

図3に示したように、このシステムには連絡網情報の更新に加えて、メール送信機能も用意しており、この機能を利用して、健康危機管理事例発生時には全国あるいは特定ブロック単位でメールを一斉送信することが可能になった。

このシステムは、感染症情報センター連絡網の管理に限らず、地衛研全国協議会としての各種の連絡網の管理や情報伝達の目的にも応用が可能であり、今後の発展的な活用が期待できる。

## 5. 感染症メーリングリストの運営

感染症メーリングリストを立ち上げ、地衛研職員、保健所および国立研究機関の職員に参加を呼びかけたところ、平成15年1月末現在で46機関(231名)の参加申し込みがあった。現在のところ、一般の参加者からの情報発信の頻度は必ずしも多くないが、検査法に関する質問や、それに答えるアドバイスなどの情報交換が僅かながら行われている。

メーリングリストへの関心を高めるために感染症に関連した報道記事を常時、紹介しており、参加者から好評を得ている。

感染症メーリングリストに対する参加者の関心の高さを計る目的で、レスポンス調査を行った。参加者231名に対して本年1月14日(火曜日)に調査依頼のメールを発信し、受信した旨を返信するよう求めたところ、14~17日の4日間で延べ112名(48.5%)から返信があった。図4に示したように、発信当日に返信があったのは82名で、以下、15日20名、16日6名、17日4名と漸減した。この結果からは比較的多くの参加者が常時メーリングリストの配信情報に注目している状況がうかがえた。

多数の専門家が閲覧するメーリングリストに情報を発信することにためらいを感じるといった声が聞かれたことから、今後は参加者が気兼ねなく、より活発に情報交換できるメーリングリストに育成させる工夫が必要と思われた。

## 6. 健康危機管理シミュレーション(試行)

現在構築中の健康危機管理情報ネットワークの有効性を評価し、あわせて健康危機発生時の情報収

集源や収集手段および地衛研の連携に役立つ情報連絡方法を調査する目的でシミュレーションの実施を検討した。新型インフルエンザ(H5N1型)患者の国内発生を題材にしたシナリオを用意し、研究班に所属する地衛研の中から6地研、延べ11名のウイルス検査部門職員に対して表1に示した内容のアンケート調査を行った。

試行の結果わかった主な点として、健康危機発生時の情報収集源としては文献検索が最も多く、次に専門家への電話等による問い合わせ、WHO、CDCおよび国立感染症研究所等のWeb検索が利用されており、現状では専門家間のメーリングリストの有用性はそれほど高く評価されていないことがあげられた。

一方、他の地衛研への情報提供手段としてはメーリングリストの利用が最も多く、伝達手段としてはその迅速性と効率性が評価されているようであった。

なお、危機の発生時点から事後措置までの各地衛研の対応を画一的なシナリオに沿って調査する方法では、組織および業務形態の違いから、地衛研によっては不自然な場面展開となることが避けられないこともわかった。また、本研究は構築中の健康危機管理情報ネットワークシステムの有用性を評価することを主要な目的としたが、地衛研ホームページが構築の途上にあることや、メーリングリストの普及、活性化が未だ十分でないこともあり、期待した評価を得ることはできなかった。

シミュレーションの本実施に当たっては、以上の点を考慮に入れ、調査方法や調査時期についての改善が必要と思われた。

## 7. 第7回地域保健のためのインターネット研究会の開催

平成14年11月29日に国立感染症研究所において、健康危機管理と感染症サーベイランスをメインテーマに研究会を開催し、地衛研、保健所、本庁および国立研究所職員ら、計69名が参加した。研究会のプログラムは資料1に示したとおりである。

## D 結論

健康危機の発生に際し、地衛研が連携して対処する上で基盤となる情報ネットワークの構築について研究を行った。地衛研間での情報の共有と発信のために地衛研ホームページを作成し、健康危機管理にかかわる情報を掲載した。今後はさらに掲載情報の充実と、より使いやすい情報検索方法について検討する。

このホームページを地衛研全国協議会の公式ホームページとするための承認と恒久的な維持・運営のための方策の検討を協議会に要請する。

江部班で構築している健康危機管理にかかわる各種のデータベースは地衛研の健康危機対応のための情報資源としてきわめて価値の高いものであり、今後も江部班と緊密に連携をとりつつ、これらのデータベースへの地衛研ホームページからのリンクを図っている。

電子メールは地衛研間の情報連絡、あるいは地衛研協議会の情報伝達手段としても有用性が高い。電子メールによる情報伝達の窓口としての各地衛研代表メールアドレスを正確に把握するとともに、それらのアドレス宛てに実際に情報を発信した場合の伝達の確実性についてもさらに検討を重ねる必要性がある。

全国の感染症情報センター担当者連絡網を作成し、また、そのデータを Web 上で更新可能な情報連絡システムを開発したが、このシステムはその他の連絡網の更新や地衛研間の情報伝達手段としても応用することが可能であることから、より広い活用を図っていく。

地衛研職員相互の情報交換手段としてメーリングリストの活用を検討した。既に感染症メーリングリストを立ち上げ、定期的な情報発信や参加者間の情報交換に利用している。今後はこの感染症メーリングリストの普及・活性化を図るとともに、他分野のメーリングリストの立ち上げについても順次進める予定である。

本研究のテーマである健康危機管理情報ネットワークが実際の健康危機の発生時に、果たして有効に機能するか否かは、シミュレーションによる検証で確かめることが重要である。しかし、組織や業務形態に違いのある各地衛研を対象に、被害の発生時点から事後対応までを調査するためには、それぞれの地衛研の実情に即したシナリオと設問を用意しなくてはならず、現実には多くの困難が伴う。こうした問題点を解決し、実効性のあるシミュレーションを行うための検討を今後も続けていく必要がある。

厚生労働省も健康危機管理のための情報基盤強化を目的に、平成 14 年度からの 3 年間で、健康危機管理支援情報システムの構築を開始した。このシステムは健康危機対応の最前線に位置する保健所や地衛研を支援するための総合的な情報ネットワーク構築を意図している。東京都立衛生研究所も、このシステム構築のための厚生労働科学研究班活動に加わり、システムの運営委員会委員として、地衛研の立場から参加している。地衛研の健康危機管理情報ネットワークと厚生労働省の健康危機管理支援情報システムがリンクを形成し、互いに補完しあうことで健康危機への対応力を一層強化することができるように、両者の密接な連携を図って行く。

