

## 令和3年度富山県衛生研究所研究評価結果について

富山県衛生研究所では、「富山県衛生研究所研究評価実施要領」に基づき、客観的かつ透明な研究評価を行い、研究開発等の活性化や研究資源の効率化を図っております。特に重要な研究課題については、外部の専門家の意見を伺い、研究内容の向上を図るとともに、社会的要請に合致した試験研究を行うことにより、県民の健康・福祉の増進や本県の科学技術の発展等に資することとしております。

また、評価結果を公表することにより、広く県民の皆様の理解を深めることに努めています。令和3年度の研究評価結果は、次のとおりです。

### 1 外部委員会の開催日時

令和3年9月28日(金) 13:30～16:30

### 2 外部委員会の開催場所

富山県薬事総合研究開発センター 創薬研究開発センター 2階大会議室  
(一部の委員はオンライン参加)

### 3 外部委員

委員名	所属・職
○荒川 宜親	修文大学医療科学部臨床検査学科教授
稲寺 秀邦	富山大学医学部公衆衛生学講座教授
加賀谷重浩	富山大学学術研究部工学系教授
齋藤 玲子	新潟大学大学院医歯学総合研究科国際保健学分野教授
竹内 弘幸	富山短期大学食物栄養学科教授
長瀬 博文	富山県厚生センター所長・支所長会代表
畑崎 喜芳	富山県立中央病院小児科部長・母子医療科医長
吉村 和久	東京都健康安全研究センター所長

○：委員長

### 4 評価対象研究課題

評価対象は全ての研究課題としており、令和3年度は43課題（事前評価13課題、中間評価22課題、終了評価8課題）が対象となりました。最初に、衛生研究所の内部評価委員会(委員：衛生研究所職員7名)で評価を行い、その中から特に重要な以下の7課題について、外部委員による評価を行っていただきました。

No.	課題名	評価区分
1	成人の侵襲性肺炎球菌感染症の血清型別解析	中間評価
2	富山県における新型コロナウイルス感染症の気道ウイルス量と感染病態に関する研究	中間評価
3	富山県内新型コロナウイルス感染症患者からのウイルス分離解析	事前評価
4	集団食中毒事例より分離された大腸菌の病原性および細菌学的解析	事前評価
5	同一患者から分離されたカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(CPE)の解析	中間評価
6	蛍光検出器付きHPLCによる食品中のグリホサート定量法の検討	終了評価
7	GC/MSによる飲料水中農薬類の一斉分析法に関する検討	中間評価

## 5 評価方法

研究課題は、研究の進捗状況に応じて、「事前評価」、「中間評価」、「事後評価」に区分し、事前評価課題については研究の実施計画を、中間評価課題については研究の進捗状況と今後の計画を、事後評価課題については得られた成果等をそれぞれ報告し、次に記載する区分ごとの評価項目と評価基準により、評価をしていただきました。

なお、評価は、あらかじめ各委員に調査研究課題の計画書・報告書等を配付し、その報告書等に基づき、外部委員会において各研究員からの説明と質疑応答により行いました。

### (事前評価)

評価項目	評価基準
○総合評価	5：良好、4：概ね良好、3：普通、 2：部分的見直し、1：全面見直し
○目的及び必要性	5：非常に優れている、4：優れている、3：普通 2：問題がある、1：非常に問題がある
○実施内容（手法・計画・体制）	
○研究期間と経費	
○学術的又は行政的意義と効果	
○研究目的を実現する可能性	

### (中間評価)

評価項目	評価基準
○評価	5：十分な成果、4：成果あり、3：普通 2：成果不十分、1：成果なし
○課題の達成見込み	5：十分あり、4：あり、3：普通、 2：少ない、1：ない
○研究課題の取扱い	5：課題を計画どおり継続し目的を達成させる、 4：課題を再整理し計画を見直す、 3：課題を再整理し調査研究期間を見直す、 2：調査研究課題を見直す、1：その他

### (事後評価)

評価項目	評価基準
○総合評価	5：十分な成果、4：成果あり、3：普通 2：成果不十分、1：成果なし
○目的達成度	5：十分あり、4：あり、3：普通、 2：少ない、1：ない
○研究成果の有用性	
○研究期間と経費の効率化	

6 各課題の評価結果

※評価点数は、各委員の平均点です。(各評価項目5点満点)

