

201237004A

厚生労働科学研究費補助金
健康安全・危機管理対策総合研究事業

地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の
確立と、その精度管理の実施、及び疫学機能
の強化に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 調 恒 明
山口県環境保健センター

平成25(2013)年 3月

目 次

I 総括研究報告

地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、その精度管理の実施、及び
疫学機能の強化に関する研究

調 恒明 ----- 1

II 分担研究報告

1 リアルタイムPCR法を用いた食水系感染症原因細菌の網羅的検査法と精度管理
(細菌部門) 後藤 良一 ----- 7

2 原因不明ウイルス感染症に対する迅速網羅的診断法とその精度管理法の開発
(ウイルス部門) 高橋 和郎 ----- 19

3 健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に
関する研究
(理化学部門) 田中 敏嗣 ----- 25

4 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究
(疫学部門) 小澤 邦寿 ----- 43

III 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 59

IV 研究成果の刊行物・別刷 ----- 59

I 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

平成 24 年度 総括研究報告書

地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、
その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究

研究代表者 調 恒明 山口県環境保健センター所長

研究要旨：

本研究では、地方衛生研究所の検査機能、疫学調査機能強化のために細菌、ウイルス、理化学の検査、及び疫学部門の研究分担班を構成し、食中毒菌、呼吸器疾患原因ウイルス、中枢神経系疾患原因ウイルスの網羅的迅速検査法の開発と検査結果の標準化、主に LC-MS/MS を用いた自然毒の検出法、地方衛生研究所における疫学データの分析・情報発信の強化について研究を行った。

1. 細菌部門

平成 24 年度は、食中毒・感染症等の事例から得た糞便試料を用いて、検査精度の検討を行った。RFBS24V の結果は細菌培養法の結果とほぼ同程度の検出感度を示したことから、本システムは、網羅的迅速検査法として実用的であることが証明された。

2. ウイルス部門

平成 24 年度は、multiplex PCR 法によるウイルスの検出法を 4 つの参加機関において急性呼吸器疾患（80 例）、脳神経疾患（20 例）の小児から得られた臨床検体（咽頭ぬぐい液、髄液）から抽出した RNA について 4 つの参加機関で PCR を行い、結果の一致率を検討した。呼吸器の検体については 73%、神経系の検体については 85% の一致率であった。

3. 理化学部門

地方衛生研究所のネットワークを活用し、全国での自然毒による食中毒の事例や検査対応例をデータベース化し、情報の共有を図り、迅速な対応に役立つツールの構築を検討した。また、化学物質による食中毒事例への検査対応として平成 24 年度はトリカブト毒及びチョウセンアサガオ毒の LC-MS/MS による迅速試験法を検討した。

4. 疫学部門

1) 人材育成：平成 22～23 年度の研修を踏まえて、各自治体の実状に併せたオーダーメイド研修プログラムを作成した。また、同プログラムの活用を含めた疫学人材育成のための研修のあり方を提案した。

2) 疫学機能強化のためのツールの開発：昨年までの研究から、保健所毎の塗り分け地図を作成するソフトへの要望が多いことがわかった。本研究では、感染症の発生状況に関する地図を描く方法であって、その方法により多くの地方感染症情報センターが、特に知識がなくても地図を用いた感染症情報の提供ができるようなシステム（業務支援ツール）を開発し、試行・実践した。

研究分担者

後藤 良一	北海道立衛生研究所	所長
高橋 和郎	大阪府立公衆衛生研究所	副所長
田中 敏嗣	神戸市環境保健研究所	所長
小澤 邦寿	群馬県衛生環境研究所	所長

A.研究目的

地方衛生研究所は、地方行政のフロントラインにおける試験検査機関として、感染症食中毒など健康危機事例において、原因究明のための検査を迅速且つ正確に行う使命がある。また、検査結果を行政機関に提出するのみならず、結果を分析し、科学的見地から対策に対する提言を行うことが重要である。本研究では、地方衛生研究所の検査機能、疫学調査機能強化のために細菌、ウイルス、理化学の検査、及び疫学部門の研究分担班を構成し、病原体については食中毒菌、呼吸器疾患原因ウイルス、中枢神経系疾患原因ウイルスの網羅的迅速検査法の開発と検査結果の標準化、化学物質については主に LC-MS/MS を用いた自然毒の検出法を検討し、疫学機能強化については、地方衛生研究所における疫学データの分析・情報発信の強化を目的として研究を行った。

B.研究方法

B-1. 細菌部門 リアルタイム PCR 法を用いた食水系感染症原因細菌の網羅的検査法と精度管理

平成 23 年度までに、開発したリアルタイム PCR を用いてインターカレーター法により食水系感染症原因菌の 24 病原

遺伝子を網羅的に検出する迅速検査法 RFBS24 ver.5 を用いて、5 参加機関において実際の食中毒事例に応用し、従来の培養法を比較することにより感度の検証を行った。

それらの菌種は *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, enterotoxigenic *Bacillus cereus*, emetic toxin producing *B. cereus*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, astA positive *Escherichia coli*, enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), diffusively adhesive *E. coli* (DAEC), *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Providencia alcalifaciens* の 24 菌株である。

