

図5 菌の死滅動態(かに)

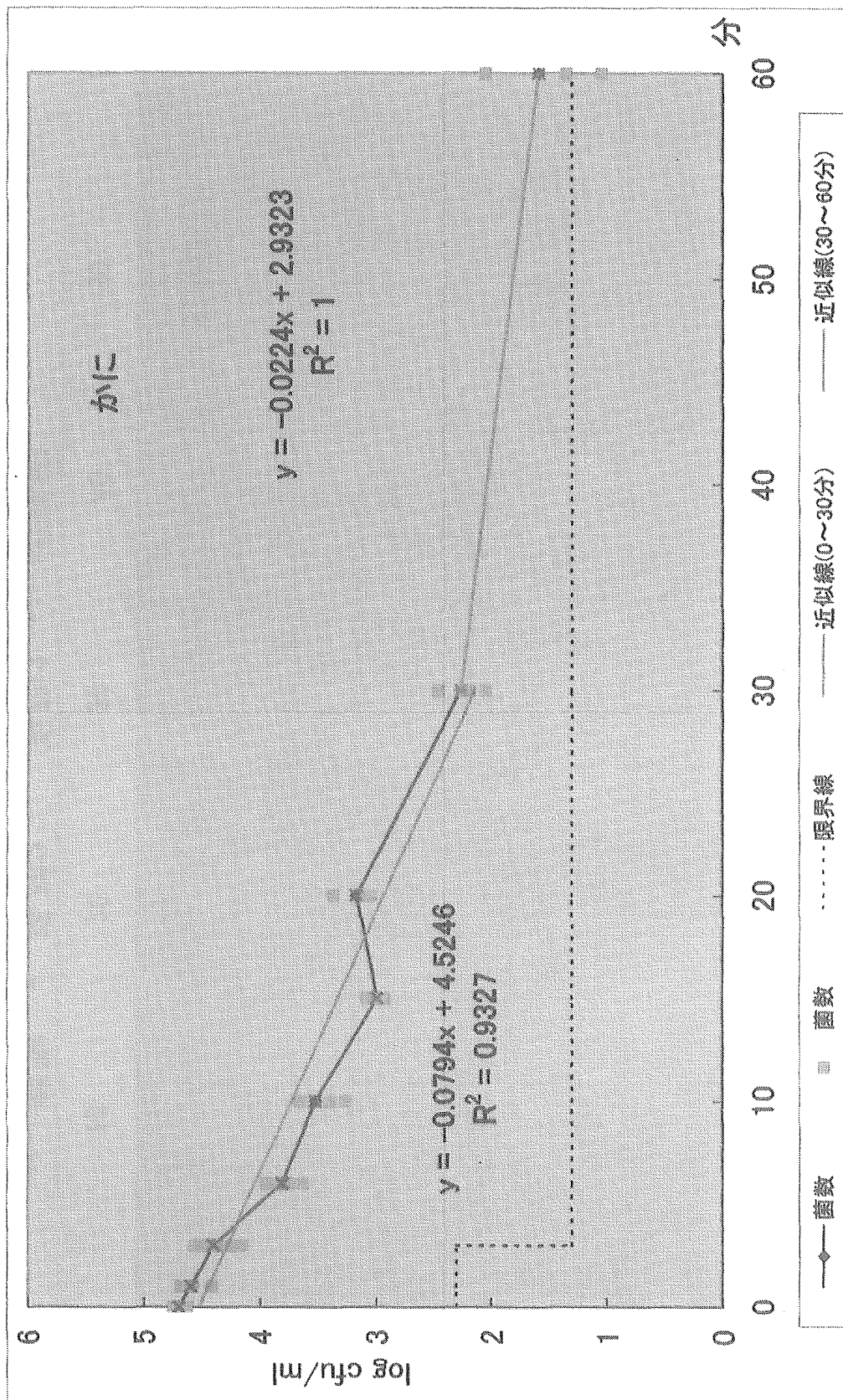


図6 菌の死滅動態(かに)

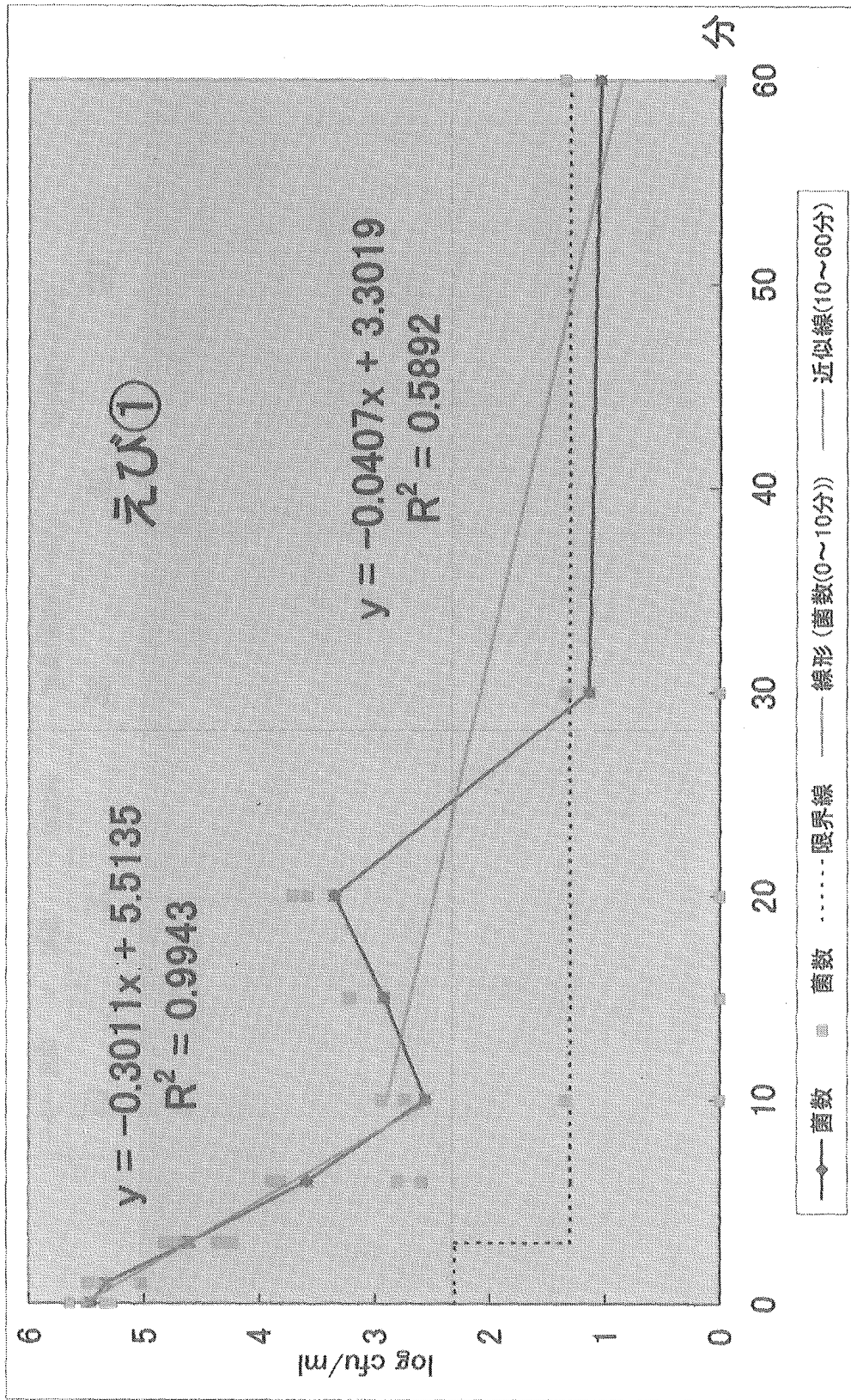


図7 菌の死滅動態(えび)

