

別紙

令和2～4年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

研究課題名 (研究項目名)	乾燥・貧栄養ストレス下で生残する食中毒細菌のフードチェーンにおける動態 解明と食中毒リスク予測手法の開発（課題番号：JPCAFSC20202004） （3. 新たなリスク評価方法等の確立 （2）細菌性食中毒の原因細菌の定量的リスク評価に関する研究）
主任研究者	研究者名：小関 成樹 所属機関：北海道大学大学院農学研究院

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

令和2年度～令和4年度（3年間）

2 研究目的

自然界で生じ得る食中毒細菌の交差汚染を中核とする食品汚染状態を再現する実験系を構築し、実態に即した食品汚染細菌の製造、流通、調理、喫食後の各過程における増殖／死滅挙動を定量的に明らかにし、予測可能とすることを目的とする。従来、実験室の良好な環境下で増菌培養された細菌を対象に、その増殖／死滅の特性が検討されてきたが、本研究では自然環境下において、乾燥や貧栄養の極度のストレス下で生残する細菌細胞の食品上での動態を解明する。得られた細菌挙動データをベイズ統計手法により確率論的に評価可能とする数理モデルを開発し、開発したモデルを基盤に食中毒発症リスクを予測評価可能とするシミュレーション手法を開発する。

本研究では以下の4つの研究小課題を達成することで、現実自然界の汚染状況を反映した食中毒細菌のリスク評価を可能とすることを最終目標とする。

(1) 自然界で生じ得る細菌汚染状態の再現実験系の構築

様々な環境ストレス（貧栄養、乾燥、低温等）下において生存する細菌細胞を再現性良く調製するための方法および、調製した細菌細胞を食品へ交差汚染させる方法を確立し、再現可能な標準的な実験方法を確立する。

(2) 加工・流通・調理・喫食後の各段階における食中毒細菌の動態解明

想定する食品毎に加工、流通、調理の各過程における食中毒細菌の増殖／死滅の動態を定量的に明らかにし、さらに喫食後の人体内における消化過程での食中毒細菌の動態から感染の用量反応関係を見出す。

(3) 各工程における食中毒細菌の増殖／死滅を確率論的に評価する予測モデルの開発

上述の各工程における食中毒細菌の増殖／死滅挙動、用量反応関係を確率論的に予測可能とする数理モデルを開発する。ベイズ統計を用いて予測の「不確実性」と「変動性」とを分離して評価可能とするモデルを開発する。

(4) 工程毎の結果を統合した食中毒リスク評価のための計算手法の構築

(3)で開発した確率論的数理モデルから、加工から喫食後に至る各段階での予測確率を統合して、汚染菌量、摂取菌量、摂取した料理の種類および摂取量を考慮して食中毒リスクを評価可能とする計算方法を構築する。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
1 自然界で生じ得る細菌汚染状態の再現実験系の構築	1) 交差汚染の特徴解析と実験系の構築 2) 交差汚染による細菌数移行モデルの構築	小関成樹（北海道大学）
(2) 加工・流通・調理・喫食後の各段階における食中毒細菌の動態解明	1) 交差汚染後の病原菌の増殖・死滅挙動特性の解明 2) 消化過程における病原菌の挙動解明 3) 小腸上皮細胞における病原菌の挙動解明	小関成樹（北海道大学）
(3) 各工程における食中毒細菌の増殖／死滅を確率論的に評価する予測モデルの開発	1) バラつきを確率論的に評価する計算手法の開発 2) 交差汚染後の細菌挙動の確率論的評価手法の開発	小関成樹（北海道大学）
4) 工程毎の結果を統合した食中毒リスク評価のための計算手法の構築	1) リスク評価モデルの基本アルゴリズムの構築 2) 日本国内におけるレタス喫食による食中毒リスク評価モデルの開発	小関成樹（北海道大学）

4 倫理面への配慮について

本研究で細菌の食品上での生残挙動を検討するため、ヒトおよび実験動物を対象とする実験は行わないことから、倫理上問題となることはない。

II 研究内容及び成果等

1 自然界で生じ得る細菌汚染状態の再現実験系の構築

(1) 個別課題：交差汚染の特徴解析と実験系の構築（小関成樹（北海道大学））

様々な環境ストレス（貧栄養、乾燥、低温等）下において生存する細菌細胞を再現性良く調製するための方法および、調製した細菌細胞を食品へ交差汚染させる方法を確立し、再現可能な標準的な実験方法を確立することを目的としている。本年度は、特に交差汚染の現象としての一般化を目指して研究を行なっている。交差汚染の発生を評価・予測するための研究はこれまでに多数行われている。しかし、既存の研究は特定の器具や食品を用いた単一の汚染経路を再現し、それに対する細菌細胞の移行評価とその予測が行われたものが殆どであり、想定したケース以外における交差汚染の評価および予測を行うことは考慮されていない。これに対し、複数の汚染経路に共通する交差汚染の特性を把握して交差汚染と呼称される現象を体系化し、その上で病原性細菌の付着・移

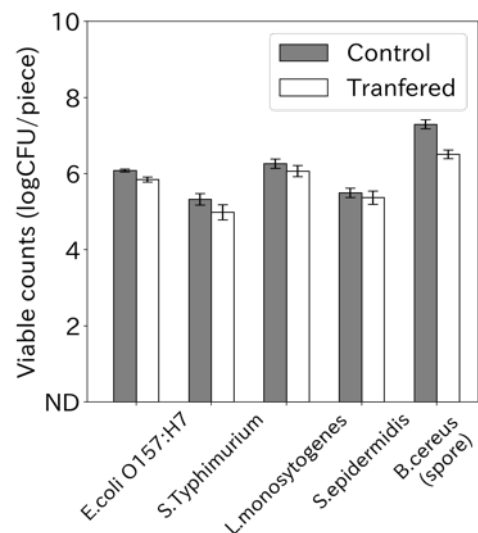


図1 菌種ごとのステンレス#400表面から回収した菌数と寒天培地に移行した菌数の比較

行動態の予測をすることが、リスク評価において交差汚染の影響を的確に評価するために求められている。これまでの交差汚染研究では、個々の食品毎のケーススタディーとしての実験データの蓄積しかなされておらず、交差汚染を現象として一般化して説明できるような研究は世界的にもなかった。

本研究では、まず初めに乾燥ストレスおよび汚染源表面上の菌数、器具に用いられる素材の材質は菌の移行に大きく寄与しないことを明らかにした。続いて、菌種が移行に作用するか否かを検討した(図1)。E. coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, Listeria monocytogenes, Staphylococcus epidermidisにおいては、寒天培地から回収した菌数に大きな差異は見られなかった。一方、Bacillus cereusの芽胞では1 log CFU程度の差が見られたが、これは芽胞表面構造が持つ疎水性が作用していると考えられる。以上より、付着による菌の移行について、菌のグラム陽性/陰性における菌種の違いは、交差汚染の発生に大きく作用しないが、細菌細胞が芽胞を形成した場合、菌の移行が起こりにくくなることが示唆された。

次に交差汚染を一般化して説明するための指標として、食品の含水率に着目した。異なる含水率に調製した食品サンプルを用いて細菌細胞の付着・移行に及ぼす含水率の影響を定量的に評価した。また実際の食品を用いて測定した移行率と、対応する含水率の食品サンプルを用いて測定した移行率を比較する。最終的に接触食品の含水率を利用して交差汚染現象を一般化して説明可能とすることを目的とする。

モデル食材として寒天培地の水分含量を変化させた素材へのステンレス片に付着している細菌(モデルとしてE. coli O157:H7)の移行を検討した(図2)。その結果、水分含量60%を境にして明確に移行率が大きく低下することが明らかとなった。この結果を実際の食品で検証すべく、種々の含水量を示す実際の食材への細菌の付着移行率についても検討した(図3)。その結果、食材の水分含量の低下に伴って細菌の付着移行率が、寒天培地での試験と同様に低下することが明らかになった。すなわち、交差汚染の多少は食品の種類というよりは、あくまでも表面の水分含量に影響を受けることが示された。

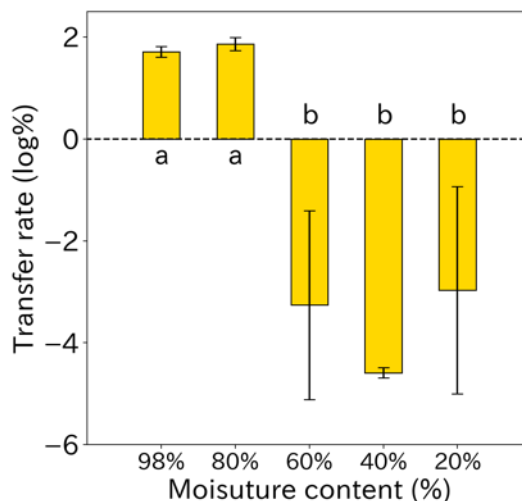


図2 ステンレス#400表面から寒天培地に移行した菌数の割合に及ぼす接触物の含水率の影響。誤差範囲は標準誤差 (n=3)。異なるアルファベットは統計的な有意差を示す。

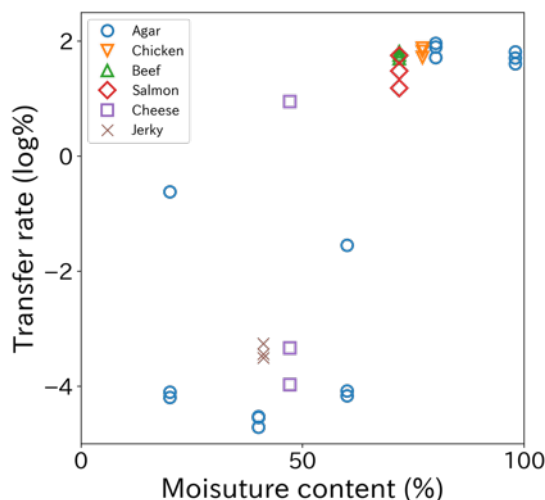


図3 ステンレス#400表面から種々の食品片へ移行した菌数の割合に及ぼす接触食品の含水率の影響。誤差範囲は標準誤差 (n=3)。異なるアルファベットは統計的な有意差を示す。

(2) 個別課題：交差汚染による細菌数移行モデルの構築 (小関成樹 (北海道大学))

交差汚染の発生を評価・予測するための研究は、菌が移動を示す数値である移行率を用いてこれまでに多数行われてきた (Chen et al., 2001; Montville and Schaffner, 2003; Ravishankar et al., 2010)。しか

し、既存の研究の多くは特定の器具および食品を用いて単一の汚染経路を再現し、再現された試験系において、細菌細胞の移行評価と予測を行ったものであり、想定した条件・場面以外における交差汚染の評価と予測を行うことは考慮されていない(de Jong et al., 2008; Møller et al., 2016, 2012; van Asselt et al., 2008)。細菌細胞の移行環境の物理的特性を把握して交差汚染現象を体系化することにより、汚染経路ごとの再現・検証を必要としない、普遍性の高い交差汚染の発生予測が可能になる。定量的な交差汚染の評価は、交差汚染によるリスクを低減するための予防策を開発する上でも有用であると考えられている (Yi et al., 2020)。

交差汚染を定量的に評価する指標として、食品表面の物理的特性を最も大きく左右する因子である食品の含水率が注目されている。包丁やまな板等の素材表面から食品表面への細菌細胞の付着・移行を検討した先行研究において、細菌細胞の移行に食品水分の関与が報告されている (Miranda and Schaffner, 2020; Jensen et al., 2013)。しかし、食品の含水率が交差汚染過程における細菌の移行へ及ぼす影響に関する定量的な評価は未だなされていない。

そこで本研究では、含水率が異なる複数の食品を用いて、食中毒細菌の交差汚染に及ぼす食品の含水率の影響を定量的に評価することを目的とした。さらに、実験から得られた付着移行特性を説明するために、食品の含水率を説明変数とした交差汚染（細菌移行率）を予測可能とする数理モデルの開発を目的とした。

研究方法

供試細菌としてグラム陽性菌とグラム陰性菌それぞれの中で、交差汚染による重大な食中毒事故が懸念される *Listeria monocytogenes* と *Escherichia coli* O157:H7 を実験で用いた(Ivanek et al., 2004; Noyce et al., 2006)。食中毒由来の *E. coli* O157:H7 4 菌株 (HIPH12361、RIMD0509939、RIMD05091896、RIMD05091897)、動物由来の *L. monocytogenes* 6 菌株(ATCC19111、ATCC19117、ATCC19118、ATCC13932、ATCC35152、ATCC15313)を個別に固体培地表面および液体培地中で増菌培養した後に混合して 10^9 CFU (Colony Forming Unit) /mL に調製した菌液を用いた。供試食品には、水分含量の異なる以下の 10 種類の食品、すなわち、キュウリ ($96.8 \pm 0.2\%$)、スイカ ($93.7 \pm 0.6\%$)、鶏ササミ肉 ($77.1 \pm 0.1\%$)、豚ヒレ肉 ($74.7 \pm 0.6\%$)、牛モモ肉 ($71.8 \pm 1.3\%$)、豚ベーコン ($62.9 \pm 2.3\%$)、プロセスチーズ ($47.2 \pm 0.0\%$)、ビーフジャーキー ($41.1 \pm 1.5\%$)、食パン ($38.2 \pm 0.9\%$)、クラッカー ($5.5 \pm 0.0\%$) を用いた。各サンプル食品は 2.6×2.6 cm に切り揃えてから使用した。

