

厚生労働科学研究費（食品の安全確保推進研究事業）

広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及び
ゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究

離島コホート研究

研究分担者 大西 真 沖縄県衛生環境研究所 感染症研究センター 室長
協力 沖縄県衛生環境研究所 久手堅 剛、平良 遥乃

研究要旨

EHEC 感染症高頻度市町村のうち 2 地域を選定し、それぞれの地域のウシ糞便を収集した。まず、1 地域各 50 検体を収集し増菌培養後ベロ毒素遺伝子 (*stx*) 陽性率を求めた (A 市 0%、B 市 38%)。 *stx* 陽性 19 検体から計 9 株の EHEC 株が分離された。また、2023 年に主に子ウシ舎での業務にあたっていた従業員が EHEC 感染症(O26, *stx1*)に罹患した農場において、子ウシからの糞便 30 検体を収集し解析した。結果、22 検体で PCR 法陽性を確認し、14 検体から *stx* 陽性菌株 15 株の分離に成功した。その内 O26, *stx1* 陽性 1 株について MLVA を実施したところ、2023 年の従業員由来分離株と 1 loci 違いだった。引き続きウシ分離株を収集し、ヒト由来株のゲノム比較解析を進めていくことで沖縄県の EHEC の原因分析につながる可能性がある。

A. 研究目的

EHEC 感染症、食中毒事例の原因となる EHEC 菌株の原因食材等の究明は、EHEC 感染症発症に必要な菌数が非常に少ないこと等から探索が困難である。そのため、EHEC 菌株の分離を伴う感染源の同定や発症と原因食材等との関係性など、明確な理解に至っていない。そこで、本分担研究では、沖縄県内の離島をフィールドとして離島コホート研究を実施する。

B. 研究方法

2023 年に引き続き、沖縄県における人口あたり EHEC 報告数及びウシ飼養数の多い 2 つの離島地域に焦点をあて 2024 年 4 月から 9 月に A 地域及び B 地域において、ウシの糞便各 50 検体合計 100 検体を収集した。なお、2023 年

にも同数の検体を収集しており、累計で 200 検体となった。

加えて、2023 年に主に子ウシ舎での業務にあたっていた従業員が EHEC 感染症(O26, *stx1*)に罹患した農場において、子ウシからの糞便 30 検体を収集した。

検体の増菌培養：ウシの糞便 1 白金耳量を緩衝ペプトン水 (BPW) および mEC 培地に接種し、それぞれ 37°C、42°Cで一晩培養した。

リアルタイム PCR によるベロ毒素遺伝子(*stx*)スクリーニング：培養液をボイルし DNA を抽出後、*stx* 検出リアルタイム PCR を実施した。

EHEC 分離：リアルタイム PCR で陽性となった培養液を X-MG 培地及びクロモアガー STEC 培地に接種し、増菌培養と同じ温度で一晩培養した。

発育したコロニーからアルカリ熱抽出により DNA を抽出し、*stx*, *eae* 及び O 抗原遺伝子 (O157, O111, O103, O26, O145, O165, O121) 検出コンベンショナル PCR (MP1 Plus) を実施した。

stx もしくは O 抗原遺伝子陽性となった菌株を LB 培地にて純培養し、グリセロール加 TSB にて -80℃ で保存した。

子ウシから分離した O26, *stx1* 陽性 1 株については、患者との遺伝的関連を確認するため、MLVA 法を実施した。

2023 年、2024 年に分離された株については、本研究班分担研究者の中村 (九州大学) へ送付し、Nanopore シーケンサーによりゲノム解析を実施し、血清型、*stx* subtype, *eae* type を決定した。

(倫理面への配慮)

C. 研究成果

A 市および B 市で飼養されるウシの EHEC 保有率

ウシの糞便 1 白金耳量を BPW および mEC 培地を用いて培養した増菌液から DNA を抽出し、*stx* 検出リアルタイム PCR を実施した結果、2024 年に収集した 100 検体中 19 検体で *stx* が検出された。*stx* 陽性となった検体はすべて B 市で収集された検体だった。*stx* 陽性検体から *stx* 保有菌株の分離を試みたところ、9 株の EHEC が分離された。2023 年と 2024 年を合わせると、*stx* 陽性は、A 市 100 検体中 6 検体、B 市 100 検体中 45 検体であり、A 市からは 2 株、B 市からは 22 株が分離された。その内訳を表 1 に示した。

O-genotyping についての結果としては、2024 年は、Og157 が 2 株分離されたが、7 株はシグナルを得ることができず、MP1 Plus で推定

できる O 群以外であると判定した (OgNT)。2023 年の結果と合わせると 24 株中 19 株が OgNT、つまりヒトから分離される EHEC の頻度の高い 7 つの血清群ではないことが示された。

stx1 陽性株が 2 株 (22.2%)、*stx2* 陽性株が 8 株 (88.9%)、うち両毒素遺伝子陽性株は 1 株であった。*eae* 陽性株は 3 株 (33.3%) 存在した。2023 年と 2024 年の分離株のゲノム解析を実施したところ、OgNT だった 19 株は 13 種類の血清型に分けられ、2 株は O 型別不能 (OUT) だった。その内訳を表 2 に示した。

