

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

**国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理
及び試験法確立のための研究**

平成 30 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 由美子

令和元年（2019）5 月

**国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理
及び試験法確立のための研究**

研究代表者 網田 由美子

令和元（2019）年 5月

目次

・総括研究報告

国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理及び試験法確立のための研究

岡田 由美子

----- 1

・分担研究報告

1. 乳および乳製品の衛生管理に関する国際動向に関する研究

窪田 邦宏 他

----- 13

2. 国内製品・製造施設の衛生実態に関する研究

朝倉 宏、中山 達哉 他

----- 29

3. 国内低温殺菌乳製造施設の衛生実態に関する研究

山崎 栄樹 他

----- 43

4. 低温殺菌牛乳等に対する簡易培地使用の妥当性及び衛生指標菌汚染実態に関する研究

岡田 由美子、鈴木 穂高 他

----- 55

平成 30 年度 研究分担者・研究協力者

研究代表者

岡田 由美子 国立医薬品食品衛生研究所

研究分担者

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所

中山 達哉 国立医薬品食品衛生研究所

窪田 邦宏 国立医薬品食品衛生研究所

鈴木 穂高 茨城大学

山崎 栄樹 帯広畜産大学

研究協力者

天沼 宏 国立医薬品食品衛生研究所

田村 克 国立医薬品食品衛生研究所

山本 詩織 国立医薬品食品衛生研究所

阿部 清孝 国立医薬品食品衛生研究所

倉園 久生 帯広畜産大学

奥村 香世 帯広畜産大学

Amalia Widya Rizky 茨城大学

永島 侑起 茨城大学

下島 優香子 東京都健康安全研究センター

福井 理恵 東京都健康安全研究センター

森田 加奈 東京都健康安全研究センター

平井 昭彦 東京都健康安全研究センター

(敬称略、順不同)

平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

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衛生管理及び試験法確立のための研究

研究代表者	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	中山 達哉	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	窪田 邦宏	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部
	鈴木 穂高	茨城大学農学部
	山崎 栄樹	帯広畜産大学動物・食品検査診断センター
研究協力者	阿部 清孝	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	山本 詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	天沼 宏	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部
	田村 克	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部
	Amalia Widya Rizky	茨城大学農学部
	永島 侑起	茨城大学農学部
	下島 優香子	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
	平井 昭彦	東京都健康安全研究センター微生物部
倉園 久生	帯広畜産大学獣医学研究部門	
奥村 香世	帯広畜産大学獣医学研究部門	

研究要旨

現在わが国の乳および乳製品の衛生管理は、昭和 26 年に発出された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」（以下乳等省令）に基づき、細菌数と大腸菌群を微生物規格として行われており、現在でもそれらが科学的に妥当か否かの検証が望まれている。また、HACCP 導入後の各種食品製造工程における衛生管理上で、迅速簡易法が適用される可能性が高まっているが、乳及び乳製品での適用の妥当性については、不明な点がある。また、日欧 EPA 交渉では乳製品も対象とされる等、今後の国際貿易の拡大を見据えた現状においては、国際動向を踏まえた形で、わが国の牛乳等の品質を評価し、一層の安全確保に向けた衛生管理策を講じることが必要な状況にある。本研究では、乳および乳製品の衛生実態を管理及び微生物規格を検討する上での基礎知見の集積を図ることを目的とし、本年度は諸外国における乳製品による健康被害実態、食品汚染実態、定められた微生物規格基準とそのサンプリングプラン、試験法の運用実態等に関する情報収集を行うと共に、EU における製造工程での衛生管理の実態について、デンマークの低温殺菌牛乳工場等を視察し、情報を収集した。また、国内で HTST 及び LTLT 牛乳を製造する施設並びに UHT 牛乳を製造する大規模施設の協力を得て、各製品の製造工程実態について衛生試験を通じた検討を行い把握することとした。更に、低温殺菌牛乳等製品における細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌の検出状況について、公定法、ISO 法並びに簡易培地を用いて検討を行った。その結果、殺菌乳に起因する食中毒アウトブレイクの発生件数及び微生物汚染は世界的に少ないこ

とが文献調査により確認された。現地視察の結果、デンマークでは HACCP に基づき、乳製造工場における衛生管理が適切に行われており、自社や業界団体、行政機関による指導も効果的に行われていることが確認された。EU 規則に基づいた国内基準を設定しているが、さらにそれを上回る自社基準を設定してより安全性を担保し、検査法は ISO 法や迅速検査法を活用しつつ、その頻度に関しては腸内細菌科菌群の検査が 1 年に 4 回という現実的な頻度でそれに対応していることが明らかとなった。一方、加熱殺菌前の原乳及び製造施設環境検体では公定法と簡易培地での集落形成数に差は見られなかったことから、簡易法であるフィルム培養法の適用範囲は今後更なる検証が必要であるとの知見を得た。また、LTLT/HTST 牛乳を製造する中規模施設では、UHT 牛乳を製造する大規模施設と同等の製造施設設備を用いていたが、充填工程で前工程との明確な施設区分化がなされておらず、充填機ノズル及び製品からは非病原菌が検出されたことから、同工程環境から製品への細菌混入を招きうる実態が明らかとなった。また、販売規模、HACCP 認証等の運営形態が異なる北海道内の複数の低温殺菌牛乳についての製造施設での製造工程、衛生検査実態の比較により、同規模の製造施設であっても危害発生が起こりうる行程に差がみられる実態が明らかとなった。市販の低温殺菌牛乳製品については簡易培地での集落形成数が公定法及び ISO 法よりも低い傾向が示された。

A. 研究目的

我が国を含む殆どの国において、食品の安全確保を目的として、多くの食品種に微生物規格が定められている。規格対象となる食品の多くは、過去に食中毒事例の原因となった食品や、製造工程において微生物制御が困難であることが明らかな食品等であり、国内の食習慣や製造環境等を踏まえて設定されてきた。しかしながら、国内の衛生状況は時代の変遷と共に変化を顕し、昨今では食品の国際流通も増加の一途を辿る等、食を取り巻く環境は変化している。わが国の乳及び乳製品については、昭和 26 年に発令された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」(乳等省令)に基づき、細菌数と大腸菌群が微生物規格に設定され、安全確保が図られているが、現在 EU 等では牛乳の製造工程管理を HACCP ベースで行うと共に、わが国で 2011 年に生食用食肉の微生物規格として採用された、腸内細菌科菌群を衛生指標として製品等の検査が実施されている状況にある。

上述の国内での乳等に対する微生物規格基準は、衛生状況が現在に比べて良好とはいえない戦後の社会的背景から設定されたものと考えられる。同規格は、現時点においても、一定の安全確保に資する内容であることには違いがない一方、国際動向を踏まえた内容

と結論づけるためには、その妥当性を科学的に評価する必要がある。

現在、国内で製造される牛乳の多くは 130 ・ 2 秒程度の超高温瞬間殺菌(UHT)処理によるものであり、国内生産量の約 91.5%を占める一方、欧米では主に製造される 63 ~ 65 ・ 30 分間の低温長時間殺菌(LTLT)牛乳や 72 ~ 75 ・ 15 秒間の高温短時間殺菌(HTST)牛乳は約 8.5%に留まるとの報告もある。こうした牛乳の製造加工に係る国内の事業所数は平成 28 年時点で全国に 524 施設あり、このうち、368 施設では飲用牛乳を主に製造するとされている。UHT 牛乳の製造加工の多くは大手事業者による一方、LTLT 牛乳や HTST 牛乳の多くは一日あたりの処理量が 2 トン未満の中小規模事業者によるとされる。しかしながら、UHT 牛乳以外の牛乳について、製造工程における衛生管理実態等について調査研究が行われた実態は見当たらない状況であった。

以上の背景を踏まえ、平成 30 年度は、諸外国における低温殺菌牛乳等の乳及び乳製品に起因する健康被害実態及び製品汚染実態を調査すると共に、海外における乳製造の衛生管理実態の把握、国内で製造流通する低温殺菌牛乳製品等を対象とした製造工程管理実態の把握、市販製品の微生物汚染実態を衛生指標菌試験(公定法)並びに簡易培地(以下、簡易法)を用いた検討を行うことで評価することを、本研究の目的

とした。更に、後者の製品に対する適用の妥当性について考察を行ったので報告する。

B. 研究方法

1) 乳及び乳製品の衛生管理に関する国際動向に関する研究

学術論文等や米国および欧州の回収・汚染情報データベース等に報告されている、これまでに報告された海外および国内における乳に起因する健康被害事例報告や、製造基準違反等に伴う乳の回収・汚染に関する事例に関する情報収集を行った。デンマークの食品衛生を担当する行政機関、乳製品の指導等を行う業界団体、低温殺菌牛乳工場を視察し、製品・製造施設の衛生実態、製造基準、検査法、サンプリングプラン等に関する情報収集を行った。

2) 国内製品・中規模及び大規模製造施設の衛生実態把握

LTLT牛乳およびHTST牛乳を製造する中規模事業施設A(以下、中規模施設A)並びにUHT牛乳を製造する大手事業施設B(以下、大規模施設B)の研究協力を得て、各施設での対象製品の製造工程フロー図、並びに牛乳製造量、製品仕様書等の情報提供を依頼し、承諾を得た。中規模施設Aでは、原乳、最終製品のほか、拭き取り検体(充填機内外のモンドレル、充填ノズル、マガジンラック、充填部、及び充填機周辺の床・壁、加熱殺菌機周辺の床・壁)を採材した。大規模施設Bでは原乳、殺菌前乳、殺菌後乳、殺菌後貯乳、最終製品、並びに拭き取り検体(加熱殺菌機出口、充填機周辺の床および昇降台、冷却プレート出口)を採材した。衛生指標菌の検出にあたっては、国際標準試験法であるISO法(細菌数、ISO 4833-1:2013;腸内細菌科菌群、ISO 21528-2:2004;大腸菌群、ISO 4832:2006;大腸菌、ISO 16649-2:2001;黄色ブドウ球菌、ISO 6888-1:1999)と共に、第三者認証機関によりISO法との同等性が確認されている迅速簡易検査製品を用いた。一部検体はDNAを抽出し、細菌叢解析を実施した。

3) 国内小規模製造施設の衛生実態把握

北海道内で低温殺菌牛乳を製造・販売する3小規模事業者について調査を実施した。各施設について、製造規模を含めた施設概要、製造工程、各施設で実施される自主検査項目について、施設見学および聞き取り調査を実施し、製造工程管理実態および衛生管理実態を取りまとめた。小規模施設A及びCより生乳及び低温殺菌牛乳を入手し、腸内細菌科菌群数、生菌数、大腸菌群数、大腸菌数について、培養法と簡易培地を用いた検査を実施した。

4) 諸外国における低温殺菌牛乳等の微生物規格の調査

EU、米国及びオーストラリアにおける低温殺菌牛乳及び生乳の微生物規格をインターネット検索により調査した。

5) 低温殺菌牛乳等に対する簡易培地使用の妥当性及び衛生指標菌汚染実態に関する研究

市販の低温殺菌牛乳等について、衛生指標菌汚染実態を調査した。調査は平成30年7月から平成31年3月まで行い、検体はLTLT乳53検体、HTST乳19検体、HTLT乳16検体の合計88検体を用いた。試験項目は、細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌とした。試験方法は、細菌数については乳等省令の試験法及びISO 4833-1:2013を、腸内細菌科菌群は定性法としてISO 21528-1:2017を、定量法としてISO 21528-2:2017を用いた。大腸菌群については乳等省令の試験法を用いた。黄色ブドウ球菌については通知法を、大腸菌については公定法及びISO 16649-2:2001を用いた。また、各試験項目の代替法として、国際的な第三者認証を取得し、国内で市販されている代表的な簡易培地を用いた。簡易培地で検出された細菌の菌種の同定は、16S rDNA塩基配列解析により行った。黄色ブドウ球菌検出用簡易培地上に形成された非定型集落の同定には、MALDI BioTyper (Bruker)を用いた。

C. 研究結果

1) 乳及び乳製品の衛生管理に関する国際動向に関する研究

PubMed データベースに報告されていた学術論文のうち殺菌乳との関連が確認された食中毒アウトブレイク事例の報告は 14 件であった。報告されているアウトブレイク発生年は 1937～2016 年に発生したものであった。2000 年以降発生事例としては 5 件のみであり、いずれも乳の殺菌作業後に環境等からの汚染がおきている事例であった。殺菌乳の喫飲に起因する食中毒アウトブレイクは 2017 年以降に発生したものは確認できなかった。近年報告されているアウトブレイク事例のほとんどは未殺菌乳の喫飲に起因するものであった。

米国 FDA 回収情報データベースには殺菌乳の微生物汚染による回収情報は報告されていなかった。RASFF データベースに報告されている殺菌乳 (Pasteurized milk もしくは UHT milk) の回収情報事例は 12 件のみであった (2004～2018 年、窪田分担報告書表 1)。そのうち、実際に健康被害が報告された事例は 2018 年 11 月にスロバキア産殺菌乳に起因してハンガリーとスロバキアでアウトブレイクが発生した 1 例のみであった。

現地査察で得られた情報で、デンマークにおける殺菌乳の衛生基準は基本的に EU 規則に沿ったものであり、腸内細菌科菌群について $n=5$, $c=0$, $m<10\text{cfu/ml}$, $M<10\text{cfu/ml}$ としていた (窪田分担報告書資料 1、項目 2.2.1)。

デンマーク農業食品評議会は同会発行しているガイダンスで乳および乳製品に関してリスクが大きいものを記述しており、乳に関してはセレウス菌やカンピロバクターを指定して指導している (窪田分担報告書資料 2)。

実際の検査法等に関しては EU の基準をもとに、各社が自主基準を設け、DVFA や DFAC といった指導機関や業界団体等が HACCP プランをはじめとする指導や定期的な監査を行うことで問題を検知し改善するシステムとなっていた (窪田分担報告書資料 3)。

原乳の出荷時の検査は出荷元の各農場が責任を負っており、原乳受け入れ時の検査、乳製品の出荷時の検査等は製造業者がより厳しい基準に従っていた (窪田分担報告書資料 4)。原乳はデンマークの国内基準では 2 日毎に乳生産農家から収集する場合には

6 以下での保存、毎日収集する場合には 8 以下での保存が求められているが、デンマークの乳製品業界の自主基準ではそれぞれさらに 2 低い保存温度で管理を行っていた。原乳受け入れ時には性状 (官能検査) と温度 (10 以下) を確認し、受領後 6 以下での保存を行なっている。最終製品の官能検査は製造直後および製品の賞味期限日に行なっている。乳製品業界では殺菌前の生菌数が $300,000\text{cfu/g}$ 以下となるよう管理している (窪田分担報告書資料 3) 各種検査には Moving Window を用いた継続した検査を行なっている。検査法は基本的に ISO 法に従っている (窪田分担報告書資料 5) 各社では迅速検査法等も使い、より厳しい基準の検査を行なっていた。

これらの検査の実態把握や操業開始時の HACCP プランを始めとする衛生管理指導を担当している DFAC (SEGES) は、操業開始時とその後 3 年に 1 度、衛生管理等に問題がないかの検査を行なっている。

牛乳の殺菌条件はデンマーク規格基準では 72 15 秒であるが、視察を行なった会社では自社基準である 74 15 秒で行なっている。加熱殺菌部の消毒は 90 45 分で行い、加熱できない容器充填部の機材は塩素により行なっているとのことである。消毒が効果的に行われたことの確認は、次回生産初期ロットの製品検査により行なっているとのことである。また、製品の加速試験も行なっており、17 24 時間負荷後の 21 培養菌数、17 24 時間負荷後の大腸菌数等を計測している。

上述した EU 規則で実施が要求されている殺菌乳の衛生基準 (腸内細菌科菌群について $n=5$, $c=0$, $m<10\text{cfu/ml}$, $M<10\text{cfu/ml}$ 、窪田分担研究報告書資料 1、項目 2.2.1) にもとづく乳の最終製品における腸内細菌科菌群の検査は 1 年に 4 回おこなっており、検査は製品の賞味期限日に行なっていた。

2) 国内製品・中規模及び大規模製造施設の衛生実態把握

2) -1. 中規模及び大規模施設での牛乳製造に係る情報の整理 (朝倉・中山分担報告書図 1,2)

中規模施設 A での年間製造量は 2017 年度実績で LTLT 乳が約 2,150t、HTST 乳が 1,990t であった。原

乳輸送には容量 10t のローリー車 2 台を用い、搾乳後 1 時間以内に集乳し 5 以下で輸送を行っていた。また、原乳の品質に基づいて、農場単位で LTLT 乳または HTST 乳のいずれの原料として用いるかを決定しており、そのために原乳検査に法令で定められる内容に上乘せをした自主検査を行い、記録を経時的に保存していた。視察及びサンプリングを行う際に対象とした製品は 72・15 秒加熱殺菌をした HTST 牛乳及び 63・30 分加熱殺菌をした LTLT 牛乳であった。何れも 1L 容量の紙パック製品であり、加熱殺菌についてはプレート方式の連続式加熱殺菌器を用いていた。

一方、大規模施設 B は 90 年代初頭に HACCP 体制を確立しており、ISO22000 等も取得していた。同施設では日平均約 121t の原乳を近郊の農場を中心に全国から 3 以下の輸送温度条件を付して受け入れ、複数種の UHT 牛乳製品を製造していた。施設内には 100t のジャイロタンクを 8 台設置・運用し、同タンク内で受け入れた原乳を計画的に合乳としていた。現有の受入検査項目は乳等省令に定められた内容であり、総菌数はブリード法で 4 万/mL との自主管理規定を設けていた。また、同日に連続製造される単一製品を 1 ロットと定義していた。

約 1 日の一次貯乳の後、クラリファイヤー、ホモゲナイザーを経た原乳は 130・2 秒の加熱殺菌処理に供され、殺菌後貯乳タンク内で一時的に 5 以下の温度条件で貯乳されていた。充填室は HEPA フィルターを付した陽圧管理・自然排気環境にあり、充填機内では H₂O₂ 噴霧と UV 照射により殺菌された容器へ自動充填されていた。これらの製造ラインの管理要件は何れも衛生管理計画が立てられた上で、中央監視システムにより自動制御されていた。

2)-2. 中規模施設 A における原乳、製品、及び施設ふき取り検体からの衛生指標菌の検出状況（朝倉・中山分担報告書図 3~5、表 1）

原乳中の一般細菌数は ISO 法では 1.2x10³~2.8x10³CFU/mL であり、簡易迅速法では製品 A が 1.6x10³~4.3x10³ CFU/mL、製品 B が 1.1x10³~1.4x10³CFU/mL、製品 C が 8.6x10²~2.3x10³CFU/mL であった。同検体での腸内

細菌科菌群、大腸菌群の数値は ISO 法でそれぞれ 9~33CFU/mL、24~51CFU/mL の範囲にあり、簡易迅速法の成績もこれに準ずるものであった。大腸菌は 3/8（37.5%）の確率で認められたが、同値は最大 2CFU/mL に留まっていた。黄色ブドウ球菌は 15~101CFU/mL の範囲で検出された（朝倉・中山分担報告書図 3）。

出荷前製品については、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌はいずれも陰性であり、一般細菌のみ <1~1.3x10²CFU/mL（平均値は HTST 製品で 1.2x10²CFU/mL、LTLT 製品で 2.5x10¹CFU/mL）の範囲で検出された。一方、簡易迅速法による一般生菌数の検出数値は検出用製品の別によらず、ISO 法による成績に比べ、低い成績を示した（朝倉・中山分担報告書図 4）。

拭き取り検体のうち、充填機周辺の壁、殺菌機周辺の床・壁、充填機内部（充填部、マンドレル、マガジンラック）は製品 C のマガジンラックを除き、一般細菌は検出されなかった。一方、充填ノズルからは、方法に拠らず一般細菌を認めた。腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌はいずれも陰性であった（朝倉・中山分担報告書図 5、同表 1）。

2)-3. 大規模施設 B における原乳、製品、及び施設ふき取り検体からの衛生指標菌の検出状況

原乳及び製品検体については、視察時に同一ロット検体の確保が困難であったため、施設事業者により、後日異なる工程で同一ロット検体を採材いただき、冷蔵温度帯で 1 昼夜かけて輸送されたものを検体として衛生試験に供した。結果として、受入時の原乳及び殺菌前バランスタンク原乳検体については、一般細菌数が 3.3x10⁶~2.0x10⁷CFU/mL、腸内細菌科菌群が 4.4x10¹~1.2x10³CFU/mL、大腸菌群が 1.9x10²~1.6x10³CFU/mL、大腸菌が 3.0x10¹~1.2x10²CFU/mL、黄色ブドウ球菌が 1.9x10³~4.1x10³CFU/mL の範囲で検出された。殺菌後貯乳及び製品については全ての指標菌が陰性の結果となった。

施設環境拭き取り箇所としては、洗浄後の加熱殺菌器出口、冷却プレート出口のほか、稼働中の充填室内で

充填機周囲の外部床と昇降台を検体とした。結果として、洗浄後の加熱殺菌器出口、冷却プレート出口、及び充填室内の昇降台については全ての指標菌が陰性となり、充填室の床についても、一般細菌のみが40CFU/100cm²検出されるに留まった。

2)-4. 製造工程を通じた構成菌叢の比較解析(朝倉・中山分担報告書図6)

中規模施設Aでは生菌・死菌の別を問わず、各検体由来DNAを鋳型として16S rRNA解析に供した。HTST牛乳の原料である原乳S6は、LTLT牛乳原料である原乳S5に比べ、*Pseudomonas*属の占有率が相対的に高い状況にあった。

製造施設環境からは、*Bradyrhizobium*属、*Sphingomonas*属、*Brevundimonas*属、*Tumebacillus*属、*Methylobacterium*属等が優勢菌群として検出された。

HTST牛乳製品検体では*Serratia*属や*Pseudomonas*属、*Streptococcus*属等が優勢構成菌叢として認められた一方、LTLT牛乳製品検体では、施設環境でも高い占有率をもって認められた*Bradyrhizobium*属や*Sphingomonas*属、*Tumebacillus*属等が優勢構成菌叢として認められた。

大規模施設B由来検体については、生菌由来16S rRNA配列を選択的に対象とするため、EMA処理後にDNA抽出を行い、16S rRNA解析に供した。結果として、多くの一般細菌数を認めた原乳・殺菌前貯乳検体では、*Pseudomonas*属等の低温細菌が優勢である状況が確認された。

3) 国内小規模製造施設の衛生実態把握

3)-1. 施設概要の比較

小規模施設の調査においては、従業員数3~5名の事業者を調査対象とした(山崎分担報告書表1)。対象とした3つの事業者間で製造規模に大きな差は無いものの、小規模施設AはFSSC 22000及び北海道HACCP自主衛生管理認証制度の認証を受けていた一方で、小規模施設BおよびCは衛生管理過程に関する定期的な第三者評価を受けていない施設であった。

各施設に共通する項目として、原乳受入元(自社牧

場)乳の殺菌条件(65℃,30分)が挙げられた。一方で、原乳の受入方法、包装形態、賞味期限、製品記載の保存方法、販売先の広域性に差が観られ、これらの項目に基づいた事業者毎に適した製造工程管理および製品管理の必要性が抽出された。