厨房における交差汚染の汚染源として、ステンレス作業台と包丁を想定し、付着工程・切断工程の 2 つの実験を行った。作業台はステンレス片、包丁はカッター刃をそれぞれ代用とした。これらの器材は、70%エタノールに 30 分間浸漬して表面を殺菌した後、安全キャビネット内で自然乾燥させた。付着工程では、菌液 10 μ L をステンレス片上に滴下した。切断工程では、菌液各 10 μ L をカッター刃の側面に 5 mm 間隔で 3 ヶ所に滴下した。その後、飽和塩（硝酸カルシウム四水和物）溶液を入れた、モーターとプロペラを取り付けて換気機能を持たせた密閉型プラスチック容器 (30×170×120mm) に汚染されたカッター刃およびステンレス片を入れ、容器内を 25°C、45±5%RH に保ち 1 時間乾燥させた。付着工程では汚染ステンレス片を対象サンプル食品上に 60 秒間静置し切断工程ではサンプル食品をレオメーター (EZ-SX、SHIMADZU) に取り付けられた汚染カッター刃で、個別に一定速度 (0.3 cm/s) で切断し移行操作とした。各移行操作はサンプルを変えて 3 回行った。

上記の移行操作の後、カッター刃またはステンレス片を、ガラスビーズ (3g、 $\phi=2$ mm) と 0.1% ペプトン水 (5 mL) とともに 15 mL 遠沈管に入れ、10 分間放置してペプトン水を材料表面に浸透させた。その後、ボルテックスミキサー (GENIE2) を用いた 1 分間の高速攪拌により、器材表面の付着細菌細胞

を剥離した。またサンプル食品を 0.1%ペプトン水 (100 mL) とともに滅菌プラスチック袋に入れ、ホモジナイザーを用いて 1 分間破碎した。破碎操作後の滅菌プラスチック袋から 0.1 mL の溶液を取り、0.1% ペプトン水で適宜 10 倍段階希釈した後に、寒天培地に塗抹し 37°C で 24 時間培養後に発生したコロニーを計測した。

細菌数の移行率は、器材表面と食品表面から回収された細菌細胞数により以下の式で算出した。

$$\text{transfer ratio} = \frac{N_r}{N_r + N_d} = \frac{N(\text{移行した菌数})}{N_0(\text{総菌数})} \quad (1-1)$$

また、菌の移行率と食品の含水率の関係を改変シグモイド関数で記述した。

$$\log_{10} \frac{N}{N_0} = \frac{a}{1 + e^{-k(MC - X_0)}} + TR_{min} \quad (1-2)$$

ここで、 N/N_0 は移行率、 MC は含水率 (%)、 X_0 は変曲点、 TR_{min} は最低移行率をそれぞれ示す。

結果と考察

(1) 細菌移行率と食品含水率の関係

付着接触過程における細菌移行率は食品の含水率によって細菌移行率が変化した (図4、図5)。k-means法を用いたクラスタ分析によって、両菌種において食品含水率50%付近で2つのクラスタに分けることができた。食品含水率が50%より高い場合 (キュウリ、メロン、鶏肉、豚肉、牛肉、ベーコン)、平均移行率は-0.015 log (約96%) から-1.73 log (約1.8%) までの範囲で-0.27 log (約53%) であった。食品の水分含量が50%以下の場合、各菌種および複数の食品で、移行率は-0.65 log (約22%) からゼロ (移行なし) までの平均-1.58 log (約2.6%) であった。クラッカー (含水率5.5%) を用いた移行操

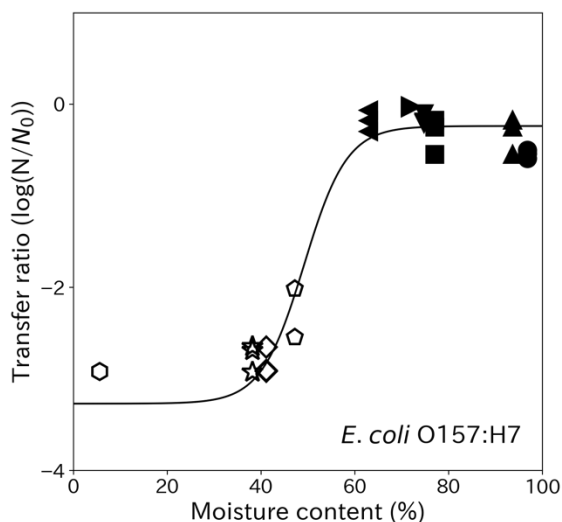


図4 付着過程におけるステンレス片から各食品への*E. coli* O157:H7の菌移行率の対数値と食品含水率の関係。曲線は改変シグモイド関数を用いて非線形回帰した結果を示す。塗りつぶし方の有無は、クラスタが異なることを示す。

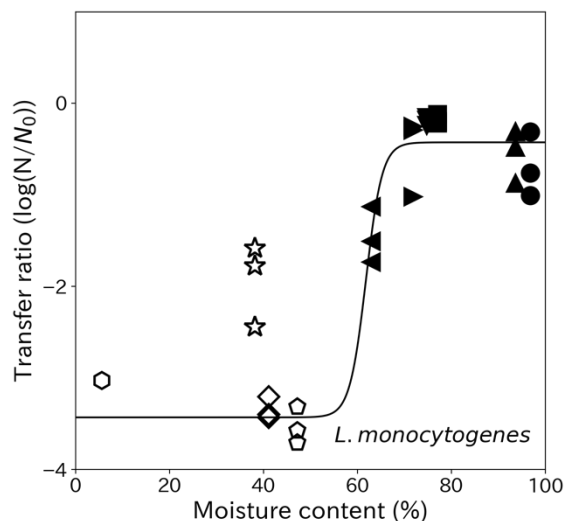


図5 付着過程におけるステンレス片から各食品への*L. monocytogenes*の菌移行率の対数値と食品含有量の関係。曲線は改変シグモイド関数を用いて非線形回帰した結果を示す。塗りつぶし方の有無は、クラスタが異なることを示す。

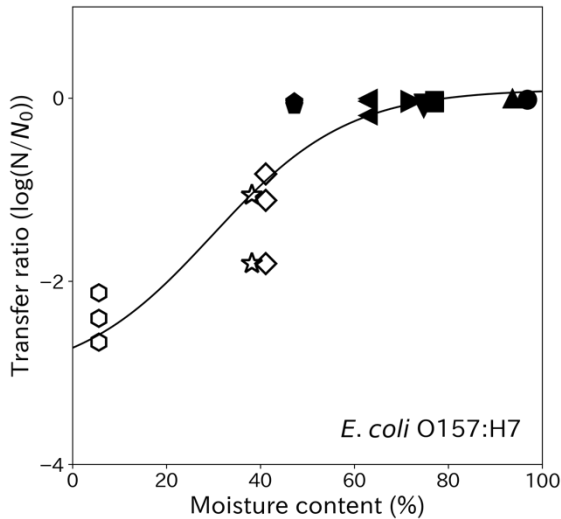


図6 切断過程におけるカッター刃から各食品への*E. coli* O157:H7の菌移行率の対数値と食品含水率の関係。曲線は改変シグモイド関数を用いて非線形回帰した結果を示す。塗りつぶし方の有無は、クラスタが異なることを示す。

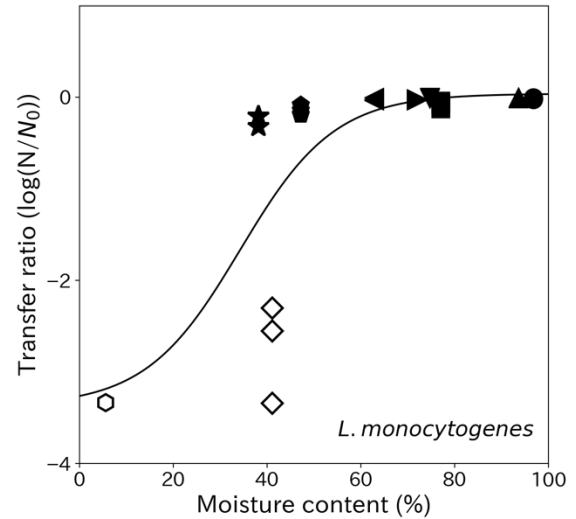


図7 切断過程におけるカッター刃から各食品への*E. coli*の菌移行率の対数値と食品含水率の関係。曲線は改変シグモイド関数を用いて非線形回帰した結果を示す。塗りつぶし方の有無は、クラスタが異なることを示す。

作では、菌の移行が確認できない場合があった。

切断過程におけるカッター刃から食品への菌体の移行においても、食品の含水率による細菌移行率への影響が確認された（図6、図7）。k-means法を用いたクラスタ分析によって、両菌種において食品含水率45%付近で2つのクラスタに概ね分けることができた。食品含水率が45%以上の場合（キュウリ、メロン、鶏肉、豚肉、牛肉、ベーコン、チーズ）、菌種によらず平均移行率は $-0.042 \log$ （91%）、最大 $-0.0021 \log$ （約99%）、最小 $-0.19 \log$ （約60%）であった（図2）。一方、食品の水分が45%以下の場合（ジャーキー、パン、クラッカー）、移行率は平均で $0.85 \log$ （約14%）と劇的に低下した。また、両菌種およびいくつかの含水率食品（パン、クラッカー）では菌の移行は観察されなかった。

（2）改変シグモイド曲線による非線形近似

改変シグモイド曲線を用いることで、食品含水率と細菌移行率の対数値の関係を概ね良好に表すことができた。接触過程の実験結果の非線形回帰について、*E. coli* O157:H7では（図4）、二乗平均平方根誤差（RMSE）は0.23であり、本実験によって得られた結果を良好に示した。また、曲線の変曲点を示す食品含水率は $MC = 49.2\%$ であり、2つのクラスタの中間点となる含水率であった。また、*L. monocytogenes*では（図5）、RMSEは0.57であり、概ね良好な当てはまりであった。曲線の変曲点を示す食品含水率は $MC = 58\%$ であり、こちらの値も2つのクラスタの中間の含水率であった。

切断過程の実験結果の非線形回帰について、*E. coli* O157:H7では（図6）、RMSEは0.31であり、本実験で得られた結果における細菌移行率の対数値と食品含水率の関係を良好に示した。一方で変曲点は $MC = 29.0\%$ であり、2つのクラスタの境界よりも低い含水率を示した。また、*L. monocytogenes*では（図7）、RMSEは0.57であり概ね良好な当てはまりであった。しかし、変曲点は $MC = 35\%$ であり、2つのクラスタの大まかな境界である45%付近よりも低い数値を示した。

以上の結果より、食品の含水率は器材・食品間での菌移行に非常に大きく影響することが示された。また改変シグモイド関数による関数としての記述も、本実験で用いた菌種に関わらず、概ね良好に菌移行率を推定することが可能であった。

交差汚染の発生における菌の移行現象は、食品含水率に大きく影響を受けることが本研究によって定量的に示された。食品の含水率と改変シグモイド関数を用いて、交差汚染における食品器材間の菌移行率を数式化した。

2 加工・流通・調理・喫食後の各段階における食中毒細菌の動態解明

(1) 個別課題：交差汚染後の病原菌の増殖・死滅挙動特性の解明（小関成樹（北海道大学））

想定する食品毎に加工，流通，調理の各過程における食中毒細菌の増殖／死滅の動態を定量的に明らかにし，さらに喫食後の人体内における消化過程での食中毒細菌の動態から感染の用量反応関係を見出すことを目標としている。*E. coli* O157:H7 と *Salmonella* を対象として，汚染生野菜（レタス等）の保存中の動態解明を検討した。

ステンレス片上で乾燥ストレスへばく露（1日あるいは7日）された *E. coli* O157:H7 からの交差汚染によってカットレタスに付着させた後，あるいは液体培地中に浸漬して，液体培地中およびカットレタス上での *E. coli* O157:H7 の増殖挙動を検討した（図8 a-c）。その結果，培地あるいはレタスへの付着移行前にばく露された乾燥ストレスの有無さらには長短にかかわらず，ほぼ同様の増殖挙動を示した。保存温度が異なっても，その傾向に変化は見られず，レタスの場合には 25°C と 15°C のいずれの保存温度においても，*E. coli* O157:H7 の増殖は環境移行前の乾燥ストレスの影響を受けなかった（図8 b, c）。事前の乾燥ストレスへばく露条件にかかわらず，同様の増殖パラメータを示し，推定パラメータ間には統計的に有意な差は認められなかった。

環境移行前の事前の乾燥ストレス条件の違いは，加熱殺菌においても影響がないことが示された。牛挽肉にステンレス片上で乾燥ストレスへばく露（1日あるいは7日）した *E. coli* O157:H7 を交差汚染させた後に，加熱殺菌した結果，付着移行前のストレス条件は加熱殺菌効果に影響を及ぼさないことが示された（図9，60°C加熱）。

