

平成30～31年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

（※研究全体の期間（初年度及び2年目以降）について記載する。）

研究課題名 (研究項目名)	食物消化過程におけるカンピロバクターの生残特性を基盤とする新たな用量反応モデルの開発（課題番号：1802） (1 危害要因・ばく露実態の評価に必要な科学的知見の集積)
主任研究者	研究者名：小関 成樹 所属機関：国立大学法人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

平成30年度～平成31年度（2年間）

### 2 研究目的

鶏肉摂食によるカンピロバクター属菌の食中毒リスク評価において、核となる摂取菌量と感染確率との関係を表す用量反応モデルを、生体反応に基づいた従来にない全く新規な方法で開発することを目的とする。従来の食中毒細菌の用量反応モデルは原因（摂取菌量）と結果（感染確率）を結びつけて数式化していたが、実際には汚染食品を摂食してから腸管内での感染が成立するまでには、幾つかの鍵となる人体内での生体反応場（胃酸、上皮細胞への侵入等）を通過する必要がある。本研究では、反応過程が不明であった従来の用量反応モデルから脱却して、鍵となる反応場毎での生存／死滅の確率を推定し、低容量における感染確率についても予測可能とする最終的な感染確率を予測する数理モデルを開発する。

具体的には本研究では以下の4つの研究小課題を達成することを目的とする。

#### 1) 胃内消化過程におけるカンピロバクターの生存／死滅確率

食物消化過程の第一関門である胃内でのカンピロバクターの生残特性を、人工胃液中での各種の鶏肉料理とともに暴露した際の生存挙動から明らかにして、生存確率を推定可能とする予測モデルを開発する。

#### 2) 小腸内消化過程における腸内細菌叢との競合環境下での生存／死滅

胃での消化過程を通過したカンピロバクターの、消化過程の第2関門である小腸での腸内細菌叢との競合条件下における生残特性を明らかにして、生存確率を推定可能とする。

#### 3) 小腸上皮細胞への定着および侵入確率の評価

カンピロバクター感染成立の最終過程である、小腸上皮細胞への侵入確率を Caco-2 細胞を用いた培養細胞系を用いて明らかにして、侵入確率を推定可能とする。

#### 4) Key Event 毎の結果を統合した用量反応モデルの開発

上記3段階の Key Event 毎での予測確率を統合して、摂取菌量、摂食した料理の種類および摂食量を考慮できる新たな用量反応モデルを開発する。また、従来の提案モデルとの比較により、開発したモデルの妥当性を検証する。

3 研究体制 (※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。)

研究項目名	個別課題名	研究担当者名 (所属機関名)
(1) 胃内消化過程におけるカンピロバクターの生存/死滅確率	1) 胃内消化過程におけるカンピロバクターの生存/死滅確率 2) 胃内における食物消化過程でのカンピロバクター死滅挙動の予測	小関成樹 (北海道大学)
(2) 小腸内消化過程における腸内細菌叢との競合環境下での生存/死滅	小腸内消化過程における腸内細菌叢との競合環境下での生存/死滅	小関成樹 (北海道大学)
(3) 小腸上皮細胞への定着および侵入程度の推定	小腸上皮細胞への定着および侵入程度の推定	小関成樹 (北海道大学)
(4) Key Event 毎の結果を統合した用量反応モデルの開発	1) 胃を通過するカンピロバクターの生存菌数および確率の推定 2) 胃内消化後の細菌挙動の予測小腸上皮様細胞への侵入菌数の予測	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) 個別課題名：胃内消化過程におけるカンピロバクターの生存/死滅確率 (研究担当者名：小関成樹 (所属機関名：北海道大学))

1) 胃液中でのカンピロバクター死滅挙動の数理モデル化

<目的>

胃消化モデル系を構築して、実際に食品を摂食した際の胃内における生残特性を明らかにする。初年度は人工胃液中での種々のpH環境下におけるカンピロバクターの生残挙動を明らかにして、変動するpH環境下におけるカンピロバクターの死滅挙動を予測可能とする基礎モデルを開発する。さらに、実際の食品消化過程を模倣した実験系での食品(鶏肉料理)に付着したカンピロバクターの生残を検討する。

予測においては様々な課題が存在する。その一つが「菌株差(strain variability)」である。微生物には属・種といった分類に加えて「株(strain)」という概念が存在し、属・種が同一でも異なるものとして扱われる。通常、微生物の挙動に関するデータを測定する場合にはある一つの菌株を培養、もしくは複数菌株をそれぞれに培養し混合した細菌液が使用され

るが、いずれにしてもその種における菌株のもつバラツキを表現することはできない。

本研究では *Campylobacter jejuni* を 11 菌株 使用し、人工胃液中における pH 耐性の菌株差についてベイズ統計を用いて解析し、その菌株差を考慮した微生物挙動の予測を可能とすることを目的とした。さらに、実際の胃消化過程を模した実験系における *Campylobacter jejuni* の死滅挙動を検討するとともに、予測可能とすることを目的とした。

<実験方法>

人工胃液を作成し、目的の pH 条件 (pH3.0 から pH3.8 まで 0.2 間隔で 5 条件) となるよう塩酸によってそれぞれ調整した。その人工胃液を恒温槽によって 37°C 一定に保ち、定常期まで培養した *C. jejuni* をそれぞれ一定量滴下し、一定時間ごとに少量取り出して菌数を測定し、生残挙動を推定した。なお、本実験に関しては、より平均的な挙動を得るため 1 条件につき 3 反復実験を行った。

c) 解析方法の概要

生残挙動の菌株差を Weibull model のパラメータである尺度係数・形状係数のバラツキによって記述した。Weibull model は微生物の生残挙動を記述するモデルとしてよく用いられ、以下のような式で表される。

$$\log_{10} \frac{N(t)}{N_0} = - \left( \frac{t}{\alpha} \right)^\beta$$

(t: 人工胃液中での経過時間,  $N_0$ :初期菌数,  $N(t)$ : t 分経過後の生残菌数,  $\alpha$ : 尺度係数,  $\beta$ :形状係数)

尺度係数と形状係数の両パラメータが「菌株に関わらず共通の値」+「各菌株が固有に持つ値」によって成り立つと仮定し、加えて「各菌株が固有に持つ値」が平均 0 の正規分布に従うと仮定することによってベイズ解析を行った。ベイズ解析によって通常の解析よりも柔軟な解析が可能となる。式で表すと以下ようになる。

$$\alpha = \alpha_{\text{common}} + \alpha[\text{strain "X"}]$$

$$\alpha[\text{strain "X"}] \sim \text{Normal}(0, s_\alpha)$$

$$\beta = \beta_{\text{common}} + \beta[\text{strain "X"}]$$

$$\beta[\text{strain "X"}] \sim \text{Normal}(0, s_\beta)$$

<研究成果>

図 1(a)は実験によって得られた pH3.0 の人工胃液中における 11 菌株の *Campylobacter jejuni* の生残率の変化である。各記号がそれぞれの菌株を表している。このデータから一つ一つの菌株を取り出し、それぞれ Weibull model によって記述したものが図 1(b)、全菌株のデータから上述の方法によってベイズ解析を行い、結果をもとに作図したものが図 1(c)である(実線は解析結果の中央値、点線は 70%信頼区間(例えば 100 菌株のデータが得られた場合、70 菌株のデータは点線の範囲に収まるという解釈)を示す)。図 1(b)のように菌株によって生残特性に多少のバラツキが生じており、図 1(c)からそのバラツキをベイズ解析によって表現できていることがわかる。したがってこの解析結果によって *C.jejuni* の菌株差を考慮した生存率の予測が可能となった。

