

200738005A-B

平成19年度厚生労働科学研究費補助金

地域健康危機管理研究事業

健康危機発生時の地方衛生研究所における  
調査及び検査体制の現状把握と検査等の  
精度管理体制に関する調査研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

平成17～19年度 総合研究報告書

主任研究者

田 中 智 之

平成20年3月

# 目 次

## I 総括研究報告書

健康危機発生時の地方衛生研究所における調査及び検査体制の 現状把握と検査等の精度管理の体制に関する調査研究 ..... 田中 智之 .....	1
---	---

## II 平成 19 年度 主任・分担研究報告書

1. 天然痘ウイルスの免疫学的迅速・簡便診断法と健康危機管理構築 ..... 田中 智之 .....	11
2. バイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理(Ⅲ) ..... 小倉 肇 .....	18
3. 化学物質モデルにおける多検体(多成分)一斉迅速検査の 精度管理等の検討 ..... 田中 敏嗣 .....	24
4. 我が国での健康危機管理体制時の検査精度管理(GLP 等)の検討 ..... 今井 俊介 .....	63
5. 健康危機管理プロジェクトの組織化と近畿地研ブロックでの連携構築 ..... 井端 泰彦 .....	69

## III 平成 17-19 年分担研究総括報告

1. 平成 17-18 年度 欧米諸国の地方衛生研究所相当機関における危機管理対策の一環として の精度管理制度の調査と本邦への導入に関する検討 ..... 吉村 健清 .....	87
2. 平成 18-19 年度 天然痘ウイルスの免疫学的迅速・簡便診断法と健康危機管理構築 ..... 田中 智之 .....	101

3. 平成 17-19 年度		
バイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理	小倉 肇	111
4. 平成 17-19 年度		
化学物質モデルにおける多検体（多成分）一斉迅速検査の精度管理等 の検討	伊藤 正寛 田中 敏嗣	118
5. 平成 17-19 年度		
我が国での健康危機管理体制時の検査精度管理(GLP 等)の検討	今井 俊介	136
<b>IV 参考資料</b>		
電子顕微鏡的ウイルス診断のためのウイルス固定法及び染色法 マニュアル（改訂版）		139
厚生科研重複研究調整内容		148
<b>V 研究成果の刊行に関する一覧表</b>		
		149

# I 総括研究報告書

総括研究報告書

健康危機発生時の地方衛生研究所における調査及び検査体制の現状把握と  
検査等の精度管理の体制に関する調査研究

主任研究者 田中 智之 堺市衛生研究所長

研究要旨:

本研究は、健康危機発生時に最前線での対応が求められる地方衛生研究所（地衛研）が、原因の科学的な分析に基づいた原因究明を行うにあたり、地方衛生研究所の調査及び検査体制の現状把握を行い、さらに科学的な検査等の基盤となる精度管理体制に関する調査研究を行うことを目的とした。

その結果、痘瘡ウイルスによる健康危機発生時には、蛍光色素標識抗体直接法で、全国地衛研の 67%で病原体診断の可能性が認められた。イムノクロマト法による痘瘡ウイルス検出法が構築された、今後、感度の向上と更なる簡便化が課題となった。

電子顕微鏡による病原ウイルス検出が健康危機管理発生時に対応でき、技術の習得と研修によって観察力の向上が見られた。

ケミカルテロを含めた未知化学物質の検出は、実習、研修を重ねることにより検出技術や対応能力が向上した。さらに、化学物質による健康危機発生時には、検出マニュアルの普遍化をはかり集大成することが今後の課題となった。

残留農薬等のポジティブ制度の制定に伴い、検査品目数の増加が全国地衛研に認められ、さらに、GLP、SOP の見直しする地衛研が増加した。一方、分析機器の老朽化、対応職員の減少、農薬標準品の確保等に多くの課題も見られた。

これらの集約として健康危機管理のモデル要領の作成を試み、保健所への支援項目を追加すると共に、全国版として普遍的な要領に発展させるための改正を行う事とした。

この健康危機発生時の調査及び検査体制について、アメリカ、カナダ、イギリスでの現状を調査・視察した。その結果、予期せぬ危機発生事態に備えて標準化された IT でのネットワークシステムを組み、公衆衛生情報の収集、迅速な共有ならびに活用、精度管理の維持を果たしながら、役割分担と協力関係の質の向上を目指していることが明確になった。これを踏まえて本邦では、健康危機常時監視体制の構築と地方情報センターからの情報の一元化、地方の感染症対策機関としての関連団体との協力体制の構築の必要性が痛感された。

