

teikodaiset.html

(※2) 乳製品試験法・注解【改訂第2版】

日本薬学会／編（金原出版株式会社）

#### E. 結論

引き続き国際的な最新の試験法に関する情報を収集し、現場視点からの問題点を国際的なハーモナイゼーションに適合した形で修正できるような条件の検討を行う必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 資料① 乳及び乳製品の試験法に関するアンケート調査結果

「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（昭和二十六年十二月二十七日厚生省令第五十二号）

別表二 （七） 乳等の成分規格の試験法」

（１） 乳及び乳製品	
1 乳及び乳製品の無脂乳固形分の定量法	…62
2 乳製品の乳固形分の定量法	
a 濃縮乳、脱脂濃縮乳、無糖練乳、無糖脱脂練乳、加糖練乳乳及び加糖脱脂練乳の乳固形分の定量法	…63
b 全粉乳、脱脂粉乳、クリームパウダー、ホエイパウダー、たんぱく質濃縮ホエイパウダー、バターミルクパウダー及び加糖粉乳の乳固形分の定量法	…64
3 乳及び乳製品の乳脂肪分及び乳たんぱく量の定量法	
a 牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳及び加工乳の乳脂肪分の定量法	…65
b 濃縮乳、無糖練乳、加糖練乳乳、全粉乳、クリームパウダー、加糖粉乳及びクリームの乳脂肪分の定量法	…66
c たんぱく質濃縮ホエイパウダーの乳たんぱく量の定量法	…66
4 乳の比重の測定法	…68
5 乳及び乳製品の酸度の測定法	…68
6 乳製品の水分の定量法	…69
7 乳製品の糖分の定量法	
a 乳糖の定量法	…70
b しよ糖の定量法	…71
8 乳及び乳製品の細菌数の測定法	
a 生乳及び生山羊乳の直接個体鏡検法による細菌数の測定法	…72
b 牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳、加工乳、クリーム、乳飲料、濃縮乳、脱脂濃縮乳、無糖練乳、無糖脱脂練乳、加糖練乳乳、加糖脱脂練乳、全粉乳、脱脂粉乳、クリームパウダー、ホエイパウダー、たんぱく質濃縮ホエイパウダー、バターミルクパウダー、加糖粉乳及び調製粉乳の標準平板培養法による細菌数（生菌数）の測定法	…73
9 乳及び乳製品の大腸菌群の測定法	…76

10	乳のアルコール試験法	…78
(2)	アイスクリーム類	
1	検体の採取及び試料の調製法	…79
2	細菌数（生菌数）の測定法	…80
3	大腸菌群の測定法	…82
4	乳脂肪分の定量法	…84
5	乳固形分の定量法	…85
(3)	発酵乳及び乳酸菌飲料	
1	無脂乳固形分の定量法	…86
2	検体の採取及び試料の調製法	…87
3	乳酸菌数の測定法	…88
4	大腸菌群の測定法	…90
(4)	バター及びバターオイル	
1	水分の定量法	…91
2	乳脂肪分の定量法	…91
3	大腸菌群の測定法	
a	検体の採取及び試料の調製法	…92
b	大腸菌群の測定法	…93
(5)	プロセスチーズ及び濃縮ホエイ	
1	乳固形分の定量法	…94
a	乳脂肪分の定量法	…94
b	乳蛋白量の定量法	…95
2	大腸菌群の測定法	…96
	その他	…97

「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（昭和二十六年十二月二十七日厚生省令第五十二号）

別表二 （七） 乳等の成分規格の試験法

（１） 乳及び乳製品

1 乳及び乳製品の無脂乳固形分の定量法

底径五c m以上のアルミニウム製平底ひよう量皿を九八度から一〇〇度までの温度の乾燥器中で乾燥して恒量とする。試料二・五gから三gを前記のひよう量皿に量り採り、水浴上で注意しながら加熱し、大部分の水分を蒸発した後前記の乾燥器に移して、恒量となるまで乾燥し乾燥物質量を求める。乾燥物質のパーセント量から乳及び乳製品の乳脂肪分の定量法の項に定める方法により定量した脂肪のパーセント量を引いて無脂乳固形分のパーセント量とする。

乾燥器は気温九九度±一度に調節できるもので器壁棚板からの伝導熱、熱板からのふく射熱等のために、試料が指定の温度以上に過熱されることのない構造のものを用いる。

<意見>

- ・水浴上に限定せず、ホットプレートのような加熱器具の使用の記載、もしくは水浴と同等の表記を入れて欲しい。
- ・多くの乳業メーカーにおいて迅速に分析結果が得られる近赤外線分析装置を用いて測定されている。本分析装置を公定法として認定してほしい。
- ・「乳及び乳製品」のうちの無脂乳固形分の規格がある品目が対象と思われるが、標題には「乳及び乳製品」とあるため、全ての品目を対象としているように見えて紛らわしい。対象品目を本文中に明記して頂きたい。
- ・ミルコスキャン等の測定機器が普及しているので機器分析の手法も記載頂きたい。
- ・水浴上で注意しながら加熱とあるが、何に注意をするのか具体的に記載頂きたい。
- ・大部分の水分蒸発した後の乾燥時間はどのくらいなのか記載して頂きたい。
- ・乾燥した後の冷却はどうするのか記載してほしい。乾燥器に関しては詳しく説明があるが、デシケーターに関しては何もない。
- ・乾燥助剤法を入れて頂きたい。
- ・無脂乳固形分の測定の際に、全固形分の測定は直接乾燥法（省令の方法）や混砂法を使用している。
- ・混砂法で使用している砂について、IDFスタンダードにはバターについての測定法の記載があり、参考にしているが、そのほかの乳飲料などに関する記載がなく、今後省令（あるいはそれに代わるもの）での記載が求められると思われる。
- ・直接乾燥法の場合には、乾燥庫内の温度の偏りをどのように検証し、是正していくか。
- ・色物乳飲料等の場合には、当該省令の方法では求めることはできないため違和感がある。
- ・乾燥機説明の記述が古い → 循環式精密電気乾燥機のような書き方がよいのではないか。

