## 研究課題の概要

研究課題名	予測微生物学的解析手法を用いた微生物学的リスク評価システムの開発
主任研究者	小関 成樹
所属機関	(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
研究成果の 概要	食品における微生物学的リスク評価を効率的・効果的に行うための支援システムを開発し、論文化の上、公開した。具体的には、リスク評価に必要不可欠な各種の食中毒菌挙動を効率的かつ確実に検索・収集可能とする従来にない操作性と検索容易性を備えたデータベース(Microbial Responses Viewer, MRV)を開発した。また、食中毒菌を食事とともに摂食した場合の、胃内における食中毒菌の死滅を予測するシミュレータを開発した。さらに、実際の食品(鶏挽肉とマグロすき身)における食中毒菌の種々の保存温度における詳細な増殖挙動データを蓄積し、それらを元にして数理モデルを構築した。開発したモデルによって、変動温度環境下における食中毒菌数および食品常在菌数の同時予測と予測菌数の取り得る確率分布の推定を可能とした。これらのデータベースと予測モデルとの連携は効率的かつ適切なリスク評価の遂行に資する。

評価所見	食中毒のリスク評価を行うためのデータベース並びにシュミレーションモデルの開発に成功した。胃内の細菌の挙動をシュミレートできるモデルは、食中毒の基礎データとして有用である。食中毒菌の食品中や体内での挙動の予測に活用できると思われる。
評価結果	目標を達成した。

## 研究成果報告書 (研究要旨)

研究課題名	予測微生物学的解析手法を用いた微生物学的リスク評価システムの 開発		
主任研究者名	所属: 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 氏 名:小関 成樹(研究課題番号:0705)		

食品における微生物学的リスク評価を効率的・効果的に行うための支援システムを開発した。具体的には、リスク評価に必要不可欠な各種の食中毒菌挙動を効率的かつ確実に検索・収集可能とする従来にない操作性と検索容易性を備えたデータベース(Microbial Responses Viewer, MRV)を開発した。また、食中毒菌を食事とともに摂食した場合の、胃内における食中毒菌の死滅を予測するシミュレータを開発した。さらに、実際の食品(鶏挽肉とマグロすき身)における食中毒菌の種々の保存温度にける詳細な増殖挙動データを蓄積し、それらを元にして数理モデルを構築した。開発したモデルによって、変動温度環境下における食中毒菌数および食品常在菌数の同時予測と予測菌数の取り得る確率分布の推定を可能とした。これらのデータベースと予測モデルとの連携は効率的かつ適切なリスク評価の遂行に資する。

## 研究成果報告書 (本体)

研究課題名	予測微生物学的解析手法を用いた微生物学的リスク評価システムの		
	開発(研究期間:平成19年度~21年度)		
	所属: 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構		
主任研究者名	食品総合研究所		
	氏 名:小関 成樹 (研究課題番号:0705)		

#### 1. 研究の概要

#### (1) 研究の目的

微生物学的リスク評価を行うためには、その評価の根拠となる<u>微生物挙動(増殖・死滅)データが必要不可欠である。</u>しかし、この評価の第一段階とも言える基礎データの収集に、現状では多大な労力が必要とされている。このような煩雑な作業を効率的かつ効果的に遂行するためには、データベースの活用が必要不可欠である。今日、情報技術のめざましい発達によって、各種のデータを大量に保存可能なだけでなく、複数の異なる分類データを関連づけて検索することが可能となってきている。このような<u>データベースを活用すれば、現状に比べ、圧倒的に効率的かつ効果的に目的とするデータ集を作成することができる。</u>したがって、微生物挙動データベースはリスク評価を円滑に行うための必要不可欠なツールといえる。

さらに、リスク評価を効率的に実施するためには、微生物挙動に関して収集したデータを効果的に活用する必要がある。すなわち、収集した<u>データから意味のある情報への変換</u>(データの解釈)が極めて重要な作業となってくる。ここで、「データ」を情報」への橋渡しをするのが、各種の数理予測モデルである。<u>モデルを活用することで、リスク評価者の意志決定の負担を軽減するだけでなく、データの解釈に統一性、客観性と透明性を付与することになる。</u>予測モデルはリスク評価の、特に暴露評価において強力なツールとなることから、データベースと同様に、今後のリスク評価手法の高度化には必要不可欠といえる。本研究では、リスク評価の基礎となるデータを検索・収集するためのデータベースを開発するとともに、各種の微生物挙動予測モデルを開発し、これらを融合的に活用することで効率的・効果的に微生物学的リスク評価を行うための支援ツールを開発する目的としている。

## (2) 研究の内容

本研究の実施体制は研究の中核部分であるデータベースおよびシステム開発を主任研究者(小関)が所属する食品総合研究所で行う。さらに、食中毒発症の用量反応モデルを開発して、食中毒リスク評価システムに活用する。また、実際の食品における病原性細菌の挙動解明は分担研究者の東京海洋大学(主に水産物とその加工品)および東京農工大学(主に農畜産物とその加工品)で実験データを蓄積して、データベース開発、さらにはリスク評価システムの開発へと活用する。また、東京農工大学では実験データから、食品上における細菌の増殖挙動を予測する数理モデル開発を進め、これによってリスク評価システムにおける暴露評価での、種々の環境条件下での微生物挙動を推定可能とする。

#### (3) 本研究の主要な成果

3 年間にわたる本研究の成果によって、研究開始当初に掲げた目標を達成することができた。 具体的には以下のとおりである。

#### 1) 効率的・効果的なリスク評価手法の確立

新たなモデリング手法(一般状態空間モデル)を開発して、従来手法ではできなかった菌数の 予測とその確率分布の推定とを同時に行うことを可能とした(図 1-1)。この結果はリスク評価に おける暴露評価ステップに対応する手法として発展することが期待される。

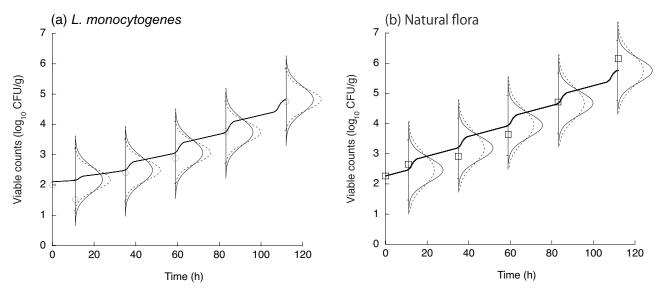


図 1-1 変動温度環境下における *L. monocytogenes* 数(実験値○)と Natural flora(常在菌)数(実験値□)変化の予測(一)とその確率分布 ---- 変動性, — 不確実性

変動性は実験によって制御できない観察対象(ここでは細菌)固有のバラツキであるのに対して、 不確実性は実験の観測誤差によるものである。本手法によれば実際のリスク推定においては双方の違いを勘案して、「○時間後には△%の確率で菌数が□になっている」といったことを予測可能とする。 このような推定はリスク評価において極めて有用な情報として活用される。

また、胃内における食中毒菌の生残挙動を解明し、胃内での食中毒菌生残挙動シミュレータを開発して、食中毒発症メカニズム解明と発症の用量反応モデルへの応用可能性への道を示すことができた。

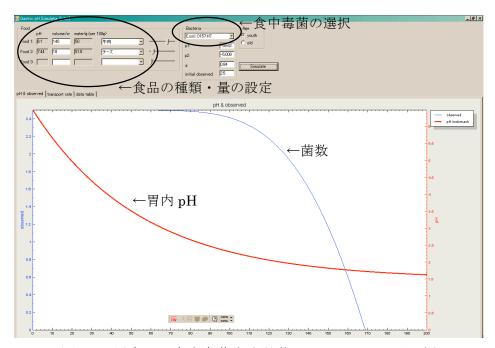


図 1-2 胃内での食中毒菌生残挙動シミュレータの画面例

## 2) データベースを中核とする, リスク評価のための基盤整備

従来にない、全く新たな細菌の増殖/非増殖データと、増殖速度に関するデータを国際予測微生物データベース ComBase (http://www.combase.cc/) に収録されているデータから抽出したデータベースを開発し、2008 年 8 月より Microbial Responses Viewer (MRV) の名前で公開している (http://cbnfri.dc.affrc.go.jp/MRV-J)。開発当初の MRV では個別の食品のデータを検索することができなかったが、最終的には、食品の種類毎に種々の菌種を網羅的に比較、検索を可能とすることを目的として大幅な機能拡張を行い、リスク評価の際の基礎的情報収集のためのプラットフォームを構築することができた。

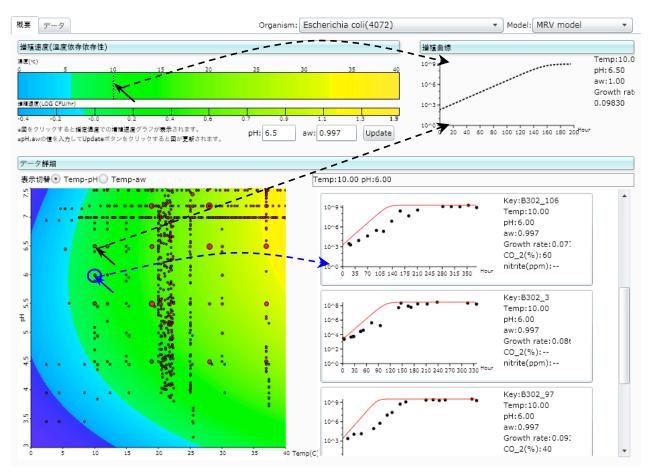


図 1-3 Microbial Responses Viewer (MRV)による検索結果画面例 等高線グラフ上でのポインタの動きに追従して増殖曲線をリアルタイムに描画

各ポイントをクリックすると時間変化データを参照できる。図中の丸印は、国際予測微生物データベース ComBase から収集した実験値である。収録されているデータ数に応じて丸印の大きさが大きくなる。実験データから得られる増殖速度を温度、pH、水分活性をパラメータとした数理モデルを構築して、その数理モデルを等高線グラフとして描画させている。任意の条件(温度、pH、水分活性)を選択すると、その増殖食速度に応じた増殖曲線を表示することを可能とした。

## 3) 各種病原性細菌のリスク評価のためのデータ蓄積

実際の食品での食中毒菌の挙動(鶏肉での Salmonella (図 1-4),マグロすき身での L. monocytogenes (図 1-5))を詳細に検討してデータを蓄積するとともに、各々の増殖予測モデルを構築することができた。これらのデータは今後日本において微生物学的リスク評価を実施する際の極めて重要なデータとなる。

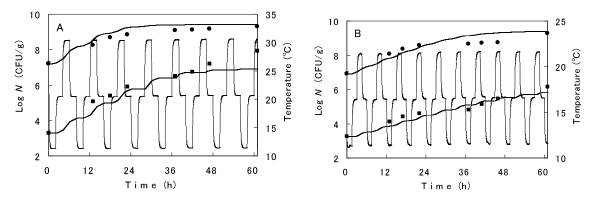


図 1-4 変動温度下における高汚染鶏肉中でのサルモネラ(■)及び一般細菌(●)の増殖予測. 黒丸は 実測値, 曲線は予測値を示す。周期的に変化する曲線は実測した鶏肉温度を示す。

図 A: 高温域での温度変化、図 B: 室温域での温度変化

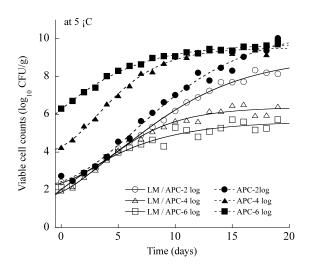


図 1-5 マグロすき身中における *L. monocytogenes* の 増殖に及ぼす natural flora の影響 (5℃保存).

- 〇: natural flora  $10^2$  CFU/g 時 $\mathcal{O}$  L. monocytogenes 数  $\triangle$ : natural flora  $10^4$  CFU/g 時 $\mathcal{O}$  L. monocytogenes 数
- △: natural flora 10° CFU/g 時の L. monocytogenes 数 □: natural flora 10° CFU/g 時の L. monocytogenes 数
- ●: natural flora 10<sup>2</sup> CFU/g の全生菌数
- ▲: natural flora 10<sup>4</sup> CFU/g の全生菌数
- ■: natural flora 10<sup>6</sup> CFU/g の全生菌数

#### 2. 研究の成果

#### (1)研究の成果と概要

#### 1) 平成19年度研究成果の概要

## 微生物挙動データベースの開発 (食総研)

リスク評価の実施において有益な微生物 挙動に関する情報を収集する必要があることは言うまでもない。従来の文献検索データベースでは目的とする微生物挙動に関する情報を直接的に検索、収集することは直接的に微生物の増殖/死滅挙動データをは、このような問題点を解決して、直接的に微生物の増殖/死滅挙動データをにてのmBaseがある。ComBaseは国際協力体制のもとで開発されたデータベースであり、非常に多数の微生物挙動データを収録している。しかし、これら多数のデータからより有益な情報を抽出すのは現状のComBaseでは困難であった。

そこで、本研究ではこれまでにない、全く 新たなコンセプトで微生物挙動に関する情 報を検索、収集可能とするデータベースの 開発を行っている。具体的には任意の環境

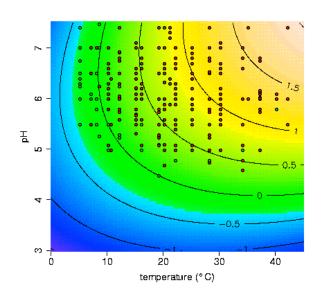


図 2-1 温度と pH の関係における L. monocytogenes の増殖/非増殖プロットと増殖率

条件下での、細菌の増殖/非増殖の情報を提供するとともに、併せて増殖速度の情報を提供する(図 2-1、検索結果サンプル)。本データベースによって収集する増殖/非増殖データは二項分布に従うと仮定することができることから、ロジスティック回帰分析手法によって、確率論的に境界条件を推定することが可能となる。つまり、ある条件下での細菌の増殖する確率を推定することができ、さらにその時の増殖速度の情報が得られることから、リスク評価の暴露評価ステップにおける細菌数の変化を確率的に推定することができるようになる。本年度 1 月現在で、収集菌種は 29 菌種(約 2 万件のデータ)、検索対象環境は温度、pH、水分活性の組み合わせとなっている。データベースとしての検索機能の完成は本年度末を予定しており、修正を経て来年度前半までには web 上で公開可能となる見通しである。なお、本データベースの開発あたり、まず Combase 開発グループ (UK、Food Research Institute、USDA、Eastern Regional Research Center、Australian Food Safety Centre of Excellence)との協力体制を確立した。 これによって、ComBase の全収録データを利用可能となったことで、元データの収集という作業を大幅に軽減化することができ、その分の労力を情報表示方式、検索方法の開発といったデータベースの利便性を向上させるための検討に費やすことができ、研究が顕著に進捗した。