分担研究者

田中 智之	堺市衛生研究所長（平成 18 年度）
小倉 肇	岡山県環境保健センター所長（平成 17-19 年度）
伊藤 正寛	神戸市環境保健研究所長（平成 17-18 年度）
田中 敏嗣	同上（平成 19 年度）
今井 俊介	奈良県保健環境研究センター（平成 17-18 年度：主任研究者）
今井 俊介	市立奈良病院・病理部長（平成 19 年度）
井端 泰彦	京都府保健環境研究所長（平成 19 年度）
吉村 健清	福岡県保健環境研究所長（平成 17-18 年度）

## 研究協力者

北元憲利	兵庫県立大学環境人間学部	田中之雄	同上
森川 茂	国立感染症研究所	田窪良行	大阪市立環境科学研究所
吉田 永祥	堺市衛生研究所	森義明	同上
藤井理津志	岡山県環境保健センター	岡田卓郎	大阪市環境衛生検査センター
大瀬戸光明	愛媛県立衛生環境研究所	木村雅則	同上
西村公志	大阪府立公衆衛生研究所	山村博平	兵庫県立健康環境科学研究所
左近直美	同上	市橋啓子	同上
三上 稔之	青森県環境保健センター	三橋隆夫	同上
宇田川悦子	国立感染症研究所	南 隆之	姫路市環境衛生研究所
H. Gelderblom	国立コッホ研究所教授、	谷口秀子	同上
伊藤光男	神戸市環境保健研究所	阪谷和彦	尼崎市立衛生研究所
小島信彰	同上	谷口 誠	同上
上田泰人	同上	足立 修	奈良県保健環境研究センター
飯島義雄	同上	素輪善典	同上
渋谷一郎	同上	大橋友紀	和歌山県環境衛生研究センター
大佛正隆	滋賀県衛生科学センター	山東英幸	同上
吉川英一	同上	森野吉晴	和歌山市衛生研究所
塩崎秀彰	京都府保健環境研究所	木野善夫	同上
日置 正	同上	澤田幸治	北海道立衛生研究所長
大槻幸廣	京都市衛生公害研究所	吉村 健清	福岡県保健環境研究所
川勝剛志	同上	小野塚大介	同上
織田 肇	大阪府立公衆衛生研究所	田中 義人	同上
		世良 暢之	同上

## 研究協力機関

滋賀県衛生科学センター、京都府保健環境研究所、京都市衛生公害研究所、  
大阪府立公衆衛生研究所、大阪市立環境科学研究所、堺市衛生研究所、  
東大阪市環境衛生検査センター、兵庫県立健康環境科学研究所、  
神戸市環境保健研究所、姫路市環境衛生研究所、尼崎市立衛生研究所、  
奈良県保健環境研究センター、和歌山県環境衛生研究センター、  
和歌山市衛生研究所

## A. 研究目的

NBC テロ、特に BC テロ（バイオテロ）を含む様々な健康危機は、いつ何時に予期せぬ大惨事が容易く発生し得る。バイオテロの使用標的にされる微生物として、細菌では、炭疽菌、ボツリヌス菌（ボツリヌス毒素）、ペスト菌、野兔病菌、ウイルスではポックスウイルス（痘瘡ウイルス）、カナダではこの他に、エボラおよびマールブルグ、ラッサ熱、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスが対照微生物として挙げられているが、普段の食中毒や様々な感染症にも健康危機要因は潜んでいる。

一方、サリン、砒素、シアンといったケミカルテロなどは殺傷性の強い健康危機であり、中でも残留農薬、直近に見られたような輸入食品に混入した有機リン系農薬、さらには家庭用品・医薬品などにも健康危機要因は潜んでいる。身近な、しかも安心して接するものに予期せぬ健康被害要因が含まれていることに対して、何人といえども予見することは困難である。従ってこのような健康危機事例発生時には、迅速かつ的確な対応、すなわち原因物質の究明が求められ、危機被害の拡大防止、市民の安全・安心に寄与しなければならない。

地方衛生研究所（地衛研）は、健康危機発生時に第一線で原因究明等の初動体制に関与する最も重要な研究機関の一つである。本研究は将来発生するかもしれない健康危機に対して、地衛研の検査体制能力について微生物部門、理化学部門の両面から現状把握を行い、問題点の発掘や備えるべき方向性等の調査を行い、その結果を踏まえて、将来の構築すべき健康危機管理体制に資する資料とすることを研究目

的とした。さらに、欧米との健康危機管理に対するシステム現状、本邦との差異、さらに本邦に活用すべき諸点について、アメリカ、カナダ、イギリスでの現地調査を行ない、情報収集を図った。