## 2 乳製品の乳固形分の定量法

### a 濃縮乳、脱脂濃縮乳、無糖練乳、無糖脱脂練乳、加糖練乳乳及び加糖脱脂練乳の乳固形分の定量法

試料20gを量り採り、温水で希釈し、100mlメスフラスコに入れて定容とし希釈試料とする。その希釈試料5ml（試料1g相当量）を採り前項と同様にして乾燥物質量を求める。濃縮乳、脱脂濃縮乳、無糖練乳及び無糖脱脂練乳にあつては、乾燥物質のパーセント量を乳固形分のパーセント量とし、加糖練乳乳及び加糖脱脂練乳にあつては、乾燥物質のパーセント量から乳製品の糖分の定量法の項に定める方法により定量したしよ糖のパーセント量を引いたものを乳固形分のパーセント量とする。

#### <意見>

- ・希釈倍率は焦げが生じない限り、希釈誤差を考えると倍率が低い方が、ばらつきが少なく精度よく測れる。そのため、試料量20gを100mlに定容するという表記では無く、幅をもたせた表記の方が良い。
- ・ピペット壁面に試料が残り誤差要因となるため、希釈試料も重量で採取した方が良い。
- ・公定法「常圧乾燥法」で校正した「マイクロ波乾燥法」を追加頂けないでしょうか。
- ・1g相当量に薄めて実施する必要があるのか、その理由を記載してほしい。
- ・試料を希釈せず直接採取することも認めたほうが良い。
- ・乾燥助剤法（混砂法）も追加したほうが良い。濃縮乳や練乳の場合、常圧加熱乾燥法を用いると水分が蒸発しきれない可能性がある。
- ・全固形分の測定は直接乾燥法（省令の方法）や混砂法を使用している。
- ・混砂法で使用している砂について、IDFスタンダードにはバターについての測定法の記載があり、参考になっているが、そのほかの乳飲料などに関する記載がなく、今後省令（あるいはそれに代わるもの）での記載が求められると思われる。
- ・直接乾燥法の場合には、乾燥庫内の温度の偏りをどのように検証し、是正していくか。
- ・この方法で技能試験(FAPAS)に参加するとZスコアが2を超える結果となる。直接採取で行うと良好な結果となるため、「試料を希釈して採取する」ことが問題であると考えられる。

b 全粉乳、脱脂粉乳、クリームパウダー、ホエイパウダー、たんぱく質濃縮ホエイパウダー、バターミルクパウダー及び加糖粉乳の乳固形分の定量法

九八度から一〇〇度までの温度の乾燥器中で乾燥し、恒量とした底径五c m以上のアルミニウム製平底ひょう量皿に試料二gを量り採り前記の乾燥器中で乾燥して乾燥物質量を求める。全粉乳、脱脂粉乳、クリームパウダー、ホエイパウダー及びバターミルクパウダーにあつては乾燥物質のパーセント量を乳固形分のパーセント量とし、加糖粉乳にあつては乾燥物質のパーセント量から乳製品の糖分の定量法の項に定める方法により定量したしよ糖のパーセント量を引いたものを乳固形分のパーセント量とする。

<意見>

- ・混砂法で使用している砂について、IDFスタンダードにはバターについての測定法の記載があり、参考にしているが、そのほかの乳飲料などに関する記載がなく、今後省令（あるいはそれに代わるもの）での記載が求められると思われる。
- ・直接乾燥法の場合には、乾燥庫内の温度の偏りをどのように検証し、是正していくか。
- ・全固形分の測定は直接乾燥法（省令の方法）や混砂法を使用している。

### 3 乳及び乳製品の乳脂肪分及び乳たんぱく量の定量法

#### a 牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳及び加工乳の乳脂肪分の定量法

硫酸一〇m l を硫酸用ピペットを用いてゲルベル乳脂計に注入し、次に乳一m l を牛乳用ピペットを用いて徐々に硫酸上に層積し更に純アミルアルコール一m l を加えゴム栓をし、指で栓を押しつつ振り乳を溶解した後、約六五度の温湯中に一五分間浸し、次に三分間から五分間遠心器（一分間の回転数七〇〇回以上）にかけ更に約六五度の温湯中に浸して温度を一定にし析出した脂肪層の度数を乳一〇〇分中の乳脂肪量とする。

#### ○試薬

A 硫酸 一五度で比重一・八二〇から一・八二五までのもの

B アミルアルコール 沸点が一二八度から一三二度まで、比重が一五度で約〇・八一のもので、本品二m l について水一一m l を用いて牛乳の場合と同様にし  
て盲検を行い一夜静置して油状物の分離を認めないもの

