

平成 30 年度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）

総括研究報告書

国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理及び試験法確立のための研究

研究代表者	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	中山 達哉	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	窪田 邦宏	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部
	鈴木 穂高	茨城大学農学部
	山崎 栄樹	帯広畜産大学動物・食品検査診断センター
研究協力者	阿部 清孝	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	山本 詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	天沼 宏	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部
	田村 克	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部
	Amalia Widya Rizky	茨城大学農学部
	永島 侑起	茨城大学農学部
	下島 優香子	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
	平井 昭彦	東京都健康安全研究センター微生物部
倉園 久生	帯広畜産大学獣医学研究部門	
奥村 香世	帯広畜産大学獣医学研究部門	

研究要旨

現在わが国の乳および乳製品の衛生管理は、昭和 26 年に発出された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」(以下乳等省令)に基づき、細菌数と大腸菌群を微生物規格として行われており、現在でもそれらが科学的に妥当か否かの検証が望まれている。また、HACCP 導入後の各種食品製造工程における衛生管理上で、迅速簡易法が適用される可能性が高まっているが、乳及び乳製品での適用の妥当性については、不明な点がある。また、日欧 EPA 交渉では乳製品も対象とされる等、今後の国際貿易の拡大を見据えた現状においては、国際動向を踏まえた形で、わが国の牛乳等の品質を評価し、一層の安全確保に向けた衛生管理策を講じることが必要な状況にある。本研究では、乳および乳製品の衛生実態を管理及び微生物規格を検討する上での基礎知見の集積を図ることを目的とし、本年度は諸外国における乳製品による健康被害実態、食品汚染実態、定められた微生物規格基準とそのサンプリングプラン、試験法の運用実態等に関する情報収集を行うと共に、EU における製造工程での衛生管理の実態について、デンマークの低温殺菌牛乳工場等を視察し、情報を収集した。また、国内で HTST 及び LTLT 牛乳を製造する施設並びに UHT 牛乳を製造する大規模施設の協力を得て、各製品の製造工程実態について衛生試験を通じた検討を行い把握することとした。更に、低温殺菌牛乳等製品における細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌の検出状況について、公定法、ISO 法並びに簡易培地を用いて検討を行った。その結果、殺菌乳に起因する食中毒アウトブレイクの発生件数及び微生物汚染は世界的に少ないこ

とが文献調査により確認された。現地視察の結果、デンマークでは HACCP に基づき、乳製造工場における衛生管理が適切に行われており、自社や業界団体、行政機関による指導も効果的に行われていることが確認された。EU 規則に基づいた国内基準を設定しているが、さらにそれを上回る自社基準を設定してより安全性を担保し、検査法は ISO 法や迅速検査法を活用しつつ、その頻度に関しては腸内細菌科菌群の検査が 1 年に 4 回という現実的な頻度でそれに対応していることが明らかとなった。一方、加熱殺菌前の原乳及び製造施設環境検体では公定法と簡易培地での集落形成数に差は見られなかったことから、簡易法であるフィルム培養法の適用範囲は今後更なる検証が必要であるとの知見を得た。また、LTLT/HTST 牛乳を製造する中規模施設では、UHT 牛乳を製造する大規模施設と同等の製造施設設備を用いていたが、充填工程で前工程との明確な施設区分化がなされておらず、充填機ノズル及び製品からは非病原菌が検出されたことから、同工程環境から製品への細菌混入を招きうる実態が明らかとなった。また、販売規模、HACCP 認証等の運営形態が異なる北海道内の複数の低温殺菌牛乳についての製造施設での製造工程、衛生検査実態の比較により、同規模の製造施設であっても危害発生が起こりうる行程に差がみられる実態が明らかとなった。市販の低温殺菌牛乳製品については簡易培地での集落形成数が公定法及び ISO 法よりも低い傾向が示された。

A. 研究目的

我が国を含む殆どの国において、食品の安全確保を目的として、多くの食品種に微生物規格が定められている。規格対象となる食品の多くは、過去に食中毒事例の原因となった食品や、製造工程において微生物制御が困難であることが明らかな食品等であり、国内の食習慣や製造環境等を踏まえて設定されてきた。しかしながら、国内の衛生状況は時代の変遷と共に変化を顕し、昨今では食品の国際流通も増加の一途を辿る等、食を取り巻く環境は変化している。わが国の乳及び乳製品については、昭和 26 年に発令された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」(乳等省令)に基づき、細菌数と大腸菌群が微生物規格に設定され、安全確保が図られているが、現在 EU 等では牛乳の製造工程管理を HACCP ベースで行うと共に、わが国で 2011 年に生食用食肉の微生物規格として採用された、腸内細菌科菌群を衛生指標として製品等の検査が実施されている状況にある。

上述の国内での乳等に対する微生物規格基準は、衛生状況が現在に比べて良好とはいえない戦後の社会的背景から設定されたものと考えられる。同規格は、現時点においても、一定の安全確保に資する内容であることには違いがない一方、国際動向を踏まえた内容

と結論づけるためには、その妥当性を科学的に評価する必要がある。

現在、国内で製造される牛乳の多くは 130 ・ 2 秒程度の超高温瞬間殺菌(UHT)処理によるものであり、国内生産量の約 91.5%を占める一方、欧米では主に製造される 63 ~ 65 ・ 30 分間の低温長時間殺菌(LTLT)牛乳や 72 ~ 75 ・ 15 秒間の高温短時間殺菌(HTST)牛乳は約 8.5%に留まるとの報告もある。こうした牛乳の製造加工に係る国内の事業所数は平成 28 年時点で全国に 524 施設あり、このうち、368 施設では飲用牛乳を主に製造するとされている。UHT 牛乳の製造加工の多くは大手事業者による一方、LTLT 牛乳や HTST 牛乳の多くは一日あたりの処理量が 2 トン未満の中小規模事業者によるとされる。しかしながら、UHT 牛乳以外の牛乳について、製造工程における衛生管理実態等について調査研究が行われた実態は見当たらない状況であった。

