

### 3.3. 競合細菌叢

特に食品中の病原菌増殖を判断するようなチャレンジ試験の結果には、競合細菌叢が影響する可能性がある。接種食品には、試験中、病原菌の一貫した増殖に干渉する可能性がある通常量の競合細菌叢（スターターカルチャー等）を含め、できる限り最も新鮮、つまり消費期限または賞味期限の最初の10%以内の食品を用いること。例えば、消費期限または賞味期限が1ヵ月未満であれば、製造後1~3日以内の食品を用いる（本文書のシェルフライフ [shelf life] は、指定温度で保管し、消費してもよいとみなされる品質の期間と定義。この評価には、化学変化や腐敗微生物の増殖に基づき、許容できる風味や外観、官能性などが含まれるが、必ずしも各国が受け入れている定義の食品安全を意味するものではない）。接種時に、病原菌の増殖を抑制するような異なるタイプの腐敗微生物が混入しないよう注意する。稀に、自然発生した細菌が病原菌の増殖や生存を高め、食品安全を低下させることがある（19）。

## 4.0. 標的微生物

### 4.1. 懸念される病原菌の同定

専門の食品微生物学者は、チャレンジ試験に使用する適切な微生物を判断すべきである。微生物学者が考慮すべき問題はいくつかある（特定の食品、その準備に用いる工程、疫学的または生態学的に関連する病原菌、等）。指定の食品に適切な病原菌を判断するために利用できるリソースがいくつかある。特定の食品に適切な標的微生物を評価した例は、IFT報告書の『潜在的にハザードがある食品の評価と定義』（53）で見つけることができるが（特に、IFT報告書の表1、表A、表B、表4-1、表6-1を参照）、簡単に確認したい場合は、付録Cを参照されたい。

表2に、モデル予測と発表文献から、懸念される病原菌の増殖を助長と思われるpHと $A_w$ 値の組み合わせを示す。この表は、組成による増殖や不活化を評価する試験で用いる微生物の選択に有用であろう。pHと $A_w$ の組み合わせの中には、多くの病原菌がリストされているものもあるが、疫学的な理由や食品特性から、適切な被験微生物の選択の幅は狭まるであろうから、特定の食品において病原菌をそれぞれ評価する必要はないと思われる。例えば、水産食品では、疫学的に考えてビブリオかサルモネラを試験に使うであろうし、病原性の栄養細胞が除去されている低温殺菌食品では、病原性の芽胞形成菌を試験に使うと思われる。試験をデザインが、非加熱のRTE食品におけるリステリア・モノサイトゲネスによる再汚染が原因による増殖や不活化を判断することであれば、この細菌を用いるかもしれない。

食品組成による不活化を判断するチャレンジ試験に用いる微生物は、殺菌特性に対する病原菌の耐性を考えて選ぶ必要があるだろう。例えば、pH4.3で $A_w$ 0.98の食品は、通常は酸耐性が強いと考えるため、サルモネラや黄色ブドウ球菌よりも腸管出血性大腸菌が選ばれる。

食品組成における病原菌の増殖を判断する試験では、存在する可能性が高くて最も増殖が速い病原菌を用いるのが理想である。試験条件下で、どの病原菌が最も増殖が速いかの判断には、予測モデルが有用であろう。例えば、所定のpHと $A_w$ の組み合わせでは、サルモネラの増殖が速いと予測モデルが示せば、チャレンジ試験に使用の食品に懸念される微生物の中では、この菌がベストチョイスと考えられる。

表2は、Food Code（付録D参照）とIFT報告書（53）にある表Bと似ているが、全く同じではないため、幾分説明が必要である。まず、表2は表Bに比べて広範である（高いpH値は、より高い値とより低い値の両方が含まれており、 $A_w$ 値も、高値のカテゴリー

がより洗練されている)。次に、IFT 報告書 (53) と Food Code (117) は、安全性を考え、特に温度管理が必要な食品にフォーカスしているが、この表 2 の対象はもっと広い。最後に、表 2 は、一般に小売食品の安全性において懸念されているよりもかなり長めの時間的尺度を考慮している。この表から「特定の pH と  $A_w$  の範囲内に入る食品には、病原菌によるチャレンジ試験が必要であることが示唆される」(例えば「 $A_w$  が高く、pH が 3.9 の食品は、サルモネラによる試験を行う必要がある」と解釈してはならない。サルモネラは pH 3.9 程の低さでも増殖することが示されているが、そうした試験は、pH 値以外に増殖に適した条件下の実験培地で行われている。食品における病原菌増殖の助長や抑制には、多くの要素が交絡している。微生物学専門家は、表 2 をガイドラインとして用いて、特定の病原菌を使った特定食品のチャレンジ試験が正当なものかどうかを評価すべきである。

表 2 は、特定の pH と  $A_w$  の組み合わせに合致する、懸念の病原菌の同定には有用だが、工程を用いる不活化試験(加熱による不活化等)での微生物の選択には、通常用いてはならない。この種の試験での微生物は、病原菌と特定の食品との関連性や、不活化に対する病原菌の耐性、公衆衛生上での当該工程の目的や、食品の使用目的などを考えて選択すべきである(訳注:表 2 の  $A_w$  が 0.96 超で pH が 4.2-4.6 のセルにリステリア・モノサイトゲネスの記載がないが、誤植(記載漏れ)と推察される)。

例えば、冷蔵食品の中には、タンパク非分解性株のボツリヌス菌が適切な被験微生物として選ばれるものもあれば、リステリア・モノサイトゲネスが選ばれる冷蔵食品もある。これは、タンパク非分解性ボツリヌス菌である可能性の高さや、食品が冷蔵されている時間、RTE 食品か、食べる前に調理されるか、といった要素による。

#### 4.2. サロゲート(代用)微生物の使用

食品への病原菌接種は、十分な生物学的封じ込め施設が必要であり、ボツリヌス菌などの特定の病原菌では、政府の承認が必要なこともある。そのため、限られたケースではあるが、病原菌が導入されてしまうと、受け入れ難いリスクが生じてしまうような工場の特殊な加工装置の試験に、非病原性のサロゲート微生物が特に有用である。サロゲートを使って試験パラメータを選択してから、病原菌による完全試験を実施するのも有用である。工場内のチャレンジ試験にサロゲートを使う場合、これらの微生物が生き残って施設の環境を汚染すれば、衛生上または規制上有害な影響を与えることもあるので、注意されたい。

サロゲートは一般的に非病原性で、懸念される病原菌の代理となり、試験状況下での生存能は類似か、さらに強い。そうした代理には、必要に応じて病原菌の無毒株が含まれることもある。理想的なサロゲートの特徴は次の通りである:非病原性、不活化特性や動態が標的病原菌のものを予測するのに使用できる、損傷に対する感受性が類似、増殖が再現可能、高密度の菌液の調製が簡単で、使用するまで安定している、計測や区別が簡単、吸光度が類似、遺伝学的に安定している(52)。

クロストリジウム・スポロゲネス (*C. sporogenes*) PA3679 は、低酸性度の缶詰食品の加熱工程を検証するための接種試験に用いる場合、ボツリヌス菌の優れたサロゲートであることが証明されている。培養的に似ていることから、クロストリジウム・スポロゲネスが、ボツリヌス菌を用いて組成を検証する回数を減らすのに適していることがある。クロストリジウム・スポロゲネスの増殖を促す組成は、ボツリヌス菌を用いたさらなる検証試験を省けるが、食品がボツリヌス毒素産生を抑制するかどうか検証するための直接の代用に、クロストリジウム・スポロゲネスは使えない(64)。この他、サロゲートと病原菌のペアの例には、リステリア・イノキュア (*L. innocua*) とリステリア・モノサイトゲネス(99)、非病原性大腸菌と大腸菌 O157:H7(26) などがある。

ある工程では、目的の反応を予測するのに十分作用するサロゲートでも、工程が異なると、サロゲートとして適当ではないこともある。例えば、熱耐性のボツリヌス菌株の芽胞でも、高静水圧に対する耐性とは相関していないものが各種あり(71)、クロストリジウム・スポロゲネスは、缶詰工程ではボツリヌス菌の代理として適したサロゲートかもしれないが、高静水圧試験では、バチルス・アミロリケファシエンス(*B. amyloliquefaciens*)などの別の微生物が、ボツリヌス菌のサロゲートとして適切なこともある(71, 86)。