#### 実食品における競合細菌共存下での病原性細菌の挙動予測手法の開発

食品における細菌の挙動を正確に予測するためには培地などのモデル系ではなく、食品上で挙動解析を進めていくことが必要不可欠である。しかし、これまでの研究では、食品上で共存する競合細菌の影響については未検討であった。適切なリスク評価のためには、実際の食品における複雑な微生物叢の中での病原性細菌の挙動を適切に予測することが望まれる。そこで、本研究では畜産食品と水産食品とを対象として、競合細菌が病原性細菌の増殖挙動に及ぼす影響を検討して、それらの影響を予測数理モデルへと組み込むことを最終目標としている。本年度は各食品で共存する常在細菌と病原性細菌の挙動を検討した。

# 1) リアルタイム PCR を用いた食肉及び食肉製品中のサルモネラ生菌数推定法の開発(農工大)

食肉及び食肉製品中の各種温度条件下でのサルモネラ増殖を解析するため、今年度はこれらの食品中のサルモネラ生菌数推定方法の開発を行なった。通常の試験法では選択平板培地上で本菌と疑われる細菌コロニーについてさらに生化学的性状検査が必要となり、相当な労

力と時間とが必要である。しかも他の細菌コロニーが混在する選択平板上で正確なサルモネラコロニー数を計測することは困難である。最近、私たちは迅速にサルモネラ生菌数のみが測定ができる、リアルタイム PCR を使った新たな推定法を開発した(Fujikawa et al., J. Food Hyg. Japan, 47,151-156,2006)。今年度はこの方法が実際の食品中のサルモネラ生菌数を推定できるかを検討した。

各種濃度に調整したサルモネラ Salmonella Enteritidis を接種した市販挽き肉 (鶏肉、豚肉、牛肉) および生ハンバーグ パテについて、Percoll®を用いた密度勾配 遠心によって食品成分を除去した。これを サルモネラ選択増菌培地(EEM)中で培養 し,一定時間ごとに試料を取り出した。そ れらの試料についてサルモネラ inv A 領域 を標的としたリアルタイム PCR を行ない, この領域のコピー数(Ct値)を測定した。 測定した Ct 値と EEM 中での培養時間の間 には, 各接種菌濃度において直線性が認め られた。さらにある培養時間での Ct 値と接 種菌数とは非常に高い直線的相関が認めら れ、この関係は接種した食品の種類にかかわ らず、ほぼ一致した。そのため、平均した単

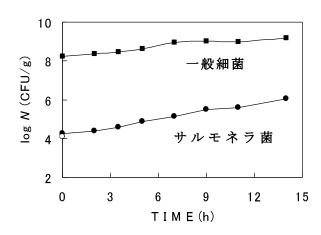


図 2-2. 保存鶏挽き肉中のサルモネラ増殖 (30℃):黒丸は推定値,白丸は接種した実測値

一の検量線を用いてこれらの食品中の本菌生菌数推定ができることが示された。実際に、この検量線を用いて、生ハンバーグパテに接種したサルモネラの生菌数を非常に高い精度で推定できた。以上の結果から、本法は食品中の対象微生物の生菌数推定に適用できることが明らかとなった。

さらに、本菌を鶏挽肉に接種し、保存中の本菌増殖を今回の手法を用いて測定した。その結果、図 2-2 に示すように本菌の増殖は緩やかであった。これはおそらく挽肉中の高濃度の微生物叢による競合のためであろう。なお、図に示したように、接種した菌濃度と本法による推定菌濃度とはほぼ等しい値であった。次年度もこの手法を用いて食肉及び食肉製品中のサルモネラ増殖を解析する。

## <u>2) 水産食品における病原性細菌の増殖挙動解析(海</u> 洋大)

生食用食品の代表格として刺身がある。なかでも病原性細菌の一つである L. monocytogenes の汚染が懸念されているネギトロに注目した。ネギトロの原料となるマグロすき身中における L. monocytogenes の保存,流通中の挙動を推定可能とすることは,リスク評価の観点からも非常に重要である。そこで,本研究ではマグロすき身中での L. monocytogenes の増殖挙動におよぼす温度の影響を明らかにするとともに,ネギトロに常在している細菌数と,接種する L. monocytogenes 数との関係を明らかにして,食中毒リスク評価のための基礎資料を得ることを目的として研究を進めている。本年度は菌株によるマグロすき身中での増殖の違い,

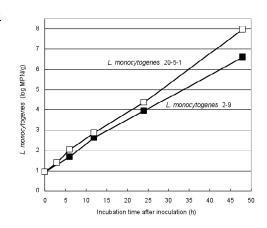


図 2-3. マグロすき身における L. monocytogenes の消長 (20°C)

常在汚染微生物が L. monocytogenes の増殖に及ぼす影響を検討している。菌株によって増殖 速度に差異が認められ、試験したなかで増殖の早い菌株(20-5-1 株)を指標菌として選抜し た。現在、引き続き実験データを蓄積中である。

## 2) 平成20年度研究成果の概要

#### 微生物挙動データベース MRV (Microbial Responses Viewer) の開発 (食総研)

リスク評価の実施において有益な微生物挙動に関する情報を収集する必要があることは言うまでもない。本研究ではこれまでにない、全く新たなコンセプトで微生物挙動に関する情報を検索、収集可能とするデータベースの開発を行っている。本研究では国際予測微生物データベース ComBase との連携を図り、ComBase 中のデータの有効利用を目的とした食品に関わる細菌の「増殖する/増殖しない」環境条件を容易に検索可能とする従来にない新たなデータベース MRV ( Microbial Responses Viewer、http://cbnfri.dc.affrc.go.jp/)を開発した。MRVでは現在16種類の細菌に対して温度、pH、水分活性の各要因の組合せにおける増殖する/しない条件を検索することができるだけでなく、増殖の速さ(速度)に関する

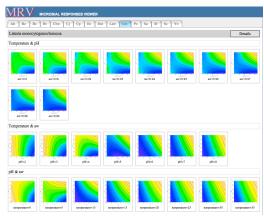


図 2-4 MRV の検索インターフェース

情報も同時に検索できる。さらに、MRV の特徴として、目的とする情報を容易に検索できるように、直感的、視覚的に情報を見出すことができるような設計となっている。具体的には任意の環境条件下での、細菌の増殖/非増殖の情報を提供するとともに、併せて増殖速度の情報を等高線化して提供する(図 2-4 検索結果サンプル)。本データベースによって収集する増殖/非増殖データは二項分布に従うと仮定することができることから、ロジスティック回帰分析手法によって、確率論的に境界条件を推定することが可能となる。つまり、ある条件下での細菌の増殖する確率を推定することができ、さらにその時の増殖速度の情報が得られることから、リスク評価の暴露評価ステップにおける細菌数の変化を確率的に推定することができるようになる。

#### 人工消化液中における病原菌の生残挙動の解析(食総研)

微生物学的リスク評価では、摂食した食品中の病原 性細菌数と食中毒発症との関係を表す用量反応モデ ルが最終的な食中毒リスクを推定する際に用いられ る。しかしながら、実際には用量反応モデルは限られ た条件下での試験結果をモデル化したもの, あるいは 疫学調査結果から推定したモデルがほとんどであり、 直接的なヒトでの反応を表しているモデルは非常に 少ない。そこで、ヒトの消化器官を模した実験系(人 工消化液を用いて, 摂取食品の種類, 量, 消化液の分 泌量を考慮) での病原性細菌の挙動から、食中毒発症 の可能性を検討した。E. coli O157:H7 は非常に酸耐性 が強く牛乳中では<10個レベルの接種でも2時間以上 は胃液中で生存した(図 2-5)。現在,他の病原菌/ 食品の組合せでも実験を行っており、 最終的には胃液 を通過して腸管中で増殖する確率を予測する数理モ デルを開発中である。

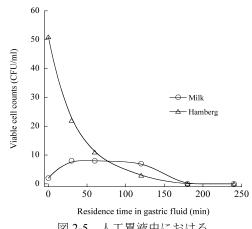


図 2-5 人工胃液中における E. coli O157:H7 の消長

#### 実食品における競合細菌共存下での病原性細菌の挙動予測手法の開発

#### <u>1)鶏肉中におけるサルモネラ増殖の解析(農工大)</u>

実際の食品中での有害微生物の増殖挙動を解析し、食品の微生物学的安全性確保のための情報を提供するため、昨年度はリアルタイム PCR 法を用いたサルモネラ菌数推定法による市販内中の増殖を検討した。この手法は高い特異性がある一方、実際の増殖データを得るには多くの労力、時間が必要となる。そこで、今年度はサルモネラの選択平板培地を用いて本菌の増殖を測定した。

市販鶏肉(挽き肉)は均一に撹拌後,等量ずつ-20℃で保存した。高濃度に微生物汚染した 鶏肉 を作成するため、同じ市販鶏肉を 30℃で 12 時間保存後、撹拌し、冷凍保存した。解凍した 鶏肉に *Salmonella* Enteritidis を接種し(平均濃度  $10^{3.3}$ CFU/g)、一定温度(32℃、28℃、24℃、20℃、16℃)で保存し、経時的に試料(2 本)を取り出した。試料の細菌数は標準寒天平板(日水製薬、東京)、サルモネラ菌数は DHL 寒天平板(日水)を用い、塗まつ法で測定した。なお、

DHL 平板上でサルモネラと疑わしいコロニーについて、リアルタイム PCR 法および O 群抗血清(デンカ生研)によるスライドガラス凝集法を用いて本菌であるかの確認を行った。得られた実測データは私達の開発した新ロジスティックモデルを用いて解析した。なお、購入した鶏肉から Salmonella は検出されなかった。

接種した市販鶏肉を各種温度で保存した結果,本菌の増殖速度および最大到達菌数は保存温度が高いほど高かった。特に, $32^{\circ}$ での本菌の最大到達菌数は細菌数と非常に近い値に達した。微生物に高濃度汚染された鶏肉中では,市販鶏肉中よりも本菌の増殖はやや抑制された程度であった。両者の差は保存温度が低いほど,小さかった。また,サルモネラの増殖は新ロジスティックモデルで高い精度で表わすことができた(図 2-6)。なお,高濃度汚染鶏肉の初期汚染細菌数( $10^{6.8}$ CFU/g)は市販鶏肉( $10^{4.8}$ CFU/g)よりもおよそ 100 倍高かった。

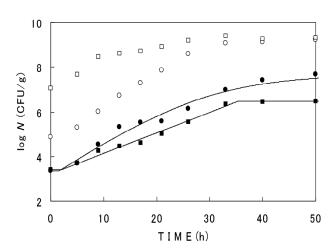


図 2-6 市販鶏肉および高濃度細菌汚染鶏肉中のサルモネラ菌数と一般細菌数の増加 (20°C). ●:市販鶏肉中のサルモネラ菌数, ■: 高濃度細菌汚染鶏肉中のサルモネラ菌数, ○: 市販鶏肉中の一般細菌数, □: 高濃度細菌汚染鶏肉中の一般細菌数。曲線は新ロジスティックモデルによってフィットさせたカーブを示す。一般細菌数が多い場合にはサルモネラの増殖が抑制される。

以上の結果、鶏肉中のサルモネラ増殖は鶏肉の初期細菌汚染濃度が高い場合には増殖速度および最大菌密度が抑制されることが明らかとなった。

## 2) マグロすき身における Listeria monocytogenes の増殖挙動 (海洋大)

本年度はマグロすき身中における L. monocytogenes の増殖に及ぼす保存温度と常在菌 (Natural flora) の影響とを広範囲に検討して、リスク評価の暴露評価段階で利用可能な予測モデル開発に資するデータを蓄積した。保存温度、2°C、5°C、10°C、15°C、20°C、25°C、30°Cを設定し、接種後任意の時間ごとに菌数の測定を行った。L. monocytogenes を含む全生菌数は 1.5%NaCl 添加 TSA 寒天平板培地で,L. monocytogenes 数は PALCAM 寒天平板培地 (MERCK)で測定した。それぞれの培地に適切に希釈した培養液をスパイラルプレーターで塗抹し、30°Cで培養した。生菌数は 24 時間後、L. monocytogenes 数は 48 時間後にコロニー数を測定した。

5°C に関してみると(図 2-7), natural flora を 6 乗接種した場合は *L. monocytogenes* が定常期に達した時の菌数は約 5 log CFU/g,4 乗接種の場合は約 6 log cfu/g,2 乗接種の場合は約 7log CFU/g,未接種の場合は約 8log CFU/g となり,natural flora の接種菌数が多いほど,*L.* 

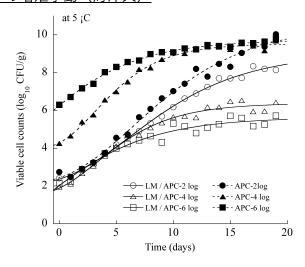


図 2-7 マグロすき身中における L. monocytogenes の 増殖に及ぼす natural flora の影響 (5℃保存).

- 〇: natural flora  $10^2$  CFU/g 時 $\mathcal{O}$  *L. monocytogenes* 数  $\triangle$ : natural flora  $10^4$  CFU/g 時 $\mathcal{O}$  *L. monocytogenes* 数  $\square$ : natural flora  $10^6$  CFU/g 時 $\mathcal{O}$  *L. monocytogenes* 数
- □: natural flora 10<sup>6</sup> CFU/g 時の *L. monocy*■: natural flora 10<sup>2</sup> CFU/g の全生菌数
- ▲: natural flora 10<sup>4</sup> CFU/g の全生菌数
- ■: natural flora 10<sup>6</sup> CFU/g の全生菌数

monocytogenes が定常期に達した時点での菌数が低くなるという結果になった。さらに、他の温度帯における L. monocytogenes の菌数に関しても、定常期の時点での菌数の差は若干縮ま

るものの、5℃と同様の傾向が認められた。

以上のように、L. monocytogenes の増殖において natural flora 数が最大増殖密度に大きく影響を与えることが示された。また、 $20^{\circ}$ C 以上の高温保存においては natural flora 数の増大に伴い、増殖速度が抑制される傾向が示された。

#### 3) 平成21年度研究成果の概要

## 微生物挙動データベース MRV (Microbial Responses Viewer) の機能拡張(食総研)

#### ①目的

微生物学的リスク評価においては、環境条件の組合せによって対象とする細菌の挙動を推測することが重要である。そこで、細菌の増殖/非増殖データと、増殖速度に関するデータを国際予測微生物データベース ComBase (http://www.combase.cc/) に収録されているデータから抽出して、データベースを開発し、2008 年 8 月より Microbial Responses Viewer (MRV) の名前で公開している (http://cbnfri.dc.affrc.go.jp/MRV-J)。開発当初の MRV では個別の食品のデータを検索することができなかったが、本年度の研究によって、食品の種類毎に種々の菌種を網羅的に比較、検索を可能とすることを目的として大幅な機能拡張を行った。

#### ②方法

ComBase (ver. 4) に収録されている 29 の菌種,全 3 万 5 千件のデータセットのうち,温度条件が 50°C 以上のデータセットを除いた約 3 万 1 千件を用いた。各データセットにおいて,観察時間内に 1.0 log 以上の増加が認められた場合には「増殖」,菌数の増加が認められなかった場合には「非増殖」とした。また,各種食品における増殖速度は温度をパラメータとした Ratkowsky の平方根モデルで記述することとした。

