

令和3年度緊急的追加研究報告書

富山市の学校給食を原因とした集団食中毒
由来大腸菌の病原性に関する研究

工藤 由起子

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

令和3年度緊急的追加研究報告書

富山市の学校給食を原因とした集団食中毒由来大腸菌の病原性に関する研究

研究要旨

令和3年6月に富山市で発生した学校給食を原因とした患者数1800人以上の大規模食中毒において、原因食品である牛乳および患者便から分離された大腸菌OUT(0抗原遺伝子型0gGp9):H18について、病原性を解明するために多角的に解析した。菌株のゲノム解析の結果、牛乳由来株および患者由来株は、1)同一クローンであること、2)典型的な病原性関連遺伝子は保有しないものの病原性を示唆する遺伝子群を保有していること、3)直接的な関連性はないものの腸管凝集性大腸菌(EAEC)と近縁であることが示された。また、培養細胞への感染実験の結果、牛乳由来株および患者由来株は、細胞付着性および細胞侵入性を示したが、EAECの示すような凝集性の付着や細胞侵入によって病原性を示す*Salmonella* Typhimuriumの示すような強い侵入性は観察されなかった。さらに、動物モデル実験の結果では、牛乳由来株および患者由来株は、マウスへの腹腔内投与によって腸管毒素原性大腸菌よりは低い、微生物試験に使用されている大腸菌株よりも高い致死性を示し、病原性を有する可能性が考えられた。また、コモンマーモセットへの経口投与によって、下痢の発症は観察されなかったが、腸管での定着性が認められた。

以上のことから、本食中毒の原因物質を「病原大腸菌OUT(0gGp9):H18(疑い)」とすることが妥当と考えられた。今後さらに、遺伝子解析や動物モデル実験による下痢発症メカニズムの解明が必要と思われる。

研究協力者

富山市保健所

瀧波賢治、鈴木富勝、水上克己

国立感染症研究所

明田幸宏、伊豫田 淳、李 謙一、窪村亜希子

富山県衛生研究所

大石和徳、木全恵子、磯部順子、綿引正則

国立医薬品食品衛生研究所

廣瀬昌平、大屋賢司、大西貴弘

A. 研究目的

令和3年6月に富山市で学校給食を原因とした患者数1,800人以上の大規模食中毒が発生した。富山市保健所の調査から原因食品として牛乳が特定されたが、牛乳から主な食中毒細菌やウイルスは検出されなかったため、当該保健所から国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部に原因物質調査が依頼された。毒素型食中毒の原因物質であるブドウ球菌エンテロトキシン、セレウス菌エンテロトキシン、ウエルシュ菌エンテロトキシンおよびセレウス菌嘔吐毒(セレウリド)は検出されず、また、感染型食中毒の原因物質のうち下痢を主徴とするものについて調査したが、サルモネラ属菌、リステリア属菌、*Escherichia albertii* および既知の病原大腸菌は検出されなかった。しかし、食中毒発生に關与する提供日の牛乳では、病原大腸菌用選択分離培地上に特徴のある大腸菌コロニーが多数生育し、それらの血清型はOUT(0血清型別不能):H18であり、0抗原遺伝子型別0-genotypingでは0gGp9であることが判明した。さらに、富山市保健所での調査時の患者検便検体の大腸菌分離用培地上のコロニーを調査した結果、多くの患者検体でOUT(0gGp9):H18が優勢大腸菌として分離され、病因物質が大腸菌OUT(0gGp9):H18である可能性が考えられた。

このため、本大腸菌の病原性について

の早急な解明を目的に、厚生労働省食品監視安全課と調整し、当研究事業において研究を実施することにした。富山市保健所、国立感染症研究所細菌第一部(感染研)、富山県衛生研究所(富山衛研)、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部(国衛研)にて多角的に解析を行なった成果を報告する。

B. 研究方法

(1) 菌株ゲノムの解析

1) 菌株

国衛研および感染研では、富山市食中毒事例牛乳由来株No.5および患者由来株No.14を解析に用いた。富山衛研では、富山市食中毒事例牛乳由来株TC49および患者由来株TC78株を解析に用いた。その他、参照株のゲノム配列データを公的データベースから取得し解析に用いた。

2) ゲノム配列の取得

国衛研では、牛乳由来株No.5および患者由来株No.14の菌体から抽出したゲノムDNAからMGIEasy FS DNA Library Prep Setを用いてライブラリーを作製し、DNBSEQ-G400(MGI Tech)シーケンサーで200bpペアエンドのシーケンシングを行った。得られたリードについてcutadapt ver1.9.1を用いてアダプタートリミングを行った後、sickle ver1.33を用いてクオリティスコアが20未満の塩基と40塩基に満たないリードを

除去した。トリミング後のリードに spades ver 3.13.2 を用いてアセンブルを行いドラフト配列とし、DFAST (<https://dfast.ddbj.nig.ac.jp>) でアノテーションを行った。

富山衛研では、牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 株ゲノム配列を Miseq を用いて取得した。

3) ゲノムの遺伝子型別

感染研では牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 の全ゲノム配列を用いて、富山衛研では牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 の全ゲノム配列を用いて、ゲノム解析パイプラインである GenEpid-J によって MLST (multi locus sequence typing) および血清型予測等の遺伝子型別を行った。また、SNP 解析については、感染研では BactSNP v1.1.0 を用い、富山衛研では cgMLST を用いた。さらに、富山衛研では、TC49 および TC78 に関してゲノム解析に先立ち、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) による遺伝子型別を標準化プロトコールに基づいて行った。

3) ゲノムの系統解析

感染研では、牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 の系統解析を以下の通り行った。公共データベース (Enterobase:<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>) から MLST 解析で近縁となる ST 株ゲノム配列データをダウンロードし、国内外の株と

の系統関係を解析した。本食中毒事例分離株ではゲノム配列からの血清型予測が困難であったため、MLST で同一 (ST1380) または 1 アリール異なる株 (single locus variants)、計 346 株を用いた比較を行った。

4) ゲノム上の病原性関連遺伝子の検索

感染研および富山衛研で行った病原性関連遺伝子の検索は、上述した GenEpid-J を用いて行った。

国衛研では、牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 と他の大腸菌参照株ゲノム上に存在する病原性関連遺伝子の検索を以下の通り行った。始めに、国衛研で選抜された病原大腸菌マーカー 43 遺伝子をクエリとして blastn ver 2.11.0 で各大腸菌株ゲノムを検索した。次に、the virulence factor database (VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) で公開されている細菌の病原性関連遺伝子セット A (3583 遺伝子) をクエリとして blastn ver 2.11.0 で牛乳由来株 No. 5 ゲノムを検索した。この検索でヒットした 90 遺伝子のリストをクエリとして blastn ver 2.11.0 で牛乳由来株 No. 5 以外の大腸菌株ゲノムを検索した。

(2) 培養細胞への感染実験

1) 菌株

国衛研では、患者由来株 No. 14、牛乳由来株 No. 5 の他、対照菌株として腸管凝集性大腸菌 (EAEC) 株 EAEC65、腸管

侵入性大腸菌 (EIEC) 株 EIEC66、遺伝子組み換え実験で汎用され病原性の知られていない大腸菌である実験室株 K12、牛肉由来大腸菌 (O 血清群型別不能) を用いた。感染研では、牛乳由来株 TC49、患者由来株 TC78 の他、対照菌株として EAEC 株 (*aggR*⁺)、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium 株 SL1344 および腸管出血性大腸菌 (EHEC) 株 O157:H7 Sakai を用いた。

2) 細胞

Hep-2 細胞は理化学研究所バイオリソース研究センターより入手した。Hep-2 細胞は 10%FBS、Non-Essential Amino Acids (NEAA)、Antibiotic-Antimycotic (AntiAnti) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用い、37°C、5% CO₂ 下で培養した。

CACO-2 細胞は理化学研究所バイオリソース研究センターより入手した。CACO-2 細胞は 20% FBS、NEAA、AntiAnti を添加した DMEM を用い、37°C、5% CO₂ 下で培養した。CACO-2 細胞の分化には BioCoat 腸管上皮細胞分化エンバイロメントキットを使用した。

