

を含む野菜汁 100% の銘柄を用いた。果汁飲料は複数の果汁を含む果汁 100% の銘柄を用いた。

## 2. リムルス試験

エンドトキシンの測定にはエンドスペシー(株式会社 生化学工業)を用いた。エンドトキシンは試薬添付の説明書の指示に従いエンドポイント法で測定した。エンドトキシン標準品を用いて試験ごとに検量線を作成した(0.5、0.25、0.125、0.0625、0 EU/ml の 5 点)。エンドトキシン標準品は日本薬局方標準品(財団法人 日本公定書協会)を用いた。

## 3. 反応干渉因子試験

各飲料を注射用水(大塚製薬)を用いて 10 倍段階希釈を行い、希釈したサンプル(以下、エンドトキシン非添加サンプル)に最終 0.25 EU/ml になるようにエンドトキシン標準品を加えたもの(以下、エンドトキシン添加サンプル)を作成した。これらのサンプルを用いてリムルス試験を行い、エンドトキシン添加サンプルの測定結果からエンドトキシン非添加サンプルの測定結果を引いた値を算出し、検量線からエンドトキシン濃度を求めた。得られたエンドトキシン濃度から添加したエンドトキシンの回収率を求めた。1 つのサンプルにつき 3 ウェルの測定を行い平均値を出し、これをこの回の結果とした。この実験を 3 回繰り返し、3 回の結果の平均値±標準誤差(n=3)で最終的な結果を表した。日本薬局方に従い、回収率が 50% から 200% の範囲にある時、リムルス試験が成立したものとみなした。

## C. 研究結果

今回は 9 種類の飲料から各 1 銘柄ずつ選び、これらの飲料がリムルス反応に干渉する

かどうか調べた。ほとんどの飲料で 10 から 100 倍希釈を行うことによって飲料によるリムルス反応への干渉を取り除くことができた。しかし、野菜飲料のように 10000 倍希釈を行わなければ測定できない飲料種も存在した。以下に飲料種ごとの結果の詳細を示す。

### 1. 緑茶飲料

緑茶飲料は濃い色調を持つが、10 倍希釈を行うことによってサンプルはほとんど無色になった。リムルス反応に対する干渉も殆ど見られず、10 倍希釈から安定した回収率を得ることができた(図 1)

### 2. 烏龍茶飲料

烏龍茶飲料も濃い色調を持つが、10 倍希釈を行うことによってサンプルはほとんど無色になった。烏龍茶飲料は 10 倍希釈では低い回収率しかえることができなかったが、100 倍以上の希釈で安定した回収率を得ることができた(図 2)。

### 3. 紅茶飲料

今回の試験には砂糖とミルク成分を含む銘柄を用いたが、ミルク成分の影響で非常に濃い色調を有しており、透明度もなかった。100 倍希釈を行ってもサンプルに若干の着色が見られたが、1000 倍以上の希釈でサンプルはほとんど無色になった。1000 倍以上の希釈でリムルス反応への干渉は見られなくなり、安定した回収率を得ることができた(図 3)。

### 4. 麦茶飲料

麦茶飲料も濃い色調を持つが、10 倍以上の希釈を行うとほとんど無色になった。10 倍希釈ではリムルス反応が完全に阻害されたが、100 倍以上の希釈で測定することができた(図 4)。

### 5. コーヒー飲料

コーヒー飲料は砂糖とミルク成分を含ものを試験に用いた。そのため、非常に濃い色調を有しており、透明度はなかった。100 倍以上の希釈を行わなければサンプルは無色にならなかった。しかし、回収率は 10 倍希釈から非常に良かった。10 倍から 1000 倍までは希釈ごとに回収率が上昇しているが、おそらく飲料中に含まれる反応干渉因子が希釈と共に減少していったことを反映していると思われる(図 5)。

#### 6. 炭酸飲料

今回用いた炭酸飲料は濃い色調を有しており、100 倍以上の希釈を行わなければ無色にならなかった。回収率は 10 倍希釈から高い回収率を得ることができた(図 6)

#### 7. スポーツ飲料

スポーツ飲料は 10 倍希釈からほとんど無色であった。回収率は 10 倍希釈から安定した結果が得られ、リムルス反応に対する阻害は殆ど見られなかった(図 7)。

#### 8. 野菜飲料

今回試験に用いた野菜飲料は非常に濃い色調を有し透明度はなく、固形成分を多く含むものであった。色調は 1000 倍以上の希釈を行わなければ無色にならず、また 1000 倍希釈でも若干の固形成分の浮遊が認められた。そのためか、1000 倍以上の希釈を行わなければリムルス反応は完全に阻害された。10000 倍以上の希釈を行うと良好な回収率を得ることができた(図 8)。

#### 9. 果汁飲料

今回は果汁 100% の果汁飲料を試験に用いた。野菜飲料と同様に非常に濃い色調を有しているが、野菜飲料ほど固形成分は多くなかった。色調は 1000 倍以上の希釈でほぼ無色になった。100 倍希釈まではリムルス反

応は完全に阻害されたが、1000 倍以上の希釈で良好な回収率を得ることができた(図 9)。

#### D. 考察

反応干渉因子の影響を取り除くことができる飲料ごとの希釈倍率を今回得られた結果から求め表 1 に示した。多くの飲料種で 10 から 100 倍希釈を行うことによって反応干渉因子の影響を取り除くことができ、リムルス反応を測定することができた。リムルス試験によるエンドトキシンの検出限界はおおよそ 1 pg/ml であるため、この程度の希釈倍率ならば十分細菌汚染を検出できるものと考えられる。しかし、野菜飲料、果汁飲料、紅茶飲料は 100 倍希釈でもリムルス反応への干渉が見られ、特に野菜飲料では 10000 倍希釈を行わなければ正常にリムルス反応を測定することができなかった。干渉因子としては様々なものが考えられるが、食品のような複雑な組成のものでは特定の因子を同定するのは難しいと思われる。また野菜飲料のように天然材料を原料とする場合、原料中に含まれるエンドトキシン量が多いため測定結果に影響が出た可能性もある。今後、これらの飲料種における干渉因子の影響を取り除く方法を考える必要性が認められた。