これらの増殖および熱死滅の結果から，交差汚染

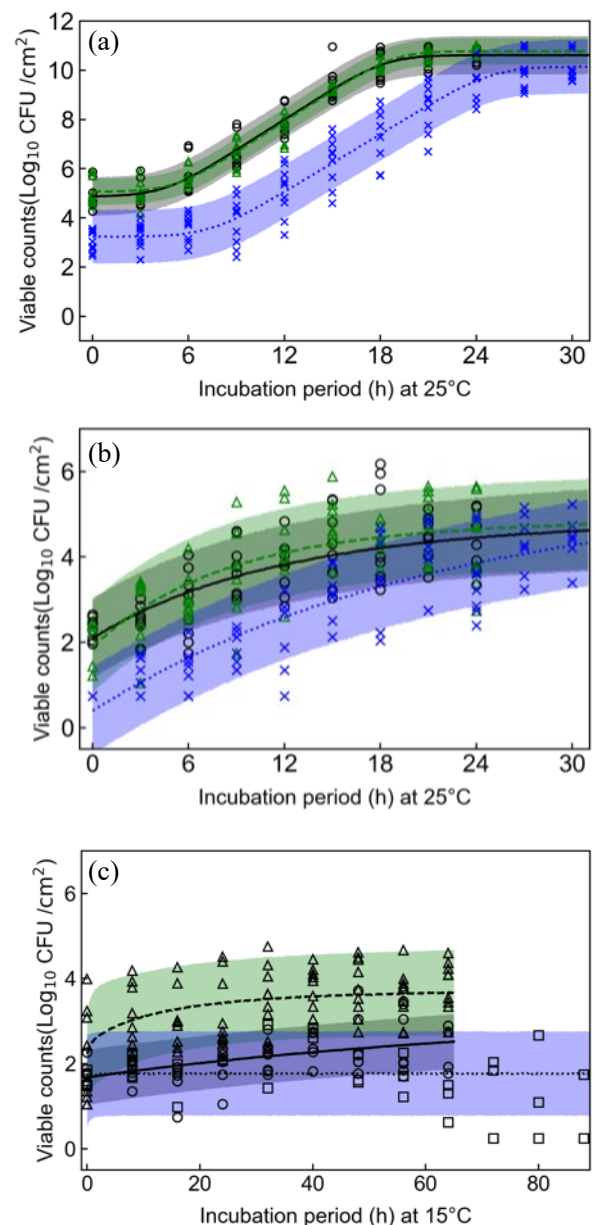


図8 乾燥ストレスが細菌増殖に及ぼす影響の比較検討 (a) 液体培地中@25°C (b) レタス表面@25°C (c) レタス表面@15°C.

○ストレスなし，△1日乾燥ストレス，× (25°C) □ (15°C) 7日乾燥ストレス. 各曲線範囲はベイズ推定によって求められた95%信頼区間を示す。

前に細菌がばく露される乾燥ストレスは、交差汚染後の増殖あるいは死滅に影響を及ぼさないことが示された。この結果は *E. coli* O157:H7 だけに限らず、同様の試験を行なった *Salmonella* においても認められている。このように、事前の乾燥ストレスばく露が増殖あるいは死滅に影響を及ぼさない原因を以下のように推察している。すなわち、食品あるいは培地中での対象細菌の増殖あるいは死滅を観察する際に計測観察している発生するコロニー数のデータは、常にその集団の中で最も速く増殖する、あるいは最も加熱耐性の高いものが、回収され代表して計測されているものと考えられる。そのため、母集団内に乾燥ストレスばく露でダメージを受けている細菌個体も一定割合で存在するかもしれないが、現状の寒天平板でのコロニー計測法では、そのような集団内の個性の違いを見出すことはできず、結果としてばく露されるストレス強度にかかわらず、ストレス耐性の高い細菌亜集団を計測している。そのために事前のストレスばく露の有無、長短によらず、同様の増殖あるいは死滅を示したものと考えられる。

以上の結果から、研究当初想定していたような、交差汚染前の乾燥ストレスばく露が、交差汚染後の増殖・死滅挙動に影響を及ぼすことはないことが確認された。したがって、これまでの研究で蓄積されてきた、通常の実験方法で取得した細菌挙動データを、交差汚染を考慮したリスク評価におけるばく露評価に利用可能であるものと判断された。

(2) 個別課題：消化過程における病原菌の挙動解明（小関成樹（北海道大学））

病原菌が体内に摂取されてからの人体内での動態について、過去に胃消化過程での挙動は検討されてきたが、その後の小腸内での挙動については明らかではなかった。そこで本研究では、モデル小腸内環境を実験的に作り、その環境下で腸内細菌との競合状態での各種病原性細菌の増殖挙動の違いを検討した。

競合する腸内細菌叢との数比の違いによって、食中毒原因細菌の増殖挙動に違いが認められた。一例として、種々の比率条件での *E. coli* O157:H7 のモデル小腸内での増殖挙動の結果を図 10 に示した。腸内細菌叢との対数比率が 1:1 から 1:4 では *E. coli* O157:H7 は腸内細菌叢に阻害を受けることなく、増殖することが確認された。さらに、腸内細菌叢との対数比率が 9:4 と著しく異なる場合にも、*E. coli* O157:H7 は 24 時間以内に 4 log CFU/mL 以上の増殖を示した（図 10d）。

しかし、腸内細菌叢との対数比率が 9:2 以下と極端な数差がある場合には（図 10e, f）増殖できなかったが、死滅することもなく、一定菌数を保っていた。このように、小腸内環境において *E. coli* O157:H7 は競合する腸内細菌叢との関係で死滅することはなく、多くの場合において増殖することが示唆された。また、結果に示された増殖曲線の範囲は、ベイズ推定によって得られたパラメータの確率分布を

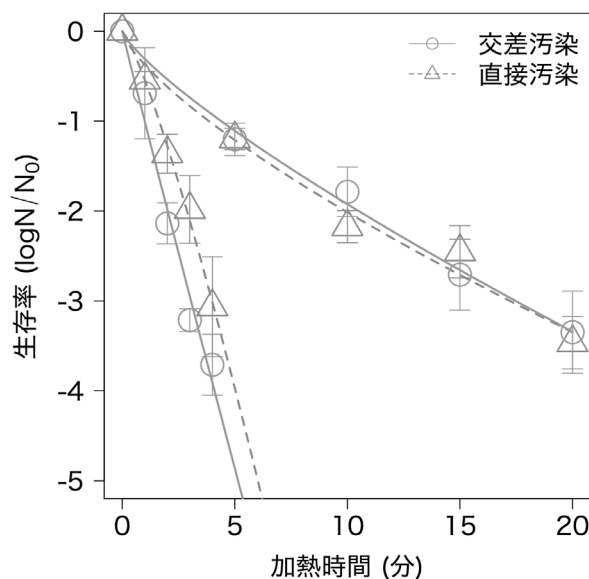


図 9. 乾燥ストレスの有無が *E. coli* O157:H7 の一定温度条件における死滅に及ぼす影響（上：57.5°C、下：60.0°C、誤差範囲は標準偏差、 $n=3$ ）

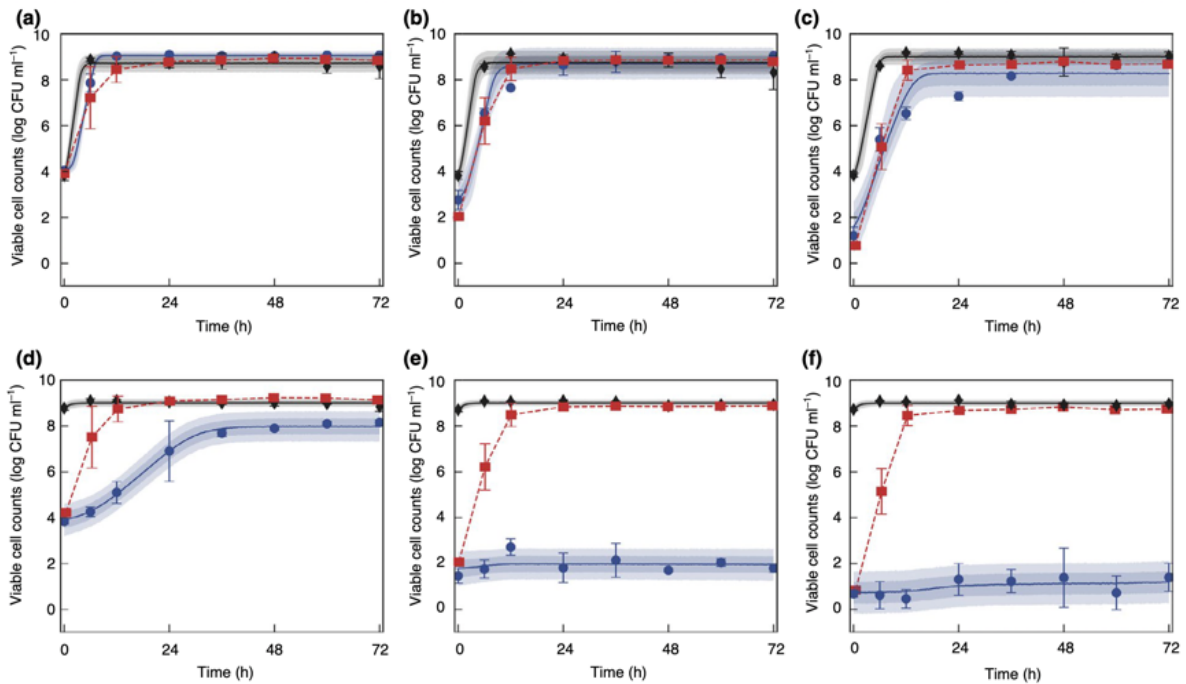


図 10 腸内細菌叢との競合条件下における *E. coli* O157:H7 の増殖挙動。

- (a) *E. coli* O157:H7: 4 log CFU per ml; intestinal bacteria: 4 log CFU per ml,
- (b) *E. coli* O157:H7: 2 log CFU per ml; intestinal bacteria: 4 log CFU per ml,
- (c) *E. coli* O157:H7: 1 log CFU per ml; intestinal bacteria: 4 log CFU per ml,
- (d) *E. coli* O157:H7: 4 log CFU per ml; intestinal bacteria: 9 log CFU per ml,
- (e) *E. coli* O157:H7: 2 log CFU per ml; intestinal bacteria: 9 log CFU per ml,
- (f) *E. coli* O157:H7: 1 log CFU per ml; intestinal bacteria: 9 log CFU per ml.

もとに予測推定した 95%信用区間であり，不確実性を適切に評価することが可能となっている。

(3) 個別課題：小腸上皮細胞における病原菌の挙動解明（小関成樹（北海道大学））

用量反応関係を評価する新しいアプローチとして Key Events Dose Response Framework (KEDRF) が提案されている (Buchanan et al., 2009)。KEDRFでは、食中毒菌を摂取してから食中毒が発症するまでの生物学的な主要ステップ (Key Events) における細菌挙動を調べ、それらを統合することで最終的な感染発症確率を推定する。また、それぞれの Key Events に対して、用量、病原性、免疫反応など反応に影響を及ぼす可能性のある様々な因子が体系的に検討される。KEDRFでは、重要な生物学的事象を理解して用量反応関係を推定することで、仮定や外挿に頼ることが少なくなると期待されている。

Salmonella と *Listeria* は、経口摂取された病原性微生物がヒトの小腸上皮細胞に定着し、侵入することで感染する。したがって、KEDRFに基づいて *Salmonella* と *Listeria* の用量反応関係を推定する際には、小腸上皮細胞への侵入という生物学的な反応が重要な Key Events となるが、*Salmonella* と *Listeria* の小腸上皮細胞への侵入挙動は、十分に明らかにされていない。したがって、KEDRFに基づく用量反応モデル開発のためには *Salmonella* と *Listeria* の小腸上皮細胞への侵入挙動の定量化が必要である。

先行研究では、*Campylobacter jejuni* の小腸上皮細胞への侵入数予測モデルと KEDRF にもとづいた *C. jejuni* の新しい用量反応モデルが開発されている (Abe et al., 2021)。そこで、本研究では、小腸上皮細胞に侵入する *Salmonella* と *Listeria* の生菌数を先行研究 (Abe et al., 2021) のモデルで記述できるかを検討した。さらにそのモデルを用いて *S. Typhimurium* と *L. monocytogenes* の感染確率を導出し、KEDRFによる用量反応関係の推定の妥当性を検討することを目的とした。

実験方法

(1) 供試試料

食中毒細菌として *Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC 29630、 ATCC 29057、 ATCC 29629、 RIMD 1985009、 RIMD 1985007) および *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111、 ATCC 19117、 ATCC 19118、 ATCC 13932、 ATCC 15213、 ATCC 3515) を、小腸上皮様細胞として Caco-2 細胞を使用した。 *S. Typhimurium* および *L. monocytogenes* は Tryptic Soy Agar (TSA) で 37°C、24 時間培養した後、Tryptic Soy Broth (TSB) 中で 37°C、24 時間培養した。培養した菌液 (100 μ L) を TSB 培地 (5 mL) に加え、さらに 37°C で 24 時間培養した。培養した菌液を遠心分離 (3000 \times g、10 min) した後、上澄みを捨て、遠心分離、Dulbecco minimal essential medium (DMEM) 培地による洗浄を 2 回行い、菌液を調製した。凍結 (-80°C) Caco-2 細胞を解凍し、Fetal bovine serum 10% (v/v); Sodium Pyruvate 1.0% (v/v); Non-essential Amino Acid Solution 1.0% (v/v); Penicillin-Streptomycin 1.0% (v/v); L-Glutamine solution 2.0% (v/v) を含む DMEM 培地で 37°C、5% CO₂ の条件下で 14 日間培養した。