EHEC 陽性患者が従事した農場の子ウシの EHEC 保有率とヒト由来株との遺伝的関連

ウシの糞便 1 白金耳量を BPW および mEC 培地を用いて培養した増菌液から DNA を抽出し、*stx* 検出リアルタイム PCR を実施した結果、30 検体中 22 検体 (73.3%) で *stx* が検出された。*stx* 陽性検体から *stx* 保有菌株の分離を試みたところ、14 検体 (46.7%) から 15 株の EHEC が分離された。その内訳は OgNT, *stx2* 陽性が 11 株、OgNT, *stx1*, *eae* 陽性が 3 株、Og26, *stx1*, *eae* 陽性が 1 株だった。ゲノム解析を実施したところ、OgNT だった 14 株は 7 種類の血清型に分けられ、O116:H16, *stx2a* 陽性が 7 株だった。その内訳を表 3 に示した。なお、OgNT, *stx2* 陽性だった 1 株は現在再度ゲノム解析中である。

このうち、O26:H16, *stx1a* について、MLVA を実施したところ、当該農場の子ウシ舎で業務していた EHEC 陽性患者と 17 loci 中 16 loci が一致し、不一致だった loci (O157-9) は 1 リピート違いだった。

D. 考察

2024 年は、100 頭のウシ糞便検体から 9 株の EHEC (STEC) が分離され、2023 年の 15 株

と合わせて累計 24 株の分離に成功した。これらの分離株は国立感染症研究所細菌第一部と共有し、それぞれの施設で保管することとした。また、ゲノム配列情報は、本研究班分担研究者である中村（九州大学）に依頼して取得してもらい、国立感染症研究所細菌第一部、中村（九州大学）と共有した。菌株およびゲノムデータは解析終了後速やかにナショナルバイオリソースプロジェクト 病原細菌拠点および公的データバンク（DDBJ）への登録を予定している。広く活用できるようにすることで、今後の領域発展に貢献できると考える。

EHEC 患者が従事していた農場における子ウシ糞便の *stx* 陽性率は 73.3%と非常に高かった。2023 年に分離されたヒト患者由来株と 2024 年に分離された子ウシ由来株 (O26:H16, *stx1a* 陽性は近縁な系統であることが MLVA により明らかとなり、当該患者はウシから感染したことが疑われた。これらの結果を当該農場主、農場管理獣医師、保健所へ情報共有し、農場従業員へ EHEC 感染症の注意喚起を行った。また、約一年間近縁な系統が農場で維持されていたことから、今後、同農場で、母ウシおよび子ウシから EHEC を分離し、遺伝的系統を比較することで、EHEC の農場内汚染実態の把握と、感染経路の推定を行い、具体的な対

策に活かす予定である。

沖縄県のヒトの EHEC 感染症例由来の株のゲノムデータに関して、本研究班代表明田らと連携して取得を現在進めている。これらヒト由来 EHEC とウシ由来 EHEC との比較解析、さらには沖縄県以外でのヒト症例由来 EHEC との比較解析を同時に進めていく必要がある。

- E. 結論
2023 年から 2024 年までに、ウシ糞便から EHEC 株の分離を試み 24%の検体から株分離に成功した。引き続きウシ分離株を収集し、ヒト由来株のゲノム比較解析を進めていく。これらのデータから沖縄県の EHEC の原因分析につながる可能性がある。
- F. 健康危険情報
特になし
- G. 研究発表
1. 論文発表 0 件
2. 学会発表 0 件
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

表 1 ウシ由来 EHEC 分離株の性状

地域	O-genotyping	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	2023	2024
A	OgNT		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	1	0
A	OgNT	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	1	0
B	Og157		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	2	2
B	OgNT		<i>stx2</i>		5	5
B	OgNT		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	1	0
B	OgNT	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>		1	1
B	OgNT	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	2	1

B	OgNT	<i>stx1</i>			1	0
B	O111	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	1	0

表 2 ゲノム解析によるウシ由来 EHEC 分離株の血清型、*stx* typing

地域	血清型	<i>stx1</i> subtype	<i>stx2</i> subtype	<i>eae</i> type	2023 年	2024 年
A	O156:H25	<i>stx1a</i>		<i>zeta3</i>	1	0
A	O109:H10		<i>stx2a</i>	<i>iota1</i>	1	0
B	O157:H7		<i>stx2c</i>	<i>gamma1</i>	2	2
B	O109:H16		<i>stx2a</i>	-	2	0
B	O174:H21		<i>stx2c</i>	-	1	0
B	O104:H7		<i>stx2a</i>	-	1	0
B	O111:H8	<i>stx1a</i>		<i>theta</i>	1	0
B	O177:H25		<i>stx2c</i>	<i>beta1</i>	1	0
B	O156:H25	<i>stx1a</i>		<i>zeta3</i>	1	1
B	O88:H25	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	-	1	0
B	O181:H49		<i>stx2a</i>	-	0	1
B	O181:H51		<i>stx2a</i>	-	1	0
B	O109:H10		<i>stx2a</i>	<i>iota1</i>	0	0
B	OgGp3(O118/O151):H16	<i>stx1a</i>		<i>beta1</i>	1	0
B	O8:H4	<i>stx1a</i>	<i>stx2d</i>	-	0	1
B	O8:H8		<i>stx2a, stx2d</i>	-	0	1
B	O171:H2		<i>stx2d</i>	-	0	2
B	OUT:H20		<i>stx2g</i>	-	0	1
B	OUT:H7	<i>stx1a</i>		-	1	0

表 3 ゲノム解析による子ウシ由来 EHEC 分離株の血清型、*stx* typing

血清型別	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	検出数
O26:H11	<i>stx1a</i>			1
O104:H7		<i>stx2a</i>	-	1
O116:H16		<i>stx2a</i>	-	7
OgGp3(O118/O151):H16	<i>stx1a</i>		<i>beta1</i>	1
O171:H2		<i>stx2d</i>	-	1
O5:H9	<i>stx1a</i>		<i>beta1</i>	1
O84:H2	<i>stx1a</i>		<i>zeta3</i>	1