

平成17年度農林水産省
食品製造工程管理
情報高度化促進事業

平成17年度
病原微生物データ分析実験作業
成果報告書

「食中毒起因細菌の各種温度条件下での
増殖予測」

平成18年1月
東京都健康安全研究センター
藤川 浩氏

平成 17 年度 食品製造工程管理情報高度化促進事業
病原微生物データ分析実験報告書

食中毒起因細菌の各種温度条件下での増殖予測

東京都健康安全研究センター 微生物部 藤川 浩

1. 目的

微生物による食中毒事件および食品腐敗の発生を抑制するための手段は、数多くあり、その代表的なものとしては温度、酸素濃度、水素イオン濃度(pH)、水分活性およびそれに関与する塩分・糖濃度、保存料濃度などがある。しかし、その大部分の要因はその食品自体に固有な値であり、製造・包装後に変えることはできない。製造後変動し、しかも最も微生物増殖に大きな影響を与える環境要因は、温度である。しかも、食品への各種添加物の使用が安全性の面から控えられている現在、微生物制御を行う最も有効な手段の一つは温度である。したがって、食品をいかに適切な温度で製造し、流通させるかは食品の安全性を確保する上で非常に重要な管理点である。

一方、製造および流通過程で対象食品が受けた温度履歴から、それを汚染する有害微生物の増殖を予測できれば、その予測結果から対象食品の微生物学的安全性に対する客観的な判断ができる。これまで国際的にいくつかの増殖モデルが発表され、中でもゴンペルツモデルとバラニーモデルは良く知られている(1, 2)。特にバラニーモデルは最近多くの研究者によって使われているが、変動温度での増殖にはうまく対応できないがある(3)。一方、ゴンペルツモデルは数学的に変動温度には適用が困難である。

最近、私たちはロジスティックモデルを基本にしたモデルを新たに開発し、このモデルを新ロジスティックモデルと名づけた(4)。本モデルは大腸菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌など各種の微生物の増殖挙動を高い精度で表すことができた(4-8)。しかも、本モデルは変動温度下の増殖を高い精度で予測することが示された(5, 7, 8)。

今回、この新ロジスティックモデルを用いて、これまで発表された有害微生物の増殖データを基に、各種の温度条件下での微生物増殖を予測するコンピュ

ータプログラムの開発を検討した。このプログラムでは、ユーザーに対してできる限り易しく、使いやすいように設計を心がけた。すなわち、増殖モデルに関する知識を必要とせず簡単に温度データを入力でき、瞬時に対象微生物の増殖予測がコンピュータ上に表示されるようにした。

2. 開発方法

2.1. 増殖予測モデル

増殖予測プログラムに用いる増殖モデルは私たちが最近開発したモデルを用いた。このモデルは生物個体数あるいは人口を表すためにこれまで良く用いられてきたロジスティックモデルを基本にし、それを拡張したものであるため、新ロジスティックモデルと呼ぶ(4-8)。その式を下に示す。

$$\frac{dN}{dt} = rN \left\{ 1 - \left(\frac{N}{N_{\max}} \right)^m \right\} \left\{ 1 - \left(\frac{N_{\min}}{N} \right)^n \right\}$$

ここで N : 菌数、 t : 時間、 r : 速度定数、 N_{\max} : 最大値 (定常期菌数)、 N_{\min} : 最小値 (接種菌数)、 m 、 n : 調節パラメータである。

2.2. 増殖データ

今回用いた微生物増殖データは以下の通りである。

1. 液体培地中の大腸菌増殖(5)
2. 牛乳中の黄色ブドウ球菌増殖とエンテロトキシン生成量(8)
3. 液体培地中の腸炎ビブリオ増殖(9)

2.3. プログラム開発方法

上記の新ロジスティックモデルは数値解法(ルンゲ-クッタ法)を用いて解いた(4-8)。速度定数 r は温度によって異なるため、各時間ステップでの値は温度からアレニウスモデルあるいは平方根モデルを用いて求めた(4-8)。ブドウ球菌エンテロトキシン生成量は私たちの方法を使って予測した(8)。

予測プログラムは表計算ソフトウェア Microsoft Excel を用いて作られた(4-8)。また、ユーザーに使いやすくするため、Excel 内の Visual Basic Application を用いて、操作をできる限り自動化した。

3. 増殖予測プログラムの開発結果：内容と使用手順

3.1. 概要

本プログラムは新ロジスティックモデルを使った一般ユーザー向けの初めての増殖予測プログラムである。ユーザーは対象とする菌種および初期菌数、温度履歴を入力すると、その条件下での増殖予測を瞬時に行う。なお、牛乳中の黄色ブドウ球菌についてはエンテロトキシン生成量も予測できる。