(2) *S. Typhimurium* および *L. monocytogenes* の小腸上皮様細胞への侵入

培養した Caco-2 細胞上に *S. Typhimurium* および *L. monocytogenes* の菌液 (100 μ L) を添加して、37°C、5% CO₂ の条件下において 6 時間ばく露した。ばく露時間は 6 時間で、1.5 時間ごとに侵入細菌数の測定を行なった。ばく露細菌数は 10³、10⁴、10⁵、10⁶ および 10⁷ CFU/mL の 5 条件とした。ばく露終了後、リン酸緩衝液で細胞を洗浄し、100 μ g/mL の Gentamycin (150 μ L) を含む DMEM 培地 (100 μ L) を加え、37°C、5% CO₂ の条件下で 1 時間浸漬処理し、Caco-2 細胞外の細菌を除去した。次に、Gentamycin を吸引した後、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、0.1% Triton X (100 μ L) を加えて細胞を溶解した。適宜 0.1% ペプトン水を用いて希釈し、TSA を用いて細胞内に侵入した細菌数を平板塗抹法で測定した。

(3) Caco-2 細胞への侵入細菌数の数理モデル化

Caco-2 細胞へ侵入する時間 t と時間 t における細菌数 $N_{invading}$ の関係を次式 (Abe et al., 2021) で記述した。 μ は最大侵入速度、 N_{max} は最大侵入数、 $C_{extracellular}$ はばく露細菌数を示している。

$$\log_{10} N_{invading} = [N_{max}(1 - e^{-\mu C_{extracellular} t})] \quad (2-1)$$

上式にて *S. Typhimurium* および *L. monocytogenes* の侵入数データを記述するために、式中のパラメータをベイズ推定により No-U-turn sampler (NUTS) 法を用いて求めた。 $\log N(t)$ の事前分布には正規分布を用いた。Chain 数は 4、各 Chain 当たりのサンプリング数は 2,000 回とした。計算の実行環境は Python (Ver. 3.7.0) と Stan (Ver. 2.19.0.0) を用いた。

(4) 感染確率の導出

上述の Caco-2 細胞への *S. Typhimurium* および *L. monocytogenes* の侵入細菌数の数理モデルを利用して、次式により感染確率を導出した。

$$P_{invading} = 1 - \left(1 - \frac{N_{max} \left(1 - e^{-\frac{\mu N_{dose}}{V}} \right)}{N_{dose}} \right)^S \quad (2-2)$$

ここで、 S は小腸の表面積 (32m²) (Helander & Fändriks, 2014)、 V は消化液量 (319 mL) (Schiller et al., 2005)、 t は小腸での平均滞留時間 (7.5 時間) (Davis, Hardy & Fara, 1986) を示している。

結果と考察

(1) Caco-2細胞への*S. Typhimurium*と*L. monocytogenes*の侵入挙動

*S. Typhimurium*と*L. monocytogenes*をCaco-2細胞へ最大9時間ばく露した際のCaco-2細胞への侵入細菌数の経時変化を検討した結果、Caco-2細胞への侵入細菌数は、時間と共に漸近的に増加する傾向が見られ、他のばく露菌数条件においても同様の結果となった。

ベイズ推定によるパラメータの推定の結果、全てのパラメータのR-hutが1.0を示し良好に収束した。したがって、*C. jejuni*の小腸上皮細胞への侵入数予測モデルとして開発された式 (Abe et al.2021) は、*S. Typhimurium*と*L. monocytogene*の小腸上皮細胞への侵入挙動の記述にも適用可能だと示された。ただし、本研究で用いたモデル式 (Abe et al., 2021) はCaco-2細胞の内外での*S. Typhimurium*と*L. monocytogene*の増殖は考慮していない。実際には、*S. Typhimurium*と*L. monocytogene*はCaco-2細胞侵入後に増殖する (Gaillard et al., 1987; Brumell et al., 2001; Méresse et al., 2001; Brawn, Hayward & Koronakis, 2007)。したがって、Caco-2細胞内外の増殖挙動を定量化することで、より現実に即した小腸上皮細胞への侵入数予測モデルが構築できると考えられる。

(2) 感染確率の導出

図11は上述のモデル式によって求めた*S. Typhimurium*と*L. monocytogenes*の感染確率と従来までに報告されている用量反応関係を示している。図11に示した通り、今回導出した*S. Typhimurium*の感染確率は、従来報告されていたもの

(Bollaerts et al. 2008; Teunis et al. 2010)と同程度であった。したがって、KEDRFに基づいて*S. Typhimurium*の用量反応関係を推定する際に、本研究の小腸上皮細胞への侵入数予測モデルが重要な役割を果たすと示唆された。一方、今回*L. monocytogenes*の感染確率を推定したところ (図12)、従来報告されているもの(Rahman et al.2018)より低用量で感染する推定結果を示した。これは、他の生体现象 (Key Events) や小腸上皮様細胞への侵入挙動以外の感染メカニズムが考慮されていないことが原因だと考えられる。特に、先行研究 (Pouillot et al., 2016) において、*L. monocytogenes*の用量反応関係には、宿主の免疫反応の影響が大きいと示唆されている。本研究ではCaco-2細胞を単層純粋培養したが、実際の小腸環境では多くの腸内細菌叢が存在している (Berg, 1996)。この細菌叢は病原性細菌の増殖と小腸上皮への定着を効果的に抑制することで生体防御の役割を果たす (Kim & Ho, 2010; Stecher & Hardt, 2011)。したがって、KEDRFに基づいて*L. monocytogenes*の用量反応関係を推定する際には、小腸上皮細胞への侵入挙動に加え、腸内細菌叢による生体防御の影響を考慮する重要性が示唆された。そこで、本研究の実験系で、培養したCaco-2細胞に食中毒細菌とともに腸内細菌をばく露することで、生体防御反応の一部を再現した小腸上皮細胞への侵入数予測モデルを構築できると期待される。

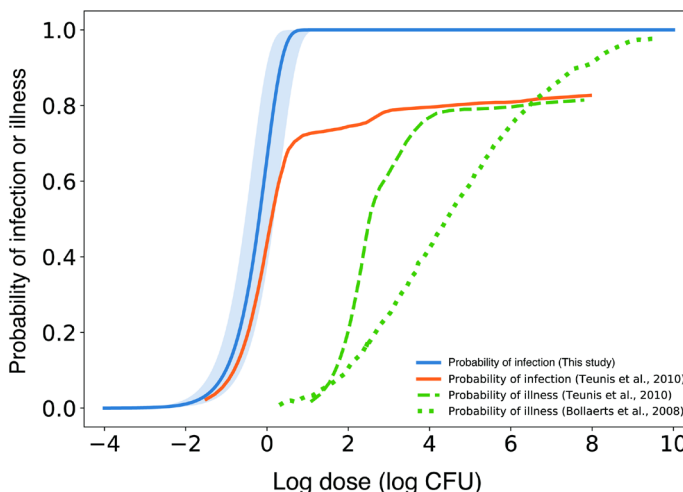


図 11 小腸上皮細胞への侵入数予測モデルから推定した *S. Typhimurium* の感染確率と従来報告されている用量反応関係の比較

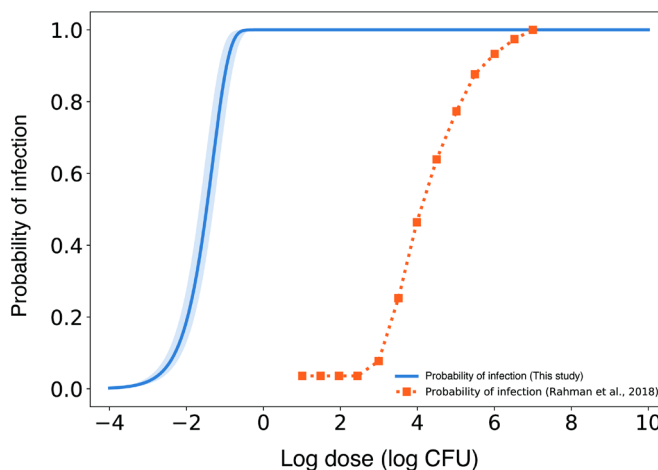


図 12 小腸上皮細胞への侵入数予測モデルから推定した *L. monocytogenes* の感染確率と従来報告されている用量反応関係の比較

以上、本研究では、先行研究 (Abe et al. 2021) で提唱された腸管上皮細胞への *C. jejuni* の侵入モデルが *Salmonella* と *Listeria* の侵入挙動の記述にも適用可能であることが示された。また、構築した侵入モデルを用いて先行研究 (Abe et al. 2021) で提唱された感染確率を推定し、特に *Salmonella* の用量反応関係への小腸上皮細胞への侵入挙動の影響の大きさが示唆された。これらの結果により、小腸上皮細胞への侵入数予測モデルは、KEDRF に基づく用量反応モデル開発において重要な役割を果たすことが示唆された。

3 各工程における食中毒細菌の増殖/死滅を確率論的に評価する予測モデルの開発

(1) 個別課題：バラつきを確率論的に評価する計算手法の開発 (小関成樹 (北海道大学))

食品中の有害微生物や腐敗菌は食品の腐敗や食中毒の原因となるため、その食品中に「どのくらい細菌が生存しているのか」という菌数を定量的に予測する必要がある。そのために、食品中での細菌の増殖あるいは死滅などの挙動を、数学モデルを用いて予測しようとする研究が行われ、様々な数理モデルが開発されてきた。これまで開発されてきた細菌の死滅あるいは増殖挙動を予測するモデルの多くは速度論モデルであった。しかし、先行研究から、100個未満の細菌集団では、個々の細菌挙動のバラつきの影響が無視できないほど大きくなることが指摘されている (Aspridou and Koutsoumanis, 2015)。少数の細菌集団の挙動を予測するには個々の細菌の挙動のバラつきを定量的に推定する必要があるが、平均値を用いて予測する従来の速度論モデルでは細菌挙動のバラつきを適切に推定することが難しい。そこで、細菌挙動のバラつきを表現可能な予測モデルの開発が求められている。

近年、細菌挙動のバラつきを確率分布に用いて表現する確率論モデルが注目されている。これまで、従来の速度論モデルをもとに乱数シミュレーションを用いることで細菌挙動のバラつきを表現できることが明らかとなった (Koyama et al., 2019; Abe et al., 2019)。しかし、モデルのデータへのフィッティング方法では、フィッティング時にそれぞれの過程に適した分布 (例えば、死滅挙動ではポアソン分布、増殖過程では負の二項分布など) を仮定したパラメータの推定ができていない。そのため、パラメータの推定と細菌挙動の予測という二つの過程の間で、同一の確率分布を仮定できていないという問題がある。

本研究ではモデルのパラメータ推定にベイズ推定を用いることで、パラメータを推定する際に各過程に適した確率分布を使用できると考えた。ベイズ推定ではモデルのパラメータを確率変数とみなし、それぞれのパラメータは確率分布として推定される。ベイズ推定では、従来のデータへのフィッティング方法では一点に決まっていたパラメータを、確率分布として推定することができるという特徴がある。ベイズ推定を死滅モデルと増殖モデルの両モデルに対して利用できることを確かめた。

方法

(1) 死滅モデル

1) 使用したデータ

Abe et al. (2019) の実験データを使用して以下の解析を行った。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 10^5 (CFU) とし、3反復分のデータを使用した。

2) パラメータ推定

得られた生存細菌数のデータ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 (van Boekel M, 2002)。ワイブルモデルは式 (3-1) で表される。実験により得られる初期菌数 (N_0)、生存細菌数 (N) と加熱時間 (t) から、尺度係数 (δ) と形状係数 (p) の2つのパラメー

タを求めることで死滅曲線が決まる。

$$\log_{10} \frac{N}{N_0} = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (3-1)$$

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

初期菌数と死滅過程における生存細菌数はポアソン分布に従うと仮定した。各時間で測定された生存細菌数 (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でき, 式 (3-2) のように書ける。

$$N \sim \text{poisson}(N_0/10^{(t/\delta)^p}) \quad (3-2)$$

本研究では, ベイズ推定により2つのパラメータ (δ と p) の推定を行った。ベイズ推定の条件として, Iterationは10,000, warm-upは5,000, 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 3.7.7) を用いた。

3) 死滅挙動の予測

得られた20,000セット (5000×4 chain) のパラメータを用いて初期菌数90 (CFU)での死滅挙動を予測した。各パラメータセットに対して, 推定されたパラメータと初期菌数, 菌数を予測したい時間から, 平均 $N_0/10^{(t/\delta)^p}$ 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。各パラメータに対して乱数を発生させると, 各時間で20,000個の乱数が得られた。20,000個の予測結果を昇順に並べ, 上位1%と下位1%にあたる点をプロットし, 98%予測区間とした。予測結果と実測値を比較した。

