

令和2年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

バター製品に対する簡易培地使用の妥当性及び衛生指標菌汚染実態に関する研究

研究分担者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部  
窪田邦宏 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部  
研究協力者 百瀬愛佳 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部  
鈴木穂高 茨城大学農学部

研究要旨

日本国内における乳及び乳製品の衛生管理は、昭和26年に発出された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」（以下乳等省令）に基づき、細菌数と大腸菌群を微生物規格として行われている。そのため、現在でもそれらが科学的に妥当か否かの検証が望まれている。また、HACCP導入後の各種食品製造工程における衛生管理上で、迅速簡易法が適用される可能性が高まっているが、乳及び乳製品での適用の妥当性については、現時点で不明な点がある。本研究では、乳及び乳製品の衛生実態を管理及び微生物規格を検討する上での基礎知見の集積を図ることを目的とし、本年度はバター製品45検体における細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌の検出状況について、公定法、ISO法並びに簡易培地を用いて検討を行った。その結果、微生物成分規格を逸脱した製品は見られなかった。簡易培地を用いた細菌数の検討では、製品により公定法の結果と差が見られず、昨年度までに検討した低温殺菌牛乳及びアイスクリーム類とは異なる傾向を示し、製品特性により損傷菌等の存在状況が異なる可能性が示唆された。

A. 研究目的

日本を含む世界各国において、食品の安全性を確保するために様々な食品に対し微生物規格が定められている。規格の対象となる項目は、過去に食中毒事例の原因となった微生物及び食品の衛生状況の指標となる項目が用いられており、食品の衛生確保に重要な役割を果たしてきた。一方、国内の衛生状況は時

代の変遷と共に変化を顕し、昨今では食品の国際流通も増加の一途を辿る等、食を取り巻く環境は変化している。わが国の乳及び乳製品については、昭和26年に発令された「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」（乳等省令）に基づき、細菌数と大腸菌群が微生物規格に設定され、安全確保が図られている。一方、現在EU等では乳製品の製造工程管理

を HACCP ベースで行うと共に、わが国で 2011 年に生食用食肉の微生物規格として採用された、腸内細菌科菌群を衛生指標として製品等の検査が実施されている状況にある。国内規格は現時点においても、一定の安全確保に資する内容であることには違いがない一方、国際動向を踏まえた内容と結論づけるためには、その科学的妥当性を評価する必要があると考えられる。

以上の背景を踏まえ、令和 2 年度は、国内で流通するバター製品を対象として、微生物汚染実態を衛生指標菌試験（公定法）並びに簡易培地（以下、簡易法）を用いた検討を行うことで評価することを目的とした。更に後者の製品に対する適用の妥当性、並びに混積培養法の代替法としての表面塗抹法について考察を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1) バター製品の衛生指標菌汚染実態調査及び簡易培地の検討

市販のバター 45 検体について、衛生指標菌汚染実態を調査した。調査は令和 2 年 10 月から令和 3 年 2 月まで行った。試験項目は、細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌とした。試験方法は、細菌数については乳等省令の試験法(32°C48 時間培養)及び ISO 4833-1:2013(30°C72 時間培養)を、腸内細菌科菌群は定性法として ISO 21528-1:2017 を、定量法として ISO 21528-2:2017 を用いた。大腸菌群については乳等省令の試験法を用いた。黄色ブドウ球菌については通知法（食安発 0729 第 4 号）を、大腸菌については公定法及び ISO 16649-2:2001 を用いた。また、各試験項目の代替法として、国

際的な第三者認証を取得し、国内で市販されている代表的な簡易培地を、製品の指示書に示された培養温度及び時間に従って用いた。細菌数については、4 種の簡易培地を用いた。同一検体間の試験法による菌数の比較は、対応のある t 検定により統計解析を行った。検出限界値未満の値は 0 CFU/g として計算を行い、対数化に当たって全数値に 1 を加算した。検出された腸内細菌科菌群の菌種同定は、16S Bacterial rDNA PCR キット（タカラバイオ）を用いた塩基配列解析及び BLAST 相同性検索により行った。

