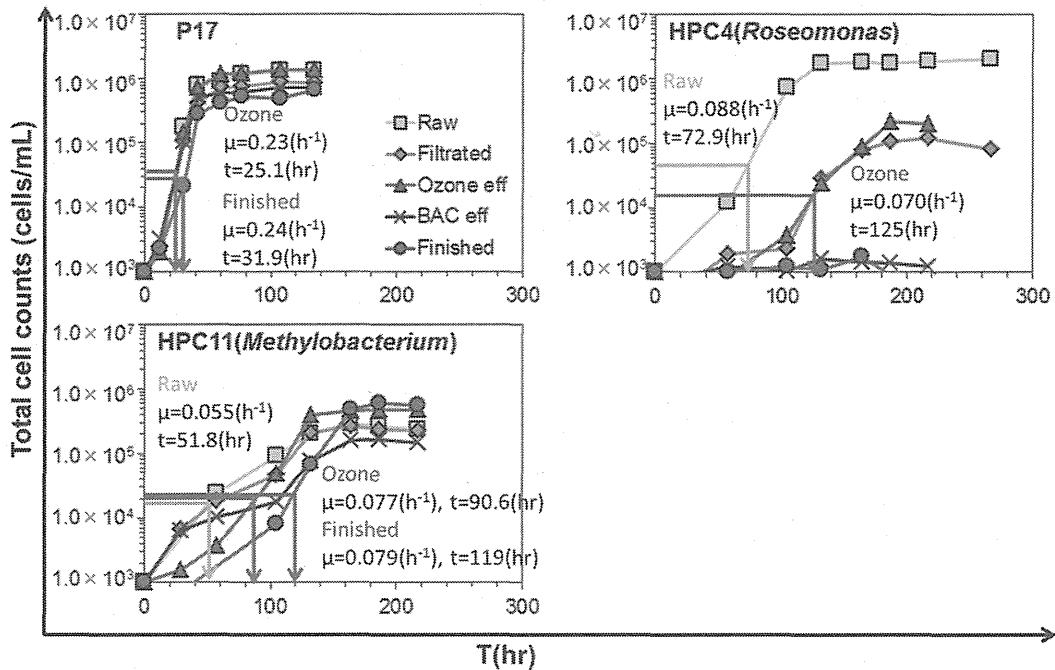


差があった。最大増殖量の半分に達するまでの時間は処理が進むと長くなる（増殖の立ち上がりが遅くなる）傾向が確認された。また、HPC4株において顕著にみられるように、前段ろ過や生物活性炭処理によって最大増殖量が大きく低減する例も観察された。



試験

D. 考察

1. 採水試料からの HPC の単離と同定

本研究では、HPC の単離株を分類する際に二重標識 T-RFLP を用いたが、その結果として、*Mycobacterium* 属近縁株が 3 株、*Brevundimonas* 属近縁株が 2 株、*Bacillus* 属近縁株が 3 株単離された。それぞれ HEX 標識した 3'末端の断片長、6-FAM 標識した 5'末端の断片長が異なっており、同じ属に近縁であっても遺伝子レベルで差異が確認された。これは種レベルでのわずかな塩基配列の違いが消化反応に用いた制限酵素 *Hha* I の認識配列 (5'-GCGC-3') と関わっていたためだと考えられる。既存の知見では、今回の単離株のうち、*Methylobacterium* 属、*Bacillus* 属、*Micrococcus* 属、*Staphylococcus* 属に近縁な細菌が古畑 (2004) によって水道水 (受水槽) から検出されている。また、*Staphylococcus* 属、*Bacillus* 属、*Micrococcus* 属、*Mycobacterium* 属に近縁な細菌は、残留塩素存在下の浄水・給水栓水から猪俣ら(2008)によって単離されている。岩本ら (2010) の調査によると、浄水では *Mycobacterium* 属、給水栓水では *Methylobacterium* 属が多く単離されることが報告されている。

2. 塩素耐性試験

単離株の塩素処理による膜損傷の程度には差異が見られ、*Methylobacterium* 属近縁株の耐性が最も高かった。Ramseier (2011) の研究によるとスイスの水道水中の細菌群集の塩素による膜損傷速度定数として、High Nucleic Acid 含有細菌群は 0.091 (exposure 0.1 mg min/L) ~1.1 L/(mg min) (exposure 1-20 mg min/L)、Low Nucleic Acid 含有細菌群は 0.1 L/(mg min) という値が得られている。本実験の単離株から得られた値と比較すると、*Methylobacterium* 属や *Mycobacterium* 属近縁株を除きほぼこの範囲に入っていることが確認された。

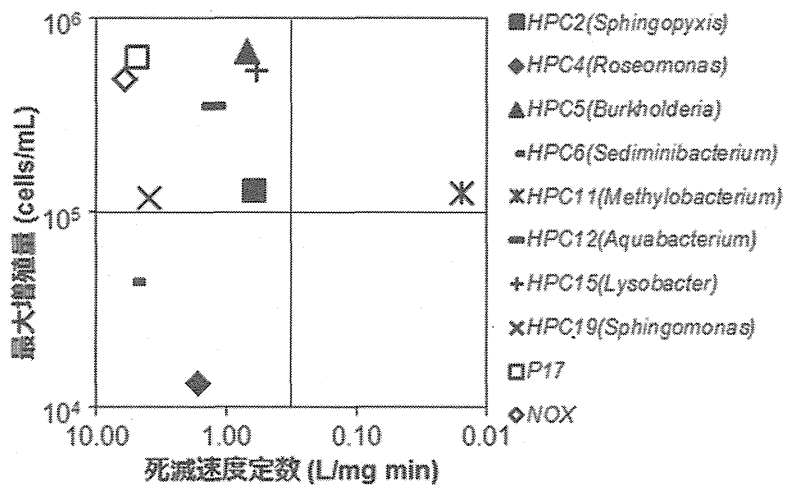
膜損傷試験から *Mycobacterium* 属近縁細菌の塩素耐性が高いことが示されたが、同じ株のコロニー形成能を評価したところ、死滅速度定数 k は 0.0612~0.128 L/(mg min) であった。病原性のある *Mycobacterium avium* について同じく培養法で塩素による死滅速度定数を求めた既報によると、死滅は two population model 式で近似され、 $k_1:0.0135$ L/(mg min)、 $k_2:0.00191$ (L/(mg min)) (pH 7.5, 20°C) と報告されている (Luh et al., 2007)。本実験で得られた近縁株の方が、死滅速度定数の値は大きいことが示された。

本実験の結果は、水道水中から単離された株の膜損傷とコロニー形成能との間に大きなギャップがあることを示している。こうした知見は Ramseier ら (2011) も指摘している。理由としては、膜を損傷せずに消毒剤が細胞内に侵入することで不活化していることが推察される。しかし、完全に死滅しているのかどうかは不明であり、コロニー形成能をなくすだけで生残している可能性もある。すなわち、膜損傷性で評価した方がより安全側の評価になると考えられる。WHO 飲料水水質ガイドライン第 3 版では、2log の細菌除去 (培養法) を塩素で行う場合、CT 値として 0.08 mg min/L (1~2°C, pH 7) という値を示している。今回の単離株について、0.08 mg min/L の CT 値の際の膜損傷割合は 30% (HPC1 株: *Exiguobacterium* 属近縁)、37% (HPC9 株: *Brevundimonas* 属近縁)、20% (HPC12 株: *Aquabacterium* 属近縁)、0.36% (HPC13 株: *Mycobacterium* 属近縁)、10% (HPC15 株、*Lysobacter* 属近縁) 等であり、膜損傷性で評価する場合には過小評価になることが示された。

3. 水道水中での増殖特性試験

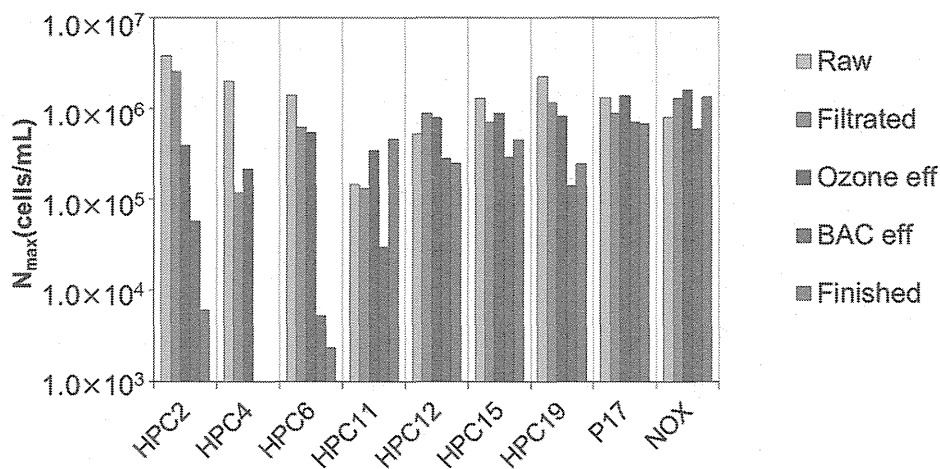
水道水中で増殖した単離株について、その最大増殖量と塩素による膜損傷 (死滅) 速度定数の値を比較した (図 4)。塩素耐性が高く、水道水中での増殖を示す HPC11 株 (*Methylobacterium* 属近縁)、塩素耐性は低いものの最大増殖量が高い HPC5 株 (*Burkholderia* 属近縁) HPC15 株 (*Lysobacter* 属近縁) など、株によって塩素耐性や増殖特性には差異が見られた。同化性有機炭素の測定に用いられる P17 株、NOX 株は水道水中で高い増殖性を示した。また、HPC4 株 (*Roseomonas* 属近縁) のように最大増殖量が低く、塩素耐性が高いわけでもない菌が水道給配水系に存在していたという点も注視すべきである。このように、HPC として検出される細菌群の塩素耐性や増殖特性は菌株により異