(2) 増殖モデル

1) 使用したデータ

Koyama et al. (2020) の実験データを使用して以下の解析を行った。*Salmonella* Typhimuriumを25°Cで保存し, 所定の時間毎に生存細菌数を測定した。初期菌数を 10^4 (CFU) とし, 3反復のデータを使用した。

2) パラメータ推定

得られた生存細菌数のデータを用いて増殖挙動を決定付ける2つのパラメータの推定を行った。増殖挙動については, 初期菌数がポアソン分布に従い (Koyama et al., 2019), 増殖する菌数が負の二項分布に従う (Nauta, 2001) と仮定した。増殖する数が負の二項分布に従うとすると, 時間 t における生存細菌数は式 (3-3) のように書ける。

$$N \sim N_0 + \text{Negbin}(N_0, \exp(-\mu \times (t - \lambda))) \quad (t > \lambda) \quad (3-3)$$

$$N = N_0 \quad (t \leq \lambda)$$

N : 時間 t (h)における生存細菌数, N_0 : 初期菌数, μ : 比増殖速度, λ : ラグタイム

今回は, 保存時間 t (h)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なった。ベイズ推定を用いて, 式 (3-3) 中の μ と λ の2つのパラメータを推定した。ベイズ推定の条件として, Iterationは10,000, warm-upは5,000, 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 3.7.7) を用いた。

3) 増殖挙動の予測

パラメータ推定により得られた20,000セット (5,000×4 chain) のパラメータを用いて初期菌数が平均10 (CFU) での増殖挙動を、以下の手順で予測した。

- ①初期菌数の予測 初期菌数はポアソン分布に従うと仮定し、平均が10のポアソン分布に従う乱数をパラメータの数 (20,000個) だけ発生させた。ここで得られた値を初期菌数とした。
- ②増殖した数の予測式 (3-3) をもとに、推定されたパラメータ (μ と λ) , 初期菌数と菌数を予測したい時間 t (h) から、負の二項分布に従う乱数を発生させた。ここで得られた乱数を、その時間における増殖した細菌数とした。この値と初期菌数を足すことで、各時間において生存している細菌数を予測した。上記の手順により得られた20,000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。

結果と考察

図13に初期菌数 10^5 (CFU) での死滅挙動の実測値を示す。縦軸に生存細菌数の対数値、横軸には加熱時間を示す。図1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、良好な収束を示した。得られたパラメータを用いて、初期菌数 90 CFUでの死滅挙動の予測結果を図14に示す。図2中の点線は98%予測区間を示し、プロットは60反復分の実測値を示す。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らるであろう範囲」という解釈になる。精度は予測区間内に入っている実測値の実測値の割合を表し、100%であった。このことから、高精度で死滅挙動の予測ができた。

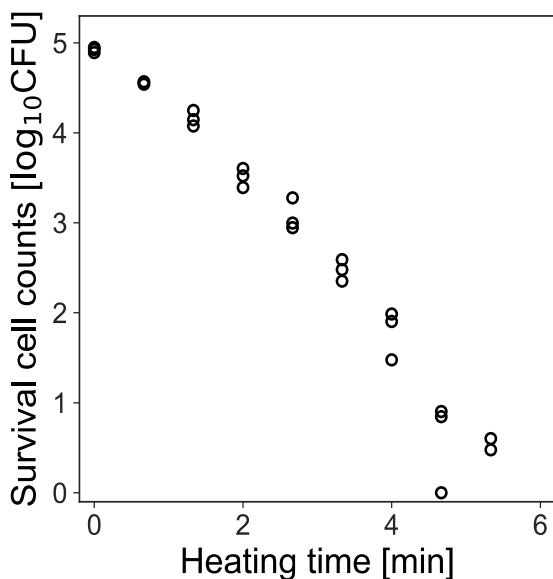


図13 Survival cell counts of *Bacillus simplex* heated at 94°C. Initial cell count is 10^5 (CFU). The number of iterations at each time was 3.

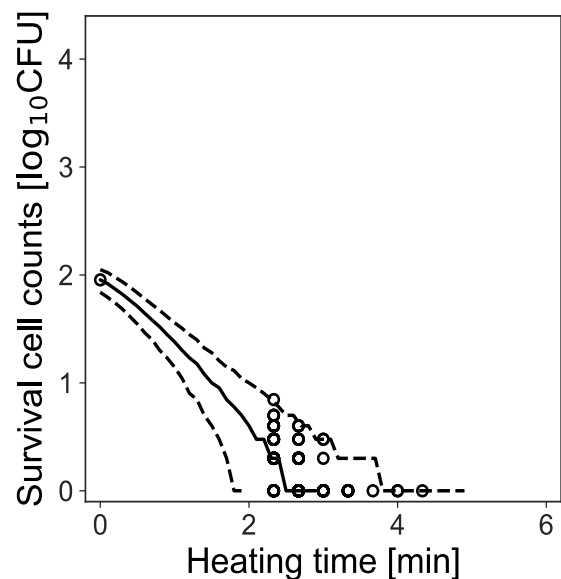


図14 Prediction of the inactivation behavior of initial cell 10^2 (CFU). Dashed line represents 98% prediction interval. Plots represent observed value. Accuracy was 100%.

また、図15に初期菌数 10^4 (CFU) での増殖挙動の実測値を示す。縦軸に生存細菌数の対数値、横軸には保存時間を示す。図15のデータを用いて比増殖速度 (μ) とラグタイム (λ) の2つのパラメータをベイズ推定により推定すると、良好な収束を示した。次に、得られたパラメータのセットを用いて、初期菌数10 (CFU) での増殖挙動を予測した結果を図16に示す。図16中のプロットは50反復分の実測

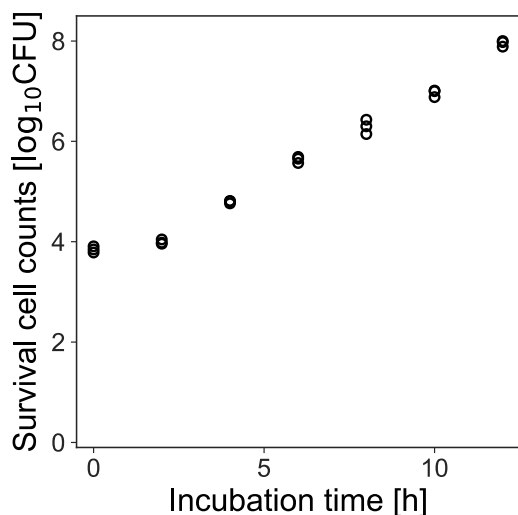


図15 Survival cell counts of *Salmonella Typhimurium* incubated at 25°C. Initial cell count is 10^4 (CFU). The number of iterations at each time was 3.

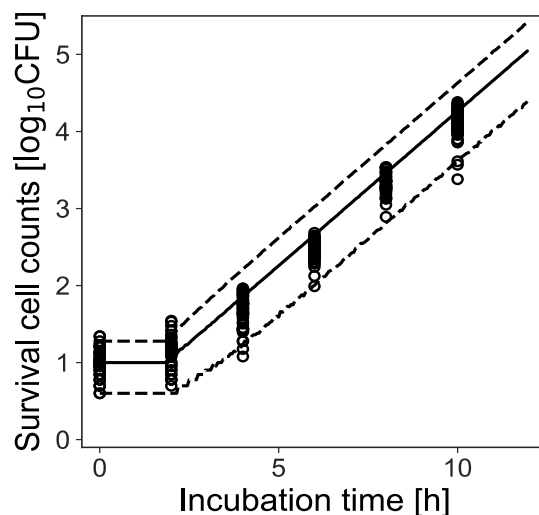


図16 Prediction of survival counts of initial cell 10^4 (CFU) in growth process. Dashed line represents 98% prediction interval. Plots represent observed value. Accuracy was 96%.

値を示している。また、図16中の破線は98%予測区間を示している。予測結果の精度は96%であり、増殖挙動についても高精度で予測できたと言える。

以上から、ベイズ推定を用いることで死滅過程と増殖過程のそれぞれに確率分布を当てはめてパラメータの推定ができ、パラメータの推定から予測まで同じ確率分布のもとで予測ができるようになると言える。

(2) 個別課題：交差汚染後の細菌挙動の確率論的評価手法の開発（小関成樹（北海道大学））

細菌性食中毒のリスクを高める要因の一つに、食品の流通経路あるいは製造工程などにおいて、何らかの原因で食品に食中毒細菌が二次的に汚染する、いわゆる「交差汚染」が考えられる。このような過程では食中毒細菌は乾燥や低温等の環境ストレスにばく露されることになるが、食中毒細菌の耐熱性等のストレス耐性が向上している可能性がある。しかし、現在までの食中毒原因細菌の死滅挙動に関する研究の大部分では、至適条件で培養された細菌細胞が用いられるのが一般的であった。そのため、交差汚染によって付着した、環境ストレスにばく露された後の細菌の食品上における死滅挙動の詳細は明らかになっていない。

そこで本研究では、*E. coli* O157:H7 と *Salmonella enterica* Oranienburg を対象として、環境ストレスへのばく露後に食品に交差汚染するという食中毒事故の実態に近い実験系を構築し、食品に移行した菌の死滅挙動を明らかにして、加熱処理過程での死滅予測を可能とすることを目的とした。

方法

(1) 供試細菌

実際の食中毒事故において分離された *E. coli* O157:H7 と *S. enterica* Oranienburg を使用した。

(2) 実験手順

1) 交差汚染の再現 直径約 20cm のステンレス製のボウルに対して菌液 ($10^{9.6}$ CFU/mL) を 2 mL を塗布し乾燥機を用いて 25 °C (50%RH 以下) で 3 時間、菌を乾燥した。乾燥後、15 °C (60%RH) で 24 時間保存し、この期間を環境ストレスの負荷期間とした。

2) サンプルの調製 牛挽肉 (100 g) あるいは鶏挽肉 (100 g) を汚染したボウル内で 1 分間攪拌した。その後、菌汚染された挽肉を 10 g ずつプラスチックフィルム製の袋に入れて約 1 mm の厚みに圧縮し、開口部をヒートシーラで閉じた。これを“交差汚染”試験区とした。対照実験として、汚染されていないボウルで牛挽肉 100 g に菌液 1 mL を滴下して 1 分間攪拌した挽肉を用意し、上と同様の方法でプラスチックフィルム製の袋に入れた。これを直接汚染試験区とした。

3) 加熱処理 恒温水槽を用いて一定温度 4 条件 (55.0、57.5、60.0、62.5 °C) と変動温度 1 条件で加熱を行った。加熱終了後は氷冷水にサンプルを浸し、速やかに冷却した。一定温度条件ではサンプルが所定の温度に到達するまでの時間は加熱時間に含めないこととした。単位重量あたりの生存菌数を寒天平板上に形成したコロニー数 (CFU/g) で計測した。各条件において独立した実験を 3 回反復した。

(3) 数理モデル作成 “直接汚染”試験区の一定温度条件でのデータから変動温度条件下における死滅挙動のばらつきを考慮したモデルを作成し、“交差汚染”試験区の非等温条件でのデータを用いて検証を行った。

1) 回帰 実測値のデータセットから Bootstrap 法を用いて 1000 個のデータセットを再標本化し、改良ワイブルモデル (式(1))を用いて細菌の死滅挙動を回帰した。

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

ここで、 N は時間 t における生菌数 (CFU/g) 、 N_0 は初期菌数 (CFU/g) 、 t は加熱時間 (s) 、 $S(t)$ は時間 t における生存率の常用対数値、 δ は尺度係数、 p は形状係数を表している。曲線回帰によって得られたモデルパラメータ δ と p の温度 (T) 依存性を以下の式 (2) と (3) でそれぞれ記述した。

$$\log_{10} \delta(T) = a \times T + (\text{intercept}) \quad (2)$$

$$p(T) = b \times T + (\text{intercept}) \quad (3)$$

次に変動性を表現するために、確率的な記述を検討した。微小な時間間隔 $[t_i, t_{i+1}]$ において不活化される菌数を算出できるモデルを構築した。 $[t_i, t_{i+1}]$ におけるパラメータ δ は一定の値であると仮定でき、式(4)で表せる。

$$\bar{\delta} = \frac{\delta_i + \delta_{i+1}}{2} \quad (4)$$

これと式(1)を用いて、実際の加熱時間 t^* は式(5)で表せる。

$$t^* = \left\lceil \frac{-\log_{10} S_{t_i}}{\bar{\delta}} \right\rceil \quad (5)$$

