

3.a	pHとAwから考えて、増殖に関する食品評価が必要か？（付録Dの表AとBを参照。）はいの場合、4.eと5.aにも答えよ。	はい、Food Codeの表Bに従って、食品評価が必要である。	
3.b	不活化試験は必要か？はいの場合、4.fと5.bにも答えよ。	いいえ。	
3.c	死滅（不活化）またはTCS（増殖）に適用できる規制があるか？	本食品は、安全のために温度管理が必要であると、Food Codeは定義している。死滅に関する要件はない。	
4	チャレンジ試験で検討する懸念される病原菌を決める		
4.a	表2と付録Cから、どの病原菌が懸念されるか？食品がシーフードでなければ、ビブリオ属は検討から外してよい。	pHとAwを考えると、セレウス菌、ボツリヌス菌、ウエルシュ菌、リステリア・モノサイトゲネス、病原性大腸菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌、赤痢菌属、エルシニア・エンテロコリチカを考慮する。	
4.b	環境、食品、疫学的な経緯から考えて、発生する可能性が合理的に高いのはどの病原菌か？（付録Cも参照）	食品検査からは、セレウス菌と黄色ブドウ球菌の存在が示されている。疫学データからは、大腸菌O157:H7の懸念が最も高く、次いでサルモネラと赤痢菌の懸念が示唆されている。ボツリヌス菌とウエルシュ菌は、最終品の性質（軽くパック詰めしたカット野菜）から除外。リステリア・モノサイトゲネスは、カットレタスで増殖するが(62)、疫学的エビデンスに欠ける(41)ため除外。エルシニア・エンテロコリチカとセレウス菌も同様に除外。	

4.c	どの病原菌が、不活化工程後に本食品を再汚染する可能性があるか？	2.b.3 の回答を参照.	
4.d	標的食品または関連食品に、病原菌の蔓延を示唆するベースライン調査があるか？	2.a.5 の回答を参照.	
4.e	増殖抑制 (TCS) 試験について：		
4.e.1	どの病原菌が最も速く増殖するか？グラム陽性 vs グラム陰性，栄養微生物 vs 芽胞形成菌を考慮すること。食品がシーフードでなければ，ビブリオ属は検討から外してよい。予測モデルを用いるか，適用可能な文献を引用せよ。必要に応じて，1.5 倍の消費期限で増殖の可能性を検討せよ。	4.e.2 および 4.e.3 の回答を参照.	
4.e.2	予測モデル	<p>温度 21°C (69.8°F)，pH 6.2，A_w0.995 と以下の予測では仮定：</p> <p>時間差を一般的な値としたとき，1 ログの増加に，ComBase Predictor は「6.5 時間後（大腸菌 O157:H7），8.2 時間後（サルモネラ），9.4 時間後（黄色ブドウ球菌），12 時間後（リステリア・モノサイトゲネス），18.5 時間後（赤痢菌）」，PMP 7.0 は「9.9 時間後（大腸菌 O157:H7），8.3 時間後（サルモネラ），9.1 時間後（黄色ブドウ球菌），9.5 時間後（リステリア・モノサイトゲネス），15.9 時間後（赤痢菌）（時間差を含む）」と予測。</p> <p>時間差をゼロとしたとき，1 ログの増加に，</p>	

		ComBase Predictor は「3.4 時間後（大腸菌 O157:H7), 3.6 時間後（サルモネラ), 4.1 時間後（黄色ブドウ球菌), 4.6 時間後（リステリア・モノサイトゲネス), 10 時間後（赤痢菌）」, PMP は「3.6 時間後（大腸菌 O157:H7), 3.0 時間後（サルモネラ), 5.6 時間後（黄色ブドウ球菌), 3.2 時間後（リステリア・モノサイトゲネス), 6.7 時間後（赤痢菌）（時間差を除く）」と示す。	
4.e.3	文献と選択を比較せよ。	発表済み研究から (1, 23, 67), カットしたアイスバーグレタスにおける大腸菌 O157:H7 の増殖に関する文献データ (4 つの増殖速度) を抽出した。4 つのデータ点は, 文献ベースのシンプルモデルと合致し, 21°C (69.8°F) での増殖速度を推定している。 文献ベースのモデルは「21°C (69.8°F) で 8 時間後, 大腸菌 O157:H7 は約 0.86 ログ増加」と予測している。この予測は増殖速度のみを考えたもので, 時間差は無視していることに注意されたい。	
4.e.4	増殖または生存に関する情報は, まだ他にも何かあるか?	いいえ。	
4.e.5	上記の分析から, 増殖抑制試験に選ばれる被験微生物は何か?	モデリングと疫学の結果によれば, 大腸菌 O157:H7 とサルモネラが最大リスクを表している。また, 上記に示すモデリングの結果は, 2 つの微生物の増殖は類似していることを示している。	上記の ComBase モデリング分析は, 室温で 8 時間経てば, 本食品の安全性は疑わしいと示す。 文献ベースのモデルは, 増殖は 1 ログ未満

		チャレンジ試験は、疫学的関連性が疾患と最も関連性が強いことから、大腸菌 O157:H7 で行う。	ということで、8時間は許容範囲の可能性を示唆している。さらに確証を得るため、チャレンジ試験が正当化された。増殖が 1 log CFU/g 未満でいられる期間を特定できるよう、試験をデザインする。
4.f	不活化試験の場合：	NA	
4.f.1	どんな死滅の処置（HPP、熱、酸等）があるか？		
4.f.2	死滅の処置（HPP、熱、酸等）に最も耐性のある微生物はどれか？		
4.f.3	病原菌が存在する可能性のある本食品の全域にわたって、菌は死滅するか？全表面と内部の汚染について説明せよ。		
4.f.4	組成において、不活化に影響するかもしれないものに何があるか？（ A_w 、水分、塩分、pH、脂質等の内因子が死滅や耐性に関与する可能性がある）		
4.f.5	本食品中の病原菌量に関するデータは何かあるか？		
4.f.6	本食品のログ低減に、規制要件または方針があるか？要件を引用せよ。		
4.f.7	ログ低減に規制要件がない場合、受け入れ可能な低減を判断するのに、科学的根拠を用いよ（21, 76）。		

