

平成 18 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 18 年度
病原微生物データ分析実験作業
成果報告書

「各種条件下における腸炎ビブリオ増殖予測モデルの開発」

平成 19 年 2 月
東京都健康安全研究センター
藤川 浩 課長補佐

平成 18 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

各種環境条件下における腸炎ビブリオの増殖解析と予測

東京都健康安全研究センター 微生物部 藤川 浩

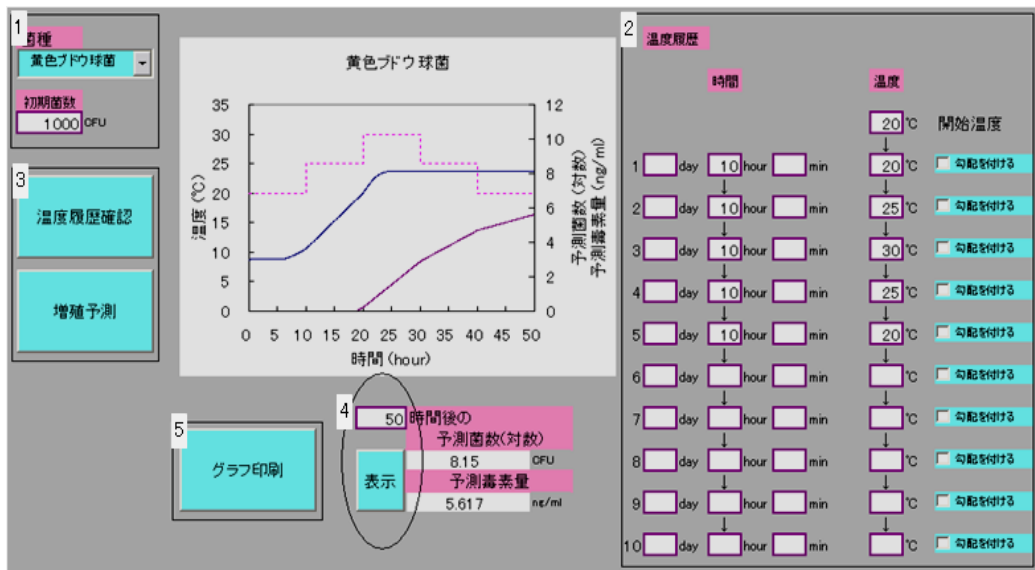
1. 目的

有害微生物による食中毒・腐敗の発生を減少させる上で、食品をいかに適切な環境条件下で製造し、流通させるかは非常に重要な管理点である。その環境要因の中で、製造および流通の過程で変動し、しかも最も微生物増殖に大きな影響を与えるものは、温度である。各過程で食品が受けた温度履歴から汚染している有害微生物の増殖を予測できれば、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)}。バラニーモデルは仮説に問題点があり、ゴンペルツモデルは本質的に変動温度に対応できない。最近私たちは新ロジスティックモデルという新たな増殖モデルを開発した³⁾。本モデルは定常および変動温度条件下で大腸菌、ブドウ球菌などの増殖を精確に予測できた⁴⁻⁸⁾。

昨年度の本センター食品製造工程管理情報高度化促進事業では、この増殖モデルを使った、微生物増殖予測のための新たなプログラムを開発した⁹⁾ (図1)。このプログラムでは、ユーザーは増殖モデルに関する知識を必要とせず、温度データを入力すると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。

今回、代表的な食中毒起因菌の一つである腸炎ビブリオの増殖について、温度以外に水分活性（塩分濃度）および水素イオン濃度を加えた環境条件下での増殖データを上記のモデルで解析し、その結果を用いて増殖予測を検討した。

図 1. 新ロジスティックモデルを用いた増殖予測プログラム
数字は操作手順を示す。



2. 方法

2.1. 増殖予測モデル

増殖モデルは私たちが最近開発した新ロジスティックモデルを用いた。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³⁻⁸⁾。その式を下に示す。

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

ここで N : 菌数、 t : 時間、 k : 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。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³⁻⁸⁾。

