

201134009A

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23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24(2012)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) 後藤 良一 ----- 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 ----- 39

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 ----- 109

# 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 23 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 所長

研究分担者

後藤 良一 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、池田徹也 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 遵 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  
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  
濱岡修二 山口県環境保健センター  
千々和勝己、世良暢之、吉富秀亮 福岡県保健環境研究所

【理化学部門】

滝川義明、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  
丹野瑳喜子、石井里枝 埼玉県衛生研究所  
岡部英男、藤巻照久、脇ますみ、熊坂謙一 神奈川県衛生研究所

皆川洋子、林留美子、後藤智美	愛知県衛生研究所
平田宏之、寺田久屋、谷口賢、小野田絢	名古屋市衛生研究所
有蘭直樹、茶谷祐行、土田貴正、野澤真里奈	京都府保健環境研究所
山本容正、木村明生、川津健太郎	大阪府立公衆衛生研究所
引石文夫、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
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、佐藤徳子	神戸市環境保健研究所
山内光晴、佐想善勇	姫路市環境衛生研究所
島田美昭、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
岸本壽男、山本 淳、肥塚加奈江、浦山豊弘	岡山県環境保健センター
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
西浜寛治、玉那覇康二、佐久川さつき、國仲奈津子	沖縄県衛生環境研究所

【疫学部門】

中野 道晴	北海道立衛生研究所
岸本 剛、尾関由姫恵	埼玉県衛生研究所
八幡裕一郎	国立感染症研究所
吉住 正和、後藤 考市	群馬県衛生環境研究所
住友眞佐美、神谷 信行、灘岡 陽子	東京都健康安全研究センター
鈴木 智之	岐阜医療科学大学
吹屋 貞子	山口県環境保健センター
吉村 健清	福岡女子大学
坂本 龍彦	福岡県保健環境研究所

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なく高くなっている。

地方衛生研究所は、地方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 年度までに食中毒菌の 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開発してきた。平成 22 年度に、これが実際に使える検出系であるかどうかを検証した結果、5 つの遺伝子について一機関以上で検出できないことがわかった。そのため、今年度は、primer の再設計、反応サイクル数、試薬の変更を行い、全ての反応系について 10-100 コピーの DNA を検出できるまでに改良された。また、新たに内部標準 DNA を合成し、これを反応系に加えることにより反応が確実に起こっていることを確認できるようになった。これにより、この検出方法は確立したとあってよく、来年度からは、食中毒事例への適用や、地衛研への普及を行う。

#### 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について、平成 22 年度に検出感度を検証した結果、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。平成 23 年度は、4 つの参加機関において急性呼吸器疾患の小児から得られた臨床検体（咽頭ぬぐい液）235 検体に応用し、single PCR と遜色ない検出感度があることがわかり、迅速かつ高感度な検出法として確立された。

#### 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、化学物質による食中毒事例への検査対応として 23 年度はスイセンなどの葉に含まれる植物毒リコリンの検出法について検討を行った。

#### 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レベルでの派遣研修を実施した。また、感染症情報センターの疫学情報機能強化のための手段として、週報自動作成プログラムの必要性や内容等について具体的な検討を行った。

## A.研究目的

地方衛生研究所は、地方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 22 年度には、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 5 参加機関において検出感度の検証を行った。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。その結果、5 つの反応系において 1 つ以上の機関で検出不能であることがわかり、今年度は大幅な反応の見直しを迫られた。24 種類の反応系のうち、10 の反応においてプライマーを再設計し、また反応条件の見直しを行った。これらの細菌 DNA から realtime PCR で増幅する領域を含む DNA 断片を PCR 法で増幅し、濃度を測定し  $10^0 - 10^3$  までの希釈倍率の標準 DNA を作成した。3 社 5 種類の異なるリアルタイム PCR 機器を用い、参加 5 機関において改良法を用いて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 法を用い、参加 4 機関で 235 の臨床検体についてウイルスの検出を行った。

