

研 究

家庭用冷蔵庫保存における冷蔵母乳の安全性の研究

～細菌数の経日的変化を指標に～

楯 亜希子¹⁾, 齋藤 良一²⁾, 三隅 順子³⁾, 大久保功子³⁾

〔論文要旨〕

目的：母乳の保存温度による安全性を食品衛生法の基準をもとに明らかにした。

対象と方法：母乳育児中の母親10名から各々搾乳した母乳20mlを使用した。母乳の各保存温度における総細菌数と大腸菌数の経日的変化を観察した。さらに、黄色ブドウ球菌と大腸菌を添加して経日的変化を観察した。

結果：冷蔵保存の母乳は食品衛生法による「乳及び、乳製品の成分規格に関する省令」の基準である、総細菌数 5×10^4 CFU/ml 以下、大腸菌群陰性を保存8日まで満たしていた。冷蔵保存の母乳は冷凍保存の母乳より8日目の時点で総細菌数は少なかった。

考察：冷蔵母乳も、8日目まで安全に使用できる可能性が示唆されたことにより、冷蔵母乳が保育所や健康な乳幼児を対象とする現場で取り扱いが可能となるようさらに研究を積み重ねる必要がある。

Key words：母乳，冷蔵母乳，冷凍，細菌数，保存期間

I. はじめに

母乳育児を継続することは、母子にとって利点がある。このため、WHO や UNICEF では母乳育児を推進しており¹⁾、日本でも現在、厚生労働省が母乳育児の推進に取り組んでいる²⁾。アメリカ小児科学会の「Breastfeeding and the Use of Human Milk 2012」では、人工乳と比較して母乳育児の場合は、乳幼児の肺炎や細気管支炎、中耳炎・胃腸炎罹患率の低下や肥満率の低さ、母親の産後うつ、心血管系疾患、高脂血症、閉経前の乳がんや卵巣がんの罹患率が低いことを指摘している³⁾。

その一方、女性の社会進出も推奨されており、働きながら母乳育児を継続する女性は増加傾向にある。働く女性の母乳育児の継続についての課題は、搾乳時間

や場所の確保の工夫、また、搾乳した母乳をどのように保存して子どもに与えるかである⁴⁾。働きながら母乳育児を継続するためには、保育所など、子どもの預け先に搾乳した母乳を預けたり、直接保育所へ授乳に行ったりする方法がある。母乳を預ける場合、母乳パックなどに小分けにして、完全に凍結された状態にすることが一般的である。また、厚生労働省の保育所保育指針では、「冷凍母乳」の受け入れについて明記されているが⁵⁾、冷蔵母乳についての記載は見当たらない。

保育現場では、「冷凍母乳では解凍に時間がかかり、お腹が空いて泣いてもすぐにあげられない」、「預かった母乳が原因で食中毒が起こると困る」という保育者の不安や困難があり⁶⁾、母乳が受け入れられない場合や、働く女性が母乳を預けられない場合がある。しかし、冷蔵母乳の預かりが可能になれば、母親や、子ど

Storage Temperature and Bacterial Count of Human Milk
Akiko TATE, Ryoichi SAITO, Junko MISUMI, Noriko OKUBO

1) 東京医科歯科大学保健衛生学研究科リプロダクティブヘルス看護学博士前期課程 (助産師)

2) 東京医科歯科大学保健衛生学研究科生体防御検査学 (研究職 / 臨床検査技師)

3) 東京医科歯科大学保健衛生学研究科リプロダクティブヘルス看護学 (研究職 / 助産師)

別刷請求先：楯亜希子 首都大学東京荒川キャンパス 〒116-8551 東京都荒川区東尾久7-2-10

Tel/Fax : 03-3819-7168

[26102]

受付 14.12. 4

採用 15. 8.28

もを預かる側にも母乳の保存方法の選択肢が広がり、母乳栄養の継続につながる可能性がある。国際的な母乳バンクの基準では、8日目まで、冷蔵母乳（4℃保存）を子どもに与えることを可能としている⁷⁾。さらにまた、母乳育児医学アカデミー（ABM；Academy of Breastfeeding Medicine）という国際的な医師の団体が示している搾乳の保存プロトコルでは、4℃での保存期間は72時間までを推奨し、さらに清潔な環境では5～8日間保管できるとしている⁸⁾。

