

令和元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）

「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」

分担研究報告書

国内小規模アイスクリーム製造施設の衛生実態に関する研究

研究分担者	山崎栄樹	国立大学法人帯広畜産大学 動物・食品検査診断センター
研究協力者	倉園久生	国立大学法人徳島大学 研究支援・産官学連携センター
	奥村香世	国立大学法人帯広畜産大学 獣医学研究部門

**研究要旨：**近年、国内で実施される食品試験法や試験項目について、国際的な方法とのハーモナイゼーションに対する要求が高まっている。本研究では乳および乳製品について国内製造施設の実態に適合する衛生管理手法の確立を目的とし、本年度の研究においては北海道内の小規模アイスクリーム製造施設を対象として調査を実施した。小規模事業者においては複数のフレーバーを製造し販売する営業形態が一般的であるが、製造工程の解析からフレーバーごとに生物学的危害の程度に差が生じる可能性が示唆された。同一施設で製造された異なるフレーバーの生菌数を検証した結果、フレーバー間で最大  $10^2$  CFU/g 程度の差が確認され、製造施設における衛生管理においてフレーバー添加工程の管理の重要性が明らかとなった。加えて、培養法と簡易検査法を用いた解析結果を比較したところ、全フレーバーで培養法と簡易検査法の結果に良好な相関が確認され、複数のフレーバーの製造を行う小規模事業者の製造形態においても簡易検査法の有用性が示された。一方で、小規模施設において自主検査を運用する上で、インキュベーターの未整備等の設備的な問題点が抽出された。そこで、簡易検査法の試験工程の中で試験結果に影響を与えると考えられる要因を抽出し、当該要因の影響の重大さについて解析を行った。その結果、簡易検査法が試験条件のばらつきに対して十分な許容性を持っていることが明らかとなり、精確な試験条件を確保できない小規模施設においても簡易検査法が有用性であることが示唆された。これらの知見は今後、国内で整備が進む HACCP の制度化および、国際的整合性を担保した形での乳及び乳製品の製造工程管理及び製品の安全性確保に向けた微生物規格基準および試験法を設定する上での基礎的知見となるものと思われる。

A. 研究目的

食品の衛生に関する国際的整合性の整備  
は食品流通のグローバル化が進む現代社会

において喫緊の課題であり、国内においても国際的整合性をもった食品微生物基準を策定するための取り組みが進められている。これまで、国内の微生物規格基準およびそれらの試験法は過去に食中毒事例が多く見られた食品を中心に、国内の食習慣や製造環境に合うように独自に整備されてきた。しかしながら、上記の理由から、本邦で採用される試験法についても国際的に利用されている試験法とのハーモナイゼーションに対する要求が増しており、国際貿易を意識した試験法の整備が急務の課題となっている。

現在、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、生菌数と大腸菌群を微生物規格とした法規制が敷かれている。一方、EUやICMSFでは、HACCPによる工程管理を前提として、腸内細菌科菌群や グルクロニダーゼ陽性大腸菌等を衛生指標として用いた衛生管理を行っている。国内においては近年、平成30年の食品衛生法改正の中で示されたHACCPの制度化をはじめとした食品流通のグローバル化に対応した取り組みを行っているが、食品衛生管理を行う上では製造工程の管理に加え、衛生指標に用いる微生物種の妥当性やその試験法についても国際的整合性についての考慮が必要である。

本研究では、国内の乳及び乳製品製造加工施設における製造基準や自主管理基準の検証と評価を行うと共に、国内流通製品の衛生実態に関する知見の収集を行い、国内で流通する製品及び、それらを製造する施設の製造環境及び衛生管理実態の把握を目

的とした。北海道においては国内の他の地域と比較して、大規模な施設に加え小規模製造加工施設も多く存在し、広域流通しない乳および乳製品も多く販売されている。しかしながら観光業が盛んな北海道においては、これらの小規模流通製品も海外からの旅行者を含む多くの消費者へ影響を与えることが懸念される。本研究においてはこのような北海道に多くみられる小規模製造加工施設を調査対象とした。

本年度の研究では、北海道においてアイスクリームを製造する複数の施設について、事業者の協力を得て調査を実施し、小規模施設における製造工程管理および衛生検査実態の調査を行った。