B-2. ウイルス部門 原因不明ウイルス感染症に対する迅速網羅的診断法とその精度管理法の開発

平成 21 年度までに開発した multiplex PCR 法を用い、参加 4 機関で 100 の臨床

検体から RNA を抽出し、同一検体についてウイルス遺伝子の検出を行い、検出の一致率を検証した。

B-3. 理化学部門 健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究

1. 自然毒による中毒事例の集積

地方衛生研究所職員専用ホームページにある既存のデータベース「自然毒中毒事例情報システム」を活用し、事例の集積と情報共有を図る。

2. LC-MS/MS によるアコニチン等 4 物質の迅速一斉試験法の開発検討

ストリカプトの有毒成分アコニチン(C₃₄H₄₇NO₁₁, MW:645.74)、メサコニチン(C₃₃H₄₅NO₁₁, MW:631.72)、チョウセンアサガオ有毒成分アトロピン(C₁₇H₂₃NO₃, MW:289.37)、スコポラミン(C₁₇H₂₁NO₄, MW:303.35)を分析対象物質とし、検査法を検討するとともに、ゴボウに対する添加回収試験を行った。

B-4. 疫学部門 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究

B-1. 研修についての検討

感染症情報センターの基盤業務である感染症発生動向調査を基準に項目を分類した。また、実践性として保健所等関係機関向けの研修立案及び講師等の技術支援のモデルを検討した。

B-2. 地方感染症情報センターに必要な疫学機能の強化

ニーズ調査：中国四国ブロック疫学研修会および連携会議（地域保健総合推進事業）

の場を利用し、各自治体の感染症情報担当者がどのように地図を活用しているか、問題点、地図作成ツールに対する要望などについて調査した。

感染症の地図作成：感染症発生動向調査のデータをもとに、簡単な操作で感染症の地図を作成する方法を試行した。作成する地図は、需要が高いと考えられる、定点把握疾患の報告数により地域を塗り分ける地図とした。

C. 研究結果

C-1. 細菌部門 リアルタイム PCR 法を用いた食水系感染症原因細菌の網羅的検査法と精度管理

今回使用した糞便試料は、食中毒、感染症および散発事例糞便試料から、74事例324検体、ノロウイルス陰性試料40検体であった。

カンピロバクターでは、培養法ならびにRFBS24V法ともに同数の検出は、13事例中9事例11項目であった。培養法の検出数が多かったものは13事例中3事例3項目、RFBS24V法の検出数が多かったものは13事例中2事例3項目であった。

サルモネラでは、培養法ならびにRFBS24V法ともに同数の検出は、6事例中3事例であった。培養法の検出数が多かったものは6事例中3事例であった。

C-2. ウイルス部門 原因不明ウイルス感染症に対する迅速網羅的診断法とその精度管理法の開発

研究協力者となっている4つの参加機関において、作製した網羅的迅速マルチプ

レックスPCR診断法を用いて呼吸器感染症および中枢神経感染症患者検体について病原体の検出を行い、検出率等を検討した。

中枢神経系ウイルス：20 検体のEV検査において4地衛研での一致率85%(17/20)であった。

呼吸器ウイルス：各地衛研の検体に対して他の3衛研がともに検出可能であった検体の一致率は、愛知、山口、福岡、大阪の検体についてそれぞれ80, 60, 80,70%(平均73%)であった。

C-3. 理化学部門 健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究

1. 自然毒による中毒事例の収録件数

収録総件数は273件である。内訳は、魚類：88件（ふぐ毒71, シガテラ9など）、貝・蟹類：37件（麻痺性15, テトラミン14など）、キノコ：62件、山野草：37件、栽培植物：32件、海藻：1件、その他（ヒスタミンなど）：16件であった。

2. LC-MS/MSによるアコニチン等4物質の迅速試験法の開発検討

抽出法は平成23年度に実施したリコリン試験法が良好な結果が得られたことから、アコニチン等4物質についても同じ方法を用いた。

LCの条件としては、ODS系、多機能系カラムが有効であった。

C-4. 疫学部門 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究

1. 人材育成

平成22～23年度の研修を踏まえて、各自治体の実状に併せたオーダーメイド研修プログラムを作成した。また、同プログラムの活用を含めた疫学人材育成のための研修のあり方を提案した。

2. 地方感染症情報センターの疫学情報機能強化

昨年までの研究から、保健所毎の塗り分け地図を作成するソフトへの要望が多いことがわかった。本研究では、感染症の発生状況に関する地図を描く方法であって、その方法により多くの地方感染症情報センターが、特に知識がなくても地図を用いた感染症情報の提供ができるようなシステム（業務支援ツール）を開発し、試行・実践した

3. 感染症情報センター職員の研修会

感染症情報センター担当者の学歴や知識の保有状況は、感染症情報センター業務が専門的知識・技術に基づいて実施されていないことを示唆していた。また、研修会が知識の保有に有効であったことから、研修会の実施を提言する。

D. 考察

D-1. 細菌部門 リアルタイムPCR法を用いた食水系感染症原因細菌の網羅的検査法と精度管理

開発した方法は、地方衛生研究所で幅広く使用できるものとなったと考えている。ドイツにおけるO104の食中毒事例では、患者便からDNAを調整し、リアルタイムPCR法により直接検出する方法

