

平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金(食の安心・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

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

真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

研究分担者 後藤 慶一(三井農林株式会社 食品総合研究所)

研究要旨

清涼飲料水の開封または口飲みによって起こる真菌および細菌の汚染について飲料種や菌種などの詳細を解析した。16 種類の清涼飲料(計 672 検体)を開封のみまたは口飲みし、室温保存下における外見の変化や汚染菌数の測定を行ったが(研究分担者: 大西貴弘の報告書参照)、同時に細菌と真菌を分離し計 714 株を得た。これらの株を形態的な特徴によってグルーピングを行い、計 421 株を遺伝子工学的手法、形態観察(真菌)および生理・生化学的試験(真菌)を併用して同定した。同定の結果から、口飲み試験では人の常在細菌である *Candida*、*Staphylococcus* および *Streptococcus* が多く検出され(約 4 割)、残りは多様な菌種であった。開封試験ではカビ(*Cladosporium* など)が多く検出された(約 8 割)。大腸菌群は茶系飲料で多く検出される傾向が見られ、乳入り飲料では比較的少ない傾向であった。酸性飲料(pH4 未満)では分離株の絶対数は多くないものの、*Staphylococcus* が多く分離された。細菌の分離株数は pH が高くなるにつれて増加し、真菌では pH5 付近で最も分離頻度が高かった。毒素産生性の *Bacillus cereus* と *Staphylococcus aureus* も分離されたことから食中毒の危険性についても示唆された。

研究協力者

大西貴弘、渡辺麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所)
杉山寛治、神田 隆 (静岡県環境衛生化学研究所)
金澤裕司 (静岡市環境保健研究所)
小澤一弘 (株式会社 中部衛生検査センター)
小沼博隆 (東海大学 海洋学部)
増田修一 (静岡県立大学 食品栄養科学部 食品生命科学科)
小林和子 (瀬戸谷幼稚園)
高鳥浩介 (NPO 法人 カビ相談センター)
岩田修二、徳田 一、池本尚人 (NPO 法人 ILSI Japan 食品微生物部会)

A. 研究目的

清涼飲料水は年間一人あたり 500ml のペットボトル換算で 300 本が消費されており、現在の我々の生活に欠くことができな

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、流通、保管、販売方法、ならびに消費のされ方も多岐にわたっている。清涼飲料水が深く浸透

する中、消費者から寄せられる苦情も後を絶たず、中でも微生物に起因する苦情は食品全体の約 25%に至っているのが実情である。そのような背景のもと、平成 20 年度に地方自治体ならびに製造業者から苦情や事故に関する情報の収集を行い、その多くは開封後の事例であることが明らかになった。しかしながら、このような苦情や事故が発生しないような取り扱い方法について消費者や製造業者に提言するには、苦情や事故に至るまでの微生物の挙動や種類についての科学的情報が依然として不十分である。そこで、平成 21 年度は、清涼飲料水の各カテゴリーの代表 16 種類を用いてボランティアの協力のもと、開封後の清涼飲料水中での微生物の増殖について調査を行った(詳細は研究分担者大西貴弘の分担報告書を参照)。さらに、微生物によって清涼飲料水が腐敗・変敗した場合、その原因となった微生物について分離・純化・グルーピング・同定を行い、どの様な製品にどの様な微生物が腐敗・変敗に関与するかの解析を行う。また、本研究では、微生物の同定は遺伝子工学的的手法によって行うが、真菌、特にカビについては既存の分類体系と遺伝子に基づく同定が必ずしも合致しないことがある。そこで、得られた真菌株(主にカビ)については、形態学的な観察に基づく同定と遺伝子工学的的手法に基づく同定との相関性もあわせて評価する(研究体制は図 1 参照)。

B. 研究方法

1. 清涼飲料水の種類と一般特性

使用する清涼飲料水の種類は、初年度

のアンケート結果ならびに文献検索情報により苦情や事例の多かったものを重点とし、また清涼飲料水の製造基準にも合致することに基づいて 16 種類を選別し(表 1)、ILSI Japan(特定非営利活動法人 国際生命科学研究機構日本支部)より提供を受けた。容器形態はペットボトルで約 300~500ml 容量のものとした。また、各製品の初発菌数は三井農林(株)で調査した(方法は後述)。各製品について、Brix(アタゴ社製糖度屈折計 RX-5000 α を使用)、pH(東亜電波工業社製ガラス電極 pH 計 HM-50Gを使用)、タンニン量(酒石酸鉄法にて日立社製分光光度計 U-2000を使用)、クエン酸酸度(京都電子工業社製電位差自動滴定装置 CHG-310を使用)および水分活性(アイネクス社製水分活性測定装置 AQUA LABを使用)を測定した。

2. 口飲みおよび開封試験詳細

2-1. 清涼飲料水の配付

16 種類の清涼飲料水を 1 セットとし、静岡県環境衛生科学研究所、静岡市環境保健研究所、静岡県立大学および(株)中部衛生検査センターに 10 セットを送付した(口飲みおよび開封試験用各 5 セット)。瀬戸谷幼稚園には口飲み試験用の 2 セットを送付した。

2-2. 口飲み試験

(1)口をつけて約半量を 9~17 時の間に複数回に分けて飲み(途中、冷蔵してもよい)、キャップを軽く閉めた(口飲み試験の検体を検体 A と表記)。可能な限り同じ人が同じ製品を飲用しないように配慮した。

・口飲みの状況については情報を収集し(例:飲用場所、冷蔵保管して飲料した、

持ち歩いて飲用した等)、記録した。

・何回ぐらいに分けて飲用したかも記録した(飲用ごとに、ボトルに「正」の字を付してもらう等の工夫を適宜行った)。

・年齢および性別も可能な場合、記録した。

・食事の内容等は収集しなかった。

(2) 飲用後は培養開始まで室温で保管した。

(3) 検体 A を 25℃ で 2 週間培養した(培養に際し、検体をビニール袋に入れ、テープやパラフィルムをキャップの切れ目にまき、二次汚染を防止した)。ただし、増殖が著しい場合(著しい濁り等)、適宜 6(±1) 日で培養を終了した。

(4) 結果の判定は目視により観察し、「3. 目視判定」に従って記録した。

(5) 以下の要領で菌数測定を行った(菌数測定の詳細は「2-5. 菌数測定、分離・純化」を参照のこと)。

① 生育が確認されていない場合の菌数測定: 1、3 および 14(±1) 日後

② 生育が確認された場合の菌数測定: 1、3、6(±1) および 14(±1) 日後

・菌数測定に際し、1 および 3 日後の測定はできるだけ前後させないようにしたが、それ以外の測定日は 1 日前後ずらした(括弧内に表記)。

・培養 1 日後の目視観察および菌数測定は 15 時～19 時の間に開始した。3、6(±1) および 14(±1) 日後の目視観察および菌数測定は約 10 時～15 時の間に開始した。

・毎菌数測定時に、検体の状態を記録した。

③ カビの浮遊物が見られ、それ以外に変

化がない場合は菌数測定を行わず、「+」または「-」の記録をつけた。

2-3. 開封試験

(1) 適当な場所で開栓し、半分を廃棄後、キャップを軽く閉めた(開封試験の検体を検体 B と表記)。

・開栓した場所を記録した。

・開栓までは冷蔵を許可した。

(2) 開栓後は室温で保管した。

(3) 検体 B を 25℃ で 14(±1) 日間培養した(培養に際し、検体をビニール袋に入れ、テープやパラフィルムをキャップの切れ目にまき、二次汚染を防止した)。ただし、増殖が著しい場合(著しい濁り等)、適宜 7(±1) 日で培養を終了した。

