

称号及び氏名 博士（獣医学） 井上 英耶

学位授与の日付 平成31年3月31日

論文名 食中毒発生原因を統計学的帰納法および演繹法に基づいて追求した研究

論文審査委員 主査 三宅 眞実
副査 中村 洋一
副査 向本 雅郁

論文要旨

はじめに 背景と目的

食中毒は、ヒトの生活に欠かせない食事が原因となり、多数の人の健康被害が発生するという観点から、公衆衛生上の重要課題の一つと捉えられる。近年、行政、事業所、消費者の様々な取り組みの結果、食中毒の件数自体は減少しているものの、依然毎年2万人以上の患者が報告される。加えて、報告に至らない潜在的な細菌性食中毒患者数が年間数千万人を超えるとする研究報告もあり(内閣府食品安全委員会資料)、その公衆衛生的な重要性は極めて高い。

食中毒事件発生時には、患者が検知されたのちもリスクを含んだ食品が流通下に残存し、これがさらなる患者の発生に関与することが問題となる。これを防止するためには、事件発生を検知したのち速やかに原因食品・病因物質を同定し、適切な被害拡大防止策を立案・実行する必要がある。しかし、微生物検査による病因物質の同定には一般的に1から3日が必要で、これが迅速な被害拡大防止措置を実行する上での障害となっている。その間、食品衛生監視員は知識と経験により病因物質を推定し、推定に基づいた対策を行うのが実状であるが、現場の経験者不足による判断の信頼性の低下が懸念されている。

本邦で発生する食中毒の中で、最も問題視されるものに腸管出血性大腸菌食中毒とサルモネラ食中毒が挙げられる。2008年からの10年間に発生した細菌性食中毒事例の中で、報告される死

者31人のうち29人はこれら食中毒の患者であった。原因となる志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) およびサルモネラはウシの消化管内に棲息し、これが食肉を汚染する。一方、生鮮野菜を原因食とする事例も近年多発しており、おそらくこれも栽培から出荷までの間に細菌が生鮮野菜を汚染するためと考えられている。しかし、実際の汚染経路は多岐にわたり、未だ特定されていない汚染経路の存在が強く疑われているなど、その詳細は完全には明らかになっていない。

本研究は、これら食中毒事件が発生する原因の一端を明らかにすると共に、一旦発生した食中毒事件に対し迅速な対策を実施するための新たな手法を開発することを目的にした。研究戦略として、研究室内で得られた実験的データに基づいて原因を拡大解釈するのではなく、実際の食中毒事例の疫学データや、牛舎など現場から得たメタ・データを材料として、これに数理統計学的手法を適用して検討を行った。材料となるデータには複雑な環境因子からの影響効果が包含され、また得られた結果からは主観的な判断が極力排除されるので、導かれた結論は現実的な食中毒制御対策に大きく役立つことが期待された。

第1章 過去の食中毒事例を基にした病因物質予測モデルの作成

本研究ではまず、細菌性食中毒事件発生後、微生物検査の結果を待つことなく速やかに、また十分な経験を経していない者でも客観的かつ高い信頼性をもって、病因物質 (原因となる微生物名) を推定できるツールの開発を試みた。

第1節では1954年から2015年間の食中毒事例779件の情報が記載されている「滋賀県食中毒分析データベース」から、病因物質が特定されかつ潜伏期間と発熱率、嘔吐率、下痢率、腹痛率 (以上、説明変数と称す) がすべて記載されている402事例を抽出した。さらにこれを無作為に7割の訓練データと3割のテストデータに分割し、訓練データに多項ロジスティック回帰分析を適用したところ、説明変数と病因物質との間に有意な相関関係が認められた。そこで相関関係を数理的に記述して予測モデルを構築、上記テストデータの説明変数をこのモデルに導入したところ、モデルにより予想された病因物質と真の病因物質との間には80.7%という高い一致率が得られた。予想される病因物質に可能性順位を適用し、順位1位から3位のいずれかの病因物質が真の病因物質と一致する確率を計算すると、確率はさらに95%に上昇した。この予想モデルは病因微生物が微生物検査により同定されるより早く、高い確率でこれを推定できることから、食中毒の被害拡大防止策の早期立案・実行に役に立つものと考えられた。

