

小型ペットボトル飲料を唾液および手指で 汚染させた時の細菌数の変化

後藤政幸，荒巻輝代，芳原達也

Changes of Bacterial Number in Small-plastic-bottled Beverages Contaminated with Saliva and Fingers

Masayuki Gotoh, Teruyo Aramaki and Tatuya Hobara

ミネラルウォーター、茶、果汁飲料等の500mlペットボトル飲料は「リキャップできる」、「携帯に便利」等の特性により、室内・外を問わず生活の種々の場面で多く飲用されている。しかしこの利便性に伴う飲用習慣が細菌増殖を引き起こし、ひいては衛生学的な問題が生じると懸念する。著者らは実験的にペットボトル飲料に実際の飲用習慣に近似した内容の細菌汚染をさせ、その飲料水中の細菌数の変化を観察して衛生学的な問題を検討した。5種の小型ペットボトル飲料(ミネラルウォーター、茶、果汁飲料、乳酸飲料、スポーツ飲料各1種)に唾液と手指で汚染させた生理食塩水を定量的に加え、15℃および36℃の温度条件下で2、5、10、20時間保存した試料について一般細菌と大腸菌群の菌数を測定した。結果、一般細菌に関しては、ミネラルウォーターと茶の場合、15℃および36℃共に2時間保存以後、時間の経過に伴い菌数は増加した。増加傾向は高温保存の方が大きかった。また、2時間保存の時点で飲料水水質基準に不適合となった。これらに対して果汁飲料、乳酸飲料およびスポーツ飲料は接種した細菌数が2時間保存以後、減少する成績が得られた。菌数の減少は時間の経過に従い大きくなる傾向を示し、特に両温度条件共に果汁飲料の2時間保存時に顕著であった。大腸菌群は、5回測定中2回の36℃保存のミネラルウォーターと茶の場合にだけ検出されたが、他の試料からは検出されなかった。特に、ミネラルウォーターの20時間、茶の10時間と20時間保存時に大腸菌群数の増加は著しかった。以上の成績から、小型ペットボトル飲料をリキャップに伴う数回の口付け飲用や野外への携帯で不潔に取り扱う等、日常の飲用形態で利用した場合、飲料水の種類によっては飲料水水質基準の細菌項目に対して不適合となる飲料水を摂取する可能性があり、衛生学的に問題となることが判明した。

キーワード：小型ペットボトル、飲料水、飲料水水質基準、細菌汚染、食品衛生

緒 言

小型容器入り飲料は、かつてはスチールやアルミニウムの金属製容器だけが使用されていたが、1997年から小型ペットボトル容器が新たに登場するに至り、ますますその消費量が拡大している。500mlサイズを中心とする小型ペットボトル飲料は飲みかけでも手軽に持ち運べる利便性が幅広い年齢層の消費者に受け入れられ、その市場規模は1998年度推定で約9,000万ケースになると言われている¹⁾。最近、より小型の350mlサイズペットボトル飲料が販売され、今後さらに小型ペットボトル飲料が消費されることが予想される。しかし、「リキャップできる」、「携帯に便利」といった小型ペットボトル飲料の特性は飲料水に対して唾液や不潔な手指に由来する過度な細菌汚染を引き起こし、ひいては衛生学的な問題を誘起することが懸念される。特に夏期の高温時には種々の細菌が著しく増殖することから、リキャップによる長時間の飲用が病原微生物による食中毒を発生させ得る。

本研究は、小型ペットボトル飲料への特徴的な飲用習慣に伴い生じることが予想される衛生学的な問題点を把握するため、5種類の市販飲料に対して実験的に唾液と手指の細菌を汚染させて菌数の推移を観察し、細菌学的な安全性を評価した。

試験方法

1 試料および唾液・手指細菌汚染液の調整

試験に用いた小型ペットボトル飲料（500ml容量）は、外国産V社天然無発泡性ナチュラルミネラルウォーター（以下「ミネラルウォーター」と記す）、K社生茶清涼飲料水（以下「茶」と記す）、S社30%オレンジ・レモン果汁入り飲料水（以下「果汁飲料」と記す）、C社乳酸菌飲料含有清涼飲料水（以下「乳酸飲料」と記す）およびO社無果汁清涼飲料水（以下「スポーツ飲料」と記す）の5種類とした。5種類飲料の原材料名を次にまとめた。

