

2008J7047A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 工藤 由起子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成21(2009)年3月

目次

総括研究報告書

- 清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
工藤 由起子

分担研究報告書

- 清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立
工藤 由起子

協力研究報告書

- 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情の調査・・・・・・・・・・・・ 11

協力研究報告書

- 真菌同定のための遺伝子指標に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 87

- 清涼飲料のカビ・酵母の腐敗と制御に関する研究・・・・・・・・・・・・ 121
後藤 慶一

- 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究・・・・・・・・・・・・ 167
大西 貴弘

総 括 研 究 報 告 書

清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究

工藤 由起子

総括研究報告書

研究代表者 工藤由起子（国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部）
研究分担者 後藤 慶一（三井農林株式会社 食品総合研究所）
大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部）

研究要旨

現代では多様な種類の清涼飲料水が製造販売されており、それらの原料や製品の製造・保管方法、加えて消費のされ方も多様である。このため、清涼飲料水に関する諸問題を整理し、安全な製品が消費者に提供・消費されるために研究を行った。

（1）清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

① 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情の調査

国内の清涼飲料水における微生物を原因とする苦情や事故に関する情報を地方自治体および製造業団体から収集した。清涼飲料水の開封前・後の両方で事例があるが開封後の方が多い、汚染微生物ではカビが多い、果汁飲料と茶系飲料で事例が多い、開封前事例では流通時での容器破損が、開封後では消費方法が原因となることが示された。流通も製造者責任の範囲にあることが再確認され、製造工程、流通、消費の各段階に対策が必要と考えられた。

② 真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

食品衛生学上重要なカビ・酵母の計 17 種を選定し、DNA 抽出法を検討したところ総合的に最も効率が良い方法はビーズ破砕併用で、CTAB 法、SDS 法、塩化ベンジル法を行うことであった（基準回収率：DNA 1 mg/菌体 1 g）。

（2）カビ・酵母の清涼飲料水の汚染と防御方法 および（3）細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法

殺菌・除菌方法である膜・紫外線・オゾン殺菌などについて既存の科学的データを収集した。透明な飲料での膜処理、水での紫外線やオゾンの事例が得られたが、紫外線やオゾンの飲料の殺菌を目的とした実用的なデータは少なく、（1）①のアンケート結果で高頻度に検出される微生物と飲料についての情報はほとんどなかった。そのため、原因腐敗微生物の各種飲料での動態調査が必要であり、接種実験の計画と試験系の考案を行った。

A. 研究目的

現代の生活にはペットボトルや紙容器などの多様な形態で、かつミネラルウォーター、炭酸飲料、果汁飲料な

ど多様な清涼飲料水が製造販売されており、それらの原料や製品の製造・保管方法、加えて消費のされ方も多様である。このため、清涼飲料水に関す

る諸問題を整理し、安全な製品が消費者に提供・消費されるための要点について検討し、情報を提示する事を目的とする。具体的には、清涼飲料水の諸微生物汚染や消費者からの苦情があると考えられ、これを解析することによって問題点を明確にする必要がある。また、清涼飲料水の汚染微生物の迅速な同定によって危害の重篤性が判断でき適切な危害対応を可能にするために必要である。微生物の清涼飲料水中での増殖性や毒素産生性など挙動のデータも明らかにする必要がある。さらに、食品衛生法では清涼飲料水の規格基準があるが、近年の製造技術の向上や風味へのこだわりから、製品の種類によっては加熱に代わる技術が代替として用いられるようになってきたが、それらの技術においては殺菌効果の科学的なデータの蓄積が必ずしも十分ではない。このため、汚染微生物の多様な殺菌方法などの現代に適した製造基準の考察に貢献したい。加えて、消費者への購入後の製品の適切な取り扱いなどの情報を提供し、製造業者にも消費者へ情報提供を行うことの協力を得ることを期待する。

今年度は、[1]国内の清涼飲料水における微生物を原因とする苦情や事故のアンケート調査を全国地方衛生局、業界関連団体を対象に行い、[2]汚染微生物のひとつであるカビを同

定するための遺伝子抽出方法を検討し、[3]カビ・酵母および[4]細菌について、膜や紫外線などによる殺菌・除菌方法および飲料中のそれら微生物の動態データの検索収集、また、不足データの補足実験の試験系を考案することを、目的とした。

