

表 6 *Penicillium olsonii* (100 cfu/bottle)の清涼飲料水中での発育

温度	飲料	培養日数												
		1	2	3	4	7	10	14	21	28				
10°C	茶系飲料	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	
	果汁飲料	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	
	野菜ジュース	0	0	0	0	2	2	2	3	3	3	3	3	
	炭酸飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	スポーツドリンク	0	0	0	0	0	0	2	3	3	3	3	3	
	ミルク入りコーヒー飲料	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	
	ニアウオーター	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	
	ミネラルウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
	25°C	茶系飲料	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		果汁飲料	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
野菜ジュース		0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
炭酸飲料		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
スポーツドリンク		0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
ミルク入りコーヒー飲料		0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
ニアウオーター		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ミネラルウォーター		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

1 飲料 3 サンプル中、カビが発育したサンプル数

表 7 *Penicillium olsonii* (10 cfu/bottle)の清涼飲料水中での発育

温度	飲料	培養日数										
		1	2	3	4	7	10	14	21	28		
25°C	茶系飲料	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	果汁飲料	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
	野菜ジュース	0	0	0	0	0	1	3	3	3	3	
	炭酸飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	スポーツドリンク	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	
	ミルク入りコーヒードリンク	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	ニアウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
	ミネラルウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

1 飲料 3 サンプル中、カビが発育したサンプル数

表 8 *Exophiala xenobiotica* (100 cfu/bottle)の清涼飲料水中での発

温度	飲料	培養日数												
		1	2	3	4	7	10	14	21	28				
10°C	茶系飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	果汁飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	野菜ジュース	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	3	
	炭酸飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	スポーツドリンク	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	ミルク入りコーヒー飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	ニアウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	ミネラルウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25°C	茶系飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		果汁飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
野菜ジュース		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
炭酸飲料		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
スポーツドリンク		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ミルク入りコーヒー飲料		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ニアウォーター		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ミネラルウォーター		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

1 飲料 3 サンプル中、カビが発育したサンプル数

表 9 100 cfu/bottle 接種時の飲料種別の総陽性サンプル数

温度	飲料	培養日数														
		1	2	3	4	7	10	14	21	28						
10°C	茶系飲料	0	0	0	3	6	6	6	6	9						
	果汁飲料	0	0	0	0	9	9	9	12	12						
	野菜ジュース	0	0	0	0	5	6	6	7	12						
	炭酸飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
	スポーツドリンク	0	0	0	0	0	3	7	9	9						
	ミルク入りコーヒー飲料	0	0	0	0	0	0	3	3	6						
	ニアウォーター	0	0	0	0	0	0	3	6	9						
	ミネラルウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	1						
	茶系飲料	0	6	9	12	15	19	19	19	19						
	果汁飲料	0	9	9	10	12	12	13	13	13						
25°C	野菜ジュース	0	4	8	9	16	16	16	16	16						
	炭酸飲料	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
	スポーツドリンク	0	3	9	9	9	9	17	17	17						
	ミルク入りコーヒー飲料	0	0	0	0	0	0	4	4	4						
	ニアウォーター	0	2	3	3	5	6	6	6	9						
	ミネラルウォーター	0	0	0	0	3	6	6	6	9						
	ミネラルウォーター	0	0	0	0	0	0	0	0	0						

1 飲料、合計 15 サンプル中、カビが発育したサンプル数

分 担 研 究 報 告 書

清涼飲料水の殺菌・除菌方法の妥当性

後藤 慶一

平成 22 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

清涼飲料水の殺菌・除菌方法の妥当性

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

大腸菌、サルモネラ、腸球菌および黄色ブドウ球菌はいずれの菌株でも 85℃・30 分の加熱条件で生菌数が 7~8 桁程度減少した(いずれの菌株でも処理後の生残が見られなかった)。一方、85℃・30 分の条件では、枯草菌芽胞の減少はほとんど見られなかった。セレウス菌に関して、NBRC 13494 はほとんど減少しないのに対し、JCM 2152T は 2~3 桁程度減少した。この違いは菌株特性によるものであることが分かった。これらのことから、製造基準の 85℃・30 分加熱の適切な指標菌が必要であることが明らかになった。また、欧米においては日本のような清涼飲料水の具体的殺菌条件は規定しておらず、メーカー側で責任を持って適切な殺菌条件とプロセスを設定し、HACCP に準拠した運用を実施することとされていた。唯一、FDA の発行文書で過去に集団食中毒事故が発生した果実・野菜飲料にて、一般生菌として 5 桁の減少を確実に実施することを製造業者に要求していた。この違いは消費される清涼飲料水の種類によるものと考えられた。欧米と日本では消費する清涼飲料水の種類が異なるため、日本の消費の形態にあった殺菌条件基準が必要であると考えられた。加えて、pH と水分活性で区分した清涼飲料水ごとに指標菌の設定など具体的な試験方法が示されることが必要と考えられる。

研究協力者

大塚 佳代子 (埼玉県衛生研究所)

小沼 博隆、荒木 恵美子 (東海大学 海洋学部)

土屋 禎、斎藤 明美 (財団法人 日本食品分析センター 微生物部)

岩田 修二、徳田 一、池本 尚人 (NPO 法人 ILSI Japan 食品微生物部会)