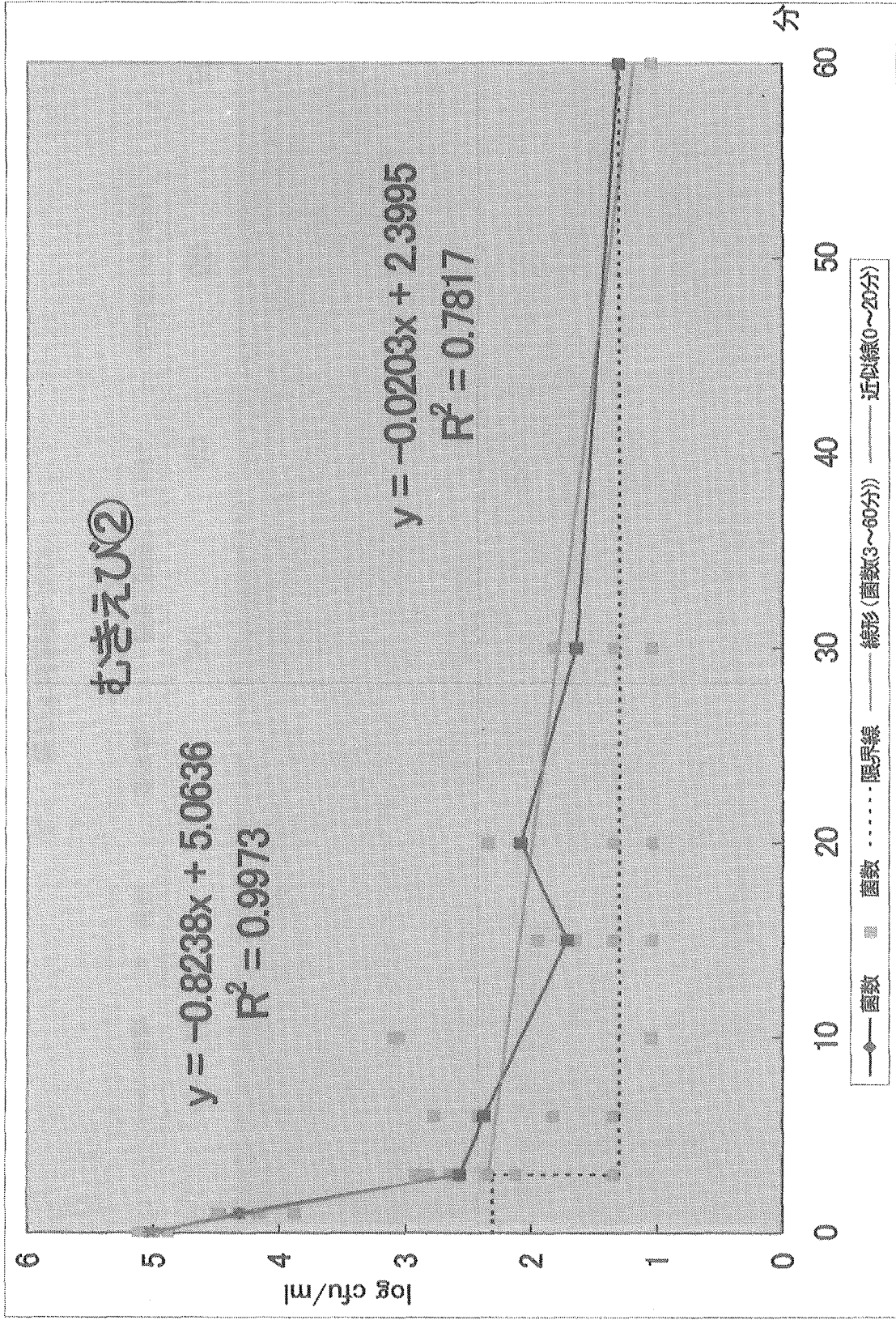


図8 菌の死滅動態(えび)

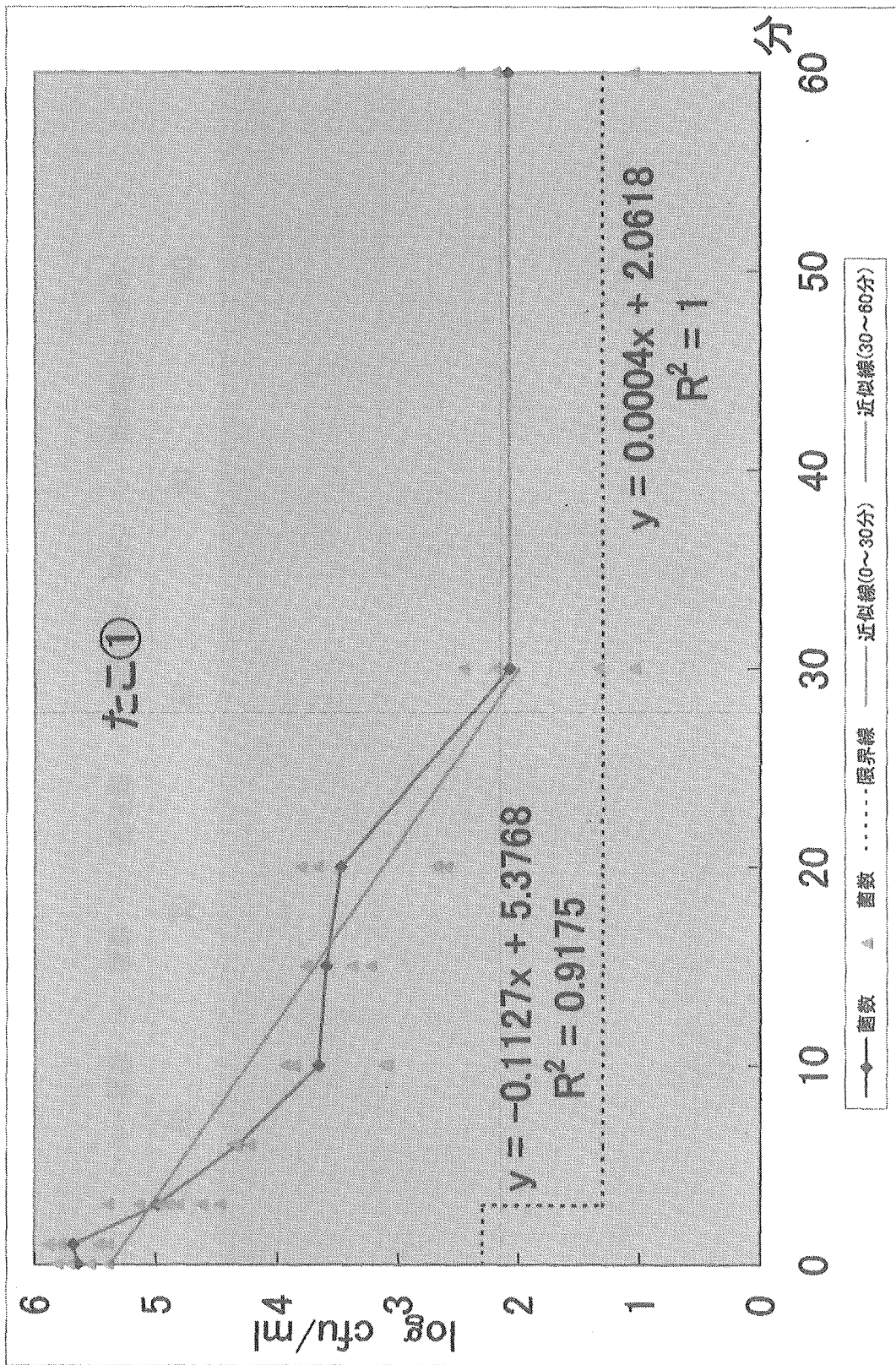


図9 菌の死滅動態(たこ)