## B. 研究方法

五分野に亘って調査研究を行った。その各々は、

- (1) 天然痘ウイルスの免疫学的迅速・簡便診断法と健康危機管理構築
- (2) バイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理
- (3) 化学物質モデルにおける多検体（多成分）迅速一斉検査の精度管理等に関する研究
- (4) 我が国での健康危機管理体制時の検査精度管理（GLP 等）の検討
- (5) 健康危機管理プロジェクトの組織化と近畿地研ブロックでの連携構築
- (6) 欧米諸国の地方衛生研究所相当機関における危機管理対策の一環としての精度管理制度の調査と本邦への導入に関する検討

(1) および (2) は全国地衛研を対象に検査資料送付を行うことによって、(1) は電子顕微鏡を、(2) は蛍光抗体法を用いて原因微生物の特定を行った。(3) は化学物質による健康危機管理対応能力および技術能力の向上、連携の強化、情報の共有化等を目的に多検体（多成分）迅速一斉検査の精度管理について高性能機器である GC/MS および LC/MS、ICP/MS、簡易検査キット等を用いて 3 年間調査研究を実施し

てきた。

(4)は検査の精度管理の根幹であるGLPについて各地研が抱える多種多様の問題点等及びその状況等を把握するため、理化学部会を中心にアンケート調査を行った。

(5)は地衛研近畿支部では「健康危機管理における近畿ブロック地方衛生研究所広域連携マニュアル(案)」等により健康危機管理整備されているが、健康危機事象の発生を想定し地衛研内部で検体受付から検査結果判定までの所内体制の整備や組織の機能等を検証した訓練は少ない。そこで感染症事例の「モデル要領案」の提示とともに、連携を含めた訓練を通してモデル要領案の実効性の検証、問題点や課題の検証を行いモデル要領を作成した。

(6)は欧米諸国の危機管理対応システムを調査し地方衛生研究所に適したシステムを検討するため、「国と地方の連携」、「精度管理」ならびに「積極的疫学調査」についての情報収集、整理を行った。

(倫理面への配慮)

取り扱う微生物検体については、不活化を行い周囲あるいは取扱者への感染予防対策を配慮した。アンケート等には個人情報が含まれていないので、個人情報には配慮はしなかった。

### C. 研究結果

①ワクシニアウイルスを用いた痘瘡ウイルス診断模擬訓練では、参加地衛研は59(78%)であった。そのうちの三分の二が痘瘡ウイルス健康危機管理で診断、対応できることが分かった。初年度で、正答が得られなかった、あるいは不参加等の37地衛研に対して、

再度の模擬訓練参加を試みたが、20地衛研が参加し多に過ぎず、そのうち60%に正答できた。不参加や正答の出来ない16地衛研があり、今後の痘瘡ウイルス危機管理対応に検討課題を残した。

②電子顕微鏡によるウイルス情報の収集、同定の研修に参加した地衛研は、平成17年度で34地研、18年度は31地研、19年度は27地研であった。精度管理正解率は平成17年度では、固定ノロウイルスVLP70.6%、平成18年度では、天然痘ワクチンウイルス51.6%、インフルエンザウイルス74.2%、陰性対象90.3%、SARSコロナウイルス51.6%、ヘルペスウイルス87.1%であった。平成19年度では天然痘ワクチンウイルス74.1%、インフルエンザウイルス92.6%、ネコカリシウイルス74.1%、アデノウイルス85.2%、麻疹ウイルス33.3%であった。

③平成17年度は化学物質モデルとして農薬を採用し、GC/MSを用いて、18年度はLC/MSを用いて共同試験を実施し、測定機器の操作技術および精度管理の向上を図った。平成19年度は健康危機管理発生時の対応能力、原因化学物質の正確な究明と精度管理の向上を目的に未知の有機化学物質類、金属類、無機イオン類の検出・同定をGC/MS、ICP/MSおよび簡易検査キットを用いて実施した。その結果から、精度管理を共有する試験や未知化学物質の検出・同定の研修に対して、対応能力や技術能力の向上に効果的な成果をあげた。これらのことから原因不明の健康危機発生時に、化学物質の原因物質究明等には地方衛生研究所間の連携の強化、情報の共有化およびネットワーク化の基礎が出来、今後大き



