

## 研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	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（課題番号：1406） （研究期間：平成26年度～平成27年度）
主任研究者名	研究者名：小関 成樹 所属機関：国立大学法人北海道大学

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、死滅挙動の数理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も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すことが期待される。

## 研究成果報告書（本体）

研究課題名	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 （研究期間：平成26年度～平成27年度）
主任研究者名	所属：国立大学法人北海道大学 氏名：小関 成樹（研究課題番号：1406）

### I 研究期間及び研究目的等

#### 1 研究期間

平成26年度～平成27年度

#### 2 研究目的

本研究では、低水分含量食品における各種サルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の生残挙動を、その菌数変化と生残確率との両面から推定可能とすることを目的として、以下の4つの研究小課題を達成する。

##### (1) 水分活性とサルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の生残挙動との関係解明と予測モデル化

各種水分活性条件下（0.2程度～0.8程度）におけるサルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の菌数変化を、種々の保存温度条件下（4℃～35℃程度）において定量的に明らかにする。保存環境の水分活性の調整は各種の金属化合物の飽和塩溶液を用いて行い、食品／食品製造環境として想定され得る限りの範囲を網羅的に検討する。これによって、水分活性条件と温度条件とからサルモネラ菌数および腸管出血性大腸菌数の時間経過に伴う変化を予測可能とする数理モデルを開発する。

##### (2) 食品サンプル上でのサルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の挙動解析

モデル系である飽和塩溶液環境での実験に加えて、数種類の食品サンプル／食品製造環境サンプル上でのサルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の生残を検討する。具体的には、チョコレートやナッツ類，乾燥野菜，魚介類の乾物等の食品上での生残挙動の解析だけでなく，二次汚染の原因ともなり得る，製造設備の表面を想定した金属版表面における生残についても明らかにする。飽和塩によるモデル実験系より構築する数理予測モデルの精度，妥当性を検証するためのデータとしても活用する。

##### (3) 血清型および菌株の違いによる生残挙動の違いの検討

サルモネラ属菌による食中毒は主として *Salmonella enterica* によるもので，その中に 2,300 程度の異なる血清型が存在することが知られている。特徴として，様々な血清型が原因となっている点があげられる。*S. Enteritidis* や *S. Typhimurium* といった代表的な血清型から，*S. Saintpaul*, *S. Seftenberg*, *S. Agona*, *S. Napoli*, *S. Newport*, *S. Stanley*, *S. Oranienburg* など様々な血清型を原因として食中毒事故が起き

ている。したがって、代表的な血清型のみならず、これまでに報告のある血清型を網羅的に解析して、それらの特徴を明らかにする。腸管出血性大腸菌については、代表的な血清型 *E. coli* O157:H7, O26, O111 等を対象として、過去の食中毒事故原因となった由来の異なる分離菌株を可能な限り用いて、菌株の違いによる生残挙動の違いを明らかにする。

#### (4) 生存確率を予測するための一細胞ごとの挙動解析

サルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌は極めて少菌数でも感染することが知られており、菌集団 (population) としての挙動だけでなく、個別の細菌細胞レベル (single cell) での生存/死滅を明らかにすることが、実際の食品汚染を考慮してリスク評価を実施するためには不可欠な知見である。なぜなら、細菌の挙動には多数の外的な環境要因に加えて、細胞自身の内的な生理活性状態等が複雑に影響することから、従来速度論による決定論的な手法で説明をするには限界がある。そこで、発想を逆転して、一細胞ずつの反応を評価し、個々の細胞の反応の違いをありのまま受入れ、その反応のバラツキを確率論的に捉えることで、より本質的な微生物集団挙動を理解する。そのために、single cell レベルでの生存確率の変化を、上述の (1) モデル系と (2) 食品系において種々の血清型のサルモネラおよび種々の菌株の腸管出血性大腸菌を対象として明らかにする。

### 3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名 (所属機関名)
低水分活性条件下におけるサルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の生残挙動の速度論的解析と予測モデルの開発	1) 培地系における水分活性と保存温度との関係解明 2) 低水分含量食品上でのサルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の挙動解明 3) 血清型および菌株の違いの影響解明 4) 速度論的な予測モデル化	小関 成樹 (北海道大学大学院農学研究院)
低水分活性条件下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確率予測モデルの開発	1) モデル系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解析 2) 低水分含量食品上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解析	小関 成樹 (北海道大学大学院農学研究院)

### 4 倫理面への配慮について

特段の配慮を必要とする研究ではない。

## II 研究内容及び成果等

- (1) 研究項目名：低水分活性条件下におけるサルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の生残挙動の速度論的解析と予測モデルの開発（研究担当者名：小関成樹（北海道大学大学院農学研究院））

### 1) 培地系における水分活性と保存温度との関係解明

#### <研究内容・方法>

低水分含量食品が消費に至る過程でばく露しうる温度帯（4°C～35°C 程度）における，サルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の生残挙動を各種水分活性条件下（0.20 程度～0.85 程度）で最低でも 7 条件程度を設定して検討する。保存環境の水分活性の調整は各種の金属化合物の飽和塩溶液を用いて行う。定常期まで液体培地中で培養したサルモネラ属菌あるいは腸管出血性大腸菌を遠心分離により集菌し，上澄みを廃棄して残ったペレットをそのままサルモネラ属菌あるいは腸管出血性大腸菌の菌体サンプルとして各水分活性に調整した容器内に保存して，保存期間中における生菌数の変化を検討する。保存期間は過去の研究報告ならびに研究期間を勘案して，12 ヶ月を一つの目安とする。

#### <研究成果>

当初の予想では，相対湿度（水分活性条件）が細菌の生残挙動に影響を与え，環境相対湿度条件によって細菌数の変動に差が現れるものと推測されたが，予想に反して，湿度環境の違いによって生残挙動に差は認められていない。このことは，菌種，菌株が異なる場合にも同様の傾向を示していた。さらに，実験開始時の予想では年単位での長期間にわたり，生存し続けるものと考えていたが，結果としては 25°C 保存では，菌種にかかわらず，湿度の影響は明確に認められなかった。一方で，保存温度の影響は顕著であり，25°C における速やかな菌数減少に対して，5°C 保存では菌数減少は限定的であった。この傾向は菌種によらず共通した傾向であった。したがって，水分活性は食中毒菌の生残に影響を与える主たる要因ではない，という結論を得ることができた（Fig. 1～3）。