#### ③結果と考察

改良したしたデータベース MRV (http://cbnfri.dc.affrc.go.jp/MRV-J/)では,種々の環境条件(温度,pH,水分活性)における各種細菌の増殖( $\bullet$ )/非増殖( $\bullet$ )データに加えて,対象となる細菌の増殖速度の情報を数理モデル化して等高線化したグラフを表現し,増殖/非増殖グラフと一体化した。これによって温度,pH,水分活性の各要因の組合せにおける増殖/非増殖条件を検索可能とするだけでなく,増殖の速さ(速度)に関する情報も同時に検索可能である(図 2-8)。

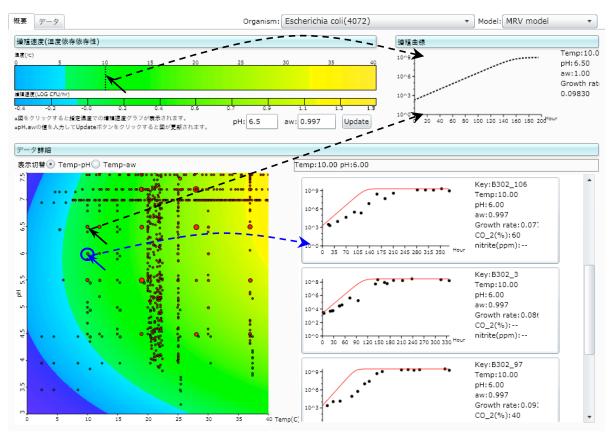


図 2-8 MRV による検索結果画面の例(大腸菌の培地環境におけるデータ) 等高線グラフ上でのポインタの動きに追従して増殖曲線をリアルタイムに描画 各ポイントをクリックすると時間変化データを参照できる。

また、食品の種類毎に増殖/非増殖データが検索可能としただけでなく、増殖速度を他の食品あるいは他の菌種と比較検討することも可能である(図 2-9)。

データベース全体 として、食中毒菌およ び腐敗菌を含む 29 種 類の菌種、18 種類の食 品群における各種微 生物挙動データ約 3 万 件に容易にアクセス

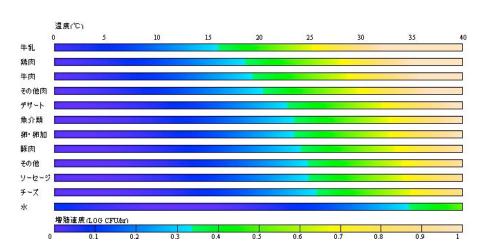


図 2-9 各種食品における増殖速度の温度依存性の検索結果の 一例 (L. monocytogenes データ)

でき,網羅的な検索も可能とした。

#### 微生物学的リスク評価のための食中毒細菌増殖予測モデルの開発(食総研)

#### ①目的

微生物学的リスク評価の暴露評価ステップにおいて、対象とする時点までの微生物数の適切な推定が求められる。そのために、種々の数理モデルを用いて予測が試みられている。しかしながら、微生物学的リスク評価では微生物数だけではなく、その数が取りうる確率分布をも推定する必要が求められるが、現状ではこの要求に的確に応える手法は提案されていない。さらに、推定値の取りうる確率分布は、その不確実性と変動性とに分けて推定することが重要であることが指摘されている。そこで、本研究では微生物数とその推定値の取りうる確率分布を不確実性と変動性とを分離推定するモデル化手法を開発することを目的とした。

#### ②方法

H20 年度に東京海洋大学にて取得した L. monocytogenes のマグロすき身中での増殖データを用いて、モデル構築した。従来のモデル化手法では観察データを直接にモデル化していたため、データが生成されるプロセスにおいて発生する誤差と、観察によって生じる誤差とを分けて推定する事はできなかった。そこで近年注目を集め始めている、これらの誤差要因の推定を可能とする一般状態空間モデル化手法を検討した。一般状態空間モデルの概念図を図 2-10 に示す。

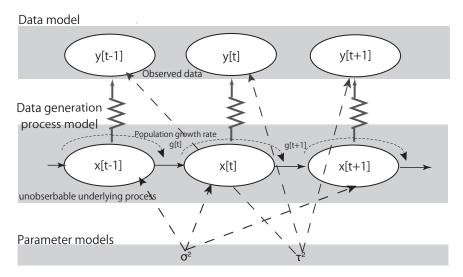


図 2-10 一般状態空間モデルの構成

図 2-10 に示すように階層構造を有しており、これらの変数全てを確率変数として捉えて、確率的に尤もらしい値を推定する手法である。パラメータ推定には Markov Chain Monte Carlo (MCMC) 法を用いて各変数の確率分布を得る。

#### <モデルの概略>

データモデルとして、シャーレ上で計測されたコロニー数がポアソン分布に従うと仮定した。

#### APC ~ Poisson (mean.APC)

ここで APC はシャーレ上で計測された Natural flora 数を表し、希釈率 conc.APC と対数変換された菌数データ (ln.APC) とから以下のように記述できる。

#### mean.APC = exp(ln.APC) / conc.APC

ここで、In.APC は正規分布に従うものと仮定して、

#### $\ln APC \sim N(xA, \tau_A^2)$

ここで xA は現実には観測することのできない隠れ状態における Natural flora の真の対数菌数密

度( $\ln \text{CFU/g}$ )を表しており、 $\tau_A^2$  は分散を表している。. 同様に *L. monocytogenes* も定義される。 LM ~ Poisson (mean.LM)

mean.LM = exp(ln.LM) / conc.LM

 $ln.LM \sim N (xL, \tau_L^2)$ 

ここで  $\ln$ LM  $\ge$  xL は観察された L. monocytogenes データ $(\ln CFU/g)$  と観測することのできない隠れ状態における L. monocytogenes  $(\ln CFU/g)$  の数をそれぞれ表している。xA  $\ge$  xL はそれらの平均値 mean.xA  $\ge$  mean.xL, さらにはそれらの分散  $\sigma_A{}^2$   $\ge$   $\sigma_L{}^2$   $\ge$  で規定される正規分布に従うと仮定する。

 $xA \sim N \text{ (mean.} xA, \sigma_A^2)$ 

 $xL \sim N \text{ (mean.} xL, \sigma_L^2)$ 

これら平均値 mean.xA と mean.xL は以下の式によって時間変化が記述される。

$$mean.xA[t] = xA[t-1] + Delta.time[t] \times \left( pA[1] + pA[2] \times Temp[t] + pA[3] \times Temp[t]^2 \right) \times \left( 1 - \frac{exp(xA[t-1])}{exp(xA.max)} \right)$$
(1)

$$mean.xL[t] = xL[t-1] + Delta.time[t] \times \left( pL[1] + pL[2] \times Temp[t] + pL[3] \times Temp[t]^2 \right)$$

$$\times \left( 1 - \frac{\exp(xLx0)}{\exp(xL[t-1])} \right) \times \left( 1 - \frac{\exp(xL[t-1])}{\exp(xL.max)} \right) \times \left( 1 - \frac{\exp(xA[t-1])}{\exp(xA.max)} \right)$$
(2)

ここで t, Temp, xA.max, xL.max, and xL.x0 はそれぞれ 時間 (h), 温度 ( $^{\circ}$ C), natural flora の最大菌密度(ln CFU/g), L. monocytogenes の最大菌密度(ln CFU/g), および L. monocytogenes (ln CFU/g) の初期菌数を表している。パラメータ pA[i] と pL[i] は推定される係数である。

<パラメータの推定方法>

全パラメータの同時確率分布は以下の尤度方程式で規定される尤度に比例すると考えられる。

$$\begin{split} p(\sigma_{A}^{2}, \tau_{A}^{2}, xA \mid APC) &\propto N(xA_{0} \mid \mu_{0}, \sigma_{0}^{2}) \cdot \prod_{t=1}^{T} N(xA_{t} \mid f(xA_{t-1}), \sigma_{A}^{2}) \cdot \prod_{t=1}^{T} N(APC_{t} \mid xA_{t}, \tau_{NF}^{2}) \cdot \\ & IG(\sigma_{A}^{2} \mid \alpha_{\sigma}, \beta_{\sigma}) \cdot IG(\tau_{A}^{2} \mid \alpha_{\tau}, \beta_{\tau}) \\ p(\sigma_{LM}^{2}, \tau_{LM}^{2}, xLM \mid LM) &\propto N(xLM_{0} \mid \mu_{0}, \sigma_{0}^{2}) \cdot \prod_{t=1}^{T} N(xLM_{t} \mid f(xLM_{t-1}), \sigma_{LM}^{2}) \cdot \prod_{t=1}^{T} N(LM_{t} \mid xLM_{t}, \tau_{LM}^{2}) \cdot \\ & IG(\sigma_{LM}^{2} \mid \alpha_{\sigma}, \beta_{\sigma}) \cdot IG(\tau_{LM}^{2} \mid \alpha_{\tau}, \beta_{\tau}) \end{split}$$

これらの式から直接的に尤度を解析的に求めるのは極めて困難であることから,擬似乱数を発生させて事後分布からのサンプリングを行い,各パラメータの事後分布を推定した。サンプリング方法として,MCMC 法による Gibbs サンプリングを R2WinBUGS package (Sturtz et al., 2005) 用いて WinBUGS 1.4.3 (Lunn et al., 2000) を R 2.8.1 (R Development Core Team, 2008)上で動作させて計算した。

#### ③結果と考察

本手法によって推定されたパラメータを用いて L. monocytogenes 数とマグロすき身の Natural flora 数とを同時に高い精度で予測することができた。合計 28 本の増殖曲線を解析し、その中の観測ポイント 584 点を用いた。

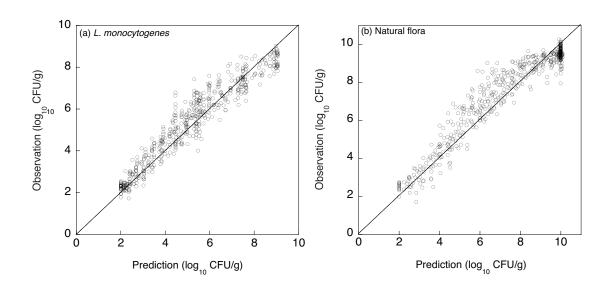


図 2-11 一般状態空間モデルによる(a) L. monocytogenes 数と (b) Natural flora 数の予測精度

また、実用的に最も重要である変動温度環境下における予測精度を、従来のモデル化手法 (Baranyi-Ratkowsky model) と比較した結果、同等の予測精度を示した。

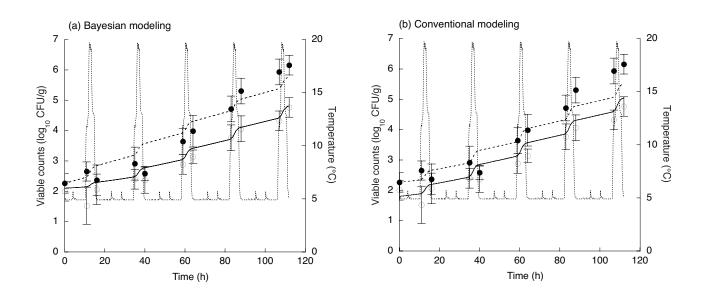


図 2-12 変動温度環境下における *L. monocytogenes* 数(○)と Natural flora 数(●)変化の予測精度の 比較

(a) New Bayesian State Space model, (b) Conventional Baranyi model

さらに、本年度新たに開発した予測手法では予測値の確率分布をその変動性と不確実性と分離し

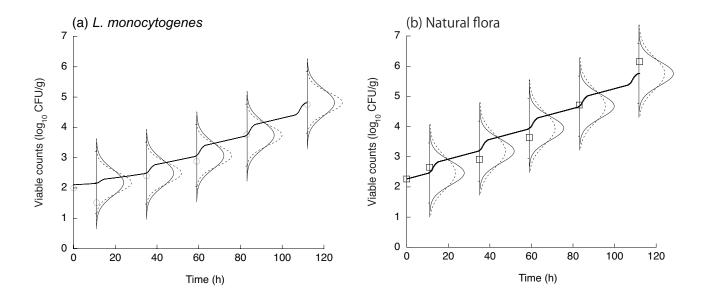


図 2-13 変動温度環境下における *L. monocytogenes* 数(○)と Natural flora 数(□)変化の予測 (一) とその確率分布 ---- 変動性, 一 不確実性

このように、特定の時間における菌数を推定することができるとともに、その推定値の取りうる 確率までも推定することができる。変動性は実験によって制御できない細菌固有のバラツキであるのに対して、不確実性は実験の観測誤差によるものである。本手法によれば実際のリスク推定においては双方の違いを勘案して、「○時間後には△%の確率で菌数が□になっている」といったことを予測可能とする。このような推定はリスク評価において極めて有用な情報として活用される。

#### 胃内での病原菌の生残挙動の解析(食総研)

#### ①背景と目的

食中毒発症の用量反応モデルの開発に関して、従来のヒトボランティア試験や疫学調査データによる手法ではない、新たな手法が提案されてきている「、摂食から感染に至るステップ毎に細分化して実験でクタを積み上げ、最終的にそれらの同時確率として食中毒発症を推定しようとする試みである。今回はその足がかりとして、胃内での病原菌の生残挙動を明らかにして、食品の種類、量の影響を組み込んだ病原菌の減少予測モデルを開発することを目的とした。

KEY EVENTS PATHWAY: L. monocytogenes intake and potential fetal death

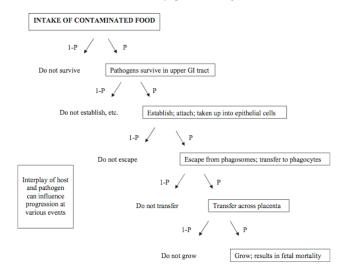


図 2-14 The Key Events Dose-Response Framework の食中毒菌への応用例

#### ②方法

一般成人の平均的な空腹時の胃液量 (30 ml) 中に,一回の食事量に相当する食品をストマッカー袋中で 37℃に保温して反応させることで,擬似的な胃消化モデルとした。反応させる食品に各種の病原菌を接種して,その生残を測定した。食事に伴い胃液の分泌量が増大するが,容量可変のポンプを用いて胃液の添加量を制御することで,実際の胃内での pH 変化を模倣した。

#### ③結果と考察

世界的に食中毒事故の報告が多い生野菜サラダを摂食した際の菌数変化と胃内の pH 変化を示す。

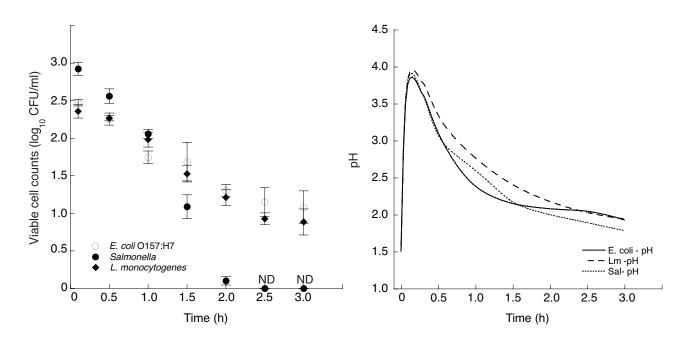


図 2-15 生野菜サラダ摂食による胃内での菌数変化と胃内 pH 変化

摂食前の菌数を  $10^2 \sim 10^3$  CFU/g と比較的低く設定したにもかかわらず, 1 時間程度の保持時間ではほとんど減少しないことが示された。これは胃内 pH の変化と同調しており, pH が 2.5 以下に低回し始めたころから死滅が進み始めている。すなわち, 胃内での菌数死滅は pH の関数として説

