

令和2年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
食品の安全確保推進研究事業

動物性食品輸出の規制対策のための研究

総括・分担研究報告書

研究代表者

国立医薬品食品衛生研究所食品部

穂山 浩

研究分担者

国立医薬品食品衛生研究所食品部

志田（齊藤）静夏

国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部

工藤 由起子

令和3年(2021年)5月

目 次

I. 総括研究報告	
動物性食品輸出の規制対策のための研究	
穂山 浩	1
II. 分担研究報告	
1. 動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価	
志田（齊藤）静夏	8
2. 牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究	
工藤由起子	99
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	152

I. 総括研究報告

動物性食品輸出の規制対策のための研究

穂山 浩

動物性食品輸出の規制対策のための研究

研究代表者 穂山 浩

研究要旨

EUに動物性食品を輸出するためには、残留物質モニタリング計画を作成し、A物質（スチルベン類等）及びB物質（抗菌性物質等）のモニタリング検査を行う必要がある。モニタリング検査においてB物質がモニタリング部位（肝臓、腎臓等）から検出された場合は筋肉（可食部位）の検査を行い、基準値を超過した場合に原因等の調査が求められる。しかし、B物質の筋肉を対象とした分析法は整備されていない。本研究では、牛の筋肉を対象として13分析法（チルミコシン分析法、スルファモイルダプソン分析法、クロルテトラサイクリン及びオキシテトラサイクリン分析法、エンロフロキサシン（シプロフロキサシンとの和）分析法、フロルフエニコール分析法、トリクラベンダゾール分析法、サリノマイシン及びモネンシン分析法、トルトラズリル分析法、ペルメトリン分析法、HCB分析法、DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH及び γ -HCH分析法、クロルデン及びノナクロル分析法、PCB分析法）を確立し、これらの分析法の妥当性評価試験を実施した。その結果、真度 77.9～112.6%、併行精度 1.1～10.8%、室内精度 2.3～17.6%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。これらの結果から、13分析法は牛の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。本研究で確立した分析法を用いることにより、B物質が牛のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに牛の筋肉（可食部位）の検査を実施することができ、EUへ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と考えられる。牛肉のSTEC汚染リスク低減のための研究を実施した。牛枝肉のSTEC調査では、2020年11月から2021年2月に7施設の協力のもとに牛枝肉合計180検体について7血清群（026、045、0103、0111、0121、0145、0157）のSTECを対象とした調査を行った。検体を増菌培養後、マルチプレックスリアルタイムPCR法、血清凝集試験および生化学的性状試験にてSTECの検出・分離を行った。また、同時に生菌数の計数を行った。この結果、1検体からSTEC 0157:H7が分離されたが、1検体のみであったことからウシの種類や性別などの特徴については考察には至らなかった。STEC 0157:H7が分離された検体において生菌数が比較的高い値を示したことから、ウシや環境状況の要因の可能性が考えられた。また、牛肉の消毒効果の検討のために、消毒薬として、酸性の過酢酸製剤、アルカリ性の次亜塩素酸ナトリウム（次亜塩素酸ソーダ）、中性のエタノール（エチルアルコール）を選択し、生理食塩水や液体培地中のSTEC浮遊液での消毒効果を検証した。結果として、十分な消毒効果が認められ、STEC接種牛肉においても消毒液の量を増やすことにより菌数は減る傾向が認められた。

研究分担者

志田(齊藤)静夏(国立医薬品食品衛生研究所
食品部主任研究官)

工藤由起子(国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部部長)

研究協力者

(一財)日本食品分析センター

飯塚誠一郎((一財)日本食品分析センター)

中村歩((一財)日本食品分析センター)

小杉正樹((一財)日本食品分析センター)

伊佐川聡((一財)日本食品分析センター)

豊岡大輔(北海道保健福祉部健康安全局食品
衛生課)

東海林明子(十和田食肉衛生検査所検査第二
課)

高橋むつみ(十和田食肉衛生検査所検査第三
課)

山口健一(秋田市食肉衛生検査所)

大迫英夫(熊本県食肉衛生検査所)

千葉由美、都丸亜希子、毛利拓子、廣瀬昌平
(国立医薬品食品衛生研究所)

A. 研究目的

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法 の確立と妥当性評価

EUに動物性食品を輸出するためには、欧州理事
会指令 96/23/EC および規則(EU)2017/625
に従って作成した残留物質モニタリング計画に基
づき、A物質(スチルベン類、抗甲状腺薬、ステロ
イド類、レゾルシン酸ラクトン類、 β -作動薬、
Council Regulation (EEC) 2377/90 AnnexIV に掲
げられた禁止物質(クロラムフェニコール、ニトロフ
ラン類、ニトロイミダゾール等))及びB物質(抗菌
性物質、駆虫剤、抗コクシジウム剤、非ステロイド
性抗炎症薬、カルバメート系農薬、ピレスロイド系
農薬、有機塩素系農薬、PCB、有機リン系農薬、

重金属・有害元素、マイコトキシン)のモニタリング
検査を行う必要がある。モニタリング検査においてA
物質がモニタリング部位から検出された場合は、原
因等を調査して必要な措置をとるまでの間、EUへ
輸出することはできない。一方、B物質がモニタリ
ング部位(肝臓、腎臓等)から検出された場合は筋
肉(可食部位)の検査を行い、基準値を超過した
場合に原因等の調査が求められる。このため、B
物質についてはモニタリング部位を対象とした分
析法に加え、筋肉を対象とした分析法も必要とな
る。しかしながら、B物質の筋肉を対象とした分析
法は整備されていない。本研究では、B物質のう
ち、牛及び鶏においてモニタリング部位が肝臓又
は腎臓となっている物質について、筋肉を対象と
した分析法を開発し、確立した分析法について妥
当性評価を実施することにより、モニタリング検査
で検出された場合に輸出再開に向けた迅速な対応
が取れる体制を整備することを目的とした。令和2
年度(1年目)は、B物質のうち、牛においてモニ
タリング部位が肝臓又は腎臓の物質(抗菌性物質
(チルミコシン等の6項目)、駆虫剤(トリクラベン
ダゾール)、抗コクシジウム剤(モネンシン等の3
項目)、ピレスロイド系農薬(ペルメリン)及び有機
塩素系物質(HCB等の15項目))について、牛の筋
肉を対象とした分析法を確立し、妥当性評価を実
施した。

牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研 究

昨今の海外での和牛の需要の高まりや日本政
府および業界関係者による和牛輸出促進の影響
のため、海外への和牛輸出量が増加している。特
に、米国への輸出は2005年から解禁されている
が、近年、米国では腸管出血性大腸菌(志賀毒素
産生性大腸菌 Shiga toxin-producing *Escherichia*
coli; STEC)食中毒防止対策のひとつとして牛肉
の STEC 検査を行い、検出した関連製品について

は米国向けに輸出ができないため、現在は国内の加熱加工原料向けに転用している。和牛は畜産食品のなかでも単価の高い高級食材であり、国内で限られた数の対米輸出食肉取扱施設でのと畜、食肉処理による生産量を考えると、加熱加工原料のみならず、効果的な殺菌方法による食中毒の発生予防措置をとった上で、加熱加工原料用以外の転用を可能にすることは、国内生産者や食肉処理関係者の継続的な生産・関連業務にもつながることが期待される。

令和2年度には、国内食肉処理施設において、牛枝肉表面の STEC について定性的・定量的検出を行う。方法としては、USDA/FSIS の試験法を参考に志賀毒素遺伝子・大腸菌 O 抗原遺伝子検出のスクリーニングを行い、分離株の血清型別、毒素型別等の解析を行うこととした。また、各種殺菌剤について、生理食塩水や液体培地中の STEC 浮遊液での消毒効果を検証し、加えて牛肉での効果を予備的に検証することとした。

B. 研究方法

1.動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

牛の筋肉を対象として 13 分析法であるチルミコシン分析法、スルファモイルダプソン分析法、クロルテトラサイクリン及びオキシテトラサイクリン分析法、エンロフロキサシン(シプロフロキサシンとの和)分析法、フロルフエニコール分析法、トリクラベンダゾール分析法、サリノマイシン及びモネンシン分析法、トルトラズリル分析法、ペルメリン分析法、HCB 分析法、DDT、アルドリ、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 分析法、クロルデン及びノナクロル分析法、PCB 分析法の確立と妥当性評価を行った。実験方法の詳細は研究分担者 志田(齊藤)静夏の分担報告書に記載した。

2.牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

国内食肉処理施設において、牛枝肉表面の STEC について定性的・定量的検出を行った。USDA/FSIS の試験法を参考に志賀毒素遺伝子・大腸菌 O 抗原遺伝子検出のスクリーニングを行い、分離株の血清型別、毒素型別等の解析を行った。また、各種殺菌剤について、生理食塩水や液体培地中の STEC 浮遊液での消毒効果を検証した。また牛肉での効果を予備的に検証した。実験方法の詳細は研究分担者 工藤由起子の分担報告書に記載した。

C. 研究結果及び考察

1.動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

牛の筋肉を対象として、以下の 13 分析法を確立し、B 物質 36 化合物について妥当性評価試験を実施した。

- ①抗菌性物質(チルミコシン分析法、スルファモイルダプソン分析法、クロルテトラサイクリン及びオキシテトラサイクリン分析法、エンロフロキサシン(シプロフロキサシンとの和)分析法、フロルフエニコール分析法)
- ②駆虫剤(トリクラベンダゾール分析法)
- ③抗コクシジウム剤(サリノマイシン及びモネンシン分析法、トルトラズリル分析法)
- ④ピレスロイド系農薬(ペルメリン分析法)
- ⑤有機塩素系物質(HCB 分析法、DDT、アルドリ、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 分析法、クロルデン及びノナクロル分析法、PCB (28、52、101、138、153 及び 180 の総和)分析法)その結果、真度 77.9~112.6%、併行精度 1.1~10.8%、室内精度 2.3~17.6%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピーク

は認められず、選択性に問題はなかった。これらの結果から、13 分析法は牛の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。

2. 牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC 調査

生菌数が検出されない 27 頭を除いた 153 頭の生菌数は 17.5 ± 63.50 (平均 \pm SD) CFU/cm² であり変動係数 (CV) =3.62 であった。ウシの種類別の生菌数、施設別の生菌数、月別で算出した生菌数、STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR、定量的な検出である MPN 測定およびリアルタイム PCR、検体増菌培養後のリアルタイム PCR の結果を算出した。

牛など反芻動物は、STEC 0157:H7 の保菌動物として重要とされており、ヒトでの本菌感染にウシに関連する食品が報告されている。

糞便中の STEC 0157:H7 の濃度は、 10^2 から 10^6 CFU/g と個体によって異なり、 10^7 CFU/g の高濃度が検出されることもあるが、ほとんどの場合 10~100 CFU/g 未満であった。牛枝肉汚染および牛糞中の含有率は相関があるという報告があるが、細菌が腸外に潜伏するために、糞便の排出と牛枝肉汚染はほとんど相関がないともいわれている。また、ウシの STEC 0157 保菌には年齢と出産が関係し、保菌率は 2 歳の牛で最も高く、それ以上の年齢の動物では減少し、未経産牛 (1 歳以上の動物) は保菌率が低く、菌の排出は、生後 2 か月未満および生後 6 か月以上の子牛と比較して生後 2~6 か月の子牛で最も高いとの報告がある。

今回、STEC 0157 の検出されたウシの糞便中の STEC の有無の調査をしていないため生体の保菌について不明だが、調査すれば有益と考えられる。また、この検体の生菌数は、他の検体

に比較して 1 から 2 桁高かったことから、と畜段階の環境の影響の可能性も考えられる。

季節性に関しては、ウシの STEC 0157 の保有率はヒトと同様に温帯気候では春の終わりから秋の初めに比較的高いといわれている。今回は、サンプリング期間が冬季の連続した 4 か月であったが、月別の生菌数の変動はみられなかった。今後は、他の季節での調査を行う必要がある。

2. 牛肉の消毒効果の検討

検証を行った消毒液の特徴として、過酢酸は、すべての微生物に対して即効性を有することである。特有な特徴として、分解生成物は、酢酸、水、酸素、過酸化水素であり、有害な分解生成物が生じないことであり、残留物が残らない、有機物の除去が促進されることなどがあげられる。銅、真鍮、青銅、普通銅、亜鉛メッキ鋼板を腐食させるが、腐食作用は、添加物や pH 調製剤により抑制できる。希釈した場合は、不安定であるとされ、1% 溶液の濃度は加水分解により 6 日間で半減するが、40% 過酢酸の有効成分の減少は 1 か月あたり 1-2% である。

作用機序については、ほとんどわかっていないが、他の酸化剤と同様に、タンパク質を変性させる、細胞壁の透過性を変化させる、酵素やほかの代謝物のスルフヒドリル基および硫黄結合を酸化させるなどといわれている。殺菌作用として、グラム陽性およびグラム陰性菌、真菌、および酵母を 100 ppm 未満、5 分以内で不活性化する。有機物の存在下では 200 から 500 ppm が必要である

次亜塩素酸塩は、最も広く使用されている塩素消毒液あり、次亜塩素酸ナトリウのような液状のものと次亜塩素カルシウムなどの固形のものが市販されている。もっとも普及している塩素製品は、次亜塩素ナトリウム水溶液の「ブ

リーチ」と称された家庭用漂白剤である。特徴として、広域スペクトルの抗菌活性があり、有毒な残渣を残さない、水の硬度に影響されない、安価で即効性がある、乾燥または固着した微生物やバイオフィルムを表面から除去できる、重大な毒性率が低いであるが、高濃度(>500 ppm)での金属に対する腐食性、有機物による不活性化、漂白作用、アンモニアまたは酸との混合による有毒ガスの発生、相対的安定性があることなどは、欠点としてあげられる。

塩素性の殺菌作用の大部分は非解離型次亜塩素酸(HOCl)によるものであり、HOClの解離は、pHに依存しているため、塩素の消毒効果は、pHが上昇するとともに低下する。微生物に対する正確な作用機序は明らかにされていないが、微生物の不活性化はいくつもの要因によって、あるいは重要部位への作用によって生じると考えられている。スルフヒドリル基やアミノ基の酸化、アミノ酸環の塩素置換、細胞成分の減少、栄養分の取り込み低下、呼吸成分の酸化、ATPの産生減少、DNA損傷、DNA合成の抑制などである。

低濃度の遊離塩素は、有機負荷がない場合、栄養型の細菌(5 μ m未満)は数秒で殺菌作用を示す。AOACの使用希釈倍率法による100 ppmの遊離塩素(6%次亜塩素酸ナトリウムを含む家庭用漂白剤では60倍希釈に相当)によって、 10^6 - 10^7 の黄色ブドウ球菌、*Salmonella choleraesuis*、緑膿菌は10分未満で死滅する。

消毒薬としてのアルコールは、エチルアルコール(エタノール)とイソプロピルアルコールであり、栄養型細菌に対しては迅速な殺菌作用を示すが、殺菌活性は50%以下の濃度に希釈した場合急激に低下し、至適殺菌濃度は60から90%水溶液(v/v)である。エタノールの殺菌活性はさまざまな濃度で調査され、緑膿菌は30-

100%(v/v)で、セラチア、大腸菌、チフス菌は40-100%によって、10秒で死滅した。グラム陽性球菌はわずかに抵抗性があり、65-95%によって10秒で死滅した。

アルコールの作用機序としては、タンパク質の変性が妥当な説明である。これは、無水エタノールや脱水剤より、水の存在下の方が急激に変性することからも裏付けられる。

このような知見を踏まえ、「(1)消毒薬のSTECへの直接効果の検証」を過酢酸および次亜塩素酸ナトリウムは100 ppmで、エタノールは市販の使用濃度で行った。この結果、有機物を含まないPBS懸濁菌液および有機物を含有するTSB懸濁菌液、ともに検討したすべての菌液でSTECは死滅した。次亜塩素酸ナトリウムは、有機物による効力の低下があるとされ、エタノールは希釈による効果の低減が言われているが、今回の有機物濃度や希釈倍率では、利用したすべての消毒薬への効力低減の影響はなく、従来知見と合致した。

過酢酸製剤の食品に対する使用基準は、過酢酸では「鶏の食肉にあつては浸漬液又は噴霧液1 kgにつき2.0 g(2,000 ppm)以下、牛および豚の食肉にあつては浸漬液又は噴霧液1 kgにつき1.80 g(1,800 ppm)以下、果実および野菜にあつては浸漬液又は噴霧液1 kgにつき0.080 g(800 ppm)以下」である。そこで、本研究では1,000 ppmを上限とし、100、200、500、1,000 ppmを使用濃度とした。

次亜塩素酸ナトリウムの食品に対する使用基準は「ごまに使用してはならない。」とされるだけであり、濃度の基準はない。医療現場では、5.25-6.15%の市販品を10から100倍に希釈して利用し、手指に対しては500 ppmを上限に使用されている。牛肉表面の殺菌を目的としたSally et. al(2012)の試験では600 ppmを上限

として行っているため、本研究では 600 ppm を上限とし、100、200、300、600 ppm を使用濃度とした。

消毒液の噴霧効果として、まず、高濃度消毒液 2 回噴霧である「1) 消毒液 2 回噴霧の効果」を行ったが、いずれの消毒液でも滅菌水との差は認められなかった。そこで、噴霧回数を 10 回に増やした「2) 消毒液 10 回噴霧の効果」を行った。この場合、消毒液の効力は「(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証」と比較して、過酢酸 1,000 ppm では 16 倍、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm では 9.6 倍、エタノールでは 1.6 倍に相当するが、いずれの場合も「1) 消毒液 2 回噴霧の効果」とほぼ変わりがなく、消毒効果は認められなかった。なお、細菌懸濁液の浸透の程度を考慮し、牛肉の筋に沿った切り方、また、処理後の時間配分を変えた場合でも、同様に効果は認められなかった。

