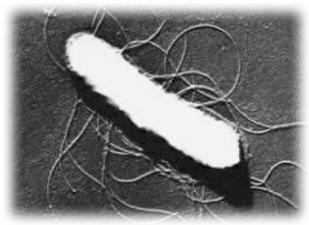
低水分含量食品中における食中毒細菌 (サルモネラ,腸管出血性大腸菌)の菌数変動および 生存確率予測モデルの開発







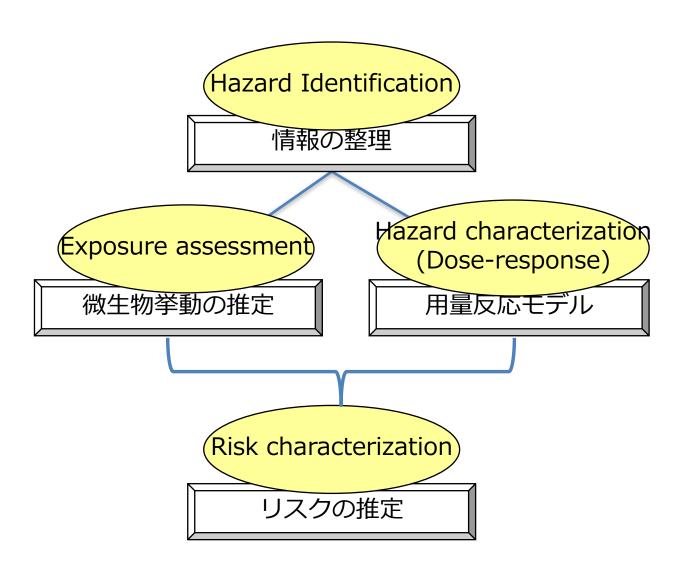


北海道大学大学院農学研究院

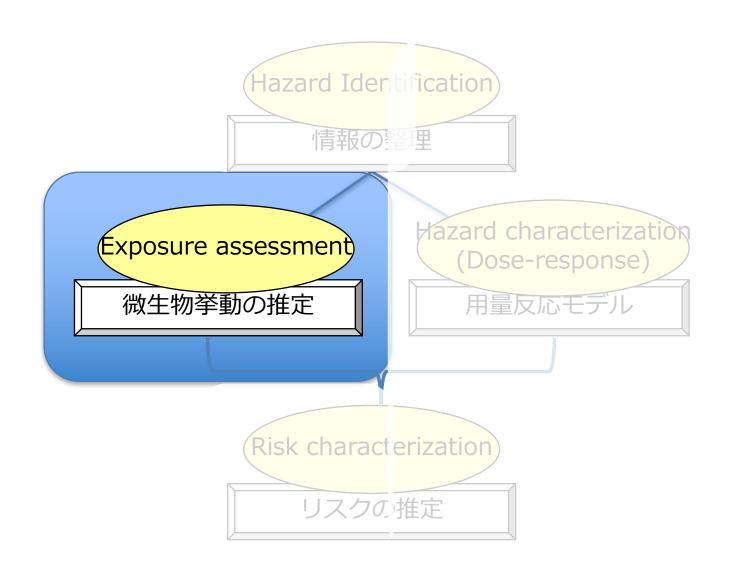
こせき しげのぶ **小関 成樹**



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 = 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)

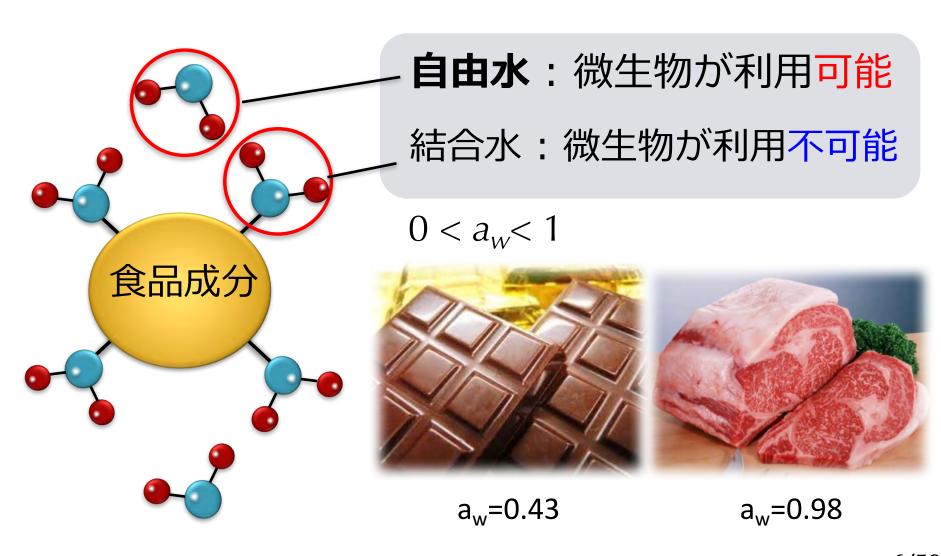
7,315 件の食中毒事故が報告 (Sofia, 2014)

2007 - 2012

5/59

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

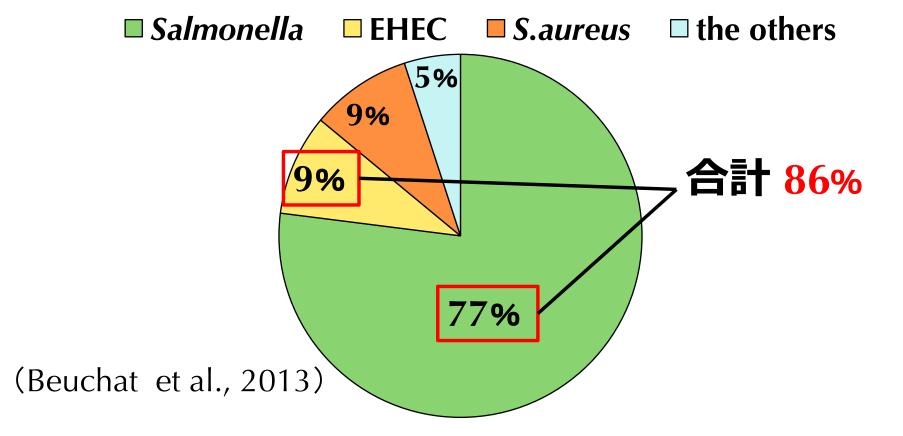


背景:問題となっている細菌は?