(4) 結果の判定は目視により観察し、「3. 目視判定」に従って記録した。

(5) 以下の要領で菌数測定を行った(菌数測定の詳細は「2-5. 菌数測定、分離・純化」を参照のこと)。

① 生育の有無にかかわらず 7(±1) および 14(±1) 日後に菌数測定した。

・3、7(±1) および 14(±1) 日後に検体の状態を記録した。

・菌数測定に際し、上記測定日の 1 日前後はずらした(括弧内に表記)。

・増殖が著しい場合(著しい濁り)、適宜 7(±1) 日で培養を終了してもよい。

・菌数測定の作業は、上記測定日中に行った。

② カビの浮遊物が見られ、それ以外に変化がない場合は菌数測定を行わず、「+」または「-」の記録をつけた。

2-4. 目視判定

観察結果を下記の 0 から 7 の中から選択して記録した。状態が複数にまたがる場

合は該当する番号全てを記録した。

0→変化が無い場合

1→わずかな濁りが見られる場合

2→濁りが見られる場合

3→浮遊物の大きさが 10mm 未満(一番大きな浮遊物で判断)

4→浮遊物の大きさが 10mm 以上(一番大きな浮遊物で判断)

5→沈殿が見られる場合

6→内容物の分離

7→その他(状況を記録する、写真でも可)

・カビの生育の有無を観察し、認められた場合は記録した。

・増殖が確認された検体の写真撮影は研究分担者が行った。

2-5. 菌数測定、菌の分離・純化、菌株の保存要領

(1) 検体を均一にするため、ペットボトルを 5 回程度転倒混和した後、サンプリングした。この際、膨張が見られるものは、開封してガスを抜いた後、閉栓せずに均一になるよう攪拌した。

(2) カビの浮遊物が見られる場合、それを白金耳などで引っかけて分離・純化した。

(3) 希釈は検体 1 ml を 9 ml の PBS に加え、菌の生育が見られる場合は 10^{-3} 、 10^{-4} および 10^{-5} 希釈、菌の生育が見られない場合は 10^{-1} および 10^{-2} 希釈とし、各希釈溶液の 100 μ l を各培地に塗抹した。培地は各希釈列について各種類を 1 枚使用した。

(4) 培養は以下の条件とし、必要な場合はビニール袋に入れて培養するなど過剰な乾燥を防いだ。

・標準寒天培地(一般生菌検出): 35°C、好気培養、2 日間

・クロラムフェニコール加 PDA 培地(真菌

検出): 25°C、好気培養、7 日間

・XM-G 寒天培地(大腸菌群検出): 35°C、好気培養、20 \pm 2 時間

(5) 菌数測定は、各試験の日数に応じて行った。菌数を記録した。

(6) 菌の分離・純化は最も高い希釈倍率のプレートを用いて分離した。必要に応じて顕微鏡観察も併用した。コロニーの種類が複数の場合、目視にてコロニーのグルーピングを行い、分離株を得た(1~5 株を目安)。XM-G 寒天培地で生じたコロニーは標準寒天培地を使用して分離・純化した。その他は菌が生育した培地で行った。

(7) 分離純化した菌株について、標準寒天培地に生じた小さなコロニー(乳酸菌)由来菌株は GAM 半流動高層培地、その他のコロニーはカジトン培地に接種し、室温で保管した。1 ピリオドごとに三井農林(株)食品総合研究所へ送付した。

(8) XM-G 寒天培地において大腸菌と大腸菌群の双方が観察された場合、両者を併せた総数に続け、括弧として大腸菌数を付記した。

2-6. 培地

(1) 標準寒天培地(生培地、日水製): 一般生菌数測定用

(2) クロラムフェニコール加 PDA 培地(生培地、日水製薬): 真菌数測定用

(3) XM-G 寒天培地(生培地、日水製薬): 大腸菌群数測定用

(4) カジトン培地(高層培地、栄研化学): 菌株保存用

(5) 糖分解性状 GAM 半流動培地(粉末培地、100 g、日水製薬)*: 菌株保存用

*各機関で小試験管等に 5~7 ml 分注したものを作成し密栓して使用した。

2-7. 検体の採番

検体の識別のため、下記の要領で採番した(具体例は記入例参照)。

(1) 組織識別

各組織の識別のため、検体番号の最初に組織記号を付記した(各組織の組織記号は下記参照)。

- ・静岡県環境衛生科学研究所…A
- ・静岡市環境保健研究所…B
- ・(株)中部衛生検査センター…C
- ・静岡県立大学…D
- ・瀬戸谷幼稚園…E

(2) 製品識別

各製品を識別するため、組織文字の次に製品記号を付記した(各製品の製品記号は下記参照)。

- ・緑茶飲料…a
- ・烏龍茶飲料…b
- ・混合茶飲料…c
- ・紅茶飲料…d
- ・果汁飲料(20%オレンジ)…e
- ・果汁飲料(20%アップル)…f
- ・野菜飲料…g
- ・炭酸飲料(コーラ)…h
- ・炭酸飲料(サイダー)…i
- ・炭酸飲料(果汁入り)…j
- ・スポーツドリンク(果汁入り)…k
- ・スポーツドリンク(無果汁)…l
- ・ミルク入りコーヒー飲料…m
- ・ミルク入り紅茶飲料…n
- ・ニアウォーター…o
- ・ミネラルウォーター…p

(3) 時期識別

実施時期を識別するため、製品文字の次に月番号を付記した。月番号は二桁で記入した(08、09、10、11 および 12)。

(4) 試験識別

試験の識別を行うため、月番号の次に試験識別記号を付記した(試験識別番号は下記参照)。

- ・口飲み試験…ク
- ・開封試験…カ

(5) 培地識別

検出された培地の識別をするため、試験識別記号の次に培地記号を付記した(各培地の培地記号は下記参照)。

- ・標準寒天培地…H
- ・PDA 培地…P
- ・XM-G 寒天培地…X

(6) 分離微生物番号

各条件で分離された微生物には、上記(1)～(4)に続けて通し番号を整数で付記した。

3. 同定

3-1. 遺伝子光学的手法による同定

細菌は 16S rDNA の Top500、真菌は 26/28S rDNA の D2 領域に基づいて行った。以下、詳細を示す。

(1) 菌株および培養

各組織より送付されてきた菌株を元の条件で復元した。目視、必要に応じて顕微鏡観察によりコロニーの純度を確認し、コンタミが確認された場合は同じ培地を使用して分離・純化を行った。好気条件で生育が思わしくない場合、微好気培養を併用して分離・純化を行った。

(2) DNA 調製

PrepMan™ Ultra Reagent (Applied Biosystems 社)を使用して調製した。濃度・純度の測定は NanoDrop® ND-1000 分光光度計 (NanoDrop 社製)を使用して行った。

(3) PCR 反応およびシーケンス反応

PCR 反応は Applied Biosystems 社が提供する MicroSeq 500 16S rDNA Bacteria Identification PCR Kit (細菌用) および MicroSeq D2 LSU rDNA Fungal Identification PCR Kit (真菌用) を用いて行った。シーケンス反応は Applied Biosystems 社が提供する MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification Sequencing Kit (細菌用) および MicroSeq D2 LSU rDNA Fungal Identification Sequencing Kit (真菌用) を用いて行った。

(4) PCR 産物の精製

QuickStep™2 PCR Purification Kit (Edge BioSystems 社製) を用いて PCR 産物の精製を行った。

(5) シーケンス反応産物の精製

illustra™ AutoSeq™ G-50 Dye Terminator Removal Kit (GE Healthcare Bio Science 社製) を用いてシーケンス反応産物の精製を行った。

