

201036022A

厚生労働科学研究費補助金  
健康安全・危機管理対策総合研究事業

地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の  
確立と、その精度管理の実施、及び疫学機能  
の強化に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 調 恒 明  
山口県環境保健センター

平成23(2011)年 3月

## 目次

### I 総括研究報告

地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、その精度管理の実施、及び 疫学機能の強化に関する研究 調 恒明 .....	1
--	---

### II 分担研究報告

1 リアルタイムPCR法を用いた食水系感染症原因細菌の網羅的検査法と精度管理 (細菌部門) 長井忠則 .....	17
2 原因不明ウイルス感染症に対する迅速網羅的診断法とその精度管理法の開発 (ウイルス部門) 高橋和郎 .....	41
3 健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に 関する研究 (理化学部門) 田中敏嗣 .....	47
4 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究 (疫学部門) 小澤 邦寿 .....	59

III 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	107
--------------------------	-----

# I 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金  
健康安全・危機管理対策総合研究事業

地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、  
その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究

平成 22 年度 総括研究報告書

研究代表者

調 恒明 山口県環境保健センター

研究分担者

長井 忠則	北海道立衛生研究所	所長
高橋 和郎	大阪府立公衆衛生研究所	副所長
田中 敏嗣	神戸市環境保健研究所	所長
小澤 邦寿	群馬県衛生環境研究所	所長

研究協力者

【細菌部門】

山口敬治	北海道立衛生研究所
綿引正則、嶋 智子	富山県衛生研究所
川瀬 勇	島根県保健環境科学研究所
亀山光博	山口県環境保健センター
堀川和美、江藤良樹	福岡県保健環境研究所

【ウイルス部門】

皆川洋子、山下照夫	愛知県衛生研究所
千々和勝己、世良暢之、吉富秀亮	福岡県保健環境研究所
濱岡修二	山口県環境保健センター
加瀬哲男、山崎謙治、倉田貴子、中田恵子	大阪府立公衆衛生研究所

【理化学部門】

滝川義明、畠山えり子、高橋悟	岩手県環境保健研究センター
阿彦忠之、笠原義正、和田章伸	山形県衛生研究所
伊能睿、石井里枝	埼玉県衛生研究所

玉井拙夫、藤巻照久、脇ますみ、熊坂謙一	神奈川県衛生研究所
金田誠一、寺田久屋、谷口賢、小野田絢	名古屋市衛生研究所
井端泰彦、茶谷祐行、土田貴正、野澤真里奈	京都府保健環境研究所
織田 肇、木村明生、赤坂 進	大阪府立公衆衛生研究所
田窪良行、山口之彦	大阪市環境科学研究所
田中智之、神藤正則、福田弘美	堺市衛生研究所
山村博平、三橋隆夫、吉岡直樹	兵庫県立健康生活科学研究所
山内光晴、佐想善勇	姫路市環境衛生研究所
島田美昭、橋爪 崇、久野恵子、高井靖智	和歌山県環境衛生研究センター
森野吉晴、浦崎美和、小田美紀、北尾拓也	和歌山市衛生研究所
調 恒明、立野幸治、三浦 泉、吹屋貞子	山口県環境保健センター
仲宗根民男、玉那覇康二、玉城宏幸、佐久川さつき	沖縄県衛生環境研究所
川上史朗、上田泰人、矢野昌弘、杉浦義紹、大久保祥嗣、山口葉子、田中徳子	神戸市環境保健研究所

**【疫学部門】**

吉村 健清	産業医科大学
八幡裕一郎	国立感染症研究所
中西 好子、神谷 信行、灘岡 陽子	東京都健康安全研究センター
岸本 剛、尾関由姫恵	埼玉県衛生研究所
小野塚大介	福岡県保健環境研究所
吹屋 貞子	山口県環境保健センター
田嶋久美子、鈴木 智之	群馬県衛生環境研究所

**研究要旨:**

近年、人的・物的移動手段の発達、それに伴う経済のグローバル化、生態系などの環境の変化等により、従来になかった感染症、食中毒などの健康危機事例が発生しており、その原因究明のためには、病原体、原因化学物質の同定が不可欠である。検査技術の発達により迅速性、正確性ととも、検査結果から得られる情報量も増大しており、行政機関が迅速に正確なデータを得て対策を講じることの重要性がこれまでに高くなっている。