☆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



背景:aw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,が低いほど, 死滅速度が増加

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

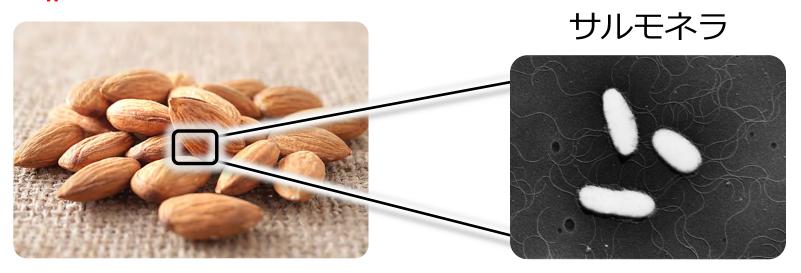


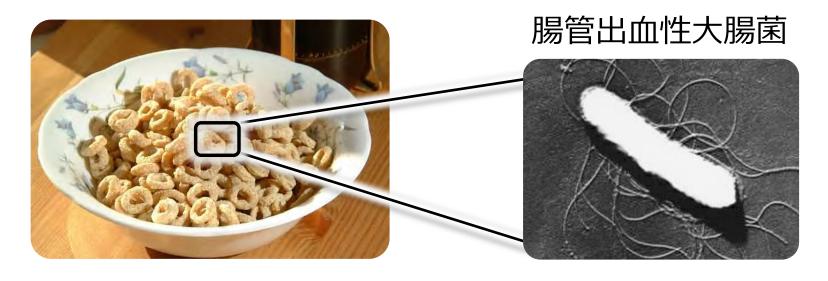
サルモネラと 腸管出血性大腸菌に対する a_wの影響は未解明

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

awの影響?/食品成分の影響?





背景:本研究が目指したもの

研究全体の目指す目標

食中毒菌の死滅 $=f(a_w)$

U

低 aw 食品での食中毒リスクの推定

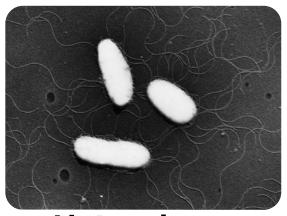


具体的なリスク管理措置の提言

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

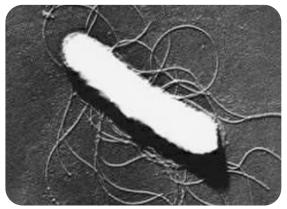
方法:供試試料



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

方法

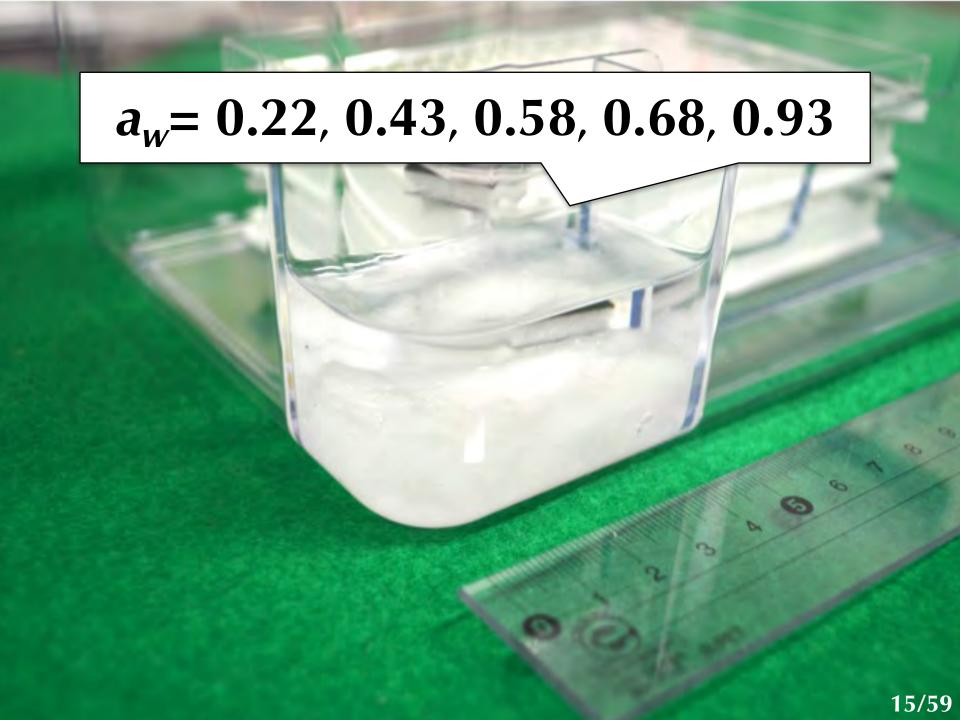
- プラスチックプレートに細菌を付着させる実験 食品成分の影響を排除して 細菌の死滅挙動を評価
- 実際の食品に細菌を付着させる実験 プレート上の実験結果と一致するのか比較検討