これらの結果から、噴霧ではなく、食鳥処理場等においてカンピロバクターの汚染低減策で試みられた消毒液への浸漬による効果「3) 消毒液浸漬の効果 (浸漬)」を検討した。消毒液の量は菌液に対して「(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証」の 10 倍量としたため、菌液当たりの消毒効力は「(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証」と比較して、過酢酸 200、500、1,000 ppm では、それぞれ 20、50、100 倍、次亜塩素酸ナトリウム 300、600 ppm では、それぞれ 30、60 倍、エタノールでは 10 倍に相当する。この結果、過酢酸では 200 ppm でわずかに減少の傾向がみられ、濃度が高くなるほど減少する傾向が見られた。次亜塩素酸ナトリウムでも、300 ppm より 600 ppm の方が減少する傾向がみられた。エタノールでも減少する傾向が見られ、浸漬効果はあることが考えられた。

有機物の影響が大きいと考えられる次亜塩

素酸ナトリウムは、浸漬では牛肉による有機物の影響が大きいと考え、多量の消毒液を掛け流すことによる効果を検証した。「3) 消毒液浸漬の効果 (浸漬)」との比較のため、過酢酸 1,000 ppm、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm で行い、掛け流す量は「3) 消毒液浸漬の効果 (浸漬)」の倍量とした。この結果、いずれの場合も、「3) 消毒液浸漬の効果 (浸漬)」の細菌残存数より 1 桁低い値となった。

以上のことから、今回のようなスモールスケールでは、エタノールの消毒効力最も高い傾向であり、次亜塩素酸ナトリウムが今回使用した諸毒薬の中では最も有機物の影響を受けやすい結果であった。消毒液の接触手法は、かけ流しによる効果が最も効果的であったが、消毒液の量が影響しているのか、接触のさせ方の影響であるのかは今回の結果からは結論できない。

D. 結論

1. 動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

牛の筋肉を対象として B 物質の分析法 (13 分析法) を確立し、妥当性評価試験を実施した。その結果、いずれの分析法も良好な結果 (真度、併行精度、室内精度及び選択性) が得られ、牛の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。本研究で確立した分析法を用いることにより、B 物質が牛のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに牛の筋肉 (可食部位) の検査を実施することができ、EU へ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と考えられる。

2. 牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

牛枝肉の STEC 調査では、2020 年 11 月から

2021年2月に7施設の協力のもとに牛枝肉合計180検体を供試した。検体を増菌培養後、マルチプレックスリアルタイムPCR法、血清凝集試験および生化学的性状試験を併用し、同時に生菌数の計数を行った。この結果、1検体から STEC 0157:H7 が分離されたが、1検体のみであったことからウシの種類や性別などの特徴については考察には至らなかった。STEC 0157:H7 が分離された検体において生菌数が比較的高い値を示した。また、全体として検体の生菌数は、15%で検出されず、検出された検体では平均値 17.5 ± 63.50 (平均 \pm SD) CFU/cm² であった。施設による生菌数の違いがあり、ウシや環境状況の要因の可能性が考えられた。今回は冬でのサンプリングであったが、今後、他の季節についての調査も必要と考えられた。

牛肉の消毒効果の検討では、消毒薬として、酸性の過酢酸製剤、アルカリ性の次亜塩素酸ナトリウム（次亜塩素酸ソーダ）、中性のエタノール（エチルアルコール）を選択し、生理食塩水や液体培地中の STEC 浮遊液での消毒効果を検証した。結果として、十分な消毒効

果が認められ、STEC 接種牛肉においても消毒液の量を増やすことにより菌数は減る傾向が認められた。今後、さらに消毒方法を検討を行う予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Saito-Shida S., Kashiwabara N., Nemoto S., Akiyama H. Determination of 8 α -hydroxymutilin as a marker residue for tiamulin in swine tissue by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Food Analytical Methods (印刷中)

2. 学会発表

志田（齊藤）静夏、柏原 奈央、根本 了、穂山 浩. 畜産物中のチアムリン試験法の開発. 第57回全国衛生化学技術協議会年会、令和2年11月9日～令和2年11月10日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告 1

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法 の確立と妥当性評価

志田(齊藤) 静夏

動物性食品輸出の規制対策のための研究

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

研究分担者 志田(齊藤)静夏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 主任研究官

研究要旨

EUに動物性食品を輸出するためには、残留物質モニタリング計画を作成し、A物質(スチルベン類等)及びB物質(抗菌性物質等)のモニタリング検査を行う必要がある。モニタリング検査においてB物質がモニタリング部位(肝臓、腎臓等)から検出された場合は筋肉(可食部位)の検査を行い、基準値を超過した場合に原因等の調査が求められる。しかし、B物質の筋肉を対象とした分析法は整備されていない。本研究では、牛の筋肉を対象として13分析法(チルミコシン分析法、スルファモイルダプソン分析法、クロルテトラサイクリン及びオキシテトラサイクリン分析法、エンロフロキサシン(シプロフロキサシンとの和)分析法、フロルフェニコール分析法、トリクラベンダゾール分析法、サリノマイシン及びモネンシン分析法、トルトラズリル分析法、ペルメトリン分析法、HCB分析法、DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH及び γ -HCH分析法、クロルデン及びノナクロル分析法、PCB分析法)を確立し、これらの分析法の妥当性評価試験を実施した。その結果、真度77.9~112.6%、併行精度1.1~10.8%、室内精度2.3~17.6%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。これらの結果から、13分析法は牛の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。本研究で確立した分析法を用いることにより、B物質が牛のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに牛の筋肉(可食部位)の検査を実施することができ、EUへ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と考えられる。

研究協力者

飯塚誠一郎((一財)日本食品分析センター)

中村歩((一財)日本食品分析センター)

小杉正樹((一財)日本食品分析センター)

伊佐川聡((一財)日本食品分析センター)

A. 研究目的

EUに動物性食品を輸出するためには、欧州理事会指令96/23/ECに基づき残留物質モニタリング計画を作成し、規則(EU)2017/625に従ってA物質(スチルベン類、抗甲状腺薬、ステロイド類、レゾルシン酸ラクトン類、 β -作動薬、

Council Regulation (EEC) 2377/90 AnnexIVに掲げられた禁止物質(クロラムフェニコール、ニトロフラン類、ニトロイミダゾール等)及びB物質(抗菌性物質、駆虫剤、抗コクシジウム剤、非ステロイド性抗炎症薬、カルバメート系農薬、ピレスロイド系農薬、有機塩素系農薬、PCB、有機リン系農薬、重金属・有害元素、マイコトキシン)のモニタリング検査を行う必要がある。モニタリング検査においてA物質がモニタリング部位から検出された場合は、原因等を調査して必要な措置をとるまでの間、EUへ輸出することはできない。一方、B物質がモニタリング

部位（肝臓、腎臓等）から検出された場合は筋肉（可食部位）の検査を行い、基準値を超過した場合に原因等の調査が求められる。このため、B物質についてはモニタリング部位を対象とした分析法に加え、筋肉を対象とした分析法も必要となる。しかしながら、B物質の筋肉を対象とした分析法は整備されていない。本研究では、B物質のうち、牛及び鶏においてモニタリング対象部位が肝臓又は腎臓となっている物質について、筋肉を対象とした分析法を開発又は適用拡大し、確立した分析法について妥当性評価を実施することにより、モニタリングで検出された場合に輸出再開に向けた迅速な対応が取れる体制を整備することを目的とした。令和2年度（1年目）は、B物質のうち、牛においてモニタリング対象部位が肝臓又は腎臓の物質（抗菌性物質（チルミコシン等の6項目）、駆虫剤（トリクラベンダゾール）、抗コクシジウム剤（モネンシン等の3項目）、ピレスロイド系農薬（ペルメトリン）及び有機塩素系物質（HCB等の15項目））について、牛の筋肉を対象とした分析法を確立し、妥当性評価を実施した。

B. 研究方法

試料： 牛の筋肉は、インターネット経由で北海道産を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクーブブリクサーを用いて細切均一化した。

1. 抗菌性物質

(1) チルミコシン試験法

① 試薬・試液

チルミコシン標準品：純度 90.0% (Sigma-Aldrich 製)

メタノール、ヘキサン、リン酸水素二ナトリウ

ム十二水和物、リン酸二水素カリウム、リン酸：特級（富士フィルム和光純薬製）

アセトニトリル：LC-MS用（関東化学製）

ギ酸：LC-MS用（富士フィルム和光純薬製）

クエン酸一水和物、リン酸水素二カリウム：特級（関東化学製）

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム：試験研究用（同仁化学研究所製）

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis HLB（60 mg/3 mL、Waters 製）

メンブランフィルター：Millex-LG（0.2 μm、MILLIPORE 製）

クエン酸緩衝液（pH 4.0）：クエン酸一水和物 1.29 g、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.8 g 及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 3.72 g を量り、水 1000 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 4.0 に調整した。

リン酸塩緩衝液（pH 8.0）：リン酸二水素カリウム 0.52 g 及びリン酸水素二カリウム 16.7 g を量り、水 750 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 8.0 に調整し、水を加えて正確に 1000 mL とした。

クエン酸緩衝液（pH 4.0）及びメタノールの混液（1 : 1）：クエン酸緩衝液（pH 4.0）500 mL 及びメタノール 500 mL を混合した。

水及びメタノールの混液（3 : 1）：水 750 mL 及びメタノール 250 mL を混合した。

水及びギ酸の混液（1000 : 0.5）：水 1000 mL 及びギ酸 0.5 mL を混合した。

アセトニトリル及びギ酸の混液（1000 : 0.5）：アセトニトリル 1000 mL 及びギ酸 0.5 mL を混合した。

標準原液：チルミコシン標準品約 25 mg を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を

調製した。

添加用標準溶液：チルミコシン標準原液をメタノールで希釈して 2 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：BM-2（日本精機製作所製）

遠心分離機：H-60R（コクサン製）

振とう機：EL（スギヤマゲン製）

pH 計：F-72（堀場アドバンスドテクノ製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-1）

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

チルミコシン標準原液をメタノールで希釈して 0.00025、0.0005、0.001、0.0025 及び 0.005 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりチルミコシンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (2 mg/L) 0.125 mL [メタノール溶液] を添加した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-1)

チルミコシンを試料からクエン酸緩衝液 (pH 4.0) 及びメタノールの混液 (1 : 1) で抽出し、ヘキサンで洗浄後、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の遠心管に量り取り、クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 及びメタノールの混液 (1 : 1) 95 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。ヘキサン 100 mL を加え、振とう機で 5 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、下層 10 mL (試料 0.5 g 相当) を遠心管に分取した。リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 30 mL を加えた後、pH 8.0 を確認し、3000 r/min で 5 分間遠心分離した。

b. 精製

上清をジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (60 mg/3 mL)] (あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL、リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 5 mL で洗浄したもの) に負荷した。カラムを水及びメタノールの混液 (3 : 1) 10 mL で洗浄した後、メタノール 9 mL で溶出し、10 mL 容全量フラスコに受けた。メタノールで定容し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度 (50 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

(2) スルファモイルダプソン試験法

① 試薬・試液

スルファモイルダプソン標準品：純度 99.7% (富士フィルム和光純薬製)

メタノール、アセトニトリル、ヘキサン、酢酸：

特級（富士フィルム和光純薬製）

メタノール：HPLC 用（富士フィルム和光純薬製）

メタノール、ギ酸：LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep NH2 FF（500 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製）

メンブランフィルター：Millex-LG（0.2 μm、MILLIPORE 製）

アセトニトリル飽和ヘキサン：アセトニトリル 30 mL 及びヘキサン 270 mL を混合し、5 分間振とうを行った。放置後、分離したヘキサン層を分取した。

アセトニトリル、水及びギ酸の混液（300：100：3）：アセトニトリル 300 mL、水 100 mL 及びギ酸 3 mL を混合した。

アセトニトリル及びギ酸の混液（100：1）：アセトニトリル 100 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。
水及び酢酸の混液（1000：0.1）：水 1000 mL 及び酢酸 100 μL を混合した。

標準原液：スルファモイルダプソン標準品約 10 mg を精秤し、メタノール（HPLC 用）で溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：スルファモイルダプソン標準原液をメタノール（特級）で希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：BM-2（日本精機製作所製）

遠心分離機：H-60R（コクサン製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-2）

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 5500	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

スルファモイルダプソン標準原液をメタノール（特級）で希釈して 1 mg/L 溶液を調製し、さらに、アセトニトリル、水及びギ酸の混液（300：100：3）で希釈して 0.00025、0.0005、0.001、0.0025 及び 0.005 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりスルファモイルダプソンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液（1 mg/L）100 μL [メタノール（特級）溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-2）

スルファモイルダプソンを試料からアセトニトリルで抽出と同時にアセトニトリル飽和ヘキサンで洗浄し、ギ酸を加えて、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、

アセトニトリル 80 mL 及びアセトニトリル飽和ヘキサン 80 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で5分間遠心分離した後、下層を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに入れ、ギ酸 1 mL を加えた後、アセトニトリルで定容した。

b. 精製

抽出液 10 mL (試料 1 g 相当) をアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep NH₂ FF (500 mg/6 mL)] (あらかじめアセトニトリル 5 mL で洗浄したもの) に負荷し、溶出液を 20 mL 容全量フラスコに受けた。次いで、アセトニトリル及びギ酸の混液 (100 : 1) 5 mL で溶出し、先の全量フラスコに合わせた後、水で定容し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界濃度 (10 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回 (2 併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

(3) 4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリン試験法

① 試薬・試液

4-*epi*-クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品:純度 86.5% (Carbosynth 製)

4-*epi*-オキシテトラサイクリン標準品:純度 81% (Acros Organics 製)

アセトニトリル、メタノール:HPLC 用 (関東化学製)

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物、酢酸、酢酸アンモニウム、リン酸水素二ナトリウム十二水和物:特級 (関東化学製)

クエン酸一水和物:特級 (富士フイルム和光純薬製)

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム: InertSep PLS-2 (270 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製)

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液:酢酸アンモニウム 15.4 g を量り、水を加えて溶かし正確に 200 mL とした。

20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4 : 1) : 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 20 mL、水 180 mL 及びメタノール 800 mL を混合した。

10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有マッキルベイン緩衝液 (pH 4.0) : クエン酸一水和物 12.9 g 及びリン酸水素二ナトリウム十二水和物 27.6 g を量り、水を加えて溶かし正確に 1000 mL とした。この溶液にエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 3.7 g を加えて溶解した。

水及びメタノールの混液 (4 : 1) : 水 160 mL とメタノール 40 mL を混合した。

水及び酢酸の混液 (1000 : 1) : 水 1000 mL と酢酸 1 mL を混合した。

標準原液:4-*epi*-クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品約 26.9 mg (4-*epi*-クロルテトラサイクリン 25mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。4-*epi*-オキシテトラサイクリン標準品約 25mg を精秤し、メタノ

ールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液:4-*epi*-クロルテトラサイクリン標準原液及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリン標準原液を 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4 : 1) で希釈して 1 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー : T 25 digital ULTRA-TURRAX (IKA ジャパン製)

遠心分離機 : H-107DF (コクサン製)

LC-MS/MS (測定条件 : 表 1-3)

装置	型式	メーカー
MS	LCMS8050	島津製作所
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	LabSolutions LCMS	島津製作所

③ 定量

4-*epi*-クロルテトラサイクリン標準原液及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリン標準原液を 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4 : 1) で希釈して 0.0005、0.001、0.0015、0.005、0.01 及び 0.015 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 1 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 1 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法により 4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (1 mg/L) 0.5 mL [20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4 : 1) 溶液] を添加した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-3)

4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリンを試料から 10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有マッキルベイン緩衝液 (pH 4.0) で抽出し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有マッキルベイン緩衝液 (pH 4.0) 100 mL を加え、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。3000 r/min で 5 分間遠心分離した。

b. 精製

抽出液 10 mL (試料 0.5 g 相当) をスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2 (270 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 5 mL 及び水 5 mL で洗浄したもの) に負荷した。水 20 mL、水及びメタノールの混液 (4 : 1) 10 mL で順次洗浄した後、20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4 : 1) 10 mL で溶出した。溶出液を 10 mL 容全量フラスコに採り、20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4 : 1) で定容したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度 (100 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

(4) エンロフロキサシン (シプロフロキサシンとの和) 試験法

① 試薬・試液

エンロフロキサシン標準品：純度 99.8% (富士フィルム和光純薬製)

シプロフロキサシン塩酸塩標準品：純度 92.3% (富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル、メタノール、塩酸、酢酸アンモニウム、25%アンモニア水、水酸化ナトリウム：特級 (富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル：LC-MS 用 (関東化学製)

ギ酸：LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製)

メタリン酸：鹿特級 (関東化学製)

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis HLB (60 mg/3 mL、Waters 製)

メンブランフィルター：Millex-LG (0.2 μm、MILLIPORE 製)

1 vol%ギ酸含有 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液：1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 50 mL、ギ酸 10 mL 及び 25%アンモニア水 6 mL に水を加えて正確に 1000 mL とした。

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム 77.08 g を量り、水を加えて溶かし正確に 1000 mL とした。

0.2%メタリン酸溶液：メタリン酸 1 g を量り、水を加えて溶かし正確に 500 mL とした。

0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液 (3:2)：0.2%メタリン酸溶液 600 mL 及びアセトニトリル (特級) 400 mL を混合した。

水、メタノール及び塩酸の混液 (500:500:1)：水 500 mL、メタノール 500 mL 及び塩酸 1 mL を混合した。

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 4 g を量り、水を加えて溶かし正確に 100 mL

とした。

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 10 mL に水を加えて正確に 100 mL とした。

標準原液：エンロフロキサシン標準品約 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。シプロフロキサシン塩酸塩標準品約 12 mg (シプロフロキサシン 10 mg 相当) を精秤し、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL を加えた後、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：エンロフロキサシン標準原液及びシプロフロキサシン標準原液を水、メタノール及び塩酸の混液 (500:500:1) で希釈して 0.5 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：BM-2 (日本精機製作所製)

ロータリーエバポレーター：N-1000V (東京理化学器械製)

遠心分離機：H-60R (コクサン製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-4)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 5500	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

エンロフロキサシン標準原液及びシプロフロキサシン標準原液を水、メタノール及び塩酸の混液 (500:500:1) で希釈して、0.00025、0.0005、0.001、0.0025 及び 0.005 mg/L の混合標

