

## 令和5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5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5年9月7日(木) 13:30～16:30

### 2 外部委員会の開催場所

富山県民会館7階 704号室 (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
木村 博一	群馬パース大学大学院保健科学研究科教授
櫻田 惣太郎	富山県厚生センター所長・支所長会代表
竹内 弘幸	富山短期大学食物栄養学科教授
畑崎 喜芳	富山県リハビリテーション病院・こども支援センター病院長
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5年度は44課題（事前評価10課題、中間評価18課題、事後評価16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8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	感染症発生動向調査データを活用した疫学的解析	中間評価
2	新生児マスキングにおける偽陽性率低減のための2次検査法の確立	中間評価
3	新型コロナウイルスワクチン導入後の高齢者の血中中和抗体の意義に関する研究	中間評価
4	患者鼻口腔内における新型コロナウイルスの感染様態の解明	事後評価
5	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	中間評価
6	潜在的なレジオネラ症患者の実態把握と感染源解明	中間評価
7	金属イオンとのオンカラム錯形成反応を利用したHPLC-UV法によるエチレンアミン類の一斉分析法の開発	事前評価
8	植物性自然毒成分の多成分一斉分析法の検討	事後評価

## 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)

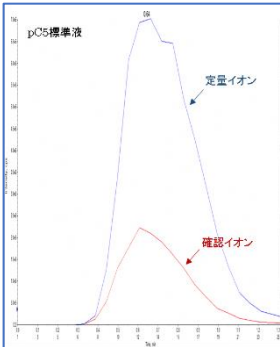
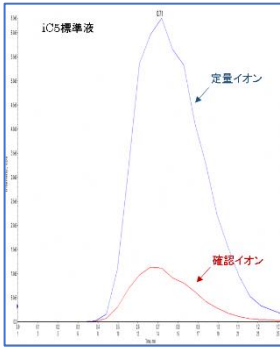
評価項目	評価基準
○総合評価	5：十分な成果、4：成果あり、3：普通 2：成果不十分、1：成果なし
○目的達成度	5：十分あり、4：あり、3：普通、 2：少ない、1：ない
○研究成果の有用性	
○研究期間と経費の効率化	

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	感染症発生動向調査データを活用した疫学的解析	
区分	中間評価	研究期間	令和3～5年度	
研究中間 報告概要	<p><b>【研究概要】</b></p> <p>感染症情報センターでは、感染症発生動向調査の週報を作成し、メーリングリスト送信、HP公開等により、県内医療機関、関係機関および県民へ情報提供、注意喚起等を行っている。週報では、各感染症の発患者数に加え、インフォメーションとして、今注意すべき感染症について、報告数の推移と共に記事を掲載しているが、報告数以外の解析(性別、年齢、職業、感染経路など)はほとんど行えていない。</p> <p>感染症発生動向調査データを用いて、発生状況のトレンドやアウトブレイク発生時の情報を解析、公表し、感染対策の一助とすると共に、感染症情報センターの機能強化に資する。</p>			
	<p><b>【研究計画の進捗度・達成度】</b></p> <p>進捗度 60%</p> <p>① <u>RSウイルス(RSV)感染症の増加について (R4年度内部評価報告済)</u></p> <p>飛沫によりヒト-ヒト感染する呼吸器感染症は、COVID-19流行以降顕著に減少した。RSV感染症は、例年は秋～初冬にかけて流行するが、2020年に流行が認められなかった。一方、2021年3月以降、季節外れの流行が認められ、例年の約2倍のピークが認められた(図1-1)。2歳以上の報告数が2018、19年と比較し、顕著に増加した(図1-2)。</p> <p>② <u>2022/23シーズンの季節性インフルエンザの流行について</u></p> <p>COVID-19流行後、2020/21、2021/22シーズンには全国的に季節性インフルエンザの流行が認められなかった。一方、2022/23シーズンには、COVID-19流行前と比較してやや遅い第8週をピークに流行が認められた。富山県内の流行の特徴を明らかにするため、2016/17～2022/23シーズンにおけるインフルエンザ定点およびインフルエンザ入院サーベイランスの報告数をシーズン別、年齢群別に解析を行った。</p> <p>結果、2022/23シーズンのインフルエンザ定点からの報告数は、&lt;15歳の小児では、COVID-19流行前(2016/17～2018/19シーズン)と同程度の流行が認められた。一方、成人、特に≥60歳の高齢者では、COVID-19流行前と比較し、大幅に報告数が減少した(図2、表)。入院サーベイランスにおいても同様に≥60歳の報告数は減少した。小児では今シーズン学級閉鎖の報告数も増加していることから、学校等集団生活の場で感染が拡大したものと考えられる。一方、成人、特に高齢者では、COVID-19感染対策が継続的に実施されており、成人間でのヒト-ヒト感染伝播が限定的であったことが示唆された。</p> <p>③ <u>梅毒の発生状況について</u></p> <p>全国的に梅毒の報告数は、増加傾向である。2012～2021年の10年間に富山県で梅毒と診断された186例を対象として、発生動向の特徴を明らかにすることを目的に解析を行った。</p> <p>保健所・厚生センター別報告数の推移を図3-1に示す。県内の梅毒報告数は増加傾向にあり、特に2019年以降急増した。特に富山市保健所管内からの報告数が増加しており、過去最多の報告数となった2021年の報告の8割を占めた(図3-1)。年代別推移では、男女ともに20歳代、30歳代の若年層で報告数が顕著に増加していた(図3-2)。また、感染経路については、性風俗産業の利用歴や従事歴についての記載が始まった2019年以降、男性の約半数で性風俗産業の利用歴があった。但し、性風俗産業の利用歴や従事歴に関しては未回答の例も多く、過小評価している可能性がある。</p>			