方法:供試試料







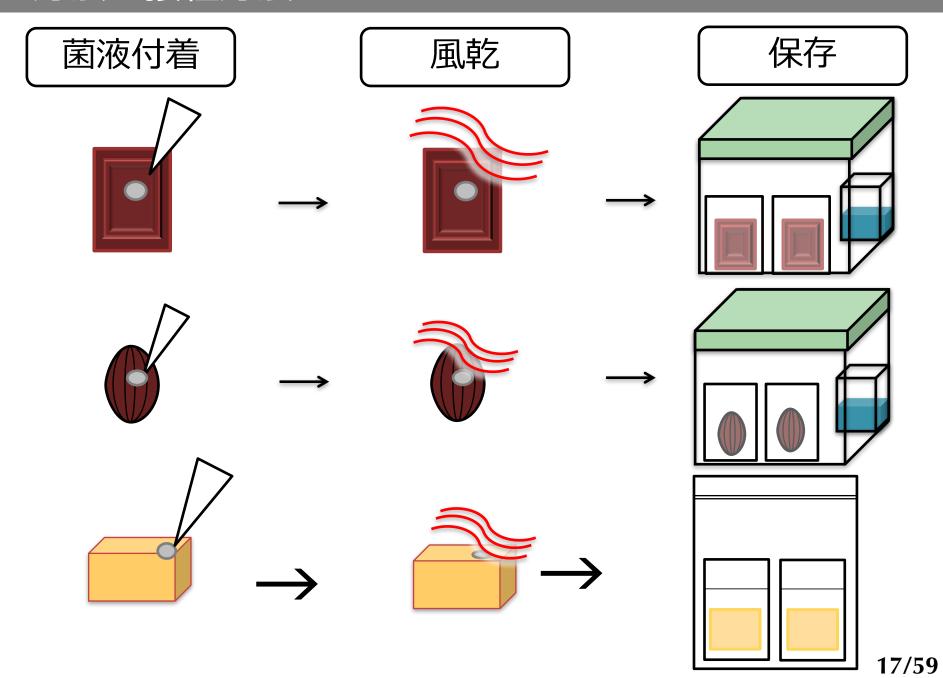
$$a_{w}$$
=0.43

$$a_{w} = 0.60$$

$$a_{w}$$
=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

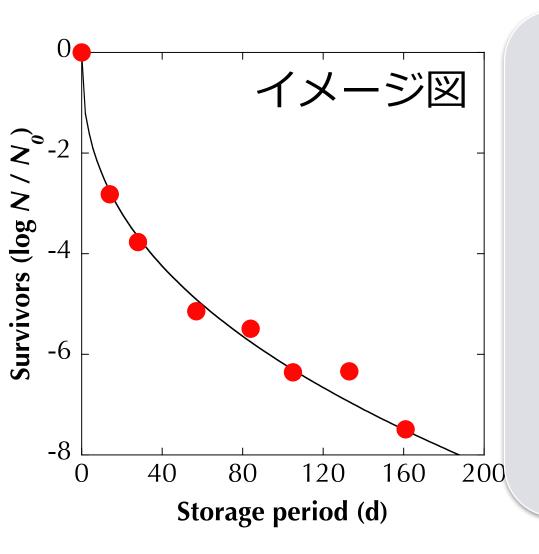








実際の菌数ではなく,細菌の死滅の割合で評価



Weibull モデル

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = -b \times t'$$

No: 初期菌数

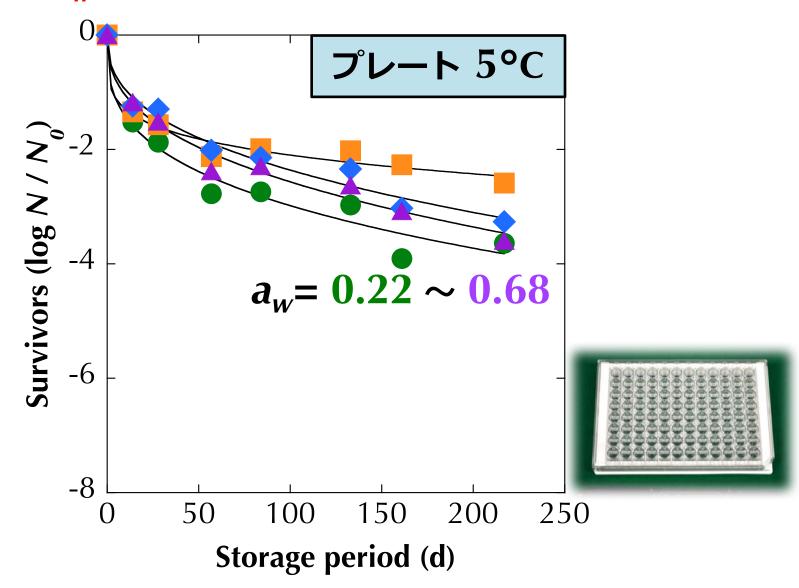
b: 速度係数

n: 形状係数

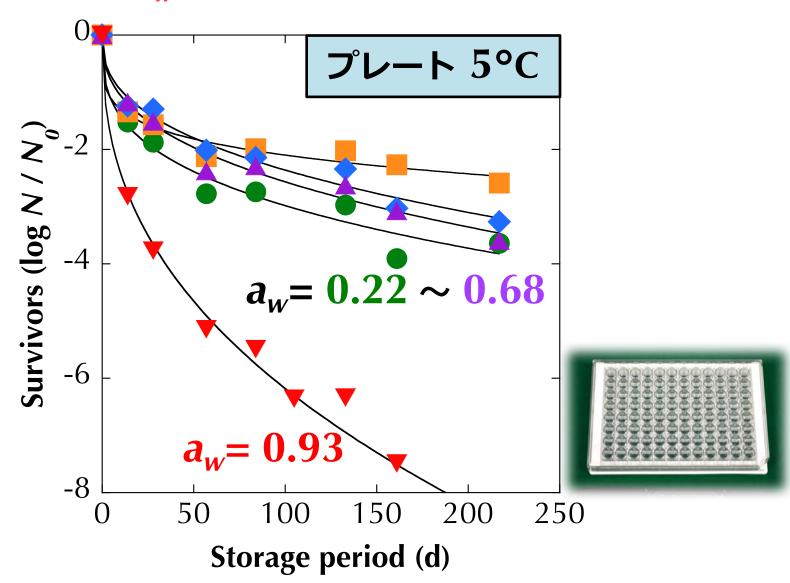
