

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 27～29 年度総合研究報告書

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 27～29 年度総合研究報告書(分担研究)

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)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

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)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

研究分担者 平井昭彦 東京都健康安全研究センター

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
H27～29年度総合研究報告書

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 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)

研究要旨：

本研究では、乳等省令の別表二(七)乳等の試験法について欧米における乳及び乳製品の試験法に関して情報を収集し、乳等省令の試験法の該当部分との比較を行った。初年度に米国、欧州連合(以下、EUと略す)、オーストラリア及びニュージーランドにおける乳及び乳製品の試験法を検索した。国内の現状を把握するために実施した、国際酪農連盟日本国内委員会(Japanese National Committee of International Dairy Federation(JIDF))の理化学分析専門部会及び微生物・衛生専門部会委員を対象とした乳等省令の試験法に関するアンケート調査から、汎用されている分析法や分析機器による測定が可能となるような試験法の見直しを望む回答とともに国内法と国際法との不一致を指摘する意見もあり、現行の試験法は、現状に即した見直しや国際的なハーモナイズが必要であることが確認された。次年度からは、比較可能と考えられる項目について、米国(OMA法)及びEU(ISO法)における試験法と現行試験法をコラボレイティブスタディを含めて実施した。乳の乳脂肪分の測定値はOMA法、ISO法と比べて乳等省令法がわずかに高い値を示し、ばらつきは大きい結果となった。乳の全固形分の測定値はOMA法と比べて乳等省令法のばらつきが小さい結果となった。クリーム中の乳脂肪分の試験値はOMA法、ISO法と比べて乳等省令法がわずかに高い値を示し、ばらつきはOMA法、ISO法と同等の結果となった。脱脂粉乳の水分の測定値は乳等省令法がISO法より高くOMA法より低い結果となったが、ばらつきは乳等省令法が一番小さい結果となった。さらに、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。

細菌数の直接個体鏡検法（ブリード法）において指定されているニューマン染色液が特定化学物質であるテトラクロロエタンを含むため、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、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により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ことから、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（平成 28、29 年度）

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

研究協力者

五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
吉川 光英 東京都健康安全研究センター 食品化学部 食品成分研究科
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

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
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

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修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. 海外における乳及び乳製品の成分規格及び試験法

乳等省令で定められる乳及び乳製品の成分規格に関して、米国、EU、オーストラリア及びニュージーランドにおける乳及

び乳製品の定義(範囲)、成分規格、試験項目等について情報収集を行った。なお、オーストラリアとニュージーランドについては同一の規格基準が適用されるため一体的に取り扱った。情報収集にあたっては、対象国・地域の関連法令やガイドラインを中心に検索を行った。具体的な情報源は以下のとおりである。

1-1 米国

< 法令 >

連邦規則集 Code of Federal Regulations (CFR)

Title21 Food and Drugs

CHAPTER I-FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

SUBCHAPTER B-FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION

PART 131-MILK AND CREAM

PART 133-CHEESES AND RELATED CHEESE PRODUCTS

1-2 EU

< 法令 >

EU 規則 (Regulation)

Council Regulation (EC) No 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products

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

ANNEX I - PART A

ANNEX I - PART B

1-3 オーストラリア/ニュージーランド
<法令>

食品規格基準法典 (The Australia New Zealand Food Standards Code)

Australia New Zealand Food Standards Code

Chapter2 Food product standards

PSRT2.5 Dairy Products

Australia New Zealand Food Standards Code

Chapter1 General food standards

PART 1.6 Microbiological and Processing Requirements

Australia New Zealand Food Standards Code

Chapter4 Primary production standards

PART4.2

Standard 4.2.4 - Primary Production and Processing Standard for Dairy Products (Australia Only)

<ガイドライン>

Methods of Analysis for Food

User guide on Methods of Analysis for Food (July 2001)

2. 乳等省令で規定される乳及び乳製品の試験法に関するアンケート調査

乳業メーカーの技術者、大学や研究機関の専門家等で構成される、国際酪農連盟日本国内委員会 (Japanese National Committee of International Dairy Federation (JIDF)) の理化学分析専門部会員 12 名及び微生物・衛生専門部会委員 16 名を対象として、乳等省令 別表二(七) 乳等の成分規格の試験法について項目毎に自由記入形式により実施した。

3. 試験法の比較

牛乳、クリームにおける乳脂肪分、脱脂粉乳における水分、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について、米国及びEUにおける乳及び乳製品の試験法について情報を整理し、比較を行った。

4. 乳児用調整粉乳および液状ミルクの規格基準

米国、EU、オーストラリア/ニュージーランドにおける乳児用調整粉乳および液状ミルクに関する規格基準について、情報収集を行った。具体的な情報源は以下のとおりである。

4-1 米国

<法令>

連邦規則集 Code of Federal Regulations (CFR)

Title21 Food and Drugs

CHAPTER I-FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

SUBCHAPTER B-FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION

PART 106 INFANT FORMULA REQUIREMENTS PERTAINING TO CURRENT GOOD MANUFACTURING PRACTICE, QUALITY CONTROL PROCEDURES, QUALITY FACTORS, RECORDS AND REPORTS, AND NOTIFICATIONS

PART 107 INFANT FORMULA

4-2 EU

<法令>

EU 規則 (Regulation)

Commission Directive 2006/141/EC on infant formulae and follow-on formulae and amending Directive 1999/21/EC

COMMISSION REGULATION (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs

4-3 オーストラリア/ニュージーランド <法令>

食品規格基準法典 (The Australia New Zealand Food Standards Code)

Australia New Zealand Food Standards Code

Chapter2 Food product standards
STANDARD 2.9.1 - INFANT FORMULA PRODUCTS

Australia New Zealand Food Standards Code

Chapter1 General food standards
PART 1.6 Microbiological and Processing Requirements

5. LL(long-life)ミルクの規格基準

米国、EU、オーストラリア/ニュージーランドにおけるLLミルクに関する規格基準について、情報収集を行った。具体的な情報源は以下のとおりである。

5-1 米国 <ガイドライン>

The Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance (Grade “A” PMO), 2013 Revision

5-2 EU <法令>

EU 規則 (Regulation)
COMMISSION REGULATION (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs

5-3 オーストラリア/ニュージーランド <法令>

食品規格基準法典 (The Australia New Zealand Food Standards Code)

Australia New Zealand Food Standards Code

Chapter1 General food standards
PART 1.6 Microbiological and Processing Requirements

Australia New Zealand Food Standards Code

Chapter4 Primary production standards
PART4.2

Standard 4.2.4 - Primary Production and Processing Standard for Dairy Products (Australia Only)

6. プリード法に係る代替染色液の検討
検体として、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東京都健康安全研究センターに輸送された生乳2検体を供試した。染色液には、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(B2)、ブロードファーストパーレイ(武藤化学)、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)を使用し、以下の4施設において実施した。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。

C. 研究結果

1. 海外における乳及び乳製品の成分規格及び試験法

1-1 米国

(1) 概要

米国では、保健福祉省食品医薬品局（FDA）、農務省食品安全検査局（USDS FSIS）および環境保護庁（EPA）の3つの政府機関が食品行政において主要な役割を担っている。FDAは、Federal Food, Drug, and Cosmetic Actに基づき、肉・肉製品と加工卵を除く全ての食品を管轄している。従って、乳および乳製品についてはFDAの所管となる。一方、肉・肉製品および加工卵については、FSISが所管するFederal Meat Inspection Act、Poultry Products Inspection Act、Egg Products Inspection Actが適用される。また、EPAはFederal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Actに基づき、農薬の登録や使用基準等を規定している。

米国のあらゆる連邦法はコード化されており、Code of Federal Regulations（CFR；連邦行政規則集）としてまとめられている。CFR title21はFDAが所管する法令を収載したものであり、その第1章B節に乳および乳製品を含む食品の成分規格が定められている。

(2) 乳および乳製品の成分規格

CFR Title21 CHAPTER 1 SUBCHAPTER B-FOOD FOR HUMAN CONSUMPTIONでは、それぞれの品目ごとに乳および乳製品の成分規格が定められている。Part131は乳およびクリーム（Milk and Cream）、Part133はチーズ及びチーズ製品（Cheese and Related cheese products）について、それぞれ乳脂肪分や無脂肪固形分、酸度、添加成分等の成分規格が定められている。同法令に記載されている「乳およびクリーム」には、牛乳、酸性乳、発酵乳、濃縮

乳、加糖練乳、脱脂粉乳、ビタミンA/D添加脱脂粉乳、無糖練乳、全脂粉乳、ドライクリーム、生クリーム、ライトクリーム、ライトホッピングクリーム、サワークリーム、自然発酵サワークリーム、エッグノッグ、ハーフ&ハーフ、ヨーグルト、低脂肪ヨーグルト、無脂肪ヨーグルトがある。また、「チーズ及びチーズ製品」については、「チェダーチーズやカッテージチーズなど72種類のチーズについてそれぞれの成分規格が規定されている。また、試験法については、それぞれの成分規格に対応した方法（OMA法）が記載されている。

乳の乳脂肪分の測定値はOMA法、ISO法と比べて乳等省令法がわずかに高い値を示し、ばらつきは大きい結果となった。乳の全固形分ではOMA法と比べて乳等省令法のばらつきが小さい結果となった。クリームの乳脂肪分ではOMA法、ISO法と比べて乳等省令法がわずかに高い値を示し、ばらつきはOMA法、ISO法と同等の結果となった。脱脂粉乳の水分の測定値は乳等省令法がISO法より高くOMA法より低い結果となったが、ばらつきは乳等省令法が一番小さい結果となった。

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。

ブリード法鏡検時の各種染色液の染色像のひかくでは、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の結果では、4 施設の平均をとると、細菌数は試料 1 で N : 4.3×10^6 /ml、B1 : 3.0×10^6 /ml、B2 : 2.2×10^6 /ml、B3 : 3.4×10^6 /ml、試料 2 で N : 7.2×10^6 /ml、B1 : 4.9×10^6 /ml、B2 : 5.1×10^6 /ml、B3 : 6.3×10^6 /ml、体細胞数は、試料 1 で N : 5.9×10^5 /ml、B1 : 4.9×10^5 /ml、B2 : 5.2×10^5 /ml、B3 : 5.3×10^5 /ml、試料 2 で N : 2.7×10^5 /ml、B1 : 2.2×10^5 /ml、B2 :