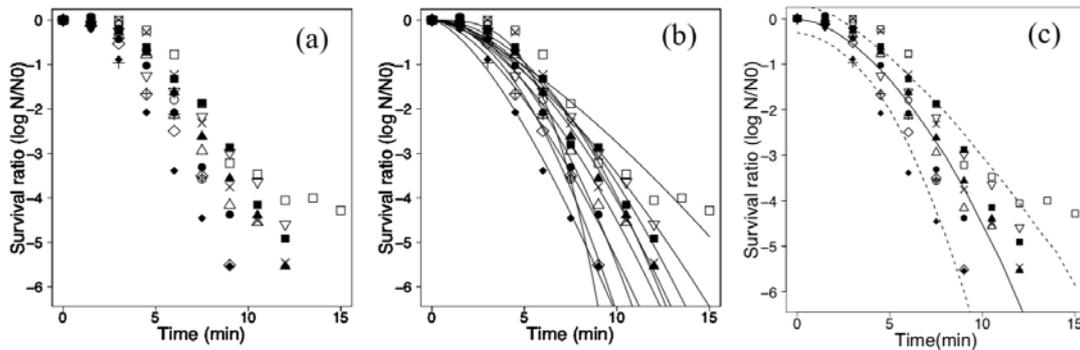


Fig. 1 Survival kinetics of *Campylobacter jejuni* in simulated gastric fluid adjusted pH3.0. Each symbol represents each strain. (a) is only measured value, (b) is Weibull fitting with each strain, (c) is Bayesian analysis using data of all 11 strains. The solid line in (c) represents the median value of the analysis results, and the dotted line represents the 70% prediction band of the analysis results.

## 2) 胃内における食物消化過程でのカンピロバクター死滅挙動の予測

### <目的>

胃消化過程におけるカンピロバクターの生残特性の解明および、その予測を可能とすることを目的とした。また、その前段階として、鶏肉の加熱調理におけるカンピロバクターの生存生残特性についても検討した。

### <方法>

a) 焼き鳥調理過程における*C. jejuni*の生残挙動 札幌市内小売店で購入した鶏もも肉を約8gずつに切り分け、各肉の表面2か所に一方の接種面がもう一方の対称面となるよう*C. jejuni*液を50μLずつ接種した。その後、滅菌済みの竹串に切り分けた鶏もも肉を菌液接種面が重なるよう5個ずつ刺し、これを一般的な焼き鳥一串と想定した。作成した焼き鳥串を表裏各面0分から4分まで0.5分間隔でガスグリル（岩谷産業株式会社）によって加熱調理した。また、K型熱電対を用いて加熱中の鶏もも肉中心部の温度履歴を測定した。各条件で加熱後の焼き鳥をストマッカー袋に入れ、Bolton Brothとともにストマッカーを用いて1分間均質化した。処理後の懸濁液を取り出してmCCDA培地に塗抹し、42°Cで48時間培養後に発生したコロニー数を計測した。再現性を確認するため、3回の独立した実験を行った。

### b) 胃消化シミュレーション過程における*C. jejuni*の生残特性

図2に実験装置の模式図を示した。食品をストマッカー袋に入れ、ストマッカーによって1分間均質化し（咀嚼を想定）、その後塩酸を用いてpH 1.5に調整した人工胃液をストマッカー袋に40 mL（健康な成人の空腹時の胃液量）加え、もう一度ストマッカーによって1分間均質化したものを食品投入直後の胃の状態と想定した。胃消化過程を表現するためこれを恒温槽によって37°C一定に保ち、また、ローラーポンプを用いて胃液の分泌をシミュレートした。具体的には食品投入後30分

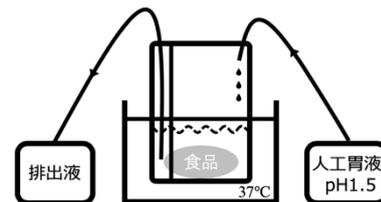


図2 胃消化シミュレート実験装置の模式図

間は3.0 mL/min, 30分から120分までは2.0 mL/min, 120分以降は1.0 mL/minの流速で人工胃液を滴下し, 食品投入から30分経過後から実験終了(180分)まで2.0 mL/minの流速でストマッカー袋内の溶液を排出した。さらに胃の蠕動運動を想定し, 10分ごとに溶液で満たされたストマッカー袋を30回程度揉み込んだ。また, pHメーターを用いて10分ごとに溶液内のpHを測定した。

カンピロバクター汚染リスクの高い鶏もも肉, 鶏レバー, 鶏つくね, およびレタスの喫食を想定して試験に供した。鶏もも肉, 鶏レバー, 鶏つくねにおいては焼き鳥を想定した。実験aと同様に約8 gとなるよう切り分け, 滅菌済みの竹串に切り分けた鶏もも肉を5個ずつ刺し, 各串を表裏各面4分ずつガスグリルによって加熱した。各実験においてこれを3串(加熱前は120 g, 加熱後は約100 g)ずつ使用した。また, 生に近い状態の鶏肉の喫食を想定し, 鶏もも肉は生の状態でも実験に使用した。鶏もも肉を約10 gとなるように切り分け30分間紫外線照射により表面殺菌し, 各実験において10個(約100 g)ずつ使用した。レタスは汚染された鶏肉からの交差汚染を想定した。約5 gとなるように切り分け, 30分間紫外線照射により表面殺菌し, 各実験において20枚(約100 g)ずつ使用した。また, 実際の食事の場面では1種類の食品ではなく, 複数種類の食品が喫食される。そこで, 焼き鳥とレタスを混合した条件でも実験を行った。鶏もも肉の焼き鳥を1.5串(加熱前は60 g, 加熱後は約50 g)と50 gのレタスを各実験に用いた(各食品の作成方法は上記と同じ)。全ての条件において, 50 µLの*C. jejuni*液を任意の点に15箇所表裏各面に接種した。各食品喫食想定において, 上述した胃消化過程シミュレート実験を行った。消化過程において適宜懸濁液を取り出してmCCDA培地に塗抹し, 42°Cで48時間培養後に発生したコロニー数を計測した。再現性を確認するため, 各条件で3回の独立した実験を行った。

#### c) 胃消化過程における*C. jejuni*の生存確率予測モデルによる予測結果との比較

予測モデルは (Takeoka et al., in submission) を参考にした。こちらの論文では3.0から3.8まで0.2間隔のpH条件に調整した人工胃液中における*C. jejuni*の生残特性を11菌株において検討し, このデータを基に任意のpHの条件下において*C. jejuni*の菌株の変動性を考慮して生存確率を予測可能なモデルを開発した。このモデルを応用してpHの変動する胃消化過程における*C. jejuni*の生存確率を予測し, 実験観測値と比較した。

#### <研究成果>

##### a) 焼き鳥調理過程における*C. jejuni*の生残特性

図3に焼き鳥調理過程における*C. jejuni*の生残特性と加熱中の鶏もも肉中心部の温度履歴を測定した結果を示した。10<sup>6</sup> CFU/g程度存在していた*C. jejuni*は合計8分間の加熱により全て不活性化された。図4には合計0, 2, 4, 6, 8分間加熱した際の焼き鳥の断面写真を示した。着目すべきは合計6分間と8分間加熱後の断面写真である。2枚の写真を比較すると, 加熱による鶏もも

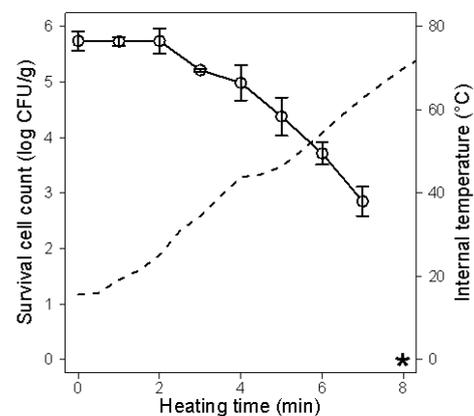


図3 焼き鳥調理過程における*C. jejuni*の生残特性 (\*は検出限界)  
 — 生残菌数    - - - 中心部温度履歴

の熱変性の程度に大きな違いはない。しかし一方で *C. jejuni* の不活化率には大きな差があり、合計8分間の加熱では全て不活性化されたのに対し、合計6分間の加熱では2桁程度の不活性化しか示さなかった。したがって、高濃度の *C. jejuni* で汚染された鶏肉を用いて焼き鳥を調理した場合、目視では十分に加熱されていると判断された場合でも、実際は *C. jejuni* が調理過程において完全に不活性化されず生存する可能性があることと示唆された。