が迅速性に優れていることから有効であったと報告されている。この事からも、従来の培養法に加えて PCR 法による検出を導入することは重要である事が示されている。

D-2. ウイルス部門 原因不明ウイルス感染症に対する迅速網羅的診断法とその精度管理法の開発

各地衛研の呼吸器感染症検体に対しての3衛研がともに検出可能であった一致率は73%とやや低い値であった。この解釈として、各地衛研での検出感度の差は上下10倍以内の範囲ではあるが、検体中に十分なウイルス遺伝子量が存在すれば検出は容易であるものの、比較的少量しか存在しない場合は、検出感度の差が検体からのウイルスの検出の可否に影響したことが考えられる。今後、感度の向上が望まれる反応系もあった。改訂作業中の病原体検出マニュアルに記載するなど、地方衛生研究所への普及を図っていく予定である。

D-3. 理化学部門 健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究

19 機関と多くの参加機関があり、自然毒の検出法の開発、標準化に関するニーズが極めて高いことが示唆された。今回検討した LC-MS/MS による迅速試験法は約 2 時間でトリカブト毒、チョウセンアサガオ毒を検出、定量することができ、また、精度管理も良好な結果であったこ

とから、健康危機管理への迅速、的確な対応に有効な手段として活用が期待される。

D-4. 疫学部門 疫学情報解析機能の強化と人材育成に関する研究

感染症に関してわかりやすい情報を発信することは地方自治体にとって今後益々重要になってくる。一方、感染症情報センターの業務は、マニュアル化しにくいものであり、実地的な要素がある研修が必須である。今後も、感染症情報センターの業務の重要性を認識し、人材の育成確保に努力する必要がある。

E. 結論

公衆衛生行政における地方衛生研究所の活動の重要性は、新型インフルエンザ、冷凍ギョウザの農薬汚染、麻疹排除における検査対応、福島原発事故に伴う環境、及び食品の放射能測定など、最近の健康危機事例への対応によって再認識されている。

この研究班では、食中毒菌の網羅的迅速検査法を開発しその実証を行い、実際の食中毒事例に応用可能であることが示された。ウイルスの検査法についても multiplex PCR 法の有用性が示され、臨床検体に応用し十分な検出感度があることが検証された。これらの方法が地方衛生研究所において使用されれば検査の迅速性、正確性の向上に大きく貢献するであろう。LC-MS/MS による自然毒検出法についても、地方衛生研究所の関心は極めて高くこの検査法の開発・共有化によ

り検査法の情報共有、標準化がなされることが期待される。感染症情報センターは、新型インフルエンザをはじめとする新興感染症、薬剤耐性菌の院内感染等における自治体の対応、正確な情報発信において重要な役割を果たしていくべきであり、本研究班における活動が機能強化の一助となることが期待される。

F.健康危機情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

○鈴木智之，神谷信行，八幡裕一郎，尾関由姫恵，岸本剛，灘岡陽子，中西好子，吉村健清，島田智恵，多田有希，調恒明，小澤邦寿

「地方感染症情報センター担当者に対する研修プログラムの需要」日本公衆衛生雑誌、印刷中

2. 学会発表

○江藤良樹，川瀬 遵，池田徹也，山口敬治，嶋 智子，亀山光博，綿引正則，堀川和美，福島 博，後藤良一，調 恒明：網羅的迅速遺伝子検査システムRapid Foodborne Bacteria Screening 24の改良と検出限界の検討，第33回日本食品微生物学会学術総会，福岡，OCT 2012 (1A09)

○川瀬 遵，江藤良樹，池田徹也，山口敬治，綿引正則，嶋 智子，亀山光博，飯田奈都子，堀川和美，福島 博，後藤良一，調 恒明：改良した網羅的迅速遺伝子検査システムRapid Foodborne Bacteria Screening 24による食中毒事例等の検討，第33回日本食品微生物学会学術総会，福

岡，OCT 2012(1A10)

○池田徹也，山口敬治，嶋智子，綿引正則，川瀬 遵，亀山光博，江藤良樹，堀川和美，福島 博，後藤良一，調 恒明：網羅的迅速遺伝子検査システムRFBS24を応用したmultiplex real-time PCRによる*stx1*，*stx2*，*eae*遺伝子検査法，第33回日本食品微生物学会学術総会，福岡，OCT 2012 (2B10)

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

○リアルタイムPCR法による食品媒介病原菌の網羅的迅速検出方法
(特願2009-096633)

2.実用新案登録

該当なし

3.その他

該当なし

Ⅱ 分担研究報告書

地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、
その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究
ーリアルタイムPCR法を用いた食水系感染症原因細菌の網羅的検査法と精度管理ー

研究代表者	調 恒 明	山口県環境保健センター	所長
研究分担者	後 藤 良 一	北海道立衛生研究所	所長
研究協力者	山 口 敬 治	北海道立衛生研究所	部長
	池 田 徹 也	北海道立衛生研究所	主査
	綿 引 正 則	富山県衛生研究所	主幹研究員
	嶋 智 子	富山県衛生研究所	主任研究員
	飯 田 奈都子	静岡県環境衛生科学研究所	主任
	川 瀬 遵	島根県保健環境科学研究所	主任研究員
	亀 山 光 博	山口県環境保健センター	研究員
	堀 川 和 美	福岡県保健環境研究所	病理細菌課長
	江 藤 良 樹	福岡県保健環境研究所	主任技師