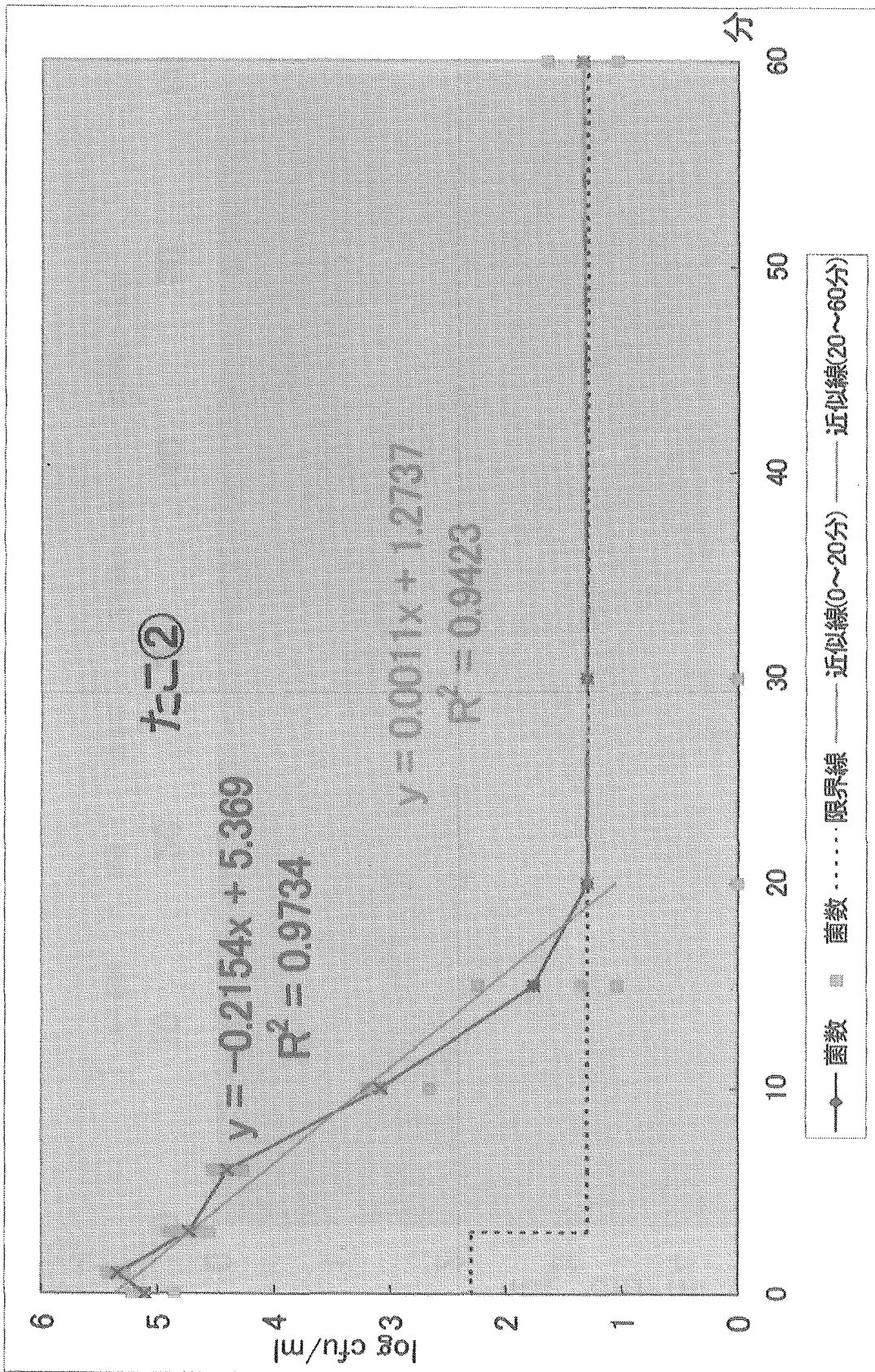


図10 菌の死滅動態(たこ)

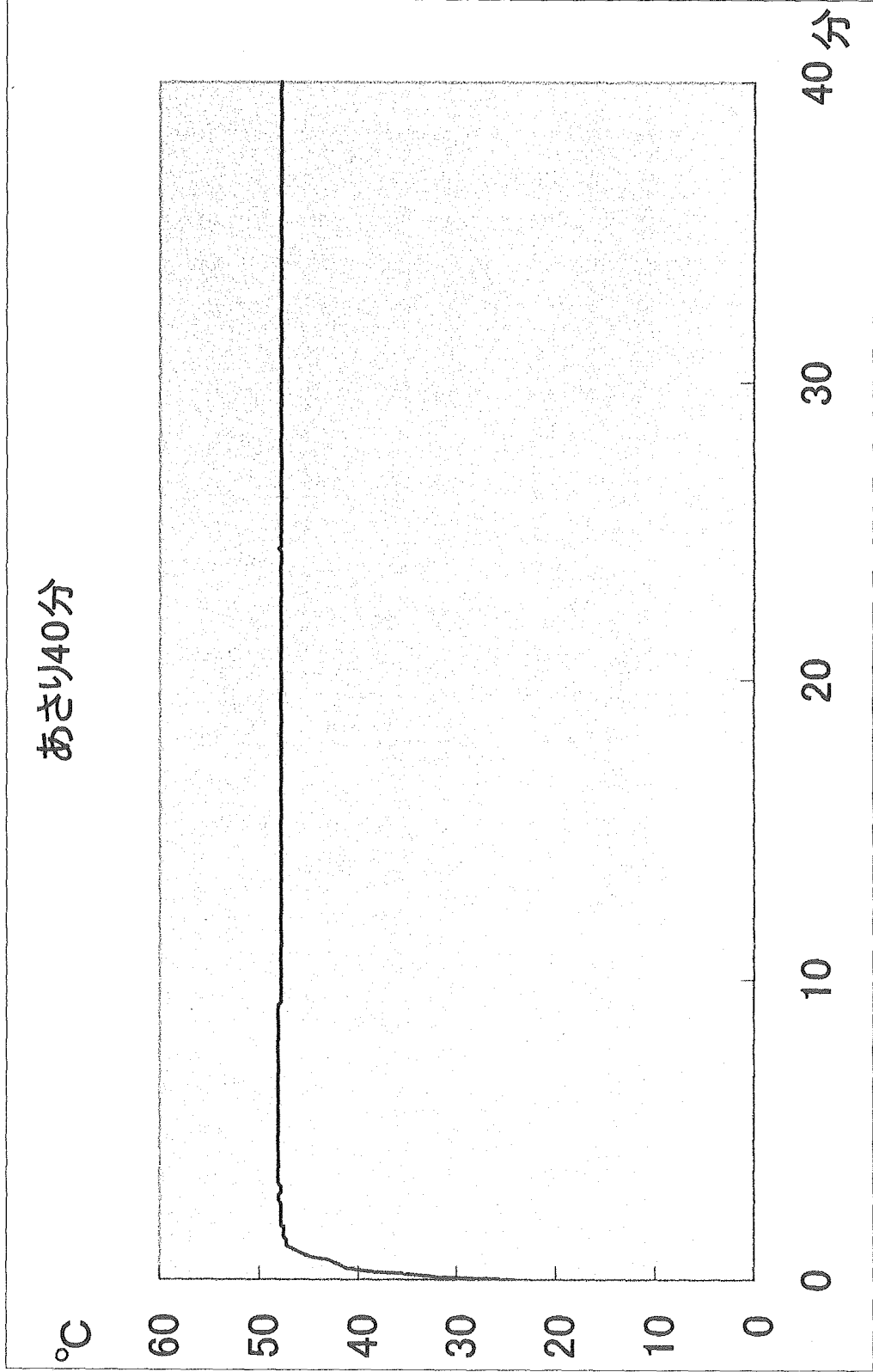


図11 温度モニター(あさり)