No.	1	課題名	成人の侵襲性肺炎球菌感染症の血清型別解析		
区分	中間評価	研究期間	令和元～3年度		
研究終了 報告概要	<p><b>【研究概要】</b></p> <p>侵襲性肺炎球菌感染症(以下、IPD)は2013年度から感染症発生動向調査の5類全数把握疾患となった。それと同時期に本研究班では国内10道県(北海道、宮城、山形、新潟、三重、奈良、高知、福岡、鹿児島、沖縄)の成人IPD症例とその原因菌のサーベイランス体制を構築した(小児IPDサーベイランスはAMED菅班で実施)。</p> <p>本研究では、これまで蓄積された成人IPDサーベイランスのデータを用いて、<b>①血清型特異的なIPDの臨床像を明らかにする、②わが国の血清型特異的な罹患率の特徴を明らかにする</b>ことを目的に実施している。</p> <p><b>【研究計画の進捗度・達成度】</b></p> <p>進捗度 60% (3年計画を100%として)</p> <p>① <u>血清型特異的な臨床像について</u></p> <p>研究班の成人IPDサーベイランスに登録され、血清型が決定された症例(n=1,702)を対象に、報告数が多い5つの血清型(3、12F、19A、10A、23A)の臨床的特徴や患者背景について、他の血清型と比較した。</p> <p>結果、血清型により、病型の割合に有意差が認められたことから、血清型によって病型形成の機序が異なる可能性が示唆された。肺炎が多い3、19Aは侵襲性が低い(鼻咽頭での保菌時間が長く、侵襲性感染症を起こす頻度が低い)ことから、鼻咽頭から肺に誤嚥され、肺炎を発症、肺から菌が血中に侵入し、菌血症を伴う肺炎へと進展することが予想された。一方、肺炎が少なく、髄膜炎が多い10A、23Aは、鼻から血中、さらに血液脳関門を通過しやすいと予想された。</p> <p>② <u>血清型特異的な罹患率の推移について</u></p> <p>海外では小児PCVワクチンの導入により、ワクチンに含まれる血清型の罹患率は、小児、成人とも減少する一方、ワクチンに含まれない血清型の罹患率の増加(血清型置換)が報告されている。研究班の報告数は2017年以降安定しており(2020年はCOVID-19の影響で減少)、2017-20年における血清型別の罹患率の推移を解析した。ワクチンタイプ別にみると、2017-19年におけるPCV13タイプの血清型置換は認められなかったが、ノンワクチンタイプ(NVT)は増加傾向が認められた。血清型別に罹患率をみると、12F、3は減少傾向である一方、NVTの23A、15Aが増加傾向にある。</p> <p><b>【今後の計画】</b></p> <p>① 血清型別臨床像の特徴について論文投稿中。</p> <p>② 血清型別罹患率の推移について、2020年までのデータに関する詳細な解析をする予定。</p>				
	評価結果	評価	課題達成の見込み	研究課題の取扱い	
	4.1	4.5	5.0		
委員会の主な意見	<p><b>【コメント】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>血清型の早期判定が治療方針に反映できれば意義深い。</li> <li>目的どおりに、血清型別の臨床像の違い及びワクチンの間接効果について、一定の結論が得られていると考える。今後は、計画通り進めていくことを期待している。</li> </ul> <p><b>【指摘事項等】</b></p>				

	<p>①IPDの原因となる菌株の血清型のみならず、ST型やSNPの差などについても解析し、地域差や検体による差などの有無も判明できると良い。</p> <p>②血清型だけでなく宿主要因も臨床像に影響すると思われるので、解析に加えてはどうか。</p> <p>③3型で致命率が高い要因を検討してはどうか。</p> <p>④可能であれば富山県の症例についても調査し、10道県の結果との類似性・相違性を比較、議論すると良いのではないかと。</p> <p>⑤新型コロナウイルス感染症（以下、「COVID-19」）により減少している原因を是非解明してほしい。COVID-19の影響で特定の血清型が増減しているのかどうかについても検討していただきたい。</p> <p>⑥罹患率の減少の要因分析において留意すべき点として、COVID-19の流行による受診控えとそれに伴う診断率の低下の影響を考慮する必要がある。</p> <p>⑦ワクチンの間接効果を評価する際には、2010年以降の小児定期接種の差し控えによる接種率低下も考慮する必要がある。</p> <p>⑧小児科領域ではすでにワクチン株のIPDは激減し、非ワクチン株の感染が増加し、全体としてはIPDが著減していることはわかっているが成人領域の検討は興味深い。</p> <p>⑨in vitroの実験系の構築を期待する。</p> <p>⑩ワクチンの影響が観察できるようになるとより有用だと思う。</p>
<p>当所における検討内容及び見解等（上記指摘事項等の番号に対応）</p>	<p>①ST型について検討した結果、臨床像に差は認められず、血清型によるものと考えている。いくつかの血清型では、同一ST間でのSNPについて解析し、SNPが臨床像への影響は確認できていない。</p> <p>②性、年齢の他、基礎疾患やワクチン接種歴などの宿主側の要因も含めた解析も検討していきたい。</p> <p>③血清型3は小児PCVワクチンに含まれるにも関わらず、成人では報告数が最も多く、また致命率も高いことから、詳細に検討していきたい。</p> <p>④富山県はIPDサーベイランスに参加していないため、発生動向調査データしかなく、成人症例の血清型はほとんど検査できていない状況。しかし、県の研究機関として、県内の特徴や県民の感染症予防に役立つことなどを情報提供できるよう、検討していきたい。</p> <p>⑤COVID-19流行後のIPD症例の減少について、検討していきたい。血清型別の動向については、特定の血清型に特徴的な増減はなく、全血清型において、減少傾向であった。</p> <p>⑥COVID-19流行に伴う、受診控え、診断率の低下は大きな要因と考える。これらの指標を反映できないか、検討していきたい。</p> <p>⑦2020年の小児ワクチン接種率の減少について、データはまだ公表されていないが、将来どのような影響を与えるのか、注視したい。</p> <p>⑧小児と成人では血清型分布が異なり、PCV13に含まれる血清型3や19Aが成人では主要な血清型であり、今後の動向についても引き続き、注視していきたい。</p> <p>⑨血清型別の菌の侵襲性についてin vitroで検討している細菌部とも連携して進めていきたい。</p> <p>⑩将来導入が期待される多価PCVワクチンについては、導入前後の罹患率の推移が観察できると考えている。</p>

