

令和6年度衛生研究所研究課題内部評価検討会議結果報告書

- 1 開催年月日 令和6年7月12日（金）
- 2 開催場所 衛生研究所 多目的ホール
- 3 評価方法 下記の基準により評価した。
 - (1) 事前評価
 - 5 独創性・貢献度等が高く、是非採択した方が良い
 - 4 採択することが妥当である
 - 3 採択することが概ね妥当である
 - 2 検討若しくは見直しをする必要がある
 - 1 採択すべきではない
 - (2) 中間評価
 - 5 独創性・貢献度等が高く、是非継続した方が良い
 - 4 継続することが妥当である
 - 3 継続することが概ね妥当である
 - 2 検討若しくは見直しをする必要がある
 - 1 中止すべきである
 - (3) 中間評価（期間延長）
 - 5 独創性・貢献度等が高く、是非期間延長した方が良い
 - 4 期間延長することが妥当である
 - 3 期間延長することが概ね妥当である
 - 2 検討若しくは見直しをする必要がある
 - 1 中止すべきである
 - (4) 中間評価（研究中止）
 - 3 継続した方が良い
 - 2 内容の見直しを行った上で、継続した方が良い
 - 1 中止すべきである
 - (5) 事後評価
 - 5 計画以上の成果が得られ、今後の発展性が認められた
 - 4 計画以上の成果が得られた
 - 3 計画どおりの成果が得られた
 - 2 計画に近い成果が得られた
 - 1 僅かな成果しか得られなかった

4 評価結果

(1) 事前評価、中間評価、中間評価（期間延長、研究中止）

区分	課題 番号	研究課題名	総合 評価
事前	06-01	千葉県における日本脳炎に対するリスク検討	4.0
	06-02	千葉県内で検出された下痢症ウイルスの遺伝子型解析状況	3.9
	06-03	健康食品中に含有するマグノフロリンの定量法の構築と実態調査	3.6
	06-04	市町村におけるフッ化物洗口の普及に関する研究	3.5
	06-05	自殺率市町村格差の関連要因に関する研究	3.5
中間	03-01	コロナ禍以降の流入下水中に存在するウイルスの動向	4.0
	03-02	健康食品中に含有する β -ニコチンアミドモノヌクレオチドの定量法の構築	3.6
	03-03	LC-MS/MS を用いた麻痺性貝毒及びフグ毒の一斉分析法の確立	3.8
中間 (期間延長)	29-10	千葉県におけるマダニの生息状況	3.9
	30-01	仁戸名糖尿病コントロール研究（0次） Nitona Integrated Trial Of Noninvasive Action for Diabetes Mellitus Control –Preliminary-	3.6
	04-07	歯科診療所における院内感染対策の現状と課題について	3.6
中間 (研究中止)	05-05	千葉県 HIV・性感染症（STI）検査事業における検査結果を加味した STI 発生動向の評価について	1.0

