

図 45 ミネラルウォーターにおける菌数の推移(開封試験)

20検体 —■— —◆— —▲— —●— —□— —◇— —◇— —△— —○—  
 - - - ■ - - - ◆ - - - ▲ - - - ● - - - □ - - - ◇ - - - △ - - - ○ - - - ×  
 —×— —+— —×— —×—

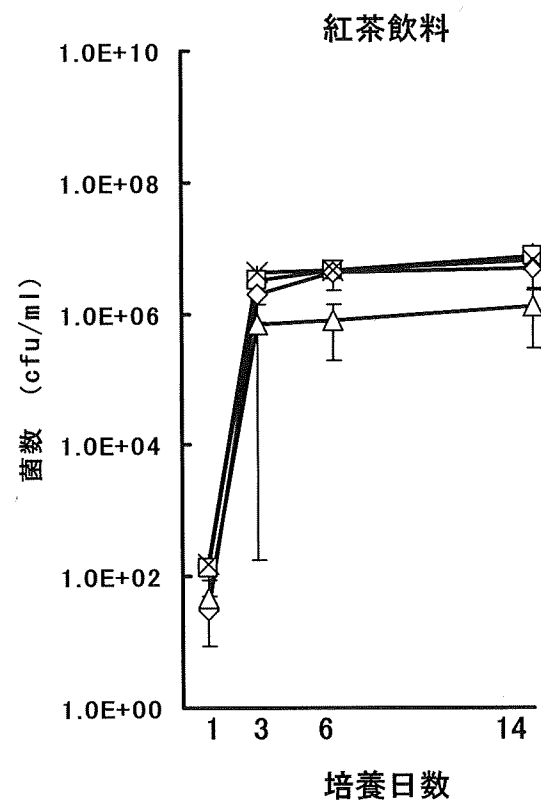
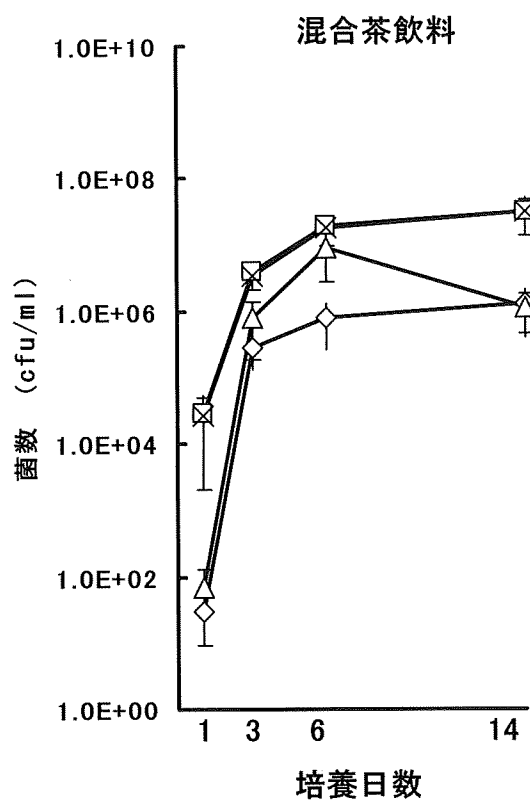
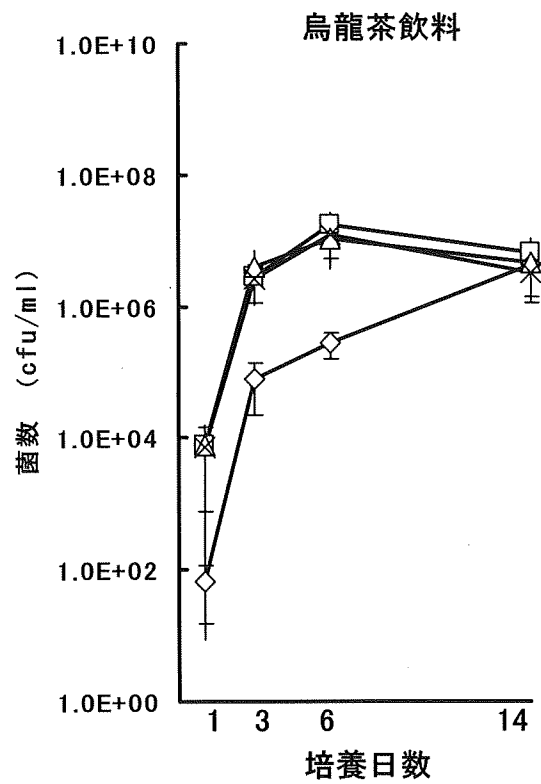
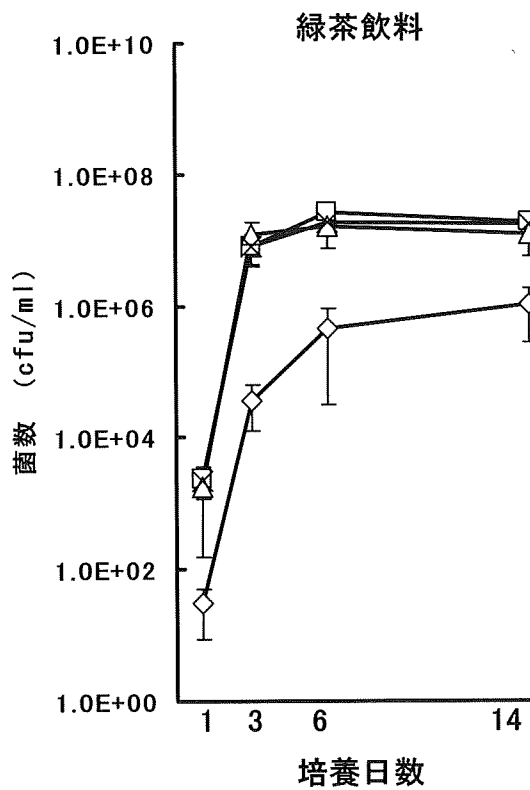


