

哺乳びん及び乳首・キャップの滅菌方法の違いによる比較

Comparison of baby bottles and nipples/caps due to different sterilization methods.

中熊 美和¹ 有村 恵美¹
Miwa Nakakuma Emi Arimura

1 鹿児島県立短期大学 生活科学科

Key Words : Cronobacter spp. , 調乳, 哺乳びん, 滅菌, 衛生管理

1. 緒言

乳児用調整粉乳は製造過程で *Enterobacter sakazakii* (以下、*E.sakazakii*) や *Salmonella enterica* などの菌に汚染されることがある¹⁾。Food and Agriculture Organization / World Health Organization (FAO/WHO) は乳児用調整粉乳の *E.sakazakii* による汚染は乳児感染及び疾患の原因となると勧告し、新生児特に早産、未熟児、免疫障害児におけるリスクが高く、*E.sakazakii* の汚染レベルは低くとも重大なリスク因子であると報告している^{2,4)}。そのため、調乳の際に 70°C 以上の湯冷ましを使用することが求められている¹⁾。わが国においても 2007 年及び 2009 年に厚生労働省通知で乳児用調整粉乳の調整時への注意喚起が行われ、*E.sakazakii* の生残を減らすために調乳温度を 70°C 以上にすることとした。従来 *E.sakazakii* とされてきたが、2008 年に *Cronobacter* spp. として再分類されたため⁹⁾、以降 *Cronobacter* spp. と記載する。2022 年にアメリカでは *Cronobacter* spp. の乳児用調整粉乳への汚染により 2 名の乳児が死亡している可能性があり、大規模な乳児用調整粉乳のリコールが起こったことは記憶に新しい⁶⁾。調乳器具においても感染の報告があり¹⁾、適切な洗浄・滅菌・保管が必要である。乳児への哺乳と調乳に使用された全ての器具を次の使用前までに徹底的に洗浄及び滅菌することは非常に重要である¹⁾。洗浄に関しては、清潔なビン用ブラシ、乳首用ブラシを使用し、ビンの内側・外側、乳首をこすり、残った乳児用調整粉乳を全て確実に除去し、洗浄後は水で十分にすすぐとある¹⁾。滅菌方法は煮沸、薬剤、電子レンジによる 3 つの滅菌方法が挙げられており、そのうち煮沸についてのみ詳細な方法が明記されている¹⁾。薬剤及び電子レンジによる滅菌方法については、メーカーの取扱い説明書に従って行うのみ明記されている¹⁾。3 つの滅菌方法を Adenosine triphosphate (ATP) + Adenosine diphosphate (ADP) + Adenosine monophosphate (AMP) ふき取り検査法 (A3 法) にて比較検討した論文は今のところない。そこで本研究では乳児用液体ミルク (以下、液体ミルク) を用いて、適切な洗浄を行った「洗浄群」と流水のみで洗浄を行わなかった「未洗浄群」を滅菌方法によって違いがあるのか検討した。

2. 方法

(1) 実施時期

2022 年 2 ~ 5 月に実施した。

(2) 滅菌方法

煮沸、薬剤、電子レンジによる加熱滅菌を行った。煮沸は哺乳びん及び乳首・キャップが浸かる大きさの鍋に約 10 L の水道水を入れ、沸騰し 100°C になったことを確認した。その後、哺乳びん等の中に空気が入らないようにし、7 分間加熱した¹⁾。薬剤滅菌は薬剤（つけるだけタブレット、ジェクス株式会社、大阪府）を使用した。薬剤の成分はジクロロイソシアヌル酸ナトリウム（500mg / 錠）であった。容器内に 2 L の水道水を入れ、薬剤を 1 錠溶かして攪拌し、哺乳びん等の中に空気が入らないようにし、1 時間浸水させた。電子レンジ滅菌は電子レンジ専用の箱（除菌じょ〜ず、コンビ株式会社、東京都）を使用し、水道水を専用キャップ 2 杯入れ、家庭用電子レンジ（BLMO-F1801-B、アイリスオーヤマ株式会社、宮城県）で 500 W 5 分加熱した。使用前に電子レンジ専用の箱は洗浄し、自然乾燥させてから使用した。