なお各飲料のpHはそれぞれ順に6.9、6.4、3.4、3.4および3.4であった。pHの測定はガ

ミネラルウォーター	水（鉱泉水）
茶	緑茶、生茶葉抽出物、ビタミンC、香料
果汁飲料	果汁（オレンジ・レモン）、果糖、香料、酸味料、ビタミンC
乳酸飲料	果糖ぶどう糖液糖、脱脂粉乳、乳酸菌飲料、酸味料、香料、安定剤（大豆多糖類）
スポーツ飲料	砂糖、ぶどう糖果糖液糖、果汁、食塩、酸味料、塩化K、乳酸Ca、調味料（アミノ酸）、香料、塩化Mg、酸化防止剤（V.C）

ラス電極法²⁾に従い、日立堀場F-21型pHメータを用いた。

各飲料に接種する唾液・手指細菌汚染液は、著者から提供された唾液 1 容量と滅菌生理食塩水50mlに手指を入れて洗った溶液 4 容量を十分に混和して作成した。混和にはパソリナ製NS-80型試験管ミキサーを使用した。一連の試験は 5 回繰り返し行った。再現性のある試験結果を得るために、著者は食事や嗜好内容等の生活習慣に伴う良好な体調を安定的に持続させて唾液・手指細菌汚染液を提供した。唾液・手指細菌汚染液は毎回昼食前に調整し、実験はその後速やかに行った。

2 細菌接種および各保存温度・時間における一般細菌数・大腸菌群数の測定

あらかじめ常温15℃および高温36℃の定温状態にした 5 種類の500ml容量ペットボトル飲料を開栓して速やかに唾液・手指細菌汚染液 1 mlを加え、15℃および36℃の温度条件下で保存した。保存にはそれぞれヤマト科学製インキュベーターIN601型および同社IN801型を用いた。保存後 2、5、10、20時間が経過した各試料について、一般細菌と大腸菌群の検査を行った。一般細菌は標準寒天培地法、大腸菌群はデソキシコール酸塩寒天培地法²⁾で実施した。培地は日本製薬製標準寒天培地および同社デゾキシコレート培地を用いた。

唾液・手指細菌汚染液を加えた直後のものを試験開始試料（以下「開始」と記す）として検査した。

なお、試験に先立ち各ペットボトル飲料の開栓直後で唾液・手指細菌汚染液を加えていない試料（以下「対照」と記す）について、一般細菌および大腸菌群の検査を行った。その結果、5 種類の飲料中に一般細菌および大腸菌群は検出されなかった。

結 果

表 1 に各飲料の15℃および36℃保存における各時間経過時の一般細菌数を平均値±標準偏差値で示した。さらに、その変化を図 1（15℃保存）および図 2（36℃保存）に示した。図の縦軸の一般細菌数（CFU/ml）は対数値で表している。ミネラルウォーターおよび茶は保存時間の経過と共に菌数は増加した。ミネラルウォーターにおける一般細菌数の増加倍率（各保存時菌数平均値/開始時菌数平均値）は、15℃保存の場合は 2、5、10、20時間時それぞれ 9、16、26、51倍であり、36℃保存の場合はそれぞれ49、83、85、69倍であった。茶における一般細菌数の増加倍率は、同様に15℃保存の場合は 9、12、16、23倍、36℃保存の場合は33、68、144、467倍であった。増加倍率は両飲料共に検討時間内では保存時間が長くなるに従い大きくなり、また高温である36℃の方が15℃の場合より著しく増大した。両飲料の増加倍率の比を保存温度で比較すると、15℃保存の場合は、全ての保存時間においてミネ

表1 15℃および36℃保存における各種飲料水の一般細菌数の経時変化

15℃保存	保存時間 (h)				
	開始	2	5	10	20
ミネラルウォーター	88 ± 10	800 ± 61	1400 ± 93	2300 ± 150	4500 ± 280
茶	80 ± 9	700 ± 58	950 ± 38	1300 ± 85	1800 ± 110
果汁飲料	72 ± 10	2 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
乳酸飲料	84 ± 11	9 ± 1	2 ± 0	2 ± 1	2 ± 1
スポーツ飲料	70 ± 12	8 ± 1	5 ± 2	5 ± 1	7 ± 2

