

プレートでの DNA-DNA ハイブリダイゼーションの条件検討を行うために、*Byssoschlamys fulva* から抽出した DNA を用い、実験系を確立した。続いて *Fusarium* 属菌 2 菌種での DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行い、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。

3. 最確数法による果実汚染真菌の定量方法

清涼飲料水の原料となる国産果実 9 種 27 検体の表皮部分を検体として用いた。定量方法には、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。

4. 市販国産果実における真菌叢の解析

清涼飲料水の原料となる国産果実 9 種 27 検体の表皮部分を検体として用いた。検体から真菌を網羅的に分離し、これら分離株について、形態学的、分子生物学的および生化学的な手法を用いて同定を行った。また、菌種ごとの汚染真菌数を算出した。

C. 結果

1. 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情の調査

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く傾向であること、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。

2. 真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

DNA 抽出法の比較検討の結果、他の抽出法よりも有意に高い DNA 収量が得られた菌種数が最も多い抽出法は SDS 法/ビーズ破砕法であること、この抽出法では PCR で遺伝子増幅しない DNA となることがあり、その菌種には偏りがあることが示された。その後の検討で、CTAB 法/ビーズ破砕法を用いた場合に全菌種の DNA で PCR に成功したことを示した。

また、rDNA 関連遺伝子および β -*tub* 塩基配列を用いた系統解析の結果、全枝長が最も長かったのは rDNA ITS1 領域 (ITS1) で 1.2126、次いで β -*tub* で 0.7987 であった。また、系統樹の樹形を比較したところ、ITS1 系統樹の解像度は十分でなく、*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、*B. fulva* を用いて、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、*B. fulva* および *Fusarium* 属菌 2 菌種から取得した β -*tub* 塩基配列の相同率と比較したところ、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。

3. 最確数法による果実汚染真菌の定量方法

MPN 法では真菌の発育が遅く 10 日間培養して初めて菌数が最大に達した検体が多く、また、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。

4. 市販国産果実における真菌叢の解析

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く、健全な状態の果実を原料とする場合、これらの真菌による清涼飲料水の腐敗および直接の健康危害のリスクは低いことが示された。

D. 考察

1. 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情の調査

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、茶系飲料は開封前より開封後で発生率が高くペットボトルに入った茶系飲料を少しずつ長時間にわたって飲み続ける習慣が広まっている結果を反映しているのではないかと考えられた。果汁飲料の年間生産量が茶系飲料の半分以下であるにもかかわらず、開封前、開封後ともに件数が多く、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。

清涼飲料水は常温で販売される製品が多く、賞味期限(開封前)が数ヶ月以上の場合も多い。消費者が開封後も常温で保管することもあり、短時間であれば苦情発生には至らないが、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保管条件によっては苦情となる変化が起こる可能性がある。また、冷蔵での保管をしたとしても開封時の状況や保管時間などによって苦情

となる可能性がある。

製造者にとって「開封前」は製造工場を出る前という意識が強く、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。

2. 真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

DNA 抽出法を比較検討したところ、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、本研究で系統解析した rDNA 関連遺伝子および β -*tub* の中では、 β -*tub* の全枝長は十分長く、また解像度の高い系統樹が得られた。よって、 β -*tub* を用いれば *Fusarium* 属菌の種間の差異が明確になると考えられ、*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。

3. 最確数法による果実汚染真菌の定量方法

平板 MPN 法は、塗抹培養法でコロニー数を計測するよりも偶発的な要因に左右されない理論的な数値が統計学的手法によって

得られ、また MPN 法よりも生菌数測定に時間を要さず、さらに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。

4. 市販国産果実における真菌叢の解析

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、従来から注目されてきた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。

E. 結論

1. 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情の調査

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。

2. 真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

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、*Fusarium* 属菌を用いてリボゾーム関連遺伝子および β チューブリン遺伝子(β -*tub*)の塩基配列の系統解析を行い、*Fusarium* 属菌同定のための遺伝子指標としては、これらの遺伝子の中では β -*tub* が最も適するということが明らかとなった。さらに、真菌の DNA を用いてマイクロプレートでの DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行う実験系を確立し、この方法を、 β -*tub* の系統解析で近縁であることが示された *Fusarium* 属菌 2 菌種に適用して全ゲノムレベルでの相同率を算出した。この相同率は、 β -*tub* の塩基配列相同率とよく相関することが示された。

3. 最確数法による果実汚染真菌の定量方法

塗抹平板法、MPN 法および平板 MPN 法の3方法の中で、平板 MPN 法は、塗抹培養法でコロニー数を計測するよりも偶発的な要因に左右されない理論的な数値が統計学的手法によって得られ、また MPN 法よりも生菌数測定に時間を要さず、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。

