

平成 30 年度厚生労働科学研究（食品の安全確保推進研究事業）
「国際動向を踏まえた乳および乳製品の試験法確立に関する研究」

分担研究課題

「国内製品・製造施設の衛生実態に関する研究」

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
研究協力者	山本 詩織	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	阿部 清孝	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部

研究要旨 国内で製造される牛乳の多くは大手事業者により超高温瞬間殺菌（UHT）処理がなされているが、中小規模事業者では高温短時間殺菌（HTST）または低温長時間殺菌（LTLT）処理を経た牛乳も製造されている。欧米等で製造される加熱殺菌牛乳の多くは後者に該当するため、国内外での牛乳製品の微生物学的品質を主たる流通製品の比較により行える状況にはない。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。本年度の分担研究では、国内で HTST 及び LTLT 牛乳を製造する中規模製造施設 A、並びに UHT 牛乳を製造する大規模施設 B 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。施設 A の製造機器等は施設 B と大きな差異は認められなかったものの、(1)原乳の搾乳から受入、受入から製造開始までの時間が極めて短いこと、(2)生産農場の衛生状況を踏まえ、HTST/LTLT 牛乳への用途を区別化していること、(3)ホモゲナイズ処理がなされていないこと、(4)施設環境の区分化が十分とはいえないこと等が差異のある項目として抽出された。施設 A の原乳については、上記(1)の特徴と相関して、一般細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌の最大値はそれぞれ 2.8×10^3 CFU/mL、 3.3×10^1 CFU/mL、 5.1×10^1 CFU/mL、2 CFU/mL と、施設 B に比べて低い傾向にあった。施設 A の製品では、一般細菌のみ最大 1.3×10^2 CFU/mL の検出を認めるに留まり、事業者の自主検査結果とあわせ、乳等省令で定められる成分規格を十分に満たすことが確認された。一方、充填機内外のふき取り検体のうち、充填機ノズルからは最大で 9 CFU の *Bradyrhizobium* 属菌が検出され、同属菌は製品からも検出されたことから、加熱殺菌後の同工程周辺機器等の洗浄消毒を徹底し、その後検証を行うことが、当該施設における今後の衛生向上に資する改善措置事項として抽出された。

A. 研究目的

国内の牛乳については、「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（乳等省令）」によりいくつかの分類がなされており、このうち、「牛乳」については、生乳（牛から搾ったままの乳）を 63・30 分以上の加熱殺菌を施したものであって、乳脂肪分 3.0% 以上、

無脂乳固形分 8.0% 以上を含み、かつ 1ml あたりの細菌数が 5 万以下、大腸菌群が陰性であること等が成分規格として定められている。厚生労働省が取り纏める食中毒統計資料によると、2009 年 1 月から 2019 年 3 月末日までの期間に届け出がなされた食中毒事例のうち、牛乳を原因とするものは

僅か 1 件であり、当該事例についても未殺菌牛乳を提供することでカンピロバクター食中毒が発生したものであり、上述の乳等省令で定められる加熱殺菌を経て製造された牛乳を原因とする事例の報告は認められていない。

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。

欧米等では牛乳による食品媒介性感染症の発生も散見されるが、それらの多くは、未殺菌牛乳を主体とする、UHT 牛乳以外の牛乳製品であり、国内外の牛乳製品の微生物学的品質を単純に主たる流通製品の比較により行える状況にはない。一方で、国内においても中小事業者を中心として HTST 牛乳や LTLT 牛乳が製造されている実態があるものの、これらの 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。

上記の背景を踏まえ、本年度の分担研究では、HTST 牛乳、LTLT 牛乳または UHT

牛乳を製造する国内乳製造施設の協力を得て、上記製品の製造工程情報を整理した上で、衛生試験を通じた衛生管理実態を検討し、衛生管理に重要となる項目及び危害要因について考察することで、乳の微生物規格の在り方を含めて取り纏めることを目的とした。