準溶液を調製した。この溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりエンロフロキサシン及びシプロフロキサシンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (0.5 mg/L) 0.1 mL [水、メタノール及び塩酸の混液 (500 : 500 : 1)] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-4)

エンロフロキサシン及びシプロフロキサシンを試料から 0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液 (3 : 2) で抽出し、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液 (3 : 2) 80 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、抽出液の上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに入れ、0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液 (3 : 2) で定容した。抽出液 10 mL (試料 0.5 g 相当) をなす形フラスコに分取し、ロータリーエバポレーター (40°C) で約 3 mL まで減圧濃縮した。

b. 精製

濃縮液をジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (60 mg/3 mL)] (あらかじめメタノール 5 mL、水 10 mL で洗浄したもの) に負荷した。なす形フラスコ内を水 5 mL で洗い、洗液をカラムに負荷した。メタノール 5 mL で溶出し、なす形フラスコに受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水、メタノール及び塩酸の混液 (500 : 500 : 1) 10 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界濃度 (10 μ g/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

(5) フロルフェニコール試験法

① 試薬・試液

フロルフェニコール標準品：純度 98.8% (富士フィルム和光純薬製)

フロルフェニコールアミン標準品：純度 99.8% (Sigma-Aldrich 製)

アセトニトリル：HPLC 用 (関東化学製)

酢酸エチル、ヘキサン、メタノール：残留農薬試験用 (関東化学製)

アセトン、塩化ナトリウム、酢酸、水酸化ナト

リウム：特級（関東化学製）

塩酸：特級（小宗化学薬品製）

25%アンモニア水：特級（富士フイルム和光純薬製）

ケイソウ土：セライト 545（関東化学製）

多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute（5 mL、ジーエルサイエンス製）

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis MCX（150 mg/6 mL、Waters 製）

メンブランフィルター：Millex-LG（0.2 μm、MILLIPORE 製）

6 mol/L 塩酸：塩酸 500 mL 及び水 500 mL を混合した。

7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 60 g を量り、水を加えて溶かし正確に 200 mL とした。

アセトン及び水の混液（1：1）：アセトン 500 mL 及び水 500 mL を混合した。

0.1 vol% 酢酸：酢酸 1 mL に水を加え、1000 mL に定容した。

0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（1：1）：0.1 vol% 酢酸 100 mL 及びメタノール 100 mL を混合した。

0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（9：1）：0.1 vol% 酢酸 450 mL 及びメタノール 50 mL を混合した。

メタノール及び 25%アンモニア水の混液（99：1）：メタノール 198 mL 及び 25%アンモニア水 2 mL を混合した。

水及び酢酸の混液（1000：1）：水 1000 mL 及び酢酸 1 mL を混合した。

アセトニトリル及び酢酸の混液（1000：1）：アセトニトリル 1000 mL 及び酢酸 1 mL を混合した。

標準原液：フロルフェニコールアミン標準品約 5 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準原液：フロルフェニコール標準品約 14.5 mg（フロルフェニコールアミンとして 10 mg 相当）を精秤し、メタノールで溶解してフロルフェニコールアミンとして 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：添加用標準原液をメタノールで希釈して 20 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

オイルバス：THERMO MINDER SH-12（タイテック製）

振とう機：EL（スギヤマゲン製）

遠心分離機：H-1000FR（コクサン製）

ロータリーエバポレーター：N-1300（東京理化学器械製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-5）

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

フロルフェニコールアミン標準原液を 0.1

vol%酢酸及びメタノールの混液 (9 : 1) で希釈して 0.0005、0.001、0.0025、0.005 及び 0.01 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりフロルフエニコールアミンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液 (20 mg/L) 100 µL [メタノール溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-5)

試料中のフロルフエニコール及び加水分解により代謝物フロルフエニコールアミンに変換される代謝物を塩酸で加水分解し、フロルフエニコールアミンとした後、ヘキサンで洗浄した。その後、多孔性ケイソウ土カラム及びスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 加水分解及び抽出

試料 10 g を 100 mL 容の遠心管に量り取り、6 mol/L 塩酸 20 mL を加え、密栓して 100°C のオイルバスで 3 時間 (15 分間置きに攪拌) 加水分解した。30 分間放冷後、試料溶液を 200 mL 容の遠心管に移し、100 mL 容の遠心管内を水 10 mL 及びヘキサン 40 mL で洗い、洗液を 200 mL 容の遠心管に合わせた後、振とう機で 5 分間振

とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、ヘキサン層を捨てた。抽出液にケイソウ土 [セラライト 545] 2 g を加え混合し、吸引ろ過器を用いて抽出液をろ過した後、遠心管内及び残留物をアセトン及び水の混液 (1 : 1) 20 mL で洗い、洗液をろ過した。全ろ液を 100 mL 容全量フラスコに合わせて水で定容した。

b. 精製

あらかじめ塩化ナトリウム 1 g 及び 7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL を加えた試験管に、抽出液 2.5 mL (試料 0.25 g 相当) を分取し試験管ミキサーで混合した後、多孔性ケイソウ土カラム [InertSep K-solute (5 mL)] に負荷し 30 分間放置した。試験管内を酢酸エチル 5 mL で洗い、洗液をカラムに負荷、溶出する操作を 2 回繰り返し、100 mL 容の遠心管に受けた。次いで酢酸エチル 20 mL で溶出し、先の遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

残留物を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (1 : 1) 1 mL に溶解し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX (150 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 2 mL 及び 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (1 : 1) 3 mL で洗浄したもの) に負荷した。遠心管内を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (1 : 1) 3 mL で洗い、洗液をカラムに負荷した。遠心管内をメタノール 2 mL で洗い、洗液をカラムに負荷した。メタノール及

び 25%アンモニア水の混液 (99 : 1) 5 mL で溶出し、50 mL 容の遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を 0.1 vol%酢酸及びメタノールの混液 (9 : 1) 2.5 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度 (200 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。なお、添加試料については試験溶液 1 mL を分取し、0.1 vol%酢酸及びメタノールの混液 (9 : 1) で 5 mL に定容したものを測定した。

2. 駆虫剤

トリクラベンダゾール試験法

① 試薬・試液

トリクラベンダゾール標準品 : 純度 99.9% (富士フィルム和光純薬製)

トリクラベンダゾールオキシソン標準品 : 純度 98.6% (富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル、エタノール、酢酸エチル、ヘキサン : 残留農薬試験用 (関東化学製)

アセトニトリル、メタノール : HPLC 用 (関東化学製)

塩酸 : 特級 (小宗化学薬品製)

30%過酸化水素水、水酸化ナトリウム : 特級 (富士フィルム和光純薬製)

酢酸 : 特級 (関東化学製)

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム : Oasis MCX (500 mg/6 mL、Waters 製)

メンブランフィルター : Econofltr PES (0.2 µm、Agilent Technologies 製)

5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 : 水酸化ナトリウム 200 g を量り、水を加えて溶かし 1000 mL とした。

5 mol/L 塩酸 : 塩酸 200 mL 及び水 240 mL を混合した。

ヘキサン飽和アセトニトリル : 分液漏斗にアセトニトリル 100 mL 及びヘキサン 20 mL を入れ、5 分間振とうした後アセトニトリル層を分取した。

エタノール及び酢酸の混液 (1 : 1) : エタノール 20 mL 及び酢酸 20 mL を混合した。(用時調製)

酢酸エチル及びヘキサンの混液 (1 : 1) : 酢酸エチル 500 mL 及びヘキサン 500 mL を混合した。

メタノール及び水の混液 (7 : 3) : メタノール 700 mL 及び水 300 mL を混合した。

メタノール及び水の混液 (95 : 5) : メタノール 950 mL 及び水 50 mL を混合した。

アセトニトリル及び水の混液 (1 : 1) : アセトニトリル 500 mL 及び水 500 mL を混合した。

水及び酢酸の混液 (10000 : 1) : 水 1000 mL 及び酢酸 100 µL を混合した。

ケト-トリクラベンダゾール標準原液 : トリクラ

ベンダゾールオキソン標準品約 25 mg を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準原液：トリクラベンダゾール標準品約 25 mg を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：添加用標準原液をメタノールで希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ロータリーエバポレーター：N-1300（東京理化学器械製）

遠心分離機：H-80Rα（コクサン製）

振とう機：EL（スギヤマゲン製）

恒温水槽：BF600（ヤマト製）

ブロックヒーター：DTU-1C（タイテック製）

LC-MS/MS（測定条件：表1-6）

装置	型式	メーカー
MS	Xevo TQ-S	Waters
LC	ACQUITY UPLC	Waters
データ処理	MassLynx	Waters

③ 定量

ケト-トリクラベンダゾール標準原液をアセトニトリル及び水の混液(1:1)で希釈して 0.4、0.8、2、4 及び 8 µg/L の標準溶液を調製した。この溶液 1 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 1 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりケト-トリクラベンダゾールの含量を算出した。換算係数 1.091* を乗じてトリクラベンダゾールの含量を算出した。

* 1.091 = トリクラベンダゾールの分子量

359.66 / ケト-トリクラベンダゾールの分子量 329.57

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液（5 mg/L） 0.45 mL [メタノール溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-6）

試料をアルカリ加水分解した後、塩酸で酸性としてトリクラベンダゾール及び酸性条件下でケト-トリクラベンダゾールに変換される代謝物を酢酸エチルで抽出した。ヘキサン/アセトニトリル分配で脱脂した後、エタノール及び酢酸混液の溶液とし、過酸化水素を加え酸化反応でトリクラベンダゾール及びその代謝物をケト-トリクラベンダゾールに酸化した。酸化反応後の溶液から酢酸エチル及びヘキサン混液で抽出し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 加水分解及び抽出

試料 10 g を 50 mL 容遠心管（ポリプロピレン製）に量り取り、5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 10 mL を加え、密栓して 100°C で 3 時間加熱した。

放冷後、内容物を 250 mL 容の広口ポリ瓶に移し、5 mol/L 塩酸 12 mL を加えた。先の遠心管内をメタノール 5 mL で洗浄し、洗液を内容物と合わせた。酢酸エチル 40 mL を加え、10 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、酢酸エチル層を分取した。次いで水層に酢酸エチル 40 mL を加え、5 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、酢酸エチル層を分取した。酢酸エチル層を 100 mL 容全量フ

ラスコに合わせ、酢酸エチルで定容した。

抽出液 6 mL (試料 0.6 g 相当) を遠心管に分取し、ロータリーエバポレーター (40°C) で減圧乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 10 mL に溶解した。ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加え、5 分間振とうした。暫時放置後、アセトニトリル層を分取した。ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加え 5 分間振とうした。暫時放置後、アセトニトリル層を分取した。アセトニトリル層をなす形フラスコに合わせ、ロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

b. 酸化反応

残留物をエタノール及び酢酸の混液 (1 : 1) 10 mL に溶解した。この液 5 mL (試料 0.3 g 相当) をねじ口試験管に取り、過酸化水素水 25 μ L を加えて密栓をし、90°C で 16 時間加熱した。

c. 精製

試験管を放冷した後、反応物を水 10 mL, 酢酸エチル及びヘキサンの混液 (1 : 1) 15 mL を用いて遠心管 (ポリプロピレン製) に移し、5 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、有機溶媒層を分取した。次いで水層に同混液 15 mL を加え、5 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、有機溶媒層を分取した。有機溶媒層を遠心管に合わせ、ロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

残留物をメタノール及び水の混液 (7:3) 4 mL に溶解し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX (500 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 5 mL、メタノール及び水の混液 (7 : 3) 5 mL で洗浄したもの) に負荷した。遠心管

内を同混液 4 mL で洗い、洗液をカラムに負荷、洗浄する操作を 2 回繰り返した。メタノール及び水の混液 (95 : 5) 20 mL で溶出し、遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

残留物をアセトニトリル及び水の混液 (1 : 1) 3 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度 (225 μ g/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。なお、添加試料については残留物をアセトニトリル及び水の混液 (1 : 1) 15 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを測定した。

3. 抗コキシジウム剤試験法

(1) サリノマイシン及びモネンシン試験法

① 試薬・試液

サリノマイシンナトリウム水和物標準品：純度 93.2% (Sigma-Aldrich 製)

モネンシンナトリウム水和物標準品：純度 85.2% (Sigma-Aldrich 製)

アセトニトリル：残留農薬試験用 (関東化学製)

メタノール：HPLC 用 (関東化学製)

酢酸アンモニウム：特級 (関東化学製)

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis HLB (200 mg/6 mL、Waters 製)

アセトニトリル及び水の混液 (9 : 1) : アセトニトリル 900 mL と水 100 mL を混合した。

水及びメタノールの混液 (1 : 1) : 水 100 mL とメタノール 100 mL を混合した。

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液: 酢酸アンモニウム 15.4 g を量り、水を加えて溶かし正確に 200 mL とした。

2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 : 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 2 mL 及び水 1000 mL を混合した。

標準原液 : サリノマイシンナトリウム水和物標準品約 25.7 mg (サリノマイシン 25 mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。モネンシンナトリウム水和物標準品を約 20.6 mg (モネンシン A 20 mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液 : サリノマイシン標準原液及びモネンシン A 標準原液をメタノールで希釈して 0.1 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー : T 25 digital ULTRA-TURRAX (IKA ジャパン製)

遠心分離機 : H-107DF (コクサン製)

振とう機 : EL (スギヤマゲン製)

LC-MS/MS (測定条件 : 表1-7)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 5500+ QTRAP	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

サリノマイシン標準原液及びモネンシン A

標準原液をメタノールで希釈して 0.05、0.1、0.25、0.5 及び 1 µg/L の標準溶液を調製した。この溶液 4 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 4 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりサリノマイシン及びモネンシン A の含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液 (0.1 mg/L) 0.2 mL [メタノール溶液] を添加した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-7)

サリノマイシン及びモネンシン A を試料からアセトニトリル及び水の混液 (9 : 1) で抽出し、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、アセトニトリル及び水の混液 (9 : 1) 60 mL を加えた後、ホモジナイザーで 30 秒間攪拌した。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物にアセトニトリル及び水の混液 (9 : 1) 60 mL を加え 5 分間振とうし、3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトニトリル及び水の混液 (9 : 1) で定容した。

b. 精製

抽出液 10 mL (試料 0.5 g 相当) に水 15 mL 加え、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (200 mg/6 mL)] (あらかじめアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄したもの) に負荷した。水及びメタノールの混液 (1 : 1) 10 mL で洗浄した後、メタノー

ル 10 mL で溶出した。溶出液を 10 mL 容全量フラスコに採り、メタノールで定容したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度 (2 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

(2) トルトラズリル試験法

① 試薬・試液

トルトラズリルスルホン標準品:純度 98.7%(富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル:残留農薬試験用(関東化学製)

アセトニトリル、メタノール:HPLC 用(関東化学製)

酢酸アンモニウム:特級(関東化学製)

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム: InertSep C18 (1000 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製)

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液:酢酸アンモニウム 15.4 g を量り、水を加えて溶かし正確に 200 mL とした。

2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液:1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 2 mL 及び水 1000 mL を混合した。

標準原液:トルトラズリルスルホン標準品約 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液:トルトラズリルスルホン標準原液をアセトニトリルで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー:T 25 digital ULTRA-TURRAX (IKA ジャパン製)

ロータリーエバポレーター:N-1300 (東京理化器械製)

LC-MS/MS (測定条件:表 1-8)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 5500+ QTRAP	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

③ 定量

トルトラズリルスルホン標準原液をアセトニトリルで希釈して 0.00025、0.0005、0.0025、0.005 及び 0.01 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりトルトラズリルスルホンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (1 mg/L) 0.5 mL [アセトニトリル溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-8)

トルトラズリルスルホンを試料からアセトニトリルで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、アセトニトリル 100 mL を加えた。ホモジナイザーで 30 秒間攪拌した後、ろ紙 (直径 60

mm、GFP、桐山製作所製)を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物をアセトニトリル 50 mL で洗浄し、ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトニトリルで定容した。抽出液 10 mL (試料 0.25 g 相当)をなす形フラスコに分取し、ロータリーエバポレーター (40°C) で約 0.5 mL 以下まで濃縮した。

b. 精製

濃縮液にアセトニトリル 3 mL 及び水 7 mL を加え、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18 (1000 mg/6 mL)] (あらかじめアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄したもの) に負荷した。アセトニトリル 5 mL で溶出し、5 mL 容全量フラスコに受けた。アセトニトリルで定容したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度 (100 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

4. ピレスロイド系農薬

ペルメトリン試験法

① 試薬・試液

cis-ペルメトリン標準品：純度 99.8% (富士フィルム和光純薬製)

trans-ペルメトリン標準品：純度 98.3% (富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル、アセトン、ジエチルエーテル、ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学製)

塩化ナトリウム：特級 (関東化学製)

無水硫酸ナトリウム：PCB 分析用 (関東化学製)

カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム (粒径 150~250 µm)：Florisil PR (残留農薬試験用、富士フィルム和光純薬製)

ヘキサン飽和アセトニトリル：アセトニトリル 500 mL とヘキサン 100 mL を混合し、5 分間振とう後静置してアセトニトリル層を分取した。ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15)：ヘキサン 850 mL 及びジエチルエーテル 150 mL を混合した。

標準原液：*cis*-ペルメトリン標準品約 25 mg を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。*trans*-ペルメトリン標準品約 25 mg を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：*cis*-ペルメトリン標準原液及び *trans*-ペルメトリン標準原液を 1 : 1 で混合、アセトンで希釈してペルメトリンとして 0.5 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-TURRAX (IKA ジャパン製)

遠心分離機：H-107DF (コクサン製)

振とう機：EL (スギヤマゲン製)

ロータリーエバポレーター：N-1300 (東京理化学器械製)

GC (測定条件：表1-9)

装置	型式	メーカー
GC	Agilent 6890N	Agilent Technologies

データ処理	ChemStation	Agilent Technologies
-------	-------------	----------------------

