

低水分含量食品中における食中毒細菌（サルモネラ，腸管出血性大腸菌）の菌数変動および生存確率予測モデルの開発

小関 成樹（こせき しげのぶ） 北海道大学 准教授



1996年3月 北海道大学農学部卒業
1998年3月 北海道大学大学院農学研究科修士課程修了
1998年4月 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
2002年3月 北海道大学大学院農学研究科生物資源生産学専攻博士課程修了（博士（農学））
2003年4月 日本学術振興会特別研究員（独立行政法人食品総合研究所）
2005年2月 独立行政法人食品総合研究所研究員
2008年2月 農研機構 食品総合研究所 主任研究員
2010年3月 タスマニア大学農学部 客員研究員
2013年8月 北海道大学大学院農学研究院 准教授（現職）
2010年3月 第14回 安藤百福賞 発明発見奨励賞

Editorial Board member（Journal of Food Protection / International Journal of Food Microbiology / Applied and Environmental Microbiology）、内閣府食品安全委員会微生物・ウイルス専門調査会専門委員、内閣府食品安全委員会評価技術企画ワーキンググループ専門委員

<研究成果概要>

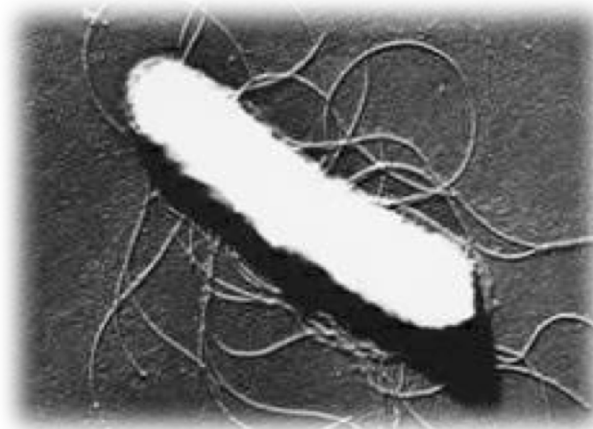
本研究では低水分活性食品（いわゆる乾き物）におけるサルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の生存／死滅に及ぼす水分活性（Water activity, a_w ）の影響を詳細に検討した。*Salmonella enterica* 4血清型（*S. Stanley*, *S. Typhimurium*, *S. Chester*および *S. Oranienburg*）と腸管出血性大腸菌3血清型（*Escherichia coli* O26, *E. coli* O111および *E. coli* O157:H7）を対象として、水分活性（ a_w 0.22～0.93）が当該細菌の生存に及ぼす影響を、食品成分の影響を排除したプラスチック表面上および食品表面上の両面から検討した。細菌集団の食品表面上とプラスチック表面上における生残の結果から、サルモネラおよび腸管出血性大腸菌の死滅に及ぼす a_w の影響は $0.22 < a_w < 0.68$ においては認められないことが明らかになった。この結果は、従来考えられてきた a_w と細菌の死滅速度との間に何らかの関係性がある、といった見解に反する新たな知見である。また、 $a_w = 0.93$ において顕著な死滅速度の増大を見出したことは、これまでの知見からは想定できない新規な結果である。 a_w が比較的高い（ $a_w = 0.8$ 程度）食品上で細菌の死滅が速い傾向は、他の研究結果においても報告がある。プラスチック表面上における生残結果とも合致することから、細菌は増殖限界程度の高い a_w 環境下（ $a_w = 0.9$ 程度）において、死滅が速くなることを明らかにした。

サルモネラおよび腸管出血性大腸菌の死滅挙動に対する a_w の影響は限定的であり、 a_w を死滅挙動の予測のための環境因子とするのは不相当と考えられた。一方で、保存温度の影響が明確に認められたことから、死滅挙動の数値モデル化において保存温度を関数としてモデル化することで、保存温度の情報から死滅挙動の予測推定を検討した。しかし、プラスチック表面上における生残とそれぞれの食品表面上での生残を比較すると大きな差異が認められた。食品上に付着した細菌は a_w の影響以外の食品成分の影響が大きいことが示唆された。今後は、低 a_w 食品として包括的に検討するのではなく、個別の食品（あるいは食品グループ）毎に食品成分の影響を加味した検討が課題である。

他方、個々の細菌細胞レベル（single cell）での生存／死滅の確率予測を検討した結果、実験で供した7血清型すべてにおいて、指数関数により、乾燥時間をパラメータとする生残確率の変化を記述するモデルを構築できた。本モデルより任意の乾燥時間において細菌の生残確率の分布を表記することが可能となった。また、全ての条件で細菌集団の生残確率推移を累積ガンマ分布でフィッティングが可能であり、細菌集団が死滅に至る時間のばらつきをガンマ分布で記述できた。温度が低いほど細菌集団の生残時間が長く、細菌集団が死滅に至る時間のばらつきが大きかった。本研究で示した細菌集団が死滅に至る時間のばらつきは、ランダムな細菌挙動を加味した予測を可能とし、少数の細菌で感染する食中毒のリスク評価に活用できる。

以上の結果から、低水分活性食品におけるサルモネラおよび腸管出血性大腸菌の食中毒リスクを推定するために必要な、細菌数の変化ならびに、少菌数における細菌の死滅確率のばらつきを的確に推定することを可能とした。これらの知見は今後の低水分活性食品におけるサルモネラおよび腸管出血性大腸菌のリスク評価のばく露評価において極めて重要な役割を果たすことが期待される。

低水分含量食品中における食中毒細菌 (サルモネラ,腸管出血性大腸菌)の菌数変動および 生存確率予測モデルの開発

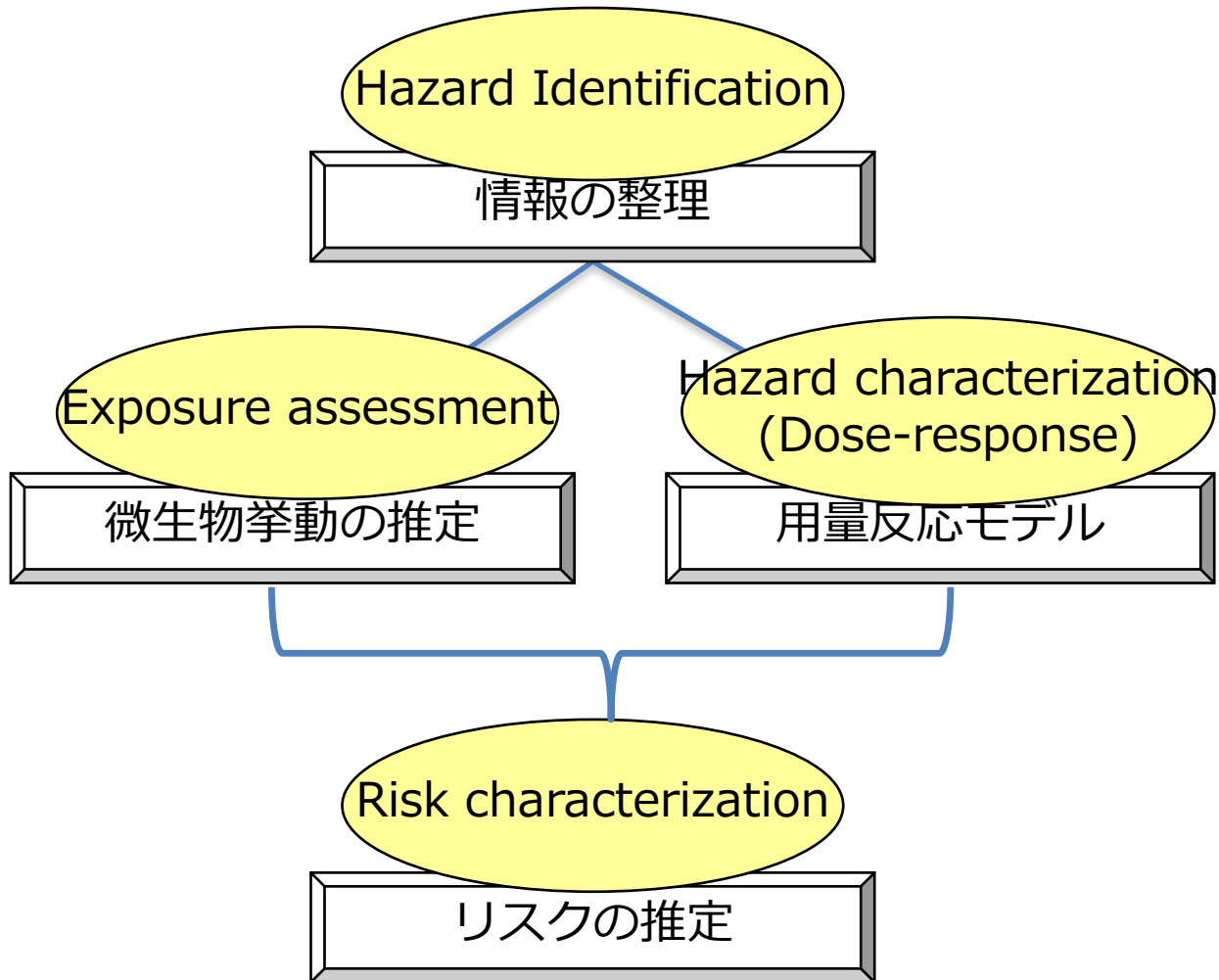


北海道大学大学院農学研究院

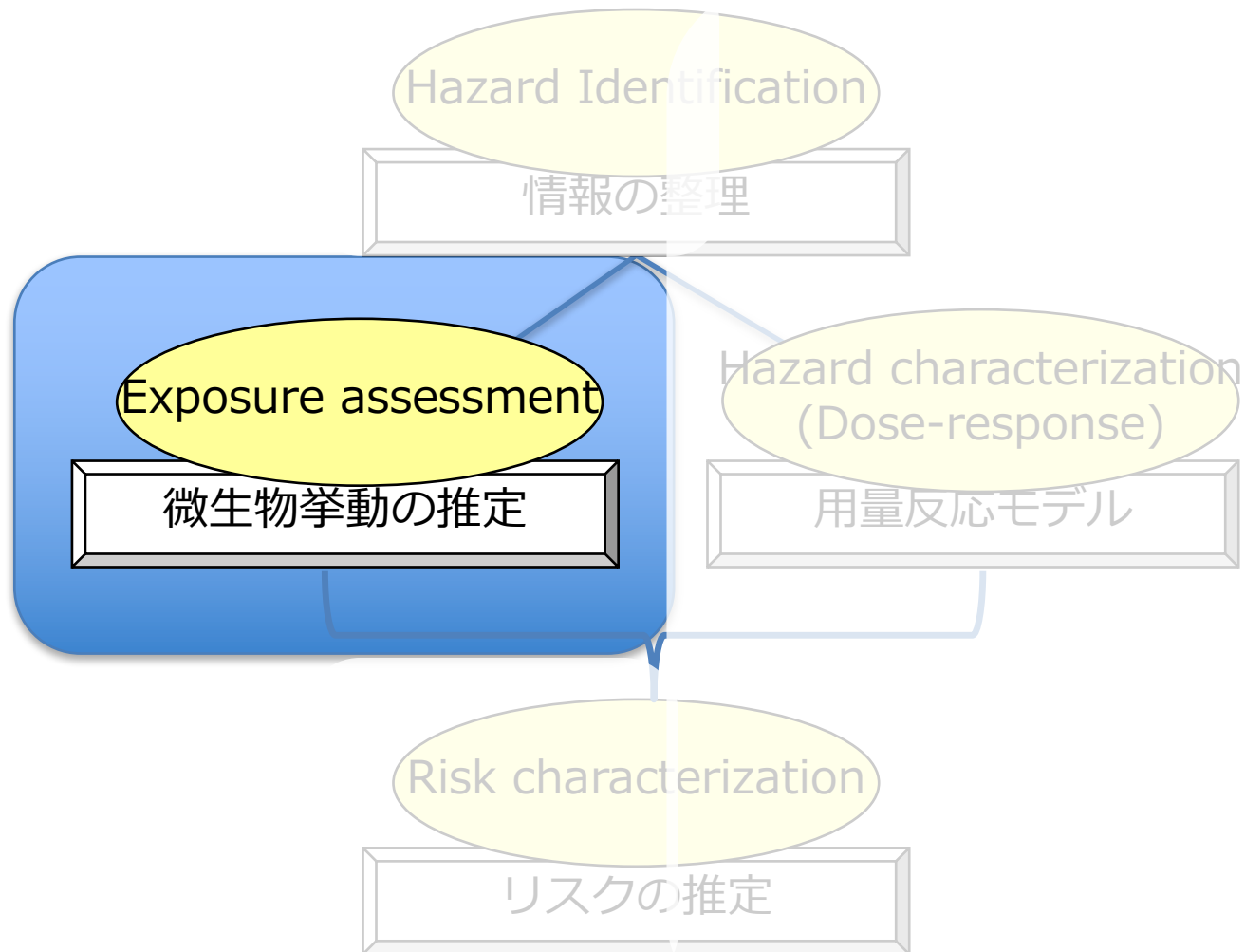
こせき しげのぶ
小関 成樹



リスク評価における 本研究のターゲットは？



リスク評価における 本研究のターゲットは？



本研究の目指したこと



低水分活性環境／食品における
サルモネラおよび腸管出血性大腸菌の生残挙動の解明



細菌集団としての生残挙動の数理モデルの開発



個々の細菌細胞の挙動の違いを確率的に捉えるための
数理モデルの開発



低水分活性環境／食品における サルモネラおよび腸管出血性大腸菌の 生残挙動の解明

背景：低水分活性食品とは？

低水分活性食品 \equiv 乾き物
(Water activity, a_w)

大規模食中毒事故が世界中で多数報告



チョコレート
イギリス, ドイツ



アーモンド
アメリカ



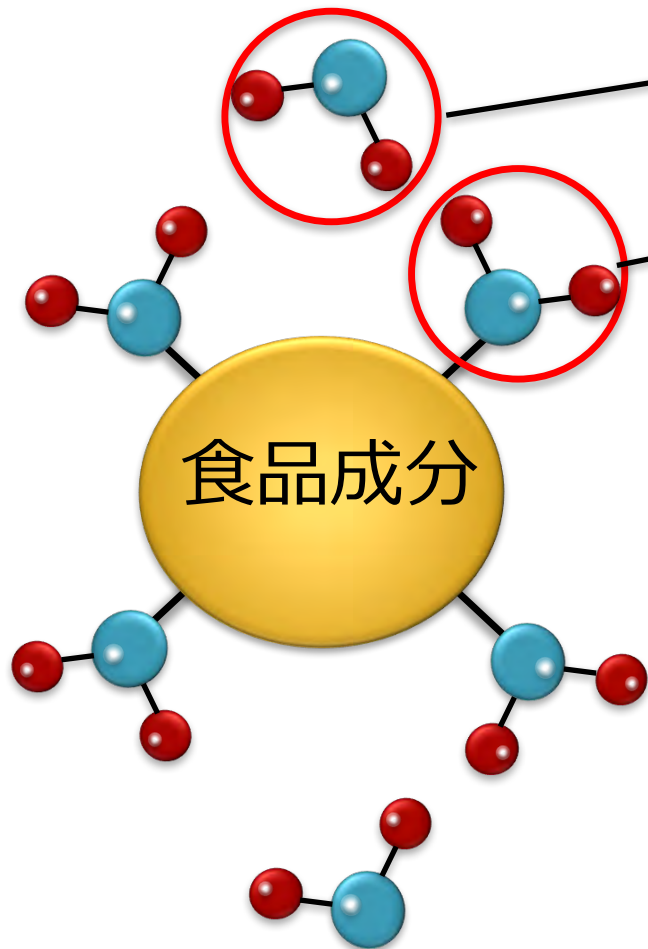
イカの燻製
日本(青森)

7,315 件の食中毒事故が報告 (Sofia, 2014)

2007 - 2012

背景：水分活性（Water activity, a_w ）とは？

水分活性とは食品に含まれる自由水の割合



自由水：微生物が利用**可能**

結合水：微生物が利用**不可能**

$$0 < a_w < 1$$



$$a_w = 0.43$$



$$a_w = 0.98$$

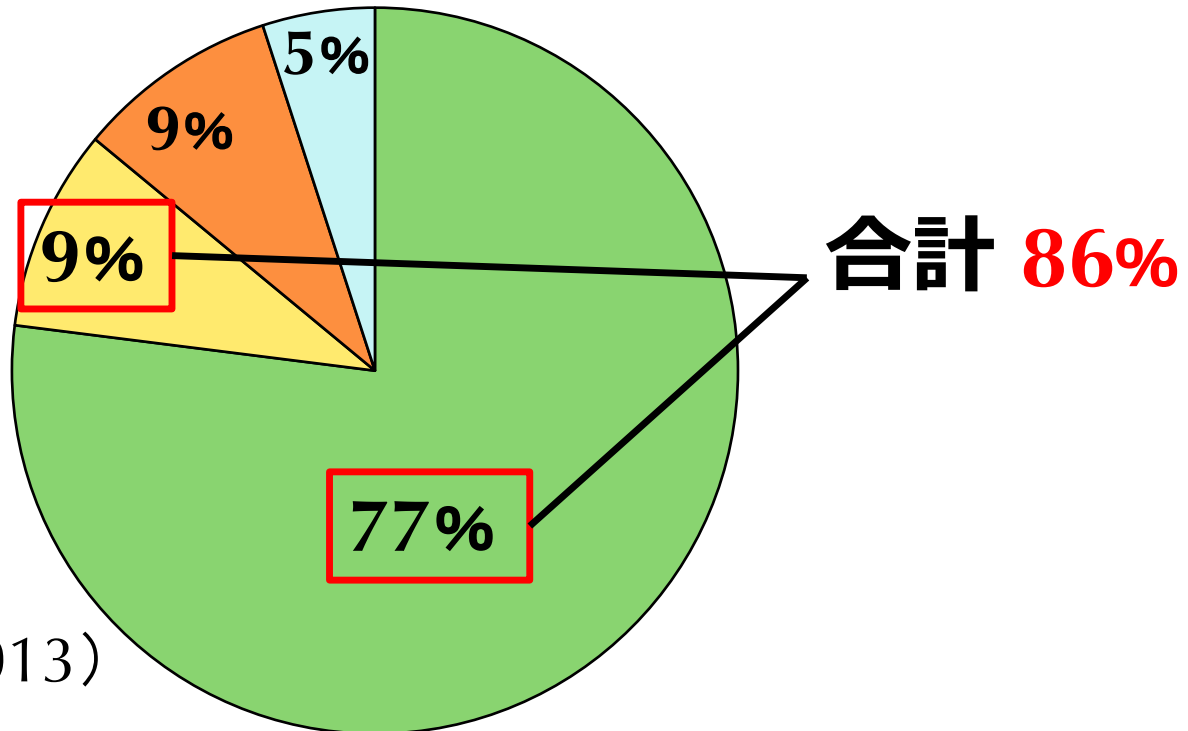
背景：問題となっている細菌は？

☆ **サルモネラ** (*Salmonella enterica*)

