

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理
及び試験法確立のための研究

平成 30 年度 - 令和 2 年度 総合研究報告書

研究代表者 岡田 由美子

令和 3 年 (2021) 5 月

目次

I. 総合研究報告

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

1-1. 乳及び乳製品の衛生管理に関する国際動向に関する研究

1-2. 国内製品・製造施設の衛生実態に関する研究

1-3. 国内小規模製造施設の衛生実態に関する研究

1-4. 乳及び乳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

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 121

平成 30 年度－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）
総合研究報告書

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
	鈴木 穂高	国立大学法人茨城大学農学部
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
	Amalia Widya Rizky	国立大学法人茨城大学農学部
	永島 侑起	国立大学法人茨城大学農学部
	渡辺 愛	国立大学法人茨城大学農学部
	御堂 梨花子	国立大学法人茨城大学農学部
	下島 優香子	東京都健康安全研究センター微生物部
	福井 理恵	東京都健康安全研究センター微生物部
	森田 加奈	東京都健康安全研究センター微生物部
	平井 昭彦	東京都健康安全研究センター微生物部
	山本 詩織	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	阿部 清孝	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	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

現在わが国の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おり、現在でもそれらが科学的に妥当か否かの検証が望まれている。また、HACCP 導入後の各種食品製造工程における衛生管理上で、迅速簡易法が適用される可能性が高まっているが、乳及び乳製品での適用の妥当性については、不明な点がある。本研究では、乳及び乳製品の衛生管理に関する海外動向、国内の大・中及び小規模製造施設の衛生管理実態、市販製品の衛生指標菌汚染実態と、第三者認証を受けた簡易培地の妥当性確認について調査研究を行い、今日の国内における乳及び乳製品の衛生管理に必要な微生物試験項目及び手法についての科学的知見を得ることを目的とした。

海外動向に関する研究では、諸外国における乳製品による健康被害実態、食品汚染実態、定められた微生物規格基準とそのサンプリングプラン、試験法の運用実態等に関する情報収集を行った。平成 30 年度は、EU における殺菌乳製造工程での衛生管理の実態について、デンマークの低温殺菌牛乳工場等を視察し、情報を収集した。令和元年度は、乳製品であるアイスクリームに関する情報調査を行い、米国における市販アイスクリームの喫食に起因する健康被害事例や、米国及び欧州における微生物関連のアイスクリーム回収・汚染事例に関する情報収集を行った。さらに EU におけるアイスクリーム製造工程での衛生管理の実態について、デンマークのアイスクリーム製造施設等を視察し、情報を収集した。令和 2 年度はインターネットによる情報収集を行い、選択された以下の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、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。以上のような海外情報を参考に、わが国において、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、今後の国際的な整合性を図る観点からの検討が必要であると考えられた。

国内の中及び大規模製造工程施設の衛生管理実態の把握については、平成 30 年度には国内で HTST 及び LTLT 牛乳を製造する中規模製造施設、並びに UHT 牛乳を製造する大規模施設の協力を得て、各製品の製造工程実態について衛生試験を通じた検討を行い把握することとした。中規模施設の製造機器等は大規模施設と大きな差異は認められなかったものの、(1) 原乳の搾乳から受入、受入から製造開

始までの時間が極めて短いこと、(2) 生産農場の衛生状況を踏まえ、HTST/LTLT 牛乳への用途を区別化していること、(3) ホモゲナイズ処理がなされていないこと、(4) 施設環境の区分化が十分とは言い難いこと等が差異のある項目として抽出された。中規模施設の原乳については、上記(1)の特徴と相関して、一般細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌の最大値はそれぞれ 2.8×10^3 CFU//mL、 3.3×10^1 CFU//mL、 5.1×10^1 CFU//mL、2CFU//mL と、大規模施設に比べて低い傾向にあった。中規模施設の製品では、一般細菌のみ最大 1.3×10^2 CFU//mL の検出を認めるに留まり、事業者の自主検査結果とあわせ、乳等省令で定められる成分規格を十分に満たすことが確認された。一方、充填機内外のふき取り検体のうち、充填機ノズルからは最大で 9CFU の *Bradyrhizobium* 属菌が検出され、同属菌は製品からも検出されたことから、加熱殺菌後の同工程周辺機器等の洗浄消毒を徹底し、その後検証を行うことが、当該施設における今後の衛生向上に資する改善措置事項として抽出された。

令和元年度は、アイスクリーム類を製造する国内事業者の協力を得て、製造施設を視察すると共に、情報収集及び各種検体を微生物試験に供することで、同製品の製造工程管理実態を調査し、製造基準の検討にあたっての科学的知見を集積することを目的として検討を進めた。大規模施設では、スティック、カップ、コーンの計 3 形態のアイスクリームを製造しており、各種原料を外部より受入れ後、区分管理を行っていた。また、原料混和から冷却工程迄は閉鎖流路を取っており、このうち加熱殺菌工程では圧力をモニタリング指標としていた。視察を通じ、冷却後以降では充填工程での硬化のために用いる冷却水管理や充填機の使用後洗浄・消毒等が製造基準を遵守する上での重要項目と想定された。同施設では製品、ストレージミックスを対象とした定期的な微生物試験のほか、環境拭取り検体の ATP 検査が自主的に行われていた。製造中に採材した原料、最終製品及び充填機拭取り検体を微生物試験に供したところ、原料 1 検体、最終製品 5 検体、充填機拭取り 2 検体から、 $1.0 - 1.5 \log$ CFU//mL の一般細菌が僅かに検出されたものの、糞便汚染指標菌は何れも不検出となり、同製造ラインの衛生管理が良好に維持されている状況が確認された。一方、菌叢解析を通じ、硬化後包装前製品を載せるトラップステージ拭取り検体の構成菌叢は原料の一つである粉末水飴の構成菌叢と極めて近似しており、同原料に生存性を持つ病原微生物が混入し、更に加熱殺菌に不備が生じた場合には、最終工程で製品やステージ表面を汚染するおそれも想定され、改めてこれらの製造基準に則った管理の重要性が示された。また、製品の出荷状況に応じて不定期にカップアイスを製造する、中規模製造施設でも原料混和から冷却工程迄は大規模施設と同様に閉鎖流路をとっていたが、充填工程は半自動であり、特に充填機器の使用後洗浄・消毒が衛生管理上の重要項目と想定された。また、中規模施設では自施設内の別ラインで製造される低温殺菌乳を原料に用いていた。未加熱の生乳(参考品)、

最終製品を微生物試験に供したところ、生乳検体からは糞便汚染指標菌である腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌がそれぞれ 1.5-3.7 logCFU//mL、1.9-3.8 logCFU//mL、<1.0-1.8 logCFU//mL の範囲で検出されたが、製品検体からこれらの糞便汚染指標菌は検出されず、同検体中の一般細菌数は 0.64-0.67 logCFU//mL の範囲に留まっていた。以上より、国内の大規模・中規模アイスクリーム製造における衛生管理は乳等省令を遵守して対応がなされており、微生物管理の面から直ちに改訂を検討する必要性は低いと判断された。一方で大腸菌群陰性とされる現行の成分規格については、国際整合性並びに原料を含めた同指標菌の動態を見極めつつ検討する必要性が考えられた。

令和2年度は、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、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 1-2logCFU//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。

国内の小規模製造施設の衛生管理に関する研究では、国内製造施設の実態に適合する衛生管理手法の確立を目的とし、乳及び乳製品の主要な生産地である北海道にて、小規模製造施設を対象とした衛生検査実態の調査を行った。加えて、小規模製造施設の自主検査及び製造形態の実情を加味して、簡易検査法の有用性及び管理基

準として用いる衛生指標菌種の妥当性についての検討を行った。小規模施設における衛生検査実態の調査においては、小規模施設内で実施可能な衛生検査が非常に限られたものである実態が明らかとなり、小規模施設衛生管理において簡易検査法が担う役割の重要性が強く示された。加えて、各施設の検査設備の脆弱性から、その運用方法についての問題点も抽出され、簡易検査法を採用した標準試験法の整備においても、施設ごとの実情に適応した簡易検査法の運用方法について提示する必要性も示唆された。脆弱な設備環境下で簡易検査法を用いた際の検査結果の妥当性について検討する目的で試験結果に設備条件が与える影響を検討した結果、恒温槽等を用いた精確な温度管理が難しい試験条件下においても簡易検査法を用いて適切な結果が得られることが明らかとなり、小規模施設における簡易検査法の有用性が示された。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は、大腸菌群数と腸内細菌科菌群数の加熱時間に対する減少率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して腸内細菌科菌群を衛生検査指標として用いることの妥当性を示す結果であると考えられる。これらの知見は今後、国内で整備が進む HACCP の制度化及び、国際的整合性を担保した形での乳及び乳製品の製造工程管理及び、製品の安全性確保に向けた微生物規格基準及び試験法を設定する上で国内の各種事業形態に適応した実行性のある試験法の整備に貢献するものであると期待された。

市販製品の衛生指標菌汚染実態調査及び簡易培地の検討に関する研究では、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、平成 30 年度には低温殺菌牛乳等 88 検体、令和元年度にはアイスクリーム類 127 検体、令和 2 年度にはバター製品 45 検体を用いて、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、国内で流通している乳及び乳製品は一定の衛生状況を保っていることが示された。低温殺菌牛乳については簡易培地での集落形成数が公定法及び ISO 法よりも低い傾向が示された。アイスクリーム類においては一部の製品で公定法の結果と差が見られたが、バター製品では同様の差は見られず、加熱損傷菌の残存等、製品特性に応じた導入検証の必要性が示された。

A. 研究目的

我が国を含む殆どの国において、食品の安全確保を目的として、多くの食品種に微生物規格が定められている。規格対象となる食品の多く

は、過去に食中毒事例の原因となった食品や、製造工程において微生物制御が困難であることが明らかな食品等であり、国内の食習慣や製造環境等を踏まえて設定されてきた。しかしな

がら、国内の衛生状況は時代の変遷と共に変化を顕し、昨今では食品の国際流通も増加の一途を辿る等、食を取り巻く環境は変化している。わが国の乳及び乳製品については、昭和 26 年に発令された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」(乳等省令)に基づき、細菌数と大腸菌群が微生物規格に設定され、安全確保が図られているが、現在 EU 等では牛乳の製造工程管理を HACCP ベースで行うと共に、わが国で 2011 年に生食用食肉の微生物規格として採用された、腸内細菌科菌群を衛生指標として製品等の検査が実施されている状況にある。

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

以上の背景を踏まえ、本研究では(1)国際動向に関する研究として、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(2)国内の中及び大規模製造施設の衛生管理に関する研究として、牛乳及びアイスクリームの製造施設における微生物汚染実態と管理状況の調査(3)国内の小規模製造施設の衛生管理に関する研究として、牛乳及びアイスクリームの製造施設における微生物汚染実態と管理状況の調査(4)市販製品の衛生指標菌汚染実態調査と簡易培地に関する検討として、国内で流通する低温殺菌牛乳、アイスクリーム類及びバター製品を対象として調査を行い、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)を用いた検討を行った。

B. 研究方法

1. 乳及び乳製品の衛生管理に関する国際動向に関する研究

1-1. 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。

1-2. 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。

1-3. 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、関連情報の検索を行なった。最終的に選択した 2 報の文献についてその重要部分を和訳

(仮訳) し、要旨を把握した。

2. 国内の中及び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調査 (平成 30 年度)

2-1-1. 協力施設での牛乳製造に係る情報収集

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

2-1-2. 採材

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

大規模施設では原乳、殺菌前乳、殺菌後乳、殺菌後貯乳、最終製品、並びに拭き取り検体 (加熱殺菌機出口、充填機周辺の床及び昇降台、冷却プレート出口) を採材した。ふき取り検体については冷蔵温度帯で輸送し、3 時間以内に試験に供した。なお、施設 B の原乳、殺菌前後乳、最終製品については同一ロットのものとするため、施設担当者により採材を行い、ロットの確認後に冷蔵温度帯で一日夜かけて輸送された。

2-1-3. 衛生指標菌定量試験

衛生指標菌の検出にあたっては、国際標準試験法である ISO 法 (細菌数、ISO 4833-1:2013;

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

拭き取り検体は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水中を用いて試験懸濁原液を調整した。同原液 1/mL を平板各培地に接種し、ISO 文書または簡易迅速培地製造者が発行する指示書等に準じて、培養を行った (平成 30 年度分担報告書図 7)。

2-1-4. 細菌叢解析

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

抽出 DNA を鋳型として、16S rRNA 799f-1179r オリゴヌクレオチドプライマーを用いた PCR 反応を行い、E-gel SizeSelect 2% (Thermo Fisher) 及び AMPure XP (Beckman) を用いて増幅産物を精製・定量後、等量混合ライブラリーを作成し、Ion Chef/Ion PGM システム (Thermo Fisher) により増幅産物の塩基配列データを取得した。

取得データは CLC Genomic Workbench v. 11 (キアゲン-CLC) を用いて不要配列を除去後、RDP Classifier pipeline へ投入し、階層化分類等を行った。

2-2. アイスクリーム製造施設における調査 (令和元年度)

2-2-1. 協力施設でのアイスクリーム製造に係る情報収集

アイスクリームを製造する大規模及び中規模事業施設の研究協力を得て、各施設での対象製品の製造工程フロー図、並びに製造量、製品仕様、自主検査等の情報提供を依頼し、承諾を得た。

2-2-2. 採材

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

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

2-2-3. 衛生指標菌定量試験

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

なお、生乳の調整にあたっては、5倍希釈液を作成し、試験原液として用いた。

拭き取り検体は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水

(PBS) を用いて試験懸濁原液を調整した。同原液 1/mL を各平板培地に接種し、上述の ISO 文書に従って培養を行い、菌数を求めた。

2-2-4. 細菌叢解析

大規模施設の検体については、試験原液 1ml を対象とした。何れも滅菌 PBS を用いて2回洗浄を行った後、MaxWell RSC DNA Blood kit (プロメガ) を用いて Total DNA を抽出した。その後、抽出 DNA を鋳型として、16S rRNA 799f-1179r オリゴヌクレオチドプライマーを用いた PCR 反応により 16S rRNA V5-V6 領域を増幅し、E-gel SizeSelect 2% (Thermo Fisher) 及び AMPure XP (Beckman) を用いて増幅産物を精製・定量した。その後、等量混合ライブラリーを作成し、Ion Chef/Ion PGM システム (Thermo Fisher) により増幅産物の塩基配列データを取得した。取得データは CLC Genomic Workbench v. 20 (キアゲン-CLC) を用いて不要配列を除去後、RDP Classifier pipeline へ投入し、階層分類等の解析を行った。

2-2-5. 生乳中の微生物動態解析

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

2-3. 有症苦情事例の見られた牛乳製造施設における調査 (令和2年度)

2-3-1. 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。

2-3-2. 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。

2-3-3. 16S rRNA 菌叢解析

上述 2-3-2. 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。

2-3-4. 保存試験を通じた微生物動態解析

上項 2-3-1. で示す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 2-3-1. 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. 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. 国内の小規模製造施設の衛生管理に関する研究

3-1-1. 製造工程管理及び衛生検査実態の調査対象施設

低温殺菌牛乳製造施設については、北海道内で低温殺菌牛乳を製造・販売する小規模事業者 (十勝地方 2 社、上川地方 1 社) について調査を実施した。調査においては、製造地域での販売に加え、通信販売・業務用販売を含めた道外での広域販売を行っている事業者を選定した。各施設について、製造規模を含めた施設概要、製造工程、各施設で実施される自主検査項目について、施設見学及び聞き取り調査を実施し、製造工程管理実態及び衛生管理実態を取りまとめた。

アイスクリーム製造施設については、北海道内でアイスクリームを製造・販売する小規模事業者 (十勝地方 2 社、石狩地方 1 社) について調査を実施した。調査においては、低温殺菌牛乳製造施設と同様に、製造地域での販売に加え、通信販売・業務用販売を含めた道外での広域販売を行っている事業者を選定し、各施設について、製造工程、各施設で実施される自主検査項目について、施設見学及び聞き取り調査を

実施し、製造工程管理実態及び衛生管理実態を取りまとめた。

3-2. 乳及び乳製品衛生検査

3-2-1. 試料概要

低温殺菌牛乳については、調査対象施設のうち2施設より生乳及び低温殺菌牛乳を入手した。何れの試料においても、輸送中を含め採取及び製造から検査までの間、5℃以下で保管されていた事を確認し、低温殺菌牛乳については賞味期限日に検査を実施した。

アイスクリームについては、調査対象施設の全てより様々なフレーバーのアイスクリーム製品を通常の販売ルートを利用して入手した。試料は受け入れ後に検査まで-30℃にて保管し、検査に際しては約20gを無菌的に量り取った後に、23℃のインキュベーター内に40分間静置することで融解し、融解物を滅菌生理食塩水で10倍希釈したものを用いた。

3-2-2. 細菌検査法概要

生乳、低温殺菌牛乳及びアイスクリーム試料に対して、腸内細菌科菌群数、生菌数、大腸菌群数、大腸菌数について、培養法と簡易培地法を用いた検査を以下の概要で実施した。

3-2-2-1. 腸内細菌科菌群数検査概要

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

3-2-2-2. 生菌数検査概要

培養法においてはISO 4883-1:2013に従い、標準寒天培地を用いた混釈培養(30±1℃, 72±2時間)を行った。簡易培地法においては3

社より入手した3製品を用い、それぞれの製品に添付の取扱説明書に従って検査を実施した。

3-2-2-3. 大腸菌群数検査概要

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

3-2-2-4. 大腸菌数検査概要

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

3-3. 簡易検査法に与える試験条件の影響の検討

3-3-1. 試料融解条件が試験結果に及ぼす影響についての解析

アイスクリーム試料5gを4℃、15℃、23℃、32℃及び37℃で完全に融解するまで静置した後に、3M™ペトリフィルム™生菌数測定用プレート(ACプレート)に接種し32℃、48時間培養を行った。

3-3-2. 培養条件が試験結果に及ぼす影響についての解析

同一条件下で調整した試料(融解条件:23℃、40分間)を3M™ペトリフィルム™生菌数測定用プレート(ACプレート)に接種し、20、25、30、32、37℃の温度条件下で24、48、72時間の培養(計15条件)を行った。それぞれの条件

について、三回ずつの試行を行い、得られた結果群に対して外れ値検定（箱ひげ図解析及び、スミノルフ・グラブス検定）を行った。また、得られた結果群を母集団としてそれぞれの測定結果の Z 値を算出した。

3-4. 加熱殺菌による衛生指標菌数動態検査

3-4-1. 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。

3-4-2. 生乳性状検査

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、16S rRNA V3/V4 領域に基づく細菌叢解析を行った。

3-4-3. 加熱殺菌前後の衛生指標菌検査

試料を乳温度 65℃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℃, 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℃, 24 時間培養）、大腸菌数（3MTMペトリフィルムTME. coli 及び大腸菌群数測定用プレート（EC プレート）にて 35℃, 48 時間培養）、大腸菌群数（3MTMペトリフ

ィルムTME. coli 及び大腸菌群数測定用プレート（EC プレート）にて 35℃, 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. 市販乳及び乳製品の衛生指標菌汚染実態及び簡易培地の検討

4-1. 諸外国における乳及び乳製品等の微生物規格の調査

EU、米国及びオーストラリアにおける低温殺菌牛乳、生乳、アイスクリーム及びバター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。

4-2. 低温殺菌牛乳等の汚染実態調査及び簡易培地の検討（平成 30 年度）

市販の低温殺菌牛乳等について、衛生指標菌汚染実態を調査した。調査は平成 30 年 7 月から平成 31 年 3 月まで行い、検体は低温保持殺菌牛乳（LTLT: 63℃~65℃、30 分）53 検体、高温短時間殺菌牛乳（HTST: 72℃以上、15 秒以上）19 検体、高温保持殺菌牛乳（HTLT: 75℃以上、15 分以上）16 検体の合計 88 検体を用いた。試験項目は、細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌とした。試験方法は、細菌数については乳等省令の試験法（32℃48 時間培養）及び ISO 4833-1:2013（30℃72 時間培養）を、腸内細菌科菌群は定性法として ISO 21528-1:2017 を、定量法として ISO 21528-2:2017 を用いた。大腸菌群については乳等省令の試験法を用いた。黄色ブドウ球菌については通知法（食安発 0729 第 4 号）を、大腸菌については公定法及び ISO 16649-2 を用いた。また、各試験項目の代替法として、国際的な第三者認証を取得し、国内で市販されている代表的な簡

易培地を用いた。得られた結果は、対応のある t 検定により統計解析を行った。検出限界値未満の値は0として計算を行った。検体管理温度、一部培養温度等に逸脱があった 19 検体については、結果を全体の統計に含めず、別途参考値として集計した。簡易培地で検出された細菌の菌種の同定は、16S Bacterial rDNA PCR キット（タカラバイオ）を用いた塩基配列解析及び BLAST 相同性検索により行った。黄色ブドウ球菌検出用簡易培地上に形成された非定型集落の同定には、MALDI BioTyper（Bruker）を用いた。

4-3. アイスクリーム類の汚染実態調査及び簡易培地の検討（令和元年度）

市販のアイスクリーム類について、衛生指標菌汚染実態を調査した。調査は令和元年7月から令和2年3月まで行い、検体はアイスクリーム（乳固形分15%以上、うち乳脂肪分8%以上）52検体、アイスマルク（乳固形分10%以上、うち乳脂肪分3%以上）45検体、ラクトアイス（乳固形分3%以上）30検体の合計127検体を用いた。試験項目は、細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌とした。試験方法は、低温殺菌牛乳と同様に実施した。また、各試験項目の代替法として、国際的な第三者認証を取得し、国内で市販されている代表的な簡易培地2種を、製品の指示書に示された培養温度及び時間に従って用いた。同一検体間の試験法による菌数の比較は、対応のある t 検定により統計解析を行った。種別ごとの菌数の比較は一元配置分散分析及び Tukey の検定を行った。検出限界値未満の値は0 CFU/g として計算を行い、対数化に当たって全数値に1を加算した。検出された腸内細菌科菌群の菌種同定は、16S Bacterial rDNA PCR キット（タカラバイ

オ）を用いた塩基配列解析及び BLAST 相同性検索により行った。3 カテゴリー間での腸内細菌科菌群陽性率の比較は、フィッシャーの正確確率検定（拡張型）により行った。

4-4. バター製品の汚染実態調査及び簡易培地の検討（令和2年度）

市販のバター製品 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、低温殺菌牛乳及びアイスクリーム類と同様に実施した。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。

C. 研究結果

1. 乳及び乳製品の衛生管理に関する国際動向に関する研究

1-1. PubMed 検索による殺菌乳関連の健康被害事例（平成30年度）

PubMed データベースに含まれる学術論文のうち殺菌乳との関連が確認された食中毒アウトブレイク事例報告は14件あった。これら14件のアウトブレイクは1937～2016年に発生したもので、2000年以降の事例としては5件報

告されていた。これらは 2015～2016 年にカナダで発生した殺菌済チョコレートミルク製品によるリステリアアウトブレイク(患者 34 人)、2007 年に米国で発生した乳生産農家での殺菌乳に関連したリステリアアウトブレイク(患者 5 人、大人 3 人死亡、流産 1 人)、2007 年にオーストリアで発生した幼稚園児 40 人が腹痛や嘔吐を呈した黄色ブドウ球菌アウトブレイク、2006 年に米国の刑務所で発生した殺菌乳(更生施設牧場及び工場生産・加工した乳を各刑務所に配布)に起因する大規模カンピロバクターアウトブレイク(患者 1,644 人)、2000 年に米国で発生したサルモネラ(*Salmonella* Typhimurium)アウトブレイク(患者 93 人以上)である。いずれも乳の殺菌作業後に環境等からの汚染が起きている事例であった。殺菌乳の喫飲に起因する食中毒アウトブレイクで 2017 年以降に発生したものは確認できなかった。

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

1-2. 米国 FDA 回収情報データベース及び EU RASFF データベースを用いた殺菌乳の回収・汚染情報の検索(平成 30 年度)

米国 FDA 回収情報データベースには殺菌乳の微生物汚染による回収は報告されていなかった。RASFF データベースは全食品を対象としており、1979～2018 年の通知件数は 53,928 件であったが、殺菌乳(Pasteurized milk もしくは UHT milk)の微生物汚染事例は 12 件のみであった(2004～2018 年、表 1)。そのうち、健康被害が報告された事例は 2018 年 11 月にスロバキア産殺菌乳に起因してハンガリーでアウトブレイクが発生した 1 件だけであった。

1-3. デンマークにおける乳の規格基準及びデンマークの乳・乳製品工場における運用実態(平成 30 年度)

