

ペットボトル詰め緑茶（清涼飲料水）の製品白濁苦情に係る細菌学的検討

江藤良樹・市原祥子・濱崎光宏・村上光一・竹中重幸
堀川和美・進藤知美*1・池田加江*2・梅崎武彦*2

ペットボトル詰め緑茶の白濁苦情を受け、製造業者への立ち入り調査を実施した。業者が保管していた苦情品（開封済み）からは、*Pantoea agglomerans* が分離された。しかし、既に開封されていたため、白濁の原因菌とは断定できなかった。さらに調査を続けたところ、Ultra-high temperature 殺菌前の調合済み緑茶から 6.6×10^4 /ml の細菌が検出された。このことから、製造ラインの細菌汚染が疑われた。また、製品を充填する前の空のペットボトルの洗浄液に *Mycobacterium* 属菌が認められたことなどから、製造施設の十分な消毒が行われていなかったことが推測された。

さらに、陽圧管理されている充填室は、非作業中には落下細菌・落下真菌はいずれも検出されなかったが、作業中には落下細菌・落下真菌が確認された。落下細菌、及び、落下真菌が製品に混入すると、白濁・異物混入の原因になる恐れがある。以上のことから、製造ラインの細菌汚染の予防、製造施設の十分な消毒実施、及び作業時の充填室内の落下細菌数・落下真菌数の抑制策が必要であると考えられた。

[キーワード：白濁苦情、緑茶、ペットボトル、細菌汚染]

1 はじめに

平成21年に、県内の同一製造業者が製造したペットボトル詰め緑茶において異臭味及び白濁苦情が4件発生したことから、製造業者への立ち入り調査を実施した。この業者が製造したペットボトル詰め緑茶の製品白濁の起因菌について、今回、詳細な細菌学的検討を実施したので、資料としてまとめた。

2 方法

2・1 検体

原料茶葉3件、工場内の拭き取り材料5件、苦情品（開封済み）1件、参考品（未開封製品）3件、殺菌前緑茶1件、及びペットボトル洗浄液3件を検査した（表1）。また、工場内の6地点において、作業時、及び、非作業時に落下細菌と落下真菌の検査を実施した。

2・2 細菌検査

① 培養検査（苦情品）

標準寒天に検体10 µl を塗抹し、35°Cで一晩培養した。生育した菌を釣菌し、生化学性状試験及び遺伝子検査（16S rRNAの遺伝子塩基配列決定）による菌種の同定を実施した。

② 細菌数、及び大腸菌群検査

細菌検査は、標準寒天培地を用いて37°Cで24時間培養した。大腸菌群は、ダーラム管入りLB培地を用いて37°Cで24時間培養した。原料茶葉については、生理食塩水にて10倍にした後、1分間ストマッキング処理し、試料液とした。また、耐熱性菌の細菌数を調べるため、100°C、10分間、加熱処理したものを同様に試料液とした。また、苦情品から分離された菌株と同じ性状の菌を検索する為に、生育した菌を釣菌し、グラム染色、嫌気条件下での培養等を実施した。

③ 落下細菌数、及び、落下真菌数検査

落下細菌数、及び、落下真菌数検査は、「弁当及びそうざいの衛生規範について」（昭和54年6月29日付環食第161号）に準じ実施した。また、苦情品から分離された菌株と同じ性状の菌を検索する為に、生育した菌を釣菌し、グラム染色、嫌気条件下での培養等を実施した。

④ 顕微鏡観察

製品緑茶は、原液50 mlを3000回転/分で20分間遠心後の沈渣を使用しグラム染色後に観察した。また、原料茶葉は、滅菌超純粋水を用いて製造と同じ条件で抽出し、遠心（3000 rpm、20分間）で得られた沈渣をグラム染色に用いた。

3 結果

3・1 細菌検査結果

① 培養検査（苦情品）

福岡県保健環境研究所（〒818-0135 太宰府市大字向佐野39）

*1 福岡県保健衛生課

*2 南筑後保健福祉環境事務所

No. 10 の苦情品（白濁品・開封済）から、通性嫌気性のグラム陰性桿菌が分離された。分離菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列決定、及び、生化学性状検査にて *Pantoea agglomerans* であることが明らかとなった。