2.2. 増殖データ

今回用いた腸炎ビブリオ増殖 (液体培地) 条件は以下の通りである。これらのデータはすべて東京海洋大学藤井・木村先生から譲渡された。

温度 : 35、30、25、20、15°C

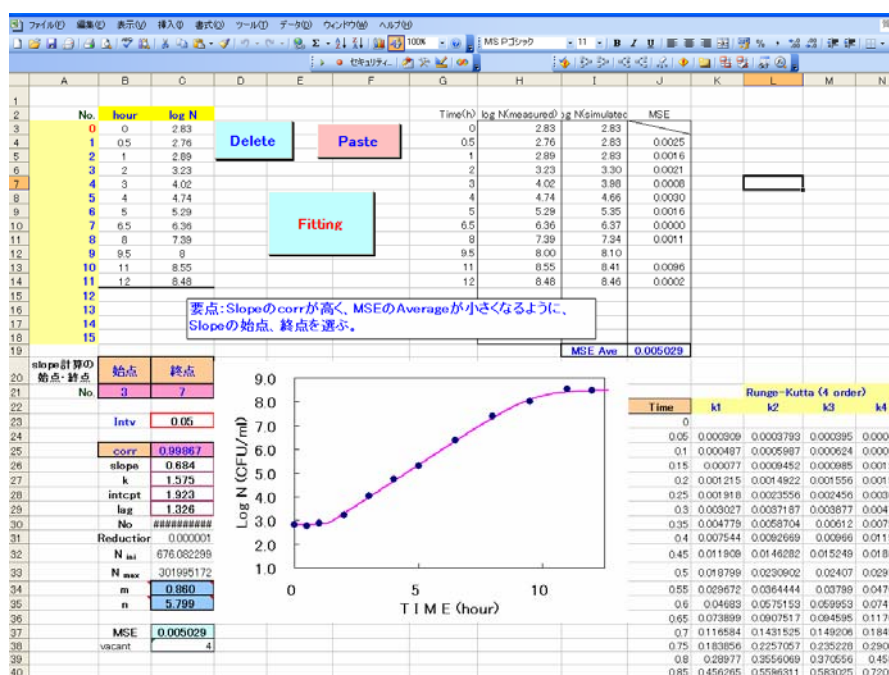
水分活性 : 1.0、0.99、0.98、0.97、0.955

pH : 8.0、7.0、6.0、5.5、5.0

2.3. 新ロジスティックモデルによる増殖解析プログラムの開発

新ロジスティックモデルによる増殖データ解析の迅速化を図るため、モデル中のパラメータ値を瞬時に求めるプログラムを開発した(図2)。このプログラムはMicrosoft Excelを使って作られ、時間と菌数の値を入力すると、瞬時に最適な増殖曲線を描き、モデル中のパラメータ k 、 m 、 n を求めることができる。ここで k は対数増殖期の傾き、 m は対数増殖期後期の曲がり方(曲率)、 n は対数増殖期の開始時期(ラグタイムの長さ)に関係するパラメータである。

図2. 新ロジスティックモデルを用いた増殖解析プログラム



2.4. 環境要因モデル

各種環境条件下での増殖データに対して得られた新ロジスティックモデルパラメータ値を多項式モデル(式(2))で解析した。

$$k = aT^2 + bS^2 + cP^2 + dTS + eSP + fPT + gT + hS + iP + j \quad (2)$$

ここでは、式中のパラメータ k を対象とした式を表す。 T :温度、 S :水分活性(塩濃度)、 P :pH。 $a, b, c, d, e, f, g, h, i, j$ は係数である。パラメータ k に対して実測値と推測値の差が最小となるような係数 a, b, c, \dots の値を求めた。ここでは、Excel中の Solver を用いた。他のパラメータ m, n についても同様な解析を行なった。