36℃保存	保存時間 (h)				
	開始	2	5	10	20
ミネラルウォーター	84 ± 9	4100 ± 290	7000 ± 390	7100 ± 450	5800 ± 310
茶	90 ± 12	3000 ± 210	6100 ± 270	13000 ± 890	42000 ± 1300
果汁飲料	75 ± 10	6 ± 2	3 ± 2	3 ± 1	2 ± 1
乳酸飲料	80 ± 11	71 ± 8*	47 ± 6	28 ± 4	16 ± 5
スポーツ飲料	82 ± 10	70 ± 10**	28 ± 5	15 ± 4	37 ± 6

値はmean ± SD (n = 5)

* : 開始との間にp < 0.05で有意差あり、** : 開始との間にp < 0.01で有意差あり

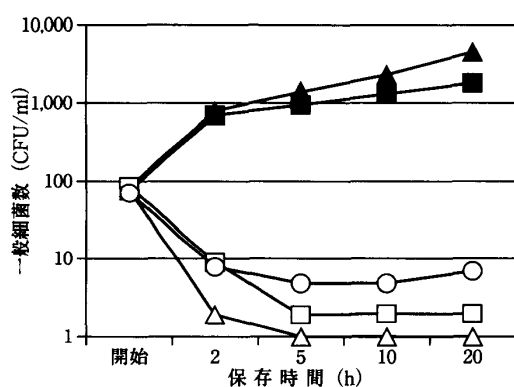


図1 15℃保存における各種飲料水中の一般細菌数の経時変化

▲ : ミネラルウォーター、■ : 茶
 △ : 果汁飲料、□ : 乳酸飲料、○ : スポーツ飲料

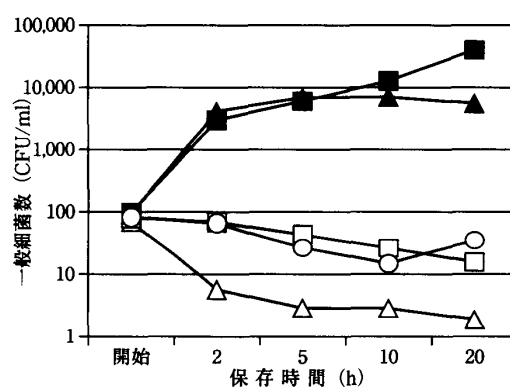


図2 36℃保存における各種飲料水中の一般細菌数の経時変化

▲ : ミネラルウォーター、■ : 茶
 △ : 果汁飲料、□ : 乳酸飲料、○ : スポーツ飲料

ラルウォーターの方が茶よりも大きく、20時間時には最も大きく増加倍率比は2.2であった。36℃保存の場合における両飲料の増加倍率比は、2時間時および5時間時は同様にミネラルウォーターの方が茶よりもそれぞれ1.5および1.2と大きかったが、10および20時間時では茶の方がミネラルウォーターより1.7および6.8と大きかった。果汁飲料、乳酸飲料およびスポーツ飲料は先の2飲料の成績と相反して、両温度共に接種された一般細菌数は保存時間の経過に従い減少する傾向を示した。15℃保存の場合、2時間時には開始時のほぼ10分の1以下に減少し、以後はほぼその状態が続いた。特に果汁飲料は減少傾向が顕著であった。36℃保存の場合も3飲料共に開始時の一般細菌数は同様に減少した。果汁飲料は2時間保存時には開始時の12.5分の1に減少し、その状況はさらに経時的に持続した。乳酸飲料とスポーツ飲料も同様に減少傾向を示したが、2時間時のそれぞれの値と開始時の値との差異が不明瞭であったため、対をなすstudent's t検定を行った。その結果、乳酸飲料は $p < 0.05$ 、スポーツ飲料は $p < 0.01$ で有意差が認められた。

大腸菌群は、15℃保存では、全ての試料に検出されなかった。36℃保存では、ミネラルウォーターと茶以外の試料は開始時を含めて全て検出されなかった。表2に36℃保存におけるミネラルウォーターと茶の5回測定の結果を示した。5回測定の内2回は、1回目の2時

表2 36℃保存におけるミネラルウォーターおよび茶の大腸菌群の測定結果
(単位: CFU/ml)

