

国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品  
の試験法の研究

( 課題番号 : H27 - 食品 - 一般 - 005 )

平成29年度 総括・分担研究報告書  
及び

平成27～29年度 総合研究報告書

( 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 )

研究代表者 寺 嶋 淳  
岩手大学

( 前所属 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 )

平成 30 ( 2018 ) 年 5 月

## 目次

### 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

#### I. 平成 29 年度総括研究報告書

国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の試験法の研究・・・・・・・・・・ 1

研究代表者 寺嶋 淳 岩手大学 農学部

(前所属 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

#### II. 平成 29 年度分担研究報告書

乳及び乳製品試験法に関する修正試験法に向けた検討

(理化学分野)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13

研究分担者 岩崎 司 公益財団法人日本乳業技術協会

乳及び乳製品試験法に関する修正試験法に向けた検討

(微生物分野)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 72

研究分担者 平井昭彦 東京都健康安全研究センター

平成 29 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  
総括研究報告書

国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の試験法の研究

研究代表者 寺嶋 淳 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

**研究要旨：**

乳等省令の別表二 乳等一般の成分規格及び製造の方法の基準のうち、(七)乳等の成分規格の試験法で定められる乳及び乳製品の試験法に該当する、EU 及び米国の最新の試験法について情報収集を行った。対応する試験法を整理した項目のうち、アイスクリーム類、濃縮乳・無糖練乳、加糖練乳について、米国における試験法 (Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL : OMA 法) 及び欧州連合における試験法 (ISO 法) と乳等省令法との比較試験を実施した。アイスクリーム類は、乳脂肪分の試験法を OMA 法と比較し、測定値は OMA 法と比べて乳等省令法が低く、室間再現相対標準偏差は乳等省令法が大きかった。濃縮乳・無糖練乳の全固形分は、乳等省令法、ISO 法、OMA 法の 990.19(AOAC990.19)及び 990.20(AOAC990.20)の 4 法を比較し、測定値は AOAC990.19 及び AOAC990.20 がほぼ同じ値で高く、次いで ISO 法、乳等省令法という順であった。室間再現相対標準偏差は、大きい順に ISO 法、乳等省令法と AOAC990.19、AOAC990.20 となった。濃縮乳・無糖練乳の乳脂肪分の測定値は ISO 法、OMA 法に比べて乳等省令法が低く、室間再現相対標準偏差は ISO 法、OMA 法に比べて乳等省令法が大きかった。加糖練乳の全固形分は ISO 法と比較し、測定値は ISO 法に比べて乳等省令法が高く、室間再現相対標準偏差は乳等省令法が大きかった。加糖練乳の乳脂肪分の測定値は ISO 法、OMA 法に比べて乳等省令法が低く、室間再現相対標準偏差は大きい順に乳等省令、ISO 法、OMA 法であった。

生乳における細菌数の直接個体鏡検法 (ブリード法) でのニューマン染色液の代替染色法について検討した。代替染色液として、ブロードハーストパーレイ染色液、その改良染色液である BPV 染色液およびブロードハーストパーレイ改良染色液を用いて、4 施設によるコロバレイティブスタディを行い、各染色液のニューマン染色液との同等性を検証した結果、いずれの染色液も同等性が確認された。よって、ブロードハーストパーレイ染色液およびその改良染色液はニューマン染色液の代替染色液として使用可能と示唆された。

## 研究分担者

岩崎 司 公益財団法人日本乳業技術  
協会 事業部  
平井昭彦 東京都健康安全研究センタ  
ー 微生物部

### A. 研究目的

本研究では、乳等省令における試験法に関連する情報収集と改正が必要と考えられる試験法について検討し、最適な試験法の策定の可能性も含めて、将来的な展望を示すことを目的とする。特に、海外の乳及び乳製品に関する試験法を規定する成分規格に関する情報を収集し、乳等省令と比較することで国際的にも対応可能な試験法の確立を目指す。

### B. 研究方法

#### 1. EU 及び米国における乳及び乳製品の試験法と乳等省令による試験法の比較

乳等省令の別表二 乳等一般の成分規格及び製造の方法の基準のうち、(七)乳等の成分規格の試験法で定められる乳及び乳製品の試験法に該当する、EU 及び米国の最新の試験法について文献調査・整理を行い、取りまとめた。

乳及び乳製品を含む食品の成分規格と試験法について、EU では COMMISSION REGULATION (EC) No 273/2008 of 5 March 2008 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products が定められており、試験法は ISO 試験法を使用している。また、米国では Code of Federal Regulation (CFR ; 連邦行政規則集) CFR TITLE 21 Food and Drugs CHAPTER

I FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES SUBCHAPTER B-FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION を定めており、乳及び乳製品については、131. MILK AND CREAM、133. CHEESES AND RELATED CHEESE PRODUCTS、135. FROZEN DESSERTS に記載されている。また、CFR では、試験法として、Official Methods of Analysis of AOAC International (AOAC) が定める試験法 (AOAC 法) を利用することが記載されている。

#### 2. 乳等省令で規定される細菌数の直接個体鏡検法(ブリード法)の代替染色法の検討

今年度は、ブロードハーストパーレイ染色液 (B2)、その改良染色液である BPV 染色液 (B1, ベッセル【獣医環境衛生研究所】) およびブロードハースト・パーレイ改良染色液 (公益社団法人 北海道酪農検定検査協会生乳検査部) のニューマン染色液 (N, 関東化学) との同等性を検証するために、4 施設によるコラボレイティブスタディを行った。2017 年に関東地方の生乳販売農業協同組合連合会生乳検査所で検査した後に冷蔵で当センターに輸送された生乳 2 検体を供試した。

### C. 研究結果

#### 1. 海外における乳及び乳製品の試験法と乳等省令による試験法の比較

今年度調査した乳等省令の試験項目に対応する ISO 試験法と AOAC 法は、表 3 1 のとおりである。なお、平成 28 年度に比較を行った試験法については、網掛けとし、掲載を割愛している。本年度に実施し

た項目の詳細については分担研究の報告を参照のこと。

## 2. 乳等省令で規定される細菌数の直接 個体鏡検法(ブリード法)の代替染色法の 検討

ブリード法鏡検時の各種染色液の染色像では、Nは初心者でも安定した染色が可能であり、鏡検時に判別しやすい印象であった。B1、B3は背景がピンク色、細菌および体細胞は青色に染色され、色が異なり判別しやすく、また色彩も判別しやすい印象であった。B2はB1と同じように背景と対象物の色が異なり判別しやすい一方、背景が濃く染まる場合があり、濃い部分では測定がしづらく、判別しにくい印象であった。

コラボレイティブスタディにより、B1、B2、B3いずれの染色液においても、求められる細菌数および体細胞数は試料1、2ともいずれも標本のばらつきの範囲内に含まれ、染色液Nによって得られる数値と同等であると考えられた。

表 エラー! 指定したスタイルは使われていません。-1 乳等省令の試験項目に対応する ISO 法と AOAC 法で規定されている試験法

分類	成分規格	試験法 (ISO) 【参照法】 1	試験法 (ISO) 【最新法】 2	試験法 (AOAC) 【参照法】 3	試験法 (AOAC) 【最新法】 4
a 生乳		—		—	
	比重 (摂氏一五度において) 一・〇二八以上	—		—	
	酸度 (乳酸として)	—		—	
	細菌数	—		—	
b 生山羊乳		—		—	
	比重 (摂氏十五度において) 一・〇三〇—一・〇三四	—		—	
	酸度 (乳酸として) 〇・二〇%以下	—		—	
	細菌数	—		—	
(1) 牛乳		【Milk and cream, not concentrated nor containing added sugar or other sweetening matter】		Milk	
	無脂乳固形分 八・〇%以上	—		“Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists,” 13th Ed. (1980), Milk solids not fat content—Calculated by subtracting the milk fat content from the total solids content as determined by the method “Total Solids, Method I—Official Final Action,” section 16.032.	Solids (Total) in Milk Method Number 925.23 Method Number 990.19 Method Number 990.20
		—			
	乳脂肪分 三・〇%以上	fat( 6% <i>m/m</i> ): ISO 1211:2001   IDF 1D:1996	ISO 1211:2010 (IDF 1:2010) Milk -- Determination of fat content -- Gravimetric method (Reference method)	“Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists,” 13th Ed. (1980), Milkfat content—“Fat, Roese-Gottlieb Method—Official Final Action,” section 16.059.	Fat in Milk Method Number 905.02 Method Number 989.05
	比重 (摂氏一五度において) 一・〇二八以上	—		—	
	酸度 (乳酸として)	—		—	
	細菌数 (標準平板培養法で一m l 当たり) 五〇、〇〇〇以下	—	ISO 13366-1:2008 (IDF 148-1:2008) Milk -- Enumeration of somatic cells -- Part 1: Microscopic method (Reference method)	—	
大腸菌群 陰性	—		—		
(2) 特別牛乳		—		—	
	乳脂肪分 三・三%以上	—		—	
	比重 (摂氏一五度において) 一・〇二八以上	—		—	
	酸度 (乳酸として)	—		—	
	細菌数 (標準平板培養法で一m l 当たり) 三〇、〇〇〇以下	—		—	
	大腸菌群 陰性	—		—	
(3) 殺菌山羊乳		—		—	
	無脂乳固形分 七・五%以上	—		—	
	乳脂肪分 二・五%以上	—		—	
	比重 (摂氏一五度において) 一・〇三〇—一・〇三四	—		—	
	酸度 (乳酸として) 〇・二〇%以下	—		—	
	細菌数 (標準平板培養法で一m l 当たり) 五〇、〇〇〇以下	—		—	

分類	成分規格	試験法 (ISO) 【参照法】 1	試験法 (ISO) 【最新法】 2	試験法 (AOAC) 【参照法】 3	試験法 (AOAC) 【最新法】 4
(4) 成分調整牛乳	大腸菌群 陰性	—		—	
		—		—	
	無脂乳固形分 八・〇%以上	—		—	
	酸度 (乳酸として) 〇・二%以下	—		—	
	細菌数 (標準平板培養法で1m <sup>l</sup> 当たり) 五〇、〇〇〇以下	—		—	
(5) 低脂肪牛乳	大腸菌群 陰性	—		—	
		—		—	
	無脂乳固形分 八・〇%以上	—		—	
	乳脂肪分 〇・五%以上 一・五%以下	—		—	
	比重 (摂氏一五度において) 一・〇三〇以上	—		—	
(6) 無脂肪牛乳	酸度 (乳酸として) 〇・二%以下	—		—	
	細菌数 (標準平板培養法で1m <sup>l</sup> 当たり) 五〇、〇〇〇以下	—		—	
	大腸菌群 陰性	—		—	
		—		—	
	無脂乳固形分 八・〇%以上	—		—	
(7) 加工乳	乳脂肪分 〇・五%未満	—		—	
	比重 (摂氏一五度において) 一・〇三二以上	—		—	
	酸度 (乳酸として) 〇・二%以下	—		—	
	細菌数 (標準平板培養法で1m <sup>l</sup> 当たり) 五〇、〇〇〇以下	—		—	
	大腸菌群 陰性	—		—	
(1) クリーム		【Cream】		Heavy cream. Light cream. Light whipping cream	
	乳脂肪分 一八・〇%以上	fat: ISO 24 50:1999   IDF 16 C:1987	ISO 2450:2008 (IDF 16:2008) Cream -- Determination of fat content -- Gravimetric method (Reference method)	"Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists," 13th Ed. (1980), sections 16.156 and 16.059, under "Fat, Roese-Gottlieb Method—Official Final Action."	Fat in Cream Method Number 920.111 Method Number 995.18 Method Number 995.19
		【Milk and cream, not concentrated nor containing added sugar or other sweetening matter】			
		fat(>6% <i>m/m</i> ): ISO 2450:1999   IDF 16C:1987	ISO 2450:2008 (IDF 16:2008) Cream -- Determination of fat content -- Gravimetric method (Reference method)		
	酸度 (乳酸として) 〇・二〇%以下	—		—	
細菌数 (標準平板培養法で1m <sup>l</sup> 当たり) 一〇〇、〇〇〇以下	—		—		
大腸菌群 陰性	—		—		

分類	成分規格	試験法 (ISO) 【参照法】 1	試験法 (ISO) 【最新法】 2	試験法 (AOAC) 【参照法】 3	試験法 (AOAC) 【最新法】 4
(2) バター		【salted butter】 【unsalted butter】		—	
	乳脂肪分 八〇・〇%以上	fat: ISO 17189:2003   IDF 194:2003	同左: ISO 17189:2003 (IDF 194:2003) Butter, edible oil emulsions and spreadable fats -- Determination of fat content (Reference method)	—	
	水分 一七・〇%以下	water: ISO 3727-1:2001   IDF 80-1:2001	同左: ISO 3727-1:2001 (IDF 80-1:2001) Butter -- Determination of moisture, non-fat solids and fat contents -- Part 1: Determination of moisture content (Reference method)	—	
	大腸菌群 陰性	coliforms: (preparation samples) ISO 8261:2001   IDF 122:2001.	ISO 6887-5:2010 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products	—	
		(procedure) ISO slandered 4831	ISO 4831:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms -- Most probable number technique	—	
	unsalted butter のみ				
(3) バターオイル		【butter oil】		—	
	乳脂肪分 九九・三%以上	—		—	
	水分 〇・五%以下	Water (if fat < 99 % m/m): ISO 5536:2002   IDF 23:2002	ISO 5536:2009 (IDF 23:2009) Milk fat products -- Determination of water content -- Karl Fischer method	—	
	大腸菌群 陰性	—			
(4) ナチュラルチーズ (ソフト及びセミハードのものに限る。)		—		CHEESES AND RELATED CHEESE PRODUCTS	
	リステリア・モノサイトゲネス (—g 当たり) 一〇〇以下	—		—	
(5) プロセスチーズ		【Cheese and curd】		CHEESES AND RELATED CHEESE PRODUCTS	
	乳固形分 四〇・〇%以上	Solids: ISO 5534:2004   IDF 4:2004	同左: ISO 5534:2004 (IDF 4:2004) Cheese and processed cheese -- Determination of the total solids content (Reference method)	—	
	大腸菌群 陰性	—		—	
(6) 濃縮ホエイ		【Whey, whether or not concentrated or containing added sugar or other sweetening matter; products consisting of natural milk constituents】		—	
	乳固形分 二五・〇%以上	solids: ISO 6734:1989   IDF 15B:1991	ISO 6734:2010 (IDF 15:2010) Sweetened condensed milk -- Determination of total solids content (Reference method)	—	
		solids (Concentrated products): ISO 6731:1989   IDF 21B:1987	ISO 6731:2010(en) Milk, cream and evaporated milk — Determination of total solids content (Reference method)	—	
	大腸菌群 陰性	—			
(7) アイスクリューム		—		Ice cream and frozen custard	
	乳固形分 一五・〇%以上	—	ISO 3728:2004 (IDF 70:2004) Ice-cream and milk ice -- Determination of total solids content (Reference method)	—	
	うち乳脂肪分 八・〇%以上	—		“Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists,” 13th Ed. (1980), sections 16.287 and 16.059, under “Fat, Roese-Gottlieb Method—Official Final Action.”	Fat in Ice Cream and Frozen Desserts Method Number 952.06



分類	成分規格	試験法 (ISO) 【参照法】 1	試験法 (ISO) 【最新法】 2	試験法 (AOAC) 【参照法】 3	試験法 (AOAC) 【最新法】 4
	細菌数 (標準平板培養法で—g 当たり) —〇〇、〇〇〇以下	—		—	
	大腸菌群 陰性	—		—	
(8) アイスミルク		—		—	
	乳固形分 —〇・〇%以上	—		—	
	うち乳脂肪分 三・〇%以上	—		—	
	細菌数 (標準平板培養法で—g 当たり) 五〇・〇〇〇以下	—		—	
	大腸菌群 陰性	—		—	
(9) ラクトアイス		—		—	
	乳固形分 三・〇%以上	—		—	
	細菌数 (標準平板培養法で—g 当たり) 五 〇・〇〇〇以下	—		—	
	大腸菌群 陰性	—		—	
(10) 濃縮乳		【Milk and cream, concentrated or containing added sugar or other sweetening matter】		Concentrated milk	
	乳固形分 二五・五%以上	Solids (evaporated milk, cream): ISO 6731:1989   IDF 21B:1987	ISO 6731:2010 (IDF 21:2010) Milk, cream and evaporated milk -- Determination of total solids content (Reference method)	“Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists,” 13th Ed. (1980), Total milk solids—“Total Solids— Official Final Action,” section 16.169.	Solids (Total) in Milk Method Number 925.23 Method Number 990.19 Method Number 990.20
	うち乳脂肪分 七・〇%以上	Fat (liquid form): ISO 1737:1999   IDF 13C:1987	ISO 1737:2008 (IDF 13:2008) Evaporated milk and sweetened condensed milk -- Determination of fat content -- Gravimetric method (Reference method)	“Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists,” 13th Ed. (1980), Milkfat content—“Fat—Official Final Action,” section 16.172.	Fat in Milk Method Number 905.02 Method Number 989.05
	細菌数 (標準平板培養法で—g 当たり) —〇〇、〇〇〇以下	—		—	
(11) 脱脂濃縮乳		—		—	
	無脂乳固形分 一八・五%以上	—		—	
	細菌数 (標準平板培養法で—g 当たり) —〇〇、〇〇〇以下	—		—	
(12) 無糖練乳		【Milk and cream, concentrated or containing added sugar or other sweetening matter】		Evaporated milk	
	乳固形分 二五・〇%以上	Solids (evaporated milk, cream): ISO 6731:1989   IDF 21B:1987	ISO 6731:2010 (IDF 21:2010) Milk, cream and evaporated milk -- Determination of total solids content (Reference method)	“Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists,” 13th Ed. (1980), Total milk solids—“Total Solids— Official Final Action,” section 16.169.	Solids (Total) in Milk Method Number 925.23
	うち乳脂肪分 七・五%以上	Fat (liquid form): ISO 1737:1999   IDF 13C:1987	ISO 1737:2008 (IDF 13:2008) Evaporated milk and sweetened condensed milk -- Determination of fat content -- Gravimetric method (Reference method)	“Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists,” 13th Ed. (1980), Milkfat content—“Fat—Official Final Action,” section 16.172.	Fat in Milk Method Number 905.02 Method Number 989.05
	細菌数 (標準平板培養法で—g 当たり) 〇	—		—	
(13) 無糖脱脂練乳		—		—	
	無脂乳固形分 一八・五%以上	—		—	
	細菌数 (標準平板培養法で—g 当たり) 〇	—		—	
(14) 加糖練乳		【Milk and cream, concentrated or containing added sugar or other sweetening matter】		Sweetened condensed milk	
	乳固形分 二八・〇%以上	Solids (sweetened condensed milk): ISO 6734:1989   IDF 15B:1991	ISO 6734:2010 (IDF 15:2010) Sweetened condensed milk -- Determination of total solids content (Reference method)	—	

