

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）
分担研究報告書

アイスクリーム類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
研究協力者 鈴木穂高 茨城大学農学部
永島侑起 茨城大学農学部
渡辺 愛 茨城大学農学部
御堂梨花子 茨城大学農学部
百瀬愛佳 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨

日本国内における乳及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いる。そのため、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、乳及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、本年度はアイスクリーム類製品 127 検体における細菌数、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、アイスクリーム類について微生物規格を逸脱した製品は見られなかった。簡易培地を用いた細菌数の検討では、製品により公定法の結果と差が見られ、導入検証の必要性が示された。

A. 研究目的

食品の安全性を確保するため、日本を含む世界各国において様々な食品に対し微生物規格が定められている。規格の対象となる項目は、過去に食中毒事例の原因となった微生物のみならず、食品の衛生状況の指標となる項目

が用いられており、国内流通食品の衛生確保に重要な役割を果たしてきた。一方、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。一方、現在 EU 等では乳製品の製造工程管理を 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。国内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と考えられる。

以上の背景を踏まえ、令和元年度は、国内で製造流通するアイスクリーム類製品を対象として、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、並びに混釈培養法の代替としての表面塗抹法について考察を行ったので報告する。

B. 研究方法

市販のアイスクリーム類について、衛生指標菌汚染実態を調査した。調査は令和元年 7 月から令和 2 年 3 月まで行い、検体はアイスクリーム(乳固形分 15%以上、うち乳脂肪分 8%以上) 52 検体、アイスマルク(乳固形分 10%以上、うち乳脂肪分 3%以上) 45 検体、ラクトアイス(乳固形分 3%以上) 30 検体の合計 127 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 16649-2:2001 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 2 種を、製品の指示書に示された培養温度及び時間に従って用いた。同一検体間の試験法による菌数の比較は、対応のある t 検定により統計解析を行った。種別ごとの菌数の比較は一元配置分散分析及び Tukey の検定を行った。検出限界値未満の値は 0 CFU/g として計算を行い、対数化に当たって全数値に 1 を加算した。検出された腸内細菌科菌群の菌種同定は、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。3 カテゴリー間での腸内細菌科菌群陽性率の比較は、フィッシャーの正確確率検定(拡張型)により行った。

C. 研究結果

今回の調査結果概要を表 1 に示した。アイスクリーム類の公定法での細菌数(32 48 時間培養)は、アイスクリーム 52 検体で平均 1.026 log CFU/g (検出限界未満 ~ 3.790 log CFU/g)、アイスマルク 45 検体で平均 1.187 log CFU/g(検出限界未満 ~ 3.301 log CFU/g)、ラクトアイス 30 検体で平均 1.140 log CFU/g (検出限界未満 ~ 3.072 log CFU/g)であった。3 カテゴリーの細菌数に、差は認められなかった(p=0.6516)。公定法と同一の培養条件(32 48 時間)で簡易培地 1 を用いた際の細菌数は、アイスクリームで平均 1.098 log

CFU/g (検出限界未満 ~ 4.017 log CFU/g) アイスマルクで平均 1.156 log CFU/g (検出限界未満 ~ 3.301 log CFU/g) ラクトアイスで平均 1.206 log CFU/g (検出限界未満 ~ 2.207 log CFU/g) であった。いずれのカテゴリーにおいても、公定法と簡易培地 1 における細菌数に有意な差は見られなかった。簡易培地 2 は製品の指示書に従い、32 24 時間で菌数を測定した。細菌数は、アイスクリームで平均 0.861 log CFU/g (検出限界未満 ~ 3.644 log CFU/g) アイスマルクで平均 0.787 log CFU/g (検出限界未満 ~ 3.322 log CFU/g) ラクトアイスで平均 0.891 log CFU/g (検出限界未満 ~ 2.044 log CFU/g) であった。簡易培地 2 の細菌数を公定法と比較したところ、アイスマルクでは有意に低く、アイスクリームとラクトアイスではやや低い傾向が見られた。ISO 法による細菌数(30 72 時間培養)は、アイスクリームで平均 1.237 log CFU/g(検出限界未満 ~ 3.909 log CFU/g)、アイスマルクで平均 1.404 log CFU/g(検出限界未満 ~ 3.352 log CFU/g) ラクトアイスで平均 1.268 log CFU/g (検出限界未満 ~ 3.163 log CFU/g) であった。ISO 法における細菌数を公定法と比較したところ、アイスクリームとアイスマルクにおいて有意に高い結果が得られたが、ラクトアイスでは差は見られなかった。ISO 法については SPC 寒天培地を用いた混釈培養と平行して、同培地を用いた表面塗抹を行ったところ、アイスクリームで平均 0.868 log CFU/g(検出限界未満 ~ 3.716 log CFU/g)、アイスマルクで平均 0.785 log CFU/g (検出限界未満 ~ 3.505 log CFU/g) ラクトアイスで平均 0.668 log CFU/g (検出限界未満 ~ 2.179 log CFU/g) となり、いずれのカテゴリーでも混釈培養における細菌数よりも有意に低い結果となった。

