

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**

令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 由美子

令和2年(2020)6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2(2020)年 6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

----- 21

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

----- 39

3. 国内小規模アイスクリーム製造施設の衛生実態に関する研究

山崎 栄樹 他

----- 53

3. アイスクリーム類等に対する簡易培地使用の妥当性及び衛生指標菌汚染実態に関する研究

岡田 由美子 他

----- 63

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)

令和元年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

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
	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	鈴木穂高
	永島侑起	国立大学法人茨城大学農学部
	渡辺 愛	国立大学法人茨城大学農学部
	御堂梨花子	国立大学法人茨城大学農学部
	百瀬愛佳	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	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
	倉園久生	国立大学法人徳島大学研究支援・産官学連携センター
	奥村香世	国立大学法人帯広畜産大学獣医学研究部門

研究要旨

日本国内における乳及び乳製品の衛生管理のための微生物規格には、現在、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)に定められた細菌数と大腸菌群が用いられている。そのため、現在でもそれらが科学的に妥当か否かの検証が望まれている。また、HACCP導入後の各種食品製造工程における衛生管理上で、迅速簡易法が適用される可能性が高まっているが、乳及び乳製品での適用の妥当性については、確認されていない部分がある。更に、今後の国際貿易の拡大を見据え、国際動向を踏まえた形でわが国の乳製品等の品質を評価し、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と考えられる。本研究では、乳及び乳製品の衛生実態を把握し、微生物規格を再検討する上での基礎的知見の集積を図ることを目的としており、本年度は諸外国におけるアイスクリーム類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、デンマークのアイスクリーム工場等を視察し、情報を収集した。また、国内でアイスクリーム類を製造する大、中及び小規模施設の協力を得て、各製品の製造工程について衛生試験を通じた検討を行い、実態を把握することとした。更に、アイスクリーム類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。文献調査の結果から、欧米諸国において市販アイスクリームの喫食に起因する食中毒報告や、回収汚染情報データベースにアイスクリームの微生物汚染に関連した情報が少なく、事例の発生が限られていることが確認された。現地調査の結果より、デンマークの国内基準はEU規則に沿って設定されており、各社では温度管理等について国内基準より厳しい自主基準を設定して衛生管理を行っていた。微生物検査に関しては、自社検査に総菌数や大腸菌群を使用することで通常の衛生状態の確認を行い、加えて定期的に検査会社に依頼してEU規則遵守の確認を行っていた。外部検査会社ではEU規則に沿ってISO法に準じていると妥当性が評価された代替法を使用していた。総じて、デンマークのアイスクリームに関連する各種衛生対策は効果的であると思われた。

大及び中規模のアイスクリーム製造施設各1施設における製造工程管理並びに実態調査の結果、アイスクリーム製造段階における製造基準は適切に遵守されている状況を確認できた。一方、製造基準や成分規格の試験項目として乳等省令に基づいた大腸菌群を糞便汚染指標とすることの適切性については、国際動向を踏まえた上で、原料、中間・最終製品中での挙動に関する知見を集積・整理することが必要と思われた。

小規模アイスクリーム製造施設の調査から、小規模施設では細菌学的汚染度の異なる複数のフレーバーを小ロットで製造している実態が明らかとなり、各施設において簡易検査法を利用した迅速な日常検査導入の重要性が示唆された。簡易検査法を用いた試験の結果に試験設備条件が与える影響について検討した結果、恒温槽等を用いた精確な温度管理が難しい試験条件下においても試験条件のたまかなコントロールにより、簡易検査法を用いて適切な結果が得られることが明らかとなり、小規模製造施設の日常検査における簡易検査法の有用性が示された。

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、市販のアイスクリーム類127検体を対象とした衛生指標菌調査を行ったところ、供試製品検体に微生物規格違反は見られず、衛生状態は概ね良好であった。細菌数試験法間の成績比較を通じ、アイスクリーム類では簡易培地の製品によって、公定法と結果の差が見られたものがあり、また、ISO法の表面塗抹法は混釈培養法より有意に低い結果を示したことから、代替試験法については導入検証が必要であることが示された。

A. 研究目的

食品の安全性を確保するため、日本を含む世界各国において様々な食品に対し微生物規格が定められている。規格の対象となる項目は、過去に食中毒事例の原因となった微生物のみならず、食品の衛生状況の指標となる項目が用いられており、食品の安全確保に重要な役割を果たしてきた。一方、国内の衛生状況は時代の変遷と共に変化を顕し、昨今では食品の国際流通も増加の一途を辿る等、食を取り巻く環境は変化している。わが国の乳及び乳製品については、昭和 26 年に発令された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」(乳等省令)に基づき、細菌数と大腸菌群が微生物規格に設定され、安全確保が図られている。一方、現在 EU 等では乳製品の製造工程管理を HACCP ベースで行うと共に、わが国で 2011 年に生食用食肉の微生物規格として採用された、腸内細菌科菌群を衛生指標として製品等の検査が実施されている状況にある。国内規格は現時点においても、一定の安全確保に資する内容であることには違いがない一方、国際動向を踏まえた内容と結論づけるためには、その妥当性を科学的に評価する必要があると考えられる。

以上の背景を踏まえ、令和元年度は、諸外国におけるアイスクリーム類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、海外におけるアイスクリーム類製造の衛生管理実態の把握、国内で製造流通するアイスクリーム類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。

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ついての調査

各種データベース等に報告されている、海外におけるアイスクリームの喫食に起因する健康被害事例や、微生物汚染による回収事例に関する情報収集を行った。

健康被害事例に関しては米国疾病予防管理センター(US CDC: Centers for Disease Control and Prevention)の全米アウトブレイク報告システムダッシュボード「NORS(National Outbreak Reporting System) dashboard

(<https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>)を用いて調査を行った。対象期間は 1998~2017 年(20 年間)、対象地域は米国全州、発生場所は全ての場所として検索を行った。家庭で製造されたアイスクリームによる健康被害事例が多く見られたが、それらは除外し市販アイスクリームによるものに限定した。

アイスクリームの回収・汚染情報について、回収・汚染情報データベースの検索を行った。米国における微生物汚染によるアイスクリーム製品回収情報の調査には、製品回収情報データベースとして FDA(US FDA: Food and Drug Administration)の回収情報データベース(<https://www.fda.gov/safety/recalls/>)を使用した。対象期間は 2017~2020 年(約 3 年間)、製品分類は食品および飲料(Food & Beverages)として検索を行った。欧州における食品汚染情報の調査は、EU の警告情報データベースである「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)」を用いて、アイスクリームの微生物汚染に関する警告情報の検索を行った。対象期間

は2010～2019年(10年間)とし、製品分類は「アイスやデザート(ices and desserts)」、ハザード分類は「病原性微生物(pathogenic micro-organisms)または微生物汚染(そのほか) microbial contaminants (other)」とした。

さらに、デンマークの食品衛生を担当する行政機関および研究機関、デンマークのアイスクリーム製造施設2ヶ所(大規模および小規模各1ヶ所)を訪問し、それぞれの製品・製造施設の衛生実態を調査するとともに、製造施設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。

2) 大及び中規模製造施設の衛生実態調査

2)-1 . 協力施設でのアイスクリーム製造に係る情報収集

アイスクリームを製造する大規模及び中規模事業施設 A、B(以下、施設 A または施設 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、並びに製造量、製品仕様、自主検査等の情報提供を依頼し、承諾を得た。

2)-2 . 採材

施設 A では、原料(脱脂粉乳2種、粉末水飴)及び最終製品のほか、充填機周辺環境拭き取り検体を3M Hydrated sponge(スリーエム)を用いて採材した。全ての検体は冷蔵温度帯で保管・輸送し、採材から3時間以内に検査に供した。

施設 B では生乳(参考品)及び最終製品のほか、充填室内の床及び壁を施設 A と同様に採材した。各検体は、冷蔵温度帯で輸送し、採材から4時間以内に試験に供した。

2)-3 . 衛生指標菌定量試験

衛生指標菌の検出には、国際標準試験法である ISO 法(細菌数、ISO 4833-1;腸内細菌科菌群、ISO 21528-2;大腸菌群、ISO 4832;大腸菌、ISO 16649-2;黄色ブドウ球菌、ISO 6888-1)を用いて検討を行った。

なお、生乳の調整にあたっては、5倍希釈液を作成し、試験原液として用いた。

拭き取り検体は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて試験懸濁原液を調整した。同原液1mLを各平板培地に接種し、上述のISO文書に従って培養を行い、菌数を求めた。

2)-4 . 細菌叢解析

施設 A の検体については、試験原液1mLを対象とした。何れも滅菌 PBS を用いて2回洗浄を行った後、MaxWell RSC DNA Blood kit(プロメガ)を用いて Total DNA を抽出した。その後、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 反応により 16S rRNA V5-V6 領域を増幅し、E-gel SizeSelect 2%(Thermo Fisher)及び AMPure XP(Beckman)を用いて増幅産物を精製・定量した。その後、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.20(キアゲン-CLC)を用いて不要配列を除去後、RDP Classifier pipelineへ投入し、階層分類等の解析を行った。

2)-5 . 生乳中の微生物動態解析

上項2.で示した施設 B 由来生乳(参考品)検体を100mLずつ分注した後、速やかに4℃にて0,1,2,5日間冷蔵保管した。各時点において検体を取り出し、上項3.に示す方法により一般

細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数、黄色ブドウ球菌数を求めた。各指標菌間の相関性の判定にはリストワイズ法を用いた相関の p 値を用いた。

3) 国内小規模アイスクリーム製造施設の衛生実態に関する研究

3) -1. 調査対象

北海道内でアイスクリームを製造・販売する小規模事業者（十勝地方 2 社、石狩地方 1 社）について調査を実施した。調査においては、製造地域での販売に加え、通信販売・業務用販売を含めた道外での広域販売を行っている事業者を選定した。各施設について、製造工程、各施設で実施される自主検査項目について、施設見学および聞き取り調査を実施し、製造工程管理実態および衛生管理実態を取りまとめた。

3) -2. 衛生検査

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

3) -2-1. 試料概要

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

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

3) -2-2. 細菌検査法概要

① 腸内細菌科菌群数

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 ($37\pm 1^{\circ}\text{C}$, 24 ± 2 時間) に引き続くオキシダーゼ試験およびブドウ糖分解性試験による確定試験を行った。簡易培地法においては 1 社より入手した 1 製品を用い、製品添付の取扱説明書に従って検査を実施した。

② 生菌数

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 ($30\pm 1^{\circ}\text{C}$, 72 ± 2 時間) を行った。簡易培地法においては 3 社より入手した 3 製品を用い、製品添付の取扱説明書に従って検査を実施した。

③ 大腸菌群数

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 ($30\pm 1^{\circ}\text{C}$, 24 ± 2 時間) に引き続く Brilliant Green Bile (BGB) 培地を用いた確認培養 ($30\pm 1^{\circ}\text{C}$, 24 ± 2 時間) を行った。簡易培地法においては 3 社より入手した 3 製品を用い、製品添付の取扱説明書に従って検査を実施した。

④ 大腸菌数

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 ($37\pm 1^{\circ}\text{C}$, 4 時間の培養の後に $44\pm 1^{\circ}\text{C}$, 24 ± 2 時間) を行った。簡易培地法においては 3 社より入手した 3 製品を用い、製品添付の取扱説明書に従って検査を実施した。

4) アイスクリーム類の細菌汚染実態調査及び簡易培地の検討

市販のアイスクリーム類について、衛生指標菌汚染実態を調査した。調査は令和元年 7 月から令和 2 年 3 月までに行い、検体はアイスクリーム (乳固形分 15% 以上、うち乳脂肪分 8% 以上) 52 検体、アイスマルク (乳固形分 10% 以上、

うち乳脂肪分 3%以上) 45 検体、ラクトアイス (乳固形分 3%以上) 30 検体の合計 127 検体を用いた。試験項目は、細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌とした。試験方法は、細菌数については乳等省令の試験法 (32°C48 時間培養) 及び ISO 4833-1:2013 (30°C72 時間培養) を、腸内細菌科菌群は定性法として ISO 21528-1:2017 を、定量法として ISO 21528-2:2017 を用いた。大腸菌群については乳等省令の試験法を用いた。黄色ブドウ球菌については通知法 (食安発 0729 第 4 号) を、大腸菌については公定法及び ISO 16649-2:2001 を用いた。また、各試験項目の代替法として、国際的な第三者認証を取得し、国内で市販されている代表的な簡易培地 2 種を、製品の指示書に示された培養温度及び時間に従って用いた。同一検体間の試験法による菌数の比較は、対応のある t 検定により統計解析を行った。種別ごとの菌数の比較は一元配置分散分析及び Tukey の検定を行った。検出限界値未満の値は 0 CFU/g として計算を行い、対数化に当たって全数値に 1 を加算した。検出された腸内細菌科菌群の菌種同定は、16S Bacterial rDNA PCR キット (タカラバイオ) を用いた塩基配列解析及び BLAST 相同性検索により行った。3 カテゴリー間での腸内細菌科菌群陽性率の比較は、フィッシャーの正確確率検定により行った。

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ついての調査

1) -1. 米国 CDC NORS dashboard を用いたアイスクリームの喫食に起因する健康被害事例の調査

米国の NORS データベースにおいて、1998

~2017 年に市販のアイスクリームとの関連が確認された、微生物を病因物質とする食中毒アウトブレイク事例は 11 件であった (窪田分担報告書 表 1)。これらの事例の病原体別の内訳は、ノロウイルスが 4 件、黄色ブドウ球菌が 3 件、サルモネラが 2 件、志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) O157 が 1 件、リステリアが 1 件であった。2015 年に報告され、患者 10 人のうち 3 人が死亡した Blue Bell Creameries 社製アイスクリームによるリステリア感染アウトブレイクは、2010 年に初発患者が発生したため表 1 では 2010 年に発生とした。2013 年の STEC O157 感染アウトブレイクでは患者 4 人のうち 1 人が死亡している。大規模事例としては、2004 年の黄色ブドウ球菌感染アウトブレイク (患者 132 人、入院患者 12 人) と 2000 年のサルモネラ (*Salmonella* Enteritidis) 感染アウトブレイク (患者 132 人) が挙げられる。

1) -2. 米 FDA 回収情報データベースおよび EU RASFF 食品汚染情報データベースを用いたアイスクリームの回収・汚染情報の調査

米国 FDA の回収情報データベースにおいて、2017~2020 年のアイスクリームの回収事例は 22 件であった。このうち、回収等の理由が微生物汚染であるものは 4 件であった (窪田分担報告書 表 2)。汚染微生物別の内訳は、リステリア、リステリアの疑い、サルモネラおよび大腸菌が各 1 件であった。

EU での食品汚染情報に関しては、RASFF データベースで 2010~2019 年の「Ices and desserts」の微生物汚染事例は 13 件で、このうちアイスクリームの汚染事例は 4 件であった。汚染微生物別の内訳は、サルモネラ及びリステリアが各 1 件、腸内細菌科菌群が 2 件であった (窪田分担報告書 表 3)。

1) -3 . デンマークにおけるアイスクリームの規格基準およびデンマークのアイスクリーム製造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。2020 年 2 月 18~21 日にデンマーク獣医食品局 (DVFA)、デンマーク工科大学国立食品研究所 (DTU Food)、大規模アイスクリーム製造施設及び家族経営の小規模アイスクリーム製造施設を訪問し、専門家、経営者及び検査担当者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アイスクリームの製造および消費の状況

デンマークでは 2015 年に 4.26 万キロリットル、2016 年に 4.65 万キロリットル、2017 年に 4.45 万キロリットルのアイスクリームが販売された。アイスクリームの一人あたりの年間消費量は、デンマークの製造会社が示した 2017 年 8 月 1 日時点の統計資料によると、デンマークはニュージーランド、米国、オーストラリア、フィンランド、スウェーデン、カナダに次いで世界第 7 位とのものであった (<https://www.worldatlas.com>)。日本アイスクリーム協会が Web ページに記載している 2016 年の世界各国の 1 人当り年間消費量 (ユーロモニター社調査) によると、デンマークはオーストラリア、ニュージーランド、フィンランド、米国、ノルウェー、イタリア、カナダ、ドイツ、スペイン、ポルトガル、チリに次いで 13 位 (8.2 リットル) であり、17 位の日本 (6.5 リットル) の約 1.3 倍の消費量である (<https://www.icecream.or.jp/biz/data/consumption.html>)。デンマークにおける課税額総額から試算した年間消費量は約 8.1 リットルとの

ことであった。

②デンマークでのアイスクリーム等の製品分類について

デンマークにおけるアイスクリーム製品の製品分類については欧州アイスクリーム協会 (EuroGlaces) により「CODE FOR EDIBLE ICES」中で定義されている (窪田分担報告書資料 1)。それによると、「Water Ice もしくは Ice Lolly」は水と砂糖のみのもの、「Ice Cream」は乳・脂肪・タンパク質・砂糖の乳剤となっているもの、「Milk Ice」は乳脂肪分を 2.5%以上と乳固形分を 6%以上含むもの、「Dairy Ice Cream」は乳脂肪分を 5%以上含むもの、「FF Fruit Ice」は 15%以上の果物を含むもの (果物の種類によっては下回ることも許容される)。「シャーベット」は果物もしくは野菜を 25%以上含むもの (ただし特定の果物は 15%まで、リストに記載された果物は 7%まで、リストに記載された野菜は 10%まで、それぞれ下げることが可能) と定義されている。

③デンマークのアイスクリーム製造に関する各種基準等について

デンマークにおけるアイスクリーム製品の衛生基準は基本的に EU 規則 (EU 規則 2073/2005) に沿ったものであり、サルモネラについては $n=5, c=0, 25g$ 検体で不検出としている (窪田分担研究報告書 資料 2 および資料 3 の項目 1.13)。また腸内細菌科菌群については $n=5, c=2, m<10 CFU/g, M<100 CFU/g$ としている (窪田分担研究報告書 資料 2 および資料 4 の項目 2.2.8)。リステリアに関しては Ready-to-eat foods (加熱せずにそのまま喫食可能な食品) に対する基準に基づき、 $n=5, c=0$ 、商品の賞味期限内で 100 CFU/g を超えること

がないこととしている（窪田分担研究報告書資料 2 および資料 5 の項目 1.2 上段）

各製造施設における上記検査結果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は、各地域の DVFA 監視員により監視指導時に確認されている。

デンマークをはじめとする EU 各国ではアイスクリーム製品に「賞味期限（Best Before）」を表示することになっている。賞味期限の長さは事業者が自らの責任で設定することになっているので、製品の品質に自信のある事業者はより長く設定することも可能とのことであった。今回視察した小規模製造施設では事業開始後 2 年目までは念のため賞味期限を 1 年と通常アイスクリーム製品よりも短く設定していたが、製品の品質に問題がないと考え、3 年目からは賞味期限を 2 年に設定するとしていた。大規模製造施設では多種多様な製品を製造しているため、含まれる原材料を考慮し、製品ごとに異なる賞味期限を設定しているとのことであった。その長さは製品が冷凍保存される性格上、衛生上の問題というよりも製品の状態（味や口当たり等）の保持期間の意味合いの方が大きいとのことであった。

