

別紙 3

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

沖縄県の STEC 感染症の発生動向の詳細分析を行い、STEC 感染症高頻度市町村のうち 2 地域を選定後、それぞれの地域のウシ糞便を収集した。令和 5～7 年度に A 市の 1 農場および B 市の 3 農場から計 144 検体を採取し、加えて A 市および B 市の食肉センターより計 250 検体を収集したところ増菌培養後ベロ毒素遺伝子 (*stx*) 陽性率は農場由来検体で 87.5%、食肉センター由来検体で 25.2% だった。*stx* 陽性 189 検体から計 144 株の STEC 株が分離された。分離株のうち、2023 年に主に子ウシ舎での業務にあたっていた従業員が STEC 感染症(O26, *stxI*)に罹患した B 市の農場において分離された O26, *stxI* 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。また、A 市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 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 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

2006 年から 2022 年に報告された STEC 感染症について、発生届に記載された患者住所、分離 STEC 血清群情報、備考等に基づいて、同一事例（家族、保育・養育施設、職場等）症例

を推定した。居住地情報に基づいて人口（2017 年人口）10 万人あたりの市町村の STEC 感染症報告事例数を求めた。ウシ飼養数と STEC 感染症事例数との関連を検討するために、令和 3 年 12 月末家畜・家きん等の使用状況調査結果（沖縄県 H P 掲載）を利用し、各市町村人口 1000 人あたりのウシ飼養頭数、ウシ飼養戸数を求め利用した。

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 2023 年 5 月から 2025 年 10 月に A、B 市の食肉センターにおいて、ウシの糞便計 250 検体を収集した(A 市 100 検体、B 市 150 検体)。加えて、2023 年に従業員が STEC 感染症(O26, *stxI*)に罹患した B 市の農場において、ウシの

糞便を 2024 年に 30 検体、2025 年に 79 検体、合計 109 を収集した。さらに A 市の 3 農場から 2025 年に 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。

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 法を実施した。また、O116:H16 株について SNPCaster を使用して core genome Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 解析を実施した。

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

STEC 感染症の発生頻度の市町村比較

2006 年から 2022 年の期間において、439 例の報告があった。散発例を含む事例数としては 270 事例であり、沖縄県の人口 10 万あたり年あたり STEC 感染症事例数は 1.76 であった。沖縄県 41 市町村ごとの 10 万あたり年あたり STEC 感染症事例数は、0-9.1 の範囲でばらつきが多かった。人口 4000 人未満の 12 町村では解析期間において報告はみられなかった。人口 4000 人以上の 29 市町村の 10 万あたり年あたり STEC 感染症事例数は、中央値 0.58 (平均 1.29) であり、10 万あたり年あたり STEC 感染症事例数が 1 未満の市町村が 29 のうち 22 存在した。平均値以上の値を示す市町村は 5 市町村と限定的であった (図 1)。これら 5 市町村はいずれも、沖縄島とは異なる離島に存在する市町村であった。

ウシ飼養数・飼養戸数の市町村比較

人口 2000 人以上の各市町村の人口 1000 人あたりウシ飼養数およびウシ飼養戸数と STEC 感染症事例数 (人・年あたり) の関連を図 2 に示した。STEC 感染症事例数が平均値以上の値を示す 5 市町村は、A 市を除いて STEC 事例数の多い順に、人口あたりウシ飼養頭数が多かった。一方で、A 市も含めた 5 市町村は、ウシ飼養農家の人口あたりの戸数は多かった。

A, B 市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、250 検体中 63 検体 (25.2%) 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、30 株の STEC 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、30 株中 25 株(83.3%)が MP1 Plus で推定できる O 群以外 (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 市および B 市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 市 3 農場 35 検体中 32 検体(91.4%)、B 市 1 農場 109 検体中 94 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 市 3 農場 25 検体(71.4%)から Og157, *stx2*, *eae* 陽性 1 株を含む 29 株の STEC が、B 市 1 農場 68 検体 (72.3%) から Og157, *stx2*, *eae* 陽性 3 株および Og111, *stx1*, *eae* 陽性 2 株, Og26, *stx1*, *eae* 陽性 1 株を含む 85 株の STEC が分離された。その内訳を表 3 に示した。現在解析中の 28 株を除く 86 株のゲノム解析を実施したところ、OgNT 株は 21 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 株を含む内訳を表 4 に示した。

