

特集：HACCP 導入による今後の食品衛生

＜総説＞

乳・乳製品の微生物ハザードとその管理状況の評価のための指標菌及び試験法

岡田由美子

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

**Microbial hazards, hygiene indicators and testing methods
in milk and dairy products**

OKADA Yumiko

National Institute of Health Sciences

抄録

乳及び乳製品は栄養素に富み、人間の貴重なたんぱく源として古くから利用されてきたが、食中毒菌を含む多くの微生物にとっても増殖に適しており、様々な食中毒事例の原因食品ともなってきた。乳及び乳製品による食中毒は、サルモネラ属菌、リステリア・モノサイトゲネス、黄色ブドウ球菌、カンピロバクター、セレウス菌、クロノバクター属菌、病原大腸菌等により引き起こされているが、製品中でのこれらの病原菌の保有率は一般に低いため、衛生管理においては細菌数、大腸菌群、腸内細菌科菌群等の衛生指標菌が用いられている。国内における乳及び乳製品の微生物規格基準は主に細菌数と大腸菌群を管理項目としており、例えば牛乳の細菌数は50000 colony forming unit (CFU) /mL以下で大腸菌群陰性、と定められている。この規格は消費期限の終わりまで適用され、逸脱時には行政措置の対象となる。一方、Codex委員会による国際規格とEU規格では、低温殺菌牛乳の微生物規格基準を2通り定めており、出荷前の時点で腸内細菌科菌群10 CFU/mL未満であること、消費期限の最終時点でサルモネラ属菌とリステリア・モノサイトゲネスが陰性であることが必要とされる。前者の逸脱時には製造環境の衛生状態の改善、後者の逸脱時には製品の回収が求められる。

微生物は食品中に均一に存在してはならず、試験に用いるためにランダムに採取した試料が当該ロットの汚染状況を正確に反映していない場合が起こりうることから、国際的な微生物学の専門家集団であるICMSFによってサンプリングプランが提唱されている。これは、偏りのない試験結果を得るために、サンプリングプランによって過去の調査で知られている食品種ごとの汚染レベルや、健康被害の大きさに応じて、1ロットから用いるべき検体数や管理すべき水準を定めたものである。国内でも、ナチュラルチーズ中のリステリア・モノサイトゲネスの規格基準として、1ロットあたり5検体を試験し、その全てが100 CFU/g以下でなくてはならない、と定められている。

規格基準適合性を判断する試験には公定法を用いる必要があるが、製造工程での衛生管理に用いる試験法は任意である。一般に微生物試験は培養を伴うため結果を得るために数日を要するが、試験期間の短縮、培地調製等の簡略化、判定の自動化等が可能となる様々な迅速簡易法が発売されている。現在国内にはそれらの妥当性評価を行う機関は存在しないが、国際標準法であるISO法や米国の公定法には第三者認証機関が存在し、妥当性評価がなされた代替法が示されている。ただし、製品や製造

連絡先：岡田由美子

〒210-9501 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26

3-25-26, Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 210-9501, Japan.

Tel: 044-270-6567

E-mail: yokada@nihs.go.jp

[令和3年4月13日受理]

工程の特性等によって認証取得済みの製品であっても得られる結果が従来法と同等でないことがあり、個々の現場で導入検証を行う必要があると思われる。

キーワード：乳及び乳製品、食中毒菌、衛生指標菌、微生物規格基準

Abstract

Milk and dairy products contain excellent nutrition and have been used as important protein sources for humans for long periods. For the same reason, they can support the growth of many types of bacteria, including food-borne pathogens. *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Cronobacter* spp., and *Escherichia coli* are considered as major microbiological hazards in milk and dairy products. Contaminated raw milk is the most important origin of these pathogens, but contamination in food processing stages has also happened. The prevalence rates of these pathogens in milk and dairy products are relatively low. Therefore, hygiene indicators such as standard plate counts (SPC), coliforms, and Enterobacteriaceae are used to control the quality of products and food processing environments.

In Japan, many types of dairy products have criteria for the number of SPCs and the absence of coliforms, and the criteria are applied at the point of shelf lives. For example, SPC in pasteurized milk should be 50,000 CFU/mL or less, and coliforms should be negative. A food lot that violates the criteria is rejected and is recalled when already retailed. In contrast, Codex and the European Union apply the criteria of pasteurized milk with *Enterobacteriaceae* at the end point of food processing, and with *salmonella* and *listeria monocytogenes*, at the end point of shelf life. When these pathogens are detected, the food is rejected. On the other hand, improvement of hygiene in the food processing environment is required at the violation of food hygiene criteria. Usually, 5 samples per lot are used for testing, and the sampling plans are set up according to characteristics of the food matrix, the average level of contamination of hygiene indicators, and the type of hazards to be controlled. To test food samples for microbiological criteria in Japan, the official methods should be used. Usually, it takes more than several days to obtain the results. For the ISO method and the official methods in the United States, third parties add certifications to validated alternative methods to shorten the test period and simplify preparation or judgment.