3)-2. 製造工程の比較

各施設の製造フローチャートを山崎分担報告書図1に示した。生乳の受入工程においては、小規模施設Aではミルクローリーから専用パイプを用いて閉鎖系で受入がなされていたのに対して、小規模施設Bでは専用バケツで受入れた生乳をホールディングタンクへ開放系で投入しており、また小規模施設Cにおいても専用ポリタンクで受入れた生乳を受入槽へ開放系で投入していた。加えて、容器包装形態が異なるために、小規模施設Aと小規模施設B、Cの間で充填工程に差が観られた。これらの結果から施設毎に生物的危害要因混入の可能性が考えられる工程に差があることが明らかとなり、同種の事業者であっても、HACCP導入を含めた適切な工程管理において個別の製造工程を勘案する必要性が示された。一方で、いずれの施設においても殺菌工程以降では充填工程を除き、中間製品の閉鎖性が維持されており、殺菌条件の遵守及び充填工程の施設環境管理が微生物汚染防止に重要な工程であることが確認された。

3)-3. 検査体制および検査項目の比較

各施設における自主検査実施状況を山崎分担報告書表2に示した。小規模施設Aは事業所内に製造部門とは独立した検査部門を持つ施設である一方で、小規模施設B及びCでは独立した検査部門を持たず製造業務を行う職員が検査業務を兼務していた。また、小規模施設B及びCにおいては特に、製造施設で実施可能な検査項目が限られており、乳等省令で成分規格として定められている項目を含めた多くの検査項目を外部委託検査に頼っている現状が明らかとなった。

すべての施設では自主検査として何らかの簡易検査法を用いている実態が確認されたことから、小規模製造施設における簡易検査法の有用性が示唆された。しかしながら、簡易検査法の使用法については、必ずしも十分な教育を受けて実施されているものとは限らないことが明らかとなり、検査精度の確保にあつ

て、適切な適用箇所や試験方法の明示を行う必要性が示された。

3) -4. 簡易検査法の有効性の検討

小規模施設における調査から、同施設において大規模製造施設とは異なった製造工程管理および衛生管理がなされている実態が明らかとなった。小規模施設においては特に、簡易検査法の利用無しでの衛生管理は現実的ではなく、国際的な動向を踏まえた乳製品の衛生管理の導入においても簡易検査法利用の有効性の検討が必要である事が示唆された。そこで、簡易検査法の有用性の検証および実効性のある衛生指標菌の選択に資する科学的知見の収集を目的として、小規模施設で製造された製品および原材料乳を入手し、EU で乳の成分規格として利用されている腸内細菌科菌群数について培養法と簡易検査法を用いた検査を実施した。また一方で、国内で成分規格が設定されている生菌数と大腸菌群、加えて大腸菌についての検査を実施し、これらの結果の比較解析を行った。培養法については ISO 規格内で示されている方法を採用し、簡易検査法については可能な限り複数の製品を利用した。

EU においては低温殺菌牛乳の成分規格として腸内細菌科菌群数で 10 cfu/mL 未満以下であることが求められている。国内小規模製造施設で製造された低温殺菌牛乳に対する腸内細菌科菌群の検査においては、ISO 法及び簡易検査法のいずれにおいても検出限界以下となった(山崎分担報告書図 2A,B)。生乳については ISO 法-簡易法間で比較的良好な相関がみられ生乳の衛生状態モニタリングにおける簡易検査法の有用性が示された(山崎分担報告書図 2C,D)。

生菌数の検査では、低温殺菌牛乳に対する検査において試料によっては ISO 法に比較して簡易検査法において低い値となる傾向が観られたことから、低温殺菌牛乳の生菌数検査に簡易検査法を導入する際には慎重な検討が必要であることが明らかとなった(山崎分担報告書図 3A)。一方で、生乳の検査においては ISO 法-簡易法間で同等の結果が得られた(山崎分担報告書図 3C,D)。

大腸菌群数の検査では、低温殺菌牛乳に対する検査において ISO 法及び簡易検査法のいずれにおいても

検出限界以下となり(山崎分担報告書図 4A,B) また生乳の検査においても ISO 法-簡易法間で同等の結果が得られ(山崎分担報告書図 4C,D) 簡易検査法の有用性が確認された。

大腸菌数の検査では、低温殺菌牛乳に対する検査において ISO 法及び簡易検査法のいずれにおいても検出限界以下であった(山崎分担報告書図 5A,B)。一方で、生乳に対する検査では ISO 法-簡易検査法間で小規模施設 A では比較的良好な相関が得られたものの、小規模施設 C では簡易法 2 でのみ陽性の結果が得られており(山崎分担報告書図 5C,D) 各施設において簡易検査法を選択する際には施設毎に乳の特性を考慮した慎重な検討が必要であることが示唆された。

4) 諸外国における低温殺菌牛乳等の微生物規格

岡田・鈴木分担報告書表 1 に諸外国における低温殺菌牛乳等の微生物規格を示した。また、参考として ICMSF により設定された低温殺菌牛乳の微生物規格についても示した。EU では低温殺菌牛乳について、製造工程の最終時の微生物規格として腸内細菌科菌群を 10CFU/mL 未満と定めており、1 ロットについて 5 検体試験し、全検体合格でなくてはならない、としていた。一方米国では、生菌数を 2.0×10^4 CFU/mL 以下とし、大腸菌群については 10CFU/mL(バルク出荷時は 100 CFU/mL)以下としていた。規格適用箇所については規定されていなかった。Codex や FAO/WHO に科学的助言をおこなっている ICMSF は、製造終了時の微生物規格として腸内細菌科菌群を対象とした 3 階級のサンプリングプランを設定しており、1 ロットについて 5 検体試験し、その内 2 検体までは 5CFU/mL であっても当該ロットを合格とする(3 検体は 1 CFU/mL 未満でなくてはならない)としていた。英国及びオーストラリアでは飲用の生乳(未殺菌乳)に微生物規格を設定しており、英国では農場での生菌数を 2.0×10^4 CFU/mL、大腸菌群を 100CFU/mL としていた。オーストラリアでは製造、加工、販売時の微生物規格としてカンピロバクター、大腸菌群、大腸菌、サルモネラ属菌及び生菌数をサンプリングプランに基づき設定していた。

5) 低温殺菌牛乳等の汚染実態調査

今回の調査結果概要を岡田・鈴木分担報告書表 2 に示した。公定法での細菌数(32 48 時間培養)は、LTLT 乳 53 検体で平均 1.49 logCFU/mL(検出限界以下~4.07 logCFU/mL)、HTST 乳 19 検体で平均 1.31 logCFU/mL(検出限界以下~3.36 logCFU/mL)、HTLT 乳 16 検体で平均 0.29 logCFU/mL(検出限界以下~1.32 logCFU/mL)であった。一方、公定法と同一の培養条件(32 48 時間)で簡易培地を用いた際と同菌数は LTLT 乳で平均 1.03 logCFU/mL(検出限界以下~4.27 logCFU/mL)、HTST 乳で平均 0.97 logCFU/mL(検出限界以下~3.40 logCFU/mL)、HTLT 乳で平均 0.28 logCFU/mL(検出限界以下~1.38 logCFU/mL)であった。また、ISO 法による細菌数(30 72 時間培養)は、LTLT 乳で平均 2.06 logCFU/mL(検出限界以下~4.34 logCFU/mL)、HTST 乳で平均 1.66 logCFU/mL(検出限界以下~3.61 logCFU/mL)、HTLT 乳で平均 0.75 logCFU/mL(検出限界以下~2.08 logCFU/mL)であった。ISO 法と同一の培養条件で簡易培地を用いた際と同菌数は、LTLT 乳で平均 1.90 logCFU/mL(検出限界以下~4.70 logCFU/mL)、HTST 乳で平均 1.23 logCFU/mL(検出限界以下~3.62 logCFU/mL)、HTLT 乳で平均 0.54 logCFU/mL(検出限界以下~1.58 logCFU/mL)であった。

細菌数における試験法間での有意差検定を通じ、公定法と簡易培地の間では、LTLT 乳と HTST 乳では有意差を示したが、HTLT 乳では有意差は見られなかった(岡田・鈴木分担報告書表 2)。また、両者の相関を寄与率で算出したところ、LTLT 乳で 0.0614(岡田・鈴木分担報告書図 1)、HTST 乳で 0.7169(同図 4)、HTLT 乳で 0.186(同図 7)であった。公定法と ISO 法の間では、LTLT 乳、HTST 乳及び HTLT 乳のいずれも有意差を示し(同表 2)、寄与率は LTLT 乳で 0.5177(同図 2)、HTST 乳で 0.7863(同図 5)、HTLT 乳で 0.1306(同図 8)であった。一方、ISO 法と簡易法の間では、HTST 乳では有意差を示したが、LTLT 乳と HTLT 乳では差は見られず(同表 2)、寄与率は、LTLT 乳で 0.6093

(同図 3)、HTST 乳で 0.6598(同図 6)、HTLT 乳で 0.7197(同図 9)であった。一部の温度逸脱等により参考値として集計した検体においても、LTLT 乳における寄与率は、公定法と ISO 法及び ISO 法と簡易法の間で高く、公定法と簡易法の間で低い傾向を示した(同図 10、11 及び 12)。今回試験した検体からは、いずれの試験法においても、黄色ブドウ球菌及び大腸菌は検出されなかった。一方大腸菌群は、LTLT 乳 1 検体より検出された。

低温殺菌牛乳等の細菌数試験においては、簡易培地上でしばしば拡大集落が形成され、菌数の測定が困難になる場合が見られた。また、簡易培地上では微小集落や遅延増殖を示す集落も認められ、所定の培養時間内では正確な菌数測定が困難になる例も見られた。これらの代表的集落について、16S rDNA 塩基配列解析に基づく菌種同定を行ったところ、拡大集落の多くは *Bacillus* 属と同定された(岡田・鈴木分担報告書表 3)。一方、増殖遅延集落や微小集落には *Paenibacillus* 属、*Kocuria* 属、*Microbacterium* 属が含まれていた。また、黄色ブドウ球菌用簡易培地上に発育した非定型集落は、*Bacillus cereus*、*B. clausii*、*Paenibacillus amylolyticus* 等であった。

D. 考察

諸外国における事例調査の結果から、殺菌乳の健康被害事例に関して近年の発生報告が少ないことは、殺菌乳の製造における HACCP プランや殺菌法や検査法、施設の衛生管理が効果をあげていることを示唆している。未殺菌乳の喫飲に起因するアウトブレイク事例は、各国で数多く報告されている。規格基準に関しては、デンマークの国内基準は EU 規則に沿って設定されていた。また微生物検査や温度管理等は各社でデンマーク国内基準より厳しい基準を自主的に設定して衛生管理を行っていた。

視察したデンマークの乳・乳製品製造工場では、EU 規則で要求されている乳の最終製品における腸内細菌科菌群の検査は 1 年に 4 回で、製品の賞味期限日に行なっている。これが他の EU 諸国においても一般的な検査頻度なのか、また衛生対策等が同様のものであるかの検討が必要である。

中及び大規模乳製造施設における調査を行ったところ、両施設は自主管理基準を設け、衛生確保に向けた管理体制を構築・運用していた。特に、中規模施設では原乳受け入れ時に大腸菌群検査も実施し、検査結果を基に、良好な衛生状況の原乳を提供する生産農場を区別化し、無菌化を図ることが困難である LTLT 牛乳の原料として用いる等、フードチェーンを通じた安全確保に向けた活動方針を立てていたことは興味深い対策と感じた。当中規模施設の施設設備は概ね大手施設と同等であり、原乳受け入れ後から殺菌後貯乳までの工程は閉鎖ラインで自動管理される状況であった。一方で、同施設では一時的に開放ラインを含む充填工程も加熱殺菌工程等と同一室内で行われていた。そのため、充填工程周辺の施設環境拭き取り検査を実施したところ、充填機ノズルから少数の一般細菌が検出される状況を確認した。検出された一般細菌は、*Bradyrhizobium* 属菌が主体であることが明らかとなり、更に同菌属は製品からも少数ではあるが検出されたことから、同工程の更なる洗浄・消毒の徹底を図ることが、同施設における更なる安全性確保に向けた対策と目される知見を得た。同菌属は非病原菌であることから、本検出成績をもって当該製品が健康危害を招きうる状況にはないと考えられ、直ちに改善措置を図る必然性は低い状況にはあるが、腐敗変敗等を介した消費期限設定等への影響は否定できる状況にはないため、今後対策とその効果の検証について事業者との間で更なる連携を図り、課題の解決を図る必要があると思われる。

更に、ISO 法と迅速簡易法であるフィルム培養法との間の相関性に関する検討を通じ、原乳や施設環境を対象とした場合には良好な相関性が得られた一方、製品を対象とした試験において、フィルム培養法の適用は困難と思われる結果を得た。後者の検査法は簡便かつ迅速な結果判定を行える利点を有するが、その適用範囲の設定には検証を行った上で設定する必要があることを示唆するものであり、今後、より多種多様な施設での比較検証を進めることで、適用箇所の設定が可能となるものと思われる。

今回調査した大規模施設では、工程別の施設環境の区分化と中央監視システムによる各管理要件のモニ

タリングが徹底されていたほか、使用・洗浄後の施設環境拭き取り検査結果は、使用後の CIP 洗浄が有効に機能している実態を示すものと考えられた。また、原乳中の指標菌のうち、特に一般細菌数で上記中規模施設に比べ高い傾向を認めたと、同施設由来の原乳、中間・最終製品は何れも大規模施設で同一ロットを確保する意義から最大 48 時間保存した後、更に一日かけて冷蔵輸送されてから試験に供したため、この間に低温細菌の増殖を招いた可能性が考えられた。実際に、構成菌叢解析を通じ、原乳及び殺菌前貯乳検体では低温細菌に位置付けられる *Pseudomonas* 属等が高い占有率をもって検出された。また、同施設で原乳受け入れ時に行われる総菌数の検査結果を別途確認したところ、約 1 か月間の検査結果は何れも 4 万/mL 以下であったことを踏まえると、本調査用に同一ロットを確保することを最優先事項としたための保存・輸送時間の延長が加熱殺菌前の原乳の一般細菌数拡大につながったと想定される。なお、加熱殺菌処理後の検体及び最終製品については全ての衛生指標菌が陰性であり、UHT 処理は低温細菌を含めた細菌の幅広い制御に資するものであることが改めて検証されたといえる。以上より、今年度研究では主に中小規模事業者等により製造される LTLT/HTST 牛乳の製造工程に係る衛生管理実態を微生物学的観点から調査し、改善に向けた対策要点を提唱することができた。また、試験方法の適用箇所等についても今後の課題を見出すことができたと考えられる。

小規模施設の調査からは、今回の調査対象施設間では製造規模に大きな差が無いものの、施設毎に生乳及び製品の検査項目や手法に差異が確認された。本調査で対象としたすべての施設で自社牧場にて搾乳した生乳を原材料としており、このため搾乳牛の飼養管理を含めた品質管理が可能となっていた。一方で、低温殺菌牛乳製造施設内で実施可能な衛生検査については、大規模施設に比較して限られた項目となっており、また、公定法が指定する培養法による衛生検査が現実的には実施不可能な施設も多く存在する実態が明らかとなり、これらの小規模施設の状況を勘案した衛生試験法提示の必要性が示された。加えて、これらの小規模施設においては、衛生検査に精通していない作業

者により検査が実施されている実態も明らかとなり、簡易法を含めた標準試験法の導入において、試験方法の整備に加え、その適切な運用方法の提示の重要性が明らかとなった。

乳製造施設における簡易検査法の有用性に関する検討においては、多くの項目で生乳の衛生状況モニタリングにおける簡易法の有用性が確認された一方で、一部の検査においては ISO 法-簡易検査法間ならびに簡易検査法間で結果に差がみられ、施設ごとに生乳の性質を勘案した最適な簡易検査法選択の必要性が示唆された。小規模製造施設において衛生検査に精通していない作業者が検査を実施している現状を踏まえると、小規模施設において簡易検査法を導入する際には専門家による支援を含めた慎重な検討の必要性も示唆される。加えて、低温殺菌牛乳の生菌数検査においては培養法に比較して簡易検査法で低い値が出る傾向がみられた。生菌数検査においては ISO 法と簡易検査法の間で培養条件（ISO 法では 30 で 72 時間、簡易検査法では 32 もしくは 35 で 48 時間）が異なっており、この事が原因で両者の結果に差が出ている可能性が考えられた。我々は培養時間を変更した追加実験において、培養条件の調整により簡易検査法によっては培養法と同等の結果を得る事も可能であることを明らかにしている。以上の結果は、低温殺菌牛乳検査における国際的な動向を踏まえた衛生管理法の導入において、簡易検査法の使用法の提示について慎重な検討の必要性を示すものと考えられる。

市販低温殺菌牛乳等を用いた今年度研究により、LTLT 乳において混釈培養による公定法と簡易培地（32 48 時間培養）での集落形成に有意な差があることが示された。一方、培養時間の長い ISO 法と簡易法（30 72 時間培養）では有意差はみられなかったことから、低温殺菌工程による半致死的な加熱損傷が、簡易培地での集落形成性を低下させ、増殖の遅延を引き起こしている可能性が示唆された。また、両者の寄与率についても、HTST 乳でも同様の傾向が見られた。一方 HTLT 乳は低温殺菌牛乳の中でも殺菌温度が高く、殺菌時間が長いため、牛乳中の残存菌数が LTLT 乳及び HTST 乳よりも低いことから、公定法及び ISO 法と簡易法の間での差が見られなかった。簡易培地は

公定法に比べ、最終判定までの所要日数が短く、細菌数の試験では検出感度も高いことから、食品の微生物試験における有用性は高いと思われるが、製品の特性上、加熱損傷菌が多く含まれ、また、製品中への *Bacillus* 属等の耐熱性菌の残存がおりうる低温殺菌牛乳等に関しては基準適合性試験よりも製造工程管理への使用が適していると思われた。

今回の試験により、市販の低温殺菌牛乳は概ね良好な衛生状態にあることが示された。また、市販製品の細菌汚染状況について簡易培地を用いた検討では、今回実施した全ての機関において、簡易培地における細菌数が混釈培養を用いる公定法よりも低い傾向を示した。原乳を用いた調査では、簡易培地と混釈培養法での細菌数に大きな違いが見られなかったため、加熱殺菌済みの製品に含まれる細菌が加熱損傷を受けているために、簡易培地での集落形成性が落ちている可能性が考えられた。一方、原乳及び製造環境のふき取り検体では混釈培養法と簡易培地に差は見られなかったことから、原乳受入れ時の検査及び製造工程管理への適用は問題ないことが示された。簡易培地は公定法に比べ、最終判定までの所要日数が短いものが多く、食品の微生物試験における有用性は高いと思われるが、簡易培地の適用には、製品の特性に合わせた導入時検証が必要であると思われた。次年度は他種の乳製品を用いた簡易培地の検証を実施する予定である。

E. 結論

殺菌乳に起因する食中毒アウトブレイクの発生件数は世界的に少ないことが確認された。乳に関連して起きている食中毒アウトブレイクは多くが未殺菌乳によるものであることが示唆された。同様に殺菌乳の微生物汚染も多くは発生していないことが確認された。

デンマークでは HACCP にもとづき、乳製造工場における衛生管理が適切に行われており、自社や業界団体、行政機関による指導も効果的に行われていることが確認された。EU 加盟国であることから EU 規則にもとづいた国内基準を設定しているが、さらにそれを上回る自社基準を設定してより安全性を担保している。検査法や検査の頻度に関しても EU 規則を遵守し、

ISO 法や迅速検査法を活用しつつ、その頻度に関しては腸内細菌科菌群の検査が1年に4回という現実的な頻度でそれに対応していることが明らかとなった。

中規模のLTLT/HTST牛乳製造施設では、大規模のUHT牛乳製造施設と同等の製造施設設備を用いていたが、充填工程は前工程との明確な施設区分化がなされておらず、充填機ノズル及び製品からは非病原菌が検出されたことから、同工程環境から製品への細菌混入を招きうる実態が明らかとなった。

小規模低温殺菌牛乳製造施設の調査から、小規模施設内で実施可能な衛生検査が非常に限られたものであり、衛生検査の多くを外部検査機関への受託検査に頼っている現状が明らかになった。

小規模製造施設においては特に、簡易検査法が担う役割の重要性が明らかになった一方で、その運用方法についての問題点も抽出された。加えて、同規模の施設であっても製造工程の差により生物的危害要因混入の危険性が考えられる工程に差がみられたことから、簡易検査法を用いた標準試験法の整備においては、各施設での適切な適用箇所や運用方法の検討を行う必要性も示された

公定法、ISO法及び第三者認証取得済みの簡易培地を用いて、市販の低温殺菌牛乳等を対象とした衛生指標菌調査を行った。供試製品検体の衛生状態は概ね良好であったが、試験法間の成績比較を通じ、簡易培地での集落形成性が公定法よりも低いことが示された。一方、加熱殺菌前の原乳では、簡易培地と公定法の細菌数に大きな差は見られなかったことから、低温殺菌牛乳の製造工程で用いられる低温加熱殺菌では熱損傷菌を生じさせている可能性が示唆された。簡易培地は公定法に比べ、最終判定までの所要日数が短いものが多く、食品及び製造工程の微生物試験における有用性は高いと思われるが、低温殺菌牛乳の最終製品については現状では適用が困難であると思われた。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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）
「国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理及び試験法確立のための研究」
総合分担研究報告書（平成30年度）

乳および乳製品の衛生管理に関する国際動向に関する研究

研究分担者 窪田邦宏 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第二室長
研究協力者 天沼 宏 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第二室
田村 克 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第二室

研究要旨： 現在わが国の乳及び乳製品については、昭和 26 年に発令された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」に基づき、一般生菌数と大腸菌群を微生物規格としている。一方、EU や ICMSF では、HACCP による工程管理を前提として、腸内細菌科菌群や グルクロニダーゼ陽性大腸菌等を用い、サンプリングプランを設定した衛生管理を行っている。国内においても、近年、国際的な整合性を図る観点から、HACCP の義務化に向けた取組みが行われているが、衛生管理を行う上で、衛生指標に用いる微生物の妥当性やその試験法について国際的整合性を考慮する必要がある。本分担研究では、諸外国における乳製品による健康被害実態、食品汚染実態、定められた微生物規格基準とそのサンプリングプラン、試験法の運用実態等に関する情報収集を行った。また、今年度は、EU における製造工程での衛生管理の実態について、デンマークの低温殺菌牛乳工場等を視察し、情報を収集した。

A. 研究目的

現在わが国の乳及び乳製品においては、昭和 26 年に発令された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」に基づき、生菌数と大腸菌群を微生物規格としている。一方、EU（欧州連合）や ICMSF（国際食品微生物規格委員会）では、HACCP による工程管理を前提として、腸内細菌科菌群や グルクロニダーゼ陽性大腸菌等を用い、

サンプリングプランを設定した衛生管理を行っている。国内においても、近年、国際的な整合性を図る観点から、HACCP の義務化に向けた取組みが行われているが、衛生管理を行う上でも、衛生指標に用いる微生物の妥当性やその試験法について国際的整合性を考慮する必要がある。本分担研究では、諸外国における乳製品による健康被害実態、食品汚染実態、定められた微生物規格基準とそのサンプリングプラン、試験法の運用実態等に関する情報収集を目的と