なり、それらの再増殖特性は一樣ではないことが確認された。こうした知見は細菌再増殖を監視、制御する上で有用である。



4. 浄水処理工程水中での増殖特性試験

浄水処理工程水中における各菌株の最大増殖量を図5に示す。オゾン処理では、HPC4株、11株、15株、P17株、NOX株の最大増殖量が増加していた。これは、オゾンの酸化作用によって、有機物の易分解性化が進行したためと考えられる。生物活性炭処理では、全ての菌株の最大増殖量が減少していた。中でも、HPC2株、4株、6株、11株、19株の最大増殖量は20%以下に減少していた。これは、生物活性炭処理により、再増殖に利用される有機物が効率的に除去されたためと考えられる。特に、塩素耐性が高いことが確認されたHPC11株(*Methylobacterium*属近縁)の最大増殖量が生物活性炭処理によって低減さ



素耐性

れたことは、浄水処理が再増殖管理にどのように寄与しているのかを考える上で有用な知見である。一方、塩素処理の結果、HPC11 株、15 株、19 株、NOX 株の最大増殖量が増加していた。塩素処理による酸化によって、生分解性有機物が一部生成することが示唆された。

E. 結論

- ① 屋外・屋内の 10 か所の給水栓から、従属栄養細菌 19 株を単離同定した。
- ② 塩素耐性試験の結果、*Mycobacterium* 属や *Methylobacterium* 属に近縁な株が他よりも高い塩素耐性を持っていることが確認された。
- ③ 塩素による不活化効果は膜損傷よりもコロニー形成能により顕著に表れることが確認され、既存の知見とも整合していた。
- ④ 単離株の水道水中での増殖性と塩素耐性とを併せて評価することで、単離株の多様な再増殖特性を分類することができた。
- ⑤ 浄水処理工程水中における単離株の増殖性を評価したところ、オゾン処理や塩素処理によって増殖が促進される傾向や、生物活性炭処理によって増殖が抑制される傾向が確認された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- 大坂幸弘、春日郁朗、栗栖太、古米弘明（2012）給水栓における滞留に伴う水質変化と細菌再増殖との関係、第 63 回全国水道研究発表会、pp.512-513. 【口頭】
- Yukihiro Osaka, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, and Hiroaki Furumai (2012) The influence of drinking water stagnation on water quality and microbial growth at faucet, Water and Environment Technology Conference 2012, 30-1B-01, p.41. 【ポスター】
- 大坂幸弘、春日郁朗、栗栖太、古米弘明（2013）給水末端から単離された従属栄養細菌の塩素耐性および増殖特性の評価、第 47 回水環境学会年会、p.297. 【口頭】

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

<参考文献>

- 1) 古畑勝則 (2004) 水道水中に生息する従属栄養細菌、食品衛生学雑誌、45(1)、pp.J1-J5.
- 2) 猪又明子、千葉隆司、保坂三継 (2008) 水道水中の従属栄養細菌の同定における DNA 塩基配列解析法と表現性状試験との比較、水環境学会誌、pp.609-614.
- 3) 岩本智江、田中繁樹、田中真紀子、高橋輝行 (2010) 浄水処理過程および配水過程における従属栄養細菌の挙動、第 61 回全国水道研究発表会講演集、pp.524-525.
- 4) Ramseier, M.K., von Gunten, U., Freihofer, P. and Hammes, F. (2011) Kinetics of membrane damage to high (HNA) and low (LNA) nucleic acid bacterial clusters in drinking water by ozone, chlorine, chlorine dioxide, monochloramine, ferrate (VI), and permanganate, *Water Research*, 45, pp.1490-1500.
- 5) Luh J Fau - Marinas, B.J. and Marinas, B.J. (2007) Inactivation of *Mycobacterium avium* with free chlorine. *Environmental Science and Technology* 41(14), pp.5096-5102.
- 6) WHO 飲料水水質ガイドライン 第 3 版

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 論文発表

- 1) 浅田安廣, 大河内由美子, 伊藤禎彦 (2012) 疫学調査に基づいた *Campylobacter jejuni* 感染における感染-発症割合の推定, 水環境学会誌, Vol. 35, No. 9, pp. 135-142.
- 2) Yumiko Ohkouchi, Satoshi Tajima, Masahiro Nomura, and Sadahiko Itoh (2012) Comparison of inflammatory responses in human cells caused by lipopolysaccharides from *Escherichia coli* and from indigenous bacteria in aquatic environment, Journal of Environmental Science and Health, Part A, Vol. 47, pp. 1966-1974.
- 3) 大河内由美子, 矢田祐次郎, 文亮太, 伊藤禎彦 (2012) ナノろ過膜処理を適用した浄水の細菌再増殖特性の評価, 用水と廃水, Vol. 54, No. 12, pp. 39-46.
- 4) Yumiko Ohkouchi, Bich Thuy Ly, Suguru Ishikawa, Yoshihiro Kawano, and Sadahiko Itoh (2013) Determination of an acceptable assimilable organic carbon (AOC) level for biological stability in water distribution systems with minimized chlorine residual, Environmental Monitoring and Assessment, Vol. 185, pp. 1427-1436.

2. 学会発表

- 1) 大河内由美子, 矢田祐次郎, 文亮太, 伊藤禎彦 (2012) ナノろ過処理水の微生物再増殖特性に関する研究, 第63回全国水道研究発表会講演集, p. 528-529.
- 2) Sadahiko Itoh (2012) Effect of the Ratio of illness to infection of *Campylobacter* on the uncertainty of DALYs in drinking water, 21st KAIST-KU-NTU-NUS Symposium on Environmental Engineering, CD-ROM.
- 3) Liang Zhou, Sadahiko Itoh (2012) Concentration interpolation method for data below detection limit in Quantitative Microbial Risk Assessment, 21st KAIST-KU-NTU-NUS Symposium on Environmental Engineering, CD-ROM.
- 4) 浅田安廣, 大河内由美子, 伊藤禎彦 (2012) 環境水中の *Campylobacter jejuni* 存在実態解明に向けた分離および定量手法の確立, 環境衛生工学研究, Vol. 26, No. 3, pp. 144-147.
- 5) 周靚, 越後信哉, 大河内由美子, 伊藤禎彦 (2012) 高度浄水処理プロセスのカンピロバクター感染確率評価における感度分析と不確実性分析, 第15回日本水環境学会シンポジウム講演集, pp. 227-228.
- 6) Y. Ohkouchi, Y. Yata, R. Bun, and S. Itoh (2012) Chlorine requirement for biologically stable drinking water after nanofiltration, The 9th International Symposium on Water Supply Technology, CD-ROM.
- 7) L. Zhou, S. Echigo, Y. Ohkouchi, and S. Itoh (2012) Quantitative microbial risk assessment of drinking water treated with advanced water treatment process, The 9th International Symposium on Water Supply Technology, CD-ROM.
- 8) 浅田安廣, 大河内由美子, 伊藤禎彦 (2012) 環境水中に存在する *Campylobacter jejuni* に対する分離方法の探索ならびに血清型調査, 第5回日本カンピロバクター研究会抄録集, p. 34.
- 9) 浅田安廣, 大河内由美子, 伊藤禎彦 (2013) 環境水中に存在する *Campylobacter jejuni* の定量における増菌培養法の比較, 第47回日本水環境学会年会, p. 71.
- 10) 藤村壮, 能岡勉, 小田嶋慎, 倉田知司, 島崎大, 伊藤雅喜, 秋葉道宏 (2012) 濁度急変時の浄水処理における大腸菌除去能力評価および微生物リスク評価, 第63回全国水道研究発表会, p. 530-531.
- 11) 藤村壮, 島崎大, 秋葉道宏, 石川力也, 平岩雅貴, 西原昌弘 (2013) 代替トレーサー

- 粒子を用いた浄水処理によるクリプトスポリジウム除去性能評価およびリスク評価，第47回日本水環境学会年会，p. 519.
- 12) Mawatari S., Otaki M. (2012) Development of quantitative analysis of heterotrophic bacteria by T-RFLP method, Proc. of Water and Environment Technology Conference 2012
 - 13) 曹雪，大瀧雅寛 (2013) バイオフィーム状態の細菌に対する塩素処理の不活化効果，第47回日本水環境学会年会，p. 189.
 - 14) 大坂幸弘，春日郁朗，栗栖太，古米弘明 (2012) 給水栓における滞留に伴う水質変化と細菌再増殖との関係，第63回全国水道研究発表会，pp. 512-513.
 - 15) Yukihiro Osaka, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, Hiroaki Furumai (2012) The influence of drinking water stagnation on water quality and microbial growth at faucet, Water and Environment Technology Conference 2012, 30-1B-01, p. 41.
 - 16) 大坂幸弘，春日郁朗，栗栖太，古米弘明 (2013) 給水末端から単離された従属栄養細菌の塩素耐性および増殖特性の評価，第47回水環境学会年会，p. 297.