3. 結果

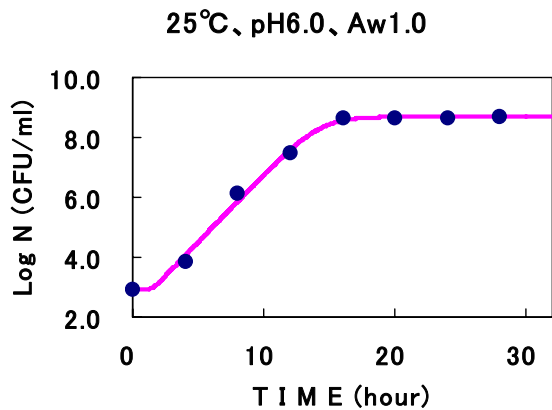
3.1. 腸炎ビブリオ増殖の新ロジスティックモデルによる解析

各種環境下での本菌の増殖挙動を新ロジスティックモデルを使って解析した。その結果、図3A, Bに示すように、ほとんどの増殖挙動は本モデルで精確に表せた。ただし、条件によっては菌数が一度定常期まで増加した後、減少した場合もあった。この場合は定常期までを解析した。

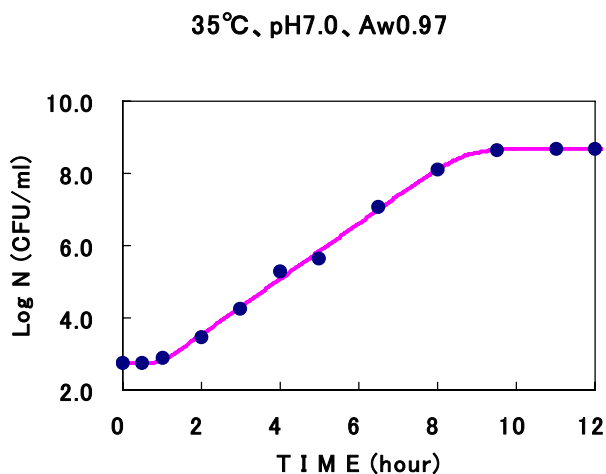
図3. 腸炎ビブリオ増殖の新ロジスティックモデルによる解析例

●：実測値、曲線は新ロジスティックモデルによって描かれた。

A



B