図 46 口飲み試験における平均菌数の推移

細菌(X)、真菌(◇)、大腸菌・大腸菌群(△)、細菌+酵母(□)  
 菌数は平均値±SE (n=22)で示す。

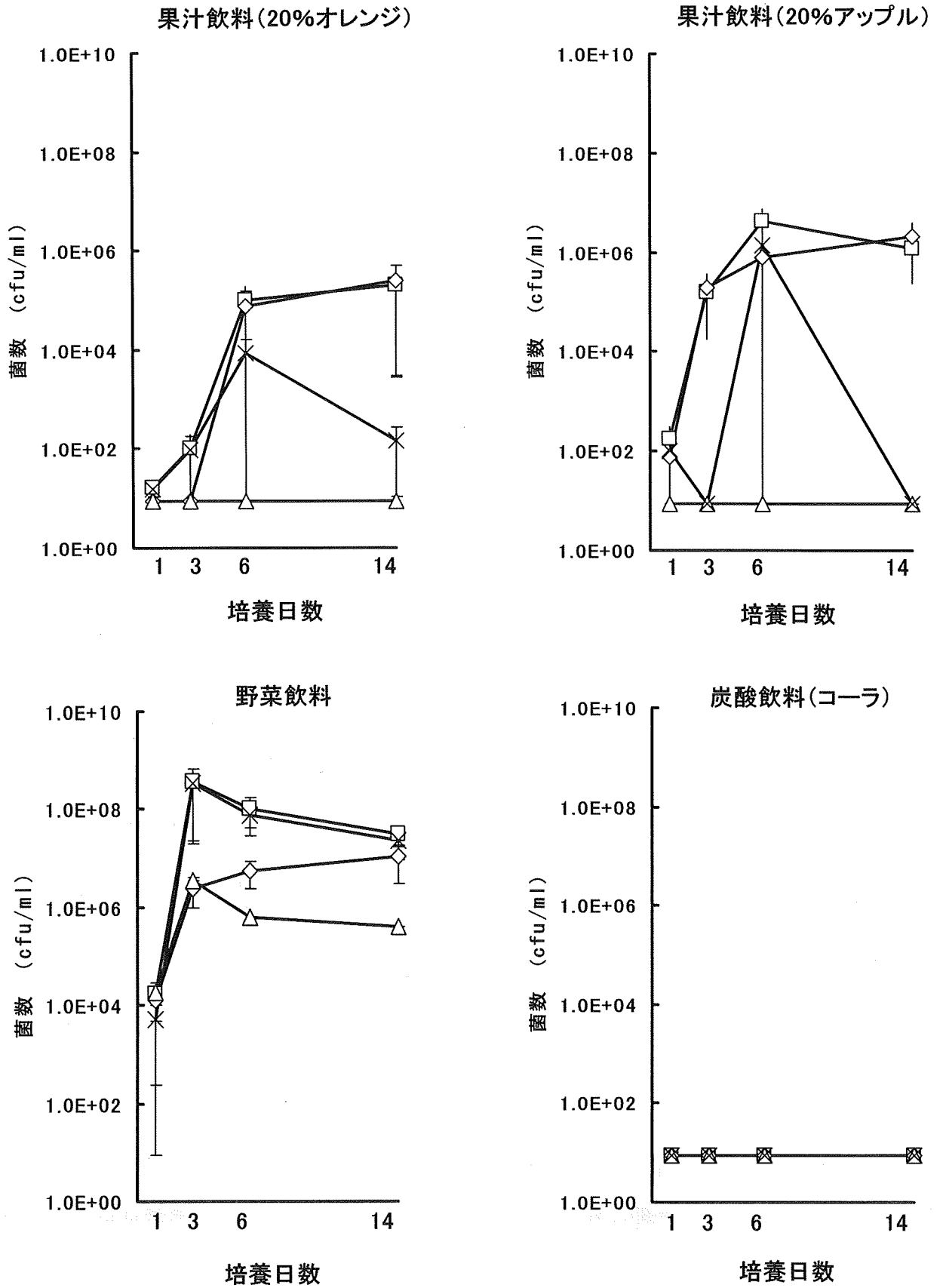


図 47 口飲み試験における平均菌数の推移

細菌(X)、真菌(◇)、大腸菌・大腸菌群(△)、細菌+酵母(□)  
 菌数は平均値±SE (n=22)で示す。

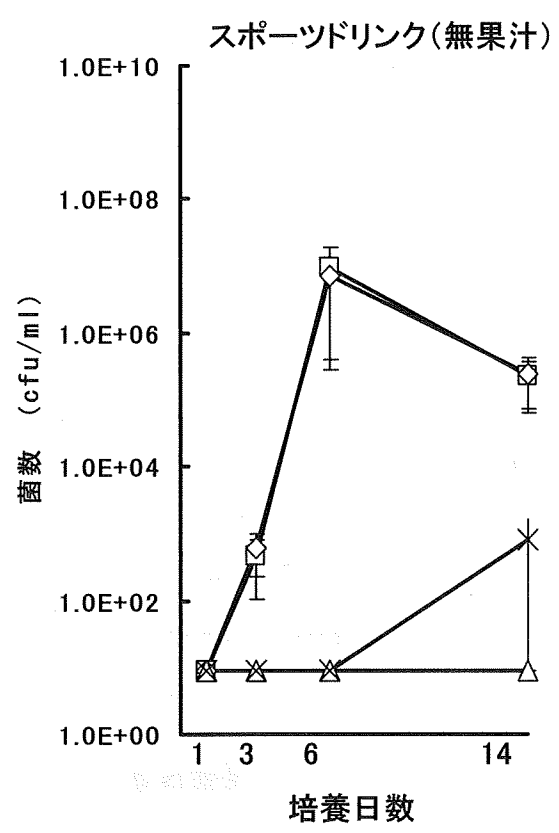
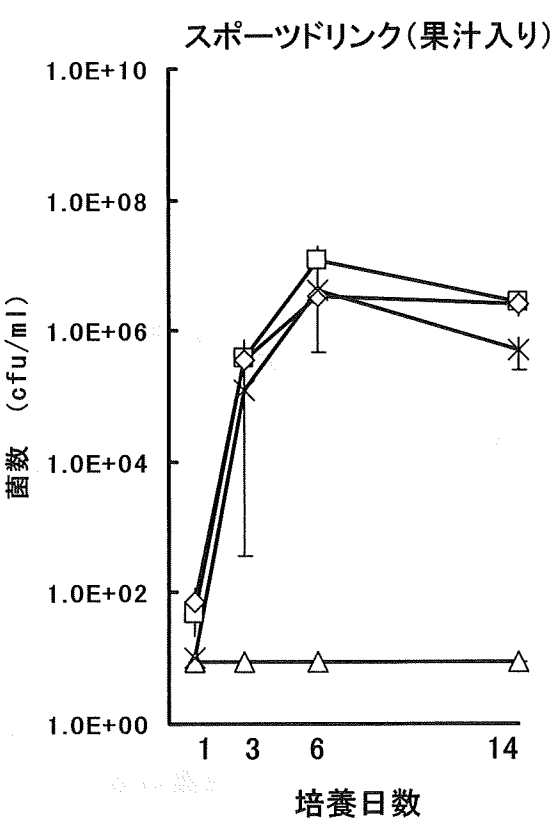
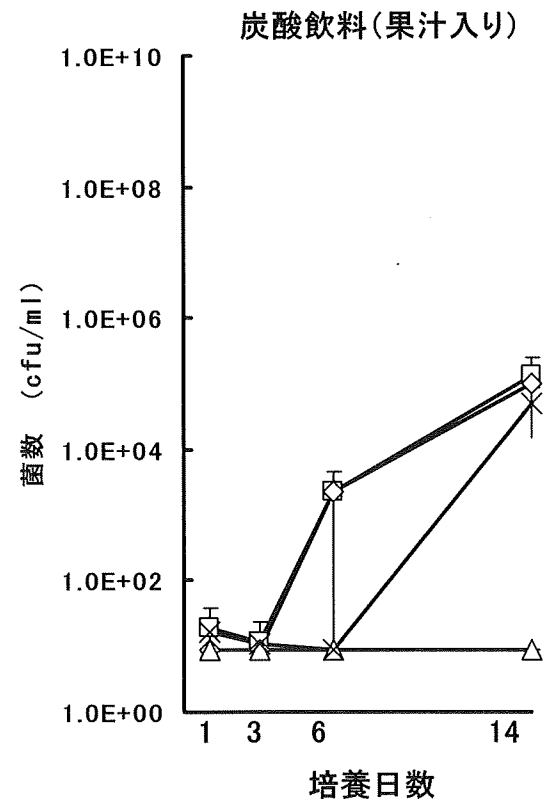
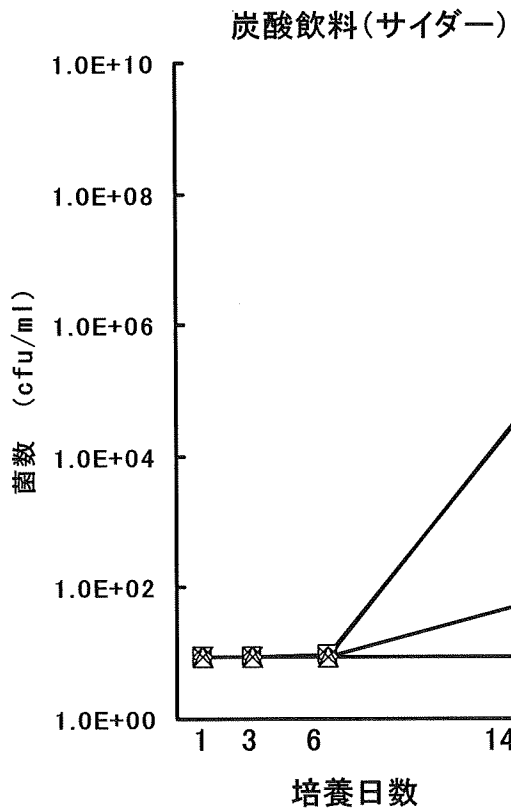


図 48 口飲み試験における平均菌数の推移

細菌(X)、真菌(◇)、大腸菌・大腸菌群(△)、細菌+酵母(□)  
 菌数は平均値±SE (n=22)で示す。

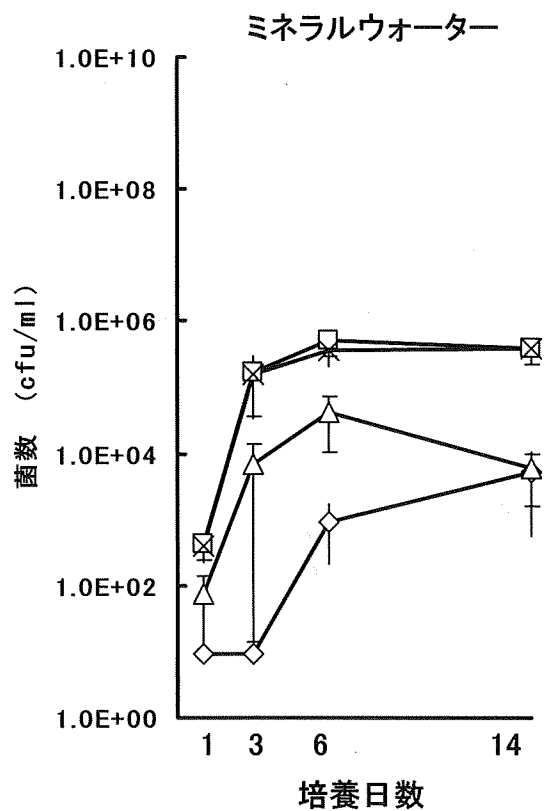
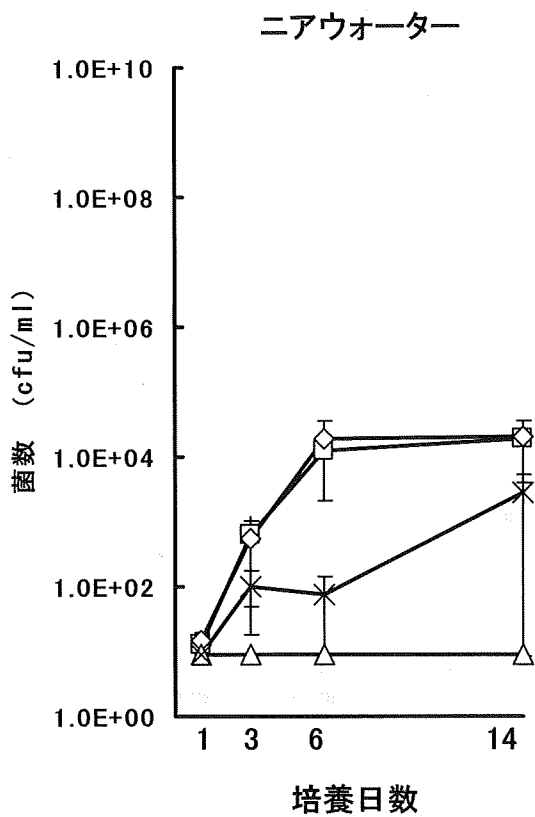
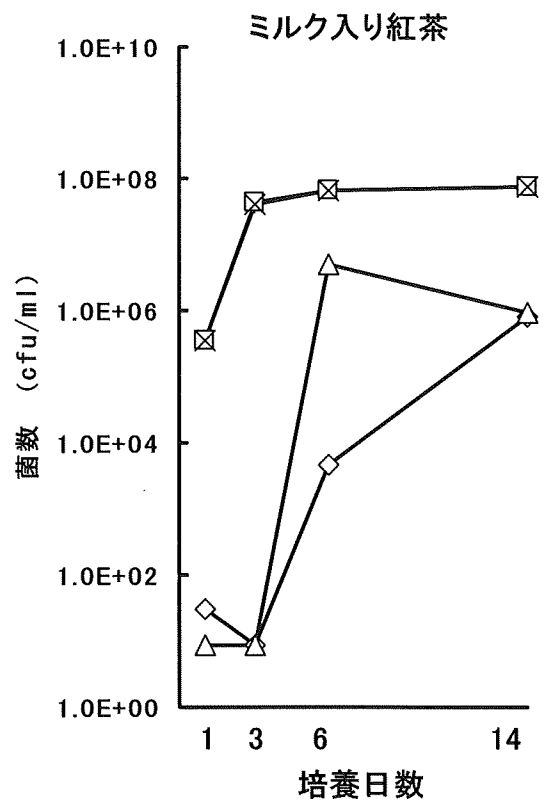
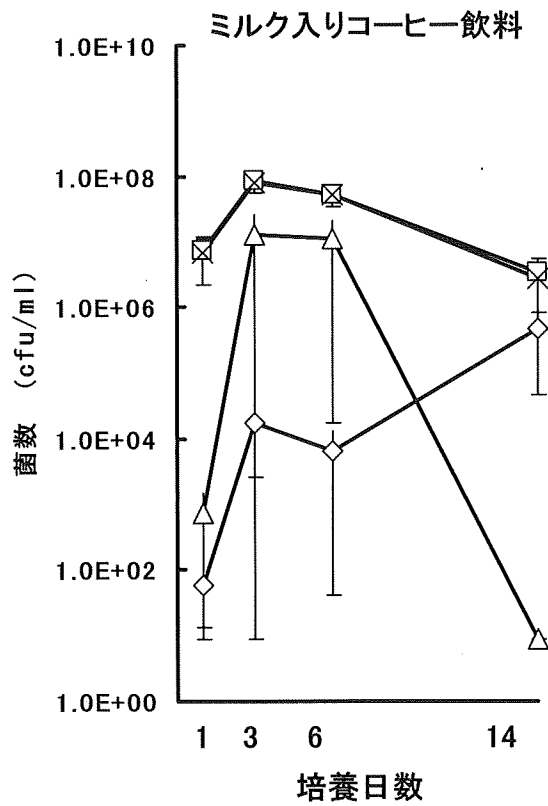


