

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の試験法の研究

研究分担者 岩崎 司 公益財団法人日本乳業技術協会 事業部
協力研究者 吉川 光英 東京都健康安全研究センター 食品化学部 食品成分研究科
協力研究者 田中 孝 株式会社明治 品質科学研究所
協力研究者 須藤 朋子 雪印メグミルク株式会社 品質保証部 分析センター

研究要旨

乳等省令に示される試験法の制定は古く、科学技術の進歩や国際整合が求められる社会情勢を踏まえると、国際的なバリデーションが担保された試験法であるか確認する必要がある。昨年度対応する試験法を整理した乳、クリーム及び脱脂粉乳について、米国における試験法(Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL: OMA 法)及び欧州連合における試験法(ISO 法)と乳等省令法との比較試験を実施した。乳の乳脂肪分の測定値は OMA 法、ISO 法と比べて乳等省令法がわずかに高い値を示し、ばらつきは大きい結果となった。乳の全固形分の測定値は OMA 法と比べて乳等省令法のばらつきが小さい結果となった。クリームの乳脂肪分の試験値は OMA 法、ISO 法と比べて乳等省令法がわずかに高い値を示し、ばらつきは OMA 法、ISO 法と同等の結果となった。脱脂粉乳の水分の測定値は乳等省令法が ISO 法より高く OMA 法より低い結果となったが、ばらつきは乳等省令法が一番小さい結果となった。

A.研究目的

昭和 26 年に告示された乳等省令の別表二(七)乳等の成分規格の試験法の制定から長い年月が経ち、種々の試験法における技術革新が進んだ現在では、乳等省令に示される試験法が昨今の試験法に用いる機器や新たに開発されてきた検査技術に対応した試験法であるとは言い難い。また、質的、量的に増加する輸入食品の規格基準の適合性を確認する試験法としては、国際的なバリデーションが担保さ

れた試験法か否かについては確認されておらず、国際的な標準試験法が確立されてゆく現状では、将来的な対応能力不足に陥る危険性をはらんでいると考えられる。本研究では、乳等省令における試験法に関連する情報収集と試験法の改正が必要と考えられる試験法について検討し、最適な試験法の策定の可能性も含めて、将来的な展望を示すことを目的とする。特に、海外の乳及び乳製品に関する試験法を規定する成分規格に関する情報を収

集し、乳等省令と比較することで国際的にも対応可能な試験法の確立を目指す。

B. 研究方法

(1) 試験法の特定

乳および乳製品を含む食品の成分規格（乳脂肪分や無脂肪固形分、酸度、添加成分等の成分規格）について、以下の国々の法令から試験法を特定した。

米国：Code of Federal Regulations (CFR；連邦行政規則集)

CFR Title 21 CHAPTER I SUBCHAPTER B—FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION

PART 131—乳及びクリーム

PART 133—チーズ及びチーズ製品

試験法として、Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (OMA法) が記載されている。

EU：Commission Regulation (EC) No 273/2008 of 5 March 2008 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products

成分規格と試験法が示されており、試験法は ISO 法を使用している。

(2) 試験の実施

乳の乳脂肪分および無脂乳固形分については 4 試験室（東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科、株式会社明治品質科学研究所、雪印メグミルク株式会社品質保証部分析センター、公

益財団法人日本乳業技術協会）による共同試験を実施し、クリームの乳脂肪分、脱脂粉乳の水分についてはシングルラボ（公益財団法人日本乳業技術協会）で試験を行った。

(3) 乳における乳脂肪分および無脂乳固形分の試験法の比較

試料は低脂肪牛乳、成分調整牛乳、牛乳、ジャージー種の牛乳を単独もしくは混合して調製し、乳脂肪分の濃度格差をつけた 8 試料（約 1%～4.5%）を用い、併行測定回数は 3 回とした。乳の乳脂肪分の試験法は乳等省令法「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」、ISO 法「ISO 1211:2010/IDF 1:2010, Milk -Determination of fat content- Gravimetric method (Reference method)」、OMA 法「AOAC Official Method 989.05 “Fat in Milk, Modified Mojonnier Ether Extraction Method”、IDF-ISO-AOAC Method, section 33.2.26」の 3 法を比較した。それぞれのフローチャートを図 1、2、3 に示す。

図1 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フローチャート（乳等省令法）

ゲルベル乳脂計

- + 硫酸 10ml
- + 試料 11ml を硫酸上に静かに層積
- + 純アミルアルコール 1ml

ゴム栓をして振り、溶解

約 65 °C の温湯中に 15 分間浸す

遠心分離 3～5 分間（700rpm 以上）

約 65 °C の温湯中に浸し温度を一定にする

析出した脂肪層の度数を乳脂肪量とする



ゲルベル乳脂計

図2 ISO1211:2010/IDF1:2010 Milk - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method)フローチャート

脂肪回収容器の準備

脂肪回収容器

乾燥 (102 ± 2 1時間)

放冷 (デシケーター使用不可)

重量測定 m_2 / m_4

試料の準備

加温 (38 ± 2)

冷却 (20 ± 2)

測定操作

マジョニア管

+ 試料採取 (10 ~ 11g) m_0

+ アンモニア水 2ml

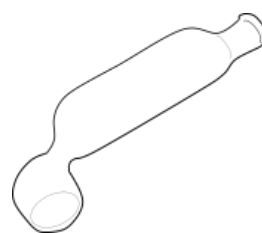
+ エタノール 10ml

+ ジエチルエーテル 25ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 25ml

振とう抽出



マジョニア管

遠心分離（80～90g、1～5分間）もしくは30分以上静置

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

+ エタノール 5ml

+ ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（80～90g、1～5分間）もしくは30分以上静置

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

+ ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（80～90g、1～5分間）もしくは30分以上静置

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

溶媒留去

乾燥 (102 ± 2 1 時間)

放冷 (デシケーター使用不可)

重量測定

乾燥 (102 ± 2 30 分間)

放冷 (デシケーター使用不可)

重量測定

重量の減少が 2.0mg 以下になるか増加するまで乾燥を繰り返す m_1 / m_3

ブランクテストの実施

試料を水 10ml に置き換えたものを同時に実施する (m_3 , m_4)

計算

$$\frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m_0} \times 100\%$$

m_0 : 試料採取量 (g)

m_1 : 脂肪回収容器と抽出物重量 (g)

m_2 : 脂肪回収容器の重量 (g)

m_3 : ブランクテストにおける脂肪回収容器と抽出物重量 (g)

m_4 : ブランクテストにおける脂肪回収容器の重量 (g)

図3 AOAC Official Method 989.05 Fat in milk Modified Mojonnier Ether Extraction Method *IDF-ISO-AOAC Method* フローチャート

脂肪回収容器の準備

脂肪回収容器

乾燥 (100 ± 1 30 分以上)

放冷 (デシケーター使用)

重量測定 m_2

試料の準備

加温 (38 ± 1)

測定操作

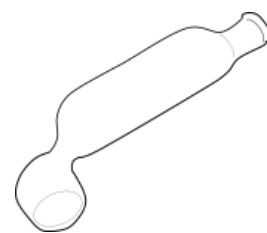
マジョニア管

- + 試料採取 (約 10g) m_0
- + アンモニア水 1.5ml
- + エタノール 10ml
- + ジエチルエーテル 25ml

振とう抽出

- + 石油エーテル 25ml

振とう抽出



マジョニア管

遠心分離（約 600rpm、30 秒以上）

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

+ エタノール 5ml

+ ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（約 600rpm、30 秒以上）

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

+ ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（約 600rpm、30 秒以上）

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

溶媒留去

乾燥 (100 ± 1 30 分以上)

放冷 (デシケーター使用)

重量測定 m_1

ブランクテストの実施

試料を水 10ml に置き換えたものを 2 連で同時に実施する m_3

計算

$$\frac{(m_1 - m_2) - m_3}{m_0} \times 100\%$$

m_0 : 試料採取量 (g)

m_1 : 脂肪回収容器と抽出物重量 (g)

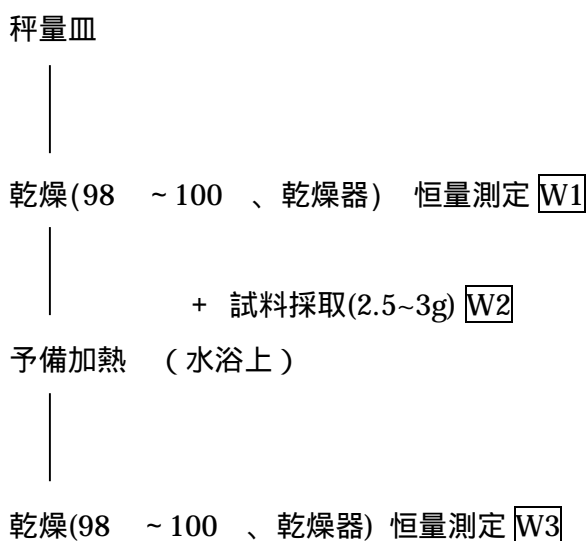
m_2 : 脂肪回収容器の重量 (g)

m_3 : ブランクテストにおける抽出残留物の平均重量 (g)

乳の無脂乳固形分については EU に規定がないため乳等省令法「乳及び乳製品の無脂乳固形分の定量法」と OMA 法「AOAC Official Method 990.21 “Solids-Not-Fat in Milk, By Difference between Total Solids and Fat Contents”, section33.2.45」の 2 法を比較した。無脂乳固形分は全固形分を測定し、乳脂肪分を差し引くことによって算出するため、全固形分を測定する試験法について比較を行った。乳等省令法は「乳及び乳製品

の無脂乳固形分の定量法」における全固形分測定部分、OMA 法は「AOAC Official Method 990.21 “Solids-Not-Fat in Milk, By Difference between Total Solids and Fat Contents”, section33.2.45」において指定されている「AOAC Official Method 990.20 “Solids(Total) in Milk, By Direct Forced Air Oven Drying”, IDF-ISO-AOAC Method, section33.2.44」である。それぞれのフローチャートを図 4、5 に示す。

図 4 乳及び乳製品の無脂乳固形分の定量法(全固形分)フローチャート(乳等省令法)



$$\text{全固形分} = \frac{W3 - W1}{W2 - W1} \times 100\%$$

W1：秤量皿重量(g)

W2：秤量皿と試料重量(g)

W3：秤量皿と乾燥物重量(g)

図5 AOAC Official Method990.20 Solids (Total) in Milk By Direct Air Oven
Drying *IDF-ISO-AOAC Method* フローチャート

試料の準備

加温 (38 ± 1)

測定操作

秤量皿 乾燥(100 ± 1 、 2 時間以上)

放冷 重量測定 W_1

+ 試料採取(約 3g) W_2

乾燥(100 ± 1 、 4 時間)

放冷 重量測定 W_3

ブランク試験 空の秤量皿を用いて 2 連で実施 B

計算

$$\frac{(W_3 - W_1) - B}{W_2 - W_1} \times 100\%$$

W1 : 秤量皿の重量(g)

W2 : 秤量皿の重量と試料重量(g)

W3 : 秤量皿の重量と乾燥物重量(g)

B : ブランクの平均重量(g)

(4) クリームにおける乳脂肪分の試験法の比較

市販のクリームを試料とし、試料数は8 (乳脂肪分約35%~47%) 併行測定回数は3回とした。シングルラボで乳等省令法「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」とISO法「ISO 2450:2008/IDF16:2008, Cream

-Determination of fat content- Gravimetric method (Reference method)」、OMA法「AOAC Official Method 995.19 “Fat in Cream, Mojonnier Ether Extraction Method”、IDF-ISO-AOAC Method, section 33.3.19」の3法を比較した。それぞれのフローチャートを図6、7、8に示す。

図6 クリームの乳脂肪分の定量法フローチャート (乳等省令法)

