

令和5年度看護研究Ⅱ

口飲みしたペットボトルの 衛生的保存方法の検討

—含嗽と温度の違いによる経時的細菌数の比較—

研究背景

- ペットボトルは衝撃に強く、軽量、開閉の自由さなどから様々な用途で用いられている。
中でも、飲料の容器としての使用は78.2%と増加傾向にあり、缶や瓶、紙容器から移行している¹⁾。
- ペットボトル入りの清涼飲料水を飲む場合・・・
口を直接ペットボトルにつけて飲む、いわゆる、**口飲み**する人が多い。

先行研究によると・・・

「口飲みペットボトルは常温・冷所保存のいずれも2時間後から細菌が増殖し、特に常温保存のミネラルウォーターに関しては一定時間経過後急激に増加するため、**2時間以内に飲み切る**ことが望ましい。」²⁾

ペットボトルの細菌汚染

- 口飲みした後飲み残したペットボトルを保存、携帯
- 口腔内には多数の細菌が存在している
- ➡ 口腔内の細菌をペットボトル内に混入させ、**内容液を汚染させている**
- 特に夏場は外気温が高く、**菌が繁殖しやすい環境**

先行研究によると・・・

- (口腔内環境に関して)「多数の常在菌が生息しており、生体に対し全身的、局所的に各種の影響を与えている。易感染宿主では通常は病原性のみられない口腔常在菌が原因となって各種の全身感染症、および各種の全身的、ならびに局所的障害を引き起こすことが明らかになってきている。」³⁾
- 口腔ケアの意義として、口腔内乾燥の予防、口腔の機能維持、唾液分泌量の増加がある。
- 「通常のおうがいの主な目的は食物残渣の有機物を除去し、口腔内が乾燥状態にある時は口腔内を湿らせるなどの物理的効果を期待するものである。」⁴⁾



含嗽による口腔ケアの必要性

- 口飲みペットボトルの**保存温度**と**細菌の経時的変化**に関する研究⁵⁻⁷⁾はあったものの、含嗽との関係にまで言及した研究は少ない。
 - 臨地実習では、化学療法を受け易感染状態にある患者を受け持ち、感染予防行動が必要であるが、売店で購入したペットボトル飲料を長時間冷蔵庫の外で保存しているという状況がみられた。
- ➡ 短時間で飲み切ることが困難であることや、飲み終わる度に冷蔵庫の中にしまうことを負担に感じていると予測される。

研究目的

口飲みしたペットボトルの**保存方法**による**細菌数の**
経時的変動を明らかにし、**衛生的保存方法**の検討を
行うこと。



保存温度を名古屋市の夏のある日の気温の平均である
常温(35°C)と**冷所(5°C)**で設定し、さらに**含嗽の有無**で
比較した。

研究方法

1.調査日

予備実験:1回目 2023年7月31日

2回目 2023年9月19日

本実験:2023年9月26日～2023年10月8日

2.被験者と材料

名古屋市立大学看護学部 感染予防看護学ゼミ4年生5名

ペットボトルの「おいしい水天然水(ASAHI)」300mL

3.調査方法

1)使用物品

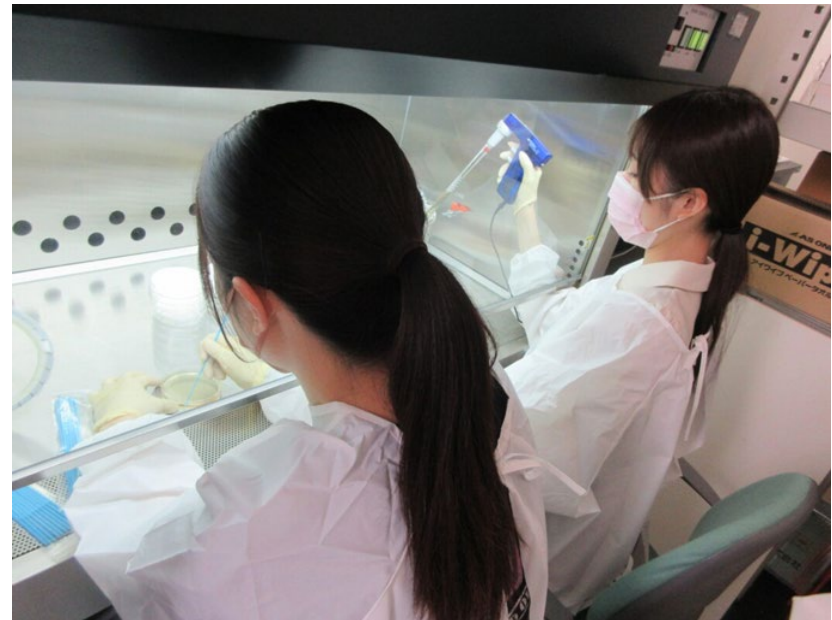
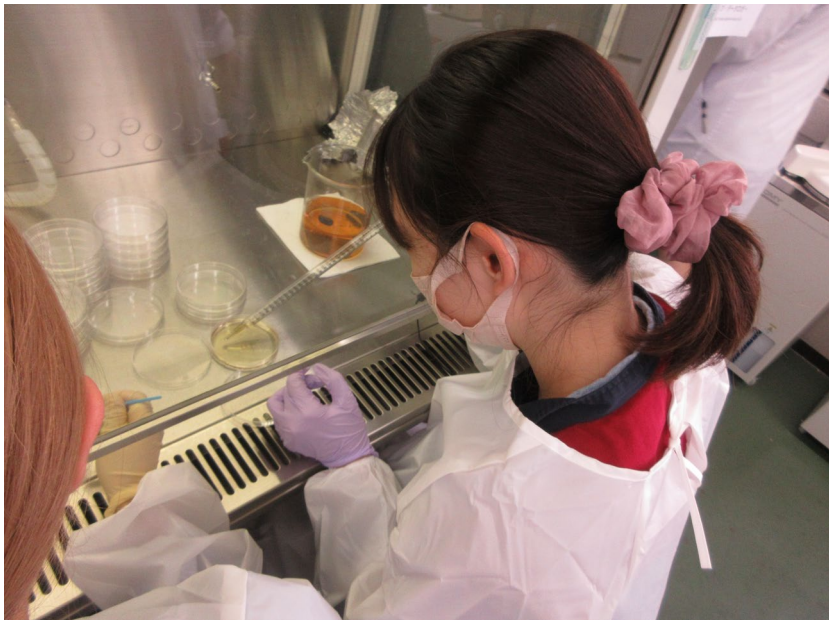
- ディスポーザブル白衣
- ディスポーザブル手袋
- ディスポマスク
- 普通寒天培地(パールコア®、栄研)
- 200 μ L分注器(PIPETMAN®, GILSON)
- 200 μ Lチップ(理科研)
- ディスポループ10型(アズワン株式会社)
- 滅菌蒸留水
- 500mLビーカー
- 500mLメスシリンダー
- 各自で用意した歯ブラシ・歯磨き粉
- アルコール除菌シート
- おいしい水天然水600mL(ASAHI)
- 水道水
- 紙コップ
- 水温計(おんどとり、T&D)
- 室温計(TANITA)
- pH測定計(HORIBASD®, LAQUAtwin)
- 薬品用冷蔵庫
(日本フリーザバイオマルチクーラー)
- 孵卵器(EYELA)
- VORTEX-GENIE2®(ScientificIndustries)
- HI-POWER MAGNATIC STIRRER
- オートクレーブ(LSX-300、TOMY)