明できることが示唆された。そこで, pH と各種病原菌の死滅速度との関係を検討して, モデル化した。

L. monocytogenes E. coli O157:H7 は耐酸性が高く,極めて低い pH でのみ急速な死滅が認められる (図 2-3-16)。このことからも L. monocytogenes E. coli O157:H7 が少数の摂取で食中毒を発症してしまうことが示唆される。一方,Salmonella は比較的は高い pH ( $\sim$ 2.5)から死滅が認められることから,消化過程で死滅が期待され,その結果ある程度の量の菌数が発症に必要であることが示唆される。

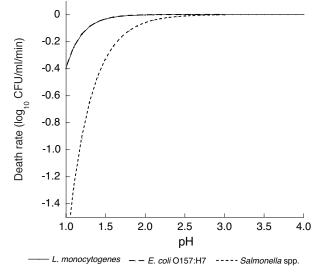


図 2-16 死滅速度と pH との関係

食品の種類および食事量によっても、胃内の pH 変化は影響される。中でも固形食品の場合、その水分が大きく影響を及ぼす。食品の種類は多岐に渡るため全ての食品、さらには食事パターンについて実験的に検証することは現実的ではない。そこで、計算シミュレーションによって多岐に渡る食品の種類と、食事パターンを反映させられるような、計算プログラムの開発を行った。以下に概略を示す。

## 胃内における病原菌死滅シミュレータの開発

(1) 食品毎の pH と水分とをデータベース化

食品のpH は以下の USFDA のサイトを参考にした。

http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm122561.htm

また食品毎の水分は五訂食品成分表を参照

http://www.mext.go.jp/b menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/05031802/002.htm

食品群毎に PDF で数値データを表にしたものがあり、数値をとることができる。 これらのデータをもとにして、食品毎の pH と水分をデータベース化した。

- (2) 上記でデータベース化した個別の食品を選択し、食事量を入力。これらの情報から胃内 pH を推定する。基本的には胃液(pH 1.5, 40 ml を想定)中の水素イオン量と食事によって持ち込まれた水素イオン量との和に、電離度(どのくらいイオン化しているかの指標)を乗じて、トータルの容量あるいは質量で除したものが胃液と食品との混合物の水素イオン濃度となり、最終的には pH =  $-\log 10$  [H+]で求められる。ここで、食品の電離度を水分別に 3 グループに分類して、。水分が低下するにつれて、電離度も低下すると仮定して食品中の水分が多い時には 1%、中間的なものを 0.1%、比較的乾いているものは 0.01%とした、
- (3) 次に摂食後の胃液分泌に伴う pH 変化を推定した。以下の式で記述した。

$$pH_{in\ stomac} = (pH_{max}-pH_{min}) \cdot \exp(a \cdot time) + pH_{min}$$

ここで、 $pH_{max}$  は食事直後のピークの pH を示し、上述の 2. で計算した値が入る。 $pH_{min}$  は胃液の pH で、今回はデフォルトを 1.5 とした。a はパラメータで、年齢の影響や、健康状態に依存して くるもので、デフォルトで -0.01 を仮定した。

(4) 胃内の pH 変化に伴う病原菌の挙動シミュレータ 基本的には一定 pH条件下で死滅曲線データを実験で取得して,以下のモデルでの記述を試みた。

x[t] <- x[t-1] + Delta.time[t] \* (p[1] \* exp(p[2] \* pH[t]))

ここで、t は時間、p[1]、p[2]は推定パラメータであり、菌種毎に異なる値をとる。実際の計算は MCMC による推定を行っているので、推定パラメータの確率分布が得られている。そこから算出 された 95%信頼区間のパラメータ値を使う。

シミュレーションは時間変化に伴う pH の変化が上述 (3) の計算式で推定できるので、その得られた pH 値を用いることで上記の式を逐次計算すれば求める菌数の時間変化が得られる。

ところで、実際の食品での試験結果は、シンプルな胃液系での予測結果とかなり異なる。これは 胃液が局所的に食品に接触して、その局所的には急激な pH 低下が起こり、細菌が死滅したと考 えられる。結果として全体での菌数変化を実験では測定するため、計算よりも少ない値が生じた のだと考えられる。この局所的殺菌効果による菌数の減少を考慮するために、理想的な胃液系で の死滅速度モデルを拡張して、実際の食品摂取にも対応可能な改良を施した式が以下のようにな ります。

death rate =  $p[1] \cdot (\exp(p[2] \cdot x))^a$ ,  $a = \{0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1\}$ 

べき乗のパラメータを入れることで、死滅速度モデルが、pH の高い方へと平行にシフトする。べき乗パラメータ a は食品の種類毎に異なり、それぞれ実験結果への当てはまり具合から決定した。以上の結果を利用して、計算は読み取ることができる。

(5) 摂食した食事の胃から十二指腸への移動率モデル

食品の移動率を, 摂取した量と移動した量とからロジスティック回帰分析を用いてモデリングした。時間と年齢群とをパラメータとしてモデル化

Transpot rate = 
$$\frac{1}{1 + \exp(-(-3.098653 + 0.022670 \cdot x + 0.469310 \cdot a))}, a = \{0, 1\}$$

ここで、a=0 は若年層、a=1 は高齢者層である。

したがって、上述 5. での菌数変化と組合せると、摂食後の任意の時間における十二指腸への移動食品量と、その時の菌数を以下のように推定することができる。

摂食後の任意の時間における食品の移動量(g) × 摂食後の任意の時間における菌数推定(CFU/g) = 十二指腸へ移動した菌数(CFU)

これによって、種々の条件での食事パターン別、年齢層別での食中毒菌の生残挙動をシミュレーションすることができる。シミュレーション画面を以下に示す。

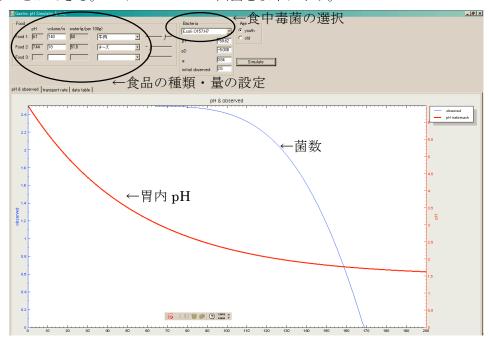


図 2-17 胃内消化中における食中毒菌の生残挙動シミュレータの結果例

現在,27種類の食品と3種類の食中毒菌との組み合わせでシミュレーションすることができるが、すべてのパターンで高い精度が保証できるわけではないので、今後広範な検証実験が必要である。

#### 実食品における競合細菌共存下での病原性細菌の挙動予測手法の開発(農工大)

#### ①目的

本研究では食品及びその原材料中での有害微生物の増殖を解析、予測し、その食品の喫食による健康被害を評価するモデルの開発を検討した。今回、食肉としてはしばしばカンピロバクター、サルモネラ、黄色ブドウ球菌などに汚染されている鶏挽き肉を、対象有害微生物として最も代表的な食中毒起因菌の1つであるサルモネラを選んだ。すなわち、市販鶏挽き肉にサルモネラを接種し、各種温度下でのその増殖挙動を解析した。鶏肉の微生物叢としては一般細菌数を測定し、解析した。また、微生物汚染濃度の高い鶏挽き肉でのサルモネラ増殖も解析し、微生物叢の汚染濃度によるサルモネラ増殖への影響も調べた。これらの解析結果を元に、増殖予測モデルの開発を検討した。

#### ②材料と方法

使用菌株として食中毒事件由来 *Salmonella* enterica serovar Enteritidis を用いた。鶏挽き肉は微生物低汚染鶏肉 low-contaminated chicken として,購入した市販肉を,微生物高汚染鶏肉 high-contaminated chicken としてこの市販鶏肉を  $30^{\circ}$ C, 10 時間保存したものをもちいた。なお,これらの鶏肉にサルモネラは検出されなかった。

本菌を栄養寒天上で 培養後, さらに TSB 液体培地中で培養し、細胞を洗浄後、生理食塩水中に浮遊させた。この浮遊菌液を挽き肉中に  $10^{3.5}$  CFU/g の濃度となるように接種し、十分に混和後、10g ずつガラス瓶(容量 110ml)に入れ、各種温度条件下で保存した。経時的にサンプリングし、試料中の細菌数およびサルモネラ菌数を測定した。細菌数 standard plate counts (SPC)は標準寒天平板を用いて、サルモネラ菌数は DHL あるいは XLD 寒天平板を用いて、測定した。サルモネラか疑わしいコロニーについてはリアルタイム PCR 法あるいはサルモネラ O 群抗体(デンカ生研)を用いて確認した。

保存中の試料温度はデジタル温度測定器 (AM-7002, 安立計器)で測定した。 計測したデータは下に示す Fujikawa ら (2004, 2005) が開発した新ロジスティックモデルを用いて解析し、また予測を行なった。

$$\frac{dN}{dt} = kN\{1 - (\frac{N}{N_{\text{max}}})^m\}\{1 - (\frac{N_{\text{min}}}{N})^n\}$$

ここで、N: 菌数、t: 時間、k: 速度定数、 $N_{\max}$ : 最大菌数、 $N_{\min}$ : 初期菌数、

m および n: パラメーターである。実際のデータ解析は Fujikawa and Kano (2009)の開発した ソフトウェアで行った。また,速度定数 k の温度依存性は平方根モデルを用いて解析した。菌数 の予測値と測定値の誤差は平均二乗誤差( $\log$  単位)として表わした。

#### ③結果

1. 低および高汚染鶏肉中のサルモネラ増殖の比較

高および低汚染鶏肉中のサルモネラと一般細菌の増殖を比較した結果,図 2-18 に示すように低 汚染鶏肉中でのサルモネラ増殖の方が高汚染鶏肉中よりも著しいことが示された。すなわち,前 者での増殖速度定数および最大菌数がより高い値を示した。

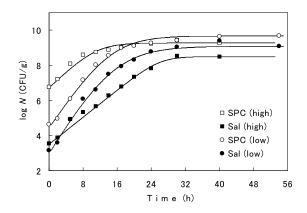


図 2-18 低および高汚染鶏肉中のサルモネラ増殖 (24℃保存). 各増殖曲線は新ロジスティックモデルで描いた。

この2種の鶏肉における各定常温度での最大菌数を比較した結果,サルモネラにおいて最大菌数は温度が高いほど高く,また低汚染鶏肉での方が高い値を示した一方,一般細菌では温度および微生物汚染程度に関わらず,ほぼ一定の値を示した(図 2-19)。

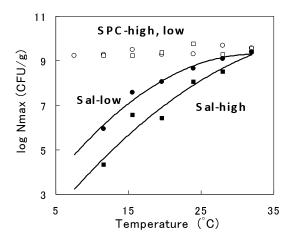


図 2-19 低及び高汚染鶏肉中の各種温度における細菌数およびサルモネラの最大菌数. 曲線は回帰曲線を示す。

増殖速度定数においては、図 2-20 に示すようにその温度依存性が平方根モデルで高および低汚 染鶏肉において高い直線性が認められた。これらの結果から、これらの直線を用いてある温度で の速度定数値が推定できることが明らかとなった。

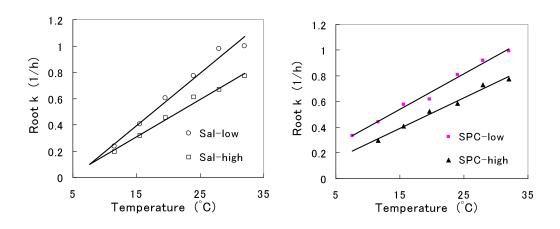


図 2-20 低及び高汚染鶏肉中の各種温度での一般細菌およびサルモネラ増殖の速度定数.

## 4. 変動温度下でのサルモネラ増殖予測

前述した解析結果を組み込んだ新ロジスティックモデルを用いて、新たな変動する温度下でのサルモネラおよび一般細菌の増殖を予測した。低汚染鶏肉中では図 2-21 に示すように比較的高温度帯(A)および低温度帯(B)において高い精度で増殖予測ができた。

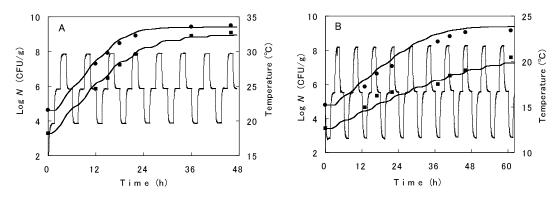


図 2-21 変動温度下における低汚染鶏肉中でのサルモネラ及び一般細菌の増殖予測. 黒丸は実測値, 曲線は予測値を示す。周期的に変化する曲線は実測した鶏肉温度を示す。

高汚染鶏肉中においても図 2-22 に示すように両温度帯で高い精度の増殖予測ができた。

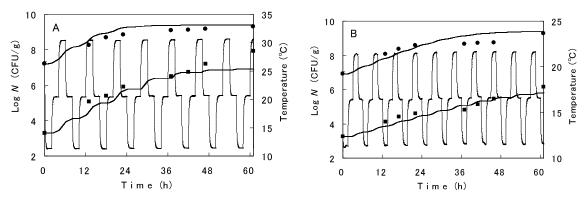


図 2-22 変動温度下における高汚染鶏肉中でのサルモネラ及び一般細菌の増殖予測. 黒丸は実測値, 曲線は予測値を示す。周期的に変化する曲線は実測した鶏肉温度を示す。

予測および実測した菌数の平均二乗誤差(log 単位)は表 2-1 に示すように小さい値を示した。

表 2-1. 変動温度下での予測および実測した菌数の平均二乗誤差 (log 単位)

鶏肉	一般細菌	サルモネラ
低汚染		
温度パターン A	0.0303	0.0317
温度パターン B	0.1560	0.0728
高汚染		
温度パターン A	0.0626	0.1370
温度パターン B	0.1650	0.1620

温度パターンは図 2-22 に対応する。

本研究では、増殖モデルを用いて微生物汚染程度の異なる鶏肉中のサルモネラおよび一般細菌増殖を高い精度で予測できることが明らかとなった。今後、さらに本研究を発展させて、食肉中でのサルモネラ増殖を予測するソフトウェアの開発が期待できる。このようなソフトウェアは食品中の病原微生物の増殖を予測する手段として、リスク評価、特に暴露評価を行う際に大いに役立つであろう。

#### ④要約

微生物汚染濃度の異なる鶏挽き肉を各種定常温度下で保存し、その間のサルモネラおよび一般細菌の増殖挙動を実測した。その結果を新ロジスティックモデルで解析し、さらにその解析結果を組み入れて新たな変動温度下でのサルモネラおよび一般細菌の増殖を予測した結果、高い精度の予測ができた。以上の結果を基に、各種保存温度における鶏肉中のサルモネラ増殖予測コンピュータソフトウェアの開発が期待できる。このようなソフトウェアは食品中の病原微生物の増殖を予測する手段として、リスク評価、特に暴露評価を行う際に大いに役立つであろう。

#### 5. 参考文献

Fujikawa, H., Kai, A., Morozumi S., 2004. A new logistic model for *Escherichia coli* at constant and dynamic temperatures. Food Microbiol. 21, 501-509.