After introducing HACCP, the frequency of microbiological testing of final products may be decreased; nevertheless, they remain necessary to check the pertinence of HACCP programs for maintaining the quality of milk and dairy products.

keywords: milk and dairy products, food borne pathogen, hygiene indicator, microbiological criteria

(accepted for publication, April 13, 2021)

I. はじめに

乳及び乳製品は人類の貴重な栄養源であるが、動物性食品であるため原料由来の微生物汚染を完全に防ぐことは難しく、世界各国でこれまでに食中毒の原因食品となった例が多くみられる。栄養と水分という微生物の増殖に必須の成分を多く含み、様々な微生物にとって増殖しやすい環境である乳及び乳製品の製造工程には加熱殺菌が含まれることが多いが、殺菌後の製造工程でも微生物汚染が起こりうる。また、一部には殺菌工程を経ない生乳から製造される製品もある。そのため、多くの乳及び乳製品の流通・保存には、低温での管理が必須となる。

本稿では、乳及び乳製品中の細菌を中心とした微生物ハザードの例と、その管理のための規格基準、基準適合性を判断するための試験法と代替法、HACCP導入後の微生物検査の方向性等について紹介する。

II. 乳及び乳製品の微生物ハザード

食品を汚染する微生物は、食品衛生上(1)食中毒を引き起こしうる病原菌、(2)ただちに健康被害を引き起こすとは限らないが、味、臭い等製品の品質を低下させる変性・腐敗菌、(3)病原菌による汚染の可能性や、製造から販売までを通じて衛生上適切な取り扱いがなされたかを把握するための衛生指標菌の3種類に分けて考えられる。

乳及び乳製品を原因食品とする食中毒の主な原因菌と、それらによる食中毒の例を表1に示した。

サルモネラ属菌による食中毒は、鶏肉、卵、牛肝臓(生食の禁止以前)等が主な原因食品であるが、乳及び乳製品によるものも一部で見られている。発症までの潜伏期間は8時間～4日程度とされており、下痢、腹痛、嘔吐及び発熱を主症状とする。本菌は鳥類、爬虫類、両生類、ほ乳類など様々な動物での保菌が知られている。乾燥に強い血清型があり、国内では乾燥イカ菓子による食中毒

表 1 乳及び乳製品の微生物ハザードと食中毒の例

原因菌	乳及び乳製品による食中毒の例	
サルモネラ属菌	2018年フランス他（山羊乳チーズ、153名）	1994年スペイン（乳児用調製粉乳、48名）
リステリア・モノサイトゲネス	2011-2015年米国（アイスクリーム、10名、うち死者3名）	2017年米国（チーズ、8名、うち死者2名）
カンピロバクター	2018年北海道（未殺菌牛乳、38名）	2016年イギリス（未殺菌牛乳、69名）
腸管出血性大腸菌	2000年和歌山（学校給食の牛乳、2名）	2018年カナダ（チーズ、7名）
黄色ブドウ球菌	2000年日本全国（低脂肪乳等、14780名）	2013年ドイツ（アイスクリーム、13名）
セレウス菌	1991年長崎県（牛乳、291名）	
クロノバクター属菌	1994年フランス（乳児用調製粉乳、18名、うち死者3名）	
エルシニア	2011年米国（低温殺菌牛乳、22名）	
結核菌及び非定型抗酸菌	-	
ブルセラ	2011-2012年マレーシア（生山羊乳、80名）	
ボツリヌス菌	2005年イギリス（乳児用調製粉乳、1名）	

事例が、海外では乳児用調製粉乳による集団事例が見られている。また、7℃前後で増殖可能な株も存在し、冷蔵庫での保管にも注意が必要である。

リステリア・モノサイトゲネスは低温増殖性を持ち、4℃以下で保管した食品中でも増殖が可能である。本菌に汚染されたチーズによる食中毒集団事例は、米国ではほぼ毎年数件発生している。本菌は高齢者、免疫弱者、妊産婦などのハイリスク群に髄膜炎や敗血症、流産等の重篤な疾病を引き起こし、他の食中毒と比較して致死率が高い（25%程度）のが特徴である。一方、健康成人には軽い風邪様症状や下痢のみを引き起こすことが多い。潜伏期間は1日～1か月程度（最長で3か月）と幅広い。日本国内では、報告義務がない疾患であり、正確な患者数等は明らかでない。本菌を含むリステリア属菌は、動物の糞便土壌、河川水、食品製造工場など環境中に広く存在しており、食中毒事例の原因食品はチーズ等の乳製品、生ハム等の食肉製品、サラダ、果物、魚介燻製等様々である。

カンピロバクターは家畜、鶏などの腸管内に存在しており、肉や内臓、飲料水等を汚染する。潜伏期間は1～7日程度で、発熱、倦怠感、頭痛、吐き気、腹痛、下痢、血便等を症状とする。通常は生命に関わることはほとんどないが、カンピロバクター感染後にギラン・バレー症候群という末梢神経の障害を発症することがある。乳及び乳製品を原因とするカンピロバクター症は、未殺菌乳に関連した事例が多い。カンピロバクターは通常の大気中では増殖しない微好気性菌であり、食品内での増殖はおこらないが、比較的少ない菌量で発症するため、家畜・家禽から食品への微量の糞便汚染によって食中毒が引き起こされている。

