

令和2年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「国際的な動向を踏まえた乳及び乳製品の衛生管理及び試験法確立のための研究」

分担研究報告書

国内小規模製造施設の衛生実態に関する研究

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

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

A. 研究目的

食品の衛生に関する国際的整合性の整備は食品流通のグローバル化が進む現代社会において喫緊の課題であり、国内において

も国際的整合性をもった食品微生物基準を策定するための取り組みが進められている。これまで、国内の微生物規格基準およびそれらの試験法は過去に食中毒事例が多

く見られた食品を中心に、国内の食習慣や製造環境に合うように独自に整備されてきた。しかしながら、上記の理由から、本邦で採用される試験法についても国際的に利用されている試験法とのハーモナイゼーションに対する要求が増しており、国際貿易を意識した試験法の整備が急務の課題となっている。

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

本研究班では昨年度までに、乳および乳製品製造の主要な地域である北海道において、小規模製造加工施設における製造基準や自主管理基準の評価を行うと共に、国内流通製品の衛生実態に関する知見の収集を行い、国内で流通する製品及び、それらを製造する施設の製造環境及び衛生管理実態の把握を実施してきた。北海道においては国内の他の地域と比較して、大規模な施設に加え小規模製造加工施設も多く存在し、広域流通しない乳および乳製品も多く販売されている。しかしながらこれらの製品の

一部は北海道ブランドの名のもとで通信販売等を通じて国内に広く流通しており、加えて、観光業が盛んな北海道においては海外からの旅行者を含む多くの消費者へ影響を与えることが懸念されている。