図 49 口飲み試験における平均菌数の推移

細菌(X)、真菌(◇)、大腸菌・大腸菌群(△)、細菌+酵母(□)  
 菌数は平均値±SE (n=22)で示す。

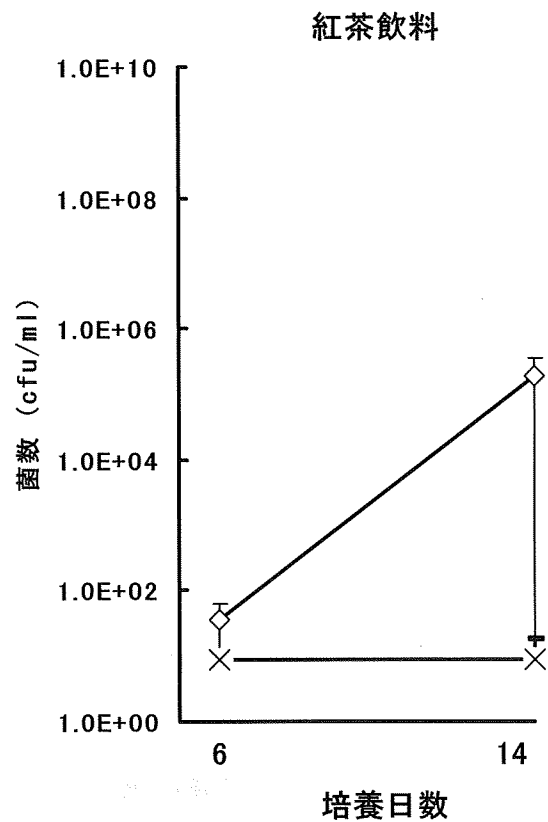
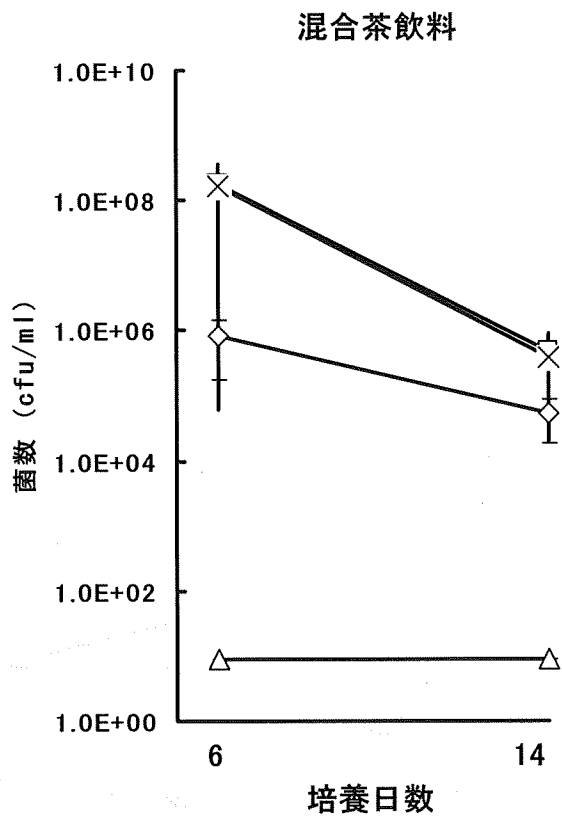
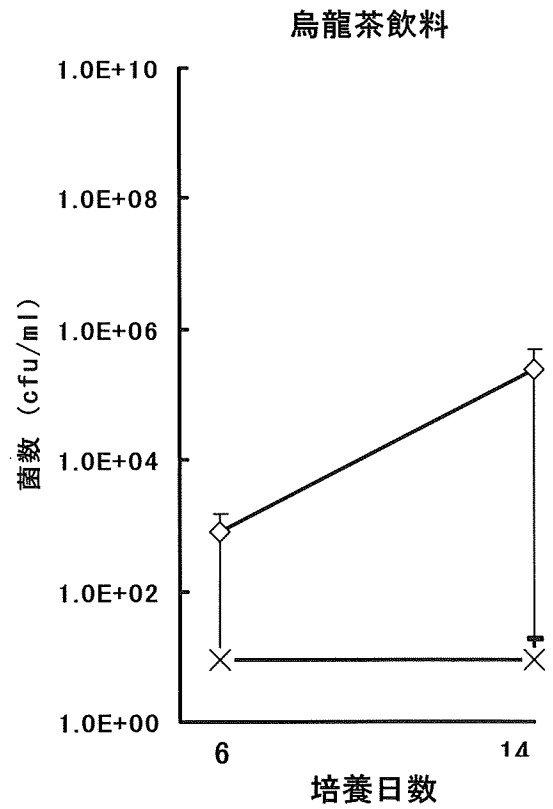
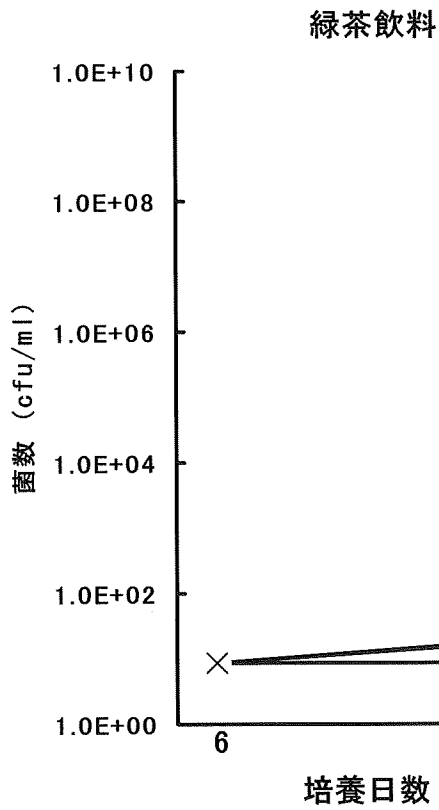