Fujikawa, H., Morozumi, S., 2005. Modeling Surface Growth of *Escherichia coli* on Agar Plates. Appl. Environ. Microbiol. 71, 7920-7926.

Fujikawa, H., Kano, Y., 2009. Development of a program to fit data to a new logistic model for microbial growth. Biocont. Sci. 14, 83-86.

## 小腸モデル in vitro 試験での *Listeria monocytogenes* の消長の検討 : リステリア食中毒発症の用量 反応モデルの構築を目指して(海洋大)

#### ①目的

人工的な胃環境の実験モデル系での各種食品を摂食した場合の pH の変化と病原菌の消長が検討されており、その結果、大部分の食品において、通常の摂食量を想定した場合には胃内環境(胃液)の pH が上昇して、元のレベルにまで低下するのに相当の時間を要することが明らかとなり、それに応じて食品とともに摂食された病原菌数の低下も緩やかで、相当数が、かなりの確率で胃を通過することが実験結果から推測されている。

病原菌に対する防御網として次に考えられるのが、侵入部位である小腸内での胆汁酸および消化酵素、また、常在菌による増殖抑制である。この小腸内での病原菌の消長を明らかにできれば、腸内に達する病原菌数に応じて、食中

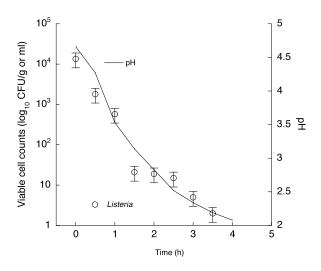


図 2-23 ネギトロ巻き 3 個 (75 g) を摂食 した際の胃内 pH と *L. monocytogenes* 数 (小関報告)

毒発症の確率を推定可能とする、用量反応モデルの構築に繋がると考えられる。

最近 Buchanan らは食中毒発症の用量反応モデルの開発に関して、従来のヒトボランティア試験や疫学調査データによる手法ではない、新たな手法 "The Key Events Dose-Response Framework" を提案している  $^{1)}$ 。これは、摂食から感染に至るステップ毎に細分化して実験データを積み上げ、最終的にそれらの同時確率として食中毒発症を推定しようとする試みである。今年度はその足がかりとして、小腸モデル(人工腸液中) *in vitro* 試験での *L. monocytogenes* の挙動と、小腸常在菌である腸球菌および乳酸菌の影響を検討した。

#### 【実験方法】

グルコースを含まない GAM ブロスにトリプシン 0.1%(w/v), ウシ胆汁 0.4%を加えたものを人工小腸液とした。病原菌として *L. monocytogenes* Scott-A CIP 103575 (Lm)をブレインハートインフュージョン(BHI)ブロスで  $30^{\circ}$ C, 6-24h 前培養し( $10^{9}$  cfu/ml),BHI で 100 希釈後 0.3ml ずつを人工小腸液 3ml に接種した(n=3)。

ヒト小腸の常在乳酸菌である乳酸桿菌 *Lactobacillus acidophilus* NBRC 13951 および腸球菌 *Enterococcus faecalis* NBRC 100480 は, MRS broth を用いて 48h 前培養 (OD 660nm≒2.0, 10<sup>9</sup> cfu/ml) した。培養後の懸濁液(OD660nm=2)について、培養上清および洗浄菌体を調製した。

上記の Lm を接種した人工小腸液に乳酸菌の培養懸濁液,培養上清あるいは洗浄菌体の懸濁液 0.3ml 加え, Lm の消長に対する E. faecalis および Lb. acidophilus の影響を調べた。対照として乳酸菌を含まない MRS broth を加えた。

Lm および乳酸菌を接種した人工小腸液はアネロパックを用いて 37°C で 24h 嫌気培養し, PALCAM 寒天培地を用いて Lm の生菌数を求めた。

#### 【結果および考察】

1) 人工小腸液に Lm のみを  $10^6$  cfu/ml 接種し 37°C, 24h 嫌気培養した場合,実験ごとで生残性 は大きく異なり, $10^9$  cfu/ml まで増加する場合と, $10^4$  cfu 以下まで減少する場合があった(図 2-24)。 増殖ステージのストレス耐性の影響も推察されたが,対数増殖期と定常期での違いは認められなかった。くりかえし実験を行った結果,Lm は減少する場合が多かった。

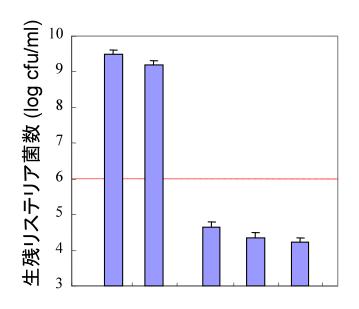


図 2-24 人工腸液中でのリステリア菌の生残性. 10<sup>6</sup> cfu/ml 接種し 37℃, 24h 嫌気培養後菌数測定

2) この実験系に MRS で前培養した Lb. acidophilus および E. faecalis を  $10^8$  cfu/ml レベルで加えた場合の Lm の生残菌数を図 2-25 に示す。Lb. acidophilus 培養懸濁液の接種により Lm の生残菌数は減少した。その培養上清では Lm 生残性に影響は認められず,洗浄菌体によっては抑制された。一方,E. faecalis の摂取では逆に Lm の生残菌数が増加した。培養上清でも同様の影響が認められた。これらの乳酸菌の Lm 生残性に対する影響は,対数増殖期後期(前培養 6h)および定常期(前培養 12h)とも同様であった。

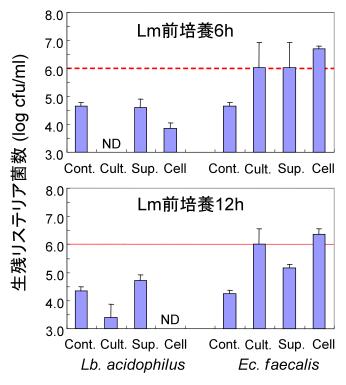


図 2-25 人工腸液中での生残リステリア菌数に対する Lactobacillus acidophilus および Enterococcus faecalis の影響.

Cont.,対照; Cult.,培養懸濁液; Sup.,培養上清; Cell, 洗浄菌体

以上の結果より、このままヒト腸管に挿入することはできないが、Lm は小腸内の胆汁酸および消化酵素に対してある程度耐性は持つものの、その生残菌数は実験ごとに大きく異なった。この人工腸小腸液中のLm の生残性の不均一性については今後検討する必要がある。

また Lm の生残性について小腸内の乳酸桿菌 Lb. acidophilus の存在が腸管感染の防御に重要であると考えられるが、腸球菌 Ec. faecalis の生成物による Lm 生残性の増加についての検討も重要と考えられる。

## 参考文献

1) Buchanan, R.L. et al., 2009. The Key Events Dose-Response Framework: Its Potential for Application to Foodborne Pathogenic Microorganisms', Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 49:8,718-728.

#### 4) 3年間の研究成果のまとめ

「研究課題:予測微生物学的解析手法を用いた微生物学的リスク評価システムの開発」

#### 1 研究全体の成果

#### ① 全体の研究目的

微生物学的リスク評価を行うためには、その評価の根拠となる<u>微生物挙動(増殖・死滅)データが必要不可欠である。</u>しかし、この評価の第一段階とも言える基礎データの収集に、現状では多大な労力が必要とされている。このような煩雑な作業を効率的かつ効果的に遂行するためには、データベースの活用が必要不可欠である。今日、情報技術のめざましい発達によって、各種のデータを大量に保存可能なだけでなく、複数の異なる分類データを関連づけて検索することが可能となってきている。このような<u>データベースを活用すれば、現状に比べ、圧倒的に効率的かつ効果的に目的とするデータ集を作成することができる。</u>したがって、微生物挙動データベースはリスク評価を円滑に行うための必要不可欠なツールといえる。

さらに、リスク評価を効率的に実施するためには、微生物挙動に関して収集したデータを効果的に活用する必要がある。すなわち、収集した<u>データから意味のある情</u>報への変換(データの解釈)が極めて重要な作業となってくる。

ここで、「データ」→ (情報)への橋渡しをするのが、各種の数理予測モデルである。 <u>モデルを活用することで、リスク評価者の意志決定の負担を軽減するだけでなく、データの解釈に統一性、客観性と透明性を付与することになる。</u>予測モデルはリスク評価の、特に暴露評価において強力なツールとなることから、データベースと同様に、今後のリスク評価手法の高度化には必要不可欠といえる。本研究では、リスク評価の基礎となるデータを検索・収集するためのデータベースを開発するとともに、各種の微生物挙動予測モデルを開発し、これらを融合的に活用することで効率的・効果的に微生物学的リスク評価を行うための支援ツールを開発する目的としている。

本研究課題終了時には、以下の3点を目標とする。

- 1) 効率的・効果的なリスク評価手法の確立
- → 情報技術の最大限に活用することで,効率的・効果的なリスク評価を可能とる。
- 2) データベースを中核とする、リスク評価のための基盤整備
- → 将来にわたり継続的に利用可能なデータベースが構築されることから,データ の追加更新を行うことで,永続的な利用が可能とする。
- 3) 各種病原性細菌のリスク評価のためのデータ蓄積
- → 現在,日本国内で問題となっている病原性細菌のリスク評価に資する,細菌挙動データと予測モデルを提供する。

#### ② 全体の研究方法

本研究の実施体制は研究の中核部分であるデータベースおよびシステム開発を主任研究者(小関)が所属する食品総合研究所で行う。さらに、食中毒発症の用量反応モデルを開発して、食中毒リスク評価システムに活用する。また、実際の食品における病原性細菌の挙動解明は分担研究者の東京海洋大学(主に水産物とその加工品)および東京農工大学(主に農畜産物とその加工品)で実験データを蓄積して、データベース開発、さらにはリスク評価システムの開発へと活用する。また、東京農工大学では実験データから、食品上における細菌の増殖挙動を予測する数理モデル開発を進め、これによってリスク評価システムにおける暴露評価での、種々の環境条件下での微生物挙動を推定可能とする。

#### ③ 研究の成果

3年間にわたる本研究の成果によって、研究開始当初に掲げた目標を達成することができた。具体的には以下のとおりである。

1) 効率的・効果的なリスク評価手法の確立

新たなモデリング手法(一般状態空間モデル)を開発して,従来手法ではできなかった菌数の予測とその確率分布の推定とを同時に行うことを可能とした。この結果はリスク評価における暴露評価ステップに対応する手法として発展することが期待される。また,胃内における食中毒菌の生残挙動を解明したことによって,食中毒発症メカニズム解明と発症の用量反応モデルへの応用可能性への道を示すことができた。

2) データベースを中核とする, リスク評価のための基盤整備

従来にない、全く新たな細菌の増殖/非増殖データと、増殖速度に関するデータを国際予測微生物データベースComBase (http://www.combase.cc/) に収録されているデータから抽出したデータベースを開発し、2008年8月よりMicrobial Responses Viewer (MRV) の名前で公開している (http://cbnfri.dc.affrc.go.jp/MRV-J)。開発当初のMRVでは個別の食品のデータを検索することができなかったが、最終的には、食品の種類毎に種々の菌種を網羅的に比較、検索を可能とすることを目的として大幅な機能拡張を行い、リスク評価の際の基礎的情報収集のためのプラットフォームを構築することができた。

3) 各種病原性細菌のリスク評価のためのデータ蓄積

実際の食品での食中毒菌の挙動 (鶏肉での Salmonella, マグロすき身での L. monocytogenes) を詳細に検討してデータを蓄積するとともに,各々の増殖予測モデルを構築することができた。これらのデータは今後日本において微生物学的リスク評価を実施する際の極めて重要なデータとなる。

以下に個別の研究成果を詳細に述べる。

- 2 各分担研究者(分担課題)の成果(主任研究者及び各分担研究者が作製する)
- 1) 「分担課題:食品微生物挙動データベースの開発」
  - ① 研究目的

リスク評価の実施において有益な微生物挙動に関する情報を収集する必要があることは言うまでもない。従来の文献検索データベースでは目的とする微生物挙動に関する情報を直接的に検索、収集することはできない。このような問題点を解決して、直接的に微生物の増殖/死滅挙動データを検索、収集可能としたデータベースにComBase がある。ComBase は国際協力体制のもとで開発されたデータベースであり、非常に多数の微生物挙動データを収録している。しかし、これら多数のデータからより有益な情報を抽出すのは現状の ComBase では困難であった。

そこで、本研究ではこれまでにない、全く新たなコンセプトで微生物挙動に関する 情報を検索、収集可能とするデータベースの開発を目的とした。

## ② 研究方法

本データベースの開発あたり,まず Combase 開発グループ (UK, Food Research Institute, USDA, Eastern Regional Research Center, Australian Food Safety Centre of Excellence) との協力体制を確立した(図 2-26)。これによって大量のデータを確保することができた。

データベースの設計は任意の環境条件下での、細菌の増殖/非増殖の情報を提供するとともに、併せて増殖速度の情報を提供する。ComBase (ver. 4) に収録されている 29の菌種、全3万5千件のデータセットのうち、温度条件が 50℃以上のデータセットを除いた約3万1千件を用いた。各データセットにおいて、観察時間内に 1.0 log 以上の増加が認められた場合には「増殖」、菌数の増加が認められなかった場合には「非増殖」とした。また、各種食品における増殖速度は温度をパ



図 2-26 ComBase コンソーシアム概要

ラメータとした Ratkowsky の平方根モデルで記述することとした。

#### ③ 研究の成果

改良したしたデータベース MRV (http://cbnfri.dc.affrc.go.jp/MRV-J/)では,種々の環境条件(温度,pH,水分活性)における各種細菌の増殖( $\bullet$ )/非増殖( $\bullet$ ))データに加えて,対象となる細菌の増殖速度の情報を数理モデル化して等高線化したグラフを表現し,増殖/非増殖グラフと一体化した。これによって温度,pH,水分活性の各要因の組合せにおける増殖/非増殖条件を検索可能とするだけでなく,増殖の速さ(速度)に関する情報も同時に検索可能である(図 2-27)。

