

平成 17-19 年度厚生科学研究補助金 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
検査等の精度管理の体制に関する調査研究

総 括 報 告

分担課題：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

分担研究者	今井俊介	市立奈良病院・病理部長
研究協力者	吉村健清	福岡県保健環境研究所長
	澤田幸治	北海道立衛生研究所長

研究要旨:

地方衛生研究所は、地域における健康危機管理の上で科学的且つ技術的中枢であり、さらに健康危機発に備えて、あるいは最前線に立って、迅速且つ正確な原因物質の分析、特定を行なう研究機関である。これらの機能を発揮するためには平常時より緊急時に備えた検査の精度管理を維持することが重要である。

制度管理の根幹を為すものは、GLPに関する内部点検、内部・外部制度管理である。これらの状況に加えて、人材、分析器等の予算について、全国地方衛生研究所の状況を把握するためにアンケート調査を行い、前年度との比較検討を行なった。

A. 研究目的

地域における健康危機管理の科学的・技術的中核としての機能を持つ地方衛生研究所（地研）は、健康危機に関して迅速かつ正確な原因物質の分析・特定を行う必要がある、そのためには、平常時あるいは、緊急時に備えた検査の精度管理が重要である。地研における食品 GLP は精度管理の根幹をなすと考えられる。GLP 検査の実施項目数で農薬検査が抜きんで多く、平成 18 年 5 月に「食品に残留する農薬等に関するポジティブリスト(PL)制度」が施行されて以来、より一層、食品衛生検査が増加し、その検査の信頼性確保のための精度管理の対応が迫られてきた。そこで PL 制度実施後 1 年あまりが経過したところで、各地

研でそれぞれ取り組みを進めているものの、各地研が抱える多種多様な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実施していただき、実施後約 3 カ月の時点で行ったアンケート調査結果との比較を行った。

B: 研究方法

アンケートは平成 18 年 9 月（25 の設問）と平成 19 年 9 月（26 の設問、図 1）の二度実施した。設問は兩年度でほぼ同内容とし、平成 19 年度は一部変更を加えて実施した。主な変更点は、設問 9 の「農薬等標準品保有数の動向は」を「農薬等標準品の有効期限は」に、設問 23 「農薬等標準品の備蓄等について」を新設したことである。

C. 結果

地研における技術系職員数は11～29名が30地研（40.0%）とH18よりやや増加したのに対し、30名以上が43地研（57.4%）とH18の46地研に比べてやや減少した。

技術系職員のうちPL制を担当している職員数は3～5名が45地研（60.0%）と一番多く、平成18年と同様少人数でこれらの検査に当たっている地研が多く見られる。PL制分析担当者の経験年数は平成18年と同様、担当者の経験年数の分布としては、2～4年が38.1%と最も多い。

PL制の担当部署は平成18年と同様、担当部署はほとんどが理化学部門であり、一部他部門からの応援を得ているようである。PL制施行に当たり予算は備品の新規購入や需用費の増加など、予算の増加した地研が57地研（76.0%）と多数を占め、H18の47地研より増加している。

農薬等の検査項目（品目）数は60地研（80.0%）が101品目以上実施しており、H18の49地研より増加した。上記検査項目数についてPL制施行後、検査数の増加したところは68地研（90.7%）であり、H18の53地研より増加した。農薬等の標準品保有数は保有数としては101～500品目程度保有している地研が53地研（70.7%）とH18の51地研より若干増加して多数を占めた。上記標準品の有効期限は供給側の提示する期限を利用するところが59地研（78.7%）と多い。自施設で設定しているところは15地研（20.0%）であった。

PL制施行後関係するSOPについては何らかの形でSOPを改訂した地研は66地研（88.0%）あり、PL制導入に際しSOPを見直している地研がH18の56地

研よりさらに増加した。農薬等の検査（分析）に関して主要な機器と台数については分析機器として多く保有されているのは、GC、GC/MS、HPLCであった。GC/MS/MS、LC/MS/MS等の超微量分析機器もそれぞれ28.0%、74.7%の地研で保有しており、これらの機器はH18よりも増加している。