B. 研究方法

1. 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情の調査

1) 清涼飲料水の微生物を原因とする苦情の情報収集

全国地方自治体、製造関連団体である特定非営利活動法人 国際生命科学研究所日本支部 (ILSI Japan) および社団法人 全国清涼飲料工業会 (全清飲) にアンケート回答による情報提供の協力依頼を行った。

2) アンケート調査結果の集計

研究班内で集計を行、全国地方自治体、製造関連団体等の代表者と検討し現状で起こっている問題点について解析した。

2. 真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

1) 供試菌株

3種の酵母および14種のカビを用いた。菌糸体および胞子をポテトデキストロース液体培地 (PDB) に接種し、25℃で70時間振盪培養した。DNA抽出に使用するまで菌は-80℃で冷凍保存した。

2) DNA 抽出方法

抽出方法には、2種の市販キット (DNeasy Plant Tissue Kit および Gen とるくん; 酵母用)、SDS 法、CTAB 法、および塩化ベンジル法を選択し、さらに、これら5方法とビーズを用いた細胞破碎の併用の有無も検討し、合計 10 通りのプロトコルいずれかを用いた抽出での DNA 収量を比較した。

3) DNA の収量と精製度の計測

DNA 濃度測定、純度測定 (OD230、OD260 および OD280nm から算出)、PCR 法での DNA 純度評価を行った。

3. カビ・酵母の清涼飲料水の汚染と防御方法

1) 清涼飲料のカビ・酵母による腐敗情報の収集 (国内外)

「菌類 (Fungi)」、「真菌 (Fungi)」、「カビ (Molds, Mold, Moulds, Mould)」、「酵母 (Yeasts, Yeast)」、「腐敗 (Decomposition, Putrefaction)」、「変敗 (Deterioration, Spoilage)」、「異物 (Pellet)」などをキーワードとし、SciFinder および JDream2 を使用して検索した。また、関連書籍等からも情報収集した。

2) オゾン、膜 (濾過) および紫外線 (UV) による清涼飲料の殺菌情報の収集 (国内)

「殺菌 (Disinfection、

Sterilization

Pasteurization)」、「除菌 (Sterilization)」、「膜 (Filtration)」、「オゾン (Ozone)」、「紫外線 (Eradication)」などをキーワードとし、SciFinder および JDream2 を使用して検索した。また、関連書籍等からも情報収集した。

3) 細菌、カビ・酵母の遺伝子による同定法の検証

MicroSEQ 法および日本薬局方の方法を比較した。

4. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法

1) 清涼飲料水中の細菌の動態に関する データ収集

一般に公表されている文献を PubMed から検索を行ない清涼飲料水中の細菌の動態に関する文献 38 報を収集した。これらの文献から清涼飲料水中の細菌の動態に関するデータの抽出を行ない、飲料種別、細菌種別に分類を行なった。

2) 清涼飲料水の殺菌方法に関する データ収集

一般に公表されている文献を PubMed から検索を行ない、清涼飲料水中の殺菌方法に関する文献 22 報を収集した。これらの文献からオゾン殺菌、紫外線殺菌、膜による除菌など清涼飲料水における加熱殺菌以外の殺菌方法

に関するデータの抽出を行なった。さらに、これらのデータを殺菌方法別、細菌種別に分類した。

C. 研究結果

1. 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情の調査

103 の地方自治体および 15 の製造者から回答を得た。清涼飲料水の開封前と開封後の両方で微生物汚染が認められるが開封後の事例の方が多い傾向であること、汚染微生物の種類としてはカビが比較的多いこと、果汁飲料と茶系飲料での汚染事例が多いこと、開封前の事例では流通時での容器の破損による微生物汚染が製造時の事故よりも原因として多いこと、開封後では消費者の消費方法が原因となることが示された。

2. 真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

今回用いた全ての菌種において、液体培養から得られた酵母細胞や胞子のみならず、ほぼ菌糸体のみから構成される検体からでも DNA 抽出は可能であることが示された。本研究に使用したほぼ全ての真菌種において、SDS/CTAB/塩化ベンジル法のいずれかを用いれば、市販キットを用いるよりも、ビーズ破碎の有無にかかわらず高い抽出効率が得られる傾向が見られた。さらに、SDS 法とビーズ破碎の併用法

