identification of bacteria associated with safety concerns in the manufacture of São Jorge, a Portuguese traditional cheese from raw cow's milk., *J. Food Prot.*, 71, 986-92 (2008)
- 8) Kandhai, M.C., Reij, M.W., Gorris, L.G., Guillaume-Gentil, O., van Schothorst, M., Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households., *Lancet.*, 363: 39-40(2004)
- 9) Iversen, C., Stephan, F., Isolation of *Eenterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products., *Food Microbiol.*, 21, 771-7 (2004)
- 10) Muyltjens, H.L., Roelofs-Willemse, H., Jaspar, G.H., Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*., *J. Clin. Microbiol.*, 6, 743-6 (1988)
- 11) Muyltjens, H.L., van der Ros-van de Repe, J., Comparative in vitro susceptibilities of eight *Enterobacter* species, with special reference to *Enterobacter sakazakii*., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 367-70 (1986)
- 12) Stock, I., Wiedemann, B., Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* strains., *Clin. Microbiol. Infect.*, 564-78 (2002)