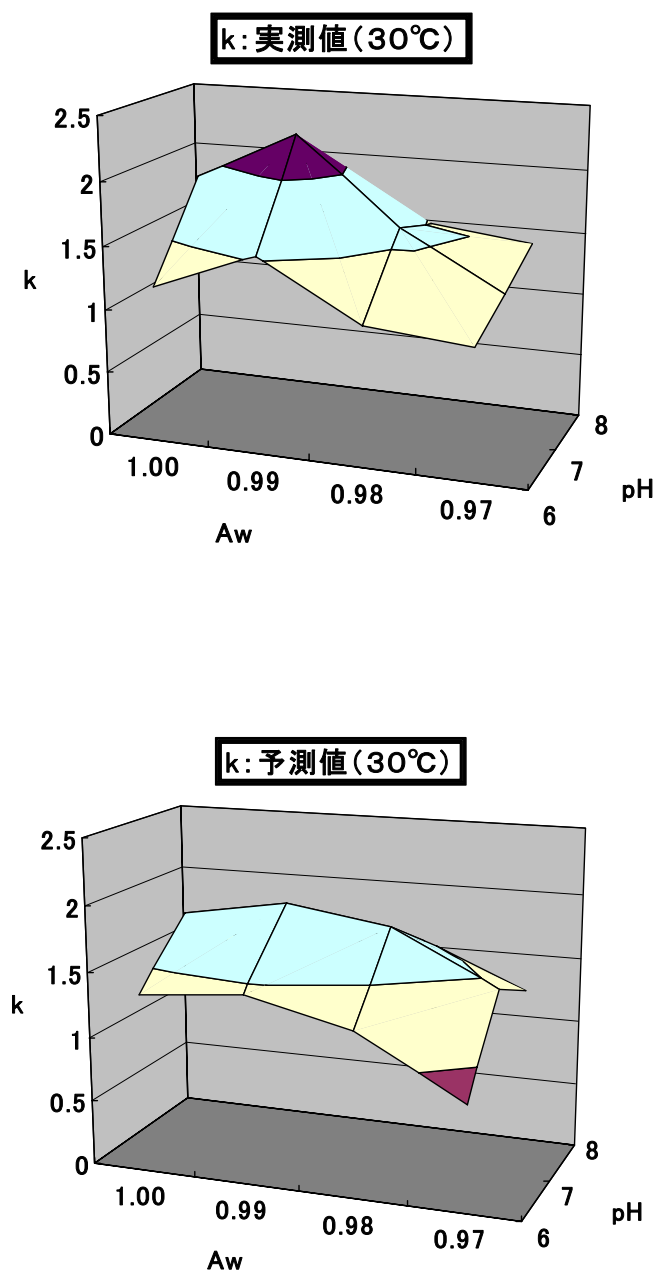


ここで、パラメータの値はA. $k = 1.04$, $m = 0.760$, $n = 7.47$ およびB. $k = 1.77$, $m = 1.47$, $n = 6.81$ であった。

3.2. 各種環境下におけるパラメータ値

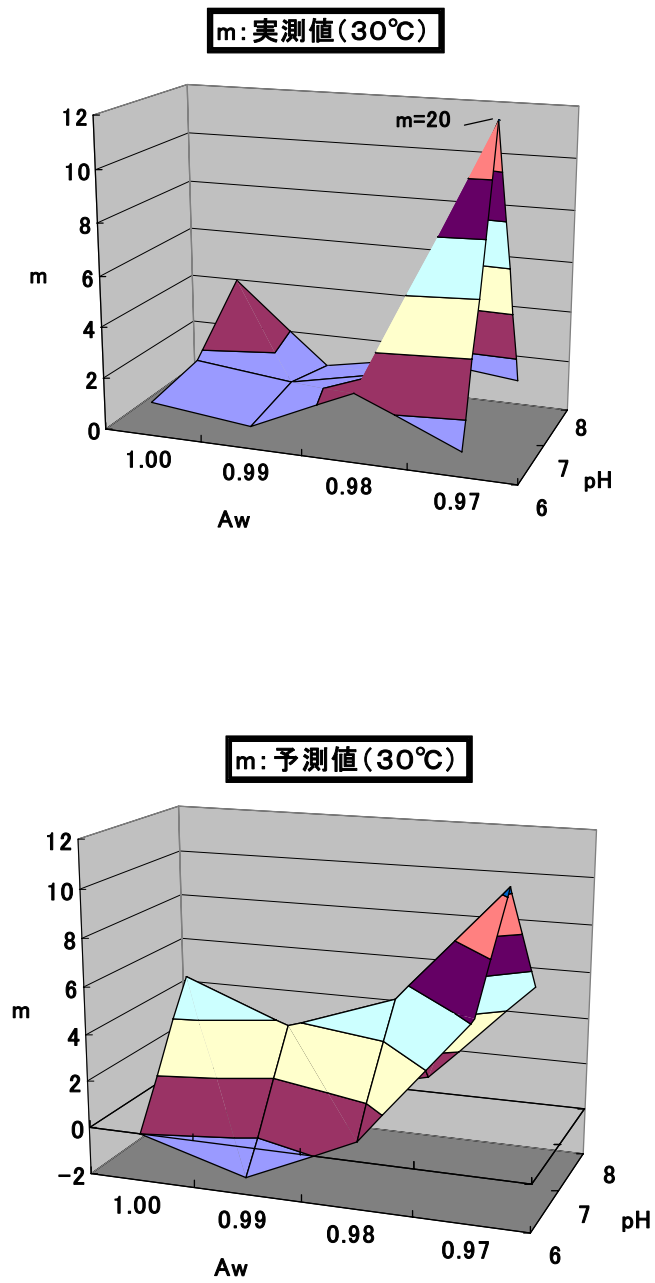
各種環境下での本菌の増殖挙動を新ロジスティックモデルを使って解析した結果得られた、3パラメータの値を多項式モデルによって解析した。ここでは30°Cでのデータ解析の結果を例示する。 k は図4に示すように、実測値では水分活性0.99、pH7.0で最大値が得られ、予測値でもほぼ同様なパターンが得られた。