研究成果の刊行物・別刷

疫学調査に基づいた*Campylobacter jejuni*感染における 感染—発症割合の推定

浅田 安廣^{*1} 大河内 由美子^{**} 伊藤 禎彦^{**}

Estimation of Illness-to-Infection Rate of *Campylobacter jejuni* Based on Epidemiological Survey

Yasuhiro ASADA^{*1}, Yumiko OHKOUCHI^{**} and Sadahiko ITOH^{**}

^{*} Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyotodaigakukatsura, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8540, Japan

^{**} Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University, Kyotodaigakukatsura, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8540, Japan

Abstract

Disability Adjusted Life Years (DALYs) are good estimates of the effects caused by waterborne pathogens in drinking water. The illness-to-infection rate of *Campylobacter jejuni* is one of the most important factors for estimating DALYs. In this study, the illness-to-infection rate of *Campylobacter jejuni* was estimated on the basis of seroepidemiological survey. From the data of serum antibody levels against *C. jejuni*, the cutoff levels for asymptomatic infection were set on the basis of medical data from previous studies and using a statistical procedure. From these cutoff levels, the percentage of people with asymptomatic infection was estimated to be 7.9 - 35.0% and 12.1 - 13.6%, respectively. By using the numbers of people with symptomatic infection estimated using the number of laboratory-confirmed cases, the illness-to-infection rate of *C. jejuni* was estimated to be 12.1 - 53.8% and 31.3 - 35.1%, respectively.

Keywords: Disability Adjusted Life Years; Waterborne disease; *Campylobacter jejuni*; Illness-to-infection rate; Seroepidemiological survey

1. はじめに

水道水の塩素消毒は、副生成物による健康リスク問題を生じさせるほか、カルキ臭を生成することから、現在の日本では水道水離れが問題視されている¹⁾。将来は塩素注入量を低減しつつ、より満足度の高い水道システムを構築する必要がある。しかし、残留塩素濃度の低減は病原微生物による微生物リスク増大に直結しうることから、同時に微生物リスク管理手法の高度化を進めることが重要となる。

微生物リスク管理の高度化は、許容リスクレベルを設定した上で、各病原体による感染確率と引き起こされる健康影響の大きさを指標として定量化したリスク値を踏まえて、そのマネジメントを行う。しかし、一般に病原微生物が引き起こす水系感染症は、症状の種類、重篤度、持続期間が多様であるため、感染症による健康影響の大きさ全体を評価する指標が必要となる。ここで、疾病要因による多種多様な健康影響の大きさを表す指標として障害調整生存年数 (Disability Adjusted Life Years: DALYs) がある。飲料水の安全評価分野では、WHO (世界保健機関) が数種類の微生物と化学物質を取り上げて

DALYsの定量を実施している²⁾。

水道水を介した水系感染症の主要原因菌のひとつに *Campylobacter jejuni* がある。日本では塩素消毒の不備により、*C. jejuni* による感染症が発生したケースが確認されており³⁾、残留塩素を低減した場合、*C. jejuni* による微生物リスクが増加すると考えられる。さらに *C. jejuni* 感染症は、下痢症だけではなくギラン・バレー症候群や反応性関節炎のような重篤な健康影響を引き起こす可能性があるため、DALYsを用いた評価は有益である。

病原体曝露後の感染確率に基づいてDALYsを評価する場合、感染者から発症者の発生する割合 (感染—発症割合) を設定する必要がある。しかし、*C. jejuni* 感染による感染—発症割合に関する有用な情報は乏しいのが現状である。Tompkinsら (1999)⁴⁾ や De Witら (2001)⁵⁾ による腸管感染症の発生率から推定した不顕性感染者 (感染者) 数に対する顕性感染者 (発症者) 数の割合がそれぞれ1.2%、0.8%であるという報告⁶⁾がある一方で、多くの用量反応モデルで発症の確率が最大100%であることから感染—発症割合を100%と仮定している⁷⁾ ケースもある。そのため、感染—発症割合は0.8~100%の広範囲で設定されているのが現状であり、これらの感染—

* 京都大学大学院工学研究科 〒615-8540 京都府京都市西京区京都大学桂

** 京都大学大学院地球環境学堂 〒615-8540 京都府京都市西京区京都大学桂

〒 連絡先: asada@urban.env.kyoto-u.ac.jp

発症割合の情報に基づいて感染確率から DALYs を推定する場合、感染-発症割合の設定により DALYs 推定値の差が最大 120 倍程度生じることになる。

オランダのある浄水処理施設を対象として、定量的微生物リスク評価 (Quantitative Microbial Risk Assessment; QMRA) によって *C. jejuni* 曝露による感染確率を求め、それに基づいて DALYs を試算した試み⁷⁾がある。その試みでは、取水する原水の種類の影響、浄水処理における除去能に対する水温の影響、病原微生物数と指標微生物の比の影響、用量反応モデルの影響、処理前後の微生物濃度データのベアリング方法の影響、感染-発症割合の影響に関して、DALYs 推定に対する不確実性分析を行った結果、感染-発症割合が DALYs 推定において最も大きな不確実性を持つ因子であると判定している⁷⁾。精度の高い DALYs 推定には信頼できる感染-発症割合に関する情報が不可欠といえる。

一般的に病原体を曝露し感染が成立した後は、発症が認められた状態 (顕性感染)、あるいは発症に至らないままの状態 (不顕性感染) となる。ここで顕性感染者は発症者であり、感染者は感染が成立した者、すなわち顕性感染者と不顕性感染者を含んでいる集団である。そして感染-発症割合を推定していく上では一般集団における感染者数と発症者数の把握が必要となる。また発展途上国では先進国に比べ、*C. jejuni* の曝露頻度が多く免疫レベルが高いため、無症状あるいは穏和な影響を示すことが多い²⁾。つまり *C. jejuni* による感染および発症には、*C. jejuni* の曝露量や曝露頻度、そして感染時に獲得した免疫による感染防御効果が大きく関わっていると考えられ、これらを踏まえた推定方法が望まれる。

感染者数については、食品安全評価委員会により *C. jejuni* の主な感染経路である鶏肉の曝露量・曝露頻度に基づいて年間感染確率・感染者数を推定した試みが報告されている⁸⁾。しかしこの推定方法は、感染時に獲得した免疫による感染防御効果について一切考慮していない。一般的に病原体の感染を受けた人が再び病原体に曝露された場合、初回感染時に産生された抗体が感染した病原体に速やかに結合し、病原体を排除し破壊するといった免疫獲得による感染防御効果を得ることとなる。特に高頻度で病原体に曝露された場合に、免疫獲得による感染防御効果が高いと予想され、対象病原体に対する感染自体も生じない可能性が高い。そのため、*C. jejuni* の主要な感染源である鶏肉の喫食頻度、特に生食の喫食頻度が高い⁹⁾ことを考慮すると、*C. jejuni* 感染に対する免疫獲得による感染防御効果が高いと予想されるため、免疫獲得による感染防御効果を考慮していない推定方法では感染者数を過大評価している危険性がある。

そこで本研究では *C. jejuni* 感染による感染-発症割合の把握を目的とし、*C. jejuni* 感染成立後に症状の有無に関わらず体内で起こる免疫応答に着目して、血清疫学調査により得られた *C. jejuni* の血清抗体価データに基づいて感染者数の推定を試みた。一方、病原体検出情報に記載された *C. jejuni* 分離報告数に基づいて一般集団中の発症者数を算出し、*C. jejuni* 感染による感染-発症割合の推定を行った。

2. 方法

2.1 血清疫学調査の対象

国立感染症研究所が管理・運営する国内血清銀行に保管されている血清の中で、京都府で一般集団を対象として 2006 年～2008 年に採取された血清 140 サンプルを対象とした。なお、年齢区分ごと (5～9 歳, 10～19 歳, 20～29 歳, 30～39 歳, 40～49 歳, 50～59 歳, 60 歳以上) に 20 検体、男女比が 1:1 になるように設定した。感染性腸炎研究会の調査で、1996 年から 2000 年までの 5 年間における *C. jejuni* による感染性腸炎入院患者数が 0～4 歳, 5～9 歳と同程度であることが報告されている⁹⁾。そのため、血清が得られなかった年齢区分 0～4 歳における *C. jejuni* 感染の感染・発症レベルは年齢区分 5～9 歳と同程度であるとみなした。なお、本調査の実施に先立ち、京都大学大学院工学研究科研究倫理委員会の審査・承認を受けた。

2.2 *Campylobacter jejuni* に対する血清中の抗体価の測定

対象とする抗体クラスは、immunoglobulin A (IgA), IgG, IgM とした。なお抗体価測定には、SERION ELISA classic *Campylobacter jejuni* IgG/IgA/IgM キット (Virion/Serion) を使用した。

2.3 *Campylobacter jejuni* による感染-発症割合の推定

2.3.1 一般集団中の *Campylobacter jejuni* 感染者割合の推定

感染者数については、2.2 により得られた抗体価測定結果に基づいて推定した。まず得られた抗体価分布に対して感染者と健常者を判別する陽性カットオフ値を設定し、抗体価陽性と判断された集団を感染者の集団と定義した。そして、140 サンプル中の感染者サンプル割合を一般集団における感染者割合とみなした。

医学的には感染者集団と健常者集団をそれぞれ設定し、各集団の測定した血清抗体価分布データに基づいて感染者と健常者を判別する陽性カットオフ値を設定している。しかし食中毒のケースを活用する場合、不顕性感染者に関しては症状がないことから、多くの病原微生物に対する血清抗体価測定において、感染者集団と健常者集団をそれぞれ設定し抗体価を測定することは困難である。そこで感染者と健常者を判別する陽性カットオフ値の設定方法として、客観的根拠として既往研究の抗体価データを用いて推定する手法について検討を行った。また客観的根拠が得られなかった場合も想定して、統計学的観点からカットオフ値を推定していく手法についても検討し、両推定方法を用いて感染者割合の推定を行った。