### 2) 諸外国におけるバター等の微生物規格の調査

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

## C. 研究結果

### 1) バター製品の汚染実態調査及び簡易培地の検討

今回の調査結果概要を表 1 に示した。バター製品 45 検体の公定法での細菌数（32°C48 時間培養）は、平均 1.645 log CFU/g（検出限界未満～7.407 log CFU/g）であった。公定法と同一の培養条件（32°C48 時間）で簡易培地 1 を用いた際の細菌数は、平均 1.452 log CFU/g（検出限界未満～7.267 log CFU/g）で、簡易培地 1 における細菌数は公定法における細菌数との間に差は見られなかった(p=0.084)。簡易培地 2 については、製品の指示書の従い 32°C24 時間培養で計測を行った。その細菌数は平均 1.361 log CFU/g（検出限界未満～6.236 log CFU/g）であり、公定法と比較してやや低

い傾向が見られた ( $p=0.019$ )。簡易培地 3 については、細菌数の平均は  $1.353 \log \text{CFU/g}$  (検出限界未満 $\sim 5.886 \log \text{CFU/g}$ ) であり、公定法と比較してやや低い傾向が見られた ( $p=0.018$ )。簡易培地 4 については、細菌数の平均は  $1.389 \log \text{CFU/g}$  (検出限界未満 $\sim 6.326 \log \text{CFU/g}$ ) であり、公定法と比較して差は見られなかった ( $p=0.039$ )。ISO 法による細菌数( $30^\circ\text{C}$  72 時間培養)は、平均  $1.635 \log \text{CFU/g}$  (検出限界未満 $\sim 7.248 \log \text{CFU/g}$ ) であった。ISO 法における細菌数を公定法と比較したところ、差は見られなかった ( $p=0.911$ )。ISO 法については SPC 寒天培地を用いた混釈培養と平行して、同培地を用いた表面塗抹を行ったところ、平均  $1.465 \log \text{CFU/g}$  (検出限界未満 $\sim 5.556 \log \text{CFU/g}$ ) となり、混釈培養における細菌数との間に有意差は見られなかった ( $p=0.126$ )。

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

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

製品が 2 検体あった。

今回試験した検体からは、いずれの試験法においても、大腸菌群、黄色ブドウ球菌及び大腸菌は検出されなかった。一方腸内細菌科菌群は、 $11.1\%$  ( $5/45$  検体) より検出された (表 1)。腸内細菌科菌群陽性であった 5 検体は全て、定性法 (ISO 21528-1:2016) で検出され、定量法 (ISO 21528-2:2016) においては検出限界未満 ( $<5 \text{CFU/g}$ ) であった。腸内細菌科菌群が検出された全 5 検体で、腸内細菌科菌群用の簡易培地からは菌は検出されなかった。また、腸内細菌科菌群陽性を示した検体からは、公定法及び簡易培地のいずれにおいても大腸菌群は検出されなかった。検出された腸内細菌科菌群の集落は、純培養後菌種同定を行ったところ、*Raoultella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Escherichia spp.* であった (表 2)。

## 2) 諸外国における乳製品の微生物規格

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

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

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

#### D. 考察

本研究での調査により、国内で市販されているバター製品において、微生物規格である大腸菌群が陽性のものは見られず、一定の衛生基準が保たれていることが示された。一方、5 検体 (11.1%) については腸内細菌科菌群定性法で陽性を示した。腸内細菌科菌群定性試験法の検出下限値が 0.04 CFU/g である一方、バターにおける大腸菌群公定法の検出下限値が 5 CFU/g であることから、陽性検体についても、その汚染菌量は理論値で 0.04~4.99 CFU/g という極めて低いレベルであることが示唆された。細菌数については、現在バターの微生物規格とはされていないが、今回の調査で、 $5\log\text{CFU/g}$  を超える製品が一部あることが示された。乳酸菌を添加して製造する発酵バター製品は、一部の発酵後に加熱工程がある製品を除き、最終製品に乳酸菌が存在していると思われるため、それらについては細菌数が高くても衛生上の問題とはならないと思われた。一方、発酵バターと明記されていない製品の中に高い細菌数を示すものが 2 検体あり、それらの製品が乳酸菌を添加されているのかは不明であった。