3) 細胞付着性試験

国衛研は大腸菌の細胞への付着を定量した。まず、Hep-2 細胞を 24 well プレートに撒種し、37°C、18 時間培養した。培養後、PBS で細胞を 3 回洗浄後、2% FBS および 1% D-マンノースを添加した DMEM を各 well に加えた。その後、18

時間培養した大腸菌液を加え、37°C、2 時間培養した。培養後、PBS で 3 回洗浄し、Triton X を添加した PBS を加え、細胞を可溶化した。37°C、1 時間培養後、PBS 中の菌数を計数した。対照として EAEC および食品由来株を用いた。また、大腸菌の付着状況を顕微鏡的に観察するために、国衛研では上記と同様に Hep-2 細胞に大腸菌液を加え、37°C、2 時間培養した後、PBS で洗浄し、ギムザ染色を行った。感染研では大腸菌液を接種後、1 時間培養を行い、培養後、PBS にて 3 回洗浄後、新たな 1% D-マンノース加 DMEM 培地を加え、さらに 3 時間培養を行ったのちにギムザ染色をおこなった。

4) 細胞侵入性試験

国衛研と感染研は細胞内に侵入した大腸菌の定量をおこなった。Hep-2 細胞を 24 well プレートに撒種し、37°C、18 時間培養した。培養後、PBS で細胞を 3 回洗浄後、2% FBS および 1% D-マンノースを添加した DMEM を各 well に加えた。その後、18 時間培養した大腸菌液を加え、37°C、2 時間培養した。培養後、PBS で 3 回洗浄し、ゲンタマイシンを添加した PBS を加え、37°C、1 時間培養した。その後、Triton X を添加した PBS を加え、37°C、1 時間培養後、PBS 中の菌数を計数した。対照として、国衛研では EAEC65 および牛肉由来大腸菌を用い、感染研では *S. Typhimurium* 株 SL1344 と EHEC 株 O157:H7 Sakai を用いた。

5) 細胞膜透過性試験

国衛研は細胞膜透過性試験を行なった。BioCoat 腸管上皮細胞分化エンバイロメントキットの説明書に従い、24 well プレート中のセルインサート上で分化させた CACO-2 細胞に 18 時間培養した大腸菌の培養液 5 μ L を加えた。その後、Millicell-ERS を用いて 1 時間ごとに経上皮電気抵抗 (TEER) を測定した。対照として EIEC66 および K12 を用いた。

(3) 動物モデル実験

動物モデル実験は国衛研にて実施した。

1) 菌株

本実験では、富山市食中毒事例株として牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 を、病原性を有する大腸菌株として腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) 株 ETEC609 および ETEC627、EAEC 株 EAEC65 および腸管病原性大腸菌 (EPEC) 株 EPEC67 を、病原性の知られていない株として、K12 および微生物試験に用いられている大腸菌株 NBRC3972 を供試した。

2) ウサギ腸管結紮ループ試験

試験菌株として、K12、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14 および EPEC67 を供試した。9 週齢のウサギ (S1c:JW/CSK) の腸管に結紮ループ作製し約 10^9 CFU/mL に調製した試験菌株の一晚培養液を 0.5 mL ずつ各ループに投与した。陰性対照として、PBS、トリプティック・ソイ・ブロスあるいは K12 の試験

菌液を、陽性対照として、EPEC67 を投与した。菌液の投与から 20 から 24 時間経過後に各結紮ループの腫脹を確認した後、ループ内容物を滅菌ガーゼに染み込ませて貯留量を計量し、また、ループの長さを計測した。

3) 抗生物質投与マウスへの経口投与

試験菌株として、K12、NBRC3972、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14、ETEC609、ETEC627、EAEC65 および EPEC67 を供試した。3 週齢のマウス (C57BL/6j) に四種類の抗生物質 (ゲンタマイシン、バンコマイシン、メトロニダゾールおよびコリスチン) を混合した飲用水を前投与し、約 10^9 CFU/mL に調製した試験菌株の一晚培養液菌液 0.1 mL を胃内投与した。投与後 5 日目まで経時的に体重測定と行動および糞性状の観察を行った。

4) マウスへの腹腔内投与試験

試験菌株として、K12、NBRC3972、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14、ETEC609、EPEC67 を用いた。4 週齢のマウス (C57BL/6j) に 10^8 あるいは 10^9 CFU/mL に調製した試験菌株の一晚培養液 0.1 mL を腹腔内投与した。投与後 1 から 3 日目まで経時的に生死判定を行い、経過日数ごとの各菌株投与群の致死率を算出した。また、3 週齢のマウス (C57BL/6j) に 10^8 あるいは 10^9 CFU/mL に調製した試験菌株の培養液 0.1 mL を腹腔内投与し、投与後 7 日目まで経時的

に症状の推移を観察した。症状は 1. 正常、2. 低活動、3. 衰弱、4. 瀕死、5. 死亡の 5 段階に分類し記録した。

5) コモンマーモセットへの経口投与試験

コモンマーモセット若齢個体 1 (9 ヶ月齢) へ 10^9 CFU/mL の濃度に調製した患者由来株 No. 14 の一晚培養液 0.1 ml を経口投与した。また、別の若齢個体 2 (9 ヶ月齢) へ 6×10^{10} CFU/mL に調製した牛乳由来株 No. 5 の一晚培養液 0.5 mL を経口投与した。さらに、老齢個体 (127 ヶ月齢) へ 10^9 CFU/mL に調製した牛乳由来株 No. 5 の一晚培養菌液 0.1 mL を経口投与した。投与後経時的に各個体の糞便を採取し、糞便性状を観察した。また、採取した糞便を懸濁・希釈して選択培地に塗抹し、37°C で一晚培養後、コロニー数をカウントして糞便中に排出される菌数を解析した。

C. 研究結果

(1) 菌株ゲノムの解析

1) ゲノムの概要

国衛研で配列を取得した、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14 ゲノムおよび代表的な大腸菌株ゲノムの概要を表 1 に示す。牛乳由来株 No. 5 のゲノムサイズは 4,971,560 bp、GC 含量は 50.4%、蛋白質コード配列 (CDS) 数は 4,591、患者由来株 No. 14 のゲノムサイズは 4,971,787 bp、GC 含量は 50.4%、CDS 数は 4,575 で

あり、両菌株間でほぼ等しい値を示した。本事例株のゲノムサイズは、K12 および NBRC3972 よりも大きく、EPEC 株 E2348/69 および ETEC 株 E24377A とほぼ等しく、ゲノムサイズが 5 メガベースを超える EHEC、EAEC および新生児髄膜炎起因大腸菌 (NMEC) より小さい値を示した。生物種でほぼ固有の値を示す GC 含量について、本事例株では表 1 に示す株の中では最も低い 50.4%であったが、大腸菌として特に逸脱していない値であると判断された。CDS 数はゲノムサイズとほぼ同様の傾向を示していた。

富山衛研で配列を取得した牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 ゲノムの概要を (表 2) に示す。ゲノムサイズおよび CDS 数いずれも、牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 とほぼ等しい値であった。

2) ゲノムの遺伝子型別

感染研で行った SNP 解析の結果、牛乳由来株 No. 5 と患者由来株 No. 14 は 1 か所の SNP のみ異なっており、同一クローンであると考えられた。ドラフトゲノムの解析をしたところ、*in silico* の血清型予測では O17/O77:H18、MLST では ST1380、phylogenetic group では D と型別された。

富山衛研で、牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 の PFGE を行ったところ、両株の PFGE パターンが一致した。続いて行ったゲノム配列の解析では、

SNP は検出されず、両株の MLST による遺伝子型は ST1380 であった (表 3)。両株の血清型は遺伝子配列から、O17:H18 と推定されたが、感染研にて行った O 血清群抗血清による血清型別では、O 血清群を確定することはできなかった。