(6) 電気泳動

PCR 反応産物の確認は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 社製) を用いて行った。シーケンス反応産物の泳動は ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) を用いて行った。

(7) 波形データの解析および塩基配列の決定

波形データは、Sequencing Analysis v5.1.1 (Windows 版、Applied Biosystems 社製)、Sequencing Analysis v3.4.1 (Mac 版、Applied Biosystems 社製)、Factura v2.2.2 (Mac 版、Applied Biosystems 社製) および GeneWorks 2.5 (IntelliGenetics

社製) を用いて塩基の読み取りが不良な箇所を目視で確認および修正し、コンセンサス配列を得た。

(8) 相同性解析

決定した塩基配列を国際 DNA データバンクの一つである DNA Data Bank of Japan (DDBJ) または National Center for Biotechnology Information (NCBI) の検索・解析ツール「BLAST」に供し、相同性検索を行った。別途、MicroSeq® ID v2.0 (Applied Biosystems 社製) および自社データベースの「BLAST」を利用して相同性解析を行った。

3-2. 酵母様真菌の同定

酵母様菌株 (A2-03、B2-09 株) について、以下の指標を用いて同定を行った¹⁾²⁾。

(1) 形態観察 (巨大集落の性状およびプレパラート標本の顕微鏡像)

①ポテトデキストロース寒天培地 (PDA、栄研化学社製) に接種し、25°C で 3~7 日間培養した。

②PDA 上に形成された巨大集落の性状を観察した。

③PDA 上に形成された巨大集落から釣菌してプレパラート標本作製し、顕微鏡観察した。封入液としてラクトフェノール液またはラクトフェノール・コットンブルー液を用いた。

(2) 生化学的性状試験

市販同定キット (ID32C アピ、シスメックス・ビオメリユー社製) を用いた。ID32C アピ添付の検査マニュアルに従い試験を行った。

3-3. 形態観察による同定

A2-03、B2-09 以外の全ての糸状菌株

について、以下の手順による形態観察を行い、同定した²⁻⁴⁾。

(1) PDA に菌体を接種して、25°Cで 14 日間培養した。

(2) PDA 上に形成された巨大集落の性状を観察した。

(3) PDA 上に形成された巨大集落から釣菌してプレパラート標本を作製し、顕微鏡観察した。封入液としてラクトフェノール液またはラクトフェノール・コットンブルー液を用いた。

(4) PDA 上で胞子が形成されなかった場合は、カーネーション葉寒天培地 (CLA^{*1}) に菌体を接種して、25°Cで 14 日間培養した。

(5) CLA 上に形成された集落から釣菌してプレパラート標本を作製し、検鏡した。封入液としてラクトフェノール液またはラクトフェノール・コットンブルー液を用いた。

3-4. *Aspergillus* および *Penicillium* の形態観察による同定

遺伝子解析で *Aspergillus* または *Penicillium* と同定された菌株について、以下の手順で同定した^{5, 6)}。

(1) 麦芽エキス寒天培地 (MEA、OXOID 社製)、ツアペック寒天培地 (Cz^{*2}) および ツアペック・酵母エキス寒天培地 (CYA^{*3}) に菌体を接種して、25°Cで 14 日間培養した。

(2) MEA、Cz および CYA 上に形成された巨大集落の性状を観察した。

(3) MEA 上に形成された巨大集落から釣菌してプレパラート標本を作製し、顕微鏡観察した。封入液としてラクトフェノール液を用いた。

*1CLA の組成: 寒天 15g、クロラムフェニコ

ール溶液 (50mg/ml) 2.0ml、精製水 1,000ml、ガス滅菌カーネーション葉 適量 (2%寒天平板培地を作製後、平板培地 1 枚につき滅菌カーネーション葉を 2~3 片のせて使用)

*2Cz の組成: Czapek-dox broth (Difco 社製) 35g、寒天 15g、クロラムフェニコール溶液 (50mg/ml) 2.0ml、精製水 1,000 ml

*3CYA の組成: Czapek-dox broth 35g、酵母エキス 10g、寒天 20g、クロラムフェニコール溶液 (50mg/ml) 2.0ml、精製水 1,000ml

4. *Bacillus cereus* の毒素確認試験

(1) 供試菌株

・陰性コントロール *Bacillus subtilis* IAM 12118^T

・下痢型毒素陽性コントロール *B. cereus* KNU-4 (三井農林保有株)

・嘔吐型毒素陽性コントロール *B. cereus* KNU-9 (三井農林保有株)

・*B. cereus* 分離株 A1-05

(2) 嘔吐型毒素生産性試験

供試菌株を Brain Heart Infusion 平板寒天培地 (日水製薬社製) を用いて純粋培養 (35°C、24 時間) し、生育したコロニーより PrepMan Ultra Reagent (Applied Biosystems 社製) を用いて DNA 抽出を行った。得られた DNA 抽出溶液の濃度を NanoDrop[®] ND-1000 分光光度計 (NanoDrop 社製) を用いて測定し、滅菌水で希釈して PCR 反应用 DNA Template (25ng/μl) とした。PCR 反応溶液は *B. cereus* (CRS gene) PCR Detection Kit (タカラバイオ社製) を用いて表 2 の組成で調製した。PCR 反応の Negative control として DNA Template を滅菌水としたもの、

Positive control として *B. cereus* (CRS gene) PCR Detection Kit 付属の CRS Positive Control Template および LE Positive Control Template を用いた。PCR 反応は TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (タカラバイオ社製) を用いて表 3 の反応サイクルで行った。PCR 反応産物は QuickStep™2 (Eddge Biosystems 社製) を用いて精製し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 社製) を用いて電気泳動を行い、増幅された PCR 反応産物の断片長に基づいてセレウリド合成酵素 (CRS) 遺伝子の有無を評価した。

(3) 下痢型毒素生産性試験

供試菌株を Brain Heart Infusion 平板寒天培地 (日水製薬社製) を用いて純粋培養 (35°C、24 時間) した。生育したコロニー 1 白金針 (10 µl ループ) 分を滅菌水 4mL に懸濁し、均質な菌液を調製した。菌液 100 µl を CGY (Casamino acids 20g、グルコース 4g、Yeast extract 6g、(NH₄)₂SO₄ 2g、K₂HPO₄ 14g、KH₂PO₄ 6g、クエン酸ナトリウム 1g、MgSO₄ 2g、精製水 1,000ml) +1% Glucose 液体培地 4ml に接種し、35°C で 4 時間振盪培養 (194 rpm) を行った。培養液および Duopath Cereus Enterotoxins (Merck 社製) を室温に戻した後、読み取り部位に培養液 150 µl を滴下した。しばらく置いた後、*B. cereus* エンテロトキシン NHE (非溶血性エンテロトキシン) および HBL (溶血素 BL) の産生を示すバンドの有無を読み取った。

5. *Staphylococcus aureus* の毒素確認試験

TSB 培地に被検菌株を接種し、37°C で 1 晩培養した。培養液を 3,000rpm で 20 分間遠心分離し、その上清を SET-RPLA キット (デンカ生研社製) を用いて調べた。以下にフローを示す。