以上の背景を踏まえ、平成 30 年度は、諸外国における低温殺菌牛乳等の乳及び乳製品に起因する健康被害実態及び製品汚染実態を調査すると共に、海外における乳製造の衛生管理実態の把握、国内で製造流通する低温殺菌牛乳製品等を対象とした製造工程管理実態の把握、市販製品の微生物汚染実態を衛生指標菌試験(公定法)並びに簡易培地(以下、簡易法)を用いた検討を行うことで評価することを、本研究の目的

とした。更に、後者の製品に対する適用の妥当性について考察を行ったので報告する。

B. 研究方法

1) 乳及び乳製品の衛生管理に関する国際動向に関する研究

学術論文等や米国および欧州の回収・汚染情報データベース等に報告されている、これまでに報告された海外および国内における乳に起因する健康被害事例報告や、製造基準違反等に伴う乳の回収・汚染に関する事例に関する情報収集を行った。デンマークの食品衛生を担当する行政機関、乳製品の指導等を行う業界団体、低温殺菌牛乳工場を視察し、製品・製造施設の衛生実態、製造基準、検査法、サンプリングプラン等に関する情報収集を行った。

2) 国内製品・中規模及び大規模製造施設の衛生実態把握

LTLT牛乳およびHTST牛乳を製造する中規模事業施設A(以下、中規模施設A)並びにUHT牛乳を製造する大手事業施設B(以下、大規模施設B)の研究協力を得て、各施設での対象製品の製造工程フロー図、並びに牛乳製造量、製品仕様書等の情報提供を依頼し、承諾を得た。中規模施設Aでは、原乳、最終製品のほか、拭き取り検体(充填機内外のモンドレル、充填ノズル、マガジンラック、充填部、及び充填機周辺の床・壁、加熱殺菌機周辺の床・壁)を採材した。大規模施設Bでは原乳、殺菌前乳、殺菌後乳、殺菌後貯乳、最終製品、並びに拭き取り検体(加熱殺菌機出口、充填機周辺の床および昇降台、冷却プレート出口)を採材した。衛生指標菌の検出にあたっては、国際標準試験法であるISO法(細菌数、ISO 4833-1:2013;腸内細菌科菌群、ISO 21528-2:2004;大腸菌群、ISO 4832:2006;大腸菌、ISO 16649-2:2001;黄色ブドウ球菌、ISO 6888-1:1999)と共に、第三者認証機関によりISO法との同等性が確認されている迅速簡易検査製品を用いた。一部検体はDNAを抽出し、細菌叢解析を実施した。

3) 国内小規模製造施設の衛生実態把握

北海道内で低温殺菌牛乳を製造・販売する3小規模事業者について調査を実施した。各施設について、製造規模を含めた施設概要、製造工程、各施設で実施される自主検査項目について、施設見学および聞き取り調査を実施し、製造工程管理実態および衛生管理実態を取りまとめた。小規模施設A及びCより生乳及び低温殺菌牛乳を入手し、腸内細菌科菌群数、生菌数、大腸菌群数、大腸菌数について、培養法と簡易培地を用いた検査を実施した。

4) 諸外国における低温殺菌牛乳等の微生物規格の調査

EU、米国及びオーストラリアにおける低温殺菌牛乳及び生乳の微生物規格をインターネット検索により調査した。

5) 低温殺菌牛乳等に対する簡易培地使用の妥当性及び衛生指標菌汚染実態に関する研究

市販の低温殺菌牛乳等について、衛生指標菌汚染実態を調査した。調査は平成30年7月から平成31年3月まで行い、検体はLTLT乳53検体、HTST乳19検体、HTLT乳16検体の合計88検体を用いた。試験項目は、細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌とした。試験方法は、細菌数については乳等省令の試験法及びISO 4833-1:2013を、腸内細菌科菌群は定性法としてISO 21528-1:2017を、定量法としてISO 21528-2:2017を用いた。大腸菌群については乳等省令の試験法を用いた。黄色ブドウ球菌については通知法を、大腸菌については公定法及びISO 16649-2:2001を用いた。また、各試験項目の代替法として、国際的な第三者認証を取得し、国内で市販されている代表的な簡易培地を用いた。簡易培地で検出された細菌の菌種の同定は、16S rDNA塩基配列解析により行った。黄色ブドウ球菌検出用簡易培地上に形成された非定型集落の同定には、MALDI BioTyper (Bruker)を用いた。

C. 研究結果

1) 乳及び乳製品の衛生管理に関する国際動向に関する研究

PubMed データベースに報告されていた学術論文のうち殺菌乳との関連が確認された食中毒アウトブレイク事例の報告は 14 件であった。報告されているアウトブレイク発生年は 1937～2016 年に発生したものであった。2000 年以降発生事例としては 5 件のみであり、いずれも乳の殺菌作業後に環境等からの汚染がおきている事例であった。殺菌乳の喫飲に起因する食中毒アウトブレイクは 2017 年以降に発生したものは確認できなかった。近年報告されているアウトブレイク事例のほとんどは未殺菌乳の喫飲に起因するものであった。