## E 健康危機情報

該当なし。

## F 研究発表

篠原 志郎：地方衛生研究所ホームページと健康危機管理情報、第 16 回公衆衛生情報研究協議会研究会、平成 15 年 1 月 31 日、横浜市健康福祉総合センター

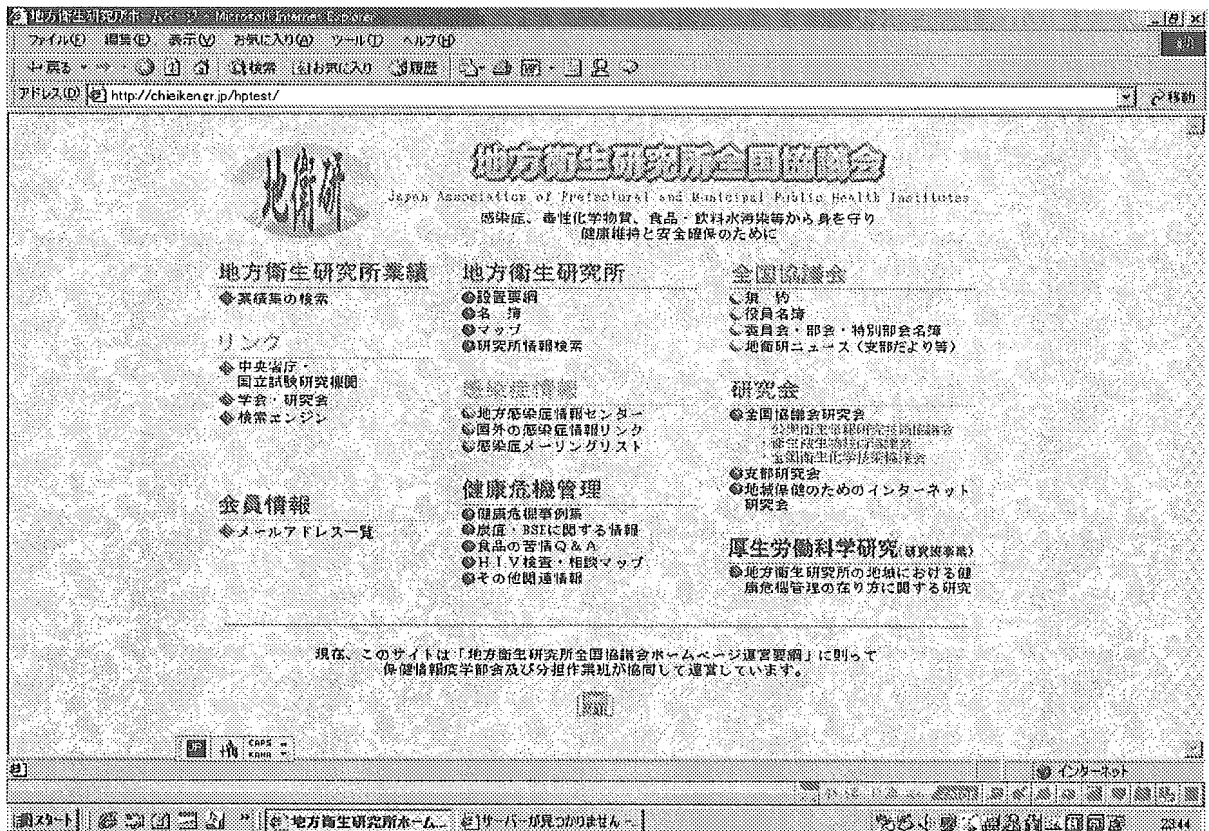


図1. 地衛研ホームページ（トップページ）

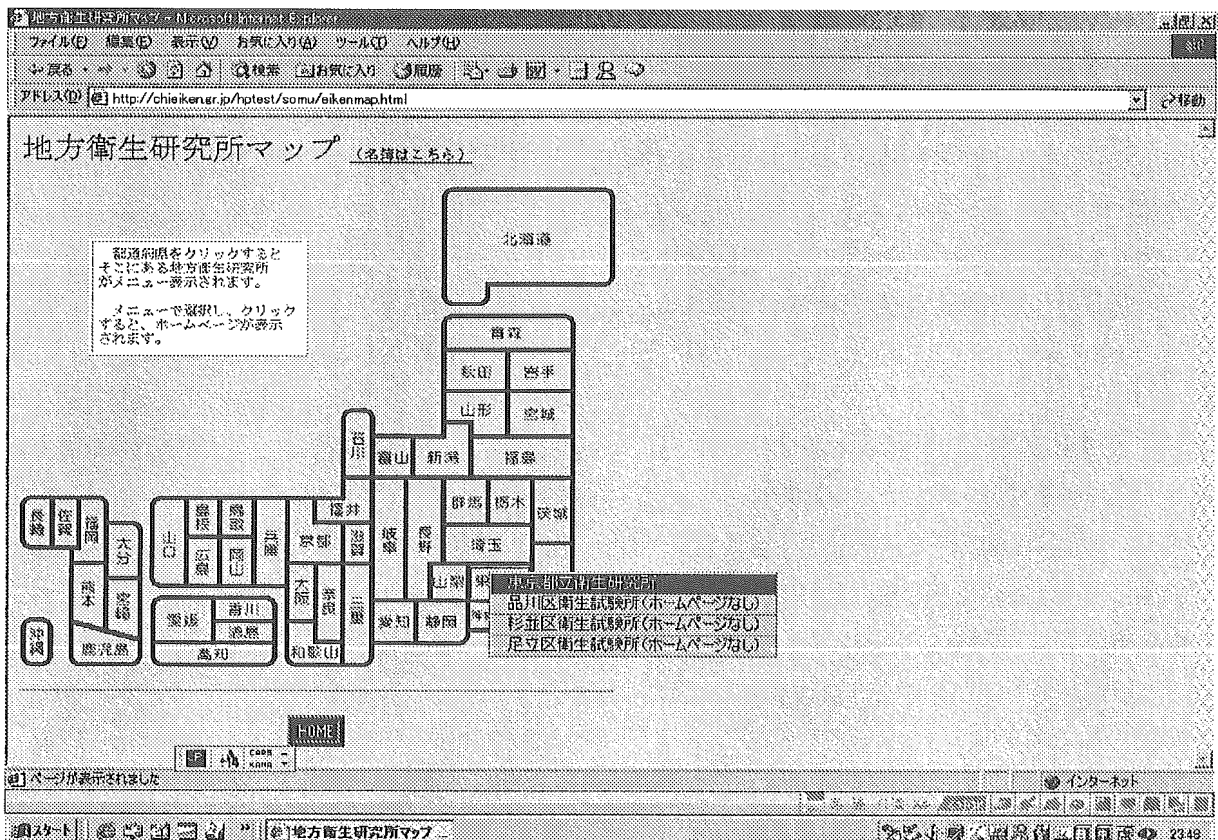


図2. 地衛研ホームページ（地衛研検索マップ）

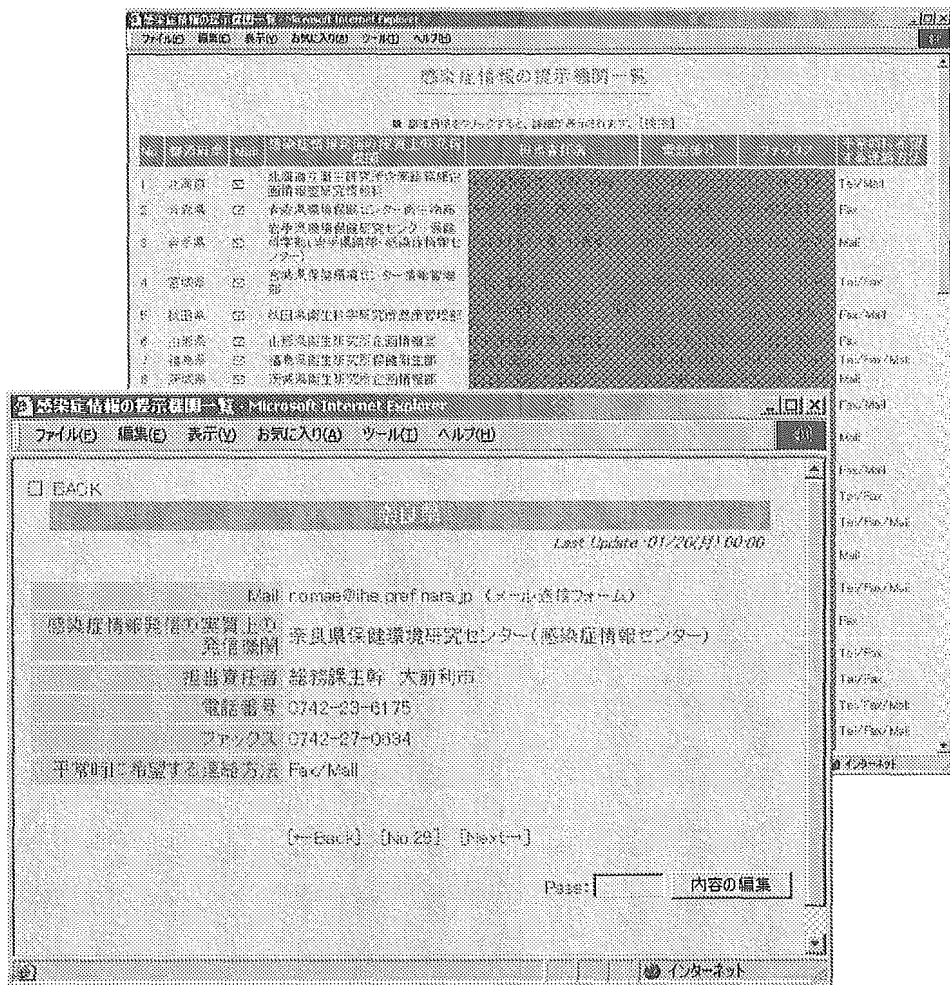


図3. Web上での感染症情報センター担当者リストと更新、メール送信システム

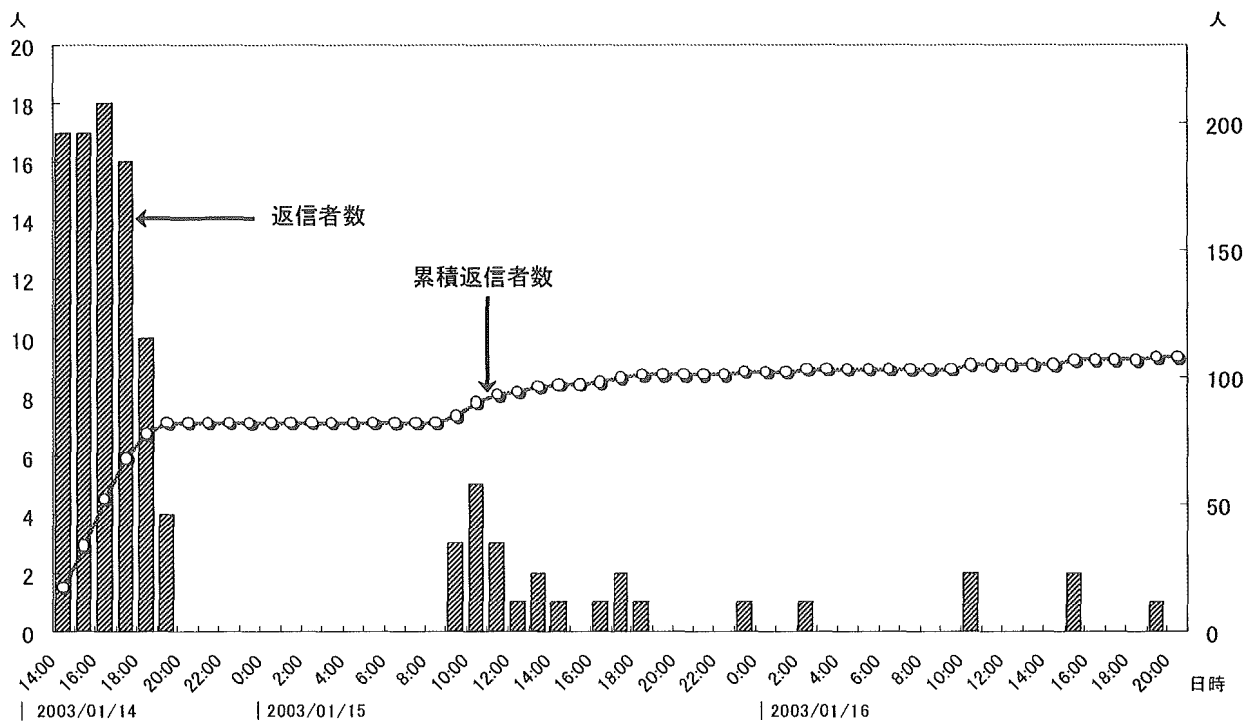


図4. 感染症メーリングリストのレスポンス調査結果

表 1. 健康危機管理シミュレーション（試行）のシナリオとアンケート調査の設問

ステージ	シナリオ	設問の内容
導入	1月31日（木）19:00、X市A市民病院（感染症発生动向調査の病原体定点病院）に70歳男性患者が呼吸困難のために緊急入院した。当該患者は1月29日（水）に風邪で民間病院を受診し、投薬を受けていた。患者の症状は、① 2-3日続く38.5℃以上の発熱、② 咽頭痛および咳、③ 胸部レントゲンで肺炎像、④ 嘔吐および水様性下痢を伴う腹痛、⑤ 低酸素血症であった。担当医師は肺炎と診断し、呼吸管理を行ったが、患者は2月1日（金）11:00に死亡。同日13:00、担当医師は所管のX市保健所に通知するとともに、ただちに県衛生研究所に病原体検索を依頼した。衛生研究所には、当該患者および同様な症状の他の患者2名の血清、気管支分泌液、胃液、便および尿が検体として送られた。	
1 検査依頼の受付	2月1日（金） 13:00 A市民病院（病原体定点）医師より電話で検査依頼あり。 医師「肺炎で死亡した患者1名および同様の症状で入院中の患者2名について、病原体検査を願います。インフルエンザが疑われるが、臨床症状は次のとおりで、検査材料は血清、気管支分泌液、胃液、便と尿を送ります。」 ① 38.5℃以上の発熱が2-3日持続 ② 咽頭痛および咳 ③ 胸部レントゲンで肺炎像 ④ 嘔吐および水様性下痢を伴う腹痛 ⑤ 低酸素血症	1 検査対応の可否  2 医師に求める情報の有無
2 検査の準備	15:00 管轄保健所から当該事例についての次のような報告がありました。 「A市民病院に重症肺炎の患者3人が入院し、内1名が本日午前死亡したとの連絡がありました。これらの患者の病原体検索を貴所で実施願います。なお、市内のB大学病院からも同様の症状の患者2人が入院しているとの報告があります。これらの患者についての状況を調査したところ、5人の患者はいずれも市内の同じ老人クラブの仲間で、1月22日から1月26日まで、老人クラブが主催した香港旅行に行っていました。この旅行に参加した老人クラブのメンバーは計23人ですが、患者5人はいずれも帰路の機内で体調不良を訴えていたそうです。」	3 通常の検査体制で臨むか否か？ 4 管轄保健所への地域内患者発生状況の問い合わせを行うか？ 5 情報収集を行うか？ 6 検索対象病原体は？ 7 保健所への関連情報問い合わせを行うか？ 8 通常の検査から異常発生対応への判断の変更 9 情報収集を行うか 10 検索対象病原体の追加変更を行うか？
3 検査の実施過程(1) 病原体未同定	2月5日 臨床細菌学的検査の結果、想定した病原体はいずれも陰性の結果が得られました。一方、ウイルス学的検査の結果、PCRではA（H1N1）、A（H3N2）およびB型インフルエンザウイルスの遺伝子はいずれも検出されませんでした。なお、並行してウイルス分離を行っています。 2月12日 ウイルス分離試験の結果、3人の患者の咽頭拭い液から病原体が分離されました。引き続き、国立感染症研究所から分与されている今シーズンのフェレット抗血清を用いてHI試験を行ったところ、A（H1N1）型、A（H3N2）型、B型のいずれに対してもHI抗体価は<10でした。	11 検査中間結果の担当医師および保健所への連絡を行うか？ 12 情報収集を行うか？ 13 新型インフルエンザウイルスを病原体として想定するか？  14 検査中間結果の担当医師、保健所、本庁担当部局への連絡を行うか？
4 検査の実施過程(2) 新型インフルエンザウイルスの可能性が出てきた	本事例での病原体が新型インフルエンザウイルス（H5N1）である可能性が出てきました。	15 新型インフルエンザウイルス同定の可否 16 同定可能な理由 17 同定不可の場合の協力要請機関の有無と機関名
5 検査結果の確定 新型インフルエンザウイルスを同定	本事例が新型インフルエンザウイルス（H5N1）によるものとの結果が出ました。	18 担当医師、保健所、本庁担当部局へ緊急連絡を行うか？ 19 国立感染症研究所、他の地衛研への緊急連絡を行うか？ 20 本事例は危機管理の対象か？ 21 危機管理マニュアルの用意の有無とマニュアルの適用時点はいつの段階か？ 22 危機管理対策本部を設置するか？ 23 対策本部設置の時点はいつの段階か？ 24 通常と異なる事態に遭遇した際の情報収集手段は以下のいずれか？ <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">                     文献検索                      専門家間の情報網 (ML)                      専門家間の情報網 (ML以外)                      Web                      その他                 </div> 実際の経験例を具体的に 25 通常と異なる事態に遭遇した際他機関との有効な連絡方法を具体的に 保健所とは？ 他地研とは？ 国研とは？ 大学等とは？ 実際の経験例を具体的に