しかしこの予想モデルにはいくつかの問題点も残されていたため、第2節では問題点を解決すべく工夫を施した。まず、滋賀県以外の地域への適用可能性を論じるため近畿2府2県1市からの食中毒事例データを加えた。また、どの説明変数を入力値として使用すべきかを「赤池情報量規準」で比較検討して、全ての説明変数を使用するモデルが最適であることを示した。また、結果の精度をLeave-one-out-cross-validation法を用いて確認し、患者数が少ない事例への適用妥当性も検証した。以上の結果得られたモデルで予測した第1位病因物質が、真の病因物質と一致する確率は86.4%となり、また、第3位までのいずれかの病因物質がそれと一致する確率は97.5%になった。このモデルをエクセルシートに組み込んで推定ツールを作成した。本ツールでは1つの事例の説明変数をシートへ入力するだけで、可能性順位1位から3位までの推定病因物質が確率と共に返さ

れる。結論として本モデルを利用することで、少なくとも近畿圏内で使用するには有用性が高く、経験によらない客観的評価が簡単にできる簡便なツールを開発することが可能となった。

第2章 牛舎内粉塵が食品の病原細菌汚染を引き起こす可能性の評価研究

生野菜等が原因で発生する STEC あるいはサルモネラ食中毒が増加している原因としては、1つには堆肥中に残存する病原細菌が圃場上で作物に付着する可能性が挙げられる。しかしこれでは説明できない場合も確認されていて、その全容は明らかでない。新たな可能性として、牛舎内に存在する糞便が乾燥して粉塵となり、これが空气中に散布され舎外に移動して、近隣圃場の野菜の細菌汚染を引き起こす可能性が指摘されている (J. Food Prot. 75:2213-8, 2012, Appl. Environ. Microbiol. 81:1101-10, 2015)。しかしその可能性を明確に明らかにした研究は報告されていない。そこで本章では、肉牛肥育農場、乳牛飼養農場それぞれにおいて、牛糞検体、牛床検体、牛舎内外の 대기 (粉塵) 検体を得て、検体中に存在する細菌叢を網羅的に解析した。その上で、それぞれ検体中の菌叢組成を統計学的手法により比較して、牛舎粉塵を介する野菜の病原細菌汚染の可能性を検討した。

まず各サンプル中の細菌叢を 16S リボゾーム DNA 配列によるアンプリコン解析し、属レベルで構成細菌を分類すると、検体間で共通する主要菌属が多数見つかる一方、特異な菌属の存在も認められた。牛舎内外の粉塵検体中には、草食動物の胃などに存在する *Ruminococcaceae* 科や、人や動物の腸内細菌叢の一部である *Turicibacter* 属が検出されたことから、糞便細菌が粉塵となって大気に浮遊する可能性が強く疑われた。食中毒原因菌である *Salmonella* 属についてはいずれの検体でも検出限界以下であったが、*Escherichia/Shigella* 属については、牛舎内粉塵 8 検体中 5 検体から、また牛舎外粉塵 8 検体中 6 検体から検出された。さらに細菌群集としての類似性を非計量多次元尺度法により可視化したところ、粉塵検体では、由来する牛舎の種類 (肉牛・乳牛)、畜舎の内・外を問わず、データは近い位置に空間配置され、これら検体に含まれる菌叢には類似性がある、すなわち牛舎内の粉塵が牛舎外へ移動することを示唆する結果が得られた。糞便検体、牛床検体も互いに類似性が認められ、牛床細菌叢が床敷の糞便汚染で形成されていることが示された。一方、粉塵検体と糞便/牛床検体との空間距離は離れており、Analysis of similarities 検定では「本研究で用いたデータからは、粉塵検体と糞便/牛床検体は統計学的には似ているとは言えない」という結論が導かれた。

以上の結果、細菌性食中毒事例の様々な症状発現率を演繹的に数理統計解析することで、より早期の病因物質の推定が可能となり、これを速やかな食中毒の被害拡大阻止に利用できることが示された。また野菜の細菌汚染の原因について、メタ・データを数理統計学的帰納手法により解析した結果、牛舎由来の細菌が粉塵となり大気中を浮遊する可能性のあることが確かめられた。今後は、さらに使用するデータの質と量を高めながら、本研究で用いた数理統計学的手法を積極的に食中毒関連疫学データに適用することで、これまで明らかにならなかった発生原因の解明や、診断・対策への技術展開が期待できると考えられる。

総括

1. 患者集団の平均潜伏期間、下痢率、嘔吐率、発熱率、腹痛率の情報を用いることで、病因物質の予測モデルを開発した。この予測モデルは、食中毒事件発生後早期に適切な被害拡大防止策をとるために有効であると考えられた。
2. 家畜由来の食中毒菌が生鮮野菜を汚染する経路の一つとして空気による伝播の可能性を指摘することができた。
3. これら数理的解析法は客観的に感染性食中毒の原因を特定(推定)するための強力なツールとして利用価値が高く、今後このような研究をさらに発展させることが重要である。

