

部 長	課 長

研 究 発 表 伺 い

平成 年 月 日

研究者名	、 、 、
所 属	部 課、
発表題目	
発表年月日	平成 年 月 日
発 表 先	(学会名、雑誌名等)
概 要:	
本庁関連課名	
本庁事前調整 ・要 ・不要	要の場合 調整年月日 年 月 日 調整内容:

平成〇年度 研究評価書（事前評価）

評価様式1号
平成 年 月 日

研究者名：
所 属： 部 課
研究題目：
<u>※最高点5－最低点1とする</u>
<p>A)研究の必要性 ()</p> <ul style="list-style-type: none"> ・行政ニーズ・社会的ニーズがあるか (問題解決につながるテーマか、社会における緊急性・重要性が高いとみとめられるか、大阪府の地域事情等にも配慮した研究かどうか) ・研究意義がみとめられるか (当該分野の研究水準向上・公衆衛生向上のために必要か、多方面への波及効果、長期的発展の可能性) <p>B)研究の妥当性 ()</p> <ul style="list-style-type: none"> ・公的機関である当所で行う必要性があるか (民間のみでは困難、市場原理によるインセンティブが働かない、産学官連携等の新たな付加価値が見込まれるか等) ・独創性があるか、同種研究の従来研究成果・関連等を把握しているか ・職員・施設能力等からみて目的達成見込みがあるか <p>C)研究計画の妥当性（適切性） ()</p> <ul style="list-style-type: none"> ・職員・予算等の配分が効果的になされているか ・目的達成可能な計画となっているか ・研究目的・成果の見通しが明確で、具体的か ・研究手法が現在の科学的水準からみて妥当か ・他の研究機関等と連携している場合、相手先は適切に選択しているか <p>D)研究成果活用の可能性・実用性 ()</p> <p style="padding-left: 40px;">研究成果活用の可能性（短期的・長期的、両方の観点からみて）</p>
コメント

平成○年度 研究評価書（中間評価）

評価様式 2 号

平成 年 月 日

研究者名：	
所 属：	部 課
研究題目：	
<u>※最高点 5 - 最低点 1 とする</u>	
A) 研究テーマの進捗状況	()
着実に進んでいるか、遅滞している場合は、どの程度か	
B) 研究計画との整合性	()
計画どおりであるか、再考するべきか	
人的配分、予算の執行状況は適切か	
他の研究機関と連携している場合、連携は成功しているか	
C) 研究の達成の見通し	()
目的とする研究成果の見込みはあるか	
D) 研究の必要性の確認	()
事前評価で確認した研究の必要性は、今も変わらないか	
他の研究機関等で、同種・類似の研究が実施されていないか	
社会情勢等の変化に伴い、研究の意義がそこなわれるものとなっていないか	
コメント	
※事前評価の妥当性	

平成〇年度 研究評価書（事後評価）

評価様式 3 号
平成 年 月 日

研究者名
所 属
研究題目
※最高点 5 - 最低点 1 とする
<p>A) 計画どおり進められたか ()</p> <p>当初の「成果の見通し」どおり又はそれに近い結果となったか 所内の予算・人的配分などは計画どおりに行われたか 研究手法等は計画どおりであったか 他の研究機関等と連携した場合、その連携は成功したか</p> <p>B) 研究成果（目的達成度はどうか、成功したか？）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・研究成果の意義 () 問題解決につながる結果が得られたか、 研究成果が重要と認められるか、 研究成果が独創性・新規性があるか 研究成果が行政ニーズ・社会的ニーズに応えるものであるか、 研究成果が当該分野の研究水準向上・公衆衛生向上に貢献するものか、 研究成果が異分野など多方面への波及効果があるか ・研究成果の活用の可能性 () (特許・実用化等の可能性、将来的に研究が継続・展開できるものであるか) ・研究成果の普及 () 学会や専門誌等での発表は積極的になされているか <p>C) 今後の研究継続の必要性 ()</p> <p>事前評価で確認した研究の必要性は今も変わらないか 他の研究機関で同種・類似の研究が実施されていないか 社会情勢の変化等で研究意義がそこなわれるものとなっていないか</p> <p>コメント</p>
※事前・中間評価の妥当性

参考資料

厚生科学研究に係る評価の実施方法に関する指針

(厚生省告示第6号:平成10年1月28日)

第1編 総括的事項

第1章 目的

平成9年8月、「国の研究開発全般に共通する評価の実施方法の在り方についての大綱的指針」(内閣総理大臣決定)が策定され、国民の保健・医療・福祉・生活環境など国民生活の向上に資することを目的とする厚生科学研究においても、厳しい財政事情の下、限られた国の財政資金の重点的・効果的配分、及び研究者の創造性が十分に発揮されるような柔軟なかつ競争的で開かれた厚生科学研究の推進を図りつつ、研究に国庫を投入していくことに関し、広く国民の理解と支持を得ることが求められている。

このため、研究事業所管課、別紙に掲げる厚生省所管の国立試験研究機関及び国立医療機関と一体化した研究機関(以下「研究機関」という。)並びに各種法人(以下「評価実施主体」という。)が行う研究課題の評価及び研究機関の評価について、外部評価の実施、評価結果の公開、研究費等の研究開発資源の配分への適切な反映等を行うことにより、研究評価の一層効果的な実施を図ることを目的として本指針を策定するものである。

第2章 対象範囲

本指針の研究評価の対象範囲は、以下のとおりとする。(平成10年度概算要求事項)