4.f.8	上記の分析から、不活化試験に選ばれる被験微生物は何か？		
5	チャレンジ試験の適切な期間とサンプル採取時点を決める		
5.a	増殖抑制 (TCS) 試験の試験期間は、消費期限の 1.25~1.5 倍で検討せよ。	8 時間置かれると仮定すると、試験期間は 8 時間 × 1.5 = 12 時間必要。	
5.a.1	製造から消費までの最大期間	8 時間。	2.c.2 のコメントを参照。
5.a.2	腐敗または受け入れ難い品質になるまでの実際の期間	過去のデータは、室温で 24 時間経過すると、受け入れ難いものになると示唆。	
5.a.3	増殖抑制試験では、微生物分析に適切なサンプル採取時点を決めること。サンプル採取時点は、5 回~7 回が推奨される。採取時点が少なければ、正当な理由が必要である (類似食品の結果を使用等)。	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 時間の時点で試験。	費用の問題があれば、少ない回数の時点での評価は可能 (0, 3, 6, 9, 12 時間等)。
5.b	不活化試験では、工程や組成を考慮して、適切なサンプル採取時点を決めること。0 時点と工程終了時には、密度を同定する。できる限り、中間でもサンプルを採取し、死滅曲線を判断する。	NA	
5.b.1	不活化の処置が不十分に終わる可能性がある場合、消費期限に微生物が回復・増殖するか、検討すること (21)。		
6	接種、保管、試験手順を決める		
6.a	試験に用いる菌株を決める (各菌種につき複数株使用を推奨。適切な食品または臨床分離株の	標識菌株のカクテルを使用。大腸菌 O157:H7 の菌株は、ヒトと食品からの分離株を併せたもので、こ	高密度に存在する自然な常在微生物叢の中から大腸菌 O157:H7 を容易に計測する

	使用を検討すること)	れらは薬物野菜が関与した孤発性の疾患や大流行との関連性が指摘されている.	ため、選択菌株を修飾して、適切な標識(抗生物質耐性、緑色蛍光タンパク質等)で表す.
6.b	接種材料の調製に適応が必要かどうか?	接種材料の適応は不要.	(42)
6.c	接種方法を決める(表面、混合、浸漬、液体、乾燥等)	カットした葉は、未カットの表面と切り口の両方にスポット接種し、安全キャビネット内で軽く風乾してから、翌日まで冷蔵温度で保管.	浸漬接種は、サラダスピナー(水切り器)がないと除去し難い余分な水分を与えてしまう。接種レタスの水分の除去に、試験室内でサラダスピナーを用いると、危険なエアロゾルを生成する可能性があり、スピナーの除染も難しい。レストランのレタスの温度プロファイルを複製するため、接種後レタスは5°C(41°F)で冷蔵する.
6.d	接種量を決める(密度、log CFU/g、1包装当たりのCFU、接種材料の割合[vol/wtまたはvol/vol]等)	複数スポット(4ヵ所以上)にスポット接種する(約10µl/10gサンプル)。目標最終濃度は、3log CFU/10gサンプル.	
6.e	用いる包装を決める	軽く密封したプラスチック容器にサンプルを保管.	
6.f	増殖抑制試験での培養温度または加熱不活化試験での温度を決める	通常は21°C(70°F)に保たれるが、最悪の条件を表すため、25°C(77°F)で培養する.	
6.g	サンプル採取方法とサンプルサイズを決める	0.1%ペプトン90mLに各10gサンプルを入れ、高速で1分間均質化してから希釈し、適切な選択培地上にプレーティングする.	
6.h	データの確実性を確保するのに、複製はいくつ必要か?一般分析または製造にばらつきが見	反復試験は2回実施し、各時点3サンプルを分析し、二度プレーティングする。反復試験はそれぞれ	

	られれば、反復試験を数回以上行うことは認められるか？複数組の類似組成を試験すべきか？組成を選択するのに統計デザイン（ブロック計画，中心複合等）は使用しているか？	別の日に行い，バッチの異なる新鮮レタスと新たな接種材料を使う。	
7	他の対照を決める		
7.a	サロゲートの使用は適切または必要か？そうであれば，正当化せよ。	サロゲートは適切または必要ではない。	
7.b	腐敗や競合細菌叢の評価，または他の目的のために，未接種の対照が必要か？	未接種の対照（1 つ）を各時点でサンプル採取する。未接種対照は，本試験で使う選択寒天とトリプティックソイ寒天上に塗抹する。対照レタスの外観を各時点で記述する。	
7.c	他の対照に何が必要か？（増殖の陰性・陽性対照を含む）	新たに調製した接種材料と 0 時点で新たに接種したレタスの大腸菌 O157:H7 濃度を測定する。	
8	判定基準を決める		
8.a	判定基準は何か？	試験終了時（12 時間）の大腸菌 O157:H7 の増殖は，1 ログ未満であること。	
8.b	本結果を利用するのに，限界は何か？	同様に準備したロメインやアイスバーグレタスには，結果は適用可能である。細かく刻む，または細切りしたロメインやアイスバーグレタスでは，さらに速い増殖が促される可能性があるため，これらのデータは当てはまらない。	本試験結果から，他の薬物野菜に関する試験を完全実施する必要はないかもしれないが，データをより広範に適用するには，何らかの試験が必要である。

