

緊急的追加研究（令和3年度からの継続）
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4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

緊急的追加研究(令和3年度からの継続) 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1,800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令和3年度に多角的に解析した。令和4年度には、病原因子を解明するために完全長ゲノムの取得と詳細なゲノム解析、複合感染としての可能性を検証するために患者便メタゲノム解析等を行った。

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

大屋賢司、大西貴弘、廣瀬昌平

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。調査の結果、食中毒発生に関与する提供日の牛乳および多く

の患者検体で、血清型OUT(0血清型別不能):H18であり、0抗原遺伝子型別で0gGp9の大腸菌が分離された。この大腸菌の動物モデル試験、ゲノム解析等の結果から、病因物質は「大腸菌OUT(0gGp9):H18(疑い)」と報告された(廣瀬ら、病原微生物検出情報、2022)。しかし、本大腸菌の病原性についての解明を引き続き行うことが求められており、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。

B. 研究方法

(1) 富山市事例大腸菌株の完全長ゲノム取得および保有プラスミドの解析

本事例牛乳由来大腸菌 OUT (OgGp9) :H18 ESC818 株の完全長ゲノムを取得するために、長鎖ゲノム DNA を調製し PromethION (Oxford Nanopore) を用いてロングリード配列を取得し、昨年度取得したショートリード配列と併せてハイブリッドアセンブルを行った。また、DFAST でアノテーションされたプラスミド上の coding sequence (CDS) を BLASTP 解析しキュレーションを行った。

(2) Type III 分泌系の病原因子遺伝子群 ETT2 発現の確認

本食中毒事例の原因食品由来株 (TC49)、患者由来株 (TC78)、完全な ETT2 を保有し、その機能解析が報告されている大腸菌 042 (EAEC 044:H18) 株を供試した (鹿児島大学医学部 西 順一郎先生から供与された)。供試菌株の LB 培地培養液から RNA 抽出および cDNA 合成をおこなった。プライマー設計を行い qRT-PCR を確立した。PCR 産物の定量はインターカレーター TBGreen の蛍光強度測定で、PCR 反応の特異性は PCR 産物の融解曲線による確認を行った。各検体について RNA 希釈列 (RNA 40ng, 10 ng, 2.5 ng, 0.625 ng) 相当の cDNA について n=2 で qRT-PCR を行った。qRT-PCR の結果について、レファレ

ンス遺伝子 *rpoA* を用いた $\Delta\Delta Ct$ 法による相対定量を行った。 $\Delta\Delta Ct$ 法は標的遺伝子とレファレンス遺伝子の増幅効率が同等である場合有効である。このため、測定した Ct 値の $\Delta\Delta Ct$ 法での有効性を検証するデータクリーニングを以下のように行った。相対増幅効率 ΔCt (標的遺伝子の Ct 平均値-レファレンス遺伝子 *rpoA* の Ct 平均値) を RNA 希釈列の対数値についてプロットし、回帰式を求めた。これらの ΔCt 値と RNA 希釈列に対する回帰式の傾きが 0.1 未満の場合を、各 RNA 希釈列における相対増幅効率 ΔCt が同等であるとし、標的遺伝子の Ct 平均値を有効とした。外れた場合は各 Ct 測定値について検証した。各遺伝子の mRNA は 042 株の mRNA 量を 1 とする相対定量値で示した。

(3) 細胞傷害性試験

HeLa 細胞を使用し、陽性対照として EHEC 0157:H7 Sakai 株、陰性対照として JM109 株を供試した。被検菌を LB ブロスで一晩振とう培養後、超音波破碎を行い、0.2 μm フィルターでろ過を行い、抽出液とした。この抽出液を培養細胞に 10 μl /well 接種し、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) による生細胞数の測定、または Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (Dojindo) による細胞傷害性の測定を行った。生細胞数の測定では、菌液を接種していないウェルの細胞数を 100%として評価を行った。細胞傷害性の測定では菌液を接種していないウェルの細胞に Lysis