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

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

サンプリングプランの見直しが随時行われていることが明らかとなった。

#### E. 結論

公定法、ISO 法及び第三者認証取得済みの簡易培地を用いて、市販のバター製品 45 検体を対象とした衛生指標菌調査を行ったところ、供試製品検体に微生物規格違反検体は見られず、衛生状態は概ね良好であった。細菌数試験法間の成績比較を通じ、バター製品では簡易培地について公定法と差は見られず、また、ISO 法の表面塗抹法と混積培養法にも差が見られなかったことから、バター製品に存在する細菌は、初年度に調査した低温殺菌牛乳及び昨年度に調査したアイスクリーム類と比較して、損傷菌の割合が低いことが推察された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

誌上発表（総説）：

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

学会発表：

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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



表 1. 各試験法によるバター製品 45 検体中の細菌数

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

\* : 表面塗抹法のみ、有意差検定を ISO 法との間で行った

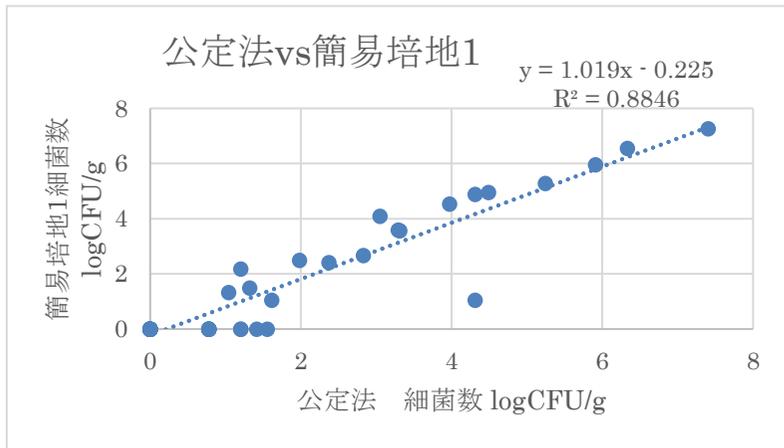


図1. 公定法と簡易法1における細菌数の相関

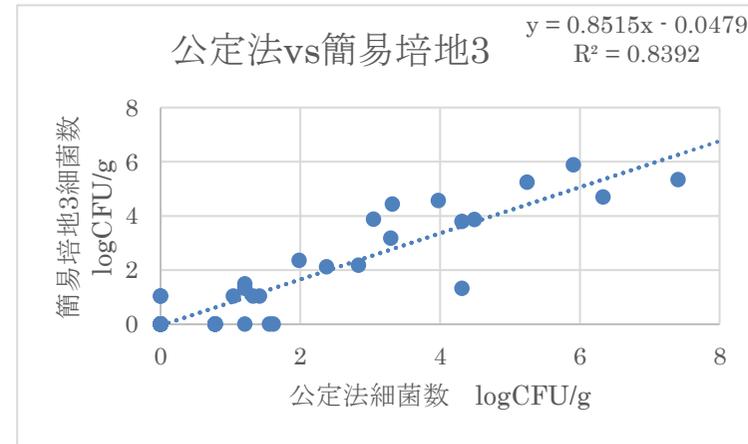


図3. 公定法と簡易培地3における細菌数の相関

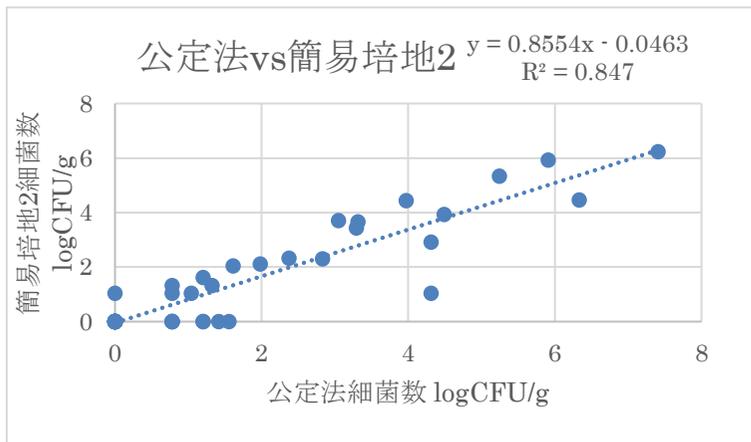


