

表 6 Real Time PCR に供した食中毒事例の便試料と検査結果

番号	分類	事例区分	症状		ウェルシュ菌					セレウス菌						
			嘔吐	下痢	菌		RPLA	PCR	SYBR	菌		RPLA	PCR	SYBR		
					直接塗抹	増菌				増菌	増菌			増菌	増菌	増菌
1	有症者便	A-1	×	○	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	有症者便	A-1	×	○	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	有症者便	A-2	×	○	-	+	NT	+	+	+	+	-	-	-	-	-
4	有症者便	A-3	×	○	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5	有症者便	A-3	×	○	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
6	有症者便	A-3	×	○	+	+	NT	+	+	+	+	-	-	-	-	-
7	有症者便	A-4	×	○	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
8	有症者便	A-5	×	○	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
9	有症者便	A-1	×	○	+	+	NT	+	+	+	+	-	-	-	+	-
10	有症者便	A-3	×	○	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
11	有症者便	A-3	×	○	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
12	有症者便	A-2	×	○	-	+	NT	+	+	+	+	+	+	+	-	-
13	有症者便	A-6	×	○	+	+	NT	+	+	+	+	+	+	+	-	-
14	有症者便	A-6	×	○	+	+	NT	+	+	+	+	+	+	+	-	-
15	有症者便	A-6	×	○	-	+	NT	+	+	+	+	-	-	-	+	-
16	有症者便	A-5	○	○	-	-	NT	+	+	+	+	-	-	-	+	-
17	有症者便	A-5	○	×	-	+	NT	+	+	+	+	+	+	+	-	-
18	従事者便	A-7	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
19	従事者便	A-7	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
20	従事者便	A-7	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-

NT: not tested, ND: not detected

表7 食材・食品のウェルシュ菌検査結果(FP/08-12 事例)

菌種	試験種類	試料由来	煮物 鶏肉	煮物 こんにゃく	煮物 ゆで卵	ひじき煮	白菜おひたし	カニ甲羅揚げ	さつまいも天ぷら	細切りキャベツ	焼き魚	エビフライ	サニーレタス	スパゲティケチャップ 和え	卵焼き	メンチカツ	スパゲティサラダ	大根 漬け物	ご飯	
<i>C. perfringens</i>	菌培養	原材料										28	30			29				
		検食	40	33	38	37	36	31	34	35	39	32								
		A-4(残品)	24	23	21	27	27	26	19	20	25									
		A-1(残品)	46	45	44	49	47	48	42	43	41									
	PCR (食品 DNA)	原材料											28	30			29			
		検食	40	33	38	37	36	31	34	35	39	32								
A-4(残品)		24	23	21	27	27	26	19	20	25										
	A-1(残品)	46	45	44	49	47	48	42	43	41										
SYBR (食品 DNA)	原材料											28	30			29				
	検食	40	33	38	37	36	31	34	35	39	32									
	A-4(残品)	24	23	21	27	27	26	19	20	25										
	A-1(残品)	46	45	44	49	47	48	42	43	41										

食品のコラム中斜線で示したものが、それぞれ陽性になったもの。

食品の種類が複数で一つのコラムになっているものは、保管時に分離していなかったため1種類として計上した。

食品のコラムの中の数字は、食品の番号

表 8 食材・食品のセレウス菌検査結果(菌培養と嘔吐毒菌検査)(FP/08-12 事例)

菌種	試験種類	試料由来	煮物 鶏肉	煮物 こんにゃく	煮物 ゆで卵	ひじき煮	白菜おひたし	カニ甲羅揚げ	さつまいも天ぷら	細切りキャベツ	焼き魚	エビフライ	サニーレタス	スパゲティケチャップ和え	卵焼き	メンチカツ	スパゲティサラダ	大根 漬け物	ご飯	
<i>B. cereus</i>	菌培養	原材料										28	30			29				
		検食	40	33	37	36	31	31	34	35	39	32								
		A-4(残品)	24	22	21	27	26	26	26	26	19	20	25							
		A-1(残品)	45	45	44	47	48	42	43	41	43	41								
<i>B. cereus</i> emetic toxin	PCR (菌株 DNA)	原材料										28	30			29				
		検食	40	33	37	36	31	34	35	39	32									
		A-4(残品)	24	22	21	27	26	26	26	19	20	25								
		A-1(残品)	45	45	44	47	48	42	43	41	43	41								
SYBR (食品 DNA)	SYBR (食品 DNA)	原材料										28	30			29				
		検食	40	33	37	36	31	34	35	39	32									
		A-4(残品)	24	22	21	27	26	26	19	20	25									
		A-1(残品)	45	45	44	47	48	42	43	41	43	41								

食品のコラム中斜線で示したものが、それぞれ陽性になったもの。

食品の種類が複数で一つのコラムになっているものは、保管時に分離していなかったため 1 種類として計上した。

食品コラムの中の数字は、食品の番号



表9 食材・食品のセレウス菌(下痢毒)検査結果 (FP/08-12 事例)

菌種	試験種類	試料由来	煮物 鶏肉	煮物 こんにゃく	煮物 ゆで卵	ひじき煮	白菜おひたし	カニ甲羅揚げ	さつまいも天ぷら	細切りキャベツ	焼き魚	エビフライ	サニーレタス	スパゲティケチャップ和え	卵焼き	メンチカツ	スパゲティサラダ	大根 漬け物	ご飯
<i>B. cereus</i> enterotoxin	PCR (菌株 DNA)	原材料										28	30			29			
		検食	40			33	38				36	31			34		35	39	32
	A-4(残品)	24	23	24	24	27	49				47		48		26	19		20	25
	A-1(残品)	46		45	44						47		48			42		43	41
	RPLA 菌株から	原材料										28	30			29			
		検食	40			33	38				36	31			34		35	39	32
	A-4(残品)	24	23	24	27	49					47		48		26	19		20	25
	A-1(残品)	46		45	44						47		48			42		43	41
	SYBR (食品 DNA)	原材料										28	30			29			
		検食	40			33	38				36	31			34		35	39	32
	A-4(残品)	24	23	24	27	49					47		48		26	19		20	25
	A-1(残品)	46		45	44						47		48			42		43	41

食品のコラム中斜線で示したものが、それぞれ陽性になったもの。

食品の種類が複数で一つのコラムになっているものは、保管時に分離していなかったため1種類として計上した。

食品コラムの中の数字は、食品の番号

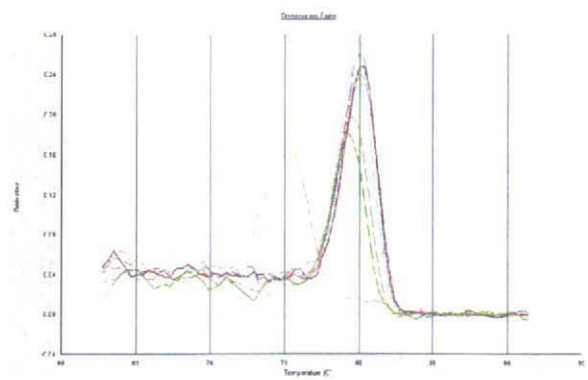
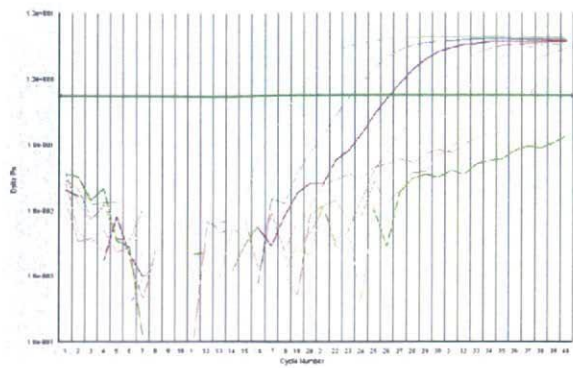