した。また、今年度は、EUにおける製造工程での衛生管理の実態について情報収集を行うことを目的とした。

B. 研究方法

学術論文等や各種データベース等に報告されている、海外および国内における乳に起因する健康被害事例や、製造基準違反等に伴う乳の回収事例に関する情報収集を行った。学術論文はPubMedデータベースにおいて「pasteurized、milk、outbreak」等のキーワードを用いて殺菌乳に関連のある最近のアウトブレイク等の健康被害事例の検索を行なった。製品回収情報データベースとして米国FDAの回収情報データベース(<https://www.fda.gov/safety/recalls/>)、食品汚染データベースとしてEUの「食品および飼料に関する早期警告システム(RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed)」において殺菌乳の回収情報や汚染情報がないかを「pasteurized、UHT、milk」等のキーワードを使用して検索した。さらにデンマークの食品衛生を担当する行政機関、乳製品の指導等を行う業界団体、低温殺菌牛乳工場を視察し、製品・製造施設の衛生実態を調査するとともに、工場の検査担当者やデンマークの行政担当者、研究者等と議論することで、製造基準、関連する検査法、サンプリングプラン、実際の検査の詳細、リスク評価等に関する情報収集を行った。

C. 研究結果

I. PubMed 検索による殺菌乳関連の健康被害事例

PubMed データベースに含まれる学術論文のうち殺菌乳との関連が確認された食中毒アウトブレイク事例報告は 14 件であった。これら 14 件のアウトブレイクは 1937 ~ 2016 年に発生したもので、2000 年以降発生の事例としては 5 件報告されていた。これらは 2015 ~ 2016 年にカナダで発生した殺菌済チョコレートミルク製品によるリステリアアウトブレイク(患者 34 人)、2007 年に米国で発生した乳生産農家での殺菌乳に関連したリステリアアウトブレイク(患者 5 名、大人 3 人死亡、流産 1 人)、2007 年にオーストリアで発生した幼稚園児 40 人が腹痛や嘔吐を呈した黄色ブドウ球菌アウトブレイク、2006 年に米国の刑務所で発生した殺菌乳(更生施設牧場および工場で生産・加工した乳を各刑務所に配布)に起因する大規模カンピロバクターアウトブレイク(患者 1,644 人)、2000 年に米国で発生したサルモネラ(*Salmonella* Typhimurium)アウトブレイク(患者 93 人以上)である。いずれも乳の殺菌作業後に環境等からの汚染が起きている事例であった。殺菌乳の喫飲に起因する食中毒アウトブレイクは 2017 年以降に発生したものは確認できなかった。

近年に乳および乳製品に関連して報告されたアウトブレイク事例のほとんどは未殺菌乳の喫飲に起因するものであった。

II. 米国 FDA 回収情報データベースおよび EU RASFF データベースを用いた殺菌乳の回収・汚染情報の探索

米国 FDA 回収情報データベースには殺菌乳の微生物汚染による回収は報告されていなかった。RASFF データベースは全食品を対象としており、1979～2018年の通知件数は53,928件であったが、殺菌乳（Pasteurized milk もしくは UHT milk）の微生物汚染事例は12件のみであった（2004～2018年、表1）。そのうち、実際に健康被害が報告された事例は2018年11月にスロバキア産殺菌乳に起因してハンガリーとスロバキアでアウトブレイクが発生した1件だけであった。発生してまだ時間が経っていないためと考えられるが、当該事例の調査結果報告等は発見できず、本アウトブレイクの全体像の詳細は不明である。

III. デンマークにおける乳の規格基準およびデンマークの乳・乳製品工場における運用実態

EU 各国における乳の規格基準および乳・乳製品工場における運用実態を把握するため、デンマークの基準および運用実態の調査を行なった。2018年11月26～29日にデンマーク獣医食品局（DVFA）、デンマーク農業食品評議会（DFAC: SEGES）、デンマーク工科大学国立食品研究所（DTU Food）、デンマークで85%のシェアを持ちEU 各国にも工場を持つ乳製造会社の乳・乳製品加工工場を訪問し、各専門家との議論および工場視察を行なった。

1. デンマークにおける殺菌乳に起因する製品回収および健康被害事例について

デンマークの食品安全に関わる複数の専門家や工場の検査担当者との情報交換や議論の結果、乳および乳製品に起因する製品回収情報および健康被害事例は全て未殺菌乳によるものであり、殺菌乳によるものは直近10年では記憶にないとのことであった。これは上述の学術論文・データベース調査の結果とも一致していることから、殺菌乳による食中毒事例はほとんど発生していないと考えられた。

2. デンマークの殺菌乳に関する各種基準等について

デンマークにおける殺菌乳および殺菌乳製品の衛生基準は基本的にEU規則に沿ったものであり、腸内細菌科菌群について $n=5$, $c=0$, $m<10\text{cfu/ml}$, $M<10\text{cfu/ml}$ としている（資料1、項目2.2.1）。

デンマーク農業食品評議会は同会発行しているガイドンス（Danish Dairy Sector Guide、2018年に更新）で乳および乳製品に関してリスクが大きいものを記述しており、乳に関してはセレウス菌やカンピロバクターを指定して指導している（資料2）。

実際の検査法等に関してはEUの基準をもとに、各社が自主基準を設け、DVFAやDFACといった指導機関や業界団体等がHACCPプランをはじめとする指導や定期的な監査を行うことで問題を検知し改善するシステムとなっている（資料3）。

原乳の出荷時の検査は出荷元の各農場が責任を負っており、原乳受け入れ時の検査、乳製品の出荷時の検査等は製造業者がより厳しい基準に従っている（資料4）。

原乳はデンマークの国内基準では2日毎に乳生産農家から収集する場合には6以下での保存、毎日収集する場合には8以下での保存が求められているが、デンマークの乳製品業界の自主基準ではそれぞれさらに2以下、2日毎に乳生産農家から収集する場合には4以下での保存、毎日収集する場合には6以下での保存という温度管理を行なっている。原乳受け入れ時には性状（官能検査）と温度（10以下）を確認し、受領後6以下での保存を行なっている。最終製品の官能検査は製造直後および製品の賞味期限日（Best before date）に行なっている。乳製品業界では殺菌前の総菌数（Cell count）が300,000cfu/g以下となるよう管理している（資料4）。各種検査にはMoving Windowを用いた継続した検査を行なっている。乳製品業界で一般的に推奨される検査法は基本的にISO法に従っている（資料5）。各社ではさらに迅速検査法等も用いて、より厳しい基準の検査を行なっている。

牛乳の殺菌条件に関してはデンマークの規格基準では72 15秒であるが、視察した会社では74 15秒の自社基準で行なっていた。

これらの検査の実態把握や操業開始時のHACCPプランを始めとする衛生管理指導を担当しているDFAC (SEGES)は、操業開始時とその後3年に1度、衛生管理等に問題がないかの検査を行なっている。3年が来る前に衛生基準が満たされていないことが判明した場合にはそれより前に検査を行うとしている。

3. デンマークの乳製品工場における運

用実態について

工場を視察した乳製品製造会社はデンマークの乳・乳製品の約85%のシェアを持っており、スーパーマーケット等でも製品をよく見かける。また他社ブランドの生産も請け負っているため、他社ブランドの製品と誤っていても当該会社の工場で製造されたものである場合が多い。当該会社は現在デンマーク国内に3カ所の大規模な乳製造施設を所有しており、今回視察を行なった施設は其中最も大きい1887年に開業した工場である。

乳製造工場部分は2004年に施設が更新されており、建物等は古い部分があるものの設備は新しいものであった。乳および乳製品の年間出荷量は約1億3千万リットルで、乳加工部門の従業員数は40人であった。当工場にはユトランド半島全域の120農家から原乳が出荷されており、原乳収集を行う120人のトラック運転手が工場への受け入れ前の官能検査も担当している。さらに受け入れ後には工場の検査員が再度各種検査を行なっている。原乳受け入れは夕方から夜に行い、夜中に操業し、早朝に出荷して朝7時頃には製品が店舗に並ぶことで「農家から原乳を収集してから24時間以内に消費者の元へ」というコンセプトのブランドで多くの乳製品の製造を行なっている。

牛乳の殺菌条件はデンマーク規格基準では72 15秒であるが、視察を行なった会社では自社基準である74 15秒で行なっている。加熱殺菌部（機材）の消毒は90 45分で行い、加熱できない容器充填部の機材は塩素により行なっているとのことであ

る。消毒が効果的に行われたことの確認（バリデーション）は、次回生産初期ロットの製品検査により行なっているとのことである。また、製品の加速試験も行なっており、17 24 時間負荷後の 21 培養生菌数、17 24 時間負荷後の大腸菌数等を計測している。また検査法として ISO 法とそれに準じる自社手法に加え、迅速検査法も用いて行なっている。

上述した EU 規則で実施が要求されている低温殺菌乳の衛生基準（腸内細菌科菌群について $n=5$, $c=0$, $m<10\text{cfu/ml}$, $M<10\text{cfu/ml}$ 、資料 1、項目 2.2.1）にもとづく乳の最終製品における腸内細菌科菌群の検査は 1 年に 4 回おこなっており、検査は製品の賞味期限日（Best before date）に行なっている。また毎日生産直後の製品と賞味期限日の製品から無作為サンプリング検査も行なっている。さらに顧客から依頼があれば追加の微生物検査を行うこともあるとのことであった。

D. 考察

諸外国における殺菌乳の健康被害事例に関して近年の発生報告が少ないことは、殺菌乳の製造における HACCP プランや殺菌法や検査法、施設の衛生管理が効果をあげていることを示唆している。報告されている殺菌乳のアウトブレイク事例は殺菌後の汚染がほとんどで、工場の設備環境が大きく影響しているか、加熱工程での設備トラブル等が疑われる事例であった。一方で未殺菌乳の喫飲に起因するアウトブレイク事例は、各国で数多く報告されている。米国や EU の回収汚染情報データベースに殺菌

乳の微生物汚染に関連した情報がほとんど報告されていないことから、各国において殺菌乳の製造工程は適切に管理されていると示唆される。

規格基準に関しては、デンマークの国内基準は EU 規則に沿って設定されている。また微生物検査や温度管理等は各社でデンマーク国内基準より厳しい基準を自主的に設定して衛生管理を行なっている。長いこと殺菌乳に起因するアウトブレイクや製品回収の記憶はないと行政関係者、業界関係者、研究者、工場の検査員のすべてが答えることから、デンマークの乳に関連する各種衛生対策は効果的であると考えられる。

視察したデンマークの乳・乳製品製造工場では、EU 規則で要求される乳の最終製品における腸内細菌科菌群の検査は 1 年に 4 回で、製品の賞味期限日に行なっている。これが他の EU 諸国においても一般的なのか、また衛生対策等が同様のものであるかの検討が必要であり、次年度以降の課題である。

E. 結論

殺菌乳に起因する食中毒アウトブレイクの発生件数は世界的に少ないことが確認された。乳に関連して起きている食中毒アウトブレイクは多くが未殺菌乳によるものであることが示唆された。同様に殺菌乳の微生物汚染も多くは発生していないことが確認された。

デンマークでは HACCP にもとづき、乳製造工場における衛生管理が適切に行われており、自社や業界団体、行政機関による指導も効果的に行われていることが確認さ

れた。EU 加盟国であることから EU 規則にもとづいた国内基準を設定しているが、さらにそれを上回る自社基準を設定してより安全性を担保している。検査法や検査の頻度に関しても EU 規則を遵守し、ISO 法や迅速検査法を活用しつつ、その頻度に関しては腸内細菌科菌群の検査が1年に4回という現実的な頻度でそれに対応している。

今年度はデンマークにおける乳の衛生管理が研究目的の一部であったが、他の EU 加盟国での対応についても EU 規則の適用に違いがないかを検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 : RASFF に登録された殺菌乳の微生物汚染に関連した通知 (12 件、1979 ~ 2018 年)

product category	date	reference	product type	notification type	notification basis	notified by	countries concerned	subject	action taken	distribution status	risk decision
milk and milk products	26/11/2018	2018.3416	food	information for follow-up	food poisoning	Hungary	Hungary (D), Slovakia (O)	microbiological contamination ($1,2 \times 10^7$; $1,8 \times 10^7$; $>3 \times 10^7$ CFU/ml) of UHT milk from Slovakia	withdrawal from the market	distribution restricted to notifying country	serious
milk and milk products	20/10/2017	2017.1712	food	information for attention	official control on the market	Croatia	Bosnia and Herzegovina (O), Croatia (D)	Clostridium (1 CFU/ml) in UHT milk from Bosnia and Herzegovina	recall from consumers	distribution restricted to notifying country	undecided
milk and milk products	03/08/2017	2017.1152	food	alert	consumer complaint	France	Belgium (D), Cameroon (D), France (D/O), Luxembourg (D)	UHT semi-skimmed milk from France infested with moulds	recall from consumers	distribution to other member countries	undecided
milk and milk products	16/02/2017	2017.0204	food	information for attention	company's own check	Germany	Germany (D/O)	Bacillus cereus ($1,3 \times 10^3$ CFU/ml) and Bacillus cereus diarrheal enterotoxin (NHE) in UHT whole milk from Germany	public warning – press release	distribution restricted to notifying country	serious
milk and milk products	07/06/2013	2013.0797	food	information for follow-up	official control on the market	Italy	Hungary (O), Italy (D)	high count of Enterobacteriaceae (100 CFU/ml) in pasteurized milk from Hungary		no distribution from notifying country	not serious
milk and milk products	01/04/2011	2011.0439	food	information for follow-up	company's own check	Germany	Commission Services, Germany (D/O), Netherlands (D)	high aerobic plate count for UHT milk from Germany	withdrawal from the market	distribution to other member countries	undecided
milk and milk products	04/07/2007	2007.BQU	food	upgraded	border control – consignment released	Greece	Bulgaria (D), Greece, Republic of North Macedonia (O)	aerobic plate count (166×10^4 /ml) too high for pasteurized milk from the Former Yugoslav Republic of Macedonia		no distribution	undecided
milk and milk products	12/07/2007	2007.0469	food	alert	border control – consignment released	Greece	Bulgaria (D), Greece, Republic of North Macedonia (O)	aerobic plate count (166×10^4 /ml) too high for pasteurized milk from the Former Yugoslav Republic of Macedonia	destination of the product identified	distribution on the market (possible)	undecided
milk and milk products	03/10/2006	2006.0677	food	alert	consumer complaint	United Kingdom	Belgium (O), United Kingdom	Bacillus cereus ($> 3 \times 10^3$ CFU/ml) in UHT semi-skimmed milk from Belgium	product recall or withdrawal	distribution on the market (possible)	undecided
milk and milk products	22/09/2005	2005.665	Food	alert	company's own check	United Kingdom	Belgium (O), United Kingdom	Bacillus cereus (up to 3×10^4 CFU/ml) in UHT semi-skimmed milk from Belgium	product recall or withdrawal	distribution on the market (possible)	undecided
milk and milk products	18/05/2005	2005.BJE	Food	information	official control on the market	Italy	France (O), Italy (D)	too high count of aerobic mesophiles (3.800.000 CFU/ml) in pasteurized milk in tank from France	physical treatment – heat treatment	distribution restricted to notifying country	undecided
milk and milk products	24/09/2004	2004.473	Food	alert	official control on the market	Italy	France (O), Italy (D)	too high count of aerobic mesophiles (1800000 CFU/g) in pasteurized milk in container	no action taken	distribution on the market (possible)	undecided

資料 1 : EU の殺菌乳および乳製品に対する微生物基準 (2.2.1 部分、EU 規則 2073/2005 より)

▼ M1

2.2 Milk and dairy products

Food category	Micro-organisms	Sampling plan (1)		Limits (2)		Analytical reference method (3)	Stage where the criterion applies	Action in case of unsatisfactory results
		n	c	m	M			
▼ M2 2.2.1 Pasteurised milk and other pasteurised liquid dairy products (4)	Enterobacteriaceae	5	0	10 cfu/ml		ISO 21528-2	End of the manufacturing process	Check on the efficiency of heat-treatment and prevention of recontamination as well as the quality of raw materials
▼ M1 2.2.2 Cheeses made from milk or whey that has undergone heat treatment	<i>E. coli</i> (5)	5	2	100 cfu/g	1 000 cfu/g	ISO 16649-1 or 2	At the time during the manufacturing process when the <i>E. coli</i> count is expected to be highest (6)	Improvements in production hygiene and selection of raw materials
2.2.3 Cheeses made from raw milk	Coagulase-positive staphylococci	5	2	10 ⁴ cfu/g	10 ⁵ cfu/g	EN/ISO 6888-2	At the time during the manufacturing process when the number of staphylococci is expected to be highest	Improvements in production hygiene and selection of raw materials. If values > 10 ⁵ cfu/g are detected, the cheese batch has to be tested for staphylococcal enterotoxins.
2.2.4 Cheeses made from milk that has undergone a lower heat treatment than pasteurisation (7) and ripened cheeses made from milk or whey that has undergone pasteurisation or a stronger heat treatment (7)	Coagulase-positive staphylococci	5	2	100 cfu/g	1 000 cfu/g	EN/ISO 6888-1 or 2		
2.2.5 Unripened soft cheeses (fresh cheeses) made from milk or whey that has undergone pasteurisation or a stronger heat treatment (7)	Coagulase-positive staphylococci	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	EN/ISO 6888-1 or 2	End of the manufacturing process	Improvements in production hygiene. If values > 10 ⁵ cfu/g are detected, the cheese batch has to be tested for staphylococcal enterotoxins.

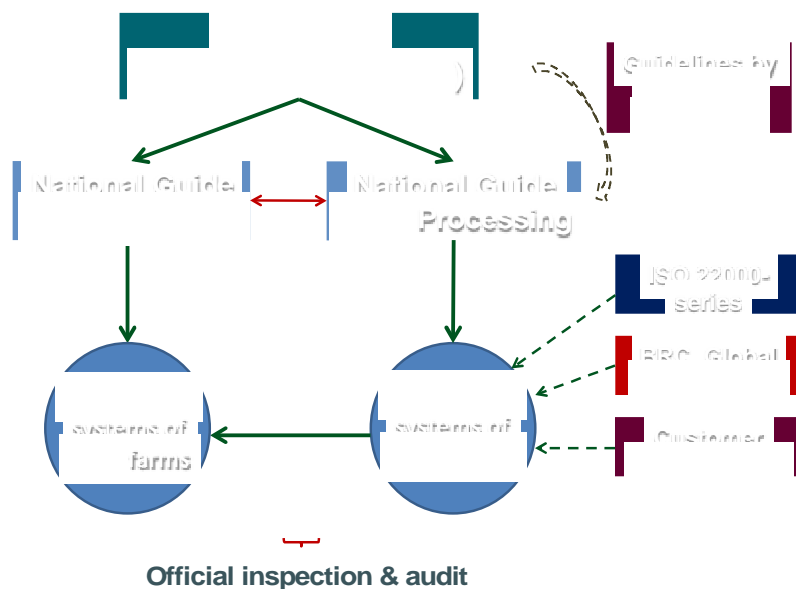
資料 2 : 乳および乳製品関連の重要なハザード (デンマーク乳業業界ガイドより)

Overview of significant hazards – Danish Dairy Sector Guide

Product type	Non-fermented liquid milks	Fermented milks, etc.	Butter & yellow fat blends ≥80% fat	Butter & yellow fat blends <80% fat	Cottage cheese and smoked fresh cheese	Cream cheese, etc.	Mozzarella & pizzalopping	Yellow cheese, etc.	Soft white moulded cheese	Blue-veined cheese	White cheese in brine	Processed cheese	Milk powder	Infant formula
Source	Antibiotics				VTEC L. monocytogenes Salmonella S. aureus				F&M disease virus					
Raw milk	B. cereus Campylobacter spp.											B. cereus	B. cereus	B. cereus Cronobacter
Cheese as raw material												Metal fragments Hard plastic VTEC L. monocytogenes Salmonella S. aureus Undesired mould Cheese mites		
Cheese coating												Natamycin		
Dry ingredients (e.g. spices, gelatine, lecithine, starch)	B. cereus Salmonella C. perfringens	B. cereus Salmonella C. perfringens	B. cereus Salmonella C. perfringens		B. cereus Salmonella C. perfringens Benzoates	B. cereus Salmonella C. perfringens Benzoates Preservatives	B. cereus Salmonella C. perfringens Benzoates Preservatives	B. cereus Salmonella C. perfringens Benzoates Preservatives	B. cereus Salmonella C. perfringens Benzoates		B. cereus Salmonella C. perfringens Benzoates	B. cereus Cl. Perfringens Salmonella Benzoates Preservatives	B. cereus Cronobacter Salmonella	B. cereus Cl. Perfringens Cronobacter Salmonella Benzoates
Wet Ingredients	L. monocytogenes	L. monocytogenes	L. monocytogenes		L. monocytogenes			L. monocytogenes	L. monocytogenes		L. monocytogenes	L. monocytogenes	L. monocytogenes	L. monocytogenes
Egg products	Salmonella Benzoates	Salmonella Benzoates										Salmonella		Salmonella
Raw mushrooms						Phenylhydrazines						Phenylhydrazines		
Not boiled, frozen fruits and vegetables originating from non-scandinavian countries		Norovirus and hepatitis A			Norovirus og hepatitis A	Norovirus og hepatitis A			Norovirus og hepatitis A			Norovirus og hepatitis A		
Products of fruit and berry	Mould	Mould			Mould	Mould						Mould		
Smoke					PAH Dioxin	PAH Dioxin		PAH Dioxin	PAH Dioxin					
Packaging material											Foreign matter			

資料3：デンマークの乳製品関連の衛生管理システム

FOOD SAFETY FRAMEWORK



資料4：デンマークの乳の検査基準(国の法定要求水準と一般的な乳製造会社の自社基準)

Parameter	Legal requirement		Typical dairy company	
	Criteria	Frequency	Criteria*	Frequency
TPC	<100 000 cfu/g (log mean - 2 months)	Every 2 weeks	Target: 60,000 (log mean - 1 month) (Bonus & penalty below/above 60,000)	3-5 per month
Cell count	<400 000 cfu/g (log mean - 3 months)	Every 4 week	Target: 300,000 (log mean - 1 month) (Bonus & penalty below/above 300,000)	Every collection (Bonus & penalty below/above 300,000)
Antibiotics	<MRLs	Every 4 weeks	Not detectable	5 per months (increasing penalties: 1: +125% 2: +150% + 400 € 3: +200 + 400 € + visit)
Urea	Not required		Company specific	Every collection
Freezing point	Not required		- 0,515 °C to - 0,545 °C.	Every collection
Sensoric	Normal		No remarks	Every truck load
Anaerobic spores	Not required		Company specific	Company specific

資料5：デンマークの乳製品製造業界で一般的に使用されている検査法や基準等の例

<i>Microorganism</i>	<i>Reference method</i>	<i>Other validated methods</i>
Sampling of surfaces	ISO 18593 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs	
Preparation of microbiological samples	<p>ISO 6887 - Microbiology of the food chain -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination</p> <p>Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions</p> <p>Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products</p> <p>Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products</p> <p>Part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage</p>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO/CEN-standard 11290 ¹	

¹ Testing against the criterion "100 cfu/g" ISO 11290-2 is applied and 1 ml incubate is spread on one petri dish (140 mm in diameter) or on 3 petri dishes (90 mm in diameter). As regards tests against the "none in 25g"- criterion, ISO 11290-1 is applied.

