

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 5 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・4年度に多角的な解析を行い、完全長ゲノムの取得と詳細なゲノム解析、患者便メタゲノム解析等を行った。令和5年度には、付着因子や菌体外分泌機構がコードされたプラスミド等が本菌の病原性に寄与することが明らかになった。

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、齋藤和輝、木全恵子、磯部順子
国立医薬品食品衛生研究所	大屋賢司、西角光平、廣瀬昌平、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。調査の結果、食中毒発生に關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ゲノムおよびプラスミドの解析

本事例牛乳由来大腸菌 OUT (0gGp9):H18 (ESC818 株) の染色体およびプラスミドを、代表的な病原性大腸菌ゲノムと比較した。染色体およびプラスミド上の付着因子など病原性に関連する領域を、Artemis を用いて各株ゲノムから抽出し、BLASTN でアライメントを作成し Easyfig で可視化した。また、増菌培地での継代によってプラスミド脱落株を作製した。プラスミド脱落株と元株についてゲノム配列間の単一塩基多型 (SNP) 解析を CSI Phylogeny に行った。ESC818 株、プラスミド脱落株、非病原性大腸菌 K-12 (NBRC3301) を Balb/c マウスに腹腔内接種し、7 日間生死を観察し生存率を求めた。実験は、国立医

薬品衛生研究所動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号 910)。

〔2〕プローブを用いた絶対定量系による *eivA* および *eilA* 遺伝子発現量の定量

本食中毒原因食品由来株 (TC49)、患者由来株 (TC78)、完全な ETT2 を保有し、機能解析が実際に行われている腸管凝集付着性大腸菌 (EAEC) 042 を供試した。LB 液体培地を用いた各供試菌株の培養液から RNA 抽出および cDNA 合成を行った。プライマーおよびプローブはウェブサーバ上の Edesign にて設計した。検量線作成には、標的遺伝子全長を PCR にて合成し、段階希釈した DNA を用いた。各 PCR 産物における *eivA* および *eilA* コピー数は、検量線を用いて算出した。

〔3〕細胞傷害性試験

富山市食中毒事例から分離された大腸菌 0gGp9:H18 の病原性解析のため、付着因子の特定および保有する百日咳様毒素 (P1t) の解析を行った。食中毒由来株の付着因子特定のため、プラスミドの各領域の破壊株作製と細胞付着性の解析を行い、その結果から確認された付着に関与する可能性のある遺伝子について破壊株と相補

株を作製し再度付着性の解析を行った。さらに、保有する百日咳様毒素遺伝子 *plt* の破壊株を作製し、本菌株感染時の CHO 細胞の形態的变化の確認、および CHO 細胞から抽出した RNA を用いて C3 (補体) mRNA 発現量を測定し野生株と比較を行った。

C. 研究結果

[1] 富山市事例大腸菌株のゲノムおよびプラスミドの解析

ESC818 株染色体ゲノム環状地図を他の病原性大腸菌株染色体ゲノムと比較したところ、EAEC や尿路原性大腸菌 (UPEC) と共通して保存されている領域が数カ所見いだされた (図 1)。また、ESC818 株は分子量約 104 kb の大プラスミド pESC818 を有しており、付着因子および菌体外分泌機構がコードされていた (図 2)。プラスミド上の付着因子および菌体外分泌機構コード領域の構造は、腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) の保有するプラスミド上の構造と類似していた。(図 3 および 4)。また、菌体外分泌機構は、染色体上にも存在していることが示された (図 4)。SNP 解析の結果、ESC818 株とプラスミド脱落株ゲノム間の SNP は 2 であり、継代によって染色体

ゲノムに変異が入っていないことが確認された (データ示さず)。非病原性大腸菌 K-12、ESC818 株、プラスミド脱落株をマウスに腹腔内接種した結果、K-12 株接種マウスは全数生存し、ESC818 株接種マウスは全数死亡した。また、プラスミド脱落株接種マウスの死亡率は 50%であった。

[2] プローブを用いた絶対定量系による *eivA* および *eilA* 遺伝子発現量の定量

各株において、*eivA* および *eilA* 遺伝子の mRNA がそれぞれ検出された。cDNA 1 ng あたりのコピー数は、各株間で同等であった (図 5)。

[3] 細胞傷害性試験

プラスミド上に存在する *cof* オペロンを含む領域を破壊した株が細胞非付着性を示した。そのため *cofA* 破壊株と相補株を作製し、各株の付着性解析から相補株のみが付着性を示した。野生株で認められた CHO 細胞の形態的变化は *plt* 破壊株では認められなかった。さらに、C3 発現量は野生株にのみ有意な上昇が認められた。(図 6)。