③ 定量

cis-ペルメトリン標準原液及び *trans*-ペルメトリン標準原液を 1:1 で混合、ヘキサンで希釈してペルメトリンとして 0.005、0.01、0.02、0.04 及び 0.06 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 1 µL を GC - ECD に注入して、得られた *cis*-ペルメトリン及び *trans*-ペルメトリンのピーク面積の含量を用いて検量線を作成した。試験溶液 1 µL を GC - ECD に注入し、検量線から絶対検量線法によりペルメトリンの含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液（ペルメトリンとして 0.5 mg/L）0.5 mL [アセトン溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要 (図1-9)

ペルメトリンを試料からアセトンで抽出し、ヘキサンで転溶した。ヘキサン/アセトニトリル分配で脱脂し、合成ケイ酸マグネシウムカラムで精製した後、GC - ECDで定量した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトン 100 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物にアセトン 50 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうし、2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を

綿栓ろ過した。ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトンで定容した。抽出液 20 mL（試料 0.5 g 相当）を分液漏斗に分取し、塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、ヘキサン層を分取した。水層にはヘキサン 50 mL を加え、同様に振とうし、ヘキサン層を分取する操作を繰り返した。全ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム約 50 g をのせたろ過器を用いて脱水ろ過し、ろ過器上をヘキサン 20 mL で洗浄した。全ろ液をなす形フラスコに合わせ、ロータリーエバポレーター（40℃）で約 5 mL まで濃縮した。この溶液を分液漏斗に移した後、ヘキサン 15 mL 及びヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、アセトニトリル層をなす形フラスコに分取した。ヘキサン層にはヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、同様に振とうし、アセトニトリル層を分取する操作を繰り返した。アセトニトリル層を先のなす形フラスコに合わせ、ロータリーエバポレーター（40℃）で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 5 mL に溶解した。

b. 精製

a で得られた溶液をカラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウムカラム（あらかじめ内径 1.5 cm のクロマトグラム管に Florisil PR 5 g をヘキサンに懸濁させて充填し、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g を積層したもの）に負荷した後、ヘキサン及びジエチルエーテルの混

液（85：15）70 mL で溶出し、全溶出液をなす形フラスコに採った。ロータリーエバポレーター（40℃）で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 2.5 mL に溶解したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度（50 µg/kg）で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回（2 併行）、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

5. 有機塩素系物質

(1) HCB 試験法

① 試薬・試液

HCB 標準品：純度 99.9%（Dr.ehrenstorfer 製）
アセトン、ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学製）

塩化ナトリウム：特級（関東化学製）

無水硫酸ナトリウム：PCB 分析用（関東化学製）

カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム（粒径 150～250 µm）：Florisil PR（残留農薬試験用、富士フイルム和光純薬製）

標準原液：HCB 標準品約 25 mg を精秤し、ヘキサンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：HCB 標準原液をアセトンで希釈して 0.1 mg/L 溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-TURRAX（IKA ジャパン製）

遠心分離機：H-107DF（コクサン製）

振とう機：EL（スギヤマゲン製）

ロータリーエバポレーター：N-1300（東京理化学器械製）

GC（測定条件：表 1-10）

装置	型式	メーカー
GC	Agilent 6890N	Agilent Technologies
データ処理	ChemStation	Agilent Technologies

③ 定量

HCB 標準原液をヘキサンで希釈して 0.0005、0.001、0.005、0.01 及び 0.02 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 1 µL を GC - ECD に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 1 µL を GC - ECD に注入し、検量線から絶対検量線法により HCB の含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液（0.1 mg/L）0.5 mL [アセトン溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要（図1-10）

HCB を試料からアセトンで抽出、ヘキサンに転溶し、合成ケイ酸マグネシウムカラムで精製した後、GC - ECD で定量した。

a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトン 50 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1

分間攪拌した。2500 r/minで5分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物にアセトン20 mLを加え5分間振とうし、2500 r/minで5分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を100 mL容全量フラスコに合わせて、アセトンで定容した。抽出液10 mL (試料1 g相当) を分液漏斗に分取し、塩化ナトリウム10 g、水200 mL及びヘキサン100 mLを加え、振とう機を用いて5分間振とうした。暫時放置後、ヘキサン層を分取した。水層にはヘキサン50 mLを加え、同様に振とうし、ヘキサン層を分取する操作を繰り返した。全ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム約50 gをのせたろ過器を用いて脱水ろ過し、ろ過器上をヘキサン20 mLで洗浄した。全ろ液をなす形フラスコに合わせ、ロータリーエバポレーター (40°C) で約5 mLまで濃縮した。

b. 精製

a で得られた溶液をカラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウムカラム (あらかじめ内径 1.5 cm のクロマトグラム管に Florisil PR 10 g をヘキサンに懸濁させて充填し、上部に無水硫酸ナトリウム約 2 g を積層したもの) に負荷した後、ヘキサン 90 mL で溶出し、全溶出液をなす形フラスコに採った。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で約 2 mL まで濃縮し、5 mL 容全量フラスコに入れ、ヘキサンで定容したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値濃度 (5 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回 (2併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

(2) DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 試験法

① 試薬・試液

o,p'-DDT 標準品：純度 98% (Dr.Ehrenstorfer 製)

p,p'-DDE 標準品：純度 99.7% (富士フィルム和光純薬製)

p,p'-DDD 標準品：純度 99.5% (富士フィルム和光純薬製)

p,p'-DDT 標準品：純度 99.4% (Dr.Ehrenstorfer 製)

アルドリン標準品：純度 98.0% (Dr.Ehrenstorfer 製)

ディルドリン標準品：純度 99.9% (Dr.Ehrenstorfer 製)

エンドリン標準品：純度 99.8% (AccuStandard 製)

ヘプタクロル標準品：純度 99.3% (Dr.Ehrenstorfer 製)

cis-ヘプタクロルエポキシド標準品：純度 100% (AccuStandard 製)

trans-ヘプタクロルエポキシド標準品：純度 99.1% (Dr.Ehrenstorfer 製)

α -HCH 標準品：純度 99.5% (AccuStandard 製)

β -HCH 標準品：純度 97.7% (Dr.Ehrenstorfer 製)

γ -HCH 標準品：純度 98.8% (Dr.Ehrenstorfer 製)

アセトニトリル、アセトン、ジエチルエーテル、ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学製)

塩化ナトリウム：特級 (関東化学製)

無水硫酸ナトリウム：PCB 分析用 (関東化学製)

カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム（粒径 150~250 μm）：Florisil PR（残留農薬試験用、富士フイルム和光純薬製）

ヘキサン飽和アセトニトリル：アセトニトリル 500 mL とヘキサン 100 mL を混合し、5 分間振とう後静置してアセトニトリル層を分取した。

ヘキサン及びジエチルエーテルの混液（85：15）：ヘキサン 850 mL 及びジエチルエーテル 150 mL を混合した。

標準原液：*o,p'*-DDT 約 25 mg を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

同様に *p,p'*-DDE 標準品、*p,p'*-DDD 標準品、*p,p'*-DDT 標準品、アルドリン標準品、ディルドリン標準品、エンドリン標準品、ヘプタクロル標準品、β-HCH 標準品及び γ-HCH 標準品約 25 mg を精秤し、アセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。*cis*-ヘプタクロルエポキシド標準品、*trans*-ヘプタクロルエポキシド標準品及び α-HCH 標準品約 10 mg を精秤し、アセトンで溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：*o,p'*-DDT 標準原液、*p,p'*-DDE 標準原液、*p,p'*-DDD 標準原液、*p,p'*-DDT 標準原液、アルドリン標準原液、ディルドリン標準原液、エンドリン標準原液、ヘプタクロル標準原液、*cis*-ヘプタクロルエポキシド標準原液、*trans*-ヘプタクロルエポキシド標準原液、α-HCH 標準原液、β-HCH 標準原液及び γ-HCH 標準原液をアセトンで希釈して 0.1 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-TURRAX（IKA ジャパン製）

遠心分離機：H-107DF（コクサン製）

振とう機：EL（スギヤマゲン製）

ロータリーエバポレーター：N-1300（東京理化学器械製）

GC（測定条件：表1-11）

装置	型式	メーカー
GC	Agilent 6890N	Agilent Technologies
データ処理	ChemStation	Agilent Technologies

③ 定量

o,p'-DDT 標準原液、*p,p'*-DDE 標準原液、*p,p'*-DDD 標準原液、*p,p'*-DDT 標準原液、アルドリン標準原液、ディルドリン標準原液、エンドリン標準原液、ヘプタクロル標準原液、*cis*-ヘプタクロルエポキシド標準原液、*trans*-ヘプタクロルエポキシド標準原液、α-HCH 標準原液、β-HCH 標準原液及び γ-HCH 標準原液を混合、ヘキサンで希釈して 0.00025、0.0005、0.001、0.0025 及び 0.005 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 2 μL を GC - ECD に注入して、得られたピーク高さを用いて検量線を作成した。試験溶液 2 μL を GC - ECD に注入し、検量線から絶対検量線法により *o,p'*-DDT、*p,p'*-DDE、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDT、アルドリン、ディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、*cis*-ヘプタクロルエポキシド、*trans*-ヘプタクロルエポキシド、α-HCH、β-HCH 及び γ-HCH の含量を算出した。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液（0.1 mg/L）0.5 mL [アセトン溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-11）

o,p'-DDT、*p,p'*-DDE、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDT、アルドリン、ディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、*cis*-ヘプタクロルエポキシド、*trans*-ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH を試料からアセトンで抽出、ヘキサンで転溶した。ヘキサン/アセトニトリル分配で脱脂し、合成ケイ酸マグネシウムカラムで精製した後、GC - ECD で定量した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトン 100 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物にアセトン 50 mL を加え 5 分間振とうし、2500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトンで定容した。抽出液 20 mL (試料 0.5 g 相当) を分液漏斗に分取し、塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、ヘキサン層を分取した。水層にはヘキサン 50 mL を加え、同様に振とうし、ヘキサン層を分取する操作を繰り返した。全ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム約 50 g をのせたろ過器を用いて脱水ろ過し、ろ過器上をヘキサン 20 mL で洗浄した。全ろ液をなす形フラスコに受け、ロータリーエバポレーター (40°C) で約 5 mL まで濃縮した。この溶液を分液漏斗に移した後、ヘキサン 15 mL 及びヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間振とうした。暫時放置後、アセトニトリル層をなす形フラスコに分取した。ヘキサン層にはヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、同様に振とうし、アセトニトリル層を分取する操作を 2 回繰り返した。アセトニトリル層を先のなす形フラ

スコに合わせ、ロータリーエバポレーター (40°C) で約 1 mL まで濃縮し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 5 mL に溶解した。

b. 精製

a で得られた溶液をカラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウムカラム (あらかじめ内径 1.5 cm のクロマトグラム管に Florisil PR 5 g をヘキサンに懸濁させて充填し、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g を積層したもの) に負荷した後、ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15) 70 mL で溶出し、全溶出液をなす形フラスコに採った。ロータリーエバポレーター (40°C) で約 1 mL まで濃縮し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 10 mL に溶解したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界値濃度 (10 μ g/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

(3) *cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、*cis*-ノナクロル及び *trans*-ノナクロル試験法

① 試薬・試液

cis-クロルデン標準品：純度 99.6% (AccuStandard 製)

trans-クロルデン標準品：純度 99.7% (AccuStandard 製)

cis-ノナクロル標準品：純度 100% (AccuStandard 製)

trans-ノナクロル標準品：純度 99%
(AccuStandard 製)

アセトニトリル、アセトン、ジエチルエーテル、
ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学製）

塩化ナトリウム：特級（関東化学製）

無水硫酸ナトリウム：PCB 分析用（関東化学製）

カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグ
ネシウム（粒径 150~250 μm）：Florisil PR（残
留農薬試験用、富士フイルム和光純薬製）

ヘキサン飽和アセトニトリル：アセトニトリル
500 mL とヘキサン 100 mL を混合し、5 分間振
とう後静置してアセトニトリル層を分取した。
ヘキサン及びジエチルエーテルの混液（85：
15）：ヘキサン 850 mL とジエチルエーテル 150
mL を混合した。

標準原液：*cis*-クロルデン標準品約 10 mg を精
秤し、アセトンで溶解して 200 mg/L 溶液を調
製した。同様に *trans*-クロルデン標準品、*cis*-ノ
ナクロル標準品及び *trans*-ノナクロル標準品約
10 mg を精秤し、アセトンで溶解して 200 mg/L
溶液を調製した。

添加用標準溶液：*cis*-クロルデン標準原液、*trans*-
クロルデン標準原液、*cis*-ノナクロル標準原液
及び *trans*-ノナクロル標準原液をアセトンで希
釈して 0.1 mg/L 混合溶液を調製した。

② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-TURRAX
(IKA ジャパン製)

遠心分離機：H-107DF（コクサン製）

振とう機：EL（スギヤマゲン製）

ロータリーエバポレーター：N-1300（東京理化
器械製）

GC（測定条件：表1-12）

装置	型式	メーカー
----	----	------

GC	Agilent 6890N	Agilent Technologies
データ処理	ChemStation	Agilent Technologies

③ 定量

cis-クロルデン標準原液、*trans*-クロルデン標準
原液、*cis*-ノナクロル標準原液及び *trans*-ノナク
ロル標準原液を混合、ヘキサンで希釈して
0.00025、0.0005、0.001、0.0025 及び 0.005 mg/L
の混合標準溶液を調製した。この溶液 2 μL を
GC - ECD に注入して、得られたピーク高さを
用いて検量線を作成した。試験溶液 2 μL を
GC - ECD に注入し、検量線から絶対検量線法
により *cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、*cis*-ノ
ナクロル及び *trans*-ノナクロルの含量を算出し
た。

④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液（0.1 mg/L）0.5 mL
[アセトン溶液] を添加し、よく混合した後、
30 分間放置した。

⑤ 試験溶液の調製

概要（図1-12）

cis-クロルデン、*trans*-クロルデン、*cis*-ノナク
ロル及び *trans*-ノナクロルを試料からアセトン
で抽出、ヘキサンで転溶した。ヘキサン/アセト
ニトリル分配で脱脂し、合成ケイ酸マグネシウ
ムカラムで精製した後、GC - ECDで定量した。

a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、
アセトン 100 mL を加えた後、ホモジナイザーで

1分間撹拌した。

2500 r/minで5分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。残留物にアセトン50 mLを加え5分間振とうし、2500 r/minで5分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を200 mL容量フラスコに合わせて、アセトンで定容した。抽出液20 mL (試料0.5 g相当) を分液漏斗に分取し、塩化ナトリウム10 g、水200 mL及びヘキサン100 mLを加え、振とう機を用いて5分間振とうした。暫時放置後、ヘキサン層を分取した。水層にはヘキサン50 mLを加え、同様に振とうし、ヘキサン層を分取する操作を繰り返した。全ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム約50 gをのせたろ過器を用いて脱水ろ過し、ろ過器上をヘキサン20 mLで洗浄した。全ろ液をなす形フラスコに受け、ロータリーエバポレーター (40°C) で約5 mLまで濃縮した。この溶液を分液漏斗に移した後、ヘキサン15 mL及びヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、振とう機を用いて5分間振とうした。暫時放置後、アセトニトリル層をなす形フラスコに分取した。ヘキサン層にはヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、同様に振とうし、アセトニトリル層を分取する操作を2回繰り返した。全アセトニトリル層を先のなす形フ

ラスコに合わせ、ロータリーエ

バポレーター (40°C) で約1 mLまで濃縮し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン5 mLに溶解した。

b. 精製

a で得られた溶液をカラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウムカラム (あらかじめ内径 1.5 cm のクロマトグラム管に Florisil PR 5 g をヘキサンに懸濁させて充填し、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g を積層したもの) に負荷した後、ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15) 70 mL で溶出し、全溶出液をなす形フラスコに採った。ロータリーエバポレーター (40°C) で約 1 mL まで濃縮し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物をヘキサン 10 mL に溶解したものを試験溶液とした。

⑥ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑦ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界値濃度 (10 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回 (2 併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

(4) PCB 試験法

① 分析対象化合物

PCB28、PCB52、PCB101、PCB138、PCB153 及び PCB180 の総和

物質名	略称及び ID Number
2,4,4'-trichlorobiphenyl	PCB28、#28
2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl	PCB52、#52
2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl	PCB101、#101
2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl	PCB138、#138
2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl	PCB153、#153
2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl	PCB180、#180

② 試料

牛の筋肉は、インターネット経由で北海道産を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクープブrikサーを用いて細切均一化した。

なお、脂質をソックスレー抽出法により測定したところ、16.8 g/100g であった。

③ 試薬・試液

BP-D7 標準溶液 (PCB28、PCB52、PCB101、PCB138、PCB153 及び PCB180 各 10 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製)

MBP-D7 標準溶液 ($^{13}\text{C}_{12}$ PCB28、 $^{13}\text{C}_{12}$ PCB52、 $^{13}\text{C}_{12}$ PCB101、 $^{13}\text{C}_{12}$ PCB138、 $^{13}\text{C}_{12}$ PCB153 及び $^{13}\text{C}_{12}$ PCB180 各 5 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製)

MBP-19 標準溶液 (50 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製)

MBP-70 標準溶液 (50 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製)

MBP-111 標準溶液 (50 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製)

MBP-159 標準溶液 (50 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製)

MBP-170 標準溶液 (50 µg/mL、WELLINGTON LABORATORIES 製)

エタノール、ヘキサン：ダイオキシン類分析用 (富士フイルム和光純薬製)

デカン：鹿特級 (関東化学製)

水酸化カリウム：特級 (関東化学製)

無水硫酸ナトリウム：PCB 分析用 (関東化学製)

カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム (粒径 150~250 µm) : Florisil PR (残留農薬試験用、富士フイルム和光純薬製)

1mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液：水酸化カリウム 56.11 g を量り、エタノールを加えて溶かし正確に 1000 mL とした。

標準原液：BP-D7 標準溶液 1 mL を量り取り、デカンで溶解して 500 µg/L 溶液を調製した。

内標準原液：MBP-D7 標準溶液 1 mL を量り取り、デカンで溶解して 500 µg/L 溶液を調製した。

内標準 (シリンジスパイク) 原液：MBP-19 標準溶液 1 mL を量り取り、デカンで溶解して 500 µg/L 溶液を調製した。MBP-70、MBP-111、MBP-159 及び MBP-170 についても同様に 500 µg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：BP-D7 標準原液をデカンで希釈して 10 µg/L 溶液及び 20 µg/L 溶液を調製した。