事前評価課題 5 課題のうち、06-01、06-02、06-03 の 3 課題が令和 6 年度の重点研究課題として選定された。

(2) 事後評価

課題番号	研究課題名	研究期間	総合評価
31 - 02 H31 重点	特定地区における優勢分布結核菌株の特定	令和元年度～ 令和5年度	2.6
<研究の概要> 千葉県では、平成 20 年度より県内の結核患者から分離された全結核菌株を収集して MLVA (multi-locus variable numbers of tandem repeats analysis) 型別により分子疫学的解析を行っているが、必ずしも感染経路の特定には至っていない。 本研究では、他自治体への通勤通学者の割合が少ないがある程度の人口規模を有する地域を対象とし、当該地域で同一 MLVA パターンと 1 領域だけ異なる SLV(single locus variant)を含めて次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を実施することで、地域に優勢に分布する結核菌株を特定し、今後の結核予防活動に寄与することを目的とする。 <研究成果> (期間延長前の実績：令和元年度～令和3年度) 2019 年（令和元年）末までに搬入された結核菌株のうち感染伝播性が高いと言われている modern Beijing lineage で MLVA (multi-locus variable numbers of tandem repeats analysis) が同一パターンまたは SLV(single locus variant)であった 33 株（選定した地域から搬入のあった結核菌 7 株を含む）を抽出し、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析を行った。得られたデータを、国立国際医療研究センターで公開されている CASTB（The Comprehensive Analysis Server for the Mycobacterium tuberculosis complex）を使用し、解析した結果、33 株全てが lineage2(East-Asian lineage)に分類され、ストレプトマイシン（Streptomycin:SM）耐性であることが判明した。続いてこの 33 株が、県内で分離された modern Beijing lineage の中でどのような位置付けになるかを調べるために、2019 年（令和元年）末までに分離された全ての modern Beijing lineage（990 株）を対象に MLVA ベースの MST（Minimum spanning tree）解析を行った結果、今回の解析の対象とした 33 株は既報（Wada et al., Plos One 2014;3:e011849）の pECT07(M4)株とその SLV であることが判明した。なお、この 33 株の全ゲノム解析データから菌株間の SNP(Single nucleotide polymorphism)を調べるために、MST 解析を行ったところ、異同判定の基準とされている 5SNPs 以内（Walker et al., Lancet Infect Dis 2013;13:137-46）の菌株は 9 菌株間でしか見られなかった（1.7%：9/528）。 これらの結果から優勢に分布しているという結核菌株の特定には至らなかった。 また、MLVA 解析では SLV までは感染の疑いがある（瀬戸ら, 結核, Vol.88.No.6:535-542, 2013）と言われているが、今回の全ゲノム解析で MLVA における SLV は 5SNPs 以下の可能性が低いことも考えられ、別な視点からの新しい知見が得られた。 ここまでの研究成果は以下の論文、学会にて発表を行った。 Journal of Infection and Chemotherapy (https://doi.org/10.1016/j.jiac.2021.12.020)			

Molecular epidemiological analysis of Mycobacterium tuberculosis modern Beijing genotype strains isolated in Chiba Prefecture over 10years

令和3年度第33回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部

細菌研究部会 研究会

「次世代シーケンサーを活用した結核菌ゲノム解析の取り組み」

(期間延長後の実績：令和4年度～令和5年度)

令和元年度から令和3年度までの3年間で modern Beijing lineage を対象として研究を進めたが、優勢に分布している株は見られなかった。そこで、他の MLVA パターンの lineage に型別された菌株についても状況を把握するため、modern Beijing lineage と同様に多く見られる ST25_19 Beijing lineage についても全ゲノム解析を行い、地域に優勢に分布する結核菌株の特定を試みることにした。

ST25_19 Beijing lineage で MLVA が同一パターンまたは SLV であった 14 株（選定した地域から搬入のあった結核菌 12 株を含む）を抽出し、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析を行った。

modern Beijing lineage の解析と同様、CASTB を使用した結果、14 株全てが lineage2 (East-Asian lineage) に分類され、薬剤耐性因子は無いことが判明した。さらに、この 14 株の全ゲノム解析データから菌株間の SNP を調べるために、MST 解析を行ったところ、異同判定の基準とされている 5SNPs 以内の菌株は 1 組（2 株）間でしか見られなかった（1.1% : 1/91）。

この結果から優勢に分布しているという結核菌株の特定には至らなかった。今回の異同判定に用いた基準は Walker らによって設定された 5SNPs であったが、北京型の比率が高い日本ではゲノム変異の発生率が高いと報告（Hakamata M et al., Sci Reports 2020;10:17997）されており、12SNPs がしきい値として適当であるとも報告（Fiebig L et al., Euro Surveill 2017;22:30439）されていることから、適切なしきい値の検討が今後の課題と考える。