3 つ全ての方法で使用できる哺乳びん及び乳首（ピジョン スリムタイプ哺乳びん、ピジョン株式会社、東京都）を使用した。

(3) A3法

A3 法はルミテスター[®]PD-30（キッコーマンバイオケミファ株式会社、東京都）及びルシパック A3 Surface（以下、ルシパック）（キッコーマンバイオケミファ株式会社、東京都）を用いた。A3 法は指標として食品残渣などに含まれる ATP・ADP・AMP を迅速・高感度に検出・測定する検査方法である。ルシファーゼの発光反応とピルベートオルトホスフェートジキナーゼ（PPDK）、ピルピン酸キナーゼ（PK）を組み合わせた酵素サイクリング法を利用している⁶⁾（図 1）。この方法により、ATP、ADP、AMP の総量に比例した発光量を得られる⁷⁾。

哺乳びんはルシパックの綿棒にて内側を上から下へ 10 回転ふき取り、同じ綿棒でびんの底を 5 往復ふき取った。乳首はルシパックの綿棒で内側の接続部分のキャップ部分を 5 回転、乳首内側部分を 5 回転ふき取った。

A3 法は相対的な発光量として、Relative Light Unit（RLU）という単位で表記した。哺乳びん及び乳首・キャップの清浄度は 200 RLU 以下で合格「○」、201～399 RLU を注意「△」、400 RLU 以上で不合格「×」と表記した⁸⁾。

(4) 実験の流れ

哺乳びん及び乳首・キャップは各 3 セット測定をした。哺乳びん・乳首の洗浄には哺乳びんの外側とキャップ部分はスポンジ、哺乳びんの内側は哺乳びん用ナイロンブラシ、乳首部分は乳首専用のナイロンブラシを使用した。スポンジ・ブラシ類はすべて煮沸してから使用した。

使用前は哺乳びん及び乳首・キャップを洗浄し、煮沸を 7 分間行った。その後、自然乾燥させたのち、A3 法にて測定を行った。その後、液体ミルク（明治 ほほえみ らくらくミルク、株式会社明治、東京都）を哺乳びんに 120 mL 入れ、乳首・キャップを装着し、乳首から 10 回液体ミルクを出すことで使用したこととした。

洗浄群の使用後は哺乳びん内の液体ミルクを捨て、使用前と同様に洗浄したのち、A3 法にて測定を行った。未洗浄群の使用後に関しては、哺乳びんは水道水 200 mL を 2 回入

れ、乳首・キャップは水道水 10 mL を 2 回入れゆすいだ後、A3 法にて測定を行った。

各滅菌方法にて滅菌したのち、滅菌直後と滅菌後 1 時間の測定を行った。煮沸及び電子レンジは常温になったところを滅菌直後とした。

本研究では液体ミルクを用いて清浄度を評価することにした。乳児用調整粉乳による調乳が一般的であるが、乳児用調整粉乳であると攪拌による哺乳びん内部への乳児用調整粉乳の付着具合が結果に影響すると考え、今回は液体ミルクを使用した。

(5) 統計解析

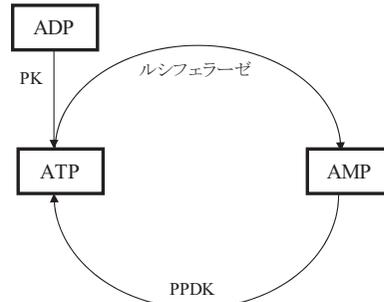
結果は連続変数については、平均値 ± 標準偏差で示した。統計学的処理には、SPSS Statistics 25 (日本 IBM 株式会社、東京) を使用した。洗浄の有無別は Shapiro-Wilk 検定にて正規性を評価したのち、等分散性の検定で等分散する場合には 2 標本 *t* 検定を行い、等分散しない場合には Welch の検定による 2 標本 *t* 検定を行った。滅菌方法別は Shapiro-Wilk 検定にて正規性を評価したのち、1 元配置分散分析を行い、結果が有意であった時に多重比較法である Tukey 法もしくは Games-Howell 法を実施した。統計学的有意水準は 5% 未満とした。

