

表 31. 遺伝子工学的手法と形態観察による同定結果対比表(その 2)

菌株番号	遺伝子塩基配列による同定結果	形態観察による同定結果
A5-03	<i>Eupenicillium parvum</i> または <i>Penicillium striatisporum</i>	<i>Penicillium</i> sp. (Section: Monoverticillata)
A5-04	<i>Eupenicillium parvum</i> または <i>Penicillium striatisporum</i>	<i>Penicillium</i> sp. (Section: Monoverticillata)
A5-05	<i>Lentinellus castoreus</i>	孢子形成無し、同定不可
B1-01	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	分生子殻形成、 <i>Sphaeropsidales</i> (目)に属する菌
B1-02	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	分生子殻形成、 <i>Sphaeropsidales</i> (目)に属する菌
B1-03	<i>Penicillium chermesinum</i>	<i>Penicillium chermesinum</i>
B1-28	<i>Phomopsis</i> sp.(近縁種 <i>P. brevistylospora</i> など)	分生子殻形成、 <i>Sphaeropsidales</i> (目)に属する菌
B2-09	<i>Coniochaetaeaceae</i> (科)に属する菌	不明
B2-13	<i>Cladosporium multigeniculatum</i> など	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
B2-14	<i>Favolus arcularius</i>	孢子形成無し、同定不可
B2-15	<i>Cladosporium cladosporioides</i> など	死滅、同定不可
B2-16	<i>Cephalotheca foveolata</i>	不明
B3-07	<i>Paecilomyces puntonii</i>	<i>Paecilomyces</i> sp.
B4-02	<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Penicillium digitatum</i>
B5-01	<i>Bjerkandera adusta</i>	不明
B5-02	<i>Arthrinium phaeospermum</i>	<i>Arthrinium phaeospermum</i>
B5-03	<i>Aspergillus flavus</i> など (<i>A. flavus</i> , <i>A. kambarensis</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. suboliveceus</i> または <i>A. thomii</i>)	<i>Aspergillus oryzae</i>
C1-18	<i>Cyphellophora</i> sp. または <i>Phialophora</i> sp. (<i>C. eucalypti</i> , <i>P. europaea</i> , <i>P. reptans</i> など)	孢子形成無し、同定不可
C1-19	<i>Sordariomycetes</i> (綱)に属する菌	<i>Humicola</i> sp., <i>Botryotrichum</i> sp. または <i>Staphylotrichum</i> sp.
C2-16	<i>Exophiala xenobiotica</i>	<i>Exophiala</i> sp. または <i>Phialophora</i> 関連菌

表 31. 遺伝子工学的手法と形態観察による同定結果対比表 (その 3)

菌株番号	遺伝子塩基配列による同定結果	形態観察による同定結果
C3-01	<i>Cladosporium cladosporioides</i> など	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
C3-02	<i>Trametes hirsuta</i> または <i>T. versicolor</i>	不明
C3-03	<i>Penicillium purpurogenum</i>	<i>Penicillium rubrum</i>
C3-04	<i>Penicillium albidum</i> または <i>P. daleae</i>	<i>Penicillium piscarium</i>
C3-05	<i>Pestalotia</i> sp. または <i>Pestalotiopsis</i> sp. (<i>Pestalotiopsis maculans</i> など)	<i>Pestalotia</i> sp. または <i>Pestalotiopsis</i> sp.
C3-13	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Isaria</i> sp.
C4-01	<i>Trametes conchifer</i> または <i>T. versicolor</i>	胞子形成無し、同定不可
C4-02	<i>Bjerkandera adusta</i>	不明
C4-03	<i>Penicillium olsonii</i>	<i>Penicillium olsonii</i>
C4-04	<i>Trametes versicolor</i>	不明
C4-05	<i>Cladosporium cladosporioides</i> など	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
C4-06	<i>Bjerkandera adusta</i>	不明
C4-07	<i>Cladosporium cladosporioides</i> など	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
C4-08	<i>Cladosporium multigeniculatum</i> など	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
C4-09	<i>Cladosporium multigeniculatum</i> など	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
C4-10	<i>Punctularia strigosozonata</i>	不明
C4-11	<i>Cladosporium sphaerosperum</i> など	<i>Cladosporium sphaerosperum</i>
C4-12	<i>Hydnochaete olivacea</i>	胞子形成無し、同定不可
C5-01	<i>Rigidoporus</i> sp. (近縁種 <i>R. microporus</i> および <i>R. vinctus</i>)	胞子形成無し、同定不可
C5-02	<i>Polyporales</i> (タマチヨレイタケ目) に属する菌	胞子形成無し、同定不可

表 31. 遺伝子工学的手法と形態観察による同定結果対比表 (その 4)

