

意見・質問等	回答
1. サルモネラ試験法について	
<p>・増菌でRVSとTTの両方を実施すると、現場の作業量が倍になります。 煩雑さを考え、どちらかに統一していく可能性はないでしょうか。</p>	<p>サルモネラのなかには少数菌量の摂取でも発症可能な菌種も存在することから精度の高い検査法が望まれています。厚労省の汚染実態調査を分析した結果、TTで検出したものは約70%で、RVでは90%であり、TT、RVのみで検出されたものはおのおの約30%、10%であり、検出率の高いRVのみでは少なくとも10%程度のサルモネラが検出できないこととなります。諸外国においても増菌培地は2種類用いて検出精度を高めています。</p>
<p>・サルモネラ陽性の時点で出荷はできないので、血清型別試験の実施は任意でもいいと思うのですが、血清型別まで実施する理由を教えてください。</p>	<p>血清型別試験はO型凝集試験のみで、これはあくまでもサルモネラを確定するために実施していただくものです。従ってH型別を含めた詳細な血清型の決定については行う必要はありません。</p>
<p>(1)サルモネラ試験法について サルモネラ試験法に関しましては、「4. 試験手順 2) 選択増菌培養 ④RV培地・・・ を$42.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$・・・培養する。」とありますが、弊社が採用しております社内標準試験法では培養温度を$41.5 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$としております。実は弊社でも古い社内標準試験法では$42.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$を採用しておりましたが、培養温度を$41.5 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$に変更してからは弊社の各国グループ会社の微生物試験室が参加する微生物検査能力評価テストで「False Negative」の判定が出なくなりました。培養温度だけが「False Negative」の原因ではない可能性もありますが、弊社では培養温度は41.5°Cを基準として設定するのが望ましいのではないかと考えます。</p>	<p>サルモネラを選択増菌の培養温度につきましては諸外国の状況を見ても様々ではありますが、多くは$42.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$を採用しています。我が国でも約10年前から現在まで継続実施している厚労省の汚染実態調査や数種類の血清型株を用いたいろいろな菌量による添加実験、今回実施したコロレティブスタディ等におきましてもこの温度帯で極めて良好な結果を得ております。</p>
<p>サルモネラ、腸炎ビブリオ、カンピロバクターについて</p>	
<p>・O157のように、PCRやLAMPなどは増菌培地から直接実施する測定法で陰性の場合にはOKというような系は今回はないのでしょうか？</p>	<p>標準試験法の提案ですので、培養を基本としています。標準法(ゴールドスタンダード)を尺度としてそれ以外の迅速・簡便法を評価してゆく予定です。</p>
<p>・PCRなどでなく、イムノクロマトなどの方法は増菌が前提であれば感度的には不足ないのではと考えます。</p>	<p>標準試験法の提案ですので、培養を基本としています。標準法(ゴールドスタンダード)を尺度としてそれ以外の迅速・簡便法を評価してゆく予定です。</p>
<p>・その場合、陽性時には、分離を追加すればいいかと思えます。</p>	<p>標準試験法の提案ですので、培養を基本としています。標準法(ゴールドスタンダード)を尺度としてそれ以外の迅速・簡便法を評価してゆく予定です。</p>
<p>サルモネラの検査法の中に$42.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$という記載がありますが、これまでの$\pm 1.0^{\circ}\text{C}$を採用されない理由があるのでしょうか。機器管理上かなり厳しい設定であると思いますが、± 1.0と± 0.5で有意な差が認められたのでしょうか？実際にGLP対応の検査を行っているものにとって採用しにくい検査法となるのであればとても残念です。</p>	<p>今回実施したコロレティブスタディにおいては気相(空調式)インキュベーターを使用し、温度管理ロガーを用いて温度を記録していただきましたが、ほとんどの機関で42.0 ± 0.5の温度設定が守られていました。仮に42.0 ± 1.0に設定いたしますと43.0°Cで培養するケースも考えられますが、43°CではRV培地においてサルモネラ発育不良との報告があることから、42.0 ± 1.0は採り入れないこととしました。</p>