2) 培地の作成

1. ビーカー(1000mL)と天秤を用いて、普通寒天培地を14.0g秤量した。
2. メスシリンダーで計量した400mLの蒸留水をビーカーに入れ、マグネチックスターラーを投入した。
3. アルミホイルでビーカーに蓋をし、化学的インジゲーターを貼付して作成日と培地名を記載した後、攪拌した。



4. ビーカーをオートクレーブに入れ、121°Cで20分間かけて滅菌した。
5. 滅菌終了後、エタノールで消毒したクリーンベンチ内でシャーレに20mLずつ分注した。
6. 培地を孵卵器に24時間入れて無菌試験を行った。



3) 被験者の条件・準備

- 実験の1時間前に食事、歯磨きを済ませ、実験の1時間前からは絶飲食とした。
- 実験前、歯磨き後のマウスウォッシュは禁止とした。
- 抗菌薬を必要とする被験者を実験から除外した。

4) 予備実験の方法と結果

お茶を口飲みし、**口をつける回数と細菌数の変動、保存温度と口腔ケアの種類・有無**による細菌数の変動を検討した。

- 予備実験1回目 2023年7月31日
 - 口をつけた回数との相関関係なし
 - ➡ 口をつける回数は自由
 - 常温(35°C)または冷所(5°C)保存での細菌数の差は少ない
 - 時間の経過による細菌数の増殖にばらつき
 - ➡ カテキンによる抗菌作用、先行文献²⁾とは異なる方法によるもの

4) 予備実験の方法と結果

- 予備実験2回目 2023年9月19日

- ・1回目の予備実験では、1000 μ Lの検体を十分に乾燥させることができず、細菌数の算出が困難

➡ 100 μ L、500 μ Lも同様に接種し、**接種量を決定することを目的**として予備実験2回目を行った。

結果

100 μ Lでは培地表面は乾燥したが、細菌数が少なかった。

500 μ Lでは培地表面が乾燥しなかった。

➡ 本実験では接種量を200 μ Lとした。

5) 定義

- 含嗽：水道水を適量口に含み、**ブクブク含嗽を15秒**行った。その後、口に含む水を入れ替え、**ガラガラ含嗽を15秒**行った。また、ガラガラ含嗽は3回繰り返し行うこととした⁸⁾。
- 常温：名古屋市の夏のある日の9時から17時の平均気温35°C
- 冷所：冷蔵庫内の温度5°C
- 飲みかけ：600mLペットボトルを半量の300mL口飲みした状態
- 口飲み：ペットボトルの直接飲用を上唇を付けて行うこと

6) 実施

(1) 実施の概要

- 口飲み後のペットボトルを常温(35°C)と冷蔵庫による冷所(5°C)で保存をし、経時的に細菌数の計測を行った。
- 常温(35°C)と冷所(5°C)のそれぞれの場所で保存するペットボトルごとに被験者全員が含嗽ありの場合と含嗽なしの場合で2回ずつ口飲みを行った(表1)。
- コントロールとして、口付けなしの検体の採取を行った。
- 水温測定用のペットボトルを用意し、温度の測定を行った。

表1 実施日程と被験者の条件

日付	保存温度	午前		保存温度	午後	
		含嗽あり	含嗽なし		含嗽あり	含嗽なし
9月26日	常温 (35°C)	ABC	DE	/	/	/
9月28日	冷所 (5°C)	DE	ABC	常温 (35°C)	DE	ABC
10月3日	/	/	/	冷所 (5°C)	ABC	DE
10月4日	冷所 (5°C)	ABC	DE	常温 (35°C)	ABC	DE
10月5日	常温 (35°C)	DE	ABC	冷所 (5°C)	DE	ABC

- ABCDEは被験者を示している
- /は未実施を示す

(2) 含嗽なしの口飲みの実施

1. 30分かけてペットボトルの口飲みを複数回行った。
その際毎回リキャップを行った。
2. 口飲みしたペットボトルを常温(35°C)又は冷所(5°C)で保存した。

(3) 含嗽ありの口飲みの実施

1. 定義通りに含嗽を実施した。
2. 30分かけてペットボトルの口飲みを複数回行った。
その際毎回リキャップを行った。
3. 口飲みしたペットボトルを常温(35°C)又は冷所(5°C)で保存した。

(4)コントロールペットボトルの作成

1. 口飲みは行わずに、ペットボトルの内容量を半量にした。

(5)準備

- 室温湿度を測定した。
- 身だしなみ(髪を一つにまとめ、口飲み後は再び手指衛生を行い、マスク・ディスポーザブル手袋、ディスポーサブル白衣を着用した)を確認した。
- 実験台をアルコール除菌シートを用いて拭いた。

