＝調 査＝

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

大西 貴弘

(国立医薬品食品衛生研究所)

(受付 平成 22 年 3 月 23 日)

(受理 平成 22 年 6 月 7 日)

Detection of Endotoxin in Japanese Mineral Water for Microbiological Assessment of the Water Source and the Factories

Takahiro OHNISHI

(National Institute of Health Sciences, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501)

ミネラルウォーターの水源およびその製造所における細菌汚染の指標としてエンドトキシンを利用できるか検討を行った。国産ミネラルウォーター 41 銘柄中 3 銘柄において非殺菌のヨーロッパ産ミネラルウォーターの約 5～15 倍、水道水の約 2.5～7.7 倍という非常に高いエンドトキシン濃度を示した。グラム陰性菌とエンドトキシン濃度の関係を表す回帰曲線を作成したところ、この 3 銘柄のエンドトキシン濃度は約 $8.9 \times 10^3 \sim 2.2 \times 10^4$ cfu/ml のグラム陰性菌に相当した。さらにこの 3 銘柄中 1 銘柄から大腸菌群の遺伝子が検出された。以上の結果から、ミネラルウォーター中のエンドトキシン濃度を測定することはミネラルウォーターにおける殺菌・除菌前の細菌汚染をスクリーニングするのに有用であることが明らかになった。

緒 言

ミネラルウォーター類（以下、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とも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 キロリットルで、国民一人当たりの年間消費量は 19.7 リットルにまで及んでいる（日本ミネラルウォーター協会 <http://minekyo.net/>）。このミネラルウォーターの原水の品質基準は「食品、添加物等の規格基準」によって管理されている。殺菌済みミネラルウォーターにおける細菌に関する基準は 1) 一般細菌数は 1 ml 当たり 100 cfu 以下であること、2) 大腸菌群は検出されないこと、と定められている。しかも、国内で生産されるミネラルワー

ターは加熱殺菌やろ過による除菌が認められているため、国産のミネラルウォーターが健康被害を引き起こすことはほとんどないと思われる。しかし、殺菌・除菌が認められているため、法令で定められている限度以上の細菌汚染が水源にあったとしても、店頭に並んでいる製品中から生菌を検出することができず、水源における細菌汚染を製品検査によって監視するのは非常に困難である。消費者はミネラルウォーターを清浄な水との認識で購入している場合が多いため、たとえ殺菌・除菌によって製品から生菌が検出されなくとも、水源における基準以上の細菌汚染は消費者の信頼を裏切る結果となる。また、ミネラルウォーターの製造過程においてさまざまな微生物汚染の可能性が指摘されており¹⁰⁾、法令では定められていないものの同様の理由から、採水後の製造所内における細菌増殖、汚染も低く抑えられたほうが良いと考えられる。

エンドトキシンはグラム陰性菌の外膜を構成する糖脂質で、化学的にはリポ多糖体 (LPS) を指す。エンドトキシンはグラム陰性菌の死滅とともに外部に放出されるため、原水にグラム陰性菌が生息していた場合、原水中にはエンドトキシンが存在していると考えられる。このエ

ンドトキシンは耐熱性であるため通常の加熱殺菌で用いられる 85°C, 30 分の加熱では失活しないうえに逆浸透膜ろ過を行わない限り液体中から除去できない。そのため、もしミネラルウォーターの水源や製造所内でグラム陰性菌による汚染があった場合、製品中にエンドトキシンが残存していると考えられる。また、エンドトキシンにはリムルス試験という簡便で高感度な検出法が既に確立されている。このリムルス試験を細菌汚染の検出に応用する試みは以前から行われ、既に非殺菌のボトルドウォーター、殺菌前のミルク、飲料水、河川水などにおける生菌数の推定に利用されている^{3, 5, 7, 8)}。今回は耐熱性でかつ通常のろ過では除去できないというエンドトキシンの特性を応用して、ミネラルウォーターにおける殺菌・除菌前の細菌汚染の指標としてエンドトキシンを利用できるか検討を行った。

