

201033009B

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・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

平成20～22年度 総合研究報告書

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

平成23(2011)年3月

目次

総合研究報告書

清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究	1
工藤 由起子	

総合研究(分担)報告書

清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立 ..	15
工藤 由起子	

真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究	23
後藤 慶一・小沼 博隆	

細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究	29
大西 貴弘	

清涼飲料水の殺菌・除菌方法の妥当性	37
後藤 慶一	

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	43
高鳥 浩介	

総 合 研 究 報 告 書

清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究

工藤 由起子

平成 20～22 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)

総合研究報告書

研究分担者 工藤 由起子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)
大西 貴弘 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)
後藤 慶一 (三井農林株式会社)
小沼 博隆 (東海大学 海洋学部)

研究要旨

現代では多様な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・保管方法、加えて消費のされ方も多様である。このため、地方自治体や製造業者の消費者窓口で苦情や問い合わせが寄せられており、微生物に関連するものも少なくない。本研究では、清涼飲料水についての消費者からの苦情等を整理し、安全な製品が消費者に提供・消費されるために調査研究を行った。原因微生物である真菌および細菌について、消費に伴う汚染および菌の増殖性について、また清涼飲料水種類による特徴などを解析した。汚染真菌については同定のための手法の確立を行った。これらについて、3 ヶ年にわたり、以下の4研究課題として実施した。

- 1.清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立
- 2.細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究
- 3.真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究
- 4.清涼飲料水の殺菌・除菌方法の妥当性

また、委託研究として、「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」を作成した。

A. 研究目的

現代では多様な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・保管方法、加えて消費のされ方も多様である。このため、地方自治体や製造業者の消費者窓口で苦情や問い合わせが寄せられており、微生物に関連するものも少なくない。本研究では、清涼飲料水について

の消費者からの苦情等を整理し、安全な製品が消費者に提供・消費されるために調査研究を行った。

清涼飲料水の消費(開封、口飲み)に伴う微生物による清涼飲料水の腐敗・変敗の実験において、各種飲料水での細菌および真菌の増殖性およびや苦情でみられる肉眼的変化などの関連を明らかにすることにした。

また、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、細菌の同定は遺伝子工学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ため、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手法に基づく同定との相関性もあわせて評価した。さらに、分離された菌株を清涼飲料水に接種し、消費に伴う温度条件などで微生物の増殖や毒素産生を解析し、苦情でみられる現象の原因に微生物に関連することを明らかにすることにした。

苦情の主な原因として真菌があげられたことから、真菌の同定方法に関する研究を行った。従来の形態学的観察では特徴を見出すのに特別な熟練技術が求められることに加え、培養が必要で時間がかかる。このため、分子生物学的手法の持つ簡便性・迅速性・客観性が注目されている。本研究では、特に糸状菌を正確に同定できる遺伝子指標を特定することを目的として、複数遺伝子の塩基配列の系統解析を行い、塩基置換速度の評価を行った。また、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの手法を用いて青果物からしばしば検出される *Fusarium* 属菌のゲノム全体での塩基配列相同性を検証し、これに基づいた系統樹を構築して、体系的な分類方法の確立について検討することとした。しかし、現段階での清涼飲料水から分離される真菌の同定をする必要性が高いため、検出頻度が高い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、消費者から問い合わせや健康被害の不安が寄せられている地方自治体の食品衛生部局等の対応を支援す

ることとした。また、汚染真菌量をできるだけ迅速に正確に測定する方法や、汚染真菌数の低い食品の製造の評価に用いる真菌数のより正確な測定方法が必要である。本研究では真菌の定量方法の検討を、果汁飲料水の原料になる果実について行った。また、果汁飲料水は風味が損なわれることを防ぐために、加熱殺菌処理などの強い殺菌が施されておらず、微生物学的な汚染が発生し易い。汚染真菌種が明確であれば殺菌を効果的に行うことが考えられるため、果実の真菌叢について解析を行った。さらに、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、本研究では食品衛生法の規格基準に示されている85℃・30分での加熱殺菌の効果を検証するとともに、清涼飲料水の製造での殺菌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した。

B. 研究方法

1. 清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

全国地方自治体、製造関連団体である特定非営利活動法人 国際生命科学研究機構日本支部 (ILSI Japan) および社団法人 全国清涼飲料工業会 (全清飲) にアンケート回答による清涼飲料水の微生物を原因とする苦情の情報提供の協力依頼を行った。アンケート調査結果の集計を研究班内で行い、全国地方自治体、製造関連団体等の代表者と検討し現状で起こっている問題点について解析した。