日本の保育所では、母乳は食品として栄養士の管理のもとに取り扱われ、食品衛生法の基準に準じ管理されている。その乳製品の安全基準では、1mlあたりの総細菌数5万個（以下、Colony Forming Unit、コロニー形成単位、CFUとする）以下、大腸菌では0 CFUと規定されている⁹⁾。冷蔵保存（4℃保存）の母乳でもこの基準を満たすことがわかれば、上記で挙げた保育所側の不安が解消され、より母乳の受け入れがしやすくなると推察される。

そこで、本研究では、通常の搾乳において、母乳の保存温度による細菌数の変化を観察し、食品衛生法上の安全基準を満たすかどうかを明らかにすることを目的とした。また、皮膚に常在する黄色ブドウ球菌が搾乳時にどの程度混入するのか、それらの菌が経日的にどのような増減をするのかを明らかにし、さらに、搾乳の際に食品衛生法上の基準を上回る菌が混入していた場合も想定して、黄色ブドウ球菌および大腸菌を添加した場合の、搾母乳中の総細菌数、黄色ブドウ球菌数、大腸菌数の経日的変化について明らかにすることを目的とした。

II. 研究方法

1. 対象

母乳育児を行っている母親10名（年齢20～45歳）が、各々搾乳した母乳20ml×10検体を対象とした。

2. データ収集期間

2014年2月18日～6月2日。

3. 搾乳方法

母親は、事前に水道の流水と石けんで15秒以上手洗いし、ペーパータオルで拭いた後、滅菌容器内に、母親本人が乳頭清拭せず搾乳した母乳を用いた。プライバシーを守るため、搾乳はリプロダクティブヘルス看

護学研究室で行った。

4. 手順

搾母乳は速やかに生体防御検査学実験室に運び、実験開始した。

1) 搾母乳の条件の設定

上記で得た搾母乳20mlを、菌を何も添加せずに自然観察する搾母乳10ml（実験A）と、菌を添加して観察する搾母乳10ml（実験B）とに分けた。

2) 保存方法

【実験A】

それぞれの搾母乳10mlから滅菌容器に2mlずつ分け、それぞれ5つの検体を用意した。うち1つは核酸の解析に使用するため-80℃で保存し、今回の研究には用いなかった。計4つの容器に入った搾母乳を、①室温（22±4℃）、②4℃保存（冷蔵保存）、③-20℃で2日間冷凍したのち4℃（解凍後冷蔵保存）、④-20℃（冷凍保存）で8日間保存した（図1）。

【実験B】

通常の搾乳の中で汚染される可能性のある黄色ブドウ球菌（ATCC25923）と大腸菌（ATCC25922）を用いて、それぞれ食品衛生法上の乳製品の検出基準を超える10万CFU/mlずつ搾母乳に添加した。その後、実験Aと同様に、①室温（22±4℃）、②4℃保存（冷蔵保存）、③-20℃で2日間冷凍したのち4℃（解凍後冷蔵保存）、④-20℃（冷凍保存）で8日間保存した（図1）。

