

令和元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

研究要旨 本年度は、アイスクリーム類を製造する国内事業者の協力を得て、製造施設を視察すると共に、情報収集及び各種検体を微生物試験に供することで、同製品の製造工程管理実態を調査し、製造基準の検討にあたっての科学的知見を集積することを目的として検討を進めた。大規模事業者の施設 A では、スティック、カップ、コーンの計 3 形態のアイスクリームを製造しており、各種原料を外部より受入れ後、区分管理を行っていた。また、原料混和から冷却工程迄は閉鎖流路を取っており、このうち加熱殺菌工程では圧力をモニタリング指標としていた。視察を通じ、冷却後以降では充填工程での硬化のために用いる冷却水管理や充填機の使用後洗浄・消毒等が製造基準を遵守する上での重要項目と想定された。同施設では製品、ストレージミックスを対象とした定期的な微生物試験のほか、環境拭取り検体の ATP 検査が自主的に行われていた。製造中に採材した原料、最終製品及び充填機拭取り検体を微生物試験に供したところ、原料 1 検体、最終製品 5 検体、充填機拭取り 2 検体から、1.0-1.5 logCFU/ml の一般細菌が僅かに検出されたものの、糞便汚染指標菌は何れも不検出となり、同製造ラインの衛生管理が良好に維持されている状況が確認された。一方、菌叢解析を通じ、硬化後包装前製品を載せるトラップステージ拭取り検体の構成菌叢は原料の一つである粉末水飴の構成菌叢と極めて近似しており、同原料に生存性を持つ病原微生物が混入し、更に加熱殺菌に不備が生じた場合には、最終工程で製品やステージ表面を汚染するおそれも想定され、改めてこれらの製造基準に則った管理の重要性が示された。また、製品の出荷状況に応じて不定期にカップアイスを製造する、中規模事業者の製造施設 B でも原料混和から冷却工程迄は施設 A と同様に閉鎖流路をとっていたが、充填工程は半自動であり、特に充填機器の使用後洗浄・消毒が衛生管理上の重要項目と想定された。また、施設 B では自施設内の別ラインで製造される低温殺菌乳を原料に用いていた。未加熱の生乳（参考品）最終製品を微生物試験に供したところ、生乳検体からは糞便汚染指標菌である腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌がそれぞれ 1.5-3.7 logCFU/ml、1.9-3.8 logCFU/ml、<1.0-1.8 logCFU/ml の範囲で検出されたが、製品検体からこれらの糞便汚染指標菌は検出されず、同検体中の一般細菌数は 0.64-0.67 logCFU/ml の範囲に留まっていた。以上より、国内の大規模・中規模アイスクリーム製造における衛生管理は乳等省令を遵守して対応がなされており、微生物管理の面から直ちに改訂を検討する必要性は低いと判断された。一方で大腸菌群陰性とされる現行の成分規格については、国際整合性並びに原料を含めた同指標菌の動態を見極めつつ検討する必要性が考えられた。

製品の成分規格等に関する省令(乳等省令)」

- A. 研究目的
- 国内の乳・乳製品については、「乳及び乳
- によりいくつかの分類がなされており、このうち、「アイスクリーム」については、原

水が食品製造用水であること、発酵乳及び乳酸菌飲料を除く原料については、摂氏68・30分以上の加熱殺菌を施すこと、氷結管からアイスクリームを抜き取る場合に、その外部を温めるため使用する水は流水（食品製造用水に限る。）であること、容器包装に分注する場合は分注機械を用い、打栓する場合は打栓機械を用いること、アイスクリームの融解水はこれをアイスクリームの原料としないこと（但し、上記加熱殺菌を施したものについてはこの限りではない）等の製造基準が定められている。また、成分規格としては、細菌数が1gあたり100,000以下、かつ大腸菌群陰性と定められている。

厚生労働省が取り纏める食中毒統計資料によると、2010年1月から2020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、アイスクリームを原因とするものは報告されていない。このことは、上述の乳等省令で定められる製造基準を遵守して製造されたアイスクリームによる健康被害実態が認められていないことを示している。

Euromonitor Internationalが2016年に行った調査では、日本国内でのアイスクリーム年間消費量は6.5Lで世界第17位であり、この量はオランダ、フランス等と同程度となっている（<https://www.euromonitor.com/ice-cream-and-frozen-desserts>）。また、財務省貿易統計によると、国内で製造されるアイスクリームは2013年に1.62tが輸出されていたが、2018年の同輸出量は5.61tにまで増加する等、近年輸出量及び輸出額が増加傾向にある（<https://www.customs.go.jp/toukei/info/>）。また、アイスクリーム全体の輸入量は大きな増加傾