(6) 培地への検体の接種

1. ボルテックス・ミキサーにより、ペットボトルの内容液を攪拌し、均一にした。
2. ペットボトルからスポイトを用いて内容液3mL採取し、スピッツに注入した。
3. 2.から200 μ Lを採取、それを普通寒天培地に接種し、ディスポールプを使って均一になるように広げた。



4. 3.の普通寒天培地を、35°C、48時間好気培養した後、細菌数を算出した。

5. 1.により作成した検体のペットボトルより、経時的に6回(直後、1時間後、2時間後、4時間後、6時間後、24時間後)採取した。

6. 採取時に内容液の温度を測定した。



(7) 分析方法

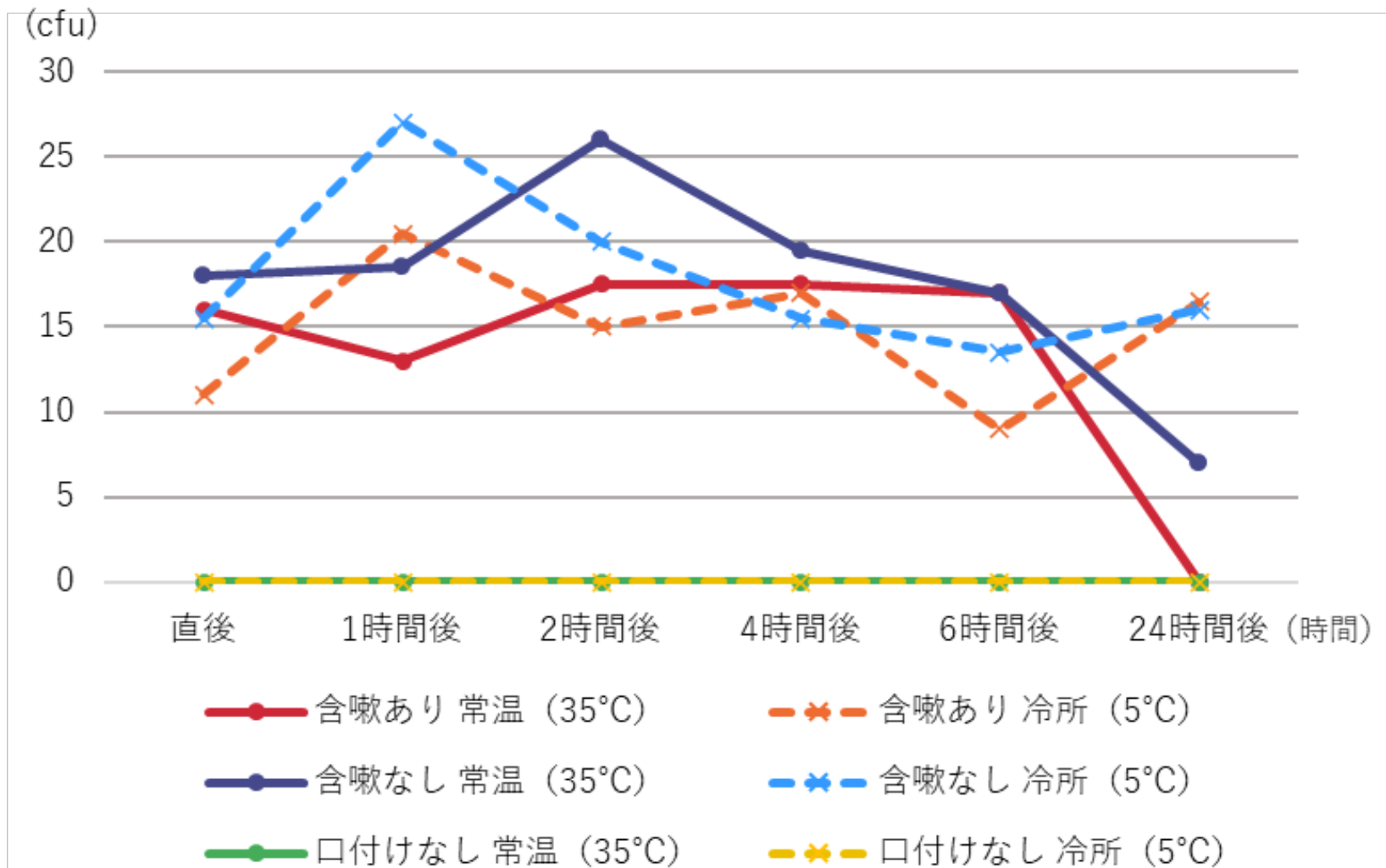
- Microsoft Office Excel 2019を用いて、細菌数を集計した。菌数算定はコロニー形成単位であるcolony forming unit (cfu)を計測した。
- 統計学的分析にはIBM SPSS Statistics 28を用いた。常温(35°C)保存、冷所(5°C)保存の比較、含嗽ありと含嗽なしの口飲み直後の比較、含嗽の有無の区別をなくした常温(35°C)保存、冷所(5°C)保存の比較をWilcoxonの符号付順位検定を用いて行った。含嗽あり、含嗽なし、口付けなしの比較はKruskal Wallis検定を用いて行った。
- 有意確率は $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

(8) 倫理的配慮

本研究は名古屋市立大学看護学部研究室において、被験者となる看護学生に研究の目的・方法を説明し、同意を得た上で行った。被験者が心身の負担となる不利益を被らないよう配慮した。被験者5名を匿名化した。