☆ **腸管出血性大腸菌** (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)

- **1~100 個**程度の少量でも感染成立
- 他の菌よりも**重篤度が高く、致死率も高い**

■ *Salmonella* ■ EHEC ■ *S.aureus* ■ the others



(Beuchat et al., 2013)

背景： a_w と細菌の死滅との関係性は？

a_w が低いほど、**死滅速度が減少**

(Lian et al., 2015, Park and Beuchat, 2000)



a_w が低いほど、**死滅速度が増加**

(Deng et al., 1998, Rojas et al., 2013)



サルモネラと
腸管出血性大腸菌に対する
 a_w の影響は未解明

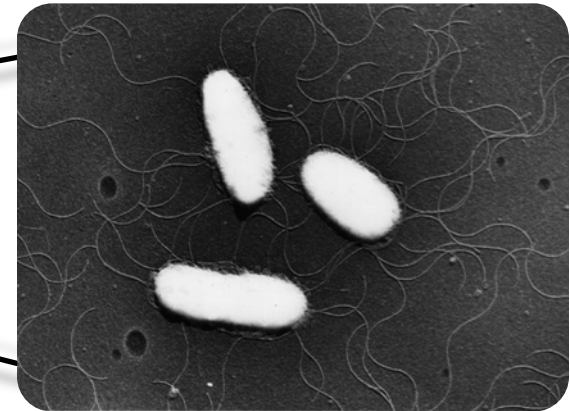
背景：これまでの研究の問題点は？

食品上での死滅挙動の検討

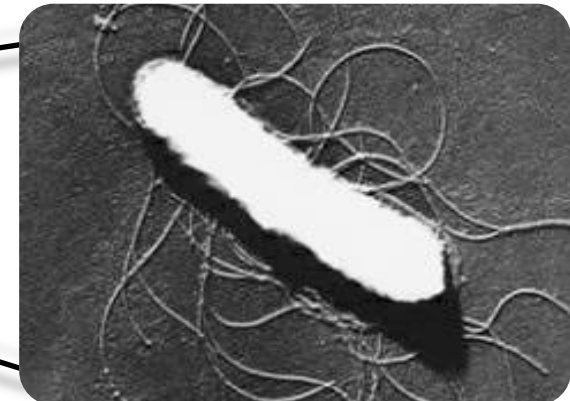
a_w の影響？ / 食品成分の影響？



サルモネラ



腸管出血性大腸菌



研究全体の目指す目標

食中毒菌の死滅 = $f(a_w)$



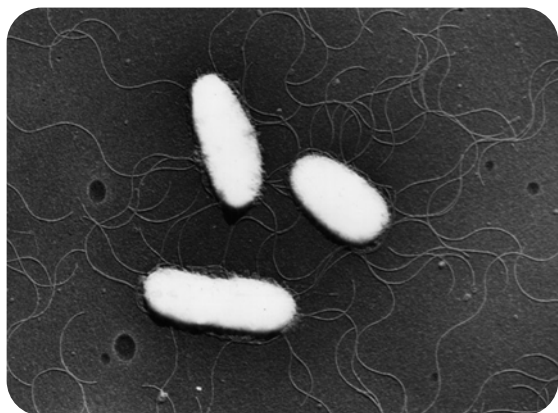
低 a_w 食品での食中毒リスクの推定



具体的なリスク管理措置の提言

本研究の目的

サルモネラと腸管出血性大腸菌の死滅における
食品成分の影響を排除した正味 a_w の影響の解明



サルモネラ

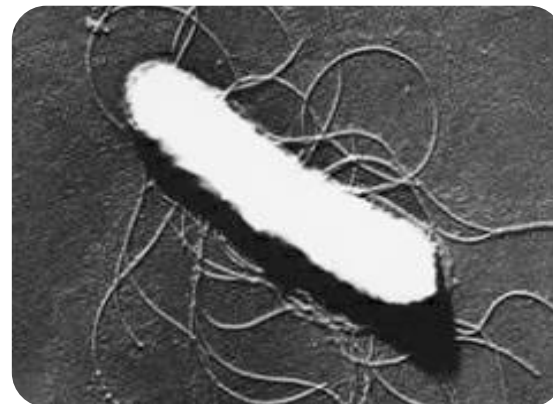
serotype

S. Stanley

S. Typhimurium

S. Chester

S. Oranienburg



腸管出血性大腸菌

serotype

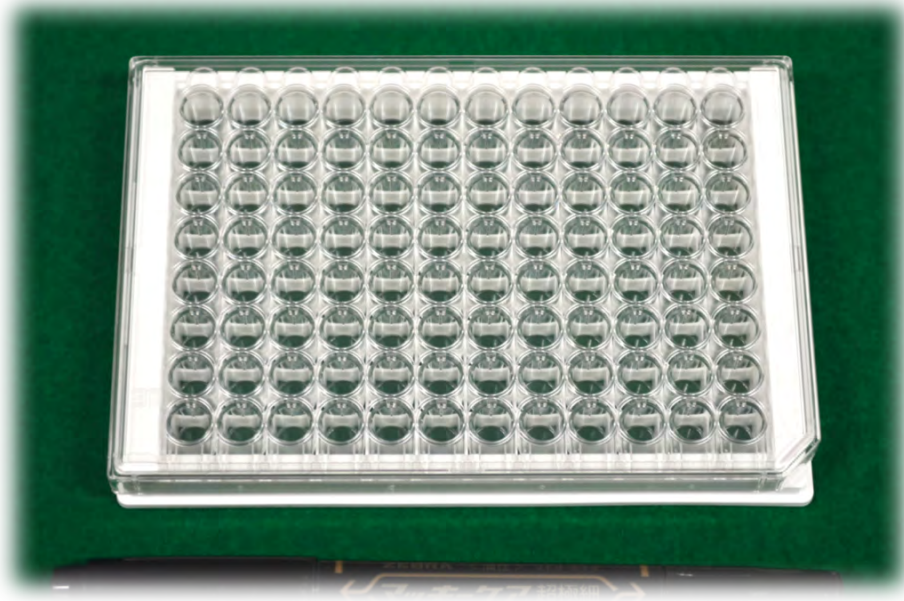
***E. coli* O26**

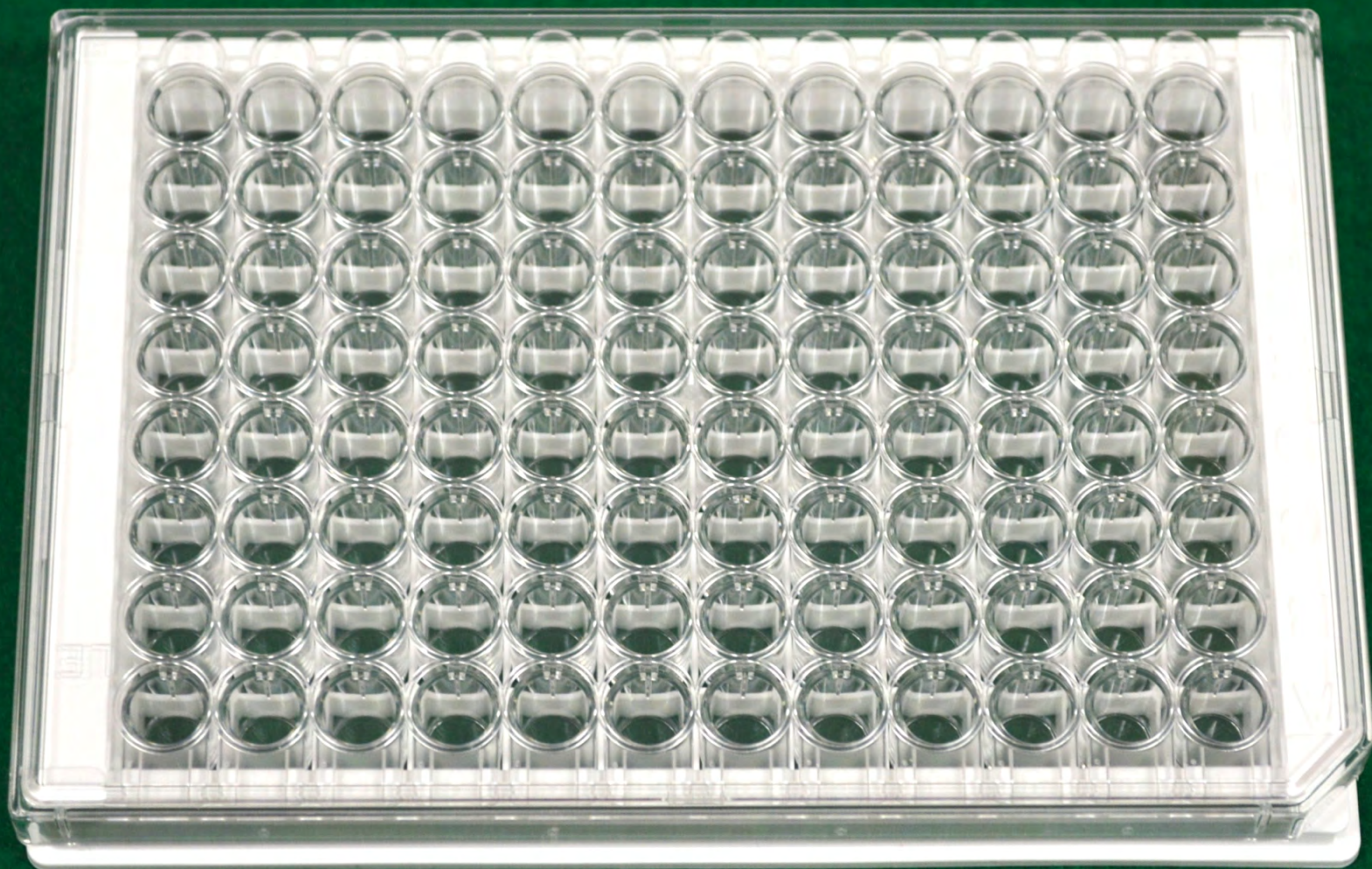
***E. coli* O111**

***E. coli* O157:H7**

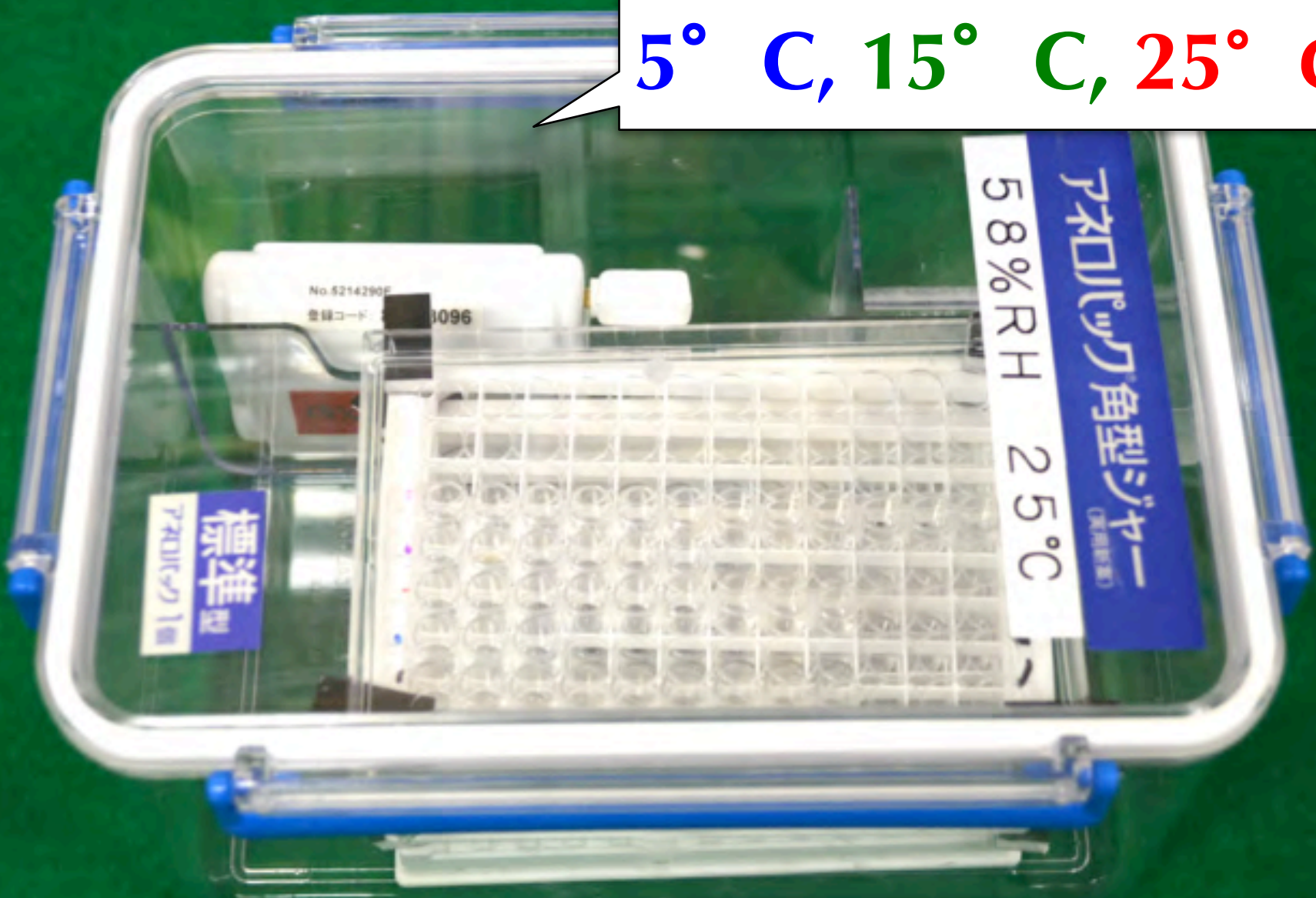
※ 全て過去に食中毒を引き起こした菌株

- **プラスチックプレートに細菌を付着させる実験**
食品成分の影響を排除して 細菌の死滅挙動を評価
- **実際の食品に細菌を付着させる実験**
プレート上の実験結果と一致するのか比較検討





5° C, 15° C, 25° C



$a_w = 0.22, 0.43, 0.58, 0.68, 0.93$



$$a_w=0.43$$



$$a_w=0.60$$

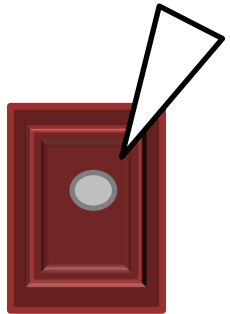


$$a_w=0.93$$

- 世界中で食されている食品
- 過去に食中毒事例の報告がある食品

方法：接種方法

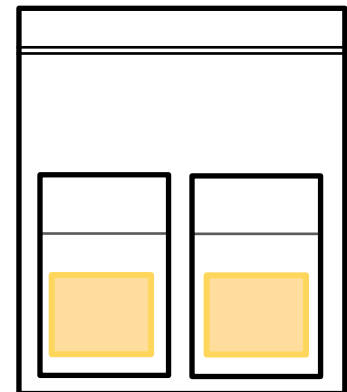
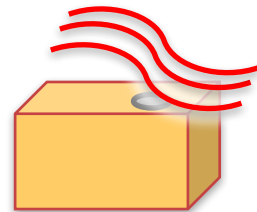
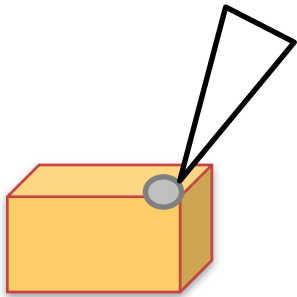
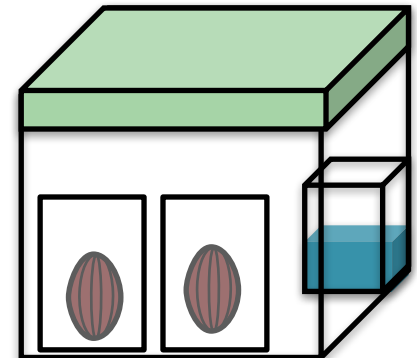
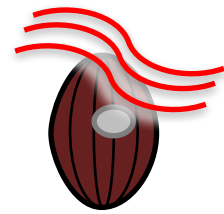
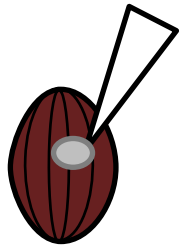
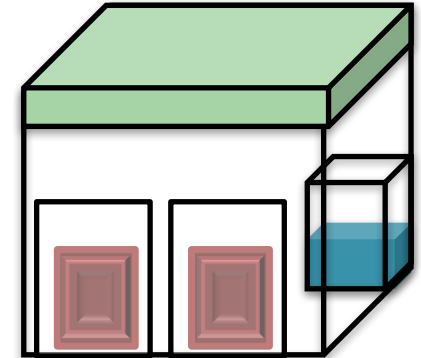
菌液付着