各カテゴリー間の相関を寄与率で算出したところ、アイスクリームにおいて公定法と簡易培地 1 では、0.7303 (図 1)、簡易培地 2 で 0.6521 (図 2)、アイスマルクでは簡易培地 1 で 0.2875 (図 3)、簡易培地 2 で 0.0783 (図 4)、ラクトアイスでは簡易培地 1 で 0.334 (図 5)、簡易培地 2 で 0.3795 であった (図 6)。公定法と ISO 法の間寄与率は、アイスクリームで 0.7149 (図 7)、アイスマルクで 0.4201 (図 8)、ラクトアイスで 0.3917 (図 9) であった。一方、ISO 法の混釈培養と表面塗抹の間寄与率は、アイスクリームで 0.5915 (図 10)、アイスマルクで 0.2525 (図 11)、ラクトアイスで 0.0772 (図 12) であった。

今回試験した検体からは、いずれの試験法においても、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌は検出されなかった。一方腸内細菌科菌群は、アイスクリームの 15.4% (8/52 検体)、アイスマルクの 13.3% (6/45 検体) 及びラクトアイスの 6.7% (2/30 検体) より検出された (表 2)。全体における陽性率は、12.6% (16/127 検体) であった。フィッシャーの正確確率検定により、アイスクリーム、アイスマルク及びラクトアイス間の陽性率の検定を行ったところ、アイスクリーム類の種別による陽性率に有意差は見られなかった ($p=0.551414$)。腸内細菌科菌群陽性であった 16 検体は全て、定性法(ISO 21528-1: 2016)で検出された。一方、定量法(ISO 21528-2:2016)においても腸内細菌科菌群が検出された検体は、アイスクリーム 2 検体のみであり、いずれの検体においても、検出菌数は 5 CFU/g であった。腸内細菌科菌群が検出された全 16 検体で、腸内細菌科菌群用の簡易培地からは菌は検出されなかった。また、腸内細菌科菌群陽性を示した検体からは、公定法及び簡易

培地のいずれにおいても大腸菌群は検出されなかった。検出された腸内細菌科菌群の集落は、純培養後菌種同定を行ったところ、8 検体由来の菌株が *Enterobacter* 属の細菌であった(表3)。

D. 考察

本研究での調査により、国内で市販されているアイスクリーム類 127 検体の細菌数は、最大のもので $6150(3.787 \log)$ CFU/g であり、微生物規格の一つである $100,000(5 \log)$ CFU/g (アイスクリーム) あるいは $50,000(4.699 \log)$ CFU/g (アイスマルク及びラクトアイス) を大幅に下回っており、一定の衛生基準が保たれていることが示された。これら検体はもう一つの微生物基準である大腸菌群についても、公定法において陰性であったものの、16 検体(12.6%) については腸内細菌科菌群定性法で陽性を示し、うち 2 検体については定量法で菌が検出されていた。これは、腸内細菌科菌群定性試験法の検出下限値が 0.04 CFU/g である一方、アイスクリーム類における大腸菌群公定法の検出下限値が 5 CFU/g であること、大腸菌群試験法で用いる選択分離培地であるデソキシコレート寒天培地が乳糖を含むのに対し、腸内細菌科菌群試験法で用いる選択分離培地である VRBG 寒天培地がブドウ糖を含んでおり、対象菌の増殖性に相違が見られたためと推察された。また、腸内細菌科菌群が定性法のみから検出された 14 検体において、その菌量の理論値は $0.04 \sim 4.99$ CFU/g であり、定量法においても検出された 2 検体では 5 CFU/g であったことから、いずれの検体も腸内細菌科菌群を製品出荷時の製造工程規格とする EU 規格においても、逸脱となる検体は見られなかった。