(1) 既往研究の医学データに基づいた陽性カットオフ値の設定

抗体価測定試薬に記載されている発症者判定に用いるカットオフ値は、およそ 400 人の血清を分析した結果から得られた値であり、急性胃腸炎の糞便検査を同時に行うことで、発症者を示すカットオフ値として感度、特異性ともに妥当であることが示されている¹⁰⁾。そこで抗体価測定試薬に記載されているカットオフ値を、発症者判定カットオフ値として採用した。

次に既往研究の *C. jejuni* 抗体価に関する医学データの

発症者集団の吸光度平均値と感染者集団の吸光度平均値の中間値が設定した発症者判定カットオフ吸光度値に該当すると仮定した。一方、同様に感染者集団の吸光度平均値と健常者集団の吸光度平均値の中間値が、感染者判定カットオフ吸光度値に該当すると仮定した。そして、感染者カットオフ吸光度値に対する発症者カットオフ吸光度値の上昇率を計算し、その比率を用いて抗体価測定試薬に記載された発症者判定カットオフ吸光度値から感染者判定カットオフ吸光度値を算出した。最後に吸光度と抗体価の関係式を用いて陽性カットオフ値を抗体価として表示した。

(2) 統計的手法に基づいた陽性カットオフ値の設定

統計的手法を用いてある疾患のカットオフ値を設定する場合、カットオフ値により生じる偽陽性、偽陰性の2種類の過誤による平均損失を最小にする値を対象疾患陽性判断のカットオフ値として設定している¹¹⁾。しかし、血清抗体価試験で得られた分布は、健常者分布と感染者分布が複合的に存在する状態であるため、得られた分布を2つのクラスに領域分割する必要がある。

まず得られる1つの分布を複合分布モデルと見なして最尤推定の観点から2つのクラスに領域分割する手法である最大尤度しきい値選定法があり、その方法には2つの推定方法が挙げられている¹²⁾。1つの方法は、各クラスの分布が平均値は異なるが同じ分散を持つ正規分布であるという仮定のもとで、条件付き分布の尤度を最大とするしきい値を求める方法(推定方法1)である。もう1つの方法は、各クラスの分布が異なる平均値と分散を持つ正規分布であるという仮定のもとで、同時分布の尤度を最大とするしきい値を求める方法(推定方法2)である。各推定方法には最大対数尤度関数が設定されている¹²⁾。そして最大対数尤度が最大となるしきい値を、血清疫学調査により得られた抗体価分布を低抗体価分布設定用データ群と高抗体価分布設定用データ群の2つに分割するしきい値と設定した。

抗体価分布をしきい値で2分化した際、各集団のデータ群に偽陽性、あるいは偽陰性のサンプルデータが含まれている可能性がある。そこで低抗体価データ群と高抗体価データ群に対して当てはめた分布と、偽陽性、偽陰性の2種類の過誤による損失の関係式¹¹⁾から陽性カットオフ値の推定を行った。カットオフ値の推定式は以下の通りである。

$$Y(a) = \frac{Y \{ d_1 \int_a^\infty f(x) dx + d_2 \int_a^\infty g(x) dx - 2N \int_a^\infty f(x) dx \cdot \int_a^\infty g(x) dx \}}{1 - \int_a^\infty f(x) dx - \int_a^\infty g(x) dx} \dots (1)$$

$f(x)$ 、 $g(x)$ は、それぞれ低抗体価データ群と高抗体価データ群に対する確率密度関数である。また d_1 、 d_2 は、カットオフ値 a の場合に健常者および感染者と判定されたデータ数、 Y は過誤による平均損失、 N は全サンプル数とした。最後に推定方法1、推定方法2により設定した分布のパラメータと式(1)を用いて陽性カットオフ値を推定した。

なお統計的手法に基づいた推定方法に関しては、仮説検定を行う際に PASW Statistics 17 (IBM) を用いて、両側有意確率が 0.05 以下の場合に仮説が棄却されると判断した。

2.3.2 *Campylobacter jejuni* 感染症発症者数および感染-発症割合の推定

対象地域の発症者数を地方衛生研究所等のホームページに記載されている病原体検出情報から推定した。病原体検出情報では、指定された定点医療機関を受診し採取された患者検体を調査した結果をまとめている。そこで、病原体検出情報に記載された *C. jejuni* 分離報告数を *C. jejuni* 感染により消化器疾患を発症した患者数と設定した。

より正確な発症者数を推定するためには、病原体分離報告数が正確である必要がある。ヒアリング調査により、定点医療機関から地方衛生研究所への *C. jejuni* 菌体分離数の報告率は 100% であることを確認できた神戸市を感染-発症割合推定の対象地域として選定した。また、*C. jejuni* 感染は、主要な汚染源の一つである養鶏場などの畜産業が盛んな地域で多いと予想されるが、血清採取地域である京都府と神戸市の産業形態の違いは小さいとみなし、神戸市の定点医療機関、神戸市環境保健研究所、神戸市中央市民病院から報告されている *C. jejuni* 分離報告数¹³⁾ を実患者数推定に用いた。

しかし、実際には *C. jejuni* 感染により消化器疾患を発症したとしても症状が軽いため医療機関を受診しないといったように、発症していながら分離報告数に含まれないケースが多く存在すると考えられる。そのため、分離報告数の集計データのみでは実際の発症実態を把握できない。そこで、宮城県で実施された急性下痢症疾患の実被害者数推定研究の考え方¹⁴⁾ に従い、対象地域の *C. jejuni* 感染症実患者数を推定した。具体的には、検査機関が対象地域の受診者人口をカバーしているかを示す指標である人口カバー率を推定し、神戸市の医療機関全体の *C. jejuni* 検出数を算出した。次に医療機関における医師の糞便検査率に基づいて、*C. jejuni* 感染症発症者の医療機関受診者数を推定した。最後に患者の医療機関受診率に基づいて、*C. jejuni* 感染症実患者数を推定した。なお、保菌者が便検査で陽性となる割合については 100% とみなした。

まず外来患者延数を用いて、対象地域である神戸市の全医療機関と定点医療機関の外来患者延数から人口カバー率を求めた。糞便検査率と医療機関受診率については、宮城県で実施された急性下痢症疾患の実被害者数推定研究のデータ¹⁴⁾ に基づいて設定した。そして *C. jejuni* 分離報告数を基にして、人口カバー率、糞便検査率、医療機関受診率の要因を加味することで得られた *C. jejuni* 感染症実患者数を、発症者数と設定した。血清抗体価分布から推定した一般集団中の感染者割合を神戸市に適用し、神戸市における3年間の *C. jejuni* 感染者数を算出し、神戸市における3年間の *C. jejuni* 感染症実患者数から、感染-発症割合を推定した。

3. 結果および考察

3.1 一般集団中の *Campylobacter jejuni* 感染者割合の推定

3.1.1 各抗体クラスにおける血清抗体価分布

140 サンプルについて、各抗体クラス毎の血清抗体価を測定した結果を Fig. 1 に示す。血清抗体価は、IgA 抗体で $0.03 \sim 20.6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、IgG 抗体で $0.6 \sim 31.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、

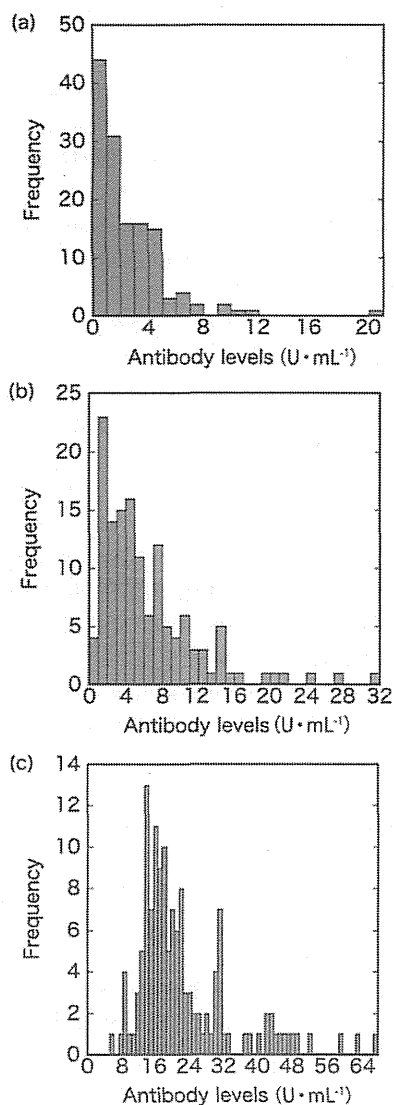


Fig. 1 The distributions of the antibody levels.
(a) IgA (b) IgG (c) IgM

IgM 抗体で $5.6 \sim 66.4 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ となり、健常者集団においても全ての抗体クラスにおいて抗体価が幅広く分布することがわかる。抗体価測定試薬には、発症者を判定するカットオフ値 (IgA 抗体: $25 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, IgG 抗体: $30 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, IgM 抗体: $60 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) が設定されているが、今回の測定サンプル中にも IgG 抗体、IgM 抗体についてはこのカットオフ値を上回るサンプルが存在した。Blaser ら (1984) や Black ら (1988) は、ボランティア試験などにより顕性感染者集団、不顕性感染者集団、健常者集団の順に抗体価レベルが低下する傾向にあると報告している^{15,16)}。140 サンプルの中に不顕性感染者あるいは発症者に由来するサンプルが存在する可能性が高い。そこで全血清サンプル中の感染者サンプル割合を推定するために、血清抗体価の測定データを用いて感染者を判定する陽性カットオフ値の設定を試みた。

