

付録 E. 食品チェックリスト：モzzarellaスライス

売り上げ拡大のため最大 2 週間常温で保管する、調整気相包装したモzzarellaスライスの評価			
	検討事項	回答	追加コメント
1	本試験の目的を決める		
1.a	安全のための時間・温度管理 (TCS) の適用除外 (冷蔵不要)	NA <sup>a</sup>	
1.b	規制要件の適用変更 (温度管理せずに 4 時間を超えておく等)	調整気相または真空包装したモzzarellaスライスの非冷蔵保管を 2 週間に延長。Food Code の適用変更。	
1.c	死滅の検証	NA (チーズの製造には低温殺菌牛乳を使用)。	
1.d	冷蔵食品または軽度の温度変動下において、組成が微生物の増殖抑制になることを立証	NA	
2	本食品に関する情報を収集する		
2.a	食品の成分は何か?	チーズ (低温殺菌牛乳, 塩, レンネット, スターター培養株)	
2.a.1	各種の源やロット間において、成分の一致度はどうか?	成分はロット間で同一または類似。pH, 水分, 塩分は若干異なることもあるが, 21 CFR 133.155-158 (119) に定義される成分規格 (Standard of Identity : SOI) を遵守。	
2.a.2	食品および・または各コンポーネントの pH, Aw, 一般分析 (水分, 塩分, 脂質, タンパク質, 残存亜硝酸塩等) はどうか?	pH 5.3~5.4 ; Aw 0.96. 製品完成時の一般分析, 水分 46~52%, NaCl 1.0%, 脂質 30%. 期間を通して均質である。	注: Aw は, 未測定または通常の製造では管理されていないが, 水分と塩分の作用である。水分は, SOI により制限されている。スターター培養株活性 (酸が発生。pH で測定) が重要管理点 (CCP) である。
2.a.3	これらの値は, 準備から消費までの間で変化するか?	スライス・包装後, 乳酸菌スターター培養株が成形時の熱で破壊されていれば, 3 ヶ月の冷蔵保管期間中に pH が 5.4 から 5.9 に上がる可能性がある。	23°C (73°F) で小売店に置かれている 2 週間の間では, pH は上がらないと思われる。
2.a.4	寸法 (カットやピース等) はどうか? (該当の場合)	NA	
2.a.5	製造開始時と完成時の一般的な微生物負荷 (種属)	微生物負荷: 牛乳に対する乳酸菌スターター培養株	

	等) かどうか?	が 7 log CFU/mL, 残りの培養株が 2 log CFU/g. 成形時に 70°C (158°F) の加熱により低減.	
2.a.6	汚染が各コンポーネントに取り込まれる, またはコンポーネントに広がる可能性があるか?	低温殺菌牛乳を用いる HACCP や GMP 下で製造すれば, 可能性は低い. 非芽胞形成菌による汚染は表面上と思われる.	
2.b	加工調製工程はどうか?		
2.b.1	本食品は, 組み立て食品 (assembled product) (複数コンポーネントから成る食品 [multicomponent product]) か?	組み立てでも, 複数コンポーネントでもない.	
2.b.2	検証済みの微生物低減工程があるか? 微生物低減工程に関連するパラメータは何か? コンポーネントが異なれば, 微生物低減工程も異なるか?	低温殺菌は, チーズ作りに使用する牛乳に対する, 加熱工程による不活化として検証済みである. チーズ表面の汚染を除去する工程はない.	
2.b.3	再汚染の可能性はあるか?	はい. スライスや包装時に再汚染の可能性あり.	
2.b.4	死滅や増殖に影響するパラメータに, どんなばらつきが見られるか?	GMP や HACCP 下で準備すれば, 死滅のばらつきはほとんど見られない. 増殖の可能性は, 高水分と低水分の製品を比べると, 製品完成時の水分と pH 次第で変わり得る.	
2.b.5	本食品はどのように包装されているか?	スライスまたはカット後, スライスまたはブロックは, 窒素と二酸化炭素の混合気体で, 真空または調整気相包装される.	
2.b.6	本食品は, 培養または発酵しているか? 意図的にスターター培養株を添加しているか?	スターター培養株を使用するが, 成形工程時に 70°C (158°F) で加熱するため, 密度は減る.	
2.b.7	本食品には, 抗菌剤 (保存料) やその他, 香辛料等の抑制性の成分が含まれるか?	NaCl が含まれるが, 抑制レベルの量ではない. チーズに抗菌剤は添加していないが, カビを防ぐのに, ナタマイシンが切り口表面またはシュレッドチーズに添加される可能性がある.	
2.c	保管条件はどうか?		
2.c.1	本食品は, 販売用にどのように陳列されるか? 陳列するのに, 包装に変更があるか?	保管は, 真空または調整気相 (窒素と二酸化炭素の混合気体) で, スライスまたはブロックを包装する. 販売拡大のため, 非冷蔵で陳列される可能性が	