3) 培養ならびに測定方法

培地は総細菌数に対して標準プレート寒天培地（A.P.H.A）、黄色ブドウ球菌数に対してクロモアガー

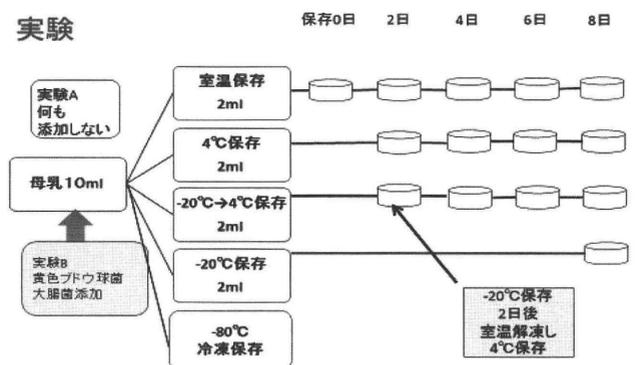


図1 【実験A】菌を入れない搾母乳、【実験B】菌を添加した搾母乳の保存方法と培養のための搾母乳抽出時期

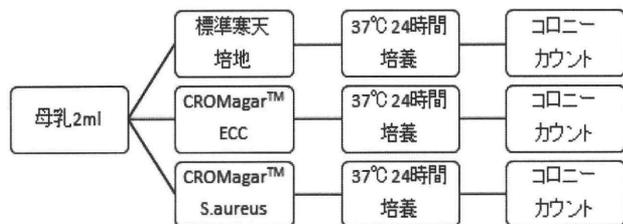


図2 培養方法

表 母乳を搾乳した母子の属性

子どもの月齢	サンプル数	離乳食回数
1～3 か月	3	0
4～6 か月	1	0
7～9 か月	2	2
10～12 か月	1	2
13～24 か月	3	3
合計	10	

スタッフアウレウス培地 (CHROMagar™ 社製) および大腸菌数に対してクロモアガー ECC 培地 (CHROMagar™ 社製) を用いた。培養のために、保存0日、2日、4日、6日、8日に、それぞれの容器から25μlの母乳をピペットですい上げ、無菌的に各種培地に滴下したのち、コーンラージ棒で塗布した。37°Cで24時間好氣的に培養したのち、コロニーカウントした (図2)。

5. 統計解析

保存0日の搾母乳と保存8日の搾母乳の比較には、Mann-Whitney U test を用いて、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。統計解析ソフトは、統計パッケージSPSS22.0を使用した。なお、平均と1標準偏差は (平均値) ± (1標準偏差) で記載した。

6. 対象者への倫理的配慮

本研究の参加者には、事前に本研究の目的と意義、方法について説明し、理解を得て、書面による同意を得た。搾母乳に関する個人情報は切り離して取り扱った。本研究は東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会の承認を受けて実施した (承認番号1726番)。

Ⅲ. 結 果

1. 搾乳を提供した母子の属性

搾乳を提供した母子の属性を表に示す。月齢7か月

以上の子どもは、離乳食や通常の食事を開始していた。

2. 実験室の環境

実験は、東京医科歯科大学保健衛生学研究科生体防御実験室で行った。室温 22 ± 4 °C、冷蔵庫内の温度は4 °C、冷凍庫内の温度は -20 °Cに維持し、冷蔵庫の開閉数は平均130回 /24時間であった。

3. 実験結果

1) 実験結果1：搾乳直後の母乳中 (保存0日) の細菌数

搾乳直後の母乳中の総細菌数は、0～8,360CFU/mlであり、 $3,384 \pm 2,750$ CFU/mlであった。菌種別に見ると、黄色ブドウ球菌数は、0～2,480CFU/mlであり、黄色ブドウ球菌が混入していた搾母乳は、10検体中4検体に確認された。黄色ブドウ球菌の菌数 308 ± 786 CFU/mlに対し、大腸菌は検出されなかった。

2) 実験結果2：実験A 各保存温度における総細菌数の経日的変化

総細菌数において、室温保存では、保存4日に約50倍まで菌数が増加し、冷蔵保存では総細菌数が減少傾向を示した (図3)。また、保存8日の総細菌数は、保存0日と比較して、冷蔵保存では有意に低下したのに対し ($p < 0.01$)、冷凍保存ではほぼ同様の菌数を示した (図4)。

