

液体ミルクの安全性の立証に向けて： 飲み残したペットボトルの口の部分に付着する細菌 および飲料物内の細菌の量および構成の解析

(研究助成金 50万円)

代表研究者 新潟大学大学院保健学研究科検査技術科学分野(臨床化学)

教授 佐藤 拓一

[1989年 新潟大学歯学部歯学科卒
1993年 新潟大学大学院歯学研究科(歯学臨床系)修了(博士課程)]

共同協力者 東北大学大学院歯学研究科口腔生化学分野・講師 鷺尾 純平

〔助成応募書〕

研究目的

乳児用「液体ミルク」は、開封すれば、乳児に、すぐ飲ませることができ、また、常温で保存できるという、使用上の大きなメリットがある。したがって、諸外国でも広く普及している。日本においても、新聞報道によれば、「液体ミルク」は、東日本大震災や熊本などの地震災害時に、「救援援助物資」として、諸外国から提供され、大変、好評を博したとのことである。しかしながら、日本では食品衛生法に基づく厚生労働省令には、「粉ミルク」の規格のみで、「液体ミルク」の規格基準がなく、使用が認められていない。海外製の液体ミルクの輸入・販売には、日本では食品添加物として認可されていない成分が使用されている、という障壁がある。

政府の専門調査会は、国や事業者団体、企業が連携して、国内における、乳児用「液体ミルク」の製造・製品化・販売を加速化するよう、求めている。さらに、政府による「女性活躍加速のための重点方針 2017」や2020年の東京オリンピック（乳児を伴った、海外からの来日者の増加）という別の観点からも、いわゆる、政府を挙げて、日本における乳児用「液体ミルク」の使用解禁の必要性が叫ばれている。

使用解禁のためには、製造の高コストや短い賞味期限、変色しやすい（変質はしていないが、日本の消費者の購入意欲を下げる）等の問題点の克服に加えて、開封後、飲み残しを「もったいない」と思い、保管しがち、という日本人の特性も考慮すべきと言われている。すなわち、飲み残しを常温保存した場合、細菌がどの程度、増殖するか等、基本的な、安全性を示すデータが不足していることから、認可が遅れているとのことである。

本研究では、飲み残しの常温保存による細菌の増殖等、開封後の乳児用液体ミルクの安全性の観点から、飲みかけのペットボトル（お茶および液体ミルク）の飲み口部分および飲料物内から試料を採取・解析し、その

細菌量および構成について明らかにする。

なお、本応募者らの研究チームは、既にペットボトルから直接、飲料物を飲んだ場合、どのような細菌が、どの程度、残留するか、細菌学的解析を予備的に開始し、少数例ながら研究会・学会報告している（第6回口腔保健用機能性食品研究会および第12回日本臨床検査学教育学会学術大会）。データの精度を高め、この秋の学会で続報を発表する予定であり、方法論の確認・確立・データの蓄積を図っているところである。

- Sano H, Hirabuki Y, Wakui A, Aida A, Abiko Y, Yamaki K, Mayanagi G, Washio J, Takahashi N, Sato T: Quantification and composition of remaining bacteria in plastic bottles after drinking. 第59回歯科基礎医学会学術大会, 2017年9月17日, 塩尻
- Aida A, Sano H, Wakui A, Hirabuki Y, Takenaka Y, Kawachi M, Vidanapathirana GU, Washio J, Sato T: A microbiological study on bacteria in plastic bottles after drinking. 第65回 JADR 総会・学術大会, 2017年11月18-19日, 東京

研究実施計画の概要

【倫理面の配慮】

新潟大学および共同研究先の東北大学において、主に学生を対象に被験者を募る（インフォームドコンセントを得る）。研究実施にあたり、新潟大学の倫理委員会の承認を得る（東北大学大学院歯学研究科研究倫理委員会の承認は取得済み）。

【市販のペットボトル（お茶；無糖）についての解析】

被験者（10例程度を想定）に直接、口を付けて飲んでもらい、その直後および1日後に、ペットボトルの口の部位を滅菌綿棒で擦過し、リン酸カリウム緩衝液に懸濁したものを試料とする。分散・均一化、希釈処理後、CDC 血液寒天平板に接種し、37°Cで1週間、嫌気培養する。次いで、1日放置後の飲料物からも試料を同様に採取し培養する。得られた各コロニーから genomic DNA を抽出し、16S rRNA シークエンス解析により細菌種の同定を行う。

