

る解析を行ったが、頻繁に確認される B 群
以外の血清群の分離株についても同様な
解析を行い、ヒトのカンピロバクター腸炎
の感染源を明らかにしていくことは重要
なことであると思われる。

表1 PFGEを行った*Campylobacter jejuni* (Penner B群)分離株のリスト

No.	菌株No.	採取日	採取場所	検体由来	性別	年齢
1	98 003	98 3 23	静岡県 島田市	散発腸炎患者	男	56
2	98 038	98 4 3	静岡県 島田市	散発腸炎患者	男	
3	98 049	98 4 8	静岡県 島田市	散発腸炎患者	男	1
4	98 157	98 6 18	静岡県 島田市	散発腸炎患者	男	31
5	98 159	98 6 24	静岡県 島田市	散発腸炎患者	女	33
6	98 177	98 7 2	静岡県 島田市	散発腸炎患者	女	10
7	98 480	99 1 4	静岡県 島田市	散発腸炎患者	男	1
8	99 003	99 3 11	静岡県 島田市	散発腸炎患者	男	58
9	99 052	99 4 11	静岡県 静岡市	散発腸炎患者	女	7
10	99 232	99 7 19	静岡県 静岡市	散発腸炎患者	男	1
11	99 341	99 11 8	静岡県 島田市	散発腸炎患者	女	2
12	99 365	99 11 29	静岡県 島田市	散発腸炎患者	女	2
13	01 578	02 1 8	静岡県 富士宮市	鶏肉(食鳥処理場)		
14	02 435	03 2 24	兵庫県	鶏肉(食鳥処理場)		
15	01 615	02 1 15	静岡県 富士宮市	鶏肉(食鳥処理場)		
16	01 616	02 1 15	静岡県 富士宮市	鶏肉(食鳥処理場)		
17	00 043	00 4 6	静岡県 静岡市	散発腸炎患者	男	10
18	01 075	01 5 9	静岡県 島田市	散発腸炎患者	女	28
19	01 080	01 5 31	静岡県 静岡市	散発腸炎患者	女	5
20	02 155	02 8 15	静岡県 島田市	散発腸炎患者	男	
21	02 184	02 8 23	静岡県 島田市	散発腸炎患者	男	3
22	02 214	02 9 26	静岡県 静岡市	鶏肉(スーパー)		
23	02 251	02 10 22	静岡県 静岡市	鶏肉(スーパー)		
24	02 255	02 10 7	静岡県 島田市	散発腸炎患者	男	8
25	02 265	02 10 28	静岡県 静岡市	鶏肉(スーパー)		
26	02 291	02 11 7	静岡県 島田市	散発腸炎患者	男	4
27	02 292	02 11 10	静岡県 島田市	散発腸炎患者	女	12
28	02 275	02 11 8	静岡県 富士宮市	鶏肉(食鳥処理場)		
29	02 303	02 11 29	静岡県 富士宮市	鶏肉(食鳥処理場)		
30	01 283	01 9 5	静岡県 静岡市	ドバト糞便(駿府公園)		
31	01 297	01 9 14	静岡県 静岡市	ドバト糞便(登呂遺跡)		
32	01 298	01 9 14	静岡県 静岡市	ドバト糞便(登呂遺跡)		
33	01 310	01 9 14	静岡県 静岡市	ドバト糞便(登呂遺跡)		
34	01 311	01 9 14	静岡県 静岡市	ドバト糞便(登呂遺跡)		
35	01 331	01 9 28	静岡県 静岡市	ドバト糞便(駿府公園)		
36	01 345	01 10 4	静岡県 三島市	ドバト糞便(三島大社)		
37	01 348	01 10 4	静岡県 三島市	ドバト糞便(三島大社)		
38	01 402	01 11 9	静岡県 静岡市	ドバト糞便(駿府公園)		
39	01 404	01 11 9	静岡県 静岡市	ドバト糞便(駿府公園)		
40	02 424	02 11 5	神奈川県	牛レバー		

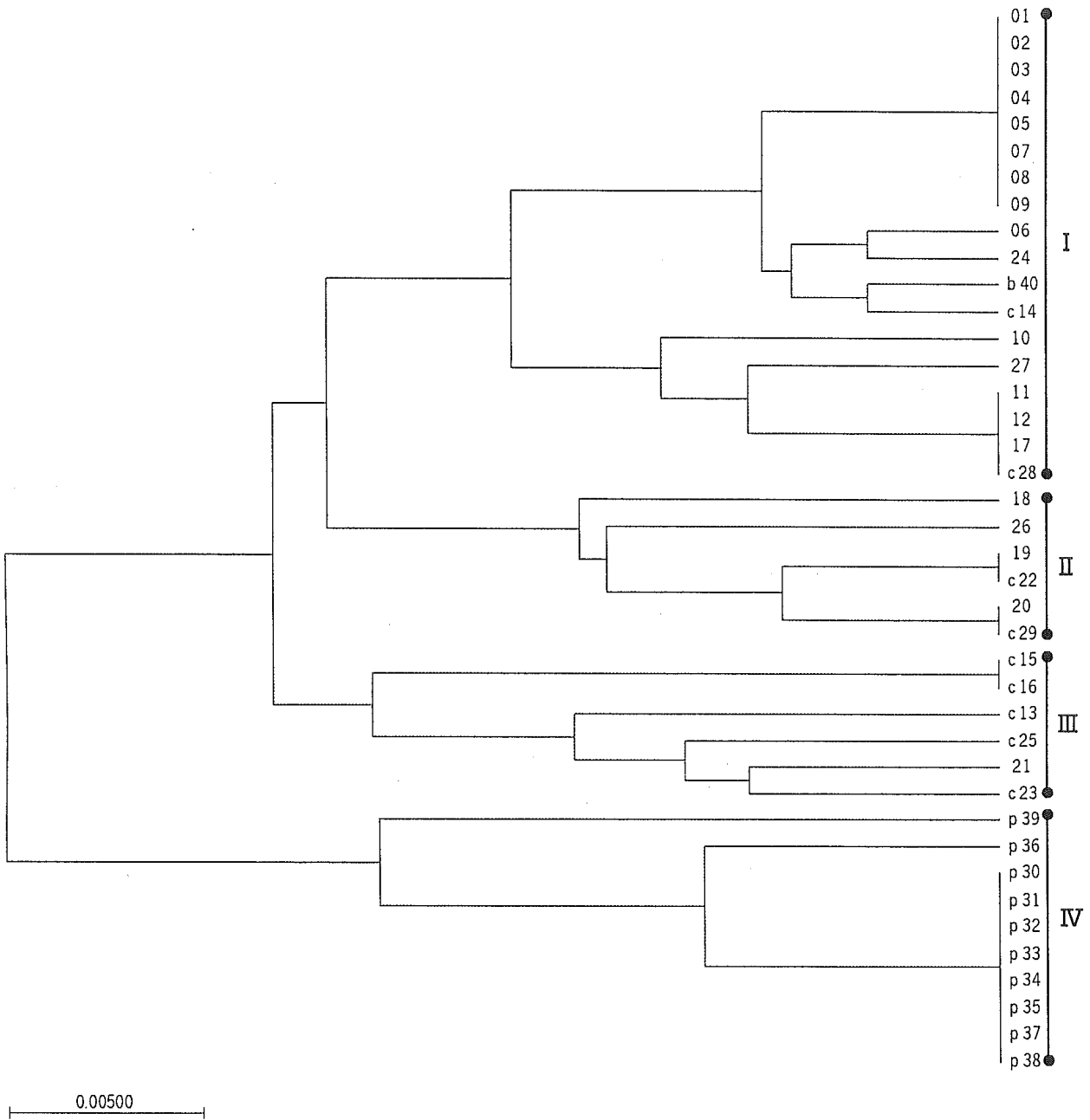
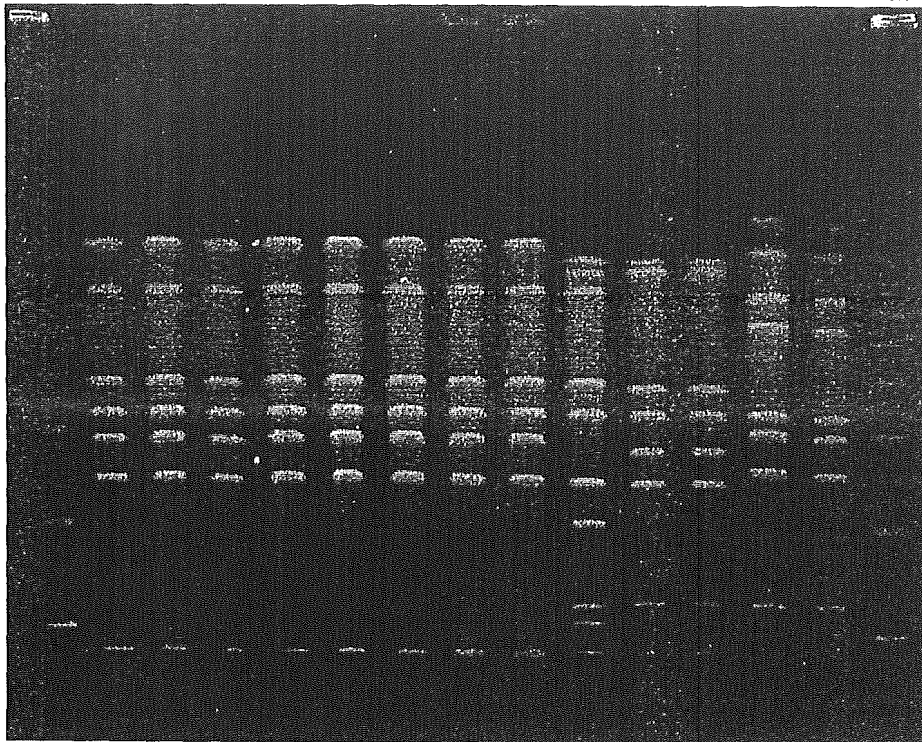