Buffer を添加することで放出される LDH の値を 100%として評価した。

(4) 食品工場従事者および有症者由来便のメタゲノム解析

食品工場従事者（サンプル番号 F5、*E. coli* 0gGp9 分離なし）および有症者（F54、*E. coli* 0gGp9 分離あり）の便検体を材料として、ショットガンメタゲノム解析を行った。便サンプル 250 mg から、QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。抽出 DNA を用いて QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN) にてライブラリー調製を行った。ライブラリーについて、HiSeqX (Illumina) を用いて 150 bp×2 のシーケンス解析を行った。得られたリードをトリミング後、Kraken2 (<https://ccb.jhu.edu/software/kraken2/>) を用いて、属レベルでの存在比を明らかにした。

また、メタゲノム解析結果の確認として、以下のプライマーペアを用いて PCR を行った：大腸菌特異的 (*gyrB*-F, AGTGATCATGACCGTTCTGCA; *gyrB*-R, TTTGTTTTGTCCATGTAGGCGTTCA)、*Campylobacter* 属菌特異的 (MD16S1Upper, ATCTAATGGCTTAACCATTAAC; MD16S2Lower, GGACGGTAACTAGTTTAGTATT)、および *C. jejuni* および *C. coli* 特異的 (C412F, GGATGACACTTTTCGGAGC; C1228R, CATTGTAGCACGTGTGTC)。

さらに、便サンプル中大腸菌における、事例株 (*E. coli* 0gGp9) の頻度を推定するために、事例株ゲノムを非病原性株 (*E.*

coli MG1655) と共通する領域および共通しない領域に分け、前者を大腸菌に共通する領域、後者を事例株特異的領域とした。すなわち、事例株 (Ec5) ショートリードを MG1655 配列にマッピング後、マッピングされた領域のアセンブリ後に得られた配列大腸菌共通領域 (4.2 Mb)、マッピングされなかった領域のアセンブリ後に得られた配列を事例株特異領域 (0.9 Mb) とした。次に、メタゲノム解析から得られたリードから、BLAST を用いて上記の配列と類似したリード (120 bp 以上のアラインメント、95%以上の類似性) を抽出しカウントした。

C. 研究結果

(1) 本事例大腸菌株の完全長ゲノム取得および保有プラスミドの解析

ESC818 株の環状化した完全長ゲノムを取得し、本株ゲノムは 4,971,560 bp の染色体と 103,988 bp のプラスミド一本からなることが明らかとなった (表 1)。昨年度実施した本株ドラフトゲノムの系統比較に用いた代表的な大腸菌株のゲノムと比較すると、本株染色体ゲノムの CDS は 4,498、rRNA は比較対照とした他の大腸菌株と同じ 22、tRNA は腸管凝集付着性大腸菌 (EAEC) 042 株と同じ 93 であった。本株プラスミドの CDS は 106 であった (表 1)。

また、プラスミドを解析した結果、複製起点は IncFIB 及び Col の 2 種が検出さ

れ、薬剤耐性遺伝子は検出されなかった。病原因子のクラスターが2種類コードされていることが明らかとなった。

(2) Type III分泌系の病原因子遺伝子群 ETT2 発現の確認

TC49は、*glyU*、*selC*に、EAEC 042のこれらのType III分泌系の遺伝子クラスターとそれぞれ98%、95%の高い相同性を示す塩基配列を保有していた(図1)。

ETT2 遺伝子群 *eicA*、*air*、*eprH*、*eilA*、*eivA* について qRT-PCR による検出系を確立した。mRNA 発現量の定量については、*eicA*、*air*、*eprH* の RNA40ng 当量における ΔCt 値(平均値)は 9.8–12.5 であり、 ΔCt 値のほとんどは有効であった(図2)。一方、*eilA*、*eivA* の mRNA 40ng 当量における ΔCt 値は 14.5–15.3 であり、mRNA 量が、*eicA*、*air*、*eprH* の 1/4~1/8 以下と少なく、 ΔCt 値の多くは採用できなかった。また、LB 培地、0.2%グルコース加 LB-DMEM(1:1) 双方において TC49・TC78 の *air*、*eprH* の mRNA 相対発現が 042 株に比べて軽度(13%~47%)減少した(図2)。しかし、*eicA* については TC49、TC78 の mRNA 相対発現量は 042 株に比べて大きく(83%~96%)減少した。また、0.2%グルコース加 LB-DMEM(1:1) での *eilA* の mRNA 量の増加は検出されなかった。