温度履歴は2つの入力方法がある。1つは手動でキーボードからステップごとに温度と時間を入力する方法である。もう1つはデジタル温度記録計で得られた時間 - 温度データを貼り付ける方法である。

3.2. 使用手順

本プログラムの使い方を実際のコンピュータ画面で表示しながら解説する。ここでは温度履歴を手動入力する方法での手順を示す。

① 菌種を「大腸菌・黄色ブドウ球菌・腸炎ビブリオ」から選択し、初期菌数を入力する（図1）。この例では、黄色ブドウ球菌（牛乳中）、1000CFU/mlとした。

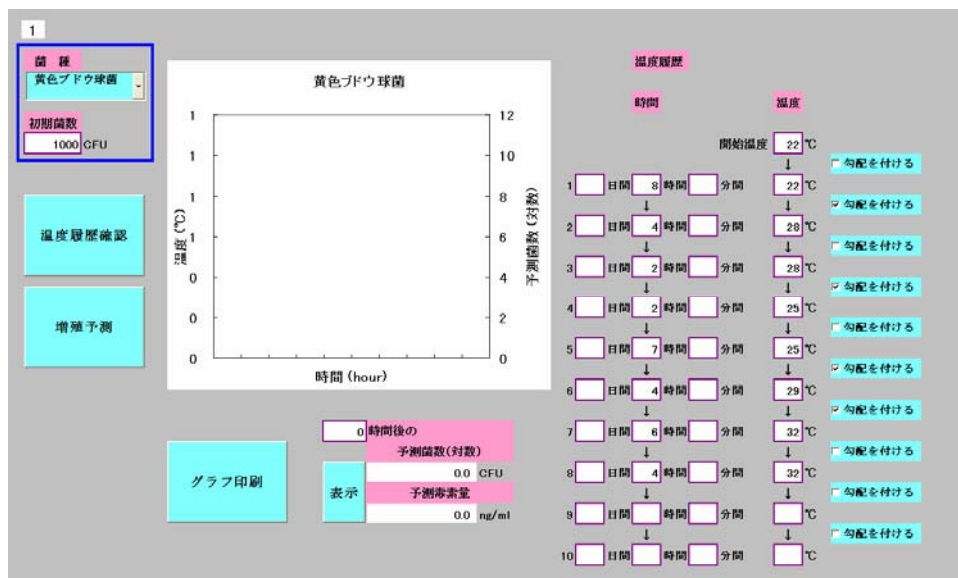


図1. 使用手順-1.

② 温度履歴を入力する（図2）。最初に開始温度を入力し、次に各温度ステップでの時間と温度を入力する。温度勾配のある場合はチェックを入れる。

The screenshot shows the '温度履歴' (Temperature History) input screen. On the right, there is a table with 10 rows. The first row is for the '開始温度' (Starting Temperature) set to 22°C. Subsequent rows have checkboxes for '勾配を付ける' (Add gradient) which are currently unchecked. Each row contains input fields for '日' (Day), '時' (Hour), and '分' (Minute) for the time step, and a '温度' (Temperature) field in °C.

図2. 使用手順-2.

③ 入力した温度履歴を確認する（図3）。「温度履歴確認」ボタンを押し、入力した温度履歴が正しいかをグラフで確認する。温度履歴曲線は赤線で示される。もし、間違っていれば数値を入れ直し、再度「温度履歴確認」ボタンを押して確認する。

The screenshot shows the '温度履歴確認' (Temperature History Confirmation) screen. The '温度履歴確認' button is highlighted with a blue box. The graph on the left now displays a red line representing the temperature history over time. The y-axis is labeled '温度(°C)' and ranges from 0 to 35. The x-axis is labeled '時間(hour)' and ranges from 0 to 37. The red line starts at 22°C at 0 hours, rises to 28°C at 4 hours, drops to 26°C at 8 hours, rises to 32°C at 12 hours, and continues to rise to 35°C at 37 hours.

図3. 使用手順-3.