2.4×10^5 /ml、B3 : 2.5×10^5 /ml となった。標準偏差を求めると、細菌数は試料 1 で 2.73×10^6 、試料 2 で 2.85×10^6 、体細胞数は試料 1 で 1.3×10^5 、試料 2 で 8.0×10^4 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すると、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

米国、EU、オーストラリア及びニュージーランドにおける乳及び乳製品の成分規格で規定されるそれぞれの国の試験法と乳等省令における試験法のうち、牛乳、クリーム及び脱脂粉乳について、米国（OMA 法）及び EU（ISO 法）における試験法と対応する現行試験法が明らかになったことから、これらの検体を当該試験法に供試した。

4 試験室で実施した乳の乳脂肪分および無脂乳固形分の試験では、原理的にまったく異なる試験法である、ゲルベル法（乳等省令法）と重量法（OMA 法及び ISO 法）を用いた試験法であることを反映した結果となった。すなわち、ばらつ

きの指標である室間再現相対標準偏差については、ISO 法、OMA 法が 0.4%、乳等省令法は 2.4%となり、乳等省令法の方がばらつきの大きい結果となった。これは、析出した脂肪柱についてゲルベル乳脂計の目盛りを直接目視で読み取る容量法である乳等省令法と、抽出した脂肪の重量を化学天びんで測定する重量法である ISO 法および OMA 法との原理の違いによる精度の差と考えられた。脂肪分の測定で海外の試験法が重量法を用いる中、容量法であるゲルベル法で国際的なハーモナイゼーションを考える場合には内容を精査し、試験の実施手順に関する詳細な記述も必要であろう。

乳の無脂乳固形分については、乳等省令法、OMA 法ともに全固形分を定量し、別に求めた乳脂肪分を差し引くことによって算出する方法であった。全固形分の定量法では、乳等省令法の方が、ばらつきが小さく、全固形分はわずかに高値になる傾向が見られた。これは、乳等省令法は乾燥機で乾燥させる前に予備乾燥を行う工程があり最終的な乾燥ムラが小さくなるものと考えられたが、OMA 法には予備乾燥の工程がなく、試料を直接乾燥機で乾燥させ乾燥物重量を定量するため、ばらつきが生じるものとかんがえられた。OMA990.20 において室間再現許容差は 0.118%であり、乳等省令法と OMA 法の測定値の差はその範囲内にあり、同等の結果が出せることができ、精度的にも乳等省令法が優れているという結果となった。また、X-Y プロットにおいても $R^2 > 0.999$ と非常に高い相関性が確認された。

クリームにおける乳脂肪分の試験法では、乳等省令法・ISO 法・OMA 法共通して原理的に同じ重量法であるものの、脂肪抽出を行う器具に違いがあり、乳等省令法には「リョーリツヒ管」が、ISO 法及び OMA 法には「マジョニア管」が規定されている。測定値の比較では、ISO 法と OMA 法は同等の結果となったが、乳等省令法は平均すると約 0.4%低値となる傾向がみられた。その原因については、抽出器具による抽出効率の違いや試験操作におけるロス等が考えられるが、ばらつきの指標である併行相対標準偏差には差が認められなかったことから、試験操作におけるロスよりも抽出器具による抽出効率の差が大きな要因となっていることが考えられた。また、X-Y プロットではいずれも $R^2 > 0.999$ と非常に高い相関性が確認された。本試験で使用する器具に関して、昨年度のアンケートでの意見もあったが、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はマジョニア管を用いるのが一般的となっている現状があることから、日本国内の実状と国際的な整合性の両方の観点からマジョニア管も適用可能とすることが望ましいと考えられた。

脱脂粉乳における水分の試験法は、乳等省令が 98~100 の乾燥機内で乾燥を行う常圧乾燥法であるのに対し、ISO 法は 87 の乾燥機内において風量 33ml/min の条件で乾燥空気を通させながら 5 時間乾燥させるという試験法であり、OMA 法は 100 の乾燥機内において 100mmHg の減圧条件下で 5 時間乾燥させるという試験法である。測定値は

低い順に ISO 法、乳等省令法、OMA 法となったが、乾燥温度が 87 であることを考えると ISO 法が一番穏やかな条件下での乾燥であり、他と比べて低めの傾向が見られたものと考えられた。乳等省令法と OMA 法はどちらも乾燥温度は 100 であるが、OMA 法は減圧条件下での乾燥であり乳等省令法と比べて水分が蒸発しやすい条件であるため高めの傾向となったものと考えられた。ばらつきの指標である併行相対標準偏差は乳等省令法が一番小さい結果となったが、ISO 法は乳等省令法と比べて操作が煩雑であることや、OMA 法は試料採取量が少ないために相対的にばらつきやすいこと等が要因として考えられた。

さらに、ISO 法及び 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られており、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

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、乳等省令における成分規格と国際的に規定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。

乳等省令で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

- ・下島優香子、井田美樹、西野由香里、福井理恵、黒田寿美代、大嶋秀克、品川邦汎、平井昭彦、貞升健志、寺嶋淳：生乳の直接個体鏡検法（ブリード法）における染色液の比較、第29回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会研究会、平成29年2月、甲府市
- ・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 27 年度～ 29 年度総合分担研究報告書

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	吉川 光英	東京都健康安全研究センター 食品化学部 食品成分研究科
	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
	菅沼 修	国際酪農連盟日本国内委員会 事務局
	大嶋 秀克	公益財団法人日本乳業技術協会 事業部
	吉田 剛	公益財団法人日本乳業技術協会 事業部
	佐々木 進	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、国際的なバリデーションが担保された試験法であるとは言い難い。乳等省令における試験法の問題点等を洗い出して整理するため、国内の試験実施者等を対象にアンケート調査を実施した。その結果、汎用されている分析法や分析機器による測定が可能となるような試験法の見直しを望む回答とともに国内法と国際法との不一致を指摘する意見もあり、乳等省令の試験法は、現状に即した見直しや国際的なハーモナイズが必要であることが確認された。アンケート調査の結果等を参考に選定した乳・クリーム・脱脂粉乳・

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) の対応する試験法を調査整理し、これらと乳等省令の試験法との比較試験を行った。その結果、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、試験法の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。

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) アンケート調査の実施

乳製品工場等において実際に試験を実施している現場の視点から乳等省令における試験法の課題等を把握するため、また

国内で汎用されている試験法との相違点を明らかにするために、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アンケート調査を実施した。アンケート調査は、乳等省令別表二(七)乳等の成分規格の試験法について項目毎に自由記入形式とした。理化学分野、微生物分野両方の見地からの意見を聞くため、国際酪農連盟日本国内委員会 (Japanese National Committee of International Dairy Federation(JIDF)) の理化学分析専門部会委員 (12 名) 及び微生物・衛生専門部会委員 (16 名) に協力を依頼した。

(2) 試験法の特定

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総括研究報告書を参照されたい。

(3) 比較試験実施項目の選定

乳等省令の試験法に対応する比較試験法が特定できた項目のうち、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中心に試験実施候補としてピックアップした。

乳	無脂乳固形分、乳脂肪分
クリーム	乳脂肪分
脱脂粉乳	水分
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

乳の無脂乳固形分はまず全固形分を測定し、そこから別に求めた乳脂肪分を差し引くことによって算出するため、全固形分を測定する試験法について比較を行った。ラクトアイス、アイスマルク、アイ

スクリームは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た。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。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とされている。一方、対応する海外の比較試験法は 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)を比較した。比較試験は以下の 9 本となり、比較試験法一覧は表 1、フローチャートは図 1 ~ 25 に示した。

乳の全固形分	(図 1、2)
乳の乳脂肪分	(図 3 ~ 5)
クリームの乳脂肪分	(図 6 ~ 8)
脱脂粉乳の水分	(図 9 ~ 11)
アイスクリーム類の乳脂肪分	(図 12、13)
濃縮乳・無糖練乳の乳固形分	(図 14 ~ 17)
濃縮乳・無糖練乳の乳脂肪分	(図 18 ~ 20)
加糖練乳の全固形分	(図 21、22)
加糖練乳の乳脂肪分	(図 23 ~ 25)

表1 比較試験法一覧

品目	項目	乳等省令 別表二(七)	EU	米国	試験所数
			ISO/IDF	OMA 法	
乳	無脂乳固形分	(1) 乳及び乳製品 1 乳及び乳製品の無脂乳固形分の定量法		AOAC Official Method 990.20 “Solids(Total) in Milk, By Direct Forced Air Oven Drying”, <i>IDF-ISO-AOAC Method</i> , section33.2.44	4
乳	乳脂肪分	(1) 乳及び乳製品 3 乳及び乳製品の乳脂肪分及び乳たんぱく量の定量法 a 牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳及び加工乳の乳脂肪分の定量法	ISO 1211:2010/IDF 1:2010, Milk -Determination of fat content- Gravimetric method (Reference method)	AOAC Official Method 989.05 “Fat in Milk, Modified Mojonnier Ether Extraction Method”, <i>IDF-ISO-AOAC Method</i> ,section33.2.26	4
クリーム	乳脂肪分	(1) 乳及び乳製品 3 乳及び乳製品の乳脂肪分及び乳たんぱく量の定量法 b 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	ISO 2450:2008/IDF16:2008, Cream -Determination of fat content- Gravimetric method (Reference method)	AOAC Official Method 995.19 “Fat in Cream, Mojonnier Ether Extraction Method”, <i>IDF-ISO-AOAC Method</i> , section33.3.19	1