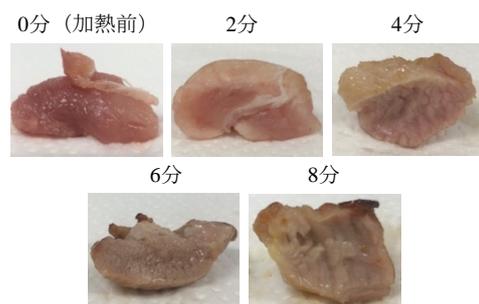


図4 合計0, 2, 4, 6, 8分加熱後の焼き鳥の断面写真

b) 胃消化シミュレーション過程における *C. jejuni* の生残特性および予測モデルとの比較

焼き鳥を想定した鶏もも肉、鶏レバー、鶏つくね、および生鶏もも肉を用いた条件においては同様の傾向が得られた。一例として、鶏レバーの結果を図5 (a)に示した。食品投入後ストマッカー袋内の溶液のpHは6.0付近まで上昇し、180分経過後もpH4.0を下回らず、*C. jejuni* の生存率の低下は1桁未満であった。一方、予測モデルによる予測値は180分経過後も全く減少しておらず、実測値の僅かな生存率の低下を示さなかった。レタスを用いた条件(図5 (b))では溶液内のpHがあまり上昇せず、180分の消化過程において常にpH 3.0を下回った。*C. jejuni* は食品投入後すぐに全て不活性化された。焼き鳥(もも)とレタスを混合した条件(図5 (c))においては、*C. jejuni* の生存率は180分間の実験過程において徐々に減少し、180分経過時の測定において検出限界に達した。モデルの予測値は実測値と同様に180分間で徐々に減少したが、多くの測定点において実験値は予測曲線よりも低い生存率を示した。

これらの結果から、カンピロバクター汚染リスクの高い食品を喫食した際の胃消化過程における *C. jejuni* の生残特性を解明することができた。胃消化過程における胃内液のpH変動は、レタス100 gのみの場合は *C. jejuni* の不活性化に十分な低さであるのに対し、鶏肉1

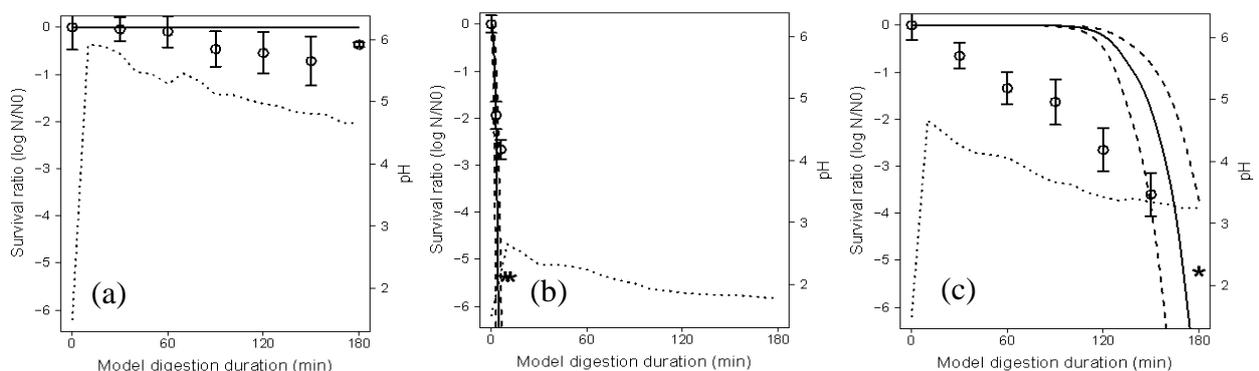


図5 (a) 焼き鳥(レバー)、(b) レタス、(c) 焼き鳥(もも)とレタスの混合条件の胃消化シミュレート実験における *C. jejuni* の生残特性 (\*は検出限界)。

—— 予測曲線 - - - 95%信用区間 ..... pH変動

00 gの場合はほとんど不活性化されない程度だった。100 g以上の鶏肉は健康な成人にとって普通に喫食される量である。したがって、胃消化過程はカンピロバクターの不活性化にあまり大きな影響を与えないことが示唆された。

一方、実験観測値は予測モデルの予測値よりもわずかに低い傾向を示した。これは実験装置の構造が影響していると推察される。図1のようにpH 1.5の人工胃液はストマッカー袋内に一定間隔で滴下された。そのため測定値に比べて滴下点付近はpHが局所的に非常に低くなり、*C. jejuni*の予測以上の生存率の低下を招いたと考えられる。このモデル消化系の構造改善によって、より正確な生残特性が把握できる可能性がある。

#### <まとめ>

本研究では胃消化過程におけるカンピロバクターの生残特性の解明、およびその生存確率を予測可能とすることを目的とした。その結果、胃消化シミュレーション過程におけるカンピロバクターの生残特性が得られ、鶏肉100 g以上の喫食においては胃内のpH変動がカンピロバクターの死滅にほとんど影響を及ぼさないことが示唆された。また、胃消化過程におけるカンピロバクターの死滅予測モデルは概ね良好に死滅挙動を予測できた。本研究の成果はカンピロバクター食中毒リスク評価のための、人体内の生体反応に着目した新たな用量反応モデル構築に適用できる可能性を示した。

(2) 個別課題名：小腸内消化過程における腸内細菌叢との競合環境下での生存／死滅  
(研究担当者名：小関成樹 (所属機関名：北海道大学) )

#### <目的>

消化過程において、カンピロバクターは胃を通過した後に小腸内へと侵入する。カンピロバクターは感染が起こるまで小腸内で滞留し、その間に細菌は生きて活動を行なっている。つまり、体内において食中毒細菌の持つ危険性が変動しており、それは個人の腸内細菌叢に影響を受けるものと考えられる。そこで本研究では実験室内でヒト小腸の再現を行なった。そしてその中に侵入させたカンピロバクターの菌数を測定する事で、ヒト腸内での細菌数変動の把握を目指した。また、腸内細菌の初期菌数条件を変化させることで、カンピロバクターが腸内環境から受ける影響の検討も行った。

#### <方法>

-80℃にて凍結保存していた *Campylobacter jejuni* 11菌株 (RIMD 0366026, RIMD 0366027, RIMD 0366028, RIMD 0366029, RIMD 0366042, RIMD 0366043, RIMD 0366044, RIMD 0366048, RIMD 0366049, RIMD 0366050, RIMD 0366051) をカンピロバクター選択培地 (プレストン処方) およびBolton brothを用いて2回前培養を行い、混合して実験に用いた。

腸内細菌叢は Human Microbiome Project で検討された腸内細菌叢をATCC MSA-2003を用いた。細菌叢の構成は以下のとおりである。*Bacillus cereus* (ATCC 10987), *Bifidobacterium adolescentis* (ATCC 15703), *Clostridium beijerinckii* (ATCC 35702), *Deinococcus radiodurans* (ATCC BAA-816) *Enterococcus faecalis* (ATCC 47077), *Escherichia coli* (ATCC 700926), *Lactobacillus gasseri* (ATCC 33323), *Rhodobacter sphaeroides* (ATCC 17029) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus mutans* (ATCC 700610)。

混合後のカンピロバクターおよび腸内細菌をそれぞれ希釈し、カンピロバクターは初期菌数 $10^4$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  CFU/mL, 腸内細菌は $10^9$ ,  $10^4$  CFU/mLに調整した。検討のため、腸内細菌0 CFU/mLの条件も用意し、組み合わせで計9条件の実験を行った。調整した菌液を人工小腸液に接種し、酸素濃度 6~12%, 二酸化炭素濃度5~8%の微好気状態, 37°Cで72 h培養した。測定間隔は0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h後の8回とした。各時間において培養液を取り出し、細菌が混合された状態からカンピロバクターのみを分離するため、選択培地であるクロモアガーカンピロバクターに塗布し微好気条件で42°C, 2日間培養した。腸内細菌の分離にはTSAへ塗布し、カンピロバクターが増殖しない好気条件において37°C, 1日培養した。培養後現れたコロニーを測定した。