(1) 培養上清

① 小試験管 4 本にそれぞれ 0.9ml の希釈液を滴下した。

② 検体 0.1ml を第 1 管目の小試験管に入れ、新しいピペットで内容を混和後、その 0.1ml を第 2 管目に加えた。

③ 同様の操作を繰り返し、1:10、1:100、1:1000 および 1:10000 の検体希釈液を作製した。

④ ドロッパーを用いて希釈液をマイクロプレートの最後穴の 5 穴に 25 µl ずつ滴加した。

⑤ 同一のドロッパーで 1:10000 の検体希釈液を吸い上げ、その下の 5 穴に 25 µl ずつ滴加した。

⑥ 同様の操作を 1:1000、1:100 および 1:10 の検体希釈液についても行い、5 系列の希釈系列をマイクロプレート上で作成した。

⑦ 感作ラテックス (抗 A~抗 D) および対照ラテックスをそれぞれの系列にドロッパーで 25 µl ずつ滴加した。

⑧ マイクロプレート用ミキサーで十分振盪した。

⑨ マイクロプレートを室温に 18~20 時間静置後、判定した。

(2) 対照エンテロトキシン

① マイクロプレート 4 系列にドロッパーを用いてすべての穴に希釈液 25 µl ずつを滴加した。

② 各対照エンテロトキシン (A~D) を 4 本

のダイリューターに吸いあげ、最後の穴を除いて2倍階段希釈した(最後の穴は各ラテックス試薬の陰性対照)。

③感作ラテックス(抗A～抗D)をそれぞれ対応する対照エンテロトキシンの系列にドロッパーで25μlずつ滴加した。

④以後の操作は通常の逆受身ラテックス凝集反応と同様に行った。

(3) 判定

結果の判定は、明るい平坦な場所に黒紙を敷き、その上にマイクロプレートを置いて、上方から各穴のラテックス凝集像を目視で観察した。

C. 結果

一連の試験の実施体制を図1に示す。口飲み試験および開封試験の詳細は大西分担研究者が取りまとめるため、本報告からは割愛する。以下、清涼飲料水の一般特性、分離・純化、同定、*B. cereus*の毒素確認試験、*S. aureus*の毒素確認試験の順に結果の詳細を示す。

1. 清涼飲料水の一般特性

試験に使用した16種類の清涼飲料水の一般特性を表4に示す。

2. 分離・純化

各組織からの分離株の受領から同定対象菌株を得るまでの流れを図2に示す。また、各月の分離株、同定株数および保存株数を表5(組織別)および表6(総括)に示す。

8月から12月にわたり、総計714株の分離株を得た。瀬戸谷幼稚園を除き、4組織の分離株数は145～172株(平均158株)と、組織ごとの合計菌株数としては顕著な変動はなかったが、静岡県環境衛生

科学研究所および静岡市環境保健研究所において8月の分離株数が他の月に比べて若干多かった(表5)。このため、月別の分離株数は8月が多くなったが(199株)、これを除けば各月とも大きな変動は見られなかった(90～139株:月平均108株、表6)。一方、2ヶ月分のデータしかないが、瀬戸谷幼稚園の分離株数は他に比べて若干多い傾向であった(5ヶ月換算で208株、表5および6)。気温の低下と分離株数に顕著な相関は認められなかった。

分離された菌株を復元し[復元できなかった菌株総数113株、全体の15.8%]、グルーピングした結果、714株が371株に絞られた(分離株数の58.8%)。グルーピング率(同定株数/分離株数)は、組織別、月別ともに顕著な変化は確認されなかった(組織別の合計菌株において50.3～73.3%、平均59.2%)。

3. 同定

3-1. 遺伝子工学的手法に基づく同定

423株の内、2株の藻類と思われる菌株を除外し、421株を遺伝子工学的手法に基づき同定した。飲料種別結果一覧を表7～22に示す。

細菌の同定において、種の絞込みが難しい菌株がいくつか見られた(種同一性の基準を相同値99.0%以上とした)。99.0%以上で複数の菌種が同じ相同値で候補として挙げられた場合、それらを全て列記した。99.0%に満たない場合、「sp.」として属名表記に留めた。一方、真菌(ここではカビおよび酵母の総称と定義する)の同定においても、細菌の場合と同様に絞込みが難しい菌株が見られた。特にカビに推定される菌株については属の推定も困難なケー

スが見受けられた。そのような場合、既存の真菌の分類体系を鑑み、その菌株を帰属させるのに最も適切と考えられる高次分類群の表記であらわした(科、目および綱)。

解析対象菌株の選定のため、同一の検体から同一の菌種が検出されている場合は、原則として採番の若いものを採用し、他は解析から除外した。その結果を表 23 に示す。全同定菌株数 421 株(細菌 251 株、カビ 80 株、酵母 90 株)の内、22 株(細菌 13 株、カビ 4 株、酵母 5 株)が重複しており、これらを差し引き、399 株(細菌 238 株、カビ 76 株、酵母 85 株)を解析対象とした。

解析対象菌株を微生物種および試験区分によって分類した結果を図 3 に示す。細菌が全体の 59.6% (238 株)、真菌が 40.4% (161 株)と、若干細菌が多い傾向にあった。細菌は口飲み試験由来の菌株が 94.9% (225 株)と大半を占めた。一方、真菌の内訳は、酵母が 52.3% (85 株)で、カビが 47.2% (76 株)であった。酵母では、口飲み試験由来の菌株が 90.6% (77 株)と大半を占めた。カビは口飲み試験 (35.5%、27 株)と開封試験 (64.5%、49 株)で、開封試験由来の菌株が過半数を占めた。真菌としては、口飲み試験由来株 (104 株)が開封試験由来株 (57 株)の約 2 倍程度であった。

開封試験および口飲み試験で検出された属・種数を表 24 および 25 に示す。開封試験では、微生物の種類を問わず、属と種の数と比較的近いのに対し(属 39:種 53)、口飲み試験では種数が属の数の 2 倍以上で(属 58:種 138)、特に細菌(2.7

倍)と酵母(2.38 倍)で差が大きかった。一方、カビでは種が属の 1.5 倍であった。

5 回以上検出された属の一覧を表 26 および 27 に示す。開封試験と口飲み試験では大きくその構成が異なった。開封試験ではカビのみであったが、口飲み試験では主として細菌で構成された。具体的には、開封試験検においては、*Cladosporium* (8 回、全開封試験検出菌に占める割合:11.4%)、*Trametes* (ホウロウタケ、7 回、全開封試験検出菌に占める割合:10%)、*Bjerkandera* (ヤケイロタケ、7 回、全開封試験検出菌に占める割合:10%)、*Penicillium* (5 回、全開封試験検出菌に占める割合:7%)の 4 属が大差なくランキングした。口飲み試験においては、14 属が 5 回以上検出され、*Streptococcus* と *Candida* が同回数で(59 回、全口飲み試験検出菌株に占める割合:17.9%)、次いで *Staphylococcus* (40 回、全口飲み試験検出菌株に占める割合:12.2%)が他に大差をつけてランキングした。大腸菌群 [*Acinetobacter* (11 回)、*Enterobacter* (12 回) および *Pantoea* (7 回)] としてみた場合、*Staphylococcus* と同じ検出回数であった。*Cladosporium* と *Penicillium* については開封試験と口飲み試験に共通して検出された(検出回数は大差なかった)。

5 回以上検出された種の一覧を表 28 および 29 に示す。開封試験では、*Bjerkandera adusta* (6 回) および *Cladosporium cladosporioides* 等 (5 回) の 2 種のみであった。一方、口飲み試験では 10 種が 5 回以上検出され、特に頻度が高かった上位 3 種は *Candida albicans* (32 回、全口飲み試験検出菌株に占める割合:

9.73%)、*Streptococcus salivarius*(26回、全口飲み試験検出菌株に占める割合：7.9%)、*S. aureus*(21回、全口飲み試験検出菌株に占める割合：6.4%)であった。10種中、*Candida*と*Streptococcus*が各々3種で、*Staphylococcus*が2種を占めた。