アイスクリーム類において、混釈培養による公定法と簡易培地での集落形成性の差は製品によって異なることが示されたことから、簡易培地の使用に際しては、導入検証が必要であると思われた。ISO 法の細菌数が公定法より高い傾向にあるのは、前者の培養時間が後者より 24 時間長いためと思われるが、ラクトアイスでは差が見られなかった。ラクトアイス製品には乳脂肪を含まない製品が多く、アイスクリーム及びアイスマルクとの原料の違いによる汚染細菌叢が異なるためである可能性が考えられた。ISO 法について、混釈培養法と表面塗抹法で比較したところ、細菌数に有意な差が見られた。アイスクリーム類においては、混釈培養でのみ微小集落を形成しうる菌が多く存在していたためと考えられ、食品に含まれる細菌叢によっては表面塗抹法で細菌数測定を代替できない可能性が示された。

今回の試験により、市販のアイスクリーム類は概ね良好な衛生状態にあることが示された。次年度は、乳製品の微生物規格としての腸内細菌科菌群の有用性を検討するため、今年度検出された腸内細菌科菌群細菌の各種培地における増殖速度等の検討並びに簡易培地の実用性を向上させるための検討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、市販のアイスクリーム類 127 検体を対象とした衛生指標菌調査を行ったところ、供試製品検体に微生物規格違反検体は見られず、衛生状態は概ね良好であった。細菌数試験法間の成績比較を通じ、アイスクリーム類では簡易培地の製品

によって、公定法と差が見られるものがあり、また、ISO法の表面塗抹法は混釈培養法より有意に低い結果を示したことから、代替試験法については導入検証が必要であることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表：

岡田 由美子, Amalia Widya Rizky, 永島 侑起, 鈴木 穂高, 下島 優 香子, 福井 理 恵, 森田 加奈, 平井 昭彦, 朝倉 宏 市販 低温殺菌乳における微生物規格に関わる試験法の検討。第92回日本細菌学会総会（平成31年4月、札幌）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 . 各試験法によるアイスクリーム類中の細菌数

		公定法	簡易培地 1	簡易培地 2	ISO 法	表面塗抹*
アイスクリーム	平均 (log CFU/g)	1.026	1.098	0.861	1.237	0.868
	n=52					
	標準偏差	0.984	0.972	0.946	0.971	1.093
	検出限界未満の 検体数	20	18	25	12	30
	p value		0.330	0.052	<0.01	<0.01
アイスマルク	平均 (log CFU/g)	1.187	1.156	0.787	1.404	0.785
	n=45					
	標準偏差	0.794	0.782	0.791	0.831	1.053
	検出限界未満の 検体数	9	11	20	6	28
	p value		0.786	<0.01	<0.05	<0.01
ラクトアイス	平均 (log CFU/g)	1.140	1.206	0.891	1.268	0.668
	n=30					
	標準偏差	0.792	0.636	0.730	0.620	0.968
	検出限界未満の 検体数	7	5	11	2	20
	p value		0.591	0.052	0.272	<0.01

* : 表面塗抹法のみ、有意差検定を ISO 法との間で行った

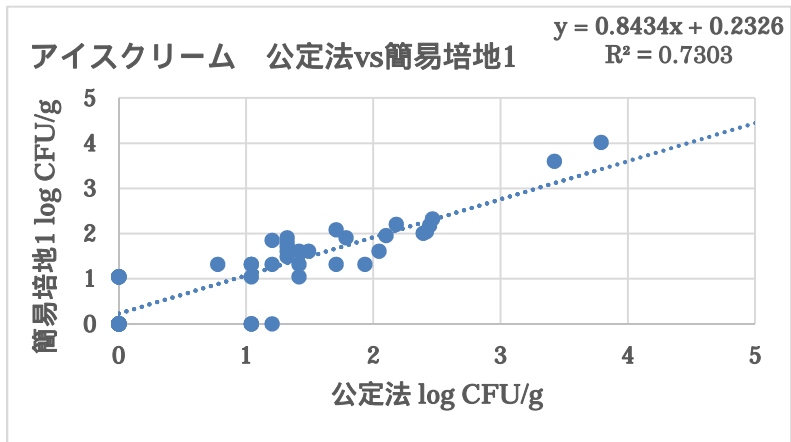


図1. 公定法と簡易法1における細菌数の相関 (アイスクリーム)

