

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 EHEC 感染症の発生動向の詳細分析を行った。市町村ごとに詳細に解析することで沖縄県 EHEC 感染症の発生頻度が高い市町村を見出した。それら市町村のウシ飼養頭数およびウシ飼養戸数との関連から、地域におけるウシ飼養と EHEC 感染症とのなんらかの関連がある可能性が示唆された。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する体制を整えた。まず、1 地域各 50 検体を収集し増菌培養後 VT 遺伝子陽性率を求めた（A 市 12%、B 市 52%）。VT 遺伝子陽性 32 検体から計 13 株の EHEC 株が分離された。ウシ糞便検体は研究班内で共有し、自施設と共通して 7 株が分離された。6 株は自施設のみで分離された。一方で我々が分離できなかった 4 株が国立感染症研究所および宮崎大学で分離された。検体の共有化により、分離率が向上することが認められた。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

沖縄県の EHEC 感染症の発生動向の解析

2006 年から 2022 年に報告された EHEC 感染症について、発生届に記載された患者住所、分離 EHEC 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 EHEC 感染症報告事例数を求めた。

ウシ飼養数と EHEC 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。

2 つの異なる離島において協力関係を構築後、2023 年 5 月から 10 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。

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℃、42℃で一晩培養した。

リアルタイム PCR による VT（ベロ毒素）遺

伝子スクリーニング：培養液をボイルし DNA を抽出後、ベロ毒素検出リアルタイム 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、ベロ毒素及び 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。

ベロ毒素もしくは 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。

(倫理面への配慮)

C. 研究成果

EHEC 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 EHEC 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 EHEC 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 EHEC 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 EHEC 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 EHEC 感染症事例数 (人・年あたり) の関連を図 2 に示した。EHEC 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 EHEC 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 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 培地を用いた増菌培養液から DNA を抽出し、ベロ毒素検出リアルタイム PCR を実施した結果、100 検体中 32 検体で VT 遺伝子が検出された。VT 遺伝子陽性検体から VT 保有菌株の分離を試みた。その結果、13 株の EHEC が分離された。A 市は 50 検体中 6 検体 (12%) が VT 遺伝子陽性、うち 2 検体から 2 株 (4%) の EHEC 株が分離された。B 市は 50 検体中 26 検体 (52%) が VT 遺伝子陽性、うち 11 検体から 11 株 (22%) の EHEC 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、Og157 および Og111 が 3 株分離されたが、10 株は MP1 Plus を用いた PCR ではいずれの O 群陽性シグナルを得ることができず、Og- という判定となった。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。

VT1 陽性株が 5 株 (46.2%)、VT2 陽性株が 9 株 (69.2%)、うち両毒素遺伝子陽性株は 1 株であった。*eae* 遺伝子陽性株は 6 株 (46.2%) 存在した。

ウシ糞便検体は国立感染症研究所 (伊豫田ら) ならびに宮崎大学 (井口ら) に供与し、それぞれ EHEC 分離を試みることで沖縄県衛生環境研究所における分離方法の妥当性を確認した。

その結果、沖縄県衛生環境研究所で分離された EHEC13 株のうち、7 株は国立感染症研究所あるいは宮崎大学において分離された。6 株については、沖縄県衛生環境研究所のみで分離された。一方で、国立感染症研究所あるいは宮崎大学で分離された 4 株は沖縄県衛生環境研究所では分離できていなかった。

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 EHEC 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 EHEC 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 EHEC 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 EHEC 感染事例は A 市が 8.88、B 市が 3.1 であった。17 年間での平均値での比較であるため、より詳細な解析を R6 年度は実施する予定である。また、A 市と B 市におけるウシ飼養状況も異なる可能性がある。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。

2023 年のヒト感染事例では B 市における牛舎での作業員（アルバイト）の感染事例が 2 例発生したが、必ずしもそのような事例が多い状況ではない。

今回 100 頭のウシ糞便検体から 17 株の EHEC（STEC）が分離された。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九州大学医学部中村ら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、中村ら（九州大学）での共有することにした。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。沖縄県の EHEC 感染事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

沖縄県の EHEC 感染症の実態の詳細分析を開始した。市町村ごとに詳細に解析することで沖縄県 EHEC 感染症の特徴の一端を明らかにした。また、ウシ糞便から EHEC 株の分離を試み 17%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 1 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.