#### <研究成果>

図6はカンピロバクター初期菌数 $10^2$  CFU/mL, 腸内細菌初期菌数 $10^9$  CFU/mLで競合を行った際の実験結果である。腸内細菌が高い初期菌数を維持したままであるのに対して、カンピロバクターはほとんど増殖せず、24時間を境にその菌数を減少させている。一方、同図には単培養を行った際のカンピロバクター菌数変動挙動も掲載した。こちらは増殖する様子が見られ、48 hの時点でほぼ最大菌数となる $10^8$  CFU/mLに到達している。また、図7は図1よりも腸内細菌の初期菌数を低く設定した時の結果を示した。この時、腸内細菌は12 hまで増殖挙動を示し、 $10^9$  CFU/mLまで到達している。この間カンピロバクターも緩やかな増殖挙動を示し、24 hには $10^4$  CFU/mLまで増殖した。しかし、これ以降は増殖することなく、細菌数を減少させていった。この結果から、競合環境下におけるカンピロバクターの増殖は競合する細菌の影響を大きく受けると考えられる。競合細菌の数が最大値にある場合は増殖することが出来ない。また、競合細菌が最大値に達していない場合はカンピロバクターも増殖挙動を示すが、一度競合細菌が最大値に到達してしまうと以降は増殖が出来なくなるのだと考えられる。

本研究により、カンピロバクターと腸内細菌の競合関係が明らかとなった。先行研究において、小腸のうち空腸部分の腸内細

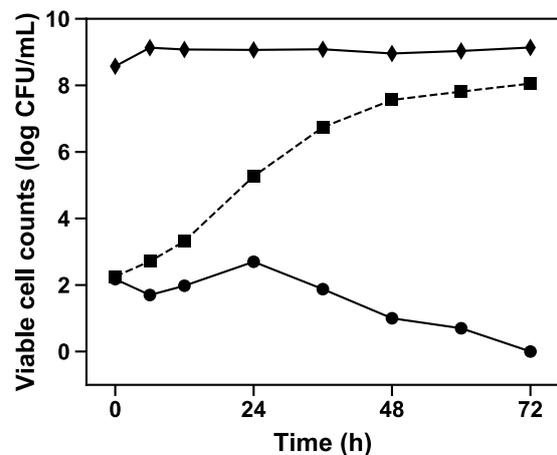


図6 カンピロバクターを腸内細菌とともに37°C微好気条件で培養した際の菌数変動および対照実験において単培養されたカンピロバクター(●:競合条件におけるカンピロバクター, ◆:腸内細菌, ■:単培養されたカンピロバクター)

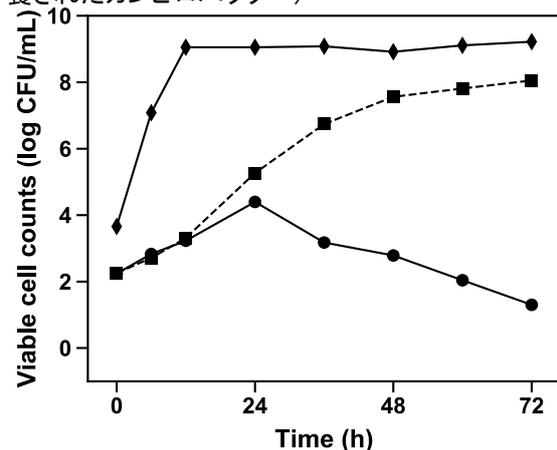


図7 カンピロバクターを初期菌数 $10^4$  CFU/mLの腸内細菌とともに37°C微好気条件で培養した際の菌数変動および対照実験において単培養されたカンピロバクター(●:競合条件におけるカンピロバクター, ◆:腸内細菌, ■:単培養)

菌数は $10^3 \sim 10^5$  CFU/mL、大腸へと続く回腸では $10^7 \sim 10^8$  CFU/mLと報告されている(Power et al, 2014)。このことより、カンピロバクターは腸内細菌叢との競合下で、小腸の前半部分では増殖傾向にあるが、後半では増殖抑制が発生すると推察される。

これらの現象はLotka-Volterra方程式で以下の数式でモデル化できる。

$$\frac{dN_1}{dt} = r_1 \frac{q_{0,1}}{q_{0,1} + e^{-m_1 t}} N_1 \left( 1 - \frac{N_1^{v_1}}{K_1^{v_1}} - C_2 \frac{N_2^{v_2}}{K_1^{v_2}} \right)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = r_2 \frac{q_{0,2}}{q_{0,2} + e^{-m_2 t}} N_2 \left( 1 - C_1 \frac{N_1^{v_1}}{K_2^{v_1}} - \frac{N_2^{v_2}}{K_2^{v_2}} \right)$$

ここで、 $N_1$ と $N_2$ はカンピロバクター菌数、腸内細菌数を、 $K_1$ 、 $K_2$ はカンピロバクターおよび腸内細菌叢の最大菌密度を、 $m_1$ と $m_2$ はカンピロバクターと腸内細菌叢の最大比増殖速度を、 $q_{0,1}$ 、 $q_{0,2}$ はカンピロバクターと腸内細菌叢のラグタイムを調整するパラメータをそれぞれ示している。これら連立微分方程式を解くことで、時間変化に伴う小腸内で変化するカンピロバクター数の変化を予測可能とする。

(3) 個別課題名：小腸上皮細胞への定着および侵入程度の推定  
(研究担当者名：小関成樹 (所属機関名：北海道大学) )

<目的>

カンピロバクター感染成立の最終過程である小腸上皮細胞への侵入菌数を、Caco-2細胞を用いた培養細胞系を用いて明らかにして、体内への侵入菌数を推定可能とする。

<方法>

(a) カンピロバクターの細胞への侵入試験

14日間培養し十分成熟させたCaco-2細胞と、培養したカンピロバクターの培養液を ( $10^n$  CFU/mL;  $n = 3-9$ ) となる様に希釈し、0時間 (10秒) から9時間まで1.5時間区切りで共培養した。共培養後、

Gentamicinを含むDMEM培地で処理し、細胞外の細菌を取り除いた。TritonX-100を用いてCaco-2細胞のみを破壊し、侵入細菌数を平板塗抹法で侵入細菌数を計数した。

(b) 侵入細菌数の数理モデル

Caco-2細胞への侵入細菌数を表すために以下の条件設定を行ない、微分方程式を作成した。

(条件1) 侵入率 $R(t)$ の最大上昇速度 $\mu$ は曝露菌数 $N_{dose}$ に関わらず、等しい。

(条件2) Caco-2細胞内へ侵入することのできる細菌数 $N(t)$ には上限 $N_{max}$ がある。

ここで、 $R(t) = \frac{N(t)}{N_{dose}}$ より、以下の微分方程式が成り立つ。

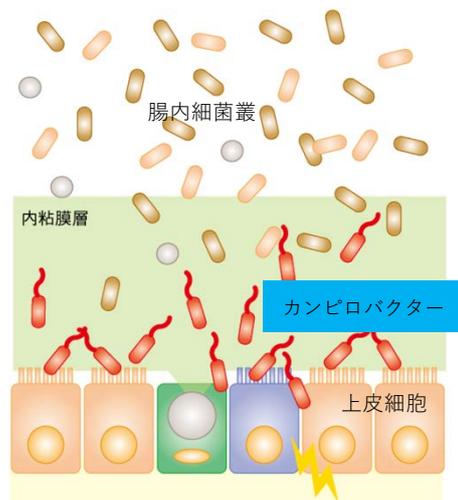


図8 腸内細菌叢を生き延びたカンピロバクターが小腸上皮細胞へ侵入するイメージ

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu N_{dose} (N_{max} - N(t)) \quad (1)$$