#### E. 結論

今回の結果から多くの飲料種で 10 倍から 100 倍希釈することにより、飲料中の反応干渉因子を取り除くことができ、リムルス反応を測定することができた。リムルス試験によるエンドトキシンの検出限界は約 1 pg/ml なので、この程度のサンプルの希釈なら細菌汚染を検出するのに十分な感度を維持できると思わ

れる。

今回の実験では各飲料カテゴリーにつき1銘柄の飲料を選んで実験を行ったが、同じカテゴリーに属する飲料でもその成分は様々であると思われる。次年度ではさらに多くの銘柄の試験を行いデータを充実させると共に、エンドトキシン量と菌数との相関の検討を行い、最終的に生菌を用いた添加回収試験を行う予定である。

#### F. 研究発表

特になし

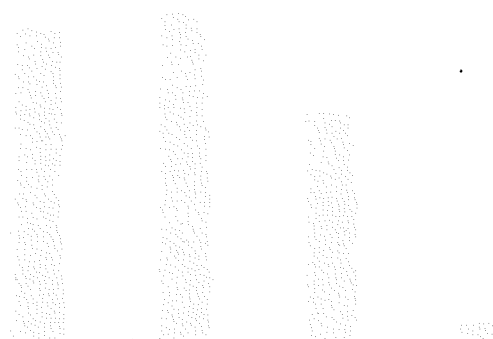


図-3-10-1

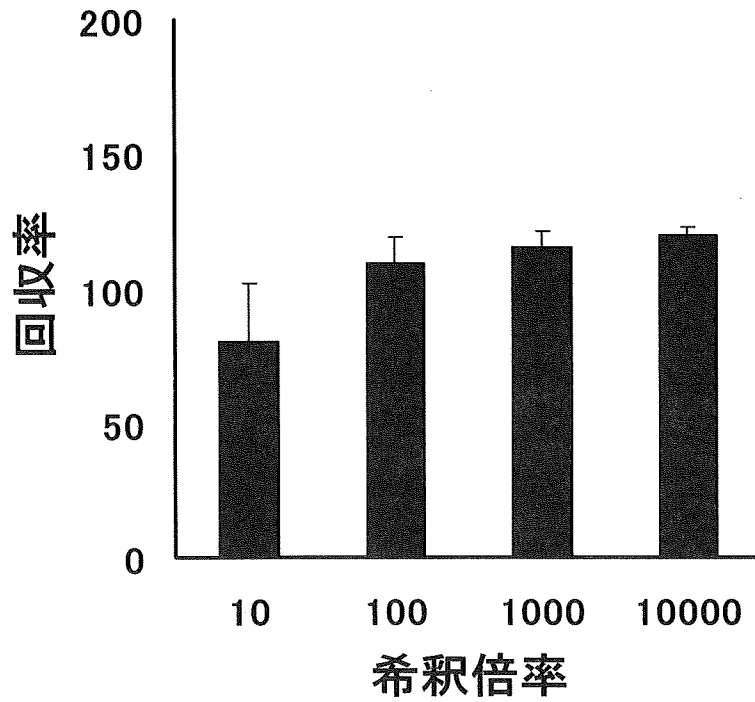


図1 緑茶飲料によるリムルス反応への干渉とサンプルの希釈倍率との関係

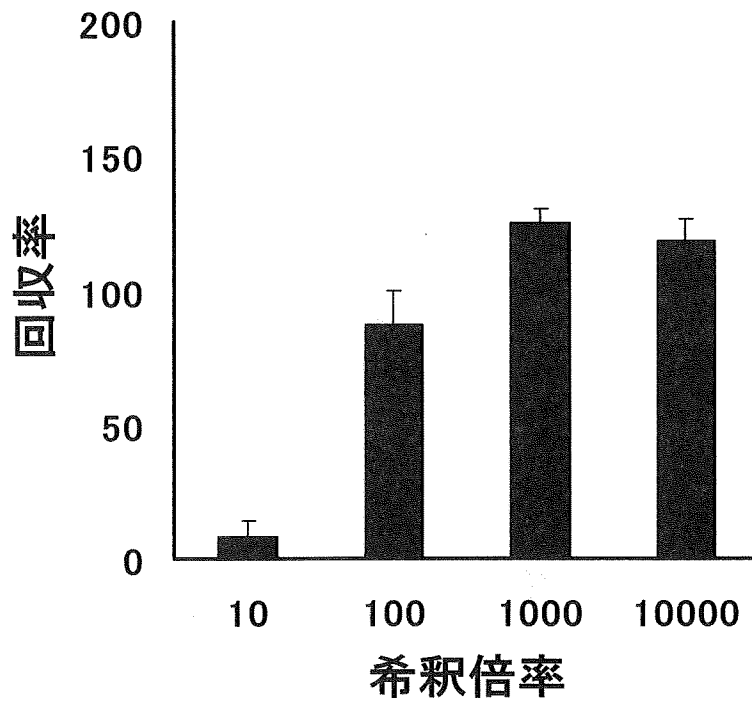


図2 烏龍茶飲料によるリムルス反応への干渉とサンプルの希釈倍率との関係

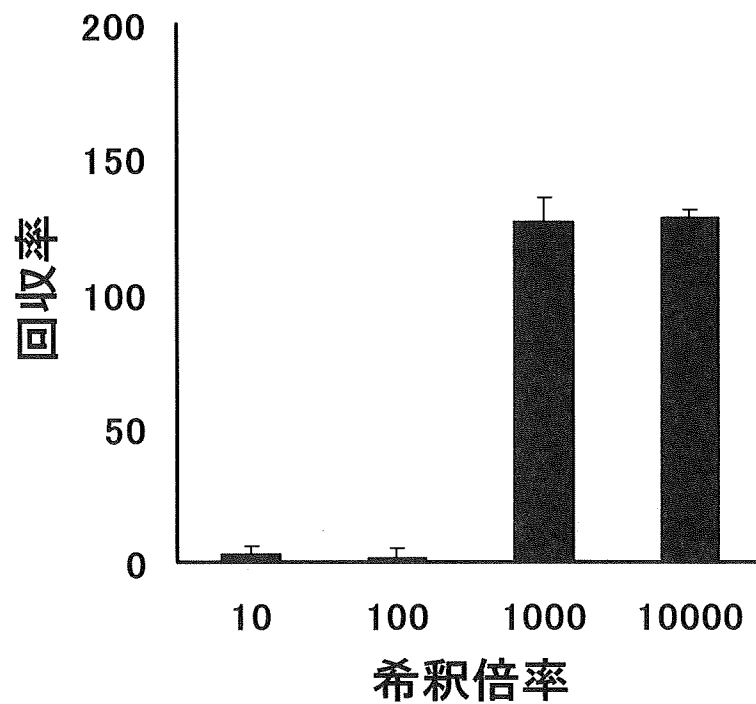


図3 紅茶飲料によるリムルス反応への干渉とサンプルの希釈倍率との関係

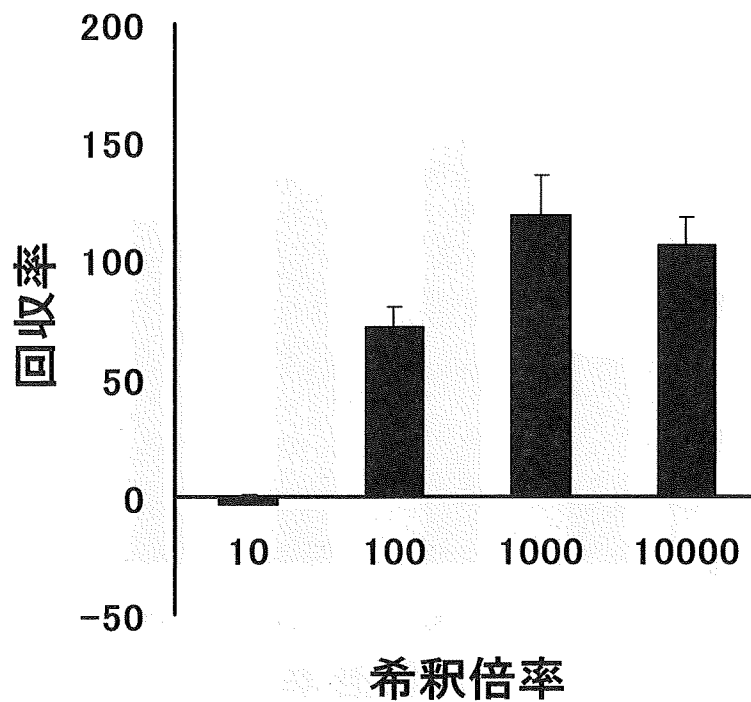