添加用内標準溶液：MBP-D7 標準原液をデカンで希釈して 100 µg/L 溶液を調製した。

添加用内標準 (シリンジスパイク) 溶液：MBP-19 標準原液、MBP-70 標準原液、MBP-111 標準原液、MBP-159 標準原液及び MBP-170 標準原液をデカンで希釈して 10 µg/L 混合溶液を調製した。

④ 装置

還流装置：GA-13S (いすゞ製作所製)

振とう機：EL (スギヤマゲン製)

ロータリーエバポレーター：R-200 (柴田科学製)

GC-MS（測定条件：表 1-13）

装置	型式	メーカー
MS	Agilent 5973N	Agilent Technologies
GC	Agilent 6890N	Agilent Technologies
データ処理	GC/MSD ChemStation	Agilent Technologies

⑤ 定量（図 1-13）

BP-D7 標準原液、MBP-D7 内標準原液、MBP-19 内標準（シリンジスパイク）原液、MBP-70 内標準（シリンジスパイク）原液、MBP-111 内標準（シリンジスパイク）原液、MBP-159 内標準（シリンジスパイク）原液及び MBP-170 内標準（シリンジスパイク）原液をデカンで希釈し、0、2、10、20 及び 50 µg/L [内標準溶液濃度及び内標準（シリンジスパイク）溶液濃度 10 µg/L] 内標準混合標準溶液を調製した。この溶液 1 µL を GC-MS に注入して、得られた内標準のピーク面積に対する対象物質のピーク面積の比を用いて検量線を作成した。試験溶液 1 µL を GC-MS に注入し、検量線から内部標準法により PCB28、PCB52、PCB101、PCB138、PCB153 及び PCB180 の含量を算出した。各対象物質に対応する内標準物質は表の通り。

対象物質	内標準物質
PCB28	[¹³ C ₁₂] PCB28
PCB52	[¹³ C ₁₂] PCB52
PCB101	[¹³ C ₁₂] PCB101

PCB138	[¹³ C ₁₂] PCB138
PCB153	[¹³ C ₁₂] PCB153
PCB180	[¹³ C ₁₂] PCB180

⑥ 添加試料の調製

0.6 µg/kg 添加（6 種 PCB 合計として 20 ng/g fat 相当）：試料 1 g に添加用標準溶液（10 µg/L）60 µL [デカン溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

1.2 µg/kg 添加（6 種 PCB 合計として 40 ng/g fat 相当）：試料 1 g に添加用標準溶液（20 µg/L）60 µL [デカン溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

1.8 µg/kg 添加（6 種 PCB 合計として 60 ng/g fat 相当）：試料 1 g に添加用標準溶液（20 µg/L）90 µL [デカン溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

⑦ 試験溶液の調製

概要

試料を 1mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液でけん化した後、PCB28、PCB52、PCB101、PCB138、PCB153 及び PCB180 をヘキサンで抽出し、カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム（粒径 150~250 µm）で精製し、GC-MS で定量及び確認した。

a. 抽出

試料 1 g を 300 mL 容のなす形フラスコに量り取り、100 µg/L 内標準溶液を 25 µL 添加（最終濃度 10 µg/L）した後、1mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液 100 mL を加え、約

90℃の水浴で1時間加熱還流した。なす形フラスコを室温に戻した後、ヘキサン100mLを加えた。綿栓ろ過をしてあらかじめ精製水100mLを入れた500mL分液漏斗に移し、振とう機で10分間振とうした。ヘキサン層を分取した後軽く水洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過した。ろ液をロータリーエバポレーター(40℃)で約5mLまで減圧濃縮した。

b. 精製

濃縮液をカラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウムカラム(あらかじめ内径2.0cmのクロマトグラム管にFlorisol PR 20gをヘキサンで湿式充填したもの)に負荷した。なす形フラスコ内をヘキサン約2mLで3回洗い、洗液をカラムに負荷した。ヘキサン200mLで溶出し、なす形フラスコに受けた。溶出液をロータリーエバポレーター(40℃)で約5mLまで減圧濃縮し、10mL容全量フラスコに合わせてヘキサンで定容した。あらかじめ10µg/L内標準(シリンジスパイク)混合溶液50µLを入れたスピッツ管に抽出液2mLを分取し、室温で窒素ガスを通じて50µLまで濃縮し、試験溶液とした。

⑧ マトリックス添加標準溶液の調製

試料マトリックスの測定影響検討用のマトリックス添加標準溶液は調製しなかった。

⑨ 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に基準値の0.5倍、1倍及び1.5倍相当(各0.6、1.2及び1.8µg/kg)で妥当性評価試験を実施した。1日1回(6併行)、3

日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

C. 結果及び考察

1. 抗菌性物質

(1) チルミコシン試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった(図2-1)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-1に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度15%未満、室内精度20%未満)を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025~0.005mg/Lの範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.992$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界10µg/kgでの残留分析として妥当であると評価された。

(2) スルファモイルダプソン試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピ

ークは検出されなかった（図2-2）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-2に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度25%未満、室内精度30%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法（平成 17 年食安発第 0124001 号）「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）」

(3) 4-epi-クロルテトラサイクリン及び 4-epi-オキシテトラサイクリン試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-3 及び図 2-4）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-3 及び表 2-4 に示した。真度の目標値（70～120%）

及び精度の目標値（併行精度 15%未満、室内精度 20%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.0005～0.015 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.998$ となり良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした 4-epi-クロルテトラサイクリンについては定量限界 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、4-epi-オキシテトラサイクリンについては定量限界 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン試験法（畜水産物）

(4) エンロフロキサシン（シプロフロキサシンとの和）試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-5 及び図 2-6）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-5 及び表 2-6 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 25%未満、室内精度 30%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.995$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法（平成 17 年食安発第 0124001 号）「エンロフロキサシン、オキシリニック酸、オフロキサシン、オルビフロキサシン、サラフロキサシン、ジフロキサシン、ダノフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン及びフルメキン試験法（畜水産物）」

(5) フロルフェニコール試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-7）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-7に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度10%未満、室内精度15%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.0005～0.01 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.998$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 フロルフェニコール試験法（畜水産物）

2. 駆虫剤

トリクラベンダゾール試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-8）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-8 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 10%未満、室内精度 15%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.4～8 $\mu\text{g}/\text{L}$ の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.996$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象

とした定量限界 10 µg/kg での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 トリクラベンダゾール試験法（畜産物）

3. 抗コキシジウム剤試験法

(1) サリノマイシン及びモネンシン試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-9 及び図 2-10）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-9 及び表 2-10 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 25%未満、室内精度 30%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.05～1 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.994$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 2 µg/kg での残留分析として妥当であると評価された。

(2) トルトラズリル試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析した

ところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-11）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-11 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 15%未満、室内精度 20%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.01 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 µg/kg での残留分析として妥当であると評価された。

4. ピレスロイド系農薬

ペルメトリン試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-12）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-12 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度 15%未満、室内精度 20%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.005～0.06 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.993$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

5. 有機塩素系物質

(1) HCB 試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった (図 2-13)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-13 に示した。真度の目標値 (70～120%) 及び精度の目標値 (併行精度 25%未満、室内精度 30%未満) を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.0005～0.02 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.996$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得ら

れたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

(2) DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった (図 2-14)。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-14 ～表 2-26 に示した。真度の目標値 (70～120%) 及び精度の目標値 (併行精度 25%未満、室内精度 30%未満) を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.994$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

(3) *cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、*cis*-ノナクロル及び *trans*-ノナクロル試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析した

ところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-15）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-27～表2-30に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度25%未満、室内精度30%未満）を満たした。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.991$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

(4) PCB 試験法

① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-16～図 2-20）。

② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表 2-31～表 2-36 に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加：併行精度 30%未満、室内精度 35%未満、1.2 及び 1.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加：併行精度 25%未満、室内精度 30%未満）を満たした。

また、内標準物質として用いた $[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB28、

$[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB52、 $[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB101、 $[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB138、 $[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB153 及び $[^{13}\text{C}_{12}]$ PCB180 の回収率はいずれも 50%以上 120%未満であった。

③ 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響については調査しなかった。

④ 検量線の直線性

0～50 $\mu\text{g}/\text{L}$ の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

⑤ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。

これらの結果から、本試験は牛の筋肉を対象とした定量限界 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析として妥当であると評価された。

[参考文献]

- 1) 日本薬学会編「衛生試験法・注解」2010
- 2) COMMISSION REGULATION (EU) No 589/2014 of 2 June 2014 laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 252/2012

D. 結論

牛の筋肉を対象としてB物質の分析法(13分析法)を確立し、妥当性評価試験を実施した。その結果、いずれの分析法も良好な結果(真度、併行精度、室内精度及び選択性)が得られ、牛の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。本研究で確立した分析法を用いることにより、B物質が牛のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに牛の筋肉(可食部位)の検査を実施することができ、EUへ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と

考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

Saito-Shida S., Kashiwabara N., Nemoto S.,
Akiyama H. Determination of 8 α -hydroxymutilin as
a marker residue for tiamulin in swine tissue by
liquid chromatography–tandem mass spectrometry.
Food Analytical Methods (印刷中)

2. 学会発表

志田（齊藤）静夏、柏原 奈央、根本 了、穉山
浩. 畜産物中のチアムリン試験法の開発. 第 57
回全国衛生化学技術協議会年会、令和 2 年 11 月
9 日～令和 2 年 11 月 10 日

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1-1 測定条件 (チルミコシン試験法)

LC 条件																														
カラム	ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.8 μm : Agilent Technologies 製)																													
移動相流速 (mL/min)	0.3																													
注入量 (μL)	2																													
カラム温度 (°C)	40																													
移動相	A液 : 水及びギ酸の混液 (1000 : 0.5) B液 : アセトニトリル及びギ酸の混液 (1000 : 0.5)																													
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>2.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>2.01</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>8.01</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>11.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>11.01</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	95	5	2.0	95	5	2.01	80	20	8.0	50	50	8.01	10	90	11.0	10	90	11.01	95	5	20.0	95	5
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																												
0.0	95	5																												
2.0	95	5																												
2.01	80	20																												
8.0	50	50																												
8.01	10	90																												
11.0	10	90																												
11.01	95	5																												
20.0	95	5																												
MS 条件																														
測定モード	SRM (選択反応モニタリング)																													
イオン化モード	ESI (+)																													
イオンスプレー電圧 (V)	5500																													
ヒーター温度 (°C)	500																													
ネブライザーガス	空気、60 psi																													
ターボガス	空気、70 psi																													
コリジョンガス	窒素																													
定量イオン (m/z)	435.4→174.2 [DP : 71 (V)、コリジョンエネルギー : 35 (eV)]																													
定性イオン (m/z)	435.4→143.0 [DP : 71 (V)、コリジョンエネルギー : 27 (eV)]																													
保持時間 (min)	4.8																													

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 及びメタノールの混液 (1 : 1) 95 mL を加えホモジナイズ

ヘキサン洗浄

↓ ヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 下層 10 mL 分取

pH 調整

↓ リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 30 mL を加え pH 8.0 を確認

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (60 mg/3 mL)]

↓ メタノール 5 mL、水 5 mL、リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 5 mL でコンディショニング

↓ 上清を注入

↓ 水及びメタノールの混液 (3 : 1) 10 mL で洗浄

↓ メタノール 9 mL で溶出 (全溶出液を採取)

↓ メタノールで 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-1 チルミコシン試験法の分析法フローチャート

表 1-2 測定条件 (スルファモイルダプソン試験法)

LC 条件																								
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μ m : Waters 製)																							
移動相流速 (mL/min)	0.35																							
注入量 (μ L)	5																							
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40																							
移動相	A液 : 水及び酢酸の混液 (1000 : 0.1) B液 : メタノール (LC-MS用)																							
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>1.9</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>5.71</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>7.60</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>7.61</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	95	5	1.9	70	30	5.71	10	90	7.60	10	90	7.61	95	5	10.0	95	5
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																						
0.0	95	5																						
1.9	70	30																						
5.71	10	90																						
7.60	10	90																						
7.61	95	5																						
10.0	95	5																						
MS 条件																								
測定モード	SRM																							
イオン化モード	ESI (+)																							
イオンスプレー電圧 (V)	5500																							
ヒーター温度 ($^{\circ}$ C)	650																							
ネブライザーガス	空気、60 psi																							
ターボガス	空気、70 psi																							
コリジョンガス	窒素																							
定量イオン (m/z)	328.1 \rightarrow 108.2 [DP : 56 (V)、コリジョンエネルギー : 29 (eV)]																							
定性イオン (m/z)	328.1 \rightarrow 80.2 [DP : 56 (V)、コリジョンエネルギー : 71 (eV)]																							
保持時間 (min)	3.0																							

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

↓ アセトニトリル 80 mL 及びアセトニトリル飽和ヘキサン 80 mL を加えホモジナイズ

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 下層を綿栓ろ過

↓ ギ酸 1 mL を加えてアセトニトリルで 100 mL に定容

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep NH2 FF (500 mg/6 mL)]

↓ アセトニトリル 5 mL で予備洗浄

↓ 抽出液 10 mL を注入 (全溶出液を採取)

↓ アセトニトリル及びギ酸 (100 : 1) 混液 5 mL で溶出 (全溶出液を採取)

↓ 水で 20 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-2 スルファモイルダプソン試験法の分析法フローチャート

表 1-3 測定条件 (4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び4-*epi*-オキシテトラサイクリン試験法)

LC 条件					
カラム	L-column2 ODS (メタルフリー、内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm :化学物質評価研究機構製)				
移動相流速(mL/min)	0.2				
注入量(μL)	1				
カラム温度(°C)	30				
移動相	A 液:水及び酢酸の混液(1000:1) B 液:アセトニトリル				
グラジエント条件	時間(分)	A 液(%)	B 液(%)		
	0.00	95	5		
	10.00	0	100		
	12.00	0	100		
	12.01	95	5		
	16.00	95	5		
MS 条件					
測定モード	SRM				
イオン化モード	ESI(+)				
インターフェイス電圧(kV)	4.0				
インターフェイス温度(°C)	300				
脱溶媒管温度(°C)	250				
ヒートブロック温度(°C)	400				
ネブライザーガス	窒素、3 L/hr				
ドライイングガス	窒素、10 L/hr				
ヒーティングガス	空気、10 L/hr				
コリジョンガス	アルゴン				
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)					
	プリカーサーイオン	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)	
		(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)	(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)
4- <i>epi</i> -クロルテトラサイクリン	479.0	444.1	21	154.1	21
4- <i>epi</i> -オキシテトラサイクリン	461.0	426.2	28	443.2	14
保持時間(min)	4- <i>epi</i> -クロルテトラサイクリン 4.5、4- <i>epi</i> -オキシテトラサイクリン 4.0				

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ 10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有マツキルベイン緩衝液 (pH 4.0) 100 mL を加え、

↓ 1 分間ホモジナイズ

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2 (270 mg/6 mL)]

↓ メタノール及び水各 5 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 10 mL を注入

↓ 水 20 mL で洗浄

↓ 水及びメタノールの混液 (4:1) で洗浄

↓ 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4:1) 10 mL で溶出 (全溶出液を採る)

↓ 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4:1) で 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-3 4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び 4-*epi*-オキシテトラサイクリン試験法の分析法フローチャート

表 1-4 測定条件 (エンロフロキサシン試験法)

LC 条件																														
カラム	ACQUITY UPLC HSS C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.8 μm : Waters 製)																													
移動相流速 (mL/min)	0.35																													
注入量 (μL)	5																													
カラム温度 (°C)	40																													
移動相	A液 : 1 vol%ギ酸含有50 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B液 : アセトニトリル																													
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>1.9</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>3.8</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>3.81</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>5.7</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>5.71</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>9.5</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>						時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	90	10	1.9	80	20	3.8	50	50	3.81	10	90	5.7	10	90	5.71	90	10	9.5	90	10
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																												
0.0	90	10																												
1.9	80	20																												
3.8	50	50																												
3.81	10	90																												
5.7	10	90																												
5.71	90	10																												
9.5	90	10																												
MS 条件																														
測定モード	SRM																													
イオン化モード	ESI (+)																													
イオンスプレー電圧 (V)	5500																													
ヒーター温度 (°C)	600																													
ネブライザーガス	空気、60 psi																													
ターボガス	空気、70 psi																													
コリジョンガス	窒素																													
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)																														
	プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																									
			(m/z)	コリジョンエネルギー (eV)	(m/z)	コリジョンエネルギー (eV)																								
エンロフロキサシン	360.1	84	316.1	24	245.1	37																								
シプロフロキサシン	332.2	86	314.2	25	231.1	49																								

保持時間 (min)	エンロフロキサシン 3.4、シプロフロキサシン 3.1
------------	-----------------------------

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ 0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液 (3 : 2) 80 mL を加えホモジナイズ

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ ろ液を 0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液 (3 : 2) で 100 mL に定容

↓ 抽出液を 10 mL 分取

濃 縮

↓ 約 3 mL まで濃縮

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (60 mg/3 mL)]

↓ メタノール 5 mL、水 10 mL でコンディショニング

↓ 濃縮液を注入

↓ 水 5 mL で洗浄

↓ メタノール 5 mL で溶出 (全溶出液を採取)

↓

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物を水、メタノール及び塩酸の混液 (500 : 500 : 1) 10 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-4 エンロフロキサシン試験法の分析法フローチャート

表 1-5 測定条件 (フロルフェニコール試験法)