B. 研究方法

1. 協力施設での牛乳製造に係る情報収集

LTLT 牛乳および HTST 牛乳を製造する中規模事業施設 A（以下、施設 A）並びに UHT 牛乳を製造する大手事業施設 B（以下、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。

2. 採材

施設 A では、原乳、最終製品のほか、拭き取り検体（充填機内外のマンドレル、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 3M Hydrated sponge（スリーエム）を用いて採材した。全ての採材検体は 4 時間以内に冷蔵温度帯で輸送し、検査に供した。

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。ふき取り検体については冷蔵温度帯で輸送し、3 時間以内に試験に供した。なお、施設 B の原乳、殺菌前後乳、最終製品については同一ロットのものとするため、施設担当者により採材を行い、ロットの確認後に

冷蔵温度帯で一日夜かけて輸送された。

3. 衛生指標菌定量試験

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のうち、国内でも入手が容易である、製品 A（一般生菌、大腸菌・大腸菌群、腸内細菌科菌群、黄色ブドウ球菌）、製品 B（一般生菌、大腸菌・大腸菌群、腸内細菌科菌群、黄色ブドウ球菌）、製品 C（一般生菌、大腸菌・大腸菌群、黄色ブドウ球菌）を用いた。なお、原乳及び牛乳製品の試験にあたっては、原液を試験原液として、必要に応じて希釈列を作成し、試験に供した。

拭き取り検体は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水中を用いて試験懸濁原液を調整した。同原液 1 mL を平板各培地に接種し、ISO 文書または簡易迅速培地製造者が発行する指示書等に準じて、培養を行った（図 7）。

4. 細菌叢解析

施設 A の検体は 1 mL を採取し、PBS で 2 回洗浄後、MaxWell RSC DNA Blood kit（プロメガ）を用いて DNA 抽出を行った。施設 B の検体は 10mL を採取し、PBS により 2 回洗浄後、Ethidium monoazide を主成分とする Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative)（タカラバイオ）を用いた後、DNA 抽出を行った。

抽出 DNA を鋳型として、16S rRNA

799f-1179r オリゴヌクレオチドプライマーを用いた PCR 反応を行い、E-gel SizeSelect 2%（Thermo Fisher）および AMPure XP（Beckman）を用いて増幅産物を精製・定量後、等量混合ライブラリーを作成し、Ion Chef / Ion PGM システム（Thermo Fisher）により増幅産物の塩基配列データを取得した。取得データは CLC Genomic Workbench v.11（キアゲン-CLC）を用いて不要配列を除去後、RDP Classifier pipeline へ投入し、階層化分類等を行った。

C. 研究結果

1. 施設 A・B での牛乳製造に係る情報の整理（図 1,2）

聞き取り調査を通じ、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 との情報を得た。原乳輸送には容量 10t のローリー車 2 台を用い、搾乳後概ね 1 時間以内に集乳し 5 以下で施設 A まで輸送されていた。また、原乳の品質に基づき農場単位で 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。

なお、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 1 L 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。工程フローは、図 1 及び 2 に示す通りである。

一方、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. 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(図 3~5、表 1)

原乳中の一般細菌数は ISO 法では 1.2×10^3 ~ 2.8×10^3 CFU/mL であり、簡易迅速法では A が 1.6×10^3 ~ 4.3×10^3 CFU/mL、製品 B が 1.1×10^3 ~ 1.4×10^3 CFU/mL、製品 C が 8.6×10^2 ~ 2.3×10^3 CFU/mL であった。同検体での腸内細菌科菌群、大腸菌群の数は ISO 法でそれぞれ 9 ~ 33 CFU/mL、24 ~ 51 CFU/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 2 CFU/mL に留まっていた。黄色ブドウ球菌は 15 ~ 101 CFU/mL の範囲で検出された(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 $< 1.3 \times 10^2$ 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(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(図 5、表 1)。

3. 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 3.3×10^6 ~ 2.0×10^7 CFU/mL、腸内細菌科菌群が 4.4×10^1 ~ 1.2×10^3 CFU/mL、大腸菌群が 1.9×10^2 ~ 1.6×10^3 CFU/mL、大腸菌が 3.0×10^1 ~ 1.2×10^2 CFU/mL、黄色ブドウ球菌が 1.9×10^3 ~ 4.1×10^3 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。

