

平成 22 年 5 月 6 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 年～2009 年度
 課題番号：20700616
 研究課題名 (和文) リムルス試験を用いたミネラルウォーター類水源における細菌汚染評価法の確立

研究課題名 (英文) Establishment of assay for bacterial contamination in source of mineral water by using Limulus test.

研究代表者

大西 貴弘 (TAKAHIRO OHNISHI)
 国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部・厚生労働技官
 研究者番号：30321855

研究成果の概要 (和文)：ミネラルウォーターの水源における細菌汚染状況を簡便に測定するために、リムルス試験を応用した測定法を開発し、国産ミネラルウォーター 41 銘柄の細菌汚染状況を調査した。その結果、41 銘柄中 3 銘柄から $8.9 \times 10^3 \sim 2.2 \times 10^4$ cfu/ml に相当する汚染が検出された。さらに、この 3 銘柄中 1 銘柄からは大腸菌群の遺伝子が検出された。以上の結果から、今回開発した方法はミネラルウォーターの水源における細菌汚染状況を調査するのに非常に有用な方法であることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：We developed the assay system for the bacterial contamination in the source of mineral water by applying the Limulus test. We studied 41 of Japanese mineral waters. We found that the contamination of bacteria which is equivalent to about $8.9 \times 10^3 \sim 2.2 \times 10^4$ cfu/ml from three mineral waters. Furthermore, we detected the gene of coliform bacteria in one of these three mineral waters. From these results, it was demonstrated that our assay system is very useful for the detection of bacterial contamination in the source of mineral water.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|------|-----------|
| 2008 年度 | 1,800,000 | 0 | 1,800,000 |
| 2009 年度 | 1,600,000 | 0 | 1,600,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 0 | 3,400,000 |

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：水質、ミネラルウォーター、リムルス試験、エンドトキシン、環境、水、細菌

1. 研究開始当初の背景

ミネラルウォーターは特定の水源から採水された地下水を原水とし、容器詰めされた飲用水のことである。日本国内では加熱による殺菌やろ過による除菌が認められている。近年では消費者の健康や安全に対する関心の高まりと共にミネラルウォーターの消費量は急増している。日本ミネラルウォーター協会の統計によれば、国内における製造業者は約400社存在し、さらに2008年度の国産および輸入ミネラルウォーターの総計は2,515,290キロリットルにまでおよぶという。この数字は国民一人当たり年間19.7リットルの消費に相当する。このミネラルウォーターの水質は法令で厳しく管理されている。細菌に関するものでは①一般細菌数は100 cfu/ml以下であること、②大腸菌群は検出されないこと、などが定められている。しかし、国内産のミネラルウォーターは殺菌、除菌を行うことが認められているため、水源の水質がどれだけ汚染しているため、製品中から細菌を検出することはできない。つまり、殺菌・除菌を行うことによりミネラルウォーターの安全性は確保されるが、その反面、水源において法令で定められた限度以上の細菌汚染が生じていても製品からは細菌を検出できないことを意味している。消費者がミネラルウォーターに対して水道水以上の金額を支払うのは、ミネラルウォーターが清浄な水であるとの認識に基づいているた

めである。したがって、殺菌・除菌を行うことによって健康被害が生じないからといって、水源における細菌汚染を放置しておくこと消費者の信頼を大きく損なう可能性がある。しかし通常、水源の汚染状況のような情報は公開されておらず、業者を信用するしかない状態にある。

2. 研究の目的

ミネラルウォーターの水源における細菌汚染をミネラルウォーター製品中から直接検出する方法を確立する。さらに、確立した方法を用いて国産ミネラルウォーターの水源における細菌汚染状況を調査する。

3. 研究の方法

本研究ではミネラルウォーターの水源における細菌汚染状況を評価する方法の確立を目的とし研究を行うが、その方法としてミネラルウォーター製品中に含まれるエンドトキシン量を測定し、水源の細菌汚染のマーカーとした。エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁外膜に存在するリポ多糖であるが、エンドトキシンの以下のような特性から水源の細菌汚染のマーカーとして適当であると考えられる。

- 熱に対して安定である。

ミネラルウォーターの加熱殺菌に用いられる85℃、30分の加熱に対して、活性を保持したまま残存することができる。

- 通常のろ過では除去できない。
ろ過による除菌過程後もミネラルウォーター中に残存する。
- 高感度の検出法がすでに確立されている。
リムルス試験を用いることによって1 pg/mlの低濃度のエンドトキシンを検出することができる。

以上のような特徴を持つエンドトキシンを細菌汚染の指標とし、その評価法の確立を行った。リムルス試験は第十五改正日本薬局方に従って行った。リムルス試薬は生化学工業(株)のエンドスペシーを用いた。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。ミネラルウォーター中からの大腸菌群の遺伝子検出は*lacZ*遺伝子を対象としたPCRによって行った。

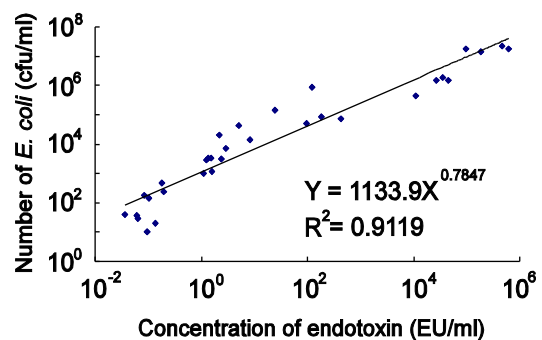
4. 研究成果

今回用いたサンプルは国産ミネラルウォーター41銘柄と比較用のヨーロッパ産非殺菌ミネラルウォーター6銘柄を用いた。これらのサンプル中のエンドトキシン濃度をリムルス試験によって測定したところ、国産ミネラルウォーター41銘柄中30銘柄が0.5 EU/ml未満であった。しかし、2 EU/ml以上の高値を示したサンプルが6銘柄存在した、そのうち銘柄Aからは43 EU/ml、銘柄Bからは34 EU/ml、銘柄Cからは14 EU/mlのエンドトキシンが検出された。原水の種類、硬度、pH、殺菌方法とエンドトキシン濃度との間には相関は見られなかった。