地方衛生研究所は、地域行政のフロントラインにおける試験検査機関として、これらの原因究明のための検査を現在利用可能な最も高いレベルの技術を用いて迅速且つ正確に行う使命がある。また、検査結果を行政機関に提出するのみならず、結果を分析し、科学的見地から対策に対する提言を行うことが重要である。

本研究では、地方衛生研究所の検査機能、疫学調査機能強化のために細菌、ウイルス、

理化学の検査、及び疫学部門の研究分担班を構成し、食中毒菌、呼吸器疾患原因ウイルス、中枢神経系疾患原因ウイルスの網羅的迅速検査法の開発と検査結果の標準化、主に LC/MS/MS を用いた自然毒の検出法、地方衛生研究所における疫学データの分析・情報発信の強化について研究を行った。

#### 1. 細菌部門

平成 21 年度までに 24 病原遺伝子をリアルタイム PCR 法により網羅的に検出するシステムを作成した。実際に広く使える検出系であるかどうかを検証するために、すべての 26 菌株から DNA を抽出し、DNA 濃度を調整したのち研究協力機関に配布し 24 種類の遺伝子について検出感度を検証した結果、一機関以上で検出できなかったものが 4 種あり、multiplex PCR における primer の干渉等が原因と考えられた。また、 $T_m$  値に  $1^\circ\text{C}$  以上の差がみられ multiplex PCR で判定が困難な菌種が 3 種あったことから、一部の標的遺伝子を検出する Primer set の再設計などの検討が必要であることが分かった。

#### 2. ウイルス部門

平成 19-21 年度に作成した multiplex PCR 法によるウイルスの検出法が臨床検体に応用可能かどうかを検証するため、4 機関において同一のウイルス或いは核酸試料を鋳型として検出を行った。その結果、検討した 20 種類のウイルスについて高感度に検出が可能であり臨床検体への応用が可能であると考えられた。

#### 3. 理化学部門

地方衛生研究所のネットワークを活用し、全国での自然毒による食中毒の事例や検査対応例をデータベース化し、情報の共有を図り、迅速な対応に役立つツールの構築を検討した。また、過去 10 年間で自然毒の中でも最も死亡例の多いふぐ毒の LC-MS による迅速試験法を開発し、精度管理を実施した結果、良好な結果を得た。

#### 4. 疫学部門

地方衛生研究所における疫学機能の強化方法を検討することを目的として、近隣の地衛研とテーマを明確にした実務的疫学手法の研修会等を開催した。また、地方衛生研究所における疫学機能の強化を目的として調査を実施した結果、広域事例発生における近接自治体の情報を NESID 上で情報共有することが可能になれば、自治体の感染症対策が円滑に進み、予防啓発活動に利用できると考えている担当者が多くいるため、今後、NESID の情報が自治体間で共有できるよう改善することが望ましい。研修会の実施の必要性等を把握することを目的として調査を実施した結果、「疫学」や「感染症サーベイランス」に関する研修会には非常に大きな需要があることが確認され、継続的な研修会開催の準備を進めるべきである。

## A.研究目的

地方衛生研究所は、地域行政のフロントラインにおける試験検査機関として、感染症食中毒など健康危機事例において、原因究明のための検査を迅速且つ正確に行う使命がある。また、検査結果を行政機関に提出するのみならず、結果を分析し、科学的見地から対策に対する提言を行うことが重要である。本研究では、地方衛生研究所の検査機能、疫学調査機能強化のために細菌、ウイルス、理化学の検査、及び疫学部門の研究分担班を構成し、病原体については食中毒菌、呼吸器疾患原因ウイルス、中枢神経系疾患原因ウイルスの網羅的迅速検査法の開発と検査結果の標準化、化学物質については主にLC/MS/MSを用いた自然毒の検出法を検討し、疫学機能強化については、地方衛生研究所における疫学データの分析・情報発信の強化について研究を行った。