3) ゲノムの系統解析

感染研にて牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 の系統解析を行った。公共データベース上の近縁株を解析した結果、本事例株と同じ ST1380 では多くの株で EAEC の指標である *aggR* が検出された (図 1)。これら *aggR* 保有株はいずれも凝集接着性線毛 (aggregative adherence fimbria: AAF) を保有していたが、本事例株では検出されなかった。本事例株と最も近縁な株は由来不明の 2 株およびアメリカ合衆国の海牛由来 2 株であった。いずれも本事例株と比較して 100 か所以上の SNP が認められたため、直接的な関連性は低いと考えられた。また、解析に用いた由来不明株で易熱性エンテロトキシン遺伝子 (*eltAB*) が検出されたが、本事例株と同様に *aggR* や AAF 遺伝子等の他の主要な病原性関連遺伝子を保有していなかった。

4) ゲノム上の病原性関連遺伝子の検索

感染研で行った牛乳由来株 No. 5 と患者由来株 No. 14 の病原性関連遺伝子解析では、*air*, *eila*, *kps*, *chuA*, *lpfA* が検出されたが、病原大腸菌に特徴的な付着関連遺伝子 (*eae*, *bfpA*, *aggR* 等) や

毒素遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *est*, *elt* 等)、薬剤耐性遺伝子は検出されなかった。

富山衛研で行った牛乳由来株 TC49 と患者由来株 TC78 の病原性関連遺伝子解析では、下痢原性大腸菌のカテゴリーの病原性関連遺伝子は検出されなかった。ST1380 の大腸菌として、EAEC E42 (O17:H18) が報告されていたことから、E42 のゲノム配列を用いて、EAEC E42、牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 の病原性関連遺伝子を比較した (表 2)。その結果、①EAEC E42 は EAEC の *aggR* 等の典型的な病原性関連遺伝子を有するプラスミドが存在するが、牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 はこのプラスミドを保有していないこと、②EAEC E42、牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 はゲノム上に同じ病原性関連遺伝子群を保有することが判明した。

国衛研では、富山市食中毒事例株と他の大腸菌株参照株ゲノム上に存在する病原性関連遺伝子の比較を行った (表 4)。病原大腸菌のマーカー遺伝子として用いられている 43 遺伝子およびデータベースとして公開されている細菌の病原性関連遺伝子 3583 遺伝子が牛乳由来株 No. 5 ゲノム上に存在するか検索したところ、マーカー遺伝子のリストから 5 遺伝子およびデータベースから 90 遺伝子が検出され、ゲノム上に合計 95 遺伝子の存在が確認された。牛乳由来株 No. 5 ゲノム上に存在した 95 遺伝子は、全て

患者由来株 No. 14 ゲノム上にも存在していた。感染研での解析と同様に、本事例株ゲノム上には、*stx*、*eae*、*elt*、*aggR* など病原大腸菌の主要な病原性関連遺伝子は存在しなかったものの、付着に関連する *air*、type I fimbriae クラスタ、Ecp クラスタ、細胞侵入に関連する *ibeB*、*ompA*、*asIA*、病原因子のレギュレーターである *eilA*、鉄取り込みに関連する Chu クラスタ、Enterobactin クラスタ、Shu クラスタ、莢膜合成に関連する K1 capsule クラスタ、III 型分泌系 (T3SS) エフェクターである *espL* 群、*espR* 群、*espX* 群、*espY* 群、II 型分泌系 (T2SS) である Gsp クラスタ等病原性への関与が示唆される遺伝子群が存在していた (表 4 および表 5)。これら病原性関連遺伝子群は、他の病原大腸菌ゲノム上にも存在しているものが多く、*ibeB*、*ompA*、*asIA*、Enterobactin クラスタは JIS 規格株ゲノム上にも存在していた。EAEC 042 株ゲノムと本事例株ゲノム間では、*air*、*eilA* および K1 capsule クラスタが共通して存在し、これら遺伝子群は K1 capsule クラスタが NMEC ゲノム上に存在する以外は、他の病原大腸菌ゲノム上には存在しなかった (表 2)。

(2) 培養細胞への感染実験

1) 細胞付着性試験

国衛研で顕微鏡観察を行ったところ、陽性対照の EAEC65 では特異的な凝集性

の付着が認められたが、牛肉由来大腸菌、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14 ではその様な付着は認められなかった (図 2)。

感染研でも同様に、陽性対照の EAEC では特異的な凝集性の付着が認められたが、牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 ではその様な付着は認められなかった (図 2)。

国衛研で行った細胞への付着性の定量試験では、EAEC65、牛肉由来大腸菌、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14 とも強い付着性が認められた (図 3)。4 株間で付着菌数に差は認められなかった (図 3)。

2) 細胞侵入性試験

国衛研の結果では、EAEC65、牛肉由来大腸菌、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14 それぞれ、 4.1×10^3 cfu/well、 1.2×10^2 cfu/well、 2.0×10^3 cfu/well、 1.1×10^3 cfu/well が回収された (図 3)。

感染研の結果では、牛乳由来株 TC49、患者由来株 TC78 とも細胞侵入率は 0.001% 未満であったのに対して、*S. Typhimurium* は 2% 以上の細胞侵入率を示した (表 6)。

3) 細胞透過性試験

国衛研で細胞透過性試験を行ったところ、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14、EIEC66、K12 を CACO-2 細胞に接種し、接種後 8 時間までの TEER の変化を経時的に測定した。EIEC66 を接種する

と、TEER が緩やかに減少を始め、接種後 6 時間で接種前の 74%まで TEER が減少した (図 4)。しかし、8 時間後には接種前の 86%まで回復した (図 4)。一方、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14、K12 では、接種後 6 時間で、それぞれ接種前の 104%、91%、91%の TEER を示した (図 4)。接種後 8 時間では、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14、K12 はそれぞれ接種前の 97%、101%、102%となった (図 3)。

(3) 動物モデル実験

1) ウサギ腸管結紮ループ試験

陽性対照である EPEC67 を投与したループは、ループ部位の腫脹および液体貯留が認められた。牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14 および陰性対照を投与したループでは、腫脹および液体貯留は認められなかった。

2) 抗生物質投与マウスへの経口投与試験

牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 投与群を含め、投与後 5 日目まで全ての投与群で下痢、著しい体重減少および行動異常は認められなかった。

3) マウスへの腹腔内投与試験

各試験菌株腹腔内投与後の致死率を解析した結果 (図 5)、陽性対照の ETEC609 を投与したマウスは投与後 1 日目までに 15 匹中 12 匹 (80%) が、投与後 2 日目までに 14 匹 (93%) が死亡した。牛乳由来株 No. 5 を投与したマウスは、

投与後 1 日目までに 15 匹中 7 匹 (47%) が、投与 2 日目までに 13 匹 (87%) が死亡した。患者由来株 No. 14 を投与したマウスは、投与後 1 日目までに 10 匹中 2 匹 (20%) が、投与 2 日目までに 7 匹 (70%) が死亡した。EPEC67 を投与したマウスは投与後 1 日目まで死亡しなかった (0%)。陰性対照とした K12 投与マウスは、投与後 3 日まで一匹も死亡しなかった (0%)。NBRC3972 を投与したマウスは投与後 1 日目に 15 匹中 1 匹 (7%) が、投与後 2 日目までに 7 匹 (47%) が死亡した。

各試験菌株腹腔内投与後の経時的な症状の推移を解析した結果、陽性対照の ETEC609 を 10^8 CFU/匹で投与したマウスは投与後 9 時間で 5 匹中 1 匹が、投与後 1 日目までに 3 匹が、投与後 2 日目までに 5 匹全てが死亡した (図 6A)。ETEC609 を 10^7 CFU/匹で投与したマウスは、投与後 1 日目までに 5 匹中 2 匹が、投与後 2 日目までに 4 匹が死亡した (図 6B)。瀕死になってから回復した個体はいなかった。牛乳由来株 No. 5 を 10^8 CFU/匹で投与したマウスは、投与後 2 日目までに 5 匹中 4 匹が死亡し、投与 3 日目までに 5 匹全てが死亡した (図 6A)。瀕死になってから回復した個体はいなかった。牛乳由来株 No. 5 を 10^7 CFU/匹で投与したマウスは、投与後 1 日目までに 5 匹中 1 匹が衰弱したがその後回復し、投与 7 日目まで死亡した個体はいなかった (図 6B)。NBRC3972 を 10^8 CFU/匹で投与したマウス