研究要旨 インターカレーター法による食水系感染症原因菌の迅速検査法について、リアルタイムPCR機器を用いて網羅的迅速検査を開発してきた。平成21年度までに24病原遺伝子を網羅的に検出するキットを作成した（Rapid Foodborne Bacteria Screening 24: RFBS24）。本研究では、平成22年度にRFBS24IV（version 4）を、平成23年度にRFBS24V（version 5）を開発した。平成24年度は、食中毒・感染症等の事例から得た糞便試料を用いて、検査精度の検討を行った。RFBS24Vの結果は細菌培養法の結果とほぼ一致し、本システムは、網羅的迅速検査法として実用的であることが証明された。

A. 研究目的

感染症を惹起する微生物は、創傷感染、呼吸器感染、消化器感染、性感染等様々な感染経路を通じて人体に侵入する。

そのうち消化管感染症は食品や水を介して感染が起きるため、食水系感染症(Food-borne infectious diseases)ともいわれる。日本の法制度上、食水系感染症は、伝播力の強い疾病(伝染病)と食中毒に分類された。いわ

ゆる食中毒は食品中の「毒」で生体に影響を与えるが、日本における法制度上の「食中毒」は狭義の食中毒(Food intoxication)のほか、食品・施設を介する感染性胃腸炎の様相を呈することが多く、感染拡大防止や危害の未然防止など公衆衛生の観点から、早急な原因物質ならびに原因食品等の究明が求められる。

「食中毒」原因細菌は、厚生省(当時)によ

り、昭和27年にチフス、パラチフスA以外のサルモネラと黄色ブドウ球菌が指定されて以降、4回に渡り追加指定されてきた。最近では、平成11年に6菌種追加され、合計21菌種/菌群によるものが報告すべき疾病として指定されている¹⁾。

現在、「食中毒」事例発生時に行われている原因物質究明調査は培養法が主である。全ての食中毒細菌を対象として培地を調整・準備し検査を実施している。そのため、事例が発生すると、膨大な量と種類の培地が消費され、また人的浪費も大きい(表1)。

近年、各種病原細菌に特有の遺伝子配列が解明され、PCR等遺伝子増幅法が感染症の原因究明に広く利用されている。現在は、1サイクル毎に蛍光を測定しPCR反応をモニターするリアルタイムPCR機器が導入されている。リアルタイムPCR法の中で、SYBR Greenを用いたインターカラー法(以下、SG-PCR法)は、DNA複製時に試薬が取り込まれ蛍光を発するため菌種毎のプローブを必要とせず、安価に実施できる利点を持っている。

福島ら²⁾はLight Cyclerを用いたインターカラー法による食中毒細菌特異遺伝子部位検出法を開発した。その後、リアルタイムPCR機器を用いた方法³⁾を検討し改良を行った。その結果、平成19-21年度厚生労働科学研究費助成金(地域健康危機管理)研究事業「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」の成果として、Rapid Foodborne Bacteria Screening 24(以下、RFBS24)が作成された⁴⁾(ver.3)。以後、当研究班で改良を加えてきたが、平成22年度にはRFBS24IV(ver.4)が作成され、それを用いて感度の検討を行った。その結果、一部増幅しない遺伝子が

あったことから、更に改良を加えることが必要であると判明した。

各地方衛生研究所等において配備されているリアルタイムPCR機器を用いた試験検査を行うためにも、検出感度の良い試薬キットが求められることから、RFBS24IVの欠点を補い検出感度向上を図ったRFBS24V(ver.5)を作成した。

また、近年、リアルタイムPCR機器が保健所等にも配備されるようになった。これらの機器を有効に使用するために、検査現場における迅速検査の必要性を勘案し、特定の遺伝子群のみをmultiplexで安価に実施する方法を検討した。

RFBS24の概説

RFBS24は、試料DNA中の病原遺伝子24種を同時に検査できるシステムをキット化したものである。Fukushima *et al.*⁴⁾が考案した。基本構成はSYBR Greenを用いたintercalator multiplex real-time PCRである。

96ウェルプレートを使用し、1試料は1列のセットで検査する。病原遺伝子3種ならびにPCR増幅確認用内部標準(Internal Amplification Control: IAC)用primer計4組を1ウェルにセットし1列8ウェル、計24種の対象遺伝子を同時に検査できる。基本列は第1列から5列である。第1列は陰性対照の、第2列はIACの、第3～5列は陽性対照の試験系を検証する。試料DNAは第6列目から第12列目まで7列使用することが可能である(図1)。すなわち、7試料について24種の病原遺伝子を同時に網羅的に検出することができる。機器により異なるが、通常PCR過程は1時間～1時間50分で終了し、サイクル毎に遺伝子増幅の有無を確認することができる。

なお、これにより検出できる菌種は次のと

おりである。 *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, enterotoxigenic *Bacillus cereus*, emetic toxin producing *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, astA positive *Escherichia coli*, enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC), diffusively adhesive *Escherichia coli* (DAEC), *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Providencia alcalifaciens* (表2)。