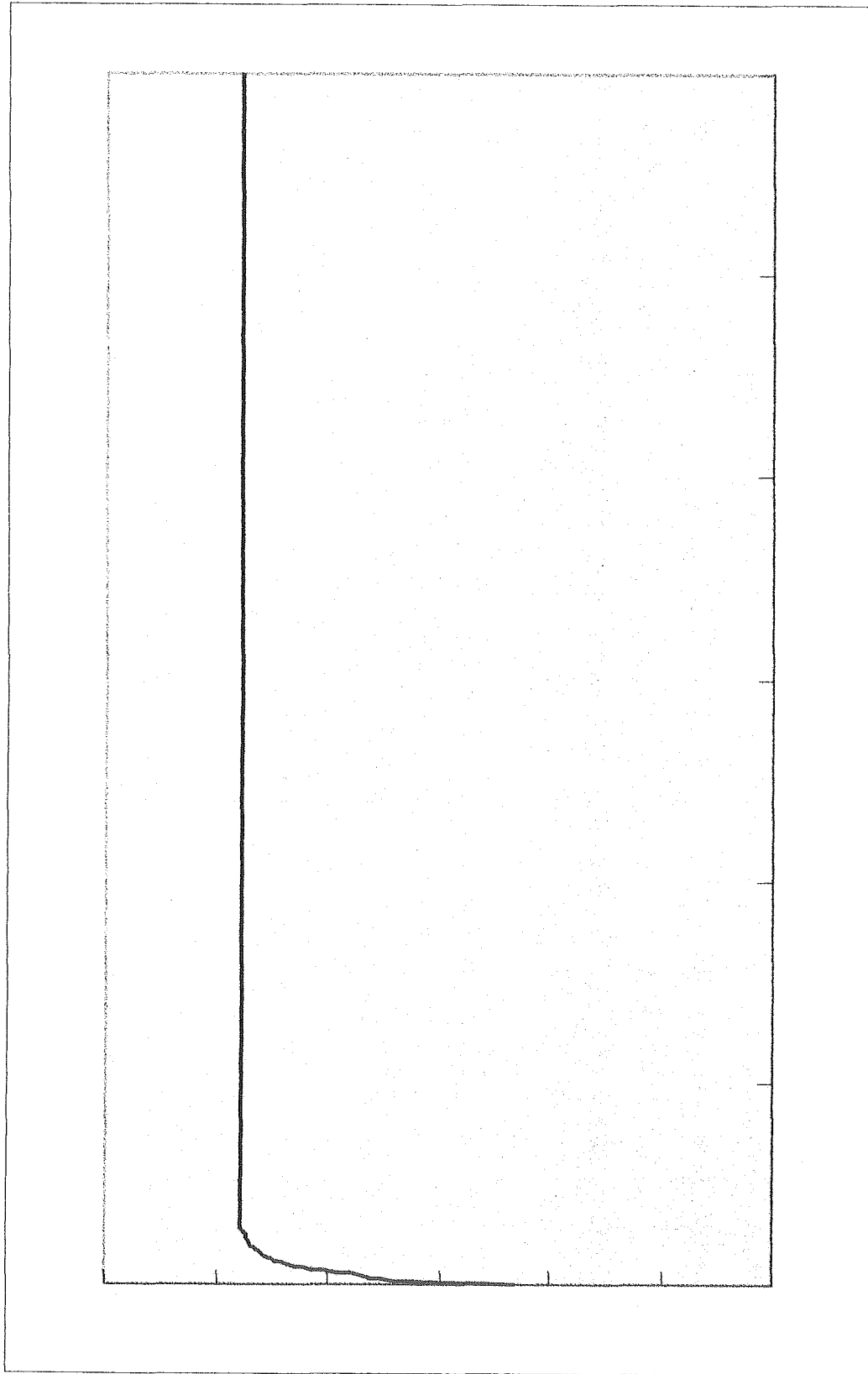


図12 温度モニター(あさり)

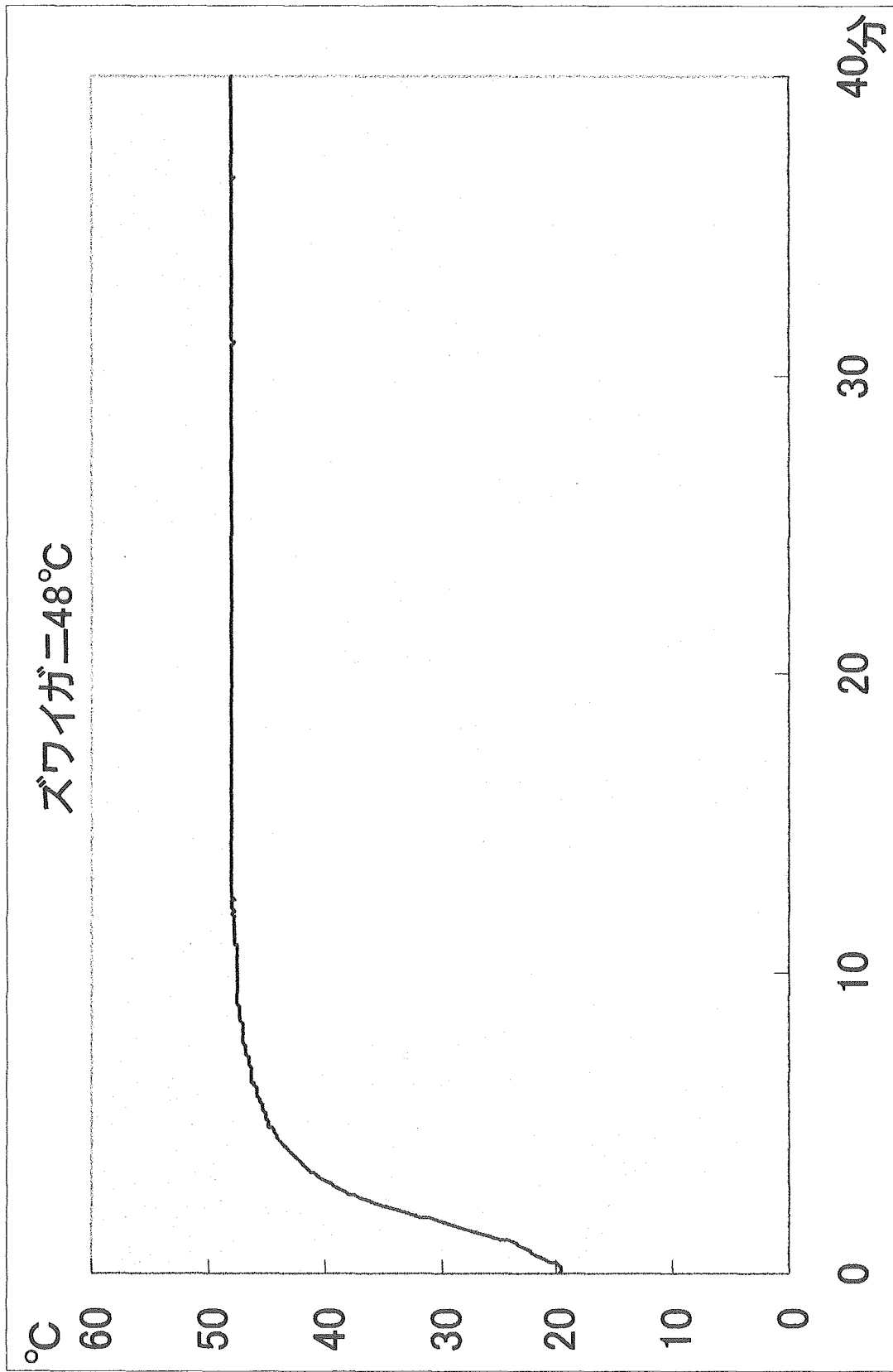


図13 温度モニター(カニ)

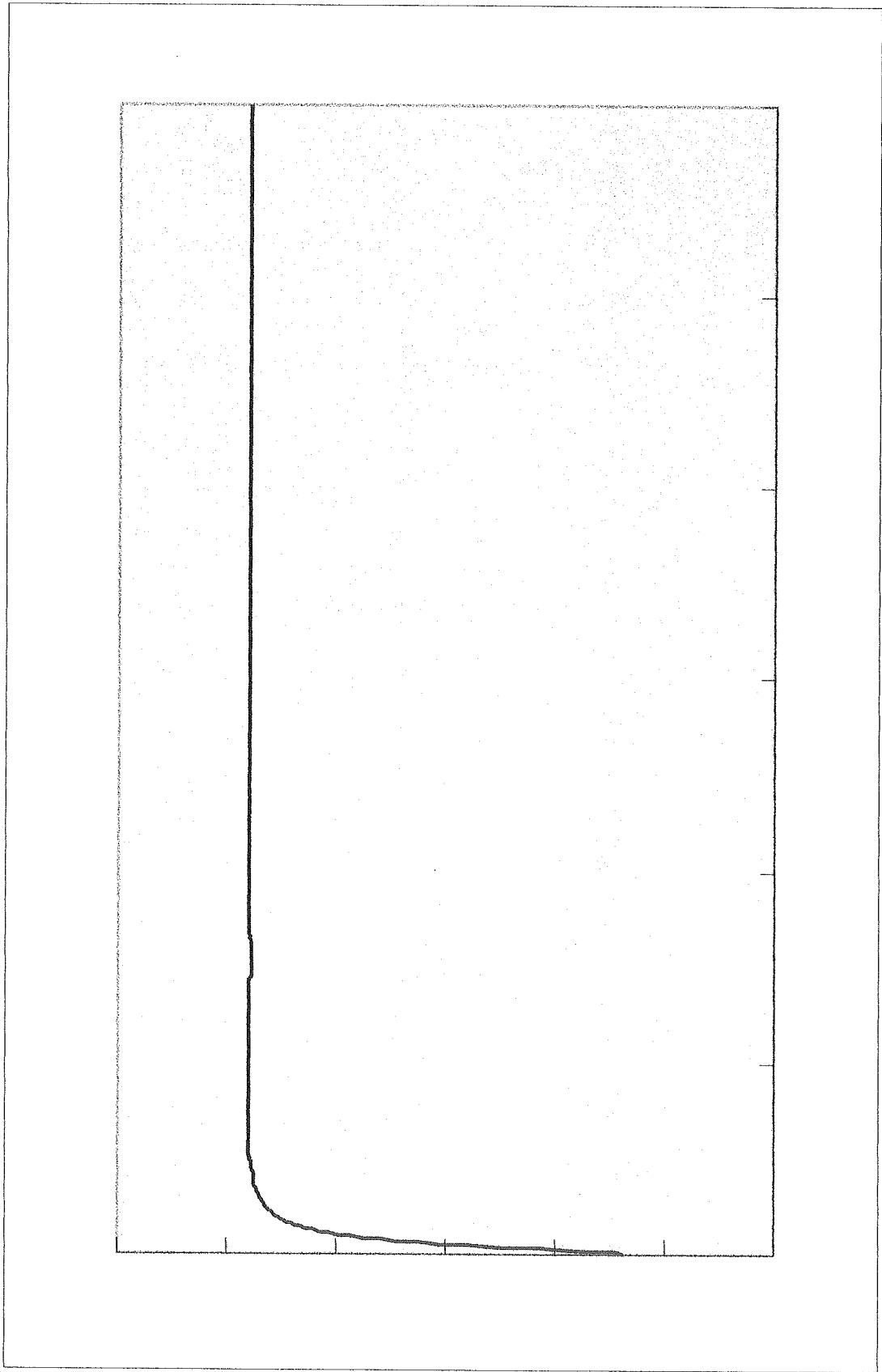


図14 温度モニター(カニ)