真菌の液体培養で得た細胞を用いて DNA 抽出法の比較を行った。2種の市販キット、SDS 法、CTAB 法および塩化ベンジル

法、およびビーズ破碎併用の有無での DNA 収率、PCR 増幅の有無および精製度を比較した。また、*Fusarium* 属菌を例に同定に適した遺伝子指標を明らかにするために、リボゾーム関連遺伝子 (rDNA) および β チューブリン遺伝子 (β -*tub*) の塩基配列を決定した。これらの遺伝子塩基配列を用いて近隣結合法で系統解析を行い、全枝長を算出した。さらに、カビ DNA を用いた DNA-DNA ハイブリダイゼーションの実験系を確立した。続いて *Fusarium* 属菌 2 菌種での供試菌株間の全ゲノムレベルの塩基配列相同率を推定した。

清涼飲料水の原料となる果実を用いて真菌数定量法を比較した。従来から微生物で用いられる塗抹培養法に加え、最確数 (most probable number; MPN) 法を用いた。MPN 法については、従来通りの試験管での液体培養による方法と、寒天平板培地に塗抹する平板 MPN 法を用いた。これら果実の真菌叢を形態学的、分子生物学的および生化学的な手法を用いて解析した。

2. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

清涼飲料水中の細菌の動態および殺菌・除菌方法に関する文献 38 報を収集した。これらの文献から清涼飲料水中の細菌の動態に関するデータの抽出を行ない、飲料種別、細菌種別に分類を行なった。

ボランティアに口飲みもしくは任意の場所で清涼飲料水の開封をしてもらい、その飲料を容器ごと 25°C で培養した。14 日間の培養期間中、発育してきた細菌数を計数し、さらに分離した菌株を遺伝学的に同定した。口のみ試験では 16 種の清涼飲料水、合計 352 検体の試験を行った。開封試験では 16

種の清涼飲料水、合計 320 検体の試験を行った。また、口のみ・開封試験で得られた細菌および酵母の 13 菌株を 8 種類の清涼飲料水にペットボトル 1 本当たり 100 cfu になるように接種し、25°C もしくは 35°C で培養し、2 日間の菌数を記録した。毒素産生も検出した。腸管出血性大腸菌 O157 等については毒素産生性も検討した。

リムルス試験を用いた清涼飲料水中の細菌検出法について、リムルス反応に対する各飲料成分の干渉の程度を検討した。

3. 真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

清涼飲料のカビ・酵母による腐敗情報およびオゾン、膜および紫外線による清涼飲料の国内における殺菌情報 (強度、利用状況や基準値等) を収集するため、SciFinder および JDream2 を使用して検索した。加えて、所有している関連書籍等からも情報収集した。

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。また、清涼飲料水への接種試験では、糸状菌を対象とし、酵母 (研究分担者: 大西貴弘の報告書参照) については細菌と同様に試験した。使用した飲料は茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、果汁

入り炭酸飲料、スポーツドリンク、コーヒー飲料、ニアウォーター、ミネラルウォーターの 8 種類を使用した。これらの飲料に昨年度実施した清涼飲料水の口のみ試験から分離された *Aspergillus sydowii*、*Aureobasidium pullulans*、*Cladosporium cladosporioides*、*Exophiala xenobiotica*、*Penicillium expansum* の 5 菌種を 10 もしくは 100 cfu/ボトルに接種し、28 日間の菌の発育を観察した。

4. 清涼飲料水の殺菌・除菌方法の妥当性

芽胞非形成菌である大腸菌、サルモネラ、腸球菌、黄色ブドウ球菌、芽胞形成菌として枯草菌およびセレウス菌を各 2 株ずつ供試し、85℃・30 分の殺菌による菌数の減少を測定した。また、海外の清涼飲料水の微生物関連規格基準の情報収集については、International Life Sciences Institute of Japan (ILSI Japan:NPO 法人 国際生命科学研究機構) および国内の研究協力者からアメリカ、イギリス、ドイツの基準や情報を入手した。

5. 委託研究「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」

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。

C. 結果

1. 清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

苦情のアンケートで 103 の地方自治体および 15 の製造者から回答を得た。清涼飲料

水の開封前と開封後の両方で微生物汚染が認められるが開封後の事例の方が多い傾向であること、汚染微生物の種類としてはカビが比較的多いこと、果汁飲料と茶系飲料での汚染事例が多いこと、開封前の事例では流通時での容器の破損による微生物汚染が製造時の事故よりも原因として多いこと、開封後では消費者の消費方法が原因となることが示された。

真菌の DNA 抽出法として、CTAB 法/ビーズ破碎法は供試した全菌種の DNA で PCR に成功し、優れていた。また、*Fusarium* 属菌の系統関係を明確に示したのは β -*tub* 系統樹であった。さらに、カビ DNA によるマイクロプレート DNA-DNA ハイブリダイゼーションの実験系を確立した。また、*Fusarium* 属菌 2 菌種での全ゲノムレベルでの相同率は、 β -*tub* 塩基配列の相同率とよく相関することが示された。