4. 製造工程を通じた構成菌叢の比較解析 (図6)

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。

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。

D. 考察

本研究では、中規模の施設 A 及び大規模の施設 B を対象とした衛生管理実態の調査を微生物学的観点から実施した。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、施設 A 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差別化し、加熱殺菌工程により、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。施設 A 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はあった。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同定により、*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。

施設 B 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、特に一般細菌数で施設 A に比べ高い傾向を認めたが、同施設由来の原乳、中間・最終製品は何れも施設 B 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ことが改めて検証されたといえる。

以上、本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。

E. 結論

LTLT/HTST 牛乳製造施設 A では、UHT 牛乳製造施設 B 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。また、試験法として、簡易迅速法（フィルム培養法）の適用範囲を明示するためには今後更なる検証が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

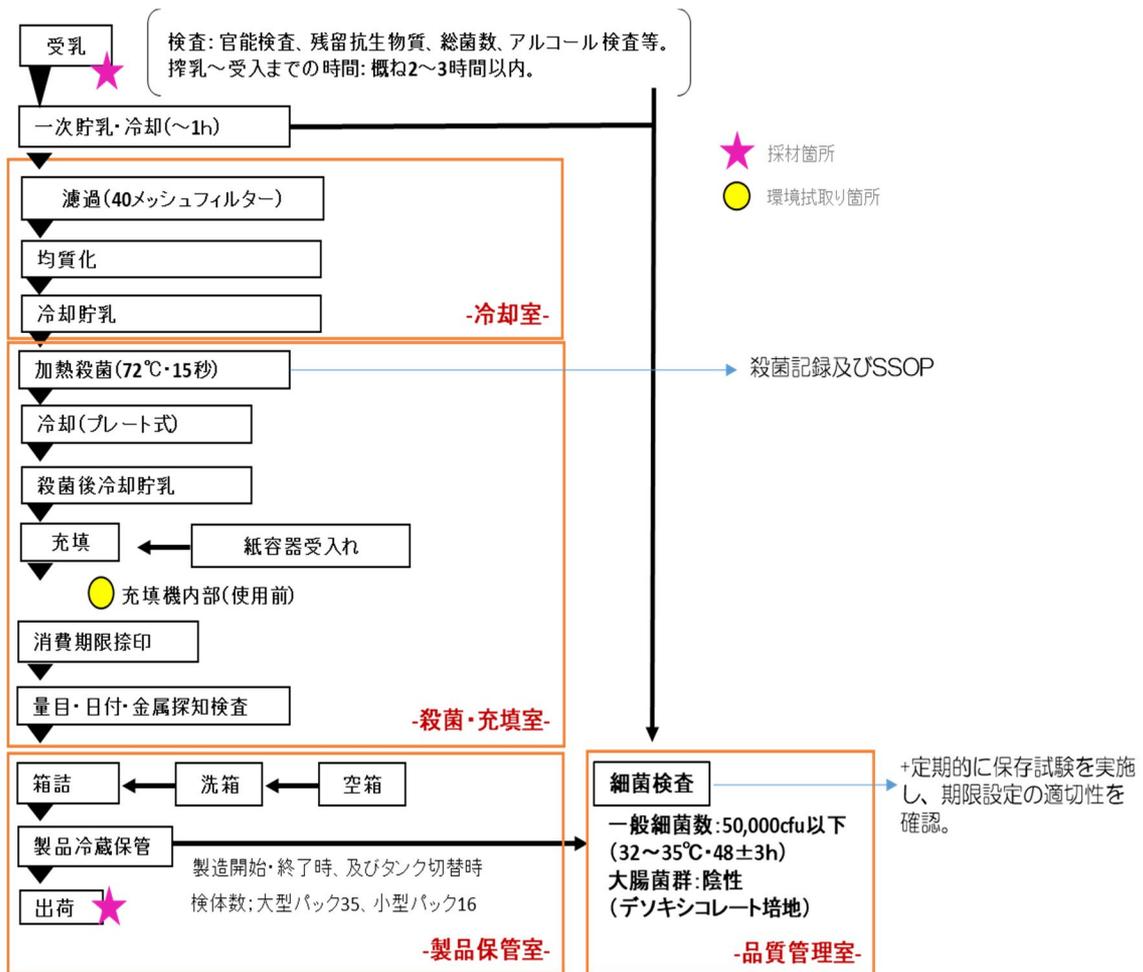


図1. 施設AにおけるHTST牛乳製品の製造工程フロー概要

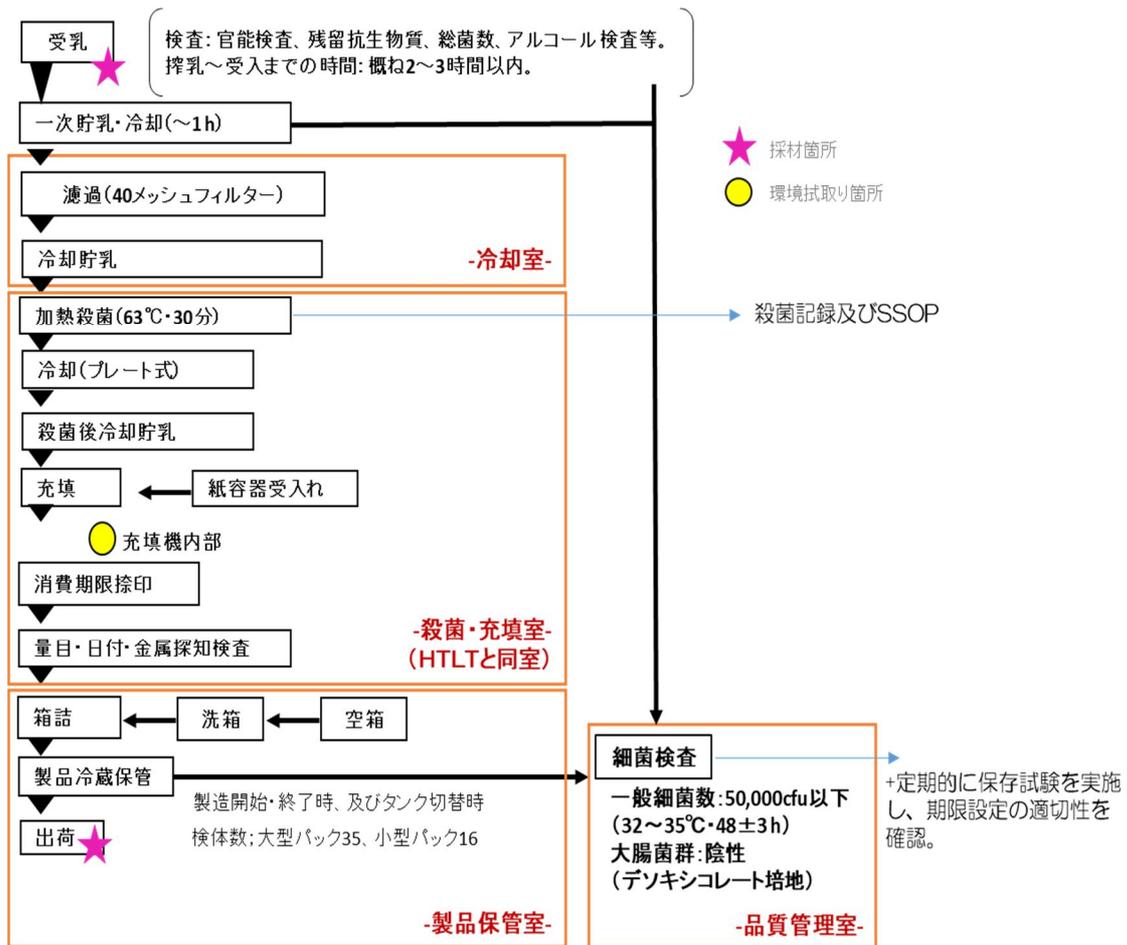
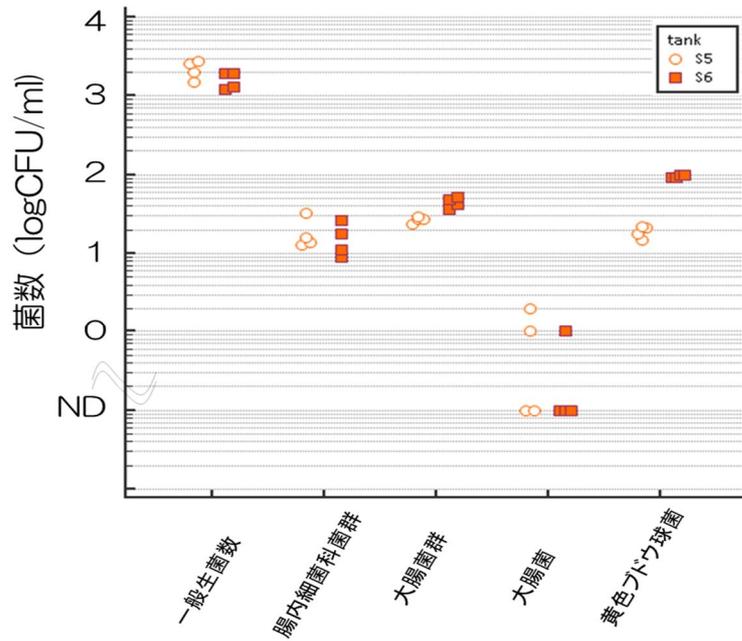