向は認められないものの安定した数量がニュージーランド、フランス、ベルギー等から輸入されている状況にある。

こうしたアイスクリームの安全確保には上述の乳等省令で示される製造基準並びに成分規格が功を奏していると目されるが、これらが定められた当時に比べ、現時点での当該製造施設における衛生管理実態については、過去数十年に亘り厚生労働省の研究調査は行われていない状況であった。

以上の背景を踏まえ、本年度の分担研究では、国内のアイスクリーム製造施設における管理実態等について調査を行い、現行の製造基準等に関する改訂の必要性を見極めるための基礎知見を収集することを目的として検討を行った。大規模及び中規模のアイスクリーム製造施設の協力を得て、情報を整理すると共に、衛生試験を通じた衛生管理実態を検討し、製造管理上重要と想定される工程・項目及びこれらの生物的危害要因に関する考察を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 協力施設でのアイスクリーム製造に係る情報収集

アイスクリームを製造する大規模及び中規模事業施設A、B（以下、施設Aまたは施設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、並びに製造量、製品仕様、自主検査等の情報提供を依頼し、承諾を得た。

2. 採材

施設Aでは、原料（脱脂粉乳2種、粉末水飴）及び最終製品のほか、充填機周辺環境拭き取り検体を3M Hydrated sponge（スリ

ーエム)を用いて採材した。全ての検体は冷蔵温度帯で保管・輸送し、採材から3時間以内に検査に供した。

施設 B では生乳(参考品)及び最終製品のほか、充填室内の床及び壁を施設 A と同様に採材した。各検体は、冷蔵温度帯で輸送し、採材から4時間以内に試験に供した。

3. 衛生指標菌定量試験

衛生指標菌の検出には、国際標準試験法である ISO 法(細菌数、ISO 4833-1; 腸内細菌科菌群、ISO 21528-2; 大腸菌群、ISO 4832; 大腸菌、ISO 16649-2; 黄色ブドウ球菌、ISO 6888-1)を用いて検討を行った。

なお、生乳の調整にあたっては、5倍希釈液を作成し、試験原液として用いた。

拭き取り検体は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて試験懸濁原液を調整した。同原液1 mLを各平板培地に接種し、上述の ISO 文書に従って培養を行い菌数を求めた。

4. 細菌叢解析

施設 A の検体については、試験原液1 mlを対象とした。何れも滅菌 PBS を用いて2回洗浄を行った後、MaxWell RSC DNA Blood kit(プロメガ)を用いて Total DNA を抽出した。その後、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 反応により16S rRNA V5-V6 領域を増幅し、E-gel SizeSelect 2%(Thermo Fisher)及び AMPure XP(Beckman)を用いて増幅産物を精製・定量した。その後、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.20(キアゲン-CLC)を用いて不要配列を除去後、RDP Classifier pipelineへ投入し、階層分類等の解析を行った。

5. 生乳中の微生物動態解析

上項2.で示した施設 B 由来生乳(参考品)検体を100 mLずつ分注した後、速やかに4にて0,1,2,5日間冷蔵保管した。各時点において検体を取り出し、上項3.に示す方法により一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数、黄色ブドウ球菌数を求めた。各指標菌間の相関性の判定にはリストワイズ法を用いた相関の p 値を用いた。

C. 研究結果

1. 施設 A・B におけるアイスクリーム製造工程に関する情報整理(図1)

施設 A でのアイスクリーム製造工程について、情報を提供いただき、今回検討対象とした製品の製造工程フロー図を作成した。

同施設では、稼働日あたり平均約150万個の製品を製造しており、製造製品としては、カップ、スティック、コーンから構成されていた。同施設は FSSC 22000 を取得しており、取得にあたり、原料保管を含めて区画化をなし得ており、管理区域は原料保管エリア、調合・貯乳エリア、充填・包装エリア、搬送・保管エリアに大別されていた。

原料調合後の加熱条件については、乳等省令では68 30分もしくはこれと同等以上とされているが、同施設ではプレート式殺菌装置を用いた85 15秒の管理目標値を設定しており、その管理は圧力をモニタリングすることによって行っていた。殺菌

後のストレージについては 10 未満で 1~4 時間を目標値として定めていたほか、容器包装のうち、紙パックについては UV 照射による使用前殺菌を行っていた。

施設 A における自主検査として特に微生物試験に関わる情報を求め、製品については、概ね 3 時間毎にサンプリングを行い、乳等省令で定められる一般細菌数（自主管理基準：300CFU/mL 未満）及び大腸菌群のほか、開始時には黄色ブドウ球菌も試験項目に定めている状況を確認した。また、ストレージミックスについても、ロット毎にサンプリングを行い、一般細菌数、大腸菌群試験を実施していた。更に、施設環境の清浄度確認には簡易キットを用いた ATP 試験を用いていた。微生物試験の適切性を評価するため、同施設では毎年外部精度管理試験を受講しているとのことであった。また、各衛生指標菌検査には 2017 年より簡易培地を用い始めていた。