分離株のうち、O157:H7 の 8 株、O111:H8 の 2 株、O26:H11 の 1 株について MLVA を実施

したところ、B-1 農場由来 O26:H11 の 1 株は当該農場の子ウシ舎で業務していた STEC 陽性患者由来株の Single Locus Variant (SLV) だった。A-1 農場由来 O157:H7 株については、2024 年に同市で発生した集団感染事例由来株の SLV だった。国立感染症研究所細菌第一部に問い合わせたところ、県外のヒト由来株 (2022-2025 散発例) にも近縁な株があった。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。O116:16 株において、core genome 数 4,270,896 のうち 11 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。

D. 考察

沖縄県の 41 市町村のうち 15 市町村は離島に存在するが、人口 4000 人以上の離島は 5 市町村のみである。また、10 町村は人口 2000 人以下の町村である。日本の腸管出血性大腸菌感染症は年間 3000~4000 例発生していて、人口 10 万人あたり約 2.4~3.2 程度である。人口 2000 未満の自治体での STEC 発生頻度は 50 年に 2~3 となると想定される。17 年間の解析においては、人口 2000 人未満の離島からの STEC 患者発生報告がないのも人口が少ないことからくる可能性がある。しかしながら、これらの人口の少ない離島自治体のなかにも、ウシ飼養数、ウシ飼養戸数が多い自治体もあることから、それらの島のウシ飼養状態の把握が、今後のヒト症例が発生した際の迅速な対応のためには必要であると考えられた。

今回、人口あたりウシの飼養数および飼養戸数が多い市町村において STEC 感染症の発生頻度が高い可能性が示された。ただし、その因果関係については不明である。

今回調査地域に選択した A 市、B 市は人口約 5 万人程度である。人口 10 万人・年あたりの STEC 感染事例は A 市が 8.88、B 市が 3.1 で

あった。A 市と B 市ともに、肉用牛以外のウシ（乳用牛・闘牛・水牛）を飼養する農家は、肉用牛飼養戸数と比べて極めて少ない（A 市 619 : 1、B 市 462 : 25）。B 市は 23000 頭以上の肉用牛が使用されていたが、A 市においては 9800 頭程度であった。つまり、B 市においては A 市よりも、1 農家あたりの飼養頭数が多い比較的大規模農家が多いことを示唆する。大規模飼養農家の設置場所と居住地域との関連についても検討する必要があると考えられた。食肉センターでサンプリングした 250 頭のウシ糞便検体から STEC30 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 144 検体から 114 株の STEC 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順次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）への登録をしているところである。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-1 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 市の 3 農場においても 91.4%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 STEC 感染症の注意喚起を行った。さらに、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。また、O157:H7 の MLVA によって A 市で発生した集団感染事例由来株と A-1 農場由来株が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。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。

E. 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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 2 件

Isolation and whole-genome sequencing analysis of *Escherichia fergusonii* harboring a heat-labile enterotoxin gene

from retail chicken meat in Okinawa, Japan. Kakita T, Lee K, Morita M, Okuno M, Kyan H, Okano S, Maeshiro N, Ishizu M, Kudeken T, Taira H, Teruya M, Ogura Y, Akeda Y, Ohnishi M, Microbiol Immunol 2024, 68 115-121. Epub 2024 Jan 20.

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 7 件

沖縄県のヒト由来腸管出血性大腸菌感染症における O 血清型別不能株の O-genotyping PCR による血清型同定とゲノム解析 柿田徹也、久手堅剛、平良遥乃、眞榮城徳之、石津桃子、岡峰友恵、高良武俊、照屋盛実、喜屋武向子、大西真 第 5 2 回沖縄県獣医学会（2023 年 7 月）

沖縄県のヒト由来腸管出血性大腸菌感染症における O 血清型別不能株の O-genotyping PCR による血清型同定とゲノム解析 柿田徹也、久手堅剛、平良遥乃、眞榮城徳之、石津桃子、岡峰友恵、高良武俊、照屋盛実、喜屋武向子、大西真、令和 5 年度獣医学術九州地区学会（2023 年 9 月）、