図4. k の実測値と推定値



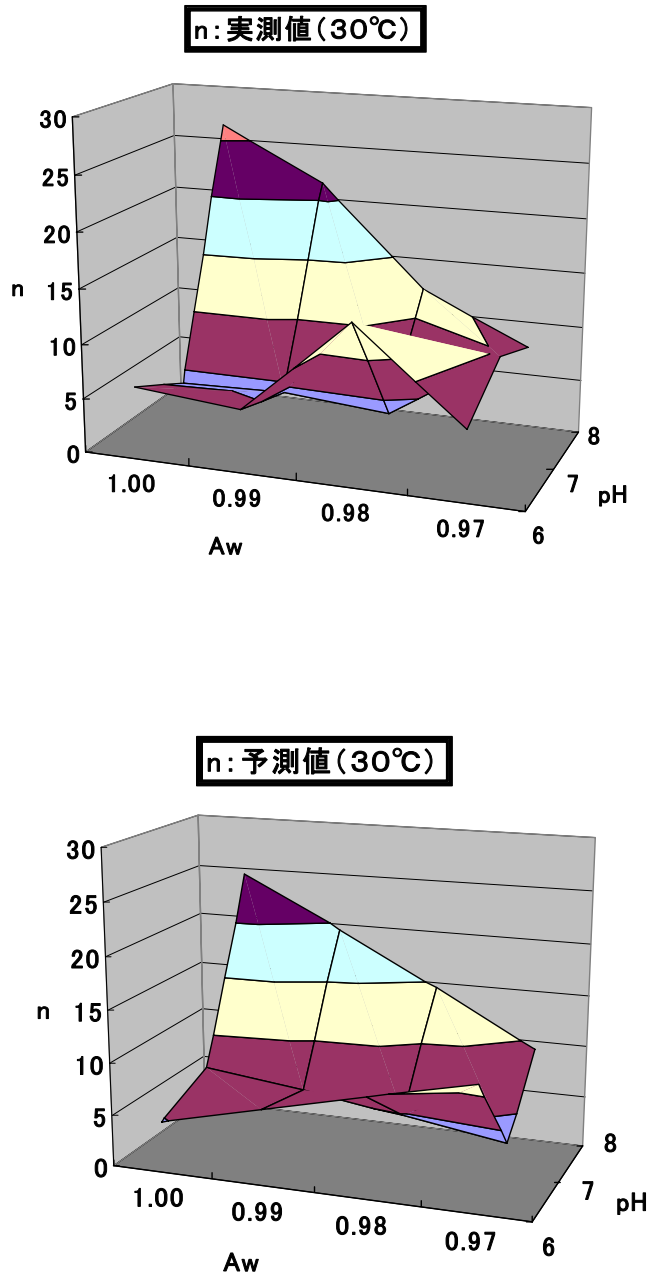
次に、 m は図5にみられるように、実測値と予測値はその傾向は類似したが、値自体はやや異なった。

図5. m の実測値と推定値



また、 n に関しては図 6 に示すように、両者はほぼ等しい値を示した。

図 6. n の実測値と推定値



3.3. 推定パラメータ値による増殖予測

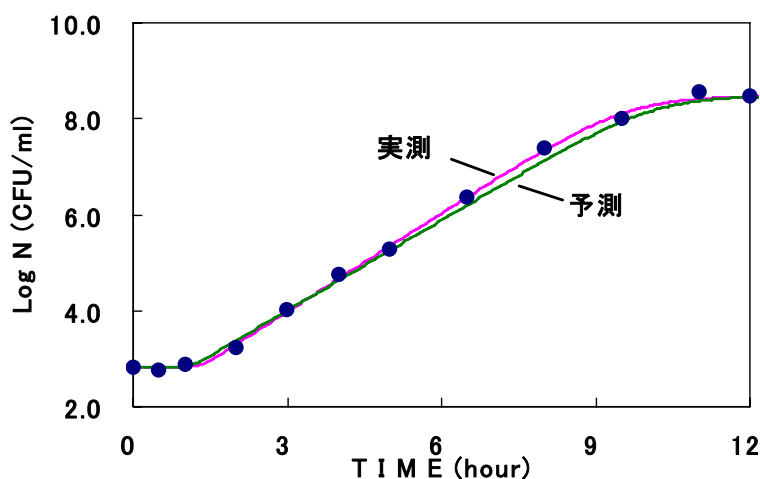
上記の解析の結果得られた3パラメータの予測値を用いて、ある環境条件での増殖を予測し、実測データと比較した。ここでは、上記の30°Cでの増殖を予測した。ただし、 m は予測値と実測値が大きく異なることがあり、また増殖曲線にそ

