

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2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 由美子

令和3年(2021)5月

目次

I. 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

II. 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

----- 41

3. 国内小規模製造施設の衛生実態に関する研究

山崎 栄樹 他

----- 55

3. バター製品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

----- 65

令和2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 | 百瀬 愛佳 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品衛生管理部 |
| | 鈴木 穂高 | 国立大学法人茨城大学 | 農学部 |
| | 山本 詩織 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品衛生管理部 |
| | 町田 李香 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品衛生管理部 |
| | 内山 栞 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品衛生管理部 |
| | 木下 直美 | 岡山市保健所 | 衛生課 |
| | 伊藤 友章 | 岡山市保健所 | 衛生課 |
| | 南 大亮 | 岡山市保健所 | 衛生課 |
| | 溝口 嘉範 | 岡山市保健所 | 衛生課 |
| | 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、現時点で不明な点がある。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。

今年度の本研究では乳及び乳製品の衛生実態を管理する上で用いる知見と共

に、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、国際動向に関する研究、大規模製造施設の衛生管理状況に関する研究、小規模製造施設の衛生管理状況に関する研究、市販乳製品の衛生指標菌汚染実態調査及び簡易培地の検討を行った。

国際動向に関する調査では、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おり、今年度はインターネットによる情報収集を行い、選択された文献について調査を行なった。「Industry Guide to Good Hygiene Practice: Milk and Dairy Products (乳及び乳製品の製造における優良衛生規範についての英国のガイド)」(Dairy UK、2010年8月)では、乳及び乳製品について規定されたEUの微生物基準がEC規則2073/2005から抽出され、それらがリスト化された形で示されていた。また、これらの基準の遵守に当たっての留意事項や、基準の適用を支援する決定樹が提示されていた。これらは、EUにおける乳及び乳製品についての微生物基準の内容、及びそれへの対応を理解する上で有益であると考えられた。「National Standard for Milk Production (Version 2020) (乳の生産についてのドイツの基準 (2020年度版))」(QM milch、2020年1月)では、生乳生産における微生物基準を述べたものではなく、生乳の品質保証のために生産農場がなすべき基本的要件を述べたもので、そのほとんどは牛の飼育管理に関すること(飼料、動物用医薬品など)であった。

大規模製造施設の衛生管理に関する研究では、苦情が寄せられた牛乳製品の製造施設における衛生管理実態を把握し、改善すべき点の有無を検証することを目的として、当該施設での牛乳製造工程を通じた微生物動態に関する研究を行った。情報調査を通じ、当該製品の製造工程フローを確認した上で、生乳、殺菌前乳、最終製品(牛乳製品)、並びに製造工程において一時的に開放系となる充填機内外の施設環境拭取りを採材対象として設定した。衛生指標菌試験を通じ、生乳検体では一般細菌数が4.0-4.2 logCFU//mL、腸内細菌科菌群が2.1-2.2 logCFU//mL、大腸菌群が1.9-2.0 logCFU //mL、黄色ブドウ球菌が2.6-2.7 logCFU//mL 検出された。殺菌前乳検体では、生乳検体に比べ、各指標菌数は概ね1-2 logCFU//mL 上昇傾向を示した。16S rRNA 菌叢解析を通じ、受入時の生乳検体に比べ、殺菌前牛乳検体では腸内細菌科菌群や *Streptococcaceae* 等の占有率が増加を示し、菌数変動とあわせ、生乳受け入れから加熱殺菌までの工程における温度管理或いは配管洗浄等に不備があった可能性が示唆された。また、最終製品検体からは直接塗抹法により全ての指標菌は検出されなかったが、保存試験を通じ、一般細菌が検出され、僅かながら微生物の生残或いは交叉汚染が生じた可能性が示唆された。菌叢解析を通じ、製品検体では *Buttiauxella*、*Trabulsiella*、*Mangrovibacterium* 等の環境由来細菌の占有率増加が確認され、後者の可能性を支

持する結果と捉えられた。実際に充填機内外の拭取り検体のうち、マガジンラック及び充填ノズルメッシュから一般細菌が検出された。菌叢解析により、マガジンラックやノズルメッシュ、充填機内部検体では充填開始前と終了後の間で顕著な変動が認められた。以上より、検討対象施設における牛乳の製造工程では、生乳受入れから殺菌までの間での温度管理、加熱殺菌工程の正常稼働、充填工程での施設設備の洗浄消毒の徹底等が衛生管理の向上に向けて検討が必要な事項として抽出された。

小規模製造施設の衛生管理に関する研究では、衛生管理上特に重要と思われる原材料乳における衛生指標菌の動態等について解析した。小規模製造施設で製造される乳及び乳製品は比較的簡易な施設で製造されているにもかかわらず、通信販売等を通じて国内に広く流通している事例も多く、乳衛生管理を考察する上で注視が必要である。小規模製造施設においては特に、製品の差別化のために原材料乳の入手元に多様性がみられる事が明らかになっている。本年度の研究では複数の農場から入手した様々な生乳について加熱殺菌前後における各種衛生指標菌数減少率の解析を行い、原材料乳の性状に多様性がみられる小規模製造施設の製品に対する衛生指標菌種の妥当性について検討を行った。独立した複数の農場から分与頂いたバルク乳及び個別の牛個体より採取した生乳について成分分析及び細菌叢解析を行った結果、生乳の成分に多様性が見られることが確認された。各乳試料について小規模製造施設で主流となっている低温殺菌条件（65℃、30分間）にて処理を行い、各処理時間における各種衛生指標菌の動態を解析した。その結果、乳の成分によらず大腸菌群数と腸内細菌科菌群数の動態に良好な相関が見られ腸内細菌科菌群についても衛生指標菌として妥当であると考えられた。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背景からも、EU諸国を中心に衛生指標菌の主流となっている腸内細菌科菌群を国内指標菌として採用することは意義の高いものであると考えられ、本研究で得られた結果は本邦の乳製品の衛生管理における国際整合性確保の推進に資するものであると期待する。

市販乳製品の衛生指標菌汚染実態調査と簡易培地の検討では、市販バター製品45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、微生物成分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、公定法の結果と大きな差が見られず、昨年度までに検討した低温殺菌牛乳及びアイスクリーム類とは異なる傾向を示し、製品特性により損傷菌等の存在状況が異なる可能性が示唆された。

A. 研究目的

日本を含む世界各国において、食品の安全性を確保するために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及び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、その科学的妥当性を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 2 年度は国際的な動向についての調査として、乳及び乳製品の衛生管理を考える上で有用となる諸外国における文献の解析を行った。また、大規模製造施設の衛生管理に関する研究として、2019 年に外観異常に関する苦情が寄せられた UHT 牛乳製品に着目し、当該製品の製造施設における製造工程管理実態を確認するため、原料、中間・最終製品並びに製造前後の環境拭取り検体について微生物検査を行い、製造工程管理の向上に資すると思われる要点の抽出を行うことを目的として検討を行った。小規

模製造施設の衛生管理に関する研究としては、複数の農場から入手した様々な生乳について菌叢解析・成分分析を行った後、低温加熱殺菌による各種衛生指標菌数動態の解析を行うことで、多様性を持った小規模製造施設の製品に対する衛生指標菌種の妥当性についての検討を行った。また、市販乳製品の衛生指標菌汚染実態を、国内で流通するバター製品を対象として、衛生指標菌試験(公定法)並びに簡易培地(以下、簡易法)を用いて検討した。更に後者の製品に対する適用の妥当性、並びに混積培養法の代替法としての表面塗抹法について考察を行った。

B. 研究方法

1. 国際動向に関する研究

令和 2 年度は当初、フランスまたはドイツの乳・乳製品工場を訪問し、情報収集を行う予定であったが、新型コロナウイルス感染症の流行により訪問は不可能になり、その代替策としてインターネットにより情報収集を行うこととした。

具体的には Google や PubMed を利用し、キーワードとして「milk standard、microbiological criteria、indicator bacteria」などを用いて関連情報の検索を行った。今回、最終的に選択した 2 報の文献(資料 1、資料 2)についてその重要部分を和訳(仮訳)し、要旨を把握した。

2. 大規模製造施設の衛生管理に関する研究

2-1. 牛乳製造施設における検体確保及び関連情報の収集

本研究では、超高温瞬間殺菌(UHT)牛乳製造施設の協力を得て、同施設で牛乳製品の製造工程に関する情報提供、並びに検体確保に関する

承諾を得た。検体の内訳は、生乳、殺菌前乳、並びに牛乳製品 2 種（各 n=3）のほか、充填機周辺環境拭き取り検体をスポンジスワブ（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採材後 48 時間以内に保管・輸送し、到着後速やかに以下の研究に供した。

2-2. 衛生指標菌定量試験

衛生指標菌の定量試験には、国際標準試験法である ISO 法（一般細菌数、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）を用いた。試験検体の希釈には、緩衝ペプトン水（BPW、Oxoid）を用いた。

2-3. 16S rRNA 菌叢解析

2-2 で調整した 10 倍乳剤 1/mL を分取し、滅菌 PBS を用いて 2 回洗浄した。その後、沈査より Maxwell RSC Blood DNA kit（プロメガ）を用いて Total DNA を抽出した。抽出 DNA 溶液を鋳型として、16S rRNA V5-V6 領域を対象とする PCR 反応を行い、同領域を増幅した。E-gel SizeSelect 2%（Thermo Fisher）、AMPure XP（Beckman）、及び Ion Library Equalizer kit（Thermo Fisher）を用いて増幅産物を精製・定量し、等量混合ライブラリーを作製した。Ion Chef/PGM システム

（Thermo Fisher）を用いて同ライブラリーを対象に、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）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。

2-4. 保存試験を通じた微生物動態解析

2-1. で示した生乳検体を無菌的に 100/mL

ずつ 100/mL 容の滅菌済容器に分注し、速やかに 5、15、25°C 下にて 0、1、2、5 日間保存した。同じく上項 2-1. で示した製品検体についても同様に、100/mL 容量にて 15°C または 25°C 下にて 5 日間保存した。保存後の検体は上項 2-2. と同様に一般細菌、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌の検出試験に供した。

3. 小規模製造施設の衛生管理に関する研究

3-1. 生乳検体

北海道内の 1 農場にて個別の牛個体より採取した生乳（以下、個体乳）15 検体を分与頂いた。加えて、北海道内の独立した 10 農場よりバルク乳を分与頂いた。全ての乳検体は採取後に密閉容器にて冷蔵温度帯で輸送し、試験実施まで 4°C 以下で保管した。

3-2. 乳性状検査

試料を冷蔵にて十勝農業協同組合連合会畜産部畜産検査センターに送付し、CombiFoss FT+600 システム（FOSS 社）により乳脂肪分、無脂乳固形分、タンパク質分、乳糖分、体細胞数、尿素体窒素濃度、遊離脂肪酸濃度、乳中ケトン体濃度の測定を行った。加えて、試料を冷凍後、株式会社生物技研に送付し、以下の概要で 16S rRNA V3/V4 領域に基づく細菌叢解析を行った。試料を VD-250R Freeze Dryer（TAITEC）を用いて凍結乾燥後、粉碎し Lysis Solution F（ニッポンジーン）を添加した後、Shake Master Neo（bms）を用いて、1,500 rpm で 2 分間粉碎した。破碎したサンプルを、65°C で 10 分間加熱処理した後、12,000 x g で 1 分間遠心分離を行い、上清を分取し、MPure-12 システムと MPure Bacterial DNA Extraction Kit（MP Bio）を用いて、DNA を精製した。その後、株式会社生物

技研が提供する 2-step tailed PCR 法を用いてライブラリーを作製し、MiSeq システムと MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用いて、2x300 bp の条件でシーケンシングを行った。FASTX-Toolkit (ver. 0.0.14) の fastx_barcode_splitter tool を用いて、得られたリード配列の読み始めが使用したプライマー配列と完全に一致するリード配列のみを抽出した。プライマー配列に N-mix を含む場合、N の数(フォワード側 6 種類 x リーバース側 6 種類 = 36 種類)を考慮して、この操作を繰り返した。抽出したリードからプライマー配列を FASTX-Toolkit の fastx_trimer で削除した後、sickle (ver. 1.33) を用いて品質値が 20 未満の配列を取り除き、40 塩基以下の長さとなった配列とそのペア配列を破棄した。ペアエンドリード結合スクリプト FLASH (ver. 1.2.11) を用いて、結合後の配列長 410 塩基、リードの結合長 280 塩基、最低の重なりを 10 塩基の条件でリードを結合し、Qiime2 (ver. 2020.8) の dada2 プラグインでキメラ配列とノイズ配列を除去した後、代表配列と OTU 表を出力した。

3-3. 加熱殺菌による衛生指標菌数動態検査

試料を乳温度 65°C まで加熱後に 10 分、20 分及び 30 分間保持した試料及び、未加熱の試料について下記の概要にて衛生指標菌数の検査を実施した。試料を生理食塩水を用いて適宜段階希釈した後、一般生菌数 (3MTM ペトリフィルムTM 生菌数測定用プレート (AC プレート) にて 32°C, 48 時間培養)、腸内細菌科菌群数 (3MTM ペトリフィルムTM 腸内細菌科菌群数測定用プレート (EB プレート) にて 37°C, 24 時間培養)、大腸菌数 (3MTM ペトリフィルムTM E. coli 及び大腸菌群数測定用プレート (EC プレート) にて 35°C, 48 時間培養)、大腸菌群数 (3MTM ペトリフ

ィルムTM E. coli 及び大腸菌群数測定用プレート (EC プレート) にて 35°C, 24 時間培養) についてそれぞれの乳試料 1 /mL あたりの CFU を算出した (検出下限 1 CFU//mL)。

4. バター製品の衛生指標菌汚染実態調査及び簡易培地の検討

市販のバター45 検体について、衛生指標菌汚染実態を調査した。調査は令和 2 年 10 月から令和 3 年 2 月まで行った。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°C 48 時間培養) 及び ISO 4833-1:2013 (30°C 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。細菌数については、4 種の簡易培地を用いた。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。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。

5. 諸外国におけるバター等の微生物規格の調査

EU、米国等におけるバター等乳製品の微生物

規格をインターネット検索により調査した。また、国際的な食品の微生物規格の作成・改訂について調査した。

C. 研究結果

1. 国際動向に関する研究

欧州諸国における乳・乳製品の生産、加工製造における衛生管理の状況、動向を探るためにインターネットにより情報検索し、今回、以下の2報の文献を最終的に選択した。

「資料1」

Industry Guide to Good Hygiene Practice:
Milk and Dairy Products

(乳及び乳製品の製造における優良衛生規範
についての英国のガイド)

Dairy UK

August 2010

http://www.dairytransport.co.uk/eblock/services/resources.ashx/000/634/680/Final_Draft_August_2010_-_Industry_guide_to_good_hygiene_practice.pdf

「資料2」

National Standard for Milk Production
(Version 2020)

(乳の生産についてのドイツの基準(2020年度
版))

QM milch (Germany)

January 2020

<https://media.diemayrei.de/92/721192.pdf>

資料1、2とも、乳・乳製品の生産者、加工製造業者等を対象とした衛生管理に関するガイドである。以下にその内容の一部を紹介すると

ともに、部分訳(仮訳)を窪田分担報告書末尾に添付した。

○ 資料1

このガイドは、タイトルからも分かるように、乳の生産から加工に至るまでの過程における衛生管理についての英国の事業者向けの公式ガイドで、2010年8月にDairy UK(業界団体)により刊行された。本報告書では、このうち、EC規則2073/2005(食品の微生物基準、<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>)に関する章を主に紹介する。

本ガイドはまず初めに、この規則では2種類の基準が設定されていることを述べている。1つは食品安全基準(food safety criteria)で、もう1つは工程衛生基準(process hygiene criteria)である。前者の目的は製品バッチの安全評価であり、後者の目的は工程の適切性の確保である。

本ガイドは次に、この規則の遵守に当たり重要な点を3つ挙げている。1)微生物基準は、食品安全管理の手法の妥当性確認と検証の両方に使用されるべきである、2)想定されるリスク、事業の性質、規模に見合った検査、3)検査においては代替の指標(たとえば経時的温度記録など)を用いてもよい、である。また、本規則の執行は監査と検体採取により達成されるとし、基準を超えた場合、事業運営管理者は是正措置をとらなければならないとしている。

本ガイドは次に、本規則が規定している食品安全基準について詳細に述べている。すなわち、本ガイドは、乳及び乳製品の 카테고리ごとに検査対象微生物種、食品安全基準、検査法等を記載し、これらをまとめて表として示している。本報告書ではこのうちの主なものについて、製

品カテゴリーと対象微生物種の項目のみを【資料1の部分訳】に窪田分担報告書表1として示した。

本ガイドはまた、乳・乳製品カテゴリーと微生物種の特定の組み合わせ(具体的には、1) RTE(そのまま喫食可能な)食品とリステリア(*Listeria monocytogenes*)、2) 乳製品とコアグラゼ陽性ブドウ球菌、3) 乳児用調製粉乳・食品と腸内細菌科菌群、サルモネラ、*Cronobacter sakazakii*)の場合に、どの基準を適用すべきか、また、実施すべきことは何かが分かる決定樹1、2、3を提示している。

本ガイドはさらに、食品安全基準が満たされなかった場合は、製品の出荷ができなくなり、既に市場に出荷したものについては撤去や回収の可能性があり、加えて、安全管理手法の見直しが必要になるとしている。

工程衛生基準についても食品安全基準と同様、本ガイドは、乳及び乳製品のカテゴリーごとに検査対象微生物種、工程衛生基準、検査法等を記載し、これらをまとめて表として示している。本報告書ではこのうちの主なものについて、製品カテゴリーと対象微生物種の項目のみを【資料1の部分訳】に窪田分担報告書表2として示した。

本ガイドでは、工程衛生基準が満たされなかった場合でも製品の市場への出荷は可能だが、以降の製品が基準を満たすように製造工程や製造方法の見直しが必要であるとしている。

○ 資料2

乳の国レベルでの品質保証を図るため、ドイツではQM Milk (Quality Management Milk) という品質管理のスキームが2002年に提案され、この方式を成文化したものとして、法規や規範などにもとづくすべての基本的要件をカバー

する基準(QM Milk Standard)が作成された。この基準はQM Milk認証プログラムに参加する農場(ドイツの全農場の90%以上)を対象とし、その目的は農場レベルでの生乳の品質保証である。資料2は2020年1月1日に発行されたこの基準の2020年度改定版で全7章からなり、本報告書では、このうち基本的要件に関する章(第4章)を紹介する(【資料2の部分訳(仮訳)】参照)。

第4章には基本的要件として6項目が挙げられており、以下に各項目についてその概要を紹介する。

・動物の健康と福祉

乳を生産するウシは、健康上の基本的な問題の徴候を呈していないものでなければならない。乳房の検査を毎月行う。

・動物の個体識別及び登録

家畜群に関する変更は、個体の識別と由来に関する公的なデータベースに登録する必要がある。

・乳の生産と保管

搾乳室には十分な照明と換気が必要である。乳の冷却と保管は、無許可の第三者や害虫などからの有害な影響を受けないような方法で行われなければならない。

・飼料

飼料は、高品質な食品の生産において最も重要な要素である。牛乳生産者は、飼料規格に関する国の枠組み協定を遵守する製造業者及び取引業者から購入した飼料のみを使用することができる。牛乳生産者は、飼料の入荷ごとに配送許可証、納品明細、その他の証明記録を保存しておかなければならない。

・動物用医薬品(VMP)

乳生産者は、治療を受けたことのあるウ

シ全頭を正確に把握していなければならない。動物用医薬品（VMP）で治療を受けたことのあるウシの乳は、休薬期間が過ぎている場合にのみ出荷の再開の可能性がある。出荷した乳に阻害剤が含まれていてはならない。

すべての乳生産者は、獣医師の協力を得て、自身の農場で動物群のチェックを行う。

乳生産者は、処方箋により薬局のみで入手できる VMP の購入証明書をいつでも提示できるようにしておかなければならない。

原則として、血清、ワクチン及び抗原は獣医師のみが投与できる。

・環境保護

肥料に関する規則は、各農場に対し、農場由来肥料の栄養素含有量の比較と記録を行うことを義務付けている。

基本的要件の遵守の状況は、各農場が作成する点数方式の自己評価表を認証機関が監査することにより把握される。資料 2 は自己評価表のフォーマットを付録 1 として掲載している。自己評価の項目は 2020 年度改定により 64 項目から 69 項目に増加した。

2. 大規模製造施設の衛生管理に関する研究

製造施設における牛乳製品の製造工程フローダイアグラムを朝倉・中山分担報告書図 1 に示した。

製造工程フローを確認後、管轄自治体並びに事業者の協力を得て、原料である生乳検体、殺菌前乳検体、最終製品検体（牛乳製品）、並びに施設環境拭き取り検体を入手し、微生物試験に供した。なお、管轄自治体は苦情を受けて、既に製造施設の調査を行ったが、記録文書を含め管理事項に大きな逸脱は確認されていない状況で

あった。

2-1. 衛生指標菌検出状況

(i) 生乳、中間・最終製品検体（朝倉・中山分担報告書図 2）

生乳 3 検体では、一般細菌数が 3.99-4.16 logCFU//mL、腸内細菌科菌群が 2.06-2.16 logCFU//mL、大腸菌群が 1.85-2.02 logCFU//mL、黄色ブドウ球菌が 2.64-2.73 logCFU//mL 検出された。大腸菌は、生乳 2 検体より検出され、検出菌数は 1.00-1.18 logCFU//mL であった。

殺菌前乳 3 検体の検出菌数は、一般細菌数が 4.65-5.11 logCFU//mL、腸内細菌科菌群が 3.83-3.90 logCFU//mL、大腸菌群が 3.32-4.07 logCFU//mL、大腸菌が 3.28-3.41 logCFU//mL、黄色ブドウ球菌が 2.90-3.00 logCFU//mL であった。生乳検体と比較して、衛生指標菌数は全体的に 1~2 logCFU//mL 程高い傾向が認められた。

製品 2 種計 6 検体については、一般細菌を含む全試験項目で陰性を示した。

(ii) 施設環境拭き取り検体（朝倉・中山分担報告書表 1）

これまでに他施設にて得られた結果を踏まえ、本研究では充填機内外環境を製品への微生物交叉汚染を生じ得る工程・箇所と想定し、拭き取り検体を確保し、微生物試験に供した。製造開始前（洗浄消毒後）において、一般細菌数はマガジンラック 2 検体、充填機内部、充填機外部、ノズルメッシュの各 1 検体より検出され、それぞれの菌数は、2.23 log CFU/ 100cm²、1.45 log CFU/100cm²、1.98 log CFU/100cm²、2.29 log CFU/ 100cm²、1.15 log CFU/ 100cm² であった。一方、製造終了後・洗浄消毒前の段階で採材した検体のうち、マガジンラック 2 検体からはそれぞれ 2.95 log CFU/ 100cm²、3.47 log CFU/

100cm²の一般細菌が検出された。このほか、腸内細菌科菌群は充填機周辺外環境の1検体から1.15 log CFU/100cm²と僅かながら検出された。大腸菌群、大腸菌及び黄色ブドウ球菌はいずれの検体からも検出されなかった。

2-2. 菌叢解析

食品の製造工程を通じた検体の構成菌叢解析は、温度管理不備等に起因する微生物増殖や、工程中での交叉汚染の発生等を予測するためのツールとして活用されつつある。本研究では、各検体より Total DNA を抽出し、16S rRNA 菌叢解析に供した。製品関連検体並びに施設環境検体における結果は以下のとおりである。

1) 生乳、中間・最終製品検体の構成菌叢

上記検体の構成菌叢に関する知見を得るため、16S rRNA 菌叢解析を実施した。対象検体からは、計 45 門 (Phylum)、87 綱 (Class)、169 目 (Order)、386 科 (Family)、1768 属 (Genus) が検出された。

① 生乳検体

Phylum 階層では、*Firmicutes* が 44.19% と最も高い占有率を示し、*Proteobacteria* が 29.95% とこれに続いた (朝倉・中山分担報告書図 3A)。

Family 階層では *Rhodocyclaceae* が 24.74% と最も高い占有率を示し、腸内細菌科菌群の占有率は 0.05% に留まった (同図 3B)。

Genus 階層では *Thauera* が最も高い占有率を示し (平均値 24.60%)、*Romboutsia* がこれに続いた (同 10.18%) (同図 3A)。腸内細菌科菌群の中では *Serratia*、*Klebsiella*、*Mangrovibacter*、*Rahnella*、*Cedecea*、*Enterobacter*、*Escherichia/Shigella* 等が優勢であった (同図 3C)。