課題番号	研究課題名	研究期間	総合評価
04-02 R4 重点	トウガラシ微斑ウイルスを使用した二枚貝 ノロウイルス食中毒検査法の確立	令和4年度～ 令和5年度	2.9
<研究の概要> 牡蠣を始めとする二枚貝はスーパーマーケット、飲食店等で流通しており、全国的に二枚貝(牡蠣が主)でのノロウイルス(以下 NoV)の食中毒が発生している。NoV は感染者の糞便に含まれており、下水→川→海という流れで最終的に牡蠣の消化管である中腸腺に蓄積・濃縮している。牡蠣の NoV 検査は厚生労働省通知に基づき実施し、濃縮操作を行っても検出感度は低い。現在 NoV に代わる汚染指標の設定が話題となっており、トウガラシ微斑ウイルス(以下 PMMoV)が指標ウイルスとして検討されていることに着目した。PMMoV は下水中に多く検出が認められ、NoV 同様牡蠣に蓄積・濃縮されていることが知られている。また NoV に比べ高濃度に検出され、NoV に代わる汚染指標として有効である可能性が示唆されている。 しかし、牡蠣を原因とした NoV 食中毒検査では PMMoV を活用した研究はまだない。PMMoV は濃縮処理前でも検出可能で、PMMoV 量から NoV 量の検出閾値を推定できれば、検査感度の改善が期待でき、食中毒検査の補助に繋がると考えられる。 <研究の成果> 1 実施内容 令和4年12月から令和6年3月までに県内で加熱用牡蠣を月に4～10個購入した。厚生労働省通知、食品衛生検査指針に基づき検査を実施し、濃縮方法は当所で実施している超遠心処理を採用し、濃縮後検体とした。さらに濃縮するに十分な量の検体は濃縮前に500μL 分取し、濃縮前検体とした。 濃縮前、濃縮後検体の RNA を抽出し、PMMoV のリアルタイム PCR を実施した。さらに RNA から cDNA を合成し 1stPCR を実施、その後 NoV の Nested リアルタイム PCR を行った。Nested リアルタイム PCR で NoV 陽性となった検体は、cDNA を鋳型としたリアルタイム PCR を実施した。 2 結果 ウイルスコピー数は PMMoV、NoV とともに中腸腺 1g あたり(単位: cpg)とした。 ① PMMoV、NoV 検出状況 PMMoV: 濃縮前、濃縮後ともに毎月検出された。6～9月は低濃度の検出だったが、感染性胃腸炎流行期(12～3月)は比較的高濃度で検出された。 NoV: 濃縮前、濃縮後ともに感染性胃腸炎流行期(12～4月)に検出された。また、濃縮前、濃縮後で検出される遺伝子群に相違が認められる検体も存在した。 ② NoV 陽性、陰性時の濃縮前 PMMoV 量比較 NoV 陽性、陰性時の濃縮前 PMMoV 量を比較し、ウィルコクソンの順位和検定で有意差が認められた($p < 0.01$)。また、PMMoV 量が 5.76 log cpg 以上で NoV 陽性検体が検出された。			

3 考察、まとめ

PMMoV は濃縮前、濃縮後全ての検体で検出されたが、 10^3 程の濃度差があり、6～9 月で低濃度となった。下水中の PMMoV は年間通してほぼ一定に推移しているとの研究結果が報告されている。下水から海水に流入する PMMoV を牡蠣は濃縮しているが、本研究で牡蠣中の PMMoV に季節変動を認めた。牡蠣は産卵期(6～9 月)に濾過水量が少なくなり、さらに摂餌量も減ると言われており、産卵期に PMMoV が低濃度になったと考えられた。NoV は感染性胃腸炎流行期に濃縮前、濃縮後で検出された。また濃縮前に検出された遺伝子群が必ずしも濃縮後に検出されていなかった。本研究では工程管理ウイルスを添加しておらず、原因は定かではないが、除去できなかった牡蠣由来物質、PCR 阻害物質などが濃縮され、濃縮後の NoV 検出を阻害したと考えられた。今後は工程管理ウイルスの添加について検証する必要がある。