米国 FDA 回収情報データベースには殺菌乳の微生物汚染による回収情報は報告されていなかった。RASFF データベースに報告されている殺菌乳 (Pasteurized milk もしくは UHT milk) の回収情報事例は 12 件のみであった (2004～2018 年、窪田分担報告書表 1)。そのうち、実際に健康被害が報告された事例は 2018 年 11 月にスロバキア産殺菌乳に起因してハンガリーとスロバキアでアウトブレイクが発生した 1 例のみであった。

現地査察で得られた情報で、デンマークにおける殺菌乳の衛生基準は基本的に EU 規則に沿ったものであり、腸内細菌科菌群について $n=5$, $c=0$, $m<10\text{cfu/ml}$, $M<10\text{cfu/ml}$ としていた (窪田分担報告書資料 1、項目 2.2.1)。

デンマーク農業食品評議会は同会発行しているガイダンスで乳および乳製品に関してリスクが大きいものを記述しており、乳に関してはセレウス菌やカンピロバクターを指定して指導している (窪田分担報告書資料 2)。

実際の検査法等に関しては EU の基準をもとに、各社が自主基準を設け、DVFA や DFAC といった指導機関や業界団体等が HACCP プランをはじめとする指導や定期的な監査を行うことで問題を検知し改善するシステムとなっていた (窪田分担報告書資料 3)。

原乳の出荷時の検査は出荷元の各農場が責任を負っており、原乳受け入れ時の検査、乳製品の出荷時の検査等は製造業者がより厳しい基準に従っていた (窪田分担報告書資料 4)。原乳はデンマークの国内基準では 2 日毎に乳生産農家から収集する場合には

6 以下での保存、毎日収集する場合には 8 以下での保存が求められているが、デンマークの乳製品業界の自主基準ではそれぞれさらに 2 低い保存温度で管理を行っていた。原乳受け入れ時には性状 (官能検査) と温度 (10 以下) を確認し、受領後 6 以下での保存を行なっている。最終製品の官能検査は製造直後および製品の賞味期限日に行なっている。乳製品業界では殺菌前の生菌数が $300,000\text{cfu/g}$ 以下となるよう管理している (窪田分担報告書資料 3) 各種検査には Moving Window を用いた継続した検査を行なっている。検査法は基本的に ISO 法に従っている (窪田分担報告書資料 5) 各社では迅速検査法等も使い、より厳しい基準の検査を行なっていた。

これらの検査の実態把握や操業開始時の HACCP プランを始めとする衛生管理指導を担当している DFAC (SEGES) は、操業開始時とその後 3 年に 1 度、衛生管理等に問題がないかの検査を行なっている。

牛乳の殺菌条件はデンマーク規格基準では 72 15 秒であるが、視察を行なった会社では自社基準である 74 15 秒で行なっている。加熱殺菌部の消毒は 90 45 分で行い、加熱できない容器充填部の機材は塩素により行なっているとのことである。消毒が効果的に行われたことの確認は、次回生産初期ロットの製品検査により行なっているとのことである。また、製品の加速試験も行なっており、17 24 時間負荷後の 21 培養菌数、17 24 時間負荷後の大腸菌数等を計測している。

上述した EU 規則で実施が要求されている殺菌乳の衛生基準 (腸内細菌科菌群について $n=5$, $c=0$, $m<10\text{cfu/ml}$, $M<10\text{cfu/ml}$ 、窪田分担研究報告書資料 1、項目 2.2.1) にもとづく乳の最終製品における腸内細菌科菌群の検査は 1 年に 4 回おこなっており、検査は製品の賞味期限日に行なっていた。

2) 国内製品・中規模及び大規模製造施設の衛生実態把握

2) -1. 中規模及び大規模施設での牛乳製造に係る情報の整理 (朝倉・中山分担報告書図 1,2)

中規模施設 A での年間製造量は 2017 年度実績で LTLT 乳が約 2,150t、HTST 乳が 1,990t であった。原

乳輸送には容量 10t のローリー車 2 台を用い、搾乳後 1 時間以内に集乳し 5 以下で輸送を行っていた。また、原乳の品質に基づいて、農場単位で LTLT 乳または HTST 乳のいずれの原料として用いるかを決定しており、そのために原乳検査に法令で定められる内容に上乘せをした自主検査を行い、記録を経時的に保存していた。視察及びサンプリングを行う際に対象とした製品は 72・15 秒加熱殺菌をした HTST 牛乳及び 63・30 分加熱殺菌をした LTLT 牛乳であった。何れも 1L 容量の紙パック製品であり、加熱殺菌についてはプレート方式の連続式加熱殺菌器を用いていた。

一方、大規模施設 B は 90 年代初頭に HACCP 体制を確立しており、ISO22000 等も取得していた。同施設では日平均約 121t の原乳を近郊の農場を中心に全国から 3 以下の輸送温度条件を付して受け入れ、複数種の UHT 牛乳製品を製造していた。施設内には 100t のジャイロタンクを 8 台設置・運用し、同タンク内で受け入れた原乳を計画的に合乳としていた。現有の受入検査項目は乳等省令に定められた内容であり、総菌数はブリード法で 4 万/mL との自主管理規定を設けていた。また、同日に連続製造される単一製品を 1 ロットと定義していた。