**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 による植物毒リコリンの迅速試験法の開発

スイセンなどの有毒成分であるアルカロイドの一種リコリン( $C_{16}H_{17}NO_4$ , MW:287.3)を分析対象物質とし、リコリンを含まないニラの葉を材料として添加回収試験を行った。細切した試料 5g にメタノールを加え抽出後、GFP 濾紙で濾過、Millex-LG4 (0.20 $\mu$ m)(Millipore)に通して LC-MS/MS で分析した。

**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. 自治体からの派遣研修における事前調整

川崎市において感染症情報センターが本庁から衛生研究所に業務移管されることを期に川崎市職員が埼玉県衛生研究所で 2 ヶ月間の研修を受けることとなり、このカリキュラム作成などに関わった。

2. 地方感染症情報センターに必要な疫学機能の強化

2011 年 11 月 21 日に開催された地域保健総合推進事業「地方感染症情報センター担当者向けブロック疫学研修会及び連携会議」(九州ブロック)において、協力依頼を行った後、電話で「集計業務の具体的な方法・集計業務における問題点・

自動作成プログラムについての要望や意見等」について聞き取り調査を実施した。また、中国四国ブロックについても、地方感染症情報センターの現状と課題について調査した。

3. 地方感染症情報センター職員に対する研修会

1) 第 70 回日本公衆衛生学会総会自由集会

地方感染症情報センターを担当する職員等に対する研修の一環として、第 70 回日本公衆衛生学会総会(平成 23 年 10 月 19-21 日、秋田市)における自由集会を開催した。

2) 第 25 回公衆衛生情報研究協議会総会・研究会関連研修会

毎年、地方感染症情報センター関連職員が多く参加する公衆衛生情報研究協議会(2012 年 1 月、和光市)の関連会議として、「地方感染症情報センターのための感染症疫学研修会」を開催した。

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

24 セットの primer のうち、8 組 20 本のプライマーについて設計し直した。また、反応サイクル数を 30 回から 35 回に延長し、反応に用いる試薬も変更した。これらの改良により検出感度の大幅な向上を達成した。これまで、約 10 万個の細菌が存在しないと検出できなかつたが 100 から 1000 個程度の細菌が存在すれば検出可能となった。食中毒の急性期においては患者便にかなりの数の原因菌が存在することからこの手法により、迅速かつ正確な食中毒原因の探索が可能となると考えられた。

また、腸管出血性大腸菌にフォーカスし、病原遺伝子の *stx1*, *stx2*, *eae* 遺伝子を 1 つの反抗系で検出するリアルタイム PCR の検討を行った。その結果、サイバークリーンを用いたこのリアルタイム PCR 法で、十分な検出感度が得られることがわかった。DNA 調整前に内部標準 DNA を添加することにより反応液の調整失敗による偽陰性を防止することができること、Taqman probe を用いたリアルタイム PCR 法よりも安価であることから地方衛生研究所に普及するメリットが大きいと考えられた。

### 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

研究協力者となっている 4 つの参加機関において、作製した網羅的迅速マルチプレックス PCR 診断法を用いて呼吸器感染症および中枢神経感染症患者検体について病原体の検出を行い、検出率等を検討した。

小児呼吸器感染症患者から採取された 235 検体について、1 種類以上の病原体が検出された陽性率は約 60-80%であり、髄膜炎の場合では、髄液、咽頭ぬぐい液、便のうち少なくとも 1 種類の検体から病原体が検出された陽性率は 27% (20/69) であった。このことから single PCR と遜色ない十分な検出感度が得られたと結論した。

### 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 255 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: 36 件 (麻痺性 16, テトラミン 12 など)、キノコ: 59 件、山野草: 36 件、栽培植物: 30 件、海藻: 1 件、その他 (ヒスタミンなど): 13 件であった。

### 2. LC-MS/MS によるリコリンの迅速試験法の開発

抽出法を検討した結果、メタノールによる 2 回抽出が効率、迅速性の点からもっとも適していると考えられた。

LC の条件としては、ODS 系、HILIC 及び多機能系カラムが有効であった。LC-MS/MS の測定条件では、プリカーサーイオンとして 288 を、プロダクトイオン 147、119、91 を定量、確認イオンとして用いた。これらの条件により、参加 17 機関で添加回収試験を行ったところ全ての機関で良好な回収率を得た。