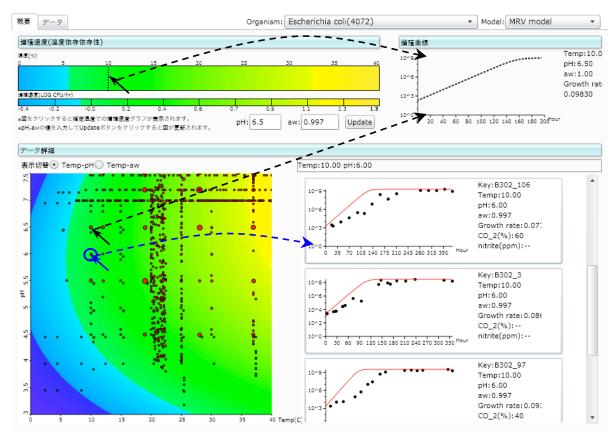


図 2-27 MRV による検索結果画面の例(大腸菌の培地環境におけるデータ) 等高線グラフ上でのポインタの動きに追従して増殖曲線をリアルタイムに描画

各ポイントをクリックすると時間変化データを参照できる。図中の丸印は、国際予測

微生物データベース ComBase から収集した実験値である。収録されているデータ数に応じて丸印の大きさが大きくなる。実験データから得られる増殖速度を温度、pH、水分活性をパラメータとした数理モデルを構築して、その数理モデルを等高線グラフとして描画させている。任意の条件(温度、pH、水分活性)を選択すると、その増殖食速度に応

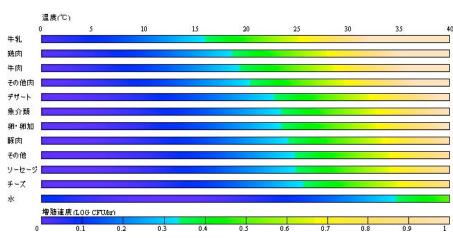


図 2-28 各種食品における増殖速度の温度依存性の検索結果の 一例 (L. monocytogenes データ)

データベース

全大として、食中毒菌および腐敗菌を含む 29 種類の菌種、18 種類の食品群における各種微生物挙動データ約3万件に容易にアクセスでき、網羅的な検索も可能とした。

#### 2) 「分担課題:微生物学的リスク評価のための食中毒細菌増殖予測モデルの開発」

① 研究目的微生物学的リスク評価の暴露評価ステップにおいて、対象とする時点までの微生物数の適切な推定が求められる。そのために、種々の数理モデルを用いて予測が試みられている。しかしながら、微生物学的リスク評価では微生物数だけではなく、その数が取りうる確率分布をも推定する必要が求められるが、現状ではこの要求に的確に応える手法は提案されていない。さらに、推定値の取りうる確率分布は、その不確実性と変動性とに分けて推定することが重要であることが指摘されている。そこで、本研究では微生物数とその推定値の取りうる確率分布を不確実性と変動性とを分離推定するモデル化手法を開発することを目的とした。

#### ②研究方法

H20 年度に東京海洋大学にて取得した L. monocytogenes のマグロすき身中での増殖データを用いて、モデル構築した。従来のモデル化手法では観察データを直接にモデル化していたため、データが生成されるプロセスにおいて発生する誤差と、観察によって生じる誤差とを分けて推定する事はできなかった。そこで近年注目を集め始めている、これらの誤差要因の推定を可能とする一般状態空間モデル化手法を検討した。一般状態空間モデルの概念図を図2-29 に示す。

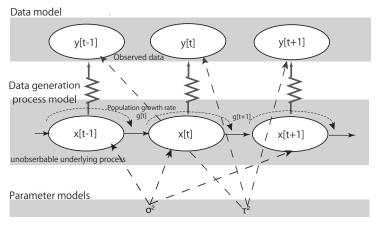


図 2-29 一般状態空間モデルの構成

図 2-29 に示すように階層構造を有しており、これらの変数全てを確率変数として捉えて、確率的に尤もらしい値を推定する手法である。パラメータ推定には Markov Chain Monte Carlo (MCMC) 法を用いて各変数の確率分布を得る。

#### <モデルの概略>

データモデルとして、シャーレ上で計測されたコロニー数がポアソン分布に従うと仮定した。

## APC ~ Poisson (mean.APC)

ここで APC はシャーレ上で計測された Natural flora 数を表し、希釈率 conc.APC と対数変換された菌数データ(In.APC)とから以下のように記述できる。

## mean.APC = exp(ln.APC) / conc.APC

ここで、In.APC は正規分布に従うものと仮定して、

#### $ln.APC \sim N(xA, \tau_A^2)$

ここで xA は現実には観測することのできない隠れ状態における Natural flora の真の対数菌数密度( $\ln$  CFU/g)を表しており、 $\tau_A{}^2$  は分散を表している。. 同様に *L. monocytogenes* も定義される。

#### LM ~ Poisson (mean.LM)

mean.LM = exp(ln.LM) / conc.LM

 $ln.LM \sim N (xL, \tau_L^2)$ 

ここで  $\ln$ LM  $\ge$  xL は観察された L. monocytogenes データ $(\ln CFU/g)$  と観測することのできない隠れ状態における L. monocytogenes  $(\ln CFU/g)$  の数をそれぞれ表している。xA  $\ge$  xL はそれらの平均値 mean.xA  $\ge$  mean.xL, さらにはそれらの分散  $\sigma_A{}^2$   $\ge$   $\sigma_L{}^2$   $\ge$  で規定される正規分布に従うと仮定する。

 $xA \sim N \text{ (mean.} xA, \sigma_A^2)$ 

 $xL \sim N \text{ (mean.} xL, \sigma_L^2)$ 

これら平均値 mean.xA と mean.xL は以下の式によって時間変化が記述される。

$$mean.xA[t] = xA[t-1] + Delta.time[t] \times \left( pA[1] + pA[2] \times Temp[t] + pA[3] \times Temp[t]^2 \right) \times \left( 1 - \frac{\exp(xA[t-1])}{\exp(xA.max)} \right)$$
(1)

$$mean.xL[t] = xL[t-1] + Delta.time[t] \times \left(pL[1] + pL[2] \times Temp[t] + pL[3] \times Temp[t]^{2}\right)$$

$$\times \left(1 - \frac{\exp(xLx0)}{\exp(xL[t-1])}\right) \times \left(1 - \frac{\exp(xL[t-1])}{\exp(xL.max)}\right) \times \left(1 - \frac{\exp(xA[t-1])}{\exp(xA.max)}\right)$$
(2)

ここで t, Temp, xA.max, xL.max, and xL.x0 はそれぞれ 時間 (h), 温度 (°C), natural flora の最大菌密度(ln CFU/g), L. monocytogenes の最大菌密度(ln CFU/g), および *L. monocytogenes* (ln CFU/g) の初期菌数を表している。パラメータ pA[i] と pL[i] は推定される係数である。

## <パラメータの推定方法>

全パラメータの同時確率分布は以下の尤度方程式で規定される尤度に比例すると考えられる。

$$\begin{split} p(\sigma_A^2, \tau_A^2, xA \mid APC) &\propto N(xA_0 \mid \mu_0, \sigma_0^2) \cdot \prod_{t=1}^T N(xA_t \mid f(xA_{t-1}), \sigma_A^2) \cdot \prod_{t=1}^T N(APC_t \mid xA_t, \tau_{NF}^2) \cdot \\ & IG(\sigma_A^2 \mid \alpha_\sigma, \beta_\sigma) \cdot IG(\tau_A^2 \mid \alpha_\tau, \beta_\tau) \\ p(\sigma_{LM}^2, \tau_{LM}^2, xLM \mid LM) &\propto N(xLM_0 \mid \mu_0, \sigma_0^2) \cdot \prod_{t=1}^T N(xLM_t \mid f(xLM_{t-1}), \sigma_{LM}^2) \cdot \prod_{t=1}^T N(LM_t \mid xLM_t, \tau_{LM}^2) \cdot \\ & IG(\sigma_{LM}^2 \mid \alpha_\sigma, \beta_\sigma) \cdot IG(\tau_{LM}^2 \mid \alpha_\tau, \beta_\tau) \end{split}$$

これらの式から直接的に尤度を解析的に求めるのは極めて困難であることから,擬似乱数を発生させて事後分布からのサンプリングを行い,各パラメータの事後分布を推定した。サンプリング方法として,MCMC 法による Gibbs サンプリングを R2WinBUGS package (Sturtz et al., 2005) 用いて WinBUGS 1.4.3 (Lunn et al., 2000) を R 2.8.1 (R Development Core Team, 2008)上で動作させて計算した

#### ③ 研究の成果

本手法によって推定されたパラメータを用いて L. monocytogenes 数とマグロすき身の Natural flora 数とを同時に高い精度で予測することができた。合計 28 本の増殖曲線を解析し、その中の観測ポイント 584 点を用いた。

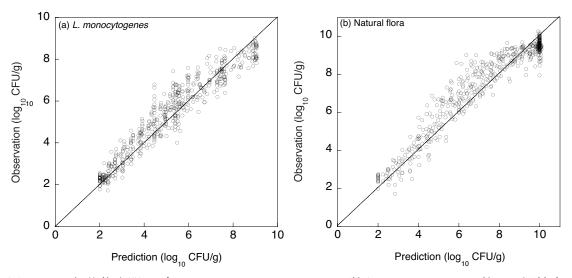


図 2-30 一般状態空間モデルによる(a) L. monocytogenes 数と (b) Natural flora 数の予測精度

また、実用的に最も重要である変動温度環境下における予測精度を、従来のモデル化手法 (Baranyi-Ratkowsky model) と比較した結果、同等の予測精度を示した。

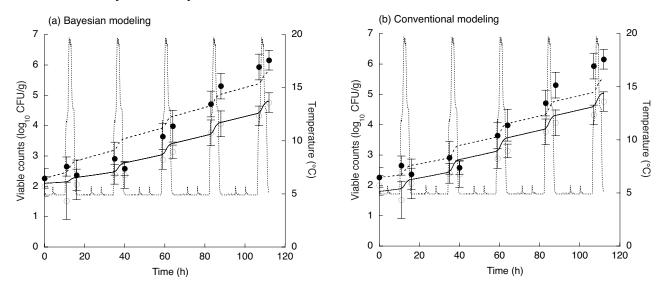


図 2-31 変動温度環境下における *L. monocytogenes* 数(○)と Natural flora 数(●)変化の予測精度の比較 (a) New Bayesian State Space model, (b) Conventional Baranyi model

さらに,本年度新たに開発した予測手法では予測値の確率分布をその変動性と不確実性と分離して推 定することを可能とした。

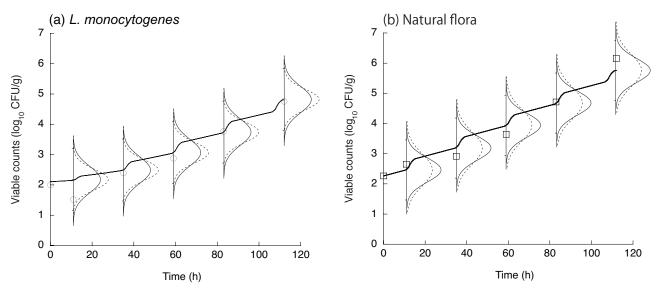


図 2-32 変動温度環境下における L. monocytogenes 数( $\bigcirc$ )と Natural flora 数( $\square$ )変化の予測(-) とその確率分布 ---- 変動性, - 不確実性

このように、特定の時間における菌数を推定することができるとともに、その推定値の取り うる確率までも推定することができる。変動性は実験によって制御できない細菌固有のバラ ツキであるのに対して、不確実性は実験の観測誤差によるものである。本手法によれば実際 のリスク推定においては双方の違いを勘案して、「○時間後には△%の確率で菌数が□にな っている」といったことを予測可能とする。このような推定はリスク評価において極めて有 用な情報として活用される。

#### 3) 胃内での病原菌の生残挙動の解析(食総研)

#### ①背景と目的

食中毒発症の用量反応モデ ルの開発に関して,従来のヒト ボランティア試験や疫学調査 データによる手法ではない,新 たな手法が提案されてきてい る<sup>1)</sup>。摂食から感染に至るステ ップ毎に細分化して実験デー タを積み上げ、最終的にそれら の同時確率として食中毒発症 を推定しようとする試みであ る。今回はその足がかりとし て, 胃内での病原菌の生残挙動 を明らかにして, 食品の種類, 量の影響を組み込んだ病原菌 の減少予測モデルを開発する ことを目的とした。

KEY EVENTS PATHWAY: L. monocytogenes intake and potential fetal death

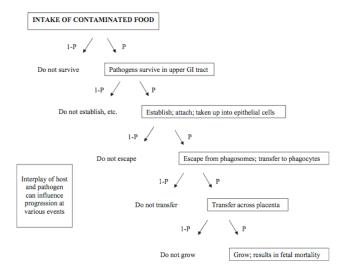


図 2-33 The Key Events Dose-Response Framework の 食中毒菌への応用例

## ②方法

一般成人の平均的な空腹時の胃液量(30 ml)中に,一回の食事量に相当する食品をストマッカー袋中で 37℃に保温して反応させることで,擬似的な胃消化モデルとした。反応させる食品に各種の病原菌を接種して,その生残を測定した。食事に伴い胃液の分泌量が増大するが,容量可変のポンプを用いて胃液の添加量を制御することで,実際の胃内でのpH変化を模倣した。

#### ③結果と考察

世界的に食中毒事故の報告が多い生野菜サラダを摂食した際の菌数変化と胃内の pH 変化を示す。

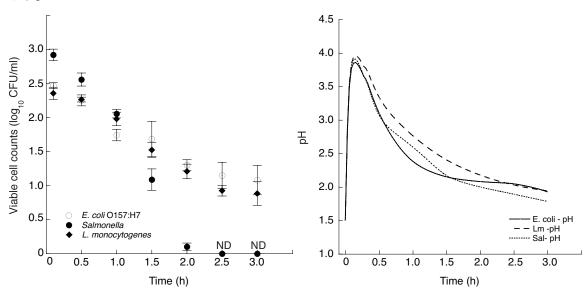


図 2-34 生野菜サラダ摂食による胃内での菌数変化と胃内 pH 変化

摂食前の菌数を  $10^2 \sim 10^3$  CFU/g と比較的低く設定したにもかかわらず,1 時間程度の保持時間ではほとんど減少しないことが示された。これは胃内 pH の変化と同調しており,pH が 2.5 以下に低回し始めたころから死滅が進み始めている。すなわち,胃内での菌数死滅は pH の関数として説明できることが示唆された。そこで,pH と各種病原菌の死滅速度との関係を検討して,モデル化した。

L. monocytogenes E. coli O157:H7 は 耐酸性が高く,極めて低い pH でのみ急速な死滅が認められる。このことからも L. monocytogenes E. coli O157:H7 が少数の摂取で食中毒を発症してしまうことが示唆される。一方,Salmonella は比較的は高い pH ( $\sim$ 2.5)から死滅が認められることから,消化過程で死滅が期待され,その結果ある程度の量の菌数が発症に必要であることが示唆される。

食品の種類および食事量によっても, 胃内のpH変化は影響される。中でも固 形食品の場合,その水分が大きく影響を 及ぼす。食品の種類は多岐に渡るため全

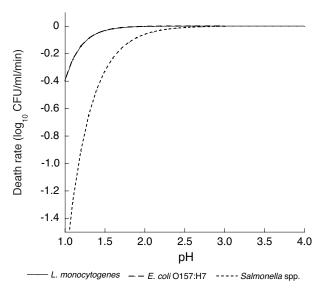


図 2-35 死滅速度と pH との関係

ての食品, さらには食事パターンについて実験的に検証することは現実的ではない。そこで, 計算シミュレーションによって多岐に渡る食品の種類と,食事パターンを反映させられるような,計算プログラムの開発を行った。以下に概略を示す。