3.1.2 既往研究の医学データに基づいた陽性カットオフ値の設定

Blaser ら (1984) と Black ら (1988) は、発症者、感染者、健常者集団の血清抗体価をそれぞれ ELISA 法により測定し、その吸光度分布を表すとともに各集団間における

吸光度の差を確認した^{15,16)}。そこで、Blaser ら (1984) と Black ら (1988) の *C. jejuni* 抗体価に関する医学データ^{15,16)}を本研究に用いる感染者判定陽性カットオフ値設定用の医学データと設定し、2.3.1 (1)の方法に従い、感染者判定陽性カットオフ値の設定を行った。

その結果、Blaser ら (1984) のデータ¹⁵⁾を用いた場合、吸光度上昇率は IgA 抗体で 2.6 倍、IgG 抗体で 1.8 倍、IgM 抗体で 2.6 倍となり、感染者に対する陽性カットオフ値は、IgA 抗体で $8.2 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、IgG 抗体では $13.2 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、IgM 抗体では $21.9 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ と計算された。一方 Black ら (1988) のデータ¹⁶⁾を用いた場合、吸光度上昇率は IgA 抗体で 2.4 倍、IgG 抗体で 1.7 倍、IgM 抗体で 1.3 倍となり、感染者に対する陽性カットオフ値は、IgA 抗体で $9.0 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、IgG 抗体では $14.9 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、IgM 抗体では $47.3 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ と計算された。

本研究では、Blaser ら (1984)¹⁵⁾および Black ら (1988)¹⁶⁾の報告に示された吸光度上昇率をともに使用したため、陽性カットオフ値は一意的に定まらなかった。そこで、今回推定された2つの陽性カットオフ値を、医学データに基づいて推定した陽性カットオフ値として採用した。

3.1.3 統計的手法に基づいた陽性カットオフ値の設定

(1) 最大尤度しきい値選定法による血清抗体価分布の領域分割

最大尤度しきい値選定法の推定方法1でしきい値を算出した結果、IgA 抗体で $3.9 \sim 4.1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、IgG 抗体で $10.6 \sim 10.8 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、IgM 抗体で $27.6 \sim 27.9 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ となった。

一方、推定方法2を用いてしきい値を算出した結果、IgA 抗体で $6.6 \sim 7.0 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、IgG 抗体で $11.5 \sim 12.3 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、IgM 抗体で $32.1 \sim 36.1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ となった。なお、ある抗体価の範囲でデータが存在しなかった場合、各推定方法の判定に用いる最大対数尤度がしきい値が変動したとしても変動しないケースがあるため、2つの推定方法ともにしきい値が一点では決定できず範囲が生じた。

最大尤度しきい値選定法では各分布設定用データ群が正規分布に従うと仮定している。そこで2種類の推定方法から得られたしきい値により2分化したデータ集団に対して、コルモゴロスースミノフ検定を行った。推定された正規分布のパラメータと有意確率を Table 1 にまとめる。IgA 抗体の高抗体価分布設定用データ群 (推定方法1) と IgA 抗体の低抗体価分布設定用データ群 (推定方法2) に関しては、「正規分布に従う」という仮説が棄却された。そのため、今回測定した IgA 抗体データ群には、この手法は不適切であると判定された。その理由として IgA 抗体の高抗体価データ数が極端に少ないことが影響していると考えられ、IgA 抗体に関してはデータ数を増やすことで今回提案した手法でしきい値が推定可能となると思われる。

以上を踏まえて陽性カットオフ値推定には、IgM 抗体、IgG 抗体に対して正規分布に従うと仮定し、これらの設定分布に基づいて検討を行っていくこととした。また IgA 抗体に対しても、不確実性要素として取り上げ、Table 1 に示した正規分布を設定し、陽性カットオフ値の推定を行っていくこととした。

Table 1 The parameters of normal distribution.

	Estimation method 1		Estimation method 2	
Antibody class	IgA		IgA	
Data group	Low antibody levels	High antibody levels	Low antibody levels	High antibody levels
Data	107	33	131	9
Parameters of normal distribution				
Mean values (U·mL ⁻¹)	1.6	6.4	2.2	10.4
Standard deviation	1.06	3.32	1.62	4.24
Significance probability	0.563	0.041	0.025	0.418
Antibody class	IgG		IgG	
Data group	Low antibody levels	High antibody levels	Low antibody levels	High antibody levels
Data	116	24	120	20
Parameters of normal distribution				
Mean values (U·mL ⁻¹)	4.4	17.0	4.7	18.1
Standard deviation	2.65	6.21	2.87	6.16
Significance probability	0.248	0.123	0.139	0.147
Antibody class	IgM		IgM	
Data group	Low antibody levels	High antibody levels	Low antibody levels	High antibody levels
Data	107	33	123	17
Parameters of normal distribution				
Mean values (U·mL ⁻¹)	16.8	38.7	18.5	46.9
Standard deviation	4.34	10.6	6.03	8.59
Significance probability	0.967	0.080	0.251	0.530

(2) 2種類の過誤による平均損失に基づいた陽性カットオフ値の推定

式(1)と各抗体価データ群に対する設定分布を用いて、陽性カットオフ値を算出した。その結果、推定方法1を用いた場合、本手法により推定された陽性カットオフ値は、IgA抗体で5.1 U·mL⁻¹、IgG抗体で11.2 U·mL⁻¹、IgM抗体で30.8 U·mL⁻¹と計算された。一方、推定方法2を用いた場合、IgA抗体で10.3 U·mL⁻¹、IgG抗体で13.0 U·mL⁻¹、IgM抗体で34.0 U·mL⁻¹と計算された。本研究では、推定方法1と推定方法2で異なる前提条件を用いて推定を行っており、陽性カットオフ値を1点に決定することはできなかった。そこで、今回推定された2つの陽性カットオフ値を、統計学的手法に基づいて推定した陽性カットオフ値として採用した。

3.2 感染者判定の抗体クラスの選定および血清抗体価分布に基づいた一般集団中の感染者割合の推定

感染者を判定する上でもう一つの重要な要素が、感染者判定に用いる抗体クラスの選定である。抗体クラスは、クラスごとに異なる *C. jejuni* 感染に対する抗体価上昇パターンを示す。IgA抗体、IgM抗体は感染後短期間で抗体価が上昇し、2ヶ月程度で健常者と同レベルまで低下する傾向を示す¹⁷⁾。一方で、IgG抗体は抗体価の持続期間が長く、1年以上も高い抗体価を持続するケースもある¹⁷⁾。Angら(2007)は、IgG抗体は若年層で上昇を示さないケースがあり、IgA抗体とIgM抗体の方が発症者

の指標として適切であると報告している¹⁸⁾。そこで、得られた各抗体クラスの血清抗体価分布から、本研究の感染-発症割合推定方法に適切な抗体クラスを選定する必要がある。

まず抗体価測定結果に対して、各抗体クラスの年齢層ごとの抗体価分布を調べた。その分布をFig. 2に示す。若年者ではIgM抗体が高い抗体価を示しており、一方でIgA、IgG抗体は30-39歳でピークを示し、その後徐々に低下する傾向となった。そのため若年者の判定にはIgM抗体が有効であり、年配者の判定にはIgA抗体あるいはIgG抗体が有効と判断した。

IgA抗体とIgG抗体に関して抗体価の上昇、持続パターンが大きく異なることから、感染者判定の際に片方のみあるいは両方の抗体クラスを用いるかを選定する必要がある。そこで、同一検体におけるIgA抗体価とIgG抗体価の関係を調べた。その結果、IgA抗体とIgG抗体は年齢による分布が同傾向であるにも関わらず、IgA抗体、IgG抗体のみが高い抗体価を示すケースが存在した。

IgA抗体のみ抗体価が高いケースは、*C. jejuni* 曝露後抗体価が上昇するまでの期間がIgA抗体の方がIgG抗体と比較して短いため、直近の感染履歴があることを表すと考えられる。IgG抗体に関しては、Stridら(2001)が *C. jejuni* 感染症患者の抗体価変動を2年間追跡した結果、2年間が経過しても高い抗体価を示すケースがあることが示されている¹⁷⁾。しかし、それ以降の抗体価変動は明らかでないため、感染あるいは発症により高いIgG

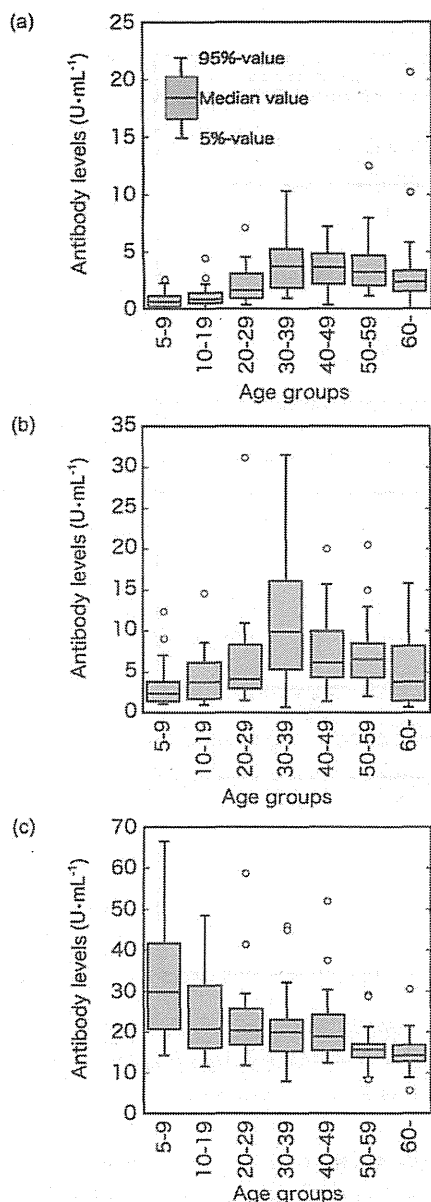


Fig. 2 The distributions of antibody levels in age groups. (a) IgA (b) IgG (c) IgM