^aNA：該当なし。

表 6. 微生物試験のデザイン，実施，評価に必要な専門性の最低推奨条件^a

カテゴリー	デザイン	実施 ^b	評価
知識およびスキル	食品および各種食品において遭遇する可能性のある病原菌に関する知識。食品，食品中の微生物挙動に影響する要因，微生物学の量的側面に関する基本的な微生物生態学の知識。工程条件およびパラメータに関する知識。試験の統計デザインに関する知識 ^c 。	基本微生物学的技術に関する知識。階段希釈する，またはバイオセーフティーレベル 2 で作業する (114) ための，無菌技術を使った作業能力。	食品および各種食品において遭遇する可能性のある病原菌に関する知識。食品，食品中の微生物挙動に影響する要因，微生物学の量的側面に関する基本的な微生物生態学の知識。統計解析に関する知識 ^c 。
教育および研修	食品科学，食品微生物学または関連分野における博士号，もしくは同等の教育や経験の組み合わせ。	食品科学，食品微生物学または関連分野における理学士号，もしくは同等の教育および経験の組み合わせ。食品微生物学における適切な現場経験も推奨される。	食品科学，食品微生物学または関連分野における博士号，もしくは同等の教育や経験の組み合わせ。
経験	チャレンジ試験実施経験が独立的に 2 年ある，および専門の食品微生物学者の指導の下でチャレンジ試験のデザイン経験。	チャレンジ試験実施経験が 2 年あることは有用だが，専門の食品微生物学者による直接監視があれば代わりになる。	チャレンジ試験実施経験が独立的に 2 年ある，および専門の食品微生物学者の指導の下でチャレンジ試験の評価経験。
能力	文献検索実施能力。試験プロトコール作成能力。	試験プロトコール解読および実行能力。安全かつ無菌的に微生物学的技術を実施する能力。	微生物学データの分析および解釈能力。

^a 適用変更の申請を支持する接種試験で示される州や地方の規制当局の食品プログラムには，試験の有効性を確認するための職員に，専門の食品微生物学者がいないかもしれない。そうしたプログラムに利用できるオプションには，州や地方の食品試験機関の専門の食品微生物学者に相談する，または地域の小売業の食品専門家を通じて FDA の食品微生物学者の支援を要請することなどがある。

^b 専門の食品微生物学者の監督下で独立して業務を行う。

^c 生物学系に適用できる経験を持つ専門の統計学者に相談するのが適切と思われる。

Journal of Food Protection, Vol. 73, No. 1, 2010, Pages 140-202

補足文書

接種・チャレンジ試験のプロトコールを決定するためのパラメータ
(Parameters for Determining Inoculated Pack/Challenge Study Protocols) †‡

2009年3月20日採用, WASHINGTON, D.C.

米国食品微生物基準諮問委員会

NACMCF 運営事務局*, 米国農務省食品安全検査局, 公衆衛生学室 (Office of Public Health Science),

Room 333 Aerospace Center, 1400 Independence Avenue S.W., Washington, D.C. 20250-3700, USA

MS 09-287 : 2009年7月2日受付, 2009年8月7日受理

要旨

米国食品微生物基準諮問委員会 (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Food : NACMCF) は, 様々な食品における病原菌の抑制および不活化試験に関するチャレンジ試験を実施するためのガイドラインを作成した. 本文書は, 食品加工業, サービス業, 小売業などの食品産業関連, 連邦, 州, 地方の食品安全規制当局, 公衆衛生当局, 食品を検査する試験機関およびプロセスの専門家など関係者による使用を目的としている. 本文書は, 細菌の不活化と増殖抑制に限定して絞ったものであり, 公衆衛生に関して特定の勧告を行うものではない.

本委員会は, 最新の方法論や問題となる病原菌に対する現行の考え方, および食品の準備, 変化し易さ, 保管条件に対する見解などを考慮して, チャレンジ試験をデザインするよう結論付けている.

試験は, 認定された試験機関において, 専門の微生物学者のガイダンスの下で実施, 評価を行い, 適切な統計学的デザインとデータ解析を含める. 本文書は, 試験に適した微生物の選択, 接種材料の作製, 接種量, 接種方法, 培養温度と時間, サンプル採取の考慮事項および試験結果解釈のためにガイドラインを提供する. 適切にデザインされた増殖抑制および不活化試験も例示する.

目次

本文書の適用範囲	1 頁
緒言および責任の明示	1
背景	2
本委員会の回答	2
本文書の使用および限界	2
チャレンジ試験の種類	3
1) 病原菌の増殖抑制試験	3
2) 病原菌の不活化試験	4
3) 増殖と不活化のコンビネーション試験	4
4) チャレンジ試験が必要かどうかの判断	4
諮問に対する回答（訳注：諮問内容の概略を記載）	6
1. 食品に TCS（安全のために温度と時間の管理）が必要かどうかを判断するためのチャレンジ試験をデザインする際に検討すべき一般的要素（プロトコール）	6
2. 増殖および不活化に関する数学モデルの例と各種食品へのモデルの適用性	23
3. ある食品に実施した接種・チャレンジ試験の結果を、別の類似食品に応用することの限界	27
4. 広範な食品種に応用するのに最も適している、他の組織が発表している既存の接種・チャレンジ試験プロトコール	28
5. 適切な接種・チャレンジ試験をデザインするのに役立つ決定樹	31
6. 接種・チャレンジ試験をデザインし、実施し、相応な結果を評価できると認められる者の要件（基本的知識，スキル，教育，研修，経験，能力）	32
参考文献	33
付録：	42
A. 受け入れられる試験法の出典	42
B. 試験機関を選定する上での検討事項	43
C. チャレンジ試験（増殖抑制，不活化，コンビネーション）が必要と思われる各食品カテゴリーに懸念される病原菌および管理方法	44
D. FDA Food Code 2005 年モデルによるチャレンジ試験に最も関連する定義	46
食品チェックリスト：	
E. 最大 2 週間常温で保管するモッツアレラスライス	51
F. 最大 8 時間冷蔵しないでおくカットレタス	59
G. 最大 12 時間室温で陳列する完全調理済みミートパイ	68
H. メレンゲパイの組成が、非冷蔵条件下で病原菌の増殖を抑制することの検証	75
I. メレンゲトッピングに懸念される病原菌に対し、加熱による不活化の適切性を評価	82
J. 最大 8 時間冷蔵しないでおくベイクドチーズピザ	89