#### <意見>

- ・迅速に分析ができる、近赤外線分析装置を公定法に認定してほしい。
- ・温湯中で温めることになっているが、ヒーター付きの遠心分離機が普及しており、現状に即していない。
- ・遠心回転数は、遠心加速度表記（ $350 \pm 50 \times g$ ）にしたほうが良い。
- ・アミルアルコールの盲検の必要性について検討して欲しい。（最近の試薬は、純度が良いので盲検はいらないと考える。）
- ・省令ではレーリッヒ管を使用とあるが、現状使用していない。
- ・乳技協監修の飲用乳の検査法に掲載されている方法で行っている。
- ・ISO/IDF においてゲルベル法は簡便法の扱いであり reference method としての重量法（いわゆるレーゼゴットリーブ法）が存在する。
- ・温度条件が曖昧（約 65℃ の記載）
- ・遠心条件 700rpm 以上 → 遠心機が小型化していることもあり g 表現が妥当ではないか
- ・試薬の名称が古い（純アミルアルコール → 3-メチル-1-ブタノール）
- ・無脂肪牛乳では脂肪分離が認められても微量の為目盛りの読み取りが困難。

b 濃縮乳、無糖練乳、加糖練乳、全粉乳、クリームパウダー、加糖粉乳及びクリームの乳脂肪分の定量法

濃縮乳、無糖練乳及び加糖練乳は乳製品の乳固形分の定量法の項に定める方法による定量の際に用いた希釈試料の10mlをリョーリツヒ管に採り、アンモニア水（二五%から三〇%で無色透明なもの）2mlエタノール（九五%から九六%）10mlを順次加えてその度によく混ぜ合わせる。

全粉乳、クリームパウダー及び加糖粉乳は試料1gを、クリームは試料5gを小型ビーカーに量り採り、温湯約4mlを加えて溶解し、リョーリツヒ管に移し、更に3mlの温湯で二回、次にアンモニア水2mlエタノール（九五%から九六%）10mlを用いて順次ビーカーを洗いリョーリツヒ管に加えその度に栓をしてよく混ぜ合わせる。

エタノールを加えたリョーリツヒ管にエーテル25mlを加え静かに回転して均一の色調となったときエーテルガスを抜き、管を水平にして三〇秒間激しく振り混ぜる。次に石油エーテル（沸点六〇度以下）25mlを加え、同様に三〇秒間振り混ぜ栓を緩め、上澄液が全く透明となるまで直立して二時間以上静置する。上澄液をあらかじめ恒量を求めたビーカーに入れる。

リョーリツヒ管にエーテル25ml次に石油エーテル25mlを加え第一回と同様にして上澄液をビーカーに合し、側管の先端をエーテル及び石油エーテル等量混合液で洗浄してビーカーに加える。

全粉乳、クリームパウダー、加糖粉乳及びクリームは、更に前回と同様の操作を行う。

ビーカーは、約七五度で注意して溶剤を揮発させ、気温一〇〇度から一〇五度までの温度の乾燥器中で一時間乾燥し増量を乳脂肪量とする。

<意見>

- ・マジョニア管も一般的であり、使用器具に加えて欲しい。
- ・溶剤を揮発させる際の容器はビーカーに限定する必要は無く、三角フラスコ等でも問題ないと思われる。「エーテル層をガラス容器に採取」のように幅を持たせた記載とした方が良い。
- ・直接乾燥法では99±1℃で乾燥するが、本法では100~105℃で乾燥となっている。温度の違いによって測定値に有意差があるのならやむを得ないが、当社での検証では、99℃と102℃では測定値に差は生じなかった。運用上どちらも99±1℃に統一して欲しい。
- ・クリームについてはバブコック法も検査法として記載して欲しい。
- ・迅速に分析ができる、近赤外線分析装置を公定法に認定してほしい。
- ・公定法「常圧乾燥法」で校正した「核磁気共鳴（NMR）装置」を追加頂けないでしょうか。
- ・マジョニア管も使用可として頂きたい。
- ・「全粉乳、クリームパウダー、加糖粉乳及びクリームは、更に前回と同様の操作を行う」とあるが、「前回」がどこからどこまでを指すのかわかりにくい。
- ・食品表示基準（消食表第139号平成27年3月30日）の別添「栄養表示等の分析方法等」に記載



されているレーゼゴットリーブ法と、溶媒の使用量や器具等に相違点がある。必ずしも食品表示基準と同じ手順である必要はないと考えるが、器具についてはいずれの器具にも対応して頂きたい。

- ・マジョニア管の使用も認めたほうが良い。
- ・エタノールは99.5%のものでも使用して良いことにしてほしい。
- ・試料の直接採取を認めたほうが良い。
- ・「エーテル」は「ジエチルエーテル」にしたほうが良い。
- ・2回目抽出の際もエタノールを入れたほうがよい。

ISO1737:2008、IDF13:2008 では、エタノール 5ml を加えることとなっている。

- ・省令ではレーリッヒ管を使用とあるが、現状使用していない。
- ・乳技協監修の飲用乳の検査法に掲載されている方法で行っている。

#### c たんぱく質濃縮ホエイパウダーの乳たんぱく量の定量法

(5) プロセスチーズ及び濃縮ホエイの1 乳固形分の定量法のbに規定する方法により求めた値を乳固形分のパーセント量で除した数に一〇〇を乗じ、乳固形分中の乳たんぱくのパーセント量とする。