く貢献できるものとする。さらに、各地衛研には、独自の対応マニュアルがあり、これらを共有化して集大成することは意義あることである。

④残留農薬等に関するポジティブリスト(PL)制度により、食品衛生検査が一層増加した。農薬等の検査項目数をみると、平成18年度の53地研より平成19年度は68地研が検査数の増加がみられた。さらに101品目以上実施が平成18年度の49地研より60地研に増加した。しかし、農薬等101～500品目程度の標準品保有数は平成18年度の51地研より53地研と目立った上昇はなかったが、その理由として、標準品の購入価格、有効期限等が影響していると考えられた。平成18年度に、ポジティブ制導入に際しSOPを見直していた56地衛研から、その後66地衛研となった。農薬等の検査(分析)に主要な分析機器はGC、GC/MS、HPLCに加え、GC/MS/MS、LC/MS/MS等の超微量分析機器も平成18年度よりは増加している。しかし、一方では分析機器の老朽化、機器の不足、需用費の不足、担当職員の不足があり、さらに行政当局への要望としては予算の拡充、分析法の充実・確立が高率であった。農薬標準品等のレファレンスセンターの運営についても国(厚労省)との回答が多かった。

⑤健康危機発生時には「健康危機管理・対応要領」の作成状況は近畿支部14地衛研では作成予定を含めると12地衛研(86%)であった。モデル要領(資料6)に関しては、地研が保健所の後方支援機関としての役割を担っている点、健康被害者に対するフォローアップが必要になった場合になどでは、「保健所への支援に関する項目」の明

記が必要でありその旨を明示した。

模擬訓練では全て順調に未知物質を探索し、目的物の定量までを行った。検査協力地研も順調に検査を行い、その日のうち(微生物は翌日)に結果が報告された。

訓練後のアンケート調査結果では、多くの地衛研で健康危機管理委員会が設置され、その機能発揮がみられた。検体受付は13地衛研中11地衛研で円滑に行なわれ、検査の実施では14地研中13地研で順調に実施された。また、検査の優先順位については、微生物検査においては12地衛研中6地衛研、化学物質検査においては、10地衛研中9地衛研で優先順位を付けていた。健康危機事象模擬訓練の実施したことのあるの地衛研は14中12地衛研であった。

各種マニュアルの整備状況では、「健康危機管理委員会運営の手引き」の整備を必要とする意見は14地衛研中11地衛研、「検体受付マニュアル」の整備を必要とする意見は14地衛研中11地衛研であった。「検査フロー」の整備は14地衛研中13地衛研が必要とした。

以上の模擬訓練を通して、(1)情報の一元管理、検査の優先順位の決定・指示、検査項目の絞り込み等の機能を所管する委員会の設置、(2)要領だけでは地研内の機能が十分発揮できないので、具体的な動きを示す各種マニュアルが必要、(3)スクリーニングのための簡易測定キットは有用であるが、検体によっては誤判定が起る場合があるので、事前にキットの特性とその適用範囲を把握し整備しておく、(4)健康危機事象は刑事事件となる可能性もあるため、裁判にも耐え得る記

述と記録のための作業手順書を整備し、日常的に訓練しておく必要がある等が明らかになった。これらの課題等については、今後、各地研が必要に応じて整理することが望まれる。

⑥諸外国での健康危機発生時対応の特徴は、公衆衛生情報の収集・共有、迅速な活用、お互いの役割分担と協力関係の質の向上を目指し、さらに検査精度の向上・維持する手段として様々な認証制度を設けている。これらの背景には積極的疫学調査の専門家を養成する国家的機関がある。これらの密なネットワーク構築が、充実した健康危機管理を維持しているものと思われる。

#### D. 考察

(1) 痘瘡ウイルス診断模擬訓練は、FITC 標識抗体を用いた簡便な方法であり、技術的には困難な点はない。基本的には整備された蛍光顕微鏡が設置されていれば対応できる診断方法である。輸入痘瘡事例があっても、感染症指定病院で検体採取・固定し、鏡検出来れば診断可能である。そのような状況想定の下に模擬訓練に参加して、常時より健康危機意識を心の片隅に持ち続けることが重要と考える。免疫クロマトグラフ法による痘瘡ウイルス検出方法は、今後、感度の検討と実用化に向けての構築が必要である。

(2) 現在、電子顕微鏡保有施設は 41 地衛研であるが、年々使用頻度は減少し、また技術を熟知している研究所員も減少してきている。電子顕微鏡による病原体の検出、特に未知のウイルスが推測されるような疾患からの微生物の検出・診断法には極め

て有効な方法である。検体の固定(不活化)処理と共に鏡検することにより、その形態が判明し、早期危機対応を立ち上げることも可能である。研修により精度管理の向上が見られた。今後も技術継承と研修による精度管理の維持・向上が必要である

(3) ケミカルテロ等を含めた未知の有機化学物質類、金属類、無機イオン類の検出や同定には精密な分析機器が必要である。またそれらを多項目に亘り、迅速かつ正確に使いこなす技術の研鑽が健康危機発生時には必要である。今回の研修からは、正確に対応できる技術を有していることが判明した。しかし、今後は、共有の検査マニュアル等の作成や情報共有の連携を図り、さらに分析力の向上を目指していかなければならない。また、簡易キットは有用であるが、現在の簡易キットには制限がある。健康危機に対しては、地衛研で独自にキットの開発を行なえるような前向きな姿勢も必要である。