非殺菌のミネラルウォーターには原水中の細菌が正常に発育した結果として約 10^3 から 10^6 cfu/mlの生菌が含まれているとの報告が

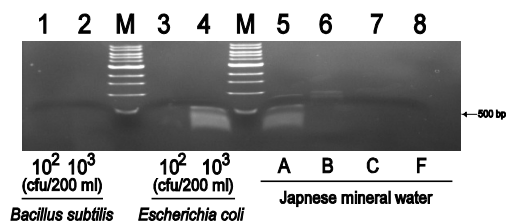
ある。そこで銘柄A~Cのエンドトキシン濃度がどの程度の菌量を示唆するのか、ヨーロッパ産の非殺菌のミネラルウォーター6銘柄中のエンドトキシン濃度と比較した。その結果、非殺菌ミネラルウォーターのエンドトキシン濃度は約0.1から4.4 EU/mlを示し、平均は2.9 EU/mlだった。このことからエンドトキシン濃度の高かった国産ミネラルウォーターの銘柄A、B、Cは非殺菌ミネラルウォーターの約4.8倍から14倍のエンドトキシン濃度を示していることが明らかになった。また、東京都の水道水のエンドトキシン濃度を測定したところ5.6 EU/mlを示した。このことから銘柄A、B、Cは水道水の約2.5から7.7倍のエンドトキシンを含んでいることが明らかになった。以上の結果から銘柄A、B、Cには殺菌・除菌前に非常に高い菌数の細菌が存在していたことが示唆された。

そこで、ミネラルウォーター中の細菌数を推定するために、大腸菌を超純水に浮遊させ85℃、30分の過熱を行い、この菌液のエンドトキシン濃度を測定し、細菌数とエンドトキシン濃度との関係を示す回帰曲線式を求めた(下図参照)。この回帰曲線にミネラルウォーター中のエンドトキシン濃度を当てはめたところ、非殺菌ミネラルウォーター6銘柄の



平均は約 2.5×10^3 cfu/ml を示したのに対して、銘柄 A、B、C は約 8.9×10^3 から 2.2×10^4 cfu/ml を示した。この値は法令で定められている一般細菌数 10^2 cfu/ml 以下という基準値を大きく上回っている。

これまでの結果から殺菌・除菌前の銘柄 A、B、C 中には高濃度の細菌が存在していたことが示唆された。本来なら高エンドトキシンを示した検体の原水から培養法によって菌量、菌種を直接確認すべきであるが、原水を入手できなかったため、代わりに高エンドトキシン濃度を示した銘柄 A、B、C、さらに低エンドトキシン濃度の銘柄 F から PCR によって大腸菌群の *lacZ* 遺伝子の検出を行った（下図参照）。その結果、陰性コントロールの *Bacillus subtilis* に対して PCR 反応は陰性を示したが（下図、1-2 列目）、陽性コントロールの *E. coli* に対しては 10^3 cfu/200 ml の濃度で



陽性になった（上図、3-4 列目）。これに対してミネラルウォーターサンプルでは PCR に用いた 4 銘柄中、銘柄 A が陽性を示した（上図、5 列目）。この結果から、殺菌・除菌前の銘柄 A に高濃度の細菌が存在していた可能性が示唆された。銘柄 B、C に関しては大腸菌群の菌数が PCR の検出限界以下であったか、加熱殺菌や紫外線殺菌などのような殺菌工程の影響で細菌の DNA が損傷したため PCR では検出できなかった可能性が考えられた。

今回の研究ではミネラルウォーター中のエ

ンドトキシン濃度をスクリーニングすることによって最終的に大腸菌群の汚染を検出することができた。このようにエンドトキシン濃度をスクリーニングすることは、ミネラルウォーターの殺菌・除菌前の細菌汚染を調べるのに有効であることが明らかになった。しかも、リムルス試験は非常に簡便でかつプレートリーダー以外の特別な機器を必要とせず、試験結果を 30 分で得られることから、日常のスクリーニングに適した試験法であると思われる。ただし、エンドトキシンの存在は必ずしも大腸菌群の存在を意味するわけではない。エンドトキシンの存在はあくまでグラム陰性菌が殺菌・除菌前に存在していたことを示すだけである。そのため結果の解析には注意が必要である。よって、エンドトキシン濃度を測定することによって汚染状況をスクリーニングし、高エンドトキシン濃度を示す検体に関しては別途、採水地、製造所から原水を採取し培養法によって結果を確定するというのがリムルス試験の適当な利用法であると考えられる。また、エンドトキシン濃度から細菌数の推定を行うことはできるが確定することはできない。そのため、異常と判定するエンドトキシン濃度の基準を決定するのは非常に難しい。そこで、今回行ったように非殺菌のミネラルウォーター中のエンドトキシン濃度を基準とするのがひとつの方法と思われる。非殺菌のミネラルウォーターのエンドトキシンは原水中の細菌が正常に発育した結果に由来するものなので、これを大きく上回る場合は殺菌・除菌前の細菌数に問題があったと考えてよいと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 貴弘 (TAKAHIRO OHNISHI)

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物
部・厚生労働技官

研究者番号：30321855