

ベイズ推定を利用した食中毒細菌の死滅挙動の予測モデルの開発

北海道大学大学院農学院農学専攻

日浦聡子 (Satoko HIURA)

概要

腸管出血性大腸菌やサルモネラは重篤な症状を引き起こす食中毒細菌である。一般的な食中毒細菌は 10^5 個以上の摂取で食中毒を起こす危険があるが、これらの細菌は 100 個未満の摂取で食中毒の発症報告があり、少数の細菌集団の挙動を正確に予測する必要がある。ベイズ推定を利用して、不確実性と変動性を含んだモデルの作成し、細菌挙動の予測を行った。精度は 90% 以上で良好であった。複数の初期菌数の死滅データを統合した予測が行えると言える。本研究は、安部大樹氏、小山健斗助教、小関成樹准教授（北海道大学）にご助言、ご協力いただきました。

1. はじめに

一般的な食中毒細菌は 10^5 個以上摂取すると食中毒を起こす危険があると言われている。一方、腸管出血性大腸菌やサルモネラなど一部の細菌は 100 個未満の摂取でも食中毒の発症報告があり[1,2]、少数の細菌数でも食中毒の原因となり得る。そのため、少数の細菌の生残挙動を正確に推定する必要がある。細菌挙動を予測するためにこれまで主に速度論的な数理モデルが開発されてきた。図 1 に速度論モデルと、実際の細菌の死滅挙動のイメージ図を示す。速度論モデルでは、細菌集団が死滅する時間を平均値を用いて記述し、細菌集団の特定の減少に必要な殺菌時間はただ一つ与えられる。しかし、

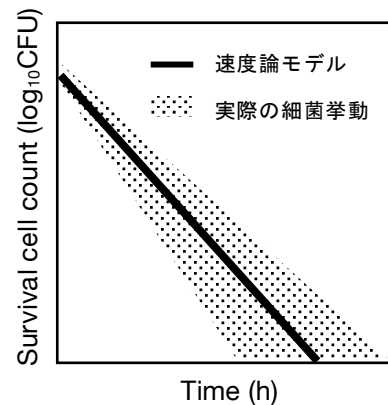


図 1 速度論モデルと細菌の死滅挙動のイメージ図

先行研究から 100 個未満の細菌集団では死滅挙動のバラつきが大きくなることが明らかとなっている[3]。細菌挙動のバラつきは variability (変動性) と uncertainty (不確実性) を含んでおり、これら二つを考慮する必要がある[4]。Uncertainty は真の値に対する知識が欠如していることによるもの、variability は個体差のような、集団が不均一であることによるものとされる[5]。従来速度論モデルでは死滅挙動のバラつきを適切に評価できないため、バラつきを表現可能なモデルの開発が求められている。

近年、細菌数のバラつきを確率分布で記述する確率論モデルが注目を集めており、個々の細菌挙動を加味した推定が行えることが期待されている。また、確率論モデルを利用し、細菌の死滅過程をモンテカルロシミュレーションによって予測する研究も進みつつある。本研究室における昨年までの研究により、確率論モデルとシミュレーションを使用することで、初期菌数と細菌の個体差による variability を表現可能であることが明らかとなった[6, 7]。しかし、uncertainty についてはまだ表現できていないため、uncertainty を考慮した

モデルの開発が求められている。

本研究では、uncertainty の要因としてパラメータのバラつきに着目し、ベイズ推定を用いることで uncertainty と variability の両方を含んだモデルの開発を試みた。これまでのパラメータの推定方法では、得られたデータをモデルにフィッティングさせるとパラメータはただ1つに決定された。ベイズ推定では全てのパラメータに確率分布を与えることで、実際の細菌挙動に近い予測を行えることが期待される。また、初期菌数については、実験のたびに同じ値に調整できるとは限らない。そこで、初期菌数の異なる複数の死滅データをまとめてフィッティングすることが期待される。

2. 方法

(1) 死滅挙動の測定 以下の解析は、Abe[7]の実験データを使用して進めた。低温殺菌乳から分離された *Bacillus simplex* の細菌芽胞を 94°C で加熱し、所定の時間毎に生存細菌数を測定した。初期菌数は 10^n ($n = 1, 2, 3, 4, 5$) (CFU) の 5 条件に設定した。各条件において 3 反復行った。CFU とは Colony Forming Unit の略で、細菌を培地で培養した時にできるコロニーの数を表す。

(2) 解析方法

1) パラメータ推定 実験により得られた生存細菌数はワイブルモデルに回帰した。ワイブルモデルは死滅曲線に柔軟に当てはめることができることから、細菌の死滅挙動について広く用いることができるモデルとして知られている[8]。ワイブルモデルは式 (1) で表され、生存率 (N/N_0) の常用対数は加熱時間 (t) の関数で書ける。実験により得られた初期菌数 (N_0)、生菌数 (N) と加熱時間 (t) から、尺度係数 (δ) と形状係数 (p) の二つのパラメータを求めることで死滅曲線が決まる。

$$\log_{10} \frac{N}{N_0} = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad \text{式 (1)}$$