【乳児用の飲料物および液体ミルクについての解析】

上記と同様に、乳児用の飲料物（粉ミルクや大塚製薬のビーンスターク等）および液体ミルクのデータの取得および検討を行う。10例程度を想定し、哺乳瓶（乳首）から飲んでもらい、付着および残留する細菌について解析する。

【現在までの準備状況】

上述の通り、予備実験を開始している。これによって、本研究の手法が或る程度、確認・確立することができた。すなわち、実施にあたって必要な、DNA 抽出装置、電気泳動装置、遠心分離器などの一般的な設備は、2016年に異動した先の、現在の本研究室に整っている。しかしながら、本格的に嫌気性菌を取り扱うためには、嫌気グローブボックスの導入が、どうしても必要であるため、機械器具として計上した。これまでは、便宜的に、簡易培養キットを利用してきたが、これだと、実験誤差あるいは誤った実験結果を導きやすく（例：口腔の試料の解析結果にも拘らず、嫌気性菌の割合が従来より、低い傾向にある等）、非常に苦慮しているのが現況である。

【成果の公表】

これまでの予備実験の成果と合わせて、研究会にて報告する（第7回口腔保健用機能性食品研究会@大阪）。

ペットボトルの飲料物，乳児用の飲料物，液体ミルクについて，データを総合し，研究成果を英文論文としてまとめ，国際誌に投稿・発表する（Journal of Oral Biosciences や Journal of Applied Microbiology 誌を想定）。

I 緒言

液体ミルクは，開封すれば，すぐ飲ませることができ，また常温で保存できるという，使用上の大きなメリットがあり，諸外国でも広く普及している。日本においても，ごく最近，規制が改正・販売が認可され，2019年の春にも市販を予定するメーカーが出てきたとのことである（2018年11月の新聞報道）。

そもそも，液体ミルクの有用性については，異論は少なく，市販されれば，日本でも広く普及するものと見込まれている。そこで懸念されるのが，液体ミルクを飲み残した場合である。特に日本人は，「もったいない」と感じる傾向があり，保管して再び飲むことができないかと考える人が多いのではないかとと思われる。

ニプル（哺乳瓶用の人工乳首）を通して飲料物を飲んだ際に，口腔から逆流するという発想について論じた論文は，文献（英論文）検索では見当たらず，飲み残しの飲料物をもったいと思う感覚は，もしかしたら，日本人特有のものなのかもしれない。

また，清涼飲料水の飲み残しについての報道（週刊誌やTVなど）は，特に夏場に，盛んになされるが，よく注意して観てみると，細菌の量についての報道だけで，その中身の詳細については触れられていないことが分かる。これはいろいろと予備実験してみたところ，量を測ることは比較的，容易ではあるが，中身（構成）の詳細について検討することは，ある程度の知識・経験・設備などが必要で，そう簡単なことではないこと，また，医学領域では，注目されて来なかったことから，積極的に取り組まれて来なかったのではないかとと思われる。

そこで，本研究では，保存方法などを検討するための基礎的データを得ることを目的として，ペットボトルの飲料物（お茶）を直接，口をつけて飲んだり，また乳児用の飲料物をニプルを通して飲んだりした際の，口腔からの逆流の有無・程度について，細菌学的に解析した。

II 研究方法

1. 被験者および試料

インフォームドコンセントを得た，健康な被験者（総計20名）に，ペットボトルのお茶（爽健美茶）を直接，ペットボトルの口から，また，ニプルを通して，乳児用の飲料物（ビーンスターク，および液体ミルク「アプタミルク」：輸入通販で入手）を，それぞれ約50mLを飲んでもらい，ペットボ

トルの口の部分またはニプルの内面を滅菌綿棒で擦過し、1.0mLの40mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)に懸濁し、試料とした。また、乳児用の飲料物(1.0mL)および唾液も採取し、試料とした。

