

図3 SSCP解析によるエンテロウイルス同定のフローチャート

表 1 平成15年度の秋田県におけるエンテロウイルス分離同定成績

中和	SSCP型	株数	同定効率
CA2	A/2003	1	×1
CA4	B/2003 C/2003 D/2003	23 4 2	×9.7
CA9	E/2003	1	×1
CA10	F/2003 G/2003	4 4	×4
CA16	H/2003 I/2003	2 1	×1.5
Echo6	J/2003 K/2003	1 1	×1
Echo9	L/2003	1	×1
EV71	M/2003 N/2003 O/2003	2 1 1	×1.3
総合	15種類	49	×3.3

同定効率：分離株数をSSCP型の数で割ったもの。例としてCA4の場合は株数が29、SSCP型がBCDの3種類であるから、同定効率は29/3で9.7倍になる。

表2 平成10～15年度のエンテロウイルス同定へのSSCP解析の適用成績

平成年度	分離株数	SSCPの数	同定効率
10	135	15	×9.0
11	71	17	×4.2
12	84	23	×3.7
13	47	12	×3.9
14	85	16	×5.3
15	49	15	×3.3
総合	471	98	×4.8

表3 エンテロウイルス流行局面でのSSCP解析導入の効果

平成年度	疾患	病原体	同定効率
10	無菌性髄膜炎	Echo30	×32
10	手足口病	CA16	×20
11	ヘルパンギーナ	CA10	×17
12	発疹症	CA9	×21
14	無菌性髄膜炎	Echo13	×38'
15	ヘルパンギーナ	CA4	×23'

*主要株

分担研究班「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」
(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)

研究協力者

榮 賢司、藤浦 明、山下 照夫、梶島 由佳

我々は手足口病の病原体の迅速同定法として遺伝子の塩基配列を用いることに注目し、本法を全国の地方衛生研究所(以下、地研)で導入することを目的として、エンテロウイルスの同定検査法の充実・普及について検討を加えた。

まずエンテロウイルス全64血清型の標準株に関する遺伝子データベースを作成し、このデータベースを使用して、2000年及び01年に愛知県内の手足口病患者から分離された38株について同定を試みた。その結果、分離株はエンテロウイルス71型(EV-71)標準株のクラスターとコクサッキーウイルスA16型(CAV-16)標準株のクラスターに収束し、それぞれこれらの血清型として同定された。また、これらのクラスターに分類された株の塩基配列は他のCA群標準株とは大きく離れており、遺伝子解析による血清型別分類法はエンテロウイルスの診断において有効な手段となりうることが強く示唆された。

そこで、本研究に協力可能と応募した13の地研に対して作成したデータベース、解析用ソフトの入手方法及びその使用方法の日本語版を作成して配布し、それぞれの地研で分離されたウイルスについてシーケンスによる同定法を試してもらい、その後、従来法と比較しての迅速性、利便性、問題点、解析結果に等に関するアンケート調査を実施した。

回答は13地研のうち10地研から得られた。その結果、シーケンス解析により同定を実施する本法では、中和法で同定不能であった42株を含め検討した49株全株が明瞭に同定された。また、同定までに要した日数は中和法では平均21.3日(最短4日、最長60日)であったが、本法では平均4.9日(最短2日、最長14日)と1/4未満の日数で同定が可能であった。また、本法の最長14日は外部委託によるもので、この例を除くと平均3.3日で同定がなされており、中和法による同定と比べ、18日も早く同定された。

アンケート調査に回答を寄せた全10地研においては、手足口病のみならずA群エンテロウイルスの対象疾患から分離されたウイルスの同定に既に本法を試用しており、本法を手足口病のみならずその他の疾患の原因ウイルス同定法として使用することを期待する地研が少なくないことが示唆された。

また、これら全地研においては、今後もこのデータベースを同定に利用するとの回答があり、本データベースとインターネットで入手できる解析用ソフト及びその使用方法の日本語版配布により、シーケンスによるエンテロウイルス同定法は少なくとも10地研において定着したものと考えられた。

A. 研究目的

手足口病は小児の比較的軽症のウイルス感染症と認識されていたが、1997年と98年にそれぞれマレーシア、台湾で、手足口病の流行に伴う小児の急性死亡例、急性脳炎例が報告されて以降、手足口病への認識が変わりつつある。

また、手足口病の起因ウイルスとされる複数のウ

イルスのうち、これらの重症症例にはEV71が関与していることが明らかとなり、注目を集めている。手足口病の主な起因ウイルスの一つとしてコクサッキーA16(以下CA16)も知られているが、CA16によるものでは脳炎や死者の発生は報告されていない。したがって、手足口病患者からの迅速なウイルス検出法、及び、その起因ウイルスの迅速同定法の

充実と普及は、健康危機管理対策上急務なことと考えられる。

しかしながら従来の分離同定法である組織培養法では同定までに2ヶ月を要し、たとえ分離された場合でも迅速な同定は困難な場合が多い。そこで、ウイルス分離後の同定に、RT-PCR法を用いてウイルス遺伝子を増幅した後その塩基配列を解析し、既知エンテロウイルスの塩基配列との比較を用いた迅速で正確な血清型同定法の確立及び普及を目的として本研究を実施することとした。

B. 研究方法

1. システム構築のためのデータベース作成と、愛知県内の手足口病患者から分離されたエンテロウイルスを用いた本システムの有効性について

a) データベースの作成

標準株のVP1領域については64種類全ての遺伝子情報を公的データベース(GenBank, EMBL, DDBJ)から得た。

VP0(含VP4全領域とVP2の約1/3の領域)及びVP4領域については登録されている22種の血清型のエンテロウイルスについて、その標準株及び分離株の遺伝子情報を同様にGenBankより入手した。また塩基配列が明らかになっていない残り42種のエンテロウイルス血清型の標準株については、愛知衛研においてVP0領域の400塩基を調べ、全64種の血清型のエンテロウイルスについての遺伝子塩基配列データベースを作成した。

b) 手足口病患者から分離されたエンテロウイルスの遺伝子塩基配列の決定

供試したウイルスは、愛知県において2000年～01年に手足口病患者から分離されたウイルスで、中和用抗血清でEV71と同定された6株及びCA16と同定された2株、それに、同定不能株38株(2000年15株、01年23株)である。