② 殺菌前乳検体

Phylum 階層では、*Proteobacteria* の占有率

は生乳検体と同等であった (平均値 28.90%) (朝倉・中山分担報告書図 3A)。また、*Firmicutes* の占有率は生乳検体に比べて増加を認めた (平均値 58.00%) (同図 3A)。

Family 階層では *Streptococcaceae* が最も高い占有率を示し、殺菌前乳検体の平均値は 27.24% であった (同図 3B)。また、同検体では腸内細菌科菌群の占有率が生乳検体に比べて著しく高値を示し (平均 21.04%、同図 3B)、その構成菌属は、*Serratia* 及び *Raoultella* が優勢であったほか、生乳検体での占有率が 0.01% 未満であった *Escherichia/Shigella* の占有率も平均 0.53% へと増加していた (同図 3C)。

③ 製品検体

Phylum 階層において、*Firmicutes* の占有率の平均値は製品 A で 69.02%、製品 B で 72.18% であった (朝倉・中山分担報告書図 3A)。

Family 階層において、製品 A、B 検体中に占める腸内細菌科菌群の割合は、それぞれ 9.38%、8.38% (共に平均値) であった (同図 3B)。また、殺菌前乳検体と同様、*Streptococcaceae* が最も優勢な菌科として検出された (同図 3B)。

Genus 階層では、殺菌前乳検体と同様に *Streptococcus* が最も優勢であったほか、腸内細菌科菌群の主たる構成菌属である *Raoultella* や *Serratia* の占有率も殺菌前乳検体と概ね同等であった (同図 3C)。

上記の検体について、Phylum 階層の結果を基に、主成分分析を行ったところ、殺菌前乳検体及び製品検体は、生乳検体に比べて、相対的に近似性を示した (同図 4)。

2) 施設環境拭取り検体の構成菌叢

各拭取り検体における構成菌叢分類を朝倉・中山分担報告書図 5 に示した。

全体の成績として、Family 階層では、

Microbacteriaceae が最も高い占有率を示した (平均値 34.67%、同図 5A)。製造前後での比較を通じ、製品に直接接触する充填ノズル及びノズルメッシュでは、*Pseudomonadaceae* の占有率が製造後に顕著な増加を認めただけ、カートンの底部を形成し、充填装置に送り込むマンドレルでは *Methylobacteriaceae* の占有率が同様に製造後に増加していた (同図 5A)。また、製造前の充填機内外表面拭取り検体からは *Moraxellaceae* が製造後に比べて顕著に高い占有率で検出された (同図 5A)。

製造後の充填ノズル及びノズルメッシュ検体で優勢であった *Pseudomonadaceae* は主として *Pseudomonas* 及び *Pseudoclavibacter* から構成されていた (同図 5B)。また、製造後のマンドレルで高い占有率を示した *Methylobacteriaceae* は主に、*Methylobacterium* により構成されていた (同図 5B)。このほか、製造前の充填機内外表面拭取り検体で検出された *Moraxellaceae* は主に *Acinetobacter* により構成され、他に *Moraxella*、*Enhydrobacter* 等が含まれていた (同図 5B)。最終製品で最も高い占有率を示した *Streptococcus* は、製造前後のマガジンラック及び製造後のノズルメッシュより相対的に高い占有率で検出された (同図 5B)。このほか、製造後の充填ノズルからは同じく相対的に高い占有率で *Listeria* が検出された。

2-3. 保存試験を通じた、生乳及び製品検体中の衛生指標菌動態

一昨年度の検討では、他施設で受け入れされた生乳を対象とした保存試験を行い、各衛生指標菌の増殖挙動を経時的に評価することで、生乳受入れ時の糞便汚染指標菌として腸内細菌科菌群を用いることが安定性等の点で有用で

ある可能性が示唆されていた。本研究では、生乳検体を 5°C、15°C、25°C 下で 0、1、2、5 日間保存した際の衛生指標菌挙動を定量評価し、上述の他施設における評価結果との整合性を評価することで、適切な糞便汚染指標菌の選定の在り方を議論するための基礎知見の集積を図ることとした。以下に生乳検体中における各指標菌の動態に関する結果を示す。

①一般細菌数

保存 0 日目に 3.99-4.16 log CFU//mL であった生乳検体中の一般細菌数は、5°C 下では保存 1 日後に 3.97-4.22 log CFU//mL、2 日後に 4.22-4.37 log CFU//mL、5 日後には 4.98-5.47 log CFU//mL と微増した。15°C 下では、1 日後に 4.35-4.79 log CFU//mL と微増であったが、2 日後には 7.32-7.38 logCFU//mL、5 日後には 9.82-9.94 logCFU//mL と顕著な増加を示した。25°C 下では、1 日後に 7.85-8.01 logCFU//mL、2 日後に 10.10-10.33 logCFU//mL と極めて顕著な増加を示した。

②腸内細菌科菌群数

0 日目に 2.06-2.16 logCFU//mL であった腸内細菌科菌群数は、5°C 下では 1 日後に 2.04-2.18 log CFU//mL、2 日後に 1.90-2.16 log CFU//mL と顕著な変化を認めなかったが、5 日後には 4.02-4.27 logCFU//mL と顕著な増加を認めた。15°C 下では、1 日後に 2.95-3.43 logCFU//mL と微増し、2 日後には 6.79-6.87 logCFU//mL、5 日後には 9.00-9.29 logCFU//mL と著しい増加を認めた。25°C 下では、1 日後に 7.78-7.93 logCFU//mL、2 日後に 9.49-9.61 logCFU//mL となる等、迅速な増加を認めた。

③大腸菌群

大腸菌群数は、5°C、15°C、25°C のいずれの温度帯でも、腸内細菌科菌群数と類似した挙動を示した。すなわち、保存 0 日目に 1.85-2.02

logCFU//mL であった大腸菌群数は、5°C下では1日後で1.85-2.10 log CFU//mL、2日後には1.90-2.18 logCFU//mL と大きな変動は示さなかったが、5日後には3.90-4.26 logCFU//mL となった。15°C下では1日後に3.24-3.92 logCFU//mL と微増し、2日後には6.84-6.95 logCFU//mL と顕著な増加を示した。25°C下では、1日後で7.70-7.93 logCFU//mL、2日後には9.50-9.54 logCFU//mL へと増加した。

④大腸菌

保存0日目において、大腸菌は3検体中2検体から検出され、最大菌数は1.18 logCFU//mL であった。5°C下で5日保存後の最大菌数は1.48 logCFU//mL となり、明らかな菌数増加は認められなかった。一方、15°C下では、保存1日後に1.95-2.18 logCFU//mL と微増を示し、2日後には4.39-4.46 logCFU//mL、5日後には5.57-5.65 logCFU//mL へと増加した。25°C下では、保存1日後には既に6.28-6.34 logCFU//mL と顕著な増加を示し、2日後には8.14-8.67 logCFU//mL へと増加した。

⑤黄色ブドウ球菌

保存0日目に2.64-2.73 logCFU//mL であった黄色ブドウ球菌数は、5°Cで保存5日後で2.53-2.54 logCFU//mL となり、顕著な変動は示さなかった。一方、15°C下では保存1日後で2.60-2.74 logCFU//mL、2日後で3.41-3.69 logCFU//mL、5日後には5.30-5.71 logCFU//mL となった。25°C下では保存1日後で4.66-5.02 logCFU//mL、2日後で5.78-6.91 logCFU//mL と顕著に増加し、5日後には6.48-6.74 logCFU//mL となった。

加えて、全ての衛生指標菌が不検出となった製品検体についても、生乳検体と同様に、25°C下で5日間保存後、改めて各衛生指標菌の検出試験を行い、潜在的な細菌汚染の可能性を評価

した。その結果、25°C下での5日間培養後には一般細菌が検出され、製品検体中に僅かながらも生菌が存在した可能性が示唆された。

3. 小規模製造施設の衛生管理に関する研究

3-1. 乳の性状検査

多様な性状の生乳検体を確保する目的で、個別の牛個体より採取した生乳(個体乳)15検体(乳検体1-15)及び、独立した10農場よりバルク乳10検体(乳検体16-25)を入手し、試験に供した。

乳の性状検査項目として、主要な乳成分である乳脂肪分、無脂乳固形分、タンパク質分、乳糖分を解析し(山崎分担報告書図1,A)、加えて乳房炎の指標の一つである乳中の体細胞数(同図1,B)及び、乳牛の栄養状態の指標として用いられている尿素体窒素濃度(同図1,C)、遊離脂肪酸濃度(同図1,D)、乳中ケトン体濃度(同図1,E)を解析した。乳脂肪分は最大値8.22%、最小値2.56%の間で、無脂乳固形分は最大値10.11%、最小値8.25%の間で、タンパク質分は最大値5.20%、最小値2.73%の間で、乳糖分は最大値4.63%、最小値3.91%の間でサンプルによって様々な値をとっており、また、これらの指標の中では乳脂肪分の変動が最も大きかった(同図1,A)。乳中の体細胞数については最大値 3734×10^4 //mL、最小値 38×10^4 //mL、尿素体窒素濃度については最大値16.1 mg/100 /mL、最小値7.2 mg/100 /mL、遊離脂肪酸濃度については最大値2.18 mmol/100gFAT、最小値-1.84 mmol/100gFAT、乳中ケトン体濃度については最大値0.20 mmol/L、最小値-0.06 mmol/Lの間で変動していた。

更に、乳試料中の細菌叢構成について解析を行った。個体乳については15検体中6検体(乳検体4,6,8,11,12及び14)を、バルク乳につい

ては10検体全てを16s rRNA 菌叢解析に供したところ、検体ごとに異なった細菌叢構成となっており試験に供した生乳試料が多様な検体であることが確認された(同図2)。Family 階層において腸内細菌科に属する菌が検出された検体は乳検体6, 8, 16, 17, 19, 21 及び24であった。

3-2. 加熱殺菌による衛生指標菌数動態の解析

小規模製造施設において主流の加熱殺菌温度である65°C下で衛生指標菌数の動態について検証を行った。各試料を65°Cの条件下で10分間、20分間及び30分間処理した後に、4種類の衛生指標菌数を検証したところ、全ての乳検体の一般生菌数で10分以内に $2 \log_{10} \text{CFU/mL}$ 以上の低下を観察した(山崎分担報告書図3)。糞便汚染の指標として国内で用いられている大腸菌群数とEU諸国で用いられている腸内細菌科菌群数を比較したところ、多くの検体で加熱前の試料及び各加熱時間後の試料の両者において腸内細菌科菌群数の方が高い傾向が認められた。加熱時間に対する減少率については、多くの試料において大腸菌群数と腸内細菌科菌群数の間で良好な相関が確認された。しかしながら、乳検体2では腸内細菌科菌群が検出されなかった一方で低濃度ながらも熱耐性の大腸菌群が検出され、また、乳検体24については逆に大腸菌群が検出されなかった一方で高濃度の熱耐性腸内細菌科菌群が検出された。

4. バター製品の汚染実態調査及び簡易培地の検討

今回の調査結果概要を岡田分担報告書表1に示した。バター製品45検体の公定法での細菌数(32°C48時間培養)は、平均 $1.645 \log \text{CFU/g}$ (検出限界未満 $\sim 7.407 \log \text{CFU/g}$)であった。

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、平均 $1.452 \log \text{CFU/g}$ (検出限界未満 $\sim 7.267 \log \text{CFU/g}$)で、簡易培地1における細菌数は公定法における細菌数との間に差は見られなかった($p=0.084$)。簡易培地2については、製品の指示書の従い32°C24時間培養で計測を行った。その細菌数は平均 $1.361 \log \text{CFU/g}$ (検出限界未満 $\sim 6.236 \log \text{CFU/g}$)であり、公定法と比較してやや低い傾向が見られた($p=0.019$)。簡易培地3については、細菌数の平均は $1.353 \log \text{CFU/g}$ (検出限界未満 $\sim 5.886 \log \text{CFU/g}$)であり、公定法と比較してやや低い傾向が見られた($p=0.018$)。簡易培地4については、細菌数の平均は $1.389 \log \text{CFU/g}$ (検出限界未満 $\sim 6.326 \log \text{CFU/g}$)であり、公定法と比較して差は見られなかった($p=0.039$)。ISO法による細菌数(30°C72時間培養)は、平均 $1.635 \log \text{CFU/g}$ (検出限界未満 $\sim 7.248 \log \text{CFU/g}$)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、差は見られなかった($p=0.911$)。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、平均 $1.465 \log \text{CFU/g}$ (検出限界未満 $\sim 5.556 \log \text{CFU/g}$)となり、混釈培養における細菌数との間に有意差は見られなかった($p=0.126$)。

各試験法の公定法との相関を寄与率で算出したところ、公定法と簡易培地1では、0.8846(岡田分担報告書図1)、簡易培地2で0.847(同図2)、簡易培地3で0.8392(同図3)、簡易培地4で0.8393(同図4)と、いずれも高い相関を示した。公定法とISO法の間寄与率は、0.9103(同図5)であった。ISO法の混釈培養と表面塗抹の間の寄与率は0.8498(同図6)であった。

バター製品には、乳酸菌を添加して製造する

種類（発酵バター）があるため、発酵バターと明記されている 8 検体とそれ以外の製品 37 検体の細菌数を比較したところ、発酵バター製品 8 検体の公定法による平均値は 3.781logCFU/g、それ以外の製品の平均値は 1.184logCFU/g であり、発酵バターと明示されている製品の細菌数が有意に高い細菌数を示した ($p < 0.01$)。一方で、発酵バターと明記されていない製品の中に 5logCFU/g を超える製品が 2 検体あった。

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、11.1% (5/45 検体) より検出された (岡田分担報告書表 1)。腸内細菌科菌群陽性であった 5 検体は全て、定性法 (ISO 21528-1: 2016) で検出され、定量法 (ISO 21528-2:2016) においては検出限界未満 (< 5 CFU/g) であった。腸内細菌科菌群が検出された全 5 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、*Raoultella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Escherichia spp.* であった (同表 2)。

5. 諸外国における乳製品の微生物規格

岡田分担報告書表 3 に日本国内及び諸外国におけるバターの、同表 4 にアイスクリーム類の微生物規格を示した。EU では、生乳を用いて作られたバターについてのみ、製造工程管理基準として大腸菌を 10CFU/g 以下、食品安全のための病原菌の規格として販売最終日における製品中のサルモネラ及びリステリア・モノサイトゲネスそれぞれについて 0/25 g と定めていた。

サンプリングプランも設定されており、製造工程管理基準は 1 ロットについて 5 検体試験し、2 検体までの逸脱が許容されており、病原体については 5 検体試験し、全検体合格でなくてはならない、としていた。フランスでは 3 種のカテゴリーのバターについて、それぞれの製品特性に基づいたリスクを考慮した微生物規格を設定していた。米国では、空気を含ませて攪拌したホイップバターと乳脂肪分 40% 以下のライトバターに微生物規格が設定されていた。アイスクリーム類については、米国ではフレーバーによって異なる大腸菌群の規格基準値を設定していた。また、EU、フランス、オーストラリア及びニュージーランドでは、衛生指標菌と病原菌の規格基準を設定していた。

Codex 委員会による規格基準作成及び改訂の手順を岡田分担報告書図 7 に示した。規格草案の提案から修正を経て総会での採択が行われたのち、規格案についても同様の手続きを経て規格基準が作成され、その過程で各国の合意が最も重視されていた。Codex や FAO/WHO に科学的助言をおこなっている国際食品微生物規格委員会 (ICMSF) は、汚染微生物のリスクに応じた微生物試験のサンプリングプランと基準値を提案しており、1978 年発刊の第 1 版と 1986 年の第 2 版で生菌数の卵製品の基準値が変更されていた (同図 8)。その改訂の経緯について調査したところ、FAO/WHO による 19 か国を対象とした汚染実態アンケートの結果に基づいて基準値を見直したものであることが明らかとなった。EU では、低温殺菌牛乳の微生物規格を 2010 年に変更していた (同図 9)。その改訂根拠についてデンマーク乳業協会関係者に確認したところ、腸内細菌科菌群試験法を MPN 法から混積培養法に変更し、それに伴って検出下限値が 1CFU/mL から 10CFU/mL に上昇したため、

サンプリングプランを $n=5$, $c=2$ から $n=5$, $c=0$ に変更した、との回答が得られた。この変更により、腸内細菌科菌群試験がより簡便になり、結果を得るまでの時間も短縮されていた。

D. 考察

国際動向に関する研究では、資料1のうちEC規則 2073/2005 に関する部分に焦点を当てた。乳及び乳製品に関わる微生物基準等をリストアップした表(付録1、5)は多くの注釈が付されて極めて複雑なため、本研究では製品カテゴリーと対象微生物種の組み合わせの概要を示すのみにとどめた(【資料1の部分訳】の表1、2)。上記の表1、2によれば、加熱殺菌乳に関しては、工程衛生基準として腸内細菌科菌群についての基準が設定されている。また殺菌乳はRTE食品でもあることから、リステリアについての食品安全基準も適用されると考えられる。しかしながら、決定樹1の注釈によると、最終包装で加熱殺菌される場合は再汚染がないので定期的なリステリア検査は不要であるとされている。資料2については、QM Milk Standardは3つの要素、すなわち1) German national standard for milk production (乳の生産についてのドイツの基準)、2) QM Milk's list of criteria (自己評価表)、3) QM Milk handbook for milk producer (乳生産者のためのハンドブック)からなり、今後、3年ごとに改定版が発行される予定である。QM Milk Standardは乳加工業者に生乳を供給する農場が対象で、課される基本的要件としては飼料や動物用医薬品など牛の飼育管理に関することが主である。

本研究では「乳の生産についてのドイツの基準」の第4章「基本的要件」を紹介したが、第6章「監査(Control system)」についても簡単に触れておく。QM Milk 認証プログラムに参加

する農場は認証機関による3年に一度の定期監査を受け、これに合格することで認証を得られる。監査時の点数によっては認証の有効期間が18カ月になることがある。認証の有効期間中に、例えば、一般細菌数が10万//mLを超えている、または、体細胞数が40万//mLを超えているなどの理由で生乳の納入が乳加工業者により一時的に停止された場合、その農場は認証が取り消される。再認証を受けるには特別監査を受け、これに合格しなければならないということが明らかとなった。

大規模製造施設の衛生管理に関する研究では、ある牛乳製造施設における製造工程管理の妥当性を評価するため、複数工程で検体を確保し、培養法である衛生指標菌の定量検出試験と非培養法である16S rRNA 菌叢解析を併用することで、同工程を通じた微生物挙動を解析した。

生乳及び中間・最終製品検体を対象とした衛生指標菌検出試験を通じ、生乳検体に比べ殺菌前検体は一般細菌数のほか、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数が何れも有意な増加を示し、生乳受入れから加熱殺菌に至る工程での温度や時間の管理若しくは設備器具の清浄性確保等に何らかの課題があると推察された。菌叢解析においても *Serratia* や *Raoultella* 属に加え、*Escherichia/Shigella* 等の腸内細菌科菌群に分類される菌属の明確な占有率増加を認めた。当該工程での管理の逸脱の有無は現時点では明確ではないが、当該検体の採材対象となったロットの製造記録を確認したところ、生乳受入れから殺菌までの所要時間は約3時間であり、当該時間枠での著しい微生物増殖が10°C以下で発生したとは想定し難いと考えられる。事業者への聴取を通じ、殺菌前乳検体は通常使用しないコックを開けて採材されており、採材時の交叉汚染が発生した可能性も考えられた。一

方、同一ロットの製品検体と殺菌前乳検体の構成菌叢は近似していることを踏まえると、大規模な交叉汚染が発生した可能性は少ないとも考えられる。

生乳の冷蔵保存を通じた各指標菌の増殖挙動データより、腸内細菌科菌群の安定的な生残、増殖が確認された。同法は大腸菌群試験法に比べ、迅速に結果判定が行える利点があり、欧州圏内の牛乳製造施設ではこの腸内細菌科菌群が製造工程管理上の糞便汚染指標として用いられている実態を踏まえると、腸内細菌科菌群定量試験法は、原乳や牛乳の微生物学的品質の評価や、牛乳製造施設環境の衛生状況を判断する上で有用と考えられ、現在乳等省令で定められている大腸菌群の代替として、同指標菌を採用することは意義が高いものとも思料される。

また、製品検体から全ての指標菌は検出されなかったが、保存試験を通じ、製品検体では僅かながら一般細菌汚染の可能性が示唆された。牛乳製品のうち、無菌性を担保する品目は、無菌充填包装を行う常温保存可能な牛乳（いわゆる LL 牛乳）に限定されるものではあるが、直接培養法による一般細菌不検出の背景には、急激な温度変化（冷却）に伴い、同検体に含まれた細菌が損傷状態或いは生きていないが培養できない（Viable but non-culturable）状態に移行した可能性も想定される。本成績は、損傷状態を引き起こしていると想定される細菌を含む食品検体に対する微生物試験の在り方を今後検討すべき点を提示していると考えられる。なお、対象施設では UHT 殺菌処理が行われており、通常では損傷状態等は発生しないものと推察されるが、製品検体における一般細菌汚染の可能性は、以降の工程、特に充填工程での交叉汚染によるかもしれない。

充填工程環境に関連し、低温増殖性を示す

Acinetobacter や *Pseudomonas* は乳検体のほか、施設環境拭取り検体からも広範に検出された。これらの細菌は耐熱性の Protease や Lipase を産生することから、当該菌或いはその代謝産物である酵素群は、牛乳及び乳製品における変敗腐敗の主因と目される。菌叢解析結果として、*Pseudomonas* は殺菌前乳検体で認められ、製品検体でも減少傾向ながら検出された。同属菌は充填ノズルメッシュから極めて高い占有率で検出されたほか、充填ノズルや充填機内外表面でも製造後には製造前に比べ相対的に占有率を増加させており、同属菌の製品汚染が充填工程で生じた可能性が示唆される。今後、当該製品並びに充填環境での *Pseudomonas* 汚染状況に関する検討を行うことにより、腐敗変敗の可能性の判定並びに汚染発生工程の特定に繋がるものと推察された。

充填機内外表面の構成菌叢は製造前には一定の差異が認められたが、製造後には大きな差異を認めなかった。このことは、製造工程を通じ充填機内表面が外表面と同機外表面と同様の微生物環境となった可能性が示唆され、製造工程中の充填機内部の密閉性が担保されているかを確認する必要があると思われる。

施設環境拭取り検体を対象とした衛生指標菌検出試験を通じ、製造開始前の段階で充填機外部より腸内細菌科菌群が僅かながらも検出されたことは、当該施設環境の清浄性確保に努める必要性を指し示した結果と言えよう。また、充填機内部環境拭取り検体のうち、マガジンラックでの一般細菌数は、他部位に比べて相対的に高く、外環境と同等の菌数を示したことから、これらの部位の洗浄・消毒を更に徹底することも衛生管理向上に向けた検討課題の一つと考えられる。

以上、加熱殺菌後工程で想定される交叉汚染

箇所として、充填環境の清浄化を更に進め、その検証を行うことは、対象施設での牛乳製品製造に係る衛生管理の向上に資するものと考えられる。腐敗変敗の直接的な指標と想定される低温細菌由来酵素活性の耐熱性に関する評価手法は研究段階に留まっており、牛乳製品の腐敗変敗の制御を果たし、品質保持期限設定の根拠創出を明確化する上で、今後検討すべき事項と思料される。

小規模製造施設の衛生管理に関する研究では昨年度までの研究で、小規模製造施設においては施設ごとに異なった独自の農場より原材料乳を入手していることを明らかにし、この結果から原材料乳の状態に多様性があることが示唆された。そこで、本年度の研究では複数の農場で搾乳された性状が異なる生乳を試料として、小規模製造施設で主流となっている低温保持殺菌(LTLT)方式下での各種衛生指標菌数の動態について検証を実施し、各衛生指標菌の衛生管理評価指標としての妥当性について検討を行った。

先述の様に、現在、わが国の乳及び乳製品については、乳等省令に基づき生菌数(一般生菌数)に加え、病原微生物による汚染度を推察する指標として大腸菌群が採用されている。一方でEU諸国においては腸内細菌科菌群を指標とした評価が行われており、食品衛生の国際的な整合性確保の観点からこれらの相違あるいは同等性についての検証が望まれている。小規模製造施設における製造形態をモデルとして実施した本解析の結果から、大部分の乳試料において低温保持殺菌条件下における大腸菌群数と腸内細菌科菌群数の動態に良好な相関が確認された。併せて低温殺菌前後において大腸菌群に比較して腸内細菌科菌群の検出率が高い傾向を示す事も確認された。これらの傾向は原