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

1-3-1. デンマークにおける殺菌乳に起因する製品回収及び健康被害事例について

デンマークの食品安全に関わる複数の専門家や工場の検査担当者との情報交換や議論の結果、乳及び乳製品に起因する製品回収情報及び健康被害事例は全て未殺菌乳によるものであり、殺菌乳によるものは直近 10 年では記憶にないとのことであった。

1-3-2. デンマークの乳に関する各種基準等について

デンマークにおける乳及び乳製品の衛生基準は基本的に EU 規則に沿ったものであり、殺菌乳の工程衛生基準としては腸内細菌科菌群について $n=5, c=0, m<10\text{cfu//mL}, M<10\text{cfu//mL}$ が規定されている(EC 規則 2073/2005)。

各種の検査に関しては EU の基準をもとに、各社が自主基準を設け、DVFA や DFAC (SEGES) といった指導機関や業界団体等が HACCP プランをはじめとする指導や定期的(3 年に一度)な監査を行なうことで問題を検知し改善するシステムとなっている(資料 1)。

原乳の出荷時の検査は出荷元の各農場が責任を負っており、原乳受け入れ時の検査、乳製品の出荷時の検査等は製造業者がより厳しい基準に従っている（資料2）。

EU の規則では原乳の受け入れ時の基準として、一般細菌数が 10 万 cfu/mL 以下、体細胞数が 40 万 cell/mL 以下と規定されているが、デンマークの乳製品業界の自主基準では、一般細菌数が 6 万 cfu/mL 以下、体細胞数が 30 万 cell/mL 以下を目標としている。

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

1-3-3. デンマークの乳製品工場における運用実態について

視察した乳製品製造会社はデンマークで乳・乳製品の約 85%のシェアを持っており、スーパーマーケット等でも製品をよく見かける。また他社ブランドの生産も請け負っている。同社は現在デンマーク国内に3カ所の大規模な乳製造施設を有しており、今回視察を行なった施設は

その中で最も大きい 1887 年に開業した工場である。

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

牛乳の殺菌条件はデンマークの規格基準では 72°C15 秒であるが、視察を行なった会社では自社基準である 74°C15 秒で行なっていた。加熱殺菌部（機材）の消毒は 90°C45 分で行ない、加熱できない容器充填部の機材は塩素により行なっているとのことである。消毒が効果的に行われたことの確認（バリデーション）は、次回生産初期ロットの製品検査により行なっているとのことであった。また、製品の加速劣化試験も行なっており、17°C24 時間負荷後の 21°C培養生菌数、大腸菌数等を計測している。

上述した EU 規則（低温殺菌乳の工程衛生基準）にもとづく、乳の最終製品における腸内細菌科菌群の検査は年に 4 回、製品の賞味期限日に行なっている。また毎日、生産直後の製品と賞味期限日の製品の無作為サンプリング検査も行なっている

1-4. 米国 CDC NORS dashboard を用いたアイ

スクリームの喫食に起因する健康被害事例の調査（令和元年度）

米国の NORS データベースにおいて、1998～2017 年に市販のアイスクリームとの関連が確認された、微生物を病因物質とする食中毒アウトブレイク事例は 11 件であった。これら 11 件のアウトブレイクの病原体別の内訳は、ノロウイルスが 4 件、黄色ブドウ球菌が 3 件、サルモネラが 2 件、志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 0157 が 1 件、及びリステリアが 1 件であった。2010 年に発生し、2015 年に報告された Blue Bell Creameries 社製アイスクリームによるリステリア感染アウトブレイクでは患者 10 人のうち 3 人が死亡した。2013 年の STEC 0157 感染アウトブレイクでは患者 4 人のうち 1 人が死亡している。規模の大きい事例としては、2004 年に発生した黄色ブドウ球菌感染アウトブレイク（患者 132 人、入院患者 12 人）と 2000 年のサルモネラ (*Salmonella* Enteritidis) 感染アウトブレイク（患者 132 人）が挙げられる。

1-5. 米国 FDA 回収情報データベース及び EU RASFF 食品汚染情報データベースを用いたアイスクリームの回収・汚染情報の調査（令和元年度）

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

EU での食品汚染情報に関しては、RASFF データベースで 2010～2019 年の「Ices and desserts」の微生物汚染事例は 13 件で、この

うちアイスクリームの汚染事例は 3 件であった。汚染微生物別の内訳は、サルモネラが 1 件、リステリアが 1 件、腸内細菌科菌群が 1 件であった。

1-6. デンマークにおけるアイスクリームの規格基準及びデンマークのアイスクリーム製造工場における運用実態（令和元年度）

2020 年 2 月 18～21 日にデンマーク獣医食品局 (DVFA)、デンマーク工科大学国立食品研究所 (DTU Food)、デンマークで約 50～60%のシェアを持ち欧州各国にもグループ企業が工場を持つアイスクリーム製造会社の製造施設、及び家族経営で 2 年前から事業を開始した小規模事業者のアイスクリーム製造施設を訪問し、専門家、経営者及び検査担当者との議論及び工場視察を行なった。

1-6-1. デンマークにおけるアイスクリームの製造及び消費の状況

デンマークでは 2015 年に 4.26 万キロリットル、2016 年に 4.65 万キロリットル、2017 年に 4.45 万キロリットルのアイスクリームが販売された。アイスクリームの 1 人あたりの年間消費量は、デンマークの製造会社が示した 2017 年 8 月 1 日時点の統計資料によると、デンマークは世界第 7 位とのものであった (<https://www.worldatlas.com>)。日本アイスクリーム協会が Web ページに掲載している 2016 年の世界各国の 1 人当り年間消費量 (ユーロモニター社調査) によると、デンマークは世界第 13 位 (8.2 リットル) で、17 位の日本 (6.5 リットル) の約 1.3 倍の消費量である (<https://www.icecream.or.jp/biz/data/consumption.html>)。

1-6-2. デンマークのアイスクリーム製造に関する各種基準等について

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

デンマークをはじめ EU 各国ではアイスクリーム製品に「賞味期限 (Best Before)」を表示することになっている。賞味期限の長さは事業者が自らの責任で設定することになっているので、製品の品質に自信のある事業者はより長く設定することも可能とのことであった。大規模製造施設では多種多様な製品を製造しているため、含まれる原材料を考慮し、製品ごとに異なる賞味期限を設定している。その長さは製品が冷凍保存される性格上、衛生上の問題というよりも製品の状態 (味や口当たり等) の保持の意味合いの方が大きいとのことであった。

1-6-3. デンマークでのアイスクリーム製造事業の認可等について

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

である。

1-6-4. デンマークの大規模アイスクリーム製造施設における検査実態について

視察した大規模製造施設は 1927 年創業の老舗アイスクリーム製造会社で、デンマークでアイスクリームの 50~60% のシェアを持っている。欧州 10 ヶ国に 11 カ所の製造施設を持ち (グループ企業 9 社)、欧州以外でもロシアや中国などへ輸出を行なっている。視察した施設からは、デンマーク国内及びドイツ、ノルウェー、スウェーデンに出荷しているとのことであった。さらに他社ブランドの生産 (OEM) も請け負っている。今回視察した製造施設はアイスクリームの生産量がデンマーク最大で、 $7,800\text{m}^2$ の面積を持ち、製造の担当者は 60~90 人である。現在約 200 種類の製品を製造している。製造設備としてはアイスクリーム原料の混合機 1 基と 8 本の製造ラインが配置されている。原料乳には殺菌乳を使用しており、生乳は使用していなかった。原料乳はデンマーク国内産と輸入がそれぞれ 50% 位とのことであった。

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

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

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

製品検査はシフト (8~12 時間) 毎に行なっ

ており、各シフトの初めの製品及び途中の製品の2検体について製造ライン（最大8ライン）ごとに行なっていた。各検体に対し製造施設内の検査室で一般細菌数及び大腸菌群の検査が行なわれ、一般細菌数が10万CFU/g超もしくは大腸菌群が100CFU/g超の異常が見られた場合は倉庫に保管されている当該シフトで製造された製品を市場に流通しないように留め置くとともに、検査会社に検体を送付し、腸内細菌科菌群、サルモネラ、リステリア等の詳細な検査を依頼するとのことであった。

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

原材料の混合タンクは週に1回検査を行なっていた。環境検査はリステリアについてのみ行なっており、外部検査会社に委託し、排水溝を年4回、製造ラインを年1回検査していた。水は井戸を源泉とする市の水道から供給されており、この水と受領した殺菌乳のタンクの検査も定期的に行なっていた。また、製造現場の空气中の浮遊細菌の検査のため、製造現場の各位置に開けっ放しにした培養プレートを1時間放置し、検査を行なっていた。

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

製品の保管に関しては、 -18°C を上回ること

がないように管理しているとのことであった。

DVFAによる衛生監視では、微生物検査に関しては検査記録等の確認が中心とのことであった。また、製造現場とは別に、DVFAは定期的に店舗から販売中の製品を収去して微生物検査を行なっているとのことであった。

1-6-5. デンマークの小規模アイスクリーム製造施設における検査実態について

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

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

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

1-7. 欧州諸国での乳・乳製品の生産、加工製造における衛生管理の状況、動向を探るためのインターネット情報検索（令和2年度）

インターネットで関連情報を検索し、最終的に以下の2報の文献を選択した。

「文献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/se
rvices/resources.ashx/000/634/680/Final_D
raft_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)

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

「文献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>

両文献とも、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。以下にそれらの内容の一部を紹介する。

○文献1

この文献は、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>）に関する章に焦点を当てた。

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。本報告書ではこれら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表2に示した。

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食品とリステリア（*Listeria monocytogenes*）、2) 乳製品とコアグララーゼ陽性ブドウ球菌、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。本報告書ではこれら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表3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。

○ 文献 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、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。文献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)に焦点を当てた。

第4章には基本的要件として6項目が挙げられている。

・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はある。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。

2. 国内の中及び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衛生管理（平成30年度）

2-1-1. 中規模及び大規模施設での牛乳製造に係る情報の整理（平成30年度分担報告書図1, 2）

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

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

一方、大規模施設は90年代初頭にHACCP体制を確立しており、ISO22000等も取得していた。同施設では日平均約121tの原乳を近郊の農場を中心に全国から3℃以下の輸送温度条件を付して受け入れ、複数種のUHT牛乳製品を製造し

ていた。施設内には100tのジャイロタンクを8台設置・運用し、同タンク内で受け入れた原乳を計画的に合乳としていた。現有の受入検査項目は乳等省令に定められた内容であり、総菌数はブリード法で4万//mLとの自主管理規定を設けていた。また、同日に連続製造される単一製品を1ロットと定義していた。

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

2-1-2. 中規模施設における原乳、製品、及び施設ふき取り検体からの衛生指標菌の検出状況（平成30年度分担報告書図3~5、表1）

原乳中の一般細菌数はISO法では $1.2 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^3$ CFU//mLであり、簡易迅速法ではAが $1.6 \times 10^3 \sim 4.3 \times 10^3$ CFU//mL、製品Bが $1.1 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^3$ CFU//mL、製品Cが $8.6 \times 10^2 \sim 2.3 \times 10^3$ CFU//mLであった。同検体での腸内細菌科菌群、大腸菌群の数値はISO法でそれぞれ9~33CFU//mL、24~51CFU//mLの範囲にあり、簡易迅速法の成績もこれに準ずるものであった。大腸菌は3/8(37.5%)の確率で認められたが、同値は最大2CFU//mLに留まっていた。黄色ブドウ球菌は15~101CFU//mLの範囲で検出された(図3)。

出荷前製品については、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌はいずれも陰性であり、一般細菌のみ $1 \sim 1.3 \times 10^2$ CFU//mL(平

均値は HTST 製品で 1.2×10^2 CFU//mL、LTLT 製品で 2.5×10^1 CFU//mL) の範囲で検出された。一方、簡易迅速法による一般細菌数の検出数値は検出用製品の別によらず、ISO 法による成績に比べ、低い成績を示した (図 4)。

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

2-1-3. 大規模施設における原乳、製品、及び施設ふき取り検体からの衛生指標菌の検出状況

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

施設環境拭き取り箇所としては、洗浄後の加熱殺菌器出口、冷却プレート出口のほか、稼働中の充填室内で充填機周囲の外部床と昇降台を検体とした。結果として、洗浄後の加熱殺菌器出口、冷却プレート出口、及び充填室内の昇降台については全ての指標菌が陰性となり、充

填室の床についても、一般細菌のみが 40CFU/100cm² 検出されるに留まった。

2-1-4. 製造工程を通じた構成菌叢の比較解析 (平成 30 年度分担報告書図 6)

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

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

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

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

2-2. アイスクリーム製造施設の衛生管理 (平成元年度)

2-2-1. 大規模及び中規模施設におけるアイスクリーム製造工程に関する情報整理 (令和元年度分担報告書図 1)

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

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

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

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

一方、中規模施設は、牛乳製造を主体とする中で、アイスクリーム製造もおこなっていた。同施設では出荷先の在庫状況を見て都度製造計画を立てる製造方式を取っており、視察時に

は製造ラインは稼働していなかった。また、同施設では同施設内で製造された低温殺菌牛乳を原料の一つとして用いていた。アイスクリーム製造は HEPA フィルターで管理された乳製品加工室内で行われており、大規模施設と同様に原料調合以降、充填に至る工程はインライン管理であった。充填は半自動の開放系機器を用いており、使用後洗浄も手動であった。加熱殺菌条件は、85～90℃・15 秒を採用しており、圧力モニタリングにより管理していた。自主検査には、原料、冷却・エイジング工程、充填・包装工程のほか、製品を対象としており、一般細菌数（30CFU//mL 未満）及び大腸菌群（陰性）を検査項目としていた。

2-2-2. 大規模施設における原料、施設ふき取り検体、及び製品からの衛生指標菌の検出状況（令和元年度分担報告書表 1）

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

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

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

2-2-3. 中規模施設における製品、施設ふき取り検体、及び生乳（参考品）からの衛生指標菌の検出状況令和元年度分担報告書（表 2）

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

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

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

2-2-4. 大規模施設での製造工程を通じた構成菌叢比較解析（令和元年度分担報告書図 2, 3）

施設 A では生菌・死菌の別を問わず、各検体由来 DNA を鋳型として 16S rRNA 解析に供した。アイスクリームの主原料である脱脂粉乳 A・B では構成菌叢が大きく異なっていたが、このうち、脱脂粉乳 B 検体で優勢であった *Streptococcaceae* は、充填ノズル周辺拭取り検体及び製品においても優勢な菌叢として認められた。同じく主な原料である粉末水飴検体については *Caulobacteraceae* が最も優勢な菌科として検出され、同菌科は製品が固化後、包装される間に輸送される際に直接載せられるトラップステージ拭取り検体及び作業従事者の手指洗浄用電解水検体においても最も優勢で

あった（令和元年度分担報告書図 2A）。

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

2-2-5. 生乳検体における各種衛生指標菌の挙動解析（令和元年度分担報告書図 4、表 3）

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

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

保存 0 日目に 1.92-3.77 logCFU//mL であった大腸菌群数は保存 1 日目には 1.96-4.53 logCFU//mL と微増したが、保存 2 日目には

1.79-3.59 logCFU//mL へと若干の減少を示し、保存 5 日目には 1.73-4.61 logCFU//mL と再び微増した。

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

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

2-3. 有症苦情事例のあった牛乳製造施設の汚染実態（令和 2 年度）

2-3-1. 当該施設の製造工程に関する情報整理

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令和 2 年度分担報告書図 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。

2-3-2. 衛生指標菌検出状況

(i) 生乳、中間・最終製品検体（令和 2 年度分担報告書図 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（令和 2 年度分担報告書表 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。

2-3-3. 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 (令和 2 年度分担報告書図 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 (令和 2 年度分担報告書図 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%) (令和 2 年度分担報告書図 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 (令和 2 年度分担報告書図 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%) (令和 2 年度分担報告書図 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%) (令和 2 年度分担報告書図 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 (令和 2 年度分担報告書図 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%、令和 2 年度分担報告書図 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 (令和 2 年度分担報告書図 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 (令和 2 年度分担報告書図 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 (令和 2 年度分担報告書図 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 (令和 2 年度分担報告書図 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 (令和 2 年度分担報告書図 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（令和2年度分担報告書図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令和2年度分担報告書図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（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（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。

2-3-4. 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℃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℃、15℃、25℃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℃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℃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℃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℃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℃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℃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℃で保存5日後2.53-2.54 logCFU//mLとなり、顕著な変動は示さなかった。一方、15℃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℃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℃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℃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. 国内の小規模製造施設の衛生管理に関する研究

3-1. 低温殺菌牛乳製造施設の工程管理及び衛生検査実態調査（平成30年度）

3-1-1. 調査対象施設概要

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

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

3-1-2. 製造工程の比較

各施設の製造フローチャートを山崎分担報

告書図1に示した。生乳の受入工程においては、施設Aではミルクローリーから専用パイプを用いて閉鎖系で受入がなされていたのに対して、施設Bでは専用バケツで受入れた生乳をホールディングタンクへ開放系で投入しており、また施設Cにおいても専用ポリタンクで受入れた生乳を受入槽へ開放系で投入していた。加えて、容器包装形態が異なるために、施設Aと施設B、Cの間で充填工程に差が観られた。これらの結果から同種の事業体であっても、施設毎に生物学的危害要因混入の可能性が考えられる工程に差があることが明らかとなった。

3-1-3. 検査体制及び検査項目の比較

各施設における自主検査実施状況を山崎分担報告書表2に示した。施設Aは事業所内に製造部門とは独立した検査部門を持つ施設である一方で、施設B及びCでは独立した検査部門を持たず製造業務を行う職員が検査業務を兼務していた。また、施設B及びCにおいては特に、製造施設で実施可能な検査項目が限られており、乳等省令で成分規格として定められている項目を含めた多くの検査項目を外部委託検査に頼っている現状が明らかとなった。加えて、すべての施設で自主検査として何らかの簡易検査法を採用している実態が確認された。また、従業員への聞き取りにより、簡易検査法の使用方法について必ずしも十分な教育を受けて実施されているものとは限らないことが明らかとなり、乳製品検査への簡易検査法の導入や試験法提示にあたって、検査精度や結果の信頼性確保のために、適切な適用箇所や試験方法の明示を行う必要性が示された。

3-2. アイスクリーム製造施設の工程管理及び衛生検査実態調査（令和元年度）

3-2-1. 調査対象施設概要

従業員数2～5名の小規模製造工場を調査対象とした（山崎分担報告書表3）。調査対象とした3つの事業者のうち、施設FはFSSC 22000の認証を受けていた一方で、施設D及びEは上記のような衛生管理過程に関する定期的な第三者評価を受けていない施設であった。各施設とも食品衛生法の改正に伴うHACCPに沿った衛生管理の制度化において小規模事業者への分類が想定される事業所であるものの、施設D及びEにおいてはインターネット販売や業務用販売を通して全国各地で入手可能な販売ルートを構築しており、本邦の食品衛生の向上を考える上で、これら小規模製造施設の衛生管理の重要性が示された。

3-2-2. 製造工程の解析

小規模施設における製造フローチャートを山崎分担報告書図2に示した。調査を行った全ての施設において基本的には共通の製造フローチャートとなっており、これは一般社団法人日本アイスクリーム協会が作成する「HACCPの考え方を取り入れた衛生管理のための手引書（小規模なアイスクリーム類製造事業者向け）」に示される「バッチ式加熱殺菌冷却・カップアイスの製造工程例」（<https://www.mhlw.go.jp/content/11135000/000554002.pdf>）によく一致するものであった。小規模アイスクリーム製造事業者においては同一製造ラインにて複数のフレーバーを製造する事業形態が一般的であったが、主原料となる乳製品等については加工済み製品を受け入れている一方で、フレーバーを決定する副原料については加工品に加えて工場内で加工するものも多く見受けられた。また、副原料については多くの製品で加熱殺菌工程の後に添加されることから、フレーバーごとに細菌学的汚染度に差が生じる可能性が抽出された。

3-2-3. 検査体制の比較

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

3-3. 低温殺菌乳に対する簡易検査法の有効性の検討（平成30年度）

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

EUにおいては低温殺菌牛乳の成分規格として腸内細菌科菌群数で1 cfu/mL未満であることが求められている。国内小規模製造施設で製造された低温殺菌牛乳に対する腸内細菌科菌群の検査においては、ISO法及び簡易検査法のいずれにおいても検出下限以下（1 cfu/mL未満）となった（山崎分担報告書図3A, B）。生乳についてはISO法-簡易法間で比較的良好な相関がみられ生乳の衛生状態モニタリングにおけ

る簡易検査法の有用性が示された（同図3C, D）。

生菌数の検査では、低温殺菌牛乳に対する検査において製品によってはISO法に比較して簡易検査法で低い値となる傾向が観られ、低温殺菌牛乳の生菌数検査に簡易検査法を導入するには慎重な検討が必要であることが明らかとなった（同図4A）。ISO法と簡易検査法を比較すると、両方で培養条件（ISO法では30℃で72時間、簡易検査法では32℃もしくは35℃で48時間）が異なっており、この事が原因で両者の結果に差が出ている可能性が考えられた。我々は培養時間を変更した追加実験において、培養条件の調整により簡易検査法の種類によっては培養法と同等の結果を得る事も可能であることを明らかにしている（同図7）。以上の結果は、低温殺菌牛乳検査に対する簡易検査法の使用法の提示について慎重な検討の必要性を示すものとする。一方で、生乳の検査においてはISO法-簡易法間で同等の結果が得られた（同図4C, D）。

大腸菌群数の検査では、低温殺菌牛乳に対する検査においてISO法及び簡易検査法のいずれにおいても検出下限以下となり（同図5A, B）、また生乳の検査においてもISO法-簡易法間で同等の結果が得られ（同図5C, D）、簡易検査法の有用性が確認された。

大腸菌数の検査では、低温殺菌牛乳に対する検査においてISO法及び簡易検査法のいずれにおいても検出下限以下であった（同図6A, B）。一方で、生乳に対する検査ではISO法-簡易検査法間で施設Aでは比較的良好な相関が得られたものの、施設Cでは簡易法2でのみ陽性の結果が得られており（同図6C, D）、各施設において簡易検査法を選択する際には施設毎に乳の特性を考慮した慎重な検討が必要であることが示唆された。

3-4. アイスクリームに対する簡易検査法の有効性の検討（令和元年度）

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

大腸菌群、大腸菌及び腸内細菌科菌群においては全てのフレーバーで ISO 法及び簡易検査法のいずれにおいても検出下限 (10^1 CFU/g) 以下であった (Data not shown)。一方で、生菌数については施設 D では最大で $10^{3.5}$ CFU/g、施設 E では最大で $10^{2.5}$ CFU/g、施設 F では 0 cfu/g が検出され、各施設で製造された全ての製品が乳等省令に定める成分規格に比較して十分に低い値であることが確認された（山崎分担報告書図 8）。検出される生菌数についてフレーバー間での比較を行ったところ、施設 D では最大で 10^2 CFU/g 程度、施設 E では最大で 10^1 CFU/g 程度の差が確認された。

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

3-5. 簡易検査法に与える試験条件の影響の検討（令和元年度）

先に示した様に、小規模施設においては十分な検査設備が整っておらず、自主検査に簡易検査法を導入したとしても、その検査精度の担保が難しい現状が抽出された。すなわち、小規模施設では検査を実施する上で十分な施設が整っておらず、簡易検査法を用いた自主検査の実施において検査結果に影響を与える要因（特性要因）の制御が十分に実施出来ない現状が明らかとなった。簡易検査法のプロトコルを解析した結果、山崎分担報告書図 9 に示す複数の特性要因が検出された。これらの中で「試料の縮分」及び「コロニーカウント」については試験実施者の教育訓練での制御が可能であり、また「添加量」については最終的な試験結果に及ぼす影響を使用する機器の精度から推定可能である。一方で、「試料の前処理条件（温度、時間）」及び「培養条件（温度、時間）」については、温度や時間の変動と試験結果（コロニー数）の相関（影響の重大さ）の評価が難しく、実測データを基にした評価が必要となる。また、小規模施設においては設備的な問題から精確な温度制御の実施が難しい実態も明らかとなっている。そこで、本研究ではアイスクリーム製品を試料として用い、簡易検査法を利用した際の「試料の前処理（融解）条件（温度、時間）」、及び「培養条件（温度及び時間）」の変動が試験結果に及ぼす影響について考察を行った。

「試料の融解条件（温度、時間）」が試験結果に及ぼす影響について解析した結果、融解条件間で試験結果に有意な差は認められなかった（同表 4）。一方で「培養条件（温度及び時間）」が試験結果に及ぼす影響について解析した結果、 20°C 、24 時間の培養で得られた結果は他の条件下で培養した際の結果に比較して外れ値とみなされた。また、得られた結果群を母集団としてそれぞれの測定結果の Z 値を算出した結

果、20°C、24 時間の培養で得られた結果のみが Z 値 $|Z| > 3$ となった (同表 5)。

3-6. 加熱殺菌による衛生指標菌数動態の解析 (令和 2 年度)