④「増殖予測」ボタンを押して予測増殖曲線を得る（図4）。予測増殖曲線は青い線で示される。黄色ブドウ球菌の場合はエンテロトキシンの予測産生量を知ることができる。予測産生毒素量は紫色の線で示される。

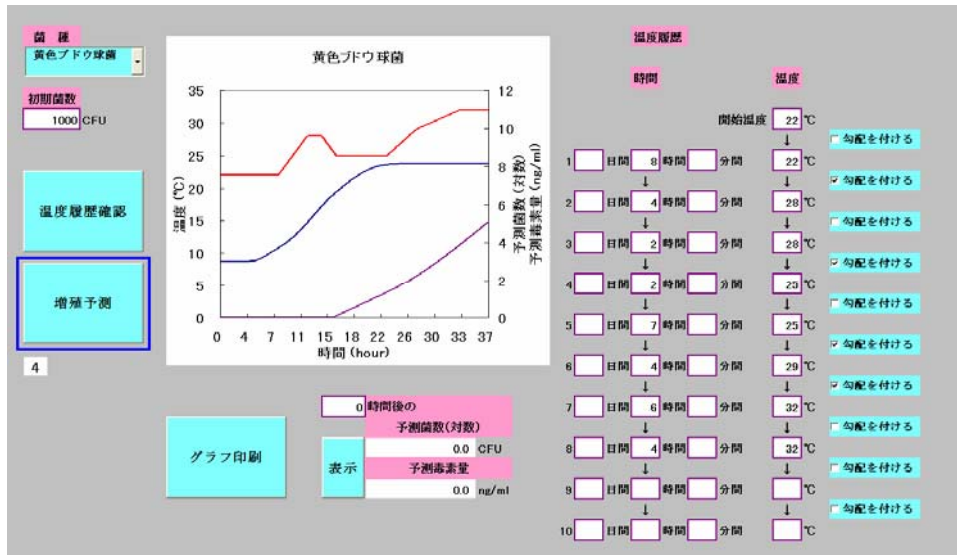


図4. 使用手順-4.

⑤指定した時間での予測菌数を知る（図5）。指定した時間を入力し、「表示」ボタンを押すと予測菌数が得られる。黄色ブドウ球菌の場合はエンテロトキシンの予測生成量を知ることができる。この図では20時間後の値を求めた。

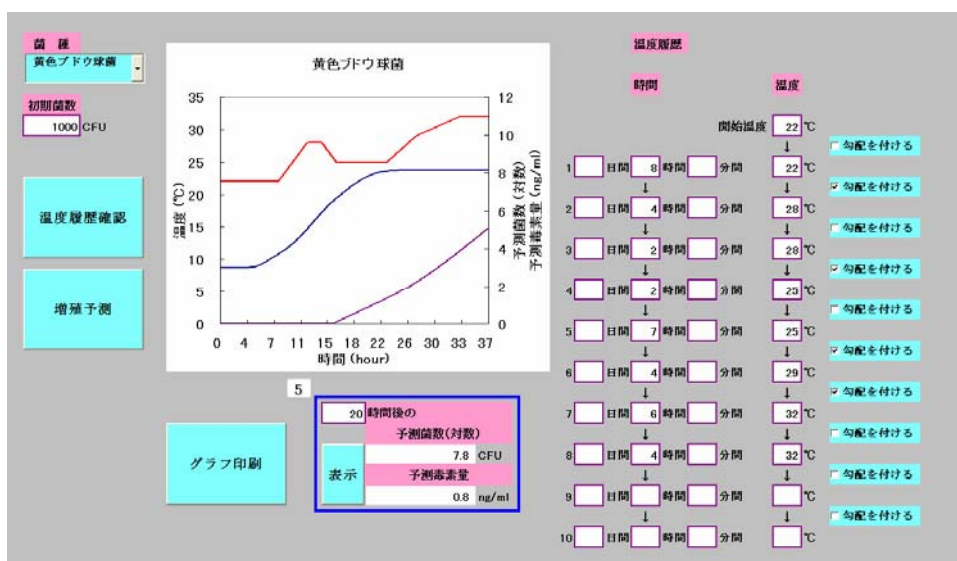


図5. 使用手順-5.