#### 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

人材育成のモデル的事例として、感染症情報センターを本庁から衛生研究所に移管する予定のある川崎市の担当職員の研修を埼玉県衛生研究所で行いその調整、カリキュラムの作成を行った。近隣自治体における相互研修と協力体制の確立のよいモデルとなると思われる。

##### 2. 地方感染症情報センターの体制、現状

中国四国ブロックでは、情報センター職員のほとんどは他業務との兼務である。感染症情報入力、解析の自動化のレベルは様々だが、多くの自治体で、ある程度の自動化が図られている。また、独自にプログラムを作成した自治体もあった。

##### 3. 感染症情報センター職員の研修会

第 70 回日本公衆衛生学会総会自由集会「感染症情報の現状と展望を考える会」には、地方衛生研究所、保健所、国立感染症研究所、大学から 43 名の参加があり、被災地の深刻な状況、被災時においていかに感染症発生動向調査事業を継続し得

たか、また避難所における感染症サーベイランスの実施状況、感染症対策について各講演者から報告を受け、質疑、参加者からの追加報告等が行われた。

#### 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

今年度は、プライマー、反応条件を見直すことにより、大幅な感度の上昇を得た。また、腸管出血性大腸菌を検出するための簡易、かつ迅速に検査できるリアルタイム PCR 法も検討した。これにより、この方法は地方衛生研究所で幅広く使用できるものとなったと考えている。ドイツにおける O104 の食中毒事例では、患者便から DNA を調整し、リアルタイム PCR 法により直接検出する方法が迅速性に優れていることから有効であったと報告されている。この事からも、従来の培養法に加えて PCR 法による検出を導入することは重要である事が示された。来年度は、この方法を実際の事例に応用することともに地衛研への普及を図って行きたい。

##### 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

今年度は、実際に臨床検体に応用し、その有効性が確認されたことから、来年度は、国立感染症研究所と地方衛生研究所の学術研究会である衛生微生物協議会

でこの方法について発表するとともに、改訂作業中の病原体検出マニュアルに記載するなど、地方衛生研究所への普及を図っていく予定である。

#### 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

18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。今回検討したLC-MS/MSによる迅速試験法は約2時間でリコリンを定量することができ、また、精度管理も良好な結果であったことから、健康危機管理への迅速、的確な対応に有効な手段として活用が期待される。

#### 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が必須である。今後も、感染症情報センターの業務の重要性を認識し、人材の育成確保に努力する必要がある。

#### 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。今年度の改良により、実用性のあるものとなった。ウイルスの検査法についても multiplex PCR 法の有用性が示され、臨床検体に応用し十分な検出感度があることが検証された。この方法が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機能強化の一助とな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, Hirano R, Hashimoto K, Haneda Y, Shirabe K, Ichiyama T. Characteristics of atopic children with pandemic H1N1 influenza viral infection: pandemic H1N1 influenza reveals 'occult' asthma of childhood. *Pediatr Allergy Immunol.* 2011 ;22, 119-23.