約 1 日の一次貯乳の後、クラリファイヤー、ホモゲナイザーを経た原乳は 130・2 秒の加熱殺菌処理に供され、殺菌後貯乳タンク内で一時的に 5 以下の温度条件で貯乳されていた。充填室は HEPA フィルターを付した陽圧管理・自然排気環境にあり、充填機内では H₂O₂ 噴霧と UV 照射により殺菌された容器へ自動充填されていた。これらの製造ラインの管理要件は何れも衛生管理計画が立てられた上で、中央監視システムにより自動制御されていた。

2)-2. 中規模施設 A における原乳、製品、及び施設ふき取り検体からの衛生指標菌の検出状況（朝倉・中山分担報告書図 3~5、表 1）

原乳中の一般細菌数は ISO 法では $1.2 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^3$ CFU/mL であり、簡易迅速法では製品 A が $1.6 \times 10^3 \sim 4.3 \times 10^3$ CFU/mL、製品 B が $1.1 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^3$ CFU/mL、製品 C が $8.6 \times 10^2 \sim 2.3 \times 10^3$ CFU/mL であった。同検体での腸内

細菌科菌群、大腸菌群の数値は ISO 法でそれぞれ 9~33CFU/mL、24~51CFU/mL の範囲にあり、簡易迅速法の成績もこれに準ずるものであった。大腸菌は 3/8（37.5%）の確率で認められたが、同値は最大 2CFU/mL に留まっていた。黄色ブドウ球菌は 15~101CFU/mL の範囲で検出された（朝倉・中山分担報告書図 3）。

出荷前製品については、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌はいずれも陰性であり、一般細菌のみ $< 1 \sim 1.3 \times 10^2$ CFU/mL（平均値は HTST 製品で 1.2×10^2 CFU/mL、LTLT 製品で 2.5×10^1 CFU/mL）の範囲で検出された。一方、簡易迅速法による一般生菌数の検出数値は検出用製品の別によらず、ISO 法による成績に比べ、低い成績を示した（朝倉・中山分担報告書図 4）。

拭き取り検体のうち、充填機周辺の壁、殺菌機周辺の床・壁、充填機内部（充填部、マンドレル、マガジンラック）は製品 C のマガジンラックを除き、一般細菌は検出されなかった。一方、充填ノズルからは、方法に拠らず一般細菌を認めた。腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌はいずれも陰性であった（朝倉・中山分担報告書図 5、同表 1）。

2)-3. 大規模施設 B における原乳、製品、及び施設ふき取り検体からの衛生指標菌の検出状況

原乳及び製品検体については、視察時に同一ロット検体の確保が困難であったため、施設事業者により、後日異なる工程で同一ロット検体を採材いただき、冷蔵温度帯で 1 昼夜かけて輸送されたものを検体として衛生試験に供した。結果として、受入時の原乳及び殺菌前バランスタンク原乳検体については、一般細菌数が $3.3 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^7$ CFU/mL、腸内細菌科菌群が $4.4 \times 10^1 \sim 1.2 \times 10^3$ CFU/mL、大腸菌群が $1.9 \times 10^2 \sim 1.6 \times 10^3$ CFU/mL、大腸菌が $3.0 \times 10^1 \sim 1.2 \times 10^2$ CFU/mL、黄色ブドウ球菌が $1.9 \times 10^3 \sim 4.1 \times 10^3$ CFU/mL の範囲で検出された。殺菌後貯乳及び製品については全ての指標菌が陰性の結果となった。

施設環境拭き取り箇所としては、洗浄後の加熱殺菌器出口、冷却プレート出口のほか、稼働中の充填室内で

充填機周囲の外部床と昇降台を検体とした。結果として、洗浄後の加熱殺菌器出口、冷却プレート出口、及び充填室内の昇降台については全ての指標菌が陰性となり、充填室の床についても、一般細菌のみが40CFU/100cm²検出されるに留まった。

2)-4. 製造工程を通じた構成菌叢の比較解析(朝倉・中山分担報告書図6)

中規模施設Aでは生菌・死菌の別を問わず、各検体由来DNAを鋳型として16S rRNA解析に供した。HTST牛乳の原料である原乳S6は、LTLT牛乳原料である原乳S5に比べ、*Pseudomonas*属の占有率が相対的に高い状況にあった。

製造施設環境からは、*Bradyrhizobium*属、*Sphingomonas*属、*Brevundimonas*属、*Tumebacillus*属、*Methylobacterium*属等が優勢菌群として検出された。

HTST牛乳製品検体では*Serratia*属や*Pseudomonas*属、*Streptococcus*属等が優勢構成菌叢として認められた一方、LTLT牛乳製品検体では、施設環境でも高い占有率をもって認められた*Bradyrhizobium*属や*Sphingomonas*属、*Tumebacillus*属等が優勢構成菌叢として認められた。

大規模施設B由来検体については、生菌由来16S rRNA配列を選択的に対象とするため、EMA処理後にDNA抽出を行い、16S rRNA解析に供した。結果として、多くの一般細菌数を認めた原乳・殺菌前貯乳検体では、*Pseudomonas*属等の低温細菌が優勢である状況が確認された。

3) 国内小規模製造施設の衛生実態把握

3)-1. 施設概要の比較

小規模施設の調査においては、従業員数3~5名の事業者を調査対象とした(山崎分担報告書表1)。対象とした3つの事業者間で製造規模に大きな差は無いものの、小規模施設AはFSSC 22000及び北海道HACCP自主衛生管理認証制度の認証を受けていた一方で、小規模施設BおよびCは衛生管理過程に関する定期的な第三者評価を受けていない施設であった。

各施設に共通する項目として、原乳受入元(自社牧

場)乳の殺菌条件(65℃,30分)が挙げられた。一方で、原乳の受入方法、包装形態、賞味期限、製品記載の保存方法、販売先の広域性に差が観られ、これらの項目に基づいた事業者毎に適した製造工程管理および製品管理の必要性が抽出された。