本文書の適用範囲

本文書は、スポンサー機関である NACMCF の要請で作成された。本文書は、食品加工業、サービス業、小売業などの食品産業関連、連邦、州、地方の食品安全規制当局、公衆衛生当局、食品を検査する試験機関、およびプロセス認証機関の関係者による使用を目的としている。本文書は、細菌の不活化と増殖抑制に限定して絞ったものであり、毒素産生性のカビ類やウイルスの不活化は検討していない。

緒言および責任の明示

責任の明示

潜在的にハザードがある食品 (Potentially Hazardous Food : PHF) または安全のために時間・温度の管理を要する (Time/temperature control for Food : TCS) 食品の定義に関し、多くの質問が規制および産業関連関係者から寄せられたため、NACMCF はこうした問題を明確にするためのガイダンスを求められている。

1. 食品が、安全のために時間・温度の管理 (TCS) がどうかを判断するための接種・チャレンジ試験で、検討しなければならない適切な基準は何か？例えば、病原菌種・株の選択、サロゲート微生物の使用、病原菌株の数、接種量、培養温度、培養時間・試験期間、食品の物理学的特性、等。
2. 増殖および不活化に関する数学モデルの適切な使用とは何か？こうしたモデルを接種・チャレンジ試験の代わりに使用できるのは、どんな状況下のときか？現在利用できるモデルのうち、使用するのに最も適切なものはどれか、また、これらのモデルの限界は何か？
3. ある食品に実施した接種・チャレンジ試験の結果を、別の類似食品に応用することの限界は何か？
4. 米国パン協会、NSF インターナショナル (訳注：NSF は 1944 年設立の National Sanitation Foundation の略。1990 年、正式名称を NSF International に変更)、その他が発表している既存の接種・チャレンジ試験プロトコールのうち、広範な食品種へと応用するのに最も適しているのはどれであり、これらのプロトコールの限界は何か？特定の食品と病原菌の組合せに適切な既存のプロトコールはあるか？
5. 適切な接種・チャレンジ試験をデザインするのに役立つ決定樹を作成して欲しい。次の 5 つの食品 (ミートパイ、ベイクドチーズピザ、カットレタス、ブロックまたはスライスチーズ、レモンメレンゲパイ) を使って、樹形図を評価または「机上チェック」して欲しい。
6. 多くの専門的な作業部会または個人が、接種・チャレンジ試験をデザインする、実施する、または相応の結果を評価する資格があると認定してもらうのに必要な、基本的知識やスキル、教育、研修、経験、能力を特定して欲しい。

* 著者連絡先 Tel : 202-690-6600, Fax : 202-690-6364,

E-mail : gerri.ransom@fsis.usda.gov.

† 米国農務省、食品安全検査局；米国保健福祉省、医薬品局、疾病対策センター；米国商務省、国家海洋漁業局；米国国防総省、獣医学研究所 (Veterinary Service Activity) が支援。
本稿は事前の許可なく複製してもよい。

‡ 本文書に記載の商標名または商品は、単に特定の情報提供を目的としたものであり、米国農務省他、NACMCF 支援機関による推奨や許可を意味するものではない。

背景

米国におけるレストランや小売の食品リテール産業は約 150 万施設に上り、その供給業者は接種・チャレンジ試験を定期的に行い、特定の食品に TCS が必要かどうかを判断している。食品関連施設にはレストラン、小売の食品店、デリ、ケータリング業者、施設 (institution) または販売所 (vending commissary) など消費者に直接食を提供する施設を含むと、米国食品医薬品局 (FDA) の Food Code (食品衛生規範) (117) に定義されている。

試験機関で試験を行って、食品関連施設での食品の取り扱い方法の変更を裏付ける場合 [冷蔵から非冷蔵での保管、シェルフライフ (訳注: Shelf life は可食期間、商品寿命などと訳されるが、わが国の食品表示基準に基づいて消費期限または賞味期限と表記する) の延長、常温での保管延長、期限表示の必要を削除等]、適用変更 (variance) (訳注: 適用変更の定義は、本文書 50 頁の定義を参照されたい) の承認申請を、州や地方の規制当局または直接 FDA にデータを提出する。申請を裏付けるために試験機関データを提出する食品関連施設や製造業者は、試験が当該食品や懸念される病原菌に適切であり、必要な要素を試験に組み込んで、確実に有効な設計や結論を導くことのできるようにする必要がある。

FDA の Food Code の規定に対する適用変更には、変更や免除によって健康ハザードが生じず、HACCP (ハザード分析および重要管理点) プランを用いた適切な管理下で食品を取り扱っていることを示す必要もある。TCS の必要性が問われた食品の例には、味付けミートやチーズ、野菜のパイ (puff pastry) ; 非冷蔵のチュロス (揚げパン) の衣; 4 時間超常温におく低温殺菌プロセスチーズ (スライス) ; 非冷蔵の特定のチーズ等がある。試験機関のこうしたエビデンスに基づいて、適用変更の申請を評価する州や地方の規制当局者には、試験が適切にデザインされており、結論が有効かどうかを判断できる基準が必要である。

PHF または TCS 食品の定義は、2005 年の FDA の Food Code (117) の第 1 章「定義」において pH と A_w (水分活性) による相互作用表を含むよう修正され、TCS が必要かどうかの判断にハードルの概念の使用が可能となった。Institute of Food Technology (IFT: 食品技術者協会) は、2 つの相互作用表と意志決定の枠組みを作成し、報告書「潜在的にハザードがある食品の評価と定義」(53) (2001 年 12 月 31 日, IFT/FDA contract No. 223-98-2333, task order No. 4) において、それらを FDA に提供している。pH と A_w による相互作用表と意志決定の枠組みを使って、食品に TCS が不必要であることを示すのが不十分であれば、接種・チャレンジ試験により、さらに食品評価が必要になる可能性がある。