④デンマークのアイスクリーム製造事業の認可等について

DVFA によるアイスクリーム製造事業の認可等は、原料として殺菌乳を使用する場合は通常の食品取り扱い事業者と同様、オンラインで事業者登録を行えばすぐに営業可能となり、その後 3 ヶ月以内に DVFA 監視員の監視指導を受けることになる。原料として生乳（未殺菌乳）を使用する場合は、DVFA へ生乳使用の登録が必要である。

デンマークの大規模アイスクリーム製造施設における検査実態について

大規模製造施設を視察したのは 1927 年創業の老舗アイスクリーム製造会社で、デンマークのアイスクリームの 50～60% のシェアを持っており、スーパーマーケット、コンビニエンスストア、高速道路のパーキングエリアの小売店等で製品を見つけることが可能である。欧州 10 ヶ国に 11 ヶ所の製造施設を持ち、ロシアや中国等への輸出を行なっている。視察した施設からは、デンマーク国内およびドイツ、ノルウェー、スウェーデンに出荷しているとのことであった。さらに他社ブランドの生産（OEM）も請け負っている。今回視察した製造施設はアイスクリームの生産量がデンマーク最大であり、7,800m² の面積を持ち、60～90 人の製造担当者が約 200 種類の製品を製造している。製造設備としてはアイスクリーム原料の混合機 1 基と 8 本の製造ラインが配置されている。原料乳には殺菌乳を使用しており、生乳は使用していなかった。原料乳はデンマーク国内産と輸入製品がそれぞれ 50% 位とのことであった。

製造施設の建物自体は古くから使われているが改修等が適宜行われており、衛生面での問題はないように見受けられた。また DVFA の衛生監視を年 4 回受けていることから、衛生上の問題は少ないと考えられた。

原料乳の殺菌条件はデンマークの規格基準では 72°C15 秒であるが、当該製造会社では自社基準である 75°C30 秒以上で行なっていた。一部の製品では 82°Cでの殺菌を行う場合もあるとのことであった。これらの殺菌条件が妥当か否かの検証を年に 1 回行っているとのことであった。

各種微生物検査に関しては、製品検査や製造設備・環境の検査を定期的に行っていた。

製品検査はシフト（8～12時間）毎に行っており、各シフトの初めの製品および途中の製品の2検体について製造ライン（最大8ライン）ごとに行っていた。各検体に対し製造施設内の検査室で総菌数および大腸菌群の検査が行われ、総菌数が10万/g超もしくは大腸菌群が100CFU/g超の異常が見られた場合は倉庫に保管されている当該シフトで製造された製品を市場流通しないように留め置くとともに、検査会社に検体を送付し、腸内細菌科菌群、サルモネラ、リステリア等の詳細な検査を依頼することであった。

大腸菌群の検査は自社の評価試験により腸内細菌科菌群の試験と同等であるとして使用していた。検査会社ではEU規則に沿ってISO法に準じていると妥当性が評価された代替法を使用していた(窪田分担研究報告書 資料6)。

原材料の混合タンクは週に1回検査を行っていた。環境検査はリステリアについてのみ行っており、外部検査会社に委託し、排水溝を年4回、製造ラインを年1回検査していた。水は井戸を源泉とする市の水道から供給されており、この水と受領した殺菌乳のタンクの検査も定期的に行っていた。また、製造現場の空気中の浮遊細菌の検査のため、製造現場の各位置に開けっ放しにした培養プレートを1時間放置し、検査を行っていた。更にOEM等受託生産の場合は顧客の要望により追加検査(サルモネラ等)や高頻度での製品検査を行う場合もあるとのことであった。

機材やラインの洗浄、消毒は消毒液やアルカリ石鹼により行っており、各生産ロットが終了した際に行っているとのことであった(その後すぐに別ロットの同一製品を生産する場合にはライン洗浄は行わずにそのまま生産を継続)。洗浄・消毒が効果的に行われたことの確認

(バリデーション)は、ライン担当者の目視による確認とともに次回生産初期製品を検査することにより行なっているとのことであった。

製品の保管に関しては、-18℃を上回ることがないように管理しているとのことであった。

DVFAによる衛生監視を年に4回受けており、微生物検査に関しては検査記録等の確認が中心とのことであった。また、製造現場とは別に、DVFAは定期的に店舗で販売中の製品を収去して微生物検査を行っているとのことであった。

デンマークの小規模アイスクリーム製造施設における検査実態について

視察した小規模アイスクリーム工場は、家族経営で従業員数が2～3人であった。春～秋しか営業していない。デンマークでは認証が必要なオーガニックのアイスクリームを製造しており、味の種類は10種類程度であった。事業を開始して3年目で、生産量は初年度が3キロリットル、2年目は9キロリットルとのことである。急速に事業拡大中であった。夏期には近くのビーチ等で直接販売も行うが、基本はレストラン等への販売であった。歴史ある建物内に製造施設を構えており、建物は古いものの製造現場は衛生的に保たれていた。視察した時期は製造を行っておらず実際の製造過程は見られなかったが、DVFAの食品衛生監視員と同行し、製造設備の管理や衛生状態についての説明を受けた。

微生物検査に関しては、自社で検査室を持たないため、検査会社に製品の腸内細菌科菌群検査を年に1度依頼していた。当該施設では製品のリステリアおよびサルモネラ検査を検査会社に依頼していなかった。これは使用している原乳が殺菌乳であり、それをさらに加熱殺菌する工程があることと、フルーツ等の他の原材料

は 90℃以上に加熱する工程があることから検査が不要とのことであった。

製品の保管温度に関して要求されているのは-18℃以下であるが、実際は-25℃としているとのことであった。

2) 大及び中規模製造施設の衛生実態調査

2)-1. 施設 A・B におけるアイスクリーム製造工程に関する情報整理(朝倉・中山分担報告書 図 1)

施設 A でのアイスクリーム製造工程について、情報を提供いただき、今回検討対象とした製品の製造工程フロー図を作成した。

同施設では、稼働日あたり平均約 150 万個の製品を製造しており、製造製品としては、カップ、スティック、コーンから構成されていた。同施設は FSSC 22000 を取得しており、取得にあたり、原料保管を含めて区画化をなし得ており、管理区域は原料保管エリア、調合・貯乳エリア、充填・包装エリア、搬送・保管エリアに大別されていた。

原料調合後の加熱条件については、乳等省令では 68℃30 分もしくはこれと同等以上とされているが、同施設ではプレート式殺菌装置を用いた 85℃15 秒の管理目標値を設定しており、その管理は圧力をモニタリングすることによって行っていた。殺菌後のストレージについては 10℃未満で 1~4 時間を目標値として定めていたほか、容器包装のうち、紙パックについては UV 照射による使用前殺菌を行っていた。

施設 A における自主検査として特に微生物試験に関わる情報を求め、製品については、概ね 3 時間毎にサンプリングを行い、乳等省令で定められる一般細菌数(自主管理基準: 300CFU/ml 未満)及び大腸菌群のほか、開始時には黄色ブドウ球菌も試験項目に定めてい

る状況を確認した。また、ストレージミックスについても、ロット毎にサンプリングを行い、一般細菌数、大腸菌群試験を実施していた。更に、施設環境の清浄度確認には簡易キットを用いた ATP 試験を用いていた。微生物試験の適切性を評価するため、同施設では毎年外部精度管理試験を受講しているとのことであった。また、各衛生指標菌検査には 2017 年より簡易培地を用い始めていた。

一方、中規模の施設 B は、牛乳製造を主体とする中で、アイスクリーム製造もおこなっていた。同施設では出荷先の在庫状況を見て都度製造計画を立てる製造方式を取っており、視察時には製造ラインは稼働していなかった。また、同施設では同施設内で製造された低温殺菌牛乳を原料の一つとして用いていた。アイスクリーム製造は HEPA フィルターで管理された乳製品加工室内で行われており、施設 A と同様に原料調合以降、充填に至る工程はインライン管理であった。充填は半自動の開放系機器を用いており、使用后洗浄も手動であった。加熱殺菌条件は、85~90℃・15 秒を採用しており、圧力モニタリングにより管理していた。自主検査には、原料、冷却・エイジング工程、充填・包装工程のほか、製品を対象としており、一般細菌数(30CFU/ml 未満)及び大腸菌群(陰性)を検査項目としていた。

2)-2. 施設 A における原料、施設ふき取り検体、及び製品からの衛生指標菌の検出状況(朝倉・中山分担報告書 表 1)

原原料 3 検体のうち、脱脂粉乳 A 及び粉末水飴検体は一般細菌数を含めた全ての微生物試験項目で陰性を示した。脱脂粉乳 B 検体についても一般細菌数が僅かに検出されるにとどまり(1.19 log CFU/mL)、他の指標菌は全て陰性

であった。

製品 5 検体についても、原料と同様に一般細菌数以外の試験項目は何れも陰性を示し、一般細菌数の検出数値は 1.33-1.51 log CFU/mL の範囲にとどまっていた。

充填機周辺の拭取り環境検体についても、充填ノズル周辺の拭取り 2 検体より一般細菌数が僅かに検出されたものの他の指標菌は全て不検出となった。

2) -3. 施設 B における製品、施設ふき取り検体、及び生乳（参考品）からの衛生指標菌の検出状況（朝倉・中山分担報告書 表 2）

製品 2 検体からは、一般細菌数が 0.64 または 0.67 log CFU/mL のみ検出されたほか、糞便汚染指標菌（腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌）及び黄色ブドウ球菌はいずれも陰性であった。

充填機が設置された加工室内の床及び壁拭取り検体についても同様に微生物試験に供したが、一般細菌数のみ 4.41-5.22 log CFU/100cm² の範囲で検出された一方、他の指標菌は全て陰性であった。

同施設に牛乳製造用に搬入された生乳計 4 検体を参考品として同様に検査に供した。一般細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群はそれぞれ 3.88-4.05 log CFU/mL、1.50-3.69 log CFU/mL、1.92-3.77 log CFU/mL の範囲で全 4 検体より検出されたほか、大腸菌及び黄色ブドウ球菌は共に 2 検体で陽性を示し、それらの検出数値の範囲は 1.76-1.80 log CFU/mL、または 2.56 log CFU/mL であった。

2)-4. 施設 A での製造工程を通じた構成菌叢比較解析（朝倉・中山分担報告書 図 2, 3）

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。アイスクリームの主原料である脱脂粉乳 A・B では構成菌叢が大きく異なっていたが、このうち、脱脂粉乳 B 検体で優勢であった *Streptococcaceae* は、充填ノズル周辺拭取り検体及び製品においても優勢な菌叢として認められた。同じく主な原料である粉末水飴検体については *Caulobacteraceae* が最も優勢な菌科として検出され、同菌科は製品が固化後、包装される間に輸送される際に直接載せられるトラップステージ拭取り検体及び作業従事者の手指洗浄用電解水検体においても最も優勢であった（朝倉・中山分担報告書 図 2A）。

菌属レベルでの解析を通じ、上述の傾向はより明確化された。すなわち、脱脂粉乳 B 検体、充填ノズル周辺拭取り検体及び製品検体で優勢菌科として検出された *Streptococcaceae* の多くが *Lactococcus* 属及び *Streptococcus* 属等として認められていたのに対し、粉末水飴検体及びトラップステージ拭取り検体で優勢菌科として検出された *Caulobacteraceae* の多くは *Asticcacaulis* 属及び *Brevundimonas* 属等により構成されている状況であることが判明した（朝倉・中山分担報告書 図 2B）。故に、施設 A 由来検体間での菌叢の共通性は菌科・属レベル双方で確認された。なお、検体間の関連性を明確化するため、網階層でのクラスターを作成したところ、上述の見解を指示する結果となった（朝倉・中山分担報告書 図 3）。

2)-5. 生乳検体における各種衛生指標菌の挙動解析（朝倉・中山分担報告書 図 4、表 3）

施設 B より参考品として提供された生乳検体を 4℃下で 0、1、2、5 日間保存し、一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数、黄色ブドウ球菌数を求めた。結果として、0 日

目に 3.88-4.05 log CFU/mL であった一般細菌数は、保存 1 日目には 3.54-4.14 log CFU/mL、保存 2 日目には 3.61-3.99 log CFU/mL、保存 5 日目には 3.44-3.86 log CFU/mL となり、顕著な変動は認められなかった。

一方、腸内細菌科菌群数は 0 日目に 1.50-3.69 log CFU/mL、保存 1 日目に 1.92-4.29 log CFU/mL、保存 2 日目に 2.14-4.41 log CFU/mL と微増したが、保存 5 日目には 2.22-4.28 log CFU/mL と微減した。

保存 0 日目に 1.92-3.77 log CFU/mL であった大腸菌群数は保存 1 日目には 1.96-4.53 log CFU/mL と微増したが、保存 2 日目には 1.79-3.59 log CFU/mL へと若干の減少を示し、保存 5 日目には 1.73-4.61 log CFU/mL と再び微増した。

大腸菌が検出された 2 検体を対象とした動態観察により、同菌は保存 2 日目迄は 1.76-1.80 log CFU/mL から 0.78-0.87 log CFU/mL へと穏やかな減少を示したが、5 日目には 1.36 log CFU/mL へと再び微増した。また、保存 0 日目の段階で大腸菌を認めた 2 検体からは黄色ブドウ球菌も検出されたが、同指標菌は保存 5 日目まで安定的な生存を示した。

得られた数値を基に、指標菌間での相関性を解析した。リストワイズ法を用いた解析結果として、一般細菌数は腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌との間でそれぞれ 0.0876、0.0947、0.4428 の相関の p 値を示し、相関はないと判断された。黄色ブドウ球菌とは 0.0004 となり相関があると判断された。腸内細菌科菌群数は大腸菌群数との間で $p=0.0027$ であったほか、黄色ブドウ球菌との p 値も 0.0253 となり、相関はあると判断された。一方、大腸菌群と大腸菌、黄色ブドウ球菌との間での p 値はそれぞれ 0.1323、0.0687 となり、相関はな

いと判断された。

3) 国内小規模アイスクリーム製造施設の衛生実態に関する研究

3)-1. 施設概要の比較

本調査においては、従業員数 2~5 名の小規模製造工場を調査対象とした(山崎分担報告書表 1)。調査対象とした 3 つの事業者のうち、施設 C は FSSC 22000 の認証を受けていた一方で、施設 A および B は上記のような衛生管理過程に関する定期的な第三者評価を受けていない施設であった。

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

3)-2. 製造工程の比較

小規模施設における製造フローチャートを山崎分担報告書 図1に示した。調査を行った全ての施設において基本的には共通の製造フローチャートとなっており、これは一般社団法人日本アイスクリーム協会が作成する「HACCP の考え方を取り入れた衛生管理のための手引書(小規模なアイスクリーム類製造事業者向け)」に示される「バッチ式加熱殺菌冷却・カップアイスの製造工程例」(<https://www.mhlw.go.jp/content/11135000/000554002.pdf>)によく一致するものであった。

小規模アイスクリーム製造事業者においては同一製造ラインにて複数のフレーバーを製造する事業形態が一般的であり、主原料となる乳製品等については加工済み製品を受け入れている一方で、フレーバーを決定する副原料につ

いては加工品に加えて工場内で加工するものが多く見受けられた。また、副原料については多くの製品で加熱殺菌工程の後に添加されることから、フレーバーごとに細菌学的汚染度に差が生じる可能性が抽出された。

3) -3 . 検査体制の比較

施設 B は事業所内に製造部門とは独立した検査部門を持つ施設である一方で、施設 A 及び B では独立した検査部門を持たず製品検査については全てを外部委託検査に頼っている現状が明らかとなった。

3) -4 . フレーバーごとの細菌学的汚染度の比較及び、簡易検査法の有効性の検討

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

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

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

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

3) -5 . 簡易検査法に与える試験条件の影響の検討

昨年度本研究において実施した小規模低温殺菌乳製造施設の衛生実態に関する研究において、小規模施設においては十分な検査設備が整っておらず、自主検査に簡易検査法を用いたとしても、その検査精度の担保が難しい現状が抽出されている。本年度に実施した小規模アイスクリーム製造施設の調査においても、小規模施設では検査を実施する上で十分な施設が整っておらず、簡易検査法を用いた自主検査の実施においても検査結果に影響を与える要因（特性要因）の制御が十分に実施出来ない現状が明らかとなった。

簡易検査法のプロトコルを解析した結果、山崎分担報告書 図 3 に示す複数の特性要因が検出された。これらの中で「試料の縮分」および「コロニーカウント」については試験実施者の教育訓練での制御が可能であり、また「添加量」については最終的な試験結果に及ぼす影響を使用する機器の精度から推定可能である。一方で、「試料の融解条件（温度、時間）」および「培養条件（温度、時間）」については、温度や時間の変動と試験結果（コロニー数）の相関（影響の重大さ）の評価が難しく、実測データを基にした評価が必要となる。また、小規模製造施設の調査結果から、小規模施設においては特に

精確な温度制御の実施が難しい実態が明らかとなっている。以上のことより、本研究においてはアイスクリーム試料に対して簡易検査法を利用した際の「試料の融解条件(温度、時間)」および「培養条件(温度および時間)」の変動が試験結果に及ぼす影響について考察を行った。

3)-5-1. 「試料の融解条件(温度、時間)」が試験結果に及ぼす影響についての解析

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

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

同一条件下で調整した試料(融解条件:23°C、40 分間)を簡易検査培地に添加し、20, 25, 30, 32, 37°Cの温度条件下で 24, 48, 72 時間の培養(計 15 条件)を行った。それぞれの条件について、三回ずつの試行を行い、得られた結果群に対して外れ値検定(箱ひげ図解析および、スミノルフ・グラブス検定)を行った結果、20°C、24 時間の培養で得られた結果は他の条件下で培養した際の結果に比較して外れ値とみなされた。また、得られた結果群を母集団としてそれぞれの測定結果の Z 値を算出した結果、20°C、24 時間の培養で得られた結果のみが Z 値 $|Z| > 3$ となった(山崎分担報告書 表 3)。

4)アイスクリーム類の細菌汚染実態調査

今回の調査結果概要を岡田分担報告書 表 1 に示した。アイスクリーム類の公定法での細菌数(32°C48 時間培養)は、アイスクリーム 52 検体で平均 1.026 log CFU/g(検出限界未満~3.790 log CFU/g)、アイスマルク 45 検体で平均 1.187 log CFU/g(検出限界未満~3.301 log