これらの菌種の検出に当たり、発症初期の菌排出が盛んな患者糞便を対象に、すなわち便中菌量が比較的高い状態を想定してシステムを構築してある。食品・食材や環境中の対象遺伝子を検出するには、あらかじめ充分量の菌数に達するまで増菌捜査が必要であるが、これにはそれぞれの種を増菌する培地が必要となる。

B. 研究方法

本年度は食中毒・感染症をはじめ原因不明ではあるものの食水系感染症を疑う事例から得た糞便を用い、RFBS24Vの性能評価を行った。

材料

1. 対象とした試料

今回使用した糞便試料は、食中毒、感染症および散発事例糞便試料から、74事例324検体、ノロウイルス陰性試料40検体であった。

それぞれの自治体において「人を対象とする研究に関する倫理審査」を経た試料を対象とした。

2. DNA抽出

DNA抽出は、QIAamp DNA Stool Mini Kit(QIAGEN)を用い、製造メーカーの使用説明書にしたがって行った

3. PCR試薬

次の試薬を使用した。試薬は同一ロットのものを使用した。

○ SYBR® Premix Dimererazer® (タカラバイオ株式会社)

4. 試薬キット

試薬キットは、島根保健環境科学研究所で一括作成し、各施設に配布し使用した。

5. サーマルサイクラー機器

使用した機器は次のとおりであった。

○7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems: 以下, 7500FAST)

○ Thermal Cycler Dice® Real Time System TP800 (タカラバイオ株式会社:以下, TP800)

○ 7900HT Fast Real time PCR system (Applied Biosystems: 以下, ABI7900)

方法

参加した自治体の保健所・地方衛生研究所等において、事例発生毎に実施した培養検査結果を集積し、同時に、もしくは後日に地方衛生研究所で実施したRFBS24V法による結果とを比較した。培養法は、それぞれの自治体で行われている方法で実施し、B.研究方法の2. DNA抽出の項で記述した方法で、糞便から抽出したDNAを用いてRFBS24V法を実施した。

C. 研究結果および考察

1. 原因物質調査結果と行政判断

原因究明調査時に、原因物質が検出できた事例でも、疫学調査結果を併せて行政機関が原因物質を特定しない場合がある。今回、複

数の事例を検討した細菌種は6種、すなわち、カンピロバクター、ウェルシュ菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌、腸管出血性大腸菌および病原大腸菌であった。それぞれ、行政判断で原因物質を特定した事例数/病原体検査で原因物質を検出した事例数で表現すると、カンピロバクター7/13、ウェルシュ菌3/4、サルモネラ4/6、黄色ブドウ球菌2/3、腸管出血性大腸菌3/3、その他の病原大腸菌1/2であった(表3)。

2. 培養法とRFBS24V法との比較

RFBS24V法の結果は、IACのピークの1/2の高さのピーク出現をもって陽性とし、陽性と判定したものののみを評価対象とした。各種事例から得られた試料を用いて、培養法とRFBS24V法とを比較した。事例毎の結果を表5-1~3に、まとめたものを表4に示した。表5中で()内に示すものは増菌培養を行ったものである。

(1)カンピロバクター

カンピロバクターでは、培養法ならびにRFBS24V法ともに同数の検出は、13事例中9事例11項目であった。培養法の検出数が多かったものは13事例中3事例3項目、RFBS24V法の検出数が多かったものは13事例中2事例3項目であった。カンピロバクターは、*C. jejuni*ならびに*C. coli*の2種の検出を行った。2つの方法で2菌種を検出したものは3事例、一方(RFBS24V法)のみ2菌種検出したものは1事例であった。

(2)ウェルシュ菌

ウェルシュ菌については、多くの例で増菌培養を行っており、また、直接培養、増菌培養いずれもウェルシュ菌が確認されると*cpe*遺伝子検出を行った。PCRにより*cpe*遺伝子を検出した検体はアスタリスク(*)をつけて区別した。*cpe*遺伝子の検出による評価では、培養法ならびにRFBS24法ともに同数の検出はなく、どちらかが多い事例が2例ずつ

であった。

表5-1原因物質の項でCPE?と記した3事例は、培養法で検出された菌は*cpe*遺伝子を保有していなかった。1事例から1検体のみRFBS24V法で*cpe*遺伝子を検出したが、優勢な遺伝子検出とはいえ、これら3事例から分離したウェルシュ菌は事例に関与しないものと考えられた。

(3)サルモネラ

サルモネラでは、培養法ならびにRFBS24V法ともに同数の検出は、6事例中3事例であった。培養法の検出数が多かったものは6事例中3事例であった。

(4)黄色ブドウ球菌

培養法ならびにRFBS24V法ともに同数の検出は、3事例中2事例であった。

(5)腸管出血性大腸菌、病原大腸菌

*stx*遺伝子でみるかぎり、培養法ならびにRFBS24V法ともに同数の検出はなかった。しかし、いずれも1検体ずつの差であり、ほぼ差のないレベルと考えられた。その他の病原大腸菌は1事例にRFBS24V法の各種遺伝子検出数が多かった。