図1 *B. cereus* (*ces*) の増幅結果と融解曲線

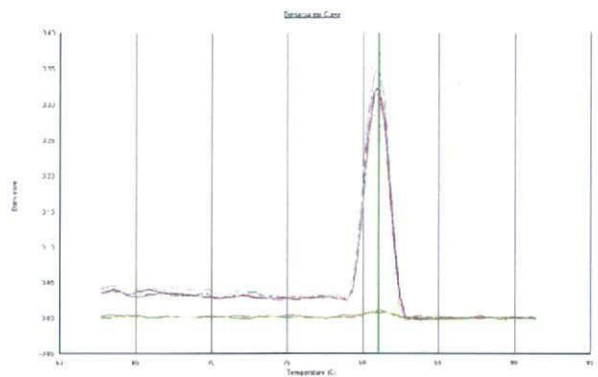
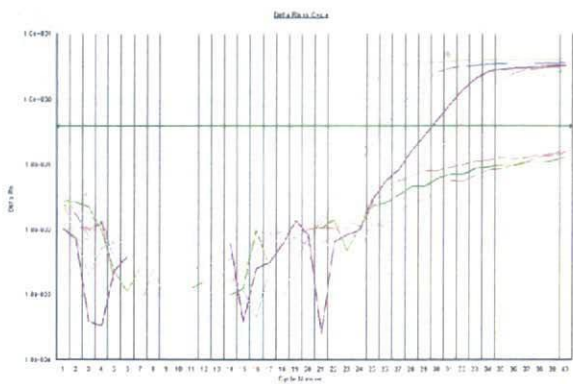


図2 *C. jejuni* (*gyrA<sup>b</sup>*) の増幅結果と融解曲線

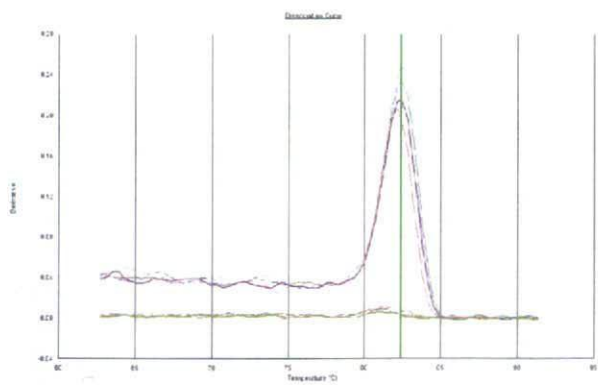
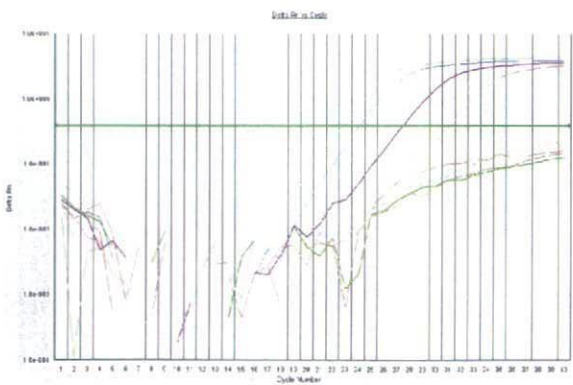


図3 *S. aureus* の増幅結果と融解曲線

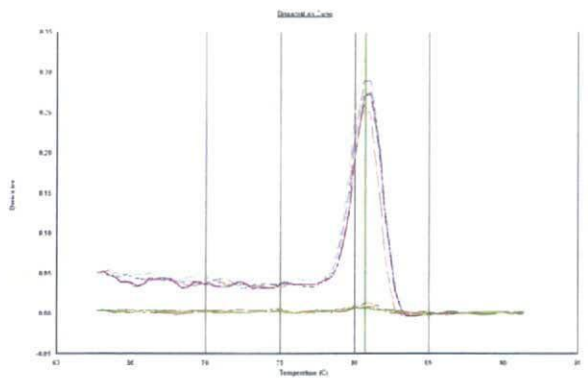
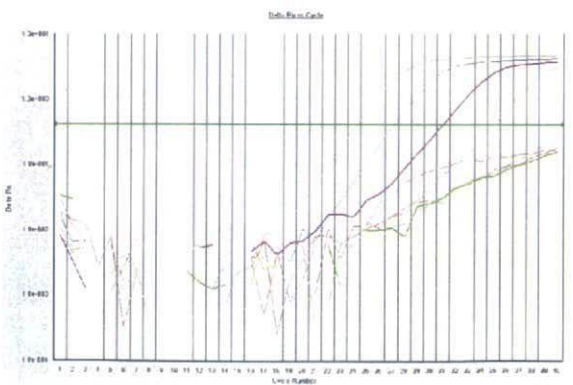


図4 EHEC (*stx1*) の増幅結果と融解曲線

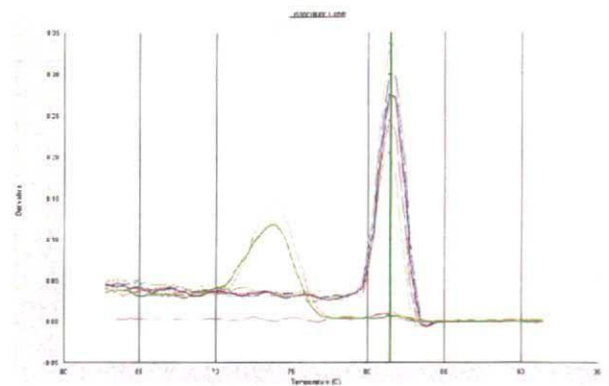
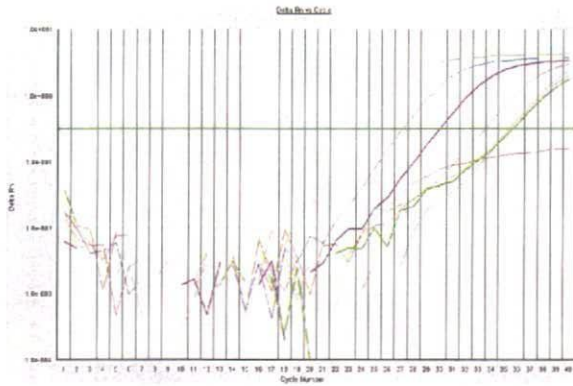


図5 EHEC (*stx2*) の増幅結果と融解曲線

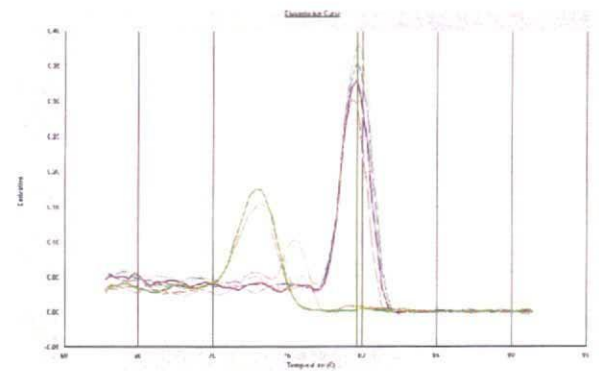
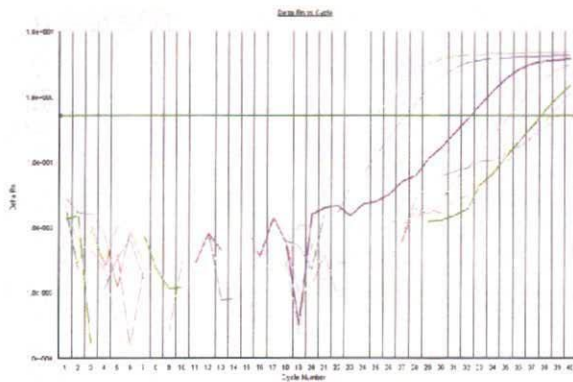