	<p>【今後の計画】</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・②インフルエンザについて、2022/23 シーズンが終わり次第、学術雑誌への投稿を行う予定。また、来シーズンの発生動向も継続して注視する。</li> <li>・③梅毒は症状の出現と軽快を繰り返す特徴から早期受診に繋がりにくい。感染者数の増加は公衆衛生上の課題であり、県民への注意喚起等対策を検討する必要がある。 <ul style="list-style-type: none"> <li>・随時、流行する感染症について解析を実施する予定。</li> </ul> </li> </ul>		
評価結果	評価	課題達成の見込み	研究課題の取扱い
	4.3	4.3	5.0
委員会の主な意見	<p>【コメント】</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・RS ウイルス感染症や季節性インフルエンザなどの流行状況等を把握し、その疫学情報を住民にわかりやすく提供することは、感染拡大防止の観点からも重要である。今後も、2022/23 期の季節性インフルエンザの集計解析や梅毒などへの取り組み強化が計画されており、その成果が期待される。</li> <li>・着実に成果が蓄積されており、このまま計画どおり継続して目的を達成することを期待します。</li> <li>・県の感染症情報は大変ありがたく、特に COVID-19、RS ウイルス感染症などの情報は日常診療上、絶対必要なものとなっている。</li> </ul> <p>【指摘事項等】</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>①COVID-19 については、5 類に変更後は、一般の関心や警戒心が低下しているが、引き続き、その発生動向を正確に把握する必要があるように思われる。</li> <li>②ニーズが高い研究であり、令和 6 年度以降も継続することが望まれる。</li> <li>③解析結果のみを公表するだけでなく、その結果を踏まえ効果的な予防方法などの紹介を加えるとなお良いのではないかと考える。</li> <li>④得られる知見は、他の感染症にも適用できる可能性が考えられることから、継続的に実施してほしい。</li> <li>⑤病原体定点由来検体のウイルスサーベイランスを基盤とする分子疫学データも加味するとさらに素晴らしい研究になると思う。</li> <li>⑥研究期間終了後も成果を活用し情報発信を継続していただきたい。</li> <li>⑦COVID-19 蔓延による RS ウイルス感染症の年齢分布の変化など、COVID-19 流行による各種ウイルス感染症への影響の考察があればありがたい。</li> <li>⑧COVID-19 の影響が今後その他の感染症の動向にどのような影響を与えるのかは大変興味がある。梅毒を含めて今後も継続して調べてほしい。</li> </ol>		
	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）	<ol style="list-style-type: none"> <li>①COVID-19 について、5 類移行後、衛生研究所のホームページにおいて、定点報告数に加え、患者推計値や年齢別発生動向などに関する情報発信を実施しており、継続していききたい。</li> <li>②④⑥ 研究期間終了後も引き続き、流行する感染症を対象に解析、情報還元を実施する等、情報発信を継続していく。</li> <li>③県民へ情報発信する際には、ご指摘頂いた効果的な予防方法を発信できるよう、検討していきたい。</li> <li>⑤ウイルス部、細菌部と連携し、よりよい研究ができるよう努めていきたい。</li> <li>⑦⑧ COVID-19 流行後の各種感染症への影響について、引き続き検討、考察を深めていきたい。</li> </ol>	

No.	2	課題名	新生児マススクリーニングにおける偽陽性率低減のための2次検査法の確立		
区分	中間評価	研究期間	令和4～5年度		
研究中間 報告概要	<p><b>【研究概要】</b></p> <p>新生児マススクリーニングのタンデムマス法の対象疾患であるイソ吉草酸血症は、イソバレリルカルニチン (iC5) を測定指標としている。ところが、ピボキシル基を持つ抗菌薬の使用により産生するピバロイルカルニチン (pC5) は、測定指標である iC5 と質量数が同じであるため、現行の LC/MS/MS を用いた測定法では判別できない。そのため、新生児や母親への抗菌薬の使用による偽陽性が増加する原因となっている。そこで、2次検査法として、新生児マススクリーニングの測定指標が高い場合に、抗菌薬使用による偽陽性か否かを同定する測定法を確立させることにより、新生児マススクリーニングとして適正な再採血率、精検率を確保することが可能となり、検査精度の向上にも繋がる。</p> <p><b>【研究計画の進捗度・達成度】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>新生児マススクリーニング用濾紙血液検体の使用について倫理審査委員会での承認を得た。</li> <li>島津製作所 服部らの方法 (Children 2022, 9, 694) を、当所のシステムに応用し、新生児の濾紙血液検体での検討を行った。</li> </ul> <p>① iC5 および pC5 の標準品についてタンデムマス分析を行い、プロダクトイオンのうち、マススクリーニング用の定量イオン (<math>m/z</math> 246.2 &gt; <u>85.0</u>) とは別に、iC5 と pC5 とで検出の差が最も大きくなる確認イオン (<math>m/z</math> 246.2 &gt; <u>187.1</u>) を検出できる測定条件を、通常のマスクリーニング用の条件に追加設定した。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <p>② 抗菌薬使用の有無の判定には、iC5 と pC5 それぞれの定量イオンと確認イオンのピーク比から求める iC5 score および pC5 score を使用する。</p> <p>pC5 score は、pC5 標準品での比を 100 となるように設定するので、濾紙血液検体での pC5 score が 100 に近い数字となれば、その新生児は抗菌薬使用による pC5 が高いことになる。同様に iC5 score が 100 に近い数字となれば、患者の可能性が高い。</p> <p>新生児検体 700 件、新生児マススクリーニングでの C5 高値例 5 例について検討した結果、C5 高値例については、いずれも pC5 score が 90 以上、iC5 score は 40 程度であり、抗菌薬の使用による偽陽性と判定された。医療機関への問い合わせの結果でも、5 例とも母親に抗菌薬が投与されていた。</p> <p>進捗度 80%</p> <p><b>【今後の計画】</b></p> <p>これまでの検討結果をまとめ、発表する。</p>				
	評価結果	評価	課題達成の見込み	研究課題の取扱い	
	4.1	4.1	5.0		

<p>委員会の 主な意見</p>	<p><b>【コメント】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・イソ吉草酸血症は、稀な疾患であるが、それを早期に正確に診断することは、重要である。しかし、ピボキシル基を持つ薬剤より生成する pC5 は、イソ吉草酸の代謝物である iC5 と質量数が同じであり LC/MS/MS では鑑別が困難であることから、pC5 と iC5 の確認イオンを検出することで、この問題を解決しようと試みており、その成果が期待される。</li> <li>・他のフラグメントの強度を用いて異性体を判断する、という発想はとても興味深い。</li> <li>・着実に成果が蓄積されており、このまま計画どおり継続して目的を達成することを期待する。</li> <li>・非常に有意義な手法の開発だと思う。</li> </ul> <p><b>【指摘事項等】</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>①研究成果は他のマススクリーニング実施機関と共有するようにつとめていただきたい。</li> <li>②当該フラグメントの強度差（比）は、装置条件によって変わらないのか疑問に思った。強度差（比）が顕著になる条件を「最適」と定義しているのか。</li> <li>③ピボキシル基を有しない抗菌薬の擬陽性に関する考察が必要と思う。</li> <li>④ピボキシル基を持たない抗生剤内服の母親からの検体でなぜ C 5 が高値になったのか、何らかの考察ができればありがたい。</li> <li>⑤カラムの選別や塩濃度の調整などの工夫を今後も進めてほしい。</li> </ol>
<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>	<ol style="list-style-type: none"> <li>①偽陽性率低減への取り組みは、全国のマスクリーニング実施機関においても課題となっているので、研究成果を論文等で報告することで情報を共有したいと考えている。</li> <li>②比較するフラグメントの強度は装置により変わるので、装置ごとに測定条件を設定することが必要となる。「最適化」とは、強度比が最も顕著となる測定条件を、標準液を用いて検出する手法であり、その測定条件をタンデムマス装置に設定して検討を行った。</li> <li>③④ ピボキシル基を有しない抗菌薬を使用していた例については、あらためて、他の抗菌薬の使用の有無の確認を行うとともに、使用されていた抗菌薬についてもどのようなフラグメントが検出されるのかを検討したい。</li> <li>⑤今回は、カラムを使用しないフローインジェクション法であるルーチン検査に影響がなく、移動相の変更など特別な操作の必要がない方法で検討したが、カラムを利用した分離法等の他の検出方法についても検討していきたい。</li> </ol>