これを解くと以下の式が得られる。

$$N(t) = (N_{dose} R_0 - N_{max}) e^{-\mu N_{dose} t} + N_{max} \quad (2)$$

この式は減衰項と定数項に分けられる。これらの項から構成される数式は、ある温度の物体が別の一定温度に変化する際の挙動などに用いられる。熱量の移動を細菌の移動と見ること、得られた式の物理的信頼性が認められる。本研究では、両辺と代数の常用対数をとって、下式のように *Campylobacter* の Caco-2 細胞への侵入挙動を表した。

$$\text{Log}N(t) = \log_{10} \left\{ (10^{\text{Log}N_{dose} + \text{Log}R_0} - 10^{\text{Log}N_{max}}) \times e^{-10^{\text{Log}\mu + \text{Log}N_{dose}} t} + 10^{\text{Log}N_{max}} \right\} \quad (3)$$

$\text{Log}N(t)$ ,  $\text{Log}N_{dose}$ ,  $\text{Log}R_0$ ,  $\text{Log}N_{max}$ ,  $\text{Log}\mu$  はそれぞれ  $N(t)$ ,  $N_{dose}$ ,  $R_0$ ,  $N_{max}$ ,  $\mu$  の常用対数を表す。

(c) ベイズ推定と Markov Chain Monte Carlo (MCMC) を用いた各パラメータの推定  
得られた *Campylobacter* の侵入挙動はベイズ推定と MCMC を用いて、作成した式(3)にフィッティングした。MCMC アルゴリズムには尤度勾配を利用しパラメータ分布の効率的な推定を可能とする NUTS (No U-Turn Sampler) 法 (Hoffman and Gelman, 2014) を、 $\text{Log}N(t)$  の事前分布には正規分布を用いた。

#### < 研究成果 >

*C. jejuni* の各菌株の小腸上皮細胞 Caco-2 細胞への侵入細菌数 (CFU/cm<sup>2</sup>) および侵入率 (曝露細菌数に対する侵入細菌数の割合) の変化を図9に表した。0時間におけるすべての条件において *C. jejuni* の侵入細菌数の挙動はおおよそ 4.5 log CFU/cm<sup>2</sup> へ漸的に増加する挙動を示している。一方、侵入率では、最大細菌濃度の条件を除いて、暴露濃度にかかわらず、似た挙動を示した。カンピロバクターの Caco-2 細胞への侵入速度は非常に早く、特に細菌濃度が高い場合は10秒程度の暴露でも小腸上皮様細胞に侵入することを確認した。

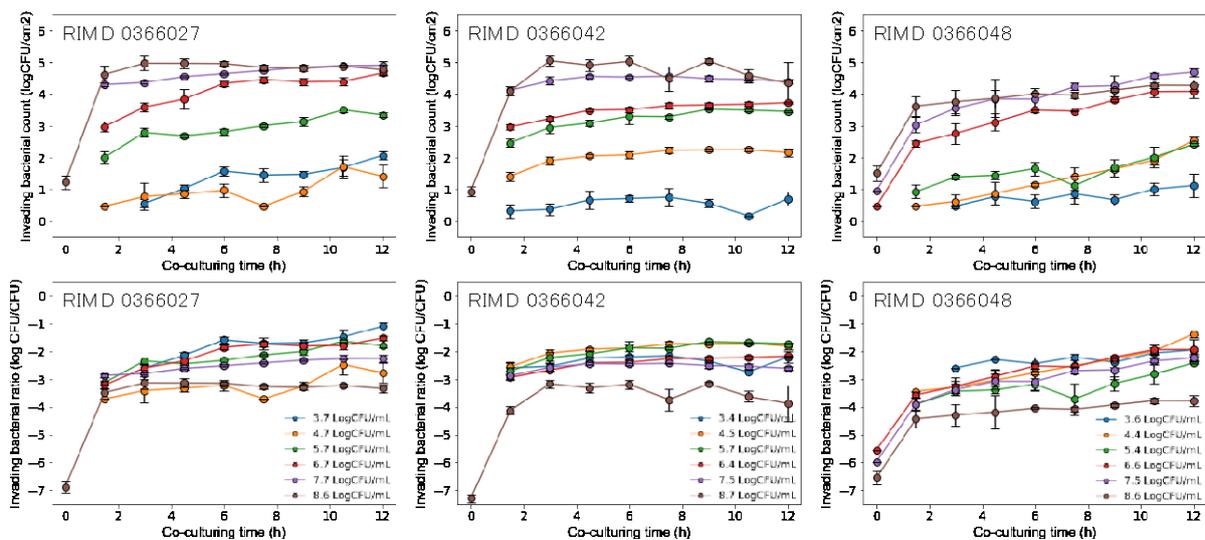


図9 *C. jejuni* (RIMD 0366027; RIMD 0366042; RIMD 0366048) の小腸上皮細胞 Caco-2 細胞への侵入細菌数 (上) および侵入率 (下)

図10に*C. jejuni* (RIMD 0366027) の侵入挙動から推定された予測モデルによって得られた予測区間 (60%, 95%, 99%) と実測値を示した。99%予測区間内に入った実測値は99%であり, 侵入細菌数の変化を正しく表すことができていると言える。以上の結果は他の二菌株 (RIMD 0366042, RIMD 0366048) においても同様の結果を示した。