図6 EHEC (*eae*) の増幅結果と融解曲線

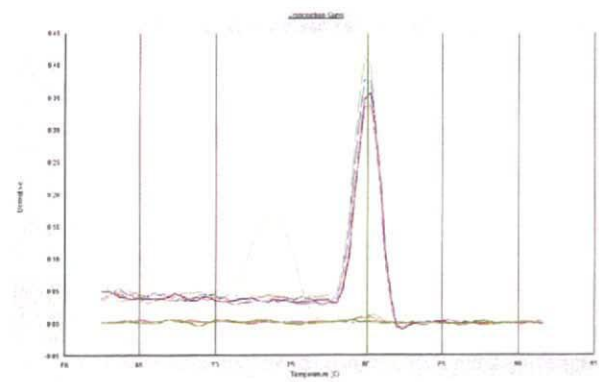
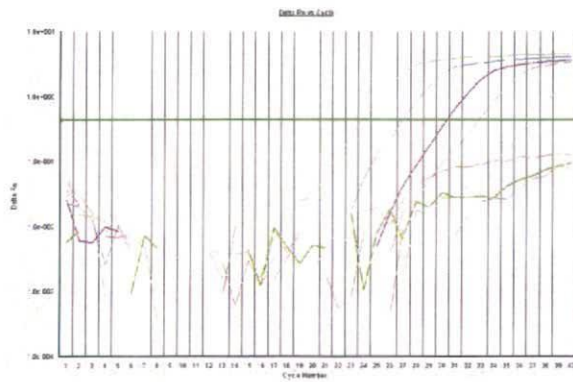


図7 *Salmonella* spp.(*invA*) の増幅結果と融解曲線

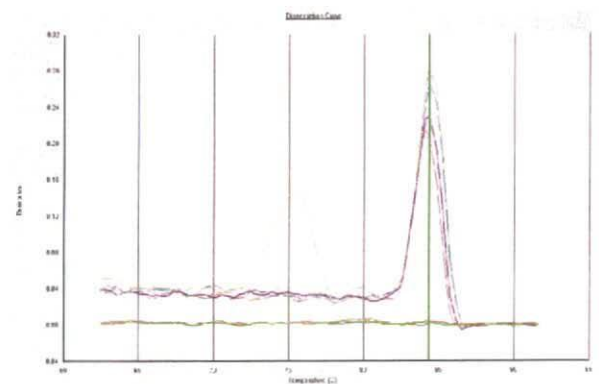
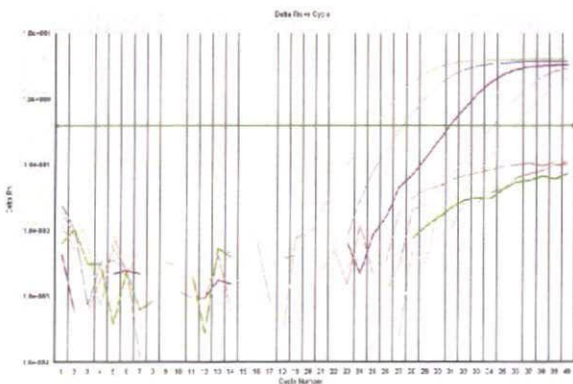


図8 *E coli* (*astA*) の増幅結果と融解曲線

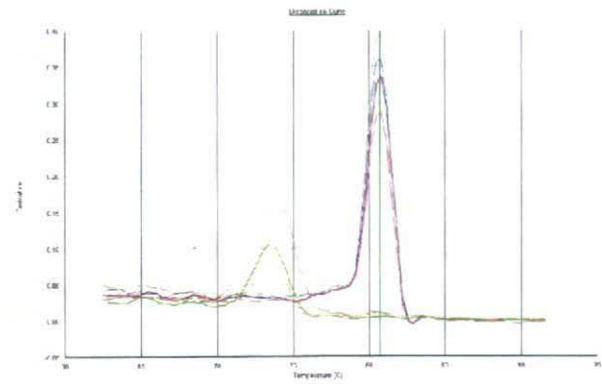
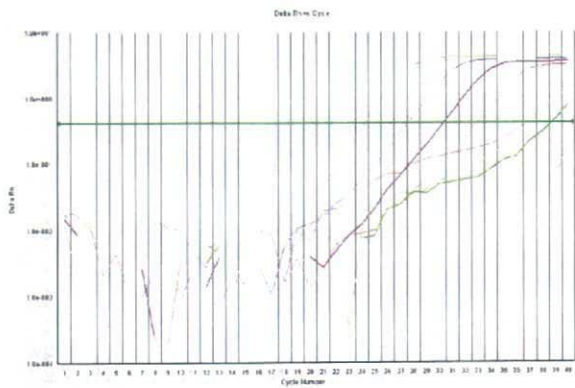


図 9 *V. parahaemolyticus*(*tdh*)の増幅結果と融解曲線

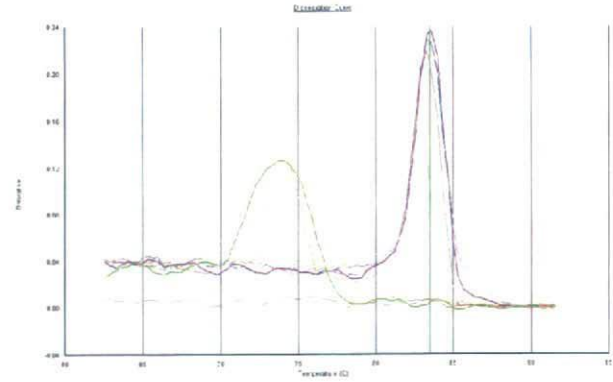
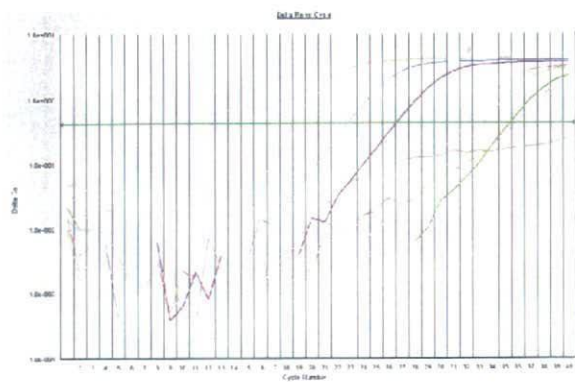


図 10 *C. perfringens*(16SrRNA) の増幅結果と融解曲線

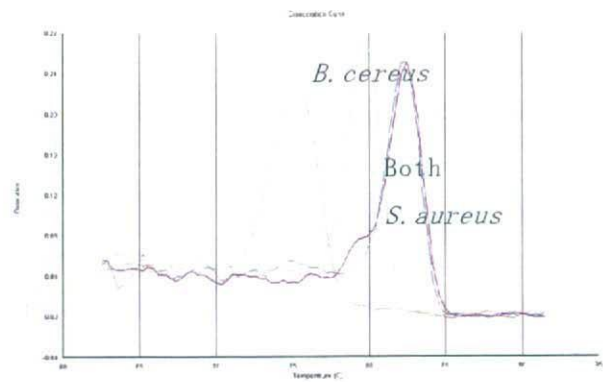
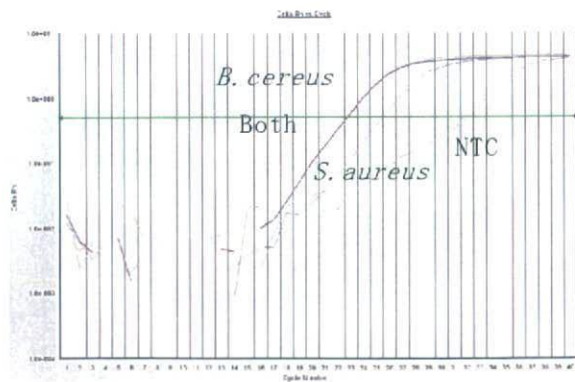