分類	成分規格	試験法 (ISO) 【参照法】 1	試験法 (ISO) 【最新法】 2	試験法 (AOAC) 【参照法】 3	試験法 (AOAC) 【最新法】 4
	うち乳脂肪分 八・〇%以上	Fat (liquid form): ISO 1737:1999   IDF 13C:1987	ISO 1737:2008 (IDF 13:2008) Evaporated milk and sweetened condensed milk -- Determination of fat content -- Gravimetric method (Reference method)	"Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists," 13th Ed. (1980), section 16.185, under "Fat—Official Final Action"	Sweetened Condensed Milk Method Number 920.115
	水分 二七・〇%以下	—	—	—	—
	糖分 (乳糖を含む。) 五八・〇%以下	Sucrose (normal content): ISO 2911:2004   IDF 35:2004	同左 : ISO 2911:2004 (IDF 35:2004) Sweetened condensed milk -- Determination of sucrose content -- Polarimetric method	—	—
		Sucrose (low content): No reference method has been established.	同左	—	—
	細菌数 (標準平板培養法で—g 当たり) 五〇、〇〇〇以下	—	—	—	—
	大腸菌群 陰性	—	—	—	—
(15) 加糖脱脂練乳		—	—	—	—
	乳固形分 二五・〇%以上	—	—	—	—
	水分 二九・〇%以下	—	—	—	—
	糖分 (乳糖を含む。) 五八・〇%以下	—	—	—	—
	細菌数 (標準平板培養法で—g 当たり) 五〇、〇〇〇以下	—	—	—	—
	大腸菌群 陰性	—	—	—	—
(16) 全粉乳		【Milk and cream, concentrated or containing added sugar or other sweetening matter】	—	Dry whole milk.	—
	乳固形分 九五・〇%以上	Solids (evaporated milk, cream): ISO 6731:1989   IDF 21B:1987	ISO 6731:2010 (IDF 21:2010) Milk, cream and evaporated milk -- Determination of total solids content (Reference method)	—	—
	うち乳脂肪分 二五・〇%以上	Fat (solid form): ISO 1736:2000   IDF 9C:1987	ISO 1736:2008 (IDF 9:2008) Dried milk and dried milk products -- Determination of fat content -- Gravimetric method (Reference method)	"Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists," 13th Ed. (1980), Milkfat content— "Fat in Dried Milk—Official Final Action," sections 16.199-16.200.	Fat in Dried Milk Method Number 932.06
	水分 五・〇%以下	Water (milk powder): ISO 5537:2004   IDF 26:2004	同左 : ISO 5537:2004 (IDF 26:2004) Dried milk -- Determination of moisture content (Reference method)	"Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists," 13th Ed. (1980), Moisture content— "Moisture—Official Final Action," section 16.192.	Moisture in Dried Milk Method Number 927.05
	細菌数 (標準平板培養法で—g 当たり) 五〇、〇〇〇以下	—	—	—	—
	大腸菌群 陰性	—	—	—	—
(17) 脱脂粉乳		【skimmed-milk powder(spray)】	—	Nonfat dry milk.	—
	乳固形分 九五・〇%以上	—	—	—	—
	水分 五・〇%以下	water: ISO 5537:2004   IDF 26:2004	同左 : ISO 5537:2004 (IDF 26:2004) Dried milk -- Determination of moisture content (Reference method)	"Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists," 13th Ed. (1980), Moisture content— "Moisture—Official Final Action," section 16.192.	Moisture in Dried Milk Method Number 927.05
	細菌数 (標準平板培養法で—g 当たり) 五〇、〇〇〇以下	—	—	—	—
	大腸菌群 陰性	coliforms: (preparation samples) ISO 8261:2001   IDF 122:2001.	ISO 6887-5:2010 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products	—	—

分類	成分規格	試験法 (ISO) 【参照法】 1	試験法 (ISO) 【最新法】 2	試験法 (AOAC) 【参照法】 3	試験法 (AOAC) 【最新法】 4
		(procedure) ISO standard 4831	ISO 4831:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms -- Most probable number technique		
(18) クリームパウダー		【Milk and cream, concentrated or containing added sugar or other sweetening matter】		Dry cream	
	乳固形分 九五・〇%以上	Solids (evaporated milk, cream): ISO 6731:1989   IDF 21B:1987	ISO 6731:2010 (IDF 21:2010) Milk, cream and evaporated milk -- Determination of total solids content (Reference method)	—	
	うち乳脂肪分 五〇・〇%以上	Fat (solid form): ISO 1736:2000   IDF 9C:1987	ISO 1736:2008 (IDF 9:2008) Dried milk and dried milk products -- Determination of fat content -- Gravimetric method (Reference method)	“Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists,” 13th Ed. (1980), Milkfat content— “Fat in Dried Milk— Official Final Action,” sections 16.199-16.200.	
	水分 五・〇%以下	Water (cream powder): ANNEX XVIII DETERMINATION OF MOISTURE CONTENT IN DRIED CREAM ISO 法はなし	同左	“Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists,” 13th Ed. (1980), Moisture content— “Moisture—Official Final Action,” section 16.192.	
	細菌数 (標準平板培養法で—g 当たり) 五〇、〇〇〇以下	—		—	
	大腸菌群 陰性	—		—	
(19) ホエイパウダー		【Whey, whether or not concentrated or containing added sugar or other sweetening matter; products consisting of natural milk constituents】		—	
	乳固形分 九五・〇%以上	solids (Concentrated products): ISO 6731:1989   IDF 21B:1987	ISO 6731:2010(en) Milk, cream and evaporated milk — Determination of total solids content (Reference method)	—	
	水分 五・〇%以下	water: IDF 21B:1987	ISO 6731:2010 (IDF 21:2010) Milk, cream and evaporated milk -- Determination of total solids content (Reference method)	—	
	細菌数 (標準平板培養法で—g 当たり) 五〇、〇〇〇以下	—		—	
	大腸菌群 陰性	—		—	
		—		—	
(20) たんぱく質濃縮ホエイパウダー		—		—	
	乳固形分 九五・〇%以上	—		—	
	乳たんぱく量 (乾燥状態において) 一五・〇%以上八〇・〇%以下	—		—	
	水分 五・〇%以下	—		—	
	細菌数 (標準平板培養法で—g 当たり) 五〇、〇〇〇以下	—		—	
	大腸菌群 陰性	—		—	
(21) バターミルクパウダー		【Buttermilk, fermented or acidified milk and cream, concentrated or not concentrated, containing added sugar or other sweetening matter】		—	
	水分 五・〇%以下	Water (acid buttermilk powder): ANNEX XIX DETERMINATION OF MOISTURE IN ACID BUTTERMILK POWDER	同左	—	
		Water (sweet buttermilk powder): ISO 5537:2004   IDF 26:2004	同左 : ISO 5537:2004 (IDF 26:2004) Dried milk -- Determination of moisture content (Reference method)	—	
	細菌数 (標準平板培養法で—g 当たり) 五〇、〇〇〇以下			—	
	大腸菌群 陰性			—	
(22) 加糖粉乳	—			—	

分類	成分規格	試験法 (ISO) 【参照法】 1	試験法 (ISO) 【最新法】 2	試験法 (AOAC) 【参照法】 3	試験法 (AOAC) 【最新法】 4
	乳固形分 七〇・〇%以上	—		—	
	うち乳脂肪分 一八・〇%以上	—		—	
	水分 五・〇%以下	—		—	
	糖分(乳糖を除く。) 二五・〇%以下	—		—	
	細菌数(標準平板培養法で—g当たり) 五〇、〇〇〇以下	—		—	
	大腸菌群 陰性	—		—	
(23) 調製粉乳		—		—	
	乳固形分 五〇・〇%以上	—		—	
	水分 五・〇%以下	—		—	
	細菌数(標準平板培養法で—g当たり) 五〇、〇〇〇以下	—		—	
(24) 発酵乳		【Buttermilk, fermented or acidified milk and cream, concentrated or not concentrated, containing added sugar or other sweetening matter】		Cultured milk.	
	無脂乳固形分 八・〇%以上	Solids (other products): Methods approved by the competent authority		Milk solids not fat content—Calculated by subtracting the milkfat content from the total solids content as determined by the method prescribed in section 16.032, "Method I—Official Final Action," under the heading "Total Solids."	Solids (Total) in Milk Method Number 925.23 Method Number 990.19 Method Number 990.20
	乳酸菌数又は酵母数(—m l 当たり) 一〇、〇〇〇、〇〇〇以上	—		—	
(25) 乳酸菌飲料 (無脂乳固形分三・〇%以上のもの)		—		—	
	乳酸菌数又は酵母数(—m l 当たり) 一〇、〇〇〇、〇〇〇以上	—		—	
	大腸菌群 陰性	—		—	
(26) 乳飲料		—		—	
	細菌数(標準平板培養法で—m l 当たり) 三〇、〇〇〇以下	—		—	
	大腸菌群 陰性	—		—	
(1) 乳酸菌飲料 (無脂乳固形分三・〇%未満のもの)		—		—	
	乳酸菌数又は酵母数(—m l 当たり) 一、〇〇〇、〇〇〇以上	—		—	
	大腸菌群 陰性	—		—	

1 : (出典) COMMISSION REGULATION (EC) No 273/2008 of 5 March 2008 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products

2 : (出典) ISO Standards catalogue ISO/TC 34/SC 5 - Milk and milk products

3 : (出典) CFR TITLE 21—Food and Drugs CHAPTER I—FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES SUBCHAPTER B—FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION

4 : (出典) AOAC Official Methods of Analysis

網掛けはH28年度調査においてフローチャートを作成している項目。

#### D. 考察

海外における試験法のうち、乳等省令に対応する試験法が明らかになった、EU (ISO 法) 及び米国 (OMA 法) における試験法について、アイスクリーム類の乳脂肪分、濃縮乳・無糖練乳の乳固形分、濃縮乳・無糖練乳の乳脂肪分、加糖練乳の乳固形分、加糖練乳の乳脂肪分の試験法を乳等省令の試験法と比較した。乳脂肪分の試験法として比較した乳等省令法及び OMA 法は、いずれも原理的には同じ重量法であるが、脂肪抽出を行う器具に違いがあり、乳等省令法には「レーリツヒ管」が、OMA 法には「マジョニア管」が規定されている。乳脂肪分の測定結果として乳等省令法は測定値が低く、試験所間で差が出やすいという傾向を示した。これは、レーリツヒ管とマジョニア管の形状の違いを反映しているものと考えられた。レーリツヒ管とマジョニア管は、どちらもガラス製の脂肪抽出器具であるが、その形状は大きく異なる。レーリツヒ管は、管の中央部付近にある側管から溶媒層を回収する構造になっており、その構造上側管より下に位置する溶媒層はレーリツヒ管内に残してしまうことになる。一方、マジョニア管は溶媒層を最後まで回収できる構造になっている。マジョニア管に比べてレーリツヒ管がロスを生じてしまう形状であることが、乳等省令法が低値となった原因であると考えられた。

濃縮乳・無糖練乳の乳固形分の測定試験法の比較では、比較試験を行った乳等省令法、ISO 法、OMA990.19 及び

OMA990.20 の 4 試験法はいずれも直接乾燥法であるが、試料採取方法や、測定操作に少しずつ違いがある。測定値の総平均値を比較した場合、AOAC990.19 と AOAC990.20 はいずれも 28.66% と同値であり、ISO 法は 28.54%、乳等省令法は 28.44% であった。ISO 法の反復精度は 0.50%、OMA 法の反復精度は AOAC990.19 が 0.013%、AOAC990.20 が 0.018% である。ばらつきについては、室間再現相対標準偏差は大きい順に ISO 法は 0.8%、乳等省令法と OMA990.19 は 0.5%、OMA990.20 は 0.3% であった。X-Y プロットは 4 法いずれの組み合わせにおいても  $R^2 > 0.999$  と非常に高い相関性が確認された。

加糖練乳の全固形分について比較試験を行った乳等省令法と ISO 法は、いずれも原理的には同じ乾燥法であるが、乳等省令法は直接乾燥法であり、ISO 法は乾燥助剤法と呼ばれる方法である。

測定値の比較において、乳等省令法の総平均は 74.11% であり、ISO 法の 73.20% より固形分値として約 0.9% 高値であった。ISO 法の反復精度は 0.6% である。乾燥助剤は、水分含量が高いことに加えて、糖質などの含量も比較的高い試料を効率的に乾燥させるために加えるとされており、約 44% とショ糖を多く含む加糖練乳は、直接法である乳等省令法では乾燥が不完全な状態となっていることが考えられた。ばらつきについては、室間再現相対標準偏差の総平均は、乳等省令法は 0.5%、ISO 法は 0.3% であった。X-Y プロットは  $R^2 = 0.9351$  であり、非常に

高い相関性が確認された。

ブリード法試験における代替染色液の候補として、コラボレイティブスタディにより、B1、B2、B3いずれの染色液においても、求められる細菌数および体細胞数は試料 1、2 ともいずれも標本のばらつきの範囲内に含まれ、染色液 N によって得られる数値と同等であると考えられた。

したがって、ブロードハーストパーレイ染色液、その改良染色液である BPV 染色液およびブロードハーストパーレイ改良染色液は、ニューマン染色液の代替染色液として使用可能と示唆された。

#### E. 結論

本年度実施したアイスクリーム類の乳脂肪分、濃縮乳・無糖練乳の乳固形分、濃縮乳・無糖練乳の乳脂肪分、加糖練乳の乳固形分、加糖練乳の乳脂肪分の試験法における測定結果のわずかな違いは、乳等省令における試験法の精度や測定原理の違いによるものであることが明らかとなった。今後は、国際的な整合性を持ち現行法の長所も取り込みうる試験法の検討が必要であろう。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

1) 誌上発表 なし

2) 学会発表

- ・国際酪農連盟日本国内委員会 理化学分析専門部会 / 添加物・汚染物質専門部会合同会議，平成29年7月18日，東京都

- ・一般社団法人日本乳業協会 生産技術委員会，平成29年8月30日，東京都

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ou



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

国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の試験法の研究

研究分担者	岩崎 司	公益財団法人日本乳業技術協会 事業部
協力研究者	田中 孝	株式会社明治 品質科学研究所
	横田 有生	株式会社明治 品質科学研究所
	伊藤 晶子	株式会社明治 品質科学研究所
	有働 久志	森永乳業株式会社 生産本部生産部
	伊藤 和彦	森永乳業株式会社 品質保証部
	佐藤 渥子	森永乳業株式会社 品質保証部
	須藤 朋子	雪印メグミルク株式会社 品質保証部 分析センター
	佐々木 麻子	雪印メグミルク株式会社 品質保証部 分析センター
	小林 信弘	雪印メグミルク株式会社 興部工場
	盛田 彰太郎	よつ葉乳業株式会社 中央研究所
	古賀野 邦博	江崎グリコ株式会社 マーケティング本部 商品開発研究所
	坂口 光一	一般社団法人日本乳業協会 生産技術部
	吉田 剛	公益財団法人日本乳業技術協会 事業部
	佐川 未弥	公益財団法人日本乳業技術協会 事業部
	丸田 陽洋	公益財団法人日本乳業技術協会 事業部

研究要旨

乳及び乳製品の成分規格等に関する省令(乳等省令)に示される試験法の制定は古く、科学技術の進歩や国際整合が求められる社会情勢を踏まえると、国際的なバリデーションが担保された試験法であるか確認する必要がある。対応する試験法を整理した項目のうち、アイスクリーム類、濃縮乳・無糖練乳、加糖練乳について、米国における試験法(Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL: OMA法)及び欧州連合における試験法(ISO法)と乳等省令法との比較試験を実施した。アイスクリーム類は、乳脂肪分の試験法を OMA 法と比較し、測定値は OMA 法と比べて乳等省令法が低く、室間再現相対標準偏差は乳等省令法が大きかった。濃縮乳・無糖練乳の全固形分は、乳等省令法、ISO 法、OMA 法の 990.19(AOAC990.19)及び 990.20(AOAC990.20)の 4 法を比較し、測定値は AOAC990.19 及び AOAC990.20 がほぼ同じ値で高く、次いで ISO 法、乳等省令法という順であった。室間再現相対標準偏差は、大きい順に ISO 法、乳等