## B. 研究方法

### 1. 調査対象

北海道内でアイスクリームを製造・販売する小規模事業者（十勝地方2社、石狩地方1社）について調査を実施した。調査においては、製造地域での販売に加え、通信販売・業務用販売を含めた道外での広域販売を行っている事業者を選定した。各施設について、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。

### 2. 衛生検査

各施設よりアイスクリーム製品を入手し、腸内細菌科菌群数、生菌数、大腸菌群数、大腸菌数について、培養法と簡易培地法を用いた検査を実施した。各試料及び、検査項目の検査方法の概要を以下に示す。

#### 2-1. 試料概要

検査に供した試料は通常の販売ルートを利用して入手した。施設 A においては店頭販売品を購入し、施設 B および C においては事業者が通常行っている流通販売を利用して購入した。

試料は受け入れ後に検査まで-30 にて保管し、検査に際しては約 20 g を無菌的に量り取った後に、23 のインキュベーター内に 40 分間静置することで融解し、融解物を滅菌生理食塩水で 10 倍希釈したものをを用いた。

## 2-2. 細菌検査法概要

### 2-2-1. 腸内細菌科菌群数検査概要

培養法においては ISO 21528-2:2004 に従い、Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) 培地を用いた混釈培養 (37±1 , 24±2 時間) に引き続くオキシダーゼ試験およびブドウ糖分解性試験による確定試験を行った。簡易培地法においては 1 社より入手した 1 製品を用い、製品添付の取扱説明書に従って検査を実施した。

### 2-2-2. 生菌数検査概要

培養法においては ISO 4883-1:2013 に従い、標準寒天培地を用いた混釈培養 (30±1 , 72±2 時間) を行った。簡易培地法においては 3 社より入手した 3 製品を用い、製品添付の取扱説明書に従って検査を実施した。

### 2-2-3. 大腸菌群数検査概要

培養法においては ISO 4832:2006 に従い、Violet Red Bile Lactose (VRBL) 寒天培地を用いた混釈培養 (30±1 , 24±2 時間) に引き続く Brilliant Green Bile (BGB) 培地を用いた確認培養 (30±1 , 24±2 時間) を行った。簡易培地法において

は 3 社より入手した 3 製品を用い、製品添付の取扱説明書に従って検査を実施した。

### 2-2-4. 大腸菌数検査概要

培養法においては ISO 16649-2:2001 に従い、Tryptone Bile X-Glucuronic (TBX) 培地を用いた混釈培養 (37±1 , 4 時間の培養の後に 44±1 , 24±2 時間) を行った。簡易培地法においては 3 社より入手した 3 製品を用い、製品添付の取扱説明書に従って検査を実施した。

## C. 結果

### 1. 施設概要の比較

本調査においては、従業員数 2~5 名の小規模製造工場を調査対象とした (表 1)。調査対象とした 3 つの事業者のうち、施設 C は FSSC 22000 の認証を受けていた一方で、施設 A および B は上記のような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。

各施設とも食品衛生法の改正に伴う HACCP に沿った衛生管理の制度化において小規模事業者への分類が想定される事業所であるものの、施設 A および B においてはインターネット販売や業務用販売を通して全国各地で入手可能な販売ルートを構築しており、これら小規模製造施設の衛生管理の重要性が示された。

### 2. 製造工程の比較

小規模施設における製造フローチャートを図 1 に示した。調査を行った全ての施設において基本的には共通の製造フローチャートとなっており、これは一般社団法人日本アイスクリーム協会が作成する「HACCP の考え方を取り入れた衛生管理のための手引書 (小規模なアイスクリーム類製造事業

者向け)」に示される「バッチ式加熱殺菌冷却・カップアイスの製造工程例」

(<https://www.mhlw.go.jp/content/11135000/000554002.pdf>)によく一致するものであった。

小規模アイスクリーム製造事業者においては同一製造ラインにて複数のフレーバーを製造する事業形態が一般的であり、主原料となる乳製品等については加工済み製品を受け入れている一方で、フレーバーを決定する副原料については加工品に加えて工場内で加工するものが多く見受けられた。また、副原料については多くの製品で加熱殺菌工程の後に添加されることから、フレーバーごとに細菌学的汚染度に差が生じる可能性が抽出された。