材料および方法

1. 試料

国内で市販されている殺菌・除菌済み国産ミネラルウォーター 41 銘柄とヨーロッパ産の非殺菌のミネラルウォーター 6 銘柄を用いた。

2. リムルス試験

リムルス試験は第十五改正 日本薬局方に従い行った。通常のエンドトキシン測定用試薬として生化学工業(株)のトキシカラー、エンドトキシン特異的な試薬としてエンドスペシーを用いた。エンドトキシンは製品マニュアルに従いエンドポイント法で測定した。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。エンドトキシン標準品を用いて試験ごとに検量線を作成し(0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0 EU/ml の 5 点)、これからエンドトキシン濃度を求めた。試験結果は一つの検体につき 3 ウェルの測定から平均値を算出し、これを 1 回の結果とした。この試験を 3 回繰り返し、3 回の結果の平均値±標準誤差($n=3$)で最終的な結果を表した。予備実験として反応干渉因子試験を行い、ミネラルウォーターがリムルス試験に干渉しないことを確認した(詳細略)。

3. ミネラルウォーター中の推定グラム陰性菌数の算出

Escherichia coli DH5 α 株を Luria-Bertani broth (Lennox) 中で 37°C, 8 時間、振とう培養した。培養後、3,000×*g*, 5 分の遠心によって大腸菌を回収し、これを滅菌超純水に浮遊させて洗浄した。さらにもう一度この遠心、洗浄操作を行った後、任意の濃度で滅菌超純水に大腸菌を浮遊させた。この菌液を Luria-Bertani (Lennox) 寒天培地に接種し、発育したコロニー数から菌数を求めた。また、この菌液を 85°C, 30 分の加熱を行い上記の方法で菌液中のエンドトキシン濃度を求めた。

これらの測定値から、菌数とエンドトキシン濃度の関係を示す回帰曲線式を求めた。

4. PCR による大腸菌群の検出

200 ml のミネラルウォーターをザルトリウス・ステディム社製の Vivaspin 15R (30,000 MWCO) を用いて約 150 μ l まで濃縮し PCR サンプルとして用いた。陰性コントロールとして *Bacillus subtilis* を、陽性コントロールとして *Escherichia coli* を 10² もしくは 10³ cfu/ml になるように滅菌超純水に浮遊させ 85°C, 30 分間加熱した。この菌液 1 ml を 200 ml の超純水に浮遊させ、ミネラルウォーターと同様に濃縮したものを PCR サンプルとして用いた。ミネラルウォーター中の大腸菌群の存在は *lacZ* 遺伝子を検出することによって確認した。検出のためのプライマーは Bej らが報告¹⁾している ZL-1675 (5'-ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC-3') と ZR-2025 (5'-GGTTTATGCAGCAACGAGACGTCA-3') を用いた。PCR による遺伝子の増幅には東洋紡績(株)製の KOD FX を用いた。反応には上記の濃縮サンプルを 10 μ l 使用し、他の条件は KOD FX の使用説明書に従った。PCR サイクルは 94°C, 2 分の最初の熱変性の後、98°C, 10 秒, 68°C, 30 秒を 40 サイクル繰り返した。PCR 産物は 0.8% アガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色で検出した。

結果および考察

1. 国産ミネラルウォーターのエンドトキシン濃度測定

市販の殺菌・除菌済みの 41 銘柄の国産ミネラルウォーターを調査した。サンプルとして使用したミネラルウォーターの原水の分類表示は温泉水 (3)、鉱水 (12)、鉱泉水 (4)、地下水 (2)、深井戸水 (8)、水 (1)、湧水 (8)、不明 (3) に分かれた(カッコ内はサンプル数)。殺菌方法による分類では非加熱殺菌が 13 サンプル、加熱殺菌が 7 サンプル、不明が 21 サンプルとなった。pH による分類では pH 7 以上 9 未満に集中していた。また、硬度は半数の銘柄で 50 以下であった。

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 (Table 1), 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、そのうち 2 銘柄は 30 EU/ml 以上を示した。エンドトキシン濃度と原水の分類、殺菌方法、pH、硬度の間に相関は見られなかった(詳細略)。通常のリムルス試験ではエンドトキシン以外に真菌の菌体やセルロースに含まれるグルカンも検出されるため、ミネラルウォーターのろ過にセルロース系の膜が使用されていると、エンドトキシン濃度が高値を示す場合がある。そこで、最初のスクリーニングでエンドトキシン濃度が高値を示した 6 銘柄 A から F をエンドトキシンに特異的なリムルス試験でさらに測定した (Fig.

Table 1. Concentration of endotoxin in samples

	Concentration of endotoxin (EU/ml)				Total
	0.00-0.05	0.05-0.50	0.50-2.00	2.00≤	
Number of samples	18	12	5	6	41

EU: endotoxin unit

Fig. 1. Concentration of endotoxin in mineral water measured by endotoxin-specific limulus test. Endotoxin was measured by conventional limulus test or endotoxin-specific limulus test. Values are means $\pm$ SE ($n=3$). EU: endotoxin unit.