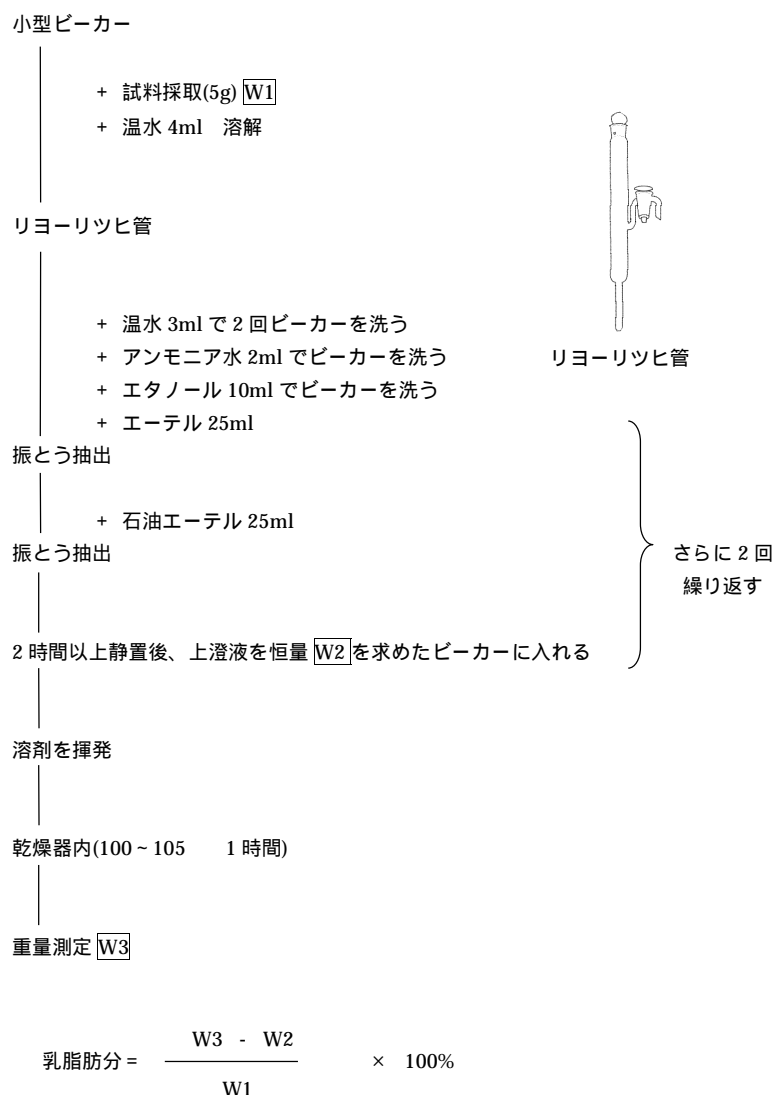


図7 ISO2450:2008/IDF16:2008 Cream - Determination of fat content -
Gravimetric method (Reference method)フローチャート

脂肪回収容器の準備

脂肪回収容器

乾燥 (102 ± 2 1 時間)

放冷 (デシケーター使用不可)

重量測定 m_2

試料の準備

加温 (35 ~ 40)

冷却 (約 20)

測定操作

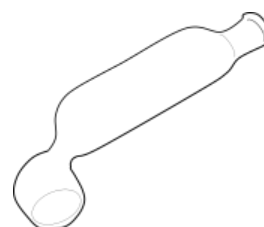
マジョニア管

- + 試料採取 (脂肪抽出量として 0.3 ~ 0.6g となるように) m_0
- + 約 50 の温水で 10 ~ 11ml に希釈
- + アンモニア水 2ml
- + エタノール 10ml
- + ジエチルエーテル 25ml

振とう抽出

- + 石油エーテル 25ml

振とう抽出



マジョニア管

遠心分離（80～90g、1～5分間）もしくは30分以上静置

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

+ エタノール 5ml

+ ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（80～90g、1～5分間）もしくは30分以上静置

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

+ ジエチルエーテル 15ml

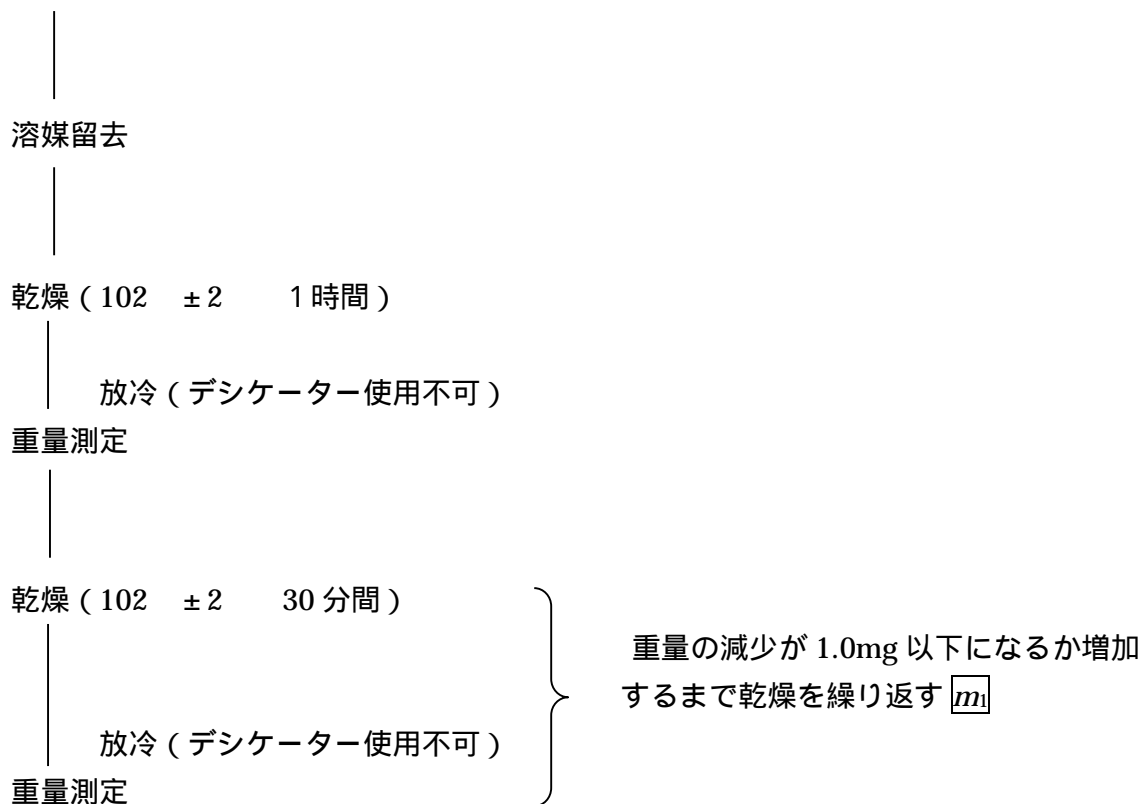
振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（80～90g、1～5分間）もしくは30分以上静置

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する



ブランクテストの実施

試料を水 10ml に置き換えたものを同時に実施する m_3 m_4

計算

$$\frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m_0} \times 100\%$$

m_0 : 試料採取量(g)

m_1 : 脂肪回収容器と抽出物重量(g)

m_2 : 脂肪回収容器の重量(g)

m_3 : ブランクテストにおける脂肪回収容器と抽出物重量(g)

m_4 : ブランクテストにおける脂肪回収容器の重量(g)

図 8 AOAC Official Method 995.19 Fat in Cream Mojonnier Ether Extraction Method *IDF-ISO-AOAC Method* フローチャート

脂肪回収容器の準備

脂肪回収容器

乾燥 (100 ± 1 30 分以上)

放冷 (デシケーター使用)

重量測定 m_2

試料の準備

加温 (38 ± 1)

測定操作

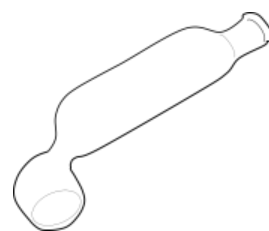
マジョニア管

- + 試料採取 (脂肪抽出量として 0.3 ~ 0.6g となるように) m_0
- + 20 ~ 22 の水で 10ml に希釈
- + アンモニア水 1.5ml
- + エタノール 10ml
- + ジエチルエーテル 25ml

振とう抽出

- + 石油エーテル 25ml

振とう抽出



マジョニア管

遠心分離（約 600rpm、30 秒以上）

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

+ エタノール 5ml

+ ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（約 600rpm、30 秒以上）

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

+ ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（約 600rpm、30 秒以上）

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

溶媒留去



乾燥 (100 ± 1 30 分以上)



放冷 (デシケーター使用)

重量測定 m_1

ブランクテストの実施

試料を水 10ml に置き換えたものを 2 連で同時に実施する m_3

計算

$$\frac{(m_1 - m_2) - m_3}{m_0} \times 100\%$$

m_0 : 試料採取量 (g)

m_1 : 脂肪回収容器と抽出物重量 (g)

m_2 : 脂肪回収容器の重量 (g)

m_3 : ブランクテストにおける抽出残留物の平均重量 (g)

(5) 脱脂粉乳における水分の試験法の比較

市販の脱脂粉乳を試料とし、試料数は8(水分約3%~5%)、併行測定回数は3回とした。シングルラボで乳等省令法「乳製品の水分の定量法」とISO法「ISO 5537:2004/IDF26:2004, Dried milk

-Determination of moisture content (Reference method)」、OMA法「AOAC Official Method 927.05 “ Loss on Drying (Moisture) in Dried Milk ”, section 33.5.02」の3法を比較した。それぞれのフローチャートを図9、10、11に示す。

図9 乳製品の水分の定量法フローチャート(乳等省令法)

秤量皿

乾燥(98 ~ 100、乾燥器) 恒量測定 W1

+ 試料採取(2g) W2

乾燥(98 ~ 100、乾燥器) 恒量測定 W3

$$\text{水分} = \frac{W2 - W3}{W2 - W1} \times 100\%$$

W1 : 秤量皿重量(g)

W2 : 秤量皿と試料重量(g)

W3 : 秤量皿と乾燥物重量(g)

図 10 ISO5537:2004/IDF26:2004 Dried milk - Determination of moisture content

(Reference method)

フィルターをセットしたカラム

乾燥 (87 、 1 時間以上、風量 33ml/min、乾燥器)

ストッパーを閉めデシケーター内で放冷 (60 ± 5 分間)

カラム重量測定 m_0

+ 試料採取 (5.0g ± 0.3g)

フィルターとストッパーを戻し重量測定 m_1

乾燥 (87 、 5 時間、風量 33ml/min、乾燥器)

デシケーター内で放冷 (60 分間 ± 5 分間)

カラム重量測定 m_2

$$\frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100\%$$

m_0 : カラムとフィルターとストッパーの重量(g)

m_1 : 乾燥前の試料とカラムとフィルターとストッパーの重量(g)

m_2 : 乾燥後の試料とカラムとフィルターとストッパーの重量(g)

図 11 AOAC Official Method927.05 Loss on Drying (Moisture) in Dried Milk

秤量皿

+ 試料採取(1~1.5g)

乾燥 (100 、 5 時間、 100mmHg 乾燥器)

冷却

重量測定

重量の消失%を水分量として計算する

C. 研究結果

(1) 乳における乳脂肪分および無脂乳固形分の試験法の比較

乳脂肪分の試験法について、乳等省令法、ISO法、OMA法の3法による測定結果を比較した。平均値は、ISO法とOMA法は同等の結果となったが、乳等省令法はISO法、OMA法に比べ乳脂肪分の高い試料ほど高めになる傾向がみられた(表1、図12)。室間再現相対標準偏差についてもISO法とOMA法は同等の結果となったが、乳等省令法の試験法はISO法、OMA法に比べ大きい結果となった(表2)。また、X-Yプロットによってそれぞれの試験法を比較したところ、乳等省令法と

ISO法による近似曲線の決定係数は $R^2=0.9996$ 、乳等省令とOMA法による近似曲線の決定係数は $R^2=0.9997$ 、ISO法とOMA法による近似曲線の決定係数は $R^2=1$ となった。(図13)。

乳の全固形分については、乳等省令法とOMA法とによる測定結果を比較した。平均値はOMA法に比べて乳等省令法の方が低い傾向にあり(表4、図14)、室間再現相対標準偏差も乳等省令法の方が小さい結果となった(表5)。乳脂肪分と同様X-Yプロットによって試験法を比較したところ、乳等省令法とOMA法による近似曲線の決定係数は $R^2=0.9997$ となった(図15)。

表1 乳の乳脂肪分における平均値の比較

	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6	試料7	試料8
乳等省令法	2.41	3.74	3.78	4.67	0.99	1.71	3.10	4.23
ISO法	2.37	3.70	3.72	4.56	1.00	1.69	3.03	4.13
OMA法	2.37	3.70	3.72	4.56	0.99	1.68	3.03	4.12

(%)

図12 乳の乳脂肪分における平均値の比較(濃度順並べ替え)