		あるが、そうでなければ、消費期限を延ばすため、冷蔵で保管される。	
2.c.2	製造、準備、保管または陳列の間、予想される温度（および時間）はどのくらいか？	チーズ製造時は、牛乳を発酵させ、40°C (104°F) 以下でカードを作る。カードは70°C (158°F) に加熱して成形する。チーズは3°C (37°F) で最大2週間寝かせ、通常7°C (45°F) 未満で小売店に卸し、そこで最大2週間、23°C (73°F) で保管される。	23°C (73°F) を上回ると品質は急落するが、例えば輸送中の温度が、高くても27°C (81°F) で、4時間を超えなければ、品質に及ぼす影響は限られた程度である。
2.c.3	上記の2.c.2 にリストした温度を超えて保管または陳列された場合、どのような可能性があるか？	記載の温度を超えて保管される可能性は低い。30°C (86°F) を超えると、品質が著しく低下する（溶ける、または脂質が分離する）。	
2.c.4	準備、保管または陳列によって生じる恐れのあるハザードは他にもあるか？	いいえ。しかし、酸素があつて、ナタマイシンを使用していなければ、カビが表面に生える可能性がある。	
2.c.5	製造から消費までの予想最大期間は？	冷蔵温度で保管して9ヵ月；非冷蔵保管で2週間。	
2.c.6	腐敗または受け入れ難い品質になるまでの期間は？	20~23°C (68~73°F) で保管されれば、非冷蔵で2週間、23°C 超だとそれより短くなる。冷蔵保管だと9ヵ月。	
3	増殖または不活化に関する食品評価が必要かどうかを判断する		
3.a	pH と $A_w$ 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、食品評価が必要である。芽胞による再汚染や生存の可能性から、Food Codeの表Bが適用される。pHが5.4超、 $A_w$ が0.96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、本試験の目的は、本食品を非冷蔵で保管した場合に、存在が疑われる病原菌が増殖するかどうかを判断することである。牛乳は前もって低温殺菌されている。	
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？	最新版 Food Code に TCS。	
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	pHが5.4、 $A_w$ が0.96であることから、懸念される微生物は、セレウス菌、ボツリヌス菌、病原性大腸	

	から外してよい。	菌、リステリア・モノサイトゲネス、サルモネラ、黄色ブドウ球菌、腸炎ビブリオ、 <del>ビブリオ・パルニフィカス</del> である。(訳注：誤記)	
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)	セレウス菌の芽胞は、低温殺菌後も生存している。工程後の取り扱いから、考えられるのは、病原性大腸菌、リステリア・モノサイトゲネス、サルモネラ、黄色ブドウ球菌。 サルモネラは、工程後の汚染ではなく、製造時の汚染によるモツァレラとの関連性が指摘されている。疾患は、菌の増殖ではなく、生存と関連。セレウス菌、リステリア・モノサイトゲネス、黄色ブドウ球菌による大流行は報告されていない(22)。	本食品を再汚染する可能性が最も高い栄養細胞は、リステリア・モノサイトゲネスと黄色ブドウ球菌である。リステリア・モノサイトゲネスの方が、環境中のその遍在性により、本食品を再汚染する病原菌の可能性が高い。黄色ブドウ球菌は、作業者の手が原因となる汚染菌と考えられる。 水産食品はコンポーネントではないので、ビブリオ属は検討から除外。 ボツリヌス菌も検討から除外した。乳製品環境では稀な芽胞である。
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？	上記に示すように、再汚染が起こる可能性がある。	
4.d	標的食料または関連食料に、病原菌の蔓延を示唆するベースライン調査があるか？	いいえ。	
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, 4.e.3, 4.e.4を参照。	
4.e.2	予測モデル	pH 5.4, Aw 0.96, 27°C (80.6°F) のとき、黄色ブドウ球菌について、PMP 7.0 (1.1版) は「好気条件下で、29時間(時間差なしで22時間)以内に3ログ増加」、ComBase Predictor は「同条件下で、18時間以内に3ログ増加」と予測。リステリア・モノ	最高温度に曝されることを想定して、モデリングは保守的に行っている。考えられる汚染菌のうち、このAwとpHで最も速く増殖するのは、リステリア・モノサイトゲネスと黄色ブドウ球菌である。チーズはスターター培