### 3. 検査体制の比較

施設 B 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、施設 A 及び B では独立した検査部門を持たず製品検査については全てを外部委託検査に頼っている現状が明らかとなった。

### 4. フレーバーごとの細菌学的汚染度の比較及び、簡易検査法の有効性の検討

製造工程の解析から同一施設で製造された製品であってもフレーバーごとに微生物学的汚染度に差が有る可能性が示唆された。そこで、施設 A および B より複数のフレーバーを入手（施設 C においては 1 種類のフレーバーのみを製造）し、生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数の比較検討を行った。全ての項目について、ISO 法に基づく混釈培養法に加え、簡易検査法による検査を実施し、アイスクリーム製品検査における簡易検査法の有用性の検討を同時に実施した。

大腸菌群、大腸菌および腸内細菌科菌群においては全てのフレーバーで ISO 法および簡易検査法のいずれにおいても検出限界（ $10^1$  CFU/g）以下であった。一方で、生菌数については施設 A では最大で  $10^{3.5}$  CFU/g、施設 B では最大で  $10^{2.5}$  CFU/g、施設 C では 0 cfu/g が検出され、各施設で製造された全ての製品が乳等省令に定める成分規格に比較して十分に低い値であることが確認された（図 2）。

フレーバー間での検出される細菌数について比較したところ、施設 A では最大で  $10^2$  CFU/g 程度、施設 B では最大で  $10^1$  CFU/g 程度の差が確認された。

ISO 法と簡易検査法の結果の比較においては、ISO 法に比較して簡易検査法で若干低い値を示す傾向にあったものの、全てのフレーバーにおいてその差は  $\log_{10}$  CUF/g  $< 1$  となり副原料による有意な阻害効果は観察されなかった。

### 5. 簡易検査法に与える試験条件の影響の検討

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）「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」において実施した小規模低温殺菌乳製造施設の衛生実態に関する研究において、小規模施設においては十分な検査設備が整っておらず、自主検査に簡易検査法を用いたとしても、その検査精度の担保が難しい現状が抽出されている。本年度に実施した小規模アイスクリーム製造施設の調査においても、小規模施設では検査を実施する上で十分な施設が整っておらず、簡易検査法を用いた自主検査の実施においても検査結果に影響を与え

る要因（特性要因）の制御が十分に実施出来ない現状が明らかとなった。

簡易検査法のプロトコールを解析した結果、図3に示す複数の特性要因が検出された。これらの中で「試料の縮分」および「コロニーカウント」については試験実施者の教育訓練での制御が可能であり、また「添加量」については最終的な試験結果に及ぼす影響を使用する機器の精度から推定可能である。一方で、「試料の融解条件（温度、時間）」および「培養条件（温度、時間）」については、温度や時間の変動と試験結果（コロニー数）の相関（影響の重大さ）の評価が難しく、実測データを基にした評価が必要となる。また、小規模製造施設の調査結果から、小規模施設においては特に精確な温度制御の実施が難しい実態が明らかとなっている。以上のことより、本研究においてはアイスクリーム試料に対して簡易検査法を利用した際の「試料の融解条件（温度、時間）」、および「培養条件（温度および時間）」の変動が試験結果に及ぼす影響について考察を行った。

5-1. 「試料の融解条件（温度、時間）」が試験結果に及ぼす影響についての解析

試料5gを表2に示す温度条件下で完全に融解するまで静置した後に、簡易検査法に添付の説明書に従った同一条件下で生菌数の検査を行った。その結果、融解条件間で試験結果に有意な差は認められなかった。

5-2. 「培養条件（温度および時間）」が試験結果に及ぼす影響についての解析

同一条件下で調整した試料（融解条件：23、40分間）を簡易検査培地に添加し、20、25、30、32、37の温度条件下で

24、48、72時間の培養（計15条件）を行った。それぞれの条件について、三回ずつの試行を行い、得られた結果群に対して外れ値検定（箱ひげ図解析および、スミノルフ・グラブス検定）を行った結果、20、24時間の培養で得られた結果は他の条件下で培養した際の結果と比較して外れ値とみなされた。また、得られた結果群を母集団としてそれぞれの測定結果のZ値を算出した結果、20、24時間の培養で得られた結果のみがZ値 $|Z| > 3$ となった（表3）。