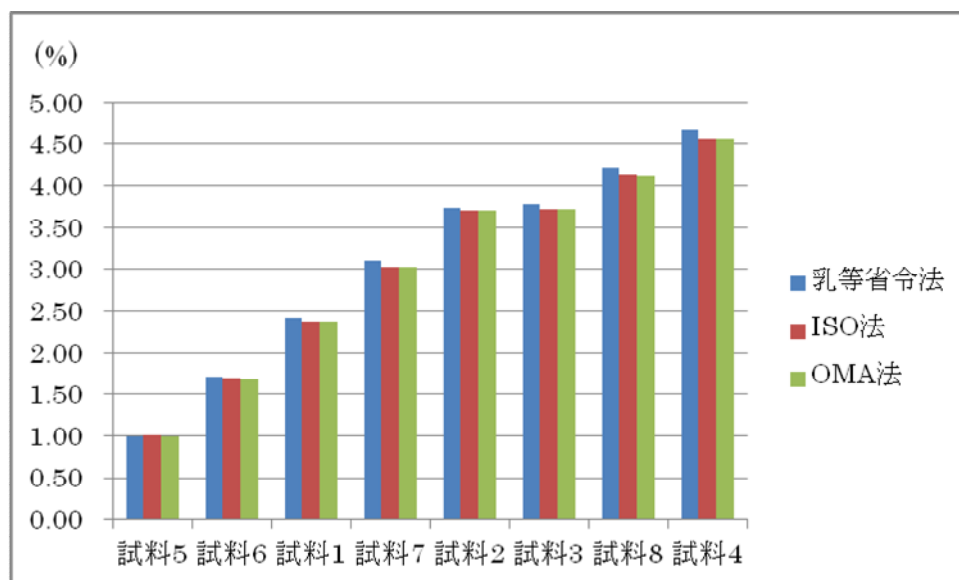


表 2 乳の乳脂肪分における精度指標比較

乳等省令法

試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	2.41	3.74	3.78	4.67	0.99	1.71	3.10	4.23	3.08
併行標準偏差 S_r (%)	0.017	0.008	0.010	0.021	0.010	0.006	0.009	0.024	0.013
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.047	0.023	0.028	0.060	0.029	0.018	0.024	0.066	0.037
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.7	0.2	0.3	0.5	1.1	0.4	0.3	0.6	0.5
室間再現標準偏差 S_R (%)	0.047	0.043	0.029	0.067	0.057	0.071	0.069	0.078	0.057
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.132	0.120	0.080	0.187	0.159	0.198	0.193	0.218	0.161
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	2.0	1.1	0.8	1.4	5.7	4.1	2.2	1.8	2.4

ISO1211:2010/IDF1:2010

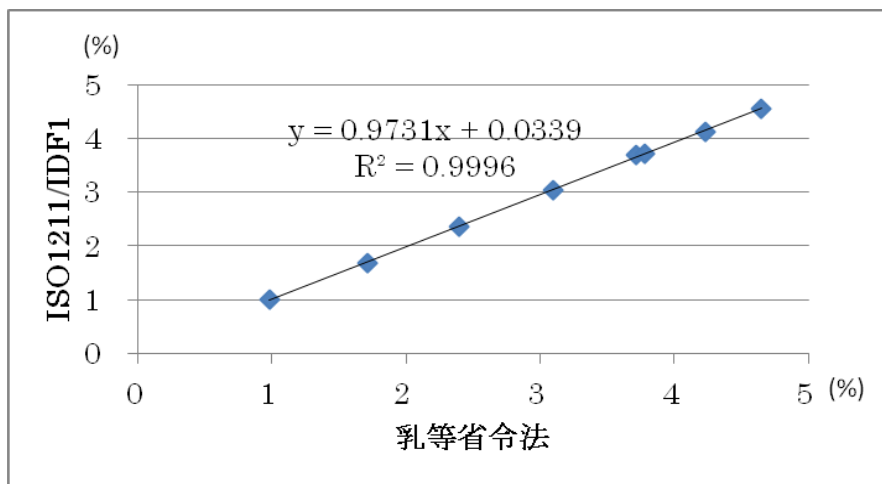
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	2.37	3.70	3.72	4.56	1.00	1.69	3.03	4.13	3.03
併行標準偏差 S_r (%)	0.006	0.010	0.009	0.008	0.005	0.000	0.004	0.009	0.006
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.018	0.029	0.026	0.023	0.014	0.000	0.011	0.024	0.018
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.3	0.3	0.2	0.2	0.5	0.0	0.1	0.2	0.2
室間再現標準偏差 S_R (%)	0.012	0.017	0.010	0.016	0.005	0.006	0.009	0.018	0.012
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.034	0.047	0.028	0.045	0.015	0.016	0.024	0.050	0.032
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	0.5	0.5	0.3	0.4	0.5	0.3	0.3	0.4	0.4

AOAC998.05

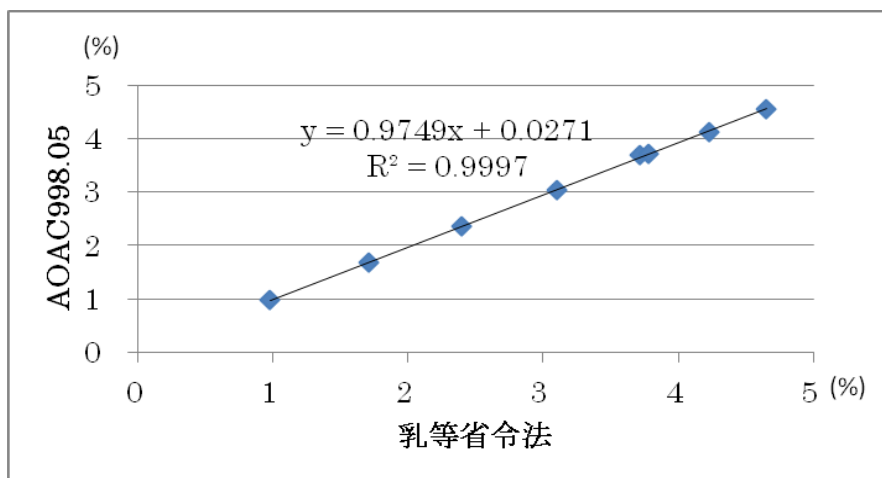
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	2.37	3.70	3.72	4.56	0.99	1.68	3.03	4.12	3.02
併行標準偏差 S_r (%)	0.009	0.004	0.004	0.017	0.004	0.004	0.005	0.011	0.007
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.026	0.011	0.011	0.046	0.011	0.011	0.014	0.031	0.020
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.4	0.1	0.1	0.4	0.4	0.2	0.2	0.3	0.3
室間再現標準偏差 S_R (%)	0.015	0.011	0.013	0.017	0.005	0.004	0.005	0.018	0.011
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.042	0.030	0.036	0.049	0.015	0.011	0.014	0.050	0.031
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	0.6	0.3	0.3	0.4	0.5	0.2	0.2	0.4	0.4

図 13 乳の乳脂肪分における X-Y プロット

乳等省令法 - ISO1211:2010/IDF1:2010



乳等省令法 - AOAC998.05



ISO1211:2010/IDF1:2010 - AOAC989.05

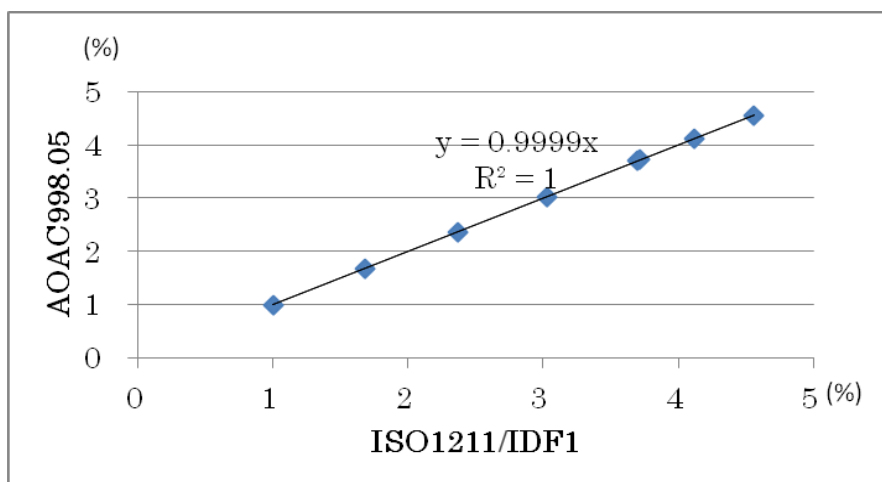


表 4 乳の全固形分における平均値の比較

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8
乳等省令法	11.00	12.40	12.43	13.73	9.95	10.48	11.71	13.07
OMA 法	11.09	12.53	12.53	13.83	10.02	10.61	11.78	13.18

図 14 乳の全固形分における平均値の比較（濃度順並べ替え）

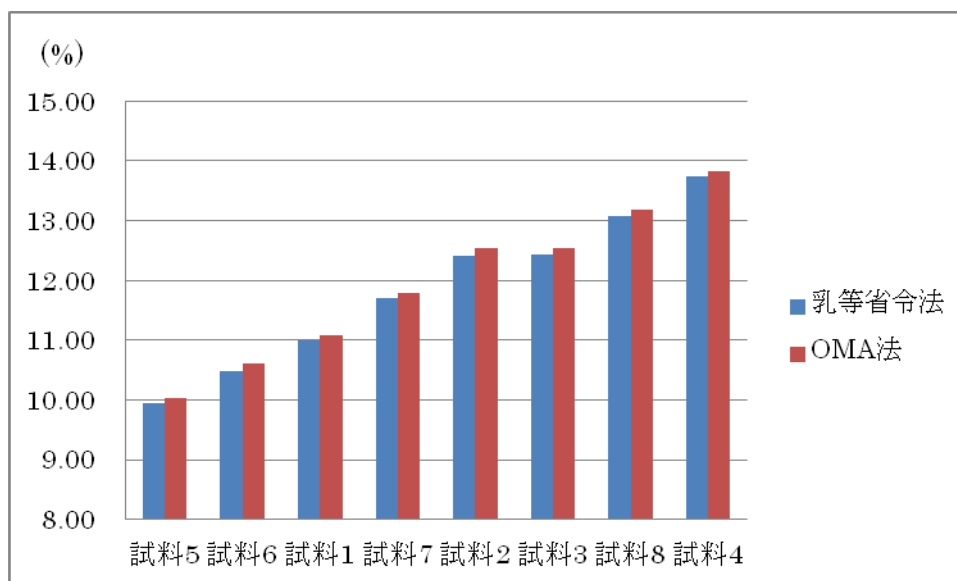


表5 乳の全固形分における精度指標比較

乳等省令法

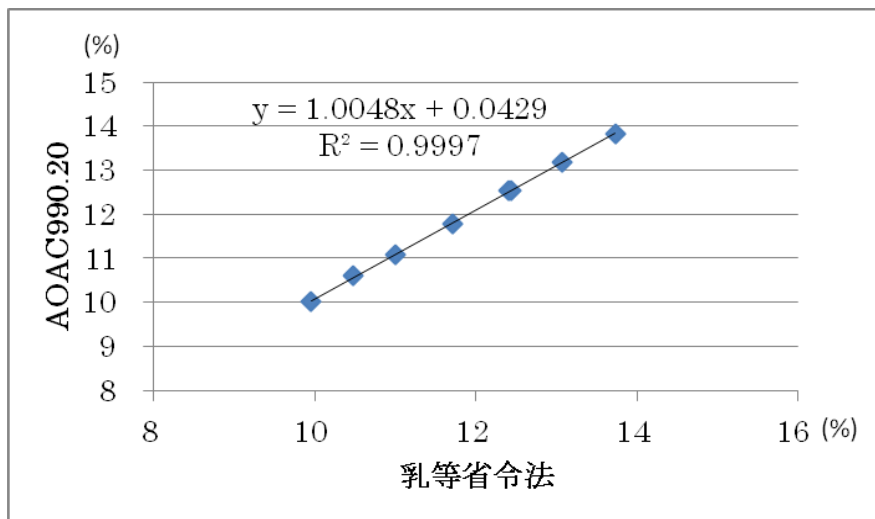
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	11.00	12.40	12.43	13.73	9.95	10.48	11.71	13.07	11.85
併行標準偏差 S_r (%)	0.031	0.014	0.014	0.009	0.016	0.006	0.019	0.012	0.015
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.086	0.040	0.040	0.026	0.045	0.018	0.052	0.034	0.043
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.3	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1
室間再現標準偏差 S_R (%)	0.035	0.029	0.021	0.023	0.055	0.033	0.045	0.043	0.035
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.099	0.080	0.058	0.065	0.154	0.092	0.127	0.120	0.099
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	0.3	0.2	0.2	0.2	0.6	0.3	0.4	0.3	0.3

AOAC990.20

試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	11.09	12.53	12.53	13.83	10.02	10.61	11.78	13.18	11.95
併行標準偏差 S_r (%)	0.012	0.028	0.021	0.018	0.014	0.017	0.019	0.021	0.019
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.032	0.080	0.060	0.050	0.040	0.046	0.054	0.059	0.053
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
室間再現標準偏差 S_R (%)	0.068	0.117	0.092	0.109	0.078	0.169	0.053	0.098	0.098
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.189	0.326	0.258	0.305	0.218	0.472	0.150	0.274	0.274
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	0.6	0.9	0.7	0.8	0.8	1.6	0.5	0.7	0.8