腸管出血性大腸菌は数十個程度のごく少量の菌で発症が可能であり、加熱不十分な肉や漬物など、様々な食品を原因とする事例が見られている。おもな症状は下痢、腹痛であるが、出血性大腸炎や脳症を引き起こすこともあり、厚生労働省による食中毒統計の中で、細菌性食中毒による死者の多くは本菌によるものである。乳及び乳製品を原因とする事例は、国内で数多くはないが、輸入検疫において海外で製造されたナチュラルチーズから本

菌が検出され、行政処分の対象となることがある。

黄色ブドウ球菌は、健康人の鼻の中、皮膚、髪の毛、土壌などにいる常在菌であり、家畜の乳房炎の原因菌としても知られている。本菌が産生する耐熱性毒素の摂取により食中毒を発症するため、潜伏期間は0.5時間～6時間程度と、他の細菌性食中毒と比較して短時間であり、主な症状は吐き気、嘔吐、下痢である。おにぎり、弁当、卵の加工品、肉製品、魚肉練り製品等の様々な食品による食中毒事例が起きている。乳製品を原因とする事例では、脱脂粉乳製造時の本菌の増殖と毒素産生により、脱脂粉乳を用いた製品による大規模集団事例が国内で発生している。本菌の産生する毒素は100℃以上の加熱でも失活しない耐熱性毒素であり、殺菌工程前に菌が増殖し毒素を産生した場合は、その後の加熱工程で殺菌がなされて菌が死滅していても、毒素が残存して食中毒が発生したと考えられている。

セレウス菌は*Bacillus*属のグラム陽性桿菌であり、環境抵抗性が強い芽胞を形成するため、100℃での加熱殺菌でも生残することが可能である。本菌は土壌、河川水、大気中、農作物等に広く分布している。本菌による食中毒は下痢型と嘔吐型に分類される。下痢型はセレウス菌の感染が必要であるため潜伏期間は8～16時間で、弁当、プリン、スープ等による事例がこれまで起こっており、下痢と腹痛を主症状とする。一方、嘔吐型はセレウス菌の産生する耐熱性嘔吐毒セレウリドにより吐き気、嘔吐を引き起こすもので、毒素の摂取により発症するため、潜伏期間は30分～6時間と、下痢型に比べ短い。これまでに、チャーハン、パスタ、焼きそばなどによる事例が知られている。乳及び乳製品を原因食品とする食中毒事例の発生は多くはないが、世界各国の調査で多くの牛乳や生乳からセレウス菌及びその毒素が検出されており、食中毒が起こりうる状況と考えられる。

クロノバクター属菌は腸内細菌科に属するグラム陰性菌で、蕎麦粉、スパイスなど乾燥食品から多く分離される。乾燥に強く、乳児用調整粉乳から分離されることがあり、乳児に髄膜炎や敗血症を引き起こすことから、サルモネラ属菌と共に乳児用調整粉乳中の微生物規格が食品の国際規格を定めるCodex委員会により定められてい

る。

エルシニア・エンテロコリチカとエルシニア・シュードツパクローシスは豚肉から分離されることが多い食中毒菌で、下痢、腹痛、発熱等の食中毒菌症状から、敗血症、虫垂炎様症状、関節炎、頭痛、喉の痛みなど様々な症状を引き起こすことがある。本菌はリステリア・モノサイトゲネスと同様に4℃以下でも増殖が可能であり、冷蔵保存中に食品中で増殖が起こりうる。本菌はネズミの糞便や井戸水などからも分離され、未処理の井戸水で洗浄した瓶を用いた牛乳からの感染事例等がある。

結核菌（特にウシ型結核菌）と牛乳汚染の関係は古くから知られており、フランスの微生物学者ルイ・パスツールがぶどう酒の殺菌のため考案した63℃30分間の低温殺菌を牛乳中の結核菌の殺菌に応用したことが牛乳の低温殺菌の基となっている。結核の発症には一般の食中毒より長時間を要するため、食品媒介性の結核は食中毒としては扱われていない。

ボツリヌス菌は芽胞を形成するグラム陽性菌で、土壌等に広く存在し、セレウス菌と同様に高い耐熱性を示す。本菌は偏性嫌気性菌であり、酸素がない条件下で増殖するため、缶詰、瓶詰め、真空包装の食品などによる食中毒が知られている。免疫の未熟な1歳未満の乳児においては、蜂蜜及び蜂蜜を含む食品等の摂取による乳児ボツリヌス症が起こりうる。本菌は神経毒素を産生し、呼吸困難、麻痺、便秘等を引き起こす。

ここに述べた多くの細菌（セレウス菌及びボツリヌス菌を除く）は、低温殺菌条件（63℃30分以上）や中心温度75℃1分間の加熱調理などの一般的な加熱条件で死滅することが知られており、適切な加熱処理により乳から除去することが可能であるが、それにも関わらず、殺菌工程後の汚染により食中毒を引き起こす事例が見られている。殺菌後の製造工程における細菌汚染の起こりやすい箇所としては、充填関連部位が挙げられている。製造環境ふき取り検体と、最終製品における菌叢解析を行った研究の結果からは、充填ノズルと最終製品における菌叢の類似が見いだされた（厚労科研費報告書）。