2. 学会発表 3 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 52 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 44 回日本食品微生物学会学術総会（2023 年 9 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
n = 270

家族例、集団事例（保育園等）は1とカウントした

市町村ごとの腸管出血性大腸菌感染症報告数

人口10万人・年あたり

左から人口の大きい市町村から順番に並べた

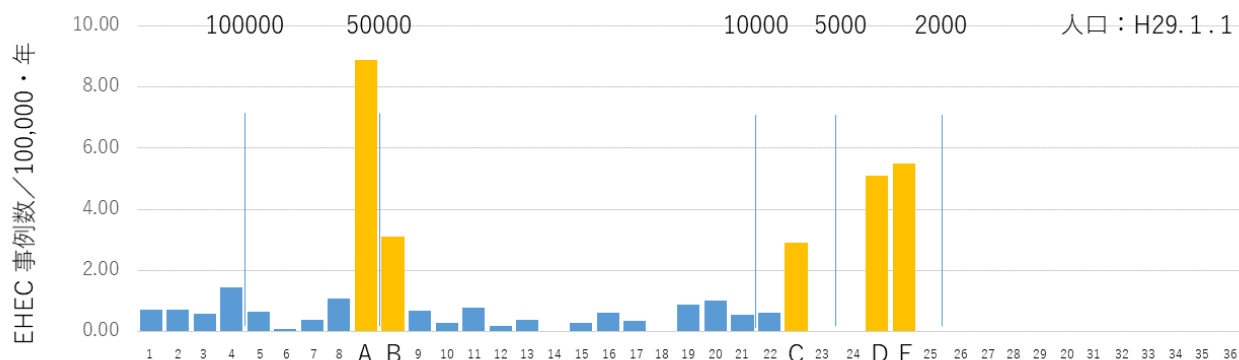


図2 沖縄県の腸管出血性大腸菌感染症（事例数）

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

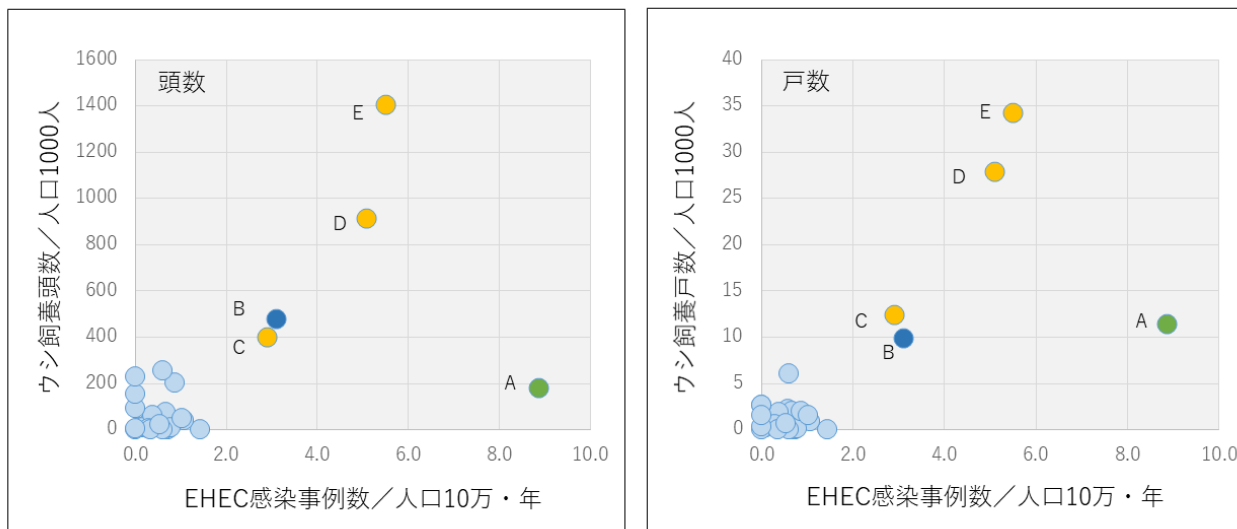


表1 ウシ由来 EHEC 分離株の性状

	O-genotyping	VT1	VT2	eae	No. isolates
A	Og-		VT2	eae	1
A	Og-	VT1		eae	1
B	Og157		VT2	eae	2
B	Og-		VT2		4
B	Og-		VT2	eae	1
B	Og-	VT1	VT2		1
B	Og-	VT1		eae	1
B	Og-	VT1			1
B	O111	VT1		eae	1
A	Og-		VT2		2
B	Og-		VT2		1
B	Og-	VT1			1