

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  $2.0 \times 10^4$ 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、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 乳において混積培養による公定法と簡易培地 ( $32^{\circ}\text{C}$  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 ( $30^{\circ}\text{C}$  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、混積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、混積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、混積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5logCFU/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0.04 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0.04~4.99 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0.04~4.99 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 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