##### <意見>

- ・ケルダール法で算出しているが、燃焼法にも対応頂きたい。
- ・「プロセスチーズ及び濃縮ホエイの1 乳固形分の定量法のbに規定する方法により求めた値」との記述があるが、参照先が分かりにくい。
- ・燃焼法は、食品衛生検査指針に記載され、平成27年3月30日付で改正された「栄養成分の分析方法等」にも追加され、一般化されつつある。追加を検討してほしい。

#### 4 乳の比重の測定法

試料約二〇〇m l をシリンダーに取り、比重一・〇一五から一・〇四〇までの浮ひよう式牛乳比重計を用い一五度において測定する。もし、一五度以外の温度で測定した場合には、生乳、生山羊乳、牛乳、特別牛乳及び殺菌山羊乳にあつては別記一全乳比重補正表、低脂肪牛乳及び無脂肪牛乳にあつては別記二 低脂肪牛乳及び無脂肪牛乳比重補正表を用いて一五度の比重に換算する。

<意見>

- ・自動密度比重計を使用できるようにしてほしい。

#### 5 乳及び乳製品の酸度の測定法

試料一〇m l に同量の炭酸ガスを含まない水を加えて希釈し、指示薬としてフェノールフタレイン液〇・五m l を加えて〇・一m o l / l 水酸化ナトリウム溶液で三〇秒間微紅色の消失しない点を限度として滴定し、その滴定量から試料一〇〇g 当たりの乳酸のパーセント量を求め酸度とする。

〇・一m o l / l 水酸化ナトリウム溶液一m l は、乳酸九m g に相当する。

指示薬は、フェノールフタレイン一g を五〇%エタノールに溶かして一〇〇m l とする。

<意見>

- ・フェノールフタレインは難溶性であるため、50%エタノールでは、白い沈殿物が析出することがある。当社での検証では、50%エタノールでも99%エタノールでも測定値に差は生じなかった。運用上50%以上のエタノールで作製として欲しい。

- ・フェノールフタレイン溶液をつくる時、一度99.5%のエタノールに溶かしてから水を加えた方がよい。

- ・指示薬は、フェノールフタレイン1g を50%エタノールに溶かして・・・と記載があるが、50%では溶けないので、純エタノールを用いるに変更してはどうか。

IDF81:1981 では、フェノールフタレイン2g を95%エタノール(V/V)の75mL に溶かし、水20mL を加え、NaOHの0.1Nを1滴加えた後、水で100mL にメスアップすることになっている。ただし、これはルーチン法で、標準法はpH滴定である。

- ・pH計による手動滴定や自動滴定装置の使用はJAS法(果汁)で既に採用されている。乳および乳製品においては整合性の検討が必要だが、原理的には全く問題ないものとする。追加に向けて、検討してほしい。

- ・中和反応の終点が見えにくいことが多く、滴下量が多くなってしまうことがある。

## 6 乳製品の水分の定量法

乳製品の乳固形分の定量法の項に定める方法と同様の方法により乾燥物質のパーセント量を求め、乾燥減量パーセント量を水分のパーセント量とする。

### <意見>

- ・乳製品のうちでも練乳や粉乳等の水分の規格のある品目が対象と思われるが、標題に「乳製品の水分」とあるため全ての品目を対象としているように見え、紛らわしい。対象品目を本文中に明記頂きたい。
- ・1 g相当量に薄めて実施する必要があるのか、なぜそうしなければいけないのか理由を記載して頂きたい。
- ・乾燥助剤法を記載して頂きたい。
- ・混砂法で使用している砂について、IDFスタンダードにはバターについての測定法の記載があり、参考にしているが、そのほかの乳飲料などに関する記載がなく、今後省令（あるいはそれに代わるもの）での記載が求められると思われる。
- ・直接乾燥法の場合には、乾燥庫内の温度の偏りをどのように検証し、是正していくか。
- ・全固形分の測定は直接乾燥法（省令の方法）や混砂法を使用している。

## 7 乳製品の糖分の定量法

### a 乳糖の定量法

加糖練乳乳及び加糖脱脂練乳は乳製品の乳固形分の定量法の項に定める方法による定量の際に用いる希釈試料二〇m l（試料四 g 相当量）を二〇〇m l のメスフラスコに採り水を加えて定容として供試液とする。

加糖粉乳は一・五 g から一・七 g までを採り温湯に溶解し前項と同様にして二〇〇m l として供試液とする。

濃縮ホエイは、検体を細碎器具を用いて均一な試料とした後、前項と同様にして二〇〇m l として供試液とする。

フェーリング溶液甲・乙各五m l と水一〇m l を二〇〇m l のマイヤーフラスコに採り供試液をビュレットに入れ滴定予定量の大部分を注加し、直火を避けて加熱し、二分間以内に沸騰させた後、加熱を弱め、硫酸銅の青色がほとんど退色した後メチレンブルー液四滴を徐々に加え煮沸しながら青色の消えるまで供試液を滴下する。滴定の終末においては一回に一滴ずつ滴下して過量とならないようにし、滴定は沸騰し始めてから三分間以内に終わらせる。滴定予定量を定めるため予備試験を行い、本試験において滴下する供試液の量は二m l 以内に止めるようにする。

滴定数より別記三乳糖定量表を用いて「供試液一〇〇m l 中の無水乳糖量」を求め、これにフェーリング溶液の甲液の力価を乗じ補正を行つて試料一 g 当たりの乳糖量を求める。