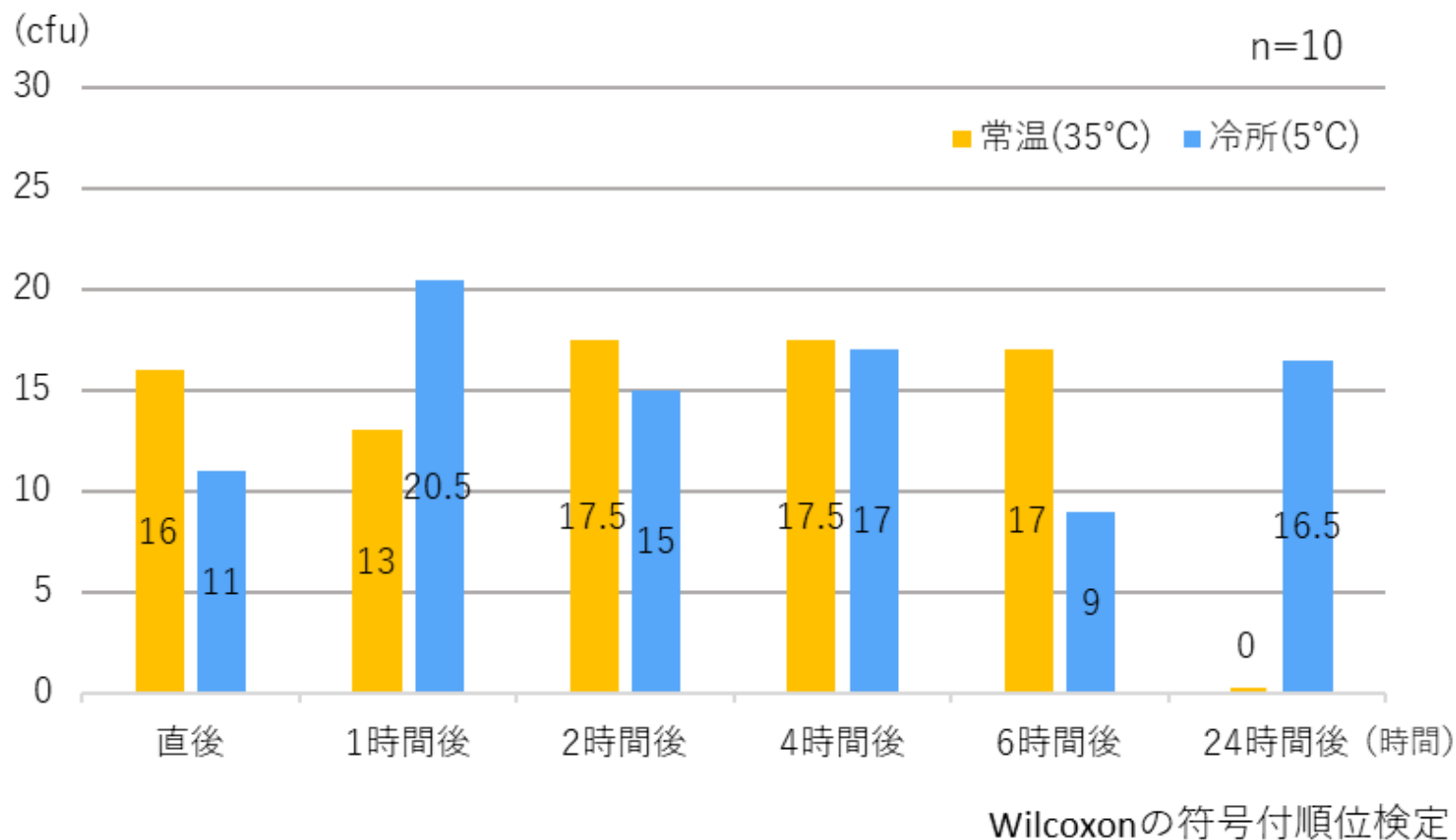
結 果

結果1 含嗽の有無と保存温度 細菌数の経時的変動



結果2-1

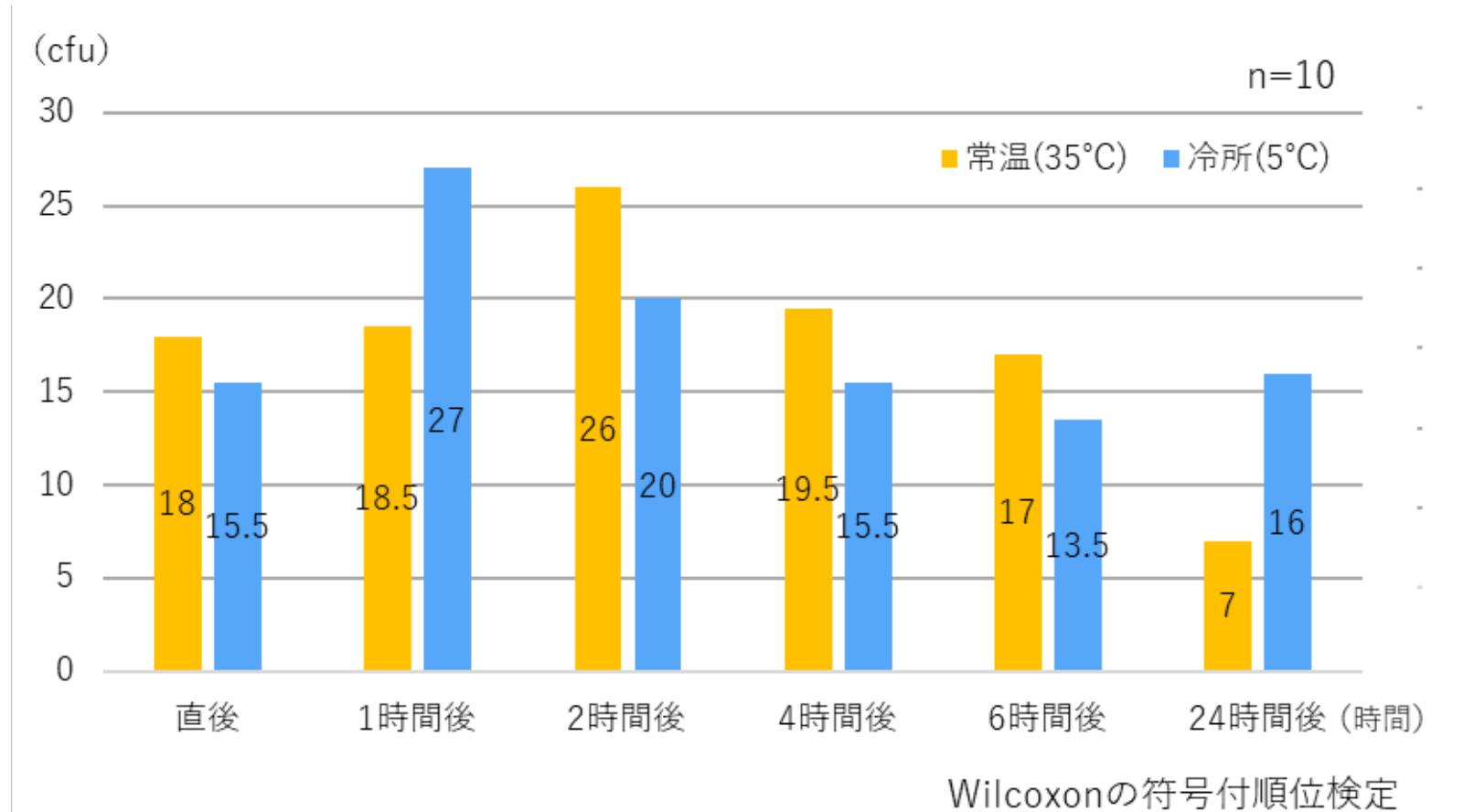
含嗽ありの場合の細菌数の比較



全ての時間において統計学的に有意差なし

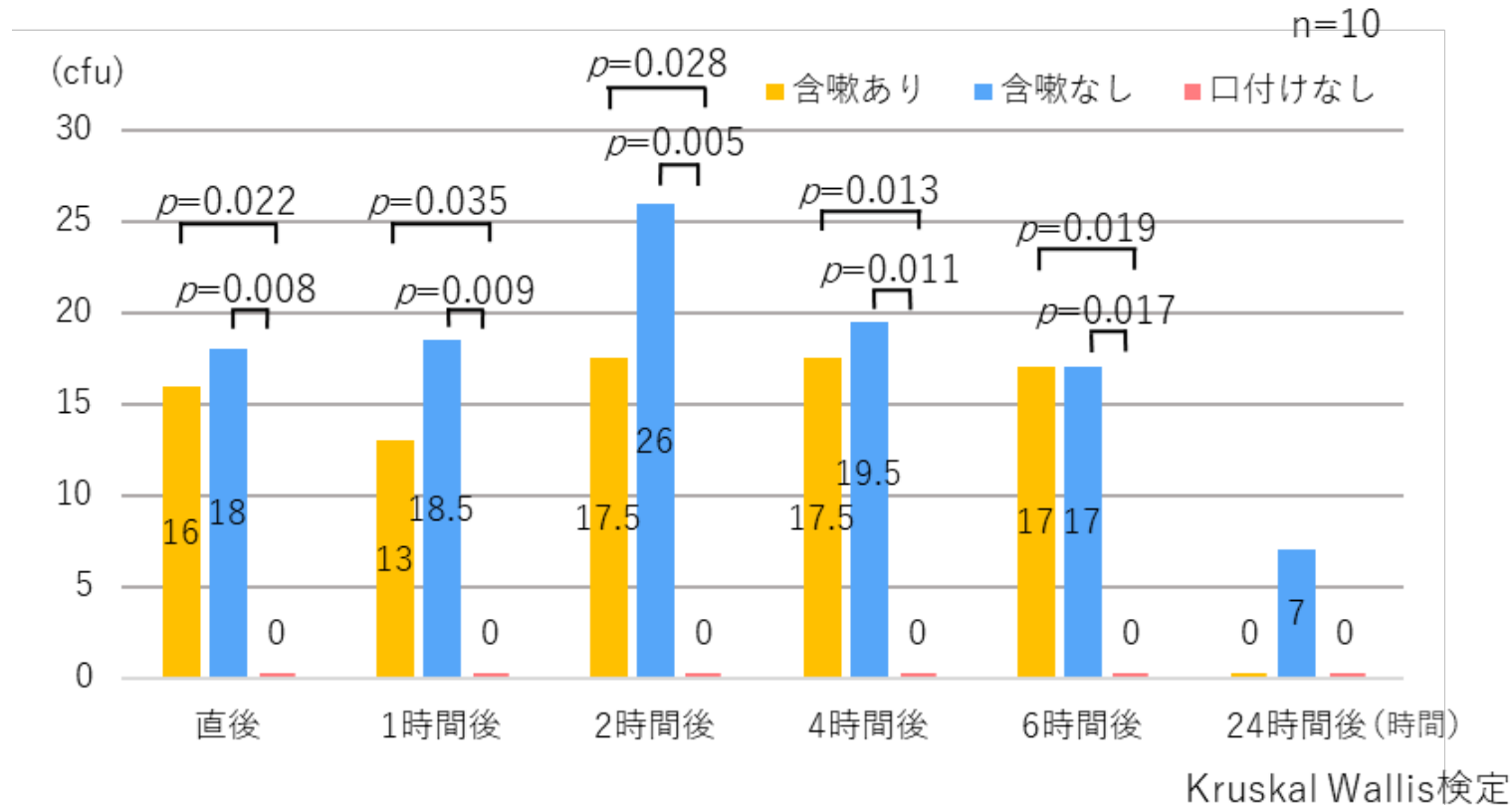
結果2-2

含嗽なしの場合の細菌数の比較



全ての時間において統計学的に有意差なし

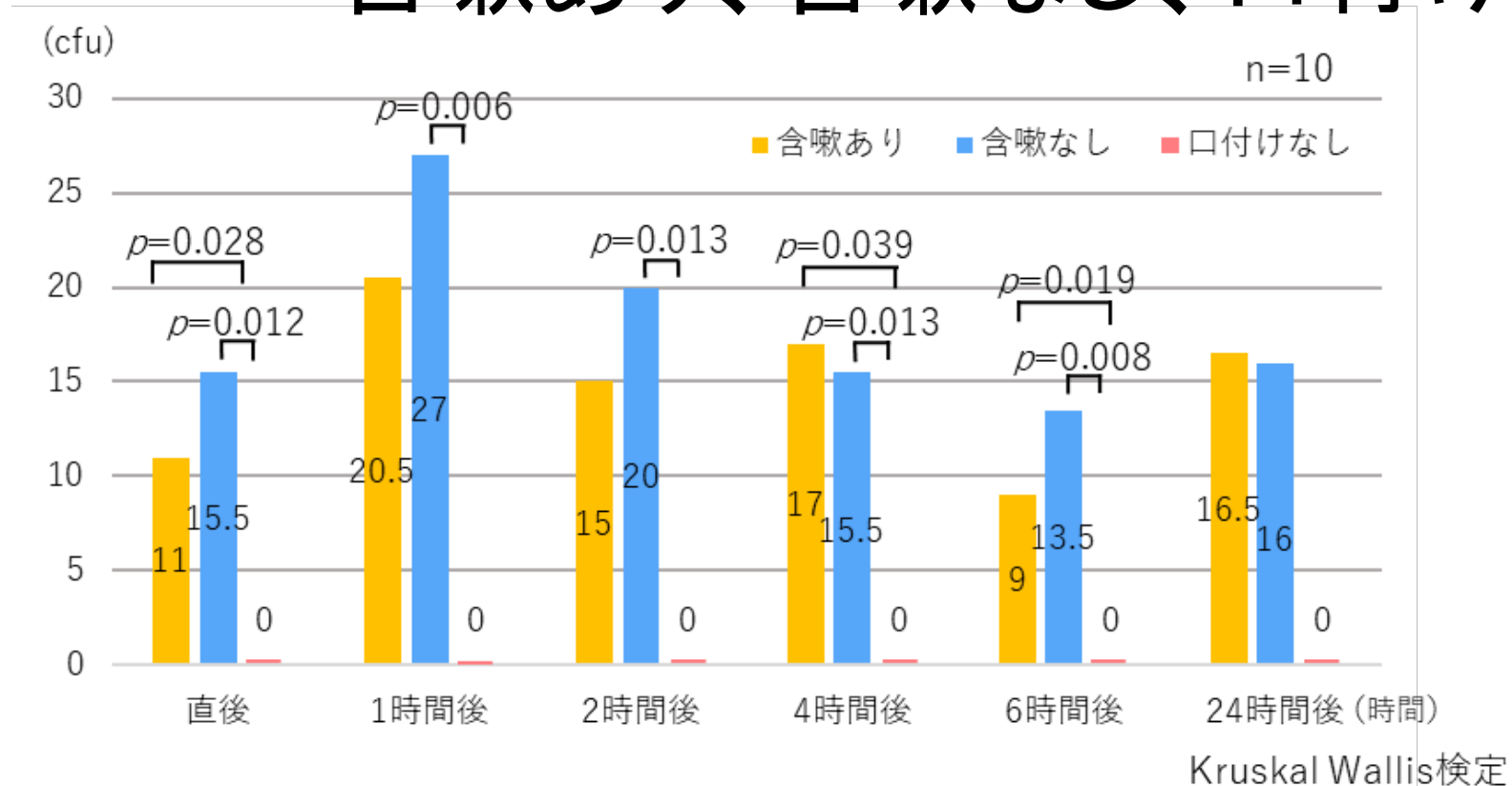
結果3-1 常温(35°C) 含嗽あり、含嗽なし、口付けなし



直後、1～6時間後の細菌数

含嗽あり > 口付けなし、含嗽なし > 口付けなし

結果3-2 冷所 (5°C) 含嗽あり、含嗽なし、口付けなし



直後、4時間後、6時間後の細菌数

含嗽あり > 口付けなし、含嗽なし > 口付けなし

1時間後、2時間後の細菌数

含嗽なし > 口付けなし

結果4

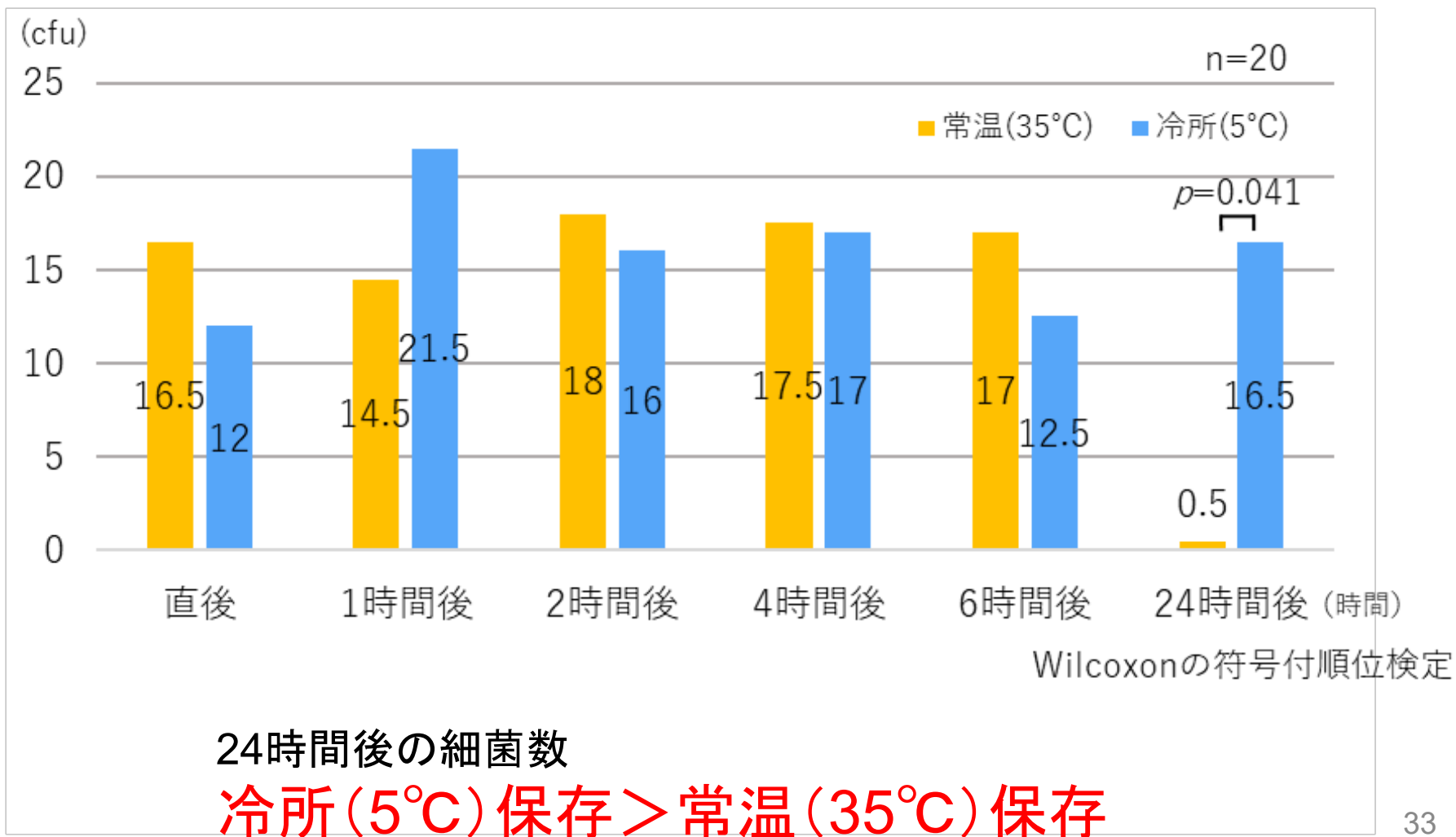
含嗽の有無での細菌数の比較

口飲み直後においては保存温度による差はないため、保存温度の区別をなくし含嗽の有無による細菌数を比較した。