金子 清久 (NPO 法人 ILSI Japan 国際協力委員会)

毎田 恵実 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

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い食品の一つである。

現在、消費者の趣向やニーズに合わせ、多様な形態かつ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、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。

こ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、この様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ったため、平成 21 年度に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。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実施した。その結果、開封試験では約 2 割の検体で *Cladosporium* などのカビが、口飲み試験では *Staphylococcus* などの細菌(約 5 割の検体)や *Candida* などの酵母(約 2 割の検体)が発育した。これらの結果から、清涼飲料水中に微生物が混入した場合、製品が腐敗する可能性が非常に高いことが示唆される。

さて、清涼飲料水の製造業者は、微生物による製品の腐敗を防止するため、そのリスクがある製品については、密封前あるいは密封後に主として熱による殺菌を行っている。熱によらない清涼飲料水の殺菌手法としては、膜除

菌、オゾン殺菌および UV 殺菌がある。膜除菌は製品中の固形物による目詰まりから用途は水や一部の透明な飲料に限定される。UV 殺菌も製品中の固形物等で UV 光が遮蔽されるシャドール効果のため、用途は限定される。オゾン殺菌は製品中の有機物でオゾン効果が失われること、およびオゾンの強い酸化力で製品特性が失われることから、水などに用途は限定される(日本ではほとんど使用されない)。膜や UV が有効な清涼飲料水についても殺菌をより完全にするため、加熱殺菌などと併用して用いられる場合が多いのが実情である。この様な事から、清涼飲料水の殺菌には熱が主に使われている。殺菌の条件は業者の知見に基づくが、食品衛生法に基づく告示(「食品、添加物等の規格基準」昭和 34 年 12 月 28 日厚生省告示第 370 号)で清涼飲料水の規格基準が示されており(表 2)、この規格・基準を遵守して条件が策定されている。しかしながら、前述の告示で示されている 85℃・30 分の加熱条件の根拠や効力に関しては、十分な知見が無いのが実情である。

そこで、本年度は、平成 21 年度に検出された細菌、ならびに病原性のある細菌の代表的な菌種について、85℃・30 分での加熱殺菌の効果を検証するための試験を行う。また、前述のような清涼飲料水の殺菌条件(製造条件)が海外でどの様に定められているかの調査も併せて実施する。

B. 研究方法

1. 85℃・30 分の殺菌効果の確認

1-1. 指標菌(各 2 株)

菌株の選定に関して、汎用性が高く、入手が容易な点を重視した。試験菌株の分担として、芽胞菌は各所にて実施した。その他の菌株については、埼玉県衛生研究所が①NBRC 3301、③NBRC 100797 および⑤NBRC 100482、日本食品分析センターが④NBRC 105726、⑥NBRC 100480 および⑦NBRC 13276、国立医薬品食品衛生研究所が②NBRC 3972 および⑧NBRC 12732 を分担した。

・大腸菌 (*Escherichia coli*)

①NBRC 3301 (JIS L 1902:2008)

②NBRC 3972 (JIS K 3705:2008)

・サルモネラ (*Salmonella enterica*)

③NBRC 100797 (日本薬局方、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony)

④NBRC 105726 (ATCC 培地性能試験株)
TYPE of *S. Typhimurium*

・腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)

⑤NBRC 100482 (JIS K 3705:2008) ATCC 29212

⑥NBRC 100480 (JIS K 3705:2008) ATCC 19433 TYPE

・黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)

⑦NBRC 13276 (JIS K 3703-3:2008)

⑧NBRC 12732 (JIS K 3703-1:2004) ATCC 6538P

・枯草菌 (*Bacillus subtilis*)

⑨NBRC 3134 (日本薬局方) ATCC 6633

⑩NBRC 14117 (JIS K 8008:1992、*B. subtilis* var. *globigii*: *B. atrophaeus*)

・セレウス菌 (*Bacillus cereus*)

⑪NBRC 3836 (ATCC 培地性能試験株、品質

管理株) ATCC 11778

⑫NBRC 13494 (=ATCC 13061) ATCC 13061

⑬JCM 2152 (Type strain)

(注) ⑪NBRC 3836 が芽胞の調製が困難であったため、その代替株として⑬JCM 2152 (Type strain) を試験途中で追加した。

(注) NBRC: NITE Biological Resource Center、
JCM: Japan Collection of Microorganisms、
ATCC: The American Type Culture Collection。

1-2. 試験方法

(1) 無菌的に、滅菌済みバイアルに菌液または芽胞液(約 10^7 cfu/ml) を 2 ml ずつ分注する(試験は 1 連で行った。日を変えて 3 回繰り返した。)

(2) キャップをしっかりと閉め、85℃のオイルバスに完全に浸漬し、30 分間加熱後、流水で急冷した(保管は水中)。

(3) 無菌的に、菌液または芽胞液 1 ml を 9 ml の滅菌 PBS 溶液に加え、よく混和した(=10 倍希釈菌液または 10 倍希釈芽胞液)。

〈菌液の場合〉

無菌的に、10 倍希釈菌液の 0.1 ml を標準寒天培地に塗抹した(10 枚塗抹し、1 ml の菌数を把握する)。菌数の記録は栄養細胞数記録書に行った(参考資料 1)。