乳及び乳製品の品質劣化に関わる細菌の主要なもの

表2 乳及び乳製品の変性・腐敗菌

細菌	事例
乳酸菌	酸敗
大腸菌群	酸敗、ガス産生
<i>Enterobacter</i>	粘稠性
<i>Aeromonas</i>	
<i>Serratia</i>	赤変
<i>Pseudomonas</i>	苦味、脂肪分解臭、変色
<i>Flavobacterium</i>	変色、苦味
<i>Micrococcus</i>	酸敗
<i>Bacillus</i>	ガス産生、苦味、凝固
<i>Alcaligenes</i>	粘稠性、脂肪分解臭
<i>Cromobacterium</i>	紫変

を表2に示した（[1], [2]を基に作成）。これらの多くは7℃以下で増殖可能な低温細菌とされており[3]、乳中の初期菌量が少なくても、冷蔵保管期間が長期になると乳の品質低下に関わる菌量まで増殖することが可能である。品質の劣化が感知されるレベルになるには、通常 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mLの菌が必要とされる[2]。また、これらの細菌が産生した耐熱性リパーゼやプロテアーゼ等の酵素による腐敗がみられることもある。セレウス菌は前述のように、下痢や嘔吐を引き起こす食中毒菌であるが、酸を産生せずに牛乳を凝固させる甘性凝固を引き起こすことがある。

衛生指標菌としてよく用いられている項目を表3に示した。これらは一種類の細菌ではなく、特定の試験法で検出される細菌群であり、総数や検体一定量における有無により、製造環境の管理や製品の合否判定基準（後述の規格基準）等に用いられる。多くの場合、食品中に病原菌が含まれている場合でもその菌量は低く、また、食品内で均一に存在していないため、見逃しが生じやすい。そのため、病原菌よりも食品内で多く存在し、微生物汚染の指標となりうる衛生指標菌を衛生管理に用いることが一般的である。日本国内では一般生菌数（標準寒天培地中で32℃～35℃において24時間～48時間培養後の集落数）と大腸菌群（35℃48時間の培養で乳糖を分解して酸とガスを産生するグラム陰性菌）が乳及び乳製品の衛生指標菌として用いられている。腸内細菌科菌群はグラム陰性無芽胞桿菌で、ブドウ糖を分解して酸を産生するオキシダーゼ陰性の通性嫌気性菌であり、細菌学上の分類の一つである。Codex委員会及びEUで主に用いられている衛生指標菌であり、日本国内では生食用肉の規格として用いられている。一方大腸菌群は食品衛生上のカテゴリーであり、エロモナスのように糞便汚染との関係性が低い、腸内細菌科に属さない菌も含まれる。

製造環境の衛生管理指標としては生菌数が主であるが、諸外国ではリステリア属菌が用いられることもある。ヒトに疾病を引き起こす病原菌はリステリア属のなかではほぼリステリア・モノサイトゲネスのみと考えられるが、リステリア属菌（特にリステリア・イノキユア）は環境中に広く分布しており、環境や食品に存在する菌数が多い場合リステリア・モノサイトゲネスよりも多く、また、低温での増殖性等の挙動がリステリア・モノサイトゲネスと同様であることから、リステリア属菌全体が陰性であることを食品製造環境の衛生が保たれている指標としているものである。そのため、食品からのリステリア・モノサイトゲネス検出の国際標準試験法であるISO 11290-1（定性法）及び2（定量法）は、2017年に改訂された際に「リステリア・モノサイトゲネスとリステリア属菌の試験法」として出版され、食品、動物用飼料及び食品の製造及び取り扱い環境由来の検体からのリステリア属菌の検出にも用いられるようになった。

表3 主な衛生指標菌

項目	定義
一般生菌数(細菌数)	標準寒天培地中で32~35°Cにて24~48時間培養した際の合計集落数(日本) 標準寒天培地中で30°Cにて72時間培養した際の合計集落数(ISO)
大腸菌群	乳糖を分解しガスと酸を産生するグラム陰性無芽胞形成菌
糞便系大腸菌(食品衛生法上のE.coli)	大腸菌群のうち44.5°Cで発育し、乳糖を分解してガスを産生するもの
腸内細菌科菌群	微生物学上の分類で、ブドウ糖を分解しガスと酸を産生するオキシダーゼ陰性のグラム陰性無芽胞形成通性嫌気性桿菌
リステリア属菌	微生物学上の分類で、エスクリンを分解するグラム陽性で微好気性の短桿菌