サロゲートの選択は正当化する必要があるため、病原菌や食品、評価すべき処置に対する当該サロゲートの適正使用について、裏付け文書を最終報告書に組み込むべきである。直接関連する発表済みの比較データが利用できなければ、「特定のサロゲートと病原菌と工程」といった組み合わせを用いることの有効性を確立するために、試験を実施する必要がある。

#### 4.3. 菌株の種類と数

増殖や生存の菌株間における変動を説明するため、通常、3~5株の菌株を個別、または併せて用いたチャレンジ試験を実施する(53, 75, 91)。株間でかなりのばらつきが見られる、または特定の食品における微生物の増殖についてほとんど知られていない場合、10株ほど使うこともある(数種類のボツリヌス菌やリステリア・モノサイトゲネスの試験等)。

一般的には、所定の病原菌の複数株(つまりカクテル)から成る接種材料を用いるのが好ましい。微生物間のばらつきを網羅できるし、必要な試験の回数を減らすことができるためである。選択した菌株は、試験で使用する前に、バクテリオシンの産生や他の抗菌要素(53)が原因となり得る拮抗作用のスクリーニングを行う。他に、試験に供する食品マトリックスの数株をスクリーニングし、どの株の耐性が最も強く、どれが最も速く増殖するかなどを判断してから、1つの菌株を用いてチャレンジ試験を実施する方法もある(12, 91)。パラメータのスクリーニングは、チャレンジ試験の目的、つまり、食品の不活化特性を判断するのか、増殖特性を判断するのかによって異なるが、湿熱耐性が非常に高いサルモネラ・センフトンベルグ(*S. Senftenberg*) 775Wのような、特殊な耐性を持つ菌株もある(79)。こうした菌株の使用は、適用される食品に存在することが合理的に予測される代表株ではないことから、試験によっては不適切と思われる。個々の菌株を用いるか、カクテルした菌株を用いるかは、食品微生物学や病原菌管理の知識豊富な専門の微生物学者が判断すること。

抗生物質耐性や緑色蛍光タンパク質などで標識した菌株は、回復した微生物が被験微生物であることを確認するのに有用と思われる。そうした株を使用する際は、チャレンジ試験に重要な要素の観点から、それらが標識していない親株と同じ特性を有していることを確認することが重要である。さらに、チャレンジ試験の間に遭遇するストレスの多い条件下で、耐性標識の保有が安定していることを検証する必要がある。

分離菌株は、被験食品にとって適切なものであるべきである(53, 80, 91)。これには、必要に応じて、食品の種類や食品加工環境、臨床検体から分離した菌株を使うことを含む。不活化試験では、加熱や高圧の工程など(16, 24, 25, 71)、被験食品の特定の工程に耐性を示す菌株を使う。生物化学特性や血清学、遺伝子プロファイル、病原性、毒性は、適宜、定期的に再確認する。増殖チャレンジ試験に用いる試験菌株は、温度や大気等の試験条件下で、実験培地や抑制物質のない類似食品においてはっきりとした増殖を示すべきである。

#### 5.0. 接種量

チャレンジ試験で用いる接種量は、試験目的が病原菌の増殖を判断するものなのか、不活化を判断するものなのかによって異なる。複数の接種量を用いてチャレンジ試験を実施し、工程・組成の安全性の幅を判断するのが望ましいと思われる (91)。

### 5.1. 増殖試験

病原菌が食品中で増殖するかどうかを判断する試験を行う場合、用いる微生物数は、食品中に通常予測される数を反映していることが理想である。一般的には、予測数を上回る場合でも 2~3 log CFU/g の接種量を用いる。この量であれば、直接プレーティングで数えることができる (53, 91)。低量での自然汚染を報告する文献があれば、もっと低い量にしてもよい。低量の方が、食品の増殖促進能をより正確に表すであろう (91)。播種密度が非常に低いもの (1 サンプル単位当たり 100 セル未満) が最適であれば、個々のサンプルに一貫した接種を行うのが難しいこともある。最初の接種懸濁液から食品中の微生物量を算出し、サンプルサイズ (25 から 250 g へ) や繰り返し数 (3 から 6 サンプルへ) を増やし、および/または最確数 (MPN) 法などの計測法を使用すれば、接種材料中の微生物数に確実さが増す。

接種量は、微生物の増殖を抑制するための抗菌成分や組成の組み合わせの明らかな有効性に影響すると思われる。接種密度が高すぎると、不適切な接種量によって増殖を抑制する要素が圧倒され、「この組成は増殖を抑制しない」という不正確な結論を導く (53, 80)。芽胞形成菌の場合、最初の芽胞負荷が高いと、発芽や増殖が観察可能になるまでの時間が著しく遅れる、または毒素の産生が著しく低減する (69, 126)。逆に、増殖試験で栄養細胞の接種量が高くても (5~7 log CFU/g)、定常期に近い集団を模倣して、明らかな増殖が見られなかったり、増殖しても少なかったりする場合がある。

### 5.2. 不活化試験

不活化試験を行う場合は、生存菌を定量化する、または不活化レベルが高いことを記載する必要から、通常は 6~7 log CFU/g (53, 91) といった多い量の微生物を使用する。目標低減量は、用いる接種量に影響し、特定の食品種の規制によって異なる。例えば、ジュースに適した病原菌は 5 ログの低減 (21 CFR 120.24) (120)、サルモネラを不活化させるためのアーモンド処理では 4 ログの低減 (7 CFR 981) (105)、食鳥肉中のサルモネラは 7 ログの低減 (9 CFR 381.150) (112) となる。規制対象食品の不活化試験を実施する試験機関は、最新の要件に気をつけるべきである。

不活化試験は、特定の工程がもたらす死滅を評価するのに実施する。例えば、紫外線でアップルサイダー中の大腸菌 O157:H7 を 5 ログ低減できるか、または、食品保管期間中の病原菌の不活化に対する保存料の影響といった病原菌の経時的な不活化を評価する。紫外線評価のような前者の場合は、上述のように、比較的高接種量を通常用いるが、保存料の評価のような後者の例では、予測される病原菌の汚染レベルと一致する低接種量を用いるかもしれない。なぜならば、保存料は通常は大量の病原菌を不活化させることを想定しておらず、pH や他の条件に依存するからである。試験はまた、再汚染されている食品中の病原菌の生存や不活化を判断するにも重要かもしれない。

食品の中には、最初の接種量が大量死滅に影響することもあるため (32, 95, 125)、これを考慮に入れておく必要がある。

### 6.0. 接種材料の調製

食品から分離した菌株は、生存や増殖、耐性等の点で特性を保つよう保存するのが理想

である（グリセロールで冷凍，フリーズドライ等）。凍結または凍結乾燥状態から分離菌株を元に戻す際、非選択増殖培地に 1~2 株継代する。冷蔵スラント等の試験用培養株を作製し、一定期間（例、7~30 日）使用してもよい。培養株を継いで新たな試験用保存培養株を作製する回数は、微生物の表現型特性に影響する遺伝子変化を避けるため、最小限にすること（91）。AOAC インターナショナルの試験室ガイドライン（8）は、初代基準試料からの継代は 5 代までにすべきと示唆している。微生物はプラスミド等の染色体外要素や他の遺伝子マーカーやファージを失いやすいので、もっと少ない継代数が適切とするものもある。

栄養細胞によるチャレンジ試験では、特定の試験用培養株の最適な増殖に適した条件下の非選択培地で増殖した定常期細胞（18~24 時間）を通常は用いる（53）。しかし、食品の特定の特性に適切な特定条件に培養株の適用や、事前調製が望ましい場合もある。例えば、低 pH 食品は、酸適応の培養に適していることがあり（34, 46, 65, 66）、1% グルコース加トリプティックソイブロスで培養株を増殖できることが多い（14, 27）。7~8°C（44.6~46.4°F）で 7 日間低温適応することで、病原菌の誘導期を減らすことができ（121）、これは冷蔵の RTE 食品の消費期限の評価に重要と思われる。低温適応は、7 日未満といった消費期限の短い冷蔵食品のチャレンジ試験により重要である。低温と酸の同時適応（95）や加熱処置前の酸ストレス（87）等、細胞を有害環境により敏感にさせてしまう習慣化した手順は避けるよう、注意されたい。