Microorganism	Reference method	Other validated methods
<i>Salmonella</i>	<p>ISO/CEN standard 6579-1 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1: Horizontal method for the detection of Salmonella spp.</p>	<p>ISO 6785/IDF 93 - Milk and milk products - Detection of Salmonella spp</p>
<i>Cronobacter spp.</i> (former <i>Enterobacter sakazakii</i>)	<p>ISO/TS standard 22964</p>	
<i>S. aureus</i> enterotoxin	<p>European screening method for the detection of staphylococcal enterotoxins in milk and milk products</p>	<p><i>Hennekinne et al. ,2003</i></p>
Coagulase positive staphylococci (<i>S. aureus</i>)	<p>ISO 6888 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (<i>Staphylococcus aureus</i> and other species)</p> <ul style="list-style-type: none"> • ISO 6888-1 - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium • ISO 6888-2 - Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium 	<p>ISO 8870/IDF 83 - Milk and milk-based products - Detection of thermonuclease produced by coagulase-positive staphylococci</p>

Microorganism	Reference method	Other validated methods
	Raw milk cheese, however, 6888-2	
<i>E. coli</i>	<p>ISO 16649 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive <i>Escherichia coli</i>.</p> <ul style="list-style-type: none"> • ISO 16649-1 - Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide • ISO 16649-2 - Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide 	<p>ISO 11866 IDF 170 - Milk and milk products - Enumeration of presumptive <i>Escherichia coli</i>.</p> <ul style="list-style-type: none"> • ISO 11866-1 IDF 170 - Part 1: Most probable number technique using 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide (MUG) • ISO 11866-2 IDF 170 - Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes • RAPID'E.coli 2 • 3M™ Petrifilm™ <i>E. coli</i>/Coliform Count Plate
<i>VTEC</i>		<p>ISO 13136 - Microbiology of food and animal feed - Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups</p>
<i>Enterobacteriaceae</i>	<p>ISO 21528 - Microbiology of the food chain - Horizontal methods for the detection and enumeration of <i>Enterobacteriaceae</i>.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dried infant formulae and dried dietary foods for special 	<p>Petrefilm: 3M product instruction 34-8704-9515-6 (2010)</p>

Microorganism	Reference method	Other validated methods
	<p>medical purposes intended for infants below six months of age as well as pasteurized liquid milk products: ISO 21528-1 - Part 1: Detection of Enterobacteriaceae is to be applied</p> <ul style="list-style-type: none"> • Milk powders and whey powders, ice cream and frozen deserts: ISO 21528-2 - Part 2: Colony-count method is to be applied 	
(Presumptive) <i>Bacillus cereus</i>	<p>ISO 7932 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive <i>Bacillus cereus</i> - Colony-count technique at 30 degrees C, plated on a Petri dish of 140 mm diameter or on three Petri dishes of 90 mm diameter</p>	
Total plate count	<p>ISO 4833 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms</p> <ul style="list-style-type: none"> • ISO 4833-1 - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique • ISO 4833-2 - Part 2: Colony count at 30 degrees C by the surface plating technique 	<p>Petrefilm: 3M product instruction 38-9018-7128-5 (2007)</p>
Coliforms	<p>ISO 4832:2006 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -</p>	<p>ISO 4832 - Microbiology of food and</p>

<i>Microorganism</i>	<i>Reference method</i>	<i>Other validated methods</i>
	Horizontal method for the enumeration of coliforms - Colony-count technique	animal feedingstuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique ISO 4831 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms -- Most probable number technique RAPID'E.coli 2 3M™ Petrifilm™ E. coli/Coliform Count Plate3M product instruction 34-8705-6227-8 (2011)
Yeasts and mould	ISO 6611/IDF 94 - Milk and milk products - Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds - Colony-count technique at 25 degrees C	3M product instruction 38-9017-8602-0 (2010)
Psychotropic plate count	ISO 8552/IDF 132 - Milk - Estimation of psychotropic microorganisms - Colony-count technique at 21 degrees C (Rapid method)	Petrifilm: 3M product instruction 38-9018-7128-5 (2007)
Total plate count in water (22° and 36°C)	ISO 6222 - Water quality - Enumeration of culturable micro-organisms - Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium at 22°C and 36°C	Petrifilm: 3M product instruction 2010-11

平成 30 年度厚生労働科学研究（食品の安全確保推進研究事業）
「国際動向を踏まえた乳および乳製品の試験法確立に関する研究」

分担研究課題

「国内製品・製造施設の衛生実態に関する研究」

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	中山 達哉	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
研究協力者	山本 詩織	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	阿部 清孝	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部

研究要旨 国内で製造される牛乳の多くは大手事業者により超高温瞬間殺菌（UHT）処理がなされているが、中小規模事業者では高温短時間殺菌（HTST）または低温長時間殺菌（LTLT）処理を経た牛乳も製造されている。欧米等で製造される加熱殺菌牛乳の多くは後者に該当するため、国内外での牛乳製品の微生物学的品質を主たる流通製品の比較により行える状況にはない。日欧 EPA 交渉では乳製品も対象とされる等、今後の国際貿易の拡大を見据えた現状においては、国際動向を踏まえた形で、わが国の牛乳等の品質を評価し、一層の安全確保に向けた衛生管理策を講じることが必要な状況にある。本年度の分担研究では、国内で HTST 及び LTLT 牛乳を製造する中規模製造施設 A、並びに UHT 牛乳を製造する大規模施設 B の協力を得て、各製品の製造工程実態について衛生試験を通じた検討を行い把握することとした。施設 A の製造機器等は施設 B と大きな差異は認められなかったものの、(1)原乳の搾乳から受入、受入から製造開始までの時間が極めて短いこと、(2)生産農場の衛生状況を踏まえ、HTST/LTLT 牛乳への用途を区別化していること、(3)ホモゲナイズ処理がなされていないこと、(4)施設環境の区分化が十分とはいえないこと等が差異のある項目として抽出された。施設 A の原乳については、上記(1)の特徴と相関して、一般細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌の最大値はそれぞれ 2.8×10^3 CFU/mL、 3.3×10^1 CFU/mL、 5.1×10^1 CFU/mL、2 CFU/mL と、施設 B に比べて低い傾向にあった。施設 A の製品では、一般細菌のみ最大 1.3×10^2 CFU/mL の検出を認めるに留まり、事業者の自主検査結果とあわせ、乳等省令で定められる成分規格を十分に満たすことが確認された。一方、充填機内外のふき取り検体のうち、充填機ノズルからは最大で 9 CFU の *Bradyrhizobium* 属菌が検出され、同属菌は製品からも検出されたことから、加熱殺菌後の同工程周辺機器等の洗浄消毒を徹底し、その後検証を行うことが、当該施設における今後の衛生向上に資する改善措置事項として抽出された。

A. 研究目的

国内の牛乳については、「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（乳等省令）」によりいくつかの分類がなされており、このうち、「牛乳」については、生乳（牛から搾ったままの乳）を 63 ・ 30 分以上の加熱殺菌を施したものであって、乳脂肪分 3.0% 以上、

無脂乳固形分 8.0% 以上を含み、かつ 1ml あたりの細菌数が 5 万以下、大腸菌群が陰性であること等が成分規格として定められている。厚生労働省が取り纏める食中毒統計資料によると、2009 年 1 月から 2019 年 3 月末日までの期間に届け出がなされた食中毒事例のうち、牛乳を原因とするものは

僅か 1 件であり、当該事例についても未殺菌牛乳を提供することでカンピロバクター食中毒が発生したものであり、上述の乳等省令で定められる加熱殺菌を経て製造された牛乳を原因とする事例の報告は認められていない。

国内で製造される牛乳の多くは 130 ・ 2 秒程度の超高温瞬間殺菌 (UHT) 処理によるものであり、国内生産量の約 91.5% を占める一方、欧米では主に製造される 63 ~ 65 ・ 30 分間の低温長時間殺菌 (LTLT) 牛乳や 72 ~ 75 ・ 15 秒間の高温短時間殺菌 (HTST) 牛乳は約 8.5% に留まるとの報告もある。

こうした牛乳の製造加工に係る国内の事業所数は平成 28 年時点で全国に 524 施設あり、このうち、368 施設では飲用牛乳を主に製造するとされている。UHT 牛乳の製造加工の多くは大手事業者による一方、LTLT 牛乳や HTST 牛乳の多くは一日あたりの処理量が 2 トン未満の中小規模事業者によるとされる。

欧米等では牛乳による食品媒介性感染症の発生も散見されるが、それらの多くは、未殺菌牛乳を主体とする、UHT 牛乳以外の牛乳製品であり、国内外の牛乳製品の微生物学的品質を単純に主たる流通製品の比較により行える状況にはない。一方で、国内においても中小事業者を中心として HTST 牛乳や LTLT 牛乳が製造されている実態があるものの、これらの UHT 牛乳以外の牛乳について、製造工程における衛生管理実態等について調査研究が行われた実態は見当たらない状況であった。

上記の背景を踏まえ、本年度の分担研究では、HTST 牛乳、LTLT 牛乳または UHT

牛乳を製造する国内乳製造施設の協力を得て、上記製品の製造工程情報を整理した上で、衛生試験を通じた衛生管理実態を検討し、衛生管理に重要となる項目及び危害要因について考察することで、乳の微生物規格の在り方を含めて取り纏めることを目的とした。

B. 研究方法

1. 協力施設での牛乳製造に係る情報収集

LTLT 牛乳および HTST 牛乳を製造する中規模事業施設 A (以下、施設 A) 並びに UHT 牛乳を製造する大手事業施設 B (以下、施設 B) の研究協力を得て、各施設での対象製品の製造工程フロー図、並びに牛乳製造量、製品仕様書等の情報提供を依頼し、承諾を得た。

2. 採材

施設 A では、原乳、最終製品のほか、拭き取り検体 (充填機内外のマンドレル、充填ノズル、マガジンラック、充填部、及び充填機周辺の床・壁、加熱殺菌機周辺の床・壁) を 3M Hydrated sponge (スリーエム) を用いて採材した。全ての採材検体は 4 時間以内に冷蔵温度帯で輸送し、検査に供した。

施設 B では原乳、殺菌前乳、殺菌後乳、殺菌後貯乳、最終製品、並びに拭き取り検体 (加熱殺菌機出口、充填機周辺の床および昇降台、冷却プレート出口) を採材した。ふき取り検体については冷蔵温度帯で輸送し、3 時間以内に試験に供した。なお、施設 B の原乳、殺菌前後乳、最終製品については同一ロットのものとするため、施設担当者により採材を行い、ロットの確認後に

冷蔵温度帯で一日夜かけて輸送された。

3. 衛生指標菌定量試験

衛生指標菌の検出にあたっては、国際標準試験法である ISO 法（細菌数、ISO 4833-1：2013；腸内細菌科菌群、ISO 21528-2：2004；大腸菌群、ISO 4832:2006；大腸菌、ISO 16649-2:2001；黄色ブドウ球菌、ISO 6888-1:1999）と共に、第三者認証機関により ISO 法との同等性が確認されている迅速簡易検査製品のうち、国内でも入手が容易である、製品 A（一般生菌、大腸菌・大腸菌群、腸内細菌科菌群、黄色ブドウ球菌）、製品 B（一般生菌、大腸菌・大腸菌群、腸内細菌科菌群、黄色ブドウ球菌）、製品 C（一般生菌、大腸菌・大腸菌群、黄色ブドウ球菌）を用いた。なお、原乳及び牛乳製品の試験にあたっては、原液を試験原液として、必要に応じて希釈列を作成し、試験に供した。

拭き取り検体は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水中を用いて試験懸濁原液を調整した。同原液 1 mL を平板各培地に接種し、ISO 文書または簡易迅速培地製造者が発行する指示書等に準じて、培養を行った（図 7）。

4. 細菌叢解析

施設 A の検体は 1 mL を採取し、PBS で 2 回洗浄後、MaxWell RSC DNA Blood kit（プロメガ）を用いて DNA 抽出を行った。施設 B の検体は 10mL を採取し、PBS により 2 回洗浄後、Ethidium monoazide を主成分とする Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative)（タカラバイオ）を用いた後、DNA 抽出を行った。

抽出 DNA を鋳型として、16S rRNA

799f-1179r オリゴヌクレオチドプライマーを用いた PCR 反応を行い、E-gel SizeSelect 2%（Thermo Fisher）および AMPure XP（Beckman）を用いて増幅産物を精製・定量後、等量混合ライブラリーを作成し、Ion Chef / Ion PGM システム（Thermo Fisher）により増幅産物の塩基配列データを取得した。取得データは CLC Genomic Workbench v.11（キアゲン-CLC）を用いて不要配列を除去後、RDP Classifier pipeline へ投入し、階層化分類等を行った。

C. 研究結果

1. 施設 A・B での牛乳製造に係る情報の整理（図 1,2）

聞き取り調査を通じ、施設 A での年間製造量は 2017 年度実績で LTLT 乳が約 2,150t、HTST 乳が 1,990t との情報を得た。原乳輸送には容量 10t のローリー車 2 台を用い、搾乳後概ね 1 時間以内に集乳し 5 以下で施設 A まで輸送されていた。また、原乳の品質に基づき農場単位で LTLT 乳または HTST 乳のいずれの原料として用いるかを決定しており、そのために原乳検査に法令で定められる内容に上乘せをした自主検査を行い、記録を経時的に保存していた。

なお、視察及びサンプリングを行う際に対象とした製品は 72・15 秒加熱殺菌をした HTST 牛乳及び 63・30 分加熱殺菌をした LTLT 牛乳であった。何れも 1 L 容量の紙パック製品であり、加熱殺菌についてはプレート方式の連続式加熱殺菌器を用いていた。工程フローは、図 1 及び 2 に示す通りである。

一方、施設 B は 90 年代初頭に HACCP 体制を確立しており、ISO22000 等も取得し

ていた。同施設では日平均約 121t の原乳を近郊の農場を中心に全国から 3 以下の輸送温度条件を付して受け入れ、複数種の UHT 牛乳製品を製造していた。施設内には 100t のジャイロタンクを 8 台設置・運用し、同タンク内で受け入れた原乳を計画的に合乳としていた。現有の受入検査項目は乳等省令に定められた内容であり、総菌数はブリード法で 4 万/mL との自主管理規定を設けていた。また、同日に連続製造される単一製品を 1 ロットと定義していた。

約 1 日の一次貯乳の後、クラリファイヤー、ホモゲナイザーを経た原乳は 130・2 秒の加熱殺菌処理に供され、殺菌後貯乳タンク内で一時的に 5 以下の温度条件で貯乳されていた。充填室は HEPA フィルターを付した陽圧管理・自然排気環境にあり、充填機内では H₂O₂ 噴霧と UV 照射により殺菌された容器へ自動充填されていた。これらの製造ラインの管理要件は何れも衛生管理計画が立てられた上で、中央監視システムにより自動制御されていた。

2. 施設 A における原乳、製品、及び施設ふき取り検体からの衛生指標菌の検出状況(図 3~5、表 1)

原乳中の一般細菌数は ISO 法では 1.2×10^3 ~ 2.8×10^3 CFU/mL であり、簡易迅速法では A が 1.6×10^3 ~ 4.3×10^3 CFU/mL、製品 B が 1.1×10^3 ~ 1.4×10^3 CFU/mL、製品 C が 8.6×10^2 ~ 2.3×10^3 CFU/mL であった。同検体での腸内細菌科菌群、大腸菌群の数は ISO 法でそれぞれ 9~33CFU/mL、24~51CFU/mL の範囲にあり、簡易迅速法の成績もこれに準ずるものであった。大腸菌は 3/8 (37.5%) の確率で認められたが、同値

は最大 2CFU/mL に留まっていた。黄色ブドウ球菌は 15~101CFU/mL の範囲で検出された(図 3)。

出荷前製品については、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌はいずれも陰性であり、一般細菌のみ $< 1.3 \times 10^2$ CFU/mL (平均値は HTST 製品で 1.2×10^2 CFU/mL, LTLT 製品で 2.5×10^1 CFU/mL) の範囲で検出された。一方、簡易迅速法による一般生菌数の検出数値は検出用製品の別によらず、ISO 法による成績に比べ、低い成績を示した(図 4)。

拭き取り検体のうち、充填機周辺の壁、殺菌機周辺の床・壁、充填機内部(充填部、マンドレル、マガジンラック)は製品 C のマガジンラックを除き、一般細菌は検出されなかった。一方、充填ノズルからは、方法に拠らず一般細菌を認めた。腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌はいずれも陰性であった(図 5、表 1)。

3. 施設 B における原乳、製品、及び施設ふき取り検体からの衛生指標菌の検出状況

原乳及び製品検体については、視察時に同一ロット検体の確保が困難であったため、施設事業者により、後日異なる工程で同一ロット検体を採材いただき、冷蔵温度帯で 1 昼夜かけて輸送されたものを検体として衛生試験に供した。結果として、受入時の原乳及び殺菌前バランスタンク原乳検体については、一般細菌数が 3.3×10^6 ~ 2.0×10^7 CFU/mL、腸内細菌科菌群が 4.4×10^1 ~ 1.2×10^3 CFU/mL、大腸菌群が 1.9×10^2 ~ 1.6×10^3 CFU/mL、大腸菌が 3.0×10^1 ~ 1.2×10^2 CFU/mL、黄色ブドウ球菌が 1.9×10^3 ~ 4.1×10^3 CFU/mL の範囲で検出

された。殺菌後貯乳及び製品については全ての指標菌が陰性の結果となった。

施設環境拭き取り箇所としては、洗浄後の加熱殺菌器出口、冷却プレート出口のほか、稼働中の充填室内で充填機周囲の外部床と昇降台を検体とした。結果として、洗浄後の加熱殺菌器出口、冷却プレート出口、及び充填室内の昇降台については全ての指標菌が陰性となり、充填室の床についても、一般細菌のみが 40CFU /100cm² 検出されるに留まった。

4. 製造工程を通じた構成菌叢の比較解析 (図6)

施設 A では生菌・死菌の別を問わず、各検体由来 DNA を鋳型として 16S rRNA 解析に供した。HTST 牛乳の原料である原乳 S6 は、LTLT 牛乳原料である原乳 S5 に比べ、*Pseudomonas* 属の占有率が相対的に高い状況にあった。

製造施設環境からは、*Bradyrhizobium* 属、*Sphingomonas* 属、*Brevundimonas* 属、*Tumebacillus* 属、*Methylobacterium* 属等が優勢菌群として検出された。

HTST 牛乳製品検体では *Serratia* 属や *Pseudomonas* 属、*Streptococcus* 属等が優勢構成菌叢として認められた一方、LTLT 牛乳製品検体では、施設環境でも高い占有率をもって認められた *Bradyrhizobium* 属や *Sphingomonas* 属、*Tumebacillus* 属等が優勢構成菌叢として認められた。

施設 B 由来検体については、生菌由来 16S rRNA 配列を選択的に対象とするため、EMA 処理後に DNA 抽出を行い、16S rRNA 解析に供した。結果として、多くの一般細菌数を認めた原乳・殺菌前貯乳検体では、

Pseudomonas 属等の低温細菌が優勢である状況が確認された。

D. 考察

本研究では、中規模の施設 A 及び大規模の施設 B を対象とした衛生管理実態の調査を微生物学的観点から実施した。両施設は自主管理基準を設け、衛生確保に向けた管理体制を構築・運用していた。特に、施設 A では原乳受け入れ時に大腸菌群検査も実施し、検査結果を基に、良好な衛生状況の原乳を提供する生産農場を差別化し、加熱殺菌工程により、無菌化を図ることが困難である LTLT 牛乳の原料として用いる等、フードチェーンを通じた安全確保に向けた活動方針を立てていたことは興味深い対策と感じた。施設 A の施設設備は概ね大手施設と同等であり、原乳受け入れ後から殺菌後貯乳までの工程は閉鎖ラインで自動管理される状況ではあった。一方で、同施設では一時的に開放ラインを含む充填工程も加熱殺菌工程等と同一室内で行われていた。そのため、充填工程周辺の施設環境拭き取り検査を実施したところ、充填機ノズルから少数の一般細菌が検出される状況を確認した。検出された一般細菌は同定により、*Bradyrhizobium* 属菌が主体であることが明らかとなり、更に同菌属は製品からも少数ではあるが検出されたことから、同工程の更なる洗浄・消毒の徹底を図ることが、同施設における更なる安全性確保に向けた対策と目される知見を得た。同菌属は非病原菌であることから、本検出成績をもって当該製品が健康危害を招きうる状況にはないと考えられ、直ちに改善措置を図る必然性は低い状況にはあるが、腐敗変敗等を介し

た消費期限設定等への影響は否定できる状況にはないため、今後対策と効果の検証について事業者との間で更なる連携を図り、課題の解決を図る必要があると思われる。

更に、ISO 法と迅速簡易法であるフィルム培養法との間の相関性に関する検討を通じ、原乳や施設環境を対象とした場合には良好な相関性が得られた一方、製品を対象とした試験において、フィルム培養法の適用は困難と思われる結果を得た。後者の検査法は簡便かつ迅速な結果判定を行える利点を有するが、その適用範囲の設定には検証を行った上で設定する必要があることを示唆するものであり、今後、より多種多様な施設での比較検証を進めることで、適用箇所の設定が可能となるものと思われる。

施設 B では、工程別の施設環境の区分化と中央監視システムによる各管理要件のモニタリングが徹底されていたほか、使用・洗浄後の施設環境拭き取り検査結果は、使用後の CIP 洗浄が有効に機能している実態を示すものと考えられた。また、原乳中の指標菌のうち、特に一般細菌数で施設 A に比べ高い傾向を認めたが、同施設由来の原乳、中間・最終製品は何れも施設 B で同一ロットを確保する意義から最大 48 時間保存した後、更に一日かけて冷蔵輸送されてから試験に供したため、この間に低温細菌の増殖を招いた可能性が考えられた。実際に、構成菌叢解析を通じ、原乳及び殺菌前貯乳検体では低温細菌に位置付けられる *Pseudomonas* 属等が高い占有率をもって検出された。また、同施設で原乳受け入れ時に行われる総菌数の検査結果を別途確認したところ、約 1 か月間の検査結果は何れも 4 万/mL 以下であったことを踏まえると、

本調査用に同一ロットを確保することを最優先事項としたための保存・輸送時間の延長が加熱殺菌前の原乳の一般細菌数拡大につながったと想定される。なお、加熱殺菌処理後の検体及び最終製品については全ての衛生指標菌が陰性であり、UHT 処理は低温細菌を含めた細菌の幅広い制御に資することが改めて検証されたといえる。

以上、本研究では主に中小規模事業者等により製造される LTLT/HTST 牛乳の製造工程に係る衛生管理実態を微生物学的観点から調査し、改善に向けた対策要点を提唱することができた。また、試験方法の適用箇所等についても今後の課題を見出すことができたと考えられる。

E. 結論

LTLT/HTST 牛乳製造施設 A では、UHT 牛乳製造施設 B と同等の製造施設設備を用いていたが、充填工程は前工程との明確な施設区分化がなされておらず、充填機ノズル及び製品からは非病原菌が検出されたことから、同工程環境から製品への細菌混入を招きうる実態が明らかとなった。また、試験法として、簡易迅速法（フィルム培養法）の適用範囲を明示するためには今後更なる検証が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