図 50 開封試験における平均菌数の推移

細菌(X)、真菌(◇)、大腸菌・大腸菌群(△)、細菌+酵母(□)  
 菌数は平均値±SE (n=20)で示す。

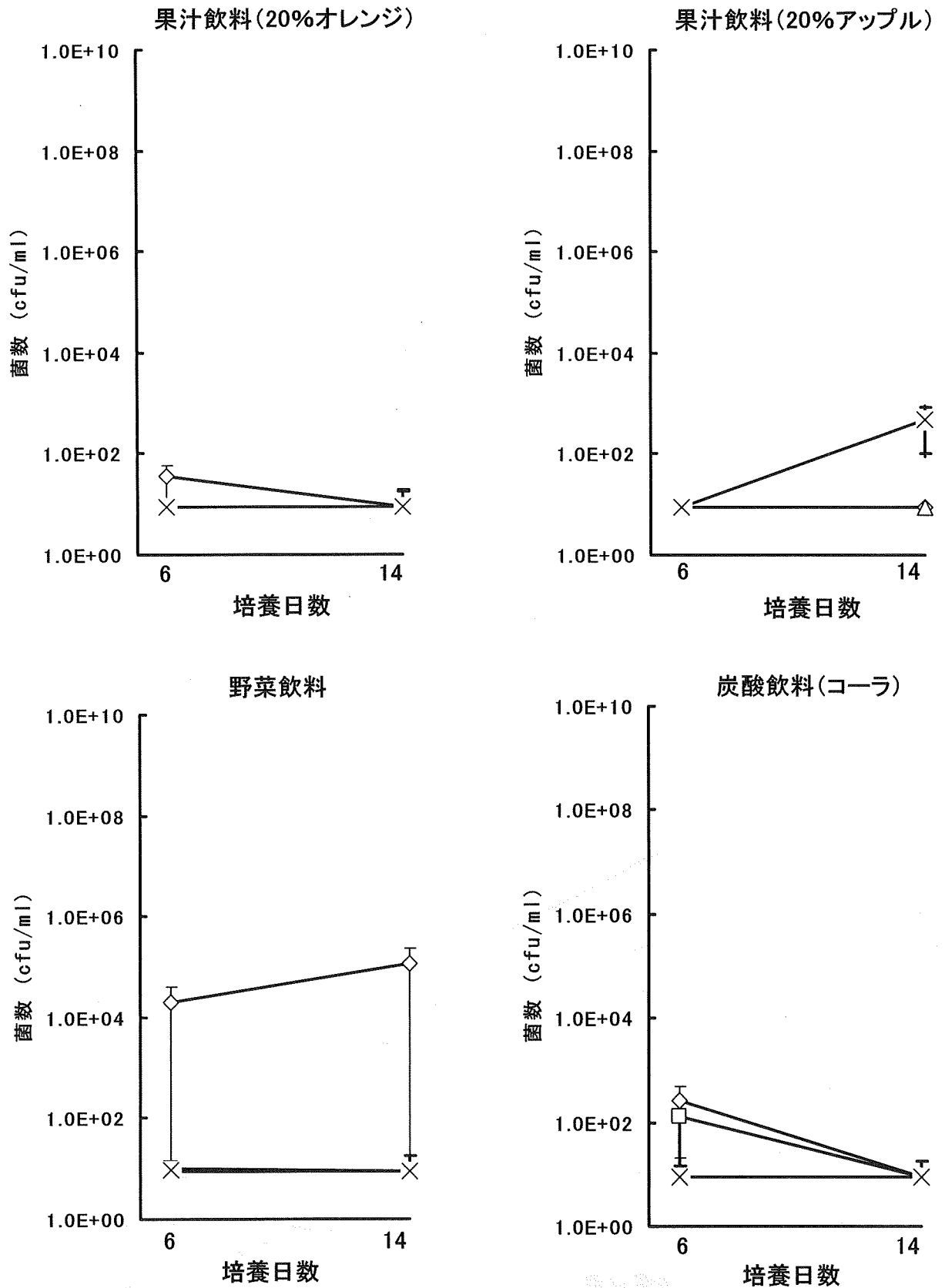


図 51 開封試験における平均菌数の推移

細菌(X)、真菌(◇)、大腸菌・大腸菌群(△)、細菌+酵母(□)  
 菌数は平均値±SE (n=20)で示す。

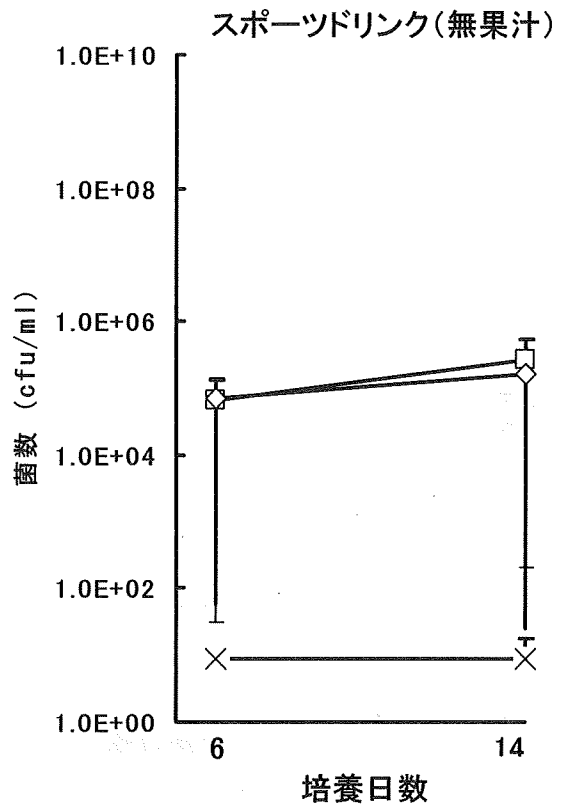
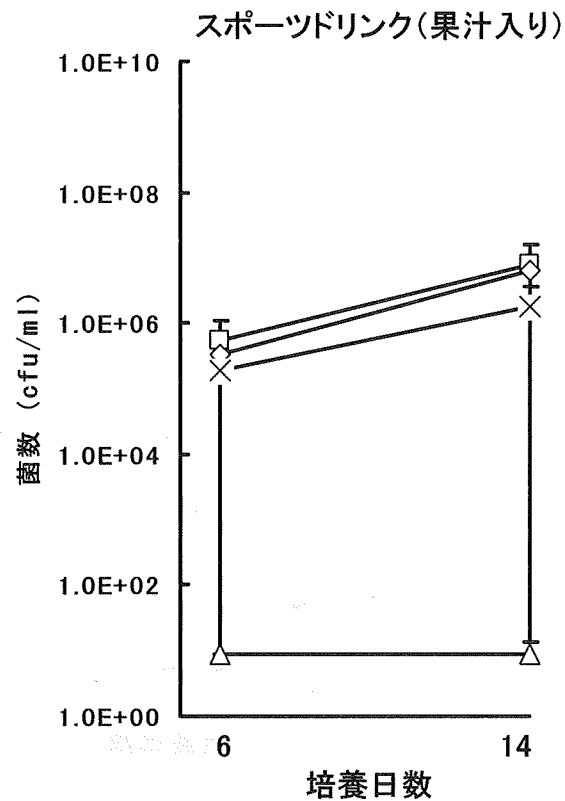
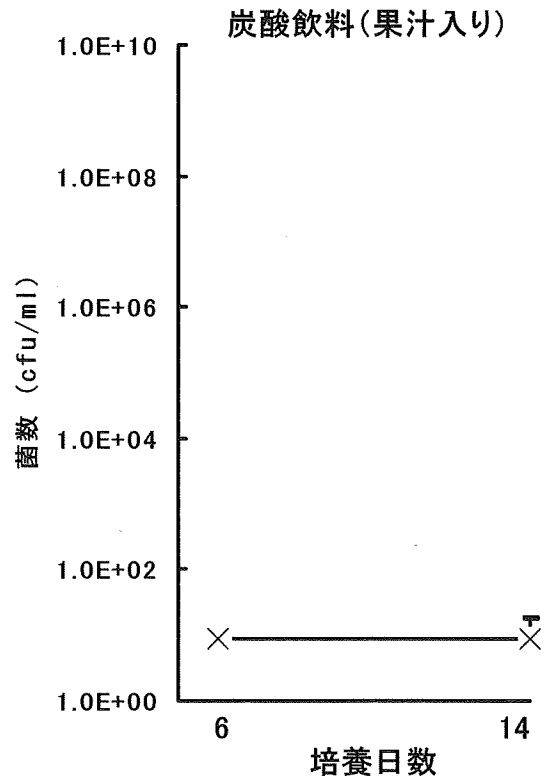
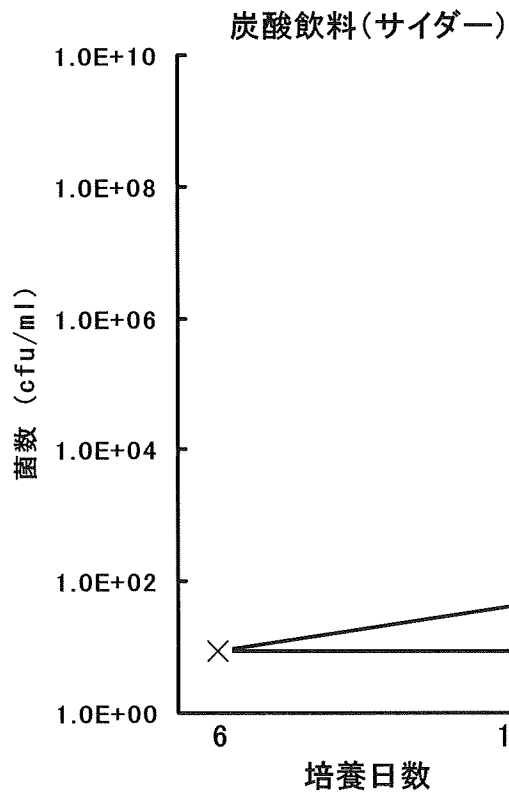


図 52 開封試験における平均菌数の推移

細菌(X)、真菌(◇)、大腸菌・大腸菌群(△)、細菌+酵母(□)  
 菌数は平均値±SE (n=20)で示す。



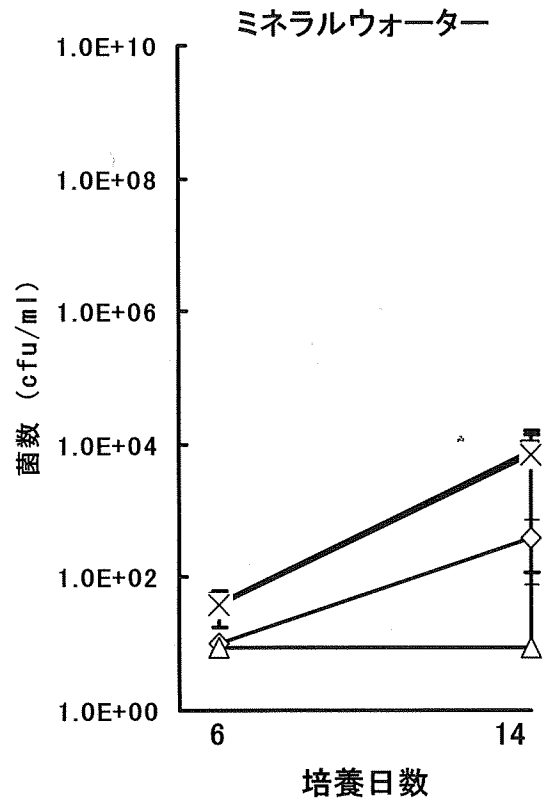
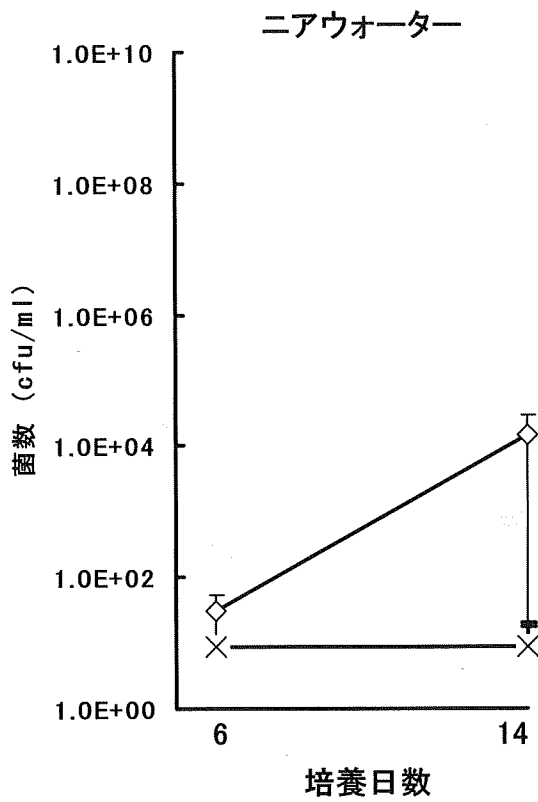
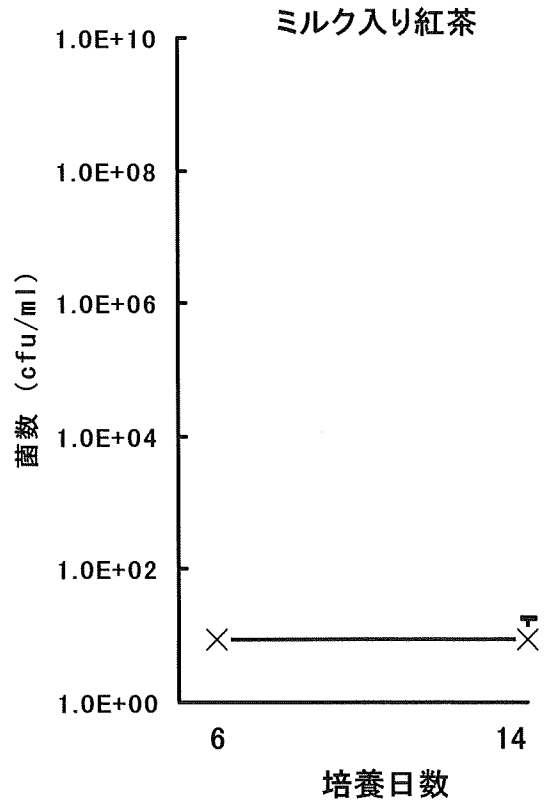
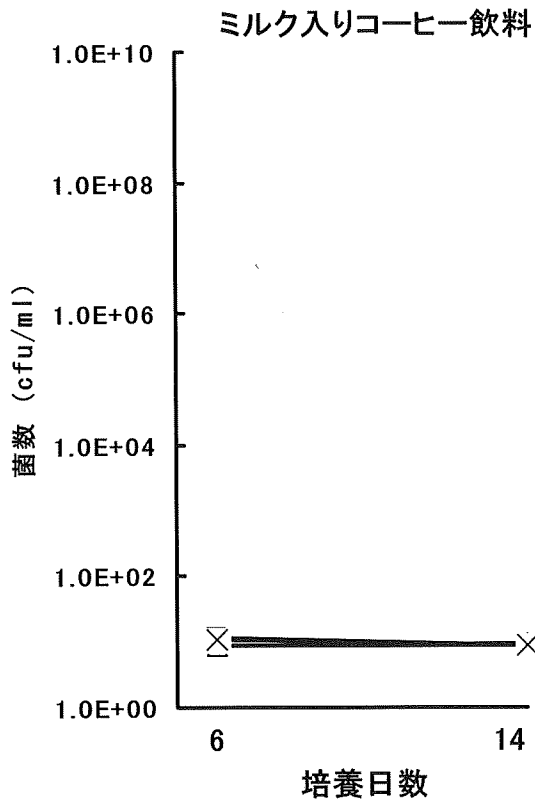