III. 乳の殺菌条件

乳及び乳製品における細菌汚染の低減には、第一に生乳の加熱による殺菌が挙げられる。乳の殺菌条件には、保持式低温殺菌であるLTLT (low temperature long time: タンクなどに入れた状態で、63°C~65°Cで30分以上加熱)、連続式低温殺菌であるLTLT (予熱後に温度保持したパイプライン中を流れる状態で、65°C~68°Cで30分以上加熱)、高温短時間殺菌であるHTST (high temperature short time: 60°Cで予熱後に75°C以上で15秒以上加熱)、高温長時間殺菌であるHTLT (high temperature long time: 75°C以上で15分以上加熱)及び超高温瞬間殺菌であるUHT (ultra high temperature: 120°C~150°Cで1~3秒加熱後急冷)の5種類がある。現在流通している牛乳のほとんどはUHT牛乳であり、賞味期限は1~2週間に設定されている。一方、牛乳本来の味を楽しめるとしてLTLTなどの低温殺菌牛乳にも根強い人気があり、多くの小規模製造所において様々な製品が販売されている。低温殺菌牛乳の殺菌条件では耐熱性細菌を除去することが難しいことから、製品中にある程度の細菌が残存しているため、UHT乳とは異なり4日~7日の消費期限が設定されている。また、UHT牛乳のうち、135°C~150°Cで殺菌され、特殊な容器に無菌充填された製品は常温保存が可能で賞味期限が2ヶ月程度のLL (long life) 牛乳として販売されている。平成30年に調査した、市販のLTLT牛乳51製品、HTST牛乳18製品及びHTLT牛乳15製品における生菌数(32°C48時間培養)の平均値はそれぞれ1.63 log CFU/mL及び1.28 log CFU/mL、0.36 log CFU/mLであり、加熱処理の強さに反比例していた。一方、いくつかの製造施設における未殺菌の原乳の細菌数(30°C72時間培養)は3~7 log CFU/mLであった[4]。

現在国内では未殺菌乳を使用したナチュラルチーズは製造されていないが、フランス、イタリア等諸外国では未殺菌の牛乳や山羊乳等を原料としたナチュラルチーズが製造、販売されている。それらは日本へも輸入されており、輸入検疫において腸管出血性大腸菌等の病原体が検出され、回収や命令検査がなされることがある。リステリア・モノサイトゲネスもまた、時折輸入検疫においてチーズから検出されるが、原料乳由来よりも製造環境における汚染に由来することが多い。

IV. 乳及び乳製品中の微生物規格基準とサンプリングプラン

食品の中には、国により微生物規格基準が定められているものがある。病原菌の規格基準は主に、過去に食中毒事例が起きた食品について、その原因となった微生物の制御すべきレベルを示しているものである。現在国内で定めている微生物規格は主に最終製品についてクリアすべきレベルを示している。一方諸外国では、製造工程中から出荷直前までの衛生管理状況を把握するための製造工程規格に当たるfood processing criteriaと、販売時の消費期限最終日での食品の安全性評価基準となるfood safety criteriaの2種類を設定している国がある。表4に、現在国内外で定められている低温殺菌牛乳とアイスクリーム中の微生物規格の例を示した。食品の微生物検査におけるサンプリングプランとは、あるロットから採取すべき検体量、検体数、基準を満たすべき検体数を定めたものである[5]。微生物は食品中に均一に存在してはならず、試験に用いるためにランダムに採取した試料が当該ロットの汚染状況を正確に反映していない場合が起こりうる。偏りのない試験結果を得るために、サンプリングプランによって過去の調査で知られている食品種ごとの汚染レベルや、健康被害の大きさに応じて、1ロットから用いるべき検体数や管理すべき水準を定めるものである。サンプリングプランには2階級と3階級があり、2階級は基準値mを超える検体は不合格、基準値以下の検体は合格であり、1ロットあたりの全試験検体nが合格でなくてはならない(c=0)。3階級は基準値mと、mよりも高い条件付き許容値Mの間の菌数を示す検体の許容数(2検体を許容する場合は、c=2)を規定しており、cが多いほどロットが許容される確率が上がるため、合格ロットが増えることになる。乳製品で最も厳しいサンプリングプランが設定されているのは乳児用調製粉乳におけるサルモネラ属菌で、Codex委員会の定める国際規格において、1ロットあたり60検体(各25g)を検査し、一つも陽性であってはならない(n=60, c=0, m=0)とされている。日本国内でも、乳製品の規格としてナチュラルチーズ(ソフト及びセミハード)について、1g中のリステリア・モノサイトゲネスが100 CFU以下でなくてはならない、と定められており、更に1ロットあたり5検体を試験し、その全てが規格に合

表 4 国内外における牛乳及びアイスクリームの微生物規格基準の例

国、地域	食品	生菌数	大腸菌群	腸内細菌科菌群	大腸菌	黄色ブドウ球菌	サルモネラ	リステリア	サンプリングプラン
日本	牛乳	$\leq 5 \times 10^4$ CFU/mL	陰性 (BGLB法)						
	アイスクリーム	$\leq 10^5$ CFU/g	陰性 (乗天法)						
香港	アイスクリームを含む冷凍食品	$\leq 5 \times 10^4$ CFU/g	≤ 100 /g						
米国	低温殺菌牛乳	$\leq 2.0 \times 10^4$ cfu/mL							
	アイスクリーム	$\leq 5 \times 10^4$ CFU/g	10/g以下(プレーン)、20/g以下(チョココレート、フルーツ等)						n=5, c=2
オーストラリア ニュージーランド	アイスクリーム	$< 10^6$			< 3	$< 10^2$		0/25 g	
		marginal not satisfactory			3-100 >100	10^2 - 10^3 10^3 - 10^4 (> 10^4 は潜在的に危険)		$< 10^2$ > 10^2 は潜在的に危険	
EU	低温殺菌牛乳			≤ 10				0/25 g	n=5, c=0
	牛乳から作ったアイスクリーム、冷凍乳製品及びデザート、シャーベット			m=10, M=100*			0/25 g**	0/25 g**	*n=5, c=2 **n=5, c=0
フランス	低温殺菌牛乳	$\leq 1 \times 10^3$		≤ 1				0/25 g	
	牛乳から作ったアイスクリーム、冷凍乳製品及びデザート、シャーベット	$\leq 1 \times 10^4$		≤ 10			0/25 g (牛乳ペー スのもののみ)	0/25 g (解凍せ ず消費する製 品は<100CFU/ g)	

