

事業区分	経常研究(基盤)	研究期間	平成23年度～平成25年度	評価区分	事前評価
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)	(生きているが通常の方法では培養できない病原菌を、マイクロコロニー法とFISH法を併用して、新たな検出方法を開発する)				
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			

<県長期構想等での位置づけ>

長崎県長期総合計画	1. 人が輝く長崎県 (2)一人ひとりをきめ細かく支える。 ④食の安全・安心の確保
新科学技術振興ビジョン(仮称)	(ライフイノベーション)(1)感染症究明・拡大防止プログラム
長崎県における食品の安全・安心確保基本指針	I 生産から消費までの食品の安全性の確保 2. 食品の安全性確保体制の充実 (1)①食品の安全管理に関する調査・研究の推進

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 ^{*1} 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の早期究明に活用することで、食の安全確保・健康の維持等に資する。	
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 ^{*2} やプライマー ^{*3} の評価 ③構築したマイクロコロニー-FISH法 ^{*4} や細胞内遺伝子増幅法 ^{*5} 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	食中毒や感染症の原因菌の探索は、これまで培養法を中心に行われてきた。病原細菌は宿主の免疫機構に抵抗し、ヒトの腸管内で活発に増殖するが、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いるが培養できない(Viable But Non-Culturable, VBNC ^{*6})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～数百個のマイクロコロニー形成段階以降、増殖を停止させていることが明らかになってきた。 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、自然環境下でVBNC状態にある病原細菌においては検出できないことが多く、必ずしも有効な方法とはなっていない。
2) 国、他県、市町、民間での実施の状況または実施の可能性	FISH法をベースとした微生物迅速検出技術は、医薬品製造用水、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。

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
			23	24	25	26	27	
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	項目数	4	/	/	/	/	達成 or 未達成
		実績		/	/	/	/	
②	耐熱性溶血毒産生性腸炎ビブリオ及びコレラの応用 FISH 試験系の確立 (H23-24) 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	項目数	4	4	/	/	/	達成 or 未達成
		実績			/	/	/	

③	In vitro における応用 FISH 法、培養法及び PCR 法の比較と評価 (H24)	検体数	目標		30				数
			実績						
④	環境由来試料におけるデータ集積及び構築した試験系の評価 (H25)	検体数	目標			72			数
			実績						

1) 参加研究機関等の役割分担

- ①長崎大学水産学部：試験系構築の技術的協力
- ②佐賀大学農学部：試験系構築の技術的協力、自動測定機器の借用

2) 予算

研究予算 (千円)	計 (千円)	人件費 (千円)	研究費 (千円)	財源			
				国庫	県債	その他	一財
全体予算	36,840	29,340	7,500	0	0	0	7,500
23年度	12,280	9,780	2,500	0	0	0	2,500
24年度	12,280	9,780	2,500	0	0	0	2,500
25年度	12,280	9,780	2,500	0	0	0	2,500
26年度							
27年度							

- ※ 過去の年度は実績、当該年度は現計予算、次年度以降は案
- ※ 人件費は職員人件費の見積額

(研究開発の途中で見直した事項)

4 有効性

研究項目	成果指標	目標	実績	H					得られる成果の補足説明等
				23	24	25	26	27	
①	学会発表	2回			○	○			確立した迅速検出系の有用性を報告する。
②	論文発表	1報					○		環境から分離される毒素産生性の腸炎ビブリオやコレラ菌の分離には多大な労力と時間を要するが、応用FISH法では容易に識別し、生菌の存在の証明も可能である。

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の確立により、これまで明らかにできなかった感染症及び食中毒原因菌の究明や拡大防止に繋がる対策が可能となり、健全な社会生活が維持される。このことは社会的経済損失をなくし、負の経済効果の解消に及ぼす波及効果は大きいと期待される。

(研究開発の途中で見直した事項)

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"> ・必要性 A 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。 ・効率性 A 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。 ・有効性 A 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。 ・総合評価 A 食中毒や感染症の原因究明、及び感染経路等の解明調査に新規技術として活用可能である。さらに、環境中の病原ビブリオのモニタリング試験など幅広い利用が考えられる。 	<p>(22 年度) 評価結果 (総合評価段階: A)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・必要性 A 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。 ・効率性 A 効率性: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。 ・有効性 A 有効性: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。 ・総合評価 A 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。
対応	対応	<p>対応</p> <p>本研究では、従来の試験法で検出困難な自然環境に生息する病原細菌の存在を生菌の特性を備えた状態での特異的高感度検出法の構築を目指します。試験系が確立された際には、食中毒や感染症の原因究明調査に活用することで、公衆衛生の向上に寄与することを目的としています。また、研究は PDCA により効率的に行い、広く認知されるよう学会および論文等で公表して参ります。</p>
途中	<p>(24 年度) 評価結果 (総合評価段階:)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・必要性 ・効率性 ・有効性 ・総合評価 	<p>(24 年度) 評価結果 (総合評価段階:)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・必要性 ・効率性 ・有効性 ・総合評価

	対応	対応
事後	(26年度) 評価結果 (総合評価段階:) ・必要性 ・効率性 ・有効性 ・総合評価	(26年度) 評価結果 (総合評価段階:) ・必要性 ・効率性 ・有効性 ・総合評価
	対応	対応

■総合評価の段階

平成20年度以降

(事前評価)

S=積極的に推進すべきである

A=概ね妥当である

B=計画の再検討が必要である

C=不相当であり採択すべきでない

(途中評価)

S=計画以上の成果をあげており、継続すべきである

A=計画どおり進捗しており、継続することは妥当である

B=研究費の減額も含め、研究計画等の大幅な見直しが必要である

C=研究を中止すべきである

(事後評価)

S=計画以上の成果をあげた

A=概ね計画を達成した

B=一部に成果があった

C=成果が認められなかった