図 53 開封試験における平均菌数の推移

細菌 (X)、真菌 (◇)、大腸菌・大腸菌群 (△)、細菌+酵母 (□)  
 菌数は平均値±SE (n=20)で示す。

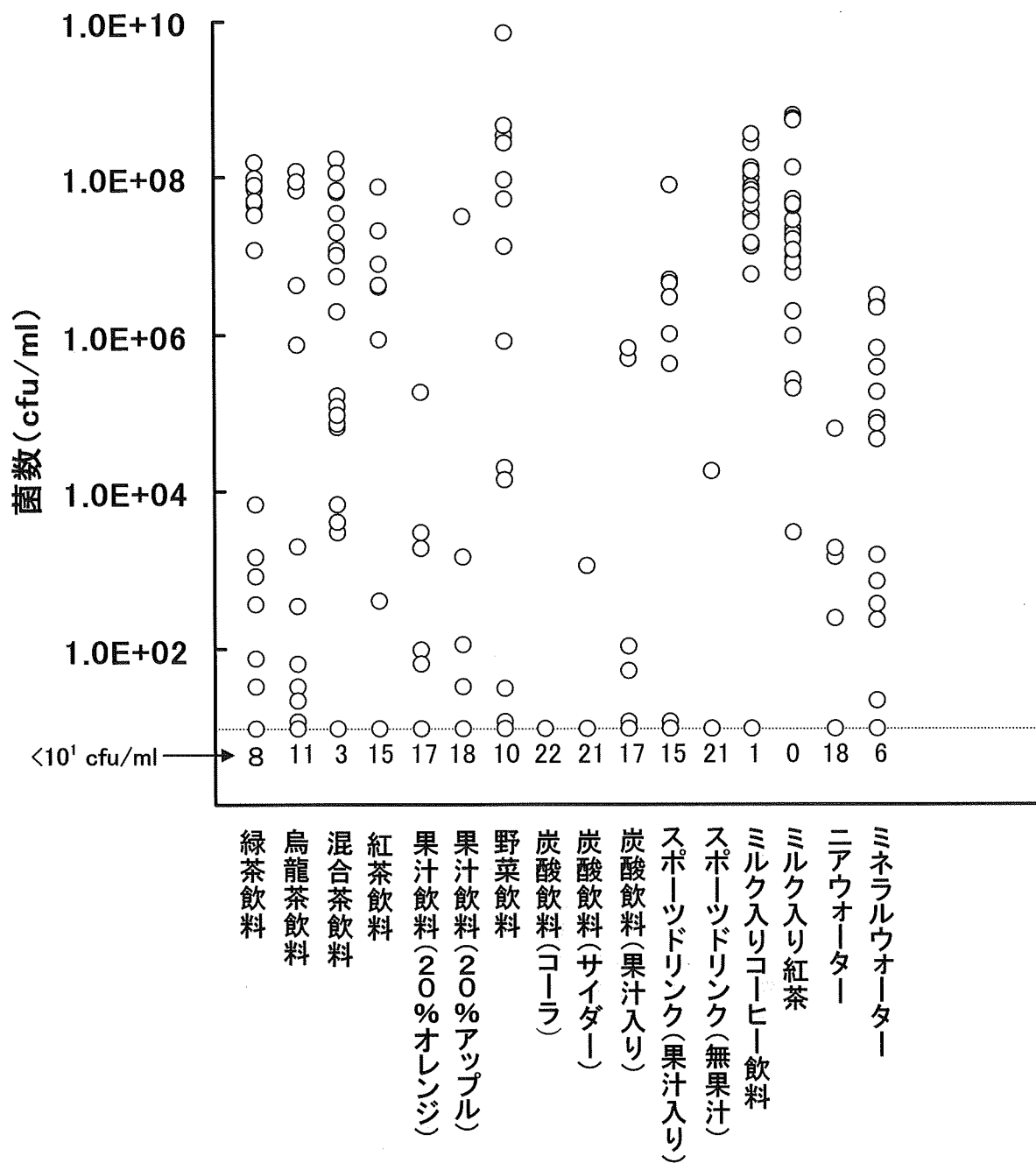


図 54 培養期間中に最も高かった検体ごとの細菌数(口飲み試験)

$<10^1$  cfu/ml: 検出限界以下の検体数

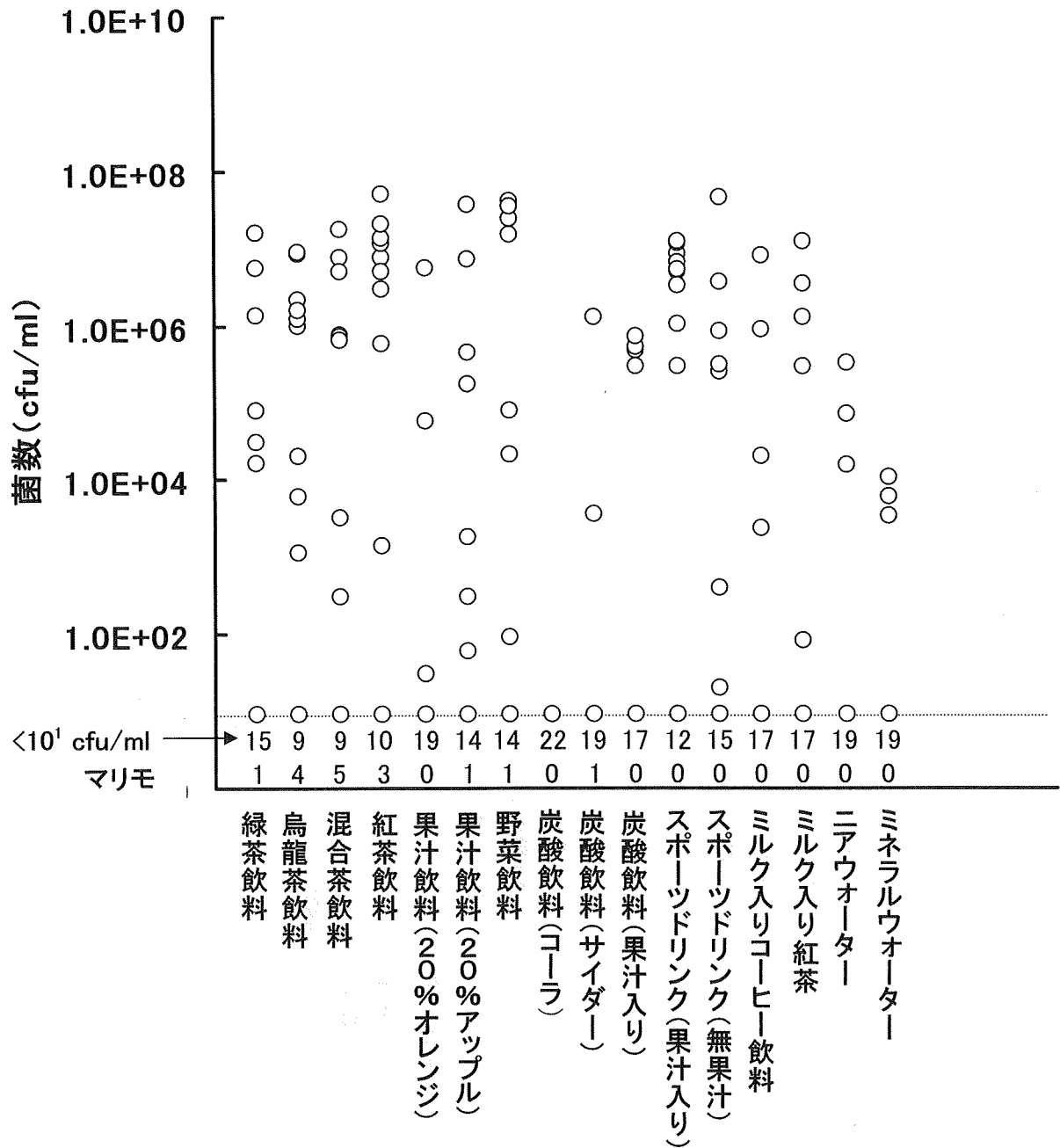


図 55 培養期間中に最も高かった検体ごとの真菌数(口飲み試験)

