

第5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24年4月11日(水) 午後15時～17時
- 2 開催場所：国立医薬品食品衛生研究所 28号館 1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

田中 廣行（財団法人日本食品分析センター）

鈴木 達也（財団法人食品薬品安全センター秦野研究所）

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）

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）

上間 匡（国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部）

4 会議の内容

1) 開会の挨拶

山本委員長から、挨拶が行われた。

2) 委員の変更

大島委員から鈴木委員（財団法人食品薬品安全センター秦野研究所）への委員の変更が確認された。

3) 議題

議題に従い、事務局から説明を行った後、各委員からご意見をいただいた後、必要に応じて今後の方針等について承認を受けた。

議題1. 二枚貝のウイルス検査法について

二枚貝の検査法（前処理、RNA抽出、cDNA合成まで）について、コラボスタディなど現

状について説明した。

議題 2. 一般食品からのウイルス検出法について

パンソルビントラップ法や、細菌添加培養処理など、有用性が期待できるウイルス検出法について説明した。

議題 3. 「食品衛生検査指針」(H24 年度末発刊予定) への掲載内容について

改訂が予定されている「食品衛生検査指針」のウイルス関連分野の記載内容について説明、意見交換を行った。

議題 4. 標準 DNA および添加回収用ウイルスについて

事務局より試験法の検討や精度管理等に用いるための標準物質としての DNA やウイルスについて説明、意見交換を行った。

議題 5. 外部精度管理について

食品のウイルス検査の外部精度管理実施に向けて説明した後、鈴木委員より、秦野研究所におけるウイルス検査の精度管理の実施に向けての進捗状況、課題等について説明を受けた。その後、意見交換を行った。

5 議事の概要

議題 1 二枚貝の検査法

(1) 試験法の公表について

二枚貝の検査法（前処理および RNA 抽出～cDNA 合成まで）については、一昨年、本委員会で標準試験法を検討し、また、コラボスタディによる評価を実施して、その結果について行政に還元したところである。しかし、検査機関間で結果に大きなバラつきが認められたこともあり、通知法の改定は緊急には考えていないようである。そのため、現在、HP での公開は控えているが、議題 3 で議論していただくように、食品衛生検査指針が改定予定である。食中毒検査ではより感度の高い検査法が求められることから、通知法と併記して、参照法として掲載するようになりたい。

↓

その方向で調整することとなった。

(2) 遠心後の沈殿物の再浮遊液について

カキの前処理において、遠心で得られた沈殿物の再浮遊液には 0.5%-Zwittergent in PBS(-)を採用することとしていたが、その後の追試により、NoV の場合は明らかに SDS-TrisGlycine の回収率が高い傾向にあった。しかし、FCV では大差がないことから、さらなる検討により、結論を出したい。

↓

食品衛生検査指針には、Zwittergent や SDS-Tris Glycine を利用するメリット、デメリットを明記した上で、「参照法」として記述していくこととなった。

(コメント)

- NoV に関しては核酸しか見ていないので回収率については FCV と比較が難しいと思う。

(3) リアルタイム PCR の定量値 10 未満の取り扱いについて

通知法でリアルタイム PCR 法の陽性限界は 10 と定められている。実際のカキの検査では 10 を超える場合は少なく、陰性と判定されてしまい、多くの自治体から改善の要望がある。陽性限界を下げると、データのばらつきが増え、また、非特異的増幅の危険性もでてくる。そのため、10 以上の場合はリアルタイム PCR 法で陽性と判定し、0 以上 10 未満の場合は、nestedPCR 法あるいは nested RealTimePCR 法により、再検査し、いずれかで陽性となった場合に陽性とするように変更したい(通知法の変更時)。

↓

10 という判定基準よりも試験方法そのものについてももう少しデータ収集する必要がある。そのうえで、判定基準の改訂や取扱いを考える必要がある。

(コメント)

- 10 コピー以下で陰性判定され、出荷されたロットの生食用カキで食中毒が起きているか？
⇒実際には起きていると思われる。
- 見逃しがどれくらいあるか、を調査データとして示せば改訂のための説得力もある。
- 当自治体では 10 コピー付近の結果では nested リアルタイム PCR で再テストを行って確認しているが、もっと検体数を増やしてデータを集めないと判定基準を変更するのは難しい。現状の 10 はハードルが高いと思われるので、他の方法も含めて安全性を担保す

る方法を検討する必要がある。

- コラボスタディで使用している機器はどの機関も同じものを使用しているのか？
⇒各機関によって違う。
⇒いろいろな機種で同じサンプルをテストしたら、同じメーカーの機器でも個体差があり、メーカー差もあるようだ。