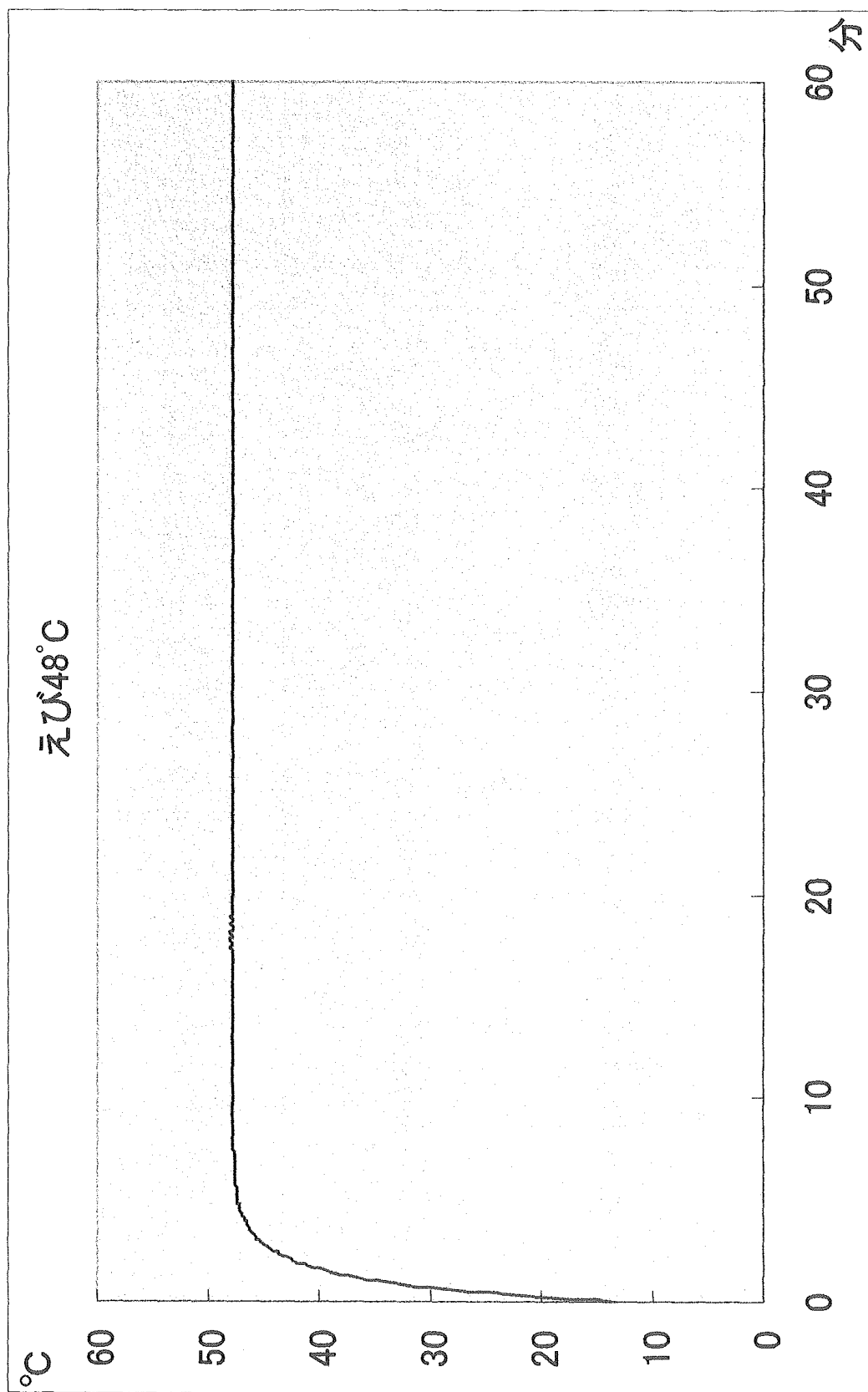


図15 温度モニター(えび)

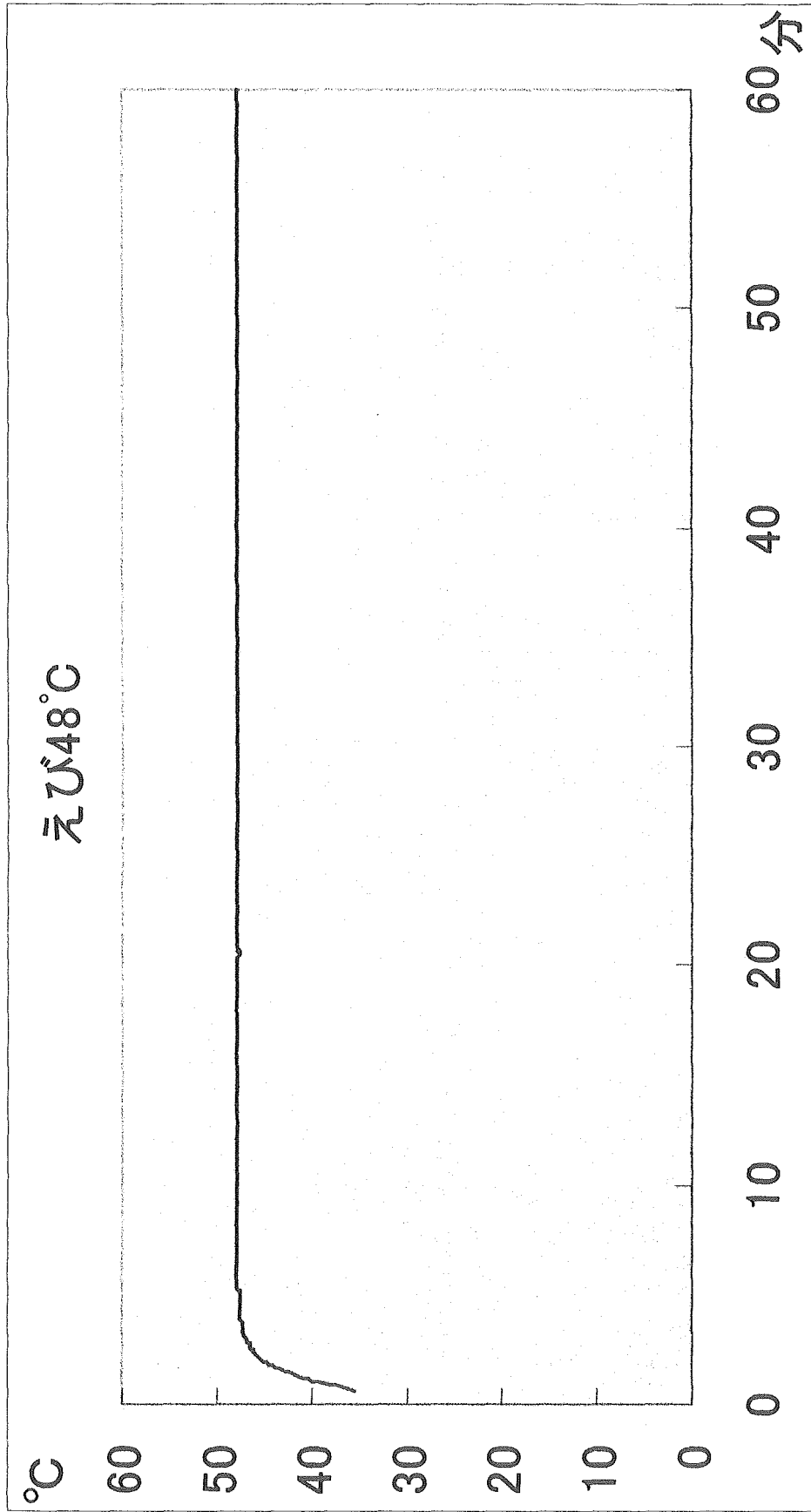


図16 温度モニター(えび)