No.	2	課題名	富山県における新型コロナウイルス感染症の気道ウイルス量と感染病態に関する研究		
区分	中間評価	研究期間	令和2～4年度		
研究終了 報告概要	<p><b>【研究概要】</b></p> <p>2019年12月に中国武漢市で発生した新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は、2020年3月にはパンデミックに発展した。本研究では、富山県内の17医療機関・施設で発生した新型コロナウイルス感染症の患者の気道ウイルス量と感染者の症状の有無、他者への感染性、重症度との関連性を検討する。また、県内の疫学情報と感染者由来のSARS-CoV-2のゲノム配列を解析することで、地域クラスターの感染伝播経路の解明に繋げる。これらのことにより、今後の感染対策に役立てる。</p> <p>本研究は富山県衛生研究所倫理審査委員会の承認を得て実施している。</p> <p><b>【研究計画の進捗度・達成度】</b>  <b>(令和2年度) 達成度：研究計画全体の50%</b></p> <p><b>1) COVID-19の臨床ウイルス学的検討</b></p> <p>県内で発生したCOVID-19症例の臨床疫学所見とウイルス量とを解析し、感染拡大に関与したリスク要因について検討した。第1波(2020年3月30日～5月18日)226例では、年齢について、0～19歳群と比較して20～64歳群と65歳以上群のウイルス量が多かった。臨床症状別では、無症候例と比較して急性上気道炎、肺炎の患者ではウイルス量が多かった。また、発症から検査までのタイムラグは呼吸補助の必要性、転帰に影響することが示唆された。重症度(軽症、中等症I、中等症II(呼吸不全あり)、重症)、転帰(死亡)、二次感染の有無とウイルス量に有意な相関はみられなかった。</p> <p><b>2) SARS-CoV-2の分子疫学</b></p> <p>2021年3月30日から現在まで545例の感染者の鼻咽頭ぬぐい液、唾液等から抽出したウイルスRNAについて、multiplex PCRおよび次世代シーケンサーにより全長の塩基配列を解読し、ゲノムネットワーク図を作成した。その結果、ウイルスの遺伝子系統は、第1波がB.1、B.1.1、第2波がB.1.214、B.1.1.284、第3波がB.1.214、B.1.1.284、R.1、第4波がR.1、B.1.1.7(アルファ株)、第5波がB.1.1.7、B.1.617.2(デルタ株)と流行時期で異なっていたことが分かった。</p> <p><b>【今後の計画】</b></p> <p><b>1) 感染者の感染病態に関する検討</b></p> <p>県内のCOVID-19症例の臨床疫学所見の収集と解析を継続し、解析結果を医療機関や県民へ還元する。</p> <p><b>2) SARS-CoV-2のゲノム解析</b></p> <p>次世代シーケンサーによるSARS-CoV-2のゲノム解析結果を、疫学情報とあわせて比較することで、変異株の流入やウイルスの伝播を監視する。</p> <p>これらのことにより、今後の感染対策や治療方針に有用な解析結果が得られることが期待される。今後の流行発生時には、同じ研究体制を用いて、さらなる研究の積み上げが可能になる。さらに、本研究は県内の医療機関と衛生研究所を含む行政機関との新型コロナウイルス感染予防対策の連携強化に繋がることが期待される。</p>				
	評価結果	評価	課題達成の見込み	研究課題の取扱い	
	4.1	4.5	5.0		
委員会の主な意見	<p><b>【コメント】</b></p> <p>・SARS-CoV-2のゲノム解析については、社会的な意義は非常に高く、継続して行っていくべきと考える。</p>				

	<p><b>【指摘事項等】</b></p> <p>①高齢者では、新型コロナでなくても普通の感冒や季節性インフルエンザなどでも肺炎などを引き起こすと死亡する事例は多いので、死亡事例の中で、新型コロナウイルスの感染のために死亡したという患者が実際にどの程度発生しているのか、超過死亡などの観点からの解析も期待したい。また、5波では、患者数に占める重症者や死亡者の割合が4波と比べ低くなっているが、その原因がウイルス側にあるのか、ヒト側にあるのかの解析も期待したい。</p> <p>②重要な臨床疫学研究である。他の都道府県の結果も共有し、臨床現場にフィードバックできる研究になるとよい。</p> <p>③本研究で作成したゲノムネットワーク図を用い、県民への現状についての説明を繰り返し行っていただきたい。</p> <p>④従来株とデルタ株との比較を行っていただきたい。また、鼻腔ぬぐい液と唾液の比較も非常に興味深い。</p> <p>⑤COVID-19の臨床ウイルス学的検討については、ウイルス量の測定が検査時しかなく条件を統一できないので、結果の解釈が難しい。Ct値が経時的に測定できれば、理想ではあるが、多変量解析の手法を用いるのもよいかもしれない。</p> <p>⑥デルタ株の特徴が明らかになるように、第5波の検体と比較することで、従来株やアルファ株との違いを明らかにしてほしい。</p> <p>⑦他の委員から指摘のあった通り、多変量解析が必要と思う。</p> <p>⑧富山地域に特異な広がり方などがあると面白い。デルタ株がそのほかの株とどのような違いがあるのかを見られると良い。特にデルタ株は局所症状を呈する感染者が多くないとか、無症状感染者の割合がどうなのかなど、個人的にも知りたいことが結構あるので、今後の研究進展に期待する。</p>
<p>当所における検討内容及び見解等（上記指摘事項等の番号に対応）</p>	<p>①ご指摘のとおり、超過死亡などの観点や、第5波における重症者・死亡者の割合、要因について解析を検討していきたい。</p> <p>②ご指摘のとおり、富山県における臨床疫学解析結果を、他の地域との違いや共通点を示しながら、臨床現場へ報告していきたい。</p> <p>③これまで、ゲノムネットワーク図を用いたSARS-CoV-2の変異については、ホームページや病原体検出情報月報（IASR）、研究成果発表会を通して、関係機関や県民へお伝えしてきた。引き続き、ウイルスの変異の現状を県民へ丁寧に伝えてまいりたい。</p> <p>④ご指摘のとおり、従来株とデルタ株との比較を行い、臨床症状、ウイルス量、細胞培養におけるウイルス分離効率についてデルタ株の特徴を示してまいりたい。これまで、国立感染症研究所（以下、「感染研」）と共同で、従来株とα株の二次感染率の比較を報告した（<a href="https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2502-idsc/iasr-in/10727-500c03.html">https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2502-idsc/iasr-in/10727-500c03.html</a>）。デルタ株との比較についても、引き続き解析したい。</p> <p>⑤⑦有症状、呼吸補助を要した症例では、無症状例よりもウイルス量が多い結果であったが、ウイルス量の測定ポイントが、検査時のみで条件を統一できないのは、ご指摘の通り。発症から検査までの期間、年齢、症状等を考慮した多変量解析を検討したい。</p> <p>⑥ご指摘のとおり、従来株（野生株、アルファ株など）とデルタ株との比較を、臨床症状、ウイルス量、ウイルス分離効率について行い、デルタ株の特徴を明らかにしたい。</p> <p>⑧ご指摘のとおり、富山県に特徴的なウイルスの変異や伝播の広がり方があるかに注目して、解析したい。デルタ株の局所症状の程度、無症状感染者の割合等、ご指摘を活かして、調査を進めてまいりたい。</p>