風乾



保存





④ 437

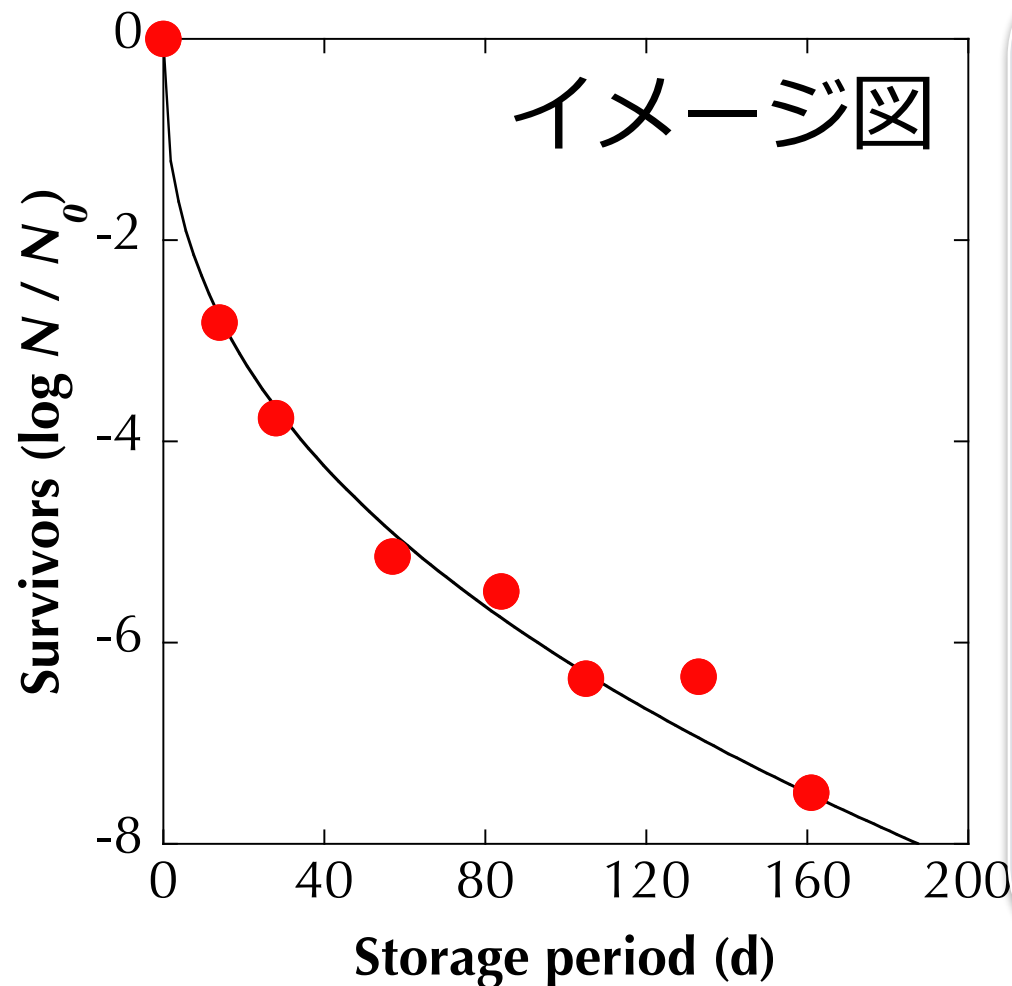
④ 437

NEPTUNE





実際の菌数ではなく、細菌の死滅の割合で評価



Weibull モデル

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = -b \times t^n$$

N_0 : 初期菌数

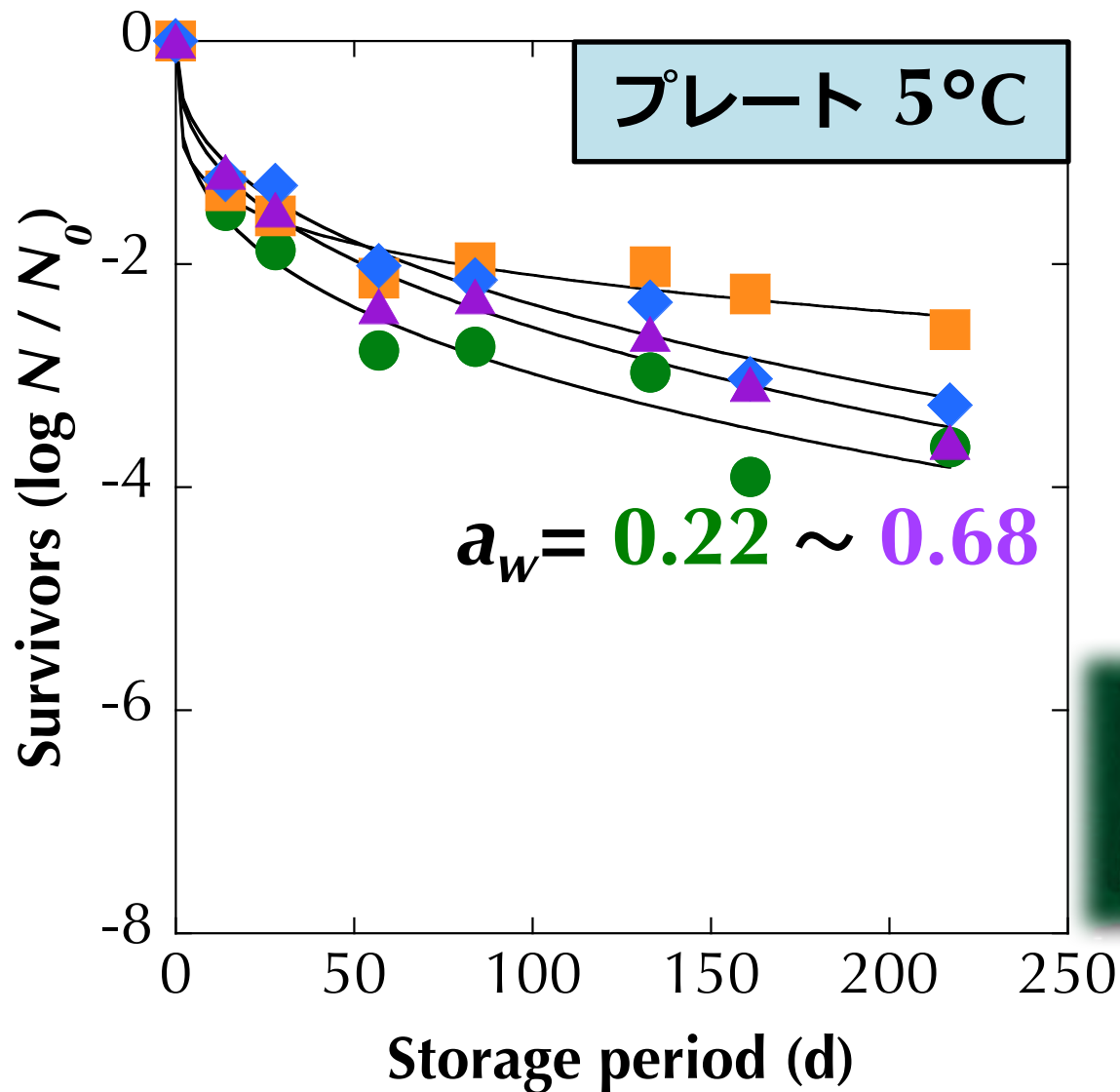
b : 速度係数

n : 形状係数

t : 経過日数

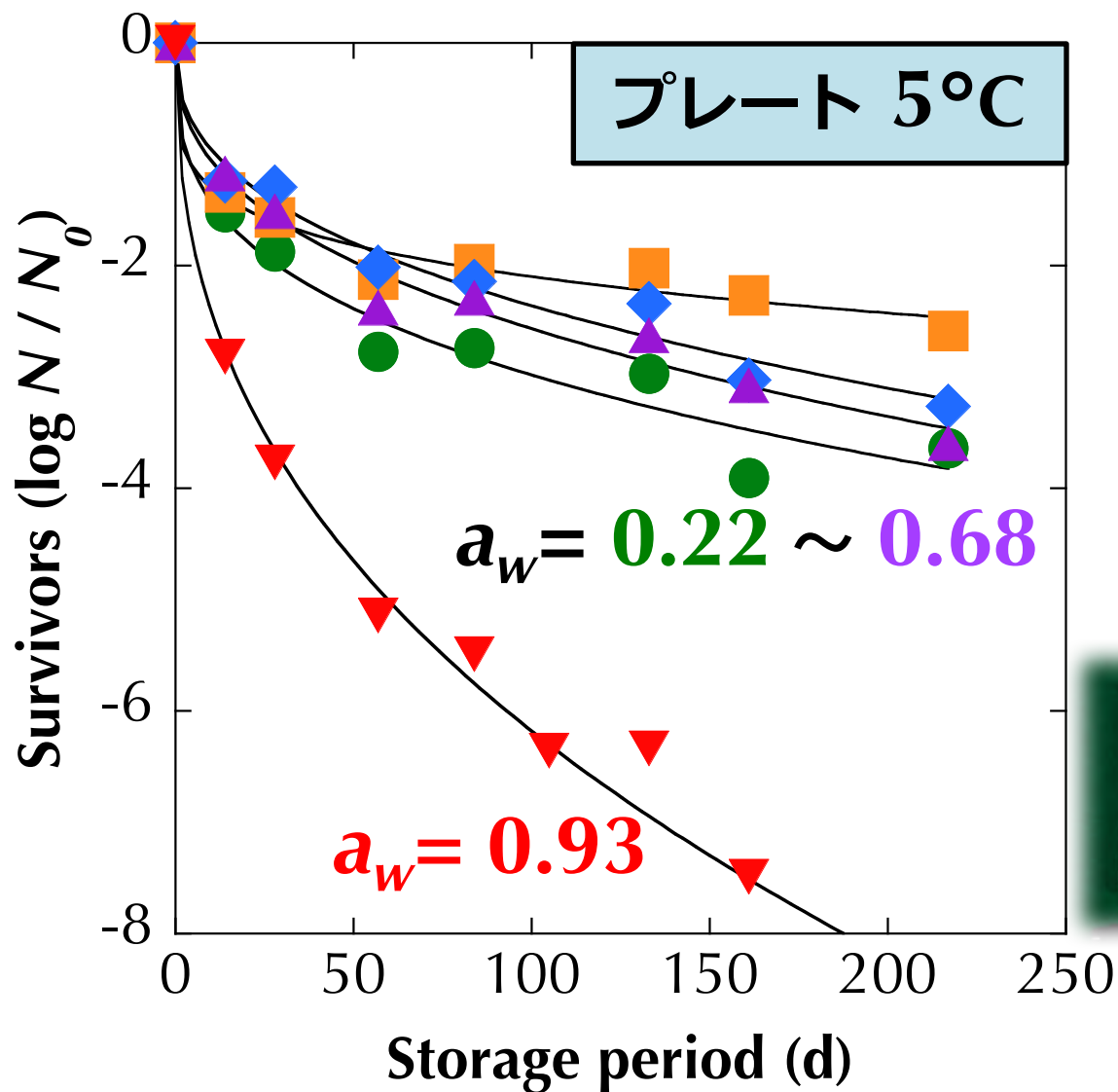
$N(t)$: 時間 t における生菌数

$a_w(0.22 \sim 0.68)$ の影響は限定的

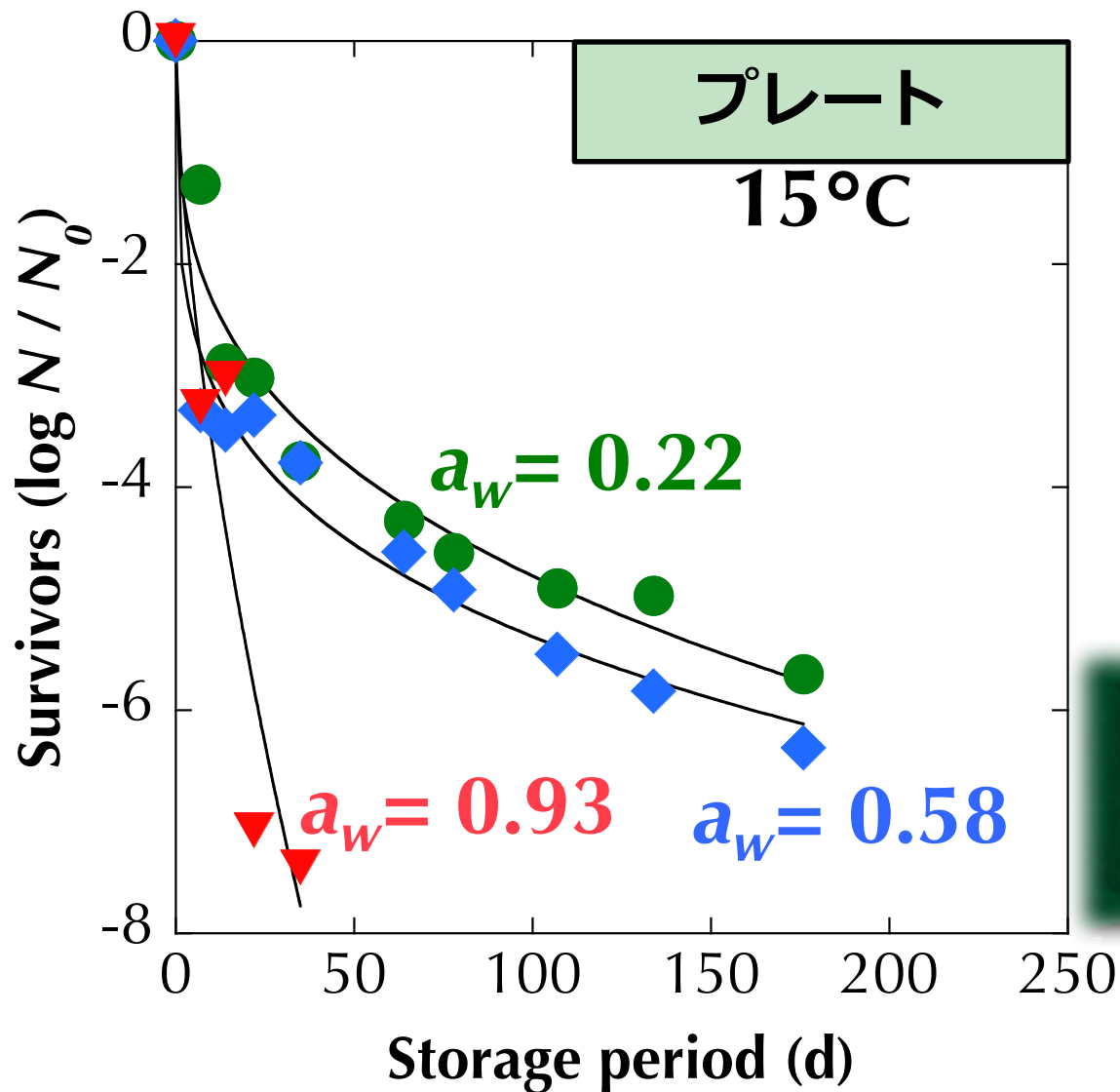


結果と考察：S. Typhimurium の死滅挙動

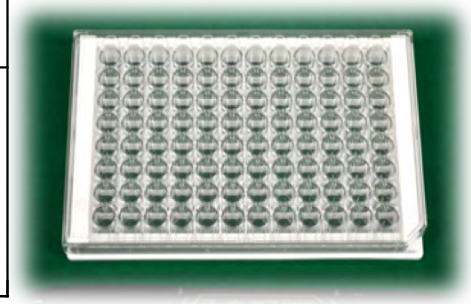
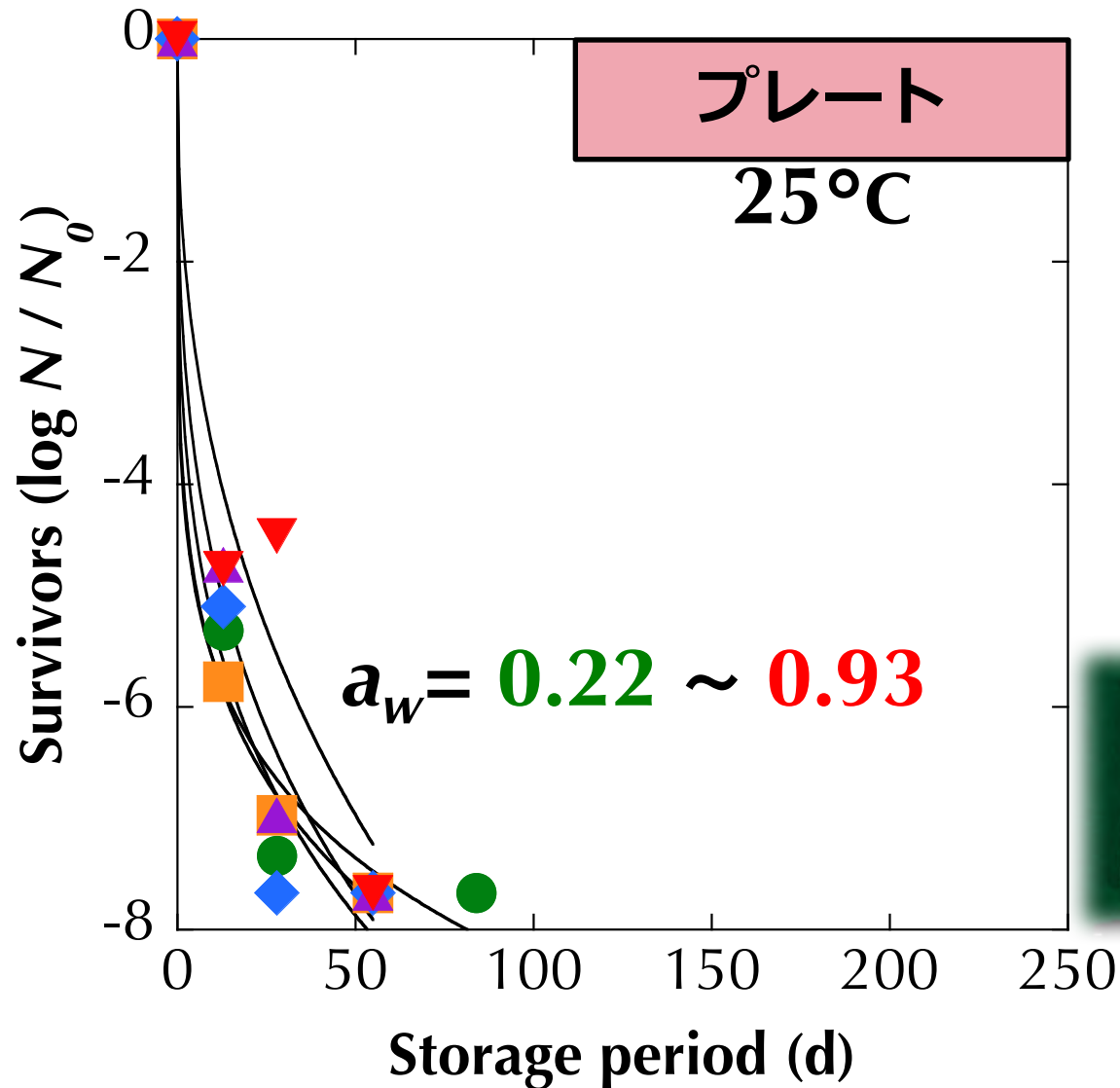
$a_w = 0.93$ 死滅が急速