(6)一例のみの事例

一例のみの事例については、リステリア以外、検出数が培養法ならびにRFBS24V法ともに同数であった。リステリアの事例は、食品衛生法第6条違反食品喫食者便であり、また、凍結保存期間が長期であったこともRFBS24V法で検出数が低かった要因であると思われる。

3. ウイルスが原因ならびに原因が不明な事例

培養法では、ウェルシュ菌、黄色ブドウ球菌、セレウス菌が散見され、RFBS24V法では*astA*、*aggR*、*daaD*、*eae*遺伝子をはじめ、黄色ブドウ球菌、セレウス菌の遺伝子が検出された。ウェルシュ菌、黄色ブドウ球菌、セレウス菌は常在菌でもあることから、培養法を用いても検出されたことと考えられる。

一方、*astA*遺伝子をはじめとする腸管凝集接着性大腸菌の各種遺伝子は、健康人からも散発的に検出されるといわれている^{5・6}。今後、case-control study を行い、これら遺伝子の疫学的評価を行う必要があるだろう。

糞便にはPCR妨害物質が含まれているため、専用のDNA抽出キットを使用した。しかし、これはDNA抽出効率に変動があり、また、消化管感染症の患者便は、水様下痢便から固形に近い便まで性状が異なるため、均一な抽出が期待できない。そうした中で、培養法と同等レベルの検出ができたことは、RFBS24Vの性能が、実験レベルに留まらず、充分実用レベルにあると考えられる。

D. 結論

平成23年度に開発した、24種の病原遺伝子を網羅的に検出するRapid Foodborne Bacteria Screening 24Vを用いて、感染症・食中毒などの事例で得た便を用いて、培養法の比較を行った。培養法、RFBS24V法いずれも同数の病原体もしくはその遺伝子を検出した事例が多かった。一方のみ検出が多かった事例もみられたが、2つの方法の比較で一方が優勢に良いという事実はなかった。RFBS24Vは、培養法とほぼ同じレベルで病原体もしくはその遺伝子を検出できると考えられ、実用に耐える方法であると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

○江藤良樹, 川瀬 遵, 池田徹也, 山口敬治, 嶋 智子, 亀山光博, 綿引正則, 堀川和美, 福島 博, 後藤良一, 調 恒明: 網羅的迅速遺伝子検査システムRapid Foodborne Bacteria Screening 24の改良と検出限界の

検討, 第33回日本食品微生物学会学術総会, 福岡, OCT 2012 (1A09)

○川瀬 遵, 江藤良樹, 池田徹也, 山口敬治, 綿引正則, 嶋 智子, 亀山光博, 飯田奈都子, 堀川和美, 福島 博, 後藤良一, 調 恒明: 改良した網羅的迅速遺伝子検査システムRapid Foodborne Bacteria Screening 24による食中毒事例等の検討, 第33回日本食品微生物学会学術総会, 福岡, OCT 2012 (1A10)

○池田徹也, 山口敬治, 嶋智子, 綿引正則, 川瀬 遵, 亀山光博, 江藤良樹, 堀川和美, 福島 博, 後藤良一, 調 恒明: 網羅的迅速遺伝子検査システムRFBS24を応用したmultiplex real-time PCRによる*stx1*, *stx2*, *eae*遺伝子検査法, 第33回日本食品微生物学会学術総会, 福岡, OCT 2012 (2B10)

F. 知的財産権の出願・登録状況

Rapid Foodborne Bacteria Screening 24について特許出願中 (特許出願元: 島根県)

G. 文献

1) 熊谷進: モダンメディア, 47(7), 181-187, 2001

2) Fukushima, H., Tsunomori, Y., and

Seki, R.: Duplex Real-Time SYBR Green PCR Assays for Detection of 17 Species of Food- or Waterborne Pathogens in Stools, *J. Clinical Microbiol.*, 41, 5134-5146, 2003

3) 福島博, 角森ヨシエ: リアルタイムPCR法による食中毒細菌の迅速スクリーニングの検討, *感染症学雑誌*, 79, 644-655, 2005

4) Fukushima, H., Kawase, J., Etoh, Y., Sugama, K., Yashiro, S., Iida, N., Yamaguchi, K.: Simultaneous Screening of 24 Target Genes of Foodborne Pathogens in 35 Foodborne Outbreaks Using Multiplex Real-time SYBR Green PCR Analysis, *Inter. J. Microbiol.*, volume 2010, article ID864817, 18 pages, 2010

5) 石畝 史, 京田芳人, 望月典郎, 堀川武

夫, 石森治樹, 大森聖円, 片山敏夫, 高塚英男: *astA*遺伝子保有大腸菌O169:HNMが原因と考えられた食中毒事例-福井県, 病原体検出情報, 25, 262-263, 2004

6) 森屋一雄, 角 典子, 中尾昌弘, 山崎 貢, 齊藤 眞, 伊藤健一郎: 散発下痢症患者及び乳幼児由来大腸菌における局在性及び凝集性付着大腸菌 (EPEC, EAaggEC) 関連遺伝子, *eaeA*, *aggR*, *astA*の保有状況, 感染症学雑誌, 74, 134-142, 2000