No.	3	課題名	新型コロナウイルスワクチン導入後の高齢者の血中中和抗体の意義に関する研究	
区分	中間評価	研究期間	令和3～5年度	
研究中間報告概要	<p><b>【研究概要】</b>          新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の原因である SARS-CoV-2 は、変異を繰り返しながら世界中で流行している。日本では、2021 年春から mRNA ワクチン接種が導入され、重症化リスクを有する高齢者や高齢者施設職員は優先接種の対象となった。</p> <p>そこで、本研究では、高齢者施設の入所者と職員を対象として mRNA ワクチンの安全性、有用性を検証するために、ワクチン接種前後の中和抗体の応答と維持期間を中長期的に解析することで、個人や社会の感染伝播のリスク評価に役立てる。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ mRNA ワクチン接種後の安全性について              県内の高齢者施設（6 施設）の入所者および施設職員の 335 名を対象に、年齢、性別、基礎疾患、ワクチン接種後の有害事象について調査する。</li> <li>・ SARS-CoV-2 抗体調査              対象者について mRNA ワクチン接種前、2 回目接種、3 回目接種、オミクロン株対応ワクチン接種（5 回目接種）後のそれぞれ 2 か月後と 5 か月後に各 1ml 程度の血液を採取し、SARS-CoV-2 シュードタイプウイルス（pv）{従来株（武漢株）、アルファ株、デルタ株、オミクロン株 BA.1、BA.5、XBB 等）のスパイクタンパク質を外套したシュードタイプ水疱性口内炎ウイルス（SARS-CoV-2pv）に対する中和活性を測定する。また、抗 SARS-CoV-2 RBD IgG および抗 nucleocapsid (N) -IgG レベルも測定する。              富山県衛生研究所倫理審査委員会の承認番号：R3-1（変更申請 R3-11，R4-14）</li> </ul> <p><b>【研究計画の進捗度・達成度】</b>  <b>（令和3～4年度）達成度：研究計画全体の80%</b></p> <p>1) SARS-CoV-2 抗体調査          対象者血清中の従来株（武漢株）、アルファ株、デルタ株、オミクロン株 BA.1、および BA.5 の SARS-CoV-2pv に対する中和活性は、2 回目接種 5 か月後では 2 回目接種 2 か月後に比べて漸減していたが、3 回目接種 2 か月後では、全ての株に対して顕著に上昇し、3 回目接種 5 か月後においても、ワクチン 2 回目接種 2 か月後よりも 2～5 倍程度高く維持されていた。RBD-IgG 価も同様の傾向が確認された。高齢者施設職員及び入居者において、追加接種による抗体応答の亢進が確認された。</p> <p>2) mRNA ワクチン接種後の有害事象と安全性について          ワクチン接種後 7 日目までの有害事象（注射部位の痛み、発赤、腫脹、発熱、易疲労感、頭痛、悪寒、嘔吐、下痢、筋肉痛、関節痛）の発生頻度と重症度（1：軽度、2：中等度、3：重度、4：極めて重度）をスコア化し、抗体価との相関を解析すると、職員、入居者ともに、局所および、全身の軽度・中等度の有害事象の発生頻度が年齢と逆相関した。入居者では、有害事象の発生頻度が低く、ワクチン接種の利点が高いものと考えられた。</p> <p>3) 学術論文の作成          上記内容については、英文学術論文にまとめ、掲載された。          Neutralization of Omicron subvariants BA.1 and BA.5 by a booster dose of COVID-19 mRNA vaccine in a Japanese nursing home cohort. Itamochi M., Yazawa S., Inasaki N., et al., Vaccine. 41: 2234-2242, 2023.</p> <p><b>【今後の計画】</b>  <b>（令和5年度）</b>          オミクロン株対応ワクチン（5 回目）接種後の抗体調査を実施する。          本研究により、COVID-19 ワクチンの安全性、有用性を検証するとともに、今後のワクチン接種スケジュール決定に資する成績を提供できるものと考えられる。<b>（昨年度研究評価における指摘事項への対応：調査の継続）</b></p>			