脱脂粉乳	水分	(1) 乳及び乳製品 6 乳製品の水分の定量法	ISO 5537:2004/IDF26:2004, Dried milk -Determination of moisture content (Reference method)	AOAC Official Method 927.05 “Loss on Drying (Moisture) in Dried Milk”,section 33.5.02	1
アイスクリーム類	乳脂肪分	(2) アイスクリーム類 4 乳脂肪分の定量法		AOAC Official Method 952.06 Fat in Ice Cream and Frozen Desserts, <i>IDF-ISO-AOAC Method, Codex-Adopted- AOAC Method</i> , section33.8.05	3
濃縮乳・無糖練乳	乳固形分	(1) 乳及び乳製品 2 乳製品の乳固形分の定量法 a 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	ISO6731:2010/IDF21:2010 Milk, cream and evaporated milk -Determination of total solids content (Reference method)	・ AOAC Official Method 990.19 Solids (Total) in Milk By Forced Air Oven Drying after Steam Table Predry, <i>IDF-ISO-AOAC Method</i> , section33.2.43 ・ AOAC Official Method 990.20 Solids (Total) in Milk By Direct Forced Air Oven Drying, <i>IDF-ISO-AOAC Method</i> , section33.2.44	4

濃縮乳・無糖練乳	乳脂肪分	<p>(1) 乳及び乳製品 3 乳及び乳製品の乳脂肪分及び乳たんぱく量の定量法 b 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</p>	<p>ISO 1737:2008/IDF 13:2008 Evaporated milk and sweetened condensed milk - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method)</p>	<p>AOAC Official Method 945.48 Evaporated Milk (Unsweetened), section 33.4.01</p>	5
加糖練乳	乳固形分	<p>(1) 乳及び乳製品 2 乳製品の乳固形分の定量法 a 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</p>	<p>ISO 6734:2010/IDF 15:2010 Sweetened condensed milk - Determination of total solids content (Reference method)</p>	/	4
加糖練乳	乳脂肪分	<p>(1) 乳及び乳製品 3 乳及び乳製品の乳脂肪分及び乳たんぱく量の定量法 b 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</p>	<p>ISO 1737:2008/IDF 13:2008 Evaporated milk and sweetened condensed milk - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method)</p>	<p>AOAC Official Method 920.115 Sweetened Condensed Milk, <i>Codex-Adopted-AOAC Method</i>, section 33.4.02</p>	4

図1 乳等省令 別表二(七) (1)1 乳及び乳製品の無脂乳固形分の定量法（全固形分）フローチャート

秤量皿

|

乾燥(98 ~ 100 、乾燥器) 恒量測定 W_1

|

+ 試料採取(2.5~3g) W_2

予備加熱 (水浴上)

|

乾燥(98 ~ 100 、乾燥器) 恒量測定 W_3

$$\text{全固形分} = \frac{W_3 - W_1}{W_2 - W_1} \times 100\%$$

W1 : 秤量皿重量(g)

W2 : 秤量皿と試料重量(g)

W3 : 秤量皿と乾燥物重量(g)

図2 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 (38 ± 1)

測定操作

秤量皿 乾燥(100 ± 1 、 2 時間以上)



放冷 重量測定 W_1



+ 試料採取(約 3g) W_2

乾燥(100 ± 1 、 4 時間)



放冷 重量測定 W_3

ブランク試験 空の秤量皿を用いて 2 連で実施 B

計算

$$\frac{(W_3 - W_1) - B}{W_2 - W_1} \times 100\%$$

W1 : 秤量皿の重量(g)

W2 : 秤量皿の重量と試料重量(g)

W3 : 秤量皿の重量と乾燥物重量(g)

B : ブランクの平均重量(g)

図3 乳等省令 別表二(七)(1)3a 牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳及び加工乳の乳脂肪分の定量法フローチャート

ゲルベル乳脂計

- + 硫酸 10ml
- + 試料 11ml を硫酸上に静かに層積
- + 純アミルアルコール 1ml

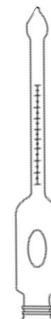
ゴム栓をして振り、溶解

約 65 °C の温湯中に 15 分間浸す

遠心分離 3~5 分間 (700rpm 以上)

約 65 °C の温湯中に浸し温度を一定にする

析出した脂肪層の度数を乳脂肪量とする



ゲルベル乳脂計

図4 ISO1211:2010/IDF1:2010 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 (デシケーター使用不可)

重量測定 m_2 / m_4

試料の準備

加温 (38 ± 2)



冷却 (20 ± 2)

測定操作

マジョニア管



+ 試料採取 (10 ~ 11g) m_0

+ アンモニア水 2ml

+ エタノール 10ml

+ ジエチルエーテル 25ml



マジョニア管

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分間）もしくは30分以上静置

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（80～90g、1～5分間）もしくは30分以上静置

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（80～90g、1～5分間）もしくは30分以上静置

上層（溶媒層）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 (デシケーター使用不可)

重量測定

乾燥 (102 ± 2 30 分間)

放冷 (デシケーター使用不可)

重量測定

重量の減少が 2.0mg 以下になるか増加
するまで乾燥を繰り返す m_1 / m_3

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 (m_3 , m_4)

計算

$$\frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m_0} \times 100\%$$

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脂肪回収容器と抽出物重量 (g)

m_4 : ブランクテストにおける脂肪回収容器の重量 (g)

図5 AOAC Official Method 989.05 Fat in milk Modified Mojonnier Ether
Extraction Method *IDF-ISO-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 (デシケーター使用)

重量測定 m_2

試料の準備

加温 (38 ± 1)

測定操作

マジョニア管

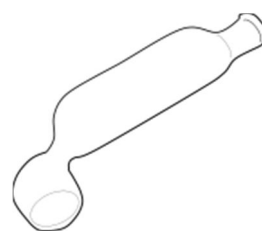
- + 試料採取 (約 10g) m_0
- + アンモニア水 1.5ml
- + エタノール 10ml
- + ジエチルエーテル 25ml

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)



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 (デシケーター使用)

重量測定 m_1

ブランクテストの実施

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)

図 6 乳等省令別表二(七)(1)3b クリームの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(5g) W1
- + 温水 4ml 溶解

リョーリツヒ管

- + 温水 3ml で 2 回ビーカーを洗う
- + アンモニア水 2ml でビーカーを洗う
- + エタノール 10ml でビーカーを洗う
- + エーテル 25ml



リョーリツヒ管

振とう抽出

- + 石油エーテル 25ml

振とう抽出

繰り返す

さらに 2 回

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

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

図7 ISO2450:2008/IDF16:2008 Cream - 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 (デシケーター使用不可)

重量測定 m_2

試料の準備

加温 (35 ~ 40)

冷却 (約 20)

測定操作

マジョニア管

+ 試料採取 (脂肪抽出量として 0.3 ~ 0.6g となるように) m_0

+ 約 50 の温水で 10 ~ 11ml に希釈

+ アンモニア水 2ml

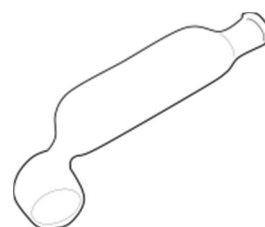
+ エタノール 10ml

+ 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



マジョニア管

遠心分離（80～90g、1～5分間）もしくは30分以上静置

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（80～90g、1～5分間）もしくは30分以上静置

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

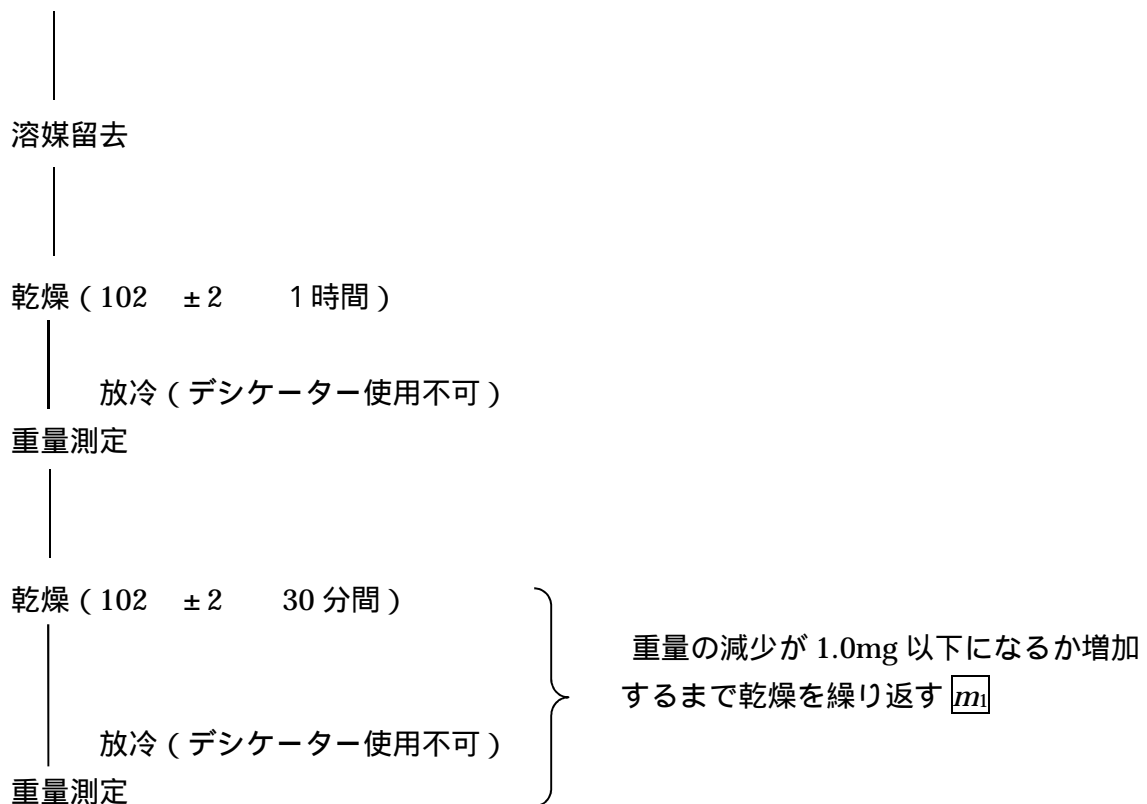
振とう抽出

+ 石油エーテル 15ml

振とう抽出

遠心分離（80～90g、1～5分間）もしくは30分以上静置

上層（溶媒層）を脂肪回収容器に回収する



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 m_3 m_4

計算

$$\frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m_0} \times 100\%$$

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脂肪回収容器と抽出物重量(g)

m_4 : ブランクテストにおける脂肪回収容器の重量(g)

