

別添 4

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

人口当たり STEC 感染症届け出数が多い市町村のうち 2 地域を選定し、それぞれの地域のウシ糞便を収集した。令和 7 年度は A 地域の 1 農場および B 地域の 3 農場から計 114 検体を採取し、加えて令和 6 年度に引き続き B 地域の食肉センターより 50 検体を収集したところ増菌培養後ペロ毒素遺伝子 (*stx*) 陽性率は農場由来検体で 91.2%、食肉センター由来検体で 24%だった。*stx* 陽性 116 検体から計 105 株の STEC 株が分離された。分離株のうち、A 地域の農場のウシから分離された O157:H7 の MLVA を実施したところ、2024 年に発生した集団感染事例と 1 locus 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 STEC の原因分析につながる可能性がある。

A. 研究目的

STEC 感染症、食中毒事例の原因となる STEC 菌株の原因食材等の究明は、STEC 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、STEC 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

2024 年に引き続き、沖縄県における人口あたり STEC 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 2025 年 5 月から 10 月に B 地域の食肉センターにおいて、ウシの糞便各 50 検体を収集した。なお、2023 年、2024 年にも検体を収集しており、累計で 250 検体

となった。

加えて、2023 年に従業員が STEC 感染症(O26, *stx1*)に罹患した B 地域の農場において、ウシの糞便を 2024 年は 30 検体を収集したが、2025 年は引き続き約 3 カ月おきに計 79 検体を収集した。さらに A 地域においても 3 農場から計 35 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 によるペロ毒素遺伝子(*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。

STEC 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ボイル抽出により DNA を抽出し、上記リアルタイム PCR を実施し、陽性コロニーについて *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°Cで保存した。

ウシから分離した O157:H7 の 3 株、O111:H8 の 2 株については、患者との遺伝的関連を確認するため、MLVA を実施した。また、O116:H16 株について core genome Single Nucleotide Polymorphism (SNP)解析を実施した。

2024 年、2025 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するとともに、外部委託によりショートリードシーケンスを実施し、血清型、*stx* subtype, *eae* type を決定した。

（倫理面への配慮）

ウシからの菌株分離とその解析のため研究倫理申請は必要ない。調査地域および農場名については匿名化した。

C. 研究成果

A, B 地域の食肉センターでサンプリングしたウシの STEC 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、2025 年に収集した 50 検体中 12 検体で *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、6 株の STEC が分離された。2023-2025 年を合わせると、増菌液にお

ける *stx* 陽性は、A 地域 100 検体中 6 検体、B 地域 150 検体中 57 検体であり、A 地域からは 2 株、B 地域からは 28 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、2025 年は、6 株全て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）。2023-2024 年の結果と合わせると 30 株中 25 株が OgNT、つまりヒトから分離される STEC 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 8 株（26.7%）、*stx2* 陽性株が 24 株（80.0%）、うち両毒素遺伝子陽性株は 2 株であった。*eae* 陽性株は 11 株（36.7%）存在した。2023-2025 年の分離株（再解析中 3 株を除く）のゲノム解析を実施したところ、OgNT だった 22 株は 18 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。

A, B 地域の特定農場におけるウシの STEC 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、A 地域 3 農場 35 検体中 32 検体(91.4%)、B 地域 1 農場 79 検体中 72 検体で *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、A 地域 3 農場 25 検体(71.4%)から 29 株の STEC が、B 地域 1 農場 54 検体（77.1%）から Og157, *stx2*, *eae* 陽性 3 株および Og111, *stx1*, *eae* 陽性 2 株を含む 70 株の STEC が分離された。2024 年の分離株と合わせてその内訳を表 3 に示した。現在解析中の 24 株を除く 46 株のゲノム解析を実施したところ、OgNT だった 93 株は 18 種類の血清型に分けられた。O116:H16, *stx2a* 陽性 11 株、O171:H2, *stx2d* 陽性 8 株を含む内訳を 2024

年に分離された株と合わせて表 4 に示した。だった。

分離株のうち、O157:H7 の 4 株、O111:H8 の 1 株について MLVA を実施したところ、A-1 農場由来 O157:H7 株については、2024 年に同地域で発生した集団感染事例由来株の Single Locus Variant (SLV) だった。国立感染症研究所に問い合わせたところ、他の 4 株については国内分離株の中では類似 MLVA プロファイルは見いだせなかった。

