

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？	40°C (104°F) に上る温度で置かれる可能性があるが、8 時間未満で品質劣化が起こる。	
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？	環境からリステリア・モノサイトゲネス汚染が発生する可能性がある。取扱いから黄色ブドウ球菌汚染を招く恐れもある。	
2.c.5	製造から消費までの予想最大期間は？	店舗で最大 8 時間陳列し、売れてから消費されるまでに 2 時間 (計 10 時間)。	
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？	パサパサしているように見えても、試験期間中は受け入れ可能な品質である。ピザに関して受け入れ難い品質パラメータや、受け入れ難い品質だと顧客が判断する可能性のあるものは、ほとんど知られていない。一般的な食品安全の慣行に従って、購入から 2 時間以内に消費されるか、冷蔵される。	
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 $A_w$ 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。本食品は、パーツによっては pH が 5.0 超、 $A_w$ が 0.92 超であり、再汚染から保護されていない。	複数コンポーネント食品である。ピザ生地の $A_w$ は低いですが、ソースの水分によって $A_w$ は高くなる。ソースはまた、ピザ生地の pH も下げる。食品の水分喪失が時間をかけて起こる。
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。	
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？	TCS に最新版 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。	チーズの測定 pH が 5.4、最大 $A_w$ 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、黄色ブドウ球菌である。 チーズとソースの接触面では、測定 pH が 5.3、最大	シーフードは含まれないので、ビブリオ属は、検討から除外。

		<p><math>A_w</math>が0.98であることから、上記と同じ微生物が懸念される。</p> <p>ソースとピザ生地の接触面では、測定 pH が 5.0、最大 <math>A_w</math>が0.97であることから、上記と同じ微生物が懸念される。</p>	
4.b	<p>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）</p>	<p>セレウス菌 とボツリヌス菌の芽胞は、ベーキング後も生存している。リステリア・モノサイトゲネスと黄色ブドウ球菌は、工程後の取り扱いにより存在する可能性がある。</p> <p>チーズピザの消費に起因する疾患の発生は知られていないが、大腸菌 O157:H7 による疾患は、冷凍ペパロニピザとの関連性が指摘されている。しかし、大流行の原因は不明である (70)。</p>	<p>病原性大腸菌とサルモネラは、ベーキングが適切に行われれば不活化する。これらが環境中に存在する可能性も低いいため、これらの微生物によるチーズピザの再汚染の可能性は低い。</p> <p>ボツリヌス菌も検討から除外した。理由は、好気条件で pH 値も低く、また、セレウス菌の芽胞の方が一般的で、増殖も速い可能性がある。</p>
4.c	<p>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？</p>	<p>再汚染が万が一発生した場合の安全性を判断するのに、試験をデザインする。</p>	
4.d	<p>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？</p>	<p>いいえ。</p>	
4.e	<p>増殖抑制 (TCS) 試験について：</p>		
4.e.1	<p>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 芽胞形成菌を考えること。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。</p>	<p>どの菌の増殖が速いのかは、測定されていなかった。4.e.2 を参照。</p>	
4.e.2	<p>予測モデル</p>	<p>チーズ表面 (pH 5.4, <math>A_w</math> 0.96, 27°C [80.6°F]) : 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・モノサイ</p>	

	<p>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>ソースとピザ生地の接触面（pH 5.0, <math>A_w</math>0.97）：黄色ブドウ球菌について、PMPは「好気条件下で、34時間（時間差なしで約23時間）以内に3ログ増加」、ComBase Predictorは「同条件下で、23時間（時間差なしで約16時間）以内に3ログ増加」と予測。リステリア・モノサイトゲネスについて、PMPは「同条件下で、52時間（時間差なしで約9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、34時間（時間差なしで13時間以内）のうちに1ログ増加」と予測。セレウス菌について、PMPは「約21時間（時間差なしで8.5時間）以内に3ログ増加」、ComBase Predictorは、<math>CO_2</math>が40%で「同条件下で、85時間（時間差なしで41時間）以内に3ログ増加」と予測している。</p> <p>チーズとソースの接触面（pH 5.3, <math>A_w</math>0.98）：黄色ブドウ球菌について、PMPは「好気条件下で、22時間（時間差なしで約16時間）以内に3ログ増加」、ComBase Predictorは「同条件下で、15時間（時間差なしで10時間）以内に3ログ増加」と予測。リステリア・モノサイトゲネスについて、PMPは「同条件下で、22時間（時間差なしで約5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、19時間（時間差なしで8時間以内）以内に</p>	
--	--	--