t: 経過日数

N(t):時間tにおける生菌数

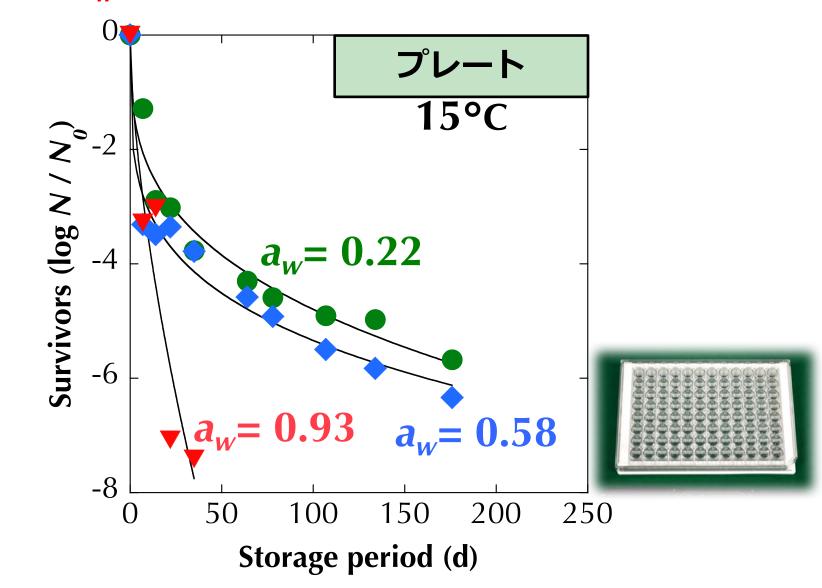
aw(0.22~0.68) の影響は限定的



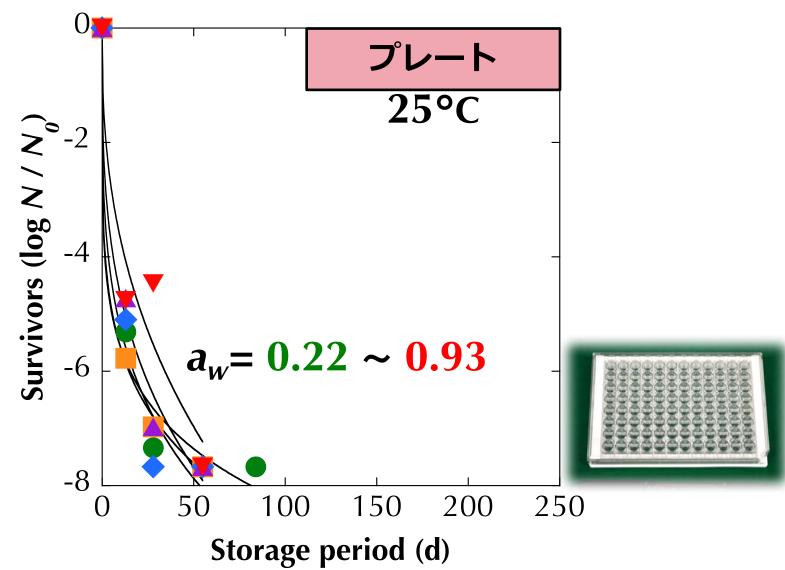
 $a_w = 0.93$ 死滅が急速



$a_w(0.22~0.58)$ の影響は限定的

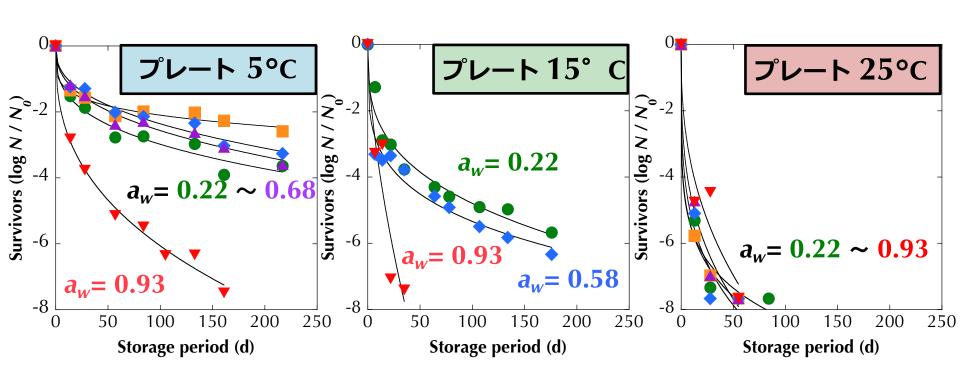




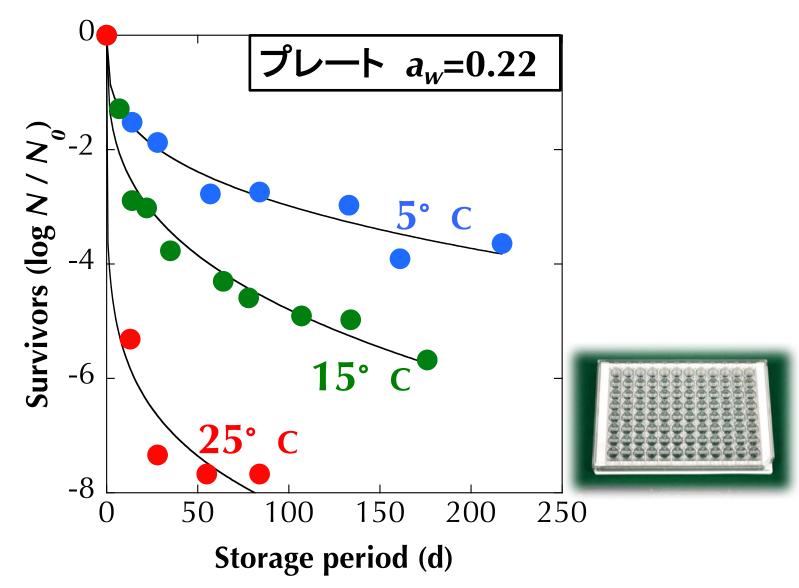


死滅挙動に対する 🗛 の影響を解明

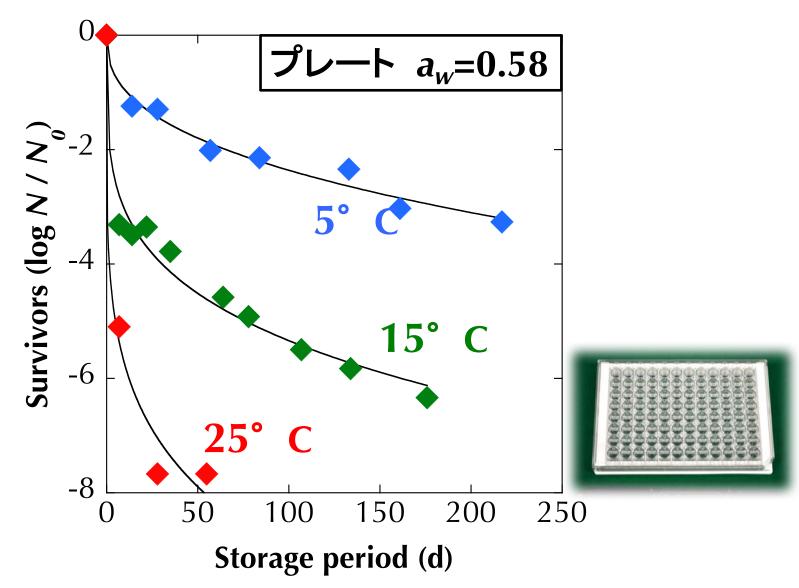
 a_w = $0.22 \sim 0.68$ 温度によらずで死滅に**影響無し** a_w = 0.93 において**死滅速度が増大**



