

平成 19 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 19 年度 病原微生物データ分析実験作業 成果報告書

「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」

平成 20 年 2 月  
国立大学法人 東京農工大学大学院  
藤川 浩教授

平成 19 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

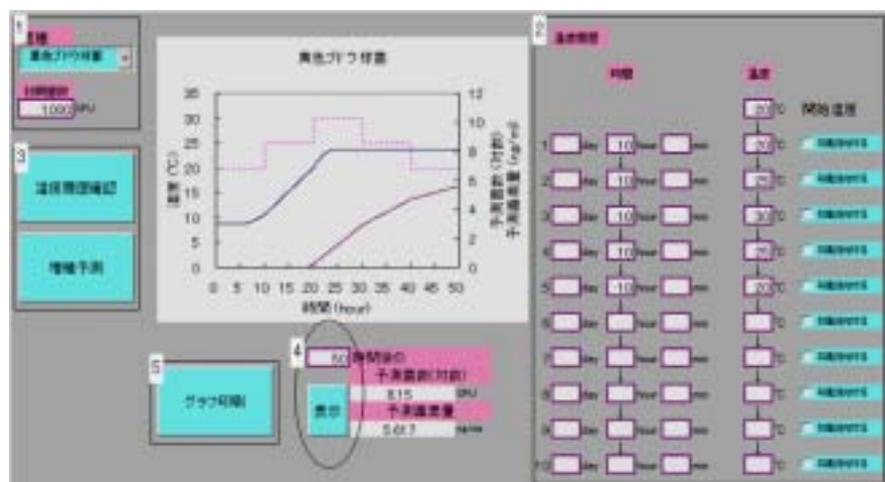
東京農工大学大学院 藤川 浩

1. 目的

食品を汚染する有害微生物による食中毒事件および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である。その環境要因の中で、最も微生物増殖に大きな影響を与えるものの一つとして温度がある。一方、食品添加物による微生物制御は安全性の面からも消費者は不安感を持っている。したがって、特に生鮮食品ではいかに温度管理、すなわち低温での製造・流通ができているかが微生物増殖に関して大きな課題である。もし、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<sup>1, 2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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<sup>4-8)</sup>。

平成 17 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<sup>9)</sup>(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専門的な知識を必要とせず、菌種・初期菌数を指定し、次に温度データを入力すると瞬時に対象微生物の増殖予測結果がコンピュータ上に表示される。

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。



平成 18 年度は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。しかし、18 年度はまだ全実験データを入手できなかった。そのため、今年度は腸炎ビブリオの全増殖データについて解析を行い、それらを用いてある環境条件下での増殖予測を検討した。さらに、これらの解析結果を基に本菌の増殖予測プログラムの開発を検討した。

## 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<sup>3-8</sup>。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。ただし、 $k$ 、 $m$ 、 $n$ はすべて正の値をとる。新ロジスティックモデルは数値解法（ルンゲ kutta 法）を用いて解いた<sup>3-8</sup>。

## 2.2 . 増殖データ

腸炎ビブリオの増殖実測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。今回解析に用いた増殖条件（液体培地）は以下の通りである。

温度：35、30、25、20、15

食塩濃度：0.5、4.5、6.5、8.9(%) (水分活性ではそれぞれ1.0、0.99、0.97、0.955に相当する。)