先に示した様に、小規模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 경우가多く確認されており、製造事業者間で原材料乳の性状に多様性がみられる可能性が示唆された。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、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°C で 30 分間処理する低温保持殺菌 (LTLT) 方式が主流であることも明らかとなった。そこで、複数の農場から様々な生乳を入手し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、原材料乳に多様性を持つ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。

3-6-1. 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 10, 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 10, 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 10, C)、遊離脂肪酸濃度 (同図 10, D)、乳中ケトン体濃度 (同図 10, 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 10, 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 11)。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。

3-6-2. 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 $2 \log_{10}$ CFU//mL 以上の低下を観察した (山崎分担報告書図 12)。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
多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. 市販乳及び乳製品における衛生指標菌の汚 染実態と簡易培地の評価

4-1. 諸外国における低温殺菌牛乳等の微生物 規格（平成 30 年度～令和 2 年度）

平成 30 年分担報告書表 1 に諸外国における
低温殺菌牛乳、令和 2 年度分担報告書表 3 にバ
ター製品、表 4 にアイスクリーム類の微生物規
格を示した。EU では低温殺菌牛乳について、製
造工程の最終時の微生物規格として腸内細菌
科菌群を 10CFU//mL 未満と定めており、1 ロッ
トについて 5 検体試験し、全検体合格でなくて
はならない、としていた。一方米国では、生菌
数を 2.0×10^4 CFU//mL 以下とし、大腸菌群につ
いては 10CFU//mL（バルク出荷時は 100 CFU//mL）
以下としていた。規格適用箇所については規定
されていなかった。Codex や FAO/WHO に科学的
助言をおこなっている ICMSF は、製造終了時の
微生物規格として腸内細菌科菌群を対象とし
た 3 階級のサンプリングプランを設定しており、
1 ロットについて 5 検体試験し、その内 2 検体
までは 5CFU/ mL であっても当該ロットを合格
とする（3 検体は 1 CFU//mL 未満でなくてはなら
ない）、としていた。英国及びオーストラリアで
は飲用の生乳（未殺菌乳）に微生物規格を設定
しており、英国では農場での生菌数を $2.0 \times$

10^4 CFU//mL、大腸菌群を 100CFU//mL としてい
た。オーストラリアでは製造、加工、販売時の
微生物規格としてカンピロバクター、大腸菌群、
大腸菌、サルモネラ属菌及び生菌数をサンプリ
ングプランに基づき設定していた。

令和 2 年度分担報告書表 3 に日本国内及び諸
外国におけるバターの、同じく表 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
手順を令和 2 年度分担報告書図 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衛生

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法から混釈培養法に変更し、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。

4-2. 低温殺菌牛乳等の汚染実態調査(平成30年度)

調査結果概要を平成30年度分担報告書表2に示した。公定法での細菌数(32°C48時間培養)は、LTLT乳53検体で平均1.49 logCFU/mL(検出限界以下~4.07 logCFU/mL)、HTST乳19検体で平均1.31 logCFU/mL(検出限界以下~3.36 logCFU/mL)、HTLT乳16検体で平均0.29 logCFU/mL(検出限界以下~1.32 logCFU/mL)であった。一方、公定法と同一の培養条件(32°C48時間)で簡易培地を用いた際の実菌数はLTLT乳で平均1.03 logCFU/mL(検出限界以下~4.27 logCFU/mL)、HTST乳で平均0.97 logCFU/mL(検出限界以下~3.40 logCFU/mL)、HTLT乳で平均0.28 logCFU/mL(検出限界以下~1.38 logCFU/mL)であった。また、ISO法に

よる細菌数(30°C72時間培養)は、LTLT乳で平均2.06 logCFU/mL(検出限界以下~4.34 logCFU/mL)、HTST乳で平均1.66 logCFU/mL(検出限界以下~3.61 logCFU/mL)、HTLT乳で平均0.75 logCFU/mL(検出限界以下~2.08 logCFU/mL)であった。ISO法と同一の培養条件で簡易培地を用いた際の実菌数は、LTLT乳で平均1.90 logCFU/mL(検出限界以下~4.70 logCFU/mL)、HTST乳で平均1.23 logCFU/mL(検出限界以下~3.62 logCFU/mL)、HTLT乳で平均0.54 logCFU/mL(検出限界以下~1.58 logCFU/mL)であった。

細菌数における試験法間での有意差検定を通じ、公定法と簡易培地の間では、LTLT乳とHTST乳では有意差を示したが、HTLT乳では有意差は見られなかった(平成30年度分担報告書表2)。また、両者の相関を寄与率で算出したところ、LTLT乳で0.0614(同図1)、HTST乳で0.7169(同図4)、HTLT乳で0.186(同図7)であった。公定法とISO法の間では、LTLT乳、HTST乳及びHTLT乳のいずれも有意差を示し(同表2)、寄与率はLTLT乳で0.5177(同図2)、HTST乳で0.7863(同図5)、HTLT乳で0.1306(同図8)であった。一方、ISO法と簡易法の間では、HTST乳では有意差を示したが、LTLT乳とHTLT乳では差は見られず(同表2)、寄与率は、LTLT乳で0.6093(同図3)、HTST乳で0.6598(同図6)、HTLT乳で0.7197(同図9)であった。一部の温度逸脱等により参考値として集計した検体においても、LTLT乳における寄与率は、公定法とISO法及びISO法と簡易法の間で高く、公定法と簡易法の間で低い傾向を示した(同図10、11及び12)。今回試験した検体からは、いずれの試験法においても、黄色ブドウ球菌及び大腸菌は検出されなかった。一方大腸菌群は、LTLT乳1検体より検出された。

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

4-3. アイスcream類の汚染実態調査(令和元年度)

アイスcream類の公定法での細菌数(32°C 48 時間培養)は、アイスcream 52 検体で平均 1.026 log CFU/g(検出限界未満~3.790 log CFU/g)、アイスマルク 45 検体で平均 1.187 log CFU/g(検出限界未満~3.301 log CFU/g)、ラクトアイス 30 検体で平均 1.140 log CFU/g(検出限界未満~3.072 log CFU/g)であった(令和元年度分担報告書表 1)。3つのカテゴリーの細菌数に、差は認められなかった($p=0.6516$)。公定法と同一の培養条件(32°C48 時間)で簡易培地 1 を用いた際の細菌数は、アイスcream で平均 1.098 log CFU/g(検出限界未満~4.017 log CFU/g)、アイスマルクで平均 1.156 log CFU/g(検出限界未満~3.301 log CFU/g)、ラクトアイスで平均 1.206 log CFU/g(検出限界未満~2.207 log CFU/g)であった。いずれのカテゴリーにおいても、公定法と簡易培地 1 における細菌数に有意な差は見られなかった。簡易培地 2 は製品の指示書に従い、32°C24 時間で

菌数を測定した。細菌数は、アイスcreamで平均 0.861 log CFU/g(検出限界未満~3.644 log CFU/g)、アイスマルクで平均 0.787 log CFU/g(検出限界未満~3.322 log CFU/g)、ラクトアイスで平均 0.891 log CFU/g(検出限界未満~2.044 log CFU/g)であった。簡易培地 2 の細菌数を公定法と比較したところ、アイスマルクでは有意に低く、アイスcreamとラクトアイスではやや低い傾向が見られた。ISO 法による細菌数(30°C72 時間培養)は、アイスcreamで平均 1.237 log CFU/g(検出限界未満~3.909 log CFU/g)、アイスマルクで平均 1.404 log CFU/g(検出限界未満~3.352 log CFU/g)、ラクトアイスで平均 1.268 log CFU/g(検出限界未満~3.163 log CFU/g)であった。ISO 法における細菌数を公定法と比較したところ、アイスcreamとアイスマルクにおいて有意に高い結果が得られたが、ラクトアイスでは差は見られなかった。ISO 法については SPC 寒天培地を用いた混積培養と平行して、同培地を用いた表面塗抹を行ったところ、アイスcreamで平均 0.868 log CFU/g(検出限界未満~3.716 log CFU/g)、アイスマルクで平均 0.785 log CFU/g(検出限界未満~3.505 log CFU/g)、ラクトアイスで平均 0.668 log CFU/g(検出限界未満~2.179 log CFU/g)となり、いずれのカテゴリーでも混積培養における細菌数よりも有意に低い結果となった。

各カテゴリー間の相関を寄与率で算出したところ、アイスcreamにおいて公定法と簡易培地 1 では、0.7303(令和元年度分担報告書図 1)、簡易培地 2 で 0.6521(同図 2)、アイスマルクでは簡易培地 1 で 0.2875(同図 3)、簡易培地 2 で 0.0783(同図 4)、ラクトアイスでは簡易培地 1 で 0.3343(同図 5)、簡易培地 2 で 0.3795 であった(同図 6)。公定法と ISO 法の

間の寄与率は、アイスクリームで0.7149(同図7)、アイスマルクで0.4201(同図8)、ラクトアイスで0.3917(同図9)であった。一方、ISO法の混積培養と表面塗抹の間の寄与率は、アイスクリームで0.5915(同図10)、アイスマルクで0.2525(同図11)、ラクトアイスで0.0772(同図12)であった。

今回試験した検体からは、いずれの試験法においても、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌は検出されなかった。一方腸内細菌科菌群は、アイスクリームの15.4%(8/52検体)、アイスマルクの13.3%(6/45検体)及びラクトアイスの6.7%(2/30検体)より検出された(令和元年度分担報告書表2)。全体における陽性率は、12.6%(16/127検体)であった。フィッシャーの正確確率検定により、アイスクリーム、アイスマルク及びラクトアイス間の陽性率の検定を行ったところ、アイスクリーム類の種別による陽性率に有意差は見られなかった($p=0.551414$)。腸内細菌科菌群陽性であった16検体は全て、定性法(ISO 21528-1:2016)で検出された。一方、定量法(ISO 21528-2:2016)においても腸内細菌科菌群が検出された検体は、アイスクリーム2検体のみであり、いずれの検体においても、検出菌数は5 CFU/gであった。腸内細菌科菌群が検出された全16検体で、腸内細菌科菌群用の簡易培地からは菌は検出されなかった。また、腸内細菌科菌群陽性を示した検体からは、公定法及び簡易培地のいずれにおいても大腸菌群は検出されなかった。検出された腸内細菌科菌群の集落は、純培養後菌種同定を行ったところ、8検体由来の菌株が*Enterobacter*属の細菌であった(令和元年度分担報告書表3)。

4-4. バター製品の汚染実態調査及び簡易培地

の検討(令和2年度)

調査結果概要を令和2年度分担報告書表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 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 CFU/g(検出限界未満~5.886 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($p=0.018$)。簡易培地4については、細菌数の平均は1.389 log CFU/g(検出限界未満~6.326 log 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 CFU/g(検出限界未満~7.248 log CFU/g)であった。ISO法における細菌数を公定法と比較したところ、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積培養と平行して、同培地を用いた表面塗抹を行ったところ、平均1.465 log CFU/g(検出限界未満~5.556 log CFU/g)となり、混積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(令和2年度分担報告書図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(令和 2 年度分担報告書表 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(令和 2 年度分担報告書表 2)。

D. 考察

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では、近年諸外国において殺菌乳による健康被害事例の発生報告が少ないこと

が示され、殺菌乳の製造における HACCP プラン、殺菌法、検査法、及び施設の衛生管理等が効果をあげていることが示唆された。報告されている殺菌乳による健康被害事例は殺菌後の汚染によるものがほとんどで、工場の設備環境が影響しているか、加熱工程での設備トラブル等が疑われる事例であった。一方で未殺菌乳の喫飲に起因する健康被害事例が各国で数多く報告されている。米国や EU の回収汚染情報データベースに殺菌乳の微生物汚染に関連した情報がほとんど報告されていないことから、各国において殺菌乳の製造工程は適切に管理されていることが示唆された。

殺菌乳の規格基準に関して、デンマークの国内基準は EU 規則に沿って設定されており、微生物検査や温度管理等は各社でデンマーク国内基準より厳しい基準を自主的に設定して衛生管理を行っていた。視察したデンマークの乳・乳製品製造工場では、EU 規則で要求される殺菌乳の最終製品における腸内細菌科菌群の検査は年に 4 回で、製品の賞味期限日に行っていた。

アイスクリームの規格基準に関しては、デンマークの国内基準は EU 規則に沿って設定されていた。また温度管理等は各社でデンマーク国内基準より厳しい基準を自主的に設定して衛生管理を行っていた。微生物検査に関しては、自社検査として一般細菌数や大腸菌群を使用することで通常の衛生状態の確認を行ない、加えて定期的に検査会社に依頼して EU 規則遵守の確認を行っていた。外部の検査会社では EU 規則に沿って ISO 法に準じていると妥当性が評価された代替法を使用していた。

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)では、EC規則2073/2005に関する部分に焦点を当て、乳及び乳製品に関連する食品安全基準、工程衛生基準について、製品カテゴリーと検査対象微生物種の項目のみ抽出した。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た。

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った。

中及び大規模製造施設の衛生管理に関する研究では、初年度において中規模の牛乳製造施設及び大規模施設を対象とした衛生管理実態の調査を微生物学的観点から実施した。両施設は自主管理基準を設け、衛生確保に向けた管理体制を構築・運用していた。特に、中規模施設では原乳受け入れ時に大腸菌群検査も実施し、検査結果を基に、良好な衛生状況の原乳を提供する生産農場を差別化し、加熱殺菌工程により、無菌化を図ることが困難である LTLT 牛乳の原料として用いる等、フードチェーンを通じた安全確保に向けた活動方針を立てていたことは興味深い対策と感じた。中規模施設の施設設備

は概ね大手施設と同等であり、原乳受け入れ後から殺菌後貯乳までの工程は閉鎖ラインで自動管理される状況ではあった。一方で、同施設では一時的に開放ラインを含む充填工程も加熱殺菌工程等と同一室内で行われていた。そのため、充填工程周辺の施設環境拭き取り検査を実施したところ、充填機ノズルから少数の一般細菌が検出される状況を確認した。検出された一般細菌は同定により、*Bradyrhizobium* 属菌が主体であることが明らかとなり、更に同菌属は製品からも少数ではあるが検出されたことから、同工程の更なる洗浄・消毒の徹底を図ることが、同施設における更なる安全性確保に向けた対策と目される知見を得た。同菌属は非病原菌であることから、本検出成績をもって当該製品が健康危害を招きうる状況にはないと考えられ、直ちに改善措置を図る必然性は低い状況にはあるが、腐敗変敗等を介した消費期限設定等への影響は否定できる状況にはないため、今後対策と効果の検証について事業者との間で更なる連携を図り、課題の解決を図る必要があると思われる。

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

大規模牛乳製造施設では、工程別の施設環境の区分化と中央監視システムによる各管理要件のモニタリングが徹底されていたほか、使

用・洗浄後の施設環境拭き取り検査結果は、使用後のCIP洗浄が有効に機能している実態を示すものと考えられた。また、原乳中の指標菌のうち、特に一般細菌数で中規模施設に比べ高い傾向を認めたが、同施設由来の原乳、中間・最終製品は何れも大規模施設で同一ロットを確保する意義から最大48時間保存した後、更に一日かけて冷蔵輸送されてから試験に供したため、この間に低温細菌の増殖を招いた可能性が考えられた。実際に、構成菌叢解析を通じ、原乳及び殺菌前貯乳検体では低温細菌に位置付けられる *Pseudomonas* 属等が高い占有率をもって検出された。また、同施設で原乳受け入れ時に行われる総菌数の検査結果を別途確認したところ、約1か月間の検査結果は何れも4万/mL以下であったことを踏まえると、本調査用に同一ロットを確保することを最優先事項としたための保存・輸送時間の延長が加熱殺菌前の原乳の一般細菌数拡大につながったと想定される。なお、加熱殺菌処理後の検体及び最終製品については全ての衛生指標菌が陰性であり、UHT処理は低温細菌を含めた細菌の幅広い制御に資することが改めて検証されたといえる。

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

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

両施設はそれぞれ自主管理基準を設け、衛生確保に向けた管理体制を構築・運用していた。

大規模施設では製品に加え、エイジング工程を重点的な工程管理対象として、微生物検査を定期的実施していた。本年度のある月に実施した自主検査記録を確認したところ、検体数1750に対し、一般細菌数で自主管理基準として定めた300CFU/mlを超えた検体数は僅かに3検体（陽性率として0.17%）であった。これらの陽性検体が確認された場合の措置としては同一ロット製品の検査記録及び工程中の不備の有無を改めて確認することが一般的な対応内容であることは言うまでもない。

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

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

生乳については受入後速やかに製造加工に供されることが衛生の確保に有効とは目され

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

最終年度の本研究では、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℃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史料される。

小規模低温殺菌牛乳製造事業者においては施設内で実施可能な衛生検査について、大規模施設に比較して限られた項目となっており、また、公定法が指定する培養法による衛生検査が現実的には実施不可能な施設が多い実態が明らかとなり、これらの小規模施設の状況を勘案した衛生試験法提示の必要性が示された。加えて、これらの小規模施設においては、衛生検査に精通していない作業員により検査が実施されている実態も明らかとなり、簡易法を含めた標準試験法の導入において、試験方法の整備に加え、その適切な運用方法の提示の重要性が明らかとなった。

小規模アイスクリーム製造事業者においても、小規模低温殺菌牛乳製造事業者と同様に、施設内で実施可能な衛生検査について非常に限られたものとなっており、これらの小規模施設の状況を勘案した衛生試験法提示の必要性が示された。特に、小規模アイスクリーム製造事業者においては、同一工場内で複数のフレーバーを生産する事業形態が一般的であり、製品目数が少ない低温殺菌牛乳製造事業者と比

較して、簡易な試験法導入の必要性がより強く示された。フレーバーを決定する副原料は加熱殺菌工程の後で加えられることが一般的であり、一般社団法人日本アイスクリーム協会が作成する「HACCP の考え方を取り入れた衛生管理のための手引書（小規模なアイスクリーム類製造事業者向け）」内においても、副原料を加熱殺菌後に添加する場合は殺菌済みの原料を使用することが求められている。副原料については加工済み製品を購入し使用する場合には、商品価値付加の理由から各事業者において独自に加工したものも使用されており、その加工方法もフレーバーごとに様々である。本研究の解析結果からフレーバーごとに最終製品の細菌学的汚染度が異なることが明らかとなった。これらの結果及び、小規模事業者において同一製造日に複数のフレーバーを生産し、かつ各フレーバーを小ロットで生産している実情を考えると、簡易検査法を用いた迅速な日常検査による各製品の細菌学的汚染度のトレンド解析は非常に有用かつ効果的な方法であると考えられる。

低温殺菌牛乳製造施設における簡易検査法の有用性に関する検討においては、一部の検査項目において ISO 法-簡易検査法間ならびに簡易検査法間で結果に差がみられ、施設ごとに乳の性質を勘案した最適な検査法選択の必要性が示唆された。小規模製造施設において衛生検査に精通していない作業者が検査を実施している現状を踏まえると、小規模施設において簡易検査法を導入する際には専門家による支援を含めた慎重な検討の必要性も示唆された。

小規模アイスクリーム製造施設で製造された製品に対する解析においては、同一事業者にて製造された複数のフレーバーに対して ISO 法と簡易検査法の結果を比較したところ、ISO 法

に比較して簡易検査法で若干低い値を示す傾向にあったものの、全てのフレーバーにおいてその差は \log_{10} CUF/g < 1 となり、成分規格に対して十分に低い汚染度の国内流通品に対して簡易検査法が十分に使用可能な方法であることが確認された。一方で、たとえ簡易検査法を用いた試験の実施を計画したとしても、小規模施設においては現状では十分な試験設備が備えられているとはいえず、各施設において簡易検査法に添付の取扱説明書に従った試験の実施が現実的ではない実態も明らかとなった。本研究では精確な温度制御をしていない条件下で簡易検査法を利用する場合を想定し、温度条件が試験結果に与える影響についてアイスクリーム製品を検体として解析を行った。その結果、25 - 37°C、24 -72 時間の範囲においては個々の条件下で得られる試験結果に有意な差は観られなかった。以上の結果から、簡易検査法は恒温槽などの設備の精確さが担保できない事業者においても十分に使用可能な方法であることが示唆された。

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、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た。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。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。

市販乳及び乳製品の衛生指標菌汚染実態と簡易培地の妥当性の検討に関する研究では、初年度の本研究により、LTLT 乳において混釈培養による公定法と簡易培地（32℃48 時間培養）での集落形成に有意な差があることが示された。

一方、培養時間の長い ISO 法と簡易法（30℃72 時間培養）では有意差はみられなかったことから、低温殺菌による半致死的な加熱損傷が、簡易培地での集落形成性を低下させ、増殖の遅延を引き起こしている可能性が示唆された。一方 HTLT 乳は低温殺菌牛乳の中でも殺菌温度が高く、殺菌時間が長いため、牛乳中の残存菌数が LTLT 乳及び HTST 乳よりも低いことから、公定法及び ISO 法と簡易法の間での差が見られなかった。簡易培地は公定法に比べ、最終判定までの所要日数が短く、細菌数の試験では検出感度も高いことから、食品の微生物試験における有用性は高いと思われるが、製品の特性上、加熱損傷菌が多く含まれ、また、製品中への *Bacillus* 属等の耐熱性菌の残存がおりうる低温殺菌牛乳等に関しては、最終製品の基準適合性試験よりも製造工程管理への使用が適していると思われた。

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

ター製品においては、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に公定法と差が見られず、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。

本研究により、国内で流通している低温殺菌牛乳、アイスクリーム類及び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。細菌数の規格基準が設定されている低温殺菌牛乳（88検体）及びアイスクリーム類（127検体）に、細菌数の規格基準超過検体は見られなかった。細菌数についてはバターの微生物規格に設定されておらず、今回の調査では $5 \log \text{CFU/g}$ を超える製品が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、それらの製品に乳酸菌が添加されているのかは不明であった。

本研究で用いた全検体で、黄色ブドウ球菌及び大腸菌の陽性検体は見られなかった。アイスクリーム類とバターでは大腸菌群も全検体で非検出であった。一方、アイスクリーム類の16検体（12.6%）については腸内細菌科菌群定性法で陽性を示し、うち2検体については定量法で菌が検出されていた。また、腸内細菌科菌群が定性法（検出下限値は 0.04 CFU/g ）のみから検出された14検体において、その菌量の理論値は $0.04 \sim 4.99 \text{ CFU/g}$ であり、定量法においても検出された2検体では 5 CFU/g であったことから、いずれの検体も腸内細菌科菌群を製品出荷時の製造工程規格とするEU規格において

も、逸脱となる検体は見られなかった。バター製品においては、5検体（11.1%）について腸内細菌科菌群定性法で陽性を示した。5検体全てにおいて定量法では検出限界未満となったことから、それらの汚染菌量は理論値で $0.04 \sim 4.99 \text{ CFU/g}$ であることが示唆された。アイスクリーム類、バターともに、検出された腸内細菌科菌群細菌の一部は大腸菌群に属するものであったが、多くの検体では大腸菌群試験法の検出限界未満（ $< 5 \text{ CFU/g}$ ）の汚染菌量であったため、大腸菌群試験では検出されなかったと考えられた。アイスクリーム類において、腸内細菌科菌群定量法で菌が検出された一方、検出感度が同じ大腸菌群試験法においては菌が検出されなかった2検体については、大腸菌群試験法で用いる選択分離培地であるデソキシコレート寒天培地が乳糖を含むのに対し、腸内細菌科菌群試験法で用いる選択分離培地であるVRBG寒天培地がブドウ糖を含んでおり、対象菌の増殖性に相違が見られたためと推察された。本研究により、乳及び乳製品の衛生管理のための微生物規格基準項目として、大腸菌群に代わり腸内細菌科菌群（定量試験）を用いた場合にも、流通している製品に違反となるものはほとんど見られなかったと思われた。一方で、それらの試験法で疑わしい集落が得られた際の確認試験については、腸内細菌科試験の方が簡便であり、大腸菌群試験に代わる項目としてある程度の利点があると推察された。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も随時行われていることが明らかとなった。

E. 結論

乳及び乳製品の衛生管理に関する海外動向に関する研究により、殺菌乳に関連する食中毒アウトブレイクの発生件数は世界的に少ないことが確認された。乳に関連して発生する食中毒アウトブレイクは多くが未殺菌乳によるものであることが示唆された。同様に殺菌乳の微生物汚染も多くは発生していないことが確認された。

現地視察の結果、デンマークでは HACCP にもとづき、乳製造工場における衛生管理が適切に行われ、自社や業界団体、行政機関による指導も効果的に行われていることが確認された。EU 加盟国であることから EU 規則にもとづいた国内基準を設定しているが、さらにそれを上回る自社基準を設定してより高い安全性を担保していた。細菌数等を衛生指標とした HACCP を実施したうえで、検査法や検査の頻度に関しても EU 規則を遵守し、ISO 法や迅速検査法を活用しつつ、その頻度に関しては殺菌乳の腸内細菌科菌群の検査が年に 4 回という現実的な頻度で対応していた。