抗体価を保有した場合に、健常者レベルまでに抗体価が減少する期間が予測できない状況にある。つまり、IgG抗体のみが高い抗体価を持つ人の感染時期を特定することができないため、調査期間より以前に感染した人を調査期間内に感染したものと判断してしまう可能性がある。

一方でIgA抗体あるいはIgM抗体を判定に用いる場合でも、3年間の調査期間を考慮した場合に、調査期間に感染したにも関わらずIgA抗体およびIgM抗体の抗体価が健常者レベルまで低下している人を見逃してしまう可能性は否めない。しかしIgG抗体とは異なり、IgA抗体、IgM抗体は抗体価が変動する期間が感染後2ヶ月程度である¹⁷⁾ため、IgA抗体あるいはIgM抗体が陽性であれば本研究で設定した調査期間に感染したと見なすことができると考えられる。本研究ではこれらの特徴を重視し、IgA抗体およびIgM抗体を直近の感染履歴判定に用いることとした。そして、IgA抗体、IgM抗体が3.1

で設定した感染者に対する陽性カットオフ値以上の抗体価を示したサンプルを、採血年に感染した経歴を持つサンプル（感染者サンプル）と判定した。

この判定基準を用いて一般集団における感染者割合を推定した結果、医学データを用いた推定方法では、7.9～35.0%と推定された。統計学的手法に基づいた推定方法では、IgA抗体を使用することができないため、ここではIgM抗体のみで感染者の判定を行った。その結果、一般集団における感染者割合は12.1～13.6%と推定された。参考としてIgA抗体を含んだ場合の感染者割合を推定すると14.3～23.6%となり、IgA抗体による判定の有無で感染者割合が変動することが確認された。これは、IgM抗体が若年者の判定に、IgA抗体が年配者の判定に有効であるという特性が影響していると考えられる。IgM抗体のみでは年配者の抗体価上昇があまり見られず、年配者の直近の感染履歴判定が難しいため、IgM抗体のみで感染者を判定する場合に年配者に対して誤陰性を示してしまう可能性がある。そのため、年配者の直近の感染履歴判定としてIgA抗体が取り上げられており、より正確に感染者割合を推定するためにはIgA抗体による感染者判定も必要であるといえる。

3.3 病原体分離報告数に基づいた *Campylobacter jejuni* 発症者数の推定および感染—発症割合の推定

神戸市における *C. jejuni* 感染症実患者数を推定するために、まず人口カバー率、糞便検査率、医療機関受診率について推定を行った。アンケート調査により13の対象医療機関の外来患者延数を調査した結果、定点医療機関における平成20年度の外来患者延数が2,566,012人であった。そして病院報告・医療施設調査で報告されている精神病院を除いた神戸市全体の医療機関の外来患者延数¹⁹⁾が8,086,015人であり、人口カバー率は31.7%となった。

次に糞便検査率と医療機関受診率の設定を行った。宮城県で行われた下痢症患者の実被害者数把握研究では、全国の電話調査の結果と宮城県の電話調査の結果が、ほぼ同程度であることを報告している¹⁴⁾。また、人口の年齢別分布が宮城県と神戸市でほとんど変化がなかったため、人口分布補正の影響は無視できると考えられる。そこで、宮城県での電話調査により推定された糞便検査率10.9%¹⁴⁾と医療機関受診率32.0%¹⁴⁾を、本研究での *C. jejuni* 感染症実患者数推定に用いることとした。

実患者数推定のために2006年から2008年の3年間の分離報告数を調査した結果、2006年から2008年の3年間の分離報告数は2,159件となった。なお、神戸市では対象医療機関からの報告率は100%である。この報告数と設定した人口カバー率、糞便検査率、医療機関受診率を用いて実患者数を推定したところ、3年間の実患者数は195,262人となり、年間10万人あたり4,252人が *C. jejuni* 感染症を発症したと推定された。

C. jejuni 感染症実患者数において日本国内では大きな差はないと予想されるものの、実患者数推定に必要な人口カバー率、糞便検査率、医療機関受診率、そしては定点医療機関から地方衛生研究所への *C. jejuni* 菌体分離数の報告率といった要因の設定方法を変更した場合、実患者数の推定値は大きく変動する可能性がある。そのた

Table 2 The parameters for estimating the illness-to-infection rate of *C. jejuni*.

	Estimation method based on medical data	Estimation method based on statistical method
The rate of asymptomatic infections (%)	7.9~35.0	12.1~13.6
The number of asymptomatic infections (person)	362,759~1,607,161	555,619~624,496
Correction factor		
Population coverage rate (%)	31.7	31.7
Consultation rate (%)	32.0	32.0
Stool sampling rate (%)	10.9	10.9
Laboratory-confirmed cases	2,159	2,159
The number of symptomatic infections (person)	195,262	195,262
The illness-to-infection rate of <i>C. jejuni</i> (%)	12.1~53.8	31.3~35.1

め、各要因の設定方法に関して様々な地域の情報を用いて検討していく必要がある。しかし、定点医療機関から地方衛生研究所への*C. jejuni*菌体分離数の報告率の設定は、地方衛生研究所、あるいは定点医療機関へのヒアリング調査が必要となる。報告率は病原体検出情報の*C. jejuni*分離報告数の正確性に関与しているため、実患者数推定に大きな影響を及ぼすと考えられる。そのため、神戸市以外の地域で*C. jejuni*感染症実患者数を推定する場合は、人口カバー率、糞便検査率、医療機関受診率といった要因を患者数のデータなどで設定する一方で、*C. jejuni*菌体分離数の報告率に関してもヒアリング調査を行うことで情報を集めることが重要である。そして対象地域においてそれらの情報が得られた場合に、本研究で用いた推定方法によって*C. jejuni*感染症実患者数を推定し、感染-発症割合を算出することが可能であると推定される。

最後に、感染-発症割合推定に必要なパラメータと推定結果をTable 2に示す。その結果、感染-発症割合は、既往研究での医学データを用いた推定方法で12.1~53.8%、統計学的手法に基づいた推定方法で、IgM抗体のみを判定基準にした場合に31.3~35.1%と推定された。一方IgA抗体を判定基準に組み込んだ場合は、感染-発症割合が18.0~29.7%と推定された。

IgM抗体は若年者の判定に有効である一方で年配者に対しては誤陰性を示す可能性がある。年配者の判定にIgA抗体を用いていることから、全年齢群における感染-発症割合を推定するためにはIgA抗体の判定が必要である。そのためIgA抗体の抗体価に関するデータ数をより多く確保することで、統計学的手法に基づいた推定方法でIgA抗体による判定が可能か否かを判定する必要があるといえる。

またBlackら(1988)が行ったボランティア試験結果では感染-発症割合は0~60.0%の範囲に存在しており¹⁶⁾、2つの推定方法で得られた推定値も共にこの範囲内にあった。本手法を用いて感染-発症割合を推定することで、現状の感染-発症割合の設定値である0.8~100%と比較してその範囲を大幅に小さくでき、結果としてDALYs推定の不確実性を小さくすることが可能である。また他の病原微生物による感染-発症割合を推定する際に、血清抗体価測定情報に対する対象者の病原微生物感染状況といった付随する情報が限られる場合において、本研究で確立した推定方法により感染-発症割合

を推定することが可能であるといえる。そして本研究で確立した推定方法により感染-発症割合を推定する際には、医学データの有無、十分な血清抗体価のデータ数の確保、*C. jejuni*分離報告数の正確性などの諸条件を考慮した上で、感染-発症割合推定に必要なデータの取得および推定方法を選択していく必要がある。

4. まとめ

水道水の微生物リスク評価指標としてDALYsを取り上げ、*C. jejuni*を対象として、その計算過程において不確実性が高い因子である感染-発症割合を血清疫学調査を用いて推定した。血清疫学調査により、一般集団における感染者割合は医学データを用いた推定方法では7.9~35.0%、統計学的手法に基づいた推定方法では、12.1~13.6%と推定された。一方、神戸市の*C. jejuni*分離報告数を基に推定した発症者数から*C. jejuni*感染による感染-発症割合を求めた結果、医学データに基づいた推定方法では12.1~53.8%、統計学的手法に基づいた推定方法では31.3~35.1%と評価され、感染-発症割合の範囲を大幅に小さくすることができた。そのため血清疫学調査による感染-発症割合の推定により、DALYs推定の精度向上が可能になる。

謝辞

本研究で用いた血清サンプルは、国立感染症研究所から分与されたものである。記して謝意を表す。本研究を行うにあたり有益な御助言を賜った国立感染症研究所遠藤卓郎先生、泉山信司先生、神戸市環境保健研究所貫名正文氏、京都大学大学院工学研究科松井利仁准教授、神戸市水道局小田琢也氏に深く感謝する。