図4 麦茶飲料によるリムルス反応への干渉とサンプルの希釈倍率との関係

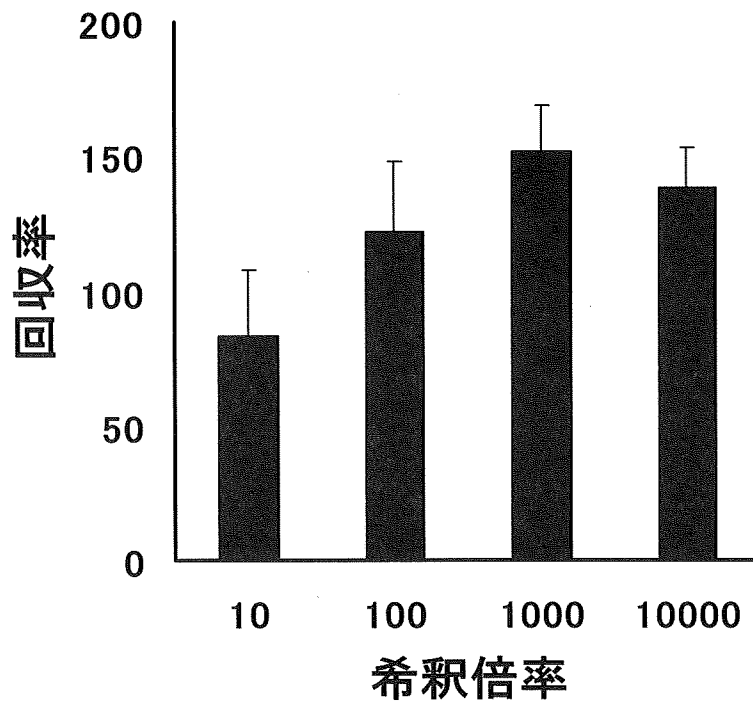


図5 コーヒー飲料によるリムルス反応への干渉とサンプルの希釈倍率との関係

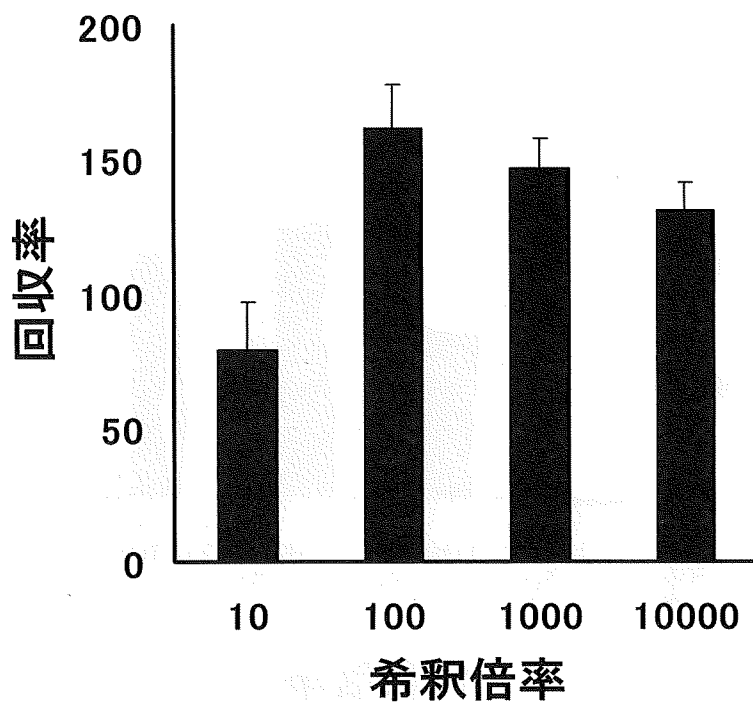


図6 炭酸飲料によるリムルス反応への干渉とサンプルの希釈倍率との関係

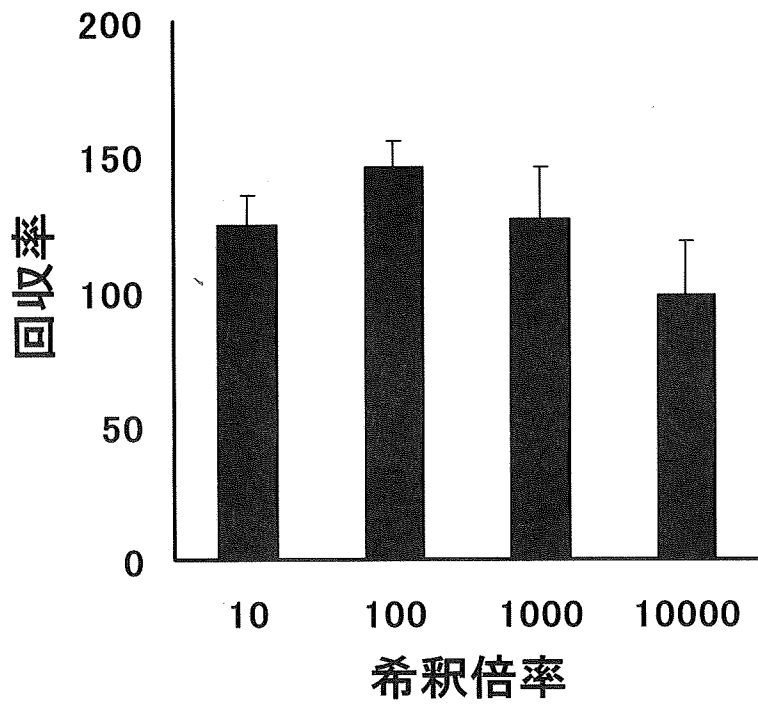


図7 スポーツ飲料によるリムルス反応への干渉とサンプルの希釈倍率との関係

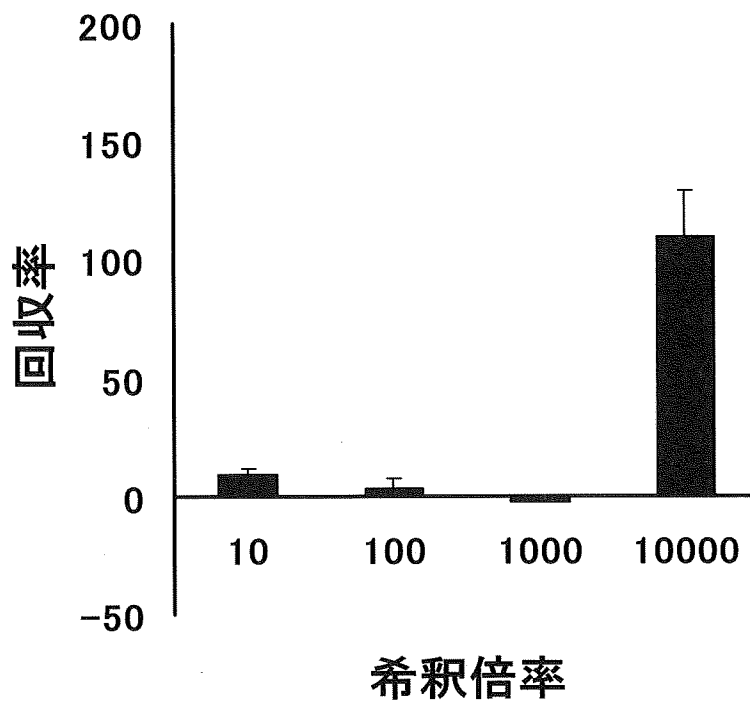


図8 野菜飲料によるリムルス反応への干渉とサンプルの希釈倍率との関係

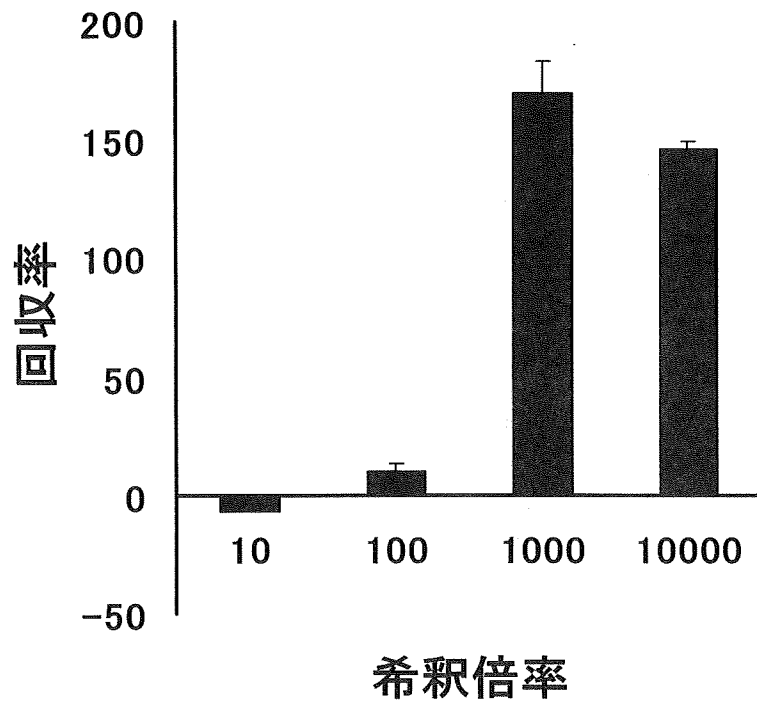


図9 果汁飲料によるリムルス反応への干渉とサンプルの希釈倍率との関係

表 1 反応干渉因子を取り除くのに必要な各飲料の希釈倍率

飲料種名	希釈倍率
緑茶飲料	10
烏龍茶飲料	100
紅茶飲料	1000
麦茶飲料	100
コーヒー飲料	10
炭酸飲料	10
スポーツ飲料	10
野菜飲料	10000
果汁飲料	1000



# 委託研究報告書

清涼飲料水からの真菌の基本的な形態及び同定に関する

簡易マニュアル

高鳥 浩介

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)