② 細菌数、及び大腸菌群検査

苦情品と同一ロットである No. 11の参考品（正常品・未開封）と、No. 9 の参考品は、細菌数は 1 未満/ml、大腸菌群は陰性であり細菌は検出されなかった（表2）。No. 1 から No. 3 の原料茶葉の細菌数を測定した結果、 $4.9 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^5$ /gであった。また、100°C で 10分間の加熱処理後の細菌数は、 $2.5 \times 10 \sim 7.5 \times 10$ /g であった（表3）。

工場内の拭き取り検査の結果、充填室内（No.4、5、6、8）の細菌数は少なく、また、大腸菌群は検出されなかった（表4）。一方で、充填室の周辺の床（No. 7）から、1400/床面 cm² 当たりの細菌数（14000 /ml）と、大腸菌群が検出された。また、拭き取り材料の細菌数を測定したプレートより、94 集落を釣菌し性状検査を実施したが、苦情品から分離された菌と同じ通性嫌気性を示すものは無かった。

製品製造時（2010年5月6日）に採取した ultra-high temperature (UHT) 殺菌前緑茶（No. 12）の細菌数を測定した結果、 6.6×10^4 /mlと高い菌量であり、また、大腸菌群についても陽性であった(表5)。釣菌した細菌の 83%（96株中80株）は、通性嫌気性のグラム陰性桿菌であり、その一部の菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を決定した結果、苦情品から分離された菌と同じ *Pantoea* 属菌も存在していた。しかしながら、No.12 を UHT 殺菌しペットボトルに詰めた No. 16 は、細菌数は 1 未満/ml、大腸菌群は陰性であった。

緑茶を詰めるペットボトルを洗浄するラインから採取した洗浄液（No. 13、14、15）の細菌数を測定（35°C、24時間）したところ、細菌数は1 未満/ml であり、大腸菌群は陰性であった（表5）。ところが、30°C で7日間培養を行ったところ、これらの検体で菌の生育が確認された。これらの一部を釣菌し、生育した菌株の16S rRNA 遺伝子の塩基配列を一部決定した結果、次亜タンク内水（No. 13）とリンサー液（No. 15）のから分離された菌は *Mycobacterium* 属であることが明らかとなった。

③ 落下細菌数、及び、落下真菌数検査

工場内の落下細菌・落下真菌について、作業時と非作業時に検査を実施したところ、表6 のような結果が得られた。非作業時の充填室内（A-2～A-5）は、作業時に比べ落下細菌・真菌数が少なかった。一方で、作業時には、少数ではあるが落下真菌が確認された。落下細菌のプレートより釣菌した 263 集落の細菌の性状検査を実施したが、苦情品から分離された *Pantoea agglomerans* と同じ性状（通性嫌気性グラム陰性桿菌）を示す菌は検出されなかった。

④ 顕微鏡観察

No. 11 の参考品（正常品・未開封）と、No. 9 の参考品の遠心沈査を、グラム染色後に検鏡したところ、多数の細菌像が観察された（図1、図2-1）。また、No. 11 の参考品については、走査型電子顕微鏡にて観察を行ったところ、同様に多数の細菌像が観察された（図2-2）。また、緑茶茶葉を製造と同じ条件で実験的に抽出し、グラム染色を行ったところ、No.2 のみ少数の細菌像が観察された。また、 6.6×10^4