は、投与後2日で5匹中2匹が死亡し、投与後3日目には3匹が死亡した(図6A)。また、投与後3日目に2匹が瀕死であったが、その後投与7日目には正常まで回復した。NBRC3972を 10^7 CFU投与したマウスは投与後9時間で5匹中5匹が低活動となったが、投与後1日目には全個体が正常に回復した(図6B)。陰性対照のK12を 10^8 CFU/匹で投与したマウスは、一部低活動がみとめられたが、投与後7日まで6匹中1匹も死亡しなかった(図6A)。

4) コモンマーマセットへの経口投与試験

患者由来株 No. 14 を 10^8 CFU/匹で経口投与した若齢個体 1、牛乳由来株 No. 5 を 3×10^{10} CFU/匹で経口投与した若齢個体 2 および牛乳由来株 No. 5 を 10^8 CFU/匹で経口投与した老齢個体は、下痢を示さなかった。しかし、若齢個体 1 では投与後 11 日目まで $10^{4.9}$ から $10^{9.2}$ CFU/g の範囲で、若齢個体 2 では投与後 15 日目まで $10^{3.5}$ から $10^{9.5}$ CFU/g の範囲で、老齢個体では投与後 28 日目まで $10^{5.2}$ から $10^{8.7}$ CFU/g の範囲で便中に菌の排出が認められた。

D. 考察

(1) 菌株ゲノムの解析

国衛研で決定した、牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 ゲノムのゲノムサイズおよび CDS 数は、K12 およ

び NBRC3972 と、主要な病原大腸菌である EHEC および EAEC の中間の値を示した。富山衛研で決定した牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 ゲノムのゲノムサイズおよび CDS 数も、同様の数値であった。一般的に、細菌はゲノムサイズが大きく、コードする遺伝子数が多いほど環境への適応度が高く病原性が強い傾向にあることから、本事例株は一定の病原性を示す可能性が示唆された。

感染研の解析では、牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 は、SNP 解析から同一クローンであると考えられ、遺伝子型は ST1380 であった。富山衛研が行った解析でも、牛乳由来株 TC49 と患者由来株 TC78 の間において SNP は検出されず、両株の遺伝子型も ST1380 で一致し、これらの株は同一クローンであると考えられた。

感染研で行った系統解析の結果、データベース上から牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 と直接的な関連性を示唆する近縁株は見出されなかった。データベース上に存在し、由来情報のある ST1380 はいずれも海外由来株であり、国内での同一 ST の分布は不明であった。しかし、本事例株と同じ ST1380 には EAEC の株が多く、本事例株は EAEC と近縁であることが示唆された。

感染研および国衛研の解析では、牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 ゲノム上には、病原大腸菌の主要な病原

性関連遺伝子は存在しないものの、病原性への関与が示唆される遺伝子群が存在していた。富山衛研が行った牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 の解析においては、本事例株は EAEC の典型的な病原性関連遺伝子を保有するプラスミドは検出されないが、ゲノム上に EAEC と類似した病原性関連遺伝子群を保有していた。また、本事例株と同じ血清型の非定型 EAEC が牛から分離され、Hep-2 細胞で凝集付着性を示したことが報告されている。さらに、国衛研で、本事例株ゲノム上に存在する遺伝子群が他の大腸菌参照株ゲノム上に存在するか検討したところ、これらの遺伝子群は他の大腸菌参照株に比べて EAEC ゲノム上に共通して存在するものが多く、本事例株は EAEC と近縁である可能性が示唆された。

以上のゲノム解析により、牛乳由来株および患者由来株は、1) 同一クローンであること、2) 典型的な病原性関連遺伝子は保有しないものの病原性を示唆する遺伝子群を保有していること、3) 直接的な関連性はないものの EAEC と近縁であることが示された。

(2) 培養細胞への感染実験

培養細胞への付着試験では、患者由来株 No. 14、牛乳由来株 No. 5 とともに強い細胞付着性が認められた (図 3)。しかし、その付着性は EAEC65 で見られる凝集性の付着ではなく (図 2)、また、牛

肉由来大腸菌との差は認められなかった (図 3)。一方、患者由来株 No. 14、牛乳由来株 No. 5 共に EAEC65 と同程度の弱い細胞侵入性を示した (図 3)。しかし、EAEC はその侵入性によって病原性を示しているわけではない。また、細胞侵入によって病原性を示す *S. Typhimurium* は、患者由来株 No. 14、牛乳由来株 No. 5 よりも強い細胞侵入性を示した (表 6)。このため、患者由来株 No. 14、牛乳由来株 No. 5 が示す侵入性と病原性との関連性は、今回の試験では明らかにできなかった。さらに、これらの株は CACO-2 細胞の TEER を低下させなかった (図 4)。以上の結果から、今回行った培養細胞に対する感染実験では、患者由来株 No. 14、牛乳由来株 No. 5 の病原性を確認できなかった。

(3) 動物モデル実験

富山市食中毒事例では原因食品を喫食した施設職員等の成人に比べて児童の発症率が高く、富山市食中毒事例株は免疫や腸内細菌叢が未発達な腸管でのみ病原性を発揮することが推察されていた。そのため主に若齢動物を用いて、動物モデル実験を行った。富山市食中毒事例株は、マウスへの腹腔内投与で致死性が認められた。本食中毒事例株の致死性は、ETEC609 より低く、病原性の知られていない大腸菌株 (NBRC3972 および K12) より高い結果であった。また、牛乳由来株 No. 5 投与群の腹腔内投与後の

症状の増悪は、ETEC609 投与群より緩やかで、NBRC3972 投与群よりは早かった。また、NBRC3972 投与群では、瀕死から回復した個体が観察されたが、牛乳由来株 No. 5 投与群では、瀕死となった個体は全て死亡した。以上より、富山市食中毒事例株は ETEC ほど高くないものの病原性を有する可能性が考えられた。一方で、ウサギ腸管結紮ループ試験および抗生物質投与マウスへの経口投与試験を行ったが、供試した富山牛乳由来株 No. 5 と富山患者由来株 No. 14 の下痢原性は認められなかった。また、コモンマーモセットへの経口投与試験においても下痢原性が認められず、動物モデル実験でのヒトの下痢症の再現性の検討が更に必要であると考えられた。しかし、コモンマーモセットへの経口投与後、糞中への菌の排出が一定期間観察されたことから、本食中毒事例株はコモンマーモセットの腸管に定着性を有することが認められた。

E. 結論

原因食品として特定された牛乳および患者便から分離された大腸菌 OUT (0 抗原遺伝子型 0gGp9) :H18 について、病原性を解明するために多角的に解析した。

(1) 菌株のゲノム解析の結果、牛乳由来株および患者由来株は、1) 同一クローンであること、2) 典型的な病

原性関連遺伝子は保有しないものの病原性を示唆する遺伝子群を保有していること、3) 直接的な関連性はないものの腸管凝集性大腸菌 (EAEC) と近縁であることが示された。

(2) 培養細胞への感染実験の結果、牛乳由来株および患者由来株は、細胞付着性および細胞侵入性を示したが、EAEC の示すような凝集性の付着や細胞侵入によって病原性を示す *Salmonella* Typhimurium の示すような強い侵入性は観察されなかった。

(3) 動物モデル実験の結果では、牛乳由来株および患者由来株は、マウスへの腹腔内投与によって腸管毒素原性大腸菌よりは低いが、微生物試験に使用されている大腸菌株よりも高い致死性を示し、病原性を有する可能性が考えられた。また、コモンマーモセットへの経口投与によって、下痢の発症は観察されなかったが、腸管での定着性が認められた。