### 委託研究報告書

清涼飲料水からの真菌の基本的な形態及び同定に関する簡易マニュアル

高鳥 浩介 NPO 法人カビ相談センター

#### 研究要旨

清涼飲料水からの検出頻度が最も高い真菌の属または一部の種を対象とした基本的な形態及び同定に関する簡易マニュアルを作成した。簡易マニュアルは、検出頻度が最も高い属または一部の種を対象とし必ず現れる極めて特徴的な性質を示した場合に用いることのできるもの、およびこれよりも対象とする属または種を増やし特徴的な性質を有するが簡易に同定するための手法がない菌株を対象としたものの2つに分けて作成した。形態学的指標としては、集落の色調、集落の湿性・乾性性状、集落の大きさ、孢子細胞数、発育可能な培地、発育可能な培養温度、集落の寒天培地上での色素産生能、および集落が発する臭気を用いた。PDA、さらに必要に応じて M40Y 寒天培地に菌体を接種し、培養して得られた集落を用いて、集落の色調・性状などを観察した。また、集落から菌体を釣菌し、プレパラートを作製して光学顕微鏡による観察を行った。その結果、必ず現れる基本的な形態学的特徴を呈している培養菌株については、清涼飲料水からの検出頻度が高い属または種を対象を絞ることによって同定を簡易に行えることが示された。また、必ずしも現れない形態学的特徴を呈した場合や同定の対象となる属および種を増やした場合には、複数の特徴に基づいた同定が重要であることが示された。