## 第7回地域保健のためのインターネット研究会

### プログラム

日 時 平成14年11月29日(金)  
午前10時～午後5時  
場 所 国立感染症研究所 第一会議室

1 開 会 (10:00) 東京都立衛生研究所 疫学情報担当副参事 荻野 周三

2 あいさつ (10:00～10:15) 東京都立衛生研究所 所長 上木 隆人  
国立感染症研究所 感染症情報センター長 岡部 信彦

3 健康危機管理・感染症サーベイランス・トピックス (10:15～4:45)

(4) 中国製ダイエット用健康食品について (10:15～11:00)

東京都立衛生研究所 上村 尚

(2) 「和風キムチ」を原因食品とする散発広域食中毒事件 (11:00～11:45)

埼玉県衛生研究所 斎藤 章暢

－ 昼 食 (11:45～1:15) －

(3) サーチエンジンGoogle (1:15～2:00)

早稲田大学理工学部情報学科 山名 早人

(1) 保健所における健康危機管理 (2:00～3:00)

世田谷区保健所 橘 とも子

－ 休 憩 (3:00～3:15) －

(5) ワールドカップ症例別サーベイランスについて (3:15～4:00)

国立感染症研究所 谷口 清州

(6) 健康危機管理情報の網羅的収集と評価に関する調査研究 (4:00～4:45)

国立保健医療科学院 緒方 裕光

4 討 論 (4:45～5:00)

5 閉 会

東京都立衛生研究所 多摩支所長 関根 大正

分担研究報告書

健康危機管理のための試験検査の開発と標準化に関する研究

— 定量PCRによる遺伝子組換え食品検査体制の確立およびバイオテロへの対応 —

分担研究者 中澤 秀夫 大阪市立環境科学研究所所長

**研究要旨：**健康危機管理における地方衛生研究所（地研）の機能を高めるため、遺伝子工学などの新しい技術の確立と標準化を行うことを目的として研究を行った。

平成14年度は、約半数以上の地研に定量PCRが導入されたことから、遺伝子組換え食品の定量検査に加え、バイオテロ対策の一つとして定量PCRの利用を検討した。

遺伝子組換え食品の検査については、トウモロコシの検査の精度管理、DNA抽出法の違いによるの定量値の比較および、市販のトウモロコシ半加工品の市場調査を行った。その結果、遺伝子組換えトウモロコシ5%含有の試料については3種類の抽出法（DNeasy法、CTAB法、G-tip法）で測定値に有意差がみられたが、2.5%含有の試料では抽出法による差はみられなかった。さらに、DNeasy法とCTAB法またはDNeasy法とG-tip法の含有率は正の相関を示した。市販のトウモロコシ半加工品（25検体）では、遺伝子組換え品であると表示されたものではなく、大部分が遺伝子組換えトウモロコシ含有量が0.10～0.20%と低く最高でも0.98%で、いずれも5%以下であり、表示上問題はなかった。

バイオテロ関連では、モデル菌として炭疽菌に近縁のセレウス菌芽胞を粉末試料として用い、健康危機事象としてのバイオテロへの対応における定量PCRの利用能を検証した。その結果、協力機関すべてで、定量PCRの病原体検出能において良好な結果が得られ、また、検出時間の短縮を図ることが可能であることが判った。

**研究協力者**

**遺伝子組換え食品について**

まとめ：大阪市立環境科学研究所 紀 雅美  
（北海道立衛生研究所）  
田村正秀 所長、加藤芳伸、鈴木智宏  
（栃木県保健環境センター）  
長谷川 博 所長、世取山 守、長門顕子  
（埼玉県衛生研究所）  
丹野瑛喜子 所長、高橋邦彦  
（東京都立衛生研究所）  
上木隆人 所長、植田忠彦、門間公夫、  
荒木理恵  
（神奈川県衛生研究所）  
益川邦彦 所長、平山クニ、大森清美、土屋久世  
（横浜市衛生研究所）  
高岡幹夫 所長、笹尾忠由  
（大阪市立環境科学研究所）  
紀 雅美、中間昭彦、山本敦史、川井信子

**バイオテロモデル菌について**

まとめ：名古屋市衛生研究所 安形則雄  
（石川県保健環境センター）  
奥村二郎 所長、倉本早苗  
（名古屋市衛生研究所）  
兒島昭徳 所長、安形則雄  
（三重県科学技術振興センター保健環境研究部）  
中山 治 部長、岩出義人  
（神戸市環境保健研究所）  
林 皓三郎 所長、黒川 学  
（奈良県保健環境研究センター）  
今井俊介 所長、中山章夫  
（広島市衛生研究所）  
荻野武雄 所長、河本秀一  
（福岡県保健環境研究所）  
加藤元博 所長、村上光一、長野英俊

## I 遺伝子組換え食品の検査体制の強化

### A. 研究目的

昨年度、定量PCRを用いた遺伝子組換え食品の定量的検出を行った。即ち、安全性審査済みの遺伝子組換え作物の中でも最も生産量が多い除草剤耐性大豆「ラウンドアップ・レディ大豆」を対象に、大豆粉末および大豆加工食品(豆腐)中におけるラウンドアップ・レディ大豆の定量的検出を行い、抽出方法および定量PCRの機種による定量値の比較を検討した。さらに、地研における定量PCRの導入状況を把握するとともに、遺伝子組換え食品の検査体制に関するアンケートを行った。その中で、DNAの抽出方法によって定量値が異なるなどの検査方法の問題点、機種の多様化、さらには遺伝子組換え食品におけるGLP導入の問題点などが指摘された。そこで、本年度は対象作物をトウモロコシにおき、精度管理的な定量検査およびDNAの抽出方法による定量値の比較検討を行った。さらに、トウモロコシ半加工品の市場調査を行った。

平成15年3月1日現在、厚生労働省が安全性審査を行った遺伝子組換え作物は6作物44品種にのぼる。そのうちトウモロコシは12品種を占め、遺伝子組換え技術により獲得した性質としては、害虫抵抗性が3品種、除草剤耐性5品種、害虫抵抗性および除草剤耐性の両方をもつものが4品種である。さらに12品種の遺伝子組換えトウモロコシのうち、デンプン含量が高く実が堅く加工に用いられるデントコーンが11品種、甘みが強く加熱程度の加工で食することの多いスイートコーンが1品種と、デントコーンが圧倒的に多い。

