

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 28-29 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。

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。

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1ml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ロエタン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1.00gから1.12g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6mlを徐々に加える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200mlを温めて1.5g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。

本研究では、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市販品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）について、ニューマン染色液との同等性を検討した。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）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）および2017年11月に輸送された生乳2検体（試料1、2）を供試した。

2) 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 250 ml を温めて 2.0 g 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。

3) 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 μ l をスライドガラスの 1 \times 1 cm 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。

4) シングルラボによる検討

鏡検者の違いによる比較

生乳 R1 検体を各染色液（2））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。

測定は、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。

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（2））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 種類に分類してと同様に測定した。

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 (2)) 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。

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。

5) コラボレイティブスタディによる検討

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

・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(当センター)

コラボレイティブスタディ

当センターにて、生乳 2 試料 (試料 1、2) 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、各施設において各染色液 (2)) を用いて染色を行った。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。

標本間誤差の検討

当センターにて、生乳 2 試料 (試料 1、2) 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)。

ブリード法の特性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、R1を各染色液で染色し、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、R1を染色者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 (R2-R6) 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考えられた。

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。

5) 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 7 および図 6 に示した。

4 施設の平均をとると、細菌数は試料 1 で N : 4.3×10^6 /ml、B1 : 3.0×10^6 /ml、B2 : 2.2×10^6 /ml、B3 : 3.4×10^6 /ml、試料 2 で N : 7.2×10^6 /ml、B1 : 4.9×10^6 /ml、B2 : 5.1×10^6 /ml、B3 : 6.3×10^6 /ml、体細胞数は、試料 1 で N : 5.9×10^5 /ml、B1 : 4.9×10^5 /ml、B2 : 5.2×10^5 /ml、B3 : 5.3×10^5 /ml、試料 2 で N : 2.7×10^5 /ml、B1 : 2.2×10^5 /ml、B2 : 2.4×10^5 /ml、B3 : 2.5×10^5 /ml であった (図 7)。

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 8 に示した。標

準偏差を求めると、細菌数は試料 1 で 2.73×10^6 、試料 2 で 2.85×10^6 、体細胞数は試料 1 で 1.3×10^5 、試料 2 で 8.0×10^4 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 7 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。

C. 考察

シングルラボによる検討で、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 (B1) およびブロードファーストパーレイの染色液 (B2) がニューマン染色液 (N) と同等であることが示唆された。

また、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、公益社団法人北海道酪農検定検査協会生乳検査部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社団法人北海道酪農検定検査協会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、公益社団法人北海道酪農検定検査協会 生乳検査部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え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

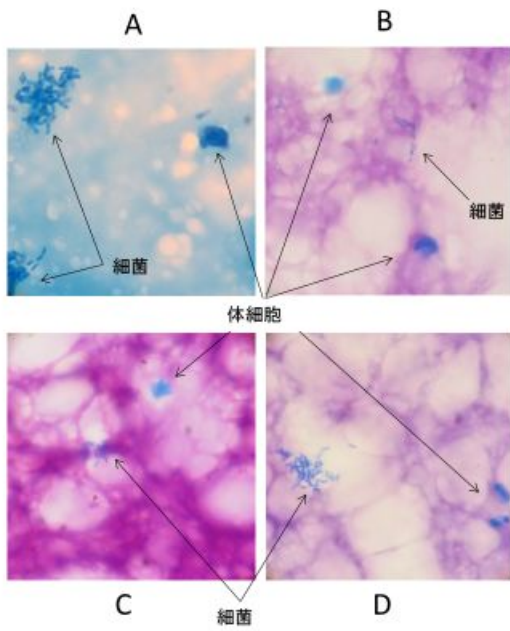


図1 ブリード法における各種染色液の染色像
 A: N(ニューマン染色液)
 B: B1(BPV染色液)
 C: B2(ブロードハーストパーレイ染色液)
 D: B3(ブロードハースト・パーレイ改良染色液)

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)	7.254×10^6	3.701×10^6	4.113×10^6	6.975×10^6	1.191×10^7	1.102×10^7	5.692×10^6	9.508×10^6	6.251×10^6	6.580×10^6	2.737×10^6
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)	8.110×10^6	9.344×10^6	1.016×10^7	1.171×10^7	6.942×10^6	9.574×10^6	1.495×10^7	7.880×10^6	1.005×10^7	4.293×10^6	2.653×10^6
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)	5.76×10^6	6.58×10^6	6.25×10^6	7.90×10^6	7.90×10^6	9.38×10^6	6.91×10^6	7.57×10^6	4.77×10^6	7.57×10^6	1.30×10^6
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)	2.14×10^6	2.14×10^6	2.80×10^6	3.95×10^6	4.11×10^6	4.28×10^6	3.29×10^6	2.30×10^6	3.13×10^6	2.96×10^6	8.00×10^4