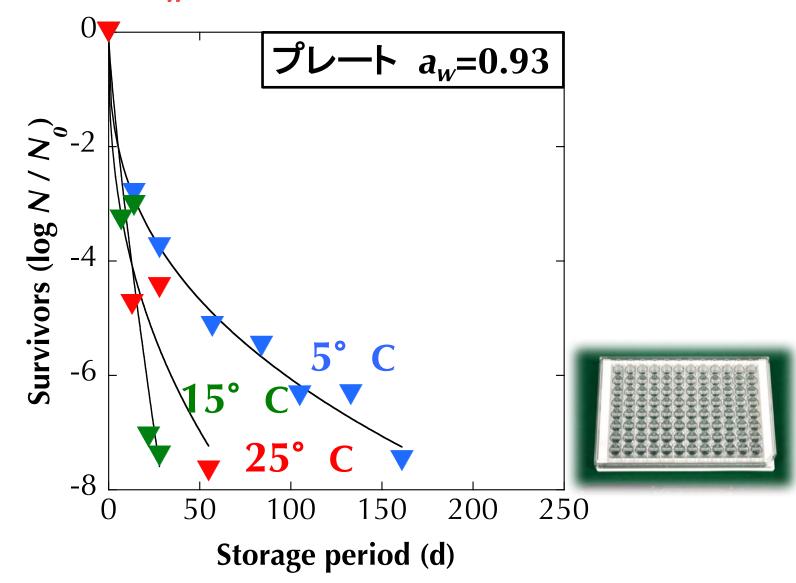
冷蔵保存で死滅が遅い



冷蔵保存で死滅が遅い

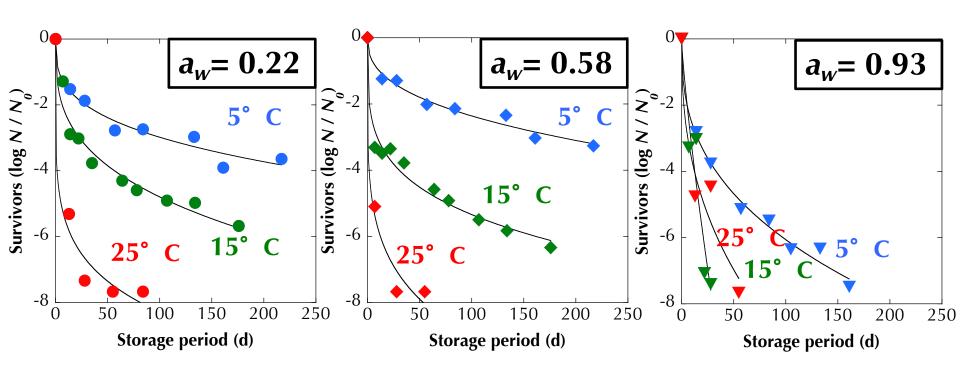


高aw→温度の影響は小

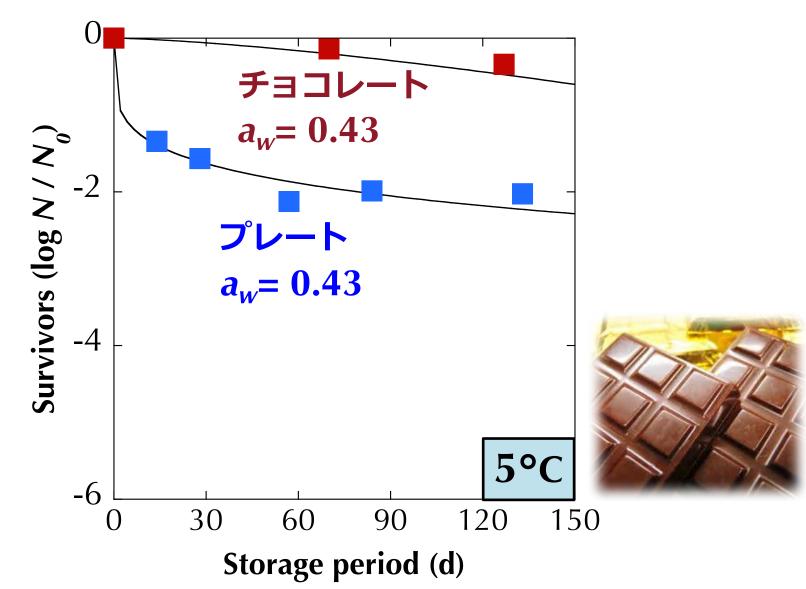


死滅挙動に対する温度依存性は明確に現れた

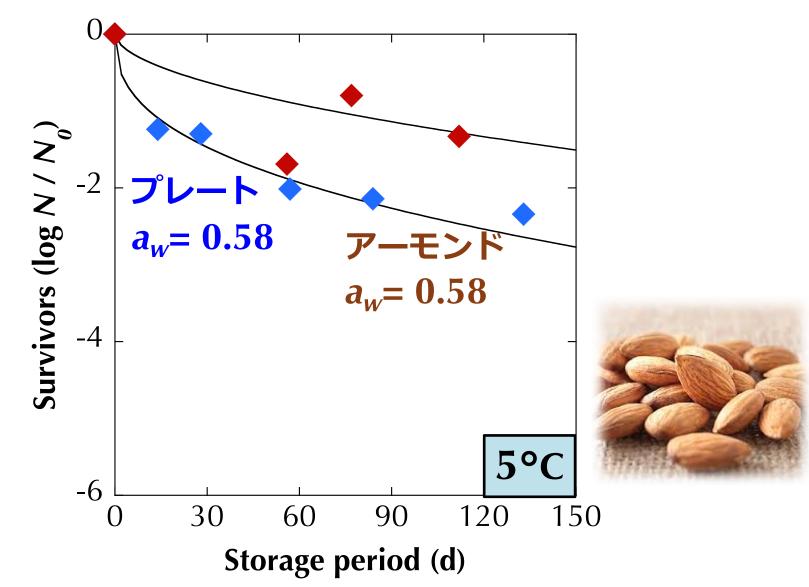
冷蔵保存5°Cで最も遅く,温度の上昇に伴い死滅速度が増大



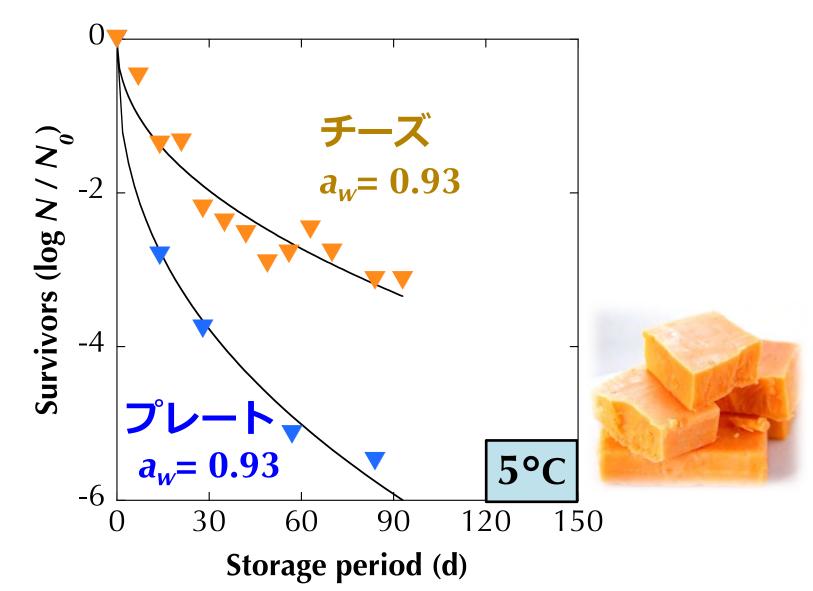
チョコレートとプレート上の死滅挙動に違い



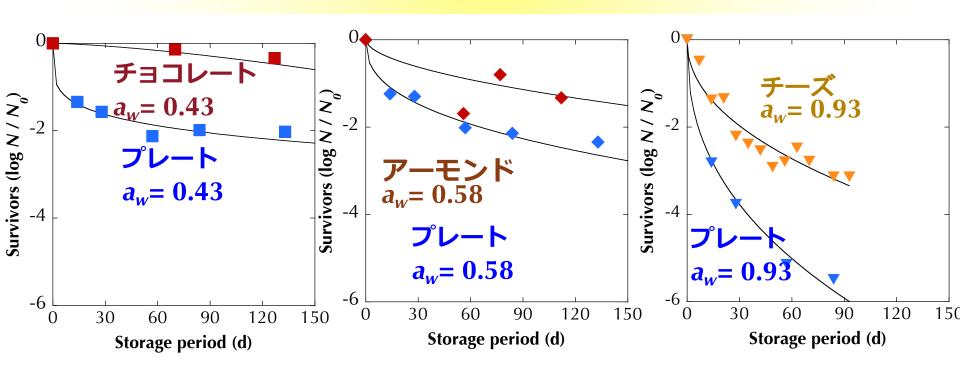
アーモンドとプレート上の死滅挙動に違い



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

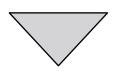


食品成分/組織構造等が影響

まとめ

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

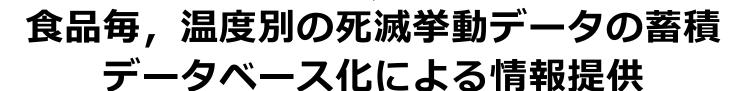
研究全体の目指す目標



食中毒菌の死滅 $=f(a_w)$

低 aw 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







Journal of Food Protection, Vol. 79, No. 10, 2016, Pages 1680–1692 doi:10.4315/0362-028X.JFP-16-081 Copyright ©, International Association for Food Protection

詳細は論文参照



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_ws 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挙動が重要か?

- 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、10⁷~10⁹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