ウイルスキャプシッド領域の中のVP1領域、VP0領域、及びVP4領域の相同性の比較はクラスタルXとツリービューにより解析した。

2. シークエンスによる同定法の配布及びアンケート調査について

遺伝子配列による同定を実施する上で必要な

項目を、クラスタルX及びツリービューの操作を英文マニュアルの中から抽出して日本語に翻訳した後、容易に使用可能な日本語マニュアルを作成した。

本研究で作成したVP4、VP0、VP1領域のエンテロウイルスデータベースと別添のクラスタルX及びツリービューの入手方法および日本語版マニュアル(別添資料1)を希望の地研に配布し、遺伝子解析による同定法の有用性を検討することとした。

その後別添資料2によるアンケート調査を実施し、従来の方法との迅速性及び利便性の比較、また解析結果について、VP4領域、VP0領域、およびVP1領域の解析評価、問題点等に対する質問を実施し、10地研から回答を得た(別添資料3)。応募した地研は以下の通りである。

1. 岩手県環境保健研究センター
2. 富山県衛生研究所
3. 岐阜県保健環境研究所
4. 静岡県環境衛生科学研究所
5. 京都府保健環境研究所
6. 島根県保健環境科学研究所
7. 広島県保健環境センター
8. 大分県衛生環境研究センター
9. 宮崎県衛生環境研究所
10. 千葉市環境保健研究所
11. 浜松市保健環境研究所
12. 堺市衛生研究所
13. 福岡市保健環境研究所

C&D. 研究結果、及び考察

1. 本システムの有効性について

エンテロウイルスデータベースを用い、クラスタルX及びツリービューを用いた遺伝子解析によるウイルス同定法を検討した。その結果、愛知県内で手足口病患者から分離されたEV71型6株とCA16型2株及び同定不能株38株は、EV71及びCA16と同一のクラスターを形成する2種に分類され、それぞれEV71とCA16と同定された。また、中和試験で同定不能であった38株は、2000年に分離された15株は全てがEV71型と、01年に分離された23株は全てがCA16型と同一のクラスターを形成し、

それぞれがEV71型、CA16型と同定された。これらの株の塩基配列は、同一の血清型においては、中和試験で同定された株と全く同一であった。すなわち、今回供試した48株については、中和試験法では8株(16.7%)のみが同定可能であったのに対し、VP0領域の塩基配列解析を用いた本法では、48株全株(100%)の同定が可能であった。

更にA群エンテロウイルス分離株とそれぞれの標準株のデータを共に解析したところ、分離株はVP1、VP0、及びVP4のどの領域を使用しても標準株とクラスターを形成し、同定可能であった。しかしながら、VP1領域を用いた解析のほうがVP4領域あるいはVP0領域を用いた解析よりも同一血清型及び他の血清型間の相同性の差が大きく、VP1領域の解析がもっとも確実であろうと考えられた。

A群エンテロウイルスは乳のみマウスによる分離が最も感受性が高いが、その手技は手間がかかり、できればRT-PCRで直接ウイルスの検出を行ないたいところである。しかしながら糞便中のウイルスは一段階のRT-PCRでは増幅が十分ではないため検出できない場合が多い。VP0領域(VP4領域を含む)においてはNested PCRの設定が可能で、直接ウイルスの検出を可能とする増幅領域と考えられる。現段階では手足口病から検出されたウイルス遺伝子についてはVP0領域をプライマーとしたPCRによる同定でも問題は無いと考えられるが、エンテロウイルス同定支援をその他のA群エンテロウイルスにまで拡大実施するためには、今後標準株と相同性の低い分離株のデータも追加して更に検討を加える必要がある。

2. シークエンスによる同定法のアンケート調査結果

回答が寄せられた10地研では平成15年には手足口病から総計134株のウイルスが分離されていた。その内訳はコクサッキーウイルスA16型(CA-V16)16株、CA-V10が14株、エンテロウイルス71型(EV-71) 89株、その他のウイルスが15株であった。一方手足口病からのウイルス分離がなかったという地研が2施設あった。

手足口病から分離されたウイルスで、中和試験によって同定できた株は91株、同定できなかった株は43件であった。このうち中和試験で同定不能

であった42株を含む49株でシークエンスによる同定が検討され、全ての株がこの方法によって同定された。

また、同法はこれら10地研全てにおいて手足口病以外から分離されたA群エンテロウイルスの同定にも使用が試みられていた。

同定までに要した日数は、中和法が平均21.3日(最短4日、最長60日)であったのに対し、シークエンス法では平均4.9日(最短2日、最長14日)であった。シークエンス法の最長14日は外部委託によるもので、この例を除くと平均3.3日であった。

今回同定用にVP0、VP4、VP1の3種類のデータベースを配布したが、VP1のデータベースを使用したのは7ヶ所、VP0が5ヶ所、VP4が3ヶ所であり、5ヶ所の衛研が複数のデータベースを使用していた。また、どちらが使用しやすかったかについては複数使用した地研ではVP1が良かったとの回答が3ヶ所で最も多かった。エンテロウイルスの同定にあたって、今回のデータベースが役に立った、今後も使用する、といった回答がこれら全地研から寄せられた。

今回の同定支援に対して、改良点等の意見を求めたところ、同定の方法としてはVP1領域を用いた同定が容易であったが、「プライマーの種類が多く煩雑」、「増幅できない株もあり、エンテロか否かの判断が出来ない」等の意見があり、できればVP0(あるいはVP4)領域で同定できるようにデータベースの充実を願う意見があった。また、データベースの充実のために、地研間でデータの相互利用の必要性についての意見も寄せられた。

