

第2回食品のウイルス標準試験法検討委員会議事録

- 1 開催日時：平成22年8月12日(木) 午後3時～6時
- 2 開催場所：国立医薬品食品衛生研究所 28号館 3階セミナー室
- 3 参加者

委員

山本 茂貴（国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部）委員長

大島 赴夫（財団法人食品薬品安全センター秦野研究所）

田中 廣行（財団法人日本食品分析センター）

林 志直（東京都健康安全研究センター）

片山 和彦（国立感染症研究所・ウイルス第二部）

岡 智一郎（国立感染症研究所・ウイルス第二部）

石井 孝司（国立感染症研究所・ウイルス第二部）

李 天成（国立感染症研究所・ウイルス第二部）

（順不同）

事務局

野田 衛（国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部）

4 会議の概要

1) 開会の挨拶

山本委員長から、挨拶が行われた。

2) 自己紹介

今回が初参加の委員もおられたため、各委員が簡単な自己紹介を行った。

3) 地方衛生研究所におけるウイルス検査について

林委員から、東京都における胃腸炎検査を中心に、地方衛生研究所におけるウイルス検査について紹介された。二枚貝を除き、食品からのウイルス検出が困難な状況にあることなどが述べられた。

4) 議事

次項に示す議事に関し審議した。

5) 標準物質等に関する情報整理・意見交換

食品のウイルス検査に用いる標準 DNA の供給体制、モニターウイルスに関する情報、外部精度管理の在り方などについて、情報整理や意見交換を行った。

5 議事の概要

1) 第1回食品中のウイルス標準試験法検討委員会議事録の承認

第1回食品中のウイルス標準試験法検討委員会議事録(案)について承認を受けた。

2) 作業部会案に関する審議

審議の前に、今後の試験法の標準化の流れについて説明を行った。

- 厚生労働省の通知法との関連においては、本委員会で作成した試験法を基本とするが、

その方法がそのまま厚生労働省の通知法に必ずしもなる訳ではない。

- 本委員会では、「食品のウイルス検査」だけを対象とするが、現在のノロウイルス、A型肝炎の通知法は、食品検査と糞便検査も記載されている。一方、感染研のリファレンス委員会でもノロウイルスの検査法にマニュアル改定も進む予定なので双方で調整しながら、作業を進めていただきたい。

第 1 作業部会(WG01)「二枚貝(カキ等)からのウイルスの濃縮法」および第 2 作業部会(WG02)「濃縮材料からの RNA の抽出、DNase 処理、逆転写反応」での検討内容および作成された作業部会案について、事務局から説明を行った。

① 第 1 作業部会(WG01)「二枚貝(カキ等)からのウイルスの濃縮法」案

- 作業部会で用いた比較に用いたデータは文献、資料に基づいているのか?
↓
基本的にはそうです。一部、当所で実施したものもあります。
- 検討資料 5)の「中腸腺 5 個からほぼ均等に採取したもの合計 1g・・・」の記述が分かりにくい。
↓
中腸腺 5 個から最終的に 10%乳剤として 10ml を濃縮にも用いるので 1g になるという意味です。
- 定量に関する記載があるが、ここで必要か?
↓
本プロトコールは全行程の一部であり、最終的にリアルタイム PCR 法では定量値を求めるので、それに必要な記載をしてあります。
- 再浮遊に SDS-トリスグリシン緩衝液を使用しているが、この条件だとウイルスが破壊している可能性がある。もし、破壊されていいのであれば、あえて SDS-トリスグリシン緩衝液を用いなくても、RNA 抽出キットに含まれる変性用の試薬を直接加えればいいのではないかと RNase による RNA の分解も気になる。ノロウイルスの変化を伴わない detergent の条件は決まっている。その試薬を使えば脂肪への吸着のロスなどが抑えられ、食品の乳剤化の最初のステップから使用できる。
↓
ここの部分は、検出率に大きく影響するので重要です。とりあえず、通知法の DW に再浮遊する方法として、SDS-トリスグリシン等溶液について検討中である旨を加える形にしたい。
- 「フィルターろ液」とあるがフィルターを通すのか?
↓
フィルター付き滅菌バックを使用しているので、そのろ液の意味です。分かりやすいように加筆します。
- 遠心条件は「rpm」ではなく、「g」表記にすべきでは?
↓
最大遠心加速度に統一します。
- 「2 必要な器具・試薬」に「濾紙」とあるが何に使用するのか?
↓

必須ではないので、削除します。

- 超遠心分離のクッションに用いる 30%ショ糖の量が「遠心管量の 10%程度」と記載されているが分かりにくいのでは？

↓

「約 1cc の 30%ショ糖溶液を・・・」に修正します。

指摘事項を修正したものをメールで確認いただいた後、ホームページに第 1 作業部会案として掲載することで了承された。

② 第 2 作業部会 (WG02) 「濃縮材料からの RNA の抽出、DNA 合成、および逆転写反応」案

- 抽出キットを特定しているが、問題はないか？

↓

あくまで例示として示してあり、記載されたキットでなければならないということではない。そのような記載に改めます。

・ 実際に使用する立場からすると、種類を特定してあるほうが導入しやすい。

- DNase 処理をすると検出感度が落ちるので、あえて DNase 処理をする必要性はないのではなか？

↓

全ての検査機関で、シーケンスを行い増幅産物が目的とするウイルス由来であることを確認できるのであればそれでもよいが、現実にはリアルタイム PCR 法だけで陽性と判断する機関も少なくない。DNase 処理をしない場合、どのくらいの頻度で非特異的増幅（偽陽性）が起こるかの明確なデータはないが、PCR で非特異的バンドは出やすいのは事実と思われる。従って、現状では偽陽性を起こさない検査法が優先されるべきと思う。また、加熱処理を伴わない DNase キットを用いると検出率の低下が起こりにくいことも報告されている。

・ 偽陽性を許容するか、偽陰性を許容するかは、食中毒原因究明検査や食品検査など目的によって異なる。十分な議論が必要である。

- 見出しの番号の種類が統一されていないので統一するように。
- 「RNA 抽出量を 600 μ l まで増量できる」と記載されているが、どういう意味か？実際に検査を行う増量の判断が難しい。

↓

キットは 600 μ l まで使用できるのでそのように記載しました。ここでは省略します。

- フローチャートは記載しないのか？

↓

このままで、行きたい。

指摘事項を修正したものをメールで確認いただいた後、ホームページに第 2 作業部会案として掲載することで、了承された。