#### D. 考察

##### 1. 小規模施設における製造工程調査および製品の細菌学的汚染度調査

小規模アイスクリーム製造事業者においては、同一工場内で複数のフレーバーを生産する事業形態が一般的である。フレーバーを決定する副原料は加熱殺菌工程の後で加えられることが一般的であり、一般社団法人日本アイスクリーム協会が作成する

「HACCPの考え方を取り入れた衛生管理のための手引書（小規模なアイスクリーム類製造事業者向け）」内においても、副原料を加熱殺菌後に添加する場合は殺菌済みの原料を使用することが求められている。副原料については加工済み製品を購入し使用する場合に加えて、商品価値付加の理由から各事業者において独自に加工したのもも使用されており、その加工方法もフレーバーごとに様々である。本研究の解析結果からフレーバーごとに最終製品の細菌学的汚染度が異なることが明らかとなった。これらの結果および、小規模事業者において同一製造日に複数のフレーバーを生産し、か

つ各フレーバーを小ロットで生産している実情を考えると、簡易検査法を用いた各製品の迅速な日常検査による細菌学的汚染度のトレンド解析は非常に有用かつ効果的な方法であると考えます。

## 2. 簡易検査法の有用性解析

小規模事業者にて製造された複数のフレーバーに対する解析の結果、全てのフレーバーにおいて細菌学的汚染度が乳等省令に定める成分規格に比較して十分に低い値であることが確認された。ISO法（混希培養法）と簡易検査法の比較においては、ISO法に比較して簡易検査法で若干低い値を示す傾向にあったものの、全てのフレーバーにおいてその差は $< 1 \log \text{CFU/g}$ となり、成分規格に対して十分に低い汚染度の国内流通品に対しては簡易検査法が十分に使用可能な方法であることが確認された。

一方で、たとえ簡易検査法を用いた試験の実施を計画したとしても、小規模施設においては現状では十分な試験設備が備えられているとはいえ、各施設において簡易検査法に添付の取扱説明書に従った試験の実施が現実的ではない実態も明らかとなった。本研究では精確な温度制御をしていない条件下で簡易検査法を利用する場合を想定し、温度条件が試験結果に与える影響について解析を行った。その結果、25 - 37、24 - 72 hの範囲においては個々の条件下で得られる試験結果に有意な差は観られなかった。以上の結果から、簡易検査法は恒温槽などの設備の精確さが担保できない施設においても十分に使用可能な方法であることが示唆された。

## E. 結論

1) 小規模アイスクリーム製造施設の調査から、小規模施設では細菌学的汚染度の異なる複数のフレーバーを小ロットで製造している実態が明らかとなり、各施設において簡易検査法を利用した迅速な日常検査導入の重要性が示唆された。

2) 簡易検査法を用いた試験の試験結果に試験設備条件が与える影響について検討した結果、恒温槽等を用いた精確な温度管理が難しい試験条件下においても試験条件の大きなコントロールにより、簡易検査法を用いて適切な結果が得られることが明らかとなった。本結果は小規模製造施設の日常検査における簡易検査法の有用性を示すものである。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Yahiro K, Ogura K, Terasaki Y, Satoh M, Miyagi S, Terasaki M, Yamasaki E, Moss J.: Cholix toxin, an eukaryotic elongation factor 2 ADP-ribosyltransferase, interacts with Prohibitins and induces apoptosis with mitochondrial dysfunction in human hepatocytes. *Cell Microbiol.*, 2019, 21:e13033.

### 学会発表

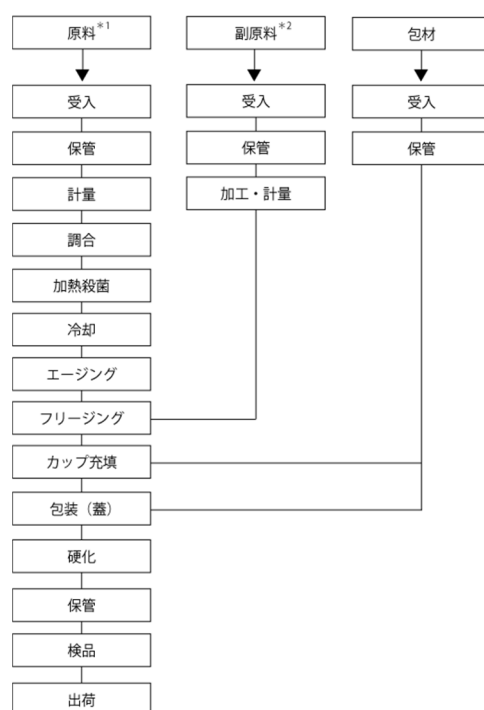
1. 八尋錦之助、小倉康平、寺崎泰弘、宮城聡、山崎栄樹。ヒト肝臓細胞における新規 Cholix 結合膜蛋白質の同定と細胞致死機構の解明。第93回日本細菌学会、名古屋市（2020.3）