不活化試験では、最適より高温で増える細胞は、最適温度で増える細胞より熱耐性を得やすいかもしれない（79, 96）。死滅寸前の温度に短時間さらされただけでも、熱耐性が増すことも観察される（ヒート・ショック）（15, 94, 123）。

不活化または増殖試験のいずれにしても、細胞の適応には、食品汚染時の微生物の考えられる生理学的状態を模倣してみるべきである。

細胞は、使用前に洗浄し（緩衝液または担体培地等で）、使用済み培地の栄養分や代謝物（被験食品における増殖に影響を与え得る）を除去する。その後、担体（緩衝液または均質化した一部の食品）に懸濁して、食品に接種する。

複合物には複数菌株が含まれるが、それぞれの株数は、ほぼ同数にする。同数にするには、特定の増殖条件下で菌株を計測する過去の経験の利用や、濁度測定（吸光度やマクファーンランド比濁法）を使い揃えることができる。

ボツリヌス菌、ウエルシュ菌、セレウス菌などの病原性の芽胞は、滅菌水で調製、洗浄、懸濁でき、できればマイナス 20°C（マイナス 4°F）以下で冷凍する。栄養細胞同様、複合物に含まれる各菌株数は、ほぼ同数にする。芽胞懸濁液は計測して芽胞数を数え、その後適量を併せて接種材料を調製する。

芽胞の接種材料は、加熱や加工前に速やかに食品に接種しないと、使用する前にヒート・ショックを受けることが多い。芽胞の接種材料にヒート・ショックを与えるかどうかの判断は、食品中に自然に発生する芽胞の予想される状態やその食品の使用条件によって異なる。例えば、加熱しない一次産品（低酸素包装の生魚等）にチャレンジ試験を実施するのであれば、芽胞にヒート・ショックは与えない。栄養細胞と芽胞を混合した物が試験に望ましい場合、懸濁液にヒート・ショックを与えてはならない。

用いる接種材料の生菌数を検証することは重要である。接種懸濁液そのものを計測するだけでなく、接種食品も計測して、0 時間の数値を得るべきである。低接種量であれば、接種材料や食品の複製数を増やす必要がある。食品に殺菌成分（消費期限または賞味期限の延長に使われるナイシンその他商業的発酵副産物等）が含まれていると、微生物密度に迅速かつ顕著な低減が観察されることが多い。例えば、フレッシュソフトチーズや、乳酸

菌発酵産物またはナイシン含有のボローニャソーセージやハム等にリステリア・モノサイトゲネスを接種すると、直後に0.5~2.5ログの低減が観察された(35, 37)。

低水分食品や加水を避ける必要のある試験では、乾燥接種材料が必要なことがある。接種材料は、フリーズドライ(53, 80)、または被験食品に類似の食品で乾燥させて(53)調製できる。脱水接種材料の調製には、微生物を安定させるのに数日から数ヵ月かかることがある(スキンミルクパウダーのサルモネラ等)(59)。したがって、安定化した乾燥接種材料の生菌密度は、使用前に判定すべきである。

## 7.0. 接種方法

チャレンジ試験の接種手順は、IFT 報告書に記載されている(53)。報告書が記すように、食品接種の際に考慮すべき重要事項には、食品の内因・外因特性を維持、製造や保管条件下で実際に発生することが考えられる汚染を想定、食品コンポーネントの接触面が独特な場合、各接触面の接種を行うようにする、などがある。

被験食品の内因特性を維持するのに重要な2点は、接種量を最小限にすること、およびpHや $A_w$ 等の食品の重要な要素を合致させることである。接種量は、通常は食品の1%以下とし、できる限り少なくする。接種量を最小限にするのに用いられる方法には、病原菌を高密度に増殖させてから、遠心分離で凝縮する方法や、固体増菌培地で病原菌を増殖させてから、接種材料として使うペーストを回収する方法などがある。被験食品の $A_w$ やpHが低ければ、食品に含まれるものに似た保水剤や酸味料を使って、希釈液の $A_w$ やpHを調整できる(53)。しかし、予備解析で、調整した緩衝液のpHや $A_w$ が病原菌の生存能に有害な影響を与えないことを立証すべきである。

重要な外因要素は、包装気相である(下記の8.1項「保管条件、包装」を参照)。まず食品に接種してから、量産で使われている包装システムを厳密に再現した適切な気相下で包装するのが理想である。代わりに、セルフシール型のゴムやシリコン製のセプタムのようなものを使い、針で包装物を刺して接種する方法がよく使われる。後者の接種方法を使うデメリットは、長期の包装の完全性を損なう点と、接種材料が分布してしまうという2点である。また、針で接種する際、培養株をできる限り広範に分布させ、限られたところに細胞や水分、栄養分が集中しないようにする必要がある。包装気相(上部の酸素や二酸化炭素等)は、試験期間中モニターして包装の完全性を評価し、ガス組成の変化の影響を必ず考慮すべきである。

通常、接種方法は、食品の製造や準備、輸送、陳列の間に発生すると考えられる潜在的な汚染が実際に想定される形で、接種材料は食品の上におくか、食品の中に入れる。液体の食品は、攪拌して食品全体に接種材料を混合することで接種する。固体の食品では、粉碎して接種材料をよく混ぜ合わせる、または表面全体や選択したスポットに浸漬、噴霧、広げて塗布できる。液体の接種材料に食品を浸漬する、または接種材料を噴霧するのは、食品の表面全体、割れ目や隙間などにも微生物を行き渡らせるが、噴霧する場合は、被験微生物から作業者を保護するため、安全キャビネット内で接種すべきである。

予備試験を実施して、食品に接触する接種量を標準化すべきである。

被験食品の多くには、複数のコンポーネントや層がある。組み立ての際に汚染が考えられる場合は、被験接種材料を様々な層やコンポーネントに塗布する。パイ生地とパイ詰め物の間の微小環境など、コンポーネント間の接触面には、独自の増殖条件が存在し得る。このような部分は、増殖を促す独自の要素が組み合わさっているかもしれないので、こうした部分にも接種材料の一部を適用する。このような理由から、食品を単に均質化して接種してはいけない。脂肪と水のエマルジョンや微小滴、分割といった、その他の微小環境

条件も考慮すべきである。

包装前の大バッチに接種する、または個々のサンプルに接種することは、考えられる汚染経路や包装の考慮事項、実用性次第で有効であり得る。1つの食品バッチに接種することは、食品の完全性を壊すことなく混合できれば、開始濃度のばらつきを最小限にし、病原菌が不均一に広がることを抑える。この問題は、増殖または不活化試験の文書化が義務付けられている規制要件（デリのサラダでは、リステリア・モノサイトゲネスの増加が1ログまでなら増殖を抑制した証拠、ジュース中の大腸菌 O157:H7 は5ログの低減が必要、等）を満たすために、特に重要である。各サンプル採取時点での試験用に、接種する大バッチを別々の部分に分ければ、大バッチからサンプル採取を繰り返すことが原因となる汚染リスクが減る。個々のサンプルに接種するのは、工程後の接触による汚染（調理済みのフランクフルト、低温殺菌牛乳で作ったチーズのスライス等）を代表する試験や、試験機関で製造を容易に再現できない場合（具を詰めたパイ、独自の気相や包装材料による個別包装等）により適していると思われる。接種量にかなりのばらつきがある、または分布が一様にならない接種方法だと、各サンプル採取時点で必要になるサンプル数が多くなり、分析に追加の複製バッチが必要になる可能性がある。

