

令和2年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「国際動向を踏まえた乳および乳製品の試験法確立に関する研究」

分担研究報告書

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

研究要旨

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

A. 研究目的

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

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

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

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

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

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

B. 研究方法

1. 牛乳製造施設における検体確保及び関連情報の収集

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

2. 衛生指標菌定量試験

衛生指標菌の定量試験には、国際標準試験法である ISO 法（一般細菌数、ISO 4833-1；腸内細菌科菌群、ISO 21528-2；大腸菌群、ISO 4832；大腸菌、ISO 16649-2；黄色ブドウ球菌、ISO 6888-1）を用いた。試験検体の希釈には、緩衝ペプトン水（BPW、Oxoid）を用いた。

3. 16S rRNA 菌叢解析

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

kit (Thermo Fisher) を用いて増幅産物を精製・定量し、等量混合ライブラリーを作製した。Ion Chef/PGM システム (Thermo Fisher) を用いて同ライブラリーを対象に、塩基配列データを取得した。取得データは、CLC Genomic Workbench v.20 (キアゲン) を用いて不要配列を除去後、RDP Classifier pipeline へ投入し、階層分類等の解析を行った。

4. 保存試験を通じた微生物動態解析

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

C. 研究結果

製造施設における牛乳製品の製造工程フローダイアグラムを図 1 に示す。

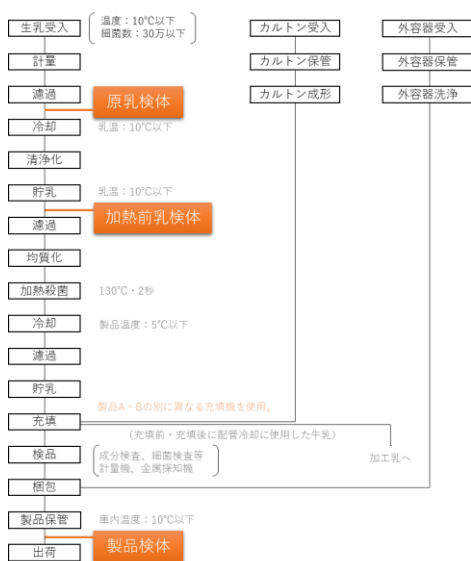


図 1. 対象施設における牛乳製造工程フローダイアグラム。

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

1. 衛生指標菌検出状況.

(i) 生乳、中間・最終製品検体 (図 2)

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

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

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

(ii) 施設環境拭き取り検体 (表 1)

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

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

2. 菌叢解析

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

1) 生乳、中間・最終製品検体の構成菌叢

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

①生乳検体

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

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

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

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

②殺菌前乳検体

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

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

③製品検体

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

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

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

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

相対的に近似性を示した (図 4)。

2) 施設環境拭取り検体の構成菌叢

各拭取り検体における構成菌叢分類を図 5 に示した。

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

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

3. 保存試験を通じた、生乳及び製品検体中の

衛生指標菌動態

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

① 一般細菌数

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

② 腸内細菌科菌群数

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

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

③大腸菌群

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

④大腸菌

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

⑤黄色ブドウ球菌

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

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

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

D. 考察

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

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

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

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

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

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

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

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

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

E. 結論

本研究では、腐敗変敗等の苦情が寄せられた牛乳製品の製造施設における製造工程管理の実態を確認し、改善に資する知見を得るため、製造工程並びに施設環境拭取り検体を入手し、微生物学的観点から調査を行った。衛生指標菌試験及び菌叢解析を通じ、生乳受入れから加熱殺菌に至る工程での微生物増殖の可能性が示唆される知見を得たことは、同工程での管理実態を精査する必要性が改善に向けた検討事項として抽出された。また、充填工程ではマガジ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る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 引用文献

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

表 1. 施設環境拭取り検体における衛生指標菌の検出状況.