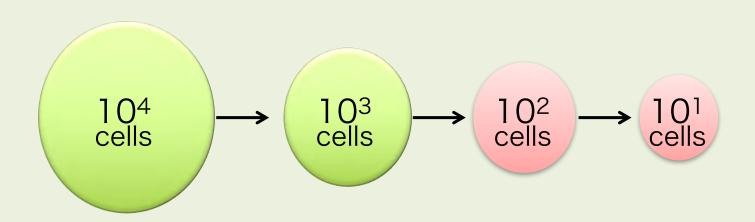
少数細菌数の細菌挙動の予測精度が低い

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

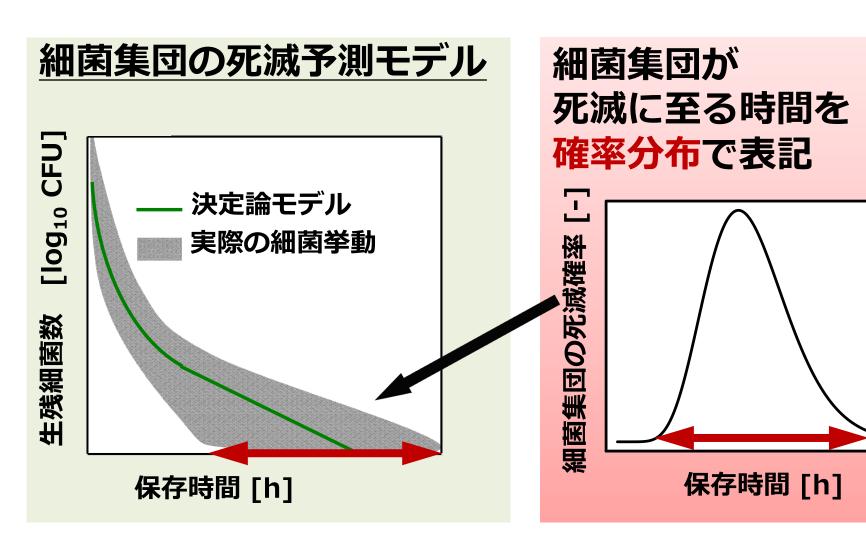
個々の細菌の個体差が大きく見える



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

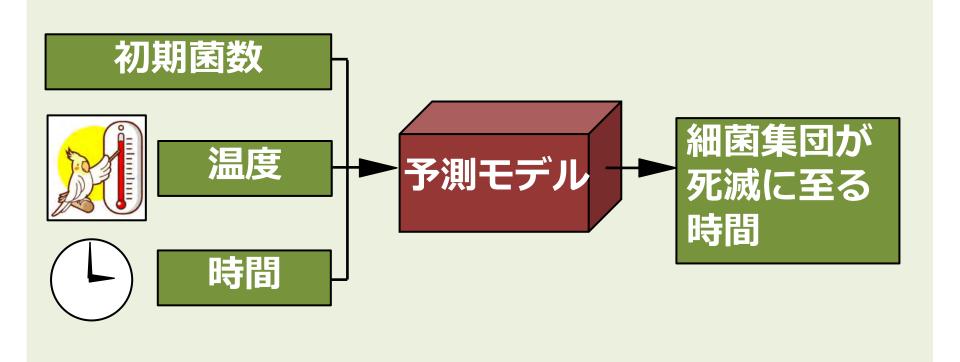


41/59

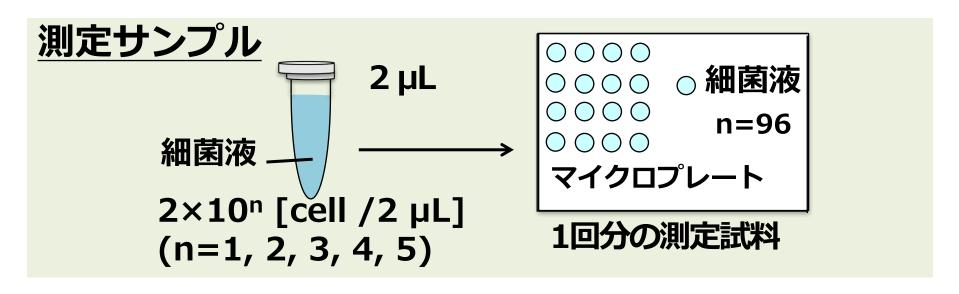
本研究の目的

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







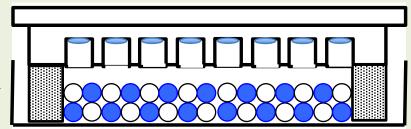
43/59

細菌液の乾燥と測定試料の保存

細菌液の乾燥

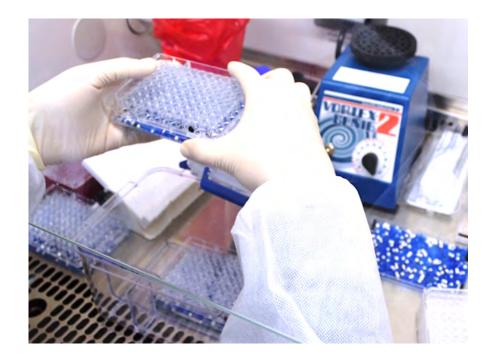
マイクロプレート (逆さ)--->

マイクロプレート蓋 ->



一 菌液 ○ シリカゲル

1回分の測定試料



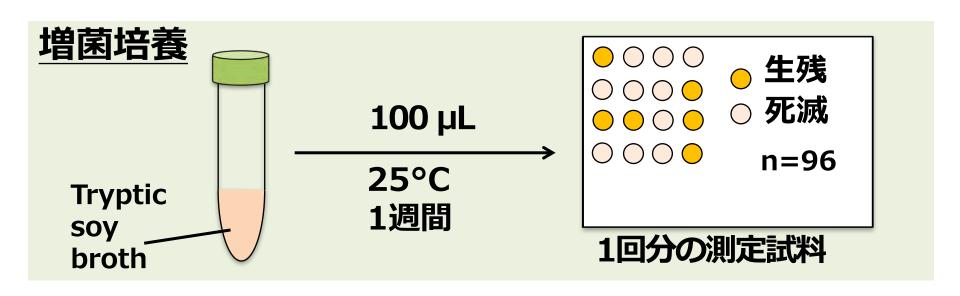
温度: 5, 15, 25°C

相対湿度: 10~20%



44/59

細菌集団の生残/死滅判定



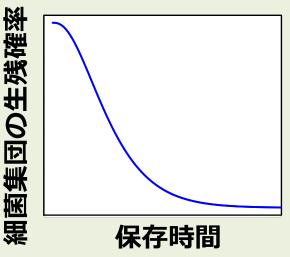


解析方法

<u>累積ガンマ分布でのフィッティング</u>例)