果実汚染真菌の定量方法では、MPN 法ではほとんどの検体において定量値が塗抹培養法および平板 MPN 法に比べて低かった。塗抹培養法および平板 MPN 法では、4 日間培養で 10 日間培養とほぼ同等の定量値を得られ、両方法の定量値に大きな差はなかった。検体の真菌叢から *Cladosporium* 属および *Penicillium* 属が多く検出され、栽培から店頭に至る環境を反映していた。また、市場病害菌およびマイコトキシン産生菌の占有率は低かった。

2. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

情報収集では、清涼飲料水中の細菌の動態は、飲料側の因子 (pH、成分など)、細菌側の因子 (酸性条件への耐性、栄養要求性、など)、環境の因子 (温度など) などの条

件の組み合わせにより複雑に変化することが明らかになった。紫外線殺菌、オゾン殺菌、膜による除菌法はそれぞれ加熱殺菌にはない利点を持っている反面、清涼飲料水の品質に与える影響が大きく、これらの殺菌・除菌法を応用するのは非常に難しいことが明らかになった。

開封または口飲み試験では、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が高く、発育が優れた。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。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。清涼飲料水への細菌の接種試験では、清涼飲料水の pH、Brix あるいは炭酸ガスまたは栄養源の有無など、製品の特性によって微生物動態が異なった。とくに茶系飲料、野菜ジュースおよびミルク入りコーヒー飲料では著しく生育する菌株が認められた。また、腸管出血性大腸菌 O157 の毒素産生が認められた。

リムルス試験では多くの飲料で 10 から 100 倍希釈するとリムルス反応阻害はなくなり、エンドトキシンを測定するできたが、野菜飲料のように 10,000 倍希釈しなければ測定できないものも存在した。

3. 真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

情報収集では、果汁飲料、茶系飲料、炭酸飲料およびミネラルウォーターでのカビ・酵母の汚染に関する情報を得ることができた。加熱殺菌に代わる殺菌法(膜、紫外線およびオゾン)について国内情報を収集したところ、多くの情報を得ることはできなかつ

た。

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。

清涼飲料水への接種試験では、飲料種と菌種の組み合わせにより菌の発育に差は見られたが、全体的に茶系飲料、果汁飲料、野菜飲料、スポーツドリンクで菌の発育が特に良好であった。菌種では *A. pullulans*、*C. cladosporioides*、*P. olsonii* が顕著な発育を示した。25°C の発育環境では培養 2 日後に菌の発育が多く認められた。10°C の発育環境でも 4 日目には菌の発育が認められる例があった。多くの菌では 10°C で培養すると、25°C で培養した場合と比較して発育速度は低下したが、発育そのものを阻止することはできなかった。

4. 清涼飲料水の殺菌・除菌方法の妥当性

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°C・30 分の加熱条件で生菌数が 7~8 桁程度減少した。一方、枯草菌では芽胞の減少はほとんど見られなかった。セレウス菌の一株はほとんど減少せず、他の一株は 2~3 桁程度減少した。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。

5. 委託研究「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」

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。作成されたマニュアルは、食品衛生行政の対応に活用されることを期待し、全国の地方自治体の衛生研究所などに配布された。

D. 考察

1. 清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

茶系飲料は清涼飲料水中で最も多い飲料種で全体の約1/3を占めるため、茶系飲料の苦情事例数の多くなっていると考えられた。また、茶系飲料は開封後に長時間にわたって飲み続ける習慣によると考えられた。果汁飲料による苦情は生産量に比して全般的に発生頻度が高いといえる。消費者が開封後も常温で保管することもあり、1日以上では清涼飲料水の種類、開封時の状況や保管温度などの条件によっては苦情となる変化が起こる可能性がある。流通上の苦情を考慮している製造者と、していない製造者が混在していた。流通も製造者の責任の範囲にあることが消費者、製造者、自治体など関係者に再確認されることが望まれる。

真菌で効率良く精製度の高い DNA 抽出を行うには、種や分類群を問わず、液体培

養で短時間に得た大量の細胞に CTAB 法とビーズ破碎併用法を適用すると良いということが明らかとなった。また、本研究では *Fusarium* 属菌同定のための遺伝子指標としては β -*tub* が比較的適するということが明らかとなった。さらに、真菌の DNA について、簡便な方法であるマイクロプレートを用いた DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行う実験系の確率に成功した。また、この方法から得られた全ゲノムレベルでの相同率を *Fusarium* 属菌の系統解析に適用すれば、従来の系統樹よりも解像度の高い系統樹の構築が可能となることが示唆された。

果実汚染真菌の定量方法では、平板 MPN 法は、塗抹培養法よりも理論的な数値が統計学的手法によって得られ、また MPN 法よりも時間を要さず定量操作として簡便であることから優れた迅速な真菌定量方法であることが明らかとなった。清涼飲料水の原料となる果実については、腐敗を防止して健全性を守ることに留意し、市場病害菌およびマイコトキシン産生菌のみならず果実の真菌叢の優占菌種となっている非病原真菌に注目した管理を行うことが重要である。

2. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

情報収集では、特定の飲料における特定の細菌および飲料種での動態を調べたものが主であり、日本国内で消費量の多い茶系飲料、炭酸飲料、コーヒー飲料、スポーツドリンクなどに関するデータはほとんど見当たらなかった。加熱殺菌と同様に紫外線殺菌、オゾン殺菌、膜による除菌でも条件の決定はさまざまな要因を考慮する必要性が明らかになった。

開封または口飲み試験では、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、中性付近で最も発育しやすいことが明らかになった。直接口飲みを少なくとも、細菌汚染が発生することが明らかになった。そのため、開封後の飲料は速やかに消費する必要性が認められた。細菌の接種試験では、茶系飲料において細菌は非常に強い発育を示した。茶系飲料に含まれているカテキンはグラム陽性菌に対する抗菌性があるといわれているが、腸内細菌や酵母が増殖する可能性など消費者への情報提供が必要であると考えられた。また、毒素産生性の食中毒細菌も清涼飲料水中で増殖することができ、毒素の産生も認められたことから、健康被害をもたらす可能性が示唆された。

リムルス試験では、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。

3. 真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

情報収集では、茶系飲料では果汁飲料に比べると栄養分は少なく、また強い加熱殺菌で製造されているにもかかわらず、真菌汚染が多く菌種が報告されていることは、飲用の形態が主要な要因であると示唆された。耐熱性カビも複数見られており、一部は殺菌不良が原因となった可能性も考えられた。国内の清涼飲料の殺菌はミネラルウォーターや一部の透明な飲料を除き加熱によるものである。膜や UV 処理が有効な清涼飲料についても加熱殺菌と併用して用いられるケースが過半数で、実用性が少ないために（微生物の種類によっては十分な殺菌を行えず、事故の原因となりうる）、それぞれ単独での清涼飲料の殺菌に関する情報が少な

いと考察された。

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胞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。口飲みによって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して苦情となる現象が発生すると考えられた。また、苦情についての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、アンケートおよび文献検索の結果で多かった菌種が比較的少ない、あるいは未検出であったことから、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。接種試験では、炭酸飲料を除くすべての飲料に対して発育に適したカビが存在したことから、開封後の清涼飲料水の保管においてカビの存在は大きな脅威となることが確認された。

4. 清涼飲料水の殺菌・除菌方法の妥当性

委託研究「清涼飲料水からの真菌の基本的な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。しかし、芽胞菌については十分な殺菌効果はなかった。殺菌効果の測定に使える指標菌の確立が必要である。また、欧米では炭酸飲料とボトルドウォーターが主な飲料種であり、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。日本では微生物の増殖のしやすい茶系飲料が主である

ため、規格基準が必要であると考えられた。

5. 委託研究「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」

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。

E. 結論

1. 清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

汚染微生物の種類としてはカビが比較的多いこと、果汁飲料(野菜汁飲料も含む)と茶系飲料での汚染事例が多いこと、開封前の事例では流通時での容器の破損による微生物汚染が製造時の事故よりも原因として多いこと、開封後では消費者の消費方法が原因となることが示された。製造から消費までを①製造工程、②流通、③消費、に分けて必要な対応を考えたところ、①製造工程では、中小製造者の支援が必要である、②流通では、運送業者名は出ない。製造者が運送・流通業者を啓発する必要がある、③消費では、行政だけでなく製造者からも消費者の啓発が必要である。消費者の教育を行うことで開封後の苦情をかなり減らすことが可能と思われる。

真菌の DNA 抽出は液体培養し CTAB 法とビーズ破砕併用法を適用すると良いということが明らかとなった。また、*Fusarium* 属菌同定のための遺伝子指標として β -*tub* が最も適するということが明らかとなった。さらに、DNA-DNA ハイブリダイゼーションでの *Fusarium* 属菌2菌種的全ゲノムレベルでの相同率は、 β -*tub* の塩基配列相同率とよく相

関することが示された。

真菌の定量方法では平板 MPN 法は優れた迅速な真菌定量方法であることが明らかとなった。果汁飲料の腐敗を防止して健全性を守ることに留意し、果実の真菌叢の優占菌種となっている非病原真菌に注目した管理を行うことが重要であることが明らかとなった。

2. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

清涼飲料水中における細菌の動態に関するデータでは特定の飲料種、細菌種に偏った報告が多く、必ずしも国内の現状と一致するものではなかった。今後、国内の状況にあったデータを得るために接種試験などを行なっていく必要性が認められた。オゾン殺菌、紫外線殺菌、膜による除菌などの殺菌・除菌方法は制限が多く清涼飲料水を含めた食品分野では応用が進んでいない。