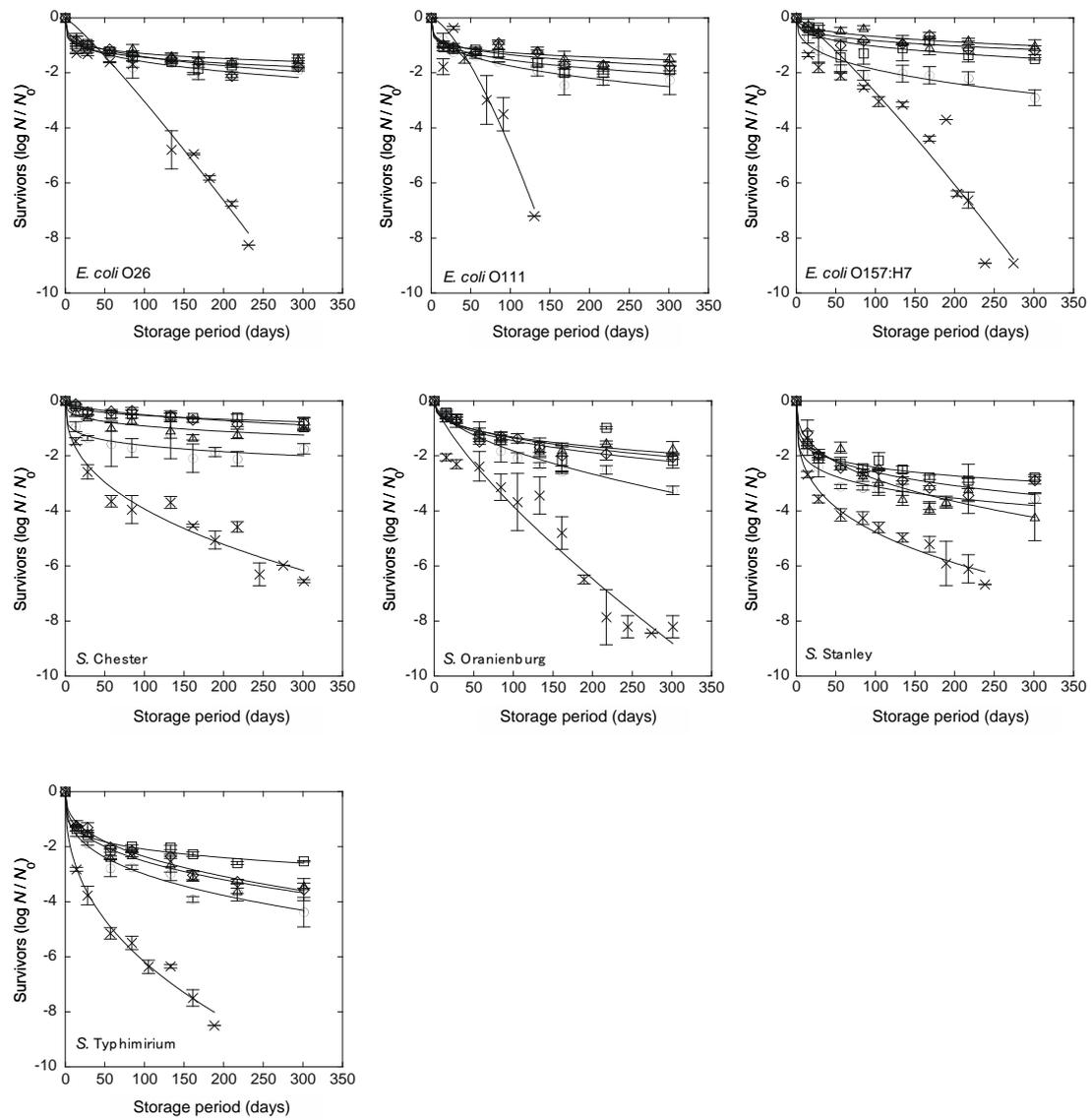


Figure 1. Survival kinetics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 (a), *E. coli* O111 (b), *E. coli* O157:H7 (c), *Salmonella* Chester (d), *Salmonella* Oranienburg (e), *Salmonella* Stanley (f), and *Salmonella* Typhimurium (g) on a plastic plate surface during storage at 5°C and a relative humidity of 22% (○), 43% (△), 58% (◇), 68% (□), or 93% (×). Error bars represent means ± standard error ( $n = 3$ ).

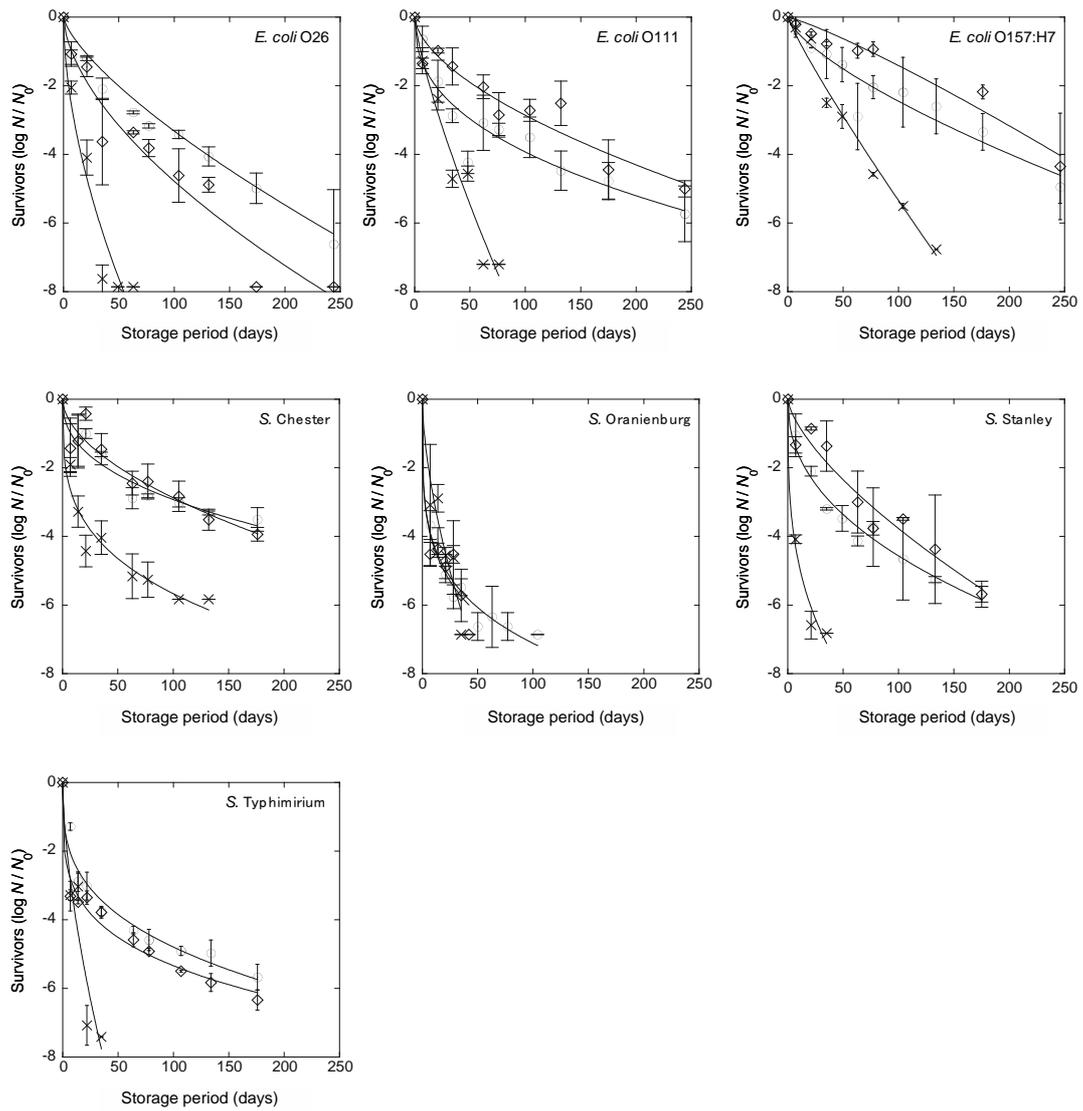


Figure 2. Survival kinetics of enterohemorrhagic *E. coli* O26 (a), *E. coli* O111 (b), *E. coli* O157:H7 (c), *S. Chester* (d), *S. Oranienburg* (e), *S. Stanley* (f), and *S. Typhimurium* (g) on a plastic plate surface during storage at 15°C and a relative humidity of 22% (○), 58% (◇), or 93% (×). Error bars represent means  $\pm$  standard error ( $n = 3$ ).