同時に滴定数に相当する同表中の数値を求めて試料一 g 当たりに換算しこれをしよ糖定量の際乳糖が還元する亜酸化銅量に基づく「試料一 g 当たりの乳糖量が転化糖として定量せられる量」とする。

#### <意見>

- ・ガスクロマトグラフ法、高速液体クロマトグラフ法（新食品表示基準の栄養成分分析法記載の方法）を追加頂けないでしょうか。
- ・高速液体クロマトグラフ（HPLC）の追加
- ・HPLC 法を認めて欲しい。

## b しよ糖の定量法

加糖練乳乳及び加糖脱脂練乳は乳糖定量用の供試液五〇m l (試料一 g 相当量) に、加糖粉乳は、一・〇 g から一・五 g までを採り五〇m l の温湯に溶解したものに転化用塩酸液 (二五%、比重一・一二五) 二・五m l を加え六五度の温湯中に浸して二〇分間これを加温して転化し、直ちに水冷してフェノールフタレイン溶液二滴を加え、水酸化ナトリウム試薬を用いて中和し水を加えて二〇〇m l とする。供試液をビュレットに入れフェーリング溶液一〇m l (甲、乙各五m l) と水一〇m l を加えたものを乳糖定量の場合と同様に滴定する。

滴定数からこれに相当する転化糖量を別記四の転化糖定量表を用いて求め「試料一 g 当たりの転化糖の全量」を算出する。次に前記により測定した「試料一 g 当たりの乳糖量が転化糖として定量せられる量」を上 の値より引いたものに〇・九五を乗じ、これにフェーリング溶液の甲液の力価を乗じて補正し、試料一 g 当たりのしよ糖量を算出する。

### ○フェーリング溶液

甲液 結晶硫酸銅 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 三四・六三九 g を水に溶かして五〇〇m l とし、その力価を定めておく。

乙液 ロツシエル塩一七三 g 及び水酸化ナトリウム五〇 g を水に溶かして五〇〇m l とする。

### ○甲液の力価検定

甲液一〇m l を正確に採り水四〇m l を加え更に酢酸 (三→一〇) 四m l を加えて酸性としこれにヨウ化カリウム三 g を加えて遊離するヨウ素を一%可溶性でん粉溶液を指示薬として〇・一m o l / 1 チオ硫酸ナトリウム溶液を用いて滴定する。〇・一m o l / 1 チオ硫酸ナトリウム溶液の一m l は六・三五七m g の銅に相当する。この滴定数から甲液一〇m l 中の銅の量を計算する。この銅の量を一七四・九m g で除した商を使用した甲液の力価とする。

この力価は一±〇・〇〇五以内となるように調製する。

メチレンブルー溶液 試薬用特級メチレンブルー一 g を水に溶かして一〇〇m l とする。

### <意見>

- ・ 滴定法は終点の見極めが非常に難しいので、HPLC 法等の採用を働きかけてはどうか？
- ・ ガスクロマトグラフ法、高速液体クロマトグラフ法 (新食品表示基準の栄養成分分析法記載の方法) を追加頂けないでしょうか。
- ・ 高速液体クロマトグラフ (HPLC) の追加
- ・ HPLC 法を認めて欲しい。
- ・ フェーリング溶液 乙液の試薬 (ロツシエル塩 → 酒石酸カリウムナトリウム)
- 甲液、乙液という表現も古いのでは → A液、B液で運用

## 8 乳及び乳製品の細菌数の測定法

### a 生乳及び生山羊乳の直接個体鏡検法による細菌数の測定法

#### A 検体の採取

滅菌かくはん器で容器内の乳を十分にかき混ぜた後、滅菌採取管で検体約二五m l から三〇m l までの量を滅菌採取瓶に採り、四度以下の温度で保持又は運搬する。検体は採取後四時間以内に試験に供しなくてはならない。四時間を超えた場合には、その旨を成績書に付記しなければならない。

#### B 測定法

検体をその容器とともに二五回以上よく振り、牛乳細菌用マイクロピペットでその検体を適当に吸引し、白布をもってピペットの外壁に附着した乳を清しきし、次にピペット内の検体をその先端より白布を用いて吸引し、検体を正確に〇・〇一m l となし、その全部を載物硝子上に放出し塗沫針を用いて一c m<sup>2</sup>の面積に様に塗り約五分間かすかに加温、乾燥した後、別記の色素溶液に瞬間浸して染色し、直ちに余液を振り落とし、乾燥するのを待つて水洗し、再び乾燥して標本を作成する。

油浸レンズを装置した顕微鏡を用い、対物測微計をもって視野の直径を〇・二〇六mmに調節し、前記の標本を鏡検し、一六以上の代表的視野の細菌数を個々に測定し、一視野に対する平均数を求める。これに三〇万を乗じた数値の上位二けたを有効数字として略算したものを生乳又は生山羊乳一m l 中の細菌数とする。

#### C 色素溶液の調製法

フラスコ中にテトラクロールエタン四〇m l 及び無水エタノール五四m l を入れ七〇度まで加温し、これにメチレンブルー一・〇〇g から一・一二g までを混じ強く振つて色素を完全に溶かし、冷却するのを待つて、酢酸六m l を徐々に加えろ過した後密栓して貯える。