菌株番号	遺伝子塩基配列による同定結果	形態観察による同定結果
C5-03	<i>Cladosporium sphaerosperum</i> など	<i>Cladosporium sphaerosperum</i>
C5-04	<i>Trametes versicolor</i>	不明
C5-05	<i>Trametes versicolor</i>	不明
C5-06	<i>Helotiales</i> (ピョウタケ目) に属する菌	胞子形成無し、同定不可
C5-07	<i>Trametes versicolor</i>	不明
C5-08	<i>Bjerkandera adusta</i>	不明
C5-09	<i>Cladosporium sphaerosperum</i> など	<i>Cladosporium sphaerosperum</i>
C5-10	<i>Trametes versicolor</i>	不明
D1-16	<i>Hydnochaete japonica</i>	胞子形成無し、同定不可
D1-17	<i>Agaricomycetes</i> 綱に属する菌	胞子形成無し、同定不可
D1-18	<i>Schizophyllum commune</i>	胞子形成無し、同定不可
D2-13	<i>Engyodontium album</i>	胞子形成無し、同定不可
D5-13	<i>Penicillium olsonii</i>	<i>Penicillium olsonii</i> または <i>P. herquei</i>
D5-14	<i>Bjerkandera adusta</i>	不明
D5-15	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium</i> sp.
E1-01	<i>Penicillium soppii</i> または <i>P. sumatrense</i>	<i>Penicillium piscarium</i>
E1-02	<i>Coniochaeta velutina</i>	胞子形成無し、同定不可
E1-03	<i>Penicillium expansum</i> など (<i>P. camemberti</i> , <i>P. carneum</i> , <i>P. clavigerum</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. echinulatum</i> , <i>P. expansum</i> , または <i>P. roqueforti</i>)	<i>Penicillium bifforme</i> , 第二候補として <i>P. camamberti</i>
E2-01	<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>

表 32. *Bacillus cereus* の毒素確認試験

	1	2	3	4	5	6	7
426bp: セレウリド合成酵素遺伝子	-	+	-	-	+	-	-
227bp: レシチナーゼ遺伝子	-	-	+	+	+	-	+
106bp: インターナルコントロール	+	+	-	-	+	+	+
Duopath コントロール				+	+	+	+
Duopath NHE				+	+	-	+
Duopath HBL				-	+	-	-

1:滅菌水(PCR 反応陰性コントロール)、2:CRS Positive Control Template(セレウリド合成酵素遺伝子検出用 PCR 反応陽性コントロール)、3:LE Positive Control Template(レシチナーゼ遺伝子検出用 PCR 反応陽性コントロール)、4:KNU-4(下痢型 *B. cereus*)、5:KNU-9(嘔吐型 *B. cereus*)、6:*B. subtilis* IAM 12118^T(無毒型)、7:*B. cereus* A1-05
(注)NHE:非溶血性エンテロトキシン、HBL:溶血素 BL エンテロトキシン

表 33. *Staphylococcus aureus* の毒素確認試験結果

菌株番号	エンテロトキシン	菌株番号	エンテロトキシン
A1-02	-	D1-10	-
A4-16	B	D1-14	-
B2-05	B	D2-06	-
B5-06	-	D2-10	B
C1-01	B	D2-16	-
C1-02	-	D3-07	C
C2-07	C	D5-03	-
C2-09	-	D5-11	B
C3-08	-	D5-12	-
C4-26	-	E1-16	-
C5-16	-		

表 34. 一検体からの分離種数

菌種数	開封試験(検体数:320)	口飲み試験(検体数:352)
0	280(87.5%)	173(49.1%)
1	51(15.9%)	91(25.9%)
2	7(2.2%)	51(14.5%)
3	2(0.6%)	24(0.7%)
4	-	7(0.2%)
5	-	3(0.1%)
6	-	3(0.1%)

表 35. 飲料種別別同定菌株数一覧

飲料種	記号	pH	Brix	微生物分離株				総合計
				細菌	カビ	真菌	酵母	
炭酸飲料(コーラ)	h	2.39	10.86	1	0	1	1	2
果汁飲料(20%アップル)	f	3.21	10.8	3	2	8	10	13
果汁飲料(20%オレンジ)	e	3.38	9.52	5	0	4	4	9
炭酸飲料(果汁入り)	j	3.41	4.89	5	5	1	6	11
炭酸飲料(サイダー)	i	3.49	9.96	2	3	3	6	8
ニアウォーター	o	3.5	7.84	2	6	3	9	11
スポーツドリンク(果汁入り)	k	3.52	6.74	2	6	13	19	21
スポーツドリンク(無果汁)	l	3.54	4.54	0	5	7	12	12
野菜飲料	g	4.32	5.24	19	6	4	10	29
混合茶飲料	c	5.45	0.46	48	13	6	19	67
紅茶飲料	d	5.64	4.06	6	8	8	16	22
烏龍茶飲料	b	5.92	0.26	20	12	8	20	40
緑茶飲料	a	6.17	0.3	26	6	7	13	39
ミルク入りコーヒー飲料	m	6.71	10.5	27	3	3	6	33
ミルク入り紅茶飲料	n	6.93	8.42	33	1	5	6	39
ミネラルウォーター	p	6.96	0.01	40	1	1	2	42

表 36. 飲料種別高頻度検出微生物一覧

飲料種	微生物種	
茶系飲料 (a~d)	属	<i>Streptococcus</i> (22)、 <i>Candida</i> (18)、 <i>Staphylococcus</i> (13)、 <i>Pseudomonas</i> (9)、 <i>Enterobacter</i> (8)、 <i>Acinetobacter</i> (7)、 <i>Pantoea</i> (5)、 <i>Penicillium</i> (5)、 <i>Rhodotorula</i> (5)
	種	<i>Candida albicans</i> (11)、 <i>Streptococcus salivarius</i> (8)、 <i>Staphylococcus aureus</i> (7)、 <i>Streptococcus anginosus</i> (5)
	属	<i>Candida</i> (8)
果汁飲料 (e, f)	該当なし	
野菜飲料 (g)	属	<i>Candida</i> (7)、 <i>Staphylococcus</i> (5)
炭酸飲料 (h~j)	属	<i>Candida</i> (17)
	属	<i>Candida albicans</i> (8)、 <i>Candida xestobii</i> または <i>Yamadazyma guilliermondii</i> (6)
	種	<i>Streptococcus</i> (12)
コーヒー飲料 (m)	属	<i>Streptococcus salivarius</i> (8)
	種	<i>Streptococcus salivarius</i> (8)
ミルク入り紅茶飲料 (n)	属	<i>Streptococcus</i> (17)、 <i>Staphylococcus</i> (8)
	種	<i>Streptococcus salivarius</i> (7)、 <i>Streptococcus anginosus</i> (5)、 <i>Staphylococcus aureus</i> (5)
ニアウォーター (o)	該当なし	
ミネラルウォーター (p)	属	<i>Streptococcus</i> (6)