		1 ログ増加」と予測。セレウス菌 について、PMP は「約 15 時間（時間差なしで 10 時間）以内に 3 ログ増加」、ComBase Predictor は、CO <sub>2</sub> が 40% で「42 時間（時間差なしで 21 時間）以内に 3 ログ増加」と予測している。	
4.e.3	文献と選択を比較せよ。		
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？		
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？	リステリア・モノサイトゲネス、黄色ブドウ球菌、セレウス菌。	モデリングの結果は、リステリア・モノサイトゲネス、黄色ブドウ球菌、セレウス菌 が チャレンジ試験の候補として考えられる全てと示唆しており、いずれもモデリングのみをベースにした検討から、完全には除外することはできない。
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？（Aw、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.	10 時間×1.5=15 時間.	
5.a.1	製造から消費までの最大期間	最大 10 時間.	
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	NA	
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, 4, 8, 10, 15 時間の時点のサンプル.	
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)	リステリア・モノサイトゲネス, 黄色ブドウ球菌, セレウス菌 の複数菌株を混合して用いる. 各病原菌の複合物は、個別に試験する (つまり、あるサンプル一組にリステリア・モノサイトゲネス複合物を接種したら、別のサンプル一組には黄色ブドウ球菌複合物を接種する, 等).	
6.b	接種材料の調製に適応が必要かどうか?	いいえ.	ソースの pH は低いですが、リステリア・モノサイトゲネスは環境から入ってきて、酸に適応

			しないと思われる。適応は黄色ブドウ球菌やセレウス菌では懸念されない。
6.c	接種方法を決める (表面, 混合, 浸漬, 液体, 乾燥等)	ピザ全体を 16 等分にスライスする (約 75 g ずつ)。(ピザは約 1,200 g と仮定。) 個々のスライスの表面と切り口に, 黄色ブドウ球菌, リステリア・モノサイトゲネス, またはセレウス菌 を接種する。	各複製で必要なのは, 10 切れの接種スライス (各サンプル採取時点につき 2 切れ) と各被験微生物につき 5 切れの対照。
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)	2 log CFU/g 以上のリステリア・モノサイトゲネス, 黄色ブドウ球菌, またはセレウス菌 を, 切り口も含めた表面に, スポット接種により接種する (50 $\mu$ 0 スポットを数回)。 上述のように, 各微生物は個別に接種し, 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 aw は変わらないと示唆している。
6.e	用いる包装を決める	通常の陳列されている間, 食品は包装されていないが, 本試験期間は, 軽くフタのできるボール紙またはプラスチックのピザ用容器に入れ, 環境から保護する。	
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	30°C (86°F) で培養。	最大温度下の食品は, 購入や消費を思いとどまらせる有害な品質変化が生じないようにおく。
6.g	サンプル採取方法とサンプルサイズを決める	ピザのスライス 1 切れ全体 (約 75 g) を分析。	付録 A に示す方法に従って, スライスの黄色ブドウ球菌, セレウス菌, リステリア・モノサイトゲネスを試験する。
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?	各被験微生物につき, 3 ロットの複製 (独自製造) (つまり, 3 個のホールピザ)。各試験期間につき, サンプル (スライス) を複製する。	異なるロットのピザを製造する際に, ばらつきが最も大きくなる可能性がある。
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	サロゲートは使用しない。	

	れば, 正当化せよ.		
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他の腐敗微生物をモニターするのに使用.	
7.c	他の対照に何が必要か? (増殖の陰性・陽性対照を含む)		
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, 黄色ブドウ球菌またはセレウス菌 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 25g にリステリア・モノサイトゲネスが検出されれば, 本食品の品質は落ちることに注意されたい. 黄色ブドウ球菌とセレウス菌 に選択した「3 ログ以下」という値は, IFT 報告書 (53) の提案に基づくものである. もっと低い数値の方が実施可能と考える規制当局もあるかもしれない.
8.b	本結果を利用するのに, 限界は何か?	これらの結果は, トマトソースのチーズピザにのみ適用可能であり, 肉や野菜をトッピングしたピザには適用できない.	チーズやトマトソースの量をわずかに変更しても, 被験微生物の増殖に大きく影響する可能性は低い.

<sup>a</sup>NA: 該当なし.

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）  
「HACCP の導入推進を科学的に支援する手法に関する研究」  
分担研究報告書

蛍光指紋を用いた生菌数可視化装置による生菌数測定に関する研究  
代表研究者 山本 茂貴 東海大学海洋学部

研究要旨： 蛍光指紋(fluorescence fingerprint)の特性を利用した非破壊センシングにより、食品中の一般生菌数を迅速に検査することで主に食品工場等の加工工程における衛生管理の効率化が期待されている。今回は荏原実業株式会社が開発した生菌数可視化装置 (fluorescent fingerprint imaging device: FFID) を用いて牛肉、マグロ、マダイの表面の一般生菌数と FFID による測定した菌数との相関似ていて検討した。