E. 結論

1. 手足口病の主な原因ウイルスであるEV71とCA16をRT-PCRとシークエンスによって同定する方法を検討した。

クラスタルX及びツリービューを使用して手足口病患者から分離されたウイルス遺伝子の系統樹に基づいてVP0、VP4、及びVP1それぞれについて解析を行なった。その結果、いずれの領域でも2000年の分離株は全てEV71標準株のクラスターに、2001年の分離株はその全てがCA16標準株のクラスターに収束していた。それぞれのクラスターには

中和試験で同定された株及び同定されなかった株が含まれていたが、同定されなかった株のシーケンスは同定された株のシーケンスと一致していたことから、両者は同一のウイルスであると考えられた。また、EV71とCA16は系統樹上大きく離れており、明らかに異なるクラスターを作っていた。従ってこれら領域のシーケンス比較によって、EV71とCA16の同定が可能であると考えられた。

手足口病の原因であるEV-71とCV-A16は、VP4、VP0、VP1のいずれの領域を用いても同定可能であったが、その他のA群エンテロウイルスについてはVP1領域をもちいた同定が最も信頼性が高いと考えられた。

アンケート調査の結果、回答を寄せた10地研全てにおいて、中和試験では同定できなかった43株の分離株全てがシーケンスによる同定法によって同定されていた。また、同定までに要した日数は中和法が平均21.3日かかっていたものが、シーケンス法ではシーケンス自体を外部委託していた一施設を除くと平均3.3日と、非常に迅速な同定が可能となることが証明された。また、これら10地研全てから、今回の試みに使用されたデータベースが役に立った、今後も使用する、といった回答があり、本データベースとインターネットで入手できる解析用ソフト及びその使用方法の日本語版配布により、シーケンスによるエンテロウイルスは少なくとも10地研において定着したものと考えられた。

今回提供したデータベースは公的データ

ベースに登録されている株のシーケンスと愛知衛研で実施したシーケンスを基に作成したものである。今回は手足口病の原因ウイルスの同定を目的としてデータベースを提供したが、アンケートに調査に回答を寄せた全10地研がその他のA群ウイルスの同定にも使用していたことから、遺伝子解析による同定法は全てのエンテロウイルスに利用可能となるようにすることが将来的には求められているものと考えられた。また、VP1領域における遺伝子解析では標準株のシーケンスのみでも充分解析可能であったが、PCRの煩雑さ、検体から直接遺伝子を検出するには感度が低いことが問題として残った。さらに、今後の検討課題として残ったVP0及びVP4領域の遺伝子解析については、特に、標準株と相同性の低い分離株を単独で相当数収集することは困難なことから、地研相互に利用可能なデータベースの共同構築を検討する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報：該当事項なし

G. 研究発表：

- 1) 論文発表：該当事項なし
- 2) 学会発表：該当事項なし

H. 知的所有権の出願・登録状況：
該当事項なし

別添資料1

地方衛生研究所ウイルス検査担当者殿

拝啓

貴下ますますご清栄のこととお喜び申し上げます。

私共は、厚生労働省科学研究助成費「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」、分担研究班「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」の中で、「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」というテーマで研究を進めております。これは同定し難い手足口病の病原体をシークエンスによって迅速に同定する方法を全国の地方衛生研究所に普及させるための研究です。

手足口病は小児の比較的軽症のウイルス感染症と認識されていますが、1997年と98年にそれぞれマレーシア、台湾で、手足口病の流行に伴う小児の急性死亡例、急性脳炎例が報告されて以降、手足口病への認識が変わりつつあります。

また、手足口病の起因ウイルスとされる複数のウイルスのうち、これらの重症症例にはエンテロウイルス(以下 EV) 71 が関与していることが明らかとなり、注目を集めています。手足口病の主な起因ウイルスの一つとしてコクサッキー A (以下 CA) 16 も知られていますが、CA16 によるものでは脳炎や死者の発生は報告されていません。したがって、手足口患者からの迅速なウイルス検出法、及び、その起因ウイルスの迅速同定法の充実と普及は、健康危機管理対策上急務なことと考えられます。

しかしながら従来に分離同定法である組織培養法では同定までに2ヶ月を要し、またこれらのウイルスは分離された当初は細胞での増殖能が弱く、たとえ分離された場合でも迅速な同定は困難な場合が多いのが実情です。そこで、ウイルス分離後の同定に RT-PCR 法を用いてウイルス遺伝子を増幅し、その塩基配列を解析して既知のエンテロウイルスの塩基配列と比較することにより、分離ウイルスの血清型を同定する、というエンテロウイルスの迅速同定法の確立・普及を目的としてこの研究を実施しております。現在までに、EV71 と CA 16 は互いに、また、その他の CA 群のウイルスとは VP1 領域の塩基配列では明確に区別出来ることが明らかとなりました。また、VP4 領域の塩基配列によっても、最近の分離株の塩基配列データを追加することによって、同定が可能であるとの結果も得られています。

そこで今回、本研究の主題である「…エンテロウイルスの同定支援」を実際に開始するにあたり、全国いずれの地方衛生研究所でも実施可能な具体的な方法として、

1. 手足口病患者の病原体を組織培養によって分離する。
 2. 分離されたウイルスの VP0 あるいは VP1 領域を RT-PCR によって増幅する。
 3. シークエンスを行なう。
 4. 得られたシークエンスデータを、配布したコクサッキー A 群のシークエンスデータと共に、「クラスタルX」及び「ツリービュー」を用いて系統樹を作成する。
 5. 分離ウイルスのシークエンスが系統樹の中のどのウイルスに一致するかを見て、同定する。
- といった手順で同定を行う事をサポートしたいと考えております。

シークエンサーのない衛生研究所も多々あることは承知していますが、現在では PCR 産物のシークエンスを外注することも可能です。これを機会にエンテロウイルスのシークエンスによる迅速同定法に取り組みたいとご希望の研究所には当方から

- (1) CA 群標準株、CA16 分離株及び EV71 分離株のシークエンスデータ

- (2)「クラスタルX」及び「ツリービュー」の入手方法
 - (3)上記ソフトを使用した系統樹の作成方法説明書
- をお送りしますので、下記の宛先までご連絡下さい。