4. 市販国産果実における真菌叢の解析

清涼飲料水の原料となる国産果実については、清涼飲料水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。

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.
- 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.
- 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.
- Watanabe, M., Masaki, H., Mori, T., Tsuchiya, T., Konuma, H., Hara-Kudo, Y., Sugita-Konishi, Y. and 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.
- 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 carcasses. *Foodborne Pathog. Dis.*, 7: 1563-1567. 2010.
- Watanabe, M., Tsutsumi, F., Lee, L., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S., Takatori, K., Hara-Kudo, Y. and Konuma, H. Enumeration of Fungi in Fruits by the Most Probable Number Method. *J. Food Sci.*, 75: M564-M567. 2010.
- 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., Tsutsumi, F., Konuma, R., Lee, L., Kawarada, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S., Takatori, K., Konuma, H. and 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. 3. 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.
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）
特になし

総合研究(分担)研究報告書

真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

後藤 慶一・小沼 博隆

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

真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 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、富田 敦子 (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)

荒木 恵美子 (東海大学海洋学部)

増田 修一 (静岡県立大学 食品栄養科学部 食品生命科学科)

小林 和子 (瀬戸谷幼稚園)

高鳥 浩介 (NPO 法人 カビ相談センター)

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

山下 裕司、雛本 恵子、峯 孝則、福田 正彦 ((社) 全国清涼飲料工業会)

大西 貴弘、渡辺 麻衣子 (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は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微生物学的原因での苦情は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。また、殺菌方法についての情報収集もおこなった。研究期間3年間のうち、1年目には清涼飲料のカビ・酵母による腐敗および殺菌方法についての情報収集、2年目には、開封または口飲みで汚染する真菌・細菌の菌種の解析、3年目には清涼飲料水への接種試験を行った。

A. 研究目的

清涼飲料は年間一人あたり約 150 リットルを消費しており、現在の我々の生活に密着した食品として位置づけられる。一方で、清涼飲料の微生物に起因する苦情は食品全

体の 25%に至り、低減化に向けた取り組みが望まれている。しかしながら、清涼飲料の腐敗に関して纏まった情報がないのが実情である。そこで、清涼飲料のカビ・酵母による腐敗について国内外の情報の収集を行った。

また、低減化に関する具体的な策として、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。

また、清涼飲料水の飲水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、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行うこととした。また、微生物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。そこで、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、消費者の苦情の中で大きく占める飲料中の異物浮遊はカビであることが明らかになっている。カビは発育に伴い菌塊を形成する場合が多く、またカビの菌体自体に様々な色がついているため、飲料中でも比較的目立ちやすいと考えられる。こういった理由から、カビの発育に伴う菌塊形成を消費者からは異物としてとらえられ、多くの苦情につながるものと思われる。そこで本研究ではこのカビの飲料中での発育に着目し、清涼飲料水にカビの接種を行い、カビの発育を観察した。

B. 研究方法

1. 清涼飲料のカビ・酵母による腐敗および殺菌方法についての情報収集

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。

2. 開封または口飲みで汚染する真菌・細菌の菌種

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。

3. 清涼飲料水への接種試験

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。

C. 結果

1. 清涼飲料のカビ・酵母による腐敗および殺菌方法についての情報収集

果汁飲料、茶系飲料、炭酸飲料およびミネラルウォーターに起因したカビ・酵母に関する情報を得ることができた。属の数として

は 42 種類で、*Penicillium*、*Cladosporium*、*Byssoschlamys*、*Aspergillus*、*Acremonium*、*Talaromyces*、*Candida*、*Neosartorya* の順で報告例が多かった。

また、低減化に関する具体的な策として、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った。これは、主な清涼飲料の物性上、加熱以外の殺菌法を適応することが困難であり、それ故、実用データが少ないためであると確認された。膜や紫外線についてはミネラルウォーターでの使用が一部見受けられるが、それらについても最終的な殺菌は加熱に依存している場合が過半数を占めた。

2. 開封または口飲みで汚染する真菌・細菌の菌種

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。

3. 清涼飲料水への接種試験

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℃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℃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℃で培養すると、25℃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。

D. 考察

1. 清涼飲料のカビ・酵母による腐敗および殺菌方法についての情報収集

栄養分を多く含み、加熱殺菌(一般的な微生物は死滅する条件)も風味を損なうことから強い条件で行えない果汁飲料で 32 属ものカビの報告があったことは合点がいくところであった。茶系飲料については、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多くの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あろう。総じて、清涼飲料の腐敗に関与するカビ・酵母は良く見聞きするものがほとんどであった。

