

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 ～ 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 (O 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、同一クローンであることが明らかになり、本事例の便検体をメタゲノム解析した結果、事例株が優占して存在することが示された。また、本事例株は動物モデル実験によってマウス致死性を示すことが明らかになった。さらに、詳細なゲノム解析の結果、本菌株は典型的な病原性関連遺伝子は保有しないものの付着因子や菌体外分泌機構がコードされたプラスミドを保有していること、染色体上の他因子についても知見が得られた。加えて、本プラスミド脱落株ではマウス致死性が半減することから本プラスミド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、綿引正則
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。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、食中毒発生に関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 (O 血清型別不能) :H18 であり、O 抗原遺伝子型別 O-genotyping では OgGp9 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 (OgGp9) :H18 が優勢大腸菌として分離され、病因物質が大腸菌 OUT (OgGp9) :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。

B. 研究方法

[1] 菌株ゲノムの解析

(1) ゲノムの遺伝子型別

感染研では本事例牛乳および患者由来株の全ゲノム配列を用いて、MLST (multi locus sequence typing)、血清型予測等の遺伝子型別および SNP 解析を実施した。

(2) ゲノムおよびプラスミドの解析

感染研、富山衛研、国衛研で本事例由来株のゲノム上の病原性関連遺伝子の検索を各機関の方法で行った。また、本事例株の完全長ゲノムを取得するために、長鎖ゲノム DNA を用いてロングリード配列を取得し、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、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。

(3) 大腸菌の Type III 分泌系遺伝子群 ETT2 発現の確認

富山衛研では、本食中毒由来株の ETT2 に含まれる *eivA* および *eilA* 遺伝子発現量の定量的ためのプライマーおよびプローブを設計した。[2] 有症者由来便のメタゲノム解析

食 k 品工場従事者 (*E. coli* OgGp9 分離なし) および有症者 (*E. coli* OgGp9 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。便サンプル中大腸菌における、事例株 (*E. coli* OgGp9) 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。実験は、国立医薬品衛生研究所研究倫理審査委員会の承認を得て行った (承認番号 355)。

[3] 培養細胞への感染実験

本事例患者由来株、対照菌株として腸管凝集性大腸菌、腸管侵入性大腸菌、病原性の知られていない大腸菌である実験室株 K12 等を供試した。Hep-2 細胞、CAC0-2 細胞、HeLa 細胞などを試験ごとに供試した。細胞付着性試験、細胞侵入性試験、細胞膜透過性試験、細胞傷害性試験を定法にしたがって実施した。また、付着に関与する可能性のある遺伝子について破壊株を作製し付着性の解析などを行った。

[4] 動物モデル実験

富山市食中毒事例牛乳由来株および患者由来株、病原性株として腸管毒素原性大腸菌など、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。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では、定法にしたがって実施した。マウスへの腹腔内投与試験では、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浮遊液 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った。コモンマーモセットへの経口投与試験では、コモンマーモセット 3 頭へ 10^9 CFU/mL の濃度に調製した患者由来株または牛乳由来株浮遊液 0.5 mL を経口投与した。投与後経時的に各個体を観察し、採取した糞便中の投与菌の測定を実施した。すべての実験は国立医薬品食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：846 (ウサギ)、910 (マウス)、945 (コモンマーモセット)]。

C. 研究結果

[1] 菌株ゲノムの解析

(1) ゲノムの遺伝子型別

感染研で行った SNP 解析の結果、牛乳由来株と患者由来株は 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:H7、MLST では ST1380、phylogenetic group では D と型別された。

(2) ゲノムおよびプラスミドの解析

本事例大腸菌株 ESC818 株の病原性関連遺伝子を探索した結果、*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) は、感染研、富山衛研、国衛研のいずれでの解析によっても検出されなかった。また、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、*air*、*eilA* および莢膜合成遺伝子群 *kps* クラスターなど腸管凝集付着性大腸菌 (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複数カ所見いだされた。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。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。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。

(3) 大腸菌の Type III 分泌系遺伝子群 ETT2 発現の確認

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。特に、プローブを用いた絶対定量系によって *eivA* および *eilA* 遺伝子の mRNA がそれぞれ検出された。

[2] 有症者由来便のメタゲノム解析

メタゲノム解析の結果、有症者では *Escherichia* 属菌の割合が 3.6%、*Campylobacter* 属菌が 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。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、大腸菌の大部分