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

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

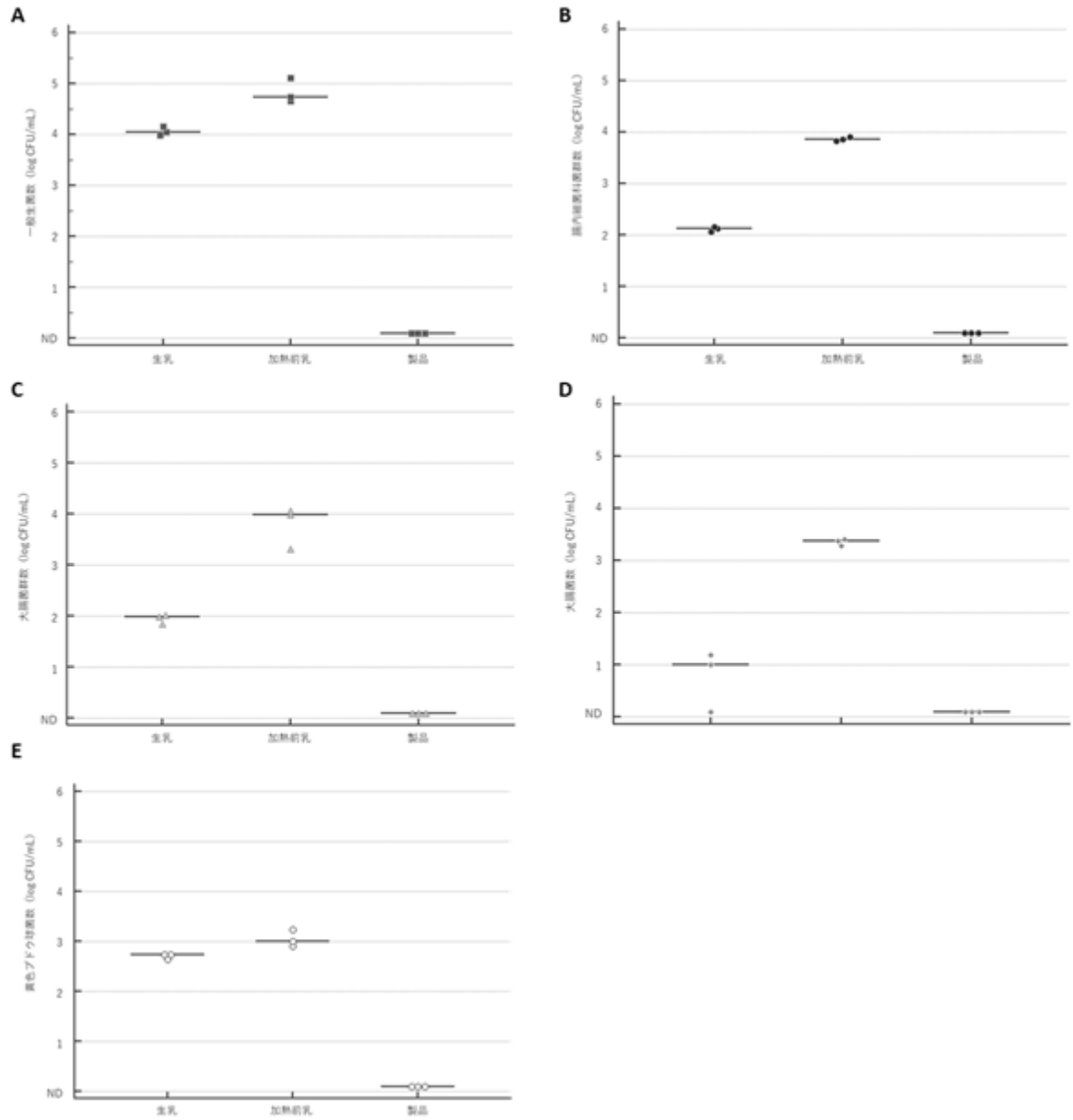


図2. 生乳、中間製品（殺菌前乳）、最終製品の各検体における衛生指標菌の検出状況。
A, 一般細菌数；B, 腸内細菌科菌群数；C, 大腸菌群数；D, 大腸菌数；E, 黄色ブドウ球菌数。
縦軸は検体 1ml あたりの菌数（対数值）を示す（ND は不検出を示す）。