を使用した場合に効率よく DNA が得られた種が全 17 種の 64.7% を占め、最も多くの種で効率良い DNA 抽出が可能であることが示された。

また、SDS 法、CTAB 法、塩化ベンジル法、および DNeasy Plant Tissue Kit を用いた場合、高分子 DNA の占める割合が多かった。

3. カビ・酵母の清涼飲料水の汚染と防御方法

1) 清涼飲料のカビ・酵母による腐敗情報の収集 (国内外)

果汁飲料、茶系飲料、炭酸飲料およびミネラルウォーターに起因したカビ・酵母に関する情報を得ることができた。属の数としては 42 種類で、*Penicillium*、*Cladosporium*、*Byssoschlamys*、*Aspergillus*、*Acremonium*、*Talaromyces*、*Candida*、*Neosartorya* の順で報告例が多かった。

2) オゾン、膜 (濾過) および紫外線 (UV) による清涼飲料の殺菌情報の収集 (国内)

加熱殺菌に代わる殺菌法 (膜、紫外線およびオゾン) について国内情報を収集したところ、多くの情報を得ることはできなかった。これは、主な清涼飲料の物性上、加熱以外の殺菌法を適応することが困難であり、それ故、実用データが少ないためであると確認

された。膜や紫外線についてはミネラルウォーターでの使用が一部見受けられるが、それらについても最終的な殺菌は加熱に依存している場合が過半数を占めた。

3) 細菌、カビ・酵母の遺伝子による同定法の検証

平成 21 年度に実施予定の口のみの試験・開封試験で得た微生物株の同定法の選定を行った。その結果、遺伝子解析による MicroSEQ 法が簡便性、正確性の面で適当であることが示された。より精度を向上させるため、カビの DNA 相同性試験に基づく形態による分類と遺伝子解析による分類との整合性を評価する必要があると考えられた。

4. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法

1) 清涼飲料水中の細菌の動態に関する データ収集

得られたデータを飲料種別に分類すると、ほとんどが果実飲料、茶系飲料、ミネラルウォーターに分類された。炭酸飲料やコーヒー飲料、スポーツ飲料などに関するデータは今回調査した限りでは非常に少なかった。

2) 清涼飲料水の殺菌方法に関する データ収集

オゾン殺菌、紫外線殺菌、膜による除菌方法は水道水や排水、医薬品分野に対してはすでに

広く利用されており、公表されている文献の数も多く見られた。しかし、清涼飲料水への応用に関する文献で公表されているものは非常に少なかった。そこで、今回は水道水、排水、医薬品に対するデータも含めて、これらの新しい殺菌法の有効性、安全性について考察したい。

D. 考察

1. 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情の調査

茶系飲料は清涼飲料水中で最も多い飲料種で全体の約 1/3 を占めるため、茶系飲料の苦情事例数の多くなっていると考えられた。また、茶系飲料は開封前より開封後で発生率が高くペットボトルに入った茶系飲料を少しづつ長時間にわたって飲み続ける習慣が広まっている結果を反映しているのではないかと考えられた。果汁飲料の年間生産量が茶系飲料の半分以下であるにもかかわらず、開封前、開封後ともに件数多く、果汁飲料による苦情は生産量に比して一般的に発生頻度が高いといえる。

清涼飲料水は常温で販売される製品が多く、賞味期限（開封前）が数ヶ月以上の場合も多い。消費者が開封後も常温で保管することもあり、短時間であれば苦情発生

には至らないが、1日以上では清涼飲料水の種類、開封時の状況や保管温度などの保管条件によっては苦情となる変化が起こる可能性がある。また、冷蔵での保管をしたとしても開封時の状況や保管時間などによって苦情となる可能性がある。

製造者にとって「開封前」は製造工場を出る前という意識が強く、流通上の苦情を考慮している製造者としていない製造者が混在していた。流通も製造者の責任の範囲にあることが消費者、製造者、自治体など関係者に再確認されることが望まれる。

2. 真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

幅広い種の真菌に対して、液体培養によって簡便に得られた細胞から効率良く DNA が抽出できる可能性が最も高いプロトコルは、SDS 法とビーズ破碎の併用法であることが示唆された。DNeasy Plant Tissue Kit は DNA 収量こそ低い、高分子の DNA を得ることができ、実験所要時間が少なく済む、危険な有機溶液を使わないなどの利点があり、量を必要とせず高分子の DNA が必要となる実験には有利な抽出方法であろう。