ミネラルウォーター		保存時間 (h)				
測定回数	開始	2	5	10	20	
1	1	0	1	5	41	
2	1	1	1	7	54	
3	0	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	0	
茶		保存時間 (h)				
測定回数	開始	2	5	10	20	
1	1	1	5	59	160	
2	2	4	8	70	220	
3	0	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	0	

間時の成績を除き、開始時から20時間保存の試料に大腸菌群が検出された。両飲料の各試料中の大腸菌群数は保存時間の経過に従い増加し、5時間保存以後は茶の方がミネラルウォーターより数値が大きかった。他3回の測定は開始時に検出されておらず、その後の各保存時間の試料においても検出されなかった。

考 察

小型ペットボトル飲料は「途中でリキャップできる」、「飲み残しても保存できる」、「持ち運びに便利」と、リキャップ性が評価され多く飲用されている。また、特に止渴性飲料としての要求から強い味覚を感じさせないミネラルウォーターや茶が好まれている。本研究は小型ペットボトル飲料の利用特性に伴う衛生学的な安全性を評価するために実施された。市販の5種類の小型ペットボトル飲料（ミネラルウォーター、茶、果汁飲料、乳酸飲料、スポーツ飲料各1種）に対して、ボトルの直接口付けを数回くり返す、野外で不潔な手指で取り扱う、高温で長時間保存する等、実際の飲用習慣を想定した実験計画を立てた。唾液と手指による細菌汚染をさせたペットボトル飲料について各保存温度・時間の条件下で一般細菌数および大腸菌群数の変化を観察した。試験に先立ち5種の飲料水の開栓直後における一般細菌および大腸菌群を測定した結果、全ての飲料水で検出されなかった。食品・食品添加物等規格基準（抄）³⁾によると、清涼飲料水の成分規格については大腸菌群は陰性であること、製造基準については一般細菌数は100個/ml以下、大腸菌群は陰性であることとされており、規格および基準内の成績であった。

唾液・手指細菌汚染液を加えた直後、つまり開始時の一般細菌数は約70～90CFU/mlであり、「水道法に基づく水質基準に関する省令」（以下「水質基準」と記す）の一般細菌の飲料水水質基準値100CFU/mlに近い値であった。実験のための積極的な細菌の接種を行ったとは言え、これらの値は容器への直接的な口付けに伴う唾液の混入や野外での飲用時に不潔な手指が容器の口部に触れた時の細菌の混入等の要因で実際に想定される値であり、この現象が衛生的な問題を誘起させることは間違いない。止渴性飲料であるミネラルウォーターと茶の一般細菌数は2時間保存時には両温度条件共に著しく増加し、水質基準を確実に超える結果となった。さらに、ミネラルウォーターおよび茶の36℃保存・開始時の成績（5回試験中2回）には大腸菌群が検出されており、先の一般細菌の結果と考え合わせて当該飲料は不潔に取り扱わないように十分に注意をすべきである。しかし、果汁飲料、乳酸飲料およびスポーツ飲料はむしろ一般細菌数は減少する結果となった。このように飲料水の種類によって細菌学的な衛生評価の判断に相違が生じた。細菌数の増減の差異は飲料水のpHが影響して

いると考える。前者のpHはほぼ中性であるのに対し、後者は原材料に酸味料が入っておりpH3.4と酸性であった。一般に唾液のpHはややアルカリ性と言われている⁴⁾。本研究で提供された唾液のpHは7.9であったことから、後者3飲料の細菌数の減少は微アルカリ性の唾液中に棲息していた細菌が酸性飲料水中で死滅したことが起因していると考ええる。後者3飲料のpHは同様であったが、果汁飲料の一般細菌数の減少が乳酸飲料とスポーツ飲料に比べて特に大きかった理由については原材料の差異等からは推論できなかった。さらに、茶にはカテキン等が含まれ殺菌効果が有ることが知られているが^{5,6)}、本研究に用いた茶においては細菌を減少させる効果は認められなかった。当該茶のカテキンの分析を含め今後の課題である。