(注) 括弧内の数字は検出回数

表37 各飲料種での*Staphylococcus aureus*および*Bacillus cereus*の検出

飲料種	口飲み試験			開封試験		
	試験検体数	真菌		試験検体数	真菌	
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
緑茶	22	0	3	20	0	0
ウーロン茶	22	0	2 (1)	20	0	0
混合茶	22	1 (1)	1 (1)	20	0	0
ストレートティー	22	0	1	20	0	0
オレンジ	22	0	0	20	0	0
アップル	22	0	0	20	0	0
トマト	22	0	2	20	0	0
コーラ	22	0	0	20	0	0
無果汁サイダー	22	0	0	20	0	0
果汁入りサイダー	22	0	1 (1)	20	0	0
果汁入りスポーツドリンク	22	0	1	20	0	0
無果汁スポーツドリンク	22	0	0	20	0	0
ミルク入りコーヒー	22	0	2 (1)	20	0	0
ミルクティー	22	0	5 (2)	20	0	0
果汁入りニアウォーター	22	0	1	20	0	0
水	22	0	2 (1)	20	0	0
合計	352	1 (1)	21 (7)	320	0	0

()内は毒素産生株検出検体数

表38 各飲料種での微生物の検出

飲料種	口飲み試験						開封試験						
	試験検体数	真菌					試験検体数	真菌					
		細菌	カビ	酵母	合計	総計		細菌	カビ	酵母	合計	総計	
緑茶	22	13	2	4	6	15	20	1	4	1	5	6	
ウーロン茶	22	9	4	7	11	17	20	0	8	0	8	8	
混合茶	22	19	4	5	9	19	20	2	8	1	9	11	
ストレートティー	22	4	5	7	10	13	20	0	3	1	4	4	
オレンジ	22	3	0	3	3	5	20	0	0	1	1	1	
アップル	22	0	2	6	7	7	20	2	1	0	1	3	
トマト	22	12	3	4	7	15	20	1	3	1	4	5	
コーラ	22	1	0	0	0	1	20	0	0	1	1	1	
無果汁サイダー	22	2	0	3	3	5	20	0	3	0	2	2	
果汁入りサイダー	22	5	1	4	5	9	20	0	1	0	1	1	
果汁入りスポーツドリンク	22	2	0	10	10	12	20	0	6	1	7	7	
無果汁スポーツドリンク	22	0	1	4	5	5	20	0	3	1	3	3	
ミルク入りコーヒー	22	17	2	3	5	17	20	1	1	0	1	2	
ミルクティー	22	21	1	4	5	21	20	0	0	0	0	0	
果汁入りニアウォーター	22	1	1	2	3	4	20	0	4	1	3	3	
水	22	16	0	1	1	16	20	2	1	0	1	3	
合計	352	125	0	26	67	90	181	320	9	46	9	51	60

分担研究報告書

細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

大西 貴弘

分担研究報告書

細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

協力研究報告書

細菌の清涼飲料水の汚染に関する研究

大西 貴弘

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

細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 大西 貴弘(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

細菌の清涼飲料水の汚染に関する研究

研究要旨

現在、多種多様な清涼飲料水が生産され消費されている。それに伴い、微生物を原因とした苦情事例の報告がなされている。このような事例から消費者を保護するためには、微生物が清涼飲料水中でどのような挙動を示すかを明らかにし、それを元に対策を立てていく必要がある。そのため今回の研究では、16 種類の清涼飲料水を 5 ヶ月間にわたってボランティアに口飲みもしくは任意の場所で開封をしてもらい、その後の飲料中での微生物の発育を解析した。口飲み試験では 352 検体中 190 検体に何らかの微生物が発育した(陽性率 54%)。これに対して開封試験では 320 検体中 70 検体に微生物が発育した(陽性率 22%)。細菌は茶系飲料、野菜飲料、ミルク入り飲料、ミネラルウォーターで陽性率、発育共に良かったが、果汁飲料、炭酸飲料では陽性率、発育共に悪かった。真菌は茶系飲料、スポーツドリンクで高い陽性率を示したが、炭酸飲料での陽性率は低かった。口飲みの翌日に着目すると、pH が高いほど細菌の陽性率および菌数が高くなる傾向が見られたが Brix の影響は少なかった。カビは口飲みの翌日の陽性率、菌数ともに pH、Brix との関係はあまり見られず、カビはあらゆる飲料種に適応できることが示された。口飲み試験の陽性率は約 54%で開封試験の陽性率は約 22%であったことから、口飲みを行うとコップなどに飲料を移してから飲用する場合に比べて高率に汚染が発生することが明らかになった。飲料種によっては微生物が発育しても外見的变化の乏しいものがあった。また、口飲みの翌日で菌数が 10^8 cfu/ml に達する例も見られた。今回の結果を元に消費者へ清涼飲料水の取り扱いについて注意を喚起していく必要が認められた。