No.	3	課題名	富山県内新型コロナウイルス感染症患者からのウイルス分離解析			
区分	事前評価	研究期間	令和3年度			
研究計画概要	<p><b>【目的及び必要性】</b>          新型コロナウイルス感染症は、呼吸器系ウイルスである SARS-CoV-2 が原因であるために、鼻腔および鼻咽頭付近でウイルスが検出される。現在、ウイルスの PCR および抗原検査等を行うために、被験者の鼻腔もしくは鼻咽頭ぬぐい液、および唾液が採取されて解析が行われている。ただ、こうした検体中にどれくらい感染性のあるウイルスが存在しているのかは不明な点が多い。先行研究において、鼻腔・鼻咽頭ぬぐい液検体においては効率よくウイルスが分離されたものの、唾液検体からは分離できないものが多かった。</p> <p>本研究では、新型コロナウイルスの PCR 検査のために衛生研究所に持ち込まれた鼻腔・鼻咽頭ぬぐい液と唾液の臨床検体を用いて、ウイルスゲノム量別に分離効率の比較を試みる。また、抗原検出イムノクロマト法（簡易キット）での陽性率と、ウイルス分離率についても評価する。鼻腔・鼻咽頭ぬぐい液や唾液中のウイルスの感染性について明らかに出来れば、今後の感染予防対策にも繋がることが期待される。</p> <p><b>【実施内容】</b>          1. 鼻腔・鼻咽頭ぬぐい液および唾液中での SARS-CoV-2 の安定性試験          鼻腔・鼻咽頭ぬぐい液および唾液に培養細胞で増殖させた SARS-CoV-2 を段階希釈してそれぞれ同量添加し、ウイルスゲノム量をリアルタイム PCR により測定する。それぞれの仮想臨床検体を培養細胞に添加し、ウイルスが分離されるかを検証する。</p> <p>2. 臨床検体でのウイルス分離試験          新型コロナウイルス陽性患者検体の鼻腔・鼻咽頭ぬぐい液および唾液を用いて培養細胞でウイルス分離を試みる。分離の成否とリアルタイム PCR の遺伝子量（Ct 値）の違い、簡易キットでの判定を比較解析し、感染性ウイルスの存在について評価する。</p> <p><b>【期待される学術的又は行政的意義又は効果】</b>          新型コロナウイルス感染症において、鼻腔・鼻咽頭ぬぐい液や唾液中のウイルスの感染性について、PCR などの遺伝子検査だけでなく抗原検査との相関も明らかに出来れば、今後の感染予防対策にも繋がることを期待される。</p>					
評価結果	総合評価	目的及び必要の妥当性	実施内容の妥当性	研究期間と経費の妥当性	学術的又は合成的意義と効果の有無	研究目的を実現する可能性の有無
	4.5	4.4	4.3	4.1	4.4	4.1
委員会の主な意見	<p><b>【コメント】</b>          ・学術的にも行政的にも重要な研究テーマである。          ・ニーズが高い研究である。          ・ウイルス分離の成否と、PCR 検査による Ct 値や検体採取方法（鼻腔・鼻咽頭、唾液）や抗原検出キットでの結果との関係を明らかにすることは今後の感染予防対策を講じる上で極めて有用な情報となると考える。成果を期待したい。          ・BSL3（P3）施設を使ってコロナの培養ができる衛研は多くないので、是非検討を続けていただきたい。</p> <p><b>【指摘事項等】</b>          ①検体中のウイルスの安定性について確認をしているが、ウイルス分離に用いた細胞株を</p>					