CFU/g)、ラクトアイス 30 検体で平均 1.140 log CFU/g(検出限界未満~3.072 log CFU/g)であった。3つのカテゴリーの細菌数に、差は認められなかった($p=0.6516$)。公定法と同一の培養条件(32°C48 時間)で簡易培地 1 を用いた際の細菌数は、アイスクリームで平均 1.098 log CFU/g(検出限界未満~4.017 log CFU/g)、アイスマルクで平均 1.156 log CFU/g(検出限界未満~3.301 log CFU/g)、ラクトアイスで平均 1.206 log CFU/g(検出限界未満~2.207 log CFU/g)であった。いずれのカテゴリーにおいても、公定法と簡易培地 1 における細菌数に有意な差は見られなかった。簡易培地 2 は製品の指示書に従い、32°C24 時間で菌数を測定した。細菌数は、アイスクリームで平均 0.861 log CFU/g(検出限界未満~3.644 log CFU/g)、アイスマルクで平均 0.787 log CFU/g(検出限界未満~3.322 log CFU/g)、ラクトアイスで平均 0.891 log CFU/g(検出限界未満~2.044 log CFU/g)であった。簡易培地 2 の細菌数を公定法と比較したところ、アイスマルクでは有意に低く、アイスクリームとラクトアイスではやや低い傾向が見られた。ISO 法による細菌数(30°C72 時間培養)は、アイスクリームで平均 1.237 log CFU/g(検出限界未満~3.909 log CFU/g)、アイスマルクで平均 1.404 log CFU/g(検出限界未満~3.352 log CFU/g)、ラクトアイスで平均 1.268 log CFU/g(検出限界未満~3.163 log CFU/g)であった。ISO 法における細菌数を公定法と比較したところ、アイスクリームとアイスマルクにおいて有意に高い結果が得られたが、ラクトアイスでは差は見られなかった。ISO 法については SPC 寒天培地を用いた混釈培養と平行して、同培地を用いた表面塗抹を行ったところ、アイスクリームで平均 0.868 log CFU/g(検出限界未満~3.716 log

CFU/g)、アイスマルクで平均 0.785 log CFU/g (検出限界未満 ~ 3.505 log CFU/g)、ラクトアイスで平均 0.668 log CFU/g (検出限界未満 ~ 2.179 log CFU/g)となり、いずれのカテゴリーでも混釈培養における細菌数よりも有意に低い結果となった。

各カテゴリー間の相関を寄与率で算出したところ、アイスクリームにおいて公定法と簡易培地 1 では、0.7303(岡田分担報告書 図 1)、簡易培地 2 で 0.6521(岡田分担報告書 図 2)、アイスマルクでは簡易培地 1 で 0.2875 (岡田分担報告書 図 3)、簡易培地 2 で 0.0783 (岡田分担報告書 図 4)、ラクトアイスでは簡易培地 1 で 0.3343 (岡田分担報告書 図 5)、簡易培地 2 で 0.3795 であった(岡田分担報告書 図 6)。公定法と ISO 法との寄与率は、アイスクリームで 0.7149 (岡田分担報告書 図 7)、アイスマルクで 0.4201(岡田分担報告書 図 8)、ラクトアイスで 0.3917(岡田分担報告書 図 9)であった。一方、ISO 法の混釈培養と表面塗抹の間の寄与率は、アイスクリームで 0.5915(岡田分担報告書 図 10)、アイスマルクで 0.2525 (図 11)、ラクトアイスで 0.0772 (岡田分担報告書 図 12)であった。

今回試験した検体からは、いずれの試験法においても、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌は検出されなかった。一方腸内細菌科菌群は、アイスクリームの 15.4% (8/52 検体)、アイスマルクの 13.3% (6/45 検体)及びラクトアイスの 6.7% (2/30 検体)より検出された(岡田分担報告書 表 2)。全体における陽性率は、12.6% (16/127 検体)であった。フィッシャーの正確確率検定により、アイスクリーム、アイスマルク及びラクトアイス間の陽性率の検定を行ったところ、アイスクリーム類の種別による陽性率に有意差は見られなかった

($p=0.551414$)。腸内細菌科菌群陽性であった 16 検体は全て、定性法(ISO 21528-1: 2016)で検出された。一方、定性法に加えて定量法(ISO 21528-2:2016)においても腸内細菌科菌群が検出された検体は、アイスクリーム 2 検体のみであり、いずれの検体においても、検出菌数は 5 CFU/g であった。腸内細菌科菌群定性法及び定量法で陽性となった全 16 検体で、腸内細菌科菌群用の簡易培地からは菌は検出されなかった。また、腸内細菌科菌群陽性を示した検体からは、公定法及び簡易培地のいずれにおいても大腸菌群は検出されなかった。検出された腸内細菌科菌群の集落は、純培養後菌種同定を行ったところ、8 検体由来の菌株が *Enterobacter* 属の細菌であった(岡田分担報告書 表 3)。

D. 考察

今年度の本研究における欧米諸国における事例調査の結果から、市販アイスクリームの喫食に起因する食中毒報告や、回収汚染情報データベースにアイスクリームの微生物汚染に関連した情報が少ない状況であったことから、それらの国においてアイスクリームの製造工程が適切に管理されていると考えられた。

現地調査の結果より、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ことが示された。温度管理等は国内基準より厳しい自主基準を各社で設定して行っていた。微生物検査に関しては、自社検査に総菌数や大腸菌群を使用することで通常の衛生状態の確認を行い、加えて定期的に検査会社に依頼して EU 規則遵守の確認を行っていた。外部検査会社では EU 規則に沿って ISO 法に準じていると妥当性が評価された代替法を使用していた。

今回議論を行った行政関係者や製造施設の検査担当者は、アイスクリームに起因するアウ

トブレイクや製品回収の事例の記憶はないとしており、デンマークのアイスクリームに関連する各種衛生対策は効果的であると思われた。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のかの検討が必要であり、次年度以降の課題と考えられた。

大規模及び中規模のアイスクリーム製造事業者の協力を得て、製造工程管理に関する実態を微生物学的見地から検討したところ、両施設はそれぞれ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。施設 A では製品に加え、エイジング工程を重点的な工程管理対象として、微生物検査を定期的に行っていた。本年度のある月に実施した自主検査記録を確認したところ、検体数 1750 に対し、一般細菌数で自主管理基準として定めた 300CFU/mL を超えた検体数は僅かに 3 検体（陽性率として 0.17%）であった。これらの陽性検体が確認された場合の措置としては同一ロット製品の検査記録及び工程中の不備の有無を改めて確認することが一般的な対応内容であることは言うまでもない。

大規模施設由来検体を対象とした菌叢解析により、充填機器周辺で採材した拭取り検体のうち、トラップステージ検体は原料（粉末水飴）検体と近似した構成菌叢を示した。水飴は粘性に富むため、トラップステージのように製品と直接接触する部位については同原料由来菌叢が残存し易い環境にあることが示唆される結果と解釈される。当該部位の洗浄に不備があった場合には一定の細菌残存も懸念され、使用後洗浄・消毒を遵守する一つの根拠となるものと考えられる。

中規模施設では自社で牛乳製造もおこなっており、その原料となる生乳受け入れ時には大

腸菌群検査も実施する等、良好な衛生状況の原料確保に向けた取り組みを行っていた。製造ラインで用いる機器は大規模施設に比べて、特に充填機の取り扱い及び使用後洗浄・消毒工程を重要な管理項目と定めていた。同施設では不定期製造であったため、製造工程毎に原料及び中間製品等を確保することができなかったが、今後可能な限り、こうした検体を確保し、微生物試験及び菌叢解析を行うことで、衛生実態の精査が可能になるものと期待される。

生乳については受入後速やかに製造加工に供されることが衛生の確保に有効とは目されるが、大規模施設では品質の安定化を図る目的で合乳作業が通常行われる。本研究では少数検体ながら、生乳を冷蔵保存した際の指標菌動態を検討した。各指標菌間の相関係数を求めた結果、供試検体中での検出分布は腸内細菌科菌群が大腸菌群に比べ、その他の糞便汚染指標菌及び黄色ブドウ球菌との間でより高い相関性を示し、包括的な糞便汚染指標としての優位性が示唆された。現時点において、中規模施設では、乳等省令に基づき大腸菌群を糞便汚染指標として管理を行っているが、今後製造基準を検討する際には、国際動向を踏まえつつ、国内での微生物動態に関する知見をより集積した上で衛生指標菌試験項目を設定することが、科学的根拠に基づいた製造基準の在り方を検討する上で望ましいと考えられる。

小規模アイスクリーム製造施設における製造工程調査および製品の細菌学的汚染度調査からは、小規模事業者においては、同一工場内で複数のフレーバーを生産する事業形態が一般的であることが示された。フレーバーを決定する副原料は加熱殺菌工程の後で加えられることが一般的であり、一般社団法人日本アイスクリーム協会が作成する「HACCP の考え方を

取り入れた衛生管理のための手引書(小規模なアイスクリーム類製造事業者向け)」内においても、副原料を加熱殺菌後に添加する場合は殺菌済みの原料を使用することが求められている。副原料については加工済み製品を購入し使用する場合に加えて、商品価値付加の理由から各事業者において独自に加工したものも使用されており、その加工方法もフレーバごとに様々である。本研究の解析結果からフレーバごとに最終製品の細菌学的汚染度が異なることが明らかとなった。これらの結果および、小規模事業者において同一製造日に複数のフレーバを生産し、かつ各フレーバを小ロットで生産している実情を考えると、簡易検査法を用いた各製品の迅速な日常検査による細菌学的汚染度のトレンド解析は非常に有用かつ効果的な方法であると考えられる。

小規模事業者にて製造された複数のフレーバに対する簡易検査法の有用性解析の結果、全てのフレーバにおいて細菌学的汚染度が乳等省令に定める成分規格に比較して十分に低い値であることが確認された。ISO法(混希培養法)と簡易検査法の比較においては、ISO法に比較して簡易検査法で若干低い値を示す傾向にあったものの、全てのフレーバにおいてその差は $< 1 \log \text{CFU/g}$ となり、成分規格に対して十分に低い汚染度の国内流通品に対しては簡易検査法が十分に使用可能な方法であることが確認された。一方で、たとえ簡易検査法を用いた試験の実施を計画したとしても、小規模施設においては現状では十分な試験設備が備えられているとはいえず、各施設において簡易検査法に添付の取扱説明書に従った試験の実施が現実的ではない実態も明らかとなった。本研究では精確な温度制御をしていない条件下で簡易検査法を利用する場合を想定し、温

度条件が試験結果に与える影響について解析を行った。その結果、 $25-37^{\circ}\text{C}$ 、 $24-72 \text{ h}$ の範囲においては個々の条件下で得られる試験結果に有意な差は観られなかった。以上の結果から、簡易検査法は恒温槽などの設備の精確さが担保できない施設においても十分に使用可能な方法であることが示唆された。

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

アイスクリーム類において、混釈培養による

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

今回の試験により、市販のアイスクリーム類は概ね良好な衛生状態にあることが示された。次年度は、乳製品の微生物規格としての腸内細菌科菌群の有用性を検討するため、今年度検出された腸内細菌科菌群細菌の各種培地における増殖速度等の検討並びに簡易培地の実用性を向上させるための検討を実施する予定である。

E. 結論

市販のアイスクリームに起因する微生物食中毒アウトブレイクの発生件数は米国でも少ないことが確認された。また回収や汚染事例も米国、EUともにそれほど多いわけではないことが確認された。

デンマークではHACCPにもとづき、アイスクリーム製造工場における衛生管理が適切に行われており、大規模製造施設では自社基準の設定や、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。小規模施設においては行政機関の定期的な監視指導により食品の安全を確保していた。EU加盟国であることからEU規則にもとづく国内基準を設定しているが、大規模製造施設ではそれを上回る自社基準を設定して安全性を担保していた。日常の施設内検査では総菌数および大腸菌群による確認を行い、異常が認められた場合には詳細な微生物検査を外部検査会社に依頼していた。小規模製造施設では全ての検査を外部検査会社に依頼していた。それらの検査会社では検査法や検査の頻度に関してEU規則を遵守し、ISO法や迅速検査法を活用しつつ対応していた。今後、他のEU加盟国についてもEU規則の適用における差異がないか検討する予定である。

大及び中規模のアイスクリーム製造事業者2社の協力を得て行った製造工程管理並びに同実態調査の結果、国内のアイスクリーム製造段階における製造基準は適切に遵守されている状況を確認できた。一方、製造基準や成分規格の試験項目として乳等省令に基づいた大腸菌群を糞便汚染指標とすることの適切性については、国際動向を踏まえた上で、原料、中間・最終製品中での挙動に関する知見を集積・整理することが必要と思われた。

小規模アイスクリーム製造施設の調査から、小規模施設では細菌学的汚染度の異なる複数のフレーバーを小ロットで製造している実態が明らかとなり、各施設において簡易検査法を利用した迅速な日常検査導入の重要性が示唆された。簡易検査法を用いた試験の試験結果に試験設備条件が与える影響について検討した結果、恒温槽等を用いた精確な温度管理が難しい試験条件下においても試験条件の大まかなコントロールにより、簡易検査法を用いて適切な結果が得られることが明らかとなり、小規模

製造施設の日常検査における簡易検査法の有用性が示された。

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、市販のアイスクリーム類 127 検体を対象とした衛生指標菌調査を行ったところ、供試製品検体に微生物規格違反検体は見られず、衛生状態は概ね良好であった。細菌数試験法間の成績比較を通じ、アイスクリーム類では簡易培地の製品によって、公定法と差が見られるものがあり、また、ISO 法の表面塗抹法は混釈培養法より有意に低い結果を示したことから、代替試験法については導入検証が必要であることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

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

学会発表

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

2. 中山達哉. 衛生管理のために用いる試験法の動向について. 日本防菌防黴学会第 46 回年次大会シンポジウム 11. (令和元年 9 月、大阪)

3. 八尋錦之助、小倉康平、寺崎泰弘、宮城聡、山崎栄樹. ヒト肝臓細胞における新規 Cholix 結合膜蛋白質の同定と細胞致死機構の解明. 第 93 回日本細菌学会 (令和 2 年 2 月、名古屋)

H. 知的財産権の出願・登録状況
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（令和元年度）

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ている。今年度は、乳製品であるアイスクリームに関する情報調査を行い、米国における市販アイスクリームの喫食に起因する健康被害事例や、米国および欧州における微生物関連のアイスクリーム回収・汚染事例に関する情報収集を行った。さらに EU におけるアイスクリーム製造工程での衛生管理の実態について、デンマークのアイスクリーム製造施設を視察し、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、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、乳製品であるアイスクリームに関する情報調査を行い、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

各種データベース等に報告されている、海外におけるアイスクリームの喫食に起因する健康被害事例や、微生物汚染による回収事例に関する情報収集を行った。

健康被害事例に関しては米国疾病予防管理センター(US CDC: Centers for Disease Control and Prevention)の全米アウトブレイク報告システムダッシュボード「NORS (National Outbreak Reporting System) dashboard」(<https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>)を用いて調査を行った。対象期間は1998~2017年(20年間)、対象地域は米国全州、発生場所は全ての場所として検索を行った。家庭で製造されたアイスクリームによる健康被害事例が多く見られたが、それらは除外し市販アイスクリームによるものに限定した。

アイスクリームの回収・汚染情報について、回収・汚染情報データベースの検索を行った。米国における微生物汚染によるアイスクリーム製品回収情報の調査には、製品回収情報データベースとしてFDA (US FDA: Food and Drug Administration)の

回収情報データベース (<https://www.fda.gov/safety/recalls/>)を使用した。対象期間は2017~2020年(約3年間)、製品分類は食品および飲料(Food & Beverages)として検索を行った。欧州における食品汚染情報の調査は、EUの警告情報データベースである「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)」を用いて、アイスクリームの微生物汚染に関する警告情報の検索を行った。対象期間は2010~2019年(10年間)とし、製品分類は「アイスやデザート(ices and desserts)」、ハザード分類は「病原性微生物(pathogenic micro-organisms)または微生物汚染(そのほか)(microbial contaminants (other))」とした。

さらに、デンマークの食品衛生を担当する行政機関および研究機関、デンマークのアイスクリーム製造施設2ヶ所(大規模および小規模各1ヶ所)を訪問し、それぞれの製品・製造施設の衛生実態を調査するとともに、製造施設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. 米国 CDC NORS dashboard を用いたアイスクリームの喫食に起因する健康被害事例の調査

米国のNORSデータベースにおいて、1998~2017年に市販のアイスクリームとの関連が確認された、微生物を病因物質と

する食中毒アウトブレイク事例は 11 件であった(表 1)。これら 11 件のアウトブレイクの病原体別の内訳は、ノロウイルスが 4 件、黄色ブドウ球菌が 3 件、サルモネラが 2 件、志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) O157 が 1 件、およびリステリアが 1 件であった。2015 年に報告され、患者 10 人のうち 3 人が死亡した Blue Bell Creameries 社製アイスクリームによるリステリア感染アウトブレイクは、2010 年に初発患者が発生したため表 1 では 2010 年に発生として報告されている。2013 年の STEC O157 感染アウトブレイクでは患者 4 人のうち 1 人が死亡している。規模の大きい事例としては、2004 年に発生した黄色ブドウ球菌感染アウトブレイク(患者 132 人、入院患者 12 人)と 2000 年のサルモネラ (*Salmonella* Enteritidis) 感染アウトブレイク(患者 132 人)が挙げられる。

II. 米国 FDA 回収情報データベースおよび EU RASFF 食品汚染情報データベースを用いたアイスクリームの回収・汚染情報の調査

米国 FDA の回収情報データベースにおいて、2017~2020 年のアイスクリームの回収事例は 22 件であった。このうち、回収等の理由が微生物汚染であるものは 4 件であった(表 2)。汚染微生物別の内訳は、リステリアが 1 件、リステリアの疑いが 1 件、サルモネラが 1 件、および大腸菌が 1 件であった。

EU での食品汚染情報に関しては、RASFF データベースで 2010~2019 年の「Ices and desserts」の微生物汚染事例は 13 件で、このうちアイスクリームの汚染事

例は 4 件であった。汚染微生物別の内訳は、サルモネラが 1 件、リステリアが 1 件、腸内細菌科菌群が 2 件であった(表 3)。

III. デンマークにおけるアイスクリームの規格基準およびデンマークのアイスクリーム製造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。2020 年 2 月 18~21 日にデンマーク獣医食品局 (DVFA)、デンマーク工科大学国立食品研究所 (DTU Food)、デンマークで約 50~60%のシェアを持ち欧州各国にもグループ企業が工場を持つアイスクリーム製造会社のアイスクリーム製造施設、家族経営で 2 年前から事業を開始した小規模事業者のアイスクリーム製造施設を訪問し、専門家、経営者および検査担当者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アイスクリームの製造および消費の状況

デンマークでは 2015 年に 4.26 万キロリットル、2016 年に 4.65 万キロリットル、2017 年に 4.45 万キロリットルのアイスクリームが販売された。アイスクリームの一人あたりの年間消費量は、デンマークの製造会社が示した 2017 年 8 月 1 日時点の統計資料によると、デンマークはニュージーランド、米国、オーストラリア、フィンランド、スウェーデン、カナダに次いで世界第 7 位とのものであった (<https://www.worldatlas.com>)。日本アイスクリーム協会が Web ページに記載して