〈芽胞液の場合〉

滅菌 PBS 溶液を用いて、無菌的に 10 倍希釈芽胞液を 100、1,000、10,000 および 100,000 倍希釈液を調製し、それぞれの 0.1 ml を標準寒天培地に塗抹し、35℃で 48 時間培養した(10 倍希釈芽胞液も同様に試験する)。芽胞液の測定は一段階希釈につき 2 連

で行った。

(4) 生じたコロニー数を計測し、85℃×30分加熱条件における生残菌数を求めた。芽胞数の記録は芽胞数記録書に行った(参考資料2)。

(注)初発濃度(cfu/ml)は、滅菌PBS溶液を用いて、分注前の菌液または芽胞液の段階希釈系列(10~100,000倍)を調製し、標準寒天培地を用いた塗抹法により求めた(35℃で48時間培養)。但し、芽胞液は本試験前に80℃×10分のヒートショックを行ったものも合わせて行った。原液には 10^4 ~ 10^6 個程度の細胞があると推測されるので、様子を見ながら適宜低希釈倍率の測定は割愛した。

1-3. *Bacillus cereus* および *B. subtilis* 芽胞の調製方法

(1) 試薬

・滅菌PBS溶液

・0.05% tween 20 添加滅菌PBS溶液:
Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (和光純薬) 200 μ l をPBS溶液400 ml に添加して十分に攪拌した後、オートクレーブ滅菌した。

・標準寒天培地

・DSM寒天培地(別名 Shaeffer's sporulation medium agar): 普通寒天培地 35 g、10% (w/v) KCl 10 ml、1.2% (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 ml および 1M NaOH 0.5 ml を適量の蒸留水に溶解させ、1M NaOH を用いて pH を 7.0 \pm 0.2 に調整した後に全量 1,000 ml とし、オートクレーブ滅菌した。冷却(約 55℃)後、フィルター滅菌した 1M $Ca(NO_3)_2$ 、0.01M $MnCl_2$ および 1mM $FeSO_4$ の溶液をそれぞれ 1 ml ずつ添

加して十分に攪拌した後、浅型滅菌シャーレに約 20 ml ずつ分注して固化・乾燥させ、平板培地とした。

(注)水和物を用いる場合は、規定の終濃度に調整して用いた。

(2) 操作

芽胞液の調製操作は、安全キャビネット内にて無菌的に行った。

a. 菌起こし

① 滅菌済ループを用いてカジトン培地に保存してあった菌体入りチューブから菌体をかき取った。

② 普通寒天培地に菌体を画線し、培地を反転させ、35℃で24時間培養した。

b. 前培養

滅菌済ループを用いて純粋培養された集落の一部を取り、普通寒天培地に菌体を画線し、培地を反転させ、35℃で24時間培養した。

c. 本培養

① 前培養した菌体(10 μ l ループ約1杯分)を掻き取り、滅菌PBS溶液2 ml に懸濁して菌液を調製した。

② 菌液 100 μ l を DSM 寒天培地上に滴下して滅菌済コンラージ棒を用いて塗抹し、培地を反転させ、35℃で7日間培養した(培地10枚で 1.0×10^9 cfu/ml 程度のものが10 ml 調製可能)。

d. 集菌・洗浄

① 集菌前に、顕微鏡を用いて十分な芽胞形成を確認した。

② 確認後、培地1枚あたり滅菌PBS溶液3 ml を加え、滅菌済コンラージ棒を用いて培地

上の芽胞形成コロニーをかき取り、その菌液を滅菌済 50 ml 遠心沈殿管に集めた。

③ 遠心分離 (3,500 rpm × 10 min, 4°C) して上清を取り除き、沈殿を滅菌 PBS 溶液 30 ml に懸濁させた。

④ ③の処理を 3 回繰り返す、洗浄した。

e. 熱処理

① 沈殿を 2 ml の滅菌 PBS 溶液に懸濁させ、配給されたバイアルに移した後、オイルバス中で加熱処理 (80°C × 10 min) した。

② 氷水中で急冷した。

f. 保存

① 遠心分離 (3,500 rpm × 10 min, 4°C) して上清を取り除き、沈殿を 0.05 % tween 20 添加滅菌 PBS 溶液 10 ml に懸濁させた (容器はフアルコンチューブなどの滅菌済みチューブを使用した)。

② 顕微鏡を用いて芽胞液の状態を確認した。

③ 4°C で冷蔵保存した。

(注) 試験実施前に芽胞の状態を顕微鏡で確認し、ダークニングがないことを確認した。起こっているようであれば芽胞液を再調製した。

g. 芽胞数測定

① 芽胞液 0.1 ml を 0.05 % tween 20 添加滅菌 PBS 溶液を 0.9 ml ずつ分注した滅菌済 1.5 ml マイクロチューブに加えてよく攪拌し、10 倍希釈液を調整した。さらに滅菌 PBS 溶液で希釈して、段階希釈液 (必要に応じ 10⁸ 倍希釈液まで) を調製した。