なお、この方法で CA 群についても同定可能です。その際は、乳のみマウスの乳剤から RT-PCR を行ない、同様の方法で同定します。

このプロジェクトに参加していただいた衛生研究所には実施後に、実施検体数、ウイルス名、中和同定法との比較等についてアンケート調査を実施致しますのでよろしくお願い致します。

また差し支えなければ、同定したウイルスのシーケンスデータのご提供をお願いします。(出来ましたら、ご自分でジーンバンクにご登録下さい)。

〒 462-8576

名古屋市北区辻町字流 7-6

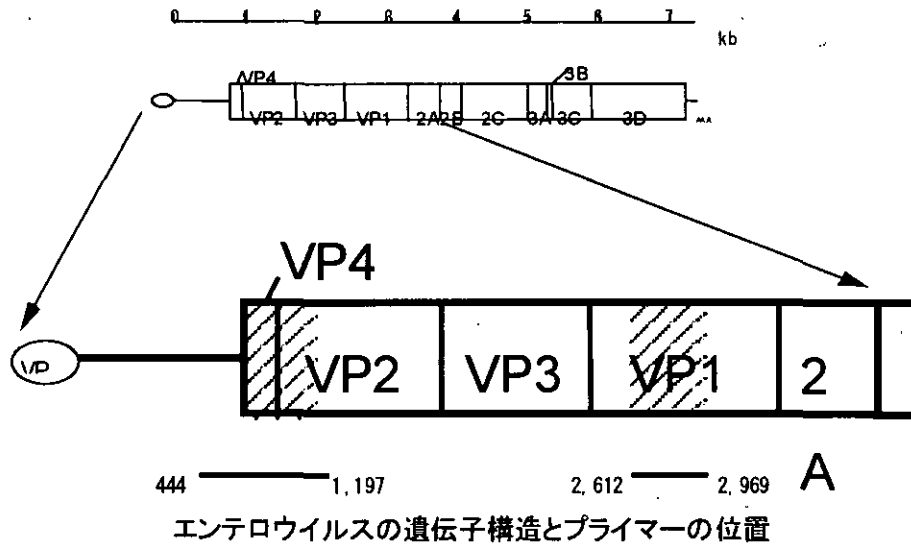
愛知県衛生研究所 微生物部

榮 賢司

TEL 052-910-5674

FAX 052-913-3641

エンテロウイルス(コクサッキーA群)のPCR



(1)

(VP0)

(Forward)

MD91: 5'-cctccggccocctgaatgaggctaat

(2)

(VP1)

(Reverse)

OL68: 5'-ggtaayttccaccaccancc

222: 5'-cicciggiggiayrwacat

94°C, for 3 min.

94°C, for 3 min

94°C, for 30 sec

94°C, for 30 sec

55°C, for 30 sec

42°C, for 30 sec

72°C, for 1 min

72°C, for 30 sec

72 °C, for 5 min

72 °C, for 5 min

40 cycles

40 cycles

参考文献

- 1) H.Ishiko, Y.Shimada, M.Yonaha, O.Hashimoto, A.Hayashi, K.Sakae and N.Takeda: Molecular Diagnosis of Enteroviruses by Phylogeny-Based Classification by Use of the VP4 Sequence. *J.Infect.Sis.* 185,744-754,2002
- 2) Oberste M.S.,Maher K.,Flemister M.R.,Marchetti G.,Kilpatrick D.R. and Pallansch M.A.: Comparison of Classic and Molecular Approaches for the identification of Untypeable enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.*38,1170-1174, 2000

シーケンスデータの処理

VP0 領域を用いた同定

シーケンスデータの 5'側から ATGGG の部分を探し、それより前の部分をカットする。
ATGGG から 399 base 取り、それ以後をカットする。

VP 4領域を用いた同定

VP0 の 5'側から 207base 取り、それ以後をカットする。

VP1 領域を用いた同定

プラスミッドに組み込んでシーケンスした場合には、プラスミッドのシーケンスをカットする。ダイレクトシーケンスのデータはそのまま使用する。

Clustal X の使い方

1. 比較したい分離株の配列を別添の A 群エンテロウイルスデータベース(ファイル名 CV-A (VP0)、CV-A (VP4)、CV-A (VP1))にあるデータの様に並べてテキスト形式で保存する。
2. Clustal X を立ち上げて File から Load Sequences を選ぶ。
3. 1にあげたファイルを開く。
4. File から Append Sequences を選ぶ。
5. 1にあげた別のファイルを加える。
6. Alignment から Do Complete Alignment を選ぶ。
7. ALIGN をクリックし待つ。
8. Alignment が終了したら、Trees から Bootstrap tree を選ぶ。
9. 保存場所を確認し OK.
10. Tree View を立ち上げ File から Open を選ぶ。
11. 9で保存したファイルを開く。
12. Tree から Phylogram を選ぶ。

遺伝子解析ソフトの入手について

ClustalX のダウンロード:

1) Windows

<http://www.biwa.ne.jp/~k-sugino/clustalx.html>

内の

ClustalX のダウンロードサイトに接続し、ソフトを入手する。

Windows 95/98

Latest version (as of 19/6/00): 1.81

clustalx1.81.msw.zip

2) Macintosh & Windows 95/98

<http://inn-prot.weizmann.ac.il/software/ClustalX.html>

内の

Macintosh

Latest version (as of 19/6/00): 1.81

clustalx1.81.PPC.sea.Hqx

・ Treeview のダウンロード

<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>

別添資料2

手足口病の病原体を中心としたエンテロウイルスのシーケンスによる同定法に関するアンケート

1. 平成15年度手足口病から分離したウイルス件数 (件)
2. 中和試験で同定した件数 (件)
3. 同定ウイルス名
CAV-16(件)、EV-71(件)、その他(ウイルス名) (件)
4. シーケンスによって検討した件数 (件)
5. シーケンスによって同定できた件数 (件)
6. シーケンスによって同定できなかった件数 (件)
7. シーケンスによる同定に要したおよその日数 (日)
8. 中和による同定のおよその日数 (日)
9. 手足口病から分離されたウイルスの同定に使用した領域(複数回答可)
VP4 VP0 VP1
10. 同定にはどの領域が使用しやすかったですか？
VP4 VP0 VP1
11. 手足口病以外のエンテロウイルス同定に応用しましたか？
Yes No
12. 同定にはどの領域が使用しやすかったですか？
VP4 VP0 VP1
13. シーケンスによる同定法は役に立ちましたか？
Yes No
14. 今回配布したデーターをこれからも利用しますか？
Yes No
15. 今後利用するに当たって、改良すべき点についてのご意見をお願いします。