D. 考察

[1] 富山市事例大腸菌株のゲノムおよびプラスミドの解析

令和 4 年度までの成果で、ESC818 株は病原性大腸菌の主要な病原因子はもたないものの、系統的には EAEC や UPEC と近縁であることが示されている。ESC818 株染色体ゲノムと他の病原性大腸菌染色体ゲノムの詳細な比較解析により見いだされた領域は、主要ではないものの病原性に関与する領域であり、ETEC や腸管出血性大腸菌（EHEC）には存在しなかった。また、ESC818 株は、付着因子や菌体外分泌機構をコードする大プラスミドを有することも明らかとなった。ESC818 株をマウスに腹腔内接種すると接種マウスは 100%死亡し、ESC818 株が病原性を有することが示された。プラスミド脱落株の接種では、死亡率は 50%であった。プラスミド脱落株と ESC818 株間の SNP 解析の結果、プラスミド脱落株の染色体には変異が入っていないことが確認されたことから、プラスミド pESC818 は、ESC818 株の病原性に強く関与していることが明らかになった。

〔2〕プローブを用いた絶対定量系による *eivA* および *eilA* 遺伝子発現量の定量

これまで、qRT-PCR の相対定量系では *eivA* および *eilA* 遺伝子の

mRNA 発現量が定量できなかった。*eilA* 遺伝子については、Sheikh らも同様に、ETT2 遺伝子領域を保有する大腸菌において、相対定量系では *eilA* 遺伝子の mRNA が定量できないことを報告している。この理由として、*eilA* 遺伝子の発現量が極めて低いことや、mRNA が不安定であること等が考えられる。本解析において、絶対定量系によって *eilA* 遺伝子における mRNA が検出された。このことから、遺伝子として機能していることが考えられたため、今後は ETT2 遺伝子群の本菌の病原性への関与について解析する。

〔3〕細胞傷害性試験

本菌の細胞付着性は *cof* オペロンがコードする付着因子 CFA/III に起因すると考えられた。また、Plt は CHO 細胞の形態的变化や炎症誘発に寄与している可能性が示唆された。

E. 結論

大腸菌 OUT (0gGp9):H18 の病原性を解明するために、今年度は、本菌の染色体ゲノムを詳細に解析し、主要ではないものの病原性に関与する領域を有することが明らかになった。また、付着因子や菌体外分泌機構をコードする

大プラスミドを有することも明らかとなった。この株はマウスに腹腔内接種すると接種マウスは100%死亡し、病原性を有することが示されたが、プラスミド脱落株では死亡率が半分になり、このプラスミドが病原性に強く関与していることが明らかになった。

また、*eilA* 遺伝子発現量の定量を絶対定量系によって検出可能であることが示され、遺伝子として機能していることが示唆された。さらに、本菌の細胞付着性は *cof* オペロンがコードする付着因子 CFA/III に起因すると考えられ、Plt が CHO 細胞の形態的变化や炎症誘発に寄与している可能性が示唆された。

以上のように、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付着因子や菌体外分泌機構をコードするプラスミド等が寄与することが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Hirose S, Ohya K, Yoshinari T,
Ohnishi T, Mizukami K, Suzuki

T, Lee K, Iyoda S, Akeda Y, Yahata Y, Tsuchihashi Y, Sunagawa T, Hara-Kudo Y. Atypical diarrhoeagenic *Escherichia coli* in milk related to a large foodborne outbreak. *Epidemiol Infect.* 2023;151:e150.

Ohya K, Hirose S, Nishikaku K, Ohnishi T, Lee K, Iyoda S, Kubomura A, Akeda Y, Mizukami K, Suzuki T, Takinami K, Taquahashi Y, Kuwagata M, Kitajima S, Inoue T, Hara-Kudo Y. Genomic features and pathogenicity of atypical diarrheagenic *Escherichia coli* from a large foodborne outbreak. (投稿中)