	<p>継代培養した場合の、分離効率の安定性などの確認も必要と思われるが、この細胞に関するそのようなデータは、既にあるのか。</p> <p>②唾液にはもともとウイルス量が少ないのか、唾液成分により検出されにくいのか、唾液内の検出率に個人差があるとすればその原因は何か、について明らかにしてほしい。</p> <p>③鼻腔、鼻咽頭ぬぐい液検体と唾液検体との間でウイルス分離率を比較する際の留意点⇄として、厚生センターでは、検体採取の原則として、ほぼ無症状の場合には唾液検体採取、一方で臨床症状が明らかな場合は、医療機関にて鼻咽頭ぬぐい液検体を採取する態勢で対応しているため、鼻咽頭ぬぐい液検体群と唾液検体群間で比較する場合、2群間の臨床像の違いを考慮した分析、考察を行うことが必須と考えられる。</p> <p>④同一人の鼻腔ぬぐい液と唾液を比較しないとだめだと思う。</p> <p>⑤デルタ株とそのほかの株との違いがどうなのかも合わせて調べていただくと有用な情報が得られるのではないかと。唾液の場合は希釈だけでなくその他のファクターも絡むので、安定性試験の条件設定は慎重にした方が良いかもしれない。</p>
<p>当所における検討内容及び見解等(上記指摘事項等の番号に対応)</p>	<p>①先行実験で臨床検体の分離実験を行っており、3回盲継代してCPEが確認できなかった場合、分離陰性としている。ウイルス分離に用いている細胞株は、感染研が樹立したもので、既に分離効率の安定性などは検証済みであると考えている。</p> <p>②ウイルス量を揃えて、唾液もしくは鼻腔ぬぐい液に添加した模擬検体を用いてウイルス分離を行なった場合でも、ウイルス分離効率は唾液では低かったため、唾液成分によって検出されにくくなっていると思われる。現在、その要因物質については検証している。</p> <p>③全ての検体で臨床情報が得られている訳ではないので、臨床像の違いを考慮して解析することは難しいが、出来るだけ検討したい。現時点では、Ct値のみを基準として比較を行っている。</p> <p>④富山県衛生研究所にある臨床検体は、もともと行政検査で集められたもので、同一人の鼻腔ぬぐい液と唾液があることはほぼなく、同一人で比較できない制限がある。そのため、できるだけ多くの検体で検証を行う必要があると考えている。今後、同一対象者から異なる部位の検体を入手できれば検討したい。</p> <p>⑤安定性試験は、デルタ株やその他の株を用いて比較する予定。模擬検体に使用する唾液は、ワクチン接種前に集めた職員の唾液を用いる予定。3人分の唾液ストックが約30mLずつあるため、個人差を含めて検証を行い、条件設定を行う。</p>



No.	4	課題名	集団食中毒事例より分離された大腸菌の病原性および細菌学的解析			
区分	事前評価	研究期間	令和3～5年度			
研究計画概要	<p><b>【目的及び必要性】</b>  2021年6月に県内で発生した集団食中毒事例において、原因食品と特定された牛乳および患者便から同一クローンの大腸菌が分離され、病因物質であることが強く疑われた。しかし、本菌は広く知られている病原性大腸菌のカテゴリーを決定する典型的な病原因子遺伝子を保有していなかった。本事例を含め、国内では、既存の病原性大腸菌のカテゴリーの典型的な病原因子遺伝子を保有しない大腸菌による大規模な食中毒事例が報告されている。本事例で分離された大腸菌は世界的に評価できる型別法であるMLST(multi locus sequence typing)、および次世代シーケンサーによる全ゲノム解析からST1380であることが判明した。そこで、本菌が当該食中毒事例における病因物質となりうるかを特定するため、細菌学的解析を行い、本菌の病原性および細菌学的特徴を明らかにする。</p> <p><b>【実施内容】</b>  〈令和3～4年度〉  1. 凝集性を中心として病原性を明らかにする。  ① 細胞凝集性・付着性を調べるための実験を行う。  コントロール株と比較した、細胞凝集性、付着性を確認する。  ② 動物モデルを用いた病原性確認試験（腸管ループ試験等）を実施する。  ③ ゲノム情報と病原性に関する表現型の検証  2. 患者便が入手できた場合  ① 病原性細菌の再分離作業と精査を実施。  ② 当該食中毒事例患者便を用いたメタゲノムの塩基配列情報を取得し、当該大腸菌、その他の大腸菌及び大腸菌以外の病原性細菌の存在とその役割について検証する。  〈令和5年度〉  分離菌のゲノム情報と患者便のメタゲノム情報の解析を行い、病因物質としての検証を行う。  本課題の実施には富山県衛生研究所倫理審査委員会の承認を得る。</p> <p><b>【期待される学術的又は行政的意義又は効果】</b>  これらの解析は、非定型病原性大腸菌による食中毒での原因究明や検査方法等の開発のための基礎的な知見が得られると期待され、公衆衛生上有意義であると考えられる。</p>					
評価結果	総合評価	目的及び必要の妥当性	実施内容の妥当性	研究期間と経費の妥当性	学術的又は合成的意義と効果の有無	研究目的を実現する可能性の有無
	4.3	4.6	4.4	3.9	4.5	4.0
委員会の主な意見	<p><b>【コメント】</b>  ・学術的にも行政的にも重要な研究テーマである。  ・富山県で発生した事例であり、当初の目的を達成してほしい。  ・今回の大規模集団食中毒事例における原因菌に関する基礎的知見を得ることは、同様の食中毒事例の予防などに有用であると考えられる。  ・病原性に関する新しい遺伝子の発見につながりそうなので、是非解析をすすめていただきたい。</p>					