検査（分析）に関して問題となっていることは分析機器の老朽化44地研（58.7%）はH18とほぼ同数で多く、機器の不足37地研（49.3%）、需用費の不足31地研（41.3%）と機器・需用費の不足を挙げる地研は増加した。また担当職員の不足などを挙げている地研も見られた。試験法（分析法）について実施しているのは一斉分析法を使用しているところが35地研（46.7%）とH18より増加して最も多く、個別法で実施の地研も5地研から15地研に増加した。一斉分析法で行っている試験方法は農作物ではGC/MS試験法がH18の53地研よりさらに増加して57地研と最も多く、ついでLC/MS試験法が21地研から35地研へと増加した。また畜水産物等ではHPLC試験法が29地研とほぼ増加した。GC/MS一斉分析及びLC/MS/MS一斉分析での1インジェクションあたりの分析項目数は101項目以上実施している地研は22地研（29.3%）、20～100項目実施が55地研（73.3%）といずれもH18より若干増加した。残留農薬試験において、添加回収試験の回収率の許容範囲は70～120%が47地研（62.7%）と多い。50～200%が12地研（16.0%）、独自で範囲を決めている地研が19地研（25.3%）であった。医薬品並の90～110%は見られなかった。添加回収試験の頻度は検査ごとに一番多くH18並の45地研（60.0%）で行われている。通知法で分析可能となっているもので、

どう工夫しても分析できなかったものは”ある”と回答した地研は24地研でH18より若干増加し、”ない”と回答したところも29地研とやや増加しており、実績を積み上げているところが増えてきていると考えられる。新規分析法の開発体制は試験法の検討、開発に関してはH18より微減の42地研(56.0%)が分析担当者に委ねている。独自の検討グループで当たっている地研は4地研(5.3%)であった。またH18の27地研より多い36地研(48.0%)が国(国衛試)に頼ると回答している。

行政当局への要望としては予算の拡充を望むというところが56地研(74.7%)と増加、分析法の充実・確立は39地研(52.0%)と減少したが、いずれも高率を示している。また、講習会・研修会の開催を望んでいるところもH18より増加し45地研(60.0%)と高率になっている。さらに、PL制で問題と思われることは一律基準値について問題視している地研は実に51地研(68.0%)とH18よりさらに増加した。続いて、基準値の妥当性を問題視するところが31地研(41.3%)あった。今後、PL制の対応として特に力を注いで行きたいことは担当職員の教育・研修と回答している地研が57地研(76.0%)とH18よりさらに増加し、分析機器の購入が49地研(65.3%)、試験法の改訂整備が40地研(53.3%)となっている。

農薬標準品等の備蓄等についてレファレンスセンターによる備蓄を望むところが36地研(48.0%)、国ないし業者による備蓄が32地研(42.7%)とこの両方で全体の約2/3を占めた。自施設での備蓄15地研(20.0%)、必要時購入と回答したところは17地研(22.7%)あった。農薬標準品等のレファレンスセンターの設置について利用を希望

しているのは52地研(69.3%)とH18の45地研より増加した。希望しない地研は9地研(12.0%)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は国(厚労省)と回答したのが42地研(56.0%)とH18の36地研(48.6%)より増加し、地研のブロック単位がH18の32地研(43.2%)から25地研(33.3%)へと減少した。

D. 考察

PL制施行に当たり備品の新規購入や需用費の増加など、予算が増加した地研が増えているのは事実である。又、SOPの見直し等、地研の積極的対応の意欲の増加が伺える点は認められる。しかし、約半数以上の地研では機器類の老朽化と共に機器・需用費の絶対不足及び、担当職員の高齢化と不足については地方自治体における予算縮小の影響を受けて決して解消されていない。又、農薬標準品等の備蓄については全く未整備であり、特に健康危機は最近では広域化を示す傾向にあることより、農薬標準品等のレファレンスセンター設置やその運営のために国が一層責務を持つことが必要と思われる。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

IV 参 考 资 料

平成18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分担班
「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」

**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）**

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ネガティブ染色法

I. 膜張りグリッドの用意

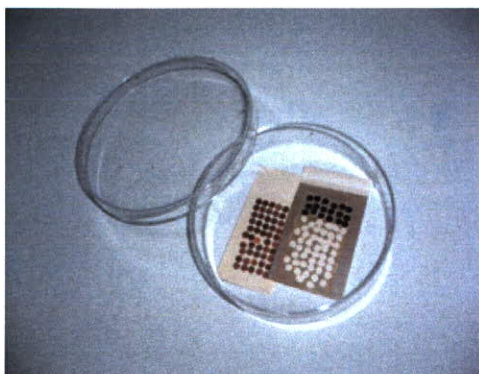
支持膜の作り方は種々の方法があるが、例として湿式法コロジオン膜と乾式法ホルムバル膜の作製法を示す。