いる 2016 年の世界各国の 1 人当り年間消費量（ユーロモニター社調査）によると、デンマークはオーストラリア、ニュージーランド、フィンランド、米国、ノルウェー、イタリア、カナダ、ドイツ、スペイン、ポルトガル、チリに次いで 13 位（8.2 リットル）であり、17 位の日本（6.5 リットル）の約 1.3 倍の消費量である（<https://www.icecream.or.jp/biz/data/consumption.html>）。デンマークではアイスクリームへの課税額は 1 リットルあたり 6.98DKK（デンマーククローネ）で、課税額総額から試算した年間消費量は約 8.1 リットルとのことであった。これは日本アイスクリーム協会が引用しているデータとほぼ一致している。

2. デンマークでのアイスクリーム等の製品分類について

デンマークにおけるアイスクリーム製品の製品分類については欧州アイスクリーム協会（EuroGlaces）により「CODE FOR EDIBLE ICES」中で定義されている（資料 1）。それによると、「Water Ice もしくは Ice Lolly」は水と砂糖のみのも、「Ice Cream」は乳・脂肪・タンパク質・砂糖の乳剤となっているもの、「Milk Ice」は乳脂肪分を 2.5%以上と乳固形分を 6%以上含むもの、「Dairy Ice Cream」は乳脂肪分を 5%以上含むもの、「FF Fruit Ice」は 15%以上の果物を含むもの（果物の種類によっては下回ることも許容される）、「シャーベット」は果物もしくは野菜を 25%以上含むもの（ただし特定の果物は 15%まで、リストに記載された果物は 7%まで、リストに記載された野菜は 10%まで、それぞれ下げ

ることが可能）と定義されている。

3. デンマークのアイスクリーム製造に関する各種基準等について

デンマークにおけるアイスクリーム製品の衛生基準は基本的に EU 規則（EU 規則 2073/2005）に沿ったものであり、サルモネラについては $n=5, c=0, 25g$ 検体で不検出としている（資料 2 および資料 3 の項目 1.13）。また腸内細菌科菌群については $n=5, c=2, m<10cfu/g, M<100cfu/g$ としている（資料 2 および資料 4 の項目 2.2.8）。リステリアに関しては Ready-to-eat foods（加熱せずにそのまま喫食可能な食品）に対する基準に基づき、 $n=5, c=0$ 、商品の賞味期限内で $100cfu/g$ を超えることがないこととしている（資料 2 および資料 5 の項目 1.2 上段）。

各製造施設における上記検査結果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は、各地域の DVFA 監視員により監視指導時に確認されている。

デンマークをはじめとする EU 各国ではアイスクリーム製品に「賞味期限（Best Before）」を表示することになっている。賞味期限の長さは事業者が自らの責任で設定することになっているので、製品の品質に自信のある事業者はより長く設定することも可能とのことであった。今回視察した小規模製造施設では事業開始後 2 年目までは念のため賞味期限を 1 年と通常のアイスクリーム製品よりも短く設定していたが、製品の品質に問題がないと考え、3 年目からは賞味期限を 2 年に設定するとしていた。大規模製造施設では多種多様な製品を製造しているため、含まれる原材料を考慮し、

製品ごとに異なる賞味期限を設定しているとのことであった。その長さは製品が冷凍保存される性格上、衛生上の問題というよりも製品の状態（味や口当たり等）の保持期間の意味合いの方が大きいとのことであった。

4. デンマークのアイスクリーム製造事業の認可等について

DVFA によるアイスクリーム製造事業の認可等は、原料として殺菌乳を使用する場合は通常の食品取り扱い事業者と同様、オンラインで事業者登録を行えばすぐに営業可能となり、その後3ヶ月以内にDVFA 監視員の監視指導を受けることになる。原料として生乳(未殺菌乳)を使用する場合は、DVFA へ生乳使用の登録が必要である。

5. デンマークの大規模アイスクリーム製造施設における検査実態について

大規模製造施設を視察したのは1927年創業の老舗アイスクリーム製造会社で、デンマークのアイスクリームの50~60%のシェアを持っており、スーパーマーケット、コンビニエンスストア、高速道路のパーキングエリアの小売店等で製品を見つけることが可能である。欧州10ヶ国に11ヶ所の製造施設を持ち(グループ企業9社)、欧州以外でもロシアや中国などの国へ輸出を行なっている。視察した施設からは、デンマーク国内およびドイツ、ノルウェー、スウェーデンに出荷しているとのことであった。さらに他社ブランドの生産(OEM)も請け負っている。今回視察した製造施設はアイスクリームの生産量がデンマーク最大であり、7,800m²の面積を持ち、製造の担

当者は60~90人である。現在約200種類の製品を製造しているが、あまりに多いため減らすべく検討中とのことであった。製造設備としてはアイスクリーム原料の混合機1基と8本の製造ラインが配置されている。原料乳には殺菌乳を使用しており、生乳は使用していなかった。原料乳はデンマーク国内産と輸入製品がそれぞれ50%位とのことであった。

製造施設の建物自体は古くから使われているが改修等が適宜行われており、衛生面での問題はないように見受けられた。またDVFAの衛生監視を年4回受けていることから、衛生上の問題は少ないと考えられた。

原料乳の殺菌条件はデンマークの規格基準では72 15秒であるが、当該製造会社では自社基準である75 30秒以上で行なっていた。一部の製品では82 での殺菌を行う場合もあるとのことであった。これらの殺菌条件が妥当か否かの検証を年に1回行っているとのことであった。

各種微生物検査に関しては、製品検査や製造設備・環境の検査を定期的に行っていた。

製品検査はシフト(8~12時間)毎に行っており、各シフトの初めの製品および途中の製品の2検体について製造ライン(最大8ライン)ごとに行っていた。各検体に対し製造施設内の検査室で総菌数および大腸菌群の検査が行われ、総菌数が10万/g超もしくは大腸菌群が100CFU/g超の異常が見られた場合は倉庫に保管されている当該シフトで製造された製品を市場流通しないように留め置くとともに、検査会社に検体を送付し、腸内細菌科菌群、サルモネラ、リステリア等の詳細な検査を依頼するとの

ことであった。

大腸菌群の検査は自社の評価試験により腸内細菌科菌群の試験と同等であるとして使用していた。検査会社では EU 規則に沿って ISO 法に準じていると妥当性が評価された代替法を使用していた（資料 6）。

原材料の混合タンクは週に 1 回検査を行っていた。環境検査はリステリアについてのみ行っており、外部検査会社に委託し、排水溝を年 4 回、製造ラインを年 1 回検査していた。水は井戸を源泉とする市の水道から供給されており、この水と受領した殺菌乳のタンクの検査も定期的に行っていた。また、製造現場の空気中の浮遊細菌の検査のため、製造現場の各位置に開けっ放しにした培養プレートを 1 時間放置し、検査を行っていた。更に OEM 等受託生産の場合は顧客の要望により追加検査（サルモネラ等）や高頻度での製品検査を行う場合もあるとのことであった。

機材やラインの洗浄、消毒は消毒液やアルカリ石鹼により行なっており、各生産ロットが終了した際に行っているとのことであった（その後すぐに別ロットの同一製品を生産する場合にはライン洗浄は行わずにそのまま生産を継続）。洗浄・消毒が効果的に行われたことの確認（バリデーション）は、ライン担当者の目視による確認とともに次回生産初期製品を検査することにより行なっているとのことであった。

製品の保管に関しては、 -18 を上回ることがないように管理しているとのことであった。

DVFA による衛生監視を年に 4 回受けており、微生物検査に関しては検査記録等の確認が中心とのことであった。また、製造

現場とは別に、DVFA は定期的に店舗で販売中の製品を収去して微生物検査を行っているとのことであった。

6. デンマークの小規模アイスクリーム製造施設における検査実態について

視察した小規模アイスクリーム工場は、家族経営で従業員数が 2~3 人であった。春~秋しか営業していない。デンマークでは認証が必要なオーガニックのアイスクリームを製造しており、味の種類は 10 種類程度であった。事業を開始して 3 年目で、生産量は初年度が 3 キロリットル、2 年目は 9 キロリットルとのことで急速に事業拡大中であった。夏期には近くのビーチ等で直接販売も行うが、基本はレストラン等への販売であった。歴史ある建物内に製造施設を構えており、建物は古いものの製造現場は衛生的に保たれていた。視察した時期は製造を行っておらず実際の製造過程は見られなかったが、DVFA の食品衛生監視員と同行し、製造設備の管理や衛生状態についての説明を受けた。

微生物検査に関しては、自社で検査室を持たないため、検査会社に製品の腸内細菌科菌群検査を年に 1 度依頼していた。当該施設では製品のリステリアおよびサルモネラ検査を検査会社に依頼していなかった。これは使用している原乳が殺菌乳であり、それをさらに加熱殺菌する工程があること、フルーツ等の他の原材料は 90 以上に加熱する工程があることから検査が不要とのことであった。

製品の保管温度に関して要求されているのは -18 以下であるが、実際は -25 としているとのことであった。

D. 考察

米国における市販アイスクリームの喫食に起因する食中毒報告が少ないことや、米国やEUの回収汚染情報データベースにアイスクリームの微生物汚染に関連した情報があまりないことは、各国においてアイスクリームの製造工程が適切に管理されているためであると考えられた。

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。微生物検査に関しては、自社検査に総菌数や大腸菌群を使用することで通常の衛生状態の確認を行い、加えて定期的に検査会社に依頼してEU規則遵守の確認を行っていた。外部検査会社ではEU規則に沿ってISO法に準じていると妥当性が評価された代替法を使用していた。

今回議論を行った行政関係者や製造施設の検査担当者は、冷凍製品であるため衛生上の不安は少なく、実際にアイスクリームに起因するアウトブレイクや製品回収の事例の記憶はないとしており、これらからデンマークのアイスクリームに関連する各種衛生対策は効果的であると考えられた。

E. 結論

市販のアイスクリームに起因する微生物食中毒アウトブレイクの発生件数は米国でも少ないことが確認された。また回収や汚染事例も米国、EUともにそれほど多いわけではないことが確認された。

デンマークではHACCPにもとづき、アイスクリーム製造工場における衛生管理が

適切に行われており、大規模製造施設では自社基準の設定や、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。小規模施設においては行政機関の定期的な監視指導により食品の安全を確保していた。EU加盟国であることからEU規則にもとづく国内基準を設定しているが、大規模製造施設ではそれを上回る自社基準を設定して安全性を担保していた。日常の施設内検査では総菌数および大腸菌群による確認を行い、異常が認められた場合には詳細な微生物検査を外部検査会社に依頼していた。小規模製造施設では全ての検査を外部検査会社に依頼していた。それらの検査会社では検査法や検査の頻度に関してEU規則を遵守し、ISO法や迅速検査法を活用しつつ対応していた。

昨年度はデンマークの乳・乳製品製造現場、今年度は同国のアイスクリーム製造現場で衛生管理状況を確認することが研究目的の一部であったが、今後、他のEU加盟国についてもEU規則の適用における差異がないか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 : US CDC NORS dashboard によるアイスクリーム (市販) の喫食に起因する微生物健康被害事例 (11 件、米国全州、1998 ~ 2017 年)

年	月	州	病因物質	血清型もしくは遺伝子型	病因物質	発生場所	患者数	入院患者数	死亡者数	原因食品
1999	8	Florida	<i>Staphylococcus aureus</i>		疑い	飲食店	3	0	0	アイスクリーム (市販)
2000	8	Ohio	<i>Salmonella enterica</i>	Enteritidis	確定	飲食店	132			アイスクリーム (市販)
2002	5	Wisconsin	Norovirus Genogroup I		確定	学校	19	0	0	アイスクリーム (市販)
2003	4	Florida	<i>Staphylococcus aureus</i>		疑い	飲食店	3			アイスクリーム (市販)
2004	5	Arizona	Norovirus unknown		疑い	飲食店	18	0	0	アイスクリーム (市販)
2004	10	Ohio	<i>Staphylococcus aureus</i>		確定	飲食店	132	12	0	アイスクリーム (市販)
2005	4	Ohio	Norovirus Genogroup I		確定	飲食店	6	0	0	アイスクリーム (市販)
2005	5	複数州	<i>Salmonella enterica</i>	Typhimurium	確定	飲食店	26	11	0	アイスクリーム (市販)
2008	11	Ohio	Norovirus Genogroup I	unknown	疑い	学校	11			アイスクリーム (市販)
2010	1	複数州	<i>Listeria monocytogenes</i>		確定	病院	10	10	3	アイスクリーム (市販)
2013	9	Idaho	<i>Escherichia coli</i> , Shiga toxin-producing	O157:H7	確定	食料品店	4	1	1	アイスクリーム (市販)

表 2 : 米国 FDA 回収情報データベースに登録された微生物汚染に起因するアイスクリーム製品の回収事例 (4 件、2017 ~ 2020 年)

回収発表日	ブランド名	製品内容	回収の理由
2018年10月19日	Working Cow	アイスクリーム	<i>Listeria monocytogenes</i> 汚染の可能性
2018年10月5日	Working Cow	砂糖無添加アイスクリーム (バニラ、チョコ味)	<i>Listeria monocytogenes</i> 汚染
2018年2月9日	La Granja INC	マンゴー味アイスクリーム	<i>Salmonella</i> 汚染
2018年2月8日	The Comfy Cow	アイスクリーム	<i>E. coli</i> 汚染

表 3 : EU RASFF データベースに登録されたアイスクリーム製品の微生物汚染事例 (4 件、2010 ~ 2019 年)

product category	date	reference	product type	notification type	notification basis	notified by	countries concerned	subject	action taken	distribution status	risk decision
ices and desserts	07/07/2011	2011.0907	food	alert	food poisoning	Italy	Hungary (D), Italy (D/O), Sweden (D)	high count of Enterobacteriaceae (1.2x10E4 CFU/g) in vanilla ice cream from Italy	withdrawal from the market	distribution to other member countries	undecided
ices and desserts	12/09/2012	2012.1311	food	information for attention	company's own check	Switzerland	Italy (O), Switzerland (D)	Listeria monocytogenes (360 CFU/g) in vanilla ice cream from Italy	destruction	distribution restricted to notifying country	serious
ices and desserts	27/11/2013	2013.1562	food	information for attention	border control - consignment released	Croatia	Commission Services, Croatia (D), Serbia (O)	Salmonella in ice cream from Serbia		product not (yet) placed on the market	serious

資料 1 : デンマークのアイスクリーム等の製品分類について[1/4] (EUROGLACES)

Code for Edible Ices (<https://www.euroglaces.eu/code-edible-ices>)



CODE FOR EDIBLE ICES, Version 2013

3. DEFINITION OF THE RESERVED DENOMINATIONS

3.0 Preliminary Note

The descriptive definitions below are to be used in conjunction with Annex IV.

Edible ices for which one may only use Dairy Fat and/or Dairy Proteins may however also contain:

- *fats and/or proteins derived from eggs;*
- *flavouring matters in which Fats and/or Proteins are naturally present;*
- *authorised additives in which Fats and /or Proteins are naturally present;*
- *gelatine.*

3.1 The denominations **Water Ice or Ice Lolly**, Wassereis, Waterijs, Glace à l'eau, Glaçon, Limonadeis, Ghiacciolo, Helado de Agua, Pagoto Granita, Gelado de Água, Is/Ispinne

are reserved for a product complying with the basic definition and containing mainly water and sugars.

3.2 The denominations **Ice Cream**, Eis, Ijs, Glace, Is, Gelato, Helado, Pagoto, Gelado, Glass

are reserved for a product complying with the basic definition and being an emulsion typically composed of water and/or milk, edible fats, proteins and sugars.

3.3 The denominations **Milk Ice**, Milchspeiseeis, Melkijs, Glace au Lait, Maelkeis, Gelato di Latte, Helado de Leche, Pagoto Galaktos, Gelado de Leite, Mjölkglass

are reserved for a product complying with the basic definition and containing at least 2.5% of exclusively dairy fat and at least 6% of Milk Solids-Non-Fat (cf. 2.2.3) excluding any fat and/or protein other than of dairy origin. (cf. 3.0)

3.4 The denominations **Dairy Ice Cream**, Eiskrem, Roomijs, Crème Glacée, Floedeis, Crema Gelato, Helado Crema, Pagoto Krema, Gelado de Nata, Gräddglass

are reserved for a product complying with the basic definition and containing at least 5% Dairy Fat, excluding any fat and/or protein other than of dairy origin. (cf. 3.0)

5

資料 1(続き): デンマークのアイスクリーム等の製品分類について[2/4](EUROGLACES)



CODE FOR EDIBLE ICES, Version 2013

- 3.5 The denominations **FF Fruit Ice**,
FF Frucht Eis, FF Vruchtenijs, Glace aux Fruits à FF, FF Frugtis, , Gelato alla Frutta,
Helado de Frutas, Pagoto FF, Gelado de Fruta, Fruktis

are reserved for a product complying with the definition of 3.1 above and containing at least 15% fruit.

For certain fruits this content may be reduced, the conditions for which are defined in Annex I.

- 3.6 The denomination **Sorbet**

is reserved for a product complying with the basic definition which contains no added fat. The product must contain the characterizing foodstuff(s) to which reference is made in words, particulars, trademarks, brand name, pictorial matter or symbols, when the foodstuff(s) is/are known to be consumed as such.

When reference is made to fruit(s) or vegetable(s) in words, particulars, trademarks, brand name, pictorial matter or symbols, the fruit(s) or vegetable(s) content must be at least 25%.

- The fruit(s) content may however be reduced respectively to 15% and to 7% for those fruits which are listed non-exhaustively in Annex II.1.
- The vegetable(s) content may however be reduced to 10% for those vegetables which are listed non-exhaustively in Annex II.2.

In the case of use of characterizing foodstuffs not intended to be consumed as such (spices, herbs, plants and part of plants...), the presence of solely non-natural flavourings and/or flavourings, as described in Art 16.6 of the Flavourings Regulation 1334/2008, is not allowed.

6

資料 1(続き): デンマークのアイスクリーム等の製品分類について[3/4](EUROGLACES)



CODE FOR EDIBLE ICES, Version 2013

ANNEX I - FRUIT ICE

Fruits for which the content may be less than 15% fruit:

- a) Minimum content reduced to 10% for
 - citrus fruit, namely lemon, orange, mandarine, tangerine, grapefruit, etc.;
 - other acidic fruit, i.e. fruit or fruit mixture the juice of which has titratable acidity, expressed as citric acid, of at least 2.5%;
 - exotic or special fruit with a strong flavour and/or a thick consistency such as pineapple, banana, corossol, cherimoya, guanabana, guava, kiwi, lychee, mango, passion fruit, etc.

- b) Minimum content reduced to 5% for
 - nuts and nut preparations.

ANNEX II - SORBET WITH REFERENCE TO FRUIT(S) – VEGETABLE(S)

1. Fruits for which the content may be less than 25% fruit:

- a) Minimum content reduced to 15% for
 - citrus fruit, namely lemon, orange, mandarine, tangerine, grapefruit, etc. ;
 - other acidic fruit, i.e. fruit or fruit mixture the juice of which has titratable acidity, expressed as citric acid, of at least 2.5%;
 - exotic or special fruit with a strong flavour and/or a thick consistency such as pineapple, banana, corossol, cherimoya, guanabana, guava, kiwi, lychee, mango, passion fruit, etc.