## 8.0. 保管条件

### 8.1. 包装

チャレンジ試験の食品包装は、一般的な市販の製造を代表するべきである。市販品が真空パック包装や調整気相 (MA) 包装されている場合、チャレンジ試験のサンプルは、同じ条件下 (MA 包装で使われているのと同じのガス混合物を使用、ガス透過性が同じ包装材料を使用、真空パック食品と同様の真空レベルを使用、等) で包装すべきである。特定の MA 包装や真空パックにより、抑制される微生物もいるかもしれないが、増殖や毒素産生が刺激される微生物もいるかもしれない (53)。チャレンジ試験に供するサンプルの包装内上部の空間やガス組成が、できる限り市販品と同じになるよう、注意されたい。

### 8.2. 保管と輸送

チャレンジ試験で使う保存温度は、市販での輸送や保管時に食品が曝される予想温度範囲を代表すべきである。冷蔵食品については、NACMCF は、米国消費者に予想される保管温度が説明できるように、7°C (44.6°F) での試験実施を推奨している (75)。冷蔵試験には、被験菌の挙動をより詳しく理解したい場合 (微生物の増殖抑制が温度依存的な抗菌化合物 [21, 91] を用いる等)、追加温度 (4~6°C [39.2~42.8°F], 10~12°C [50~53.6°F] 等) を組み入れることができる。

温度の変更は、例えば、製造業が冷蔵食品をその消費期限または賞味期限内に十分に管理された条件下で輸送した後、その食品を使用する直前または使用中に温度が上がるような場合、チャレンジ試験のプロトコールに組み入れることができる (53)。常温保存可能な食品の一般的な温度範囲は、予想される保管場所の温度によって、24~35°C (75.2~95°F) になる (21)。湿度も保管条件の要素として考慮すべきである。水分量が周囲の湿度条件に応じて変わる可能性がある食品は、代表的な環境湿度の変動を組み入れてチャレンジ試験をデザインする (80)。

試験期間を通して適切な保存スペースが利用でき、適温が維持、記録されるようにする。外で作られた食品が試験機関に到着するまでの保管および輸送中の温度はモニターする (連続温度記録計、データロガー、手動で温度を定期的に確認、等)。病原菌接種サンプルは、うっかり人が食べてしまわないよう、隔離してはっきりと表示する。

## 9.0. サンプルに関する考慮事項

### 9.1. サンプル採取

食品微生物試験のサンプル採取計画は、単に統計学的デザインに基づくものばかりでなく、慣例に左右されることが多い。以下の提案は、この慣例を反映したものである。最初と工程時の各時点および／または保管時に分析すべきサンプル数は最低2つだが、3サンプル以上で分析するのが望ましい。複製は、異なる食品バッチと接種材料を使って独立試行で行い、食品や接種材料、その他の要素における変動を説明する。可変性や不確実性が高い状況では、サンプル数や複製数を増やすのが一般的である。各時点の分析サンプル数が2つしかなければ、3回以上試験を繰り返した方がよい。各時点の被験サンプルが3つ以上あれば、複製は通常2つで十分である。ボツリヌス毒素のサンプルを分析する際、サンプル間で毒素産生にばらつきが考えられるため(74)、各時点のサンプル数は多く(5つ以上等)選ぶのが適切である。

最終的な死滅の判定では、各時点5~10サンプルが適切と思われる。他の試験による裏付けデータがあれば、繰り返す必要性は減るだろう(91)。統計学的デザインが適切であれば、試験の有効性を改善できる。試験の統計学的品質を評価するには、検出量分析等の定量的方法がある。試験デザインは、食品微生物学試験に精通した統計学者に相談することで、向上すると思われる。

サンプル調製方法は、食品や接種方法の種類や特性に基づいて選択する。調製方法は、食品や接種手順により異なる(53, 91)。表面に接種した固体の食品や、表面に汚染が局在することが予想される食品のサンプルは、スポンジ等で拭き取ったり、洗浄またはすすいだり、既知の量の液体の緩衝液や希釈液で攪拌してよい。よくかき混ぜた後、すすぎ液を適度に希釈し、適切な培地に直接塗抹して分析する(下記9.2項参照)。結果は、特に不規則な立体構造の項目については、単位表面積ごとまたはサンプルごとに表示できる。例えば、表面接種したフランクフルトソーセージは、丸々1本を希釈液で洗浄またはすすいで、リステリア・モノサイトゲネス検出用に調製する。結果は単位表面積ごと、または太さが均一の大きさであれば丸々1本で表示してもよい。

代わりに、表面サンプルを切り出し、希釈液で均質化し、結果を単位表面積ごとまたはグラムごとで表示できる。例えば、スポット接種した葉物野菜は、接種表面をその周囲よりさらに大きめに切り取ってサンプル採取し、均質化または浸軟させて菌を放出する。表面に接種したホールトマトやメロンのような食品は、滅菌コルク穿孔器を使ってサンプルを採取し、接種・処置した表面から規定部分を抽出することができる。

チャレンジ試験において複合サンプルの分析を検討する場合には注意すべきである。病原菌を計測するために複数サンプルを複合すると、別々だと存在するばらつきが検出できなくなるため、分析感度を下げることがある。さらに複合サンプルは、毒素が複数サンプルの中に1つにしかなかった場合には、その毒素を希釈して検出可能値未満にしてしまうこともある。しかし、増菌手順前の複合サンプルや手順後にプールしたサンプルは、不活化試験で生存菌がないことを確認するのに適切な場合もある。増菌後のプールは、オリジナルサンプルの陽性数を後で測定できるスクリーニング手順として用いることができる。複合またはプーリングの手法は、検証して、感度が失われていないことを確認する必要がある。

### 9.2. 標的病原菌または毒素のサンプル分析

微生物分析のサンプル調製の目的は、目的の微生物の芽胞や細胞(または必要に応じて、



毒素)の全てを回収することである。サンプルの調製は、代謝活性により活性を示唆する検出可能なコロニーや他の測定結果を導き、生存や増殖レベルを測定できる条件を提供する必要がある。増殖性の病原菌や芽胞では、バターフィールドリン酸緩衝液や緩衝ペプトン水の最初の希釈は1:10を使うのが一般的であるが、食品の塩分や糖分が高ければ、希釈緩衝液を調整して、細胞にショックを与えないことが必要と思われる。直接プレーティングによる生存菌レベルが検出限界を下回ると予想、またはそう判断した時点で、標的病原菌の増菌手順を検討する。計測の必要がなければ、検証済みの迅速検出法(付録Aを参照)が適している。

サンプル分析は、微生物が正確で再現性のあるよう回復できる方法を使って行う必要がある。全例において使用する緩衝液や希釈液の量を定義し、サンプル間で一定にするが、この量は、サンプルサイズや予想される汚染レベル、望まれる最小検出レベルに基づいて選ぶ。サンプル調製のプロトコールおよび洗浄、すすぎ、または混合の時間は一貫させ、サンプル処理から塗抹までの時間は短時間にし、全サンプル一定にする。サンプルの調製温度や時間、サンプル調製に関する条件や変数は、できるだけ変わらないように維持する。これらの変数には、体積または重量、表面積、組成、特性(pH等)がある(12)。

増殖試験では、病原菌を適切な選択寒天培地上で計測すること(付録Aを参照)。不活化試験では、細胞は損傷に至ると思われるので、これらの損傷細胞を選択寒天培地に直接塗抹するのは、死滅の程度を過大評価する恐れがある。そういう場合、損傷細胞を修復、回復できる形でサンプルを調製し、試験する。損傷細胞は、以下を使用して回復を高めることができる:非選択培地(トリプチケースソイ寒天培地[TSA]等)、または選択寒天を重ねた標準寒天培地(最適温度で2~4時間培養)(20, 40)、非選択寒天を重ねた選択寒天(124)、寒天アンダーレイ技術(60, 61)、非選択寒天(TSA等)から選択寒天までのレプリカ平板法(100)。食品からボツリヌス菌の神経毒や黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンを抽出する標準法は、付録Aに示す参考文献より見つけることができる。