牛肉、マグロおよびマダイは、5cmx5cm、厚さ約 1cm に切り出した。一般生菌数は、0hr、24hr、48hr にペトリフィルム RAC (3M 社) で 35℃±1℃で 24 間±2 時間培養し、そこに生育したコロニーを生菌数とした。FFID は、牛肉、マグロ、マダイ用にあらかじめ準備された計量線を元に表面の生菌数とした。

牛肉は相関係数  $R^2=0.6906$ 、マグロは相関係数  $R^2=0.8185$ 、マダイは相関係数  $R^2=0.8938$  であった。マグロの相関がやや低かったが、いずれも相関が認められたことから、それぞれの食品原材料表面の生菌数を FFID によって測定可能と考えられた。

#### A. 研究目的

蛍光指紋(fluorescence fingerprint)の特性を利用した非破壊センシングにより、食品中の一般生菌数を迅速に検査することで主に食品工場等の加工工程における衛生管理の効率化が期待されている。

今回は荏原実業株式会社が開発した生菌数可視化装置 (fluorescent fingerprint imaging device: FFID) を用いて牛肉、マグロ、マダイの表面の一般生菌数と FFID による測定した菌数との相関似ていて検討した。

#### B. 研究方法

牛肉、マグロおよびマダイは、5cmx5cm、厚さ約 1cm に切り出した。一般生菌数は、0hr、24hr、48hr に、検体の重量測定後、生理食塩水で 10 倍に希釈し、ストマッキングした。それを 10 希釈検体とし、さらに 10 倍段階希釈液を作成後、適切な希釈液 1ml をペトリフィルム RAC (3M

社) で 35℃±1℃で 24 間±2 時間培養した。そこに生育したコロニーを生菌数とした。

一部の検体には、トリプトソイ液体培地であらかじめ、35℃±1℃、約 18 時間培養した *Escherichia coli* を約  $10^6$  cfu/検体塗抹して計測した。

