

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 29 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
	森田加奈	東京都健康安全研究センター微生物部
	岡田三弘	関東生乳販売農業協同組合連合会生乳検査所
	大嶋秀克	公益財団法人日本乳業技術協会事業部技術開発課
	内田雅之	公益社団法人北海道酪農検定検査協会事業部生乳検査部
	小坂英次郎	公益社団法人北海道酪農検定検査協会事業部生乳検査部

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。また、その改良染色液である BPV 染色液（ベッセル【獣医環境衛生研究所】）およびブロードハーストパーレイ改良染色液（公益社団法人 北海道酪農検定検査協会生乳検査部）も併せて検討した。

4 施設によるコラボレイティブスタディを行い、各染色液のニューマン染色液との同等性を検証した結果、いずれの染色液も同等性が確認された。よって、ブロードハーストパーレイ染色液およびその改良染色液はニューマン染色液の代替染色液として使用可能と示唆された。

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。

昨年度、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。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なく体細胞数も併せて測定されていることから、体細胞数についても染色性を検証した。その結果、いずれの染色液も、鏡検者あるいは染色者が異なっても、細菌数および体細胞数と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、いずれの染色液も計測数は同等であり、相関があることが示唆された。

今年度は、ブロードハーストパーレイ染色液、その改良染色液である BPV 染色液（ベッセル【獣医環境衛生研究所】）およびブロードハースト・パーレイ改良染色液（公益社団法人 北海道酪農検定検査協会生乳検査部）のニューマン染色液との同等性を検証するために、4 施設によるコラボレイティブスタディを行った。

## B. 研究方法

### 1) 参加施設（A-D）

- ・公益社団法人 北海道酪農検定検査協会 生乳検査部検査課
- ・関東生乳販売農業協同組合連合会 生乳検査所
- ・公益財団法人 日本乳業技術協会事業部技

## 術開発課

・東京都健康安全研究センター

### 2) 試料

2017年11月に、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当センターに輸送された生乳2検体(試料1、2)を供試した。

### 3) 染色液

以下の染色液を使用した。

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】)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ある。

ブロードハーストパーレイ染色液(B2)ブロードファーストパーレイ(武藤化学, 1000ml 中含有量: アニリン約25ml, エタノール約700ml, 水約300ml, フクシン約7.5g, メチレンブルー約7.5g)220mlに12mlの希硫酸を混和して温めて濾過し、濾液100mlごとに50mlの温水を加えてよく混和して使用した。

ブロードハースト・パーレイ改良染色液(B3, 公益社団法人北海道酪農検定検査協会生乳検査部)70%エチルアルコール250mlを温めて2.0gのメチレンブルーを溶解し、10%フクシン原液3mlを加える。さらにアニリン5mlを加え混和する。15mlの希硫酸を混和し、温めて濾過し、濾液100mlごとに50mlの温水を加えてよく混和して、使用した。

### 4) 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準じて実施

した。

すなわち生乳10 $\mu$ lをスライドガラスの1 $\times$ 1cmに塗抹し、約50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。N、B2については、瞬間染色し(滴下して数秒間表面を軽く乾燥させる)40以上のお湯で静かにしかも十分に2回水洗して乾燥させた。B1については、ベッセルのマニュアルに従い、2~3秒染色液に浸漬し、直ちに代液を振り落とし(2秒程)粗水洗(3秒程)本水洗(2秒~50秒)の後、キムワイプ等で水滴を拭い、乾燥させた。B3については、北海道酪農検定検査協会のプロトコールに従い、染色液に1分間以上(今回2分間とする)浸漬し、40以上のお湯で静かにしかも十分に2回水洗して乾燥させた。染色した試料を1000倍の油浸レンズで鏡検した。

### 5) コラボレイティブスタディ

当センターにて、生乳2試料について2区画ずつ塗抹し乾燥、70%エタノールに浸したのち再び乾燥させたスライドガラスを参加施設に配布し、各施設において染色を行った。各検査員(3~6人/施設)が各試料についてそれぞれの区画を16~64視野計測し(1視野0~3:64視野、4~6:32視野、7~:16視野)1視野平均を算出し、2区画の平均をその検査員の測定値とした。検査員の平均値および顕微鏡係数から各施設における細菌数および体細胞数を染色液ごとに算出した。さらに、4施設の平均値を染色液ごとの細菌数および体細胞数とした。