審査結果の要旨

食中毒は、日々喫食する食品が原因で発生する健康被害であり、人に最も身近な健康問題と言える。科学技術の進歩にも関わらずその患者数は過去60年間に大幅に減少したとは言い難く、これまでにない新しい概念に基づく予防措置が社会から強く求められている。現代社会において特に重要性の高いのは微生物が原因となる感染性食中毒である。これによる健康被害を最小限に留めるためには、できるだけ早期に原因となる微生物を特定し、微生物汚染食品をフードチェーンから取り除くことが必要である。このため原因と疑われる食品や臨床検体中の微生物を、可能な限り早期に同定することが求められる。しかし現在の法令に基づいた微生物培養による検査法では、同定に3日から5日間を要し、効果的な拡大防止措置を早期に講じることが難しい。さらに微生物検査にはその手技の習得に熟練を要し、小規模の検査室では精度の高い検査技術を保つのは容易ではない。

本研究では、従来の培養を主体とする微生物学的検査法ではなく、数理統計学的手法を用いた推定法を導入して、食中毒事件が発生した際に原因となった微生物を早期に推定する手法と、食中毒原因細菌の食品汚染ルートを統計学的群集解析により追求する手法の確立を試みた。

第1章では、発生した食中毒事件の患者情報のみを用いて、微生物検査に依らず病因物質(微生物)を推定できるツールを開発することを試みた。近畿2府2県1市から529件の食中毒事例データの提供を受け、記載されている発症までの平均潜伏期間と、下痢、嘔吐、発熱、腹痛、それぞれの発症割合を説明変数に設定した。またそれぞれの事例の原因となった微生物名を6種類のカテゴリーに分類し、これを目的変数に指定した。両変数の関係を多項ロジスティック回帰分析により統計解析し、必要な係数を実事例より導き出して数理モデルを作成した。一旦作成したモデルでの推定結果を検証し、さらに改良を加えた結果、最終的に食中毒発生初期に得られる患者情報を入力するだけで、推定確率1位での正

解率が86.4%、3位までで一致した正解率は94.2%という、高精度の結果を回答する利便性の高い食中毒病因物質推定ツールを完成することができた。

第2章では食材が食中毒原因細菌で汚染される経路の究明を統計学的手法により特定することを試みた。研究対象として、近年問題視されている、野菜が腸管出血性大腸菌やサルモネラに汚染される経路を取り上げた。両細菌はウシなど家畜の消化管に棲息し、1つには堆肥を介して野菜を汚染することが指摘されている。しかしそれ以外の汚染経路が存在するにもかかわらず、現在まで他の経路についてはほとんど解明されていない。本研究では、牛舎内のウシ糞便中に含まれる病原細菌が、乾燥により粉塵となり飛散し、牛舎外へ拡散することで近隣圃場の野菜汚染を引き起こす可能性について統計解析手法により追求した。

牛舎内外の大気に浮遊する粉塵をエアースンプラーにより採取すると共に、同牛舎にあるウシ糞便、牛舎床の敷き藁を採取、これらからDNAを抽出し、16SリボゾームRNA遺伝子のアンプリコン解析を行った。得られたメタゲノムデータを解析したところ、牛舎内外の細菌叢は互いに非常によく似ていること、牛舎内外の大気中には基本的に動物の腸内にしか検出されない細菌属の遺伝子がかなり含まれていること、大腸菌／赤痢菌属の遺伝子も高頻度で検出されることが明らかになった。これは糞便細菌が粉塵となり大気中を浮遊する可能性を強く示唆するが、一方、これらと糞便や牛床中の細菌叢とは「似ているとは言えない」という群集解析結果も得られた。結果を総合的に考察すると、糞便中に含まれる細菌の一部は粉塵となり大気を浮遊し、牛舎外へ移動して野菜汚染を引き起こす可能性が疑われるが、それを明確に示すにはより大規模な研究材料を用いた群集解析を実施することが必要であるといえる。

以上の結果は、感染性食中毒の原因となる食品汚染ルートの解明や、食中毒の被害拡大防止策を立案する上で、数理統計学的手法が大きな潜在力を有することを初めて示すものである。本研究の成果は食中毒対策に新たな概念を提唱すると共に、獣医公衆衛生学の分野のみならず実社会に対して多大な貢献をするものと考えられる。従って、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。