(3) 細胞傷害性試験

非病原性株である JM109 株の抽出液と比較した際に、事例株の抽出液では生細胞数および細胞傷害性いずれにおいても顕

著な差は認められなかった(図3)。

(4) 食品工場従事者および有症者由来便のメタゲノム解析

メタゲノム解析の結果、サンプル F5 では *Bifidobacterium* 属菌が、F54 では *Phocaeicola* 属菌が最も高い頻度で検出された(図4)。*Escherichia* 属菌の割合は、F5 では 0.02%、F54 では 3.6%であった。また *Campylobacter* 属菌が F5 では 0.03%、F54 では 0.06%の割合で検出された。その他の病原体(細菌、ウイルス、寄生虫)特異的な配列は検出されなかった。本結果を確認するために、*E. coli*、*Campylobacter* 属菌、*C. jejuni* および *C. coli* 特異的プライマーを用いて PCR を行った。その結果、いずれのサンプルからも *E. coli* 特異的産物は検出されたが、*Campylobacter* 属菌、*C. jejuni* および *C. coli* 特異的産物は検出されなかった。メタゲノムリードから大腸菌特異的な配列を抽出した結果、いずれのサンプルにおいても、大腸菌共通配列に類似したリードの割合は約 80%、事例株特異配列に類似したリードの割合は約 20%であった。この割合は、事例株ゲノムの割合と類似していたことから、両サンプル中に存在する大腸菌の大部分は事例株であることが示唆された。

D. 考察

(1) 本事例大腸菌株の完全長ゲノム取得および保有プラスミドの解析

今年度は、牛乳由来 ESC818 株の完全長ゲノムを取得した。昨年度取得したドラフト配列では同定された rRNA 数は 3 であったが、完全長ゲノムでは他の大腸菌株と同じ 22 であることが示され、より正確なゲノム解析を実施できる環境が整った。さらに、ESC818 株は病原因子のクラスターを 2 種類コードする特徴的なプラスミドを保有することが明らかとなった。現在、特にプラスミドに注目し *in vitro* 及び *in vivo* の系で大腸菌 OUT (OgGp9):H18 の病原性について解析を進めている。

(2) Type III 分泌系の病原因子遺伝子群 ETT2 発現の確認

本研究で解析した領域にコードされる複数の遺伝子は mRNA が検出され、遺伝子として機能していることが示された。しかしながら *eilA*、*eivA* の mRNA 発現を定量できなかった。この原因として *eilA*、*eivA* は mRNA 発現量が少なく、qRT-PCR の定量性を確保できるダイナミックレンジ内に入らなかったためと考えられた。また、0.2% グルコース加 LB-DMEM (1:1) での *eilA* の発現上昇が検出できなかった。*eilA* は mRNA 量が少なく qRT-PCR で安定した定量性が得られなかった。Fox らはこの原因として *eilA* の mRNA の不安定さ等をあげている。本研究において mRNA の相対定量が可能であった *eicA*、*air*、*eprH* の 3 つの遺伝子は他の T3SS 病原因子との比較から、それぞれ chaperone、adhesin、type III 分泌装置の inner membrane ring

の構成タンパク質の機能を有すると推測されている。042 株と比べて食中毒由来株 (TC49・TC78) の *air*、*eprH* の mRNA 発現は軽度減少し、*eicA* は 10 分の 1 と大きく低下していることが判明した。

(3) 細胞傷害性試験

事例株における培養細胞への傷害性試験では、実施した条件では顕著な傷害性は認められなかった。今後、他種の細胞を用いるなどして、本菌の病原性を明らかにする必要がある。

(4) 食品工場従事者および有症者由来便のメタゲノム解析

メタゲノム解析では、大腸菌および *Campylobacter* 以外の既知の病原体の情報は得られなかった。*Campylobacter* については、PCR で特異配列が増幅されなかったため、メタゲノム解析結果では非特異的な配列を検出したと考えられる。このため、大腸菌以外が食中毒の原因である証拠は得られなかった。一方、F54 のメタゲノム解析でより高い頻度で大腸菌が検出されたことは、分離培養の結果 (F5 で大腸菌非分離、F54 で分離) と一致した。また F5 のサンプルでは、頻度が低いながらも事例株特異的配列が認められたことから、サンプルを採取した食品工場従事者も事例株を保有していたことが示唆された。