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

B. 研究方法

1. 生乳検体

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

2. 乳性状検査

試料を冷蔵にて十勝農業協同組合連合会畜産部畜産検査センターに送付し、

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

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

3. 加熱殺菌による衛生指標菌数動態検査

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

C. 結果

1. 乳の性状検査

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

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

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

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

2. 加熱殺菌による衛生指標菌数動態の解析

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

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

D. 考察

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

先述の様に、現在、わが国の乳及び乳製品については、乳等省令に基づき生菌数

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

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

な乳製品の衛生管理体制を構築していくことが望まれる。

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

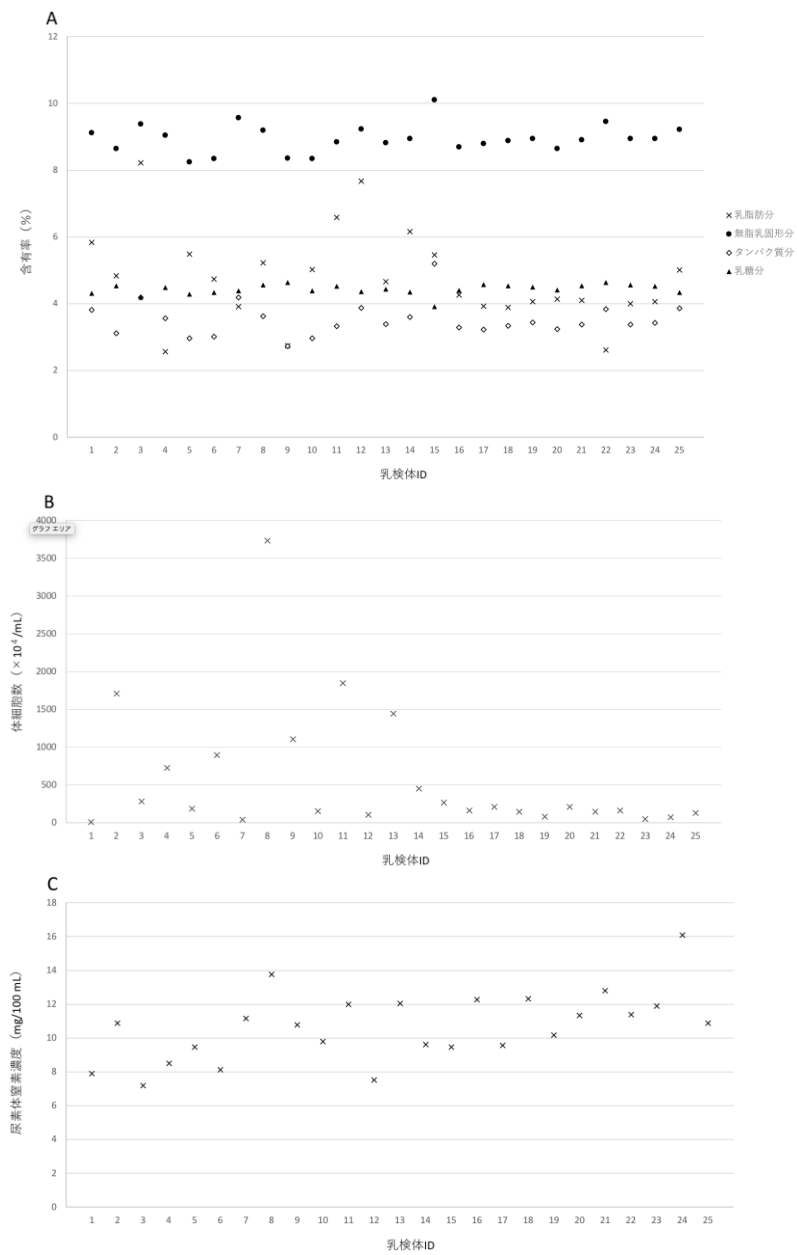


図1 生乳試料の成分分析

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

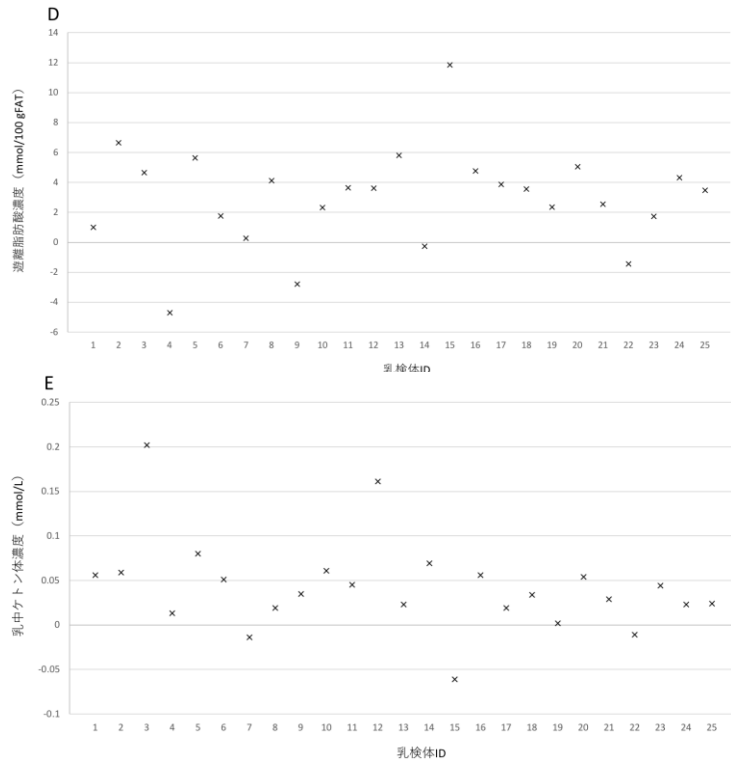


図1 生乳試料の成分分析 (つづき)