	<ul style="list-style-type: none"> <li>・食中毒発生時の現場対応には、被害拡大防止のためにも迅速な対応が求められる。細菌学的検査において食中毒菌の検索で明らかにならない場合でも、本研究のような細菌学的解析にて原因究明や公衆衛生上の対策に寄与できるような知見が得られることを期待する。</li> <li>・新たな病原性大腸菌のモニターは続けるべきだと思う。</li> </ul> <p><b>【指摘事項等】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>①ST1380 株の <i>aggR</i> 遺伝子の欠落は、ORF 中の特定の領域の欠落なのか、それとも、<i>aggR</i> を含むかなり大きな領域の欠落なのかについての説明があってもよかった。なお、ST1380 株の病原性に関与する遺伝子(群)が特定されることを期待したい。</li> <li>②動物実験は行った方が良いと思う。病原因子遺伝子を特定できるかどうかはなかなか困難と思う。論文になることを期待している。</li> </ul>
<p>当所における検討内容及び見解等(上記指摘事項等の番号に対応)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>①<i>aggR</i> はその関連する遺伝子も含めてプラスミド上に存在している。本菌株では、<i>aggR</i> および関連遺伝子も検出されていないため、このプラスミド自体が保有されていないと推察される。</li> <li>②当所単独では難しいため、共同研究等を検討したい。</li> </ul>

No.	5	課題名	同一患者から分離されたカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) の解析	
区分	中間評価	研究期間	令和2～3年度	
研究中間報告概要	<p><b>【研究概要】</b>  カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) はカルバペネム系抗菌薬に耐性を示す薬剤耐性菌である。CRE の中でもカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) は医療関連感染対策上重要とされており、IMP 型、NDM 型などいくつかの遺伝子型が存在することが知られている。</p> <p>2019 年、県内医療機関で海外渡航歴のある患者から NDM-5 メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生大腸菌が検出された。その1年後の検査で、再び NDM-5 MBL 産生大腸菌が保菌状態で検出された。2019 年に分離された2株の NDM-5 MBL 産生菌と、2020 年に分離された2株の計4株について一塩基多型 (SNP) 解析を実施した。</p> <p>本研究では、この4株の SNP が生じた遺伝子の表現型における変化を細菌学的に解析し、薬剤耐性菌の長期的な保菌と SNP の関連性について考察する。本研究の結果は、長年にわたる薬剤耐性菌の保菌メカニズムや県内における CRE の院内感染対策に資する情報が得られると考えられる。</p> <p><b>【研究計画の進捗度・達成度】</b>  80%  令和2年度</p> <p>・4株のゲノム解析の結果から、既知の薬剤耐性遺伝子や ST 型等ゲノムデータを確認した。また本症例で検出された1菌株を基準とし4株間の pairwise SNP 解析を行ったところ、この4株が遺伝学的に同一の菌株であることを裏付けるものであった。一方で一年間の保菌期間中に7SNP が加わっていることが示唆された。SNP が生じた遺伝子は2017年に報告があった家族内での長期大腸菌保有症例で SNP が生じた遺伝子と一部一致しており、長期保菌における SNP の発生に一定の傾向があることが示唆された (J Bacteriol 199:e00036-17 2017)。</p> <p>尚、本研究は当所倫理審査委員会の承認済である。</p> <p><b>【今後の計画】</b>  SNP が検出された遺伝子は転写因子や乳糖分解酵素の調節因子、芳香族物質の排出ポンプ、薬剤耐性因子などにわたっており、これらの遺伝子の変異が菌株の表現型にどのような影響を与えたか解析を行い、人体の中で長期にわたり細菌が保菌されるために必要な遺伝子変化を解析する。それにより慢性感染症を引き起こすメカニズムを解明する一助とする。</p>			
評価結果	評価	課題達成の見込み	研究課題の取扱い	
	4.3	4.5	5.0	
委員会の主な意見	<p><b>【コメント】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・行政的にも細菌学的にも重要な研究である。</li> <li>・人体の中で薬剤耐性菌が長期間保菌されるメカニズム解明のため、地道に検討を続けてほしい。</li> <li>・CPE の長期保菌メカニズムが明らかになりつつある。既報による知見とも比較検討し、一般性を高めていただきたい。</li> <li>・説明が大変分かりやすかった。研究の内容がよく整理されている。今後の成果を期待する。</li> <li>・痰検体や便検体と比較して、尿検体において SNP が多く起こっている事実を踏まえ、呼吸器系、消化器系ではなく、尿路系で長期間保菌することと SNP の発現しやすさとの関係性にも着目した成果を期待したい。</li> </ul>			