### 6) 標本間誤差の検討

当センターにて、生乳2試料をそれぞれ10標本ずつ塗抹し、ニューマン染色液で染色し、

1 検査員が 16 視野測定し、その平均値および顕微鏡係数から各標本の細菌数および体細胞数を算出し、標準偏差を求めた。

## C. 研究結果

### 1) ブリード法鏡検時の各種染色液の染色像

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、B3 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、D)。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)。

### 2) コラボレイティブスタディ

コラボレイティブスタディにおける染色液 N、B1、B2、B3、施設 A、B、C、D、試料 1、2 の細菌数および体細胞数を表 1 および図 2 に示した。

4 施設の平均をとると、細菌数は試料 1 で N :  $4.3 \times 10^6$  /ml、B1 :  $3.0 \times 10^6$  /ml、B2 :  $2.2 \times 10^6$  /ml、B3 :  $3.4 \times 10^6$  /ml、試料 2 で N :  $7.2 \times 10^6$  /ml、B1 :  $4.9 \times 10^6$  /ml、B2 :  $5.1 \times 10^6$  /ml、B3 :  $6.3 \times 10^6$  /ml、体細胞数は、試料 1 で N :  $5.9 \times 10^5$  /ml、B1 :  $4.9 \times 10^5$  /ml、B2 :  $5.2 \times 10^5$  /ml、B3 :  $5.3 \times 10^5$  /ml、試料 2 で N :  $2.7 \times 10^5$  /ml、B1 :  $2.2 \times 10^5$  /ml、B2 :  $2.4 \times 10^5$  /ml、B3 :  $2.5 \times 10^5$  /ml であり、図 3 に示した。

標本間誤差を見るために、試料 1、2 を 10 標本作成、測定した結果を表 2 に示した。標準偏差を求めると、細菌数は試料 1 で  $2.73 \times 10^6$ 、試料 2 で  $2.85 \times 10^6$ 、体細胞数は試料 1

で  $1.3 \times 10^5$ 、試料 2 で  $8.0 \times 10^4$  であった。同一試料でも標本により、また測定視野により、測定結果に誤差が生じると考えられた。

コラボレイティブスタディで得られた染色液 N による試料 1、2 の細菌数および体細胞数に標準偏差を誤差範囲として想定し、図 3 に示した。染色液 N で得られる細菌数は、試料 1 では  $1.6 \times 10^6 \sim 7.1 \times 10^6$  /ml、試料 2 では  $4.3 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$  /ml、体細胞数は、試料 1 では  $4.6 \times 10^5 \sim 7.2 \times 10^5$  /ml、試料 2 では  $1.9 \times 10^5 \sim 3.5 \times 10^5$  /ml であると考えられた。B1、B2、B3 で得られた細菌数および体細胞数は試料 1、2 ともいずれもその範囲内に含まれ、染色液 N によって得られる数値と同等であると示唆された。

## D. 考察

コラボレイティブスタディにより、B1、B2、B3 いずれの染色液においても、求められる細菌数および体細胞数は試料 1、2 ともいずれも標本のばらつきの範囲内に含まれ、染色液 N によって得られる数値と同等であると考えられた。

B1 ; BPV 染色液について、メーカーの説明書には、浸漬「2~3 秒」とされている。今回、公益財団法人北海道酪農検定検査協会生乳検査部検査課および東京都健康安全研究センターにて、染色が薄い部分が見受けられた。関東生乳販売農業協同組合連合会生乳検査所では、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。長めに染色するほうが望ましいと考えられた。

B2;ブロードハーストパーレイ染色液では、背景が濃く染色されてしまう傾向がある。そのため、細菌を見落とさないよう注意する必要があると考えられた。

B3;ブロードハースト・パーレイ改良染色液は公益財団法人北海道酪農検定検査協会生乳検査部検査課の前身である社団法人北海道生乳検査協会による改良品である。改良点として、フクシンの量を減らし、背景の赤色が淡くなり、目への負担を軽くなった点をあげている。また、染色法として染色液を満たしたバットに1分以上保持することによって行い、実際には、作業の手がすいたときに引き上げ乾燥させることで染色時間を十分確保できると同時に、数秒間の保持の操作を省略しうるため作業性の向上も図ることができるとしている。今回は染色時間は2分間としたが、明瞭な染色像を得ることができた。また、公益財団法人北海道酪農検定検査協会生乳検査部検査課においても同等性が検証されている。

