

「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
研究協力者	中山 達哉	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	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

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を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の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、大腸菌群の数値は ISO 法でそれぞれ 9～33 CFU/mL、24～51 CFU/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 2 CFU/mL に留まっていた。黄色ブドウ球菌は 15～101 CFU/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）。

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 40 CFU/100 cm² 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、*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%、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。

3-4. 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もの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.