#### A. 研究目的

清涼飲料水においては、過去に国内外での異物混入事例が報告されている(1、2)。清涼飲料水の真菌による異物混入やそれらの喫食事故を未然に防ぐためには、汚染真菌の生態学的特徴を把握した上での適切な衛生指導が重要であり、そのための情報として原因菌の正確な同定が不可欠である。しかし、清涼飲料水からの一般的な真菌同定手法マニュアルは確立されておらず、同定が困難となっている。そこで本研究では、清涼飲料水からの検出頻度が高いために

重要な真菌を対象として、基本的な形態学的特徴を指標とした簡易同定マニュアルを作成した。

#### B. 研究方法

簡易マニュアルを(a). 清涼飲料水由来真菌の簡易同定手法1および(b). 清涼飲料水由来真菌の簡易同定手法2に分けて作成した。(a). 清涼飲料水由来真菌の簡易同定手法1とは、検出頻度が最も高い属または一部の種計 24 属または種を対象とし(表1)、必ず現れる極めて特徴的な性質を示した場

合に用いることのできる簡易同定マニュアルである。(b). 清涼飲料水由来真菌の簡易同定手法2とは、(a)よりも対象とする属または種を計 51 属または種に増やし(表1)、特徴的な性質を有するが(a)のように簡易に同定するための手法がない菌株を対象とした簡易同定マニュアルである。(a)については①集落色調による判別法および②孢子細胞数による判別法に分けて、また(b)については①集落色調による判別法、②湿性集落・乾性集落による判別法、③集落の大きさによる判別法、④孢子細胞数による判別法、E. 培地による判別法、⑤培養温度による判別法、⑥色素産生による判別法および⑦臭気による判別法に分けて作成した。