以上のことから、本食中毒の原因物質を「病原大腸菌 OUT (0gGp9) :H18 (疑い)」とすることが妥当と考えられた。今後さらに、遺伝子解析や動物モデル実験による下痢発症メカニズムの解明が必要と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

(投稿予定)

(学会等発表)

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

I. 謝辞

本研究の動物モデル実験に際して、
ご協力およびご指導いただきました以
下の先生方に感謝いたします。

公益財団法人実験動物中央研究所
佐々木えりか先生、井上貴史先生

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 北
嶋聡先生、栗形麻樹子先生

国立医薬品食品衛生研究所 動物管理
室 高橋祐次先生

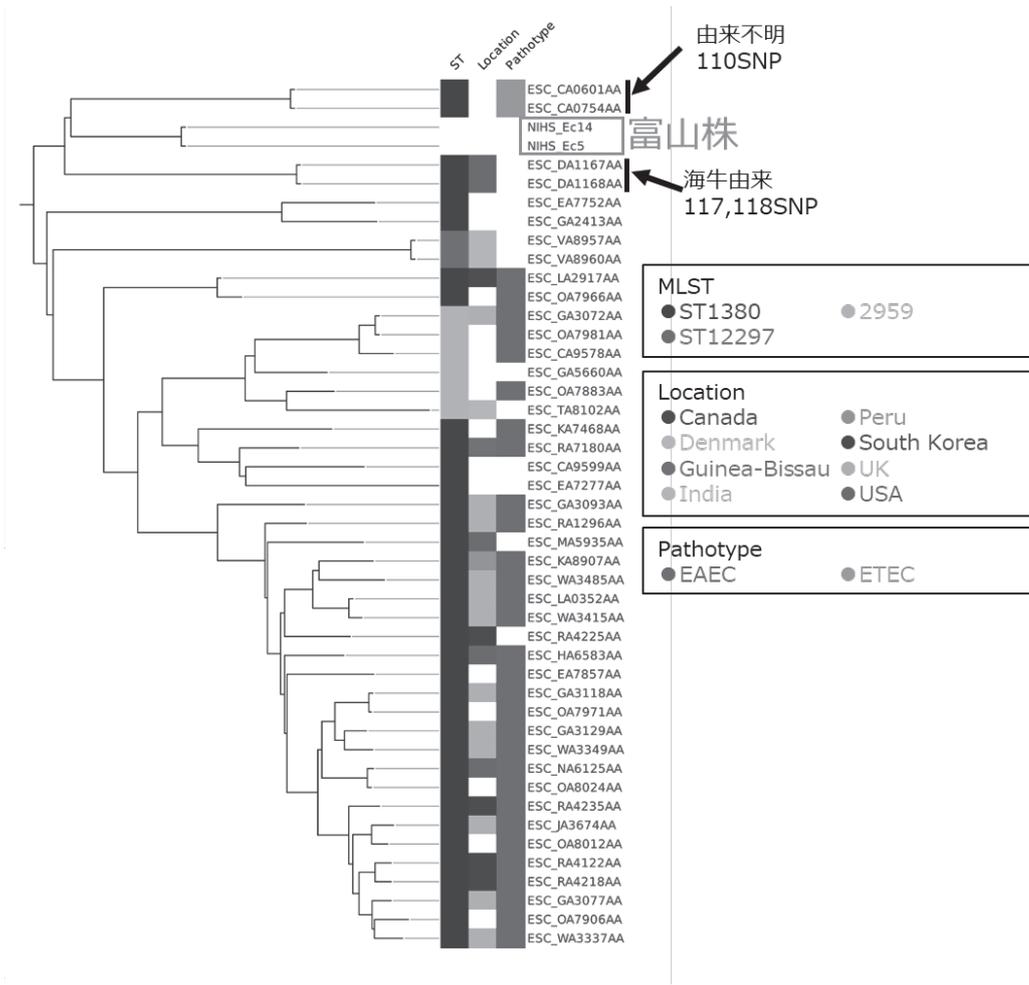
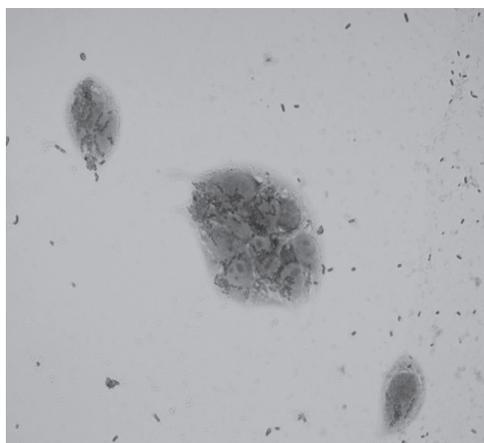
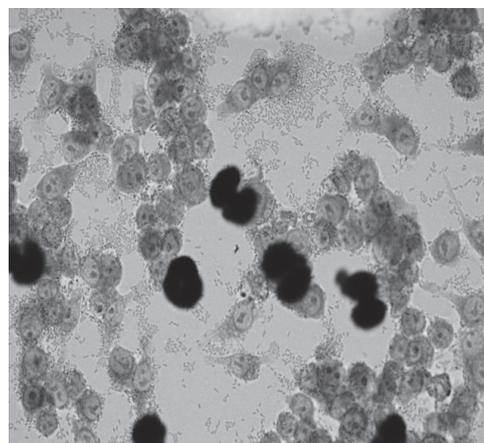


図1 大腸菌 ST1380 および近縁株における SNP を用いた最尤法系統樹
 食中毒由来株と近縁な 46 株の系統樹。右側のカラムは MLST、分離国、
 pathotype を示す。Pathotype については、EAEC は *aggR*、ETEC は *e1tAB* 保有
 を示す。

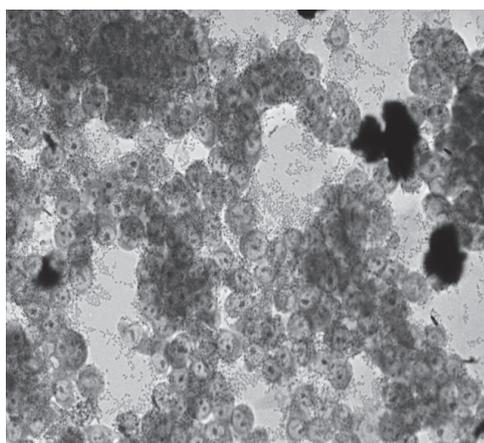
(a) 国衛研



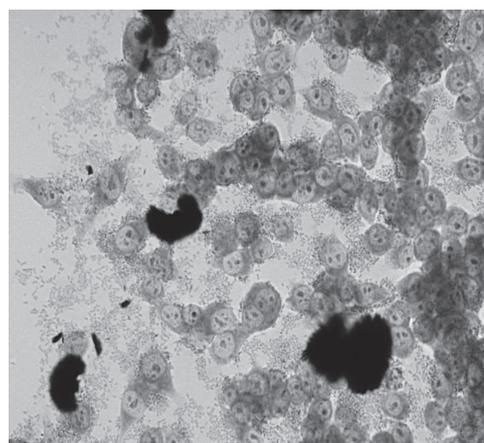
EAEC65



牛肉由来大腸菌

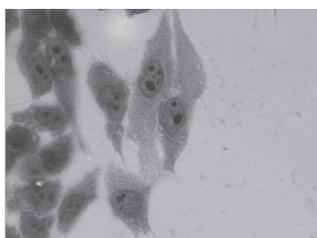


牛乳由来株 No. 5

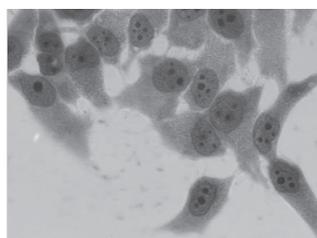


患者由来株 No. 14

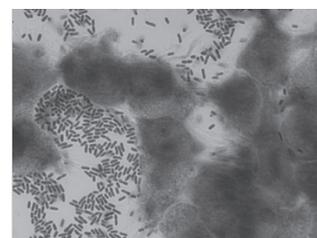
(b) 感染研



TC49 (牛乳由来)



