

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）
分担研究報告書

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

研究分担者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
鈴木穂高 茨城大学農学部
研究協力者 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

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。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、低温殺菌牛乳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。

以上の背景を踏まえ、平成30年度は、国内で製造流通する低温殺菌牛乳製品等を対象として、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) 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。

2) 低温殺菌牛乳等の汚染実態調査及び簡易培地の検討

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、検体は低温保持殺菌牛乳（LTLT: 63～65、30分）53検体、高温短時間殺菌牛乳（HTST: 72以上、15秒以上）19検体、高温保持殺菌牛乳（HTLT:

75以上、15分以上）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（32～48時間培養）及びISO 4833-1:2013（30～72時間培養）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（食安発0729第4号）を、大腸菌については公定法及びISO 16649-2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。得られた結果は、対応のあるt検定により統計解析を行った。検出限界値未満の値は0として計算を行った。検体管理温度、一部培養温度等に逸脱があった19検体については、結果を全体の統計に含めず、別途参考値として集計した。簡易培地で検出された細菌の菌種の同定は、16S Bacterial rDNA PCRキット（タカラバイオ）を用いた塩基配列解析及びBLAST相同性検索により行った。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) 諸外国における低温殺菌牛乳等の微生物規格

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。

2) 低温殺菌牛乳等の汚染実態調査

今回の調査結果概要を表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の実菌数は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の実菌数は、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(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(図1)、HTST乳で0.7169(図4)、HTLT乳で0.186(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(表2)、寄与率はLTLT乳で0.5177(図2)、HTST乳で0.7863(図5)、HTLT乳で0.1306(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(表2)、寄与率は、LTLT乳で0.6093(図3)、HTST乳で0.6598(図6)、HTLT乳で0.7197(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(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(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

本研究により、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。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、最終製品の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。次年度は、対象とする乳製品の種類を拡大した汚染実態調査を実施すると共に、今年度検討した簡易培地を用いた検証を実施する予定である。

E. 結論

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、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、食品の微生物試験における有用性は高いと思われるが、上述の理由から低温殺菌牛乳等への適用は現状では難しいと思われた。

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

表1. 諸外国、地域等における低温殺菌牛乳等の微生物規格

EU				
対象食品	対象微生物	規格	サンプリングプラン	適用箇所
低温殺菌乳	腸内細菌科菌群	$m < 10 \text{ cfu/mL}$	$n=5, c=0$	製造工程の最終時
米国				
対象食品	対象微生物	規格	サンプリングプラン	適用箇所
低温殺菌乳	生菌数	$m = 2.0 \times 10^4 \text{ cfu/mL}$	記載なし	記載なし
	大腸菌群	$m = 10 \text{ cfu/mL}$ (パルク出荷時は 100 cfu/mL)	記載なし	
ICMSF				
対象食品	対象微生物	規格	サンプリングプラン	適用箇所
低温殺菌乳	腸内細菌科菌群	$m < 1 \text{ cfu/mL}$, $M = 5 \text{ cfu/mL}$	$n=5, c=2$	製造終了時
英国				
対象食品	対象微生物	規格	サンプリングプラン	適用箇所
直接飲用される生乳	生菌数	$2.0 \times 10^4 \text{ cfu/mL}$	記載なし	農場
	大腸菌群	100 cfu/mL	記載なし	
オーストラリア				
対象食品	対象微生物	規格	サンプリングプラン	適用箇所
未殺菌乳(小売用)	カンピロバクター	0/25mL	$n=5, c=0$	製造, 加工, 販売
	大腸菌群	$m = 100 \text{ cfu/mL}$, $M = 1,000 \text{ cfu/mL}$	$n=5, c=1$	
	大腸菌	$m = 3 \text{ cfu/mL}$, $M = 9 \text{ cfu/mL}$	$n=5, c=1$	
	サルモネラ属菌	0/25mL	$n=5, c=0$	
	生菌数	$m = 2.5 \times 10^4 \text{ cfu/mL}$, $M = 2.5 \times 10^5 \text{ cfu/mL}$	$n=5, c=1$	

表 2 . 各試験法による低温殺菌牛乳等中の細菌数

	LTLT 乳 (53 検体)	HTST 乳 (19 検体)	HTLT 乳 (16 検体)
公定法平均値 (log CFU/mL)	1.49	1.31	0.29
簡易法(32) 平均値 (log CFU/mL)	1.03	0.97	0.28
p value(vs 公定法)	0.002841**	0.022899*	0.919564
ISO 法平均値 (log CFU/mL)	2.06	1.66	0.75
p value(vs 公定法)	<0.00001**	0.010847*	0.023498*
簡易法(30) 平均値 (log CFU/mL)	1.90	1.23	0.54
p value(vs ISO 法)	0.062791	0.013697*	0.054438