図 8 AOAC Official Method 995.19 Fat in Cream Mojonnier Ether Extraction Method *IDF-ISO-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 (デシケーター使用)

重量測定 m_2

試料の準備

加温 (38 ± 1)

測定操作

マジョニア管

+ 試料採取 (脂肪抽出量として 0.3 ~ 0.6g となるように) m_0

+ 20 ~ 22 の水で 10ml に希釈

+ アンモニア水 1.5ml

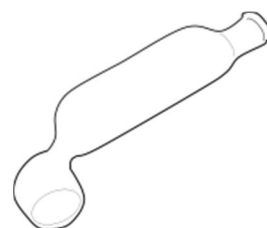
+ エタノール 10ml

+ 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



マジョニア管

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 (デシケーター使用)

重量測定 m_1

ブランクテストの実施

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

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

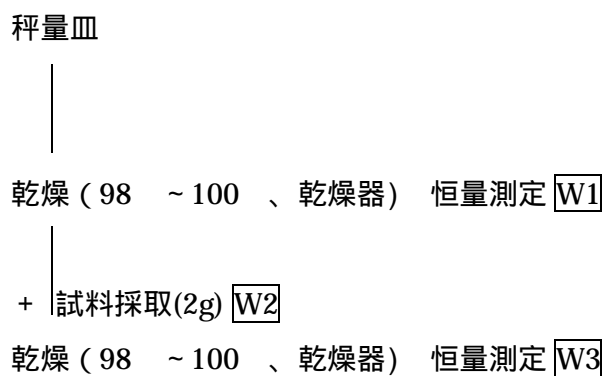
m_0 : 試料採取量 (g)

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)

図9 乳等省令 別表二(七)(1)6 乳製品の水分の定量法フローチャート



$$\text{水分} = \frac{W2 - W3}{W2 - W1} \times 100\%$$

W1 : 秤量皿重量(g)

W2 : 秤量皿と試料重量(g)

W3 : 秤量皿と乾燥物重量(g)

図 10 ISO5537:2004/IDF26:2004 Dried milk - Determination of moisture content
(Reference method)

フィルターをセットしたカラム

乾燥 (87 、 1 時間以上、風量 33ml/min、乾燥器)

ストッパーを閉めデシケーター内で放冷 (60 ± 5 分間)

カラム重量測定 m_0

+ 試料採取 (5.0g ± 0.3g)

フィルターとストッパーを戻し重量測定 m_1

乾燥 (87 、 5 時間、風量 33ml/min、乾燥器)

デシケーター内で放冷 (60 分間 ± 5 分間)

カラム重量測定 m_2

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

m_0 : カラムとフィルターとストッパーの重量(g)

m_1 : 乾燥前の試料とカラムとフィルターとストッパーの重量(g)

m_2 : 乾燥後の試料とカラムとフィルターとストッパーの重量(g)

図 11 AOAC Official Method 927.05 Loss on Drying (Moisture) in Dried Milk

秤量皿

|
+ |

試料採取(1~1.5g)

乾燥 (100 ℃、5 時間、 100mmHg 乾燥器)

|

冷却

|

重量測定

重量の消失%を水分量として計算する

図 12 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) W_1
+ 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

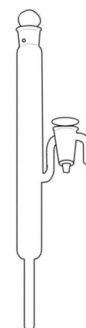
振とう抽出

2 時間以上静置後、上澄液を恒量 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



レーリツヒ管

さらに 1 回繰り返す

$$\text{乳脂肪分} = \frac{W_3 - W_2}{W_1} \times 100$$

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 13 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

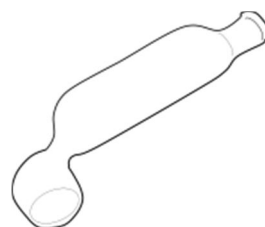
- + エタノール 10 ml
- + ジエチルエーテル 25ml

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 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)

図 14 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 $W3$

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

$$W1 \times \frac{\quad}{100}$$

<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 15 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

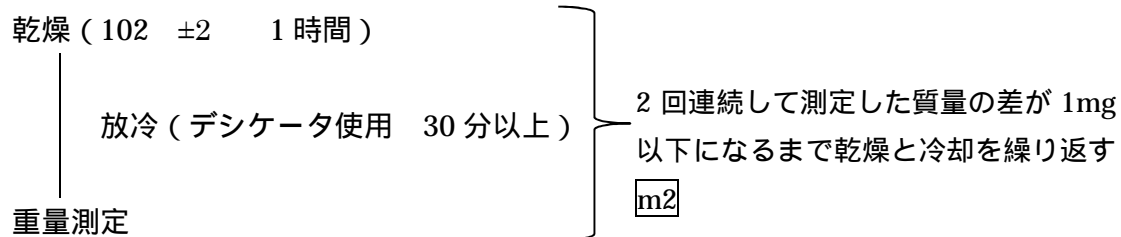
+ 水 3～5ml

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 16 AOAC Official Method 990.19 Solids (Total) in Milk By Forced Air Oven
Drying after Steam Table Predry, *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 \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 17 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 \boxed{W}

+ 試料採取 (希釈試料 4 ~ 5g) $\boxed{W1}$

乾燥 (100 ±1 4 時間)

放冷 (デシケータ使用 30 分以上) 重量測定 $\boxed{W2}$

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 18 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

繰り返す

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

さらに1回

溶剤を揮発

乾燥器内(100 ~ 105 1時間)

重量測定 W_3

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

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 19 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分以上静置

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分以上静置

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分以上静置

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)

放冷 (デシケーター使用不可 30 分以上)

重量測定

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 20 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 600pm、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 600pm、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 600pm、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)

図 21 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) $\boxed{W1}$

+ | 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 $\boxed{W2}$

+ |

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 $\boxed{W3}$

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

$$W1 \times \frac{\quad}{100}$$

<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 22 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

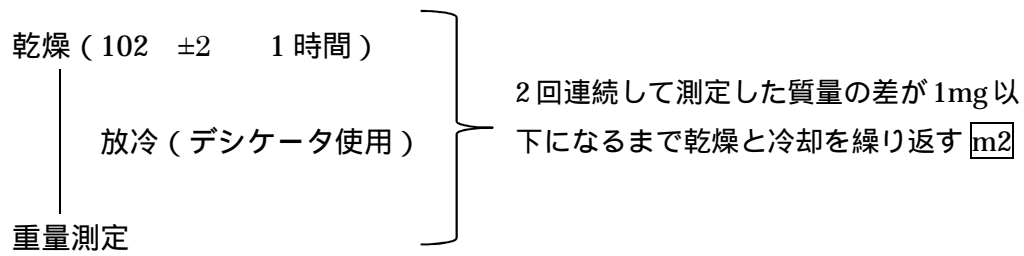
+ 水 5ml

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)

図 23 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) **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

繰り返す

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

} さらに1回

溶剤を揮発

乾燥器内(100 ~ 105 1時間)

重量測定 **W3**

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

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 24 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)

放冷 (デシケーター使用不可 30 分以上)

重量測定

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 25 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

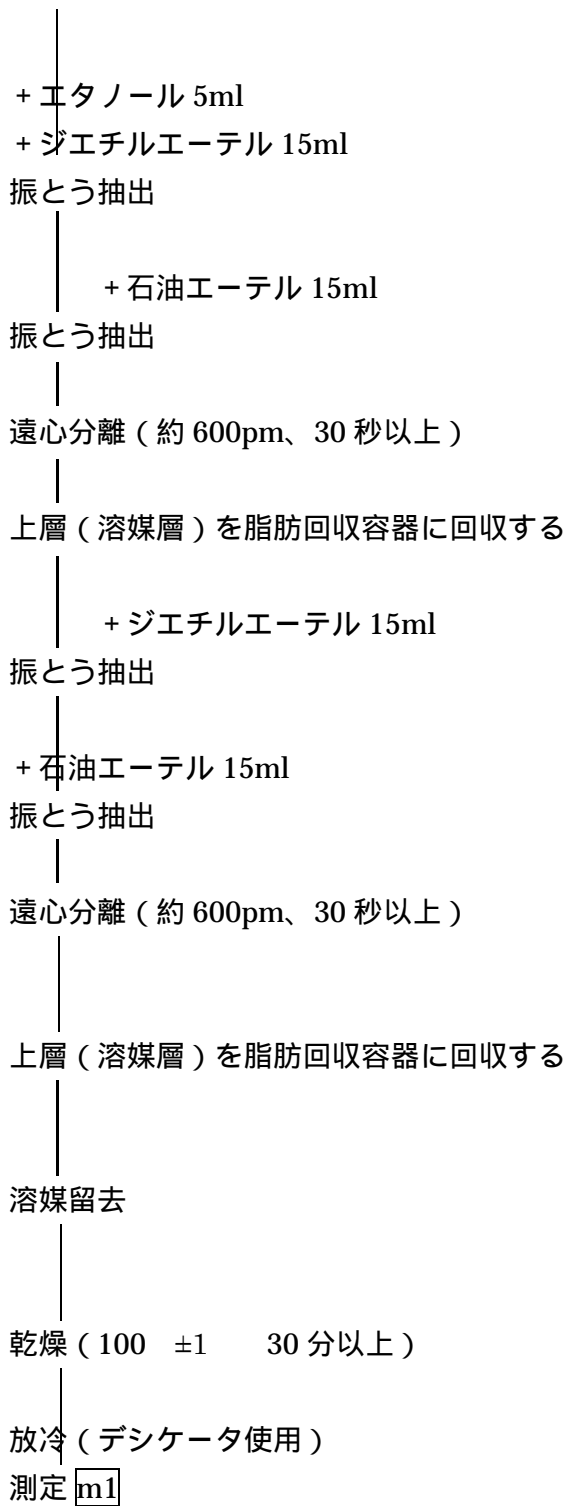
振とう抽出

+ 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



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) 比較試験の実施

乳の乳脂肪分及び乳固形分においては東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科、株式会社明治品質科学研究所、雪印メグミルク株式会社品質保証部分分析センター、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。試料は市販の低脂肪牛乳、成分調整牛乳、牛乳、ジャージー種の牛乳を単独もしくは混合して調製し、乳脂肪分の濃度格差をつけた8試料(約1%~4.5%)を用い、併行測定回数は3とした。