表1 我が国における細菌性食中毒の発生状況

菌種	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012*
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	469	428	447	491	558	645	416	335	509	345	361	336	238
<i>Salmonella</i> spp.	518	361	465	350	225	144	124	89	99	67	73	67	30
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	422	307	229	108	205	113	71	28	17	14	36	9	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	87	92	72	59	55	63	61	43	58	41	33	37	42
<i>Clostridium perfringens</i>	32	22	37	34	28	27	35	20	34	20	24	24	23
<i>Bacillus cereus</i>	10	9	7	12	25	16	18	5	21	13	15	10	2
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	16	24	13	12	18	24	24	18	17	26	27	25	14
その他の <i>Escherichia coli</i>	203	199	83	35	27	25	19	9	12	10	8	24	4
<i>Clostridium botulinum</i>			1				1	1			1		1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	4	8		1								2
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1	5	1	2	2					1				1
<i>Vibrio cholerae</i>	1	1	2						3				
<i>Shigella</i> spp.	1	3	2	1	1		1		3		1	7	
その他の細菌	18	18	9	6	9	8	4	5	4		1	4	5
総事例数	1,783	1,469	1,377	1,110	1,152	1,065	774	553	778	536	580	543	371

2000～2011年は確定値、2012年は速報値を集計

出典: <http://www.mhlw.go.jp/topics/shokuchu/04.html>

表2 RFBS24で検出する菌種ならびに対象遺伝子

	菌種	対象遺伝子
1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i>
2	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>gyrB</i>
3	Enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	<i>stx1, stx2, eae</i>
4	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	<i>stx2f, eae, astA</i>
5	<i>Campylobacter jejuni</i>	specific
6	TRH positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (TRH1)	<i>trh1</i>
7	TRH positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (TRH2)	<i>trh2</i>
8	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (LT)	<i>lt, stp</i>
9	Emetic <i>Bacillus cereus</i>	<i>ces</i>
10	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>ompW</i>
11	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>
12	Enterotoxigenic <i>B. cereus</i>	<i>nheB</i>
13	<i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i>
14	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	<i>aggR</i>
15	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>
16	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ST)	<i>sth</i>
17	TDH positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>
18	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>gyrB</i>
19	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	<i>ipaH</i>
20	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>ahh1</i>
21	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>yadA</i>
22	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>yadA</i>
23	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>
24	Deffusely adherent <i>Escherichia coli</i>	<i>daaD</i>

表3 使用した試料の由来
 複数事例における原因究明確認ならびに行政判断事例数

	原因究明調査で確認された事例数	行政機関で断定された事例数
カンピロバクター	13	7
ウェルシュ菌	7	3
サルモネラ	6	4
黄色ブドウ球菌	3	2
腸管出血性大腸菌	3	3
病原大腸菌	2	1

表4 培養法とRFBS24法による検出数の比較

	事例数	培養法とRFBS24法による検出数の比較		
		同じ検出数	培養法が多い	RFBS24法が多い
カンピロバクター	13	9	3	2
ウェルシュ菌	4		2	2
サルモネラ	6	3	3	
黄色ブドウ球菌	3	3		
腸管出血性大腸菌	3		2	1
病原大腸菌	2	1		1
<i>P. alcalifaciens</i>	1	1		
<i>P. shigeloides</i>	1	1		
<i>B. cereus</i>	1	1		
<i>L. monocytogenes</i>	1		1	
<i>Y. enterocolitica</i>	1	1		

カンピロバクターは2種の菌種が同時に検出された事例があった

腸管出血性大腸菌は *stx* gene で比較, ウェルシュ菌は *cpe* gene で比較した.