図1. 公定法と簡易法における集落数の相関 (LTLT 乳)

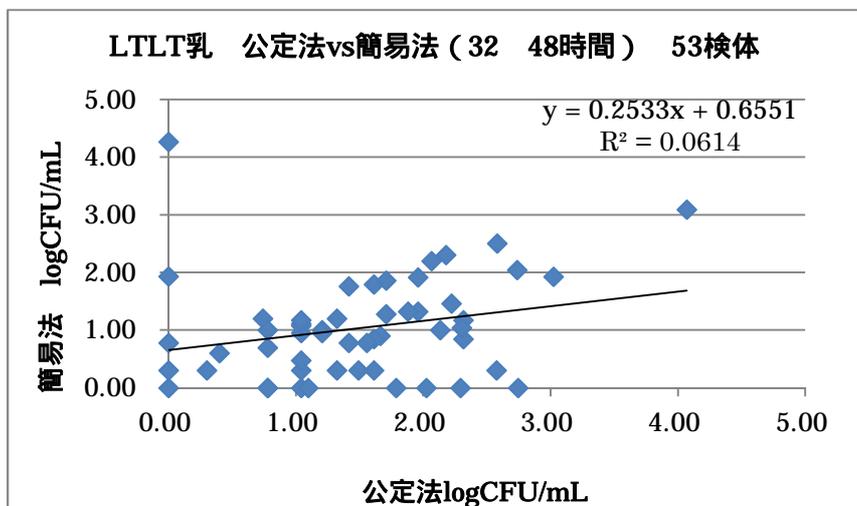


図2. 公定法とISO法における集落数の相関 (LTLT 乳)

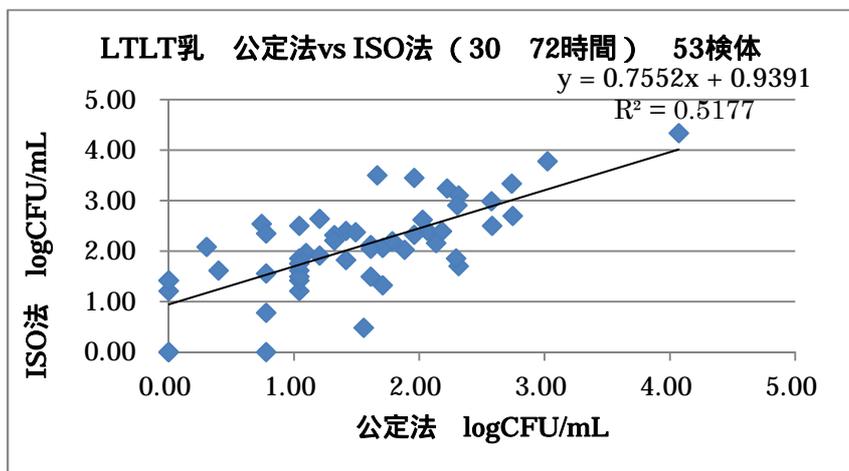


図3. ISO法と簡易法 (30 72時間培養) における集落数の相関 (LTLT 乳)