#### <意見>

・現在の生乳の品質を鑑みて観察すべき視野数 16 では少なすぎる。また、視野の直径を調節できない場合の顕微鏡係数の設定の仕方が記載されていない。

・規格値に対しては現行の試験法でも良いと思うが、現状の乳質を考慮すると試験法が適切ではない（感度が低すぎる）。新しい方法に置き換えるか両方法を併記する必要があるのではないか。

・受け入れ段階での目安としては、あった方がよい。

・ニューマン染色液の代替染色液を記載して頂きたい。

（テトラクロールエタン：特化物 H26. 11 法改正により管理が必要となったため。）

・顕微鏡係数の違い、視野範囲の違い等により結果の再現性が低く熟練が必要。

・安全性の点から、テトラクロールエタンに代わる試薬があれば採用頂きたい。

・ニューマン氏液に替わる染色液が販売されており（B P V 染色液）、市販染色液での結果も直接個体鏡検法として認可いただきたい。

・ブリード液（ニューマン試薬）の発がん性といった取り扱いの難しさが指摘されており、代替試薬として、B P V 染色液、ブロードファーストバーレイ染色液などを自社内での検討を行う予定。

b 牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳、加工乳、クリーム、乳飲料、濃縮乳、脱脂濃縮乳、無糖練乳、無糖脱脂練乳、加糖練乳乳、加糖脱脂練乳、全粉乳、脱脂粉乳、クリームパウダー、ホエイパウダー、たんぱく質濃縮ホエイパウダー、バターミルクパウダー、加糖粉乳及び調製粉乳の標準平板培養法による細菌数（生菌数）の測定法

#### A 検体の採取及び試料の調製法

牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳、加工乳、クリーム及び乳飲料にあつては容器包装のまま採取するか、又はその成分規格に適合するかしないかを判断することのできる数量を滅菌採取器具を用いて無菌的に滅菌採取瓶に採り、濃縮乳及び脱脂濃縮乳にあつては a 生乳及び生山羊乳の直接個体鏡検法による細菌数の測定法 A 検体の採取に定める方法により約二〇〇 g を採取する。この場合四度以下の温度で保持し運搬する。検体はその後四時間以内に試験に供しなくてはならない。四時間を越えた場合は、その旨を成績書に付記しなければならない。

次に、濃縮乳及び脱脂濃縮乳を除き、滅菌採取瓶に採取したものにあつてはそのまま、容器包装のまま採取したものにあつてはその全部を滅菌広口瓶に無菌的に移し、二五回以上よく振り滅菌牛乳用ピペットをもつて滅菌希釈瓶を用いて一〇倍及び一〇〇倍の希釈液を、更に希釈をする場合には滅菌化学用ピペットをもつて同様に希釈液をつくる。

無糖練乳、無糖脱脂練乳、加糖練乳乳、加糖脱脂練乳、全粉乳、脱脂粉乳、クリームパウダー、ホエイパウダー、たんぱく質濃縮ホエイパウダー、バターミルクパウダー、加糖粉乳及び調製粉乳にあつては容器包装のまま採取するか、又はその成分規格に適合するかしないかを判断することのできる数量を滅菌採取器具を用いて無菌的に滅菌採取瓶に採り、濃縮乳及び脱脂濃縮乳にあつては滅菌採取瓶のまま、二五回以上よく振り、滅菌スプーンで検体一〇 g を共栓三角フラスコ（栓を除いて重量八五 g 以下で一〇〇 m l の所にかく線有するもの）に採り、滅菌生理食塩水を加え一〇〇 m l として一〇倍希釈液をつくり、以下牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳、加工乳、クリーム及び乳飲料と同様に希釈液をつくる。

#### B 測定法

牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳、加工乳、クリーム、乳飲料、濃縮乳、脱脂濃縮乳、加糖練乳乳、加糖脱脂練乳、全粉乳、脱脂粉乳、クリームパウダー、ホエイパウダー、たんぱく質濃縮ホエイパウダー、バターミルクパウダー、加糖粉乳及び調製粉乳の各希釈液で一平板に、三〇個から三〇〇個までの集落が得られるような希釈液を選択し、同一希釈液に対し滅菌ペトリー皿二枚以上を用意し滅菌ピペットでそれぞれの希釈液各一 m l ずつを正確に採り、これにあらかじめ加温溶解して四三度から四五度までの温度に保持した標準寒天培養基約一五 m l を加え、静かに回転、前後左右に傾斜して混合し、冷却凝固させる。

試料をペトリー皿に採ってから培養基を注加するまでに二〇分以上を経過してはならない。

培養基が凝固したならば、これを倒置して三二度から三五度までの温度で四八時間（前後三時間

の余裕を認める。) 培養後発生した集落数を算定する。この場合培養時間を経過した後、直ちに算定できない場合は、これを取り出して五度以下の冷蔵庫に保存すれば、二四時間以内は算定に供し得る。

試料を加えないで希釈用液一m l と培養基とを混合したものを対照とし、ペトリー皿、希釈液及び培養基の無菌であつたこと並びに操作が完全であつたことを確かめなくてはならない。

ペトリー皿は直径九cmから一〇cmまで、深さ一・五cmとする。

無糖練乳及び無糖脱脂練乳は調製した一〇倍希釈液一〇m l を二m l ずつ滅菌ペトリー皿五枚に採り、以下牛乳と同様に実施する。

細菌数算定は、次の要領による。

無糖練乳及び無糖脱脂練乳を除いては一平板の集落数三〇個から三〇〇個までの場合及び拡散集落があつてもその部分が平板の二分の一以下で他の集落がよく分散していて、算定に支障のないものを選び出し、集落計算器を用いて常に一定した光線の下で集落数を計測し、一平板の集落数又は二枚以上の平均集落数に希釈倍数を乗じた数字を記載する場合、高位から三けた目を四捨五入して二けたのみを記載しそれ以下は〇を附する。