3) 実験結果3：実験A 各保存温度における黄色ブドウ球菌数と大腸菌数の経日的変化

室温保存の搾母乳では、搾乳直後から何らかの菌が混入していた場合、保存0日と比較すると、保存8日

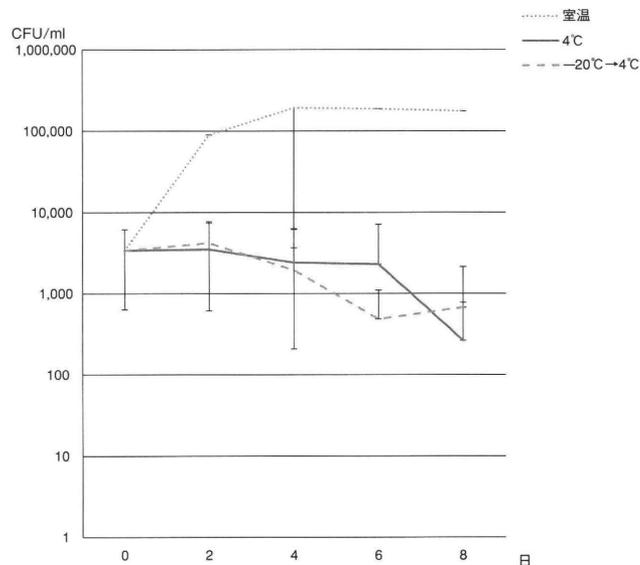


図3 総細菌数の経日的変化

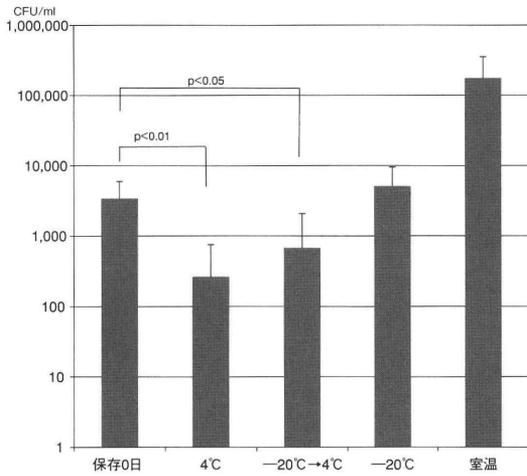


図4 保存温度ごとの8日目の総細菌数

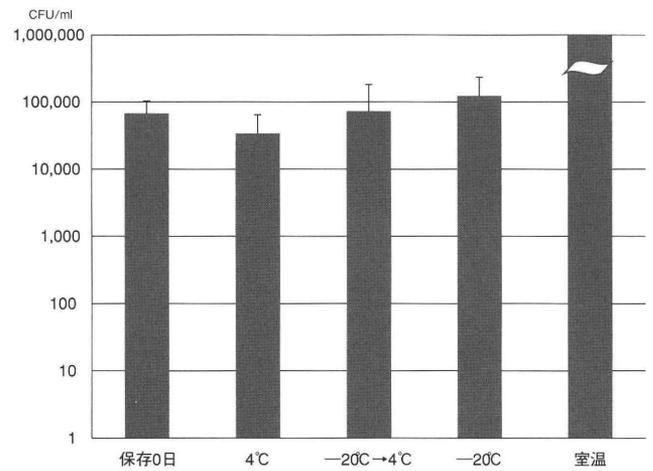


図6 菌添加群の保存温度ごとの8日目の黄色ブドウ球菌数

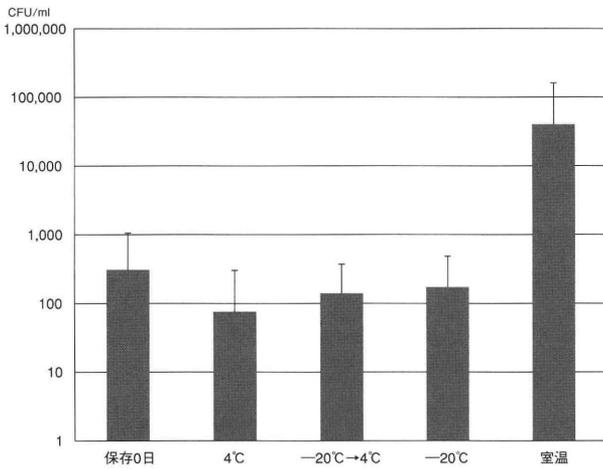


図5 保存温度ごとの8日目の黄色ブドウ球菌数

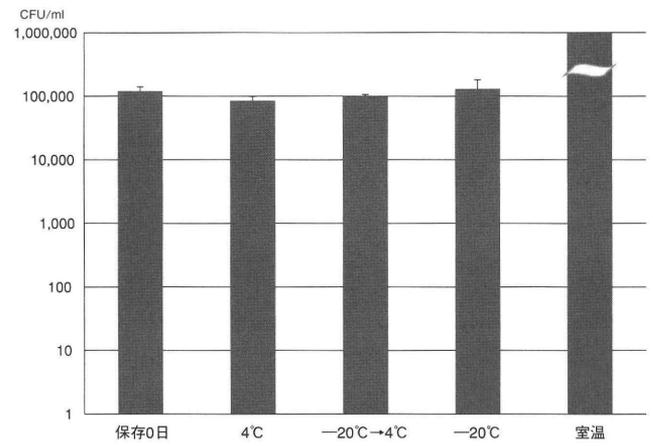


図7 菌添加群の保存温度ごとの8日目の大腸菌数

には菌数は100倍以上の増加を示した。一方、冷蔵保存の搾母乳では、保存0日と比較すると、保存8日には菌数は減少を示した(図5)。

なお、保存8日まですべての保存温度において、大腸菌群は検出されなかった。

4) 実験結果4：実験B 菌添加群の各保存温度における黄色ブドウ球菌数の経日的変化

菌を添加した搾母乳では、保存0日には黄色ブドウ球菌が $67,524 \pm 36,042$ CFU/mlであったものの、冷蔵保存の場合には、保存8日には $33,782 \pm 30,806$ CFU/mlと、減少した。また、解凍後冷蔵保存の場合は、 $72,610 \pm 108,242$ CFU/mlと、保存0日とほぼ同じであった。しかし、冷凍保存では、経日的にわずかに減少しているが、保存0日と比して、2倍の $123,051 \pm 110,435$ CFU/mlを示した(図6)。

5) 実験結果5：実験B 各保存温度における大腸菌数の経日的変化

菌を添加した搾母乳では、保存0日には大腸菌数が $32,148 \pm 20,219$ CFU/mlで、室温を除く、冷蔵、解凍後冷蔵、および冷凍保存の場合、保存8日の菌数はほぼ横ばいであった(図7)。

IV. 考 察

1. 搾乳直後の母乳について