有り難うございました。アンケート結果につきましてはまとも次第お送り致します。

別添資料3

手足口病の病原体を中心としたエンテロウイルスのシーケンスによる同定法に関するアンケート集計結果

質 問	項目	合計
平成15年度手足口病から分離したウイルス件数		134
中和試験で同定した件数		91
同定ウイルス名	CAV-16	16
	EV71	89
	Other	29
シーケンスによって検討した件数		49
シーケンスによって同定できた件数		49
シーケンスによって同定できなかった件数		0
シーケンスによる同定に要したおよその日数	平均	4.9*
中和による同定のおよその日数	平均	21.3
手足口病から分離されたウイルスの同定に使用した領域(複数回答可)	VP4	2
	VP0	4
	VP1	6
同定にはどの領域が使用しやすかったですか？	VP4	1
	VP0	2
	VP1	4
手足口病以外のエンテロウイルス同定に応用しましたか？	Yes	10
	No	0
同定にはどの領域が使用しやすかったですか？	VP4	1
	VP0	3
	VP1	6
シーケンスによる同定法は役に立ちましたか？	Yes	10
	No	0
今回配布したデーターをこれからも利用しますか？	Yes	10
	No	0

* 外部委託した最長の14日を除くと平均3.3日

今後利用するに当たって、改良すべき点についての意見

- * EV71の4検体の内2検体ではVP1のPCR用プライマーの選択に迷いました。
- * シーケンスの解析結果を皆さんがデーターバンクに登録されて、データーの蓄積が更に進み、解析の信頼性があがればよいと思います。
- * 登録方法についても支援して頂きたいです。
- * CA16、EV71以外のエンテロウイルスについても、同定できればよいと思います。
- * エンテロウイルス検出を初めて2年目で中和できなかった株の同定にシーケンスが役立っています。
- * 今夏CA群の同定に利用させて頂き有効に使用することが出来ました。
- * VP1の方がデーターベースから検索して同定しやすかったが、プライマーの種類が多く煩雑。同定にはエンテロかどうかの判断も含めて実施している(VP1領域では増幅できない株もある)ので、VP0(VP4)領域のデーターベースが充実されると良いと思う。
- * シーケンスの領域、方法等については全く問題ない気がします。今後は各地研で得たデーターノ相互

利用、例えば積極的にGenbankに登録することにより、他の物もそのデーターを利用可能とするといったことが必要な気がします。

健康危機管理のための地域での連携体制の構築に関する研究

分担研究者 大道正義 千葉市環境保健研究所長

研究要旨： 地方衛生研究所（以下地研）が地域での健康危機発生に適切に対応するためには迅速化・高度化を保障する検査機能の強化と、地域での機関連携が必要である。そのため、1 健康危機発生状況の把握と原因究明に不可欠な分子疫学などを駆使した迅速で正確な微生物の検出・高精度化学物質微量分析などの地研検査体制の迅速な立ち上げシステムの構築、2 地域内関連行政機関との連携構築、3 感染症・食中毒の発生動向など直近の健康関連情報や検査技術情報などの地域内発受信システム整備による医療機関・医師会・学校・研究機関との連携体制の構築、4 民間検査機関を含む地域内検査機関連携による検査機能の多機能化、5 通常業務の日常連携の恒常化、などを目的として、北海道から沖縄県までの9地研が参画して18題の事例研究を行った。事例研究内容は参画地研の自主的・独創的で地域密着型の課題設定により、ア 感染症情報センターを含めた自所のホームページの機能拡充による保健行政・住民への情報発信の高度化、イ 医師会をはじめとする医療機関連合体との常設的な、相互通信のためのメーリングリストによる双方向通信の導入・情報発受信の迅速化、ウ 遺伝子解析等の微生物検査結果の類似性、相同性迅速確認のための情報共有連携システムの開発、エ 食中毒の臨場調査票作成による疫学情報収集の実利的簡便化、オ 結核菌相同性同定へのRFLP法の導入・結核関連行政連携対応の迅速化、カ 安価なFTPサーバー導入によるホームページ拡充と微生物検査九州パルスネットのリンク連携の構築、キ 保健衛生部門外行政機関との連携構築、ク 国や民間の研究機関との連携強化、ケ 健康危機発生時の地域内連携の構築と危機管理運営の馴化などが企画、検討された。研究成果としては、地域における多様な機関連携の構築と拡充が進捗し検査迅速対応、情報発受信機能・検査リファレンスセンター機能・業務運営マネージメント機能・研修機能・研究機能の強化が成し遂げられた。

研究協力者

藤田 晃 三 札幌市衛生研究所長
吉田 菊 喜 仙台市衛生研究所長
丹野 瑛喜子 埼玉県衛生研究所長
中山 治 三重県科学技術振興センター
保健環境研究部長
田中 智之 堺市衛生研究所長
小倉 肇 岡山県環境保健センター所長
馬場崎 正博 福岡市保健環境研究所長
池間 次郎 沖縄県衛生環境研究所長

24日午前2時30分頃、モロッコのアル・ホセイマ周辺でマグニチュード6.5の地震が発生し乾燥煉瓦造りの建築物の倒壊で住民多数が下敷きになり、26日には死者564人に達し、クレーン車などの重機の不足が被災者の救出を困難にしている事が報じられた。被災者の救援と健康危機の速やかな排除が課題であることが外国の事例ではあるが今回もまた銘示された自然災害であった。日本でも1995年1月17日5時46分、マグニチュード7.3の阪神淡路大震災が発生、5000人余が死亡し、多数の住民が被災した大規模健康危機があった。これら自然災害である大地震発生の予防は困難である。この健康危機に備える事の目的は2次予防であり、食品・飲料水・住居・衣料品・ユンボなどの重機・非常時通信網・交通の確保、医療の早期開始、感染症・食品・飲料水などの検査体制の早期立ち上げが急がれるが、災害対策マニュアル整備後の