また、ゲノム解析結果が得られている B-1 農場由来 O116:H16 の 11 株について core genome SNP 解析を実施したところ、core genome 数 4,270,896 中、菌株間の SNP は 0-17 だった。他の農場から O116:H16 は検出されなかった。

考察

2025 年は、食肉センターでサンプリングした 50 頭のウシ糞便検体から 6 株の STEC が分離され、2023 年から 2025 年までに累計 30 株の分離に成功した。また、特定農場においてサンプリングした 114 検体から 99 株の STEC が分離され、2024 年と合わせて累計 114 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。

STEC 患者が従事していた B 地域の農場におけるウシ糞便の *stx* 陽性率は 2025 年も引き続き 86.2% と非常に高く、A 地域の 3 農場においても 91.4% と非常に高かった。特に A 地域

で発生した集団感染事例由来株と A-1 農場由来株については MLVA により近縁であることが示唆された。この MLVA 型は沖縄県内ではこの地域に特異的ではある一方、県外において 2025 年散発事例株の SLV が報告されている。県内集団感染事例における牛肉の喫食やウシとの接触といった感染経路は不明であり、県外 SLV 株との関係もまた不明である。また、B-1 農場由来における 2024-2025 年の継続的な調査で、O116:H16 といった同一クローン株が農場内に長期間残存していることが明らかとなった。今後すべての株の全ゲノム解析を完了させ、農場内 STEC の採取時期、個体や牛群、使用環境による変動について解析していく予定である。

2006 年から 2024 年までの沖縄県のヒトの STEC 感染症例由来の株 309 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し、DDBJ へ登録した。今後これらヒト由来 STEC とウシ由来 STEC との比較解析、さらには沖縄県以外でのヒト症例由来 STEC との比較解析を同時に進めていく必要がある。

D. 結論

2023 年から 2025 年までに、ウシ糞便から STEC 株の分離を試み 144 株の分離に成功した。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 STEC の原因分析につながる可能性がある。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表 1 件

Closed genome sequences of 39 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains

isolated from healthy cattle in Okinawa, Japan. Kakita T, Iyoda S, Taira H, Kudeken T, Akeda Y, Ohnishi M, Nakamura K, Microbiol Resour Announc. 2025 13;14(11):e0081625.

2. 学会発表 4 件

ウシ農場で発生した腸管出血性大腸菌感染症一子牛の保菌調査とゲノム解析一、柿田徹也、中村佳司、土城勝彦、平良遙乃、久手堅剛、照屋盛美、喜屋武向子、大西真 第 5 4 回沖縄県獣医学会 (2025 年 7 月)

ナノポアリードのみを用いた全ゲノム配列比較による細菌検査方法の検討、中村佳司、柿田 徹也、大西 真、明田 幸宏、第 27 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2025 年 9 月)

完全長ゲノム配列の比較解析に基づく腸管出血性大腸菌感染症起因菌のゲノム変化の解明、中村 佳司、柿田 徹也、大西真、明田 幸宏、九州微生物研究フォーラム 2025 (2025 年 9 月)

ウシ農場で発生した腸管出血性大腸菌感染症一子牛の保菌調査とゲノム解析一、柿田徹也、中村佳司、土城勝彦、平良遙乃、久手堅剛、照屋盛美、喜屋武向子、大西真 令和 7 年度獣医学術九州地区学会 (2025 年 10 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

表 1 食肉センターにおけるウシ由来 STEC 分離株の性状

地域	O-genotyping	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	2023	2024	2025	計
A	OgNT		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	1	0	0	1
A	OgNT	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	1	0	0	1
B	Og157		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	2	2	0	4
B	OgNT		<i>stx2</i>		5	5	6	16
B	OgNT		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	1	0	0	1
B	OgNT	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>		1	1	0	2
B	OgNT	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	2	1	0	3
B	OgNT	<i>stx1</i>			1	0	0	1
B	O111	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	1	0	0	1

表 2 ゲノム解析による食肉センターのウシ由来 STEC 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	2025 年	計
A	O156:H25	<i>stx1a</i>		<i>zeta3</i>	1	0	0	1