② 段階希釈液 100 μl を標準寒天培地上に滴下して滅菌済コンラージ棒を用いて塗抹し、培地を反転させ、35°C で 24 時間培養した (一

希釈段階につき 2 連で実施)。

③ コロニー形成数をカウントし、芽胞数を求めた。

1-4. 栄養細胞液 (菌液) の調製方法

(1) 試薬

① 滅菌 PBS 溶液

② 標準寒天培地

③ SCD (=TS) 液体培地

(2) 操作

菌液調製操作は、以下のフローに沿って安全キャビネット内にて無菌的に行った。

a. 菌起こし

① 滅菌済ループを用いてカジトン培地に保存してあった菌体入りチューブから菌体をかき取った。

② 標準寒天培地に菌体を画線し、培地を反転させ、35°C で 24 時間培養した。

b. 本培養

① 滅菌済白金線を用いて純粋培養された集落の一部を取り、SCD 液体培地 (10 ml) に菌体を接種し、35°C で 15 時間培養した。

c. 集菌・洗浄

① 菌液を遠心沈殿管に移し、遠心分離 (3,500 rpm × 10 min, 4°C) して上清を取り除き、沈殿を滅菌 PBS 溶液 10 ml に懸濁した。

② ①の処理を 3 回繰り返す、洗浄した。

d. 菌数測定

① 菌液 1 ml を滅菌 PBS 溶液 9 ml と混和し、10 倍希釈液を調整した。さらに滅菌 PBS 溶液で希釈して、段階希釈液 (必要に応じ 10⁷ 倍希釈液まで) を調整した。

② 段階希釈液 100 μl を標準寒天培地上に滴下して滅菌済コンラージ棒を用いて塗抹し、

培地を反転させ、35°Cで24時間培養した(一希釈段階につき2連で実施)。

③ コロニー形成数をカウントし、菌数を求めた。

(注) 栄養細胞の菌液は試験ごとに調製する。濁度計などを用い、あらかじめ約 10^7 cfu/mlの濃度に調製できる目安(濁度など)を作っておき、試験毎の濃度調整はその目安をもとに行った。

1-5. 芽胞染色(Wirtz法)

調製した芽胞液の状態を確認するために芽胞染色を行った。

スライドグラスにMilli-Q水を1滴滴下し、白金耳でかきとったコロニーを溶液中に拡散させた。安全キャビネット内で自然乾燥後、火炎固定を行う。ガラスのシャーレ内に5%マラカイトグリーン水溶液を入れ、ヒートブロックを60°Cに設定後、温まった染色液中にスライドグラスを10分間浸させた。ついでスライドグラスを流水で30秒間洗い、0.5%サフラニン水溶液で約30秒間後染色した。流水で洗い、光学顕微鏡下で観察した。

1-6. デンプン分解性確認試験¹⁾

Bacillus cereus 芽胞の耐熱性とデンプン分解性との関係を調べるため、デンプン分解性確認試験を行った。

デンプンを1%添加した普通寒天培地に試験菌を接種して、35°Cで5日間培養した。ヨウ素ヨウ化カリウム液(グラム染色用ルゴール液)を注ぎ、コーンラージ棒で増殖面を掻き取り、判定を行う。デンプンが分解されていない場合、培地は紫色に染まり、分解されている場合はコロニーの周囲が透明になった。

2. 海外の清涼飲料水の微生物関連規格基準の情報収集

日本の清涼飲料水の製造基準の妥当性を評価し、基準の見直しや拡充などを含めた考察に役立てるため、欧米の清涼飲料水の殺菌基準(製造基準)を入手した。

International Life Sciences Institute of Japan(ILSI Japan:NPO 法人 国際生命科学研究機構)の国際協力委員会にアメリカ、イギリス、ドイツの基準を入手するように依頼した。国際協力委員会より、アメリカのワシントンDCにあるILSI本部の国際組織委員会(International Organizations Committee)に働きかけ、各国の支部に情報収集の呼びかけを行った。また、東海大学の荒木教授よりFDAにおける当該情報を入手した。得られた情報を取り纏め、日本の清涼飲料水の殺菌基準(製造基準)との対比を行い、殺菌の妥当性に関する考察を行った。

C. 結果

1. 85°C・30分の殺菌効果の確認

1-1. 85°C・30分の殺菌試験

菌液および芽胞液を85°C・30分間処理した結果を表1に示した。

大腸菌(*Escherichia coli*)、サルモネラ(*Salmonella enterica*)、腸球菌(*Enterococcus faecalis*)および黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)はいずれの菌株でも85°C・30分の加熱条件で生菌数が7~8桁程度減少した(いずれの菌株でも処理後の生残が見られなかった)。

一方、85°C・30分の条件では、枯草菌

(*Bacillus subtilis*) 芽胞の減少はほとんど見られなかった(NBRC 3134: $D_{85^{\circ}\text{C}}=114.9$ 分および NBRC 14117: $D_{85^{\circ}\text{C}}=357.2$ 分)。セレウス菌(*Bacillus cereus*)に関して、NBRC 13494 はほとんど減少しないのに対し、JCM 2152^T は2~3桁程度減少した(NBRC 13494: $D_{85^{\circ}\text{C}}=142.9$ 分および JCM 2152^T: $D_{85^{\circ}\text{C}}=8.74$ 分、D値は表1に示す生残曲線から算出)。なお、NBRC 3836 は十分な芽胞形成が見られず、加熱試験からは除外した。