一方、中規模の施設 B は、牛乳製造を主体とする中で、アイスクリーム製造もおこなっていた。同施設では出荷先の在庫状況を見て都度製造計画を立てる製造方式を取っており、視察時には製造ラインは稼働していなかった。また、同施設では同施設内で製造された低温殺菌牛乳を原料の一つとして用いていた。アイスクリーム製造は HEPA フィルターで管理された乳製品加工室内で行われており、施設 A と同様に原料調合以降、充填に至る工程はインライン管理であった。充填は半自動の開放系機器を用いており、使用後洗浄も手動であった。加熱殺菌条件は、85~90・15 秒を採用しており、圧力モニタリングにより管理していた。自主検査には、原料、冷却・エイジング

工程、充填・包装工程のほか、製品を対象としており、一般細菌数（30CFU/mL 未満）及び大腸菌群（陰性）を検査項目としていた。

2. 施設 A における原料、施設ふき取り検体、及び製品からの衛生指標菌の検出状況（表 1）

原料 3 検体のうち、脱脂粉乳 A 及び粉末水飴検体は一般細菌数を含めた全ての微生物試験項目で陰性を示した。脱脂粉乳 B 検体についても一般細菌数が僅かに検出されるにとどまり（1.19 logCFU/mL）、他の指標菌は全て陰性であった。

製品 5 検体についても、原料と同様に一般細菌数以外の試験項目は何れも陰性を示し、一般細菌数の検出数値は 1.33-1.51 logCFU/mL の範囲にとどまっていた。

充填機周辺の拭取り環境検体についても、充填ノズル周辺の拭取り 2 検体より一般細菌数が僅かに検出されたものの他の指標菌は全て不検出となった。

3 施設 B における製品、施設ふき取り検体、及び生乳（参考品）からの衛生指標菌の検出状況（表 2）

製品 2 検体からは、一般細菌数が 0.64 または 0.67 log CFU/mL のみ検出されたほか、糞便汚染指標菌（腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌）及び黄色ブドウ球菌はいずれも陰性であった。

充填機が設置された加工室内の床及び壁拭取り検体についても同様に微生物試験に供したが、一般細菌数のみ 4.41-5.22 logCFU/100cm² の範囲で検出された一方、他の指標菌は全て陰性であった。

同施設に牛乳製造用に搬入された生乳計4検体を参考品として同様に検査に供した。一般細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群はそれぞれ 3.88-4.05 logCFU/mL、1.50-3.69 logCFU/mL、1.92-3.77 logCFU/mL の範囲で全4検体より検出されたほか、大腸菌及び黄色ブドウ球菌は共に2検体で陽性を示し、それらの検出数値の範囲は 1.76-1.80 logCFU/mL、または 2.56 logCFU/mL であった。

4. 施設 A での製造工程を通じた構成菌叢比較解析 (図 2, 3)

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。アイスクリームの主原料である脱脂粉乳 A・B では構成菌叢が大きく異なっていたが、このうち、脱脂粉乳 B 検体で優勢であった *Streptococcaceae* は、充填ノズル周辺拭取り検体及び製品においても優勢な菌叢として認められた。同じく主な原料である粉末水飴検体については *Caulobacteraceae* が最も優勢な菌科として検出され、同菌科は製品が固化後、包装される間に輸送される際に直接載せられるトラップステージ拭取り検体及び作業従事者の手指洗浄用電解水検体においても最も優勢であった (図 2A)。

菌属レベルでの解析を通じ、上述の傾向はより明確化された。すなわち、脱脂粉乳 B 検体、充填ノズル周辺拭取り検体及び製品検体で優勢菌科として検出された *Streptococcaceae* の多くが *Lactococcus* 属及び *Streptococcus* 属等として認められていたのに対し、粉末水飴検体及びトラップステージ拭取り検体で優勢菌科として検出

された *Caulobacteraceae* の多くは *Asticcacaulis* 属及び *Brevundimonas* 属等により構成されている状況であることが判明した (図 2B)。故に、施設 A 由来検体間での菌叢の共通性は菌科・属レベル双方で確認された。なお、検体間の関連性を明確化するため、網階層でのクラスターを作成したところ、上述の見解を指示する結果となった (図 3)。