- b) Minimum content reduced to 7% for
 - nuts and nut preparations.

2. Vegetables for which the content may be less than 25% vegetables:

Minimum content reduced to 10% for

- vegetables with a strong flavour and/or a thick consistency such as celery, green or red pepper, turnip, pumpkin, etc.

資料 1 (続き): デンマークのアイスクリーム等の製品分類について[4/4] (EUROGLACES)



CODE FOR EDIBLE ICES, Version 2013

ANNEX IV – COMPOSITIONAL STANDARDS

Denominations as listed in Chapter 3	COMPOSITIONAL CRITERIA								
	MSNF	PROTEINS		EDIBLE FATS		FRUIT(S) or VEGETABLE(S)			
		Dairy	Non-Dairy	Dairy	Non-Dairy	Ordinary	Fruit(s) or Acid or Strong Flavour	Vegetable(s) listed in Annex II.2	Nuts & Nut Preparations
3.1. Water Ice									
3.2. Ice Cream		Optional	Optional	Dairy and/or non-dairy edible fats mandatory					
3.3. Milk Ice	6.0% min.	Mandatory	Excluded	2.5% min.	Excluded				
3.4. Dairy Ice Cream		Mandatory	Excluded	5.0% min.	Excluded				
3.5. FF Fruit Ice						15% min.	10% min. Fruit(s) listed in Annex I.a	-	5% min.
3.6. Sorbet						25% min.	15% min. Fruit(s) listed in Annex II.1.a	10% min.	7% min.

資料 2 : デンマークのアイスクリーム等の微生物基準について (EUROGLACES)

Code for Edible Ices (<https://www.euroglaces.eu/code-edible-ices>)



CODE FOR EDIBLE ICES, Version 2013

ANNEX III - MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR EDIBLE ICES

- m:** *The threshold value in micro-organism: the result is considered as acceptable when, in all the sample units, the microbial count is lower than or equal to m.*
- M:** *The maximum permitted level of the specified micro-organism in the sample.*
- n:** *Number of sample units to be examined in one lot.*
- c:** *When, in n examined sample units, the microbial count remains between m and M for a number of units lower than or equal to c, the product may be accepted provided that no other sample unit has a count higher than m.*

Micro-organisms / their toxins, metabolites	Sampling Plan		Limits		Analytical Reference method	Stage where the criterion applies
	n	c	m	M		
1) Food safety criteria						
- Listeria monocytogenes	5	0	100 cfu/g		EN/ISO 11290-2 EN/ISO 6579	Products placed on the market during shelf life Products placed on the market during shelf life
- Salmonella *	5	0	Absence in 25 g			
2) Process Hygiene criteria						
- Enterobacteriaceae *	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	ISO 21528-2	End of the manufacturing process

* only for Edible Ices containing milk ingredients

NB: *Sampling plans and interpretation of results must be in accordance with the rules laid down in Regulation (EC) No 2073/2005.*

資料 3： EU のアイスクリーム製品に対する微生物基準（サルモネラ）（1.13 部分、EU 規則 2073/2005 より）

▼M1

Food category	Micro-organisms/their toxins, metabolites	Sampling plan ⁽¹⁾		Limits ⁽²⁾		Analytical reference method ⁽³⁾	Stage where the criterion applies
		n	c	V _m	M		
1.8 Meat products intended to be eaten raw, excluding products where the manufacturing process or the composition of the product will eliminate the salmonella risk	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 25 g		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life
▼M2							
1.9 Meat products made from poultry meat intended to be eaten cooked	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 25 g		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life
▼M1							
1.10 Gelatine and collagen	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 25 g		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life
1.11 Cheeses, butter and cream made from raw milk or milk that has undergone a lower heat treatment than pasteurisation ⁽¹⁰⁾	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 25 g		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life
1.12 Milk powder and whey powder	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 25 g		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life
1.13 Ice cream ⁽¹¹⁾ , excluding products where the manufacturing process or the composition of the product will eliminate the salmonella risk	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 25 g		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life
1.14 Egg products, excluding products where the manufacturing process or the composition of the product will eliminate the salmonella risk	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 25 g		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life
1.15 Ready-to-eat foods containing raw egg, excluding products where the manufacturing process or the composition of the product will eliminate the salmonella risk	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 25 g or ml		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life
1.16 Cooked crustaceans and molluscan shellfish	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 25 g		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life

¹¹ 乳を含むアイスクリームのみ。

資料 4： EU のアイスクリーム製品に対する微生物基準（腸内細菌科菌群）（2.2.8 部分、EU 規則 2073/2005 より）

▼M1

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			
2.2.6 Butter and cream made from raw milk or milk that has undergone a lower heat treatment than pasteurisation	<i>E. coli</i> ⁽⁵⁾	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	ISO 16649-1 or 2	End of the manufacturing process	Improvements in production hygiene and selection of raw materials
2.2.7 Milk powder and whey powder ⁽⁴⁾	Enterobacteriaceae	5	0	10 cfu/g		ISO 21528-2	End of the manufacturing process	Check on the efficiency of heat treatment and prevention of recontamination
	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 batch has to be tested for staphylococcal enterotoxins.
2.2.8 Ice cream ⁽⁸⁾ and frozen dairy desserts	Enterobacteriaceae	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	ISO 21528-2	End of the manufacturing process	Improvements in production hygiene
2.2.9 Dried infant formulae and dried dietary foods for special medical purposes intended for infants below six months of age	Enterobacteriaceae	10	0	Absence in 10 g		ISO 21528-1	End of the manufacturing process	Improvements in production hygiene to minimise contamination ⁽⁹⁾
2.2.10 Dried follow-on formulae	Enterobacteriaceae	5	0	Absence in 10 g		ISO 21528-1	End of the manufacturing process	Improvements in production hygiene to minimise contamination

⁸ 乳を含むアイスクリームのみ。

資料 5 : EU のアイスクリーム製品に対する微生物基準 (リステリア) (1.2 上段部分、EU 規則 2073/2005 より)

Food category	Micro-organisms/their toxins, metabolites	Sampling plan ⁽¹⁾		Limits ⁽²⁾		Analytical reference method ⁽³⁾	Stage where the criterion applies
		n	c	Vm	M		
1.1 Ready-to-eat foods intended for infants and ready-to-eat foods for special medical purposes ⁽⁴⁾	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Absence in 25 g		EN/ISO 11290-1	Products placed on the market during their shelf-life
1.2 Ready-to-eat foods able to support the growth of <i>L. monocytogenes</i> , other than those intended for infants and for special medical purposes	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g ⁽⁵⁾		EN/ISO 11290-2 ⁽⁶⁾	Products placed on the market during their shelf-life
		5	0	Absence in 25 g ⁽⁷⁾		EN/ISO 11290-1	Before the food has left the immediate control of the food business operator, who has produced it
1.3 Ready-to-eat foods unable to support the growth of <i>L. monocytogenes</i> , other than those intended for infants and for special medical purposes ⁽⁴⁾ ⁽⁸⁾	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g		EN/ISO 11290-2 ⁽⁶⁾	Products placed on the market during their shelf-life
1.4 Minced meat and meat preparations intended to be eaten raw	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 25 g		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life
▼ M2							
1.5 Minced meat and meat preparations made from poultry meat intended to be eaten cooked	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 25 g		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life
▼ M1							
1.6 Minced meat and meat preparations made from other species than poultry intended to be eaten cooked	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 10 g		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life
1.7 Mechanically separated meat (MSM) ⁽⁹⁾	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 10 g		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life

02005R2073 — EN — 01.01.2018 — 007.001 — 9

資料 6 : 外部検査会社が微生物検査で使用している ISO 法代替検査法およびその妥当性確認情報 (検査会社の説明資料を日本語に要約)

	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
EU規則指定ISO法	ISO11290-1	ISO11290-1	ISO6579	ISO21528-2
検査会社使用検査法	Rapid L'mono	Vidas	Salmonella BAX	NMKL144
代替法の妥当性確認	Nordvalによる確認	AFNORによる確認	AFNORによる確認	ISO21528-2への直接の妥当性確認はされていないものの、同様の手法 (同じ寒天培地および培養時間と培養温度) を使用し検査を行っている。どちらもオキシダーゼ試験で確認を行っており、同等であると判断した。
代替法の妥当性確認証	Nordval22	AFNOR BIO12/02-06/94	QUA18/03-11-02	NMKL144

令和元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

研究要旨 本年度は、アイスクリーム類を製造する国内事業者の協力を得て、製造施設を視察すると共に、情報収集及び各種検体を微生物試験に供することで、同製品の製造工程管理実態を調査し、製造基準の検討にあたっての科学的知見を集積することを目的として検討を進めた。大規模事業者の施設 A では、スティック、カップ、コーンの計 3 形態のアイスクリームを製造しており、各種原料を外部より受入れ後、区分管理を行っていた。また、原料混和から冷却工程迄は閉鎖流路を取っており、このうち加熱殺菌工程では圧力をモニタリング指標としていた。視察を通じ、冷却後以降では充填工程での硬化のために用いる冷却水管理や充填機の使用後洗浄・消毒等が製造基準を遵守する上での重要項目と想定された。同施設では製品、ストレージミックスを対象とした定期的な微生物試験のほか、環境拭取り検体の ATP 検査が自主的に行われていた。製造中に採材した原料、最終製品及び充填機拭取り検体を微生物試験に供したところ、原料 1 検体、最終製品 5 検体、充填機拭取り 2 検体から、1.0-1.5 logCFU/ml の一般細菌が僅かに検出されたものの、糞便汚染指標菌は何れも不検出となり、同製造ラインの衛生管理が良好に維持されている状況が確認された。一方、菌叢解析を通じ、硬化後包装前製品を載せるトラップステージ拭取り検体の構成菌叢は原料の一つである粉末水飴の構成菌叢と極めて近似しており、同原料に生存性を持つ病原微生物が混入し、更に加熱殺菌に不備が生じた場合には、最終工程で製品やステージ表面を汚染するおそれも想定され、改めてこれらの製造基準に則った管理の重要性が示された。また、製品の出荷状況に応じて不定期にカップアイスを製造する、中規模事業者の製造施設 B でも原料混和から冷却工程迄は施設 A と同様に閉鎖流路をとっていたが、充填工程は半自動であり、特に充填機器の使用後洗浄・消毒が衛生管理上の重要項目と想定された。また、施設 B では自施設内の別ラインで製造される低温殺菌乳を原料に用いていた。未加熱の生乳（参考品）最終製品を微生物試験に供したところ、生乳検体からは糞便汚染指標菌である腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌がそれぞれ 1.5-3.7 logCFU/ml、1.9-3.8 logCFU/ml、<1.0-1.8 logCFU/ml の範囲で検出されたが、製品検体からこれらの糞便汚染指標菌は検出されず、同検体中の一般細菌数は 0.64-0.67 logCFU/ml の範囲に留まっていた。以上より、国内の大規模・中規模アイスクリーム製造における衛生管理は乳等省令を遵守して対応がなされており、微生物管理の面から直ちに改訂を検討する必要性は低いと判断された。一方で大腸菌群陰性とされる現行の成分規格については、国際整合性並びに原料を含めた同指標菌の動態を見極めつつ検討する必要性が考えられた。

製品の成分規格等に関する省令(乳等省令)」

- A. 研究目的 によりいくつかの分類がなされており、このうち、「アイスクリーム」については、国内の乳・乳製品については、「乳及び乳

水が食品製造用水であること、発酵乳及び乳酸菌飲料を除く原料については、摂氏68・30分以上の加熱殺菌を施すこと、氷結管からアイスクリームを抜き取る場合に、その外部を温めるため使用する水は流水（食品製造用水に限る。）であること、容器包装に分注する場合は分注機械を用い、打栓する場合は打栓機械を用いること、アイスクリームの融解水はこれをアイスクリームの原料としないこと（但し、上記加熱殺菌を施したものについてはこの限りではない）等の製造基準が定められている。また、成分規格としては、細菌数が1gあたり100,000以下、かつ大腸菌群陰性と定められている。

厚生労働省が取り纏める食中毒統計資料によると、2010年1月から2020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、アイスクリームを原因とするものは報告されていない。このことは、上述の乳等省令で定められる製造基準を遵守して製造されたアイスクリームによる健康被害実態が認められていないことを示している。

Euromonitor Internationalが2016年に行った調査では、日本国内でのアイスクリーム年間消費量は6.5Lで世界第17位であり、この量はオランダ、フランス等と同程度となっている（<https://www.euromonitor.com/ice-cream-and-frozen-desserts>）。また、財務省貿易統計によると、国内で製造されるアイスクリームは2013年に1.62tが輸出されていたが、2018年の同輸出量は5.61tにまで増加する等、近年輸出量及び輸出額が増加傾向にある（<https://www.customs.go.jp/toukei/info/>）。また、アイスクリーム全体の輸入量は大きな増加傾

向は認められないものの安定した数量がニュージーランド、フランス、ベルギー等から輸入されている状況にある。

こうしたアイスクリームの安全確保には上述の乳等省令で示される製造基準並びに成分規格が功を奏していると目されるが、これらが定められた当時に比べ、現時点での当該製造施設における衛生管理実態については、過去数十年に亘り厚生労働省の研究調査は行われていない状況であった。

以上の背景を踏まえ、本年度の分担研究では、国内のアイスクリーム製造施設における管理実態等について調査を行い、現行の製造基準等に関する改訂の必要性を見極めるための基礎知見を収集することを目的として検討を行った。大規模及び中規模のアイスクリーム製造施設の協力を得て、情報を整理すると共に、衛生試験を通じた衛生管理実態を検討し、製造管理上重要と想定される工程・項目及びこれらの生物的危害要因に関する考察を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 協力施設でのアイスクリーム製造に係る情報収集

アイスクリームを製造する大規模及び中規模事業施設A、B（以下、施設Aまたは施設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、並びに製造量、製品仕様、自主検査等の情報提供を依頼し、承諾を得た。

2. 採材

施設Aでは、原料（脱脂粉乳2種、粉末水飴）及び最終製品のほか、充填機周辺環境拭き取り検体を3M Hydrated sponge（スリ

ーエム)を用いて採材した。全ての検体は冷蔵温度帯で保管・輸送し、採材から3時間以内に検査に供した。

施設 B では生乳(参考品)及び最終製品のほか、充填室内の床及び壁を施設 A と同様に採材した。各検体は、冷蔵温度帯で輸送し、採材から4時間以内に試験に供した。

3. 衛生指標菌定量試験

衛生指標菌の検出には、国際標準試験法である ISO 法(細菌数、ISO 4833-1; 腸内細菌科菌群、ISO 21528-2; 大腸菌群、ISO 4832; 大腸菌、ISO 16649-2; 黄色ブドウ球菌、ISO 6888-1)を用いて検討を行った。

なお、生乳の調整にあたっては、5倍希釈液を作成し、試験原液として用いた。

拭き取り検体は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて試験懸濁原液を調整した。同原液1 mLを各平板培地に接種し、上述の ISO 文書に従って培養を行い菌数を求めた。

4. 細菌叢解析

施設 A の検体については、試験原液1 mlを対象とした。何れも滅菌 PBS を用いて2回洗浄を行った後、MaxWell RSC DNA Blood kit(プロメガ)を用いて Total DNA を抽出した。その後、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 反応により16S rRNA V5-V6 領域を増幅し、E-gel SizeSelect 2%(Thermo Fisher)及び AMPure XP(Beckman)を用いて増幅産物を精製・定量した。その後、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.20(キアゲン-CLC)を用いて不要配列を除去後、RDP Classifier pipelineへ投入し、階層分類等の解析を行った。

5. 生乳中の微生物動態解析

上項2.で示した施設 B 由来生乳(参考品)検体を100 mLずつ分注した後、速やかに4にて0,1,2,5日間冷蔵保管した。各時点において検体を取り出し、上項3.に示す方法により一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数、黄色ブドウ球菌数を求めた。各指標菌間の相関性の判定にはリストワイズ法を用いた相関の p 値を用いた。

C. 研究結果

1. 施設 A・B におけるアイスクリーム製造工程に関する情報整理(図1)

施設 A でのアイスクリーム製造工程について、情報を提供いただき、今回検討対象とした製品の製造工程フロー図を作成した。

同施設では、稼働日あたり平均約150万個の製品を製造しており、製造製品としては、カップ、スティック、コーンから構成されていた。同施設は FSSC 22000 を取得しており、取得にあたり、原料保管を含めて区画化をなし得ており、管理区域は原料保管エリア、調合・貯乳エリア、充填・包装エリア、搬送・保管エリアに大別されていた。

原料調合後の加熱条件については、乳等省令では68 30分もしくはこれと同等以上とされているが、同施設ではプレート式殺菌装置を用いた85 15秒の管理目標値を設定しており、その管理は圧力をモニタリングすることによって行っていた。殺菌

後のストレージについては 10 未満で 1~4 時間を目標値として定めていたほか、容器包装のうち、紙パックについては UV 照射による使用前殺菌を行っていた。

施設 A における自主検査として特に微生物試験に関わる情報を求め、製品については、概ね 3 時間毎にサンプリングを行い、乳等省令で定められる一般細菌数（自主管理基準：300CFU/mL 未満）及び大腸菌群のほか、開始時には黄色ブドウ球菌も試験項目に定めている状況を確認した。また、ストレージミックスについても、ロット毎にサンプリングを行い、一般細菌数、大腸菌群試験を実施していた。更に、施設環境の清浄度確認には簡易キットを用いた ATP 試験を用いていた。微生物試験の適切性を評価するため、同施設では毎年外部精度管理試験を受講しているとのことであった。また、各衛生指標菌検査には 2017 年より簡易培地を用い始めていた。

一方、中規模の施設 B は、牛乳製造を主体とする中で、アイスクリーム製造もおこなっていた。同施設では出荷先の在庫状況を見て都度製造計画を立てる製造方式を取っており、視察時には製造ラインは稼働していなかった。また、同施設では同施設内で製造された低温殺菌牛乳を原料の一つとして用いていた。アイスクリーム製造は HEPA フィルターで管理された乳製品加工室内で行われており、施設 A と同様に原料調合以降、充填に至る工程はインライン管理であった。充填は半自動の開放系機器を用いており、使用後洗浄も手動であった。加熱殺菌条件は、85~90・15 秒を採用しており、圧力モニタリングにより管理していた。自主検査には、原料、冷却・エイジング

工程、充填・包装工程のほか、製品を対象としており、一般細菌数（30CFU/mL 未満）及び大腸菌群（陰性）を検査項目としていた。

2. 施設 A における原料、施設ふき取り検体、及び製品からの衛生指標菌の検出状況（表 1）

原料 3 検体のうち、脱脂粉乳 A 及び粉末水飴検体は一般細菌数を含めた全ての微生物試験項目で陰性を示した。脱脂粉乳 B 検体についても一般細菌数が僅かに検出されるにとどまり（1.19 logCFU/mL）、他の指標菌は全て陰性であった。