## <胃内における病原菌死滅シミュレータの開発>

(1) 食品毎のpHと水分とをデータベース化 食品のpHは以下のUSFDAのサイトを参考にした。

 $\frac{http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalTooxins/BadBugBook/ucm122561.htm}{}$ 

また食品毎の水分は五訂食品成分表を参照

http://www.mext.go.jp/b\_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/05031802/002.htm 食品群毎に PDF で数値データを表にしたものがあり、数値をとることができる。これらのデータをもとにして、食品毎の pH と水分をデータベース化した。

- (2) 上記でデータベース化した個別の食品を選択し、食事量を入力。これらの情報から胃内 pH を推定する。基本的には胃液(pH 1.5, 40 ml を想定)中の水素イオン量と食事によって持ち込まれた水素イオン量との和に、電離度(どのくらいイオン化しているかの指標)を乗じて、トータルの容量あるいは質量で除したものが胃液と食品との混合物の水素イオン濃度となり、最終的には pH =  $-\log 10$  [H+]で求められる。ここで、食品の電離度を水分別に 3 グループに分類して、。水分が低下するにつれて、電離度も低下すると仮定して食品中の水分が多い時には 1%、中間的なものを 0.1%、比較的乾いているものは 0.01%とした、
  - (3) 次に摂食後の胃液分泌に伴う pH 変化を推定した。以下の式で記述した。

## $pH_{in\ stomac} = (pH_{max}-pH_{min}) \cdot \exp(a \cdot time) + pH_{min}$

ここで、 $pH_{max}$  は食事直後のピークの pH を示し、上述の 2. で計算した値が入る。 $pH_{min}$  は胃液の pH で、今回はデフォルトを 1.5 とした。a はパラメータで、年齢の影響や、健康状態に依存してくるもので、デフォルトで -0.01 を仮定した。

(4) 胃内の pH 変化に伴う病原菌の挙動シミュレータ 基本的には一定 pH 条件下で死滅曲線データを実験で取得して,以下のモデルでの記述を試みた。

x[t] <- x[t - 1] + Delta.time[t] \* (p[1] \* exp(p[2] \* pH[t]))

ここで、t は時間、p[1]、p[2]は推定パラメータであり、菌種毎に異なる値をとる。実際の計算は MCMC による推定を行っているので、推定パラメータの確率分布が得られている。そこから算出された 95%信頼区間のパラメータ値を使う。

シミュレーションは時間変化に伴う pH の変化が上述(3)の計算式で推定できるので、その得られた pH 値を用いることで上記の式を逐次計算すれば求める菌数の時間変化が得られる。

ところで、実際の食品での試験結果は、シンプルな胃液系での予測結果とかなり異なる。これは胃液が局所的に食品に接触して、その局所的には急激な pH 低下が起こり、細菌が死滅したと考えられる。結果として全体での菌数変化を実験では測定するため、計算よりも少ない値が生じたのだと考えられる。この局所的殺菌効果による菌数の減少を考慮するために、理想的な胃液系での死滅速度モデルを拡張して、実際の食品摂取にも対応可能な改良を施した式が以下のようになります。

death rate =  $p[1] \cdot (\exp(p[2] \cdot x))^a$ ,  $a = \{0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1\}$ 

べき乗のパラメータを入れることで,死滅速度モデルが,pHの高い方へと平行にシフトする。 べき乗パラメータ a は食品の種類毎に異なり,それぞれ実験結果への当てはまり具合から決定 した。

以上の結果を利用して、計算は読み取ることができる。

(5) 摂食した食事の胃から十二指腸への移動率モデル 食品の移動率を, 摂取した量と移動した量とからロジスティック回帰分析を用いてモデリング した。時間と年齢群とをパラメータとしてモデル化

Transpot rate = 
$$\frac{1}{1 + \exp(-(-3.098653 + 0.022670 \cdot x + 0.469310 \cdot a))}, a = \{0, 1\}$$

ここで、a=0 は若年層、a=1 は高齢者層である。

したがって、上述 5. での菌数変化と組合せると、摂食後の任意の時間における十二指腸への 移動食品量と、その時の菌数を以下のように推定することができる。 摂食後の任意の時間における食品の移動量  $(g) \times$  摂食後の任意の時間における菌数推定 (CFU/g) = + 二指腸へ移動した菌数 (CFU)

これによって、種々の条件での食事パターン別、年齢層別での食中毒菌の生残挙動をシミュレーションすることができる。シミュレーション画面を以下に示す。

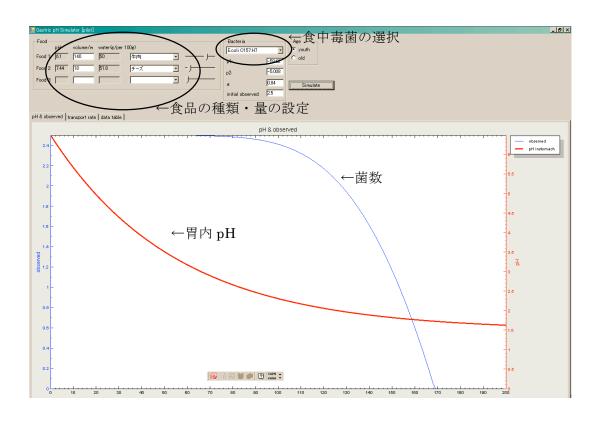


図 2-36 胃内消化中における食中毒菌の生残挙動シミュレータの結果例

現在,27種類の食品と3種類の食中毒菌との組み合わせでシミュレーションすることができるが、すべてのパターンで高い精度が保証できるわけではないので、今後広範な検証実験が必要である。

## 4) 実食品における競合細菌共存下での病原性細菌の挙動予測手法の開発(農工大) ①目的

食品及びその原材料を汚染する有害微生物による食中毒事件などの健康被害は毎年多く 発生し、その件数を減少させることは非常に難しい。特に、食肉はしばしば各種の食中毒起 因菌に汚染されており、食肉製品を介した食中毒事件がこれまで多く報告されてきた。この ような有害微生物に汚染された食肉が冷蔵温度以上の温度で処理、輸送および保存された場 合、汚染していた病原菌はその間に増殖し、食中毒事件を起こすリスクは当然増す。

一方,通常の農畜産物と同様に、食肉は通常多くの微生物によって汚染され、微生物叢を 形成している。問題とする有害微生物がその食肉を汚染した場合、微生物間の競合の影響を 受けながらその微生物がどのように増殖するかを解析し、予測することは食肉および食肉製 品の微生物学的な安全性を評価する上で、非常に重要である。

そこで、本研究では食品及びその原材料中での有害微生物の増殖を解析、予測し、その食品の喫食による健康被害を評価するモデルの開発を検討した。今回、食肉としてはしばしばカンピロバクター、サルモネラ、黄色ブドウ球菌などに汚染されている鶏挽き肉を、対象有害微生物として最も代表的な食中毒起因菌の1つであるサルモネラを選んだ。すなわち、市販鶏挽き肉にサルモネラを接種し、各種温度下でのその増殖挙動を解析した。鶏肉の微生物叢としては一般細菌数を測定し、解析した。また、微生物汚染濃度の高い鶏挽き肉でのサルモネラ増殖も解析し、微生物叢の汚染濃度によるサルモネラ増殖への影響も調べた。これらの解析結果を元に、増殖予測モデルの開発を検討した。

#### ②材料と方法

使用菌株として食中毒事件由来 *Salmonella* enterica serovar Enteritidis を用いた。 鶏挽き肉は微生物低汚染鶏肉 low-contaminated chicken として、購入した市販肉を、微生物高汚染鶏肉 high-contaminated chicken としてこの市販鶏肉を 30°C、 10 時間保存したものをもちいた。 なお,これらの鶏肉にサルモネラは検出されなかった。

本菌を栄養寒天上で 培養後、さらに TSB 液体培地中で培養し、細胞を洗浄後、生理食塩水中に浮遊させた。この浮遊菌液を挽き肉中に  $10^{3.5}$  CFU/g の濃度となるように接種し、十分に混和後、10g ずつガラス瓶(容量 110ml)に入れ、各種温度条件下で保存した。経時的にサンプリングし、試料中の細菌数およびサルモネラ菌数を測定した。細菌数 standard plate counts (SPC)は標準寒天平板を用いて、サルモネラ菌数は DHL あるいは XLD 寒天平板を用いて、測定した。サルモネラか疑わしいコロニーについてはリアルタイム PCR 法あるいはサルモネラ O 群抗体(デンカ生研)を用いて確認した。

保存中の試料温度はデジタル温度測定器 (AM-7002, 安立計器)で測定した。 計測したデータは下に示す Fujikawa ら (2004, 2005) が開発した新ロジスティックモデルを 用いて解析し、また予測を行なった。

$$\frac{dN}{dt} = kN\{1 - (\frac{N}{N_{\text{max}}})^{m}\}\{1 - (\frac{N_{\text{min}}}{N})^{n}\}$$

ここで、N: 菌数、t: 時間、k: 速度定数、 $N_{max}$ : 最大菌数、 $N_{min}$ : 初期菌数、m および n: パラメーターである。実際のデータ解析は Fujikawa and Kano (2009)の開発したソフトウェアで行った。また、速度定数 k の温度依存性は平方根モデルを用いて解析した。菌数の予測値と測定値の誤差は平均二乗誤差( $\log$  単位)として表わした。

#### ③結果

#### 1. 各種温度で保存した低汚染鶏肉中のサルモネラ増殖

微生物汚染濃度が低い鶏肉(約  $10^{4.7}$  CFU/g)中でのサルモネラ増殖は図 2-38A に示すように保存温度によって大きく異なった。すなわち,温度が高いほど定常期での最大菌数  $N_{\text{max}}$  と対数期の傾きである k は高くなった。8 Cでは明らかな増殖が認められなかった。一方,鶏肉の細菌数 SPC は温度が高いほど k は高くなったが, $N_{\text{max}}$  はほぼ一定値であった(図 2-38B)。なお,図に示したようにはいずれの増殖挙動も新ロジスティックモデルに精確にフィットした。

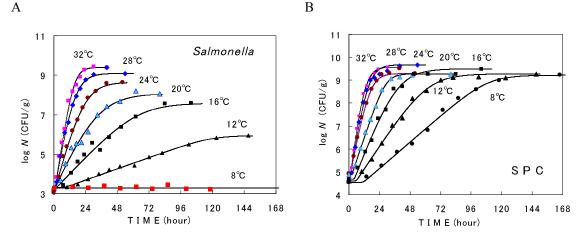


図 2-38 各種温度で保存した低汚染鶏肉中のサルモネラ(A)および一般細菌(B)の増殖. 各増殖曲線は新ロジスティックモデルで描いた。

#### 2. 各種温度で保存した高汚染鶏肉中のサルモネラ増殖

微生物の汚染濃度が高い鶏肉(約  $10^{6.8}$  CFU/g)中でのサルモネラ増殖も図 2-39A に示すように保存温度によって大きく異なった。すなわち、温度が高いほど、 $N_{max}$  と k は高くなった。一方、図 2-39B に示すように鶏肉の細菌数は温度が高いほど k は高くなったが、 $N_{max}$  はほぼ一定値であった。なお、新ロジスティックモデルはいずれの増殖挙動も精確にフィットできた。

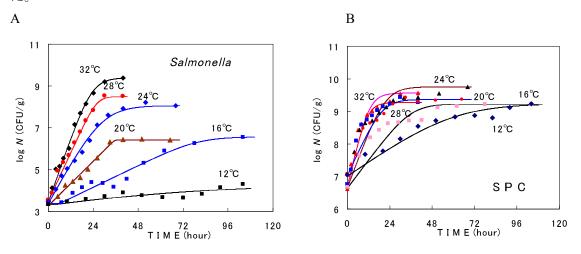


図 2-39 各種温度で保存した高汚染鶏肉中のサルモネラ(A)および一般細菌(B)の増殖. 各増殖曲線は新ロジスティックモデルで描いた。

#### 3. 低および高汚染鶏肉中のサルモネラ増殖の比較

上記の結果から、高および低汚染鶏肉中のサルモネラと一般細菌の増殖を比較した結果、 図 2-40 に示すように低汚染鶏肉中でのサルモネラ増殖の方が高汚染鶏肉中よりも著しいこ とが示された。すなわち、前者での増殖速度定数および最大菌数がより高い値を示した。

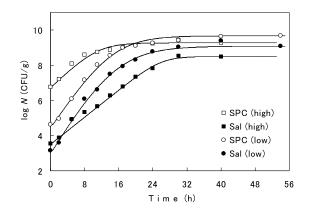


図 2-40 低および高汚染鶏肉中のサルモネラ増殖 (24℃保存). 各増殖曲線は新ロジスティックモデルで描いた。

この2種の鶏肉における各定常温度での最大菌数を比較した結果,サルモネラにおいて最大菌数は温度が高いほど高く,また低汚染鶏肉での方が高い値を示した一方,一般細菌では温度および微生物汚染程度に関わらず,ほぼ一定の値を示した(図 2-41)。

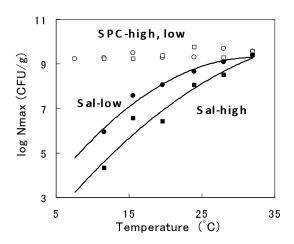


図 2-41 低及び高汚染鶏肉中の各種温度における細菌数およびサルモネラの最大菌数. 曲線は回帰曲線を示す。

増殖速度定数においては、図 2-42 に示すようにその温度依存性が平方根モデルで高および低 汚染鶏肉において高い直線性が認められた。これらの結果から、これらの直線を用いてある 温度での速度定数値が推定できることが明らかとなった。

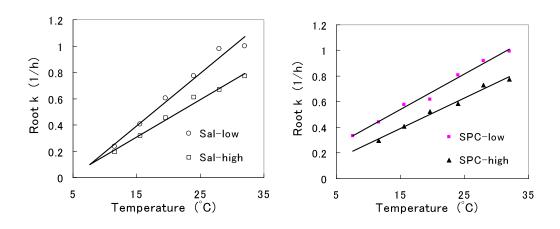


図 2-42 低及び高汚染鶏肉中の各種温度での一般細菌およびサルモネラ増殖の速度定数.