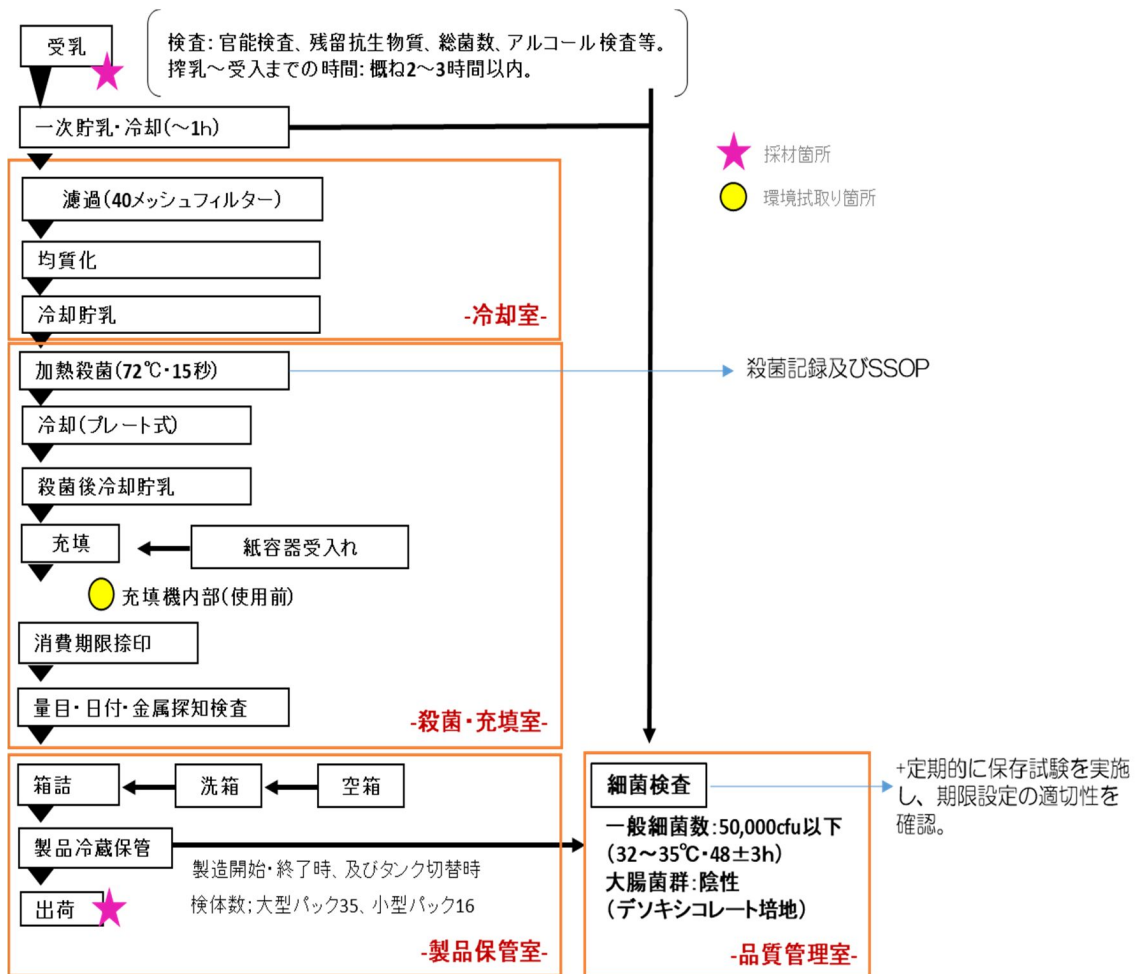


図1. 施設AにおけるHTST牛乳製品の製造工程フロー概要

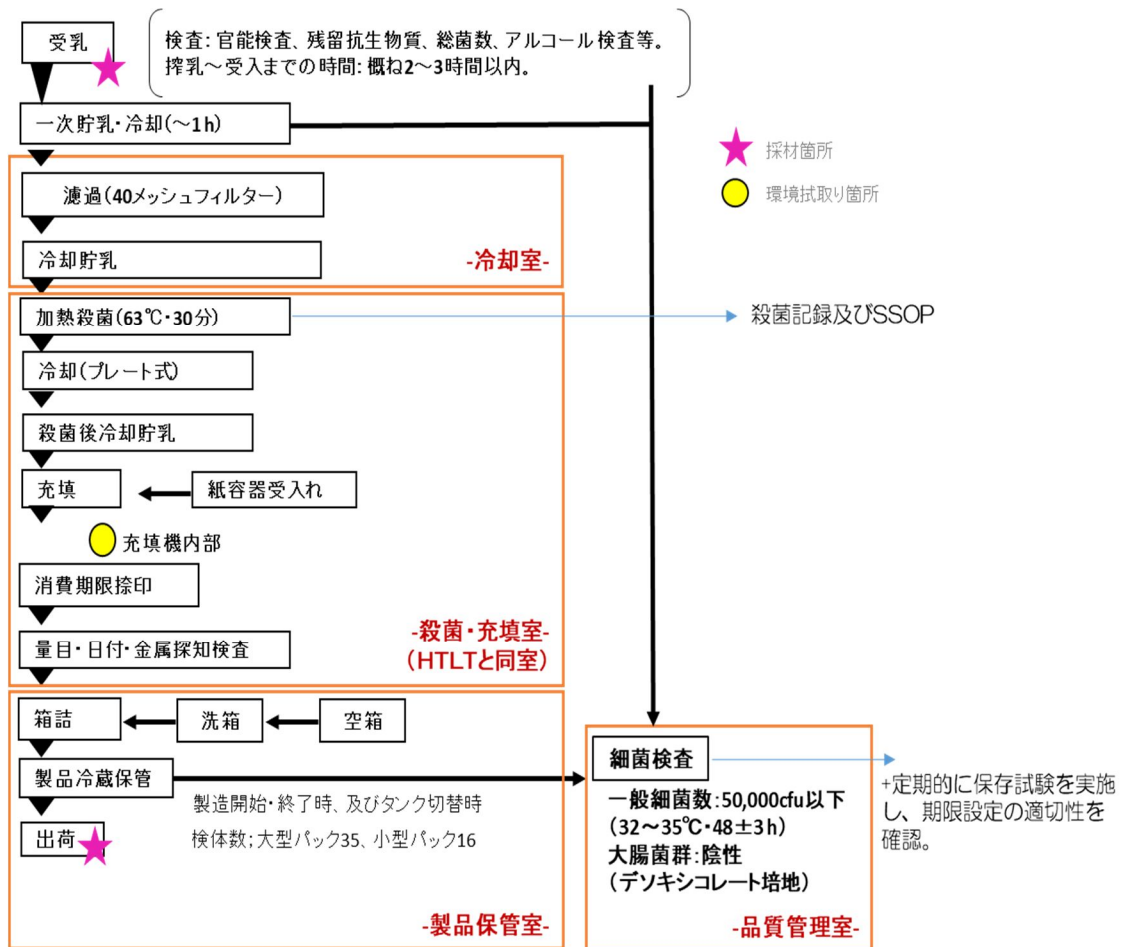
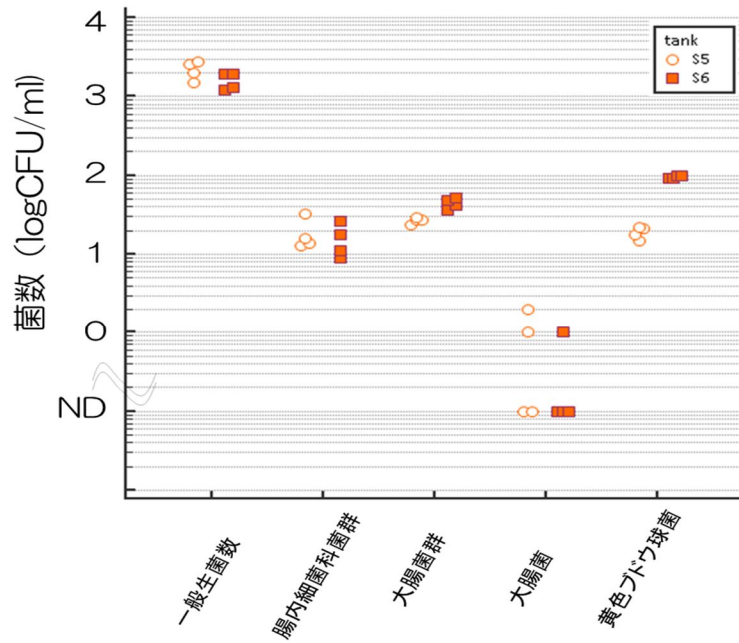


図2. 施設AにおけるLTLT牛乳製品の製造工程フロー概要

A



B

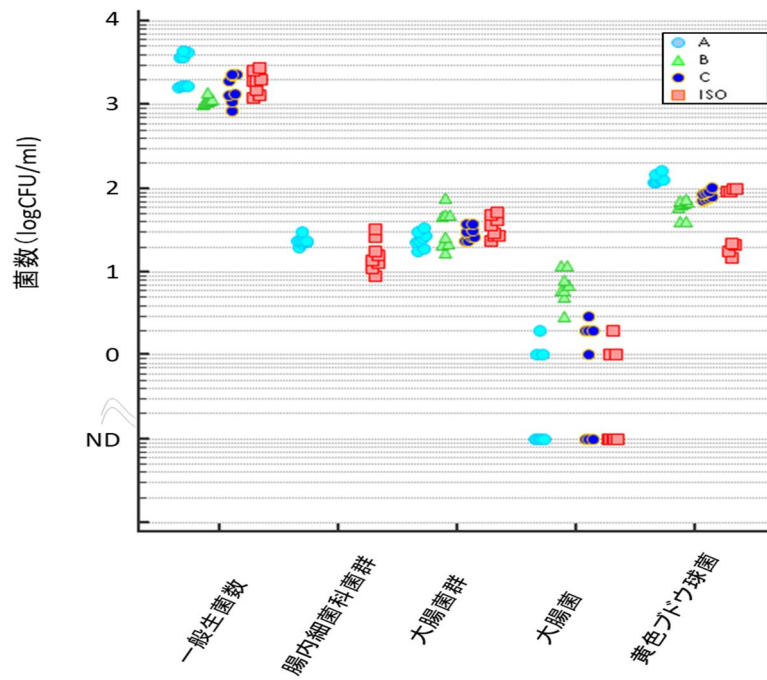


図3. 施設A由来生乳（一次貯乳）検体における各種衛生指標菌の検出状況。

セクションAのS5及びS6はHTST乳、LTLT乳製造用の生乳一次貯乳タンクの識別名を示す。タンク別に一般生菌数をISO法により求めた成績をセクションAに、セクションBでは両タンク由来検体の各指標菌成績をISO法及び簡易迅速法により求めた成績を示す。

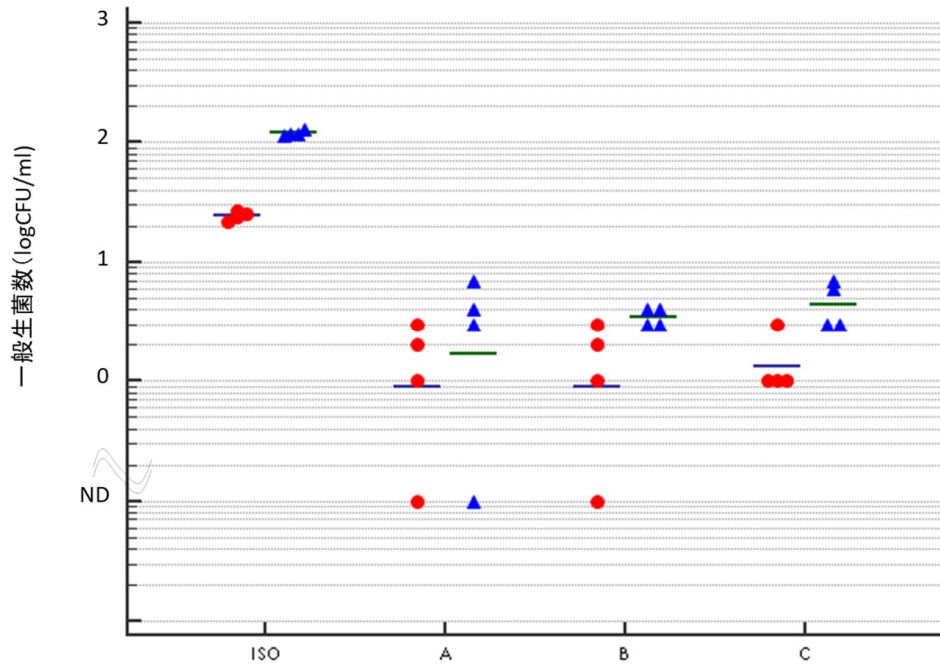
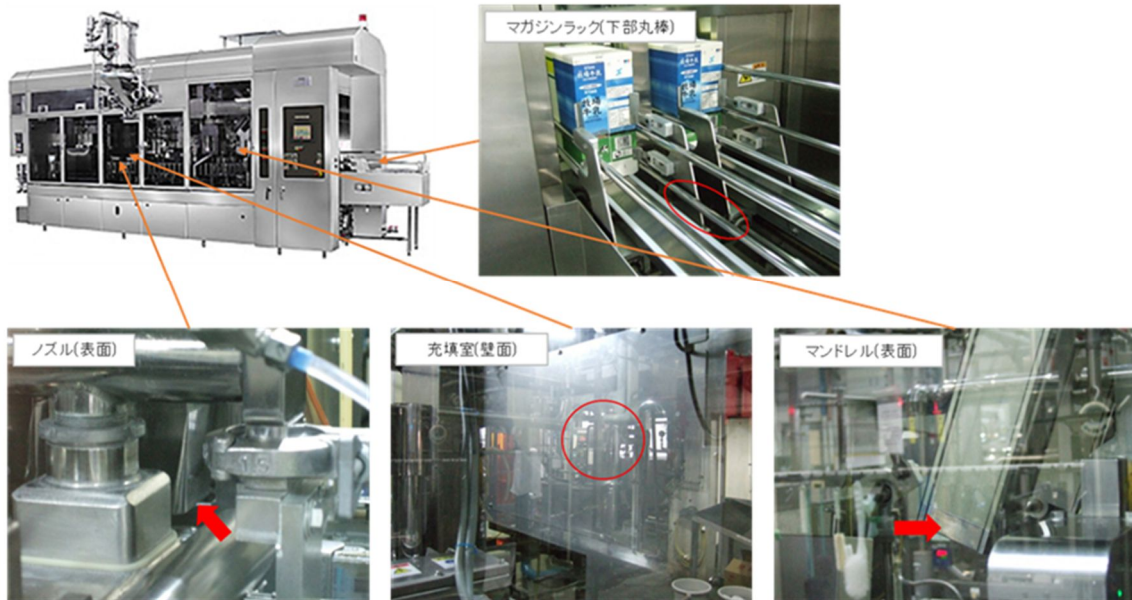


図4. 施設A由来HTST牛乳製品及びLTLT牛乳製品からの一般細菌数検出状況。
 LTLT製品(赤)及びHTST製品(青)を対象として、ISO法及び代表3製品(A,B,C)を用いたフィルム培養法により一般細菌数を求めた。なお、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌についても同時に検出試験を行ったが何れも陰性であったため、本図中には記載していない。

S E



M E

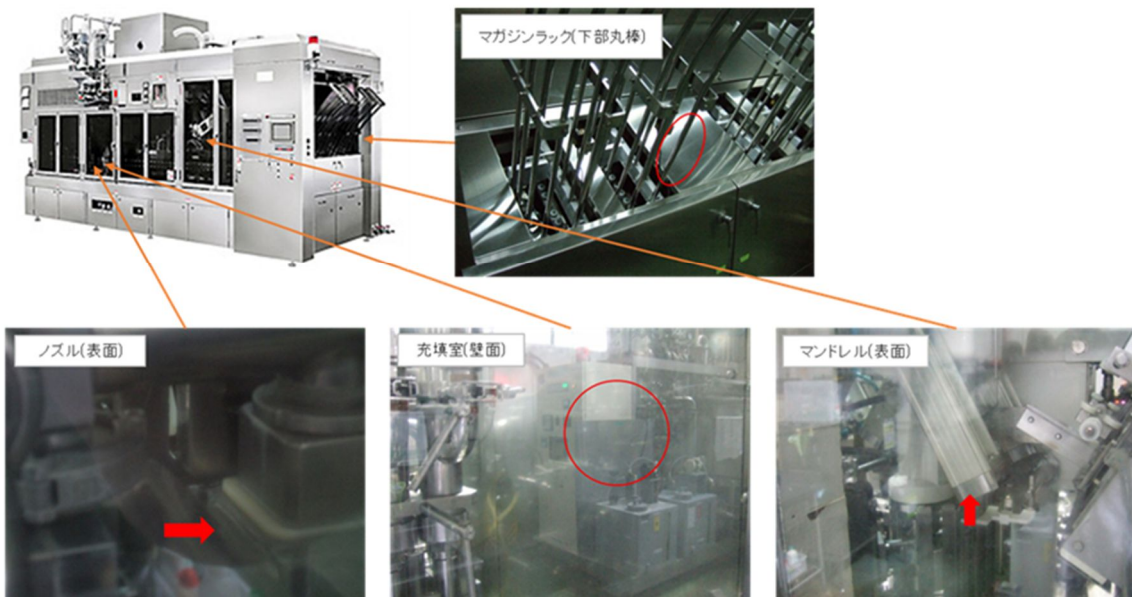


図 5. 施設 A の充填機内外における拭き取り箇所概要 .

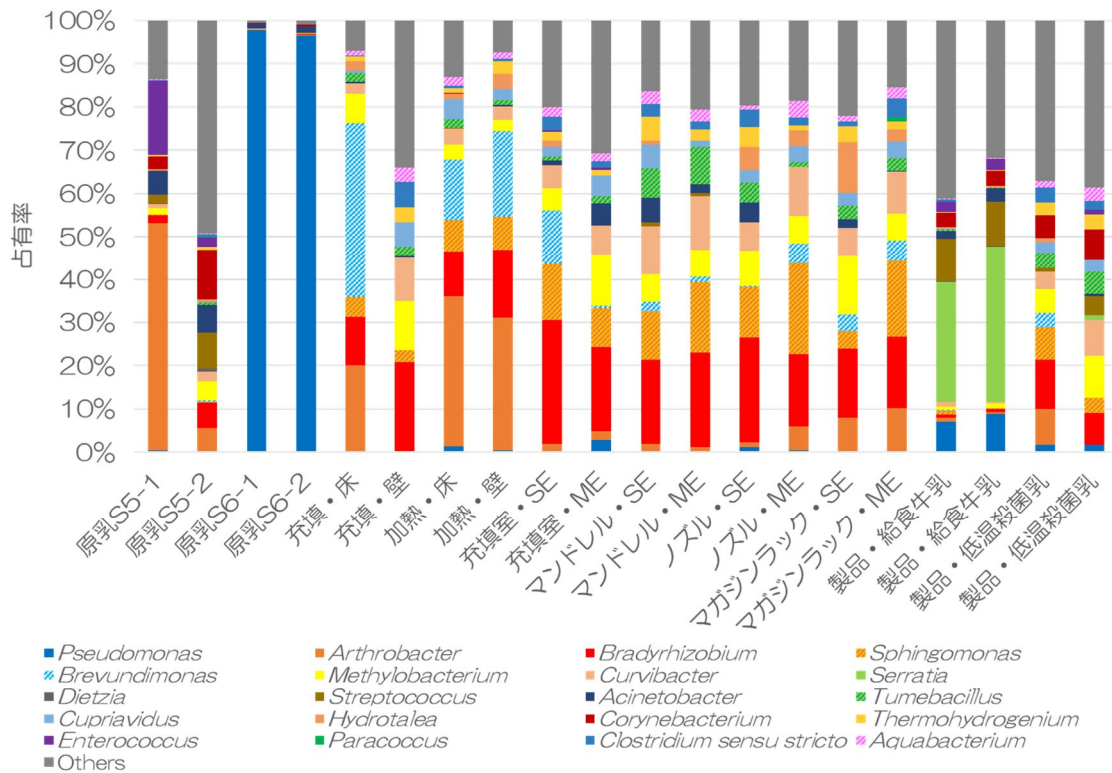


図6. 施設A由来生乳、施設環境、及び製品検体における構成菌叢解析結果。

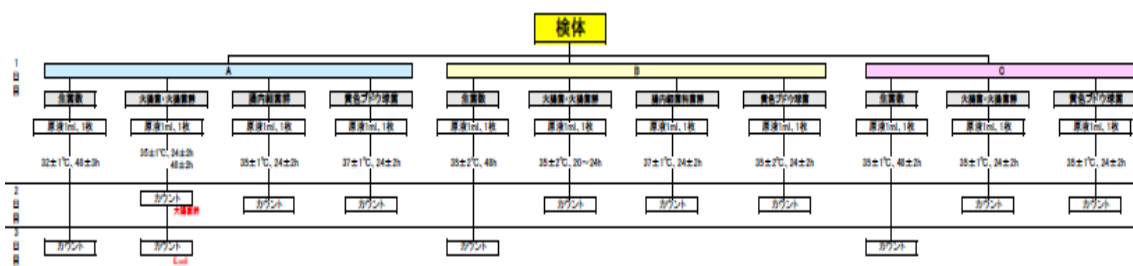


図7. 簡易迅速法に関する試験フロー

表 1. 施設 A の施設環境拭き取り検体における衛生指標菌の検出状況

検体種別		検体 No.	生菌数 (CFU/mL)			
			ISO法	フィルム培養法 (製品A)	フィルム培養法 (製品B)	フィルム培養法 (製品C)
充填機周辺環境	床	1	ND	ND	ND	ND
	壁	2	ND	ND	ND	ND
殺菌機周辺環境	床	3	ND	ND	ND	ND
	壁	4	ND	ND	ND	ND
充填室	SE	5	ND	ND	ND	ND
	ME	6	ND	ND	ND	ND
マンドレル	SE	7	ND	ND	ND	ND
	ME	8	ND	ND	ND	ND
ノズル	SE	9	9	9	2	4
	ME	10	ND	ND	1	2
マガジンラック	SE	11	ND	ND	ND	2
	ME	12	ND	ND	ND	1
充填機付近の外部床 (参考)		13	3.0×10^2	3.0×10^2	2.0×10^2	3.1×10^2

平成30年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理及び試験法確立のための研究」
分担研究報告書

国内低温殺菌乳製造施設の衛生実態に関する研究

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

研究要旨：近年、国内で実施される食品試験法や試験項目について、国際的な方法とのハーモナイゼーションに対する要求が高まっている。本研究では乳および乳製品について国内の製造施設における衛生管理手法の実態調査を目的とし、本年度の研究では北海道内の複数の低温殺菌牛乳製造施設において調査を実施した。販売規模、HACCP 認証等の運営形態が異なる施設について、製造工程、衛生検査実態の比較により、同規模の製造施設であっても危害発生が起りうる行程に差がみられる実態が明らかとなった。さらに、小規模施設においては特に、衛生検査における簡易検査法導入の重要性が確認された一方で、その運用方法についての問題点も明らかとなった。これらの知見は今後、国際的整合性を担保した形での、乳及び乳製品の製造工程管理及び製品の安全性確保に向けた微生物規格基準の設定を検討する上での基礎的知見となるものと思われる。

A. 研究目的

食品の衛生に関する国際的整合性の整備は食品流通のグローバル化が進む現代において喫緊の課題であり、国内においても国際的整合性をもった食品微生物基準を策定するための取り組みが進められている。これまで、国内の微生物規格基準およびそれらの試験法は過去に食中毒事例が多く見られた食品を中心に、国内の食習慣や製造環境に合うように独自に整備されてきた。しかしながら、上記の理由から、本邦で採用される試験法についても国際的に利用されている試験法とのハーモナイゼーションに