2. 試料の細菌培養

試料はボルテックスミキサーを用いて、迅速に分散・均一化を行い、上述の緩衝液で10倍連続希釈した。各100 μ LをCDC血液寒天培地(BD, Franklin Lakes, NJ, USA)に接種し、37 $^{\circ}$ Cで1週間の嫌気培養を行った。培養後の、計数可能な100個以下のコロニーが得られた平板からCFU(細菌量)を算定し、適切な希釈平板上に得られたコロニー全てを植え継ぎ、純培養した。

3. DNAの抽出およびPCR増幅

純培養したコロニーから、InstaGene Matrix Kit (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)を用いてゲノミックDNAを抽出した。

抽出したゲノミックDNAをテンプレートにして、細菌16S ribosomal RNA遺伝子のユニバーサルプライマー(27F, 1492R)(Lane 1991, Marchesi *et al* 1998)を用いてPCR増幅を行った。プライマーの塩基配列は、27F: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3', 1492R: 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'。抽出したDNAに2.5 units Taq DNA polymerase (HotStarTaq Master Mix, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)を添加した後、iCycler (Bio-Rad Laboratories)を用いて以下の条件でPCR増幅を行った。PCR増幅プログラムは、95 $^{\circ}$ C 5分の初期加熱後、94 $^{\circ}$ C 1分で熱変性、55 $^{\circ}$ C 1分でアニーリング、72 $^{\circ}$ C 1分30秒の伸長反応を3ステップ1サイクルとして30サイクル、さらに72 $^{\circ}$ C 10分の最終反応を行った。

4. 制限酵素処理およびシーケンス解析

得られたPCR産物を制限酵素 *Hpa*II (FastDigest *Hpa*II, Thermo Scientific, Inc., USA)を用いて処理(37 $^{\circ}$ C, 5分間)した。処理後、2%アガロースゲル(High Strength Analytical Grade Agarose, Bio-Rad Laboratories)で電気泳動・エチジウムブロマイド染色を行い、電気泳動像を、トランスイルミネーター上で、デジタルカメラで撮影・記録した。

得られた電気泳動パターンから細菌種のグループ分けを行った(PCR-RFLP法)。そして、各グループの代表株について、細菌16S ribosomal RNA遺伝子のシーケンス解析を行った。データベース(National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA)と照合し、99%を超える相同性の場合を同一菌種と見なした(Ishida *et al* 2015)。

また、本研究を遂行する過程において、電気泳動パターンから迅速に菌種同定する手法も確立した(Figure 1.を参照)。すなわち、*Neisseria perflava*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis/oralis*, *S. australis*, *S. infantis*, *S. parasanguinis*に特有な電気泳動パターンを見出すことに成功し、このパターンと同一のものは、シーケンス解析を経ずに、迅速に同定することが可能となった。

Figure 1 電気泳動パターン

Ⅲ 研究結果および考察

解析の結果，得られた細菌量を，次のグラフ（Figure 2）に示す。

直接，ペットボトルの口からお茶を飲んだ場合の，飲み口部分から，平均 $(2.0 \pm 4.9) \times 10^5$ CFU/mL の細菌が得られ，飲料物（お茶）内からは， $(1.0 \pm 1.8) \times 10^4$ CFU/mL の細菌が得られた。これが1日経つと，それぞれ， $(2.0 \pm 1.4) \times 10^4$ CFU/mL， $(2.6 \pm 3.1) \times 10^6$ CFU/mL になった。

一方，ビースタークを（ニプルを通して）飲んだ場合，ニプルの内側部分から，平均 $(4.2 \pm 2.5) \times 10^3$ CFU/mL の細菌が得られ，乳児用飲料のビースターク内からは， $(1.3 \pm 1.7) \times 10^4$ CFU/mL の細菌が得られた。また，液体ミルクを（ニプルを通して）飲んだ場合，液体ミルク内から， $(3.2 \pm 3.0) \times 10^4$ CFU/mL の細菌が得られ，3時間保管した後でも， $(3.4 \pm 3.3) \times 10^4$ CFU/mL の細菌が得られた。