A	O109:H10		<i>stx2a</i>	<i>iota1</i>	1	0	0	1
B	O157:H7		<i>stx2c</i>	<i>gamma1</i>	2	2	0	4
B	O109:H16		<i>stx2a</i>	-	2	0	1	3
B	O174:H21		<i>stx2c</i>	-	1	0	0	1
B	O104:H7		<i>stx2a</i>	-	1	0	0	1
B	O111:H8	<i>stx1a</i>		<i>theta</i>	1	0	0	1
B	O177:H25		<i>stx2c</i>	<i>beta1</i>	1	0	0	1
B	O156:H25	<i>stx1a</i>		<i>zeta3</i>	1	1	0	2
B	O88:H25	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	-	1	0	0	1
B	O181:H49		<i>stx2a</i>	-	0	1	1	2
B	O181:H51		<i>stx2a</i>	-	1	0	0	1
B	O109:H10		<i>stx2a</i>	<i>iota1</i>	0	0	0	0
B	OgGp3 (O118/O151):H16	<i>stx1a</i>		<i>beta1</i>	1	0	0	1
B	O8:H4	<i>stx1a</i>	<i>stx2d</i>	-	0	1	0	1
B	O8:H8		<i>stx2a</i> , <i>stx2d</i>	-	0	1	0	1
B	O171:H2		<i>stx2d</i>	-	0	2	0	2
B	O2:H45		<i>stx2d</i>	-	0	0	1	1
B	OUT:H7	<i>stx1a</i>		-	1	0	0	1
B	OUT:H20		<i>stx2g</i>	-	0	1	0	1

表3 特定農場におけるウシの STEC 分離株の性状

地域	農場	O- genotyping	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	2024	2025	計
A	A-1	OgNT		<i>stx2</i>		0	1	1
A	A-1	Og157		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	0	1	1
A	A-2	OgNT		<i>stx2</i>		0	3	3
A	A-2	OgNT	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>		0	1	1
A	A-3	OgNT		<i>stx2</i>		0	19	19
A	A-3	OgNT	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>		0	3	3
A	A-3	OgNT	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	0	1	1
B	B-1	OgNT		<i>stx2</i>		11	38	49

B	B-1	OgNT		stx2	eae	0	1	1
B	B-1	OgNT	stx1		eae	4	3	7
B	B-1	Og26	stx1		eae	1	0	1
B	B-1	OgNT	stx1			0	6	6
B	B-1	OgNT	stx1	stx2		0	17	17
B	B-1	Og157		stx2	eae	0	3	3
B	B-1	Og111	stx1		eae	0	2	2

表4 ゲノム解析による特定農場のウシ由来 STEC 分離株の血清型、stx typing

地域	農場	血清型別	stx1	stx2	eae	2024 年	2025 年	計
B	B-1	O26:H11	stx1a		beta1	1	0	1
B	B-1	O104:H7		stx2a	-	1	1	2
B	B-1	O116:H16		stx2a	-	8	3	11
B	B-1	OgGp3(O118/O151):H16	stx1a		beta1	1	1	2
B	B-1	O171:H2		stx2d	-	1	7	8
B	B-1	O5:H9	stx1a		beta1	1	0	1
B	B-1	O84:H2	stx1a		zeta3	1	0	1
B	B-1	O168:H8		stx2a	-	1	0	1
B	B-1	O111:H8	stx1a		theta	0	2	2
B	B-1	O112:H21	stx1a		-	0	3	3
B	B-1	O113:H21		stx2d	-	0	2	2
B	B-1	O113:H4		stx2d	-	0	7	7
B	B-1	O153/O178:H19	stx1a	stx2a	-	0	1	1
B	B-1	O157:H7		stx2c	gamma1	0	1	1
B	B-1	O174:H21		stx2c, stx2d	-	0	2	2
B	B-1	O177:H25		stx2c	beta1	0	1	1
B	B-1	O2:H25		stx2a	-	0	1	1
B	B-1	O21:H25		stx2a	-	0	1	1
B	B-1	O8:H49	stx1a	stx2d	-	0	2	2
B	B-1	O8:H8		stx2a	-	0	3	3
B	B-1	O82:H8	stx1a	stx2c, stx2d	-	0	4	4
B	B-1	O87:H16		stx2b	-	0	1	1

B	B-1	O88:H25	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	-	0	2	2
B	B-1	OUT:H11		<i>stx2a</i>	-	0	1	1