1. コロジオン支持膜（湿式法）の作製

- 1) VECO 400mesh Cu / オランダ製を用意
- 2) バイヤルに上記グリッドを移し、アセトンで3回洗浄
- 3) ドラフトで濾紙上に広げ、乾燥
- 4) グリッドを1枚ずつピンセットで掴み、0.2~0.5%ネオプレンW トルエン溶液に浸けて濾紙上に叩きつけコーティング（接着剤を必ずしも使用しなくても可）
- 5) ドラフトでそのまま乾燥
- 6) 市販のコロジオン膜張器（日新 EM 650）にステンレスの網板を沈める
- 7) 約 40°Cの蒸留水を満たす
- 8) ステンレス網板の上に 400 メッシュの銅製グリッドの表を上に向け 50枚程度並べる
- 9) 2%コロジオン液（酢酸アミル溶液）（日新 EM 601）をパスツールピペットで1滴静かに滴下
- 10) 10分程度静置し酢酸アミルが揮発するのを待つ
- 11) 膜張器の下のコックを緩め、静かに水を抜いて水位を下げ、銅製グリッドにコロジオン膜を張り付かせる
- 12) ステンレス網板ごと取り出し、濾紙上で水切りした後、室温で一夜乾燥
- 13) カーボン蒸着してコロジオン膜を補強する。カーボンの蒸着量は、銅製グリッドの側に置いた濾紙が薄く着色する程度が良い
（応研商事の真空蒸着膜比較版セットの 150-200A の厚み）
コロジオン膜の厚さは、滴下する水面の面積、水温、溶液の濃度、滴下量によって決まる。作製条件や使用する器具は一定にし、膜の厚さは滴下量で調整するのがよい。適当な口径のピペットを選び常に同じものを使用するようにする。

2. ホルムバール支持膜（乾式法）の作製

- 1) VECO 400mesh Cu / オランダ製を用意
- 2) バイヤルに上記グリッドを移し、アセトンで3回洗浄
- 3) ドラフトで濾紙上に広げ、乾燥
- 4) グリッドを1枚ずつピンセットで掴み、ネオプレンW液に浸けて濾紙上に叩きつけコーティング（接着剤を必ずしも使用しなくても可）
- 5) ドラフトでそのまま乾燥
- 6) 市販のホルムバール膜張器（日新 EM 652）に新しい清浄なスライドグラスを入れる（古いスライドグラスは不可）
- 7) 1%Formbal-1,2-dichloroethane の液面を上げて下げることでスライドグラスをホルムバール液で濡らせる(日新 EM 602)
- 8) スライドグラスの1,2-dichloroethane が揮発するのを待つ
- 9) スライドグラスのホルムバール膜の四辺にカミソリで切れ目を入れる
- 10) 清浄なビーカー（500ml）に蒸留水を9分目程度入れる
- 11) 切れ目を入れたスライドグラスを斜めにして水に沈めホルムバール膜をはがし水面に浮かせる
- 12) ホルムバール膜に洗浄コーティング済み 400 メッシュの銅製グリッドを表を下に向け 50 枚程度、静かに載せる
- 13) 清浄なケント紙の片側下面を膜面にあて、垂直に沈めホルムバール膜をケント紙に張り付ける
- 14) 水滴を吸い取りシャーレに入れ、37℃ふらん器内で乾燥
- 15) カーボン蒸着でホルムバール膜を補強。
カーボンの蒸着量は、銅製グリッドの台紙が薄く着色する程度が良い
（応研商事の真空蒸着膜比較版セットの 150-200A の厚み）
- 16) デシケータ保存



支持膜張り・カーボンコーティング済みグリッドの入手

市販のカーボンコーティング済の膜張りグリッドとして、日本電子データの 400mesh (カタログ上には 200mesh までしかないが、400mesh を特注可能) や日立製品等を利用可能。当研究班で試用してみたところ、膜の強度に関してロットによるばらつきがあった。