<math><10^1</math> cfu/ml: 検出限界以下の検体数; マリモ: カビがマリモ状の菌塊を形成したため菌数測定を行えなかった検体数。

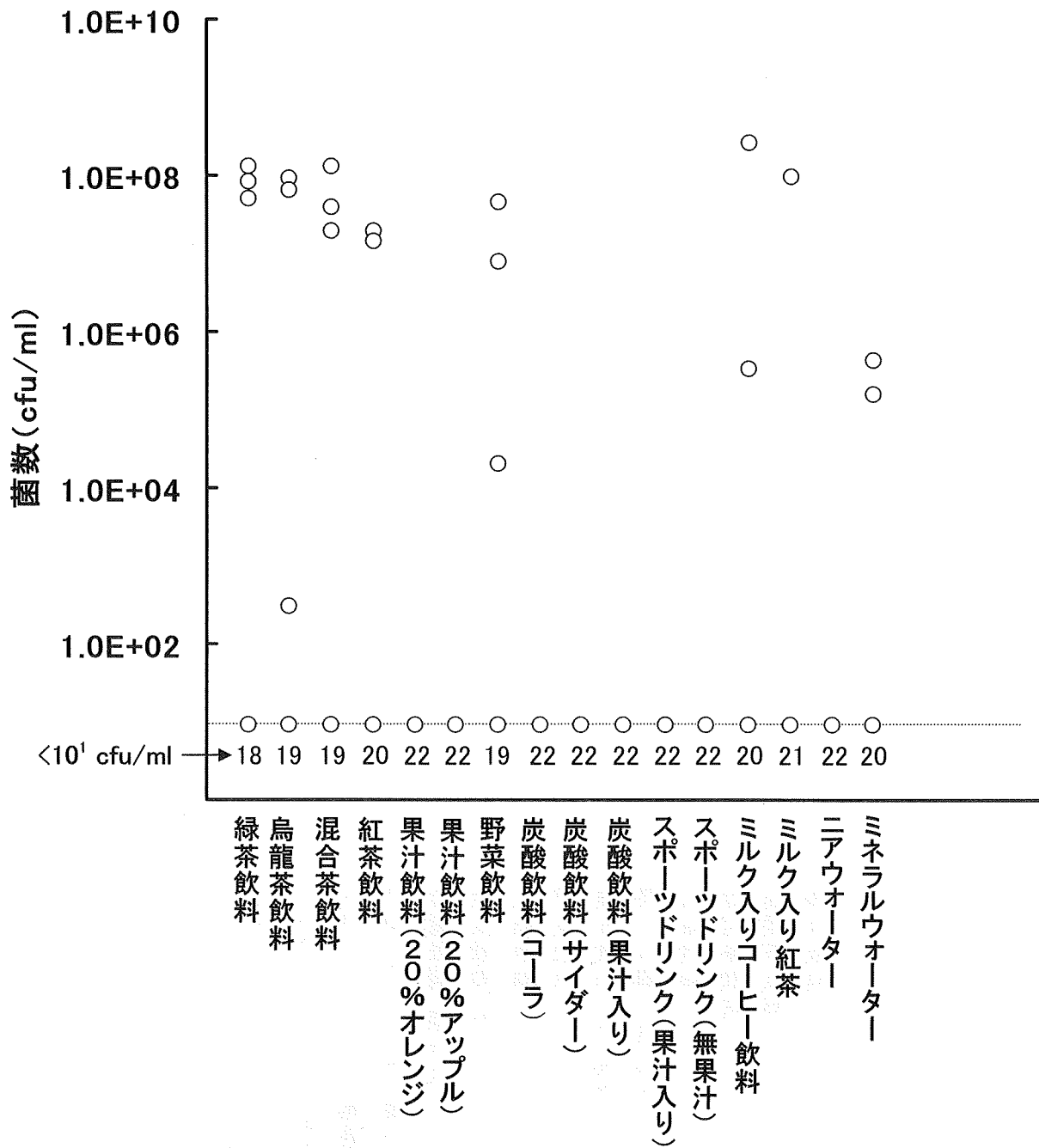


図 56 培養期間中に最も高かった検体ごとの大腸菌・大腸菌群の菌数(口飲み試験)

<math>10^1</math> cfu/ml: 検出限界以下の検体数

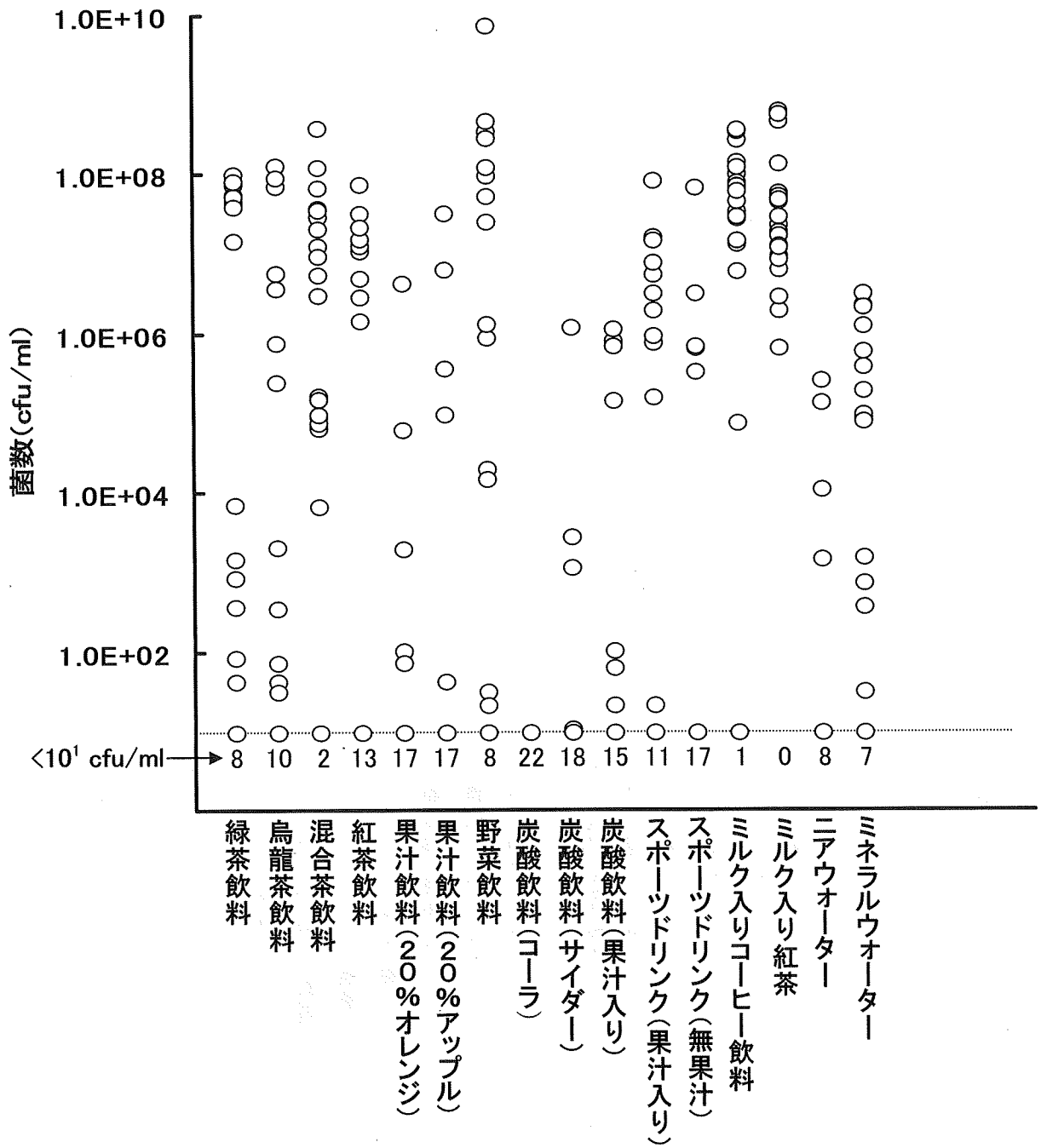


図 57 培養期間中に最も高かった検体ごとの細菌・酵母数(口飲み試験)