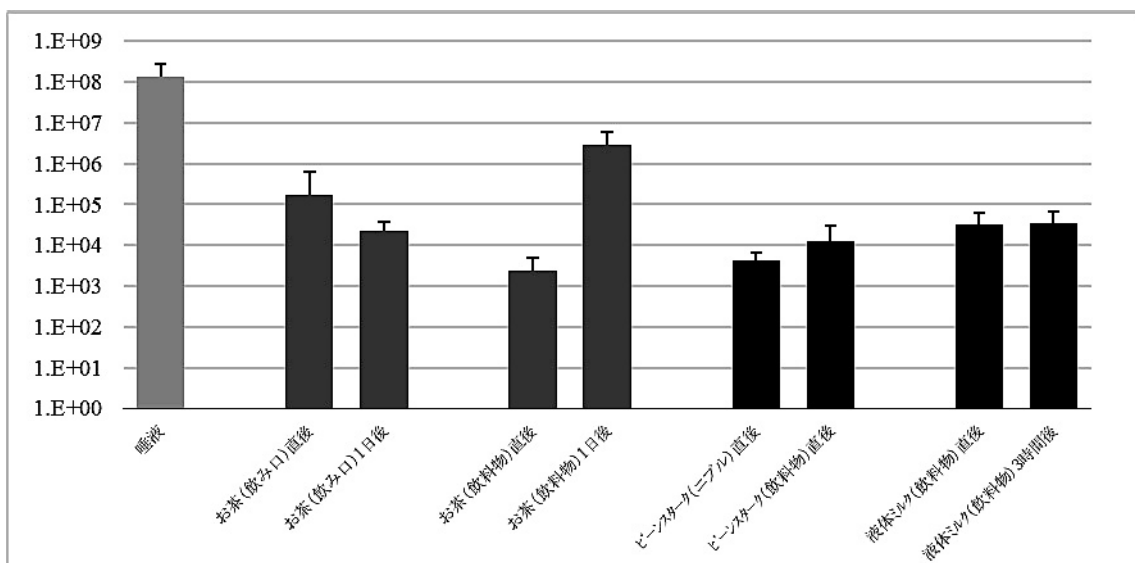


Figure 2 各試料の細菌量

以上のことから、唾液よりは少ないものの、口腔から飲料物内へ確かに逆流していることが示された（なお、口を付けていないペットボトルの飲み口部分、お茶、ニプルおよび乳児用飲料物からは、細菌が全く検出されないことを予備的な実験によって予め確かめておいた）。