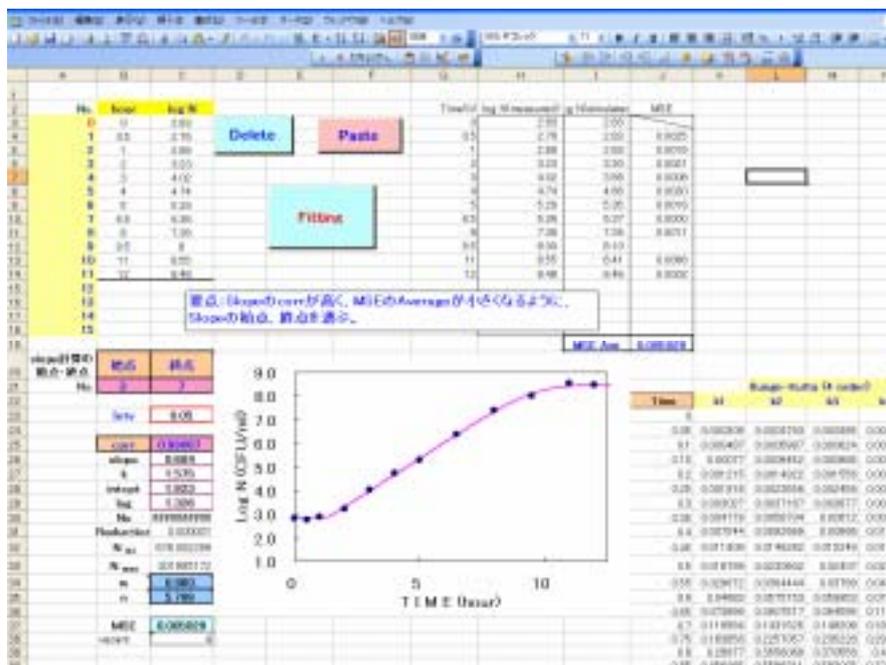
pH：8.0、7.0、6.0、5.5

なお、ここでは食品の水分活性を用いずに、食塩濃度を環境要因とした。これは食品の製造管理上、食塩濃度の方が実用性で適しているためである。

## 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 2003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で解析した。多項式モデルでは各パラメータを次の式のように環境要因である温度、塩分濃度、pH で表す。ここではパラメータ  $k$  を 2 次式で表したものを示した。

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

ここで、 $T$ :温度、 $S$ :食塩濃度、 $P$ :pH。  $a, b, \dots, j$  は係数である。 $k$  に対して式(2)について実測値と推測値の誤差が最小となるような各係数の最適値を最小 2 乗法によって求めた。ここでは、Microsoft Excel 2003 中の Solver を用いた。誤差をさらに小さくするため、多項式の次数を 3 次、4 次に上げて解析した。 $k$  を 3 次式で表したものを下に示す。

$$k = aT^3 + bS^3 + cP^3 + dT^2S + eS^2P + fP^2T + gT^2P + hS^2T + iP^2S + jTSP \\ + kT^2 + lS^2 + mP^2 + nTS + oSP + pPT + qT + rS + sP + t \quad (3)$$

さらに、実測値の無い条件に対して、異常な値を推定しないかを検討した。

パラメータ  $n$  についても同様な解析を行なった。

## 2.5 . 増殖予測プログラムの作成

増殖モデル (新ロジスティックモデル) を基に、そこで用いるパラメータ値を多項式モデルを使って求め、増殖予測プログラムの作成を行なった。

すなわち、本予測プログラムでは、ユーザーが入力した条件 (温度、塩分濃度、pH) に適合するパラメータ  $k$  および  $n$  の値を多項式モデルを使って求め、その値を新ロジスティックモデルに代入して増殖曲線を予測した。パラメータ  $m$  は増殖曲線へ与える影響が少ないため、その値を 1 に固定した。プログラム作成は Microsoft Excel 2003 を使って検討した。

### 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

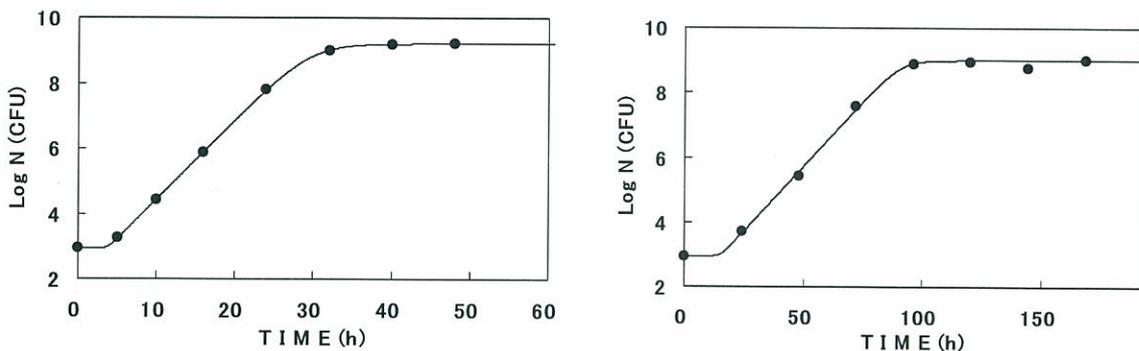
各種環境下での本菌の増殖挙動を新ロジスティックモデルを使って解析した。その結果、図3A, Bに示すように、ほとんどの増殖挙動は本モデルで精確に表せた。ただし、条件によっては菌数が一度定常期まで増加した後、減少した場合もあった。この場合は定常期までを解析した。