<p>1) 選択増菌培地にRVS(ラパポート・バシリアディス・ソーヤペプトン)も検討・記載してほしい。</p>	<p>サルモネラを選択培地にはいろいろな種類があり、多くの培地を検討することは実際には不可能です。諸外国において広く一般的に採用されていて、かつ、我が国においても従来から採り入れられているRVとTTについて検討、採用いたしました。</p>

<p>2) 分離培地にSS寒天培地、ランバック改良型培地を記載してほしい</p>	<p>分離培地についても様々な培地が発売されていますが、上記と同様に我が国において多くの機関で採り入れているもの、諸外国でも多く採り入れられているものを中心に選定いたしました。硫化水素産生性で検出する培地4種類と硫化水素産生性に関わらずサルモネラを検出する4種類について、2機関で比較実験を実施し、検討した上でのおの3種類、4種類の分離検出培地を記載いたしました。</p>
<p>3) 確認試験TSI培地で硫化水素(ー)の株がごくたまにある。</p>	<p>硫化水素産生陰性のサルモネラも検出できる試験法を提案いたしております。</p>
<p>4) LIM培地でリジン陰性の場合がある</p>	<p>リジン脱炭酸陰性のサルモネラも検出できる試験法を提案いたしております。</p>
<p>5) H血清型別試験方法も記載してほしい</p>	<p>サルモネラの確定にはH血清型は必須でないので、食品のサルモネラ試験法にはこの検査を省きました。</p>
<p>1. サルモネラ試験法(ステージ3:コラボ案)6)血清型別 ①O血清型別試験をTSI斜面上から菌を採取して実施する。 ↓</p>	
<p>・TSIと限定されている理由をご教示ください。</p>	<p>分離培地に発育したコロニーをTSI寒天培地およびLIM培地に接種する際に、トリプトソイ寒天培地(TSA)にも同様に接種することが望ましいのですが、手数が増える作業になるとの意見があり、抗血清を用いる凝集反応はTSI斜面から採取してもらうことにいたしました。もちろん微妙な反応がみられた菌株に対しては、非選択培地上の集落を採取して判定を行う必要があります。</p>
<p>・血清の添付資料には、非選択培地を用いると記載されていますので、添付資料を参考にす。または、非選択培地から採取するといった記載法がよいのではないのでしょうか。</p>	<p>分離培地に発育したコロニーをTSI寒天培地およびLIM培地に接種する際に、トリプトソイ寒天培地(TSA)にも同様に接種することが望ましいのですが、手数が増える作業になるとの意見があり、抗血清を用いる凝集反応はTSI斜面から採取してもらうことにいたしました。もちろん微妙な反応がみられた菌株に対しては、非選択培地上の集落を採取して判定を行う必要があります。</p>
<p>選択分離培地にSS寒天培地が含まれていませんが、鶏肉のように夾雑菌(特にProteus属)が多い場合、DHL培地では釣菌できない場合が多々あり、選択性の強い、SS寒天培地も必要ではないかと考えます。</p>	<p>SS寒天培地は臨床分野においてよく使用されています。選択制が強いいためか、多くのメーカーがかなり改良を加えており、どのメーカーのSS寒天培地を検討したらよいのかわからないほど多くの種類があることと、ご指摘のような場合の夾雑菌を考えても、2種類の分離培地により、誤った判定はふせぐことができると考えていますので、選択よりはずしています。</p>
<p>1) 選択増菌培養において ・TT培地は当所で通常使用している培地と異なり、使用時にヨウ素液を添加して用いる点など扱にくいと考えられる。 ・増菌培地の種類により摂取量が異なるため注意が必要であり、熟練を要すると思われる。 ・前培養液を増菌培地に摂取する際、培地が容量10mlと少ないことからこれをあらかじめ培養温度に設定しておく必要があるのか疑問である。</p>	<p>厚労省の汚染実態調査で結果を分析した結果、RVで検出されなかったサルモネラが10%ほどTTから検出されています。少数菌摂取でも病原性の強いサルモネラでは10%を見逃してはいけないと考えております。また、接種量の違いは選択増菌培地の選択制の違いによるものですので、ご了解下さい。選択増菌培地を設定温度近くにして接種することは選択性を高めるために必要なことですので、そのように設定していただければ、よい結果が得られます。</p>