評価結果	評価	課題達成の見込み	研究課題の取扱い
		4.4	4.4
委員会の 主な意見	<p>【コメント】</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・新型コロナウイルスワクチン接種後の高齢者の血中中和抗体の獲得状況を把握することは、ワクチン政策の立案とともに、感染防止対策の観点からも重要である。</li> <li>・本研究が著名な英文誌（Vaccine）に掲載されるなど極めて有用な研究であると思われる。敬意を表する。</li> <li>・社会的にも重要なテーマなので、継続して目的を達成することを期待する。</li> <li>・細かな調査を行っており非常に評価できる研究内容と考える。</li> </ul> <p>【指摘事項等】</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>①副反応の弱かった事例において、十分な感染・発症防止能力が獲得できているか否かはワクチンの接種効果の重要な評価ポイントとなる。ワクチンの接種効果の評価指標として、中和抗体価のレベルとともに、SARS-CoV-2 ウイルスの抗原刺激に対する T-リンパ球の応答を評価の対象に加えてみるなどの試みも期待したい。</li> <li>②重要な研究である。対象者の脱落が多いことは残念である。</li> <li>③ワクチン効果に関する知見として記録に残す必要がある。ぜひ継続的に研究を進めていただきたい。</li> <li>④今後、Breakthrough 感染に関与した株とワクチン株との抗原性が比較できる研究に発展することを期待する。</li> <li>⑤解析が難しいと思うが、ブレイクスルーの有無を含めて、解析できればより価値のある知見となると思う。</li> <li>⑥評価委員会では出された意見についてご検討いただきたい。例えばワクチン接種後の副反応の発生頻度であるが、入居者では殆ど副反応がなく、データとして提示するには不自然と思われる。非常に有意義な研究と思われるので、ぜひ続行いただければありがたい。</li> <li>⑦ワクチンを受けた回数と今後の感染確率や重症度に違いがないか気になる。可能ならフォローの研究も続けてほしい。期待している。</li> </ol>		
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）	<ol style="list-style-type: none"> <li>①ご指摘のとおり、ワクチン接種後の有害事象の弱い事例における抗体価および、感染後の重症度等について検討していきたい。T-リンパ球の応答については、残念ながら本調査ではこれまで末梢血単核球を採取していなかったことから測定は難しいが、今後の調査では、T-リンパ球の応答に関する評価も考慮していきたい。</li> <li>②コメントいただいたように、ご協力いただいた方に納得いただけるように、調査結果をまとめてまいりたい。</li> <li>③コメントいただいたとおり、調査結果をまとめていく。今後の研究の継続について、可能かどうか検討してまいりたい。</li> <li>④コメントのとおり、Breakthrough 感染に関与したウイルス株とワクチン株との抗原性の比較に関する研究への発展ができるように、努めてまいりたい。</li> <li>⑤ご指摘のとおり、本調査におけるブレイクスルー感染の有無に関しても、解析していきたい。</li> <li>⑥評価委員会でのご指摘を受け、副反応の発生頻度の解釈（入居者での副反応の少なさ、副反応の発生を捉えることの困難さを考慮すること等）について、検討していきたい。また、調査の続行につきまして、可能かどうか検討してまいりたい。</li> <li>⑦ワクチン接種回数とブレイクスルー感染や重症度の違いについて、解析していきたい。また、フォローの研究について、可能かどうか検討してまいりたい。</li> </ol>		



No.	4	課題名	患者鼻口腔内における新型コロナウイルスの感染様態の解明	
区分	事後評価	研究期間	令和3～4年度	
研究終了 報告概要	<p><b>【研究概要】</b></p> <p>新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の宿主細胞への侵入には、まず細胞表面にある ACE2 受容体に結合することから始まる。その後、エンドソーム内で外被蛋白質であるスパイク(S)蛋白質がカテプシンにより開裂を受け脱殻する経路と、細胞膜上で S 蛋白質が宿主の蛋白質分解酵素(プロテアーゼ)である TMPRSS2 により開裂を受け膜融合により脱殻する経路が知られている。そのため、新型コロナウイルスは細胞への感染時に何らかのプロテアーゼが存在していると、S 蛋白質が開裂され、感染が増強されることが予想される。インフルエンザウイルスにおいては、ウイルスが細胞から放出される際にプロテアーゼによって外被糖蛋白質が開裂を受けると、感染が増強されることが知られており、実際に気道上皮細胞から分泌されるトリプターゼ・クララや口腔内細菌等のプロテアーゼで感染が増強されるため、口腔内を清浄化することにより、ウイルスの感染を抑制できることも明らかとなっている。</p> <p>本研究では、インフルエンザウイルスと同様に新型コロナウイルスにおいても口腔内細菌等のプロテアーゼによって感染が増強されるのかを検証した。また、実際に臨床検体を用いて、感染患者鼻咽頭内の新型コロナウイルスがどれくらい宿主や口腔内細菌等のプロテアーゼで活性化されているのかを培養細胞を用いたウイルスの感染価の増減で検証した。</p>			
	<p><b>【得られた成果】</b></p> <p><b>1. 臨床検体での評価試験</b></p> <p>臨床検体がトリプシンの処理によって感染増強するのかを調べるため、同一検体をトリプシン処理/未処理で用意し、細胞に添加した。一定時間後に細胞を回収し、ウイルスゲノム量をリアルタイム PCR によって測定し、ゲノム量が何倍になるか評価したところ、デルタ株の検体 (n=56) では、トリプシン処理によってすべての検体の感染力が増強した(中央値 115.1 倍)。オミクロン株の検体 (n=44) では、トリプシン処理によって 33 件が感染増強したが、11 件は増強が見られなかった(中央値 3.86 倍)。この結果より、臨床検体中の新型コロナウイルスは、トリプシン処理により感染が増強することが分かった。一方で、オミクロン株では、デルタ株に比べて感染増強効果が弱く、ウイルスの性状が異なることが示唆された。</p> <p><b>2. シュードタイプウイルス (SARS-CoV-2pv) を用いた試験</b></p> <p>SARS-CoV-2 のスパイク蛋白質を外殻した人工擬似ウイルス(シュードタイプウイルス)を VeroE6 細胞に感染させた後に、トリプシンを添加し、感染増強効果を検証した。シュードタイプウイルスの感染性は、ルシフェラーゼによる活性化を指標に評価した。その結果、従来株、アルファ株、デルタ株ではトリプシン濃度依存的に感染力が増大したが、オミクロン株ではトリプシン処理による増強効果は確認できなかった。次に、ウイルス感染におけるトリプシンの作用機序を調べるために、細胞に感染させる前に SARS-CoV-2pv をトリプシンで前処理したが、すべての株で、感染増強効果は確認できなかった。SARS-CoV-2pv では、ウイルス粒子そのものがトリプシンにより活性化するのではなく、細胞接着後にトリプシンによる感染増強が起こることが推測された。</p> <p><b>3. 口腔内細菌培養上清を用いた感染増強効果</b></p> <p>3 種類の口腔内嫌気性菌 (<i>Prevotella melaninogenica</i>, <i>Prevotella intermedia</i>, <i>Fusobacterium necrophorum</i>) を培養し、濾過滅菌した培養液を用いて、それぞれ 6 検体をトリプシン処理と同様の条件で反応させ、ウイルスゲノム量を測定した。その結果、<i>F. necrophorum</i> の培養液で処理した場合、すべての検体で 10 倍近い感染増強効果が確認できた。これらの細菌は、健康人でも多くの方が口腔内に保有している常在菌の一種で、歯周病や歯肉炎の増悪化にも関与することが報告されている。</p>			