表5-1 培養法とRFBS24V法の比較

(1) カンピロバクター, ウェルシュ, サルモネラ

行政対応 取扱	行政結果 原因物質	原因 物質	菌分離			RFBS24結果												
			1	2	3	1	2	3	4	5								
感染症		Campy	C. jejuni	2/2	astA	1/2		C. jejuni	1/2	astA	1/2	S. aureus	1/2					
食中毒	カンピロバクター・ジェジュニ		C. jejuni	4/5	S. aureus	4/5	DAEC	1/5	C. jejuni	4/5	S. aureus	1/5	DAEC	1/5				
食中毒	カンピロバクター・ジェジュニ		C. jejuni	4/7	ウェルシュ	1/7	S. aureus	1/7	C. jejuni	3/7	eae	1/7	aggR	1/7	astA	1/7		
食中毒	カンピロバクター		C. coli	2/2					C. coli	2/2	C. jejuni	2/2	astA	1/2				
食中毒	カンピロバクター		C. jejuni	3/4	C. coli	1/4	S. aureus	3/4	C. jejuni	2/4	C. coli	1/4	astA	2/4				
食中毒	カンピロバクター		C. coli	2/4	ウェルシュ	1/4	S. aureus	2/4	C. coli	2/4								
食中毒	カンピロバクター		C. jejuni	3/10	C. coli	2/10	ウェルシュ	3/10	C. jejuni	3/10	C. coli	2/10	eae	2/10	astA	1/10	DAEC	1/10
有症苦情	カンピロバクター		C. jejuni	1/2					C. jejuni	1/2								
有症苦情			C. jejuni	1/1					C. jejuni	1/1	astA	1/1						
有症苦情			C. jejuni	3/6					C. jejuni	2/6	Salmonella	2/6	A. hydro	1/6				
有症苦情			C. jejuni	1/4	C. coli	1/4			C. jejuni	2/4	C. coli	2/4						
有症苦情			C. jejuni	2/3					C. jejuni	2/3	astA	1/3						
有症苦情			C. jejuni	1/1	S. aureus	1/1			C. jejuni	1/1	astA	1/1						
食中毒	ウェルシュ菌		OPER	ウェルシュ*(5)	7/7				ウェルシュ	7/7	S. aureus	2/7	astA	1/7				
食中毒	ウェルシュ菌	ウェルシュ*(4)		5/6					ウェルシュ	3/6	stp & sth	1/6						
食中毒	ウェルシュ菌	ウェルシュ*		3/7					ウェルシュ	5/7	A. hydro	3/7	S. aureus	1/7	DAEC	1/7		
有症苦情		(ウェルシュ*)		6/7	(S. aureus)	3/7			ウェルシュ	2/7								
有症苦情		OPER?	(ウェルシュ)	2/5				astA	5/5	eae	1/5	ウェルシュ	1/5					
有症苦情			(ウェルシュ)	2/5	(S. aureus)	3/5	(Salmonella)	1/5	astA	5/5	eae	1/5	A. hydro	1/5				
有症苦情			ウェルシュ	2/7	(S. aureus)	1/7			ND									
食中毒	サルモネラ	SAL	Salmonella	7/12	S. aureus	4/12	ウェルシュ	2/12	Salmonella	5/12	S. aureus	1/12	astA	2/12	A. hydrophila	1/12		
食中毒	サルモネラ		Salmonella	2/3	S. aureus	1/3			Salmonella	2/3	DAEC	1/3	ウェルシュ	1/3				
有症苦情	サルモネラ		Salmonella	1/3					Salmonella	1/3	astA	1/3						
有症苦情	不明		Salmonella	2/2					Salmonella	1/2								
有症苦情			Salmonella	2/2					Salmonella	2/2								
他県食中毒関連調査			Salmonella	3/6	(B. cereus)	1/6			Salmonella	1/6								

表5-2 培養法とRFBS24V法の比較

(2) 黄色ブドウ球菌, 腸管出血性大腸菌ほか及びウイルス

行政対応 取扱	行政結果 原因物質	原因 物質	菌分離			RFBS24結果												
			1	2	3	1	2	3	4	5								
食中毒	黄色ブドウ球菌	STAPH	S. aureus	2/2			S. aureus	2/2										
食中毒	黄色ブドウ球菌		S. aureus	2/5			S. aureus	2/5	Salmonella	4/5	astA	1/5						
不明			S. aureus	1/3	ウエルシュ	1/3		S. aureus	?1/3									
食中毒	腸管出血性大腸菌O157	EHEC	EHEC	13/13			stx1&2	12/13	eae	13/13	S. aureus	2/13						
食中毒	腸管出血性大腸菌		EHEC	4/5			stx1&2	3/5	eae	4/5	astA	3/5						
食中毒	腸管出血性大腸菌		EHEC	5/7	ウエルシュ	4/7	(S. aureus)	1/7	stx1&2	6/7	astA	1/7						
食中毒	病原性大腸菌	EAEC	EAEC(astA)	6/8	EAEC(aggR)	4/8	ETEC	3/8	astA	8/8	aggR	5/8	st	4/8	eae	3/8	lt	1/8
有症苦情			EAEC(ast)	2/2	(ウエルシュ)	1/2			astA	2/2								
有症苦情		Palcal	(P. alcalif)	1/5	(S. aureus)	1/5			P. alcali	1/5	astA	2/5	eae	1/5				
食中毒	不明	Pshige	P. shigeloides	2/5					P. shigelides	2/5	eae	1/5						
食中毒	セレウス菌	Bcer	セレウス(ces,nhe)	2/4					B. cereus ces	1/4	B. cereus nhe	1/4	C. jejuni	1/4	aggR	1/4		
その他	リステリア	Lm	Lm	10/10					Lm	4/10	S. aureus	5/10	eae	1/10				
有症苦情	Y. pseudotuberculosis	Yersinia	Y. entero	2/5					Y. entero	2/5								

行政対応 取扱	行政結果 原因物質	原因 物質	菌分離			RFBS24結果								
			1	2	3	1	2	3	4	5				
食中毒	ノロウイルス	Noro	ウエルシュ	1/3				ND						
食中毒	原因不明	Rota	NT					St. aureus	1/2					
有症苦情		Noro						DAEC	1/7					
有症苦情		Noro	(S. aureus)	1/2				ND						
有症苦情		Rota	ウエルシュ	1/3	(S. aureus)	1/3			astA	2/3				
不明		Noro	Y. entero	1/6					S. aureus	3/6	astA	1/6	Y. entero	1/6
不明		Noro	NT						ND					
不明		Noro	NT						astA	1/6				
不明		Noro	NT						ND					
不明		Noro	NT						S. aureus	1/4				
不明		Sapo	NT						S. aureus	1/6				