次の場合はこれを試験室内事故とする。

イ 集落の発生がなかつた場合 (常温保存可能品、無糖練乳、無糖脱脂練乳及び摂氏一一五度で一五分間以上加熱殺菌した乳飲料の場合を除く。)

ロ 拡散集落の部分が平板の二分の一を超えた場合

ハ 汚染されたことが明らかなもの

ニ その他不相当と思われるもの

#### ○培地

##### 標準寒天培養基

ペプトン五g、酵母エキス二・五g、ブドウ糖一g及び寒天一五gを精製水一、〇〇〇m l に合して加熱して溶かし、高圧滅菌する (滅菌後のpHは七・〇から七・二までとする。)

#### <意見>

・希釈液が生理食塩水に限定されている。2連のシャーレの計測数にばらつきがあつた場合の計算法がない。

・32~35℃だと低温菌が増殖しない可能性がある。実際に菌による腐敗変敗が発生する可能性が高い品目は、常温流通品 (粉物や加糖練乳) よりもチルド流通品 (液状乳全般) であるため、低温菌も視野に入れて、培養温度に幅をもたせた記載にして欲しい (「30~35℃」など)。

・加温溶解して43~45℃の温度に保持という条件では培地温度が低いため、検査数 (培地を分注するペトリー皿の枚数) が多い場合、検査の後半では培地温度が低下し固まり始めてしまう。細かく記載せず、幅をもたせた記載にして欲しい (「50℃以下」など)。

・ISO 法等の国際標準に統一してはどうか。あと培養温度は「中心温度±許容幅」で記載した方が良い。またコロニー計数法を国際法に合わせるかを研究班で議論してほしい。

・器具を限定しないことを希望 (例: 共栓三角フラスコ) (他の測定法でも同様)



- ・算定法を国際法（ISO, BAM 等）と合わせることを希望（他の測定法でも同様）
- ・試験室内事故について「集落の発生しなかった場合」を除くことを希望（他の測定法でも同様）
- ・ $0.0 \times 10^0$ と表記することを希望（他の測定法でも同様）
- ・『43～45℃に保持した標準寒天培地』とする表記について、現行使用している製品（国内製品）は47℃前後でないと固まることが多く、表記を『45℃～47℃』に検討して頂きたい。
- ・『菌数カウントで集落が発生しなかった場合をLAにする』について、同時に検査したブランクで集落が発生しなかった場合、『LA としない』とできないか検討して頂きたい。
- ・なお、TPPなどを踏まえると、将来的にはISO法に変えて行く必要があると考えます。食品衛生検査指針と比較するとISO法は中温性と低温性をみるため、培養温度が $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 、培養日数が+1日多く、集落の算定方法が異なるなど、ISO法を導入する場合は、時間をかけて業界に周知する必要があります。
- ・乳省令での検出菌数の測定で30～300の集落数の計測ルールと、ISO法、BAM法での計測ルール（計算式がある）が違う。ISO法、BAM法は計算が必要で有り複雑で、結果も変わってくる。（あえて変えるべきかは疑問がある）。
- ・海外では標準寒天培地(Standard Plate Count agar)よりPCA(standard method agar)+脱脂粉乳（0.1%添加）(30℃72時間)を一般生菌数としているところもある。
- ・クリームは直接1mlを混釈すると濁って集落の確認がしづらい。10倍程度の希釈が適当だが菌数は少ない為、検出されない場合が増える。
- ・脱脂粉乳、クリームパウダー、ホエイパウダー、たんぱく質濃縮ホエイパウダー、バターミルクパウダーの様な粉体検査の場合、フィルム培地での一般生菌数と寒天培地での一般生菌数では検出感度が異なる場合がある。
- ・コロニーと試料残渣の区別が付きにくい場合がある。
- ・培養基という表記方法に馴染みがない。

## 9 乳及び乳製品の大腸菌群の測定法

本試験における大腸菌群とは、グラム陰性、無芽胞性の桿菌で乳糖を分解してガスを発生するすべての好気性及び通性嫌気性の細菌をいう。

### a 検体の採取及び試料の調製法

(1) 乳及び乳製品の8 乳及び乳製品の細菌数の測定法のb (標準平板培養法) のAに準ずる。

### b 測定法

検体1m l及びその10倍希釈液、100倍希釈液の各1m lを二本ずつB・G・L・B・発酵管に接種し、三二度から三五度までの温度で四八時間(前後三時間の余裕を認める。)培養してガス発生の有無を観察する。

ガス発生を認めないものは、大腸菌群陰性とし、ガス発生を認めた場合には、その発酵管を採り、一白金耳を遠藤培養基又はE・M・B・培養基にかく線培養して、独立した集落を発生せしめる。三二度から三五度までの温度で二四時間(前後二時間の余裕を認める。)培養後遠藤培養基又はE・M・B・培養基から定型的大腸菌群集落又は二個以上の非定型的集落を釣菌して、乳糖ブイオン発酵管及び寒天斜面にそれぞれ移植する。