TC78 (患者由来)



陽性对照(*aggR*+ EAEC)

図 2 細胞付着性試験

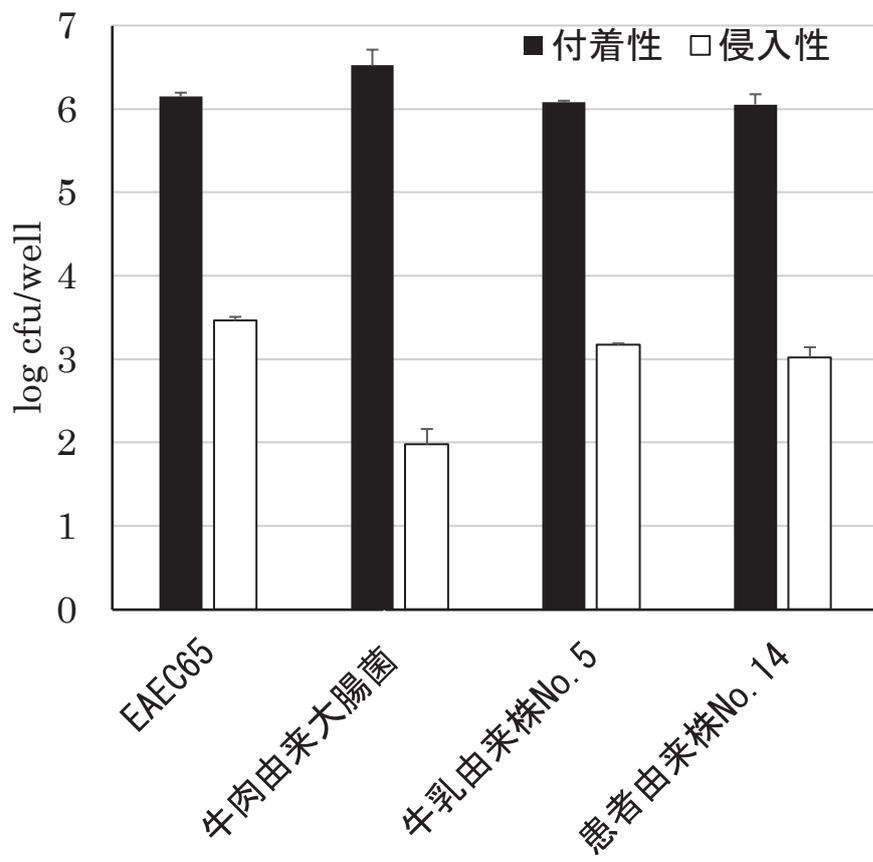


図3 細胞侵入性・付着性試験（国衛研）

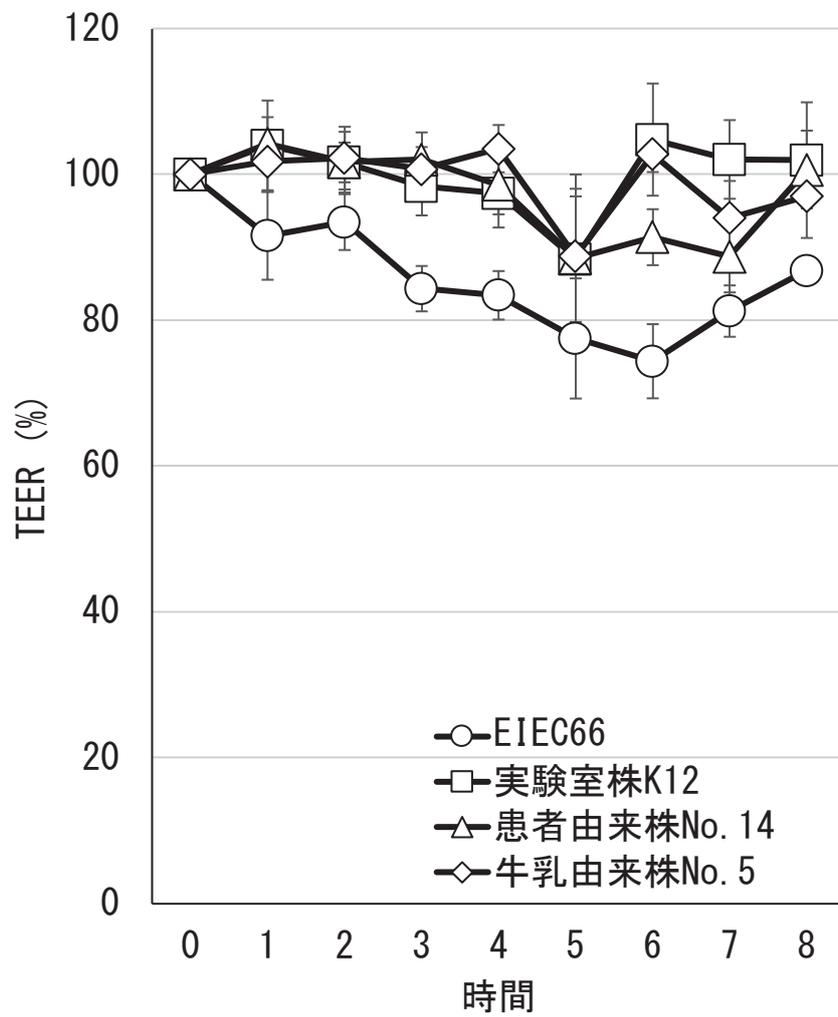


図4 細胞膜透過性試験 (国衛研)

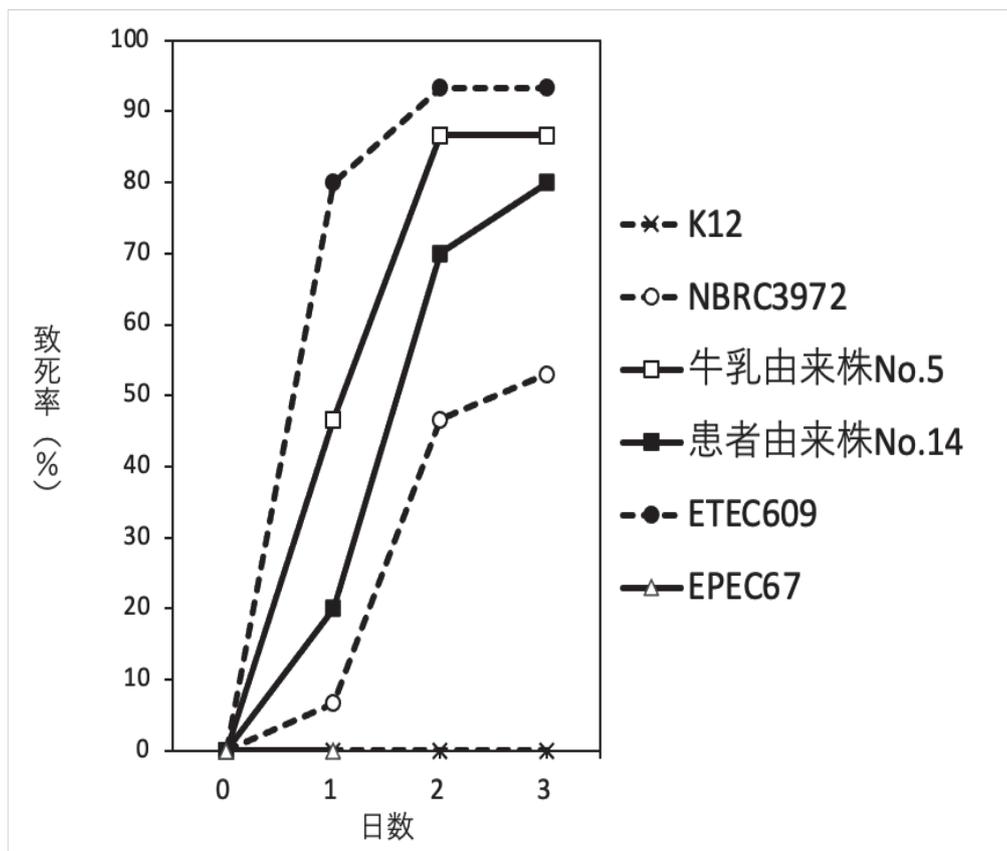
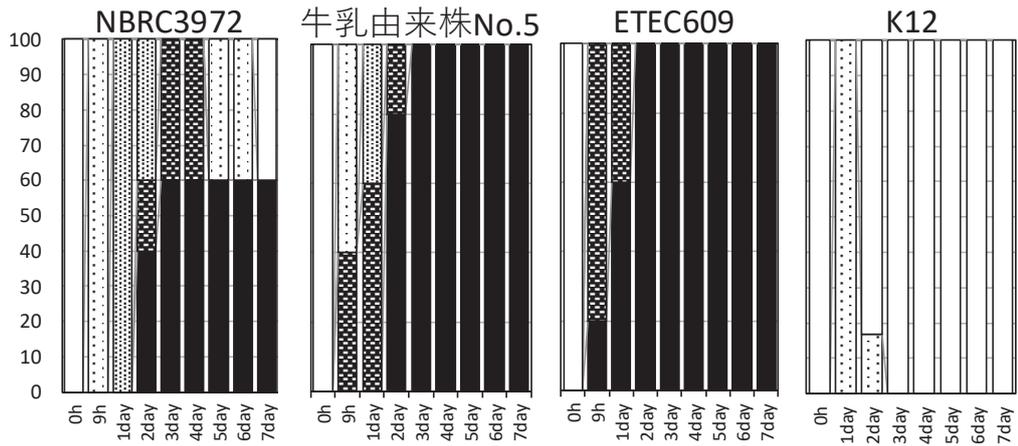