市販のアイスクリームに関連する微生物食中毒アウトブレイクの発生件数は米国でも少ないことが確認された。また回収や汚染事例も米国、EU ともに少ないことが確認された。

デンマークでは HACCP にもとづき、アイスクリーム製造工場における衛生管理が適切に行われていた。EU 加盟国であることから EU 規則にもとづく国内基準を設定しているが、大規模製造施設ではそれを上回る自社基準の設定や、行政機関による指導も効果的に行われていることが確認された。小規模施設においては行政機関の定期的な監視指導により安全を確保していた。日常の施設内検査では一般細菌数及び大腸菌群による確認を行ない、異常が認められた場合には詳細な微生物検査を外部検査会社

に依頼していた。小規模製造施設では全ての検査を外部検査会社に依頼していた。検査会社では検査法や検査の頻度に関して EU 規則を遵守し、ISO 法や迅速検査法を活用しつつ対応していた。

インターネット検索により得られた英国の事業者向けのガイドには、乳及び乳製品について規定された EU の微生物基準がリスト化されて記載されていた。また、これらの基準の遵守にあたっての留意事項や、基準の選択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、及びそれへの対応の理解に役立つと考えられる。

以上のような海外情報を参考に、わが国において、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、今後の国際的な整合性を図る観点からの検討が必要であると考えられる。

中及び大規模製造施設の衛生管理に関する研究では、初年度実施した牛乳製造施設調査において、LTLT/HTST 牛乳を製造している中規模施設では、UHT 牛乳を製造している大規模施設と同等の製造施設設備を用いていたが、充填工程は前工程との明確な施設区分化がなされておらず、充填機ノズル及び製品からは非病原菌が検出されたことから、同工程環境から製品への細菌混入を招きうる実態が明らかとなった。また、試験法として、簡易迅速法（フィルム培養法）の適用範囲を明示するためには今後更なる検証が必要と考えられた。

次年度に実施したアイスクリーム製造事業者 2 社の協力を得て行った製造工程管理並びに同実態調査の結果、国内のアイスクリーム製造段階における製造基準は適切に遵守されている状況を確認できた。一方、製造基準や成分規格の試験項目として乳等省令に基づいた大腸

菌群を糞便汚染指標とすることの適切性については、国際動向を踏まえた上で、原料、中間・最終製品中での挙動に関する知見を集積・整理することが必要と思われた。

最終年度には、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、低温殺菌牛乳製造施設及びアイスクリーム製造施設の調査から、小規模施設内で実施可能な衛生検査が非常に限られたものである実態が明らかとなった。これらの施設において衛生検査の多くを外部検査機関への受託検査に頼っている現状からも、今後の新たな衛生管理手法の導入において、簡易検査法が担う役割の重要性が強く示された。特に、小規模アイスクリーム製造施設では細菌学的汚染度の異なる複数のフレーバーを小ロットで製造している実態が明らかとなり、各施設において簡易検査法を利用した迅速な日常検査導入の重要性が示唆された。加えて、小規模事業者では十分な教育訓練を受けていない従業員が検査を実施している等の簡易検査の運用方法についての問題点も抽出され、簡易検査法を用いた標準試験法の整備においては、各施設での適切な適用箇

所や運用方法に関する支援を行う必要性も示された。簡易検査法を用いた試験の結果に試験設備条件が与える影響について検討した結果、恒温槽等を用いた精確な温度管理が難しい試験条件下においても試験条件の大まかなコントロールにより、簡易検査法を用いて適切な結果が得られることが明らかとなった。本結果は小規模製造施設の日常検査における簡易検査法の有用性を示すものである。

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られる。

本研究により得られた成果は乳及び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り、今後、簡易検査法の導入を含めた国内の各種事業形態に適応した実行性のある試験法整備に貢献するものであると期待する。

公定法、ISO法及び第三者認証取得済みの簡易培地を用いて、市販の低温殺菌牛乳等 88 検体、アイスクリーム類 127 検体、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。供試製品検体の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、低温殺菌牛乳の製造工程で用いられる低温加熱殺菌では熱損傷菌を生じさせている可能性が示唆された。簡易培地は公定法に比べ、最終判定までの所要日数が短いものが多く、食品の微生物試験における有用性は高いと思われるが、上述の理由から低温殺菌牛乳等への適用は現状では難しいと思われた。アイスクリーム類では簡易培地の

製品によって、公定法と差が見られるものがあり、また、ISO法の表面塗抹法は混積培養法より有意に低い結果を示した。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。以上の結果から、乳及び乳製品において製品の特性により公定法と簡易培地の細菌数の相関に大きな相違が見られたことから、代替試験法については対象製品を用いた導入検証が必要であることが示唆された。

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：

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

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

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

平成 30 年度－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）
分担総合研究報告書

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： 現在、わが国の乳及び乳製品については、昭和 26 年に発令された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」に基づき、一般細菌数と大腸菌群を微生物規格としている。一方、EU や ICMSF では、HACCP による工程管理を前提として、腸内細菌科菌群や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、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も国際的整合性を考慮する必要がある。本分担研究では、諸外国における乳製品による健康被害実態、食品汚染実態、定められた微生物規格基準とそのサンプリングプラン、試験法の運用実態等に関する情報収集を行った。

平成 30 年度は、EU における殺菌乳製造工程での衛生管理の実態について、デンマークの低温殺菌牛乳工場等を視察し、情報を収集した。令和元年度は、乳製品であるアイスクリームに関する情報調査を行い、米国における市販アイスクリームの喫食に起因する健康被害事例や、米国及び欧州における微生物関連のアイスクリーム回収・汚染事例に関する情報収集を行った。さらに EU におけるアイスクリーム製造工程での衛生管理の実態について、デンマークのアイスクリーム製造施設等を視察し、情報を収集した。令和 2 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。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、文献 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、文献 2）であった。文献 1 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。文献 2 は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。

以上のような海外情報を参考に、わが国において、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、今後の国際的な整合性を図る観点からの検討が必要であると考えられる。

A. 研究目的

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

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、関連情報の検索を行なった。最終的に選択した 2 報の文献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

I. PubMed 検索による殺菌乳関連の健康被害事例

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

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

II. 米国 FDA 回収情報データベース及び EU RASFF データベースを用いた殺菌乳の回収・汚染情報の検索

米国 FDA 回収情報データベースには殺菌乳の微生物汚染による回収は報告されていなかった。RASFF データベースは全食品を対象としており、1979～2018 年の通知件数は 53,928 件であったが、殺菌乳 (Pasteurized milk もしくは UHT milk) の微生物汚染事例は 12 件のみであった (2004～2018 年、表 1)。そのうち、健康被害が報告された事例は 2018 年 11 月にスロバキア産殺菌乳に起因してハンガリーでアウトブレイクが発生した 1 件だけであった。

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

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

1. デンマークにおける殺菌乳に起因する製品回収及び健康被害事例について

デンマークの食品安全に関わる複数の専門家や工場の検査担当者との情報交換や議論の結果、乳及び乳製品に起因する製品回収情報及び健康被害事例は全て未殺菌乳によるものであり、殺菌乳によるものは直近10年では記憶にないとのことであった。

2. デンマークの乳に関する各種基準等について

デンマークにおける乳及び乳製品の衛生基準は基本的に EU 規則に沿ったものであり、殺菌乳の工程衛生基準としては腸内細菌科菌群について $n=5, c=0, m<10\text{cfu/ml}, M<10\text{cfu/ml}$ が規定されている (EC 規則 2073/2005)。

各種の検査に関しては EU の基準をもとに、各社が自主基準を設け、DVFA や DFAC (SEGES) といった指導機関や業界団体等が HACCP プランをはじめとする指導や定期的 (3年に一度) な監査を行なうことで問題を検知し改善するシステムとなっている (資料 1)。

原乳の出荷時の検査は出荷元の各農場が責任を負っており、原乳受け入れ時の検査、乳製品の出荷時の検査等は製造業者がより厳しい基準に従い行なっている (資料 2)。

EU の規則では原乳の受け入れ時の基準として、一般細菌数が 10 万 cfu/ml 以下、体細胞数が 40 万 cell/ml 以下と規定されているが、デンマークの乳製品業界の自主基準では、一般細菌数が 6 万 cfu/ml 以下、体

細胞数が 30 万 cell/ml 以下を目標としている。

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

3. デンマークの乳製品工場における運用実態について

視察した乳製品製造会社はデンマークで乳・乳製品の約 85% のシェアを持っており、スーパーマーケット等でも製品をよく見かける。また他社ブランドの生産も請け負っている。同社は現在デンマーク国内に 3 カ所の大規模な乳製造施設を有しており、今回視察を行なった施設はその中で最も大きい 1887 年に開業した工場である。

乳製造工場部分は 2004 年に施設が更新されており、建物等は古い部分があるものの設備は新しいものであった。乳及び乳製

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

牛乳の殺菌条件はデンマークの規格基準では72°C15秒であるが、視察を行なった会社では自社基準である74°C15秒で行なっていた。加熱殺菌部（機材）の消毒は90°C45分で行ない、加熱できない容器充填部の機材は塩素により行なっているとのことである。消毒が効果的に行われたことの確認（バリデーション）は、次回生産初期ロットの製品検査により行なっているとのことであった。また、製品の加速劣化試験も行なっており、17°C24時間負荷後の21°C培養生菌数、大腸菌数等を計測している。

上述したEU規則（低温殺菌乳の工程衛生基準）にもとづく、乳の最終製品における腸内細菌科菌群の検査は年に4回、製品の賞味期限日に行なっている。また毎日、生産直後の製品と賞味期限日の製品の無作為サンプリング検査も行なっている

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

米国の NORS データベースにおいて、1998～2017年に市販のアイスクリームとの関連が確認された、微生物を病因物質とする食中毒アウトブレイク事例は11件であった。これら11件のアウトブレイクの病原体別の内訳は、ノロウイルスが4件、黄色ブドウ球菌が3件、サルモネラが2件、志賀毒素産生性大腸菌（STEC）O157が1件、及びリステリアが1件であった。2010年に発生し、2015年に報告された Blue Bell Creameries 社製アイスクリームによるリステリア感染アウトブレイクでは患者10人のうち3人が死亡した。2013年の STEC O157 感染アウトブレイクでは患者4人のうち1人が死亡している。規模の大きい事例としては、2004年に発生した黄色ブドウ球菌感染アウトブレイク（患者132人、入院患者12人）と2000年のサルモネラ（*Salmonella Enteritidis*）感染アウトブレイク（患者132人）が挙げられる。

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

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

EU での食品汚染情報に関しては、

RASFF データベースで 2010～2019 年の「Ices and desserts」の微生物汚染事例は 13 件で、このうちアイスクリームの汚染事例は 3 件であった。汚染微生物別の内訳は、サルモネラが 1 件、リステリアが 1 件、腸内細菌科菌群が 1 件であった。

VI. デンマークにおけるアイスクリームの規格基準及びデンマークのアイスクリーム製造工場における運用実態

2020 年 2 月 18～21 日にデンマーク獣医食品局 (DVFA)、デンマーク工科大学国立食品研究所 (DTU Food)、デンマークで約 50～60%のシェアを持ち欧州各国にもグループ企業が工場を持つアイスクリーム製造会社の製造施設、及び家族経営で 2 年前から事業を開始した小規模事業者のアイスクリーム製造施設を訪問し、専門家、経営者及び検査担当者との議論及び工場視察を行なった。

1. デンマークにおけるアイスクリームの製造及び消費の状況

デンマークでは 2015 年に 4.26 万キロリットル、2016 年に 4.65 万キロリットル、2017 年に 4.45 万キロリットルのアイスクリームが販売された。アイスクリームの 1 人あたりの年間消費量は、デンマークの製造会社が示した 2017 年 8 月 1 日時点の統計資料によると、デンマークは世界第 7 位とのことであった (<https://www.worldatlas.com>)。日本アイスクリーム協会が Web ページに掲載してい

る 2016 年の世界各国の 1 人当たり年間消費量 (ユーロモニター社調査) によると、デンマークは世界第 13 位 (8.2 リットル) で、17 位の日本 (6.5 リットル) の約 1.3 倍の消費量である (<https://www.icecream.or.jp/biz/data/consumption.html>)。

2. デンマークのアイスクリーム製造に関する各種基準等について

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

デンマークをはじめ EU 各国ではアイスクリーム製品に「賞味期限 (Best Before)」を表示することになっている。賞味期限の長さは事業者が自らの責任で設定することになっているので、製品の品質に自信のある事業者はより長く設定することも可能とのことであった。大規模製造施設では多種多様な製品を製造しているため、含まれる原材料を考慮し、製品ごとに異なる賞味期限を設定している。その長さは製品が冷凍保存される性格上、衛生上の問題というよりも製品の状態 (味や口当たり等) の保持の

意味合いの方が大きいとのことであった。

3. デンマークでのアイスクリーム製造事業の認可等について

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

4. デンマークの大規模アイスクリーム製造施設における検査実態について

視察した大規模製造施設は 1927 年創業の老舗アイスクリーム製造会社で、デンマークでアイスクリームの 50~60%のシェアを持っている。欧州 10 ヶ国に 11 カ所の製造施設を持ち(グループ企業 9 社)、欧州以外でもロシアや中国などへ輸出を行なっている。視察した施設からは、デンマーク国内及びドイツ、ノルウェー、スウェーデンに出荷しているとのことであった。さらに他社ブランドの生産(OEM)も請け負っている。今回視察した製造施設はアイスクリームの生産量がデンマーク最大で、7,800m²の面積を持ち、製造の担当者は 60~90 人である。現在約 200 種類の製品を製造している。製造設備としてはアイスクリーム原料の混合機 1 基と 8 本の製造ラインが配置されている。原料乳には殺菌乳を使用しており、生乳は使用していなかった。原料乳はデンマーク国内産と輸入がそれぞれ 50%位とのこ

とであった。

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

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

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

製品検査はシフト(8~12 時間)毎に行なっており、各シフトの初めの製品及び途中の製品の 2 検体について製造ライン(最大 8 ライン)ごとに行なっていた。各検体に対し製造施設内の検査室で一般細菌数及び大腸菌群の検査が行なわれ、一般細菌数が 10 万 CFU/g 超もしくは大腸菌群が 100CFU/g 超の異常が見られた場合は倉庫に保管されている当該シフトで製造された製品を市場に流通しないように留め置くとともに、検査会社に検体を送付し、腸内細菌科菌群、サルモネラ、リステリア等の詳細な検査を依頼するとのことであった。

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

原材料の混合タンクは週に 1 回検査を行なっていた。環境検査はリステリアについ

でのみ行っており、外部検査会社に委託し、排水溝を年4回、製造ラインを年1回検査していた。水は井戸を源泉とする市の水道から供給されており、この水と受領した殺菌乳のタンクの検査も定期的に行っていた。また、製造現場の空気中の浮遊細菌の検査のため、製造現場の各位置に開けっ放しにした培養プレートを1時間放置し、検査を行っていた。

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

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

DVFAによる衛生監視では、微生物検査に関しては検査記録等の確認が中心とのことであった。また、製造現場とは別に、DVFAは定期的に店舗から販売中の製品を収去して微生物検査を行なっているとのことであった。

5. デンマークの小規模アイスクリーム製造施設における検査実態について

視察した小規模アイスクリーム工場は、家族経営で従業員数が2~3人であった。春~秋しか営業していない。デンマークでは認証が必要なオーガニックのアイスクリームを製造しており、味の種類は10種類程度

であった。事業を開始して3年目で、生産量は初年度が3キロリットル、2年目は9キロリットルとのことで急速に事業拡大中であった。夏期には近くのビーチ等で直接販売も行うが、基本はレストラン等への販売であった。歴史ある建物内に製造施設を構えており、建物は古いものの製造現場は衛生的に保たれていた。視察した時は製造を行っておらず実際の製造過程は見られなかったが、DVFAの食品衛生監視員と同行し、製造設備の管理や衛生状態についての説明を受けた。

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

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

VII. 欧州諸国での乳・乳製品の生産、加工製造における衛生管理の状況、動向を探るためのインターネット情報検索

インターネットで関連情報を検索し、最終的に以下の2報の文献を選択した。

「文献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

「文献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>

両文献とも、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。以下にそれらの内容の一部を紹介する。

○文献1

この文献は、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>) に関する章に焦点を当てた。

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、乳及び乳製品のカテゴリ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。本報告書ではこれらのうちの主なものについて、製品カテゴリと対象微生物種の項目のみを表 2 に示した。

本ガイドはまた、乳・乳製品カテゴリと微生物種の特定の組み合わせ (具体的には、1) RTE 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。本報告書ではこれら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表 3 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。

○ 文献 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のものとして、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。文献 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) に焦点を当てた。

第 4 章には基本的要件として 6 項目が挙げられている。

・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。

D. 考察

諸外国において殺菌乳による健康被害事例に関して近年の発生報告が少ないことは、殺菌乳の製造における HACCP プラン、殺菌法、検査法、及び施設の衛生管理等が効果をあげていることを示唆している。報告されている殺菌乳による健康被害事例は殺菌後の汚染によるものがほとんどで、工場の設備環境が影響しているか、加熱工程での設備トラブル等が疑われる事例であった。一方で未殺菌乳の喫飲に起因する健康被害事例が各国で数多く報告されている。米国や EU の回収汚染情報データベースに殺菌乳の微生物汚染に関連した情報がほとんど報告されていないことから、各国において殺菌乳の製造工程は適切に管理されていることが示唆される。

殺菌乳の規格基準に関して、デンマークの国内基準は EU 規則に沿って設定されている。また微生物検査や温度管理等は各社でデンマーク国内基準より厳しい基準を自主的に設定して衛生管理を行なっている。長いこと殺菌乳に起因するアウトブレイク

や製品回収の記憶はないと行政関係者、業界関係者、研究者、工場の検査員のすべてが答えたことから、デンマークの殺菌乳に関連する各種衛生対策は効果的であると考えられる。

視察したデンマークの乳・乳製品製造工場では、EU 規則で要求される殺菌乳の最終製品における腸内細菌科菌群の検査は年に4回で、製品の賞味期限日に行なっていた。

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

アイスクリームの規格基準に関しては、デンマークの国内基準は EU 規則に沿って設定されていた。また温度管理等は各社でデンマーク国内基準より厳しい基準を自主的に設定して衛生管理を行なっていた。微生物検査に関しては、自社検査として一般細菌数や大腸菌群を使用することで通常の衛生状態の確認を行ない、加えて定期的に検査会社に依頼して EU 規則遵守の確認を行なっていた。外部の検査会社では EU 規則に沿って ISO 法に準じていると妥当性が評価された代替法を使用していた。

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

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) では、EC 規則 2073/2005 に関する部分に焦点を当て、乳及び乳製品に関連する食品安全基準、工程衛生基準について、製品カテゴリーと検査対象微生物種の項目のみを表 2、3 に示した。

これらの表によれば、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。

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。

E. 結論

殺菌乳に関連する食中毒アウトブレイクの発生件数は世界的に少ないことが確認された。乳に関連して発生する食中毒アウト

ブレイクは多くが未殺菌乳によるものであることが示唆された。同様に殺菌乳の微生物汚染も多くは発生していないことが確認された。

デンマークでは HACCP にもとづき、乳製造工場における衛生管理が適切に行われ、自社や業界団体、行政機関による指導も効果的に行われていることが確認された。EU 加盟国であることから EU 規則にもとづいた国内基準を設定しているが、さらにそれを上回る自社基準を設定してより高い安全性を担保している。検査法や検査の頻度に関しても EU 規則を遵守し、ISO 法や迅速検査法を活用しつつ、その頻度に関しては殺菌乳の腸内細菌科菌群の検査が年に 4 回という現実的な頻度で対応している。

市販のアイスクリームに関連する微生物食中毒アウトブレイクの発生件数は米国でも少ないことが確認された。また回収や汚染事例も米国、EU ともに少ないことが確認された。

デンマークでは HACCP にもとづき、アイスクリーム製造工場における衛生管理が適切に行われていた。EU 加盟国であることから EU 規則にもとづく国内基準を設定しているが、大規模製造施設ではそれを上回る自社基準の設定や、行政機関による指導も効果的に行われていることが確認された。小規模施設においては行政機関の定期的な監視指導により安全を確保していた。日常の施設内検査では一般細菌数及び大腸菌群による確認を行ない、異常が認められた場合には詳細な微生物検査を外部検査会社に依頼していた。小規模製造施設では全ての検査を外部検査会社に依頼していた。検査会社では検査法や検査の頻度に関して EU

規則を遵守し、ISO 法や迅速検査法を活用しつつ対応していた。

インターネット検索により得られた英国の事業者向けのガイドには、乳及び乳製品について規定された EU の微生物基準がリスト化されて記載されていた。また、これらの基準の遵守にあたっての留意事項や、基準の選択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、及びそれへの対応の理解に役立つと考えられる。

以上のような海外情報を参考に、わが国において、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、今後の国際的な整合性を図る観点からの検討が必要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

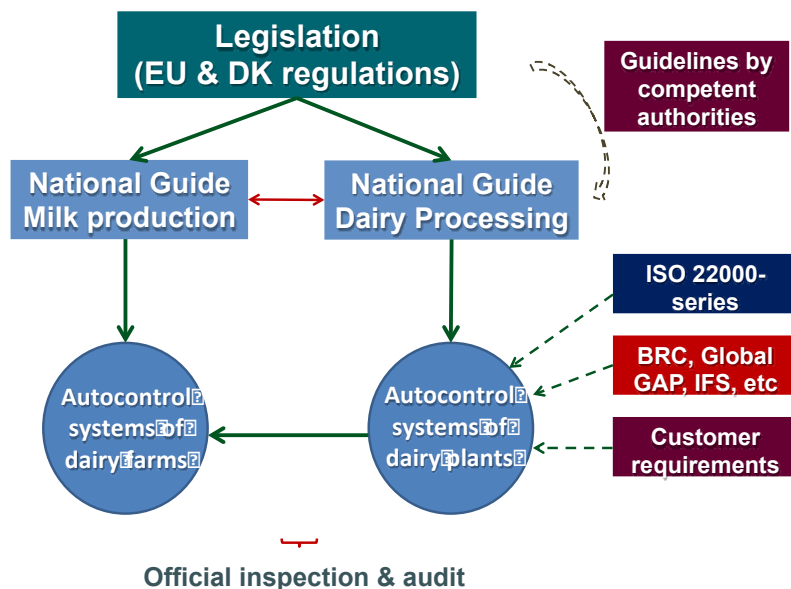
なし

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

product category	date	reference	product type	notification type	notification basis	notified by	countries concerned	subject	action taken	distribution status	risk decision
milk and milk products	26/11/2018	2018.3416	food	information for follow-up	food poisoning	Hungary	Hungary (D), Slovakia (O)	microbiological contamination (1,2 x10E7; 1,8 x10E7; >3 x10E7 CFU/ml) of UHT milk from Slovakia	withdrawal from the market	distribution restricted to notifying country	serious
milk and milk products	20/10/2017	2017.1712	food	information for attention	official control on the market	Croatia	Bosnia and Herzegovina (O), Croatia (D)	Clostridium (1 CFU/ml) in UHT milk from Bosnia and Herzegovina	recall from consumers	distribution restricted to notifying country	undecided
milk and milk products	03/08/2017	2017.1152	food	alert	consumer complaint	France	Belgium (D), Cameroon (D), France (D/O), Luxembourg (D)	UHT semi-skimmed milk from France infested with moulds	recall from consumers	distribution to other member countries	undecided
milk and milk products	16/02/2017	2017.0204	food	information for attention	company's own check	Germany	Germany (D/O)	Bacillus cereus (1,3x10E3 CFU/ml) and Bacillus cereus diarrheal enterotoxin (NHE) in UHT whole milk from Germany	public warning – press release	distribution restricted to notifying country	serious
milk and milk products	07/06/2013	2013.0797	food	information for follow-up	official control on the market	Italy	Hungary (O), Italy (D)	high count of Enterobacteriaceae (100 CFU/ml) in pasteurized milk from Hungary		no distribution from notifying country	not serious
milk and milk products	01/04/2011	2011.0439	food	information for follow-up	company's own check	Germany	Commission Services, Germany (D/O), Netherlands (D)	high aerobic plate count for UHT milk from Germany	withdrawal from the market	distribution to other member countries	undecided
milk and milk products	04/07/2007	2007.BQU	food	upgraded	border control – consignment released	Greece	Bulgaria (D), Greece, Republic of North Macedonia (O)	aerobic plate count (166 X 10*4 /ml) too high for pasteurized milk from the Former Yugoslav Republic of Macedonia		no distribution	undecided
milk and milk products	12/07/2007	2007.0469	food	alert	border control – consignment released	Greece	Bulgaria (D), Greece, Republic of North Macedonia (O)	aerobic plate count (166 X 10*4 /ml) too high for pasteurized milk from the Former Yugoslav Republic of Macedonia	destination of the product identified	distribution on the market (possible)	undecided
milk and milk products	03/10/2006	2006.0677	food	alert	consumer complaint	United Kingdom	Belgium (O), United Kingdom	Bacillus cereus (> 3 x 10*3 CFU/ml) in UHT semi-skimmed milk from Belgium	product recall or withdrawal	distribution on the market (possible)	undecided
milk and milk products	22/09/2005	2005.665	Food	alert	company's own check	United Kingdom	Belgium (O), United Kingdom	Bacillus cereus (up to 3 x 10E4 CFU/ml) in UHT semi-skimmed milk from Belgium	product recall or withdrawal	distribution on the market (possible)	undecided
milk and milk products	18/05/2005	2005.BJE	Food	information	official control on the market	Italy	France (O), Italy (D)	too high count of aerobic mesophiles (3,800,000 CFU/ml) in pasteurized milk in tank from France	physical treatment – heat treatment	distribution restricted to notifying country	undecided
milk and milk products	24/09/2004	2004.473	Food	alert	official control on the market	Italy	France (O), Italy (D)	too high count of aerobic mesophiles (1800000 CFU/g) in pasteurized milk in container	no action taken	distribution on the market (possible)	undecided