- ①厚生科学研究費補助金による各研究事業
- ②特定疾患研究費補助金(特定疾患調査研究費)による研究事業
- ③国立病院特別会計におけるがん研究助成金、循環器病研究委託費、国際医療協力研究委託費、小児医療研究委託費、精神・神経疾患研究委託費及び長寿医療研究委託費による研究事業
- ④医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構が実施する基礎研究推進事業
- ⑤医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構が実施する医薬品、医療機器等の研究開発に対する出融資事業
- ⑥研究機関が実施する研究及び活動

第3章 評価実施主体、研究者及び評価者の責務

(1)各評価実施主体は、それぞれの研究事業や研究機関に適した評価を行うため、本指針を基本として、それぞれの性格に応じた実施要領等の具体的な仕組みを整備し、厳正な評価を実施するとともに、国民に対する積極的な情報提供を図り、本指針の目的が達せられるよう努力しなければならない。

(2)研究者は、研究の評価が、本来、研究活動に不可分のものとして自主的に行うべきことを念頭に置き、評価の重要性を十分認識の上、自発的に評価に協力するとともに、評価の結果を十分に生かして積極的に研究に取り組まなければならない。

(3)評価者は、厳正な評価を行うことを常に認識するとともに、優れている研究を伸ばし、より良いものになるよう、研究者を励まし、適切な助言を与えるということを忘れてはならない。また、自らの評価結果が、後の評価者によって評価されるとともに、最終的には国民によって評価されるものであることを十分に認識しなければならない。

第4章 評価の基本的な考え方

1. 外部評価の実施

評価実施主体は、評価の客観性・公正さ・信頼性を確保するために、第三者(評価実施主体にも研究者の所属する機関(以下「被評価主体」という。)にも属さない者)を評価者とした外部評価を実施することを原則とし、評価者は当該研究分野及びそれに関連する分野の専門家から選任するものとする。ただし、特に必要と認める場合には、当該研究分野の専門家以外の有識者等からも選任できるものとする。

なお、必要に応じて、評価実施主体、当該研究事業の所管課又は関係課に所属する者、被評価主体に所属する者も評価者として選任できるものとする。

2. 開かれた評価の実施

厚生科学研究の現状について国民の理解を得るとともに、評価の透明性・公正さを確保するため、評価に係る諸情報を積極的に公開することが必要である。

ただし、個人情報・企業秘密や未発表の研究成果・知的財産権の取得等に係る事項の取扱いについては、それらを保護する観点から十分な配慮を行うものとする。

3. 研究開発資源の配分への反映等評価結果の適切な活用

評価結果を十分に活用し、研究の一層の活性化を図るため、画一的、短期的な視点のみにとらわれないよう留意しつつ、評価結果を研究費等の研究開発資源の重点的・効率的配分、研究開発計画の見直し等の研究企画に適切に反映することが必要である。このことは、柔軟かつ競争的で開かれた、より創造的な研究環境の醸成に寄与し、活力あふれた研究開発を推進することにもつながるものである。

4. 評価支援体制の整備

(1)研究の評価を行うに当たっては、評価者・被評価者双方において、関係資料の準備やその検討など、一連の評価業務に係る作業が必要となるが、評価に伴うこれらの作業負担が過重なものとなり、かえって研究活動に支障が生ずるようなことにならないよう、評価実施主体においては被評価主体や研究者の協力を得て、研究者の研究課題・研究成果等の情報を収集し、管理し、提供する仕組み(データベース)の整備を図ることが必要である。

(2)評価実施主体は、評価の準備・支援を行う要員や評価実施のための所要の予算などの確保に努めることが必要である。

5. 研究の性格等に応じた適切な配慮

(1)本指針が対象とする研究は、多様な目的を持つものであり、例えば出融資事業による研究や研究機関の試験・調査・研究などそれぞれの研究事業が持つ性格や目的を十分に考慮し、それぞれの研究事業や研究機関に適した評価を行うことが必要である。

(2)国立試験研究機関の試験・調査等は、各種の研究活動の基盤整備的な役割を担うものであり、評価に当たっては個々の業務の性格を踏まえ、一般的な研究活動の評価の際に使用される評価指標、例えば論文数や特許権の取得数などとは異なる評価指標を用いるなどの配慮が必要である。

第5章 本指針の見直し等

厚生科学審議会は、評価の実施方法について必要に応じて再検討を行い、本指針をより適切なものとするべく見直しを行うものとする。

第2編 研究課題の評価の具体的実施方法

第1章 評価の実施方法

1. 総括的事項

- (1)研究課題の評価は、新規申請課題の採択の可否及び指定県有課題の適否について審査する事前評価、研究継続の可否等を審査する中間評価、研究終了後の研究成果を審査する事後評価の3つの過程に分けられる。
- (2)必要に応じて、施設の訪問調査を実施する。
- (3)緊急時の行政的要請に基づいて行う調査研究等は、事前評価の対象としないことができる。

2. 事前評価

(1)評価方法

- ①事前評価を行うため、研究事業ごとに、事前評価委員会を評価実施主体に置く。
- ②事前評価委員会は、原則として当該研究分野の専門家から構成される。また、必要に応じて専門家以外の有識者等や、評価実施主体、本省所管課及び関係課に所属する者も委員とすることができる。
- ③事前評価委員会は、各研究課題(後述する評価小委員会を置いた場合には、評価小委員会の報告に基づいて絞り込んだ研究課題)について、書面により専門的・学術的観点からの評点と行政的観点からの評点の両面から総合的に評価を行う。なお、その際大型の公募研究(先端的厚生科学研究等)については、必要に応じ当該研究申請者に対して出席及び説明を求めること(ヒアリング)や施設の訪問調査を実施し、評価を行うものとする。
- ④事前評価委員会は、必要に応じて当該研究分野の専門家、本省所管課及び関係課に所属する者からなる評価小委員会を置くことができる。
- ⑤評価小委員会は、各研究課題について、専門的・学術的観点と行政的観点から書面による評価を実施し、課題数の絞り込みを行い、事前評価委員会に報告する。