## B.研究方法

**B-1. 細菌部門** リアルタイムPCR法を用いた食水系感染症原因細菌の網羅的検査法と精度管理

平成21年度までに開発したリアルタイムPCRを用いてインターカーレーター法により食水系感染症原因菌の24病原遺伝子を網羅的に検出する迅速検査法について、すべての遺伝子について検出感度の検証を行った。26菌株からDNAを抽出し、DNA濃度を調整したのち各所に配布し、複数の地方衛生研究所において10倍段階希釈した24種の対象遺伝子についてそれぞれのリアルタイムPCR機器を用いて検証した。それらの菌種は

*Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, enterotoxigenic *Bacillus cereus*, emetic toxin producing *B. cereus*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, astA positive *Escherichia coli*, enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), diffusively adhesive *E. coli* (DAEC), *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Providencia alcalifaciens* の24菌株である。Primerはこれまでに開発したRFBS24 (Rapid Foodborne Bacteria Screening 24)の配列を用いた。DNA試料について、10<sup>6</sup>希釈まで希釈した試料溶液を鋳型として、SG-PCRを実施した。異なる4種類のリアルタイムPCR機器を用い、参加5機関においてCt値ならびに融解曲線解析により、検出感度の検証を行った。

**B-2. ウイルス部門** 原因不明ウイルス感染症に対する迅速網羅的診断法とその精度管理法の開発

平成21年度までに開発したmultiplex PCR法の検出感度について検討するため、標準ウイルス若しくは核酸を調整し参加4機関に配布し、PCRを行い検出感度を比較した。対象とした病原体は、influenza

A, B, C, corona OC43, corona NL68, rhinovirus, Echo25, Mycoplasma, human Bocavirus, Adeovirus, parainfluenza 1,2,3,4, RS virus, human metapneumovirus である。これらのウイルスについてウイルスそのもの、若しくはウイルス核酸を配布し、10倍ごとに希釈した試料についてPCRを行い、4機関における検出感度を比較した。

### B-3. 理化学部門 健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究

#### 1. 自然毒による中毒事例の集積

地方衛生研究所職員専用ホームページにある既存のデータベース「自然毒中毒事例情報システム」を活用し、事例の集積と情報共有を図る。

#### 2. LC-MS/MSによるふぐ毒(TTX)の迅速試験法の開発

ふぐ毒は TTX とその多くの同族体が知られているが、標準品の入手は困難であることから、分析対象物質は TTX ( $C_{11}H_{17}N_3O_8$ , MW:319.3)とした。試料は、0.1%酢酸を加え、熱処理により抽出し、Amicon Ultra-4 10kDa で濾過後、LC-MS/MS で分析した。

#### 3. マウス公定法

ddy 系雄マウスの 19-21g に LC-MS/MS による検査と同様の前処理を行った試験溶液 1mL を腹腔内注射し、10分程度で致死させる毒力を算出した（食品衛生検査指針理化学編 2005、p. 661-666）。

### B-4. 疫学部門 疫学情報解析機能の強

### 化と人材育成に関する研究

1. 近隣自治体に職員を相互派遣し、実務研修を行った。2. 感染症サーベイランスの実務担当者向け基礎的内容講演及び経験に応じた近隣衛生研究所と連携した人材育成プログラムを開始したモデル事例紹介の研修会を約1時間行った。3. 広域事例が発生したときの情報収集の方法や週報自動化ツールに求められているもの等について調査を行った。4. 地方感染症情報センターの職員に研修の希望があるか、仕事をする上での問題点、問題の解決への取組などについて調査を行った。

### 倫理面への配慮

本研究においては、検査手法の検討、評価が主になっているため、原則としては倫理面への対応は必要ない。また、本研究の試験検査で取り扱う対象の多くは行政検査対象物のため、特に倫理面の問題は生じないと考える。その他、実験動物を用いる実験を行うにあたり、研究代表者、研究分担者の所属する地衛研の「動物実験管理手順」等に定める規則に従い、実験動物には苦痛を与えないよう研究を遂行した。また、疫学情報を取り扱う感染症サーベイランスの関連情報は、あらかじめ定められた情報取扱い規則に準じて取扱い、個人情報保護の徹底を計っている。