	<p><b>【まとめ】</b>          本研究により、鼻口腔内に存在する SARS-CoV-2 は、プロテアーゼによって 感染性が增大することがわかり、口腔内細菌が常在する口腔内でも同様の影響が見られることが予想される。日常的に口腔内を清潔に保つことは、新型コロナウイルス感染症の感染予防対策の一助となることが示唆される。          上記内容については、英文学術論文にまとめ、掲載された。          Activation of SARS-CoV-2 by trypsin-like proteases in the clinical specimens of patients with COVID-19. Yamazaki E., Yazawa S., Shimada T., et al., Sci Rep. 13: 11632, 2023.</p> <p><b>【今後の課題】</b>          口腔内細菌による感染性増強について作用機序等が不明であるため、今後解析する必要があると思われる。SARS-CoV-2 動物実験モデルを用いて、細菌の重複感染時における感染増強、重症化などについても検証する（富山大森永教授との共同研究）。</p>			
評価結果	総合評価	目的達成度	研究成果の有用性	研究機関と経費の効率化
	4.9	4.9	4.8	4.8
委員会の 主な意見	<p><b>【コメント】</b>          ・本研究内容が Sci Rep に掲載されたのは素晴らしい成果と思う。敬意を表する。          ・大変に価値ある知見が得られたと考える。</p> <p><b>【指摘事項等】</b>          ①ヒトの鼻口腔内で SARS-CoV-2 ウイルスは、プロテアーゼにより感染力が増大することが確認された。しかし、ウイルスの変異株間で差があり、またそのメカニズムには未解明な部分も残る。そこで、研究を継続しその解明が求められる。また、最終的な成果として、何らかのプロテアーゼ阻害剤の投与が感染力の減弱をもたらす可能性があり、感染予防の観点からも研究の発展が期待される。          ②感染予防には口腔内を清潔に保つことの重要性を示唆する成果といえ、臨床的にも有用な知見が得られたものと考ええる。          ③デルタ株などとオミクロン株との差異が明確となり、それぞれによる感染状況との整合性がとれている点は、高く評価できる。          ④細胞毒性が低く、作用機序の異なるプロテアーゼ阻害剤を用いた追加実験を行うとさらに完成度の高い研究になると思う。          ⑤オミクロン株で感染増強強化が顕著に見られなかった理由については、今後解明できればよいと考える。          ⑥大変興味深い研究だと思った。オミクロン株は細胞への感染にプロテアーゼを使わないことも面白いと感じた。また、プロテアーゼを出さない細菌ではウイルスの感染を増強しないことも面白いと思った。ぜひ、論文として結果を発信されたい。          ⑦新型コロナウイルスがオミクロン株に変わってから、劇的に細胞との結合とプロテアーゼの効果が変わったことがよくわかる研究である。口腔内の清潔維持と感染予防の関係がわかりやすく証明されており大変面白かった。</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>①プロテアーゼによる感染増大性に関するウイルスの変異株間での差については、TMPRSS2 の依存性に比例していると思われる。メカニズムや阻害剤による影響については in vivo での検証も含めて継続して研究を進めていきたい。          ②臨床的にも効果があるのか検証できるとより有用な知見になると思われる。          ③トリプシン処理による影響が TMPRSS2 との依存性と合致した結果が得られたのはよかったと考えている。          ④プロテアーゼ阻害剤処理によって感染増強を抑制できるのか検証してみたい。          ⑤細胞侵入に関して、オミクロン株はプロテアーゼ（TMPRSS2）による依存性が低いこと</p>			

がトリプシン処理での感染増強効果が弱かった理由の一つではないかと考えているが、詳細については今後検討したい。

⑥細菌由来のプロテアーゼが感染増強に関与しているかはより詳細な検証を行わなければならないと考えています。

⑦感染者の口腔内で実際に起こっているであろう現象を臨床検体を用いて検証できたことは研究として有意義であったと考えている。

No.	5	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	中間評価	研究期間	令和3～6年度	
研究中間 報告概要	<p><b>【研究概要】</b></p> <p>2021年6月に県内で給食等を原因とした大規模な集団食中毒が発生した。原因食品と特定された牛乳および患者便から同一菌株の大腸菌（以下、本菌）が分離され、病因物質であることが強く疑われた。本菌が当該食中毒事例における病因物質となりうるか特定することを目的として、これまでに以下の細菌学的解析を行ってきた。</p> <p>① 患者糞便のメタゲノム解析 本菌以外に原因菌として推定される塩基配列は検出されなかった。</p> <p>② MLST (multi locus sequence typing) による型別 本菌は ST1380 であることが判明した。同じ ST 型の大腸菌として、下痢原性大腸菌カテゴリーの 1 つである腸管凝集性大腸菌 (EAEC) が知られていることから、本菌は EAEC と近縁であることが考えられた。</p> <p>③ 培養細胞を用いた接着実験 培養細胞への接着は観察されたが、EAEC が示すような典型的な接着パターンは観察されなかった。</p> <p>④ ゲノム解析による病原因子遺伝子の検索 本菌ゲノム配列から主要な下痢原性大腸菌が保有する典型的な病原因子遺伝子は検出されなかった。しかしながら、本菌はゲノム上に細胞接着因子等をコードしている Type III 分泌系の病原因子遺伝子群 ETT2 を保有していた。ETT2 は凝集付着性の増強や血清補体に対する抵抗性の寄与なども報告されており、細菌の病原性に関与することが判明している。</p> <p>本菌において、ETT2 が病原性に関与するかを調べるに先立ち、定量リアルタイム PCR (qRT-PCR) によって ETT2 が発現しているかを確認した。ETT2 における mRNA 相対定量系および絶対定量系を構築し、mRNA が検出されるかを確認した。その結果、ETT2 の複数の遺伝子において mRNA が検出された。そのため、ETT2 は遺伝子として機能していることが考えられた。</p> <p>今後は、本菌における ETT2 の機能解析を行い、ETT2 が本菌の病原性に関与するかを解析する。</p> <p><b>【研究計画の進捗度・達成度】</b></p> <p>令和4年度 進捗度・達成度 60%</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>ETT2 遺伝子群 <i>eicA</i>、<i>air</i>、<i>eprH</i>、<i>eivA</i> について、qRT-PCR による mRNA 相対定量系を構築した。リファレンス遺伝子 <i>rpoA</i> の mRNA 量との相対比を算出し、各遺伝子における mRNA 量を求めた。その結果、<i>eicA</i>、<i>air</i>、<i>eprH</i> の3つの遺伝子においては、比較対照株 EAEC 042 株と比較して発現量は少なく、<i>eicA</i> においては 1/10 程度であった。一方で、<i>eivA</i> においては、<i>rpoA</i> 遺伝子と増幅効率が同等ではなかったため、発現量を定量できなかった。</li> <li>相対定量ができなかった <i>eivA</i> については、TaqMan プローブ法を用いた絶対定量系を新たに構築し、mRNA の検出を試みた。その結果、<i>eivA</i> において mRNA が検出され、EAEC 042 株と同等の発現量を示した。</li> </ul> <p>上記の解析により、ETT2 の複数の遺伝子において mRNA が検出されたことから、本菌において ETT2 が遺伝子として機能していることが判明した。</p> <p><b>【今後の計画】</b></p> <p>① ETT2 領域にコードされている主要な遺伝子について、それぞれ遺伝子破壊株を、転</p>			