材料乳の性状及び細菌叢構成の多様性に左右されておらず、この事から、原材料乳の状態に多様性が示唆される小規模製造施設の製品においても各衛生指標菌数の動態が本モデル実験の結果と同様の傾向であるものと推察される。これらの結果は、乳及び乳製品の評価指標として現在乳等省令で採用されている大腸菌群の代替として腸内細菌科菌群を利用する事の妥当性を示すものであると考える。

一方で、一部の乳検体においては耐熱性の腸内細菌科菌群の存在が示された(山崎分担研究報告書図3、乳検体24)。同検体においては一般生菌数についても加熱処理後に多くの生残が確認されている。現在、国内の多くの生乳検査機関において耐熱性細菌数(バルク乳を63℃、30分間処理した後に検出される生菌数)をモニタリングする取組みが実施されており、農場における農場衛生及び搾乳衛生の向上に役立っている。今後、これらの生乳及び農場衛生に関する取り組みと乳製品検査の連携によって、より高度な乳製品の衛生管理体制を構築していくことが望まれる。

Genus階層における細菌叢解析結果から、耐熱性腸内細菌科菌群が認められた乳検体24においては*Citrobacter*、*Ewingella*、*Morganella*、*Trabulsiella*、*Yersinia*といった腸内細菌科に属する菌が特異的に検出されている(Data not shown)。これらの菌と耐熱性菌出現との相関については今後の検討課題となっている。今後、加熱後の試料から腸内細菌科菌群検査法により分離した菌の詳細な解析を行い、乳の衛生管理上問題となる菌についてより詳細な議論を進めたいと考える。

市販バター製品の衛生指標菌汚染実態調査により、国内で市販されているバター製品において、微生物規格である大腸菌群が陽性のもの

は見られず、一定の衛生基準が保たれていることが示された。一方、5 検体 (11.1%) については腸内細菌科菌群定性法で陽性を示した。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、バターにおける大腸菌群公定法の検出下限値が 5 CFU/g であることから、陽性検体についても、その汚染菌量は理論値で 0.04~4.99 CFU/g という極めて低いレベルであることが示唆された。細菌数については、現在バターの微生物規格とはされていないが、今回の調査で $5 \log \text{CFU/g}$ を超える製品が一部あることが示された。乳酸菌を添加して製造する発酵バター製品は、一部の発酵後に加熱工程がある製品を除き、最終製品に乳酸菌が存在していると思われるため、それらについては細菌数が高くても衛生上の問題とはならないと思われた。一方、発酵バターと明記されていない製品の中に高い細菌数を示すものが 2 検体あり、それらの製品が乳酸菌を添加されているのかは不明であった。

今回の調査により、市販のバター製品は概ね良好な衛生状態にあることが示された。また、低温殺菌牛乳及びアイスクリーム類とは異なり、簡易培地を用いた細菌数試験及び ISO 法による細菌数試験の結果が公定法と大きな差が見られず、製品の種類による製造工程における損傷菌の出現の差が簡易培地の有用性に大きな影響を与えることが示唆された。

また、本研究により、国際的な微生物規格基準の設定及び改訂の手順やその根拠の一部が示され、汚染レベルの調査結果や試験法の変更に伴う検出感度等に応じて基準値やサンプリングプランの見直しが随時行われていることが明らかとなった。

E. 結論

国際動向に関する調査では、インターネット検索により得られた文献 (資料 1、2) の調査により、以下の結論が得られた。

資料 1 には、乳及び乳製品について規定された EU の微生物基準が EC 規則 2073/2005 から抽出され、それらがリスト化された形で記載されていた。また、これらの基準の遵守に当たっての留意事項や、基準の適用を支援する決定樹が提示されていた。これらは、EU における乳及び乳製品についての微生物基準の内容、及びそれへの対応を理解する上で有益であると考えられた。

資料 2 は生乳生産における微生物基準を述べたものではなく、生乳の品質保証のために生産農場がなすべき基本的要件を述べたもので、そのほとんどは牛の飼育管理に関すること (飼料、動物用医薬品など) であった。

大規模製造施設の衛生管理に関する研究では、腐敗変敗等の苦情が寄せられた牛乳製品の製造施設における製造工程管理の実態を確認し、改善に資する知見を得るため、製造工程並びに施設環境拭取り検体を入手し、微生物学的観点から調査を行った。衛生指標菌試験及び菌叢解析を通じ、生乳受入れから加熱殺菌に至る工程での微生物増殖の可能性が示唆される知見を得たことは、同工程での管理実態を精査する必要性が改善に向けた検討事項として抽出された。また、充填工程ではマガジンラック等の清浄度は十分とは言い難く、製品への微生物交叉汚染の防止に資する改善策としてこれらの洗浄消毒方法を改めて検討する必要性を示す根拠を得た。これらの点については今後の改善指導に向けた知見として活用されることが期待された。

小規模製造施設の衛生管理に関する研究では、小規模製造施設の製造形態をモデルとし

て実施した多様な性状の生乳に対する加熱処理後の衛生指標菌検査において、大腸菌群数と腸内細菌科菌群数の動態に良好な相関が見られた。これらの結果は、小規模製造施設で製造された製品に対する衛生検査指標として腸内細菌科菌群を用いることの妥当性を示す結果であると考え。本結果は乳製品の衛生管理における国際整合性確保の推進に資するものであると期待する。

市販バター製品の衛生指標菌汚染実態調査及び簡易培地の検討では、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、市販のバター製品45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、バター製品では簡易培地について公定法と大きな差は見られず、また、ISO法の表面塗抹法と混釈培養法にも差が見られなかったことから、バター製品に存在する細菌は、初年度に調査した低温殺菌牛乳及び昨年度に調査したアイスクリーム類と比較して、損傷菌の割合が低いことが推察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

誌上発表（総説）：

岡田由美子 HACCP と微生物試験法 クリーンテクノロジー 2020;30:52-56.

学会発表：

渡辺愛, Amalia Widya Rizky, 御堂梨花子, 岡田由美子, 鈴木 穂高. 牛乳の微生物検査における公定法、ISO法、簡易法の比較。第

163 回日本獣医学会学術総会（令和2年9月、オンライン開催）

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」
分担研究報告書（令和2年度）

乳及び乳製品の衛生管理に関する国際動向に関する研究

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：

国内において、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な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なっている。今年度はインターネットによる情報収集を行い、選択された文献について調査を行なった。

今回、調査対象とした文献は、「Industry Guide to Good Hygiene Practice: Milk and Dairy Products（乳及び乳製品の製造における優良衛生規範についての英国のガイド）」（Dairy UK、2010年8月、資料1）及び「National Standard for Milk Production (Version 2020)（乳の生産についてのドイツの基準（2020年度版）」（QM milch、2020年1月、資料2）であった。資料1には、乳及び乳製品について規定されたEUの微生物基準がEC規則2073/2005から抽出され、それらがリスト化された形で示されていた。また、これらの基準の遵守に当たっての留意事項や、基準の適用を支援する決定樹が提示されていた。これらは、EUにおける乳及び乳製品についての微生物基準の内容、及びそれへの対応を理解する上で有益であると考えられた。資料2は生乳生産における微生物基準を述べたものではなく、生乳の品質保証のために生産農場がなすべき基本的要件を述べたもので、そのほとんどは牛の飼育管理に関すること（飼料、動物用医薬品など）であった。

A. 研究目的

現在我が国の乳及び乳製品については、昭和 26 年に発令された「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」に基づき、一般細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β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。

B. 研究方法

上述の目的のために、平成 30 年度は殺菌乳関連の微生物健康被害についての論文を対象に PubMed データベースを検索し、また、殺菌乳の微生物汚染事例、回収事例について EU の RASFF データベース、及び米国の FDA データベースの検索を行なった。さらに、殺菌乳関連の微生物規格基準、検査法やその運用実態を知るために、デンマークの行政当局（DVFA）、業界団体（DFAC: SEGES）、低温殺菌牛乳工場等について現地調査を行なった。

令和元年度は、乳製品としてアイスクリームを選択し、その喫食に関連する微生物

健康被害事例を米国 CDC の NORS データベースで検索した。また、アイスクリーム関連の微生物汚染事例、回収事例について、前年度と同様、RASFF データベース、及び FDA データベースで検索を行なった。さらに、アイスクリーム関連の微生物規格基準、検査法やその運用実態を知るために、デンマークの行政当局（DVFA）、大学（DTU Food）、アイスクリーム製造施設 2 カ所を訪問し、現地調査を行なった。

今年度（令和 2 年度）は当初、フランスまたはドイツの乳・乳製品工場を訪問し、情報収集を行う予定であったが、新型コロナウイルス感染症の流行により訪問は不可能になり、その代替策としてインターネットにより情報収集を行うこととした。

具体的には Google や PubMed を利用し、キーワードとして「milk standard、microbiological criteria、indicator bacteria」などを用いて関連情報の検索を行なった。今回、最終的に選択した 2 報の文献（資料 1、資料 2）についてその重要部分を和訳（仮訳）し、要旨を把握した。

C. 研究結果

欧州諸国における乳・乳製品の生産、加工製造における衛生管理の状況、動向を探るためにインターネットにより情報検索し、今回、以下の 2 報の文献を最終的に選択した。

「資料 1」

Industry Guide to Good Hygiene Practice: Milk and Dairy Products

（乳及び乳製品の製造における優良衛生規

範についての英国のガイド)

Dairy UK

August 2010

http://www.dairytransport.co.uk/eblock/services/resources.ashx/000/634/680/Final_Draft_August_2010_-_Industry_guide_to_good_hygiene_practice.pdf

「資料 2」

National Standard for Milk Production
(Version 2020)

(乳の生産についてのドイツの基準 (2020
年度版))

QM milch (Germany)

January 2020

<https://media.diemayrei.de/92/721192.pdf>

資料 1、2 とも、乳・乳製品の生産者、加工製造業者等を対象とした衛生管理に関するガイドである。以下にその内容の一部を紹介するとともに、部分訳 (仮訳) を報告書末尾に添付した。

○ 資料 1

このガイドは、タイトルからも分かるように、乳の生産から加工に至るまでの過程における衛生管理についての英国の事業者向けの公式ガイドで、2010 年 8 月に Dairy UK (業界団体) により刊行された。本報告書では、このうち、EC 規則 2073/2005 (食品の微生物基準、<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>) に関する章を主に紹介する。

本ガイドはまず初めに、この規則では 2

種類の基準が設定されていることを述べている。1 つは食品安全基準 (food safety criteria) で、もう 1 つは工程衛生基準 (process hygiene criteria) である。前者の目的は製品バッチの安全評価であり、後者の目的は工程の適切性の確保である。

本ガイドは次に、この規則の遵守に当たり重要な点を 3 つ挙げている。1) 微生物基準は、食品安全管理の手法の妥当性確認と検証の両方に使用されるべきである、2) 想定されるリスク、事業の性質、規模に見合った検査、3) 検査においては代替の指標 (たとえば経時的温度記録など) を用いてもよい、である。また、本規則の執行は監査と検体採取により達成されるとし、基準を超えた場合、事業運営管理者は是正措置をとらなければならないとしている。

本ガイドは次に、本規則が規定している食品安全基準について詳細に述べている。すなわち、本ガイドは、乳及び乳製品の 카테고리ごとに検査対象微生物種、食品安全基準、検査法等を記載し、これらをまとめて表として示している。本報告書ではこのうちの主なものについて、製品カテゴリーと対象微生物種の項目のみを【資料 1 の部分訳】に表 1 として示した。

本ガイドはまた、乳・乳製品カテゴリーと微生物種の特定の組み合わせ (具体的には、1) RTE (そのまま喫食可能な) 食品とリステリア (*Listeria monocytogenes*)、2) 乳製品とコアグラージェ陽性ブドウ球菌、3) 乳児用調製粉乳・食品と腸内細菌科菌群、サルモネラ、*Cronobacter sakazakii*) の場合に、どの基準を適用すべきか、また、実施すべきことは何か分かる決定樹 1、2、3 を提示している。

本ガイドはさらに、食品安全基準が満たされなかった場合は、製品の出荷ができなくなり、既に市場に出荷したものについては撤去や回収の可能性があるし、加えて、安全管理手法の見直しが必要になるとしている。

工程衛生基準についても食品安全基準と同様、本ガイドは、乳及び乳製品の категорияごとに検査対象微生物種、工程衛生基準、検査法等を記載し、これらをまとめて表として示している。本報告書ではこのうちの主なものについて、製品カテゴリーと対象微生物種の項目のみを【資料1の部分訳】に表2として示した。

本ガイドでは、工程衛生基準が満たされなかった場合でも製品の市場への出荷は可能だが、以降の製品が基準を満たすように製造工程や製造方法の見直しが必要であるとしている。

○ 資料2

乳の国レベルでの品質保証を図るため、ドイツではQM Milk (Quality Management Milk) という品質管理のスキームが2002年に提案され、この方式を成文化したものととして、法規や規範などにもとづくすべての基本的要件をカバーする基準(QM Milk Standard)が作成された。この基準はQM Milk認証プログラムに参加する農場(ドイツの全農場の90%以上)を対象とし、その目的は農場レベルでの生乳の品質保証である。資料2は2020年1月1日に発行されたこの基準の2020年度改定版で全7章からなり、本報告書では、このうち基本的要件に関する章(第4章)を紹介する(【資料2の部分訳(仮訳)】参照)。

第4章には基本的要件として6項目が挙

げられており、以下に各項目についてその概要を紹介する。

・動物の健康と福祉

乳を生産するウシは、健康上の基本的な問題の徴候を呈していないものでなければならない。乳房の検査を毎月行う。

・動物の個体識別及び登録

家畜群に関する変更は、個体の識別と由来に関する公的なデータベースに登録する必要がある。

・乳の生産と保管

搾乳室には十分な照明と換気が必要である。乳の冷却と保管は、無許可の第三者や害虫などからの有害な影響を受けないような方法で行われなければならない。

・飼料

飼料は、高品質な食品の生産において最も重要な要素である。牛乳生産者は、飼料規格に関する国の枠組み協定を遵守する製造業者及び取引業者から購入した飼料のみを使用することができる。牛乳生産者は、飼料の入荷ごとに配送許可証、納品明細、その他の証明記録を保存しておかななければならない。

・動物用医薬品(VMP)

乳生産者は、治療を受けたことのあるウシ全頭を正確に把握していなければならない。動物用医薬品(VMP)で治療を受けたことのあるウシの乳は、休薬期間が過ぎている場合にのみ出荷の再開の可能性がある。出荷した乳に阻害剤が含まれてはならない。

すべての乳生産者は、獣医師の協力を得て、自身の農場で動物群のチェックを行う。

乳生産者は、処方箋により薬局のみで入手できる VMP の購入証明書をいつでも提示できるようにしておかなければならない。

原則として、血清、ワクチン及び抗原は獣医師のみが投与できる。

・環境保護

肥料に関する規則は、各農場に対し、農場由来肥料の栄養素含有量の比較と記録を行うことを義務付けている。

基本的要件の遵守の状況は、各農場が作成する点数方式の自己評価表を認証機関が監査することにより把握される。資料 2 は自己評価表のフォーマットを付録 1 として掲載している。自己評価の項目は 2020 年度改定により 64 項目から 69 項目に増加した。

D. 考察

○ 資料 1 について

本報告書では、資料 1 のうち EC 規則 2073/2005 に関する部分に焦点を当てた。乳及び乳製品に関わる微生物基準等をリストアップした表（付録 1、5）は多くの注釈が付されて極めて複雑なため、本報告書では製品カテゴリーと対象微生物種の組み合わせの概要を示すのみにとどめた（【資料 1 の部分訳】の表 1、2）。

上記の表 1、2 によれば、加熱殺菌乳に関しては、工程衛生基準として腸内細菌科菌群についての基準が設定されている。また殺菌乳は RTE 食品でもあることから、リステリアについての食品安全基準も適用されると考えられる。しかしながら、決定樹 1 の注釈によると、最終包装で加熱殺菌される

場合は再汚染がないので定期的なリステリア検査は不要であるとされている。

○ 資料 2 について

QM Milk Standard は 3 つの要素、すなわち 1) German national standard for milk production（乳の生産についてのドイツの基準）、2) QM Milk's list of criteria（自己評価表）、3) QM Milk handbook for milk producer（乳生産者のためのハンドブック）からなり、今後、3 年ごとに改定版が発行される予定である。QM Milk Standard は乳加工業者に生乳を供給する農場が対象で、課される基本的要件としては飼料や動物用医薬品など牛の飼育管理に関することが主である。

本報告書では「乳の生産についてのドイツの基準」の第 4 章「基本的要件」を紹介したが、第 6 章「監査（Control system）」についても簡単に触れておく。QM Milk 認証プログラムに参加する農場は認証機関による 3 年に一度の定期監査を受け、これに合格することで認証を得られる。監査時の点数によっては認証の有効期間が 18 カ月になることがある。認証の有効期間中に、例えば、一般細菌数が 10 万/ml を超えている、または、体細胞数が 40 万/ml を超えているなどの理由で生乳の納入が乳加工業者により一時的に停止された場合、その農場は認証が取り消される。再認証を受けるには特別監査を受け、これに合格しなければならない。

E. 結論

インターネット検索により得られた文献（資料 1、2）の調査により、以下の結論が得られた。

資料 1 には、乳及び乳製品について規定された EU の微生物基準が EC 規則 2073/2005 から抽出され、それらがリスト化された形で記載されていた。また、これらの基準の遵守に当たっての留意事項や、基準の適用を支援する決定樹が提示されていた。これらは、EU における乳及び乳製品についての微生物基準の内容、及びそれへの対応を理解する上で有益であると考えられた。

資料 2 は生乳生産における微生物基準を述べたものではなく、生乳の品質保証のために生産農場がなすべき基本的要件を述べたもので、そのほとんどは牛の飼育管理に関すること（飼料、動物用医薬品など）であった。

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

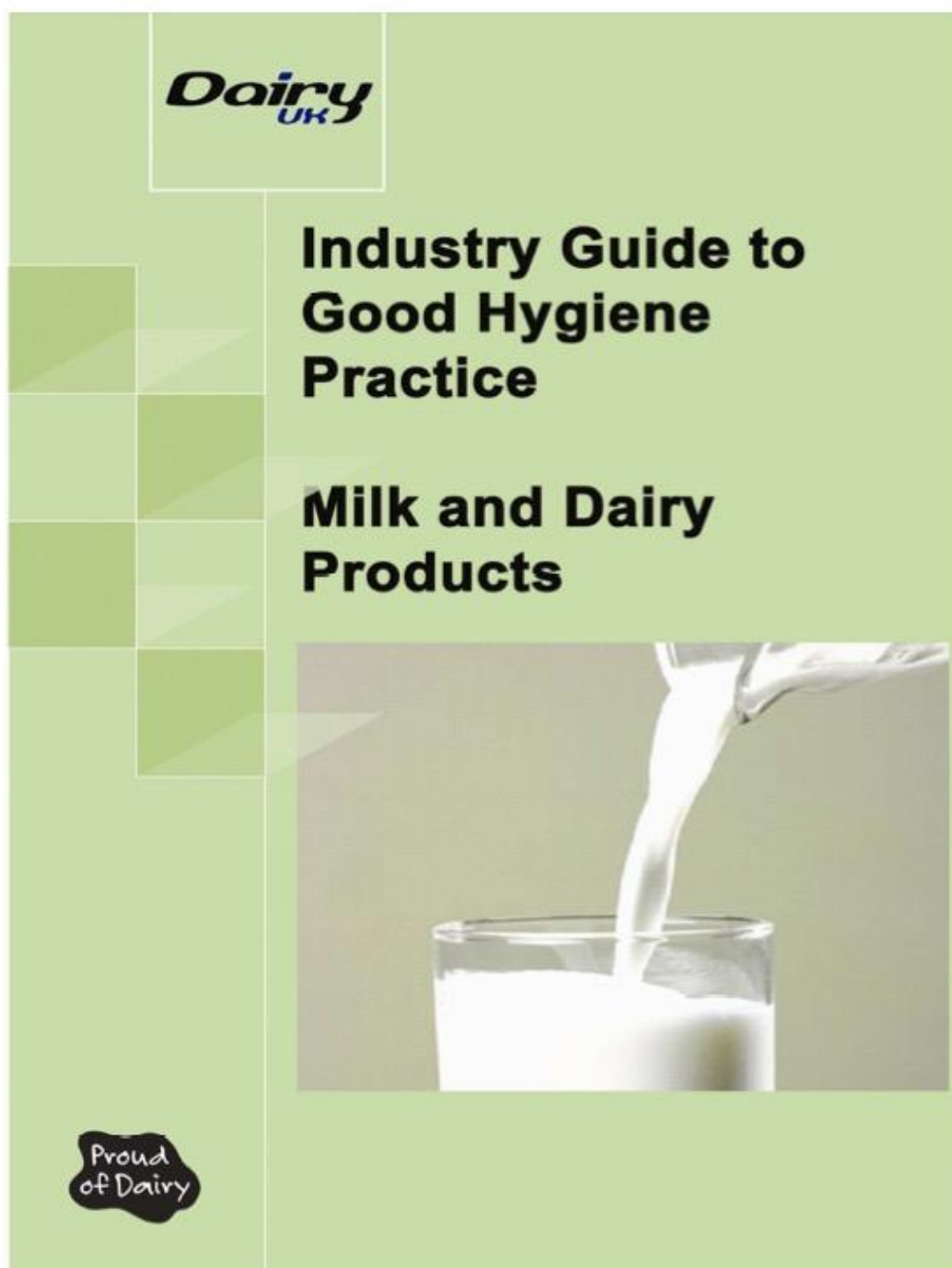
2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

【資料 1-1】



【資料 1-2】

Industry Guide to Good Hygiene Practice

Milk and Dairy Products

Regulation (EC) 852/2004 *The hygiene of foodstuffs*

Regulation (EC) 853/2004 *Hygiene rules for food of animal origin*

Regulation (EC) 2073/2005 *Microbiological criteria for foodstuffs* (as amended by EC Regulation No. 1441/2007 and Regulation No. 365/2010)

August 2010

CONTENTS

| Industry Guide to Good Hygiene Practice | | Page Number |
|--|--|-------------|
| Preface | | 5 |
| Acknowledgement | | 6 |
| Introduction | | 7 |
| Scope | | 8 |
| Structure of the Guide | | 9 |
| Legal background | | 10 – 11 |
| HACCP | | 12 - 14 |
| Regulation 852/2004 The hygiene of foodstuffs | | 15 – 53 |
| | HACCP | 15 - 16 |
| | General requirements for food premises | 17 – 22 |
| | Specific requirements in rooms where foodstuffs are prepared, treated or processed | 23 – 27 |
| | Requirements for movable and temporary premises | 28 – 30 |
| | Transport | 31 – 34 |
| | Equipment requirements | 35 – 37 |
| | Food Waste | 38 – 39 |
| | Water Supply | 40 – 41 |
| | Personal hygiene | 42 – 44 |
| | Provisions applicable to foodstuffs | 45 – 48 |
| | Wrapping and Packing | 49 – 50 |
| | Heat Treatment | 51 |
| | Training | 52 – 53 |
| Regulation 853/2004 Hygiene rules for food of animal origin | | 54 – 79 |
| | Primary Production | 55 – 60 |
| | Milk Production Holdings | 61 - 63 |
| | Milking, Collection and Transport | 64 – 65 |
| | Staff hygiene | 66 |
| | Criteria for Raw Milk | 67 – 69 |
| | Dairy Products - Temperature | 70 - 71 |
| | Heat Treatment | 72– 75 |
| | Criteria for Raw Cows' Milk | 76 |
| | Wrapping and Packing | 77 |

【資料 1-4】

| | | |
|---|--|---------|
| | Labelling | 78 |
| | Identification Marking | 79 |
| Regulation 2073/2005 Microbiological criteria for foodstuffs | | 80 – 90 |
| | Microbiological Criteria for Milk and Dairy Products | 80 – 82 |
| | Food Safety Criteria | 83 – 87 |
| | Process Hygiene Criteria | 88 – 90 |
| References | | 91 |
| Glossary | | 92 - 95 |
| Annex | | 96 - 97 |