### C.研究結果

C-1. 細菌部門 リアルタイムPCR法を用いた食水系感染症原因細菌の網羅的検査法と精度管理



Ct 値、Tm 値、融解曲線における内部標準と比較したピークの大きさから検出の有無を決定し、検出した最大希釈率を用いて、最低検出濃度（換算）を算出した。一部の遺伝子をのぞいて、検出感度はおおむね  $10^4 \sim 10^6$  cfu/mL であった。検出感度が低い試料について Taq の変更と PCR 時の伸長反応の延長を試みたところ、いずれも  $10^1 \sim 10^3$  程度の結果の向上がみられた。

**C-2. ウイルス部門 原因不明ウイルス感染症に対する迅速網羅的診断法とその精度管理法の開発**

1. 呼吸器マルチプレックス PCR 法の検出感度（福岡県開発）

この検出法は influenza A, B, C, corona OC43, corona NL68, rhinovirus, Echo25, Mycoplasma, human Bocavirus, Adevovirus の 8 種類の呼吸器感染症ウイルスを検出する。大阪の結果では 4 種のうち 3 種では基準の検出感度よりもさらに 50 倍以上の高感度であった。山口では 1 種のウイルスでやや高感度であった。愛知では基準と同等の感度であった。

2. 呼吸器マルチプレックス PCR 法の検出感度（大阪府開発）

この検出法では、parainfluenza 1,2,3,4, RS virus, human metapneumovirus の 8 種類のウイルスを検出する。他の 3 地衛研での実験結果ではほぼ同様の感度であった。

3. エンテロウイルス PCR 法の検出感度（愛知県開発）

本方法では 4 種類のコントロールウイルスを用いた。福岡では 2 種のウイルスでやや高感度であった。山口、大阪では VP1 で不検出の場合が認められた。

**C-3. 理化学部門 健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究**

1. 自然毒による中毒事例の収録件数

収録総件数は 248 件である。内訳は、魚類:80 件(ふぐ毒 66, シガテラ 9 など)、貝・蟹類:35 件(麻痺性 16, テトラミン 12 など)、キノコ:58 件、山野草:33 件、栽培植物:28 件であった。

2. LC-MS/MS によるふぐ毒(TTX)の迅速試験法の開発

通知法に従い抽出溶液を調製し、希釈、限外ろ過を行い調製した試験溶液を LC-MS/MS で測定した。標準物質を使った測定では、0.2~100 ng/mL の範囲で直線性が得られた。参加 15 機関による共同試験結果については、各機関の回収率は 84.0~108%でかつ RSD<sub>r</sub>、Z スコアも良好な結果であった。2.2 µg/g 濃度の精度管理目標値の範囲内の結果が得られ、今回共同試験を実施した LC-MS/MS による迅速試験法の妥当性が確認された。また、マウス試験の場合の定量下限値 1.1 µg/g (5MU/g)と比較すると 5 倍以上の感度を得られ、食品の残品、患者尿、血液等低濃度の試験にも有効に活用できることが示唆された。

3. ふぐ毒の LC-MS/MS による迅速試験法

とマウス試験法との毒力 (MU) の比較検討

LC-MS/MS 法を公定法として採用するための検討を行うため、マウス試験法に対する LC-MS/MS 法の検出感度の比較を行った。測定値の比率は 66%~108%と変動が認められた。概ね同等の値を示したが、シマフグのように 66%、75%とマウス法に比べ低い MU を示す試料も認められた。そこで今後さらに魚種、部位等多くの試料について検討を加える必要が認められた。

#### C-4. 疫学部門 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究

##### 1. 人材育成

近隣の地方衛生研究所の職員の相互派遣による研修、埼玉県における腸管出血性大腸菌の diffuse outbreak に対する対応の研修に参加、レジオネラの発生についての埼玉県、東京都の共同による解析を行った。研修参加者 24 名についてアンケートを行った結果では、多くが情報センターの仕事を「専門性が必要」と回答し、情報の取得、連携が十分でなく、これらを改善する手段として研修への参加をあげている。

2. 感染症情報センターにおける情報共有  
複数の自治体をまたいで患者が存在するような広域事例の際、NESID 上で情報共有ができれば、対策が円滑に進むと回答したのが 56 機関、円滑に進まないと回答したのは 5 機関であり、NESID 上での情報共有が促進されることが望まれている。