		<p>サイトゲネスについて、PMPは「同条件下で、42時間（時間差なしで7時間）以内に1ログ増加」、ComBase Predictorは、乳酸菌5,000 ppmで「同条件下で、33時間以内に1ログ増加」と予測。セレウス菌について、<math>A_w</math>が0.96のとき、PMPは予測に含めていないが、ComBase Predictorは、<math>CO_2</math>が40%で「101時間以内に3ログ増加」と予測している。</p>	<p>養株で作られるため、黄色ブドウ球菌は通常はあまり競合しないが、加熱と成形工程により、スターター培養株が減少する。セレウス菌の増殖が発生する場合、リステリア・モノサイトゲネスや黄色ブドウ球菌に比べ、増殖速度は遅い。</p>
4.e.3	文献と選択を比較せよ。	<p>Stecchini et al. (10)は、「リステリア・モノサイトゲネスは、5°C (41°F) で21日間保管の間に5ログ増加」と示唆している（pHと水分は報告されていない）。</p>	
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？	<p>2003年の国際食品保全学会（IAFP）の年次大会（29）で発表された細切りチーズのリステリア・モノサイトゲネスとサルモネラ（cheese shreds for <i>L. monocytogenes</i> and <i>Salmonella</i>）に関するデータは、15°C (59°F) で2ヵ月間保管された低水分のモツアレラ（pH 5.0~5.5, 水分47%, <math>A_w</math> 0.965）に、増殖は見られなかったことを示している。</p>	
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？	<p>リステリア・モノサイトゲネスおよび黄色ブドウ球菌。</p>	
4.f	不活化試験の場合：	<p>NA</p>	
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かがあるか？（ $A_w$ 、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。	14 日×1.5=21 日。	
5.a.1	製造から消費までの最大期間	冷蔵すれば最大 9 ヶ月、非冷蔵であれば 21 日。	
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	受け入れ難い品質の時点：21 日。	
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, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 日時点のサンプル。	予測モデルから、増殖は、27°C (81°F) で 24~48 時間以内に発生すると考えられる；サンプル採取時点は、増殖までの最短時間を確実に同定できるよう、8 回以上が適切である。
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	3 株の混合物を用いて、リステリア・モノサイトゲネ	

	使用を推奨。適切な食品または臨床分離株の使用を検討すること)	スと黄色ブドウ球菌を個別に試験する。各混合物には、チーズまたは他の乳製品から分離した株、もしくは臨床分離株を含める。	
6.b	接種材料の調製に適応が必要かどうか?	適応は不要。常温で酸性度は低く、 $A_w$ は高い。	
6.c	接種方法を定める (表面、混合、浸漬、液体、乾燥等)	各 25 g のスライスに表面接種。1 包装につきスライス 2 切れを使用し、2 切れのスライスの中の内面に接種。	1 包装につき 2 切れを使い、スライスの上に接種し、水分を保持して、増殖に適した最悪のシナリオを提供。
6.d	接種量を定める (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)	3 log CFU/g。1 包装につき 0.05 mL (50 $\mu$ L)。各微生物は個別に接種し (別々のサンプル)、異なる微生物間の拮抗作用を避ける。	汚染の可能性を考慮に入れ、接種量は多いが、直接プレーティングによる計測や、増殖や保管時の組成による低量の不活化の検出が可能である。接種量は、サンプルサイズの 1% を超えないこと。予備データは、接種材料により、感知できるほど pH や $A_w$ は変わらないと示唆している。
6.e	用いる包装を決める	1 包装につき接種した 2 切れのスライスを、窒素 60% と二酸化炭素 40% の混合気体を使って包装、密封する。ガスや水分不透過の包装材料を使用。	包装は市販品に同じ。
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	23°C (73°F)。	本食品は、最大 23°C (73°F) までは、購入や消費を思いとどまらせる有害な品質変化は生じない。
6.g	サンプル採取方法とサンプルサイズを決める	サンプル全体 (スライス 2 切れ) を袋に入れて混ぜ、25 g を取り出して微生物分析に用いる。同量の 0.1% ペプトン緩衝液でサンプルを均質化し、適宜 FDA BAM 法 (115) に従って、連続希釈したものを選択寒天土におく。	
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 (ブロックデザイン、中心複合	水分と pH の組み合わせは最大のものにした、2 ロットの複製 (独自製造)。各試験期間につき、3 組のサンプル。	