	<p>写制御因子については過剰発現株をそれぞれ作製する。</p> <p>② 作製した遺伝子破壊株および過剰発現株を培養細胞に添加し、接着パターンを観察する。特徴的な接着パターン等が観察された際には、細胞障害性などの詳細な解析を行う。</p>		
評価結果	評価	課題達成の見込み	研究課題の取扱い
	4.0	4.3	4.9
委員会の 主な意見	<p><b>【コメント】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・本菌による食中毒発生のメカニズムが明らかとなるように研究の継続を期待したい。</li> <li>・原因の解明に向け、広い視野に立ち、研究を進めていただきたい。</li> <li>・下痢原性大腸菌解析において、多角的解析が行われており、優れた内容の研究と思う。ぜひ、ETT2 の病原性解析を深められたい。</li> <li>・さらなる研究の推進と成果が期待される。</li> <li>・県内で起きた大規模食中毒に関する重要なテーマである。容易に解決できないと思うが、粘り強く研究を継続して解明に結び付けることが期待される。</li> <li>・評価委員会で出されたご意見を参考に、何とか病原性を証明できれば素晴らしいと考える。前途多難な面もあるが、成果を期待している。</li> </ul> <p><b>【指摘事項等】</b></p> <p>①ゲノム解析では、既知の病原遺伝子については網羅的に検出することは可能であるが、新しい未知の病原遺伝子の検出は難しいという限界がある。そこで、オーソドックスなクローニング技術も併用して、プラスミドベクターを用いた ST11380 株の <i>E. coli</i> ゲノムライブラリーを構築し、それを腸管由来の培養細胞に感染させて、細胞死や空胞化などの形態変化などを指標にして、毒性に関連する遺伝子や遺伝子領域を網羅的に特定する試みも並行して実施してはいかがか。</p> <p>②遺伝子的な手法以外も視野に入れて研究を進めることが重要と考える。</p> <p>③まだまだ不明な点が多い病原性大腸菌であるので、未知の遺伝子を一つずつ確認していく作業は必要であるので、頑張ってもらいたい。確実に病原性をつなげる実験の工夫も必要かもしれない。</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>①今後の方針としては、ゲノム解析だけではなく、クローニング技術や遺伝子編集技術によって遺伝子変異株や過剰発現株を作製し、ETT2 領域における遺伝子の機能解析を主として行っていきたいと考いる。具体的には、培養細胞株を用いた形態変化および細胞障害性等の解析や、マウスモデルを用いた感染実験によって機能解析を行っていきたいと考えている。</p> <p>②ゲノム解析だけでなく、遺伝子編集や、培養細胞を用いた ETT2 の機能解析、実験動物を用いた感染実験等、多角的に解析を進めていきたいと考えている。</p> <p>③委員会の中での指摘のとおり、何もわからないまま時間が過ぎていってしまう可能性が大いに考えられると思う。遺伝子操作等、古典的な実験系での解析を地道に行いながらも、有望な実験系を模索していきたい。</p>		

No.	6	課題名	潜在的なレジオネラ症患者の実態把握と感染源解明	
区分	中間評価	研究期間	令和2～5年度	
研究中間 報告概要	<p><b>【研究概要】</b>  現在普及しているレジオネラ症診断用の尿中抗原検査試薬は、<i>Legionella pneumophila</i> 血清群1 (Lp1) 以外の菌種・血清群に対する感度は著しく低い。そのため、Lp1 以外のレジオネラ属菌に感染している患者はほとんど把握されていない。また、Lp1 に感染した患者についても、入浴施設以外の感染源に関する報告は少ない。</p> <p>本研究の目的は、前向き調査により潜在的なレジオネラ症患者を積極的な喀痰培養検査によって診断し、その患者実態の把握を通じて、感染源を明らかにすることである。患者の行動調査や、臨床分離株と環境分離株の系統解析から、これまで不明であった Lp1 以外を原因菌とするレジオネラ症患者の感染源を解明する。また、Lp1 に感染した患者の入浴施設以外の感染源についても、菌株の系統解析から解明する。</p>			
	<p><b>【研究計画の進捗度・達成度】</b>  <u>進捗度・達成度 70%</u>  本研究を実施するにあたり、当所における倫理審査委員会の承認を得た。また、レジオネラ症を疑う患者の喀痰を含む呼吸器検体を確保するため、県内2か所の医療機関に協力を依頼し、当該医療機関における倫理審査委員会の承認を得た。</p> <p>これまでに、当所に搬入された呼吸器検体（189症例201検体）について、レジオネラ属菌検査の結果を解析した。尿中抗原によってレジオネラ症と診断された177検体のうち、65検体（36.8%）から菌が分離され、すべてLp1であった。一方、尿中抗原が陰性であったレジオネラ症疑い患者から採取された24検体のうち、2検体からLp2が分離された（令和4年度は3検体搬入されたが、いずれも陰性）。したがって、Lp1 以外を原因菌とする、従来の尿中抗原検査では診断できない潜在的なレジオネラ症患者の存在が示唆された。また、入浴施設を利用していない患者の多くは、菌株の系統解析の結果からも入浴施設以外の感染が疑われた。</p> <p><b>【今後の計画】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・得られた呼吸器検体について、積極的に培養検査や遺伝子検査など様々な検査を実施し、検査診断の確定に取り組む。</li> <li>・臨床分離株と当所に保存してある環境分離株の系統解析を実施し、患者の行動調査と合わせて、とりわけLp1 以外を原因菌とするレジオネラ症患者について、その感染源を解明する。</li> <li>・レジオネラ属菌が陰性であった喀痰検体からDNAを抽出後、16Sアンプリコン解析を実施し、他の原因菌が検出されるか精査する。</li> </ul>			
評価結果	評価	課題達成の見込み	研究課題の取扱い	
	4.1	4.3	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>・Lp2 系統の <i>L. pneumophila</i> 感染症の診断法の構築や、その感染源・感染経路を特定することは、学術的にも公衆衛生上も重要な課題でありその成果が期待される。</li> <li>・県内の罹患率が全国に比べて高いことから、実態把握や感染源の解明は重要であると考えられる。着実に研究を進めて、目的を達成することが期待される。</li> <li>・臨床分離株と環境分離株の遺伝子型が一致しない例も多く、今後まだ明らかとなっていない感染源が特定できれば素晴らしいと感じる。今後の成果を期待する。</li> </ul> <p><b>【指摘事項等】</b></p>			