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。

2. 開封または口飲みで汚染する真菌・細菌の菌種

ヒトからよく分離される微生物が口飲み試験で高頻度に検出されることから、主たる口飲みにおける微生物腐敗は、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(飲料と共に逆流、あるいは接着部分から進入と推定)して発生すると考えられた。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。また、昨年度実施した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。しかしながら、アンケートおよび文献検索の結果で多かった *Acremonium*、*Aspergillus*、*Byssoschlamys* および *Neosartorya* は今回の試験では比較的少ない、あるいは未検出であった。カビの同定は容易ではないことから、単にカビや異物として処理されることもあり、アンケート結果との単純比較は難しいかもしれない。このような一部の差異に関して、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。

3. 清涼飲料水への接種試験

菌種によって発育に適した飲料は異なるが、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することが明らかになった。以上のことから、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。

E. 結論

1. 清涼飲料のカビ・酵母による腐敗および

殺菌方法についての情報収集

清涼飲料のカビ・酵母による腐敗について国内外の情報の収集を行ったところ、果汁飲料、茶系飲料、炭酸飲料およびミネラルウォーターについて起因したカビ・酵母に関する情報を多く得ることができた。また、低減化に関する具体的な策として、加熱殺菌に変わる殺菌法(膜、紫外線およびオゾン)に関する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った。これは、主な清涼飲料の物性上、加熱以外の殺菌法を適応することが困難であり、それ故、実用データが少ないと確認された。膜や紫外線についてはミネラルウォーターでの使用が一部見受けられるが、それらについても最終的な殺菌は加熱に依存している場合が過半数を占めた。

2. 開封または口飲みで汚染する真菌・細菌の菌種

口飲み試験ではヒトに常在する菌多く検出され(約4割)た。開封試験ではカビが多く検出された(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た。pH4未満の酸性飲料では *Staphylococcus* がよく分離された。pHが中性に近づくにつれて細菌の分離株数は増加したが、真菌ではpH5付近で最も分離頻度は高かった。*B. cereus* と *S. aureus* の毒素産生株が分離されたことから、清涼飲料水中でのこれらの菌の増殖によって食中毒の危険性も考える必要があることが示唆された。これらの菌は増殖が著しい場合に毒素を産生して食中毒をもたらすことから、今後、菌が増殖しやすい清涼飲料水の種類など明らかにし増殖を防ぐ取扱方法などを検討することが必要である

3. 清涼飲料水への接種試験

10 cfu という少量のカビでも清涼飲料水中で強く発育することができた。室温では培養2日後でカビが肉眼的に観察される例が多く見られた。冷蔵庫で保存しても、カビの発育を遅らせることはできても、カビの発育自体を阻止することはできないことが明らかになった。カビは様々な種類の飲料に対応でき、その中で発育できることが明らかになった。以上のことから、開封後の清涼飲料水を保管する上でカビは大きな脅威となることを再認識できた。今後これらの結果をもとに消費者や企業に対して注意喚起を行う必要があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

2. 学会発表

後藤 慶一、分子生物学的手法、NPO 法人 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 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, Genetic Diversity of *Alicyclobacillus acidoterrestris* 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

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

特になし

総合研究(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

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(分担)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

分担研究者 大西 貴弘 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

研究協力者

杉山 寛治、神田 隆 (静岡県環境衛生研究所)

金澤 裕司、富田 敦子 (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、荒木 恵美子 (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)

研究要旨

現在、国内では多くの種類の清涼飲料水が製造されている。また、PET ボトルのような新しい形態の容器の出現により、清涼飲料水の消費のされ方は非常に多様に変化してきている。このような変化の中、地方自治体や企業には細菌を原因とする苦情事例が多く寄せられるようになってきている。そこで平成 20 年度から平成 22 年度にかけて以下の研究課題を実施した。

1. 清涼飲料水における細菌の動態情報収集
2. 清涼飲料水の殺菌・除菌方法に関する情報収集
3. 清涼飲料水の口のみ・開封試験
4. 清涼飲料水への細菌の接種試験
5. リムルス試験を用いた清涼飲料水中の細菌検出法の検討

A. 研究目的

清涼飲料水の飲用時および開封後の細菌汚染およびそれに伴う健康被害を予防する目的で以下の研究を行った。

現在、非常に多くの清涼飲料水が市販されており、それらの製造、保管、消費のされ方も多様である。特に近年ではペットボトルや紙パックの普及により、開封後の清涼飲料水を容易に長期間保存できるようになって