図 15 乳の全固形分における X-Y プロット

乳等省令法 - AOAC990.20



(2) クリームにおける試験法の比較
 クリームの乳脂肪分について、シングルラボで乳等省令法、ISO法、OMA法の3法による測定結果を比較した。平均値は、ISO法とOMA法は同等の結果となったが、乳等省令法はISO法、OMA法に比べ低めの傾向がみられた(表7、図16)。併行相対標準偏差は3法とも同等

の結果となった(表8)。また、X-Yプロットによってそれぞれの試験法を比較したところ、乳等省令法とISO法による近似曲線の決定係数は $R^2=0.9998$ 、乳等省令とOMA法による近似曲線の決定係数は $R^2=0.9998$ 、ISO法とOMA法による近似曲線の決定係数は $R^2=0.9999$ となった(図17)。

表7 クリームの乳脂肪分における平均値の比較

(%)

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8
乳等省令法	46.49	36.65	34.84	41.79	46.87	34.89	45.11	39.44
ISO法	46.96	37.02	35.14	42.15	47.43	35.12	45.55	39.65
OMA法	47.03	37.03	35.14	42.22	47.48	35.10	45.50	39.73

図16 クリームの乳脂肪分における平均値の比較(濃度順並べ替え)

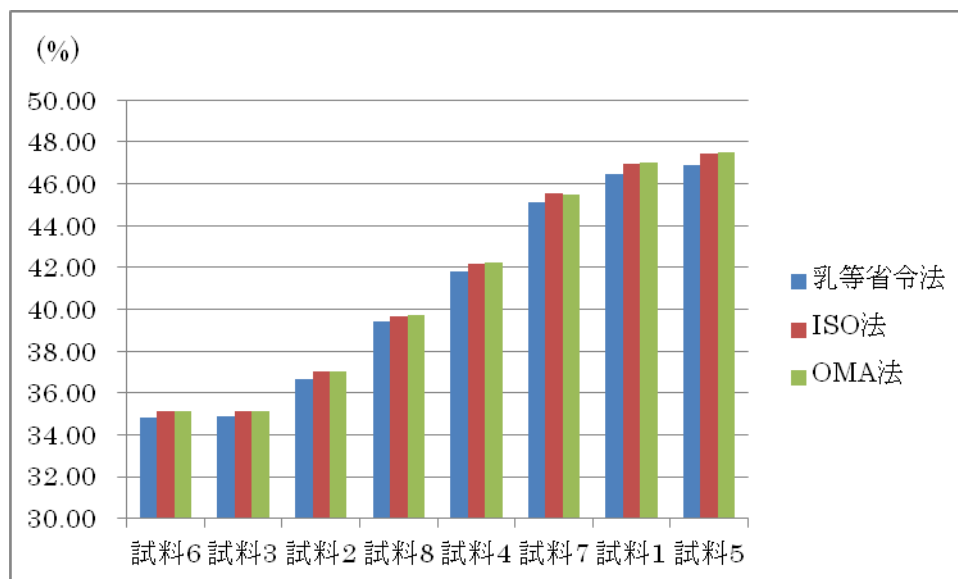
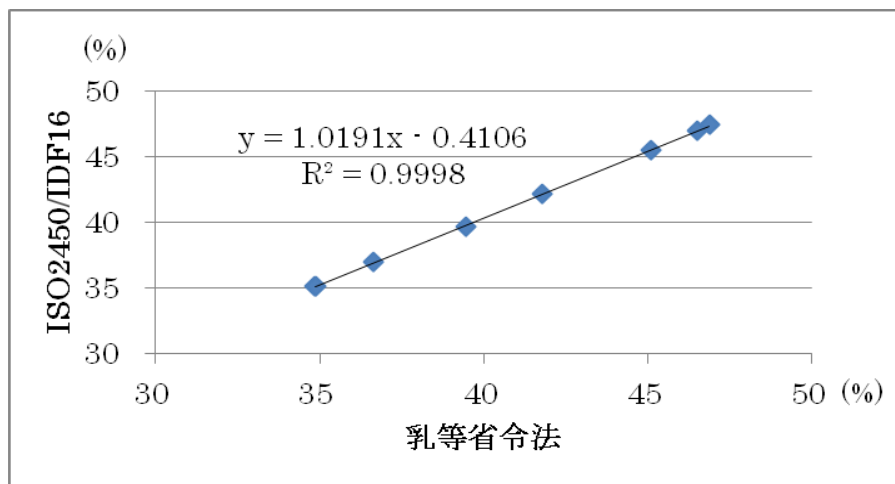


表 8 クリームの乳脂肪分における精度指標比較

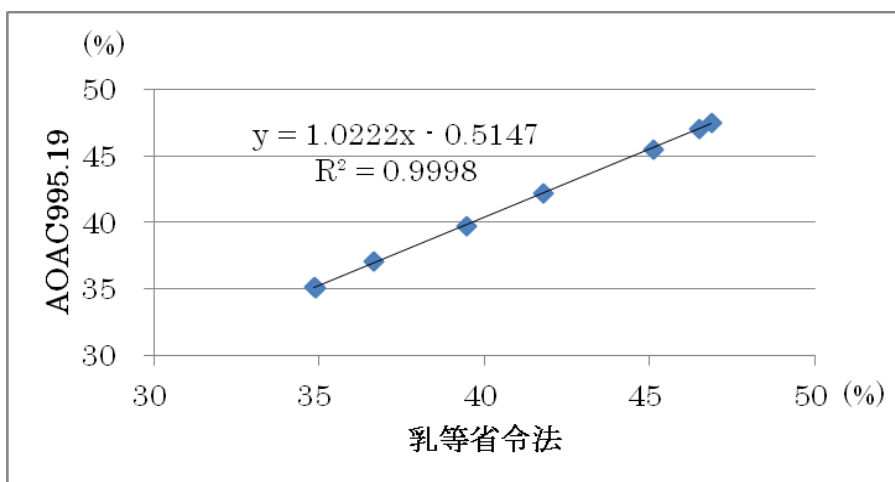
乳等省令法									
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	1	1	1	1	1	1	1	1	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	46.49	36.65	34.84	41.79	46.87	34.89	45.11	39.44	40.76
併行標準偏差 S_r (%)	0.071	0.100	0.061	0.050	0.055	0.025	0.046	0.038	0.056
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.199	0.280	0.171	0.141	0.154	0.070	0.128	0.106	0.156
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.2	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ISO2450:2008/IDF16:2008									
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	1	1	1	1	1	1	1	1	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	46.96	37.02	35.14	42.15	47.43	35.12	45.55	39.65	41.13
併行標準偏差 S_r (%)	0.01	0.08	0.04	0.10	0.03	0.09	0.10	0.07	0.064
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.016	0.233	0.106	0.291	0.074	0.249	0.267	0.186	0.178
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.0	0.2	0.1	0.2	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2
AOAC995.19									
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	1	1	1	1	1	1	1	1	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	47.03	37.03	35.14	42.22	47.48	35.10	45.50	39.73	41.15
併行標準偏差 S_r (%)	0.12	0.07	0.09	0.09	0.03	0.04	0.03	0.03	0.063
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.342	0.191	0.254	0.238	0.081	0.122	0.086	0.090	0.177
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.3	0.2	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2

図 17 クリームの乳脂肪分における X-Y プロット

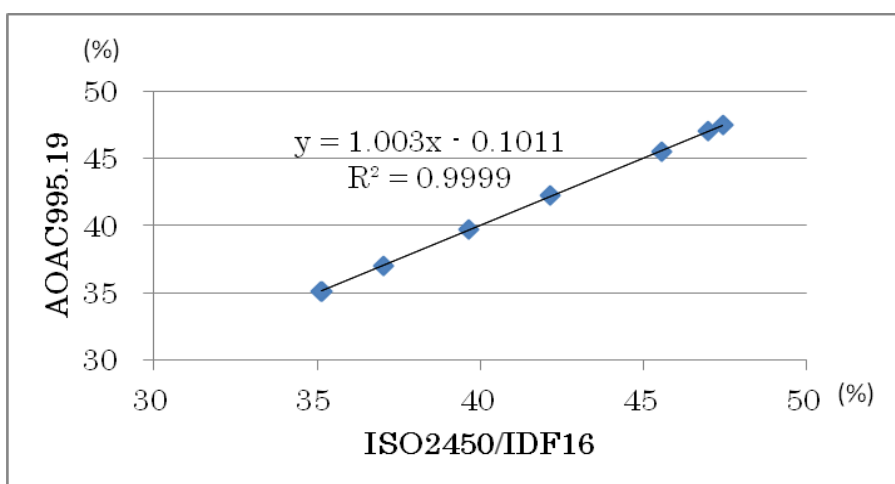
乳等省令法 - ISO2450:2008/IDF16:2008



乳等省令法 - AOAC995.19



ISO2450:2008/IDF16:2008 - AOAC995.19



(3) 脱脂粉乳における試験法の比較

脱脂粉乳の水分について、シングルラボで乳等省令法、ISO法、OMA法の3法による測定結果を比較した。平均値は、低い順にISO法、乳等省令法、OMA法となった(表10、図18)。併行相対標準偏差は、低い順に乳等省令法、OMA法、ISO法となった(表11)。また、X-Yプ

ロットによってそれぞれの試験法を比較したところ、乳等省令法とISO法による近似曲線の決定係数は $R^2=0.9497$ 、乳等省令とOMA法による近似曲線の決定係数は $R^2=0.9906$ 、ISO法とOMA法による近似曲線の決定係数は $R^2=0.9647$ となった(図19)。

表10 脱脂粉乳の水分における平均値の比較

	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6	試料7	試料8
乳等省令法	4.75	4.28	4.98	3.75	4.81	4.98	4.26	4.01
ISO法	4.39	3.92	4.72	3.02	4.46	4.55	3.93	3.72
OMA法	4.97	4.43	5.15	3.90	4.91	5.14	4.48	4.25

図18 脱脂粉乳の水分における平均値の比較(濃度順並べ替え)

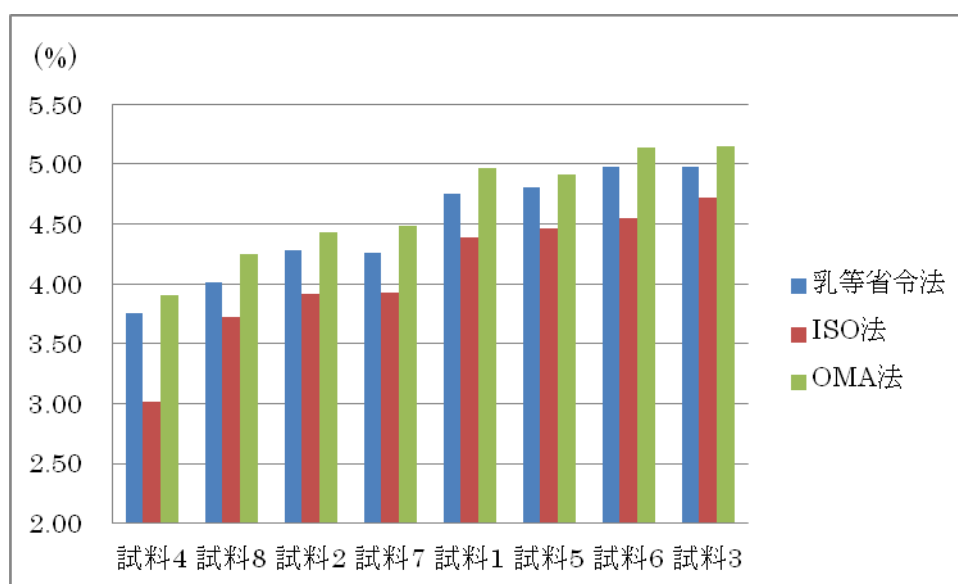
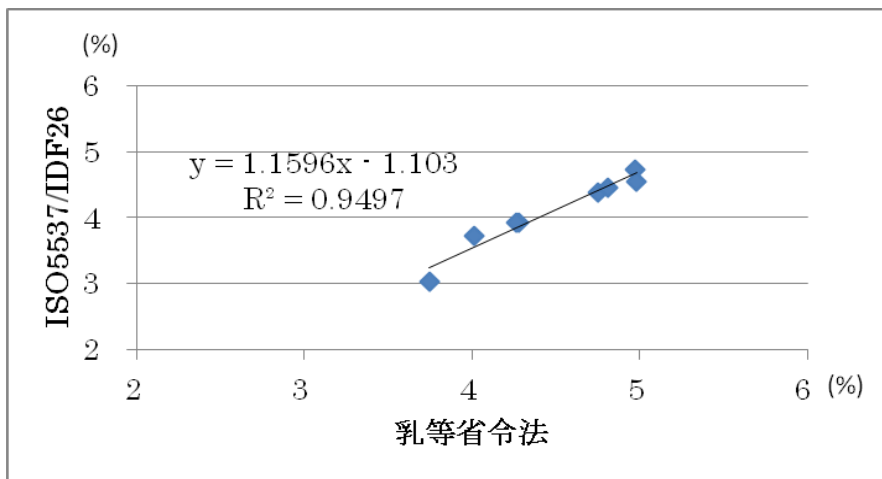