クリームの乳脂肪分及び脱脂粉乳の水分は公益財団法人日本乳業技術協会においてシングルラボで試験を実施した。試料は市販されている製品を使用し、試料数8、併行測定回数は3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においては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、試料は協力企業より提供された製品を用いた。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。

C. 研究結果

(1) アンケート調査の結果

所属組織が同じ委員から社内統一意見として合同で提出されたものは1つの意見としてカウントし、回答数は12であった。全般的に、器具、試薬の表記が古い、試験

条件の詳細部分が不足している、検査方法の名称が書かれていない、目的の試験法が探しづらいとの意見があった。また、漢数字表記は読みにくく、間違いの原因となることがあるので、アラビア数字表記を用いて欲しいとの意見もあった。

アイスクリーム類、発酵乳においては、乳由来以外の原料が含まれることが多い現状において無脂乳固形分算出時の係数が実際と合っていない可能性を指摘する意見があった。

省令の中に試験法を記載すると改訂手続きが煩雑になるため、試験法は通知等で示すべきとの意見もあった。

詳細は、「別添1 乳及び乳製品の試験法に関するアンケート調査結果」の通りである。

1.1 理化学的試験法

飲用乳の乳固形分の定量法(常圧乾燥法)について、近年分析の現場で汎用されている迅速測定器による測定や乾燥助剤法の適用を求める意見があった。

牛乳の乳脂肪分の定量法について、乳固形分と同様迅速測定器による測定の適用を求める意見があり、また、乳等省令の試験法は国際的には簡便法であるとの意見があった。

乳製品の乳脂肪分の定量法について、規定されている器具はレーリッヒ管であるが、マジョニア管の適用を求める意見があった。

蛋白質の定量法について、燃焼法の適用を求める意見があった。

糖分の定量法について、高速液体クロマトグラフ法やガスクロマトグラフ法を求

める意見があった。

プロセスチーズについて、乳等省令では乳脂肪分と乳蛋白量の和を乳固形分としているが、乾燥助剤を用いた乳固形分算出の適用を求める意見があった。

また、濃縮乳や練乳類において、乾燥助剤法の適用のほか、試料の重量採取の適用を求める意見もあった。

1.2 細菌学的試験法

乳及び乳製品の細菌数の測定法について、生乳及び生山羊乳の直接個体検鏡法による細菌数の測定法は、現在の乳質を考慮すると試験法が適切ではないとする意見、代替染色液の適用を求める意見があった。

牛乳等の標準寒天培地による細菌数の測定法について、試験条件及び計算方法をISO法等の国際標準に統一すべきとの意見、試験室内事故：LA(Laboratory Accident)について「集落の発生のなかった場合」を除くことを希望する意見、規定の条件では標準寒天培地が固まってしまうことがあるため保持温度条件を上げてほしいとの意見があった。

アイスクリーム類の細菌数の測定法について、乳酸菌を含む製品の場合の「乳酸菌又は酵母以外の細菌数」の算出方法が示されていないことを指摘する意見があった。

大腸菌群の測定法について、デソキシコーレイト培地は国際的には使用が少ないため、広く使用されている培地(VRB培地等)に合わせた方が良いとの意見、飲用乳、脱脂粉乳等の公定法であるBGLB培地は、バター、発酵乳等のデソキシコーレイト

培地法に比べ所要時間が長いことデソキシコーレイト培地法に統一できないかとの意見があった。

乳酸菌数の測定法について、BCP培地を用いる検査法に関し、BCP培地で黄変した集落を乳酸菌とする現行の省令の定義や培地を改訂すべきという意見がある一方で、個別の培地を用いて識別する国際法は検査が煩雑であるため、現行法で差し支えないとの意見もあった。

(2) 比較試験の結果

比較試験を実施した品目ごとの試験法について、比較した結果の精度指標を表2~10に示した。また、これらの結果について、測定値総平均及び室間再現相対標準偏差を測定値比較の際に判断基準としたISO法及びOMA法のReproducibility(再現精度)とともに一覧にして表11に示した。なお、クリームの乳脂肪分及び脱脂粉乳の水分の試験法については、シングルラボでの実施であったため、測定値総平均、併行相対標準偏差、Repeatability(反復精度)である。

表 2 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	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	11.00	12.40	12.43	13.73	9.95	10.48	11.71	13.07	11.85
併行標準偏差 S_r (%)	0.031	0.014	0.014	0.009	0.016	0.006	0.019	0.012	0.015
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.086	0.040	0.040	0.026	0.045	0.018	0.052	0.034	0.043
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.3	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1
室間再現標準偏差 S_R (%)	0.035	0.029	0.021	0.023	0.055	0.033	0.045	0.043	0.035
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.099	0.080	0.058	0.065	0.154	0.092	0.127	0.120	0.099
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	0.3	0.2	0.2	0.2	0.6	0.3	0.4	0.3	0.3

AOAC990.20

試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	11.09	12.53	12.53	13.83	10.02	10.61	11.78	13.18	11.95
併行標準偏差 S_r (%)	0.012	0.028	0.021	0.018	0.014	0.017	0.019	0.021	0.019
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.032	0.080	0.060	0.050	0.040	0.046	0.054	0.059	0.053
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
室間再現標準偏差 S_R (%)	0.068	0.117	0.092	0.109	0.078	0.169	0.053	0.098	0.098
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.189	0.326	0.258	0.305	0.218	0.472	0.150	0.274	0.274
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	0.6	0.9	0.7	0.8	0.8	1.6	0.5	0.7	0.8

表3 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	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	2.41	3.74	3.78	4.67	0.99	1.71	3.10	4.23	3.08
併行標準偏差 S_r (%)	0.017	0.008	0.010	0.021	0.010	0.006	0.009	0.024	0.013
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.047	0.023	0.028	0.060	0.029	0.018	0.024	0.066	0.037
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.7	0.2	0.3	0.5	1.1	0.4	0.3	0.6	0.5
室間再現標準偏差 S_R (%)	0.047	0.043	0.029	0.067	0.057	0.071	0.069	0.078	0.057
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.132	0.120	0.080	0.187	0.159	0.198	0.193	0.218	0.161
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	2.0	1.1	0.8	1.4	5.7	4.1	2.2	1.8	2.4

ISO1211:2010/IDF1:2010

試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	2.37	3.70	3.72	4.56	1.00	1.69	3.03	4.13	3.03
併行標準偏差 S_r (%)	0.006	0.010	0.009	0.008	0.005	0.000	0.004	0.009	0.006
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.018	0.029	0.026	0.023	0.014	0.000	0.011	0.024	0.018
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.3	0.3	0.2	0.2	0.5	0.0	0.1	0.2	0.2
室間再現標準偏差 S_R (%)	0.012	0.017	0.010	0.016	0.005	0.006	0.009	0.018	0.012
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.034	0.047	0.028	0.045	0.015	0.016	0.024	0.050	0.032
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	0.5	0.5	0.3	0.4	0.5	0.3	0.3	0.4	0.4

AOAC998.05

試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	4	4	4	4	4	4	4	4	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	2.37	3.70	3.72	4.56	0.99	1.68	3.03	4.12	3.02
併行標準偏差 S_r (%)	0.009	0.004	0.004	0.017	0.004	0.004	0.005	0.011	0.007
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.026	0.011	0.011	0.046	0.011	0.011	0.014	0.031	0.020
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.4	0.1	0.1	0.4	0.4	0.2	0.2	0.3	0.3
室間再現標準偏差 S_R (%)	0.015	0.011	0.013	0.017	0.005	0.004	0.005	0.018	0.011
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.042	0.030	0.036	0.049	0.015	0.011	0.014	0.050	0.031
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	0.6	0.3	0.3	0.4	0.5	0.2	0.2	0.4	0.4

表 4 クリーム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	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	1	1	1	1	1	1	1	1	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	46.49	36.65	34.84	41.79	46.87	34.89	45.11	39.44	40.76
併行標準偏差 S_r (%)	0.071	0.100	0.061	0.050	0.055	0.025	0.046	0.038	0.056
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.199	0.280	0.171	0.141	0.154	0.070	0.128	0.106	0.156
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.2	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ISO2450:2008/IDF16:2008									
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	1	1	1	1	1	1	1	1	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	46.96	37.02	35.14	42.15	47.43	35.12	45.55	39.65	41.13
併行標準偏差 S_r (%)	0.01	0.08	0.04	0.10	0.03	0.09	0.10	0.07	0.064
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.016	0.233	0.106	0.291	0.074	0.249	0.267	0.186	0.178
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.0	0.2	0.1	0.2	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2
AOAC995.19									
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	1	1	1	1	1	1	1	1	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	47.03	37.03	35.14	42.22	47.48	35.10	45.50	39.73	41.15
併行標準偏差 S_r (%)	0.12	0.07	0.09	0.09	0.03	0.04	0.03	0.03	0.063
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.342	0.191	0.254	0.238	0.081	0.122	0.086	0.090	0.177
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.3	0.2	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2

表 5 脱脂粉乳の水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	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	1	1	1	1	1	1	1	1	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	4.75	4.28	4.98	3.75	4.81	4.98	4.26	4.01	4.48
併行標準偏差 S_r (%)	0.017	0.021	0.015	0.021	0.010	0.006	0.035	0.021	0.018
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.048	0.058	0.043	0.058	0.028	0.016	0.098	0.058	0.051
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.4	0.5	0.3	0.6	0.2	0.1	0.8	0.5	0.4
ISO5537:2004/IDF26:2004									
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	1	1	1	1	1	1	1	1	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	4.39	3.92	4.72	3.02	4.46	4.55	3.93	3.72	4.09
併行標準偏差 S_r (%)	0.11	0.12	0.29	0.40	0.19	0.25	0.01	0.07	0.178
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.308	0.338	0.798	1.115	0.519	0.688	0.032	0.191	0.499
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	2.5	3.1	6.0	13.2	4.2	5.4	0.3	1.8	4.6
AOAC927.05									
試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	総平均
参加試験所数	1	1	1	1	1	1	1	1	
併行測定回数	3	3	3	3	3	3	3	3	
平均値(%)	4.97	4.43	5.15	3.90	4.91	5.14	4.48	4.25	4.66
併行標準偏差 S_r (%)	0.08	0.03	0.09	0.07	0.04	0.10	0.06	0.06	0.066
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.225	0.086	0.242	0.199	0.106	0.267	0.175	0.169	0.184
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	1.6	0.7	1.7	1.8	0.8	1.9	1.4	1.4	1.4