3)-2. 製造工程の比較

各施設の製造フローチャートを山崎分担報告書図1に示した。生乳の受入工程においては、小規模施設Aではミルクローリーから専用パイプを用いて閉鎖系で受入がなされていたのに対して、小規模施設Bでは専用バケツで受入れた生乳をホールディングタンクへ開放系で投入しており、また小規模施設Cにおいても専用ポリタンクで受入れた生乳を受入槽へ開放系で投入していた。加えて、容器包装形態が異なるために、小規模施設Aと小規模施設B、Cの間で充填工程に差が観られた。これらの結果から施設毎に生物的危害要因混入の可能性が考えられる工程に差があることが明らかとなり、同種の事業者であっても、HACCP導入を含めた適切な工程管理において個別の製造工程を勘案する必要性が示された。一方で、いずれの施設においても殺菌工程以降では充填工程を除き、中間製品の閉鎖性が維持されており、殺菌条件の遵守及び充填工程の施設環境管理が微生物汚染防止に重要な工程であることが確認された。

3)-3. 検査体制および検査項目の比較

各施設における自主検査実施状況を山崎分担報告書表2に示した。小規模施設Aは事業所内に製造部門とは独立した検査部門を持つ施設である一方で、小規模施設B及びCでは独立した検査部門を持たず製造業務を行う職員が検査業務を兼務していた。また、小規模施設B及びCにおいては特に、製造施設で実施可能な検査項目が限られており、乳等省令で成分規格として定められている項目を含めた多くの検査項目を外部委託検査に頼っている現状が明らかとなった。

すべての施設では自主検査として何らかの簡易検査法を用いている実態が確認されたことから、小規模製造施設における簡易検査法の有用性が示唆された。しかしながら、簡易検査法の使用法については、必ずしも十分な教育を受けて実施されているものとは限らないことが明らかとなり、検査精度の確保にあつ

て、適切な適用箇所や試験方法の明示を行う必要性が示された。

3) -4. 簡易検査法の有効性の検討

小規模施設における調査から、同施設において大規模製造施設とは異なった製造工程管理および衛生管理がなされている実態が明らかとなった。小規模施設においては特に、簡易検査法の利用無しでの衛生管理は現実的ではなく、国際的な動向を踏まえた乳製品の衛生管理の導入においても簡易検査法利用の有効性の検討が必要である事が示唆された。そこで、簡易検査法の有用性の検証および実効性のある衛生指標菌の選択に資する科学的知見の収集を目的として、小規模施設で製造された製品および原材料乳を入手し、EU で乳の成分規格として利用されている腸内細菌科菌群数について培養法と簡易検査法を用いた検査を実施した。また一方で、国内で成分規格が設定されている生菌数と大腸菌群、加えて大腸菌についての検査を実施し、これらの結果の比較解析を行った。培養法については ISO 規格内で示されている方法を採用し、簡易検査法については可能な限り複数の製品を利用した。

EU においては低温殺菌牛乳の成分規格として腸内細菌科菌群数で 10 cfu/mL 未満以下であることが求められている。国内小規模製造施設で製造された低温殺菌牛乳に対する腸内細菌科菌群の検査においては、ISO 法及び簡易検査法のいずれにおいても検出限界以下となった(山崎分担報告書図 2A,B)。生乳については ISO 法-簡易法間で比較的良好な相関がみられ生乳の衛生状態モニタリングにおける簡易検査法の有用性が示された(山崎分担報告書図 2C,D)。

生菌数の検査では、低温殺菌牛乳に対する検査において試料によっては ISO 法に比較して簡易検査法において低い値となる傾向が観られたことから、低温殺菌牛乳の生菌数検査に簡易検査法を導入する際には慎重な検討が必要であることが明らかとなった(山崎分担報告書図 3A)。一方で、生乳の検査においては ISO 法-簡易法間で同等の結果が得られた(山崎分担報告書図 3C,D)。

大腸菌群数の検査では、低温殺菌牛乳に対する検査において ISO 法及び簡易検査法のいずれにおいても

検出限界以下となり(山崎分担報告書図 4A,B)。また生乳の検査においても ISO 法-簡易法間で同等の結果が得られ(山崎分担報告書図 4C,D)。簡易検査法の有用性が確認された。

大腸菌数の検査では、低温殺菌牛乳に対する検査において ISO 法及び簡易検査法のいずれにおいても検出限界以下であった(山崎分担報告書図 5A,B)。一方で、生乳に対する検査では ISO 法-簡易検査法間で小規模施設 A では比較的良好な相関が得られたものの、小規模施設 C では簡易法 2 でのみ陽性の結果が得られており(山崎分担報告書図 5C,D)。各施設において簡易検査法を選択する際には施設毎に乳の特性を考慮した慎重な検討が必要であることが示唆された。