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

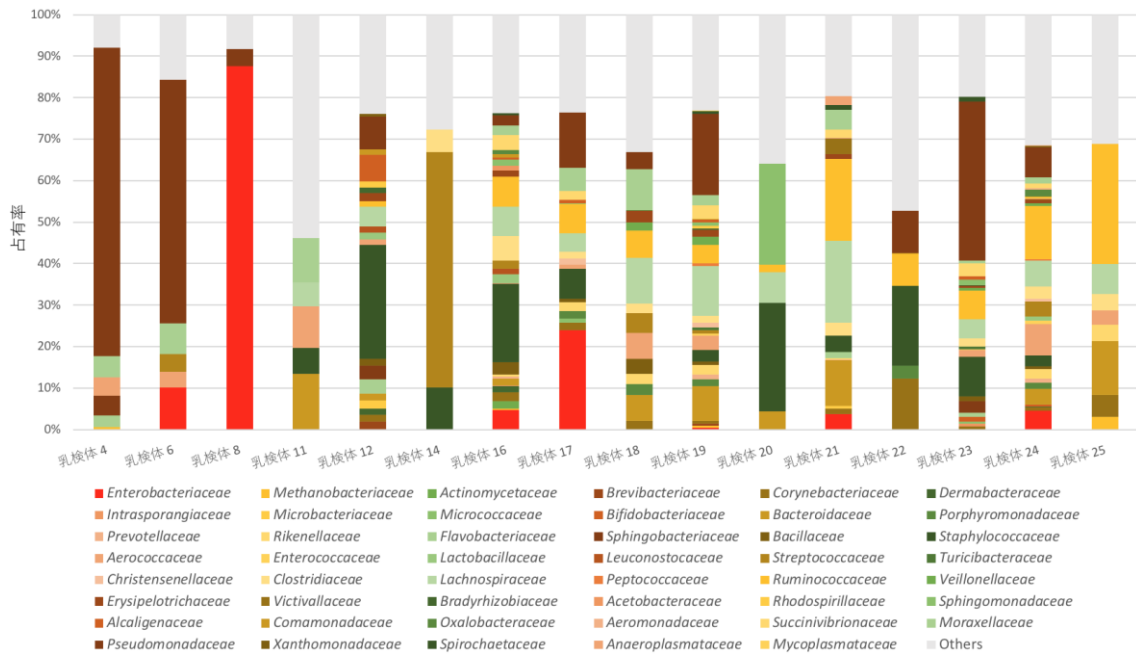


図2 生乳試料の細菌叢解析

Family 階層における構成細菌叢の占有率をバーチャートで示した。

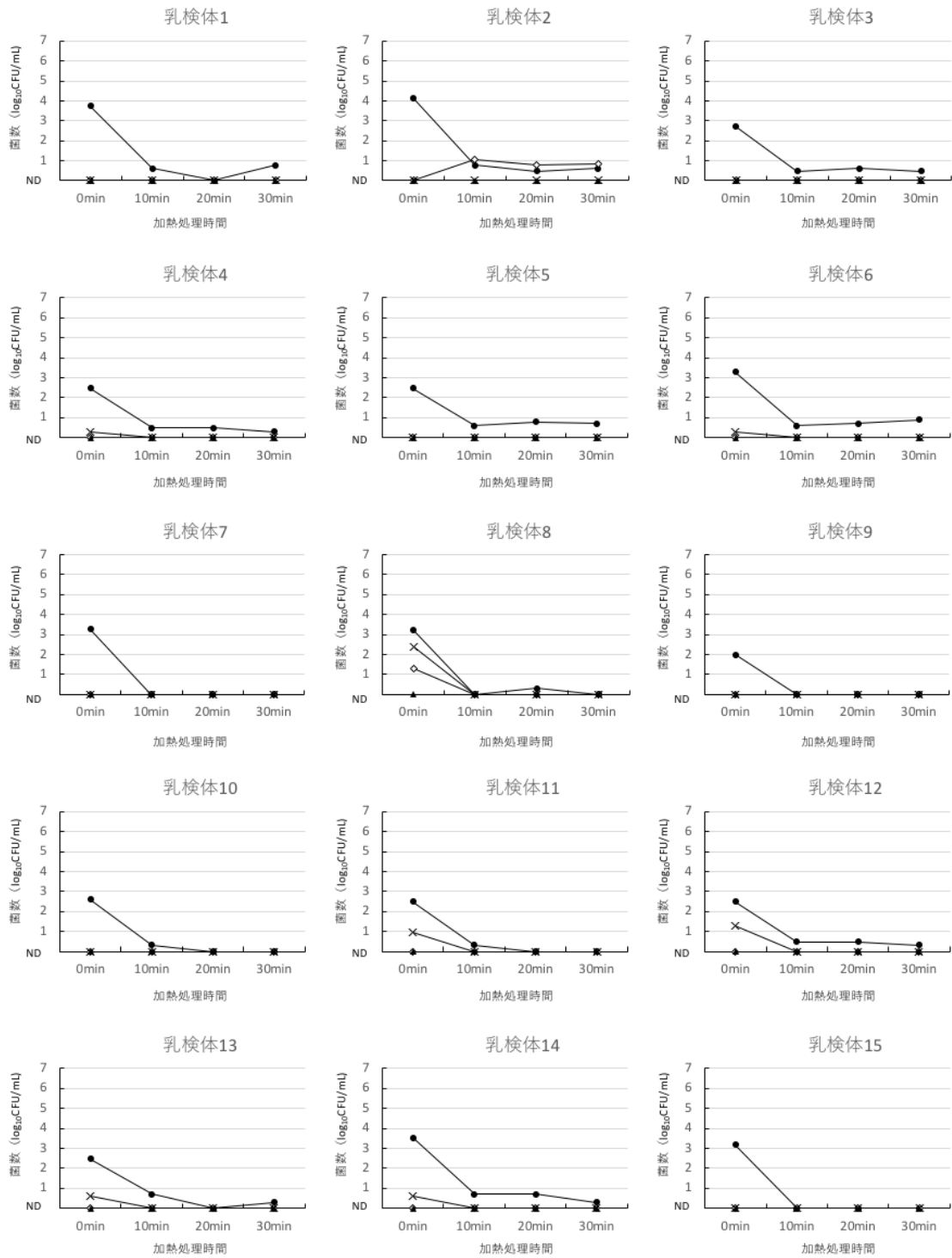