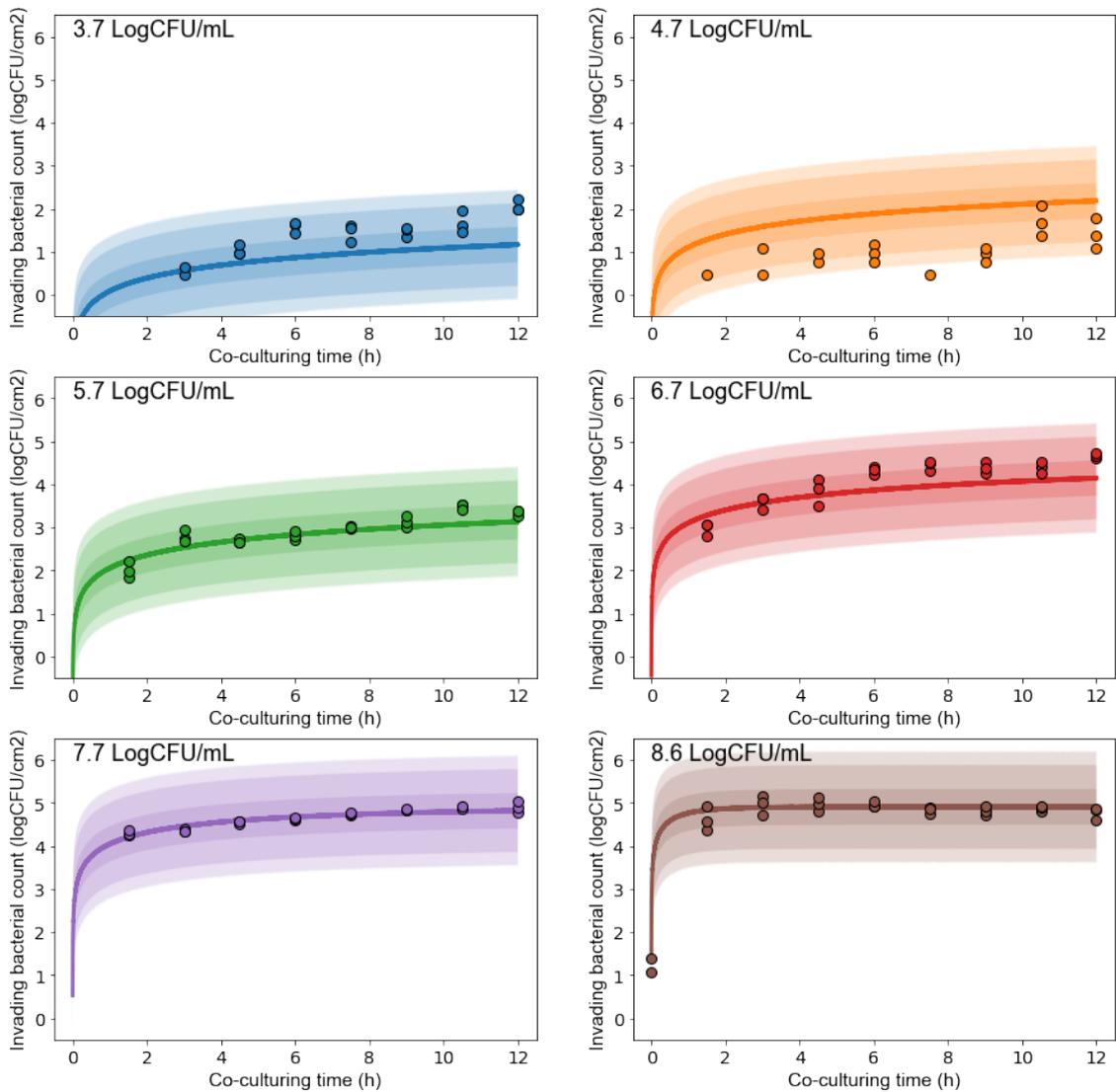


図 10 *C. jejuni* (RIMD 0366027) の各暴露濃度 (各図左上) における侵入細菌数の予測区間 (60%, 95%, 99%), 中央値および実測値 (○)

カンピロバクターによる小腸上皮様細胞への侵入挙動は, 腸内細菌の増殖速度に比べて非常に早く, 腸内細菌叢によって増殖が抑制される前に体内へと侵入することがわかった。また, 数理モデルを用いて小腸上皮様細胞への侵入挙動について表したのは本研究が世界初であり, 今後のKEDRFに基づいた用量反応モデルを構築するにあたって, あらゆる食中毒細菌の用量反応モデルの基礎となることが期待される。さらに, 微生物挙動の変動性 (variability) と測定による不確実性 (uncertainty) を考慮に入れて細菌挙動を示している。そのため, 感染確率の予測への利用も行いやすく, 体内へ侵入するあらゆる食中毒細菌

のモデル化に応用されることが期待される。

(4) 個別課題名：Key Event 毎の結果を統合した用量反応モデルの開発  
(研究担当者名：小関成樹 (所属機関名：北海道大学) )

1) 胃を通過するカンピロバクターの生存菌数および確率の推定

<目的>

一般的な食事後の胃内pHの変化と食物の胃内滞在時間からカンピロバクターが通過する胃内環境を推定し、一般的な食事を摂取した後の胃を通過するカンピロバクターの生存菌数の分布を推定した。

<方法>

先行研究 (Dressman et al., 1990) より健康的な若年ボランティア34人の一般的な食事後 (1000 kcal) の胃内pH の変化の測定データを使用し、ベイズ推定を用いて、以下の式で表した。

$$pH(t) = pH_0 e^{-kt} + pH_{min}$$

先行研究 (Verian et al., 1985) よりボランティア6人の一般的な食事後 (500 kcal) の胃内滞留時間の測定データを使用し、滞留時間を待ち時間分布として利用されるガンマ分布で表した。得られた胃通過時間とpH変化より、研究成果 (1) の予測モデルより生存細菌数のバラつきをシミュレーション (10,000反復) によって推定した。

<研究成果>

一般的な食事後の胃内pHの変化 (図11) と食品の胃内滞在時間の推定結果 (図12) を示した。また、得られた胃内環境から推定される摂食細菌数が3 log CFUの時の胃通過菌数を図13左

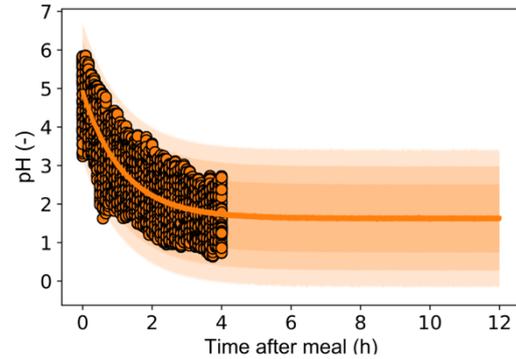


図 11 一般的な食事後 (1000 kcal) の胃内 pH の変化。点が実測値 (Dressman et al. 1990), 塗りつぶされた領域が外側から 99%, 95%, 80% 予測区間を示す。

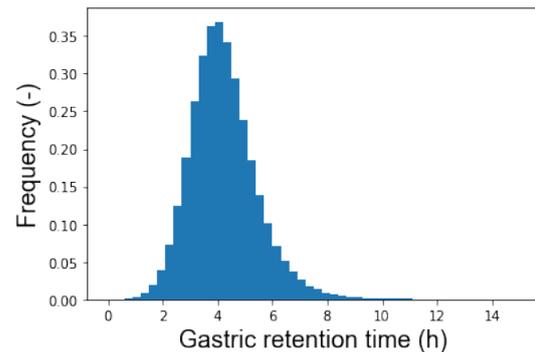


図 12 推定された一般的な食事後の食品の胃内滞在時間の分布

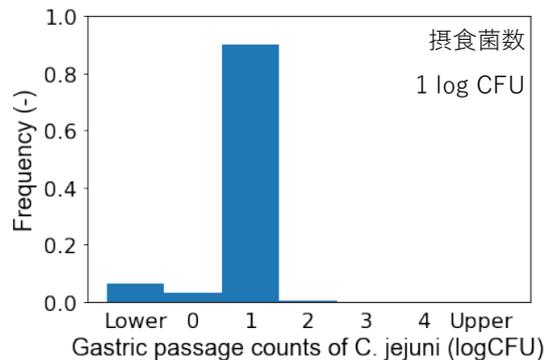
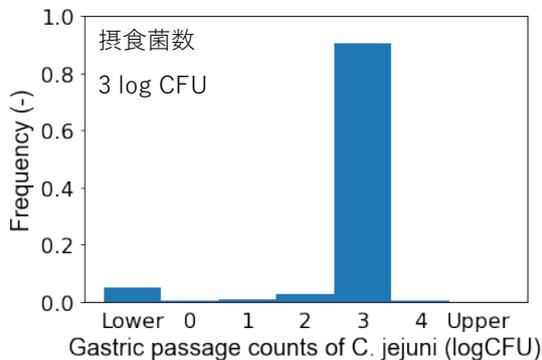


図 13 一般的な食事後 (1000 kcal) の胃通過細菌数分布の推定 (左：摂食菌数 3 log CFU ; 右：摂食菌数 1 log CFU)

に、1 log CFUの時の胃通過菌数を図13右に示した。摂食後、90%以上の確率でカンピロバクターの生存細菌数は減少せず、カンピロバクターの高い生存性が示された。

一般的な食事後の胃を通過する生存細菌数が明らかになったことで、カンピロバクターの高い用量反応関係の要因の一つが裏付けされたと言える。また、本研究における胃内環境の推定は、個人差によるバラつき（変動性）と測定によるバラつき（不確実性）の両方が考慮に入れられているため、より公衆的な胃内におけるカンピロバクターの生存挙動の推定が可能となったと言える。

## 2) 胃内消化後の細菌挙動の予測小腸上皮様細胞への侵入菌数の予測

<目的>

感染過程までの第一関門である胃内における消化ストレスを受けたカンピロバクターが、第二関門の腸内細菌叢との競合過程および第三関門である小腸上皮様細胞への侵入過程において、どのような挙動をするのか明らかにし、予測する。

<方法>

胃内における消化過程（研究成果1）での細菌死滅実験後（消化物：鶏もも串50 gおよびレタス50 g；消化180分後）の細菌液を用いて、競合過程における実験（研究成果2）と小腸上皮様細胞への侵入実験（研究成果3）を行い、細菌挙動を明らかにした。