3. 結果

洗浄の有無の各滅菌方法による A3 法測定結果を表 1 に示す。哺乳びんは洗浄群・未洗浄群に関わらず、どの滅菌方法でも清浄度は合格であった。しかし、哺乳びんの薬剤滅菌の使用後と電子レンジ滅菌の使用後、電子レンジ滅菌の滅菌直後にて、洗浄群と未洗浄群では有意差を認めた (薬剤使用後 *P* 値 = 0.012、電子レンジ使用後 *P* 値 = 0.013、電子レンジ滅菌直後 *P* 値 = 0.014)。乳首及びキャップの洗浄群は、どの滅菌方法でも使用前の清浄度は合格であった。未洗浄群の使用後はどの滅菌方法でも清浄度は不合格であった。未洗浄群の乳首・キャップの滅菌直後及び滅菌後 1 時間に関しては、電子レンジ方法のみ清浄度が不合格であった。乳首・キャップの煮沸使用後、滅菌直後及び電子レンジ使用後、滅菌直後、滅菌後 1 時間にて、洗浄群と未洗浄群では有意差を認めた (煮沸使用後 *P* 値 = 0.001、煮沸滅菌直後 *P* 値 = 0.008、電子レンジ使用後 *P* 値 = 0.021、電子レンジ滅菌直後 *P* 値 = 0.005、電子レンジ滅菌後 1 時間 *P* 値 = 0.010)。

滅菌方法別による洗浄有無の A3 法測定結果を表 2 に示す。哺乳びんの洗浄群・未洗浄群ともにすべて清浄度は合格であり、滅菌方法別による有意差は認められなかった。乳首・キャップの洗浄に関しては、すべて清浄度が合格であり、滅菌方法別による有意差は認められなかった。乳首・キャップの未洗浄に関しては滅菌直後、滅菌後 1 時間で有意差

図 1 ATP 法での酵素サイクリング法の発光原理



PK (ピルビン酸キナーゼ) : ADP を ATP へ変換

PPDK (ピルバートオルトホスフェートジキナーゼ) : AMP を ATP に変換

ルシフェラーゼ : ATP から光を発生

が認められた。そのため、多重比較法を行い、煮沸と薬剤に比べ、電子レンジが有意に高かった（滅菌直後 P 値 = 0.001 煮沸 vs 電子レンジ P 値 = 0.002 薬剤 vs 電子レンジ P 値 = 0.002、滅菌後 1 時間 P 値 = 0.005 煮沸 vs 電子レンジ P 値 = 0.007 薬剤 vs 電子レンジ P 値 = 0.009）。

表 1 A3法測定結果 洗浄の有無別

a. 煮沸（哺乳びん）				d. 煮沸（乳首・キャップ）			
	洗浄群	未洗浄群	P 値		洗浄群	未洗浄群	P 値
使用前	13 ± 9 ○	9 ± 4 ○	0.564	使用前	17 ± 12 ○	16 ± 12 ○	0.922
使用後	9 ± 11 ○	36 ± 18 ○	0.103	使用後	23 ± 7 ○	1,591 ± 345 ×	0.001**
滅菌直後	15 ± 6 ○	11 ± 1 ○	0.346	滅菌直後	32 ± 6 ○	74 ± 13 ○	0.008**
滅菌後 1 時間	25 ± 17 ○	27 ± 8 ○	0.908	滅菌後 1 時間	27 ± 12 ○	61 ± 23 ○	0.090
b. 薬剤（哺乳びん）				e. 薬剤（乳首・キャップ）			
	洗浄群	未洗浄群	P 値		洗浄群	未洗浄群	P 値
使用前	7 ± 1 ○	10 ± 3 ○	0.140	使用前	8 ± 3 ○	9 ± 4 ○	0.718
使用後	11 ± 8 ○	78 ± 26 ○	0.012*	使用後	29 ± 5 ○	2,096 ± 1,653 ×	0.163
滅菌直後	9 ± 1 ○	27 ± 31 ○	0.405	滅菌直後	39 ± 13 ○	95 ± 60 ○	0.192
滅菌後 1 時間	9 ± 3 ○	17 ± 11 ○	0.301	滅菌後 1 時間	49 ± 27 ○	94 ± 83 ○	0.424
c. 電子レンジ（哺乳びん）				f. 電子レンジ（乳首・キャップ）			
	洗浄群	未洗浄群	P 値		洗浄群	未洗浄群	P 値
使用前	9 ± 2 ○	10 ± 1 ○	0.152	使用前	22 ± 5 ○	38 ± 19 ○	0.221
使用後	8 ± 4 ○	102 ± 38 ○	0.013*	使用後	15 ± 4 ○	828 ± 379 ×	0.021*
滅菌直後	18 ± 8 ○	96 ± 32 ○	0.014*	滅菌直後	33 ± 20 ○	774 ± 234 ×	0.005**
滅菌後 1 時間	21 ± 4 ○	82 ± 43 ○	0.131	滅菌後 1 時間	29 ± 15 ○	564 ± 201 ×	0.010*