口のみ・開封試験では、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、細菌に汚染する可能性が高くなった。また、飲用の翌日でも細菌は高率に発育した。飲料種によっては細菌が発育しているのにもかかわらず外見的变化が乏しく、消費者が飲料中の細菌増殖を判定できない事例が見られた。こういったことから、開封・飲用後の清涼飲料水は速やかに消費することが必要であり、消費者への注意の喚起を行う必要があると思われる。清涼飲料水は製品の特性により、接種した微生物の挙動が異なることが分かった。25℃保存で増殖した微生物は 35℃保存でも増殖しており、室温でも十分増殖可能であると思われる。各メーカーは製品の特性および本研究の結果等を参考に製品開封後の保存性に関する情報を自ら把握し、

消費者に対する注意喚起を行う必要があると考えられた。

リムルス試験では、多くの飲料種で10から100倍希釈によって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。さらに多くの銘柄で試験しデータを充実させる必要性が認められた。

3. 真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

情報収集では、茶系飲料で真菌汚染が多くの菌種が報告されていることは、飲用の形態、耐熱性カビの殺菌不良が原因となったことが考えられた。国内の清涼飲料の殺菌は主に加熱によるものであり、膜やUV処理は実用性が少ないためにそれぞれ単独での清涼飲料の殺菌に関する情報が少ないと考察された。

開封試験では、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た。口飲みによって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して苦情となる現象が発生すると考えられた。また、苦情のアンケート調査の結果と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、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。接種試験では、炭酸飲料を除くすべての飲料に対して発育に適したカビが存在したことから、開封後の清涼飲料水の保管においてカビの存在は大きな脅威となることが確認された。

4. 清涼飲料水の殺菌・除菌方法の妥当性

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、

欧米と日本では消費する清涼飲料水の種類が異なり日本に適切な殺菌条件基準が必要であると考えられた。

5. 委託研究「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」

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、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。作成されたマニュアルは、食品衛生行政の対応に活用されることを期待し、全国の地方自治体の衛生研究所などに配布された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hara-Kudo, Y., Niizuma, J., Goto, I., Iizuka, S., Kamakura, K., Kaji, Y., Suzuki, S. and Takatori, K. Surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Beef with Effective Procedures, Independent of Serotype. *Foodborne Pathog. Dis.*, 5: 98-104, 2008.

Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Otsuka, K., Hiramatsu, R., Tanaka, H., Tsuchiya, T., Konuma, H. and Takatori, K. Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method: A collaborative study. *Int. J. Food. Microbiol.* 122/1-2 pp 156-161, 2008.