2. 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*. 2011 ;54(2):167-72.
3. Association between the FTO gene and overweight in Japanese children and adolescents. Okuda M, Hinoda Y, Okayama N, Suehiro Y, Shirabe K, Sasaki S, Kunitsugu I, Yoshitake N, Hobara T. *Pediatr Diabetes*. 2011;12(5):494-500.
4. Hasegawa S, Hirano R, Okamoto-Nakagawa R, Ichiyama T, Shirabe K, . Enterovirus 68 infection in children with asthma attacks: Virus-induced asthma in Japanese children *Allergy* 2011; 66(12) 1618-1620
5. Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J Med Microbiol*. 2012 ;61, 410-9.
6. Yasugi M, Nakamura S, Daidoji T, Kawashita N, Ramadhany R, Yang CS, Yasunaga T, Iida T, Horii T, Ikuta K, Takahashi K, Nakaya T. Frequency of D222G and Q223R Hemagglutinin Mutants of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Virus in Japan between 2009 and 2010. *PLoS One*. 2012;7(2):e30946.
7. Hiroi S, Koike N, Nishimura T, Takahashi K, Morikawa S, Kase T. Genetic analysis of human adenovirus type 54 detected in Osaka, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2011;64(6):535-7.
8. Morlighem JÉ, Aoki S, Kishima M, Hanami M, Ogawa C, Jalloh A, Takahashi Y, Kawai Y, Saga S, Hayashi E, Ban T, Izumi S, Wada A, Mano M, Fukunaga M, Kijima Y, Shiomi M, Inoue K, Hata T, Koretsune Y, Kudo K, Himeno Y, Hirai A, Takahashi K, Sakai-Tagawa Y, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y, Hayashizaki Y, Ishikawa T. Mutation analysis of 2009 pandemic influenza A(H1N1) viruses collected in Japan during the peak phase of the pandemic. *PLoS One*. 2011 ;6(4):e18956.
9. Ninomiya-Mori A, Nukuzuma S, Suga T, Akiyoshi K, Nukina M, Tanaka T. Genetic evidence for containment of viruses in the first outbreak of influenza A pandemic (H1N1) 2009 in Kobe, Japan. *Influenza Other Respi Viruses*. 2011 ;5(3):180-7.
10. Zeng H, Hatabayashi H, Nakagawa H, Cai J, Suzuki R, Sakuno E, Tanaka T, Ito Y, Ehrlich KC, Nakajima H, Yabe K. Conversion of 11-hydroxy-O-

methylsterigmatocystin to aflatoxin G1 in *Aspergillus parasiticus*.

*Appl Microbiol Biotechnol*.

2011 ;90(2):635-50.

11. Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H. Molecular epidemiology of attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010.

*J Med Microbiol*. 2012 in press

12. Mizuta K, Saitoh M, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Katsushima N, Itagaki T, Noda M, Kozawa K, Ahiko T, Kimura H.

Detailed genetic analysis of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene in human parainfluenza virus type 1 isolates from patients with acute respiratory infection between 2002 and 2009 in Yamagata prefecture, Japan.

*Virology*. 2011 ;8:533.

13. Nishina A, Kimura H, Kozawa K, Sommen G, Nakamura T, Heimgartner H, Koketsu M, Furukawa S. A superoxide anion-scavenger,

1,3-selenazolidin-4-one suppresses serum deprivation-induced apoptosis in PC12 cells by activating MAP kinase.

*Toxicol Appl Pharmacol*.

2011 ;257(3):388-95.

14. Nishina A, Kimura H, Kozawa K, Sommen G, Favero F, Heimgartner H, Koketsu M, Furukawa S.

3-(2,6-dimethylphenyl)-2-selenoxo-1,3-tiazolidin-4-one suppresses hydrogen peroxide-induced cytotoxicity on PC12 cells via activation of MAPK.

*Int J Toxicol*. 2011 ;30(6):690-9.

15. Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. The impact of Saffold cardiovirus in patients with acute respiratory infections in Yamagata, Japan.

*Scand J Infect Dis*. 2011 ;43(8):669-71.

16. 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*. 2011 ;35(5):467-74.

H.知的所有権の取得状況

なし

平成24年2月24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)

代表者 山口県環境保健センター 所長 調 恒明

研究分担者

細菌部門: 北海道立衛生研究所 所長 後藤 良一

ウイルス部門: 大阪府立公衆衛生研究所 副所長 高橋 和郎

理化学部門: 神戸市環境保健研究所 所長 田中 敏嗣

疫学部門: 群馬県衛生環境研究所 所長 小澤 邦壽

研究協力者: 感染研、28の地方衛生研究所

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

細菌部門: 食中毒細菌の網羅的迅速検査法の確立

・ウイルス

・自然毒

化学部門: 自然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

ウイルス部門: 呼吸器、神経系ウイルス網羅的迅速検査法の確立

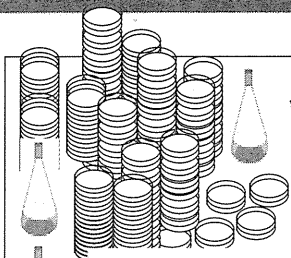
・細菌

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)