(原稿受付 2012年1月17日)

(原稿受理 2012年7月10日)

参考文献

- 1) 伊藤禎彦, 城征司, 平山修久, 越後信哉, 大河内由美子 (2007) 水道水に対する満足感の因果モデル構築と満足感向上策に関する考察, 水道協会雑誌, 76, 25-37.
- 2) Havelaar, A. H. and Melse, J. M. (2003) Quantifying public health risk in the WHO Guidelines for drinking-water quality; A burden of disease approach, RIVM report 734301022.
- 3) 山田俊郎, 秋葉道宏 (2007) 最近10年間の水を介した健康被害事例, 保健医療科学, 56, 16-23.
- 4) Tompkins, D. S., Hudson, M. J., Smith, H. R., Eglin, R. P., Wheeler, J. G., Brett, M. M., Owen, R. J., Brazier, J. S., Cumberland, P., King,

- V., and Cook, P. E. (1999) A study of infectious intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls, *Commun. Dis. Public Health*, 2, 108-113.
- 5) De Wit, M. A. S., Koopmans, M. P. G., Kortbeek, L. M., Wannet, W. J., Vinjé, J., van Leusden, F., Bartelds, A. I. M. and van Duynhoven, Y. T. H. P. (2001) Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology, *Am. J. Epidemiol.*, 154, 666-674.
- 6) Havelaar, A. H., van Pelt, W., Ang, C. W., Wagenaar, J. A., Gross, U., van Putten, J. P. M. and Newell, D. G. (2009) Immunity to *Campylobacter*: its role in risk assessment and epidemiology, *Critical Reviews in Microbiol.*, 35, 1-22.
- 7) Itoh, S. (2010) Quantification of infection risk and disease burden of drinking water, Annual Conference on Health Risk Management in FY 2009, Kyoto University Global COE Program Global Center for Education and Research on Human Security Engineering for Asian Megacities, 37-50.
- 8) 食品安全委員会 (2009) 鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ/コリ, <https://www.fsc.go.jp/fscii/evaluationDocument/show/kya20041216001> (2011年12月時点).
- 9) 小花光夫, 相楽裕子, 青木知信, 金龍起, 滝沢慶彦, 角田隆文, 入交昭一郎, 山下和予 (2002) 「感染性腸炎の最近の動向」- 1996年~2000年における感染性腸炎研究会の調査成績より-, *感染症雑誌*, 76, 355-368.
- 10) Virion-Serion (2009) Virion-Serion, SERION ELISA classic, http://www.virion-serion.de/uploads/mit_download/Campylobacter_V_8-eng_01.pdf (2011年7月時点).
- 11) 丹後敏郎, 宮原英夫 (1995) 医学統計学ハンドブック, 720pp., 朝倉書店, 東京.
- 12) Kurita, T., Otsu, N. and Abdelmalek, N. (1992) Maximum likelihood thresholding based on population mixture models, *Pattern Recognition*, 25, 1231-1240.
- 13) 神戸市 神戸市感染症発生動向調査, 月報, <http://www.city.kobe.lg.jp/life/health/infection/trend/kgtop.html> (2011年11月時点).
- 14) 春日文子, 窪田邦宏 (2009) 宮城県における積極的食品由来感染症病原体サーベイランスならびに急性下痢症疾患の実被害者数推定 (微生物に起因する原因不明食中毒の実態調査に関する研究), 厚生労働科学研究費補助金 食品衛生関連情報の効率的な活用に関する研究 平成20年度分担研究報告書, 127-155.
- 15) Blaser, M. J. and Duncan, D. (1984) Human serum antibody response to *Campylobacter jejuni* infection as measured in an enzyme-linked immunosorbent assay, *Infect. Immun.*, 44, 292-298.
- 16) Black, R. E, Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P. and Blaser, M. J. (1988) Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans, *J. Infect. Dis.*, 157, 472-479.
- 17) Strid, M. A., Engberg, J., Larsen, L. B., Begtrup, K., Mølbak, K. and Krogfelt, K. A. (2001) Antibody response to *Campylobacter* infections determined by an enzyme-linked immunosorbent assay: 2-year follow-up study of 210 patients, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8, 314-319.
- 18) Ang, C. W., Krogfelt, K., Herbrink, P., Keijsers, J., van Pelt, W., Dalby, T., Kuiff, M., Jacobs, B. C., Berbman, M. P., Schiellerup, P. and Visser, C. E. (2007) Validation of an ELISA for the diagnosis of recent *Campylobacter* infections in Guillain-Barré and reactive arthritis patients, *Clin. Microbiol. Infect.*, 13, 915-922.
- 19) 厚生労働省大臣官房統計情報部 (2008) 平成20年 医療施設 (静態・動態) 調査・病院報告 下巻 (都道府県編), 692pp., 厚生統計協会, 東京.

[論 文 要 旨]

水道水を介した水系感染症による健康影響を表す指標として、障害調整生存年数 (Disability Adjusted Life Years: DALYs) に着目し、*Campylobacter jejuni* を対象として、その評価値に最も影響を与える因子である感染-発症割合を、血清疫学調査に基づいて推定した。まず血清疫学調査で得られた血清抗体価データに対して、既往研究の医学データ、統計学的手法を用いて感染者を判定する陽性カットオフ値を設定し、一般集団における感染者割合を求めた。その結果、7.9~35.0% (医学データ)、12.1~13.6% (統計学的手法) と推定された。最終的に *C. jejuni* 分離報告数に基づいて推定した発症者数から *C. jejuni* 感染による感染-発症割合を求めた結果、12.1~53.8% (医学データ)、31.3~35.1% (統計学的手法) と評価された。

キーワード：障害調整生存年数；水系感染症；カンピロバクター・ジェジュニ；感染-発症割合；血清疫学調査

Comparison of inflammatory responses in human cells caused by lipopolysaccharides from *Escherichia coli* and from indigenous bacteria in aquatic environment

YUMIKO OHKOUCHI¹, SATOSHI TAJIMA², MASAHIRO NOMURA³ and SADAHIKO ITOH¹

¹Department of Global Ecology, Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University, Nishikyo-ku, Kyoto, Japan

²West Japan Railway Company, Shinkansen Hakata, Fukuoka, Japan

³Department of Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan

The endotoxic activities of lipopolysaccharides (LPSs) in water samples are usually determined using a *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) assay, but it is known that the determined activities do not always represent their inflammatory potency in humans. In this investigation, the inflammatory responses in three different human cells stimulated with *Escherichia coli* LPS, keratinocyte, CD14⁺ monocyte, and THP-1, were compared using cytokine secretion as biomarkers to develop novel *in vitro* assay systems for detecting changes in inflammatory potencies of endotoxins in aquatic environment. Only THP-1 with 6-h stimulation showed dose-dependent responses in the range of normal endotoxin levels in aquatic environment. Then, the inflammatory potency of environmental LPS, which was purified from river water, was tested using THP-1. The levels and patterns of cytokine secretion after the environmental LPS stimulation were completely different from *E. coli* LPS. Interleukin 8 (IL-8) secretions after the environmental LPS stimulation were approximately 10-fold higher than those after *E. coli* LPS stimulation. The environmental LPS also induced much higher levels of TNF- α secretions in THP-1. These results suggest that a diversity of LPS structures in aquatic environment could contribute to stronger and different inflammatory responses. This investigation indicated that the proposed THP-1 assay system could be useful for detecting the changes in inflammatory potencies caused by aquatic bacteria.

Keywords: Lipopolysaccharide (LPS), endotoxin, human keratinocyte, human blood cells, cytokine secretion, aquatic environment.

Introduction

It is widely known that lipopolysaccharides (LPSs), which are outer membranes of gram-negative bacterial or cyanobacterial cells, can cause strong innate immune reactions in humans via Toll-like receptor 4 (TLR-4) on cell surfaces. Their biological activities are also called endotoxin. In aquatic environments or manmade water systems, there are various situations in which endotoxins increase: cyanobacterial blooms in water resources^[1], bacterial regrowth in piped water systems^[2], water reuse^[3] and so on.

An increase of endotoxins caused by cyanobacterial blooms requires enhancement of physicochemical removal process, such as coagulation-sedimentation or media filtration. The endotoxins in piped water can be increased with detachment of accumulated biofilm inside pipe systems.

The bacterial communities inside pipes varying from systems to systems have not yet been elucidated, but Norton and LeChevallier^[4] reported that gram-negative bacteria were dominant in biofilm.

Reclamation of wastewater in particular is increasingly gaining attention as a solution to reduce imbalances in the quantity and quality of water resources in urban areas. However, treated wastewater usually contains a higher level of endotoxins than virgin water, not only because the sewage itself contains a high level of bacterial substances but because endotoxins are released from activated sludge^[5] during the decay process in sewage treatment. Thus, as a result of concern about increasing endotoxin levels in aquatic environments, knowledge of the endotoxin levels and their changes has been accumulating to enhance endotoxin monitoring.