IFT 報告書 (53) とその FDA への推奨事項は、pH と A_w に基づいて TCS が必要かどうかを製造者が判断できない場合の食品評価をどう理解し、実施したらよいかについて、未回答の質問をいくらか残している。これを明確にする必要性が、Conference for Food Protection (食品保護会議) が実施した 2005 年の関係者調査において確認された (18)。

本委員会の回答

本文書の使用および限界

本文書の主要目的は、TCS に対する適用変更が Food Code 下で認められるかどうかを判断するのに必要なチャレンジ試験のガイドラインを提供することである。次に、本文書が示すガイドラインは、商取引に導入する前の各種食品の安全性を評価するため、病原菌の抑制や不活化試験を実施する試験機関にとって有用と思われる。適切な規制当局と共に提案している試験をレビューし、デザインや方法を適切にすることは有用であろう。試験

は、専門の食品微生物学者の監督および解釈の下で実施すること（表 1）。これらの試験の限界の 1 つは、統計的な有効性と実用性とのバランスである。チャレンジ試験ではある程度のばらつきが予想されるが、それが結果の有効性と解釈に影響する可能性がある。しかし、資源の制約により、ばらつきは通常、最悪の事態を想定して取り扱い、保守的な結果を提供する必要がある。本文書は様々な出典を網羅しているが、チャレンジ試験を実施する者は、最新の метод論や、新たな病原菌、考慮の必要な規制要件、関連する統計学的問題を確認するよう、意識しなければならない。本文書は、公衆衛生に関して特定の勧告を行うものではない。

チャレンジ試験の種類

食品安全の工程手順や食品の保管条件、消費期限または賞味期限を検証するチャレンジ試験は数種類ある。食品品質に着目する賞味期限試験は、通常は食品安全とは関係ないことから、本文書では取り扱っていない。だが、食品安全関連のチャレンジ試験における多くの原則は、賞味期限試験に当てはまる。食品安全関連のチャレンジ試験は、病原菌の増殖抑制試験なのか、あるいは病原菌の不活化試験なのか、それともこの 2 つを組み合わせたコンビネーション試験なのか等、その試験の目的で異なれば、食品の種類や生産工程、食品のハザード分析によっても異なってくる。

食品安全関連のチャレンジ試験には、次のものがある。

1) 病原菌の増殖抑制試験

増殖抑制試験は、特定の工程や包装を施した特定の食品組成が、特定の保管条件下（時間や温度）におかれたとき、ある種の病原菌の増殖を抑制するかどうかを評価するのに用いる。

表 1. 微生物試験のデザイン、実施、評価に必要な専門性の最低推奨条件^a

カテゴリー	デザイン	実施 ^b	評価
知識およびスキル	食品および各種食品において遭遇する可能性のある病原菌に関する知識。食品、食品中の微生物挙動に影響する要因、微生物学の量的側面に関する基本的な微生物生態学の知識。工程条件およびパラメータに関する知識。試験の統計デザインに関する知識 ^c 。	基本微生物学的技術に関する知識。階段希釈する、またはバイオセーフティーレベル 2 で作業する (114) ための、無菌技術を使った作業能力。	食品および各種食品において遭遇する可能性のある病原菌に関する知識。食品、食品中の微生物挙動に影響する要因、微生物学の量的側面に関する基本的な微生物生態学の知識。統計解析に関する知識 ^c 。
教育および研修	食品科学、食品微生物学または関連分野における博士号、もしくは同等の教育や経験の組み合わせ。	食品科学、食品微生物学または関連分野における理学士号、もしくは同等の教育および経験の組み合わせ。食品微生物学における適切	食品科学、食品微生物学または関連分野における博士号、もしくは同等の教育や経験の組み合わせ。

		な現場経験も推奨される。	
経験	チャレンジ試験実施経験が独立的に2年ある、および専門の食品微生物学者の指導の下でチャレンジ試験のデザイン経験。	チャレンジ試験実施経験が2年あることは有用だが、専門の食品微生物学者による直接監視があれば代わりになる。	チャレンジ試験実施経験が独立的に2年ある、および専門の食品微生物学者の指導の下でチャレンジ試験の評価経験。
能力	文献検索実施能力、試験プロトコール作成能力。	試験プロトコール解読および実行能力、安全かつ無菌的に微生物学的技術を実施する能力。	微生物学データの分析および解釈能力。

^a 適用変更の申請を支持する接種試験で示される州や地方の規制当局の食品プログラムには、試験の有効性を確認するための職員に、専門の食品微生物学者がいないかもしれない。そうしたプログラムに利用できるオプションには、州や地方の食品試験機関の専門の食品微生物学者に相談する、または地域の小売業の食品専門家を通じて FDA の食品微生物学者の支援を要請することなどがある。

^b 専門の食品微生物学者の監督下で独立して業務を行う。

^c 生物学系に適用できる経験を持つ専門の統計学者に相談するのが適切と思われる。

2) 病原菌の不活化試験

不活化試験は、特定の工程や包装を施した特定の食品組成、特定の食品製造実践、またはこれらを組み合わせることによって、ある種の病原菌が不活化するかどうかを評価するのに用いる。食品の保管や包装条件に影響されることもあるため、これらの変動も考慮する必要がある。

3) 増殖と不活化のコンビネーション試験

コンビネーション試験は、特定の食品または工程が、ある種の病原菌を不活化させ、別のある種の病原菌の増殖を抑制するかどうか、もしくは、ある程度の不活化を達成した後、工程後に混入した生存菌や汚染菌の増殖を抑制するかどうかを評価するのに用いることがある。