対する要求が増しており、国際貿易を意識した試験法の整備が急務の課題となっている。

現在、わが国の乳及び乳製品については、昭和26年に発令された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」（乳等省令）に基づき、生菌数と大腸菌群を微生物規格とした法規制が敷かれている。一方、EUやICMSFでは、HACCPによる工程管理を前提として、腸内細菌科菌群やβグルクロニダーゼ陽性大腸菌等を衛生指標として用いた衛生管理を行っている。国内においては近年、平成30年の食品衛生法改正の中で示された

HACCPの制度化をはじめとした食品流通のグローバル化に対応した取り組みを行っているが、食品衛生管理を行う上では製造工程の管理に加え、衛生指標に用いる微生物種の妥当性やその試験法についても国際的整合性についての考慮が必要である。

本研究では、国内の乳及び乳製品製造加工施設における製造基準や自主管理基準の検証と評価を行うと共に、国内流通製品の衛生実態に関する知見の収集を行い、国内で流通する製品及び、それらを製造する施設の製造環境及び衛生管理実態の把握を目的とした。北海道においては国内の他の地域と比較して、大規模な施設に加え小規模製造加工施設も多く存在し、広域流通しない乳および乳製品も多く販売されている。しかしながら観光業が盛んな北海道においては、これらの小規模流通製品も海外からの旅行者を含む多くの消費者へ影響を与えることが懸念される。本研究においてはこのような北海道に多くみられる小規模製造加工施設を調査対象とした。

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

B. 研究方法

1. 調査対象

北海道内で低温殺菌牛乳を製造・販売する小規模事業者（十勝地方2社、上川地方1社）について調査を実施した。調査においては、製造地域での販売に加え、通信販売・業務用販売を含めた道外での広域販売を行っている事業者を選定した（表1）。各

施設について、製造規模を含めた施設概要、製造工程、各施設で実施される自主検査項目について、施設見学および聞き取り調査を実施し、製造工程管理実態および衛生管理実態を取りまとめた。

2. 衛生検査

施設A及びCより生乳及び低温殺菌牛乳を入手し、腸内細菌科菌群数、生菌数、大腸菌群数、大腸菌数について、培養法と簡易培地法を用いた検査を実施した。各試料及び、検査項目の検査方法の概要を以下に示す。

2-1. 試料概要

検査に供した試料は何れの試料においても、校正済み温度ロガーを用いて、輸送中を含め採取および製造から検査までの間、5℃以下で保管されていた事を確認している。低温殺菌牛乳については賞味期限日に検査を実施した。

2-2. 検査法概要

2-2-1. 腸内細菌科菌群数検査概要

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

2-2-2. 生菌数検査概要

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

2-2-3. 大腸菌群数検査概要

培養法においてはISO 4832:2006に従い、Violet Red Bile Lactose (VRBL)寒天培地を用いた混釈培養(30±1℃, 24±2時間)に引き続くBrilliant Green Bile (BGB)培地を用いた確認培養(30±1℃, 24±2時間)を行った。簡易培地法においては3社より入手した3製品を用い、添付の取扱説明書に従って検査を実施した。

2-2-4. 大腸菌数検査概要

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

C. 結果

1. 施設概要の比較

本調査においては、従業員数3~5名の小規模事業者を調査対象とした(表1)。調査対象とした3つの事業者間で製造規模に大きな差は無いものの、施設AはFSSC 22000及び北海道HACCP自主衛生管理認証制度の認証を受けていた一方で、施設BおよびCは上記のような衛生管理過程に関する定期的な第三者評価を受けていない施設であった。

各施設に共通する項目として、原乳受入元(自社牧場)、乳の殺菌条件(65℃, 30分)が挙げられた。一方で、原乳の受入方法、包装形態、賞味期限、製品記載の保存方法、販売先の広域性に差が観られ、これらの項目に基づいた事業者毎に適した製造工程管理および製品管理の必要性が抽出された。

2. 製造工程の比較

各施設の製造フローチャートを図1に示した。生乳の受入工程においては、施設Aではミルクローリーから専用パイプを用いて閉鎖系で受入がなされていたのに対して、施設Bでは専用バケツで受入れた生乳をホールディングタンクへ開放系で投入しており、また施設Cにおいても専用ポリタンクで受入れた生乳を受入槽へ開放系で投入していた。加えて、容器包装形態が異なるために、施設Aと施設B、Cの間で充填工程に差が観られた。これらの結果から施設毎に生物的危害要因混入の可能性が考えられる工程に差があることが明らかとなり、同種の事業者であっても、HACCP導入を含めた適切な工程管理において個別の製造工程を勘案する必要性が示された。一方で、いずれの施設においても殺菌工程以降では充填工程を除き、中間製品の閉鎖性が維持されており、殺菌条件の遵守及び充填工程の施設環境管理が微生物汚染防止に重要な工程であることが確認された。

3. 検査体制および検査項目の比較

各施設における自主検査実施状況を表2に示した。施設Aは事業所内に製造部門とは独立した検査部門を持つ施設である一方で、施設B及びCでは独立した検査部門を持たず製造業務を行う職員が検査業務を兼務していた。また、施設B及びCにおいては特に、製造施設で実施可能な検査項目が限られており、乳等省令で成分規格として定められている項目を含めた多くの検査項目を外部委託検査に頼っている現状が明らかとなった。

すべての施設では自主検査として何らかの簡易検査法を用いている実態が確認され

たことから、小規模製造施設における簡易検査法の有用性が示唆された。しかしながら、従業員への聞き取りにより、こうした簡易検査法の使用法については、必ずしも十分な教育を受けて実施されているものとは限らないことが明らかとなり、検査精度の確保にあたって、適切な適用箇所や試験方法の明示を行う必要性が示された。

4. 簡易検査法の有効性の検討

小規模施設における調査から、同施設において大規模製造施設とは異なった製造工程管理および衛生管理がなされている実態が明らかとなった。小規模施設においては特に、簡易検査法の利用無しでの衛生管理は現実的ではなく、国際的な動向を踏まえた乳製品の衛生管理の導入においても簡易検査法利用の有効性の検討が必要である事が示唆された。そこで、簡易検査法の有用性の検証および実効性のある衛生指標菌の選択に資する科学的知見の収集を目的として、小規模施設で製造された製品および原材料乳を入手し、EUで乳の成分規格として利用されている腸内細菌科菌群数について培養法と簡易検査法を用いた検査を実施した。また一方で、国内で成分規格が設定されている生菌数と大腸菌群、加えて大腸菌についての検査を実施し、これらの結果の比較解析を行った。培養法についてはISO規格内で示されている方法を採用し、簡易検査法については可能な限り複数の製品を利用した。

EUにおいては低温殺菌牛乳の成分規格として腸内細菌科菌群数で10 cfu/mL未満であることが求められている。国内小規模製造施設で製造された低温殺菌牛乳に対する腸内細菌科菌群の検査においては、ISO法

及び簡易検査法のいずれにおいても検出限界以下となった(図2A, B)。生乳についてはISO法-簡易法間で比較的良好な相関がみられ生乳の衛生状態モニタリングにおける簡易検査法の有用性が示された(図2C, D)。

生菌数の検査では、低温殺菌牛乳に対する検査において試料によってはISO法に比較して簡易検査法において低い値となる傾向が観られたことから、低温殺菌牛乳の生菌数検査に簡易検査法を導入する際には慎重な検討が必要であることが明らかとなった(図3A)。一方で、生乳の検査においてはISO法-簡易法間で同等の結果が得られた(図3C, D)。

大腸菌群数の検査では、低温殺菌牛乳に対する検査においてISO法及び簡易検査法のいずれにおいても検出限界以下となり(図4A, B)、また生乳の検査においてもISO法-簡易法間で同等の結果が得られ(図4C, D)、簡易検査法の有用性が確認された。

大腸菌数の検査では、低温殺菌牛乳に対する検査においてISO法及び簡易検査法のいずれにおいても検出限界以下であった(図5A, B)。一方で、生乳に対する検査ではISO法-簡易検査法間で施設Aでは比較的良好な相関が得られたものの、施設Cでは簡易法2でのみ陽性の結果が得られており(図5C, D)、各施設において簡易検査法を選択する際には施設毎に乳の特性を考慮した慎重な検討が必要であることが示唆された。

D. 考察

今回、調査を実施した施設間では製造規模に大きな差が無い一方で、施設毎に生乳及び製品の検査項目や手法に差異が確認された。

本調査では対象としたすべての施設で自社牧場にて搾乳した生乳を原材料としており、このため搾乳牛の飼養管理を含めた品質管理が可能となっていた。一方で、低温殺菌牛乳製造施設内で実施可能な衛生検査については、大規模施設に比較して限られた項目となっており、また、公定法が指定する培養法による衛生検査が現実的には実施不可能な施設も多く存在する実態が明らかとなり、これらの小規模施設の状況を勘案した衛生試験法提示の必要性が示された。加えて、これらの小規模施設においては、衛生検査に精通していない作業員により検査が実施されている実態も明らかとなり、簡易法を含めた標準試験法の導入において、試験方法の整備に加え、その適切な運用方法の提示の重要性が明らかとなった。

乳製造施設における簡易検査法の有用性に関する検討においては、多くの項目で生乳の衛生状況モニタリングにおける簡易法の有用性が確認された一方で、一部の検査においては ISO 法-簡易検査法間ならびに簡易検査法間で結果に差がみられ、施設ごとに生乳の性質を勘案した最適な簡易検査法選択の必要性が示唆された。小規模製造施設において衛生検査に精通していない作業員が検査を実施している現状を踏まえると、小規模施設において簡易検査法を導入する際には専門家による支援を含めた慎重な検討の必要性も示唆される。加えて、低温殺菌牛乳の生菌数検査においては培養法に比較して簡易検査法で低い値が出る傾向がみられた。生菌数検査においては ISO 法と簡易検査法の間で培養条件（ISO 法では 30℃で 72 時間、簡易検査法では 32℃もしくは 35℃で 48 時間）が異なっており、こ

の事が原因で両者の結果に差が出ている可能性が考えられた。我々は培養時間を変更した追加実験において、培養条件の調整により簡易検査法によっては培養法と同等の結果を得る事も可能である事を明らかにしている（図 6A, B）。以上の結果は、低温殺菌牛乳検査における国際的な動向を踏まえた衛生管理法の導入において、簡易検査法の使用法の提示について慎重な検討の必要性を示すものとする。

E. 結論

1) 小規模低温殺菌牛乳製造施設の調査から、小規模施設内で実施可能な衛生検査が非常に限られたものであり、衛生検査の多くを外部検査機関への受託検査に頼っている現状が明らかになった。

2) 小規模製造施設においては特に、簡易検査法が担う役割の重要性が明らかになった一方で、その運用方法についての問題点も抽出された。加えて、同規模の施設であっても製造工程の差により生物的危害要因混入の危険性が考えられる工程に差がみられたことから、簡易検査法を用いた標準試験法の整備においては、各施設での適切な適用箇所や運用方法の検討を行う必要性も示された。

F. 研究発表

学会発表

1. 八尋錦之助、小倉康平、寺崎泰弘、佐藤守、山崎栄樹、Cholix による細胞致死機構における新規結合タンパク質の同定と機能解析. 第 65 回トキシシンポジウム, 金沢市 (2018. 7)
2. Eiki Yamasaki, Hisao Kurazono, Myo

Thura Zaw, Kayo Okumura, Shingo Yamamoto. *Uropathogenic specific protein* gene, highly distributed in extraintestinal uropathogenic *Escherichia coli* isolated from both humans and companion animals, encodes a new member of H-N-H nuclease superfamily. 4th International Conference on One Medicine One Science, チェンマイ, タイ (2019.1)

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

表 1 低温殺菌牛乳製造施設の概要一覧

施設名	施設 A	施設 B	施設 C
製造品目	LTLT 牛乳、UHT 牛乳、アイスクリーム	LTLT 牛乳、ソフトクリーム、ミルクジャム	LTLT 牛乳、アイスクリーム
従業員数	5 名	4 名	3 名
受入乳量	製造日あたり 400 L	製造日あたり 300 L	製造日あたり 300 L
受入元	自社牧場	自社牧場	自社牧場
集乳方法	隣接の搾乳施設より専用ミルクローリーで搬入	隣接の搾乳施設よりインラインで搬入	隣接の搾乳施設よりポリタンクで搬入後、冷蔵保管
低温殺菌牛乳の殺菌条件	65℃、30 分間	65℃、30 分間（ノンホモ牛乳）	65℃、30 分間（ノンホモ牛乳）
包装形態	ゲーブルトップ紙容器（500 mL）	瓶詰め（720 mL） 業務用ビニールバック詰め（10 L、5 L）	瓶詰め（720 mL、200 mL） 業務用ビニールバック詰め（10 L）
生産量	週 1 回製造 製造日あたりの製造量 ・ゲーブルトップ紙容器（500 mL）x 600 本	週 2 回製造 製造日あたりの製造量 ・瓶詰め（720 mL）x 12 本 x 8~20 ケース ・業務用ビニールバック詰め（10 L）x 15~25 パック	週 2 回製造 製造日あたりの製造量 ・瓶詰め（720 mL）x 12 本 x 10~15 ケース ・瓶詰め（200 mL）x 20 本 x 5~10 ケース ・業務用ビニールバック詰め（10 L）x 7~10 パック
容器の殺菌方法	ゲーブルトップ紙容器：殺菌済み製品を購入	瓶詰め用瓶：アルカリ洗浄後、蒸気加熱殺菌（90℃、5 分） 瓶詰め用紙キャップ：殺菌済み製品を購入 ビニールバック：殺菌済み製品を購入	瓶詰め用瓶：アルカリ洗浄後、蒸気加熱殺菌（85℃、30 分） 瓶詰め用紙キャップ：殺菌済み製品を購入 ビニールバック：殺菌済み製品を購入
賞味期限	製造日翌日より 5 日間	製造日より 5 日間	製造日より 8 日間
保存方法	要冷蔵（10℃以下）	要冷蔵（6℃以下）	要冷蔵（10℃以下）
販売先	直営販売所（北海道 1 箇所） スーパーマーケット販売（北海道）	直営販売所（北海道内 2 箇所） スーパーマーケット販売（東京都） 通信販売 業務用販売（北海道、東京都）	スーパーマーケット販売（北海道） 通信販売 業務用販売（北海道、大阪）
認定	FSSC 22000、北海道 HCCP	無し	無し

表2 低温殺菌牛乳製造施設における自主検査項目の比較

工程	検査対象	検査項目	施設 A			施設 B			施設 C		
			頻度	作業内容または手順	チェック項目	頻度	作業内容または手順	チェック項目	頻度	作業内容または手順	チェック項目
生乳受入検査	生乳	視覚試験	製造ごと	バルククーラーの蓋を開け、視覚的に生乳状態を判断する。	色・凍結・異物確認	製造ごと	受入時に、視覚的に生乳状態を判断	色・凍結・異物確認	製造ごと	受乳槽投入時に、視覚的に生乳状態を判断	色・凍結・異物確認
		嗅覚試験	製造ごと	バルククーラーの蓋を開け、臭いを嗅ぐ。	洗剤・塩素・発酵・牛舎・飼料の臭いがないか確認	製造ごと	受入時に、臭いを嗅ぐ	洗剤・塩素・発酵・牛舎・飼料の臭いがないか確認	製造ごと	受乳槽投入時に、臭いを嗅ぐ	洗剤・塩素・発酵・牛舎・飼料の臭いがないか確認
		味覚試験	製造ごと	口に含み鼻腔を通して息を吐き出す。	塩味、苦味、酸味、嗅覚での異常がないか確認	-	-	-	-	-	-
		アルコールテスト	製造ごと	ディッパーにて同量の生乳・アルコールを混合する。	凝固がないか確認	-	-	-	-	-	-
		比重	製造ごと	乳比重計にて、比重測定→乳温測定を行い、比重補正值にて判定する。	比重補正值が1.033前後であることを確認	-	-	-	製造ごと	乳比重計にて、比重測定→乳温測定を行い、比重補正值にて判定	1.028-1.034の範囲であるかを確認
		生菌数	製造ごと	生乳をコンラージ棒にて血液寒天培地に無菌的に塗抹し38℃24時間培養する。	菌数に異常がないことを確認	-	-	-	-	-	-
		ブドウ球菌数	製造ごと	生乳をコンラージ棒にてマンニト食塩寒天培地に無菌的に塗抹し38℃24時間培養する。	菌数に異常がないことを確認	-	-	-	-	-	-
		腸内細菌数	製造ごと	生乳をコンラージ棒にて DHL 寒天培地に無菌的に塗抹し38℃24時間培養する。	菌数に異常がないことを確認	-	-	-	-	-	-
		残留抗生物質	製造ごと	検査キットに生乳を染み込ませ、専用インキュベーターで加温（8分）する。	陰性であることを確認	-	-	-	-	-	-
		製品検査	牛乳	乳温	製造ごと	充填開始時、バックへ温度計を入れ測定	10℃以下であることを確認	製造ごと	プレート式熱交換器に付属の温度計をチェックする	5℃以下であることを確認	-
視覚試験	製造ごと			視覚的に牛乳の状態を判断する	色に異常、異物がないか確認	製造ごと	視覚的に牛乳の状態を判断する	色に異常、異物がないか確認	製造ごと	視覚的に牛乳の状態を判断する	色に異常、異物がないか確認
味覚試験	製造ごと			口に含み鼻腔を通して息を吐き出す	塩味、苦味、酸味、嗅覚での異常がないか確認	製造ごと	口に含み鼻腔を通して息を吐き出した後に、飲乳する	塩味、苦味、酸味、嗅覚での異常がないか確認	-	-	-
異物確認	製造ごと			セジメントテストにより確認	異物がないか確認	-	-	-	-	-	-
比重	製造ごと			乳比重計にて、比重測定→乳温測定を行い、比重補正值にて判定する。	比重補正值が1.033前後であることを確認	-	-	-	-	-	-
重量	製造ごと			製品の重量を計測する	528g以上（包装容器込み）であることを確認	-	-	-	-	-	-
一般生菌数	製造ごと			牛乳をコンラージ棒にて血液寒天培地に無菌的に塗抹し、38℃24時間培養。	100cfu/ml以下であることを確認	-	-	-	-	-	-
大腸菌群数	製造ごと			・牛乳を BGLB 発酵管へ注入し、38℃24時間培養。 ・牛乳を簡易培地でサンドし 38℃24時間培養。	陰性であることを確認	製造ごと	牛乳を簡易培地でサンドし、工場内の温所で24時間培養	陰性であることを確認	製造ごと	簡易迅速測定キットにより判定	陰性であることを確認
残留抗生物質	製造ごと			培地上のペーパーディスクに牛乳を染み込ませ、55℃6時間培養	陰性であることを確認	-	-	-	-	-	-
包装状態	トップ圧着チェック			製造ごと	ダイチェック（色素液の漏洩チェック）により確認	漏れがないか確認	-	-	-	-	-
	ボトム圧着チェック		製造ごと	ダイチェック（色素液の漏洩チェック）により確認	漏れがないか確認	-	-	-	-	-	-
	キャップチェック		-	-	-	製品ごと	目視により確認	密封状態に異常がないか確認	製品ごと	目視により確認	密封状態に異常がないか確認
	トップフィルム圧着チェック		-	-	-	製品ごと	目視により確認	異常がないか確認	製品ごと	目視により確認	異常がないか確認
賞味期限印字確認	製造ごと		目視により確認	賞味期限印字状態を確認	製品ごと	目視により確認	賞味期限印字状態を確認	製品ごと	目視により確認	賞味期限印字状態を確認	
備考（外部委託検査について）			上記項目以外に体細胞数、総菌数、耐熱性菌数、乳脂肪分、無脂乳固形分、比重、酸度について外部委託により検査を実施。			上記項目以外に体細胞数、生菌、耐熱菌数、乳脂肪分、無脂乳固形分、比重、酸度、アルコールテスト、残留抗生物質、血液混入、タンパク質含有量、乳糖量、氷点、窒素量、について外部委託により検査を実施。			上記項目以外に生菌、大腸菌群数、大腸菌、乳脂肪分、無脂乳固形分、比重、酸度、残留抗生物質について外部委託により検査を実施。		

A. 低温殺菌牛乳製造フローチャート（乳）



B. 低温殺菌牛乳製造フローチャート（容器等）

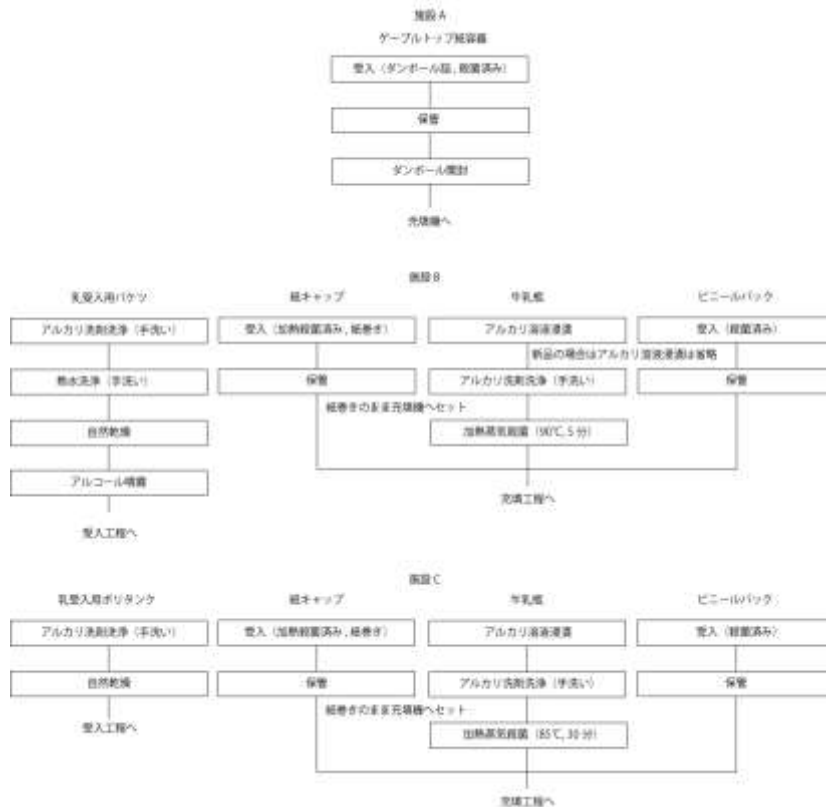


図1 製造フローチャートの比較

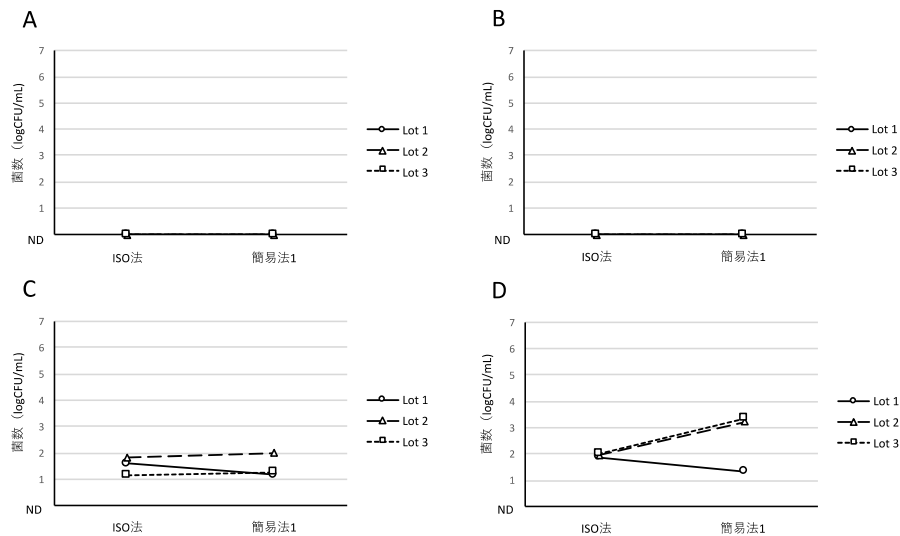


図2 乳試料に対する腸内細菌科菌群検査法における培養法と簡易検査法の比較

施設A及び施設Cから入手した生乳及び低温殺菌牛乳についてISO法及び簡易検査法を用いた腸内細菌科菌群検査の結果を示した。全ての試験は各施設から入手した異なる3ロットの試料について実施した。縦軸のNDは検出限界以下を示す。それぞれのグラフは施設Aの低温殺菌牛乳(A)、施設Cの低温殺菌牛乳(B)、施設Aの生乳(C)、施設Cの生乳(D)に対する試験結果を示す。