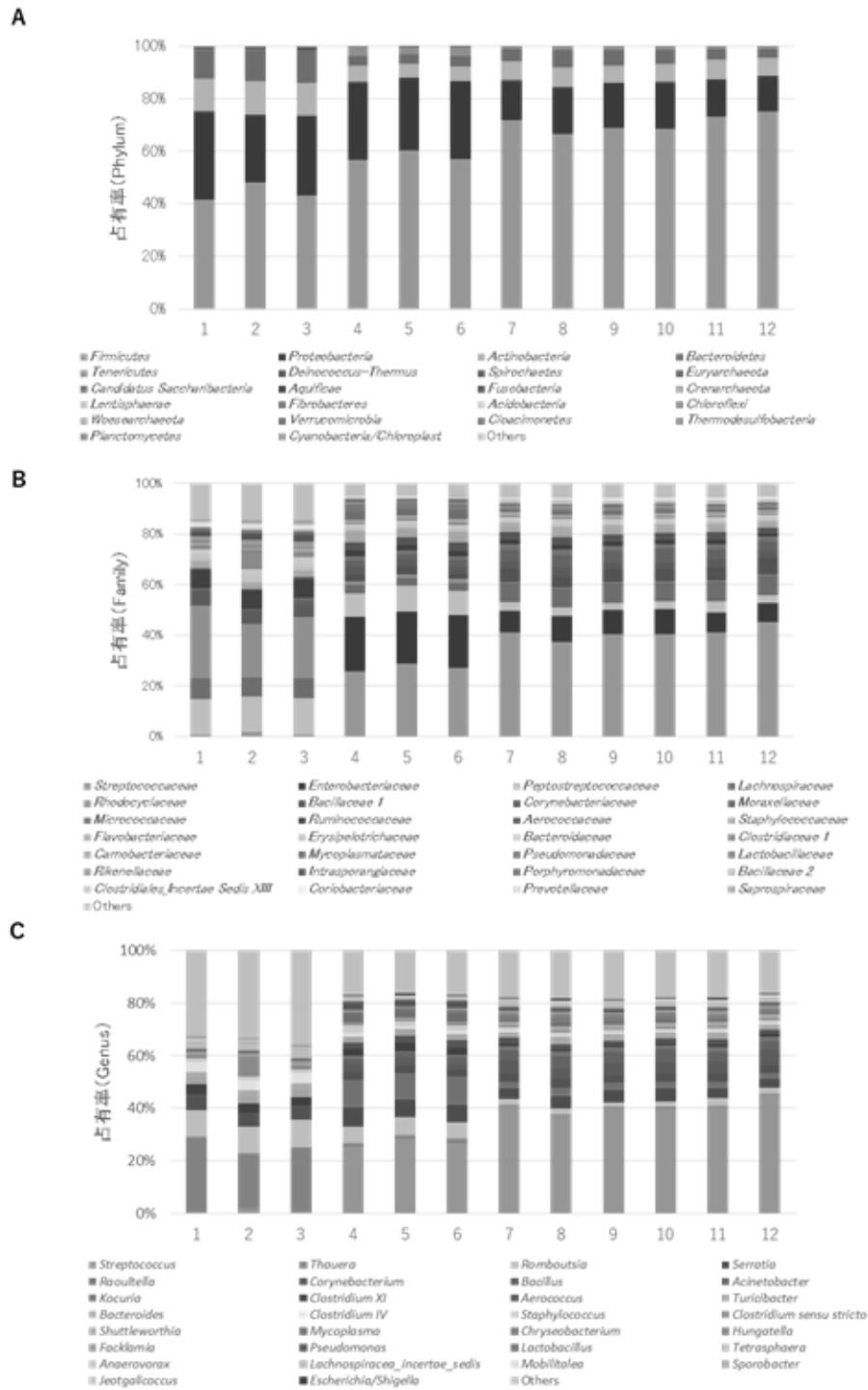


図3. 生乳、加熱前乳及び最終製品の各検体における構成菌叢解析.