5. 生乳検体における各種衛生指標菌の挙動解析 (図 4、表 3)

施設 B より参考品として提供された生乳検体を4下で0、1、2、5日間保存し、一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数、黄色ブドウ球菌数を求めた。結果として、0日目に 3.88-4.05 logCFU/mL であった一般細菌数は、保存1日目には 3.54-4.14 logCFU/mL、保存2日目には 3.61-3.99 logCFU/mL、保存5日目には 3.44-3.86 logCFU/mL となり、顕著な変動は認められなかった。

一方、腸内細菌科菌群数は0日目に 1.50-3.69 logCFU/mL、保存1日目に 1.92-4.29 logCFU/mL、保存2日目に 2.14-4.41 logCFU/mL と微増したが、保存5日目には 2.22-4.28 logCFU/mL と微減した。

保存0日目に 1.92-3.77 logCFU/mL であった大腸菌群数は保存1日目には 1.96-4.53 logCFU/mL と微増したが、保存2日目には 1.79-3.59 logCFU/mL へと若干の減少を示し、保存5日目には 1.73-4.61 logCFU/mL と再び微増した。

大腸菌が検出された2検体を対象とした動態観察により同菌は保存2日目迄は 1.76-1.80 logCFU/mL から 0.78-0.87

logCFU/mL へと穏やかな減少を示したが、5 日目には 1.36 logCFU/mL へと再び微増した。また、保存 0 日目の段階で大腸菌を認められた 2 検体からは黄色ブドウ球菌も検出されたが、同指標菌は保存 5 日目まで安定的な生存を示した。

得られた数値を基に、指標菌間での相関性を解析した。リストワイズ法を用いた解析結果として、一般細菌数は腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌との間でそれぞれ 0.0876、0.0947、0.4428 の相関の p 値を示し、相関はないと判断された。黄色ブドウ球菌とは 0.0004 となり相関があると判断された。腸内細菌科菌群数は大腸菌群数との間で $p=0.0027$ であったほか、黄色ブドウ球菌との p 値も 0.0253 となり、相関はあると判断された。一方、大腸菌群と大腸菌、黄色ブドウ球菌との間での p 値はそれぞれ 0.1323、0.0687 となり、相関はないと判断された。

D. 考察

本研究では、大規模及び中規模のアイスクリーム製造事業者の協力を得て、製造工程管理に関する実態を微生物学的見地から検討した。

両施設はそれぞれ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。施設 A では製品に加え、エイジング工程を重点的な工程管理対象として、微生物検査を定期的実施していた。本年度のある月に実施した自主検査記録を確認したところ、検体数 1750 に対し、一般細菌数で自主管理基準として定めた 300CFU/ml を超えた検体数は僅かに 3 検体（陽性率として 0.17%）であった。これらの陽性検体

が確認された場合の措置としては同一ロット製品の検査記録及び工程中の不備の有無を改めて確認することが一般的な対応内容であることは言うまでもない。

施設 A 由来検体を対象とした菌叢解析により、充填機器周辺で採材した拭取り検体のうち、トラップステージ検体は原料（粉末水飴）検体と近似した構成菌叢を示した。水飴は粘着性に富むため、トラップステージのように製品と直接接触する部位については同原料由来菌叢が残存し易い環境にあることが示唆される結果と解釈される。当該部位の洗浄に不備があった場合には一定の細菌残存も懸念され、使用後洗浄・消毒を遵守する一つの根拠となるものと考えられる。

施設 B では自社で牛乳製造もおこなっており、その原料となる生乳受け入れ時には大腸菌群検査も実施する等、良好な衛生状況の原料確保に向けた取り組みを行っていた。製造ラインで用いる機器は施設 A に比べて、特に充填機の取り扱い及び使用後洗浄・消毒工程を重要な管理項目と定めていた。同施設では不定期製造であったため、製造工程毎に原料及び中間製品等を確保することができなかったが、今後可能な限り、こうした検体を確保し、微生物試験及び菌叢解析を行うことで、衛生実態の精査が可能になるものと期待される。

生乳については受入後速やかに製造加工に供されることが衛生の確保に有効とは目されるが、大規模施設では品質の安定化を図る目的で合乳作業が通常行われる。本研究では少数検体ながら、生乳を冷蔵保存した際の指標菌動態を検討した。各指標菌間の相関係数を求めた結果、供試検体中での検出分布は腸内細菌科菌群が大腸菌群に比