図5 腹腔内投与後の致死率（マウス）

A



B

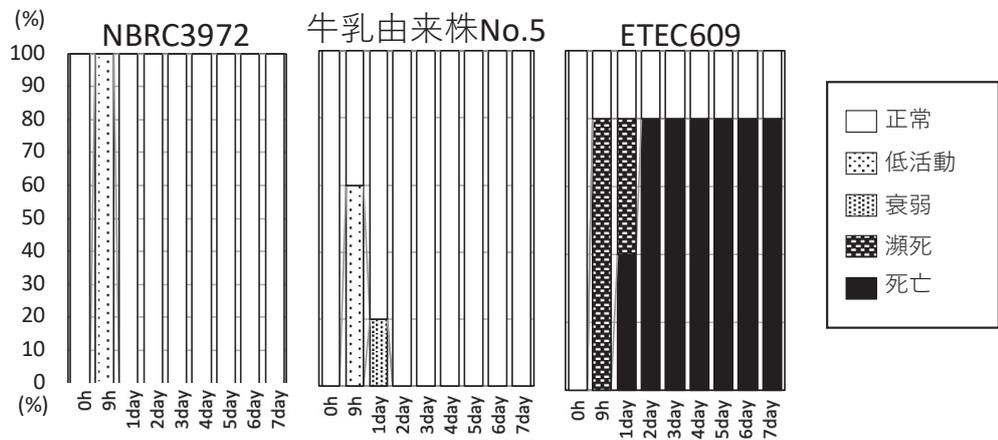


図6 腹腔内投与後の症状の推移 (マウス)

表 1 富山市食中毒事例株および代表的な病原大腸菌株ゲノムの概要

株名	病原大腸菌	全長 (bp)	GC含量 (%)
牛乳由来株 No.5		4,971,560	50.4
患者由来株 No.14		4,971,787	50.4
<i>E. coli</i> K12		4,641,652	50.8
<i>E. coli</i> NBRC3972		4,746,218	50.9
<i>E. coli</i> O157:H7 Sakai	EHEC	5,498,578	50.5
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009	EHEC	5,449,314	50.7
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69	EPEC	4,965,553	50.6
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615	EPEC	5,386,352	50.5
<i>E. coli</i> O139:H28 E24377A	ETEC	4,979,619	50.5
<i>E. coli</i> O78:H11:K80 str. H10407	ETEC	5,153,435	50.7
<i>E. coli</i> 55989	EAEC	5,154,862	50.7
<i>E. coli</i> O44:H18 042	EAEC	5,241,977	50.6
<i>E. coli</i> O18:K1:H7 IHE3034	NMEC	5,108,383	50.7

病原大腸菌のカテゴリー

- EHEC：腸管出血性大腸菌
- EPEC：腸管病原性大腸菌
- ETEC：腸管毒素原性大腸菌
- EAEC：腸管凝集性大腸菌
- NMEC：新生児髄膜炎起因大腸菌

表 2 Genepid-JによるEAEC E42、TC 49およびTC 78のゲノム解析のまとめ

	EAEC E42 ^{a)}	TC 49 / TC 78
Genome サイズ (bp)	5,288,527	4,979,836 / 4,980,977
contigs数	149	49 / 53
遺伝子数 (CDS数)	5,025	4,638 / 4,647
MLST 遺伝子型	ST1380	ST1380
血清型	O 17/O 77 O 17/O 44 H18	O 17/O 77 O 17/O 44 H18
プラスミド レプリコン	hncF B hncF II hncII-I(α)	hncF B
薬剤耐性遺伝子	<i>bb_{EC-8}</i> <i>mdfA</i> <i>bb_{C_{TX-M-15}}</i> <i>bb_{TEM-1}</i>	<i>bb_{EC-8}</i> <i>mdfA</i>
病原因子遺伝子 ^{b), c)}	(E42のみ検出された病原因子遺伝子 15遺伝子) <i>orf3, orf4, aaC, aap, aap/aspU, aatA, agg4A, agg4C, agg4D, aggR, capU, sepA, iss, set1A, set1B</i>	(TC 49およびTC 78のみ検出された病原因子遺伝子 1遺伝子) <i>gtrA</i>
	(E42, TC 49およびTC 78で共通な病原因子遺伝子 72遺伝子)	
	<i>ar, asA, chuA, chuS, chuU, chuV, chuW, chuY, eia, entB, entC, entD, entE, entF, entS, espL1, espL4, espR1, espX1, espX4, espX5, espY1, espY3, espY4, fdeC, fepA, fepB, fepC, fepD, fepG, fes, fimA, fimB, fimC, fimD, fimE, fimF, fimG, fimH, fimI, gad, gspC, gspD, gspE, gspF, gspG, gspH, gspI, gspJ, gspK, gspL, gspM, kpsC, kpsD, kpsE, kpsF, kpsM, kpsM II, kpsS, kpsU, pfa, ompA, shuA, shuT, shuX, terC, yagV/ecpE, yagW/ecpD, yagX/ecpC, yagY/ecpB, yagZ/ecpA, ykgK/ecpR</i>	<i>ar, asA, chuA, chuS, chuU, chuV, chuW, chuY, eia, entB, entC, entD, entE, entF, entS, espL1, espL4, espR1, espX1, espX4, espX5, espY1, espY3, espY4, fdeC, fepA, fepB, fepC, fepD, fepG, fes, fimA, fimB, fimC, fimD, fimE, fimF, fimG, fimH, fimI, gad, gspC, gspD, gspE, gspF, gspG, gspH, gspI, gspJ, gspK, gspL, gspM, kpsC, kpsD, kpsE, kpsF, kpsM, kpsM II, kpsS, kpsU, pfa, ompA, shuA, shuT, shuX, terC, yagV/ecpE, yagW/ecpD, yagX/ecpC, yagY/ecpB, yagZ/ecpA, ykgK/ecpR</i>

Genepid-Jを用いてE42, TC 49およびTC 78の塩基配列を解析した

^{a)} accession number: JACFEW 000000000

^{b)} 太字: プラスミド由来 (EAEC 042 プラスミドpAA2等、公的データベースのプラスミド塩基配列上にコードされている遺伝子) Virulence 12:57-74,2020、Mol Microbiol 111:534-55,2019