式(4)を変形すると、 t_{i+1} における生存率 $\log_{10} S_{t_{i+1}}$ は式(6)のように表せる。

$$\log_{10} S_{t_{i+1}} = \left(\frac{t^* + \Delta t}{\bar{\delta}} \right) \quad (6)$$

$$(\Delta t = t_{i+1} - t_i)$$

t_{i+1} における生菌数は式(6)で表され、 Δt の間に死滅する菌数は式(7)で表すことができる。

$$N_{t_{i+1}} = N_0 \times 10^{-\left(\frac{t^* + \Delta t}{\delta}\right)^p} \quad (7)$$

$$N_{dead\ cell[t_i, t_{i+1}]} = N_{(t_i)} - N_{(t_{i+1})} \quad (8)$$

動的モデルで得られた値を菌の死滅挙動の平均値として、モンテカルロ法を用いて菌数の変化を確率的に推定した。モデル内では確率分布に従った乱数を発生させた。初期細菌数は正規分布に従うとし、微小時間に死滅する菌数は二項分布に従うと仮定した。

結果と考察

乾燥ストレスに1日あるいは3日間ばく露された後、交差汚染を経て牛挽肉あるいは鶏挽肉中に混入した *E. coli* O157:H7 あるいは *S. enterica* Oranienburg の加熱過程における死滅予測曲線および実測値

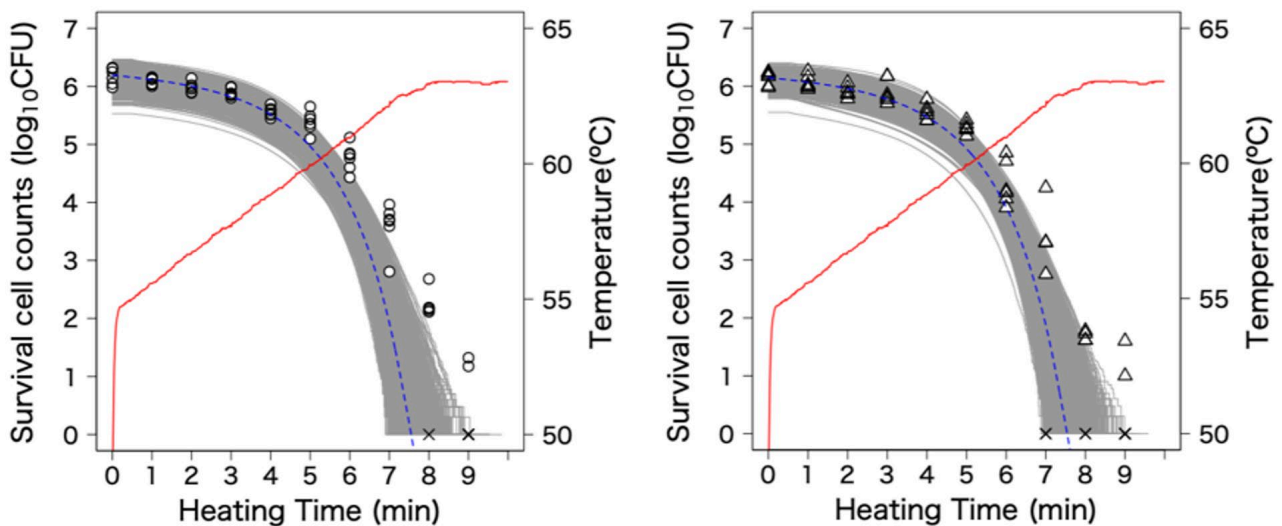


図17 加熱過程における牛挽肉中の *E. coli* O157:H7 (左：乾燥ストレス1日、右：乾燥ストレス3日) の死滅予測シミュレーション結果と実測値の比較

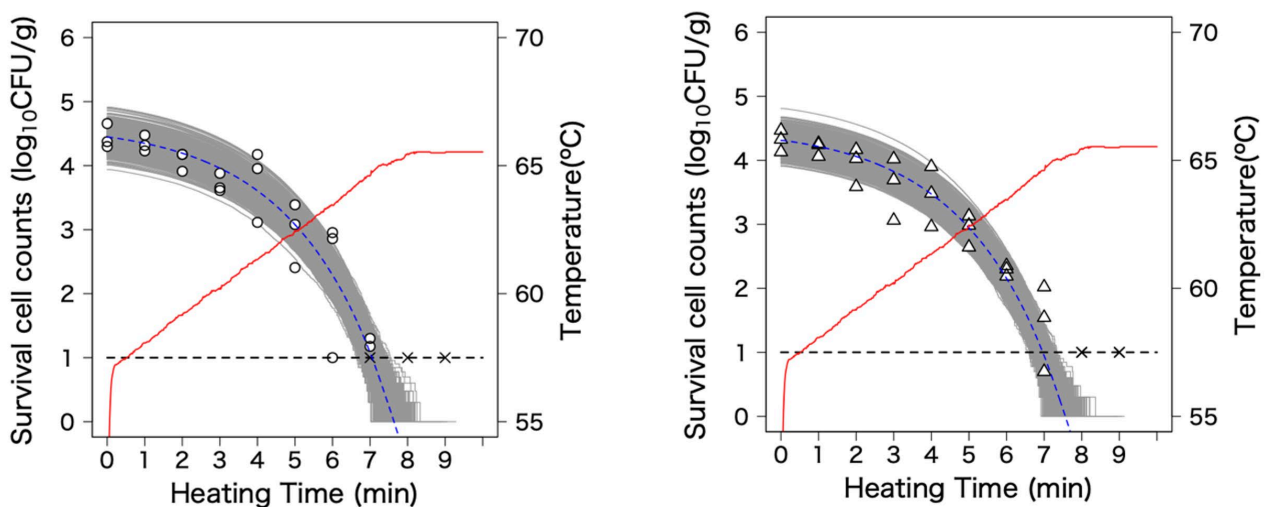


図18 加熱過程における鶏ひき肉中の *S. enterica* (左：乾燥ストレス1日、右：乾燥ストレス3日) の死滅予測シミュレーション結果と実測値の比較

を図 17 と図 18 にそれぞれ示した。

赤色の実線が温度変化を、破線が動的モデルによる点推定の予測値を、灰色の線が確率論モデルによる予測シミュレーション結果を、プロットが実測値をそれぞれ示している。乾燥ストレスの長短によらず、変動する温度環境下においても予測シミュレーションは良好な予測結果を示していた。本予測シミュレーションモデルにより、交差汚染によって汚染した鶏ひき肉中のサルモネラの調理過程における死滅・生残数およびその発生確率を推定可能とした。

4 工程毎の結果を統合した食中毒リスク評価のための計算手法の構築

(1) 個別課題：リスク評価モデルの基本アルゴリズムの構築（小関成樹（北海道大学））

上述（研究課題 3）で開発した確率論的数理モデルから、加工から喫食後に至る各段階での予測確率を統合して、汚染菌量、摂取菌量、摂取した料理の種類および摂取量を考慮して食中毒リスクを評価可能とする計算方法を構築することを目的としている。

既往の文献等から、どのようなアルゴリズムで生産から消費に至るまでのリスク評価が可能であるかを調査している。現時点では、喫食後の体内での病原菌の動態を評価するための用量反応関係の評価するアルゴリズムを構築した。対象とするヒト集団が若年層か高齢者か、摂取食物が固体か液体か、食物摂取後の胃内 pH の変化、胃内での滞留時間、胃から小腸へ移行する生存菌数の割合、結腸での滞留時間、小腸上皮細胞への侵入確率といった過程を全

て統合、確率計算することで用量反応関係を導出できることを明らかにした。さらに、その計算結果は、過去の食中毒事故の報告結果と z 概ね合致して、妥当性が示された。また、感度分析の結果から（図 19）、改めて喫食時の汚染菌数が食中毒感染に大きな影響を与えていることが確認された。一方で、胃内での菌数低下は食中毒を抑える意味合いはないことが示されたことから、実験的に食中毒の用量反応関係を導出し得ることを明らかにした。

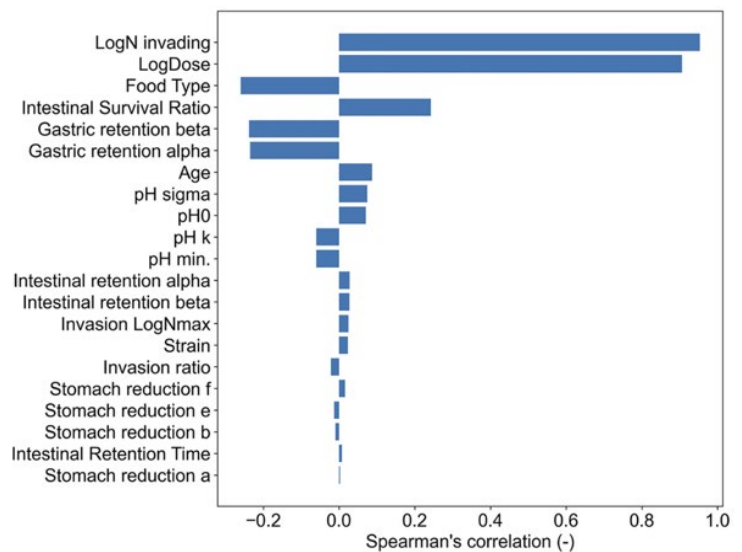


図 19 Spearman の相関分析による感度分析結果
Food type, food type indicator (liquid: 0; solid: 1);
Age, mean age of individuals subjected to the pH test
(young adult: 25; elderly: 71).

(1) 個別課題：日本国内におけるレタス喫食による食中毒リスク評価モデルの開発（小関成樹（北海道大学））

近年、健康志向や利便性に対する関心の高まりにより、サラダなど生野菜の需要が増加しているものの、生野菜は喫食直前に加熱処理を施さないため、食中毒細菌による食中毒を引き起こす恐れがある。事実、生野菜の消費増加に伴い、病原性の高い腸管出血性大腸菌O157:H7、サルモネラ、リステリア、カンピロバクターなどによる生野菜の食中毒事例は世界各国で増えており、日本でもO157:H7などによる食中毒が報告されることが過去にあった（Machado-Moreira et al., 2019; Michino & Otsuki et al., 2000）。生野菜の中では、レタスの消費量が多くリスクも高いとされている（de Oliveira Elias et al.

., 2019)。レタスが圃場から食卓まで運ばれるフードチェーンにおいて、圃場土壌中における細菌汚染や、その細菌が輸送中や家庭内の不適切な温度管理によって増殖することが、食中毒発症リスクに影響を及ぼすと報告されている (Pang et al., 2017)。

一方で、調理中に生肉などに生残する食中毒細菌が、手、まな板、包丁などを介しレタスに付着する、いわゆる「交差汚染」現象も、日本を含む世界各国で細菌汚染の原因として考えられている (Hayama et al., 2011)。交差汚染の食中毒発症リスクへの影響を解明する既往研究において、交差汚染の定量化が重要だと考えられているが (van Asselt et al., 2008)、細菌移行の再現性の難しさ、条件の複雑さゆえに検討事例は少ない (Possas et al., 2017)。日本は海外と異なり、圃場土壌中における細菌汚染の検出が稀であり (Koseki et al., 2011)、ゆえに輸送中の細菌増殖も考えにくいものの、食中毒事例は報告されていることから、食中毒発症リスクへの影響が未解明である、交差汚染が細菌汚染の主要因ではないかと考えられる。

以上より本研究では、交差汚染による食中毒発症リスクへの影響が大きいと考えられる日本に着目し、一般家庭における主要食中毒細菌 (腸管出血性大腸菌O157:H7、サルモネラ、リステリア、カンピロバクター) のレタス喫食に伴う食中毒発症リスクを明らかにすることを目的とした。交差汚染が食中毒発症リスクに及ぼす影響を明らかにするため、有効な手法とされている定量的微生物リスク評価 (Quantitative Microbial Risk Assessment; QMRA) を用いて、食中毒発症確率への影響を解明した。また交差汚染では複数回、器具や手を介して細菌が移行するが、その移行経路の違いによる影響も定量化が重要であるため (den Aantrekker et al., 2003)、その影響も明らかにした。

方法

(1) 圃場土壌中における細菌汚染

圃場土壌中の細菌によるレタスの汚染濃度を推定するため、日本では主要食中毒細菌が土壌から検出されることが少ないことを踏まえ、海外圃場の土壌における主要食中毒細菌 (腸管出血性大腸菌O157:H7、サルモネラ、リステリア、カンピロバクター) の汚染濃度を用いた。確率分布で表される汚染濃度を用いることで、圃場土壌中における細菌汚染の、食中毒発症リスクへの影響を定量化した。

(2) 輸送中における細菌増殖

圃場でのレタス収穫後、小売店までの輸送中、および家庭内での冷蔵保存中における、レタス上での細菌増殖挙動を推定するため、レタスの輸送中の温度履歴と *E. coli* O157:H7、*S. Typhimurium*、*L. monocytogenes* の増殖挙動の観測結果、家庭内での冷蔵保存の温度履歴を用いて、ベイズ推定により細菌の増殖挙動を推定した。輸送中の温度、時間による食中毒発症リスクへの影響を定量化するため、圃場から小売店までの輸送に関しては (Koseki & Isobe et al., 2005) の観測結果を平均値、家庭内での冷蔵保存に関しては (Pang et al., 2017) で用いられた観測結果を平均値として、それぞれ正規分布に基づいて複数の温度帯を想定した。この温度帯と、(Koseki & Isobe et al., 2005) で報告された3菌種の増殖挙動結果と増殖予測モデル式を用いて、2次モデル式のパラメータに対し正規分布に従って生成を行い、(4-1)に示す式 (Lu et al. 2020) を用いて時刻 $Time_{trans}$ における増殖挙動の推定を行った。

$$N_c(Time_{trans}) = C_0 + \mu_{max} * A(Time_{trans}) - \ln \left[1 + \frac{e^{\mu_{max} * A(Time_{trans})} - 1}{e^{(N_{max} - C_0)}} \right] \quad (4-1)$$