⑥出力した増殖予測曲線を印刷する(図6)。「グラフ印刷」ボタンを押した後、Excelの操作指示に従って印刷することができる。

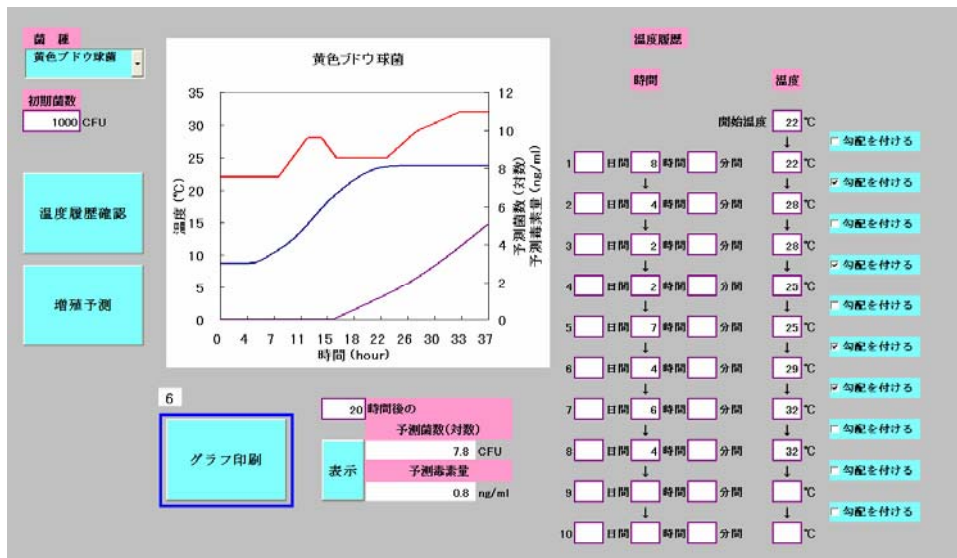


図6. 使用手順-6.

デジタル温度記録計で連続測定した場合も同様に行う(図7)。時間-温度データは右側の表に貼り付け、「増殖予測」ボタンを押す。図7では上記と同じ温度履歴を入力した場合の予測結果を示す。

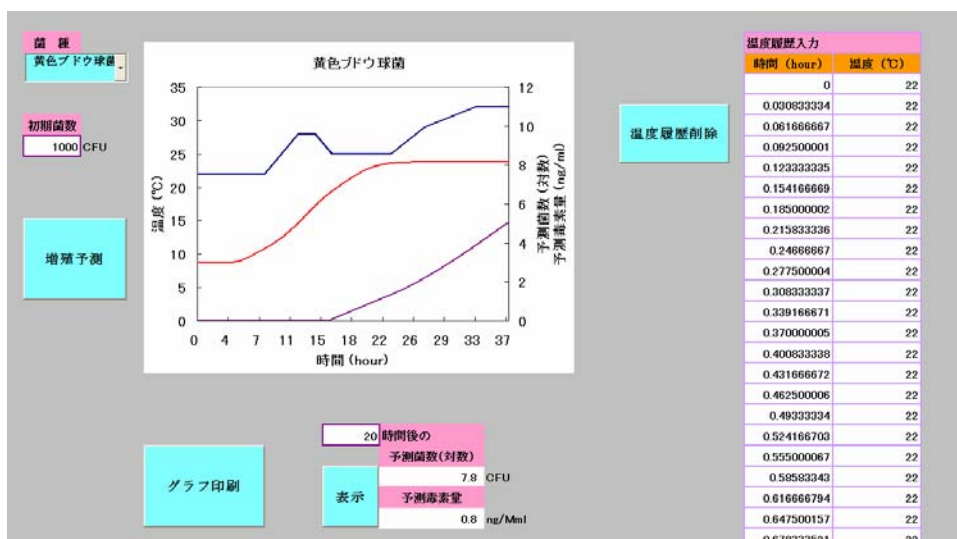


図7. 連続測定温度を入力した場合の予測結果.

4. 増殖予測プログラムの活用

増殖予測プログラムの活用法はいろいろ考えられるが、例を挙げて説明したい。本プログラムでは対象とする食品について危害となり得る有害微生物を選択し、その初期汚染量、次いで温度履歴を入力し、その微生物の増殖を予測する。その予測結果から微生物学的安全性が評価できる。その際、評価基準が必要となる。

一般に食中毒起因細菌の初期汚染量は食品によるがゼロあるいは非常に低いことが多い。そこで、私達の考えではこれらの有害菌については予測結果に明らかな増殖が認められなければ、その食品の微生物学的安全性はほぼ確保されていると考えてよいだろう。例えば、ある有害菌の初期汚染量が 10 CFU/g であった場合、その工程での最終増殖予測結果が 100 CFU/g 以下であればその工程の一応安全性は確保されていると考えてかもしれない。しかし、もっと厳しい基準であれば、増殖予測結果も 10 CFU/g、すなわち増殖を認めないこともあり得る。この判断する基準値は対象微生物あるいは対象食品によって異なるであろう。