A. 研究目的

2003年12月26日午前5時30分頃、イランのバム周辺でマグニチュード6.3の地震が発生、家屋倒壊で多数が生き埋めとなり12月31日には周辺の住民12万人のうち4万1千人余が死亡、負傷者は数万人に達している事が明らかになった。2004年2月

現在でも継続懸案事項となっていることが示唆された。

一方、テロ対策事例としては、2004年初頭、アメリカでは国務省関連施設への郵便物中に白い粉の入った封筒が発見され、当初、中味はタンパク質と公表されたが、検査の結果は猛毒のリシンであることが判明した。この事例は不特定多数の健康危機を惹起させる意図をもった犯罪であり、検査は警察、CDCなど検査分析部門が保安体制を強化する中で鑑別・鑑定が行われた。2002年アメリカの郵便局で発生した炭疽菌郵送の事案では感染による死者が確認され、アメリカ国内をパニックに陥れ、この事件の発生直後からわが国に模倣的な事案の続発として波及した。福島郵便局の事例を初発として各地の白い粉の炭素菌緊急検査には、微生物部門を所管する地研が、科捜研などの警察所管検査部門を連携支援することとなった。いずれも結果が陰性であったが、地研は1500余件の行政依頼検査として分担を果たした。

他方、感染症による健康危機対応として、2003年秋にはコイヘルペスウイルスに、2004年早期に高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染した動物が相次いで多数発見され、国・県・政令市の農林行政を軸に、国内では初めての緊急検査対応が協議された。早急な封じ込め対策として感染拠点の関連動物全殺処分が行われたが付近住民の健康不安は増大していた。幸いにも住民の健康被害は未だ発生していない。高病原鳥インフルエンザウイルスについてはSARSウイルスと同じく、厚生労働省から地方行政に検査体制整備の行政通知が発せられ、急遽、地研の微生物部門で検査対応がなされつつある。2001年アメリカ東部でカラスの大量死が発生して感染が確認されたウエストナイルウイルスは、ほ乳類への急速な感染拡大を呈し、2003年にはアメリカで感染者数4156人、死亡者は230人に達している。わが国でも、厚生労働省から都道府県・政令指定都市に対し検査体制の整備が指示された。鳥類の死体検案では全例が陰性、ヒトへの感染も確認されていない。

近年で最も健康危機の緊迫感をもたらした感染症がSARSである。2002年11月、中国でSARSウイルス感染患者第1号が発症、中国から世界各地に伝播し、2003年7月までに感染者数8098人、死亡者は774人に達する大規模健康危機となった。国内

ではWHO指定伝播地域からの帰国者（有症者）を対象に指定医療機関で臨床対応体制が構築された。SARSウイルス関連検査は厚生労働省からの行政通知により地研が分担することとなった。当初は疑い例以上の患者について、多くの地研が鑑別検査を担当し、国立感染症研究所（以下感染研）が併行検査または最終確認を担当した。検査を担当する地研サイドではSafety level 3の実験室の整備や陽性コントロールの入手などで迅速対応に課題が残った。国内では現在まで感染者は確認されていない。

これらの健康危機発生の起源は非意図的、意図的など、多種多様であり、また、地域住民の健康保持には重要な関連があることから、地方行政では緊急体制を構築して対応してきている。所管行政の検討課題は山積しているが、地研の緊急課題も多い。SARS健康危機発生の初動対応には地研の検査機能、中でも迅速な原因の特定と鑑別、そのためのリファレンス機能の確保が不可欠である。また、地研相互・地域内関連機関の連携による機能強化も急務となっている。

本分担研究課題「地研の健康危機管理における地域の連携体制の構築」の重要かつ主要な研究目的は、第一に、日常検査の迅速化、高度化、近隣機関との検査連携の恒常化、第二にはインターネットやメールを活用した情報発受信の拡充、第三には関連機関連携の構築と運用馴化である。

B. 研究方法

本研究に参画した9機関が、健康危機管理のための通常あるいは危機発生時の地域内連携体制の円滑な運用による迅速対応に向けて、以下の18事例研究課題を検討した。

- 1 SARS等検査のアンケート緊急実態調査：迅速検査は可能か？（分担研班）
- 2 SARS擬似患者発生対応訓練時の時系列プログラムのモデル作成と課題の検討：感染症による健康危機管理の問題点把握と対策の創出（分担研班）
- 3 平常時の検査・調査機能の連携強化
 - 3-1-1 第一線医療機関等と地研の連携の模索：市内の主な医療機関を対象とした大規模災害等発生時の危機管理対応に関するアンケート調査（仙台市）