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. 温度 20℃、pH 7、食塩 6.5%

B. 温度 20℃、pH 7、食塩 8.9%



#### 3.2. 各種環境下におけるパラメータ値の推定

各種環境下で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パラメータの値を多項式モデルによって解析した。

$k$ については多項式の次数を2, 3, 4と上げるほど、推定値と実測値の誤差は減少した(表1)。しかし、4次式ではある環境条件を入力すると異常な推定値が現れたため、3次の多項式を用いることとした。

$n$ については3次式で誤差が最小となったため、これを用いることとした(表1)。

表1. 多項式による推定値と実測値の誤差 (2乗平均値)

	2次式	3次式	4次式
$k$	0.0522	0.0132	0.0062
$n$	17.3	12.3	21.9

### 3.3. 解析データ範囲の変更

$k$ および $n$ について多項式モデルとしてそれぞれ3次式を用いて、各種条件下での増殖を予測し、実測値と比較した。その結果、多くの条件下で実測値と予測値とはほぼ一致したが、一部の条件下では大きく異なった(図4)。特に誤差が大きく異なった環境条件領域は食塩濃度8.9(%)およびpH5.5の領域であった(図5)。

図4. 環境要因からの増殖予測曲線

●: 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. 温度 30℃、食塩 6.5%、pH 5.5

B. 温度 30℃、食塩 8.9%、pH 6

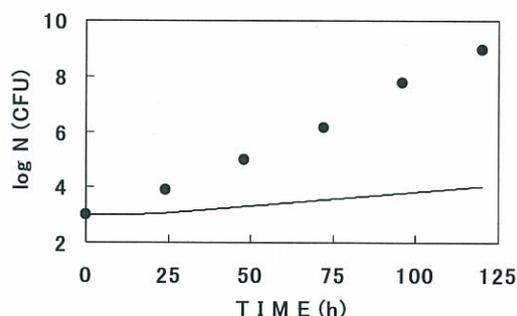
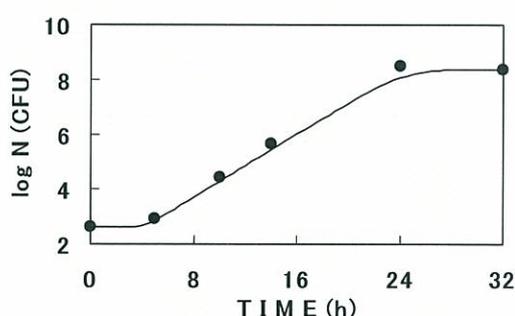


図5. 環境条件領域の変更. ピンク色の領域は予測値と実測値が明らかに異なったため、データ解析から除いて再度解析を行なった。

	p H			
食塩濃度(%)	5.5	6	7	8
0.5				
4.5				
6.5				
8.9				

そのため、これらの予測の改善できない条件を削除した条件下で、再度 $k$ および $n$ についてそれぞれ3次多項式による最適な係数値を求めた(図5)。

このようにして得られたパラメータ値はこの条件内で実測した条件以外の環境条件でも異常な値はみられなかった。推定値と実測値の誤差(2乗平均値)は $k$ および $n$ について0.011および11.5となり、条件を制約したことによって表1と比べ、値が減少した。