(4) 微生物分野、理化学分野を問わず、検査に関する SOP の作成や GLP (精度管理等)を保つことは、検査を行う上で極めて基本的かつ重要である。特に残留農薬検査については、700 品目以上の検査項目を実施する、いわゆるポジティブ制度が導入され、地衛研ではその対応に追われた。その実情を知る目的で行なった調査から、検査項目数を増加し、SOP を見直すなどの精力的な取り組みが見られたが、しかし、人員減少や分析機器の老朽化など様々な問題点を抱えていることも判明した。今後、人員の増員や予算の確保、農薬標準品保有数等の増加に向けた検討が必要

である。

- (5) 健康危機管理要領は多くの地衛研で作成され、活用されている。しかし、まだ作成されていない地衛研も存在している。このような観点から、微生物、化学物質による健康危機模擬訓練を行い、それらの結果の解析から、モデル危機管理要領の作成を試みた。検体の受付マニュアル、トリアージの決定等が実質的に検討された。健康危機発生時には、このような普遍的な要領の有無が、危機拡大予防の根本となるが、保健所支援は欠かせない項目として追加された。何よりも、共通の言語で検出方法や検出結果の情報を交換できることは極めて大きなメリットである。まずは、近畿ブロックからはじめ、改善を計りつつ全国地衛研の参考になるような発信が必要と考える。
- (6) 欧米諸国における健康危機管理体制の調査から、本邦の地衛研の役割に対して、地方の健康危機情報の一元化をはかり健康危機常時監視体制の構築が必要と考えられた。また、地方の感染症対策機関として関連団体との協力体制の構築の必要性も痛感された。普段でも容易ではない情報共有を健康危機事例発生時にいかにして共有するかを議論しておく必要がある。

## E. 結語

- 痘瘡ウイルスによる健康危機発生時には、蛍光色素標識蛍光抗体直接法で、全国地衛研の67%で病原体診断の可能性が認められた。
- イムノクロマト法による痘瘡ウイルス検出法が構築された。今後、感度の向上と更なる簡便化が課題となっ

た。

- 健康危機管理発生時に対応できる電子顕微鏡の病原ウイルス検出が技術の習得と研修によって向上した。
- ケミカルテロを含めた未知化学物質の検出に、検出技術や対応能力が、実習、研修を重ねることにより向上した。
- 化学物質による健康危機発生時には、検出マニュアルの普遍化をはかり、集大成することが重要である。
- 残留農薬等のポジティブ制度の制定に伴い、検査品目数の増加が全国地衛研に認められた。
- ポジティブ制度の制定により、GLP、SOPの見直しする地衛研が増加した。
- 分析機器の老朽化、対応職員の減少、農薬標準品の確保等に多くの課題が見られた。
- 健康危機管理のモデル要領の作成を試みた。普遍的な要領に発展させ、さらに保健所の支援項目を追加した。
- 地衛研は地方の情報センターとして情報の一元化をはかり、健康危機常時監視体制を構築しておく必要がある。
- 関係団体と健康危機感染症対策機関に関しての協力体制の構築が必要である。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Noritoshi Kitamoto, Takayuki Kobayashi, Yoji Kato, Nobutaka Wakamiya, Kazuyoshi Ikuta, Tomoyuki Tanaka, Shigeharu Ueda, Hiroyuki Miyamoto, and

Shiro Kato. Preparation of Monoclonal Antibodies Cross-Reactive with Orthopoxviruses and Their Application for Direct Immunofluorescence Test. Microbiol. Immunol. 2005, 49(3), 219-225

2) 北元憲利、森川 茂、加藤陽二、田中智之. 抗ワクシニアウイルス単クロナル抗体のサル痘ウイルスに対する反応性とその有用性。日本感染症学会誌 (投稿中)

3) Kuzuya M., Fujii R., Hamano M., Nishijima M. and Ogura H. Detection and molecular characterization of human group C rotaviruses in Okayama Prefecture, Japan, between 1986 and 2005. J. Med. Microbiol.

79, 1219-1228 (2007)

4) 伊藤光男、小島信彰、米田篤司、田中敏嗣、井上成人: 有機化学物質の迅速分析・検索システム Chemofind 2001、神戸市環境保健研究所報 2001. 29:63-82.