【資料 1 の部分訳（仮訳）】

Industry Guide to Good Hygiene Practice: Milk and Dairy Products

（乳及び乳製品の製造における優良衛生規範についての英国のガイド）

Dairy UK

August 2010

http://www.dairytransport.co.uk/eblock/services/resources.ashx/000/634/680/Final_Draft_August_2010_-_Industry_guide_to_good_hygiene_practice.pdf

<以下、<>の部分は分担研究者による編集や意見を含む部分であり、『』の部分は原文を和訳（仮訳）し、そのまま引用した部分である。>

<目次（一部省略）

- ・ 緒言
- ・ 序論
- ・ 適用範囲
- ・ このガイドの構成
- ・ 法的背景
- ・ HACCP
- ・ EC 規則 852/2004: 食品衛生
- ・ EC 規則 853/2004: 動物由来食品の衛生規則
- ・ EC 規則 2073/2005 及びその修正 1441/2007、365/2010: 食品の微生物基準

緒言

このガイドの目的は EU 規則にどのように従うかを示すことであり、このガイドは公式なものである。このガイドに従う法的な義務はないが、考慮されるべきである。

序論

このガイドは、乳生産者、乳加工業者、その他の酪農業者が EC 規則 852/2004、853/2004 を遵守することを支援するのが目的である。加えて、EC 規則 2073/2005 の一部、及びこれについての UK FSA（英国食品基準庁）の解説も含まれる。

このガイドの構成

HACCP 以降の 4 つの章は、それぞれ、1) 法的要件である規則の紹介、2) 規則の遵守についてのガイド、3) 法的要件以外の優良規範の紹介からなっている。>

<以下は「EC 規則 2073/2005 及びその修正 1441/2007、365/2010（食品の微生物基準）」の章の和訳（仮訳）である。>

『EC 規則 2073/2005：食品の微生物基準』

「乳及び乳製品の微生物基準」

序論

この EC 規則では2種類の基準が規定されている。これらの基準を逸脱した場合、食品事業運営管理者は是正措置をとらなければならない。

- ・ 食品安全基準 (food safety criteria)：製品もしくは食品のバッチの安全の目安
- ・ 工程衛生基準 (process hygiene criteria)：製造工程が適切に作動していることを保証するために使用

遵守

微生物検査によって食品安全が保証されたり、コントロールされたりすることはない。この規則は、一般的に、最終製品の微生物検査の回数や、検査結果が判明するまで出荷を停止する製品の数を増やすことはない。この規則の遵守を確実にするために、以下のことを実行すべきである。

- ・ 微生物基準は、食品事業者による食品安全管理の手法の有効性評価及び検証に使用すべきである。
- ・ 検体の収集、検査の規模は、想定されるリスク、事業の性質、規模に見合ったものであるべきである。
- ・ 同様の結果が得られることを示すために、代替の指標（たとえば経時的温度記録、優良衛生洗浄規範の遵守）を用いても良い。

執行

- (1) この基準の遵守は、食品の生産から流通までのフードチェーンのすべての段階で、各地の環境衛生局が責任を持つ。
- (2) 具体的に (1) の目的は、食品事業者による食品安全管理の状況の監査または製品のサンプリングにより達成される。監査においてはこの基準が満たされていることを示すエビデンスが要求される。
- (3) 基準を超えた場合、食品事業運営管理者は是正措置をとらなければならない。

食品安全基準

- 法的要件

乳及び乳製品関連の食品安全基準（微生物検査基準）についてはリスト化されたものが付録1に示されている。また、下記に示す製品と微生物の組み合わせの場合に実施すべき検査の種類を決める決定樹が付録2～4に記載されている。

付録2（決定樹1）：RTE（そのまま喫食可能な）食品とリステリア（*Listeria monocytogenes*）

付録3（決定樹2）：乳製品とコアグラージェ陽性ブドウ球菌

付録4（決定樹3）：乳児用調製粉乳・食品と腸内細菌科菌群、サルモネラ、*Cronobacter sakazakii*

○ 遵守に関するガイド

食品安全基準はあるバッチの食品の安全性を評価するために使用される。食品安全基準は当該製品の品質保持期間を通して有効である。食品安全基準が満たされない場合、通常、食品事業運営管理者は当該食品を市場に出荷できなくなるか、または、当該食品を市場から撤去し、今後の製品が基準を満たすよう方策を講じざるを得なくなる。場合によっては当該食品の回収が必要になる。当該食品が今後は食品安全基準を満たすことを確実にするために、食品安全管理の手法の見直しを行うべきである。

○ 優良規範についてのアドバイス

製品の検査は、製造時及び品質保持期間の終了時にその食品としての安全性要件が確保されるか否かを知るために、製品の開発段階から実施することが推奨される。それ以降は、食品事業管理システムの規定にしたがって、現場ごとに決められる定期的な検査を行う。

HACCP プランでは加熱殺菌や加熱殺菌後の汚染の防止について触れ、前提となる必要な管理が行われることを保証すべきである。このような条件下では製品の工場からの出荷前に検査をする必要はない。しかしながら、製品の開発段階においてその品質保持期間を決定する際、上述の条件が確立されることが望ましい。』

<乳及び乳製品関連の食品安全基準のリスト（付録1）については、正確を期すため全体を示すことはせず、製品カテゴリーと微生物種の組み合わせの概要のみを表1に示した。また決定樹についてはそれぞれのタイトルのみを示した。

表 1：乳及び乳製品関連の食品安全基準（製品カテゴリーと微生物種の組み合わせ）

| 製品カテゴリー | 微生物（その毒素） |
|---|--|
| RTE 食品（乳児用を含む） | リステリア（ <i>Listeria monocytogenes</i> ） |
| チーズ、バター、クリーム（生乳由来） 粉ミルク、アイスクリーム 乳児用調製粉乳 | サルモネラ属菌 |
| チーズ、粉ミルク | ブドウ球菌毒素 |
| 乳児用調製粉乳 | <i>Cronobacter sakazakii</i> |

- ・ 決定樹 1： RTE 食品のリステリア汚染について、どの基準を用いれば良いか
- ・ 決定樹 2：乳製品がコアグラゼ陽性ブドウ球菌またはブドウ球菌毒素に汚染していた場合、どうすれば良いか
- ・ 決定樹 3：乳児用調製粉乳・食品が腸内細菌科菌群、サルモネラまたは *Cronobacter sakazakii* に汚染されていた場合、どうすれば良いか>

『工程衛生基準』

○ 法的要件

乳及び乳製品関連の工程衛生基準（微生物検査基準）についてはリスト化されたものが付録 5 に示されている。

○ 遵守に関するガイド

- ・ 工程衛生基準は製造工程が適切に機能していることを示すために使用される。工程衛生基準は製造及び製品取り扱いのすべての段階に適用される。
- ・ 工程衛生基準が満たされていなくても製品を市場に出荷することはできる。しかし、食品事業運営管理者は、将来の製品が工程衛生基準を満たすよう製造工程や製造方法を見直し、工程衛生を改善しなければならない。
- ・ 本 EC 規則は検査の最低条件を規定しておらず、また食品事業運営管理者に対して、日常的な微生物検査を行うことや検査の結果を待つために製品の市場への出荷を遅らせることを要求していない。工程衛生基準は食品安全管理手法が適切に機能していることを確認するために使用すべきである。
- ・ 乳製品がコアグラゼ陽性ブドウ球菌に汚染されていたり、乳児用調製粉乳が腸内細菌科菌群に汚染されていた場合は更なる検査が必要になる可能性がある。このような場合になすべきことを食品安全管理手法に記載しておくべきである。またこのような場合、執行機関は食品事業運営管理者が適切な是正措置をとったことを示す十分なエビデンスを必要とする。

○ 優良規範についてのアドバイス

洗浄や消毒の規範を満たしていることを示すために定期的な製品検査が推奨される。各バッチについて、その製造開始時に、または製造現場ごとに決められたガイドラインに沿って検査をすることが望ましい。

規則を遵守していることを示すのに必要な達成目標よりもより厳しい目標を設定することは良いやり方である。この場合、検査の規模は小さくてよく、通常は1つの検体につき1回の検査が良い。

本規則は、リステリア関連の公衆衛生リスクがある RTE 食品の製造施設管理者に対し、リステリア汚染の有無について製造環境をモニターすべきであると規定している。さらに、製造環境及び従業員の個人衛生状況に関するモニターシステム（たとえば、機器の拭き取り、手指の拭き取り、水質検査など）を備えることが推奨される。』

<乳及び乳製品関連の工程衛生基準のリスト（付録5）については、正確を期すため全体を示すことはせず、製品カテゴリーと微生物種の組み合わせの概要のみを表2に示した。

表2：乳及び乳製品関連の工程衛生基準（製品カテゴリーと微生物種の組み合わせ）

| 製品カテゴリー | 微生物 |
|--|----------------|
| 加熱殺菌乳（及び液状乳製品） 粉ミルク、アイスクリーム、デザート 乳児用調製粉乳 | 腸内細菌科菌群 |
| チーズ、バター、クリーム | 大腸菌 |
| チーズ（生乳等由来）、粉ミルク | コアグラージェ陽性ブドウ球菌 |
| 乳児用調製粉乳 | セレウス菌 |

>

【資料 2-1】



QUALITÄTSMANAGEMENT milch

NATIONAL STANDARD FOR MILK PRODUCTION

Version 2020

Applies from 01.01.2020

QUALITÄTSMANAGEMENT MILCH IS AN INITIATIVE OF



Situation on 07.03.2019

Contents

| | | |
|------|--|----|
| 1. | General introduction..... | 4 |
| 1.1. | The basics..... | 4 |
| 1.2. | The QM Milk standard..... | 4 |
| 1.3. | The QM Milk advisory board | 5 |
| 2. | Setting targets..... | 5 |
| 3. | Scope..... | 6 |
| 4. | General requirements | 6 |
| 4.1. | Animal health and well-being | 7 |
| 4.2. | Animal identification and the farm register | 7 |
| 4.3. | Milk production and storage..... | 7 |
| 4.4. | Feed..... | 7 |
| 4.5. | Veterinary medicinal products (VMPs) | 8 |
| 4.6. | The environment | 9 |
| 5. | Detecting residues | 9 |
| 6. | Control system | 10 |
| 6.1. | Requirements of certification bodies | 10 |
| 6.2. | Requirements of the auditors..... | 11 |
| 6.3. | Further education and training..... | 12 |
| 6.4. | Duty for the holding pending certification to cooperate..... | 12 |
| 6.5. | Inspection system | 12 |
| 6.6. | Interval between inspections: system and special audits..... | 13 |
| 6.7. | Interpreting the findings of the audit..... | 16 |
| 7. | Issuing of certificates | 17 |
| | Annexes | |

【資料 2 の部分訳（仮訳）】

National Standard for Milk Production (Version 2020)

（乳の生産についてのドイツの基準（2020 年度版））

QM milch (Germany)

January 2020

<https://media.diemayrei.de/92/721192.pdf>

<本ガイドは全体で 7 章と付録からなるが、以下は第 4 章「基本的要件」の和訳（仮訳）である。>

『4. 基本的要件

生乳生産のモニタリングには、以下の項目に関する状況の確認が必要である。

- ・動物の健康と福祉
- ・動物の個体識別と由来
- ・乳の生産と保管
- ・飼料
- ・医薬品の使用に関する法規の遵守
- ・環境保護

4.1 動物の健康と福祉

食品としての乳の生産では、衛生及び畜舎に関する一定の条件が守られなければならない。さらに、ウシの健康状態については厳しい規定がある。特に、食品としての乳を生産するウシは、健康上の基本的な問題の徴候を呈していないものでなければならない。乳房の健康状態を調べるために動物群の検査を毎月行う。乳房感染の疑いがある場合は、治療法を決定するため、または慢性感染と薬剤耐性の有無を確認するために、その動物の個別検査を行う必要がある。

4.2 動物の個体識別及び登録

法規により、牛乳生産者はウシ 1 頭に耳標 2 個を付けることが義務付けられている。片方の耳標が紛失した場合、牛乳生産者は代替の耳標を直ちに当局に申請し、個体識別を再開しなければならない。家畜の移動に関する規則（Viehverkehrsverordnung - VVVO）により、家畜生産者には家畜の登録簿への記入が義務付けられている。家畜群に関する変更は、個体の識別と由来に関する公的なデータベース（HI-Tier-Datenbank）に登録する必要がある。

4.3 乳の生産と保管

ウシの搾乳が行われる環境は、高品質な牛乳の生産に資するものでなければならない。搾乳室には十分な照明と換気が必要である。搾乳用器具、搾乳クラスター及び冷却タンクは定期的に点検する必要がある。搾乳については、搾乳従事者が守らなければならない特定の衛生要件がある。乳の冷却と保管は、無許可の第三者や害虫などからの有害な影響を受けないような方法で行われなければならない。

4.4 飼料

飼料は、高品質な食品の生産において最も重要な要素である。このため、飼料の購入と使用については特別な要件が規定されている。

乳生産者は、飼料規格に関する国の枠組み協定を遵守する製造業者及び取引業者から購入した飼料（配合飼料、単体飼料）のみを使用することができる。飼料規格に関する枠組み協定は、以下の Web ページ (www.qm-milch.de) からダウンロードできる。また、飼料の原材料に関するポジティブリストに記載されている飼料のみが使用できる。

飼料は、公的機関やその他の機関で、モニタリングプログラムの枠組みに従い不適切な物質に関して検査が行われる。

牛乳生産者は、飼料の入荷ごとに配送許可証、納品明細、その他の証明記録を保存しておかなければならない。この義務は、農家で製造される飼料を購入する場合も同じである。

異なる動物種用の飼料を別々に保管することにより、飼料の混入を効果的に防ぐことができる。

家畜及び環境の双方を重視する方法で給餌するためには、1回の給餌量を計算する際に栄養分析の結果を利用することが推奨される。

肥育場が汚染されたことが強く疑われる場合は、自家製の飼料に対する残留物対策も実施すべきである。

4.5 動物用医薬品（VMP）

乳生産者は、治療を受けたことのあるウシ全頭を正確に把握していなければならない。動物用医薬品（VMP）で治療を受けたことのあるウシの乳は、休薬期間が過ぎている場合にのみ出荷の再開の可能性がある。出荷した乳に阻害剤が含まれていてはならない。乳は、乳の品質に関する規則、QM Milk の基本的モニタリング、及び必要ならば、乳の出荷に関する規則に従い、定期的（月に数回）に阻害剤の検査が行われる。

すべての乳生産者は、獣医師の協力を得て、自身の農場で動物群のチェックを行う。その目的は、群の健康状態を維持することである。健康維持に関する契約を獣医師と交わすことが推奨される。

乳生産者は、処方箋により薬局のみで入手できる VMP の購入証明書をいつでも提示できるようにしておかなければならない。この購入証明書は、適切に記載されていることを入念

に確認し、日付順にファイルして5年間保存すべきである。

乳生産者は、所有する家畜にVMPを使用した場合、これをすべて記録しなければならない。乳生産者が自身でVMPを投与する場合は、上述の購入証明書を発行した獣医師の指示を遵守しなければならない。獣医師が定めた休薬期間を守ることが特に重要である。

原則として、血清、ワクチン及び抗原は獣医師のみが投与できる。獣医師の要請により、場合によっては関係当局が例外を認めることがある。

獣医師／薬局から入手した医薬品はすべて、添付文書に記載された指示に従って保存する。使用期限が過ぎた医薬品は適切な方法で廃棄する。使用したすべての器具は、清潔を保ち、次の業務にすぐに使用できる状態にしておくべきである。

4.6 環境保護

肥料に関する規則は、各農場に対し、農場由来肥料の栄養素含有量の比較と記録を行うこと、及び比較したことの証拠を示すことを義務付けている。優良農業規範のガイドは、農場由来の糞尿堆肥の散布を制限している。』

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 |
| | 窪田 邦宏 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 安全情報部 |
| | 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 |
| | 町田 李香 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品衛生管理部 |
| | 内山 栞 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品衛生管理部 |
| | 木下 直美 | 岡山市保健所 衛生課 | |
| | 伊藤 友章 | 岡山市保健所 衛生課 | |
| | 南 大亮 | 岡山市保健所 衛生課 | |
| | 溝口 嘉範 | 岡山市保健所 衛生課 | |

研究要旨

本研究では、苦情が寄せられた牛乳製品の製造施設における衛生管理実態を把握し、改善すべき点の有無を検証することを目的として、当該施設での牛乳製造工程を通じた微生物動態に関する研究を行った。情報調査を通じ、当該製品の製造工程フローを確認した上で、生乳、殺菌前乳、最終製品（牛乳製品）、並びに製造工程において一時的に開放系となる充填機内外の施設環境拭取りを採材対象として設定した。衛生指標菌試験を通じ、生乳検体では一般細菌数が4.0-4.2 logCFU/mL、腸内細菌科菌群が2.1-2.2 logCFU/mL、大腸菌群が1.9-2.0 logCFU/mL、黄色ブドウ球菌が2.6-2.7 logCFU/mL 検出された。殺菌前乳検体では、生乳検体に比べ、各指標菌数は概ね1-2 logCFU/mL 上昇傾向を示した。16S rRNA 菌叢解析を通じ、受入時の生乳検体に比べ、殺菌前牛乳検体では腸内細菌科菌群や *Streptococcaceae* 等の占有率が増加を示し、菌数変動とあわせ、生乳受け入れから加熱殺菌までの工程における温度管理或いは配管洗浄等に不備があった可能性が示唆された。また、最終製品検体からは直接塗抹法により全ての指標菌は検出されなかったが、保存試験を通じ、一般細菌が検出され、僅かながら微生物の生残或いは交叉汚染が生じた可能性が示唆された。菌叢解析を通じ、製品検体では *Buttiauxella*、*Trabulsiella*、*Mangrovibacterium* 等の環境由来細菌の占有率増加が確認され、後者の可能性を支持する結果と捉えられた。実際に充填機内外の拭取り検体のうち、マガジンラック及び充填ノズルメッシュから一般細菌が検出された。菌叢解析により、マガジンラックやノズルメッシュ、充填機内部検体では充填開始前と終了後の間で顕著な変動が認められた。以上より、検討対象施設における牛乳の製造工程では、生乳受け入れから殺菌までの間での温度管理、加熱殺菌工程の正常稼働、充填工程での施設設備の洗浄消毒の徹底等が衛生管理の向上に向けて検討が必要な事項として抽出された。

A. 研究目的

本分担研究では、乳・乳製品の製造工程に関わる管理実態の把握並びに改善すべき工程管理の在り方を提言することを目的として検討を進めてきた。前年度までに検討した中規模の低温殺菌牛乳製造施設における工

程管理に関する検討では、充填機内部での環境由来細菌(非病原細菌)の汚染が見出され、牛乳製品からも当該菌が少数ながら検出された実態を把握した。充填機の洗浄消毒については、一般衛生管理としてこれまでも対応がなされていたが、当該施設においては、よ

り高度衛生管理体制の構築に向けて、充填工程における機器・器具の洗浄消毒の徹底が求められる課題として抽出されたといえる。

牛乳製品の安全確保を推進する上で、微生物学的な検討は欠かせない。これは原料となる生乳中に多様な微生物が含まれていることに起因する。こうした微生物危害の制御を製造工程で果たすため、乳等省令では従来より、加熱殺菌条件をはじめ、生乳受入れ検査（直接鏡検法）や製品検査として行われる成分規格を設定している。近年、牛乳製品を原因食品とする食中毒事例は発生が認められていないが、（有症）苦情については依然として散見されている。一例として、東京都に寄せられた乳・乳製品に関わる苦情事例の多くは、異味・異臭、異物混入、または外観異常であることが報告されている¹⁾。また、セレウス菌汚染による甘性凝固が報告されている²⁾。いわゆる常温保存牛乳を除き、全ての牛乳製品で無菌を担保することは困難であることは周知のとおりであるが、製造工程を通じた微生物制御の高度化を果たすことは、消費者のみならず、製造事業者の不利益を回避する上でも重要な事項と考えられる。実際に、大阪市内の総合衛生管理製造過程承認施設において製造された牛乳製品に対して、有症苦情が寄せられ、計 24,340 本を自主回収した事例も報告されている³⁾。当該事例では、*Pseudomonas fluorescences* が充填工程直前のセミアセプティックサージタンクの圧力異常により、充填機内に外空気が侵入したことが細菌汚染の要因と推定されており、製造工程における衛生確保は今後も検証する必要が増すものと想定される。

本年度は2019年に外観異常に関する苦情が寄せられたUHT牛乳製品に着目し、当該製品の製造施設における製造工程管理実態を確認するため、原料、中間・最終製品並びに

製造前後の環境拭取り検体について微生物検査を行い、製造工程管理の向上に資すると思われる要点の抽出を行うことを目的として検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 牛乳製造施設における検体確保及び関連情報の収集

本研究では、超高温瞬間殺菌（UHT）牛乳製造施設の協力を得て、同施設で牛乳製品の製造工程に関する情報提供、並びに検体確保に関する承諾を得た。検体の内訳は、生乳、殺菌前乳、並びに牛乳製品 2 種（各 n=3）のほか、充填機周辺環境拭き取り検体をスポンジスワブ（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採材後 48 時間以内に保管・輸送し、到着後速やかに以下の研究に供した。

2. 衛生指標菌定量試験

衛生指標菌の定量試験には、国際標準試験法である ISO 法（一般細菌数、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）を用いた。試験検体の希釈には、緩衝ペプトン水（BPW、Oxoid）を用いた。

3. 16S rRNA 菌叢解析

上述 2. で調整した 10 倍乳剤 1ml を分取し、滅菌 PBS を用いて 2 回洗浄した。その後、沈査より Maxwell RSC Blood DNA kit（プロメガ）を用いて Total DNA を抽出した。抽出 DNA 溶液を鋳型として、16S rRNA V5-V6 領域を対象とする PCR 反応を行い、同領域を増幅した。E-gel SizeSelect 2%（Thermo Fisher）、AMPure XP（Beckman）、及び Ion Library Equalizer

kit (Thermo Fisher) を用いて増幅産物を精製・定量し、等量混合ライブラリーを作製した。Ion Chef/PGM システム (Thermo Fisher) を用いて同ライブラリーを対象に、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) 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。

4. 保存試験を通じた微生物動態解析

上項 1. で示す生乳検体を無菌的に 100mL ずつ 100mL 容の滅菌済容器に分注し、速やかに 5、15、25°C 下にて 0、1、2、5 日間保存した。同じく上項 1. で示した製品検体についても同様に、100mL 容量にて 15°C または 25°C 下にて 5 日間保存した。保存後の検体は上項 2. と同様に一般細菌、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌の検出試験に供した。

C. 研究結果

製造施設における牛乳製品の製造工程フローダイアグラムを図 1 に示す。

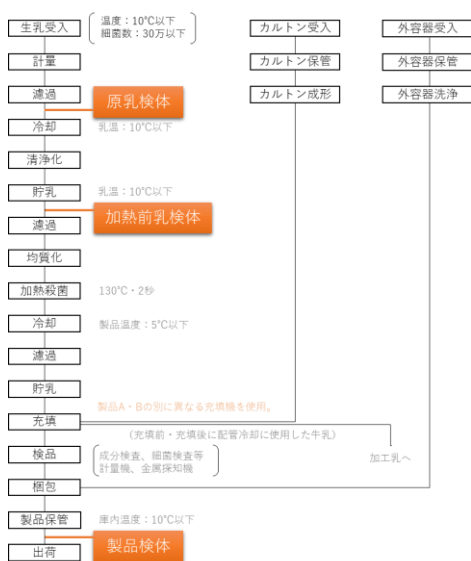


図 1. 対象施設における牛乳製造工程フローダイアグラム。

製造工程フローを確認後、管轄自治体並びに事業者の協力を得て、原料である生乳検体、殺菌前乳検体、最終製品検体 (牛乳製品)、並びに施設環境拭取り検体入手し、微生物試験に供した。なお、管轄自治体は苦情を受けて、既に製造施設の調査を行ったが、記録文書を含め管理事項に大きな逸脱は確認されていない状況であった。

1. 衛生指標菌検出状況.