図 11 Duplex PCR *B. cereus*, *S. aureus* の増幅結果と融解曲線

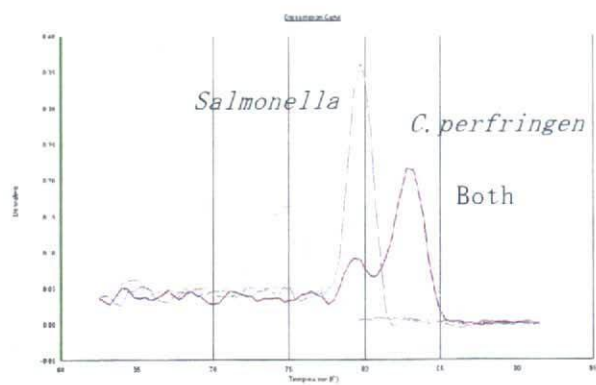
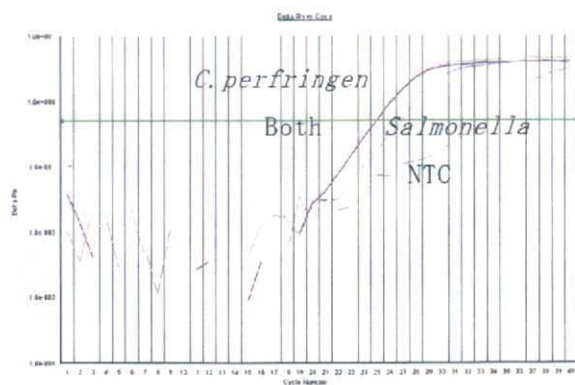


図 12 Duplex PCR *C. perfringens*, *Salmonella* の増幅結果と融解曲線



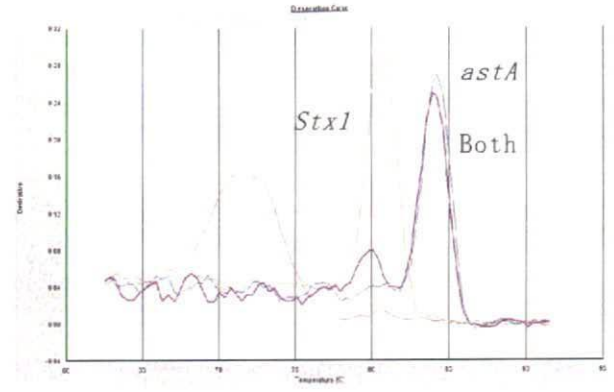
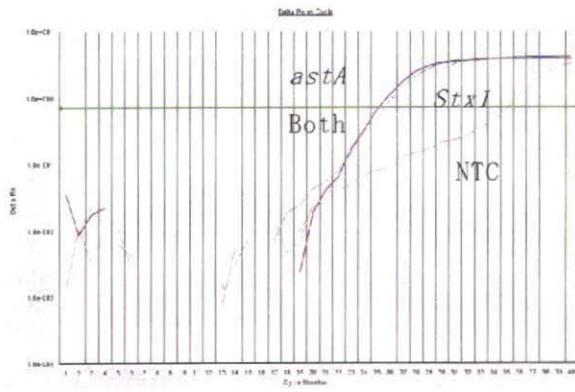


図 13 Duplex PCR *stx1*, *astA* の増幅結果と融解曲線

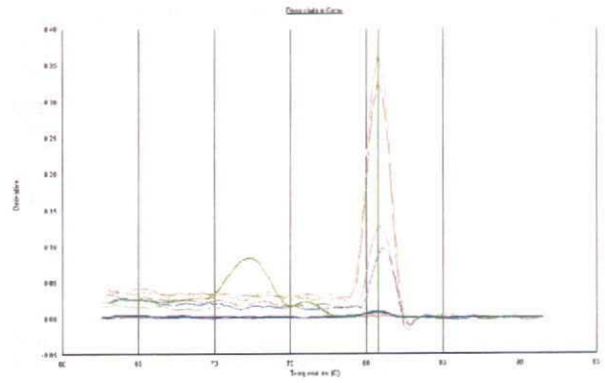
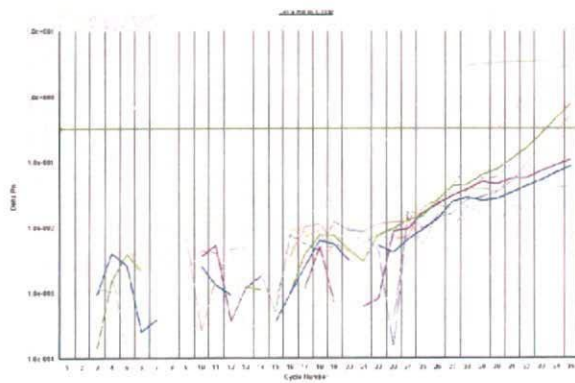


図 14 検体 No.1~8 *C.jejuni*

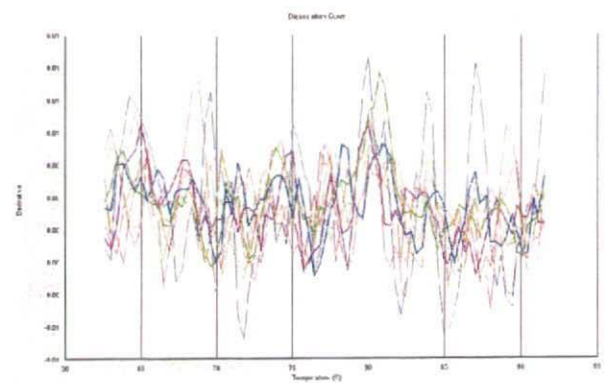
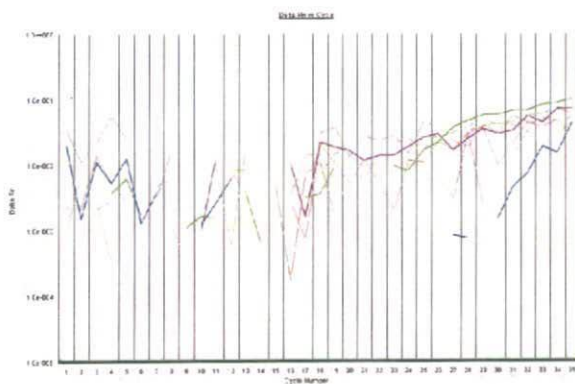


図 15 検体 No.1~8 *Salmonella* spp.