疫学部門: 疫学情報解析機能の強化

# Project 1: 24種類の食中毒細菌の網羅的迅速検査法の確立

培養法による検出



分離培養: 選択培地  
複数の培地  
24-48 時間



スライド凝集反応

生化学性状検査

培養  
血清型別  
12-48 時間

PCR 4-5 時間

合計 2-4日

リアルタイムPCR  
による検出

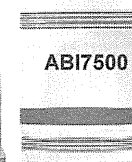


## 食中毒菌検査への リアルタイムPCRの導入

### 目的

- 検査のスピード化→原因菌の早期推定
- 迅速な疫学調査
- 稀少原因菌のスクリーニング
- 検査コスト(試薬、人件費)の軽減

数時間



Fukushima et al. *J Clin Microbiol.* 2003.

## 検出感度の不足: 試料DNA希釈率から換算した対象菌種の最低検出菌数(H22結果)

Group	試験に供した菌種	対象 遺伝子	菌数 換算値	検出感度の不足: 試料DNA希釈率から換算した対象菌種の最低検出菌数(H22結果)						
				富山 ABI7000	福岡 ABI7500Fast	福岡 MX3005P	島根 TP800	山口 ABI7500Fast	北海道 TP800	
A	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i>	5.0E+05	5.0E+03	5.0E+03	5.0E+03	5.0E+02	5.0E+03	5.0E+03	
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>gyrB</i>	1.7E+08	1.7E+06	1.7E+05	1.7E+06	1.7E+05	1.7E+05	1.7E+06	
	ETEC ( <i>ft &amp; stp</i> )	<i>ft</i>	7.8E+08	7.8E+05	7.8E+08	7.8E+07	7.8E+07	7.8E+06	7.8E+06	
B	<i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i>	1.1E+08	1.1E+05	1.1E+05	1.1E+05	1.1E+06	1.1E+06	1.1E+06	
	<i>Campylobacter jejuni</i>	specific	6.6E+07	6.6E+04	6.6E+04	6.6E+04	6.6E+04	6.6E+04	6.6E+05	
	<i>Vibrio parahaemolyticus (trh1)</i>	<i>trh(trh1)</i>	5.4E+05	5.4E+03	ND	ND	5.4E+05	5.4E+05	5.4E+04	
	<i>Vibrio parahaemolyticus (trh2)</i>	<i>trh(trh2)</i>	9.2E+06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
C	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	2.1E+08	2.1E+05	2.1E+05	2.1E+05	2.1E+04	2.1E+05	2.1E+05	
	Emetic <i>Bacillus cereus</i>	<i>ces</i>	8.2E+07	8.2E+05	8.2E+05	8.2E+05	8.2E+04	8.2E+05	8.2E+04	
	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>ompW</i>	1.5E+07	1.5E+06	1.5E+05	1.5E+05	1.5E+05	1.5E+05	1.5E+05	
D	ETEC ( <i>sth</i> )	<i>st(sth)</i>	1.0E+08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	ETEC ( <i>ft &amp; stp</i> )	<i>st(stp)</i>	7.8E+08	7.8E+06	7.8E+07	7.8E+07	7.8E+07	7.8E+06	7.8E+06	
	EHEC ( <i>stx1, stx2, eae</i> )	<i>eaeA</i>	9.5E+08	9.5E+05	9.5E+06	9.5E+05	9.5E+05	9.5E+05	9.5E+06	
	Enterotoxigenic <i>Bacillus cereus</i>	<i>nheB</i>	2.4E+07	2.4E+05	2.4E+05	2.4E+05	2.4E+04	2.4E+06	2.4E+05	
E	EHEC ( <i>stx1, stx2, eae</i> )	<i>stx1</i>	9.5E+08	9.5E+05	9.5E+05	9.5E+05	9.5E+05	9.5E+05	9.5E+06	
	EAEC	<i>aggR</i>	1.4E+09	1.4E+08	ND	ND	1.4E+09	1.4E+09	1.4E+09	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	7.0E+08	7.0E+06	7.0E+07	7.0E+07	7.0E+06	7.0E+06	7.0E+07	
F	<i>Vibrio parahaemolyticus (tdh)</i>	<i>tdh</i>	1.2E+07	1.2E+04	1.2E+07	1.2E+06	1.2E+05	1.2E+05	1.2E+05	
	EHEC ( <i>stx1, stx2, eae</i> )	<i>stx2</i>	9.5E+08	9.5E+05	9.5E+06	9.5E+06	9.5E+05	9.5E+06	9.5E+06	
	EAEC ( <i>astA, eae, stx2f</i> )	<i>stx2(stx2f)</i>	9.4E+08	9.4E+06	9.4E+07	9.4E+06	9.4E+07	9.4E+07	9.4E+07	
	<i>Plisimonas shigelloides</i>	<i>gyrB</i>	1.6E+07	1.6E+04	1.6E+05	1.6E+05	1.6E+04	1.6E+05	1.6E+05	
G	EAEC ( <i>astA, eae, stx2f</i> )	<i>astA</i>	9.4E+08	9.4E+05	9.4E+05	9.4E+05	9.4E+05	9.4E+05	9.4E+05	
	EIEC	<i>ipaH</i>	8.7E+07	8.7E+04	8.7E+04	8.7E+04	8.7E+04	8.7E+04	8.7E+05	
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>ahh1</i>	3.4E+08	3.4E+06	3.4E+06	3.4E+06	3.4E+06	3.4E+05	3.4E+06	
H	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>yadA</i>	3.7E+07	3.7E+06	3.7E+06	3.7E+06	3.7E+06	3.7E+07	3.7E+06	
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>yadA</i>	1.1E+08	1.1E+07	1.1E+07	1.1E+07	1.1E+07	1.1E+07	1.1E+08	
	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	2.4E+08	2.4E+06	2.4E+08	2.4E+07	2.4E+07	2.4E+06	2.4E+06	
DAEC	<i>daaD</i>	4.6E+07	4.6E+05	4.6E+05	4.6E+05	4.6E+04	4.6E+05	4.6E+05		