N_0 : 初期菌数 (CFU), N : 生菌数 (CFU), t : 経過時間, δ : 尺度係数, p : 形状係数
本研究では、二つのパラメータを求める方法としてベイズ推定を用いた。ベイズ推定では、得られたデータは確率分布から生成されたものと見なし、全てのパラメータ (今回の場合は δ と p) で確率分布が得られる。式 (1) を変形すると、

$$N = N_0 / 10^{(t/\delta)^p} \quad \text{式 (2)}$$

となる。先行研究から、10 個未満の細菌集団はポアソン分布に従うと言える[9]。そこで、各時間において得られた生存細菌数 (N) はそれぞれ、平均 $N_0 / 10^{(t/\delta)^p}$ のポアソン分布から取り出されたものと仮定することができ、式 (3) のように書ける。

$$N[i] \sim \text{Poisson}(N_0 / 10^{(t[i]/\delta)^p}) \quad \text{式 (3)}$$

今回は、加熱時間 t (min) と各時間における生存細菌数 N (CFU) からパラメータの推定を行った。ベイズ推定の条件として、Iteration は 10000, warm-up は 5000, chain 数は 4 とした。ベイズ推定には Stan を、その他の解析には Python (version 3.7.0) を用いた。

2) 死滅挙動の予測 パラメータ推定により得られた 20000 セット (5000×4chain) のパラメータを用いて初期菌数 10^3 での死滅挙動を予測した。各パラメータセットに対して、パラメータ (δ と p) と、初期菌数、菌数を予測したい時間を式 (2) に代入し、平均が $N_0/10^{(t/\delta)^p}$ のポアソン分布に従う乱数を一つ発生させた。ここで得られた乱数を、その時間における生存細菌数とした。各パラメータセットに対して乱数を発生させると、各時間で 20000 個の乱数が得られた。20000 個の予測結果を昇順に並べ、上位 1%と下位 1%に当たる点をプロットした。これを 98%予測区間とし、予測結果と実測値と比較した。

3. 結果と考察

図 2 に各初期菌数での死滅挙動の実測値を示す。縦軸に生存細菌数の常用対数値、横軸には加熱時間を示す。図 2 のデータを用いてベイズ推定によりパラメータを推定すると、 δ と p のパラメータセットが 20000 セット得られ、 δ と p の分布はそれぞれ図 3 のようになった。Chain1~Chain4 は Chain 数を表し、繰り返しの数を意味する。どの chain でも同じような分布であれば、計算が収束したと言えるため、今回行なったフィッティングは収束したと言える。得られた 20000 セットのパラメータを式 (2)に代入し、ポアソン分布に従う乱数を発生させることで初期菌数 10^3 (CFU)の細菌集団の死滅挙動を予測した結果を図 4 に示す。図 4 中の点線は 98%予測区間を示している。また、図 4 中のプロットは 60 反復の実測値を示している。精度 (Accuracy)

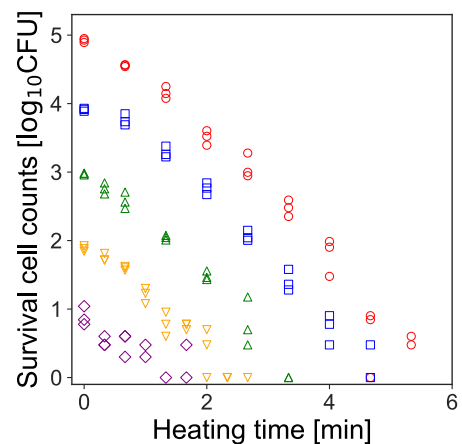


図 2 *Bacillus simplex* を 94°C で加熱した際の生存細菌数の時間変化。図中のプロットはそれぞれ、初期菌数 10^5 [CFU] (○), 10^4 [CFU] (□), 10^3 [CFU] (△), 10^2 [CFU] (▽) and 10 [CFU] (◇)を表す。

