

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23655

研究課題名（和文）ベイズ推定が解き明かす食品の微生物学的リスクの実態：農場から食卓に至る予測評価

研究課題名（英文）Bayesian estimation for bacterial behavior from farm to fork

研究代表者

小山 健斗（KOYAMA, KENTO）

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：60845907

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：従来の頻度論的なモデリング手法を一新して、ベイズ統計による細菌挙動の予測を行った。ベイズ統計を用いることで、細菌個体の増殖・死滅のタイミングを確率として表現可能とした。確率を用いたモデリングにより、細菌による食中毒の発生を確率として捉えることを補助できる。本研究は、100年前に提案された平均値に基づく頻度論統計からベイズ統計へと計算手法を根本的に変える挑戦的な研究である。具体的には、細菌挙動のリスティアとサルモネラの増殖とバチルスの死滅に焦点を当てた。数理モデリングで用いられる出生死滅過程を応用し、細菌の増殖および死滅のモデル化に成功した。また、実験によって理論値と合致するかを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌集団の動きを一つの細菌に落とし込んで計算をし直した点に本研究の意義がある。一つの細菌は個体差があり、その動きを数理モデルで捉えることが難しかった。ベイズ統計の手法によるばらつきを包括的に扱う試みはカビやウイルスによる健康被害の計算にも応用可能であり関連する研究分野への波及効果が高い。学会においては、リスク評価の観点から確率的なアプローチが重要となっている。モデル作成から予測まで一貫して確率的なモデルを構築可能とした本研究は、健康被害を確率論的に論じる上で重要な役割を担うと考えられる。社会的意義としては、HACCPでの工程管理をお行う際の微生物学的安全性の計算に役立と考えられる。

研究成果の概要（英文）： Bayesian statistic for predicting bacterial population behavior was introduced instead of classical frequentist statistical method. Probabilistic approach based on Bayesian statistic enabled to deal individual cell growth or inactivation using probability distribution. Probabilistic approach would be useful for estimating food borne illness using probability distribution. Approach in this study tries to use probabilistic approach instead of kinetic model, which has been used so far.

Especially, this study focused on growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* and inactivation of *Bacillus*. Pure birth process and pure death process were applied for describing individual cell growth or inactivation. Experiment was performed for validation.

研究分野：予測微生物学

キーワード：ベイズ統計 食中毒 リスティア バチルス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

100年前に計算された缶詰における芽胞菌の死滅時間の計算 [Bigelow, 1919] は細菌挙動の数理モデル化の第一歩目の報告である。現在の多くの数理モデルはこの Bigelow のモデルを原則とし、ある時間における細菌数の平均値を計算する。この平均値に基づく評価により、液卵 (60 °C, 3分30秒) および、牛乳の殺菌時間 (63 °C, 30分) が設定された。

一方で、食中毒が原因となる健康被害のリスクを定量化するには、確率に基づいた計算が必要である [Nauta, 2000]。従来、 $10^4$ 個以上の細菌数を対象に研究が行われてきたが、食品の汚染のほとんどは低濃度での汚染が原因であり [Beuchat et al., 2013], 100個未満の少ない細菌では個体差の影響が表れ平均値での評価が困難である [Aspridou et al., 2015]。平均値による点での評価から、確率による幅での評価への転換が求められている。平均値では細菌挙動の全体を把握できず、リスクを考慮した微生物学的な安全性の評価が不十分である。生物と統計由来のばらつきにより、細菌の増殖・死滅挙動は平均値から離れる。確率論を用い、ばらつきを含めた細菌挙動全体の評価が必要である。近年10年間で、生物由来と統計由来のばらつきは個別に研究されてきた。複数のばらつきを統合した細菌挙動の評価は平均値より現実に即した評価であろう。

### 2. 研究の目的

収穫後から喫食に至る細菌挙動の全体を確率分布で予測するモデルを開発する。平均値から離れた挙動を予測のために、生物由来と統計由来のばらつきを加味する。従来の頻度論的統計では、ばらつきの包括的な処理が困難であった。本研究では、ベイズ統計モデリングで生物由来、統計由来のばらつきを統合する。本研究は、100年前に提案された平均値に基づく頻度論統計からベイズ統計へと計算手法を根本的に変える挑戦的な研究である。