表 6 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

表 7 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

表 8 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

表 9 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

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

表 11 各試験法の比較結果一覧

品目	項目	測定値総平均 (%)			室間再現相対標準偏差 (RSD%)			再現精度
		乳等省令法	ISO 法	OMA 法	乳等省令法	ISO 法	OMA 法	
乳	全固形分	乳等省令法		OMA 法	乳等省令法		OMA 法	0.118%(OMA)
		11.85		11.95	0.3		0.8	
乳	乳脂肪分	乳等省令法	ISO 法	OMA 法	乳等省令法	ISO 法	OMA 法	0.056%(ISO) 0.056%(OMA)
		3.08	3.03	3.02	2.4	0.4	0.4	
クリーム	乳脂肪分	乳等省令法	ISO 法	OMA 法	乳等省令法	ISO 法	OMA 法	0.50% mass fraction of fat in the sample (ISO) 0.354% (OMA)
		40.76	41.13	41.15	0.1	0.2	0.2	
脱脂粉乳	水分	乳等省令法	ISO 法	OMA 法	乳等省令法	ISO 法	OMA 法	0.15% (ISO)
		4.48	4.09	4.66	0.4	4.6	1.4	

アイスクリーム類	乳脂肪分	乳等省令法		OMA 法		乳等省令法		OMA 法		0.056%(OMA)				
		6.53		7.00		3.9		0.4						
濃縮乳・ 無糖練乳	乳固形分	乳等 省令法	ISO 法	OMA 法		乳等 省令法	ISO 法	OMA 法		0.50g/100g(ISO) 0.113%(AOAC990.19) 0.118%(AOAC990.20)				
		28.44	28.54	990.19	990.20	28.66	28.66	0.5	0.8		990.19	990.20	0.5	0.3
	乳脂肪分	乳等省令法		ISO 法		OMA 法		乳等省令法		ISO 法		OMA 法		0.06%(ISO) 0.056%(OMA)
		7.88		8.41		8.39		1.7		0.4		0.3		
加糖練乳	全固形分	乳等省令法		ISO 法		乳等省令法		ISO 法		0.6g/100g(ISO)				
		74.11		73.20		0.5		0.3						
	乳脂肪分	乳等省令法	ISO 法	OMA 法		乳等省令法	ISO 法	OMA 法		0.06%(ISO) 0.056%(OMA)				
7.78		8.33	8.34		2.7	0.4	1.0							

クリーム及び脱脂粉乳はシングルラボでの比較のため、併行相対標準偏差及び反復精度

2.1 乳における試験法の比較

2.1.1 乳の全固形分

比較試験を行った乳の全固形分の測定値について、OMA 法に比べて乳等省令法の測定値が低い傾向が見られたが、その差は再現精度の範囲内であった。ばらつきは乳等省令法が小さかった。

2.1.2 乳の乳脂肪分

比較試験を行った乳の乳脂肪分の測定値について、ISO 法、OMA 法に比べて乳等省令法が高い傾向は見られたが、その差は再現精度の範囲に入るか入らないかであった。その中でも乳脂肪含量の低い試料ではほとんど差は見られないが、高くなるにつれて差が大きくなる傾向が認められ、最大で乳等省令法が約 0.1%高い値となった。ばらつきは ISO 法と OMA 法に比べて乳等省令法が大きかった。

2.2 クリームの乳脂肪分における試験法の比較

比較試験を行ったクリームの乳脂肪分の測定値について、ISO 法、OMA 法に比べて乳等省令法が低く反復精度の範囲外であった。ISO 法の反復精度は「0.50% mass fraction of fat in the sample」とされており、脂肪分 40%の試料においては脂肪値として 0.2%ということになる。ばらつきは ISO 法、OMA 法に比べて乳等省令法が大きかった。

2.3 脱脂粉乳の水分における試験法の比較

比較試験を行った脱脂粉乳の水分の測定値について、低い順に ISO 法、乳等省令

法、OMA 法となり、どの組み合わせも反復精度の範囲外であった。ばらつきは小さい順に乳等省令法、OMA 法、ISO 法となった。

2.4 アイスクリーム類の乳脂肪分における試験法の比較

比較試験を行ったアイスクリーム類の乳脂肪分の測定値について、OMA 法に比べて乳等省令法の測定値が低い傾向が見られ、その差は再現精度の範囲外であった。ばらつきは乳等省令法が大きかった。

2.5 濃縮乳・無糖練乳における試験法の比較

2.5.1 濃縮乳・無糖練乳の乳固形分

比較試験を行った濃縮乳・無糖練乳の乳固形分の測定値について、OMA 法の 990.19(AOAC990.19) 及び 990.20(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。4 法はいずれも ISO 法の再現精度の許容範囲内であったが、OMA 法の再現精度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った。ばらつきは大きい順に ISO 法、乳等省令法と AOAC990.19、AOAC990.20 であった。

2.5.2 濃縮乳・無糖練乳の乳脂肪分

比較試験を行った濃縮乳・無糖練乳の乳脂肪分の測定値について、ISO 法、OMA 法に比べて乳等省令法が低く再現精度の範囲外であった。ばらつきは ISO 法、OMA 法に比べて乳等省令法が大きかった。

2.6 加糖練乳における試験法の比較

2.6.1 加糖練乳の乳固形分

比較試験を行った加糖練乳の乳固形分の測定値について、ISO 法に比べて乳等省令法が高く再現精度の範囲外であった。ばらつきは乳等省令法が大きかった。

2.6.2 加糖練乳の乳脂肪分

比較試験を行った濃縮乳・無糖練乳の乳脂肪分の測定値について、ISO 法、OMA 法に比べて乳等省令法が低く再現精度の範囲外であった。ばらつきは大きい順に乳等省令、ISO 法、OMA 法であった。

D. 考察

(1) アンケート調査の結果

乳等省令の試験法の制定は昭和 26 年と古く、その後の機器の開発等様々な状況の変化に即していない点が多く明らかになった。

表現が古いと考えられる器具・試薬として、アンケート調査で挙げられたものも含め、純アミルアルコール、マイヤーフラスコ、ピペット、ビュレット、甲液、乙液、ロツシエル塩、ペトリー皿、培養基等があり、それぞれ新しい名称等に変えることが望ましい。

試験条件の詳細部分が不足している点として、牛乳の乳脂肪分の定量法における保持温度が約 65 度となっている点等が挙げられる。ISO 法におけるゲルベル法 (ISO2446:2008/IDF 226:2008) において 65 ± 2 と規定されているように具体的な範囲が示されることが望ましい。

無脂乳固形分の定量法に関することとして、係数の妥当性が挙げられた。アイスクリーム類及び発酵乳において無脂乳固形分は蛋白量を測定した後、係数 2.82 を掛けることによって算出することになっているが、家畜改良事業団・乳用牛群能力検定成績⁽¹⁾によると、現在の生乳における蛋白量と無脂乳固形分比は 2.65 程度で、制定当時と比べて乳質が大きく変化しており、係数の妥当性を検討する必要があると考えられる。この場合には、原料が国内の生乳だけであるのか、外国の乳製品を使用しているのか、また、乳由来以外の原料を使用しているか等も考慮に入れる必要がある。

乳由来以外の原料の考え方はプロセスチーズの乳固形分の定量法にも関わる問題である。プロセスチーズは乳脂肪分と乳蛋白量の和を乳固形分としているが、測定される脂肪分と蛋白量は乳由来以外の原料に由来する脂肪分と蛋白量を含んだ総脂肪分と総蛋白量である。様々な原料が用いられるようになった現在、乳固形分の定量法の考え方がこのままでよいのか検討する必要性もあると考える。チーズの業界団体であるチーズ公正取引協議会が実施している会員企業のプロセスチーズ新商品の成分規格検査においては、乳由来以外の脂肪分及び蛋白量を差し引いて乳脂肪分及び乳蛋白量を求め、乳固形分を算出している。

1.1 理化学的試験法

飲用乳の乳固形分や乳脂肪分の測定において、製造現場等では迅速測定器が用いられている。多成分を同時にかつ迅速

に測定できるため日常的に多く行われているが、公定法との同等性を確保するために定期的な校正が必要である。最新の代表的な機器としてはフーリエ変換赤外分光光度計等があり、その適用についてのガイドラインとしてはISO9622:2013/IDF141:2013がある。

乳製品の乳脂肪分の試験法はレーゼ・ゴットリーブ法であり、アンケートにおいてレーリッヒ管に加えてマジョニア管の適用を求める意見があった。実際に乳製品の試験を行う現場においてはマジョニア管を用いることが一般的である。乳製品試験法・注解⁽²⁾に記載されているレーゼ・ゴットリーブ法においてもレーリッヒ管とマジョニア管のどちらを用いてもよいとされている。

アイスクリーム類及び発酵乳において無脂乳固形分算出に用いる蛋白量の定量法はケルダール法である。ケルダール法は、たんぱく質を濃硫酸と加熱分解して、窒素をアンモニアに変えて定量する方法であり、環境に対する負荷が大きいことが問題視されている。一方燃焼法は含窒素化合物を酸化銅とともに加熱し、酸化分解して生ずる窒素ガスの容量を定量する方法であり環境への負荷が小さいことが知られており、蛋白量の定量法において燃焼法の適用を求める意見もあった。乳及び乳製品における燃焼法はISO14891:2002/IDF185:2002として既に規格化されているほか、飼料分析基準（平成20年4月1日・19消安第14729号 農林水産省消費・安全局長通知）における粗たんぱく質の分析法ではケルダール法とともに認められている。