この際に行う培養方法は以下の通りである。最初に、potato dextrose agar (PDA; 栄研化学、東京)さらに必要に応じて好稠性真菌の発育に適する M40Y 寒天培地(3)に菌体を接種し 25 度または必要に応じて 30 度以上で 10 日から 14 日間培養した。次に、形成された集落の色調・性状などを観察した。この後、集落から菌体を釣菌し、プレパラートを作製した。この際には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。作製したプレパラートは光学顕微鏡を用いて観察し、孢子の着色の有無および孢子形状の確認を行った。

## C. 結果

### (a). 清涼飲料水由来真菌の簡易同定手法

#### 1

#### ①集落色調による判別法

まず、PDA 上に形成された集落を、暗色

系集落および明色系集落に分類する。

次に、暗色系集落を、黒色、オリーブ色、緑色および紫色を呈するグループに分類する。黒色集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Alternaria*、粉状を呈する場合は *Aspergillus niger*、またビロード状を呈する場合は *Exophiala* であると同定される。これらの属または種と同定するにあたり、類似の性状を示す属または種を区別するために、特に著しい特徴を確認する必要がある。*Alternaria* では孢子形態、*Aspergillus niger* では頂のう、*Exophiala* では孢子集合体を確認する。オリーブ色集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Chaetomium*、またビロード状を呈する場合は *Cladosporium* であると同定される。*Chaetomium* では子のうを形成することが著しい特徴として挙げられ、これを確認する必要がある。

*Cladosporium* では集落色調が特に著しい特徴である。緑色集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Trichoderma* であると同定される。本属の特に著しい特徴は、発育が早く著しく大きい集落である。紫色集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Fusarium* であると同定される。本属は、特徴的な孢子形態をとることが著しい特徴として挙げられ、これを確認する必要がある。

また、明色系集落を、白色、クリーム色、緑色、朱色および黄色を呈するグループに分類する。白色集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Absidia*、粉状を呈する場合は *Geotrichum*、またビロード状を呈する場合は *Saccharomyces* であると同定される。これらの属では、*Absidia* では発育が早く著

しく大きい集落、*Geotrichum* では臭気、*Saccharomyces* では発酵臭が著しい特徴として挙げられ、これらを確認する必要がある。クリーム色集落を呈するグループでは、ビロード状を呈する場合は *Acremonium* であると同定される。本属は、特徴的な孢子集合体を形成することが著しい特徴として挙げられ、これを確認する必要がある。緑色集落を呈するグループでは、粉状を呈する場合は *Penicillium* であると同定される。本属は、ペニシリを形成することが著しい特徴として挙げられ、これを確認する必要がある。朱色集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Monascus* であると同定される。本属は、子のうを形成することが著しい特徴として挙げられ、これを確認する必要がある。黄色集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Epicoccum* であると同定される。本属は、集落色調が特に著しい特徴である。

## ②孢子細胞数による判別法

まず、作製したプレパラートを検鏡して孢子を観察し、単細胞孢子形成株および二細胞以上の孢子形成株に分類する。

次に、単細胞孢子形成株を、無色孢子形成株および有色孢子形成株に、さらに単細胞孢子形成株を菌糸に隔壁が有る株、菌糸に隔壁が無い株および酵母型菌株に分類する。無色孢子形成株で菌糸に隔壁が有る株のグループでは、集落が粉状でクリーム色を呈する場合は *Geotrichum*、粉状で緑色を呈する場合は *Penicillium*、集落が粉状であずき色を呈する場合は *Wallemia*、集落が粉状でその他の色を呈する場合は *Paecilomyces*、集落が綿状を呈する場合は

*Trichoderma*、集落がビロード状でクリーム色を呈する場合は *Acremonium*、集落がビロード状で暗色を呈する場合は *Phoma* と同定される。無色孢子形成株で菌糸に隔壁が無い場合は *Rhizopus* と同定される。無色孢子形成株で酵母型である場合は *Candida*、*Saccharomyces* または *Zygosaccharomyces* と同定される。有色孢子形成株のグループでは、集落が綿状を呈する場合は *Arthrinium* または *Chaetomium*、粉状を呈する場合は *Nigrospora*、ビロード状を呈する場合は *Cladosporium* または *Exophiala* と同定される。

また、二細胞以上の孢子形成株を、無色孢子形成株および有色孢子形成株に分類する。無色孢子形成株のグループでは、集落が綿状を呈する場合は *Fusarium*、集落が粉状を呈する場合は *Trichothecium* と同定される。有色孢子形成株のグループでは、集落がビロード状を呈する場合は *Curvularia*、集落が粉状を呈する場合は *Stachybotrys* と同定される。

## (b). 清涼飲料水由来真菌の簡易同定手法 2

### ①集落色調による判別法

まず、PDA 上に形成された集落を、暗色系集落および明色系集落に分類する。

次に、暗色系集落を、黒色、灰色、オリーブ色、緑色、褐色および紫色を呈するグループに分類する。黒色集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Alternaria* または *Stachybotrys*、粉状を呈する場合は *Curvularia* または *Aspergillus niger*、またビロード状を呈する場合は *Exophiala* または

*Aureobasidium* であると同定される。灰色集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Nigrospora*、また粉状を呈する場合は *Aspergillus ustus* であると同定される。オリーブ色集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Chaetomium*、粉状およびビロード状を呈する場合は *Cladosporium* であると同定される。緑色集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Trichoderma*、粉状を呈する場合は *Penicillium* または *Aspergillus fumigatus* であると同定される。褐色集落を呈するグループでは、綿状を呈するグループでは *Drechslera*、*Alternaria* または *Ulocladium* であると同定される。紫色集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Fusarium* であると同定される。