#### (1) 細菌集団の個々の死滅を確率過程により扱う。

Pure birth process の応用により、個々の細菌の死滅を確率として扱う。初期菌数が10個程度と現実的な食中毒汚染を対象にして研究を行う。

#### (2) 細菌集団の個々の増殖を確率過程により扱う。

Pure death process の応用により、個々の細菌の増殖を確率として扱う。初期菌数が10個程度と現実的な食中毒汚染を対象にして研究を行う。

#### (3) Web上の公開データベースを用いて、食品中の細菌挙動の予測を行う。

食品による影響や温度、pH、水分活性といった要素が複雑であるため、機械学習により簡易的なモデルを作成する。既往の研究のデータを活用し、新たな知見を見出す。

### 3. 研究の方法

本研究では、収穫後から喫食に至るまでの細菌集団の増殖・死滅を確率の理論に基づき予測するモデルを構築する。ベイズ統計を用い、生物・統計由来のばらつきを考慮に入れる。

#### (1) 統計由来のばらつきを考慮した細菌集団の増殖・死滅モデルの開発

ベイズ統計モデリングの基礎を構築した。50反復の細菌の増殖実験を行いサルモネラおよびリステリアの増殖挙動のデータを得た。従来は3反復のみの実験が多く、平均値から離れた部分は誤差と考えられたが、本研究では平均値から離れた情報を取るために50反復の実験を行うに至った。

得られた情報を基に、PythonとStanを使ってパチルスおよびリステリア、サルモネラのモデルを別々に作成した。コードは個々の細菌の増殖を加味して書かれた。

#### (2) 生鶏肉、野菜における細菌挙動の評価

収穫後から喫食に至るまでの温度履歴を想定して、細菌を摂取した生鮮食品における細菌数の変動を予測した。培地上のみならず、牛肉、豚肉、魚、野菜におけるリステリアのデータを扱い、種々の細菌の増殖および死滅挙動の予測を試みた。データはWEB上のデータベースのCobaseから抽出した。

#### (3) 生物由来と統計由来のばらつき両方を考慮したモデルの開発

収穫後から喫食に至る細菌挙動の予測を目指した。(1)ではベイズ統計モデル、(2)では機械学習モデル今後、統計由来のばらつきに加え、既往の論文から生物由来のばらつき(菌株差、個体差)を取り出し、モデルを統合する。機械学習と確率モデルを統合することで、平均値のみならずばらつきを予測することを可能とする。

#### 4. 研究成果

ベイズ統計により細菌の増殖死滅の個々のばらつきと統計のばらつきを加味した予測を可能とした(図1)。初年度で作成した細菌挙動のベイズ統計による予測について英文誌に論文投稿までに至った。また、初年度では培地を用いた基礎研究だったのに対して、最終年度では複数の食品(魚、野菜、肉類)での *Listeria monocytogenes* の増殖および死滅の予測を行った。食品ごとで細菌の増殖速度の違いが 従来の研究から指摘されており、細菌を取り巻く環境と細菌挙動は複雑な関係である。機械学習を用いることで、食品と細菌挙動の関係性を推測することができた。食品での細菌挙動を予測できたため、研究の実用性が現実味をおびてきた。今後は、ベイズ統計と機械学習の双方を用いることで、食品といった複雑な環境と細菌数挙動のばらつきに対応したモデルを作成していきたい。

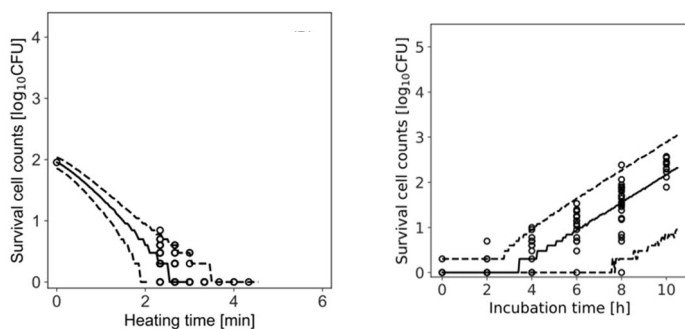


図1 ベイズ統計モデリングによるバチルス死滅予測とリステリアの増殖予測。プロットが実験値、実線が予測の中央値、破線が95%の予測区間(引用文献2)

新たな発見としては、統計モデリングの限界を発見できた点である。個々の食品に対応したモデルを数式化することは難しく、多くの情報を統合する必要性に迫られた。機械学習では多くの情報の関係性を見つけることが容易であり、今後リステリア以外の細菌にも活用できると考えられる。本研究を通して、データ別のモデリング方法の開発に着手することができ、展望が広がる結果となった。機械学習ではラフは細菌数の予測が可能となった(図2)。