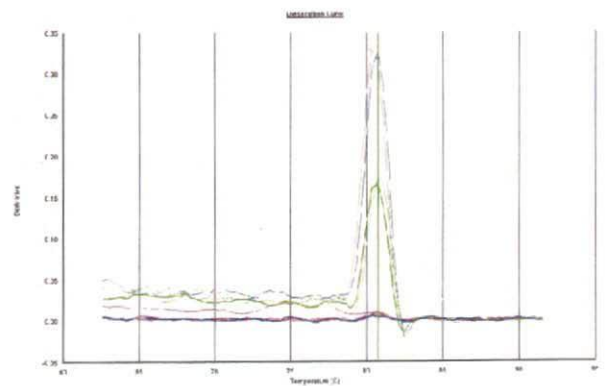
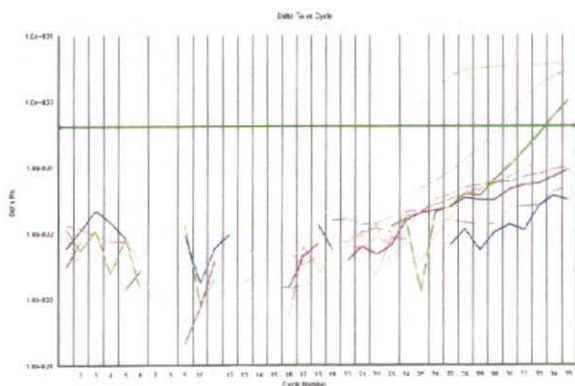


図 16 検体 No.1~8 Duplex PCR *C.jejuni*, *E.coli(astA)*



地域における健康危機管理に対応するための  
地方衛生研究所機能強化に関する研究

分担研究報告書(ウイルス部門)

原因不明感染症に対する迅速な包括的診断法の開発と有効性の評価

研究代表者	吉村健清	福岡県保健環境研究所	所長
研究分担者	織田 肇	大阪府立公衆衛生研究所	所長
研究協力者	高橋和郎	大阪府立公衆衛生研究所	副所長兼感染症部長
	加瀬哲男	大阪府立公衆衛生研究所	感染症部ウイルス課長
	倉田貴子	大阪府立公衆衛生研究所	感染症部ウイルス課
	廣井 聡	大阪府立公衆衛生研究所	感染症部ウイルス課
	皆川洋子	愛知県衛生研究所	所長
	山下照夫	愛知県衛生研究所	生物学部ウイルス研究室長
	伊藤 雅	愛知県衛生研究所	生物学部ウイルス研究室主任
	千々和勝己	福岡県保健環境研究所	保健科学部長ウイルス 課長
	世良暢之	福岡県保健環境研究所	保健科学部ウイルス課
	石橋哲也	福岡県保健環境研究所	保健科学部ウイルス課
	中山志幸	福岡県保健環境研究所	保健科学部ウイルス課
	江藤良樹	福岡県保健環境研究所	保健科学部病理細菌課

研究概要

本研究では、健康危機発生時に、地方衛生研究所において実施すべきウイルス検査について、特に、呼吸器症状を主徴とする原因不明感染症および消化管や中枢神経系はじめ全身感染症の患者検体を対象に、迅速性、網羅性を考慮し、最適な手法を確立することを目的とした。本年度は、第1に、呼吸器ウイルスを対象としたマルチプレックスPCR法について検討を行い、influenzavirus A および B, RSvirus, human Metapneumovirus の系と、Rhinovirus, Enterovirus, Coronavirus および Influenzavirus C の系、2つについてマルチプレックス RT-nested PCR 法での検査手法を決定した。また、第2に、防疫対策上重要度の高いエンテロウイルスを対象とした高感度の PCR 法による同定型別法について、実際に中枢神経系症状を主徴とする原因不明感染症患者検体に適用し評価を行った。第3に、呼吸器系ウイルスを対象としたマルチプレックス RT-PCR 法を従来法の培養細胞を用いた分離同定法と比較検討を行い、本法が包括的な迅速診断法として利用可能であるかどうかを評価した。

#### A. 研究目的

本研究では、呼吸器症状を主徴とする原因不明感染症の患者検体を対象に、マルチプレックス PCR 法による呼吸器系ウイルスの網羅的検査法を確立することを目的とする。

#### B. 研究方法

本年度は呼吸器系ウイルスのうち、Influenzavirus A 及び B, RSvirus, human Metapneumovirus を検出するマルチプレックス PCR 法と Rhinovirus, Enterovirus, Coronavirus OC43 及び 229E, Influenzavirus C を検出するマルチプレックス PCR 法の検査手法を決定し、一部臨床検体での応用を試みた。

検査に際して Influenzavirus A, B, RSvirus, Rhinovirus は 96well plate で培養した MDCK, HEp2 および H1Hela cell を用いてタイトレーションを行い、インフルエンザウイルスについては ffu を、それ以外のウイルスについては TCID<sub>50</sub> を決定した。それぞれのウイルス培養液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出を行い、陽性コントロールとした。Human Metapneumovirus については増幅領域を含むプラスミドを作成し、陽性コントロールとした。

PCR のプライマーと PCR の反応条件は、以下の論文のものを一部改変したものを採用した。

J. Clin. Microbiol. 2000. 38: 1191-1195

J. Virol.Methods. 2005. 126: 53-63

J. Clin. Microbiol. 1998. 36: 2990-2995

Intervirolgy 2002. 45: 136-141

RT-nested PCR では、1 回目の PCR は One Step RT-PCR kit (QIAGEN) を用い、2 回目の PCR は KOD Fx (TOYOBO) を用いた。

PCR の検出感度を調べるために、陽性コントロールのウイルス RNA はそれぞれ精製水で 10 倍段階希釈し、鋳型として使用した。

増幅産物は 2% アガロースゲルで電気泳動して可視化した後、シーケンスを行い塩基配列を確認した。

#### C. 研究結果

##### 1) 検査手法の決定

Influenzavirus を含むマルチプレックス RT-nested PCR では、それぞれの増幅産物の長さが Influenzavirus A: 129bp; Influenzavirus B: 254bp; RSvirus: 180bp; human Metapneumovirus: 405bp で独立して増幅された。それぞれのウイルスの検出感度は、Influenzavirus A: 10<sup>-2</sup>ffu; Influenzavirus B: 10<sup>-2</sup>ffu; RSvirus: 10<sup>-3</sup>TCID<sub>50</sub>; human Metapneumovirus: 10 copy であった。Rhinovirus を含むマルチプレックス RT-nested PCR では、それぞれの増幅産物の長さが、Rhinovirus/Enterovirus: 530/650bp; Influenzavirus C: 391bp; Coronavirus OC43: 170bp; Coronavirus 229E: 230bp で設計されたが、陽性コントロールとして Rhinovirus しか準備できなかったため検出感度は Rhinovirus のみで検討し、10<sup>-1</sup>TCID<sub>50</sub> であった。

##### 2) 臨床応用

2006 年 12 月に集団発生した原因不明の呼吸器疾患症例の患者 12 名の鼻腔吸引液を用いて、昨年報告した Parainfluenzavirus 1-4 のマルチプレックスおよび今回報告した 2 つのマルチプレックス PCR 法を検討した。その結果、全ての臨床検体から Rhinovirus が増幅され、それらの塩基配列はほぼ一致していたため、本症例が Rhinovirus の集団感染であったことが示された。

#### D. 考察

本研究において、呼吸器系ウイルスの網羅的検査法を目的とし、本年度は Influenzavirus A, B, RSvirus, human Metapneumovirus の系と、Rhinovirus, Enterovirus, Influenzavirus C

及び Coronavirus OC43, 229E の系のマルチプレックス RT-nested PCR の手法を決定した。検出感度は比較的良好で、実際の臨床検体を用いた検査でも有効なウイルス検出方法となることが期待された。現在さらに Adenovirus, Parvo virus, Boca virus などの DNA ウイルスを対象としたマルチプレックス nested PCR 法を検討中である。今後、臨床検体で活用していくことで原因病原体不明の呼吸器症状を示す患者の原因解明に利用できると考えられた。

#### E. 結論

Influenzavirus A, B, RSvirus, human Metapneumovirus の系と、Rhinovirus, Enterovirus, Influenzavirus C 及び Coronavirus OC43, 229E の系のマルチプレックス RT-nested PCR の手法を決定した。検出感度は比較的良好で、実際の臨床検体を用いた検査でも有効なウイルス検出方法となることが期待された。