	<ul style="list-style-type: none"> <li>・临床上、CPEが常在菌的に存在し、なかなか消失しないことは経験するが、遺伝子変異により病原性が増強されることがもしあるとすれば興味深い。</li> <li>・長期感染症例による大腸菌のセレクションは大変興味深い研究である。存在局所による菌の異なる変異と病原性の違いが分かれば、採取部位を狙って目的の菌の有無を調べ、薬剤耐性菌の萌芽をつぶせるかもしれないので。もう少し症例数が増えると良いが。</li> </ul> <p><b>【指摘事項等】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>①以下の点について解明を期待したい。 <ul style="list-style-type: none"> <li>・NDM-5 の遺伝子の所在は、プラスミドか染色体か。</li> <li>・NDM-5 の遺伝子を媒介するエレメントは何か。</li> <li>・NDM-5 の遺伝子を媒介するエレメントは、他の菌種等で報告されているエレメントとどの程度類似しているのか否か。</li> </ul> </li> <li>②このように長期間保菌状態がつづくとおどろいた。特殊な例なのか。</li> </ul>
<p>当所における検討内容及び見解等(上記指摘事項等の番号に対応)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>①NDM-5 遺伝子の所在、媒介するエレメントについては、既報の配列情報と比較を行い今後の方向性を検討していく。また、S1-PFGE とリアルタイム PCR 法を用いて plasmid または染色体のどちらに NDM-5 遺伝子が存在するかを決定する方法を現在検討中である。</li> <li>②同一大腸菌による同一家族内での長期保菌例の報告はこれまでもあるが、同一患者内での長期保菌例の報告はこれまではなかったものである。特殊な例であるかどうか、今後の報告が待たれる。</li> </ul>

No.	6	課題名	蛍光検出器付き HPLC による食品中のグリホサート定量法の検討		
区分	事後評価	研究期間	平成 30～令和 2 年度		
研究終了 報告概要	<p><b>【研究概要】</b></p> <p>グリホサートは含リンアミノ酸系の非選択性除草剤であり、毒劇物ではないことからホームセンターなどで販売されており（商品名：ラウンドアップ 等）、容易に入手可能で広く利用されている。そのため中毒事件・事故の原因物質となる事例が報告されている。</p> <p>グリホサートは他の農薬類に比べて極性が高く、紫外部吸収や蛍光を有さないことから、その分析を行うためには、通常煩雑な操作が必要である。簡便でより迅速な精製法・測定法を確立することが健康危機管理の面でも有用であり、報告例もある。当所においてもこれらの報告例を参考にして検討を実施し、アルミナ固相を利用して精製し、汎用される ODS 系カラムで測定を行う分析法を確立した。この手法は今後の検査業務での活用も期待できる。</p> <p><b>【得られた成果】</b></p> <p><u>測定方法</u>：分析手法として誘導体化-高速液体クロマトグラフ法を採用した。分析カラムについては、高極性物質の測定に通常使用されるイオン交換系カラムでの測定（平成 30～令和元年度）と、高極性物質の保持は弱い汎用される ODS 系カラムを用いた測定について検討を行った（平成 30 年～2 年度）。その結果 ODS 系カラムでの測定も可能となった。</p> <p><u>試料処理及び精製法</u>：経口急性毒性を考慮して比較的高濃度のグリホサートを含有するという前提で、検査試料としてジュースや牛乳などの飲料やレトルト食品など複雑なマトリックス成分を有する加工食品等へ添加し、検討を行った。HPLC 測定の場合、誘導体化しても、通常は他の高極性マトリックス成分の妨害により、多段階の精製処理無しでは測定は難しい。そこで、グリホサートの構造の特徴を利用してアルミナ固相に吸着させ、他の成分と分離精製する方法を検討し、良好な結果を得ることができた。ジュースや牛乳などの飲料類に対して <math>10 \mu\text{g/g}</math>、カレーなどのレトルト食品に対して <math>100 \mu\text{g/g}</math> 相当の添加試験を実施したところ、概ね 80%～120%の回収率で農薬を検出することができた。この方法では、食品によってはマトリックス成分の妨害の影響があるものの、同様に AMPA（グリホサートの代謝物）、グルホシネートについても検出可能であり、これらの農薬による中毒が疑われる緊急時の検査に適用可能と考えられた。</p>				
評価結果	総合評価	目的達成度	研究成果の有用性	研究期間と経費の効率化	
	4.1	4.3	4.3	4.3	
委員会の主な意見	<p><b>【コメント】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・既存の方法に比べ迅速であり、食品などからの添加回収試験の結果も良好である。本法は中毒事例発生時対応の方法として有用であると考えられる。</li> <li>・比較的高濃度のサンプルを対象とした分析法であるが、急性毒性時の分析法としては有用であると考えられる。検査実施標準作業書として承認を受けたことは評価できる。</li> <li>・急性中毒への適用が期待される検査である。それゆえ迅速かつ正確な結果が求められることから、それらがクリアされることで現場での活用が期待される。</li> </ul>				

	<p><b>【指摘事項等】</b></p> <p>①次のステップとして、除草剤を日常的に使用している農業者等において、その使用料や使用頻度と血中や尿中の除草剤やその代謝物の濃度との関係性なども解明できることを期待したい。</p> <p>②簡便な定量法を確立したことは評価できる。グリホサートに蓄積性や有害性があれば、農作物への付着量等測定のために、低濃度域での定量法についても検討を進めてはどうか。</p> <p>③可能であればさらに検討して、より低濃度のサンプルでも分析できるようになるとよい。</p> <p>④これまでの方法と比べてそれほど手間が増えるわけではないということなので、分離能が上がるのは悪くない。どのような条件下でも同じような分離能が得られるかどうかは肝となると思われる。</p>
<p>当所における検討内容及び見解等（上記指摘事項等の番号に対応）</p>	<p>①グリホサートに関して動物に対する慢性毒性等の新たな知見が得られた場合には、生体への曝露に関する調査は、有意義だと思われる。調査研究のテーマとなり得るか今後の検討課題としたい。</p> <p>②③グリホサートの発がん性を懸念する報道がされることがあるが、食品安全委員会等では、現時点において、グリホサートの動物に対する有害性はあまり高くはないと評価している。慢性毒性について懸念すべき評価が成された場合には、検査の必要性が高まると予想されるため、その際には改めて検討を行いたい。</p> <p>④食品によって妨害となる成分は異なるため、実際の試験に際しては分離状態を確認し、必要に応じて修正して検査することを想定している。</p>