含嗽ありは13.5cfu(0~56)、含嗽なしは17.5cfu(1~216)であった。含嗽の有無において統計的に有意な差は見られなかった($p=0.433$)。

結果5

保存温度の違いによる細菌数の比較 (含嗽の有無による区別なし)



考察

1)保存温度の違いによる細菌数の経時的変動

- 含嗽ありの条件、または含嗽なしの条件での保存温度によるペットボトル内の細菌数の経時的比較では、常温(35°C)保存と冷所(5°C)保存の違いによって細菌数に有意な差は見られなかった。

▶ 考えられる原因

- 吉井らの研究²⁾では保存温度を25°Cと4°Cに設定しており、今回の実験と方法が異なるため類似した結果が出なかった。
- 水は細菌が生存、増殖するための栄養素が不足しているため、どちらの温度でも細菌が生存できなかった。

- 唾液には1mLあたり $10^9 \sim 10^{10}$ 個の細菌が存在する⁹⁾が、ペットボトル内へどれほど唾液が混入するかは分泌量や飲み方などによって**個体差**がある。

➡ 細菌数の経時的変動もそれぞれで異なる可能性。



常温(35°C)保存と冷所(5°C)保存の違いがあつたとしても**細菌の生存、増殖には大きく関係しなかつた可能性**があると考えられる。