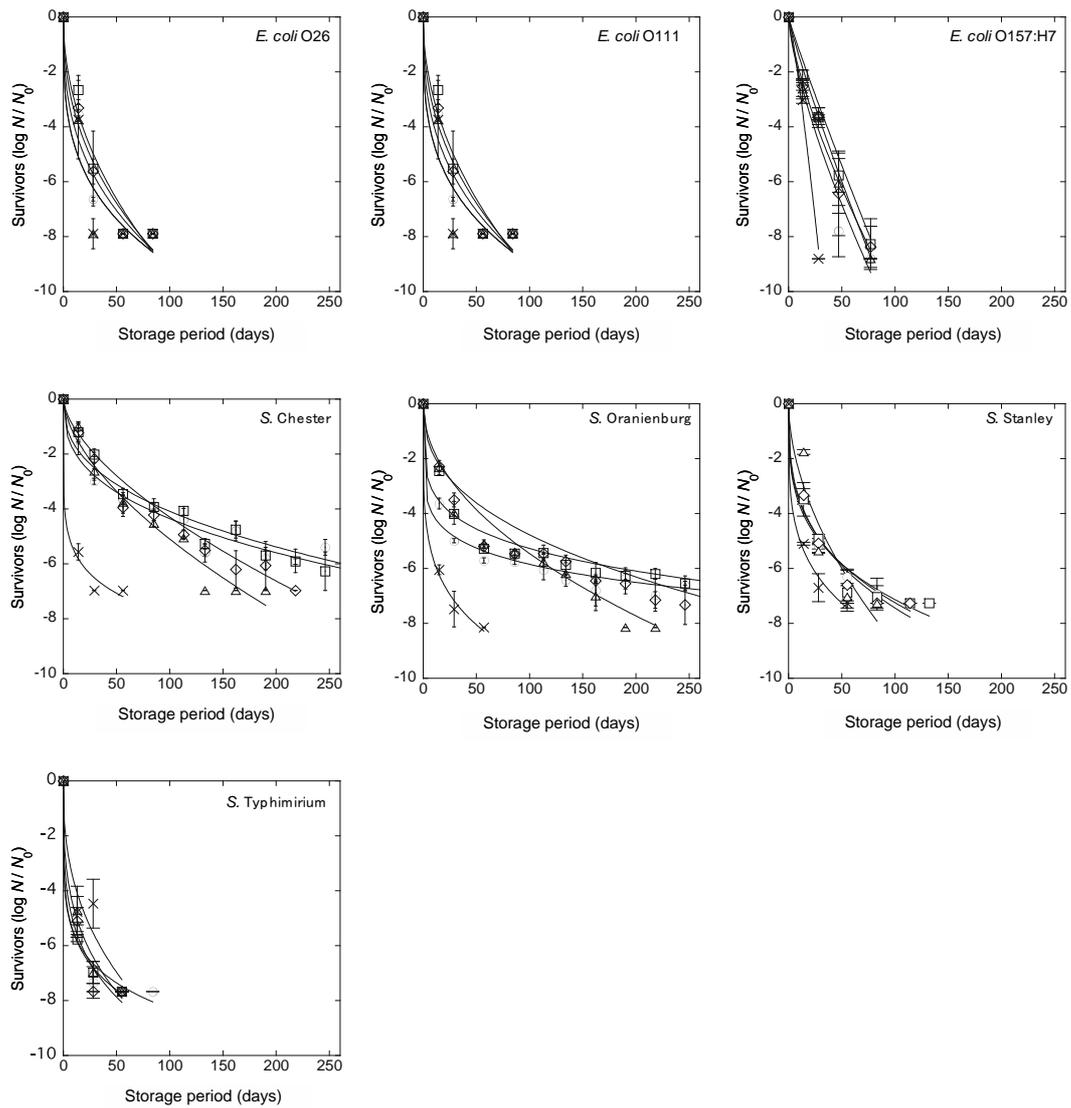


Figure 3. Survival kinetics of enterohemorrhagic *E. coli* O26 (a), *E. coli* O111 (b), *E. coli* O157:H7 (c), *S. Chester* (d), *S. Oranienburg* (e), *S. Stanley* (f), and *S. Typhimurium* (g) on a plastic plate surface during storage at 25°C and a relative humidity of 22% (○), 43% (△), 58% (◇), 68% (□), or 93% (×). Error bars represent means ± standard error ( $n = 3$ ).

## 2) 低水分含量食品上でのサルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の挙動解明

### <研究内容・方法>

過去にサルモネラ属菌による食中毒あるいは腸管出血性大腸菌による食中毒の原因食材となったことのある、チョコレートやナッツ類、魚介類の乾物等の食品上での生残挙動の解析を行う。上述のように血清型の違い、株間の違いを考慮して、各食品に別々に細菌を接種して、保存中の菌数変化を検討する。また、二次汚染の原因ともなり得る製造設備の表面を想定した金属版表面におけるサルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の菌数変化についても明らかにする。

### <研究成果>

室温条件下での各病原性細菌の死滅は、当初の想定よりも速く、1ヶ月程度の保存でいずれの菌種も5桁程度の減少を示した。他の食品、チョコレートとカイワレ大根種子上においても、おおよそ同様の傾向が認められていたことから、食品の種類による差は小さかった。一方で、チーズは水分活性が他と比較して高かった ( $a_w = 0.93$ ) が、保存温度を5°Cとしたことから、いずれの菌種においても顕著な菌数減少は認められなかった

(図3)。菌体のみでの保存中の菌数変化の結果と比較すると、大きな差は認められなかったが、水分活性だけを指標とした場合には完全に一致することはなかった。この結果からも、食材ごとによる死滅挙動データの集積が重要な情報源となることが示唆された (Fig. 4~6)。

## 3) 血清型および菌株の違いの影響解明

過去に低水分含量食品を原因とするサルモネラ属菌による食中毒として報告のある血清型 (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Saintpaul*, *S. Seftenberg*, *S. Agona*, *S. Napoli*, *S. Newport*, *S. Stanley*, *S. Oranienburg* など) を可能な限り収集して、上述の各種水分活性条件下における生残挙動を定量的に明らかにする。また、各血清型における株間の差についても考慮する必要があることから、各血清型において可能な限り複数株について検討する。腸管出血性大腸菌については、代表的な血清型 *E. coli* O157:H7, O26, O111等を対象として、分離由来の異なる菌株を用いて、菌株の違いによる生残挙動の違いを明らかにする。

### <研究成果>

血清型の違いによる死滅特性の違いは、あまり大きくなく、今回用いた7血清型の中での違いも限定的であった。傾向としてはサルモネラ属菌の方が腸管出血性大腸菌よりも緩やかな死滅挙動をしめした。いずれの血清型も食中毒原因菌株であり、環境変動に抵抗性を有していたことが考えられるが、このような結果もまたリスク評価においては重要な情報源となることが示唆された。

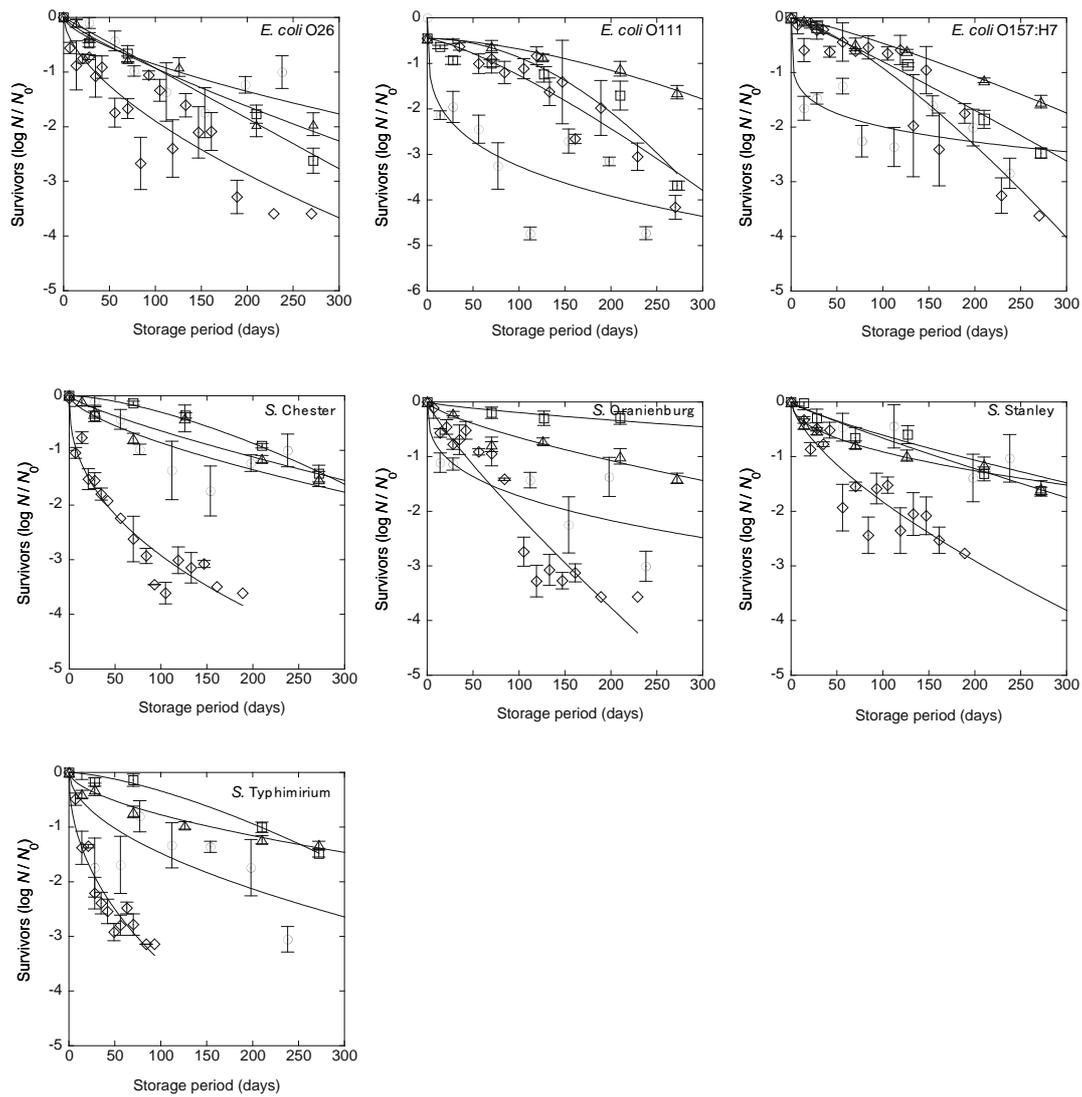


Figure 4. Survival kinetics of enterohemorrhagic *E. coli* O26 (a), *E. coli* O111 (b), *E. coli* O157:H7 (c), *S. Chester* (d), *S. Oranienburg* (e), *S. Stanley* (f), and *S. Typhimurium* (g) on a surface of almonds (○), chocolate (△), radish seeds (▲), or cheddar cheese (◇) during storage at 5°C. Error bars represent means  $\pm$  standard error ( $n = 3$ ).