FFID は、牛肉、マグロ、マダイ用にあらかじめ準備された計量線を元に表面の生菌数とした。

#### C. 研究結果及び考察

図 1 に牛肉、図 2 にマグロ、図 3 にマダイの結果を示した。

牛肉は相関係数  $R^2=0.6906$ 、

マグロは相関係数  $R^2=0.8185$

マダイは相関係数  $R^2=0.8938$  であった。

マグロの相関がやや低かったが、いずれも相関が認められたことから、それぞれの食品原材料表面の生菌数を FFID によって測定可能と考えられた。



**D. まとめ**

さらなる妥当性確認が必要ではあるが、いずれも相関が認められたことから、それぞれの食品原材料表面の生菌数を FFID に よって測定可能と考えられた。

**E. 研究発表**

**1. 論文発表**

なし

**2. 学会発表**

なし

**F. 知的財産権の出願・登録状況**

特になし

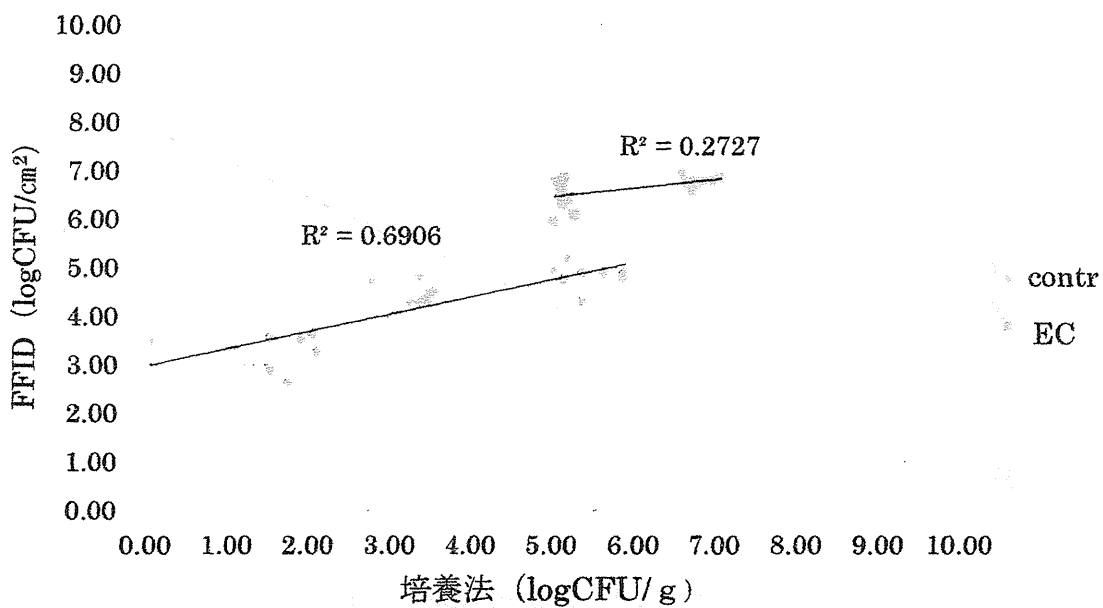


図1 牛肉の生菌数の比較

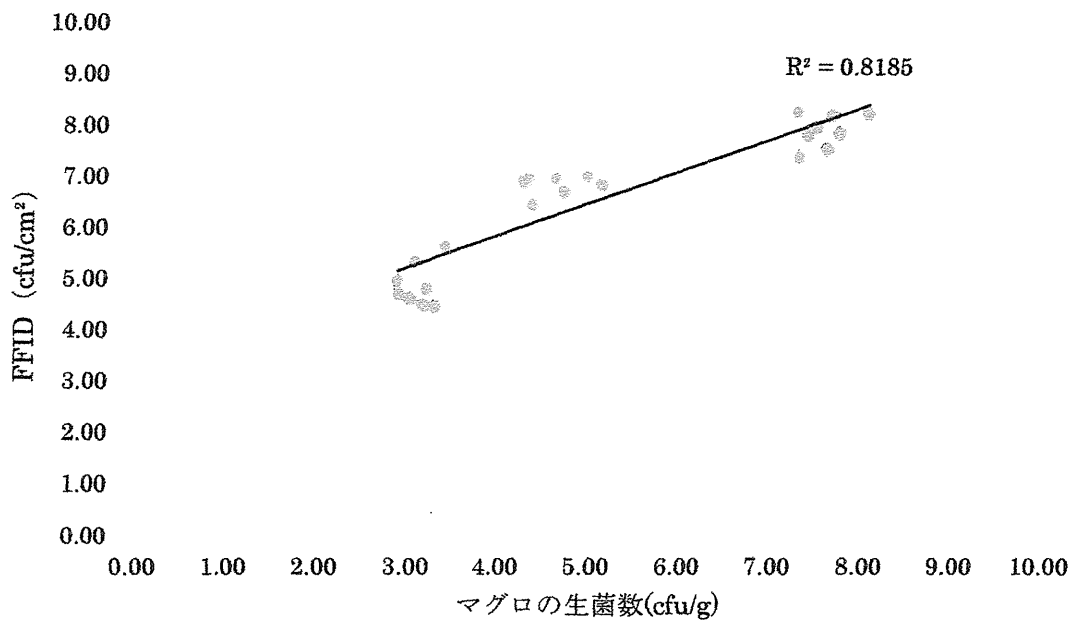


図2 マグロの生菌数の比較

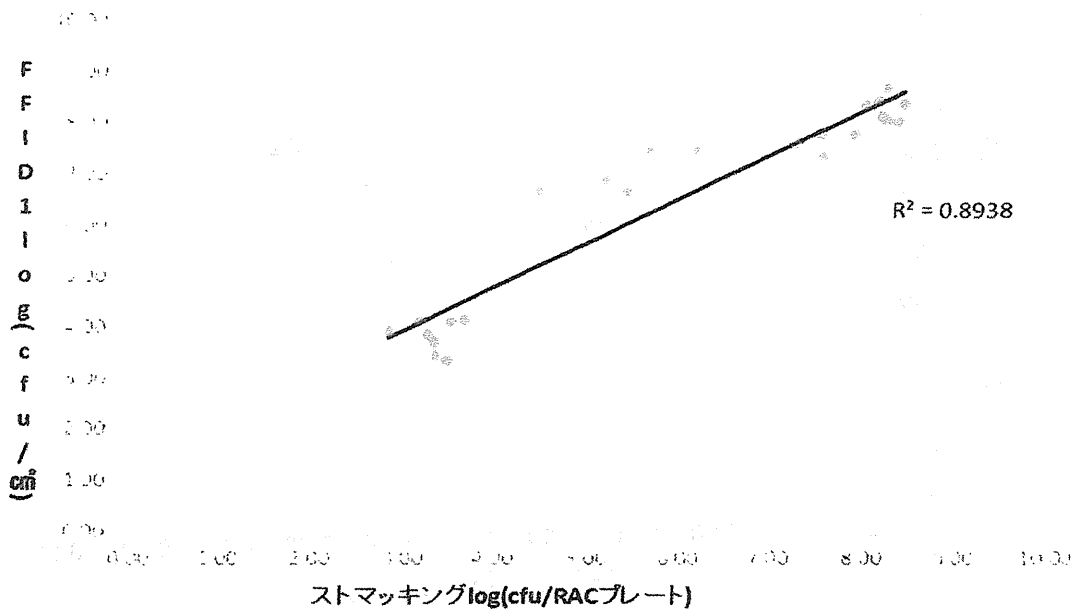


図3 マダイの生菌数の比較