3. カビ・酵母の清涼飲料水の汚染と防御方法

1) 清涼飲料のカビ・酵母による

腐敗情報の収集（国内外）

栄養分を多く含み、加熱殺菌（一般的な微生物は死滅する条件）も風味を損なうことから強い条件で行えない果汁飲料で 32 属ものカビの報告があったことは合点がいくところである。他の飲料にも共通するが、耐熱性カビは報告数としては多いが、消費者からの苦情としては、*Aspergillus*、*Cladosporium* や *Penicillium* など、耐熱性のない菌種による事例が多いのが実態のようである。

2) オゾン、膜および紫外線による清涼飲料の殺菌情報の収集（国内）

国内の清涼飲料の殺菌はミネラルウォーターや一部の透明な飲料を除き熱によるものである。加熱以外にも膜、紫外線やオゾンといった殺菌法があるが、膜や UV 処理が有効な清涼飲料についても加熱殺菌と併用して用いられるケースが過半数で、実用性が少ないために（微生物の種類によっては十分な殺菌を行えず、事故の原因となりうる）、それぞれ単独での清涼飲料の殺菌に関する情報が少ないと考察された。

3) 細菌、カビ・酵母の遺伝子による同定法の検証

カビの同定精度を向上させるためには、DNA 類似度に基づく分類

体系の再調査が必要であると考えられた。また、MicroSEQ法において、市販のデータベースで被検菌が未登録の菌種であることにより同定できない事例が若干目立ち、単独で結果を出すことは正確性の面で支障があると考えられた。他のデータベースも必要に応じて補足データベースとして使用するのが誤同定を未然に防ぐと考えられた。

4. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法

1) 清涼飲料水中の細菌の動態に関する データ収集

日本国内の現状に合致するように対象を設定した接種試験を今後行う必要がある。しかし、飲料側の因子、細菌側の因子、環境の因子など条件の組み合わせによって細菌の動態は多様な変化を示す。今後、接種試験を行い清涼飲料水中の細菌の動態を調査する場合には、これらの設定を慎重に行う必要がある。どのような飲料を用いるのか、どのような菌種を用いるのか、調査、検討を行い、決定しなければならない。そのためには、すでに我々の研究班で行っている企業や自治体を対象にした清涼飲料水事故に関するアンケートの結果が役立つと考えられた。

2) 清涼飲料水の殺菌方法に関する

データ収集

オゾン殺菌、紫外線殺菌はその殺菌効率に影響を及ぼす要素が非常に多く複雑で、確実な殺菌を行うためには条件設定を慎重に行なう必要が認められた。また、これらの殺菌法は製品の品質に及ぼす影響も大きいことが明らかになった。そのため、殺菌効率と品質への影響の両方を考慮しながら殺菌条件を決める必要が認められた。膜による除菌に関するデータはほとんど公表されていなかった。

E. 結論

1. 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情の調査

製造から消費までを①製造工程、②流通、③消費、に分けて必要な対応を考えたところ、①製造工程では、中小製造者の支援が必要である、②流通では、運送業者名は出ない。製造者が運送・流通業者を啓発する必要がある、③消費では、行政だけでなく製造者からも消費者の啓発が必要である。消費者の教育を行うことで開封後の苦情をかなり減らすことが可能と思われる。

2. 真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

本年度行った検討によって、食品衛生学上重要な真菌種の細胞か

ら効率の良い DNA 抽出を行うためには、種を問わず、液体培養によって大量の細胞を簡便に得て、最初に試行する抽出法として SDS 法とビーズ破碎を併用したプロトコルを選択するべきであるということが明らかとなった。

3. カビ・酵母の清涼飲料水の汚染と防御方法

果汁飲料、茶系飲料、炭酸飲料およびミネラルウォーターについて起因したカビ・酵母に関する情報を多く得ることができた。また、加熱殺菌に変わる殺菌法（膜、紫外線およびオゾン）に関する国内情報を収集したところ、多くの情報を得ることはできなかった。さらに、微生物株の同定法では遺伝子解析による MicroSEQ 法が簡便性、正確性の面で適当であることが示された。

4. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法

清涼飲料水中における細菌の動態に関するデータでは特定の飲料種に偏った報告が多く、国内の現状と一致するものではなかった。今後、国内の状況にあったデータを得るために接種試験などを行なっていく必要が認められた。