ある時間まで"<u>機械</u>"が"<u>壊れない</u>"確率

本研究では "<u>細菌集団</u>"が"<u>生残する</u>"確率を示す

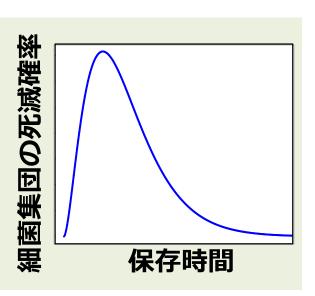


微分

ガンマ分布で表記

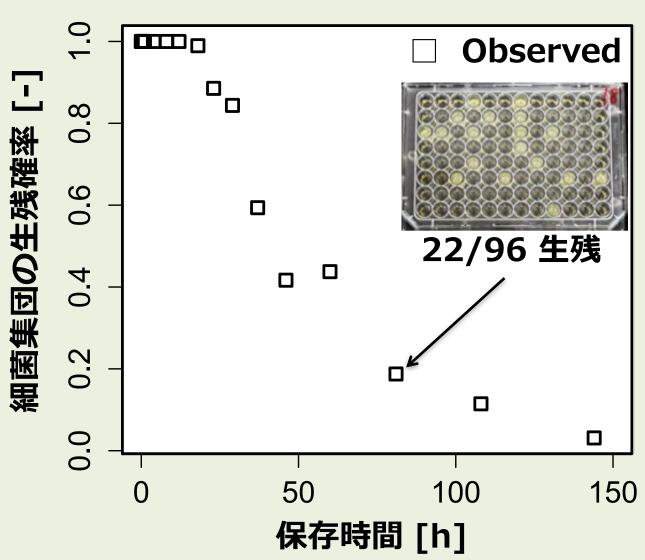
例)いつ"<u>機械</u>"が"<u>壊れるか"</u>を示す

本研究では いつ"<u>細菌集団</u>"が"<u>死滅に至るか</u>"を示す

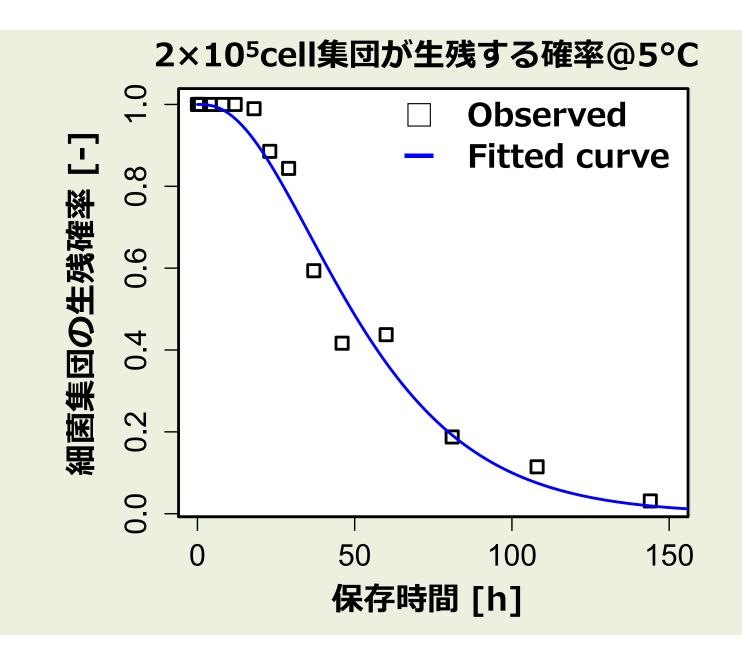


測定データ

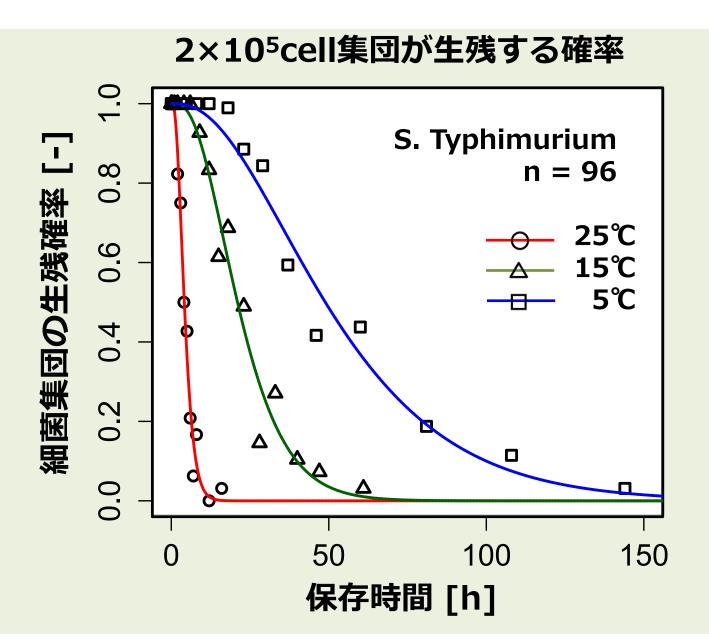




累積ガンマ分布でのフィッティング

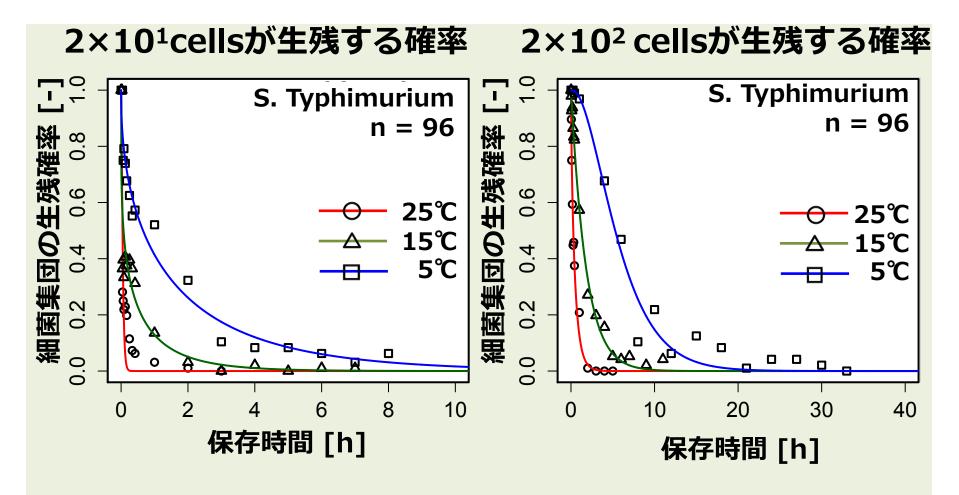


累積ガンマ分布でのフィッティング



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

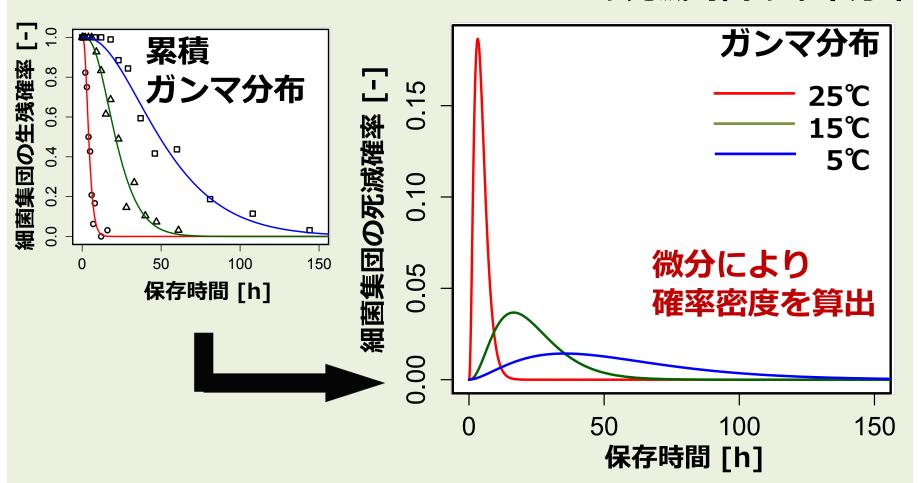


細菌集団が死滅に至る時間

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

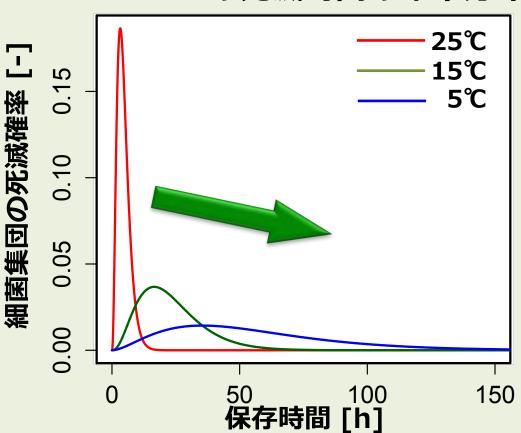
2×10⁵ cellsの死滅時間の確率分布



温度と細菌集団が死滅に至る時間

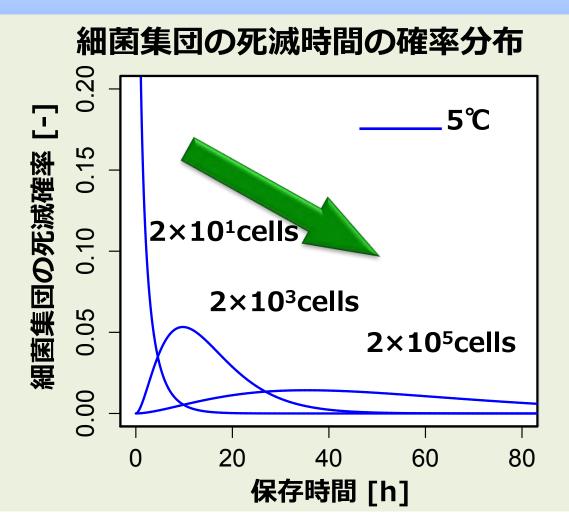