## 愛知県衛生研究所の分担研究

### A. 研究目的

本研究は、健康危機管理事例発生の場合における迅速な原因ウイルスを推定する実験室診断法の確立を目的としている。当所はこのうち中枢神経系症状を主徴とする原因不明ウイルス感染症疑い検査診断法確立を担当している。昨年度本研究において、RT-PCR法＋塩基配列決定に基づいたエンテロウイルスの迅速な検出・同定型別法を比較検討した結果に基づき、高検出感度の VP4-VP2 領域検出と VP1 領域検出法を、今年度当所に搬入された患者検体に適用し非エンテロウイルス検出を含めた評価を行った。

### B. 研究方法

#### ①RT-PCR 法を用いたエンテロウイルス迅速検出システムの評価・検討

中枢神経系等重篤なウイルス感染症が疑われる健康危機事例発生に備えて平成 20 年 4 月以降に当所に搬入された患者検体のうち、以下の条件を満たす全ての症例について当初 20 例を目標として、RT-PCR 法(2 法)と培養細胞を用いたウイルス分離を行い、検討した。

#### ◎対象症例の条件

・臨床診断名に、脳(脊髄)炎をはじめとする中枢神経系感染症あるいは脳症の記載がある(疑いを含む)。

・糞便あるいは直腸ぬぐい液が採取された。

#### ②エンテロウイルス検出及び型別同定法用 RT-PCR 法に用いるプライマーセットの評価

昨年度、ウイルス分離・検出陽性検体 30 件を用いて RT-PCR 法＋塩基配列決定に基づくエンテロウイルスの検出・同定型別法を比較検討した結果に基づき、今年度は上記検体について、高検出感度の VP4-VP2 領域検出と VP1 領域の遺伝子情報を合わせて VP4-VP2

領域の遺伝子情報を収集し、ウイルス分離法とあわせ A 群エンテロウイルスの正確な同定を可能にすることをめざした。

### C. 研究結果

①症例数目標 20 例は年度末を待たずに達成した。何れかの検査法でウイルスが検出された 9 例(9/20=45%)の概要を表 1 に示した。これらウイルス陽性 9 例のうち臨床的に原因ウイルス推定がなされたのはムンプスウイルスが分離された 1 例のみであった。エンテロウイルス陽性をしめした 5 例の内訳は Coxsackie A4 陽性 2 例、同 A16、同 B1 及び echo-11 各 1 例であった。他 4 例はアデノウイルス 2 例、ヒトパレコウイルス(エンテロウイルス属から独立しパレコウイルス属を形成)及びムンプスウイルス各 1 例であった。ヒトパレコウイルス検出同定は、現在は培養細胞上の CPE 出現を待って行っているため数週間を要するが、日本国内を含め各地から分離検出報告の蓄積が進んでおり、遺伝子情報を元にした RT-PCR 法等迅速診断法の開発が望まれる。

②20 年度検討した症例中エンテロウイルス陽性例 5 例については、上述の 2 法とも PCR 陽性であった。

### D. 考察

ヒト病原ウイルスは多様であるが、とりわけポリオを含むエンテロウイルス(及びパレコウイルス)は、ポリオの場合はワクチン接種等の対策、下水から分離される等公衆衛生上インパクトが大きい。健康危機のなかでも中枢神経感染症はじめ全身性重症患者発生に際しては、公衆衛生対策の迅速な実施のみならず住民の不安を軽減するためにも病原(ウイルス学)診断結果の 1 日も早い提供が望ましい。

①糞便(あるいは直腸ぬぐい液)は、主要な感染源というばかりでなく、患者の全身状態に左右されることが少なく非侵襲的に採取可能と



いう利点をもつが、ウイルス検出における糞便検体の有用性が確認された。さらに今年度臨床検体を用いた検討において、エンテロウイルスと並行して実施したアデノウイルス PCR の有用性及びヒトパレコウイルス PCR 検出系確立の必要性が明らかになった。

②異なるプライマーを用いる PCR2法より得られたウイルス遺伝子情報の解析を元に、今後より鋭敏で迅速に型別結果の得られる解析手順開発を予定している。

## E. 結論

中枢神経系ウイルス感染症が疑われる症例についてウイルス学的診断法を検討したところ、糞便検体からエンテロウイルス、ヒトパレコウイルス及びアデノウイルス検出陽性結果を得、有用性が改めて確認された。

中枢神経系ウイルス感染症については、アルボウイルス等を含めた網羅的診断プロトコル提供が望ましい。

表1 中枢神経感染症患者からのウイルス検出(2008年)

No.	臨床診断名	検出ウイルス	PCR		細胞培養		備考 (その他検体)
			糞便	その他	糞便	その他	
4	急性散在性脳脊髄炎	Echo-11	+	-	+	-	CSF、血清、咽頭ぬぐい液
7	急性小脳失調症	Adeno-5	(-)	-	+	-	血清、咽頭ぬぐい液
11	急性脳炎	Coxsackie A4	+	-	-	-	CSF
13	急性脳炎	Coxsackie A16	+	-	+	-	咽頭ぬぐい液
14	急性脳炎	Adeno-3	(-)	-	+	+(咽頭)	CSF、咽頭ぬぐい液
15	脳症	HPeV-3	-	-	+	-	咽頭ぬぐい液
16	髄膜脳炎	Coxsackie A4	-	+(咽頭)	-	-	CSF、咽頭ぬぐい液、尿
18	急性散在性脳脊髄炎	Coxsackie B1	+	-	+	-	咽頭ぬぐい液、尿
19	急性脳炎	Mumps	-	-	-	+(CSF)	CSF、咽頭ぬぐい液
	(他 11 例は全て陰性)						
		陽性率	4/20 (20%)	1/20 (5%)	6/20 (30%)	2/20 (10%)	

#### A. 研究目的

本研究は地域における健康危機管理事例発生時において、疫学調査等を実施する保健所と共に、検査部門における最前線となりうる地方衛生研究所の対応能力を向上させるために、包括的な迅速診断法の開発・改良を行うことにより、行政機関に速やかな検査結果の提供を可能とすることを目的としている。今年度は、初年度にほぼ確立したマルチプレックス RT-PCR 法を従来法である培養細胞を用いたウイルス株の分離同定法(新しい方法を開発した際の評価すべき標準 Gold standard となっている(David O. White and Frank J. Fenner, Medical Virology, 北村 敬訳、医学ウイルス学 第四版))と比較検討し、その有効性を評価することを目的とした。

#### B. 研究方法

検討した検体は、感染症発生動向調査事業で当所に搬入された咽頭拭い液 108 検体(平成 18 年度 32 検体、平成 19 年度 46 検体、平成 20 年度 30 検体)である。診断名は、咽頭結膜熱、無菌性髄膜炎、手足口病、不明熱及び発疹症などで、培養細胞への接種により分離同定されたウイルスはアデノウイルス、RS ウイルス、インフルエンザウイルス、エンテロウイルス、麻疹ウイルス及びライノウイルスなどであった。

検査方法は昨年度と同様のマルチプレックス RT-PCR 法を用いた。検査対照とした病原体は、アデノウイルス、RS ウイルス、インフルエンザウイルス A、B、C 型、エンテロウイルス、コロナウイルス、パラインフルエンザウイルス 1 型、2 型、3 型、4 型、ヒトメタニューモウイルス、ボカウイルス、ライノウイルスの 9 種類である。PCR 産物が得られた検体についてはダイレクトシーケンス法によりウイルスの同定を行った。アデノウイルス検出系について