占部友理恵, 薬袋裕二, 芳賀実, 小西良子, 石黒厚, 工藤由起子. 香辛料における

- サルモネラの生残性と調理食品中での増殖性. 食品衛生学雑誌. 49: 70-75, 2008.
- Asai, Y., Kaneko, M., Ohtsuka, K., Morita, Y., Kaneko, S., Noda, H., Furukawa, I., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. *Salmonella* prevalence in seafood imported into Japan. J. Food Prot., 71: 1460-1464. 2008.
- Hayashidani, H., Iwata, T., Yamaguchi, F., Hara-Kudo, Y., Okatani, T. A., Watanabe M., Lee, K., Kumagai, S. Survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in vacuum-packed or non-vacuum-packed pork at low temperature. Biocont. Sci., 13: 139-144, 2008.
- Ui, J., Kondo, K., Sawada, T. and Hara-Kudo, Y. Survival of foodborne pathogens in grain products and effect of catechins. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 50: 126-130, 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 *Vibrio parahaemolyticus* by the Loop-mediated isothermal amplification. J. Food Prot. 72: 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 *Salmonella* Weltevreden 及び *S. Senftenberg* の生残性. 食品衛生学雑誌. 50: 86-90, 2009.
- Toyota-Hanatani, Y., Ekawa, T., Ohta, H., Igimi, S., Hara-Kudo, Y., Sasai, K. and Baba, E. An assessment on inactivated-*Salmonella* Enteritidis vaccine treatment in the layer flocks with regard to public health. Appl. Environ. Microbiol. 75: 1005-1010, 2009.
- Hidaka, A., Hokyo, T., Arikawa, K., Fujiwara, S., Ogasawara, J., Hase, A., Hara-Kudo, Y. and Nishikawa, Y. Multiplex real-time PCR for exhaustive detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli*. J. Appl. Microbiol. 106: 410-420, 2009.
- Hara-Kudo, Y. and Takatori, K. Microbial quality of liquid egg and *Salmonella* infection status in Japan. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 50: 34-40, 2009.
- 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.
- 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. Commun. 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 *Oxalicibacterium horti* sp. nov. and *Oxalicibacterium 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.
- 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. Vol. 50, No. 6. p. 315-320, 2009.
- 小沼 ルミ、渡辺 麻衣子、工藤 由起子、小西 良子、瓦田 研介、高鳥 浩介. 糸状菌の流動パラフィン重層法による長期保存後の生存性. 防菌防黴. 38: 75-80, 2010.
- 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., 73: 1077-1084, 2010.
- 小沼 ルミ、渡辺 麻衣子、工藤 由起子、小西 良子、高鳥 浩介、一戸 正勝. 炭素源資化性分析を用いた環境汚染糸状菌の同定および同定精度の向上. 防菌防黴. 38: 363-369, 2010.
- Iibuchi, R., Hara-Kudo, Y., Hasegawa, A. and Kumagai, S. Survival of *Salmonella* on a polypropylene surface under dry conditions in relation to biofilm-formation capability. J. Food Prot. 73:1506-1510, 2010.
- Watanabe, M., Masaki, H., Mori, T., Tsuchiya, T., Konuma, H., Hara-Kudo, Y., Sugita-Konishi, Y., Takatori, K. Inactivation effects of UV irradiation and ozone treatment on the yeast and mold in mineral water. J. Food Prot., 73: 1537-1542, 2010.
- Watanabe, M., Tsutsumi, F., Lee, L., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S., Takatori, K., Hara-Kudo, Y., Konuma, H. Enumeration of Fungi in Fruits by the Most Probable Number Method. Journal of Food Science. 75: M564-M567. 2010.
- 田中 廣行、土屋 禎、大島 赴夫、鈴木 達也、工藤 由起子. 技能試験データに基づく細菌数の不確かさの推定. 日本食品微生物学会雑誌. 27: 158-162, 2010.
- 森 哲也、田中 廣行、和田 真太郎、伊藤 武、宇田川 藤江、工藤 由起子. 市販の生食用カット野菜、カット果実およびスプラウトの微生物汚染調査. 日本食品微生物学会雑誌. 27: 163-170, 2010.
- Ohtsuka, K., Tanaka, M., Ohtsuka, M., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. Comparison of detection methods for *Escherichia coli* O157 in beef livers and car-

- casses. Foodborne Pathog. Dis.. 7: 1563-1567. 2010.
- 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.
- Moe, K., Mimura, J., Ohnishi, T., Wake, T., Yamazaki, W., Nakai, M. and Misawa, N. The mode of biofilm formation on Smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. J. Vet. Med. Sci. 74: 411-416, 2010
- 大西 貴弘. 国産ミネラルウォーターのエンドトキシン濃度測定による水源およびその製造所における細菌汚染検出の試み. 日本食品微生物学雑誌. 27: 141-145, 2010.
- 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.
- 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: 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.
- Watanabe, M., Tsutsumi, F., Konuma, R., Lee, L., Kawarada, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S., Takatori, K., Konuma, H., Hara-Kudo, Y. Quantitative analysis of mycoflora on commercial domestic fruits in Japan. J. Food Prot., 印刷中.
- Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K. and Hara-Kudo, Y. Evaluation of genetic markers for identifying isolates to of the species of the genus *Fusarium*. J. Sci. Food Agric., 印刷中.
- ## 2. 学会発表
- 工藤 由起子. 飲料水と汚染物質. 平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業シンポジウム. 平成 21 年2月 10 日東京、2月 17 日盛岡市.
- 渡辺 麻衣子, 正木 宏幸、森 哲也、土屋 禎、小沼 博隆、工藤 由起子、小西 良子、高鳥 浩介. ミネラルウォーター中の酵母およびカビに対する紫外線照射およびオゾン処理による殺菌効果. 第 36 回日本防菌防黴学会年次大会. 2009.9. 大阪.
- 小沼 ルミ、渡辺 麻衣子、工藤 由起子、小西 良子、瓦田 研介、高鳥 浩介. 流動パラフィン重層法による糸状菌の長期保存に関する検討. 第 36 回日本防菌防黴学会年次大会. 2009.9. 大阪.
- 渡辺 麻衣子、李 謙一、後藤 慶一、熊谷 進、小西 良子、工藤 由起子. 食品汚染にかかわる真菌からの迅速な大量 DNA