製品 5 検体についても、原料と同様に一般細菌数以外の試験項目は何れも陰性を示し、一般細菌数の検出数値は 1.33-1.51 logCFU/mL の範囲にとどまっていた。

充填機周辺の拭取り環境検体についても、充填ノズル周辺の拭取り 2 検体より一般細菌数が僅かに検出されたものの他の指標菌は全て不検出となった。

3 施設 B における製品、施設ふき取り検体、及び生乳（参考品）からの衛生指標菌の検出状況（表 2）

製品 2 検体からは、一般細菌数が 0.64 または 0.67 log CFU/mL のみ検出されたほか、糞便汚染指標菌（腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌）及び黄色ブドウ球菌はいずれも陰性であった。

充填機が設置された加工室内の床及び壁拭取り検体についても同様に微生物試験に供したが、一般細菌数のみ 4.41-5.22 logCFU/100cm² の範囲で検出された一方、他の指標菌は全て陰性であった。

同施設に牛乳製造用に搬入された生乳計4検体を参考品として同様に検査に供した。一般細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群はそれぞれ 3.88-4.05 logCFU/mL、1.50-3.69 logCFU/mL、1.92-3.77 logCFU/mL の範囲で全4検体より検出されたほか、大腸菌及び黄色ブドウ球菌は共に2検体で陽性を示し、それらの検出数値の範囲は 1.76-1.80 logCFU/mL、または 2.56 logCFU/mL であった。

4. 施設 A での製造工程を通じた構成菌叢比較解析 (図 2, 3)

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。アイスクリームの主原料である脱脂粉乳 A・B では構成菌叢が大きく異なっていたが、このうち、脱脂粉乳 B 検体で優勢であった *Streptococcaceae* は、充填ノズル周辺拭取り検体及び製品においても優勢な菌叢として認められた。同じく主な原料である粉末水飴検体については *Caulobacteraceae* が最も優勢な菌科として検出され、同菌科は製品が固化後、包装される間に輸送される際に直接載せられるトラップステージ拭取り検体及び作業従事者の手指洗浄用電解水検体においても最も優勢であった (図 2A)。

菌属レベルでの解析を通じ、上述の傾向はより明確化された。すなわち、脱脂粉乳 B 検体、充填ノズル周辺拭取り検体及び製品検体で優勢菌科として検出された *Streptococcaceae* の多くが *Lactococcus* 属及び *Streptococcus* 属等として認められていたのに対し、粉末水飴検体及びトラップステージ拭取り検体で優勢菌科として検出

された *Caulobacteraceae* の多くは *Asticcacaulis* 属及び *Brevundimonas* 属等により構成されている状況であることが判明した (図 2B)。故に、施設 A 由来検体間での菌叢の共通性は菌科・属レベル双方で確認された。なお、検体間の関連性を明確化するため、網階層でのクラスターを作成したところ、上述の見解を指示する結果となった (図 3)。

5. 生乳検体における各種衛生指標菌の挙動解析 (図 4、表 3)

施設 B より参考品として提供された生乳検体を4下で0、1、2、5日間保存し、一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数、黄色ブドウ球菌数を求めた。結果として、0日目に3.88-4.05 logCFU/mLであった一般細菌数は、保存1日目には3.54-4.14 logCFU/mL、保存2日目には3.61-3.99 logCFU/mL、保存5日目には3.44-3.86 logCFU/mLとなり、顕著な変動は認められなかった。

一方、腸内細菌科菌群数は0日目に1.50-3.69 logCFU/mL、保存1日目に1.92-4.29 logCFU/mL、保存2日目に2.14-4.41 logCFU/mLと微増したが、保存5日目には2.22-4.28 logCFU/mLと微減した。

保存0日目に1.92-3.77 logCFU/mLであった大腸菌群数は保存1日目には1.96-4.53 logCFU/mLと微増したが、保存2日目には1.79-3.59 logCFU/mLへと若干の減少を示し、保存5日目には1.73-4.61 logCFU/mLと再び微増した。

大腸菌が検出された2検体を対象とした動態観察により同菌は保存2日目迄は1.76-1.80 logCFU/mL から 0.78-0.87

logCFU/mL へと穏やかな減少を示したが、5 日目には 1.36 logCFU/mL へと再び微増した。また、保存 0 日目の段階で大腸菌を認められた 2 検体からは黄色ブドウ球菌も検出されたが、同指標菌は保存 5 日目まで安定的な生存を示した。

得られた数値を基に、指標菌間での相関性を解析した。リストワイズ法を用いた解析結果として、一般細菌数は腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌との間でそれぞれ 0.0876、0.0947、0.4428 の相関の p 値を示し、相関はないと判断された。黄色ブドウ球菌とは 0.0004 となり相関があると判断された。腸内細菌科菌群数は大腸菌群数との間で $p=0.0027$ であったほか、黄色ブドウ球菌との p 値も 0.0253 となり、相関はあると判断された。一方、大腸菌群と大腸菌、黄色ブドウ球菌との間での p 値はそれぞれ 0.1323、0.0687 となり、相関はないと判断された。

D. 考察

本研究では、大規模及び中規模のアイスクリーム製造事業者の協力を得て、製造工程管理に関する実態を微生物学的見地から検討した。

両施設はそれぞれ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。施設 A では製品に加え、エイジング工程を重点的な工程管理対象として、微生物検査を定期的実施していた。本年度のある月に実施した自主検査記録を確認したところ、検体数 1750 に対し、一般細菌数で自主管理基準として定めた 300CFU/ml を超えた検体数は僅かに 3 検体（陽性率として 0.17%）であった。これらの陽性検体

が確認された場合の措置としては同一ロット製品の検査記録及び工程中の不備の有無を改めて確認することが一般的な対応内容であることは言うまでもない。

施設 A 由来検体を対象とした菌叢解析により、充填機器周辺で採材した拭取り検体のうち、トラップステージ検体は原料(粉末水飴)検体と近似した構成菌叢を示した。水飴は粘着性に富むため、トラップステージのように製品と直接接触する部位については同原料由来菌叢が残存し易い環境にあることが示唆される結果と解釈される。当該部位の洗浄に不備があった場合には一定の細菌残存も懸念され、使用後洗浄・消毒を遵守する一つの根拠となるものと考えられる。

施設 B では自社で牛乳製造もおこなっており、その原料となる生乳受け入れ時には大腸菌群検査も実施する等、良好な衛生状況の原料確保に向けた取り組みを行っていた。製造ラインで用いる機器は施設 A に比べて、特に充填機の取り扱い及び使用後洗浄・消毒工程を重要な管理項目と定めていた。同施設では不定期製造であったため、製造工程毎に原料及び中間製品等を確保することができなかったが、今後可能な限り、こうした検体を確保し、微生物試験及び菌叢解析を行うことで、衛生実態の精査が可能になるものと期待される。

生乳については受入後速やかに製造加工に供されることが衛生の確保に有効とは目されるが、大規模施設では品質の安定化を図る目的で合乳作業が通常行われる。本研究では少数検体ながら、生乳を冷蔵保存した際の指標菌動態を検討した。各指標菌間の相関係数を求めた結果、供試検体中での検出分布は腸内細菌科菌群が大腸菌群に比

べ、その他の糞便汚染指標菌及び黄色ブドウ球菌との間でより高い相関性を示し、包括的な糞便汚染指標としての優位性が示唆された。現時点において、施設 B では、乳等省令に基づき大腸菌群を糞便汚染指標として管理を行っているが、今後製造基準を検討する際には、国際動向を踏まえつつ、国内での微生物動態に関する知見をより集積した上で衛生指標菌試験項目を設定することが、科学的根拠に基づいた製造基準の在り方を検討する上で望ましいと考えられる。

E. 結論

アイスクリーム製造事業者 2 社の協力を得て行った製造工程管理並びに同実態調査の結果、国内のアイスクリーム製造段階における製造基準は適切に遵守されている状況を確認できた。一方、製造基準や成分規格の試験項目として乳等省令に基づいた大腸菌群を糞便汚染指標とすることの適切性については、国際動向を踏まえた上で、原料、中間・最終製品中での挙動に関する知見を集積・整理することが必要と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(学会発表)

1. 中山達哉．衛生管理のために用いる試験法の動向について．日本防菌防黴学会第46回年次大会シンポジウム 11. 2019年9月26日．大阪．

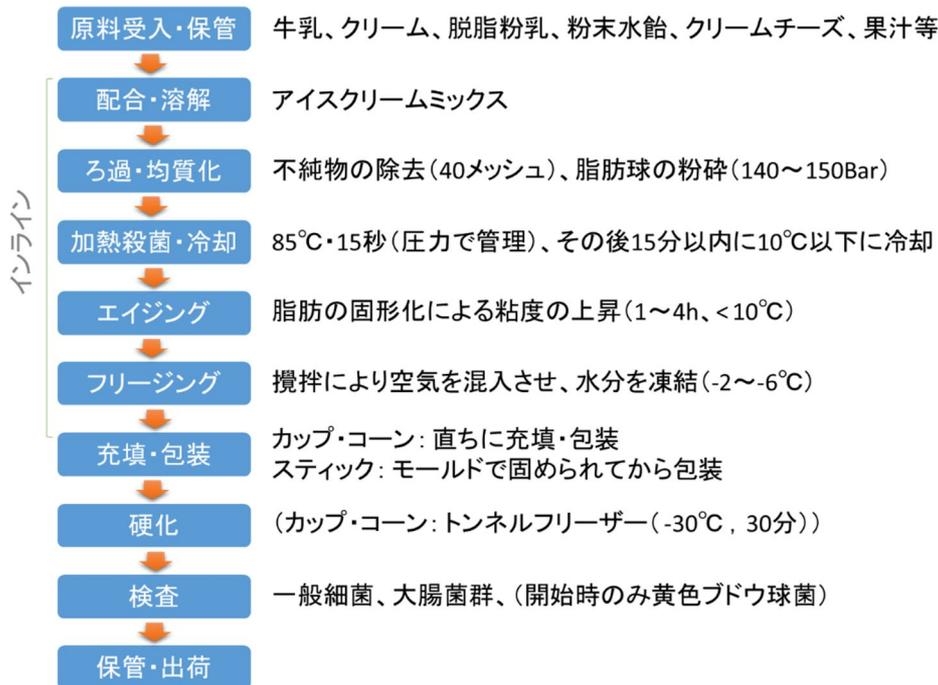
(論文発表)

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

A



B

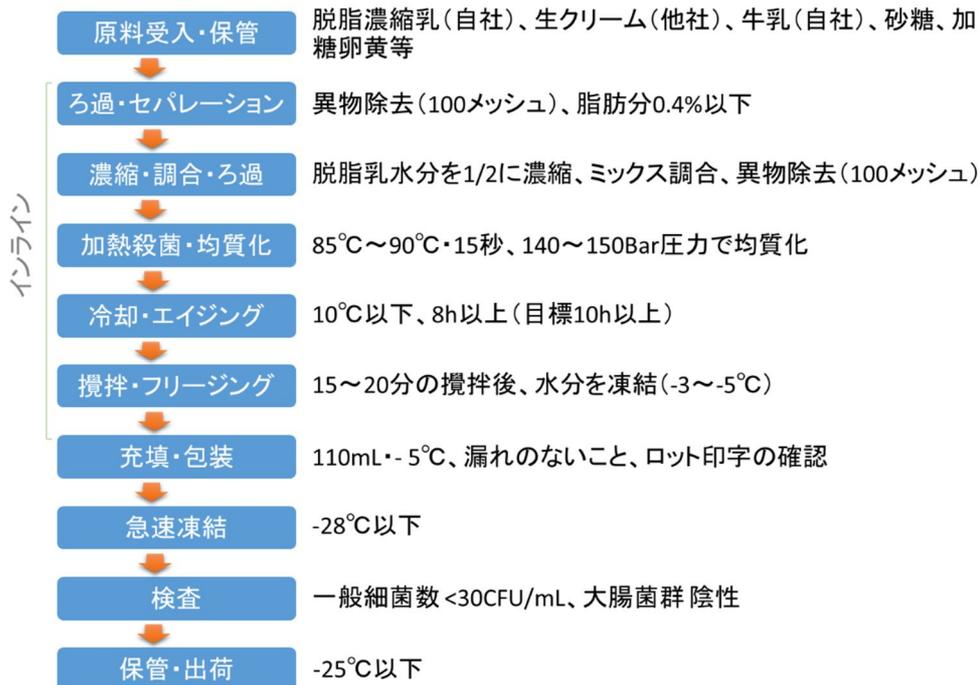
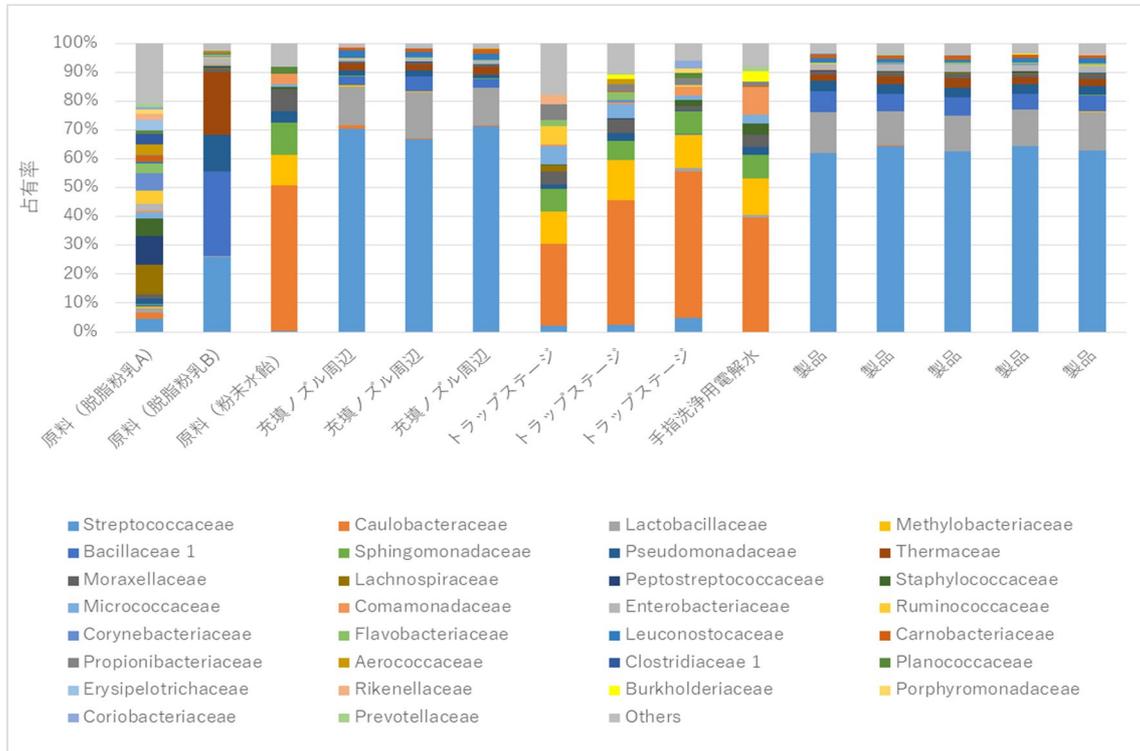