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

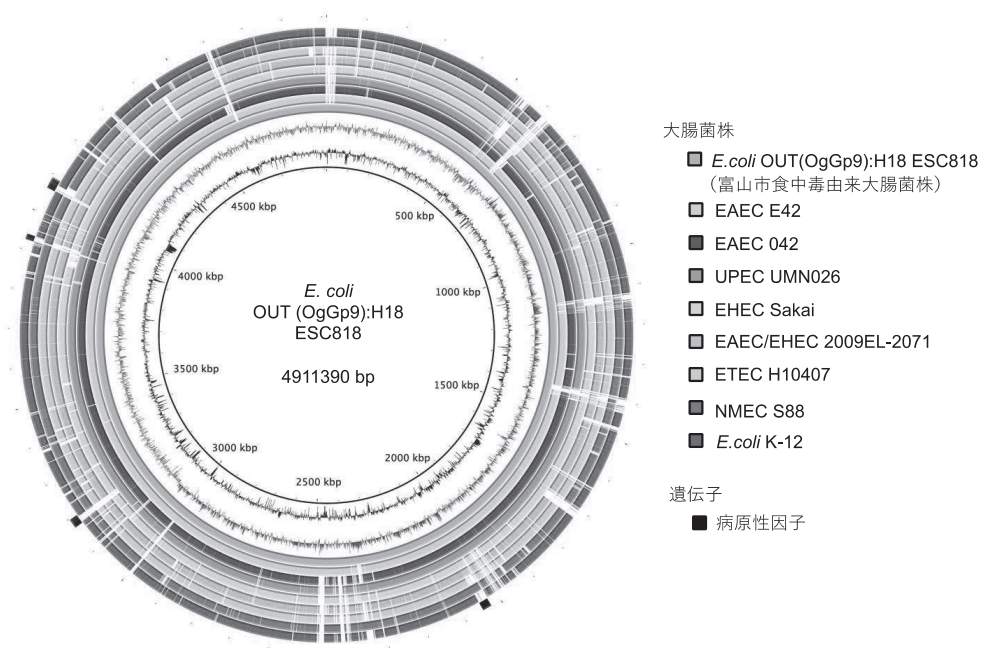


図 1 富山市食中毒由来大腸菌株と関連株の染色体比較

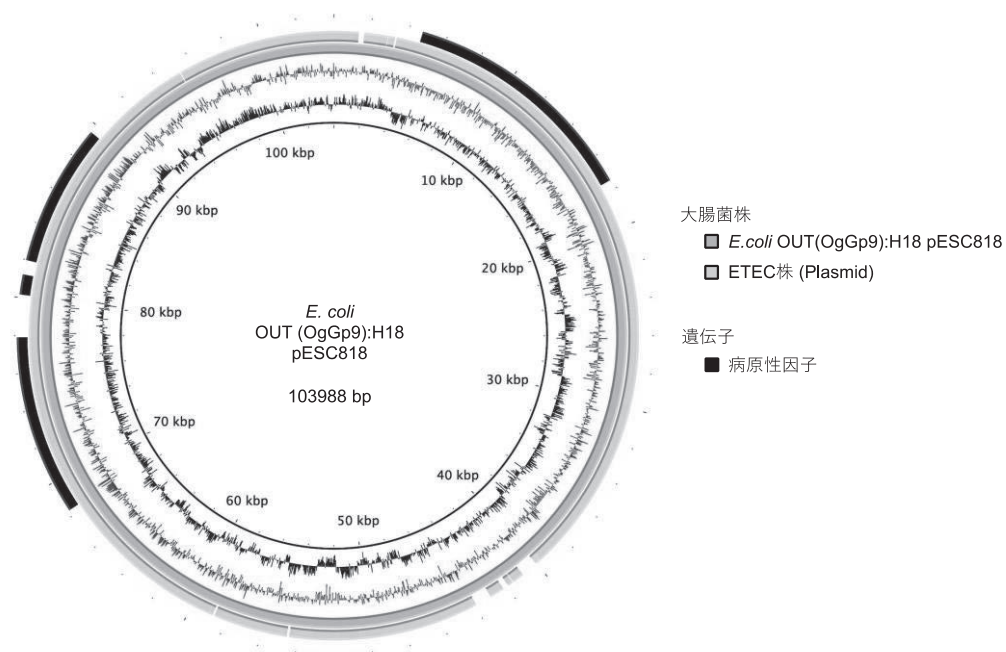


図 2 富山市食中毒由来大腸菌株と関連株のプラスミド比較

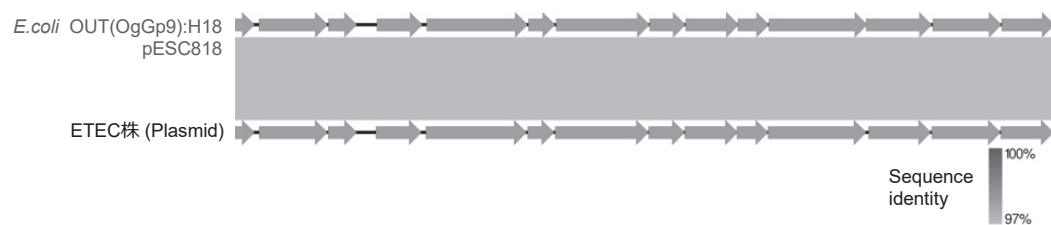


図3 プラスミド上の付着因子コード領域のゲノム比較

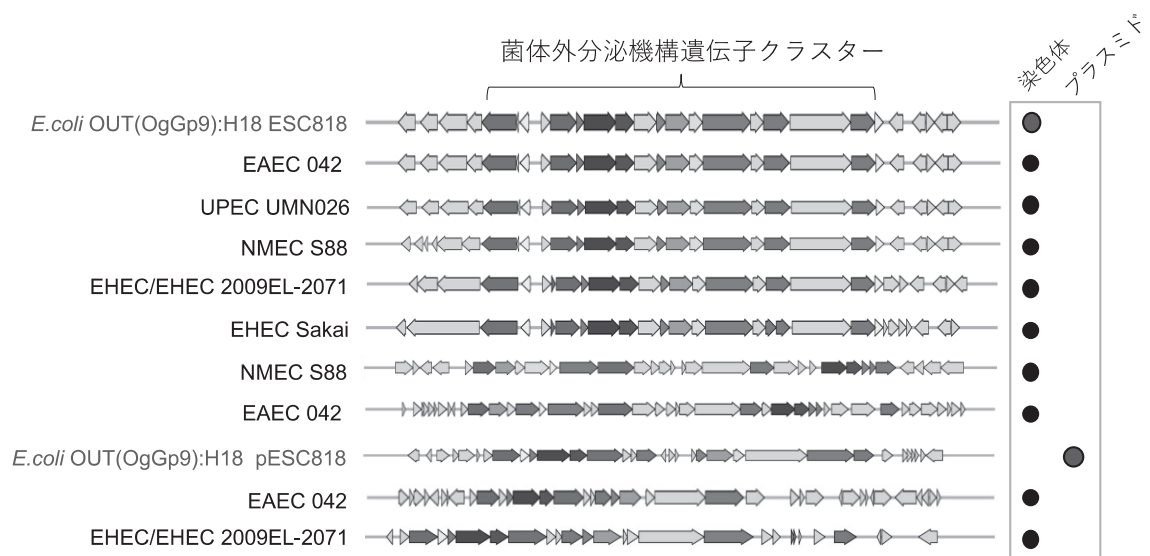


図4 菌体外分泌機構コード領域のゲノム比較