ここで C_0 は初期菌数 (CFU/g)、 N_{max} は最大菌数 (CFU/g)、 $Time_{trans}$ は輸送時間 (h)、 μ_{max} は最大比増殖速度 (h^{-1}) を示し、 N_{max} と μ_{max} は温度変化に伴う関数である。 $A(Time_{trans})$ は、Lu et al. (2020)

において計算を収束させるために使用された、以下の式(4-2)で表される2次モデルである。

$$A(Time_{trans}) = Time_{trans} + \frac{1}{\mu_{max}} * \ln[e^{-\mu_{max} * Time_{trans}} + e^{-\alpha} - e^{-\mu_{max} * Time_{trans} - \alpha}] \quad (4-2)$$

ここで α は細菌の生理学状態を示す。なお、*C. jejuni*は微好気性環境条件下でないと増殖能を持たないことから、輸送中の増殖は考慮していない。

(3) 交差汚染における細菌汚染

家庭内におけるレタスの食中毒細菌による交差汚染のモデル図を、図20に示す。図中の $X_1 \sim X_7$ は細菌の移行率を示し、(Chen et al., 2001; Smid et al., 2013)をもとに、移行率ごとに異なる確率分布から移行率を抽出して菌の移行を計算し、交差汚染後のレタスの汚染濃度を計算した。汚染源となる肉の汚染濃度はAngelidis & Koutsoumanis (2006)、Mazengia et al. (2014)、Rhoades et al. (2009)、Suzuki & Yamamoto (2009)の調査結果から生成した確率分布を使用し、菌種ごとに異なる肉のデータを用いて、確率分布から抽出した。使用した肉の汚染濃度の平均値を表1に示した。

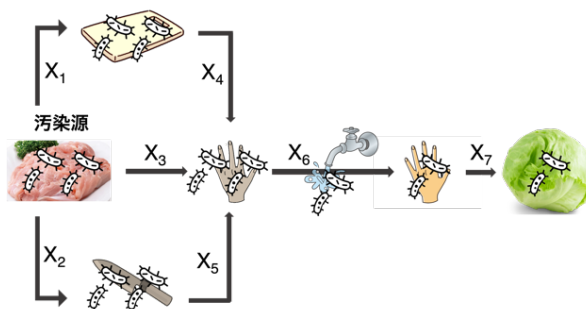


図20 生肉中の細菌が手、まな板、包丁を介して生野菜に移行する交差汚染モデル

表1 使用した4種の肉における、汚染濃度の平均値

	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. jejuni</i>
汚染濃度(Log CFU/g)	-1.091	-1.445	0.557	1.550

(4) 摂取量に基づく食中毒発症確率

上述の(1) - (3)の結果を用いて菌種ごとに細菌の摂取用量に基づく発症確率を、既に報告されている用量反応モデル (Teunis et al., 2004; Teunis et al., 2010; FAO/WHO, 2004; Teunis et al., 2005)を用いて推定した。

(5) 交差汚染が食中毒発症確率に及ぼす影響

上述の(1) - (4)の結果を用いて、日本国内における1年間の家庭用レタスの流通量、レタス1個当たりの平均重量と平均喫食回数を参考に、30,800,000回の乱数シミュレーションを行い、菌種ごとの平均発症確率を計算した。その上で交差汚染が食中毒発症確率に及ぼす影響を検証するため、スピアマンの順位相関を用いて、「圃場土壌中の細菌汚染」「輸送時間」「輸送中の温度変化」「生肉の汚染濃度」「交差汚染後のレタスの汚染濃度」の5つのリスク因子が、食中毒発症確率へ与える影響を計算、比較した。

(6) 細菌の移行率の違いが食中毒発症確率に及ぼす影響

上述の(1) - (4)の結果を用いて、移行率の違いによる食中毒発症確率への影響を検証した。ス

ピアマンの順位相関を用いて、図20に示した7種類の菌の移行率と、食中毒発症確率との順位相関を計算し比較した。なお（3）における交差汚染モデルの計算に関して、汚染源である肉以外に菌種による違いが無いため、1菌種における計算のみ行なった。

結果と考察

4菌種の食中毒発症確率に対する、リスク因子の影響の違いを図21に示した。いずれの菌種においても、「交差汚染後のレタスの汚染濃度」、すなわち交差汚染による食中毒発症確率への影響が大きいことが明らかになった。交差汚染後のレタスの汚染濃度は、*E. coli* O157:H7および*S. Typhimurium*においては、従来報告されている輸送中の温度、時間と同程度の影響を示し、*L. monocytogenes*および*C. jejuni*に関しては他のリスク因子に比べ大きな影響を示した。交差汚染の影響力については、4菌種いずれの結果でも見られるように、交差汚染の汚染源である、生肉の汚染濃度の影響を受け、交差汚染後のレタスの汚染濃度が大きくなり、発症に至る菌数になったことで、影響が大きくなったと考えられる。特に*L. monocytogenes*、*C. jejuni*は使用した汚染源である肉の汚染濃度が、*E. coli* O157:H7、*S. Typhimurium*より大きかったこと（表1）、加えて*C. jejuni*はフードチェーン中の他のリスク因子が少ないことが、交差汚染の影響が極めて大きくなった原因と考えられる。*L. monocytogenes*、*C. jejuni*における交差汚染の重要性はZilelidou et al. (2015) と Verhoeff-Bakkenes et al. (2008) でも述べられているが、*L. monocytogenes*に関しては近年、日本での検出事例が報告されていない。そのため、より実態に即したリスク評価には、日本における肉の汚染実態を明らかにする必要がある。本研究で食中毒発症確率に対する交差汚染の影響を定量化したことで、交差汚染は生肉の汚染濃度と同程度、あるいはそれ

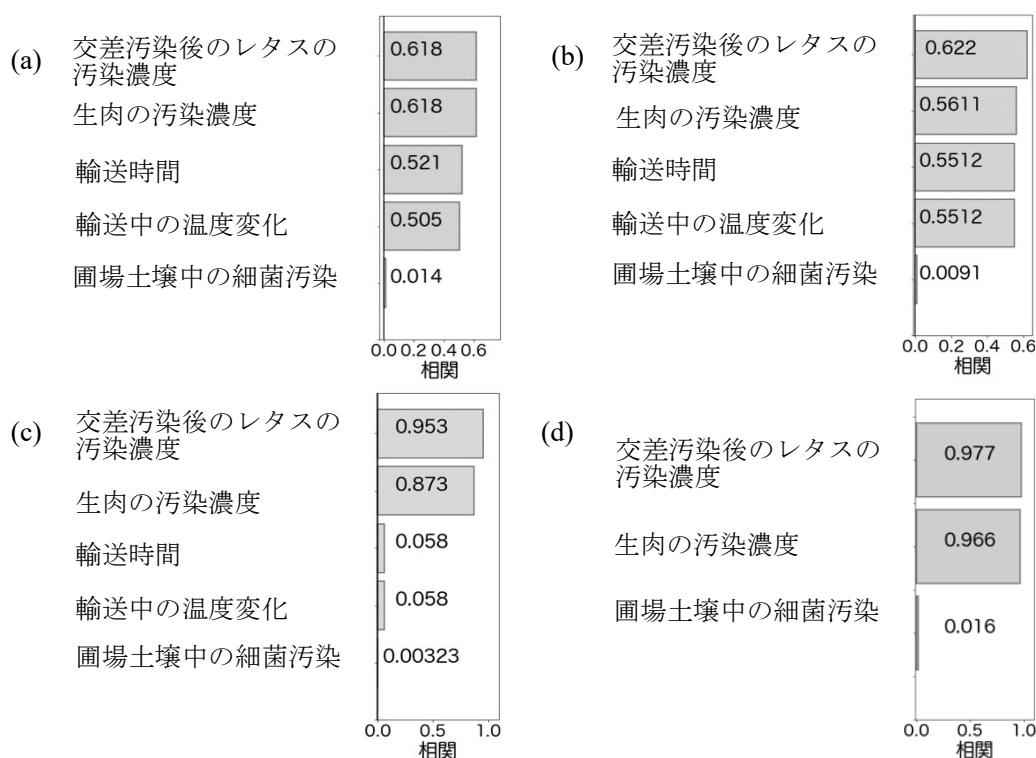


図21 4菌種における、平均発症確率に対する各リスク因子の影響。縦軸がリスク因子、横軸は各リスク因子の発症確率に対する相関を示し、枠内または枠横の数値は相関値である。上位にあるほど平均発症確率への影響が大きく、下位にあるほどその影響は小さい。(a) : *E. coli* O157:H7、(b) : *S. Typhimurium*、(c) : *L. monocytogenes*、(d) : *C. jejuni*である。

以上の影響を食中毒発症確率に及ぼすことがわかった。このことから、日本のレタス喫食による食中毒の予防には、まず「交差汚染」を予防すること、次に「生肉の汚染濃度」を減少させることが重要とわかる。「交差汚染」の予防は消費者一人一人のできる食中毒予防であるため、一般家庭における交差汚染予防の重要性が示唆された。

また、細菌の移行率の違いが食中毒発症確率に及ぼす影響については、図21および図22より「肉→まな板 (X_1)」「肉→手 (X_3)」が大きいことがわかった。これはde Boer & Hahné (1990) の結果と同様であり、まな板や手は包丁と比べ、肉との接触面積が大きく接触時間も長いため、多くの菌が移行することが原因と考えられる。一方で、「手洗いによるリスク減少 (X_6)」の影響は小さく、手洗いだけでは十分に交差汚染を予防できないことを意味している。本研究結果とChen et al. (2001)、Ravishankar et al. (2010) の報告を考慮すると、生肉による交差汚染の徹底した予防には、十分な手洗いに加え、包丁やまな板など調理器具の洗浄や交換、および手袋の着用や交換が重要となる。

以上、日本におけるレタスの食中毒発症リスクには、交差汚染が生肉の汚染濃度と同程度、あるいはそれ以上の大きな影響を及ぼすことを示し、食中毒予防における、交差汚染予防の重要性を定量的に示すことができた。また、その交差汚染を予防するには手洗いに加え、調理器具の洗浄や交換、手袋の使用の重要性を示せた。以上のように、本研究では、今後の食中毒予防の具体的対策の立案に不可欠な知見を得ることができた。

5 研究全体の成果、考察及び結論

本研究では自然界で起こりうる病原菌の汚染状況を反映した食中毒細菌のリスク評価を可能とすることを最終目標とした。そのなかで、交差汚染の発生における細菌の移行現象は、食品含水率に大きく影響を受けることを定量的に明らかにした。さらに、食品の含水率と改変シグモイド関数を用いて、交差汚染における食品器材間の菌移行率の数理モデルを構築した。これにより、食品の種類によらず、食品の含水率のみで交差汚染（付着、切断過程）における細菌数の移行率の推定を可能とすることで、食中毒リスク評価において交差汚染の影響を定量的に組み込むことを可能とした。

乾燥ストレスを経て、交差汚染によって付着した病原菌の増殖あるいは死滅挙動を検討した結果、菌種によらず、実験的に直接細菌を食品に付着させた場合と交差汚染によって付着した場合とで、その後の増殖挙動（レタス表面）および死滅挙動（牛挽肉中）に有意な差は認められないことを明らかにした。これらの結果は当初の想定とは異なるものであったが、既往研究で実験的に直接汚染させた場合の各種の増殖あるいは死滅の実験データが、現実的な交差汚染を介しての汚染を想定した場合にも適用可能であることを示す結果であった。したがって、食中毒リスク評価においては、過去報告されている種々の実験的な直接汚染による試験データを利用することで、交差汚染を介したシナリオにも対応可能であることを示した。

細菌の増殖／死滅予測モデルにおいてバラつきを適切に表現するとともに、その変動性と不確実性を分離して推定することが重要である。パラメータ推定にベイズ推定を用いると、パラメータを推定

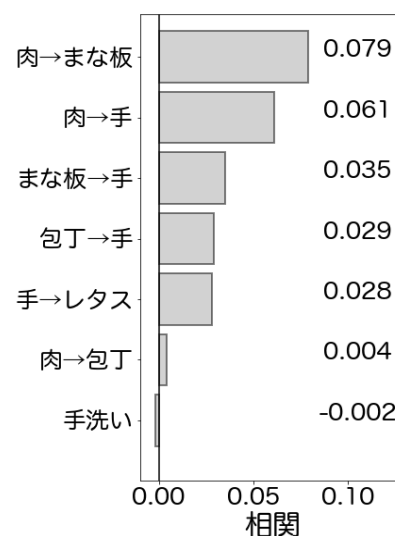


図22 交差汚染の、7種の移行率による食中毒発症確率への影響。縦軸がリスク因子、横軸は各リスク因子の発症確率に対する相関を示し、棒内または棒横の数値は相関値である。