は、文献を参考に新たにプライマーを設定した(Journal of Clinical Microbiology, 39(2), 498-505)。

搬入された検体は十分に攪拌後、遠心(3,000 回転、20 分間)した上清に、細菌やカビの侵入を防ぐための抗生物質(ペニシリン及びストレプトマイシン)を添加した後、6 種類の培養細胞(FL 細胞、HEp-2 細胞、LLC-MK2 細胞、MDCK 細胞、RD18s 細胞及び Vero 細胞)に接種、34°C の孵卵器で培養した。顕微鏡により細胞変性効果(cytopathic effect、CPE)を毎日観察し、CPE が見られない場合は新たな培養細胞に 2 代継代接種し、観察を続けた。CPE が認められた場合、まずウイルス価を測定し、診断名及び CPE の形態などから推定される病原ウイルスの抗血清を用いてウイルス中和試験を行い、分離されたウイルスの血清型を同定した。

#### C. 研究結果

培養法を用いたウイルス分離同定試験の結果と、マルチプレックス RT-PCR 法を用いたウイルス遺伝子同定試験の結果を表 1 に示す。この結果から、培養細胞で分離され、マルチプレックス RT-PCR 法で同じウイルスが同定されたものが 108 検体中 27 検体(25.0%)、培養細胞で分離されず、マルチプレックス RT-PCR 法でもウイルスが同定されなかったものが 108 検体中 73 検体(67.6%)であった。培養細胞で分離され、マルチプレックス RT-PCR でウイルスが同定されなかったものが 108 検体中 5 検体(4.6%)あり、これらはアデノウイルス、コクサッキー A6 型、コクサッキー A9 型、麻疹ウイルス D5 型及びライノウイルスであった。培養細胞で分離されずに、マルチプレックス RT-PCR でエンテロウイルス疑いのものが 108 検体中 3 検体(2.8%)あった。この PCR 産物をダイレクトシーケンスして BLAST



検索を実施したが、相同性が低く、エンテロウイルスを同定するには至らなかった。

#### D. 考察

初年度にほぼ確立したマルチプレックス RT-PCR 法の一部を改変し、アデノウイルスを検出するプライマーを新たに設定したことによって、本方法はウイルス検査の gold standard である培養細胞を用いた分離同定法と比較して、92.6%(108 検体中 100 検体)という一致率を示した。しかしながら、エンテロウイルスについては PCR 産物が 134bp と比較的小さいことから、PCR 産物が確認できた場合でもダイレクトシーケンス法による同定が困難であることから、最終年度はこのエンテロウイルスを同定できるプライマーの変更等を検討することに

している。

#### E. 結論

感染症発生動向調査事業で搬入された咽頭拭い液の培養細胞を用いたウイルス分離に対するマルチプレックス RT-PCR 法の陽性一致率は 25.0%(27/108)、陰性一致率は 67.6%(73/108)、全体では 92.6%と高い一致率が見られた。しかしながら、マルチプレックス RT-PCR 法で陰性と判断される検体が 5 検体(4.6%)、陽性或いは偽陽性と判断される検体が 3 検体(2.8%)あり、これを解決するためにはエンテロウイルス等を検出するためのプライマーを新たに設定する必要があり、最終年度の課題とした。

表1 培養細胞を用いたウイルス分離結果と MultiplexPCRの結果の比較

		Multiplex PCR	
		+	-
培養細胞	+	27	5
	-	3(?)	73

培養細胞は、FL細胞、HEp-2細胞、LLC-MK2細胞、MDCK細胞、RD18s細胞及びVero細胞を用いた。

検出できなかったウイルスはアデノウイルス1株、コクサッキーウイルス2株、麻疹ウイルス1株及びライノウイルス1株の合計5株であった。

PCRのみでエンテロウイルス疑いのバンドが3検体から検出されたが、PCR産物が134bpと小さく、ダイレクトシーケンスの結果をBLAST検索した結果、相同性が低く、同定できなかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 伊藤雅, 山下照夫, 都築秀明, 柁島由佳, 藤浦明, 長谷川晶子, 長谷聡子, 榮賢司, 皆川洋子: Human parechovirus の検出ならびに同定方法の検討. 愛知県衛生研究所報 58:1-8, 2008.

2) 山下照夫, 伊藤雅, 水谷絵美, 藤原範子, 皆川洋子: 無菌性髄膜炎からのエンテロウイルス検出状況, 2004~2008年. 病原微生物検出情報 30(1):6-8, 2009.

### 2. 学会発表

1) 伊藤雅, 山下照夫, 皆川洋子: 愛知県におけるヒトパレコウイルス(HPeV)の検出状況. 第49回日本臨床ウイルス学会. 愛知県犬山市, 2008年6月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）

分担研究報告書

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  
～分担研究 地方衛生研究所の疫学機能強化に関する研究～

（分担研究者）前田 秀雄 東京都健康安全研究センター所長

#### 研究要旨

自治体が多様化・複雑化する健康危機に迅速的確に対応し、事前予防型政策を推進するために、疫学機能の強化が必須である。そこで、自治体の疫学機能の強化を図るために、①記述疫学（健康危機の探知）②分析疫学（健康危機の要因分析）③介入疫学（政策の効果検証）の疫学の各工程における具体的な推進策を、特に地方衛生研究所の機能強化と関連して探求した。

その結果、疫学機能を組織的に強化することが本質的な解決策であることが明らかとなったが、組織的機能強化のためには保健所・本庁・地衛研の新たな役割分担を検討する必要がある。

そこで、多くが地方感染症情報センター機能を有し、試験検査部門と疫学調査部門の密接な連携が可能であり、理化学分野における疫学機能の拡大に寄与できる地方衛生研究所へ疫学機能を集約化することが、最も効率的かつ効果的であると考えられる。

#### 研究協力者

群馬県衛生環境研究所	加藤 政彦
群馬県衛生環境研究所	森田 幸雄
群馬県衛生環境研究所	鈴木 智之
埼玉県衛生研究所	岸本 剛
東京都健康安全研究センター	神谷 信行
富山県衛生研究所	堀元 栄詞
福岡県保健環境研究所	小野塚 大介
国立保健医療科学院	八幡 裕一郎

#### A. 研究目的

地方自治体が公衆衛生政策を合理的にかつ効果的に推進するためには、政策の基盤となる科学的根拠が必須であり、さらに、科学的根拠を政策化するための疫学機能が不可欠である。一方、地方衛生研究所は、試験検査情

報と実地疫学情報の一元的な解析機能を担うことを目指しているが、そのための体制及び方法論は未だ確立されていない。このため、自治体の疫学機能強化のための各工程における具体的な推進策を、特に、地方衛生研究所の研究体制、人材育成との関連について、事例報告調査等から探求する。

#### B. 研究方法

今年度研究では、自治体の疫学機能を、「リスクの探知」、「リスクの把握」、「リスクの応用」の3段階の各工程における具体的な推進策を探求した。

「リスクの探知」では、感染症分野における具体的なリスクの探知業務である感染症発生動向調査の効果的活用方を事例として検討した。（担当：八幡・（保健医療科学院）

「リスクの同定」では、学術委員会が収集している危機管理事例集から、発生時の試験検査結果と実地疫学情報の総合的な解析が行われた事例について、地研・保健所の連携による疫学分析の効果を検証した。（担当：岸本・埼玉県、堀元・富山県）

「リスクの発信」では、群馬県における地衛研疫学情報部門と保健所の疫学機能と連携状況を事例として、保健所が求める感染症対策への支援機能について検討した。（担当：鈴木・群馬県）

また、感染症分野だけではなく理化学分野における疫学機能強化策についてその要因をPREDEED・PROCEED Model（以下PPモデル）を用いて検討した。（担当：小野塚・福岡県）