一方、115株(種)は一度しか検出されなかった菌種で、今回検出された総菌種数191種の過半数を占めた。

耐熱性を有する細菌は5株(*B. subtilis*など)、真菌は2株(*Eupenicillium*と*Taralomyces*)しか検出されなかった。また、耐浸透圧能を有する*Zygosaccharomyces*が1株検出された。

クロラムフェニコール加PDA寒天培地から分離された菌株の内、14株は細菌であることが分かった。菌種の内訳は以下に示す。

- ・*Acinetobacter* genomospecies 13
- ・*Cupriavidus pauculus*
- ・*Methylobacterium brachiatum*
- ・*Methylobacterium* sp.
- ・*Pseudomonas aeruginosa*
- ・*Pseudomonas* spp.
- ・*Rhizobium radiobacter*
- ・*Serratia marcescens*
- ・*Staphylococcus warneri*

真菌(酵母については2株のみ)については、国立医薬品食品衛生研究所にて三井農林(株)で決定した塩基配列をDNA Data Bank of Japan(DDBJ)のみを使用してクロスチェック検索を行った[三井農林(株)では3種類のデータベースを複合的に使用]。基本的に両者の結果に大きな違いはなかった(表30)。しかしながら、一部の菌株においては、近縁な種を選択し

ているものの、完全には一致する結果ではなかった。

3-2. 酵母様真菌の同定

酵母様菌株(A2-03およびB2-09株)について、形態観察と生化学的性状試験(ID32Cアピ)を用いて同定したところ、A2-03は*Rhodotorula* sp.と推定されたが、B2-09はキットのデータベースに一致するパターンがなく(詳細略)、同定できなかった(表31)。

3-3. 形態観察による同定

遺伝子解析でカビと同定された77株について、国立医薬品食品衛生研究所にて形態観察による同定を行った。その結果を表31に示す。形態観察の同定では、同定の指標となる孢子形成が観察されない、または参照標準がないなどの理由で同定できない菌株は、死滅した1株を除く76株の内、37株に及んだ(48.7%)。その他の菌株(39株：51.3%)は*Aspergillus*、*Cladosporium*、*Penicillium*などで、これらについてはいずれの手法でも顕著な不一致は見られなかった(種名が異なった場合でも、互いに近縁な関係であった)。しかしながら、遺伝子工学的手法では複数の種が同定候補として列挙される菌株において、形態観察により種が絞り込める場合があった(特に*Cladosporium*と*Penicillium*)。その反面、数例ではあるが、遺伝子工学的手法で種が絞り込めた菌株において、形態観察では種の絞込みができない場合もあった。

4. *B. cereus*の毒素確認試験

*B. cereus*または*B. thuringensis*と遺伝子工学的手法によって同定された分離株A1-05について、毒素生産性を確認した

ところ、A1-05 は嘔吐毒素非生産性・下痢型毒素 NHE 生産株であることがわかった(表 32)。

5. *S. aureus* の毒素確認試験

S. aureus と遺伝子工学的手法によって同定された 21 株について、毒素生産性を確認したところ、5 株が B 型のエンテロトキシンを、2 株が C 型のエンテロトキシンを生産することが分かった(表 33)。

D. 考察

1. 分離・純化

二箇所の試験所で 8 月の分離株が多かったが、グルーピングと同定の結果から、それらの分離株の多くは重複している菌株であることが分かった。その理由は、8 月は初回の試験で、余裕を見て菌株を分離したため、結果として分離株数が多くなったことによるものであった。表 5 および 6 からも分かる通り、9 月以降の分離株数と同定株数の差は縮まってきており、より精度の高い分離とグルーピングが行われるようになった。

一検体からの分離種数を表 34 に示す。開封試験で何らかの微生物の発育が見られた検体数は 70 本で(開封試験の全清涼飲料水に占める割合:21.8%)、その多くが単一の微生物によるものであった。一方、口飲み試験では 179 本(口飲み試験の全清涼飲料水に占める割合:50.9%)で何らかの微生物の発育が観察された。その約半数が一検体から複数の微生物種が検出された。一方、試験に使用した清涼飲料水の未開封品から、同じ試験条件で微生物が全く分離されなかったことから(詳細略)、いずれの微生物も製品由来では

ないと考えられた。

今回、113 株(全分離株数の 15.8%)の分離株を復元することができなかった。11 月より、分離後の菌株の保存温度ならびに保存培地を一部変更したが(カビは PDA 寒天培地、その他は冷蔵保存)、顕著な改善は見られなかった。月単位での検体の回収であったため、復元するまでに一ヶ月以上かかる場合もあり、これが分離株を死滅させた一因であると考えられた。しかしながら、たとえ死滅してしまっても、その菌株由来の検体(清涼飲料水)から同種と推察される菌株が正常に復元されている場合が多く、解析を行う上で大きな障害にはならないと考えた。

2. 同定

分離・純化・グルーピングされた菌株を遺伝子工学的に同定したところ、開封試験と口飲み試験で顕著な違いが見られた。以下、それぞれの試験ごとに取りまとめて考察する(一部の試験は関連試験と包含させた)。また、昨年度実施したアンケート調査の結果と今回の試験結果を見比べた場合、微生物の種類に著しい違いはなく、傾向的には類似していた。しかしながら、アンケートおよび文献検索の結果が多かった *Acremonium*、*Aspergillus*、*Byssochlamys* および *Neosartorya* は今回の試験では比較的少ない、あるいは未検出であった。カビの同定は容易ではないことから、単にカビや異物として処理されることもあり、アンケート結果との単純比較は難しいかもしれない。このような一部の差異に関して、開封や口飲み以外の原因(原料、製造工程、流通など)による微生物腐敗も関与している可能性があり、その

究明にはさらに条件を多くした検討が必要となろう。

2-1. 口飲み試験

口飲み試験では細菌と酵母が大多数を占めた(表 25、27 および 29)。高頻度に検出された *Streptococcus* は口腔常在菌で、*Candida* や *Staphylococcus* はヒト常在菌としてよく知られている。*Enterobacter* をはじめとする大腸菌群(今回、*E. coli* は検出されていない)、*Kocuria* や *Micrococcus* もヒトの常在菌である。ヒトからよく分離される微生物が口飲み試験で高頻度に検出されることから、主たる口飲みにおける微生物腐敗は、口あるいはその周辺に常在する微生物が清涼飲料水中に混入(飲料と共に逆流、あるいは接着部分から進入と推定)して発生すると考えられた。開封試験に比べて検出される菌種は纏まるものの(表 25)、一度しか検出されない菌種も少なくなく、常在菌に混じって偶然居合わせた微生物(いわゆる雑菌)が混入して微生物腐敗を起こす可能性も相応にあることが示唆された。その可能性は昨年度のアンケート結果からも支持される。

2-2. 開封試験

開封試験ではカビが分離株の過半数を占めた。これは、環境中に漂っているカビの孢子が開封時に混入する確率が細菌や酵母が混入する確率よりも高いことが示唆される。また、先にも述べたとおり、開封試験では多くは単一の微生物しか検出されず(表 34)、さらに、口飲み試験に比べて検出される微生物も非常に多様で(表 24、26 および 28)、すなわち、開封による微生物腐敗は、偶然その環境にいた雑多な微生物が混入することにより発生すると