II. 膜張りグリッドの親水処理法 (特に固定ウイルスサンプルの場合は必要)

(親水化の効果は 1-2 日でなくなるので出来るだけ早く使う。数日後使用する場合は再処理)

1. Ion sputter AC 500V 5mA 15~20sec



2. Ion sputter のない場合は UV ランプ処理でも良い

(6~10cm 離して 20 min 以上照射、overnight しても良い)

3. さらなる親水処理法として Alucianblue(SERVA)液を用いる方法

stock solution 2% 水溶液(使用時には再蒸留水で 1% とすると 4°C で一ヶ月は安定している)

a) パラフィルム上に Alucianblue 液 1 滴をつくり、グリッドを 5~10min 浮かべる。

b) パラフィルム上に再蒸留水を 5 滴つくり、グリッドをピンセットでつかみ Alucianblue を洗うように順次浸す (少し青みがある程度まで)。

濾紙片で残りの液を吸い取る (少しはぬれている程度まで)

c) 素早くサンプルをグリッドに乗せて、適当な時間吸着させる。

4. 牛血清アルブミン(BSA)をウイルスサンプルないし染色液に最終濃度

0.005~0.05%になるように加える。

III. ウイルスサンプル固定法

1. 試料

- 1) 培養細胞液(そのまま、または濃縮、場合により固定してから濃縮)
- 2) 糞便材料 (超遠心濃縮精製した Gastroenteritis virus)
- 3) 水疱液(天然痘疑い等の場合)

2. 固定法

1) サンプルを液の状態固定する方法

a) 3%パラフォルムアルデヒド(Paraformaldehyde)で 20min 以上固定

Paraformaldehyde (応研 TAAB Paraformaldehyde EM Grade)を購入。

10～12% になるように Hepes buffer (pH7.2)に入れて 60～70℃に保ち 10N NaOH 液を透明になるまで滴入する(約 2 滴)。

少量ずつ容器に分配し、-20℃に保存する。

使用時には室温で(ウイルス材料 3～4 : Paraformaldehyde 液 1) に混じ

20分固定する。最終濃度 3%位がよい。

b) 3%のホルムアルデヒド(Formaldehyde)で 20min 以上固定

1ml の試料に Formalin(和光純薬 064-00406、37%ホルムアルデヒド、新しい物を使用)を 88ul 加えると 3% になる。

c) 3%グルタルアルデヒド(Glutaraldehyde) で 20min 以上固定

1ml の試料に 20% Glutaraldehyde (和光純薬 072-02262) を 176ul 加えると 3% になる。

2) グリッド上のサンプルを固定する方法

ウイルス液をグリッドにのせて空気乾燥させた場合は、1%グルタルアルデヒド 液中で 10 分固定し、再蒸留水で 2 回洗浄し、染色する。

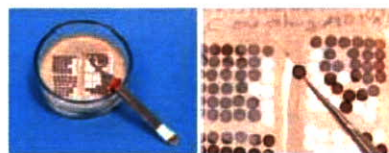
天然痘疑い水泡液の固定法（ベッドサイドで行う4方法）



①



②③



④

(Dr. G. Gelderblom 原図、出典 Gelderblom, H.R., Bannert, N.(2005)

Diagnostic electron microscopy in infectious diseases emergencies and bioterrorism. European Microscopy Society, Yearbook 2005,(ISSN 1609-1191), Editor: Peter Hawkes, pp 47-54

①光学顕微鏡用スライドガラス塗末標本を固定（数枚作成すること）

水泡をハサミかピンセットで開き、スライドガラスを注意しながら押しつけるか注射器に採取した水泡液を乗せる。プレパラートを空気乾燥後、容器内 PBS または HEPES-buffer 中の 4%ホルムアルデヒドで 5 秒固定。中間にマッチ棒を挟んでこすれ合わないようサンドイッチ状として容器に入れ電顕室へ運ぶ。この塗末部に 20ul のホルムアルデヒド緩衝液を乗せて懸濁し、グリッドに取る（浮遊させて）

②シリンジに固定液を入れておき水泡液を吸引採取

③エッペンドルフチューブにホルムアルデヒド固定液を入れておき、シリンジに吸引した水泡液を注入

④グリッドを水泡液または水泡病巣の基底部へ触れさせ、空気乾燥後ホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒド固定 （基底部にウイルスが一番多い）