乳等省令における糖分の定量法はレイン・エイノン法である。レイン・エイノン法は希釈試料を一定量の沸騰フェーリング液に滴下しながら反応させ、硫酸銅イオンを還元した後に内部指示薬のメチレンブルーを還元して青色が消失したところを終点とし滴定量より求めるという試験法であるが、終点の判断が極めて難しく、高度な熟練を要する試験である。そのため、高速液体クロマトグラフ法やガスクロマトグラフ法の適用を求める意見が多く挙げられたものと考えられる。

1.2 微生物学的試験法

生乳及び生山羊乳の直接個体鏡法による細菌数の測定法について、現在の乳質を考慮すると試験法が適切ではない、また、代替染色液の適用を求める意見があった。

直接個体鏡法は手法の原理上、標本中の観察対象物が少なくなればなるほど観察視野数を増やさないと正確な測定値を得ることができない。乳等省令に規定されている観察視野数は16視野以上であるが、最小値である16視野は生乳の細菌数基準400万/ml以下であるかを判定するための視野数であり、現在の生乳の品質からみるとより多くの視野を観察する必要があると考える。

また、省令では標本の面積から顕微鏡視野の面積を除いた顕微鏡係数を30万と固定しており、これは顕微鏡視野の直径が0.206mmであった場合の計算値である。省令では0.206mmになるよう鏡筒を調節することとしているが、現在の顕微鏡は固定式が多く、直径0.206mmに調節

できずに使用されることが多い。顕微鏡係数を 30 万に固定せず、具体的な算出方法の記載も必要であると考える。

染色液については、染色に用いられるニューマン氏液中のテトラクロルエタンが特別化学物質障害予防規則(昭和 47 年労働省令第 39 号)において発がん性物質とされ、排気装置の設置や検査室の大気分析等、取り扱いに規制が設けられたことを受け、意見が出されたものとする。標準寒天培地による細菌数の測定法について、乳等省令の試験法では発生集落数 30~300 の範囲にある希釈倍率の集落数を用いて計算することとしているが、複数の希釈倍率で集落数が 30~300 の範囲となった場合や 2 連の数値に差があった場合の処理の仕方が記載されていない。そのため、計算方法を国際的な ISO 法等にすべきとの意見が出されている。また、集落が全く発生しなかった場合は、試験室内事故として扱い、計算に供しないとしていることについて、UHT 牛乳(摂氏 120 度から 150 度で 1 秒間から 3 秒間殺菌した牛乳)等では集落がほとんど発生しないことから、「集落の発生のなかった場合」を試験室内事故の定義から外すべきである等の意見が出された。

乳酸菌を使用して製造されたフローズンヨーグルトは、含まれる乳酸菌数によって発酵乳として分類される場合とアイスクリーム類として分類される場合がある。アイスクリーム類の細菌数規格基準は 10 万以下/g 又は 5 万以下/g であるが、乳酸菌が含まれる製品の場合には乳酸菌も細菌数として計測されるため、基準値を大幅に超えてしまうことがある。そのため、

「ただし、発酵乳又は乳酸菌飲料を原料として使用したものにあつては、乳酸菌又は酵母以外の細菌の数」とされているが、乳等省令では検査による乳酸菌とそれ以外の菌の識別法は規定していないため、規格の見直しや検査法の規定が必要であるとの意見があった。

大腸菌群の測定法において、デソキシコーレイト培地は日本以外の国ではほとんど使用されておらず、海外との検査結果に齟齬をきたしやすいため、国際的に使用されている培地(VRB 培地等)を採用した方が良いとの意見があった。食品衛生法における汚染指標は大腸菌群であり、サルモネラ属菌やエルシニア属菌等は外れているが、これらも食中毒の起因菌としてリスト化されており、また、海外では腸内細菌科菌群を汚染指標とする考え方が主流になっているため、これを採用すべきとの意見もあった。

乳酸菌数の測定では、現行の省令の定義や培地を改訂すべきという意見があったが、乳酸桿菌と球菌を個別の培地で識別し、個々の菌数を要求する海外の基準に合致しない場合が生じるためであると考えられる。

(2) 試験法の比較

乳等省令における乳の乳脂肪分の試験法は一般的にゲルベル法と呼ばれる方法である。ゲルベル法は乳に濃硫酸を加えて脂肪以外の成分を溶解しエマルジョンを破壊した後、硫酸液中に浮遊する脂肪の小滴を遠心分離しその容量から脂肪量を求める試験法である。一方 ISO 法、OMA 法における試験法は重量法である。重量

法はアンモニアエタノール溶液中の試料中の脂肪をジエチルエーテルと石油エーテルで抽出し、抽出液の溶媒を留去して抽出量を求める試験法であり、ゲルベル法とは原理的に全く異なる方法である。ISO/IDF standard には、試験法として容量法であるゲルベル法 (ISO2446:2008/IDF226:2008) も存在はしているが、参照法は重量法であり、重量法と同等の結果が出るように実施することが前提とされている。

試験条件の記述について、乳等省令法においては約 65 とされている温度条件が 65 ± 2 と範囲指定されている、また、乳等省令法では触れられていない試料の準備についての記述があるなど、ISO2446:2008/IDF226:2008 にはより詳細に記されている。試験条件以外にも試験法の概要、器具、試薬等様々な情報が詳細に記載されており、乳等省令の試験法が

「硫酸 10ml を硫酸用ピペットを用いてゲルベル乳脂計に注入し、次に乳 1ml を牛乳用ピペットを用いて徐々に硫酸上に層積し更に純アミルアルコール 1ml を加えゴム栓をし、指で栓を押しつつ振り乳を溶解した後、約六五度の温湯中に一分間浸し、次に三分間から五分間遠心器 (一分間の回転数七〇〇回以上) にかけて更に約六五度の温湯中に浸して温度を一定にし析出した脂肪層の度数を乳 100 分中の乳脂肪量とする。

・試薬

A 硫酸 一五度で比重 1.820 から 1.825 までのもの

B アミルアルコール 沸点が一二八

度から一三二度まで、比重が一五度で約 0.81 のもので、本品 2ml について水 1ml を用いて牛乳の場合と同様にして盲検を行い一夜静置して油状物の分離を認めないもの」

との記述のみであるのに対し、ISO2446:2008/IDF226:2008 は詳細な記述が 12 ページにも及ぶ。仮にゲルベル法において国際的なハーモナイゼーションを考える場合には内容を精査し、ISO 法のように詳細な記述も必要であると考え

る。クリーム、アイスクリーム類、濃縮乳、無糖練乳、加糖練乳の乳脂肪分における試験法の比較について、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「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。比較を行ったこれらすべての品目において乳等省令法の測定値が低く、ばらつきは大きい結果となった。

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 6、図 7)。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。

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⁽²⁾。

脱脂粉乳の水分において比較を行った乳等省令法、ISO 法、OMA 法はすべて乾燥法であるが、乾燥条件がそれぞれ異なるものであり、乳等省令は 98~100 の乾燥機内で乾燥を行う常圧乾燥法、ISO 法は 87 の乾燥機内において風量 33ml/min の条件で乾燥空気を通させながら 5 時間乾燥させるという試験法、OMA 法は 100 の乾燥機内において 100mmHg の減圧条件下で 5 時間乾燥させるという試験法であった。測定値は低い順に ISO 法、乳等省令法、OMA 法となったが、乾燥温度が 87 であることを考えると ISO 法が一番穏やかな条件下での乾燥であり、他と比べて低めの傾向が見られたものと考えられた。乳等省令法と OMA 法はどちらも乾燥温度は 100 であるが、OMA 法は減圧条件下での乾燥であり乳等省令法と比べて水分が蒸発しやすい条件であるため高めの傾向となったものと考えられた。この ISO 法は Codex の Type Method とされている試験法⁽³⁾であるが、その実施には特殊な装置が必要であり、日本国内において広く用いることは難しいと考える。

加糖練乳の全固形分において比較試験を行った乳等省令法と ISO 法は、どちら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⁽⁴⁾。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⁽⁵⁾とされており、約 44%⁽⁶⁾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。

また、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、という違いがあった。

E. 結論

アンケート調査を実施した結果、汎用されている分析法や分析機器による測定が可能となるような試験法の見直しを望む

回答とともに国内法と国際法との不一致を指摘する意見もあり、乳及び乳製品の現行の試験法は、現状に即した見直しや国際的なハーモナイズが必要であることが確認された。

また、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) 家畜改良事業団・乳用牛群能力検定成績

<http://liaj.lin.gr.jp/japanese/kenteikodaiset.html>

(2) 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

(3) RECOMMENDED METHOD OF ANALYSIS AND SAMPLING CODEX STAN 234-1999, 41

(4) 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

(5) 安井明美・渡邊智子・中里孝史・瀧上賢一(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

(6) 文部科学省科学技術・学術審査会資源調査分科会(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 28-29 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。

鏡検者による差、染色手技による差を検証した結果、いずれの染色液も、鏡検者があるいは染色者が異なっても、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、生乳 5 検体について各染色液で染色して計測を行った結果、計測数はいずれの染色液も同等であり、相関があることが示唆された。

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1ml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ロエタン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1.00gから1.12g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6ml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200mlを温めて1.5g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。

本研究では、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市販品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）について、ニューマン染色液との同等性を検討した。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、体細胞についても染色性を検証した。

B. 研究方法

1) 材料

2016年9月に東北地方の農場で採取され、冷蔵で輸送された生乳1検体（R1）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輸送された生乳5検体（R2-R6）および2017年11月に輸送された生乳2検体（試料1、2）を供試した。

2) 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 250 ml を温めて 2.0 g 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。

3) 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 μ l をスライドガラスの 1 \times 1 cm 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。

4) シングルラボによる検討

鏡検者の違いによる比較

生乳 R1 検体を各染色液（2））で染色し、顕微鏡の同一視野をブリード法初心者である鏡検者 3 名（A, B, C）が測定した。各染色液につき 3 視野ずつ、細菌および体細胞を対象とし、典型像、可能性の高い像、夾雑物と推定される像の 3 種類に分類して測定した。