研究協力者

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)

後藤慶一 (三井農林株式会社 食品総合研究所)

A. 研究目的

現在、多種多様な形態および種類の清涼飲料水が製造販売されている。それに伴い製品の製造、流通、保管、消費のされ方も複雑になってきている。特に近年、PET ボトルや紙パック入りの飲料が普及したため、飲料の開封後の保存が非常に容易になった。その結果、飲料に微生物が混入し発育する事例が多発している。このような事例を防ぐためには清涼飲料水中で微生物がどのような挙動を示すのか解析を行い、それを元に企業や消費者に正しい清涼飲料水の取扱い方を提示することが有効であると思われる。このような背景の下、本研究では清涼飲料水中での微生物の増殖について解析を行った。

清涼飲料水中での微生物の増殖に関する報告はいくつかあるが、多くのものは最初から接種する微生物を特定の菌種に絞り、それを特定の飲料に接種した研究である。しかし、実際には人の口腔内には少なくとも 600 種類の細菌が存在していると考えられている [1]。また、これらの細菌は個人ごとに特異的な細菌叢を形成していると考えられている。よって、最初から特定の菌種に絞って研究を行っても、実際の微生物汚染を再現していない可能性がある。また、微生物種によって増殖に適した飲料種が分かれるため、広範囲の飲料を用いて実験を行った方が良いと思われる。本研究ではより自然な結果を得るために、不特定多数の人に飲料を飲用してもらい、発育してきた微生物を解析する方法を採用した。

B. 研究方法

詳しい研究方法是本年度の研究分担者：

後藤慶一の分担報告に記載されている。概略を述べると、今回の研究ではボランティアに口飲みもしくは任意の場所で開封をしてもらい、その飲料を容器ごと 25°C で培養する。14 日間の培養期間中、口飲み試験では 1, 3, 6 (微生物の発育が見られた場合)、14 日目に、開封試験では 6, 14 日目に飲料を標準寒天培地、クロラムフェニコール加 PDA 寒天培地 (以下 PDA 培地)、XM-G 寒天培地に塗抹し、菌数を計算した。PDA 培地に発育したコロニー数から真菌数を、XM-G 培地に発育したコロニー数から大腸菌・大腸菌群数を計算した。ただし、標準培地には細菌と共に酵母も発育するため、標準培地の菌数から PDA 培地の菌数を引いたものを細菌数として定義した。また、まれに PDA 培地に細菌が発育する場合があるが、本分担報告では PDA 培地上に発育した微生物をすべて真菌と定義した。分離された微生物の遺伝学的同定結果については本年度の研究分担者：後藤慶一の分担報告に記載されている。また培養期間中、菌数の記録とともに飲料の外見的变化の目視観察についても記録した。

C. 研究結果

1. 試験結果の全体的な傾向

1-1 目視観察結果

14 日間の培養期間中に飲料に見られた目視変化を記録した。記録した項目はわずかに濁りあり、濁りあり (図 1a)、10 mm 未満の浮遊物あり (図 1b)、10 mm 以上の浮遊物あり (図 2a, b)、沈殿あり (図 3a)、分離 (図 3b)、カビ (図 4a)、ガス発生 (膨張を含む) (図 4b) の 8 項目である。濁り、浮遊物に関しては茶系飲料、炭酸飲料 (果汁入り)、スポーツ

リンク(果汁入り)で多く観察された(図 5a, b)。沈殿は茶系飲料、果汁飲料、スポーツドリンク(果汁入り)、炭酸飲料、ミルク入り飲料で多く見られた(図 5c)。分離はミルク入り飲料と野菜飲料で見られた(図 6a)。目視によるカビの観察は主に茶系飲料で見られた(図 6b)。ガス発生は主に野菜飲料で観察された(図 6c)。

後述のようにミネラルウォーターは細菌の発育が良く、多くの検体が 10^4 cfu/ml を超えたが(3-16 ミネラルウォーターの項を参照)、目視観察では特に大きな変化はみられなかった(図 6)。

1-2. 陽性検体の分布状況

今回の試験ではボランティアに5ヶ月間にわたって16種類の清涼飲料水を用いて口飲み試験および開封試験を行ってもらった。最終的に口飲み試験で352の検体、開封試験で320の検体が集まった。口飲み試験では352検体中190検体に何らかの微生物が発育した(陽性率54%)。これに対して、開封試験では320検体中70検体に微生物が発育した(陽性率22%)。細菌は口飲み試験では149検体、開封試験では15検体から分離された(図7)。真菌は口飲み試験では105検体、開封試験では61検体から分離された(図7)。年齢別で見ると、幼児と60歳以上において陽性率が若干高めに出る傾向が見られた(図8)。男女間の比較では陽性率に特に差は見られなかった(図9)。

今回の研究ではボランティアに清涼飲料水を任意の場所で開封してもらい、その後容器内で微生物が発育するかどうかを観察する開封試験を行った。開封場所はキッチンやリビングが最も多かった(図10)。検体数が少ないためはっきりとした傾向を読み取ることは

できないが、庭や屋外が室内に比べて高い陽性率を示した。また室内の内、風呂では高い陽性率が見られた。

飲料種ごとに陽性率の比較を行った(図11)。口飲み試験では緑茶、烏龍茶、紅茶などの茶系飲料、野菜飲料、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で高い陽性率が見られた。一方、果汁飲料(20%オレンジ、20%アップル)、炭酸飲料、ニアウォーターでは陽性率は低めであった。開封試験では茶系飲料やスポーツドリンク(果汁入り)で高い陽性率が見られた。しかし、口飲み試験において高い陽性率を示したミルク入り飲料(ミルク入りコーヒー飲料、ミルク入り紅茶)の陽性率は低かった。