資料 1 : デンマークの乳製品関連の衛生管理システム

FOOD SAFETY FRAMEWORK



資料 2 : デンマークの乳の検査基準（国の法定要求水準と一般的な乳製造会社の自社基準）

Parameter	Legal requirement		Typical dairy company	
	Criteria	Frequency	Criteria*	Frequency
TPC	<100 000 cfu/g (log mean - 2 months)	Every 2 weeks	Target: 60,000 (log mean - 1 month) (Bonus & penalty below/above 600,000)	3-5 per month
Cell count	<400 000 cfu/g (log mean - 3 months)	Every 4 week	Target: 300,000 (log mean - 1 month) (Bonus & penalty below/above 300,000)	Every collection (Bonus & penalty below/above 300,000)
Antibiotics	<MRLs	Every 4 weeks	Not detectable	5 per months (increasing penalties: 1: +125% 2: +150% + 400 € 3: +200 + 400 € + visit)
Urea	Not required		Company specific	Every collection
Freezing point	Not required		- 0,515 °C to - 0,545 °C.	Every collection
Sensoric	Normal		No remarks	Every truck load
Anaerobic spores	Not required		Company specific	Company specific

資料 3 : デンマークのアイスクリーム等の微生物基準について (EUROGLACES)
Code for Edible Ices (<https://www.euroglaces.eu/code-edible-ices>)



CODE FOR EDIBLE ICES, Version 2013

ANNEX III - MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR EDIBLE ICES

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

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

* only for Edible Ices containing milk ingredients

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

9

表 2：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項目）

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>

表 3：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項目）

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

「国際動向を踏まえた乳および乳製品の試験法確立に関する研究」

分担総合研究報告書

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
	阿部 清孝	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

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

次年度は、アイスクリーム類を製造する国内事業者の協力を得て、製造施設を視察すると共に、情報収集及び各種検体を微生物試験に供することで、同製品の製造工程管理実態を調査し、製造基準の検討にあたっての科学的知見を集積することを目的として検討を進めた。大規模施設では、スティック、カップ、コーンの計 3 形態のアイスクリームを製造しており、各種原料を外部より受入れ後、区分管理を行っていた。また、原料混和から冷却工程迄は閉鎖流路を取っており、このうち加熱殺菌工程では圧力をモニタリング指標としていた。視察を通じ、冷却後以降では充填工程での硬化のために用いる冷却水管理や充填機の使用後洗浄・消毒等が製造基準を遵守する上での重要項目と想定された。同施設では製品、ストレージミックスを対象とした定期的な微生物試験のほか、環境拭取り検体の ATP 検査が自主的に行われていた。製造中に採材した原料、最終製品及び充填機拭取り検体を微生物試験に供したところ、原料 1 検体、最終製品 5 検体、充填機拭取り 2 検体から、 1.0 - 1.5 logCFU/ml の一般細菌が僅かに検出されたものの、糞便汚染指標菌は何れも不検出となり、同製造ラインの衛生管理が良好に維持されている状況が確認された。

一方、菌叢解析を通じ、硬化後包装前製品を載せるトラップステージ拭取り検体の構成菌叢は原料の一つである粉末水飴の構成菌叢と極めて近似しており、同原料に生存性を持つ病原微生物が混入し、更に加熱殺菌に不備が生じた場合には、最終工程で製品やステージ表面を汚染するおそれも想定され、改めてこれらの製造基準に則った管理の重要性が示された。また、製品の出荷状況に応じて不定期にカップアイスを製造する、中規模製造施設でも原料混和から冷却工程迄は大規模施設と同様に閉鎖流路をとっていたが、充填工程は半自動であり、特に充填機器の使用後洗浄・消毒が衛生管理上の重要項目と想定された。また、中規模施設では自施設内の別ラインで製造される低温殺菌乳を原料に用いていた。未加熱の生乳（参考品）、最終製品を微生物試験に供したところ、生乳検体からは糞便汚染指標菌である腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌がそれぞれ 1.5-3.7 logCFU/ml、1.9-3.8 logCFU/ml、<1.0-1.8 logCFU/ml の範囲で検出されたが、製品検体からこれらの糞便汚染指標菌は検出されず、同検体中の一般細菌数は 0.64-0.67 logCFU/ml の範囲に留まっていた。以上より、国内の大規模・中規模アイスクリーム製造における衛生管理は乳等省令を遵守して対応がなされており、微生物管理の面から直ちに改訂を検討する必要性は低いと判断された。一方で大腸菌群陰性とされる現行の成分規格については、国際整合性並びに原料を含めた同指標菌の動態を見極めつつ検討する必要性が考えられた。

最終年度は、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、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 1-2logCFU/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

国内の牛乳については、「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（乳等省令）」によりいくつかの分類がなされており、このうち、「牛乳」については、生乳（牛から搾ったままの乳）を 63°C・30 分以上の加熱殺菌を施したものであって、乳脂肪分 3.0%以上、無脂乳固形分 8.0%以上を含み、かつ 1ml あたりの細菌数が 5 万以下、大腸菌群が陰性であること等が成分規格として定められてい

る。厚生労働省が取り纏める食中毒統計資料によると、2009 年 1 月から 2019 年 3 月末日までの期間に届け出がなされた食中毒事例のうち、牛乳を原因とするものは僅か 1 件であり、当該事例についても未殺菌牛乳を提供することでカンピロバクター食中毒が発生したものであり、上述の乳等省令で定められる加熱殺菌を経て製造された牛乳を原因とする事例の報告は認められていない。

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

こうした牛乳の製造加工に係る国内の事業所数は平成 28 年時点で全国に 524 施設あり、このうち、368 施設では飲用牛乳を主に製造するとされている。UHT 牛乳の製造加工の多くは大手事業者による一方、LTLT 牛乳や HTST 牛乳の多くは一日あたりの処理量が 2 トン未満の中小規模事業者によるとされる。欧米等では牛乳による食品媒介性感染症の発生も散見されるが、それらの多くは、未殺菌牛乳を主体とする、UHT 牛乳以外の牛乳製品であり、国内外の牛乳製品の微生物学的品質を単純に主たる流通製品の比較により行える状況にはない。一方で、国内においても中小事業者を中心として HTST 牛乳や LTLT 牛乳が製造されている実態があるものの、これらの UHT 牛乳以外の牛乳について、製造工程における衛生管理実態等について調査研究が行われた実態は見当たらない状況であった。

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

国内の「アイスクリーム」については、「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令(乳等省令)」により、原水が食品製造用水であること、発酵乳及び乳酸菌飲料を除く原料につ

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

厚生労働省が取り纏める食中毒統計資料によると、2010 年 1 月から 2020 年 3 月末日までの期間に届け出がなされた食中毒事例のうち、アイスクリームを原因とするものは報告されていない。このことは、上述の乳等省令で定められる製造基準を遵守して製造されたアイスクリームによる健康被害実態が認められていないことを示している。

Euromonitor International が 2016 年に行った調査では、日本国内でのアイスクリーム年間消費量は 6.5L で世界第 17 位であり、この量はオランダ、フランス等と同程度となっている (<https://www.euromonitor.com/ice-cream-and-frozen-desserts>)。また、財務省貿易統計によると、国内で製造されるアイスクリームは 2013 年に 1.62 t が輸出されていたが、2018 年の同輸出量は 5.61 t にまで増加する等、近年輸出量及び輸出額が増加傾向にある (<https://www.customs.go.jp/toukei/info/>)。また、アイスクリーム全体の輸入量は大きな増加傾向は認められないものの安定した数量がニュージーランド、フランス、ベルギー等から輸入されている状況にある。こうしたアイスクリームの安全確保には上述の乳等省令

で示される製造基準並びに成分規格が功を奏していると目されるが、これらが定められた当時に比べ、現時点での当該製造施設における衛生管理実態については、過去数十年に亘り厚生労働省の研究調査は行われていない状況であった。

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

令和 2 年度には、苦情事例の見られた牛乳製造施設における衛生実態の把握を行った。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あるものと想定される。本研究では、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。

B. 研究方法

1. 牛乳製造施設における調査（平成 30 年度）

1-1. 協力施設での牛乳製造に係る情報収集

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

1-2. 採材

中規模施設では、原乳、最終製品のほか、拭き取り検体（充填機内外のマンドレル、充填ノズル、マガジンラック、充填部、及び充填機周辺の床・壁、加熱殺菌機周辺の床・壁）を 3M Hydrated sponge（スリーエム）を用

いて採材した。全ての採材検体は 4 時間以内に冷蔵温度帯で輸送し、検査に供した。

大規模施設では原乳、殺菌前乳、殺菌後乳、殺菌後貯乳、最終製品、並びに拭き取り検体（加熱殺菌機出口、充填機周辺の床および昇降台、冷却プレート出口）を採材した。ふき取り検体については冷蔵温度帯で輸送し、3 時間以内に試験に供した。なお、施設 B の原乳、殺菌前後乳、最終製品については同一ロットのものとするため、施設担当者により採材を行い、ロットの確認後に冷蔵温度帯で一日夜かけて輸送された。

1-3. 衛生指標菌定量試験

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

拭き取り検体は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水中を用いて試験懸濁原液を調整した。同原液 1 mL を平板各培地に接種し、ISO 文書または簡易迅速培地製造者が発行する指示書等に準じて、培養を行った（平成 30 年度分担報告書図 7）。

1-4. 細菌叢解析

中規模施設の検体は 1 mL を採取し、PBS で 2 回洗浄後、MaxWell RSC DNA Blood kit（プロメガ）を用いて DNA 抽出を行った。施設 B の検体は 10mL を採取し、PBS により 2 回洗浄後、Ethidium monoazide を主成分とする Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative)（タカラバイオ）を用いた後、DNA 抽出を行った。抽出 DNA を鋳型として、16S rRNA 799f-1179r オリゴヌクレオチドプライマーを用いた PCR 反応を行い、E-gel SizeSelect 2%（Thermo Fisher）および AMPure XP（Beckman）を用いて増幅産物を精製・定量後、等量混合ライブラリーを作成し、Ion Chef/Ion PGM システム（Thermo Fisher）により増幅産物の塩基配列データを取得した。取得データは CLC Genomic Workbench v.11（キアゲン-CLC）を用いて不要配列を除去後、RDP Classifier pipeline へ投入し、階層化分類等を行った。

2. アイスクリーム製造施設における調査（令和元年度）

2-1. 協力施設でのアイスクリーム製造に係る情報収集

アイスクリームを製造する大規模及び中規模事業施設の研究協力を得て、各施設での対象製品の製造工程フロー図、並びに製造量、製品仕様、自主検査等の情報提供を依頼し、承諾を得た。

2-2. 採材

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

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

2-3. 衛生指標菌定量試験

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

なお、生乳の調整にあたっては、5 倍希釈液を作成し、試験原液として用いた。

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

4. 細菌叢解析

大規模施設の検体については、試験原液 1ml を対象とした。何れも滅菌 PBS を用いて 2 回洗浄を行った後、MaxWell RSC DNA Blood kit（プロメガ）を用いて Total DNA を抽出した。その後、抽出 DNA を鋳型として、16S rRNA 799f-1179r オリゴヌクレオチドプライマーを用いた PCR 反応により 16S rRNA V5-V6 領域を増幅し、E-gel SizeSelect 2%（Thermo Fisher）及び AMPure XP（Beckman）を用いて増幅産物を精製・定量した。その後、等量混合ライブラリーを作成し、Ion Chef/Ion PGM システム（Thermo Fisher）により増幅産物の塩基配列データを取得した。取得データは CLC Genomic Workbench v.20（キアゲン-CLC）を用いて不要配列を除去後、RDP Classifier pipeline へ投入し、階層分類等の解析を行った。

2-5. 生乳中の微生物動態解析

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

3. 有症苦情事例の見られた牛乳製造施設における調査（令和 2 年度）

3-1. 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。

3-2. 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。

3-3. 16S rRNA 菌叢解析

上述 3-2. 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製作した。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。

3-4. 保存試験を通じた微生物動態解析

上項 3-1. で示す生乳検体を無菌的に 100 mL 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

1. 牛乳製造施設における衛生管理（平成 30 年度）

1-1. 中規模及び大規模施設での牛乳製造に係る情報の整理（平成 30 年度分担報告書図 1,2）

聞き取り調査を通じ、中規模施設での年間製造量は 2017 年度実績で LTLT 乳が約 2,150t、HTST 乳が 1,990t との情報を得た。原乳輸送には容量 10t のローリー車 2 台を用い、搾乳後概ね 1 時間以内に集乳し 5°C 以

下で中規模施設まで輸送されていた。また、原乳の品質に基づき農場単位で LTLT 乳または HTST 乳のいずれの原料として用いるかを決定しており、そのために原乳検査に法令で定められる内容に上乘せをした自主検査を行い、記録を経時的に保存していた。

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

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

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

1-2. 中規模施設における原乳、製品、及び施設ふき取り検体からの衛生指標菌の検出状況（平成 30 年度分担報告書図 3～5、表 1）

原乳中の一般細菌数は ISO 法では $1.2 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^3$ CFU/mL であり、簡易迅速法では A が $1.6 \times 10^3 \sim 4.3 \times 10^3$ CFU/mL、製品 B が $1.1 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^3$ CFU/mL、製品 C が $8.6 \times 10^2 \sim 2.3 \times 10^3$ CFU/mL であった。同検体での腸内細菌科菌群、大腸菌群の数值は ISO 法でそれぞれ 9～33CFU/mL、24～51CFU/mL の範囲にあり、簡易迅速法の成績もこれに準ずるものであった。大腸菌は 3/8 (37.5%) の確率で認められたが、同値は最大 2CFU/mL に留まっていた。黄色ブドウ球菌は 15～101CFU/mL の範囲で検出された（図 3）。

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

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

1-3. 大規模施設における原乳、製品、及び施設ふき取り検体からの衛生指標菌の検出状況

原乳及び製品検体については、視察時に同

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

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

1-4. 製造工程を通じた構成菌叢の比較解析（平成 30 年度分担報告書図 6）

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

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

HTST 牛乳製品検体では *Serratia* 属や *Pseudomonas* 属、*Streptococcus* 属等が優勢構成菌叢として認められた一方、LTLT 牛

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

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

2. アイスクリーム製造施設の衛生管理 (平成元年度)

2-1. 大規模及び中規模施設におけるアイスクリーム製造工程に関する情報整理(令和元年度分担報告書図 1)

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

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

原料調合後の加熱条件については、乳等省令では 68°C30 分もしくはこれと同等以上とされているが、同施設ではプレート式殺菌装置を用いた 85°C15 秒の管理目標値を設定しており、その管理は圧力をモニタリングすることによって行っていた。殺菌後のストレージについては 10°C未満で 1~4 時間を目標値として定めていたほか、容器包装のうち、紙パックについては UV 照射による使用前

殺菌を行っていた。

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

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

2-2. 大規模施設における原料、施設ふき取

り検体、及び製品からの衛生指標菌の検出状況（令和元年度分担報告書表 1）

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

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

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

2-3. 中規模施設における製品、施設ふき取り検体、及び生乳（参考品）からの衛生指標菌の検出状況令和元年度分担報告書（表 2）

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

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

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

logCFU/mL、または 2.56 logCFU/mL であった。

2-4. 大規模施設での製造工程を通じた構成菌叢比較解析（令和元年度分担報告書図 2, 3）

施設 A では生菌・死菌の別を問わず、各検体由来 DNA を鋳型として 16S rRNA 解析に供した。アイスクリームの主原料である脱脂粉乳 A・B では構成菌叢が大きく異なっていたが、このうち、脱脂粉乳 B 検体で優勢であった *Streptococcaceae* は、充填ノズル周辺拭取り検体及び製品においても優勢な菌叢として認められた。同じく主な原料である粉末水飴検体については *Caulobacteraceae* が最も優勢な菌科として検出され、同菌科は製品が固化後、包装される間に輸送される際に直接載せられるトラップステージ拭取り検体及び作業従事者の手指洗浄用電解水検体においても最も優勢であった（令和元年度分担報告書図 2A）。

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

2-5. 生乳検体における各種衛生指標菌の挙動解析(令和元年度分担報告書図4、表3)

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

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

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

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

得られた数値を基に、指標菌間での相関性を解析した。リストワイズ法を用いた解析結果として、一般細菌数は腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌との間でそれぞれ 0.0876、0.0947、0.4428 の相関の p

値を示し、相関はないと判断された。黄色ブドウ球菌とは 0.0004 となり相関があると判断された。腸内細菌科菌群数は大腸菌群数との間で $p=0.0027$ であったほか、黄色ブドウ球菌との p 値も 0.0253 となり、相関はあると判断された。一方、大腸菌群と大腸菌、黄色ブドウ球菌との間での p 値はそれぞれ 0.1323、0.0687 となり、相関はないと判断された。

3. 有症苦情事例のあった牛乳製造施設の汚染実態(令和2年度)

3-1. 当該施設の製造工程に関する情報整理

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令和2年度分担報告書図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。

3-2. 衛生指標菌検出状況。

(i) 生乳、中間・最終製品検体(令和2年度分担報告書図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（令和 2 年度分担報告書表 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。

3-3. 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、*Firmcutes* 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（令和 2 年度分担報告書図 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（令和 2 年度分担報告書図 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%）（令和 2 年度分担報告書図 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（令和 2 年度分担報告書図 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%）（令和 2 年度分担報告書図 3A）。また、*Firmcutes* の占有率は生乳検体に比べて増加を認めた（平均値 58.00%）（令和 2 年度分担報告書図 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（令和 2 年度分担報告書図 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%、令和 2 年度分担報告書 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（令和 2 年度分担報告書 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（令和 2 年度分担報告書 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（令和 2 年度分担報告書 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（令和 2 年度分担報告書 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（令和 2 年度分担報告書 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（令和 2 年度分担報告書 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令和 2 年度分担報告書 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%、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とほか、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。

3-4. 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

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

要があると思われる。

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

大規模牛乳製造施設では、工程別の施設環境の区分化と中央監視システムによる各管理要件のモニタリングが徹底されていたほか、使用・洗浄後の施設環境拭き取り検査結果は、使用後の CIP 洗浄が有効に機能している実態を示すものと考えられた。また、原乳中の指標菌のうち、特に一般細菌数で中規模施設に比べ高い傾向を認めたが、同施設由来の原乳、中間・最終製品は何れも大規模施設で同一ロットを確保する意義から最大 48 時間保存した後、更に一日かけて冷蔵輸送されてから試験に供したため、この間に低温細菌の増殖を招いた可能性が考えられた。実際に、構成菌叢解析を通じ、原乳及び殺菌前貯乳検体では低温細菌に位置付けられる *Pseudomonas* 属等が高い占有率をもって検出された。また、同施設で原乳受け入れ時に行われる総菌数の検査結果を別途確認したところ、約 1 か月間の検査結果は何れも 4 万/mL 以下であったことを踏まえると、本調査用に同一ロットを確保することを最優先事項としたための保存・輸送時間の延長が加熱殺菌前の原乳の一般細菌数拡大につながったと想定される。なお、加熱殺菌処理後の検体及び最終製品については全ての衛生

指標菌が陰性であり、UHT 処理は低温細菌を含めた細菌の幅広い制御に資することが改めて検証されたといえる。

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

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

両施設はそれぞれ自主管理基準を設け、衛生確保に向けた管理体制を構築・運用していた。大規模施設では製品に加え、エイジング工程を重点的な工程管理対象として、微生物検査を定期的実施していた。本年度のある月に実施した自主検査記録を確認したところ、検体数 1750 に対し、一般細菌数で自主管理基準として定めた 300CFU/ml を超えた検体数は僅かに 3 検体（陽性率として 0.17%）であった。これらの陽性検体が確認された場合の措置としては同一ロット製品の検査記録及び工程中の不備の有無を改めて確認することが一般的な対応内容であることは言うまでもない。

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

する一つの根拠となるものと考えられる。

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

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

最終年度の本研究では、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思料される。

E. 結論

初年度実施した牛乳製造施設調査において、LTLT/HTST 牛乳を製造している中規模施設では、UHT 牛乳を製造している大規模施設と同等の製造施設設備を用いていたが、充填工程は前工程との明確な施設区分化がなされておらず、充填機ノズル及び製品から

は非病原菌が検出されたことから、同工程環境から製品への細菌混入を招きうる実態が明らかとなった。また、試験法として、簡易迅速法（フィルム培養法）の適用範囲を明示するためには今後更なる検証が必要と考えられた。

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

最終年度には、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。

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

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

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.

