

令和4年3月17日

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会

富山市集団食中毒の原因食品からの原因物質調査と 大腸菌分離株の病原性について

国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部

原因物質調査

富山市保健所から依頼

冷凍牛乳 200 mLパック（提供日：14日、15日、16日）

毒素型食中毒：

牛乳

ブドウ球菌エンテロトキシン

VIDASキット A～E型

逆受け身ラテックス凝集キット

セレウス菌エンテロトキシン

逆受け身ラテックス凝集キット

ウェルシュ菌エンテロトキシン

逆受け身ラテックス凝集キット

セレウス嘔吐毒（セレウリド）

LC-MS/MS

牛乳の増菌培養液

黄色ブドウ球菌分離

セレウス菌の分離

（セレウリド産生株）

陽性

ただし、全日の牛乳から分離

陰性

感染型食中毒：

主症状は下痢、腹痛、発熱、嘔吐

サルモネラ属菌

Listeria

monocytogenes

Escherichia albertii

選択増菌培養

遺伝子検出

選択分離培養

陰性

病原大腸菌

選択増菌培養

選択分離培養

15・16日両日の寒天培地上に多数の大腸菌コロニーの生育、大腸菌株の分離

O抗原：血清凝集試験ではO群別不能(OUT)

O-genotypingでは **OgGp9**（該当する血清型は O17, O44, O73, O77, O106）

H抗原：H18

大腸菌OUT(OgGp9):H18

このうち、従業員2名と患者61名では試験したほとんどの大腸菌コロニーが該当

富山市保健所から便検体培養平板培地

従業員6名（無症状）と患者64名便検体の大腸菌用分離培地上の生育コロニーを調査

牛乳中の大腸菌OgGp9および細菌の解析

牛乳パックの大腸菌OgGp9汚染率

給食提供日	製造日	OgGp9陽性率
6月14日 (月)	6月11日 (金)	0%
6月15日 (火)	6月14日 (月)	約50%
6月16日 (水)	6月15日 (火)	約90%
6月17日 (木) 未提供	6月16日 (水)	約30%

- ・ 6月14日提供の牛乳からは検出されなかった。
- ・ 6月15日、16日提供、17日未提供の牛乳から検出された。

牛乳検体中の大腸菌OgGp9定量値の解析

給食提供日	製造日	OgGp9:H18	生菌数
		定量値(MPN/100 mL)	定量値(MPN/100 mL)
		平均	平均
6月14日 (月)	6月11日 (金)	—	約700
6月15日 (火)	6月14日 (月)	約10	約300
6月16日 (水)	6月15日 (火)	約10	約600
6月17日 (木) 未提供	6月16日 (水)	約10	約20,000

- ・大腸菌OgGp9のMPN値は、100 mLあたり約10であり、15・16日提供、17日提供予定の牛乳間で大きな差はなかった。
 - ・生菌数のMPN値は、14日、15日、16日提供の牛乳間で大きな差はなかった。
 - ・上記から、生菌数と大腸菌OgGp9の汚染菌数には相関は認められなかった。
- 14日、15日、16日提供の牛乳での製造時の殺菌効率は同等であったことが考えられる。

大腸菌OgGp9の特性解析（牛乳由来株）

耐凍性

牛乳100 mLあたり約3 log CFUを接種
約-30°Cで冷凍保管

1日後：1 logの減少または減少なし
4週間後：最大1 log以下の減少

凍結による菌数の大きな減少は
認められなかった。

増殖性

牛乳中25°Cおよび37°C下

大腸菌NBRC3972、腸管凝集性
大腸菌と同様の増殖性を示した。

増殖性に特徴はなかった。

耐熱性

牛乳中65°C下での菌数減少
1分で5 log以上の減少

K-12、腸管出血性大腸菌O157、
腸管毒素原性大腸菌と同等または
早い

耐熱性は認められなかった。

耐酸性

緩衝ペプトン水(pH 7.0, 4.0, 3.0, 2.5)中、
37°C 3h攪拌

pH2.5において

大腸菌K-12では、約 1 log 減少
食品由来株では、約 3 log 減少

富山市食中毒牛乳由来株では、減少なし
腸管出血性大腸菌O157では、減少なし
腸管毒素原性大腸菌では、減少なし

腸管出血性大腸菌等と同程度の
耐酸性が認められた。

原因食品からの原因物質調査のまとめ

- 原因と考えられる牛乳から黄色ブドウ球菌、セレウス菌、ウエルシュ菌の各エンテロトキシン、セレウス嘔吐毒は検出されなかった。
- また、下痢を主徴とする感染型食中毒細菌であるサルモネラ属菌、*Listeria monocytogenes*および*Escherichia albertii*は分離されなかった。
- しかし、大腸菌OUT(OgGp9):H18が、15・16日提供の牛乳から分離され、従業員6名中2名、患者64名中61名からも優勢な大腸菌として分離され、原因物質の可能性が考えられた。
- 大腸菌OUT(OgGp9):H18の牛乳汚染菌数は、100 mLあたり約10-20であった。
- 牛乳中の大腸菌OUT(OgGp9):H18の菌数や生菌数、大腸菌OUT(OgGp9):H18の性質などから考察すると、15・16日の牛乳の殺菌効率は14日と同等であり、本菌の牛乳汚染は殺菌後であった可能性が考えられた。

大腸菌OgGp9のゲノム解析

富山食中毒株ゲノム配列の取得・概要

株名	蛋白質コード配列 (CDS) 数
牛乳由来株 (No.5)	約4,600
患者由来株 (No.14)	

<i>E. coli</i> K12 MG1655	約4,300
<i>E. coli</i> NBRC3972 (ATCC8739)	