	等) は使用しているか?		
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?	未接種の対照は, 試験期間中, pH を変える可能性のあるカビや酵母, その他腐敗微生物の増殖をモニターする, または本試験開始時の一般分析に使用する.	
7.c	他の対照に何が必要か? (増殖の陰性・陽性対照を含む)	本試験では不要. サンプルが十分な期間おかれる場合には, 増殖を想定する.	
8	判定基準を決める		
8.a	判定基準は何か?	リステリア・モノサイトゲネスの増殖は1ログ以下, 黄色ブドウ球菌は3ログ以下であること.	リステリア・モノサイトゲネスが1ログ増えれば, 有意な増殖とみなされるが, RET 食品中にリステリア・モノサイトゲネスが少しでも検出されれば, 本食品の品質は落ちる.
8.b	本結果を利用するのに, 限界は何か?	データは, 本試験で検討した最大限度 (水分, pH, 温度, 期間の点で) のモツァレラにのみ適用可能である.	

<sup>a</sup>NA: 該当なし.



付録 F. 食品チェックリスト：カットレタス

最大 8 時間冷蔵しないでおくカットレタスに、懸念される病原菌の増殖が検出されないこと（1 ログ未満）を判断するための評価			
	検討事項	回答	追加コメント
1	本試験の目的を決める		
1.a	安全のための時間・温度管理（TCS）の適用除外（冷蔵不要）	NA <sup>a</sup>	
1.b	規制要件の適用変更（温度管理せずに 4 時間を超えておく等）	はい。本試験の目的は、カットレタスを温度管理せず、室温で最大 8 時間おけるようにすることである。これは、店内で消費されるサラダバー用の食品である。温度管理から外したレタスは、8 時間以内に使用するか破棄することになる。食品は再冷蔵する、または後でサービスに使用しない。	
1.c	死滅の検証	NA	
1.d	冷蔵食品または軽度の温度変動下において、組成が微生物の増殖抑制になることを立証	NA	
2	本食品に関する情報を収集する		
2.a	食品の成分は何か？	丸ごと一株のロメインレタスの単一成分である。カットし、ラベルの指定濃度の洗浄水清浄剤を含む水で洗浄する。	
2.a.1	各種の源やロット間において、成分の一致度はどうか？	本食品の生菌数は、バッチ間で広く異なる。	
2.a.2	食品および・または各コンポーネントの pH, aw, 一般分析（水分、塩、脂質、タンパク質、残存亜硝酸塩等）はどうか？	pH は推定 5.8~6.2 (118)。アイスパークレタスの水分活性は 0.995~0.998 であるが、ロメインにも当てはまると思われる (33)。水分が非常に多く、塩、脂質、タンパク質は最小限である。	
2.a.3	これらの値は、準備から消費までの間で変化するか？	pH が変わる可能性は低い。乾くと Aw は若干減るかもしれないが、この乾燥が病原菌の増殖に与える影響は無視して検討した。	
2.a.4	寸法（カットやピース等）はどうか？（該当の場合）	丸ごと一株のレタスを一切れ約 5×5 cm にカットする。	