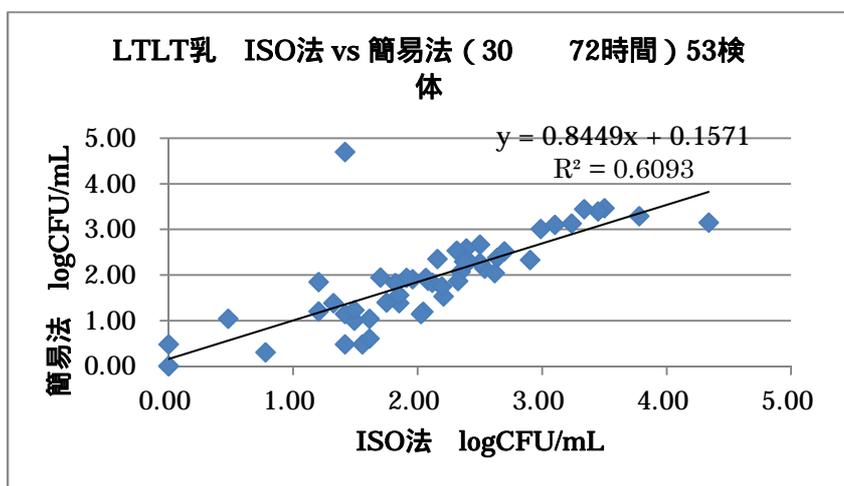


図4．公定法と簡易法（32 48時間）における集落数の相関（HTST乳）

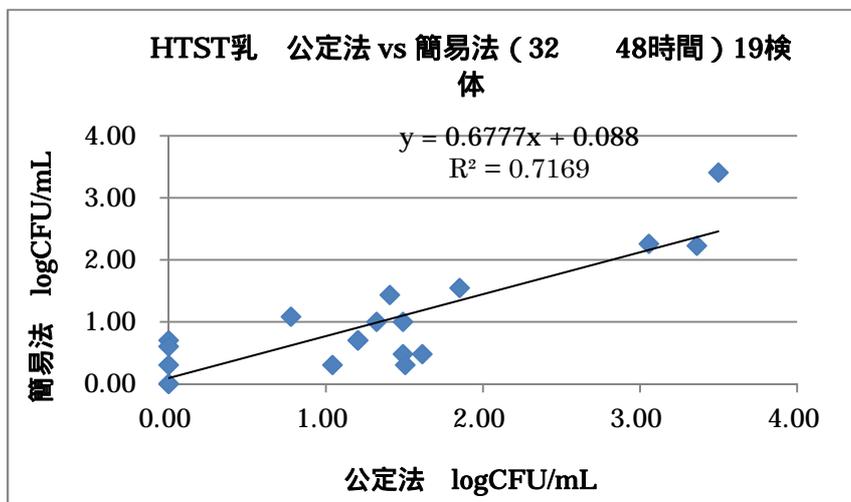


図5．公定法とISO法における集落数の相関（HTST乳）

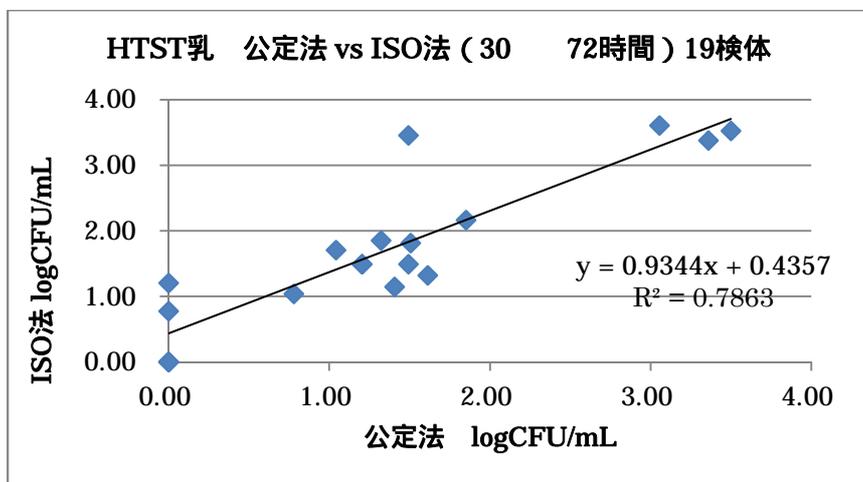


図6．ISO法と簡易法（30 72時間培養）における集落数の相関（HTST乳）

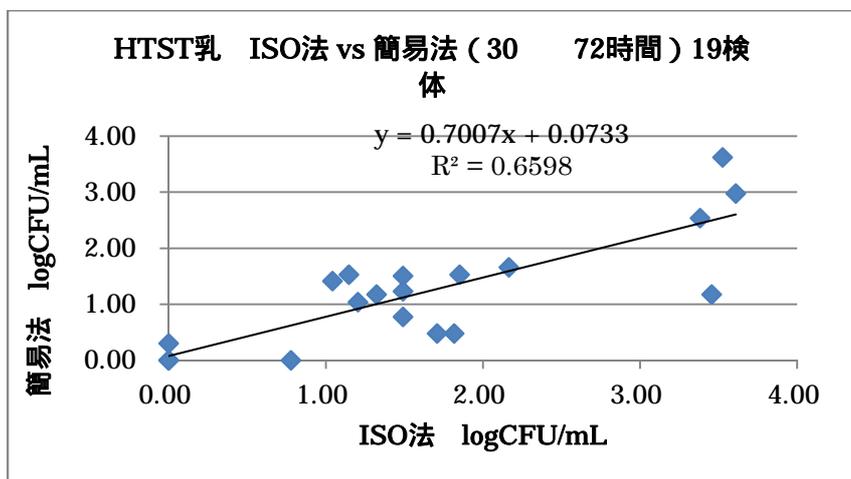