(i) 生乳、中間・最終製品検体 (図 2)

生乳 3 検体では、一般細菌数が 3.99-4.16 logCFU/mL、腸内細菌科菌群が 2.06-2.16 logCFU/mL、大腸菌群が 1.85-2.02 logCFU/mL、黄色ブドウ球菌が 2.64-2.73 logCFU/mL 検出された。大腸菌は、生乳 2 検体より検出され、検出菌数は 1.00-1.18 logCFU/mL であった。

殺菌前乳 3 検体の検出菌数は、一般細菌数が 4.65-5.11 logCFU/mL、腸内細菌科菌群が 3.83-3.90 logCFU/mL、大腸菌群が 3.32-4.07 logCFU/mL、大腸菌が 3.28-3.41 logCFU/mL、黄色ブドウ球菌が 2.90-3.00 logCFU/mL であった。生乳検体と比較して、衛生指標菌数は全体的に 1~2 logCFU/mL 程高い傾向が認められた。

製品 2 種計 6 検体については、一般細菌を含む全試験項目で陰性を示した。

(ii) 施設環境拭き取り検体 (表 1)

これまでに他施設にて得られた結果を踏まえ、本研究では充填機内外環境を製品への微生物交叉汚染を生じ得る工程・箇所と想定し、拭取り検体を確保し、微生物試験に供した。製造開始前 (洗浄消毒後) において、一般細菌数はマガジンラック 2 検体、充填機内部、充填機外部、ノズルメッシュの各 1 検体より検出され、それぞれの菌数は、2.23 log

CFU/100cm²、1.45 log CFU/100cm²、1.98 log CFU/100cm²、2.29 log CFU/100cm²、1.15 log CFU/100cm²であった。一方、製造終了後・洗浄消毒前の段階で採材した検体のうち、マガジンラック 2 検体からはそれぞれ 2.95 log CFU/100cm²、3.47 log CFU/100cm²の一般細菌が検出された。このほか、腸内細菌科菌群は充填機周辺外環境の 1 検体から 1.15 log CFU/100cm²と僅かながら検出された。大腸菌群、大腸菌及び黄色ブドウ球菌はいずれの検体からも検出されなかった。

2. 菌叢解析

食品の製造工程を通じた検体の構成菌叢解析は、温度管理不備等に起因する微生物増殖や、工程中での交叉汚染の発生等を予測するためのツールとして活用されつつある。本研究では、各検体より Total DNA を抽出し、16S rRNA 菌叢解析に供した。製品関連検体並びに施設環境検体における結果は以下のとおりである。

1) 生乳、中間・最終製品検体の構成菌叢

上記検体の構成菌叢に関する知見を得るため、16S rRNA 菌叢解析を実施した。対象検体からは、計 45 門(Phylum)、87 綱(Class)、169 目(Order)、386 科(Family)、1768 属(Genus)が検出された。

①生乳検体

Phylum 階層では、*Firmicutes* が 44.19% と最も高い占有率を示し、*Proteobacteria* が 29.95%とこれに続いた(図 3A)。

Family 階層では *Rhodocyclaceae* が 24.74%と最も高い占有率を示し、腸内細菌科菌群の占有率は 0.05%に留まった(図 3B)。

Genus 階層では *Thauera* が最も高い占有率を示し(平均値 24.60%)、*Romboutsia* がこれに続いた(同 10.18%) (図 3A)。腸内

細菌科菌群の中では *Serratia*、*Klebsiella*、*Mangrovibacter*、*Rahnella*、*Cedecea*、*Enterobacter*、*Escherichia/Shigella* 等が優勢であった(図 3C)。

②殺菌前乳検体

Phylum 階層では、*Proteobacteria* の占有率は生乳検体と同等であった(平均値 28.90%) (図 3A)。また、*Firmicutes* の占有率は生乳検体に比べて増加を認めた(平均値 58.00%) (図 3A)。

Family 階層では *Streptococcaceae* が最も高い占有率を示し、殺菌前乳検体の平均値は 27.24%であった(図 3B)。また、同検体では腸内細菌科菌群の占有率が生乳検体に比べて著しく高値を示し(平均 21.04%、図 3B)、その構成菌属は、*Serratia* 及び *Raoultella* が優勢であったほか、生乳検体での占有率が 0.01%未満であった *Escherichia/Shigella* の占有率も平均 0.53%へと増加していた(図 3C)。

③製品検体

Phylum 階層において、*Firmicutes* の占有率の平均値は製品 A で 69.02%、製品 B で 72.18%であった(図 3A)。

Family 階層において、製品 A、B 検体中に占める腸内細菌科菌群の割合は、それぞれ 9.38%、8.38% (共に平均値)であった(図 3B)。また、殺菌前乳検体と同様、*Streptococcaceae* が最も優勢な菌科として検出された(図 3B)。

Genus 階層では、殺菌前乳検体と同様に *Streptococcus* が最も優勢であったほか、腸内細菌科菌群の主たる構成菌属である *Raoultella* や *Serratia* の占有率も殺菌前乳検体と概ね同等であった(図 3C)。

上記の検体について、Phylum 階層の結果を基に、主成分分析を行ったところ、殺菌前乳検体及び製品検体は、生乳検体に比べて、

相対的に近似性を示した (図 4)。

2) 施設環境拭取り検体の構成菌叢

各拭取り検体における構成菌叢分類を図 5 に示した。

全体の成績として、Family 階層では、*Microbacteriaceae* が最も高い占有率を示した (平均値 34.67%、図 5A)。製造前後での比較を通じ、製品に直接接触する充填ノズル及びノズルメッシュでは、*Pseudomonadaceae* の占有率が製造後に顕著な増加を認めたほか、カートンの底部を形成し、充填装置に送り込むマンドレルでは *Methylobacteriaceae* の占有率が同様に製造後に増加していた (図 5A)。また、製造前の充填機内外表面拭取り検体からは *Moraxellaceae* が製造後に比べて顕著に高い占有率で検出された (図 5A)。

製造後の充填ノズル及びノズルメッシュ検体で優勢であった *Pseudomonadaceae* は主として *Pseudomonas* 及び *Pseudoclavibacter* から構成されていた (図 5B)。また、製造後のマンドレルで高い占有率を示した *Methylobacteriaceae* は主に、*Methylobacterium* により構成されていた (図 5B)。このほか、製造前の充填機内外表面拭取り検体で検出された *Moraxellaceae* は主に *Acinetobacter* により構成され、他に *Moraxella*、*Enhydrobacter* 等が含まれていた (図 5B)。最終製品で最も高い占有率を示した *Streptococcus* は、製造前後のマガジンラック及び製造後のノズルメッシュより相対的に高い占有率で検出された (図 5B)。このほか、製造後の充填ノズルからは同じく相対的に高い占有率で *Listeria* が検出された。

3. 保存試験を通じた、生乳及び製品検体中の

衛生指標菌動態

一昨年度の検討では、他施設で受け入れられた生乳を対象とした保存試験を行い、各衛生指標菌の増殖挙動を経時的に評価することで、生乳受入れ時の糞便汚染指標菌として腸内細菌科菌群を用いることが安定性等の点で有用である可能性が示唆されていた。本研究では、生乳検体を 5°C、15°C、25°C 下で 0、1、2、5 日間保存した際の衛生指標菌挙動を定量評価し、上述の他施設における評価結果との整合性を評価することで、適切な糞便汚染指標菌の選定の在り方を議論するための基礎知見の集積を図ることとした。以下に生乳検体中における各指標菌の動態に関する結果を示す。

①一般細菌数

保存 0 日目に 3.99-4.16 log CFU/mL であった生乳検体中の一般細菌数は、5°C 下では保存 1 日後に 3.97-4.22 log CFU/mL、2 日後に 4.22-4.37 log CFU/mL、5 日後には 4.98-5.47 log CFU/mL と微増した。15°C 下では、1 日後に 4.35-4.79 log CFU/mL と微増であったが、2 日後には 7.32-7.38 log CFU/mL、5 日後には 9.82-9.94 log CFU/mL と顕著な増加を示した。25°C 下では、1 日後に 7.85-8.01 log CFU/mL、2 日後に 10.10-10.33 log CFU/mL と極めて顕著な増加を示した。

②腸内細菌科菌群数

0 日目に 2.06-2.16 log CFU/mL であった腸内細菌科菌群数は、5°C 下では 1 日後に 2.04-2.18 log CFU/mL、2 日後に 1.90-2.16 log CFU/mL と顕著な変化を認めなかったが、5 日後には 4.02-4.27 log CFU/mL と顕著な増加を認めた。15°C 下では、1 日後に 2.95-3.43 log CFU/mL と微増し、2 日後には 6.79-6.87 log CFU/mL、5 日後には 9.00-9.29 log CFU/mL と著しい増加を認めた。25°C 下

では、1日後に 7.78-7.93 logCFU/mL、2日後に 9.49-9.61 logCFU/mL となる等、迅速な増加を認めた。

③大腸菌群

大腸菌群数は、5°C、15°C、25°Cのいずれの温度帯でも、腸内細菌科菌群数と類似した挙動を示した。すなわち、保存0日目に 1.85-2.02 logCFU/mL であった大腸菌群数は、5°C下では1日後で 1.85-2.10 log CFU/mL、2日後には 1.90-2.18 logCFU/mL と大きな変動は示さなかったが、5日後には 3.90-4.26 logCFU/mL となった。15°C下では1日後に 3.24-3.92 logCFU/mL と微増し、2日後には 6.84-6.95 logCFU/mL と顕著な増加を示した。25°C下では、1日後で 7.70-7.93 logCFU/mL、2日後には 9.50-9.54 logCFU/mL へと増加した。

④大腸菌

保存0日目において、大腸菌は3検体中2検体から検出され、最大菌数は 1.18 logCFU/mL であった。5°C下で5日保存後の最大菌数は 1.48 logCFU/mL となり、明らかな菌数増加は認められなかった。一方、15°C下では、保存1日後に 1.95-2.18 logCFU/mL と微増を示し、2日後には 4.39-4.46 logCFU/mL、5日後には 5.57-5.65 logCFU/mL へと増加した。25°C下では、保存1日後には既に 6.28-6.34 logCFU/mL と顕著な増加を示し、2日後には 8.14-8.67 logCFU/mL へと増加した。

⑤黄色ブドウ球菌

保存0日目に 2.64-2.73 logCFU/mL であった黄色ブドウ球菌数は、5°Cで保存5日後で 2.53-2.54 logCFU/mL となり、顕著な変動は示さなかった。一方、15°C下では保存1日後で 2.60-2.74 logCFU/mL、2日後で 3.41-3.69 logCFU/mL、5日後には 5.30-5.71 logCFU/mL となった。25°C下では保存1日

後で 4.66-5.02 logCFU/mL、2日後で 5.78-6.91 logCFU/mL と顕著に増加し、5日後には 6.48-6.74 logCFU/mL となった。

加えて、全ての衛生指標菌が不検出となった製品検体についても、生乳検体と同様に、25°C下で5日間保存後、改めて各衛生指標菌の検出試験を行い、潜在的な細菌汚染の可能性を評価した。その結果、25°C下での5日間培養後には一般細菌が検出され、製品検体中に僅かながらも生菌が存在した可能性が示唆された。

D. 考察

本研究では、ある牛乳製造施設における製造工程管理の妥当性を評価するため、複数工程で検体を確保し、培養法である衛生指標菌の定量検出試験と非培養法である 16S rRNA 菌叢解析を併用することで、同工程を通じた微生物挙動を解析した。

生乳及び中間・最終製品検体を対象とした衛生指標菌検出試験を通じ、生乳検体に比べ殺菌前検体は一般細菌数のほか、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数が何れも有意な増加を示し、生乳受入れから加熱殺菌に至る工程での温度や時間の管理若しくは設備器具の清浄性確保等に何らかの課題があると推察された。菌叢解析においても *Serratia* や *Raoultella* 属に加え、*Escherichia/Shigella* 等の腸内細菌科菌群に分類される菌属の明確な占有率増加を認めた。当該工程での管理の逸脱の有無は現時点では明確ではないが、当該検体の採材対象となったロットの製造記録を確認したところ、生乳受入れから殺菌までの所要時間は約3時間であり、当該時間枠での著しい微生物増殖が 10°C以下で発生したとは想定し難いと考えられる。事業者への聴取を通じ、殺菌前乳検体は通常使用しないコックを開けて採材されており、

採材時の交叉汚染が発生した可能性も考えられた。一方、同一ロットの製品検体と殺菌前乳検体の構成菌叢は近似していることを踏まえると、大規模な交叉汚染が発生した可能性は少ないとも考えられる。

生乳の冷蔵保存を通じた各指標菌の増殖挙動データより、腸内細菌科菌群の安定的な生残、増殖が確認された。同法は大腸菌群試験法に比べ、迅速に結果判定が行える利点があり、欧州圏内の牛乳製造施設ではこの腸内細菌科菌群が製造工程管理上の糞便汚染指標として用いられている実態を踏まえると、腸内細菌科菌群定量試験法は、原乳や牛乳の微生物学的品質の評価や、牛乳製造施設環境の衛生状況を判断する上で有用と考えられ、現在乳等省令で定められている大腸菌群の代替として、同指標菌を採用することは意義が高いものとも思料される。

また、製品検体から全ての指標菌は検出されなかったが、保存試験を通じ、製品検体では僅かながら一般細菌汚染の可能性が示唆された。牛乳製品のうち、無菌性を担保する品目は、無菌充填包装を行う常温保存可能な牛乳（いわゆる LL 牛乳）に限定されるものではあるが、直接培養法による一般細菌不検出の背景には、急激な温度変化（冷却）に伴い、同検体に含まれた細菌が損傷状態或いは生きていないが培養できない（Viable but non-culturable）状態に移行した可能性も想定される。本成績は、損傷状態を引き起こしていると想定される細菌を含む食品検体に対する微生物試験の在り方を今後検討すべき点を提示していると考えられる。なお、対象施設では UHT 殺菌処理が行われており、通常では損傷状態等は発生しないものと推察されるが、製品検体における一般細菌汚染の可能性は、以降の工程、特に充填工程での交叉汚染によるかもしれない。

充填工程環境に関連し、低温増殖性を示す *Acinetobacter* や *Pseudomonas* は乳検体のほか、施設環境拭取り検体からも広範に検出された。これらの細菌は耐熱性の Protease や Lipase を産生することから、当該菌或いはその代謝産物である酵素群は、牛乳及び乳製品における変敗腐敗の主因と目される^{5,6)}。菌叢解析結果として、*Pseudomonas* は殺菌前乳検体で認められ、製品検体でも減少傾向ながら検出された。同属菌は充填ノズルメッシュから極めて高い占有率で検出されたほか、充填ノズルや充填機内外表面でも製造後には製造前に比べ相対的に占有率を増加させており、同属菌の製品汚染が充填工程で生じた可能性が示唆される。今後、当該製品並びに充填環境での *Pseudomonas* 汚染状況に関する検討を行うことにより、腐敗変敗の可能性の判定並びに汚染発生工程の特定に繋がるものと推察された。

充填機内外表面の構成菌叢は製造前には一定の差異が認められたが、製造後には大きな差異を認めなかった。このことは、製造工程を通じ充填機内表面が外表面と同機外表面と同様の微生物環境となった可能性が示唆され、製造工程中の充填機内部の密閉性が担保されているかを確認する必要があると思われる。

施設環境拭取り検体を対象とした衛生指標菌検出試験を通じ、製造開始前の段階で充填機外部より腸内細菌科菌群が僅かながらも検出されたことは、当該施設環境の清浄性確保に努める必要性を指し示した結果と言えよう。また、充填機内部環境拭取り検体のうち、マガジンラックでの一般細菌数は、他部位に比べて相対的に高く、外環境と同等の菌数を示したことから、これらの部位の洗浄・消毒を更に徹底することも衛生管理向上に向けた検討課題の一つと考えられる。

以上、加熱殺菌後工程で想定される交叉汚染箇所として、充填環境の清浄化を更に進め、その検証を行うことは、対象施設での牛乳製品製造に係る衛生管理の向上に資するものと考えられる。腐敗変敗の直接的な指標と想定される低温細菌由来酵素活性の耐熱性に関する評価手法は研究段階に留まっており、牛乳製品の腐敗変敗の制御を果たし、品質保持期限設定の根拠創出を明確化する上で、今後検討すべき事項と史料される。

E. 結論

本研究では、腐敗変敗等の苦情が寄せられた牛乳製品の製造施設における製造工程管理の実態を確認し、改善に資する知見を得るため、製造工程並びに施設環境拭取り検体を入手し、微生物学的観点から調査を行った。衛生指標菌試験及び菌叢解析を通じ、生乳受入れから加熱殺菌に至る工程での微生物増殖の可能性が示唆される知見を得たことは、同工程での管理実態を精査する必要性が改善に向けた検討事項として抽出された。また、充填工程ではマガジトラック等の清浄度は十分とは言い難く、製品への微生物交叉汚染の防止に資する改善策としてこれらの洗浄消毒方法を改めて検討する必要性を示す根拠を得た。これらの点については今後の改善指導に向けた知見として活用されることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 引用文献

- 1) 坂本美穂ら. 乳・乳製品の苦情事例. 東京衛研年報. 2001;52:133-137.
- 2) 目黒区. 食品衛生 苦情処理事例集 事例 6. 牛乳がヨーグルトのようになった. https://www.city.meguro.tokyo.jp/kurashi/hoken_eisei/eisei/shokuhin/jireishu/jirei6.html
- 3) 安福潔ら. 総合衛生管理製造過程承認施設における賞味期限延長型牛乳細菌汚染事例の原因究明ならびに HACCP による衛生管理の問題点. 日本食品微生物学会雑誌. 2013;30:116-124.
- 4) George GM, Don BJ, Noel KR, James ST. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2. Springer.
- 5) Fusco V *et al.* Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020;19(4):2013-49.
- 6) von Neubeck M *et al.* Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *Int J Food Microbiol.* 2015;211: 57-65.

表 1. 施設環境拭取り検体における衛生指標菌の検出状況.

| 検体 | 検出菌数 (logCFU/100cm ²) | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------------------------|-------------------|---------|-----|------|-----|-----|-----|---------|-----|----|
| | 細菌数 | | 腸内細菌科菌群 | | 大腸菌群 | | 大腸菌 | | 黄色ブドウ球菌 | | |
| | 製造前 ^{※1} | 製造後 ^{※2} | 製造前 | 製造後 | 製造前 | 製造後 | 製造前 | 製造後 | 製造前 | 製造後 | |
| マンドレル 1 | ND ^{※3} | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| マンドレル 2 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| マガジンラック 1 | 2.23 | 3.47 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| マガジンラック 2 | 1.45 | 2.95 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 充填機中 | 1.98 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 充填機外 | 2.29 | 2.13 | 1.15 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| ノズル 1 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| ノズル 2 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| ノズルメッシュ 1 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| ノズルメッシュ 2 | 1.15 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

※1 製造前, 洗浄消毒後の製造前. ※2 製造後, 製造後の洗浄消毒前. ※3 ND, 不検出.

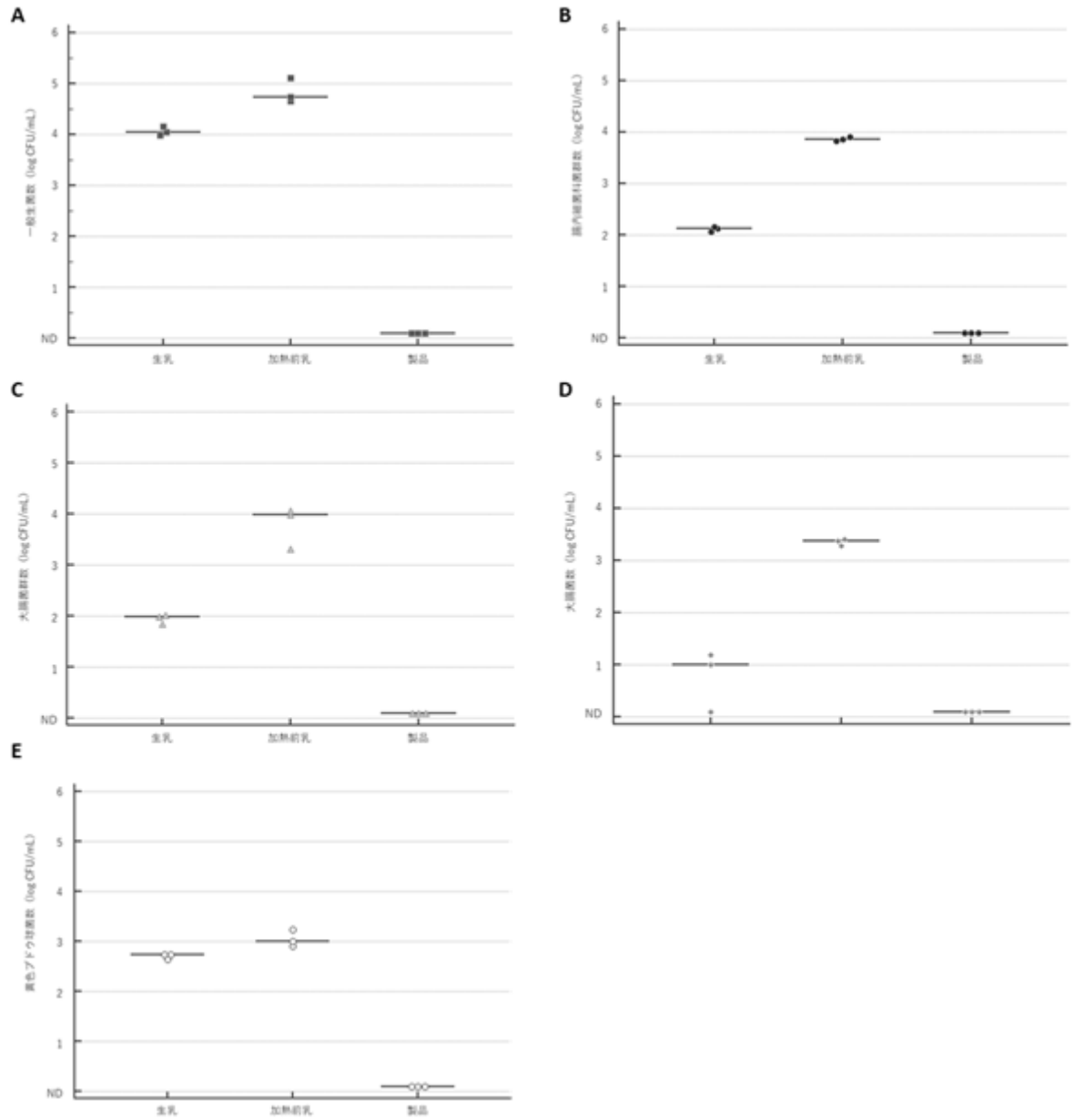


図2. 生乳、中間製品（殺菌前乳）、最終製品の各検体における衛生指標菌の検出状況。A, 一般細菌数；B, 腸内細菌科菌群数；C, 大腸菌群数；D, 大腸菌数；E, 黄色ブドウ球菌数。縦軸は検体 1ml あたりの菌数（対数值）を示す（ND は不検出を示す）。

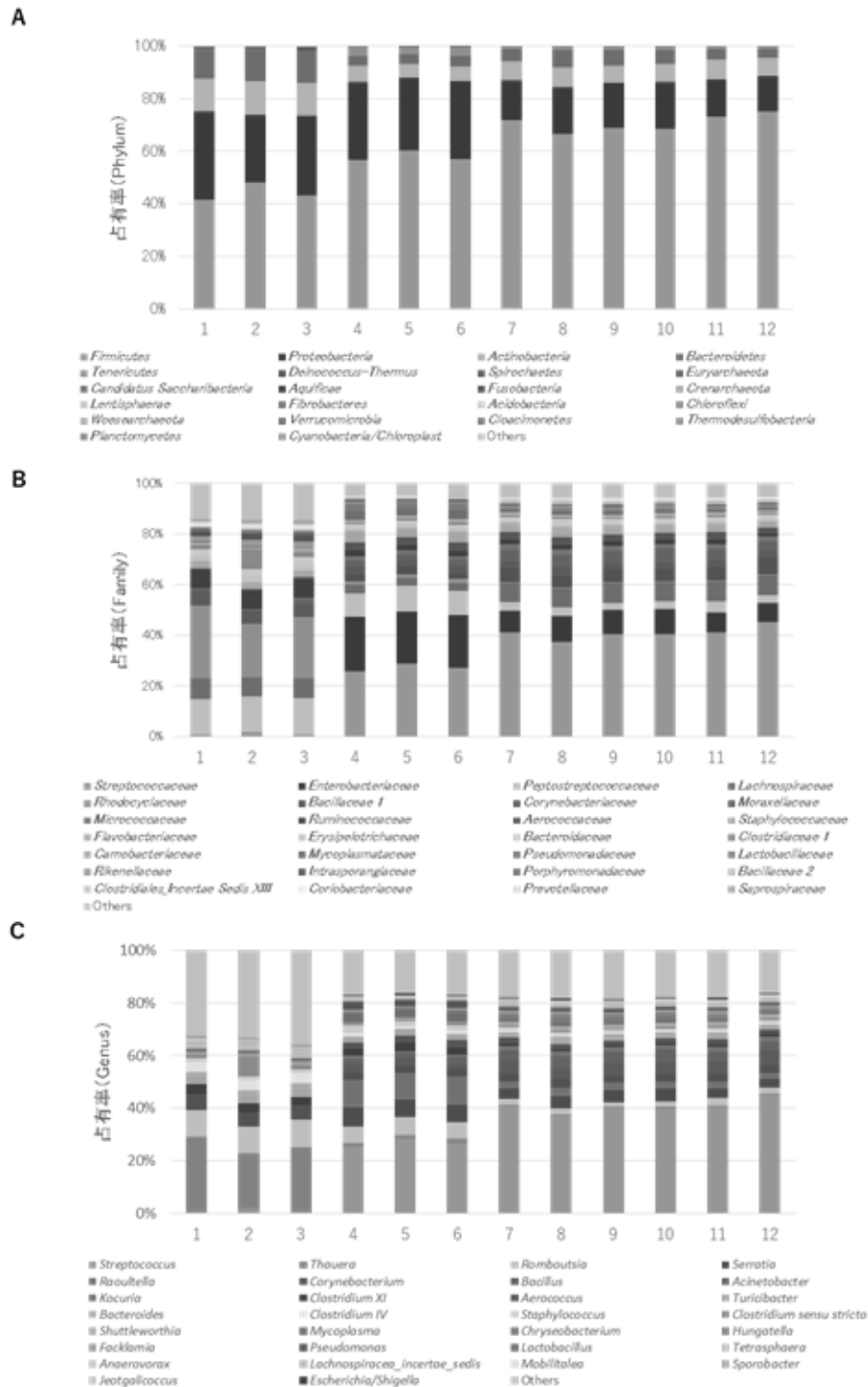


図3. 生乳、加熱前乳及び最終製品の各検体における構成菌叢解析.