温度が低くなるほど, 細菌集団の生残時間は長く,死滅時間は広く分布

2×10⁵ 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 生残時間は長く、死滅する時間は広く分布



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

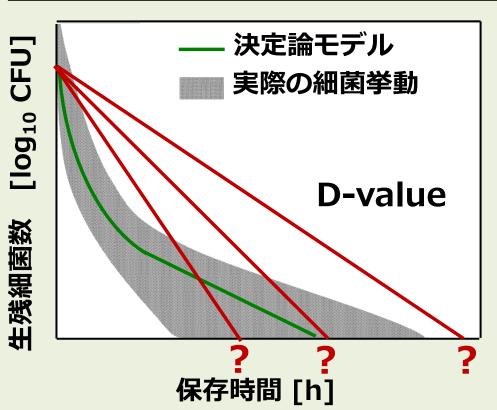
結論

"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

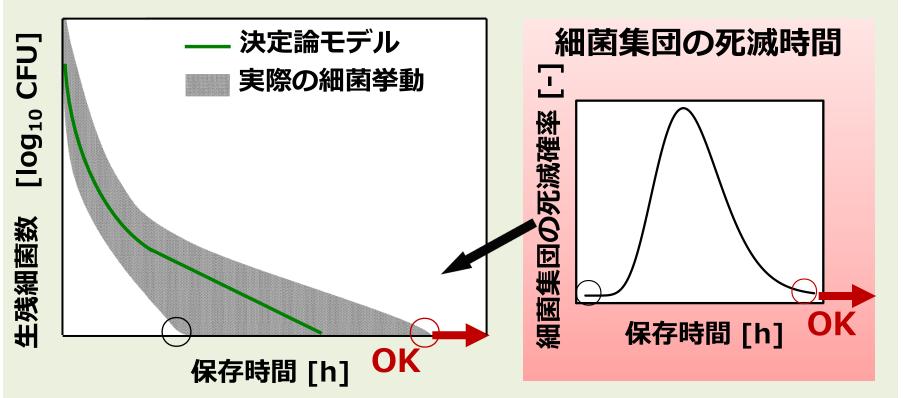
<原因> "点"による推定

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

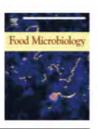




Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

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



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



ARTICLEINFO

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





お問合せ先 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