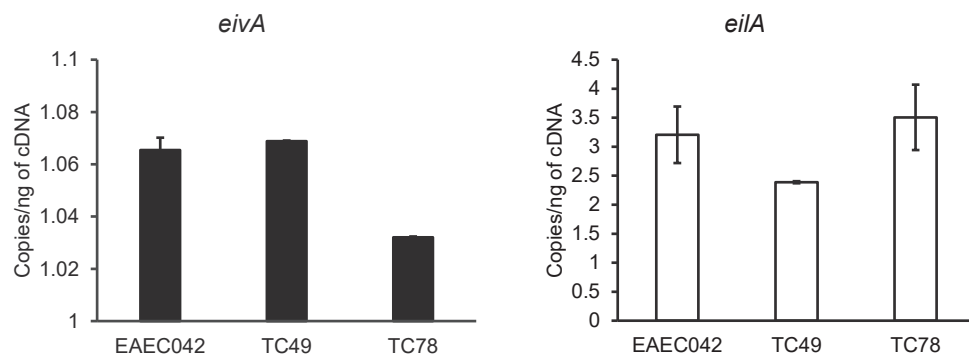
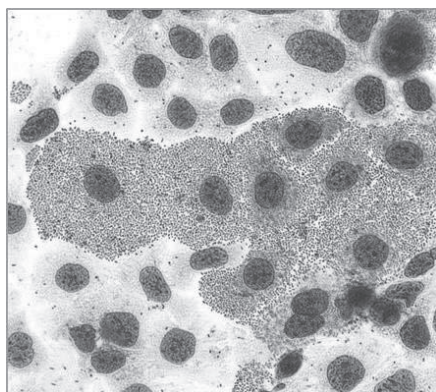
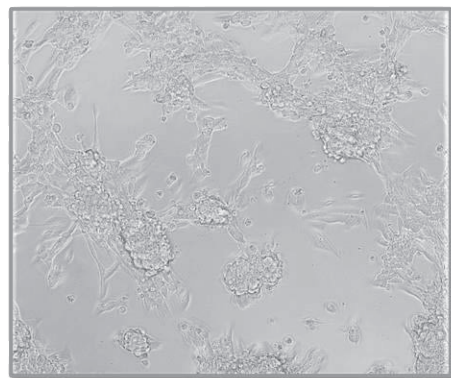


図5 プローブを用いた絶対定量系による *eivA* および *eilA* 遺伝子発現量の定量 (2連で行った実験より得られた測定値から平均値±標準偏差を算出した。3回の独立した実験を行い、その代表的なデータを示す。)



(a) 富山株の Caco-2 細胞付着像



(b) 富山株の菌液を接種した CHO 細胞



(c) 富山株の *pltA* 破壊株の菌液を接種した CHO 細胞

図6 CHO 細胞での菌の付着性および形態的变化