- 抽出方法. 日本食品衛生学会第 98 回学術講演会. 2009.10. 函館.
- 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. 日本食品衛生学会第 98 回学術講演会. 2009.10. 函館.
- 李 謙一、渡辺 麻衣子、小西 良子、工藤 由起子、熊谷 進. チーズスターターカビ *Penicillium camemberti* による腸管出血性大腸菌の増殖促進効果. 第 30 回日本食品微生物学会総会. 2009. 10. 東京.
- 渡辺 麻衣子、李 謙一、後藤 慶一、熊谷 進、小西 良子、工藤 由起子. 真菌からの迅速な大量 DNA 抽出のための物理的抽出法、化学的抽出法および市販キットの比較検討. 日本マイコトキシン学会第 67 回学術講演会. 2010.01. 東京.
- 李 謙一、渡辺 麻衣子、小西 良子、工藤 由起子、熊谷 進. チーズ製造モデルにおける *Penicillium camemberti* による腸管出血性大腸菌の増殖促進作用. 第 149 回日本獣医学会学術集会. 2010. 03. 東京.
- 渡辺 麻衣子、米澤 隆弘、李 謙一、熊谷 進、小西 良子、後藤 慶一、工藤 由起子. *Fusarium* 属菌の同定に適する遺伝子指標の評価. 第 30 回日本食品微生物学会学術総会, 大津, 2010. 9.
- 小沼 ルミ、渡辺 麻衣子、工藤 由起子、小西 良子、高鳥 浩介、一戸 正勝、瓦田 研介. 炭素源資化性分析を用いた糸状菌同定の検討. 第 37 回日本防菌防黴学会年次大会, 東京, 2010.9.
- Watanabe, M., Hara-Kudo, Y., Tsutsumi, F., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Takatori, K., Konuma, H.. Rapid enumeration methods for fungi in fruit by the most probable number method. IAFP 2010, Anaheim, California, 2010.8.
- 渡辺 麻衣子、堤 史行、小沼 ルミ、李 謙一、瓦田 研介、小西 良子、熊谷 進、高鳥 浩介、小沼 博隆、工藤 由起子. 市販国産果実における真菌叢の解析. 日本食品衛生学会第 100 回, 熊本, 2010. 9.
- 大西 貴弘, 室井 正志, 棚元 憲一: Dimerization of intracellular domain of TLR4 is not required for the activation of MyD88-independent signaling pathway. 10th Conference of the International Endotoxin and Innate Immunity Society. 平成 20 年 7 月 31 日
- 室井 正志、大西 貴弘、棚元 憲一: TRAF6 distinctively mediates MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF- κ B. 10th Conference of the International Endotoxin and Innate Immunity Society. 平成 20 年 7 月 31 日
- 大西 貴弘、室井 正志、棚元 憲一: MyD88 非依存性経路活性化における TLR4 二量体形成の役割の解析. 第 14 回日本エンドトキシン研究会. 平成 20 年 10 月 25 日
- 大西 貴弘: 平成 20 年度日本エンドトキシン研究会奨励賞受賞講演—マクロファージ細胞膜表面におけるエンドトキシン認識機構に関する研究—. 第 14 回日本エンドトキシン研究会. 平成 20 年 10 月 25 日
- 塩入 利一、室井 正志、大西 貴弘、棚元 憲一: エンドトキシンによる血管内皮細胞のアポトーシス誘導と可溶性 CD14,

MD-2 の効果. 第 14 回日本エンドトキシン研究会. 平成 20 年 10 月 25 日
天野 憲一, 横田 伸一, 大西 貴弘, 三澤 尚明 : 自然免疫におけるカンピロバクターとヘリコバクター由来 LPS の炎症性サイトカイン誘導能. 第 1 回日本カンピロバクター研究会. 平成 20 年 12 月 2 日
大西 貴弘, 室井 正志, 棚元 憲一 : LPS 刺激は TRIF を TLR4 から解離させる. 第 82 回日本細菌学会総会. 平成 20 年 3 月 13 日
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
後藤 慶一、分子生物学的手法、NPO 法人カビ相談センター 第 6 回カビ講話会(迅速・簡易なカビ検査法)
後藤 慶一、遺伝子同定の基礎編、NPO 法人カビ相談センター 第 7 回カビ講話会
後藤 慶一、遺伝子同定の応用編、NPO 法人カビ相談センター 第 9 回カビ講話会
後藤 慶一、遺伝子解析手法による微生物同定システムの効果的運用、Applied Biosystems 第 1 回 SEQ[®]セミナー
後藤 慶一、耐熱性好酸性菌統一検査法の現状、(社)日本果汁協会 平成 20 年実務担当者研修会
K. Matsumoto, Y. Kato and K. Goto, Ge-

netic Diversity of *Alicyclobacillus acido-terrestris* and the Correlation with Their Spoilage Ability, IAFP2008 95th Annual Meeting.
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.
神田 隆, 金澤 裕司, 小澤 一弘, 後藤 慶一, 小沼 博隆, 杉山 寛治, 工藤 由起子. 清涼飲料水の開封・口のみでの汚染物質の挙動解析. 第 100 回日本食品衛生学会. 平成 22 年 9 月
大西 貴弘, 後藤 慶一, 金澤 裕司, 小澤 一弘, 神田 隆, 杉山 寛治, 渡辺 麻衣子, 小沼 博隆, 工藤 由起子. 清涼飲料水の開封・口のみによって生じる微生物汚染での原因菌の解析. 第 31 回日本食品微生物学会. 平成 22 年 11 月
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.
G.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)
なし