<研究成果>

胃内において食品とともに消化されたカンピロバクターの増殖挙動について以下の図14に、小腸上皮様細胞への侵入挙動について図15に示した。研究成果2と同様に腸内細菌の細菌数が定常期に達した後、カンピロバクターの増殖抑制効果が見られた。

また、図15には胃消化過程後のカンピロバクターの小腸上皮様細胞への侵入挙動と研究成果3において作成された侵入挙動予測モデルによる推定結果を示した。得られた侵入挙動は研究成果3による予測モデルによって十分に推定できることがわかった。

以上、各消化プロセスでのカンピロバクターの生存挙動を統合することで、用量反応関係を新たに推定可能とした。すなわち、1個のカンピロバクターが食事とともに胃を通過する確率、腸内へ到達し

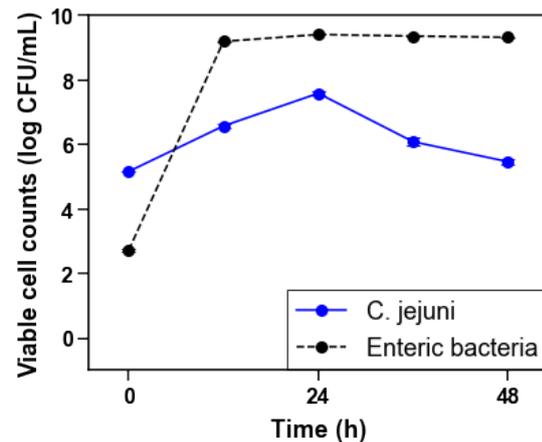


図 14 胃消化過程後のカンピロバクターの腸内細菌との競合増殖挙動

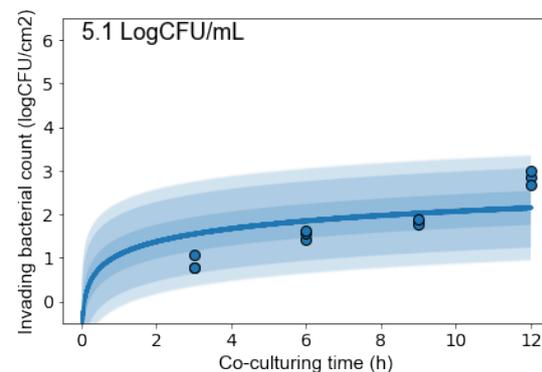


図 15 胃消化過程後のカンピロバクターの小腸上皮様細胞への侵入挙動と侵入挙動予測モデル（研究成果3）による推定

て、競合細菌叢との競合環境下で生残する確率、そして小腸上皮細胞内へカンピロバクターが侵入する確率の3つの要素が同時に発生する確率と、食事とともに摂取しうるカンピロバクター数を乗じることによって、用量反応関係を導き出した(図16)。その結果、摂取菌数が1個以上10個未満から発症確率が上がり始めることが示され、100個以上では90%程度の感染確率になることが予測結果として示された。それに対して、英国とオランダにおいて発生した牛乳でのカンピロバクター感染事故の疫学データを重ねてみると、本研究で推定した用量反応曲線が高い精度で合致することが確認された。このことから、本研究で開発した用量反応モデルによる推定結果の妥当性が示唆された。また、本研究で開発した用量反応モデルは、従来の疫学データ等を基盤にしたフィッティングによって導出された用量反応モデルではなく、各プロセスでの観測結果から予測される生存確率を基礎に計算により導き出された結果である点が、従来の研究結果と大きく異なる部分であり、これまでに実現できなかった点である。

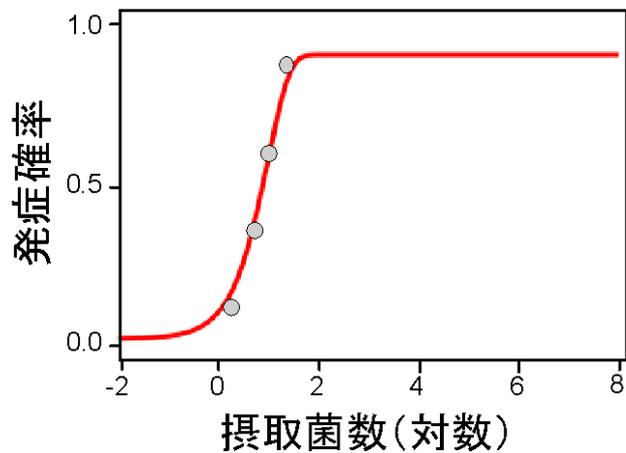


図16 本研究によって推定されたカンピロバクターの用量反応曲線と観測データとの比較。観測データはEvans et al. 1996とvan den Brandhof et al., 2002によって報告されたカンピロバクター食中毒事故の疫学データ

#### <結果による意義>

胃内におけるストレスを受けたカンピロバクターとそのストレスを受けていないカンピロバクターの挙動が同様の結果を示したため、各消化過程における細菌挙動をモデル化し、最終的な用量反応関係を推定するKey Events Dose-Response Frameworkによる用量反応モデルの作成の可能性が示された。胃通過生存細菌数を研究成果4のモデルによって予測し、細胞内への侵入細菌数を推定することで、従来のモデルでは推定不可能であった低用量時(1 log CFU以下)の感染確率について算出可能とした。

#### (5) 研究全体の成果、考察及び結論

本研究では、カンピロバクター食中毒の感染成立までを消化プロセス毎に分割して、各プロセスにおけるカンピロバクターの生残挙動を明らかにし、その挙動を予測する数理モデルを開発することで、カンピロバクターを摂取した際の食中毒リスクを推定可能とすることを目的とした。その結果、食事とともに摂取されたカンピロバクターは胃内で死滅することはほとんどなく、小腸に到達し、競合細菌によって増殖が抑制されるよりも前に、小腸上皮細胞内へと侵入してしまうことが確認された。

また、本研究においては、パラメータ推定を必要とする統計モデリングにおいては全ての過程で、パラメータの不確実性を考慮するためにベイズ推定により、パラメータを確率分布として推定した。これによって、構築したモデルにより予測推定される結果も確率分

布として記述することが可能となり、バラつきを考慮した予測を可能とした。

最終的には各プロセスでのカンピロバクターの生存確率を統合することで、感染確率を推定可能とし、さらには摂取菌数との関係からカンピロバクターの新たな用量反応モデルを構築した。従来の、人ボランティア試験データ、食中毒事故発生時の疫学データ等による数式のフィッティングのみに依存したモデル開発とは全くコンセプトの異なる方法で、用量反応モデルが構築できることを示すことができた。本研究では3つのプロセスのみに注目したが、現実的に感染後に発症（病状を呈する）するかどうかは、ヒトの免疫機能の関係性を明らかにする必要がある、完全なものではない。しかしながら、従来の疫学データ等の間接的なデータからしか、用量反応関係を推定するだけであった状況に、実験的にデータを蓄積して、順序立てて計算することで用量反応関係を推定できることを示した意義は非常に大きいと考える。従来の疫学データと、本研究で示した実験的なモデル構築方法を相補的に活用することで、より現実の感染実態を反映したカンピロバクターの用量反応モデルが構築される。それによって、カンピロバクター食中毒のリスク評価もまた、より現実即した評価が可能になるものと考えられる。

### III 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（※別添として別刷（投稿中のものは、受理証明書の写し）を提出すること。）
  - 1) Hiura, S., Abe, H., Koyama, K., and Koseki, S. Transforming kinetic model into a stochastic inactivation model: Statistical evaluation of stochastic inactivation of individual cells in a bacterial population. *Food Microbiology*, 91, 103508, 2020.
- 2 本研究を基にした学会発表の実績
  - 1) 武岡晃平, 小山健斗, 安部大樹, 川村周三, 小関成樹. 人工胃液中におけるカンピロバクターの生残特性の解明と数理モデル化, 日本食品科学工学会北海道支部大会, 2018年12月2日, 札幌市（藤女子大学）
  - 2) Kohei Takeoka, Hiroki Abe, Kento Koyama and Shige Koseki. Modeling the Survival Kinetics of *Campylobacter jejuni* in Simulated Gastric Fluid. IAFP 2019 Annual meeting, 21-24 July 2019, Louisville, Kentucky, USA.
  - 3) Satoko Hiura, Kento Koyama, Hiroki Abe, Shige Koseki. Stochastic evaluation for survival bacterial numbers and the time-to-inactivation by using Weibull modelling and Monte Carlo simulation. 11<sup>th</sup> International Conference on Predictive Modelling in Food, 17-20 September 2019, Braganza, Portugal.
- 3 特許及び特許出願の数と概要  
なし
- 4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）  
Young Researcher Best Oral Presentation for Satoko Hiura in 11<sup>th</sup> International Conference on Predictive Modelling in Food, 17-20 September 2019, Braganza, Portugal.