3-1-2 院内感染防止のための環境中のClostridium difficile汚染の調査法の検討：菌の採取法と増菌培地の比較検討（仙台市）

3-2 O157食中毒発生時における効率的な疫学調査法の研究：検査結果情報の共有化と活用方法の検討（埼玉県）

3-3 腸管出血性大腸菌の患者由来株及び河川水由来株の広域疫学的解析：広域的な健康被害の発生予測・予防対策への還元（堺市）

3-4 結核をモデルとした地域における健康危機管理連携体制の構築：保健所結核行政への科学的支援（岡山県）

3-5 輸入食品の安全性確保における地研と検疫所との連携（沖縄県）

4 情報発受信機能の連携拡充

4-1 健康危機発生時の迅速対応に対する連携体制構築の事例研究：感染症情報センターの機能強化と、地域内連携強化のための情報発信の質的拡充（札幌市）

4-2 健康危機管理における地研と地区医師会等臨床部門との情報連携策の構築：地研と県内医師会とのメーリングリスト構築と運用管理の拡充（三重県）

4-3 健康危機発生時における保健福祉センター等行政機関及び県域3地研間の連携体制の構築：県内・支部内の機関連携システムの開発と運用改善（福岡市）

5 健康危機発生時の迅速対応強化と恒常化

5-1 ウェストナイル感染疑似例発生時の部門を越えた緊急検査連携：県と政令市の本庁主管部連携と、農水部門との有機的連携による迅速対応の実践（千葉市）

5-2 SARS疑似患者発生時の検疫所・医療機関・保健所・本庁・地研との連携訓練：検疫通報から検査対応までの臨場シミュレーションと課題抽出（千葉市）

5-3 所管行政を越えた機関連携構築とシミュレーション：健康危機発生時の消防・警察との連携訓練と科学的技術支援策の構築（千葉市）

6 地研機能強化のための多様な機関連携構築と拡充強化

6-1 千葉大学大学院医学研究院テロ対策室の化学的支援連携の検討（千葉市）

6-2 広島大学テロ対策室との連携：臨床から法医

学までの情報リンク参画（仙台市、千葉市）

6-3 室内汚染化学物質の除去法の検討：解剖実習室の環境改善（千葉市）

6-4 焼成カルシウムを用いた炭ボードの作成と化学物質除去効果の検討（千葉市）

6-5 尿中結合性アルコール・アセトアルデヒドの測定（千葉市）

（倫理面への配慮）

健康危機事例の収集および情報発信の際には、プライバシー保護等に十分配慮した。

C. 研究結果

1 SARS等検査のアンケート緊急実態調査：迅速検査は可能か？（分担研班）

平成14年6月の一次調査では一次スクリーニングを含めて97%の地研が検査可能と回答、多くの担当者から検査手法や陽性コントロールの入手について要望があり、感染研で作成、配布した。平成15年3月のSARSウイルス検査に限定した二次調査では90%、ウエストナイルウイルスでは76%、高病原性鳥インフルエンザウイルスでは81%が検査可能と回答し、検査体制はほぼ整備されていることが判明した。一方、近隣地研との連携有りは43%、農水行政の検査部門との連携有りは19%、消防・警察の検査部門との連携有りは24%であった。地研と行政所管外部機関との連携には検討課題が多いことを示唆している。

2 SARS疑似患者発生対応訓練時の時系列プログラムのモデル作成と課題の検討：感染症による健康危機管理の問題点把握と対策の創出（分担研班）

平成14年10月28～29日に厚生労働省千葉検疫所千葉支所主管のSARS疑似患者発生対応訓練が千葉港民間所有埠頭で行われ、検疫所支所への事前通報から、千葉市本庁・保健所・指定病院・地研など地方行政対応の時系列プログラムを作成、地研の機能と役割を検証した。船舶代理店からの初報が千葉検疫所千葉支所に入電した時点から関係機関との相互連絡が開始され、検疫、疑似患者の特定、隔離、搬送、入院、積極的疫学調査、一次・二次検査、感染症審査協議会などの流れは順調に推移していた。抽出された対応課題は、担当職員の防護マニュアルを解り易く使いやすい

内容にすることや、防護服・手袋・マスク・足カバーなどの着脱・廃棄方法の習熟も必修課題であった。ロ いくつかの機関が連携するので全体の把握と割振りをする統括管理部署の設置と担当者の配置について調整が必要なこと、ハ 連携部門での情報の共有のために患者情報の行政内限定開示について協議が必要なこと、ニ 事後の迅速対応のための報告書などの記録作成が必要なこと、ホ連携円滑化のための定期協議を設定すること、などが把握され、速やかな具体化が急務となった。そこで、当所の緊急対応項目を時系列で整理した。訓練全体の時系列は別表1。

初報探知、その時、地研では何をする？

初報 千葉市対応 本庁・保健所・病院・研究所ラインアップ 15:00 対応開始

- 1 連携開始 双方向連絡ライン確保：携帯電話を含めて2ルート 内容のバックアップ
- 2 詳細解析・追加情報入手 発信元整理：検体種類・個数・患者情報の把握
- 3 検査準備注意報発令・所内掲示・対応体制の共有
- 4 検体受入れシュミレーション・記録確認
- 5 100件以下（少数）・300件まで（中規模）・1000件以上（大規模）の対応を判断
- 6 担当課長：対応決定 所内周知・確認
- 7 検体搬入・検査開始 保健所・本庁へ報告・検体の追加搬入を保健所に問い合わせ
- 8 検査経過を所内報告、記録、保健所・本庁へ報告

- 9 検査結果を所内幹部複数で確認、記録
- 10 保健所・本庁へ口頭仮報告
- 11 保健所へ結果書提出 17:00 訓練終了
- 12 訓練情報の整理・反省点の把握と検討会での総括・全体記録作成

3 平常時の検査・調査機能の連携強化
3-1-1 第一線医療機関等と地研の連携の模索：市内の主な医療機関を対象とした大規模災害等発生時の危機管理対応に関するアンケート調査（仙台市）

大規模災害時には多くの死傷者が予想され、医療機関の対応は、その対策の成否を左右する重要な要素である。今回、仙台市内の主な医療機関の協力を得て、大規模災害時の準備状況を調査した。結果を数量化し、設問項目毎、医療機関毎の対応

状況を比較した。設問項目毎の検討では、純粋に医療に属する項目については対応状況は進んでおり、日常の延長とも言える項目では遅れていた。また、医療機関毎の比較でも、必ずしも公的医療機関で対応が進んでいる状況ではなかった。