次に、細菌構成を解析した結果を、次の表（Table 1）に示す。

Table 1 各試料の細菌構成（菌属レベルで集計）

Total (% of total isolates)	お茶（飲み口）			お茶（飲料物）		ビーンスターク		液体ミルク	
	唾液	お茶（飲み口）		お茶（飲料物）		ビーンスターク		液体ミルク	
	198 (%)	直後	1日後	直後	1日後	ニプル	直後	直後	3時間後
198 (%)	198 (%)	195 (%)	196 (%)	92 (%)	151 (%)	279 (%)	226 (%)	172 (%)	159 (%)
偏性嫌気性菌	37 (18.7%)	30 (15.4%)	0 (0.0%)	15 (16.3%)	4 (2.6%)	84 (30.1%)	71 (2.3%)	52 (30.2%)	47 (27.3%)
<i>Veillonella</i>	14 (7.1%)	8 (4.1%)	0 (0.0%)	6 (6.5%)	0 (0.0%)	51 (18.3%)	26 (11.5%)	28 (16.3%)	18 (10.5%)
<i>Propionibacterium</i>	7 (3.5%)	14 (7.2%)	0 (0.0%)	9 (9.8%)	4 (2.6%)	4 (1.4%)	11 (4.9%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)
<i>Prevotella</i>	6 (3.0%)	4 (2.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	15 (5.4%)	13 (5.8%)	4 (2.3%)	12 (7.0%)
<i>Atopobium</i>	4 (2.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)	1 (0.4%)	5 (2.9%)	6 (3.5%)
<i>Porphyromonas</i>	3 (1.5%)	1 (0.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)	3 (1.3%)	2 (1.2%)	1 (0.6%)
<i>Leptotrichia</i>	1 (0.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (1.2%)	1 (0.6%)
<i>Megasphaera</i>	1 (0.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (0.7%)	0 (0.0%)	3 (1.7%)	0 (0.0%)
<i>Selenomonas</i>	1 (0.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (0.7%)	1 (0.4%)	2 (1.2%)	1 (0.6%)
<i>Eubacterium</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (1.4%)	2 (0.9%)	1 (0.6%)	2 (1.2%)
<i>Fusobacterium</i>	0 (0.0%)	3 (1.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (1.3%)	0 (0.0%)	2 (1.2%)
<i>Olsenella</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (1.1%)	7 (3.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<i>Oribacterium</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)	0 (0.0%)	4 (2.3%)	1 (0.6%)
<i>Peptostreptococcus</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (1.8%)	0 (0.0%)	3 (1.7%)
<i>Solobacterium</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)	2 (1.2%)
通性嫌気性菌	161 (81.3%)	165 (84.6%)	196 (100.0%)	77 (83.7%)	147 (97.4%)	195 (69.9%)	155 (68.6%)	120 (69.8%)	112 (65.1%)
<i>Streptococcus</i>	112 (56.6%)	108 (55.4%)	156 (79.6%)	69 (75.0%)	146 (96.7%)	146 (52.3%)	87 (38.5%)	72 (41.9%)	65 (37.8%)
<i>Actinomyces</i>	19 (9.6%)	27 (13.8%)	0 (0.0%)	7 (7.6%)	0 (0.0%)	29 (10.4%)	59 (26.1%)	42 (24.4%)	35 (20.3%)
<i>Neisseria</i>	15 (7.6%)	4 (2.1%)	0 (0.0%)	1 (1.1%)	1 (0.7%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)	0 (0.0%)	3 (1.7%)
<i>Rothia</i>	9 (4.5%)	3 (1.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (1.1%)	1 (0.4%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)
<i>Gemella</i>	3 (1.5%)	10 (5.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	15 (5.4%)	3 (1.3%)	3 (1.7%)	5 (2.9%)
<i>Staphylococcus</i>	2 (1.0%)	7 (3.6%)	40 (20.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<i>Campylobacter</i>	1 (0.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (0.7%)	2 (0.9%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)
<i>Abiotrophia</i>	0 (0.0%)	1 (0.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<i>Capnocytophaga</i>	0 (0.0%)	3 (1.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (0.9%)	2 (1.2%)	2 (1.2%)
<i>Corynebacterium</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)
<i>Haemophilus</i>	0 (0.0%)	2 (1.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

唾液（8例）からは、総計198菌株が分離され、*Streptococcus*（112株、56.6%）、*Actinomyces*（19株、9.6%）、*Neisseria*（15株、7.6%）、*Veillonella*（14株、7.1%）、*Rothia*（9株、4.5%）、*Propionibacterium*（7株、3.5%）、*Prevotella*（6株、3.0%）が、主な細菌構成となっていた。

直接、ペットボトルの口からお茶を飲んだ場合（8例）の、飲み口部分の細菌構成は、直後は、多種多様で、主な菌属を列挙すると、*Streptococcus*（108株、55.4%）の他、*Actinomyces*（27株、13.8%）、*Propionibacterium*（14株、7.2%）、*Gemella*（10株、5.1%）、*Veillonella*（8株、4.1%）、*Staphylococcus*（7株、3.6%）と、唾液を反映した細菌構成となっていた。これが1日経つと、様変わりし、*Streptococcus*（156株、79.6%）、*Staphylococcus*（40株、20.4%）の2菌属で構成されていた。

また、ペットボトルの口から直接、飲んだ場合の、飲料物（お茶）の中の細菌構成は、直後は、*Streptococcus*（69株、75.0%）、*Propionibacterium*（9株、9.8%）、*Actinomyces*（7株、7.6%）、*Veillonella*（6株、6.5%）であった。一方、これが1日経つと、ほぼ、*Streptococcus*（146株、96.7%）だけで構成されていた。