オゾン殺菌、紫外線殺菌、膜による除菌などの殺菌方法は制限が多く清涼飲料水を含めた食品分野で

は応用が進んでいない。しかし、これらの殺菌方法には加熱殺菌にはない特徴をそれぞれ持っているため、単独で使用するのではなく加熱殺菌を補完する目的で使用するのが適当であると考えられた。また、膜による除菌に関するデータはほとんど公表されていないことがわかった。今後、補足試験を行いデータの拡充を行う必要性が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hara-Kudo, Y., Niizuma, J., Goto, I., Iizuka, S., Kamakura, K., Kaji, Y., Suzuki, S. and Takatori, K. Surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Beef with Effective Procedures, Independent of Serotype. *Foodborne Pathogens and Disease*. 5: 98-104, 2008.

Hara-Kudo, Y., Konishi, N. Otsuka, K., Hiramatsu, R. Tanaka, H., Tsuchiya, T., Konuma, H. and Takatori, K. Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method: A collaborative study. *Int. J. Food. Microbiol.* 122/1-2 pp

- 156-161, 2008.
- 占部友理恵, 葉袋裕二, 芳賀実, 小西良子, 石黒厚, 工藤由起子. 香料におけるサルモネラの生残性と調理食品中での増殖性. 食品衛生学雑誌. 49: 70-75, 2008.
- Asai, Y., Kaneko, M., Ohtsuka, K., Morita, Y., Kaneko, S., Noda, H., Furukawa, I., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. *Salmonella* prevalence in seafood imported into Japan. J. Food Prot. 71:1460-1464. 2008.
- Hayashidani, H., Iwata, T., Yamaguchi, F., Hara-Kudo, Y., Okatani, T. A., Watanabe M., Lee, K., Kumagai, S. Survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in vacuum-packed or non-vacuum-packed pork at low temperature. Biocontrol Science, 13:139-144, 2008.
- 大西貴弘, 室井正志, 棚元憲一: MD-2 非発現細胞における新しいLPS認識機構. エンドトキシン研究 12 (in press) .
2. 学会発表
- 工藤由起子. 飲料水と汚染物質. 平成20年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業シンポジウム. 平成21年2月10日東京、2月17日盛岡市.
- 後藤慶一, 分子生物学的手法, NPO法人 第6回カビ講話会 (迅速・簡易なカビ検査法)
- 後藤慶一, 遺伝子同定の基礎編, NPO法人 第7回カビ講話会
- 後藤慶一, 遺伝子同定の応用編, NPO法人 カビ相談センター 第9回カビ講話会
- 後藤慶一, 遺伝子解析手法による微生物同定システムの効果的運用, Applied Biosystems 第1回SEQ®セミナー
- 後藤慶一, 耐熱性好酸性菌統一検査法の現状, (社)日本果汁協会 平成20年実務担当者研修会
- K. Matsumoto, Y. Kato and K. Goto, Genetic Diversity of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and the Correlation with Their Spoilage Ability, IAFP2008 95th Annual Meeting.
- 大西貴弘, 室井正志, 棚元憲一: Dimerization of intracellular domain of TLR4 is not required for the activation of MyD88-independent signaling pathway. 10th Conference of the International Endotoxin and Innate Immunity Society. 平成20年7月31日

室井正志, 大西貴弘, 棚元憲一:
TRAF6 distinctively mediates
MyD88- and IRAK-1-induced acti-
vation of NF- κ B. 10th Conference
of the International Endotoxin
and Innate Immunity Society. 平
成 20 年 7 月 31 日

大西貴弘, 室井正志, 棚元憲一:
MyD88 非依存性経路活性化におけ
る TLR4 二量体形成の役割の解
析. 第 14 回日本エンドトキシン
研究会. 平成 20 年 10 月 25 日

大西貴弘 : 平成 20 年度日本エンド
トキシン研究会奨励賞受賞講演
—マクロファージ細胞膜表面にお
けるエンドトキシン認識機構に関
する研究—. 第 14 回日本エンド
トキシン研究会. 平成 20 年 10 月 25
日

塩入利一, 室井正志, 大西貴弘, 棚
元 憲一 : エンドトキシンによる
血管内皮細胞のアポトーシ
ス誘導と可溶性 CD14, MD-2 の
効果. 第 14 回日本エンドトキシ
ン研究会. 平成 20 年 10 月 25 日