図2. 施設AにおけるLTLT牛乳製品の製造工程フロー概要

A



B

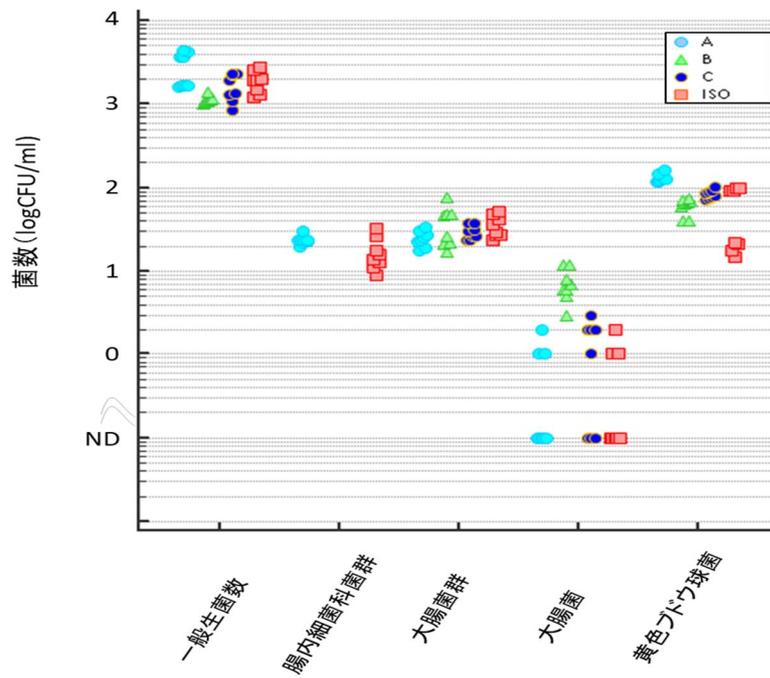


図3. 施設A由来生乳（一次貯乳）検体における各種衛生指標菌の検出状況。

セクションAのS5及びS6はHTST乳、LTLT乳製造用の生乳一次貯乳タンクの識別名を示す。タンク別に一般生菌数をISO法により求めた成績をセクションAに、セクションBでは両タンク由来検体の各指標菌成績をISO法及び簡易迅速法により求めた成績を示す。