3. 感染症情報センター職員の研修の需要

43 自治体の 53 名の調査では、半数以上が「体系的な人材育成のコース」の設置を望んでおり、数時間の研修会の定期的実施を半数が希望しており、研修の要望は極めて高かった。

#### D. 考察

D-1. 細菌部門 リアルタイム PCR 法を用いた食水系感染症原因細菌の網羅的検査法と精度管理

4 種類の primer については、再検討の必要がある事が分かった。今後、改良を行いすべての地方衛生研究所において使用可能な検査法に完成させ実用化することを最優先する必要がある。これが完成し、使用されれば迅速に且つ正確に食中毒の原因究明が可能となる。また、まさに網羅的に検査が行われるので、食中毒の原因について客観的、科学的に判断する事が可能となる。

D-2. ウイルス部門 原因不明ウイルス感染症に対する迅速網羅的診断法とその精度管理法の開発

multiplex PCR 法であるにもかかわらず、10—100 個程度のウイルスを検出可能である事が判明し、来年度から臨床検体にこれを応用し従来法と検出頻度を比較することにより実用性を検証する。この検査法が認められれば、病原体発生動向調査事業におけるウイルス検索に貢献するであろう。

D-3. 理化学部門 健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築

と精度管理に関する研究

26 機関と多くの参加機関があり、自然毒の検出法の開発、標準化に関するニーズが極めて高いことが示唆された。ふぐ毒検出法に LC-MS/MS 法を使用することが可能であり、その有用性が示された。今後、フグ種、検討する臓器を増やし、公定法に採用されるためのデータを蓄積していく。

#### D-4. 疫学部門 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究

感染症に関してわかりやすい情報を発信することは地方自治体にとって今後益々重要になってくる。一方、感染症情報センターの業務は、マニュアル化しにくいものであり、実地的な要素がある研修と 2 週間程度の研修コースが必須である。この研究班を通じモデル的な実施は行ったが、今後、定期的な研修が行われるよう働きかける必要がある。

#### E. 結論

公衆衛生行政における地方衛生研究所の活動の重要性は、新型インフルエンザ、冷凍ギョウザの農薬汚染、麻疹排除における検査対応、福島原発事故に伴う環境、及び食品の放射能測定など、最近の健康危機事例への対応によって再認識されている。この研究班では、食中毒菌の網羅的迅速検査法を開発しその実証を行っている。今後の改良により、実際にすべてに地方衛生研究所で使われるようになるよう全力を傾ける。ウイルスの検査法についても multiplex PCR 法の有用性が示

され、臨床検体について検討することにより地方衛生研究所において使用されれば検査の迅速性、正確性の向上に大きく貢献するであろう。自然毒検出法についても、地方衛生研究所の関心は極めて高くこの検査法の開発・共有化により検査法の情報共有、標準化がなされることが期待される。感染症情報センターは、新型インフルエンザをはじめとする新興感染症、薬剤耐性菌の院内感染等における自治体の対応、正確な情報発信において重要な役割を果たしていくべきであり、本研究班における活動がその事に寄与することが期待される。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hasegawa, S., Matsushige, T., Inoue, H., Shirabe, K., Fukano, R., Ichiyama, T. Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy Cytokine, in press
2. Okuda M, Sugiyama S, Kunitsugu I, Hinoda Y, Okuda Y, Shirabe K., Yoshitake N, Hobara T. Use of body mass index and percentage overweight cutoffs to screen Japanese children and adolescents for obesity-related risk factors. *J Epidemiol.* 2010, 20(1):46-53.