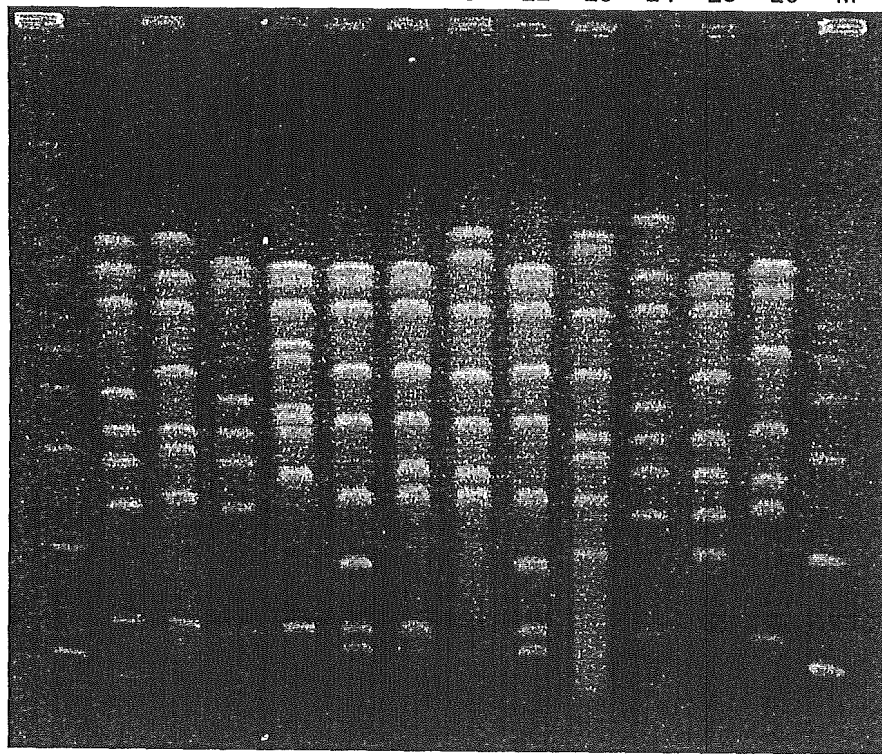
図2 *Campylobacter jejuni* (Penner B群)分離株のPFGEパターンによる系統樹
 無印 患者由来株、b 牛由来株、c 鶏由来株、p ドバト由来株

M 1 2 3 4 5 7 8 9 10 11 12 15 16 M



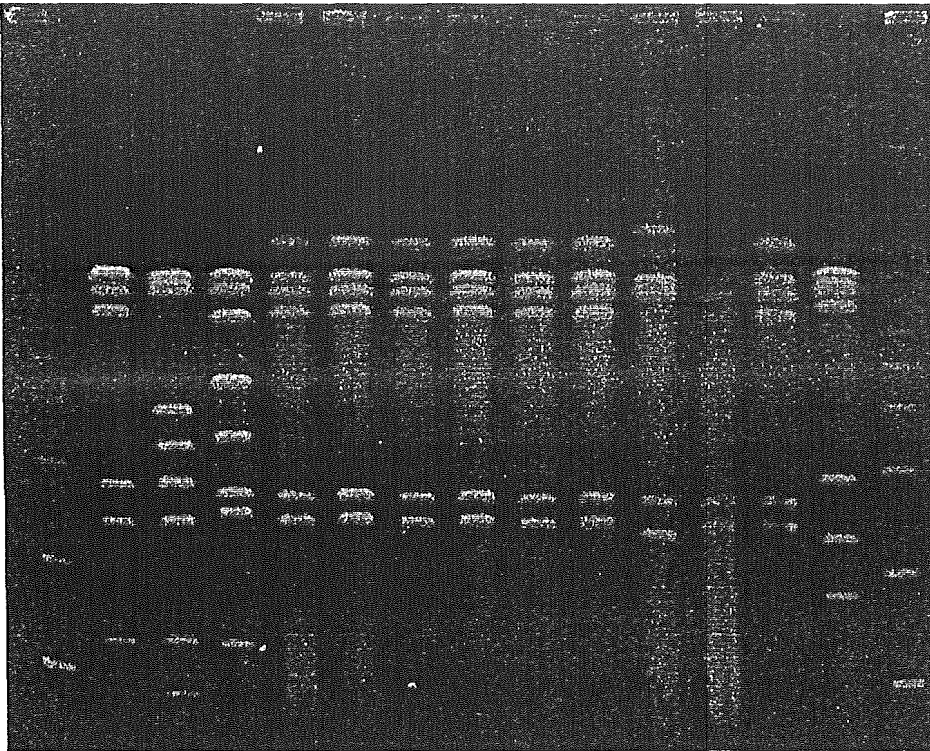
1	散発患者(1998年)
2	散発患者(1998年)
3	散発患者(1998年)
4	散発患者(1998年)
5	散発患者(1998年)
7	散発患者(1999年)
8	散発患者(1999年)
9	散発患者(1999年)
10	散発患者(1999年)
11	散発患者(1999年)
12	散発患者(1999年)
15	鶏肉(2002年)
16	鶏肉(2002年)