以上より、ブロードハーストパーレイ染色液、その改良染色液である BPV 染色液およびブロードハーストパーレイ改良染色液は、ニューマン染色液の代替染色液として使用可能と示唆された。

#### 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ハース

ト・パーレイ改良染色液についても併せてニューマン染色液との同等性を検証し、ニューマン染色液の代替染色液として使用可能と示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

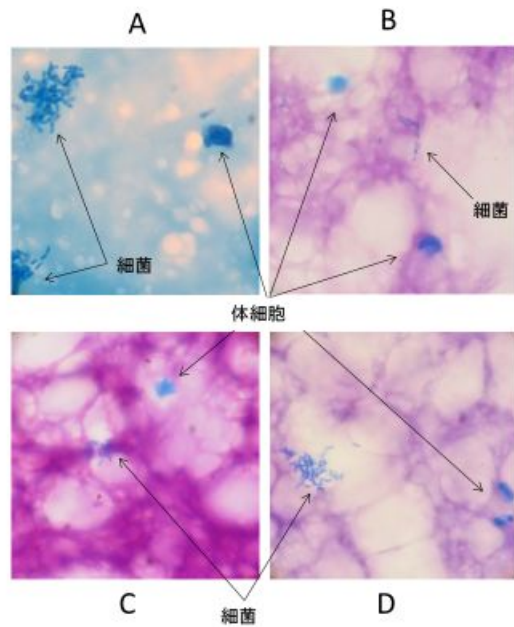


図1 プリード法における各種染色液の染色像  
 A: N(ニューマン染色液)  
 B: B1(BPV染色液)  
 C: B2(ブロードハースト・パーレイ染色液)  
 D: B3(ブロードハースト・パーレイ改良染色液)

