

事業区分	経常研究	研究期間	平成 23 年度～平成 25 年度	評価区分	事後評価
研究テーマ名	病原ビブリオの感染源究明のための迅速検出技術に関する研究				
(副題)	(蛍光標識プローブによる病原ビブリオ迅速検出系の構築)				
主管の機関・科(研究室)名	研究代表者名	環境保健研究センター・保健科 右田 雄二			

### <県総合計画等での位置づけ>

長崎県総合計画	Ⅲ.安心で快適な暮らしの実現 7.安全・安心の確保向上プロジェクト 食の安全・安心を確立する体制づくり
科学技術振興ビジョン	(1) 豊かな生活環境のための科学技術振興 ⑦ 安全・安心の確保向上プロジェクト
環境保健研究センター運営計画 (研究重点目標等)	【重点目標5】「感染症の究明・拡大防止」を図る ① 感染症の究明・拡大防止に関する研究

### 1 研究の概要(100 文字)

増殖能力を有する細菌の高感度検出法として有用な FISH 法を応用した迅速検出技術を用い、特定病原ビブリオ(ビブリオ・バルニフィカス、耐熱性溶血毒産生性腸炎ビブリオ及びコレラ)の迅速かつ高精度な定量法を確立し、感染症や食中毒の原因究明調査に利用する。	
研究項目	①マイクロコロニー形成条件(培地処方・培養条件)の検討 ②特定ビブリオ種に特異的な DNA 配列から作製したプローブやプライマーの評価 ③構築したマイクロコロニー-FISH 法や細胞内遺伝子増幅法等の特異性評価 ④環境試料における新規開発試験系と培養試験系との比較及び評価

### 2 研究の必要性

1) 社会的・経済的背景及びニーズ	<p>食中毒や感染症の原因菌の探索は、これまで培養法が中心に行われてきた。ヒトの腸管内では、病原細菌は優勢に増殖するが、貧栄養かつ種々の環境ストレスが存在する自然環境中では、多くの細菌は生きてはいるが培養できない(Viable But Non-Culturable, VBNC)状態にあると考えられている。近年、この VBNC 状態とは、細菌が数十～数百個の <math>\mu</math>-colony 形成段階以降、増殖を停止させていることが明らかになってきた。</p> <p>現在の富栄養培地による培養試験系は増殖活性の高い菌を対象に考案されているため、環境下で VBNC 状態にある病原細菌の検出法としては必ずしも有効な方法ではない。</p>
2) 国、他県、市町、民間での実施の状況または実施の可能性	<p>FISH 法をベースとした微生物迅速検出技術は、医薬品製造水、土壌及び堆肥の衛生管理等に利用されており、大阪大学や佐賀大学が中心に取り組んでいる。今回の研究はこれらの検出技術を病原ビブリオの探索に利用範囲の拡大を目指した応用研究であり、先行研究例は少ない。</p>

### 3 効率性(研究項目と内容・方法)

研究項目	研究内容・方法	活動指標	H					単位
			22	23	24	25	26	
①	ビブリオ・バルニフィカスの応用 FISH 試験系の確立 (H23) 1) マイクロコロニー形成条件の検討 2) プローブ選抜 3) 反応系の検討 4) 特異性及び感度の評価	目標	4	/	/	/	/	試験項目数
		実績	4	/	/	/	/	



1)従来技術・先行技術と比較した新規性、優位性

応用 FISH 法は、培養を主体とした従来技術で明らかに出来なかった環境あるいは食品中の病原細菌の存在を明らかに出来る可能性が期待される。また結果によっては、特定病原微生物の新規定量試験法として衛生微生物領域で提言することも可能である。さらに迅速・低コストの試験系の実現が可能である。

2)成果の普及

■研究成果の社会・経済への還元シナリオ

論文・学会発表を通して衛生微生物領域の新たな検査技法として提言するとともに感染症や食中毒の原因究明調査へ活用する。

■研究成果による社会・経済への波及効果の見込み

・社会・経済への波及効果

新規に構築した試験系が感染症及び食中毒の原因究明や病原細菌のモニタリング法として、他研究機関や民間検査機関で普及する可能性もある。

(研究開発の途中で見直した事項)

研究開始時は、in situ PCR 法による毒素遺伝子の増幅を予定していたが、蛍光シグナルを増幅させることで PCR 法と同等以上の検出感度を有し、簡便かつ迅速に結果が得られる CARD (Catalyzed Reporter Deposition) 法に変更した。