$<10^1$  cfu/ml: 検出限界以下の検体数

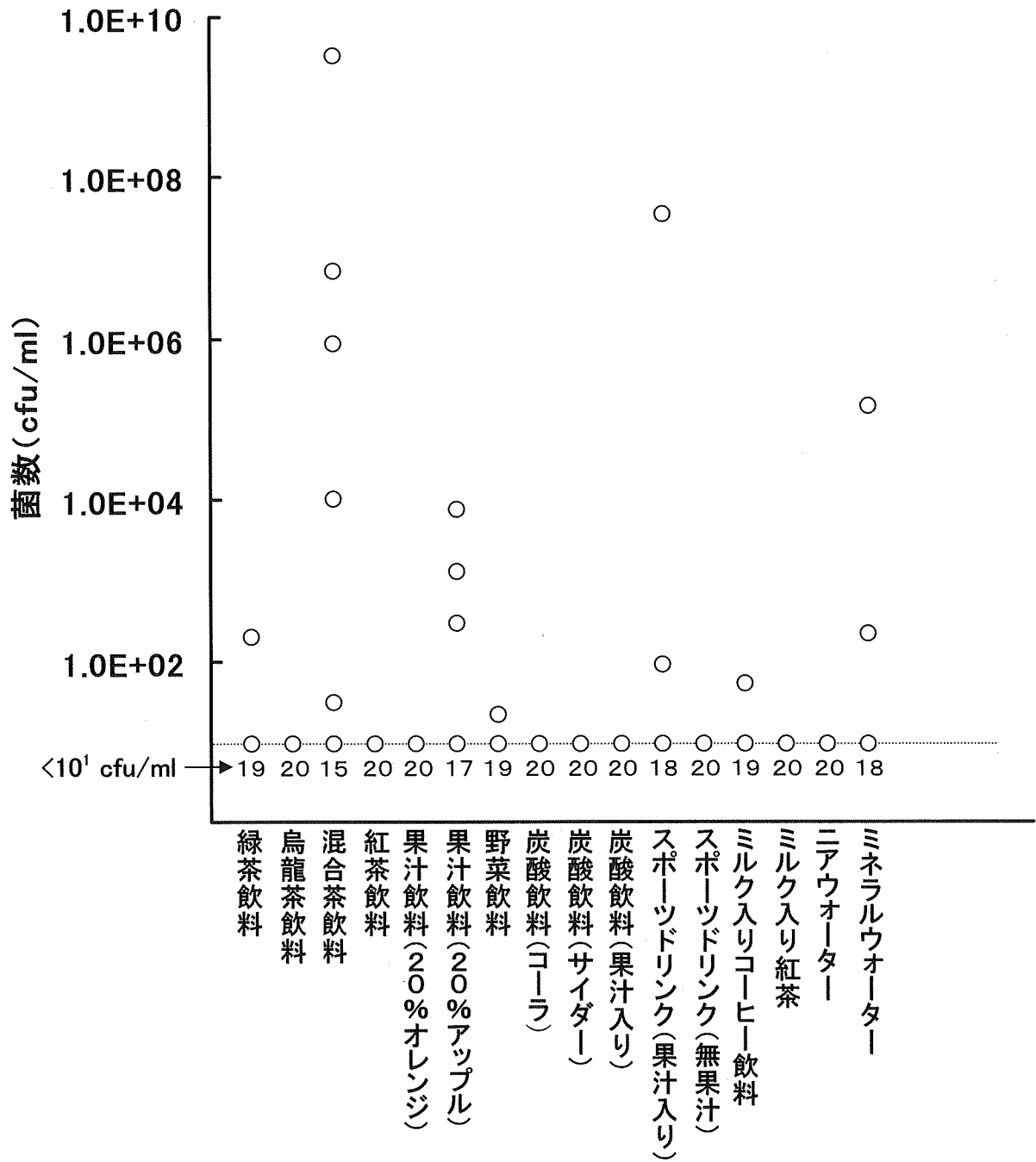


図 58 培養期間中に最も高かった検体ごとの細菌数(開封試験)

<math>10^1</math> cfu/ml: 検出限界以下の検体数

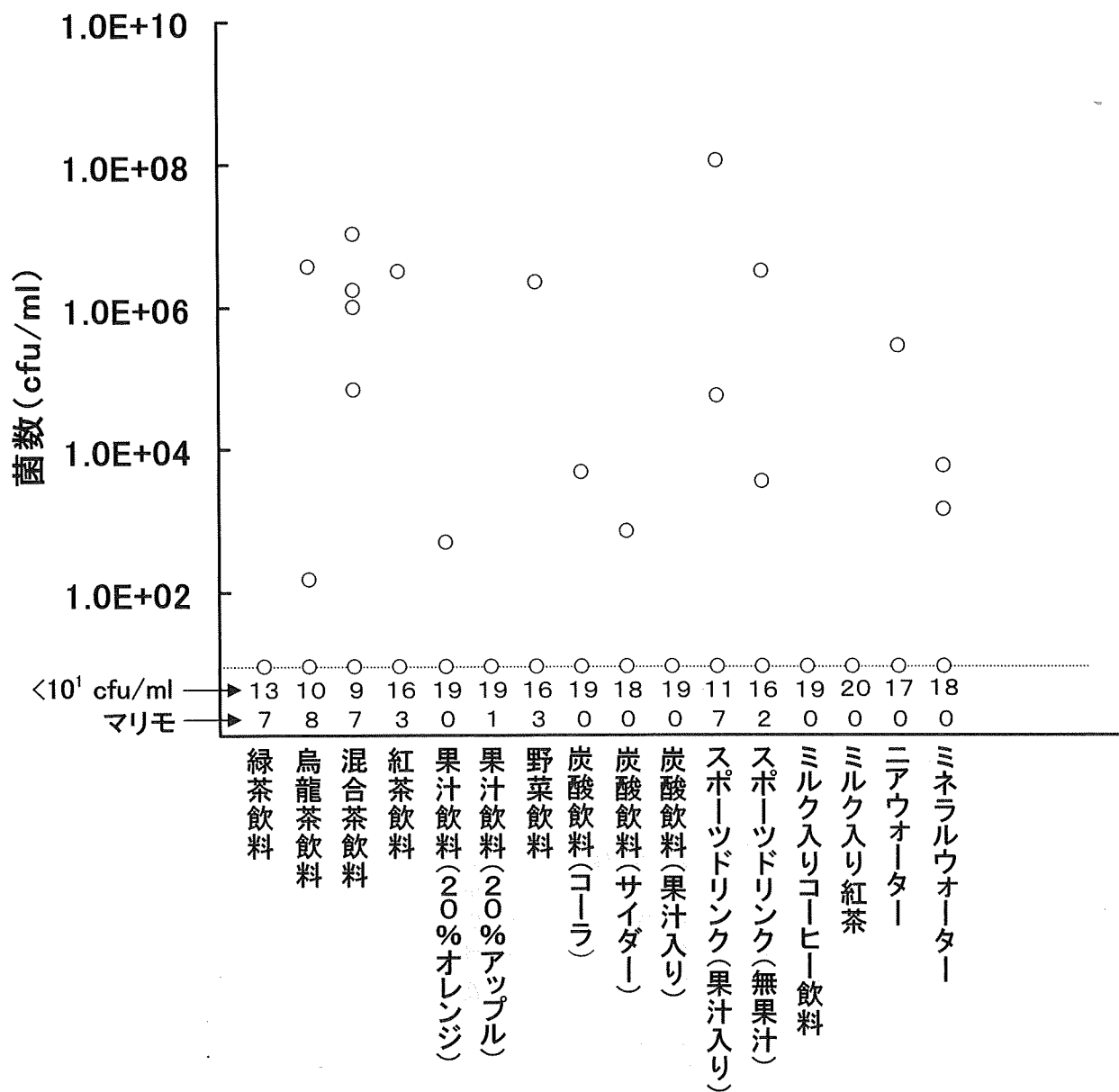


図 59 培養期間中に最も高かった検体ごとの真菌数(開封試験)

<math>< 10^1</math> cfu/ml: 検出限界以下の検体数; マリモ: カビがマリモ状の菌塊を形成したため菌数測定を行えなかった検体数

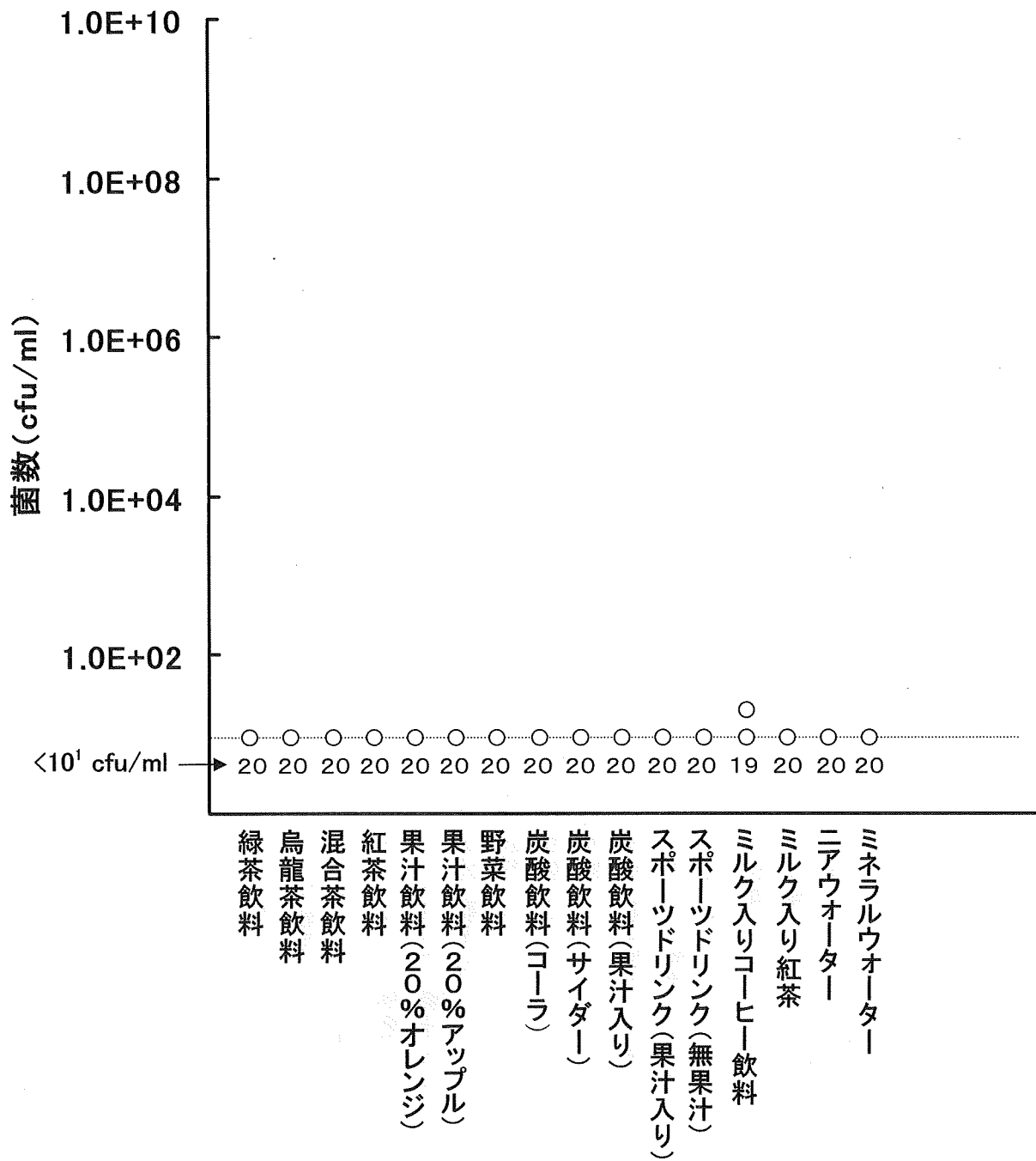


図 60 培養期間中に最も高かった検体ごとの大腸菌・大腸菌群菌数(開封試験)