表 11 脱脂粉乳の水分における精度指標比較

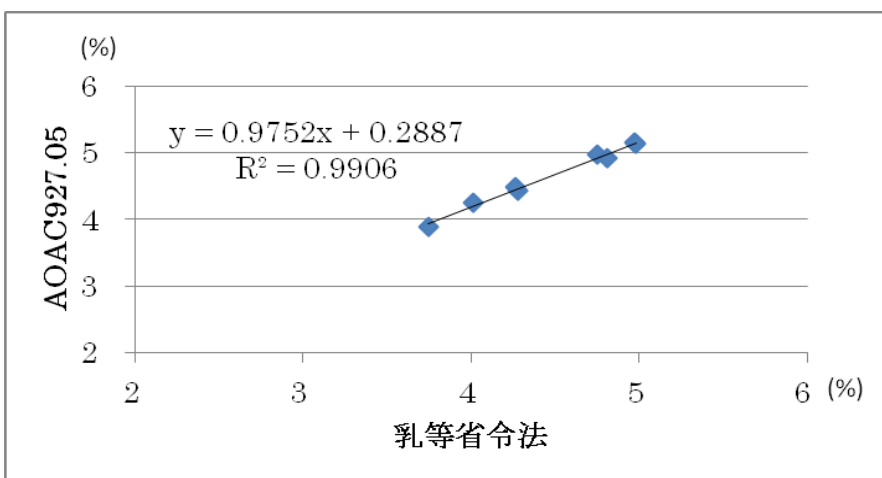
乳等省令法									
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	1	1	1	1	1	1	1	1	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	4.75	4.28	4.98	3.75	4.81	4.98	4.26	4.01	4.48
併行標準偏差 S_r (%)	0.017	0.021	0.015	0.021	0.010	0.006	0.035	0.021	0.018
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.048	0.058	0.043	0.058	0.028	0.016	0.098	0.058	0.051
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.4	0.5	0.3	0.6	0.2	0.1	0.8	0.5	0.4
ISO5537:2004/IDF26:2004									
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	1	1	1	1	1	1	1	1	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	4.39	3.92	4.72	3.02	4.46	4.55	3.93	3.72	4.09
併行標準偏差 S_r (%)	0.11	0.12	0.29	0.40	0.19	0.25	0.01	0.07	0.178
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.308	0.338	0.798	1.115	0.519	0.688	0.032	0.191	0.499
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	2.5	3.1	6.0	13.2	4.2	5.4	0.3	1.8	4.6
AOAC927.05									
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	1	1	1	1	1	1	1	1	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	4.97	4.43	5.15	3.90	4.91	5.14	4.48	4.25	4.66
併行標準偏差 S_r (%)	0.08	0.03	0.09	0.07	0.04	0.10	0.06	0.06	0.066
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.225	0.086	0.242	0.199	0.106	0.267	0.175	0.169	0.184
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	1.6	0.7	1.7	1.8	0.8	1.9	1.4	1.4	1.4

図 19 脱脂粉乳の水分における X-Y プロット

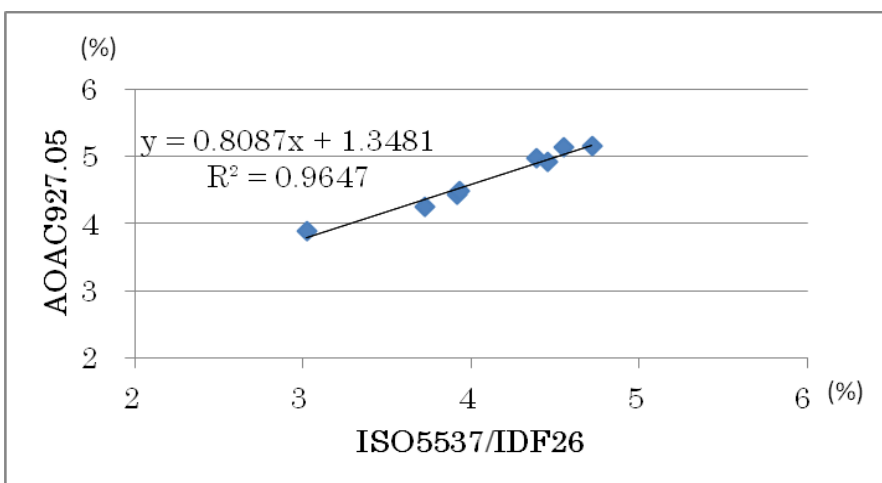
乳等省令法 - ISO5537:2004/IDF26:2004



乳等省令法 - AOAC927.05



ISO5537:2004/IDF26:2004 - AOAC927.05



D. 考察

(1) 乳における乳脂肪分および無脂乳固形分の試験法の比較

乳等省令における乳の乳脂肪分の試験法は一般的にゲルベル法と呼ばれる方法である。ゲルベル法は乳に濃硫酸を加えて脂肪以外の成分を溶解しエマルジョンを破壊した後、硫酸液中に浮遊する脂肪の小滴を遠心分離しその容量から脂肪量を求める試験法である。一方 ISO 法、OMA 法における試験法は重量法である。重量法はアンモニアエタノール溶液中の試料中の脂肪をジエチルエーテルと石油エーテルで抽出し、抽出液の溶媒を留去して抽出量を求める試験法であり、ゲルベル法とは原理的に全く異なる方法である。一般的にはレーゼ・ゴットリーブ法とも呼ばれ、乳等省令においても後に述べるクリームの乳脂肪分等の試験法に同様の原理が採用されている。フローチャートを見るとわかる通り、ゲルベル法の方が簡便な試験法であり、製造現場でも広く実施されている。

乳等省令法による測定値は ISO 法、OMA 法に比べわずかに高い結果となった。乳脂肪含量が低い試料ではほとんど差はみられないが、高くなるにつれて差が大きくなる傾向が認められ、最大で乳等省令法が約 0.1% 高い値となった。重量法に比べゲルベル法の測定値が高い傾向があることは古くから知られており(1)、今回の比較においても同様の結果が得られたものとする。OMA 法および ISO 法に記載されている室間再現許容差はどちらも 0.056% である。この数値は一つの試験法内における許容差であるが、仮にこれを

複数の試験法間で同等の結果が出せているかをみる指標として考えた場合、高濃度の試料においては乳等省令法と OMA 法および ISO 法との差は約 0.1% であり、室間再現許容差を超過している。一方、X-Y プロットでは、いずれも $R^2 > 0.999$ と非常に高い相関性が確認された。

また、ばらつきの指標である室間再現相対標準偏差については、ISO 法、OMA 法が 0.4% であったのに対し乳等省令法は 2.4% であり、乳等省令法の方がばらつきの大きい結果となった。これは、析出した脂肪柱についてゲルベル乳脂計の目盛りを直接目視で読み取る容量法である乳等省令法と、抽出した脂肪の重量を化学天びんで測定する重量法である ISO 法および OMA 法との原理の違いによる精度の差であると考えられる。

本研究において ISO 法として実施した試験法は、前述の通り重量法である。ISO/IDF standard には、試験法として容量法であるゲルベル法 (ISO2446:2008/IDF226:2008) も存在はしているが、参照法は重量法であり、これ(重量法)と同等の結果が出るように実施することが前提とされている。

試験条件の記述について、乳等省令法においては約 65 とされている温度条件が 65 ± 2 と範囲指定されている、また、乳等省令法では触れられていない試料の準備についての記述があるなど、ISO2446:2008/IDF226:2008 にはより詳細に記されている。フローチャートを図 20 に示す。試験条件以外にも試験法の概要、器具、試薬等様々な情報が詳細に記載されており、乳等省令の試験法が

「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」

との記述のみであるのに対し、ISO2446:2008/IDF226:2008 は詳細な記述が12ページにも及ぶ。仮にゲルベル法において国際的なハーモナイゼーションを考える場合には内容を精査し、ISO法のように詳細な記述も必要であると考え

る。
乳の無脂乳固形分については、乳等省令法、OMA法ともに全固形分を定量し、別に求めた乳脂肪分を差し引くことによって算出する方法であるため、全固形分の定量法について比較を行ったが、乳等省令法の方が、ばらつきが小さく、全固形分はわずかに高値になる傾向が見られた。乳等省令法は乾燥機で乾燥させる前

に沸騰水浴上で予備乾燥を行う工程があり、予備乾燥によって表面をひび割れさせてあらかじめ水分を蒸発させることによって、最終的な乾燥ムラが小さくなるものと考えられる。一方OMA法には予備乾燥の工程がなく、試料を直接乾燥機で乾燥させることによって乾燥物重量を定量する。この工程の違いがばらつきの差を生じさせ、乳等省令法の方がばらつきの小さい結果になったものとする。平均値としては約0.1%程度乳等省令法が低い結果が得られた。乳等省令法が蓋付き秤量皿を使用しているのに対して、OMA法は蓋なし秤量皿を使用しているため、工程において若干吸湿した可能性や、前述の予備乾燥工程の有無により乳等省令法と比べて乾燥不足の状態になった可能性が考えられる。OMA990.20において室間再現許容差は0.118%であり、乳等省令法とOMA法の測定値の差はその範囲内にあり、同等の結果が出せる試験法であることに加え、精度的にも乳等省令法が優れているという結果となった。また、X-Yプロットにおいても $R^2 > 0.999$ と非常に高い相関性が確認された。

OMA990.20で指定された試験法ではないが、OMA法にも予備乾燥の工程のある試験法「AOAC Official Method 990.19 “Solids(Total) in Milk, By Forced Air Oven Drying after Steam Table Predry”, IDF-ISO-AOAC Method, section33.2.43」が存在することを申し添えておく。

(2) クリームにおける試験法の比較

クリームにおける乳脂肪分の試験法は、

乳等省令法・ISO法・OMA法共通して原理的には同じ重量法であるが、脂肪抽出を行う器具に違いがあり、乳等省令法には「リョーリツヒ管」が、ISO法及びOMA法には「マジョニア管」が規定されている。測定値の比較において、ISO法とOMA法は同等の結果となったが、乳等省令法は平均すると約0.4%低値となる傾向がみられた。ISO法における併行許容差は0.50%、室間再現許容差は1.00%、OMA法における併行許容差は0.354%、室間再現許容差は0.427%であるとされている。クリームの試験法比較はシングルラボで行ったため、併行許容差を指標として考えた場合、ISO法においては許容範囲内にあり、OMA法においては超過しているものの、室間再現許容差程度の結果となった。乳等省令法が低値になった原因としては、抽出器具による抽出効率の違いや試験操作におけるロス等が考えられるが、ばらつきの指標である併行相対標準偏差には差が認められなかったことから、試験操作におけるロスよりも抽出器具による抽出効率の差が大きな要因となっていることが考えられた。また、X-Yプロットではいずれも $R^2 > 0.999$ と非常に高い相関性が確認された。

昨年度実施したアンケート調査でも意見として挙げられていたが、日本国内においてもレーゼ・ゴットリーブ法を実施する際にはマジョニア管を用いるのが一般的となっている現状がある⁽²⁾。日本国内の実状と国際的な整合性の両方の観点からマジョニア管も適用可能とすることが望ましいと考える。

(3) 脱脂粉乳における試験法の比較

脱脂粉乳における水分の試験法は、乳等省令法が98~100の乾燥機内で乾燥を行う常圧乾燥法であるのに対し、ISO法及びOMA法は条件の異なる乾燥法である。ISO法は87の乾燥機内において風量33ml/minの条件で乾燥空気を通過させながら5時間乾燥させるという試験法であり、OMA法は100の乾燥機内において100mmHgの減圧条件下で5時間乾燥させるという試験法である。測定値は低い順にISO法、乳等省令法、OMA法となったが、乾燥温度が87であることを考えるとISO法が一番穏やかな条件下での乾燥であり、他と比べて低めの傾向が見られたものと考えられた。乳等省令法とOMA法はどちらも乾燥温度は100であるが、OMA法は減圧条件下での乾燥であり乳等省令法と比べて水分が蒸発しやすい条件であるため高めの傾向となったものと考えられた。ISO法における併行許容差は0.15%、室間再現許容差は0.20%とされているが、乳等省令法との差は約0.4%であり、室間再現許容差も超過する結果となった。OMA法における許容差の記載はないが、OMA法と乳等省令法の差は約0.2%となった。一方、X-Yプロットではいずれも $R^2 > 0.9$ と高い相関性が確認された。ばらつきの指標である併行相対標準偏差は乳等省令法が一番小さい結果となったが、ISO法は乳等省令法と比べて操作が煩雑であることや、OMA法は試料採取量が少ないために相対的にばらつきやすいこと等が要因として考えられた。