図1に、農林水産省および厚生労働省により検査方法が確立されている遺伝子組換え作物6品種の挿入遺伝子の模式図およびPCR増幅領域を示した。ラウンドアップ・レディ・大豆および5品種のトウモロコシBt11、Event176、MON810、T25、GA21が示されている。Bt11、Event176、MON810、T25およびラウンドアップ・レディ・大豆は共通のプロモーター遺伝子としてCaMV35Sプロモーター遺伝子を、Bt11、GA21およびラウンドアップ・レディ・大豆は共通のターミネーター遺伝子としてNOSターミネーター遺伝子を有する。品種特異的なPCR増幅領域は、自然界には存在しない領域を増幅するように設計されている。遺伝子組換えトウモロコシの定量検査にあたっては、方法の項

で詳細は記述するが、遺伝子組換えトウモロコシ4品種Bt11、Event176、MON810、T25が有するCaMV35Sプロモーター遺伝子と、GA21の品種特異的遺伝子について定量的検出を行い、それぞれの遺伝子の含有率の和を遺伝子組換えトウモロコシ含有率とした。

### B. 研究方法

#### 1. 研究推進体制

共同研究を円滑に進めるため、まず、研究協力機関を対象にアンケート調査をおこない、その結果に基づいて詳細な研究計画をたてた。さらに、事務局(大阪市)と各機関は日常的にEメールにより情報交換を行いながら研究を進めた。

#### 2. 試料

平成12年に入手した分別生産流通管理トウモロコシ、および不分別生産流通管理トウモロコシを粉砕し、事務局で定量を行い、遺伝子組換えトウモロコシの含量が5%、2.5%になるように調整した。なお、遺伝子組換えトウモロコシの混入していないデントコーンの入手が困難だったため、冷凍スイートコーンの凍結乾燥粉末を遺伝子組換えトウモロコシ0%の粉末とした。これら3点のトウモロコシ粉末を研究協力機関に配布した。

トウモロコシ半加工品(コーングリッツ、コーンフラワー、コーンミール)における遺伝子組換えトウモロコシ含量の市場調査については、研究協力機関の周辺にあるスーパー、百貨店、製パン・製菓材料取り扱い店、通信販売などで該当品を購入してもらった。

#### 2. DNAの抽出

厚生労働省の「組換えDNA技術応用食品の検査方法」による遺伝子組換えトウモロコシ定量検査では、まず1検体1抽出でCaMV35S遺伝子とGA21特異的遺伝子の定量によるスクリーニング検査を行い、その混入率の合計が4.5%を越えていれば、さらに2抽出を行い、合計3抽出により得られたDNA溶液中の遺伝子組換えトウモロコシ5品種(Bt11、Event176、T25、MON810、GA21)の個別定量を行うことになっている。しかし本研究では、配布したトウモロコシ粉末については定量値を得ることが目的であるため、1検体あたり2gずつ3抽出でCaMV35S遺伝子とGA21特異的遺伝子の定量を行い遺伝子組換えトウモロコシの定量を行った。DNAの抽出方法は「組換えDNA技術応用食品の検査



方法」に記載されている方法であるシリカゲル膜タイプキット法を必須とし、さらにCTAB法、あるいは記載はされていないが地研で希望の多かったイオン交換系タイプキット(QIAGEN社製 Genomic-tip (以下G-tipと略す))を用いてDNAを抽出し、抽出方法による定量値の比較を行った。

トウモロコシ半加工品の市場調査については、「組換えDNA技術応用食品の検査方法」に従い、シリカゲル膜タイプキットを用いて1検体あたり2gずつ1回抽出にてスクリーニング検査を行った。

以下にシリカゲル膜タイプキットおよびCTAB法による抽出方法を示す。

### 3.1 シリカゲル膜タイプキット法

シリカゲル膜タイプキットとしてQIAGEN社製 DNeasy Plant Mini kit(以下DNeasy と略す)を用いた。

50mlのチューブに検体を2g測りとり、65°Cに温めておいたAP1バッファー10mlおよび RNase A 20  $\mu$ lを加え、ボルテックスにて激しく混合した。65°C、15minインキュベーション(5分ごとに転倒混和)した後、AP2バッファー2350  $\mu$ lを加え、よく攪拌し、氷中につけ5分間放置した。3000 $\times$ g以上で5min遠心した。上清600  $\mu$ lをQIAshredder spin columnに移し、10000 $\times$ g以上で4min遠心、溶出液を2.0mlの遠心チューブに移した。残りの上清のうちさらに600  $\mu$ lをQIAshredder spin columnに負荷し、10000 $\times$ g以上で4min遠心、溶出液を2.0mlの遠心チューブに移した。溶出液の1.5倍量のAP3-エタノール溶液を加え混合した。この混合液600  $\mu$ lをmini spin columnに移し、10000 $\times$ g以上で2min遠心し、溶出液を捨てた。この操作を混合液がなくなるまで繰り返した。mini spin columnをチューブに戻し、AWバッファー500  $\mu$ lを加え、10000 $\times$ g以上で1min遠心し、溶出液を捨てた。もう一度AWバッファー500  $\mu$ lを加え同じ操作を行った。12000 $\times$ g以上で15min遠心し、カラムを乾燥させた。spin columnをキットに付属の新しい遠心チューブに移し、予め65°Cに温めておいた超純水70  $\mu$ lを加え、5分間放置した後、10000 $\times$ g以上で1min遠心した。

もう一度65°Cに温めておいた超純水を加えて同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせDNA溶液とした。

DNA溶液は希釈して200~300nmにおける吸光度を測定し、DNAの純度およびDNAの濃度を算出した。さらにDNA溶液は、超純水を用いて20ng/ $\mu$ lとな

るように希釈し、分注して、使用するまで-20°Cで保存した。

### 3.2 CTAB法

50mlのチューブに検体を2g測りとり、CTAB溶液15mlを加えホモジナイズした。さらにCTAB溶液30mlを加え、ボルテックスした後、55°Cで30分間、インキュベーションした。室温まで冷まし、3000rpmで10分間遠心した。上清1.5mlを1.5mlのチューブに移し、15000rpmで1分間遠心した。得られた上清900  $\mu$ lを2.0mlのチューブに移し、750  $\mu$ lのフェノールクロロホルム溶液を加え、軽くボルテックスし、7500 $\times$ g、15分間遠心した。上清を新しい2.0mlのマイクロ遠心チューブに移し、等量のクロロホルム-イソアミルアルコール溶液を加え、軽くボルテックスし、7500 $\times$ g、15分間遠心した。上清を新しい2.0mlのマイクロ遠心チューブに移し、等量のイソプロピルアルコールを添加し、転倒混和後、7500 $\times$ g、10分間遠心しDNAを沈殿させた。上清を捨て、500  $\mu$ lの70%エタノールを加え、軽く混和し、7500 $\times$ g、1分間遠心して上清の70%エタノールを捨てた。軽く遠心し、残った70%エタノールをピペットにて完全に除去し、2~3分間真空乾燥した。沈殿を50  $\mu$ lのTE溶液にとかし、RNase A 5  $\mu$ lを加え、37°Cで30分間放置した。200  $\mu$ lのCTAB溶液を加えた後、250  $\mu$ lのクロロホルム/イソアミルアルコール溶液を加え、軽くボルテックスした。7500 $\times$ g、15分間遠心し、上清を新しい1.5mlのマイクロ遠心チューブに移した。上清と等量のイソプロパノールを添加し、転倒混和後、7500 $\times$ g、10分間遠心した。上清を捨て、500  $\mu$ lの70%エタノールを加え、軽く混和し7500 $\times$ g、1分間遠心して上清の70%エタノールを捨てた。軽く遠心し、残った70%エタノールをピペットにて完全に除去し、2~3分間真空乾燥した。沈殿を50  $\mu$ lの超純水にとかす。

DNA溶液は希釈して200~300nmにおける吸光度を測定し、DNAの純度およびDNAの濃度を算出した。さらにDNA溶液は、超純水を用いて20ng/ $\mu$ lとなるように希釈し、分注して、使用するまで-20°Cで保存した。

## 4. 遺伝子組換えトウモロコシの定量検査

定量検査はスクリーニング検査を前提として、ABI PRISM® 7700を用いて定量を行った。

PCR反応液は、1×TaqMan Universal Master mix、0.5 μM 5'-プライマー、0.5 μM 3'-プライマー、0.2 μM TaqManプローブ (CaM35S定量用プローブは0.1 μM)、DNA 50ngとなるように調整し、DNA 1抽出あたり、トウモロコシ内在遺伝子定量用、CaMV35Sプロモーター定量用、GA21定量用を作成しそれぞれについて25 μlずつ3wellに分注した。プライマー、TaqManプローブ、標準曲線作成用の標準プラスミドは厚生労働省の「組換えDNA技術応用食品の検査方法」あるいは農林水産省のJAS試験分析ハンドブック「遺伝子組換え食品・分析マニュアル」に記載されているものを使用した。反応条件は、50℃で2分間、95℃で10分間加熱後、95℃で30秒、59℃で1分間の加熱を40サイクル行った。データの解析は厚生労働省の「組換えDNA技術応用食品の検査方法」およびJAS試験分析ハンドブック「遺伝子組換え食品・分析マニュアル」に従い、トウモロコシ内在遺伝子、CaMV35Sプロモーター遺伝子、GA21遺伝子のコピー数を算出し、以下の計算式を用いて含有率を求めた。

遺伝子組換えトウモロコシの含有率 (%) =  
[CaMV35プロモーター遺伝子コピー数/(トウモロコシ内在遺伝子×0.39)] × 100 + [GA21由来遺伝子コピー数/(トウモロコシ内在遺伝子×1.40)] × 100

ここで、0.39はスクリーニングにおけるCaMV35プロモーター遺伝子の内標比、1.40はGA21由来遺伝子の内標比を意味する。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 研究推進体制

恒常的なEメールにより、分析方法の詳細な確認、結果の添付、サンプル送付のスケジュール確認、GMO検査に関する意見・質問、定量PCRに関する問い合わせなどの情報交換を行った。疑問点などについては、平成14年10月の全国衛生化学技術協議会自由集会で発表し、国立医薬品食品衛生研究所の考え方など回答を得た。

### 2. 配布粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量的検出

遺伝子組換えトウモロコシ含有量が5%、2.5%、0%になるように調整したトウモロコシ粉末を関係機関に送付し定量を行った。DNAの抽出方法として、DNeasy法は7地研全てで、もう一つの抽出方