省令法と AOAC990.19、AOAC990.20 となった。濃縮乳・無糖練乳の乳脂肪分の測定値は ISO 法、OMA 法に比べて乳等省令法が低く、室間再現相対標準偏差は ISO 法、OMA 法に比べて乳等省令法が大きかった。加糖練乳の全固形分は ISO 法と比較し、測定値は ISO 法に比べて乳等省令法が高く、室間再現相対標準偏差は乳等省令法が大きかった。加糖練乳の乳脂肪分の測定値は ISO 法、OMA 法に比べて乳等省令法が低く、室間再現相対標準偏差は大きい順に乳等省令、ISO 法、OMA 法であった。

#### A. 研究目的

昭和 26 年に告示された乳等省令の別表二(七)乳等の成分規格の試験法の制定から長い年月が経ち、種々の試験法における技術革新が進んだ現在では、乳等省令に示される試験法が昨今の試験法に用いる機器や新たに開発されてきた検査技術に対応した試験法であるとは言い難い。また、質的、量的に増加する輸入食品の規格基準の適合性を確認する試験法としては、国際的なバリデーションが担保された試験法か否かについては確認されておらず、国際的な標準試験法が確立されてゆく現状では、将来的な対応能力不足に陥る危険性をはらんでいると考えられる。本研究では、乳等省令における試験法に関連する情報収集と試験法の改正が必要と考えられる試験法について検討し、最適な試験法の策定の可能性も含めて、将来的な展望を示すことを目的とする。特に、海外の乳及び乳製品に関する試験法を規定する成分規格に関する情報を収集し、乳等省令と比較することで国際的にも対応可能な試験法の確立を目指す。

#### B. 研究方法

##### (1) 試験法の特定

平成 28 年度同様、乳および乳製品の成分規格(乳脂肪分や無脂肪固形分、酸度、

添加成分等の成分規格)について、以下の国々の法令から試験法を特定した。

米国 : Code of Federal Regulations (CFR ; 連邦行政規則集)

CFR Title21 CHAPTER I  
SUBCHAPTER B—FOOD FOR  
HUMAN CONSUMPTION

PART 131—乳及びクリーム

PART 133—チーズ及びチーズ製品

試験法として、Official Methods of  
Analysis of AOAC INTERNATIONAL  
(OMA 法)が記載されている。

EU : Commission Regulation (EC) No  
273/2008 of 5 March 2008 laying down  
detailed rules for the application of  
Council Regulation (EC) No 1255/1999  
as regards methods for the analysis and  
quality evaluation of milk and milk  
products

成分規格と試験法が示されており、試験法は ISO 法を使用している。

特定した試験法の一覧は平成 29 年度  
総括研究報告書を参照されたい。

##### (2) 比較試験実施項目の選定

乳等省令の試験法に対応する試験法が

特定できた項目のうち、平成 27 年度に実施したアンケート調査において見直し等の要望が挙げられた試験法を比較試験実施候補としてピックアップした。

アイスクリーム類	乳脂肪分
濃縮乳	乳固形分・乳脂肪分
無糖練乳	乳固形分・乳脂肪分
加糖練乳	乳固形分・乳脂肪分

このうち、濃縮乳と無糖練乳は乳等省令における試験法が同一であり、かつ、対応する海外の試験法も同一のものであると整理されたため、同じ枠の中で比較試験を実施することとした。また、ラクトアイス、アイスマルク、アイスクリームも試験法の区別がないため、アイスクリーム類としてまとめて実施することとし、以下の 5 本の比較試験とした。

アイスクリーム類の乳脂肪分
濃縮乳・無糖練乳の乳固形分
濃縮乳・無糖練乳の乳脂肪分
加糖練乳の乳固形分
加糖練乳の乳脂肪分

### ( 3 ) 共同試験の実施

株式会社明治品質科学研究所、森永乳業株式会社品質保証部、雪印メグミルク株式会社品質保証部分析センター、よつ葉乳業株式会社中央研究所及び公益財団法人日本乳業技術協会による共同試験を実施した。項目によって参加試験所数は異なるが、すべて試料数は 6、併行測定回数は 3 とした。試料は協力企業より提供された製品を用いた。

### ( 4 ) 試験法の比較

#### 4.1 アイスクリーム類の乳脂肪分

試料はラクトアイス、アイスマルク、アイスクリームそれぞれ 2 試料ずつ計 6 試料を用いた。併行測定回数は 3 回とし、3 試験所による共同試験を実施した。アイスクリーム類の乳脂肪分は EU において規格がないため、乳等省令法「別表二(七)(2)4 乳脂肪分の定量法」と OMA 法「AOAC Official Method 952.06 Fat in Ice Cream and Frozen Desserts, *IDF-ISO-AOAC Method, Codex-Adopted-AOAC Method, section 33.8.05*」の 2 法を比較した。それぞれのフローチャートを図 1、2 に示す。

図1 乳等省令 別表二(七)(2)4 乳脂肪分の定量法フローチャート

小型ビーカー

+ 試料採取(4g)  $W1$

+ 温水 3ml

レーリツヒ管に試料溶液を移す。

+ ビーカーを 温水 3ml で洗う

+ アンモニア水 2ml

レーリツヒ管を 60 の水溶液中で時々振り混ぜながら 20 分間加温

+ エタノール 10ml

+ エーテル 25ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 25ml

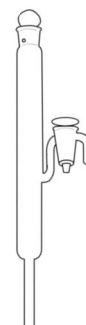
振とう抽出

2 時間以上静置後、上澄液を恒量  $W2$  を求めた  
ビーカーに入れる

溶剤を揮発

乾燥器内(100 ~ 105 1 時間)

重量測定  $W3$



レーリツヒ管

さらに 1 回繰り返す

$$\text{乳脂肪分} = \frac{W3 - W2}{W1} \times 100$$

W1 : 試料重量(g)

W2 : ビーカー重量(g)

W3 : ビーカーと抽出物重量(g)

図2 AOAC Official Method 952.06 Fat in Ice Cream and Frozen Desserts, *IDF-ISO-AOAC Method, Codex-Adopted-AOAC-Method* フローチャート

脂肪回収容器の準備

脂肪回収容器

乾燥 (100 ±1 30分以上)

放冷 (デシケータ使用)

重量測定 m2

測定操作

マジョニア管

- + 試料採取 4~5g m0
- + 水 (総量約 10ml になるように)
- + アンモニア水 2ml

加熱 (水浴中 60 20分間)

冷却

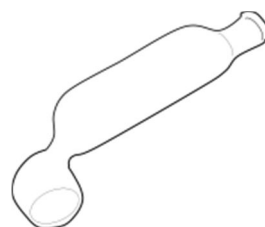
- + エタノール 10 ml
- + ジエチルエーテル 25ml

振とう抽出

- + 石油エーテル 25ml

振とう抽出

遠心分離 (約 600rpm、30 秒以上)



マジョニア管

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

+ エタノール 5ml  
+ ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（約 600rpm、30 秒以上）

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

+ ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（約 600rpm、30 秒以上）

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

溶媒留去

乾燥（100 ±1 30 分以上）

放冷（デシケータ使用）

測定 m1

### ブランクテスト

試料を水 10ml に置き換えたものを 2 連で同時に実施する  $m_3$

### 計算

$$\frac{(m_1 - m_2) - m_3}{m_0} \times 100\%$$

$m_0$  : 試料採取量 (g)

$m_1$  : 脂肪回収容器と抽出物重量 (g)

$m_2$  : 脂肪回収容器の重量 (g)

$m_3$  : ブランクテストにおける抽出残留物の平均重量 (g)

#### 4.2 濃縮乳及び無糖練乳の乳固形分

試料は濃縮乳、無糖練乳それぞれ 3 試料ずつ計 6 試料を用いた。併行測定回数は 3 回とし、4 試験所による共同試験を実施した。乳等省令法「別表二(七)(1)2a 濃縮乳、脱脂濃縮乳、無糖練乳、無糖脱脂練乳、加糖練乳及び加糖脱脂練乳の乳固形分の定量法」と ISO 法「ISO6731:2010/IDF21:2010 Milk, cream and evaporated milk - Determination of total solids content (Reference method)」、OMA 法「AOAC Official Method 945.48 Evaporated Milk (Unsweetened), section33.4.01」の 3 法を比較した。

AOAC945.48 は、Evaporated Milk(Unsweetened)の様々な成分について網羅的に書かれた試験法であり、固形分の試験法は D. Total Solids , *IDF-ISO-AOAC Method* として収載されている。その中で、固形分の試験法は 2 つの試験法「AOAC Official Method 990.19 Solids (Total) in Milk By Forced Air Oven Drying after Steam Table Predry, *IDF-ISO-AOAC Method*, section33.2.43」と「AOAC Official Method 990.20 Solids (Total) in Milk By Direct Forced Air Oven Drying, *IDF-ISO-AOAC Method*, section33.2.44」のいずれかを選択できるとされていることから、OMA 法はこれら 2 つの試験法について実施することとした。すなわち、乳等省令法、ISO 法、OMA 法の比較試験は、実際には 4 つの試験法について比較した。

なお、ISO6731:2010/IDF21:2010 と AOAC945.48 は、どちらも「Total solids」

を測定する試験法であり、乳等省令の「乳固形分」とは異なる規格のための試験法であるとも言えるが、乳等省令の試験法は水分を除去した乾燥物である「全固形分」をそのまま「乳固形分」としており、試験法の原理上同じ測定対象物を測定する試験法である。それぞれのフローチャートを図 3、4、5、6 に示す。

図3 乳等省令 別表二(七)(1)2a 濃縮乳、脱脂濃縮乳、無糖練乳、無糖脱脂練乳、加糖練乳及び加糖脱脂練乳の乳固形分の定量法フローチャート

試料の前処理

試料採取(20 g)  $W1$

|  
+ 温水で希釈

メスフラスコ(100ml)に入れて定容し希釈試料とする

測定操作

秤量皿

|

乾燥(98 ~ 100、乾燥器) 恒量測定  $W2$

|

+ 希釈試料(5ml 試料 1 g 相当量)

予備加熱 (水浴上)

|

乾燥(98 ~ 100、乾燥器) 恒量測定  $W3$

$$\text{全固形分} = \frac{W3 - W2}{W1 \times \frac{5}{100}} \times 100$$

<p>W1 : 試料重量(g) W2 : 秤量皿重量(g) W3 : 秤量皿と乾燥物重量(g)</p>
---

加糖練乳及び加糖脱脂練乳においてはしよ糖のパーセント量を引いたものを乳固形分のパーセント量とする。



図4 ISO6731:2010/IDF21:2010 Milk, cream and evaporated milk -Determination of total solids content(Reference method)フローチャート

平底皿の準備

平底皿（高さ 20～25 mm、直径 50～75 mm）、蓋（容易に取り外し可能なもの）

乾燥（102 ±2 1時間以上）

放冷（デシケータ使用 30分以上）

重量測定  $m_0$

試料の準備

加温（水浴中 40～60℃）

混合（15分ごと 2時間）

冷却（20～25℃）

測定操作

平底皿

+ 試料採取（1～5g）  $m_1$

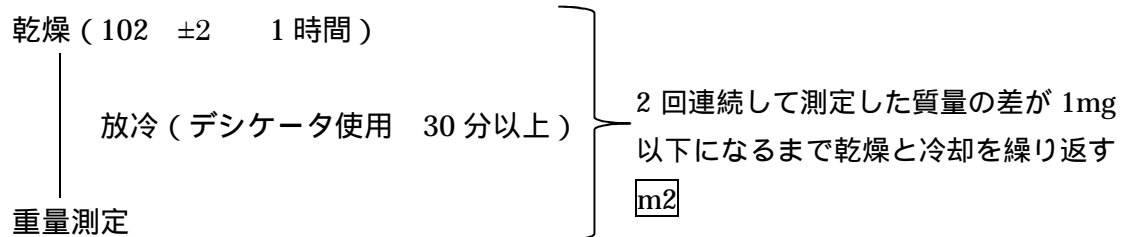
+ 水 3～5ml

加熱（沸騰水浴上 30分間）

乾燥（102 ±2 2時間）

放冷（デシケータ使用 30分以上）

重量測定



### 計算

$$\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \%$$

$m_0$  : 平底皿と蓋の重量 ( g )

$m_1$  : 平底皿と蓋及び試料の重量 ( g )

$m_2$  : 平底皿と蓋及び乾燥した試料の重量 ( g )

図5 AOAC Official Method 990.19 Solids (Total) in Milk By Forced Air Oven  
Drying after Steam Table Predry フローチャート

試料の準備

加温 (水浴中 60 )

混合 (15 分ごと 2 時間)

試料 40g を水 60g で希釈

加温 (38 ±1 )

測定操作

秤量皿

乾燥 (100 ±1 2 時間以上)

放冷 (デシケータ使用) 重量測定  $\boxed{W}$

+ 試料採取 (希釈試料 4~5g)  $\boxed{W1}$

予備加熱 (水浴上 25 分以内)

乾燥 (100 ±1 3 時間)

放冷 (デシケータ使用 30 分以上) 重量測定  $\boxed{W2}$

ブランクテスト

空の秤量皿を用いて 2 連で実施する  $\boxed{B}$

### 計算

$$\frac{(W2 - W) - B}{W1 - W} \times 2.5 * \times 100\%$$

W : 秤量皿の重量 (g)

W1 : 秤量皿の重量と試料重量 (g)

W2 : 秤量皿の重量と乾燥物重量 (g)

B : ブランクテストの平均重量 (g)

\* : 希釈倍数

図 6 AOAC Official Method 990.20 Solids (Total) in Milk By Direct Forced Air Oven  
Drying, *IDF-ISO-AOAC Method* フローチャート

試料の準備

加温 ( 水浴中 60 )

混合 ( 15 分ごと 2 時間 )

試料 40g を水 60g で希釈

加温 ( 38 ±1 )

測定操作

秤量皿

乾燥 ( 100 ±1 2 時間以上 )

放冷 ( デシケータ使用 ) 重量測定  $W$

+ 試料採取 ( 希釈試料 4 ~ 5g )  $W1$

乾燥 ( 100 ±1 4 時間 )

放冷 ( デシケータ使用 30 分以上 ) 重量測定  $W2$

ブランクテスト

空の秤量皿を用いて 2 連で実施する  $B$

計算

$$\frac{(W2 - W) - B}{W1 - W} \times 2.5 \times 100\%$$

W : 秤量皿の重量 (g)

W1 : 秤量皿の重量と試料重量 (g)

W2 : 秤量皿の重量と乾燥物重量 (g)

B : ブランクテストの平均重量 (g)

\* : 希釈倍数

#### 4.3 濃縮乳及び無糖練乳の乳脂肪分

試料は濃縮乳、無糖練乳それぞれ 3 試料ずつ計 6 試料を用いた。併行測定回数は 3 回とし、5 試験所による共同試験を実施した。乳等省令法「別表二(七)(1)3b 濃縮乳、無糖練乳、加糖練乳、全粉乳、クリームパウダー、加糖粉乳及びクリームの乳脂肪分の定量法」と ISO 法「ISO 1737:2008/IDF 13:2008 Evaporated milk and sweetened condensed milk - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method)」、OMA 法「AOAC Official Method 945.48 Evaporated Milk (Unsweetened), section 33.4.01」の 3 法を比較した。それぞれのフローチャートを図 7、8、9 に示す。

図7 乳等省令 別表二(七)(1)3b 濃縮乳、無糖練乳、加糖練乳の乳脂肪分の定量法フローチャート

試料の前処理

試料採取(20g) **W1**

↓  
+ 温水で希釈

メスフラスコ(100ml)に入れて定容し希釈試料とする

測定操作

リョーリツヒ管

↓  
+ 希釈試料 10ml  
+ アンモニア水 2ml  
+ エタノール 10ml  
+ エーテル 25ml

振とう抽出

↓  
+ 石油エーテル 25ml

振とう抽出

↓  
2時間以上静置後、上澄液を恒量 **W2** を求めたビーカーに入れる

↓  
溶剤を揮発

↓  
乾燥器内(100 ~ 105 1時間)

↓  
重量測定 **W3**

} さらに1回  
繰り返す



$$\text{乳脂肪分} = \frac{W3 - W2}{W1 \times \frac{10}{100}} \times 100\%$$

W1 : 試料重量(g)

W2 : ビーカー重量(g)

W3 : ビーカーと抽出物重量(g)

図 8 ISO1737:2008/IDF13:2008 Evaporated milk and sweetened condensed milk  
-Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method) フローチャ  
ート

脂肪回収容器の準備

脂肪回収容器

乾燥 ( 102 ±2 1 時間 )

放冷 ( デシケータ使用不可 30 分以上 )

重量測定 m2

< 濃縮乳 > 試料の準備

加温 ( 水浴中 40 ~ 60 )

< 加糖練乳 ( 密閉缶試料の場合 ) > 試料の準備

加温 ( 水浴中 30 ~ 40 )

混合 ( 15 分ごと 2 時間 )

冷却 ( 室温 )

測定操作

脂肪抽出フラスコ

+ 試料採取 ( 濃縮乳 4 ~ 5g 加糖練乳 2 ~ 2.5g ) m0

+ 約 50 の温水 ( 総量 10 ~ 11ml になるように )

+ アンモニア水 2mL

+ エタノール 10mL

+ ジエチルエーテル 25ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 25ml

振とう抽出

遠心分離（80～90g、1～5分）もしくは30分以上静止

上層を脂肪回収容器に回収する

+ エタノール 5ml  
+ ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（80～90g、1～5分）もしくは30分以上静止

上層を脂肪回収容器に回収する

+ ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（80～90g、1～5分）もしくは30分以上静止

上層を脂肪回収容器に回収する

溶媒留去

乾燥（102 ±2 1時間）

放冷（デシケータ使用不可 30分以上）

重量測定

乾燥 ( 102 ±2 )