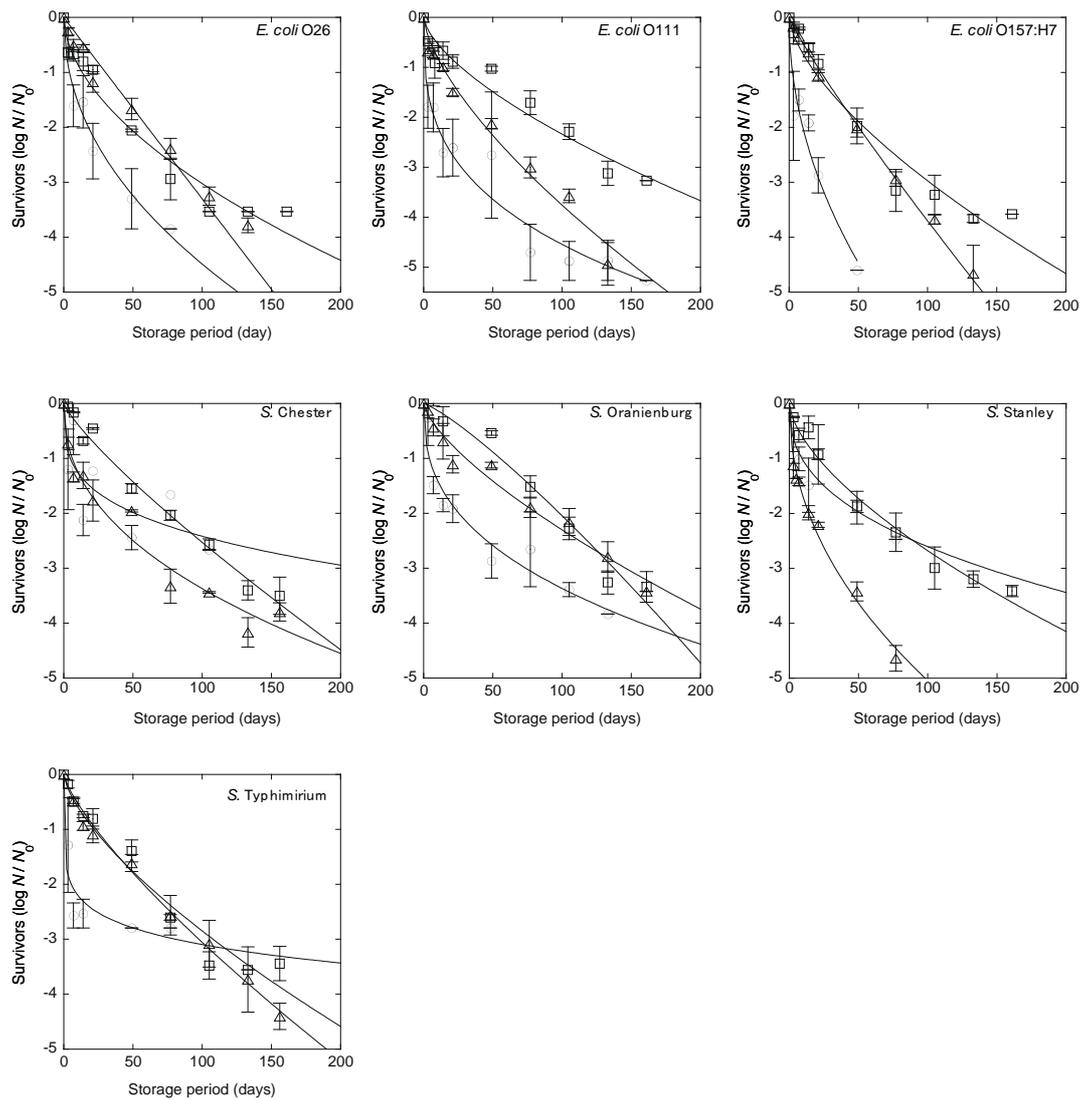


Figure 5. Survival kinetics of enterohemorrhagic *E. coli* O26 (a), *E. coli* O111 (b), *E. coli* O157:H7 (c), *S. Chester* (d), *S. Oranienburg* (e), *S. Stanley* (f), and *S. Typhimurium* (g) on a surface of almonds (○), chocolate (△), or radish seeds (△) during storage at 15°C. Error bars represent means  $\pm$  standard error ( $n = 3$ ).

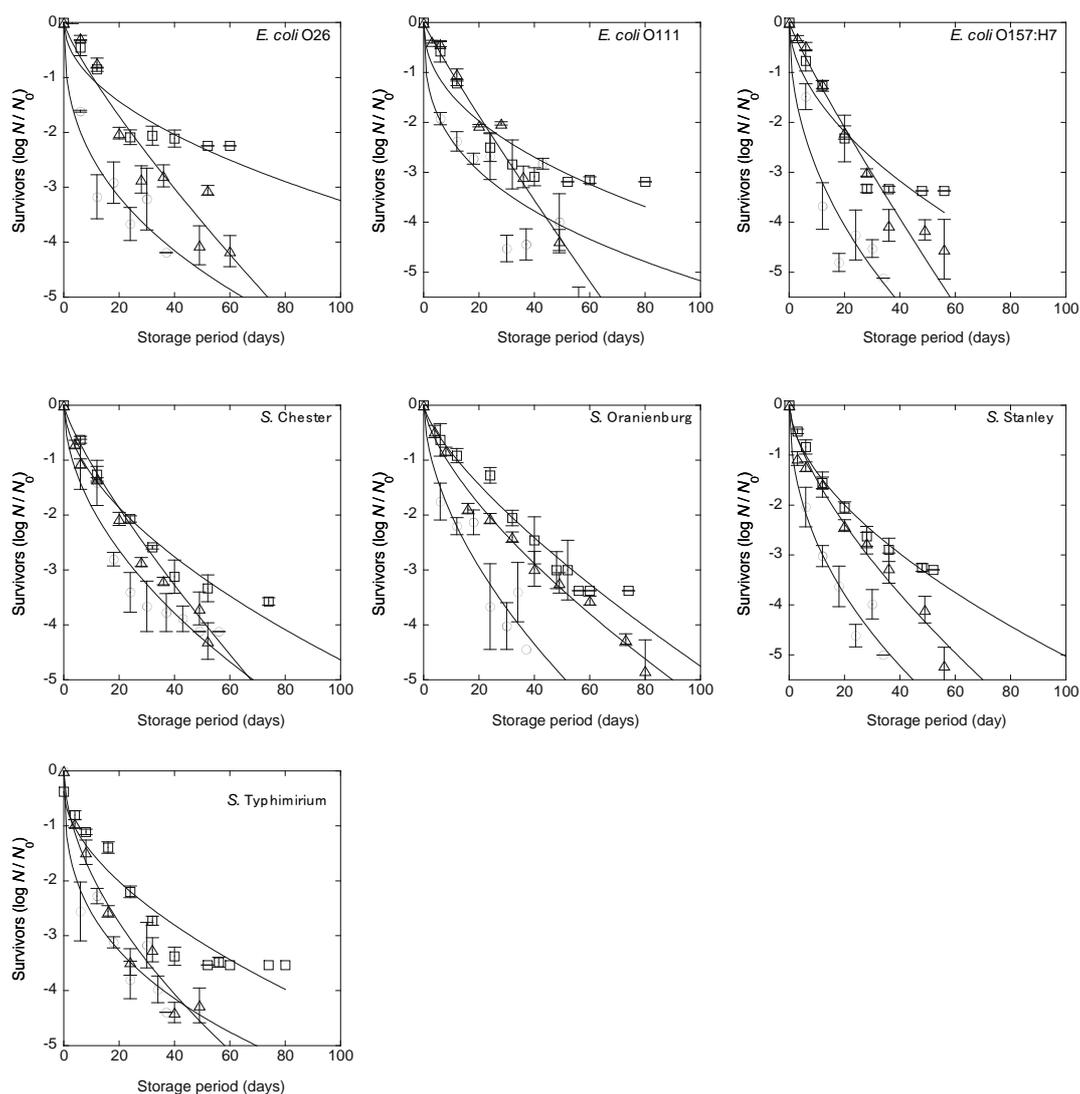


Figure 6. Survival kinetics of enterohemorrhagic *E. coli* O26 (a), *E. coli* O111 (b), *E. coli* O157:H7 (c), *S. Chester* (d), *S. Oranienburg* (e), *S. Stanley* (f), and *S. Typhimurium* (g) on a surface of almonds (○), chocolate (△), or radish sprout seeds (△) during storage at 25°C. Error bars represent means  $\pm$  standard error ( $n = 3$ ).