2. 飲料の一般性状による傾向

培養1日目の菌数と飲料のpHとの関係を解析したところ(図12)、細菌はpHが中性付近の飲料ほど発育しやすい傾向が見られた。しかし、真菌ではそのような傾向は認められなかった。また培養1日目の菌数と飲料のBrixとの関係を比較してみたが(図13)、細菌ではBrixが高い飲料ほど発育が良くなる傾向が若干見られた。しかし真菌の発育とBrixとの間に関係は認められなかった。

3. 飲料ごとの傾向

全検体の菌数の推移をプロットしたものを図14から図45に示し、菌数の平均値をグラフ化したものを図46から図53に示した。また、各検体の培養期間中の最高菌数をプロットしたものを図54から図61に示した。ただし、微生物は発育したが、菌数を測定できなかった検体はこれらのグラフにプロットしていない。また、カビの発育が進みマリモ状の菌塊が形成されると、正確に菌数を計数できないため、その場合、菌数計算は行わずにマリモ

状の菌塊が形成された検体数を図 55、59 にあわせて記した。

3-1. 茶系飲料

口飲み試験(図 14, 46, 図 54 から図 57)において細菌、酵母の発育が非常に良く、培養 3 日目で 10^7 cfu/ml を超える検体が多く見られた。大腸菌・大腸菌群は非常に発育が良く、 10^8 cfu/ml まで増殖した。真菌数は細菌に比べて増殖速度は遅いが、14 日目には 10^6 cfu/ml を超える検体が見られた。

開封試験(図 30, 50, 図 58 から 61)では陽性検体数が少なく、細菌の発育は良くなかった。真菌は PDA 培地からは検出されなかったが、マリモ状の菌塊の形成が観察された検体が多く見られた(図 59)。

3-2. 烏龍茶飲料

口飲み試験(図 15, 46, 図 54 から 57)において細菌の発育はそれほど良くなく、3 検体が 10^8 cfu/ml 前後に達しただけであった。その 3 検体の内、2 検体が大腸菌・大腸菌群であった。真菌の発育も非常に良く、培養 3 日目で多くの検体が 10^4 cfu/ml を超え、14 日目には 10^6 cfu/ml を超えた。

開封試験(図 31, 50, 図 58 から 61)では細菌の発育は観察されなかった。真菌は目視観察でマリモ状の菌塊を形成する検体が多く認められた(図 59)。

3-3. 混合茶飲料

口飲み試験(図 16, 46, 図 54 から 57)では細菌の発育が非常に良く、多くの検体が 1 日目で 10^2 cfu/ml を越え、3 日目には 10^6 cfu/ml を超えた。大腸菌・大腸菌群の発育も非常に良かった。真菌も 3 日目で約 10^6 cfu/ml に達する検体が見られた。

開封試験(図 32, 50, 図 58 から 61)では細菌の発育は良くなかった。しかし、真菌の

発育は良く、マリモ状の菌塊の形成が多く検体で観察された(図 59)。

3-4. 紅茶飲料

口飲み試験では細菌の発育は比較的良かった(図 17, 46, 図 54 から 57)。大腸菌・大腸菌群は 2 検体が陽性で、発育も非常に良かった。真菌の発育も非常に良く、培養 3 日目で 10^6 cfu/ml を超える検体が多く見られた。

開封試験(図 33, 50, 図 58 から 61)では細菌は発育しなかった。真菌は PDA 上に発育した 1 検体と、マリモ状の菌塊の形成が見られた 3 検体が認められた(図 59)。

3-5. 果汁飲料(20%オレンジ)

口飲み試験(図 18, 47, 図 54 から 57)、開封試験(図 34, 51, 図 58 から 61)において、細菌、真菌共に非常に発育が悪かった。

3-6. 果汁飲料(20%アップル)

口飲み試験においては細菌の発育は非常に悪かった(図 19, 47, 図 54 から 57)。真菌の発育は同じ果汁飲料の 20%オレンジに比べると比較的良かった。

開封試験(図 35, 51, 図 58 から 61)では細菌の発育は非常に悪く 14 日目に 3 検体が僅かに発育したのみであった。真菌はすべて陰性であった。

3-7. 野菜飲料

口飲み試験(図 20, 47, 図 54 から 57)において細菌は非常に発育が良く、多くの検体の菌数が 10^6 cfu/ml まで達した。真菌の発育も比較的良く 10^7 cfu/ml を超える検体が幾つか見られた(図 55)。

開封試験では細菌、真菌共に発育が非常に悪かった(図 36, 51, 図 58 から 61)。

3-8. 炭酸飲料(コーラ)

開封試験で真菌が 1 検体陽性になった

けで、他の検体はすべて陰性だった(図 21, 37, 47, 51, 図 54 から 61)。

3-9. 炭酸飲料(サイダー)

口飲み試験、開封試験共に微生物の発育は非常に良くなかった(図 22, 38, 48, 52, 図 54 から 61)。陽性の検体の多くは 14 日目になって初めて発育が認められたものだった(図 22, 37)。

3-10. 炭酸飲料(果汁入り)

口飲み試験では微生物の発育は非常に良くなかった(図 23, 48, 図 54 から 57)。陽性の検体の多くは 14 日目になって初めて発育が認められたものだった。