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」

分担総合研究報告書（平成 30 年～令和 2 年）

国内小規模乳製品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、本邦の乳及び乳製品に関わる衛生管理を考える上で注視が必要である。本研究では国内製造施設の実態に適合する衛生管理手法の確立を目的とし、乳及び乳製品の主要な生産地である北海道にて、小規模製造施設を対象とした衛生検査実態の調査を行った。加えて、小規模製造施設の自主検査及び製造形態の実情を加味して、簡易検査法の有用性及び管理基準として用いる衛生指標菌種の妥当性についての検討を行った。小規模施設における衛生検査実態の調査においては、小規模施設内で実施可能な衛生検査が非常に限られたものである実態が明らかとなり、小規模施設衛生管理において簡易検査法が担う役割の重要性が強く示された。加えて、各施設の検査設備の脆弱性から、その運用方法についての問題点も抽出され、簡易検査法を採用した標準試験法の整備においても、施設ごとの実情に適応した簡易検査法の運用方法について提示する必要性も示唆された。脆弱な設備環境下で簡易検査法を用いた際の検査結果の妥当性について検討する目的で試験結果に設備条件が与える影響を検討した結果、恒温槽等を用いた精確な温度管理が難しい試験条件下においても簡易検査法を用いて適切な結果が得られることが明らかとなり、小規模施設における簡易検査法の有用性が示された。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は、大腸菌群数と腸内細菌科菌群数の加熱時間に対する減少率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して腸内細菌科菌群を衛生検査指標として用いることの妥当性を示す結果であると考えられる。これらの知見は今後、国内で整備が進む HACCP の制度化及び、国際的整合性を担保した形での乳及び乳製品の製造工程管理及び、製品の安全性確保に向けた微生物規格基準及び試験法を設定する上で国内の各種事業形態に適応した実行性のある試験法の整備に貢献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及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、食品流通のグローバル化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「乳及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が行われている。国内においては近年、平成30年の食品衛生法改正の中で示されたHACCPの制度化をはじめとした食品流通のグローバル化に対応した取り組みを行っているが、食品衛生管理を行う上では製造工程の管理に加え、衛生指標に用いる微生物種の妥当性やその試験法についても国際的整合性についての考慮が必要である。

本研究では、乳及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工程及び衛生管理実態の把握を目的とした。北海道においては国内の他の地域と比較して、大規模な施設に加え小規模製造加工施設が多く存在し、広域流通しない乳及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、小規模流通製品も海外からの旅行者を含む多くの消費者へ影響を与えることが懸念される。本研究においてはこれらの理由から、北海道に多くみられる小規模製造加工施設を調査対象とした。

初年度の研究では北海道において低温殺菌牛乳を製造する施設を対象として、次年度の研究ではアイスクリームを製造する施設を対象として事業者の協力を得て調査を実施し、小規模施設における製造工程管理及び衛生検査実態の調査を行った。加えて、小規模製造施設の自主検査実態を加味して、簡易検査法の有用性について考察を行った。最終年度には前年度までの調査で得られた小規模製造施設の製造形態に関する知見を加味した上で、小規模製造施設で製造された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. 製造工程管理及び衛生検査実態の調査対象施設

低温殺菌牛乳製造施設については、北海道内で低温殺菌牛乳を製造・販売する小規模事業者（十勝地方2社、上川地方1

社)について調査を実施した。調査においては、製造地域での販売に加え、通信販売・業務用販売を含めた道外での広域販売を行っている事業者を選定した。各施設について、製造規模を含めた施設概要、製造工程、各施設で実施される自主検査項目について、施設見学及び聞き取り調査を実施し、製造工程管理実態及び衛生管理実態を取りまとめた。

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

2. 乳及び乳製品衛生検査

2-1. 試料概要

低温殺菌牛乳については、調査対象施設のうち2施設より生乳及び低温殺菌牛乳を入手した。何れの試料においても、輸送中を含め採取及び製造から検査までの間、5℃以下で保管されていた事を確認し、低温殺菌牛乳については賞味期限日に検査を実施した。

アイスクリームについては、調査対象施設の全てより様々なフレーバーのアイスクリーム製品を通常の販売ルートを利用して入手した。試料は受け入れ後に検査まで-30℃にて保管し、検査に際しては約20gを無菌的に量り取った後に、23℃のインキ

ュベーター内に40分間静置することで融解し、融解物を滅菌生理食塩水で10倍希釈したものを用いた。

2-2. 細菌検査法概要

生乳、低温殺菌牛乳及びアイスクリーム試料に対して、腸内細菌科菌群数、生菌数、大腸菌群数、大腸菌数について、培養法と簡易培地法を用いた検査を以下の概要で実施した。

2-2-1. 腸内細菌科菌群数検査概要

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

2-2-2. 生菌数検査概要

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

2-2-3. 大腸菌群数検査概要

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

2-2-4. 大腸菌数検査概要

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

3. 簡易検査法に与える試験条件の影響の検討

3-1. 試料融解条件が試験結果に及ぼす影響についての解析

アイスクリーム試料 5 g を 4°C、15°C、23°C、32°C 及び 37°C で完全に融解するまで静置した後に、3M™ ペトリフィルム™ 生菌数測定用プレート (AC プレート) に接種し 32°C, 48 時間培養を行った。

3-2. 培養条件が試験結果に及ぼす影響についての解析

同一条件下で調整した試料 (融解条件: 23°C、40 分間) を 3M™ ペトリフィルム™ 生菌数測定用プレート (AC プレート) に接種し、20, 25, 30, 32, 37°C の温度条件下で 24, 48, 72 時間の培養 (計 15 条件) を行った。それぞれの条件について、三回づつの試行を行い、得られた結果群に対して外れ値検定 (箱ひげ図解析及び、スミノルフ・グラブス検定) を行った。また、得られた結果群を母集団としてそれぞれの測定結果の Z 値を算出した。

4. 加熱殺菌による衛生指標菌数動態検査

4-1. 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。

4-2. 生乳性状検査

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、16S rRNA V3/V4 領域に基づく細菌叢解析を行った。

4-3. 加熱殺菌前後の衛生指標菌検査

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 (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 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 (3M™ ペトリフィルム™ 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)。

C. 結果

1. 低温殺菌牛乳製造施設の工程管理及び衛生検査実態調査

1-1. 調査対象施設概要

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

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

1-2. 製造工程の比較

各施設の製造フローチャートを図 1 に示した。生乳の受入工程においては、施設 A ではミルクローリーから専用パイプを用いて閉鎖系で受入がなされていたのに対して、施設 B では専用バケツで受入れた生乳をホールディングタンクへ開放系で投入しており、また施設 C においても専用ポリタンクで受入れた生乳を受入槽へ開放系で投入していた。加えて、容器包装形態が異なるために、施設 A と施設 B、C の間で充填工程に差が観られた。これらの結果から同種の事業体であっても、施設毎に生物的危害要因混入の可能性が考えられる工程に差があることが明らかとなった。

1-3. 検査体制及び検査項目の比較

各施設における自主検査実施状況を表 2 に示した。施設 A は事業所内に製造部門とは独立した検査部門を持つ施設である一方

で、施設 B 及び C では独立した検査部門を持たず製造業務を行う職員が検査業務を兼務していた。また、施設 B 及び C においては特に、製造施設で実施可能な検査項目が限られており、乳等省令で成分規格として定められている項目を含めた多くの検査項目を外部委託検査に頼っている現状が明らかとなった。加えて、すべての施設で自主検査として何らかの簡易検査法を採用している実態が確認された。また、従業員への聞き取りにより、簡易検査法の使用方法について必ずしも十分な教育を受けて実施されているものとは限らないことが明らかとなり、乳製品検査への簡易検査法の導入や試験法提示にあたって、検査精度や結果の信頼性確保のために、適切な適用箇所や試験方法の明示を行う必要性が示された。

2. アイスクリーム製造施設の工程管理及び衛生検査実態調査

2-1. 調査対象施設概要

従業員数 2～5 名の小規模製造工場を調査対象とした（表 3）。調査対象とした 3 つの事業者のうち、施設 F は FSSC 22000 の認証を受けていた一方で、施設 D 及び E は上記のような衛生管理過程に関する定期的な第三者評価を受けていない施設であった。各施設とも食品衛生法の改正に伴う HACCP に沿った衛生管理の制度化において小規模事業者への分類が想定される事業所であるものの、施設 D 及び E においてはインターネット販売や業務用販売を通して全国各地で入手可能な販売ルートを構築しており、本邦の食品衛生の向上を考える上で、これら小規模製造施設の衛生管理の重要性が示された。

2-2. 製造工程の解析

小規模施設における製造フローチャートを図2に示した。調査を行った全ての施設において基本的には共通の製造フローチャートとなっており、これは一般社団法人日本アイスクリーム協会が作成する

「HACCPの考え方を取り入れた衛生管理のための手引書（小規模なアイスクリーム類製造事業者向け）」に示される「バッチ式加熱殺菌冷却・カップアイスの製造工程例」

(<https://www.mhlw.go.jp/content/11135000/000554002.pdf>)によく一致するものであった。小規模アイスクリーム製造事業者においては同一製造ラインにて複数のフレーバーを製造する事業形態が一般的であったが、主原料となる乳製品等については加工済み製品を受け入れている一方で、フレーバーを決定する副原料については加工品に加えて工場内で加工するものも多く見受けられた。また、副原料については多くの製品で加熱殺菌工程の後に添加されることから、フレーバーごとに細菌学的汚染度に差が生じる可能性が抽出された。

2-3. 検査体制の比較

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

3. 低温殺菌乳に対する簡易検査法の有効性の検討

小規模施設における調査から、小規模施設においては特に、簡易検査法の利用無しでの衛生管理は現実的ではなく、国際的な動向を踏まえた乳製品の衛生管理の導入においても簡易検査法利用の有効性の検討が

必要である事が示唆された。そこで、簡易検査法の有用性の検証及び実効性のある衛生指標菌の選択に資する科学的知見の収集を目的として、小規模施設で製造された低温殺菌牛乳及び原材料乳を入手し、EUで乳の成分規格として利用されている腸内細菌科菌群数について培養法と簡易検査法を用いた検査を実施した。また一方で、国内で成分規格が設定されている生菌数と大腸菌群、加えて大腸菌についての検査を実施し、これらの結果の比較解析を行った。培養法についてはISO規格内で示されている方法を採用し、簡易検査法については可能な限り複数の製品を利用した。

EUにおいては低温殺菌牛乳の成分規格として腸内細菌科菌群数で1 cfu/mL未満であることが求められている。国内小規模製造施設で製造された低温殺菌牛乳に対する腸内細菌科菌群の検査においては、ISO法及び簡易検査法のいずれにおいても検出下限以下（1 cfu/mL未満）となった(図3A, B)。生乳についてはISO法-簡易法間で比較的良好な相関がみられ生乳の衛生状態モニタリングにおける簡易検査法の有用性が示された(図3C, D)。

生菌数の検査では、低温殺菌牛乳に対する検査において製品によってはISO法に比較して簡易検査法で低い値となる傾向が観られ、低温殺菌牛乳の生菌数検査に簡易検査法を導入する際には慎重な検討が必要であることが明らかとなった(図4A)。ISO法と簡易検査法を比較すると、両方で培養条件（ISO法では30°Cで72時間、簡易検査法では32°Cもしくは35°Cで48時間）が異なっており、この事が原因で両者の結果に差が出ている可能性が考えられた。我々

は培養時間を変更した追加実験において、培養条件の調整により簡易検査法の種類によっては培養法と同等の結果を得る事も可能である事を明らかにしている(図7)。以上の結果は、低温殺菌牛乳検査に対する簡易検査法の使用法の提示について慎重な検討の必要性を示すものと考え。一方で、生乳の検査においてはISO法-簡易法間で同等の結果が得られた(図4C, D)。

大腸菌群数の検査では、低温殺菌牛乳に対する検査においてISO法及び簡易検査法のいずれにおいても検出下限以下となり(図5A, B)、また生乳の検査においてもISO法-簡易法間で同等の結果が得られ(図5C, D)、簡易検査法の有用性が確認された。

大腸菌数の検査では、低温殺菌牛乳に対する検査においてISO法及び簡易検査法のいずれにおいても検出下限以下であった(図6A, B)。一方で、生乳に対する検査ではISO法-簡易検査法間で施設Aでは比較的良好な相関が得られたものの、施設Cでは簡易法2でのみ陽性の結果が得られており(図6C, D)、各施設において簡易検査法を選択する際には施設毎に乳の特性を考慮した慎重な検討が必要であることが示唆された。

4. アイスクリームに対する簡易検査法の有効性の検討

小規模アイスクリーム製造施設の製造工程解析から同一施設で製造された製品であってもフレーバーごとに微生物学的汚染度に差が有る可能性が示唆された。そこで、施設D及びEより複数のフレーバーを入手(施設Fにおいては1種類のフレーバーのみを製造)し、生菌数、大腸菌群数、大腸

菌数及び腸内細菌科菌群数の比較検討を行った。全ての項目について、ISO法に基づく混積培養法に加え、簡易検査法による検査を実施し、アイスクリーム製品検査における簡易検査法の有用性の検討も同時に実施した。

大腸菌群、大腸菌及び腸内細菌科菌群においては全てのフレーバーでISO法及び簡易検査法のいずれにおいても検出下限(10^1 CFU/g)以下であった(Data not shown)。一方で、生菌数については施設Dでは最大で $10^{3.5}$ CFU/g、施設Eでは最大で $10^{2.5}$ CFU/g、施設Fでは0 cfu/gが検出され、各施設で製造された全ての製品が乳等省令に定める成分規格に比較して十分に低い値であることが確認された(図8)。検出される生菌数についてフレーバー間での比較を行ったところ、施設Dでは最大で 10^2 CFU/g程度、施設Eでは最大で 10^1 CFU/g程度の差が確認された。

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

5. 簡易検査法に与える試験条件の影響の検討

先に示した様に、小規模施設においては十分な検査設備が整っておらず、自主検査に簡易検査法を導入したとしても、その検査精度の担保が難しい現状が抽出された。すなわち、小規模施設では検査を実施する上で十分な施設が整っておらず、簡易検査法を用いた自主検査の実施において検査結果に影響を与える要因(特性要因)の

制御が十分に実施出来ない現状が明らかとなった。簡易検査法のプロトコールを解析した結果、図9に示す複数の特性要因が検出された。これらの中で「試料の縮分」及び「コロニーカウント」については試験実施者の教育訓練での制御が可能であり、また「添加量」については最終的な試験結果に及ぼす影響を使用する機器の精度から推定可能である。一方で、「試料の前処理条件（温度、時間）」及び「培養条件（温度、時間）」については、温度や時間の変動と試験結果（コロニー数）の相関（影響の重大さ）の評価が難しく、実測データを基にした評価が必要となる。また、小規模施設においては設備的な問題から精確な温度制御の実施が難しい実態も明らかとなっている。そこで、本研究ではアイスクリーム製品を試料として用い、簡易検査法を利用した際の「試料の前処理（融解）条件（温度、時間）」、及び「培養条件（温度及び時間）」の変動が試験結果に及ぼす影響について考察を行った。

「試料の融解条件（温度、時間）」が試験結果に及ぼす影響について解析した結果、融解条件間で試験結果に有意な差は認められなかった（表4）。一方で「培養条件（温度及び時間）」が試験結果に及ぼす影響について解析した結果、20℃、24時間の培養で得られた結果は他の条件下で培養した際の結果に比較して外れ値とみなされた。また、得られた結果群を母集団としてそれぞれの測定結果のZ値を算出した結果、20℃、24時間の培養で得られた結果のみがZ値 $|Z| > 3$ となった（表5）。

6. 加熱殺菌による衛生指標菌数動態の解析

先に示した様に、小規模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場合が多く確認されており、製造事業者間で原材料乳の性状に多様性がみられる可能性が示唆された。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、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）方式が主流であることも明らかとなった。そこで、複数の農場から様々な生乳を入手し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、原材料乳に多様性を持つ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。

6-1. 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（図10, A）、加えて乳房炎の指標の一つである乳中の体細胞数（図10, 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（図10, C）、遊離脂肪酸濃度（図10, D）、乳中ケトン体濃度（図10, 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 10, 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（図 11）。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。

6-2. 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 $2 \log_{10}$ CFU/mL 以上の低下を観察した（図 12）。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。

D. 考察

1. 小規模低温殺菌牛乳製造施設における製造工程及び検査体制の調査

小規模低温殺菌牛乳製造事業者においては施設内で実施可能な衛生検査について、大規模施設に比較して限られた項目となっており、また、公定法が指定する培養法による衛生検査が現実的には実施不可能な施設が多い実態が明らかとなり、これらの小規模施設の状況を勘案した衛生試験法提示の必要性が示された。加えて、これらの小規模施設においては、衛生検査に精通していない作業員により検査が実施されている実態も明らかとなり、簡易法を含めた標準試験法の導入において、試験方法の整備に加え、その適切な運用方法の提示の重要性が明らかとなった。

2. 小規模アイスクリーム製造施設における製造工程及び検査体制の調査

小規模アイスクリーム製造事業者においても、小規模低温殺菌牛乳製造事業者と同様に、施設内で実施可能な衛生検査について非常に限られたものとなっており、これらの小規模施設の状況を勘案した衛生試験法提示の必要性が示された。特に、小規模アイスクリーム製造事業者においては、同

一工場内で複数のフレーバーを生産する事業形態が一般的であり、製造品目数が少ない低温殺菌牛乳製造事業者と比較して、簡易な試験法導入の必要性がより強く示された。フレーバーを決定する副原料は加熱殺菌工程の後で加えられることが一般的であり、一般社団法人日本アイスクリーム協会が作成する「HACCPの考え方を取り入れた衛生管理のための手引書（小規模なアイスクリーム類製造事業者向け）」内においても、副原料を加熱殺菌後に添加する場合は殺菌済みの原料を使用することが求められている。副原料については加工済み製品を購入し使用する場合に加えて、商品価値付加の理由から各事業者において独自に加工したものも使用されており、その加工方法もフレーバーごとに様々である。本研究の解析結果からフレーバーごとに最終製品の細菌学的汚染度が異なることが明らかとなった。これらの結果及び、小規模事業者において同一製造日に複数のフレーバーを生産し、かつ各フレーバーを小ロットで生産している実情を考えると、簡易検査法を用いた迅速な日常検査による各製品の細菌学的汚染度のトレンド解析は非常に有用かつ効果的な方法であると考えられる。

3. 簡易検査法の有用性解析

低温殺菌牛乳製造施設における簡易検査法の有用性に関する検討においては、一部の検査項目においてISO法-簡易検査法間ならびに簡易検査法間で結果に差がみられ、施設ごとに乳の性質を勘案した最適な検査法選択の必要性が示唆された。小規模製造施設において衛生検査に精通していない作業者が検査を実施している現状を踏まえると、小規模施設において簡易検査法を

導入するには専門家による支援を含めた慎重な検討の必要性も示唆された。

小規模アイスクリーム製造施設で製造された製品に対する解析においては、同一事業者にて製造された複数のフレーバーに対してISO法と簡易検査法の結果を比較したところ、ISO法に比較して簡易検査法で若干低い値を示す傾向にあったものの、全てのフレーバーにおいてその差は \log_{10} CUF/g < 1 となり、成分規格に対して十分に低い汚染度の国内流通品に対して簡易検査法が十分に使用可能な方法であることが確認された。

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

4. 加熱殺菌による衛生指標菌数動態検査

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、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た。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（図2、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。

E. 結論

小規模低温殺菌牛乳製造施設及び小規模アイスクリーム製造施設の調査から、小規模施設内で実施可能な衛生検査が非常に限られたものである実態が明らかとなった。これらの施設において衛生検査の多くを外部検査機関への受託検査に頼っている現状からも、今後の新たな衛生管理手法の導入において、簡易検査法が担う役割の重要性が強く示された。特に、小規模アイスクリーム製造施設では細菌学的汚染度の異なる複数のフレーバーを小ロットで製造している実態が明らかとなり、各施設において簡易検査法を利用した迅速な日常検査導入の重要性が示唆された。加えて、小規模事業者では十分な教育訓練を受けていない従業員が検査を実施している等の簡易検査の運用方法についての問題点も抽出され、簡易検査法を用いた標準試験法の整備においては、各施設での適切な適用箇所や運用方法に関する支援を行う必要性も示された。簡易検査法を用いた試験の結果に試験設備条件が与える影響について検討した結果、恒温槽等を用いた正確な温度管理が難しい試験条件下においても試験条件の大まかなコントロールにより、簡易検査法を用

いて適切な結果が得られることが明らかとなった。本結果は小規模製造施設の日常検査における簡易検査法の有用性を示すものである。

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られる。

本研究により得られた成果は乳及び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り、今後、簡易検査法の導入を含めた国内の各種事業形態に適応した実行性のある試験法整備に貢献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

論文発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1 低温殺菌牛乳製造施設の概要

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

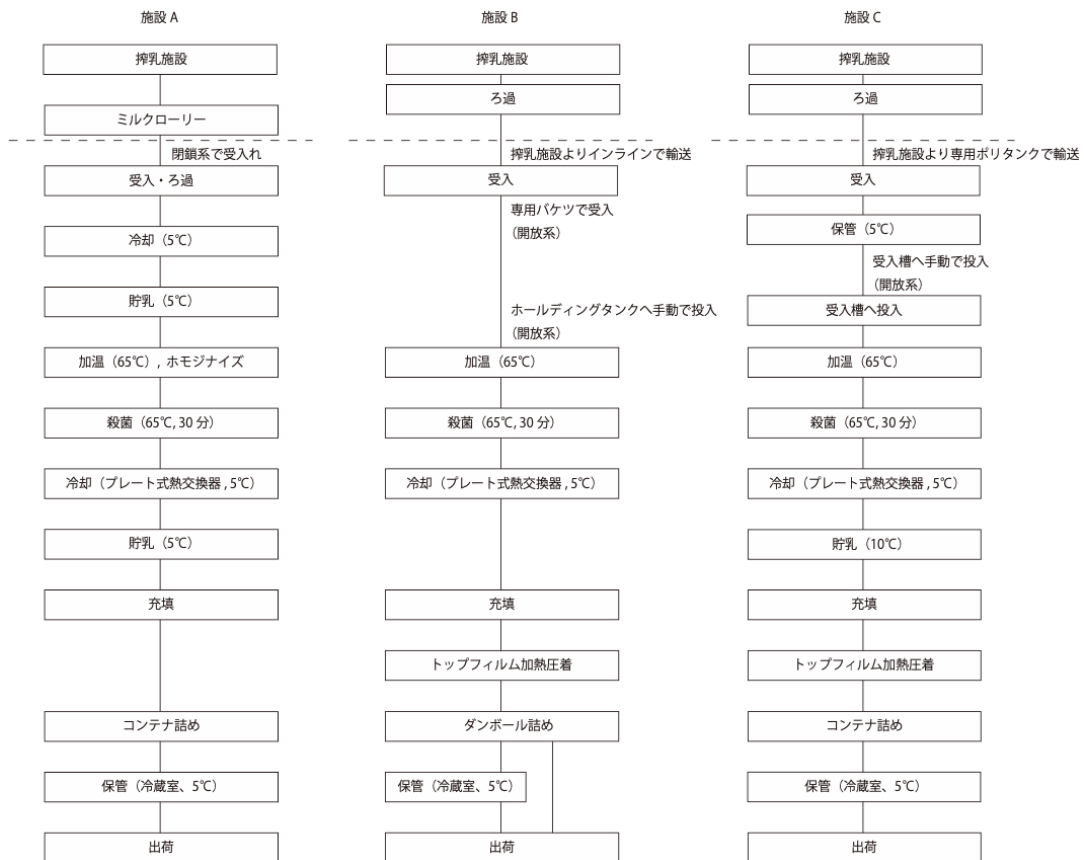


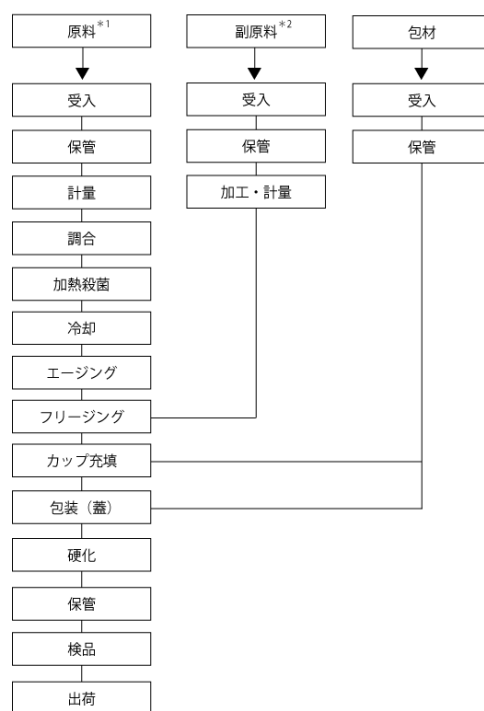
図1 小規模低温殺菌牛乳製造施設における製造フローチャートの比較

表 2 低温殺菌牛乳製造施設における自主検査項目の比較

工程	検査対象	検査項目	施設 A			施設 B			施設 C		
			頻度	作業内容または手順	チェック項目	頻度	作業内容または手順	チェック項目	頻度	作業内容または手順	チェック項目
生乳受入検査	生乳	視覚試験	製造ごと	バルククーラーの蓋を開け、視覚的に生乳状態を判断する。	色・凍結・異物確認	製造ごと	受入時に、視覚的に生乳状態を判断	色・凍結・異物確認	製造ごと	受乳槽投入時に、視覚的に生乳状態を判断	色・凍結・異物確認
		嗅覚試験	製造ごと	バルククーラーの蓋を開け、臭いを嗅ぐ。	洗剤・塩素・発酵・牛舎・飼料の臭いがないか確認	製造ごと	受入時に、臭いを嗅ぐ	洗剤・塩素・発酵・牛舎・飼料の臭いがないか確認	製造ごと	受乳槽投入時に、臭いを嗅ぐ	洗剤・塩素・発酵・牛舎・飼料の臭いがないか確認
		味覚試験	製造ごと	口に含み鼻腔を通して息を吐き出す。	塩味、苦味、酸味、嗅覚での異臭がないか確認	-	-	-	-	-	-
		アルコールテスト	製造ごと	ディッパーにて同量の生乳・アルコールを混合する。	凝固がないか確認	-	-	-	-	-	-
		比重	製造ごと	乳比重計にて、比重測定→乳温測定を行い、比重補正値にて判定すること	比重補正値が1.033前後であることを確認	-	-	-	製造ごと	乳比重計にて、比重測定→乳温測定を行い、比重補正値にて判定	1.028-1.034の範囲であることを確認
		生菌数	製造ごと	生乳をコンラージ棒にて血液寒天培地に無菌的に塗抹し38℃24時間培養する。	菌数に異常がないことを確認	-	-	-	-	-	-
		ブドウ球菌数	製造ごと	生乳をコンラージ棒にてマンニト食塩寒天培地に無菌的に塗抹し38℃24時間培養する。	菌数に異常がないことを確認	-	-	-	-	-	-
		腸内細菌数	製造ごと	生乳をコンラージ棒にてDHL寒天培地に無菌的に塗抹し38℃24時間培養する。	菌数に異常がないことを確認	-	-	-	-	-	-
		残留抗生物質	製造ごと	検査キットに生乳を染み込ませ、専用インキュベーターで加温(8分)する。	陰性であることを確認	-	-	-	-	-	-
		製品検査	牛乳	乳温	製造ごと	充填開始時、バックへ温度計を入れ測定	10℃以下であることを確認	製造ごと	プレート式熱交換器に付属の温度計をチェックする	5℃以下であることを確認	-
視覚試験	製造ごと			視覚的に牛乳の状態を判断する	色に異常、異物がないか確認	製造ごと	視覚的に牛乳の状態を判断する	色に異常、異物がないか確認	製造ごと	視覚的に牛乳の状態を判断する	色に異常、異物がないか確認
味覚試験	製造ごと			口に含み鼻腔を通して息を吐き出す	塩味、苦味、酸味、嗅覚での異臭がないか確認	製造ごと	口に含み鼻腔を通して息を吐き出した後に、飲用する	塩味、苦味、酸味、嗅覚での異臭がないか確認	-	-	-
異物確認	製造ごと			セジメントテストにより確認	異物がないか確認	-	-	-	-	-	-
比重	製造ごと			乳比重計にて、比重測定→乳温測定を行い、比重補正値にて判定すること	比重補正値が1.033前後であることを確認	-	-	-	-	-	-
重量	製造ごと			製品の重量を計測する	528g以上(包装容器込み)であることを確認	-	-	-	-	-	-
一般生菌数	製造ごと			牛乳をコンラージ棒にて血液寒天培地に無菌的に塗抹し、38℃24時間培養	100cfu/m ¹ 以下であることを確認	-	-	-	-	-	-
大腸菌群数	製造ごと			・牛乳をBGLB発酵管へ注入し、38℃24時間培養。 ・牛乳を簡易培地でサンドし38℃24時間培養	陰性であることを確認	製造ごと	牛乳を簡易培地でサンドし、工場内の温所で24時間培養	陰性であることを確認	製造ごと	簡易迅速測定キットにより判定	陰性であることを確認
残留抗生物質	製造ごと			培地上的ペーパーディスクに牛乳を染み込ませ、55℃6時間培養	陰性であることを確認	-	-	-	-	-	-
包装状態	トップ圧着チェック			製造ごと	ダイチェック(色素液の漏洩チェック)により確認	漏れが無いことを確認	-	-	-	-	-
	ボトム圧着チェック		製造ごと	ダイチェック(色素液の漏洩チェック)により確認	漏れが無いことを確認	-	-	-	-	-	-
	キャップチェック		-	-	-	製品ごと	目視により確認	密封状態に異常が無いことを確認	製品ごと	目視により確認	密封状態に異常が無いことを確認
	トップフィルム圧着チェック		-	-	-	製品ごと	目視により確認	異常が無いことを確認	製品ごと	目視により確認	異常が無いことを確認
	賞味期限印字確認		製造ごと	目視により確認	賞味期限印字状態を確認	製品ごと	目視により確認	賞味期限印字状態を確認	製品ごと	目視により確認	賞味期限印字状態を確認
備考(外部委託検査について)			上記項目以外に体細胞数、総菌数、耐熱性菌数、乳脂肪分、無脂乳固形分、比重、酸度について外部委託により検査を実施。			上記項目以外に体細胞数、生菌、耐熱菌数、乳脂肪分、無脂乳固形分、比重、酸度、アルコールテスト、残留抗生物質、血液混入、タンパク質含有量、乳糖量、水点、窒素量、について外部委託により検査を実施。			上記項目以外に生菌、大腸菌群数、大腸菌、乳脂肪分、無脂乳固形分、比重、酸度、残留抗生物質について外部委託により検査を実施。		