#### 4) 速度論的な予測モデル化

##### <研究内容・方法>

低水分活性条件下におけるサルモネラ属菌等、細菌の不活化挙動を Weibull モデルで記述できることを確認している。本研究においても以下の基本式を用いる。

$$\log_{10} S(t) = \log_{10} \frac{N(t)}{N_0} = -b \cdot t^n \quad (1)$$

ここで、 $N(t)$  は時刻  $t$  における菌数 (CFU/g) を、 $N_0$  は初期菌数 (CFU/g) を、 $b$  は

速度係数,  $n$  は形状係数をそれぞれ表す。条件毎に係数  $b, n$  を推定して, 得られた  $b, n$  を水分活性および温度の関数として記述する。

$$b = f(aw, Temp)$$

$$n = f(aw, Temp)$$

これらの関数を用いて, 実際の環境条件下 (変動する温度環境および水分活性条件) における菌数を, 式 (1) を微分方程式化した以下の式 (2) によって予測計算可能とする。

$$\frac{d \log_{10} S(t)}{dt} = -b[aw(t)Temp(t)] \cdot n[aw(t)Temp(t)] \left\{ -\frac{\log_{10} S(t)}{b[aw(t)Temp(t)]} \right\}^{\frac{n[aw(t)Temp(t)]-1}{n[aw(t)Temp(t)]}} \quad (2)$$

以上のモデル式によって, リスク評価のばく露評価ステップにおいて, 対象食品がばく露されてきた環境条件情報をもとにして, サルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の菌数変化を予測することを目的とした。

<研究成果>

水分活性の違いは死滅挙動に大きな影響を与えなかったことから, 水分活性をパラメータとするモデル化には至らなかった (TABLE 1)。一方で, 保存温度による影響は大きかったことから, 保存温度をパラメータとする数理モデル化を行った。大部分の血清型の菌種において, 保存温度をパラメータとする数理モデルを構築することができたが, 培地ベースによるモデル系での予測結果から, 実際の食品上における挙動を高精度に予測することはできなかった (TABLE 2)。

TABLE 1. Estimated Weibullian parameters ( $b$  and  $n$ ) of bacterial inactivation on the plastic surface during storage at 5, 15, and 25°C.

Bacteria	Relative humidity (%RH)	Temperature (°C)								
		5°C			15°C			25°C		
		$b$	$n$	$R^2$	$b$	$n$	$R^2$	$b$	$n$	$R^2$
<i>E. coli</i> O26	22	0.43	0.29	0.97	0.12	0.72	0.98	0.52	0.59	0.97
	43	0.58	0.20	0.96	-	-	-	1.49	0.33	0.93
	58	0.36	0.30	0.97	0.30	0.60	0.97	3.45	0.17	0.96
	68	0.56	0.18	0.98	-	-	-	1.83	0.33	0.97
	93	0.02	1.13	0.98	0.85	0.56	0.97	0.25	0.93	1.00
<i>E. coli</i> O111	22	0.39	0.33	0.98	0.61	0.41	0.95	1.72	0.36	0.97
	43	0.47	0.26	0.97	-	-	-	0.95	0.50	0.98
	58	0.45	0.24	0.95	0.19	0.59	0.96	1.25	0.43	0.98
	68	0.58	0.17	0.95	-	-	-	1.01	0.48	0.97
	93	0.01	1.45	0.96	0.27	0.77	0.98	2.36	0.29	0.95
<i>E. coli</i> O157	22	0.38	0.34	0.97	0.10	0.70	0.96	0.81	0.53	0.96
	43	0.23	0.32	0.75	-	-	-	0.49	0.63	0.99
	58	0.21	0.30	0.90	0.01	1.17	0.98	0.63	0.57	0.98
	68	0.12	0.37	0.90	-	-	-	0.60	0.59	0.98
	93	0.03	0.99	0.96	0.17	0.76	0.93	0.16	1.19	1.00
<i>S. Stanley</i>	22	1.35	0.18	0.97	0.60	0.44	0.99	1.73	0.31	0.99
	43	1.09	0.17	0.98	-	-	-	1.89	0.29	0.98
	58	0.83	0.25	0.67	0.16	0.68	0.97	1.60	0.33	0.99
	68	0.54	0.36	0.96	-	-	-	0.71	0.55	0.96
	93	1.18	0.30	0.99	2.35	0.31	0.99	2.80	0.24	1.00

TABLE 1. Continued

Bacteria	Relative humidity (%RH)	Temperature (°C)								
		5°C			15°C			25°C		
		$b$	$n$	$R^2$	$b$	$n$	$R^2$	$b$	$n$	$R^2$
<i>S. Typhimurium</i>	22	0.65	0.33	0.99	1.11	0.32	0.98	3.74	0.17	0.99
	43	0.84	0.20	0.99	-	-	-	3.57	0.19	1.00
	58	0.40	0.38	0.99	1.75	0.24	0.99	2.92	0.25	0.99
	68	0.53	0.34	0.98	-	-	-	2.28	0.31	0.99
	93	0.93	0.41	0.99	0.85	0.62	0.95	1.47	0.40	0.97
<i>S. Chester</i>	22	0.68	0.19	0.93	0.44	0.41	0.97	0.82	0.36	0.98
	43	0.12	0.33	0.97	-	-	-	0.66	0.40	0.97
	58	0.05	0.50	0.96	0.23	0.55	0.95	0.24	0.62	0.98
	68	0.25	0.28	0.91	-	-	-	0.32	0.60	0.98
	93	0.13	0.67	0.93	1.51	0.29	0.98	3.87	0.15	0.99
<i>S. Oranienburg</i>	22	0.14	0.55	0.98	2.48	0.23	0.99	2.87	0.15	0.98
	43	0.24	0.38	0.86	-	-	-	2.01	0.21	0.97
	58	0.25	0.38	0.97	2.48	0.24	0.96	0.75	0.40	0.97
	68	0.28	0.33	0.95	-	-	-	0.54	0.50	0.98
	93	0.15	0.71	0.97	0.71	0.61	0.96	3.50	0.21	1.00

<sup>a</sup>: Not determined due to lack of data

TABLE 2. Estimated Weibullian parameters ( $b$  and  $n$ ) of bacterial inactivation on the food surface during storage at 5, 15, and 25°C.

Bacteria	Food	$a_w$	Temperature (°C)								
			5°C				15°C			25°C	
			$b$	$n$	$R^2$	$b$	$n$	$R^2$	$b$	$n$	$R^2$
<i>E. coli</i> O26	Almond	0.58	0.96	0.26	0.87	0.52	0.47	0.98	0.61	0.53	0.96
	Chocolate	0.43	0.01	0.99	0.99	0.24	0.55	0.98	0.32	0.59	0.95
	Seeds of radish sprout	0.58	0.02	0.81	0.98	0.03	1.00	0.98	0.18	0.80	0.97
	Cheddar cheese	0.93	0.12	0.60	0.92	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O111	Almond	0.58	0.66	0.28	0.91	1.04	0.32	0.98	0.73	0.47	0.91
	Chocolate	0.43	0.00	1.96	0.95	0.12	0.65	0.97	0.40	0.51	0.95
	Seeds of radish sprout	0.58	0.00	1.58	0.96	0.13	0.73	0.99	0.10	0.96	0.99
	Cheddar cheese	0.93	0.00	1.29	0.96	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O157	Almond	0.58	0.84	0.19	0.88	0.65	0.49	0.97	1.13	0.41	0.93
	Chocolate	0.43	0.01	1.08	0.99	0.15	0.65	0.98	0.35	0.59	0.95
	Seeds of radish sprout	0.58	0.00	1.20	0.97	0.06	0.90	1.00	0.16	0.86	0.98
	Cheddar cheese	0.93	0.00	1.34	0.96	-	-	-	-	-	-
<i>S. Stanley</i>	Almond	0.58	0.02	0.01	0.36	0.41	0.40	0.96	1.12	0.40	0.96
	Chocolate	0.43	0.01	0.89	0.98	0.15	0.63	0.99	0.27	0.65	0.99
	Seeds of radish sprout	0.58	0.11	0.47	0.99	0.55	0.49	0.35	0.42	0.59	0.98
	Cheddar cheese	0.93	0.08	0.67	0.92	-	-	-	-	-	-

TABLE 2. Continued

Bacteria	Food	$a_w$	Temperature (°C)								
			5°C				15°C			25°C	
			$b$	$n$	$R^2$	$b$	$n$	$R^2$	$b$	$n$	$R^2$
<i>S. Typhimurium</i>	Almond	0.58	0.13	0.53	0.78	1.40	0.16	0.87	1.39	0.30	0.95
	Chocolate	0.43	0.00	1.47	0.99	0.12	0.69	0.98	0.31	0.59	0.97
	Seeds of radish sprout	0.58	0.05	0.58	0.98	0.09	0.77	0.99	0.50	0.57	0.98
	Cheddar cheese	0.93	0.40	0.47	0.96	-	-	-	-	-	-
<i>S. Chester</i>	Almond	0.58	0.04	0.65	0.81	0.65	0.28	0.83	0.59	0.49	0.94
	Chocolate	0.43	0.00	1.53	0.96	0.06	0.83	0.99	0.32	0.58	0.98
	Seeds of radish sprout	0.58	0.02	0.80	0.94	0.46	0.43	0.98	0.35	0.63	0.99
	Cheddar cheese	0.93	0.41	0.43	0.97	-	-	-	-	-	-
<i>S. Oranienburg</i>	Almond	0.58	0.83	0.19	0.75	0.58	0.38	0.97	0.43	0.62	0.94
	Chocolate	0.43	0.01	0.78	0.88	0.01	1.21	0.99	0.16	0.73	0.98
	Seeds of radish sprout	0.58	0.02	0.72	0.96	0.09	0.70	0.99	0.17	0.76	0.99
	Cheddar cheese	0.93	0.04	0.85	0.95	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Not determined