(2)評定事項

事前評価の評定事項は、次のとおりとする。

①専門的・学術的観点からの評定事項

(ア)研究の厚生科学分野における重要性

- ・厚生科学分野に関して有用と考えられる研究であるか

(イ)研究の厚生科学分野における発展性

- ・研究成果が厚生科学分野の振興・発展に役立つか

(ウ)研究の独創性・新規性

- ・研究内容が独創性・新規性を有しているか

(エ)研究目標の実現性

- ・実現可能な研究であるか

(オ)研究者の資質、施設の能力

- ・研究業績や研究者の構成、施設の設備等の観点から、遂行可能な研究であるか

②行政的観点からの評定事項

(ア)行政課題との関連性

- ・厚生行政の課題と関連性がある研究であるか

(イ)行政的重要性

- ・厚生行政にとって重要な研究であるか

(ウ)行政的緊急性

- ・現時点で実施する必要性・緊急性を有する研究であるか。

③総合的に勘案すべき事項

研究内容の倫理性等総合的に勘案すべき事項を評定事項に加えるものとする。

- ④申請者に対してヒアリングを実施する場合は、上記の評定事項の他、申請課題に対する研究の背景、目的、構想、研究体制、展望等についても説明を求めるものとする。

(3)評定方法

各研究課題につき、専門的・学術的観点と行政的観点の評定事項に基いて、それぞれ以下の5段階評価で評点を付ける。なお、評点を「1」又は「5」とした場合は、その理由を付すこととする。

- 5:特に優れている
- 4:優れている
- 3:良好
- 2:やや劣っている
- 1:劣っている

(4)留意すべき事項

- ①事前評価委員会の委員は、当該研究事業に応募することができないものとする。
- ②委員は、自らが現在所属している部署に所属している者の研究課題については、評定しないものとする。
- ③評点付けにおいては、1課題に対して事前評価委員会(評価小委員会を置いている場合は評価小委員会)の複数名の委員が行うものとする。
- ④なお、課題の採択に当たっては、研究資金の重点的・効率的配分を図る観点から、関係省庁等と十分な連携・調整等を図ることとする。

3. 中間評価

(1)評価方法

- ①研究課題の中間評価及び事後評価を行うため、研究事業ごとに、中間・事後評価委員会を評価実施主体に置く。
- ②中間・事後評価委員会の委員の構成は、事前評価委員会の委員の構成に準じるものとする。
- ③中間・事後評価委員会は、毎年、継続して実施される研究課題について、書面により専門的・学術的観点からの評点と行政的観点からの評点の両面から総合的に評価を行う。なお、その際必要に応じて当該研究継続申請者に対してヒアリングを実施し、評価を行うものとする。
- ④中間・事後評価委員会は、大型の研究については、必要に応じて研究を実施している施設の訪問調査を行う。

(2)評定事項

中間評価の評定事項は、次のとおりとする。

①専門的・学術的観点からの評定事項

(ア)研究計画の達成度(成果)

- ・当所の計画どおり研究が進行しているか

(イ)今後の研究計画の妥当性

- ・今後研究を進めていく上で問題点はないか
- ・問題点がある場合は、研究内容等の変更が必要か
- ・その際にはどのように変更または修正すべきか

(ウ)研究継続能力

- ・研究者の構成、研究者の能力や施設の段階からみて研究を継続し、所期の目的を達成することが可能か
- ・研究者の構成に変更が必要な場合は、どのように変更すべきか

②行政的観点からの評定事項

「期待される厚生行政に対する貢献度」を評定事項とする。

③総合的に勘案すべき事項

研究内容の倫理性等総合的に勘案すべき事項を評定事項に加えるものとする。

④研究継続申請者に対してヒアリングを実施する場合は、上記の評定事項の他、次年度の継続研究課題に対する研究課題の概要、研究の経過、今後の展望等についても説明を求めるものとする。

(3)評定方法

評点については、事前評価と同様に5段階で評点を付ける。

(4)留意すべき事項

- ①中間・事後評価委員会の委員は、当該研究事業に応募することができないものとする。
- ②委員は、自らが現在所属している部署に所属している者の継続研究課題については、評定しないものとする。
- ③評点付けにおいては、1課題に対して中間・事後評価委員会の複数名の委員が行うものとする。

4. 事後評価

(1)評価方法

中間・事後評価委員会は、研究課題について、書面により専門的・学術的観点からの評点と行政的観点からの評点の両面から総合的に評価を行うものとする。なお、その際必要に応じてヒアリングを実施するものとする。

(2)評定事項

事後評価の評定事項は、次のとおりとする。

①専門的・学術的観点からの評定事項

(ア)研究目的の達成度(成果)

- ・計画していた目的を達成したか
- ・計画していた目的を達成できなかった場合、どこに問題があったか

(イ)研究成果の学術的・国際的・社会的意義

- ・研究成果の学術的・国際的・社会的意義がどの程度あるか

(ウ)研究成果の発展性

- ・研究成果の今後の研究への発展性があるか

②行政的観点からの評定事項

「期待される厚生行政に対する貢献度」を評定事項とする。

③評価の際には、専門学術雑誌への発表、学会での講演、発表など研究成果の公表状況や特許の出願及び取得状況について考慮する。

④当該研究の主任研究者に対してヒアリングを実施する場合は、上記の評定事項の他、研究の結果及び成果と今後の展望等についても説明を求めるものとする。

(3)評定方法

評点については、事前評価と同様に5段階評価で評点を付ける。

5. 評価の実施体制等

(1)評価実施主体は、事前評価委員会及び中間・事後評価委員会の委員を選任する。

(2)事前評価委員会及び中間・事後評価委員会の委員の数は10～15名程度を標準とする。

(3)中間・事後評価委員会の委員の概ね3分の1は、事前評価委員会の委員とは異なる者をもって充てるものとする。

(4)事前評価委員会は、評価小委員会の委員を選任する。

(5)評価に必要な申請書等の様式、委員の任期等については、別途定めるものとする。

第2章 評価結果の通知・公表等について

1. 評価結果の通知等について

(1)事前評価

評価実施主体は、課題の採否結果を研究事業所管課を通じて厚生科学審議会に報告するとともに、個々の研究申請者に通知する。なお、必要に応じて評価結果の内容等を研究者に通知するものとする。