べ、その他の糞便汚染指標菌及び黄色ブドウ球菌との間でより高い相関性を示し、包括的な糞便汚染指標としての優位性が示唆された。現時点において、施設 B では、乳等省令に基づき大腸菌群を糞便汚染指標として管理を行っているが、今後製造基準を検討する際には、国際動向を踏まえつつ、国内での微生物動態に関する知見をより集積した上で衛生指標菌試験項目を設定することが、科学的根拠に基づいた製造基準の在り方を検討する上で望ましいと考えられる。

E. 結論

アイスクリーム製造事業者 2 社の協力を得て行った製造工程管理並びに同実態調査の結果、国内のアイスクリーム製造段階における製造基準は適切に遵守されている状況を確認できた。一方、製造基準や成分規格の試験項目として乳等省令に基づいた大腸菌群を糞便汚染指標とすることの適切性については、国際動向を踏まえた上で、原料、中間・最終製品中での挙動に関する知見を集積・整理することが必要と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(学会発表)

1. 中山達哉．衛生管理のために用いる試験法の動向について．日本防菌防黴学会第 46 回年次大会シンポジウム 11. 2019 年 9 月 26 日．大阪．

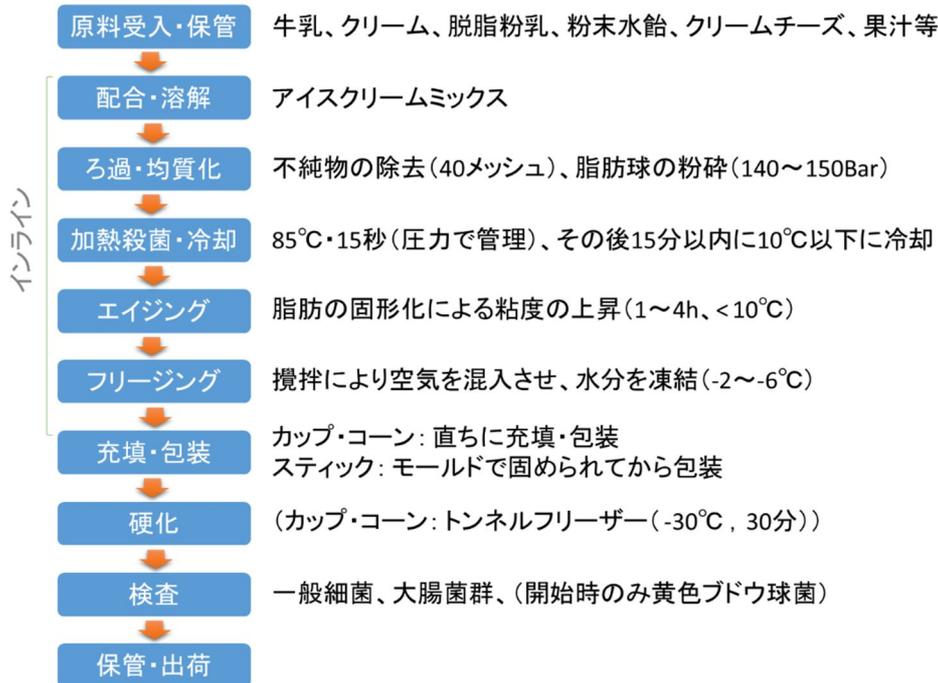
(論文発表)