	<p>①<i>L. pneumophila</i>の感染経路は、一般的に温泉や浴場、噴水などの飛沫の吸入や温泉水の飲水などと理解されているが、それらに暴露されたことがはっきりしない事例もあることから、Lp2 系統別の経路、例えば、赤痢アメーバの感染経路のような、汚染された水や飲食物を介した保菌アメーバの経口感染なども想定して調査・研究も考えてみる価値はあるように思われる。</p> <p>②入浴施設以外の感染源についても明らかにしてほしい。本県はレジオネラ症の発症が多いので、入浴施設の消毒徹底等を指導されてはいかがか。</p> <p>③県西部の入浴施設から検出される ST502、ST505 の起源はなにか、気になる。これらによる感染を防ぐことができれば、罹患率を低下させることができる。消毒、清掃などによる排除が難しい原因の解明が待たれる。</p> <p>④なぜ、富山県でレジオネラ感染症が多いのか？その理由がわかる細菌学的、分子疫学的研究に発展することを期待する。また、分離株の NGS+バイオインフォマティクス解析を提案するがいかがか。</p> <p>⑤不明な点も多いので、他の自治体との協力も重要となるといえる。</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入浴施設以外の感染経路について、Lp2 を中心に精査していきたいと考えている。</p> <p>②入浴施設以外の感染経路について精査していきたい。また、行政とも連携し、入浴施設における消毒等の徹底についても協議していきたいと考えている。</p> <p>③ST502、ST505 については、その起源や消毒に対する抵抗等について、研究を進めていく予定である。</p> <p>④今後、NGS を用いた分離株の解析を進めていきたいと考えている。</p> <p>⑤ST502、ST505 の他県での検出状況など、他の自治体とも協力して進めていきたいと考えている。</p>

No.	7	課題名	金属イオンとのオンカラム錯形成反応を利用した HPLC-UV 法によるエチレンアミン類の一斉分析法の開発			
区分	事前評価	研究期間	令和5～7年度			
研究事前計画概要	<p><b>【研究概要】</b>  エチレンアミン類は工業的に広く用いられる化学物質であるが、生分解性に乏しい物質が多く、環境中に流出した際、生態系や人体に悪影響を及ぼす可能性がある。また、水道管の内側のエポキシ樹脂塗料の硬化剤として使われており、水道水を介して人の口に渡ることが懸念されている。日本ではエチレンアミン類のうち、トリエチレンテトラミン (TETA) は厚生労働省により要検討項目、エチレンジアミン (EDA)、テトラエチレンペンタミン (TEPA) は環境省により要調査項目に選定されている。アミン類の定量は、蛍光誘導体化後、HPLC-FL 法を用いる方法が一般的だが、煩雑な前処理、高価な誘導体化試薬、蛍光検出器が必要となる等の点で汎用性や簡便性に課題がある。そこで、本研究では移動相に金属イオン (銅イオン) を添加し、エチレンアミン類をオンラインで銅イオンに配位させ、HPLC-UV 法で一斉分析する方法の確立を目的とした。この方法は、汎用的な分析装置を用いた簡便なエチレンアミン類の一斉分析手法として期待できる。</p> <p><b>【実施内容】</b>  4種のエチレンアミン類、EDA、ジエチレントリアミン (DETA)、TETA、TEPA を測定対象に HPLC-UV 法による一斉分析法を検討する。  また、開発した一斉分析法を様々な試料に適用するための前処理法を検討し、実試料分析に応用する。  R5年度  ・エチレンアミン類一斉分析法の確立  ・エチレンアミン類の含有量が多い試料 (エポキシ樹脂硬化剤) の前処理法の検討  ・エポキシ樹脂硬化剤中のエチレンアミン類の測定  R6年度  ・エチレンアミン類の含有量が少ない試料 (水道水や環境水) の前処理法の検討  R7年度  ・水道水や環境水中のエチレンアミン類の測定</p> <p><b>【期待される学術的又は行政的意義又は効果】</b>  エチレンアミン類の一斉分析法についての報告例は極めて少ない。そのため、本研究で開発した一斉分析法は、汎用的で簡便な方法として、水道水や環境水の水質管理に利用されることが期待できる。  また、水道水中や環境水中のエチレンアミン類の濃度については存在量が不明等の理由から情報や知見を収集している状況であり、本研究においてエチレンアミン類濃度をモニターすることで得られた知見は有意義なものになると考えられる。</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
	3.9	3.9	4.0	4.0	4.0	4.1
委員会の主な意見	<p><b>【コメント】</b>  ・富山県には、多くの医薬品メーカーや化学薬品メーカーがあり、そこで、さまざまなエチレンアミン類が使用され環境中に放出されている可能性や、従業員がエチレンアミン類に暴露されている可能性もあり、環境衛生的観点からも、エチレンアミン類を一斉分析する試験方法の確立は重要であり、その成果を期待したい。  ・エチレンアミン類の環境動態については、まだ不明な点も多い。本研究により得られる</p>					