重量測定

放冷 ( デシケーター使用不可 30 分以上 )

重量の減少が 1.0mg 以下になるか  
増加するまで乾燥を繰り返す [m1]

### ブランクテストの実施

試料を水 10ml に置き換えたものを同時に実施する [m3] [m4]

### 計算

$$\frac{(m1 - m2) - (m3 - m4)}{m0} \times 100\%$$

m0 : 試料採取量(g)

m1 : 脂肪回収容器と抽出物重量 ( g )

m2 : 脂肪回収容器の重量 ( g )

m3 : ブランクテストにおける脂肪回収容器と抽出物重量 ( g )

m4 : ブランクテストにおける脂肪回収容器の重量 ( g )

図9 AOAC Official Method 945.48 Evaporated Milk (Unsweetened)フローチャート

脂肪回収容器の準備

脂肪回収容器

乾燥 (100 ±1 30分以上)

放冷 (デシケータ使用)

重量測定  $m_2$

試料の準備

加温 (水浴中 60 )

混合 (15分ごと 2時間)

冷却 (室温)

冷却 (20 )

測定操作

マジョニア管

+ 試料採取 4~5g  $m_0$

+ 水 7ml

試料が溶けるまで加温しながら混ぜる (40~50 )

+ アンモニア水 1.25ml

+ エタノール 10ml

+ ジエチルエーテル 25ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 25ml

振とう抽出

遠心分離（約 600rpm、30 秒以上）

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

+ エタノール 5ml

+ ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（約 600rpm、30 秒以上）

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

+ ジエチルエーテル 15ml

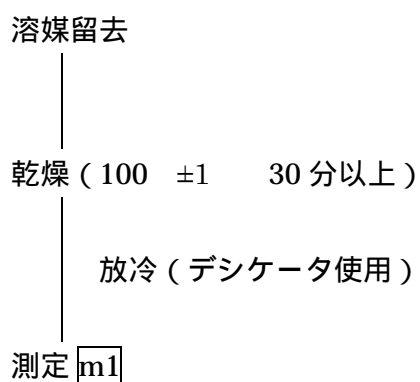
振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（約 600rpm、30 秒以上）

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する



### ブランクテスト

試料を水 10ml に置き換えたものを 2 連で同時に実施する m3

### 計算

$$\frac{(m1 - m2) - m3}{m0} \times 100\%$$

m0 : 試料採取量 ( g )

m1 : 脂肪回収容器と抽出物重量 ( g )

m2 : 脂肪回収容器の重量 ( g )

m3 : ブランクテストにおける抽出残留物の平均重量 ( g )

#### 4.4 加糖練乳の乳固形分（全固形分）

試料は 6 試料を用いて併行測定回数は 3 回とし、4 試験所による共同試験を実施した。加糖練乳の乳固形分は米国において規格がないため、乳等省令法「別表二(七)(1)2a 濃縮乳、脱脂濃縮乳、無糖練乳、無糖脱脂練乳、加糖練乳及び加糖脱脂練乳の乳固形分の定量法」と ISO 法「ISO 6734:2010/IDF 15:2010 Sweetened condensed milk - Determination of total solids content (Reference method)」の 2 法を比較した。乳等省令における加糖練乳の乳固形分は、乾燥物質のパーセント量を測定後、別に定める方法により定量したしよ糖のパーセント量を差し引くことによって求めることとされている。

一方、ISO 6734:2010/IDF 15:2010 は total solids content を測定する試験法であるため、乳等省令法においては、しよ糖を差し引く前までの結果(全固形分)を比較し、全固形分の結果として取りまとめることとした。それぞれのフローチャートを図 10、11 に示す。



図 10 乳等省令 別表二(七)(1)2a 濃縮乳、脱脂濃縮乳、無糖練乳、無糖脱脂練乳、加糖練乳及び加糖脱脂練乳の乳固形分の定量法フローチャート

試料の前処理

試料採取(20 g)  $W1$

↓  
+ 温水で希釈

メスフラスコ(100ml)に入れて定容し希釈試料とする

測定操作

秤量皿

↓

乾燥(98 ~ 100、乾燥器) 恒量測定  $W2$

↓

+ 希釈試料(5ml 試料 1 g 相当量)

予備加熱 (水浴上)

↓

乾燥(98 ~ 100、乾燥器) 恒量測定  $W3$

$$\text{全固形分} = \frac{W3 - W2}{W1 \times \frac{5}{100}} \times 100$$

<p>W1 : 試料重量(g) W2 : 秤量皿重量(g) W3 : 秤量皿と乾燥物重量(g)</p>
---

加糖練乳及び加糖脱脂練乳においてはしよ糖のパーセント量を引いたものを乳固形分のパーセント量とする。

図 11 ISO6734:2010/IDF15:2010 Sweetened condensed milk -Determination of total solids content(Reference method)フローチャート

平底皿の準備

平底皿（高さ 20 ~ 25 mm、直径 50 ~ 75 mm）、蓋（容易に取り外し可能なもの）

- + 攪拌棒
- + 石英砂または海砂 25g

乾燥（102 ±2 1 時間以上）

放冷（デシケータ使用 45 分以上）

重量測定 m0

試料の準備

加温（水浴中 30 ~ 40 ）

冷却（20 ~ 25 ）

測定操作

平底皿

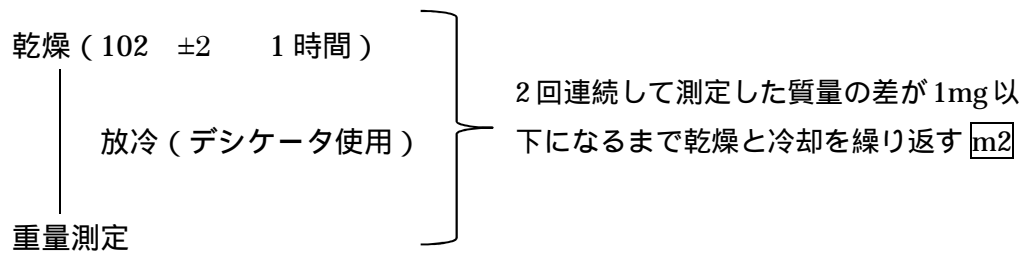
- + 試料採取（2g）m1
- + 水 5ml

加熱（沸騰水浴上 30 分間）

乾燥（102 ±2 2 時間）

放冷（デシケータ使用 45 分以上）

重量測定



### 計算

$$\frac{m2 - m0}{m1 - m0} \times 100\%$$

m0 : 平底皿と蓋の重量 (g)

m1 : 平底皿と蓋及び試料の重量 (g)

m2 : 平底皿と蓋及び乾燥した試料の重量 (g)

#### 4.5 加糖練乳の乳脂肪分

試料は 6 試料を用いて併行測定回数は 3 回とし、4 試験所による共同試験を実施した。乳等省令法「別表二(七)(1)3b 濃縮乳、無糖練乳、加糖練乳、全粉乳、クリームパウダー、加糖粉乳及びクリームの乳脂肪分の定量法」と ISO 法「ISO 1737:2008/IDF 13:2008 Evaporated milk and sweetened condensed milk - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method)」、OMA 法「AOAC Official Method 920.115 Sweetened Condensed Milk, *Codex-Adopted-AOAC Method*, section 33.4.02」の 3 法を比較した。それぞれのフローチャートを図 12、13、14 に示す。

図 12 乳等省令 別表二(七)(1)3b 濃縮乳、無糖練乳、加糖練乳の乳脂肪分の定量法フローチャート

試料の前処理

試料採取(20 g)  $W_1$

┆  
┆ + 温水で希釈

メスフラスコ(100ml)に入れて定容し希釈試料とする

測定操作

リョーリツヒ管

┆ + 希釈試料 10ml  
┆ + アンモニア水 2ml  
┆ + エタノール 10ml  
┆ + エーテル 25ml

振とう抽出

┆ + 石油エーテル 25ml

振とう抽出

2時間以上静置後、上澄液を恒量  $W_2$  を求めたビーカーに入れる

溶剤を揮発

乾燥器内(100 ~ 105 1時間)

重量測定  $W_3$

} さらに1回  
繰り返す

$$\text{乳脂肪分} = \frac{W3 - W2}{10} \times 100\%$$
$$W1 \times \frac{\quad}{100}$$

W1 : 試料重量(g)

W2 : ビーカー重量(g)

W3 : ビーカーと抽出物重量(g)

図 13 ISO1737:2008/IDF13:2008 Evaporated milk and sweetened condensed milk - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method) フロートチャート

### 脂肪回収容器の準備

脂肪回収容器

乾燥 ( 102 ±2 1 時間 )

放冷 ( デシケータ使用不可 30 分以上 )

重量測定  $m_2$

< 濃縮乳 > 試料の準備

加温 ( 水浴中 40 ~ 60 )

< 加糖練乳 ( 密閉缶試料の場合 ) > 試料の準備

加温 ( 水浴中 30 ~ 40 )

混合 ( 15 分ごと 2 時間 )

冷却 ( 室温 )

### 測定操作

脂肪抽出フラスコ

+ 試料採取 ( 濃縮乳 4 ~ 5g 加糖練乳 2 ~ 2.5g )  $m_0$

+ 約 50 の温水 ( 総量 10 ~ 11ml になるように )

+ アンモニア水 2mL

+ エタノール 10mL

+ ジエチルエーテル 25ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 25ml

振とう抽出

遠心分離（80～90g、1～5分）もしくは30分以上静止

上層を脂肪回収容器に回収する

+ エタノール 5ml  
+ ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（80～90g、1～5分）もしくは30分以上静止

上層を脂肪回収容器に回収する

+ ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（80～90g、1～5分）もしくは30分以上静止

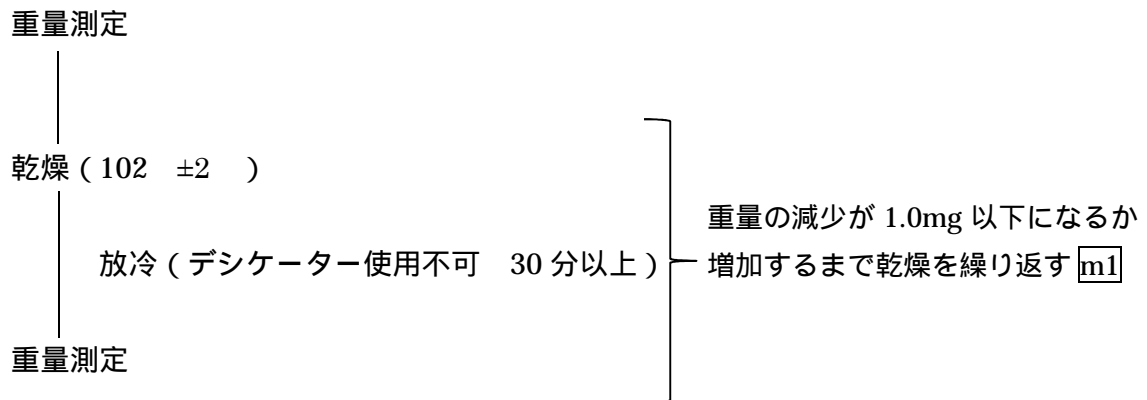
上層を脂肪回収容器に回収する

溶媒留去

乾燥（102 ±2 1時間）

放冷（デシケータ使用不可 30分以上）





### ブランクテストの実施

試料を水 10ml に置き換えたものを同時に実施する [m3] [m4]

### 計算

$$\frac{(m1 - m2) - (m3 - m4)}{m0} \times 100\%$$

m0 : 試料採取量(g)

m1 : 脂肪回収容器と抽出物重量 ( g )

m2 : 脂肪回収容器の重量 ( g )

m3 : ブランクテストにおける脂肪回収容器と抽出物重量 ( g )

m4 : ブランクテストにおける脂肪回収容器の重量 ( g )

図 14 AOAC Official Method 920.115 Sweetened Condensed Milk, *Codex-Adopted-AOAC Method* フローチャート

脂肪回収容器の準備

脂肪回収容器



乾燥 ( 100 ±1 30 分以上 )



放冷 ( デシケータ使用 )

重量測定 m2

試料の準備

試料 ( 未開封 )



加温 ( 水浴中 30 ~ 35 )

測定操作

マジョニア管



- + 試料採取 2 ~ 2.5gml m0
- + 水 ( 総量約 10.5ml になるように )
- + アンモニア水 1.25ml
- + エタノール 10ml
- + ジエチルエーテル 25ml

振とう抽出



- + 石油エーテル 25ml

振とう抽出



遠心分離 ( 約 600rpm、30 秒以上 )



上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

- + エタノール 5ml
- + ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

- + 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（約 600rpm、30 秒以上）

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

- + ジエチルエーテル 15ml

振とう抽出

- + 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（約 600rpm、30 秒以上）

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する

溶媒留去

乾燥（100 ±1 30 分以上）

放冷（デシケータ使用）

測定 m1

### ブランクテスト

試料を水 10ml に置き換えたものを 2 連で同時に実施する m3

### 計算

$$\frac{(m1 - m2) - m3}{m0} \times 100\%$$

m0 : 試料採取量 (g)

m1 : 脂肪回収容器と抽出物重量 (g)

m2 : 脂肪回収容器の重量 (g)

m3 : ブランクテストにおける抽出残留物の平均重量 (g)

C. 研究結果

(1) アイスクリーム類における乳脂肪分の試験法の比較

アイスクリーム類の乳脂肪分の試験法について、乳等省令法、OMA法の2法による測定結果を比較した。平均値は、乳等省令法が OMA 法より低い傾向が見られ

た。(表 1、図 15)。室間再現相対標準偏差は、乳等省令法は OMA 法に比べ大きい傾向が見られた(表 2)。また、X-Y プロットによって2つの試験法について比較したところ、乳等省令法と OMA 法による近似曲線の決定係数は  $R^2=0.9982$  であった。(図 16)。

表 1 アイスクリーム類の乳脂肪分における平均値の比較

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6
乳等省令法	6.26	3.45	8.07	3.86	8.95	8.59
OMA 法	6.67	3.62	8.63	4.11	9.84	9.11

図 15 アイスクリーム類の乳脂肪分における平均値の比較(濃度順並べ替え)

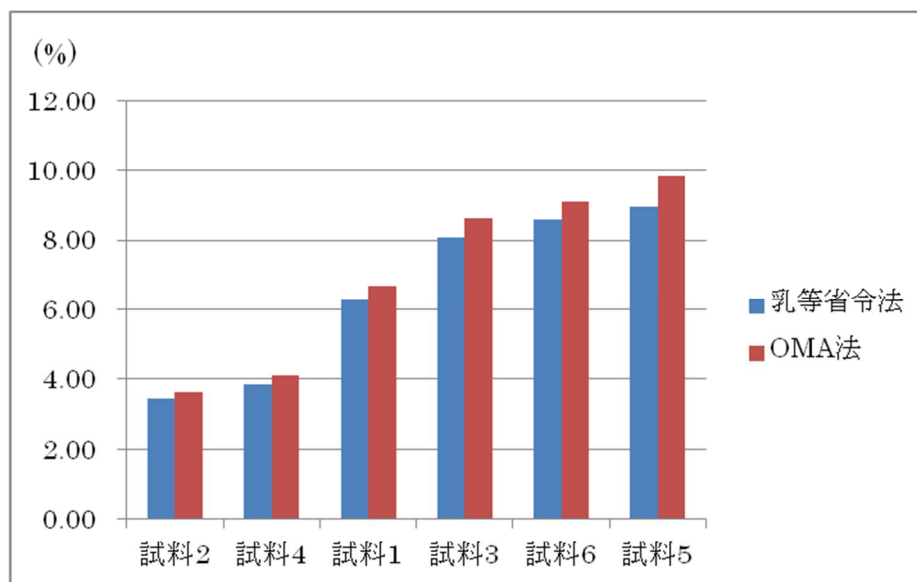


表2 アイスクリーム類の乳脂肪分における精度指標比較

乳等省令法

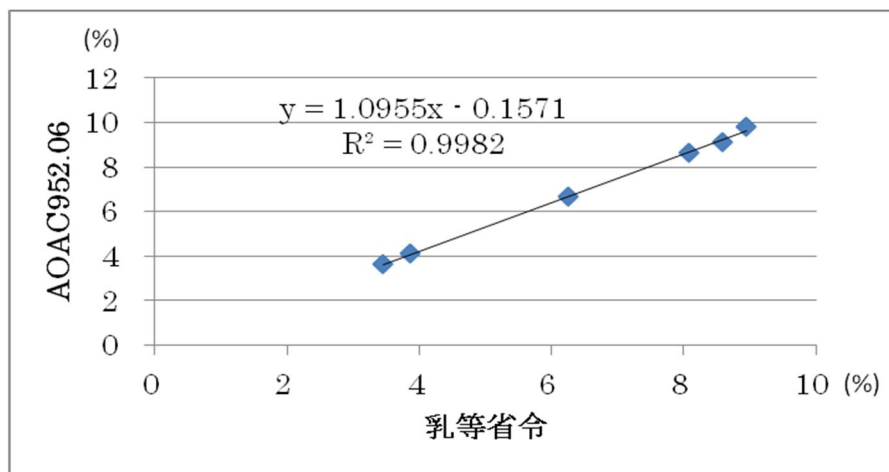
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	総平均
参加試験所数	3	3	3	3	3	3	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	6.26	3.45	8.07	3.86	8.95	8.59	6.53
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.024	0.012	0.037	0.036	0.029	0.021	0.027
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.067	0.032	0.104	0.101	0.082	0.060	0.074
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	0.4	0.3	0.5	0.9	0.3	0.2	0.4
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.211	0.150	0.362	0.113	0.407	0.319	0.261
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.592	0.421	1.015	0.316	1.139	0.895	0.730
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	3.4	4.4	4.5	2.9	4.5	3.7	3.9