1) 総細菌数

微生物汚染について考察する時、食品微生物検査において、微生物汚染の要因は微生物の「附着」、「混入」、「増殖」である。微生物汚染の一つの判断材料として「微生物指標菌」の検査があり、一般生菌、大腸菌群が品質評価、安全評価の対象となる¹⁰⁾。

実験結果1より、搾乳直後の母乳(保存0日)中の総細菌数は、0~8,360CFU/ml、 $3,384 \pm 2,750$ CFU/ml

であったことから、食品衛生法の基準による総細菌数5万CFU/ml以下という基準を満たしていた。つまり、子どもが健康で、母親が健康な場合、通常の石鹸と流水による手洗いの後搾乳することにより、母乳中の総細菌数は、食品衛生法の基準を満たしている。

2) 大腸菌群

搾乳直後の母乳中の大腸菌群は、いずれの試料においても陰性であった。これにより、上記の手洗い後の搾母乳は、食品衛生法上の基準を満たしている。

2. 保存温度ごとの搾母乳の経日的変化

1) 総細菌数

実験結果2より、室温保存では、保存4日には搾母乳中の総細菌数が約50倍に増加したのに対して、冷蔵保存では減少傾向を示した(図3)。これは、ラクトフェリンやリゾチームのような母乳中に特異的に存在する抗菌効果を示す因子に加え、貪食細胞などの細胞性免疫の働きによるものと考えられる。一方、冷蔵保存した搾母乳は保存8日の時点で保存0日の搾母乳と同程度の細菌数であった。実験に用いる細菌を生存させたままの長期保存には、 -80°C での凍結保存が推奨されている¹¹⁾。このことから、 -20°C であったとしても8日間であれば、凍結することでむしろ細菌が生きのまま保存されていたと考えられる。

2) 大腸菌群

実験結果3より、搾母乳中の大腸菌群は、搾乳直後だけでなく経日的観察においてもすべての保存温度で陰性を保持していた。このことから、最初に搾乳した時点で、細菌数が5万CFU/ml以下の場合には、食品衛生法上の基準を冷蔵母乳でも保存8日まで満たしている。さらに、実験Bの結果より、食品衛生法上の基準を上回る10万CFU/mlの細菌を添加した場合でも、冷蔵保存ではその後の細菌数の増殖はみられなかった。このことから、冷蔵母乳も食品として使用できる可能性があると考えられる。