4) チャレンジ試験が必要かどうかの判断

チャレンジ試験の必要性を判断する最初のステップは、食品と工程を書き出し、ハザード分析を実施して重要な微生物ハザードを判断し、当該食品におけるこうした微生物ハザードの増殖や不活化について知られているものを評価することである (80)。考えられる汚染経路、食品が増殖を助長する可能性に影響する内因子 (A_w や pH 等)、懸念される病原菌を死滅させる加工技術の使用、食品の安全な使用に関する過去の記録などを検討する必要がある (53, 80)。2000 年、FDA は IFT に、科学有識者パネルを結成して、安全性のために食品が要冷蔵かどうかを判断する問題の検討を要請した。本パネルは責任に取り組む中で、こうした食品を TCS 食品と定義し、安全性のために時間と温度管理が必要かどうかを判断する枠組みを定めた。この枠組みには、 A_w と pH 値の組み合わせを見る 2 つの表 (1 つは芽胞の制御、もう 1 つは芽胞および栄養細胞の制御) が含められ、微生物チャ

レンジ試験等の食品評価が必要な場合を示唆している (53).

この考え方は、その後 2005 年の FDA モデルである Food Code (117) において、食品に冷蔵や何か他の形で時間と温度管理が必要な場合の定義の基礎として採用された。これらの A_w と pH の組み合わせは、個々の病原菌に限定されたものではないため、懸念される病原菌が確立している特定の食品では、他の pH と A_w の値が冷蔵の必要を定義することもある。各種病原菌の増殖管理に関連するパラメータの情報は、国際食品微生物規格委員会 (International Commission on Microbiological Specifications for Foods : ICMSF) 発行の『食品中の微生物 : 5. 微生物の病原菌の特徴 (Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens)』(54) などの文献より探すことができる。

食品中の要因が、病原菌の増殖管理できる周知のパラメータと一致していれば、微生物チャレンジ試験は不要である (91)。例えば、pH 3.5 の食品に、サルモネラの増殖を助長しているかどうかを評価する必要はないだろう。サルモネラはこれくらいの低 pH では増殖しない。しかし、この pH でサルモネラが生きているか、または経時的に不活化されるかどうかを判断する試験は、環境によっては正当化されることもある。専門の食品微生物学者や技術者により、チャレンジ試験の必要性を評価することが重要である (表 1)。

pH, A_w , その組み合わせ等の特性から病原菌の管理が保証されないのであれば、食品中の病原菌の増殖可否の評価にチャレンジ試験が必要と思われる。pH と A_w を使った病原菌の増殖管理に関する詳細は、『食品の微生物学試験に関する方法の摘要 (Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods)』(90) を参照されたい。IFT および Food Code の表中でチャレンジ試験の是非を判断することは、食品評価とされている (53, 117)。

乳酸塩や二酢酸塩等の保存料を添加するなど、pH と A_w 以外の要素やそれらに加えたものにより、増殖が抑制される場合、文献から病原菌や食品に関連した情報が得られることもある。しかし、データが特定の食品や使用条件に確実に当てはまる必要がある。抗菌剤の有効性は、食品組成次第で異なる可能性がある。例えば、脂質量のような要素は抗菌剤 (ナイシン [36, 58] やソルビン酸 [82, 98] 等) の有効性を低下させるが、低 pH は、抗菌剤 (ソルビン酸や安息香酸 [39] 等) の活性を増強することがある。こうした評価は、抗菌剤の特徴や作用機序に精通した専門の微生物学者や食品技術者が行うべきである。

個々の食品全てに微生物チャレンジ試験が必要と考えるのは合理的ではない。表が食品評価の必要性を示唆する食品でも、その多くがこれまで安全に使用されている。しかし、これまでの食品安全が該当するのは、条件が全て同じままであった場合のみである。明らかにわずかな変更しか食品や工程、包装方法にしていなくても、食品の安全に大きな影響を及ぼし得る。さらには、病原菌の生態学や生理学、遺伝子構造に変化があれば、これまで問題なかった食品でも、安全性の問題につながることもある (31, 73, 84)。

諮問に対する回答

本委員会は、支援を受けている連邦政府機関より、6つの質問に回答するよう求められた。以下に回答を順に示す。

1. 食品に TCS が必要かどうかを判断するための接種・チャレンジ試験で、検討しなければならない適切な基準は何か？例えば、病原菌種・株の選択、サロゲート微生物の使用、病原菌株の数、接種量、培養温度、培養時間・試験期間、食品の物理的特性、等。

チャレンジ試験をデザインする際に検討すべき一般的要素

標準化する方法は、様々な試験間の結果を比較するのに有用だが、幅広い食品種、果実や野菜といった1つのカテゴリーにさえも広範に適用できる1つのプロトコールを作成するのは不可能である(12)。微生物チャレンジ試験をデザインする際に検討すべきパラメータの概要を以下に記載する(12, 53, 80, 91, 122)。

- 1.0. 専門家の助言取得および試験機関の特定
- 2.0. 試験の種類
 - 2.1. 増殖抑制試験
 - 2.2. 不活化試験
 - 2.3. コンビネーション試験
- 3.0. 被験食品に関連する要素
 - 3.1. 食品の準備
 - 3.2. 食品の変化し易さ
 - 3.3. 競合細菌叢
- 4.0. 標的微生物
 - 4.1. 懸念される病原菌の同定
 - 4.2. サロゲート(代用)微生物の使用
 - 4.3. 菌株の種類と数
- 5.0. 接種量
 - 5.1. 増殖試験
 - 5.2. 不活化試験
- 6.0. 接種材料の調製
- 7.0. 接種方法
- 8.0. 保管条件
 - 8.1. 包装
 - 8.2. 保管と輸送
- 9.0. サンプルに関する考慮事項
 - 9.1. サンプル採取
 - 9.2. 標的病原菌または毒性のサンプル分析
 - 9.3. 常在細菌叢の計測
 - 9.4. 物理学的パラメータの決定
- 10.0. 試験期間およびサンプル採取の間隔
- 11.0. 試験結果の解釈
- 12.0. 報告書に含める要素