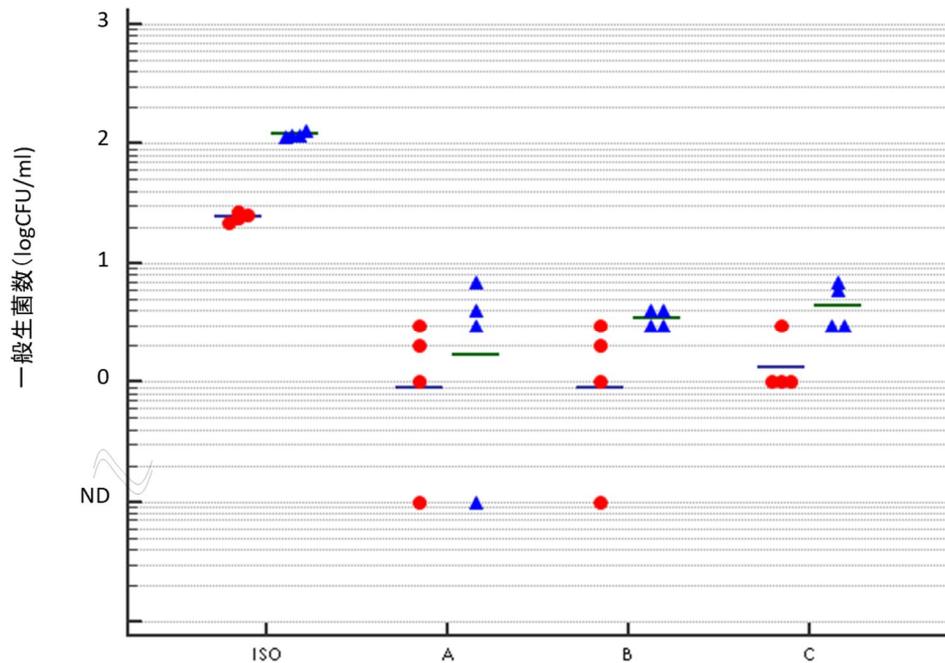
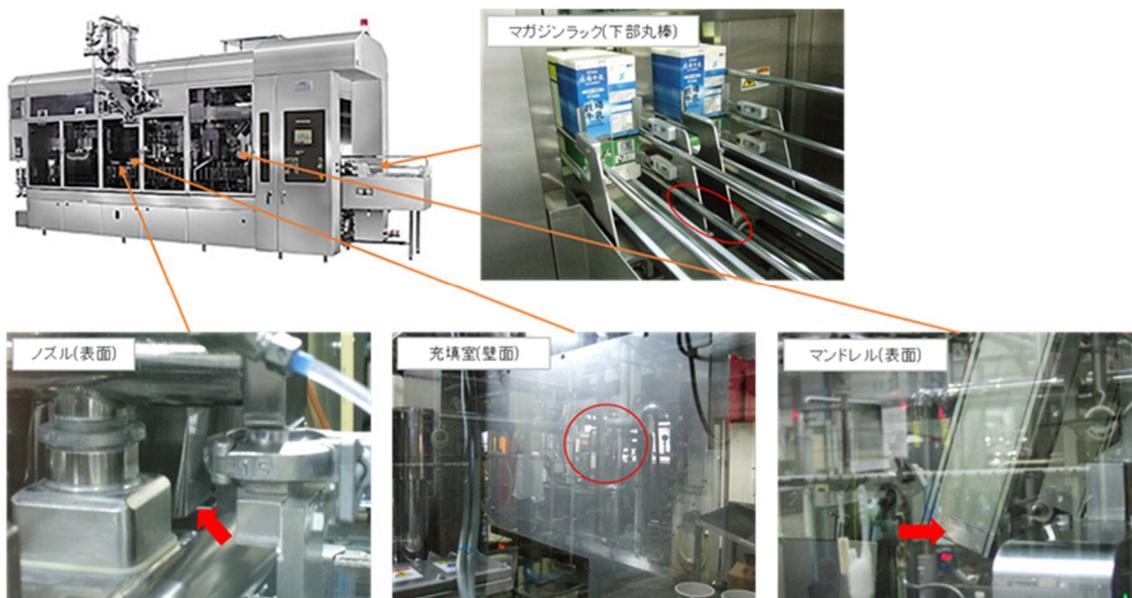