<math>< 10^1</math> cfu/ml: 検出限界以下の検体数



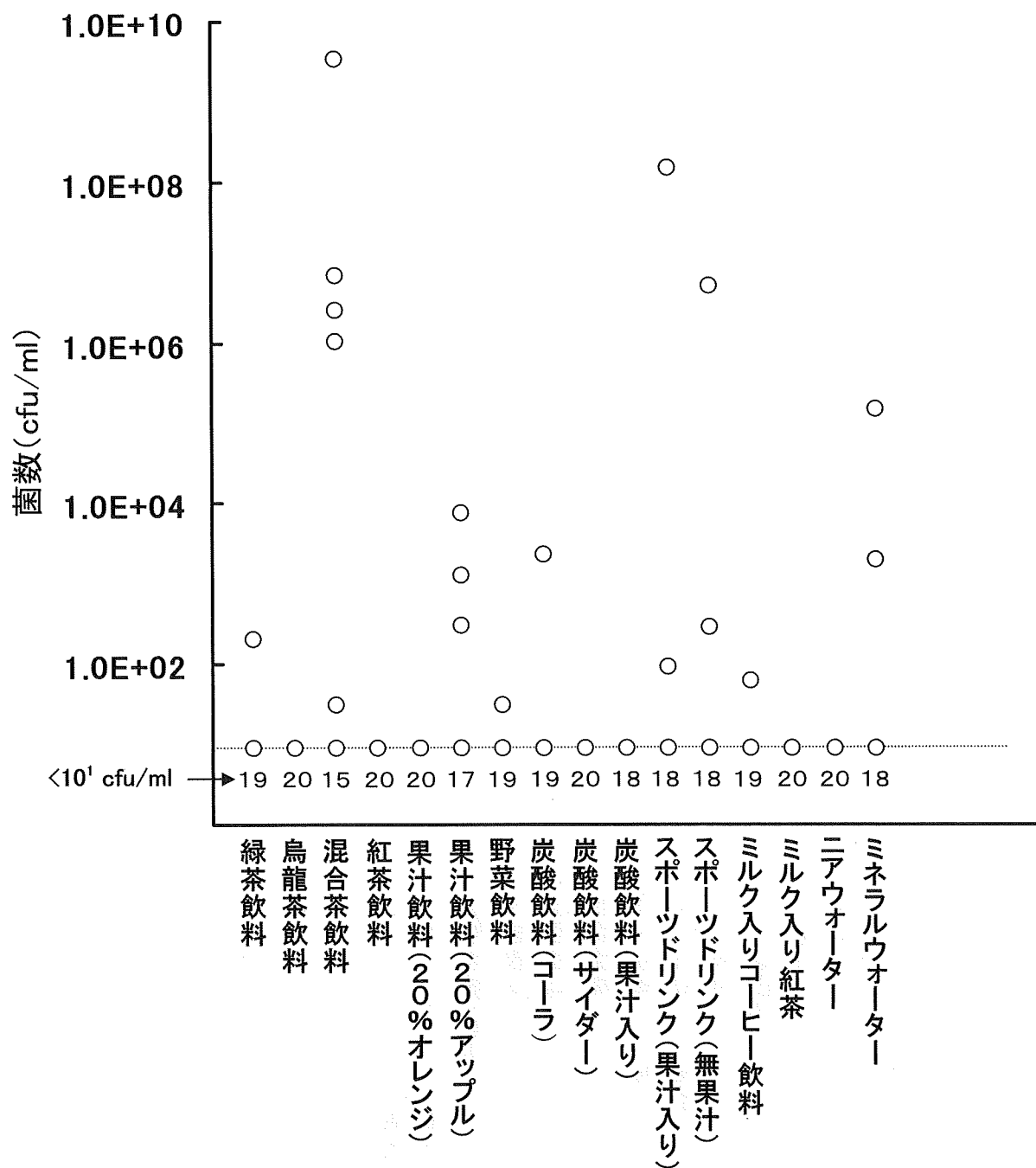


図 61 培養期間中に最も高かった検体ごとの細菌・酵母数(開封試験)  
 <math>< 10^1</math> cfu/ml: 検出限界以下の検体数

# 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

リムルス試験を用いた清涼飲料水中の細菌の

迅速検出法に関する研究

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

リムルス試験を用いた清涼飲料水中の細菌の迅速検出法に関する研究

#### 研究要旨

近年ではリムルス試験の発達がめざましく、グラム陰性菌の菌体成分であるエンドトキシン、細菌の菌体成分であるペプチドグリカン、また真菌の菌体成分である $\beta$ グルカン、それぞれを特異的に認識する試薬が開発されている。これらの試薬を用いれば特別な機器を必要とせずに、また 30 分から 1 時間程度と極めて短時間でおよその微生物の量を測定することが出来る。本研究では清涼飲料水における細菌汚染を検出する目的でエンドトキシン特異的リムルス試験の応用を試みた。今年度はエンドトキシン特異的リムルス反応を清涼飲料水中で利用できるかどうかを調べるための基礎的な研究として、反応干渉因子試験を行った。試験では段階希釈した緑茶飲料、ウーロン茶飲料、紅茶飲料、麦茶飲料、コーヒー飲料、炭酸飲料、スポーツ飲料、野菜飲料、果汁飲料、それぞれに 0.25 EU/ml のエンドトキシンを加えたものを検体としリムルス試験を行い、加えたエンドトキシンの回収率をもとめた。その結果、多くの飲料では 10 倍から 100 倍希釈するとリムルス反応の阻害は見られなくなり、エンドトキシンを測定することができた。しかし、野菜飲料のように 10000 倍希釈しなければ測定できないものも存在した。今後さらにサンプル数を増やして試験を行い、飲料種ごとの傾向を明らかにしていく必要が認められた。

#### 研究協力者

後藤 慶一 (三井農林株式会社 食品総合研究所)

#### A. 研究目的

地方自治体や製造業者の消費者窓口には清涼飲料水についての苦情や問い合わせが寄せられている。現場では持込まれた苦情に対して試験を計画し、苦情の原因を突き止めて行かなければならない。しかし最終的な原因を同定する以前の段階でも、苦情を訴えた消費者に対応するために、その苦情が正当なものであるかどうか、正当なも

のであるならば原因が微生物であるかどうか、微生物が原因の場合、原因微生物が細菌であるか真菌であるかなどの情報が速やかに必要とされる。しかし、菌量が少ない場合や清涼飲料水自体の色や濁度のために肉眼で微生物の存在をすぐに確認できない場合も多い。また、培養法では細菌の場合で少なくとも 1 日、真菌の場合は 7 日程度と時間がかかるのが難点である。そのため、消費者か

らの苦情があった場合に迅速に微生物の存在を確認できる試験法の開発が必要である。

リムルス試験はカプトガニの血液がグラム陰性菌の菌体成分であるエンドトキシンや真菌の菌体成分である $\beta$ グルカンと反応すると凝固することを利用した試験法である。当初はエンドトキシンと $\beta$ グルカンとを区別することができなかったが、やがてエンドトキシンに特異的なリムルス試験試薬が開発され、1 pg/ml の極めて低濃度のエンドトキシンを検出できるようになった。近年では $\beta$ グルカン特異的なリムルス試験試薬も開発され、臨床分野における深在性真菌症の診断薬として利用されている。またカプトガニの血液ではないが、カイコの体液が細菌の菌体成分であるペプチドグリカンと $\beta$ グルカンに反応して凝固することを利用した試薬も市販されている。リムルス試験を用いる利点として、

- 非常に高感度である。
- 試験方法は 96 ウェル プレート上でサンプルと試薬を混合するだけで、誰にでも行うことができる。
- 反応時間が 30 分と非常に短時間である。
- 特別な機器を必要とせず、プレートリーダーがあればどこでも行うことができる。

などがある。

このようにリムルス試験には多くの利点があるため、医薬品の製造管理や臨床分野における診断には古くから利用されている。しかし、食品分野においてはリムルス試験の応用はあまり進んでいない。その理由の一つとして食品は多くの成分からなるため、これらの成分がリムルス反応に干渉し定量性が損

なわれやすいことが挙げられる。リムルス反応はサンプルの pH や金属イオン等によって干渉を受けることが知られている。これらの干渉に対してはサンプルの pH の調節を行ったり、サンプルにキレート剤を加えたりすることなどが考案されているが、このような操作は外部からのエンドトキシン汚染を招く可能性がある。また、食品中には未知の干渉因子が存在している可能性がある。さらに飲料種によっては濃い色調を持っており透明度の低いものが存在し、リムルス反応の測定に影響を及ぼす。このようなことから、最も効率的で汚染の少ないサンプルの調整法は、サンプルをエンドトキシンを含まない注射用水で希釈することであると思われる。

本研究では清涼飲料水における細菌汚染を検出する目的でエンドトキシン特異的なリムルス試験の応用を試みた。応用にあたってまず本年度は反応干渉因子試験を行い、各飲料種におけるリムルス反応の干渉程度を測定すると同時に、リムルス反応を干渉しないサンプルの希釈倍率を求めた。

## B. 研究方法

### 1. サンプル

緑茶飲料(おーいお茶、伊藤園)、烏龍茶飲料(烏龍茶、サントリー)、紅茶飲料(午後の紅茶 ミルクティー、キリン)、麦茶飲料(六条麦茶、カゴメ)、コーヒー飲料(ドトール カフェオレ、JT)、炭酸飲料(コカ・コーラ、日本コカ・コーラ)、スポーツ飲料(ポカリスエット、大塚製薬)、野菜飲料(野菜ジュース、カゴメ)、果汁飲料(ミニッツメイド 朝の健康果実、日本コカ・コーラ)を試験に用いた。コーヒー飲料、紅茶飲料は共に砂糖とミルク成分を含む銘柄を選んだ。野菜飲料は複数の野菜汁