1.0. 専門家の助言取得および試験機関の特定

チャレンジ試験は、専門の食品微生物学者がデザインし、評価する必要がある。この専門家の助言は、試験機関の職員に属するものでも、そうでなくてもよい。そうでない場合は、試験機関で共に業務を行い、適切な試験を実施することのできる助言者を選択することが重要である。助言の源として考えられるものには、社内の専門家、大学の教職員、試験機関、独立コンサルタントなどがある。試験デザインが決まれば、生物学系のふさわしい経験を持つ統計学者に相談し、規制当局や当該試験の受取人にデザインをレビューしてもらうことが適切であろう。

その後、修正が提案されれば、試験実施前に組み込むことが可能である。

試験機関の選択には、注意深い検討が必要である。試験機関が全て、チャレンジ試験をデザインする専門知識や、規制当局や他の審査機関が認めてくれる有効な結果を生み出すのに必要な品質管理手順を有しているわけではない。試験機関は、例えば水および廃水の検査、ISO/IEC 17025、グレード A の乳製品検査など、様々な組織や州・連邦政府機関から認定・認証を受けることがあるが、こうした認証があっても、微生物チャレンジ試験のデザインや実施資格が試験機関にあることを必ずしも意味するわけではない。チャレンジ試験に選定された試験機関は、チャレンジ試験を実施した過去の経験を示す必要がある。チャレンジ試験に必要な種類の分析を実施するのに、職員が経験豊かで資格を有しており（表 1）、これらの職員が広く受け入れられている GLP（適正試験所規範；good laboratory practices）に従うよう保証する必要がある。微生物チャレンジ試験を実施する試験機関は、目的の用途に対して妥当性確認された試験方法を使用すべきである。一般に受け入れられている方法例の幾つかが、付録 A にリストされている参考文献の最新版において利用可能である。認められている方法が利用できない、または適用できない場合、試験機関は、査読済み専門誌で言及されているような、他に広く受け入れられている方法の使用を検討できるだろう。試験を適切にデザインできず、有効な方法や適した管理を使用しなければ、そのチャレンジ試験は受け入れられず、余分な時間やリソースが必要になり、試験を繰り返すことになるだろう。試験機関選考の参考に、付録 B の質問を参照されたい。

表 2. 食品 pH と A_w ^b の相互作用に基づき、増殖試験で懸念される病原菌^a

A_w	pH					
	<3.9	3.9~<4.2	4.2-4.6	>4.6-5.0	>5.0-5.4	>5.4
<0.88	NG ^c	NG	NG	NG	NG	NG
0.88-0.90	NG	NG	NG	NG	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
>0.90-0.92	NG	NG	NG	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>S. aureus</i>
>0.92-0.94	NG	NG	<i>L. monocytogenes</i> <i>Salmonella</i>	<i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>Salmonella</i> <i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i> <i>C. botulinum</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>Salmonella</i> <i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i> <i>C. botulinum</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>Salmonella</i> <i>S. aureus</i>
>0.94-0.96	NG	NG	<i>L. monocytogenes</i> Pathogenic <i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> <i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i> <i>C. botulinum</i> <i>L. monocytogenes</i> Pathogenic <i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> <i>S. aureus</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>B. cereus</i> <i>C. botulinum</i> <i>L. monocytogenes</i> Pathogenic <i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> <i>S. aureus</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	<i>B. cereus</i> <i>C. botulinum</i> <i>C. perfringens</i> <i>L. monocytogenes</i> Pathogenic <i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> <i>S. aureus</i> <i>V. parahaemolyticus</i>
>0.96	NG	<i>Salmonella</i>	Pathogenic <i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> <i>S. aureus</i> 訳注： <i>L. monocytogenes</i> の 記載漏れと思われる。	<i>B. cereus</i> <i>C. botulinum</i> <i>L. monocytogenes</i> Pathogenic <i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> <i>S. aureus</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	<i>B. cereus</i> <i>C. botulinum</i> <i>L. monocytogenes</i> Pathogenic <i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> <i>S. aureus</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i>	<i>B. cereus</i> <i>C. botulinum</i> <i>C. perfringens</i> <i>L. monocytogenes</i> Pathogenic <i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> <i>S. aureus</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i>

^a カンピロバクター属、赤痢菌、エルシニア・エンテロコリチカは、一覧にある病原菌を対処している際は通常管理されているため、ここでは登場しない。

^b データは、PMP (106), ComBase predictor (50), ComBase データベース (49), または査読済み発表論文 (11, 17, 45) に基づく。

^c NG: 増殖なし。病原菌増殖はないと予想されるが、組成または工程による不活化試験がまだ必要なこともある。

2.0. 試験の種類

チャレンジ試験は様々な理由で実施される。試験の特定の目的により、下記に示すように、菌株の選択や接種量、検査パラメータの選択、分析の種類、試験期間などが定まる。例えば、増殖抑制を評価する試験であれば、表 2 に示す菌種の検討が必要だが、一方、死滅や生存評価で種を選択するには、耐性株の選択によって異なり、これは、工程や技術ばかりでなく、特定の食品に対する規制 (FDA, 米国農務省食品安全検査局 [USDA-FSIS], 低温殺菌牛乳令に基づく州法等) へのコンプライアンスも関係してくる。

2.1. 増殖抑制試験

増殖試験の目的は、TCS または Food Code, 低温殺菌牛乳令で定める除外 (適用変更) の申請, あるいは FDA, USDA-FSIS, 国, 州, 地方の規制等, 他の要求事項によることと思われる。その他の目的には、通常の冷蔵または常温下で延長した消費期限内における現行の組成の安全性を示すこと、食品が温度変化を受ける場合、組成や工程の変更が必要かどうかを判断すること、変更した組成や工程、包装技術の影響を判断することなどが考えられる。