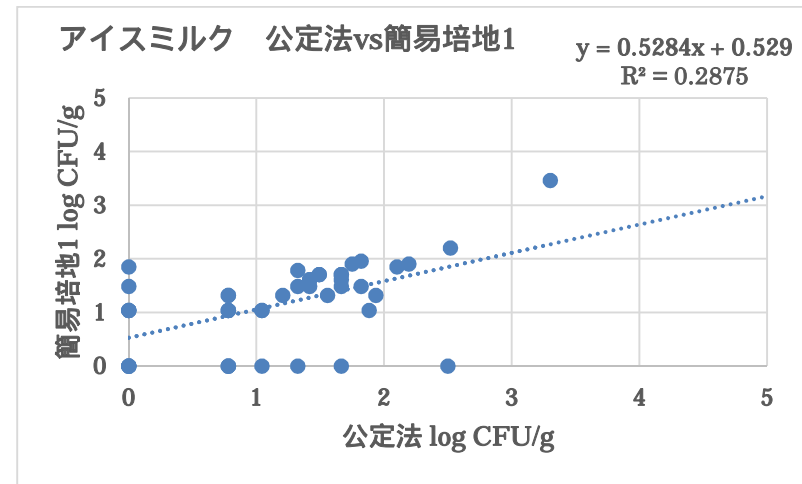


図3. 公定法と簡易培地1における細菌数の相関 (アイスマルク)

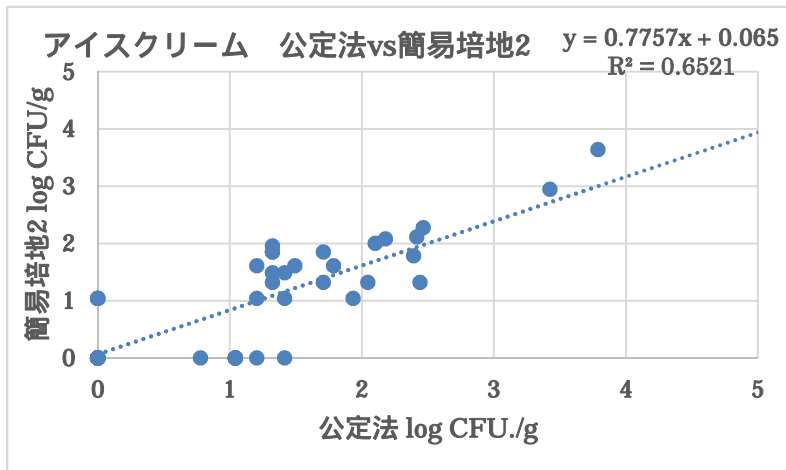


図2. 公定法と簡易培地2における細菌数の相関 (アイスクリーム)

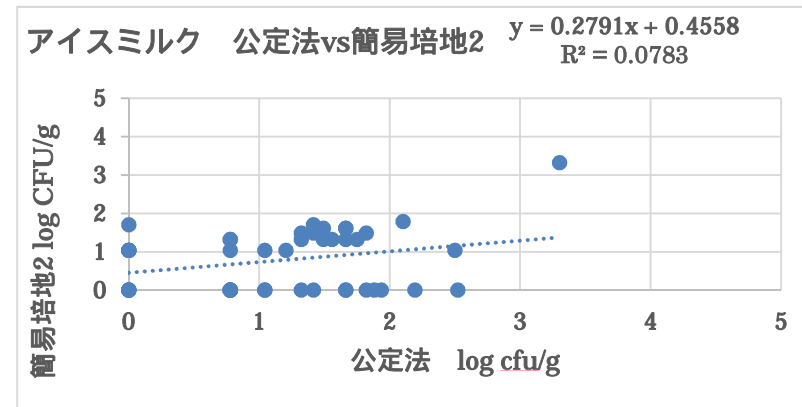


図4. 公定法と簡易培地2における細菌数の相関 (アイスマルク)