表1 検査検体一覧と検査項目

番号	検体名	種別	採取日	検査項目			備考
				細菌数	大腸菌群	落下細菌数 落下真菌数	
No.1	煎茶AH	原料茶葉	2010年2月8日	○			苦情品のロット(No10、11)に使用
No.2	煎茶AGO	原料茶葉		○			
No.3	煎茶AG	原料茶葉		○			
No.4	B-1 充填機ノズル(充填室内)	拭き取り	2010年2月16日	○	○		
No.5	B-2 リンサーノズル(充填室内)	拭き取り		○	○		
No.6	B-3 充填機囲い扉の取っ手(充填室内)	拭き取り		○	○		
No.7	B-4 充填機出口付近床	拭き取り		○	○		
No.8	B-5 キャップ上部(充填室内)	拭き取り		○	○		
No.9	清涼飲料水 緑茶	参考品		○	○		未開封品(2010年2月16日製造)
No.10	清涼飲料水 苦情品緑茶(白濁品)	苦情品	○			開封済み	
No.11	清涼飲料水 苦情品緑茶(同一ロット正常品)	参考品	○	○		未開封品	
No.12	調合タンク内水(調合終了後緑茶)	殺菌前緑茶	○	○			
No.13	次亜タンク内水	ペットボトル洗浄液	2010年5月12日	○	○		次亜塩素酸ナトリウム 0.2 ppm
No.14	リンサー液(その1)	ペットボトル洗浄液		○	○		次亜塩素酸ナトリウム 10~20 ppm
No.15	リンサー液(その2)	ペットボトル洗浄液		○	○		次亜塩素酸ナトリウム 0.2 ppm
No.16	製品サンプル(2L)	参考品		○	○		未開封品(No.12をUHT殺菌後に充填)
A-1	PETホッパー上	落下細菌・真菌	作業時 2010年2月16日 非作業時 2010年3月4日			○	
A-2	充填室解放部付近①(充填室内)	落下細菌・真菌		○			充填室内は陽圧管理
A-3	充填室解放部付近②(充填室内)	落下細菌・真菌		○			充填室内は陽圧管理
A-4	リンサー上部(充填室内)	落下細菌・真菌		○			充填室内は陽圧管理
A-5	キャップ上部(充填室内)	落下細菌・真菌		○			充填室内は陽圧管理
A-6	キャップホッパー上部	落下細菌・真菌		○			

/mlの細菌数であったUHT殺菌前緑茶 (No. 12) を UHT 殺菌しペットボトルに詰めた製品であるNo. 16 は、グラム染色で多数の細菌像が確認された。

4 考察

No. 10 の苦情品 (白濁品・開封済) より、*Pantoea agglomerans* (通性嫌気性のグラム陰性桿菌) が分離された。しかし、既に開封されていた事や、苦情申立者が口を付けて飲んでいた為、本菌と製品白濁との因果関係は明確ではない。

No. 11 の参考品 (苦情品と同一ロットの正常品・未開封) から細菌は分離できなかったが、グラム染色及び電子顕微鏡で多数の細菌像が観察された (図2-1、図2-2)。確認の為に、他社が製造したペットボトル詰め緑茶について、同様の操作で観察を行ったが細菌像はほとんど観察されなかった。このことから、苦情品と同一ロットの製品は殺菌前にかかなりの菌量が存在していたと考えられた。また、苦情品が製造された約半年後に製造された製品 (No. 9) についても、No. 11 と同様に、多数の細菌像が観察された (表2、図2-1)。このことから、製造ラインの細菌汚染は半年以上の間、継続していたものと推測された。また、原料茶葉による汚染の可能性も考えられる為、実験的に原料茶葉から製造と同じ条件で抽出しグラム染色を行ったが、観察された細菌は少数であった (表3)。苦情品に使用されていた茶葉の細菌量が、他と比べ多いことは無かったことから、細菌汚染は茶葉が原因では無く、茶葉抽出以降の製造工程に原因があると推測された。さらに、UHT 殺菌前の調整済み緑茶 (No.12) の細菌数は 6.6×10^4 /ml と高い値であったことから、加熱抽出以降の製造工程の装置・タンクなどの洗浄・管理が不十分であり細菌が繁殖していると考えられた。

製造する環境中に苦情品からの分離菌と同じ菌が存在するか確認するために、落下細菌検査、及び、拭き取り検査で生育した計 357 集落を釣菌し、通性嫌気性のグラム陰性桿菌をスクリーニングしたが、苦情品より分離された菌と同じ性状の菌は検出されなかった。一方で、UHT 殺菌前緑茶 (No. 12) より釣菌した細菌の 83% (96株中80株) は、通性嫌気性のグラム陰性桿菌であり、その一部の菌の 16S rRNA 遺伝

子塩基配列を決定した結果、苦情品から分離された菌と同じ *Pantoea* 属菌も存在していた。このことから、UHT 殺菌機の故障や操作ミスにより製品に生菌が混入した可能性も否定できない。