LC 条件																								
カラム	Ascentis Express F5 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 2.7 μ m : Supelco 製) + Ascentis Express F5 Guard Column (内径 2.1 mm、長さ 5 mm、粒子径 2.7 μ m : Supelco 製)																							
移動相流速 (mL/min)	0.2																							
注入量 (μ L)	5																							
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40																							
移動相	A液 : 水及び酢酸の混液 (1000 : 1) B液 : アセトニトリル及び酢酸の混液 (1000 : 1)																							
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>7.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>17.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>17.1</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>24.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	100	0	5.0	60	40	7.0	5	95	17.0	5	95	17.1	100	0	24.0	100	0
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																						
0.0	100	0																						
5.0	60	40																						
7.0	5	95																						
17.0	5	95																						
17.1	100	0																						
24.0	100	0																						
MS 条件																								
測定モード	SRM																							
イオン化モード	ESI (+)																							
イオンスプレー電圧 (V)	5500																							
ヒーター温度 ($^{\circ}$ C)	400																							
ネブライザーガス	空気、40 psi																							
ターボガス	空気、60 psi																							
コリジョンガス	窒素																							
定量イオン (m/z)	248.0 \rightarrow 91.0 [DP : 46 (V)、コリジョンエネルギー : 63 (eV)]																							
定性イオン (m/z)	248.0 \rightarrow 131.0 [DP : 46 (V)、コリジョンエネルギー : 29 (eV)]																							
保持時間 (min)	4.4																							

秤 取

↓ 試料 10 g

加水分解及び抽出

↓ 6 mol/L 塩酸 20 mL を加え密栓し、100°Cのオイルバスで3時間加水分解（15分間置きに攪拌）

↓ 30分間放冷

↓ 水 10 mL 及びヘキサン 40 mL を加え、5分間振とう

↓ 3000 r/min で5分間遠心分離

↓ ヘキサン層除去

↓ 抽出液にケイソウ土 [セライト 545] 2 g 加え混合

↓ 吸引ろ過

↓ アセトン及び水の混液（1：1）20 mL で洗浄

↓ ろ液を合わせて水で 100 mL に定容

多孔性ケイソウ土カラム [InertSep K-solute (5 mL)]

↓ 抽出液 2.5 mL に、塩化ナトリウム 1 g 及び 7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL を加え混合

↓ 混合液を注入、30分間放置

↓ 酢酸エチル 30 mL で溶出（全溶出液を採取）

濃縮（溶媒除去）

↓ 残留物を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（1：1）1 mL に溶解

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX

(150 mg/6 mL)]

↓ メタノール 2 mL、0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（1：1）3 mL でコンディショニング

↓ 溶解液を注入

↓ 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（1：1）3 mL で洗浄

↓ メタノール 2 mL で洗浄

↓ メタノール及び 25% アンモニア水の混液（99：1）5 mL で溶出（全溶出液を採取）

濃縮（溶媒除去）

↓ 残留物を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液（9：1）2.5 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-5 フロルフェニコール試験法の分析法フローチャート

表 1-6 測定条件（トリクラベンダゾール試験法）

LC 条件												
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μ m : Waters 製)											
移動相流速 (mL/min)	0.35											
注入量 (μ L)	1											
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40											
移動相	A液：水及び酢酸の混液（10000：1） B液：メタノール											
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>3.5</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	30	70	3.5	30	70
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)										
0.0	30	70										
3.5	30	70										
MS 条件												
測定モード	SRM											
イオン化モード	ESI (-)											
キャピラリ電圧 (V)	-500											
ソース温度 ($^{\circ}$ C)	150											
脱溶媒温度 ($^{\circ}$ C)	500											
コーンガス	窒素、150 L/hr											
脱溶媒ガス	窒素、1000 L/hr											
コリジョンガス	アルゴン											
定量イオン (m/z)	327.0 \rightarrow 182.0 [コーン電圧：-40 (V)、コリジョンエネルギー：-25 (eV)]											
定性イオン (m/z)	327.0 \rightarrow 146.0 [コーン電圧：-40 (V)、コリジョンエネルギー：-35 (eV)]											
保持時間 (min)	2.3											

秤 取

↓ 試料 10 g

加水分解及び抽出

- ↓ 5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 10 mL を加え 100°C で 3 時間加熱
- ↓ 5 mol/L 塩酸 12 mL、メタノール 5 mL 及び酢酸エチル 40 mL を加え 10 分間振とう
- ↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離、酢酸エチル層を採る
- ↓ 水層に酢酸エチル 40 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離、酢酸エチル層を採る
- ↓ 酢酸エチル層を合わせ、酢酸エチルで 100 mL に定容
- ↓ 抽出液 6 mL 分取

濃縮 (溶媒除去)

↓

ヘキサン/アセトニトリル分配

- ↓ 残留物にヘキサン 10 mL を加えて溶解
- ↓ ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を採る
- ↓ ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせる

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物をエタノール及び酢酸の混液 (1 : 1) 10 mL に溶解

酸化反応

- ↓ 5 mL を分取し、過酸化水素水 25 μ L を加え 90°C で 16 時間加熱

酢酸エチル及びヘキサン混液転溶

- ↓ 水 10 mL、酢酸エチル及びヘキサンの混液 (1 : 1) 15 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 有機溶媒層を採る
- ↓ 水層に酢酸エチル及びヘキサンの混液 (1 : 1) 15 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 有機溶媒層を採り、先の有機溶媒層と合わせる

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物をメタノール及び水の混液 (7 : 3) 4 mL に溶解

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX (500 mg/6 mL)]

- ↓ メタノール 5 mL、メタノール及び水の混液 (7 : 3) 5 mL でコンディショニング
- ↓ 全量注入
- ↓ メタノール及び水の混液 (7 : 3) 8 mL で洗浄
- ↓ メタノール及び水の混液 (95 : 5) 20 mL で溶出 (全溶出液を採る)

濃縮（溶媒除去）

↓ 残留物をアセトニトリル及び水の混液（1：1）3 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-6 トリクラベンダゾール試験法の分析法フローチャート

表 1-7 測定条件 (サリノマイシン及びモネンシン試験法)

LC 条件					
カラム	L-column2 ODS(メタルフリー) (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm : 化学物質評価研究機構製)				
移動相流速(mL/min)	0.2				
注入量(μL)	4				
カラム温度(°C)	40				
移動相	A 液: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液: メタノール				
グラジエント条件	時間(分)	A 液(%)	B 液(%)		
	0.00	40	60		
	6.00	5	95		
	15.00	5	95		
	15.01	40	60		
	18.00	40	60		
MS 条件					
測定モード	SRM				
イオン化モード	ESI(+)				
イオンスプレー電圧(V)	4500				
ヒーター温度(°C)	500				
ネブライザーガス	空気、70 psi				
ターボガス	空気、70 psi				
コリジョンガス	窒素				
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)					
		プリカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	DP (V)	コリジョンエ ネルギー (eV)
サリノマイシン	(定量用)	768.3	733.4	1	27
	(定性用)	773.4	431.3	1	67
モネンシン A	(定量用)	688.3	635.5	1	27
	(定性用)	693.3	675.3	1	51
保持時間(min)	サリノマイシン 9.7、モネンシン A 9.0				

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

- ↓ アセトニトリル及び水の混液(9:1)60 mL を加え 30 秒間ホモジナイズ
- ↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ 残留物にアセトニトリル及び水の混液(9:1)60 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ ろ液を合わせ、アセトニトリル及び水の混液(9:1)で 200 mL に定容

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB(200 mg/6 mL)]

- ↓ アセトニトリル及び水各 5 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出液 10 mL に水 15 mL を加えて注入
- ↓ 水及びメタノールの混液(1:1)10 mL で洗淨
- ↓ メタノール 10 mL で溶出(全溶出液を採る)
- ↓ メタノールで 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-7 サリノマイシン及びモネンシン試験法の分析法フローチャート

表 1-8 測定条件（トルトラズリル試験法）

LC 条件				
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm : ジーエルサイエンス製)			
移動相流速 (mL/min)	0.2			
注入量 (μL)	2			
カラム温度 (°C)	40			
移動相	A 液 : 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液 : アセトニトリル			
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	
	0.0	40	60	
	7.0	40	60	
MS 条件				
測定モード	SRM			
イオン化モード	ESI (-)			
イオンスプレー電圧 (V)	-4500			
ヒーター温度 (°C)	500			
ネブライザーガス	空気、70 psi			
ターボガス	空気、70 psi			
コリジョンガス	窒素			
定量イオン (m/z)	456.0→42.0 [DP : -120 (V)、コリジョンエネルギー : -62 (eV)]			
定性イオン (m/z)	456.0→399.0 [DP : -120 (V)、コリジョンエネルギー : -14 (eV)]			
保持時間 (min)	3.9			

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ アセトニトリル 100 mL を加え 30 秒間ホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ 残留物をアセトニトリル 50 mL で洗浄

↓ ろ液を合わせ、アセトニトリルで 200 mL 定容

↓ 抽出液 10 mL 分取

濃 縮

↓ 約 0.5 mL まで濃縮

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18 (1000 mg/6 mL)]

↓ アセトニトリル及び水各 5 mL でコンディショニング

↓ 濃縮液にアセトニトリル 3 mL 及び水 7 mL を加えて注入

↓ アセトニトリル 5 mL で溶出 (全溶出液を採る)

↓ アセトニトリルで 5 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-8 トルトラズリル試験法の分析法フローチャート

表 1-9 測定条件 (ペルメトリン試験法)

検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m :Agilent Technologies 製)
カラム温度(°C)	80°C (2 min) – 30°C/min – 190°C – 3.6°C/min – 280°C (5 min)
注入口温度(°C)	250
検出器温度(°C)	300
キャリアガス	ヘリウム
キャリアガス流量 (mL/min)	2.5
注入法	スプリットレス法
注入量(μ L)	1
保持時間(min)	<i>cis</i> -ペルメトリン 23.8、 <i>trans</i> -ペルメトリン 24.4

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

- ↓ アセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ 残留物にアセトン 50 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容
- ↓ 抽出液 20 mL 分取

ヘキサン転溶

- ↓ 塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を採る
- ↓ ヘキサン 50 mL 加え 5 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を採る
- ↓ ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

↓ 約 5 mL まで濃縮

ヘキサン/アセトニトリル分配

- ↓ ヘキサン 15 mL
- ↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を採る
- ↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせる

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 5 mL に溶解

合成ケイ酸マグネシウムカラム

- ↓ [Florisil PR(粒径 150~250 μm)、
- ↓ 5 g をヘキサンで湿式充填、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g 積層、内径 1.5 cm]
- ↓ 濃縮液を注入
- ↓ ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15)70 mL で溶出(全溶出液を採る)

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 2.5 mL に溶解

試験溶液



GC-ECD

図 1-9 ペルメトリン試験法の分析法フローチャート

表 1-10 測定条件 (HCB 試験法)

検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m : Agilent Technologies 製)
カラム温度($^{\circ}$ C)	70 $^{\circ}$ C(2 min)–20 $^{\circ}$ C/min–280 $^{\circ}$ C(10 min)
注入口温度($^{\circ}$ C)	250
検出器温度($^{\circ}$ C)	300
キャリアガス	ヘリウム
キャリアガス流量 (mL/min)	2.5
注入法	スプリットレス法
注入量(μ L)	1
保持時間(min)	9.4

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

- ↓ アセトン 50 mL を加え 1 分間ホモジナイズ
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ 残留物にアセトン 20 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ ろ液を合わせてアセトンで 100 mL に定容
- ↓ 抽出液 10 mL 分取

ヘキサン転溶

- ↓ 塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を採る
- ↓ ヘキサン 50 mL 加え 5 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を採る
- ↓ ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

- ↓ 約 5 mL まで濃縮

合成ケイ酸マグネシウムカラム

- ↓ [Florisil PR (粒径 150~250 μm)、
- ↓ 10 g をヘキサンで湿式充填、上部に無水硫酸ナトリウム 2 g 積層、内径 1.5 cm]
- ↓ 濃縮液を注入
- ↓ ヘキサン 90 mL で溶出(全溶出液を採る)

濃 縮

- ↓ 約 2 mL まで濃縮
- ↓ ヘキサンで 5 mL に定容

試験溶液

↓

GC-ECD

図 1-10 HCB 試験法の分析法フローチャート

表 1-11 測定条件 (DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 試験法)

検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m : Agilent Technologies 製)
カラム温度 (°C)	80°C (2 min) - 30°C/min - 190°C - 3.6°C/min - 280°C (5 min)
注入口温度 (°C)	250
検出器温度 (°C)	300
キャリアーガス	ヘリウム
キャリアーガス流量 (mL/min)	2.5
注入法	スプリットレス法
注入量 (μ L)	2
保持時間 (min)	8.0 (α -HCH) 8.8 (γ -HCH) 9.2 (ヘプタクロル) 9.8 (アルドリン) 10.5 (β -HCH) 11.6 (<i>cis</i> -ヘプタクロルエポキシド) 11.7 (<i>trans</i> -ヘプタクロルエポキシド) 13.1 (<i>p,p'</i> -DDE) 13.6 (ディルドリン) 14.3 (エンドリン) 14.7 (<i>o,p'</i> -DDT) 15.9 (<i>p,p'</i> -DDD) 16.5 (<i>p,p'</i> -DDT)

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ アセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ

↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ 残留物にアセトン 50 mL を加え振とう

↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容

↓ 抽出液 20 mL 分取

ヘキサン転溶

↓ 塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ ヘキサン層を採る

↓ ヘキサン 50 mL 加え 5 分間振とう

↓ ヘキサン層を採る

↓ ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

↓ 約 5 mL まで濃縮

ヘキサン/アセトニトリル分配

↓ ヘキサン 15 mL

↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採る

↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採る

↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせる

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 5 mL に溶解

合成ケイ酸マグネシウムカラム

↓ [Florisil PR (粒径 150~250 μm)、

↓ 5 g をヘキサンで湿式充填、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g 積層、内径 1.5 cm]

↓ 濃縮液を注入

↓ ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15) 70 mL で溶出 (全溶出液を採る)

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 10 mL に溶解

試験溶液

↓

GC - ECD

図 1-11 DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 試験法の分析法フローチャート

表 1-12 測定条件 (クロルデン及びノナクロル試験法)

検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m : Agilent Technologies 製)
カラム温度 (°C)	80°C (2 min) - 30°C/min - 190°C - 3.6°C/min - 280°C (5 min)
注入口温度 (°C)	250
検出器温度 (°C)	300
キャリアーガス	ヘリウム
キャリアーガス流量 (mL/min)	2.5
注入法	スプリットレス法
注入量 (μ L)	2
保持時間 (min)	12.6 (<i>trans</i> -クロルデン) 12.8 (<i>cis</i> -クロルデン) 12.9 (<i>trans</i> -ノナクロル) 16.1 (<i>cis</i> -ノナクロル)

秤 取

↓ 試料 5 g

抽 出

↓ アセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ

↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ 残留物にアセトン 50 mL を加え振とう

↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容

↓ 抽出液 20 mL 分取

ヘキサン転溶

↓ 塩化ナトリウム 10 g、水 200 mL 及びヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ ヘキサン層を採る

↓ ヘキサン 50 mL 加え 5 分間振とう

↓ ヘキサン層を採る

↓ ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

↓ 約 5 mL まで濃縮

ヘキサン/アセトニトリル分配

↓ ヘキサン 15 mL

↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採る

↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採る

↓ ヘキサン飽和アセトニトリルを 30 mL 加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせる

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 5 mL に溶解

合成ケイ酸マグネシウムカラム

↓ [Florisil PR (粒径 150~250 μm)、

↓ 5 g をヘキサンで湿式充填、上部に無水硫酸ナトリウム約 1 g 積層、内径 1.5 cm]

↓ 濃縮液を注入

↓ ヘキサン及びジエチルエーテルの混液 (85 : 15) 70 mL で溶出 (全溶出液を採る)

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をヘキサン 10 mL に溶解

試験溶液

↓

GC - ECD

図 1-12 クロルデン及びビノナクロル試験法の分析法フローチャート

表 1-13 測定条件 (PCB 試験法)

GC 条件		
カラム	Fused Silica HT8-PCB (内径 0.25 mm、長さ 60 m、膜厚 0.25 μm : 関東化学製)	
カラム温度 ($^{\circ}\text{C}$)	100 $^{\circ}\text{C}$ (1 min) $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -180°C (0 min) $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -300°C (0 min)	
注入口温度 ($^{\circ}\text{C}$)	250	
インターフェース温度 ($^{\circ}\text{C}$)	300	
キャリアーガス	ヘリウム	
キャリアーガス流量 (mL/min)	1	
注入法	スプリットレス法	
注入量 (μL)	1	
MS 条件		
測定モード	SIM	
イオン化法	EI (+)	
イオン化エネルギー (eV)	70	
EM 電圧 (V)	オートチューニングでの設定値	
イオン源温度 ($^{\circ}\text{C}$)	230	
四重極温度 ($^{\circ}\text{C}$)	150	
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)		
	定量イオン (m/z)	定性イオン (m/z)
PCB28	256.0	258.0
[$^{13}\text{C}_{12}$] PCB28	268.0	270.0
MBP-19	268.0	270.0
PCB52	289.9	291.9
[$^{13}\text{C}_{12}$] PCB52	302.0	304.0
MBP-70	302.0	304.0
PCB101	325.9	327.9
[$^{13}\text{C}_{12}$] PCB101	337.9	339.9
MBP-111	337.9	339.9
PCB138 及び PCB153	359.8	361.8
[$^{13}\text{C}_{12}$] PCB138 及び [$^{13}\text{C}_{12}$] PCB153	371.9	373.9
MBP-159	371.9	373.9
PCB180	393.8	395.8
[$^{13}\text{C}_{12}$] PCB180	405.8	407.8

	MBP-170	405.8	407.8	
保持時間 (min)	PCB28 15.3、PCB52 16.3、PCB101 19.5、PCB138 23.8、 PCB153 22.7、PCB180 26.3			

秤 取

- ↓ 試料 1 g
- ↓ 100 µg/L 内標準溶液を 25 µL 添加

抽 出

- ↓ 1mol/L 水酸化カリウムのエタノール溶液 100 mL を加え、約 90 °C の水浴で 1 時間加熱還流
- ↓ ヘキサン 100 mL を加え、綿栓ろ過をしてあらかじめ精製水 100 mL を入れた 500 mL 分液漏斗に移す
- ↓ 10 分間振とう
- ↓ ヘキサン層を分取した後軽く水洗浄
- ↓ 無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過

濃 縮

- ↓ 約 5 mL まで濃縮

合成ケイ酸マグネシウムカラム

- ↓ [Florisil PR (粒径 150~250 µm) 、
- ↓ 20 g をヘキサンで湿式充填、内径 2.0 cm]
- ↓ 濃縮液を負荷
- ↓ ヘキサン約 2 mL でなす形フラスコ内を 3 回洗い、洗液をカラムに負荷
- ↓ ヘキサン 200 mL で溶出 (全溶出液を採取)