図2. 公定法と簡易培地2における細菌数の相関

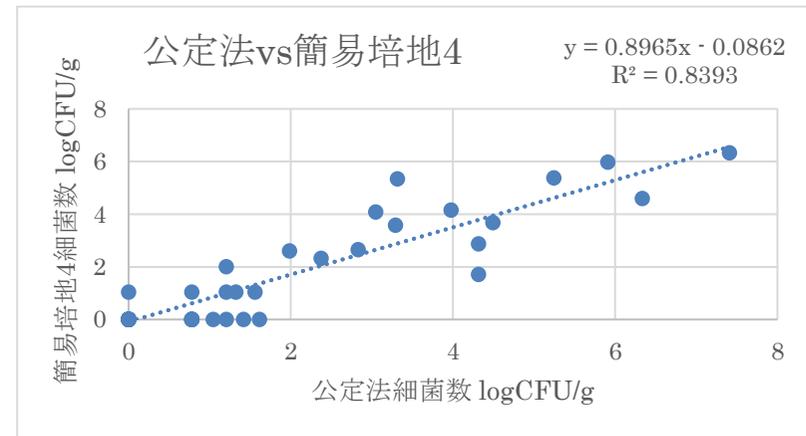


図4. 公定法と簡易培地2における細菌数の相関

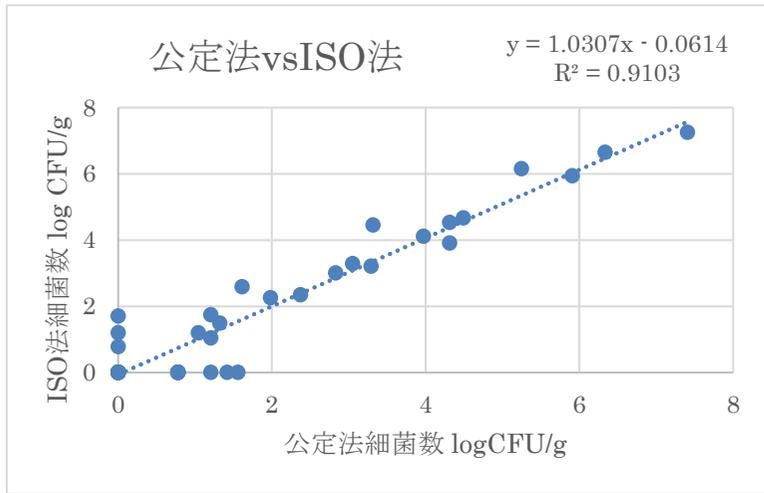


図 5. 公定法と ISO 法における細菌数の相関

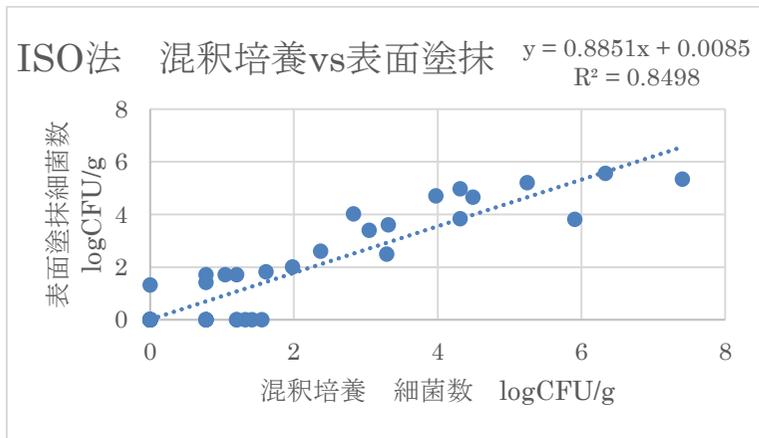


図 6. ISO 法（混釈培養）と表面塗抹における細菌数の相関

表 2. 検出された腸内細菌科菌群の菌種同定結果

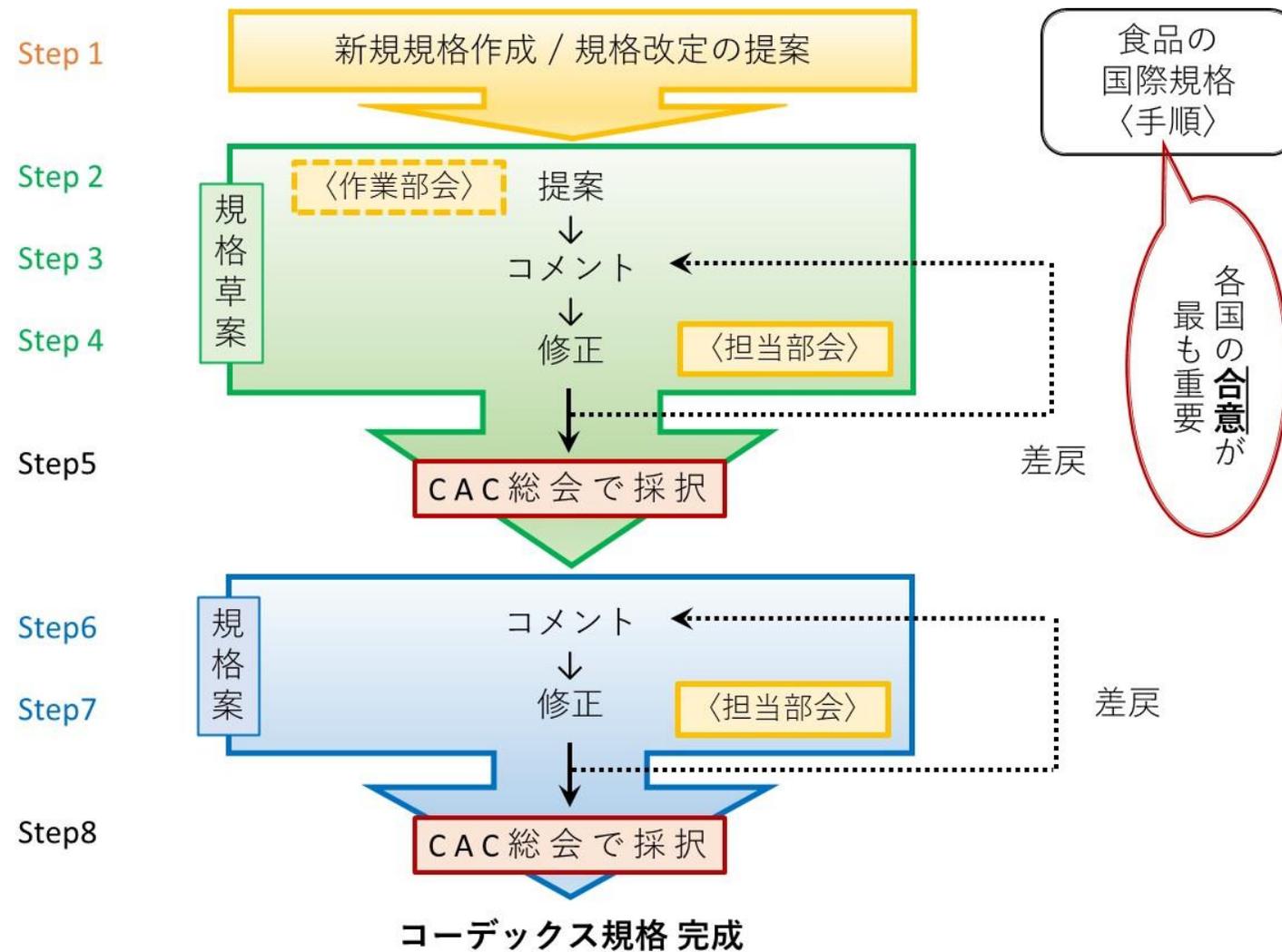
検体	同定結果
1	<i>Raoultella</i> spp.
2	<i>Enterobacter</i> spp.
3	<i>Serratia</i> spp.
4	<i>Escherichia</i> spp.
5	<i>Raoultella</i> spp.