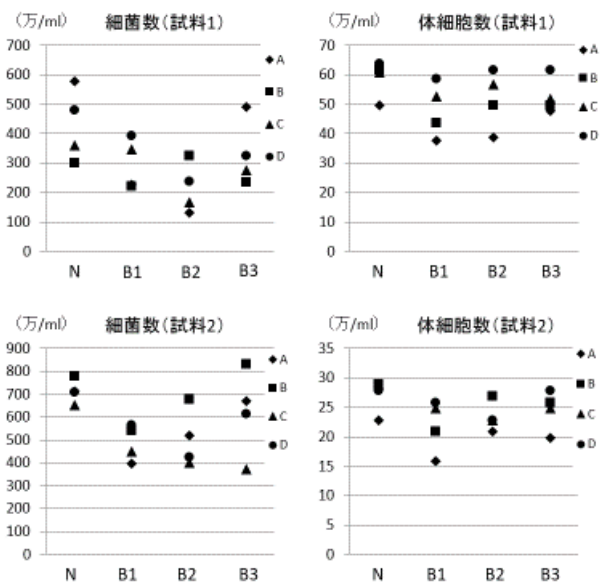


図2.コラボレイティブスタディによる染色液ごと施設ごとの細菌数および体細胞数

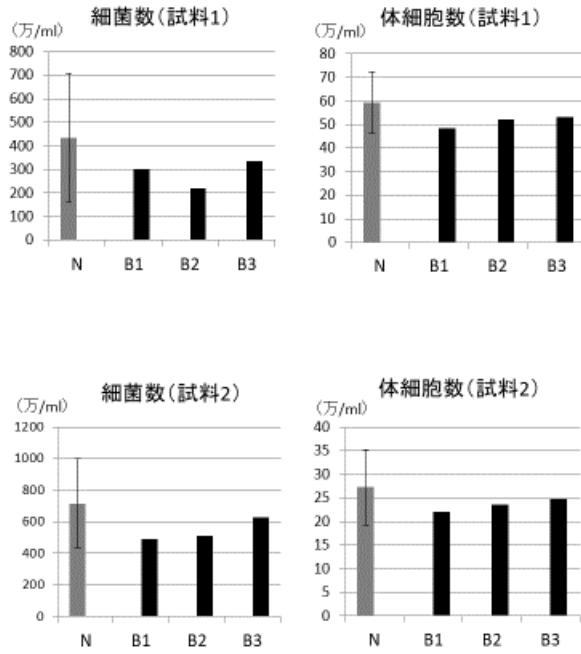


図3.コラボレイティブスタディによる染色液ごとの細菌数および体細胞数

表1.コラボレイティブスタディ結果

試料	施設	細菌数 (/ml)				体細胞数 (/ml)			
		N	B1	B2	B3	N	B1	B2	B3
1	A	$5.8 \times 10^6$	$2.3 \times 10^6$	$1.4 \times 10^6$	$5.0 \times 10^6$	$5.0 \times 10^5$	$3.8 \times 10^5$	$3.9 \times 10^5$	$4.8 \times 10^5$
	B	$3.0 \times 10^6$	$2.3 \times 10^6$	$3.3 \times 10^6$	$2.4 \times 10^6$	$6.2 \times 10^5$	$4.4 \times 10^5$	$5.0 \times 10^5$	$5.0 \times 10^5$
	C	$3.6 \times 10^6$	$3.5 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$	$2.8 \times 10^6$	$6.1 \times 10^5$	$5.3 \times 10^5$	$5.7 \times 10^5$	$5.2 \times 10^5$
	D	$4.8 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$	$2.4 \times 10^6$	$3.3 \times 10^6$	$6.4 \times 10^5$	$5.9 \times 10^5$	$6.2 \times 10^5$	$6.2 \times 10^5$
	平均	$4.3 \times 10^6$	$3.0 \times 10^6$	$2.2 \times 10^6$	$3.4 \times 10^6$	$5.9 \times 10^5$	$4.9 \times 10^5$	$5.2 \times 10^5$	$5.3 \times 10^5$
2	A	$7.1 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$	$6.7 \times 10^6$	$2.3 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$
	B	$7.8 \times 10^6$	$5.4 \times 10^6$	$6.8 \times 10^6$	$8.4 \times 10^6$	$2.9 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$2.7 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$
	C	$6.6 \times 10^6$	$4.5 \times 10^6$	$4.1 \times 10^6$	$3.8 \times 10^6$	$2.9 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$
	D	$7.1 \times 10^6$	$5.7 \times 10^6$	$4.3 \times 10^6$	$6.2 \times 10^6$	$2.8 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$
	平均	$7.2 \times 10^6$	$4.9 \times 10^6$	$5.1 \times 10^6$	$6.3 \times 10^6$	$2.7 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$

表2.標本間誤差

細菌数												
試料	標本1	標本2	標本3	標本4	標本5	標本6	標本7	標本8	標本9	標本10	標準偏差	
1	視野平均 (個)	27.6	14.1	15.6	26.5	45.3	41.9	21.6	36.1	23.8	25.0	
	細菌数 (/ml)	$7.254 \times 10^8$	$3.701 \times 10^8$	$4.113 \times 10^8$	$6.975 \times 10^8$	$1.191 \times 10^7$	$1.102 \times 10^7$	$5.692 \times 10^8$	$9.508 \times 10^8$	$6.251 \times 10^8$	$6.580 \times 10^8$	$2.737 \times 10^8$
2	視野平均 (個)	30.8	35.5	38.7	44.5	26.4	36.4	56.8	29.9	38.2	16.3	
	細菌数 (/ml)	$8.110 \times 10^8$	$9.344 \times 10^8$	$1.018 \times 10^7$	$1.171 \times 10^7$	$6.942 \times 10^8$	$9.574 \times 10^8$	$1.495 \times 10^7$	$7.880 \times 10^8$	$1.005 \times 10^7$	$4.293 \times 10^8$	$2.853 \times 10^8$
体細胞数												
試料	標本1	標本2	標本3	標本4	標本5	標本6	標本7	標本8	標本9	標本10	標準偏差	
1	視野平均 (個)	2.2	2.5	2.4	3.0	3.0	3.6	2.6	2.9	1.8	2.9	
	体細胞数 (/ml)	$5.76 \times 10^5$	$6.58 \times 10^5$	$6.25 \times 10^5$	$7.90 \times 10^5$	$7.90 \times 10^5$	$9.38 \times 10^5$	$6.91 \times 10^5$	$7.57 \times 10^5$	$4.77 \times 10^5$	$7.57 \times 10^5$	$1.30 \times 10^5$
2	視野平均 (個)	0.81	0.81	1.1	1.5	1.6	1.6	1.3	0.9	1.2	1.1	
	体細胞数 (/ml)	$2.14 \times 10^5$	$2.14 \times 10^5$	$2.80 \times 10^5$	$3.95 \times 10^5$	$4.11 \times 10^5$	$4.28 \times 10^5$	$3.29 \times 10^5$	$2.30 \times 10^5$	$3.13 \times 10^5$	$2.96 \times 10^5$	$8.00 \times 10^4$