IV. ネガティブ染色法

1. ネガティブ染色液

1) Phosphotungstic Acid (PTA)(日新 EM 3261)

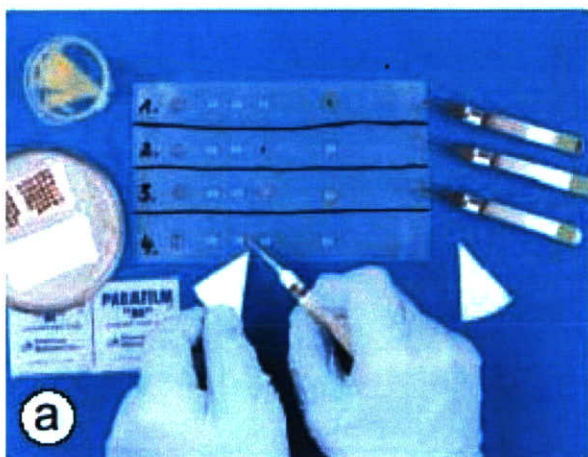
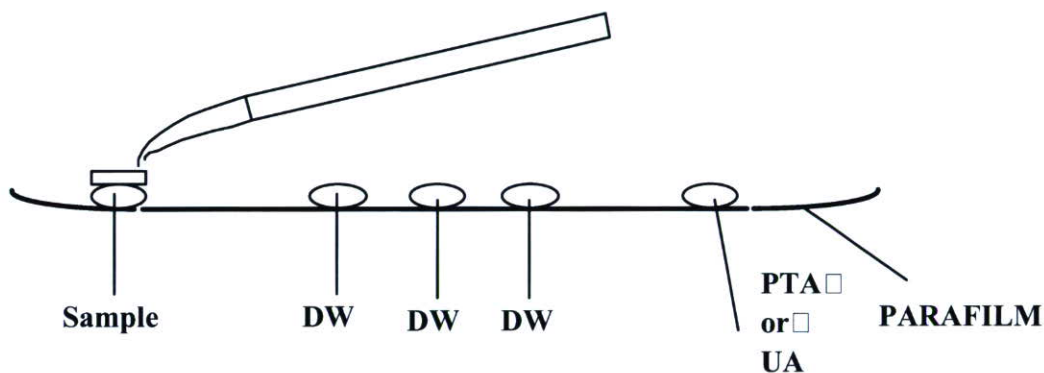
2% Phosphotungstic Acid (PH 7.1) 1N KOH または 1N NaOH で調整

2) Uranyl acetate (UA) (ただし、「核原料物質、核燃料物質及び原子炉等の規制に関する法律」第6 1 条の3 第1 項に基づき国際規制物資使用許可を受ける必要がある。)

1 ~2% Uranyl acetate 水溶液(PH 調整不要)

2. ネガティブ染色操作

1)グリッド移動法 (フローティング法)

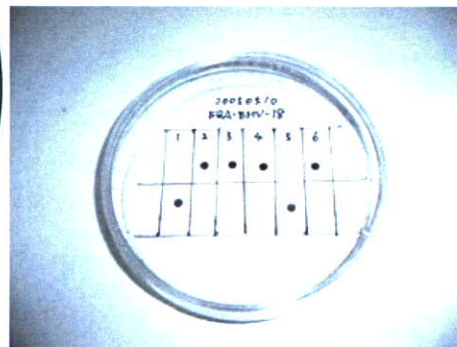
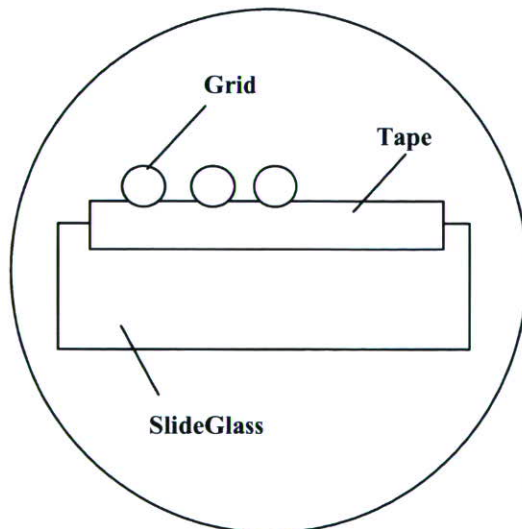