AOAC952.06

試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	総平均
参加試験所数	3	3	3	3	3	3	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	6.67	3.62	8.63	4.11	9.84	9.11	7.00
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.020	0.016	0.022	0.014	0.022	0.019	0.019
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.056	0.046	0.063	0.040	0.062	0.053	0.053
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	0.3	0.5	0.3	0.3	0.2	0.2	0.3
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.032	0.015	0.032	0.013	0.047	0.060	0.033
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.088	0.041	0.090	0.036	0.131	0.168	0.092
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	0.5	0.4	0.4	0.3	0.5	0.7	0.4

図 16 アイスクリーム類の乳脂肪分における X-Y プロット

乳等省令法 - AOAC952.06



(2)濃縮乳・無糖練乳における乳固形分の試験法の比較

濃縮乳・無糖練乳の乳固形分の試験法について、乳等省令法、ISO法、OMA法の990.19(AOAC990.19)及び990.20(AOAC990.20)の4法による測定結果を比較した。AOAC990.19及びAOAC990.20がほぼ同じ値で高く、次いでISO法、乳等省令法という傾向が見られた。室間再現相対標準偏差は大きい順にISO法、乳等省令法とAOAC990.19、

AOAC990.20であった。(表3、図17、表4)。また、X-Yプロットによってそれぞれの試験法を比較した。近似曲線の決定係数は、乳等省令法とISO法は $R^2=0.9998$ 、乳等省令法とAOAC990.19は $R^2=1$ 、乳等省令法とAOAC990.20は $R^2=1$ 、ISO法とAOAC990.19は $R^2=0.9995$ 、ISO法とAOAC990.20は $R^2=0.9995$ 、AOAC990.19とAOAC990.20は $R^2=0.9995$ であった(図18)。

表3 濃縮乳・無糖練乳の乳固形分における平均値の比較

	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6
乳等省令法	26.55	26.54	26.45	35.82	27.65	27.64
ISO法	26.70	26.68	26.68	35.75	27.74	27.68
OMA990.19	26.77	26.75	26.69	36.04	27.88	27.81
OMA990.20	26.71	26.70	26.64	36.04	27.95	27.91

図17 濃縮乳・無糖練乳の乳固形分における平均値の比較(濃度順並べ替え)

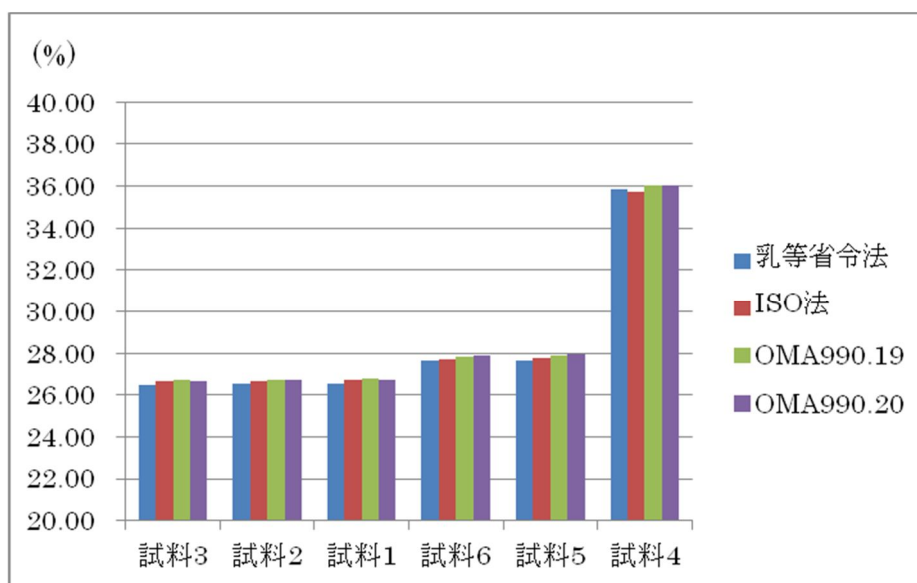




表 4 濃縮乳・無糖練乳の乳固形分における精度指標比較

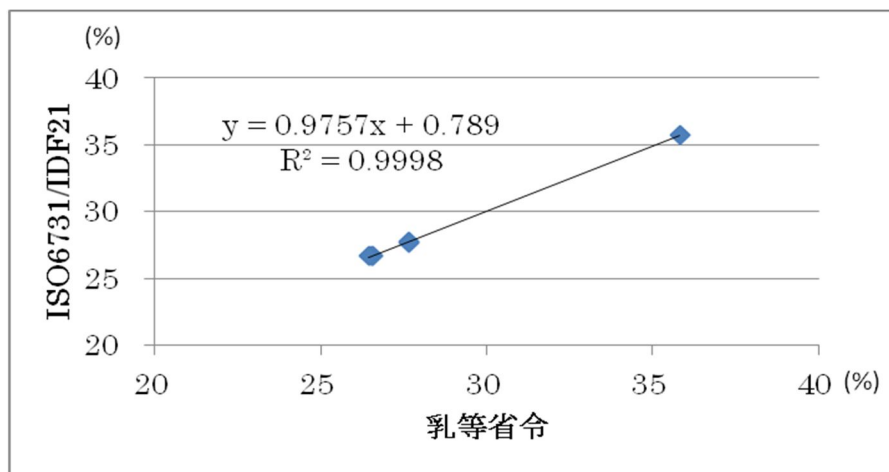
乳等省令法							
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	26.55	26.54	26.45	35.82	27.65	27.64	28.44
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.073	0.032	0.046	0.071	0.039	0.014	0.046
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.205	0.091	0.128	0.199	0.110	0.038	0.129
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	0.3	0.1	0.2	0.2	0.1	0.0	0.2
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.166	0.102	0.088	0.108	0.177	0.147	0.131
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.464	0.285	0.247	0.304	0.495	0.410	0.367
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	0.6	0.4	0.3	0.3	0.6	0.5	0.5
ISO6731:2010/IDF21:2010							
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	26.70	26.68	26.68	35.75	27.74	27.68	28.54
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.038	0.037	0.034	0.098	0.049	0.044	0.050
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.107	0.103	0.096	0.276	0.138	0.124	0.140
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.192	0.222	0.315	0.316	0.153	0.224	0.237
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.538	0.621	0.881	0.884	0.429	0.627	0.663
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	0.7	0.8	1.2	0.9	0.6	0.8	0.8
AOAC990.19							
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	26.77	26.75	26.69	36.04	27.88	27.81	28.66
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.025	0.048	0.026	0.037	0.026	0.025	0.031
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.071	0.135	0.072	0.103	0.074	0.071	0.088
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.131	0.187	0.154	0.167	0.110	0.025	0.129
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.366	0.523	0.432	0.467	0.308	0.071	0.361
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	0.5	0.7	0.6	0.5	0.4	0.1	0.5

AOAC990.20

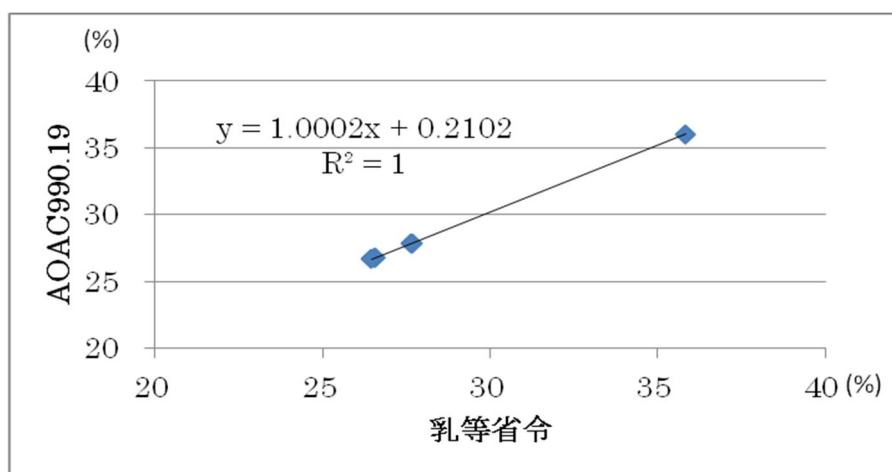
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	總平均
參加試驗所數	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	
平均值(%)	26.71	26.70	26.64	36.04	27.95	27.91	28.66
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.037	0.033	0.027	0.055	0.032	0.060	0.040
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.103	0.093	0.075	0.153	0.089	0.168	0.113
併行相對標準偏差 $RSD_r$ (%)	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.058	0.043	0.036	0.191	0.148	0.060	0.089
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.162	0.121	0.101	0.535	0.415	0.168	0.250
室間再現相對標準偏差 $RSD_R$ (%)	0.2	0.2	0.1	0.5	0.5	0.2	0.3

図 18 濃縮乳・無糖練乳の乳固形分における X-Y プロット

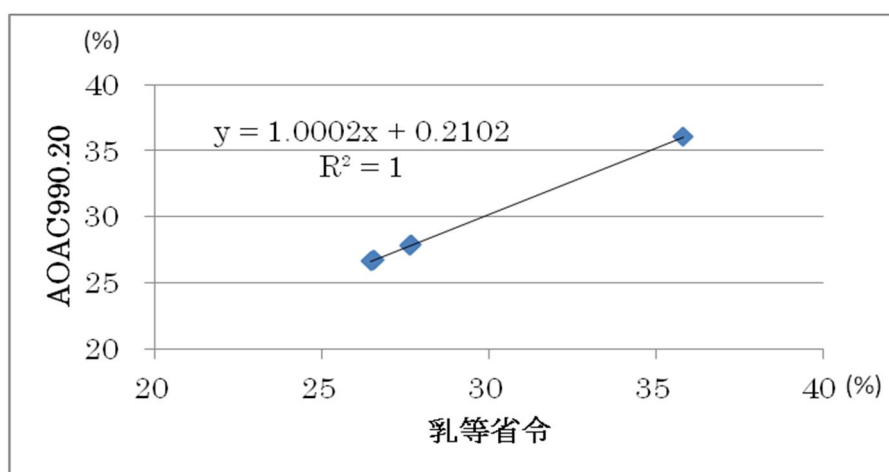
乳等省令法 - ISO6731:2010/IDF21:2010



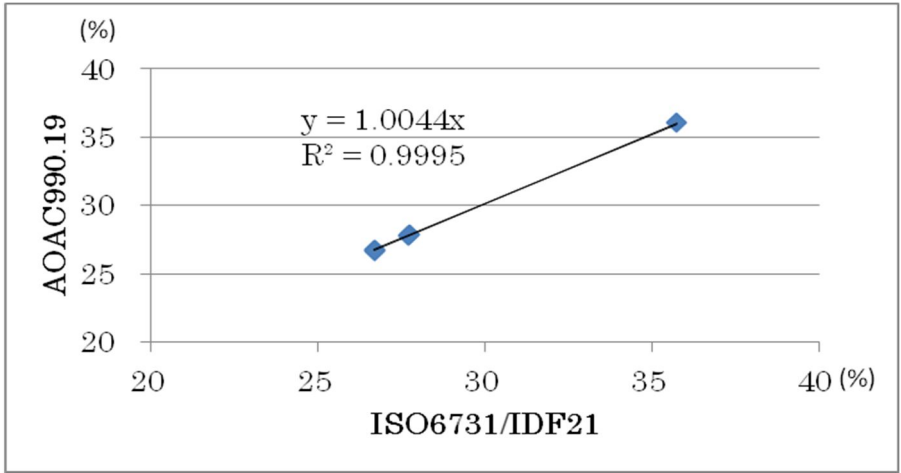
乳等省令法 - AOAC990.19



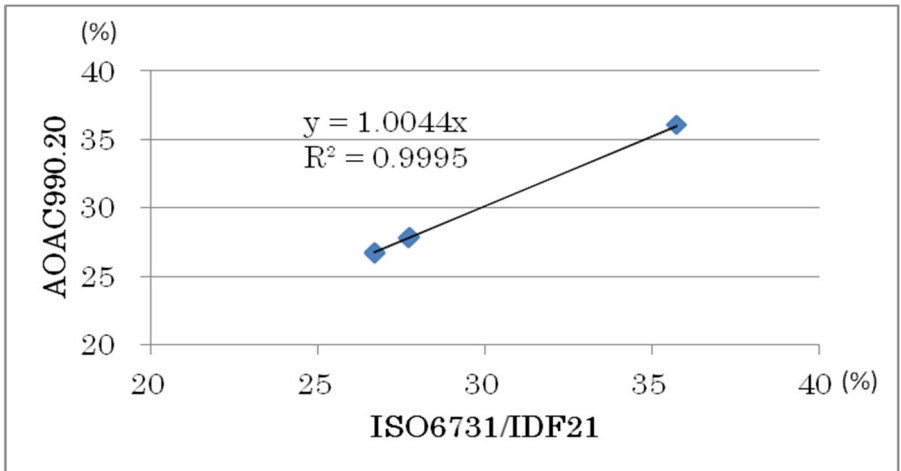
乳等省令法 - AOAC990.20



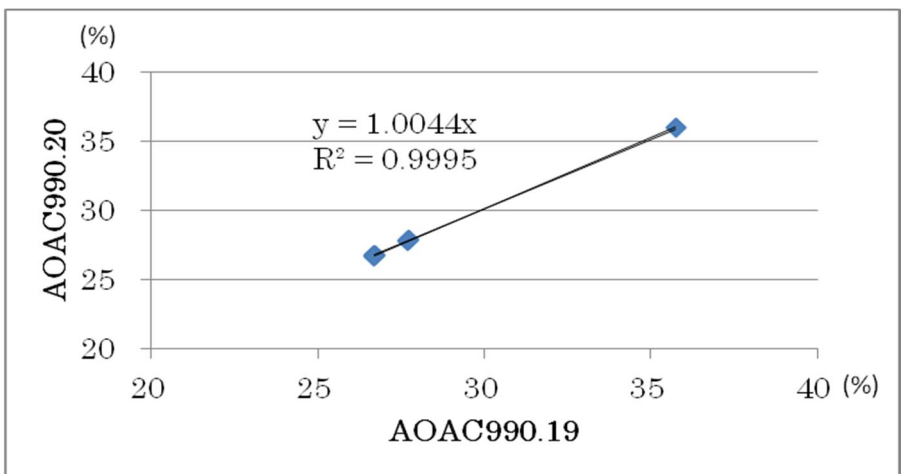
ISO6731:2010/IDF21:2010 - AOAC990.19



ISO6731:2010/IDF21:2010 - AOAC990.20



AOAC990.19 - AOAC990.20



(3) 濃縮乳・無糖練乳における乳脂肪分の試験法の比較

濃縮乳・無糖練乳の乳脂肪分の試験法について、乳等省令法、ISO法、OMA法の3法による測定結果を比較した。平均値は、ISO法、OMA法に比べて乳等省令法が低い傾向が見られた(表5、図19)。室間再現標準偏差はISO法、OMA法に

比べて乳等省令法が大きい傾向が見られた(表6)。また、X-Yプロットによってそれぞれの試験法を比較した。近似曲線の決定係数は、乳等省令法とISO法は $R^2=0.9993$ 、乳等省令とOMA法は $R^2=0.9996$ 、ISO法とOMA法は $R^2=0.9999$ であった(図20)。

表5 濃縮乳・無糖練乳の乳脂肪分における平均値の比較

(%)

	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6
乳等省令法	7.55	7.45	7.55	9.78	7.50	7.47
ISO法	8.02	7.93	7.99	10.53	7.99	7.98
OMA法	8.01	7.92	7.98	10.51	7.98	7.94

図19 濃縮乳・無糖練乳の乳脂肪分における平均値の比較(濃度順並べ替え)

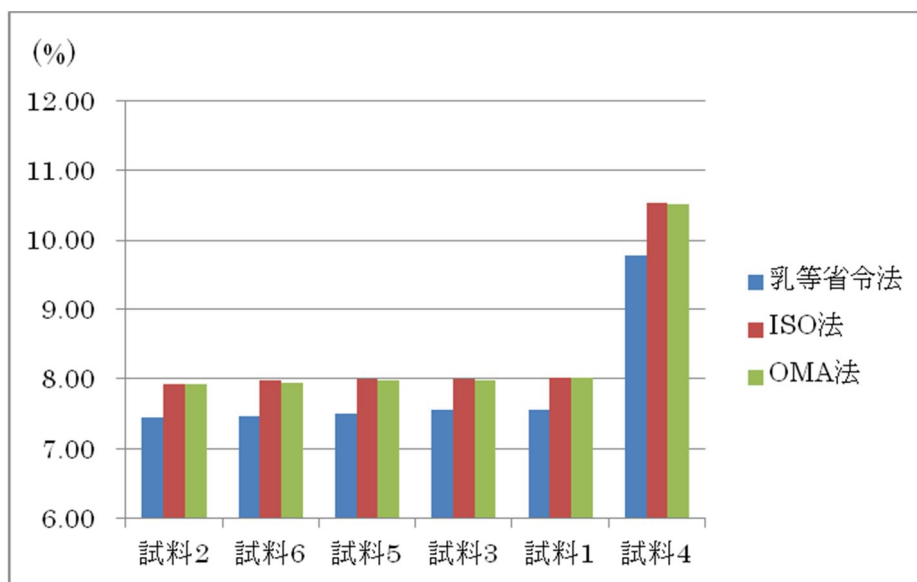
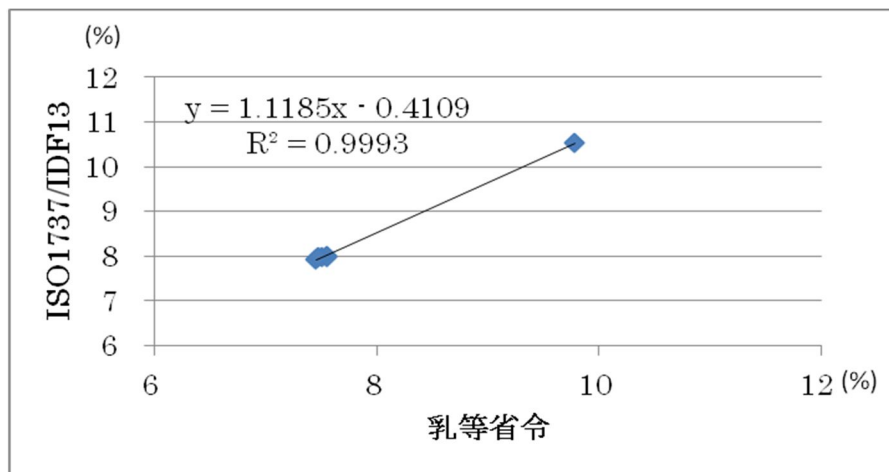