天野憲一, 横田伸一, 大西貴弘, 三
澤尚明 : 自然免疫におけるカンピ
ロバクターとヘリコバクター由
来 LPS の炎症性サイトカイン誘
導能. 第 1 回日本カンピロバク
ター研究会. 平成 20 年 12 月 2 日

大西貴弘, 室井正志, 棚元憲一 : LPS
刺激は TRIF を TLR4 から解離さ

せる. 第 82 回日本細菌学会総
会. 平成 20 年 3 月 13 日

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む)
特になし

分 担 研 究 報 告 書

清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための
微生物同定方法の確立

工藤 由起子

分 担 研 究 報 告 書

清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための
微生物同定方法の確立

協力研究報告書

清涼飲料水における微生物を原因とする苦情の調査

工藤 由起子

清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究

研究代表者 工藤 由起子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究報告書

清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

研究分担者 工藤由起子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究報告書

清涼飲料水における微生物を原因とする苦情の調査

研究要旨

現代では多様な種類の清涼飲料水が製造販売されており、それらの原料や製品の製造・保管方法、加えて消費のされ方も多様である。このため、地方自治体や製造業者の消費者窓口に苦情や問い合わせが寄せられており、微生物に関連するものも少なくない。本研究では、清涼飲料水についての消費者からの苦情等を整理し、安全な製品が消費者に提供・消費されるために調査を行った。国内の清涼飲料水における過去5年間の微生物を原因とする苦情や事故に関するアンケートを地方自治体および製造業団体に実施した。清涼飲料水の開封前と開封後の両方で微生物汚染が認められるが開封後の事例の方が多い傾向であること、汚染微生物の種類としてはカビが比較的多いこと、果汁飲料（野菜汁飲料も含む）と茶系飲料での汚染事例が多いこと、開封前の事例では流通時での容器の破損による微生物汚染が製造時の事故よりも原因として多いこと、開封後では消費者の消費方法が原因となることが示された。流通も製造者の責任の範囲にあることが関係者に再確認され、①製造工程、②流通、③消費、に分けて対策をすることが必要と考えられた。

研究協力者

後藤慶一（三井農林株式会社）

大西貴弘（国立医薬品食品衛生研究所）

尾上洋一（元 神奈川県衛生研究所）

矢野一好（東京都健康安全研究センター）

平井昭彦（東京都健康安全研究センター）

千葉隆司（東京都健康安全研究センター）

池本尚人（NPO 法人 ILSI Japan）

福田正彦（（社）全国清涼飲料工業会）

山下裕司（（社）全国清涼飲料工業会）

渡辺麻衣子（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

今日のわが国においては、清涼飲料水は現代の生活に必要とされており、生産・消費量も膨大な量にのぼってい

る。また、ペットボトルや紙など多様な容器形態に入ったミネラルウォーター、炭酸飲料、果汁飲料など多様な種類の清涼飲料水が製造販売されており、

それらの原料や製品の製造・保管方法、加えて消費のされ方は様々である。これまでに、これらの清涼飲料水に関しての多くの微生物汚染事例が地方自治体の保健所や清涼飲料水製造者に消費者からの苦情として寄せられている。このため、我々は清涼飲料水に関する微生物学的な問題点を整理し、安全な製品が製造され、消費者に提供され、そして消費されるための要点について検討し、消費者、食品衛生行政関係者および製造者等に情報を提示することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1. 清涼飲料水の微生物を原因とする苦情の情報収集

平成20年7月から8月に全国地方自治体、製造関連団体である特定非営利活動法人 国際生命科学研究機構日本支部 (ILSI Japan) および全国清涼飲料工業会 (全清飲) にアンケート回答による情報提供の協力依頼を行った。アンケート回答において消費者の個人情報記載されない形式とし、製造関連団体のアンケート回答では回答企業名が示されない回答用紙の返信方法を採用した。苦情の対象は過去5年分とし、アンケートの書式では苦情の発生の原因を考察するために、清涼飲料水の飲み口の開封がされる前の製品で苦情となる問題が発生したのか、開封された後に発生したのかを分けて回答を依頼した。全国地方自治体へのアンケートでは事例ごとに清涼飲料水の種類、容