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

A



B

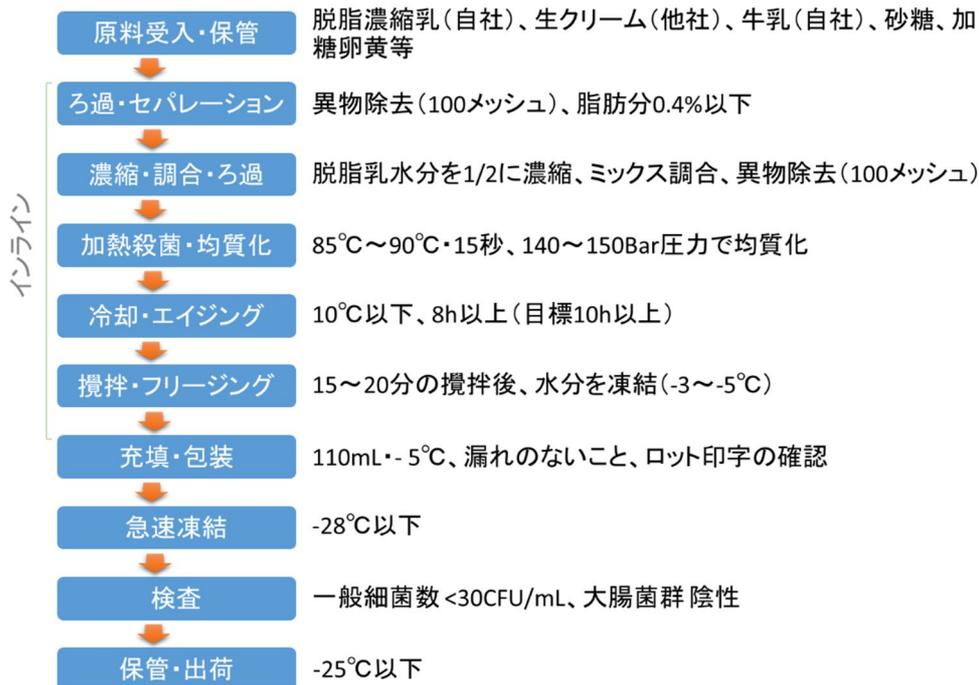
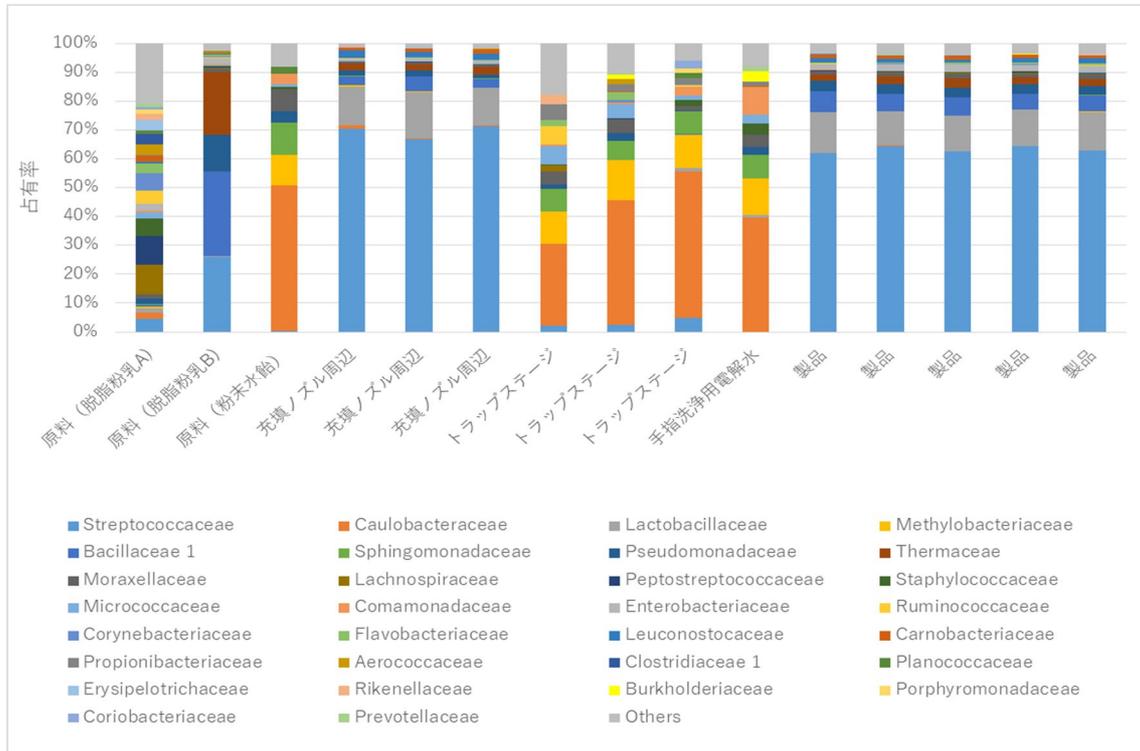