表 3 アイスクリーム製造施設の概要

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



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

図 2 小規模アイスクリーム製造施設における、カップアイスクリーム製造フローチャート

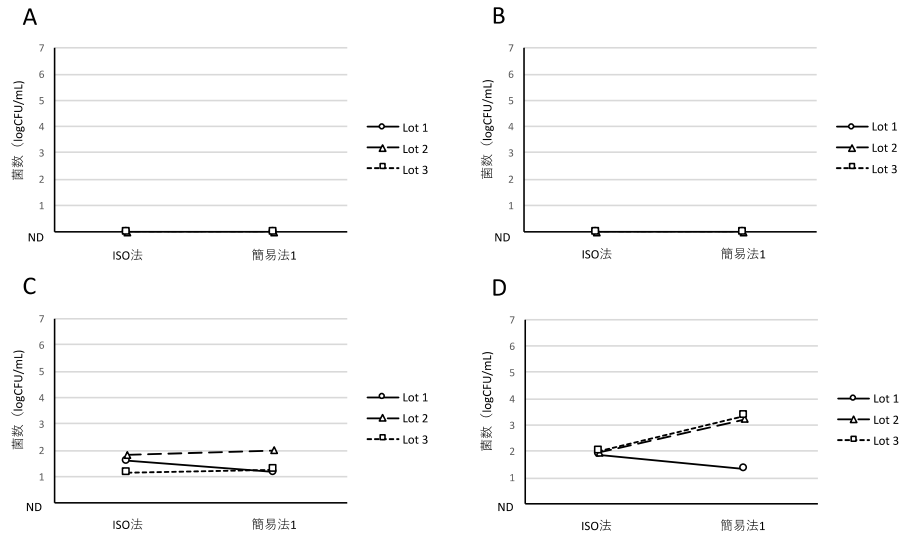


図3 乳試料に対する腸内細菌科菌群検査法における培養法と簡易検査法の比較

施設A及び施設Cから入手した生乳及び低温殺菌牛乳についてISO法及び簡易検査法を用いた腸内細菌科菌群検査の結果を示した。全ての試験は各施設から入手した異なる3ロットの試料について実施した。縦軸のNDは検出下限以下(1 cfu/mL未滿)を示す。それぞれのグラフは施設Aの低温殺菌牛乳(A)、施設Cの低温殺菌牛乳(B)、施設Aの生乳(C)、施設Cの生乳(D)に対する試験結果を示す。

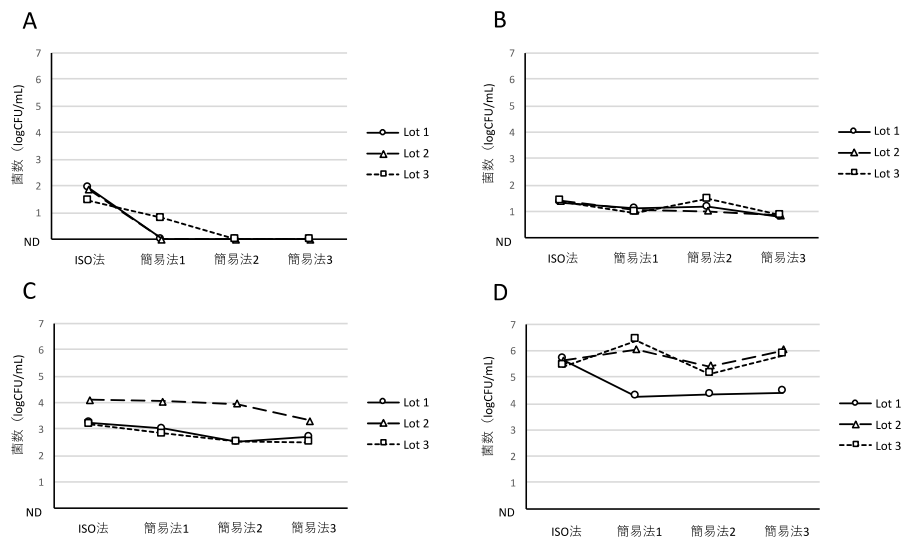


図4 乳試料に対する生菌数検査における培養法と簡易検査法の比較

施設A及び施設Cから入手した生乳及び低温殺菌牛乳についてISO法及び簡易検査法を用いた生菌数検査の結果を示した。全ての試験は各施設から入手した異なる3ロットの試料について実施した。縦軸のNDは検出下限以下(1 cfu/mL未滿)を示す。それぞれのグラフは施設Aの低温殺菌牛乳(A)、施設Cの低温殺菌牛乳(B)、施設Aの生乳(C)、施設Cの生乳(D)に対する試験結果を示す。

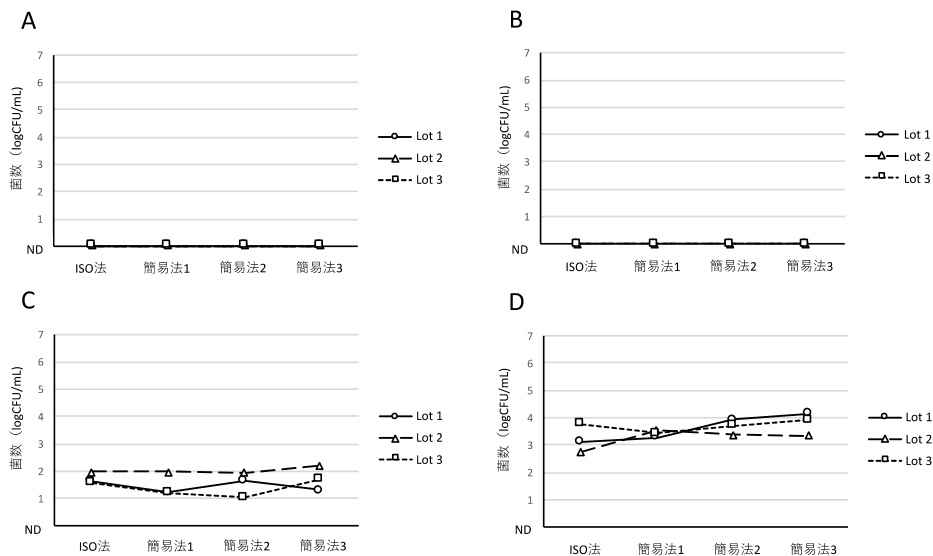


図5 乳試料に対する大腸菌群検査法における培養法と簡易検査法の比較

施設A及び施設Cから入手した生乳及び低温殺菌牛乳についてISO法及び簡易検査法を用いた大腸菌群検査の結果を示した。全ての試験は各施設から入手した異なる3ロットの試料について実施した。縦軸のNDは検出下限以下(1 cfu/mL未滿)を示す。それぞれのグラフは施設Aの低温殺菌牛乳(A)、施設Cの低温殺菌牛乳(B)、施設Aの生乳(C)、施設Cの生乳(D)に対する試験結果を示す。

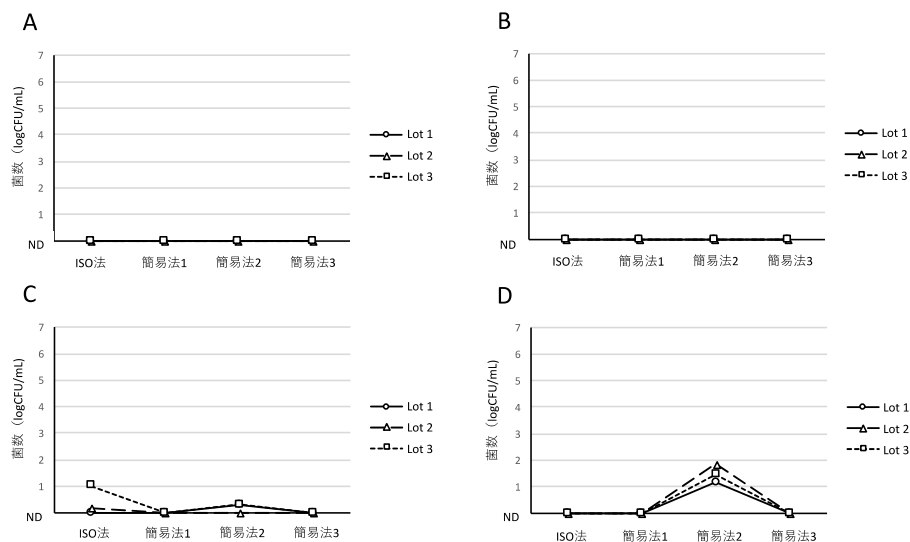


図6 乳試料に対する大腸菌検査における培養法と簡易検査法の比較

施設A及び施設Cから入手した生乳及び低温殺菌牛乳についてISO法及び簡易検査法を用いた大腸菌数検査の結果を示した。全ての試験は各施設から入手した異なる3ロットの試料について実施した。縦軸のNDは検出下限以下(1 cfu/mL未滿)を示す。それぞれのグラフは施設Aの低温殺菌牛乳(A)、施設Cの低温殺菌牛乳(B)、施設Aの生乳(C)、施設Cの生乳(D)に対する試験結果を示す。

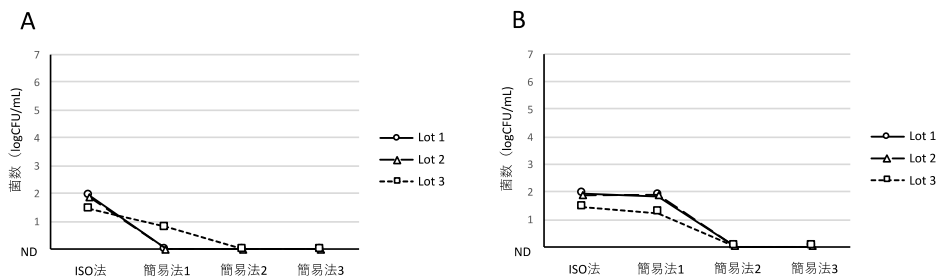


図7 培養条件が検査結果へ及ぼす影響の検討

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

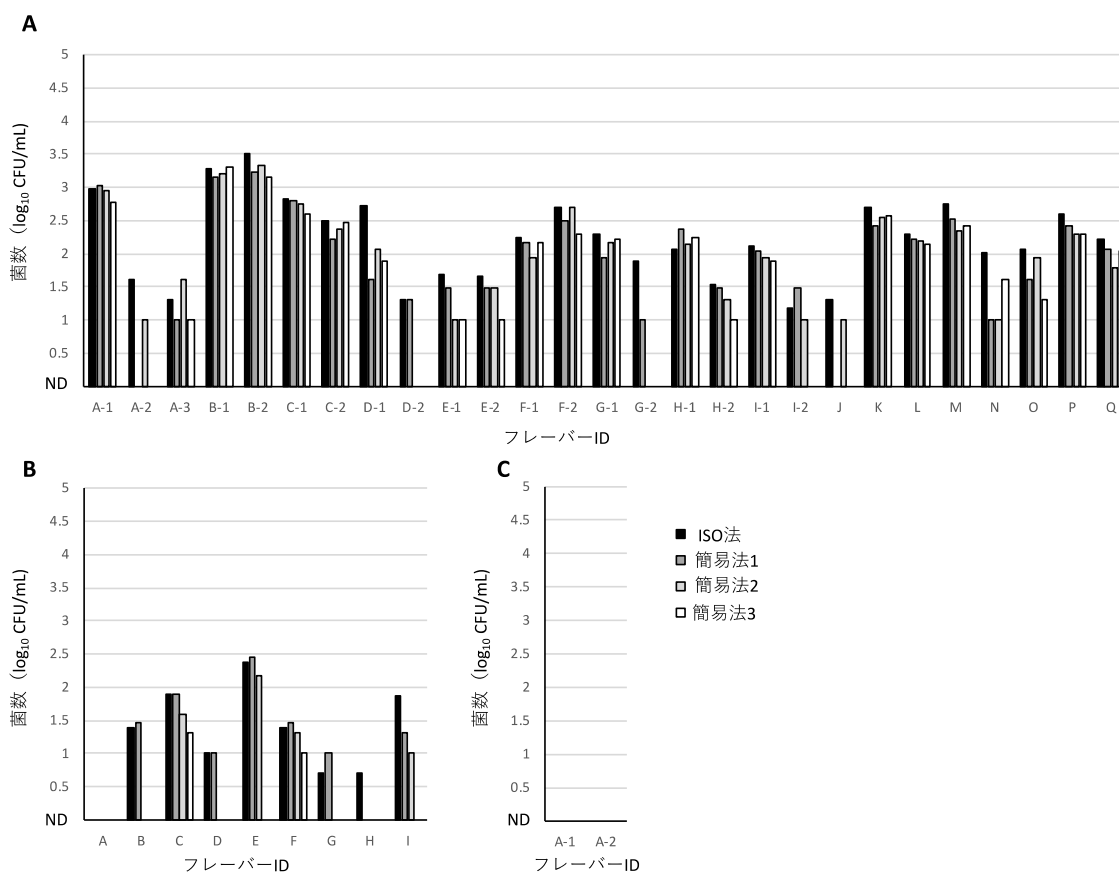


図8 小規模製造施設で製造されたアイスクリーム製品の生菌数

各施設から購入した製品についてISO法及び簡易検査法(3種類)を用いた生菌数検査の結果を示した。縦軸のNDは検出下限以下(10 cfu/mL未満)を示す。それぞれのグラフは(A)施設Dで製造されたA-Qまでの異なる17種類のフレーバー(フレーバーAについては枝番で示す製造日の異なる3つの製造ロットを、フレーバーB-Iについては枝番で示す製造日の異なる2つの製造ロットを、フレーバーJ-Qについては1製造ロットを試験に供した)、(B)施設Eで製造されたA-Iまでの異なる9種類のフレーバー、(C)施設Fで製造された1種類のフレーバー(製造日の異なる2つの製造ロットを試験に供した)に対する試験結果を示す。

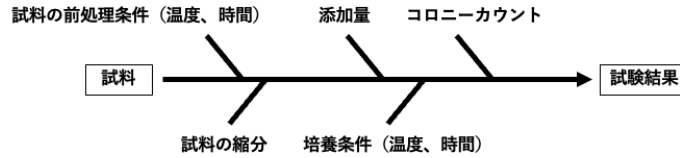


図9 簡易検査法の試験結果に影響を与える要因 (特性要因図)

表4 異なる条件で融解した試料に対して簡易検査法を用いて得られる結果の比較

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

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

表5 異なる条件で培養した場合に得られる簡易検査法の結果の比較

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

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

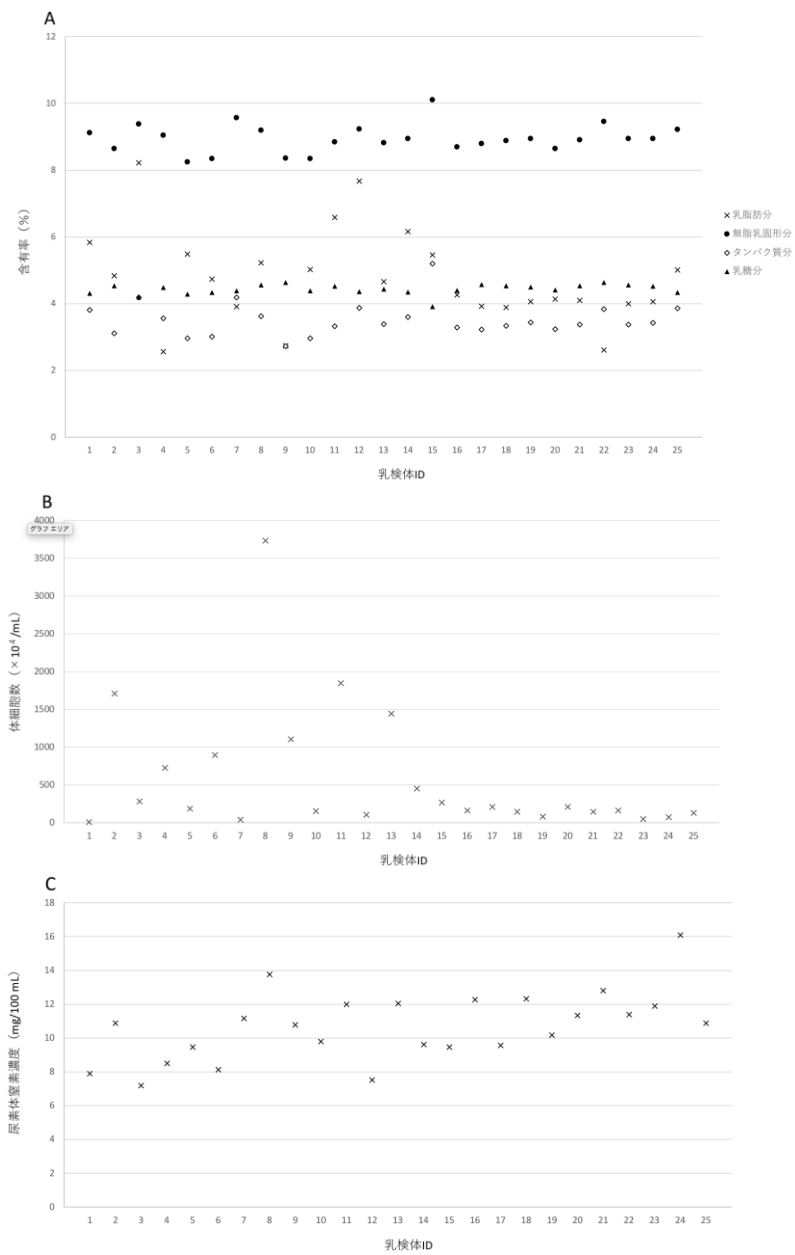


図 10 生乳試料の成分分析

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。

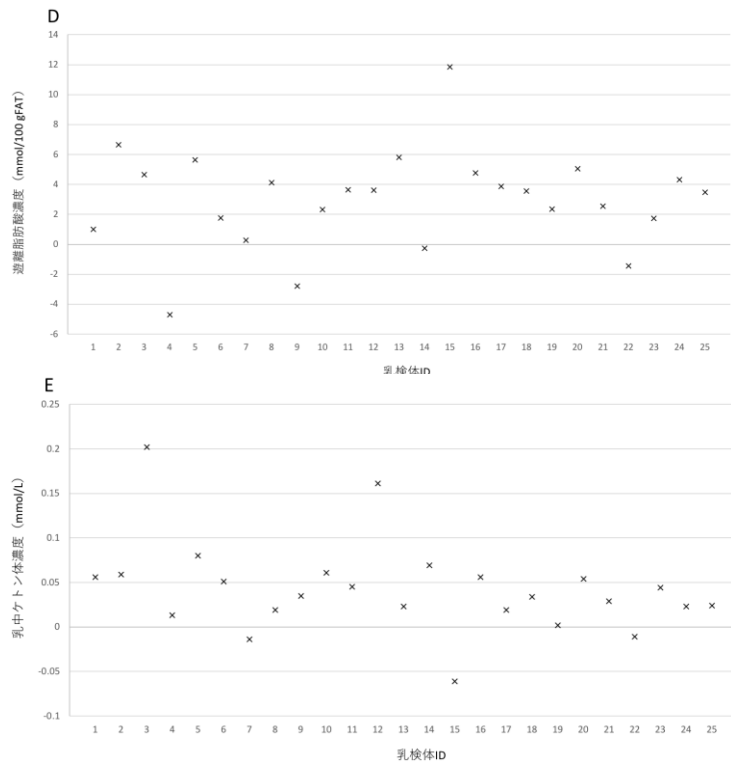


図 10 生乳試料の成分分析 (つづき)