P 値：2 標本 t 検定 * : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$ 有意差あり
合格：○ 注意：△ 不合格：×

表 2 A3法測定結果 滅菌方法別

a. 哺乳びん 洗浄

	洗浄			P 値 ¹	P 値 ²		
	1. 煮沸	2. 薬剤	3. 電子レンジ		1vs2	1vs3	2vs3
使用前	13 ± 9	○ 7 ± 1	○ 9 ± 2	○ 0.207	-	-	-
使用后	9 ± 11	○ 11 ± 8	○ 8 ± 4	○ 0.928	-	-	-
滅菌直後	15 ± 6	○ 9 ± 1	○ 18 ± 8	○ 0.244	-	-	-
滅菌後 1 時間	25 ± 17	○ 9 ± 3	○ 21 ± 4	○ 0.210	-	-	-

b. 哺乳びん 未洗浄

	未洗浄			P 値 ¹	P 値 ²		
	1. 煮沸	2. 薬剤	3. 電子レンジ		1vs2	1vs3	2vs3
使用前	9 ± 4	○ 10 ± 3	○ 10 ± 1	○ 0.890	-	-	-
使用后	36 ± 18	○ 78 ± 26	○ 102 ± 38	○ 0.075	-	-	-
滅菌直後	11 ± 1	○ 27 ± 31	○ 96 ± 32	○ 0.065	-	-	-
滅菌後 1 時間	27 ± 8	○ 17 ± 11	○ 82 ± 43	○ 0.173	-	-	-

c. 乳首及びキャップ 洗浄

	洗浄			P 値 ¹	P 値 ²		
	1. 煮沸	2. 薬剤	3. 電子レンジ		1vs2	1vs3	2vs3
使用前	17 ± 12	○ 8 ± 3	○ 22 ± 5	○ 0.145	-	-	-
使用后	23 ± 7	○ 29 ± 5	○ 15 ± 4	○ 0.057	-	-	-
滅菌直後	32 ± 6	○ 39 ± 13	○ 33 ± 20	○ 0.802	-	-	-
滅菌後 1 時間	27 ± 12	○ 49 ± 27	○ 29 ± 15	○ 0.374	-	-	-

d. 乳首及びキャップ 未洗浄

	未洗浄			P 値 ¹	P 値 ²		
	1. 煮沸	2. 薬剤	3. 電子レンジ		1vs2	1vs3	2vs3
使用前	16 ± 12	○ 9 ± 4	○ 38 ± 19	○ 0.079	-	-	-
使用后	1,591 ± 345	× 2,096 ± 1,653	× 828 ± 379	× 0.358	-	-	-
滅菌直後	74 ± 13	○ 95 ± 60	○ 774 ± 234	× 0.001**	0.983	0.002 ^{††}	0.002 ^{††}
滅菌後 1 時間	61 ± 23	○ 94 ± 83	○ 564 ± 201	× 0.005**	0.947	0.007 ^{††}	0.009 ^{††}

P 値¹: 1 元配置分散分析 ** : p < 0.01 有意差あり

P 値²: Tukey 法 ^{††}: p < 0.01 有意差あり

合格: ○ 注意: △ 不合格: ×

4. 考察

哺乳びんは洗浄群・未洗浄群に関わらず、どの滅菌方法でも清浄度は合格であり、滅菌方法に有意差はなかった。哺乳びん内部は凹凸がなく、液体ミルクを使用したことから水道水でゆすぐだけで概ね洗浄できたと考えられた。哺乳びんを使用後はできるだけ速やかに洗浄することが求められているが、すぐに洗浄できない場合には水道水でゆすいで置くことも推奨されている⁹⁾。今回の結果はそのこととも矛盾しなかった。使用後はできるだけ速やかに洗浄する必要があるが、水道水ですすぎだけでも行うことで、ミルクの残渣が減り、細菌等の繁殖を抑制できるのではないかと考えられた。