図7. 公定法と簡易法（32 48時間）における集落数の相関（HTLT 乳）

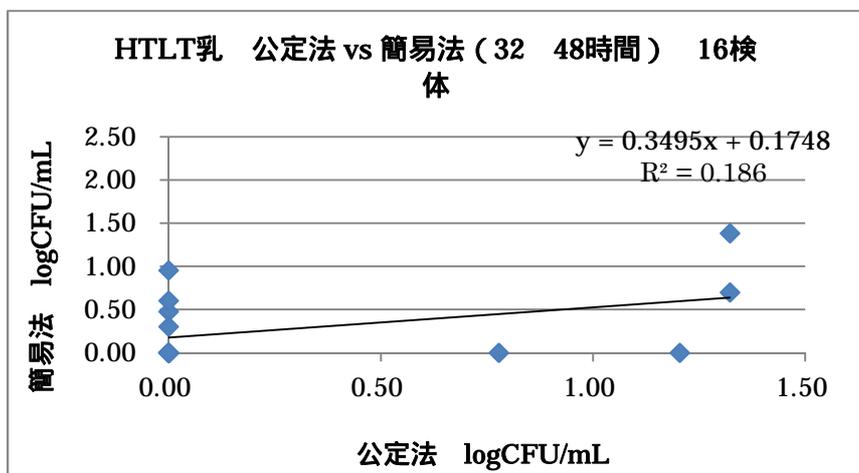


図8. 公定法とISO法における集落数の相関（HTLT 乳）

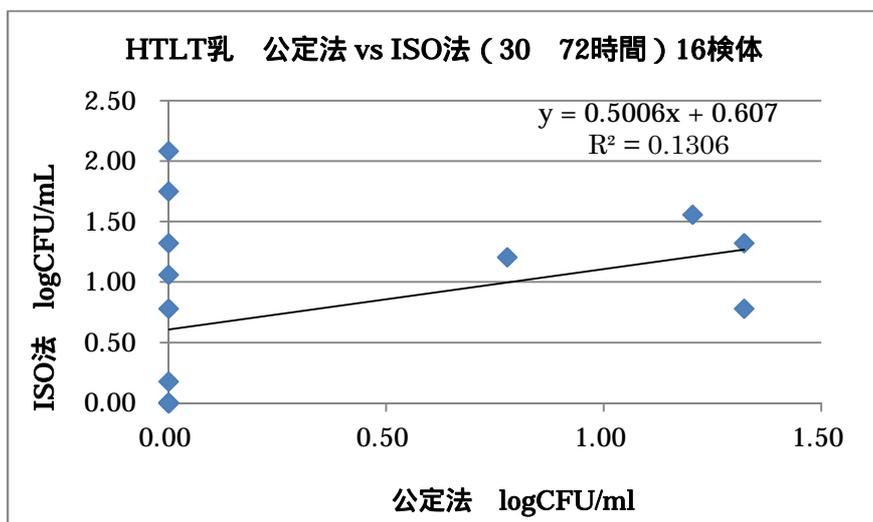


図9. ISO法と簡易法（30 72時間）における集落数の相関（HTLT 乳）

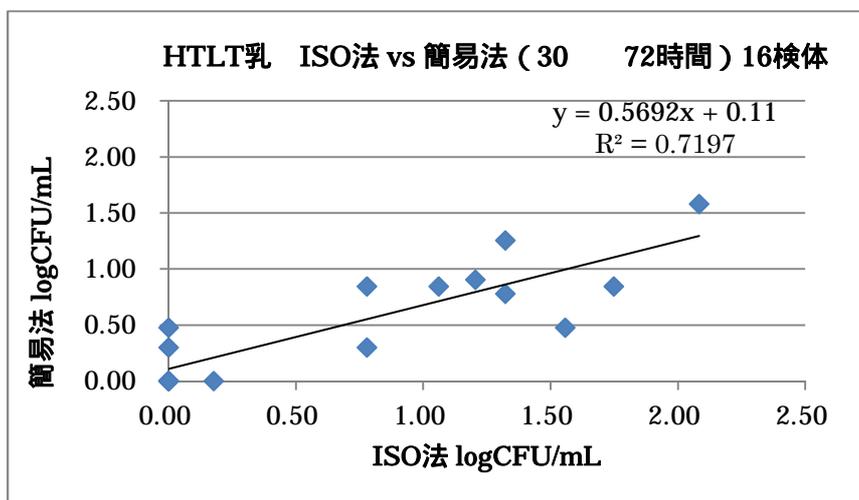