開封試験ではすべての検体が陰性であった(図 39, 52, 図 58 から 61)。

3-11. スポーツドリンク(果汁入り)

口飲み試験(図 24, 48, 図 54 から 57)では細菌、真菌共に発育が非常に良く、3 日目から 6 日目の間に多くの検体が 10^6 cfu/ml に達した(図 54, 55)。

開封試験(図 40, 52, 図 58 から 61)では細菌の発育は良くなかったが、真菌は 7 検体でマリモ状の菌塊の形成が見られた。(図 55)。

3-12. スポーツドリンク(無果汁)

口飲み試験(図 25, 48, 図 54 から 57)ではスポーツドリンク(果汁入り)と比較して細菌の発育は良くなく、1 検体のみが陽性であった。しかし、真菌の発育は比較的良かった。

開封試験(図 41, 52, 図 58 から 61)は細菌、真菌共に発育が悪く、スポーツドリンク(果汁入り)と比較しても真菌の発育は良くなかった。

3-13. ミルク入りコーヒー飲料

口飲み試験(図 26, 49, 図 54 から 57)では細菌の発育が非常に良く、1 日目でほとん

どの検体が 10^5 cfu/ml を超えており、中には 10^8 cfu/ml に達している検体も見られた。ただし、多くの検体の菌数は 3 日目から 6 日目でピークに達した後、緩やかに減少していった。真菌の発育は細菌ほどではないが比較的良好であった。

開封試験(図 42, 53, 図 58 から 61)では細菌、真菌共に発育が非常に悪く、1 検体から細菌が検出されただけであった。

3-14. ミルク入り紅茶

口飲み試験(図 27, 49, 図 54 から 57)では細菌の発育は比較的良かった。大腸菌・大腸菌群も 2 検体で陽性を示し 10^6 cfu/ml に達した。真菌の発育は非常に良く、多くの検体が 3 日目で 10^6 cfu/ml に達した。

開封試験(図 43, 53, 図 58 から 61)ではすべての検体で陰性の結果だった。

3-15. ニアウォーター

口飲み試験(図 28, 49, 図 54 から 57)では細菌の発育は非常に悪く、真菌も 3 検体が 10^4 cfu/ml を超えたのみだった。

開封試験(図 44, 53, 図 58 から 61)では 1 検体のみが真菌で陽性であったが、他の検体はすべて陰性であった。

3-16. ミネラルウォーター

口のみ試験(図 29, 49, 図 54 から 57)では細菌の発育が非常に良く、多くの検体が培養 6 日目までに 10^5 cfu/ml を超えていた。大腸菌・大腸菌群は 2 検体が陽性で発育も良かった。真菌の発育はあまり良くなく 4 検体が 10^3 cfu/ml を超えただけであった。

開封試験では細菌、真菌共に発育は良くなく、細菌で 1 検体が 10^4 cfu/ml を、真菌では 2 検体が約 10^3 cfu/ml に達したのみだった(図 45, 53, 図 58 から 61)。

D. 考察

1. 目視観察

多くの飲料種で微生物が発育すると何らかの外見的な変化が観察された。茶系飲料において濁り、浮遊物、カビが多く観察されたのは飲料が透明のため発見が容易であったためであろうと思われる。そのため他の飲料でも同様の変化が生じている可能性はある。ミルク入り飲料に微生物が発育すると分離が高率に発生しているが、これは微生物によってタンパクが分解された結果によるものと考えられる。ガス産生に関しては野菜飲料に特異的に多く観察された。野菜飲料には他の飲料と比べて高濃度のタンパク質や糖分、繊維質などが含まれていることから、これらの成分を分解してガスを産生する微生物が発育した可能性が考えられる。分離された微生物の同定結果については本年度の研究分担者：後藤慶一の分担報告に記載されている。

このように多くの飲料種では微生物が発育すると何らかの外見的な変化が生じるが、ミネラルウォーターは透明であり細菌の発育も良好であるにもかかわらず目視観察ではほとんど変化がみられなかった。今後さらに検討を行う必要があるが、同じ透明の飲料である茶系飲料と比べて真菌の発育が殆どみられないことが目視変化に乏しい原因の1つと考えられる。

2. 微生物の発育と飲料の一般性状について

清涼飲料水中での微生物の発育に関与する清涼飲料水の一般性状として pH と Brix が最も重要な因子と考えられる。今回試験に使用した清涼飲料水を pH と Brix で分類すると、

- pH が低く、Brix が高い飲料(果汁飲料、野菜飲料、炭酸飲料、スポーツドリンク(無果汁)、ニアウォーター)
- pH が弱酸性で Brix が低い飲料(茶系飲料)
- pH が中性付近で Brix が低い飲料(ミネラルウォーター)
- pH が中性付近で Brix も高い飲料(ミルク入りコーヒー飲料、ミルク入り紅茶)

に分かれる。今回の結果から細菌の培養後1日目の発育は飲料の Brix よりも pH に大きく影響を受けることが明らかになった(図 12, 13)。また、中性付近で最も発育しやすいことが明らかになった(図 12)。つまり、ミネラルウォーターの様に Brix は低くても pH が中性付近にある飲料において細菌は十分発育できた。しかし、pH が低い飲料でも細菌の発育が見られる場合もあったことから、pH が低い飲料でも取り扱いには十分注意する必要がある(図 12, 13, 54, 58)。また、pH が中性付近でかつ Brix も高いミルク入り飲料では細菌の発育が非常に良かった(図 54)。これは pH、Brix の影響だけでなくタンパク源としてミルク成分を含んでいるため細菌の発育に適していたことも一つの要因として考えられる。