#### IV 主任研究者による申請時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

##### 1 申請時に申告した達成目標

達成目標	評価結果	自己評価コメント
<p>(1) 胃内消化過程におけるカンピロバクターの生存／死滅確率</p> <p>食物消化過程の第一関門である胃内でのカンピロバクターの生残特性を、人工胃液中での各種の鶏肉料理とともに暴露した際の生存挙動から明らかにして、生存確率を推定可能とする予測モデルを開発する。</p>	5	<p>想定していた以上に多くのカンピロバクター株を試験することができただけでなく、膨大な実験データから、ベイズ統計手法による菌株の違いも組み込んだ死滅予測モデルを構築できた。さらに実際の消化過程での死滅に関してもデータ蓄積、モデルによる予測がなされ、重要な知見を蓄積できた。</p>
<p>(2) 小腸内消化過程における腸内細菌叢との競合環境下での生存／死滅</p> <p>胃での消化過程を通過したカンピロバクターの、消化過程の第2関門である小腸での腸内細菌叢との競合条件下における生残特性を明らかにして、生存確率を推定可能とする。</p>	5	<p>腸内細菌が競合する小腸環境内におけるカンピロバクターの生残挙動を初期菌数の多少に関わらず明らかし、感染（小腸上皮細胞への侵入）までに大きな変化が無いことを明らかにした。また、競合細菌叢との関係性を Lotka-Volterra 方程式を改変することで記述可能とした。</p>
<p>(3) 小腸上皮細胞への定着および侵入確率の評価</p> <p>カンピロバクター感染成立の最終過程である、小腸上皮細胞への侵入確率を Caco-2 細胞を用いた培養細胞系を用いて明らかにして、侵入確率を推定可能とする。</p>	5	<p>極めて短時間（1時間以内）のうちに小腸上皮細胞内に <i>C. jejuni</i> が侵入すること、さらに少ない菌数（<math>10^2</math> CFU/ml 程度）でも小腸上皮細胞内部に侵入することが確認できた。このことから、少数でも小腸に到達すれば細胞内に侵入して感染を引き起こすことが示唆され、重要な知見を得られた。</p>
<p>(4) Key Event 毎の結果を統合した用量反応モデルの開発</p> <p>上記3段階の Key Event 毎での予測確率を統合して、摂取菌量、摂取した料理の種</p>	5	<p>上記の各 Key Event で予測推定された生存確率および侵入確率の確率密度分布を統合して最終的な感染確率をモンテカルロシミュレーションによって推定可能とする計算を可能とした。既往の用量反応モデルとの差あるいは類似性を見出すことができ、実</p>

類および摂食量を考慮できる新たな用量反応モデルを開発する。また、従来の提案モデルとの比較により、開発したモデルの妥当性を検証する。		験的にデータを蓄積して、順序立てて計算することで用量反応関係を推定できることを示した。
---	--	---

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

## 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	カンピロバクターの胃液中での生残に加えて、小腸内での生残、増殖挙動、小腸上皮細胞内への侵入過程、さらにはそれらを統合した予測アルゴリズム開発は用量反応モデル構築に極めて有用な知見となる。
<p>総合コメント</p> <p>大量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モデル化、さらには研究最終目標である用量反応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段階で記述すること。

※次のただし書を枠で囲って記載すること。

<p>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。</p>
--

(別紙) 研究成果の概要 (英文)

Title of research project	Development of a new dose-response model based on survival characteristics of <i>Campylobacter</i> during food digestion process
Research project number	1802
Research period	FY 2018 – FY2019
Name of principal research investigator (PI)	Shigenobu Koseki

Abstract/Summary

The objective of this study was to develop a dose-response model that expresses the relationship between the ingestion amount of a pathogenic bacteria and the probability of infection of *Campylobacter* spp. Although the conventional dose-response model of food-borne pathogenic bacteria has been mathematically expressed by associating the cause (amount of ingested bacteria) and the result (probability of infection), in reality, there are some key bioreaction fields in the human body (gastric acid, invasion of epithelial cells, etc.) from ingestion of contaminated food to the establishment of infection in the intestinal tract. In this study, we aimed to break away from the conventional dose-response model in which the reaction process was unknown, estimate the survival / death probability at each key reaction site, and predict the infection probability at low doses. Then, we have developed a mathematical model that predicts the probability of infection. In concrete, this study examined the following four processes. First of all, we examined the probability of survival / death of *Campylobacter* during gastric digestion. Survival characteristics of *Campylobacter* in the stomach, which is the first barrier of food digestion process, are clarified from the survival behavior when exposed with various chicken dishes in artificial gastric juice, and a prediction model that enables estimation of survival probability was developed. Second, we investigated the survival/death in a competitive environment with intestinal flora in the small intestinal digestive process. The survival probability of *Campylobacter* that passed through the digestive process in the stomach under the condition of competing with the intestinal bacterial flora in the small intestine, which is the second barrier of the digestive process, was clarified. And then, we evaluated the probability of colonization and invasion of small intestinal epithelial cells. The invasion probability to the intestinal epithelial cells, which is the final process of establishment of *Campylobacter* infection, was clarified by using a cultured cell line using Caco-2 cells, and the invasion probability could be estimated. Finally, we developed a dose-response model that integrates the results of each Key Event mentioned above. A new dose-response model that can consider the amount of bacteria ingested, the type of food eaten, and the amount of food intake was developed by integrating the predictive probabilities for each of the above three levels of Key Event. Moreover, it was clarified that the developed model is valid by comparison with the conventional proposal model.

※次のただし書（Disclaimer）を枠で囲って記載すること。

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

Hiura, S., Abe, H., Koyama, K., and Koseki, S. Transforming kinetic model into a stochastic inactivation model: Statistical evaluation of stochastic inactivation of individual cells in a bacterial population. *Food Microbiology*, 91, 103508, 2020.

2. List of presentations based on this research

- 1) 武岡晃平, 小山健斗, 安部大樹, 川村周三, 小関成樹. 人工胃液中におけるカンピロバクターの生残特性の解明と数理モデル化, 日本食品科学工学会北海道支部大会, 2018年12月2日, 札幌市(藤女子大学)
- 2) Kohei Takeoka, Hiroki Abe, Kento Koyama and Shige Koseki. Modeling the Survival Kinetics of *Campylobacter jejuni* in Simulated Gastric Fluid. IAFP 2019 Annual meeting, 21-24 July 2019, Louisville, Kentucky, USA.
- 3) Satoko Hiura, Kento Koyama, Hiroki Abe, Shige Koseki. Stochastic evaluation for survival bacterial numbers and the time-to-inactivation by using Weibull modelling and Monte Carlo simulation. 11<sup>th</sup> International Conference on Predictive Modelling in Food, 17-20 September 2019, Braganza, Portugal.

3. The number and summary of patents and patent applications

None

4. Others (awards, press releases, software and database construction)

Young Researcher Best Oral Presentation for Satoko Hiura in 11<sup>th</sup> International Conference on Predictive Modelling in Food, 17-20 September 2019, Braganza, Portugal.