法としてCTAB法を用いた地研が4地研、G-tip法を用いた地研が3地研であった。

定量にはABI PRISM® 7700を用いた。結果を図2に示す。5%粉末の定量値は、DNeasy法で4.58 ± 0.21%、CTAB法で4.00 ± 0.34%、G-tip法で5.68 ± 0.90%であった。G-tip法でDNeasy法およびCTAB法に比べ有意に高かった(p < 0.01)。2.5%粉末ではDNeasy法で2.28 ± 0.06%、CTAB法で2.25 ± 0.20%、G-tip法で2.36 ± 0.07%となり、良好な結果が得られた。2.5%粉末では、抽出方法による差は認められなかった。なお、いずれの地研においても遺伝子組換えトウモロコシ含有量が0%の粉末からは、遺伝子組換えトウモロコシの遺伝子は検出されなかった。

DNeasy法で抽出したDNAから算出された遺伝子組換えトウモロコシ含有率に対して、CTAB法およびG-tip法で抽出したDNAの含有率をプロットし、相関関係を検討した(図3)。CTAB法およびG-tip法ともにDNeasy法と正の相関が見られるが、回帰直線は、DNeasy法とCTAB法ではDNeasy法の方に、DNeasy法とG-tip法ではG-tip法の方に傾いていた。さらに、抽出方法による分散分析を行った結果、CTAB法とG-tip法で有意な差(p = 0.014)がみられた。

昨年大豆粉末の定量においては、CATB法に比べDNeasy法で含有率が低いという結果が得られたが、本年度のトウモロコシの定量においては、有意な差はなかったものCTAB法に比べDNeasy法で高い定量値が得られる傾向にあった。これは、大豆とトウモロコシの成分の違いに起因すると考えられ、このことはDNAの回収量にも反映している。デンプン含量の高いトウモロコシ粉末は、CATB法よりもDNeasy法が適していることが示唆された。また、G-tip法で抽出したDNAより算出された遺伝子組換えトウモロコシ含有率は、DNeasy法およびCTAB法による定量値よりも高い値が得られたが、検体数が少なく、また、ばらつきも大きかったので、今後、さらなる検討が必要と思われる。

### 3. トウモロコシ半加工品の試買試験

トウモロコシ半加工品は、コーングリッツ、コーンフラワー、コーンミールを意味し、これらはトウモロコシ(主にデント種)穀粒を粉砕して得られた粉末で、加熱等の加工による変性は受けていない。コーンフラワーは粒度60メッシュ以下の粉質胚乳部で、60メッシュ以上の硬質胚乳部をコー

ングリッツと呼んでいる。また、原料トウモロコシをそのまま粉砕したものをコーンミールと呼ぶ。これらは、製菓・製パン・味噌・ビールの材料として用いられることが多い。

現在、定量PCRによる遺伝子組換えトウモロコシの定量に関しては、トウモロコシ穀粒（デントコーン）およびトウモロコシ半加工品のみが可能となっており、コーンスナック菓子をはじめ、その他多くのトウモロコシ加工品には適応できない。デントコーンはスイートコーンと異なり、デンプン含量が多くて堅いため加工利用される。そのため、デントコーンの穀粒を店頭で購入することは困難である。そこで、遺伝子組換えトウモロコシ含有率の市場調査として、デントコーンの粉末であるトウモロコシ半加工品の試買調査を行うことにした。

研究協力機関でトウモロコシ半加工品を購入してもらった結果、25検体を得ることができた。内訳はコーングリッツ9検体(36%)、コーンフラワー10検体(40%)、コーンミール6検体(24%)であった。大豆加工品やコーンスナック菓子等に比べ、種類が少なく入手が困難であった。実際、販売者や輸入者を確認したところ、4地研で同じメーカーのものを購入しており、製造・輸入メーカーが限られ、それが日本国内で広域に流通していることが考えられた。トウモロコシの産地としてはアメリカと表記のあったものが6検体(24%)、アメリカ・カナダが12検体(48%)、中国1検体(4%)、表示が無かったものが6検体(24%)であった。次に遺伝子組換えの使用に関する表示であるが、遺伝子組換えでない旨の表示があったものが18検体(72%)、表示の無かったもの7検体(28%)で、遺伝子組換えを使用している旨の表示は無かった。

遺伝子組換えトウモロコシの含有率は、最小値0.10%、最大値0.98%、平均 $0.28 \pm 0.04\%$ となり、表示は適正であると判断できる。度数分布を図4に示したが、0.1%以上0.2%未満が13検体と最も多く、次いで0.2%以上0.3%未満が6検体、0.3%以上0.4%未満が2検体と、以降、遺伝子組換えトウモロコシの含有率が多くなるにつれて検体数が少なくなる傾向がみられた。なお、遺伝子組換えトウモロコシが検出されなかった検体は無かった。検出されたCaMV35Sプロモータ遺伝子およびGA21特異的遺伝子のコピー数をみると、CaMV35Sプロモータ遺伝子は全ての検体で検出されていたが、定量用プラスミドの最小コピー数である20コピー数

を下回っていた検体が12検体であった。GA21特異的遺伝子は12検体から検出されているが、20コピー数を上回っていたものは1検体だけであった。このように、遺伝子組換えトウモロコシ由来の遺伝子が、定量用プラスミドの最小コピー数である20コピー数を下回る検体がほとんどであり、定量値としては信頼性に欠けるものであるが、トウモロコシ内在遺伝子は平均28800コピー検出されており、表示やIPハンドリングの科学的検証という観点では問題ないと思われる。

#### D. 結論

同一の定量PCRを有する7機関による、トウモロコシおよびその半加工品の遺伝子組み換え食品の定量分析の共同研究を行った結果、DNA抽出法による定量値に若干の違いがみられた。昨年度、大豆粉末の定量において、CTAB法に比べDNeasy法で含有率が低かったが、今年度のトウモロコシでは、有意差はないが、DNeasy法の方が高い傾向であり、試料の成分がDNA回収率やPCRの測定に影響していることが示唆され、精度管理の観点から、遺伝子組み換え食品の分析において、食品の成分の影響について検討する必要があることがわかった。しかし、分析法間の相関は高く、測定値についても大きく外れる機関はなく、良好な結果が得られたと考えられる。また、市販のトウモロコシ半加工品の試買検査の結果、いずれも、わずかながら遺伝子組み換え食品を含むが、全て1%未満であり、表示に関する基準を満たしていた。

#### 参考文献

- 1) 厚生労働省「組換えDNA技術応用食品の検査方法」
- 2) 農林水産消費技術センター JAS分析試験ハンドブック
- 3) 「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」