きている。その結果、清涼飲料水に細菌が混入して生じる事故が多発している。清涼飲料水における微生物事故を防止するためには、清涼飲料水中で細菌がどのような挙動をするのか調べ安全な取り扱いを提示する必要がある。そのために、公表されている既存の文献から清涼飲料水中での細菌の動態に関するデータの収集を行った。

また、これまで清涼飲料水の殺菌方法とし

て加熱殺菌が確立された方法として広く使われてきているが、加熱を行うため風味や栄養の点で劣るとされてきた。また、加熱殺菌だけでは耐熱性細菌や芽胞による事故を防ぐことができないと考えられる。そこで近年では加熱殺菌に代わる、あるいは加熱殺菌を補足する技術として紫外線殺菌、オゾン殺菌、膜による除菌が注目されている。しかし、これらの方法の安全性などは十分に評価されていない。そこで、既存の文献から新しい殺菌・除菌方法に関するデータの収集を行い、これらの有用性、安全性、問題点などを整理した。

さらに文献調査の結果を踏まえて、清涼飲料水中での細菌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研究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。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。そこで、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、発育してきた細菌を分離同定した。また、分離同定した細菌の飲料中での動態を詳細に観察するために、これらの細菌を飲料に接種し、増殖や毒素産生性について解析を行った。

また、検査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、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。グラム陰性菌の菌体成分であるエンドトキシンを検出するリムルス試験は非常に簡便で高感度、反応が 30 分と短時間なうえ、プレートリーダー以外の特別な機器を必要としないなどの利点がある。そこで、このリムルス試験を清涼飲料水中での細菌の検出に応用できないか検討を行った。

B.研究方法

1.清涼飲料水中での細菌の動態に関する情報収集

一般に公表されている文献を PubMed から検索を行い、清涼飲料水中の細菌の動態に関する文献 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い、飲料種別、細菌種別に分類を行なった。

2.加熱殺菌に代わる新しい殺菌・除菌方法に関する情報収集

一般に公表されている文献を PubMed から検索を行ない、清涼飲料水中の殺菌・除菌方法に関する文献 22 報を収集した。これらの文献からオゾン殺菌、紫外線殺菌、膜による除菌など清涼飲料水における加熱殺菌以外の殺菌方法に関するデータの抽出を行なった。これらのデータを殺菌・除菌方法別、細菌種別に分類した。

3. 清涼飲料水の口のみ・開封試験に関する研究

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℃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。

4. 清涼飲料水への細菌の接種試験に関する研究

口のみ・開封試験で得られた酵母を含む 13 菌株 (*Lactobacillus fermentum*、*Streptococcus salivarius*、*Micrococcus luteus*、*Enterobacter cancerogenus*、*Enterococcus faecalis*、*Klebsiella pneumoniae*、*Candida albicans*、*Rhodotorula mucilaginosa*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Staphylococcus aureus*、*Bacillus cereus*、*Salmonella Typhimurium*、*Escherichia coli*) 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℃もしくは 35℃で培養し、2 日間の菌数を記録した。また、*S. aureus*、*B. cereus*、*S. Typhimurium*、*E. coli* に関しては飲料中での毒素産生も検出した。

5. リムルス試験を用いた清涼飲料水中の細菌検出法に関する研究

9 種類の清涼飲料水それぞれに 0.25 EU/ml になるようにエンドトキシンを加え、その飲料中のエンドトキシン濃度をエンドトキシン特異的リムルス試験で測定を行った。得られた結果から、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。

C. 研究結果

1. 清涼飲料水中での細菌の動態に関する情報収集

公表されている文献 38 報から清涼飲料水中の細菌の動態に関するデータの収集を行った。その結果、清涼飲料水中の細菌の動態には飲料側の因子 (pH、成分など)、細菌側の因子 (酸性条件への耐性、栄養要求性、至適増殖温度、細菌が活動状態にあるのか静止期にあるのかなど)、環境の因子 (温度など) などの条件が非常に重要で、これらの組み合わせにより細菌の飲料中での増殖は複雑に変化することが明らかになった。得られたデータを飲料種別に分類するとほとんどが果実飲料、茶系飲料、ミネラルウォーターに分類された。海外の研究が多かったので試験に使用されている飲料および菌種は非常に限定されたもので、国内で消費量の多い炭酸飲料やコーヒー飲料、スポーツ飲料などに関するデータは今回調査した限りでは非常に少なかった。このように今回得られた結果は必ずしも国内での現状と一致するものではなかった。