### 9.3. 常在細菌叢の計測

接種食品の他、対応する未接種の対照サンプルを試験して、工程後や消費期限または賞味期限内に起こる変化後も生存している常在細菌叢の量を判断することも、時に有用である(53, 91)。さらに、食品組成に基づいて増殖抑制や不活化を判断するためのチャレンジ試験のプロトコールは、自然に発生する細菌叢が、懸念される病原菌に及ぼす潜在的な影響を考慮し、それに対処する必要がある。また、腐敗や消費期限または賞味期限の終わりは通常、微生物集団の増加と関連していることから、生菌数や食品によく見られる腐敗菌数(乳酸菌や酵母菌・カビ等)などの微生物学的数値を算出することが推奨される。これらや他の指標微生物の試験は、病原菌試験の代用にはできないし、腐敗菌の有無は安全性の指標として使うこともできない。

乳酸菌は、発酵食品に比較的高密度(6 log CFU/g等)で存在することが予想されるが、ほとんどの加工食品では常在菌の密度は低い。この類の細菌は、低量の病原菌と栄養分がよく競合することが知られており、広域な温度にわたって増殖でき、酸を産生して食品pHを下げる。また、バクテリオシンを産生して、幾つかの病原菌を抑制できる菌株もある。自然に発生する食品中の乳酸菌の常在量の存在に頼るのは、病原菌の管理には不確かな方法である。逆に、競合細菌叢は、特定の病原菌の増殖を抑制することがあるため、この相互作用を説明できないと、誤った結論に至る可能性がある。このため、一部の環境では、競合が病原菌の抑制に寄与しているかどうかを判断するのに、チャレンジ試験の間、乳酸菌増殖をモニターするのは重要と思われる。

カビや酵母菌も存在すると思われるが、それらは食品に最初は見えないかもしれない。カビによる食品タンパク質の脱アミノ化により、アンモニアが産生し、pH が局所的に上がることがあるが、これは微小環境における病原菌増殖を高める可能性がある(81)。カビや酵母菌集団は、様々な選択平板培地やその他検証済み手順を用いて計測することができる。

#### 9.4. 物理的パラメータの決定

一般成分(タンパク質、脂質、水分)、pH、滴定酸度、 $A_w$ 、塩分、残存亜硝酸塩等の食品特性は、病原菌の挙動に影響を及ぼし得る。チャレンジ試験の一部としてこれらの要素の測定は重要と思われる。pH などの一部のパラメータは試験期間中に変化する可能性があり、微生物分析と平行して試験期間を通して適当な時点でモニターする必要がある。適切な方法に関する出典は、付録 A に示している。分析すべきサンプル数は、上記 9.1 項に記載している。

微生物密度が計測されない場合や、増殖が顕著でなかったら、pH の変化が微生物代謝の指標となり得る。均一でマトリックスを通じて pH が一貫していると考えられる食品の pH は、代表サンプルで測定可能である。逆に、複数の別々のコンポーネントや成分から成る複雑な食品は、pH を繰り返し測定する必要があるかもしれない。例えば、サンドイッチは、コンポーネント表面や接触面に加え、均質化したサンプルの pH 測定も必要と思われる。

被験サンプルでは、安全性が理由であることは明白だが、外観の変化(相分離、濁度、テクスチャ、ガス組成)以外、官能評価は行わない。場合により、視覚・嗅覚による観察に基づいて、食品が「可食」とみなされるかどうかを試験者が判断する。病原菌や毒素が存在する可能性から、嗅覚による観察は、試験機関の作業者に受け入れ難いリスクをもたらす場合もあることに注意されたい。

#### 10.0. 試験期間およびサンプル採取の間隔

チャレンジ試験は、最低でも、その食品が目的とする消費期限または賞味期限を評価するのに実施すること(21, 53, 122)。常温保存可能食品の中には、食品が 1 年以上保持されることを意味するものもあるだろう。申告している賞味期限の終わりを過ぎても食品を消費する可能性のあるユーザーに説明し、安全マージンをさらに広げるためにも、目的とする賞味期限の終わりを過ぎてから一定期間は、食品を保持するのが理想である(53)。その食品の賞味期限にもよるが、この期間は、目的とする賞味期限より 25% (賞味期限が 3~6 ヶ月の場合) から 50% (消費期限または賞味期限が 7~10 日の場合) 長くなる(53, 91)。この追加期間は、熱や抗菌成分で損傷した食品中の細胞の回復に重要であろう。腐敗しているように見えない限り、消費者は食品を消費することが考えられるため、目的とする消費期限または賞味期限の終わりでも、まだ官能特性が受け入れられる一部の食品には、明らかに腐敗するまで試験を続けることが重要と思われる。変化の大きい条件下におかれたサンプルは、消費期限または賞味期限を全うする可能性は低いため、通常は短めの期間でサンプル採取する(53)。

対照も含め、サンプルはまず接種後(場合によっては、短い平衡化期間後)に分析し、その後は試験期間中 5~7 回分析を行う(53)。消費期限または賞味期限が長い食品には、8 回以上サンプル採取時点を設ける必要があるだろう。

サンプル採取の間隔は、これまでの類似食品での経験に基づき、考えられる生存期間や増殖・不活化の速度を考慮して決定する。消費期限または賞味期限の長い食品は、食品特

性や予想される結果によるが、試験初期は頻繁に（毎日）、後半は長めの間隔で試験するのが適切と思われる（53）。

増殖抑制試験を終えるタイミングは、次のようなときが考えられる：増殖が 1~2 ログの増加より大きい、採取時点のサンプルから 2 回連続して毒素を検出（懸念される病原菌の増殖を示唆）、肉眼で腐敗が確認され、食品が消費に適さない。腐敗なのか、可食に見えるかは主観的なものなので、この判断には注意されたい。

病原菌の不活化評価の場合、食品から病原菌が回復しなくなれば、試験は通常終了する。しかし、場合によっては（加熱による死滅時間を評価する試験等）、損傷細胞の可能性を考慮に入れ、消費期限または賞味期限の最後までサンプル培養を続け、損傷細胞が回復・増殖しない（91）、または経時的に食品に毒素が産生していないことを検証するのが重要と思われる。代わりに、食品で一定期間培養後、非抑制の増菌培地で病原菌の回復を試みることで、生存菌がないことを検証する方法として使える場合もある。

### 11.0. 試験結果の解釈

微生物の増殖・不活化試験の結果の解釈は、全関連要素を考慮する専門の微生物学者の評価が必要である（53, 80, 91）。食品が病原菌の増殖を助長しているかどうかの判断は、最後と最初の数を比較するのと同様に単純であることは稀である。各サンプル採取時点の数値は、特に増殖を制限する抗菌剤が食品に含まれていれば、サンプル採取や計測手順に元々内在する変動によって異なることもある。

数の変化が本物なのか、分析的なばらつきによるものなのかを判断するのは難しいことと思われる。さらに、接種後の食品の中には最初に大量死が見られるものもあり、この後の増殖が標的接種量を超えていなければ、これは増殖と認識されないかもしれない。この問題は、最初の計測実施前に、食品中の接種材料を短時間（例：2 時間）平衡化させることで、対処できる（53）。正常なサンプルの変動が、有意ではないかもしれないが、サンプル採取時点で急上昇することがある（122）。この変動は、複数サンプルを試験することで対処できることが多い。傾向の検討にデータを図示するのは、実際に増殖しているかどうかを評価するのに有用であろう（53）。これは、データセットに異常なデータ点が 1 つ以上見られる場合、特に重要である。一貫性のない結果や変動の大きい結果の解釈は、重要複雑な問題であるため、専門の微生物学者が行うこと（表 1 を参照）。

食品微生物学者は、2 つ以上の時点にかけ、1 ログ増加していれば、通常有意とみなす（122）。それより増加が小さくても、計測法、用いるサンプルや複製の数、データ点におけるばらつきによっては有意なこともあるため、食品が病原菌の増殖を促さないという判定は、一般的には、その食品が目的とする消費期限または賞味期限内や反復試験の期間にわたって、最初の接種量から増えても 1 ログの増加を下回ることで適切な受け入れ基準であろう（53, 91）。この数値は、微生物の計測に伴って元々内在する変動を反映している（53, 103）。