3. Toda S, Kimura H, Noda M, Mizuta K, Matsumoto T, Suzuki E, Shirabe K. Phylogenetic analysis of human metapneumovirus from children with acute respiratory infection in Yamaguchi, Japan, during summer 2009. *Jpn J Infect Dis*. 2010, 63(2):139-40.
4. Hasegawa S, Hirano R, Hashimoto K, Haneda Y, Shirabe K, Ichiyama T. Characteristics of pandemic H1N1 influenza viral infection in atopic individuals Pandemic H1N1 influenza reveals “occult” asthma *Pediatric Allergy and Immunology*, in press
5. Okuda M, Hinoda Y, Okayama N, Suehiro Y, Shirabe K, Sasaki S, Kunitsugu I, Yoshitake N, Hobara T Association between the FTO gene and overweight in Japanese children and adolescents. *Pediatric Diabetes*, in press
6. Kojima H, Sata F, Takeuchi S, Sueyoshi T, Nagai T. Comparative study of human and mouse pregnane X receptor agonistic activity in 200 pesticides using in vitro reporter gene assays. *Toxicology*. in press
7. Kanai Y, Boonsathorn N, Chittaganpitch M, Bai G, Li Y, Kase T, Takahashi K, Okuno Y, Jampangern W, Ikuta K, Sawanpanyalert P. The impact of antigenic drift of influenza A virus human herd immunity: Sero-epidemiological study of H1N1 in healthy Thai population in 2009. *Vaccine*. 2010, 28(33):5437-44.
8. Yunoki M, Kubota-Koketsu R, Urayama T, Sasaki T, Analiwa D, Konoshima Y, Ideno S, Fukunaga Y, Morikawa S, Hiroi S, Takahashi K, Okuno Y, Hagiwara K, Ikuta K. Significant neutralizing activity of human immunoglobulin preparations against pandemic 2009 H1N1. *Br J Haematol*. 2010, 148(6):953-5.
9. Aoyama I, Uno K, Yumisashi T, Takasaki T, Lim CK, Kurane I, Kase T, Takahashi K. A case of chikungunya fever imported from India to Japan, follow-up of specific IgM and IgG antibodies over a 6-month period. *Jpn J Infect Dis*. 2010 Jan;63(1):65-6
10. Tanaka H, Takino M, Sugita-konishi Y, Tanaka T, Leeman D, Toriba A, Hayakawa K, Determination of *Fusarium* mycotoxins by liquid chromatography/tandem mass spectrometry coupled with immunoaffinity extraction, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2010, 24: 2445–2452
11. Tanaka H, Takino M,

- Sugita-konishi Y, Tanaka T, Toriba A, Hayakawa K, A survey of the occurrence of *Fusarium* mycotoxins in biscuits in Japan by using LC/MS, *J. Health Science*, 2010, 56: 188-194
12. Aoyama K, Nakajima M, Tabata S, Ishiguro E, Tanaka T, Sugiyama K, Sugita-Konishi Y, Kumagai S, Four-Year Surveillance for Ochratoxin A and Fumonisin in Retail Foods in Japan, *J. Food Protection*, 2010, 73: 344-352
13. Yoshizumi Y, Kimura H, Okayama Y, Nishina A, Noda M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Kurabayashi M. Relationships between cytokine profiles and signaling pathways in parainfluenza virus-infected lung fibroblasts. *Front in Virol* in press.
14. Ishioka T, Kimura H, Kita H, Obuchi M, Hoshino H, Noda M, Nishina A, Kozawa K, Kato M. Effects of respiratory syncytial virus infection and major basic protein derived from eosinophils in pulmonary alveolar epithelial cells (A549). *Cell Biol Int*. 2010 Oct 27. [Epub ahead of print]
15. Tsukagoshi H, Masuda Y, Mizutani T, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. Sequencing and phylogenetic analyses of Saffold coronavirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2010 Sep;63(5):378-380.
16. 吉村健清：公衆衛生行政の中の地方衛生研究所の位置付けとこれから.公衆衛生 2010 ; 74 : 262-263

#### H.知的所有権の取得状況

なし

平成23年2月21日 国立保健医療科学院

「地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究」

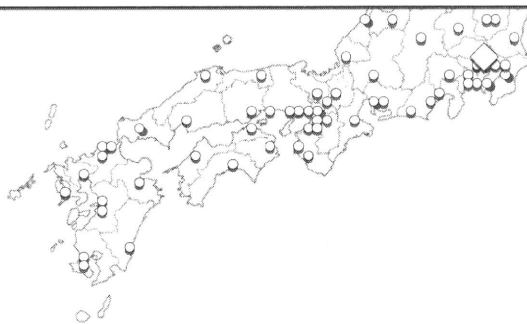
平成22-24年度 厚生労働科学研究費補助金  
(健康安全・危機管理対策総合研究事業)