(注)D値:所定の温度において菌数が1桁減少するに必要な加熱時間

1-2. 芽胞染色

枯草菌2株およびセレウス菌3株について芽胞染色を行った結果を図1~6に示す。枯草菌(NBRC 3134 および NBRC 14117)とセレウス菌(NBRC 13494)の芽胞は、芽胞液調製時における80°C・10分の加熱処理前後で変化はなかった(芽胞:緑色に染色された状態、図1~3)。しかし、セレウス菌(JCM 2152^T)の芽胞は十分に調製できていたにもかかわらず(図5)、80°C・10分での加熱後には赤く染色された(栄養細胞は赤く染まる、図4)。加熱を75°C・1分で行った場合(図6)、80°C・10分より芽胞の残留が多く確認された。

1-3. デンプン分解性試験

セレウス菌のデンプン分解性を確認したところ、*B. cereus* NBRC 13494 は陰性、*B. cereus* JCM 2152^T および *B. cereus* NBRC 3836 は陽性であった。

2. 欧米における清涼飲料水の殺菌基準

2-1. 米国における殺菌基準

米国 Food and Drug Administration (FDA)

の規定により食品群は、① Acid Food (pH 4.6以下の食品)、② Low-acid Food (pH 4.6以上で水分活性0.85以上のアルコール飲料以外の食品)、および③ Acidified Food (上述のAcid Foodや酸を加えて平衡状態になった時のpHが4.6以下で水分活性が0.85以上)に分類されるが、これらのそれぞれに対して個々の殺菌条件は規定しておらず、メーカー側で責任を持って適切な殺菌条件とプロセスを設定し、HACCPに準拠した運用を実施することとなっていた。FDAの発行文書の「CFR-Code of Federal Regulations Title 21, Part 120 Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems, Subpart B Pathogen Reduction, § 120.20 General, § 120.24 Process controls および § 120.25 Process verification for certain processors」に果実飲料と野菜飲料に関する規格が記載されていた(<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=120>)。原文は著作権の関係上掲載できないが、要約すると、果実飲料および野菜飲料では一般生菌として5桁の減少を確実に実施することを製造業者に要求しており、その低減手段は明確化されていなかった。

2-2. EUにおける殺菌基準

EUでも清涼飲料水に対する殺菌条件は規定されておらず、EUの一般衛生指針で規定されているのは各メーカーが製品を製造する際の食品安全・衛生に関する責任、流通における安全確保についての要求であり、結果的にはHACCPの遵守とトレーサビリティの確立が求められているのみであった。食品におけ

る微生物に関する規定はあるが、その対象が食肉、卵、牛乳、魚介類等となっており、清涼飲料水は対象とされていなかった。

D. 考察

1. 85℃・30 分の殺菌効果の確認

85℃・30 分の加熱により大腸菌などの栄養細胞は全て死滅していたことから、この条件は耐熱性のない細菌(非芽胞形成細菌)に対しては、既知の情報と同様、十分であると考えられた¹⁻³⁾。芽胞形成細菌であっても、これまでの知見から、芽胞が形成されていない栄養細胞の状態であれば 85℃・30 分の加熱で同様の殺菌効果が得られると考えられる⁴⁾。これらのことから、細菌の栄養細胞を対象とした場合、85℃・30 分の加熱で少なくとも 7 桁程度の菌数の減少が期待できると推察される。

枯草菌(*B. subtilis*)の芽胞に対しては、85℃・30 分の加熱では 1 桁未満の菌数の減少であった。枯草菌に関しては、115℃における D 値が 0.5~5 分との報告があり、これを 85℃に換算した場合、z 値を 10℃とした場合に D 値は 500~5,000 分で、今回の試験で十分な芽胞の低減が見られなかったことは妥当な結果であると考えられた⁵⁾。NBRC 3134 の $D_{85℃}$ は 114.9 分で、前述した一般的な枯草菌の D 値に比べて低い値であったが、これは耐熱性の低い未熟な芽胞が混入したことによると考えられた(通常耐熱性を求める場合は複数の温度と時間で試験を行って算出するため、試験誤差もあると推察される)。

セレウス菌(*B. cereus*)の芽胞に関して、NBRC 13494 は 1 桁未満、JCM 2152^T は 3 桁

以上の芽胞の減少が確認された。セレウス菌の 100℃での D 値は 3 分前後であることが一般的に知られているが、血清型によって耐熱性が異なることが知られている。例えば、95℃での D 値の比較では、血清型 I 型の菌株は 22.4~36.2 分であるのに対し、他の血清型は 1.5~6 分の間と報告されている⁶⁾。また、芽胞の耐熱性はデンプン分解性と相関があることが知られており、デンプンを分解する菌株は $D_{95℃}=4.1\sim7.0$ 分、デンプン非分解性の菌株は $D_{95℃}=6.3\sim25$ 分と報じられている⁷⁾。今回の試験では、*B. cereus* NBRC 13494 は陰性、*B. cereus* JCM 2152^T および *B. cereus* NBRC 3836 は陽性であったが、耐熱性はデンプンを分解する後者の二株の方が遙かに低い傾向で、既知の情報と同じ傾向であった。前述の情報から、z 値を 10℃とした場合にデンプン分解性の菌株は $D_{95℃}=41\sim70$ 分、デンプン非分解性の菌株は $D_{95℃}=63\sim250$ 分と計算される。デンプン非分解性の NBRC 13494 は $D_{85℃}=142.9$ 分であり、既知情報と合致する。一方、デンプン分解性の JCM 2152^T は $D_{85℃}=8.74$ 分で、既知情報を下回った。これも枯草菌の場合と同様に、未熟芽胞の混入が影響していると考えられた。さらに、JCM 2152^T の芽胞染色の結果は、芽胞液調製の際の加熱処理(栄養細胞を殺滅する目的)が強い方が赤く染まる細胞が増え、この株の芽胞の耐熱性が低いことを示唆するものであった。