## C. 研究結果

### 1. リスクの探知

現状の疫学的情報からのリスク探知の可能性について、感染症発生動向調査の効果的活用法の構築を通じて検討をした。

まず、疫学機能強化のための感染症対策におけるアウトブレイク探知のためのガイドライン案を作成した。ガイドライン案に基づき過去の事例を利用し、①サーベイランスデータから異常値の検出、②集積性の検出、③累積患者数での検証したところ、ガイドライン案は概ね良好であった。今後はこれらの3事例以外にパイロットスタディーとしていくつかの地方感染症情報センターの担当者が日常の業務の中で検証を行いガイドラインとして完成させることが今後の課題である。

### 2. リスクの同定

試験検査部門と疫学調査部門の連携による効果について事例調査に基づいて検討した。対象とした2つの事例は非典型的な健康危機事例で、当事者が検査や疫学調査のプロトコールを作っていかなければならなかった。第

一の事例においては疫学部門が衛生研究所内に設置されていたことが、検査のプロトコールの的確な変更役に役立った。また、第二の事例は保健所・衛生研究所・県庁の円滑な連絡調整により、疫学調査と試験検査が効率的に連携できた。しかし、試験検査部門と疫学部門が組織的に近い関係にあれば、事件当初から検査検体のみならず疫学情報を入手して解析していくことで、事件終息がよりスムーズにいった可能性は高かった。

健康危機については自治体の疫学機能が重視されるが、規模や形態が多様化しており、担当職員1人1人が疫学を理解して調査が行われるのが理想であるが、知識習得経験ともに拠点施設への知見及び専門職員を集積し、担当職員をバックアップする疫学機能の強化は現実的であると言える。

さらに、疫学調査結果を適切に政策に反映するためには、試験検査情報と疫学情報を一体として解析し相乗的な効果を得ることが求められる。

### 3. リスクの発信

群馬県衛生環境研究所に設置されている感染制御センターをモデルとして、保健所に対する疫学支援機能の評価と保健所が求める感染症の疫学支援機能を検討した。

保健所の感染症担当者数が少ない他に兼務業務も担当し、詳細な情報収集・調査を実施する機会が減少している。このため、現状において保健所が現実的に実施できる感染症対策は感染拡大防止のための初期対応であり、疫学的解析によるリスクの発信までの詳細な調査は実施することは困難であることが明らかとなった。したがって、保健所への支援として求められる機能は、初期対応に対する技術的支援と共に、対策の推進に資するリスクの分析を行う疫学的解析であると考えられた。

近年、多くの自治体において人員削減が実施されていることから、時間的制約・経験不



足を問題として認識している自治体においては、保健所の業務を支援する組織の設置を検討する必要があると思われる。

また、組織の設置より、職員が集中的に多くの事例を経験し実地疫学の方法を効率的に学ぶことができるため、疫学分野における指導者の育成が期待できる。

#### 4. 理化学部門の疫学機能強化策

地方衛生研究所において、理化学分野で疫学機能が活用されにくい要因として、①担当研究職の出身学部教育課程に「疫学」講座がないため、基本的素養がない、②就職後においても理化学分野の研究職を対象とした疫学の研修が少ない、③理化学分野では分析法の精度向上、手技開発が優先される組織風土がある。④理化学分野の組織的背景となる生活衛生行政が規格基準に基づく監視指導行政であり、疫学的解析に基づく事前対応型政策立案の志向が弱い、等の理由により、疫学への関心及び業務における活用意識が薄いためであると考えられる。

このため、理化学分野における疫学機能を強化するためには、①理化学分野の研究職を対象とする疫学の研修機会の確保する、②理化学分野の取り組む試験検査結果を題材にした実務的な疫学的解析モデルを提示する、③生活衛生行政が事前予防型行政へ方向性の転換をはかる、等の方策が重要である。

#### D. 考察

「リスクの探知」は、健康危機管理のための疫学機能の基盤である。今回の検討を通じて、感染症法に基づいて地方感染症情報センターに集積される発生動向情報等から感染症アウトブレイクの早期探知が可能であることが明らかとなった。現在、ほとんどの地方感染症情報センターは地方衛生研究所に設置されていることから、地方衛生研究所は感染症分野における疫学機能の基盤を担う施設とし

て期待される。

「リスクの同定」においては、試験検査機能の高度化に伴い、発生状況に応じた精緻な検査が可能となっていることから、疫学部門と検査部門の密接な連携により、検査部門が事前から実地疫学情報を踏まえると、非定型的な健康危機事例においても実効性ある検査プロトコルの設計が可能である事が事例から示された。

一方で、健康危機は規模、形態とも多様化しており、一人一人の職員が全体的な知識経験を持つことは不可能となっているため、拠点施設へ知見及び専門職員を集積することによる疫学機能の強化が必要である。

しかしながら、現状では、保健所・本庁・地衛研の役割分担の形式的硬直化、保健所の機能低下、本庁の専門能力の不足、高度化する試験検査の活用不足等の課題がある。このため、衛生研究所内への独立した疫学情報部門の設置が自治体としての疫学機能強化のために効率的かつ効果的と考えられる。

一方、疫学的な調査研究及びその対策への応用は、感染症対策分野に偏重している傾向があるが、健康危機は食品保健、環境保健分野等にも多発しており、政策的な抜本的解決策が求められていることから、こうした分野における疫学機能の強化も重要な課題である。

しかしながら、健康危機の全分野の試験検査に包括的に対応する地方衛生研究所においても、感染症以外の分野での疫学機能は不十分である。その打開策としては、担当研究員への教育・研修と共に、本質的には、試験検査の根幹を担う生活衛生行政自体が、健康危機の多様化・複雑化に対応して、従来の監視指導と行政処分を中心とする違反取り締まり行政から、リスクの疫学的分析に基づく事前予防型行政へ転換することが求められる。ただし、固定化した行政スタイルを自ら転換することは、一般的にきわめて困難であることから、むしろ関連分野の行政検査結果等の疫

学的な分析研究を推進し、新たな行政スタイルの政策決定に資するエビデンスを提供することにより、ボトムアップ的に改革を図るべきと考える。そして、現状では、そうしたエビデンスの提供は、地方衛生研究所の研究部門が担うことが最も適当である。

#### E. 結論

本年度の研究を通じて、地方自治体は、多様化・複雑化する健康危機に迅速的確に対応し、事前予防型政策を推進するために、疫学機能を組織的に強化することが必要である。効果的であることが明らかとなった。

しかしながら、疫学機能強化のためには新たな保健所・本庁・地衛研の役割分担を再検討する必要がある。

そこで、多くが地方感染症情報センター機能を有し、試験検査部門と疫学調査部門の密接な連携が可能であり、理化学分野における疫学機能の拡大に寄与できる地方衛生研究所

へ疫学機能を集約化することが、最も効果的かつ効果的であると考えられる。

#### F. 研究発表

1. 灘岡陽子、梶原聡子、池田一夫、阿保満、神谷信行他、東京都におけるインフルエンザ定点追加指定とサーベイランス結果への影響、第22回公衆衛生情報研究協議会研究会(2009年1月)
2. 塩原正枝、鈴木智之他、群馬県感染症発生動向調査で報告された百日咳に対する医療機関へのアンケート調査結果（ワクチン接種歴と診断方法）、第22回公衆衛生情報研究協議会研究会(2009年1月)
3. 八幡裕一郎、ルーモアサーベイランスによるアウトブレイクの探知と対策、第22回公衆衛生情報研究協議会研究会(2009年1月)
4. 岸本剛他、埼玉県におけるコレラ菌食中毒事例について、第22回公衆衛生情報研究協議会研究会(2009年1月)
5. 川本薫、岸本剛他、O157等原因調査事業による県内散発患者間の共通性の検討、第22回公衆衛生情報研究協議会研究会(2009年1月)