セクションA、B、Cにはそれぞれ Phylum、Family、Genus の各階層における構成菌叢の占有率をバーチャートで示す。検体番号 1~3 は生乳検体、4~6 は殺菌前乳検体、7~9 は製品 A 検体、10~12 は製品 B 検体を指す。

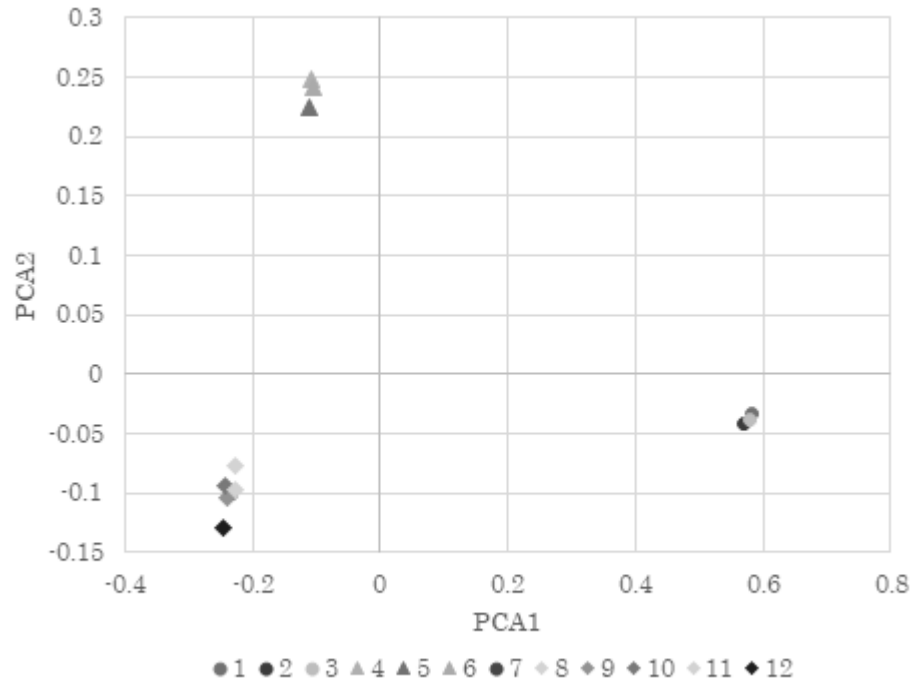


図 4. 生乳、殺菌前乳及び製品検体を対象とした Phylum 階層データに基づく主成分分析図。検体番号 1~3 は生乳検体 (○)、4~6 は殺菌前乳検体 (△)、7~9 は製品 A 検体、10~12 は製品 B 検体 (◇) を指す。

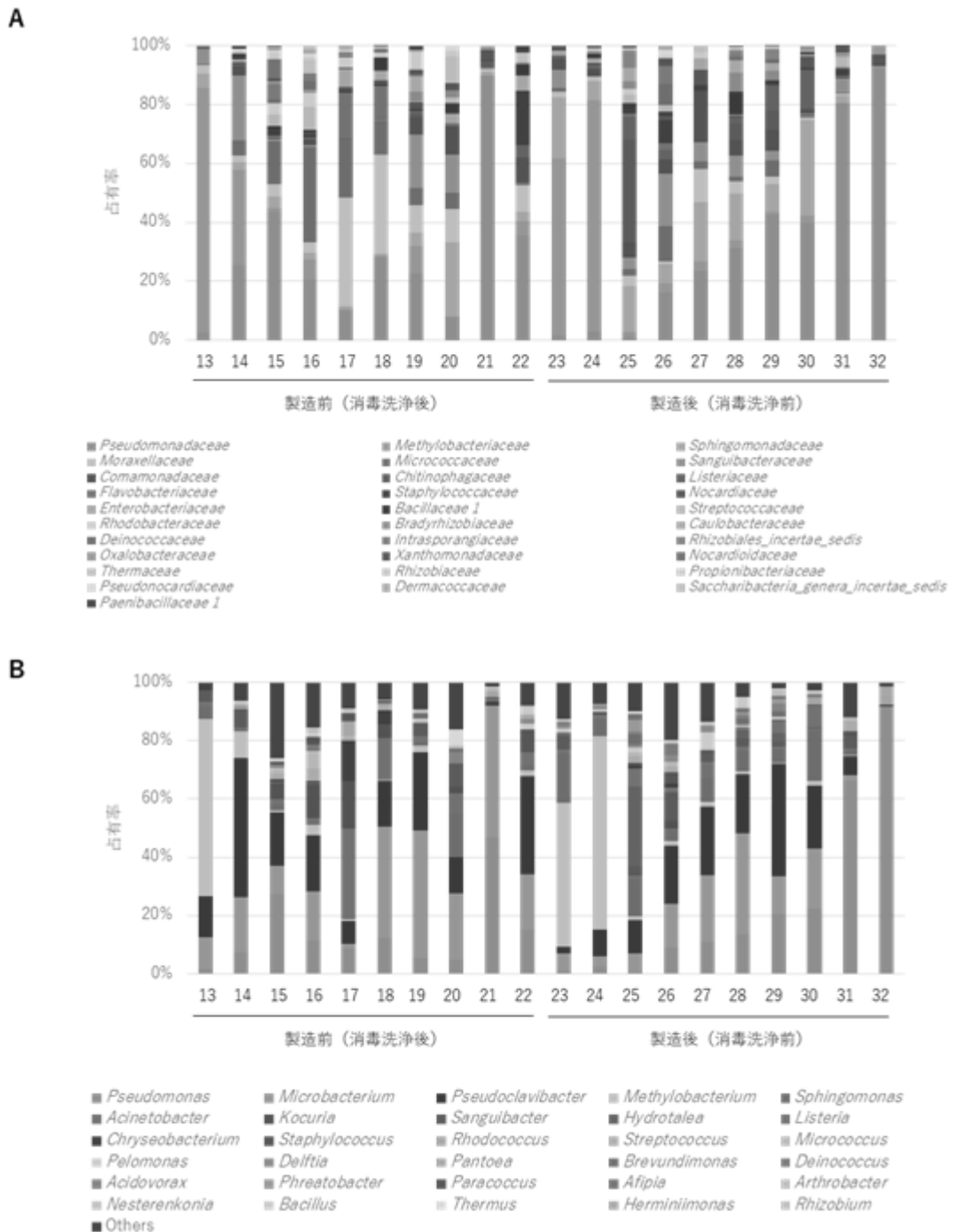


図5. 充填機関連環境検体の構成菌叢解析.

セクション A、B にはそれぞれ Family または Genus 階層における構成菌叢の占有率をバーチャートで示す。検体番号 13/23 はマンドレル 1、14/24 はマンドレル 2、15/25 はマガジンラック 1、16/26 はマガジンラック 2、17/27 は充填機内部、18/28 は充填機外部、19/29 は充填ノズル 1、20/30 は充填ノズル 2、21/31 はノズルメッシュ 1、22/32 はノズルメッシュ 2 を指す。

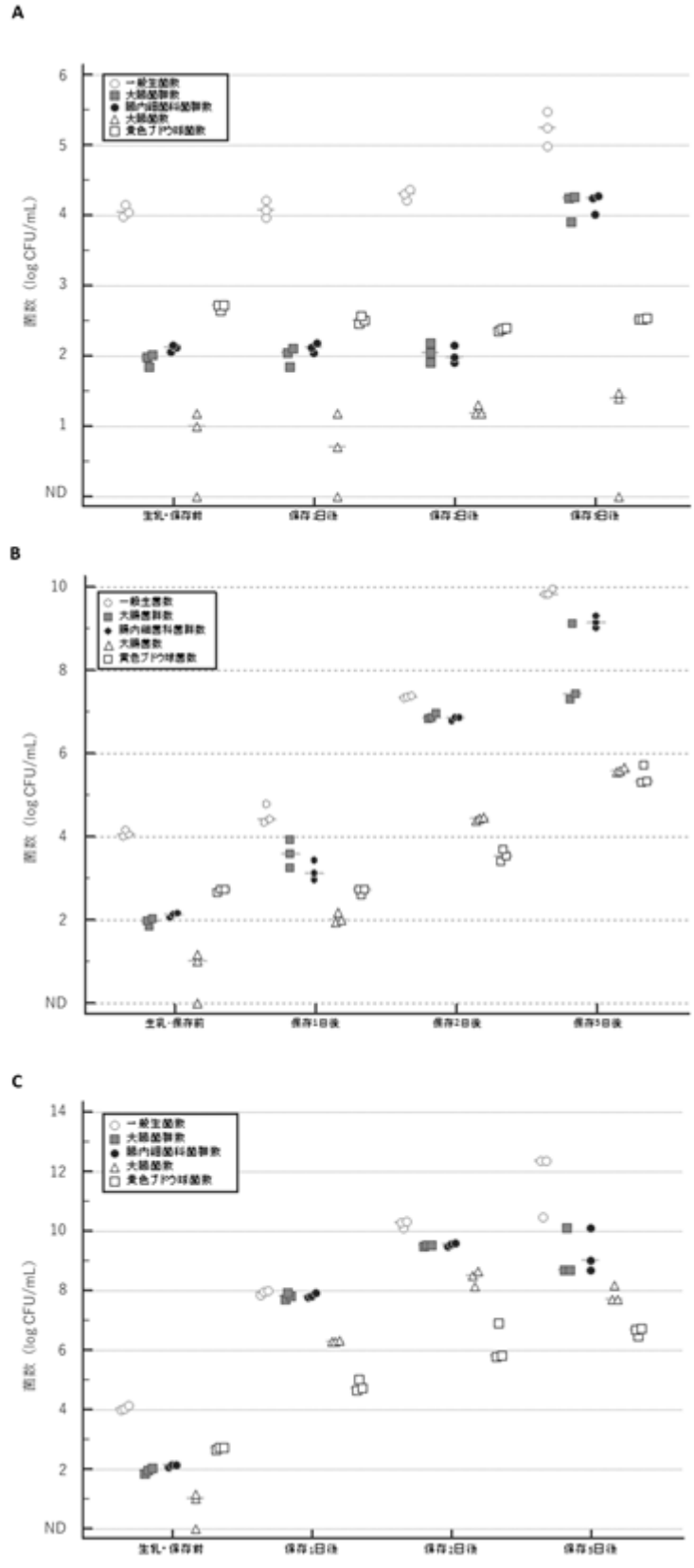


図 6. 保存試験を通じた、生乳検体における衛生指標菌数の経時挙動。セクション A は 5°C、B は 15°C、C は 25°C 下での検出結果を示す。

令和2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：小規模製造施設で製造される乳および乳製品は比較的簡易な施設で製造されているにもかかわらず通信販売等を通じて国内に広く流通している事例も多く、乳衛生管理を考察する上で注視が必要である。小規模製造施設においては特に、製品の差別化のために原材料乳の入手元に多様性がみられる事が明らかになっている。本年度の研究では複数の農場から入手した様々な生乳について加熱殺菌前後における各種衛生指標菌数減少率の解析を行い、原材料乳の性状に多様性がみられる小規模製造施設の製品に対する衛生指標菌種の妥当性について検討を行った。独立した複数の農場から分与頂いたバルク乳および個別の牛個体より採取した生乳について成分分析および細菌叢解析を行った結果、生乳の成分に多様性が見られることが確認された。各乳試料について小規模製造施設で主流となっている低温殺菌条件（65℃、30分間）にて処理を行い、各処理時間における各種衛生指標菌の動態を解析した。その結果、乳の成分によらず大腸菌群数と腸内細菌科菌群数の動態に良好な相関が見られ腸内細菌科菌群についても衛生指標菌として妥当であると考えられた。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背景からも、EU諸国を中心に衛生指標菌の主流となっている腸内細菌科菌群を国内指標菌として採用することは意義の高いものであると考えられ、本研究で得られた結果は本邦の乳製品の衛生管理における国際整合性確保の推進に資するものであると期待する。

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諸国等では、HACCPによる工程管理を前提として、腸内細菌科菌群や β グルクロニダーゼ陽性大腸菌等を衛生指標として用いた衛生管理を行っている。国内においては近年、平成30年の食品衛生法改正の中で示されたHACCPの制度化をはじめとした食品流通のグローバル化に対応した取り組みを行っているが、食品衛生管理を行う上では製造工程の管理に加え、衛生指標に用いる微生物種の妥当性についても国際的整合性への考慮が必要である。

本研究班では昨年度までに、乳および乳製品製造の主要な地域である北海道において、小規模製造加工施設における製造基準や自主管理基準の評価を行うと共に、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実施してきた。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。しかしながらこれらの製品の

一部は北海道ブランドの名のもとで通信販売等を通じて国内に広く流通しており、加えて、観光業が盛んな北海道においては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ている。

昨年度までの調査において、小規模製造施設においては特に製品の差別化（ブランド化）のために原材料乳の入手元を直営農場に限定するなど、製造事業者間で原材料乳の性状に多様性がみられる事が示唆された。また、小規模製造施設で製造される牛乳の殺菌方式については、高温短時間殺菌（HTST）あるいは超高温瞬間殺菌（UHT）が主流である大規模製造施設とは異なり、63～65℃で30分間処理する低温保持殺菌（LTLT）方式であることも明らかとなった。そこで、本年度の研究においては複数の農場から入手した様々な生乳について菌叢解析・成分分析を行った後、低温加熱殺菌による各種衛生指標菌数動態の解析を行うことで、多様性を持った小規模製造施設の製品に対する衛生指標菌種の妥当性についての検討を行った。

B. 研究方法

1. 生乳検体

北海道内の1農場にて個別の牛個体より採取した生乳（以下、個体乳）15検体を分与頂いた。加えて、北海道内の独立した10農場よりバルク乳を分与頂いた。全ての乳検体は採取後に密閉容器にて冷蔵温度帯で輸送し、試験実施まで4℃以下で保管した。

2. 乳性状検査

試料を冷蔵にて十勝農業協同組合連合会畜産部畜産検査センターに送付し、

CombiFoss FT+600 システム (FOSS 社) により乳脂肪分、無脂乳固形分、タンパク質分、乳糖分、体細胞数、尿素体窒素濃度、遊離脂肪酸濃度、乳中ケトン体濃度の測定を行った。加えて、試料を冷凍後、株式会社生物技研に送付し、以下の概要で 16S rRNA V3/V4 領域に基づく細菌叢解析を行った。試料を VD-250R Freeze Dryer (TAITEC) を用いて凍結乾燥後、粉碎し Lysis Solution F (ニッポンジーン) を添加した後、Shake Master Neo (bms) を用いて、1,500 rpm で 2 分間粉碎した。破碎したサンプルを、65°C で 10 分間加熱処理した後、12,000 x g で 1 分間遠心分離を行い、上清を分取し、MPure-12 システムと MPure Bacterial DNA Extraction Kit (MP Bio) を用いて、DNA を精製した。その後、株式会社生物技研が提供する 2-step tailed PCR 法を用いてライブラリーを製作し、MiSeq システムと MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用いて、2x300 bp の条件でシーケンシングを行った。FASTX-Toolkit (ver. 0.0.14) の fastx_barcode_splitter tool を用いて、得られたリード配列の読み始めが使用したプライマー配列と完全に一致するリード配列のみを抽出した。プライマー配列に N-mix を含む場合、N の数(フォワード側 6 種類 x リバーズ側 6 種類 = 36 種類)を考慮して、この操作を繰り返した。抽出したリードからプライマー配列を FASTX-Toolkit の fastx_trimer で削除した後、sickle (ver. 1.33) を用いて品質値が 20 未満の配列を取り除き、40 塩基以下の長さとなった配列とそのペア配列を破棄した。ペアエンドリード結合スクリプト FLASH (ver.

1.2.11) を用いて、結合後の配列長 410 塩基、リードの結合長 280 塩基、最低の重なりを 10 塩基の条件でリードを結合し、Qiime2 (ver. 2020.8) の dada2 プラグインでキメラ配列とノイズ配列を除去した後、代表配列と OTU 表を出力した。

3. 加熱殺菌による衛生指標菌数動態検査

試料を乳温度 65°C まで加熱後に 10 分、20 分および 30 分間保持した試料および、未加熱の試料について下記の概要にて衛生指標菌数の検査を実施した。試料を生理食塩水を用いて適宜段階希釈した後、一般生菌数 (3M™ ペトリフィルム™ 生菌数測定用プレート (AC プレート) にて 32°C, 48 時間培養)、腸内細菌科菌群数 (3M™ ペトリフィルム™ 腸内細菌科菌群数測定用プレート (EB プレート) にて 37°C, 24 時間培養)、大腸菌数 (3M™ ペトリフィルム™ E. coli および大腸菌群数測定用プレート (EC プレート) にて 35°C, 48 時間培養)、大腸菌群数 (3M™ ペトリフィルム™ E. coli および大腸菌群数測定用プレート (EC プレート) にて 35°C, 24 時間培養) についてそれぞれの乳試料 1 mL あたりの CFU を算出した (検出下限 1 CFU/mL)。

C. 結果

1. 乳の性状検査

多様な性状の生乳検体を確保する目的で、個別の牛個体より採取した生乳 (個体乳) 15 検体 (乳検体 1 - 15) および、独立した 10 農場よりバルク乳 10 検体 (乳検体 16 - 25) を入手し、試験に供した。

乳の性状検査項目として、主要な乳成分である乳脂肪分、無脂乳固形分、タンパク質分、乳糖分を解析し (図 1, A)、加えて

乳房炎の指標の一つである乳中の体細胞数 (図 1, B) および、乳牛の栄養状態の指標として用いられている尿素体窒素濃度 (図 1, C)、遊離脂肪酸濃度 (図 1, D)、乳中ケトン体濃度 (図 1, E) を解析した。乳脂肪分は最大値 8.22%、最小値 2.56%の間で、無脂乳固形分は最大値 10.11%、最小値 8.25%の間で、タンパク質分は最大値 5.20%、最小値 2.73%の間で、乳糖分は最大値 4.63%、最小値 3.91%の間でサンプルによって様々な値をとっており、また、これらの指標の中では乳脂肪分の変動が最も大きかった (図 1, A)。乳中の体細胞数については最大値 3734×10^4 /mL、最小値 38×10^4 /mL、尿素体窒素濃度については最大値 16.1 mg/100 mL、最小値 7.2 mg/100 mL、遊離脂肪酸濃度については最大値 2.18 mmol/100gFAT、最小値 1.84 mmol/100gFAT、乳中ケトン体濃度については最大値 0.20 mmol/L、最小値 0.06 mmol/L の間で変動していた。

更に、乳試料中の細菌叢構成について解析を行った。個体乳については 15 検体中 6 検体 (乳検体 4, 6, 8, 11, 12 および 14) を、バルク乳については 10 検体全てを 16s rRNA 菌叢解析に供したところ、検体ごとに異なった細菌叢構成となっており試験に供した生乳試料が多様な検体であることが確認された (図 2)。Family 階層において腸内細菌科に属する菌が検出された検体は乳検体 6, 8, 16, 17, 19, 21 および 24 であった。

2. 加熱殺菌による衛生指標菌数動態の解析

小規模製造施設において主流の加熱殺菌温度である 65°C 下で衛生指標菌数の動態

について検証を行った。各試料を 65°C の条件下で 10 分間、20 分間および 30 分間処理した後に、4 種類の衛生指標菌数を検証したところ、全ての乳検体の一般生菌数で 10 分以内に $2 \log_{10}$ CFU/mL 以上の低下を観察した (図 3)。糞便汚染の指標として国内で用いられている大腸菌群数と EU 諸国で用いられている腸内細菌科菌群数を比較したところ、多くの検体で加熱前の試料および各加熱時間後の試料の両者において腸内細菌科菌群数の方が高い傾向が認められた。加熱時間に対する減少率については、多くの試料において大腸菌群数と腸内細菌科菌群数の間で良好な相関が確認された。しかしながら、乳検体 2 では腸内細菌科菌群が検出されなかった一方で低濃度ながらも熱耐性の大腸菌群が検出され、また、乳検体 24 については逆に大腸菌群が検出されなかった一方で高濃度の熱耐性腸内細菌科菌群が検出された。

D. 考察

我々の昨年度までの研究で、小規模製造施設では施設ごとに異なった独自の農場より原材料乳を入手していることを明らかにし、この結果から原材料乳の状態に多様性があることが示唆された。そこで、本年度の研究では複数の農場で搾乳された性状が異なる生乳を試料として、小規模製造施設で主流となっている低温保持殺菌 (LTLT) 方式下での各種衛生指標菌数の動態について検証を実施し、各衛生指標菌の衛生管理評価指標としての妥当性について検討を行った。

先述の様に、現在、わが国の乳及び乳製品については、乳等省令に基づき生菌数

(一般生菌数)に加え、病原微生物による汚染度を推察する指標として大腸菌群が採用されている。一方で EU 諸国においては腸内細菌科菌群を指標とした評価が行われており、食品衛生の国際的な整合性確保の観点からこれらの相違あるいは同等性についての検証が望まれている。小規模製造施設における製造形態をモデルとして実施した本解析の結果から、大部分の乳試料において低温保持殺菌条件下における大腸菌群数と腸内細菌科菌群数の動態に良好な相関が確認された。併せて低温殺菌前後において大腸菌群に比較して腸内細菌科菌群の検出率が高い傾向を示す事も確認された。これらの傾向は原材料乳の性状および細菌叢構成の多様性に左右されておらず、この事から、原材料乳の状態に多様性が示唆される小規模製造施設の製品においても各衛生指標菌数の動態が本モデル実験の結果と同様の傾向であるものと推察される。これらの結果は、乳および乳製品の評価指標として現在乳等省令で採用されている大腸菌群の代替として腸内細菌科菌群を利用する事の妥当性を示すものであると考える。

一方で、一部の乳検体においては耐熱性の腸内細菌科菌群の存在が示された(図 3、乳検体 24)。同検体においては一般生菌数についても加熱処理後に多くの生残が確認されている。現在、国内の多くの生乳検査機関において耐熱性細菌数(バルク乳を 63°C、30 分間処理した後に検出される生菌数)をモニタリングする取組みが実施されており、農場における農場衛生および搾乳衛生の向上に役立っている。今後、これらの生乳および農場衛生に関する取り組みと乳製品検査の連携によって、より高度