	<p>知見は学術的に意義のあるものになると思われる。  ・今後測定が必要となる物質の可能性が高いため、準備を進めることは重要であると考え。</p> <p><b>【指摘事項等】</b></p> <p>①評価対象の金属イオンとして、銅の他に、コバルトや鉄、ルビジウムなど、アミン類と配位しやすい他の金属も試しても良いように思う。</p> <p>②4 物質の環境中への排出量および環境政策上の位置づけは異なっているので、一斉分析を行う意義を整理したらどうか。</p> <p>③エチレンアミン類を定量目的成分とする理由、分離定量する必要性については、文献などを調査し、深めてほしい。</p> <p>④確立した方法が各種水質検査に有用なものとし、行政的にも意義のある研究としてほしい。</p> <p>⑤なぜ、衛生研究所で当該物質群の研究が必要なのか？エチレンアミン類の毒性評価ならびに重要性に関する科学的な根拠が必要と思う。</p> <p>⑥蛍光誘導法に比べて、UV 法は感度が低いとのこと。感度や精度など、分析法を開発するにあたり、あらかじめ具体的な目標を設定することが重要と考える。</p> <p>⑦環境中へのエチレンアミン類の排出量は多く、公共水域への排出量も多量であるが、公共水域のエチレンアミン類の濃度は非常に低いように思う。かなり低濃度(多分 0.1 μg/L 以下)のエチレンアミン類は測定できるのか。</p> <p>⑧感度や分離能のさらなる向上に努めてほしい。</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エチレンアミン類は金属イオンの中でも特に銅と安定な錯体を形成するため、本研究では銅を用いることが適切であると考えている。</p> <p>②環境水のようなエチレンアミン類の中でどれがどの程度含まれているか不明な試料については、分離して定量を行う必要があるため、まずは一斉分析法が求められると考えている。</p> <p>③④⑤エチレンアミン類の暴露により、目や皮膚、呼吸器に影響を及ぼすことが知られている。人は環境水を介してエチレンアミン類を体内に取り込む可能性があるが、環境水中の存在量については知られておらず現在知見を収集している状況である。よって、本研究で得られたデータは人への健康影響を評価していく上で重要なものになると考えている。また、富山県内の環境水中のエチレンアミン類の検出状況についてのデータはないことに加え、富山県は医薬品メーカーや化学メーカーが多くあるため、工場付近の河川水などを測定し排出状況などを把握していくことは、当所で行う調査研究として意義があると考えている。</p> <p>⑥上水試験法に記載されているアミン類分析法の定量下限値 0.05 mg/L を目標としている。</p> <p>⑦⑧公共水域のエチレンアミン類量は非常に低いことが予想される。UV 検出器は FL や MS 等の検出器と比較すると感度が悪く、本研究で開発した HPLC-UV 法では、低濃度（0.1 μg/L 以下）のエチレンアミン類を測定することができない。このため、現在、開発した HPLC-UV 法を環境水測定に適用するため、エチレンアミン類の濃縮法を検討している。</p>

No.	8	課題名	植物性自然毒成分の多成分一斉分析法の検討		
区分	事後評価	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>          自然毒による食中毒は例年、発生件数は少ないものの、毎年死者が発生しており、重大な健康被害をもたらす可能性が大きい。そのため、食中毒事件が発生した場合には原因物質の究明を迅速に行うことが衛生研究所の業務として重要である。そこで、食中毒事例が多い植物を対象に、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析装置（LC-MS/MS）による自然毒の多成分一斉分析法および簡便に試料処理ができる前処理法を検討し、食中毒発生時に迅速な対応が可能となる検査方法を確立する。</p> <p><b>【得られた成果】</b>          ・自然毒による食中毒事例が多い植物（8種類）自然毒成分（16成分）を対象に、全成分が検出可能なLC-MS/MSの測定条件を作成した。          ・食品の前処理法について抽出溶媒、固相カラムを比較検討し、採用する方法を決めた。          ・確立した検査方法で調理食品を含む4種の食品について添加回収試験を行った。イルジンSは予備検討で回収率が低かったが、試験溶液を希釈することで回収率が改善したため、10倍希釈して測定することとした。添加回収試験結果では全ての食品、自然毒成分について目標値を満たした（目標回収率50～200%、併行精度30%未満）。          ・スイセン、イヌサフランの有毒植物を調理し（炒め物、煮物、茹で物）、調理前後の自然毒含有量を比較した。炒め物の自然毒量は生の植物と大きな差はなかった。煮物や茹で物では自然毒は汁に多く移行していたが、植物と汁を合わせた全体では生の植物と差がなく、自然毒は有毒植物を調理後も減少しないこと、また、調理品の検査で検出できることが確認された。          ・吐物から自然毒が検出可能か検討するために、スイセン、イヌサフランの炒め物を人工胃液で消化し測定した。その結果、消化試料から自然毒は検出可能であったが、30分の消化で急激に低下していた。また、消化時間が長くなるとさらに低下したことから、吐物からの検出は摂取後経過時間の影響が大きいことが分かった。</p> <p><b>【今後の課題】</b>          自然毒食中毒は発生頻度が低いいため、検査体制の維持が課題である。特に、標準品については、所有する自然毒とそれらの使用期限を検討する必要がある。</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	
	4.3	4.4	4.1	4.3	
委員会の 主な意見	<p><b>【コメント】</b>          ・植物自然毒による食中毒は、毎年、全国の多くの地域で繰り返されており、その原因毒物の特定は、治療法を選択したり予後を推定する上で重要な情報である。本研究では、毒素検出法の構築や検出条件の最適化とともに、自然毒摂取後の各種毒素のヒト消化管内での経時的安定性の程度の把握を行い、さらに、毒素の検査のための標準手順書の作成とともに今後、毒素標準品の準備が検討されており、行政研究として重要と思われる、今後も継続する価値があると考えます。          ・多種の自然毒成分を一斉分析できる方法を確立した点は、検査方法として有用である。</p> <p><b>【指摘事項等】</b>          ①十分な成果が得られたと考える。研究成果は他の衛生研究所・検査機関とも共有してほしい。          ②標準品の入手、保存にやや難があるとのことであるが、スクリーニング時には全ての標</p>				

	<p>準品を用いずとも半定量できる工夫ができるとなると感じている。今後、検討していただきたい。</p> <p>③人口胃液処理による自然毒検出低下のメカニズムに対する言及が必要と思う。</p> <p>④今後は、今回の研究で得られた知見を十分に活用できるように、今後の活用法（成果発表他）や検査体制の維持について、検討していくことが重要と考える。</p> <p>⑤工夫して植物性自然毒を一度に複数分析できる系を構築していることは評価できる。ただあまり発生することがないものまで範囲に入れるより、より発生頻度が高いものや、命にかかわる可能性が高いものなど優先順位をつけることも必要かもしれない。期待しているので頑張ってほしい。</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>①⑤ 研究成果については公表し、地方衛生研究所（地衛研）間で共有していきたいと考えている。その上で今後さらに、他の地衛研の研究者と分析が重要な自然毒やスクリーニング時の半定量法等について、意見交換や議論をしていきたいと考えている。</p> <p>②標準品が無くても半定量できると良い、というご意見は大変重要だと考える。今後その可能性について情報収集していきたい。</p> <p>③人工胃液は0.1%ペプシン含有の日本薬局方溶出試験第1液：pH1.2を使用しており、酸または酵素の影響を受けて低下したものと推測しているが詳細については不明である。今回の実験は、摂食して胃液で消化された吐物を検査試料とした場合に、自然毒を検出できるか確認することを目的に行い、検出可能であることを確認できたことには意義があると考えている。</p> <p>④検査体制については、模擬試験（地衛研で実施している精度管理事業）等を活用し、多くの職員が経験を積めるように努めていくこととしている。</p>