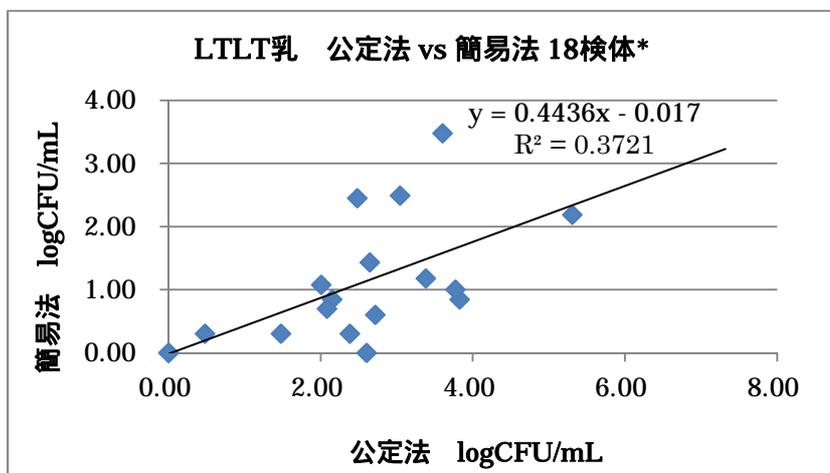


図 10 . 管理温度逸脱等があった検体での公定法と簡易法 (32 48 時間培養) の集落数の相関 (参考値)



*1 検体は簡易法で計測不能

図 11 . 管理温度逸脱等があった検体での公定法と ISO 法の集落数の相関 (参考値)

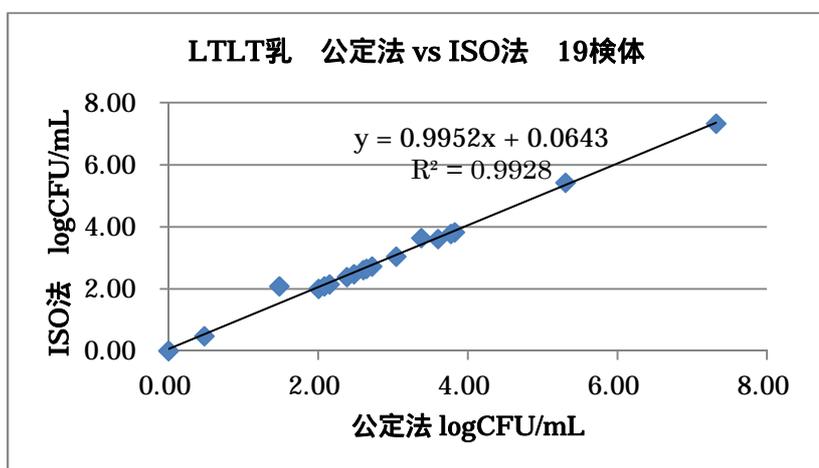


図 12 . 管理温度逸脱等があった検体での ISO 法と簡易法 (30 72 時間) の集落数の相関 (参考値)