2.a.5	製造開始時と完成時の一般的な微生物負荷（種属等）はどうか？	丸ごと一株のレタスに関して利用できる発表済みデータはない。カット後のレタスに関する社内データは、数年にわたるサンプル収集に基づき、以下の傾向を示す（サンプルサイズは 25 g）： 生菌数は、通常平均 5.5 log CFU/g および標準偏差 1.5 log CFU/g で分布。黄色ブドウ球菌は 50 サンプル中に 1 つ、サルモネラは 200 サンプル中 1 つ、セレウス菌は 10 サンプル中 1 つに見つかる。E. coli は通常はないが、20 サンプル中の 1 つに、2 log MPN/g 超見られた。リステリア・モノサイトゲネスは、200 サンプル以上試験した中では検出されなかった。	ここに提示したデータは、レタスを洗浄、カット後に収集されたものである。
2.a.6	汚染が各コンポーネントに取り込まれる、またはコンポーネントに広がる可能性があるか？	試験機関の発表済みデータによれば、新鮮カットレタスの内部移行はあり得る (93)。実際の状況下でこれが起こる程度は明らかではない。	
2.b	加工調製工程はどうか？	業者からレタスを受け取り、使用するまで冷却器で保管し、冷却器から取り出し、外側の葉を取り除いて捨て、底を切り落とし、残りの葉をばらしてから、ラベルの指定濃度の洗浄水清浄剤を含む水で洗い、水切りして余分な水分を取り除き、一切れ約 5×5 cm にカットする。	
2.b.1	本食品は、組み立て食品（複数コンポーネントから成る食品）か？	組み立てでも、複数コンポーネントでもない。	
2.b.2	検証済みの微生物低減工程があるか？微生物低減工程に関連するパラメータは何か？コンポーネントが異なれば、微生物低減工程も異なるか？	洗浄工程により、生菌数は 1~2 ログ低減することが示されている。	ここに報告の微生物の低減は、本食品のチャレンジ試験のデザインでは考慮に入れていない。
2.b.3	再汚染の可能性はあるか？	再汚染の可能性は若干ある。レタスは、食品サービスの厨房環境において手でカットされる。実際の食品に関するデータ（上記参照）によれば、黄色ブドウ球菌は本食品を汚染する可能性があるが、リステリア・モノサイトゲネスは有意なリスクを示していない。従	

		業員は食品安全研修を毎年受けており、管理者は公認の食品衛生管理者証明書 (Food Managers Certification) 試験で認定される。準備中の相互汚染予防に、標準手順書が整備されている。	
2.b.4	死滅や増殖に影響するパラメータに、どんなばらつきが見られるか?	本食品は、生物学的に正常な変動があるため、必ず異なる。pH と $A_w$ は増殖を大変助長する値であるため、ばらつきが病原菌の増殖に影響する可能性は低い。	
2.b.5	本食品はどのように包装されているか?	包装されていないが、プラスチックの箱 (bin) に入っており、陳列前は、冷蔵用に食品ラップで覆われている。	
2.b.6	本食品は、培養または発酵しているか? 意図的にスターター培養株を添加しているか?	いいえ。	
2.b.7	本食品には、抗菌剤 (保存料) やその他、香辛料等の抑制性の成分が含まれるか?	抗菌剤, 保存料, その他抑制性の成分は入っていない。	
2.c	保管条件はどうか?		
2.c.1	本食品は、販売用にどのように陳列されるか? 陳列するのに、包装に変更があるか?	サラダバーでフタのない容器 (open container) に陳列。	
2.c.2	製造、準備、保管または陳列の間、予想される温度 (および時間) はどのくらいか?	準備前は 5°C (41°F) 以下で保管。準備は室温 (21.1°C, 70°F) で、バッチにつき約 2 時間かかる。準備後は、食品ラップをかけて冷蔵されるか、販売・消費のため室温におかれる。	カットレタスは準備後、4 時間以内に速やかに 5°C (41°F) で冷蔵しなければ、8 時間は準備の時点からスタート (カウント) する。冷蔵すれば、冷蔵から取り出した時点から 8 時間になる。
2.c.3	上記の 2.c.2 にリストした温度を超えて保管または陳列された場合、どのような可能性があるか?	レストランは温度調節されている。我々のデータによれば、室温は通常 21.1°C (70°F) だが、短期間 23.9°C (75°F) まで上昇することもあり得る。	
2.c.4	準備、保管または陳列によって生じる恐れのあるハザードは他にもあるか?	サービス中に消費者による再汚染はあり得るが、Food Code の通常の慣行に従って、くしゃみガードやトングを使用している。	
2.c.5	製造から消費までの予想最大期間は?	温度管理外にある最大時間は、8 時間である。	
2.c.6	腐敗または受け入れ難い品質になるまでの期間	室温で 24 時間後に明らかに腐敗する。	