#### E. 健康危険情報

公衆衛生の見地から昨年度の大豆に引き続き、トウモロコシの遺伝子組換え食品の分析法の確立ならびに標準化を行い、良好な結果を得た。

#### F. 知的所有権の取得状況

特になし

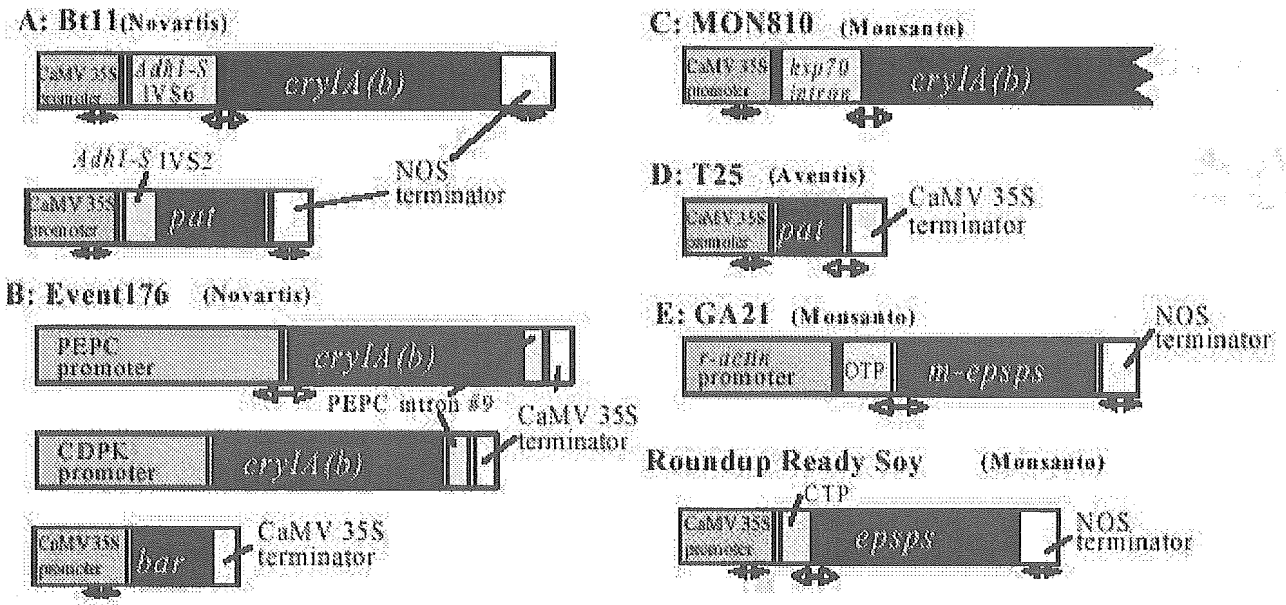


図1 遺伝子組換え作物に導入されている遺伝子の模式図およびPCR増幅領域

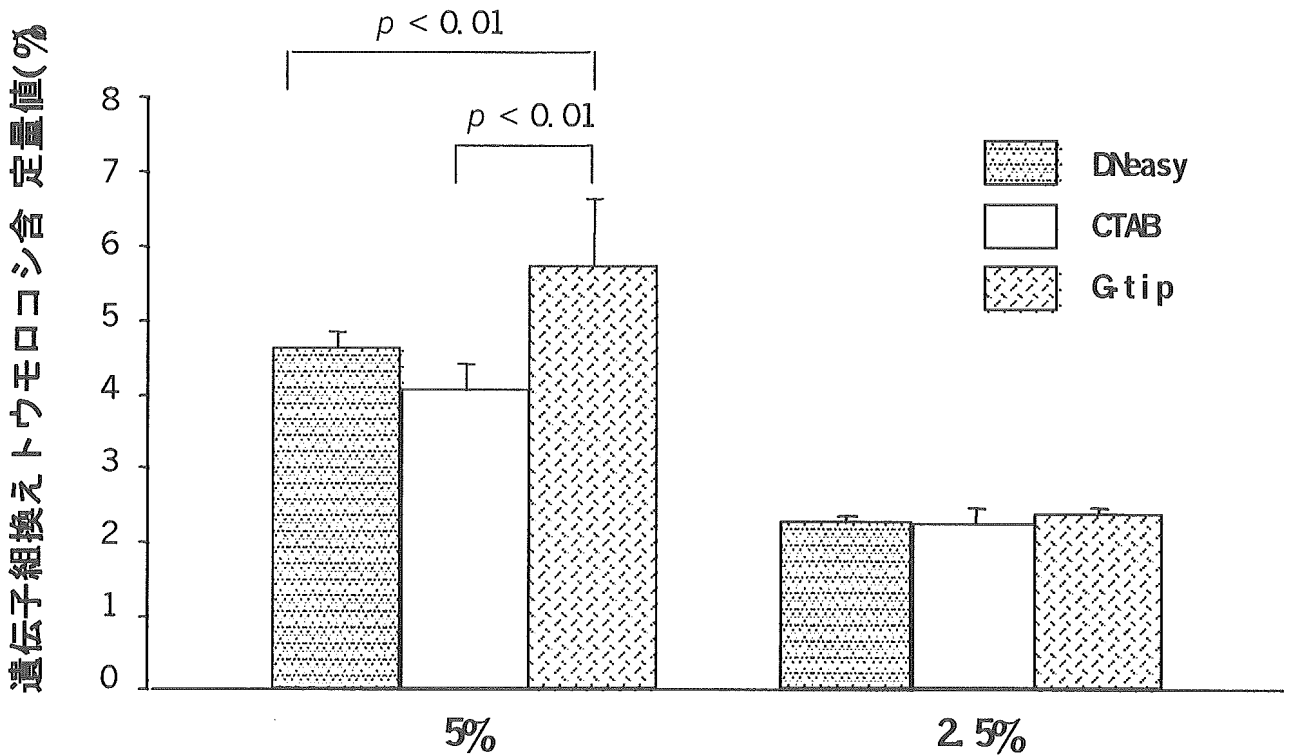


図2 配布トウモロコシ粉末の定量値

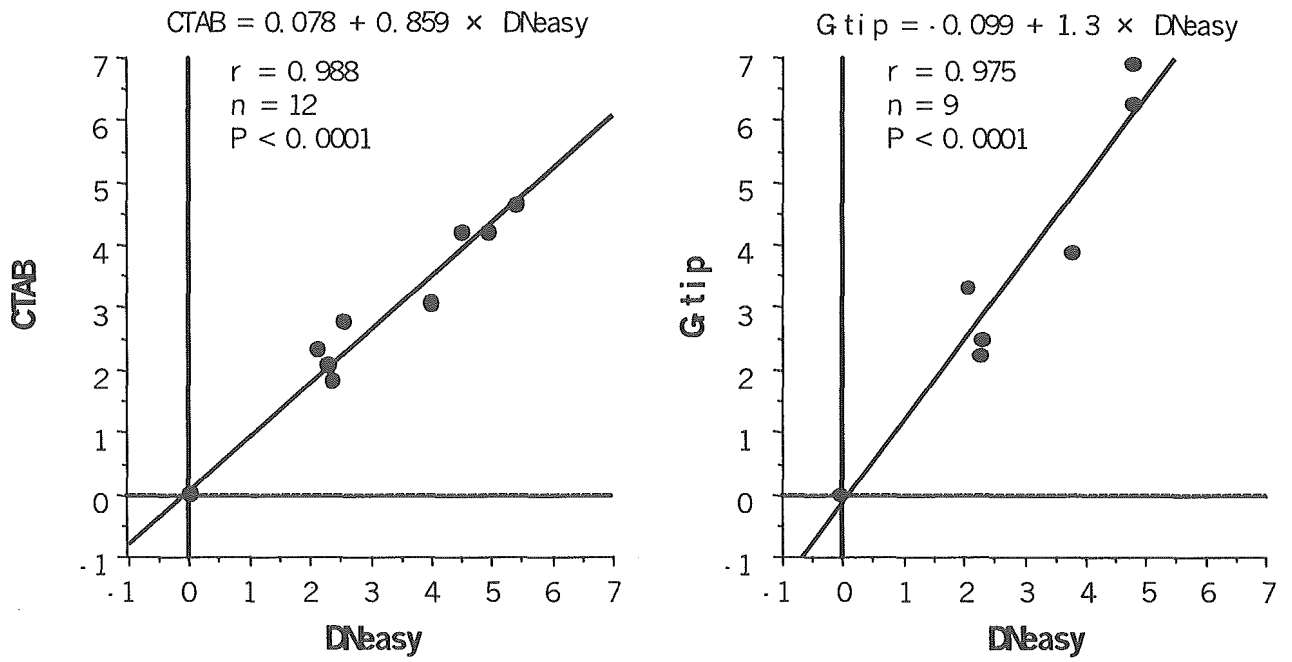


図3 配布トウモロコシ粉末の定量値の相関

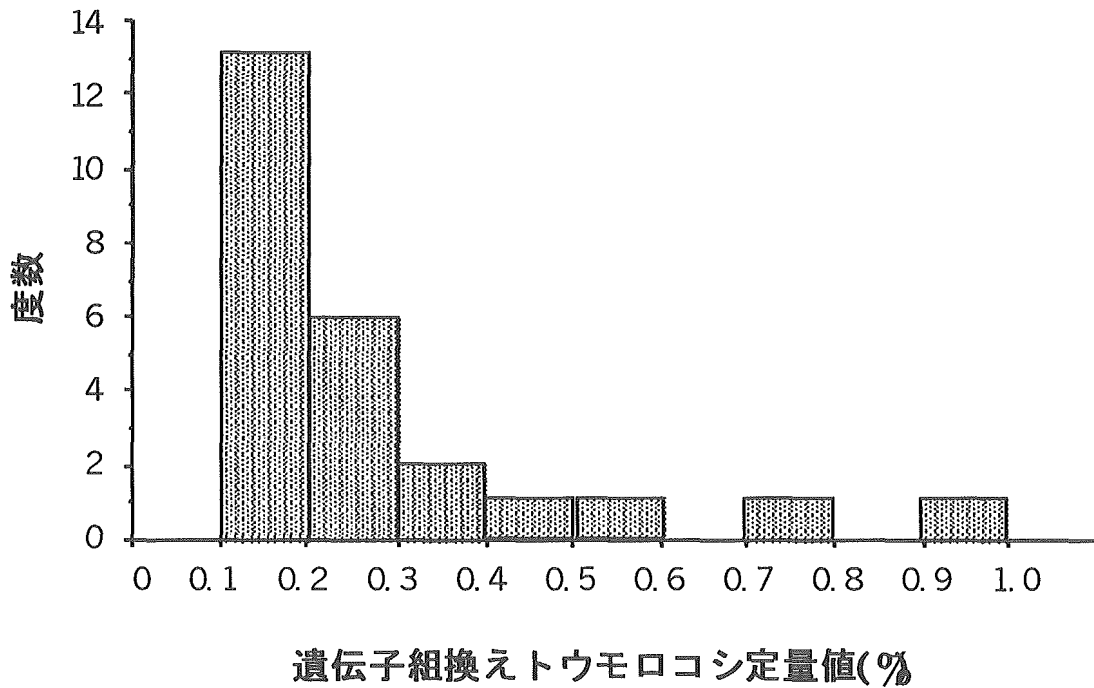


図4 試買トウモロコシ半加工品における  
 遺伝子組換えトウモロコシ定量値の度数分布

## II モデル菌を用いた定量PCRの病原体検出能の検証

### A. 研究目的

2001年、米国で同時多発テロにひき続き炭疽菌によるテロが疑われた事例が発生した。わが国でも「白い粉」をはじめとする苦情事例が多く発生し、バイオテロ対策が緊急の課題となった。平成14年のサッカーワールドカップの際にも対策が必要とされ、今後催される大規模な博覧会やスポーツ大会などではより迅速な結果の判定が必要となると思われる。

現在各地方衛生研究所において、バイオテロ関連で国の補助金がついたリアルタイム（定量）PCRの整備が進みつつあり、緊急を要する事例における本機器を用いた病原微生物のDNA検査能を検証し、その問題点を検討しておく必要がある。そこで、平成14年度は炭疽菌に近縁のセレウス菌をバイオモデル菌として用いて、バイオテロへの対応について検討し、検査法の迅速化、標準化を図った。

### B. 研究方法

#### 1. バイオテロ想定実験

名古屋市衛生研究所で、セレウス菌芽胞粉末（G）および芽胞と夾雑物を想定した食塩と混合した粉末（S）を作成した。それぞれの試料を「白い粉」サンプルとして用い、PCR試験に用いるプライマーおよびプローブを決定、統一するとともに地研協議会の8ヶ所の共同研究機関に送付して、研究を実施した。「白い粉」サンプルは直接手渡しし、プライマーおよびプローブは、合成を依頼した業者（フナコシ、アプライドバイオシステム）から共同研究機関に送付してもらった。定性PCR、リアルタイムPCRに用いたプライマーおよびプローブは、モデル菌として用いたセレウス菌（ATCC14579）が保有しているエンテロトキシン遺伝子（*hbl*）から今回設計し、使用した。プライマーおよびプローブの名称と配列をTable 1に示す。

#### 2. 検討内容

試験項目は、国立感染症研究所・厚生労働省主催の「炭疽菌の検査法に関する講習会」に従い、

塗抹検査、培養および定性PCRとした。さらにリアルタイムPCRによる試験を加え、各試験における試料搬入から前処理、判定までの所要時間を測定し、健康危機への対応における所要時間の短縮と問題点の検討を図った。

各試験方法は、リアルタイムPCRのみ TaqMan プローブ法に限定したがそのほかは各地研が日常的に行っている方法を用いることにし、問題点の検討も試みた。

### C. 研究結果及び考察

#### 1. 塗抹検査

各地研で、グラム染色、ギムザ染色に加え芽胞染色を用いて試料粉末の染色が行われ、検鏡によって試料が観察された。ほとんどの機関で有芽胞グラム陽性桿菌が多数存在することが確認された。しかし試料が粉末であるためスライドガラスへの固定が困難であった、との指摘が複数見られるとともに、芽胞染色等の手技にやや不慣れであるため検査時間がかかった等の意見があった。