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

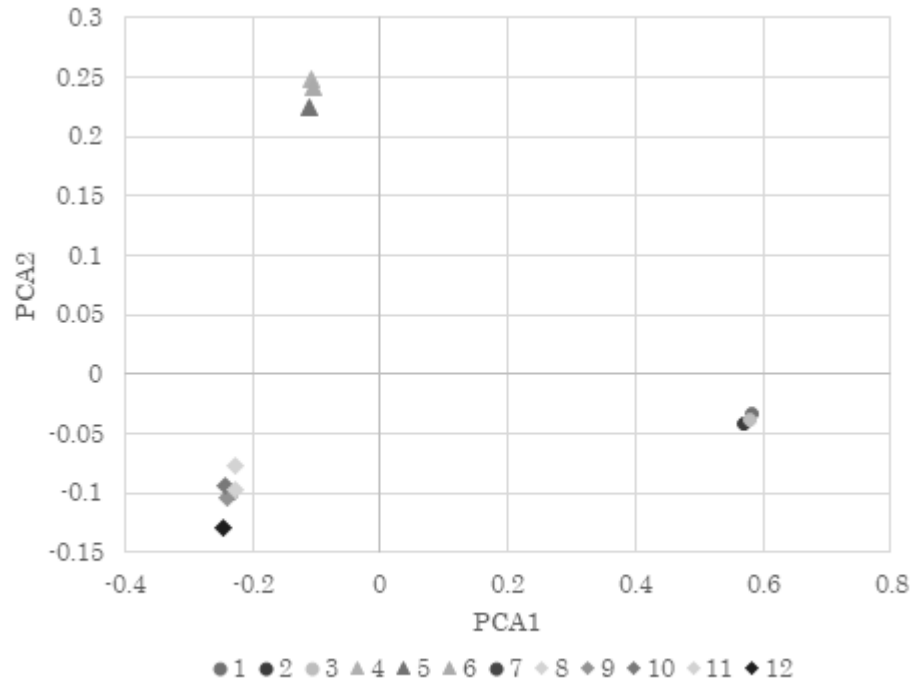


図 4. 生乳、殺菌前乳及び製品検体を対象とした Phylum 階層データに基づく主成分分析図。検体番号 1~3 は生乳検体 (○)、4~6 は殺菌前乳検体 (△)、7~9 は製品 A 検体、10~12 は製品 B 検体 (◇) を指す。