4) 諸外国における低温殺菌牛乳等の微生物規格

岡田・鈴木分担報告書表 1 に諸外国における低温殺菌牛乳等の微生物規格を示した。また、参考として ICMSF により設定された低温殺菌牛乳の微生物規格についても示した。EU では低温殺菌牛乳について、製造工程の最終時の微生物規格として腸内細菌科菌群を 10CFU/mL 未満と定めており、1 ロットについて 5 検体試験し、全検体合格でなくてはならない、としていた。一方米国では、生菌数を 2.0×10^4 CFU/mL 以下とし、大腸菌群については 10CFU/mL(バルク出荷時は 100 CFU/mL)以下としていた。規格適用箇所については規定されていなかった。Codex や FAO/WHO に科学的助言をおこなっている ICMSF は、製造終了時の微生物規格として腸内細菌科菌群を対象とした 3 階級のサンプリングプランを設定しており、1 ロットについて 5 検体試験し、その内 2 検体までは 5CFU/mL であっても当該ロットを合格とする(3 検体は 1 CFU/mL 未満でなくてはならない)としていた。英国及びオーストラリアでは飲用の生乳(未殺菌乳)に微生物規格を設定しており、英国では農場での生菌数を 2.0×10^4 CFU/mL、大腸菌群を 100CFU/mL としていた。オーストラリアでは製造、加工、販売時の微生物規格としてカンピロバクター、大腸菌群、大腸菌、サルモネラ属菌及び生菌数をサンプリングプランに基づき設定していた。

5) 低温殺菌牛乳等の汚染実態調査

今回の調査結果概要を岡田・鈴木分担報告書表 2 に示した。公定法での細菌数(32 48 時間培養)は、LTLT 乳 53 検体で平均 1.49 logCFU/mL(検出限界以下~4.07 logCFU/mL)、HTST 乳 19 検体で平均 1.31 logCFU/mL(検出限界以下~3.36 logCFU/mL)、HTLT 乳 16 検体で平均 0.29 logCFU/mL(検出限界以下~1.32 logCFU/mL)であった。一方、公定法と同一の培養条件(32 48 時間)で簡易培地を用いた際と同菌数は LTLT 乳で平均 1.03 logCFU/mL(検出限界以下~4.27 logCFU/mL)、HTST 乳で平均 0.97 logCFU/mL(検出限界以下~3.40 logCFU/mL)、HTLT 乳で平均 0.28 logCFU/mL(検出限界以下~1.38 logCFU/mL)であった。また、ISO 法による細菌数(30 72 時間培養)は、LTLT 乳で平均 2.06 logCFU/mL(検出限界以下~4.34 logCFU/mL)、HTST 乳で平均 1.66 logCFU/mL(検出限界以下~3.61 logCFU/mL)、HTLT 乳で平均 0.75 logCFU/mL(検出限界以下~2.08 logCFU/mL)であった。ISO 法と同一の培養条件で簡易培地を用いた際と同菌数は、LTLT 乳で平均 1.90 logCFU/mL(検出限界以下~4.70 logCFU/mL)、HTST 乳で平均 1.23 logCFU/mL(検出限界以下~3.62 logCFU/mL)、HTLT 乳で平均 0.54 logCFU/mL(検出限界以下~1.58 logCFU/mL)であった。

細菌数における試験法間での有意差検定を通じ、公定法と簡易培地の間では、LTLT 乳と HTST 乳では有意差を示したが、HTLT 乳では有意差は見られなかった(岡田・鈴木分担報告書表 2)。また、両者の相関を寄与率で算出したところ、LTLT 乳で 0.0614(岡田・鈴木分担報告書図 1)、HTST 乳で 0.7169(同図 4)、HTLT 乳で 0.186(同図 7)であった。公定法と ISO 法の間では、LTLT 乳、HTST 乳及び HTLT 乳のいずれも有意差を示し(同表 2)、寄与率は LTLT 乳で 0.5177(同図 2)、HTST 乳で 0.7863(同図 5)、HTLT 乳で 0.1306(同図 8)であった。一方、ISO 法と簡易法の間では、HTST 乳では有意差を示したが、LTLT 乳と HTLT 乳では差は見られず(同表 2)、寄与率は、LTLT 乳で 0.6093

(同図 3)、HTST 乳で 0.6598(同図 6)、HTLT 乳で 0.7197(同図 9)であった。一部の温度逸脱等により参考値として集計した検体においても、LTLT 乳における寄与率は、公定法と ISO 法及び ISO 法と簡易法の間で高く、公定法と簡易法の間で低い傾向を示した(同図 10、11 及び 12)。今回試験した検体からは、いずれの試験法においても、黄色ブドウ球菌及び大腸菌は検出されなかった。一方大腸菌群は、LTLT 乳 1 検体より検出された。

低温殺菌牛乳等の細菌数試験においては、簡易培地上でしばしば拡大集落が形成され、菌数の測定が困難になる場合が見られた。また、簡易培地上では微小集落や遅延増殖を示す集落も認められ、所定の培養時間内では正確な菌数測定が困難になる例も見られた。これらの代表的集落について、16S rDNA 塩基配列解析に基づく菌種同定を行ったところ、拡大集落の多くは *Bacillus* 属と同定された(岡田・鈴木分担報告書表 3)。一方、増殖遅延集落や微小集落には *Paenibacillus* 属、*Kocuria* 属、*Microbacterium* 属が含まれていた。また、黄色ブドウ球菌用簡易培地上に発育した非定型集落は、*Bacillus cereus*、*B. clausii*、*Paenibacillus amylolyticus* 等であった。

D. 考察

諸外国における事例調査の結果から、殺菌乳の健康被害事例に関して近年の発生報告が少ないことは、殺菌乳の製造における HACCP プランや殺菌法や検査法、施設の衛生管理が効果をあげていることを示唆している。未殺菌乳の喫飲に起因するアウトブレイク事例は、各国で数多く報告されている。規格基準に関しては、デンマークの国内基準は EU 規則に沿って設定されていた。また微生物検査や温度管理等は各社でデンマーク国内基準より厳しい基準を自主的に設定して衛生管理を行っていた。