E. 結論

大腸菌 OUT (OgGp9):H18 の病原性を解明

するために、今年度は、本菌の完全長ゲノムを取得し、病原因子のクラスターを2種類コードする特徴的なプラスミドを保有することが判明した。今後、*in vitro* および *in vivo* の系で本菌の病原性について解析を進める予定である。また、ETT2 Type III分泌系が機能しているか否かの解析の必要性が明らかになった。さらに、本菌の病原性に関わる特徴を明らかにするために培養細胞への傷害性の有無を測定したが、顕著な傷害性は見出されなかった。加えて、本事例無症者および有症者の便検体をショットガンメタゲノム解析した結果、大腸菌以外の既知の病原体は検出されず、メタゲノムリード中の大腸菌特異的配列を抽出し解析した結果、

いずれのサンプルにおいても事例株が優占して存在することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

廣瀬ら. 富山市集団食中毒の原因食品からの原因物質調査. 病原微生物検出情報. 43(10), 15-16, 2022.

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

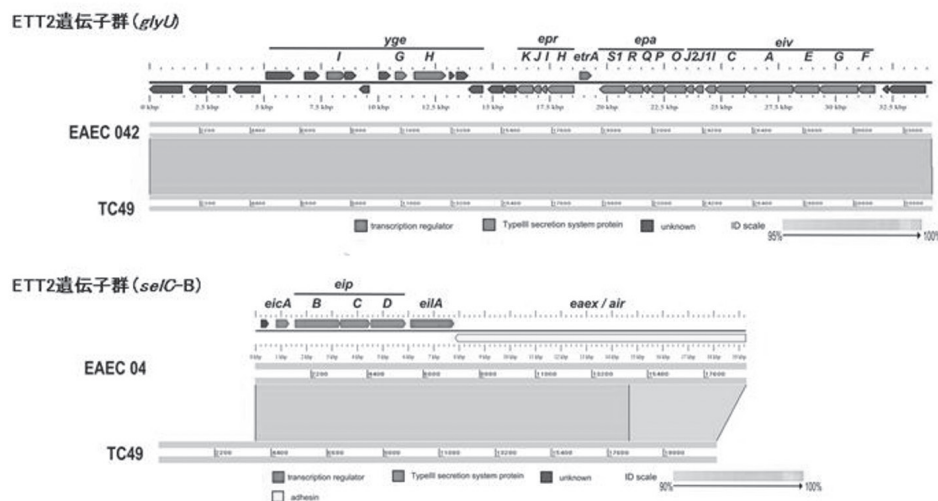
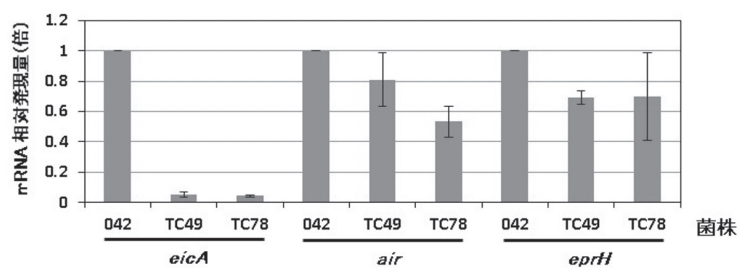