格していなくてはならない ($n=5$, $c=0$, $m \leq 100$), というサンプリングプランが設定されている。

病原菌以外の微生物規格基準には、生菌数や衛生指標菌がある。過去には腐敗、変敗の防止や糞便汚染の可能性の検知を主な目的としていたが、現在では主に製造工程上の衛生管理が適切に行われていることの確認の指標として用いられている部分が多い。日本国内の衛生指標菌の微生物規格基準の例としては、牛乳について、生菌数(乳及び乳製品の規格では細菌数)が1mL当たり5万個、かつ大腸菌群陰性、と定められており、逸脱時には製品の回収が行われる。一方、Codex委員会及びEUでは低温殺菌牛乳について、大腸菌群ではなく腸内細菌科菌群を製造工程規格としており、そのサンプリングプランは $n=5$, $c=0$, $m \leq 10$ となっている。逸脱時には、当該食品の製造環境の衛生状態の改善を行うこととされている。

V. 食品中の微生物試験法

1. 公定法

規格基準が定められた食品が基準に適合しているか否かを判断するには、国により定められた方法(公定法)により試験を行わなければならない。検疫所による輸入食品検査や保健所等における収去試験などの行政処分を伴う試験がそれに該当する。公定法には、官報に掲載される告示法と、通知として発出される通知法がある。最近では、平成26年12月に上述のナチュラルチーズ及び非加熱食肉製品中のリステリア・モノサイトゲネスの試験法が、平成27年7月にはサルモネラ属菌と黄色ブドウ球菌の試験法が従来のものから変更され、それぞれ通知として発出された。

2. 標準試験法と国際整合性

規格基準のない食品についてどの試験法を用いるかは、試験者(あるいは試験の依頼者)が選択するものである。国内では一般に、規格が設定されている食品の公定法を規格対象外の食品について用いたり、広く使われている食品の試験法マニュアルである「食品衛生検査指針」[6]に記載された方法が用いられることが多い。

以前は、数十年見直しされることなく用いられ、国際的な試験法との互換性が確認されていない公定法があった。また、過去の「食品衛生検査指針」には、それぞれの微生物の専門家により長年の研究成果をもとに作成された優れた試験法ではあるが、国際的な試験法と大きく異なっている試験法が収載されていたこともあった。しかし今日では、世界貿易機関(WTO)加盟国において、科学的な正当性を示すことなく海外で広く用いられている規格基準や試験法と異なる国内規格や試験法を用いることは、非関税障壁とみなされ、提訴される可能性がある。逆に、諸外国で用いられている試験法よりも感度の低い試験法を用いている場合は、海外で流通できない汚

染レベルの食品が国内に輸入されるリスクも考えられる。我が国は多くの食品を海外からの輸入に頼っており、食品の規格基準及びその試験法における国際ハーモナイゼーションは大変重要であるといえる。そこで平成17年に、日本国内における食品からの微生物試験法の今後の方向性を議論し、標準試験法を作成するため、約20名の専門家から構成される「食品からの微生物標準試験法検討委員会」(以下、検討委員会)が結成され、試験法について公開の場での議論を経て試験法を作成している。これまでに作られた標準試験法のうち、現在までにサルモネラ属菌定性法、黄色ブドウ球菌集落計数法、リステリアモノサイトゲネス定性法及び集落計数法、腸内細菌科菌群定性法が公定法(通知法)として採用、発出されている。各試験法の詳細については、検討委員会のホームページで公表されている[7]。

国際的な標準試験法はInternational Organization for Standardization (ISO)により定められているが、そのうち食品中の微生物についてはTechnical committee (TC) 34内のSub-committee (SC) 9で作成されており、現在議決権のあるParticipating memberには日本を含む37か国が、議決権のないObserving memberには29か国が含まれている。これまでに86の標準試験法や技術仕様書を作成しており、21の試験法等が現在作成中である(2021年3月時点)[8]。食品の国際規格を定める機関であるCodexは、各国にISO法もしくはISO法との妥当性が確認された試験法を用いて食品の基準適合性を評価することを求めており、EU加盟国において公定法とされている。