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

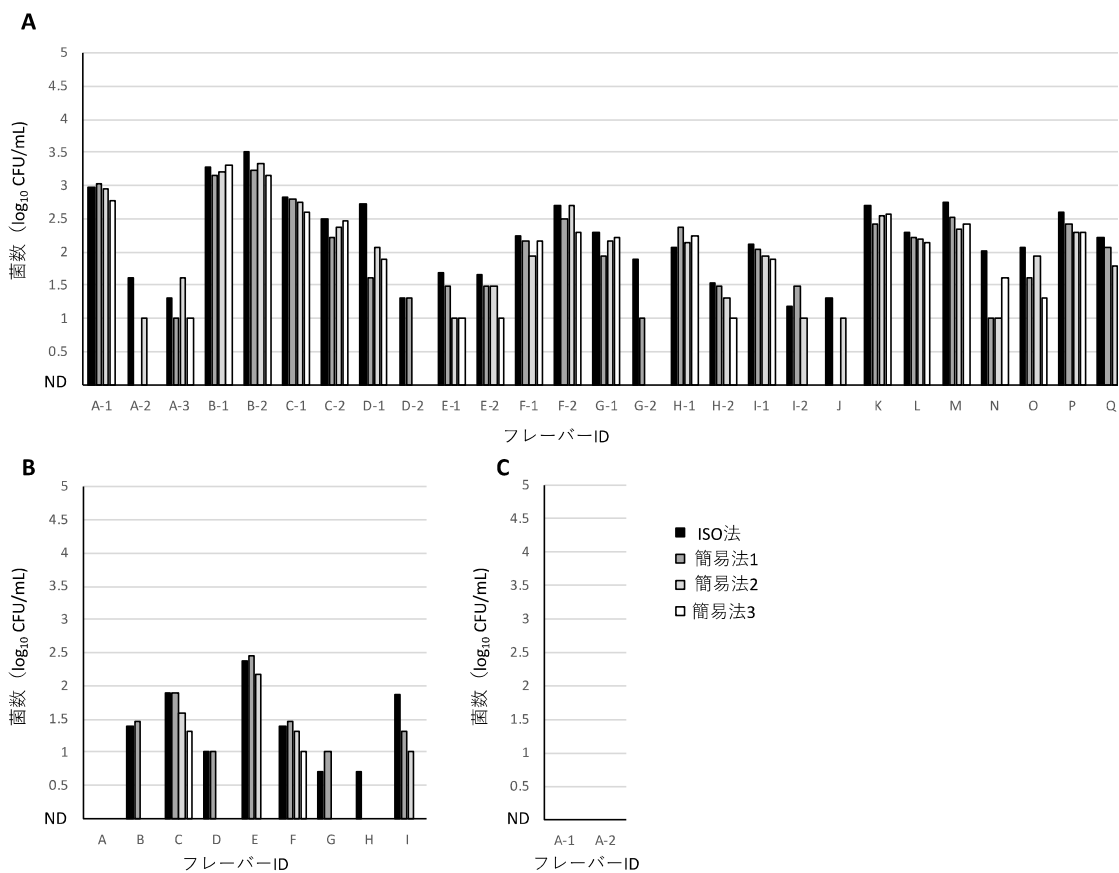
表 1 調査対象施設の概要

施設名	施設 A	施設 B	施設 C
製造品目	アイスクリーム、ラクトアイス	アイスクリーム	アイスクリーム
従業員数	5名	4名	2名
包装形態	紙容器	紙容器	紙容器
生産量	週5(繁忙期)-2回(閑散期) 製造日あたりの製造量 ・2,000個(カップアイス換算)	週5回(繁忙期)-2回(閑散期) 製造日あたりの製造量 ・1,000個(カップアイス換算)	月2回 製造日あたりの製造量 ・400個(カップアイス換算)
販売先	直営販売所(北海道内3箇所) 通信販売 業務用販売(PB含む)(北海道、東京都)	直営販売所(北海道内2箇所) 非直営販売所(百貨店等)(北海道、東京都、徳島県、島根県、兵庫県) 通信販売 業務用販売(PB含む)(北海道、東京都)	直営販売所(北海道内1箇所)
認定	無し	無し	FSSC 22000



\*1 原料：生クリーム、脱脂粉乳、バター、砂糖、ブドウ糖、安定剤、乳化剤、水  
\*2 副原料：フレーバー毎に異なる

図 1 小規模アイスクリーム製造施設における、カップアイスクリーム製造フローチャート



**図2 小規模製造施設で製造されたアイスクリーム製品の生菌数**

各施設から購入した製品について ISO 法及び簡易検査法(3 種類)を用いた生菌数検査の結果を示した。縦軸の ND は検出限界以下を示す。それぞれのグラフは(A)施設 A で製造された A-Q までの異なる 17 種類のフレーバー(フレーバー A については枝番で示す製造日の異なる 3 つの製造ロットを、フレーバー B-I については枝番で示す製造日の異なる 2 つの製造ロットを、フレーバー J-Q については 1 製造ロットを試験に供した)、(B)施設 B で製造された A-I までの異なる 9 種類のフレーバー、(C)施設 C で製造された 1 種類のフレーバー(製造日の異なる 2 つの製造ロットを試験に供した)に対する試験結果を示す。



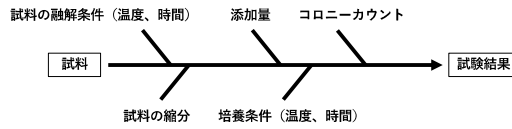


図3 簡易検査法の試験結果に影響を与える要因(特性要因図)

表2 異なる条件で融解した試料に対して簡易検査法を用いて得られる結果の比較