M 6 13 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 M



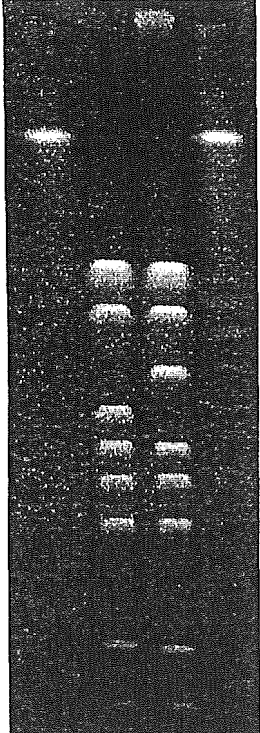
6	散発患者(1998年)
13	鶏肉(2002年)
17	散発患者(2000年)
18	散発患者(2001年)
19	散発患者(2001年)
20	散発患者(2002年)
21	散発患者(2002年)
22	鶏肉(2002年)
23	鶏肉(2002年)
24	散発患者(2002年)
25	鶏肉(2002年)
26	散発患者(2002年)

M 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 M



27	散発患者(2002年)
28	鶏肉(2002年)
29	鶏肉(2002年)
30	ドバト糞便(駿府公園)
31	ドバト糞便(登呂遺跡)
32	ドバト糞便(登呂遺跡)
33	ドバト糞便(登呂遺跡)
34	ドバト糞便(登呂遺跡)
35	ドバト糞便(駿府公園)
36	ドバト糞便(三島大社)
37	ドバト糞便(三島大社)
38	ドバト糞便(駿府公園)
39	ドバト糞便(駿府公園)

M 14 40 M



14	鶏肉(2003年、兵庫)
40	牛レバー(2002年、神奈川)

II 分担研究報告書

II-2.

脱脂粉乳製造における食中毒菌（黄色ブドウ球菌等）およびブドウ球菌エンテロトキシン、セレウス菌嘔吐毒の危害評価とその製造管理法の確立

II-2-1. 脱脂粉乳製造の高度衛生管理に関する研究－製造各工程における菌の挙動、エンテロトキシン産生条件等に関するデータ収集

高谷 幸 （(社) 日本乳業協会）

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

脱脂粉乳製造の高度衛生管理に関する研究

製造各工程における菌の挙動、エンテロトキシン産生条件等に関する
データの収集

分担研究者 高谷 幸 社団法人日本乳業協会常務理事

研究要旨

昨年に引き続き、脱脂粉乳の危害評価に欠かせない黄色ブドウ球菌およびブドウ球菌エンテロトキシンについて、製造各工程のうち、未殺菌（受乳・分離）工程、殺菌・濃縮工程（濃縮脱脂乳）およびライン回収乳について、ブドウ球菌の挙動、エンテロトキシン産生条件等について新たなデータを得るための試験を行った。これにより得られたデータは危害に係るデータベースの作成はもとより危害のコントロール手法の確立等、脱脂粉乳の製造における高度衛生管理システムの構築に役立つものと考えられる。

研究協力者

馬場良雄（明治乳業株式会社）
森田秀樹（明治乳業株式会社）
上門英明（明治乳業株式会社）
辻本義憲（明治乳業株式会社）
柳田茂雄（森永乳業株式会社）
村松健（森永乳業株式会社）
矢野陽一郎（森永乳業株式会社）
副島隆志（森永乳業株式会社）
伊保内義正（森永乳業株式会社）
柳平修一（雪印乳業株式会社）
守田大（雪印乳業株式会社）
鈴木明（雪印乳業株式会社）
中川めぐみ（雪印乳業株式会社）
相澤純一（(社)日本乳業協会）

A. 研究目的

黄色ブドウ球菌エンテロトキシンが混入した脱脂粉乳を原料に用いた低脂肪乳を原因食品とする大規模食中毒事件が発生し、大きな社会問題となったことから、平成13年12月に脱脂粉乳の製造基準が新設され、平成16年4月から施行される。

これにより、脱脂粉乳の製造についても、HACCPの導入がなされることになり、本研究では、HACCPの導入に必要な危害に係る新たなデータを得ることを目的として、未殺菌乳では、低温下での黄色ブドウ球菌の挙動と、自社工場で集乳した生乳由来の黄色ブドウ球菌を実験菌株とし、「未殺菌乳中の増殖性及びエンテロトキシンの産生」について、濃縮脱脂乳において

は、コアグララーゼ型の違う食中毒由来の黄色ブドウ球菌 4 株を用いて、その増殖特性及びエンテロトキシン産生量について、ライン回収乳では、乳固形分 15%、25%、及び 35%の脱脂濃縮乳を回収乳として、*S. aureus* で汚染された場合における貯乳中の菌の挙動及びエンテロトキシン産生性について、調べた。

B. 研究方法

1. 未殺菌（受乳、分離）工程

1) 生乳由来黄色ブドウ球菌の分離及び性状試験

①東北地区(12 検体)及び関東地区(3 検体)の自社工場の生乳を卵黄加マンニット食塩培地を用いて、35°C 48 時間培養後、コロニーの観察結果から卵黄反応を有するコロニーを選別して標準寒天培地に分離して性状試験に用いた。

②性状試験として、グラム染色性、カタラーゼ試験、コアグララーゼ試験を定法により、生育性についてはブレインハートインフュージョン (BHI) 培地を用いて、7、10、40、45、及び 48°C に調整した恒温水槽で培養し、目視で培地の濁りのあるものを生育とした。(最長 8 日間培養) エンテロトキシン型は検出用キットを用いた。

2) 生乳及び脱脂乳中での黄色ブドウ球菌の増殖とエンテロトキシン産生性

①北海道の自社工場の生乳及び脱脂乳（未殺菌）、対照として牛乳(UHT 殺菌)を用い、供試菌株として、岩手大学 品川教授より分与された *Staphylococcus aureus* 11658 株（エンテロトキシン A 産生株、以下 SEA 基準株）という）と上記で分離した黄色ブドウ球菌の中からエンテロトキシン A(SEA)