考えられた。よく検出された微生物の内、*Cladosporium* と *Penicillium* は住環境中によく見られるカビであるが、*Bjerkandera* や *Trametes* についてはいずれも木材腐朽菌として知られている。また、それらの分離時期は 11 月と 12 月に集中している(全ての試験所で分離されている)。この理由について、夏から秋にかけて発生したこれらの菌株が徐々に孢子を成熟させ、冬の到来と共に環境中に孢子を飛散させ、それが風などを介して住環境に持ち込まれ、偶然清涼飲料に混入したためと推察された。しかしながら、偶然にしては高頻度にこれらの菌種が検出されているため、相当量の孢子がこの時期に飛散されているものと推察される。

2-3. 形態観察に基づく同定

遺伝子に基づく同定では正誤はともかくとして何らかの結果が得られるのに対し、形態観察を行った真菌株の約半数は特徴的な形質が観察されない、あるいは文献や適切な標本がないなどの理由で同定が困難であった。一方で、今回用いた遺伝子指標では菌種を絞り込めなかった菌株において、より正確に同定することが可能であった。特に *Aspergillus*、*Penicillium* および *Cladosporium* において有効であった。その理由として、それらの種の分類が他に比べて非常に整理されており、また情報も多く、比較的容易に特徴的な形質を観察することが可能であるためと考えられる。ただ、実際に観察を行ったり、種の絞り込みを行うためには相応の知識とトレーニングが必要で、万人が可能なわけではない。したがって、真菌の同定においても、比較的ルーティン的かつ一元的に試験が

可能な遺伝子解析で大まかな属や種の同定を行い、絞込みの必要がある菌種について、形態観察やその他の試験を行なうことが有効であると考えられた。

2-4. 同定結果と分離源との関係

分離された微生物数とその分離源の関係について表 35 に示す。また、pH と分離株数の関係を図 4 に示す。栄養源としての糖含量と分離株数の相関は見られなかった。しかしながら、pH と分離株数は明瞭な相関を示した。細菌については、pH の上昇に伴い、直線的に分離株数も上昇した。分離された細菌のほとんどが中性付近に至的生育域を有しており(乳酸菌は弱酸性域)、その傾向は妥当なものと考えられる。一方、真菌は、カビ、酵母の区分に関わらず、pH5 付近を頂点とした放物線状で分離株数は分布した。この傾向も生育 pH 域が弱酸性域であることから妥当な傾向であろう。さて、好酸性菌でないにもかかわらず、pH4 未満の清涼飲料水で以下に示す細菌が検出された。これらの細菌が旺盛に清涼飲料中で生育するか否かは接種試験等で再検証する必要がある。

- *Bacillus amyloliquefaciens*
- *B. subtilis*
- *Kocuria* sp.
- *Micrococcus luteus*
- *Neisseria flavescens*
- *Pseudomonas oryzihabitans*
- *Shingomonas* sp.
- *S. aureus*
- *Staphylococcus capitis*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Staphylococcus haemolyticus*

- *Staphylococcus hominis*
- *Staphylococcus warneri*
- *Streptococcus* sp.

pH2.39 の炭酸飲料(コーラ)から *S. hominis* および *Exobasidiomycetes* 綱に属する真菌が検出されたが、これらの微生物が低い pH の炭酸飲料(コーラ)中で増殖することは生理学的に困難であると考えられるため、混入はしたもの、増殖せずにそのまま留まっていたものが検出されたと推察された。今回、細菌の分離は中性・好気条件で行ったが、酸性の培地を使用したり、嫌気条件で分離を試みた場合、乳酸菌、好酸性や嫌気性菌などが分離される可能性も考えられる。

清涼飲料水のカテゴリーごとに 5 回以上検出された微生物を表 36 に示す。カテゴリーごとに、高頻度検出微生物種は特徴が見られた。果汁飲料、野菜飲料、炭酸飲料およびスポーツドリンクでは主に酵母(*Candida*)が、次いで *Staphylococcus* がランキングした。それ以外の飲料(野菜飲料とニアウォーターを除く)では *Streptococcus* と *Staphylococcus* が高頻度に検出された。特徴的なのは、茶系飲料では大腸菌群がランキングしているのに対し、他の清涼飲料水では低頻度となっていることである(乳入り飲料では比較的少ない)。栄養源あるいは混在微生物との何らかの関係があると推察されるが、その説明は今後の課題である。

3. 毒素生産性

B. cereus や *S. aureus* といった食中毒を引き起こす菌種が口飲みした検体から検出され、その毒素産生性を調べた。その結果、毒素産生性 *B. cereus* は混合茶飲

料1検体、毒素産生性 *S. aureus* は烏龍茶飲料、混合茶飲料、炭酸飲料(果汁入り)、ミルク入りコーヒー飲料、ミルク入り紅茶、ミネラルウォーターの計7検体を汚染していたことが明らかとなった(表37)。これらの細菌が増殖した清涼飲料水で毒素が生産されていたか否かについては接種試験などにより明らかにしていく必要がある。

B. cereus A1-05 株については非溶血性エンテロトキシンを生産することが明らかとなった。これは下痢原性毒素で、本毒素による食中毒発生には汚染菌量として一般に $10^7 \sim 10^8$ cfu/g 以上とされている。腐敗した清涼飲料水中でそのような菌数に到達するか、また毒素を生産するか否かは飲料の種類にもよるかも知れないが、明確なことは今後の試験により示していく必要がある。

一方、ブドウ球菌の生産する毒素としてはエンテロトキシンA型からE型がよく知られているが、近年、新たな毒素型の存在が報告されている⁷⁾。A型生産菌による食中毒が大多数を占めるが⁸⁾、今回分離された菌株においてはB型またはC型生産株であった(A~D型以外の毒素型については未調査)。ブドウ球菌食中毒に至るエンテロトキシン量は明らかではないものの、毒素生産株が混入し、著しい増殖が起こった清涼飲料水を飲用することは健康被害のリスクが高いと考えられる。わが国において清涼飲料水でのブドウ球菌食中毒は知られていないが、*S. aureus* は口飲み試験で高頻度に分離された菌種であることから、飲料業界や消費者に対して飲用方法を啓発していくことは食中毒予防のた

めにも重要なことである。

4. 清涼飲料種ごとの微生物検出率

研究分担者:大西貴弘の分担報告書に記載の細菌用または真菌用の培地でのコロニーの生育によって大まかに細菌および真菌の菌数を測定したが、本研究での同定結果を反映させて清涼飲料種ごとに集計した(表38)。口飲み試験では茶系全体の集計では、の口飲み試験の352検体中181検体(51.4%)から微生物が分離され、種類では69.0%が細菌、37.0%が酵母、14.4%がカビが分離され細菌の汚染が多かった。一方、開封試験の320検体中60検体(18.8%)から微生物が分離され、種類では15.0%が細菌、15.0%が酵母、76.7%がカビが分離されカビの汚染が多かった。この結果は、大西の報告を裏付けるものであった。また、昨年度の苦情の調査ではカビを原因とする苦情が多かったことから、口飲みよりも開封時の清涼飲料水中への環境からの汚染が実際の苦情に結びついていることが示唆された。

E. 結論

口飲み試験ではヒトに常在する *Candida*、*Staphylococcus* および *Streptococcus* が多く検出され(約4割)、残りは多様な菌種であった。この傾向は概ね過去の情報と合致する⁹⁻¹²⁾。開封試験では真菌(カビ: *Bjerkandera*、*Cladosporium*、*Penicillium* および *Trametes*) が多く検出された(約8割)。*Cladosporium* や *Penicillium* は過去の情報と一致するが、*Trametes* や *Bjerkandera* に関する知見は今回が初めてである。主要菌種以外の菌種についてはヒトの常在菌