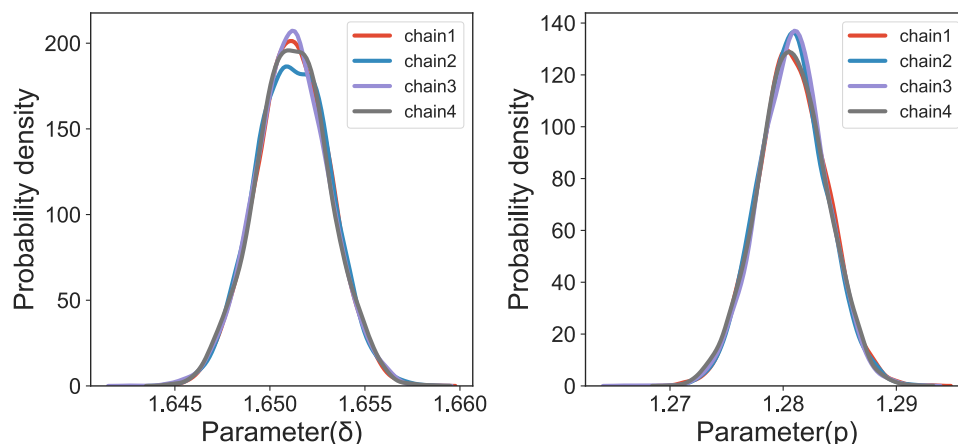


図 3 ベイズ推定により得られたワイブル回帰のパラメータ (δ と p) の確率分布

は 98%で、精度は予測区間内に入った実測値の割合を表している。98%の予測区間というのは、「100 回のうち 98 回は予測範囲内に入であろう範囲」という解釈になる。つまり、今回の場合、60 反復のうち 59 反復が予測区間内に入っていればよいという事になる。精度は 98%であり、高精度で細菌集団の死滅挙動を予測できたと言える。

4. まとめ

複数の初期菌数の速度論データを使用しフィッティングを行うことができた。初期菌数は、毎回同じような値に調整できるとは限らない。本手法により初期菌数が異なる、複数の死滅データをまとめてフィッティングすることが可能となると言える。また、細菌数は常用対数値をとって扱うことが多いため、菌数が 0 (CFU) でデータについてはフィッティングに組み込まれないことが多かった。しかし、今回の手法では生存細菌数は常用対数値を取らずにフィッティングを行なった。そのため、常用対数を取ることのできない菌数 0 (CFU)のデータもフィッティングに組み込むことが可能となったと言える。

種々の微生物挙動を収録しているデータベースには、様々な初期菌数で測定したデータが存在する。本手法は、これらのデータを用いて任意の初期菌数の微生物挙動を予測する際に利用できると期待される。

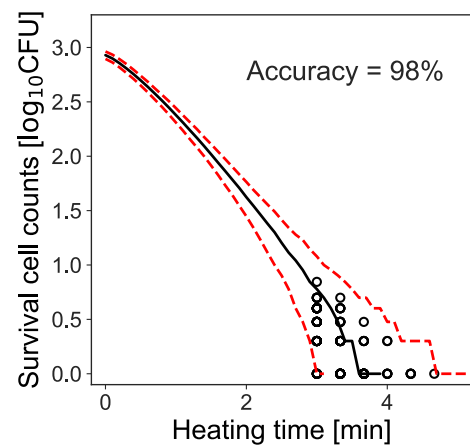


図 4 初期菌数が 10^3 (CFU)での死滅挙動の予測結果。破線は 98%予測区間を示す。プロットは 60 反復の生存細菌数の実測値を示す。

参考文献

- [1] Gill A, Huszczynski G. 2016. Enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 in outbreak-associated beef patties. *Journal of Food Protection* 79(7):1266–1268.
- [2] Hara-Kudo Y, Takatori K. 2010. Contamination level and ingestion dose of foodborne pathogens associated with infections. *Epidemiology and Infection* 139(10):1505–1510.
- [3] Aspridou Z, Koutsoumanis KP. 2015. Individual cell heterogeneity as variability source in population dynamics of microbial inactivation. *Food Microbiology* 45(Pt B):216–221.
- [4] Nauta MJ. 2000. Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. *International Journal of Food Microbiology* 57(1-2): 9–18.
- [5] Elizabeth L Anderson and Dale Hattis. 1999. A. Uncertainty and variability. *Risk Analysis* 19(1): 47-68.
- [6] Kento Koyama, Hiroki Abe, Shuso Kawamura, Shigenobu Koseki. 2019. Stochastic simulation for death probability of bacterial population considering variability in individual cell inactivation time and initial number of cells. *International Journal of Food Microbiology* 290: 125-131.

- [7] Hiroki Abe, Kento Koyama, Shuso Kawamura, Shigenobu Koseki. 2019. Stochastic modeling of variability in survival behavior of *Bacillus simplex* spore population during isothermal inactivation at the single cell level using a Monte Carlo simulation. *Food Microbiology* 82: 436-444.
- [8] van Boekel M. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology* 74:139–159.
- [9] Koyama K, Hokunan H, Hasegawa M, Kawamura S, Koseki S. 2016. Do bacterial cell numbers follow a theoretical Poisson distribution? Comparison of experimentally obtained numbers of single cells with random number generation via computer simulation. *Food Microbiology* 60:49–53.