(注) z 値: D 値の 1/10 または 10 倍の変化に対応する加熱温度の変化(℃)

2. 海外の清涼飲料水の微生物関連規格基準の情報収集

欧米諸国において、日本のように綿密な微生物の殺菌基準(表 2 および 3)が清涼飲料水では決められていないことが今回の調査で明らかとなった。また、ミネラルウォーターに関し、欧州ではミネラルウォーターには微生物がいることが前提になっているのに対し(微生物フローラがバランスの取れた状態で、増殖が起こらないため、リスクはないとの主張)、米国では微生物が存在することがリスクであると考えられているため、統一見解(定義)が得られていないのが実情である。

日本における清涼飲料水の分類を表 4 に、アメリカ、EU および日本における主要品目別消費・生産量を表 5 に示す。表 5 から、欧米では炭酸飲料とボトルドウォーター(注 1)が突出していることが分かる(両者で全体の 80%)。炭酸飲料は炭酸による静菌作用で微生物による腐敗・変敗が起こりにくく、ボトルドウォーターも栄養がほとんどないことから、顕著な微生物による食中毒リスクは低い。果実飲料と野菜飲料は欧米では 13%のシェアであるが、このカテゴリーで微生物に関する規格・基準が米国で定められている。これはアップルを原料とする果実飲料で *E. coli* O-157 による集団食中毒が発生したことを契機に定められたものである(注 2)。従って、微生物による食中毒が危惧されるものは規格基準のガイドラインを設定するが、大半はそのリスクが低いものであるため、必要以上に規格基準を設定しないのが欧米の基本的なスタンスであると考えられた。

一方、日本では茶系飲料が非常に大きなシェアを占める。昨年度の結果から、茶系飲料などの pH が中性に近い飲料では微生物が

よく増殖することが明らかになっている。日本では清涼飲料水における集団食中毒の報告は知られていないが、中性飲料では大腸菌群も増殖することが分かっている。そのため、少なくとも大腸菌群などの食中毒リスクを排除するため、清涼飲料水を pH と水分活性で区分し、それぞれにそれぞれに規格基準が設けられている必要があると考えられた。(表 5)。

(注 1)ボトルドウォーター:地下水ではなく、蒸留水、水道水、河川の表流水など飲用可能な原水をもとにした水のことで、地下水を原水とするミネラルウォーターとは異なる。

(注 2)この果実飲料は、新鮮さを保持するために加熱殺菌しないことを特徴としていたため(現在は加熱殺菌を取り入れている)、何らかの経路で *E. coli* O-157 が汚染し、この様な事故につながったものと考えられる。

E. 結論

一連の試験の結果、85℃・30 分の加熱殺菌は大腸菌などの栄養細胞を殺滅するに十分な条件であると考えられた。しかしながら、菌種や菌株による違いはあるものの、芽胞に対してこの条件はほとんど効果がないことも検証された。また、セレウス菌芽胞の耐熱性はデンプン分解性と相関することが実証された。

欧米には日本の食品衛生法で定められているような pH や水分活性で区分した清涼飲料水の製造基準はなく、製造業者に対する指針が概説されているのみであった。具体的数値の記述として、米国 FDA が果実・野菜飲料

において一般生菌として5桁の減少を確実に実施することを製造業者に要求していた。この様な欧米と日本の違いは消費される清涼飲料水の種類が大きく影響していた。

F. 参考文献

- 1) 動物性食品の HACCP 研究班編、HACCP:衛生管理の計画の作成と実践データ編. 中央法規出版、4、1997.
- 2) ICMSF (The International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies, Microorganisms in foods. Blackie Academic & Professional, 5, 126-140, 1996.
- 3) 動物性食品の HACCP 研究班編、HACCP:衛生管理の計画の作成と実践データ編. 中央法規出版、42、1997.
- 4) 芝崎 勲. 新・食品殺菌工学. 光琳. 8-9、1998.
- 5) 遠田 昌人. 微生物殺菌実用データ集. サイエンスフォーラム. 78、2005.
- 6) Parry, J. M. and R. Gilbert. Studies on the heat resistance of *Bacillus cereus* spores and growth of the organism in boiled rice. J. Hyg. (London), 84, 77-82, 1980.
- 7) 高鳥 浩介・五十君 静信 監修、最新細菌・カビ・酵母図鑑 3. *Bacillus cereus*(セレウス菌). 技術情報協会. 31、2007.

G. 研究発表

1. 論文発表

後藤 慶一. DNA 塩基配列に基づくカビ・酵母の同定法-食品の汚染・変敗にかかわる

分類群への適用を中心に-. 日本食品微生物学会雑誌、27(2)、56-62、2010.