E. 結論

初年度に実施したアンケート結果も参考に選定した代表的な品目の試験法について、海外の試験法との比較により、乳等省令法の精度や測定原理の違い等による測定結果の違いを確認することができた。

引き続き乳等省令に規定されている他の品目の試験法についても海外の試験法との比較を実施し、現場視点から国際的なハーモナイゼーションに必要な提案ができるよう検討を行う必要があると考える。

(参考文献)

- (1) 足立達(2008)：日本の法令における乳質検査の容量式脂肪率法の史的展開 酪農乳業史研究, 創刊号, pp33-34
- (2) 日本薬学会(編)(1984). 乳製品試験法・注解 金原出版株式会社, pp87-88

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

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

平成 28 年度 分担研究報告書

国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の試験法の研究

分担課題 乳及び乳製品試験法に関する改正試験法に向けた検討（微生物分野）

研究分担者	平井昭彦	東京都健康安全研究センター微生物部
研究協力者	下島優香子	東京都健康安全研究センター微生物部
	井田美樹	東京都健康安全研究センター微生物部
	西野由香里	東京都健康安全研究センター微生物部
	福井理恵	東京都健康安全研究センター微生物部

研究要旨

乳及び乳製品の成分規格等に関する省令では、牛乳や乳製品等を製造する際に使用する生乳は、細菌数が直接個体鏡検法(ブリード法)で 1 ml あたり 400 万以下であることと定められている。指定される染色液であるニューマン染色液は成分に含まれるテトラクロロエタンが平成 26 年に特定化学物質障害予防規則の特定化学物質となり、取扱場所の制限や健康管理などが必要となった。そのため、日常的にブリード法試験を実施している現場からは、染色液の代替品が求められている。本研究では代替染色液として、ブロードハーストパーレイ染色液を検討した。ブロードハーストパーレイ染色液の市販品である BPV 染色液(ベッセル【獣医環境衛生研究所】)およびブロードファーストパーレイ(武藤化学)についてニューマン染色液との同等性を検証した。

鏡検者による差、染色手技による差を検証した結果、いずれの染色液も、鏡検者があるいは染色者が異なっても、計測数のばらつきが少なく、典型像を確認できることが示された。また、生乳 5 検体について各染色液で染色して計測を行った結果、計測数はいずれの染色液も同等であり、相関があることが示唆された。

今後はより安定した染色のための条件検討および更なる統計解析による同等性の検証を実施する予定である。

A. 研究目的

乳及び乳製品の成分規格等に関する省令(乳等省令)では、牛乳、殺菌山羊乳、乳製品等を製造する場合に使用する生乳または生山羊乳は、細菌数が直接個体鏡検法(ブ

リード法)で 1 ml あたり 400 万以下であることと定められている。本検査法に使用される染色液は、「フラスコ中にテトラクロールエタン 40ml 及び無水エタノール 54ml を入れ 70 度まで加温し、これにメチレンブルー 1.00 g

から 1.12 g までを混じ強く振って色素を完全に溶かし、冷却するのを待って、酢酸 6 ml を徐々に加えろ過した後密栓して貯える」と作成法が記載されている「ニューマン染色液」である。この染色液に含まれる 1,1,2,2-テトラクロロエタンは平成 26 年 11 月の特定化学物質障害予防規則改正により特定化学物質の特別管理物質に追加され、特別有機溶剤等に位置付けられた。取扱場所の制限や健康管理などが必要となり、そのため、日常的にブリード法試験を実施している現場からは、染色液の代替品が求められている。平成 27 年度に本研究班が実施した、日常的に乳及び乳製品の試験を実施している現場担当者や乳及び乳製品の試験法に精通している専門家を対象に実施したアンケート調査結果でも、ブリード法による細菌数測定に代替染色液の適用を求める意見があった。

本研究ではニューマン染色液の代替染色液を検証することを目的として、テトラクロロエタンを含まないブロードハーストパーレイ染色液を検討した。ブロードハーストパーレイ染色液は、「70%エチルアルコール 200 ml を温めて 1.5 g のメチレンブルーを溶解し、10% フクシン原液（95%エチルアルコール 100ml にフクシン 10g を溶かす）15ml を加える。さらにアニリン 5ml を加え混和する。12ml の希硫酸（濃硫酸 5.7ml を蒸留水約 90ml の中に加え、総量を 100ml とする）を混和し、温めて濾過し、濾液 100ml ごとに 50ml の温水を加えてよく混和する」（技術の手引き 16 牛の乳房炎、農林水産省畜産局衛生課、農林水産省家畜衛生試験場監修、社団法人日本獣医師会発行）方法で作製し、特定化学物質を含まない。今回は市販品 2 製品について検討した。また、乳質の向上等を図るための指標

として、指定生乳生産者団体では体細胞数を 30 万/ml 以下とする自主基準が設けられており、乳処理業等の現場ではブリード法で細菌数だけではなく体細胞数も併せて測定されていることから、体細胞についても染色性を検証した。

B. 研究方法

1) 材料

2016 年 9 月に、東北地方の農場で採取され、冷蔵で輸送された生乳 1 検体 (R1) および関東地方の生乳販売農業協同組合連合会生乳検査所で検査した後に冷蔵で輸送された生乳 5 検体 (R2-R6) を供試した。

2) ブリード法

ブリード法は、乳等省令および一般社団法人 J-milk の生乳検査マニュアルに従い実施した。すなわち、生乳 10 μ l をスライドガラスの 1 \times 1 cm に塗抹し、約 40 秒の板の上で乾燥させ、70%エタノールに浸したのち、再び乾燥させた。各染色液で瞬間染色し、2 回水洗して乾燥させ、1000 倍の油浸レンズで鏡検した。16 視野以上（1 視野あたり細菌数 0-3 の場合は 64 視野、4-6 の場合は 32 視野、7 以上の場合は 16 視野）について細菌数および体細胞数を測定して 1 視野平均数をもとめ、その値に顕微鏡係数（標本の面積を視野の面積で除した数値を 1 ml 当たりの数に換算するため 100 倍した係数、使用した顕微鏡では 263200）を乗じ、1 ml 当たりの細菌数または体細胞数を算出した。

使用した染色液はニューマン染色液 (N, 関東化学)、BPV 染色液 (B1, ベッセル【獣医環境衛生研究所】) およびブロードファーストパーレイ (B2, 武藤化学) の 3 種類とし

た。B1 はブロードハーストパーレイ染色液の組成に改良が加えられた市販品で、既に国内でも一部使用されている。B2 はブロードハーストパーレイ染色液のアニリンを加えた段階の状態です市販されており、今回はその市販品 100ml に 50ml の温水を加えて混和して使用した。

3) 鏡検者の違いによる比較

生乳 R1 検体を各染色液で染色し、顕微鏡の同一視野をブリード法初心者である鏡検者 3 名 (A, B, C) が測定した。各染色液につき 3 視野ずつ、細菌および体細胞を対象とし、典型像、可能性の高い像、夾雑物と推定される像の 3 種類に分類して測定した。

4) 染色手技による比較

生乳 R3 検体をブリード法初心者である染色者 3 名 (A, B, C) が各染色液で染色し、顕微鏡の同一視野を鏡検者 3 名 (A, B, C) で測定した。各染色者、各染色液につき 1 視野ずつ、細菌および体細胞を対象とし、典型像、可能性の高い像、夾雑物と推定される像の 3 種類に分類して測定した。

5) 各染色液による細菌数および体細胞数の比較

生乳 5 検体 (R2-6) を各染色液で 2 回ずつ染色し、1 視野あたりの平均細菌数が 0-3 の場合は 64 視野、4-6 の場合は 32 視野、7 以上の場合は 16 視野について細菌数と体細胞数を計測し、1 視野の平均数を求めた。さらに、1 視野の平均数に顕微鏡係数を乗じ、1 ml あたりの細菌数または体細胞数を算出した。

6) 統計処理

鏡検者あるいは染色手技による比較においては、計測数のばらつきを変動係数 (CV 値) により評価した。ブリード法による細菌数および体細胞数の比較においては、各染色液で 2 回ずつ染色・測定した計測値を生乳検体ごとに Z スコアを求めて同等性を評価した。また、1 ml あたりの細菌数および体細胞数を算出し、N と B1 および N と B2 について線形近似曲線を求め、 R^2 値により相関を評価した。

C. 研究結果

1) ブリード法鏡検時の各種染色液の使用感

図 1 に、各種染色液の染色像を示した。N は初心者でも安定した染色が可能であり、鏡検時に判別しやすい印象であった (図 1A)。B1 は背景がピンク色、細菌および体細胞は青色に染色され、色が異なり判別しやすく、また色彩も判別しやすい印象であった (図 1B)。しかし染まりにムラがでて体細胞等が薄い場合があった。染色時に染色液を滴下ではなく浸漬とし、染色時間を長くするなどの工夫により安定した染色が可能となると考えられる。B2 は B1 と同じように背景と対象物の色が異なり判別しやすい一方、背景が濃く染まる場合があり、濃い部分では測定がしづらく、判別しにくい印象であった (図 1C)。B2 に硫酸を加えることで改良される可能性も考えられる。

ブリード法の特長としていずれの染色液においても、1 個と計測するか 2 個と計測するか判断に迷うことがある。細菌の分裂時に、どの段階から 2 個と計測するか (図 2A)、体細胞では離れかけた 1 個の細胞の分葉核か 2 個の細胞の核かの判断 (図 2B) が難しい。また、試料に厚みがあるため、一方にピント

をあわせると、他方がぼやけたり消えたりする場合がある(図 3A)。ピントを調節しながら測定していく必要があるが、見落としてしまう可能性もある。細菌塊では、重なった部分の正確な計測は困難と考えられる(図 3B)。

2) 鏡検者の違いによる比較

表 1 に、各染色液で染色し、同一視野を鏡検者 3 名で各染色液につき 3 視野ずつ測定した結果を示した。細菌数と体細胞数について、典型像および可能性の高い像として測定されたものを視野あたりの計測数とした。計測視野ごとに鏡検者 3 名による計測数のばらつきを変動係数 (CV 値) により評価した。細菌数について、染色液 N では CV 値は視野ごとでは 2.4-8.2%、3 視野合計で 2.5%、B1 では視野ごとでは 1.1-6.3%、3 視野合計で 1.5%、B2 では視野ごとでは 2.5-10.9%、3 視野合計では 4.5%であった。B2 で 10.9%であった視野が 1 視野あったが、他はいずれも 10%以内であった。体細胞について、視野ごとでは計測数が少ないため 3 視野合計数で評価すると、CV 値は N では 2.5%、B1 では 1.5%、B2 では 4.5%といずれも 10%以内であった。よって、いずれの染色液も、同一視野を鏡検した際の 3 名の計測数は偏りが少ないと考えられた。

表 2 に、各染色液で各視野について各鏡検者が典型像、可能性の高い像、夾雑物と推定される像と計測した数値を示した。3 視野、3 鏡検者の計測数の合計数で、典型像と測定された割合は、細菌数では N は 100%、B1 は 99.2%、B2 は 100%、体細胞では N は 74.2%、B1 は 83.3%、B2 は 95.5%であり、いずれの染色液も、高率に典型像を確認できたと考えられた。

3) 染色手技による比較

表 3 に、染色者 3 名が各染色液で染色し、顕微鏡の同一視野を 3 名で測定した結果を示した。細菌数と体細胞数について、典型像および可能性の高い像として測定されたものを視野あたりの計測数とした。計測視野ごとに鏡検者 3 名による計測数のばらつきを CV 値により評価した。細菌数について、染色液 N では CV 値は視野ごとでは 4.0-7.3%、3 視野合計で 4.5%、B1 では視野ごとでは 5.5-10.7%、3 視野合計で 3.8%、B2 では視野ごとでは 0-9.0%、3 視野合計では 6.6%であった。B1 で 10.7%であった視野が 1 視野あったが、他はいずれも 10%以内であった。体細胞について、視野ごとでは計測数が少ないため 3 視野合計数で評価すると、CV 値は N では 4.0%、B1 では 0%、B2 では 4.9%といずれも 10%以内であった。よって、いずれの染色液もいずれの染色者でも、同一視野を鏡検した際の 3 名の計測数は偏りが少ないと考えられた。

表 4 に、各染色液で各染色者についての染色視野で、各鏡検者が典型像、可能性の高い像、夾雑物と推定される像と計測した数値を示した。3 染色者、3 鏡検者の計測数の合計数で、典型像と測定された割合は、細菌数ではいずれも 100%、体細胞では N は 97.1%、B1 は 100%、B2 は 96.4%であり、いずれの染色液も、いずれの染色者による染色でも、高率に典型像を確認できると考えられた。