$a_w(0.22\sim0.58)$ の影響は限定的



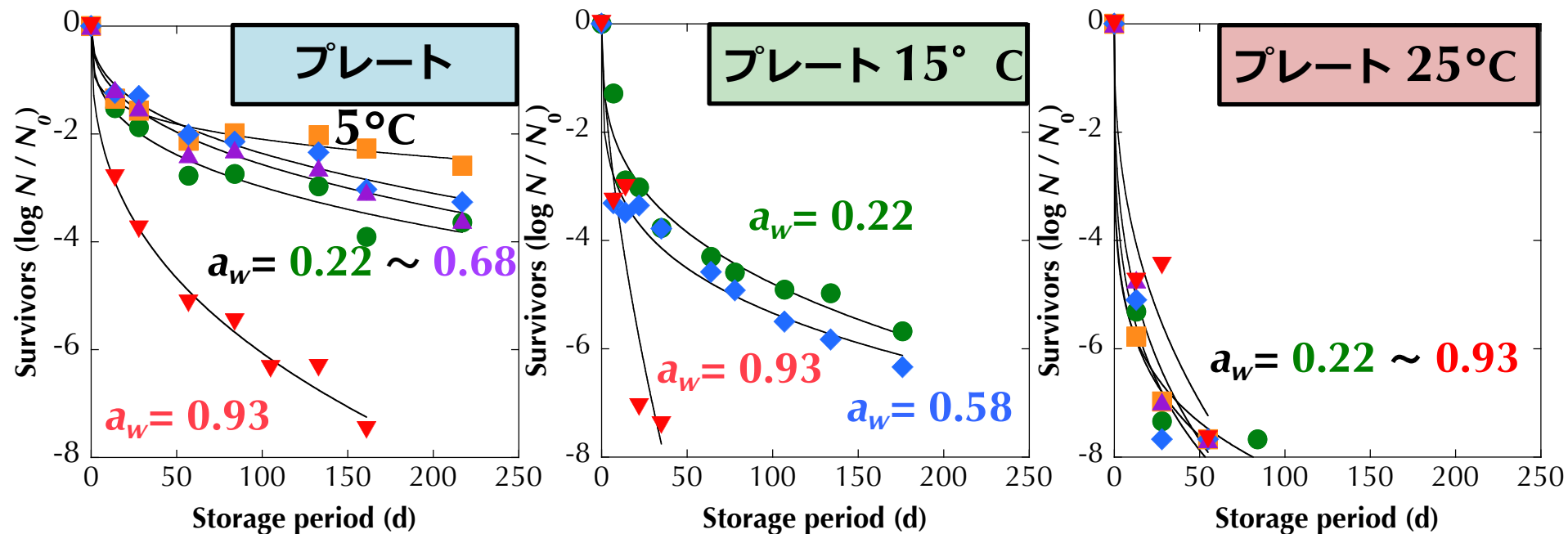
a_w の影響なし



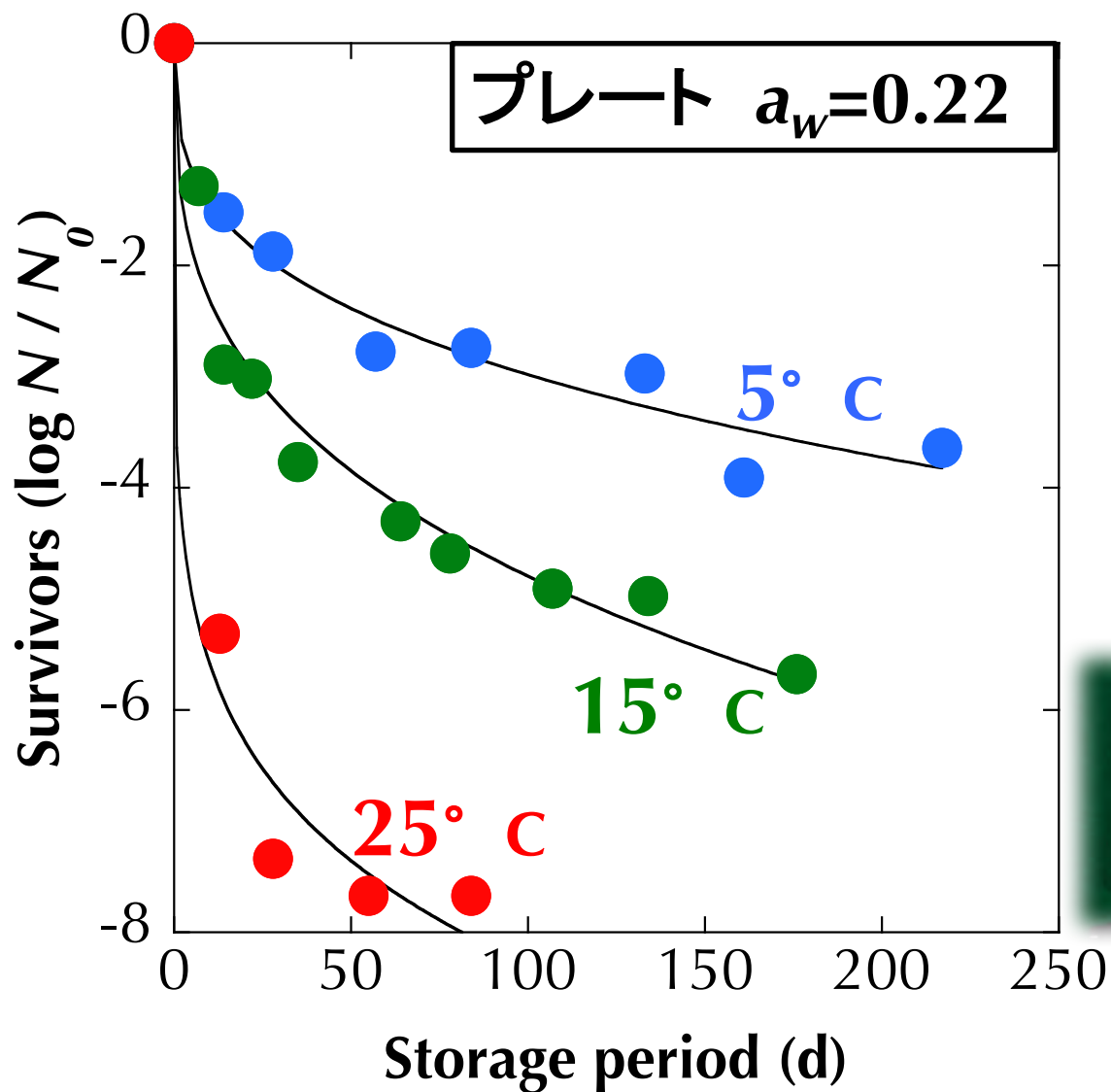
死滅挙動に対する a_w の影響を解明

$a_w = 0.22 \sim 0.68$ 温度によらずで死滅に影響無し

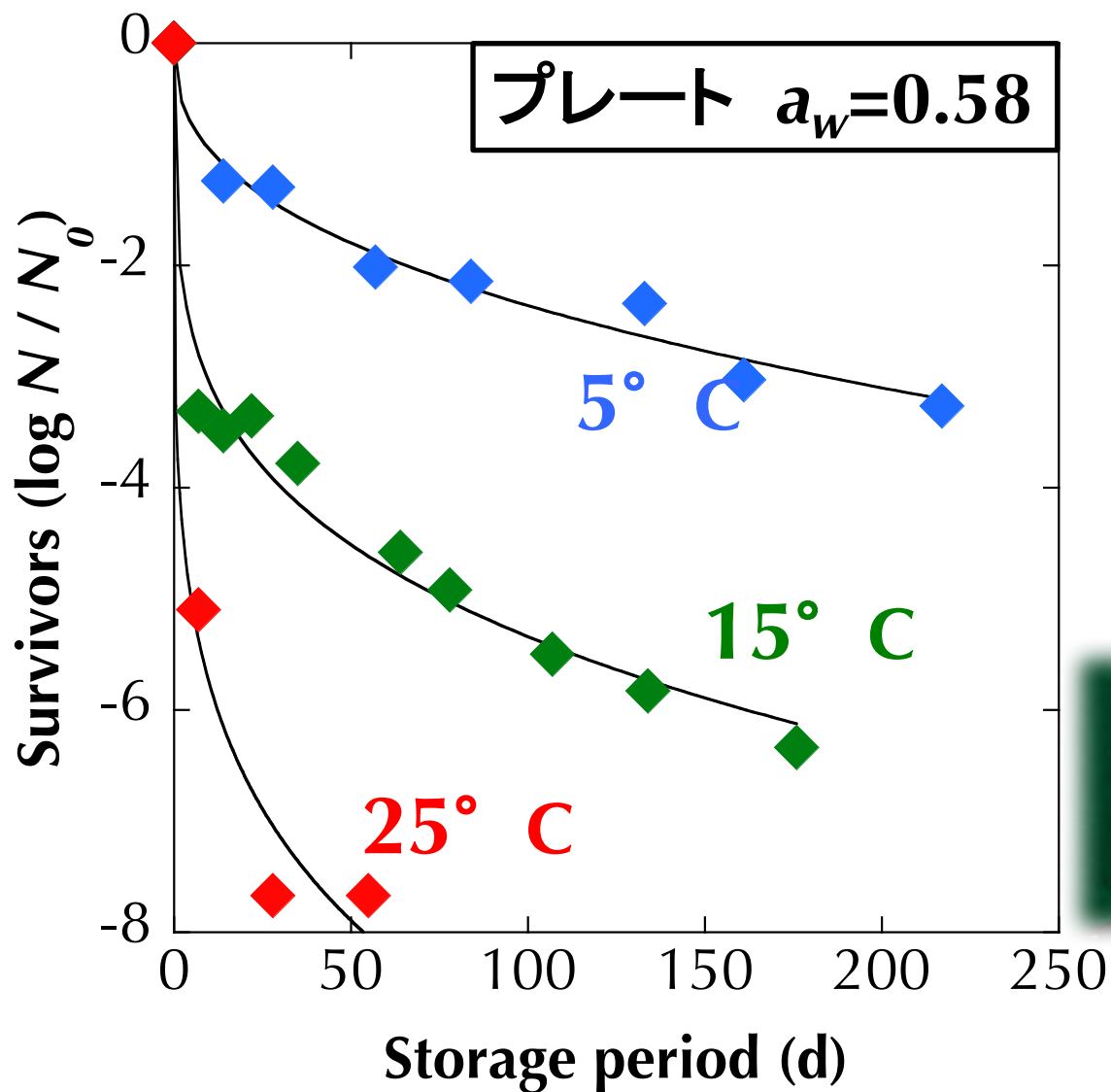
$a_w = 0.93$ において死滅速度が増大



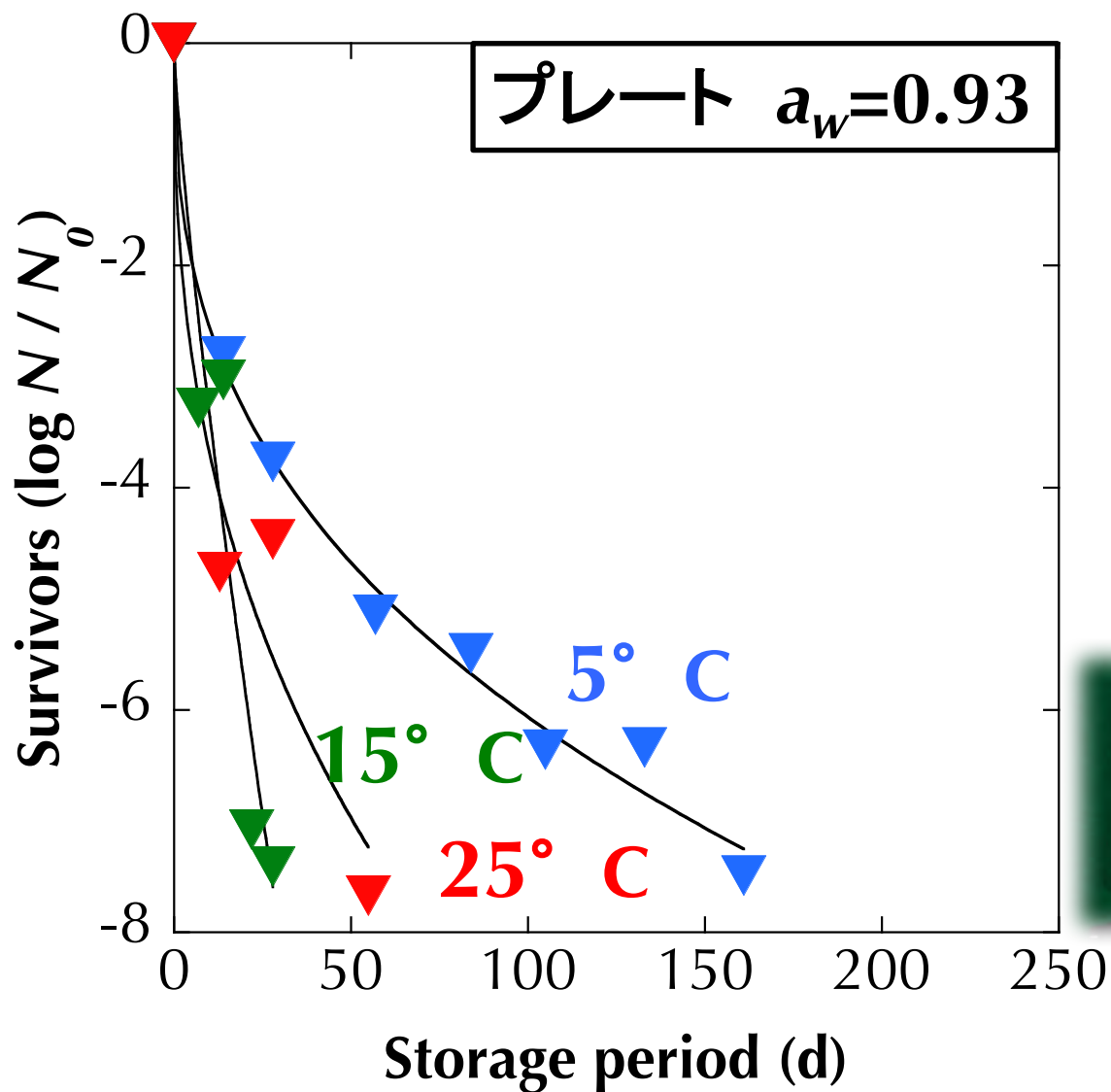
冷蔵保存で死滅が遅い



冷蔵保存で死滅が遅い

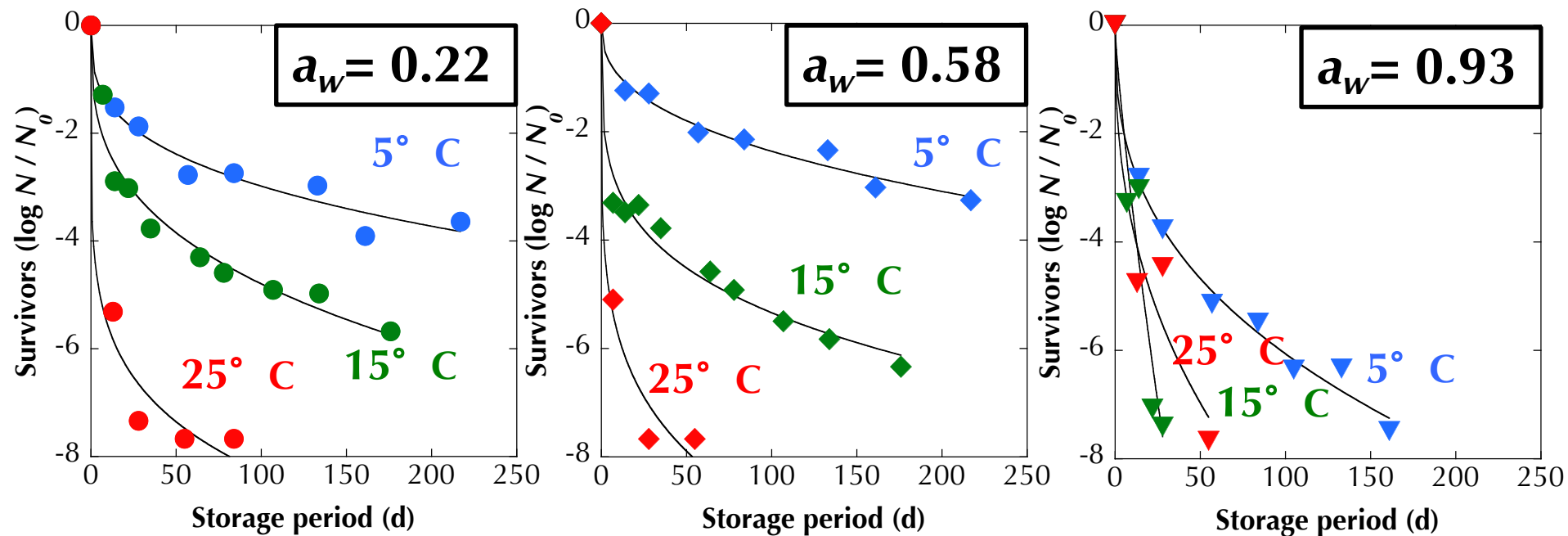


高 a_w → 温度の影響は小

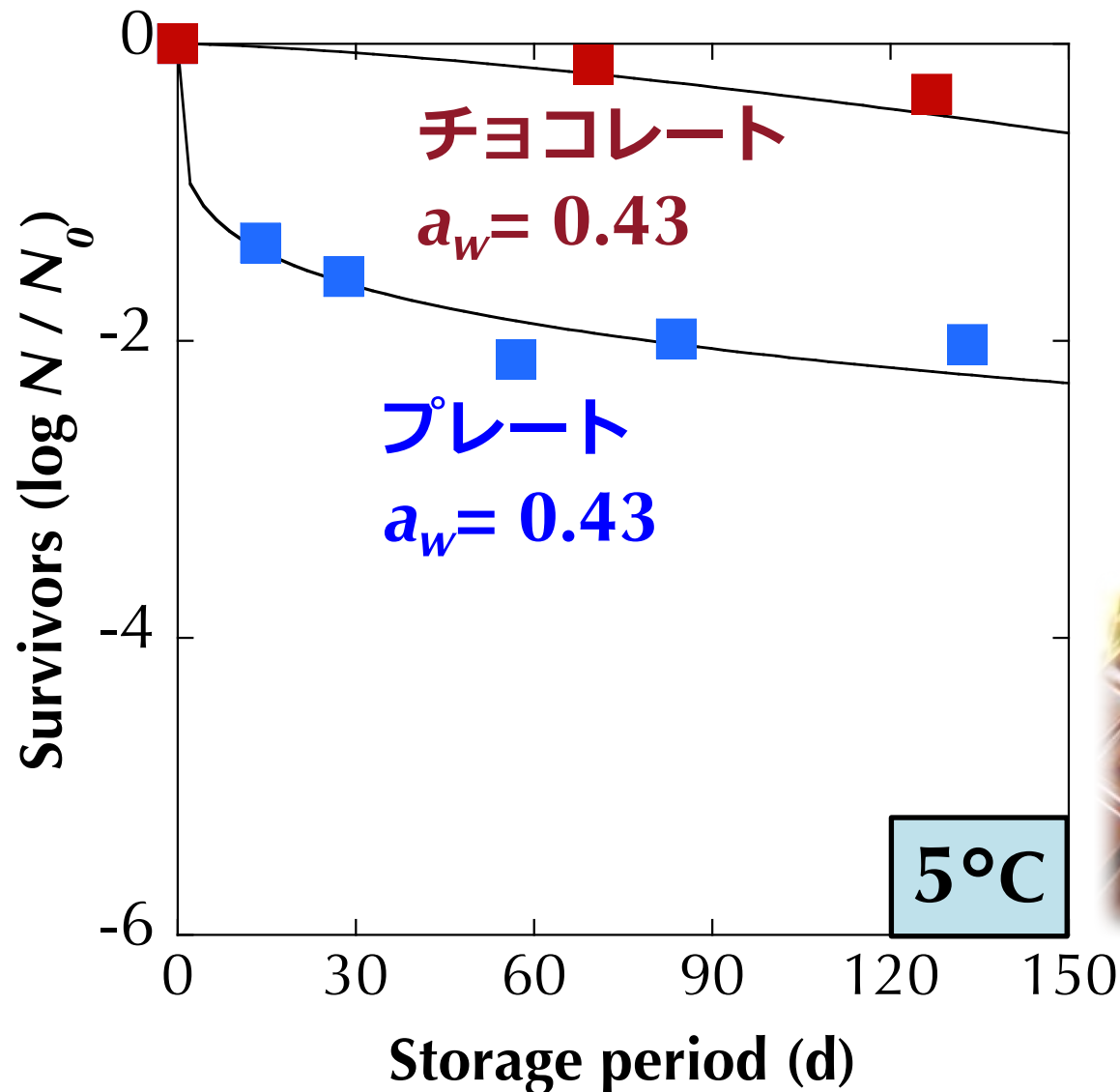


死滅挙動に対する温度依存性は明確に現れた

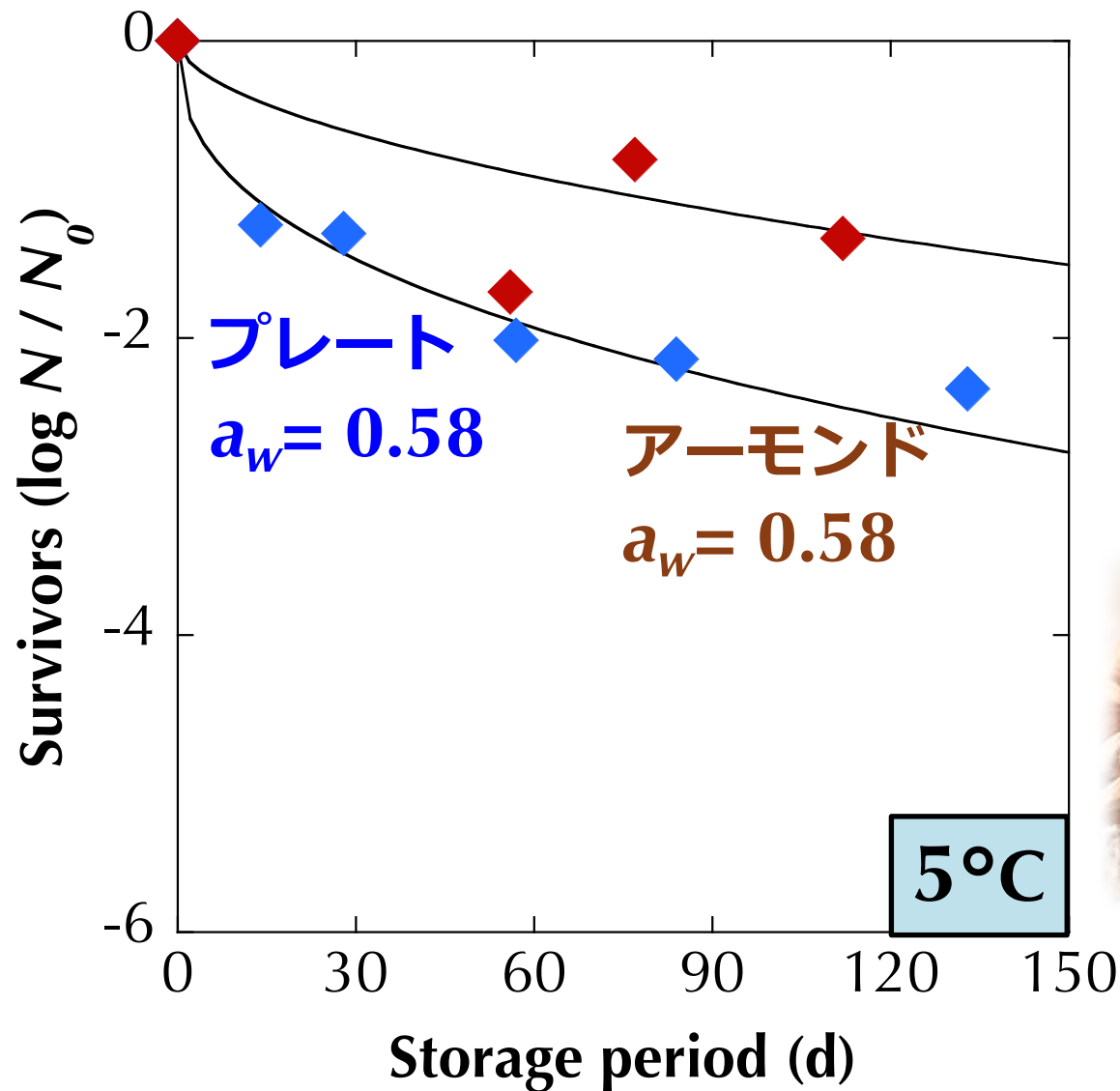
冷蔵保存5°Cで最も遅く，温度の上昇に伴い死滅速度が増大



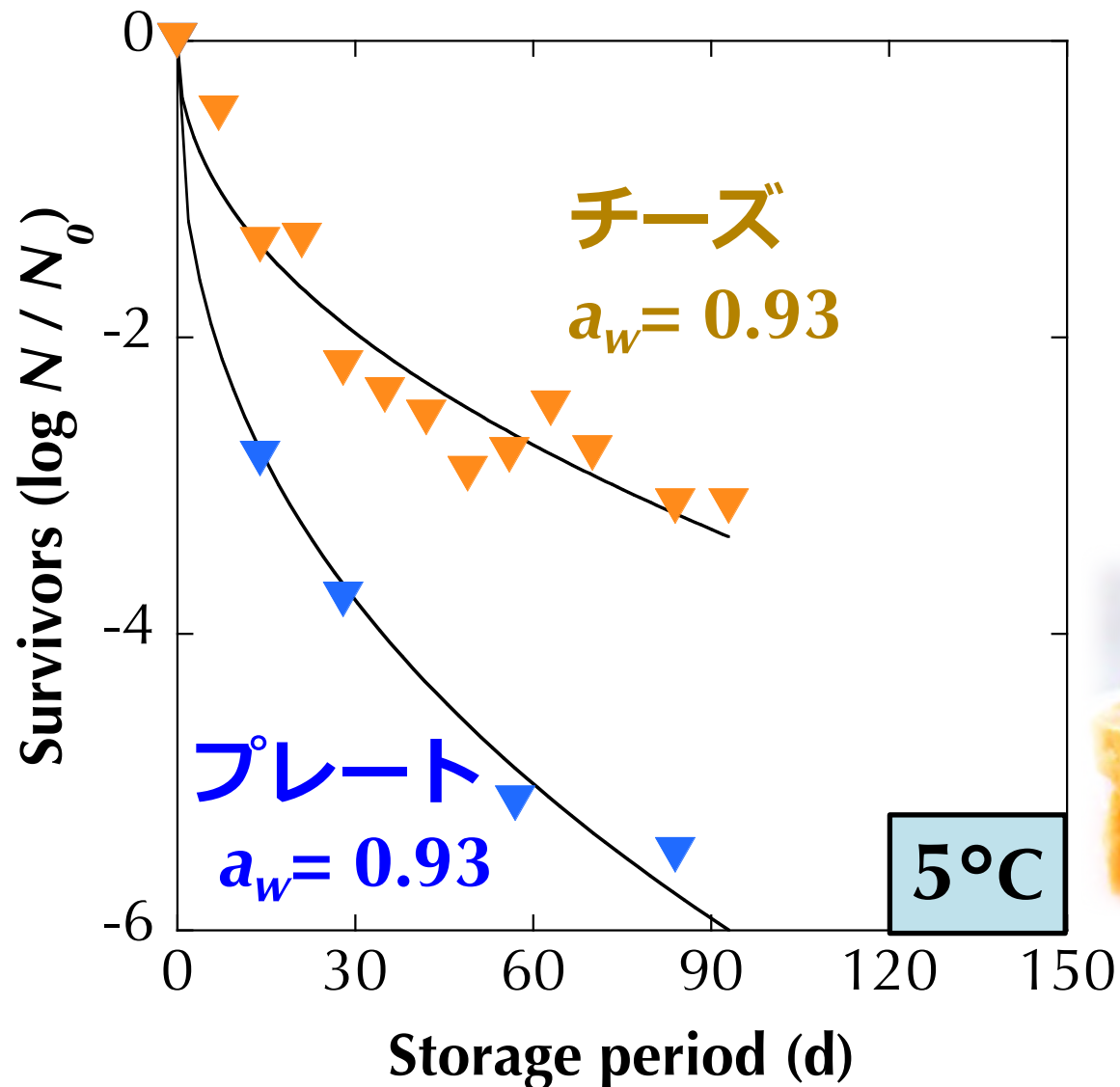
チョコレートとプレート上の死滅挙動に違い



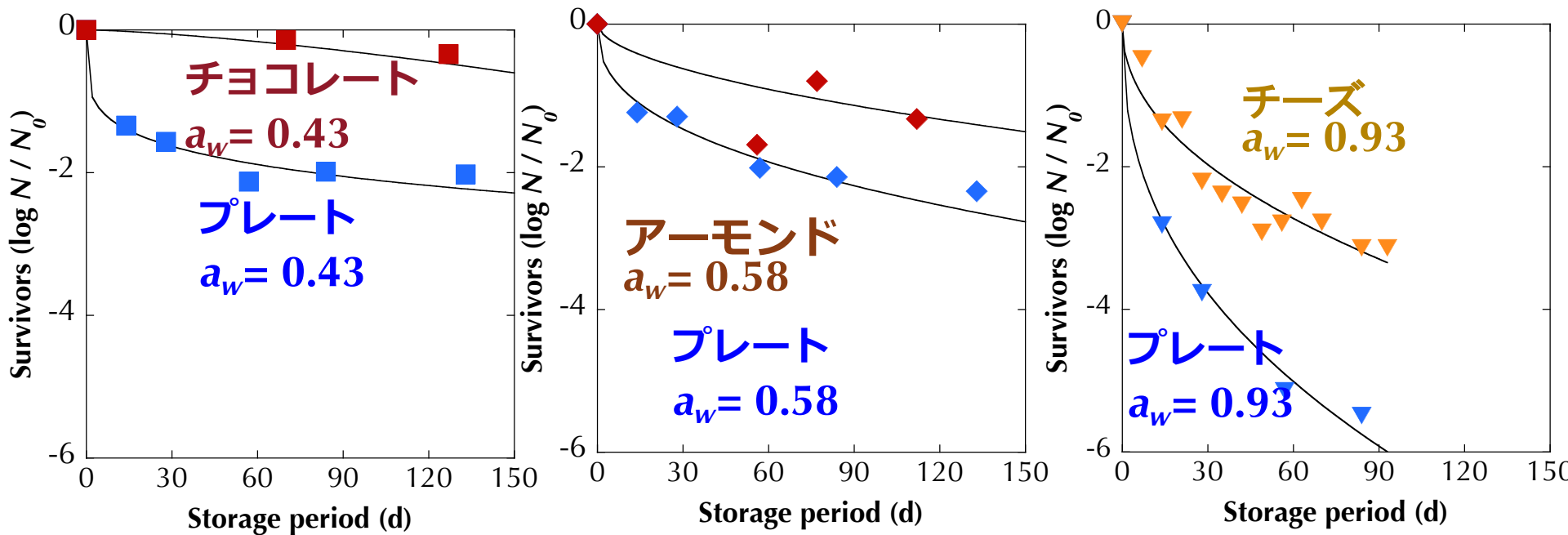
アーモンドとプレート上の死滅挙動の違い



チーズとプレート上の死滅挙動に違い



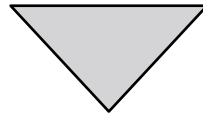
a_w だけでは低 a_w 環境下における 細菌の死滅を説明不可能



食品成分／組織構造等が影響

本研究の目的

サルモネラと腸管出血性大腸菌の死滅における食品成分の影響を排除した正味 a_w の影響の解明



- ✓ $a_w = 0.22 - 0.68$ の範囲で死滅挙動に影響無し
- ✓ $a_w = 0.93$ において死滅速度が増大
- ✓ 食品毎の差が顕著で、 a_w だけでは説明不能
- ✓ 保存温度の影響大→冷蔵庫内では長期間生残

研究全体の目指す目標

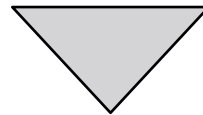
× 食中毒菌の死滅 = $f(a_w)$



低 a_w 食品での食中毒リスクの推定



具体的なリスク管理措置の提言



食品毎，温度別の死滅挙動データの蓄積
データベース化による情報提供



論文掲載されました！



Survival Kinetics of *Salmonella enterica* and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* on a Plastic Surface at Low Relative Humidity and on Low–Water Activity Foods

HIDEKAZU HOKUNAN, KENTO KOYAMA, MAYUMI HASEGAWA, SHUSO KAWAMURA, AND SHIGENOBU KOSEKI*

Graduate School of Agricultural Sciences, Hokkaido University, Kita 9, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan

MS 16-081: Received 21 February 2016/Accepted 23 May 2016

ABSTRACT