器形態、異常の内容、微生物の種類など示した項目の中から選択して詳細に回答をすることとした (参考資料1)。ILSI Japan へのアンケートでは全国地方自治体へのアンケートを基本としたが、製造者での苦情事例数が膨大であることが事前に判明していたため、個々の事例についての詳細ではなく、苦情事例のパターンとして清涼飲料水の種類、容器形態、異常の内容、微生物の種類など示した項目の中から選択して詳細に回答することとした (参考資料2)。苦情に対応するに当たり必要な情報について、全国地方自治体および ILSI Japan のアンケートの共通項目として調査した。また、製造工程における殺菌・除菌方法について、加熱処理以外の方法について製造基準の設定に関する考えの調査も行った。全清飲へのアンケートでは、ILSI Japan のアンケートを基に簡易な書式に変更することが求められたため、全国地方自治体および ILSI Japan とはアンケートの書式が異なった (参考資料3)。製造者への苦情事例数が膨大であることが、ILSI Japan と同様に事前に判明していたため、個々の事例についての詳細ではなく、事例のパターンについて回答することとした。

2. アンケート調査結果の集計

研究代表者に返信されたアンケート調査シートは、研究代表者が保管を行い、研究班内で集計を行った。集計された結果については、全国地方自治体、製造関連団体等の代表者と検討し現状

で起こっている問題点について解析した。

C. 結果

1. 全国地方自治体からの苦情情報の解析

全国地方自治体については103の自治体（一部、同一自治体から複数の機関に分かれて回答しているため回答数としては109）（表1）から回答を得た。

1) 過去5年間の苦情発生状況（Q1）

2003年から2007年の回答結果を集計したところ、総計404件であった（表2）。年代として2007年が多かったが、文書保管期間切れの自治体も予想されるため2003年はデータが少ない可能性が考えられた。

2) 開封前の苦情発生（Q2）

苦情発生全体に対する開封前の苦情の割合を①100～10%と回答した自治体が28%、⑤開封前の苦情はほとんどなしと回答した自治体が44%であり、この二つの回答が多い結果であった（図1）。

3) 開封前の苦情について：苦情の傾向（Q3～Q5）

苦情の多い事例パターンとして1位に上げられる清涼飲料水の種類は、ミネラルウォーター（30%）であり、次いで茶系飲料（18%）、果汁飲料（17%）であった（図2）。1から3位を総合しても同様の傾向であった。また、1位に上げられる容器形態は、ペットボトル（55%）であり、次いで瓶（13%）、

缶（9%）であった（図3）。1から3位を総合しても同様の傾向であった。さらに、1位に上げられる苦情内容は、カビ・酵母であり（46%）、次いで異味（13%）、異物（13%）であった（図4）。1から3位を総合しても同様の傾向であったが、細菌、濁りや変色なども多かった。

4) 開封後の苦情について：苦情の傾向（Q7～Q9）

苦情の多い事例パターンとして1位に上げられる清涼飲料水の種類は、茶系飲料（40%）であり、次いで果汁飲料（27%）、ミネラルウォーター（13%）、スポーツドリンク系飲料（12%）であった（図5）。1から3位を総合しても同様の傾向であった。また、1位に上げられる容器形態は、ペットボトル（60%）であり、次いで紙（14%）、瓶（11%）、缶（10%）であった（図6）。1から3位を総合しても同様の傾向であった。さらに、1位に上げられる苦情内容は、カビ・酵母であり（47%）、次いで異物（23%）であった（図7）。1から3位を総合しても同様の傾向であったが、異味、異臭なども多かった。

5) 開封前および開封後の苦情の総計について：苦情の傾向（Q3～Q5、Q7～Q9）

苦情の多い事例パターンとして1位に上げられる清涼飲料水の種

類は、茶系飲料（33%）であり、次いで果汁飲料（22%）、ミネラルウォーター（19%）、スポーツドリンク系飲料（9%）であった（図8）。1から3位を総合しても同様の傾向であった。また、1位に上げられる容器形態は、ペットボトル（58%）であり、次いで瓶（12%）、紙（11%）、缶（9%）であった（図9）。1から3位を総合しても同様の傾向であった。さらに、1位に上げられる苦情内容は、カビ・酵母であり（47%）、次いで異物（19%）であった（図10）。1から3位を総合しても同様の傾向であったが、異味、異臭なども多かった。