全飲料を通じて、同一飲料における15℃と36℃の保存温度の相違により一般細菌数の増加あるいは減少に差異があるのは異菌種の至適温度が反映されていると考える。本研究での細菌による衛生学的安全性の評価は、使用培地および検討された温度条件に至適な細菌について得られた成績による判定である。衛生微生物学的な見地に立つならば、この評価は不十分であることは否めない。例えば、口腔細菌の中で歯の原因菌である *Streptococcus (mutans)* は通常の寒天培地では増殖が悪いとされている⁷⁾。さらには高温時に特に著しく増殖する食中毒菌に関しても検討する必要がある。また *Yersinia enterocolitica* のような低温で増殖可能な環境汚染菌^{8,9)}の混入も否定できない。長時間の保存を考えるならば、以上述べた種々の細菌の存在も十分に検討すべきである。本研究で行った一般細菌と大腸菌群の試験は飲料水水質基準や食品衛生関連の法規に常套されている細菌検査項目であり、細菌汚染の安全性の概略を評価するためには有効でかつ簡易・迅速な方法である。しかし、細菌汚染に関する衛生学的評価をよりの確に行うためには、先に述べたような細菌等が存在している可能性を十分に考慮した研究を遂行すべきである。

結論として、飲料水により相違はあるものの、ペットボトル飲料を数回におよぼ直接的な口付けで長時間飲用することは衛生学的に問題であり、一度に飲み切るべきである。積極的には推奨されないが飲料水によっては抗菌作用を持つ保存料の添加も検討すべきである。著者らは添加物の使用はなるべく避けるべきであるとの観点から、飲料製造・販売者に対して、例えば「不潔な取り扱いによる細菌の増殖に注意すること」、「開栓後はなるべく早く飲用すること」等の表示を容器に記載するなど、消費者に注意を喚起する方策を検討することを提案する。

安全性をよりの確に評価するためには、先に述べたようにより詳細な細菌学的な検討が必要である。今後は汚染している細菌種の同定等、衛生微生物学的視点から追求したい。

要 約

- 1) 5種類の飲料水の対照は、一般細菌および大腸菌群は検出されなかった。
- 2) 止渴性飲料であるミネラルウォーターと茶は常温(15℃)および高温(36℃)で2時間以上保存すると一般細菌数が著しく増殖し、飲料水水質基準に対して不適合になる結果が得られた。しかし、果汁飲料、乳酸飲料とスポーツ飲料は両温度共に2時間保存以後、接種された細菌数が減少する結果となった。
- 3) 不潔な取り扱いにより大腸菌群による汚染が想定された。大腸菌群が混入したミネラルウォーターと茶は高温で長時間保存すると著しく増殖し、衛生学的に問題となることが分かった。

謝 辞

本研究の細菌試験に多大なご助力を頂きました和洋女子大学短期大学部大塚久美助手補、和洋女子大学4年生稲葉蘭、久下順子、鈴木佑佳、長沢恵里の方々に心からお礼を申し上げます。なお、本研究の一部は平成13年度文部省科学研究費萌芽的研究助成の援助により行なった。

文 献

- 1) 日経リサーチ企業調査編：飲料業界ガイドブック1998年版、10-12、(1998) 日経リサーチ
- 2) 厚生省生活衛生局水道環境部監修：上水試験方法1993年版、80、483-496、(1994) 日本水道協会
- 3) 日本食品衛生学会編：食品・食品添加物等規格基準(抄)、食品衛生学雑誌、vol. 42 No. 1、J-16-17、(2001)
- 4) 医学大辞典18版、1302、(1999) 南山堂
- 5) Isogai E, Isogai H, Nishikawa T, et al.: Protective effect of Japanese green tea extract on gnotobiotic mice infected with an *Escherichia coli* O157: H7 strain. Microbiol. Immunol. **42** (2), 125-128 (1998)
- 6) Mabe K, Yamada M, Oguni I, et al.: *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. Antimicrob. Agents Chemother. **43** (7), 1788-1791 (1999)
- 7) 医学大辞典18版、2227、(1999) 南山堂

- 8) McFeters GA, LeChevallier MW, Singh A, et al.: Health significance and occurrence of injured bacteria in drinking water. *Water Sci. Technol.* **18** (10), 227-231 (1986)
- 9) Rho MJ, Chung MS, Lee JH, et al.: Monitoring of microbial hazards at farms, slaughterhouses, and processing lines of swine in Korea. *J. Food Prot.* **64** (9), 1388-1391 (2001)

後 藤 政 幸（短期大学部食物栄養学科教授）

荒 巻 輝 代（宇部短期大学健康福祉学科教授）

芳 原 達 也（山口大学医学部公衆衛生学教授）