視察したデンマークの乳・乳製品製造工場では、EU 規則で要求されている乳の最終製品における腸内細菌科菌群の検査は 1 年に 4 回で、製品の賞味期限日に行なっている。これが他の EU 諸国においても一般的な検査頻度なのか、また衛生対策等が同様のものであるかの検討が必要である。

中及び大規模乳製造施設における調査を行ったところ、両施設は自主管理基準を設け、衛生確保に向けた管理体制を構築・運用していた。特に、中規模施設では原乳受け入れ時に大腸菌群検査も実施し、検査結果を基に、良好な衛生状況の原乳を提供する生産農場を区別化し、無菌化を図ることが困難である LTLT 牛乳の原料として用いる等、フードチェーンを通じた安全確保に向けた活動方針を立てていたことは興味深い対策と感じた。当中規模施設の施設設備は概ね大手施設と同等であり、原乳受け入れ後から殺菌後貯乳までの工程は閉鎖ラインで自動管理される状況であった。一方で、同施設では一時的に開放ラインを含む充填工程も加熱殺菌工程等と同一室内で行われていた。そのため、充填工程周辺の施設環境拭き取り検査を実施したところ、充填機ノズルから少数の一般細菌が検出される状況を確認した。検出された一般細菌は、*Bradyrhizobium* 属菌が主体であることが明らかとなり、更に同菌属は製品からも少数ではあるが検出されたことから、同工程の更なる洗浄・消毒の徹底を図ることが、同施設における更なる安全性確保に向けた対策と目される知見を得た。同菌属は非病原菌であることから、本検出成績をもって当該製品が健康危害を招きうる状況にはないと考えられ、直ちに改善措置を図る必然性は低い状況にはあるが、腐敗変敗等を介した消費期限設定等への影響は否定できる状況にはないため、今後対策とその効果の検証について事業者との間で更なる連携を図り、課題の解決を図る必要があると思われる。

更に、ISO 法と迅速簡易法であるフィルム培養法との間の相関性に関する検討を通じ、原乳や施設環境を対象とした場合には良好な相関性が得られた一方、製品を対象とした試験において、フィルム培養法の適用は困難と思われる結果を得た。後者の検査法は簡便かつ迅速な結果判定を行える利点を有するが、その適用範囲の設定には検証を行った上で設定する必要があることを示唆するものであり、今後、より多種多様な施設での比較検証を進めることで、適用箇所の設定が可能となるものと思われる。

今回調査した大規模施設では、工程別の施設環境の区分化と中央監視システムによる各管理要件のモニ

タリングが徹底されていたほか、使用・洗浄後の施設環境拭き取り検査結果は、使用後の CIP 洗浄が有効に機能している実態を示すものと考えられた。また、原乳中の指標菌のうち、特に一般細菌数で上記中規模施設に比べ高い傾向を認めたと、同施設由来の原乳、中間・最終製品は何れも大規模施設で同一ロットを確保する意義から最大 48 時間保存した後、更に一日かけて冷蔵輸送されてから試験に供したため、この間に低温細菌の増殖を招いた可能性が考えられた。実際に、構成菌叢解析を通じ、原乳及び殺菌前貯乳検体では低温細菌に位置付けられる *Pseudomonas* 属等が高い占有率をもって検出された。また、同施設で原乳受け入れ時に行われる総菌数の検査結果を別途確認したところ、約 1 か月間の検査結果は何れも 4 万/mL 以下であったことを踏まえると、本調査用に同一ロットを確保することを最優先事項としたための保存・輸送時間の延長が加熱殺菌前の原乳の一般細菌数拡大につながったと想定される。なお、加熱殺菌処理後の検体及び最終製品については全ての衛生指標菌が陰性であり、UHT 処理は低温細菌を含めた細菌の幅広い制御に資するものであることが改めて検証されたといえる。以上より、今年度研究では主に中小規模事業者等により製造される LTLT/HTST 牛乳の製造工程に係る衛生管理実態を微生物学的観点から調査し、改善に向けた対策要点を提唱することができた。また、試験方法の適用箇所等についても今後の課題を見出すことができたと考えられる。

小規模施設の調査からは、今回の調査対象施設間では製造規模に大きな差が無いものの、施設毎に生乳及び製品の検査項目や手法に差異が確認された。本調査で対象としたすべての施設で自社牧場にて搾乳した生乳を原材料としており、このため搾乳牛の飼養管理を含めた品質管理が可能となっていた。一方で、低温殺菌牛乳製造施設内で実施可能な衛生検査については、大規模施設に比較して限られた項目となっており、また、公定法が指定する培養法による衛生検査が現実的には実施不可能な施設も多く存在する実態が明らかとなり、これらの小規模施設の状況を勘案した衛生試験法提示の必要性が示された。加えて、これらの小規模施設においては、衛生検査に精通していない作業