No.	7	課題名	GC/MS による飲料水中農薬類の一斉分析法に関する検討	
区分	中間評価	研究期間	令和元～3年度	
研究中間 報告概要	<p><b>【研究概要】</b>  ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）は、医薬品、環境、食品衛生等の分野の有機分析に広く活用されており、最近ではMS/MS、Q-TOF/MS等の高感度・高分解能MS使用した研究報告も増えている。一方で、残留農薬等の微量成分分析においては、試料夾雑成分の干渉によりMSレスポンスの再現性、直線性、選択性、精度等の分析パラメータに負の影響を及ぼす“マトリックス効果”（ME）と呼ばれる現象が知られており、分析結果の信頼性を保証する上で、すべてのMS分析に共通する課題となっている。</p> <p>当所で実施する水道原水等の農薬検査では、GC/MS分析で疑似マトリックスとしてポリエチレングリコールを使用し、MEを補正しているが、疑似マトリックスが一部の農薬に及ぼす分解、妨害ピークの影響、分析システムへの過大な負荷によるメンテナンス頻度の増加等が問題としてある。</p> <p>本研究では、農薬を保持時間、MEによるMSレスポンスの変化率（ME（%））等に基づいてグループ化し、各グループに同様の挙動を示す化合物を内部標準として使用する内部標準法により、MEを補正する検討を行った。</p>			
	<p><b>【研究計画の進捗度・達成度】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・6種の多環芳香族炭化水素を内部標準物質候補として検討した。</li> <li>・水道水関連で規制される131種の農薬を対象に、保持時間、ME（%）からそれぞれに適当な内部標準物質を適用した。各農薬について、水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン（平成29年10月18日薬生水発1018第1号）に準拠し、検量線（濃度点5点）、添加試料（水道水使用、添加濃度2点）の真度を評価したところ、73種の農薬が目標（検量線：80～120%、添加試料：70～130%）に適合することを確認した。</li> <li>・精製水、水道水、5種のミネラルウォーターを使用した添加回収試験において、上記73種の農薬で概ね良好な結果が得られることを確認した。</li> </ul> <p>達成度 60%</p> <p><b>【今後の計画】</b></p> <p>本検討で内部標準物質の適用外となった58種の農薬を対象に、物性、化学構造、保持時間等を考慮し、新たな内部標準物質候補を検討する。</p> <p>開発したメソッドについて、分析パラメータの評価を行う。また、異なる分析条件、試料種（飲料水以外の環境水）を用いて、分析の堅牢性を評価する。</p>			
評価結果	評価	課題達成の見込み		研究課題の取扱い
	4.3	4.8		5.0
委員会の 主な意見	<p><b>【コメント】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・飲料水中の農薬などの化学物質の濃度を正確に測定する技術の開発は、行政的にも公衆衛生学的にも重要な研究課題であり、国内外で汎用される測定法として実用化されることを期待したい。</li> <li>・行政検査の観点からニーズの高い重要な課題である。</li> <li>・GC/MSにおいて、分析の信頼性を向上させることは、非常に重要なことなので、引き続き検討していくべきと考える。</li> </ul>			

	<p><b>【指摘事項等】</b></p> <p>①飲料水は比較的マトリックス成分濃度が小さいと思われるが、農薬定量に影響を及ぼすのほどのようなマトリックス成分なのか、についても検討してはどうか。</p> <p>②今回の研究により、GC/MS 測定時の定量値の正確さ・精度が改善される。飲料水中の農薬定量には、抽出操作における抽出率も大きな影響を及ぼす。可能であれば、抽出率については検討する必要はないか。</p> <p>③今回採用されたIS法により良好な結果が得られた 73 種の農薬と、適用外となった 58 種の農薬の化学的特性の違いにも着目し、化学的構造等の共通因子なども含めて考察することで、農薬に限らず普遍的な知見も得られるのではないかと期待する。</p> <p>④より微量でも定量できる方法があれば良いかと思う。</p> <p>⑤ME がこれほど測定値に影響を及ぼすとは知らなかった。より汎用性の広い IS の探索も今後行うのか。もし良いものが見つかったら情報共有のためどんどん発表を行っていただきたい。</p>
<p>当所における検討内容及び見解等(上記指摘事項等の番号に対応)</p>	<p>①飲料水、環境水等の複数の試料種を用いて、IS 法に適用する検討を、今後行う予定。その結果から、分析への影響が大きいと予想されるマトリックス成分について、考察したい。</p> <p>②農薬の抽出率については、当所の標準検査方法を用いた妥当性評価の結果より、多くの農薬で許容範囲にあることを確認している。問題のある農薬について、本検討と併せて改善策を検討したい。</p> <p>③様々な化合物への応用が可能な分析法となるよう、今後の課題として取り組みたいと考える。</p> <p>④本検討により、低濃度における分析精度を向上させることで、定量下限値の改善にもつなげたいと考える。</p> <p>⑤農薬分析等で汎用されるより広範な IS 及び農薬の安定同位体標識化合物の適切な使用方法について、今後検討する予定。得られた成果を積極的に発表したい。</p>