	は？		
3	増殖または不活化に関する食品評価が必要かどうかを判断する		
3.a	pHと $A_w$ 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 $A_w$ 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	4.e.2 および4.e.3の回答を参照。	

	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	予測モデル	<p>温度 21°C (69.8°F), pH 6.2, <math>A_w</math> 0.995 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, 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.</p>	
4.e.3	文献と選択を比較せよ.	<p>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.</p> <p>文献ベースのモデルは「21°C (69.8°F) で 8 時間後,</p>	

		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。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。	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かがあるか？（ $A_w$ 、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使用を検討すること)	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。	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 ヶ所以上) にスポット接種する (約 10 µl/10 g サンプル)。目標最終濃度は、3 log CFU/10 g 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 90 mL に各 10 g 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?	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、他の葉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。

<sup>a</sup>NA : 該当なし。

付録 G. 食品チェックリスト：ミートパイ

最大 12 時間室温で陳列する完全調理済みミートパイの評価			
	検討事項	回答	追加コメント
1	本試験の目的を決める		
1.a	安全のための時間・温度管理 (TCS) の適用除外 (冷蔵不要)	NA <sup>a</sup>	常温保存可能食品ではない。
1.b	規制要件の適用変更 (温度管理せずに 4 時間を超えておく等)	完全調理済み肉製品を室温で最大 12 時間置きたい (購入後 2 時間以内の消費を想定)。	12 時間以内に提供しなければ破棄する。
1.c	死滅の検証	NA	州または連邦当局の査察を受けた食品加工施設 (調理後冷却 [cook and cool] に関する規制要件を満たしている) で加工。
1.d	冷蔵食品または軽度の温度変動下において、組成が微生物の増殖抑制になることを立証	NA	
2	本食品に関する情報を収集する		
2.a	食品の成分は何か?	RTE 食品。調理済み牛ひき肉, 香辛料, 塩, パイ生地を含む。	
2.a.1	各種の源やロット間において, 成分の一致度はどうか?	ロット間の一致性は高い。	食品規格が定められており, GMP 下の食品加工施設で製造。
2.a.2	食品および・または各コンポーネントの pH, Aw, 一般分析 (水分, 塩分, 脂質, タンパク質, 残存亜硝酸塩等) はどうか?	ビーフの肉詰め: pH 6.2, Aw 0.97. パイ生地: pH 7.0, 接触面の Aw は 0.97, 外表の Aw は 0.75.	不活化試験であれば, 脂質量の割合が重要と思われるが, 本増殖試験では該当しない。
2.a.3	これらの値は, 準備から消費までの間で変化するか?	pH は変わらない。置かれる時間が長くなれば, パイ外表の Aw は 0.75 を上回ると考えられる。	包装とパイ表面の間に凝縮物が形成されれば, 外表の Aw が上がる可能性あり。
2.a.4	寸法 (カットやピース等) はどうか? (該当の場合)	NA	コンポーネントの寸法は食品規格に一致。
2.a.5	製造開始時と完成時の一般的な微生物負荷 (種属等) はどうか?	栄養性の病原菌は調理中に不活化される。芽胞形成性の病原菌は調理後も生存している可能性がある。微生物が低濃度存在する可能性あり (生菌数は最大 2 log CFU/g)。	加工施設で完全調理済み。
2.a.6	汚染が各コンポーネントに取り込まれる, または	はい, 調理工程後に生存する芽胞が, 本食品中に広が	内外の栄養性の病原菌は調理工程により死滅