5) 伊藤光男、上田泰人、田中敏嗣: 健康危機管理のための GC/MS 分析事例 (Chemofind システムを用いた迅速同定事例)、神戸市環境保健研究所報 2007. 35:46-52

## 2. 学会発表

1) 田中智之 天然痘ウイルスの免疫学的迅速・簡便診断法の確立と健康危機管理構築. 第 66 回日本公衆衛生学会総会 発表 (愛媛県松山市、平成 19 年 10 月 24-26 日)

2) 小倉肇、藤井理津志、大瀬戸光明、西村公 志、左近直美、宇田川悦子、後藤俊幸、Gelderblom H.

バイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理

第 23 回中国四国ウイルス研究会 2007 年 6 月 松山市

3) 濱野雅子、藤井理津志、葛谷光隆、小倉肇、金谷誠久、国富泰二 2006/2007 シーズン岡山県における Norovirus の流行状況と遺伝子解析

第 77 回日本感染症学会西日本地方会 2007 年 11 月 佐賀市

4) 化学物質モデルにおける多検体(多成分)迅速一斉検査の精度管理等の検討—LC/MS/MS による農薬一斉分析の精度管理について 伊藤光男、上田泰人、小島信彰、田中敏嗣、飯島義雄、中道民広、伊藤正寛 (神戸市環境保健研究所) 大藤升美、山田豊、塩崎秀彰、井端泰彦 (京都府保健環境研究所)、北川陽子、高取聡、住本建夫、田中之雄、織田肇 (大阪府立公衆衛生研究所)、伊吹幸代、宇野正清、素輪善典、今井俊介 (奈良県保健環境研究センター)、佐想善勇、谷口秀子、南隆之 (姫路市環境衛生研究所)、宇治田正則、吉増幸誠、中北照男 (和歌山市衛生研究所) :

第 44 回全国衛生化学技術協議会年会、平成 19 年 11 月 15-16 日、三重県総合文化センター

5) 化学物質モデルにおける多検体(多成分)迅速一斉検査の精度管理等の検討—健康危機管理対応の実際と実習

伊藤光男、田中敏嗣、小島信彰、上

田泰人、飯島義雄(神戸市環境保健研究所)、大佛正隆、吉川英一(滋賀県衛生科学センター)、井端泰彦、塩崎秀彰、日置 正(京都府保健環境研究所)、大槻幸廣、川勝剛志(京都市衛生公害研究所)、織田肇、田中之雄(大阪府立公衆衛生研究所)、田窪良行、森義明(大阪市立環境科学研究所)、田中智之(堺市衛生研究所)、岡田卓郎、木村雅則(東大阪市環境衛生検査センター)、山村博平、市橋啓子、三橋隆夫(兵庫県立健康環境科学研究センター)、南隆之、谷口秀子(姫路市環境衛生研究所)、阪谷和彦、谷口誠(尼崎市立衛生研究所)、足立修、素輪善典(奈良

県保健環境研究センター)、大橋友紀、山東英幸(和歌山県環境衛生研究センター)、森野吉晴、木野善夫(和歌山市衛生研究所)

:平成 19 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部理化学部会研修会、平成 20 年 2 月 1 日、大津市

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

#### I. 知的財産権の出願、登録状況

なし

## Ⅱ 平成19年度 主任・分担研究報告書

## 平成19年度厚生労働科学研究費補助金 地域健康危機管理研究事業

### 健康危機発生時の地方衛生研究所における調査及び検査体制 の現状把握と検査等の精度管理体制に関する調査研究

研究課題：天然痘ウイルスの免疫学的迅速・簡便診断法と健康危機管理構築

主任研究者：	堺市衛生研究所長	田中 智之
研究協力者：	兵庫県立大学環境人間学部	北元 憲利
	国立感染症研究所ウイルスI部	森川 茂
	堺市衛生研究所	吉田 永祥

#### 研究要旨：

平成18年度の研究課題として、健康危機に対する迅速な病原体特定の一手法として輸入痘瘡のシミュレーションを想定し、痘瘡ウイルスの蛍光抗体法による迅速診断を、全国地方衛生研究所を対象に試みた。参加した地方衛生研究所59機関(78%)のなかで正答率53%、一部正解を入れても66%の判定率であった。今年度は、誤答或いは不参加の37衛生研究所を対象に同様の迅速診断研修を再度試みた(参加率56%)。その結果、正答率は50%、一部正答を加えても60%であった。前回誤答の15施設は今回10施設(67%)が正答し、健康危機対応の研修成果が窺えた。一方、前回誤答5施設は今回も同様に正答が得られなかった。前回不参加または参加への意思表示の見られなかった13施設は今回も同様に不参加または未返答であった。健康危機認識には、地衛研間で大きな差のあることが判明した。イムノクロマトグラフ法による痘瘡ウイルスの構築を行い、短時間でかつ特異的にワクシニアウイルスを検出することが判明した。