な乳製品の衛生管理体制を構築していくことが望まれる。

Genus 階層における細菌叢解析結果から、耐熱性腸内細菌科菌群が認められた乳検体 24 においては *Citrobacter*、*Ewingella*、*Morganella*、*Trabulsiella*、*Yersinia* といった腸内細菌科に属する菌が特異的に検出されている(Data not shown)。これらの菌と耐熱性菌出現との相関については今後の検討課題となっている。今後、加熱後の試料から腸内細菌科菌群検査法により分離した菌の詳細な解析を行い、乳の衛生管理上問題となる菌についてより詳細な議論を進めたいと考える。

E. 結論

小規模製造施設の製造形態をモデルとして実施した多様な性状の生乳に対する加熱処理後の衛生指標菌検査において、大腸菌群数と腸内細菌科菌群数の動態に良好な相関が見られた。これらの結果は、小規模製造施設で製造された製品に対する衛生検査指標として腸内細菌科菌群を用いることの妥当性を示す結果であると考え。本結果は乳製品の衛生管理における国際整合性確保の推進に資するものであると期待する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

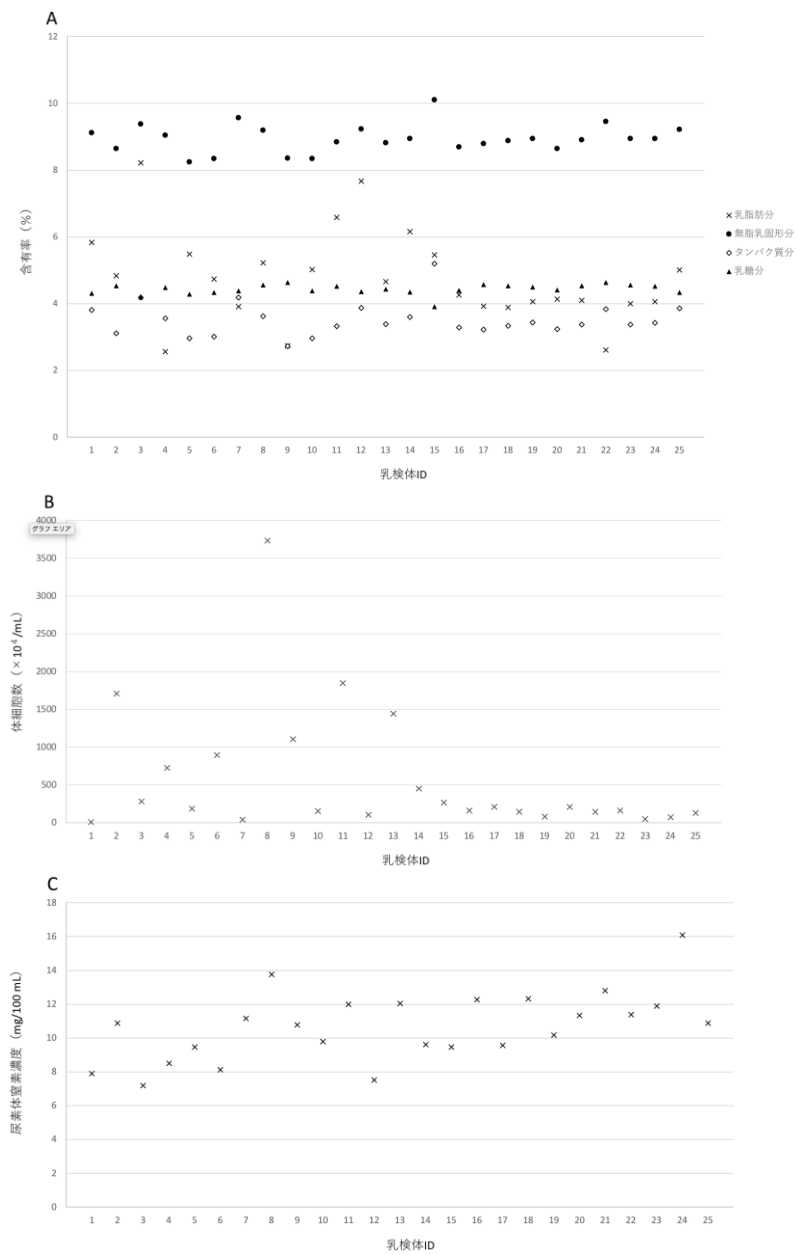


図1 生乳試料の成分分析

各乳検体について乳中の乳脂肪分、無脂乳固形分、タンパク質分、乳糖分 (A)、体細胞数 (B) 尿素体窒素濃度 (C)、遊離脂肪酸濃度 (D)、乳中ケトン体濃度 (E) の解析結果を示した。

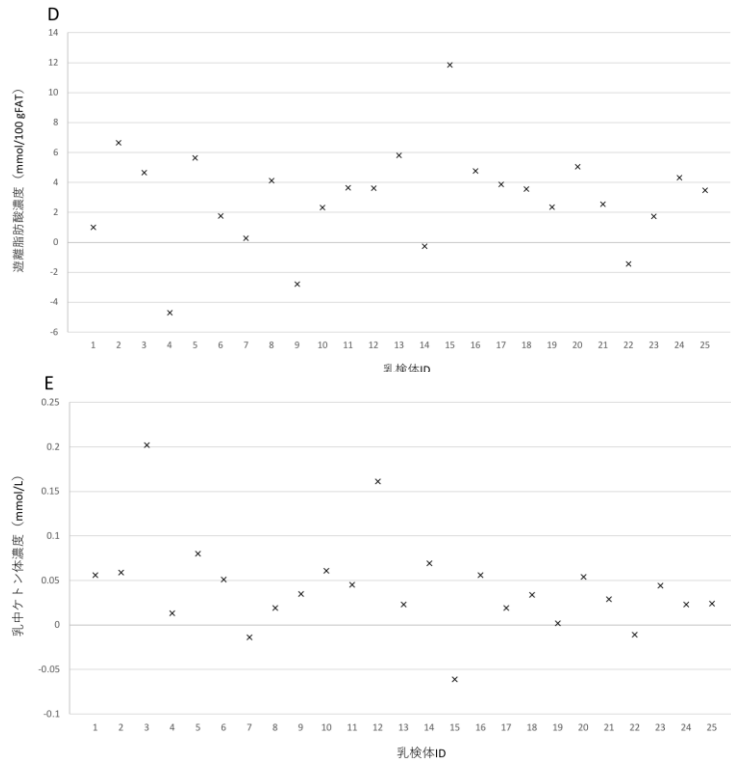


図1 生乳試料の成分分析 (つづき)

各乳検体について乳中の乳脂肪分、無脂乳固形分、タンパク質分、乳糖分 (A)、体細胞数 (B) 尿素体窒素濃度 (C)、遊離脂肪酸濃度 (D)、乳中ケトン体濃度 (E) の解析結果を示した。

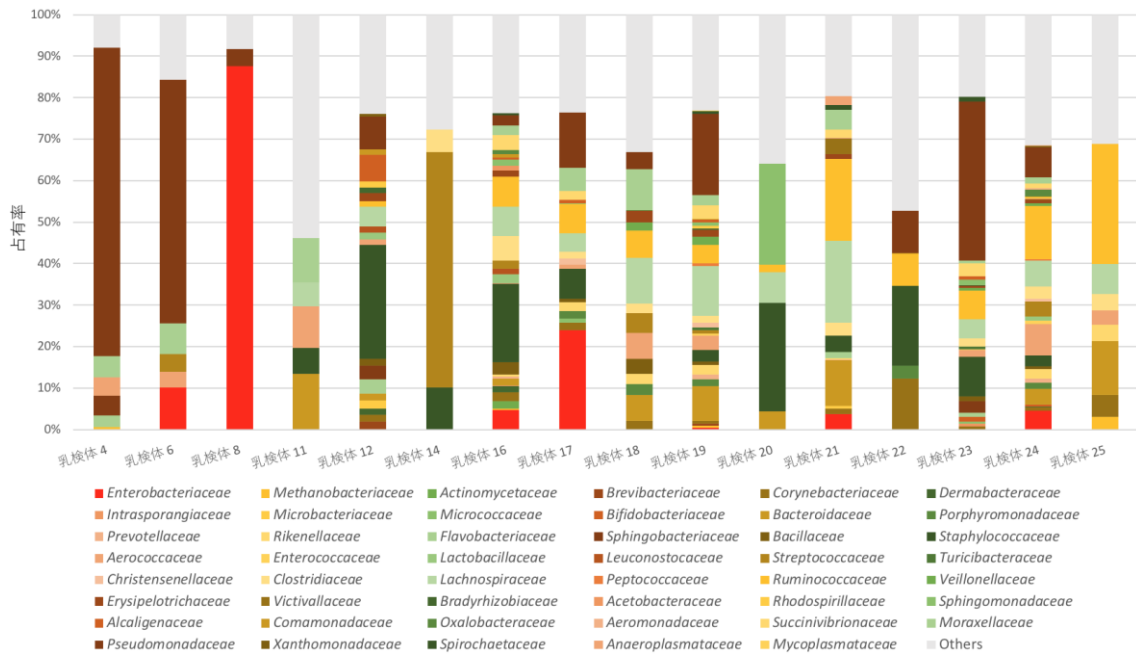


図2 生乳試料の細菌叢解析

Family 階層における構成細菌叢の占有率をバーチャートで示した。

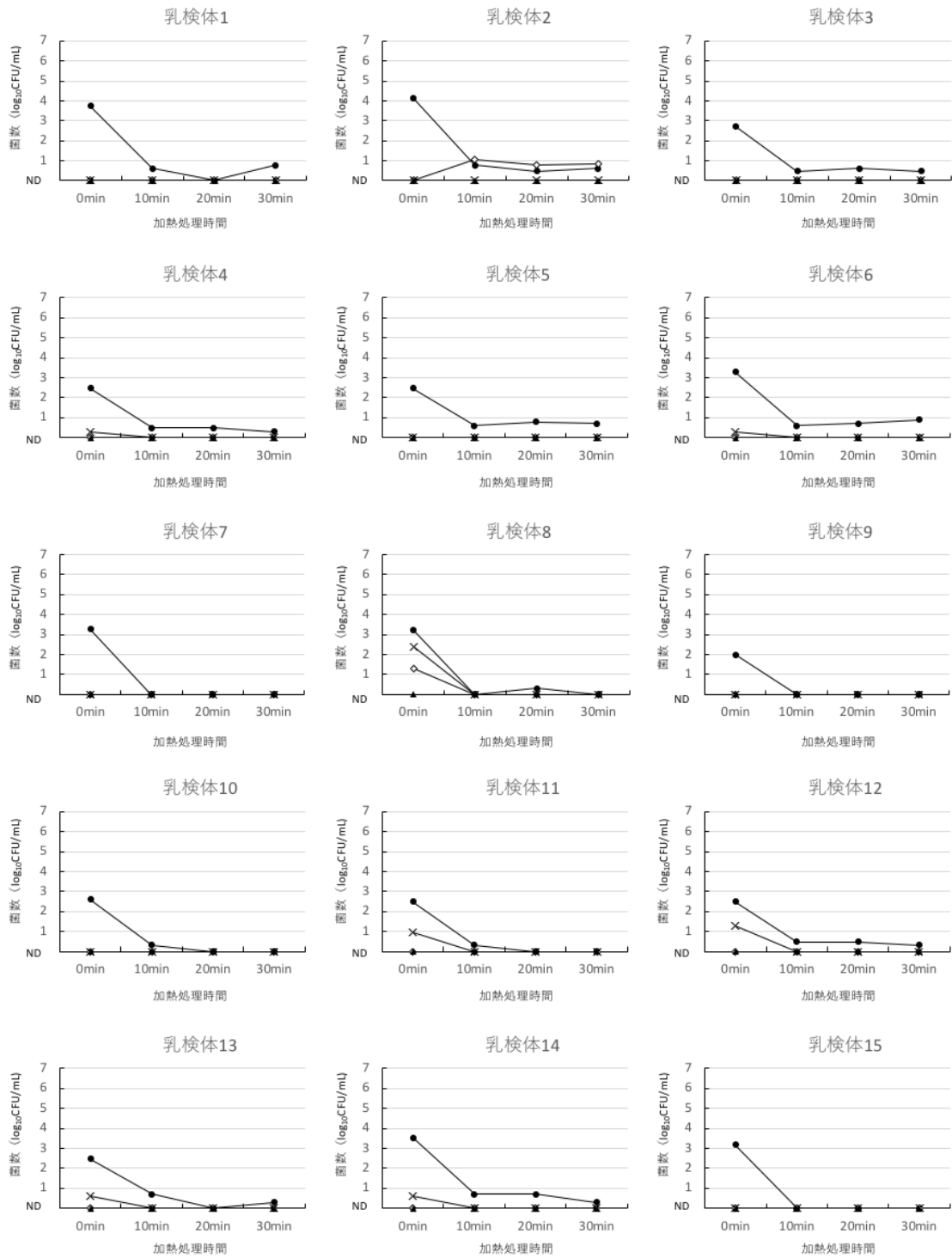


図3 加熱殺菌前後の衛生指標菌数の動態

65°Cで各時間加熱処理した検体の一般生菌数(●)、大腸菌群数(◇)、大腸菌数(▲)および腸内細菌科菌群数(×)の検出結果を示した。NDは検出下限以下を示す。

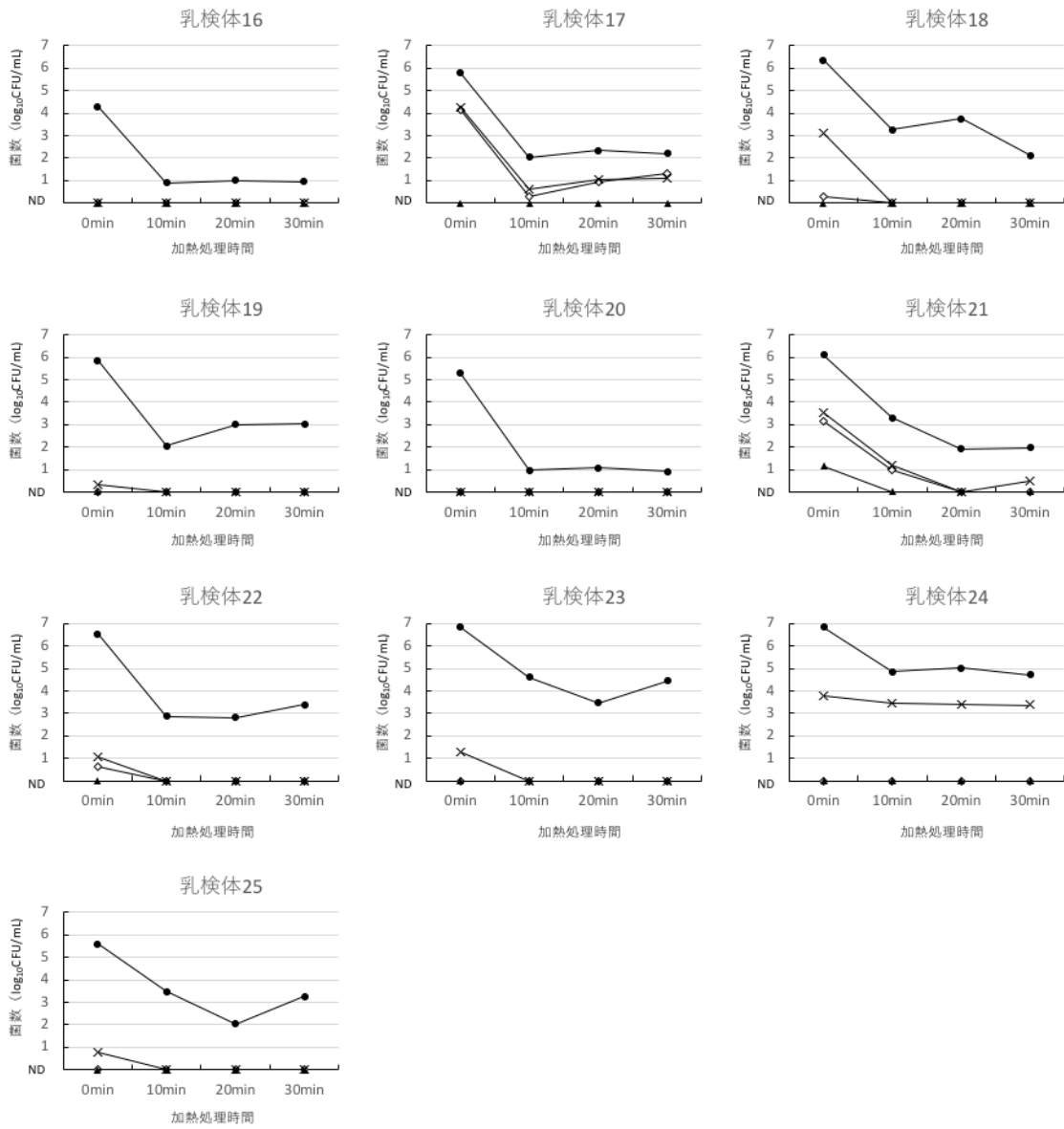


図3 加熱殺菌前後の衛生指標菌数の動態 (つづき)

65℃で各時間加熱処理した検体の一般生菌数 (●)、大腸菌群数 (◇)、大腸菌数 (▲) および腸内細菌科菌数 (×) の検出結果を示した。NDは検出下限以下を示す。

令和2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

バター製品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
窪田邦宏 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部
研究協力者 百瀬愛佳 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
鈴木穂高 茨城大学農学部

研究要旨

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、現時点で不明な点がある。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、本年度はバター製品45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、微生物成分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ず、昨年度までに検討した低温殺菌牛乳及びアイスクリーム類とは異なる傾向を示し、製品特性により損傷菌等の存在状況が異なる可能性が示唆された。

A. 研究目的

日本を含む世界各国において、食品の安全性を確保するために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及び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、その科学的妥当性を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 2 年度は、国内で流通するバター製品を対象として、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、並びに混積培養法の代替法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

1) バター製品の衛生指標菌汚染実態調査及び簡易培地の検討

市販のバター 45 検体について、衛生指標菌汚染実態を調査した。調査は令和 2 年 10 月から令和 3 年 2 月まで行った。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。細菌数については、4 種の簡易培地を用いた。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。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。

2) 諸外国におけるバター等の微生物規格の調査

EU、米国等におけるバター等乳製品の微生物規格をインターネット検索により調査した。また、国際的な食品の微生物規格の作成・改訂について調査した。

C. 研究結果

1) バター製品の汚染実態調査及び簡易培地の検討

今回の調査結果概要を表 1 に示した。バター製品 45 検体の公定法での細菌数（32°C48 時間培養）は、平均 1.645 log CFU/g（検出限界未満～7.407 log CFU/g）であった。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、平均 1.452 log CFU/g（検出限界未満～7.267 log CFU/g）で、簡易培地 1 における細菌数は公定法における細菌数との間に差は見られなかった(p=0.084)。簡易培地 2 については、製品の指示書の従い 32°C24 時間培養で計測を行った。その細菌数は平均 1.361 log CFU/g（検出限界未満～6.236 log CFU/g）であり、公定法と比較してやや低

い傾向が見られた ($p=0.019$)。簡易培地 3 については、細菌数の平均は $1.353 \log \text{CFU/g}$ (検出限界未満 $\sim 5.886 \log \text{CFU/g}$) であり、公定法と比較してやや低い傾向が見られた ($p=0.018$)。簡易培地 4 については、細菌数の平均は $1.389 \log \text{CFU/g}$ (検出限界未満 $\sim 6.326 \log \text{CFU/g}$) であり、公定法と比較して差は見られなかった ($p=0.039$)。ISO 法による細菌数(30°C 72 時間培養)は、平均 $1.635 \log \text{CFU/g}$ (検出限界未満 $\sim 7.248 \log \text{CFU/g}$) 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、差は見られなかった ($p=0.911$)。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、平均 $1.465 \log \text{CFU/g}$ (検出限界未満 $\sim 5.556 \log \text{CFU/g}$) となり、混釈培養における細菌数との間に有意差は見られなかった ($p=0.126$)。

各試験法の公定法との相関を寄与率で算出したところ、公定法と簡易培地 1 では、 0.8846 (図 1)、簡易培地 2 で 0.847 (図 2)、簡易培地 3 で 0.8392 (図 3)、簡易培地 4 で 0.8393 (図 4) と、いずれも高い相関を示した。公定法と ISO 法の間寄与率は、 0.9103 (図 5) であった。ISO 法の混釈培養と表面塗抹の間寄与率は 0.8498 (図 6) であった。

バター製品には、乳酸菌を添加して製造する種類 (発酵バター) があるため、発酵バターと明記されている 8 検体とそれ以外の製品 37 検体の細菌数を比較したところ、発酵バター製品 8 検体の公定法による平均値は $3.781 \log \text{CFU/g}$ 、それ以外の製品の平均値は $1.184 \log \text{CFU/g}$ であり、発酵バターと明示されている製品の細菌数が有意に高い細菌数を示した ($p<0.01$)。一方で、発酵バターと明記されていない製品の中に $5 \log \text{CFU/g}$ を超える

製品が 2 検体あった。

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、 11.1% ($5/45$ 検体) より検出された (表 1)。腸内細菌科菌群陽性であった 5 検体は全て、定性法 (ISO 21528-1:2016) で検出され、定量法 (ISO 21528-2:2016) においては検出限界未満 ($<5 \text{CFU/g}$) であった。腸内細菌科菌群が検出された全 5 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、*Raoultella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Escherichia spp.* であった (表 2)。

2) 諸外国における乳製品の微生物規格

表 3 に日本国内及び諸外国におけるバターの、表 4 にアイスクリーム類の微生物規格を示した。EU では、生乳を用いて作られたバターについてのみ、製造工程管理基準として大腸菌を 10CFU/g 以下、食品安全のための病原菌の規格として販売最終日における製品中のサルモネラ及びリステリア・モノサイトゲネスそれぞれについて $0/25 \text{g}$ と定めていた。サンプリングプランも設定されており、製造工程管理基準は 1 ロットについて 5 検体試験し、2 検体までの逸脱が許容されており、病原体については 5 検体試験し、全検体合格でなくてはならない、としていた。フランスでは 3 種のカテゴリーのバターについて、それぞれの製品特性に基づいたリスクを考慮した微生物規格を設定していた。米国では、

空気を含ませて攪拌したホイップバターと乳脂肪分 40%以下のライトバターに微生物規格が設定されていた。アイスクリーム類については、米国ではフレーバーによって異なる大腸菌群の規格基準値を設定していた。また、EU、フランス、オーストラリア及びニュージーランドでは、衛生指標菌と病原菌の規格基準を設定していた。

Codex 委員会による規格基準作成及び改訂の手順を図 7 に示した。規格草案の提案から修正を経て総会での採択が行われたのち、規格案についても同様の手続きを経て規格基準が作成され、その過程で各国の合意が最も重視されていた。Codex や FAO/WHO に科学的助言をおこなっている国際食品微生物規格委員会 (ICMSF) は、汚染微生物のリスクに応じた微生物試験のサンプリングプランと基準値を提案しており、1978 年発刊の第 1 版と 1986 年の第 2 版で生菌数の卵製品の基準値が変更されていた (図 8)。その改訂の経緯について調査したところ、FAO/WHO による 19 か国を対象とした汚染実態アンケートの結果に基づいて基準値を見直したものであることが明らかとなった。EU では、低温殺菌牛乳の微生物規格を 2010 年に変更していた (図 9)。その改訂根拠についてデンマーク乳業協会関係者に確認したところ、腸内細菌科菌群試験法を MPN 法から混積培養法に変更し、それに伴って検出下限値が 1CFU/mL から 10CFU/mL に上昇したため、サンプリングプランを $n=5, c=2$ から $n=5, c=0$ に変更した、との回答が得られた。この変更により、腸内細菌科菌群試験がより簡便になり、結果を得るまでの時間も短縮されていた。

D. 考察

本研究での調査により、国内で市販されているバター製品において、微生物規格である大腸菌群が陽性のものは見られず、一定の衛生基準が保たれていることが示された。一方、5 検体 (11.1%) については腸内細菌科菌群定性法で陽性を示した。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、バターにおける大腸菌群公定法の検出下限値が 5 CFU/g であることから、陽性検体についても、その汚染菌量は理論値で 0.04~4.99 CFU/g という極めて低いレベルであることが示唆された。細菌数については、現在バターの微生物規格とはされていないが、今回の調査で、 $5\log\text{CFU/g}$ を超える製品が一部あることが示された。乳酸菌を添加して製造する発酵バター製品は、一部の発酵後に加熱工程がある製品を除き、最終製品に乳酸菌が存在していると思われるため、それらについては細菌数が高くても衛生上の問題とはならないと思われた。一方、発酵バターと明記されていない製品の中に高い細菌数を示すものが 2 検体あり、それらの製品が乳酸菌を添加されているのかは不明であった。

今回の調査により、市販のバター製品は概ね良好な衛生状態にあることが示された。また、低温殺菌牛乳やアイスクリーム類とは異なり、簡易培地を用いた細菌数試験及び ISO 法による細菌数試験の結果が公定法と大きな差が見られず、製品の種類による製造工程における損傷菌の出現の差が簡易培地の有用性に大きな影響を与えることが示唆された。

また、本研究により、国際的な微生物規格基準の設定及び改訂の手順やその根拠の一部が示され、汚染レベルの調査結果や試験法の変更に伴う検出感度等に応じて基準値や

サンプリングプランの見直しが随時行われていることが明らかとなった。

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、市販のバター製品 45 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、バター製品では簡易培地について公定法と差は見られず、また、ISO 法の表面塗抹法と混積培養法にも差が見られなかったことから、バター製品に存在する細菌は、初年度に調査した低温殺菌牛乳及び昨年度に調査したアイスクリーム類と比較して、損傷菌の割合が低いことが推察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

誌上発表（総説）：

岡田由美子 HACCP と微生物試験法 クリー
ンテクノロジー 2020;30:52-56.