山口県環境保健センター 調 恒明

- ◇ 国立保健医療科学院
- ◇ 国立医薬品食品衛生研究所
- ◇ 国立感染症研究所
  
- 地方衛生研究所  
(都道府県、政令市、特別区 77施設)



本研究では、26地衛研と感染研が研究に参加  
全ての地衛研で确实、迅速に結果が得られる方法の確立



## 地方衛生研究所の使命

### 1. 食中毒の原因究明（食品衛生法）

・細菌

Project1 食中毒細菌の網羅的迅速検査法の確立

・ウイルス

・自然毒

Project2 フグ毒の迅速検査法の確立と事例データベースの充実

### 2. 感染症の原因究明（感染症法）

・ウイルス

Project 3 呼吸器、神経系ウイルス網羅的迅速検査法の確立

### 3. 地方感染症情報センターにおける解析と情報発信（感染症法 → 感染症発生動向調査事業実施要項）

Project 4 疫学情報解析機能の強化

#### Project1 食中毒細菌の網羅的迅速検査法の確立

Rapid Foodborne Bacteria Screening 24（RFBS24）システムの確立

原理：SYBR Greenを用いたReal-time PCR

患者便（急性期）からDNAを抽出



96 well のplateで24種の病原菌に特有の遺伝子配列を増幅する



病原菌の推定（7検体以内なら数時間程度で結果）

今年度

24種の菌の標準DNAを調整し5機関で検証  
・感度不良の遺伝子について反応条件の改良を行った  
・primerの見直しが必要な遺伝子も見つかった

来年度

方法の確立、症状別のキット作成

## Project 2 フグ毒の迅速検査法の確立と事例データベースの充実

公定法：フグ毒 (TTX) 検出法はマウスを用いたバイオアッセイ

- 欠点
1. 低感度のため患者血液、尿検体からの検出が困難
  2. ある程度の熟練（汎用性に乏しい技術）が必要
  3. 生後4週、19-20 gのddYマウスが必要