図 4. 施設 A 由来 HTST 牛乳製品及び LTLT 牛乳製品からの一般細菌数検出状況 .
 LTLT 製品 (赤) 及び HTST 製品 (青) を対象として , ISO 法及び代表 3 製品 (A,B,C) を用いたフィルム培養法により一般細菌数を求めた。なお、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌についても同時に検出試験を行ったが何れも陰性であったため、本図中には記載していない。

S E



M E

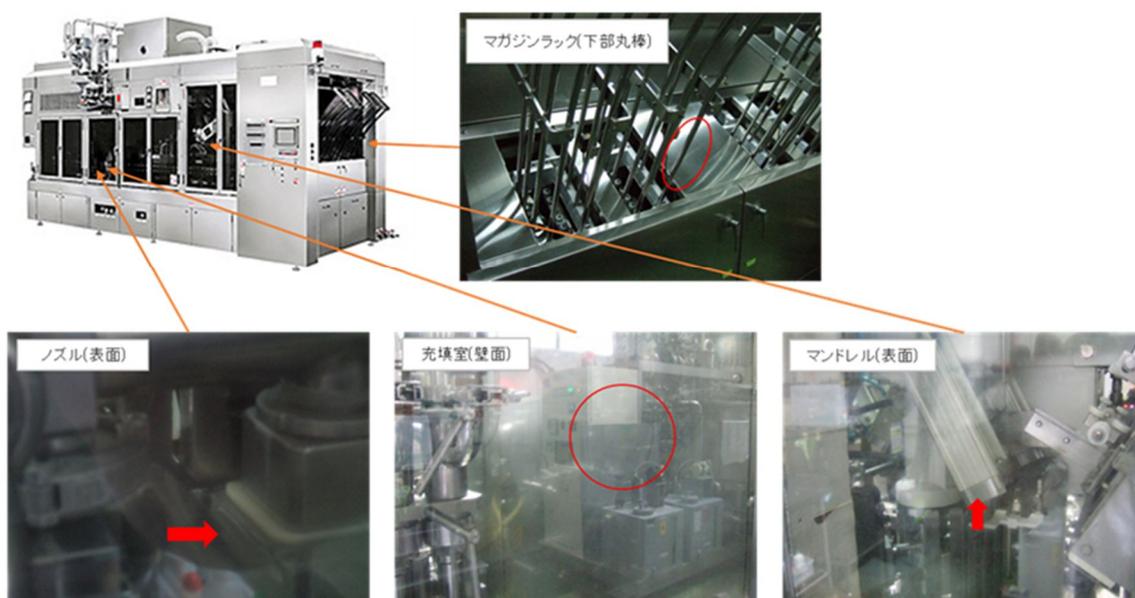


図 5. 施設 A の充填機内外における拭き取り箇所概要 .