#### A. 研究目的

前年度に引き続き、バイオテロによる健康危機管理対応の一手段として、痘瘡ウイルスと同属のワクシニアウイルスを用いた原因微生物の同定シミュレーションを行った。今年度は、前年度に正答の得られなかった地衛研、シミュレーションに不参加の地衛研を対象とし、技術的解析、健康危機

対応シミュレーションの意識を評価の対象とし、今後のプロスペクティブな方策を考察した。

また、蛍光抗体法より簡便な病原体微生物の同定方法であるImmunochromatography(IC)法の開発を試みた。

## B. 研究材料と方法

1. 材料 前回同様に痘瘡ウイルスと同属のワクシニアウイルスを RK13 細胞に感染させ、冷アセトン固定したものをを用いた。この標本(スライドグラス)を、前回正答の得られなかった 36 地衛研に送付した。

### 2. 方法

同定方法は直接蛍光抗体法検査手順に準じて行った。すなわち、蛍光色素 (FITC) 標識抗ワクシニアウイルスモノクローナル抗体とスライドグラス上の固定感染細胞を反応させ、洗浄後、蛍光顕微鏡で検鏡した。検査手順は、前年度と同じ方法である。モノクローナル抗体は、ワクシニアウイルスを免疫源として作成されたもので、サル痘ウイルスを含めたポックスウイルス科のウイルスと広範囲に交差反応する抗体である。

この模擬研修の参加対象は前回の研修成績から、誤答或いは研修不参加の 36 衛生研究所を対象に同様の迅速診断研修を試みた。

IC キットは上記のモノクローナル抗体にラテックスを標識した。ニトロセルロース膜に抗マウスグロブリン抗体とポックス属ウイルス特異的モノクローナル抗体あるいは抗ワクシニア免疫マウス血清を固層したストリップを作成した。ラテックス標識モノクローナル抗体をワクシニアウイルスと反応させ、その混合液をストリップに吸収させることにより反応させた。吸収過程の中で、陽性検体では、先ず捕捉モノクローナル抗体とウイ

ルス・ラテックス標識モノクローナルの反応がみられる。次いで標識モノクローナル抗体が捕捉抗マウスガンマグロブリンと反応する。したがって、陽性検体は二本の反応性生物がブルーラインとして目視されることになる。陰性検体は後者の抗マウスガンマグロブリンとの反応複合物が見られるのみで一本のブルーラインが目視されることになる。

## C. 研究結果

対象 36 衛生研究所の参加は 20 地衛研 (参加率 56%) であった。不参加 9 地衛研、参加不参加の意思表示なしが 7 地衛研もあった(表 1a、表 1b)。判定結果は、正答率は 10 地衛研(50%)、一部正答の 2 地衛研を加えても 60% であった。前回誤答の 15 施設は今回 10 施設 (67%) が正答し、また前回不参加あるいは回答なしの 2 地衛研は正答であった。前回誤答 5 施設は今回も同様に正答が得られなかった。前回不参加または参加への意思表示の見られなかった 13 施設は今回も同様に不参加または意思表示がなかった。前回で機器整備不良が判明した 1 地衛研は、機器改善が見られていなかった。また、驚いたことには、「EM を保有していない」、「1 種病原体を取り扱えない、ウイルス検査を EM で行っていない」との意見の地衛研が見られた。

一方、前回のシミュレーションの成績を検討した結果、出張の実技指導依頼が 2 地衛研からあった。さらに、当研究所に実技研修依頼が 1 地衛研あり、



3月中旬に二名の1地衛研所員が来所し蛍光抗体法の実技研修と細胞内でのウイルスの増殖様式、それに特異抗体の反応様式について研修した。また、1地衛研から「昨年是不正解、今年は正解でした。その理由は、観察に用いたフィルターのセットが昨年と今年で違っていたからだと判断しています。通常、FITCラベルの系で検査を行っていますので、昨年は、ニコンのBV-2Aのセットで観察し、ラベル抗体の力価不足かと思いながら結果をだしました。今年、ニコンB-2Aセットでも観察し、これで特異蛍光を見ることができました。ラベルした蛍光色素が明示されていない場合、複数のフィルターセットを試すことが必要だと感じた。結果を見ますと不可の県がいくつかあります。もしかしたら、同じ理由で間違われたところもあるかと思い、僭越ですが連絡させていただきました。」との前回の反省を踏まえた建設的な意見交換もあった。