We investigated the survival kinetics of *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* under various water activity (a_w) conditions to elucidate the net effect of a_w on pathogen survival kinetics and to pursue the development of a predictive model of pathogen survival as a function of a_w . Four serotypes of *S. enterica* (Stanley, Typhimurium, Chester, and Oranienburg) and three serotypes of enterohemorrhagic *E. coli* (*E. coli* O26, *E. coli* O111, and *E. coli* O157:H7) were examined. These bacterial strains were inoculated on a plastic plate surface at a constant relative humidity (RH) (22, 43, 58, 68, or 93% RH, corresponding to the a_w) or on a surface of almond kernels (a_w 0.58), chocolate (a_w 0.43), radish sprout seeds (a_w 0.58), or Cheddar cheese (a_w 0.93) at 5, 15, or 25°C for up to 11 months. Under most conditions, the survival kinetics were nonlinear with tailing regardless of the storage a_w , temperature, and bacterial strain. For all bacterial serotypes, there were no apparent differences in pathogen survival kinetics on the plastic surface at a given storage temperature among the tested RH conditions, except for the 93% RH condition. Most bacterial serotypes were rapidly inactivated on Cheddar cheese when stored at 5°C compared with their inactivation on chocolate, almonds, and radish sprout seeds. Distinct trends in bacterial survival kinetics were also observed between almond kernels and radish sprout seeds, even though the a_w s of these two foods were not significantly different. The survival kinetics of bacteria inoculated on the plastic plate surface showed little correspondence to those of bacteria inoculated on food matrices at an identical a_w . Thus, these results demonstrated that, for low- a_w foods and/or environments, a_w alone is insufficient to account for the survival kinetics of *S. enterica* and enterohemorrhagic *E. coli*.