2)口飲み前の含嗽の有無による細菌数の変化

- 口飲み直後のペットボトル内の細菌数の比較を行ったところ、含嗽の有無において有意な差は見られなかった。
- 口飲み前の含嗽あり、含嗽なし、口付けなしの条件でペットボトル内の細菌数の経時的比較を行ったところ、含嗽ありと含嗽なしの違いによって有意な差は見られなかった。



本研究で行った含嗽方法(ブクブク含嗽を15秒1回、ガラガラ含嗽を15秒3回)では、**ペットボトル内の細菌数は有意に減少しない**ことが分かった。

- 神野ら¹⁰⁾は、水道水でブクブク含嗽を15秒1回と15秒3回を行い、口腔内の一般細菌の減少率をみたところ、15秒1回の含嗽では55.5%、**15秒3回の含嗽では94.0%**であり、15秒3回の含嗽は含嗽剤による薬剤効果に匹敵していた。



- 口飲み前に**ブクブク含嗽を複数回**行うことで口腔内細菌を減少させることができる。
- **水道水は無味無臭、低刺激**であることから、誰でも抵抗なく手軽に含嗽できる。

 頻繁に含嗽を行うには**水道水で複数回ブクブク含嗽**することが適している可能性があると推測される。

3) 易感染患者に推奨するペットボトルの衛生的保存方法

保存温度について