3-1-2 院内感染防止のための環境中の Clostridium difficile 汚染の調査法の検討：菌の採取法と増菌培地の比較検討（仙台市）

環境中の Clostridium difficile 汚染の調査法を確立するため、Clostridium difficile 用の分離培地を比較するとともに、芽胞検出に最も適した条件を検討した。芽胞の検出には、Na-taurocholate を加えた自家調製 Cycloserine-Cefoxitin-Mannitol-Agar (CCMA) 培地が市販の CCMA 培地および Cycloserine-Cefoxitin-Frucutose-Agar (CCFA) 培地よりも高感度に検出が可能であった。また、この Na-taurocholate を加えた自家調製 CCMA 培地では、栄養型の菌体は市販の培地よりも検出感度が悪かった。芽胞をプラスチック平板上に塗抹・乾燥した模擬環境を作成し、ロダックプレートを用いる方法や綿棒による拭き取り、または Cooked Meat Medium による増菌を行うなどの菌の採取ならびに検出法の比較検討を行ったところ、予備還元をしておいた Na-taurocholate 添加自家調製 CCMA 培地で作成したロダックプレートでスタンプし、直後に嫌気培養を行う方法が最も高感度に菌の検出が可能であることが明らかとなりまた、環境中の Clostridium difficile の分離を選択的に行うことが可能であることが明らかとなった。今後、保健所、医療機関の協力を得て臨場調査を検討する。

3-2 O157 食中毒発生時における効率的な疫学調査法の研究：検査結果情報の共有化と活用方法の検討（埼玉県）腸管出血性大腸菌の広域散発型集団発生 (Diffuse Outbreak) の原因究明を行うため、「腸管出血性大腸菌感染症発生原因調査票」の考案と衛生研究所への感染症疫学部門の新設を柱とする新しい調査法の開発を行い、平成15年度から一連の調査システムとして運用を開始した。開発した調査票による患者調査は、調査精度の標準化と情報の集積、共有化に有用であることが示唆された。また、調査システムの運用を通じて、自治体の枠を超えた情報交換は Diffuse Outbreak の原因究明には必須の条件であり、自治

体間の連携を含めた関係機関の連携体制は、適切な行政対応の迅速化に有用であることが示唆された。腸管出血性大腸菌のDiffuse Outbreakの早期探知を目的に、科学的根拠に基づいた調査票の作成を行い、衛生研究所の機能強化及び関係機関との連携により原因究明を効果的に行うためのシステムを構築した。さらに、システムを運用する中で、考案した調査票の評価、情報の効果的な活用方法及び情報の共有化について検討した。考案した調査票により、患者発生時調査の効率化が図られ、疫学情報と分離菌株情報の一元化が図られた。また、自治体間の情報交換による事例対応の結果から、衛生研究所間の直線的な情報交換の有用性が示唆された。

3-3 腸管出血性大腸菌の患者由来株及び河川水由来株の広域疫学的解析：広域的な健康被害の発生予測・予防対策への還元（堺市）平成15年5月～平成16年1月まで2ヶ月毎に、堺市内の河川流域に点在する牛舎の関与も含めて、大和川（1級河川）及び石津川流域の9定点から、大和川上流に位置する奈良県の4定点を選び腸管出血性大腸菌0157及び026の分離を試みた。これらの河川水より026-H11が4株、026-HNMが2株、0157-H7が3株、計り株が分離された。河川水由来株と堺市及び奈良県における腸管出血性大腸菌感染症の、患者由来株を用いて細菌疫学的解析を行った。その結果、河川水及び患者由来株間には相同性が少ないことがわかった。さらにウイルス性胃腸炎の主要な病原体であるノロウイルスについても河川水からの検出を試み季節的消長や集団発生事例との疫学的解析を検討している。

3-4 結核をモデルとした地域における健康危機管理連携体制の構築：保健所結核行政への科学的支援（岡山県）結核の集団感染と偶然同時多発の区別や感染経路の確認などに大変有効な手段である結核菌DNAのRestriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析法を活用した、地域における結核対策としての健康危機管理連携体制の構築について検討した。平成13年度は、地域における「結核をモデルとした健康危機管理システムを構築する研究で、「結核対策連携マニュアル」の素案をつくった。平成14年度にはこれが機能するかどうかを実際に運用し、問題点を抽出、改訂を行ったり、新たなマニュアルを作成した。平成15年

度は、これら地域における連携体制マニュアルが県内で実用化できるように、更なる検証と改訂を行った。特に、保健所における結核患者発生時の対策フローを追加し、結核チェックリストに関しては、利便性を高めて県下全体および他府県でも実用できるようさらなる改訂を行った。また、岡山県におけるRFLP検査事業に対する補助金給付の終了に伴い、これまでの分離結核菌の全例RFLP検査を行う方式を改め、一事例で2人以上の患者がいる場合や、患者が学校や老人施設等に所属し集団発生に発展する可能性のある場合など、結核健康危機発生ないしは発生の可能性のあるときに的確に対応するための対応フロー図とマニュアルを作成した。そのほかに、これまでの連携によりRFLP検査が役に立った事例を集めて検証した。なお、結核菌DNAのRFLP検査を全国ネットワークとする構想は、個人情報保護条例等で実現は難しい。

3-5 輸入食品の安全性確保における地研と検疫所との連携（沖縄県）

平成14年における我が国の食糧自給率は、カロリーベースで約40%であり、残り60%は外国からの輸入食品に頼っている。しかも輸入量は年々増加の傾向にある。平成14年次における輸入食品の総件数は1,618,880件で、重量は、33,201,949トンである。この輸入届け出に対して検査は8.4%にあたる136,087件が実施され、972件が食品衛生法不適合として、積み戻し又は廃棄等の措置が執られている。このように外国から押し寄せる大量の不適合食品を全て水際でくい止めるには、検疫所のみでは困難である。中には昨年問題となった中国産冷凍ハウレンソウの残留農薬や肝障害の発生した医薬品配合の健康食品など検査をすり抜けてくる不適合食品は後を絶たない。このような現状において地衛研が検疫所等と連携し、検査をめぐり抜けてくる不適合食品から健康被害を少なくするための連携体制について検討した。輸入食品すべてについて検査を実施することは物理的に不可能であり、現システムでは各種情報に基づき重点検査を実施せざるを得ない。検査は検査課を有する各検疫所と横浜検疫所輸入食品・検疫検査センターと神戸検疫所輸入食品・検疫検査センターで主に実施するが、遺伝子組換え食品やGC-MS・LC-MS等を使用する高度な試験は両検査センターで実施している。上記各種検査項目については、