Key words: Bacterial pathogen; Desiccation; Inactivation; Low–water activity foods; Weibull model



個々の細菌細胞の挙動の違いを 確率的に捉えるための数理モデルの開発

なぜ少数だけ生き残る細菌の振舞いが重要か？

- 食中毒の原因となる細菌数が(< 100)であるケースが多い
([Hara-kudo and Takatori, 2010](#))
- 少数菌数の場合, $10^7 \sim 10^9$ 個を基礎とする死滅予測モデルから予測して大丈夫？ ([Aspridou and Koutsoumanis, 2015](#)).
- 集団からの外挿は無理がある。リスク評価のためには、個別に少数細菌でのバラツキを含んだ予測が必要
([Ross and McMeekin, 2003](#)).
- 個々の細菌の死滅をモニタリングすることは技術的に難しい

細菌の死滅予測モデルの課題

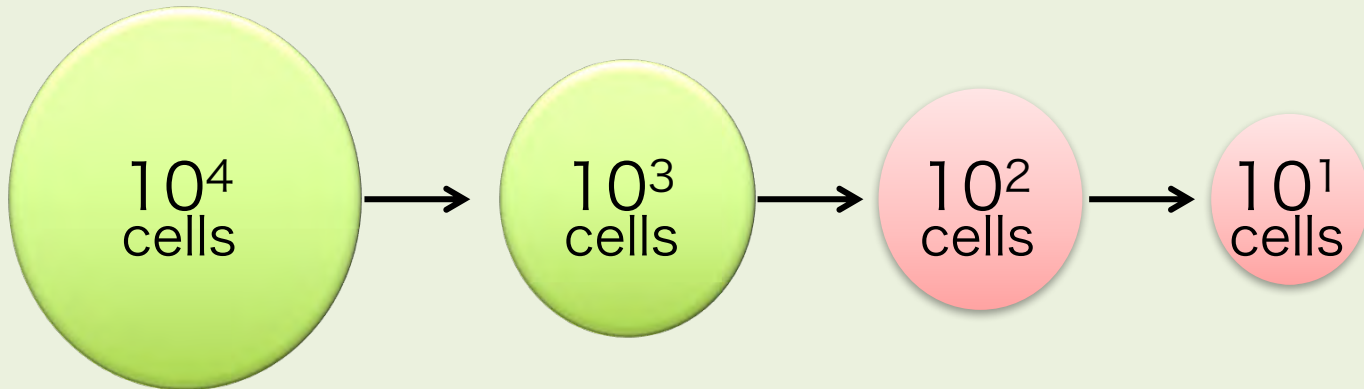
少数細菌数の細菌挙動の予測精度が低い

特に100個未満 (Aspridou, 2015)

少数細菌の細菌挙動

細菌数が減少すると

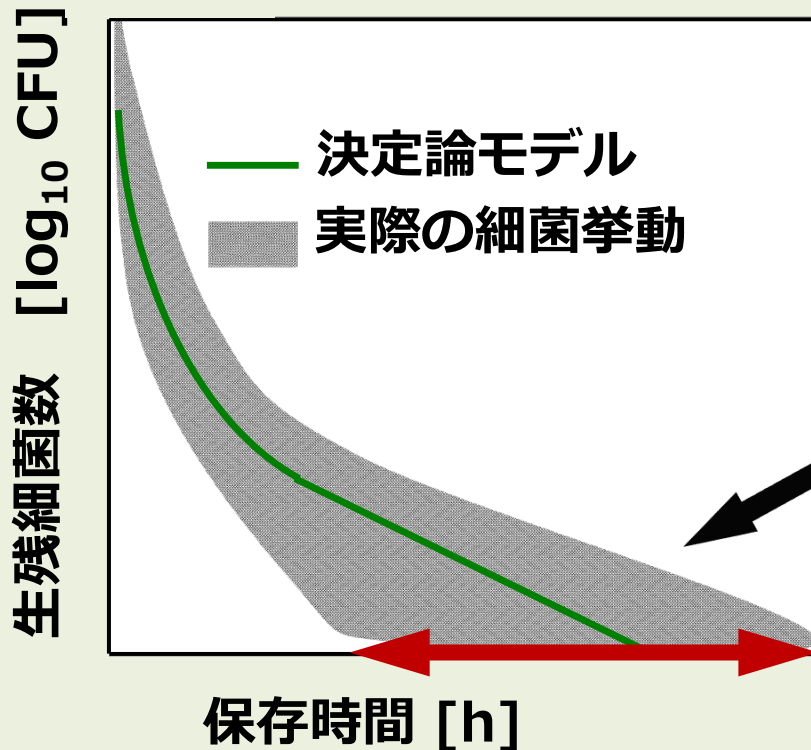
個々の細菌の個体差が大きく見える



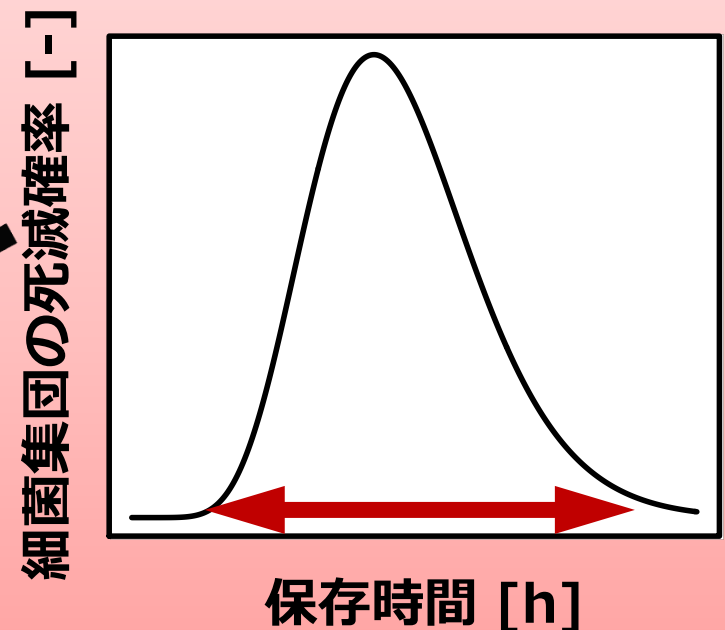
本研究の着眼点

細菌集団が死滅に至る時間を確率分布で表記
個体差が最も顕著に見られる部分

細菌集団の死滅予測モデル



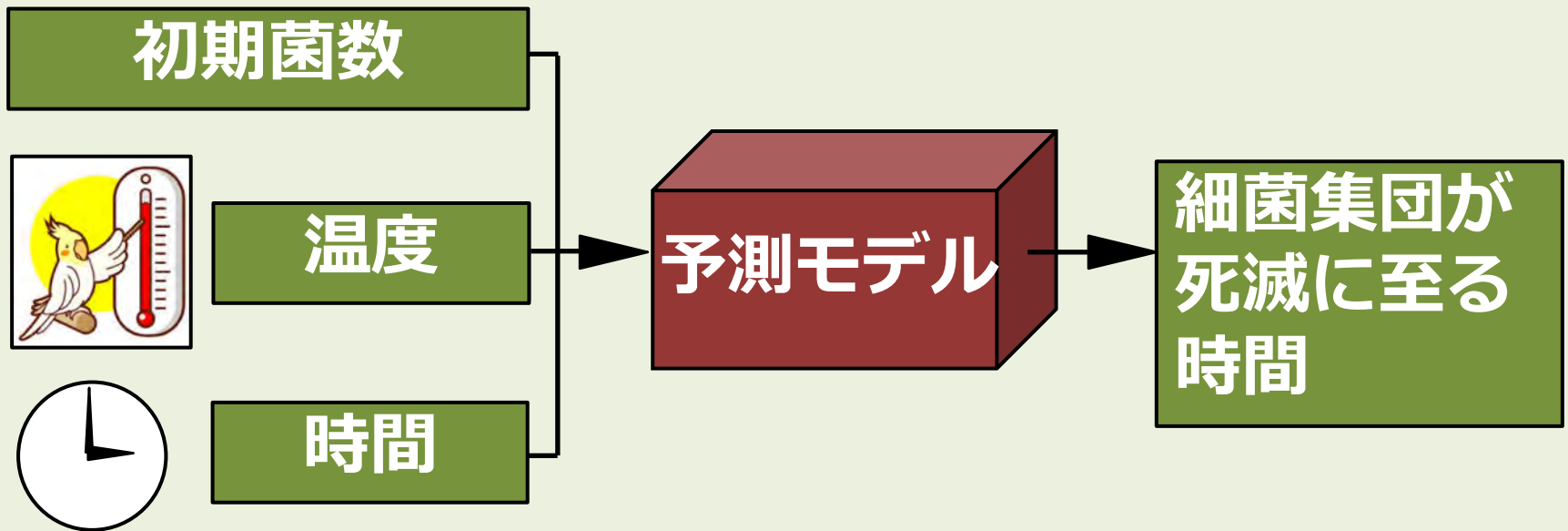
細菌集団が
死滅に至る時間を
確率分布で表記



本研究の目的

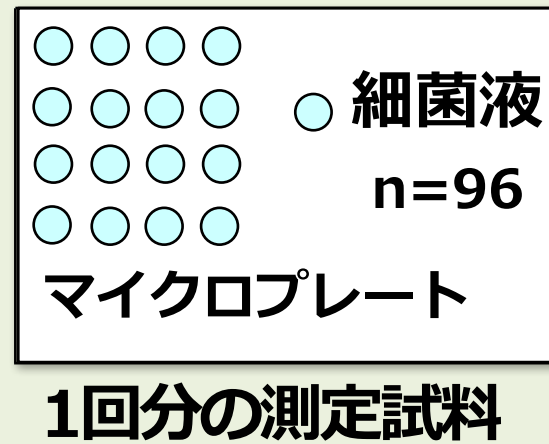
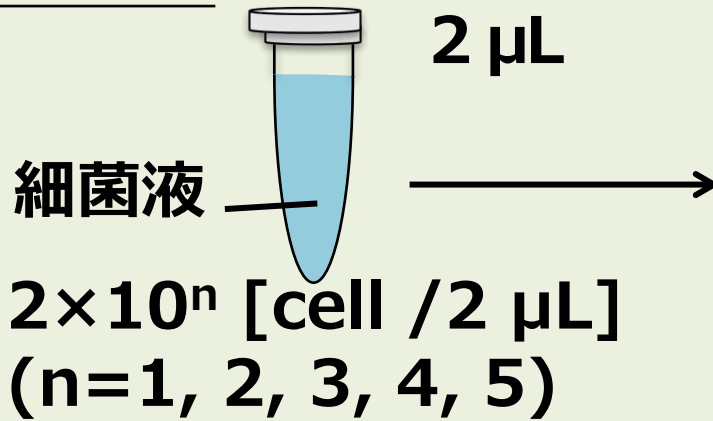
乾燥環境下で細菌集団が死滅に至る時間を確率で表記するモデルの開発

本研究で開発する予測モデル



測定試料の作成: Salmonella Typhimurium

測定サンプル

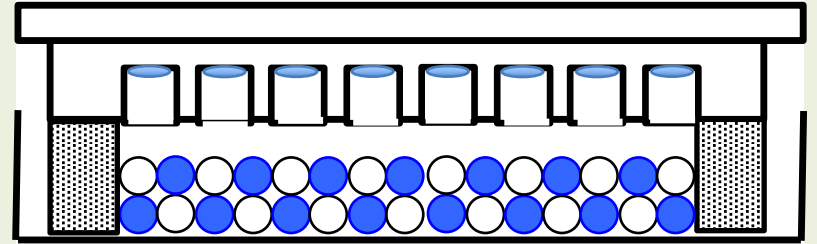


細菌液の乾燥と測定試料の保存

細菌液の乾燥

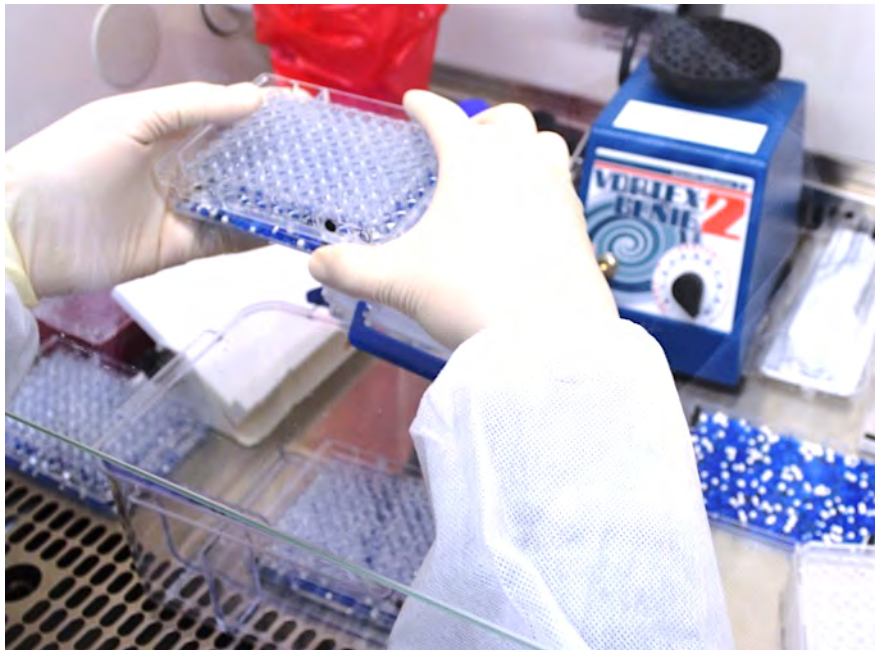
マイクロプレート (逆さ) →

マイクロプレート蓋 →



● 菌液 ○ シリカゲル

1回分の測定試料

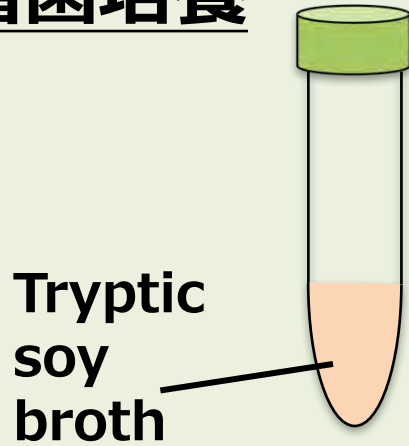


温度: 5, 15, 25°C
相対湿度: 10~20%

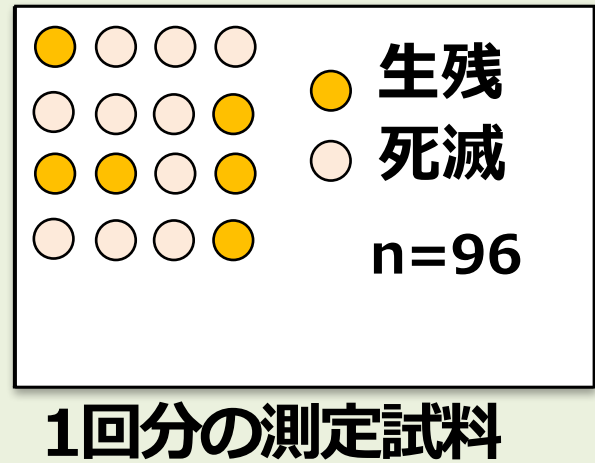


細菌集団の生残／死滅判定

増菌培養



100 μ L
25°C
1週間



解析方法

累積ガンマ分布でのフィッティング

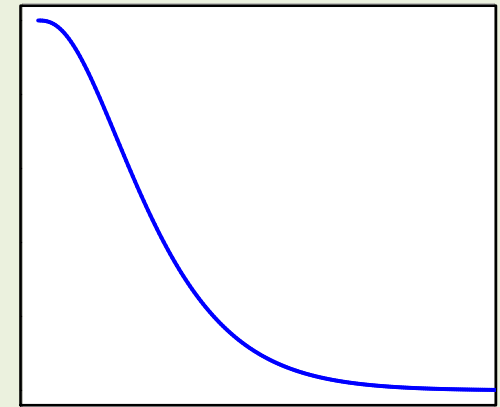
例)