	コンポーネントに広がる可能性があるか？	る可能性がある。	するが、取り扱いや包装の際、栄養性の病原菌が外表に導入される可能性がある。
<b>2.b</b>	<b>加工調製工程はどうか？</b>		
2.b.1	本食品は、組み立て食品（複数コンポーネントから成る食品）か？	はい。	食品成分と上述を参照。
2.b.2	検証済みの微生物低減工程があるか？微生物低減工程に関連するパラメータは何か？コンポーネントが異なれば、微生物低減工程も異なるか？	はい。 RTE 食品としての適切な死滅と冷却の工程（調理後冷却の全要件を満たしている）。調理後冷却は、複数コンポーネント食品用の一工程である。	最低内部温度が 73.9°C (165°F) に達すれば、サルモネラは、死滅に関して最低 6.5 ログ低減する。(108) を参照。適切な冷却については、(109) を参照。
2.b.3	再汚染の可能性はあるか？	はい、リステリア・モノサイトゲネスは、再汚染菌の可能性はある。	個別に包まれているが、取り扱いや包装の際、栄養性の病原菌が外表に導入される可能性がある。死滅後のこのリステリア・モノサイトゲネスによる汚染リスクの管理は、9 CFR 430 が扱う (113)。
2.b.4	死滅や増殖に影響するパラメータに、どんなばらつきが見られるか？	規制された食品加工施設で管理されているため、調理済み食品の製造上のばらつきは限定的。冷蔵での流通や販売で陳列されるまでの保管の間のばらつきも限定的。	
2.b.5	本食品はどのように包装されているか？	査察済み施設にて、透明なプラスチックの食品ラップを使って、個々に手で包む。包んだパイは、ラベル表示されている箱に入れる。	水分と空気から保護する。
2.b.6	本食品は、培養または発酵しているか？意図的にスターター培養株を添加しているか？	いいえ。	
2.b.7	本食品には、抗菌剤（保存料）やその他、香辛料等の抑制性の成分が含まれるか？	いいえ。	低い含有量の香辛料や塩は菌の増殖を抑制しない。
<b>2.c</b>	<b>保管条件はどうか？</b>		
2.c.1	本食品は、販売用にどのように陳列されるか？陳列するのに、包装に変更があるか？	個別に包まれたままである。	
2.c.2	製造、準備、保管または陳列の間、予想される温度（および時間）はどのくらいか？	5°C (41°F) 以下の冷蔵で小売店に配送され、陳列されるまで冷蔵保管。顧客用の陳列では、室温におかれ	

		る。24°C (75°F) の室温で最大 12 時間陳列される。本食品は、購入後 2 時間以内に消費または冷蔵されると想定。	
2.c.3	上記の 2.c.2 にリストした温度を超えて保管または陳列された場合、どのような可能性があるか？	加熱ランプ下で加熱・陳列されれば、さらに高い温度もあり得る。	加熱ランプ下で保管される食品には、別に試験が必要なことがある。
2.c.4	準備、保管または陳列によって生じる恐れのあるハザードは他にもあるか？	いいえ。	
2.c.5	製造から消費までの予想最大期間は？	冷蔵で 7 日間。	ラベル表示されている消費期限は、製造後 7 日間である。
2.c.6	腐敗または受け入れ難い品質になるまでの期間は？	冷蔵で 10 日間、常温で 2 日間。	食品は常温陳列から 12 時間後に破棄するが、陳列期間の最後でも、受け入れ可能な外観と匂いを維持していることもある。加熱ランプ下での保管は、受け入れ難い官能特性につながる可能性がある。
3	増殖または不活化に関する食品評価が必要かどうかを判断する		
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、ビーフの肉詰めの pH は 6.2、Aw は 0.97 である。	Aw が 0.75 のパイの外側コンポーネントは、増殖の食品評価は不要。
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？	はい、安全のための温度管理がされていない場合は、最大 4 時間が限度である (Food Code)。	
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。	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、腸炎ビブリオ、 <del>ビブリオ・バルネイカス</del> 。	
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)	ウエルシュ菌、ボツリヌス菌、セレウス菌。	USDA FSIS の検証済み調理工程により、栄養細胞は懸念されない。加工後汚染はパイシエルの外側に限定されるが、aw が非常に低