を産生する 1128-4 株を用いた。生乳及び脱脂乳のエンテロトキシンは、65°C 30 秒加熱処理後、mini VIDAS 及び VIDAS Staph Enterotoxin を用いて直接測定した。牛乳は加熱処理をせずプロトコールに従い直接測定した。(直接法で検出されなかった牛乳試料については、TCA 法で濃縮後再度測定した。各測定結果から、検量線を用い SEA 濃度を算出した。

② 消長試験

供試菌株を BHI ブイヨン中で 35°C 一晚培養し、この液を 10^2 及び 10^4 cfu/ml オーダーとなるよう生乳、脱脂乳及び牛乳に接種し、所定温度（10、20、30、40、45、及び 48°C）で振とう培養（120 ストローク/分）、経時的に培養液を分取し、定法に従って、生菌数、黄色ブドウ球菌数及び SEA 濃度を測定した。なお、岩手大分与株については、生乳及び牛乳のみを用い、10 及び 20°C について検討した。

2. 殺菌・濃縮工程

1) 使用する黄色ブドウ球菌の増殖特性とエンテロトキシン産生性

①使用菌株は岩手大学品川教授より分与された *S. aureus* 基準株と元東京都立衛生研究所より分与された *S. aureus* (No.51、57、67) を使用。

②コアグララーゼ型およびエンテロトキシン型は定法により調べた。

③各菌株の温度による世代時間は、バイオフォトレコーダー(ADVANTEC)を用い、培養条件は温度が（30、32.5、35、37.5 および 40°C）、振とう条件(50rpm)とし、6 分ごとに O.D.(660nm)を測定した結果から算出した。

2)45%濃縮脱脂乳中での *S. aureus* の増殖と SEA 産生量の測定

①実験は 3L ガラス製反応槽、攪拌機及び恒温槽を組み合わせた装置を用い、併せて DO(溶存酸素)センサーにより、溶存酸素量(DO)の変化を観察した。

②BHI で前培養した菌懸濁液を 45%濃縮脱脂乳に接種し、攪拌数は 800rpm、培養温度は世代時間及び SEA 産生量から最適と判断できる条件を菌株ごとに設定した。

③サンプリングは培養開始から 10 時間までを 1 時間ごとに、さらに 23 及び 25 時間目に実施し、定法により、*S. aureus* の増殖と SEA 産生量の測定

3. 回収乳工程

ライン回収乳における黄色ブドウ球菌汚染時の菌の挙動と毒素産生性を検討した。

①試菌株及び培養条件

*S. aureus*11658 (岩手大分与菌株) を BHI に接種し、35°C24 時間静置培養し、適宜、希釈して使用した。

②脱脂濃縮乳(TS 48%)を滅菌水により、乳固形分(TS)15%、25%、及び 35%に希釈し、試験に供した。

③水分活性 A_w 及び生菌数は定法により測定した。

④TSを調整した脱脂濃縮乳 (15%、25%、及び 35%) の保存温度 (15°C、25°C、及び 35°C)、振とう(120rpm)及び静置保存における黄色ブドウ球菌の挙動と SEA 産生性を測定した。

C. 結果と考察

1. 未殺菌 (受乳、分離) 工程

1)生乳由来黄色ブドウ球菌の分離と形状試験結果

各生乳サンプルより 31 株の卵黄反応陽性のグラム陽性球菌を分離した。(表-1) これらは全てカタラーゼ陽性、コアグラーゼ陽性であり、黄色ブドウ球菌と考えられた。

この 31 株の生育温度は、10°C以下では全て生育せず、40 及び 45°Cでは全て生育、48°Cでは 14 株(45%)が生育した。しかし、48°Cでは早い菌株でも 4 日、遅いものでは 8 日目にわずかに濁りが認められる程度であり、45°C(1~3 日で生育)と比較して明らかに遅かった。(表-2)

SE 産生性は、関東地方の生乳分離株 2 株で認められ、1 株は SEA、もう 1 株は SEB 産生株であった。

2) 生乳及び脱脂乳中での黄色ブドウ球菌の増殖とエンテロトキシン産生性

①岩手大分与株

10°C培養では接種菌数オーダーにかかわらず、生乳中での黄色ブドウ球菌の増殖は認められなかった。

20°C培養で接種菌数を 10^4 cfu/ml オーダーとした場合、72 時間培養後の生乳中の黄色ブドウ球菌数は約 10^6 cfu/ml、牛乳中では 24 時間後には 10^8 cfu/ml に達して大きな差が認められた。(表-4)

SEA は、牛乳中でほぼ黄色ブドウ球菌数の増加に合わせて濃度が増加した。生乳では測定しなかった。

②生乳から分離した 1128-4 株 (SEA 産生株) 接種菌数 10^4 cfu/ml オーダーの場合、30 及び 40°C培養では、生乳 (生菌数 10^4 cfu/ml オーダー)、脱脂乳 (同 $10^3 \sim 10^4$ cfu/ml オーダー) 及び牛乳 (0 cfu/ml) のいずれの中でも黄色ブドウ球菌の増殖態度はほぼ類似しており、最終的な到達菌数は $10^7 \sim 10$

8 cfu/ml オーダーまで達した。SEA の産生量は脱脂乳中で非常に多く、次いで、生乳、牛乳の順であった。(表-9、10) 生菌数でも同様に推移しており、生乳、脱脂乳ではグラム陰性桿菌が優勢であった。

10°C 培養では、生乳、脱脂乳中で黄色ブドウ球菌は増殖せず、SEA も検出しなかったが、牛乳中のごく微量の SEA が検出された。

20°C 培養では、牛乳と比較して生乳及び脱脂乳中では黄色ブドウ吸引数が 1 オーダー低く SEA は検出されなかった。(表-8)

45°C では黄色ブドウ球菌数が漸増後に減少し、SEA 濃度の増加はないものの、断続的に検出された。

48°C では、黄色ブドウ球菌は検出限界以下 (10 cfu/ml) となり、 48°C 保持により死滅したと考えられた。

接種菌数 10^2 cfu/ml オーダーの場合、30 及び 40°C では初発菌数の違いの差はあるものの増殖態度は類似していた。SEA の産生は牛乳中で高く、 10^4 cfu/ml と異なる結果となった。(表-15、16)

10°C 培養ではいずれも増殖しなかった。

20°C 培養では生乳、脱脂乳中では僅かな増殖であったが、牛乳中では 24 時間後には 10^6 cfu/ml まで増殖し、SEA も検出された。

45°C では、生乳、脱脂乳中で一時的に増菌後、検出限界以下となった。牛乳中では初発菌数と同等で推移後、48 時間で増菌し、SEA も検出された。(表-17)