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。

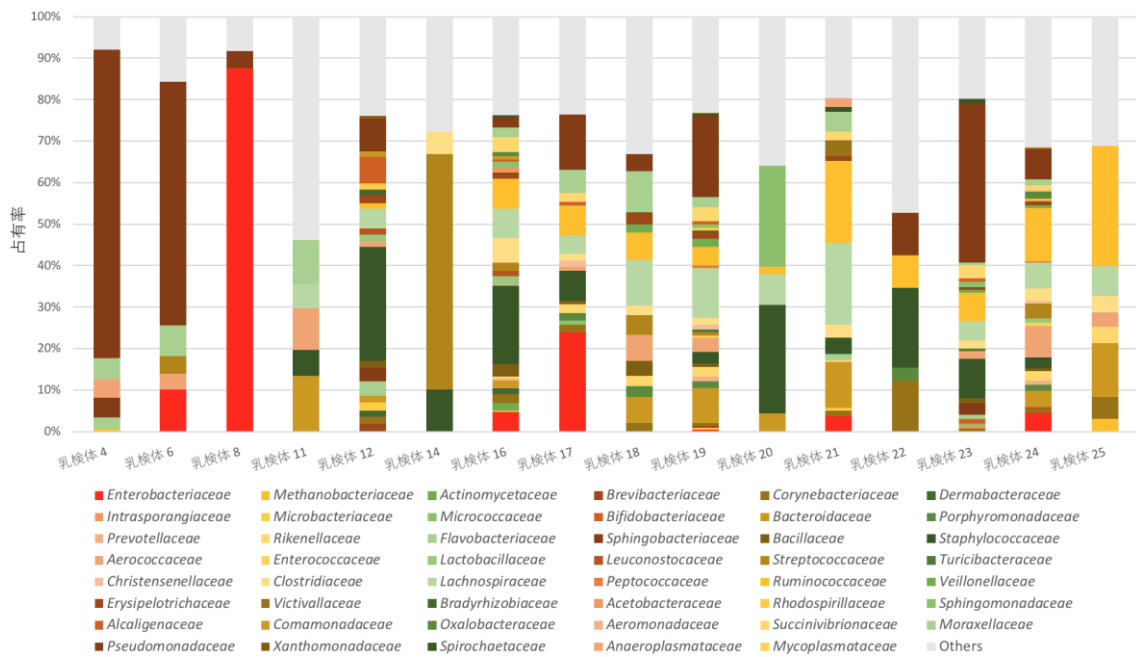


図 11 生乳試料の細菌叢解析

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。

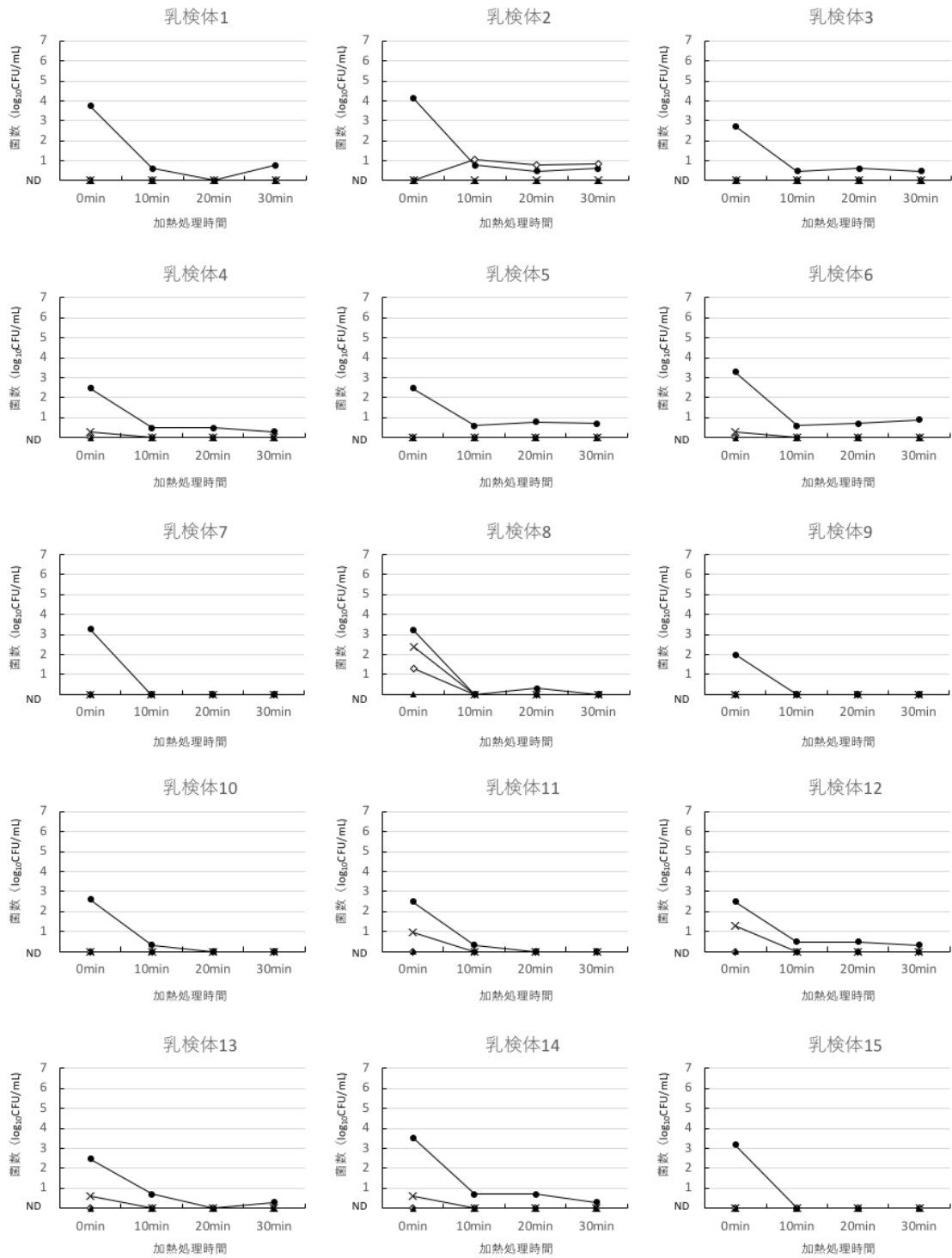


図 12 加熱殺菌前後の衛生指標菌数の動態

65°Cで各時間加熱処理した検体の一般細菌数 (●)、大腸菌群数 (◇)、大腸菌数 (▲) 及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 (1 cfu/mL 未満) を示す。

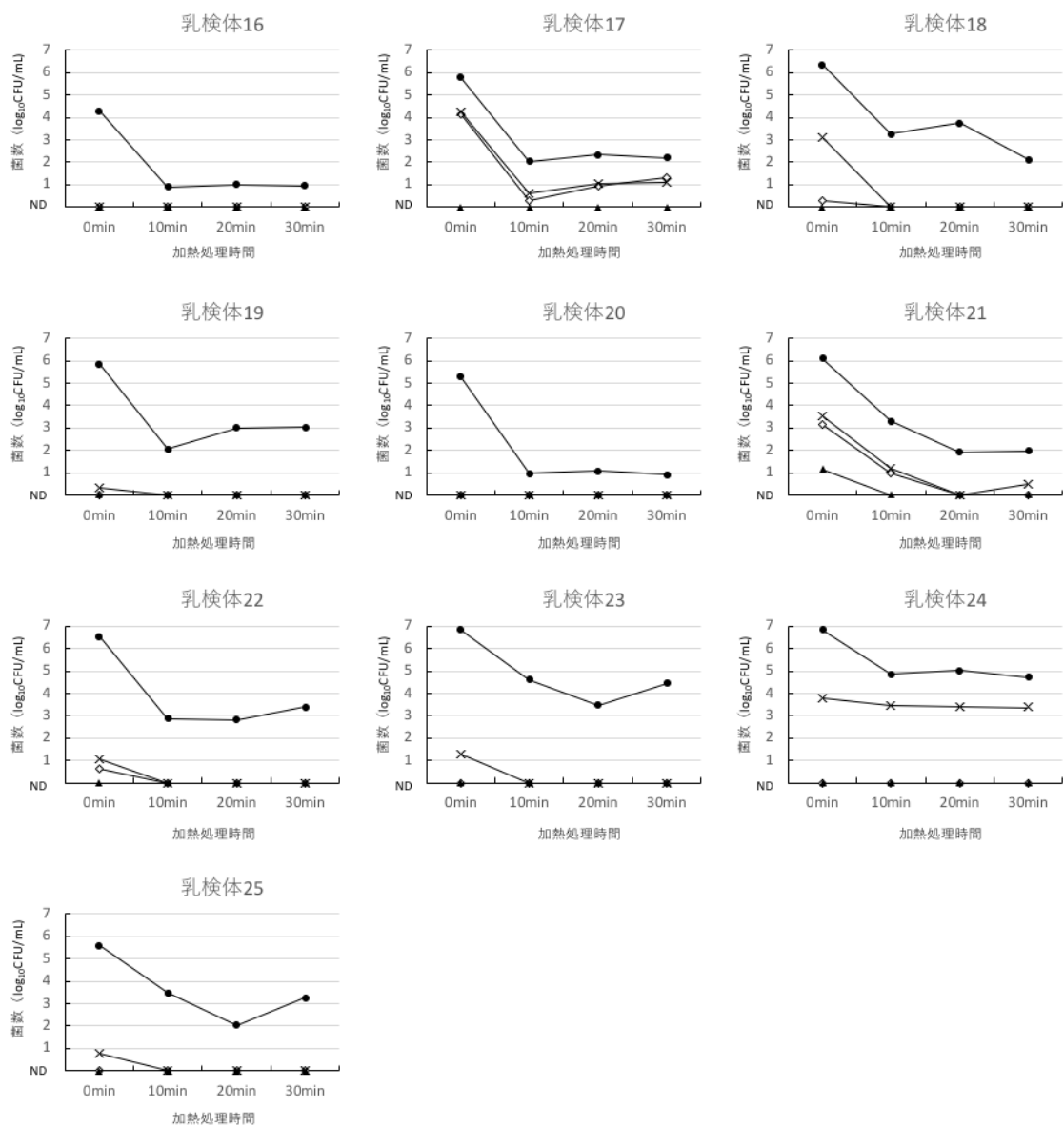


図 12 加熱殺菌前後の衛生指標菌数の減少動態 (つづき)

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 (▲) 及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 (1 cfu/mL未滿) を示す。

平成 30 年度－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）
分担総合研究報告書

乳及び乳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
鈴木穂高 茨城大学農学部
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
Amalia Widya Rizky 茨城大学農学部
永島侑起 茨城大学農学部
渡辺 愛 茨城大学農学部
御堂梨花子 茨城大学農学部
下島優香子 東京都健康安全研究センター微生物部
福井理恵 東京都健康安全研究センター微生物部
森田加奈 東京都健康安全研究センター微生物部
平井昭彦 東京都健康安全研究センター微生物部

研究要旨

現在わが国の乳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おり、現在でもそれらが科学的に妥当か否かの検証が望まれている。また、HACCP 導入後の各種食品製造工程における衛生管理上で、迅速簡易法が適用される可能性が高まっているが、乳及び乳製品での適用の妥当性については、不明な点がある。本研究では、乳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、市販の低温殺菌牛乳等 88 検体、アイスクリーム類 127 検体及びバター製品 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、低温殺菌牛乳については簡易培地での集落形成数が公定法及び ISO 法よりも低い傾向が示された。アイスクリーム類においては、一部の製品で公定法の結果と差が見られ、加熱損傷菌の残存等、製品特性に応じた導入検証の必要性が示された。

A. 研究目的

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

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

以上の背景を踏まえ、本研究では国内で流通する低温殺菌牛乳、アイスクリーム類及び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について考察を行ったので報告する。

B. 研究方法

1) 諸外国における乳及び乳製品等の微生物規格の調査

EU、米国及びオーストラリアにおける低温殺菌牛乳、生乳、アイスクリーム及びバター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。

2) 低温殺菌牛乳等の汚染実態調査及び簡易培地の検討(平成 30 年度)

市販の低温殺菌牛乳等について、衛生指標菌汚染実態を調査した。調査は平成 30 年 7 月から平成 31 年 3 月まで行い、検体は低温保持殺菌牛乳(LTLT: 63°C~65°C、30 分) 53 検体、高温短時間殺菌牛乳(HTST: 72°C以上、15 秒以上) 19 検体、高温保持殺菌牛乳(HTLT: 75°C以上、15 分以上) 16 検体の合計 88 検体を用いた。試験項目は、細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌とした。試験方法は、細菌数については乳等省令の試験法(32°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 を用いた。また、各試験項目の代替法として、国際的な第三者認証を取得し、国内で市販されている代表的な簡易培地を用いた。得られた結果は、対応のある t 検定により統計解析を行った。検出限界値未満

の値は0として計算を行った。検体管理温度、一部培養温度等に逸脱があった19検体については、結果を全体の統計に含めず、別途参考値として集計した。簡易培地で検出された細菌の菌種の同定は、16S Bacterial rDNA PCR キット（タカラバイオ）を用いた塩基配列解析及びBLAST 相同性検索により行った。黄色ブドウ球菌検出用簡易培地上に形成された非定型集落の同定には、MALDI BioTyper (Bruker)を用いた。

3) アイスクリーム類の汚染実態調査及び簡易培地の検討（令和元年度）

市販のアイスクリーム類について、衛生指標菌汚染実態を調査した。調査は令和元年7月から令和2年3月まで行い、検体はアイスクリーム（乳固形分15%以上、うち乳脂肪分8%以上）52検体、アイスマルク（乳固形分10%以上、うち乳脂肪分3%以上）45検体、ラクトアイス（乳固形分3%以上）30検体の合計127検体を用いた。試験項目は、細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌とした。試験方法は、低温殺菌牛乳と同様に実施した。また、各試験項目の代替法として、国際的な第三者認証を取得し、国内で市販されている代表的な簡易培地2種を、製品の指示書に示された培養温度及び時間に従って用いた。同一検体間の試験法による菌数の比較は、対応のあるt検定により統計解析を行った。種別ごとの菌数の比較は一元配置分散分析及びTukeyの検定を行った。検出限界値未満の値は0CFU/gとして計算を行い、対数化に当たって全数値に1を加算した。検出された腸内細菌科菌群の菌種同定は、16S Bacterial rDNA PCR キット（タカラバイオ）を用いた塩基配列解析及びBLAST 相同

性検索により行った。3カテゴリ間での腸内細菌科菌群陽性率の比較は、フィッシャーの正確確率検定（拡張型）により行った。

4) バター製品の汚染実態調査及び簡易培地の検討（令和2年度）

市販のバター製品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、低温殺菌牛乳及びアイスクリーム類と同様に実施した。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0CFU/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。

C. 研究結果

1) 諸外国における低温殺菌牛乳等の微生物規格

平成30年分担報告書表1に諸外国における低温殺菌牛乳、令和2年度分担報告書表3にバター製品、表4にアイスクリーム類の微生物規格を示した。EUでは低温殺菌牛乳について、製造工程の最終時の微生物規格として腸内細菌科菌群を10CFU/mL未満と定めており、1ロットについて5検体試験し、全検

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

令和 2 年度分担報告書表 3 に日本国内及び諸外国におけるバター、同じく表 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令和 2 年度分担報告書図 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 法から混釈培養法に変更し、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。

2) 低温殺菌牛乳等の汚染実態調査（平成 30 年度）

調査結果概要を平成 30 年度分担報告書表 2 に示した。公定法での細菌数（32°C48 時間培養）は、LTLT 乳 53 検体で平均 1.49 logCFU/mL（検出限界以下～4.07 logCFU/mL）、HTST 乳 19 検体で平均 1.31 logCFU/mL（検出限界以下～3.36 logCFU/mL）、HTLT 乳 16 検体で平均 0.29 logCFU/mL（検出限界以下～1.32 logCFU/mL）であった。一方、公定法と同一の培養条件（32°C48 時間）で簡易培地を用いた際と同菌数は LTLT 乳で平均 1.03 logCFU/mL（検出限界以下～4.27 logCFU/mL）、HTST 乳で平均 0.97 logCFU/mL（検出限界以下～3.40 logCFU/mL）、HTLT 乳で平均 0.28 logCFU/mL（検出限界以下～1.38 logCFU/mL）であった。また、ISO 法による細菌数（30°C72 時間培養）は、LTLT 乳で平均 2.06 logCFU/mL（検出限界以下～4.34 logCFU/mL）、HTST 乳で平均 1.66 logCFU/mL（検出限界以下～3.61 logCFU/mL）、HTLT 乳で平均 0.75 logCFU/mL（検出限界以下～2.08 logCFU/mL）であった。ISO 法と同一の培養条件で簡易培地を用いた際と同菌数は、LTLT 乳で平均 1.90 logCFU/mL（検出限界以下～4.70 logCFU/mL）、HTST 乳で平均 1.23 logCFU/mL（検出限界以下～3.62 logCFU/mL）、HTLT 乳で平均 0.54 logCFU/mL（検出限界以下～1.58 logCFU/mL）であった。

細菌数における試験法間での有意差検定を通じ、公定法と簡易培地の間では、LTLT 乳と HTST 乳では有意差を示したが、HTLT 乳では有意差は見られなかった（平成 30 年度

分担報告書表 2）。また、両者の相関を寄与率で算出したところ、LTLT 乳で 0.0614（同図 1）、HTST 乳で 0.7169（同図 4）、HTLT 乳で 0.186（同図 7）であった。公定法と ISO 法の間では、LTLT 乳、HTST 乳及び HTLT 乳のいずれも有意差を示し（同表 2）、寄与率は LTLT 乳で 0.5177（同図 2）、HTST 乳で 0.7863（同図 5）、HTLT 乳で 0.1306（同図 8）であった。一方、ISO 法と簡易法の間では、HTST 乳では有意差を示したが、LTLT 乳と HTLT 乳では差は見られず（同表 2）、寄与率は、LTLT 乳で 0.6093（同図 3）、HTST 乳で 0.6598（同図 6）、HTLT 乳で 0.7197（同図 9）であった。一部の温度逸脱等により参考値として集計した検体においても、LTLT 乳における寄与率は、公定法と ISO 法及び ISO 法と簡易法の間で高く、公定法と簡易法の間で低い傾向を示した（同図 10、11 及び 12）。今回試験した検体からは、いずれの試験法においても、黄色ブドウ球菌及び大腸菌は検出されなかった。一方大腸菌群は、LTLT 乳 1 検体より検出された。

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

であった。

3) アイスクリーム類の汚染実態調査(令和元年度)

アイスクリーム類の公定法での細菌数(32°C48時間培養)は、アイスクリーム52検体で平均1.026 log CFU/g(検出限界未満~3.790 log CFU/g)、アイスマルク45検体で平均1.187 log CFU/g(検出限界未満~3.301 log CFU/g)、ラクトアイス30検体で平均1.140 log CFU/g(検出限界未満~3.072 log CFU/g)であった(令和元年度分担報告書表1)。3つのカテゴリーの細菌数に、差は認められなかった($p=0.6516$)。公定法と同一の培養条件(32°C48時間)で簡易培地1を用いた際の細菌数は、アイスクリームで平均1.098 log CFU/g(検出限界未満~4.017 log CFU/g)、アイスマルクで平均1.156 log CFU/g(検出限界未満~3.301 log CFU/g)、ラクトアイスで平均1.206 log CFU/g(検出限界未満~2.207 log CFU/g)であった。いずれのカテゴリーにおいても、公定法と簡易培地1における細菌数に有意な差は見られなかった。簡易培地2は製品の指示書に従い、32°C24時間で菌数を測定した。細菌数は、アイスクリームで平均0.861 log CFU/g(検出限界未満~3.644 log CFU/g)、アイスマルクで平均0.787 log CFU/g(検出限界未満~3.322 log CFU/g)、ラクトアイスで平均0.891 log CFU/g(検出限界未満~2.044 log CFU/g)であった。簡易培地2の細菌数を公定法と比較したところ、アイスマルクでは有意に低く、アイスクリームとラクトアイスではやや低い傾向が見られた。ISO法による細菌数(30°C72時間培養)は、アイスクリームで平均1.237 log CFU/g(検出限界未満~3.909 log CFU/g)、アイスマルクで平均1.404

log CFU/g(検出限界未満~3.352 log CFU/g)、ラクトアイスで平均1.268 log CFU/g(検出限界未満~3.163 log CFU/g)であった。ISO法における細菌数を公定法と比較したところ、アイスクリームとアイスマルクにおいて有意に高い結果が得られたが、ラクトアイスでは差は見られなかった。ISO法についてはSPC寒天培地を用いた混釈培養と平行して、同培地を用いた表面塗抹を行ったところ、アイスクリームで平均0.868 log CFU/g(検出限界未満~3.716 log CFU/g)、アイスマルクで平均0.785 log CFU/g(検出限界未満~3.505 log CFU/g)、ラクトアイスで平均0.668 log CFU/g(検出限界未満~2.179 log CFU/g)となり、いずれのカテゴリーでも混釈培養における細菌数よりも有意に低い結果となった。

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

今回試験した検体からは、いずれの試験法においても、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌は検出されなかった。一方腸内細菌科菌群は、アイスクリームの15.4%(8/52検体)、アイスマルクの13.3%(6/45検体)及びラク

トアイスの 6.7% (2/30 検体) より検出された (令和元年度分担報告書表 2)。全体における陽性率は、12.6% (16/127 検体) であった。フィッシャーの正確確率検定により、アイスクリーム、アイスマイルク及びラクトアイス間の陽性率の検定を行ったところ、アイスクリーム類の種別による陽性率に有意差は見られなかった ($p=0.551414$)。腸内細菌科菌群陽性であった 16 検体は全て、定性法 (ISO 21528-1: 2016) で検出された。一方、定量法 (ISO 21528-2:2016) においても腸内細菌科菌群が検出された検体は、アイスクリーム 2 検体のみであり、いずれの検体においても、検出菌数は 5 CFU/g であった。腸内細菌科菌群が検出された全 16 検体で、腸内細菌科菌群用の簡易培地からは菌は検出されなかった。また、腸内細菌科菌群陽性を示した検体からは、公定法及び簡易培地のいずれにおいても大腸菌群は検出されなかった。検出された腸内細菌科菌群の集落は、純培養後菌種同定を行ったところ、8 検体由来の菌株が *Enterobacter* 属の細菌であった (令和元年度分担報告書表 3)。

4) バター製品の汚染実態調査及び簡易培地の検討 (令和 2 年度)

調査結果概要を令和 2 年度分担報告書表 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 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 CFU/g (検出限界未満~5.886 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 ($p=0.018$)。簡易培地 4 については、細菌数の平均は 1.389 log CFU/g (検出限界未満~6.326 log 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 CFU/g (検出限界未満~7.248 log CFU/g) であった。ISO 法における細菌数を公定法と比較したところ、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 CFU/g (検出限界未満~5.556 log 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 (令和 2 年度分担報告書図 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 3.781 log CFU/g、それ以外の製品の平均値は 1.184 log 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 (令和 2 年度分担報告書表 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 ($<5\text{CFU/g}$) 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 (令和 2 年度分担報告書表 2)。

D. 考察

初年度の本研究により、LTLT 乳において混釈培養による公定法と簡易培地 (32°C 48 時間培養) での集落形成に有意な差があることが示された。一方、培養時間の長い ISO 法と簡易法 (30°C 72 時間培養) では有意差はみられなかったことから、低温殺菌による半致死的な加熱損傷が、簡易培地での集落形成性を低下させ、増殖の遅延を引き起こしている可能性が示唆された。一方 HTLT 乳は低温殺菌牛乳の中でも殺菌温度が高く、殺菌時間が長いため、牛乳中の残存菌数が LTLT 乳及び HTST 乳よりも低いことから、公定法及び ISO

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

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

本研究により、国内で流通している低温殺菌牛乳、アイスクリーム類及び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。細菌数の規格基準が設定されている低温殺菌牛乳(88 検体)及びアイスクリーム類(127 検体)に、細菌数の規格基準超過検体は見られなかった。細菌数についてはバターの微生物規格に設定されておらず、今回の調査では $5\log\text{CFU/g}$ を超える製品が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。

本研究で用いた全検体で、黄色ブドウ球菌及び大腸菌の陽性検体は見られなかった。アイスクリーム類とバターでは大腸菌群も全検体で非検出であった。一方、アイスクリーム類の16 検体(12.6%)については腸内細菌科菌群定性法で陽性を示し、うち2 検体については定量法で菌が検出されていた。また、腸内細菌科菌群が定性法(検出下限値は 0.04CFU/g)のみから検出された14 検体において、その菌量の理論値は $0.04\sim 4.99\text{CFU/g}$ であり、定量法においても検出された2 検体では 5CFU/g であったことから、いずれの検体も腸内細菌科菌群を製品出荷時の製造工程規格とする EU 規格においても、逸脱となる検体は見られなかった。バター製品においては、5 検体(11.1%)について腸内細菌科菌群定性法で陽性を示した。5 検体全てにおいて定量法では検出限界未満となったことから、それ

らの汚染菌量は理論値で $0.04\sim 4.99\text{CFU/g}$ であることが示唆された。アイスクリーム類、バターともに、検出された腸内細菌科菌群細菌の一部は大腸菌群に属するものであったが、多くの検体では大腸菌群試験法の検出限界未満($<5\text{CFU/g}$)の汚染菌量であったため、大腸菌群試験では検出されなかったと考えられた。アイスクリーム類において、腸内細菌科菌群定量法で菌が検出された一方、検出感度が同じ大腸菌群試験法においては菌が検出されなかった2 検体については、大腸菌群試験法で用いる選択分離培地であるデソキシコレート寒天培地が乳糖を含むのに対し、腸内細菌科菌群試験法で用いる選択分離培地である VRBG 寒天培地がブドウ糖を含んでおり、対象菌の増殖性に相違が見られたためと推察された。本研究により、乳及び乳製品の衛生管理のための微生物規格基準項目として、大腸菌群に代わり腸内細菌科菌群(定量試験)を用いた場合にも、流通している製品に違反となるものはほとんど見られないと思われた。一方で、それらの試験法で疑わしい集落が得られた際の確認試験については、腸内細菌科試験の方が簡便であり、大腸菌群試験に代わる項目としてある程度の利点があると推察された。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、市販の低温殺菌牛乳等

88 検体、アイスクリーム類 127 検体、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。供試製品検体の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、低温殺菌牛乳の製造工程で用いられる低温加熱殺菌では熱損傷菌を生じさせている可能性が示唆された。簡易培地は公定法に比べ、最終判定までの所要日数が短いものが多く、食品の微生物試験における有用性は高いと思われるが、上述の理由から低温殺菌牛乳等への適用は現状では難しいと思われた。アイスクリーム類では簡易培地の製品によって、公定法と差が見られるものがあり、また、ISO 法の表面塗抹法は混釈培養法より有意に低い結果を示した。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。以上の結果から、乳及び乳製品において製品の特性により公定法と簡易培地の細菌数の相関に大きな相違が見られたことから、代替試験法については対象製品を用いた導入検証が必要であることが示唆された。

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：

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

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

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