でない菌種が多く、偶然混入したものと考
えられた。大腸菌群は茶系飲料で多く検
出される傾向が見られた(乳入り飲料では
比較的少ない)。その理由に関しては明
確にはならなかった。pH4 未満の酸性飲
料では分離株の絶対数は多くないものの、
*Staphylococcus*がよく分離された。pHが中
性に近づくとつれて細菌の分離株数は増
加したが、真菌では pH5 付近で最も分離
頻度は高かった。それぞれの微生物の生
育 pH 域を鑑みれば、この傾向は妥当な
結果であった。条件を変えた場合に分離
される微生物種については興味深く、今
後が期待される。また、*B. cereus* と *S.*
aurantis の毒素産生株が分離されたことか
ら、清涼飲料水中でのこれらの菌の増殖
によって食中毒の危険性も考える必要が
あることが示唆された。これらの菌は増殖
が著しい場合に毒素を産生して食中毒を
もたらすことから、今後、菌が増殖しやす
い清涼飲料水の種類などを明らかにし増
殖を防ぐ取扱方法などを検討することが必
要である。

一連の研究において、既知の情報を凌
駕する膨大な知見が得られた。その反面、
得られた新たな諸知見を論理的に考察す
るには更なる諸調査が必要であると考えら
れた。今後、腐敗微生物が混入した際のリ
スク(腐敗までの日数、保存条件、健康被
害など)について更なる追加調査を行い、
その事実に基づいた飲料業界や消費者
へ提言が期待される場所である。

F. 参考文献

1) Lodder, J. and Kreger-Van, Rij, N. J.
W. The yeasts, a taxonomic study. 1st

ed. North-Holland Publ. Co. Amster-
dam. 1967.

- 2) Samson, R. A. , et al. Introduction to
food-and airborne fungi. 7 th ed. Cen-
traalbureau voor Schimmelcultures,
Utrecht. 2004.
- 3) Barnett, H. L. and Hunter, B. B.
Illustrated Genera of Imperfect Fungi,
4th ed. APS press. Minnesota. 1998.
- 4) 高鳥浩介監. かび検査マニュアルカー
ー図譜. テクノシステム株式会社. 福岡.
2002.
- 5) Raper, K. B. and Thom, C. Manual
of the Penicillia. Williams and Wilkins
Co. Baltimore. 1949.
- 6) Klich, M. A. Identification of common
Aspergillus species. CBS. Utrecht.
2002.
- 7) 重茂克彦. 日細菌誌. 60: 357-363,
2005.
- 8) 五十嵐英夫. 日食微誌. 20: 51-62,
2003.
- 9) 国民生活センター編. 注意情報&テス
ト、飲み残しペットボトルの破裂にご注
意!. たしかな目. 215: 39-45, 2004.
- 10) 龍見宗樹ら. リシール容器飲料での
酵母の二次発酵に関する基礎調査. 果
汁協会報. 1月号. 2006.
- 11) 小林麻理子、川井英雄. PET ボトル入
り清涼飲料水の直接飲用でボトル内に
混入した口腔常在菌の消長. 日本清涼
飲料研究会第 18 回研究発表会. 2008.
- 12) 小田隆弘ら. 酵母増殖による飲み残
しペットボトルの膨張・破裂の危険性に
ついて. 食衛誌. 47: 237-241, 2006.

G. 研究発表

1. 論文発表

工藤由起子、後藤慶一、尾上洋一、渡辺麻衣子、李謙一、熊谷進、小西良子、大西貴弘. 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情事例の解析. 食品衛生学雑誌. 50: 315-320, 2009.

後藤慶一. 食品から分離された *Alicyclobacillus acidoterrestris* の種内遺伝的集団に関する研究. IFO Res. Commum. 23: 5-13, 2009.

Sakamoto, M., Takagaki, A., Matsumoto, K., Kato, Y., Goto, K. and Benno, Y. *Butyricimonas synergistica* gen. nov., sp. nov. and *Butyricimonas virosa* sp. nov., butyric acid-producing bacteria in the family 'Porphyromonadaceae' isolated from rat faeces, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 1748-1753, 2009.

Sahin, N., Portillo, M. C., Kato, Y. and Schumann, P. Description of *Oxalici-bacterium horti* sp. nov. and *Oxalici-bacterium faecigallinarum* sp. nov., new aerobic, yellow-pigmented, oxalotrophic bacteria, FEMS Microbiol. Lett. 296: 198-202, 2009.

藤田理英子、後藤慶一、池本尚人、古畑勝則. *Alicyclobacillus* 属細菌検出用培地の評価. 果汁協会報. 607: 1-7, 2009.

Furuhata, K., Kato, Y., Goto, K., Hara, M. and Fukuyama, M. Diversity of heterotrophic bacteria isolated from biofilm samples and cell surface hydrophobicity. J. Gen. Appl. Microbiol.

55: 69-74, 2009.

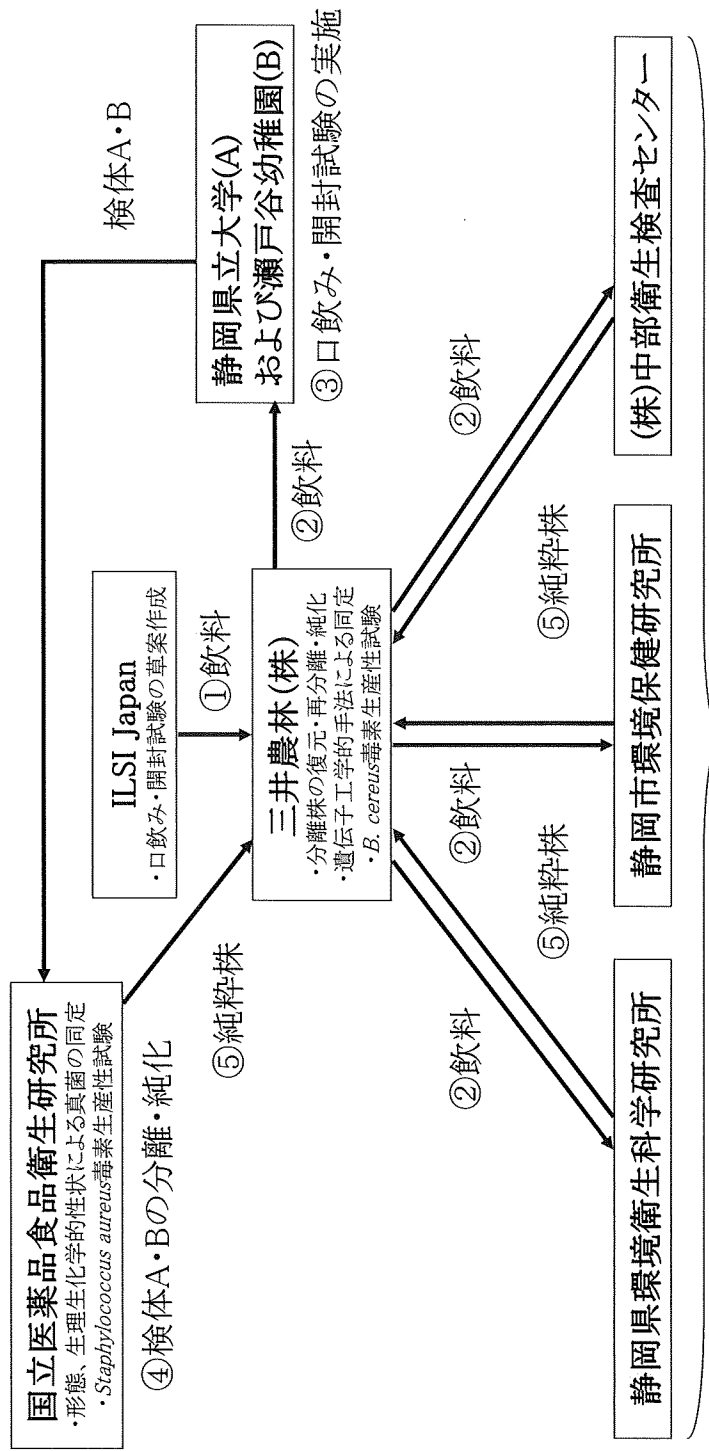
後藤慶一. DNA 塩基配列を用いたカビ・酵母の同定、モダンメディア. 55: 237-242, 2009.