6) 苦情事例個票(Q6、Q10)の集計データの解析

個々の事例を精査したところ、有効回答事例は111件が開封前の清涼飲料水で微生物汚染が発生または判明したものであり、145件が開封後に微生物汚染が発生または判明したものであった。合計256件であり、これらについて解析した。

清涼飲料水の種類（図11）：開封前では111件中に果汁飲料（28%）、茶系飲料（26%）が約30件でありミネラルウォーターが15件（14%）と続いた。開封後では145件中に茶系飲料が60件（41%）、果汁飲料が48件（33%）と増え全体に占める割合も増えた。総計では、果汁飲料、茶系飲料に次いでスポーツドリンク

系飲料、ミネラルウォーターが多かった。

容器形態の種類（図12）：開封前では111件中にペットボトルが57件と半数以上であり、次いで缶が18件（16%）、瓶が14件（13%）、紙が12件（11%）であった。開封後では145件中に茶系飲料が6割以上を占め、紙や瓶も多かった。総計では、ペットボトルが半数以上であり、次いで紙、瓶、缶が11～13%と同じくらいであった。

流通販売条件（図13）：開封前では111件中に常温が6割以上であり、次いで低温（8%）であった。開封後では145件中に常温が7割近く、次いで低温（10%）であった。総計でも同様の結果であった。

製造国（図14）：開封前も開封後もほとんどが国内産であった。約5%を占めた外国産では生産国はスペイン、中国、南アフリカ、ネパール王国、フィンランド、マレーシア、米国と多国であった。清涼飲料水の種類としては、果汁飲料が多い傾向であった。

異常の内容（図15）：開封前では111件中に微生物由来異物が半数以上であり、次いで異味（15%）、異臭（9%）、濁り（8%）であった。開封後では145件中に微生物由来異物が75%であり次いで異味、異臭、濁りであった。総計でも同様の結果であった。

微生物の種類（図16）：開封前、

開封後、総計のいずれでもカビが最も多く7-8割を占めた。細菌は開封前で26%であったが、開封後は13%であった。酵母は開封前、開封後、総計のいずれでも5-7%であった。

苦情発生原因(図17)：開封前では不明が半数以上と最も多かったが、包材の破損(24%)と製造ラインでの事故(14%)が次いで多く、これらは開封前の事例にのみ当てはまり開封後の事例では該当しない原因である。開封後では約9割を不明が占めた。ごく一部(5%)で開封後の取り扱いの不備があった。

清涼飲料水の種類と微生物の種類組み合わせ(図18)：開封前111件と開封後145件であるが、開封前に比べ開封後に非常に多くなるのは果汁飲料と茶系飲料のカビであった。ミネラルウォーターでは開封前のカビの苦情が11件と開封後の7件と比べて多く、細菌も開封前が4件であるが開封後の2件と比べて多い。

清涼飲料水の種類と発生原因の組み合わせ(図19)：開封前に比べ開封後に非常に多くなるのは果汁飲料と茶系飲料の原因が不明の苦情であった。開封後に増えるのがスポーツドリンク系飲料であった。

清涼飲料水の種類と容器形態の組み合わせ(図20)：茶系飲料でのペットボトルが際だって多かった。果汁飲料では紙と瓶によるものが多

い特徴があった。

7) 対応に必要な情報について(Q11)

微生物による腐敗情報：必要と思う人が8割で微生物の種類・性質、味・臭いなどが上げられた(表3)。

微生物自体の毒性情報：必要と思う人が8割で健康被害、事例集・写真集が上げられた。

産生毒素の健康影響情報：必要と思う人が7割で健康被害、微生物種と毒素の特徴、事例集・写真集が上げられた。

全体的に、事例集・写真集(カラー印刷)、微生物の情報、健康被害について(毒性)、苦情に至った原因の様な情報を必要とする自治体が多かった。

2. 製造関連団体からの苦情情報の解析

ILSI Japanから6社、全清飲から9社の計15社から回答が寄せられた。各製造者は回答に際して1団体を通じて1度のみ回答することとした。両団体のアンケート書式が異なるため回答が片方の団体からのみである設問も生じた。

1) 年間の苦情発生件数(ILSI Japan・全清飲：Q1)

開封前での年間苦情発生件数は、年間あたり11-100件の回答もあった。0または0-1件が多く15製造者中11製造者(約7割)が該当した(図21)。開封後に原因があった事例では、年間あたり100件以上が最も多く(5製造者、3割)、次いで11-100