Ct値、Tm値、増幅曲線に基づく

感度不足の反応系

*Vibrio parahaemolyticus* (*trh1*)

*Vibrio parahaemolyticus* (*trh2*)

ETEC (*sth*)

EAEC

*Salmonella* spp.



1. 反応条件の変更(試薬、サイクル数)
2. プライマーの再設計

すべての反応系で約1000倍の感度上昇  
10 - 100 コピーのDNAを検出可能

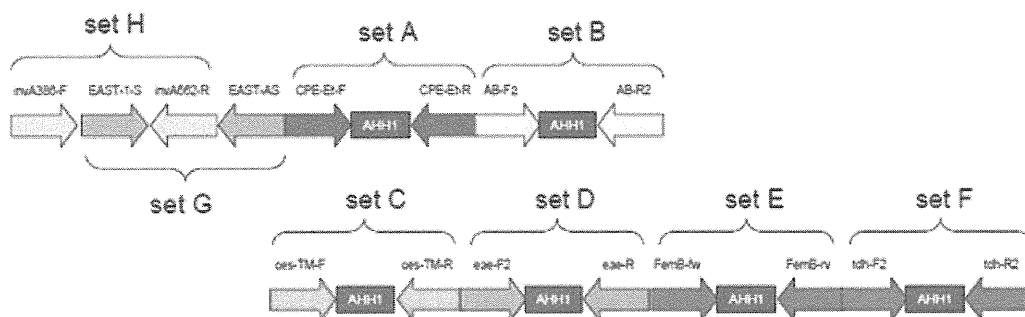
内部標準DNAの不良 → 競合内部標準の作成

8反応系の全てで  
使用可能な内部標  
準の作成に成功

- set A *cpe* primer *Cl. perfringens*
- set B *AB* primer *C. jejuni*
- set C *ces* primer emetic *B. cereus*
- set D *eae* primer EPEC (*eae*)
- set E *femB* primer *Staph. aureus*
- set F *tdh* primer *V. parahaemolyticus* (*tdh*)
- set G *astA* primer EPEC (*astA*)
- set H *invA* primer *Salmonella* spp.