(2)中間評価

評価実施主体は、研究継続の可否を研究事業所管課を通じて厚生科学審議会に報告するとともに、事前評価委員会及び個々の研究申請者に通知する。なお、必要に応じて研究計画の変更、研究費の増減、共同研究者の変更、研究の中止等の評価結果の内容を研究者に通知するものとする。

(3)事後評価

評価実施主体は、研究事業所管課を通じて厚生科学審議会に報告するとともに、事前評価委員会及び個々の研究者に通知する。

2. 評価結果の公表等について

(1)以下の事項について、研究事業所管課は、刊行物、厚生省ホームページ等により公表するものとする。

①研究採択課題、研究費の交付予定額や研究報告書の概要

②事前評価委員会及び中間・事後評価委員会の委員の氏名

(2)公表に当たっては、個人情報・企業秘密や未発表の研究成果・知的財産権の取得等について、それらを保護する観点から十分に配慮するものとする。

第3編 研究機関の評価の具体的実施方法

第1章 評価の実施方法

研究機関については、各研究機関における厚生科学研究の一層の推進を図るため、機関活動全般を評価対象とする機関評価を定期的実施する。

1. 評価方法

- (1)各研究機関に、当該研究機関の運営全般を評価するために、概ね10名程度の当該研究機関に所属していない専門家等より構成される評価委員会を置く。
- (2)研究機関の長は、当該研究機関全体の評価が3年に1回を目安として定期的に行われるよう評価実施計画を策定する。
- (3)研究機関の各部等は、評価実施計画に基づいて、当該部等の活動の現状、体制、将来の計画等について報告書を作成し、研究機関の長に提出する。
- (4)研究機関の長は、各部等からの報告書を取りまとめ、評価委員会に提出する。
- (5)評価委員会は、研究機関との討議等を行い、総合的見地から評価を実施し、運営全般についての評価報告書を作成する。
- (6)評価委員会は、評価報告書を研究機関の長に提出する。
- (7)評価結果は、研究機関の長が取りまとめ、当該研究機関の所管課を通じて厚生科学審議会に報告する。

2. 評定事項

機関評価の評定事項は、以下の事項とする。

- ①研究・試験・調査の状況と成果
- ②研究開発分野・課題の選定
- ③研究資金等の研究開発資源の配分
- ④組織・施設設備・情報基盤・研究及び知的財産権取得の支援体制
- ⑤共同研究・民間資金の導入状況、国際協力等外部との交流
- ⑥倫理規定の整備状況
- ⑦その他

3. 評価の実施体制

(1)評価委員会の委員の構成

評価委員会の委員は、以下の者とする。

当該研究機関に所属していない者で、当該研究機関の行う研究分野の指導的研究者から、当該研究機関の長が選任する者

ただし、必要に応じて研究機関の長は、以下の者を委員として選任することができるものとする。

- ①当該研究機関の所掌する専門分野以外の分野の有識者
- ②研究機関所管課、または研究事業所管課に所属する者
- ③当該研究機関に所属する者

(2)評価委員会の委員の任期等は別に定める。

第2章 評価結果の通知・公表等について

1. 評価結果の通知について

(1)厚生科学審議会は、評価委員会のとりまとめた評価結果に基づき検討を行い、当該研究機関の厚生科学研究の一層の推進を図るための改善すべき事項等について意見を取りまとめ、当該研究機関の所管課はその意見を踏まえ、研究機関の長に対し対処を指示するとともに、その支援に努めるものとする。

(2)各研究機関においては、厚生科学審議会の意見を踏まえた改善状況について同審議会に報告する。

2. 評価結果の公表等について

(1)各研究機関の所管課は、所管している研究機関で行われている研究課題や研究成果、厚生科学審議会が改善すべき事項について取りまとめた意見及びそれに基づき講ずる、または講じた状況等について、刊行物、厚生省ホームページ等により公表する。

(2)公表に当たっては、個人情報・企業秘密や未発表の研究成果・知的財産権の取得等について、それらを保護する観点から十分に配慮するものとする。

第3章 事前の自主点検の実施等

各研究機関は、すでに所内に設置されている評価委員会等を活用し、当該研究機関の研究活動について定期的な自主点検の実施に努めるものとする。

(別紙)