塗抹検査は、検体入手時に短時間で多数の微生物の存在が確認できるという利点があり、普段から基本的な染色検査の方法には習熟しておく必要がある。また芽胞の存在が予想される場合には、固定操作の必要ない位相差付の顕微鏡による観察も有効な手段と考えられる。

#### 2. 培養検査

いずれの機関でも、直接検鏡の結果から適切な細菌培養法および選択培地（NGKG培地またはポリミキシン加CW寒天培地等）を用いて培養した。発育した集落の形態および生化学的性状から *Bacillus cereus* と同定され、類似菌である炭疽菌との鑑別が正確に行われていた。

#### 3. 定性PCR検査

各機関で用いられた方法（鋳型DNAの抽出、検査試薬、PCR機器、増幅条件など）が異なったため、検出可能な試料の希釈限界に差は見られたが、すべての機関で目的とする約300bpのDNAプロダクトが増幅された。しかし、検体の芽胞液をテンプレートとしてそのまま用いる場合、泳動条件によってはプロダクトが複数見られた場合が報告された。また、定性PCR検査の結果に対して夾雑物質等の影

響も考えられるため、事前に目的微生物の増幅条件（使用する試薬や反応条件）を検討しておく必要があると考えられた。

#### 4. リアルタイムPCR検査

研究協力機関に導入されている機種の内訳は、アプライドバイオシステム社の ABI PRISM®7000 が3地研（石川県、奈良県、福岡県）、ABI PRISM®7700が1地研（大阪市）、ABI PRISM®7900HTが2地研（神戸市、名古屋市）、ロシュ・ダイアグノスティック社の Light Cyclerが2地研（三重県、広島市）であった。リアルタイムPCRでの検査結果は使用機種、反応条件によって測定時間に若干差が認められたが、すべての機関で芽胞試料液から直接TaqMan 法を用いて目的の遺伝子を検出することが可能であった（Fig. 1）。検体試料への環境からの汚染を想定し、夾雑物質によるリアルタイムPCR検査等への影響を検討した結果をTable 2 に示した。その結果、夾雑物質への吸着等の理由から反応の阻害が観察された。対策として短時間（2-4時間）の培養が阻害物質の影響除去に有効であり、試料中の目的菌の菌数によっては必要な場合も考えられる。

また検出可能な検体中の菌数の測定および定量化については、上記の夾雑物の影響に加え鋳型DNAの抽出法による差も考えられ今後の検討課題と思われる。

#### 5. 各検査における所要時間

各検査法における試験開始から判定までに要した平均時間は、塗抹検査で約40分、培養検査で約55時間、定性PCR検査が約4.3時間、リアルタイムPCR検査が約3時間であった。

リアルタイムPCRは、定性PCRに比べ電気泳動を行う必要がなく検査時間が短縮できるため、バイオテロなど緊急を要する際に有害微生物のDNAの検出に関してきわめて有効な手法といえる。

#### D. 結論

8ヶ所の地方衛生研究所による、炭疽菌に近縁のセレウス菌をモデル菌としたバイオテロにおける検査の迅速化について行った共同研究の結果、リアルタイムPCRを行うことでかなり精度の高い分析結果が迅速に得られることが確認できた。

バイオテロに用いられる可能性のある微生物は培養に危険性が伴う上、標準菌の入手が大変困難である。このためリアルタイムPCRによる微生物のDNAの検出は、緊急性の高い健康危機事例の迅速な対応に有効と考えられ、今後各種の有害微生物に対応可能なプライマーセットの準備や手技に熟練しておくことが必要である。

#### E. 参考文献

- 1) 厚生労働省通知「炭疽菌等の汚染のおそれのある場合の対応について」
- 2) 国立感染症研究所・厚生労働省「炭疽菌の検査法に関する講習会—資料」

#### F. 知的所有権の取得状況

特になし

Table 1 使用したプライマーおよびプローブ\*

	名称	シーケンス
定性PCR	HBLA-5	5' TAGCAGAATTACGTCAGACC3'
	HBLA-3	5' TTATTCCTTCTTTAATGTA3'
リアルタイムPCR用プライマー	HBLA-F	5' CTTGATGATGCTATTAACGCTCTTACTT3'
	HBLA-R	5' CCCTAGAACGCCCGAATATTG3'
リアルタイムPCR用プローブ (タックマンプローブ)	HBLA-TP	5' ATGTCCACGCAGTGGCATGATTTAGATTC3'

\* : *Bacillus cereus* ATCC14579の下痢毒素 (*hbI*遺伝子) から設計

Table 2 セレウス菌芽胞を様々な物質に混合した時の検出結果 (神戸市環境保健研究所において実施)

No.	試料		鏡検所見		PCR		Realtime PCR				
	混合した物質	肉眼所見	グラム染色	芽胞染色	熱水抽出法	塩化ベンジル法	熱水抽出法 <sup>#1</sup>	濃度 <sup>#2</sup>	濃度 <sup>#2</sup>	濃度 <sup>#2</sup>	塩化ベンジル法 <sup>#1</sup>
1	炭酸カルシウム	白い粉	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	0.2	(+)	(+)	4.3
2	塩化カルシウム	白い粉	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	250.6	(+)	(+)	38.7
3	炭酸水素ナトリウム	白い粉	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	108.9	(-)	(-)	0.3
4	砂糖	白い粉	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	182.5	(+)	(+)	25.6
5	塩化ナトリウム	白い粉	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	246.1	(+)	(+)	31.6
6	寒天	白い粉	(+)	(+)	(+) <sup>#5</sup>	(w+) <sup>#3</sup>	(+) <sup>#5</sup>	32.7	(+)	(+)	3.8
7	ゼラチン	白い粉	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	5.3	(-)	(-)	0.5
8	バビ-ハ-リダー	白い粉	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	0	(-)	(+)	460.4
9	タルク末	白い粉	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	0.03	(-)	(+)	410.1
10	洗濯洗剤	白い粉	(-) <sup>#4</sup>	(-) <sup>#4</sup>	(+)	(-)	(+)	389.6	(+)	(-)	1.1
11	小麦粉	白い粉	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	2	(-)	(+)	41.2
12	片栗粉(でんぷん)	白い粉	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	116.7	(+)	(+)	102.5
13	シュートン寒天培地	淡黄色の粉	(+)	(+)	X <sup>#5</sup>	(+)	X <sup>#5</sup>		(+)	(+)	39.3
14	トリイ <sup>®</sup> ロス	淡黄色の粉	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	22.8	(+)	(+)	19.8
15	脱脂粉乳	白い粉	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	94	(+)	(+)	7.5
16	実験室テーパールの埃(1)	灰色の粉	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	49.7	(+)	(+)	36.6
17	実験室テーパールの埃(2)	黒褐色の粉	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	3.6	(-)	(-)	0
18	土	黒褐色の粉	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	39.4	(+)	(-)	0
19	砂	灰色の粒子状	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	21.7	(+)	(-)	0
20	空調ダクトの埃	黒い粉	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	122	(+)	(+)	12.4

\*1: Realtime PCRの定性判定は、Ct値 ≤ 30を陽性とした

\*2: セレウス菌DNA溶液(原液)の濃度を16384とした時の濃度

\*3: 肉眼でかろうじて増幅バンドが認められる

\*4: 界面活性剤の結晶にマスキングされて判別できず

\*5: サンプルがゲル化凝固したためにDNA抽出は不可能

\*6: サンプルがゲル化凝固したが、破壊して遠心(13,000 × g, 30分)後の水層を試験



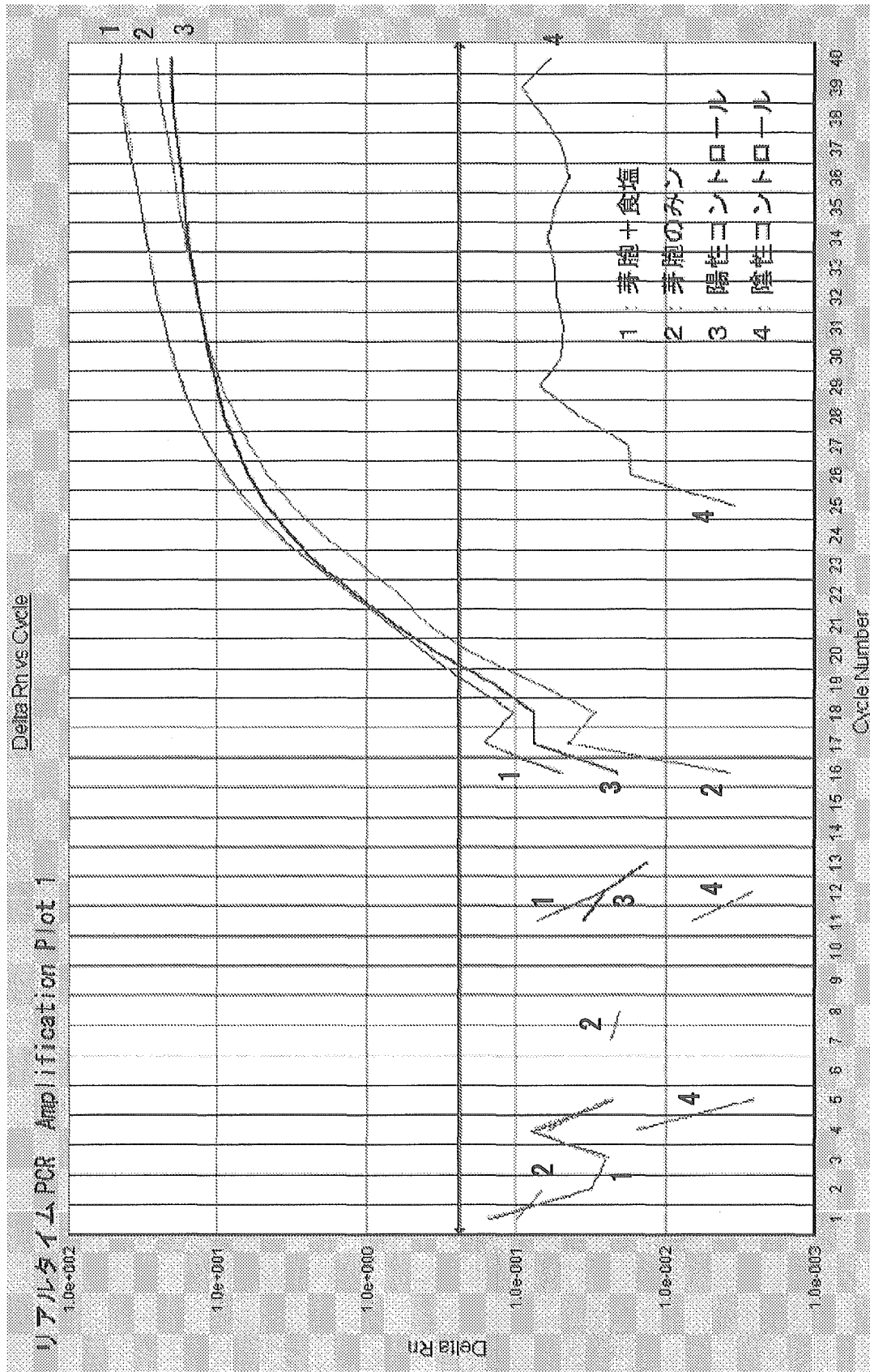


Fig. 1 Amplification Plot  
(福岡県保健環境研究所におけるABI7000機種による例)