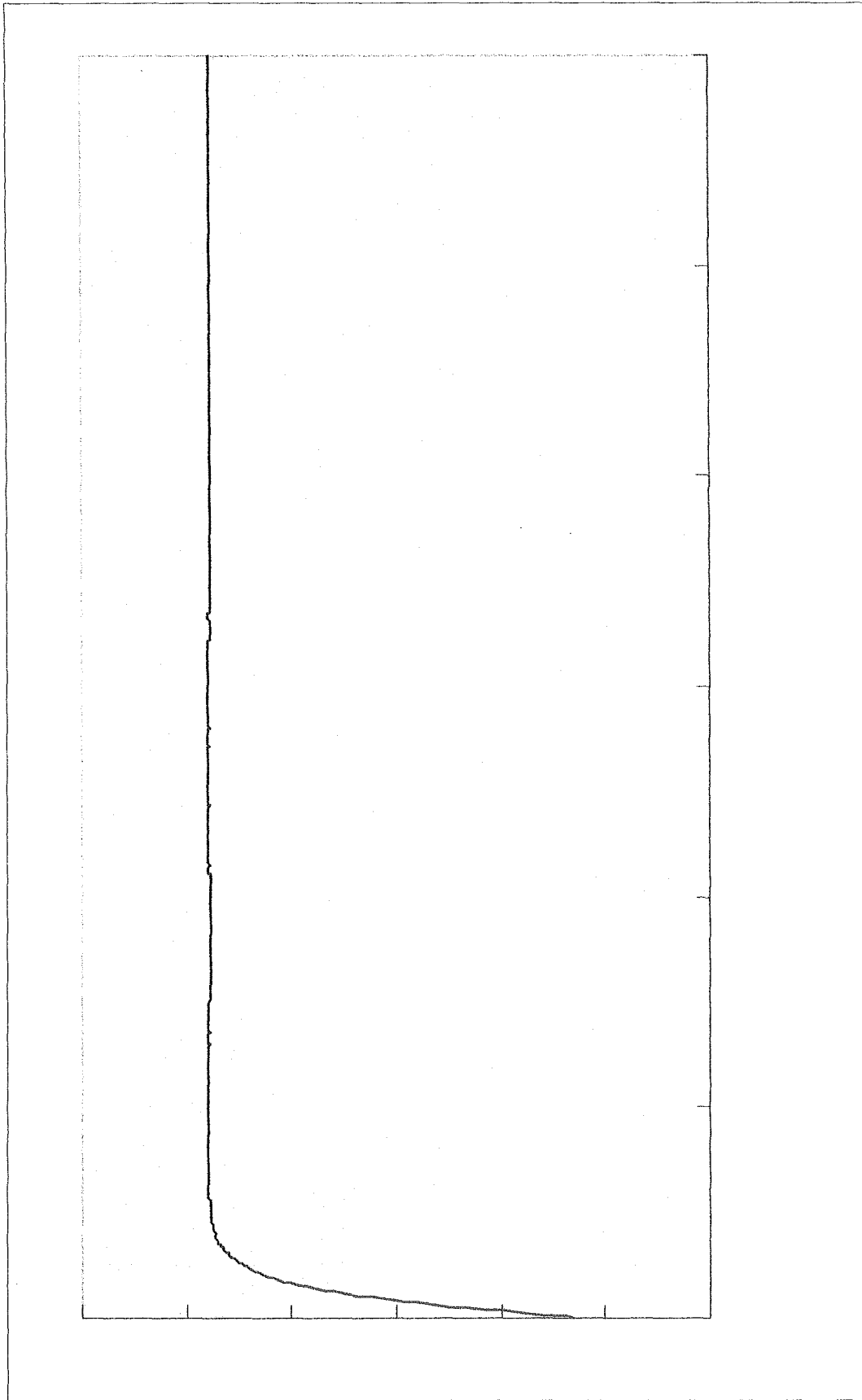


図17 温度モニター(たこ)

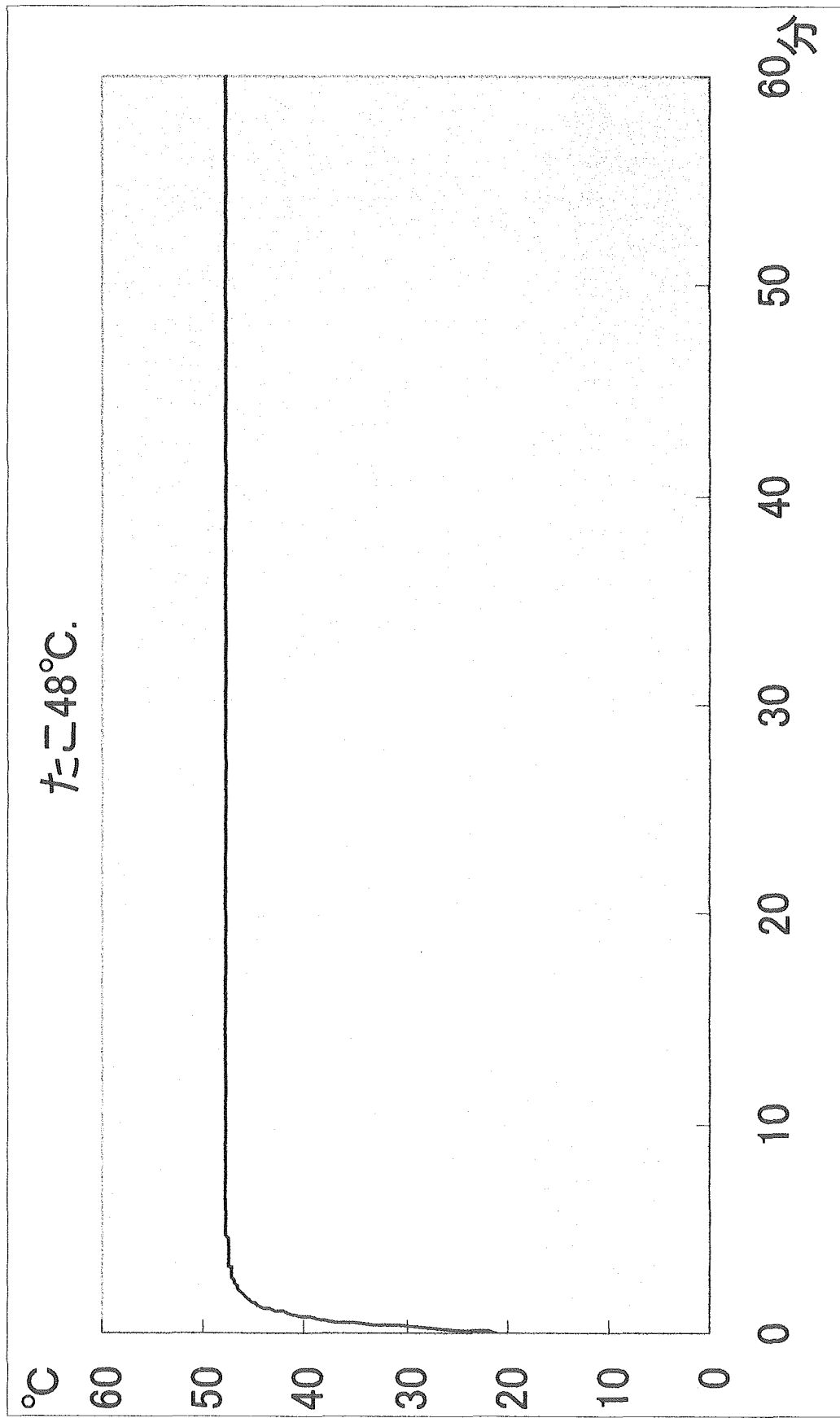


図18 温度モニター(たこ)

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

国際的リスクアセスメントの手法を用いたモデリングに関する研究
—腸炎ビブリオのリスクアセスメントに関する確率論モデルの作成

分担研究者 春日 文子（国立医薬品食品衛生研究所）

協力研究者 山本昭夫（兵庫県立健康環境科学研究所）

岩堀淳一郎（高知医科大学）

西淵光昭（京都大学東南アジア研究センター）

小坂健、重松美加（国立感染症研究所）

豊福肇（WHO Food Safety Department）

研究要旨

国際的に議論されている微生物学的リスクアセスメントの手順や手法に準じて、リスクアセスメントを構築するために、基礎となる知見の収集と得られたデータの数学的解析を行った。