図1 食中毒由来株 TC49 と 042 の ETT2 遺伝子群の塩基配列の相同性

(A) LB培地



(B) 0.2%グルコース加 LB-DMEM (1:1)培地

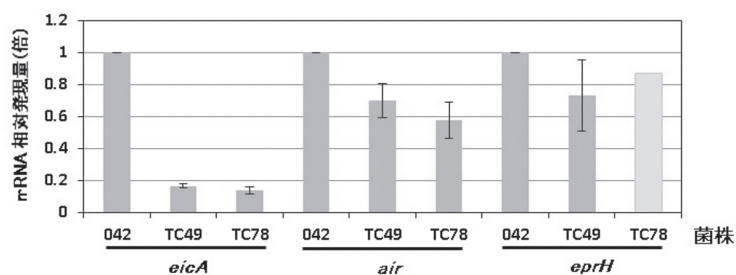


図2 ETT2 遺伝子 RNA 発現量の菌株巻の比較

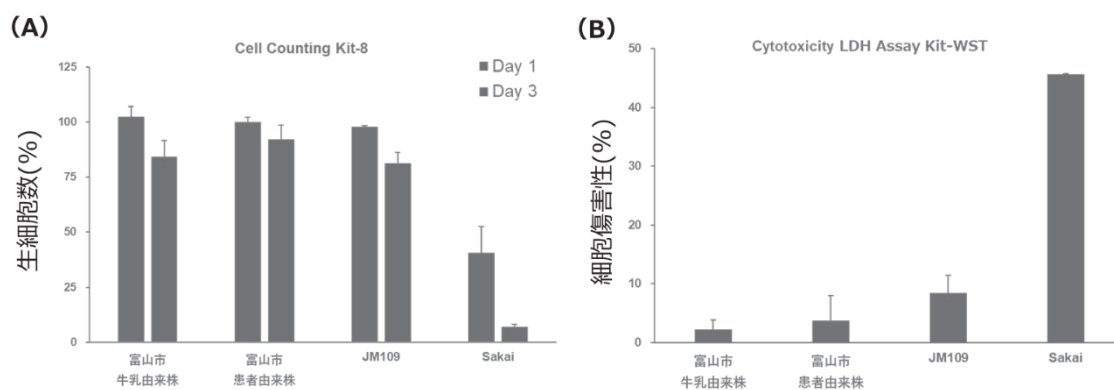


図3 HeLa 細胞を使用した細胞傷害性試験結果

(A) Cell Counting Kit-8 による生細胞数測定、(B) Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST による細胞傷害性測定

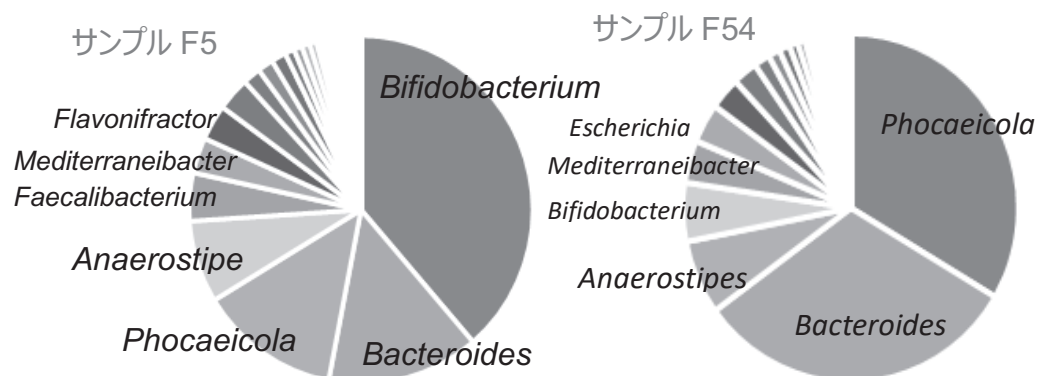


図4 ショットガンメタゲノム解析による菌属別の存在比

表1 ESC818 株及び他の大腸菌株ゲノムの概要

	牛乳由来株 ESC818 ドラフト	牛乳由来株 ESC818 (OgGp9:H18) 染色体	牛乳由来株 プラスミド	K-12 MG1655 染色体	EAEC 042 (O44:H18) 染色体	UPEC UMN026 (O17:H18) 染色体	EHEC Sakai (O157:H7) 染色体
Total Sequence Length (bp):	4,971,560	4,911,390	103,988	4,641,652	5,241,977	5,202,090	5,498,578
GCcontent (%):	50.4	50.6	41.4	50.8	50.6	50.7	50.5
Number of CDSs:	4,591	4,498	106	4,298	4,798	4,802	5,067
Number of rRNAs:	3	22	0	22	22	22	22
Number of tRNAs:	87	93	0	86	93	90	103