表 6 濃縮乳・無糖練乳の乳脂肪分における精度指標比較

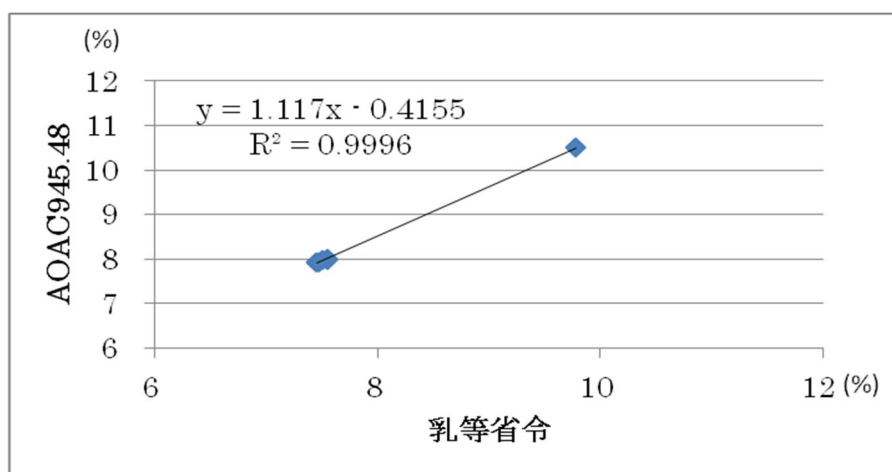
乳等省令法							
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	総平均
参加試験所数	5	5	5	5	5	5	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	7.55	7.45	7.55	9.78	7.50	7.47	7.88
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.020	0.032	0.033	0.031	0.026	0.039	0.030
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.055	0.090	0.092	0.088	0.073	0.110	0.085
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.5	0.4
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.084	0.095	0.053	0.396	0.093	0.119	0.140
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.237	0.266	0.147	1.110	0.260	0.333	0.392
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	1.1	1.3	0.7	4.1	1.2	1.6	1.7
ISO1737:2008/IDF13:2008							
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	総平均
参加試験所数	5	5	5	5	5	5	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	8.02	7.93	7.99	10.53	7.99	7.98	8.41
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.010	0.013	0.010	0.018	0.015	0.009	0.013
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.027	0.038	0.029	0.049	0.042	0.026	0.035
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.016	0.023	0.030	0.055	0.046	0.014	0.031
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.044	0.066	0.085	0.153	0.128	0.040	0.086
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.2	0.4
AOAC945.48							
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	総平均
参加試験所数	5	5	5	5	5	5	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	8.01	7.92	7.98	10.51	7.98	7.94	8.39
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.013	0.010	0.019	0.013	0.013	0.012	0.013
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.037	0.027	0.053	0.037	0.037	0.034	0.037
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.015	0.019	0.026	0.061	0.034	0.012	0.028
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.041	0.053	0.072	0.170	0.096	0.034	0.078
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	0.2	0.2	0.3	0.6	0.4	0.2	0.3

図 20 濃縮乳・無糖練乳の乳脂肪分における X-Y プロット

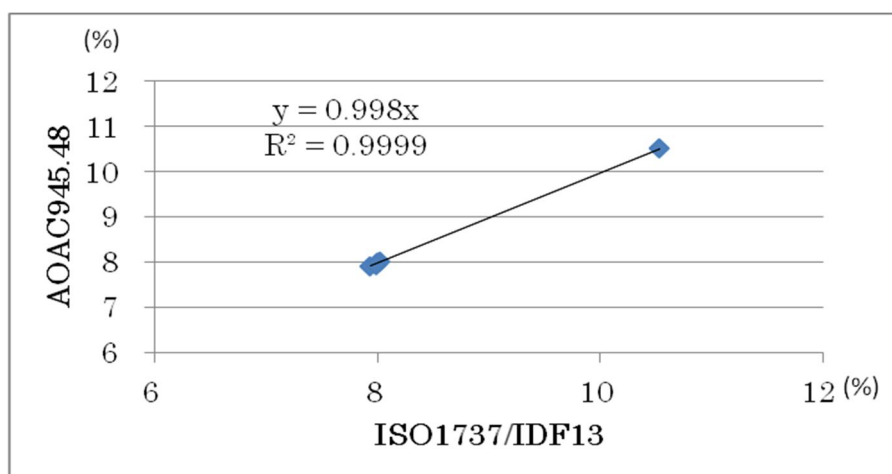
乳等省令法 - ISO1737:2008/IDF13:2008



乳等省令法 - AOAC945.48



ISO1737:2008/IDF13:2008 - AOAC945.48



(4) 加糖練乳における全固形分の試験法の比較

加糖練乳の全固形分の試験法について、乳等省令法、ISO法の2法による測定結果を比較した。平均値は、乳等省令法がISO法より高い傾向が見られた。(表7、図21)。室間再現相対標準偏差は、乳等省

令法が高かった(表8)。また、X-Yプロットによってそれぞれの試験法を比較したところ、乳等省令法とISO法による近似曲線の決定係数は $R^2=0.9351$ であった。(図22)。

表7 加糖練乳の全固形分における平均値の比較

	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6
乳等省令法	73.90	73.85	74.12	74.16	74.40	74.23
ISO法	72.93	72.92	73.08	73.28	73.56	73.40

図21 加糖練乳の全固形分における平均値の比較(濃度順並べ替え)

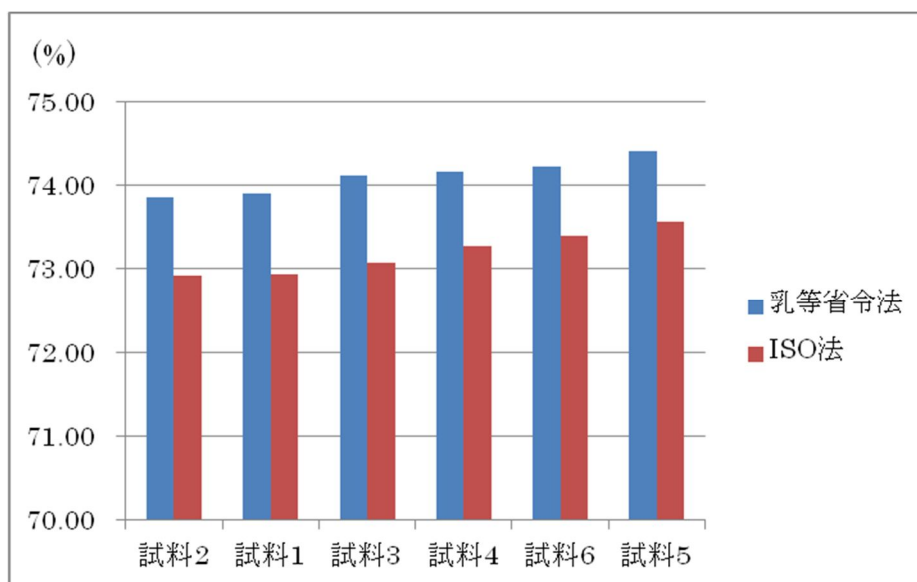


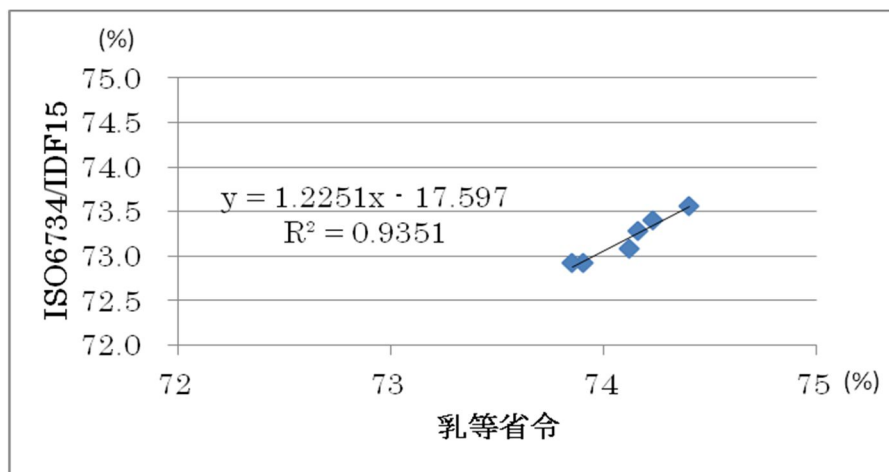


表 8 加糖練乳の全固形分における精度指標比較

乳等省令法							
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	73.90	73.85	74.12	74.16	74.40	74.23	74.11
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.077	0.128	0.119	0.117	0.136	0.104	0.113
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.216	0.358	0.335	0.326	0.382	0.290	0.318
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.415	0.360	0.314	0.279	0.466	0.340	0.362
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	1.162	1.008	0.878	0.780	1.306	0.952	1.014
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	0.6	0.5	0.4	0.4	0.6	0.5	0.5
ISO6734:2010/IDF15:2010							
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	72.93	72.92	73.08	73.28	73.56	73.40	73.20
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.053	0.101	0.042	0.053	0.070	0.020	0.056
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.147	0.282	0.117	0.147	0.197	0.057	0.158
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.141	0.229	0.130	0.359	0.307	0.084	0.208
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.394	0.640	0.365	1.005	0.860	0.236	0.583
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	0.2	0.3	0.2	0.5	0.4	0.1	0.3

図 22 加糖練乳の全固形分における X-Y プロット

乳等省令法 - ISO6734:2010/IDF15:2010



(5) 加糖練乳における乳脂肪分の試験法の比較

加糖練乳の乳脂肪分について、乳等省令法、ISO法、OMA法の3法による測定結果を比較した。平均値は、ISO法、OMA法に比べて乳等省令法が低い傾向が見られた(表9、図23)。室間再現相対標準偏差は大きい順に乳等省令法、OMA法、

ISO法であった。(表10)。また、X-Yプロットによってそれぞれの試験法を比較した。近似曲線の決定係数は乳等省令法とISO法は $R^2=0.7947$ 、乳等省令とOMA法は $R^2=0.9159$ 、ISO法とOMA法は $R^2=0.8832$ であった(図24)。

表9 加糖練乳の乳脂肪分における平均値の比較

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6
乳等省令法	7.78	7.48	7.61	7.91	7.99	7.89
ISO法	8.20	8.16	8.22	8.41	8.50	8.47
OMA法	8.30	8.16	8.21	8.38	8.49	8.47

(%)

図23 加糖練乳の乳脂肪分における平均値の比較(濃度順並べ替え)

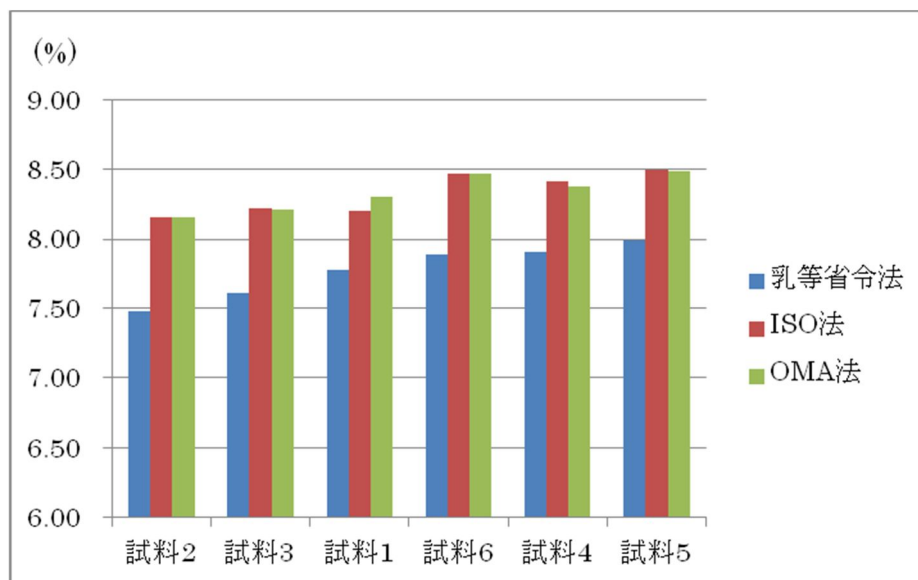
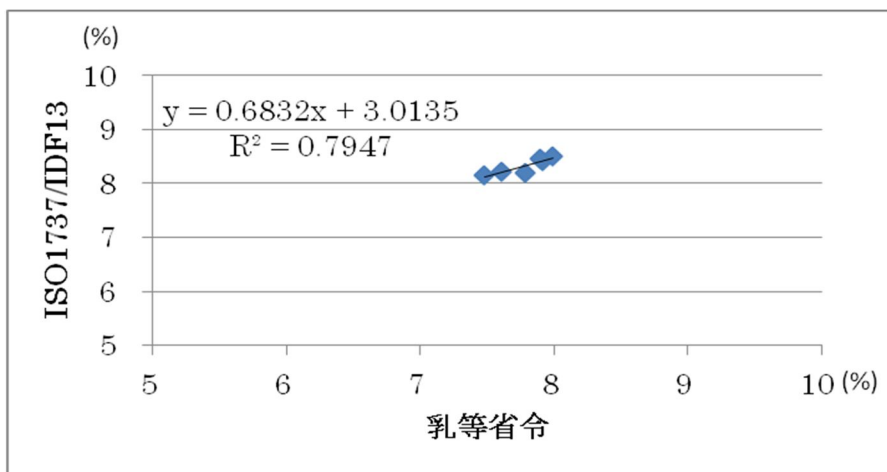


表 10 加糖練乳の乳脂肪分における精度指標比較

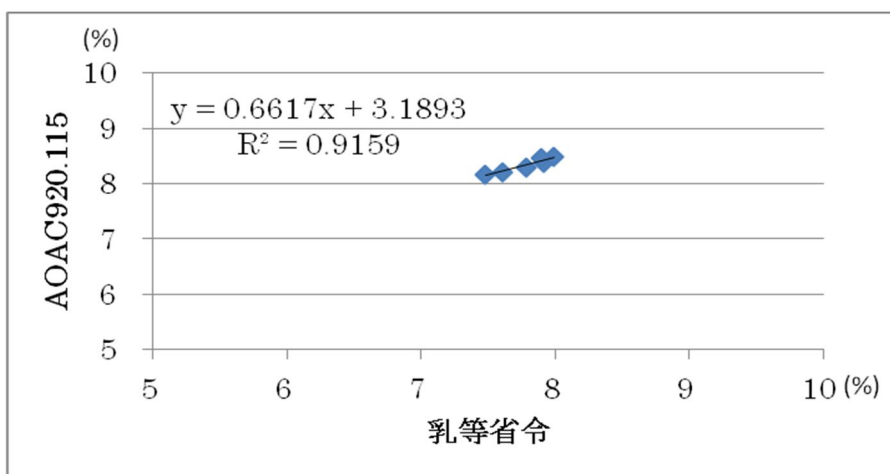
乳等省令法							
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	7.78	7.48	7.61	7.91	7.99	7.89	7.78
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.029	0.028	0.036	0.011	0.024	0.029	0.026
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.082	0.078	0.102	0.031	0.068	0.082	0.074
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	0.4	0.4	0.5	0.1	0.3	0.4	0.3
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.107	0.430	0.303	0.112	0.134	0.179	0.211
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.300	1.203	0.847	0.313	0.376	0.502	0.590
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	1.4	5.7	4.0	1.4	1.7	2.3	2.7
ISO1737:2008/IDF13:2008							
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	8.20	8.16	8.22	8.41	8.50	8.47	8.33
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.027	0.029	0.011	0.023	0.011	0.014	0.019
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.075	0.081	0.030	0.064	0.030	0.038	0.053
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	0.3	0.4	0.1	0.3	0.1	0.2	0.2
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.053	0.029	0.038	0.038	0.019	0.041	0.036
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.149	0.081	0.107	0.107	0.052	0.115	0.102
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	0.7	0.4	0.5	0.5	0.2	0.5	0.4
AOAC920.115							
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	8.30	8.16	8.21	8.38	8.49	8.47	8.34
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.012	0.022	0.020	0.013	0.018	0.043	0.021
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.034	0.060	0.057	0.037	0.050	0.122	0.060
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.5	0.3
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.259	0.053	0.037	0.076	0.033	0.043	0.083
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.725	0.148	0.105	0.212	0.091	0.122	0.234
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	3.1	0.6	0.5	0.9	0.4	0.5	1.0