タイ南部地区で頻繁に喫食される赤貝(bloody clam)の腸炎ビブリオ汚染を対象に、貝の収穫、輸送、小売、調理、そして喫食段階における腸炎ビブリオの汚染率と菌数について、定量的な exposure assessment を行い、年間患者発生数を推定した。その際、総腸炎ビブリオ数と毒素産生株 (*tdh* 遺伝子陽性及び *trh* 遺伝子陽性菌株) とを分けて解析した。具体的には、漁獲段階と小売段階における総腸炎ビブリオ濃度は、その分布の形から対数正規分布に従うと仮定し、分布のパラメーターはブートストラップ法により推定した。病原菌株の濃度は非常に低いので、ポアソン分布に従うと仮定し、それらの平均濃度をベイズ法により推定した。調理後の総腸炎ビブリオ濃度、病原株の濃度については、双方ともポアソン分布に従うと仮定し、それらの平均濃度をベイズ法により推定した。家庭での貝の摂食頻度及び摂食量の推定には、協力大学の学生及び職員を対象として年間の家庭での貝の摂食回数及び1回あたりの摂食個数を聞き取り調査し、それをもとに一人当たりの年間貝の摂食頻度及び一人1回あたりの摂食量の分布をブートストラップ法により推定した。実験室内で貝をボイルした条件では、腸炎ビブリオは十分死滅し、患者発生数は非常に低く抑えられることが示された。

A. 研究目的

FAOとWHOの共同プロジェクトとして水産食品中のビブリオについての Risk Assessment がすすめられている。欧米ではかきの生食における腸炎ビブリオ及びバルニフィカスに関心が集中しているが、日本を含むアジア諸国ではその他の魚介類を介した腸炎ビブリオによる食中毒が重要である。西洲らのグループは、年間を通じ腸炎ビブリオによる食中毒が発生する、タイ南部の地区をモデル地域として選び、魚介類からの腸炎ビブリオの分離を行い、血清型、毒素産生性を比較検討した。病原性株が検出されたのは、現地で好んで食される二枚貝類であり、患者からの分離株のタイプと相同性も高かった。当分担研究では、国際的な微生物学的リスクアセスメントの手法を応用することを目的に、それらの貝の一つであるアカガイの1種に関して、漁獲から調理（ボイル）までの定量的な exposure assessment を行い、さらに年間の発症確率を推定した。

B. 研究方法

微生物学的検査

臨床検査、環境調査（定性検査）、環境調査（定量検査）、その他細菌学的方法については、西洲らの協力研究報告に詳述されているが、以下簡略に記載する。

臨床検査： タイ南部のソンクラ（Songkla）州ハジャイ（Hat Yai）市にある2つの市中病院で下痢患者を対象に調査した。糞便および直採綿棒を TCBS 寒天培地に接種し、生育してきた緑色集落を生化

学性状検査に供し、腸炎ビブリオ菌株を分離・同定した。分離菌株を LB 培地で培養し、PCR 法で検査した（下記）。

環境調査（定性検査）： 新鮮な海産物をハジャイ市内の市場から購入し、1時間以内に検査に供した。10倍量（w/w）のアルカリペプトン水を添加し、37°Cで6-8時間増菌培養した。培養液を抗K抗原ウサギ抗体（K6, K68, K12, K25, K41, K68）と反応させた後、抗ウサギ IgG 抗体を結合させた磁気ビーズと混合・洗浄後、TCBS 寒天培地上に磁気ビーズを画線し、37°Cで一夜培養した。緑色集落を生化学性状検査に供し、腸炎ビブリオ菌株を分離・同定した。分離菌株を LB 培地で培養し、PCR 法で検査した（下記）。

環境調査（定量検査）： アカガイの1種（bloody clam, *Anadara granosa*）を対象に調査した。タイ南部のパタニ（Pattani）州で2002年2月14日から4月30日までの調査期間に12回サンプリングを実施し、合計32セットのアカガイを検査した（1セットx2回、3セットx10回）。1セットの検査で1, 3, 6, 9, 12, または15個体のアカガイの中身（肉）をプールして検査した。いずれのサンプリングでも正午ごろ陸揚げ・選別直後の貝を1バッチ入手した。この時点として「harvest（漁獲）」として、サンプルを採取し、残りの貝をハジャイ市にあるソンクラ大学まで輸送し、室外（室温）で保存した。午後5時頃を「retail（小売り）」時点としてサンプルを採取し、残りの貝を室外（室温）で保存し、午後6時頃を「consumption（消費）」時点として、貝を所要時間沸騰水中で加熱した後にサンプル

を採取した。それぞれのサンプル採取時点で、貝内部の温度を測定した。またサンプル採取時点間の所要時間と室温を記録した。貝に含まれる腸炎ビブリオを定量的に検出するために、規定数の貝から無菌的に中身（肉）を採取し、滅菌フラスコにプールした後に、肉重量の 10 倍 (w/w) のアルカリペプトン水を添加し、よく攪拌した（原液）。5 段階濃度の 3 本試験管 MPN 法を実施するために、定法に従って原液および 4 段階希釈液（アルカリペプトン水）10 ml をそれぞれ 3 本ずつ試験管に調製し、37°C で一夜培養した。次に、それぞれの培養液 1 ml を食塩ポリミキシンブイオン 10 ml に接種し、37°C で一夜培養した。その後、それぞれの培養液 1 ml を新しい食塩ポリミキシンブイオン 10 ml に接種し、37°C で 6 時間培養した。この第 3 回目の増菌培養液中の腸炎ビブリオ（すべての菌株、*tdh* 遺伝子陽性菌株、および *trh* 遺伝子陽性菌株）の有無を直接 PCR 法および分離菌-PCR 法で検査し、それぞれについて MPN（肉 10 g 当たり）を決定した。直接 PCR 法では、増菌培養液 1 ml を検査材料とし、*toxR* 遺伝子、*tdh* 遺伝子、および *trh* 遺伝子の有無を検査した（下記）。分離菌-PCR 法では、増菌培養液を CHROMagar Vibrio に接種し、37°C で一夜培養後藤色集落 2 個を選び、それぞれを LB 培地に接種し、37°C で一夜培養した。この培養液を材料として、*toxR* 遺伝子、*tdh* 遺伝子、および *trh* 遺伝子の有無を検査した（下記）。少なくとも 1 集落陽性結果を呈した場合、その培養液はそれぞれの遺伝子について陽性であると判定した。

PCR: 培養液 1 ml 中の菌を遠心分離により

集菌し、1 ml の蒸留水に懸濁させて、100°C で 5 分間加熱後、遠心分離により上清を得た。上清の 10 倍希釈液（蒸留水中）を PCR の検査材料とし、既に報告した方法に従って、腸炎ビブリオすべての菌株を検出するための PCR (*toxR* 遺伝子を標的、Kim et al. 1999)、*tdh* 遺伝子と *trh* 遺伝子検出用 PCR (Tada et al. 1992) および世界的流行株を検出するための GS-PCR (*toxRS* オペロンを標的、Matsumoto et al. 2000) を実施した。

数学的解析

1. 汚染率の推定:

環境調査各サンプリング時（漁獲、小売、消費）の汚染は、それぞれ一つの汚染率であらわせる、日時によらないランダムな事象であり、検査は感度、特異性とも完全であると仮定して、直接 PCR 法及び分離菌-PCR 法ごとに各 12 サンプル、32 個のデータからベイズ法により汚染率を推定した。これを、総腸炎ビブリオ、*tdh* 遺伝子陽性及び *trh* 遺伝子陽性株について行った。

2. 貝 1 個体当たりの菌数（濃度）分布の推定:

貝 1 個体当たりの菌数（以下濃度）についても、直接 PCR 法によるデータと分離菌-PCR 法によるデータ双方について推定を行った。

漁獲段階と小売段階における総腸炎ビブリオ濃度は、その分布の形から対数正規分布に従うと仮定し、分布のパラメーターはブートストラップ法により推定した。*tdh* 遺伝子陽性及び *trh* 遺伝子陽性菌株の濃度は非常に低いので、ポアソン分布に従うと

仮定し、それらの平均濃度をベイズ法により推定した。

調理前の総腸炎ビブリオ濃度、*tdh* 遺伝子陽性及び *trh* 遺伝子陽性株の濃度は、小売段階の濃度から USFDA (Anonymous, 2001) のカキにおける増殖式において、われわれのデータにあうようパラメーターを修正して計算した。

調理後の総腸炎ビブリオ濃度、*tdh* 遺伝子陽性及び *trh* 遺伝子陽性株の濃度についても、収穫及び小売段階と同様にポアソン分布に従うと仮定し、それらの平均濃度をベイズ法により推定した。