3) 黄色ブドウ球菌

実験結果3より、自然に混入した黄色ブドウ球菌は -20°C で保存した場合、保存8日に保存0日と同様の黄色ブドウ球菌数を示した。これに対して、冷蔵保存の黄色ブドウ球菌数は経日的に有意に低下したことから(図5)、細菌の増殖を抑制するうえで、母乳の冷蔵保存は凍結保存より適切な保存条件であることを示唆している。

3. 解凍し冷蔵保存した母乳について

-20°C で2日間冷凍した後、冷蔵保存した母乳については、図3に示すように、解凍後冷蔵保存を開始すると細菌数は減少傾向にあった。また、実験Bの菌添加群でも、解凍後冷蔵保存した搾母乳では、その後細菌数が増加しなかった。このことから、現在推奨されている冷凍母乳の預かりのみならず、半解凍や半冷凍の状態の母乳でも、その後の冷蔵保存を保っていれば、細菌数は減少し、健康な母子の搾母乳であれば、食品衛生法上の基準を保存8日まで満たすと考えられる。

4. 母乳の保存温度と細菌数を経日的に見た安全性の検討

現在、多くの保育所では冷凍以外の母乳の受け入れは行われておらず、冷蔵や半解凍の搾母乳は破棄するか、母親に返却されることが多い。それは、厚生労働省の保育所保育指針が冷凍母乳の受け入れを明記しているためと考えられるが、冷凍母乳と限定していることについて、そのエビデンスには言及していない。本研究により、搾母乳は冷蔵保存より冷蔵保存した方がより細菌数が少なくなることが示された。搾乳後8日以内に使用する予定であれば、冷蔵保存より、冷蔵保存した方が搾母乳中の細菌の増殖が抑制されたため^{12,13)}と考えられる。さらに、今回のパイロットテストの段階で、人工乳を用いて同様のプロトコールで実験を行ったところ、冷蔵保存の人工乳は2日目の時点で細菌数がカウント不能なまでに増加し、それ以降の実験継続ができなかった。また、母乳は生きた免疫細胞の宝庫であると言われる^{8,12)}。このことから推察されることは、搾母乳を冷蔵保存することにより、母乳中の免疫細胞が活性化している可能性がある。

今後、冷蔵母乳が取り扱えるようになると、子どもにとって哺乳のニーズがすぐに満たされる。保育士や小児科看護師にとって、母乳を解凍する間、泣いている子どもをそのまま待たせるというストレスが減る。さらに、母親にとっては、朝一番に搾乳した母乳を冷凍の手間をかけずに冷蔵の状態で届けることができ、完全に凍結していないからとせっかく搾った母乳を捨てなくて済む。扱いが簡便になることで、母乳育児を継続する母親が増えることにより、子どもの疾病の罹患率が下がれば、社会全体の医療費の削減も見込まれる。また、働く女性にとっては、子どもの病気による欠勤を減らすことにつながる可能性がある。

本研究により、冷蔵母乳は食品衛生法上の基準を満たしており、細菌数という観点からすると、従来の冷凍母乳だけでなく冷蔵母乳も使用できることが示唆された。

V. 結 論

1. 冷蔵保存の母乳は食品衛生法による「乳及び、乳製品の成分規格等に関する省令」の基準である、総細菌数5万 CFU/ml以下、大腸菌群陰性の状態を保存8日まで満たしていた。
2. 冷蔵保存の母乳は冷凍保存の母乳より8日目の時点での総細菌数は減少傾向を示した。
3. 2日間冷凍保存したのち、冷蔵した母乳では、保存8日までの食品衛生法上の安全基準を満たしていた。
4. 大腸菌や黄色ブドウ球菌を基準以上の量で添加した母乳では、4℃や-20℃の保存をすることで菌が増殖することはなかった。
5. 保育所等での母乳の受け入れが「冷凍母乳」と規定されているが、「冷蔵母乳」の受け入れを検討する必要性が示唆された。