48°C では、検出限界以下となった。

2. 殺菌・濃縮工程

1) 使用する黄色ブドウ球菌の増殖特性とエンテロトキシン産生性

①使用菌株

今回の使用菌株はコアグラゼ型の異なる 4 種の SEA 産生株を使用した。個々のコアグラゼ型は IWATE が III 型、No.51 が VI 型、No.57 が VII 型、No.67 が IV 型である。

②世代時間及び SEA 産生量

いずれの菌株も温度の上昇に伴い世代時間は短くなる傾向であった。

SEA 産生量と温度の関係では、各株ごとに特徴的なパターンを示した。(Fig.3) IWATE は温度の上昇とともに SEA 産生量が増加し、約 40°C で最大となった。No.57 及び No.67 は焼く 33°C で最大となり、No.51 は温度の影響を受けなかった。

③45%濃縮脱脂乳中での S.aureus 増殖と SEA 産生

BHI 中で世代時間が最短となる温度と SEA 産生量が最大となる温度を選択して濃縮脱脂乳中での増殖及び SEA 産生量を測定したが、いずれの菌株も 40°C 培養で SEA の産生量が最大となった。No.51 では 30°C 及び 40°C での SEA 産生量に差は認められなかったが、No.57 及び No.67 は 40°C の方が高かった。No.57 は 32.5°C の約 4 倍、No.67 は 32.5°C の約 2 倍の産生量であった。

No.51 は 25 時間後の SEA 産生量は最も低かったが、 40°C では 4 時間後に 0.14 ng/g 、5 時間後に 1.08 ng/g ともっとも早く SEA 産生量が増大した。

SEA 産生量と溶存酸素量とのプロット (fig.8,9,10,11) では、SEA 産生量の増加開始と溶存酸素量の低下開始がほぼ同時であることが明らかとなった。

3. 回収乳工程

①脱脂濃縮乳の水分活性 A_w

脱脂濃縮乳 (TS15%、25%、35%、及び 48%) の水分活性 (A_w) 値はそれぞれ 0.97、

0.96、0.95、0.94であった。

②脱脂濃縮乳 (TS15%、25%、及び35%)、保存温度 (15°C、25°C、及び35°C)、振とう (120rpm) 及び静置保存における黄色ブドウ球菌の挙動と SEA 産生性

各保存条件における脱脂濃縮乳 (TS15%、25%、及び35%) 中の *S.aureus* の増殖性及び SEA 産生結果は Table 4.A、4.B、及び 4.C に示した。保存条件では、35°C で最も高く、乳固形分では、増殖性にはほとんど影響はないが、SEA 産生性は TS35% が TS25% 及び 15% より高かった。振とうは増殖性にほとんど影響はないが、SEA 産生性には 35°C で顕著な促進効果を及ぼした。

15°C 保存では、24 時間保存後の菌数が $2.3 \sim 2.6 \log_{10} \text{cfu/ml}$ と低く SEA も検出しなかった。25°C 保存では、10 時間では菌数が $3.7 \sim 3.9 \log_{10} \text{cfu/ml}$ と低く SEA も検出しなかったが、24 時間では $7.3 \sim 7.7 \log_{10} \text{cfu/ml}$ であり、SEA は $1.70 \sim 3.40 \text{ng/ml}$ であった。35°C 保存では、振とうの場合、SEA は 6 時間で検出され、菌数は $5.1 \sim 5.6 \log_{10} \text{cfu/ml}$ であり、静置の場合は、菌数では差はなかったが、SEA 産生速度は遅く、TS35% においてのみ、6 時間で 8 時間ではすべての固形分で SEA が $0.10 \sim 0.30 \text{ng/ml}$ の濃度で検出された。

D. 結論

未殺菌乳中における黄色ブドウ球菌の増殖性は 10°C 以下では増殖しない。脱脂粉乳の製造における製造工程のうち、受乳、分離の工程は、通常、黄色ブドウ球菌の増殖及びエンテロトキシン産生の至適温度付近で処理されるが、今回の検討結果では、静乳由来の黄色ブドウ球菌のうち、48°C

で生育する菌株は約半数であり、その生育速度は 45°C と比較してかなり遅かった。さらに 48°C 生育株を用いて未殺菌乳中での消長を検討すると、48°C では増殖せずに死滅すると考えられた。

また、今回得られた SEA 産生の結果から、脱脂乳に 10^4cfu/ml の黄色ブドウ球菌 (SEA 産生株) が汚染していたと仮定した場合、40°C で 4~6 時間滞留 (攪拌等が必要) すると 4 時間で 0.66ng/ml 、6 時間で 14ng/ml 、30°C でも 6 時間で 7.1ng/ml の SEA が産生され、この脱脂乳から脱脂粉乳を製造すると約 10 倍濃縮されることから食中毒事件の際に脱脂粉乳から検出された濃度 ($3.3 \sim 20.0 \text{ng/g}$) と概ね一致すると考えられた。

濃縮脱脂乳における SEA 産生量は、使用した、いずれの菌株も 40°C 培養下で最も高いことがわかった。25 時間後の産生量は No. 67 (IV) が最も高く約 100ng/g 、次いで、IWATE (III) が約 73ng/g 、No. 57 (VII) が約 42ng/g 、No. 51 (VI) が約 18ng/g の順であった。なお、No. 51 (VI) は SEA の産生量が少ないにもかかわらず、培養開始後 4 時間目より検出され、4 株中에서도最も速く生成することが明らかになった。SEA の産生と溶存酸素量との間には、SEA の産生と同時に溶存酸素量の急激な低下が見られ、SEA の産生には、溶存酸素が深くかかわっていることが示唆された。

製造工程での回収乳における黄色ブドウ球菌の増殖性とエンテロトキシン (SEA) の産生性について、検討した結果、保存温度が 35°C で一番高い増殖性と産生性を示した。

回収乳の乳固形分は菌の増殖性にはほとんど影響はないが、SEA 産生性に影響があ

り 35%で最も高かった。また、攪拌の影響もSEA 産生を促進した。

25℃保存では攪拌の有無に拘わらず最低でも 10 時間まで、15℃保存では 24 時間までは産生されない可能性が示唆された。

実験の継続にあたっては、次の事項に留意する必要がある。

- ① 黄色ブドウ球菌の初期汚染量が高い場合、エンテロトキシン産生のリスクは脱脂乳でより高いことが示唆されており、追試験で確認する。
- ② 濃縮脱脂乳での黄色ブドウ球菌の増殖およびエンテロトキシンの産生には、溶存酸素量が大きく影響している可能性が示唆されたことから、培養実験における攪拌（回転数）や溶存酸素量をコントロールした培養条件での実験、固形濃度や培養温度の影響についての検討

表-1 牛乳、脱脂乳及び牛乳中での牛菌数、黄色ブドウ球菌数及びSEA濃度の推移
(培養温度 37℃、接種菌数10⁷)