柿田徹也、李謙一、森田昌知、奥野未来、喜屋武向子、岡野祥、眞榮城徳之、石津桃

子、久手堅剛、平良遥乃、照屋盛実、小椋義俊、大西真 沖縄県産鶏肉における易熱性エンテロトキシン保有 *Escherichia fergusonii* 汚染実態及びゲノム解析、第 4 4 回日本食品微生物学会学術総会（2023 年 9 月）

ウシ農場で発生した腸管出血性大腸菌感染症—子牛の保菌調査とゲノム解析—、柿田徹也、中村佳司、土城勝彦、平良遥乃、久手堅剛、照屋盛実、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—子牛の保菌調査とゲノム解析—、柿田徹也、中村佳司、土城勝彦、平良遥乃、久手堅剛、照屋盛実、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）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

図1 沖縄県の腸管出血性大腸菌感染症（事例数） 2006 - 2022
家族例、集団事例（保育園等）は1とカウントした n = 270

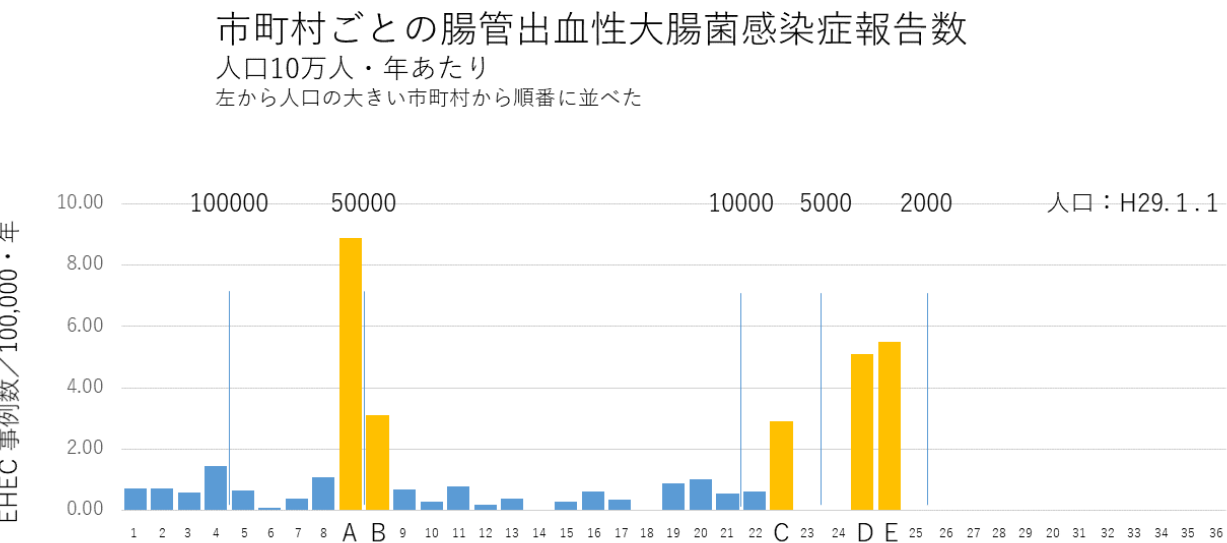


図2 沖縄県の腸管出血性大腸菌感染症（事例数）
市町村ごとの人口10万人・年あたりEHEC事例数と飼養頭数、飼養戸数との関連
人口2000人以上の30市町村

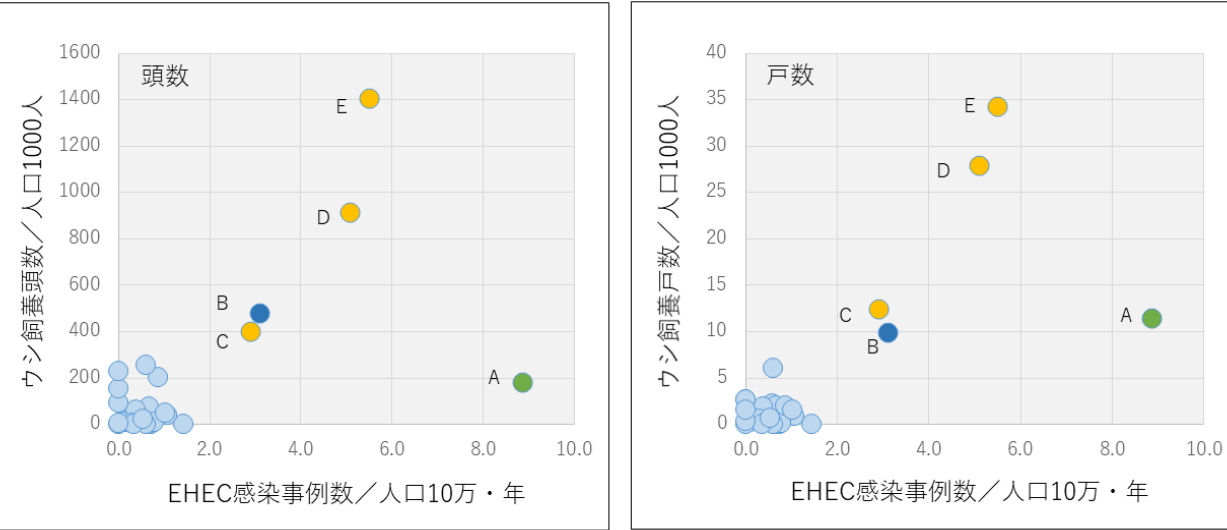


表1 食肉センターにおけるウシ由来 STEC 分離株の性状

市	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

市	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

市	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		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	0	1	1
B	B-1	OgNT	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	3	3	6
B	B-1	Og26	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	1	0	1
B	B-1	OgNT	<i>stx1</i>			0	6	6
B	B-1	OgNT	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>		0	17	17
B	B-1	Og157		<i>stx2</i>	<i>eae</i>	0	3	3
B	B-1	Og111	<i>stx1</i>		<i>eae</i>	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	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	2024 年	2025 年	計
A	A-1	OUT:H16	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i> , <i>stx2d</i>			1	1