は事例株であることが示唆された。

[3] 培養細胞への感染実験

本事例由来株では、陽性対照と比べて明確な特異的な凝集性の付着、細胞侵入性および細胞透過性は認められなかった。しかし、細胞付着が認められ、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。

[4] 動物モデル実験

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では、明らかな陽性反応は認められなかった。しかし、マウスへの腹腔内投与試験では、本事例由来株投与後 2 日目までに約 70-90% が死亡し、陽性対照の ETEC の投与では 90% 以上が死亡し、陰性対照の K12 株では死亡しなかった。また、微生物試験に使用される NBRC3972 を投与したマウスは投与後 2 日目までに約 50% が死亡した。コモンマーモセットへの経口投与試験では、3 頭ともに下痢を発症しなかったが、うち 1 頭で投与後 11 日目まで $10^{4.9}$ から $10^{9.2}$ CFU/g、別の 1 頭で投与後 15 日目まで $10^{3.5}$ から $10^{9.5}$ CFU/g、さらに別の 1 頭で投与後 28 日目まで $10^{5.2}$ から $10^{8.7}$ CFU/g で便中に菌の排出が認められた。

また、本事例株のプラスミド脱落株をマウスに腹腔内接種した結果、マウスの死亡率は 50% であり、プラスミド保有株では接種後マウスは全数死亡した。

D. 考察

[1] 菌株ゲノムの解析

感染研の解析では、牛乳由来株および患者由来株は、SNP 解析から同一クローンであると考えられた。感染研および国衛研の解析では、両株

のゲノム上には、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。本事例株の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、本事例株は、付着因子や菌体外分泌機構をコードする特徴的なプラスミドを有することが明らかとなった。このため、プラスミド脱落株を作製し、本事例株の示す動物モデル実験での病原性への関与を検証することとした。さらに、Type III 分泌系の病原因子遺伝子群 ETT2 発現の確認のために、特に *eivA* および *eilA* 遺伝子発現量を定量するための絶対定量系を確立した。測定の結果、*eilA* 遺伝子における mRNA が検出され、遺伝子として機能していることが考えられた。

[2] 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。有症者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（食品工場従事者で大腸菌非分離、有症者で分離）と一致した。また、食品工場従事者のサンプルでは、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。

[3] 培養細胞への感染実験

培養細胞への付着試験では、凝集性の付着ではない細胞付着性が認められた。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。

[4] 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、ETEC 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。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ことが示された。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、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。

また、マウスへの腹腔内投与試験では、本菌が保有するプラスミドを脱落させた株を投与したところ、死亡率は約半分に減少し、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。

E. 結論

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 (O 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、同一クローンであることが明らかになった。2) 本事例の便検体をメタゲノム解析した結果、事例株が優占して存在することが示唆された。3) 培養細胞への感染実験の結果、侵入性は観察されなかったが、付着性については CFA/III が関与することが示唆された。4) 動物モデル実験の結果、マウス致死性を示すことが明らかになった。5) ゲノムおよびプラスミドの解析の結果、本菌株は典型的な病原性関連遺伝子は保有しないものの付着因子や菌体外分泌機構がコードされたプラスミドを保有していること、*eilA* 遺伝子発現についても知見が得られた。6) 本プラスミド脱落株の動物モデル試験の結果、マウス致死性が半減することから本プラスミドが本菌の病原性に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)

廣瀬昌平、大屋賢司、吉成知也、大西貴弘、工藤由起子、水上克己、鈴

木富勝、瀧波賢治、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏、八幡裕一郎、土橋酉紀、砂川富正．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.

水上克己、黒崎薫、楠秀子、江戸岳夫、横田夏生、桐溪茜、柴野真由美、鈴木富勝、瀧波賢治、屋賢司、廣瀬昌平、吉成知也、大西貴弘、工藤由起子、八幡裕一郎、土橋酉紀、砂川富正．富山市の学校給食における牛乳を原因とする食中毒事例疫学調査解析．病原微生物検出情報．43(10), 16-18, 2022.

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

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：佐々木えりか博士、井上貴史博士
国立医薬品食品衛生研究所 毒性部：北嶋聡博士、栞形麻樹子博士、動物管理室：高橋祐次博士