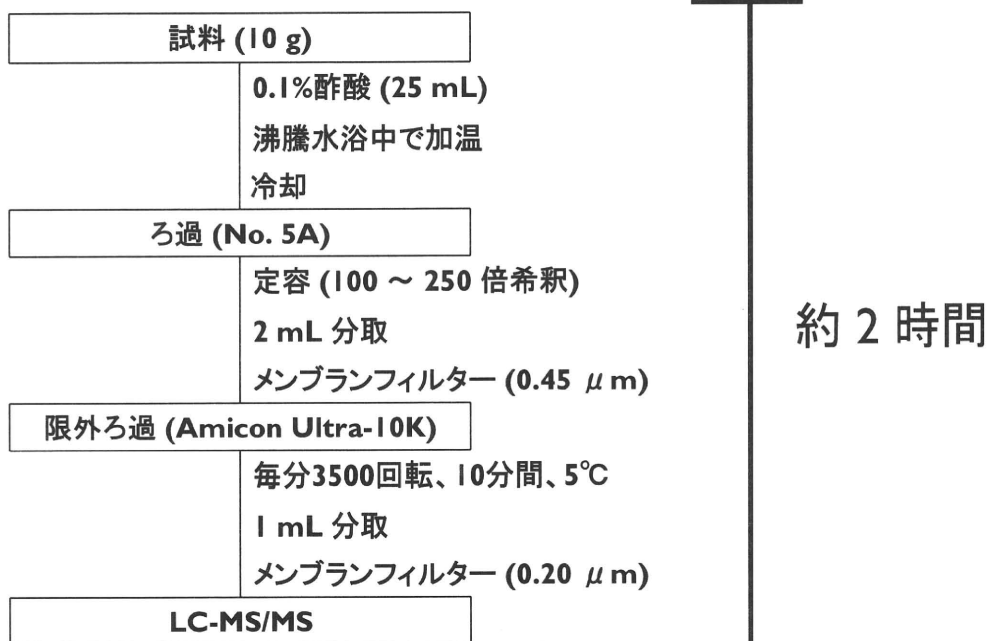
開発する技術：迅速な前処理 → LC/MS/MS

- 利点
1. 高感度のため患者血液、尿検体からの検出が可能
  2. LC/MS/MSは汎用性のある技術
  3. 迅速に結果が得られる



LC/MS/MS法の公定法採用を目指すため基礎データ作成

### Project 2 LC-MS/MSによるTTX迅速試験法

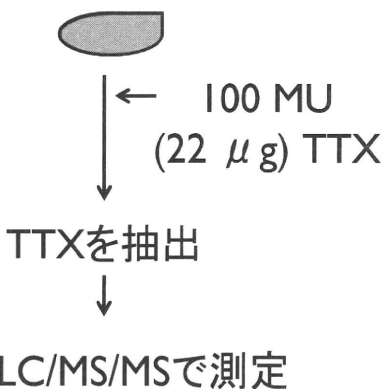




### Project 2 LC-MS/MSによるTTX迅速試験法

#### 添加回収試験

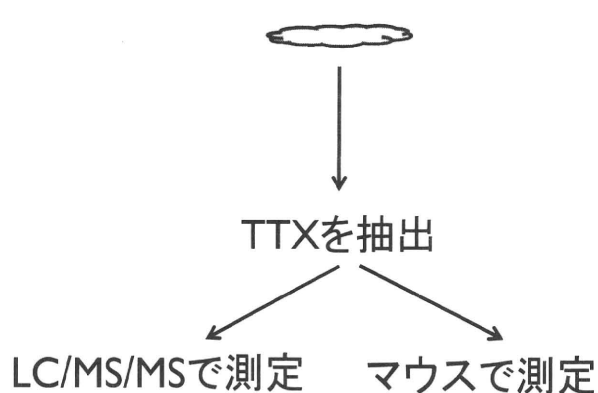
10 gの無毒フグ肝



7機関全てで94%以上の回収率

#### マウス公定法との比較

フグの肝、皮など有毒部位



LC/MS/MSで66%から108%

### Project 3 呼吸器、神経系ウイルス網羅的迅速検査法の確立

3種類のウイルスを同時に検出するmultiplex PCRを開発

#### 今年度

呼吸器ウイルス16種類、エンテロウイルス4種類の標準DNA、ウイルス、RNAを作成

4機関で検出感度を検定

一部試薬、機種の違いによる検出感度の差が見られたが、概ね十分な感度 (10 copy) が得られた

#### 来年度

臨床検体で有効性を検定、地衛研に普及

## Project 4 疫学情報解析機能の強化

今年度

感染症情報解析ツールのニーズ調査、人材育成を目的とした研究発表会、研修会

- ・予想を超える参加者を得た
- ・解析ツールのニーズは高い

来年度

感染症情報解析ツールの作成

Project1 食中毒細菌の網羅的迅速検査法の確立

Primerの一部改良により実用化

Project2 フグ毒の迅速検査法の確立と事例データベースの充実

LC/MS/MS法の公定法化、植物毒、カビ毒

Project 3 呼吸器、神経系ウイルス網羅的迅速検査法の確立

臨床検体への応用と普及、精度管理

Project 4 地方感染症情報センターの機能強化

感染症情報解析ツールの開発

来年度以降、より幅広い国立研究所の研究者の参加を  
お願いしていきます

平成23年2月21日 国立保健医療科学院

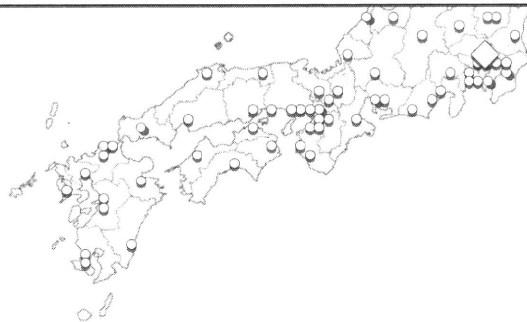
「地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究」

平成22-24年度 厚生労働科学研究費補助金  
(健康安全・危機管理対策総合研究事業)

山口県環境保健センター 調 恒明

- ◆ 国立保健医療科学院  
国立医薬品食品衛生研究所  
国立感染症研究所
- 地方衛生研究所  
(都道府県、政令市、特別区 77施設)

本研究では、26地衛研と感染研が研究に参加  
全ての地衛研で确实、迅速に結果が得られる方法の確立



## II 分担研究報告