時間	牛乳			脱脂乳			牛乳	
	牛菌数	黄 ⁷ 菌数	SEA	牛菌数	黄 ⁷ 菌数	SEA	牛菌数	黄 ⁷ 菌数
0	2.9×10 ⁷	<10	nt	2.9×10 ⁷	6.0×10 ⁷	nt	5.6×10 ⁷	2.1×10 ⁷
2	4.0×10 ⁷	4.6×10 ⁷	nt	2.3×10 ⁷	1.1×10 ⁷	nt	3.1×10 ⁷	6.0×10 ⁷
4	4.7×10 ⁷	1.4×10 ⁷	nt	1.7×10 ⁷	6.5×10 ⁷	nt	7.0×10 ⁷	1.3×10 ⁷
6	1.7×10 ⁷	3.9×10 ⁷	0.15	4.0×10 ⁷	1.1×10 ⁷	0.21	4.8×10 ⁷	2.1×10 ⁷
8	6.3×10 ⁷	4.7×10 ⁷	0.27	6.3×10 ⁷	LA	0.33	8.8×10 ⁷	1.1×10 ⁷
10	1.7×10 ⁷	4.8×10 ⁷	0.82	2.9×10 ⁷	8.3×10 ⁷	1.01	4.3×10 ⁷	8.0×10 ⁷
12	7.7×10 ⁷	6.4×10 ⁷	1.97	5.4×10 ⁷	2.6×10 ⁷	0.58	1.0×10 ⁷	2.0×10 ⁷
18	7.7×10 ⁷	8.8×10 ⁷	0.56	1.2×10 ⁷	3.3×10 ⁷	0.82	1.1×10 ⁷	2.4×10 ⁷

黄⁷菌数：黄色ブドウ球菌数、SEA：エンゲルキソンA

表-2 牛乳、脱脂乳及び牛乳中での牛菌数、黄色ブドウ球菌数及びSEA濃度の推移
(培養温度 37℃、接種菌数10⁷)

時間	牛乳			脱脂乳			牛乳	
	牛菌数	黄 ⁷ 菌数	SEA	牛菌数	黄 ⁷ 菌数	SEA	牛菌数	黄 ⁷ 菌数
0	4.4×10 ⁷	3.2×10 ⁷	nt	2.9×10 ⁷	3.7×10 ⁷	nt	1.4×10 ⁷	2.2×10 ⁷
2	6.2×10 ⁷	2.0×10 ⁷	nt	4.6×10 ⁷	2.1×10 ⁷	nt	4.2×10 ⁷	7.7×10 ⁷
4	6.2×10 ⁷	1.5×10 ⁷	0.16	5.0×10 ⁷	1.2×10 ⁷	0.25	1.7×10 ⁷	1.0×10 ⁷
6	1.6×10 ⁷	2.5×10 ⁷	2.30	7.7×10 ⁷	4.8×10 ⁷	3.77	3.1×10 ⁷	5.5×10 ⁷
8	3.7×10 ⁷	7.0×10 ⁷	12.46	4.8×10 ⁷	LA	12.00	4.7×10 ⁷	9.8×10 ⁷
10	4.2×10 ⁷	1.8×10 ⁷	13.17	6.0×10 ⁷	1.2×10 ⁷	12.58	1.0×10 ⁷	1.5×10 ⁷
12	7.5×10 ⁷	7.1×10 ⁷	13.48	9.0×10 ⁷	2.5×10 ⁷	12.12	9.2×10 ⁷	1.8×10 ⁷

表-3 10%SM中のS.aureusの増殖とSEA産生量

A

time (hr)	cfu/ml	SEA (ng/ml)
0	1.24E+04	ND
1	2.49E+04	ND
2	1.12E+05	ND
4	3.40E+06	0.03
6	4.00E+07	0.51
8	2.52E+08	3.23
10	5.30E+08	11.7
12	4.20E+08	17.2
24	3.40E+08	41.4

B

time (hr)	cfu/ml	SEA (ng/ml)
0	1.28E+04	ND
1	2.44E+04	ND
16	4.90E+08	37.3
20	3.70E+08	46.4
24	3.30E+08	46.4

※ND…not detected

表-4 45%濃縮脱脂粉乳中のS.aureusの増殖とSEA産生量 (

A			B		
time (hr)	cfu/ml	SEA (ng/ml)	time (hr)	cfu/ml	SEA (ng/ml)
0	8.30E+03	ND	0	7.50E+03	ND
2	4.20E+04	ND	14	5.00E+08	42.97
4	8.40E+05	0.01	16	5.50E+08	48.46
6	2.90E+07	0.53	18	6.20E+08	60.58
8	8.80E+07	2.71	20	4.30E+08	64.61
10	4.00E+08	12.72	22	4.30E+08	66.63
12	-	27.45	24	3.60E+08	78.73
24	6.00E+08	82.81			

※ND…not detected

表-5 45%濃縮脱脂粉乳中のS.aureusの増殖とSEA産生量 (

C			D		
time (hr)	cfu/ml	SEA (ng/ml)	time (hr)	cfu/ml	SEA (ng/ml)
0	1.47E+04	ND	0	1.33E+04	ND
2	1.10E+05	ND	14	2.50E+08	131.19
4	5.40E+06	0.01	16	3.10E+08	141.28
6	1.91E+08	8.96	18	4.00E+08	138.28
8	4.06E+08	24.25	20	3.20E+08	137.33
10	6.38E+08	67.81	22	3.00E+08	137.29
12	6.30E+08	103.35	24	3.60E+08	146.47
24	5.00E+08	145.36			

※ND…not detected

表-6 未殺菌脱脂濃縮乳 (TS25%) 中での S. aureus の増殖とSEA産生

Time / hr	Viable Cell count (S. aureus) / (cfu/mL)	Enterotoxin (ng/mL) ¹⁾	A /
0	4×10 ¹	ND	
2	8×10 ¹	ND	
4	1.7×10 ³	ND	
6	1.7×10 ⁴	ND	
8	2.1×10 ⁵	ND	
9.5	7.0×10 ⁵	ND	
24	7.1×10 ⁵	ND	

表一7 脱脂濃縮乳 (TS 25%) 中での *S. aureus* の増殖とSEA産生

Time /hr	Viable Cell Count (<i>S. aureus</i>) / (cfu/mL)	Enterotoxin A / (ng/mL) ¹⁾
0	4×10^1	ND
2	2.1×10^2	ND
4	6.4×10^3	ND
6	5.1×10^4	ND
8	2.5×10^6	7.9×10^{-2}
10	2.9×10^7	9.3×10^{-1}
24	2.3×10^9	1.0×10^2

1) Conc. of enterotoxin A in 25% concentrated Milk.