操業時、非操業時の落下細菌数・落下真菌数を測定したが、その結果、操業中は空気中に浮遊する細菌・真菌が増加していた (表6)。この工場の充填室は陽圧管理されたクリーンルームだが、操業中は充填前のペットボトルが充填室の壁の流入口から高速で流入している。この流入口のからの微生物汚染対策が十分でないため、充填室外部の細菌・真菌がペットボトルともに流入している可能性も十分考えられる。操業中の充填室内の落下細菌数、及び、落下真菌数を最小限に抑える工夫を行わなければ、耐熱性細菌や真菌の製品への混入が、今後も起こる可能性も否定できない。

今回、0.2ppm 次亜塩素酸ナトリウムを含むペットボトル洗浄用のリンサー液 (No.13、No15) から *Mycobacterium* 属菌が分離された。*Mycobacterium* 属菌の一つである *M. tuberculosis* を殺菌するには、1000ppm の塩素濃度が必要である¹⁾ことから、分離菌は0.2ppm の次亜塩素酸ナトリウムを含むリンサー液では殺菌されず、生育が可能であったと考えられる。この工場では、リンサー液は次亜塩素酸ナトリウムを含むため細菌は生育出来ないと考え、洗浄作業等は一切行われていなかった。

以上の結果より、今後は、製造ラインの洗浄の徹底や、操業時の充填室内の落下細菌数・落下真菌数の抑制するための対策が急務である。また、製造ラインの細菌汚染を管理する為に、調整済み緑茶 (UHT殺菌前) の細菌数測定を製造バッチ毎に行うよう助言した。この指標を用いて細菌数を低く抑えることで、品質の安定的な向上につながるだろう。

文献

- 1) Rutala WA *et al.*: Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by 14 hospital disinfectants., *Am. J. Med.*, 91, 267S-271S, 1991

表2 苦情品及び参考品の検査結果

番号	検体名	細菌数 (/ml)	大腸菌群	遠心処理後 グラム染色 ^a
No.9	清涼飲料水 緑茶(コントロール)	1未満	陰性	多数の菌を観察 (図1)
No.10	清涼飲料水 苦情品緑茶(白濁品)	1.3×10^6	NT ^b	NT ^b
No.11	清涼飲料水 苦情品緑茶(同一ロット正常品)	1未満	陰性	多数の菌を観察 (図2-1)