2 研究項目名：低水分活性条件下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確率予測モデルの開発（研究担当者名：小関成樹（北海道大学大学院農学研究院））

1) モデル系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解析

<研究内容・方法>

サルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌は極めて少菌数でも感染することが知られており、上述した菌集団（population）としての速度論的な挙動だけでなく、少数さらには個々の細菌細胞レベル（single cell）での生存／死滅の確率を明らかにすることが、実際の食品汚染を考慮してリスク評価を実施する上では重要な知見となる。

Single cell を扱うための簡易で再現性の高い実験系として、ある濃度で細胞が懸濁している溶液の2倍段階希釈を続けることで、最終的に single cell の細胞液を得ることができる。しかしながら、最終希釈時に100%の確率で single cell になるとは限らない。そこで、希釈操作によって得られる細胞数がある確率過程にしたがっていると仮定して、single cell が得られる確率（分布）を実験データとリサンプリングシミュレーションによって導き出す手法を開発する。

確立した Single cell 実験系を用いて、各種のサルモネラ属菌の血清型あるいは腸管出血性大腸菌の細菌細胞をモデル系（培地系）において各水分活性条件下で保存し、一定期間毎に液体培地中で増菌培養して、生存／死滅を評価して実験データを集積する。

<研究成果>

安定して1個あるいは2個といった数を平均値とするポアソン分布に則る細菌サンプルを調製可能となった（Fig. 7, 8）。これを用いて、個々の細菌の死滅確率を推定するモデルを開発した。開発したモデルは、死滅過程における細菌数の確率分布の変化も追跡することが可能となり、細菌の死滅挙動を確率事象としての的確に捉えることを可能とした（Fig. 9, 10, 11）。さらに、この細菌死滅確率の変化が妥当なものであるのかを、コンピュータシミュレーションによっても検証できた（Fig. 12）。

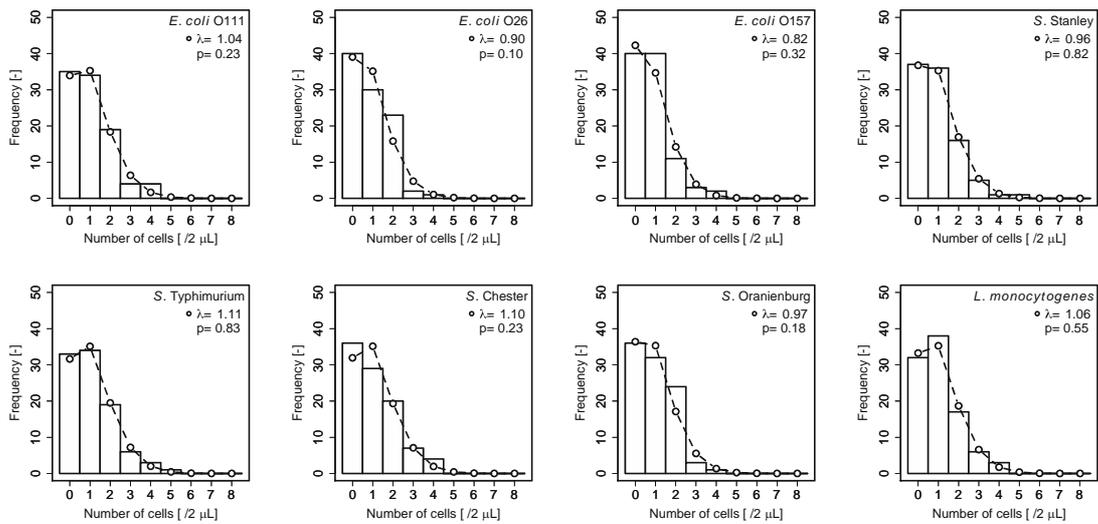


Figure 7. Distribution of bacterial cell counts obtained from the experiment (histogram) and estimated using maximum likelihood (○). The target cell number, □ parameter, was 1 CFU/2  $\mu$ L. A p-value was estimated using a likelihood-ratio test. A p-value  $> 0.05$  indicates that the bacterial counts followed a Poisson distribution. Parameters of each strain were estimated using the maximum likelihood.

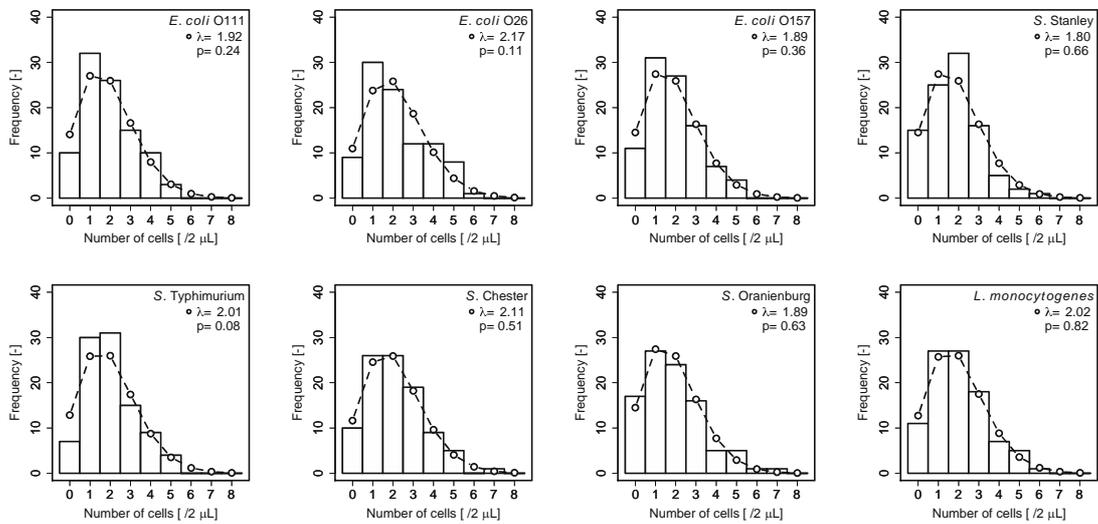


Figure 8. Distribution of bacterial cell counts obtained from the experiment (histogram) and estimated using the maximum likelihood (○). The target cell number, □ parameter, was 2 CFU/2  $\mu$ L. The p-value was estimated using the likelihood-ratio test. A p-value  $> 0.05$  indicates that the bacterial counts followed a Poisson distribution. The □ parameters of each strain were estimated using maximum likelihood.