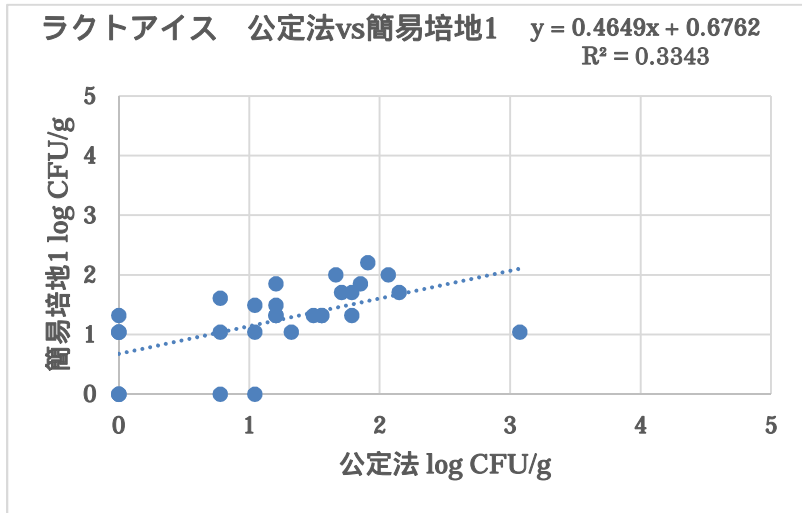


図5. 公定法と簡易培地1における細菌数の相関(ラクトアイス)

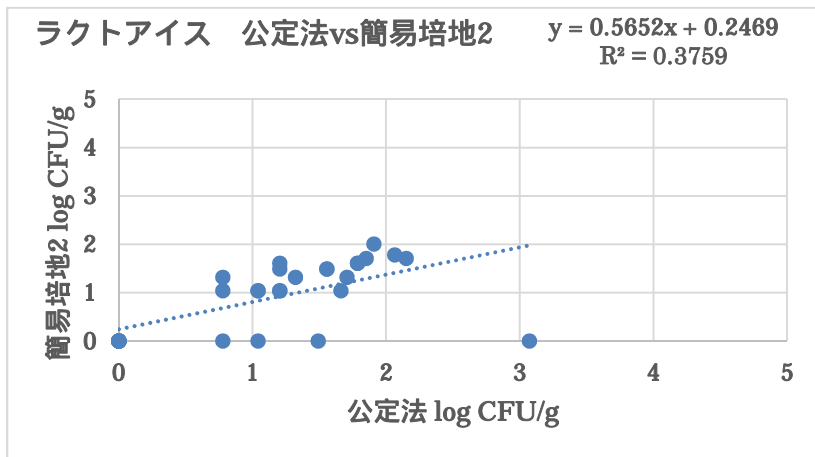


図6. 公定法と簡易培地2における細菌数の相関(ラクトアイス)

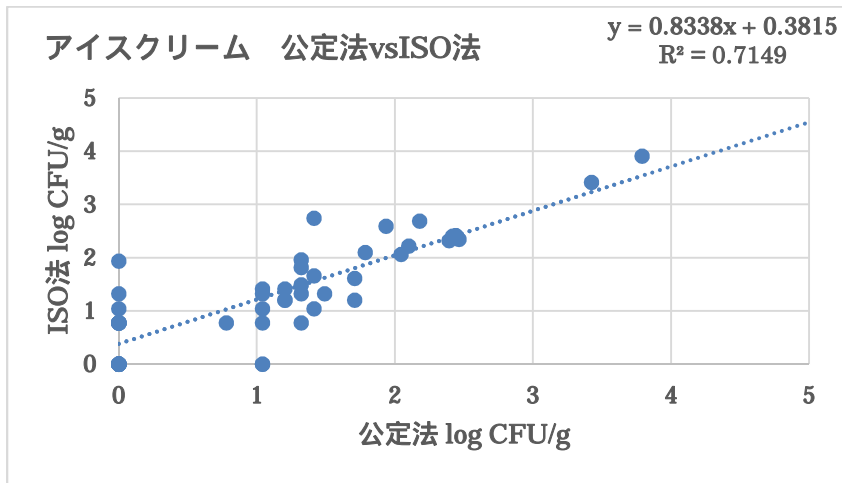


図7. 公定法とISO法における集落数の相関(アイスクリーム)