例えば、一般細菌数では考え方は有害菌と同じであるが、判断する基準値は有害菌に比べてもっと緩やかになると考えられる。食品の種類によるが生鮮食品では最終予測菌数が例として 10^6 CFU/g 以下であれば微生物学的安全性および品質は確保されていると考えてよいかもしれない。

これらの判断結果に基づいて、その食品をそのまま次の工程に送るか、あるいは破棄・再加工などを行うか選択できる。このようにして、本増殖予測プログラムは食品の微生物学的安全性確保のための道具として活用できると考えられる。

5. 今後の課題

本プログラムは前述したように初めての一般ユーザー向けに開発したものである。まだ対象菌種も 3 種類であり、用いた基質（食品）も液体ブロスおよび牛乳である。ただし、この 3 菌種はそれぞれ黄色ブドウ球菌が乳肉原材料由来の食中毒起因細菌、腸炎ビブリオが海産物由来の食中毒起因細菌、大腸菌が一般的な（通性嫌気性）非病原あるいは病原細菌に対応している。また、私達の最近の大腸菌を用いた実験では、栄養が十分ある環境では液体、固体表面、固体内部（あるいは包装容器内）での増殖はほとんど一致した^{5,7)}。したがって、今回示した増殖予測は一般の食品形態でほぼ当てはまるのではないかと考えられる。ただし、今後さらに多くの菌種および食品でのデータは必要である。

また、微生物は同じ温度でも食品のもつ pH、水分活性、保存物質など
の要因によって増殖は変化する。これらの要因のとり得る値をすべて使
って増殖実測をすることは不可能に近い。しかも食品の pH または水分
活性が同一であっても、含まれる酸、塩あるいは糖の種類によって微
生物の挙動は異なる。そのため、対象とする食品についてできる限り
精度の高い増殖予測をするためには、実際にその食品を使った定常温
度での増殖実測値が必要となる。しかし、これらの要因の濃度はその
食品群ごとにほぼ一定の値であることが多いので、実測データを一度
得ておけば、そのデータは多方面で活用できると考えられる。

今回使用した増殖モデルもどのような温度条件まで予測できるか、そ
の限界を知っておくべきである。現在までは各種の変動温度に対して
高い精度で予測できているが、どの程度の大きな温度変化、速い温
度変化、あるいはどの範囲の温度帯にまで適用可能であるかは未知
である。今後、本モデルの改良も含めて、さらに検討する必要がある
だろう。

また、コンピュータプログラムにおいても、ユーザーの要望に沿ってさ
らに使いやすくし、また新たな機能を加えるなどの改良が今後必要と
なるかもしれない。

一方、食品の温度はその部位時間によって異なり、しかも時間によ
って変化する。対象食品上の表面温度を連続的に測定し、その値から
食品内部の温度を推測し、得られた結果から本増殖プログラムを使っ
て汚染微生物の増殖予測を行うシステムを、現在私達は検討している。
今後、このような増殖予測システムが開発されれば、少ない測定点で
の温度から食品全体の微生物増殖予測も可能と考えられる。

参考文献

1. Gibson, A. M., Bratchell, N., Roberts, T. A. 1987. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. J. Appl. Bacteriol., 62, 479-490.
2. Baranyi, J., Roberts, T. A., McClure, P. 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. Food Microbiol. 10, 43-59.
3. Baranyi, J., Robinson, T. P., Kaloti, A., Mackey, B. M. 1995. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. Int. J. Food Microbiol. 27, 61-75.
4. H. Fujikawa, A. Kai, and S. Morozumi. 2003. A New Logistic Model for Bacterial Growth. Journal of the Food Hygienic Society of Japan. 44:155-160.
5. H. Fujikawa, A. Kai, and S. Morozumi. 2004. A New Logistic Model for *Escherichia coli* Growth at Constant and Dynamic Temperatures. Food Microbiology. 21:501-509.
6. H. Fujikawa, A. Kai, and S. Morozumi. 2004. Improvement of New Logistic Model for Bacterial Growth. Journal of the Food Hygienic Society of Japan. 45:250-254.
7. H. Fujikawa and S. Morozumi. 2005. Modeling Surface Growth of *Escherichia coli* on Agar Plates. Applied and Environmental Microbiology 71:7920-7926.
8. H. Fujikawa and S. Morozumi. 2006. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. Food Microbiology. 23:260-267.
9. 藤井 建夫、木村 凡 「腸炎ビブリオ血清型 O3:K6 株の基礎データ構築」平成 16 年度食品製造工程管理情報高度化促進事業病原微生物データ分析実験報告書.