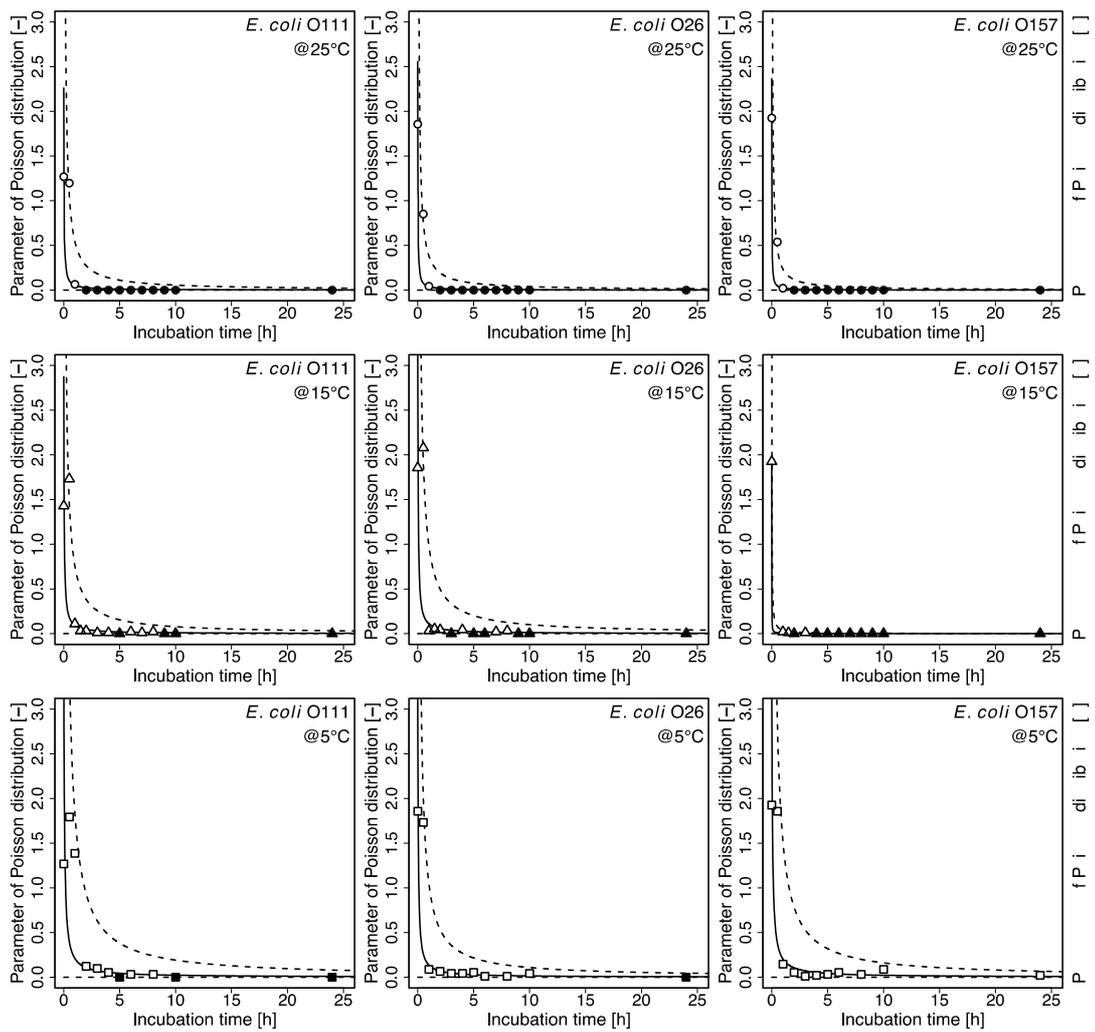


Figure 9. Changes in the parameter of Poisson distributions of the numbers of surviving *E. coli* at 5° C ( $\square$ ), 15° C ( $\triangle$ ), and 25° C ( $\circ$ ) under a desiccation environment. The lines represent the best fit to the gamma regression. Closed symbols indicate that all bacteria were dead in the experiment.

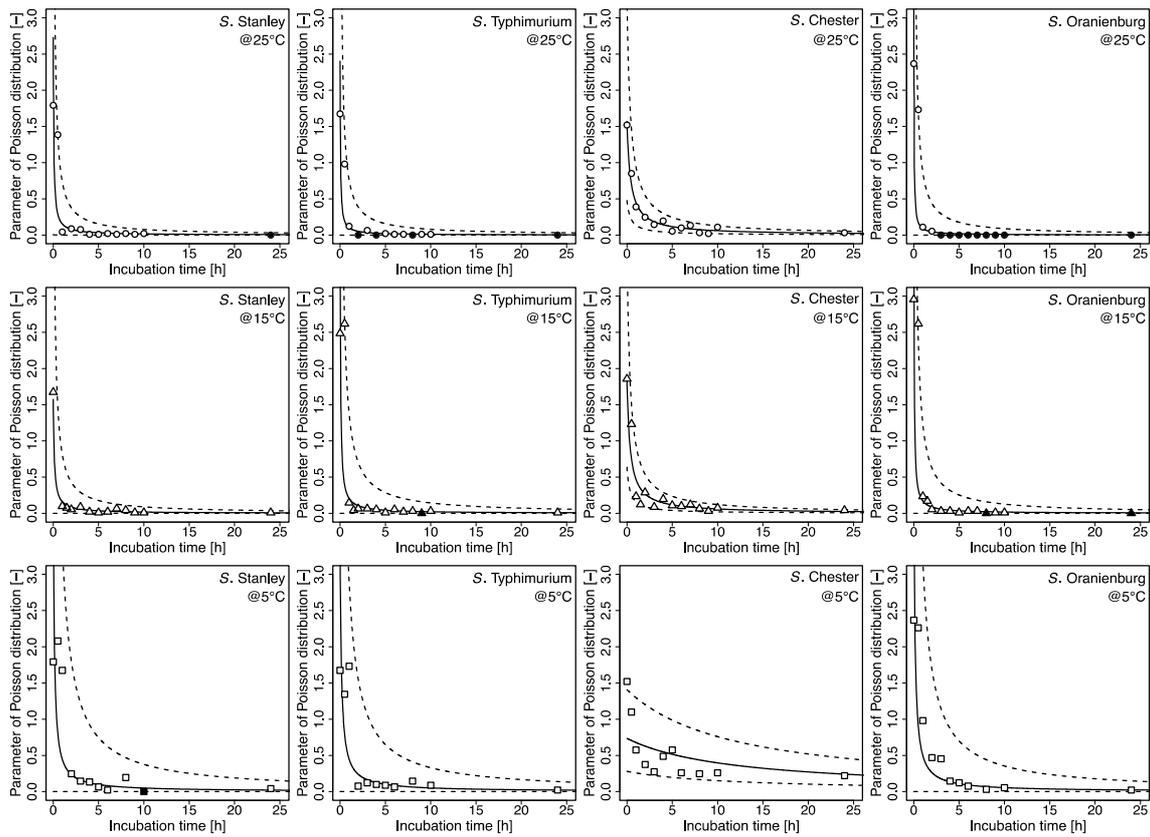


Figure 10. Changes in the parameter of Poisson distributions of the numbers of surviving *Salmonella* at  $5^{\circ}\text{C}$  ( $\square$ ),  $15^{\circ}\text{C}$  ( $\triangle$ ), and  $25^{\circ}\text{C}$  ( $\circ$ ) under a desiccation environment. The lines represent the best fit to the gamma regression. Closed symbols indicate that all bacteria were dead in the experiment.

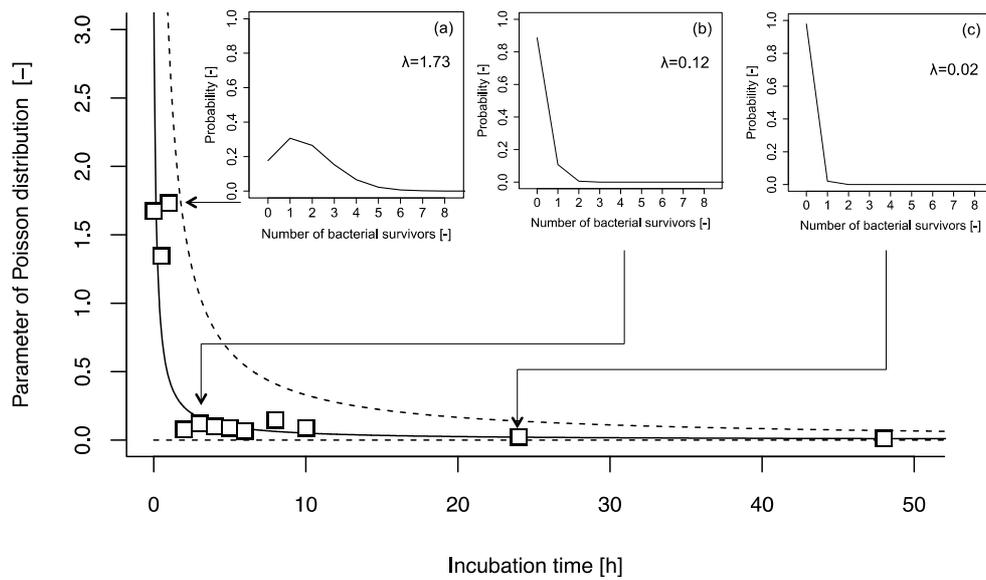
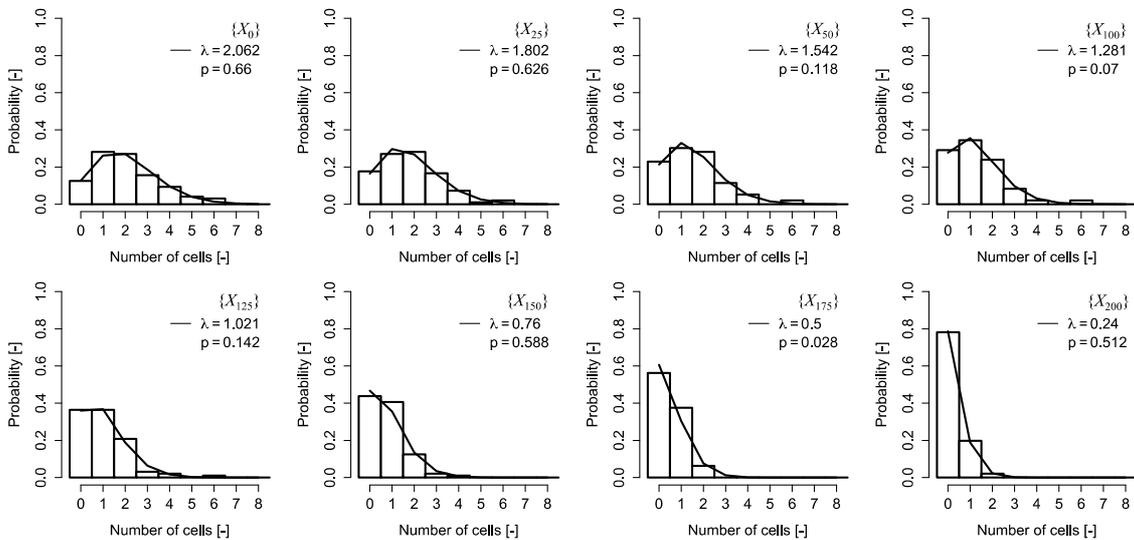


Figure 11. An example of changing the parameter of the Poisson distribution of the numbers of



were examined as the initial distribution  $\{X_0\}$ . The distribution of survivors in a well obtained from the simulation are illustrated as histograms. The mean value of the number of survivors in a 96-well microplate is described as the parameter of the Poisson distribution (solid lines). The p-values were estimated using a likelihood-ratio test. If the p-value was smaller than 0.05, the hypothesis that the bacterial cell counts followed a Poisson distribution was rejected.