ICキットはワクシニアウイルス細胞培養上清、非感染の細胞培養上清、アデノウイルス培養液上清との反応性を確認した。陽性検体のワクシニアウイルス細胞培養上清は二本のバンド、非感染の細胞培養上清、アデノウイルス培養液上清陰性検体では一本のバンドを目視することができた(図1)。

#### D. 考察

今回の成績は、前回と比較して正答率53%、一部正解を入れて66%の正

答率であった。つまり、このシミュレーションでは痘瘡ウイルス診断率は全国地衛研の三分の二が迅速に対応できることになる。加えて、前回誤答の施設の三分の二が今回は正答でき、その後の健康危機対応の研修成果が窺えた。以上から、前年度の成績を加味すると、83.6%の地衛研が痘瘡ウイルス健康危機に対応可能となる。しかし、全国地方衛生研究所は健康危機発生時には最前線で対応しなければならないが、躊躇している地衛研もあり、積極的な参画が出来る企画をしなければならない。蛍光抗体法より簡便な痘瘡ウイルス、サル痘ウイルスを広範囲に認識するモノクローナル抗体を用いたImmunochromatography(IC)法を開発した。ワクシニアウイルス検体やアデノウイルス検体とは特異的に陽性、陰性反応が確認された。実際の痘瘡ウイルス検体を用いた確認試験は、当研究施設では不可能であるが、痘瘡の健康危機発生時には、感染症指定病院で水泡液の採取や引き続いてのIC法を用いた痘瘡ウイルス検出検査は可能と思われる。迅速な診断から得られる迅速な感染拡大防止対策が構築されるものと考えられる。

#### E. 結論

蛍光抗体法による痘瘡ウイルス同定の健康危機模擬研修では、84%の全国地衛研が対応できることが分かった。しかし、健康危機意識の低い地衛研もみられた。

痘瘡ウイルスと交差反応するワクシニアウイルスモノクローナル抗体を用いて構築されたイムノクロマトグラフ法は、ワクシニアウイルスと特異的な反応を示した。痘瘡ウイルスあるいはサル痘の診断に十分対応できると考えられる。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Noritoshi Kitamoto, Takayuki Kobayashi, Yoji Kato, Nobutaka Wakamiya, Kazuyoshi Ikuta, Tomoyuki Tanaka, Shigeharu Ueda, Hiroyuki Miyamoto, and Shiro Kato. Preparation of Monoclonal Antibodies Cross-Reactive with

Orthopoxviruses and Their Application for Direct Immunofluorescence Test. *Microbiol. Immunol.* 2005, 49(3), 219-225 2) 北元憲利、森川 茂、加藤陽二、田中智之. 抗ワクシニアウイルス単クローナル抗体のサル痘ウイルスに対する反応性とその有用性。

日本感染症学会誌 (投稿中)

### 2. 学会発表

- 1) 田中智之 天然痘ウイルスの免疫学的迅速・簡便診断法の確立と健康危機管理構築. 第 66 回日本公衆衛生学会総会 発表 (愛媛県松山市、平成 19 年 10 月 24-26 日)

## H. 知的所有権の取得状況

なし

	参加	スライド	正解	回答	前回	成績	不参加理由
札幌市立衛生研究所	○	B	46	236	不可	良	(陰性コントロールがない)
函館市衛生試験所	×				不参加		実施していない
仙台市衛生研究所	×				不参加		担当者が EM 操作研修中
新潟県保健環境科学研究所	○	B	46	46	なし	優	
茨城県衛生研究所	×				不参加		
栃木県保健環境センター	○	A	35	23456	不可	不可	
宇都宮市衛生環境試験所	×				不参加		EM を保有していない、 1 種病原体を取り扱えない
群馬県衛生環境研究所	○	D	45	36	不可	不可	
千葉県衛生研究所	○	A	35	246	不参加	不可	
千葉市環境保健研究所	○	D	45	45	不参加	優	
足立区衛生試験所	▲				不参加		
杉並区衛生試験所	×				不参加		ウイルス検査を EM で 行っていない
横浜市衛生研究所	○	C	36	26	なし	良	
川崎市衛生研究所	▲				不可		
横須賀市健康安全科学 センター	×				不参加		
相模原市衛生試験所	×				不参加		蛍光顕微鏡が整備されて いない
山梨県衛生公害研究所	○	C	36	3456	不参加	不可	
長野県環境保全研究所	○	A	35	35	不可	優	
静岡県環境衛生科学研究所	×				不可		
福井県衛生環境研究 センター	▲				不可		
岐阜県保健環境研究所	○	D	45	123456	不可	不可	
岐阜市衛生研究所	×				不参加		

○ 参加、 × 不参加、 ▲ 返事なし