厚生省所管の国立試験研究機関及び国立医療機関と一体化した研究機関

1. 施設等機関

国立社会保障・人口問題研究所

国立医療・病院管理研究所

国立公衆衛生院

国立感染症研究所

国立健康・栄養研究所

国立医薬品食品衛生研究所

国立身体障害者リハビリテーションセンター研究所

2. 国立高度専門医療センター

国立がんセンター研究所

国立循環器病センター研究所

国立精神・神経センター神経研究所

国立精神・神経センター精神保健研究所

国立国際医療センター研究所

3. 国立病院

国立小児病院小児医療研究センター

4. 国立療養所

国立療養所中部病院長寿医療研究センター

Ⅲ 有機的連携のためのモデル研究

—細胞付着性大腸菌の実態の把握とその検査法の確立に関する共同研究—

Ⅲ 有機的連携のためのモデル研究

－細胞付着性大腸菌の実態の把握とその検査法の確立に関する共同研究－

1. 研究目的

下痢原性大腸菌は、病原的機序の違いによって腸管出血性大腸菌(EHEC) (または志賀毒素産生性大腸菌、STEC)、腸管組織侵入性大腸菌(EIEC)、腸管毒素産生性大腸菌(ETEC)、腸管病原性大腸菌(EPEC)の4種類と複数の付着様式がわかっている腸管細胞付着性大腸菌(EAEC)の5種類のカテゴリーに大別されている。各大腸菌の病原性発現に至る第一段階は腸管粘膜上皮細胞への付着であり、その付着様式はそれぞれの大腸菌において相違することが明らかになってきた。一方、日常の下痢原性大腸菌検索においては、その同定に際し病原因子の確認が重要であり、ETECとEHECでは毒素産生性、EIECでは細胞侵入能の有無によって同定されているが、これら以外の大腸菌では血清型別が病原菌と非病原菌の鑑別に利用されている。すなわち、特定の血清型株を病原性大腸菌(EPEC)、それ以外の血清型を非病原性大腸菌としている。近年、細胞への付着性そのものが病原因子としての役割を持つという報告があり¹⁾、その付着様式を限局型付着(localized adherence, LA)、分散型付着(diffused adherence, DA)、凝集型付着(aggregative adherence, AA)に区別し、それぞれの大腸菌を限局付着性大腸菌(LAEC)、分散付着性大腸菌(DAEC)、凝集付着性大腸菌(EA_{agg}EC)とよび、これらの3つのカテゴリーも下痢原性大腸菌とすることも²⁾ある。しかしながらEHEC、ETECにもこれらと同じ付着因子を保有するものが知られており、大腸菌の分類には少なからず混乱がある。また、この付着様式は培養細胞を用いて確認されるが、再現性に乏しく、時間もかかり、判定が紛らわしい。さらに大腸菌が検出されたならば直ちに試験するために常時細胞を使用できる状態に維持しておかなければならず、労力や経済的負担も大きく、多くの施設で行う日常検査法とはなっていないことから、大腸菌の付着因子に関する実態は明らかにされていない。

そこで日常業務の検査対象菌の一つである大腸菌における付着因子を迅速・簡便に試験するため遺伝子増幅法(PCR法)を検討し、保有実態を明らかにすることを目的として平成11、12年度の2ヶ年に地方衛生研究所間で共同研究を行ったのでその結果を報告する。

2. 研究方法

1) 被検菌株

地方衛生研究所で保存されているヒト由来1150事例(1321株)とヒト以外材料由来593事例(616株)(内訳、動物;322例、食品;84例、河川水;92例、砂場;39例、汚水・環境水;46例、その他;10例)の合計1743事例(1937株)を実験に供した(表7)。被検株は各施設で分離時に同定したEHEC、ETEC、EIECと、それ以外の菌株は血清型別によってEPECと'その他の大腸菌'に分類して集計した。なおEPECは施設ごとで同定のために使用している血清型表が異なっていたため本研究では、それらの血清型表を基に血清型表を作成し(表8)、これに従って分類した。なおH型別未実施もしくは型別不能(HUT)でO血清型が表に記載されているものはEPECに含め、また集団発生由来株は1事例として集計した。

2) 増幅用プライマー

付着様式が異なる3種類の遺伝子領域 (*eaeA*、*bfpA*、*aggR*) の増幅用として明らかにされているいくつかの異なったプライマーと凝集付着性大腸菌 (EAggEC) が産生する耐熱性毒素 (ST) 様毒素 (EAST1) の遺伝子増幅用プライマー (*astA*) は表 9 に記載したが、プライマーは同じ菌株で統一した方法によるPCR法を行い、増幅条件やプライマーの使用量ならびに数種のプライマーを検討し、最終的に3回に分けて合計19株の菌株で予備実験を行い施設間で差がないこと、増幅効率と特異性の優れた組み合わせを確認して最終的に決定し、全てのプライマーは1施設でカスタム合成して各施設に配布し、同ロットを同量使用した。増幅後の各遺伝子の電気泳動像によるDNA断片を図 2 に示した。

3) PCR法

全施設とも *eaeA* と *aggR* (Pr-*eae* と Pr-*agg*)、*bfpA* と *astA* (Pr-*bfp* と Pr-*ast*) の2種類を混合するマルチプライマー法で行い、各プライマーの最終濃度は0.2 μ M を使用した。被検菌株からのテンプレートは、普通寒天平板上の集落を滅菌蒸留水に一夜培養菌液程度の濁度に浮遊し、100°C、10分加熱後、15,000rpm、5分の遠心上清を5 μ l 供した。試薬は全施設とも同一ロットのReady-To-Go (ファルマシア) を用いた。なお使用する増幅器 (サーマルサイクラー) は施設ごとに異なるが、増幅ファイルは、94°C、2分前加熱後、94°C、45秒→55°C、2分→72°C、1分の25サイクル後、72°C、5分で最終伸展させた。電気泳動には100bp ladder DNA サイズマーカー (タカラ) を用いたほかは写真撮影とともに各施設の装置で行った。

3. 結果と考察

1) 大腸菌別遺伝子保有状況 (表10)