NoV 陽性、陰性時の濃縮前 PMMoV 量を比較したところ、ウィルコクソンの順位和検定で有意差が認められ($p < 0.01$)、NoV 陰性時に比べ陽性時で PMMoV 量が多くなることが示された。そこで PMMoV 量を 4.50 log cpg から 0.25 ずつ区分けし、NoV が陽性になる閾値を求めたところ、5.76 log cpg 以上(最低検出濃度 5.84 log cpg)で NoV が検出された。このことから濃縮前 PMMoV が 5.76 log cpg 以上だった場合に濃縮前で NoV 検出を試みることにより、超遠心の濃縮処理工程を行わずに NoV を検出できる可能性がある。

本研究で濃縮前 PMMoV を測定することにより、迅速性の向上に繋げることができ、NoV 食中毒検査改善の一助になると示唆された。しかし、濃縮前と濃縮後で検出される遺伝子群に相違がある可能性があること、PMMoV の濃度について全国の牡蠣が本研究結果と同様に推移するか明らかになっていないことを踏まえ実施する必要がある。

本研究は NoV 検出のため加熱用牡蠣を使用した。感染性胃腸炎流行期は牡蠣から NoV が検出されることを再認識した。加熱用牡蠣は中心温度が 85°C ～ 90°C で 90 秒以上加熱することが推奨されており、徹底することにより NoV への感染リスクを大きく減らすことができる。また、生で喫食できるのは生食用牡蠣のみで、本県は千葉県食品監視指導計画に基づく買上検査で NoV 陰性を確認しており、NoV による牡蠣の食中毒未然防止を行っている。

4 今後の課題

NoV は培養法が確立されておらず、感染性の有無の評価が難しく、本研究で検出された NoV も感染性の有無について不明である。検出されたウイルスの感染リスクを評価する方法として感染性推定遺伝子検査法が示されている。農林水産省の「カキのノロウイルスに係る平常時水準調査委員会」によると、感染性推定遺伝子検査法を用いると、従来より定量値は下がるが感染性を持つウイルスを検出しやすくなる。感染性推定遺伝子検査法を用い、牡蠣中の PMMoV と感染性 NoV との関係を観察することで、より牡蠣のリスクを評価できるのではないかと考えられた。今後の課題について精査した上で来年度以降の新規研究課題として挙げるか検討する。

また、濃縮前 PMMoV 量から NoV 検出の推定ができることで、感染性胃腸炎流行期における県内流通牡蠣の NoV モニタリングに PMMoV を活用することが可能になると思われる。さらに、海水温、雨量などを含めた多変量解析を行うことで、モニタリング強化となると考えられた。

課題番号	研究課題名	研究期間	総合評価
02-06	軟膏状及びクリーム状で販売される製品中に含有する防腐剤の定量法の構築	令和3年度～ 令和5年度	3.3
<研究の概要> 令和2年3月、県薬務課より軟膏状の製品（医薬品、医薬部外品及び化粧品ではない製品）中の防腐剤サリチル酸の定量の依頼があった。東京都から、過量のサリチル酸を含有している可能性がある旨の通報があったことから、収去して検査依頼が行われたものであるが、当室では定量法がなく定量するまで、3週間程要した。今後も軟膏状の製品中の防腐剤の検査依頼がなされる可能性もあることから、一斉定量分析法の構築を試みた。また、軟膏状の製品に形状が類似しているクリーム状の製品も検討対象とした。なお、検討の対象とした防腐剤成分は化粧品基準中に配合制限があるソルビン酸、安息香酸、サリチル酸、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、イソプロピルパラベン、ブチルパラベン及びイソブチルパラベンの9成分とした。 クリーム中のパラベン類の検査法は衛生試験法・注解に記載されているが、HPLCを用いた分析法であり、移動相の調製も複雑である。本研究では、迅速に分析可能となるよう超高速液体クロマトグラフィーを用い、簡易な調製で済む移動相での一斉定量分析法の構築を行った。また、構築した分析法を用い、インターネット通販サイトで購入した軟膏状及びクリーム状の製品並びに令和2年3月に千葉県薬務課から検査依頼のあった軟膏中の防腐剤の含有量の調査を行った。 <研究の成果> ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 カラムを用いることで、薄めたリン酸とアセトニトリルという調製が簡単な移動相で一斉定量分析が可能となった。構築した分析法で添加回収率、直線性、定量限界を求めたところ、回収率は100.1-101.3%、直線性は9成分全て0.1～100 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性（$r^2=0.999$ 以上）、定量限界は9成分全てで0.10 $\mu\text{g/mL}$ と良好な結果が得られた。また、市販された軟膏状及びクリーム状の製品中の防腐剤を本分析法にて分析したところ、含有する防腐剤を検出できた。 【発表等】 ・軟膏及びクリーム中に含有する防腐剤の定量法の構築 千葉県衛生研究所年報 第72号 2023年 掲載予定			