細菌に対して、真菌の培養後1日目の発育は pH、Brix の影響をほとんど受けなかった(図 12, 13)。このことは真菌が広範な飲料に適応して発育できる可能性を示唆している。ただし、ミルク入り紅茶、ミルク入りコーヒー飲料、ミネラルウォーターは細菌と比べて真菌の発育が悪かった(図 26, 29)。この3つの飲料は pH が中性付近にあるため、弱酸性域を好む真菌が発育できなかった可能性がある。またこの pH の違いが、同じ Brix の低い茶系

飲料とミネラルウォーター間における真菌の発育程度の差として表れているのではないかとと思われる。

培養後 1 日目で細菌、真菌の発育が多くの検体で見られた(図 12, 13)。特に細菌の発育が良く、検体によっては 10^8 cfu/ml に達している場合もあった。このように、飲用の翌日でも微生物の良好な発育が見られるため、消費者へ注意を呼びかける必要があると思われる。

炭酸飲料は含有する二酸化炭素のために微生物の発育が抑えられている。今回の結果では炭酸飲料からも微生物の発育が検出された。しかし、今回検出された微生物の多くは培養後 14 日目になって発育してきたものである(図 22, 23, 38, 39)。おそらく、培養期間中に二酸化炭素濃度が下がってきたために微生物の発育が可能になったものと考えられる。通常の飲用では問題ないと思われるが、炭酸飲料でも微生物が発育する可能性があることを留意しておく必要がある。

3. 口飲み試験と開封試験の比較

今回の研究では消費者の清涼飲料水の取り扱いを想定して、口飲み試験と開封試験を行った。その結果、口のみ試験の陽性率は約 54% で開封試験の陽性率は約 22% であった。また、口飲み試験における細菌は 149 検体から分離されたのに対し、真菌は約 105 検体から分離された(図 7)。しかし、開封試験において細菌は 15 検体から分離されたが、真菌は 61 検体からと細菌の約 4 倍であった(図 7)。これらの結果から、直接口をつけて飲用すると、コップなどに注いでから飲用する場合より高率に汚染が起こることが示唆される。しかし同時にこのことは、直接口飲みをしなくとも微生物汚染が発生することを

示唆している。また、直接飲用することにより細菌の分離数が高くなるのは、おそらく口腔内細菌が分離されるためであると思われる。一方、開封試験で真菌の陽性率が高くなるのは環境中の真菌が高率に分離されたためと考えられる。

4. 清涼飲料水における微生物を原因とした苦情調査と今回の結果との比較

昨年度、本研究班では『清涼飲料水における微生物を原因とする苦情の調査』を行い、全国の地方自治体や製造業団体から清涼飲料水における微生物を原因とした苦情についての情報を収集した[2]。その結果、飲料の開封後の苦情事例では自治体からの情報では約 9 割で真菌が原因となっており、製造業団体からの情報でも約 7 割が真菌によるものとなっている。このように清涼飲料水における微生物を原因とした苦情事例では真菌が大きな原因となっている。今年度の結果では口飲み試験、開封試験を合わせると細菌が 164 検体から、真菌が 166 検体から分離され、陽性率はほぼ等しくなっており昨年度の調査と大きく異なっている(図 7)。しかし、先程述べたように開封試験では真菌は細菌の約 4 倍と細菌より高率に分離されている。このことから、おそらく昨年度の調査における苦情事例には直接口飲みはせずに、コップなどに注いで飲用した事例が多く含まれているのではないかと考えられる。

昨年度の調査で開封後の苦情があった清涼飲料水の種類として、自治体、製造業団体いずれの情報でも果汁飲料と茶系飲料で全体の約 7 割を占めていた[2]。しかし、今回の研究では果汁飲料の陽性率は他の飲料と比較して非常に低くなった。昨年度の調査と今回の結果との間でこのような違いが生じた

原因の一つとして、果汁飲料は紙パックでの販売が多いためではないかと思われる。社団法人全国清涼飲料工業会の統計によれば、果汁飲料の容器別生産割合は紙パックが35.2%とPETボトルの41.1%に次いで多い[3]。緑茶飲料ではPETボトルの85.4%に対して紙パックは2.9%にすぎない。そのため、昨年度の調査では紙パック入り果汁飲料の苦情事例数は紙パック入り茶系飲料の約5倍と多くなっている[2]。紙パックでは中身が見えないため微生物がかなり増殖してからでないと気づかないことが多く、特に大容量の紙パックでは飲み切るまでに数日間を要する場合があるため、その間に微生物が増殖しやすくなると思われる。今年度の口飲み・開封試験の結果から果汁飲料中での微生物の発育は他の飲料と比較して良くないが、開封後長期間保管する傾向のある紙パック入り製品の割合が多い果汁飲料は、開封後すぐに飲みきってしまう他の飲料に比べて苦情として報告され易くなるのではないかと考えられる。反対に今年度の試験のようにすべての飲料間で条件を揃えた場合、pHが低く微生物の発育しにくい果汁飲料は他の飲料と比較して陽性率が低くなってしまふものと思われる。

E. 結論

今回、明らかになったことをまとめると次のようになる。

- 口飲みを行うとコップに注いでから飲用する場合よりも、微生物に汚染する可能性が高くなった。
- 飲用の翌日でも微生物は高率に発育した。
- 口飲み試験では主に細菌が、開封試