れほど大きな影響を与えないため、値を1に固定した。その結果、図7に示すように、予測曲線は実測データとよく一致した。

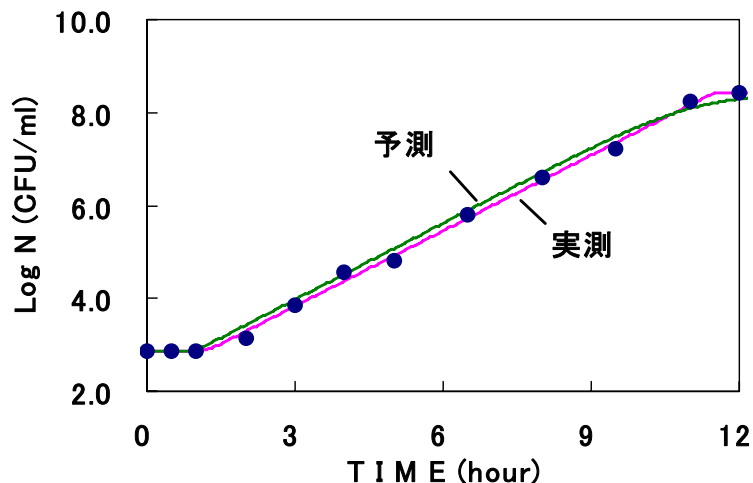
図7. 予測パラメータ値を用いた各種環境条件下での増殖予測

●：実測値、曲線は新ロジスティックモデルによって描かれた。

A. 30°C、pH 6.0、Aw 0.99



B. 30°C、pH 6.0、Aw 0.98



ここで、Aにおいて実測パラメータ値は $k = 1.58$ 、 $m=0.86$ 、 $n=5.80$ 、予測パラメータ値は $k = 1.45$ 、 $m=1$ (固定)、 $n=7.25$ であった。Bでの実測パラメータ値は $k = 1.25$ 、 $m=20$ 、 $n=7.87$ 、予測パラメータ値は $k = 1.26$ 、 $m=1$ (固定)、 $n=9.56$ であった。

4. まとめ

今回、各種環境条件下での腸炎ビブリオ増殖データを、新ロジスティックモデルを用いて解析した。ほとんどのデータは本モデルで精確に表すことができた。得られたモデルのパラメータ値を多項式モデルで解析した。環境条件から推定したパラメータ値を新ロジスティックモデルに代入し、本菌の増殖曲線を予測した。得られた増殖曲線は実測値とよく一致した。これらの結果から、今回示した解析・予測方法は各種環境条件下での微生物予測に応用できることが示唆された。

今後、この方法が実際の食品および原材料においても有効であるかを検証する必要がある。

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. 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.
4. 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.
5. H. Fujikawa and S. Morozumi. 2005. Modeling Surface Growth of *Escherichia coli* on Agar Plates. Applied and Environmental Microbiology 71:7920-7926.
6. H. Fujikawa and S. Morozumi. 2006. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. Food Microbiology. 23:260-267.
7. H. Fujikawa, K. Yano, and S. Morozumi. 2006. Characteristics and modeling of *Escherichia coli* growth in pouched food. Journal of the Food Hygienic Society of Japan. 47:95-98.
8. H. Fujikawa, K. Yano, and S. Morozumi. 2006. Model comparison for *Escherichia coli* growth in pouched food. Journal of the Food Hygienic Society of Japan. 47:115-118.

9. 藤川浩、矢野一好、諸角聖、木村凡、藤井建夫. 2006. 各種温度条件下における微生物増殖予測プログラムの開発. 日本食品衛生学雑誌 47:288-292.