To determine endotoxin levels in water samples, *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) assay is widely used. This highly sensitive assay is based on the coagulating reaction of LAL with endotoxin, and can detect trace amounts of endotoxin. In this method, relative endotoxin levels in samples to *Escherichia coli* (*E. coli*) LPS reference standard are determined. However, there has been an on-going argument

Address correspondence to Yumiko Ohkouchi, Department of Global Ecology, Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University, Kyoto Daigaku Katsura CI-2-233, Nishikyoku, Kyoto 615-8540, Japan; E-mail: yohkouchi@urban.env.kyoto-u.ac.jp

Received December 24, 2011.

that endotoxic activity determined by LAL assay represents the potency to induce immune responses in humans.^[6-7] As the relationships between the endotoxic activity and LPS structures were determined for some enteric/non-enteric bacteria, it became known that the differences in the chemical structures of LPS could also contribute to the potency to induce immune responses in humans.^[8]

However, there is still little available information on endotoxin toxicity caused by indigenous bacteria in aquatic environments. Pool et al.^[9] and Wichmann et al.^[10] attempted to evaluate the inflammatory potency of endotoxins in river water using human whole blood cells or peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors. These methods were originally developed as alternative methods to animal testing to detect pyrogenic substances including endotoxins, and were recognized as very sensitive screening tools for pharmaceuticals contaminated with trace levels of pyrogenic substances.^[11-12]

Unfortunately, these methods may not always work well in the quantitative detection of endotoxins in aquatic environments because the endotoxin levels are usually much higher than the contaminated pharmaceuticals. There is also a lot of individual variation in the reactivity of blood cells collected from different donors. These disadvantages made it more difficult to compare the obtained data by different assay systems, and therefore novel assay systems for pharmaceuticals using monocytoid cell lines were proposed to mitigate the variation.^[13-14] Thus, an appropriate *in vitro* assay system, which would enable us to detect endotoxin contamination and to assess the toxicity in water samples taken from the environment or water systems, is needed.

In this investigation, three different cell lines, normal human epidermal keratinocyte (NHEK) and two types of blood cells were compared regarding their responsiveness to endotoxin stimulation. Keratinocytes make up approximately 95% of the cells in the human epidermis, and it is well known that keratinocytes express cell surface TLR-4 and play a role in cutaneous inflammation and immune responses by dermal contact of bacterial agents^[15] as well as acting as a barrier for environmental stimuli.

Based on the comparison results, the most appropriate cell line was chosen to detect changes in toxicity caused by endotoxins in the aquatic environment. Then, LPSs sample derived from indigenous bacteria on river water was purified. The cells were then exposed to the purified environmental LPS, and the cytokine secretions were determined to estimate the relative toxicity of endotoxins derived from bacteria in aquatic environments to that derived from *E. coli*.

Materials and methods

Water sampling

A 21.8 L river water sample was taken in the downstream area of the Yodo River in Osaka (N34.72.48.47, E135.51.30.37) in December 2010. The water container was soaked

with Pyroclean (Alerchek, Inc., Portland, ME, USA) for more than 1 hour to degrade endotoxin contamination, and then rinsed thoroughly with endotoxin-free Milli-Q water. The endotoxin-free Milli-Q water was produced with Milli-Q Academic equipped with a BioPak cartridge as a final filter. The water sample was transported to our laboratory under refrigeration at 4 °C. The culturable and total bacterial cell counts were determined by pour plating using R2A agar plates and fluorescence microscopic enumeration after 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, respectively.

Endotoxin extraction

First, the river water sample was filtrated through a glass fiber filter (GA-100, Advantec Toyo Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan) and then enriched using an ultrafiltration device with membranes of MWCO 10,000 (Q0100, Advantec Toyo Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan). The devices and membranes were washed with 5 N or 1 N NaOH by soaking for more than 3 h to degrade organic contaminants, and then rinsed thoroughly with endotoxin-free Milli-Q water.

After the enriched sample was lyophilized, LPS was extracted according to the method reported by Bernardová et al.^[16] A brief description of the procedure follows. An equal volume of hot 90% phenol-water mixture was added to the suspension of lyophilized cells (20.3 mg) in endotoxin-free water, and then stirred at 65–70 °C for 20 min. This extraction procedure was repeated twice.

After centrifugation, the supernatant aqueous phase was collected and dialyzed using Spectra/Por 7 (1000 Da; Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) against endotoxin-free Milli-Q water for 3–4 days. The dialyzed sample was lyophilized again, and dissolved in 0.1 M Tris-HCl buffer containing 25 µg/mL RNase A (from Bovine Pancreas, Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan). After incubation for 16 h at 37 °C to degrade RNA, an equal volume of 90% phenol-water solution was added again, and stirred vigorously. The aqueous phase containing LPS was separated by centrifugation at 9600 × *g* and dialyzed sufficiently against endotoxin-free water using Amicon Ultra-15 (MWCO 3 kDa, Millipore Japan, Tokyo). Finally, the dialyzed sample was lyophilized and stored at –80 °C until further assay.

Cell culture

Normal human epidermal keratinocytes (NHEK (B); adult breast skin) were purchased from Kurabo Industries Ltd. (Osaka, Japan), and cultured in serum-free keratinocyte growth medium, EpiLife (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo, Japan), supplemented with purified bovine serum albumin, purified bovine transferrin, hydrocortisone, recombinant human insulin-like growth factor type-1, prostaglandin E2, and recombinant human epidermal growth factor. The assays were performed using four passages NHEK.

Cryopreserved CD14⁺ monocyte was purchased from TAKARA BIO Inc. (Otsu, Shiga, Japan) and cultured in LGM-3 medium (Lonza, MD, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). The assays were performed using monocytes after 3–7 days incubation. THP-1 (JCRB0112.1) purchased from the Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank was cultured in RPMI1640 medium with 5% heat-inactivated FBS. The passages of the THP-1 cells were unknown. All culture flasks were incubated at 37 °C in humidified 5% CO₂.

Endotoxin stimulation

Aliquots of 100 μ L NHEK suspension at 1.0×10^5 cells/mL were seeded in flat-bottomed 96-well culture plates (Greiner Bio-One Co. Ltd., Tokyo, Japan) and incubated at 37 °C in humidified 5% CO₂ for 24 h prior to endotoxin stimulation. The non-adherent cells, CD14⁺ monocyte and THP-1 were suspended into each medium at 1.0×10^6 cells/mL. Aliquots of 100 μ L cell suspensions were seeded in the same way, and then preincubated for 3 h. LPSs purified from *E. coli* O55:B5 (Sigma Aldrich Japan) or the river water samples were dissolved in endotoxin-free Milli-Q water and filtrated through with a sterilized 0.2 μ m syringe filter (DISMIC-25CS, Advantec Toyo Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan). After preincubation, the culture medium in each well was removed and 100 μ L fresh medium was added. The NHEK was stimulated for 48 h by adding aliquots of 10 μ L LPS suspension into each well. The blood cells (CD14⁺ monocytes and THP-1) were stimulated 6 and 24 h in the same manner.

Determination of cytokine levels and cell counts

After stimulation with LPS, the culture supernatants were removed and stored at –80 °C until cytokines determination. An aliquot of 100 μ L fresh medium was added to each well again, and the cells were incubated for 30 min. Viable cell counts were then determined using Cell Counting Kit-8 (Dojin Laboratories, Tokyo, Japan). The cytokines, tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-8, were measured by indirect sandwich ELISA assays (Diacclone, Gen-Probe Inc., San Diego, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

Endotoxin determination

The endotoxins in river water samples were fractionated by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min at 4 °C, and the supernatant fractions were used for free endotoxin determination. The endotoxins in the water samples were determined by a kinetic-chromogenic LAL assay using Pyrochrome (Seikagaku Biobusiness Corporation, Tokyo, Japan). The unintentional reaction with β -glucan remaining in the samples was blocked using a Glucashield buffer. LPS purified from *E. coli* strain O113:H10 (Seikagaku Biobusi-

ness Corporation, Tokyo, Japan) was used for calibration, and the results were represented in endotoxin units (EU). Each sample was diluted with endotoxin-free Milli-Q water. Pipette chips and microplates guaranteed to be endotoxin-free were used for assay.

RT-PCR assay for mRNA expression levels of TLR-2

This assay was performed to check an involvement of contaminated substances from gram-positive bacteria in the purified LPS from the river water sample. Toll-like receptor 2 (TLR-2) can recognize the cell components of gram-positive bacteria such like peptidoglycan or lipoteichoic acid, and the expression level changes by stimulation with those compounds. THP-1 was stimulated with LPSs purified from *E. coli* O55:B5 and the river water for 2 h at 0, 500, 1000 EU/mL, and then total RNA was extracted from the cells using RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen K.K., Tokyo, Japan). Reverse transcription of the RNA samples to cDNA was performed with PrimeScript II 1st strand cDNA synthesis Kit (TAKARA BIO Inc., Otsu, Shiga, Japan). PCR using primer pairs for TLR-2 was basically performed according to the method reported by Yang et al.^[17] using TAKARA PCR Thermal Cycler Dice. Amplified products were visualized on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide under UV light.

Contaminant assay by blocking endotoxin activity

The contribution of contaminated substances in the purified LPS from the river water sample to the changes in cytokines secretion of THP-1 was also evaluated by adding Polymixin B sulfate (Sigma Aldrich Japan) as an inhibitor of endotoxin activity. The LPS samples purified from *E. coli* O55:B5 and the river water (5000 EU/mL) were pre-treated with 50 μ g/mL Polymixin B for 1 hour at room temperature. Then, THP-1 was stimulated with the pre-treated LPSs at 500 EU/mL and the cytokine secretions were determined in the same way as above-mentioned.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA, USA). Data were compared by *t*-test, and the significant differences were determined with a level of $p < 0.05$ in all analyses.

Results and discussion

Cytokine secretions in three different cell lines stimulated with endotoxin

NHEK. The cell viability of NHEK after stimulation with purified *E. coli* LPS is shown in Figure 1 (a). The final endotoxin concentrations in the culture medium ranged from 0 to 75000 EU/mL. A cytotoxic effect caused by