統計手法もまた、特定のサンプル採取時点での数の差異が、本物の増殖を示すものなのか、単にサンプル採取や測定誤差によるものかの判定に使うことができる。妥当性確認試験（validation study）を通じて計測法の繰り返し性（repeatability）および再現性（reproducibility）が決定する、または再現性の標準偏差（standard deviation）を算出できるところでは、より正確に有意差を判断できる。例えば、フランス食品衛生安全庁（Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments : AFSSA）（13）は、最初に比べ、最終濃度に 0.5 log CFU/g の増加が見られれば、リステリア・モノサイトゲネスが増殖していることを示すと勧告している。この値は、測定の「不確かさ（uncertainty）」を推測

したものを基にしており (55, 57), 再現性の標準偏差を倍加して定めたものである。しかし, 再現性の標準偏差は変動することに注意されたい。Scotter et al. (92) は, 食品中のリステリア・モノサイトゲネスの計測に関する国際標準化機構 (ISO) 法を検証するため, 試験を実施したところ, 再現性の標準偏差は  $0.17 \sim 0.45 \log \text{CFU/g}$  と, 食品や汚染レベルにより異なっていた。このように, 食品や接種量, 計測法次第で,  $0.5 \log \text{CFU/g}$  超の差が, 適切な基準の可能性もあれば, そうでないこともある。統計学的有意差が必ずしも生物学的に該当するとは限らないことに注意されたい。専門の微生物学者は, 利用可能データと過去の経験を駆使して, データが増加傾向を表しているのか, 単に計測試験で変動が見られただけなのかを最もよく判断できる (91)。

ボツリヌス菌に関する試験では, 数が増えるのではなく, 毒素が産生されるので, 増殖ではなく, 毒素の検出を測定する (47)。チャレンジ試験の期間中, 食品に毒素が検出されないことが必要である (53)。ブドウ球菌のエンテロトキシンは, 試験する代わりに,  $3 \log \text{CFU/g}$  未満という黄色ブドウ球菌の増殖限度を用いてもよい (53)。この増殖限度値は, 最初の密度は  $3 \log \text{CFU/g}$  を超えておらず, ブドウ球菌のエンテロトキシン産生には, 最低  $6 \log \text{CFU/g}$  必要という仮定に基づいたものである。

複数の組成を試験している場合, ある組成には増殖や毒素産生が見られるが, 別のものには見られなければ, 病原菌増殖に関し, 食品の抑制特性に有用なデータを与えてくれる。この場合, 組成の差の影響は, 病原菌の増殖や毒素産生の管理に必要な重要要素を同定する手立てとなる。同様に, 「不可」の時点が含まれる製造工程で食品が製造されている場合, これは, 製造のばらつきが大きすぎて, この方法で組成された食品の安全は保証できないことを示唆している。

死滅を評価する場合, 反復試験におけるログ低減を判断する。低減したログが, 食品に適用される既存の性能に関する規制基準を満たしていること。性能基準がないところでは, 得られるログの低減が, 最も少なくとも, 食品や工程に予測されるばらつきと一致している安全幅に組み込む量 (2 ログの幅を使うことが多い) の分は, 予想される汚染量を上回ること (91)。

以上の考察が示唆するのは, 試験結果の解釈に普遍的に受け入れられるルールはまだないということであり, この件に関して明確なガイダンスを作るには, さらに検討が必要であることを指摘している。

## 12.0. 報告書に含める要素

第3者がチャレンジ試験の適切性を評価するために, 試験報告書は, 結果の解釈も含め, 適切な情報を提供することが必須である。報告書は緒言から始め, 試験の目的やデータの試験デザインを裏付けるデータのレビューを含める。食品や工程を特徴づける情報を含めるべきである。材料および方法は, 科学論文と同様に記述する。結果には, 生データと要約データの両方を含め, 明白に提示する。統計学的デザインと結果の解析はくまなく記述する。統計解析を用いなかった場合は, それを明確に述べ, 根拠を記す。考察には, 結果の解釈やデータの適用性の限界を記述する。結論には推奨事項を含め, 食品の組成や工程において, 新たなチャレンジ試験の実施を正当化できる類の変更事項などを示唆する。

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、どんな状況下の時か？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？

表 3. 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

モデル名	参考文献	適用性
米国食肉協会研究財団 (AMIF) の Process Lethality Determination Spreadsheet (プロセス死滅判定スプレッドシート)	4	本モデルは、食肉加工業者に、懸念される微生物を除去する特定の加熱工程の有効性を示すのに使用できる科学ベースの検証ツールを提供する。
ComBase Predictor	50	ComBase Predictor の予測モデルは、培地での観察に基づいたもので、20 の増殖モデル、7 の加熱死滅モデル、2 の非加熱生存モデルのセットから構成される。温度、pH、 $A_w$ (通常は NaCl の作用として) が中心要素だが、微生物によっては、CO <sub>2</sub> や亜硝酸塩等の 4 つめの要素の影響にも注目している。
Isothermal-Based Prediction Tool (IBPT; 等温ベースの予測ツール)	104	本ソフトウェアは、サルモネラ、大腸菌 O157:H7、黄色ブドウ球菌が、生の牛肉や豚肉食品において「懸念レベル」まで増殖するかどうかの予測に使用できる。
ComBase の Microbial Responses Viewer (MRV; 微生物反応ビューアー) (ベータ 1 版)	78	MRV は、ComBase 由来の微生物の増殖・非増殖データから構成される新規データベースである。本ソフトウェアを使って、ユーザーは、実際の ComBase データで上書きされた増殖・非増殖の輪郭図を迅速に見ることができる。3 つの変数 (温度、pH、 $A_w$ ) のうち 1 つを一定に保つことで、残り 2 つの輪郭を視覚化できる。
Opti.Form <i>Listeria</i> Control Model 2007 (Opti.Form リステリア管理モデル)	85	本モデルは、調理済みの塩蔵食肉製品と非塩蔵食肉製品の両方におけるリステリアの増殖を予測する。本モデルでは、調理済みの塩蔵・非塩蔵の食肉・食鳥肉製品に必要な品質保持期間において、リステリアを管理するために必要な乳酸塩と二酢酸塩の量を計算することができる。
病原細菌増殖予測プログラム (PMP)	106	この予測微生物学アプリケーションは、食品を媒介する病原菌の増殖、不活化、生存に対する複数変数の影響を評価する研究教育ツールとしてデザインされた。モデルの大半は、微生物の液体培地における微生物挙動の実験データに基づいている。
Perfringens Predictor (パーフリンジェンス予測モデル)	51	本予測モデルは、食肉冷却時のクロストリジウム・パーフリンジェンスの増殖を予測する。ComBase Predictor の一部であり、PMP のクロストリジウム・パーフリンジェンスモデル (89, 97) よりも正確な予測を提供可能。

Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP ;シーフードの腐敗および安全性予測モデル 3.0 版)	77	ソフトウェアに含まれるものには、腐敗の相対速度モデル、特定のシーフードにおける腐敗菌の増殖モデル、モルガネラ属によるヒスタミン産生予測モデル、軽く保存処理したシーフードにおけるリステリア・モノサイトゲネスと乳酸菌の同時増殖を予測するモデル、軽く保存処理したシーフードにおけるリステリア・モノサイトゲネスの増殖限度を予測するモデルがある。
---	----	--

予測食品微生物学は、食品微生物学の下に位置する学問で、モデル（数式等）を使い、食品系における微生物の増殖、生存、不活化について記述する。増殖および不活化に関する数学モデルは、食品評価やチャレンジ試験のデザインをガイドできるような、常に使用することができる。こうした場合、チャレンジ試験は、モデルの予測を実証する（つまり、予測に賛同するか、保守的立場をとる）か、その予測は特定の食品には無効であると示すかのいずれかである。保守的モデルの例には、チャレンジ試験では1ログの増加が示されるが、2ログの増加と予測するモデルなどがある。2つの理想的な予測モデルを使用するのは、安全性に関して検証すべき処置の選択を絞り、または適切な被験微生物を選択するためである。

モデルに入力する内因および外因子（pH、 $A_w$ 、温度等）は、注意して選択すること。工程条件の範囲を決めるには、最も制約の少ないパラメータを用いる。モデルにした条件から、増殖が示される、またはその食品や工程では死滅が限られることが示唆される場合は、その後追加試験や食品の再組成、標的消費期間または賞味期間の変更を行う正当な理由となろう。モデルにそれほど確証がなければ、限定的にチャレンジ試験を行って、モデルの予測を検証することもある(1)。