濃 縮

- ↓ 約 5 mL まで濃縮
- ↓ ヘキサンで 10 mL に定容
- ↓ 10 µg/L 内標準 (シリンジスパイク) 混合溶液 50 µL を入れたスピッツ管に抽出液 2 mL を分取
- ↓ 窒素ガスを通じて 50 µL まで濃縮

試験溶液

- ↓

GC-MS

図 1-13 PCB 試験法の分析法フローチャート

(1) チルミコシン試験法

表2-1 チルミコシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	54.1	57.8	55.6	57.8	55.1	56.3	112.6	1.3	3.1
	2回目	55.1	57.2	54.9	59.2	56.2				

(2) スルファモイルダプソン試験法

表2-2 スルファモイルダプソンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.3	8.4	7.8	8.4	8.3	8.4	84.2	3.0	8.1
	2回目	9.6	8.1	7.5	8.9	8.0				

(3) 4-*epi*-クロルテトラサイクリン及び4-*epi*-オキシテトラサイクリン試験法

表2-3 4-*epi*-クロルテトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	92	87	84	92	82	89	88.7	3.3	4.1
	2回目	91	91	92	90	86				

表2-4 4-*epi*-オキシテトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	111	101	93	116	117	109	109.1	3.4	7.9
	2回目	110	108	102	117	116				

(4) エンロフロキサシン (シプロフロキサシンとの和) 試験法

表2-5 エンロフロキサシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.0	8.1	8.1	7.3	9.0	8.1	81.2	6.0	9.5
	2回目	7.7	7.4	8.0	7.3	9.2				

表2-6 シプロフロキサシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.9	8.7	9.3	8.2	9.1	8.7	86.5	5.5	6.6
	2回目	8.0	7.9	8.6	8.3	9.5				

(5) フロルフェニコール試験法

表2-7 フロルフェニコールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
200	1回目	192	189	191	153	194	185	92.3	7.5	7.8
	2回目	199	178	168	188	194				

(6) トリクラベンダゾール試験法

表2-8 トリクラベンダゾールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
225	1回目	168	195	206	166	188	184	81.6	2.4	8.2
	2回目	171	189	200	172	180				

(7) サリノマイシン及びモネンシン試験法

表2-9 サリノマイシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
2	1回目	1.94	2.02	1.93	2.00	1.91	1.98	99.0	5.7	6.6
	2回目	1.70	2.05	1.96	2.18	2.10				

表2-10 モネンシンAの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
2	1回目	1.95	1.92	1.74	1.73	1.70	1.75	87.5	6.9	9.0
	2回目	1.69	1.97	1.48	1.69	1.63				

(8) トルトラズリル試験法

表 2-11 トルトラズリルスルホンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	94	106	103	97	100	100	100.0	1.1	4.9
	2回目	95	107	104	97	98				

(9) ペルメトリン試験法

表2-12 ペルメトリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	50.7	50.7	49.5	46.0	53.4	49.9	99.9	6.4	8.1
	2回目	55.3	42.7	53.0	46.0	51.9				

(10) HCB 試験法

表2-13 HCBの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
5	1回目	4.71	3.77	4.17	4.40	4.60	4.41	88.1	6.8	10.7
	2回目	4.68	3.93	4.68	3.91	5.21				

(11) DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 試験法

表 2-14 o,p' -DDT の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.0	8.3	8.8	10.0	13.1	9.9	98.6	10.8	17.6
	2回目	10.2	7.9	8.7	12.0	10.7				

表 2-15 p,p' -DDE の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.4	8.9	8.1	9.2	8.8	9.0	89.9	6.8	8.5
	2回目	9.3	8.6	8.2	10.5	9.9				

表 2-16 p,p' -DDD の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.6	9.4	8.4	9.1	9.0	9.4	93.9	8.6	10.8
	2回目	10.5	9.3	7.7	11.2	9.8				

表 2-17 *p,p'*-DDT の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.0	9.4	9.1	10.4	8.6	9.8	97.7	7.8	11.0
	2回目	10.8	8.7	8.7	11.8	10.2				

表 2-18 アルドリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	7.6	7.4	7.2	8.0	7.2	7.8	77.9	6.8	8.4
	2回目	8.7	7.2	7.4	9.0	8.0				

表 2-19 ディルドリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.9	10.0	8.9	9.8	8.8	9.5	95.2	7.2	7.7
	2回目	10.0	9.0	9.0	11.0	9.8				

表 2-20 エンドリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.1	10.0	9.1	9.4	8.1	9.6	95.7	6.4	9.0
	2回目	10.2	9.8	9.0	11.1	9.1				

表 2-21 ヘプタクロルの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.3	8.8	7.9	8.0	8.3	8.6	85.9	8.7	8.7
	2回目	9.7	8.1	7.9	9.5	9.4				

表 2-22 *cis*-ヘプタクロルエポキシドの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.1	9.5	8.6	9.1	7.6	9.1	90.6	6.9	7.7
	2回目	9.8	8.8	9.1	10.1	8.9				

表 2-23 *trans*-ヘプタクロルエポキシドの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.5	9.1	8.6	9.4	9.0	9.1	91.2	6.6	7.8
	2回目	9.3	8.2	8.9	10.6	9.8				

表 2-24 α -HCH の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.2	9.2	9.2	8.9	8.7	9.2	92.2	5.8	5.8
	2回目	9.7	8.7	9.3	10.3	9.1				

表 2-25 β -HCH の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.2	9.6	9.4	8.8	8.1	9.1	91.3	8.3	8.3
	2回目	9.3	9.0	9.2	10.3	9.4				

表2-26 γ -HCHの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.3	9.6	9.5	8.7	8.5	9.1	90.6	5.5	5.5
	2回目	8.7	9.0	9.3	9.7	9.3				

(12) *cis*-クロロデン、*trans*-クロロデン、*cis*-ノナクロル及び*trans*-ノナクロル試験法

表2-27 *cis*-クロロデンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.5	8.2	8.3	9.3	9.3	9.3	92.5	3.0	8.7
	2回目	10.2	8.6	8.9	9.6	9.5				

表2-28 *trans*-クロロデンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.6	8.3	8.3	10.3	10.3	9.4	94.0	3.4	8.8
	2回目	9.7	8.9	8.8	9.7	10.2				

表2-29 *cis*-ノナクロルの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.0	8.2	8.8	9.4	9.5	9.3	92.8	5.1	8.2
	2回目	9.7	9.1	8.1	9.9	10.3				

表 2-30 *trans*-ノナクロルの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.3	8.1	8.5	8.6	8.3	8.4	83.8	5.1	5.7
	2回目	8.7	8.4	8.0	7.6	8.5				

(13) PCB 試験法

表2-31 PCB28の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.541	0.522	0.566	0.569	0.567	0.555	0.587	97.8	4.6	7.1
	2日目	0.589	0.590	0.555	0.538	0.600	0.619				
	3日目	0.612	0.653	0.597	0.663	0.587	0.639				
1.2	1日目	1.110	1.147	1.115	1.156	1.093	1.106	1.126	93.8	2.3	2.3
	2日目	1.101	1.127	1.183	1.096	1.100	1.118				
	3日目	1.158	1.121	1.133	1.155	1.120	1.137				
1.8	1日目	1.621	1.526	1.553	1.642	1.633	1.615	1.630	90.6	2.7	3.0
	2日目	1.638	1.639	1.576	1.713	1.626	1.629				
	3日目	1.684	1.675	1.647	1.674	1.669	1.581				

表2-32 PCB52の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.614	0.561	0.578	0.590	0.593	0.518	0.605	100.8	5.0	6.0
	2日目	0.635	0.620	0.620	0.572	0.646	0.643				
	3日目	0.590	0.589	0.652	0.653	0.616	0.598				
1.2	1日目	1.085	1.171	1.190	1.093	1.102	1.137	1.145	95.4	3.4	3.5
	2日目	1.104	1.138	1.205	1.175	1.149	1.072				
	3日目	1.148	1.146	1.171	1.204	1.152	1.163				
1.8	1日目	1.727	1.594	1.738	1.769	1.719	1.694	1.741	96.7	3.8	3.8
	2日目	1.698	1.634	1.896	1.775	1.742	1.801				
	3日目	1.718	1.763	1.777	1.776	1.719	1.799				

表 2-33 PCB101 の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.619	0.625	0.604	0.569	0.616	0.623	0.610	101.7	3.7	3.7
	2日目	0.635	0.617	0.574	0.612	0.598	0.632				
	3日目	0.587	0.586	0.612	0.639	0.589	0.635				
1.2	1日目	1.129	1.081	1.057	1.115	1.162	1.173	1.157	96.4	3.4	4.5
	2日目	1.186	1.194	1.209	1.217	1.227	1.167				
	3日目	1.170	1.171	1.192	1.151	1.160	1.064				
1.8	1日目	1.616	1.636	1.739	1.716	1.714	1.618	1.700	94.4	4.0	4.2
	2日目	1.690	1.677	1.780	1.793	1.790	1.721				
	3日目	1.581	1.692	1.578	1.806	1.706	1.746				

表2-34 PCB138の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.621	0.645	0.642	0.612	0.618	0.626	0.609	101.5	4.1	6.5
	2日目	0.555	0.532	0.569	0.563	0.551	0.644				
	3日目	0.623	0.615	0.628	0.624	0.648	0.642				
1.2	1日目	1.152	1.283	1.119	1.237	1.233	1.139	1.161	96.8	4.7	5.3
	2日目	1.144	1.077	1.220	1.125	1.105	1.051				
	3日目	1.191	1.103	1.176	1.193	1.174	1.169				
1.8	1日目	1.646	1.675	1.656	1.645	1.637	1.633	1.691	93.9	1.7	2.6
	2日目	1.678	1.690	1.707	1.729	1.708	1.686				
	3日目	1.746	1.738	1.648	1.757	1.702	1.755				

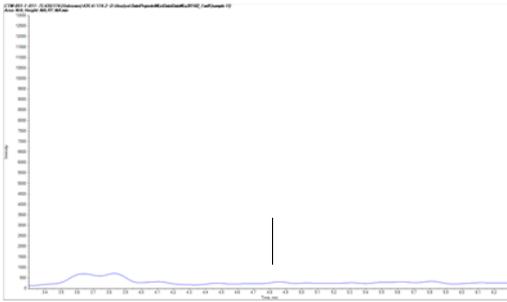
表2-35 PCB153の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.632	0.619	0.621	0.640	0.635	0.574	0.616	102.7	4.1	4.2
	2日目	0.599	0.623	0.639	0.631	0.634	0.633				
	3日目	0.555	0.607	0.603	0.658	0.592	0.601				
1.2	1日目	1.224	1.196	1.123	1.219	1.199	1.128	1.181	98.4	3.4	3.4
	2日目	1.185	1.183	1.255	1.138	1.196	1.142				
	3日目	1.163	1.139	1.223	1.202	1.158	1.185				
1.8	1日目	1.705	1.730	1.716	1.691	1.641	1.738	1.731	96.2	2.0	2.7
	2日目	1.839	1.746	1.745	1.743	1.746	1.811				
	3日目	1.742	1.701	1.742	1.695	1.738	1.693				

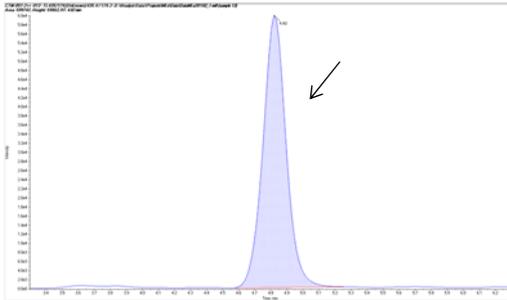
表 2-36 PCB180 の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	並行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.6	1日目	0.588	0.519	0.539	0.508	0.523	0.546	0.552	92.0	6.3	7.3
	2日目	0.536	0.530	0.601	0.634	0.619	0.574				
	3日目	0.523	0.539	0.513	0.591	0.507	0.547				
1.2	1日目	1.026	1.093	1.107	1.110	1.099	1.208	1.136	94.7	5.0	6.3
	2日目	1.276	1.240	1.173	1.162	1.092	1.241				
	3日目	1.110	1.061	1.144	1.145	1.114	1.050				
1.8	1日目	1.534	1.684	1.599	1.728	1.559	1.570	1.674	93.0	4.1	5.1
	2日目	1.625	1.699	1.798	1.757	1.826	1.701				
	3日目	1.670	1.682	1.677	1.658	1.768	1.595				

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.0025 mg/L)

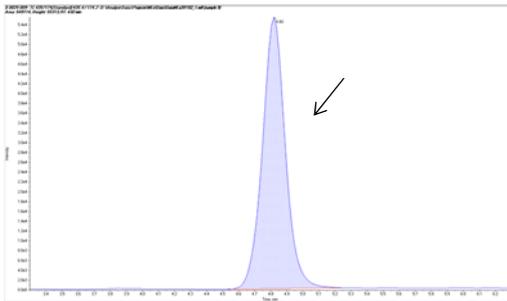
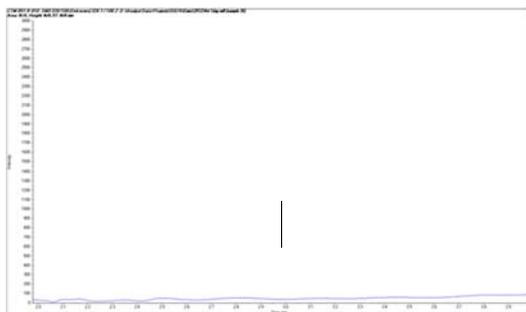
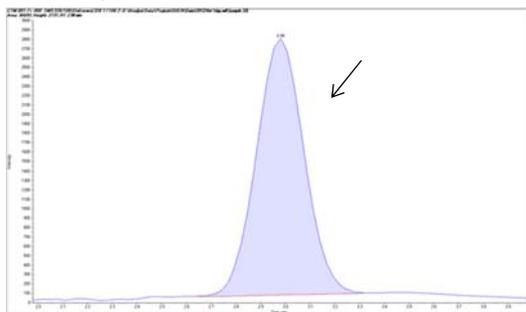


図 2-1 チルミコシンの SRM クロマトグラム
(m/z 435.4 \rightarrow 174.2)
添加濃度 : 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0005 mg/L)

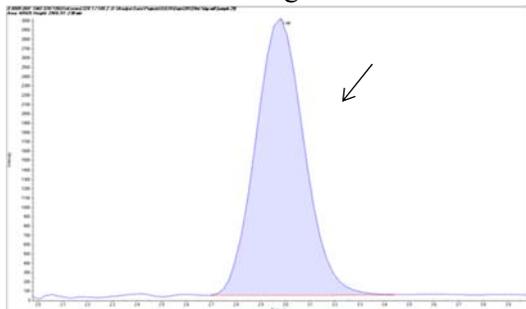
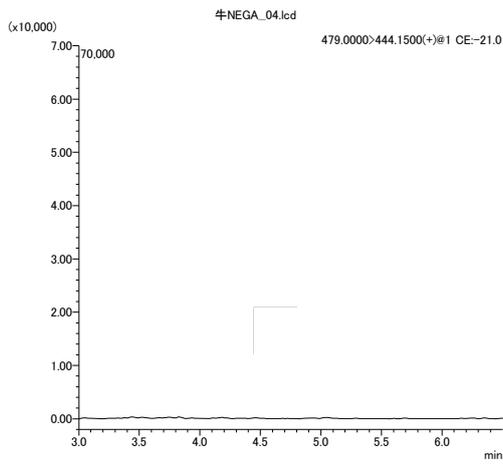


図 2-2 スルファモイルダプソンの SRM クロマトグラム

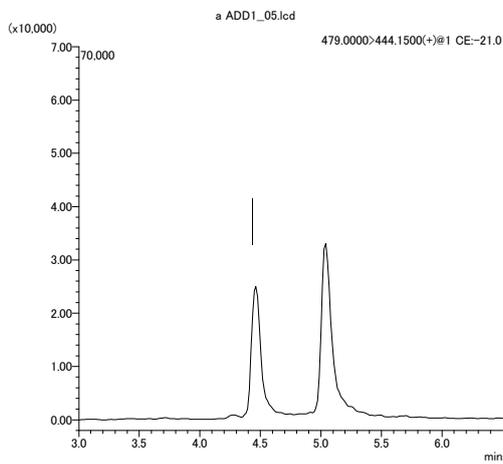
(m/z 328.1 \rightarrow 108.2)

添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.005 mg/L)

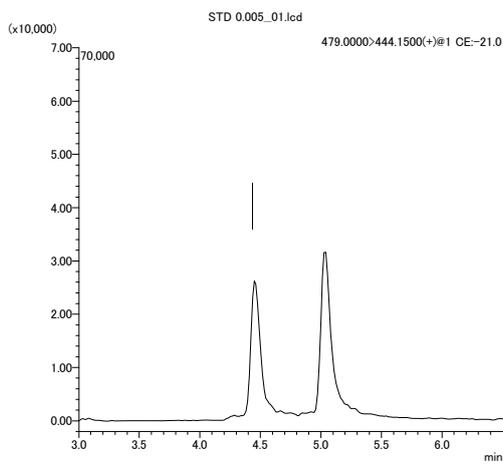
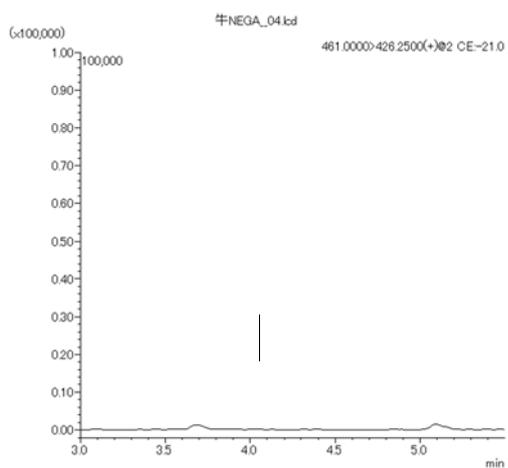
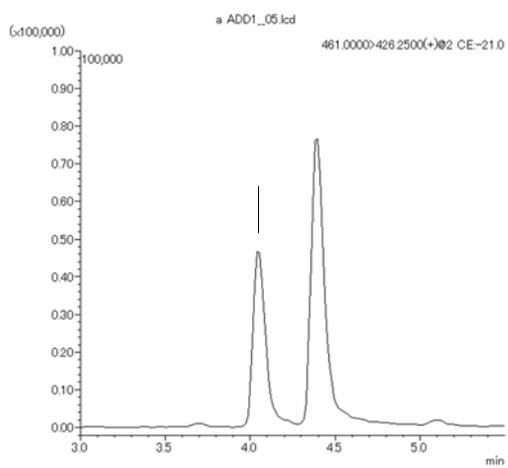