ヒト由来では1150事例 (1321株) 中647例 (56.3%)、ヒト以外由来では593事例 (616株) 中209例 (35.2%) がいずれかの遺伝子を保有しており、陰性のものはヒト以外由来株に多くみられた。保有株のうち *astA* をのぞく付着因子の保有はヒト由来では473例 (73.1%)、ヒト以外由来では119例 (56.9%) でヒト由来株に多数の保有株がみられた。保有遺伝子は *eaeA* には3種類または4種類のパターンがみられるが、317例 (27.6%) と117例 (19.7%) でヒト由来に多く、*aggR* は156例 (13.6%) と2例 (0.3%) でヒト以外由来での保有が著明に少なかった。保有パターンでは *eaeA* 単独保有が最も多く、ついで *astA* 単独保有であり、*aggR* + *astA*、*aggR* 単独保有はヒト由来株で多くみられている。*bfpA* 保有株は全般的に少なく、調べた1743事例 (1937株) のうち17例 (1.0%) にしかみられず、ヒト由来15例 (1.3%) とヒト以外由来2例 (0.3%) であった。

2) 腸管出血性大腸菌 (EHEC) の保有状況 (表11)

ヒト由来202事例 (258株) とヒト以外由来134事例 (136株) を調べたが、*eaeA* 保有がもっとも多くヒト由来では181例 (89.6%)、ヒト以外由来で84例 (62.7%) と高率であり、*aggR* または *bfpA* 保有はヒト由来の *aggR* 単独の1株しかみられず、極めて少ないものであった。*astA* 保有も少数で単独保有、5例と *eaeA* との複数保有の12例であった。遺伝子を全く保有しない菌株はヒト以外由来では34.3%にみられヒト由来の9.4%より高率であった。

これを血清型でみると、わが国で主要なO157、O26、O111の3血清型では由来に関係なく

全例(全株)が *eaeA* を保有していた。他の血清型では0103、0119や0121も *eaeA* 保有率が高いが、091や0139では保有株はみられず、同一血清型内に保有するものとしなない株があるなど血清型で様々であった。志賀毒素(STx)(あるいはベロ毒素;VT)の他に *astA* を併せ保有する菌株も少数ではあるが確認され、これらの二種類の毒素を保有する菌株と付着因子を保有しないEHEC株の病原的機序、ならびに下痢症における関連性を明らかにする必要がある。また、EHECでは *aggR* 保有が少なく *eaeA* が主要な付着因子であることは、この遺伝子とSTx遺伝子との関連が示唆され、EHECの成立過程を考えると、後述のEPECなどの *eaeA* 保有菌にSTxの毒素遺伝子が保有されやすいか、導入されやすいという可能性が考えられる。

3) 腸管毒素産生性大腸菌 (ETEC) の保有状況 (表12)

ヒト由来166事例(186株)とヒト以外由来52事例(54株)では、*astA* 単独保有が107例(64.5%)と24例(46.2%)で最も多く、付着因子はヒト由来株では *eaeA*、*aggR* が2.4%、1.2%と少数であり、ヒト以外由来株では全く認められなかったが、このカテゴリーは今回調べた付着因子とは別の colonization factor antigen(CFA)という線毛によることが明らかにされていることから当然の結果である。しかしながらCFAは調べていないが、*eaeA* や *aggR* 保有株も少数ながら存在することはETECにもこのような付着因子による腸管内での定着性が存在するのか、CFAとの関連がどうなっているのか調べなければならない。

ETECの産生毒素別にみると、ヒト由来株の *astA* 保有は *eaeA* と *aggR* との複数保有も含めた110例のうち、ST(耐熱性毒素)を産生する株は105例(95.5%)であるのに対してLT(易熱性毒素)産生株は31例(28.2%)で、ST産生との関連を示す結果であった。一方ヒト以外由来では、24例の *astA* 保有のうちST産生は12例(50.0%)、LT産生は18例(75.0%)で、ヒト由来株と異なりLT産生と併行していた。これはヒト由来のST単独産生株では79例(70.5%)、LT単独産生株は5例(27.8%)が *astA* 産生であるのに対し、ヒト以外由来ではST単独産生株は6例(19.4%)、LT単独産生株が12例(85.7%)であったことから明らかである。この *astA* 保有が下痢症発現にどのように関係しているのか、ヒト由来株がSTと、ヒト以外由来株がLTと関連することについて、さらなる調査と細菌学的研究が必要である。また付着因子保有株がこのETECの腸管内定着因子であるCFAを保有しないのか、保有しているならばこれらの付着因子が下痢発現にどのように関係しているのかなど、動物実験による下痢症状の確認や培養細胞(HEp-2やHeLaなど)による細胞への付着様式の確認など生物学的な研究から明らかにされなければならない。

4) 腸管組織侵入性大腸菌 (EIEC) の保有状況 (表13)

この下痢原性大腸菌はヒト由来の8株のみの結果であるが、今回調べた4種類の遺伝子保有は全く認められなかった。このカテゴリーは赤痢菌と同じく別の遺伝子に制御された付着因子による細胞への接着が明らかにされている。

5) 腸管病原性大腸菌 (EPEC) の保有状況 (表14)

ヒト由来508事例(578株)、ヒト以外由来91事例(94株)を調べた。ヒト由来では *eaeA* あるいは *aggR* 保有が74例(14.6%)と137例(27.0%)、ヒト以外由来ではそれぞれ11例(12.1%)、2