パラフィルムを用意し、その上に染色液滴を作り、グリッドのサンプル面を下にして浮かべることにより染色する。

(汚染 contamination を防ぐため、サンプルごとにピンセットを替えること)

- a) ウイルス溶液 (10ul) をパラフィルムにのせ、グリッドのサンプル面を下にして浮かべ、静置 1min~10min
- b) 小さく切った濾紙で吸い取り
- c) 試料の塩類含量が多い場合は、試料を吸い取った後、直ちに蒸留水 1 滴~3 滴で洗浄してから染色すると良い。
- d) PTA 溶液 または UA 溶液(10ul)
パラフィルムにのせ、グリッドのサンプル面を下にして浮かべ、静置 1min
- e) 小さく切った濾紙で吸い取り (グリッド面が一様に濡れた状態)
- f) 37~45°C インキュベータで乾燥
- g) 乾燥後、濾紙をひいたシャーレに移動する

2) グリッド固定法



- a) スライドガラスとメンディングテープを使ったグリッドクランプ (上図)を入れたシャーレを用意
- b) グリッドのサンプル面を上にしてグリッドクランプに接着
- c) ウイルス溶液 (5ul) をグリッドにのせ静置 1min~10min

- d) 裂いた濾紙で吸い取り（グリッド面が一様に濡れた状態がよい）
- e) PTA 溶液 または UA 溶液(5ul)（ 洗うときは 2 回）をグリッドに
のせ静置 1min
- f) 裂いた濾紙で吸い取り（グリッド面が一様に濡れた状態がよい）
- g) 37～45℃ インキュベータで乾燥
- h) 乾燥後、濾紙をひいたシャーレに移動

V. 観察・撮影・プリント

1. EM (Transmission Electron Microscope) 倍率 x 40,000 で観察
試料の観察は常に同一倍率で行うのがよく、4 万倍を使用
1 グリッドにつき少なくとも 5 スクエアは観察し・粒子の有無を判定試
料の載りかたにより観察するスクエア数を調節
2. ウイルスを撮影し、フィルム現像
3. フィルムスキャナーを用いてデジタル化または倍率 2 倍でプリント

3 研究課題の研究内容の重複について（調整会議のまとめ 2007.8.10, 於 広島大学）

研究内容細目	研究課題 1	研究課題 2	研究課題 3	重複課題の比較	
研究課題名	「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」	[地域における健康危機に対応するための地方衛生研究所機能強化に関する研究]	「健康危機発生時の迅速なる検査体制および原因究明に向けた連携体制構築に関する研究」		
研究年度	17～19年度	19～21年度	19～21年度		
主任研究者	田中智之（堺市衛生研究所）	吉村健清（福岡県保健環境研究所）	西田まなみ（広島大学）		
分担研究内容	化学物質関連	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	健康危機関連化学物質の迅速スクリーニング法の開発	対象物質が「農薬」と「重金属」で全く異なる研究	
	微生物関連（ウイルス）	パイオトロ等健康危機管理発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理 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	感染症発生時におけるウイルス学的迅速診断法の検討	「電子顕微鏡」、「免疫学的手法」と「PCR手法」で全く異なる観点からの研究	
	微生物関連（細菌）	無し	感染症発生時における細菌学的迅速診断法の検討	無し	
	疫学関連	無し	疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究	無し	
	その他（GLP 調査）	地方衛生研究所における GLP の精度管理に関するアンケート調査	無し	地域における検査体制に関する実地調査	無し
	その他（危機管理）	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	無し	各機関の連携体制の構築（危機管理および分析ネットワーク）	組織化の対象機関が、地方衛生研究所と、それより広範な機関を対象としている。
	その他（海外調査）	無し	無し	無し	無し

V 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	49(3)	219-225	2005
Kuzuya M., Fujii R., Hamano M., Nishijima M. and Ogura H.	Detection and molecular characteri-zation of human group C rotaviruses in Okayama Prefecture, Japan, between 1986 and 2005	J. Med. Microbiol.	79	1219-1228	2007
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 単クロナール抗体のサ 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)			
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	29	63-82	2001
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	35	46-52	2007