spacer *AHH1*

略Tm値 set A~F : 86.5°C, set G & H : 76.5°C





## Project 2 自然毒の迅速検査法の確立と事例データベースの充実

### 1) 自然毒の迅速検査法の確立と精度管理

- ・自然毒食中毒事例は、原因が不明の場合社会不安をきたす
- ・自然毒食中毒事例は、まれであるが故に経験に乏しく対応に苦慮する



LC-MS/MSによる迅速検査法を確立し多くの地衛研(28施設)で方法を検証

平成22年度:フグ毒テトロドトキシン

平成23年度:植物毒リコリン

### 2) 事例データベースの拡充

255事例を地方衛生研究所全国協議会のホームページに蓄積

## Project 3 呼吸器、神経系ウイルス網羅的迅速検査法の確立

呼吸器ウイルス16種類、エンテロウイルス4種類  
を検出するmultiplex PCR  
平成22年度に良好な検出感度を確認

23年度

4機関で臨床検体(咽頭ぬぐい液、髄液)  
235検体について検討



146検体(62%)でウイルスを検出

来年度

地衛研への普及、精度管理

## Project 4: 疫学情報解析機能の強化

今年度

人材育成を目的とした研究発表会、研修会  
感染症情報解析ツールのニーズ調査

1. 日本公衆衛生学会自由集会  
「感染症情報の現状と展望を考える会」  
演者:岩手県、宮城県、感染研  
(2011年10月、秋田市)
2. 公衆衛生研究協議会(2012年 1月、東京都)  
「記述疫学とリスク評価データの評価の方法  
異常の探知方法」

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

普及、精度管理をおこなう

### 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

カビ毒(アフラトキシン)

### Project 3 呼吸器、神経系ウイルス網羅的迅速検査法の確立

地衛研への普及、精度管理  
(平成24年衛生微生物協議会シンポジウムで発表予定、  
病原体検出マニュアルに記載)

### 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

## II 分担研究報告

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  
ーリアルタイム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ー

研究代表者	調 恒 明	山口県環境保健センター	所長
研究分担者	後 藤 良 一	北海道立衛生研究所	所長
研究協力者	綿 引 正 則	富山県衛生研究所	主幹研究員
	嶋 智 子	富山県衛生研究所	主任研究員
	川 瀬 遵	島根県保健環境科学研究所	主任研究員
	亀 山 光 博	山口県環境保健センター	研究員
	堀 川 和 美	福岡県保健環境研究所	病理細菌課長
	江 藤 良 樹	福岡県保健環境研究所	主任技師
	山 口 敬 治	北海道立衛生研究所	主幹
	池 田 徹 也	北海道立衛生研究所	研究職員

研究要旨 インターカレーター法による食水系感染症原因菌の迅速検査法について、リアルタイムPCR機器を用いて網羅的迅速検査を開発してきた。平成21年度までに24病原遺伝子を網羅的に検出するキットを作成した（RFBS24）。平成23年度は、RFBS24IV（RFBS24 ver.4:平成22年度に作成）のprimerを大幅に変更し、リアルタイムPCRのサイクル数を増やして感度向上を図った。また、競合型内部標準を導入した（RFBS24V）。24菌株のDNAから対象遺伝子部位前後を増幅し、コピー数既知のDNA templateを調整した後、RFBS24Vの精度管理を実施した。また、リアルタイムPCR機器を用いた簡易スクリーニング試験を導入するために、*stx1*, *stx2*, *eae*の三種の遺伝子が同時に検出できる系を検討した。

#### A. 研究目的

感染症を惹起する微生物は、創傷感染、呼吸器感染、消化器感染、性感染等様々な感染経路を通じて人体に侵入する。

消化管感染症は食品や水を介して感染が起きるため、食水系感染症(Food-borne infectious diseases)ともいわれる。日本の法制度上、食水系感染症は、伝播力の強い疾病

(伝染病)と食中毒に分類された。いわゆる食中毒は食品中の「毒」で生体に影響を与えるが、日本における法制度上の「食中毒」は狭義の食中毒(Food intoxication)のほか、食品・施設を介する感染性胃腸炎の様相を呈することが多く、感染拡大防止や危害の未然防止など公衆衛生の観点から、早急な原因物質ならびに原因食品等の究明が求められる。