2.2. 不活化試験

不活化試験は、規制や政府方針が定義するように、加熱処理によって標的病原菌の対数が十分低減するかどうかを判断するのに用いられると考えられる (発酵ドライソーセージにおける大腸菌 O157:H7 の FSIS 要件は、5 ログの低減等) (110)。不活化試験はまた、非加熱技術や、または pH, A_w , 保存料, 食品提供前に特定温度で特定時間放置することを組み合わせることで、食品を安全にするだけ十分に死滅するかどうかの判断にも用いることがある (生乳のパルメザンチーズは 2 年間熟成, マヨネーズは 3 日間室温放置でサルモネラを不活化, 等)。

2.3. コンビネーション試験

その他の試験は、保管延長期間の微生物数の変化を評価または不活化を検証する、その両方に関わっており、上記の両試験のコンセプトを併せ持つ。例えば、FSIS 規制の Alternative 1: リステリア・モノサイトゲネスの管理 (control of *Listeria monocytogenes*) (9 CFR 430 [米国連邦規則第 9 条 430]) (113) に分類される製品ラインを取り扱いたい加工肉製造業者は、試験を受けて、高圧処理 (HPP) 後に、冷蔵保管の延長期間内の食品組成により増殖抑制をして、非加熱の RTE 食肉のリステリア・モノサイトゲネスに対する 2 ログの死滅後の除去工程を示すものと考えられる。低温充填する pH 3.5 のホットソース生産者は、20°C (68°F) で 3 日間おく際、酸耐性のサルモネラが 5 ログ死滅することや、1 年間の常温保管期間中、病原菌が回復または増殖しないことを示したいと考えられる。

3.0. 被験食品に関連する要素

3.1. 食品の準備

食品は、目的とする使用条件や予想される食品の変化のし易さに基づいて、増殖や生存を最も助長する条件下で準備する。準備する食品の物性 (pH, A_w 等) やこれらの特性がチャレンジ試験や不活化試験の結果に与え得る影響を考慮すべきである。重要な物性値は、完成品を目的とした適切な管理の上限または下限にあるよう、食品を準備する (下記 3.2

項「食品の変化し易さ」を参照)。

複数コンポーネントから成る食品では、水分、 A_w 、pHを平衡化するのに時間がかかることがある。そうした食品は通常、平衡化前に、最も増殖を助長すると考えられる場所(そこが汚染される可能性がかなり高いという前提)に接種する。一般的には、粒子が大きいと平衡化にも時間がかかる。再汚染による病原菌の増殖、不活化、生存を判断する試験は、平衡化後に接種する。

3.2.食品の変化し易さ

チャレンジ試験の適切な試験パラメータを判断するには、製造や生産の変動性という知識が必要である。pH、 A_w 等の組成要素を測定して、ロット内およびロット間の変動を判断すべきである。変動が大きいほど、食品サンプルをたくさん評価する必要、つまり、上限・下限の管理限界を判断するのに、たくさん測定する必要がある。チャレンジ試験でpH等の属性を選択する場合、その選択したpHは、測定や製造能力に不確かさがあっても、次いで製造されるその食品のpH仕様範囲の上限となる。

試験に使う食品は、実際の商業生産施設(製造施設や、食品サービスの厨房、販売所)から入手したもの、または試験的食品加工施設を持つ試験機関で製造されたものをできる限り使う。試験的施設で製造された食品は、実際の商業運転(調理温度や時間、均質化、高温充填、スライス等)で使う条件を模倣して加工する。チャレンジ試験に用いる食品ロットは、通常生産を代表したものにし、酸性度、水分、塩分、 A_w 等に必要な調整をせず、各組成の管理限界(control limit)で、病原菌の増殖や生存に最も適した条件を作り出すべきである(製造の可変性の知識に基づく最悪のシナリオ)。加工肉やチーズ、スモークシーフードなど数種の食品では、生産者が塩分や水分の割合を測定し、管理するのが A_w より容易なので、チャレンジ試験の管理パラメータに用いることがある。

水分または A_w の目標限界値は、試験の目的が不活化の検証なのか、増殖抑制の検証なのかによって変わってくる。加熱不活化試験では、病原菌の熱耐性が高まる可能性があるため(10, 24, 25, 38, 102)、低めの水分または A_w 値を使用する。同様に、溶質濃度が高いと、リステリア・モノサイトゲネスは高静水圧から保護されることが示されている(43, 63)。逆に、増殖チャレンジ試験では、水分または A_w の上限を目標とするのが適切である。例えば、一般的な水分の範囲が56~58%とすれば、加熱不活化試験は56%以下の水分で実施し、増殖チャレンジ試験は58%以上の水分で実施する。

管理要素の1つがpHの場合は、食品組成が許す限りの最低の酸性度に調製する。そうすれば、pHは上限範囲に収まり、試験機関で調整が不要になる。目標pHは4.8だが、複数の製造バッチに観察されたpHが最大5.0であれば、5.0以上のpHで増殖抑制または不活化試験を実施すべきである。pHの調整が必要で、水酸化ナトリウムを使ってpHを上げる場合、調整前に滴定酸度を測定し報告すれば、調整後の食品のpHと比較できる。

食品のpHを下げる必要があれば、食品を占める酸と同じものを使うことが重要である。

酸味料は、同じpHでも抗菌活性が異なる。例えば、酢酸は多くの微生物に対して最も阻害能が強く、次いで乳酸、クエン酸は最も弱い(2, 3, 28, 30, 83)。そのため、組成に酢酸(酢)を使う食品で実施したチャレンジ試験は、再組成にクエン酸(レモンジュース)を使った食品には、最終pHが同じだとしても、有効ではないと思われる。増殖や生存を最も助長する組成を試験すれば、場合によっては、同じような一般分析や酸性度、 A_w を持つ複数の組成には、チャレンジ試験の回数を減らすことができる。