後藤 慶一、大西 貴弘、渡辺 麻衣子、神田 隆、金澤 裕司、小澤 一弘、餅田 薫、田中 裕子、藤田 理英子、吉田 義博、松本 幸平、大谷 俊次、杉山 寛治、小沼 博隆、高鳥 浩介、工藤 由起子. 清涼飲料水の開封・口飲み保管により検出される微生物. 日本清涼飲料研究会編、「第 20 回研究発表会」講演集、33-38、2010.

2. 学会発表

後藤 慶一、大西 貴弘、渡辺 麻衣子、神田 隆、金澤 裕司、小澤 一弘、餅田 薫、田中 裕子、藤田 理英子、吉田 義博、松本 幸平、大谷 俊次、杉山 寛治、小沼 博隆、高鳥 浩介、工藤 由起子. 清涼飲料水の開封・口飲み保管により検出される微生物. 日本清涼飲料研究会、第 20 回研究発表会、2010.

H. 知的財産の所有権

なし

(参考資料1)

栄養細胞数記録書

菌種名：	菌株名：NBRC
実施機関：①国立医薬品食品衛生研究所 ②埼玉県衛生研究所 ③日本食品分析センター	

【記録に際して】

(1) 下記の表には、実施日、加熱前菌数、プレートごとのコロニー数および合計菌数を記録する。

(2) 一枚のプレートに300個以上コロニーが出現した場合は、>300としても良い。

希釈	1回目 (実施)	2回目 (実施)	3回目 (実施)
加熱前菌濃度	cfu/ml	cfu/ml	cfu/ml
1枚目			
2枚目			
3枚目			
4枚目			
5枚目			
6枚目			
7枚目			
8枚目			
9枚目			
10枚目			
10枚の合計 (cfu/ml)			
備考			

芽胞数記録書

菌種名：	菌株名：
実施機関：①国立医薬品食品衛生研究所 ②埼玉県衛生研究所 ③日本食品分析センター	

【記録に際して】

- (1) 下記の表には、実施日と各希釈倍率におけるコロニー数を記録する。実施していない(実施の必要のない) 項は記録の必要はない。
- (2) 一枚のプレートに 300 個以上コロニーが出現した場合は、>300 としてもよい。
- (3) 菌濃度の計算は一枚のプレートのコロニー数が 30~300 のものを採用する(採用した数を○で囲む)。

希釈	1 回目 (実施日)		2 回目 (実施日)		3 回目 (実施日)	
	①	②	①	②	①	②
加熱前 菌濃度	cfu/ml		cfu/ml		cfu/ml	
10 ⁰						
10 ⁻¹						
10 ⁻²						
10 ⁻³						
10 ⁻⁴						
10 ⁻⁵						
菌濃度 (cfu/ml)	①のみで算出	②のみで算出	①のみで算出	②のみで算出	①のみで算出	②のみで算出
菌濃度 平均	①と②の平均 cfu/ml		①と②の平均 cfu/ml		①と②の平均 cfu/ml	
備考						

平成 22 年度 清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究
所定条件における指標細菌の殺菌状況の確認試験

1. 目的

85℃×30 分の加熱条件における指標細菌の殺菌状況のデータ取りを行う。

2. 指標菌 (各 2 株)

- ・大腸菌 (*Escherichia coli*)

NBRC 3301 (JIS L 1902:2008)

NBRC 3972 (JIS K 3705:2008)

- ・サルモネラ (*Salmonella enterica*)

NBRC 100797 (日本薬局方、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony)

NBRC105726 (ATCC 培地性能試験株) TYPE of *S. Typhimurium*

- ・腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)

NBRC 100482 (JIS K 3705:2008) ATCC 29212

NBRC 100480 (JIS K 3705:2008) ATCC 19433 TYPE

- ・黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)

NBRC 13276 (JIS K 3703-3:2008)

NBRC 12732 (JIS K 3703-1:2004) ATCC 6538P

- ・枯草菌 (*Bacillus subtilis*)

NBRC 3134 (日本薬局方) ATCC 6633

NBRC 14117 (JIS K 8008:1992、*B. subtilis* var. *globigii* : *B. atrophaeus*)

- ・セレウス菌 (*Bacillus cereus*)

NBRC3836 (ATCC 培地性能試験株、品質管理株) ATCC 11778

NBRC13494 (=ATCC13061) ATCC 13061

(注) 試験分担：芽胞菌－各所にて実施

埼玉県衛生研究所－NBRC 3301、NBRC 100797、NBRC 100482

日本食品分析センター－NBRC105726、NBRC 100480、NBRC 13276

国立医薬品食品衛生研究所－NBRC 3972、NBRC 12732

3. 試験方法

(1)無菌的に、滅菌済みバイアルに菌液または芽胞液 (約 10^7 cfu/ml) を 2ml ずつ分注する (試験は 1 連で行う。日を変えて 3 回繰り返す。)

(2)キャップをしっかりと閉め、85℃のオイルバスに完全に浸漬し、30 分間加熱後、流水で急冷する (保管は水中)。

(3)無菌的に、菌液または芽胞液 1mL を 9ml の滅菌 PBS 溶液に加え、よく混和する (= 10 倍希釈菌液または 10 倍希釈芽胞液)。

(参考資料 3)