## 2) 低水分含量食品上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解析 ＜研究内容・方法＞

上述のモデル系における実験系と同様に、適宜に希釈して少菌数に設定した菌液をそれぞれの食品サンプルに接種して、一定期間毎に生存／死滅を増菌培養によって確認する。得られた結果は、低水分含量食品上でのサルモネラ属菌の生存確率データとして蓄積し、モデル系で構築する予測モデルの検証データとして活用する。

### ＜研究成果＞

(1) の課題で確立した実験手法を、アーモンドやチョコレートといった低水分活性食品上で検討した結果、概ね (1) の課題と同様に確率論的に説明が可能となり、実際の食品上においても少数の菌数の死滅確率のバラツキの予測が可能であることが示唆された。

### (2) 研究全体の成果、考察及び結論

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、サルモネラ属菌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。Gradl et al. (2015) と Keller et al. (2013) は  $a_w$  が高い ( $a_w = 0.85$ ) 場合に死滅速度が高くなることを報告している。本研究においても、チョコレート ( $a_w = 0.43$ )、生アーモンド ( $a_w = 0.60$ ) よりもチーズ ( $a_w = 0.93$ ) 表面上における細菌の死滅が速いことが示されている。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。

サルモネラ属菌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して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、速度係数  $b$  と形状係数  $n$  を保存温度の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。この原因として、食品成分が細菌の死滅挙動に影響を与えた可能性が考えられる。例えば、Hiramatsuet et al. (2005) はスクロースが細菌の死滅を抑制する保護的な効果があることを報告している。本研究でチョコレート表面上での細菌の死滅が他の食品と比較して緩やかであった原因と考えられる。以上のように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。その典型例として *Salmonella* Typhimurium の結果を図 1 に示した。scale パラメータを比較することで、保存温度の影響が大きく、25°C 保存よりも 5°C において長期間にわたり生残することが示された。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属菌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バラツキをも的確に推定すること可能とした。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属菌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。

### Ⅲ 本研究を基に発表した論文等

#### 1 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

- 1) Kento Koyama, Hidekazu Hokunan, Mayumi Hasegawa, Shigenobu Koseki: Do bacterial cell numbers follow a theoretical Poisson distribution? Comparison of experimentally obtained numbers of single cells with random number generation via computer simulation, (in submission to *Food Microbiology*)
- 2) Hidekazu Hokunan, Kento Koyama, Mayumi Hasegawa, Shuso Kawamura and Shigenobu Koseki: Survival kinetics of *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* on a plastic surface at low relative humidity and on low water activity foods, (in submission to *Journal of Food Protection*)
- 3) Kento Koyama, Hidekazu Hokunan, Mayumi Hasegawa, Shuso Kawamura, and Shigenobu Koseki: Modeling stochastic variability of the number of surviving cells of *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* at the single-cell level in a desiccation environment, (in submission to *Food Microbiology*)

#### 2 本研究を基にした学会発表の実績

- 1) 長谷川真弓, 北南秀和, 小山健斗, 川村周三, 小関成樹, 低水分活性食品における腸管出血性大腸菌およびサルモネラの死滅挙動, 日本食品科学工学会 2015 年北海道支部大会, 2015 年 2 月 28 日, ロワジールホテル函館 (函館市)
- 2) 小山健斗, 北南秀和, 長谷川真弓, 川村周三, 小関成樹, 乾燥環境下における腸管出血性大腸菌およびサルモネラの生残確率予測モデルの開発, 日本食品科学工学会 2015 年北海道支部大会, 2015 年 2 月 28 日, ロワジールホテル函館 (函館市)
- 3) 北南秀和, 小山健斗, 長谷川真弓, 川村周三, 小関成樹, 乾燥環境下における腸管出血性大腸菌およびサルモネラの死滅挙動予測モデルの開発, 日本食品科学工学会 2015 年北海道支部大会, 2015 年 2 月 28 日, ロワジールホテル函館 (函館市)
- 4) Hidekazu Hokunan, Kento Koyama, Mayumi Hasegawa, Shige Koseki: A pathogen survival kinetics model for a low water activity environment and low water activity foods, 2015 Annual Meeting of International Association for Food Protection, July 27, 2015, Portland, USA.
- 5) Kento Koyama, Hidekazu Hokunan, Mayumi Hasegawa, Shige Koseki: Stochastic Single Cell Survival Model of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in a Desiccation Environment, 2015 Annual Meeting of International Association for Food Protection, July 28, 2015, Portland, USA.
- 6) Hidekazu Hokunan, Kento Koyama, Mayumi Hasegawa, Shige Koseki: Survival kinetics of *Salmonella* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* under low water activity environments and on low water activity foods, 9th International Conference on Predictive Modeling in Food, September 9, 2015, Rio de Janeiro, Brazil.

- 7) Kento Koyama, Hidekazu Hokunan, Mayumi Hasegawa, Shige Koseki: Modelling the survival probability of Salmonella enterica and enterohemorrhagic Escherichia coli in a single cell level under desiccation environment, 9th International Conference on Predictive Modelling in Food, September 9, 2015, Rio de Janeiro, Brazil.
- 8) 長谷川真弓, 北南秀和, 小山健斗, 川村周三, 小関成樹, 低水分活性食品における食中毒細菌の死滅挙動の解明, 第 74 回農業食料工学会年次大会, 2015 年 9 月 15 日, 岩手大学 (盛岡市)
- 9) 北南秀和, 長谷川真弓, 小山健斗, 川村周三, 小関成樹, 乾燥環境下における腸管出血性大腸菌およびサルモネラの死滅挙動予測モデルの開発, 第 74 回農業食料工学会年次大会, 2015 年 9 月 15 日, 岩手大学 (盛岡市)
- 10) 小山健斗, 北南秀和, 長谷川真弓, 川村周三, 小関成樹, 乾燥環境下における個々の細菌の生残/死滅を予測する確率論的数理モデルの開発, 第 74 回農業食料工学会年次大会, 2015 年 9 月 15 日, 岩手大学 (盛岡市)
- 11) 小山健斗, 北南秀和, 長谷川真弓, 川村周三, 小関成樹, 乾燥環境下におけるサルモネラの死滅時間のばらつきを予測する確率モデルの開発, 日本食品科学工学会 2016 年北海道支部大会, 2016 年 2 月 26 日, (地独) 北海道立総合研究機構 食品加工研究センター (江別市)

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)  
なし

#### IV 主任研究者による申請時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

##### 1 申請時に申告した達成目標

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) サルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の菌数変化に関する定量データが、モデル系（培地系）だけでなく低水分含量食品において系統的かつ網羅的に整備され、リスク評価におけるデータギャップを解消する。	5	本目標については、十分に達成できている。細菌7血清型、水分活性条件5段階、温度条件3段階、食品系サンプル4種類の保存試験データを集積できている。
(2) 低水分環境下におけるサルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の生残挙動を、水分活性条件および温度条件とから予測可能となり、ばく露評価ステップにおいて、種々のシナリオに対応してサルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の菌数変化を推定可能とする。	5	速度論的な数理モデル化と確率論的な数理モデル化の2本柱を、並行してすすめることができおり、いずれの開発モデルも今後のリスク評価において、特に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できる。速度論的モデル化に関する論文を投稿中である。
(3) 低水分環境下におけるサルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の single cell レベルでの生存/死滅の確率が予測可能となり、少量感染のリスクを直接的に推定可能とする。	5	従来にないアプローチ方法を開発して、個々の細菌細胞の死滅挙動を確率論的に記述する手法を確立でき、極めてその意義は大きい。すでに、英文論文として2本の投稿を行っている。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

##### 2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	5	目標として設定した課題に関しては、概ね達成できている。当初の予想を覆すような結果も得られているが、現時点ではまだ未完成な部分もあり、残りの研究期間で仕上げる。
(2) 研究成果の有用性	5	従来にない、新たな知見、実験手法、モデル化手法を提案することができ、今後のリスク評価において大いに活用されることが期待される。
総合コメント 着実に実験・解析を進め、国際学会発表、論文投稿と成果を公表しつつあること		

から、研究全体として極めて良好に進捗していると判断する。

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。