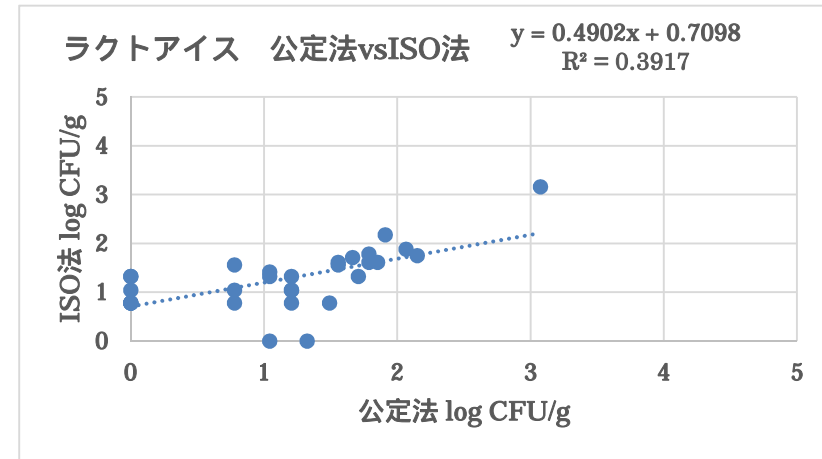


図9. 公定法とISO法における細菌数の相関(ラクトアイス)

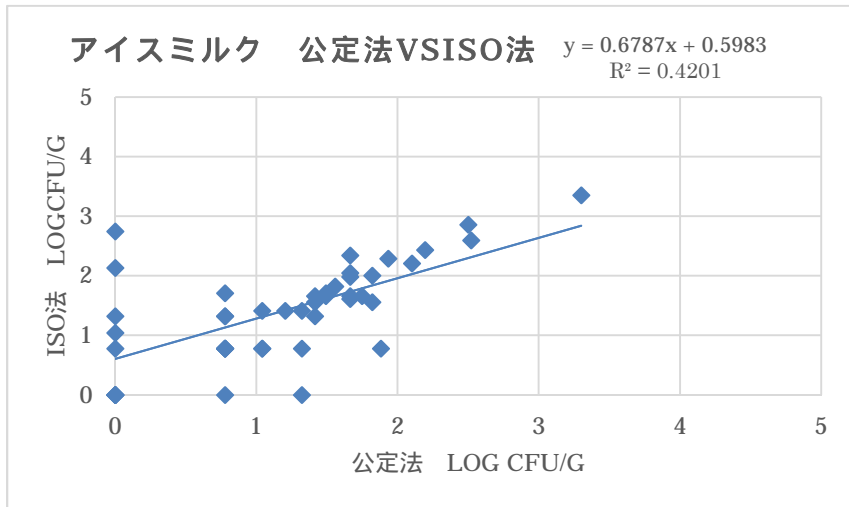


図8. 公定法とISO法における細菌数の相関(アイスマルク)

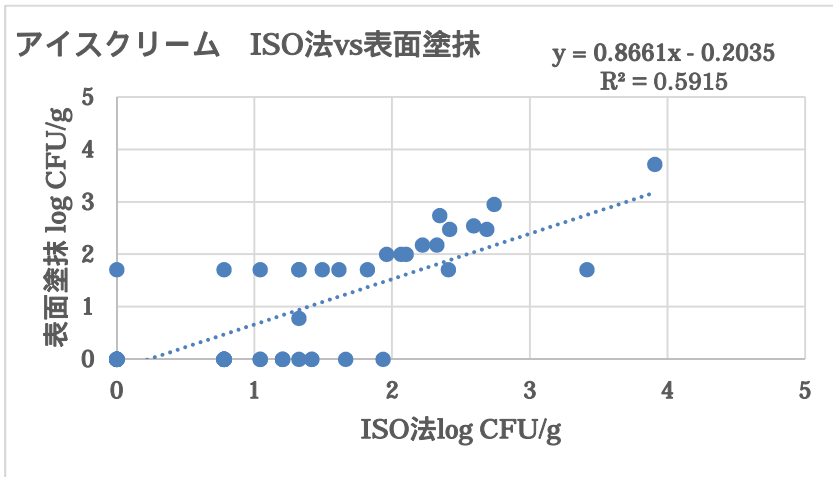


図 10 . ISO 法の混釈培養と表面塗抹法の細菌数の相関 (アイスクリーム)