- 後藤ら¹²⁾の研究: 口飲みしたミネラルウォーターを36°C保存した時、試験5回中2回**大腸菌群が検出**された。
- 小林ら¹³⁾の研究: 8時間後に検出された *Staphylococcus*属菌と *Streptococcus*属菌は、栄養要求性が高くないため、**長時間の生存が可能**であったと考えられる。



- 口飲みしたペットボトルは**不衛生**であり、**常温(35°C)保存でも衛生的ではない**と考えられる。

- 一般的にペットボトルは冷所保存が推奨されている。

▶ しかし…

- 含嗽の有無の区別をなくし保存温度の違いによる細菌数の経時的比較を行ったところ、口飲み直後から6時間後までは有意な差はみられなかったが、24時間後では統計学的に有意な差がみられた。



- 口飲みしたペットボトルを冷所(5°C)保存していても、24時間後には衛生的ではない。

飲み方について

- 複数のペットボトルで口飲み直後から清涼飲料水の製造基準¹⁴⁾である一般細菌数100cfu/mL以下を超えていた。

➡ **口飲みは細菌を混入させる**行為である。

- 口付けなしペットボトルと口飲みペットボトルの細菌数について比較したところ、24時間以内において常温(35°C)保存、冷所(5°C)保存どちらの保存温度でも統計的に有意な差があった。