3. 家庭での貝の摂食頻度及び摂食量の推定：

聞き取り対象を実現可能性から選択し、ソクラ大学の学生及び職員から 14 人を選び、年間の家庭での貝の摂食回数及び 1 回あたりの摂食個数を聞き取り調査した。それをもとに一人当たりの年間貝の摂食頻度及び一人 1 回あたりの摂食量の分布をブートストラップ法により推定した。摂食 1 回当たりの病原性株菌数の推定：*tdh* 遺伝子陽性あるいは *trh* 遺伝子陽性株を有している貝を汚染貝とした。1 回の摂食における汚染貝の個数は、二項分布によるものとしてシミュレートした。汚染貝中の *tdh* 遺伝子陽性及び *trh* 遺伝子陽性株の合計菌数は、先に求めた調理後の *tdh* 遺伝子陽性及び *trh* 遺伝子陽性株の濃度分布より求めた。この汚染貝中の *tdh* 遺伝子陽性及び *trh* 遺伝子陽性株の合計菌数を、1 回の摂食における汚染貝の個数回繰り返しシミュレートし、それらの累計菌数を一人当たりの 1 回の摂食における病原性の摂取菌数とした。

その分布は、30,000 回の繰り返しによるシミュレーションを実施して求めた。

4. 量反応関係：

病原性の摂取菌数と発症との関係はベータ・ポアソン・モデルを用い、Sumner ら (Sumner et al., 2001) の係数をそのまま用い次式により計算した。

$$p = 1 - \left(1 + \frac{\lambda}{\beta} \right)^{-\alpha}$$

$$\alpha = 18912766$$

$$\beta = 5.36058658 \times 10^{14}$$

ここで、 λ は摂取病原性菌数、 p はそれによる発症確率を表す。

5. 発症率の推定：

上述の式を用い、一人当たりの 1 回の摂食における病原性の摂取菌数による発症確率を求め、これに年間の摂食頻度を乗じて年間の発症率とした。その分布は、上述のシミュレーションにおいて 1 回の繰り返しに年間の発症率を算出することにより求めた。

6. シミュレーション：

以上の推定は、@RISK を用いた、繰り返し数 30,000 回のモンテカルロシミュレーションにより行なった。その際、ラテン方格法を採用した。また、ブートストラップ法の繰り返し数はすべて 1,000 回とした。

C. 結果

1. Hazard Identification

臨床検査：1999年から2001年の調査期間に、504菌株の腸炎ビブリオが分離できた。*tdh* 遺伝子、*trh* 遺伝子、および両遺伝子を保有する菌株は、それぞれ 89.2%、4.4%、2.3%であった。*tdh* 遺伝子陽性株の中では、GS-PCR 陽性が非常に多く、367 菌株(全菌株の 72.8%)が GS-PCR 陽性で、このうち O3:K6 型 (285 株) と O1:K25 型 (41 株) が大部分を占めていた。

環境調査 (定性検査)：全調査期間 (1998-2001 年) を通じて海産物 427 検体を調査した。1998 年から 2000 年の調査期間にエビ 50 検体、カニ 9 検体、魚 100 検体、貝 136 検体を検査したが、病原性株 (*tdh* または *trh* 遺伝子陽性株) は、貝からのみ分離できた (5 菌株)。そこで、2001 年は貝 132 検体を検査し、病原性株 8 菌株を分離した。分離した病原性菌株 13 菌株のうち、GS-PCR 陽性 O3:K6 株が大部分 (8 株) を占め、その他に GS-PCR 陽性 O1:K25 株も 2 株含まれていた。この結果は臨床分離菌株の性状分布と良く一致しており、ハジヤイ市では明らかに市販の貝が腸炎ビブリオ感染症の原因であることを示している。病原性菌株が分離できた貝は、上記アカガイの他、イガイの 1 種 (*Perna viridis*) とハマグリ of 1 種 (*Meretrix lusoria*) であった。

2. Exposure Assessment

環境調査 (定量検査)：総腸炎ビブリオ、*tdh* 陽性株および *trh* 陽性株の出現頻度と MPN の結果を表に示す。

表 1. 直接 PCR 法、分離菌-PCR 法による総腸炎ビブリオ、*tdh* 陽性株および *trh*

陽性株の貝あたり MPN および出現頻度

直接 PCR 法

段階	総菌数	<i>tdh</i> 陽性株	<i>trh</i> 陽性株
漁獲	5-16,100 (100%)	1 (13%)	1 (6.3%)
小売	15-38,500 (100%)	0 (0%)	1 (3.1%)
調理後	0-3 (3.1%)	0 (0%)	0 (0%)

分離菌-PCR 法

段階	総菌数	<i>tdh</i> 陽性株	<i>trh</i> 陽性株
漁獲	8-38,500 (100%)	1 (6.3%)	1-10 (9.4%)
小売	15-38,500 (100%)	0 (0%)	1-10 (6.3%)
調理後	1-3,255 (6.3%)	0 (0%)	0 (0%)

各段階すべて 3 2 試料検査。カッコ内は出現頻度。

汚染率及び濃度分布の推定：直接 PCR 法のデータから求めた漁獲、小売段階の汚染率は、いずれも 80% (mean)、83% (median)、70 - 92% (25-75%ile) であった。また、貝 1 個あたり総腸炎ビブリオ菌数は、漁獲段階で 680 (mean)、479 (median)、138 - 2265 (25 - 75%ile)、小売段階で 2213(mean)、1747(median)、550 - 6869 (25 - 75%ile) であった。汚染率の推定例を図 1、2 に、漁獲時の総腸炎ビブリオ菌数の推定を図 3 に、*trh* 陽性株菌数の推定を図 4 に示す。

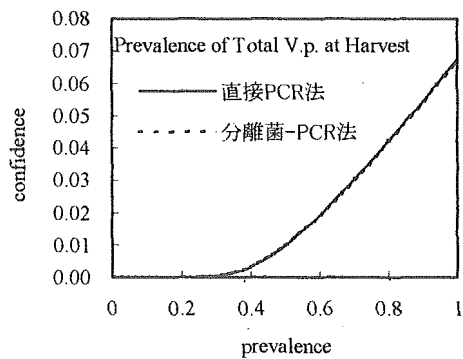


図1 漁獲時の汚染率（総腸炎ビブリオ）

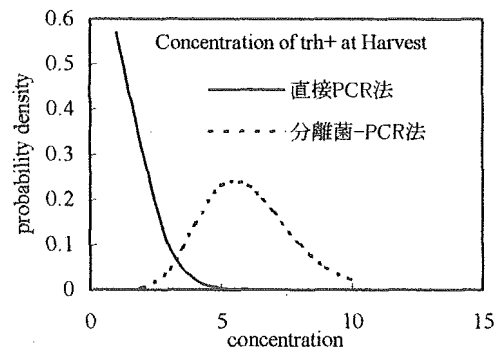


図4 漁獲時の *trh* 陽性株菌数（貝1個あたり）

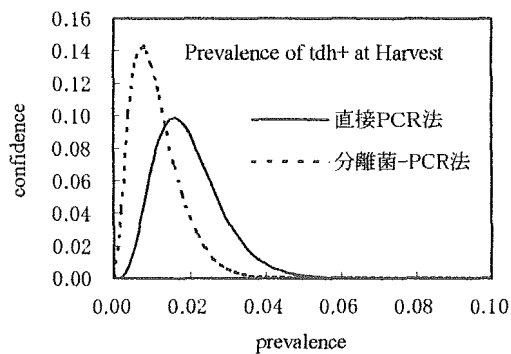


図2 漁獲時の汚染率（*tdh* 陽性株）

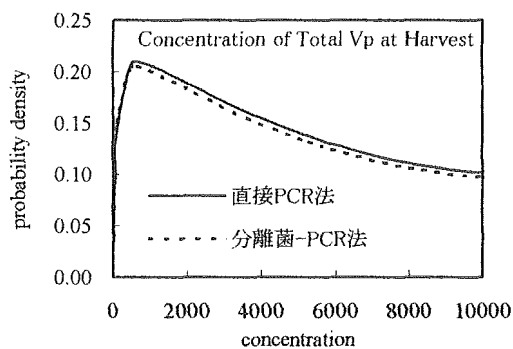


図3 漁獲時の総腸炎ビブリオ菌数（貝1個あたり）

調理後における総腸炎ビブリオの濃度：直接 PCR 法，分離菌-PCR 法で腸炎ビブリオは、それぞれ 3 2 試料中 1 および 4 試料で検出された。直接 PCR 法による総腸炎ビブリオ汚染率は 0.8% (mean)、0.6% (median)、0.4-1.0% (25-75%ile)であった。総腸炎ビブリオ菌数は貝1個あたり 4 (mean)、4 (median)、3-5(25-75%ile)と見積もられた。調理後における *tdh* 陽性株及び *trh* 陽性株菌数は、いずれも貝1個あたり 1.58 (mean)、1(median)、1-2(25-75%ile)と見積もられた(図5)。それらの汚染率は調理前における平均汚染率の比から、総腸炎ビブリオの 4.57×10^{-3} (*tdh* 陽性株)、 9.54×10^{-3} (*trh* 陽性株)と見積もられた。