Fig. 2. Comparison of endotoxin in Japanese mineral water with that in non-sterilized mineral water and tap water. Endotoxin was measured by endotoxin-specific limulus test. Values are means $\pm$ SE ($n=3$). EU: endotoxin unit.

1). その結果、銘柄 D と E のエンドトキシン濃度はそれぞれ約 15 分の 1, 5 分の 1 に減少した。この結果から、銘柄 D と E はろ過にセルロース系の膜が使用されていたか、真菌の汚染が発生していたことが示唆された。

2. 非殺菌ミネラルウォーターとの比較

水源に存在していた細菌が瓶詰め後、容器内で増殖することが知られており、非殺菌のミネラルウォーターにはこうした細菌が約 10^3 から 10^6 cfu/ml 程度、含まれているとの報告がある^{2,4,6,9)}。そこで、殺菌・除菌を行っている国産ミネラルウォーターと非殺菌のヨーロッパ産ミネラルウォーターのエンドトキシン濃度を比較することにより、国産ミネラルウォーターに含まれるエン

Fig. 3. Relationship between concentration of endotoxin and number of *Escherichia coli*. EU: endotoxin unit.

Fig. 4. Estimated number of bacteria in mineral water. Endotoxin was measured by endotoxin-specific limulus test. Values are means $\pm$ SE ($n=3$).

ドトキシン濃度がどの程度の菌量を示唆するのか検討を行った (Fig. 2). ヨーロッパ産の非殺菌ミネラルウォーター 6 銘柄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 であった。この結果からエンドトキシン濃度の高かった銘柄 A, B, C はヨーロッパ産の非殺菌ミネラルウォーター 6 銘柄平均の約 4.8 から 14 倍のエンドトキシン濃度を示した。また、東京都内の水道水中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濃度を示していることが明らかになった。以上の結果から、銘柄 A, B, C の製造に何らかの異常があり、非常に高い菌数のグラム陰性菌が存在していた可能性が示唆された。

3. ミネラルウォーター中の推定グラム陰性菌数の算出

次にミネラルウォーター中のグラム陰性菌数を推定するため、大腸菌をグラム陰性菌の標準菌として用い、菌数とエンドトキシン濃度の関係を示す回帰曲線式を求めた (Fig. 3)。この回帰曲線式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、非殺菌のヨーロッパ産ミネラルウォーター6銘柄の平均は約 2.5×10^3 cfu/mlであったのに対し、銘柄A, B, Cは約 8.9×10^3 から 2.2×10^4 cfu/mlを示した (Fig. 4).

4. 高エンドトキシンサンプルからの大腸菌群の検出

これまでの実験から殺菌・除菌前の銘柄A, B, C中には高濃度のグラム陰性菌が存在していたことが示唆された。高エンドトキシン濃度を示した検体の原水を入手できず、培養法によって菌量や菌種を直接確認することができなかったため、高エンドトキシン濃度を示した銘柄からPCRによって大腸菌群の*lacZ* 遺伝子の検出を行った (Fig. 5)。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 (lane 1, 2)、陽性コントロールの*E. coli* (lane 3, 4) に対しては 10^3 cfu/200 mlの濃度で陽性になった (lane 4)。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 (lane 5~8)、銘柄Aが陽性を示した (lane 5)。この結果から、殺菌・除菌前の銘柄Aに大腸菌群が存在していたことが示唆された。この銘柄Aは深井戸水で硬度は7.2、殺菌方法、pHは不明であった。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る。また、環境水中には*Pseudomonas* のような*lacZ* 遺伝子陰性菌が存在するが、銘柄B, Cにはこのような菌が存在していた可能性も考えられる。

今回の実験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推定するのに非常に有効であることが明らかになった。ミネラルウォーターのような低い菌数のサンプルからPCRによって特定の遺伝子の検出を行うためには、今回のように濃縮操作が必要である (Fig. 5)。しかし、リムルス試験を利用することによって約 10^2 cfu/ml程度の細菌を濃縮せずに検出することができた (Fig. 3)。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、試験結果が30分で得られるため、日常のモニタリング作業に非常に適した試験法であると思われる。また、viable but non-culturable 状態の細菌の検出を行えることも本法の大きな利点と思われる。しかしエンドトキシンを検出するという原理上、グラム陽性菌の検出を行うことができない。また、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。あくまでも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ので結果の解析には注意が必要である。すなわち、エンドトキシン濃度を測定するこ

Fig. 5. Detection of *lacZ* from Japanese mineral water.