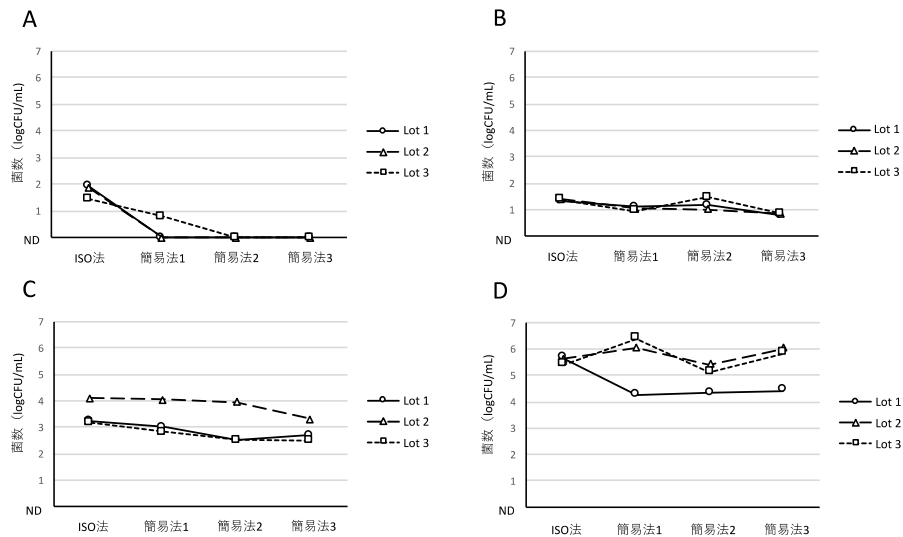


図3 乳試料に対する生菌数検査における培養法と簡易検査法の比較

施設A及び施設Cから入手した生乳及び低温殺菌牛乳についてISO法及び簡易検査法を用いた生菌数検査の結果を示した。全ての試験は各施設から入手した異なる3ロットの試料について実施した。縦軸のNDは検出限界以下を示す。それぞれのグラフは施設Aの低温殺菌牛乳(A)、施設Cの低温殺菌牛乳(B)、施設Aの生乳(C)、施設Cの生乳(D)に対する試験結果を示す。

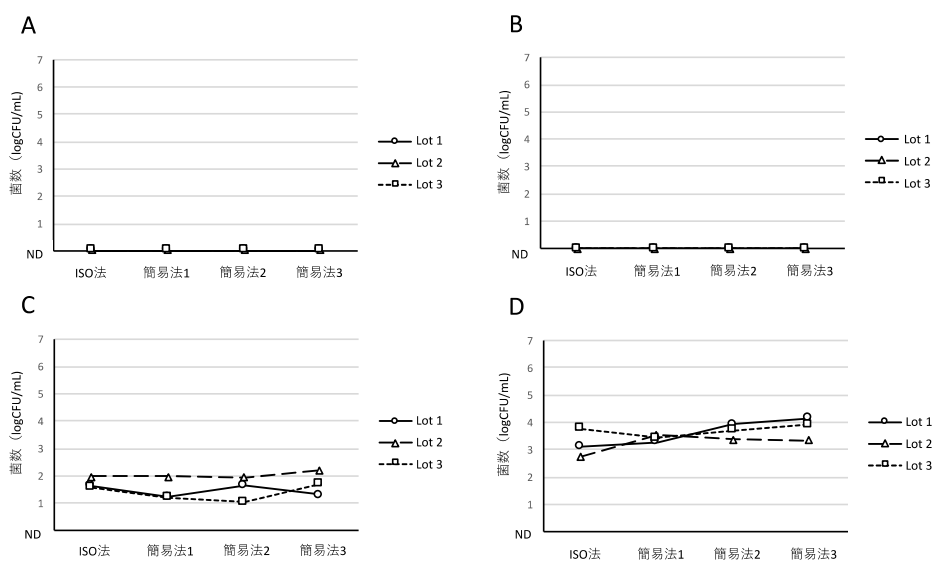


図4 乳試料に対する大腸菌群検査法における培養法と簡易検査法の比較

施設A及び施設Cから入手した生乳及び低温殺菌牛乳についてISO法及び簡易検査法を用いた大腸菌群検査の結果を示した。全ての試験は各施設から入手した異なる3ロットの試料について実施した。縦軸のNDは検出限界以下を示す。それぞれのグラフは施設Aの低温殺菌牛乳(A)、施設Cの低温殺菌牛乳(B)、施設Aの生乳(C)、施設Cの生乳(D)に対する試験結果を示す。

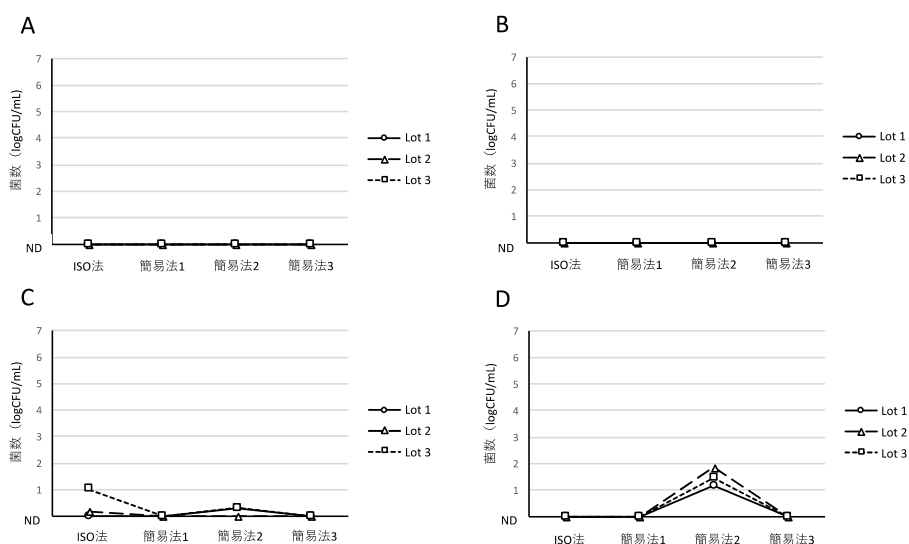


図5 乳試料に対する大腸菌数検査における培養法と簡易検査法の比較

施設A及び施設Cから入手した生乳及び低温殺菌牛乳についてISO法及び簡易検査法を用いた大腸菌数検査の結果を示した。全ての試験は各施設から入手した異なる3ロットの試料について実施した。縦軸のNDは検出限界以下を示す。それぞれのグラフは施設Aの低温殺菌牛乳(A)、施設Cの低温殺菌牛乳(B)、施設Aの生乳(C)、施設Cの生乳(D)に対する試験結果を示す。

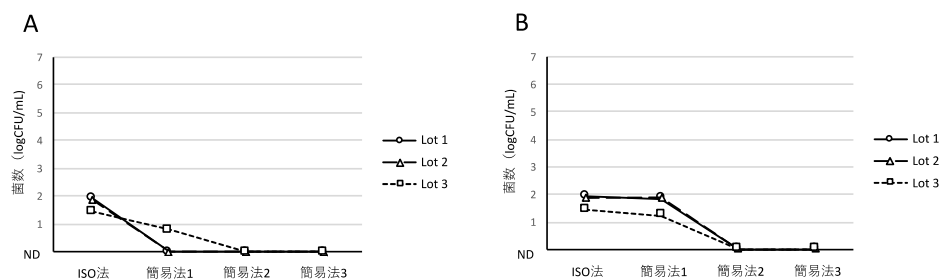


図6 培養条件が検査結果へ及ぼす影響の検討

施設A及から入手した低温殺菌牛乳についてISO法及び簡易検査法を用いた一般生菌数検査の結果を示した。全ての試験は異なる3ロットの試料について実施した。縦軸のNDは検出限界以下を示す。ISO法についてはグラフA,Bの両方で30°C, 72時間培養後の結果を示す。簡易検査法についてはグラフAでは32°Cもしくは35°Cで48時間培養後の結果を示しており、グラフBでは32°Cもしくは35°Cで72時間培養後の結果を示している。簡易法1においては48時間培養後にはISO法に比較して低い値を示しているが、72時間培養後にはISO法と同等の結果が得られている。

平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

低温殺菌牛乳等に対する簡易培地使用の妥当性及び衛生指標菌汚染実態に関する研究

研究分担者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
鈴木穂高 茨城大学農学部
研究協力者 Amalia Widya Rizky 茨城大学農学部
永島侑起 茨城大学農学部
下島優香子 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
平井昭彦 東京都健康安全研究センター微生物部

研究要旨

現在わが国の乳および乳製品の衛生管理は、昭和 26 年に発出された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」(以下乳等省令)に基づき、細菌数と大腸菌群を微生物規格として行われており、現在でもそれらが科学的に妥当か否かの検証が望まれている。また、HACCP 導入後の各種食品製造工程における衛生管理上で、迅速簡易法が適用される可能性が高まっているが、乳及び乳製品での適用の妥当性については、不明な点がある。本研究では、乳および乳製品の衛生実態を管理及び微生物規格を検討する上での基礎知見の集積を図ることを目的とし、本年度は低温殺菌牛乳等製品における細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌の検出状況について、公定法、ISO 法並びに簡易培地を用いて検討を行った。その結果、低温殺菌牛乳については簡易培地での集落形成数が公定法及び ISO 法よりも低い傾向が示された。

A. 研究目的

我が国を含む殆どの国において、食品の安全確保を目的として、多くの食品種に微生物規格が定められている。規格対象となる食品の多くは、過去に食中毒事例の原因となった食品や、製造工程において微生物制御が困難であることが明らかな食品等であり、国内の食習慣や製造環境等を踏まえて設定されてきた。

しかしながら、国内の衛生状況は時代の変遷と共に変化を顕し、昨今では食品の国際流通も増加の一途を辿る等、食を取り巻く環境は変化している。わが国の乳及び乳製品については、昭和 26 年に発令された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」(乳等省令)に基づき、細菌数と大腸菌群が微生物規格に設定され、安全確保が図られているが、現在

EU等では牛乳の製造工程管理をHACCPベースで行うと共に、わが国で2011年に生食用食肉の微生物規格として採用された、腸内細菌科菌群を衛生指標として製品等の検査が実施されている状況にある。

上述の国内での乳等に対する微生物規格基準は、衛生状況が現在に比べて良好とはいえない戦後の社会的背景から設定されたものと考えられる。同規格は現時点においても、一定の安全確保に資する内容であることには違いがない一方、国際動向を踏まえた内容と結論づけるためには、その妥当性を科学的に評価する必要がある。

以上の背景を踏まえ、平成30年度は、国内で製造流通する低温殺菌牛乳製品等を対象として、微生物汚染実態を衛生指標菌試験（公定法）並びに簡易培地（以下、簡易法）を用いた検討を行うことで評価することを目的とした。更に後者の製品に対する適用の妥当性について考察を行ったので報告する。

B. 研究方法

1) 諸外国における低温殺菌牛乳等の微生物規格の調査

EU、米国及びオーストラリアにおける低温殺菌牛乳及び生乳の微生物規格をインターネット検索により調査した。

2) 低温殺菌牛乳等の汚染実態調査及び簡易培地の検討

市販の低温殺菌牛乳等について、衛生指標菌汚染実態を調査した。調査は平成30年7月から平成31年3月まで行い、検体は低温保持殺菌牛乳（LTLT: 63～65、30分）53検体、高温短時間殺菌牛乳（HTST: 72以上、15秒以上）19検体、高温保持殺菌牛乳（HTLT:

75以上、15分以上）16検体の合計88検体を用いた。試験項目は、細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌とした。試験方法は、細菌数については乳等省令の試験法（32～48時間培養）及びISO 4833-1:2013（30～72時間培養）を、腸内細菌科菌群は定性法としてISO 21528-1:2017を、定量法としてISO 21528-2:2017を用いた。大腸菌群については乳等省令の試験法を用いた。黄色ブドウ球菌については通知法（食安発0729第4号）を、大腸菌については公定法及びISO 16649-2を用いた。また、各試験項目の代替法として、国際的な第三者認証を取得し、国内で市販されている代表的な簡易培地を用いた。得られた結果は、対応のあるt検定により統計解析を行った。検出限界値未満の値は0として計算を行った。検体管理温度、一部培養温度等に逸脱があった19検体については、結果を全体の統計に含めず、別途参考値として集計した。簡易培地で検出された細菌の菌種の同定は、16S Bacterial rDNA PCRキット（タカラバイオ）を用いた塩基配列解析及びBLAST相同性検索により行った。黄色ブドウ球菌検出用簡易培地上に形成された非定型集落の同定には、MALDI BioTyper（Bruker）を用いた。

C. 研究結果

1) 諸外国における低温殺菌牛乳等の微生物規格

表1に諸外国における低温殺菌牛乳等の微生物規格を示した。また、参考としてICMSFにより設定された低温殺菌牛乳の微生物規格についても示した。EUでは低温殺菌牛乳について、製造工程の最終時の微生物規格として腸内細菌科菌群を10CFU/mL未満と定め

ており、1ロットについて5検体試験し、全検体合格でなくてはならない、としていた。一方米国では、生菌数を 2.0×10^4 CFU/mL 以下とし、大腸菌群については 10 CFU/mL (バルク出荷時は 100 CFU/mL) 以下としていた。規格適用箇所については規定されていなかった。Codex や FAO/WHO に科学的助言をおこなっている ICMSF は、製造終了時の微生物規格として腸内細菌科菌群を対象とした3階級のサンプリングプランを設定しており、1ロットについて5検体試験し、その内2検体までは 5 CFU/mL であっても当該ロットを合格とする(3検体は 1 CFU/mL 未満でなくてはならない)、としていた。英国及びオーストラリアでは飲用の生乳(未殺菌乳)に微生物規格を設定しており、英国では農場での生菌数を 2.0×10^4 CFU/mL、大腸菌群を 100 CFU/mL としていた。オーストラリアでは製造、加工、販売時の微生物規格としてカンピロバクター、大腸菌群、大腸菌、サルモネラ属菌及び生菌数をサンプリングプランに基づき設定していた。

2) 低温殺菌牛乳等の汚染実態調査

今回の調査結果概要を表2に示した。公定法での細菌数(32-48時間培養)は、LTLT 乳 53 検体で平均 1.49 logCFU/mL (検出限界以下 ~ 4.07 logCFU/mL)、HTST 乳 19 検体で平均 1.31 logCFU/mL (検出限界以下 ~ 3.36 logCFU/mL)、HTLT 乳 16 検体で平均 0.29 logCFU/mL (検出限界以下 ~ 1.32 logCFU/mL) であった。一方、公定法と同一の培養条件(32-48時間)で簡易培地を用いた際の実菌数は LTLT 乳で平均 1.03 logCFU/mL (検出限界以下 ~ 4.27 logCFU/mL)、HTST 乳で平均 0.97 logCFU/mL (検出限界以下 ~ 3.40

logCFU/mL)、HTLT 乳で平均 0.28 logCFU/mL (検出限界以下 ~ 1.38 logCFU/mL) であった。また、ISO 法による細菌数(30-72時間培養)は、LTLT 乳で平均 2.06 logCFU/mL (検出限界以下 ~ 4.34 logCFU/mL)、HTST 乳で平均 1.66 logCFU/mL (検出限界以下 ~ 3.61 logCFU/mL)、HTLT 乳で平均 0.75 logCFU/mL (検出限界以下 ~ 2.08 logCFU/mL) であった。ISO 法と同一の培養条件で簡易培地を用いた際の実菌数は、LTLT 乳で平均 1.90 logCFU/mL (検出限界以下 ~ 4.70 logCFU/mL)、HTST 乳で平均 1.23 logCFU/mL (検出限界以下 ~ 3.62 logCFU/mL)、HTLT 乳で平均 0.54 logCFU/mL (検出限界以下 ~ 1.58 logCFU/mL) であった。

細菌数における試験法間での有意差検定を通じ、公定法と簡易培地の間では、LTLT 乳と HTST 乳では有意差を示したが、HTLT 乳では有意差は見られなかった(表2)。また、両者の相関を寄与率で算出したところ、LTLT 乳で 0.0614 (図1)、HTST 乳で 0.7169 (図4)、HTLT 乳で 0.186 (図7) であった。公定法と ISO 法の間では、LTLT 乳、HTST 乳及び HTLT 乳のいずれも有意差を示し(表2)、寄与率は LTLT 乳で 0.5177 (図2)、HTST 乳で 0.7863 (図5)、HTLT 乳で 0.1306 (図8) であった。一方、ISO 法と簡易法の間では、HTST 乳では有意差を示したが、LTLT 乳と HTLT 乳では差は見られず(表2)、寄与率は、LTLT 乳で 0.6093 (図3)、HTST 乳で 0.6598 (図6)、HTLT 乳で 0.7197 (図9) であった。一部の温度逸脱等により参考値として集計した検体においても、LTLT 乳における寄与率は、公定法と ISO 法及び ISO 法と簡易法の間で高く、公定法と簡易法の間で低い傾向を示した(図10、11 及び 12)。今回試験した検体からは、いずれの試験法においても、黄色ブドウ

球菌及び大腸菌は検出されなかった。一方大腸菌群は、LTLT 乳 1 検体より検出された。

低温殺菌牛乳等の細菌数試験においては、簡易培地上でしばしば拡大集落が形成され、菌数の測定が困難になる場合が見られた。また、簡易培地上では微小集落や遅延増殖を示す集落も認められ、所定の培養時間内では正確な菌数測定が困難になる例も見られた。これらの代表的集落について、16S rDNA 塩基配列解析に基づく菌種同定を行ったところ、拡大集落の多くは *Bacillus* 属と同定された(表 3)。一方、増殖遅延集落や微小集落には *Paenibacillus* 属、*Kocuria* 属、*Microbacterium* 属が含まれていた。また、黄色ブドウ球菌用簡易培地上に発育した非定型集落は、*Bacillus cereus*、*B. clausii*、*Paenibacillus amylolyticus* 等であった。

D. 考察

本研究により、LTLT 乳において混釈培養による公定法と簡易培地(32-48 時間培養)での集落形成に有意な差があることが示された。一方、培養時間の長い ISO 法と簡易法(30-72 時間培養)では有意差はみられなかったことから、低温殺菌による半致死的な加熱損傷が、簡易培地での集落形成性を低下させ、増殖の遅延を引き起こしている可能性が示唆された。一方 HTLT 乳は低温殺菌牛乳の中でも殺菌温度が高く、殺菌時間が長いため、牛乳中の残存菌数が LTLT 乳及び HTST 乳よりも低いことから、公定法及び ISO 法と簡易法の間での差が見られなかった。簡易培地は公定法に比べ、最終判定までの所要日数が短く、細菌数の試験では検出感度も高いことから、食品の微生物試験における有用性は高いと思われるが、製品の特性上、加熱損傷菌が

多く含まれ、また、製品中への *Bacillus* 属等の耐熱性菌の残存がおりうる低温殺菌牛乳等に関しては、最終製品の基準適合性試験よりも製造工程管理への使用が適していると思われた。

今回の試験により、市販の低温殺菌牛乳は概ね良好な衛生状態にあることが示された。次年度は、対象とする乳製品の種類を拡大した汚染実態調査を実施すると共に、今年度検討した簡易培地を用いた検証を実施する予定である。

E. 結論

公定法、ISO 法及び第三者認証取得済みの簡易培地を用いて、市販の低温殺菌牛乳等を対象とした衛生指標菌調査を行った。供試製品検体の衛生状態は概ね良好であったが、試験法間の成績比較を通じ、低温殺菌牛乳の製造工程で用いられる低温加熱殺菌では熱損傷菌を生じさせている可能性が示唆された。簡易培地は公定法に比べ、最終判定までの所要日数が短いものが多く、食品の微生物試験における有用性は高いと思われるが、上述の理由から低温殺菌牛乳等への適用は現状では難しいと思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 諸外国、地域等における低温殺菌牛乳等の微生物規格

EU				
対象食品	対象微生物	規格	サンプリングプラン	適用箇所
低温殺菌乳	腸内細菌科菌群	m=<10cfu/mL	n=5, c=0	製造工程の最終時
米国				
対象食品	対象微生物	規格	サンプリングプラン	適用箇所
低温殺菌乳	生菌数	m=2.0x10 ⁴ cfu/mL	記載なし	記載なし
	大腸菌群	m=10cfu/mL(パルク出荷時は100cfu/mL)	記載なし	
ICMSF				
対象食品	対象微生物	規格	サンプリングプラン	適用箇所
低温殺菌乳	腸内細菌科菌群	m=<1cfu/mL, M= 5cfu/mL	n=5, c=2	製造終了時
英国				
対象食品	対象微生物	規格	サンプリングプラン	適用箇所
直接飲用される生乳	生菌数	2.0x10 ⁴ cfu/mL	記載なし	農場
	大腸菌群	100cfu/mL	記載なし	
オーストラリア				
対象食品	対象微生物	規格	サンプリングプラン	適用箇所
未殺菌乳(小売用)	カンピロバクター	0/25mL	n=5, c=0	製造, 加工, 販売
	大腸菌群	m=100cfu/mL, M=1,000cfu/mL	n=5, c=1	
	大腸菌	m=3cfu/mL, M=9cfu/mL	n=5, c=1	
	サルモネラ属菌	0/25mL	n=5, c=0	
	生菌数	m=2.5x10 ⁴ cfu/mL, M=2.5x10 ⁵ cfu/mL	n=5, c=1	

表 2 . 各試験法による低温殺菌牛乳等中の細菌数

	LTLT 乳 (53 検体)	HTST 乳 (19 検体)	HTLT 乳 (16 検体)
公定法平均値 (log CFU/mL)	1.49	1.31	0.29
簡易法(32) 平均値 (log CFU/mL)	1.03	0.97	0.28
p value(vs 公定法)	0.002841**	0.022899*	0.919564
ISO 法平均値 (log CFU/mL)	2.06	1.66	0.75
p value(vs 公定法)	<0.00001**	0.010847*	0.023498*
簡易法(30) 平均値 (log CFU/mL)	1.90	1.23	0.54
p value(vs ISO 法)	0.062791	0.013697*	0.054438