表 3. バターの微生物規格基準

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

表4. アイスクリーム類の微生物規格基準

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



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

図 7. Codex 委員会による規格基準作成及び改訂の手順

ICMSF Book2 (1st ed., 1978)

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

試験法とセットで合否を規定

*n*: 検体数  
*c*: 違反検体の最大許容数  
*m, M*: 微生物学的な基準値

基準値の変更

FAO/WHO  
 レポート  
 (1975)

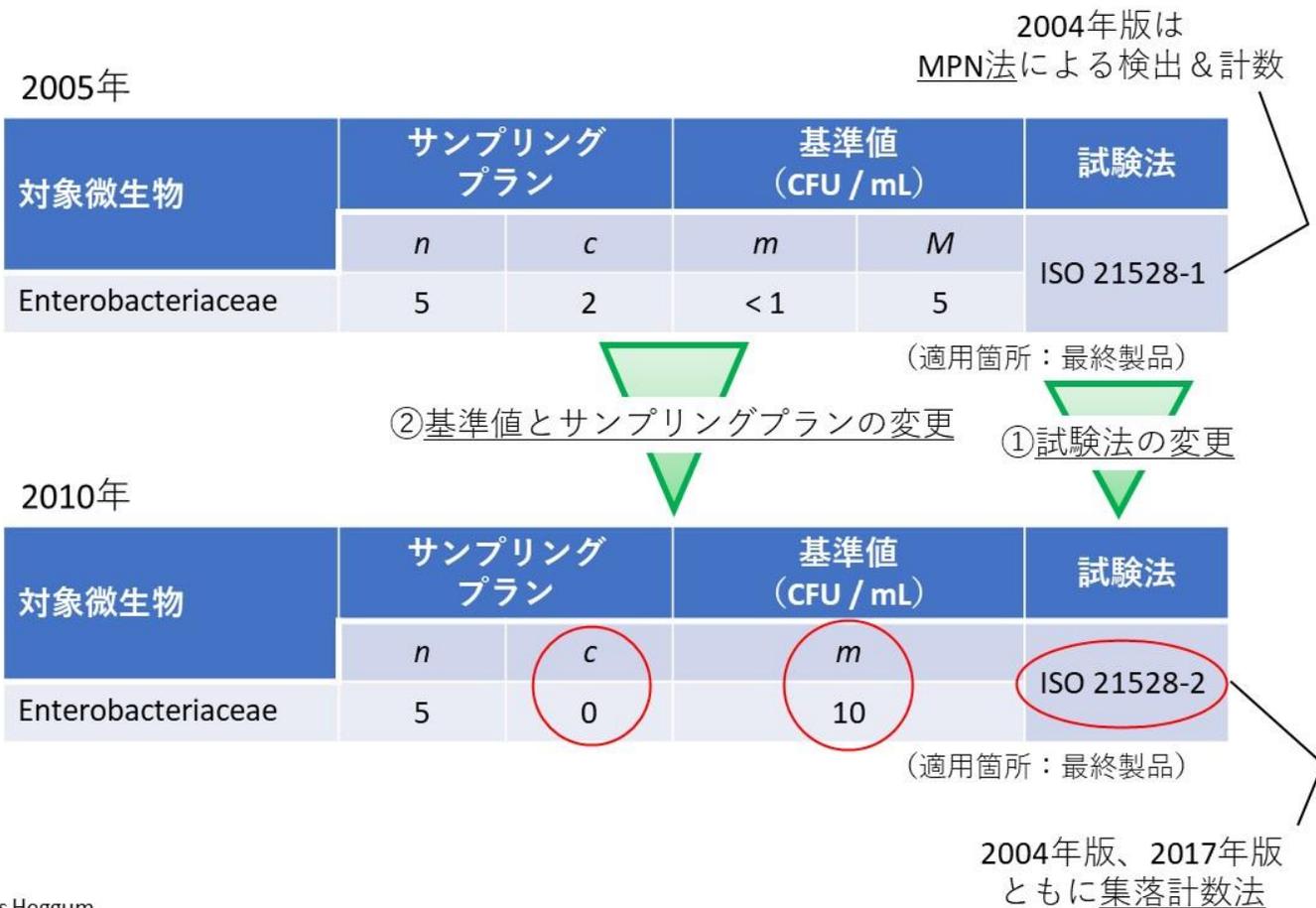
ICMSF Book2 (2nd ed., 1986)

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

ICMSF Book7 (2002)ではこれに試験法の項目が追加

注：現在の EU 規格とは異なる。

図 8. ICMSF での卵製品の微生物規格基準例改訂の経緯



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

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

図 9. EU による低温殺菌牛乳の微生物規格基準の改訂