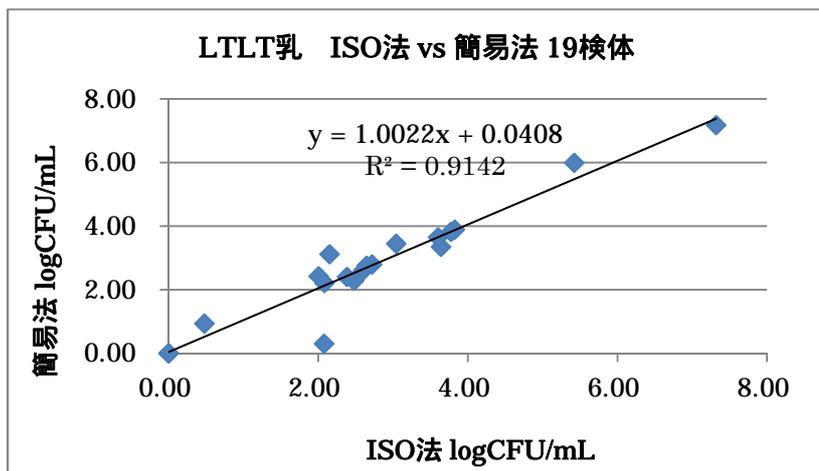


表 3. 簡易培地上に形成された計数困難集落の菌種同定結果

検体	検体種類	試験法	培養温度	性状	菌種同定結果	上位 3 菌種			
A	LTLT	簡易培地 1	30	赤青拡大集落	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>				
		簡易培地 2	32	赤色拡大集落	<i>Bacillus licheniformis</i>				
B	LTLT	簡易培地 3	35	普通	<i>Bacillus spp.</i>				
		簡易培地 3	35	遅延増殖	<i>Kocuria spp.</i>				
C	HTST	簡易培地 2	32	遅延増殖	<i>Kocuria spp.</i>	<i>Actinobacteria spp.</i>			
D	LTLT	簡易培地 2	32	遅延増殖	<i>Microbacterium spp.</i>				
E	HTST	簡易培地 2	32	遅延増殖	<i>Microbacterium spp.</i>				
F	LTLT	簡易培地 1	32	青色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>				
		簡易培地 2	32	赤色拡大集落	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus sp</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	
		簡易培地 1	30	青色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus tropicus</i>	<i>Bacillus paramycoides</i>	<i>Bacillus nitratireducens</i>	
G	HTST	簡易培地 2	32	赤色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus velezensis,</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>	
		簡易培地 2	32	赤色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus licheniformis,</i>	<i>B. haynesii,</i>	<i>B. sonorensis</i>	
		簡易培地 2	32	微小集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus kochii,</i>	<i>B. depressus</i>	<i>B. purgationiresistens</i>	
		簡易培地 2	32	普通	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. tequilensis</i>	<i>B. mojavensis</i>	
H	LTLT	簡易培地 2	32	赤色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>B. velezensis</i>	<i>B. subtilis</i>	
		簡易培地 2	32	普通	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus aerius</i>	<i>B. stratosphericus</i>	<i>B. altitudinis</i>	
		簡易培地 2	32	微小集落	<i>Paenibacillus spp.</i>	<i>P. odorifier</i>	<i>P. albidus</i>	<i>P. etheri</i>	
		簡易培地 2	32	赤色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>B. velezensis</i>	<i>B. subtilis</i>	
I	LTLT	簡易培地 2	30	普通	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus zhanghouensis,</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. pumilus</i>	
		簡易培地 1	30	青色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus licheniformis,</i>	<i>B. aerius</i>	<i>B. haynesii,</i>	
		簡易培地 1	30	赤色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>B. haynesii,</i>	<i>Bacillus licheniformis,</i>	<i>B. sonorensis</i>	
		簡易培地 1	30	青色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>				

J	HTST	簡易培地 1	30	赤色擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>			
		簡易培地 1	30	赤青擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus licheniformis,</i>	<i>B. haynesii,</i>	<i>B. sonorensis</i>
		簡易培地 1	30	青色擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus aerius</i>	<i>B. stratosphericus</i>	<i>B. atitudinis</i>
K	LTLT	簡易培地 3	30	遲延增殖	<i>Paenibacillus spp.</i>	<i>Paenibacillus peoriae</i>	<i>P. polymyxa</i>	<i>P. brasiliensis</i>
		簡易培地 4	30	遲延增殖	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus zhanghouensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. pumilus</i>
L	LTLT	簡易培地 2	30	普通	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus aerius</i>	<i>B. stratosphericus</i>	<i>B. altitudinis</i>
M	LTLT	簡易培地 1	30	青色擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus zhanghouensis,</i>	<i>B. australimaris</i>	<i>B. xiamenensis</i>
		簡易培地 1	32	赤青擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus aerius</i>	<i>B. stratosphericus,</i>	<i>B. altitudinis</i>
		簡易培地 1	32	青色擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus licheniformis,</i>	<i>B. sonorensis</i>	<i>B. haynesii,</i>
		簡易培地 2	32	赤色擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus licheniformis,</i>	<i>B. sonorensis</i>	<i>B. haynesii,</i>
N	LTLT	簡易培地 2	32	遲延增殖	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Pseudomonas weihenstephanensis</i>	<i>Pseudomonas deceptionensis</i>	<i>P. lundensis</i>
		簡易培地 1	30	青色擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus zhanghouensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. pumilus</i>
O	LTLT	簡易培地 2	30	微小集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. tequilensis</i>	<i>B. halotolerans</i>
P	HTST	簡易培地 2	30	赤色擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus licheniformis,</i>	<i>B. haynesii,</i>	<i>B. sonorensis</i>