VI. 本研究の限界

今回の研究の限界は、サンプル数が10と少なかったことである。さらにデータを積み重ねて検証することが必要である。また、細菌数が減少している原因について抗微生物効果を示す物質や、免疫細胞の活動を測定したり観察したりしていないため、何が微生物に対して抗菌作用を示しているのか検討することが今後の課題である。さらに、保存0日の時点で、あらかじめ搾母乳中に含まれていた細菌の同定を行っていないため、その病原性の有無については言及できない。今回の研究では、たんぱく質の変性やPHの変化、浸透圧の変化、ウイルスなどの安全性については検討していない。したがって、今後さらなる研究の積み重ねが必要である。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご多忙の中、搾乳にご協力くださいました授乳中のお母さま方に、深く感謝いたします。

なお、本研究は平成25年度科学研究費挑戦的萌芽研究(課題番号26670974、研究代表者：三隅順子)課題名「冷

蔵保存した母乳と食品としての安全性について」を受けて実施したものである。

利益相反はない。

文 献

- 1) WHO. ヘルストピック母乳. <http://www.who.int/topics/breastfeeding/en/> アクセス 2014.4.25.
- 2) 厚生労働省. 平成22年度乳幼児栄養調査. <http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/73-22.html> アクセス 2014.4.25.
- 3) Eiderlman, Arthur I. Breastfeeding and the use of human milk: an analysis of the American Academy of Pediatrics 2012 Breastfeeding Policy Statement. *Breastfeeding Med* 2012; 5: 323-324.
- 4) 大山牧子, 古屋真弓. 保育所における搾母乳の取り扱い 神奈川県内市町村へのアンケート結果より. *小児保健研究* 2006; 65 (2): 348-356.
- 5) 保育所保育指針解説書. http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kodomo/kodomo_kosodate/hoiku/index.html アクセス 2014.4.25
- 6) 楯 亜希子. 保育園における母乳の受け入れ状況. *保育と保健* 2007; 13 (1): 80-82.
- 7) Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. Human Milk Banking Association of North America Incorporated, 2013: 27-28.
- 8) PROTOCOL, A. B. M. ABM clinical protocol # 8: Human milk storage information for home use for full-term infants (original protocol March 2004; revision # 1 March 2010). *Breastfeeding Medicine*, 2010: 127-129.
- 9) 食品衛生法第十九条第一項の規定に基づく乳及び乳製品並びにこれらを主要原料とする食品の表示の基準に関する内閣府令(平成二十三年八月三十一日内閣府令第四十六号). <http://law.e-gov.go.jp/htmldata/H23/H23F10001> アクセス 2014.4.25.
- 10) 日本食品微生物学会. 食品微生物 Q & A, Q1. 衛生指標細菌や汚染指標細菌を検査する意義はなんですか. http://www.jsfm.jp/services/faq/q_01.html アクセス 2014.4.25
- 11) 独立行政法人製品評価技術基盤機構. NBRC ニュース. http://www.nbrc.nite.go.jp/news/news_vol03.html#news3_2 アクセス2014.12.01

- 12) Lawrence RA. Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. *Acta Paediatr* 1999 ; 88 (430) : 14-18.
- 13) Pardou, Anne. Human milk banking : influence of storage processes and of bacterial contamination on some milk constituents. *Neonatology* 1994;65 (5) : 302-309.

[Summary]

Objective : To determine the safety of breast milk stored at different temperatures. To assess whether the standards stipulated in the Food Sanitation Act of Japan are satisfied, particularly with regard to the bacterial count.

Subjects and Methods : Breast milk used (20ml) was collected by pumping from 10 mothers who were breast-feeding infants. Changes in the number of bacteria in breast milk samples stored at different temperatures were monitored daily over 8 days. Further, samples containing added *Staphylococcus aureus* and *Escherichia*

coli were stored at different temperatures, and respective bacteria therein were counted daily over 8 days.

Results : The breast milk samples subjected to refrigerated storage for up to 8 days satisfied the total bacterial count of 5×10^4 CFU/ml and the negative test for coliform bacteria, standards stipulated in the "Ministerial Ordinance Concerning Compositional Standards etc. for Milk and Milk Products" based on the Food Sanitation Act. The total bacterial count after 8 days of storage was fewer in refrigerated breast milk compared to that in frozen milk.

Discussion : The results suggest that refrigerated breast milk can also be used safely for up to 8 days. Further studies should be conducted to allow day-care centers and other institutions involving healthy infants to handle refrigerated breast milk.

[Key words]

breast milk, refrigerated breast milk, frozen, bacterial count, storage period