A	A-3	O112:H16		<i>stx2a</i> , <i>stx2d</i>			7	7
A	A-3	O156:H25	<i>stx1a</i>				1	1
A	A-1	O157:H7		<i>stx2c</i>			1	1
A	A-3	O171:H2		<i>stx2d</i>			1	1
A	A-2	O177:H25		<i>stx2c</i> , <i>stx2d</i>			1	1
A	A-1	O22:H8		<i>stx2a</i> , <i>stx2d</i>			2	2
A	A-3	O42/O28:H25		<i>stx2a</i>			3	1
A	A-2, A-3	O8:H8		<i>stx2a</i>			8	8

A	A-3	O82:H8	<i>stx1a</i>	<i>stx2d</i>			2	2
B	B-1	O26:H11	<i>stx1a</i>		<i>beta1</i>	1	0	1
B	B-1	O104:H7		<i>stx2a</i>	-	1	1	2
B	B-1	O116:H16		<i>stx2a</i>	-	8	3	11
B	B-1	OgGp3(O118/O151):H16	<i>stx1a</i>		<i>beta1</i>	1	1	2
B	B-1	O171:H2		<i>stx2d</i>	-	1	7	8
B	B-1	O5:H9	<i>stx1a</i>		<i>beta1</i>	1	0	1
B	B-1	O84:H2	<i>stx1a</i>		<i>zeta3</i>	1	0	1
B	B-1	O168:H8		<i>stx2a</i>	-	1	0	1
B	B-1	O111:H8	<i>stx1a</i>		<i>theta</i>	0	2	2
B	B-1	O112:H21	<i>stx1a</i>		-	0	3	3
B	B-1	O113:H21		<i>stx2d</i>	-	0	2	2
B	B-1	O113:H4		<i>stx2d</i>	-	0	7	7
B	B-1	O153/O178:H19	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	-	0	1	1
B	B-1	O157:H7		<i>stx2c</i>	<i>gamma1</i>	0	1	1
B	B-1	O174:H21		<i>stx2c, stx2d</i>	-	0	2	2
B	B-1	O177:H25		<i>stx2c</i>	<i>beta1</i>	0	1	1
B	B-1	O2:H25		<i>stx2a</i>	-	0	1	1
B	B-1	O21:H25		<i>stx2a</i>	-	0	1	1
B	B-1	O8:H49	<i>stx1a</i>	<i>stx2d</i>	-	0	2	2
B	B-1	O8:H8		<i>stx2a</i>	-	0	3	3
B	B-1	O82:H8	<i>stx1a</i>	<i>stx2c, stx2d</i>	-	0	4	4
B	B-1	O87:H16		<i>stx2b</i>	-	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