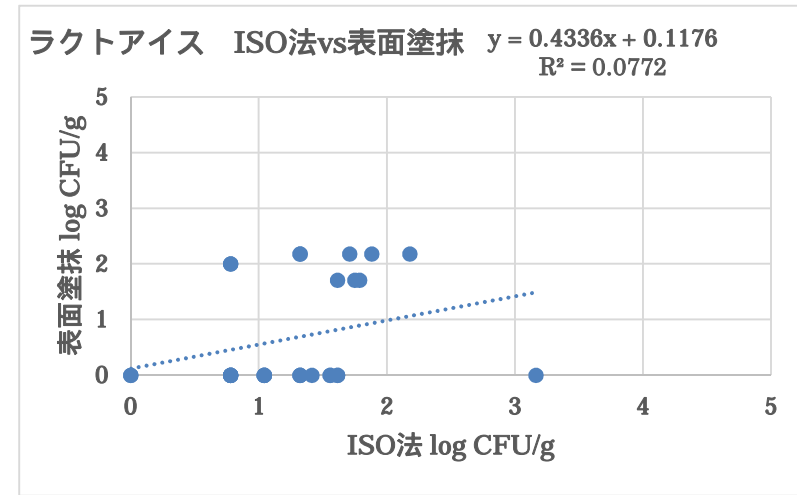


図 12 . ISO 法の混釈培養と表面塗抹法の細菌数の相関 (ラクトアイス)

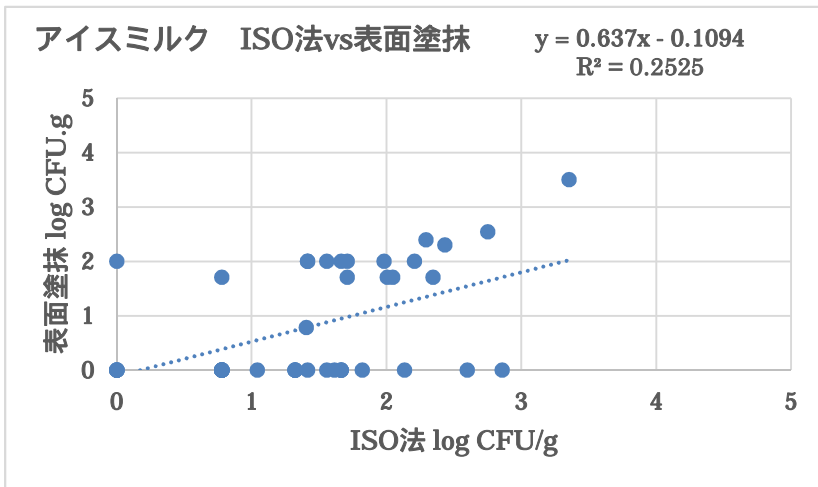


図 11 . ISO 法の混釈培養と表面塗抹法の細菌数の相関 (アイスマルク)

表2. アイスクリーム類における腸内細菌科菌群の検出状況

	定性法			定量法	
	検体数	陽性検体数	%	陽性検体数*	%
アイスクリーム	52	8	15.4	2	3.8
アイスミルク	45	6	13.3	0	0
ラクトアイス	30	2	6.7	0	0
合計	127	16	12.6	2	1.6

表 3. 検出された腸内細菌科菌群細菌の菌種同定結果

種別	検体	同定菌種	
		定性法	定量法
アイスクリーム	1	<i>Acinetobacter</i> sp.	
	2	<i>Enterobacter</i> sp.	
	3	<i>Enterobacter</i> sp.	
	4	<i>Pantoea septica</i>	
	5	<i>Serratia quinivorans</i>	
	6	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Pantoea</i> sp.
	7	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.
	8	<i>Enterobacter kobei</i>	
アイスマルク	1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	
	2	<i>Acinetobacter</i> sp.	
	3	<i>Enterobacter</i> sp.	
	4	<i>Enterobacter</i> sp.	
	5	<i>Klebsiella oxytoca</i>	
	6	<i>Serratia liquefaciens</i>	
ラクトアイス	1	<i>Pluralibacter gergoviae</i>	
	2	<i>Enterobacter ludwigii</i>	