表一8 脱脂濃縮乳 (TS 15%) における *S. aureus* の増殖速度およびSEA産生量

Time / hr	Viable cell count / (cfu/mL)	SEA / (ng/mL ³)
0	$1.5 \times 10^1 (2.0 \times 10^2)$	ND
2	$5.5 \times 10^1 (6.5 \times 10^2)$	ND
4	$1.1 \times 10^1 (1.6 \times 10^2)$	ND
6	$2.4 \times 10^1 (5.0 \times 10^2)$	1.6×10^2
8	$1.4 \times 10^1 (7.6 \times 10^2)$	4.9×10^1
10	$1.1 \times 10^1 (2.1 \times 10^2)$	3.2
24	$8.3 \times 10^1 (1.9 \times 10^2)$	8.3×10^1

1) 15%脱脂濃縮乳中の黄色ブドウ球菌数 (卵黄加マンニット食塩寒天培地)

2) 15%脱脂濃縮乳中の黄色ブドウ球菌数 (ラピッドメディア-SPC標準寒天培地)

3) 15%脱脂濃縮乳におけるのSEA量

表一9 脱脂濃縮乳 (TS 35%) における *S. aureus* の増殖速度およびSEA産生量

Time / hr	Viable cell count / (cfu/mL)	SEA / (ng/mL ³)
0	$4.0 \times 10^6 (4.1 \times 10^6)$	1.3
2	-	5.7
4	-	5.3×10^1
6	$4.9 \times 10^8 (5.1 \times 10^8)$	1.0×10^2
8	$2.1 \times 10^8 (2.2 \times 10^8)$	1.5×10^2
10	$2.3 \times 10^8 (3.5 \times 10^8)$	1.7×10^2
24	$3.9 \times 10^8 (5.6 \times 10^8)$	2.9×10^2
48	$4.0 \times 10^8 (5.4 \times 10^8)$	3.0×10^2
120	$8.0 \times 10^8 (3.7 \times 10^9)$	3.7×10^2
168	$4.0 \times 10^8 (2.6 \times 10^8)$	3.4×10^2

1) 35%脱脂濃縮乳中の黄色ブドウ球菌数 (卵黄加マンニット食塩寒天培地)

2) 35%脱脂濃縮乳中の黄色ブドウ球菌数 (ラピッドメディア-SPC標準寒天培地)

3) 35%脱脂濃縮乳中のSEA量

II 分担研究報告書

II-3.

液卵（未殺菌液卵）製造におけるサルモネラ（特に *S. Enteritidis*）の危害評価と製造管理方法

II-3-1. 中小規模の液卵工場における HACCP マニュアル作製に向けて (1) 中小規模の液卵工場の製造工程・作業ラインおよび実際の作業現状について

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

II-3-2. 中小規模の液卵工場における HACCP マニュアル作製に向けて (2) 手割液卵工場内での衛生に必要な科学的データについて

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

II-3-3. 液卵・鶏卵に関連する食中毒発生や液卵の生産の現状について (1) 液卵による最近 5 年間（平成 9-13 年度）の食中毒事例の解析

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

II-3-4. 液卵・鶏卵に関連する食中毒発生や液卵の生産の現状について (2) 液卵の製造・流通の現状と細菌学的データについて

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

II-3-5. 液卵・鶏卵に関連する食中毒発生や液卵の生産の現状について (3) 液卵工場内でのモニタリングによる製造工程の問題点の明瞭化とその改善について

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

II-3-6. サルモネラに関する研究 (1) 1971 年以降のサルモネラ食中毒の原因と菌株の解析

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

II-3-7. サルモネラに関する研究 (2) *Salmonella Enteritidis* の生残性に及ぼす相対湿度の影響

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

II-3-8. サルモネラに関する研究 (3) 鶏卵および採卵廃鶏におけるサルモネラ属菌汚染状況

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

平成14年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

液卵製造の高度衛生管理に関する研究

分担研究者 高鳥浩介 国立医薬品食品衛生研究所

- 1) 中小規模の液卵工場におけるHACCPマニュアル作製に向けて
(1) 中小規模の液卵工場の製造工程・作業ラインおよび
実際の作業現状について

国内の中小規模の液卵製造工場における製造工程、製造基準、衛生管理の現状を調査した。6社について調査を行った結果、製造工程は手割り割卵を主体としたシンプルな作業ラインで、10人前後の人員で未殺菌の液全卵ホールの製造が中心であった。法制化された液卵製造基準については、ほぼ遵守されていたが、一般的衛生管理事項については記録管理を含め不備が多々確認された。

研究協力者

栗原健志 キューピー（株）品質管理部
井上 斌 社団法人日本卵業協会
工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所
尾上洋一 神奈川県衛生研究所
古川一郎 神奈川県衛生研究所
指原信廣 キューピー（株）研究所
熊谷 進 東京大学大学院

B. 方法

1. 調査施設

国内の中小規模6社の液卵工場を選定し、製造状況と衛生管理状況を確認した。6社の会社概況は以下の通りである。

[A社]：敷地面積：1000坪、加工場面積：15坪、従業員数：（製造部門7人、品質管理部門1人）、生産品目：液全卵ロカ、液全卵ホール、卵黄ホール、液卵白、生産数量：1.5t/日、割卵設備：洗卵機、割卵機1台（150個/分）、卵殻沈降槽、ろ過設備有り、殺菌機なし、秤量器、ヒートシール機、原料卵：自社農場格外卵、自社GPセンター発生の格外卵が主体、液卵販売先：中小製菓会社。

A. 研究目的

中小規模の液卵製造工場をどのように衛生管理をしたらよいかについてHACCPマニュアルを作成するにあたり、どのような製造工程で生産しているか、製造基準の遵守はどうか、衛生管理状況はどうかなどの現状を把握することを目的とした。

〔B社〕：敷地面積：50,000坪、加工場面積：120坪、従業員数：(製造部門9人、管理部門2人)、生産品目：液全卵ホール、生産数量：2.5t/日、割卵設備：手割り作業台(樋式)、殺菌機なし、秤量器、ヒートシール機、原料卵：自社農場格外卵、自社GPセンターの格外卵が主体、液卵販売先：中堅製菓、製パン会社。

〔C社〕：敷地面積：270坪、加工場面積：34坪、従業員数：(製造部門9人、品質管理部門1人)、生産品目：液全卵ホール、卵黄ホール、液卵白、生産数量：2t/日、割卵設備：手割り器具(ボール、オタマ、ピンセット、卵黄卵白分離器)、殺菌機なし、秤量器、ヒートシール機、原料卵：指定養鶏場から契約購入或いはスポット購入、液卵販売先：中小食品会社、中堅製菓製パン会社。

〔D社〕：従業員数：(製造部門8人、管理部門1人)、生産品目：全卵、液全卵ホール、卵黄ホール、液卵白、生産数量：0.5t/日、割卵設備：割卵作業台、卵殻沈殿槽、卵黄卵白分離板、手割り器具(ボール、オタマ)、殺菌機なし、秤量器、原料卵：指定養鶏場から契約購入或いはスポット購入、液卵販売先：中堅洋菓子店、和菓子屋。

〔E社〕：従業員数：(製造部門4人)、生産品目：液全卵ホール、生産数量：0.5t/日、割卵設備：割卵作業台、殺菌機なし、秤量器、原料卵：指定養鶏場から契約購入或いはスポット購入、液卵販売先：中堅洋菓子店。