4) 各染色液による細菌数および体細胞数の比較

生乳 5 検体について、各染色液を用いてブリード法で測定された細菌数および体細胞数の 1 視野平均数を表 5 に示した。検体ごと

に Z スコアを求めたところ、いずれの検体もいずれの染色液も ± 2 以内に分布した。よって、各染色液とも細菌数および体細胞数の 1 視野平均数は同等と示された。

2 回染色を行って測定した計測数の平均をとり、顕微鏡係数を乗じて、1ml あたりの細菌数および体細胞数を求めた(表 6)。細菌数(/ml)の対数値について、N と B1 および N と B2 の相関を求めた(図 4)。いずれも線形近似を示し、 R^2 値は >0.9 であり相関が認められた。体細胞数(/ml)の対数値について、N と B1 および N と B2 の相関を求めた(図 5)。N と B1 は R^2 値 >0.9 であり相関が認められたが、N と B2 は R^2 値 0.74 であり、やや低い相関を示した。

D. 考察

今回の検討により、検査者が初心者であっても結果が同等であることから、ブロードハーストパーレイを基にした市販品である BPV 染色液およびブロードファーストパーレイの染色液がニューマン染色液と同等であることが示唆された。

より安定した染色を可能とするため、今後染色手技の検討も課題と考える。今回、BPV 染色液は乳等省令および一般社団法人 J-milk の生乳検査マニュアルに従って、ニューマン染色液と同様に滴下による瞬間染色で行ったが、メーカーの説明書には、浸漬「2~3 秒」とされている。関東生乳販売農業協同組合連合会生乳検査所では、BPV 染色液で手順通りに染色すると薄い傾向になることから、瞬間染色については数秒長く浸し、その後直ぐに洗浄せず、染色したプレパラートを乾燥させ、その後、洗浄して乾燥することで、薄い傾向が改善されたとコメントしている。ブロード

ファーストパーレイ(武藤化学)については、「技術の手引き 16 牛の乳房炎」に記載されたように、硫酸を加えた組成の検討も必要と考えられる。さらに、公益社団法人北海道酪農検定検査協会生乳検査部の前身である社団法人北海道生乳検査協会による改良染色液「メチレンブルー 2.0g を 70% の温エチルアルコール 250ml に溶かす。塩基性フクシンのアルコール飽和溶液(10.0g を 95% エチルアルコール 100ml に溶かす) 3ml を加える。アニリン 5ml を加え、液が温かい間によく振り混ぜる。希硫酸(蒸留水 95ml 中に濃硫酸 5ml を加える) 15ml を加えよく混合し加温、濾過する。濾液 100ml に対し熱蒸留水 50ml を加えよく振り混ぜる。ただし、希硫酸を加えた時、液が濃ちようになるようであれば、濾過前に熱蒸留水を加える。」を用いた場合、フクシンの量が少なくなっているため背景の赤色が淡くなり、目への負担が軽くなっているとの報告もある。これらの方法についての検討も必要と考えられる。

また、分裂段階の細菌の計測、体細胞における離れかけた 1 個の細胞の分葉核か 2 個の細胞の核かの判断について、指針を設けることで、鏡検者によるばらつきを減ずることができると思う。

今後、母数の増加やコラボレイティブスタディの実施により更なる統計解析を行い、同等性を検証する予定である。

E. 結論

乳等省令では、牛乳や乳製品等を製造する際に使用する生乳は、細菌数がブリード法で 1 ml あたり 400 万以下であることと定められている。指定される染色液であるニューマン染色液の代替染色液として、ブロードハース

トパーレイ染色液を検討した。ブロードハーストパーレイ染色液の市販品である BPV 染色液およびブロードファーストパーレイについてニューマン染色液との同等性を検証した。

鏡検者による差、染色手技による差を検証した結果、いずれの染色液も、鏡検者あるいは染色者が異なっても、計測数のばらつきが少なく、典型像を確認できることが示された。また、生乳 5 検体について各染色液で染色して計測を行った結果、計測数はいずれの染色液も同等であり、相関があることが示唆された。

今後はより安定した染色のための条件検討および更なる統計解析による同等性の検証を実施する予定である。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表
学会発表
下島優香子、井田美樹、西野由香里、福井理恵、黒田寿美代、大嶋秀克、品川邦汎、平井昭彦、貞升健志、寺嶋淳：生乳の直接個体鏡検法（ブリード法）における染色液の比較、第 29 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会研究会、平成 29 年 2 月、甲府市

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

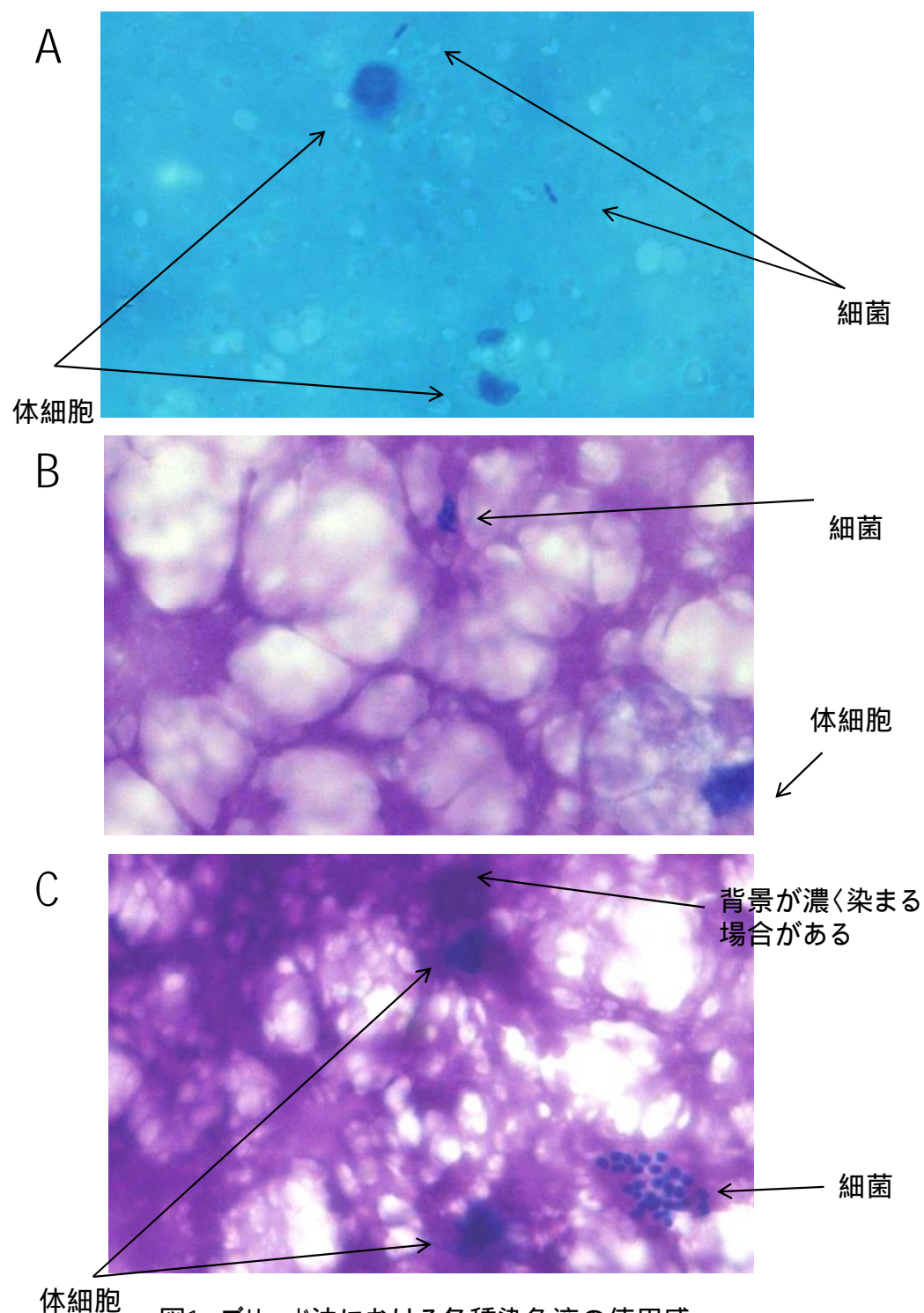


図1 ブリード法における各種染色液の使用感
 A: N(ニューマン染色液)
 B: B1(BPV染色液)
 C: B2(プロードファーストバーレイ)