3. 代替試験法

上述の公定法や標準試験法では、食品及びその希釈液を培養することで微生物を検出、同定するため、結果を得るまでに通常1日~1週間程度時間を要する。また、希釈水以外に、前増菌培地、増菌培地、選択分離培地等様々な種類の培地調製が必要となることが多い。生菌数、大腸菌群試験(寒天法)、腸内細菌科菌群定量法などの試験法では、溶解した寒天培地を50℃以下に保管したのち、検体の希釈液とシャーレ内で混合してから固化し培養する混積培養法を用いているため、あらかじめ寒天平板を作成しておくことができず試験当日に培地を調製しなければならない。そのため、日常的な衛生管理のための試験として用いるのは利便性が低いといえる。また、試験実施者の習熟度によって試験結果に差がみられる可能性がある。分析を専門としている検査機関等では、研修、内部及び外部精度管理等により、そのような問題点は解消されるが、製造所の規模によっては、食品製造現場で行う衛生管理業務として通常の培養法を採用するのは困難な部分も多いと思われる。

近年、選択分離培地や生菌数測定用培地の代替として、フィルム状や小型化された容器入りの簡易培地が市販されており、集落数の計数についても自動化されている製品もある。また、免疫学的手法を用いて、検体内の病原

菌抗原を検出するキット、比較的短時間の増菌培養とPCR法を組み合わせる短時間で病原菌を検出するキットなども販売されている。公定法や標準試験法に採用されていないものの、新しく開発された選択分離培地や性状検査用キット等も代替試験法とみなされる。

代替試験法の使用により、通常の微生物試験法に必要な作業の手間、結果を得るまでの時間が大幅に削減されることが多い。また、従来法に比べ検出感度が向上する場合もある。牛乳における生菌数試験では、公定法による混積培養の場合、牛乳原液を接種すると培地の白濁が強く、集落の目視が困難であるため、通常10倍希釈液とその階段希釈液を用いて試験を行う。そのため、1検体当たり平板を2枚用いる際の公定法の検出下限値は5 CFU/mLである。一方、市販のフィルム状の簡易培地では形成された集落が赤色などに着色されるため、牛乳原液1 mLを接種して生菌数を測定することが可能で、検出下限値は1CFU/mLとなる。

VI. 第三者認証

代替試験法として販売されている製品は数多く存在するが、現在国内には、これらの製品について標準試験法との同等性を評価する認証機関はない。海外ではISO法とのバリデーションを行う第三者認証機関として、フランス規格協会AFNOR、オランダの政府機関であるMicroVal、北欧5か国（デンマーク、スウェーデン、ノルウェー、フィンランド及びアイスランド）の合同機関NMKLによるNordValがある。これらの機関は、開発者により申請された製品に対し、ISOの定める妥当性確認のガイドラインISO 16140シリーズに基づく評価を行っている。認証取得を希望するメーカーは、このガイドラインに基づく試験を実施し、ISO法との同等性を示す必要がある。認証を取得した製品を用いた試験は、ISO法と同等として扱われ、公的機関においても用いられる。

一方、米国の第三者認証機関にはAOAC internationalがあり、米国医薬食品局（FDA）の試験法であるBAM法や農務省（USDA-FSIS）の試験法等との妥当性確認が行われた代替試験法について、認証を与えている。AOACの認証には、複数の試験機関による共同試験による妥当性評価が行われ、公定法と同等に扱われるOfficial Method of Analysis（OMA）と、開発業者による評価のみが行われ、公定法と同等としては扱われないものの、自主試験等に用いることができるPerformance Tested Method（PTM）の2種類がある。

VII. 代替法の導入検証と HACCP での活用

HACCPの完全制度化に伴い、受け入れ原料、製造環境のふき取り検体、最終製品等の細菌汚染レベルの確認など、製造工程の衛生管理に、簡便・迅速に微生物試験を実施できる代替試験法のニーズは高まると思われる。

また、代替試験法を選択する際に、第三者認証を取得しているかがその信頼性に影響を与える。しかし、第三者認証取得済み代替法においても、認証取得外の食品種を対象とする場合等、従来の試験法（代替法と比較する意味で、参照法と呼ぶ）と同等レベルの結果を示さないことが起こりうる。認証取得済み簡易培地を用いた低温殺菌牛乳等の細菌数を公定法と比較したところ、簡易培地での菌数が有意に低い結果が見られた[4]。未殺菌の生乳では公定法と簡易培地の形成集落数に差が見られなかったこと、簡易培地の培養時間を48時間から72時間まで延長すると公定法との差が小さくなることから、63℃～65℃30分、75℃15秒などの半致死的な加熱殺菌により損傷菌が多く存在すると考えられる低温殺菌牛乳等では、簡易培地における集落形成に通常よりも時間がかかると考えられた。他にも、食品検体の特性（pH、常在細菌叢、保存温度、高圧等の殺菌処理など）やふき取り環境の特性（洗剤の使用、乾燥、高温等）により、代替法が参照法より低い結果を示す可能性がある。一方、検体中に存在する細菌叢が熱に弱い場合等、47℃前後に保温された寒天培地と検体を混和する混積培養法よりも、熱が加わらない簡易培地での集落形成性が高い場合もある。選択した代替法で得られる結果が従来法と同等以上であることは、個々の現場でバリフィケーションにより確認する必要がある。