乳児用飲料のビーンスターク（8例）を飲んだ直後、ニプルの内側からは、総計279菌株が分離され、*Streptococcus*（146株、52.3%）、*Veillonella*（51株、18.3%）、*Actinomyces*（29株、10.4%）、*Gemella*（15株、5.4%）、*Prevotella*（14株、5.4%）が主な細菌構成であった。一方、飲料物（ビーンスターク）内からは、226菌株が分離され、主な細菌構成は、*Streptococcus*（87株、38.5%）、*Actinomyces*（59株、26.1%）、*Veillonella*（26株、11.5%）、*Prevotella*（13株、5.8%）、*Propionibacterium*（11株、4.9%）、

Olsenella (7株, 3.1%)であった。

乳児用の液体ミルク (4例) を飲んだ直後, 飲料物内からは, 172菌株が分離され, 主な細菌構成は, Streptococcus (72株, 41.9%), Actinomyces (42株, 24.4%), Veillonella (28株, 16.3%) で, その他, Atopobium (5株, 2.9%), Prevotella (4株, 2.3%), Oribacterium (4株, 2.3%), Gemella (3株, 1.7%), Megasphaera (3株, 1.7%), Capnocytophaga (2株, 1.2%), Porphyromonas (2株, 1.2%), Leptotrichia (2株, 1.2%), Selenomonas (2株, 1.2%) などであった。

3時間保管後に再度, 試料を採取し, 解析してみると, 159菌株が分離され, Streptococcus (65株, 37.8%), Actinomyces (35株, 20.3%), Veillonella (18株, 10.5%), Prevotella (12株, 7.0%), Atopobium (6株, 3.5%), Gemella (5株, 2.9%), Peptostreptococcus (3株, 1.7%), Neisseria (3株, 1.7%), Capnocytophaga (2株, 1.2%), Eubacterium (2株, 1.2%), Fusobacterium (2株, 1.2%), Solobacterium (2株, 1.2%) などであった。飲んだ直後との類似性から, 3時間程度の保管だと, 液体ミルクそのものに大きな影響・変化は見られないことが示唆された。

さらに, 優勢な菌属であった, Streptococcus, Veillonella, Actinomyces について, 菌種レベルの詳細な構成内容を, 次の表 (Table 2) に示す。

Table 2 Streptococcus, Veillonella, Actinomyces の, 菌種レベルの構成

	お茶 (飲み口)			お茶 (飲料物)		ビーンスターク		液体ミルク	
	唾液	直後	1日後	直後	1日後	ニブル	直後	直後	3時間後
Streptococcus	112	108	156	69	146	146	87	87	87
<i>S. mitis/oralis</i>	60(53.6%)	64(59.3%)	115(73.7%)	46(66.7%)	125(85.6%)	40(14.3%)	24(10.6%)	24(14.0%)	24(14.0%)
<i>S. parasanguinis</i>	24(21.4%)	27(25.0%)	8(5.1%)	10(14.5%)	4(2.7%)	79(28.3%)	49(21.7%)	49(28.5%)	49(28.5%)
<i>S. cristatus</i>	10(8.9%)	1(0.9%)	5(3.2%)	4(5.8%)	1(0.7%)	10(3.6%)	2(0.9%)	2(1.2%)	2(1.2%)
<i>S. australis</i>	9(8.0%)	7(6.5%)	1(0.6%)	5(7.2%)	3(2.1%)	10(3.6%)	1(0.4%)	1(0.6%)	1(0.6%)
<i>S. infantis</i>	8(7.1%)	1(0.9%)	26(16.7%)	0(0.0%)	13(8.9%)	5(1.8%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
<i>S. salivarius</i>	1(0.9%)	8(7.4%)	1(0.6%)	4(5.8%)	0(0.0%)	2(0.7%)	5(2.2%)	5(2.9%)	5(2.9%)
<i>S. mitis/oralis</i> or <i>S. infantis</i>	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	6(2.7%)	6(3.5%)	6(3.5%)
Veillonella	14	8	0	6	0	51	26	26	26
<i>V. tobetsuensis</i>	7(50.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	2(0.7%)	7(3.1%)	7(4.1%)	7(4.1%)
<i>V. parvula</i>	6(42.9%)	8(100.0%)	0(0.0%)	6(100.0%)	0(0.0%)	49(17.6%)	18(8.0%)	18(10.5%)	18(10.5%)
<i>V. parvula/tobetsuensis</i>	1(7.1%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
<i>V. dispar</i>	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	1(0.4%)	1(0.6%)	1(0.6%)
Actinomyces	19	27	0	7	0	29	59	59	59
<i>A. odontolyticus</i>	10(52.6%)	17(63.0%)	0(0.0%)	4(57.1%)	0(0.0%)	22(7.9%)	51(22.6%)	51(29.7%)	51(29.7%)
<i>A. oris/naeslundii</i>	8(42.1%)	10(37.0%)	0(0.0%)	3(42.9%)	0(0.0%)	4(1.4%)	6(2.7%)	6(3.5%)	6(3.5%)
<i>A. graevenitii</i>	1(5.3%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	2(0.9%)	2(1.2%)	2(1.2%)
<i>A. israelii</i>	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	2(0.7%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
<i>A. johnsonii</i>	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	1(0.4%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)