学会発表：

渡辺愛, Amalia Widya Rizky, 御堂梨花
子, 岡田由美子, 鈴木 穂高. 牛乳の微生物
検査における公定法、ISO 法、簡易法の比
較。第 163 回日本獣医学会学術総会（令和 2
年 9 月、オンライン開催）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 各試験法によるバター製品 45 検体中の細菌数

| | 公定法 | 簡易培地 1 | 簡易培地 2 | 簡易培地 3 | 簡易培地 4 | ISO 法 | 表面塗抹* |
|-------------------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| 平均 (log CFU/g) | 1.645 | 1.452 | 1.361 | 1.353 | 1.389 | 1.635 | 1.465 |
| 標準偏差 | 1.995 | 2.162 | 1.855 | 1.855 | 1.953 | 2.156 | 1.916 |
| 検出限界未満 の検体数 | 17 | 27 | 24 | 24 | 25 | 23 | 25 |
| p value | | 0.084 | 0.019 | 0.018 | 0.039 | 0.911 | 0.126 |

* : 表面塗抹法のみ、有意差検定を ISO 法との間で行った

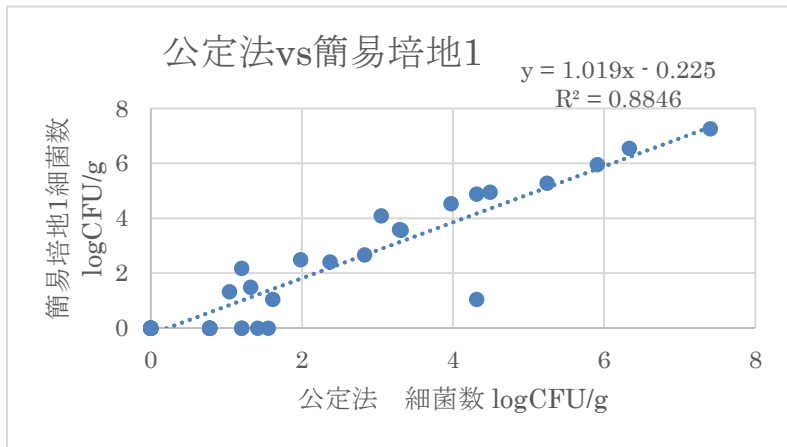


図1. 公定法と簡易法1における細菌数の相関

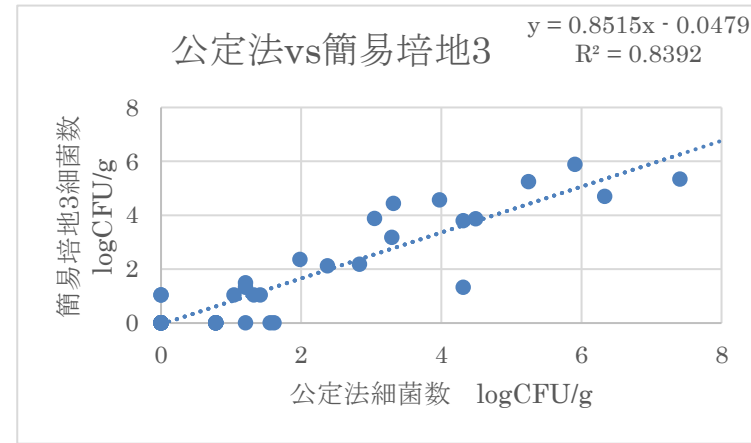


図3. 公定法と簡易培地3における細菌数の相関

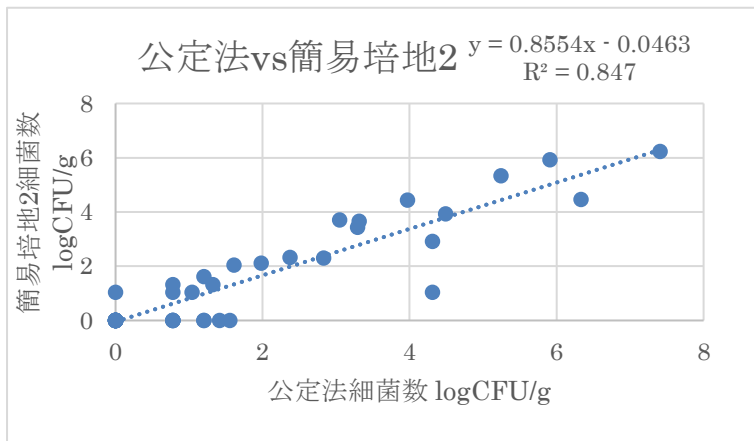


図2. 公定法と簡易培地2における細菌数の相関

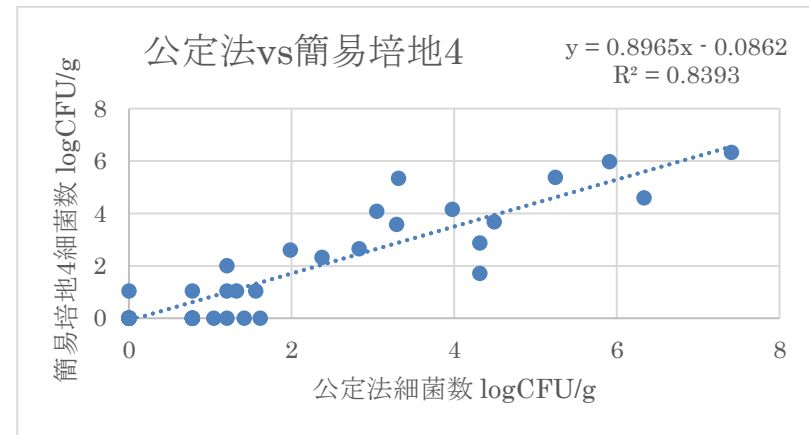


図4. 公定法と簡易培地2における細菌数の相関

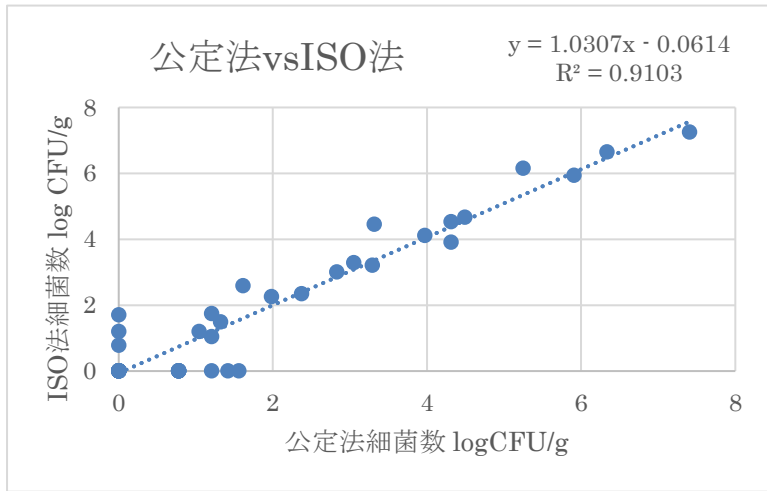


図 5. 公定法と ISO 法における細菌数の相関

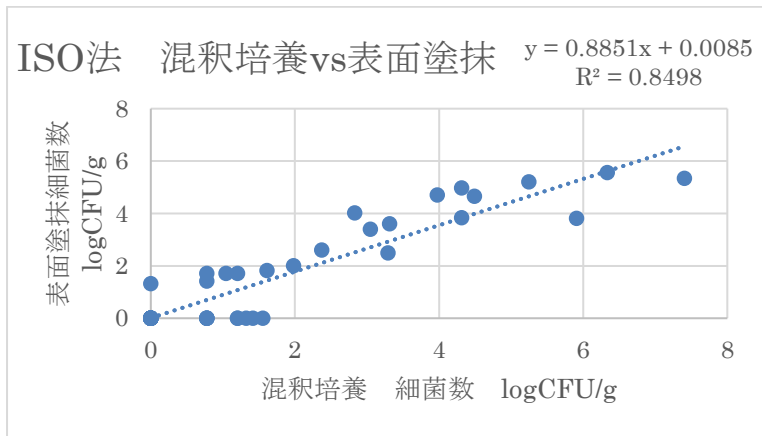


図 6. ISO 法（混釈培養）と表面塗抹における細菌数の相関

表 2. 検出された腸内細菌科菌群の菌種同定結果

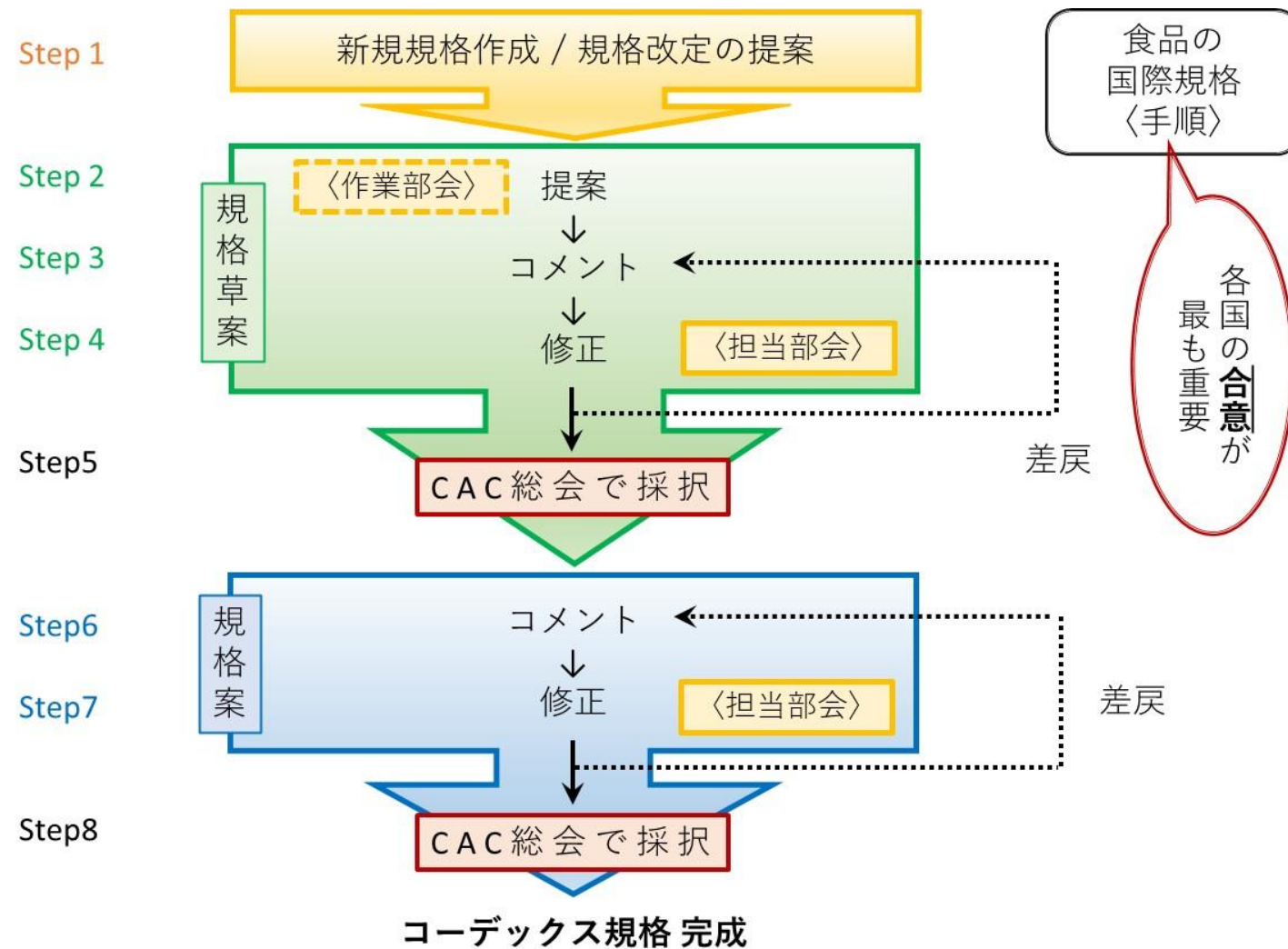
| 検体 | 同定結果 |
|----|--------------------------|
| 1 | <i>Raoultella</i> spp. |
| 2 | <i>Enterobacter</i> spp. |
| 3 | <i>Serratia</i> spp. |
| 4 | <i>Escherichia</i> spp. |
| 5 | <i>Raoultella</i> spp. |

表 3. バターの微生物規格基準

| 国、地域 | 対象食品 | 対象微生物 | 規格 | サンプリングプラン | 適用箇所 |
|------|------------------------|----------------|-------------|-----------|-------|
| 日本 | バター | 大腸菌群 | 陰性 | | |
| 米国 | ホイップバター | 大腸菌群 | 10/ g 以下 | | |
| | | カビ・酵母 | 10/ g 以下 | | |
| | ライトバター (乳脂肪分 40%以下) | 生菌数 | 1000/ g 以下 | | |
| | | 大腸菌 | 陰性 | | |
| | | 大腸菌群 | 10/ g 以下 | | |
| | | カビ・酵母 | 10/ g 以下 | | |
| EU | 生乳由来バター | 大腸菌 | m=10, M=100 | n=5, c=2 | 出荷前 |
| | | サルモネラ属菌 | 0/25 g | n=5, c=0 | 販売最終日 |
| | | リステリアモノサイトゲネス | 0/25 g | n=5, c=0 | 販売最終日 |
| フランス | 生乳由来バター | 大腸菌 | m=10 | | |
| | | 酵母 | m=100 | | |
| | | コアグラージェ陽性ブドウ球菌 | m=100 | | |
| | | サルモネラ属菌 | 0/25 g | | |
| | | リステリアモノサイトゲネス | 0/25 g | | |
| | 低温殺菌乳由来バター | 酵母 | m=100 | | |
| | | 大腸菌群 | m=10 | | |
| | | サルモネラ属菌 | 0/25 g | | |
| | | リステリアモノサイトゲネス | 0/25 g | | |
| | 濃縮バター | 酵母 | m=100 | | |
| | | 大腸菌群 | m=10 | | |
| | | リステリアモノサイトゲネス | 0/25 g | | |

表4. アイスクリーム類の微生物規格基準

| 国、地域 | 対象食品 | 対象微生物 | 規格 | | | その他 |
|------|-----------------|---------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|----------------|
| 日本 | アイスクリーム | 生菌数 | $\leq 10^5$ CFU/g | | | |
| | | 大腸菌群 | 陰性 | | | |
| | アイスマイルク・ラクトアイス | 生菌数 | $\leq 5 \times 10^4$ /g | | | |
| | | 大腸菌群 | 陰性 | | | |
| 米国 | アイスクリーム（プレーン） | 生菌数 | $\leq 5 \times 10^4$ /g | | | |
| | | 大腸菌群 | ≤ 10 /g | | | |
| | アイスクリーム（チョコなど） | 生菌数 | $\leq 5 \times 10^4$ /g | | | |
| | | 大腸菌群 | ≤ 20 /g | | | |
| EU | 牛乳から作ったアイスクリーム等 | 腸内細菌科菌群 | m=10, M=100* | | | n=5, c=2（出荷前） |
| | | サルモネラ属菌 | 0/25 g | | | n=5, c=0（最終製品） |
| | | リステリアモノサイトゲネス | 0/25 g | | | n=5, c=0（最終製品） |
| 仏 | 牛乳から作ったアイスクリーム等 | 生菌数 | $\leq 1 \times 10^4$ | | | |
| | | 腸内細菌科菌群 | ≤ 10 /g | | | |
| | | サルモネラ属菌 | 0/25 g | | | |
| | | リステリアモノサイトゲネス | 0/25 g（解凍せず消費する製品は<100CFU/g） | | | |
| 香港 | 冷凍菓子 | 生菌数 | $\leq 5 \times 10^4$ /g | | | |
| | | 大腸菌群 | ≤ 100 /g | | | |
| 豪・NZ | アイスクリーム | | satisfactory | marginal | unsatisfactory・潜在的危険 | |
| | | 生菌数 | $< 10^6$ /g | $10^6 \sim < 10^7$ /g | $\geq 10^7$ /g | |
| | | 黄色ブドウ球菌 | $< 10^2$ | $10^2 - 10^3$ | $10^3 - 10^4$ （ $> 10^4$ は潜在的に危険） | |
| | | 大腸菌（病原性ではない） | < 3 | 3-100 | > 100 | |
| | | リステリアモノサイトゲネス | 0/25 g | $< 10^2$ | $\geq 10^2$ は潜在的に危険 | |



(<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/en/> より)

図7. Codex 委員会による規格基準作成及び改訂の手順

ICMSF Book2 (1st ed., 1978)

| 製品 | 対象微生物 | サンプリングプラン | | 基準値 (CFU / g) | | |
|------|-------|-----------------------------------|----------|---------------|-----------------|-----------------|
| | | <i>n</i> | <i>c</i> | <i>m</i> | <i>M</i> | |
| 乾燥食品 | 卵製品 | SPC | 5 | 2 | 10 ⁴ | 10 ⁶ |
| | | Coliforms もしくは Enterobacteriaceae | 5 | 2 | 10 | 10 ³ |
| | | <i>Salmonella</i> | 10 | 0 | 0 | — |

試験法とセットで合否を規定

n: 検体数
c: 違反検体の最大許容数
m, M: 微生物学的な基準値

基準値の変更

FAO/WHO
 レポート
 (1975)

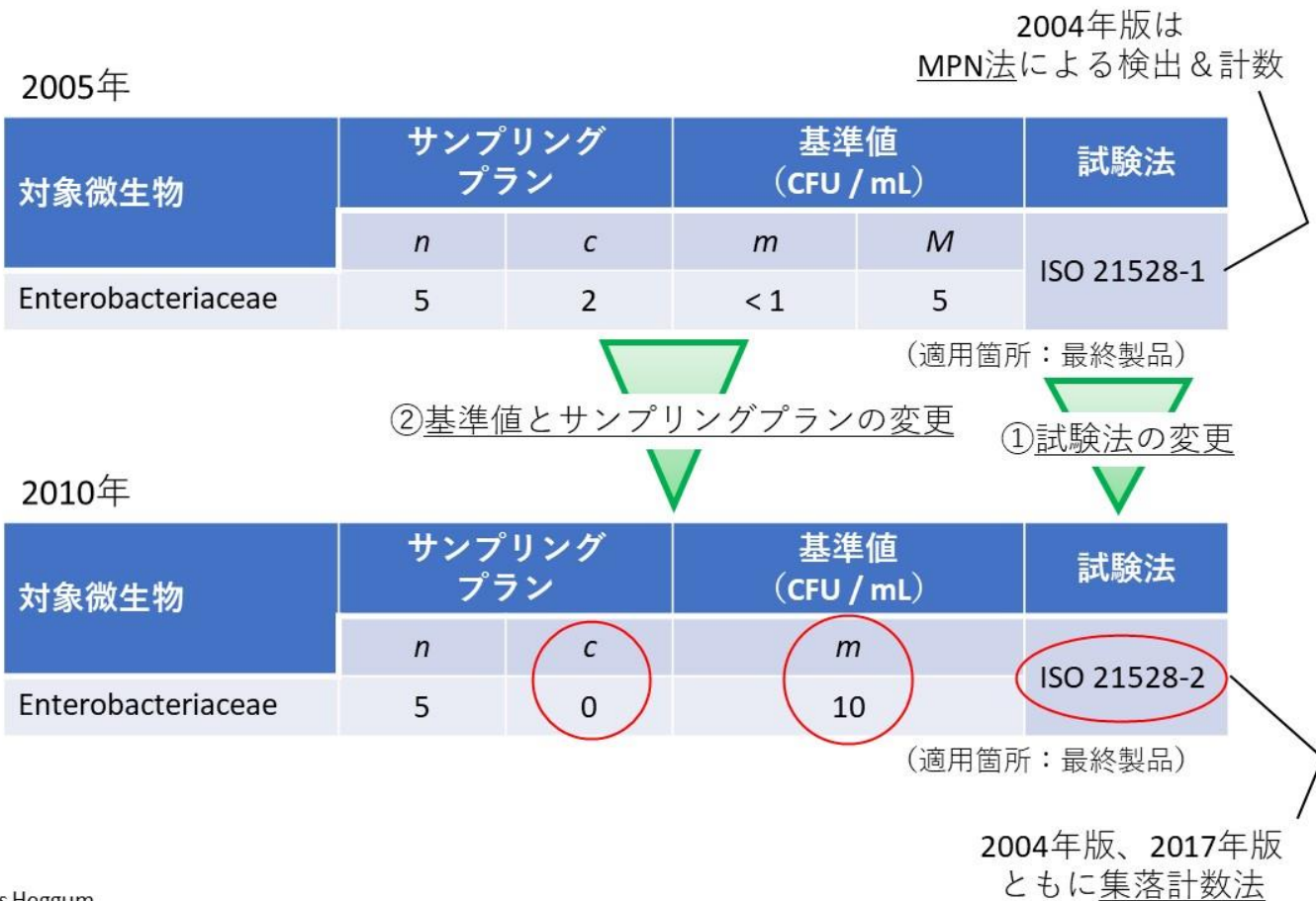
ICMSF Book2 (2nd ed., 1986)

| 製品 | 対象微生物 | サンプリングプラン | | 基準値 (CFU / g) | |
|-------------------------------|-------------------|------------------|----------|---------------------|-----------------|
| | | <i>n</i> | <i>c</i> | <i>m</i> | <i>M</i> |
| 卵製品 - 液卵 - 凍結卵 - 乾燥卵 | APC | 5 | 2 | 5 × 10 ⁴ | 10 ⁶ |
| | Coliforms | 5 | 2 | 10 | 10 ³ |
| | <i>Salmonella</i> | (ケースにより異なる数値を設定) | | | |

ICMSF Book7 (2002)ではこれに試験法の項目が追加

注：現在の EU 規格とは異なる。

図 8. ICMSF での卵製品の微生物規格基準例改訂の経緯



参考
Dr. Claus Heggum

Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs

Commission Regulation (EU) No 365/2010 of 28 April 2010 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs as regards Enterobacteriaceae in pasteurized milk and other pasteurized liquid dairy products and *Listeria monocytogenes* in food grade salt

図 9. EU による低温殺菌牛乳の微生物規格基準の改訂

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 | | | | | |

総説

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻 | ページ | 出版年 |
|-------|--------------|------------|----|-------|------|
| 岡田由美子 | HACCPと微生物試験法 | クリーンテクノロジー | 30 | 52-56 | 2020 |

厚生労働大臣殿

令和3年 3 月 29 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 合田 幸広 印

次の職員の令和2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

| | 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。

令和3年 3 月 29 日

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

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
所属研究機関長 職名 所長
氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金・食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理及び試験法確立のための研究 (H30-食品-一般-009)
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品衛生管理部・部長
(氏名・フリガナ) 朝倉 宏 ・ アサクラ ヒロシ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、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。

厚生労働大臣殿

令和3年 3 月 29 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 合田 幸広 印

次の職員の令和2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

| | 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。

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 合田 幸広

次の職員の令和2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□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3年5月6日

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

機関名 国立大学法人帯広畜産大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 奥田 潔 印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、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。