例(2.2%)で、*aggR*保有率に有意差がありヒト由来株においてかなり高率であった。*bfpA*は試験したEPEC、599例中*eaeA*と複数保有の3例(0.5%)だけで、本カテゴリー株の病原的機序とされる集束線毛(BFP)による細胞への局在性の緩やかな付着に引き続き起こる細胞内インチミン増量(A/E遺伝子;*eaeA*が関係する)というステップに一致しない結果を示したが、細胞への接着に*bfpA*、すなわちBFPによらないものが存在することを示している。このカテゴリーにはむしろそのような菌株が多いという結果は興味がある。しかしながら*bfpA*の別領域を調べることや*eaeA+bfpA*株、*eaeA*単独株などについて動物実験や培養細胞試験などの生物学的方法による下痢発現の機序、付着性を調べることが必要と思われる。また本カテゴリーにはEAggECに分類すべき菌株が多数含まれており、ヒトとヒト以外株においてその保有状況に有意差がみられたが、これはヒトでは下痢症からの分離が多く、無症状や健康者からの株が少なく、ヒト以外では単にEPEC血清型に該当したことだけで集めたことによる結果で、*aggR*保有のEPEC株、すなわちEAggECは下痢原性をもつことを表しているものと思われる。*astA*保有は由来による有意差がなく22.4%、25.3%で、保有しない菌株との間に病原的相違があるのか明らかにされなければならない。

EPECの血清型による保有状況(表15)は、下痢患者から検出される頻度が高い01と018では付着因子や*astA*毒素遺伝子を保有するものは非常に少数であるが、ヒト以外由来の01では半数以上(55.6%)が*astA*単独保有であった。他の血清型では全体的にヒト由来株に付着因子保有が多く認められ、0111、0126、086では*aggR*保有がそれぞれ62事例中54例(87.1%)、50例中37例(74.0%)、44例中27例(61.4%)であったが、とくに0111、0126では*aggR+astA*型保有が多いのに対して086では*aggR*単独型であった。ヒト以外由来では*astA*保有株の23例中21例(91.3%)が単独保有株であり、ヒト由来株の4.5%とは相違がみられた。

EPEC、055と026では保有率からみるとEHEC、0157や026等と類似し、*eaeA*保有が多く、それぞれ31例中29例(93.5%)、21例中15例(71.4%)という高い頻度であった。これは、EHEC、0157はEPEC、055に由来するという報告があり³⁾、EHEC、026の場合もEPEC、026にSTx遺伝子をもつファージが感染していることを示唆する結果と思われる。EPEC、0119においても付着因子は*eaeA*だけでこの血清型のEHECもEPECからの由来を思わせる結果として興味がある。一方、EPEC、0111は付着因子は全て*aggR*であるのに対し、EHEC、0111は全て*eaeA*保有株であることは、EHEC、0111の成立過程は055の場合のようなEPECではないように思われた。またEPEC、0128ではヒト由来株で*eaeA*保有株は38例中13例(34.2%)にみられたが、遺伝子を保有しない株(20例、52.6%)や*aggR*保有株も3株みられ、この血清型のEHECも同様の成立過程が推察されるが、上記の血清型ほどの関連性は認められず、菌株数が少ないことから、両カテゴリーのH抗原やSTx型などをも詳細に考慮する必要がある。ヒト以外由来では被検株数が少なく明確な考察はできないが、遺伝子保有率が低いものの、026や0119では*eaeA*保有株でありヒト由来と同様であった。

以上のように、EPECの付着因子には*eaeA*あるいは*aggR*の2種類が認められ、血清型によっていずれかにまとまっているものや、両方をもつものなどに分かれている。従って、*aggR*陽性株はEAggECに分類し、それ以外のLA型付着、すなわち*eaeA*保有株のうち特定の血清型をEPEC、それ以外をLAECとすることが検査体系としては行いやすいと考えられる。しかしながら*eaeA*だけでは病原性発現には至らないとする報告⁴⁾や、EHECとEPECの*eaeA*に相違があ

るとするものもあり⁹⁾、病原性があるかないかという問に対する回答はさらに多くの観点からの研究によらねばならない

6) 「その他の大腸菌」の保有状況(表13)

先に述べた4種類の下痢原性大腸菌に該当しないいわゆる非病原性に扱われる菌株は、ヒト由来266事例(291株)とヒト以外由来316事例(332株)について調べたが、*eaeA*保有と*aggR*保有ではヒト由来がヒト以外株より高率であり、ヒト以外由来では*aggR*保有株はみられず*eaeA*保有が316例中22例(7.0%)であった。ヒト由来株における*eaeA*保有はEPECの14.6%より21.8%と高率であったが、*aggR*は反対にEPECの27.0%よりかなり低い6.0%であった。

*aggR*保有株がヒト以外株に少なくヒト由来株に多いことは、この付着因子が下痢発現に関係することを示唆しているものと思われる。また*aggR*株がEPECに多いことは、下痢症患者からのものが多く、EPEC血清型に属するため同定し保存されるが、それ以外の菌株は患者由来であっても非病原菌とされるために保存されることは少ないものと考えられる。そのため健康者からのEPEC血清型菌株ならびに患者由来のEPEC以外の血清型菌株を用いて同様の調査が必要と思われる。*eaeA*保有株はEPEC、その他の大腸菌の両カテゴリともヒト由来に多く認められ、何らかの病原的意義をもつものと思われるが、先に述べたように反対の報告もあることから今後の研究に待たねばならない。なお*bfpa*保有はこのカテゴリのヒト由来株に多く13例(4.9%)にみられたが、多くは患者からのものであった。

7) *bfpa*遺伝子の保有状況(表16)

EPECで3例(3株)、その他の株で14例(15株)の合計17例(18株)が認められたが、全ては*eaeA*との複数保有が確認された。EPECに属する血清型はO119、O125、O127で、症状の有無が不明の1株と健康者由来2株で、3株とも*eaeA+bfpa*の複数の付着因子保有株で、これまでの分類に基づいたEPEC株であった。*bfpa+eaeA+astA*保有の12例(13株)の血清型はO157:H45が9例(10株)と最も多く、O153:H21、2株、OUT:H12、1株で、患者由来はそれぞれ8例(9株)、1株、1株であったが、全て非病原性大腸菌として扱われるカテゴリであった。他の*eaeA+bfpa*株はOUT株であり糞便由来と由来不明の2株であった。この*bfpa*保有株だけでみると*astA*保有株では有症者由来が多くみられることは、EAST1が下痢症に関係するようと思われるが、被検菌株数が少なくさらに多くの菌株について調査が必要である。また、O157:H45、O153:H21などのような病原因子からはEPECに合致する性状を保有しているがEPEC血清型に属さない大腸菌の扱いについてもさらに多くの由来が明らかな菌株での調査が不可欠である。