課題番号	研究課題名	研究期間	総合評価
04-04	アシュワガンダ含有健康食品中のウィザフェリンAの定量法の構築と実態調査	令和4年度～ 令和5年度	3.4
<研究の概要> アシュワガンダ含有健康食品は日本では強壮作用を標榜する健康食品として販売されていたが、アシュワガンダには毒性が強いウィザフェリンAが含まれているため、現在は食薬区分上の専ら医薬品として取り扱われており、国内で生産されている製品はない。しかしながら、海外では数多く販売されており、個人輸入により入手可能である。実際、そのような製品を個人輸入で購入し、健康被害が生じた事例も報告されている。 アシュワガンダには毒性が強いウィザフェリンAが含まれているが、健康食品中にはどの程度含まれているかの報告は少ない。含有量によっては、健康被害を引き起こす可能性も考えられることから、健康被害発生時に分析可能とするため、アシュワガンダ含有健康食品中のウィザフェリンAの定量法の構築を検討した。 本研究では、迅速に分析可能となるよう超高速液体クロマトグラフィー（UHPLC-PDA）を用い、簡易な移動相での一斉定量分析法の構築を行った。また、構築した分析法を用い、インターネット通販サイトで購入したアシュワガンダ含有健康食品中のウィザフェリンA含有量の調査を行った。 <研究の成果> UHPLC-PDA を用い、ACQUITY UPLC BEH C18 カラム、薄めたリン酸及びアセトニトリルという調製が簡単な移動相を使用することで、迅速な一斉定量分析が可能となった。構築した分析法で添加回収率、直線性、定量限界を求めたところ、回収率は 99.2%、直線性は 0.1～500 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性（$r^2=0.999$ 以上）、定量限界は 0.10 $\mu\text{g/mL}$ と良好な結果が得られた。また、市販されたアシュワガンダ含有健康食品中のウィザフェリンAを本分析法にて分析したところ、含有するウィザフェリンAを検出できた。 千葉県でも数年に1回程度、健康食品を喫食したことによる健康被害が発生している。アシュワガンダ含有健康食品でも健康被害が起こる可能性があり、そのような状況になった際、構築した定量法を用いることで迅速な危機対応が可能となった。 【発表等】 ・アシュワガンダ含有健康食品中のウィザフェリンAの定量および定性分析 日本食品化学学会誌 第30巻 第3号 (2023) 134-141			

課題番号	研究課題名	研究期間	総合評価
04-06	入浴施設へ源泉を移送するタンクローリーに係る汚染状況調査について	令和4年度～ 令和5年度	3.3
<研究の概要> 県内には、タンクローリーを使用して、ひとつの源泉から複数の温泉利用許可施設へ配湯している業態がある。施設間で共有されるタンクローリーが適正に維持管理されない場合、タンクローリーはレジオネラ属菌の汚染源となる可能性がある。しかし、タンクローリーの衛生管理については、関係法令による規制がない。また、平成8年に発出されている環境省通知「タンクローリー等に係る温泉法第12条等の運用について」には、衛生管理についての具体的な方法が示されていない。 そこで、タンクローリーを介した入浴施設等の汚染を防止し、レジオネラ感染症の発生病リスクを低減させることを目的として、千葉県内の約20カ所の入浴施設に源泉を移送するタンクローリー及び源泉を一時貯留する源泉タンク等の汚染実態調査を実施し、併せて源泉（硫黄泉）における有効な消毒剤を検討した。当所は保健所の協力機関として検体の検査を実施、検体に適した消毒剤の検討を行った。 <研究の成果> 2022年12月及び2023年1月に実施した実態調査の結果、タンクローリー内部からレジオネラ属菌（<i>Legionella rubrilucens</i>）が検出された。源泉タンク等は、レジオネラ属菌の培養検査は陰性であったが、遺伝子検査では多くの陽性箇所を認め、いずれもレジオネラ属菌の汚染源となる可能性が示唆された。また、当該源泉における有効な消毒剤の検討をするため、2種類の塩素系消毒剤及び4種類の非塩素系消毒剤を用いたレジオネラ属菌の添加回収試験を行った結果、非塩素系消毒剤のひとつである陽イオン界面活性剤に消毒効果があることを明らかにした。 本研究の成果を踏まえて、浴槽水における陽イオン界面活性剤の実用的な運用方法について検討を継続する。 【発表等】 ・温泉水を利用する浴槽水への陽イオン界面活性剤の使用を想定した基礎検討 第83回日本公衆衛生学会総会 ・温泉水を移送するタンクローリー等に係る汚染実態調査および温泉水に有効な消毒剤の検討 千葉県衛生研究所年報 第72号 2023年 掲載予定			

課題番号	研究課題名	研究期間	総合評価
02-01	COVID-19 の流行を踏まえて千葉県保健医療計画に精緻な情報を加えるための疫学研究	令和3年度～ 令和5年度	3.4
<研究の概要> 当初計画していた超過死亡をはじめ、他疾患への影響は、(一社)日本医学会連合が全国レベルで研究することとなり、日本公衆衛生学会の研究グループに参画して1の研究を行った。これらとは別に県では2の研究を行った。 1 日本公衆衛生学会における研究 【研究名】COVID-19 諸施策フレームワークの構築：危機管理とポストコロナ時代を見据えて 【研究の概要】健康危機に対して、多視点（各省庁、都道府県、市町村、保健所、医療団体、医療機関、各産業、市民など）から、多側面（検査体制、データ・情報の公開・発信・説明責任、感染対策と経済対策のバランスのとり方、ICT やデータ活用、手続き等の効率化、ステークホルダーの連携体制・協力スキーム、関連施策群全体のガバナンス等）の諸施策を包括的に設計・推進するための体系的フレームワークが必要である。当研究ではそのようなフレームワークの構築、具体的には科学に基づく感染制御を基盤に健康危機管理の実践、政策決定、および感染制御と社会・経済活動が両立できるあり方の構築に向けて、行政、保健所、地方衛生研究所、医療機関、一般市民などの意見や認識を調査票調査やインタビューで収集し、施策や計画の課題を整理した。 2 県における研究 感染症発生動向調査、自殺にかかる情報を用いて、COVID-19 による影響を分析した。 <研究の成果> 1 日本公衆衛生学会における研究 科学に基づく感染制御を実現するためには、健康危機管理の実践、社会活動/経済活動、政策決定を並行して進める必要がある。そのためには連携・協働等のあり方、感染制御と政策決定の関係、感染制御と社会経済活動の観点で各々対策を進めることが重要であると考えられる。 厚生労働省行政推進調査事業費補助金（新興・再興感染症及び予防接種推進研究事業）新型コロナウイルス感染症による他疾患を含めた医療・医学に与えた影響の解明に関する研究 令和4年度総括・分担研究報告書 p561-571 2 県における研究 感染症発生動向調査では、一部の対象疾患の報告数等は2019年度から2020年度は顕著に減少し、2020年度から2021年度はほぼ横ばいであった。一部の感染症の発生に、COVID-19 の流行が影響した可能性が考えられる。 自殺では、2015年から2019年の5年間を感染拡大前平均として、2020年及び2021年における年齢階級別自殺者数の増減率をみると、男性では特に80歳以上の増加、女性ではほぼすべての年齢において増加が認められた。			