図 24 加糖練乳の乳脂肪分における X-Y プロット

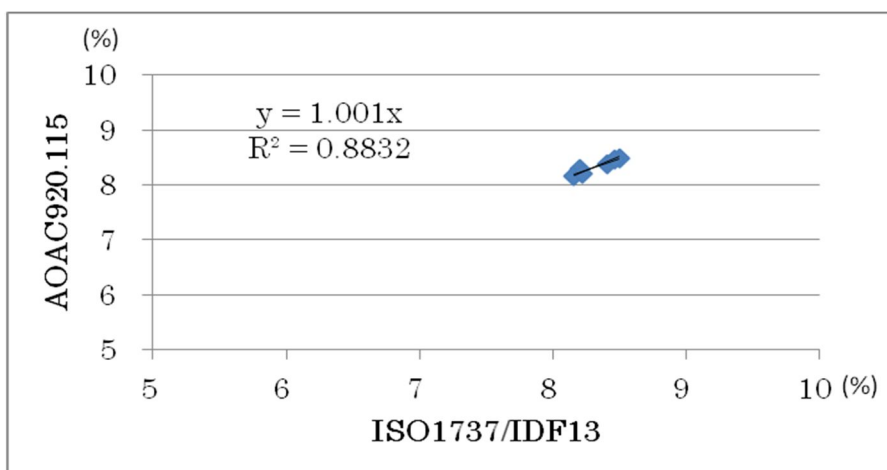
乳等省令法 - ISO1737:2008/IDF13:2008



乳等省令法 - AOAC920.115



ISO1737:2008/IDF13:2008 - AOAC920.115



## D. 考察

### (1) アイスクリーム類における試験法の比較

アイスクリーム類の乳脂肪分の試験法として比較した乳等省令法及び OMA 法は、いずれも原理的には同じ重量法であるが、脂肪抽出を行う器具に違いがある。乳等省令法には「レーリツヒ管」が、OMA 法には「マジョニア管」が規定されている。このことは平成 28 年度に比較試験を実施したクリームと同じである。なお、乳等省令において、クリームの試験法である「別表二(七)(1)3b 濃縮乳、無糖練乳、加糖練乳全粉乳、クリームパウダー、加糖粉乳及びクリームの乳脂肪分の定量法」では「リヨーリツヒ管」、アイスクリーム類の試験法である「別表二(七)(2)4 乳脂肪分の定量法」では「レーリツヒ管」とそれぞれ記載に違いがあるが、器具自体は同じものとして比較試験を実施した。

測定値の比較において、乳等省令法は OMA 法より平均値が脂肪分値として約 0.5% 低かった。OMA 法の Reproducibility (反復精度) は 0.056% である。この数値は一つの試験法についての複数の試験所間の許容差であるが、これを複数の試験法間で同等の結果が出せるかをみる指標としてあてはめれば、ISO 法と OMA 法はいずれの指標でも許容範囲内にあり、乳等省令法は許容範囲外である。また、ばらつきについては、室間再現相対標準偏差の総平均は、OMA 法が 0.4%、乳等省令法は 3.9% であり、併行相対標準偏差は、OMA 法が 0.3%、乳等省令法は 0.4% であった。併行相対標準偏差は OMA 法と同等であり、室間再現相対

標準偏差は OMA 法の約 10 倍であったことから、乳等省令法は、同一試験所内における併行測定では OMA 法と同水準の精度で結果を出すことができるが、試験所間の差が大きく、試験の操作方法によって差が生じやすい試験法であると考えられた。

X-Y プロットは  $R^2=0.9982$  であり非常に高い相関性が確認された。

レーリツヒ管とマジョニア管は、どちらもガラス製の脂肪抽出器具であるが、その形状は大きく異なる(図 1、図 2)。レーリツヒ管は、管の中央部付近にある側管から溶媒層を回収する構造になっており、その構造上側管より下に位置する溶媒層はレーリツヒ管内に残してしまうことになる。一方、マジョニア管は溶媒層を最後まで回収できる構造になっている。マジョニア管に比べてレーリツヒ管がロスを生じてしまう形状であることが、乳等省令法が低値となった原因であると考えられた。試験所間で生じる測定値の差も同様に抽出器具の違いに起因する操作方法の熟練度等に原因があるものではないかと考えられた。

マジョニア管適用への要望は、平成 27 年度に実施したアンケート調査でも指摘されており、また、日本国内においてもレーゼ・ゴットリーブ法を実施する際にレーリツヒ管同様に用いることができるとされている<sup>(1)</sup>。

### (2) 濃縮乳・無糖練乳における試験法の比較

#### 2.1 濃縮乳・無糖練乳の乳固形分

比較試験を行った乳等省令法、ISO 法、

OMA990.19 及び OMA990.20 の 4 試験法はいずれも直接乾燥法であるが、試料採取方法や、測定操作に少しずつ違いがある。

試料採取方法については、乳等省令法は試料 20g を 100ml メスフラスコで希釈し、希釈試料 10ml を容量採取する、ISO 法は試料 1 ~ 5g を直接重量採取する、AOAC990.19、AOAC990.20 は共通して試料 40g を水 60g で希釈し、希釈試料 4 ~ 5g を重量採取する、という違いがある。

乾燥条件については、乳等省令法は 98 ~ 100 で恒量になるまで、ISO 法は  $102 \pm 2$  で 2 時間乾燥後、2 回連続して測定した質量の差が 1mg 以下になるまで 1 時間乾燥の繰り返し、AOAC990.19 は  $100 \pm 1$  で 3 時間、AOAC990.20 は  $100 \pm 1$  で 4 時間、という違いがある。また、乳等省令法、ISO 法、AOAC990.19 の 3 法は共通して、乾燥機で乾燥する前に沸騰水浴上で予備乾燥を行うことになっているが、AOAC990.20 は予備乾燥の工程なしに乾燥機で乾燥させることとなっている。

測定値の総平均値を比較した場合、AOAC990.19 と AOAC990.20 はいずれも 28.66% と同値であり、ISO 法は 28.54%、乳等省令法は 28.44% であった。ISO 法の反復精度は 0.50%、OMA 法の反復精度は AOAC990.19 が 0.013%、AOAC990.20 が 0.018% である。ISO 法の数値を指標としてあてはめれば、4 法はいずれも許容範囲内であるが、OMA 法の数値を指標としてあてはめれば、乳等省令法と OMA 法は許容範囲外である。また、ばらつきについては、室間再現相対標

準偏差は大きい順に ISO 法は 0.8%、乳等省令法と OMA990.19 は 0.5%、OMA990.20 は 0.3% であった。

X-Y プロットは 4 法いずれの組み合わせにおいても  $R^2 > 0.999$  と非常に高い相関性が確認された。

## 2.2 濃縮乳・無糖練乳の乳脂肪分

比較試験を行った乳等省令法、ISO 法、OMA 法はいずれも原理的には同じ重量法であるが、脂肪抽出を行う器具に違いがある。乳等省令法には「リヨールツヒ管」が、OMA 法には「マジョニア管」が規定されており、このことはアイスクリーム類と同じである。

測定値の比較において、ISO 法と OMA 法の総平均値は 8.41% と 8.39%、乳等省令法は 7.88% であり、ISO 法及び OMA 法より脂肪分値として約 0.5% 低値であった。ISO 法の反復精度は 0.06% であり、OMA 法の反復精度は 0.056% である。これらの数値を指標としてあてはめれば、ISO 法と OMA 法はいずれの指標でも許容範囲内にあり、乳等省令法は許容範囲外である。

ばらつきについては、室間再現相対標準偏差の総平均は、ISO 法が 0.4%、OMA 法が 0.3%、乳等省令法は 1.7% であり、併行相対標準偏差は、ISO 法が 0.1%、OMA 法が 0.2%、乳等省令法が 0.4% であった。乳等省令法は、測定値は低く、試験所間の差が生じやすいというアイスクリーム類と同じ傾向であった。

X-Y プロットは、3 法いずれの組み合わせも  $R^2 > 0.999$  と非常に高い相関性が確認された。

### (3) 加糖練乳における試験法の比較

#### 3.1 加糖練乳の全固形分

比較試験を行った乳等省令法と ISO 法は、いずれも原理的には同じ乾燥法であるが、乳等省令法は直接乾燥法であり、ISO 法は乾燥助剤法と呼ばれる方法である。乾燥助剤法は国内においても乳飲料等の全固形分の測定に一般的に用いられている方法である。乾燥助剤法は、直接法では水の蒸発が不完全な食品に適用される。すなわち、加熱乾燥にあたり、食品試料から水を効率よくかつ完全に蒸発させるには、蒸発面積を大きくすることと、水蒸気が食品組織から抜け出られる道を作ることが必要である。粘質状、液状、ペースト状などの食品は、そのままでは上記の条件を満たさないばかりか、加熱温度の上昇に伴って、水に溶解あるいは分散、乳化していた成分が、蒸発表面に被膜を形成し、乾燥が阻害されることがある。そこで乾燥助剤として精製ケイ砂やケイソウ土などを試料に混和し、蒸発表面積を大きくするなどして乾燥する方法が行われる<sup>(2)</sup>。

試料採取方法については、乳等省令法は試料 20g を 100ml メスフラスコで希釈し希釈試料 10ml を容量採取する、ISO 法は試料 2g を直接重量採取する、という違いがある。

乾燥条件については、乳等省令法が 98 ~ 100 で恒量になるまでであるのに対し、ISO 法は 102 ± 2 で 2 時間乾燥後 2 回連続して測定した質量の差が 1mg 以下になるまで 1 時間乾燥を繰り返す、という違いがある。

測定値の比較において、乳等省令法の総平均は 74.11% であり、ISO 法の 73.20% より固形分値として約 0.9% 高値であった。ISO 法の反復精度は 0.6% である。この数値を試験法間の指標としてあてはめれば、ISO 法と乳等省令法は許容範囲外である。乾燥助剤は、水分含量が高いことに加えて、糖質などの含量も比較的高い試料を効率的に乾燥させるために加える<sup>(3)</sup>とされており、約 44%<sup>(4)</sup> とシヨ糖を多く含む加糖練乳は、直接法である乳等省令法では乾燥が不完全な状態となっていることが考えられた。ばらつきについては、室間再現相対標準偏差の総平均は、乳等省令法は 0.5%、ISO 法は 0.3% であった。

X-Y プロットは  $R^2=0.9351$  であり、非常に高い相関性が確認された。

#### 3.2 加糖練乳の乳脂肪分

比較試験を行った乳等省令法、ISO 法、OMA 法はいずれも同じ重量法であるが、脂肪抽出を行う器具に違いがある。乳等省令法には「リヨールツヒ管」が、OMA 法には「マジョニア管」が規定されており、このことはアイスクリーム類及び濃縮乳・無糖練乳と同じである。

測定値の比較において、ISO 法と OMA 法の総平均値は 8.33% と 8.34%、乳等省令法は 7.78% であり、ISO 法及び OMA 法より脂肪分値として約 0.5% 低値であった。ISO 法の反復精度は 0.06% であり、OMA 法の反復精度は 0.056% である。これらの数値を指標としてあてはめれば、ISO 法と OMA 法はいずれの指標でも許容範囲内にあり、乳等省令法は許容範囲



外である。また、ばらつきについては室間再現相対標準偏差の総平均は、ISO 法が 0.4%、OMA 法が 1.0%、乳等省令法は 2.7%であり、併行相対標準偏差は、ISO 法が 0.2%、OMA 法が 0.3%、乳等省令法は 0.3%であった。加糖練乳においても乳等省令法は測定値は低く、試験所間で差が出やすいというアイスクリーム類と同じ傾向であった。

X-Y プロットは、乳等省令法と ISO 法は  $R^2=0.7947$ 、乳等省令法と OMA 法は  $R^2=0.9159$ 、ISO 法と OMA 法は  $R^2=0.8832$  であり、他の比較試験と比べて低値となった。このことは 6 試料の濃度差が広くとれなかったことによるものと考えられるが、それでも 3 法いずれの組み合わせも十分高い相関性はあると考える。

#### E. 結論

本研究により、初年度に実施したアンケート結果を参考に選定した代表的な品目の試験法について、海外の試験法との比較により、乳等省令法の精度や測定原理の違い等による測定結果の違いが確認され、改正について検討が必要な器具や操作法が明らかになった。

本研究では、乳等省令の成分規格に対応する海外の成分規格の試験法を整理し、該当する試験法を対象として比較試験を実施したが、対応する成分規格がない品目も多く存在したことから、これらの品目の試験法の国際整合をどのように進めるか、また、乳等省令においては「乳脂肪分」、「乳固形分」であるのに対して、国際的には「fat content」や「total solids

content」とされている成分規格をどう整合させていくのかなど、今後、成分規格と規格試験法を考えていく上での課題も明らかとなった。

#### (参考文献)

- (1) 日本薬学会(編)(1984). 乳製品試験法・注解 金原出版株式会社, pp87-88
- (2) 財団法人日本食品分析センター(編)(2001). 分析実務者が書いた五訂日本食品標準成分表分析マニュアルの解説 中央法規出版株式会社, p13
- (3) 安井明美・渡邊智子・中里孝史・淵上賢一(編)(2016). 日本食品標準成分表 2015 年版(七訂)分析マニュアル・解説 建帛社, p14
- (4) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会(編)(2015). 日本食品標準成分表 2015 年版(七訂) 全国官報販売協同組合, pp174-175

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

国際酪農連盟日本国内委員会 理化学分析専門部会 / 添加物・汚染物質専門部会合同会議, 平成 29 年 7 月 18 日, 東京

都

一般社団法人日本乳業協会 生産技術  
委員会，平成 29 年 8 月 30 日，東京都

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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）

平成 29 年度 分担研究報告書

国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の試験法の研究

分担課題 乳及び乳製品試験法に関する改正試験法に向けた検討（微生物分野）

研究分担者	平井昭彦	東京都健康安全研究センター微生物部
研究協力者	下島優香子	東京都健康安全研究センター微生物部
	井田美樹	東京都健康安全研究センター微生物部
	西野由香里	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
	岡田三弘	関東生乳販売農業協同組合連合会生乳検査所
	大嶋秀克	公益財団法人日本乳業技術協会事業部技術開発課
	内田雅之	公益社団法人北海道酪農検定検査協会事業部生乳検査部
	小坂英次郎	公益社団法人北海道酪農検定検査協会事業部生乳検査部

研究要旨

乳及び乳製品の成分規格等に関する省令では、牛乳や乳製品等を製造する際に使用する生乳は、細菌数が直接個体鏡検法（ブリード法）で 1 ml あたり 400 万以下であることと定められている。指定される染色液であるニューマン染色液は成分に含まれるテトラクロロエタンが平成 26 年に特定化学物質障害予防規則の特定化学物質となり、取扱場所の制限や健康管理などが必要となった。そのため、日常的にブリード法試験を実施している現場からは、染色液の代替品が求められている。本研究では代替染色液として、ブロードハーストパーレイ染色液を検討した。また、その改良染色液である BPV 染色液（ベッセル【獣医環境衛生研究所】）およびブロードハーストパーレイ改良染色液（公益社団法人 北海道酪農検定検査協会生乳検査部）も併せて検討した。

4 施設によるコラボレイティブスタディを行い、各染色液のニューマン染色液との同等性を検証した結果、いずれの染色液も同等性が確認された。よって、ブロードハーストパーレイ染色液およびその改良染色液はニューマン染色液の代替染色液として使用可能と示唆された。

A. 研究目的

乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（乳等省令）では、牛乳、殺菌山羊乳、乳製

品等を製造する場合に使用する生乳または生山羊乳は、細菌数が直接個体鏡検法（ブリード法）で 1 ml あたり 400 万以下であること

と定められている。本検査法に使用される染色液は、「フラスコ中にテトラクロールエタン 40ml 及び無水エタノール 54ml を入れ 70 度まで加温し、これにメチレンブルー 1.00 g から 1.12 g までを混じ強く振って色素を完全に溶かし、冷却するのを待って、酢酸 6 ml を徐々に加える過した後密栓して貯える」と作成法が記載されている「ニューマン染色液」である。この染色液に含まれる 1,1,2,2-テトラクロロエタンは平成 26 年 11 月の特定化学物質障害予防規則改正により特定化学物質の特別管理物質に追加され、特別有機溶剤等に位置付けられた。取扱場所の制限や健康管理などが必要となり、そのため、日常的にブリード法試験を実施している現場からは、染色液の代替品が求められている。平成 27 年度に本研究班が実施した、日常的に乳及び乳製品の試験を実施している現場担当者や乳及び乳製品の試験法に精通している専門家を対象に実施したアンケート調査結果でも、ブリード法による細菌数測定に代替染色液の適用を求める意見があった。

本研究ではニューマン染色液の代替染色液を検証することを目的として、テトラクロロエタンを含まないブロードハーストパーレイ染色液を検討した。ブロードハーストパーレイ染色液は、「70%エチルアルコール 200 ml を温めて 1.5 g のメチレンブルーを溶解し、10% フクシン原液（95%エチルアルコール 100ml にフクシン 10g を溶かす）15ml を加える。さらにアニリン 5ml を加え混和する。12ml の希硫酸（濃硫酸 5.7ml を蒸留水約 90ml の中に加え、総量を 100ml とする）を混和し、温めて濾過し、濾液 100ml ごとに 50ml の温水を加えてよく混和する」（技術の手引き 16 牛の乳房炎、農林水産省畜産局衛生課、農林

水産省家畜衛生試験場監修、社団法人日本獣医師会発行）方法で作製し、特定化学物質を含まない。

昨年度、ブロードハーストパーレイ染色液の市販品である BPV 染色液（ベッセル【獣医環境衛生研究所】）およびブロードファーストパーレイ（武藤化学）についてニューマン染色液との同等性を検証した。また、乳質の向上等を図るための指標として、指定生乳生産者団体では体細胞数を 30 万/ml 以下とする自主基準が設けられており、乳処理業等の現場ではブリード法で細菌数だけでなく体細胞数も併せて測定されていることから、体細胞数についても染色性を検証した。その結果、いずれの染色液も、鏡検者あるいは染色者が異なっても、細菌数および体細胞数とも計測数のばらつきが少なく、典型像を確認できることが示された。また、いずれの染色液も計測数は同等であり、相関があることが示唆された。