する際に各過程に適した確率分布を使用できる。本研究では、細菌の増殖過程においては、初期菌数がポアソン分布に従い、増殖する菌数が負の二項分布に従うと仮定、細菌の死滅過程においては初期菌数と死滅過程における生存細菌数はポアソン分布に従うと仮定した。この手法によって、パラメータの推定から予測まで同じ確率分布のもとで予測可能とした。

食中毒細菌の感染リスクを評価するために、喫食後の体内での病原菌の動態を評価するための用量反応関係を評価するアルゴリズムを構築した。対象とするヒト集団が若年層か高齢者か、摂取食物が固体か液体か、食物摂取後の胃内pHの変化、胃内での滞留時間、胃から小腸へ移行する生存菌数の割合、結腸での滞留時間、小腸上皮細胞への侵入確率といった過程を全て統合、確率計算することで用量反応関係を導出できることを明らかにした。

上記の研究成果を統合して、日本におけるレタス喫食による食中毒リスクを評価した。その結果、交差汚染が生肉の汚染濃度と同程度、あるいはそれ以上の大きな影響を及ぼすことを示し、食中毒予防における、交差汚染予防の重要性を定量的に示した。また、その交差汚染を予防するには手洗いに加え、調理器具の洗浄や交換、手袋の使用の重要性を定量的に示せた。

以上、本研究では定量的微生物リスク評価において不可欠な要素を定量的に記述推定する手法を構築して、それらを統合することでより現実に即したリスク評価を実施可能とした。今後の微生物リスク評価の基礎的な枠組みを提示することができた。

Ⅲ 本研究を基にした論文等

1 本研究を基にした論文と掲載された雑誌名のリスト

- 1) Fuchisawa, Y., Abe, H., Koyama, K. & Koseki, S. Competitive growth kinetics of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* with enteric microflora in a small-intestine model. ©Journal of Applied Microbiology. 132, 1467–1478 (2021) <https://doi.org/10.1111/jam.15294>.
- 2) Abe, H., Takeoka, K., Fuchisawa, Y., Koyama, K., Koseki, S. A new dose response model for estimating the infection probability of *Campylobacter jejuni* based on the key events dose-response framework. ©Appl Environ Microbiol 87:e01299-21 (2021) <https://doi.org/10.1128/AEM.01299-21.2021>
- 3) Hiura, S., Abe, H., Koyama, K. & Koseki, S. Bayesian generalized linear model for simulating bacterial inactivation/growth considering variability and uncertainty. ©Frontiers in Microbiology. 12, 674364 (2021) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.674364>
- 4) Takahashi, Y., Abe, H., Koayama, K. & Koseki, S. Modelling the invasion of human small intestinal epithelial-like cells by *Salmonella enterica* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* using Bayesian inference. ©Letters in Applied Microbiology, 75, 388–395 (2022) <https://doi.org/10.1111/lam.13738>

2 本研究を基にした学会発表の実績

- 1) Ryoma Honda, Akihiro Ando, Kento Koyama and Shigenobu Koseki. Effect of Desiccation Stress on the Cross-Contamination of *Escherichia coli* O157:H7 from Food-Contact Surface to Food. IAFP 2021 Annual Meeting, July 22, 2021, Phoenix, USA.
- 2) Akihiro Ando, Ryoma Honda, Kento Koyama and Shigenobu Koseki. How Does Cross-Contaminated *Escherichia coli* O157:H7 on Fresh-Cut Lettuce Behave? IAFP 2021 Annual Meeting, July 21, 2021, Phoenix, USA.
- 3) Hidemoto Yabe, Kento Koyama and Shigenobu Koseki. How Do the Survival Kinetics of Cross-Contaminated *Escherichia coli* O157:H7 Differ in Ground Beef during Thermal Inactivation Process? IAFP

2022 Annual Meeting, August 3, 2022, Pittsburgh, USA.

- 4) 矢辺秀茂、小山健斗、小関成樹. 交差汚染後の食品中における食中毒細菌の死滅挙動の解明および予測モデル開発. 第43回日本食品微生物学会学術集会 2022年9月29日タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

3 特許権等の出願・申請等の状況
なし

4 プログラムの著作物及びデータベースの著作物
なし

5 その他 (各種受賞、プレスリリース等)
なし

IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) 自然界で生じ得る細菌汚染状態の再現実験系の構築 様々な環境ストレス (貧栄養, 乾燥, 低温等) 下において生存する細菌細胞を再現性良く調製するための方法および, 調製した細菌細胞を食品へ交差汚染させる方法を確立し, 再現可能な標準的な実験方法を確立する。	5	交差汚染現象を水分含量という包括的な指標で評価しうる方法論を構築した。さらに、交差汚染現象を食品の含水率という包括的な指標で評価しうる方法論を構築し、さらには細菌の移行率を推定記述可能とする数理モデル化に至った。
(2) 加工・流通・調理・喫食後の各段階における食中毒細菌の動態解明 想定する食品毎に加工, 流通, 調理の各過程における食中毒細菌の増殖/死滅の動態を定量的に明らかにし, さらに喫食後の人体内における消化過程での食中毒細菌の動態から感染の用量反応関係を見出す。	5	乾燥ストレスへのばく露は交差汚染後の食品上での食中毒細菌の増殖あるいは死滅に影響を与えないことを明らかにした。これにより、既往の研究成果データのリスク評価への適用の妥当性を示すことができた。
(3) 各工程における食中毒細菌の増殖/死滅を確率論的に評価する予測モデルの開発 上述の各工程における食中毒細菌の増殖/死滅挙動, 用量反応関係を確率論的に予測可能とする数理モデルを開発する。ベイズ統計を用いて予測の「不確実	5	食中毒細菌の加熱死滅挙動におけるバラつきを「不確実性」と「変動性」とを分離して評価可能とする、ベイズ推定による予測シミュレーション方法を確立した。

性」と「変動性」とを分離して評価可能とするモデルを開発する。		
(4) 上記課題で開発した確率論的数理モデルから、加工から喫食後に至る各段階での予測確率を統合して、汚染菌量、摂取菌量、摂食した料理の種類および摂食量を考慮して食中毒リスクを評価可能とする計算方法を構築する。	5	喫食後の体内での病原菌の動態を評価するための用量反応関係を評価するアルゴリズムを構築した。生食するレタスを対象として、交差汚染が食中毒発症リスクに及ぼす影響を推定可するために、リスク評価モデルを構築し、交差汚染の影響を推定可能とした。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	5	研究全体の進捗は想定どおりであるが、得られた実験結果は想定外であり、学術的にも極めて有意義なデータを蓄積している。
(2) 研究成果の有用性	5	本研究では定量的微生物リスク評価において不可欠な要素を定量的に記述推定する手法を構築して、それらを統合することでより現実に即したリスク評価を実施可能とした。今後の微生物リスク評価の基礎的な枠組みを提示することができた。
<p>総合コメント</p> <p>多数の有用な実験データを蓄積することができただけでなく、ベイズ統計およびシミュレーション手法を駆使した計算方法を構築するとともに、データとシミュレーションを駆使することで、実際のリスク評価モデルの開発を成し遂げた。</p>		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。

(別添1)

研究成果の概要（和文）

現実的に自然界で起こりうる食中毒細菌の汚染状況を反映した食中毒リスク評価を可能とすることを最終目標として、種々の要素の影響を定量的に明らかにした。食中毒リスクに影響を及ぼす要因の一つである交差汚染における細菌の移行現象を定量評価する数理モデルを構築した。これにより、食品の種類によらず、食品の含水率のみで交差汚染（付着、切断過程）における細菌数の移行率の推定を可能とした。さらに、乾燥ストレスを経て、交差汚染によって付着した病原菌の増殖あるいは死滅挙動を検討した結果、菌種によらず、実験的に直接細菌を食品に付着させた場合と交差汚染によって付着した場合とで、その後の増殖挙動および死滅挙動に有意な差が認められないことを明らかにした。そして、細菌の増殖／死滅予測モデルにおいてバラつきを適切に表現するとともに、その変動性と不確実性を分離して推定するためのベイズ推定に基づく解析手法を開発した。最終的に、上述の研究成果を統合して、日本におけるレタス喫食による食中毒リスクを評価し、交差汚染が大きな影響を及ぼすことを示し、食中毒予防における、交差汚染予防の重要性を定量的に示した。

以上、本研究では定量的微生物リスク評価において不可欠な要素を定量的に記述推定する手法を構築して、それらを統合することでより現実に即したリスク評価を実施可能とした。今後の微生物リスク評価の基礎的な枠組みを提示することができた。

(別添2)

研究成果の概要 (英文)

Title of research project	Elucidation of the dynamics of foodborne pathogens surviving under drought and oligotrophic stress in the food chain and development of a method for predicting foodborne disease risk
Research project number	JPCAFSC20202004
Research period	FY 2020 – 2022
Name of principal research investigator (PI)	Shigenobu Koseki

Abstract/Summary

With the goal of enabling risk assessment of foodborne bacteria that reflects the contamination of pathogens that could realistically occur in nature, we quantitatively clarified the effects of various factors. A mathematical model was developed to quantitatively evaluate the phenomenon of bacterial transfer in cross-contamination, which is one of the factors affecting the risk of foodborne illness. This enabled us to estimate the transfer rate of the number of bacteria in cross-contamination (adhesion and cutting processes) based only on the moisture content of the food, regardless of the type of food. Furthermore, we examined the growth or death behavior of pathogens attached by cross-contamination after undergoing drying stress, and found that there was no significant difference in the subsequent growth and death behavior between the case where bacteria were experimentally attached directly to the food and the case where bacteria were attached by cross-contamination, regardless of the bacterial species. We then developed an analytical method based on Bayesian estimation to appropriately represent the variability in the bacterial growth/death prediction model and to estimate its variability and uncertainty separately. Finally, by integrating the results of the above studies, we evaluated the risk of foodborne illness caused by eating lettuce in Japan and showed that cross-contamination has a significant impact, quantitatively demonstrating the importance of cross-contamination prevention in the prevention of foodborne illness.

In summary, this study established a method for quantitatively describing and estimating the essential elements of quantitative microbial risk assessment, and by integrating these elements, a more realistic risk assessment can be conducted. We were able to present a basic framework for future microbial risk assessment.

This report provides outcome of the captioned research programme funded by Food Safety Commission Japan (FSCJ). This is not a formal publication of FSCJ and is neither for sale nor for use in conjunction with commercial purpose. All rights are reserved by FSCJ. The view expressed in this report does not imply any opinion on the part of FSCJ.

1. List of papers published on the basis of this research

- 1) Fuchisawa, Y., Abe, H., Koyama, K. & Koseki, S. Competitive growth kinetics of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* with enteric microflora in a small-intestine model. *Journal of Applied Microbiology*. 132, 1467–1478 (2021) <https://doi:10.1111/jam.15294>.

- 2) Abe, H., Takeoka, K., Fuchisawa, Y., Koyama, K., Koseki, S. A new dose response model for estimating the infection probability of *Campylobacter jejuni* based on the key events dose-response framework. *Appl Environ Microbiol* 87:e01299-21 (2021) <https://doi.org/10.1128/AEM.01299-21.2021>"
 - 3) Hiura, S., Abe, H., Koyama, K. & Koseki, S. Bayesian generalized linear model for simulating bacterial inactivation/growth considering variability and uncertainty. *Frontiers in Microbiology*. 12, 674364 (2021) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.674364>
 - 4) Takahashi, Y., Abe, H., Koayama, K. & Koseki, S. Modelling the invasion of human small intestinal epithelial - like cells by *Salmonella enterica* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* using Bayesian inference. *Letters in Applied Microbiology*, 75, 388-395 (2022) <https://doi.org/10.1111/lam.13738>
2. List of presentations based on this research
 - 1) Ryoma Honda, Akihiro Ando, Kento Koyama and Shigenobu Koseki. Effect of Desiccation Stress on the Cross-Contamination of *Escherichia coli* O157:H7 from Food-Contact Surface to Food. IAFP 2021 Annual Meeting, July 22, 2021, Phoenix, USA.
 - 2) Akihiro Ando, Ryoma Honda, Kento Koyama and Shigenobu Koseki. How Does Cross-Contaminated *Escherichia coli* O157:H7 on Fresh-Cut Lettuce Behave? IAFP 2021 Annual Meeting, July 21, 2021, Phoenix, USA.
 - 3) Hidemoto Yabe, Kento Koyama and Shigenobu Koseki. How Do the Survival Kinetics of Cross-Contaminated *Escherichia coli* O157:H7 Differ in Ground Beef during Thermal Inactivation Process? IAFP 2022 Annual Meeting, August 3, 2022, Pittsburgh, USA.
 - 4) Hidemoto Yabe, Kento Koyama and Shigeki Koseki. Elucidation of Killing Behavior of Foodborne Bacteria in Foods after Cross-Contamination and Development of a Prediction Model. The 43rd Annual Meeting of the Japanese Society for Food Microbiology, September 29, 2022, Tower Hall Funabori, Edogawa-ku, Tokyo.
 3. The number and summary of patents and patent applications
None
 4. Others (awards, press releases, software and database construction)
None