a: 濃縮のために3000回転/分で20分間遠心を行った。 b: 未実施

図1 遠心濃縮後の清涼飲料水 緑茶(コントロール)のグラム染色像

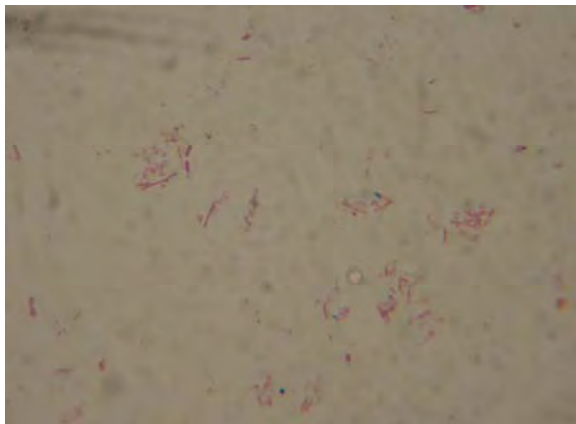


図2-1 遠心濃縮後の苦情品緑茶(同一ロット正常品)のグラム染色像

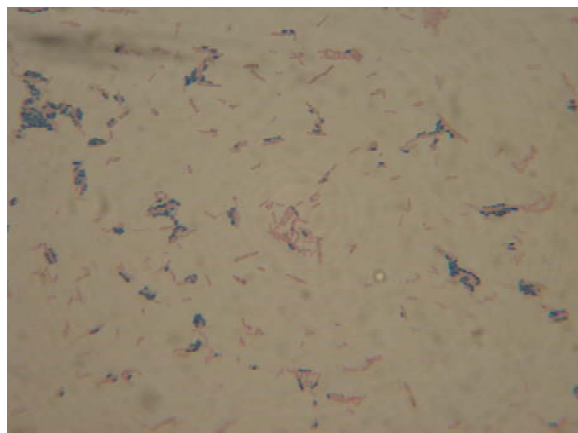
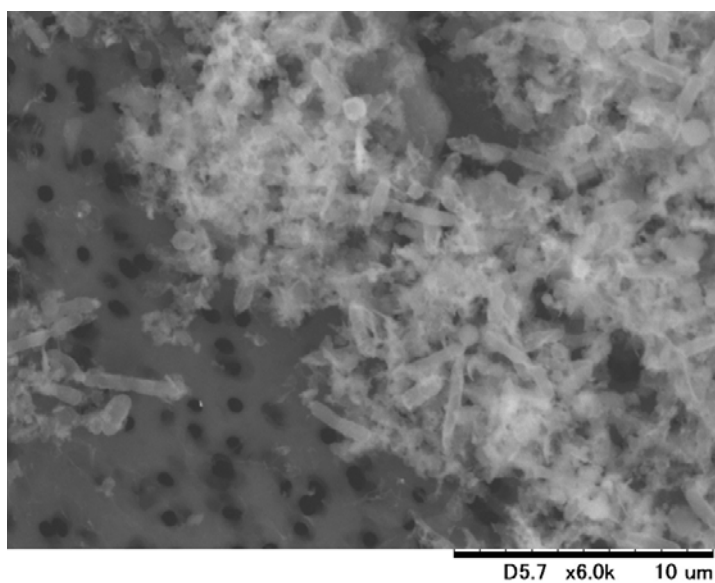


図2-2 遠心濃縮後の苦情品緑茶(同一ロット正常品)のSEM像



D5.7 x6.0k 10 um

表3 原料茶葉の細菌検査結果

番号	検体名	細菌数(/g)		遠心処理後 グラム染色 ^a
		未処理	100℃、10分	
No.1	煎茶AH	4.9×10^4	2.5×10	観察されず
No.2	煎茶AGO	9.7×10^4	3.5×10	少数の細菌を観察
No.3	煎茶AG(白濁苦情品に使用)	1.5×10^5	7.5×10	観察されず

a: 濃縮のために3000回転/分で20分間遠心を行った。 b: 未実施

表4 拭き取り検査結果

番号	検体名	細菌数(/ml)	大腸菌群
No.4	B-1 充填機ノズル(充填室内)	3	陰性
No.5	B-2 リンサーノズル(充填室内)	1	陰性
No.6	B-3 充填機囲い扉の取っ手(充填室内)	45	陰性
No.7	B-4 充填機出口付近床	14000	陽性
No.8	B-5 キャップパー上部(充填室内)	19	陰性

表5 製造時(2010年5月6日)に採取した検体の検査結果

番号	検体名	細菌数(/ml)		大腸菌群	遠心処理後 グラム染色 ^a
		35℃、48時間	30℃、7日間		
No.12	調合タンク内水(調合終了後緑茶)	6.6×10^4	≥ 300	陽性	多数の菌を観察
No.13	次亜タンク内水	1未満	3	陰性	観察されず
No.14	リンサー液(その1) 10~20 ppm	1未満	6	陰性	観察されず
No.15	リンサー液(その2) 0.2 ppm	1未満	139	陰性	観察されず
No.16	製品サンプル(2L)	1未満	1未満	陰性	多数の菌を観察

a: 濃縮のために3000回転/分で20分間遠心を行った

表6 落下細菌数・落下真菌数の検査結果

番号	検体名	落下細菌数(/5分) ^a		落下真菌数(/20分) ^a	
		操業時	非操業時	操業時	非操業時
A-1	PETホッパー上	3	1	2	4
A-2	充填室解放部付近①(充填室内)	4	1未満	1未満 ^b	1未満
A-3	充填室解放部付近②(充填室内)	27	1未満	1未満	1未満
A-4	リンサー上部(充填室内)	2	1未満	1	1未満
A-5	キャップパー上部(充填室内)	3	1未満	1未満 ^b	1未満
A-6	キャップホッパー上部	3	1未満	1	1未満

a: シャーレ3枚の平均値 b: 3枚のシャーレのうち1枚で真菌の生育が観察された