ある時間まで“機械”が“壊れない”確率

本研究では

“細菌集団”が“生残する”確率を示す

細菌集団の生残確率



保存時間

↓ 微分

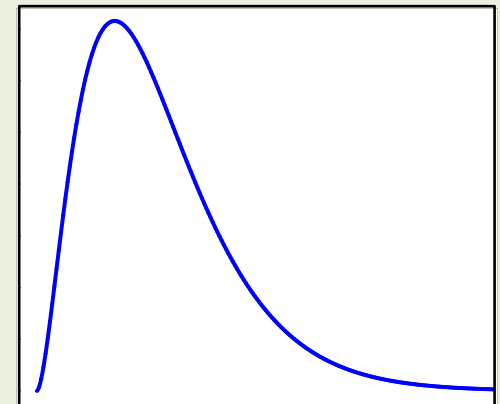
ガンマ分布で表記

例) いつ“機械”が“壊れるか”を示す

本研究では

いつ“細菌集団”が“死滅に至るか”を示す

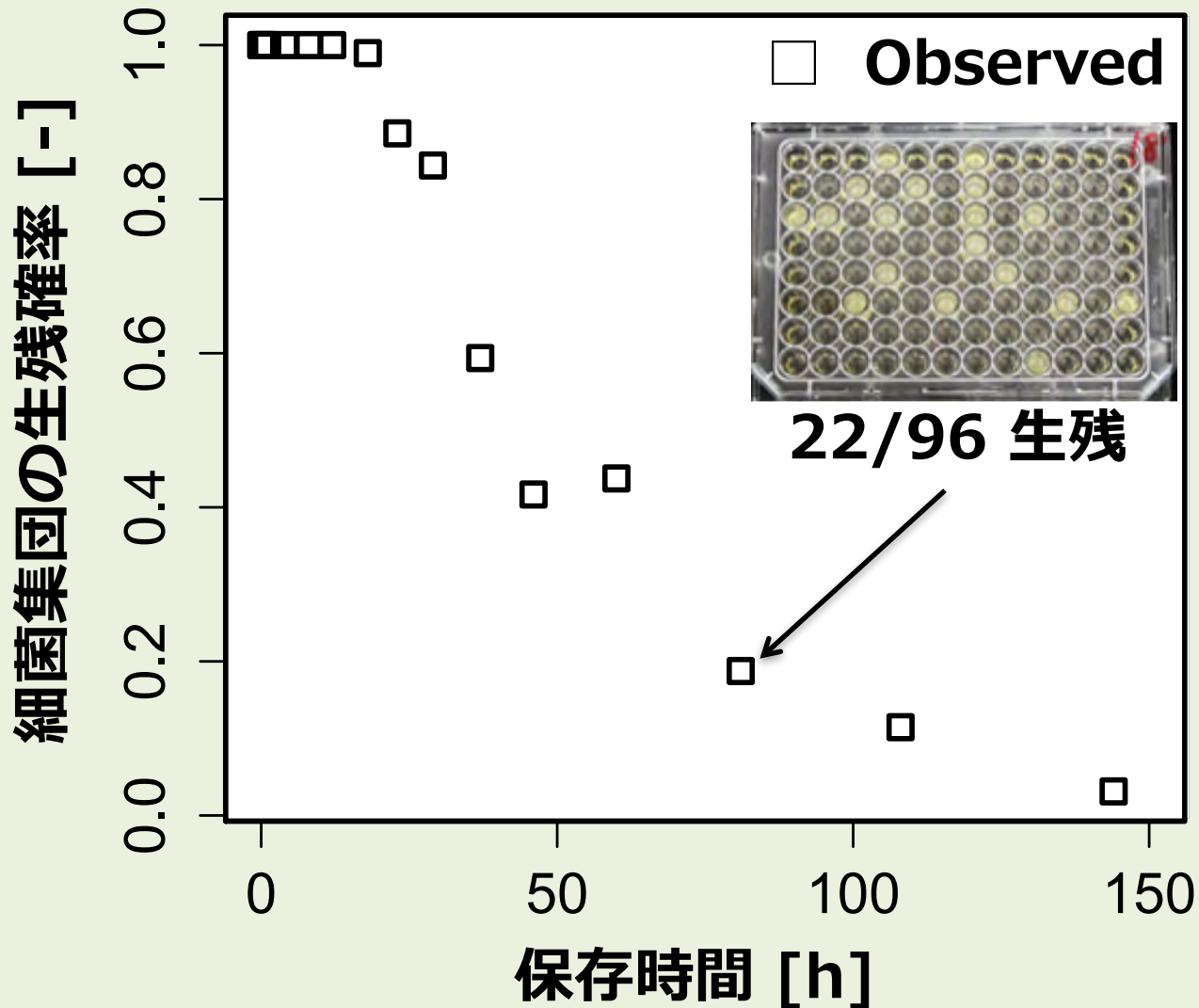
細菌集団の死滅確率



保存時間

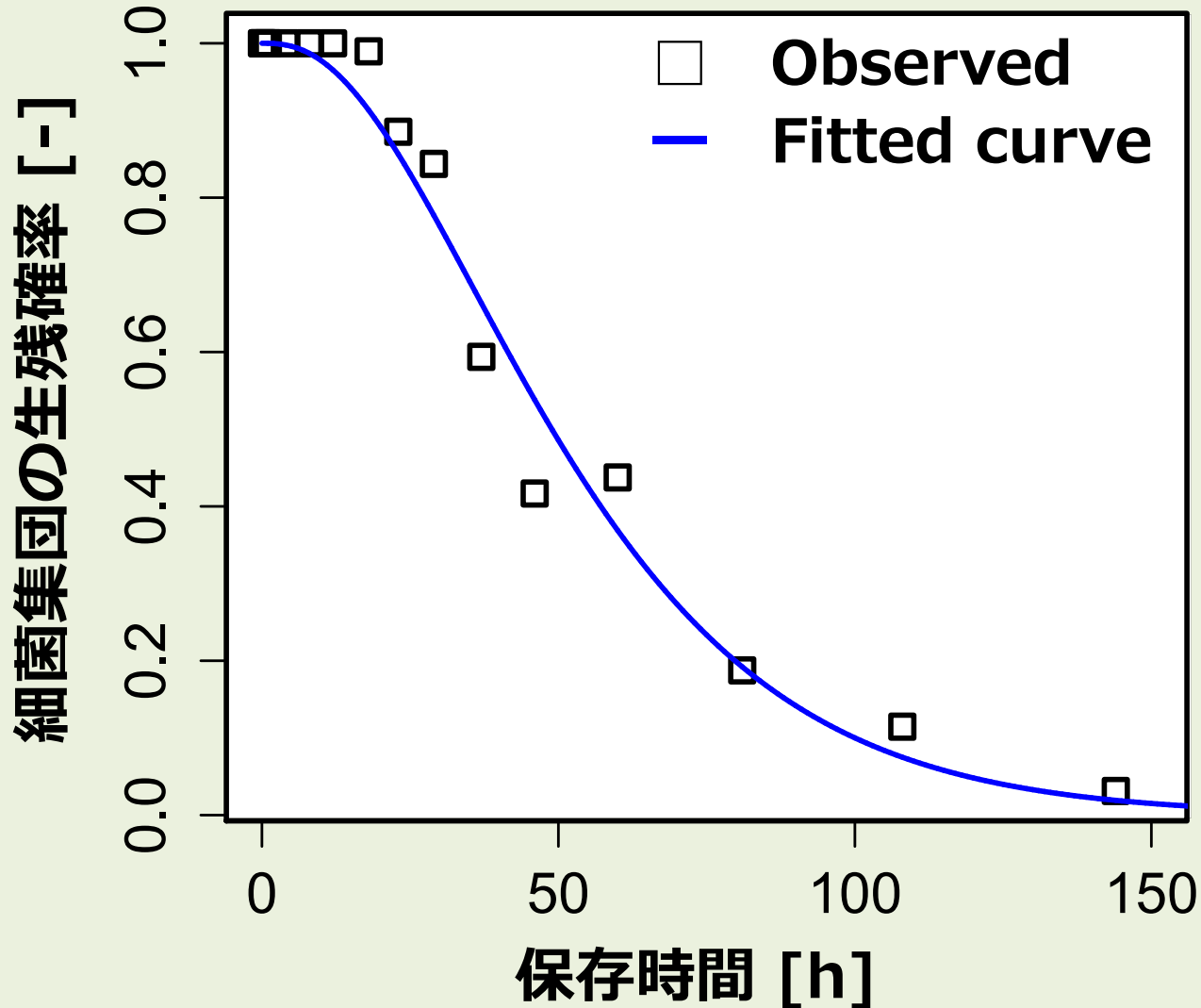
測定データ

2×10⁵cell集団が生残する確率@5°C



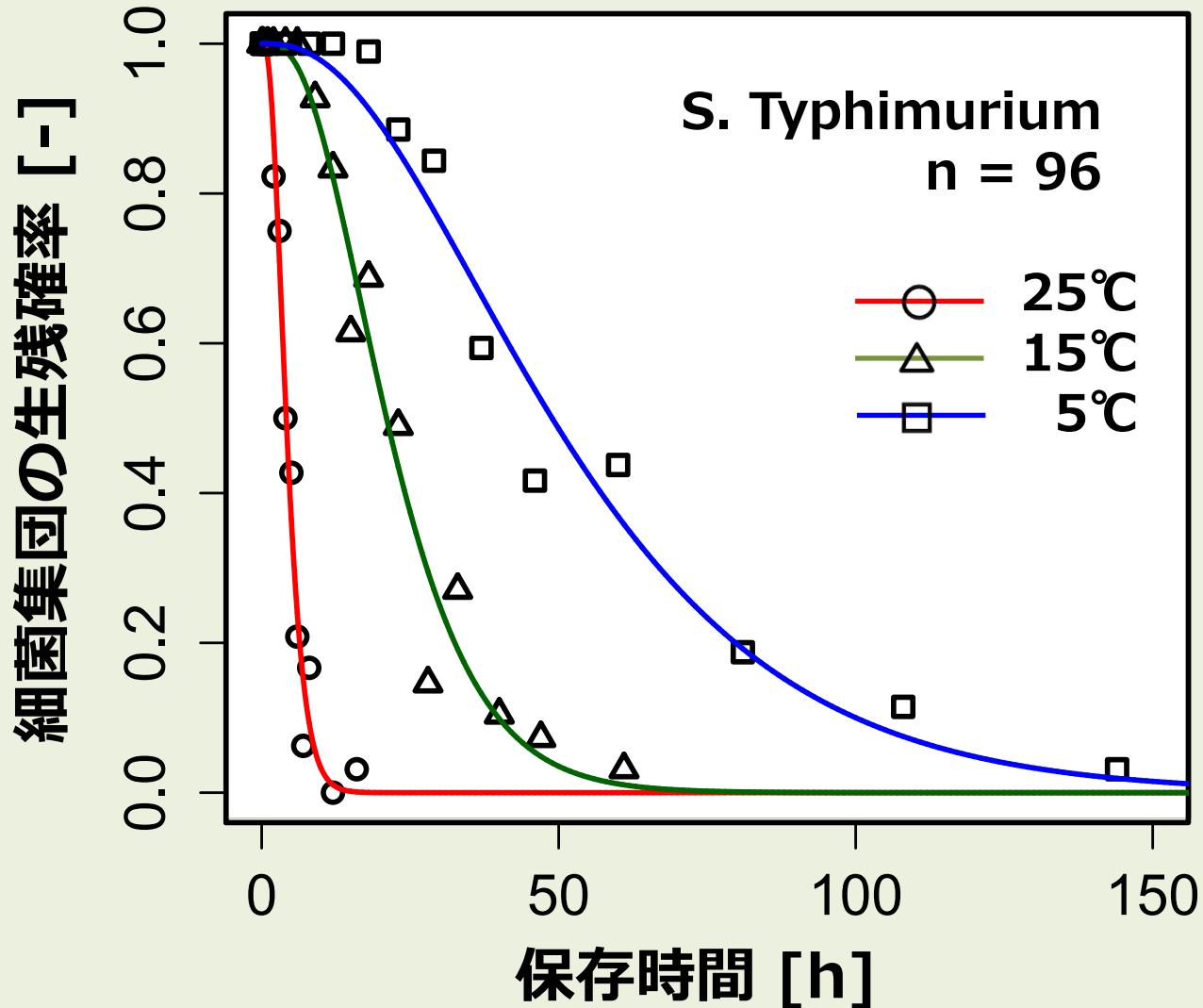
累積ガンマ分布でのフィッティング

2×10⁵cell集団が生残する確率@5°C



累積ガンマ分布でのフィッティング

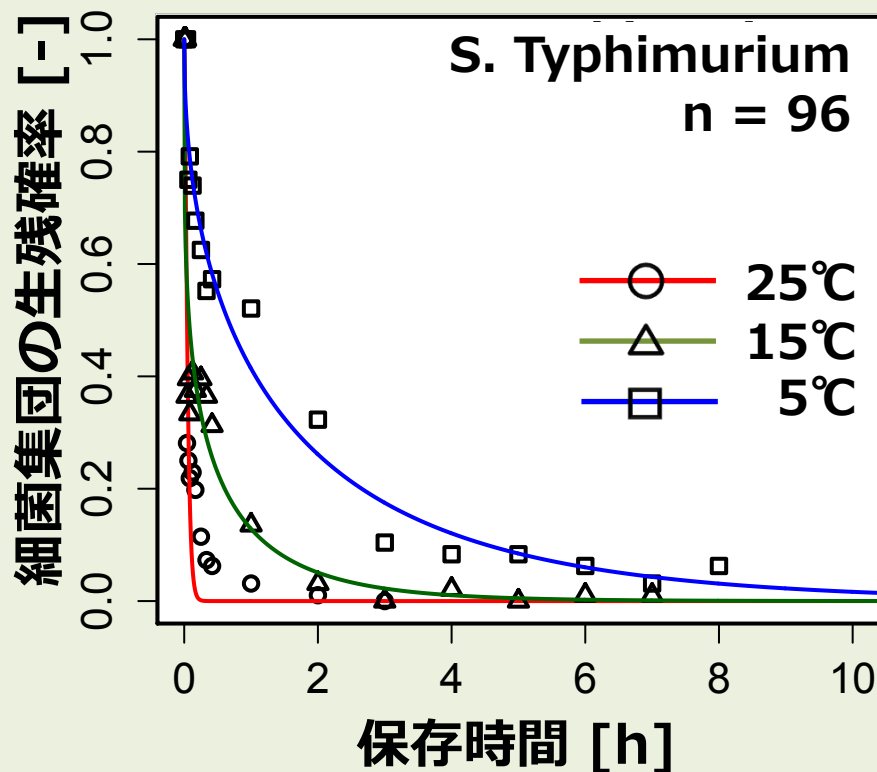
2×10⁵cell集団が生残する確率



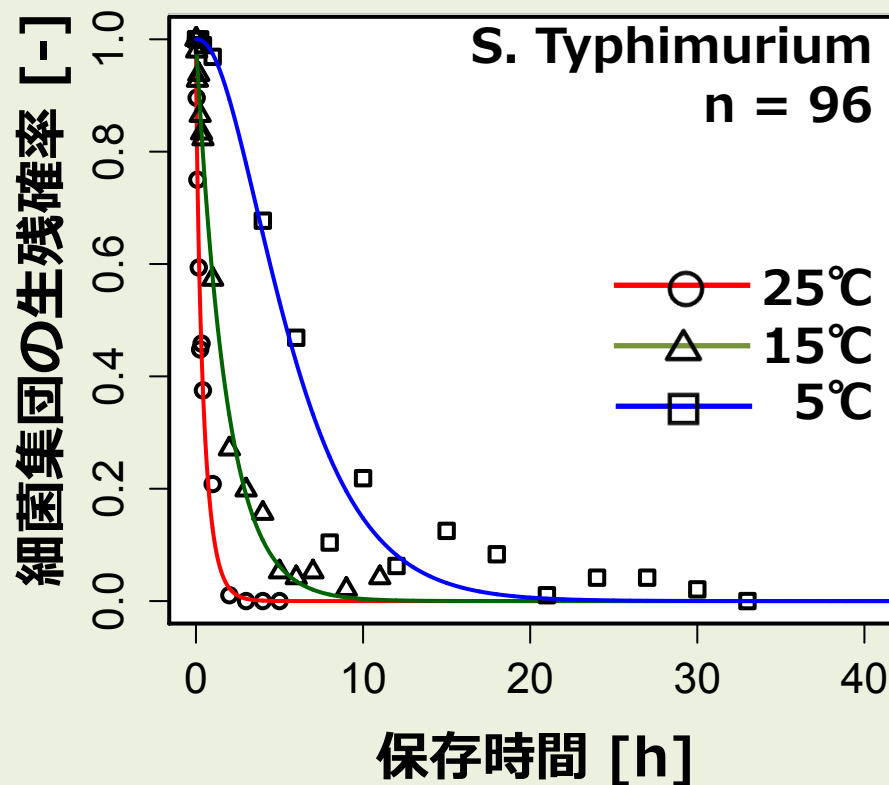
累積ガンマ分布でのフィッティング

すべての条件において累積ガンマ分布で細菌集団の生残確率を**フィッティング**が可能

2×10¹ cellsが生残する確率



2×10² cellsが生残する確率

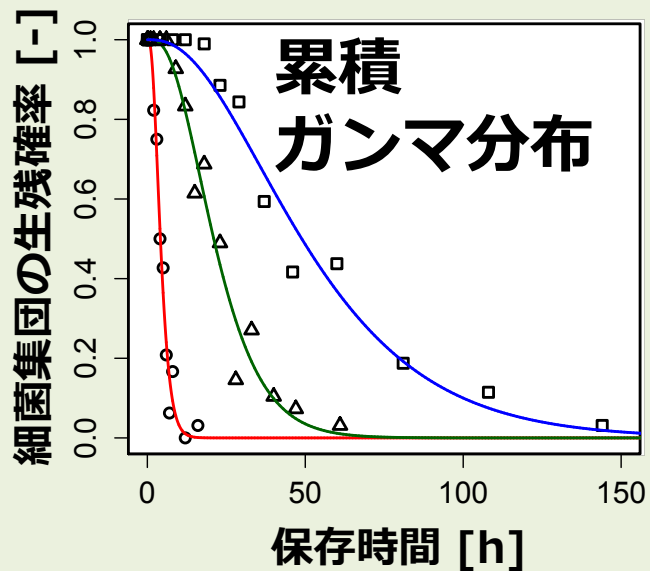


細菌集団が死滅に至る時間

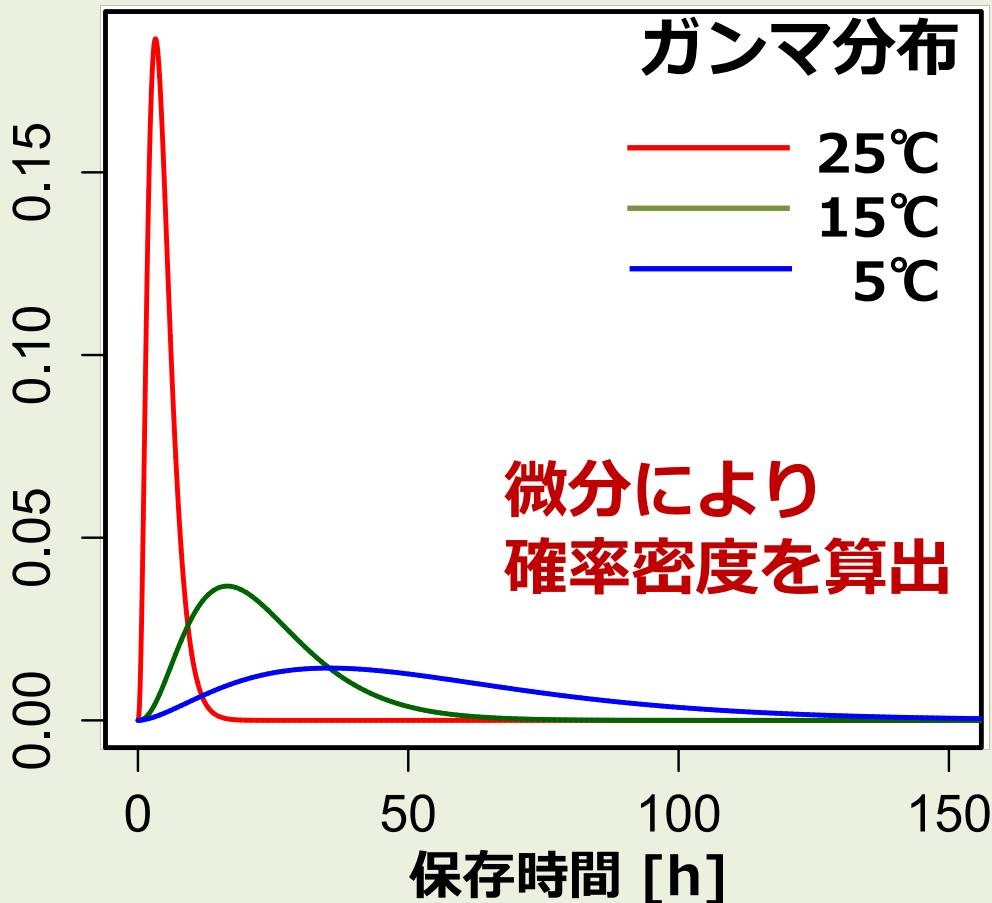
ガンマ分布で細菌集団が死滅する時間の分布を表記

細菌集団が生残する確率

2×10^5 cellsの死滅時間の確率分布



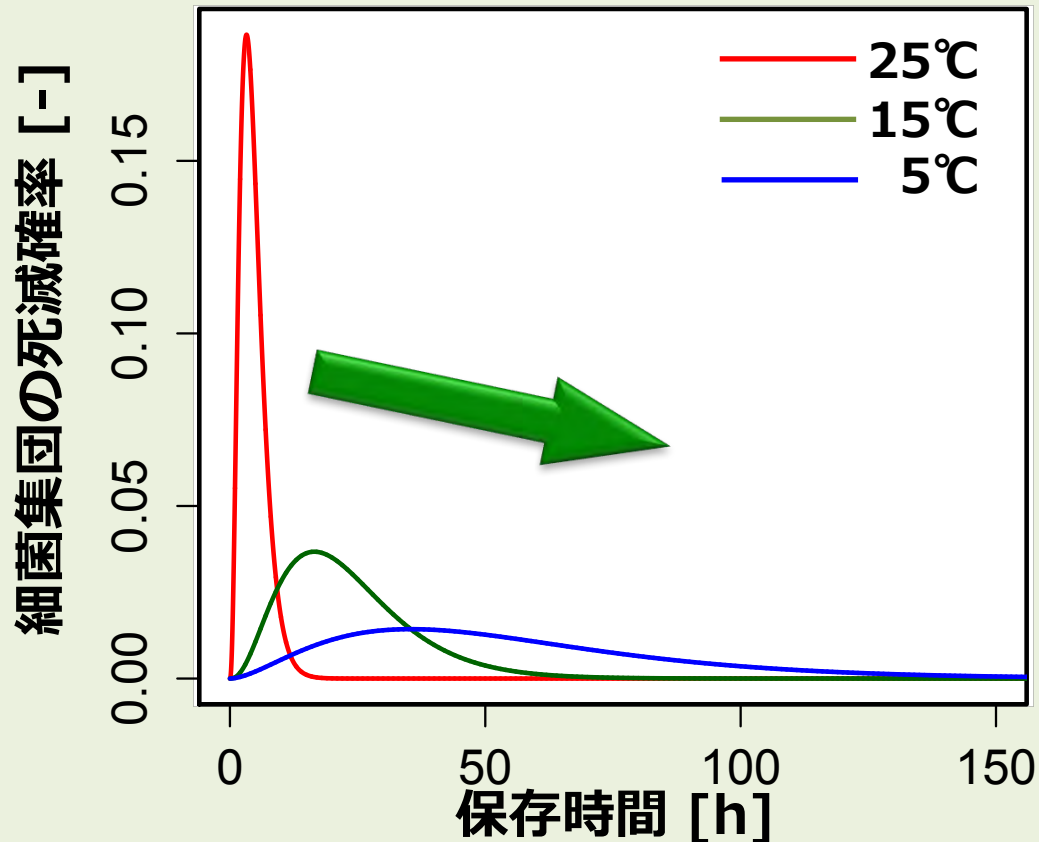
細菌集団の死滅確率 [-]



温度と細菌集団が死滅に至る時間

温度が低くなるほど、
細菌集団の生存時間は**長く**、死滅時間は**広く分布**

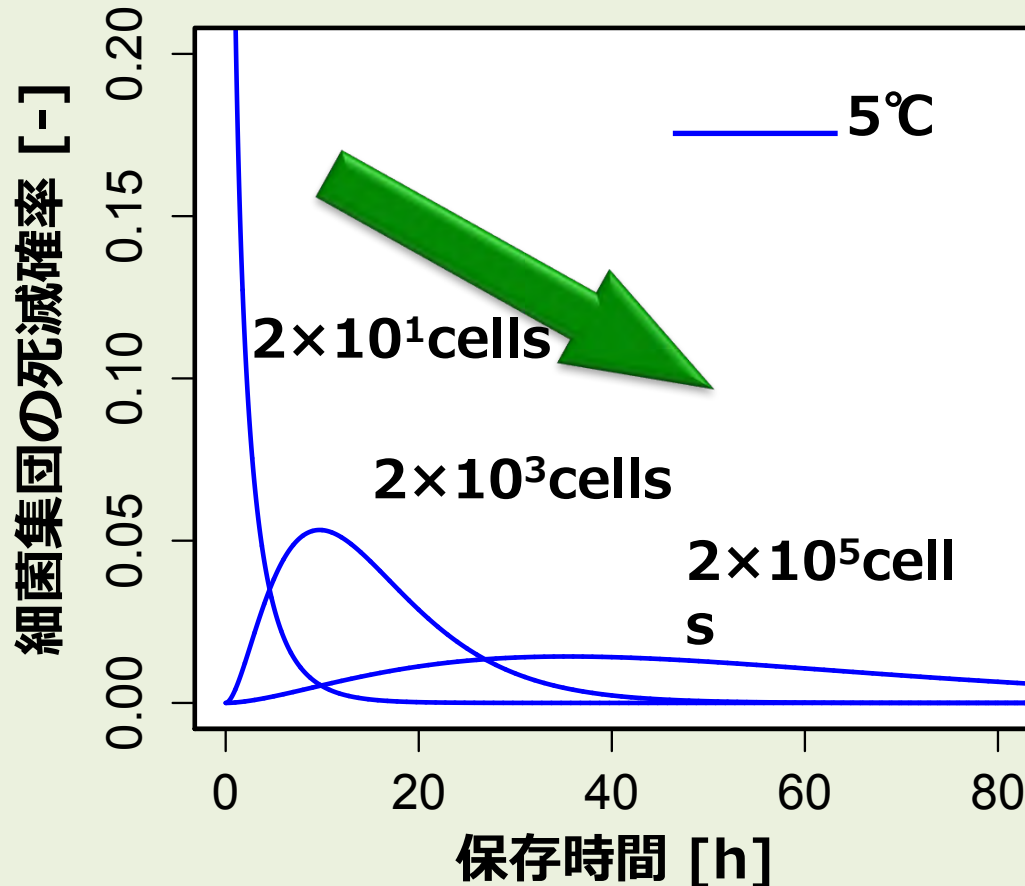
2×10^5 cellsの死滅時間の確率分布



細菌数と細菌集団が死滅に至る時間

細菌集団が大きくなるほど，細菌集団の
生存時間は**長く**，死滅する時間は**広く分布**

細菌集団の死滅時間の確率分布



まとめ

目的

細菌集団が死滅に至る時間を予測するモデルの開発

結果

細菌集団の平均死滅時間が長いほど、
死滅時間が**広く分布し**，“点”での推定が困難

結論

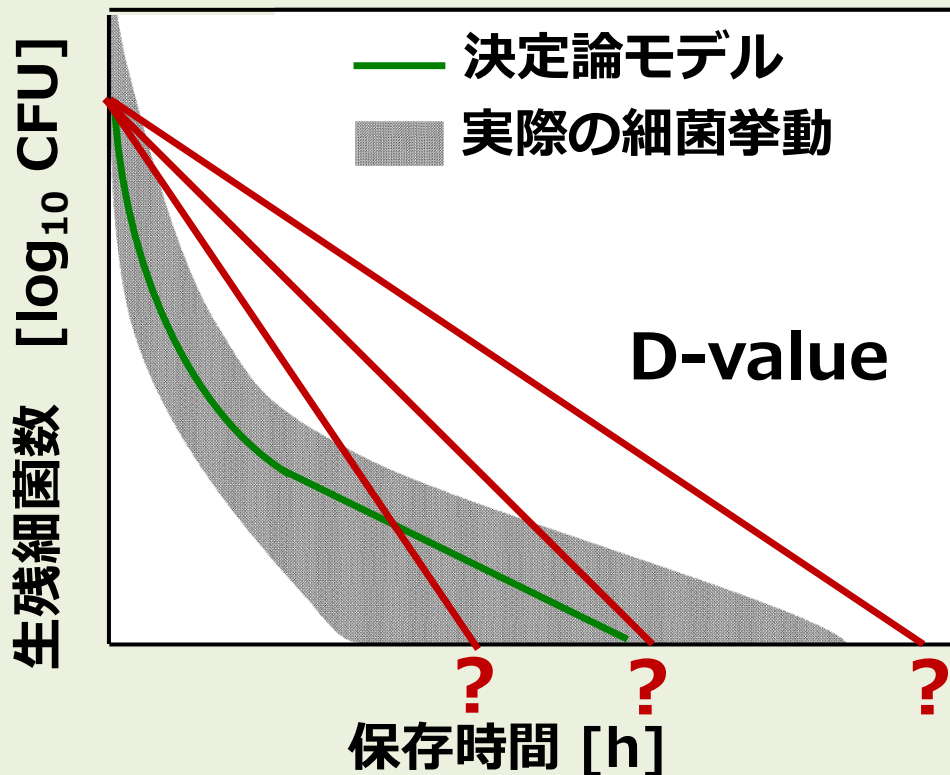
“点”で表記されてきた細菌集団が死滅に至る時間を
“**ガンマ分布**”を用いて表記することが可能

本研究の展望

D値に代わる新たな殺菌指標の作成

従来の決定論的予測モデルにおいての問題点

“点”推定をベースとした殺菌時間の設定



<問題>
細菌挙動から
大きく乖離

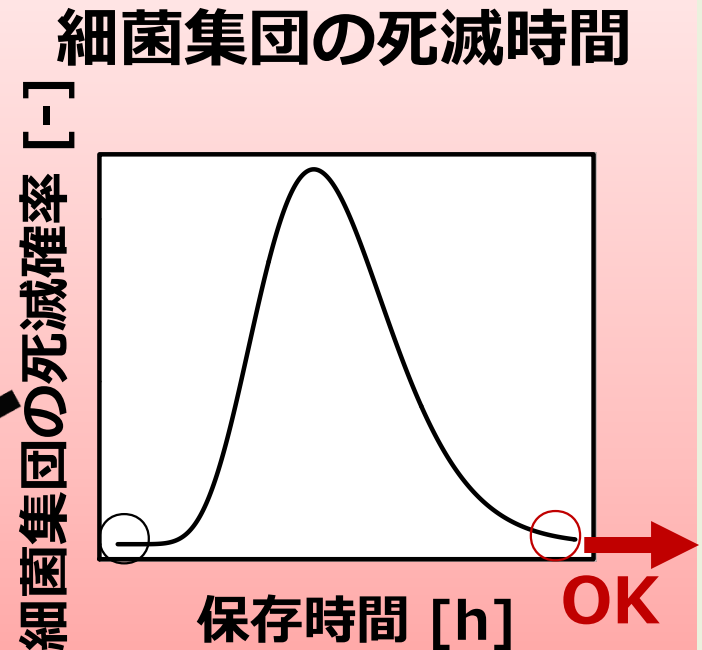
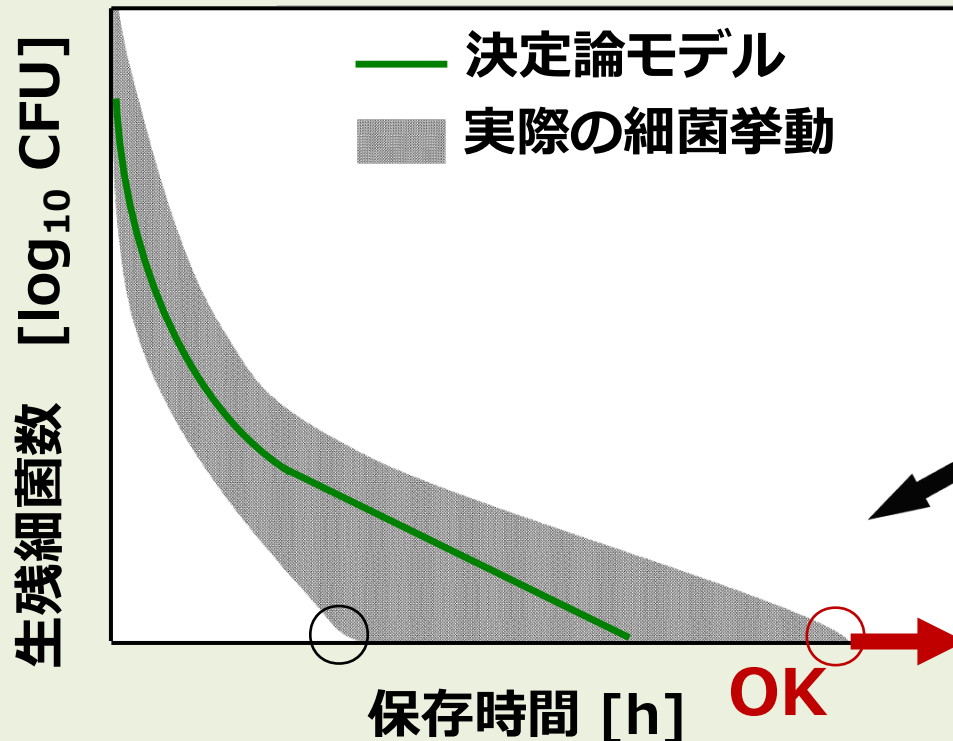
<原因>
“点”による推定

本研究の展望

D値に代わる新たな殺菌指標の作成

→ 例) 確率に基づき, **99.99%**細菌集団の滅菌を保証する死滅時間の設定

確率を根拠とした殺菌時間の設定





Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

論文掲載されました！

Do bacterial cell numbers follow a theoretical Poisson distribution?
Comparison of experimentally obtained numbers of single cells with
random number generation via computer simulation



Kento Koyama, Hidekazu Hokunan, Mayumi Hasegawa, Shuso Kawamura,
Shigenobu Koseki*

Graduate School of Agricultural Science, Hokkaido University, Kita-9, Nishi-9, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2016

Received in revised form

16 May 2016

Accepted 19 May 2016

Available online 22 June 2016

Keywords:

Individual cell modelling

Single-cell

Poisson distribution

ABSTRACT