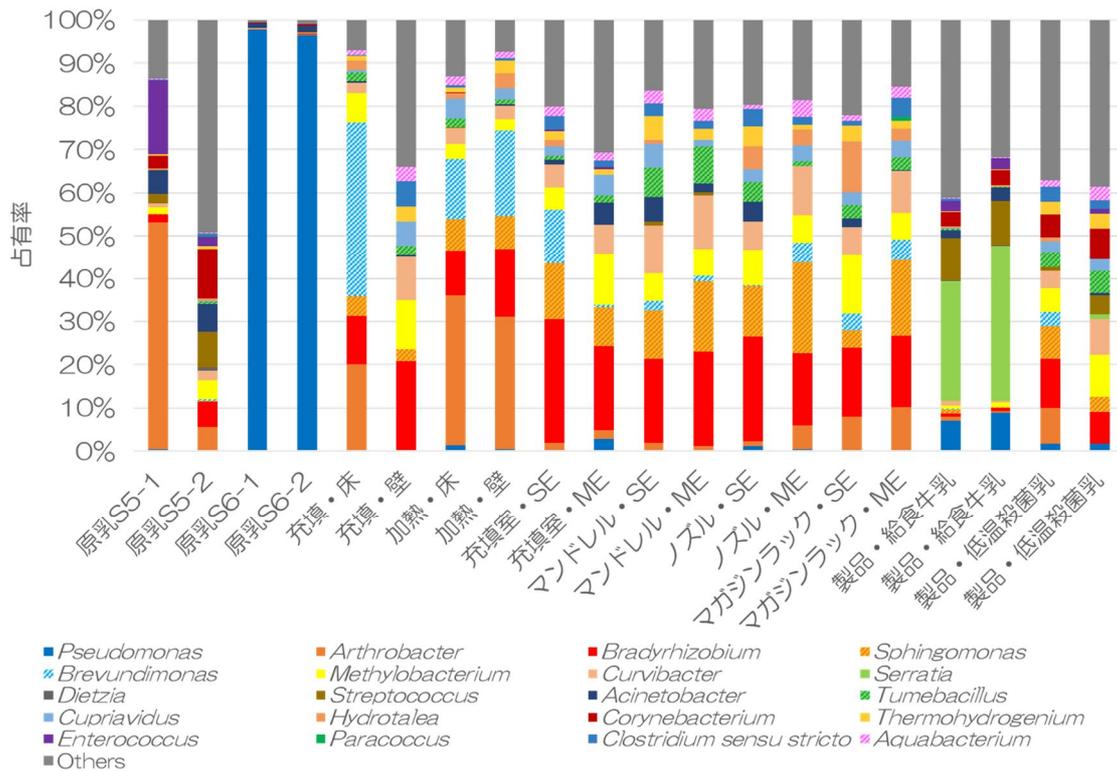


図 6. 施設 A 由来生乳、施設環境、及び製品検体における構成菌叢解析結果。

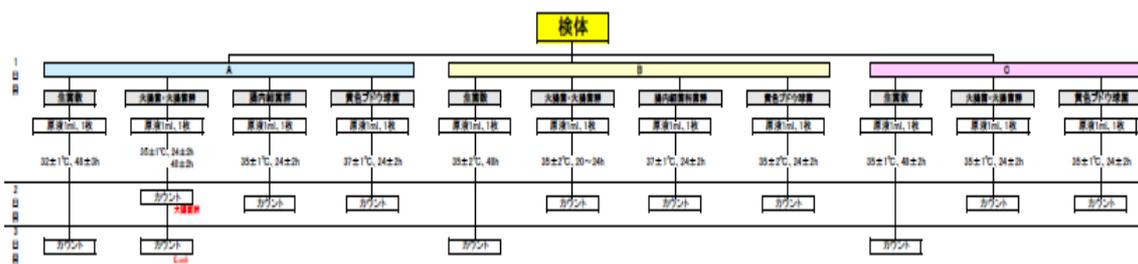


図 7. 簡易迅速法に関する試験フロー

表 1. 施設 A の施設環境拭き取り検体における衛生指標菌の検出状況

検体種別		検体 No.	生菌数 (CFU/mL)			
			ISO法	フィルム培養法 (製品A)	フィルム培養法 (製品B)	フィルム培養法 (製品C)
充填機周辺環境	床	1	ND	ND	ND	ND
	壁	2	ND	ND	ND	ND
殺菌機周辺環境	床	3	ND	ND	ND	ND
	壁	4	ND	ND	ND	ND
充填室	SE	5	ND	ND	ND	ND
	ME	6	ND	ND	ND	ND
マンドレル	SE	7	ND	ND	ND	ND
	ME	8	ND	ND	ND	ND
ノズル	SE	9	9	9	2	4
	ME	10	ND	ND	1	2
マガジンラック	SE	11	ND	ND	ND	2
	ME	12	ND	ND	ND	1
充填機付近の外部床 (参考)		13	3.0×10^2	3.0×10^2	2.0×10^2	3.1×10^2