2. 加熱殺菌に代わる新しい殺菌・除菌方法に関する情報収集

新しい殺菌・除菌方法に関する文献は 22 報収集した。今回は紫外線殺菌、オゾン殺菌、膜による除菌に関する有効性、安全性に関するデータを中心に収集を行った。これらの殺菌・除菌法は水道水や排水、医薬品分野に対してはすでに広く利用されており、公表されている文献の数も多く見られた。しかし、これらの殺菌・除菌法の清涼飲料水への応用に関する文献で公表されているものは非常に少なかった。今回収集したデータ

から紫外線殺菌、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、清涼飲料水へこれらの殺菌・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。

3. 清涼飲料水の口のみ・開封試験に関する研究

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。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。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。

4. 清涼飲料水への細菌の接種試験に関する研究

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。またこれら3種類の清涼飲料水に毒素産生性細菌を接種し静置および振盪条件で保存したところ、静置条件で毒素の産生が認められたものの振盪条件では産生が認められない菌株があり、飲料の種類によっては振盪により菌の増殖性に影響を与える可能性があることが分かった。また、細菌の発育性は、製品の特性によって異なることが明らかになっ

た。

5. リムルス試験を用いた清涼飲料水中の細菌検出法に関する研究

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。

D. 考察

1. 清涼飲料水中での細菌の動態に関する情報収集

なるべく多くの種類の飲料、細菌に関するデータを収集しようと試みたが、公表されている文献の多くは特定の飲料における特定の細菌の動態を調べたものであった。飲料種に関しては米国で好んで飲用され、また微生物事故の件数が多い果汁飲料、特にリンゴジュースに関するものが多く、日本国内の清涼飲料水事故の現状とは一致しなかった。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。また、細菌種に関していえば、*E. coli* O157:H7 に関する文献が非常に多く見られたが、これは米国で *E. coli* O157:H7 に汚染

したリンゴジュースによる集団食中毒が多発しているため、日本国内の現状とは必ずしも合致しない。今回の結果から、清涼飲料中での細菌の動態は多くの因子によって大きく影響を受けることが明らかになっている。そのため、日本国内の現状を反映した接種試験を行い、清涼飲料水中の細菌の動態を明らかにする必要性が認められた。

2.加熱殺菌に代わる新しい殺菌・除菌方法に関する情報収集

今回の研究から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。つまり製品の数だけ条件が存在することになるため、細かな殺菌・除菌条件を基準として設定するのは現実的でない。日本国内では食品衛生法に基づく規格基準に含まれている「85℃・30分加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法」という規定があるので、基本的にはこの規定に従って各製造所で加熱殺菌との同等性を評価してゆけば良いと思われる。ただし、今後海外からの非加熱殺菌を単独で用いた清涼飲料水の輸入が増加すれば、海外の基準、例えば米国の5-log reductionと我国の加熱殺菌を基にした基準が同等の性能を有するか評価していく必要があると思われる。

3.清涼飲料水の口のみ・開封試験に関する研究

清涼飲料水中での細菌の発育に関与する一般性状としてはpHとBrixが最も重要な因子と考えられる。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。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。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。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。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。また、今回の結果から直接口飲みをしなくとも、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。

4.清涼飲料水への細菌の接種試験に関する研究

細菌の発育は飲料の成分、特にpH、Brixによる影響を受けることが明らかになった。市場では多様な飲料が流通していることから、さらなる検討が必要であろう。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、今回の結果から腸内細菌や酵母が増殖する可能性が認められたため、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。したがって、毒素産生性の食中毒細菌が汚染した場合、飲料の保存状態によっては健康被害をもたらす程度まで増殖する可能性が示唆された。更なる消費者への注意喚起が必要であると考えられた。

5.リムルス試験を用いた清涼飲料水中の細菌検出法に関する研究

多くの飲料種で 10 から 100 倍希釈を行うことによって飲料中の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

1. 清涼飲料中での細菌の動態に関する情報収集

清涼飲料水中における細菌の動態に関するデータ種集を行なった。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。

2. 加熱殺菌に代わる新しい殺菌・除菌方法に関する情報収集

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。しかし、これらの殺菌・除菌方法には加熱殺菌にはない特徴をそれぞれ持っているため、単独で使用するのではなく加熱殺菌を補完する目的で使用するのが適当であると考えられた。また、膜による除菌に関するデータはほとんど公表されていないことがわかった。今後、補足試験を行いデータの拡充をおこなう必要性が認められた。

3. 清涼飲料水の口のみ・開封試験に関する研究

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にもかかわらず外見的な変化が乏しく、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た。

4. 清涼飲料水への細菌の接種試験に関する研究

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。

5. リムルス試験を用いた清涼飲料水中の細菌検出法に関する研究

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