2. 学会発表

後藤慶一、餅田薫、加藤裕子、藤田理英子、西堀綾子、松本幸平. 食品から分離された *Alicyclobacillus* 属細菌の種内遺伝的集団と性状に関する研究. 日本清涼飲料研究会第 19 回研究発表会. 2009.

H. 知的財産の所有権

なし



③口飲み・開封試験の実施 + ④分離・純化

図1. 試験の分担および流れ

(注) 流れの概要

- ① 各社提供の飲料を三井農林に送付、② 三井農林で仕分けし、協力研究者に送付
- ③ 口飲み・開封試験を実施 (検体は試験開始まで冷蔵)、④ 分離純化を実施、⑤ 純粋菌株を三井農林へ送付

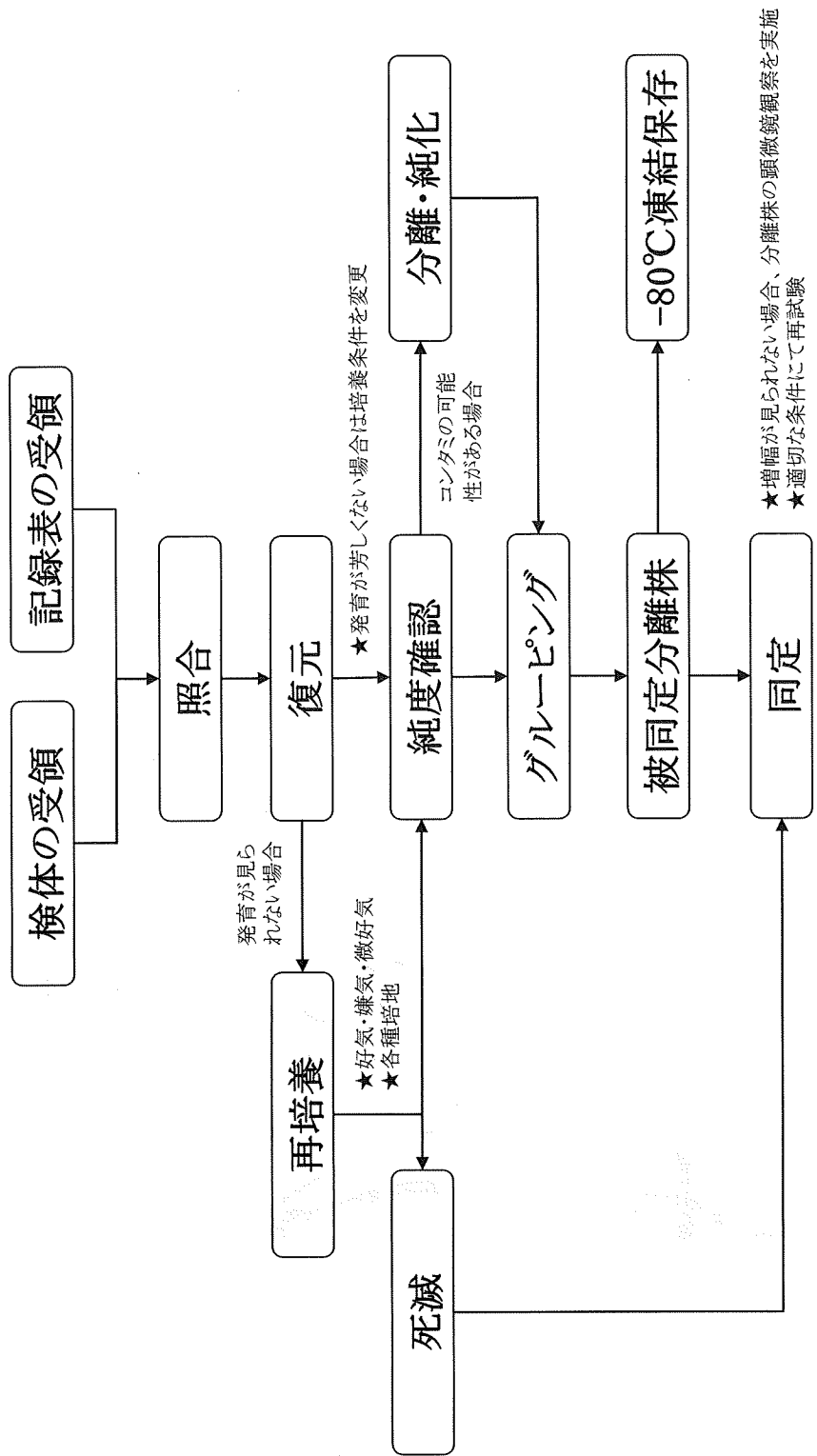


図 2. 検体受領から同定対象菌株を得るまでの流れ

細菌238株		真菌161株			
		カビ 76株		酵母 85株	
開封 13株	口飲 225株	開封 49株	口飲 27株	開封 8株	口飲 77株

図3. 同定結果内訳

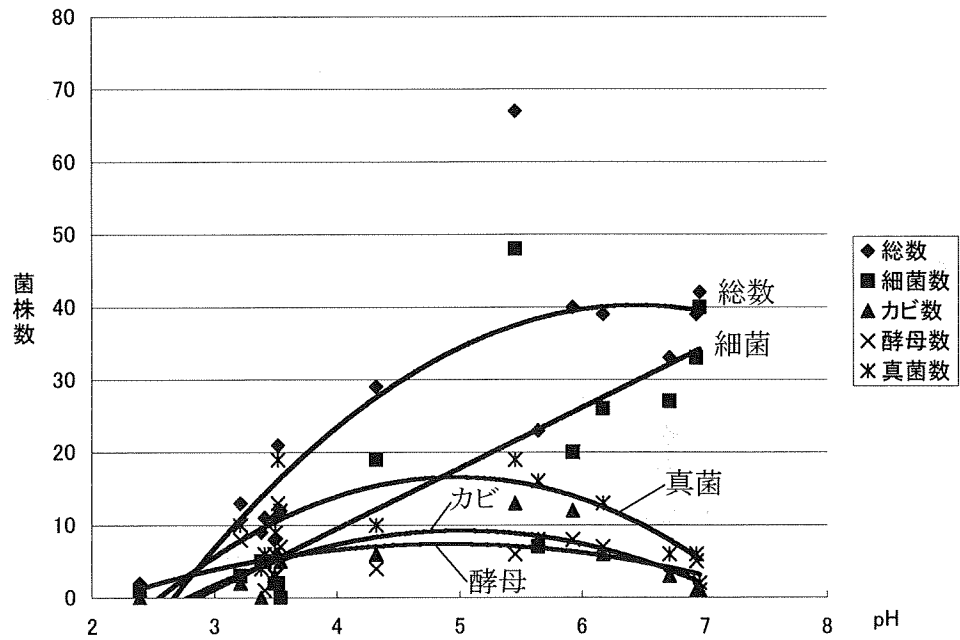


図4. pHと分離株数との関係