(4)-1 菌液の場合

無菌的に、菌液の 0.1 mL を標準寒天培地に塗抹する (10 枚塗抹し、1mL の菌数を把握する)。

(4)-2 芽胞液の場合

無菌的に、10 倍希釈芽胞液を滅菌 PBS 溶液を用いて 100、1,000、10,000 および 100,000 倍希釈液を調製し、それぞれの 0.1 ml を標準寒天培地に塗抹し、35℃で 48 時間培養する (10 倍希釈芽胞液も同様に試験する)。芽胞液の測定は一段階希釈につき 2 連で行う。

(5)生じたコロニー数を計測し、85℃×30 分加熱条件における生残菌数を求める。

(注) 初発濃度 (cfu/ml) は、分注前の菌液または芽胞液の段階希釈系列 (10~100,000 倍) を滅菌 PBS 溶液を用いて調製し、標準寒天培地を用いた塗抹法により求める (35℃で 48 時間培養)。但し、芽胞液は本試験前に 80℃×10 分のヒートショックを行ったものも合わせて行う。原液には 10^4 ~ 10^6 個程度の生細胞があると推測されるので、様子を見ながら適宜低希釈倍率の測定は割愛しても良い。

(補足)

・ *Bacillus cereus* および *Bacillus subtilis* 芽胞の調製方法

1. 試薬

① 滅菌 PBS 溶液

② 0.05% tween20 添加滅菌 PBS 溶液

Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (和光純薬) 200 μ L を PBS 溶液 400 mL に添加して十分に攪拌した後、オートクレーブ滅菌する。

③ 標準寒天培地

④ DSM 寒天培地 (別名 Shaeffer's sporulation medium agar)

普通寒天培地 35 g、10% (w/v) KCl 10 mL、1.2% (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mL および 1M NaOH 0.5 mL を適当量の蒸留水に溶解させ、1M NaOH を用いて pH を 7.0 \pm 0.2 に調整した後に全量 1,000 mL とし、オートクレーブ滅菌する。冷却 (約 55℃) 後、フィルター滅菌した 1M $Ca(NO_3)_2$ 、0.01M $MnCl_2$ および 1mM $FeSO_4$ の溶液をそれぞれ 1 mL ずつ添加して十分に攪拌した後、浅型滅菌シャーレに約 20 mL ずつ分注して固化・乾燥させ、平板培地とする。

(注) 水和物を用いる場合は、規定の終濃度に調整して用いる。

2. 操作

芽胞液の調製操作は、安全キャビネット内にて無菌的に行う。

2.1 菌起こし

①滅菌済ループを用いてカジトン培地に保存してあった菌体入りチューブから菌体をかき取る。

(参考資料 3)

② 普通寒天培地に菌体を画線し、培地を反転させ、35℃で24時間培養する。

2.2 前培養

滅菌済ループを用いて純粋培養された集落の一部を取り、普通寒天培地に菌体を画線し、培地を反転させ、35℃で24時間培養する。

2.3 本培養

① 前培養した菌体 (10 μ L ループ約1杯分) を掻き取り、滅菌 PBS 溶液 2 mL に懸濁して菌液を調製する。

② 菌液 100 μ L を DSM 寒天培地上に滴下して滅菌済コンラージ棒を用いて塗抹し、培地を反転させ、35℃で7日間培養する (培地 10 枚で 1.0×10^9 cfu/mL 程度のものが 10 mL 調製可能)。

2.4 集菌・洗浄

① 集菌前に、顕微鏡を用いて十分な芽胞形成を確認する。

② 確認後、培地 1 枚あたり滅菌 PBS 溶液 3 mL を加え、滅菌済コンラージ棒を用いて培地上の芽胞形成コロニーをかき取り、その菌液を滅菌済 50mL 遠心沈殿管に集める。

③ 遠心分離 (3,500 rpm \times 10 min、4℃) して上清を取り除き、沈殿を滅菌 PBS 溶液 30 mL に懸濁させる。

④ ③の処理を3回繰り返し、洗浄する。

2.5 熱処理

① 沈殿を 2 mL の滅菌 PBS 溶液に懸濁させ、配給されたバイアルに移した後、オイルバス中で加熱処理 (80℃ \times 10 min) する。

② 氷水中で急冷する。

2.6 保存

① 遠心分離 (3,500 rpm \times 10 min、4℃) して上清を取り除き、沈殿を 0.05% tween20 添加滅菌 PBS 溶液 10 mL に懸濁させる (容器はファルコンチューブなどの滅菌済みチューブを使用する)。

② 顕微鏡を用いて芽胞液の状態を確認する。

③ 4℃で冷蔵保存する。

(注) 試験実施前に芽胞の状態を顕微鏡で確認し、ダークニングがないことを確認する。起こっているようであれば芽胞液を再調製する。

2.7 芽胞数測定

① 芽胞液 0.1mL を 0.05% tween20 添加滅菌 PBS 溶液を 0.9 mL ずつ分注した滅菌済 1.5 mL マイクロチューブに加えてよく攪拌し、10 倍希釈液を調整する。さらに滅菌 PBS 溶液で希釈して、段階希釈液 (必要に応じ 10^8 倍希釈液まで) を調製する。

② 段階希釈液 100 μ L を標準寒天培地上に滴下して滅菌済コンラージ棒を用いて塗抹し、培地を反転させ、35℃で24時間培養する (一希釈段階につき2連で実施)。