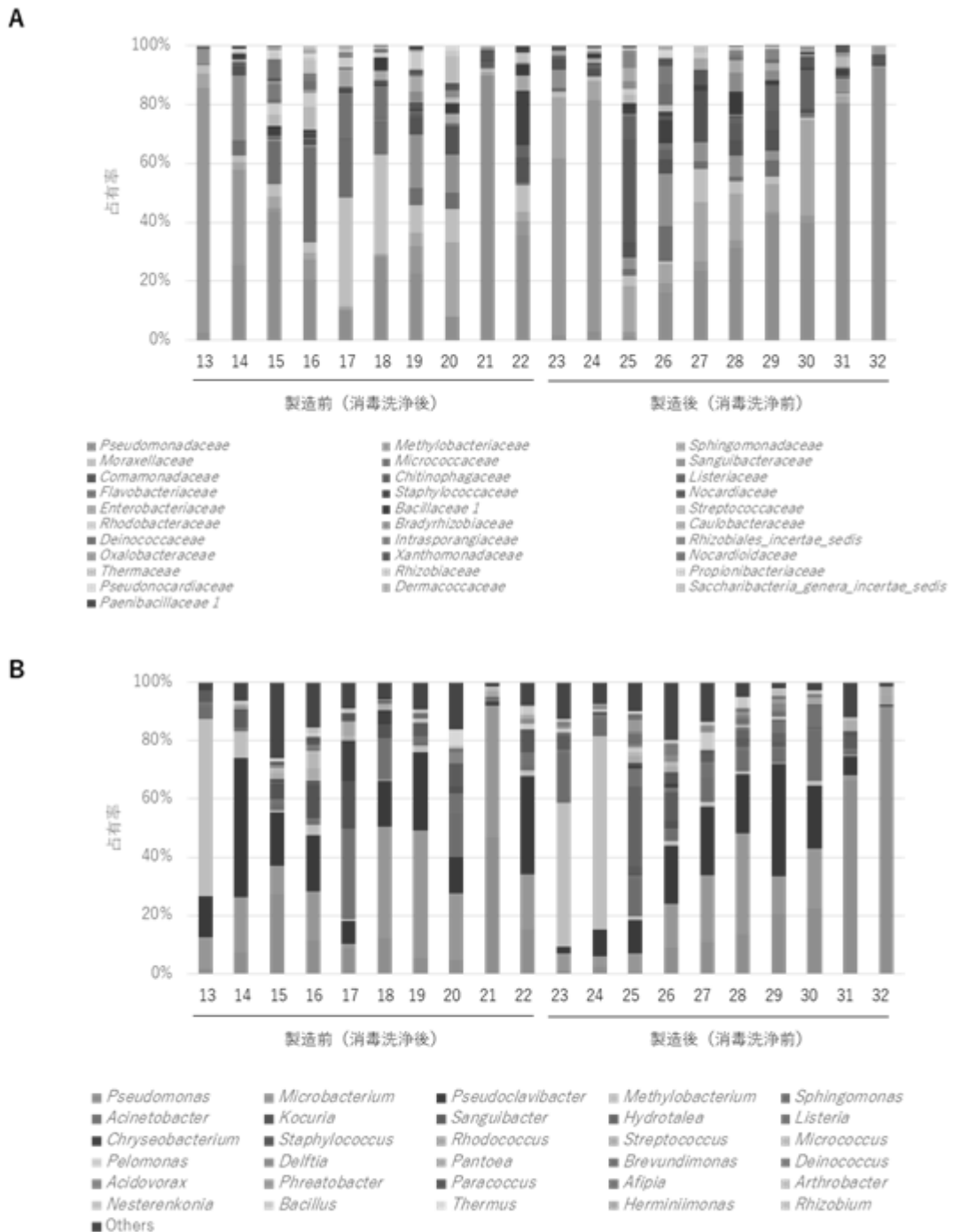


図5. 充填機関連環境検体の構成菌叢解析.

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

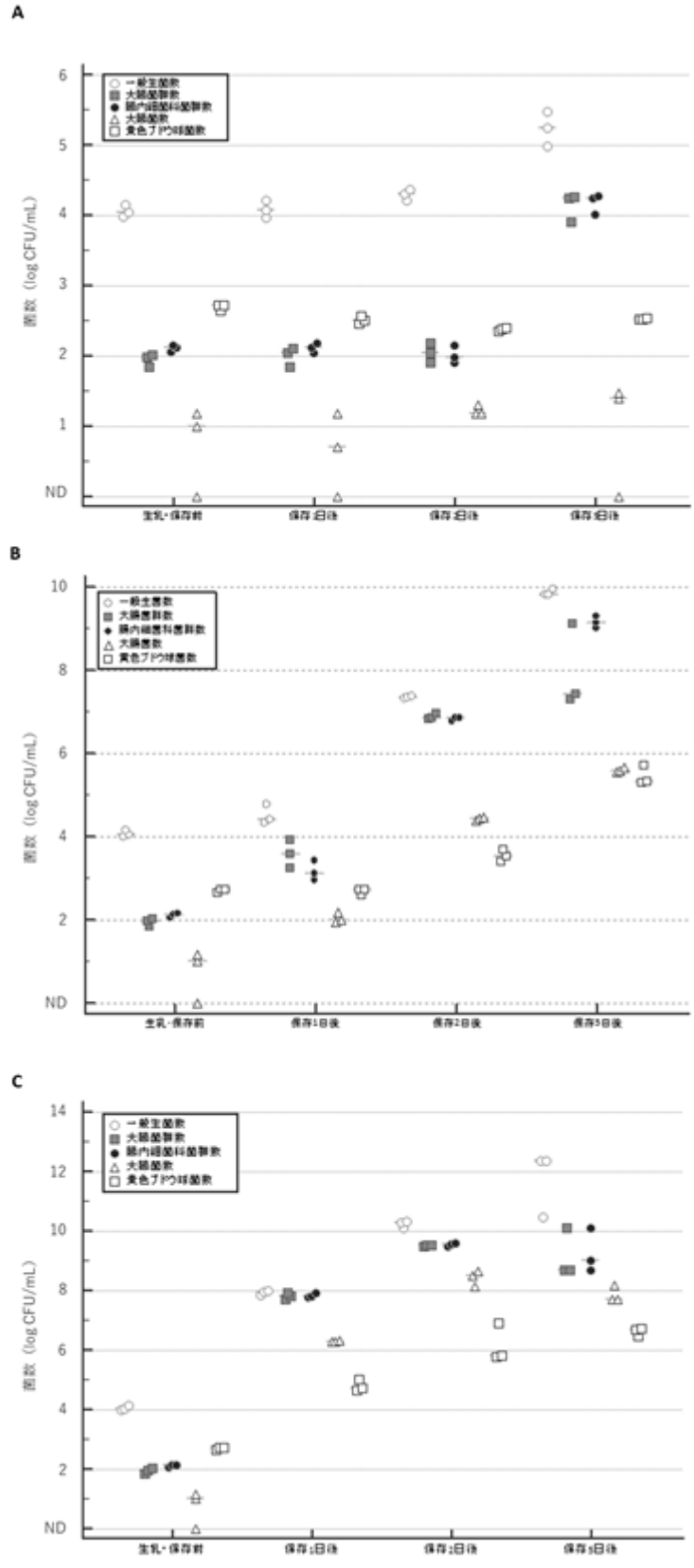


図 6. 保存試験を通じた、生乳検体における衛生指標菌数の経時挙動。セクション A は 5°C、B は 15°C、C は 25°C 下での検出結果を示す。