<p>2) 確認培養について ・各分離培地に形成された定型的集落を3個ずつ釣菌とあるが、分離平板はのべ4枚あり最大12株以上の菌株の確認検査を行うことになり非常に煩雑となる。なお、フローチャートでは「定型的集落を3個釣菌」とも受け取れる表記である。</p>	<p>4枚の分離培地上に定型的集落があれば、分離していただき、確認することになります。ただし、1株でもサルモネラがあれば、全体としてサルモネラ陽性ですので、多くの均一なサルモネラと思われる集落がどの分離培地にでもあれば、全部(12個)釣菌しなくてもよい場合も考えられます。サルモネラと見られる集落なのに陰性とするような場合は、少なくとも各培地から3個は確認してくださいということをご記載いたしております。</p>

<p>3 その他 意見というほどのものではありませんが、少々気づいたことを述べさせていただきました。 今回の検査法の検討につきましては委員の皆様には大きな重責がかかっていると推察いたします。転換点に当たっては少なからぬ混乱があり、すべての食品衛生関係者が新たな検査法に習熟するまでの時間も必要です。先のことでありますが、今後ともどうぞよろしくご指導くださいますようお願いいたします。</p>	<p>不明な点については担当者またはこの委員会にお尋ね下さい。</p>
<p>(1) コラボ試験の目的及び試験方法等の関連性が不明である。 理由: 目的(1.再現性の確認)及び検討内容(4.培地の検証、7.菌量レベルの検討)が一致していない。再現性の確認を目的とするならば、検討内容については検証済みでなければならないと考える。 また、ISOに準拠した点について明確にされたい。</p>	<p>サルモネラのコラボ試験法のWEB公開から1ヶ月後にコラボ試験が実施されましたが、こちらの手違いによりコラボ試験終了後に試験法に対する意見を求めるメールが配布されたために、いただいた意見を反映することができませんでした。しかしながら、約3年近く再現性、培地、菌量レベルなど検証実験を重ねてきたことをコラボ実験の結果で確認することができました。以上の点、ご理解をお願いいたします。ISOに準拠の件につきましては、提案したサルモネラ検査法は我が国および諸外国の検査法をあらゆる角度から検討を加えた結果として作成されたものであって、最初からISOに準拠したことはありません。</p>
<p>(2) 検証方法等の根拠について明示をお願いしたい。 理由: 今回示されたコラボ案は、従前の「食品の食中毒菌汚染実態調査」における試験方法と大きな変更はみられないが、10年来実施してきた汚染実態調査の試験方法等の精査の結果は反映されているのかを示されたい。 また、提示案の根拠(検証結果)を提示願いたい。</p>	<p>ご指摘のように10年来実施してきた方法を基本にいたしております。この調査結果を分析して、どの選択培地から検出されたか、どの分離平板培地から検出されたか等を探り入れて、試験法を検討してきました。 この試験法は厚労科研費により検討されていますので、畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究(H17-19年度)の報告書をご覧になって下さい。</p>
<p>(3) 選択増菌培養については、RV培地のみとする。 理由: TT培地を併用することにより食品中のサルモネラの検出率が有意に上昇するものではないことから、TT培地を使用する場合の煩雑さを考</p>	<p>厚労省の汚染実態調査での分析結果によりますと、サルモネラ陽性検体の10%程度はRVからは検出されず、TTからのみ検出されています。検出精度を高めることから増菌培地の併用は必須であり、諸外国においても2種類用いています。</p>
<p>(4) 文言の整理。 ・培地等の作成 → 作製 ・TT培地の加温溶解 → 混和 ・分離培地を用いた菌の判定 → 選択あるいは鑑別等 ・略名が既出している培地について、後半略されていない</p>	<p>ご指摘いただきありがとうございます。ご指摘いただいた点について修正いたしました。</p>
<p>・非定型的な性状を示すサルモネラが疑われる場合、 具体的にどの性質を調べて同定するか示したほうがよいと思います。</p>	<p>非定型的サルモネラの場合も含めて、同定についての詳細を掲示いたしました。</p>
<p>・O抗原の種類によって出荷基準等が変わるわけではないので、 O抗原の試験は標準試験法内には記述せず、任意の試験でいいのではないのでしょうか。</p>	<p>O抗原検出によって、サルモネラを特定する一助といたしております。O抗原については必須項目です。</p>
<p>・選択増菌培地にRVとTTの2種類を使用していますが、数が増えるので どちらか片方に統一できないでしょうか。また増菌培地に使用するセレン、 亜テルル酸の廃棄方法について示したほうがいいのかではないでしょうか。</p>	<p>厚労省の汚染実態調査で結果を分析した結果、RVで検出されなかったサルモネラが10%ほどTTから検出されています。少数菌摂取でも病原性の強いサルモネラでは10%を見逃してはいけなく考えております。 セレンやアテルル酸に関しては今回提案の試験法には含まれていません。</p>