議題2 一般食品からのウイルス検出法について

(1) パンソルビントラップ法について

NoVの通知法は、二枚貝を対象とした検査法が記載されている。現在のNoV食中毒は調理従事者からの二次汚染を受けた食品を原因とするケースが多数を占め、多種多様な食材・食品が原因となっている。そのため、多種・多様な食品からの検査法の確立が望まれており、厚生労働科学研究費補助金「食品中のウイルスの制御に関する研究」（平成19年度～平成21年度）および「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」（平成22年度～平成24年度）においても最重要検討課題となっている。

斎藤らによって開発されたパンソルビントラップ法は、ポテトサラダ（糖分 rich）、焼きそば（油 rich）など、多種・多様な食品からのウイルス検出を可能とする優れた方法である。国内、国外の文献や報告書を比較した結果、本法が現時点においては最も優れていると思われる。本法は主に地方衛生研究所の食中毒の原因究明検査に使用されると思われることから、本委員会のホームページで公表し、パブコメを得た後、「食品衛生検査指針」に「その他の方法」として、掲載するようにしたい。

↓

その方向で調整することとなった。

(コメント)

- ガンマグロブリンを使用するよりも、ノロウイルス特異的な抗体を使用するのがいいのではないかと？抗体作製は難しくないと思うが？
⇒現在ノロウイルスに対する特異抗体（モノクローナル、ポリクローナル）の作製、供給は感染研で行っているが、全国の地研等に配布するとなるとかなり大量に生産しなければならず、キャパシティが足りない。また、特異抗体ではターゲットとなるウイルスが限定される。特にノロウイルスは遺伝子型が多く、対応は困難と思われる。さら

に、食中毒検査の場合にはターゲットとなるウイルスは不明であるため、複数のウイルスに汎用できるものを利用するのがよいと思われる。もちろん患者血清や、特異抗体の使用についても記載する。

議題 3 「食品衛生検査指針」(平成 24 年度末発刊予定) への掲載内容について

(1) NoV、HAV の記載内容について

食品衛生検査指針微生物編「(社) 日本食品衛生協会」(2004 年版) が平成 24 年度末に改定予定である。本書は、食品の衛生検査にかかる試験法の記載が原則であるが、ウイルスに関しては、規格基準がないこと、食中毒の原因究明のための食品検査と実質的に同じ手法であることおよびその検査が大半を占めることから、食中毒の原因究明を目的とした検査の記載が認められている。

本書においては、通知法が存在するもの (NoV、HAV) についてはその記載が原則であるが、食中毒検査においてはより感度が高い方法が求められることもあり、以下の項目を通知法とともに、参照法として併記することとしたい。

- 本検討委員会で検討した方法
 - 二枚貝 (カキ) からのウイルスの濃縮法
 - 逆転写反応～cDNA 合成
- HAV 検出用 nested PCR 法 (2010 年の A 型肝炎多発を受けて、通知法では感度が十分でなく、遺伝子解析領域も短かった。これを解決するために、石井先生をはじめ地方衛研の先生方の協力も得て、RT-PCR の高感度化と、分子疫学解析範囲の拡大を図り、その有用性を確認した。)

↓

その方向で記載することとなった。

(2) 豚、イノシシの肝臓、血清を対象とした前処理方法

E 型肝炎ウイルスでは、豚、イノシシ等の肝臓、食肉、血清を対象とした前処理法、およびリアルタイム PCR、Nested PCR について記載する方向で進めてもらいたい。

↓

その方向で記載することとなった。

(3) RT-PCR 法および RT-nested PCR 法

NoV、HAV の他に SaV、AstV、AiV、RV、AdV、EnV、HEV、FCV、MNV、糞便系ファージについて記載したい。食品からの検出が主であることから、RT-PCR、nested-PCR を中心に記載してもらおう予定である。それらの検査法については執筆者に任せて、原稿作成時に編集責任者（野田）や執筆者以外の専門家にコメントを求めるようにしたい。NoV は通知法を原則として、キメラウイルス検出 PCR など、新しいプロトコールの記載を考えたい。

↓

その方向で調整することとなった。

(コメント)