決定にモデルのみを使う場合は注意が必要である。モデルの使用には、モデリングと食品微生物学の両方における経験と判断を要する。決定にモデルしか使わない場合、問題の食品にそのモデルが有効であることを示す必要があり、またロット間の変動を考慮する必要もある。非常に類似または同一食品の検証は、発表データ、未発表データのどちらに基づいて行ってもよいが、そのデータは、チャレンジ試験を実施する上で適切な知識やスキル、能力を持つ職員のいる試験機関が導き出したものであるか（表1を参照）、他の関連する発表済み試験から得たものであることが必要である。

今日最もよく知られており、利用可能な2つの複数病原菌対象の多因子モデルは、USDAの農業研究サービス東部研究センター（Agricultural Research Service Eastern Regional Research Center）の病原細菌増殖予測プログラム（PMP）（106）と ComBase Predictor（50）（旧名 Food Micro Model [表3]）である。これらのモデリングプログラムのどちらも、食品を媒介する広範な病原菌と増殖因子（温度、pH等）について予測を行う。また、どちらも食品ではなく、主に実験培地から収集したデータに基づいており、必ずしも各増殖パラメータの全範囲をカバーしてはいない（表4および5）。

表 4. ComBase と病原細菌増殖予測プログラム (PMP) が用いる病原菌の増殖範囲<sup>a</sup>

病原菌	ComBase					PMP				
	温度 (°C)		pH		Aw	温度 (°C)		pH		Aw
	最低	最高	最低	最高	最低	最低	最高	最低	最高	最低
<i>B. cereus</i> CO <sub>2</sub> あり 好気 嫌気	5	34	4.9	7.5	0.974	5	42	4.7	7.5	0.97
						10	42	5.0	9.0	0.97
<i>C. botulinum</i> (増殖のみ)	14	40	4.7	7.2	0.954	15	34	5.0	7.2	0.977
タンパク分解性	4	30	5.1	7.5	0.974	5	28	5.0	7.0	0.977
タンパク非分解性										
<i>C. perfringens</i>	15	52	5	8	0.971	19	37	6.0	6.5	0.983
<i>E. coli</i> O157:H7 CO <sub>2</sub> あり 好気 嫌気	10	30	4.5	7	0.961	5	42	4.5	8.5	0.97
						5	42	4.5	8.5	0.97
<i>L. monocytogenes</i> CO <sub>2</sub> あり 好気 嫌気	1	35	4.4	7.5	0.934	4	37	4.5	7.5	0.928
						4	37	4.5	8.0	0.97
<i>S. aureus</i> (増殖のみ) 特になし 好気 嫌気	7.5	30	4.4	7.1	0.907	10	42	4.5	9.0	0.911
						12	42	5.3	9.0	0.872
<i>Salmonella</i> CO <sub>2</sub> あり 好気	7	30	3.9	7.4	0.973	10	30	5.6	6.8	0.974

<sup>a</sup> ComBase (48) および PMP (106) で検討している限度は、必ずしも増殖の限度を表してはいない。増殖限度については、表 5 を参照。

両モデルの要素は、それぞれの食品系に限定的ではあるが、検証済みである（発表済みおよび未発表試験の両方により）。

PMP や ComBase の一部にはない実験培地や食品系において開発されたコンピュータモデルも幅広くある。一部のモデルの例を表 3 に示す。科学論文に発表されたモデルの中には、使い勝手がよくてダウンロードできる形では利用できないものもある。こうしたモデルには、有用な予測を生み出すのに、ユーザー側での幾分適度にモデル化や、スプレッドシートの操作スキルが必要である。

ComBase モデリングツールボックスの一部である ComBase ブラウザ (48) という別ツールについても言及していなければ、モデリングやモデル検証に関するどんな考察もいい加減なものになってしまうだろう。ComBase ブラウザは、微生物の食品環境への反応を収録した ComBase データベースへのアクセスを提供している。現時点で、データベースには 3 万 5000 件を上回る観察結果が収録されており、うち 1 万 3000 件以上が食品関連、

残り約 2 万 2000 件が培地関連のものとなっている。微生物の増殖や生存データについて発表する研究者は、ComBase にデータを提出するよう、要望、奨励されている (49)。ComBase に含まれるデータは、モデルの検証に有用な、発表済み・未発表データの出典を代表していると言えよう。



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？

ある食品に関して行ったチャレンジ試験は、ときに他の食品に応用することができるが、その食品の内因特性と試験した食品のそれとに有意差があれば、試験結果の応用はできないと思われる。パラメータや条件が、応用を検討している食品のものよりも、増殖や生存に資するものでチャレンジ試験が実施されているのであれば、その後追加のチャレンジ試験は必要ないと思われる(76)。例えば、pH 5.8の食品組成において特定の病原菌を調べたチャレンジ試験の結果は、主たる違いがpH 5.4である類似組成に応用できる可能性はあるが、あるチャレンジ試験を別の食品に応用できるかどうかは、専門の微生物学者が判断する必要がある。ある試験から別の食品への応用可能性を判断する際は、2つの食品の構成(タンパク質含量、炭水化物、有機酸の種類、脂質、水分等)を検討する。一般的に、構成が類似しているほど、試験は応用できる可能性は高い。

表5. 参考文献(54)と(116)に基づく、他の条件がほぼ最適なときの増殖限度

病原菌	出典 <sup>a</sup>	温度(°C)		pH		Aw 最低	最大水相 食塩濃度 (%)
		最低	最高	最低	最高		
<i>B. cereus</i>	FDA	4	55	4.3	9.3	0.92	10
	ICMSF	4	55	5.0	8.8	0.93	
<i>C. botulinum</i> (増殖のみ, タンパク分解性)	FDA	10	48	4.6	9	0.93	10
	ICMSF	10-12		4.6		0.93	
<i>C. botulinum</i> (増殖のみ, タンパク非分解性)	FDA	3.3	45	5	9	0.97	5
	ICMSF	3.3		5.0		0.97	
<i>C. perfringens</i>	FDA	10	52	5	9	0.93	7
	ICMSF	12	50	5.5- 5.8	8.0- 9.0	0.97	
Pathogenic <i>E. coli</i>	FDA	6.5	49.4	4	9	0.95	6.5
	ICMSF	7-8	44-46	4.4	9.0	0.95	
<i>E. coli</i> O157:H7	ICMSF	8	44-45	4.5			6.5で増殖遅延, 8.5で増殖なし
<i>L. monocytogenes</i>	FDA	-0.4	45	4.4	9.4	0.92	10
	ICMSF	-0.4	45	4.39	9.4	0.92	
<i>S. aureus</i> (増殖のみ) 好気 嫌気	FDA	7	50	4	10	0.83	20
	ICMSF	7	48	4	10	0.83	
	ICMSF			5.0		0.90	
<i>Salmonella</i>	FDA	5.2	46.2	3.7	9.5	0.94	8
	ICMSF	5.2 <sup>b</sup>	46.2	3.8	9.5	0.94	

<sup>a</sup> FDA: 米国食品医薬品局(116), ICMSF: 国際食品微生物規格委員会(54)

<sup>b</sup> ほとんどの血清型は、7°C(44.6°F)未満では増殖しない。

4. 米国パン協会、NSF インターナショナル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、これらのプロトコルの制限は何か？特定の食品と病原菌のペアに適切な既存のプロトコルはあるか？

委員会は、米国パン協会（American Bakers Association : ABA）および NSF の試験プロトコルのいずれも著しい弱点があることを示唆した IFT 報告書（53）の初期の評価に同意する。以下に簡潔に抜き出しているが、詳細は IFT 報告書（53）の表 2（NSF, ABA, 専門家パネルのプロトコルを比較）を参照されたい。