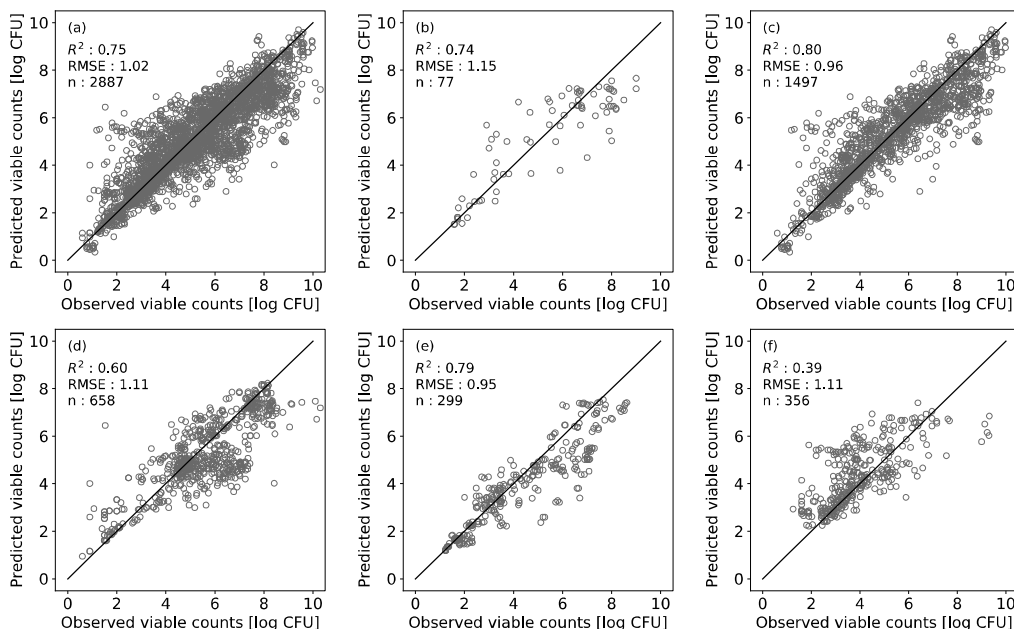


図2 全体(a)、牛肉(b)、培地(c)、豚肉(d)、魚介類(e)、野菜(f)でのリステリアの細菌数予測(引用文献3)

#### 引用文献

1. Koyama, K., Hiura, S., Abe, H., Koseki, S. Application of growth rate from kinetic model to calculate stochastic growth of a bacteria population at low contamination level. *Journal of Theoretical biology*, 2021.
2. Hiura, S., Abe, H., Koyama, K., Koseki, S. Bayesian generalized linear model for simulating bacterial inactivation/growth considering variability and uncertainty. *Frontiers in Microbiology*, 2021.
3. Hiura, S., Koseki, S., Koyama, K. Prediction of population behavior of *Listeria monocytogenes* in food using machine learning and a microbial growth and survival database. *Scientific Reports*, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Koyama Kento, Aspidou Zafiro, Koseki Shige, Koutsoumanis Konstantinos	4. 巻 10
2. 論文標題 Describing Uncertainty in Salmonella Thermal Inactivation Using Bayesian Statistical Modeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2019.02239	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Koyama Kento, Hiura Satoko, Abe Hiroki, Koseki Shige	4. 巻 525
2. 論文標題 Application of growth rate from kinetic model to calculate stochastic growth of a bacteria population at low contamination level	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Theoretical Biology	6. 最初と最後の頁 110758 ~ 110758
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtbi.2021.110758	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiura Satoko, Koseki Shige, Koyama Kento	4. 巻 11
2. 論文標題 Prediction of population behavior of Listeria monocytogenes in food using machine learning and a microbial growth and survival database	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10613 ~ 10613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-90164-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hiura Satoko, Hiroki Abe, Koyama Kento, Koseki Shige	4. 巻 -
2. 論文標題 Bayesian generalized linear model for simulating bacterial inactivation/growth considering variability and uncertainty	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.674364	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kento Koyama, Zafiro Aspidou, Konstantinos Koutsoumanis, Shige Koseki
2. 発表標題 Interpreting and predicting the changes in Salmonella population during thermal inactivation by Bayesian statistical modelling
3. 学会等名 11th International Conference on Predictive Modelling in Food (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------