験では主に真菌が原因微生物となった。

- 細菌の発育は飲料の Brix より pH に大きく影響を受けた。
- 真菌の発育は飲料の pH、Brix にあまり影響を受けず、広範な飲料に適応できる可能性が示唆された。
- ミネラルウォーターは細菌の発育は良好であったが、目視変化に乏しかった。

今後、これらの結果を元にして消費者への注意の喚起を行う必要があると思われる。また、微生物の清涼飲料水中の動態をさらに詳しく解析するために、今後接種試験を行いたい。

F. 参考文献

- 1) Dewhirst, F.E., et al.: The Human Oral Microbiome Database.
<http://www.HOMD.org>
- 2) 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進事業 『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・分担報告書
- 3) 清涼飲料関係統計資料 2009 年 社団法人全国清涼飲料工業会

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohnishi, T., Muroi, M. and Tanamoto, K. Soluble MD-2 and soluble CD14 inhibit the growth of both gram positive and gram negative bacteria. *Microbiology and Immunology*, 54: 74-80, 2010.

天野憲一, 斉藤志保子, 八柳 潤, 三澤尚明, 大西貴弘. *Campylobacter jejuni* LPS

と疾患とのかかわり合い. エンドトキシン研究. 11: 23-25, 2009.

大西貴弘. グリコシル化によるエンドトキシン認識分子の活性調節. エンドトキシン研究. 12: 39-43, 2009.

大西貴弘, 室井正志, 棚元憲一. MyD88 非依存性経路における TLR4 二量体形成の役割. エンドトキシン研究. 12: 72-74, 2009.

2. 学会発表

大西貴弘, 後藤慶一, 尾上洋一, 渡辺麻衣子, 小西良子, 工藤由起子: 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. 第 98 回日本食品衛生学会. 平成 21 年 10 月

大西貴弘, 宮原美知子, 工藤由起子, 鎌田洋一, 小沼博隆, 高鳥浩介, 尾上洋一, 小西良子: 我が国における過去 10 年間の食品中食中毒菌汚染実態調査. 第 30 回日本食品微生物学会. 平成 21 年 10 月

(a)



(b)



図 1 目視観察結果 (a) 濁りあり、(b) 10 mm 未満の浮遊物あり

(a)



(b)

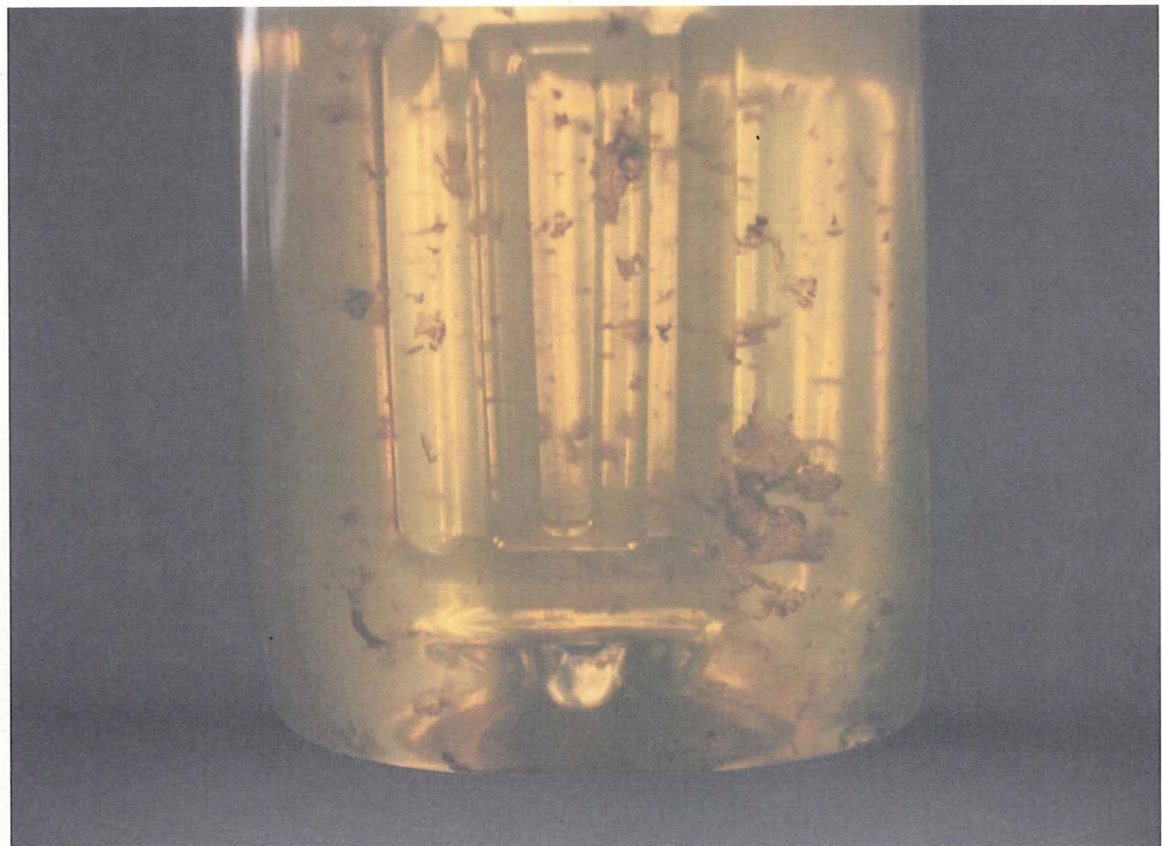


図 2 目視観察結果 10 mm 以上の浮遊物あり (a)綿状、(b)固形