200 ml of mineral water was concentrated to 150 μ l by ultrafiltration, and 10 μ l of concentrated mineral water was subjected to PCR. Heat-killed *B. subtilis* (10^2 or 10^3 cfu) or *E. coli* (10^2 or 10^3 cfu) was suspended to 200 ml of ultrapure water, and these suspensions were concentrated to 150 μ l by ultrafiltration. A 10 μ l of suspension was subjected to PCR as a control. The product of PCR should be detected at 0.326 Kbp. Lane M: DNA marker.

とによって汚染状況をスクリーニングし、高濃度の汚染が見られる検体に関しては別途、採水地、製造所から原水を採水し、培養法によって結果を確定するというのが、リムルス試験の実際的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グラム陰性菌の菌数を推定できても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を決めるのが非常に難しいが、一つの目安として非殺菌のミネラルウォーターのエンドトキシン濃度を基準として利用する方法が考えられる。水源に存在していた細菌が瓶詰め後、容器内で増殖することが知られているが、非殺菌のミネラルウォーター中のエンドトキシンはこうした容器内で増殖した細菌に由来するものなので、これを大きく上回る場合は殺菌・除菌前のグラム陰性菌数に問題があったと考えて良いと思われる。

今回見られたような殺菌・除菌前のミネラルウォーター中に高濃度のグラム陰性菌が存在する原因として、1) 水源が基準値を上回って汚染していた場合、2) 水源に含まれていた細菌が採水後に貯水タンクなどで増殖した場合、3) 製造所内において二次的な汚染が発生した場合、が考えられる。1) に関しては法令違反になるが、2)、3) についてはこれらを規制する法令がない。しかし、他の清涼飲料水と異なりミネラルウォーターの場合、消費者はミネラルウォーターが持つ清浄性にメリットを感じ購入している場合が多いため、採水後の細菌の増殖や製造所内における細菌汚染を放置しておくことは好ましくない。そういった点からも、今回示したように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1) から3) すべての場合に対応できるため、ミネラルウォーターの品質向上にもつながると考えられる。

謝 辞

本研究は文部科学省科学研究費補助金 (20700616) の助成を受けたものである。

文 献

- 1) Bej, A. K., Steffan, R. J., DiCesare, J., Haff, L. and Atlas, R. M.: Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 307-314 (1990).
- 2) Defives, C., Guyard, S., Oularé, M. M., Mary, P. and Hornez, J. P.: Total counts, culturable and viable, and non-culturable microflora of a French mineral water: A case study. *J. Appl. Microbiol.*, **86**, 1033-1038 (1999).
- 3) Evans, T. M., Schillinger, J. E. and Stuart, D. G.: Rapid determination of bacteriological water quality by using *Limulus* lysate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 376-382 (1978).
- 4) Grant, M. A.: Analysis of bottled water for *Escherichia coli* and total coliforms. *J. Food Prot.*, **61**, 334-338 (1998).
- 5) Jorgensen, J. H., Lee, J. C. and Pahren, H. R.: Rapid detection of bacterial endotoxins in drinking water and renovated wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 347-351 (1976).
- 6) Mavridou, A.: Study of the bacterial flora of a non-carbonated natural mineral water. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**, 355-361 (1992).
- 7) Reyes, M. I., Pérez, C. M. and Negrón, E. L.: Microbiological assessment of house and imported bottled water by comparison of bacterial endotoxin concentration, heterotrophic plate count, and fecal coliform count. *P. R. Health Sci. J.*, **27**, 21-26 (2008).
- 8) Rhee, M. S. and Kang, D. H.: Rapid and simple estimation of microbiological quality of raw milk using chromogenic *Limulus* amoebocyte lysate endpoint assay. *J. Food Prot.*, **65**, 1447-1451 (2002).
- 9) Tamagnini, L. M. and Gonzalez, R. D.: Bacteriological stability and growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water. *J. Appl. Microbiol.*, **83**, 91-94 (1997).
- 10) 鮫島陽人, 鶴木隆文, 下野かおり, 亀澤浩幸, 間世田春作: ミネラルウォーターの品質管理に関する研究—ミネラルウォーターの製造過程における微生物数の変化—. 鹿児島県工業技術センター研究報告, **16**, 23-26 (2002).