乳首・キャップの洗浄群は、どの滅菌方法でも清浄度は合格であり、滅菌方法に有意差はなかった。適切に洗浄された哺乳びん及び乳首・キャップはどの滅菌方法であっても清浄度に変化はないと考えられた。未洗浄群は滅菌直後及び滅菌後1時間では電子レンジの除菌のみ清浄度が低かった。このことから適切な洗浄がなされていない乳首・キャップの場合には、電子レンジでの滅菌方法は特に注意が必要であると考えられた。哺乳びんよりも乳首・キャップは凹凸があるため、汚れが落ちにくい。また、電子レンジ方法では使用する水の量が少ないため、他の方法よりも清浄度が低下したと推測された。近年では電子レンジの普及によって、より簡便で安価な電子レンジでの滅菌方法を選択する保育者もいる。飛田らの報告でも消毒方法として電子レンジでの滅菌方法が最も多く、他の方法と比べて生後6か月まで哺乳びんの消毒を継続した割合が多かった¹⁰⁾。滅菌方法はそれぞれの特性を理解した上でメーカーの取扱説明書に従って使用する必要がある。哺乳びんや乳首・キャップは適切に洗浄を行えば、どの滅菌方法でも清浄度は問題がないと考えられた。

本研究の結果では哺乳びんや乳首・キャップは適切な洗浄を行えば、煮沸・薬剤・電子レンジのどの滅菌方法でも清浄度没有问题がないと考えられた。そのため、哺乳びん等を洗浄する人が適切な洗浄方法を知り、実際洗浄できているかを把握する必要があるため、今後検討したいと考える。

A3法を用いて哺乳びん及び乳首・キャップの滅菌方法による違いを比較・検討した。A3法は簡便で迅速に結果を得られる方法ではあるが、細菌数と食品残渣を同時に測定するため、細菌数や菌種は不明である¹¹⁾。発光量は菌種により異なることや損傷した細菌ではATP量が減少していることもあったと考えられた^{11,12)}。A3法は簡便で結果がすぐに出るためすぐに清浄度を測定することに優れている。しかし、他の方法でも清浄度を測定する必要があると考えられた。

5. 参考文献

1. World Health Organization: Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula meeting report. Microbiological Risk Assessment Series, No. 6. WHO, 2007
2. Food and Agriculture Organization of the United Nation and World Health Organization. Enterobacter sakazakii and Salmonella in powdered infant formula. Meeting Report, 2006
3. 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>) (2022年12月1日)
4. 荻原 博和, 露木 朝子, 古川 壮一, 他: 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, 50(3): 109-116, 2009
5. 岡田由美子: *Cronobacter* 属菌について, 日本食品微生物学会雑誌, 34(2): 65-75, 2017
 6. Food and Drug Administration. FDA Investigation of *Cronobacter* Infections: Powdered Infant Formula (February 2022). (<https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/fda-investigation-cronobacter-infections-powdered-infant-formula-february-2022>) (2022年12月1日)
 7. Mikio Bakke, Shigeya Suzuki: Development of a Novel Hygiene Monitoring System Based on the Detection of Total Adenylate (ATP+ADP+AMP). *Journal of Food Protection*, 81(5): 729-737, 2018
 8. 伊藤武: 現場のための ATP ふき取り検査マニュアル~基礎から応用まで~, ATP・迅速検査研究会, 東京, pp.19-56, 2016
 9. 飛田八千代, 鈴木里美, 廣木光子: 哺乳びん消毒の効果的な指導方法の検討 - アンケート調査の結果から - 茨城県母性衛生学会誌 (21): 24-26, 2001
 10. 水野清子: 母子健康・栄養ハンドブック, 医歯薬出版株式会社, 東京, pp.139-143, 2000
 11. 厚生労働省: 食品衛生検査指針微生物編, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京, pp.148-151, 2018
 12. 小高秀正, 福田佳子, 水落慎吾, 他: 食品の変敗に関わる微生物中の ATP 含量, 日本食品微生物学会雑誌, 13(1): 29-34, 1996