#### 4. 変動温度下でのサルモネラ増殖予測

前述した解析結果を組み込んだ新ロジスティックモデルを用いて、新たな変動する温度下でのサルモネラおよび一般細菌の増殖を予測した。低汚染鶏肉中では図 2-43 に示すように比較的高温度帯(A)および低温度帯(B)において高い精度で増殖予測ができた。

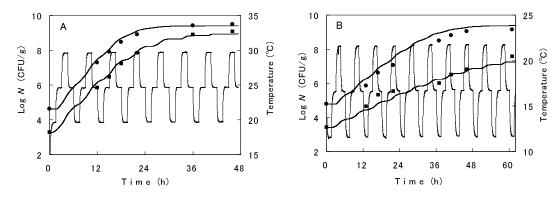


図 2-43 変動温度下における低汚染鶏肉中でのサルモネラ及び一般細菌の増殖予測. 黒丸は実測値, 曲線は予測値を示す。周期的に変化する曲線は実測した鶏肉温度を示す。

高汚染鶏肉中においても図2-44に示すように両温度帯で高い精度の増殖予測ができた。

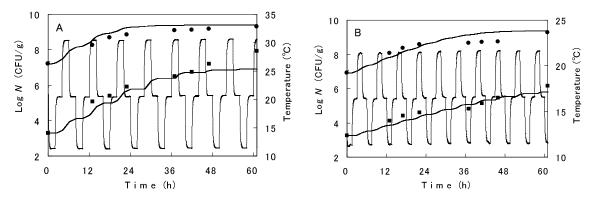


図 2-44 変動温度下における高汚染鶏肉中でのサルモネラ及び一般細菌の増殖予測. 黒丸は実測値, 曲線は予測値を示す。周期的に変化する曲線は実測した鶏肉温度を示す。

予測および実測した菌数の平均二乗誤差(log 単位)は表 2 に示すように小さい値を示した。

表 2 変動温度下での予測および実測した菌数の平均二乗誤差 (log 単位)

鶏肉	一般細菌	サルモネラ
低汚染		
温度パターン A	0.0303	0.0317
温度パターン B	0.1560	0.0728
高汚染		
温度パターン A	0.0626	0.1370
温度パターン B	0.1650	0.1620

温度パターンは図 2-44

本研究では、増殖モデルを用いて微生物汚染程度の異なる鶏肉中のサルモネラおよび一般細菌増殖を高い精度で予測できることが明らかとなった。今後、さらに本研究を発展させて、食肉中でのサルモネラ増殖を予測するソフトウェアの開発が期待できる。このようなソフトウェアは食品中の病原微生物の増殖を予測する手段として、リスク評価、特に暴露評価を行う際に大いに役立つであろう。

#### ④要約

微生物汚染濃度の異なる鶏挽き肉を各種定常温度下で保存し、その間のサルモネラおよび一般細菌の増殖挙動を実測した。その結果を新ロジスティックモデルで解析し、さらにその解析結果を組み入れて新たな変動温度下でのサルモネラおよび一般細菌の増殖を予測した結果、高い精度の予測ができた。以上の結果を基に、各種保存温度における鶏肉中のサルモネラ増殖予測コンピュータソフトウェアの開発が期待できる。このようなソフトウェアは食品中の病原微生物の増殖を予測する手段として、リスク評価、特に暴露評価を行う際に大いに役立つであろう。

#### 5. 参考文献

Fujikawa, H., Kai, A., Morozumi S., 2004. A new logistic model for *Escherichia coli* at constant and dynamic temperatures. Food Microbiol. 21, 501-509.

Fujikawa, H., Morozumi, S., 2005. Modeling Surface Growth of *Escherichia coli* on Agar Plates. Appl. Environ. Microbiol. 71, 7920-7926.

Fujikawa, H., Kano, Y., 2009. Development of a program to fit data to a new logistic model for microbial growth. Biocont. Sci. 14, 83-86.

## 5) マグロすき身における Listeria monocytogenes の増殖挙動 (海洋大)

マグロすき身中における L. monocytogenes の増殖に及ぼす保存温度と常在菌(Natural flora)の影響とを広範囲に検討して,リスク評価の暴露評価段階で利用可能な予測モデル開発に資するデータを蓄積した。保存温度, $2^{\circ}$ C , $5^{\circ}$ C , $10^{\circ}$ C , $15^{\circ}$ C , $20^{\circ}$ C , $20^{\circ}$ C , $20^{\circ}$ C , $20^{\circ}$ C を設定し,接種後任意の時間ごとに菌数の測定を行った。L. monocytogenes を含む全生菌数は 1.5%NaCl 添加 TSA 寒天平板培地で,L. monocytogenes 数は PALCAM 寒天平板培地(MERCK)で測定した。それぞれの培地に適切に希釈した培養液をスパイラルプレ

ーターで塗抹し、30℃で培養した。生菌数は 24 時間後, L. monocytogenes 数は 48 時間後にコロニー数を測定した。

5 °C に関してみると(図 2-45)、natural flora を 6 乗接種した場合は L. monocytogenes が定常期に達した時の菌数は約  $5 \log CFU/g$ , 4 乗接種の場合は約  $6 \log cfu/g$ , 2 乗接種の場合は約  $7 \log CFU/g$ , 未接種の場合は約  $8 \log CFU/g$  となり、natural flora の接種菌数が多いほど,L. monocytogenes が定常期に達した時点での菌数が低くなるという結果になった。さらに、他の温度帯における L. monocytogenes の菌数に関しても、定常期の時点での菌数の差は若干縮まるものの、5 °C と同様の傾向が認められた。

以上のように、L. monocytogenes の増殖において natural flora 数が最大増殖密度に大きく影響を与えることが示された。また、20°C 以上の高温保存においては natural flora 数の増大に伴い、増殖速度が抑制される傾向が示された

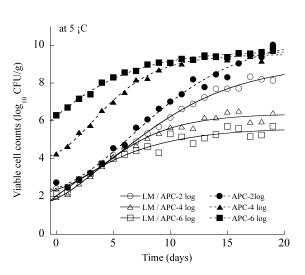


図 2-45 マグロすき身中における *L. monocytogenes* の 増殖に及ぼす natural flora の影響 (5℃保存).

- 〇: natural flora  $10^2$  CFU/g 時 $\mathcal{O}$  L. monocytogenes 数  $\triangle$ : natural flora  $10^4$  CFU/g 時 $\mathcal{O}$  L. monocytogenes 数
- □: natural flora 10<sup>6</sup> CFU/g 時の L. monocytogenes 数
- ●: natural flora 10<sup>2</sup> CFU/g の全生菌数
- ▲: natural flora 10<sup>4</sup> CFU/g の全生菌数
- ■: natural flora 10<sup>6</sup> CFU/g の全生菌数

## 6) 小腸モデル in vitro 試験での Listeria monocytogenes の消長の検討: リステリア食中毒発症の 用量反応モデルの構築を目指して(海洋大)

## ①目的

人工的な胃環境の実験モデル系での各種食品を摂食した場合のpHの変化と病原菌の消長が検討されており、その結果、大部分の食品において、通常の摂食量を想定した場合には胃内環境(胃液)のpHが上昇して、元のレベルにまで低下するのに相当の時間を要することが明らかとなり、それに応じて食品とともに摂食された病原菌数の低下も緩やかで、相当数が、かなりの確率で胃を通過することが実験結果から推測されている。

病原菌に対する防御網として次に考えられるのが,侵入部位である小腸内での胆 汁酸および消化酵素,また,常在菌による

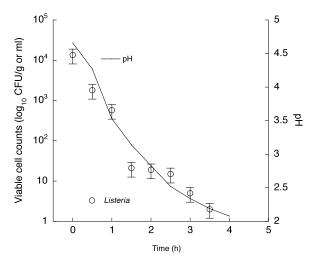


図 2-46 ネギトロ巻き 3 個(75 g)を摂食した際の胃内 pH と *L. monocytogenes* 数 (小関報告)

増殖抑制である。この小腸内での病原菌の消長を明らかにできれば、腸内に達する病原菌数

に応じて,食中毒発症の確率を推定可能とする,用量反応モデルの構築に繋がると考えられる。

最近 Buchanan らは食中毒発症の用量反応モデルの開発に関して、従来のヒトボランティア試験や疫学調査データによる手法ではない、新たな手法 "The Key Events Dose-Response Framework" を提案している  $^{1)}$ 。これは、摂食から感染に至るステップ毎に細分化して実験データを積み上げ、最終的にそれらの同時確率として食中毒発症を推定しようとする試みである。今年度はその足がかりとして、小腸モデル(人工腸液中) *in vitro* 試験での *L. monocytogenes* の挙動と、小腸常在菌である腸球菌および乳酸菌の影響を検討した。

#### 【実験方法】

グルコースを含まない GAM ブロスにトリプシン 0.1%(w/v), ウシ胆汁 0.4%を加えたものを人工小腸液とした。病原菌として *L. monocytogenes* Scott-A CIP 103575 (Lm)をブレインハートインフュージョン(BHI)ブロスで  $30^{\circ}$ C, 6-24h 前培養し( $10^{9}$  cfu/ml), BHI で 100 希釈後 0.3ml ずつを人工小腸液 3ml に接種した(n=3)。

ヒト小腸の常在乳酸菌である乳酸桿菌 *Lactobacillus acidophilus* NBRC 13951 および腸球菌 *Enterococcus faecalis* NBRC 100480 は、MRS broth を用いて 48h 前培養(OD 660nm ⇒ 2.0、10<sup>9</sup> cfu/ml)した。培養後の懸濁液(OD660nm=2)について、培養上清および洗浄菌体を調製した。 上記の Lm を接種した人工小腸液に乳酸菌の培養懸濁液、培養上清あるいは洗浄菌体の懸濁液 0.3ml 加え、Lm の消長に対する *E. faecalis* および *Lb. acidophilus* の影響を調べた。対照として乳酸菌を含まない MRS broth を加えた。

Lm および乳酸菌を接種した人工小腸液はアネロパックを用いて 37°C で 24h 嫌気培養し、 PALCAM 寒天培地を用いて Lm の生菌数を求めた。

## 【結果および考察】

1) 人工小腸液に Lm のみを  $10^6$  cfu/ml 接種し 37°C,24h 嫌気培養した場合,実験ごとで生残性は大きく異なり, $10^9$  cfu/ml まで増加する場合と, $10^4$  cfu 以下まで減少する場合があった(図 2-47)。増殖ステージのストレス耐性の影響も推察されたが,対数増殖期と定常期での違いは認められなかった。くりかえし実験を行った結果,Lm は減少する場合が多かった。

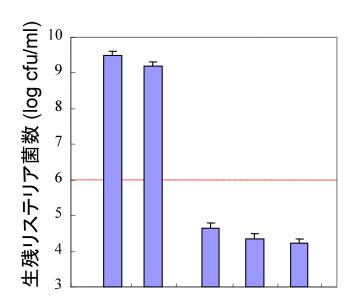


図 2-47 人工腸液中でのリステリア菌の生残性.  $10^6$  cfu/ml 接種し 37 $^{\circ}$ C, 24h 嫌気培養後菌数測定

3) この実験系に MRS で前培養した Lb. acidophilus および E. faecalis を  $10^8$  cfu/ml レベルで加えた場合の Lm の生残菌数を図 2-48 に示す。Lb. acidophilus 培養懸濁液の接種により Lm の生残菌数は減少した。その培養上清では Lm 生残性に影響は認められず,洗浄菌体によっては抑制された。一方,E. faecalis の摂取では逆に Lm の生残菌数が増加した。培養上清でも同様の影響が認められた。これらの乳酸菌の Lm 生残性に対する影響は,対数増殖期後期(前培養 6h)および定常期(前培養 12h)とも同様であった。

以上の結果より、このままヒト腸管に挿入することはできないが、Lm は小腸内の胆汁酸および消化酵素に対してある程度耐性は持つものの、その生残菌数は実験ごとに大きく異なった。この人工腸小腸液中のLm の生残性の不均一性については今後検討する必要がある。またLm の生残性について小腸内の乳酸桿菌 Lb. acidophilus の存在が腸管感染の防御に重要であると考えられるが、腸球菌 Ec. faecalis の生成物によるLm 生残性の増加についての検討も重要と考えられる。

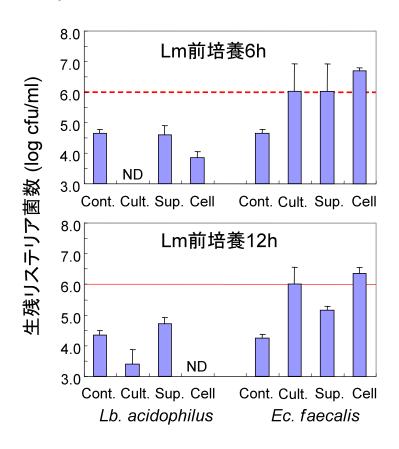


図 2-48 人工腸液中での生残リステリア菌数に対する Lactobacillus acidophilus および Enterococcus faecalis の影響.

Cont.,対照; Cult.,培養懸濁液; Sup.,培養上清; Cell, 洗浄菌体.

Buchanan, R.L. et al., 2009. The Key Events Dose-Response Framework: Its Potential for Application to Foodborne Pathogenic Microorganisms', Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 49:8,718-728.

- (2) 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト(論文は、添付すること。)
  - 1) <u>Koseki, S.</u> 2009. Microbial Responses Viewer (MRV): a new ComBase-derived database of microbial responses to food environments. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 75-82. (IF = 2.753)
  - 2) Shige Koseki<sup>1</sup>\*, Yoshiko Takizawa<sup>2</sup>, Satoko Miya<sup>2</sup>, Hajime Takahashi<sup>2</sup>, and Bon Kimura. A Novel Approach to Predicting the Bacterial Growth using Bayesian State Space Model: Quantify both the Bacterial Population and its Probability Distribution. (in submission)
  - 3) Shige Koseki<sup>1</sup>\*, Yasuko Mizuno. Pathogen can survive during digesting process: Prediction of pathogen survival in si,ulated gastric fluid with various foods. (in submission)
- (3)特許及び特許出願の数と概要

なし

- (4) その他(各種受賞,プレスリリース,開発ソフト・データベースの構築等)
  - ・2009 年度第 14 回安藤百福賞 発明発見奨励賞
  - ・食品微生物挙動データベース MRV (http://dc.cbnfri.affrc.go.jp/MRV-J) の開発
  - ・人工胃液中における病原菌死滅シミュレータの開発

#### 3 今後の問題点等

3年間にわたる研究の結果、微生物学的リスク評価のための新たな評価支援ツール(データベースと胃内死滅シミュレータ)を開発することに成功した。さらに、実際の食品群にける詳細な食中毒菌の増殖挙動データを蓄積するとともに、各食品-病原菌の組み合わせにおける予測モデルを構築することができ、今後のリスク評価の際の重要な知見として活用されることが見込まれる。本研究においては摂食段階までの食中毒菌数と、摂食後の胃内での死滅挙動までを予測することができるようになったが、実際に腸管内に食中毒菌が到達して感染発症するかについては未解明のままである。本研究最終年度において、腸管内菌叢における食中毒菌の挙動解明を試みたが、再現性のある結果を得ることが難しく、結論を導くまでには至らなかった。今後はより腸管上皮細胞上での腸内菌叢と食中毒菌との関係を、生化学的な手法を用いて検証していくことで、食中毒発症の用量反応の解明に繋がるものと考えられる。この段階まで明らかにすることができれば現在Buchananらによって提唱されている摂食から消化における各段階での食中毒菌の挙動を同時確率として捉える手法によって、食中毒の発症確率をより的確に捉えることを可能にするであろう。