➡ **直接口付けしなければ**、保存温度関係なく細菌の増殖を防ぐことができると考えられる。

- 複数のペットボトルが保存1、2時間後に細菌数が最大となり、その後細菌数が減少した。

➡ 水は細菌にとって栄養素が少なく死菌となったことから、細菌数が減少してみえたと考えられる。



ペットボトル開封後から衛生的に保存するためには、**直接口飲みせずコップなど他の容器に移し替えてから飲用することが必要である**と考える。

容量について

- 本研究では600mLのペットボトルを使用した**が、容量が多いと保存時間が長くなり飲料中の細菌数も増加すると考えられる。**
- 渡辺ら¹⁵⁾の研究:「吸い飲みでの繰り返しの飲用の際には口腔内細菌や真菌が混入、残留し、増殖した状態の飲料を飲むことになる。飲み残しの飲料が入った吸い飲みで長時間繰り返し飲むことは食中毒のリスクもあり、衛生的に安全でないと考える。」
- 小容量であっても細菌の増殖が認められているため、**短時間で飲み切る**必要がある。



280mLや350mLなど**小さい容量のペットボトル**を選択すべきである**と考える。**

結 論

- ▶ 含嗽ありの条件、または含嗽なしの条件での保存温度によるペットボトル内の細菌数の経時的比較から、**常温(35°C)保存と冷所(5°C)保存の違いはない**ことが分かった。
- ▶ しかし、長時間生存可能な細菌の存在や細菌の性質から、**常温(35°C)保存は衛生的ではない**と考えられる。また、含嗽の有無の区別をなくした保存温度の違いによる細菌数の経時的比較からは、口飲み24時間後には**常温(35°C)保存よりも冷所(5°C)保存の方が細菌数が多い**ことが分かった。よって、**口飲みした場合は冷所(5°C)保存も衛生的ではない**と考えられる。

- ▶ ペットボトルは口飲み直後から細菌が混入するため、ペットボトルに入った水は口飲みせず、別の容器に移して飲用するべきであると考える。
- ▶ ペットボトルを口飲みする場合は、細菌の増殖を防ぐために、より短時間で飲み切れる小容量のペットボトルを選択すべきであると考える。

研究の限界

- 被験者の数が5名と少数であったため、得られた結果を一般化しにくい
- 実験1時間前禁飲食という条件があるものの、被験者の口腔内衛生状態は個体差があり、実験後の結果に影響を及ぼした可能性がある
- 他の含嗽方法を用いた場合、今回とは異なる結果が出る可能性がある
- ペットボトルの内容液は水であったが、他の飲料を用いる場合は細菌の発育環境が異なり、今回とは異なる結果が得られる可能性がある

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々にご指導とご協力をいただき、心より御礼申し上げます。感染予防看護学ゼミの仲間、名古屋市立大学病院職員関係者の皆様、名古屋市立大学医学部附属東部医療センター職員関係者の皆様、ならびに物品の手配からレポートの作成など、ご指導とご教授をいただきました名古屋市立大学感染予防看護学ゼミ担当の矢野久子教授、安岡砂織准教授、吉川寛美講師、中嶋未佳助手に深く感謝いたします。

引用文献

- (1) 一般社団法人全国清涼飲料連合会：清涼飲料水統計2023, 2023,06. 2023jsda_databook_print_h14 (j-sda.or.jp), (2023,10,31最終閲覧)
- (2) 吉井美穂, 八塚美樹, 安田智美：小型ペットボトル飲料使用における安全性の検討, 日本看護研究学会雑誌, 32(1), 125-129, 2009.
- (3) 茂木健司, 笹岡邦典, 樋口有香子他：各種口腔ケアの効果に関する検討—口腔常在菌数を指標として—第1報 含嗽剤の薬剤効果, The KITAKANTO medical journal, 57, 239-244, 2007.
- (4) 波多江新平, 金澤美弥子, 杉山香代子他：かぜ症候群の予防と治療 うがい, 手洗い, マスクの科学, 治療と診断, 92(12), 2278, 2007
- (5) 後藤慶一, 廣瀬昭博, 折笠旦綱他：開栓したペットボトル入り清涼飲料水における微生物の増殖挙動, 食衛誌, 61(5), 200-205, 2020.
- (6) 成井浩二, 竹ノ内清彦, 野口雅久他：園児が使用したペットボトルの細菌学的調査, 東京薬科大学研究紀要, 7, 1-4, 2004.

引用文献

- (7) 小野郁, 今清佳, 森菜穂子他: ペットボトル入り飲料に関する研究, 弘前大学教育学部紀要, 92, 133-145, 2004.
- (8) 日本日本赤十字社. “効果的なうがいの仕方 咳エチケット”. 2021,05,01. https://www.jrc.or.jp/chapter/saitama/about/topics/2021/0501_017471.html, (2023,10,16最終閲覧)
- (9) 神谷茂: 標準微生物学, 医学書院, 東京, 2021.
- (10) 神野恵治, 茂木健司, 笹岡邦典他: 各種口腔ケアの効果に関する検討 —口腔常在菌を指標として—第2報 各種含嗽剤による含嗽効果の検討, The KITAKANTO medical journal, 58, 1-7, 2008.
- (11) 徳永綾子, 高みな子, 中村雅子他: 水がもたらす含嗽の効果, 奈良県立医科大学付属病院, 35, 38-42, 2005.
- (12) 後藤政幸, 荒巻輝代, 芳原達也: 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, 和洋女子大学紀要, 42, 29-37, 2002-03.

引用文献

(13) 小林麻里子, 奥脇義行, 川井英雄: PETボトル入り清涼飲料水の直接飲用でボトル内に混入した口腔内常在菌の消長, 日本食生活学会誌, 17(2), 19-24, 2006.

(14) 厚生労働省告示第370号: 食品、添加物等の規格基準, 1959, <https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000000ypmm-att/2r9852000000ypvf.pdf> (2023, 10, 31 最終閲覧)

(15) 渡辺朱里, 長岡仁美, 中江弘美他: 吸い飲み内残余飲料の微生物汚染状況に関する実験的予備調査, 医学と生物学, 159(4), 1-6, 2019.