〔F社〕：生産品目：液全卵、液全卵ホール、卵黄ホール、液卵白、生産数量：5t/日、割卵設備：洗卵機、割卵機1台(500個/分)、卵殻沈降槽、ろ過設備有り、手割り器具、バルク殺菌機、秤量器、ヒートシール機、原料卵：数カ所以上から購入、液卵販売先：大手洋菓子店。

2. 調査日時

A社：平成15年2月7日

B社：平成15年3月13日

C社：平成14年5月16日

D、E、F社：平成14年12月11日

に現地に訪問して製造工程・製造基準・衛生管理の現状を調査した。

C. 調査結果

(a) 製造工程及び製造基準の管理状況確認(表1、2)

〔A社、B社、C社〕

原料卵は常温トラックにて工場に搬入され、設置された冷蔵貯卵庫に搬入される。貯卵庫内温度は、A社B社C社は5℃でセットされていたがA社は冷却能力がない為か実温は9℃であった。原料卵は食用不適卵を使用することなく、正常卵、破卵、汚卵に選別されており、A社B社は養鶏場で発生した奇形卵や汚卵、及びGPセンターの検卵工程で排除された卵が主体で、C社は破卵が多い状況で、在庫量が多すぎるように思われた(破卵在庫が24時間で割卵される以上に保管されていた)。

機械割卵をしていたA社は洗卵工

程は全量を 200ppm の次亜塩素酸ナトリウム溶液でシャワリングされブラッシング洗浄していたが、洗浄水の品温管理は実施されていなかった。A社 B社 C社の手割り割卵は、汚卵以外は無洗のまま割卵されていた。汚卵は水槽に 150ppm の次亜塩素酸ナトリウム溶液をため、その中で手洗浄しているとのことだったが、実作業は確認できなかった。我々の経験では初めは 150ppm でも、卵殻上の有機物によって直に有効塩素濃度は低下するように思われた。

割卵工程は、A社の機械割卵は機械の調整の不備が目立ち、不割卵の床や製品トレイの落下や卵殻の飛散が非常に多く、液卵中への卵殻表面細菌の混入が心配された。A社C社の手割り作業はシンプルでボール内に卵を割り込み、ある程度溜まったら側に用意された最終製品ポリ袋にあげ返る方法である。この時の割り込む数は作業により異なっていたが 3個～10個程度であり、プールしたホール状の液卵を目視で状態確認をし、乱れたものや血玉が混入したものはオタマですくって、廃棄用の容器に捨てていた。またボール内に混入した卵殻はピンセットで除去し、乱れや卵殻等でボールやオタマが汚れ、作業がやりづらくなった場合に近くのシンクで洗浄を行い、隣の 150ppm 次亜塩素酸ナトリウム水槽内で簡単に消毒されていた。

A社B社の手割り割卵は分業制になっており、割卵作業場に冷蔵庫か

ら原料卵を運ぶ人、手割り割卵する人、充填した製品ポリ袋を受け取って秤量、シールしそのまま冷蔵庫保管場所に運ぶ人に大まかに作業区分けがされていた。一方C社は割卵作業者が自己完結する作業で、自分が割卵する分だけ冷蔵庫より持ち出し、割卵後秤量し、自分でシールを行いそのまま冷蔵庫に製品搬入する方法であった。したがってポリ袋には作業者ごとのトレース番号がマジックで記入され、責任の所在が明確にされていた。B社の割卵は処理量アップのための工夫がなされ、一人ずつ製品を 1缶ずつ作り上げるのではなく共有のロングパンに卵を割込み、それを集めて1缶ずつ充填していく方法が取られていた。血玉や乱れ等の卵が発生した場合は樹脂製のスコップでロングパンからすくい取り除去する。ロングパン（作業台）のサンテーションは、昼休み前と作業終了後に中性洗剤にて洗浄後、150ppm 次亜塩素酸ナトリウム溶液をかけて消毒する。A社B社C社は割卵作業は一貫して行われ手際よく短時間で行われていた。割卵された製品品温は、貯蔵された原料卵品温に影響され、8℃～15℃であった。

A社は元々冷蔵庫仕様の建物を加工場に変更しており、密封性には優れ防虫対策面では問題ないが、湿度が高く床も落下した食卵や水によりウェット状態で雑然としており良い管理状態にあるとは言いがたい。また当日製造の当日出荷品は、品温が

8℃以上の 12℃前後で出荷されており、この物は更に原料卵品温を下げ、割卵する必要があった。B社は建物が古く、食鳥処理場の内部を改装したもので、特に防虫面で設備的に難点がある。使用水はA社B社C社は市水が使われA社のみ5tの受水槽を持っていた。原料卵にヒビを入れる道具は、A社は以前は石を使用していたとの事だが、今はステンレスの特製の器具の使用に変更してヒビ入れを行い、B社は手割作業台ロングパンの淵でヒビを入れ、C社はゴルフボールを利用してヒビ入れを行っていた。割卵作業者はA社は素手、B社C社は手袋をはめて作業を行っていた。

液卵の表示においては、6社は食品衛生法に定められたとおり管理されており未殺菌品である旨と、加熱の必要性を赤字で強調表示するなど問題なかった。受注はA社B社は、追加注文を昼からも受け、見込み生産とともに、製造残は翌日までの繰越生産及び一部凍結卵としての生産がみられた。C社は受注された数量のみの生産となっていた。

[D社]

手割りによる未殺菌液卵の製造を行っている。液卵製造よりもそのまま箱卵を他へ卸す（保冷車）ほうが多い。小規模で行っている。細菌検査はしていない。通常9時半から12時半くらい営業している。原料卵は専用プラスチックコンテナにて遠方の他県からトラック（保冷ではない）

で入荷される。サイズは3Lくらいの大きいものが多いが、規格外の小さいものもある。既に洗卵してあるものを購入している。半分以上はひび卵だが、中身がでている物はほとんどなく食用不適卵もない。輸送により一部穴が開いているものが認められる。週3日入荷し2日以内に液卵として出荷する。割卵は夏期には卵黄がくずれやすい。割卵台、沈殿槽、卵黄・卵白分離用の板を使用。沈殿槽をしきり板をつけて組み立てた後、はじめからプールに流し入ると卵黄が割れるのであらかじめ割っておいた卵をお玉で搦って流し込む。割卵台で割り流れていく卵はその卵の上を流れていく。しかし、下部の卵はそのまま作業終了まで下に溜まる可能性がある。卵白、卵黄、全卵は容器（プラスチックの円形容器、中蓋付き、17~19Kg）に直に入れる。中袋がなく、また配送先で洗浄しないため容器の返却時に液卵が付着している。洗浄後は自然乾燥する。製品は室温で作成するが、低温貯蔵庫に随時搬入する。出荷まで4℃で貯蔵し翌日には出荷する。需要生産なので当日または翌日には出荷してしまう。出荷時に日付および未殺菌液卵のため加熱が必要との表示をつけてある。配送は保冷車で行う。割卵終了時には作業台や用具を水洗いする。一部塩素で消毒する。割卵室は当日20℃くらいで湿度が80%以上であった。床は水洗方式である。