なお *iss* はゲノム上にコードされるタイプと、プラスミド上に存在するタイプがあるが、今回は型別していない。

^{c)} 下線: EAEC の典型的レギュレーター-AggR による発現制御を受ける Virulence 12:57-74,2020)

表 3 本食中毒事例の解析対象株および参照株の詳細

菌株名	由来	血清型	ST	病原因子	凝集付着性	分類
解析対象株						
TC 49	牛乳由来	O 17/O 77 (wzx) O 17/O 44 (wzy) H18	1380	なし	検討中	-
TC 78 *	患者由来	O 17/O 77 (wzx) O 17/O 44 (wzy) H18	1380	なし	検討中	-
TC 76	患者由来	O 75 H5	1193	<i>pap, iuc</i> 遺伝子群保有	未実施	-
参照株						
E42	論文報告a	O 17 H18	1380	<i>aggR</i> 等保有	あり	EAEC
牛由来株	論文報告b	O 17 H18	-	なし	あり	非典型EAEC
UT由来株	論文報告c,d	O 75 H5	1193	<i>papA, usp, vat</i> 等	不明	UPEC/ExPEC

*PFGEパターンがTC 49と一致

a Virulence 12:57-74,2020

b FEMS Microbiol Lett 256:251-7,2006

c Sci Rep. doi:10.1038/srep44866, 2017

d Front Microbiol 12: article 746995, 2021

UTI: urinary tract infection, EAEC: Enteroaggregative *E. coli*, UPEC: Uropathogenic *E. coli*, ExPEC: Extraintestinal pathogenic *E. coli*

表 4 富山市食中毒事例株が保有する病原性関連遺伝子と他の大腸菌での保有状況

検索法	カテゴリー	遺伝子	機能	由来菌種	牛乳由来株 (No.5)	患者由来株 (No.14)	他の大腸菌での保有状況						NBER3972 (ATCC3739) JIS株株 NC_010468.1
							EAEK O44:H18 042 NC_017626	ETEC O78:H11:K80 H10407 NC_017633	EPEC O127:H6 E2348/69 NC_011601	EHEC O157:H7 Sakai NC_002695	NMEC O18:K1:H7 IHE3034 NC_017628		
病原性大腸菌 マーカ-遺伝子 のリストから 検索	Autotransporter adhesin	<i>air</i>	付着因子	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	
	Major fimbrial subunit	<i>fliA</i>	付着因子	<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	
	Ibcs	<i>ibcs</i>	細胞侵入	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Transcriptional regulator	<i>eiaA</i>	転写生薬	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	
	Inner membrane protein	<i>bil121</i>	その他	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Type 1 fimbriae	<i>fimA-H</i> の9遺伝子	付着因子	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	
	Adhesive fimbriae	<i>cafA</i>	付着因子	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	
	Ecp	<i>ecpA-E, R</i> の6遺伝子	付着因子	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Adhesion	<i>fdeC</i>	付着因子	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Outer membrane protein	<i>ompA</i>	細胞侵入	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Arylsulfatase	<i>asia</i>	細胞侵入	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Chu	<i>chuA, S-γ</i> の8遺伝子	細胞取り込み	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Enterobactin	<i>fepA-D, G, entB-F, S;</i> <i>fes</i> の12遺伝子	鉄取り込み	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	
	K1 capsule	<i>KpsC-F, M, S-U</i> の8遺伝子	荚膜合成	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	
	T3SS effector	<i>espA, I, 4; espR1, 3, 4;</i> <i>espX1, 4-6; espY1, 4</i> の13遺伝子	その他	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+/-	
	VFDBのリスト から検索	Curlin	<i>csgB</i>	付着因子	<i>Salmonella Typhimurium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
		Curlin	<i>csgG</i>	付着因子	<i>Salmonella Typhimurium</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
		Capsule	<i>gnd</i>	荚膜合成	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
		RcsAB	<i>rcaB</i>	荚膜合成	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
		T2SS	<i>exsG</i>	菌体外分泌系	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
T2SS		<i>gspC-M</i> の11遺伝子	菌体外分泌系	<i>Shigella dysenteriae</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	
T6SS		<i>cjpl/bsrH</i>	菌体外分泌系	<i>Shigella sonnei</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	
Shu		<i>shuA, S-V, X, Y</i> の3遺伝子	鉄取り込み	<i>Shigella dysenteriae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	
Allantoin utilization		<i>allB</i>	その他	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	
Acriflavine resistance protein		<i>acrA</i>	その他	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	±	±	±	±	±	
Acriflavine resistance protein	<i>acrB</i>	その他	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	±	±	±	±	±		
LPS	<i>gtrA</i>	その他	<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	+	+	+	+	+		
Flagella	<i>fliA</i>	その他	<i>Vibrio cholera</i>	+	+	+	-	-	-	-	-		
Flagella	<i>fliB</i>	その他	<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	+	+	-	-	-	-	-		

*VFDB: virulence factor data base; <http://www.mgc.ac.cn/VFs>

±: identity < 80%

+/-: クラスター内の複数の遺伝子が存在しない

表5 富山市食中毒事例株が保有する病原性関連遺伝子（群）

遺伝子（群）名	機能	病原性への関与
<i>air</i>	付着因子	Enteragggregative immunoglobulin repeat protein. EAECの付着に関与
<i>lpfA</i>	付着因子	宿主細胞への付着に関与（線毛アドヘジン）
Type 1 fimbriae クラスター	付着因子	1型線毛。宿主細胞への付着に関与
<i>cofA</i>	付着因子	CFA/III線毛の構成成分。宿主細胞への付着に関与。
Ecpクラスター	付着因子	<i>E. coli</i> common pilus。宿主細胞への付着に関与。EHEC O157では主要な病原因子
<i>fdeC</i>	付着因子	非線毛性のアドヘジン。宿主細胞への付着、腎臓・膀胱への定着に関与
<i>Agf</i>	付着因子	<i>Salmonella</i> 属の凝集性線毛のホモログ
<i>ibeB</i>	細胞侵入	大腸菌K1株（新生児髄膜炎の原因）の脳毛細血管内皮細胞への侵入に関与 鶏病原性大腸菌（APEC）の線維芽細胞への侵入と病原性に関与
<i>ompA</i>	細胞侵入	大腸菌K1株の脳毛細血管内皮細胞への侵入に関与
<i>aslA</i>	細胞侵入	大腸菌K1株の脳毛細血管内皮細胞への侵入に関与
<i>eilA</i>	転写制御	EAECのT3SSレギュレーター。Airの発現を制御
K1 capsule クラスター	莢膜合成	大腸菌K1株の莢膜合成遺伝子群（ <i>kps</i> 群のみで、 <i>neu</i> 群は存在しない） 宿主細胞内への侵入に関与（細胞内での生存能を増強）
RcsAB	莢膜合成	<i>Klebsiella</i> 属の莢膜合成レギュレーターのホモログ
III型分泌エフェクター（ <i>espL</i> 群、 <i>espR</i> 群、 <i>espX</i> 群、 <i>espY</i> 群）	その他	EspLは <i>Citrobacter rodentium</i> のマウス腸管への定着に関与。
II型分泌系（Gspクラスター）	菌体外分泌系	<i>Shigella</i> 属のII型分泌系（T2SS）のホモログ
		ETECのGSPクラスターは、易熱性毒素（LT）の分泌に関与 コレラ菌のGSPクラスターは、コレラ毒素の分泌に関与
Chuクラスター	鉄取り込み	ヘム鉄の取り込みに関与
Enterobactinクラスター	鉄取り込み	遊離鉄をキレートし、鉄取り込みに関与
Shuクラスター	鉄取り込み	<i>Shigella</i> 属のヘム鉄の取り込みに関与する系のホモログ

表6 細胞侵入性試験結果（感染研）

試験菌株	細胞侵入率(%)
TC49 (本食中毒事例分離株、牛乳由来)	<0.001
TC78 (本食中毒事例分離株、患者由来)	<0.001
EHEC O157 Sakai	<0.001
<i>S. Typhimurium</i> SL1344	>2.0

培養細胞無しの条件における細胞侵入率はいずれの試験菌株においても<0.001%