図1. 施設A及びBにおけるアイスクリーム製造工程フローの概要.
セクションA/Bはそれぞれ施設A/Bの製造工程フロー図を示す。

A



B

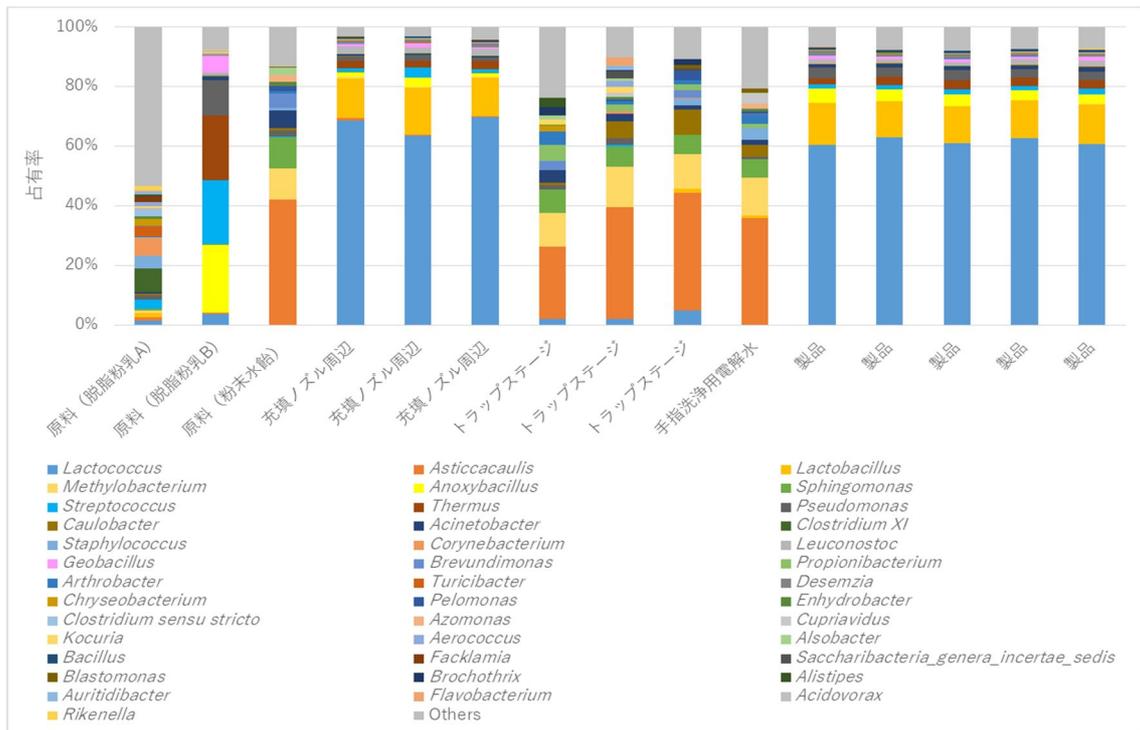


図2. 施設 A 由来の原料、充填機周辺環境拭取り、製品検体における構成菌叢解析結果概要
セクション A/B はそれぞれ科/属階層のバーチャートを示す。

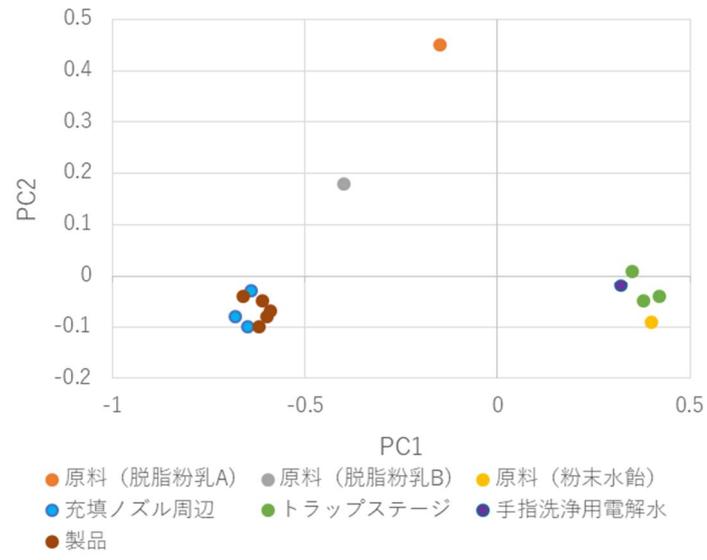
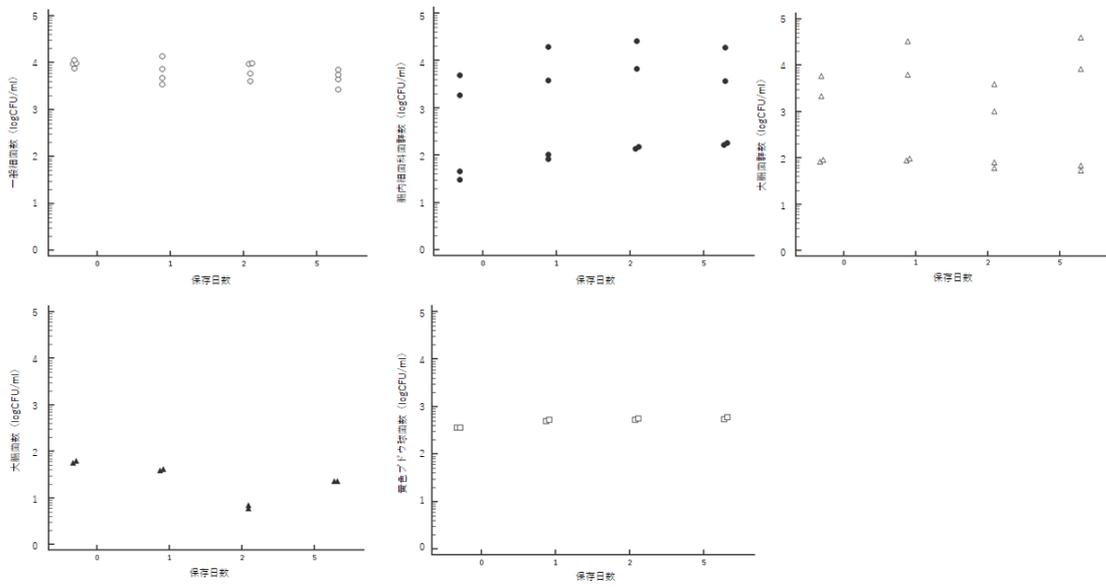
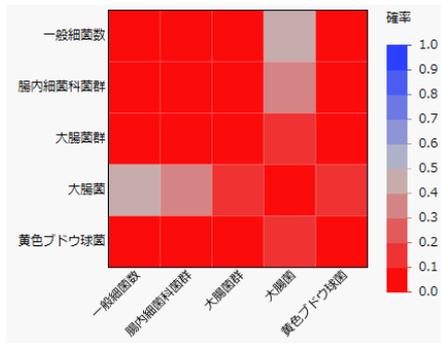


図 3. 網階層での施設 A 由来検体に係る主成分分析図



A



B

図 4. 冷蔵保存を通じた生乳検体中の各種衛生指標菌の挙動.

セクション A は各衛生指標菌の時系列推移を、セクション B は各指標菌数の相関 p 値に関するヒートマップを示す。

表1. 施設 A 由来検体における各種衛生指標菌の検出状況 .

種別	検体番号	菌数 (logCFU/mlまたは100cm ²)				
		一般細菌	腸内細菌科菌群	大腸菌群	大腸菌	黄色ブドウ球菌
原料 ^{※1}	M-1	ND ^{※2}	ND	ND	ND	ND
	M-2	1.19	ND	ND	ND	ND
	M-3	ND	ND	ND	ND	ND
製品 (アイスバー)	S-1	1.40	ND	ND	ND	ND
	S-2	1.51	ND	ND	ND	ND
	S-3	1.33	ND	ND	ND	ND
	S-4	1.51	ND	ND	ND	ND
	S-5	1.51	ND	ND	ND	ND
拭き取り ^{※1} (充填機)	F-4	ND	ND	ND	ND	ND
	F-5	ND	ND	ND	ND	ND
	F-6	1.00	ND	ND	ND	ND
	F-7	1.00	ND	ND	ND	ND
	F-8	ND	ND	ND	ND	ND
手指洗浄水	F-10	ND	ND	ND	ND	ND

¹ M-1: 脱脂粉乳 A, M-2:脱脂粉乳 B, M-3: 粉末水飴, F-4 6: 充填ノズル周辺, F-7 9: トラップステージ (硬化後). ² ND: 不検出を指す .

表2. 施設 B 由来検体における各種衛生指標菌の検出状況 .

種別	検体番号	菌数 (logCFU/mlまたは100cm ²)				
		一般細菌	腸内細菌科菌群	大腸菌群	大腸菌	黄色ブドウ球菌
拭き取り ^{※1} (充填室)	F-1	4.18	ND ^{※2}	ND	ND	ND
	F-2	5.22	ND	ND	ND	ND
	F-3	4.41	ND	ND	ND	ND
生乳 (参考品)	R-1	3.98	1.66	1.97	ND	ND
	R-2	3.99	1.50	1.92	ND	ND
	R-3	3.88	3.27	3.34	1.80	2.56
	R-4	4.05	3.69	3.77	1.76	2.56
製品	I-1	0.67	ND	ND	ND	ND
	I-2	0.64	ND	ND	ND	ND

¹ F-1,2: 充填室床, F-3: 充填室壁. ² ND: 不検出を指す .

表 3. 生乳検体由来各種衛生指標菌の検出成績に関する相関の p 値.

	一般細菌数	腸内細菌科菌群	大腸菌群	大腸菌	黄色ブドウ球菌
一般細菌数	0.0000	0.0876	0.0947	0.4428	0.0004
腸内細菌科菌群	0.0876	0.0000	0.0027	0.3566	0.0253
大腸菌群	0.0947	0.0027	0.0000	0.1323	0.0687
大腸菌	0.4428	0.3566	0.1323	0.0000	0.1068
黄色ブドウ球菌	0.0004	0.0253	0.0687	0.1068	0.0000

令和元年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理及び試験法確立のための研究」

分担研究報告書

国内小規模アイスクリーム製造施設の衛生実態に関する研究

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

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

A. 研究目的

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

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

現在、わが国の乳及び乳製品については、昭和26年に発令された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」（乳等省令）に基づき、生菌数と大腸菌群を微生物規格とした法規制が敷かれている。一方、EUやICMSFでは、HACCPによる工程管理を前提として、腸内細菌科菌群や グルクロニダーゼ陽性大腸菌等を衛生指標として用いた衛生管理を行っている。国内においては近年、平成30年の食品衛生法改正の中で示されたHACCPの制度化をはじめとした食品流通のグローバル化に対応した取り組みを行っているが、食品衛生管理を行う上では製造工程の管理に加え、衛生指標に用いる微生物種の妥当性やその試験法についても国際的整合性についての考慮が必要である。

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

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

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

B. 研究方法

1. 調査対象

北海道内でアイスクリームを製造・販売する小規模事業者（十勝地方2社、石狩地方1社）について調査を実施した。調査においては、製造地域での販売に加え、通信販売・業務用販売を含めた道外での広域販売を行っている事業者を選定した。各施設について、製造工程、各施設で実施される自主検査項目について、施設見学および聞き取り調査を実施し、製造工程管理実態および衛生管理実態を取りまとめた。

2. 衛生検査

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

2-1. 試料概要

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

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

2-2. 細菌検査法概要

2-2-1. 腸内細菌科菌群数検査概要

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

2-2-2. 生菌数検査概要

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

2-2-3. 大腸菌群数検査概要

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

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

2-2-4. 大腸菌数検査概要

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

C. 結果

1. 施設概要の比較

本調査においては、従業員数 2~5 名の小規模製造工場を調査対象とした (表 1)。調査対象とした 3 つの事業者のうち、施設 C は FSSC 22000 の認証を受けていた一方で、施設 A および B は上記のような衛生管理過程に関する定期的な第三者評価を受けていない施設であった。

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

2. 製造工程の比較

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

者向け)」に示される「バッチ式加熱殺菌冷却・カップアイスの製造工程例」

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

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

3. 検査体制の比較

施設 B は事業所内に製造部門とは独立した検査部門を持つ施設である一方で、施設 A 及び B では独立した検査部門を持たず製品検査については全てを外部委託検査に頼っている現状が明らかとなった。

4. フレーバーごとの細菌学的汚染度の比較及び、簡易検査法の有効性の検討

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

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

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

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

5. 簡易検査法に与える試験条件の影響の検討

平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）「国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理及び試験法確立のための研究」において実施した小規模低温殺菌乳製造施設の衛生実態に関する研究において、小規模施設においては十分な検査設備が整っておらず、自主検査に簡易検査法を用いたとしても、その検査精度の担保が難しい現状が抽出されている。本年度に実施した小規模アイスクリーム製造施設の調査においても、小規模施設では検査を実施する上で十分な施設が整っておらず、簡易検査法を用いた自主検査の実施においても検査結果に影響を与え

る要因（特性要因）の制御が十分に実施出来ない現状が明らかとなった。

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

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

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

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

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

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

D. 考察

1. 小規模施設における製造工程調査および製品の細菌学的汚染度調査

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

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

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

2. 簡易検査法の有用性解析

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

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

E. 結論

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

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

F. 研究発表

論文発表

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

学会発表

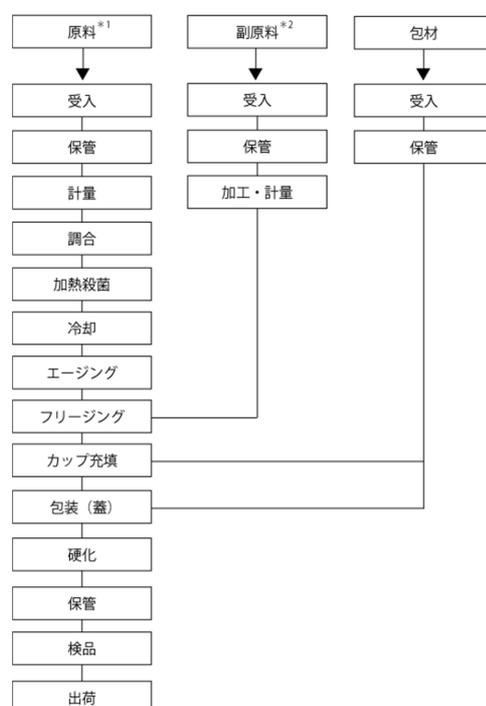
1. 八尋錦之助、小倉康平、寺崎泰弘、宮城聡、山崎栄樹。ヒト肝臓細胞における新規 Cholix 結合膜蛋白質の同定と細胞致死機構の解明。第93回日本細菌学会、名古屋市（2020.3）

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1 調査対象施設の概要

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



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

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

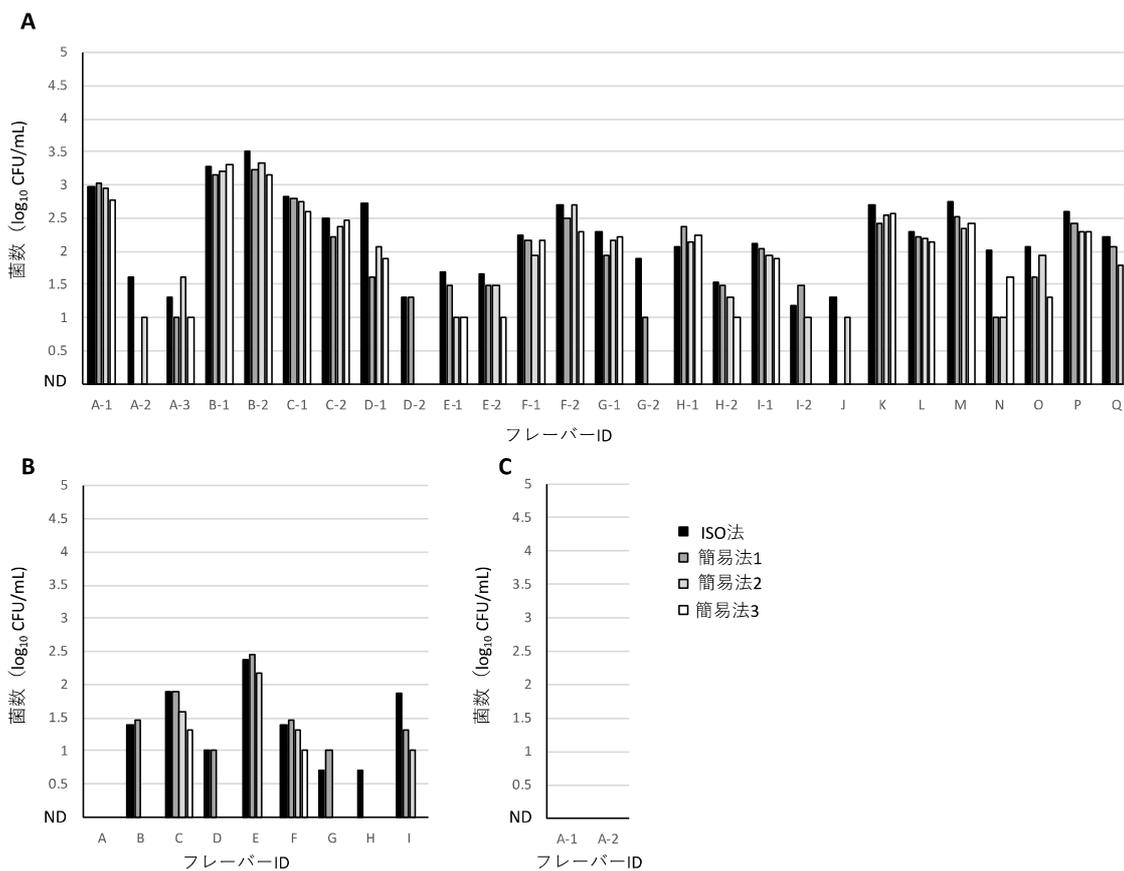


図2 小規模製造施設で製造されたアイスクリーム製品の生菌数

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

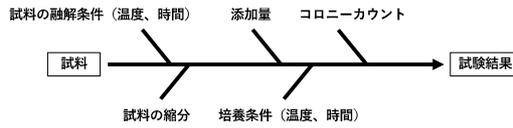


図3 簡易検査法の試験結果に影響を与える要因(特性要因図)

表2 異なる条件で融解した試料に対して簡易検査法を用いて得られる結果の比較

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

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

表3 異なる条件で培養した場合に得られる簡易検査法の結果の比較

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

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

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

アイスクリーム類等に対する簡易培地使用の妥当性及び衛生指標菌汚染実態に関する研究

研究分担者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者 鈴木穂高 茨城大学農学部
永島侑起 茨城大学農学部
渡辺 愛 茨城大学農学部
御堂梨花子 茨城大学農学部
百瀬愛佳 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨

日本国内における乳及び乳製品の衛生管理は、昭和 26 年に発出された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」(以下乳等省令)に基づき、細菌数と大腸菌群を微生物規格として行われている。そのため、現在でもそれらが科学的に妥当か否かの検証が望まれている。また、HACCP 導入後の各種食品製造工程における衛生管理上で、迅速簡易法が適用される可能性が高まっているが、乳及び乳製品での適用の妥当性については、不明な点がある。本研究では、乳及び乳製品の衛生実態を管理及び微生物規格を検討する上での基礎知見の集積を図ることを目的とし、本年度はアイスクリーム類製品 127 検体における細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌の検出状況について、公定法、ISO 法並びに簡易培地を用いて検討を行った。その結果、アイスクリーム類について微生物規格を逸脱した製品は見られなかった。簡易培地を用いた細菌数の検討では、製品により公定法の結果と差が見られ、導入検証の必要性が示された。

A. 研究目的

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

が用いられており、国内流通食品の衛生確保に重要な役割を果たしてきた。一方、国内の衛生状況は時代の変遷と共に変化を顕し、昨今では食品の国際流通も増加の一途を辿る等、食を取り巻く環境は変化している。わが国の乳及び乳製品については、昭和 26 年に

発令された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」(乳等省令)に基づき、細菌数と大腸菌群が微生物規格に設定され、安全確保が図られている。一方、現在 EU 等では乳製品の製造工程管理を HACCP ベースで行うと共に、わが国で 2011 年に生食用食肉の微生物規格として採用された、腸内細菌科菌群を衛生指標として製品等の検査が実施されている状況にある。国内規格は現時点においても、一定の安全確保に資する内容であることには違いがない一方、国際動向を踏まえた内容と結論づけるためには、その妥当性を科学的に評価する必要があると考えられる。

以上の背景を踏まえ、令和元年度は、国内で製造流通するアイスクリーム類製品を対象として、微生物汚染実態を衛生指標菌試験(公定法)並びに簡易培地(以下、簡易法)を用いた検討を行うことで評価することを目的とした。更に後者の製品に対する適用の妥当性、並びに混釈培養法の代替としての表面塗抹法について考察を行ったので報告する。

B. 研究方法

市販のアイスクリーム類について、衛生指標菌汚染実態を調査した。調査は令和元年 7 月から令和 2 年 3 月まで行い、検体はアイスクリーム(乳固形分 15%以上、うち乳脂肪分 8%以上) 52 検体、アイスマルク(乳固形分 10%以上、うち乳脂肪分 3%以上) 45 検体、ラクトアイス(乳固形分 3%以上) 30 検体の合計 127 検体を用いた。試験項目は、細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌とした。試験方法は、細菌数については乳等省令の試験法(32 48 時間培養)及び ISO 4833-1:2013(30 72 時間培養)を、腸内

細菌科菌群は定性法として ISO 21528-1:2017 を、定量法として ISO 21528-2:2017 を用いた。大腸菌群については乳等省令の試験法を用いた。黄色ブドウ球菌については通知法(食安発 0729 第 4 号)を、大腸菌については公定法及び ISO 16649-2:2001 を用いた。また、各試験項目の代替法として、国際的な第三者認証を取得し、国内で市販されている代表的な簡易培地 2 種を、製品の指示書に示された培養温度及び時間に従って用いた。同一検体間の試験法による菌数の比較は、対応のある t 検定により統計解析を行った。種別ごとの菌数の比較は一元配置分散分析及び Tukey の検定を行った。検出限界値未満の値は 0 CFU/g として計算を行い、対数化に当たって全数値に 1 を加算した。検出された腸内細菌科菌群の菌種同定は、16S Bacterial rDNA PCR キット(タカラバイオ)を用いた塩基配列解析及び BLAST 相同性検索により行った。3 カテゴリー間での腸内細菌科菌群陽性率の比較は、フィッシャーの正確確率検定(拡張型)により行った。