8) 患者由来と無症状者由来株の保有状況(表17)

各施設で調査した結果に基づいて患者株と無症状者株についてみると、遺伝子を保有しない株は後者に多くみられ、患者由来では何らかの遺伝子の保有株が多くみられた。すなわちEHECでは*eaeA*保有が患者では93.3%に対し無症状者では68.4%、EPECとその他の大腸菌では患者由来は*eaeA*、*aggR*、*astA*の保有率が高いが、*astA*保有は*aggR*との複数保有で、これは現在の分類ではEA_{agg}ECの定義に該当するものであった。その他の株では*astA*単独保有

が多く、この大腸菌の分類と下痢原性についての検討が必要である。また、*eaeA*や*aggR*単独保有株も患者由来株に多数みられたことは、これらの菌株も下痢発症に何らかの役割をもっていることを示すもので、現在の下痢原性大腸菌の分類の混乱を解決するためには、少なくとも病原因子を加味した定義による分類が必要と考えられる。そのためには各カテゴリーの菌株を多数検討し、その結果を菌株の由来を含めて考察する必要がある。なお今回ETEC、EIECの患者、無症状由来菌株数が少ないため比較はできなかった。

4. おわりに

近年の細菌学における病原的機序に関する分子生物学的研究が進展したのに伴い、これまでの下痢原性大腸菌の分類法にいくつかの問題点が明らかになってきた。それを解決するにはさらに多くの分野からの調査と研究に待たねばならないが、多くの検査施設では下痢原性大腸菌の検査は日常検査として行われているものであり、統一した検査法の確立が臨床上、行政上早急に必要である。以上のことから地方衛生研究所間において、付着性大腸菌の実態把握と検査法の確立に関する共同研究を行い、その結果をふまえて下痢原性大腸菌の日常検査に利用できると思われる分類法を図3に示したが、これは細菌学的な分類の確立を意図したものではなく、統一した同定・検査指針によって本菌検査を遂行するために示したものである。LAEC、DAEC、EA_ggECの明確な定義と区別の必要性、EPECにはLA型付着をもつものと保有しない従来の定義である特定の血清型を残していること、本研究で調査した付着因子以外にも腸管内付着（あるいは接着、定着）に関係するとされる因子があることなど、下痢原性大腸菌の分類を確立するためには、まだまだ解決しなければならない問題がある。

これまで述べてきたごとくEPECと付着性因子を保有するカテゴリーの病原的機序および分類上の定義が完全に明らかになっておらず、本研究で調べた付着因子の結果からの同定された菌株が病原性を保有しているかどうかは、今後の研究結果を待たねばならないことはいうまでもない。このことを認識した上で、同じEPEC血清型表を使い、同じ同定マニュアルに従って検査を行うことは危機管理上有意義であると思われる。

5. 文献

- 1) Nataro JP, and Kaper JB, Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin.Microbiol.Rev., 11:142- 201, 1998.
- 2) Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P and Levine MM, Pattern of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. Pediatr.Infect.Dis.J., 6:829-831, 1987.
- 3) Whittam TS, Evolution of *Escherichia coli* O157:H7 and other shigatoxin-producing *E.coli* strains. *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E.coli* strains p195-209, ed. Kaper JB and O'Brien AD, ASM, WashingtonDC, 1998.
- 4) Donnenberg MS and Kaper JB, Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect.Immun., 60:3953-3961, 1992.
- 5) Beebakhee G, Louie M, De Azavedo J and Brunton J., Cloning and nucleotide sequence of the *eae* gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. FEMS Microbiol. Lett., 91:63-68, 1992.

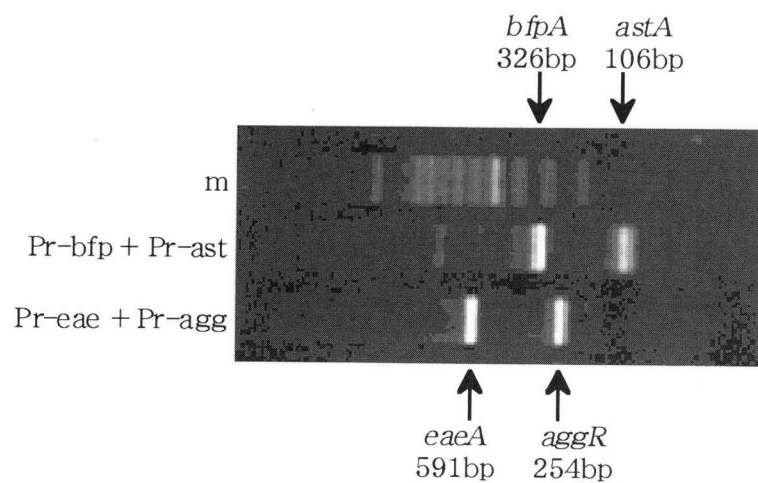


図2 PCR増幅後の電気泳動像

PCR法はマルチプライマー法で行い、その他の *E. coli* 血清型 0157:H45, PV51 (*eaeA*・*bfpA*・*astA*) と EPEC 0111:H21, EC2287 (*aggR*・*astA*) の混合菌液を PCR を行うごとに陽性対照としてテンプレートに使用した。

m : DNA サイズマーカー (100bp ladder)