種類	自己評価	研究評価委員会
事前	<p>(22 年度 ) 評価結果 (総合評価段階: A )</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・必要性 : A</li> </ul> <p>生体外や自然環境中の病原細菌は、貧栄養や種々の環境ストレスに曝され増殖活性が低下していることが多い。現在の富栄養培地を主体とした培養試験系は、環境中の病原細菌の検出法として、必ずしも有効な方法となっておらず、新たな特異的高感度検出法の開発が望まれる。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・効率性 : A</li> </ul> <p>現在、広く用いられている FISH 法の応用技術であるマイクロコニー-FISH 法や細胞内遺伝子増幅 (CPRINS-FISH) 法を用い、病原ビブリオについて試験系の構築を行う。また、長崎大学水産学部や佐賀大学農学部の技術的な協力支援体制も得ており、効率的な研究推進が期待できる。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・有効性 : A</li> </ul> <p>応用 FISH 法の技術を用いることにより、培養を主体とした従来技術で明らかに出来なかった環境下の病原細菌の存在を明らかに出来る可能性が期待される。また、特異性の高い試験系が構築できた場合、病原ビブリオの新規定量試験法として衛生微生物領域で提言することも可能である。さらに迅速・低コストの試験系実現の可能性もある。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・総合評価 : A</li> </ul>	<p>(22 年度) 評価結果 (総合評価段階: A )</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・必要性 A</li> </ul> <p>県民の健康維持や食の安全という観点から、公設研究機関としての研究の必要性は高いが、研究の意義や具体的な対策、展開について整理して欲しい。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・効率性 A</li> </ul> <p>対象を絞り込み現行法との比較研究を行うものであり、また、大学との研究協力・支援体制も確立していることから、効率的な研究展開が期待できる。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・有効性 A</li> </ul> <p>研究成果は、感染症や食中毒の原因解明等広く応用可能であり、有効性は高く、社会的波及効果も高い。PDCAを用いて迅速かつ確実に成果を出し、得られた成果については広く公表して欲しい。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・総合評価 A</li> </ul> <p>本研究は、優れた検出法の開発を行う先駆的な研究であり、食中毒や感染症の原因究明に役立つと考える。県民の安全・安心に対して本研究が資する必要性についてさらに検討し、公定法に取り入れられるようにして欲しい。</p>
途中	<p>( 年度 ) 評価結果 (総合評価段階: )</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・必要性</li> <li>・効率性</li> <li>・有効性</li> <li>・総合評価</li> </ul>	<p>( 年度 ) 評価結果 (総合評価段階: )</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・必要性</li> <li>・効率性</li> <li>・有効性</li> <li>・総合評価</li> </ul>
	対応	対応

<p>( H26 年度 )  <b>評価結果</b>  (総合評価段階: B )</p> <p>・必要性 : A</p> <p>自然環境中の病原細菌は、貧栄養や種々の環境ストレスに曝され、VBNC 状態に陥り検出困難となる。  また、培養試験系において、毒素保有株の選択分離にも多大な労力を要する。  このため、増殖特性を示した状態での特異的高感度検出法の開発が望まれている。</p> <p>・効率性 : B</p> <p>長崎大学および佐賀大学から、マイクロコロニー FISH 法の基本技術・最新情報の提供により RNA を標的とする検出系を効率的に構築することができ、概ね目的を達成できた。  一方、CARD-FISH 法を用いた毒素遺伝子の検出系については、プローブは設計・試作できたものの染色が不安定で技術の標準化に課題が残った。</p> <p>・有効性 : B</p> <p>マイクロコロニー FISH 法のプローブ設計を完成させ、類縁菌に対する特異性および FISH 法の反応率が高いことを証明した。  さらに環境由来試料のデータによって、実用性を確認した。  また、学会報告・論文等の公表については、H26年度中の公衆衛生学会等での発表を予定している。</p> <p>・総合評価 : B</p> <p>病原ビブリオを対象としたマイクロコロニー FISH 法の適用に見通しを得た事で、培養を主体とした従来技術では明らかにできなかった環境中あるいは食品中の病原細菌の存在を検出できる可能性が示された。  今後、食中毒や感染症などの公衆衛生領域での活用を進めるとともに、水産および農業分野の衛生管理にも新たな利用可能性を探っていきたい。</p>	<p>( H26 年度 )  <b>評価結果</b>  (総合評価段階: A )</p> <p>・必要性 A</p> <p>県民の健康に資するものであり、難培養性病原細菌の迅速な定量法の確立は、食中毒の原因究明調査ばかりか安全な食生活を保障することに繋がり必要性は高いが、具体的な対策の展開についても整理して欲しい。</p> <p>・効率性 B</p> <p>大学等との研究協力により、他用途の迅速検出技術を応用し、菌の検出時間を大幅に短縮できた迅速性の面では評価できるが、確実性には不安があり、今後の研究成果を期待したい。</p> <p>・有効性 A</p> <p>従来法と比較して菌検出が大幅に迅速化が出来ることを明らかにしており、今後さらに低コスト化と毒素検出技術の両面からの解析が出来れば更に有効性は増すものと考える。</p> <p>・総合評価 A</p> <p>研究に要した時間・費用を考えると、研究成果が乏しいと感じる面もあるが、検査時間の短縮は食中毒、感染症の原因究明に有効で、行政対策に役立つものである。研究課題解決に向け更なる取組みを期待したい。</p>
<p>対応:</p>	<p>対応</p> <p>今回、構築した病原ビブリオの迅速診断技術は、一部の類縁菌との交差反応があるものの、環境ストレス等により難培養化した菌も検出可能な方法である。  よって、食中毒や感染症の原因究明の際に、従来法に本法を加えることで、効率的な感染源究明調査を行えるよう進めて行く予定である。</p>