唾液, ニブル, ビーンスターク, 液体ミルクとも, *S. mitis/oralis*, *S. parasanguinis*, *V. parvula*, *V. tobetsuensis*, *A. odontolyticus*, *A. oris/naeslundii* が主体を成していることが分かった。

本研究の成果として, 飲みかけのペットボトル飲料物 (お茶), および乳児用飲料物 (ビーンスターク, 液体ミルク) 内に残存・増殖する細菌の詳細について (知られている限り, 世界で) 初めて明らかにすることができた。

ペットボトル飲料物内に残存・増殖する細菌は, 量こそ, 唾液より少なめではあったが, 構成細菌種は, 唾液で主体を成す Streptococcus がやはり主体であった。

また, 唾液の細菌構成は, Streptococcus, Actinomyces, Neisseria, Veillonella, Rothia, Propionibacterium, Prevotella であり, 一方, 飲み口部分の細菌構成は, Streptococcus, Actinomyces, Propionibacterium, Gemella, Veillonella, Staphylococcus であったことから, 両者 (唾液と飲み口の細菌構成) は類似していることが示唆された。

ニプルを通して飲んだ場合、乳児用飲料物に、1 mL 当たり数千個程度（以上）の口腔細菌が流入していることが判明した。また、唾液で優勢であった *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella* が、ニプルの内側や乳児用飲料内でも優勢菌として検出されたことから、口腔から唾液が逆流していることが裏付けられた。

IV 結 語

本研究の結果、ニプルを通して、乳児用飲料を飲むと、数千レベル（以上）の細菌が口腔から逆流することが判明した。したがって、乳児用飲料において、その飲ませ方や飲み残しの保存・保管方法に、ある一定の配慮が必要であると思われた。すなわち、①乳児用飲料を飲ませる場合は、全量を飲み切る、②少量を飲ませる場合は、別の容器に移し、口腔からの逆流（細菌混入）を防ぐ、③開封後、保存・保管する場合は、冷蔵保存することなどが考えられた。

V 謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人総合研究推進財団に深謝する次第である。また、本研究遂行に多大な尽力をいただいた佐野拓人および涌井杏奈の両氏（新潟大学大学院保健学研究科検査技術科学分野・臨床化学・大学院生）に厚く御礼申し上げる。

【参考文献】

- 1) Ishida N, Sato T, Hoshikawa Y, Tanda N, Sasaki K, Kondo T, Takahashi N: Microbiota profiling of bronchial fluids of patients with pulmonary carcinoma. *J Oral Biosci* 57(2): 110-117, 2015.
- 2) Lane DJ: 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 115-175, 1991.
- 3) Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Dymock D, Wade WG: Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64(2): 795-799, 1998.
- 4) 読売新聞：乳児用の液体ミルク、解禁へ・・・育児の負担軽減、2016.10.16付け。
- 5) 朝日新聞：液体ミルク 今夏にも解禁 乳児用、2018.3.13付け。
- 6) 朝日新聞：乳児用液体ミルク、新基準「特別用途食品」設けて販売へ、2018.5.16付け。
- 7) 朝日新聞：液体ミルク 安全性は？ 乳児向け 国産品の市販へ準備、2018.9.15付け。
- 8) 朝日新聞：大人のための粉ミルク 知っていますか？、2018.10.20付け。
- 9) 朝日新聞：液体ミルクの承認申請へ 江崎グリコ、来春販売めざす、2018.11.20付け。