図3 加熱殺菌前後の衛生指標菌数の動態

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

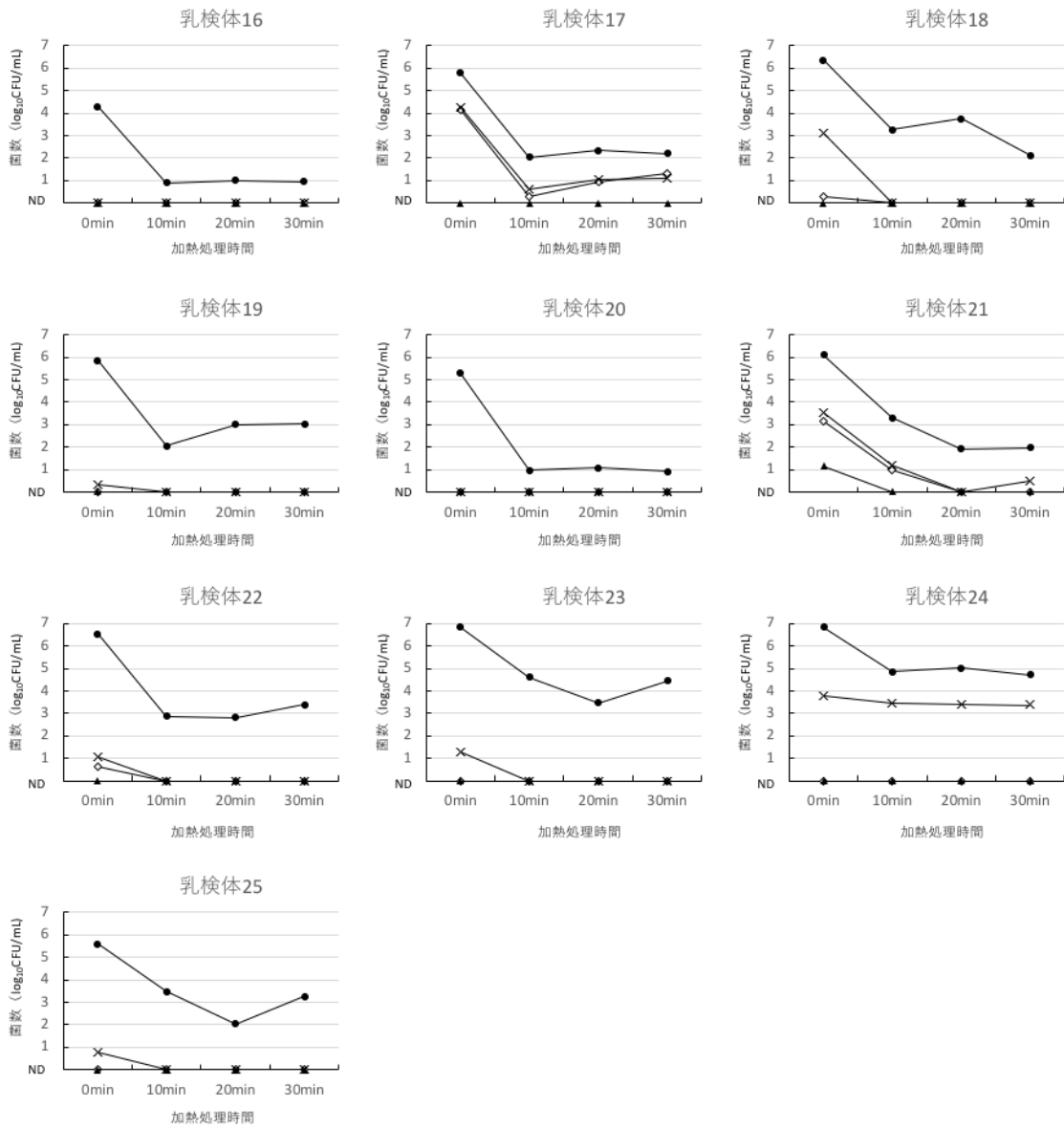


図3 加熱殺菌前後の衛生指標菌数の動態 (つづき)

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