図1. 施設A及びBにおけるアイスクリーム製造工程フローの概要.
セクションA/Bはそれぞれ施設A/Bの製造工程フロー図を示す。

A



B

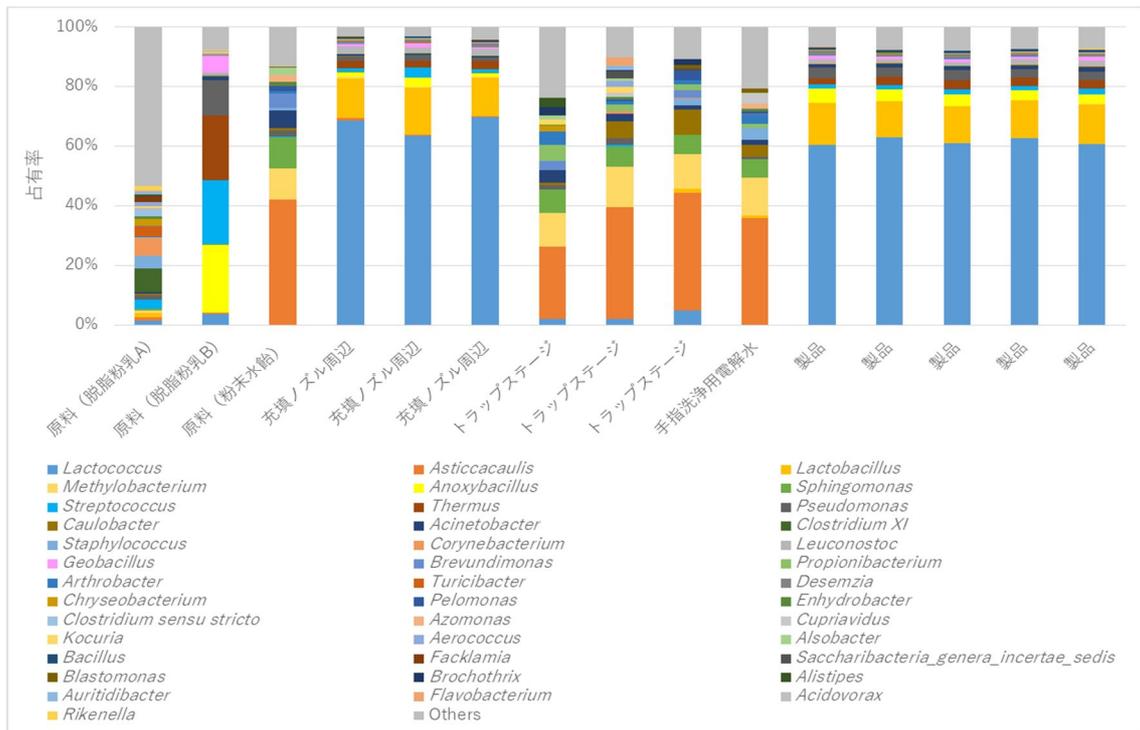


図2. 施設 A 由来の原料、充填機周辺環境拭取り、製品検体における構成菌叢解析結果概要
セクション A/B はそれぞれ科/属階層のバーチャートを示す。

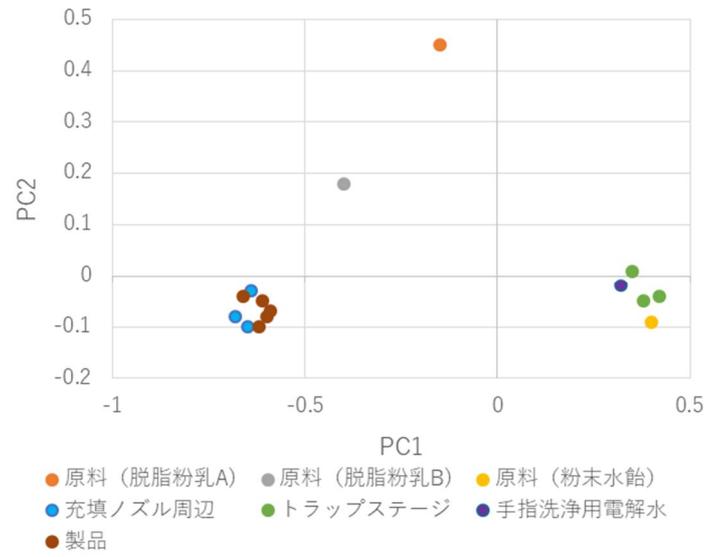
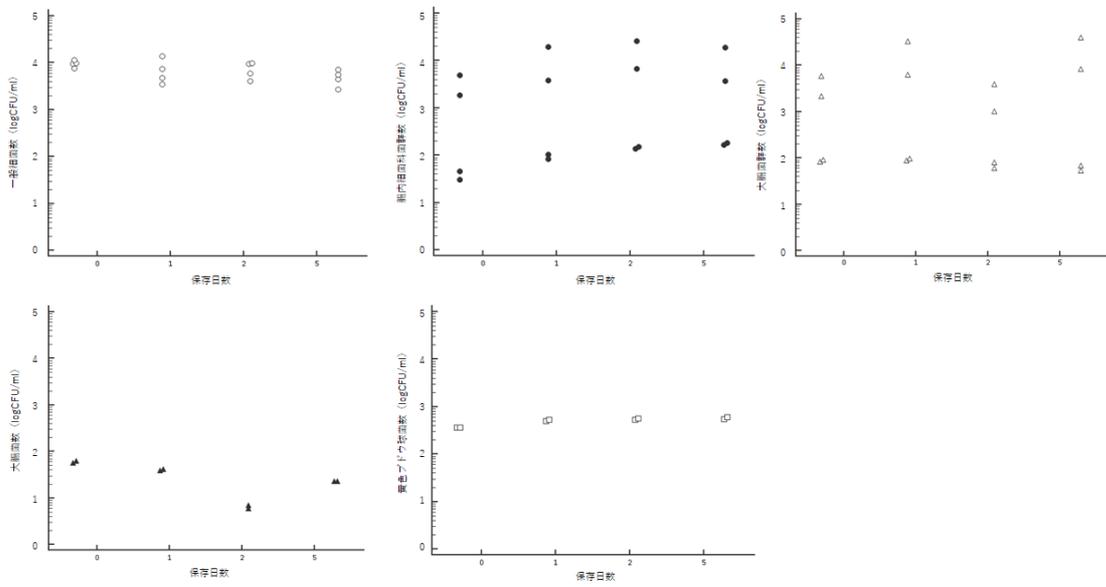
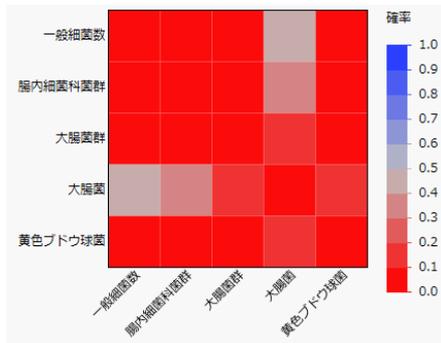