また、明色系集落を、白色、クリーム色、緑色、朱色、黄色および橙色を呈するグループに分類する。白色集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Absidia*、粉状を呈する場合は *Aspergillus candidus*、*Geotrichum*、および *Monilia*、またビロード状を呈する場合は *Saccharomyces* または *Candida* であると同定される。クリーム色集落を呈するグループでは、綿状集落を呈する場合は *Trichothecium*、粉状集落を呈する場合は *Geotrichum*、またビロード状を呈する場合は *Acremonium* であると同定される。緑色集落を呈するグループでは、綿状集落を呈する場合は *Trichoderma*、また粉状を呈する場合は *Penicillium*、*Emericella*、*Aspergillus versicolor*、*Aspergillus flavus*、または *Aspergillus clavatus* であると同定される。朱色集落を呈するグループでは、綿状を呈

する場合は *Monascus* または *Epicoccum* であると同定される。黄色集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Epicoccum* または *Eurotium* であると同定される。橙色集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Eurotium* であると同定される。

## ②湿性集落・乾性集落による判別法

PDA 上に形成された集落を、湿性集落および乾性集落に分類する。綿状を呈する場合は *Rhizoctonia* または *Trichoderma*、粉状を呈する場合は *Geotrichum*、ビロード状を呈する場合は *Acremonium*、*Aureobasidium* または *Exophiala*、また酵母状を呈する場合は *Aureobasidium*、*Candida*、*Exophiala*、*Rhodotorula*、*Saccharomyces* または *Zygosaccharomyces* と同定される。乾性集落を呈するグループでは、綿状を呈する場合は *Alternaria*、*Arthrimum*、*Drechslera*、*Doratomyces*、*Mucor*、*Nigrospora*、*Rhizopus*、*Stachybotrys*、*Trichothecium* または *Ulocladium*、粉状を呈する場合は *Aspergillus*、*Cladosporium*、*Emericella*、*Geotrichum*、*Paecilomyces*、*Penicillium*、*Trichothecium* または *Wallemia* と同定される。

## ③集落の大きさによる判別

PDA 上に形成された集落を、極めて大きい集落(1週間で8cm以上に発育する)、大きい集落(1週間で5cm以上に発育する)および小さい集落(1週間で2cm以下に発育する)に分類する。極めて大きい集落を形成する場合は *Absidia*、*Botrytis*、*Rhizopus* または *Trichoderma* と同定される。大きい集落を形成する場合は *Alternaria*、*Curvularia*、

*Drechslera*, *Epicoccum*, *Emericella*,  
*Eurotium*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*,  
*Penicillium*, *Phoma*, *Stachybotrys*,  
*Trichothecium*または *Ulocladium*と同定され  
る。小さい集落を形成する場合は  
*Aureobasidium*, *Candida*, *Exophiala*,  
*Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Wallemia*また  
は *Zygosaccharomyces*と同定される。

#### ④孢子細胞数による判別法

まず、作製したプレパラートを検鏡して胞  
子を観察し、単細胞孢子形成株および二細  
胞以上の孢子形成株に分類する。

次に、単細胞孢子形成株を、無色孢子形  
成株および有色孢子形成株に分類する。  
無色孢子形成株である場合は、*Absidia*,  
*Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*,  
*Candida*, *Emericella*, *Eurotium*,  
*Geotrichum*, *Mucor*, *Monilliera*,  
*Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma*,  
*Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*,  
*Trichoderma*, *Verticillium*, *Wallemia*または  
*Zygosaccharomyces*のいずれかであると同  
定される。有色孢子形成株である場合は、  
*Arthrinium*, *Botrytis*, *Bippora*,  
*Cladosporium*, *Chaetomium*, *Doratomyces*,  
*Exophiala*, *Humicola*, *Monilliera* および  
*Nigrospora*のいずれかであると同定される。

また、二細胞以上の孢子形成株を、無色  
孢子形成株および有色孢子形成株に分類  
する。無色孢子形成株である場合は  
*Fusarium*または *Trichothecium*であると同定  
される。有色孢子形成株である場合は、  
*Alternaria*, *Curvularia*, *Drechslera*,  
*Stachybotrys*, *Ulocladium*のいずれかである

と同定される。

#### ⑤培地による判別法

PDA および M40Y 上に形成された集落の  
発育状態を観察する。その結果、M40Y 寒  
天培地で発育良好、PDA 上で発育不良で  
ある場合は、*Aspergillus restrictus*,  
*Eurotium*, *Wallemia*または  
*Zygosaccharomyces*のいずれかであると同  
定される。

#### ⑥培養温度による判別法

PDA および M40Y 上に菌体を接種し、培  
養温度 30 度以上で発育がみられる菌株お  
よび 30 度以下で発育がみられる菌株に分  
類する。30 度以上で発育がみられる場合  
は *Absidia*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*,  
*Saccharomyces* または *Zygosaccharomyces*  
と同定される。30 度以下で発育がみられる  
場合は *Botrytis*, *Bispora*, *Cladosporium*,  
*Doratomyces*, *Epicoccum*, *Exophiala*,  
*Geotrichum*, *Humicola*, *Nigrospora*,  
*Oidiodendron*, *Penicillium*, *Phoma*,  
*Stachybotrys*, *Trichoderma*,  
*Trichothecium*, *Ulocladium*,  
*Verticillium*または *Wallemia*と同定される。