C. 研究結果

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

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

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

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

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

D. 考察

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

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

今回の試験により、市販のアイスクリーム類は概ね良好な衛生状態にあることが示された。次年度は、乳製品の微生物規格としての腸内細菌科菌群の有用性を検討するため、今年度検出された腸内細菌科菌群細菌の各種培地における増殖速度等の検討並びに簡易培地の実用性を向上させるための検討を実施する予定である。

E. 結論

公定法、ISO 法及び第三者認証取得済みの簡易培地を用いて、市販のアイスクリーム類 127 検体を対象とした衛生指標菌調査を行ったところ、供試製品検体に微生物規格違反検体は見られず、衛生状態は概ね良好であった。細菌数試験法間の成績比較を通じ、アイスクリーム類では簡易培地の製品

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表：

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 . 各試験法によるアイスクリーム類中の細菌数

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

* : 表面塗抹法のみ、有意差検定を ISO 法との間で行った

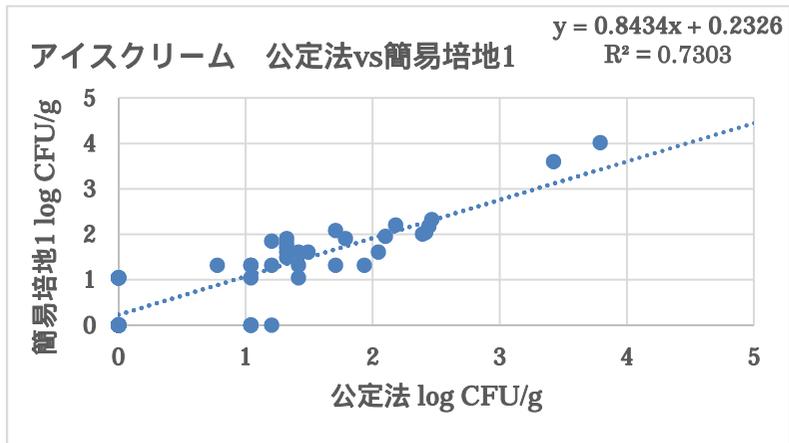


図1. 公定法と簡易法1における細菌数の相関(アイスクリーム)

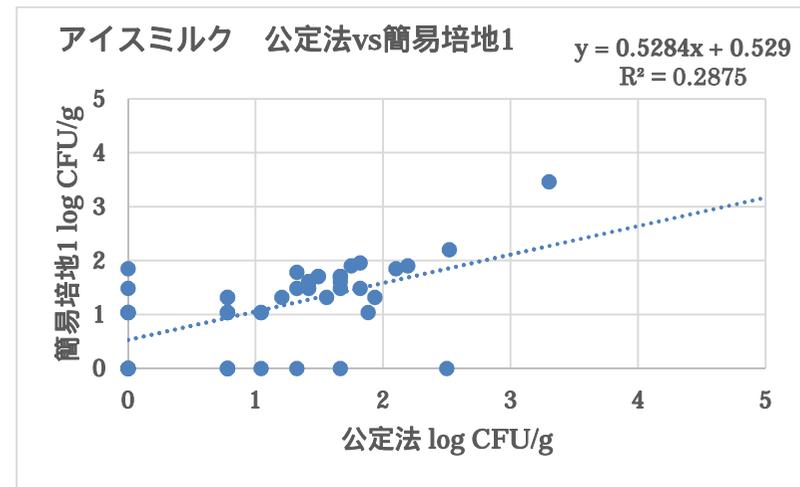


図3. 公定法と簡易培地1における細菌数の相関(アイスマルク)

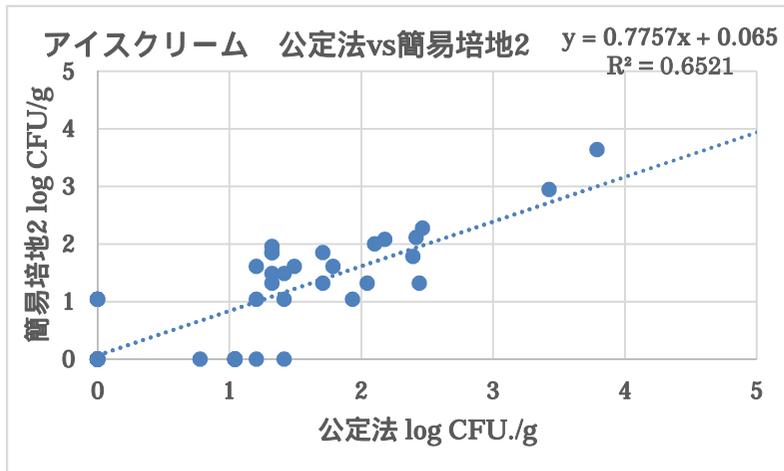


図2. 公定法と簡易培地2における細菌数の相関(アイスクリーム)

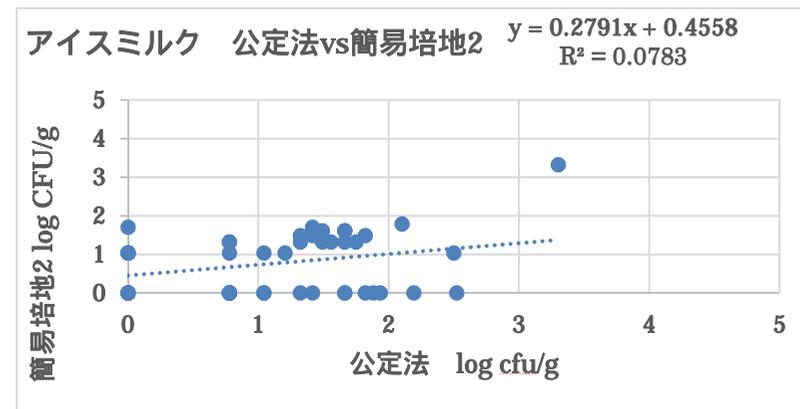


図4. 公定法と簡易培地2における細菌数の相関(アイスマルク)

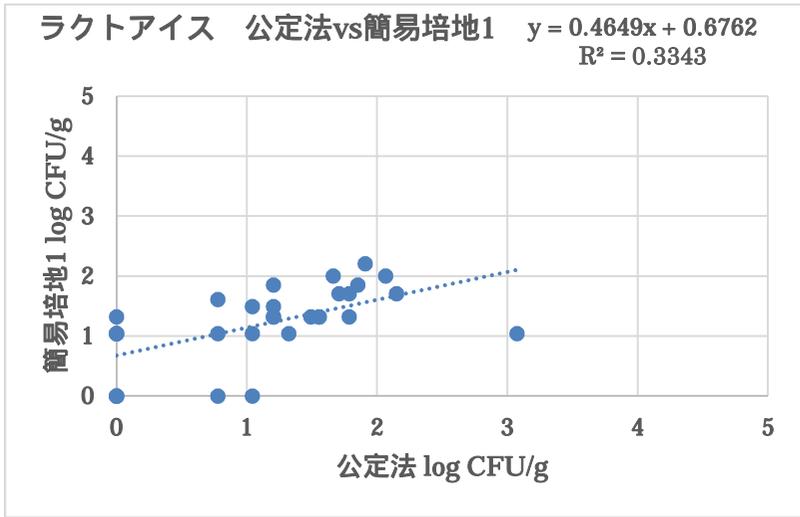


図5. 公定法と簡易培地1における細菌数の相関(ラクトアイス)

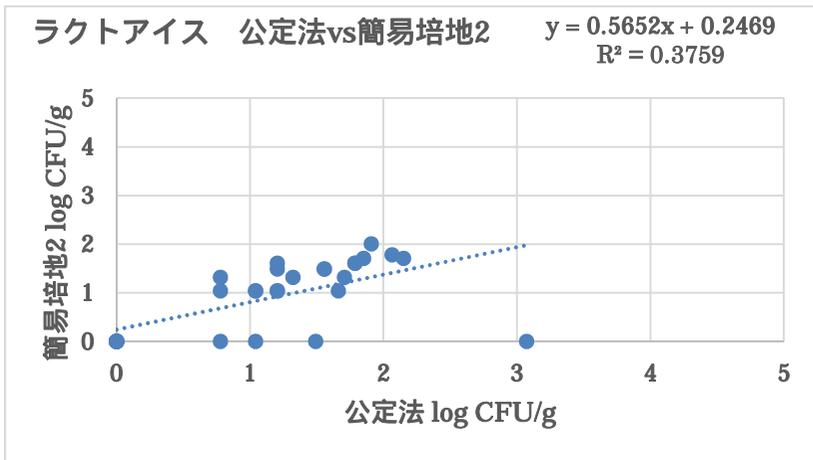


図6. 公定法と簡易培地2における細菌数の相関(ラクトアイス)

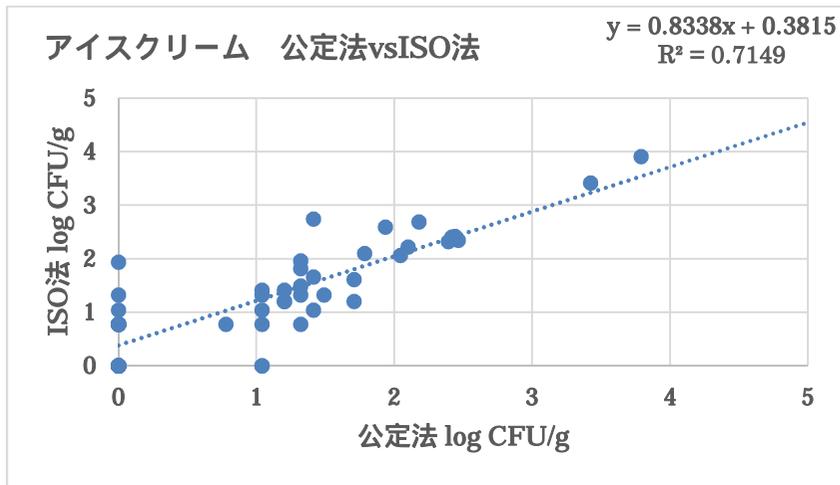


図7. 公定法とISO法における集落数の相関(アイスクリーム)

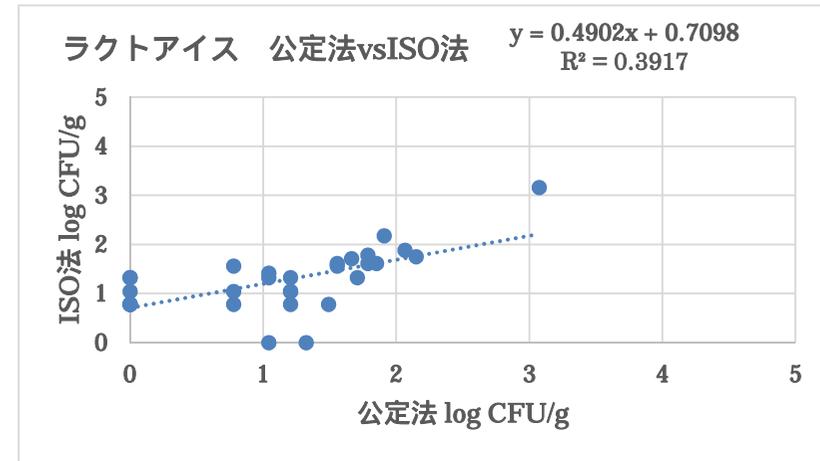


図9. 公定法とISO法における細菌数の相関(ラクトアイス)

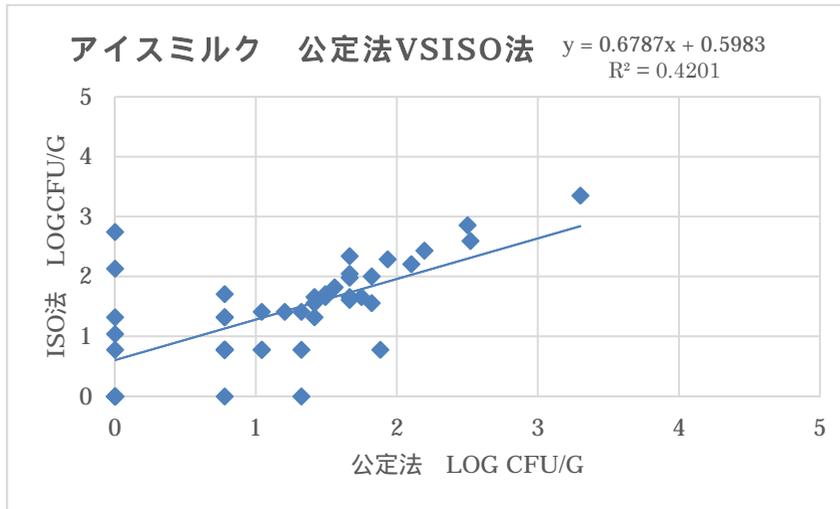


図8. 公定法とISO法における細菌数の相関(アイスマルク)

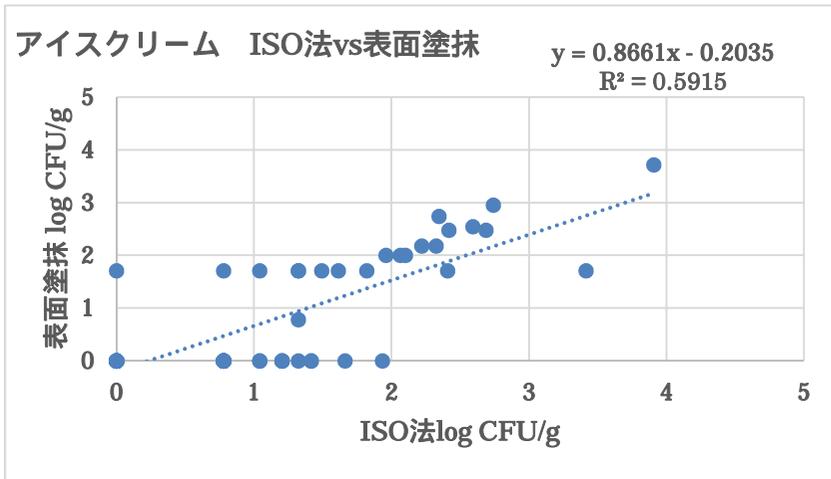


図 10 . ISO 法の混釈培養と表面塗抹法の細菌数の相関 (アイスクリーム)

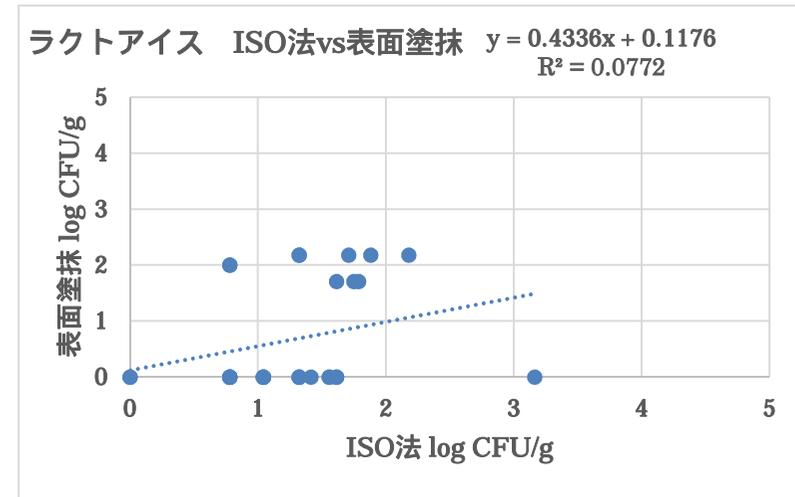


図 12 . ISO 法の混釈培養と表面塗抹法の細菌数の相関 (ラクトアイス)

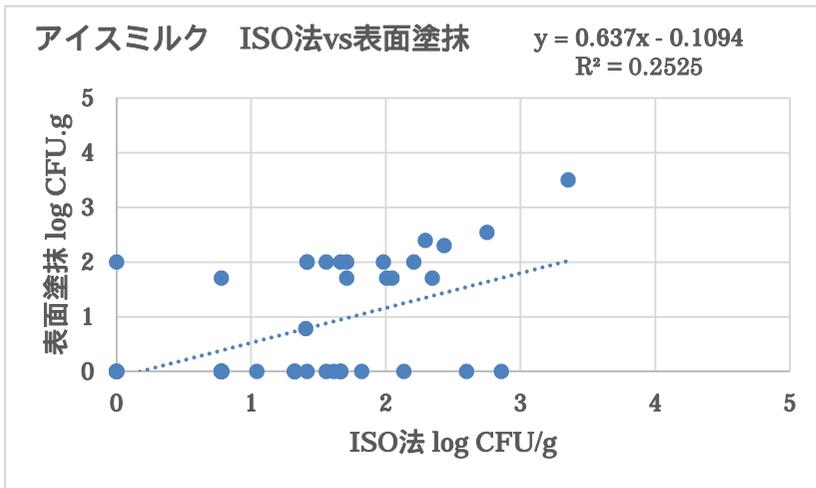


図 11 . ISO 法の混釈培養と表面塗抹法の細菌数の相関 (アイスマルク)

表2. アイスクリーム類における腸内細菌科菌群の検出状況

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

表 3. 検出された腸内細菌科菌群細菌の菌種同定結果

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

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
なし					

講演

発表者氏名	演題名	発表学会名	発表時期
中山達哉	衛生管理のために用いる試験法の動向について	日本防菌防黴学会第 46 回年次大会シンポジウム	2019 年 9 月 26 日

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏

次の職員の令和元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) 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

Table with 5 columns: 該当性の有無 (有/無), 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) (審査済み, 審査した機関, 未審査 (※2)). Rows include: ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針, 遺伝子治療等臨床研究に関する指針, 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3), 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, 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:)

(※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) 病原体等の取り扱い (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

Table with 2 columns: 研究倫理教育の受講状況, 受講 [x] 未受講 []

6. 利益相反の管理

Table with 2 columns: 管理項目, 有 [x] 無 [] (無の場合はその理由:). Rows include: 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定, 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無, 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無, 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無

(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。

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏

次の職員の令和元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) 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) 病原体等の取り扱い (所内の管理規定に従って実験を実施)

(※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 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏

次の職員の令和元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) 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

Table with 5 columns: 該当性の有無 (有/無), 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) (審査済み, 審査した機関, 未審査 (※2)). Rows include: ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針, 遺伝子治療等臨床研究に関する指針, 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3), 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, 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:)

(※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) 病原体等の取り扱い (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

Table with 2 columns: 研究倫理教育の受講状況, 受講 (checked) / 未受講 (unchecked)

6. 利益相反の管理

Table with 2 columns: 管理に関する規定/指針の有無, 有 (checked) / 無 (unchecked) (無の場合はその理由:)

(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 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏

次の職員の令和元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) 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) 病原体等の取り扱い (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) ・該当する口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 帯広畜産大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 奥田 潔

次の職員の令和元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) 病原体等の取り扱い (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。