さらに、 $k$ および $n$ について実測した菌数と予測菌数との誤差が最小になるように係数を求めた。その結果、 $k$ および $n$ にそれぞれ1、1.3の係数を掛けることで

最適値が得られた。

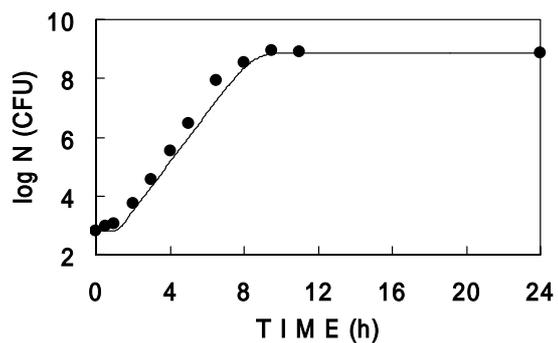
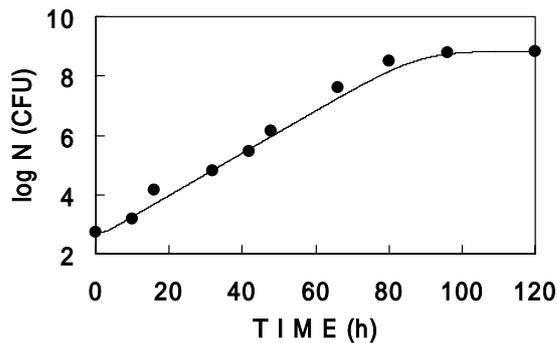
以上の解析結果を用いて腸炎ビブリオの増殖予測を行なった結果、実測値との良い一致が認められた。(図6)

図6. 制限条件領域における増殖予測

: 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. 温度 15 、食塩 6.5%、pH 7

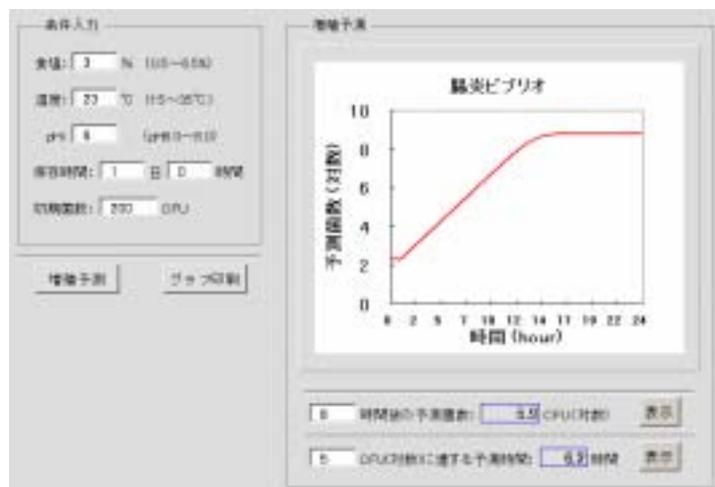
B. 温度 30 、食塩 4.5%、pH 7



#### 4. 増殖予測プログラムの作成

以上のような解析過程を経て、腸炎ビブリオ増殖予測プログラムを作成した(図7)。入力項目としては、腸炎ビブリオの環境要因(温度、食塩濃度、pH)、初期菌数および保存時間である。各環境要因にはその適用範囲を明示した。出力としては、入力条件に応じた増殖予測曲線が描かれ、印刷ができる。さらに保存中の任意の時間における予測菌数(対数)、設定菌数(対数)までの予測到達時間も出力できる。

図7. 腸炎ビブリオ増殖予測プログラム(画面)



#### 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。得られたモデルの各パラメータ値は3次の多項式モデルで一部の環境条件を除いてほぼ予測できた。さらに環境条件領域を制限することで、高い精度のパラメータ値が予測できた。得られたパラメータ値を新ロジスティックモデルに代入し、精度の高い増殖曲線が予測できた。以上の解析結果を基に一般ユーザー向けの腸炎ビブリオ増殖予測プログラムが作成された。

#### 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 . 47:288-292.