図 3. 網階層での施設 A 由来検体に係る主成分分析図



A



B

図 4. 冷蔵保存を通じた生乳検体中の各種衛生指標菌の挙動.

セクション A は各衛生指標菌の時系列推移を、セクション B は各指標菌数の相関 p 値に関するヒートマップを示す。

表1. 施設 A 由来検体における各種衛生指標菌の検出状況 .

種別	検体番号	菌数 (logCFU/mlまたは100cm ²)				
		一般細菌	腸内細菌科菌群	大腸菌群	大腸菌	黄色ブドウ球菌
原料 ^{※1}	M-1	ND ^{※2}	ND	ND	ND	ND
	M-2	1.19	ND	ND	ND	ND
	M-3	ND	ND	ND	ND	ND
製品 (アイスバー)	S-1	1.40	ND	ND	ND	ND
	S-2	1.51	ND	ND	ND	ND
	S-3	1.33	ND	ND	ND	ND
	S-4	1.51	ND	ND	ND	ND
	S-5	1.51	ND	ND	ND	ND
拭き取り ^{※1} (充填機)	F-4	ND	ND	ND	ND	ND
	F-5	ND	ND	ND	ND	ND
	F-6	1.00	ND	ND	ND	ND
	F-7	1.00	ND	ND	ND	ND
	F-8	ND	ND	ND	ND	ND
手指洗浄水	F-10	ND	ND	ND	ND	ND

¹ M-1: 脱脂粉乳 A, M-2:脱脂粉乳 B, M-3: 粉末水飴, F-4 6: 充填ノズル周辺, F-7 9: トラップステージ (硬化後). ² ND: 不検出を指す .

表2. 施設 B 由来検体における各種衛生指標菌の検出状況 .

種別	検体番号	菌数 (logCFU/mlまたは100cm ²)				
		一般細菌	腸内細菌科菌群	大腸菌群	大腸菌	黄色ブドウ球菌
拭き取り ^{※1} (充填室)	F-1	4.18	ND ^{※2}	ND	ND	ND
	F-2	5.22	ND	ND	ND	ND
	F-3	4.41	ND	ND	ND	ND
生乳 (参考品)	R-1	3.98	1.66	1.97	ND	ND
	R-2	3.99	1.50	1.92	ND	ND
	R-3	3.88	3.27	3.34	1.80	2.56
	R-4	4.05	3.69	3.77	1.76	2.56
製品	I-1	0.67	ND	ND	ND	ND
	I-2	0.64	ND	ND	ND	ND

¹ F-1,2: 充填室床, F-3: 充填室壁. ² ND: 不検出を指す .

表 3. 生乳検体由来各種衛生指標菌の検出成績に関する相関の p 値.

	一般細菌数	腸内細菌科菌群	大腸菌群	大腸菌	黄色ブドウ球菌
一般細菌数	0.0000	0.0876	0.0947	0.4428	0.0004
腸内細菌科菌群	0.0876	0.0000	0.0027	0.3566	0.0253
大腸菌群	0.0947	0.0027	0.0000	0.1323	0.0687
大腸菌	0.4428	0.3566	0.1323	0.0000	0.1068
黄色ブドウ球菌	0.0004	0.0253	0.0687	0.1068	0.0000