乳糖ブイオン発酵管は三二度から三五度までの温度で四八時間(前後三時間の余裕を認める。)、寒天斜面は三二度から三五度までの温度で二四時間培養し、乳糖ブイオン発酵管においてガス発生を確認した場合に、これと相対する寒天斜面培養について鏡検し、グラム陰性無芽胞桿菌を認めた場合を大腸菌群陽性とする。

### o 培地

#### A B・G・L・B・発酵管

ペプトン10g及び乳糖10gを蒸留水500m lに溶解し、これに新鮮な牛胆汁200m l(又は乾燥牛胆末20gを水200m lに溶解したものでpH七・〇から七・五までのもの)を加えて約九七五m lとしpH七・四に修正し、これに0・1%のブリリアントグリーン水溶液一三・三m lを加えて、全量を一、〇〇〇m lとし、綿ろ過し、ダーラム管を入れた試験管に約10m lずつ分注して後間けつ滅菌する(滅菌後のpHは七・一から七・四までとする。)

#### B 遠藤培養基

3%の普通寒天(pH七・四から七・八までのもの)一、〇〇〇m lを加温溶解し、これにかからかじめ少量の水に溶した乳糖一五gを加えてよく混和する。さらにこれにフクシンのエタノール飽和溶液(エタノール100m lにフクシン約1gを溶かしたもの)一・〇m lを加え冷却して約五〇度になったとき、新たに製した10%の亜硫酸ナトリウム溶液を少量ずつ加える。フクシンの色が淡桃色になったとき滴加を止める。

これを試験管又はフラスコに四〇m lから一〇〇m lまでを分注し、間けつ滅菌し、用に臨み溶かして平板とする。

#### C E・M・B・培養基

ペプトン一〇g リン酸二カリウム ( $K_2HPO_4$ ) 二g 及び寒天二五g から三〇g までを蒸留水一、〇〇〇m l に加え加熱溶解し、沸騰後蒸発水量を補正する (pH の修正不要)。これに乳糖一〇g 二% エオジン水溶液 (エオジン黄) 二〇m l 及び〇・五% メチレンブルー水溶液一三m l を加えてよく混和し、分注し、間けつ滅菌して用に臨み平板とする。

#### D 乳糖ブイオン発酵管

普通ブイオンに乳糖を〇・五% の割合に加えて、ダーラム管を入れた試験管に約一〇m l ずつ分注し、間けつ滅菌する (滅菌後の pH は六・四から七・〇までとする。)

#### <意見>

・固形培地としてデソキシコーレイト培地を使用することになっているが、国際的には少数派である。

・現在、多くの乳業メーカーでは少しでも早く検査結果を出したい実情がある。しかし、BGLB 法では判定まで 48 時間かかるため、乳業メーカーとしてはデソ法 (20 時間) での試験が好ましい。そのため、品目ごとに限定せず、すべての品目で BGLB 法またはデソ法で試験するという記載にして欲しい。

・デソ培地を採用している国はほぼ無いと思うので、当初は多少混乱するかもしれないが、国際標準に合わせて LST 培地、VRB 培地に変更するほうが良いと考える。

・アイスクリーム類・醗酵乳・乳酸菌飲料・バター・チーズは、Deso 法が公定法として認められているが、それ以外は BGLB 培地法となっている。この方法では、 $48 \pm 3$  時間、ガス発生が認められたときには、さらに  $24 \pm 2$  時間。さらに乳酸培地及びブイオン培地で 24 時間培養し判定する。簡便に結果がでる、Deso 法にすることはできないか。

・食品衛生法『牛乳処理体制の正常化について (昭和 60 年 1 月 14 日：衛乳第四号の別紙、検査実施要領において、『大腸菌群推定試験として、デソキシコートレイト寒天培地等による試験』が追記されたことから、本文にも使用可能な記載を追記して頂きたい。

・(1)8b と同様 TPP を踏まえると、大腸菌群は、ISO 法 (VRB 寒天) に合わせて行く必要があると考えます。

・デオキシコーレイト寒天培地については、検査法として、あまり推奨されたものではないと聞き及んでいるが、アイスクリームの検査法に合わせて、乳・乳飲料にも適用頂けないでしょうか。

・VBR 寒天培地、VRBG 寒天培地のような FDA や IDF/ISO の検査法を追加頂けないでしょうか。(国際ハーモニゼーション)

・BGLB での培養時間 48 時間では、製品の出荷判定としては時間がかかりすぎる。実際には 12 時間以内判定でないと製品の出荷に合わせられない事も多い。

・クリームを接種すると白濁が強くダーラム管の確認がしづらい。

・海外では大腸菌群 (coliforms) ではほとんど受け入れられず、腸内細菌科菌群 (ENTEROBACTERIASEAE) を衛生指標としている。

・現在、DESO 培地を使用しているが、海外では VRB 培地などを使用している。

DESO 培地で検査を行っているのは日本だけということもあり、今後 TPP を見据え輸出を行う機会の増加も考えられる。そのためにも、諸外国に対してこの理由が明示され、認証などを得るなどの必要があると感じられる。

#### 10 乳のアルコール試験法

試料 2ml を小型ペトリー皿に採り、これに試料と同容量の 70% (v/v) エタノールを加えて混和し、凝固物の生成の有無を観察する。肉眼で凝固物を認めない場合をアルコール試験陰性とする。

##### <意見>

- ・アルコールと原乳 1 : 1 だけでなく、2 : 1 の場合も検査上あるのでは無いか。