NSF のプロトコルは、安全面で食品に冷蔵が必要ではないことを判断する試験方法を提供している。本プロトコルは柔軟性に欠けており、あまりに規範的に微生物株や方法を指定している。本プロトコルが適用する食品は、限られた一部のものしかなく（焼く〔ベーキング〕前に野菜やソフトチーズを添加したパンやペストリー；ベーキング後にクリーム、クレーム (cre`me)、カスタード、チーズを詰める、またはトッピングしたベーカリー食品；ベーキング前にカボチャ、サツマイモ、カスタード、メレンゲパイ等を詰めた食品；温度管理せず保管するトッピング、シロップ、砂糖衣、詰め物）、潜在的に懸念される食品の一部は除外している（調整気相包装食品、pH 4.6 未満の全食品、温度管理せず 24 時間未満または 31 日超保管する食品、等）。チャレンジ試験の微生物選択基準は  $A_w$  と pH のみであり、適切な微生物の選択に、その食品を考えて工程を考慮していない。さらに、ボツリヌス菌によるチャレンジ試験は検討しておらず、クロストリジウム・パーフリンジェンスしか考えていない。報告は不要に至ることもあれば、時にチャレンジ試験が不適切なこともある。接種材料を状況に適合させる必要を考えておらず、量は全食品で固定されている。本プロトコルは、複数コンポーネント食品は、各コンポーネントや接触面に接種する必要を必ず考慮しており、各時点の複製サンプルを複数の食品ロットを用いて試験しなければならない。概して、本プロトコルには、目的とする食品に適用する上でも著しい制限がある。

ABA のプロトコル（カボチャパイの常温保存性を確立するための業界プロトコル）は、範囲がさらにもっと制限されている（つまり、冷蔵を必要としない輸送と陳列を目的としたカボチャパイにのみ適用）。本プロトコルの目的は、当時の最新版 FDA Food Code に従って、カボチャパイ食品が常温での保存性に優れていることを示すために、製造業者が用いることのできるプロセスを定義することである。本プロトコルは、接種チャレンジ試験ではなく、自然に発生する微生物（病原性であろうともなかろうとも）を死滅させる観点から、調理手順を検証する方法（最も低い温度点でも、食品は最低 82.2°C [180°F] に達する）である。しかし、このような試験で「病原菌がない」というのが、食品に病原菌がいた場合の「増殖するか否かを判断している」ものだと信頼できるわけがない。なぜなら「病原菌は元々いたのかもしれないし、いなかったのかもしれない」のだから。また、ボツリヌス菌が増殖して毒性を産生するかどうかを確かめるための、食品中の酸化還元電位のモニタリングは、増殖するか否かの判断には不適切である。以上、本プロトコルには、目的とする食品に適用する上でも著しい制限がある。

IFT の専門家パネル報告書（53）は、幅広い食品を網羅しており、食品に TCS が必要かどうかを判断する枠組みを提供している。本報告書は、食品が 1 つ以上の病原菌増殖を促すことができるかどうかを判断するためのチャレンジ試験向けのガイドラインも記しているが、不活化チャレンジ試験は取り扱っていない。ガイドラインは柔軟だが、特定の食品類に適切なものを判断する際、異なる解釈につながる恐れがある。解釈が異なれば、デー

タをレビュー・評価する者が、試験自体が適切だったかどうか、判断することが困難になるため、レビュー者は、評価に技術的な専門知識が必要であろう。これは、幅広い食品類に適用するようデザインしているどんな文書にも付きまとう弱点である。

Notermans et al. (80) は、食品の安全と安定性を目的に、微生物チャレンジ試験のユーザーガイドを作成した。本ユーザーガイドは、適切な微生物の選択、接種材料の調製、接種量、接種手順、試験期間、サンプル採取時点を取り扱っている。推奨事項は概ねこの NACMCF 文書と一致しているが、それほど詳細ではない。IFT の専門家パネル報告書と同様に (53)、こうしたガイドラインに従って行われた試験の適切性を解釈するには、技術的な専門知識が必要であろう。

Scott et al. (91) は、食品のリステリア・モノサイトゲネスチャレンジ試験を実施するためのガイドラインを発表した。本稿は、食品が持つリステリア・モノサイトゲネス増殖能と、食品中の本微生物不活化の両方を評価する試験のガイドラインをカバーしている。本稿は、リステリア・モノサイトゲネスに関わるチャレンジ試験に、IFT 報告書の推奨事項 (53) を大部分で適用しているため、1つの微生物に特化している。本プロトコールも、リステリア・モノサイトゲネスの増殖や不活化が問題となる食品に限定される。本プロトコールは概ねこの NACMCF 文書のものと一致しており、冷蔵の RTE 食品におけるリステリア・モノサイトゲネスに適した内容となっている。

リステリア・モノサイトゲネスに関する欧州連合 (EU) の基準検査機関である AFSSA は、RTE 食品におけるリステリア・モノサイトゲネスの微生物学的基準へのコンプライアンスを判断するために、消費期限または賞味期限に関する試験 (shelf-life study) の実施に向けた技術ガイダンス文書を最近発表し、EC 規制 No. 2073/2005 内で提示している (13)。Scott et al. (91) と同様に、その範囲はリステリア・モノサイトゲネスに限定されており、自然に汚染および人為的に汚染された RTE 食品の消費期限または賞味期限を評価する試験実施方法に関する情報が含まれている。本ガイダンス文書は、耐久性に関する試験 (durability study) と呼ばれる、自然に汚染された食品の消費期限または賞味期限の評価について記述しているが、これは本 NACMCF 文書では取り扱っていない。この AFSSA 文書は、RTE 食品における EU のリステリア・モノサイトゲネス規制基準 (消費期限または賞味期限終了時で 100 CFU/g 以下) に対し、得られた結果の解釈方法についても情報を提供している。AFSSA 文書は、リステリア・モノサイトゲネスの不活化は取り扱っていないが、本 NACMCF 文書と同じ多くの重要ポイント (食品特性を考慮、バッチの可変性、複数株を使用、被験生物に適合、食品接種の際に自然条件を想定、等) をきっちり取り扱っている。AFSSA 文書のプロトコールは、増殖の可能性のあるサンプル評価は消費期限または賞味期限の始めと終りにのみ行えばよいことや、これらの各時点で必要なサンプルの計測は、均一な食品では 1 サンプルのみ (不均一な食品は 3 サンプル) でよいことを示唆している。(最大増殖率や時間差を評価したい試験では、さらに多くのサンプル採取時点を推奨している。) AFSSA 文書に記載されている方法は、冷蔵の RTE 食品におけるリステリア・モノサイトゲネスには適しているが、受け入れ基準は、本 NACMCF 文書が提案するものとは異なる。

NACMCF は、微生物チャレンジ試験実施のガイダンスをいくつかの文書に提供している。NACMCF は 1990 年 (74)、消費期限または賞味期限を延長した調理済みの冷蔵食肉および食鳥肉に関して勧告を行っている。この勧告には、リステリア・モノサイトゲネスの加熱不活化試験およびボツリヌス菌接種試験のガイドラインに関する付録も含まれている。これらの勧告は、総じて本 NACMCF 文書と一致している。1990 年勧告で使われているアプローチは、冷蔵食肉および食鳥肉には限定されないが、作成されたガイダンスが目

的する個々の微生物に特定されるものである。プロトコールはその目的の用途に適している。

NACMCF は 2005 年 (75), 冷蔵の RTE 食品に関する安全性に基づいた消費期限表示を確立するための検討事項に関する論文を発表した。この文書の付録に、安全性に基づいた消費期限表示を検証するための、微生物チャレンジ試験実施用のガイダンスが含まれている。このガイダンスはリステリア・モノサイトゲネスに特定されるものであり、本 NACMCF 文書のガイダンスと一致している。プロトコールはその目的の用途 (消費期限の検証) に適している。

特定の目的に有用な優れたチャレンジ試験のプロトコールがいくつかある。本 NACMCF 文書および IFT 報告書 (53) は、最も包括的で、広範囲を対象とした文書であり、微生物チャレンジ試験の適切性を評価するのに適用できる。これらの文書は、ある食品カテゴリーに特定されるものではないため、被験生物の適切性や保管温度等に関して、チャレンジ試験の適切性を評価するには、技術的な専門知識を必要とするであろう。しかし、よく練られた報告書は、多くの選択に論拠を提供すべきであり、そうすることで、試験の適切性を判断するためのレビューの助けとなる。