We investigated a bacterial sample preparation procedure for single-cell studies. In the present study, we examined whether single bacterial cells obtained via 10-fold dilution followed a theoretical Poisson distribution. Four serotypes of *Salmonella enterica*, three serotypes of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and one serotype of *Listeria monocytogenes* were used as sample bacteria. An inoculum of each serotype was prepared via a 10-fold dilution series to obtain bacterial cell counts with mean values of one or two. To determine whether the experimentally obtained bacterial cell counts follow a theoretical Poisson distribution, a likelihood ratio test between the experimentally obtained cell counts and Poisson distribution which parameter estimated by maximum likelihood estimation (MLE) was conducted. The bacterial cell counts of each serotype sufficiently followed a Poisson distribution. Furthermore, to examine the validity of the parameters of Poisson distribution from experimentally obtained bacterial cell counts, we compared these with the parameters of a Poisson distribution that were estimated using random number generation via computer simulation. The Poisson distribution parameters experimentally obtained from bacterial cell counts were within the range of the parameters estimated using a computer simulation. These results demonstrate that the bacterial cell counts of each serotype obtained via 10-fold dilution followed a Poisson distribution. The fact that the frequency of bacterial cell counts follows a Poisson distribution at low number would be applied to some single-cell studies with a few bacterial cells. In particular, the procedure presented in this study enables us to develop an inactivation model at the single-cell level that can estimate the variability of survival bacterial numbers during the bacterial death process.

本研究のまとめ



低水分活性環境／食品における サルモネラおよび腸管出血性大腸菌の生残挙動の解明



awレベルの高低は死滅挙動に影響を与えない。
保存温度が低いほど、長期間（1年以上）にわたり生残する。



個々の細菌細胞の挙動の違いを確率的に捉えるための 数理モデルの開発



Single cellレベルでの死滅挙動を確率分布の変化で表現可能に
細菌集団が死滅に至る時間を確率分布で表現可能に



お問い合わせ先

北海道大学大学院農学研究院 食品加工工学研究室

こせき しげのぶ
小関 成樹

koseki@bpe.agr.hokudai.ac.jp