<i>E. coli</i> O157:H7 Sakai (EHEC)	約5,000
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009 (EHEC)	
<i>E. coli</i> 55989 (EAggEC)	
<i>E. coli</i> O44:H18 042 (EAggEC)	

SNP解析

・1か所のSNPのみ検出され、NIHS Ec5 (牛乳由来株) とNIHS Ec14 (患者由来株) は同一クローンであると考えられる。

系統等の解析

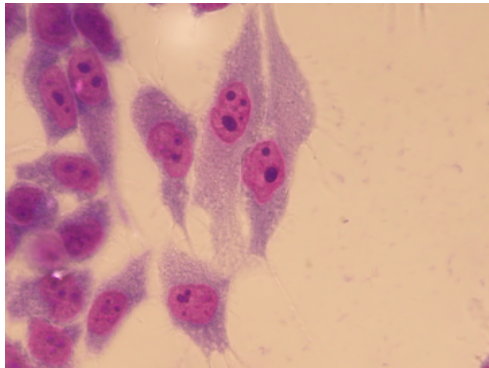
- ・予想される血清型は O17/O77:H18
- ・データベース上には近縁な株は存在しない

遺伝子保有状況

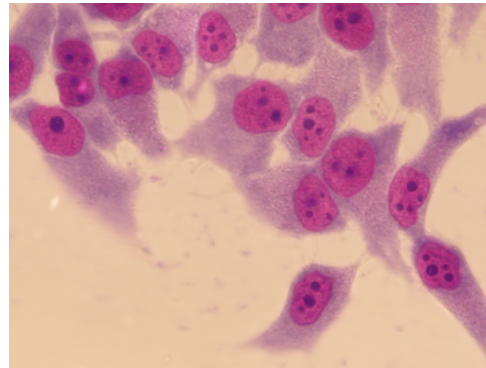
- ・主要な病原大腸菌の病原性関連遺伝子を保有しない。
- ・保有する病原性関連遺伝子の予測される機能付着因子、線毛、莢膜、鉄取り込みなど

○ 付着性試験（Hep-2細胞・1%マンノース存在下）

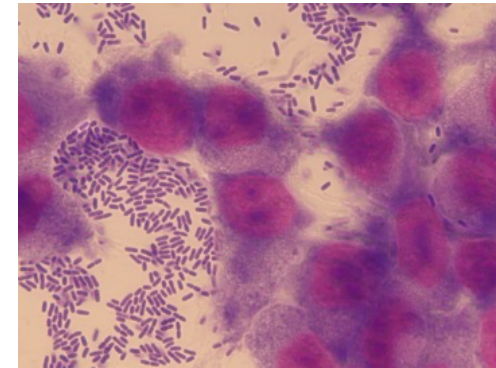
- 牛乳由来、患者由来株とも付着性は認められた
- 腸管凝集付着性大腸菌に特異的な凝集性の付着は観察されなかった



牛乳由来



患者由来



腸管凝集付着性大腸菌

○ 侵入性試験（Hep-2細胞・1%マンノース存在下）

- 腸管凝集付着性大腸菌と同程度の回収菌数が得られた
- 細胞侵入性細菌であるサルモネラと比較して顕著な侵入性は認められなかった

○ 細胞膜透過性試験（Caco-2細胞）

- 分化したCaco-2細胞に感染後、膜抵抗値を経時的に測定
- 細胞膜透過性の亢進は認められなかった

動物モデル試験

マウスへの腹腔内投与試験

致死率

菌株 (投与菌数: 10 ⁸ CFU/匹)	投与後経過日数(日)		
	1	2	3
K12	0%	0%	0%
NBRC3972	約10%	約50%	約50%
富山牛乳No.5	約50%	約90%	約90%
富山患者No.14	約20%	約70%	約80%
ETEC	約80%	約90%	約90%

富山市食中毒由来大腸菌の致死性は、ETECより低く、微生物試験に使用されている大腸菌株NBRC3972およびK-12よりは高い結果であった。

コモンマーモセットへの経口投与試験

試験菌株：富山市食中毒牛乳由来株No.5

投与後、下痢や糞形状変化は認められなかった。
投与後28日目まで糞から大腸菌OgGp9が検出され、腸管に定着していることが考えられた。

大腸菌OgGp9の病原性解析のまとめ

● 遺伝子解析

主要な病原大腸菌の病原性関連遺伝子を保有しないものの、付着性や莢膜関連の複数の病原性関連遺伝子の保有が認められた。

● 細胞への感染試験

付着性が認められた。サルモネラと比較すると顕著な侵入性は認められなかった。細胞膜透過性亢進は認められなかった。

● 動物モデル試験

マウスへの腹腔内投与で致死性が認められた。致死性は、ETECより低く、微生物試験に使用されている大腸菌株NBRC3972およびK-12よりは高い結果であった。

コモンマーモセットの腸管に定着が認められた。

これらの結果から、分離された大腸菌OgGp9は病原性を有する大腸菌であることが示唆された。

総 括

- 牛乳からは食中毒原因となる細菌毒素や主要な食中毒細菌は検出されなかった。
- 食中毒の原因と考えられる牛乳および多くの患者から大腸菌OUT(OgGp9):H18が分離された。
- 本大腸菌は、付着性や莢膜関連の複数の病原性関連遺伝子を保有し、細胞感染試験での細胞への付着性、マウス腹腔内投与での致死性、コモンマーモセット経口投与での腸管定着性が認められたことから、病原性を有することが考えられた。
- これらの結果から、病因物質は病原大腸菌OUT(OgGp9):H18である可能性が考えられた。
- 今後、本大腸菌の病原性に関してさらに調査・研究を行う予定である。