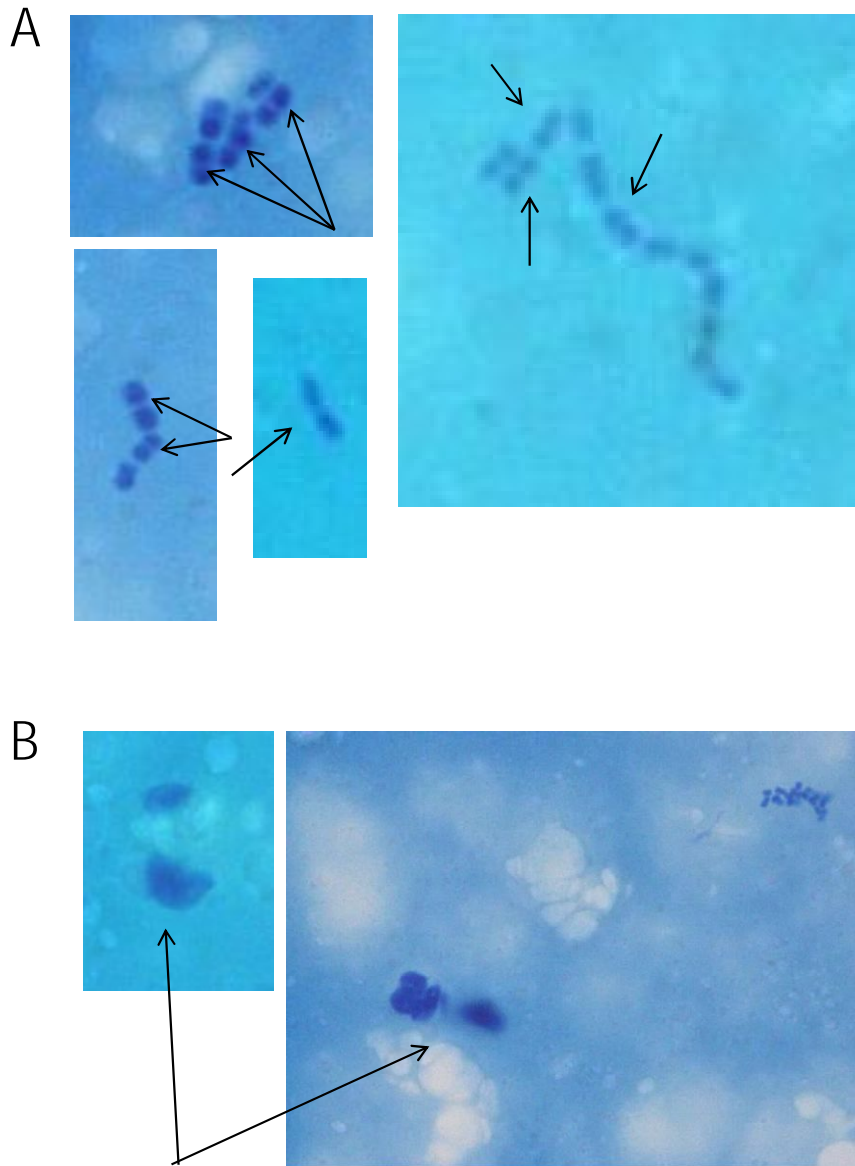


図2 ブリード法における観察時の注意点(1) 1個か2個か
A:細菌, B: 体細胞

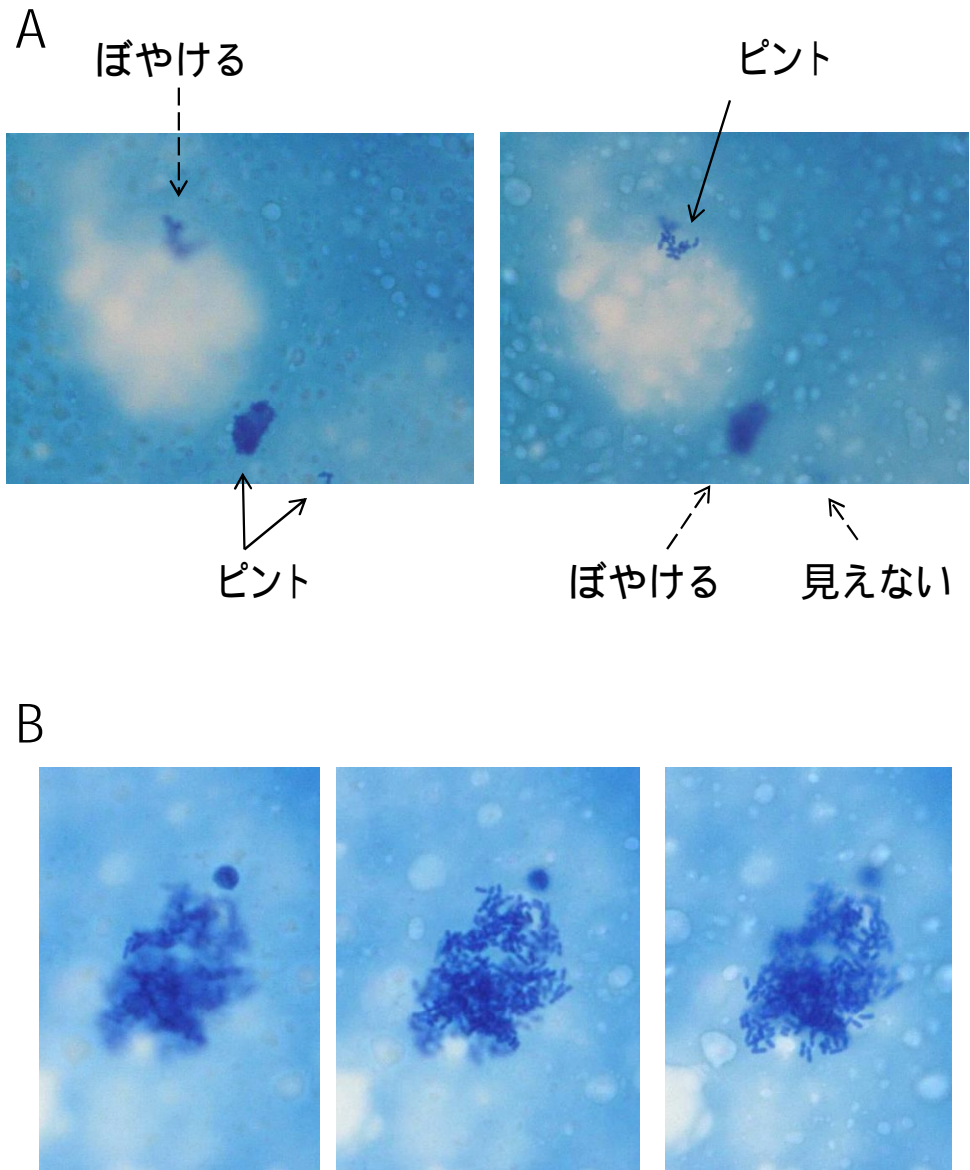


図3 プリード法における観察時の注意点(2) 厚み
A:細菌, 体細胞, B:細菌塊

表1 鏡検者の違いによる計測数比較

視野	鏡検者	細菌数(数/視野)			体細胞数(数/視野)		
		N	B1	B2	N	B1	B2
1視野目	A	103	39	66	4	1	2
	B	98	37	69	3	1	2
	C	98	43	65	3	1	2
	CV(%)	2.4	6.3	2.5	14.1	0	0
2視野目	A	33	73	55	2	4	4
	B	29	72	44	2	4	3
	C	33	71	44	2	4	3
	CV(%)	6.0	1.1	10.9	0	0	14.1
3視野目	A	51	104	90	4	2	2
	B	55	115	79	4	2	2
	C	45	105	83	3	2	2
	CV(%)	8.2	4.6	5.4	12.9	0	0
計	A	187	216	211	10	7	8
	B	182	224	192	9	7	7
	C	176	219	192	8	7	7
	CV(%)	2.5	1.5	4.5	2.5	1.5	4.5

表2 鏡検者の違いによる典型像計測比較

視野	鏡検者	細菌数(数/視野)						体細胞数(数/視野)											
		N		B1		B2		N		B1		B2							
1	A	103	0	39	0	66	0	3	1	1	1	2	0						
	B	98	0	37	0	69	0	3	1	1	1	2	0						
	C	98	0	43	0	65	0	2	1	1	1	2	0						
2	A	33	0	73	0	55	0	2	1	4	1	4	0						
	B	29	0	72	5	44	0	2	1	4	1	3	0						
	C	33	0	71	0	44	0	2	1	3	1	2	1						
3	A	51	0	104	0	90	0	3	1	2	1	2	0						
	B	55	0	115	0	79	0	3	1	2	1	2	0						
	C	45	0	105	0	83	0	3	1	2	1	2	0						
計		545	0	0	659	0	5	595	0	0	23	4	4	20	1	3	21	1	0
(%)		(100)	(0)	(0)	(99.2)	(0)	(0.8)	(100)	(0)	(0)	(74.2)	(12.9)	(12.9)	(83.3)	(4.2)	(12.5)	(95.5)	(4.5)	(0)

:典型像 :可能性高い像 :夾雑物と推定される像

表3 染色手技による計測数比較

染色者	鏡検者	細菌数(数/視野)			体細胞数(数/視野)		
		N	B1	B2	N	B1	B2
A	A	51	43	8	3	1	3
	B	54	50	8	3	1	3
	C	49	56	8	3	1	3
	CV(%)	4.0	10.7	0	0	0	0
B	A	33	58	59	6	2	3
	B	29	50	68	6	2	3
	C	28	54	55	6	2	3
	CV(%)	7.2	6.0	9.0	0	0	0
C	A	31	48	15	2	3	4
	B	28	42	16	3	3	4
	C	26	46	16	3	3	3
	CV(%)	7.3	5.5	3.0	17.7	0	12.9
計	A	115	149	82	11	6	10
	B	111	142	92	12	6	10
	C	103	156	79	12	6	9
	CV(%)	4.5	3.8	6.6	4.0	0	4.9

表4 染色手技による典型像計測比較

染色者	鏡検者	細菌数(数/視野)						体細胞数(数/視野)							
		N		B1		B2		N		B1		B2			
A	A	51	0	43	0	8	0	3	1	0	3	0			
	B	54	0	50	0	8	0	3	1	0	3	0			
	C	49	0	56	0	8	0	3	1	0	3	0			
B	A	33	0	58	0	59	0	6	2	0	3	0			
	B	29	0	50	0	68	0	6	2	0	3	0			
	C	28	0	54	0	55	0	6	2	0	3	0			
C	A	31	0	48	0	15	0	2	3	0	4	0			
	B	28	0	42	0	16	1	2	3	1	3	1			
	C	26	0	46	0	16	0	3	3	0	3	0			
計		329	0	447	0	253	0	34	1	0	18	0	28	1	0
(%)		(100)		(100)		(100)		(97.1)	(2.9)		(100)		(96.6)	(3.4)	

:典型像 :可能性高い像 :夾雑物と推定される像

表5 ブリード法における各種染色液の比較

項目	検体	平均数/視野(zスコア)					
		N		B1		B2	
		1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目
細菌数	R2	29.2 (0.51)	17.2 (-1.00)	22.9 (-0.28)	24.5 (-0.08)	16.8 (-1.05)	40.1 (1.89)
	R3	14.5 (-1.11)	31.6 (0.73)	13.2 (-1.25)	19.9 (-0.53)	36.8 (1.29)	32.7 (0.85)
	R4	11.5 (0.81)	7.6 (-0.96)	7.4 (-1.05)	9.9 (0.08)	13.5 (1.72)	8.4 (-0.60)
	R5	5.1 (1.82)	3.8 (0.33)	3.9 (0.44)	2.5 (-1.17)	3.0 (-0.59)	2.8 (-0.82)
	R6	6.3 (0.78)	7.0 (1.30)	3.0 (-1.68)	4.3 (-0.71)	4.9 (-0.26)	6.0 (0.56)
	体細胞数	R2	1.5 (1.84)	1.1 (0.28)	0.6 (-1.54)	1.0 (-0.10)	1.0 (-0.10)
R3		2.4 (1.64)	2.1 (0.95)	1.1 (-1.33)	1.4 (-0.65)	1.5 (-0.42)	1.6 (-0.19)
R4		2.7 (1.02)	2.9 (1.46)	1.6 (-1.39)	1.8 (-0.95)	2.2 (-0.07)	2.2 (-0.07)
R5		1.2 (0.26)	1.5 (1.85)	1.0 (-0.79)	0.9 (-1.32)	1.1 (-0.26)	1.2 (0.26)
R6		2.0 (0.90)	1.7 (0.00)	1.5 (-0.60)	1.1 (-1.81)	1.8 (0.30)	2.1 (1.21)

表6 ブリード法による細菌数および体細胞数

	細菌数(/ml)			体細胞数(/ml)		
	N	B1	B2	N	B1	B2
R2	6.1.E+06	6.2.E+06	7.5.E+06	3.4.E+05	2.1.E+05	2.5.E+05
R3	6.1.E+06	4.4.E+06	9.1.E+06	5.9.E+05	3.3.E+05	4.1.E+05
R4	2.5.E+06	2.3.E+06	2.9.E+06	7.4.E+05	4.5.E+05	5.8.E+05
R5	1.2.E+06	8.4.E+05	7.6.E+05	3.6.E+05	2.5.E+05	3.0.E+05
R6	1.8.E+06	9.6.E+05	1.4.E+06	4.9.E+05	3.4.E+05	5.1.E+05

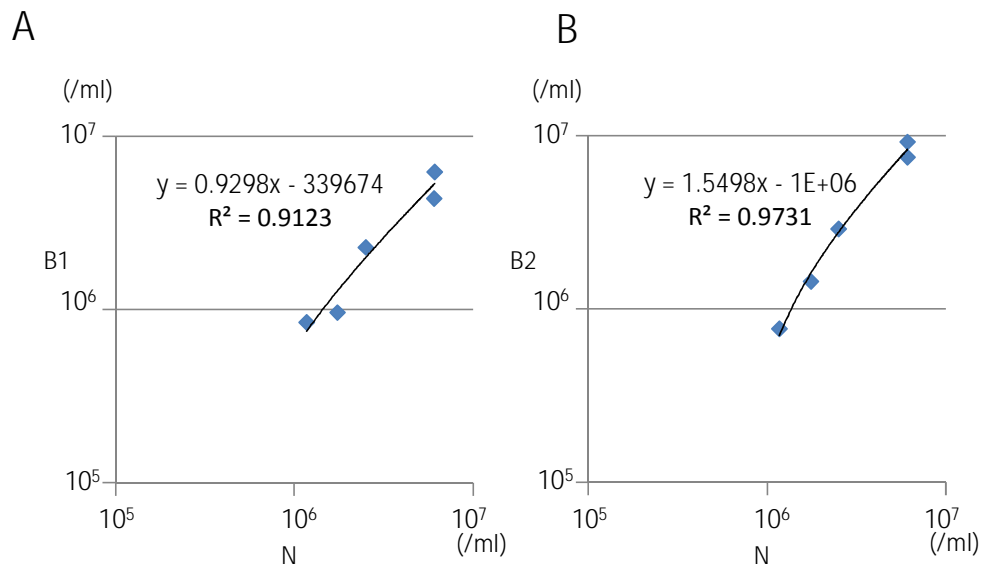


図4 ブリード法による細菌数の相関
A: NとB1, B: NとB2

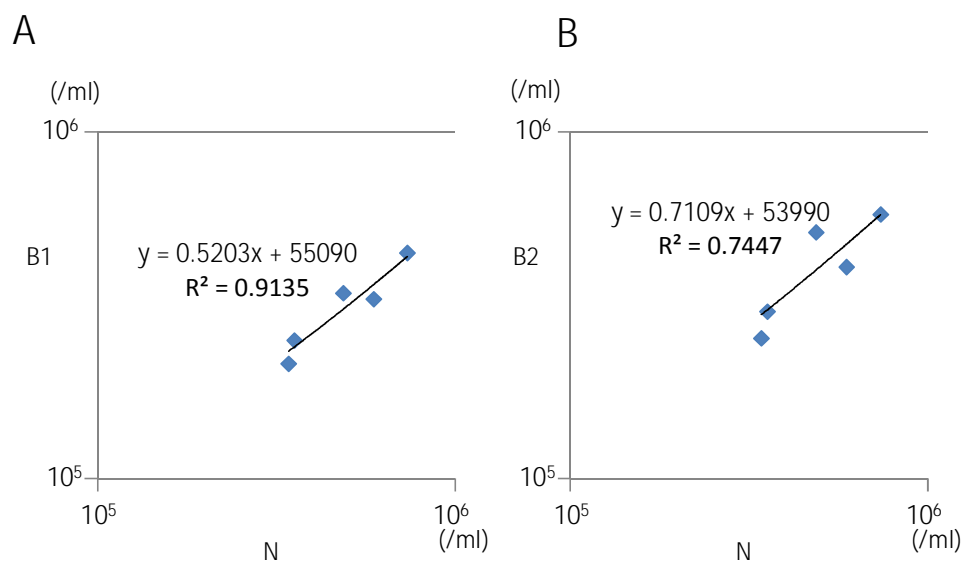


図5 ブリード法による体細胞数の相関
A: NとB1, B: NとB2