地方衛生研究所の地域における健康危機管理のあり方に関する研究報告書

分担研究 「健康危機管理のための試験検査技術の充実・普及に関する研究」

分担研究者 宮崎 豊 愛知県衛生研究所 所長

研究要旨：

「健康危機管理のための試験検査技術の充実・普及に関する研究」として前年度と同様に1) 研修情報システムとリファレンス情報データベースの作成、2) 情報システム上での遠隔研修の検討、3) 保健所と地研の試験検査技術の向上のための連携の検討、4) IT技術の導入に関する検討、5) 手足口病の病原体を中心としたエンテロウイルスの同定支援 の5課題について研究を実施した。

その結果、1) に関しては、健康危機管理対応型として簡略化した食品中残留農薬のデータベース構築に多くの地研の参加を可能とするため、個別情報を排除した採取年月日、食品名、農薬検出項目、検出濃度、それに食品の国産・輸入別の5項目に限定し、実際に入力フォームに従い愛知県衛生研究所及び神戸市環境保健研究所における過去5年分の検査データ(2,907件)を入力し、入力及びデータベースの利用に関する問題点について検討を加えた。2) に関しては、原虫性下痢症による健康危機管理に備えた遠隔研修を地方衛生研究所全国協議会のホームページを利用して実施することを目標とし、最適なマニュアルの内容に検討を加えた結果、検査行程等(102枚)及び原虫類(135枚)の写真を用いたマニュアルの原案を完成した。3) に関しては、平成11年に全国の保健所に緊急配備された“毒劇物スクリーニング検査用簡易キット”の使用上の問題点を把握する目的で、その反応特性についてヒ素と亜鉛にを対象として検討を加え、固形食品が検査対象である場合には、検体をアルカリ化した後、何らかの抽出操作が必要であることを明らかにした。4) に関しては、健康危機発生時における原因究明のための化学物質試験検査について、メーリングリストを利用する情報伝達の必要性とその運用のあり方について、多くのホームページの検討から最も充実したメーリングリストを保有していると考えられた日本中毒情報ネットワーク [poison-net \(http://maple-www2.med.hirishima-u.ac.jp/\)](http://maple-www2.med.hirishima-u.ac.jp/) に参加し検討した結果、地研の担当者がこのメーリングリストに積極的に参加する、または、地研全国協議会と国立医薬品食品衛生研究所が共同で同様なメーリングリストを開設することが必要と考えられた。5) に関しては、全国の地研におけるエンテロウイルス(EV)の迅速同定を支援する目的で、i) 一本鎖高次構造多型(SSCP)解析を用いたEVの同定作業緩和効率の検証を実施し、秋田県での分離株(83株)及び愛知県での手足口病患者から分離株(49株)いずれの場合も5倍以上に同定効率が向上することが判明した。さらに、同一血清型が多数分離された場合には、その同定効率は10倍以上にも向上することが示された。ii) 全63種の血清型のEVについて、シークエンスデータベースによる同定を全国の地研で実施可能とする為、インターネットで無料で入手可能なクラスタルX及びツリービューを利用したシークエンス解析法に関するマニュアルを日本語で作

成し配布した。

#### 研究協力者

宮島嘉道 秋田県衛生科学研究所長  
丹野瑛喜子 埼玉県衛生研究所長  
林皓三郎 神戸市環境保健研究所長  
関龍太郎 島根県保健環境科学研究所長  
堤 俊明 長崎県衛生公害研究所長

#### A. 研究目的：

1. 本研究では、様々な技術レベルを持つ全国の地研が健康危機事例に直面した場合、可能な限り多数の地研で迅速かつ信頼性の高い試験検査結果の提供が可能となることを目的として、「健康危機管理のための試験検査技術の充実・普及」を図るため、試験検査技術の充実とともに検査技術の遠隔研修方法の確立、及び研修支援システムの構築を目指して前年度に引き続き研究を実施した。

(課題1)では、健康危機管理に不可欠な平時における食品中の残留農薬検出に関する情報を全国の地研でも独自に加工・利用可能なリファレンス情報データベースとして作成・公表すること、(課題2)では、全国の地研を対象とした情報システム上での遠隔研修を実施可能とする目的で、原虫性下痢症の病原体の検出検査法に関するマニュアル作成及びそれを用いた遠隔研修の実施に関して検討を加えることとする。さらに、(課題3)では、健康危機の発生現場で業務にあたる保健所と地研が試験検査技術(平成11年に全国の保健所に緊急配備された“スクリーニング用毒劇薬検査キット”を用いて)の向上を図るための連携について検討を加える。(課題4)では、IT技

術の導入に関する検討として、「健康危機管理のための試験検査技術の充実・普及」に関して、電子図書の作成、ITを利用した検査技術に関する情報等の獲得及び専門家へのアクセス等を考慮した最適の方法についての検討を加えることとしている。さらに(課題5)では、健康危機の原因となりうるエンテロウイルスの迅速同定検査法として、(課題5-1)一本鎖高次構造多型(SSCP)解析と呼ばれる新たな検査法の導入、(課題5-2)遺伝子の塩基配列を用いた同定法の検討、及び全国の地研に対するこれら検査法を用いた同定支援に関する検討を加えるなど、「健康危機管理のための試験検査技術の充実・普及に関する研究」を実施している。

#### B. 研究方法：

(課題1) 研修情報システムとリファレンス情報データベースの作成

研究協力者：

神戸市環境保健研究所

林 皓三郎 所長

同 田中敏嗣、小松 均

愛知県衛生研究所 斎藤 勲、山本 功、

同 松本 浩

平成9～10年度厚生科学研究費補助金「地域保健等のデータのデジタル化・規格化に関する研究」(主任研究者 石川直久前愛知県衛研所長)において作成された入力システムを基本として、昨年度の本研究で検討した

1. 入力項目の整理整頓、簡略化
2. カード型入力方式
3. 基本項目はプルダウン方式でリスト

から選択入力  
を目的として修正・改良したものを使用  
した。入力方法としては、Windows 対応  
のデータベースソフト「アクセス」を使  
用し、データ入力した各地研においても  
自らのデータはもちろん、その他全国の  
地研から入力されたデータを有効活用出  
来るシステムを構築した。また、従来の  
国立医薬品食品衛生研究所の「汚染物モ  
ニタリング調査」で入力されたエクセル  
のデータもそのまま取り込み利用可能な  
システムとした。将来的には、入力され  
たデータの中から個別情報は除いた共通  
項目をホストコンピュータに送り、リフ  
ァレンスデータベースを作成する方向で  
検討を加える。そして、データベースは  
各種キーワード（化学物質名、作物・食  
品別、検出頻度、検出範囲、地域別等）  
から多角的に検索可能となるようなシス  
テムを構築する。又、報告形式としてC  
S V形式によるE X C E Lへの出力も可  
能とし、各地研での成績書、報告書様式  
出力にも対応する。

本年度は、昨年度の本研究で作成した  
データベースアクセスの入力フォームに  
従い、愛知県衛生研究所及び神戸市環境  
保健研究所が平成8年から12年の5年  
間に実施した食品中残留農薬分析のデー  
タを入力し、入力における問題点及び作  
成されたデータベース内容の検討による  
問題点、改善点を検証した。

（課題2）情報システム上での遠隔研修  
の検討

研究協力者：

埼玉県衛生研究所 丹野瑛喜子 所長  
同 山本徳栄

本年度は、昨年度の本研究で検討した

結果に基づき、ビジュアルで詳細な検査  
マニュアル作成へ向けて 1) 試薬、器材、  
検査行程等に関する写真、2) 原虫類（ク  
リプトスポリジウム、ジアルジア、赤痢  
アメーバ、サイクロスポーラ他）の写真  
をデジタルカメラを用いて撮影し、検査  
時の同定・鑑別に有用となるような写真  
の選別を実施した。また、3) ヒト由来株  
以外に、イヌやネコ等のクリプトスポリ  
ジウムの PCR-RFLP パターンを集積する  
と共に、特定部位の塩基配列を解析した。  
将来的にはビジュアルで詳細な検査マニ  
ュアルを地方衛生研究所全国協議会のホ  
ームページに掲載し、そのマニュアルを  
用いた遠隔地研修を実施可能とする方法  
について検討を加えると共に、健康危機  
発生時には PCR-RFLP パターンをメール  
で送信することにより、“情報システム  
上での遠隔研修”及び健康危機管理とし  
ての疫学的解析に活用可能となるよう検  
討を加えた。

（課題3）保健所と地研の試験検査技術  
の向上のための連携の検討

研究協力者：

島根県保健環境科学研究所

関 龍太郎、所長

同 犬山義晴、岸 亮子、糸川浩司

昨年度の本研究におけるアンケート調  
査結果をもとに、本年度は1) 簡易検査  
キットの検証として、過去に毒劇物が混  
入されたことのある清涼飲料（お茶、コ  
ーヒー、ジュース等）やカレーに既知量  
のヒ素、亜鉛を添加し、平成11年に全国  
の保健所に緊急配備された“毒劇物スク  
リーニング用簡易検査キット”及び市販  
の水質検査キットを用いて分析を実施