測定は、16 視野以上（1 視野あたり細菌数 0-3 の場合は 64 視野、4-6 の場合は 32 視野、7 以上の場合は 16 視野）について細菌数および体細胞数を測定して 1 視野平均数をもとめ、その値に顕微鏡係数（標本の面積を視野の面積で除した数値を 1 ml 当たりの数に換算するため 100 倍した係数、使用した顕微鏡では 263200）を乗じ、1 ml 当たりの細菌数または体細胞数を算出した。

染色手技による比較

生乳 R3 検体をブリード法初心者である染色者 3 名（A, B, C）が各染色液（2））で染色し、顕微鏡の同一視野を鏡検者 3 名（A, B, C）で測定した。各染色者、各染色液につき 1 視野ずつ、細菌および体細胞を対象とし、典型像、可能性の高い像、夾雑物と推定される像の 3 種類に分類してと同様に測定した。

各染色液による細菌数および体細胞数の比較

生乳 5 検体 (R2-6) を各染色液 (2)) で 2 回ずつ染色し、1 視野あたりの平均細菌数が 0-3 の場合は 64 視野、4-6 の場合は 32 視野、7 以上の場合は 16 視野について細菌数と体細胞数を計測し、1 視野の平均数を求めた。さらに、1 視野の平均数に顕微鏡係数を乗じ、1 ml あたりの細菌数または体細胞数を算出した。

統計処理

鏡検者あるいは染色手技による比較においては、計測数のばらつきを変動係数(CV 値)により評価した。ブリード法による細菌数および体細胞数の比較においては、各染色液で 2 回ずつ染色・測定した計測値を生乳検体ごとに Z スコアを求めて同等性を評価した。また、1 ml あたりの細菌数および体細胞数を算出し、N と B1 および N と B2 について線形近似曲線を求め、 R^2 値により相関を評価した。

5) コラボレイティブスタディによる検討

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

・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(当センター)

コラボレイティブスタディ

当センターにて、生乳 2 試料 (試料 1、2) 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、各施設において各染色液 (2)) を用いて染色を行った。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。

標本間誤差の検討

当センターにて、生乳 2 試料 (試料 1、2) 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)。

ブリード法の特性としていずれの染色液においても、1 個と計測するか 2 個と計測す

るか判断に迷うことがある。細菌の分裂時に、どの段階から2個と計測するか(図2A)、体細胞では離れかけた1個の細胞の分葉核か2個の細胞の核かの判断(図2B)が難しい。また、試料に厚みがあるため、一方にピントをあわせると、他方がぼやけたり消えたりする場合がある(図3A)。ピントを調節しながら測定していく必要があるが、見落としてしまう可能性もある。細菌塊では、重なった部分の正確な計測は困難と考えられる(図3B)。

2) 鏡検者の違いによる比較

表1に、R1を各染色液で染色し、同一視野を鏡検者3名で各染色液につき3視野ずつ測定した結果を示した。細菌数と体細胞数について、典型像および可能性の高い像として測定されたものを視野あたりの計測数とした。計測視野ごとに鏡検者3名による計測数のばらつきを変動係数(CV値)により評価した。細菌数について、染色液NではCV値は視野ごとでは2.4-8.2%、3視野合計で2.5%、B1では視野ごとでは1.1-6.3%、3視野合計で1.5%、B2では視野ごとでは2.5-10.9%、3視野合計では4.5%であった。B2で10.9%であった視野が1視野あったが、他はいずれも10%以内であった。体細胞について、視野ごとでは計測数が少ないため3視野合計数で評価すると、CV値はNでは2.5%、B1では1.5%、B2では4.5%といずれも10%以内であった。よって、いずれの染色液も、同一視野を鏡検した際の3名の計測数は偏りが少ないと考えられた。

表2に、各染色液で各視野について各鏡検者が典型像、可能性の高い像、夾雑物と推定される像と計測した数値を示した。3視野、3鏡検者の計測数の合計数で、典型像と測定された割合は、細菌数ではNは100%、B1は

99.2%、B2は100%、体細胞ではNは74.2%、B1は83.3%、B2は95.5%であり、いずれの染色液も、高率に典型像を確認できたと考えられた。

3) 染色手技による比較

表3に、R1を染色者3名が各染色液で染色し、顕微鏡の同一視野を3名で測定した結果を示した。細菌数と体細胞数について、典型像および可能性の高い像として測定されたものを視野あたりの計測数とした。計測視野ごとに鏡検者3名による計測数のばらつきをCV値により評価した。細菌数について、染色液NではCV値は視野ごとでは4.0-7.3%、3視野合計で4.5%、B1では視野ごとでは5.5-10.7%、3視野合計で3.8%、B2では視野ごとでは0-9.0%、3視野合計では6.6%であった。B1で10.7%であった視野が1視野あったが、他はいずれも10%以内であった。体細胞について、視野ごとでは計測数が少ないため3視野合計数で評価すると、CV値はNでは4.0%、B1では0%、B2では4.9%といずれも10%以内であった。よって、いずれの染色液もいずれの染色者でも、同一視野を鏡検した際の3名の計測数は偏りが少ないと考えられた。

表4に、各染色液で各染色者についての染色視野で、各鏡検者が典型像、可能性の高い像、夾雑物と推定される像と計測した数値を示した。3染色者、3鏡検者の計測数の合計数で、典型像と測定された割合は、細菌数ではいずれも100%、体細胞ではNは97.1%、B1は100%、B2は96.4%であり、いずれの染色液も、いずれの染色者による染色でも、高率に典型像を確認できると考えられた。

4) 各染色液による細菌数および体細胞数の

比較

生乳 5 検体 (R2-R6) について、各染色液を用いてブリード法で測定された細菌数および体細胞数の 1 視野平均数を表 5 に示した。検体ごとに Z スコアを求めたところ、いずれの検体もいずれの染色液も ± 2 以内に分布した。よって、各染色液とも細菌数および体細胞数の 1 視野平均数は同等と考えられた。

2 回染色を行って測定した計測数の平均をとり、顕微鏡係数を乗じて、1ml あたりの細菌数および体細胞数を求めた (表 6)。細菌数 (/ml) の対数値について、N と B1 および N と B2 の相関を求めた (図 4)。いずれも線形近似を示し、 R^2 値は >0.9 であり相関が認められた。体細胞数 (/ml) の対数値について、N と B1 および N と B2 の相関を求めた (図 5)。N と B1 は R^2 値 >0.9 であり相関が認められたが、N と B2 は R^2 値 0.74 であり、やや低い相関を示した。

5) 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 7 および図 6 に示した。

4 施設の平均をとると、細菌数は試料 1 で N : 4.3×10^6 /ml、B1 : 3.0×10^6 /ml、B2 : 2.2×10^6 /ml、B3 : 3.4×10^6 /ml、試料 2 で N : 7.2×10^6 /ml、B1 : 4.9×10^6 /ml、B2 : 5.1×10^6 /ml、B3 : 6.3×10^6 /ml、体細胞数は、試料 1 で N : 5.9×10^5 /ml、B1 : 4.9×10^5 /ml、B2 : 5.2×10^5 /ml、B3 : 5.3×10^5 /ml、試料 2 で N : 2.7×10^5 /ml、B1 : 2.2×10^5 /ml、B2 : 2.4×10^5 /ml、B3 : 2.5×10^5 /ml であった (図 7)。

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 8 に示した。標

準偏差を求めると、細菌数は試料 1 で 2.73×10^6 、試料 2 で 2.85×10^6 、体細胞数は試料 1 で 1.3×10^5 、試料 2 で 8.0×10^4 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 7 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。

C. 考察

シングルラボによる検討で、検査者が初心者であっても結果が同等であることから、ブロードハーストパーレイを基にした市販品である BPV 染色液 (B1) およびブロードファーストパーレイの染色液 (B2) がニューマン染色液 (N) と同等であることが示唆された。

また、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。

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、公益社団法人北海道酪農検定検査協会生乳検査部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社団法人北海道酪農検定検査協会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、公益社団法人北海道酪農検定検査協会 生乳検査部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え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

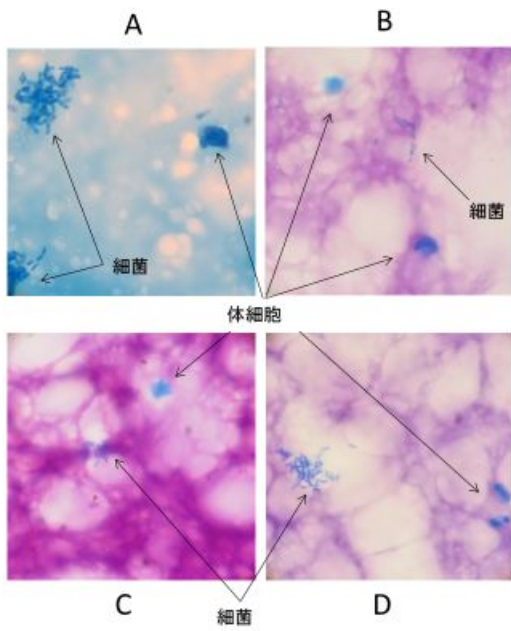


図1 ブリード法における各種染色液の染色像
 A: N(ニューマン染色液)
 B: B1(BPV染色液)
 C: B2(ブロードハーストパーレイ染色液)
 D: B3(ブロードハースト・パーレイ改良染色液)

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)	7.254×10^6	3.701×10^6	4.113×10^6	6.975×10^6	1.191×10^7	1.102×10^7	5.692×10^6	9.508×10^6	6.251×10^6	6.580×10^6	2.737×10^6
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)	8.110×10^6	9.344×10^6	1.016×10^7	1.171×10^7	6.942×10^6	9.574×10^6	1.495×10^7	7.880×10^6	1.005×10^7	4.293×10^6	2.653×10^6
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)	5.76×10^6	6.58×10^6	6.25×10^6	7.90×10^6	7.90×10^6	9.38×10^6	6.91×10^6	7.57×10^6	4.77×10^6	7.57×10^6	1.30×10^6
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)	2.14×10^6	2.14×10^6	2.80×10^6	3.95×10^6	4.11×10^6	4.28×10^6	3.29×10^6	2.30×10^6	3.13×10^6	2.96×10^6	8.00×10^4

なし