- 記載するプロトコールは、オリジナルのものでないといけないのか？
⇒記載するものについては、完全オリジナルではなく、外国での報告の引用でもよい。ただ、その場合、ラボで実際に使用し、問題なく利用できることが検討（特に、ラボで）されたものが望ましい。
- FCV や MNV は食品と関係ないようだが？
⇒FCV、MNV は、海外では必須項目となっている添加回収のモニタリング用の陽性コントロールとしての利用することがあるので、その記載が必要と考える。
- 方法は1種類でないといけないのか？
⇒複数の方法を記載いただいてよい。その場合、検出感度に優れる領域だとか、遺伝子型の型別に優れる領域だとか、長所・短所等を記載してもらおうと助かる。
- ウイルス不活化試験法とは？
⇒現在我が国では消毒薬の評価法に取決めがないので、統一された方法が求められている。あくまで参考法としての記載になるが、紹介する方向で調整したい。不活化には、加熱、紫外線などの殺菌方法がいろいろあるが、消毒薬についての記載が主となると思われる。薬剤、消毒剤の場合は、反応後の中和が最も重要になると思われるが、そこは薬剤等によって異なるので、具体的な中和方法（濃度、時間等）について記載するのは難しいだろう。

議題4 標準 DNA および添加回収用ウイルス

(1) 標準 DNA の民間での供給について

現在、NoV、HAV、SaVのPCR法およびリアルタイムPCR法の実施に必要な、標準Plasmid（コピー数が明らかな組み換えDNA）や標準ウイルス株は、国立感染症情報センター第六室から地方衛生研究所への供給体制が確立されている（HEVについては、李先生）。しかし、検査需要の高まりにより民間での検査が増加しているが、民間検査機関への配布体制は確立されていない。

一方、遺伝子組み換え食品のPCR検査の標準品については、試薬メーカーからの配布体制が確立されている。業者に打診したところ、積極的に対応したいとのことであった。

ウイルス検査の標準品についても、同様の体制の構築が可能と思われるので、その方向で調整するようにしたい。

↓

その方向で調整することとなった。

（コメント）

- 標準DNAの配列情報についてはNoV、HAV、HEVについては感染研から提供してもらいたい。
⇒現在は、遺伝子配列はインターネット上のデータベースで公開されており、Plasmidの作製についても外注で人工合成することができるので、配列情報をメーカーに渡し、生産、販売してもらうことで問題ない。ただ、販売したものと、現在感染研から配布しているものとの間で、検査の値がずれる可能性があるため、中立の立場で検定する必要がある。GIについては、ノーウォーク(GI/1)は流行していないが、現在地研で利用しているものに合わせると問題が生じにくいので、それをベースにするのがいいと思う。

(2) ネコカリシウイルスを添加回収用ウイルスとして用いた場合のRT-PCRおよびリアルタイムPCR増幅系の構築とネコカリシウイルスワクチンの利用の可能性について

ネコカリシウイルスを添加回収用ウイルスとした場合の、RT-PCR、RT-リアルタイムPCR増幅系および（ウイルスの培養ができない施設を念頭に）ネコカリシウイルスワクチンの利用の可能性を現在検討中であるので、その報告を行った。

（コメント）

- 実際にワクチンを利用する場合はメーカーに依頼して、FCV 単独の不活化ウイルスとして入手することも考慮したほうがよい。

(3) パンソルビントラップ法における添加回収用ウイルスについて

パンソルビントラップ法では、ヒトのガンマグロブリン製剤を使用するので、ネコカリシウイルスは（抗体がないと思われるので）利用できない可能性が高い。現在の通知法で使用されているエコーウイルス9型を含め、適した添加回収用ウイルスを今後検討する予定である。

議題5 外部精度管理

(1) 外部精度管理実施に向けて

二枚貝等のノロウイルス検査については厚生労働省からの通知法等により検査が行われているが、現在食品のノロウイルス検査については外部精度管理体制が確立されておらず、検査の信頼性確保が困難な状況にある。

そのため外部精度管理体制の確立が望まれるが、厚生労働省からは、外部精度管理実施に向けての問題点の指摘を受けている。また、現在外部精度管理を実施している秦野研究所はウイルス（生きた）ウイルスを扱えないため、添加ウイルスを含め、試料の調整法を十分に検討する必要がある。

その上で、来年度以降、秦野研究所の協力を得ながら、調査研究的に実施していきたい旨を説明した。

(秦野研究所からの現在の進行状況の説明)

生きたウイルスを使用できないことから NoV を用いる場合は、ホルマリン固定したものなど不活化させたものを用いる必要がある。配布試料の均一性の確保や、サンプル自体の安定性、保存について、検討する必要がある。

外部精度管理に参加している機関に、ウイルスの外部精度管理の試行的実施に参加するかアンケートを配布したところ（結果はまだ未回収）。

外部精度管理は、調査研究として試行的に実施することから始めたほうがいいと思う。

(コメント)

- ウイルスのソースはどうするのか？ ロットが変わると検査結果はバラバラになる。
⇒NoV は患者便しかない（大量調整は困難）。HAV や FCV は、培養上清、ワクチンが利用できる。どのようにするか、現在検討中である。