総合研究(分担)研究報告書

清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための
微生物同定方法の確立

工藤 由起子

平成 20～22 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

清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

研究分担者 工藤 由起子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

研究協力者

大塚 佳代子 (埼玉県衛生研究所)

尾上 洋一 (元 神奈川県衛生研究所)

平井 昭彦, 千葉 隆司, 矢野 一好 (東京都健康安全研究センター)

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, 金子 清久 (NPO 法人 ILSI Japan)

山下 裕司, 福田 正彦 ((社)全国清涼飲料工業会)

堤 史行, 小沼 博隆 (東海大学海洋学部)

後藤 慶一 (三井農林株式会社)

小沼 ルミ (東京都立産業技術研究センター)

大西 貴弘, 毎田 恵実, 渡辺 麻衣子, 鎌田 洋一 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

現代では多様な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・保管方法、加えて消費のされ方も多様である。このため、地方自治体や製造業者の消費者窓口に苦情や問い合わせが寄せられており、微生物に関連するものも少なくない。本研究では、清涼飲料水についての消費者からの苦情等を整理し、安全な製品が消費者に提供・消費されるために調査を行った。また、真菌が主な原因であることから、真菌に関する研究を行なった。以下の4研究課題について3年間の研究期間に取り組んだ。

1. 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情の調査
2. 真菌同定のための遺伝子指標に関する研究
3. 最確数法による果実汚染真菌の定量方法
4. 市販国産果実における真菌叢の解析

A. 研究目的

現代では多様な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・保管方法、加えて消費のされ方も多様である。このため、地方自治体や製造業者の消費者窓口に苦情や問い合わせが寄

せられており、微生物に関連するものも少なくない。本研究では、清涼飲料水についての消費者からの苦情等を整理し、安全な製品が消費者に提供・消費されるために調査を行った。

また、真菌が主な原因であることから、真菌に関する研究を行なった。真菌の同定方法は、従来は形態学的観察に頼った方法が主流であったが、特徴を見出すのに特別な熟練技術が求められることに加え、培養が必要で時間がかかる。このため、分子生物学的手法の持つ簡便性・迅速性・客観性が注目されている。本研究では、特に糸状菌を正確に同定できる遺伝子指標を特定することを目的として、複数遺伝子の塩基配列の系統解析を行い、塩基置換速度の評価を行った。対象真菌には、清涼飲料水の原料を含めた多くの青果物からしばしば検出されることが知られる *Fusarium* 属菌とした。さらに、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの手法を用いて *Fusarium* 属菌のゲノム全体での塩基配列相同性を検証し、これに基づいた系統樹を構築して、体系的な分類方法の確立について検討した。

汚染真菌量をできるだけ迅速に正確に測定する方法や、汚染真菌数の低い食品の製造の評価に用いる真菌数のより正確な測定方法が必要である。本研究では真菌の定量方法の検討を、果汁飲料水の原料になる果実について行った。また、清涼飲料水の製造での適切な真菌殺菌方法を決定するには、原料の生菌数を知るとともに、優勢な真菌種の確定が重要である。果汁飲料水は風味が損なわれることを防ぐために、加熱殺菌処理などの強い殺菌が施されておらず、微生物学的な汚染が発生し易い。このため、

特に果実の真菌叢について解析を行った。

B. 研究方法

1. 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情の調査

全国地方自治体、製造関連団体である特定非営利活動法人 国際生命科学研究機構日本支部(ILSI Japan)および社団法人 全国清涼飲料工業会(全清飲)にアンケート回答による清涼飲料水の微生物を原因とする苦情の情報提供の協力依頼を行った。アンケート調査結果の集計を研究班内で行い、全国地方自治体、製造関連団体等の代表者と検討し現状で起こっている問題点について解析した。

2. 真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

酵母およびカビ計 17 種を対象とし、液体培養で得た細胞を用いて DNA 抽出法の比較を行った。2種の市販キット、SDS 法、CTAB 法および塩化ベンジル法、およびビーズ破碎併用の有無を検討し、合計 10 通りの抽出法で3回繰り返し実験を行った。これらの DNA 収率、PCR 増幅の有無および精製度を比較した。

また、*Fusarium* 属菌同定に適した遺伝子指標を明らかにするために、リボゾーム関連遺伝子(rDNA)および β チューブリン遺伝子(β -*tub*)の塩基配列を決定した。*Fusarium* 属菌全体から 23 菌種を選択し、これらの標準株またはこれに準じた菌株を収集し計 46 菌株を供試した。これらの遺伝子塩基配列を用いて近隣結合法で系統解析を行い、全枝長を算出した。

さらに、カビDNAを用いた塩化セシウム密度勾配法による DNA の精製およびマイクロ