者により検査が実施されている実態も明らかとなり、簡易法を含めた標準試験法の導入において、試験方法の整備に加え、その適切な運用方法の提示の重要性が明らかとなった。

乳製造施設における簡易検査法の有用性に関する検討においては、多くの項目で生乳の衛生状況モニタリングにおける簡易法の有用性が確認された一方で、一部の検査においては ISO 法-簡易検査法間ならびに簡易検査法間で結果に差がみられ、施設ごとに生乳の性質を勘案した最適な簡易検査法選択の必要性が示唆された。小規模製造施設において衛生検査に精通していない作業者が検査を実施している現状を踏まえると、小規模施設において簡易検査法を導入する際には専門家による支援を含めた慎重な検討の必要性も示唆される。加えて、低温殺菌牛乳の生菌数検査においては培養法に比較して簡易検査法で低い値が出る傾向がみられた。生菌数検査においては ISO 法と簡易検査法の間で培養条件 (ISO 法では 30 で 72 時間、簡易検査法では 32 もしくは 35 で 48 時間) が異なっており、この事が原因で両者の結果に差が出ている可能性が考えられた。我々は培養時間を変更した追加実験において、培養条件の調整により簡易検査法によっては培養法と同等の結果を得る事も可能であることを明らかにしている。以上の結果は、低温殺菌牛乳検査における国際的な動向を踏まえた衛生管理法の導入において、簡易検査法の使用法の提示について慎重な検討の必要性を示すものと考えられる。

市販低温殺菌牛乳等を用いた今年度研究により、LTLT 乳において混釈培養による公定法と簡易培地 (32 48 時間培養) での集落形成に有意な差があることが示された。一方、培養時間の長い ISO 法と簡易法 (30 72 時間培養) では有意差はみられなかったことから、低温殺菌工程による半致死的な加熱損傷が、簡易培地での集落形成性を低下させ、増殖の遅延を引き起こしている可能性が示唆された。また、両者の寄与率についても、HTST 乳でも同様の傾向が見られた。一方 HTLT 乳は低温殺菌牛乳の中でも殺菌温度が高く、殺菌時間が長いため、牛乳中の残存菌数が LTLT 乳及び HTST 乳よりも低いことから、公定法及び ISO 法と簡易法の間での差が見られなかった。簡易培地は

公定法に比べ、最終判定までの所要日数が短く、細菌数の試験では検出感度も高いことから、食品の微生物試験における有用性は高いと思われるが、製品の特性上、加熱損傷菌が多く含まれ、また、製品中への *Bacillus* 属等の耐熱性菌の残存がおりうる低温殺菌牛乳等に関しては基準適合性試験よりも製造工程管理への使用が適していると思われた。

今回の試験により、市販の低温殺菌牛乳は概ね良好な衛生状態にあることが示された。また、市販製品の細菌汚染状況について簡易培地を用いた検討では、今回実施した全ての機関において、簡易培地における細菌数が混釈培養を用いる公定法よりも低い傾向を示した。原乳を用いた調査では、簡易培地と混釈培養法での細菌数に大きな違いが見られなかったため、加熱殺菌済みの製品に含まれる細菌が加熱損傷を受けているために、簡易培地での集落形成性が落ちている可能性が考えられた。一方、原乳及び製造環境のふき取り検体では混釈培養法と簡易培地に差は見られなかったことから、原乳受入れ時の検査及び製造工程管理への適用は問題ないことが示された。簡易培地は公定法に比べ、最終判定までの所要日数が短いものが多く、食品の微生物試験における有用性は高いと思われるが、簡易培地の適用には、製品の特性に合わせた導入時検証が必要であると思われた。次年度は他種の乳製品を用いた簡易培地の検証を実施する予定である。

E. 結論

殺菌乳に起因する食中毒アウトブレイクの発生件数は世界的に少ないことが確認された。乳に関連して起きている食中毒アウトブレイクは多くが未殺菌乳によるものであることが示唆された。同様に殺菌乳の微生物汚染も多くは発生していないことが確認された。

デンマークでは HACCP にもとづき、乳製造工場における衛生管理が適切に行われており、自社や業界団体、行政機関による指導も効果的に行われていることが確認された。EU 加盟国であることから EU 規則にもとづいた国内基準を設定しているが、さらにそれを上回る自社基準を設定してより安全性を担保している。検査法や検査の頻度に関しても EU 規則を遵守し、

ISO 法や迅速検査法を活用しつつ、その頻度に関しては腸内細菌科菌群の検査が1年に4回という現実的な頻度でそれに対応していることが明らかとなった。

中規模のLTLT/HTST牛乳製造施設では、大規模のUHT牛乳製造施設と同等の製造施設設備を用いていたが、充填工程は前工程との明確な施設区分化がなされておらず、充填機ノズル及び製品からは非病原菌が検出されたことから、同工程環境から製品への細菌混入を招きうる実態が明らかとなった。

小規模低温殺菌牛乳製造施設の調査から、小規模施設内で実施可能な衛生検査が非常に限られたものであり、衛生検査の多くを外部検査機関への受託検査に頼っている現状が明らかになった。

小規模製造施設においては特に、簡易検査法が担う役割の重要性が明らかになった一方で、その運用方法についての問題点も抽出された。加えて、同規模の施設であっても製造工程の差により生物的有害要因混入の危険性が考えられる工程に差がみられたことから、簡易検査法を用いた標準試験法の整備においては、各施設での適切な適用箇所や運用方法の検討を行う必要性も示された

公定法、ISO法及び第三者認証取得済みの簡易培地を用いて、市販の低温殺菌牛乳等を対象とした衛生指標菌調査を行った。供試製品検体の衛生状態は概ね良好であったが、試験法間の成績比較を通じ、簡易培地での集落形成性が公定法よりも低いことが示された。一方、加熱殺菌前の原乳では、簡易培地と公定法の細菌数に大きな差は見られなかったことから、低温殺菌牛乳の製造工程で用いられる低温加熱殺菌では熱損傷菌を生じさせている可能性が示唆された。簡易培地は公定法に比べ、最終判定までの所要日数が短いものが多く、食品及び製造工程の微生物試験における有用性は高いと思われるが、低温殺菌牛乳の最終製品については現状では適用が困難であると思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし