

(五十君) よりよい解決策をだしていきたいということでの話です。

(塚本) 膨大なデータのまとめというのは煩雑となると思われ、逆にわかりにくくなる恐れもあるが。

(藤井) BAM と ISO などの方法の関係を出していただけるだけでもわかりやすくなるように思う。

(山本) 培地や培養の条件といった大枠でもいいので、それらを方法別に大枠でも列挙してもらえば、明確になるように思う。詳細データは別添でもいいと思う。

(宮原) 食品マトリックスを畜水産食品とすることは以前の委員会で決定しているので、それを省くところになってしまうように思う。

(五十君) 12月には委員会がとれないので、作業部会を進めておいていただきたい。ブドウ球菌については、清水先生と一覧表を作成したい。ビブリオについては、荒川委員と甲斐先生で協議していただきたい。サルモネラについては、進んでいるようなので、次の委員会に提出いただければと思う。

標準法作成ガイドラインに関する討論

(五十君) 資料 A-3 に示しておりますガイドライン作成についてであるが、公開にしてこの作成方針に関する意見交換行いたいと思うので、ご確認いただきたい。であれば、次の委員会にこの点に関する情報、意見を併せて出していきたい。

(浅尾) ステージ 4 を最終ステージとしたほうがわかりやすいのではないか。

(五十君) それでいいと思う。

(春日) シンプルなことだが、作業部会案と試案というのはわかりにくいかもしれないが。

(五十君) その意見については確かにあると思う。

(春日) ステージを出すか、もしくはステージ 3 はコラボ案とか、コラボ実施案というのはいかがでしょうか？

(山本) なるほど。

(五十君) AOAC では確か定性検査で 12 とか 15 とか決めている。予算の問題もあるので、規模を小さくして行うとなると思う。その規模規格については、必ずしも AOAC にこだわって合わせる必要はないと思っている。

(山本) 全部、コラボは必要になるということになるが。標準法ということになるが。ステージ 2 で止まることはあるか？ 予算の問題がある？

(五十君) 行政官としてはコラボを行うところを包含して考えていると思う。コラボは必要と思われ、ステージ 2 で止まることはないと思う。予算的な面からコラボは場合によってはボランティアとなることもあると思うので、このあたりは本省と連絡を密にしてつめていきたい。

(浅尾) 地研では国から研究費をもらうことに負担を伴うところも多い。コラボ協力はしたがって、非常に難しいところもあると思う。

(五十君) 所長あてに依頼書を出しても難しいか？

(浅尾) 難しいところは難しい。国政と地方行政との隔りがある現状では、研究内容自体が地方と結びついていない以上、できないところもあるように感じる。従って、できるところできな

いところをあらかじめ設定しておいたほうが良いように思う。

(松岡) 0157 の時、小沼先生がやってらっしゃったコラボは民間にふっていたように思う。

(森) 民間でも株式会社とその中に分析機関を設けているところは Authorize の目的で、立候補してくることもあると思う。データの整合性を得るためには、Trial 的に参加される対象がある程度の技術をもっていることが前提となるように思う。

(山本) コラボ募集に際しては、こうしたことも視野に入れて文言で書いていったほうが良いと思う。

(五十君) コラボ実施案としていいか？

(山本) いいとおもう。

(森) 最終案はどのようにでてるか？

(五十君) 案として問題なかったということと、プロトコルそのものを出すということだと思います。また、基準審査課で、たとえばサルモネラ検査については、衛研の No. XXX を使用するよう、告示を出していただいて、前の告示法を消していくといった形で、行政面へ反映されることを期待する。

(山本) 最初のステージで、後々の標準法の定義づけを行っていくことが大事であると思う。もちろん、すぐに公定法となるわけではないが、これについては行政方面と併せて調整をとっていききたい。

(森) 食品衛生検査指針への影響は？

(山本) 標準法の開発に伴い、将来的な整合性を保つためには、どれをバイブルにしたらいいのかがよくわからなく可能性もある。この立場を行政側との連絡を行っていききたい。

(五十君) おそらく標準法というカテゴリーとして、食品衛生検査指針の中に入ってくるかもしれない。

(浅尾) 検査業務の側からいくと、こうした方法を行政に反映させていただきたいと思う。

(塚本) 検査指針との住み分けはできるのではないかと。若干ニュアンスは違う。

(山本) 検査指針は、何でもかんでもだしている嫌いがあり、混乱を招いているのは否めない。一つには指針自体を改定する意味合いもある。また、学会などを通じて、外部からの声で変更させるよう動けるかもしれない。

(松岡) 新しい検査法の提示は常にあり得る。後からでてきた検査法が良いのかどうかは、既に評価された検査法との同等性を評価する必要がある。もし先に評価された検査法の問題点が明らかになったら、その検査法を改定することが必要である。その改定のプロセスも公開して行うべきである。それらの評価では、規模はともかく、やはりコラボで行うことが必要と思う。因みに、日本国内のように狭い地域内でコラボをすれば、日米間でコラボするのに比べ、微生物試料を凍結せずに輸送して直ちに試験することが可能なので、試料の等価性を保ちやすい。

(春日) そうすると、ステージ 2 は見直しの時にでも適用できると考えていいわけですね。

(松岡) コラボの実施に際しては、誰が行うか、という問題が次に来る。Proficiency testing program というものによって技量の認定を受けたものが実施することが要請される。

(春日) それは検査機関の Validation か？

(松岡) そうではなく、人の技量のバリデーションである。検査機関のバリデーションは、Laboratory accreditation といって、施設、機器、の充実度、その運転管理状態などがチェックされる。

(山本) 当初は、地検を中心に考えていたのだが、難しいとなれば、民間の登録検査機関など、ラボを5-6箇所募っていく方向で文面にも公開に出していきたい。

(五十君) 標準プロトコールについては、これまで経験がないので、次は国がそうした保証精度に悩むことになるが、まだわが国の不備な点であり、こうしたところにまで継承できればと思う。

4. その他、事務連絡等

(山本) 今回の議事録についても、後日お送りしますので、修正等ございましたらご指摘のほどお願いします。次回の委員会については、12月中には予定を伺い、1月の中旬に行えればと思っています。

以上

議事録作成担当 朝倉、石和

平成17年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業
畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究（H17-食品-009）

食品からの微生物検査標準法検討委員会

第4回検討委員会 議事次第

日 時： 平成18年2月14日（火） 14:00～17:00

会 場： 国立医薬品食品衛生研究所 28号館3F 第一会議室

1. はじめに（山本委員長、高鳥副委員長）
2. 行政担当官からの発言
3. 配布資料の確認・第3回議事録及び議事録概要案の確認
4. 討論
EHEC 検査法について
本委員会の検討対象となる試験法の範囲について
作業部会から提出された資料に対する意見交換
標準法作成ガイドラインについて
5. その他、事務連絡等

「食品からの微生物検査標準法検討委員会」第四回委員会議事録（案）

日時：平成18年2月14日（火）14：00～17：00

会場：国立医薬品食品衛生研究所 28号館3階 第一会議室

出席者

委員長	山本 茂貴	（国衛研・食品衛生管理部）
副委員長	高鳥 浩介	（国衛研・衛生微生物部）
委員	宮原 美知子	（国衛研・衛生微生物部）研究班長
	五十君 静信	（国衛研・食品衛生管理部）事務局、作業部会
	荒川 英二	（国立感染症研・細菌第一部）作業部会
	清水 晃	（神戸大学農学部）作業部会
	甲斐 明美	（東京都健康安全研究センター）作業部会
	塚本 定三	（大阪府立公衆衛生研究所）作業部会
	丸山 務	（財団法人 日本食品衛生協会）
	松岡 英明	（AOACI Japan Section）
	浅尾 努	（大阪府立公衆衛生研究所，日本食品微生物学会）
	藤井 建夫	（東京海洋大学海洋科学部）
	小崎 俊二	（大阪府立大学生命環境科学部）
	田中 廣行	（財団法人 日本食品分析センター）

欠席者

	渡辺 治雄	（国立感染症研究所・副所長）
	春日 文子	（国衛研・食品衛生管理部）
	伊藤 武	（東京顕微鏡院）
	小久保 彌太郎	（財団法人 日本食品衛生協会）
	森 曜子	（財団法人 日本冷凍食品検査協会）
	品川 邦汎	（岩手大学農学部）
	近藤 卓也	（厚生労働省・基準審査課）
	道野 英司	（厚生労働省・監視安全課）

議事

1. はじめに（山本委員長、高鳥副委員長）

（山本）それでは第4回検討委員会を始めたいと思います。これまで検討してきた方法論についての具体的な議論も今回は含まれますので、よろしくお願いいたします。

2. 行政担当官からの発言

厚労省緊急対応のため、残念ながら欠席となります。

3. 配布資料の確認・第3回議事録および議事録概要案の確認

(五十君) お手元の資料についてご確認ください。今回の資料は議事次第から始まる書類一式とサルモネラ作業部会からの提出書類の併せて2部になります。早速ではありますが、前回の議事録案および議事録概要の確認をさせていただきます。議事録案については皆様のご意見を伺った上、修正を行いましたので、確認については資料16ページに記載しております概要に沿って行いたいと思います。ご確認願います。ないようですので、これを議事録とさせていただきます。後日でも修正点がございましたらメールなどでお知らせください。

(山本) それでは討論に入る前に、大阪府立大学の小崎先生に本委員会にご参加いただくことになりましたのでご紹介申し上げます。迅速検査法の研究班でお世話になる予定ですので、よろしく願いいたします。なお、もうお一人、岩手大学農学部品の品川先生にも新しい委員としてご参加いただけることとなりました。黄色ブドウ球菌、ウェルシュ菌について検討していただきたいと思っております。

それでは今回の議題について、討論を始めたいと思います。

4. 討論

① EHEC 検査法について

(高鳥) H17年度より始まっている厚生労働科学研究費補助金事業「細菌性食中毒の検査法に関する研究」の中で、腸管出血性大腸菌(EHEC)の検査法について、検討してきました。具体的には日本特有の食品とそれに起因する食中毒の発生状況を鑑み、リスクアセスメントモデルを作成しようということで、対象としては生食食品(主に肉、野菜など)について検討した経緯があります。リスクアセスメントモデルの検討についてはCampylobacterあるいはListeriaについて先行した形で行われていることから、血清型O157以外のEHECについてリスクアセスメントモデルを検討してはどうだろうということとなりました。この段階で、具体的な検査協力機関である検疫所等に打診したところ、検査法が確立していない段階で、行うことは難しいということになりました。そこで、感染研の渡辺副所長にも、問題点となる所を担当して頂きながら、試験法を検討してきました。資料の最終ページには試験法を挙げており、プレラボを実施した結果から、ラボを行っていけるという状況にあります。通常、試験法についてはパブリックコメントを経た後にラボを行うものですが、本省とも協議した結果、通常とは反対の手順ではありますが、ラボ実施後にパブリックコメントを求めていく方向性になっております。こうした経緯と併せて、今回、本委員会にご報告させていただくこととなりました。具体的な試験法については、田中委員にご説明願います。

(山本) このラボについては、本委員会が設立される前に検討が始まっていたということで、今回、本省あるいは高鳥先生のお許しを得て、本委員会に資料を提供していただきました。実際には資料の19ページに出されている形で近々にラボにもっていくということになっているようです。では、田中委員より検討されたEHECの検査法についてご説明をお願いいたします。

(田中) 昨秋、国衛研衛生微生物部の工藤先生よりご提案いただき、最終的なコラボを始める前に、プレコラボを当方、日本食品分析センターを含めて5機関で、行っております。その結果、資料にお示した方法として固まってきました。コラボの参加機関としては計21機関に打診しております。内容としては2回に分けて行う予定で、第一回目はO157、2回目はO26を対象菌として、牛のひき肉、アルファルファを対象食品に検討を始める予定です。接種サンプル、無接種サンプルを各機関に送付して検査して戴く形を取り、遺伝子検査法としてLAMP法を導入する予定となっております。選択培地はO157とO26で異なっておりますが、O26ではラムノース分解性がその他の血清型のE.coliとは異なるため、こうした培地を用いることとなっております。告示法への応用を将来的にはご検討されていらっしゃるようですが、それまでの検討課題としては少なくとも、O111なども考慮に入れる必要があると思います。プレコラボの段階ではO111についても検討していますが、コラボでは時間の関係上、2血清型に制限しております。また、LAMP法という一社の手法に限定されていいのかという議論もあり、一定範囲の検出感度・精度が得られれば、そのあたりも解決されるのではないかと考えております。ただ、プレコラボの中でも複数の遺伝子検査法を検討しておりますが、LAMP法は突出して高感度な結果を示しております。加えて、分離菌株の確認試験については、現在、血清型別のみですが、生化学性状などの試験法の実案も織り込んでいく必要があると思われま。

(山本) この試験法についてですが、コラボ実施後に意見を聴くことになるのでしょうか、それともそのまま法にもっていくのでしょうか？

(高鳥) これについては厚労省監視安全課との協議の上、コラボ終了後にパブリックコメントを求めることとなっております。

(山本) そこで何か大きな指摘があった場合には、検討し直すことがあるのでしょうか？

(高鳥) パブリックコメントの回答次第ということにもなるかと思えます。問題がないという回答がだされれば、そのまま通るが、問題点が指摘されれば、対処することになると思えます。

(山本) 試験法の中に、スクリーニング法としてLAMP法が今回入っていますが、並列された形で入っています。これは必ずしも使用しないでもいいということなのでしょうか？

(田中) あくまでもスクリーニングに使用するものですので、LAMP法陽性となればその後の分離検査を行い、これで陰性となれば分離試験は行わないという形で使用することとなります。

(高鳥) 本省としては、遺伝子検出と培養法を一本化してもらいたいという意向があったのは確かです。従って菌分離の前段階で迅速な検査が行えるような方法が望ましいとする考えから使用しております。

(松岡) 検査法の違う3種の方法をこの後どのように評価されていくのでしょうか？そしてそれを評価する母体はどういうところになるのでしょうか？

(田中) 最終結果は全て工藤先生が評価・取りまとめを行うことになると思います。

(松岡) 方法論を構築していく中で、食品中に菌がいるかいないかという判断をしていくことと、方法論の評価を行うことは分けて考える必要があるように思います。

(五十君) それは元になる評価法がないとできないということでしょうか？

(松岡) それは接種食品からの分離であるので、菌としてでてきたものを数として算定できるの

かということを確認する必要があるということです。

(高鳥) 遺伝子検出法の導入は、従来の方法より、迅速で高感度な結果を得ようとする背景から始めている。培地を使った培養法のみではなく、早くやりましたということではじまっている。

(松岡) 培養法が Golden standard として考えたとき、培養法と比較してどうなのか？ということをお聞きできればと思う。例えば那須先生あたりは培養法と迅速法は異なる結果を示すといった見解をお示しされていらっしゃるようなので。

(五十君) 本質的なご質問かと思えます。この委員会では、標準的な細菌検査法とはどういったところなのか、ということ議論していくことで始まった経緯があり、食品からの標準検査法の Golden standard は培養法で、これに基づき、迅速検査法の有用性を評価していきたいということであったと理解しています。この委員会の機能を考える上で問題となっているのは、現在研究班の一部として動いているところであります。また、議論した検査法をどの段階で標準法に反映させていくべきかということも課題となってくるように思います。今回、EHEC 検査法については、高鳥先生のご好意としてご報告いただいたわけですが、検討した方法と標準法との兼ね合いを統一させていければと思います。

(山本) この委員会の位置づけを今後確固たるものにしていく必要があるように思います。

(宮原) 先行しているものについては、提案して頂き、意見を出す形ではどうでしょうか？

(山本) 検討委員会の開始は昨夏で、それ以前より検討されているものについては、おっしゃるような形で今後は収束していけるような形にしていかなければ統一した方法論の構築は難しいと思います。可能な限り、本委員会で議論していかなければと思う。本委員会として、今回は意見を出していきたいと考えております。もちろんそうした場合にこの委員会での意見に強制力はないのですが、受ける側として意見を反映させていただければと思います。

(高鳥) まさにそのとおりで、丸山先生が第一回の委員会でおっしゃっていただいたように、細菌の検査法がこれほど多岐にわたっていることは、驚きでもあります。非常に煩雑で、整理していかなければならないところでありましょう。食品の細菌検査法について、ある程度は議論していくべきだろうと考えています。今回はご報告ということで進捗状況もあるので、ご提示することしかできませんが。

(松岡) 今回は判定の指標となるものを教えていただければと思ったわけです。

(山本) おっしゃるように、培養というものを機軸として、そのほかの感度、特異性などについて検討を行うことで、この委員会の意義が出てくるように思います。また、培地の定量性などをとっていくなれば、また少し違った方向性もでてくるのでしょうか。

(甲斐) この EHEC 検査法として新たに実施される目的が少しわからないところです。現行の O157 検査法では、酵素基質培地 2 種類以上を使用することになっているので、これを修正しても検出には支障ないという考えから、こうした培地の変更を記載されていらっしゃるのでしょうか？また、コラボで使用予定の O26 分離培地は適当であるのかどうかという点についても教えていただければと思います。3 つ目に、遺伝子検査法の使用目的がどこにあるのか判断しづらいのでご説明いただけませんか。この使用によって O157 については培地を減らしてもいいということにつながるのでしょうか？

(山本) プレコラボの時にそういったところが問題となったのでしょうか？

(田中) まず一点目のご質問として、H9 年度の実施結果と比べてはおりませんが、プレコラボの段階では、4 種類程度の選択的酵素基質培地を用いており、どれを用いても同様の結果を得ております。O26 については、選択に適する培地として 3 種類を検討しております。今後のコラボの結果を見てから更に検討されていくことになるでしょう。

(甲斐) 培地の種類を減らしてほしいというのが正直なところ現場の意見です。

(山本) 検討委員会としてはパブリックコメントとして意見を出していくということになるでしょうが、スクリーニングの考え方としてはご意見ありますでしょうか？ 遺伝子検査法としては LAMP 法と PCR 法での比較を行ったのでしょうか？

(田中) 以前、検討は行っていらっしゃっており、試料の前処理を適当に行えば感度は上がるかもしれません。

(宮原) mEC は増殖効率の問題があり、増菌後に高感度の遺伝子検査法を使用することは意味がないのではないのでしょうか。また、汚染 EHEC の血清型が O157、O26 と判別できない段階で、培地として共通性をもたせないというところにも問題があるかもしれません。

(山本) 検査法としての特異性と感度、そして通知法としてだすときの考え方とは少し異なる部分もあるのではないかと考えています。純粹に検査法の検討というところで単純な問題点が出てくればそれは問題となりましょう。それらをまとめて提案するということを本委員会で行えればと思います。もちろんそれがどのように反映されるかについては今後の議論でありましょうが。

(高鳥) 検査法自体の内容については、ここでは議論とはせず、試験法大枠の問題点を議論していただいで、こちらにもそれに沿った対応を出していきたいと思います。

(五十君) コラボのデザインがどのような形か公にならない場で実施されることには一念の危惧を感じます。コラボをパブコメの先に行くことは意味がないように思うのですが。

(高鳥) 正論から言いますと、確かにパブリックコメントが逆転してしまっているのはあってはいけないことであるが、この案件については行政的な思惑も介在しているので、科学的確証のみからは決議できないところもあります。

(五十君) それでは今回の議論内容については、コラボの前にお渡しすればよろしいのでしょうか？ それともパブリックコメントの段階でのほうがいいのでしょうか？

(山本) まとも難しいのですが、こうした観点からやっているということを工藤先生にまとめていただいで、その後パブリックコメントを出していただければどうでしょうか。集まらない場合にはメールなどで意見交換を行っていただきたいと思います。

委員会の検討対象となる試験法の範囲について

(五十君) 国衛研が関わる試験法については出来る限り良いものを出していただきたいという意図から、EHEC 検査法についてご好意としてご提示いただいたところです。その他のところでだす予定あるいは検討中の課題についても、本委員会でも方向性の確認ができればと考えております。一つ具体案を申しますと、食品からの *Campylobacter* の検査法について以前より進めており、現在通知法がないという状況であることから、それをにらんだ検査法の作成について 10 機関のご協

力をいただいております、Web 上でプロトコールに関する意見を求めているところです。こうした実際のプロトコールについてもこの委員会の方式に則り、討議していただきたいと考えています。

(山本) それ以外にはあるのでしょうか？

(五十君) 厚生科研の調査費で、冷凍食品の規格基準の見直しを行っているところです。冷凍食品というカテゴリーに入るかどうかで、その規格基準が決まってくるわけですが、この検査では以前、藤井先生からご提案があったように、汚染指標菌の検討を行うべきとの観点から、現在検討中の課題です。これについても今後検討していただければと思っております。その他、通知法では対象としていない食品への対応として、Listeria の Ready-to eat の食肉からの分離法の検討を行う必要性がでてきております。検査法の検討にはまだ入っていませんが、これについても今後、検討委員会で討議していただければと考えています。それから、高鳥先生が担当されていらっしゃる清涼飲料水の規格基準法の作成を行う必要性がでてくるのお話もあります。これについては従来の検査法を使うのか、それとも新たに作成する必要があるのかで、こちらで方向性を確認していただくことになる場合もあると思います。

(山本) その他、細菌性 2 類感染症として赤痢、コレラの検査法を考えております。コレラ検査法は検疫所に通知が出されており、コレラ毒素遺伝子を標的とした遺伝子スクリーニング法が出されております。検討の余地があるかどうかは、通知が出されて以降、食品からコレラ菌が分離されていないというところで、特に荒川先生にはそのへんのところを改めてご検討いただければと思う。赤痢については当所にいらっしゃった小沼先生、そして当研究班長の宮原先生に行っていたところもあり、現在帯広畜産大学の牧野先生にご検討いただいております。これがもう少しできた段階で検討委員会に出していきたいと考えております。

この標準法検討委員会の在り方といいますか、国として authorize するというものでもないので、認識のずれがあるところもあり、できればこうした広い範疇に入る食品の規格基準についてはこちらで検討していける委員会として機能させていきたいと考えております。食品という特性上、ここには汚染指標菌も含めていきたいわけであります。そうなった時渡辺先生にもお話があったように、感染研との兼ね合いもあります。これについては食品からの検査法に限定しているということ、そして、求めている方法は一個の菌も見逃さない方法ではなく、通常の検査法として使用に充り、そして培養法との兼ね合いがとれるところではないかと考えております。

(五十君) 労力・予算の兼ね合いとならうかと思いますが、その辺りのご意見もいただければと思います。ガイドラインについては、ステージ 4 としてやっていくわけですが、作業部会から挙げた案を集まって頂き、原案の形で議論を行っていくこと、そして、具体的な案のチェックを合わせて行うことになります。このペースでいくと、年間 3・4 件のプロトコールを処理する必要があるでしょう。汚染指標菌の問題は、結論が出にくいところかと思いますが、基本的にはここで作成した方法で統一的な方向性を示していかないと、以前の状況とかわらないでしょうし、標準法の確立ができないと思います。検査法の一元的なコントロールも行政面からみると難しくなるわけですから、議論していきたいと考えております。

(山本) 非常に広い範囲を担っていただくことになりましようが、ご協力お願い致します。

(丸山) O157 など個々の方法を作成していくことは重要であり、重要度・緊急性の高いものか

ら進めていただきたいと思います。また、汚染指標菌については避けては通れない問題なのでいつも頭においていただきたいと思います。例えば、大腸菌。大腸菌群をどうするのか？ということ、そして、色々な食品の規格基準の中で、一般生菌数 105 個という規定がありますが、その基準は何の根拠によるものなのかわからないのが現状です。誰も異論を唱えてはいません。様々な食品がある中で、法律としてこうした根拠のわからないところを明らかにしていただきたいと思います。これについては昭和 30 年に東京都で出された指導基準に基づいて今も続いているところであり、皆さんにはこうしたところをやっていただきたいと思います。

(山本) 最終製品における微生物規格がどうあるべきかについては、CODEX の食品衛生部会で Food Safety Objective という議論がなされていて、食品がヒトの「口に入るときの菌数を基準にリスクアセスメントが行われます。これをどこのレベルに押さえるか、何パーセントに抑えるかというところの設定の仕方によってその基準も変わってきます。次の議論として、工場での処理によってどう変動するのか、というところも議論されていますが、その後の管理についてはどうもはっきりしていません。その原因の一つとしては、遵守されない条件、たとえば保存温度などが介在しているためであります。こうした原因がわずかでもあれば、こうしたリスクアセスメントを議論に載せて考えていくことは難しくなります。丸山先生のおっしゃっていただいた点はリスクアセスメントを行う上でも重要な点になるかと思えます。

(丸山) 根拠となるところをしっかりとしていただけるよう願っております。

(山本) 数的理論の入った中での検討を行うべきであるということかと思えます。また、食品微生物学会などにもご協力いただき、検討していきたいと考えています。幸い、浅尾先生と私も理事として当該学会には参加しておりますので、こうした観点からも議論を今後も進めていきたいと思っております。

(休憩)

作業部会から提出された資料に対する意見交換

(山本) サルモネラ検討班から報告をお願いします。

(塚本) 今回の比較表については宮原先生に作成いただきました。前回、比較表がなかったため、方法論の検証が難しいということで今回はこれをご提示させていただいております。此処の手順に沿って見てまいりますと、検体量としては 25g が一般的であります。例外としては USDA の方法がありますが、これはと体やすすぎ肉などを対象としているため、最高で 325g と表記されております。前増菌培養法としては、食肉製品は EEM、液卵は BPW を使用することがわが国の基準ですが、アメリカの BAM 法を基準に考えていきますと、食品により選択肢が 23 種あるので、標準法としては非常にまとめにくいところがあります。USDA では BPW が主流、カナダでは BPW と Nutrient broth を同等としております。その他も BPW が主流となっております。培養温度については、概ね 35℃-37℃となっております。増菌培養はセレナイト、HTT などが主流であるが、セレナイトについては 35℃、TT は 42℃となっております。微生物汚染が多い場合には TT は 42℃とする付記もあります。分離培地については多様で後ほど検討した経緯・結果について述べます。同定法については、VP や TSI と LIM で決まると思えます。市販血清として混合の

H 抗血清のあるところはこの用いることになっています。

最後から 2 ページ目には、前回のものに若干追記をしたプロトコールを表示しております。TT の方が選択性が強いために BPW 接種量は RV に比べ多くなっております。また、選択培地については硫化水素 (H₂S) 産生性を考慮するため、H₂S 産生株・非産生株を併せて分離できるよう培地を列挙しております。生化学性状試験は TSI および LIM により行い、最終的に血清型別を行うことで、最終確定とする概略をお示しいたしました。また、迅速化の手法として、最終ページに PCR、免疫学的検査法、あるいは LAMP 法、簡易検査法などについてご提示いたしております。これらのうち、簡易検査キットは RV や TT での増菌後に使用するような説明が記載されておりますが、BPW の段階でできればという印象も受けます。

(山本) 比較表の作成ありがとうございます。

(五十君) 標準法の一般的な議論を行う上での重要な資料として使用させていただきたいと思えます。国際的なハーモナイゼーションを行う上でもこうした比較は重要です。ここでは培養温度などの条件について、妥当であるか検討していきたいと思えます。

まず、検体については基本を 25g としているの、前回議論となりました統一基準を担保しているの、問題ないように思えます。次に BPW の妥当性はどうか？米国の BAM 法では食品の種類により多岐にわたっているというところがありましたが、その根拠は何なのでしょう？

(塚本) 食品毎に比較したというデータは BAM 法には無いです。

(宮原) 食品ごとに多くの機関で検討した結果、このような多岐にわたる方法になったようです。

(五十君) 分けている特段の科学的理由がないのであればそのままよいと思えます。

(塚本) Universal Preenrichment broth は *Listeria* の増菌にも有効であることから、複数のターゲットを検出できる培地として選択しているのかもしれない。

(五十君) BPW は汎用性の面も考慮して選ばれたということでしょうか？

(塚本) 実際に BAM 法の中でも新しい方法では BPW の使用が増えていることも考慮しております。

(五十君) AOAC 法についてはどうでしょうか？

(松岡) AOAC では増菌に使用する培地も指定しており、培養法として行ったコラボの結果、AOAC 法として出しています。ISO が #6579 をサルモネラのチーズ、乳製品の検出法として出していますが、ISO は必ずしもコラボを行っていないようで、AOAC との間に温度差があるということとなり、AOAC が ISO の方法を同様に行っていたというのが一番右の欄に示した論文かと思えます。AOAC と ISO が併せて検討したというものはこれが最初で最後です。コラボは 21 機関で行っており、チーズ、鶏肉、卵についてはこの方法で十分信頼できることを AOAC が示しています。もちろん全ての食品を網羅しているわけではないので、標準法としてそのまま適用できるかについては議論が必要かと思えます。

(宮原) 結局 ISO 法がよりよい結果を得ることができるということをあの論文では明らかにしているようです。

(五十君) まとめて考えますと、基本的には最大公約数である BPW に統一するという理解でよ

ろしいと思います。

(山本) 次に、培養温度についてですが、手法により幅があるようですが。

(五十君) 新しいものについては、概ね $36 \pm 1^\circ\text{C}$ と記載されていますが、この温度については正確に記していく必要があると思います。

(浅尾) 食品検査の現場ではフラン器を概ね $35 \pm 1^\circ\text{C}$ に設定しています。

(五十君) 先に培養時間についてはどうでしょうか？

(浅尾) この時間の幅は一夜培養するわけですから、大きな影響はないと思います。現状のままでもいいのではないのでしょうか。

(塚本) 中西先生とも協議しましたが、おっしゃるように増菌時間の変動は却って混乱しやすいのではないかと考えて統一したところでもあります。

(五十君) 実行上の問題がないというところで、 22 ± 2 時間に統一したいと思います。

(浅尾) それよりも培養温度のほうが重要になってくるように思います。

(甲斐) 35 ± 1 ということになると 37°C は使用できないということになるのでしょうか。

(浅尾) 食品関係では 35°C という機械が多いのですが、臨床関係の現場では 37°C が多いということですね。食品の規格試験検査法ではほとんどが 35°C となっています。

(荒川) 例えば $35\text{-}37^\circ\text{C}$ という風にしてはどうなののでしょうか？

(浅尾) 個々の事情ということになるのですが、GLP がらみの問題で 36 ± 1 では通常の 35°C のフラン器では難しい。そうするのであればフラン器の設定を変更しないといけないことになります。

(五十君) 数字上の問題のみということになるだろうが、ひとまずは $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ として原案のたたき台そのままとして返すことにします。

(山本) それでは次に選択培地についてはご意見ありますでしょうか？

(宮原) 今の液卵の方法については問題があり、RV に接種する菌液量を 0.1ml と変更しています。また TT については選択性が高いので、 1ml 入れた方が検出率が高くなると考え、変更をいたしました。実際に、RV の場合には 100 倍以上の希釈率でないと増殖が低くなるデータを示した論文もあります。

(甲斐) ストマッカー袋から 0.1ml 取るという作業は、ピペットを汚染させる恐れもあり、なかなか難しいと思うのですがいかがでしょうか。

(宮原) 以前行った結果として、TT については BAM、USDA の方法をとりとうということになっています。

(五十君) 培地に合わせた接種量を考慮しているということであれば問題ないと思います。その設定の経緯をコメントとして付記していただければありがたいです。

(山本) 培養温度条件がかなり厳しいように思うのですが、いかがでしょうか？

(塚本) 42°C に保温した培地に接種すれば問題ないと思うのですが、例えば冷蔵庫に入れた培地をすぐに使用したい場合を考慮して恒温水槽を使用した形を記載しております。

(五十君) $\pm 0.2^\circ\text{C}$ というのは、かなり厳密であるように思うのですが。

(宮原) これは BAM 法に準拠して記載しています。しかし、現実性を考えますと、恒温水槽は

一般的に使用されているのでしょうか。あまり使用されていない感があるのですが。

(浅尾) 確かにそれはあります。煩雑な手順を経ることになるので、現場での使用は少ないかもしれません。フラン器のほうが実用的ではあるのでしょうか。

(甲斐) 問題は温度のブレをここまで厳密にする必要があるかどうかということですね。

(宮原) この根拠は *Salmonella* によっては 42.5 度で増殖抑制が生じることに起因しています。各国の状況をみると、 ± 0.5 という表現を使用されているところが多いので問題ないと思うのですが。

(清水) これはおそらく鶏の体温が 42 度でそれを基準にしているのではないかと思いますし、そう考えますと、根拠は非常に単純なところでないでしょうか。

(藤井) 気相では確かに厳密な温度制御が難しいので、もし $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ という表記にするならば、恒温水槽を使用する必要があるように思います。

(甲斐) 厳密には恒温水槽を用いることがあるが、まずは前提として 42.5°C を超えてはいけないということに尽きると思います。

(浅尾) 現実的には生じえないと思います。

(小崎) リスクから考えますと、恒温水槽が妥当との結論に至ると思いますが、水を使うこと、あるいは装置を使用することが、非現実的となるのか、現場の先生と議論しないといけないわけで、その選択は別次元にあるように思うのですが。

(山本) 国際標準云々について議論していく必要性があるもので、ある程度はこちらで決めていかなければいけないところでもあります。

(五十君) 一つには恒温水槽という表記をすればそれ以外の使用を認めないことにつながります。まずは現場の使い勝手のよい方法を用いて行った後、問題が出るか検討を行っていただくことで解決の糸口はでてくるのではないのでしょうか。これについては作業部会でデータを出していただくような形でお願いできればと思います。

(小崎) 検査法を国際標準化するとすると、それをきめたときの指標が設定されるわけで、温度制御のよりよいものがあれば、メーカーなどがそれを作ってくるかもしれません。温度の厳密な定義を明らかにすることで、実際の使用方法をきめていただくことになるのではないのでしょうか。

(山本) そうすると、作業部会でこうした検討を行えますでしょうか？

(宮原) 経験的に差はないように思うが、確証はありません。

(小崎) それはサンプル云々ではなく、温度制御の Validation ということになるでしょう。多分、こうしたことは行わなければならないようにおもうのですが。

(松岡) 実際にコラボを実施すれば、色々な点がみえてくるかと思います。ここでの案は必ずしも絶対である必要はないので、まずは一つのプロトコルを決めてコラボを行えばいいように思います。もし、その中でフラン器で制御の悪いものを使用している機関があれば、精度の問題がでてくることになり、問題点が挙げられるでしょう。

(甲斐) BPW 一つにしても温度の予温も必要になり、温度のことをとらえるならばこうしたところも留意すべき点として挙がってくるように思います。

(松岡) コラボは作成プロトコールの検証ですので、行うことで実際に適用すべき温度幅もわかってくると思います。

(甲斐) どの程度の面積にサンプルを入れるのかということでも温度の制御は変わってきますね。

(松岡) そうですね。そうすると、温度管理をフラン器内の何点で取るかという議論にもつながります。

(藤井) 菌としての選択性を担保した形での 42℃なのか、培養そのものの 42℃なのか、それを明らかにすることで、制御の仕方も変わってくるように思います。

(松岡) Validation の仕組みを考えるための委員会として認識していますが、 $42 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ならばそれをしっかりとモニタリングしていかないといけない。それが方法論としての信頼性なのであるが、実施者により差があれば当然問題となります。

(甲斐) そうすると、例えば食品によって選択性も異なるように思う。

(松岡) そうですね。ですから食品 Material によって方法が多岐にわたっているのでしょうか。

(甲斐) 冷凍品も別の観点で異なるかと思います。

(松岡) ご指摘の通り、冷凍食品は解凍などで損傷を受ける場合もあるので、それらを別個に扱うこととなります。しかし、別々に考えていくとなると煩雑になりすぎていくので一般的に受け入れられなくなる恐れも多分にあります。

(山本) ということは、たとえば $42^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ なら、 41.5°C と 42.5°C の別々を設定してコラボを行う必要があるということでしょうか？

(松岡) そうではなくて、コラボは 42°C での設定で、フラン器の温度を記録しておくことが必要なだけでよいかと思います。GLP 基準として保障されているものを使用しなさいという表記もあるので、データシートのついているものが GLP と Validation の一体化が今まであったので、技量認定と、別々の方法論があります。

(小崎) 今は Hard と Soft の話をミックスした形で議論されているが、装置についてはモニタリングの徹底でサンプルの違いとは関係ないように感じます。ですから、前提となるところでどういった装置を使うのかというところを作業部会で検討していただければいいのではないのでしょうか。記録は記録としてしっかりとつけておいていただいて、ばらつきを検証することで解決されるのではないのでしょうか。

(山本) そうすると、 $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で GLP 規格のフラン器で使用するということでもいいのでしょうか。

(小崎) フラン器であれ、恒温水槽であれ、モニタリング機器のついたものを使用することでまずは管理していけばいいように思います。

(松岡) 初めに行う Validation はトライアルとして行うならばそれでいいと思います。方法として検証できたら次にどんな機器を使うのか、という議論が必要になってきますが、コラボの結果がそうした判断基準とはなるのではないのでしょうか。

(山本) そうすると、 $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$ という原案に従ってコラボを行い、温度のモニタリング結果を Validation へとつなげればいいということですね。

(山本) 次に、選択培地についてですがご意見ありますでしょうか？

(宮原) 以前に行われた食品の汚染実態調査では H₂S 非産生株は分離されていませんでした。実際には H₂S 非産生株は 5%以下であると思います。選択培地の数として少し多すぎるかとも思いますが、一応列挙させていただいております。

(塚本) 海外との比較としまして、BAM では H₂S 産生株のみを検出する培地を使用しております。Canada は両方、ISO も H₂S 産生株のみ検出可能な培地を使用しております。

(山本) 厚労省からは両方検出できるような系で検討して欲しいとの意向が液卵の折にはありましたが。

(宮原) H₂S 非産生株を含めた選択検出培地は一般的に作成が煩雑であったり、判定しづらい問題点もあります。また、1 サンプルあたり 4 枚の選択培地を使用するのは大変であり、だからこそ簡易検査法を組み込んでいきたいと感じているわけです。

(浅尾) H₂S 産生・非産生株を選択できる培地がこれだけあるならば、どちらか一方でいいのではないのでしょうか？海外でこれだけ使っている国はないと思います。汎用性の高いものを使用しに行くことでまず行ってはどうでしょうか。

(甲斐) 浅尾先生のお話であった、DHL 等は慣れていること、そしてコストが安いことが利点として挙げられます。H₂S 非産生株をターゲットに入れる必要性がどこまであるのかを明らかにしなければならぬように思います。細菌検査は目視で行うわけですから、見づらい H₂S 非産生性株培地での判定はミスを招く恐れもあります。

(浅尾) 現場の労働力は限られているので、少量の検体で検出率を上げるのか、それとも多数の検体をこなしていくのかという方向性にもよるように思います。

(松岡) Golden standard として一度まわしてみても、その後コラボで検討した結果、同じような結果が得られれば簡易な方法も有効であると Validation されるわけです。今回のプロトコールでは誰がやってもできる方法論を作成しようということですから、まずは Golden standard である培養法の策定が重要であると思います。

(山本) まず基準となる方法を作成して、次によりよい方法を作成して告示法として作成したいというところで、基準を作成したいと思っています。

(浅尾) これをそのまま通知法として出すわけではないという認識でよろしいのでしょうか。

(山本) もちろんそのままということではありません。ここでは迅速法は別としてまず標準法としてこの形を採用したいと思います。また、温度についても先ほどの議論にありましてとおり、このままでいったん次のステージへ進むということで、これを原案としてオープンにし、意見を求めていくこととなります。

(五十君) 先ほどのコメントについてもこれに加えた形で、追記していきたいと思っています。(丸山) 確認試験の TSI, LIM についてですが集落 2 個を釣菌という記載は、疑わしい集落をなど変えたほうが良いように思うのですが。

(塚本) ご指摘ありがとうございます。訂正いたします。

(五十君) 文章で説明を加えた形で公開したいと思います。

(甲斐) TT の接種量が 1ml となっているのは、今までの 0.5 から変わっているのでそれを変えた根拠も追記したほうが良いのではないのでしょうか？

(浅尾) 確かに現場サイドからも変更点に関する根拠は問いたいところですので、何らかの方法で記載していただいたほうがよいかと思えます。

(山本) 国際的な整合性をとるために、1ml に変更したということで追記してはどうでしょうか。

標準法作成ガイドラインについて

(山本) ガイドライン策定にあたってのステージの進め方については 18 ページに記したとおりです。今日はサルモネラ検査法のステージ 1 について議論していただいた形となります。

(五十君) これについては関係団体にも文書通知することになっています。

(山本) 次のステージは検討委員会として少数のグループでこの方法が正確に動くことを確認してもらえればと思います。

(甲斐) 先ほどの BPW の温度制御についてはどうでしょうか？

(宮原) 35℃に予め温めておくこととしたいと思えます。

(山本) このことも文章として追記するべきかと思えます。

5. その他、事務連絡等

(五十君) 研究費の振込が遅れているため、皆様にはご迷惑をおかけいたしておりますが、本日も分を含めまして一括して振込が近々に行われると聞いております。また、次回の委員会ですが、本年度は行えないと思えますので、4 月以降に第 5 回の委員会を行いたいと思えます。その他、国衛研 HP 上で本委員会の議事録概要については閲覧可能となっております。方法の公開に際しては、ご意見などを吸収するためメールアドレスを開設いたしますので、その旨関係各所にご通達いただければ幸いです。

以上

議事録作成担当 朝倉、石和

II. 分担研究報告

2. サルモネラ検査法

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

分担研究報告書

畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究

サルモネラ検出法検討班

塚本定三 大阪府立公衆衛生研究所細菌課長

宮原美知子 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部第二室長

研究要旨 食品中サルモネラの検出法に関して検討を行った。食肉等に関して現在用いられている方法は現在の世界的な技術水準等から考えて、見直すべき段階にある。情動的、あるいは検討実験等を行い、また、「食品からの微生物検査標準法検討委員会」に提出して、有識者の意見を集約して提案すべき検査法を作成した。これを国立医薬品食品衛生研究所のホームページ等に公開し、さらに、学会等にも公開して、広く意見を集める予定である。

A. 研究目的

本研究では、食中毒起因細菌の標準となる検査法がどの様にあるべきかを示し、その方針に沿ってサルモネラについての検査法の検討を行うことを目的としている。

サルモネラ検査法は、食品衛生法の食品、添加物等の規格基準の食肉製品中の食肉製品の成分規格、平成5年11月29日の通知の別紙1においてEEM培地での前増菌からセレナイトシスチン、セレナイトブリリアントグリーンあるいはハーナのテトラチオン酸塩培地での選択培養そしてMLCBまたはDHL培地への塗抹などにより検出することになっている。しかし、セレナイトは化学物質管理促進法で毒性があることより、管理すべき物質として指定され、排出量の管理が必要とされている。そのため、世界的に見

てもサルモネラの検査法から、セレナイト化合物は排除されるようになってきている。また、EEMでの前増菌がサルモネラの検査法の前増菌として採用されない状況もある。わが国においても、1998年11月25日に通知された液卵のサルモネラ属菌試験法については、BPW培地の前増菌から、RVとTT培地での選択培養、そして2種類の選択分離寒天平板への塗抹での検査を通知している。同じサルモネラの検査法でありながら、食品によって、極端な検査法の違いを是正し、かつ、理論的な裏付けもある、実際に検査を行う人たちにも同意の得られるそして、世界の現状から見ても技術革新の方向に沿った検査法を構築することを目的としている。

B. 研究方法

1. サルモネラ検討委員会を組織する。
2. サルモネラ検討委員会において日本の現状と世界各国のサルモネラ検査法を調べ、比較検討を行う。
3. 日本として採用すべきと思われる検査法を「食品からの微生物検査標準法検討委員会」へ提出する。
4. 提案した検査法に対して、検討を受けた項目に関して検討を一部で行ってみる。
5. 検討した項目の結果を再度「食品からの微生物検査標準法検討委員会」へ提出し、検討を行う。

検討すべきと提示された項目に関して、次のような実験を行った。提示された問題点は、選択培養時の培養温度の問題であった。この培養温度を、フランキあるいは恒温槽のどちらを採用すべきか、温度帯はどうかについて次の実験を行った。

サルモネラフリー*である鶏挽肉検体 25g にサルモネラを 3 段階 (40, 400, 4000 cfu) の菌量で接種した。この検体に BPW(緩衝ペプトン水)225ml を加え、一晚培養液を使用して、RV (Rappaport-Vassiliadis) 培地 10 ml にこの培養液の 0.1 ml を添加し、恒温槽 41, 42, 43°C あるいはインキュベーター 42 と 41.5°C で

の培養を行い、滅菌生理食塩水にて 10 倍希釈を行い、その希釈菌液 (原液、 10^3 、 10^5 希釈菌液) をそれぞれ、スバイラルプレートにて、XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) 寒天培地に塗抹を行って、検出菌数の比較を行った。なお、黒色のコロニーとして出現したものをサルモネラとして計測した。

*BPW 培養液をサルモネラ確認の PCR により検討し、サルモネラが無いと判断される BPW 培養液を使用し、実験に供した。その BPW 培養液はさらに選択培養一塗抹法によりサルモネラフリーを確認した。

C. 研究結果

1. サルモネラ検出法検討班は次の六人のメンバーを選出した。アイウエオ順に敬称略で列記した。

久米田裕子 (大阪府立公衛研)

高須一重 (食品分析センター大阪)

田口真澄 (大阪府立公衛研)

塚本定三 (分担研究員)

仲西寿男 (食品分析センター大阪)

宮原美知子 (分担研究員)

2. 日本の使われているサルモネラ検出法二種類 (参考資料 1 と 2) と病原微生物汚染実態調査で厚労省が 1999 年より毎年の様に行っているもの (参考資料 3)、米国の FDA/BAM 法、(参考資料 4)、