今年度は、ブロードハーストパーレイ染色液、その改良染色液である BPV 染色液（ベッセル【獣医環境衛生研究所】）およびブロードハースト・パーレイ改良染色液（公益社団法人 北海道酪農検定検査協会生乳検査部）のニューマン染色液との同等性を検証するために、4 施設によるコラボレイティブスタディを行った。

## B. 研究方法

### 1) 参加施設 (A-D)

- ・公益社団法人 北海道酪農検定検査協会 生乳検査部検査課
- ・関東生乳販売農業協同組合連合会 生乳検査所
- ・公益財団法人 日本乳業技術協会事業部技

## 術開発課

・東京都健康安全研究センター

### 2) 試料

2017年11月に、関東地方の生乳販売農業協同組合連合会生乳検査所で検査した後に冷蔵で当センターに輸送された生乳2検体(試料1、2)を供試した。

### 3) 染色液

以下の染色液を使用した。

ニューマン染色液(N, 関東化学)

BPV染色液(B1, ベッセル【獣医環境衛生研究所】)ブロードハーストパーレイ染色液の組成に改良が加えられた市販品である。

ブロードハーストパーレイ染色液(B2)ブロードファーストパーレイ(武藤化学, 1000ml 中含有量: アニリン約25ml, エタノール約700ml, 水約300ml, フクシン約7.5g, メチレンブルー約7.5g)220mlに12mlの希硫酸を混和して温めて濾過し、濾液100mlごとに50mlの温水を加えてよく混和して使用した。

ブロードハースト・パーレイ改良染色液(B3, 公益社団法人北海道酪農検定検査協会生乳検査部)70%エチルアルコール250mlを温めて2.0gのメチレンブルーを溶解し、10%フクシン原液3mlを加える。さらにアニリン5mlを加え混和する。15mlの希硫酸を混和し、温めて濾過し、濾液100mlごとに50mlの温水を加えてよく混和して、使用した。

### 4) ブリード法

ブリード法は、乳等省令および一般社団法人J-milkの生乳検査マニュアルに準じて実施

した。

すなわち生乳10 $\mu$ lをスライドガラスの1 $\times$ 1cmに塗抹し、約50の板の上で乾燥させ、70%エタノールに浸したのち、再び乾燥させた。N、B2については、瞬間染色し(滴下して数秒間表面を軽く乾燥させる)40以上のお湯で静かにしかも十分に2回水洗して乾燥させた。B1については、ベッセルのマニュアルに従い、2~3秒染色液に浸漬し、直ちに代液を振り落とし(2秒程)粗水洗(3秒程)本水洗(2秒~50秒)の後、キムワイプ等で水滴を拭い、乾燥させた。B3については、北海道酪農検定検査協会のプロトコールに従い、染色液に1分間以上(今回2分間とする)浸漬し、40以上のお湯で静かにしかも十分に2回水洗して乾燥させた。染色した試料を1000倍の油浸レンズで鏡検した。

### 5) コラボレイティブスタディ

当センターにて、生乳2試料について2区画ずつ塗抹し乾燥、70%エタノールに浸したのち再び乾燥させたスライドガラスを参加施設に配布し、各施設において染色を行った。各検査員(3~6人/施設)が各試料についてそれぞれの区画を16~64視野計測し(1視野0~3:64視野、4~6:32視野、7~:16視野)1視野平均を算出し、2区画の平均をその検査員の測定値とした。検査員の平均値および顕微鏡係数から各施設における細菌数および体細胞数を染色液ごとに算出した。さらに、4施設の平均値を染色液ごとの細菌数および体細胞数とした。

### 6) 標本間誤差の検討

当センターにて、生乳2試料をそれぞれ10標本ずつ塗抹し、ニューマン染色液で染色し、

1 検査員が 16 視野測定し、その平均値および顕微鏡係数から各標本の細菌数および体細胞数を算出し、標準偏差を求めた。

## C. 研究結果

### 1) ブリード法鏡検時の各種染色液の染色像

図 1 に、各種染色液の染色像を示した。N は初心者でも安定した染色が可能であり、鏡検時に判別しやすい印象であった(図 1A)。B1、B3 は背景がピンク色、細菌および体細胞は青色に染色され、色が異なり判別しやすく、また色彩も判別しやすい印象であった(図 1B、D)。B2 は B1 と同じように背景と対象物の色が異なり判別しやすい一方、背景が濃く染まる場合があり、濃い部分では測定がしづらく、判別しにくい印象であった(図 1C)。

### 2) コラボレイティブスタディ

コラボレイティブスタディにおける染色液 N、B1、B2、B3、施設 A、B、C、D、試料 1、2 の細菌数および体細胞数を表 1 および図 2 に示した。

4 施設の平均をとると、細菌数は試料 1 で N :  $4.3 \times 10^6$  /ml、B1 :  $3.0 \times 10^6$  /ml、B2 :  $2.2 \times 10^6$  /ml、B3 :  $3.4 \times 10^6$  /ml、試料 2 で N :  $7.2 \times 10^6$  /ml、B1 :  $4.9 \times 10^6$  /ml、B2 :  $5.1 \times 10^6$  /ml、B3 :  $6.3 \times 10^6$  /ml、体細胞数は、試料 1 で N :  $5.9 \times 10^5$  /ml、B1 :  $4.9 \times 10^5$  /ml、B2 :  $5.2 \times 10^5$  /ml、B3 :  $5.3 \times 10^5$  /ml、試料 2 で N :  $2.7 \times 10^5$  /ml、B1 :  $2.2 \times 10^5$  /ml、B2 :  $2.4 \times 10^5$  /ml、B3 :  $2.5 \times 10^5$  /ml であり、図 3 に示した。

標本間誤差を見るために、試料 1、2 を 10 標本作成、測定した結果を表 2 に示した。標準偏差を求めると、細菌数は試料 1 で  $2.73 \times 10^6$ 、試料 2 で  $2.85 \times 10^6$ 、体細胞数は試料 1

で  $1.3 \times 10^5$ 、試料 2 で  $8.0 \times 10^4$  であった。同一試料でも標本により、また測定視野により、測定結果に誤差が生じると考えられた。

コラボレイティブスタディで得られた染色液 N による試料 1、2 の細菌数および体細胞数に標準偏差を誤差範囲として想定し、図 3 に示した。染色液 N で得られる細菌数は、試料 1 では  $1.6 \times 10^6 \sim 7.1 \times 10^6$  /ml、試料 2 では  $4.3 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$  /ml、体細胞数は、試料 1 では  $4.6 \times 10^5 \sim 7.2 \times 10^5$  /ml、試料 2 では  $1.9 \times 10^5 \sim 3.5 \times 10^5$  /ml であると考えられた。B1、B2、B3 で得られた細菌数および体細胞数は試料 1、2 ともいずれもその範囲内に含まれ、染色液 N によって得られる数値と同等であると示唆された。

## D. 考察

コラボレイティブスタディにより、B1、B2、B3 いずれの染色液においても、求められる細菌数および体細胞数は試料 1、2 ともいずれも標本のばらつきの範囲内に含まれ、染色液 N によって得られる数値と同等であると考えられた。

B1 ; BPV 染色液について、メーカーの説明書には、浸漬「2~3 秒」とされている。今回、公益財団法人北海道酪農検定検査協会生乳検査部検査課および東京都健康安全研究センターにて、染色が薄い部分が見受けられた。関東生乳販売農業協同組合連合会生乳検査所では、手順通りに染色すると薄い傾向になることから、瞬間染色については数秒長く浸し、その後直ぐに洗浄せず、染色したプレパラートを乾燥させ、その後、洗浄して乾燥することで、薄い傾向が改善されたとコメントしている。長めに染色するほうが望ましいと考えられた。

B2;ブロードハーストパーレイ染色液では、背景が濃く染色されてしまう傾向がある。そのため、細菌を見落とさないよう注意する必要があると考えられた。

B3;ブロードハースト・パーレイ改良染色液は公益財団法人北海道酪農検定検査協会生乳検査部検査課の前身である社団法人北海道生乳検査協会による改良品である。改良点として、フクシンの量を減らし、背景の赤色が淡くなり、目への負担を軽くなった点をあげている。また、染色法として染色液を満たしたバットに1分以上保持することによって行い、実際には、作業の手がすいたときに引き上げ乾燥させることで染色時間を十分確保できると同時に、数秒間の保持の操作を省略しうるため作業性の向上も図ることができるとしている。今回は染色時間は2分間としたが、明瞭な染色像を得ることができた。また、公益財団法人北海道酪農検定検査協会生乳検査部検査課においても同等性が検証されている。

以上より、ブロードハーストパーレイ染色液、その改良染色液であるBPV染色液およびブロードハーストパーレイ改良染色液は、ニューマン染色液の代替染色液として使用可能と示唆された。

#### E. 結論

乳等省令では、牛乳や乳製品等を製造する際に使用する生乳は、細菌数がブリード法で1mlあたり400万以下であることと定められている。指定される染色液であるニューマン染色液の代替染色液として、ブロードハーストパーレイ染色液を検討した。ブロードハーストパーレイ染色液の市販品であるBPV染色液およびブロードハース

ト・パーレイ改良染色液についても併せてニューマン染色液との同等性を検証し、ニューマン染色液の代替染色液として使用可能と示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

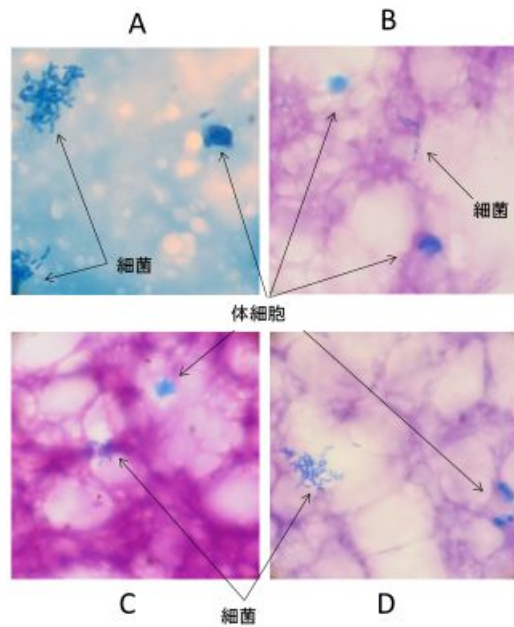


図1 プリード法における各種染色液の染色像  
 A: N(ニューマン染色液)  
 B: B1(BPV染色液)  
 C: B2(ブロードハースト・パーレイ染色液)  
 D: B3(ブロードハースト・パーレイ改良染色液)

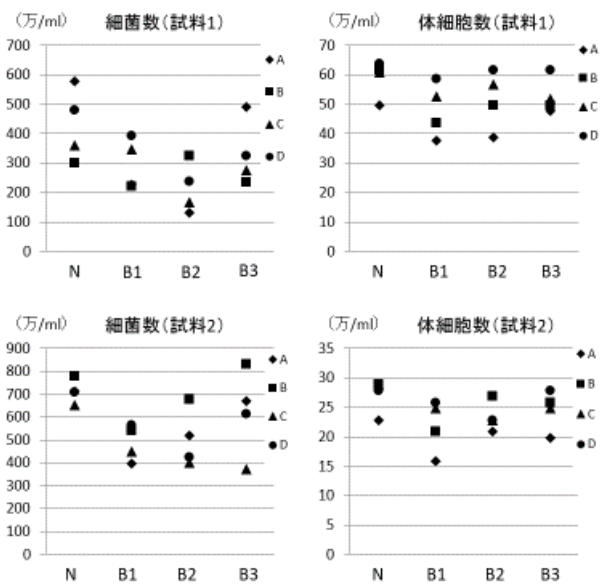


図2.コラボレイティブスタディによる染色液ごと施設ごとの細菌数および体細胞数



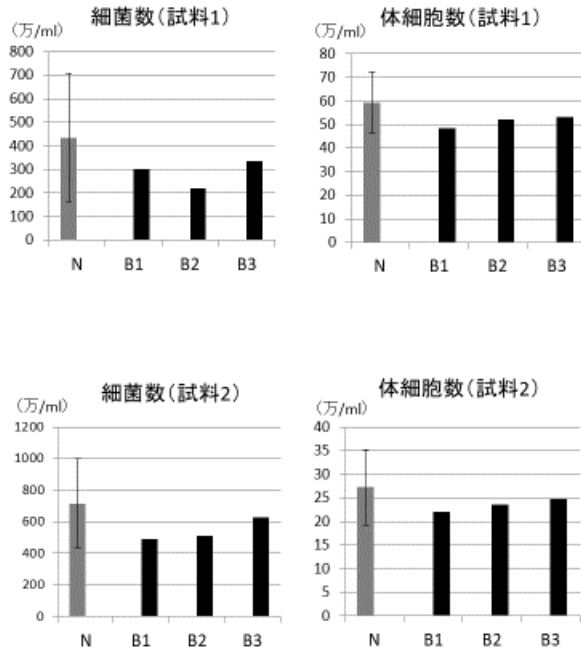


図3.コラボレイティブスタディによる染色液ごとの細菌数および体細胞数

表1.コラボレイティブスタディ結果

試料	施設	細菌数 (/ml)				体細胞数 (/ml)			
		N	B1	B2	B3	N	B1	B2	B3
1	A	$5.8 \times 10^6$	$2.3 \times 10^6$	$1.4 \times 10^6$	$5.0 \times 10^6$	$5.0 \times 10^5$	$3.8 \times 10^5$	$3.9 \times 10^5$	$4.8 \times 10^5$
	B	$3.0 \times 10^6$	$2.3 \times 10^6$	$3.3 \times 10^6$	$2.4 \times 10^6$	$6.2 \times 10^5$	$4.4 \times 10^5$	$5.0 \times 10^5$	$5.0 \times 10^5$
	C	$3.6 \times 10^6$	$3.5 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$	$2.8 \times 10^6$	$6.1 \times 10^5$	$5.3 \times 10^5$	$5.7 \times 10^5$	$5.2 \times 10^5$
	D	$4.8 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$	$2.4 \times 10^6$	$3.3 \times 10^6$	$6.4 \times 10^5$	$5.9 \times 10^5$	$6.2 \times 10^5$	$6.2 \times 10^5$
	平均	$4.3 \times 10^6$	$3.0 \times 10^6$	$2.2 \times 10^6$	$3.4 \times 10^6$	$5.9 \times 10^5$	$4.9 \times 10^5$	$5.2 \times 10^5$	$5.3 \times 10^5$
2	A	$7.1 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$	$6.7 \times 10^6$	$2.3 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$
	B	$7.8 \times 10^6$	$5.4 \times 10^6$	$6.8 \times 10^6$	$8.4 \times 10^6$	$2.9 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$2.7 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$
	C	$6.6 \times 10^6$	$4.5 \times 10^6$	$4.1 \times 10^6$	$3.8 \times 10^6$	$2.9 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$
	D	$7.1 \times 10^6$	$5.7 \times 10^6$	$4.3 \times 10^6$	$6.2 \times 10^6$	$2.8 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$
	平均	$7.2 \times 10^6$	$4.9 \times 10^6$	$5.1 \times 10^6$	$6.3 \times 10^6$	$2.7 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$

表2.標本間誤差

細菌数											
試料	標本1	標本2	標本3	標本4	標本5	標本6	標本7	標本8	標本9	標本10	標準偏差
1	視野平均 (個)	27.6	14.1	15.6	26.5	45.3	41.9	21.6	36.1	23.8	25.0
	細菌数 (/ml)	$7.254 \times 10^8$	$3.701 \times 10^8$	$4.113 \times 10^8$	$6.975 \times 10^8$	$1.191 \times 10^7$	$1.102 \times 10^7$	$5.692 \times 10^8$	$9.508 \times 10^8$	$6.251 \times 10^8$	$6.580 \times 10^8$
2	視野平均 (個)	30.8	35.5	38.7	44.5	26.4	36.4	56.8	29.9	38.2	16.3
	細菌数 (/ml)	$8.110 \times 10^8$	$9.344 \times 10^8$	$1.018 \times 10^7$	$1.171 \times 10^7$	$6.942 \times 10^8$	$9.574 \times 10^8$	$1.495 \times 10^7$	$7.880 \times 10^8$	$1.005 \times 10^7$	$4.293 \times 10^8$
体細胞数											
試料	標本1	標本2	標本3	標本4	標本5	標本6	標本7	標本8	標本9	標本10	標準偏差
1	視野平均 (個)	2.2	2.5	2.4	3.0	3.0	3.6	2.6	2.9	1.8	2.9
	体細胞数 (/ml)	$5.76 \times 10^5$	$6.58 \times 10^5$	$6.25 \times 10^5$	$7.90 \times 10^5$	$7.90 \times 10^5$	$9.38 \times 10^5$	$6.91 \times 10^5$	$7.57 \times 10^5$	$4.77 \times 10^5$	$7.57 \times 10^5$
2	視野平均 (個)	0.81	0.81	1.1	1.5	1.6	1.6	1.3	0.9	1.2	1.1
	体細胞数 (/ml)	$2.14 \times 10^5$	$2.14 \times 10^5$	$2.80 \times 10^5$	$3.95 \times 10^5$	$4.11 \times 10^5$	$4.28 \times 10^5$	$3.29 \times 10^5$	$2.30 \times 10^5$	$3.13 \times 10^5$	$2.96 \times 10^5$

なし