ISOでは認証外の食品種を対象として代替法を使用する際の、個々の試験機関によるバリフィケーションのガイドラインであるISO 16140-3：2021について、ISO 17025を取得している機関では、そのガイドラインを遵守することが求められる（2027年までを移行期間としている）。ISO 17025を取得していない試験機関や製造現場では、ガイドライン遵守は要求されないものの、代替試験法の導入時には、従来の方法との併用を行うことにより、自社での運用に問題がないことを確認してから導入する必要がある。特に、最終製品を対象とする場合には、自社製品が代替法の認証取得時の食品種に該当するかどうかも含めて、公定法等との同等性を確認するのが望ましい。製造環境の清掃効果を確認するためには、用いている洗剤等の種類に合わせた中和剤入りの培地を用いるのがよい場合もある。

HACCPでは、環境ふき取り検体や最終製品等の生菌数等のデータについて、あらかじめ定められた一定期間（1週間等）での数値が、設定した基準を上回らないことを確認することで管理する方法がある。新しいデータが加わる度に管理する期間をずらしていくことで、チェックする期間が随時ずれていく状態を窓がスライドするのに例え、moving windowと呼ばれる手法である[9]。また、比較的長期間（数か月間以上、上限を設けないこともある）での同様のデータについて、自社基準範囲内での上昇傾向や周期的な自社基準の逸脱等を検出するトレンド解析を行うことで、短期間のデータであるmoving windowでは把握できない、データの長期的傾向（漸増

漸減, 季節変動, 周期的な上昇等) によって示された不具合を是正することも可能となる[9]. ふき取り試験の実施箇所及び頻度, 是正措置をとるための基準については, 製造する食品の種類, 施設の設計及び規模などによって大きく異なる.

VIII. おわりに

栄養価が高く, 微生物が増殖しやすい乳及び乳製品は古くから様々な食中毒の原因食品となってきた. 乳及び乳製品を通じて食中毒を起こしうる微生物ハザードの多くは通常の加熱処理で不活化することが可能である. また, 乳及び乳製品の製造工程における衛生管理の中心は温度制御であり, 製造環境の清掃と, 加熱殺菌と製造工程での低温管理が適切であれば, 製品への細菌汚染を防ぐことは困難ではないと思われる. 一方今後の完全制度化で, HACCPにおける監視項目に微生物試験結果を用いないプランを設定することは多いものの, HACCP導入により微生物試験が完全に不要となることはなく, 用いているHACCPプランが妥当であるかの確認のために, 一定の頻度での製造環境や製品の微生物汚染レベルを確認することは, 今後も必要となると考えられる.

参考文献

- [1] 佐藤順, 山本茂貴. 現場必携 微生物殺菌実用データ集. 東京: サイエンスフォーラム; 2005.
Sato S, Yamamoto S. Genba hikkei Biseibutsu saikkin jitsuyo data shu. Tokyo: Science Forum; 2005. (in Japanese)
- [2] ICMSE, 山本茂貴. 食品微生物の生態—微生物制御の全貌. 東京: 中央法規出版; 2011.
ICMSE, Yamamoto S. Shokuhin biseibutsu no seitai: biseibutsu seigy no zenyo. Tokyo; Chuo hoki shuppan; 2011. (in Japanese)
- [3] 春田三佐夫. 乳, 乳製品と低温細菌. コールドチェーン研究. 1978;4(2):27-36.
Haruta M. Nyu. Nyuseihin to teion saikin. Journal of institute of Cold Chain. 1978;4(2):27-36.
- [4] 岡田由美子, 研究代表者. 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」令和元年度総括研究報告書. 2020.
Okada Y, Kenkyu daihyosha. [Research on Food Safety, Health, Labour and Welfare Sciences Research Grants “Studies for the development of hygienic control and testing methods of milk and dairy products.” Reiwa ganendo sokatsu kenkyu hokokusho.] 2020. (in Japanese)
- [5] ICMSE, 春日文子, 小久保彌太郎, 島原義臣. 食品安全管理における微生物学的検査: 基準の設定と検査の考え方. 東京: 中央法規出版; 2013.
ICMSE, Kasuga F, Kokubo Y, Shimabara Y. Microbiological testing in food safety management. Tokyo: Chuo hoki shuppan; 2013. (in Japanese)
- [6] 日本食品衛生協会, 編. 食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版. 東京: 日本食品衛生協会; 2018.
Japan Food Hygiene Association. Standard Methods of Analysis in Food Safety Regulation; 2nd edition. Tokyo: Japan Food Hygiene Association; 2018. (in Japanese)
- [7] 食品からの微生物標準試験法検討委員会ホームページ. www.nihs.go.jp/fhm/mmef/index.html (accessed 2021-03-10)
[The methods for the microbiological examination of foods.] www.nihs.go.jp/fhm/mmef/index.html (in Japanese) (accessed 2021-03-10)
- [8] ISO/TC34/SC9. https://www.iso.org/committee/47920.html (accessed 2021-03-10)
- [9] Heggum C, Guerrero Vallejos HH, Njie OB, Adegboye AO. Application of the moving window approach in the verification of the performance of food safety management systems. Food Control. 2015;58:17-22.