#### ⑦色素産生による判別法

PDA および M40Y 上に形成された集落が  
産生する色素を観察し、黄色、橙色、紫色、  
朱色、黒色および藍色に分類する。黄色を  
呈する場合は *Penicillium chrysogenum*また  
は *Eurotium*、橙色を呈する場合は  
*Epicoccum*, *Aspergillus versicolor*,  
*Fusarium*または *Eurotium*、紫色を呈する場  
合は *Fusarium*または *Emericella*、朱色を呈  
する場合は *Penicillium islandicum*,

*Monascus*, *Eurotium* または *Fusarium*, 黒色を呈する場合は *Stachybotrys*, *Nigrospora* または *Aureobasidium*, 藍色を呈する場合は *Fusarium* と同定される。

#### ⑧臭気による判別法

PDA および M40Y 上に形成された集落が発する臭気の特徴によって分類する。墨汁臭を発する場合は *Penicillium*, 干し草臭を発する場合は *Trichoderma*, また甘味臭を発する場合は *Geotrichum* と同定される。

#### D. 考察

清涼飲料水からの検出頻度が最も高い属または一部の種を対象とし極めて特徴的な性質を示した場合に用いることのできる簡易同定マニュアル、および対象とする属または種を増やし、特徴的な性質を有するが簡易に同定するための手法がない菌株を対象とした簡易同定マニュアルの2つに分けてマニュアルの作成を行った。

本研究の結果から、必ず現れる基本的な形態学的特徴を呈している培養菌株については、清涼飲料水からの検出頻度が高い属または種を対象を絞ることによって同定を簡易に行えることが示された。また、必ずしも現れない形態学的特徴を呈した場合や同定の対象となる属および種を増やした場合には、複数の特徴に基づいた同定が重要であることが示された。

今後は、同定の対象となる属および種をさらに増やし、清涼飲料水由来の真菌を幅

広くカバーした詳細な同定マニュアルを作成したい。

#### E. 結論

清涼飲料水からの検出頻度が高い真菌の属または一部の種を対象とし、集落性状およびプレパラート顕微鏡像の基本的な形態を用いた同定に関するマニュアルを作成した。その結果、清涼飲料水由来の属および種合計 24 または 51 群の同定が可能となるマニュアルの作成に成功した。また、必ずしも現れない形態学的特徴を呈した場合や同定の対象となる属および種を増やした場合には、複数の特徴に基づいた同定が重要であることが示された。

#### F. 引用文献

- 1) 藤川 浩ら. 東京都におけるミネラルウォーターへの微生物性異物混入の実態. 日本食品微生物学雑誌 13:41-44, 1996.
- 2) 諸角 聖ら. 食品のカビ汚染と防止対策. 東京都健康安全センター年報 55: 3-12, 2004.
- 3) 高鳥浩介 監修. かび検査マニュアル カラー図鑑. 株式会社テクノシステム, 2002.

表1. 清涼飲料水からの簡易真菌同定マニュアルにおいて対象とする真菌

真菌同定簡易マニュアル		
マニュアル	(1) 清涼飲料水由来真菌の簡易同定手法 1	(2) 清涼飲料水由来真菌の簡易同定手法 2
対象とする 属または種	<i>Absidia</i> , <i>Acremonium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Arthrinium</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Epicoccum</i> , <i>Exophiala</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Monascus</i> , <i>Nigrospora</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Phoma</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Stachybotrys</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Trichothecium</i> , <i>Wallemia</i>	<i>Absidia</i> , <i>Acremonium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Arthrinium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Aspergillus candidus</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus restrictus</i> , <i>Aspergillus ustus</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aureobasidium</i> , <i>Bippora</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Candida</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Doratomyces</i> , <i>Drechslera</i> , <i>Emericella</i> , <i>Epicoccum</i> , <i>Eurotium</i> , <i>Exophiala</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Humicola</i> , <i>Monascus</i> , <i>Monilia</i> , <i>Monilliera</i> , <i>Mucor</i> , <i>Myrothecium</i> , <i>Nigrospora</i> , <i>Oidiodendron</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i> , <i>Penicillium</i> <i>islandicum</i> , <i>Phoma</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Stachybotrys</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Trichothecium</i> , <i>Ulocladium</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Wallemia</i> , <i>Zygosaccharomyces</i>
合計	24	51
種または属数		



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Watanabe, M., Lee, K., Goto, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y. and Hara-Kudo, Y.	Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA.	J. Food Prot.			印刷中
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 巻 6 号	315-320	2009
Nemoto, J., Sugawara, C., Akahane, K., Hashimoto, K., Kojima, T., Ikedo, M., Konuma, H. and Hara-Kudo, Y.	Rapid and specific detection of the thermostable direct haemolysin gene in <i>Vibrio parahaemolyticus</i> by loop-mediated isothermal amplification.	J. Food Prot.	72 巻 4 号	748-754	2009
野田裕之、千須和美母衣、金子通治、尾上洋一、高鳥浩介、工藤由起子.	ブラックタイガーエビに接種した <i>Salmonella</i> Weltevreden および <i>S. Senftenberg</i> の冷凍保存下における生残性.	食品衛生学雑誌	50 巻 2 号	85-88	2009
Hidaka, A., Hokyō, T., Arikawa, K., Fujihara, S., Ogasawara, J., Hase, A., Hara-Kudo, Y. and Nishikawa, Y.	Multiplex real-time PCR for exhaustive detection of diarrhoeagenic <i>Escherichia coli</i> .	J. Appl. Microbiol.	106 巻	410-420	2009
Hara-Kudo, Y. and Takatori, K.	Microbial quality of liquid egg and <i>Salmonella</i> infection status in Japan.	J. Food Hyg. Soc. Jpn.	50 巻 1 号	34-40	2009