図1. 公定法と簡易法における集落数の相関 (LTLT 乳)

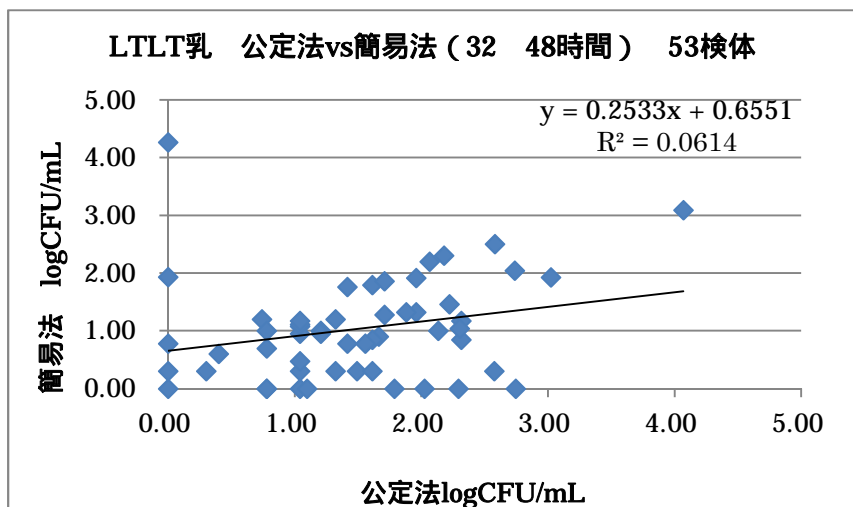


図2. 公定法とISO法における集落数の相関 (LTLT 乳)

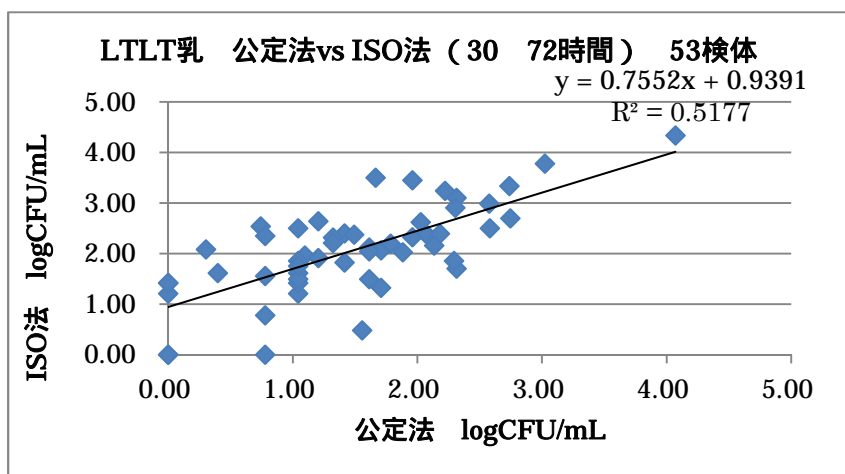


図3. ISO法と簡易法 (30 72時間培養) における集落数の相関 (LTLT 乳)

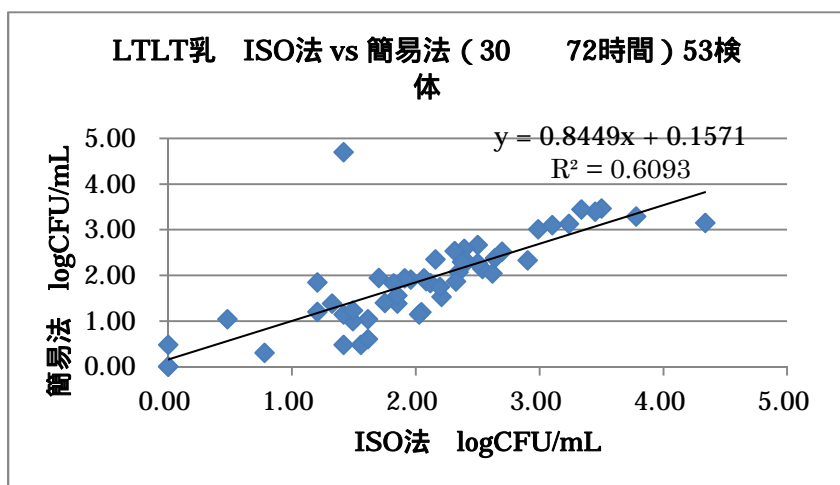


図4. 公定法と簡易法（32 48時間）における集落数の相関（HTST乳）

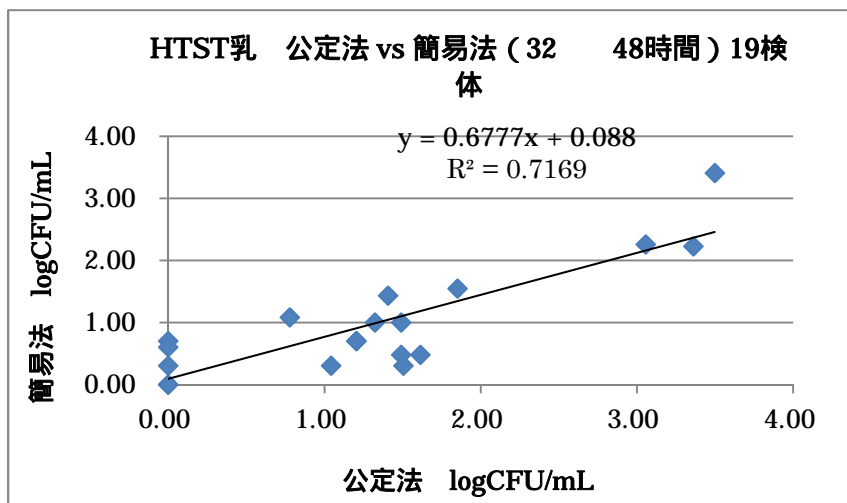


図5. 公定法とISO法における集落数の相関（HTST乳）

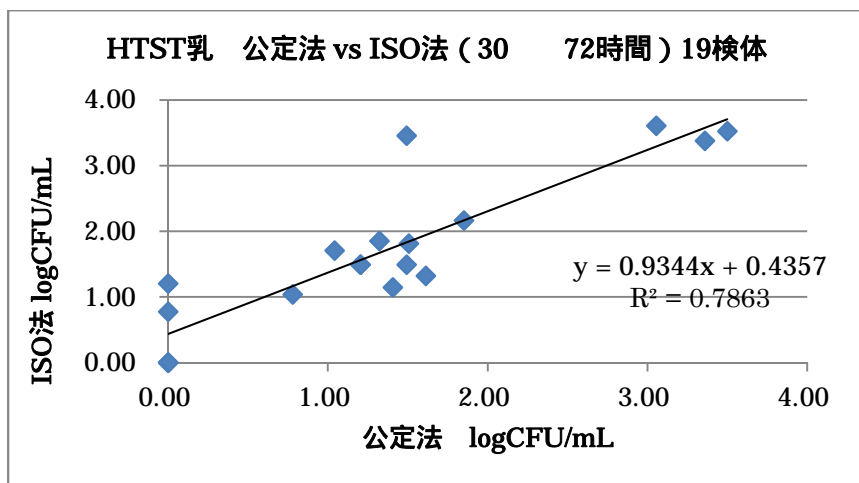


図6. ISO法と簡易法（30 72時間培養）における集落数の相関（HTST乳）

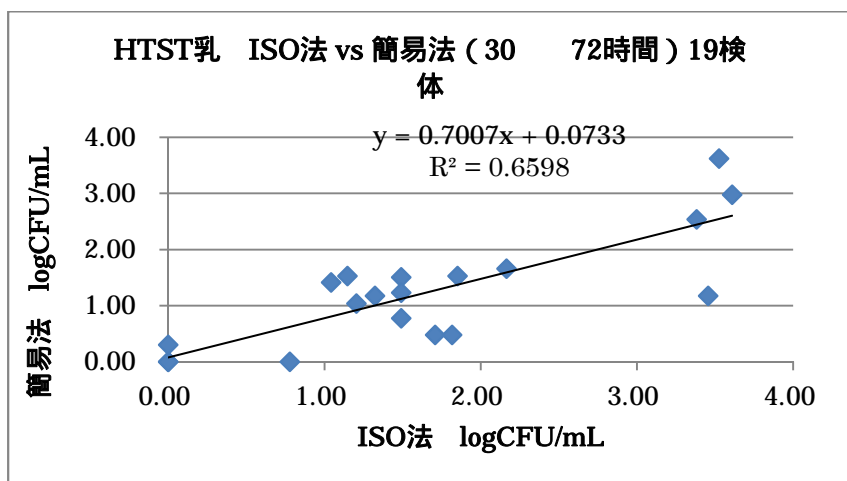


図7. 公定法と簡易法 (32 48時間) における集落数の相関 (HTLT 乳)

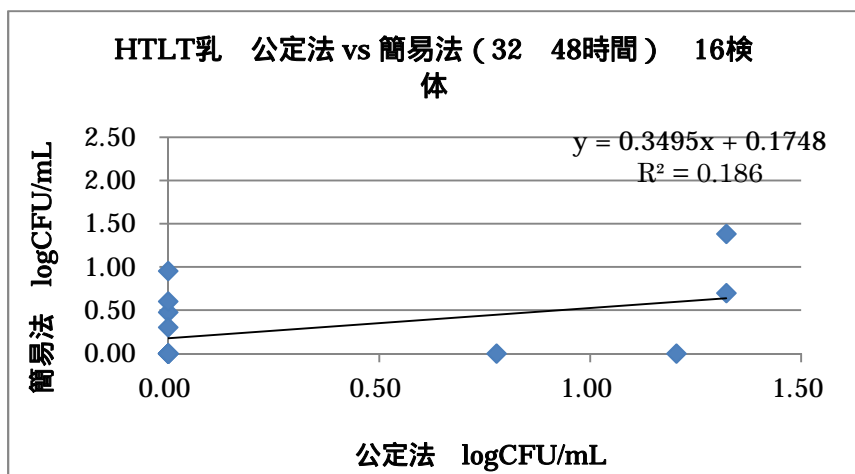


図8. 公定法とISO法における集落数の相関 (HTLT 乳)

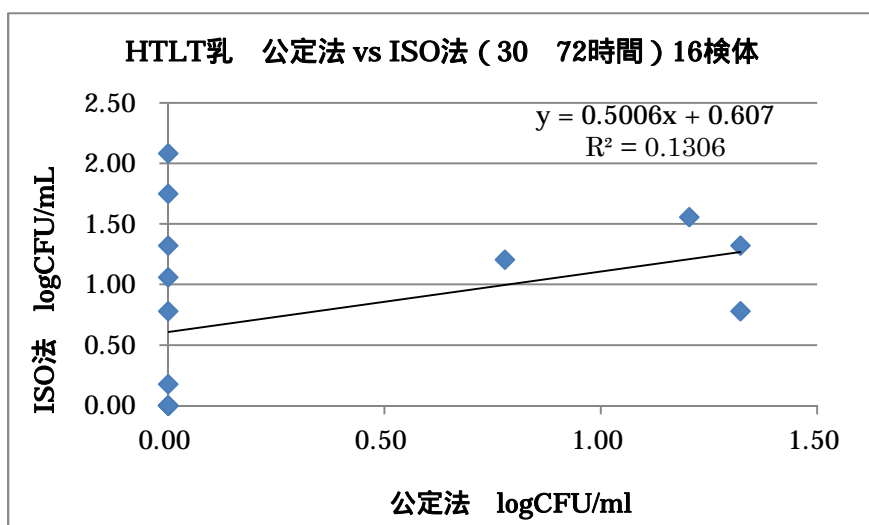


図9. ISO法と簡易法 (30 72時間) における集落数の相関 (HTLT 乳)

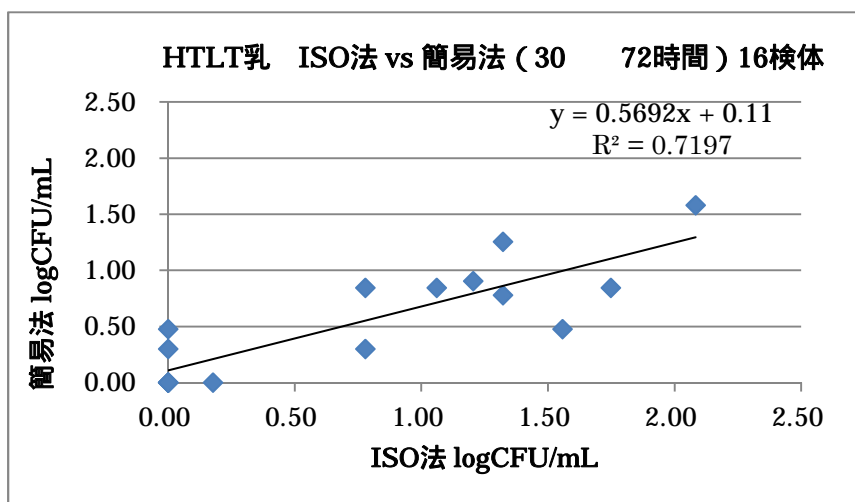
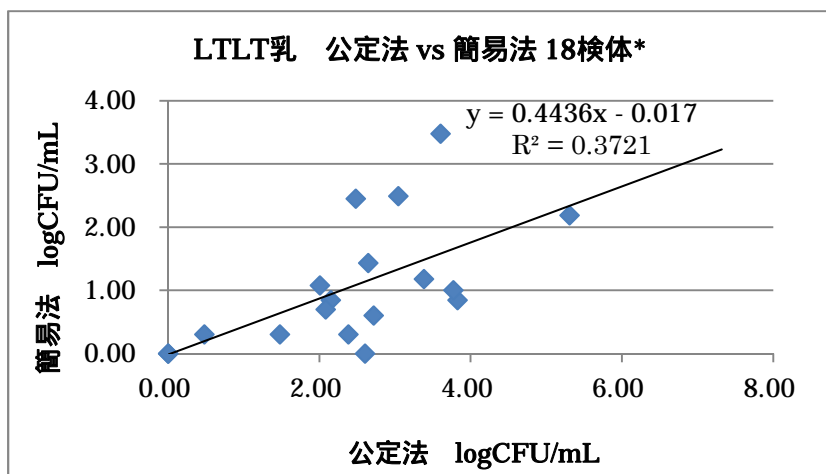


図 10 . 管理温度逸脱等があった検体での公定法と簡易法 (32 48 時間培養) の集落数の相関 (参考値)



*1 検体は簡易法で計測不能

図 11 . 管理温度逸脱等があった検体での公定法と ISO 法の集落数の相関 (参考値)

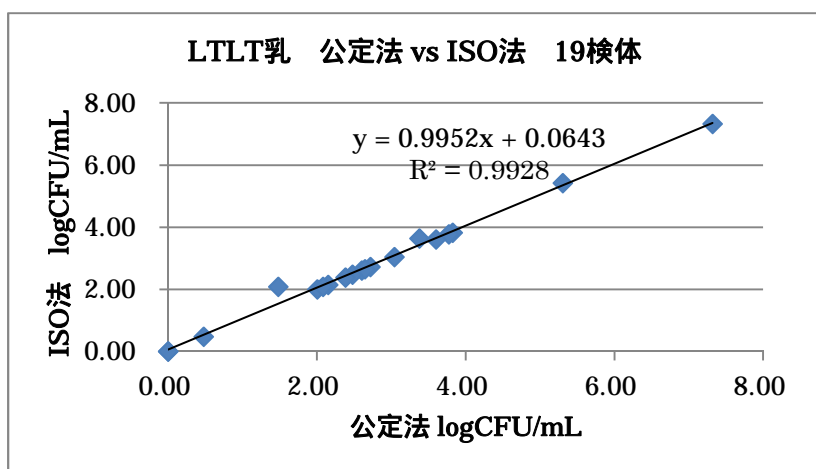


図 12 . 管理温度逸脱等があった検体での ISO 法と簡易法 (30 72 時間) の集落数の相関 (参考値)

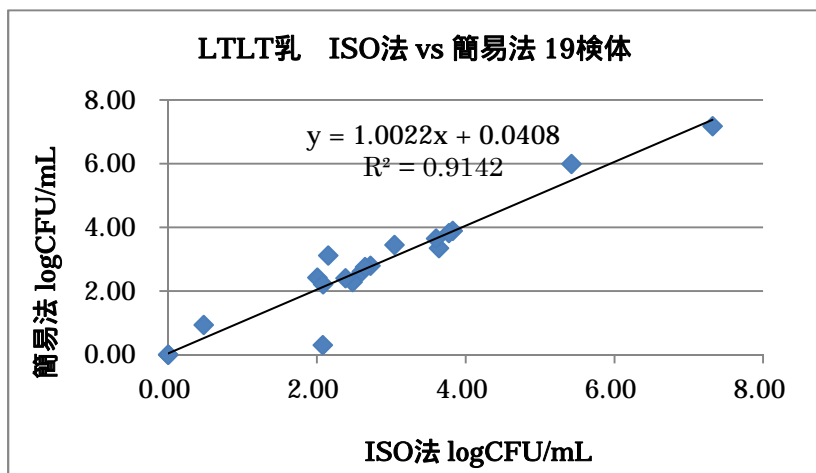


表 3. 簡易培地上に形成された計数困難集落の菌種同定結果

検体	検体種類	試験法	培養温度	性状	菌種同定結果	上位 3 菌種			
A	LTLT	簡易培地 1	30	赤青拡大集落	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>				
		簡易培地 2	32	赤色拡大集落	<i>Bacillus licheniformis</i>				
B	LTLT	簡易培地 3	35	普通	<i>Bacillus spp.</i>				
		簡易培地 3	35	遅延増殖	<i>Kocuria spp.</i>				
C	HTST	簡易培地 2	32	遅延増殖	<i>Kocuria spp.</i>	<i>Actinobacteria spp.</i>			
D	LTLT	簡易培地 2	32	遅延増殖	<i>Microbacterium spp.</i>				
E	HTST	簡易培地 2	32	遅延増殖	<i>Microbacterium spp.</i>				
F	LTLT	簡易培地 1	32	青色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>				
		簡易培地 2	32	赤色拡大集落	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus sp</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	
		簡易培地 1	30	青色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus tropicus</i>	<i>Bacillus paramycoides</i>	<i>Bacillus nitratireducens</i>	
G	HTST	簡易培地 2	32	赤色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus velezensis,</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>	
		簡易培地 2	32	赤色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus licheniformis,</i>	<i>B. haynesii,</i>	<i>B. sonorensis</i>	
		簡易培地 2	32	微小集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus kochii,</i>	<i>B. depressus</i>	<i>B. purgationiresistens</i>	
		簡易培地 2	32	普通	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. tequilensis</i>	<i>B. mojavensis</i>	
H	LTLT	簡易培地 2	32	赤色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>B. velezensis</i>	<i>B. subtilis</i>	
		簡易培地 2	32	普通	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus aerius</i>	<i>B. stratosphericus</i>	<i>B. altitudinis</i>	
		簡易培地 2	32	微小集落	<i>Paenibacillus spp.</i>	<i>P. odorifier</i>	<i>P. albidus</i>	<i>P. etheri</i>	
		簡易培地 2	32	赤色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>B. velezensis</i>	<i>B. subtilis</i>	
I	LTLT	簡易培地 2	30	普通	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus zhanghouensis,</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. pumilus</i>	
		簡易培地 1	30	青色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus licheniformis,</i>	<i>B. aerius</i>	<i>B. haynesii,</i>	
		簡易培地 1	30	赤色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>B. haynesii,</i>	<i>Bacillus licheniformis,</i>	<i>B. sonorensis</i>	
		簡易培地 1	30	青色拡大集落	<i>Bacillus spp.</i>				

J	HTST	簡易培地 1	30	赤色擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>			
		簡易培地 1	30	赤青擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus licheniformis,</i>	<i>B. haynesii,</i>	<i>B. sonorensis</i>
		簡易培地 1	30	青色擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus aerius</i>	<i>B. stratosphericus</i>	<i>B. altitudinis</i>
K	LTLT	簡易培地 3	30	遲延增殖	<i>Paenibacillus spp.</i>	<i>Paenibacillus peoriae</i>	<i>P. polymyxa</i>	<i>P. brasiliensis</i>
		簡易培地 4	30	遲延增殖	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus zhanghouensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. pumilus</i>
L	LTLT	簡易培地 2	30	普通	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus aerius</i>	<i>B. stratosphericus</i>	<i>B. altitudinis</i>
M	LTLT	簡易培地 1	30	青色擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus zhanghouensis,</i>	<i>B. australimaris</i>	<i>B. xiamenensis</i>
		簡易培地 1	32	赤青擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus aerius</i>	<i>B. stratosphericus,</i>	<i>B. altitudinis</i>
		簡易培地 1	32	青色擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus licheniformis,</i>	<i>B. sonorensis</i>	<i>B. haynesii,</i>
		簡易培地 2	32	赤色擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus licheniformis,</i>	<i>B. sonorensis</i>	<i>B. haynesii,</i>
N	LTLT	簡易培地 2	32	遲延增殖	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Pseudomonas weihenstephanensis</i>	<i>Pseudomonas deceptionensis</i>	<i>P. lundensis</i>
		簡易培地 1	30	青色擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus zhanghouensis</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. pumilus</i>
O	LTLT	簡易培地 2	30	微小集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. tequilensis</i>	<i>B. halotolerans</i>
P	HTST	簡易培地 2	30	赤色擴大集落	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus licheniformis,</i>	<i>B. haynesii,</i>	<i>B. sonorensis</i>

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
特になし					

講演

発表者氏名	演題名	発表学会名	発表時期
特になし			

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理及び試験法確立のための研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 食品衛生管理部 第三室長
(氏名・フリガナ) 岡田 由美子 (オカダ ユミコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項) 病原体等の取扱い(所内の管理規定に従って実験を実施)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

厚生労働大臣
—(国立医薬品食品衛生研究所長)— 殿
—(国立保健医療科学院長)—

機関名 国立医薬品食

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田 晴宏



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

2. 研究課題名 国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理及び試験法確立のための研究

(H30 - 食品 - 一般 - 009)

3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品衛生管理部・部長

(氏名・フリガナ) 朝倉 宏 ・ アサクラ ヒロシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

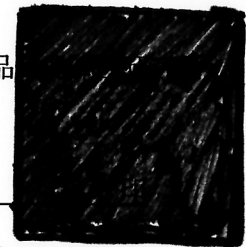
当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田晴宏



次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理及び試験法の確立のための研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品衛生管理部・主任研究官

(氏名・フリガナ) 中山 達哉 (ナカヤマ タツヤ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理及び試験法確立のための研究 (H30-食品-一般-009)
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全情報部 第二室長
(氏名・フリガナ) 窪田 邦宏 (クボタ クニヒロ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年4月10日

厚生労働大臣殿

機関名 国立大学
所属研究機関長 職名 学長
氏名 三村 信

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及びについては以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理及び試験法確立のための研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 茨城大学農学部・准教授
(氏名・フリガナ) 鈴木 穂高 (スズキ ホダカ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年 3月20日

厚生労働大臣殿

機関名 国立大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 奥田 遼 印

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理及び試験法確立のための研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 動物・食品検査診断センター・准教授
(氏名・フリガナ) 山崎 栄樹・ヤマサキ エイキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。