試料の融解条件		結果		
温度	時間	1回目	2回目	3回目
4	120 min	440 (-1.82)	620 (0.53)	550 (-0.38)
15	50 min	620 (0.53)	580 (0.01)	650(0.92)
23	35 min	460 (-1.56)	640 (0.79)	530 (-0.65)
32	30 min	500 (-1.04)	690 (1.45)	640 (0.79)
37	25 min	610 (0.40)	510 (-0.91)	650 (0.92)

それぞれの数値はアイスクリーム試料1g当りの菌数(cfu/g)を示す。また括弧内の数値は得られた結果群を観察集団とした際の、個々の試験結果のZ値を示す。

表3 異なる条件で培養した場合に得られる簡易検査法の結果の比較

培養条件		結果		
温度	時間	1回目	2回目	3回目
20	24h	0 (-3.38)	0 (-3.38)	0 (-3.38)
	48h	910 (0.75)	800 (0.25)	890 (0.65)
	72h	910 (0.75)	800 (0.25)	920 (0.79)
25	24h	830 (0.38)	680 (-0.30)	820 (0.34)
	48h	900 (0.70)	730 (-0.07)	840 (0.43)
	72h	900 (0.70)	730 (-0.07)	840 (0.43)
30	24h	650 (-0.43)	720 (-0.12)	960 (0.97)
	48h	650 (-0.43)	720 (-0.12)	960 (0.97)
	72h	650 (-0.43)	720 (-0.12)	960 (0.97)
32	24h	750 (0.02)	760 (0.06)	800 (0.25)
	48h	750 (0.02)	760 (0.06)	800 (0.25)
	72h	750 (0.02)	760 (0.06)	800 (0.25)
37	24h	700 (-0.21)	760 (0.06)	920 (0.79)
	48h	700 (-0.21)	760 (0.06)	920 (0.79)
	72h	700 (-0.21)	760 (0.06)	920 (0.79)

それぞれの数値はアイスクリーム試料1g当りの菌数(cfu/g)を示す。また括弧内の数値は得られた結果群を観察集団とした際の、個々の試験結果のZ値を示す。