図 2-3 4-*epi*-クロルテトラサイクリンの SRM クロマトグラム
(m/z 479.0→444.1)
添加濃度: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.005 mg/L)

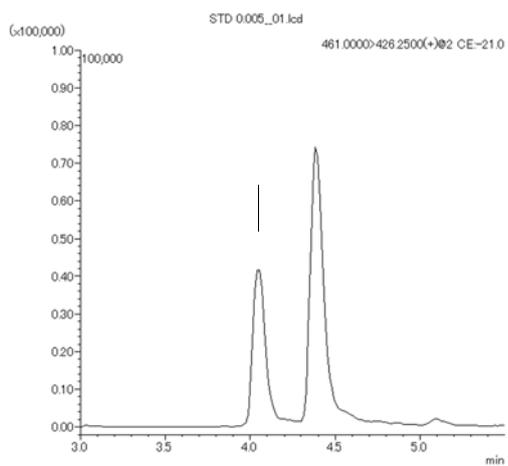


図 2-4 4-*epi*-オキシテトラサイクリンの SRM クロマトグラム
(m/z 461.0→426.2)
添加濃度: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料

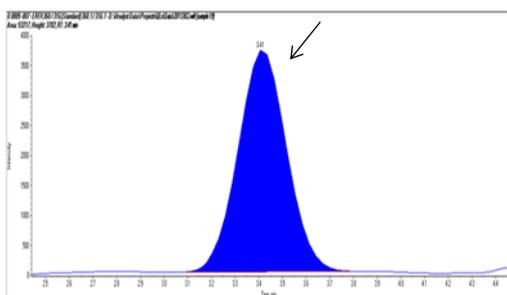
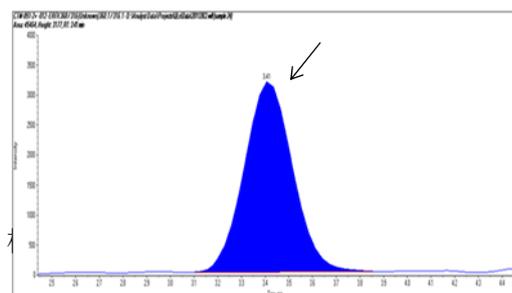
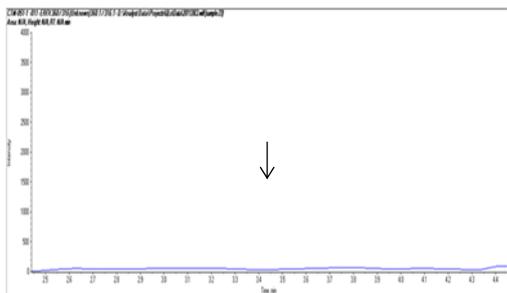


図 2-5 エンロフロキサシンの SRM クロマトグラム
(m/z 360.1→316.1)
添加濃度：10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料

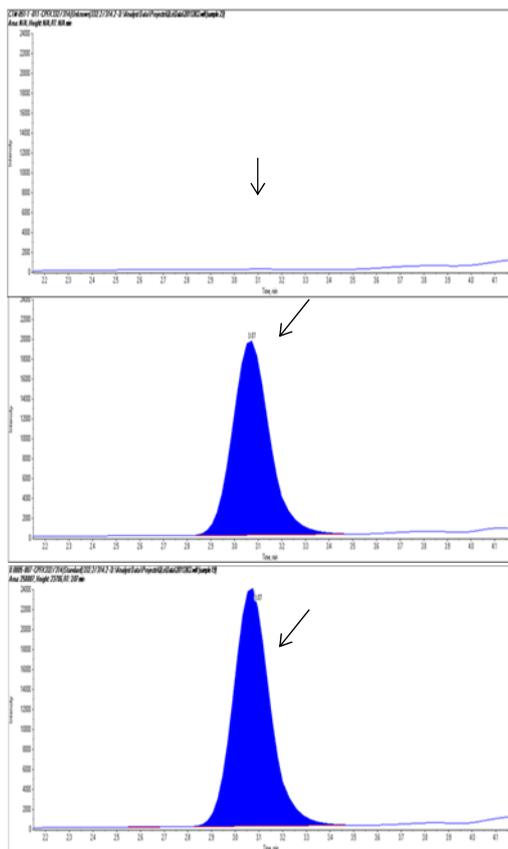
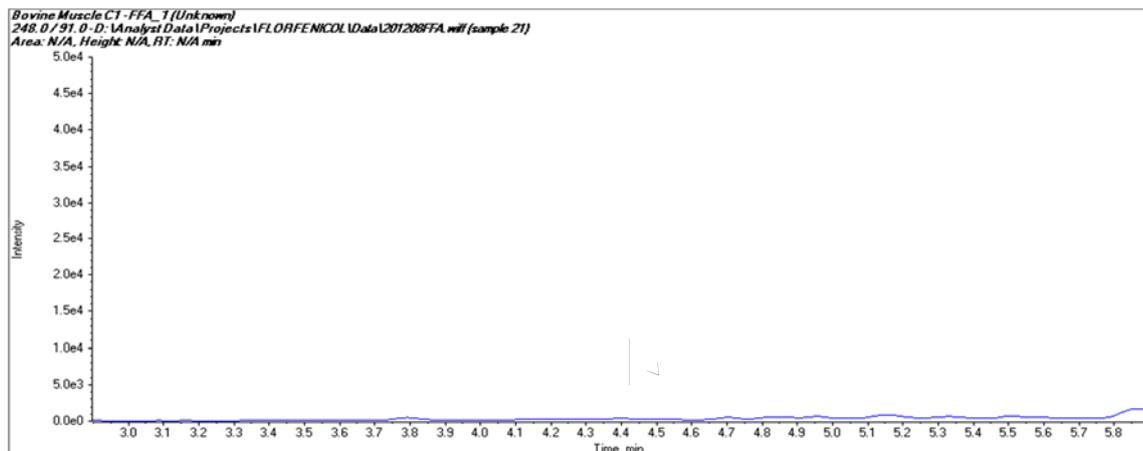
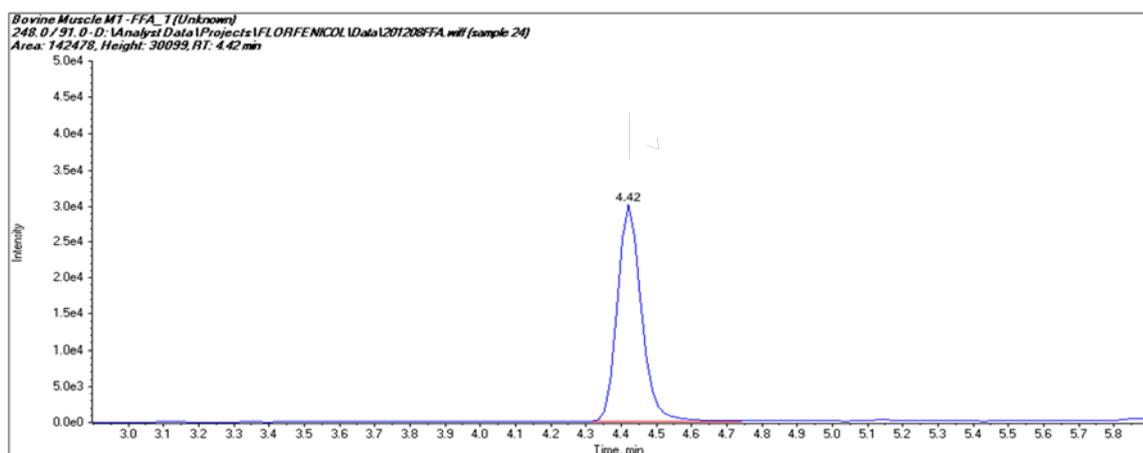


図 2-6 シプロフロキサシンの SRM クロマトグラム
(m/z 332.2→314.2)
添加濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.005 mg/L)

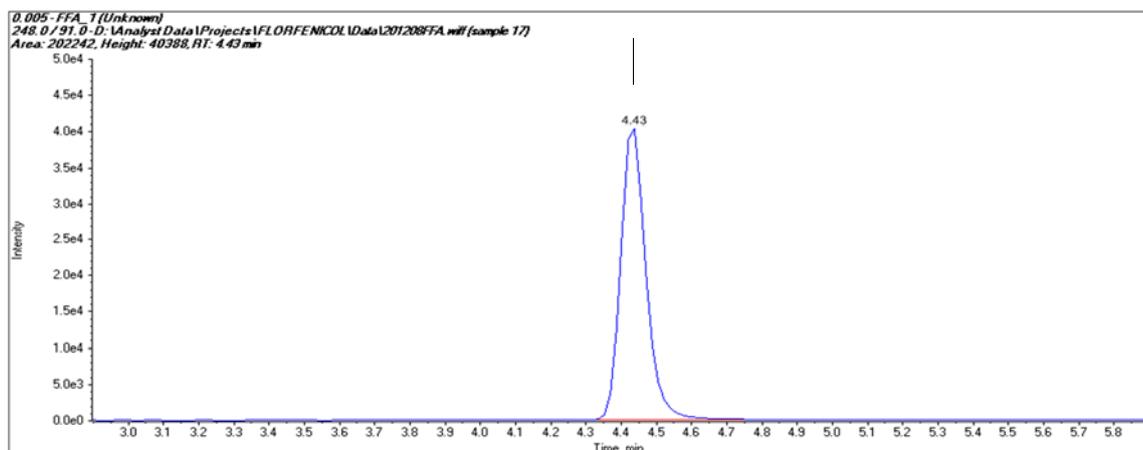
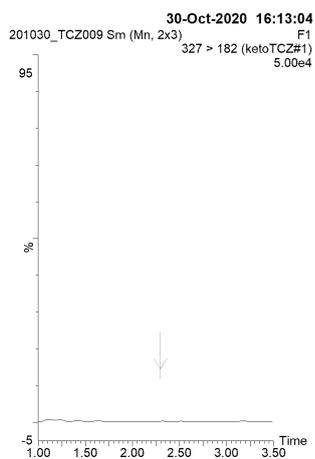


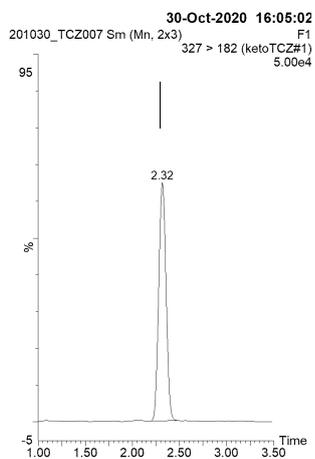
図 2-7 フロルフェニコールアミンの SRM クロマトグラム
(m/z 248.0→91.0)

添加濃度：200 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



ケト-トリクラベンダゾール標準溶液 (4 µg/L)

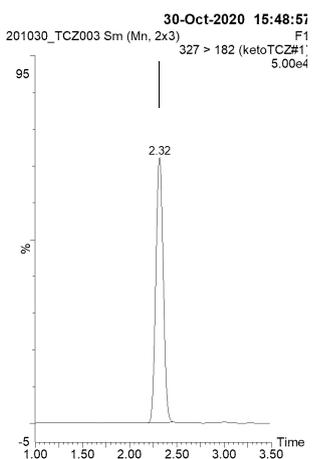
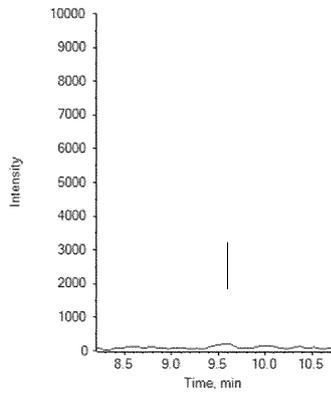


図 2-8 ケト-トリクラベンダゾールの SRM クロマトグラム
(m/z 327.0→182.0)

添加濃度 : 225 µg/kg

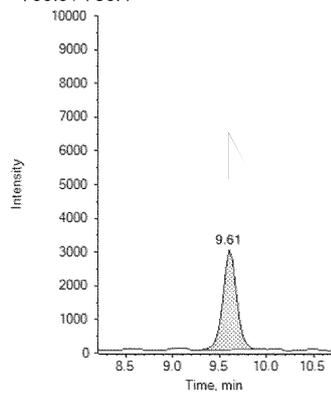
ブランク試料

11/23/2020 5:25:54 PM
768.3 / 733.4



添加試料

11/23/2020 5:44:30 PM
768.3 / 733.4



標準溶液(0.1 µg/L)

11/23/2020 4:48:46 PM
768.3 / 733.4

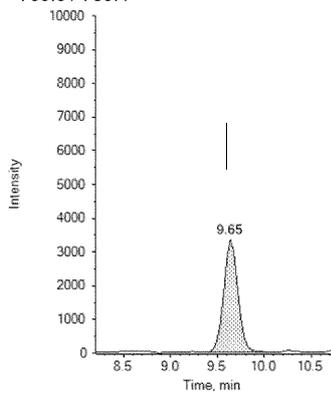


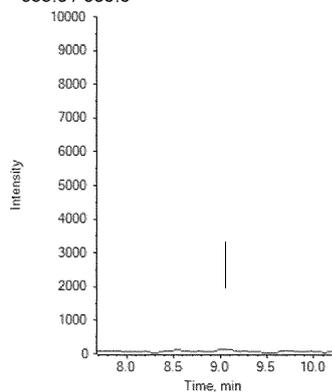
図 2-9 サリノマイシンの SRM クロマトグラム

(m/z 768.3→733.4)

添加濃度: 2 µg/kg

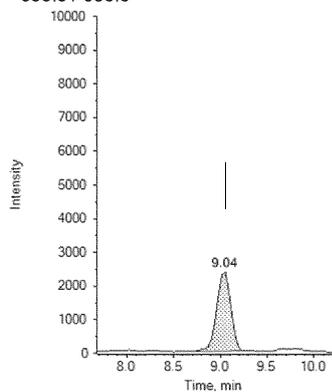
ブランク試料

11/23/2020 5:25:54 PM
688.3 / 635.5



添加試料

11/23/2020 5:44:30 PM
688.3 / 635.5



標準溶液 (0.1 µg/L)

11/23/2020 4:48:46 PM
688.3 / 635.5

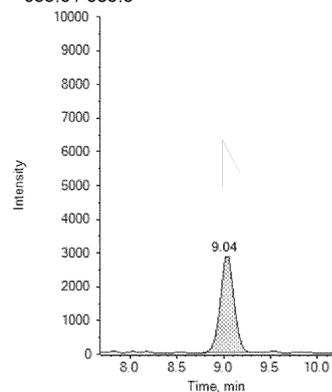


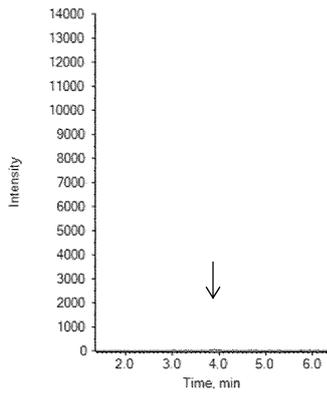
図 2-10 モネンシン A の SRM クロマトグラム

(m/z 688.3→635.5)

添加濃度 : 2 µg/kg

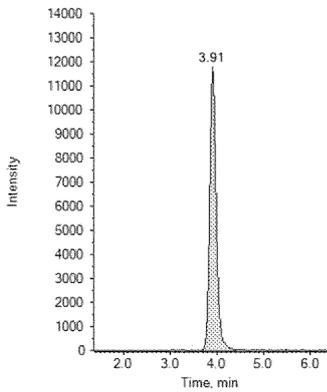
ブランク試料

1/7/2021 4:05:33 PM
456.0 / 42.0



添加試料

1/7/2021 4:13:07 PM
456.0 / 42.0



標準溶液 (0.005 mg/L)

1/7/2021 3:35:18 PM
456.0 / 42.0

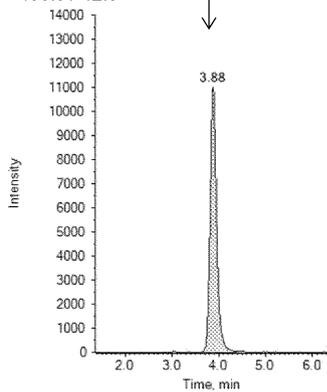
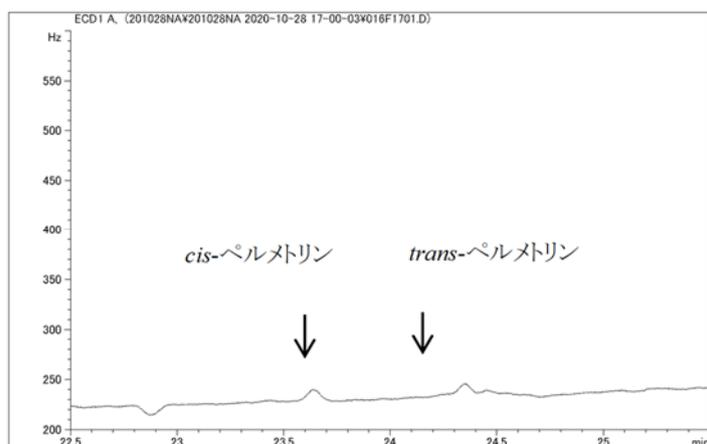
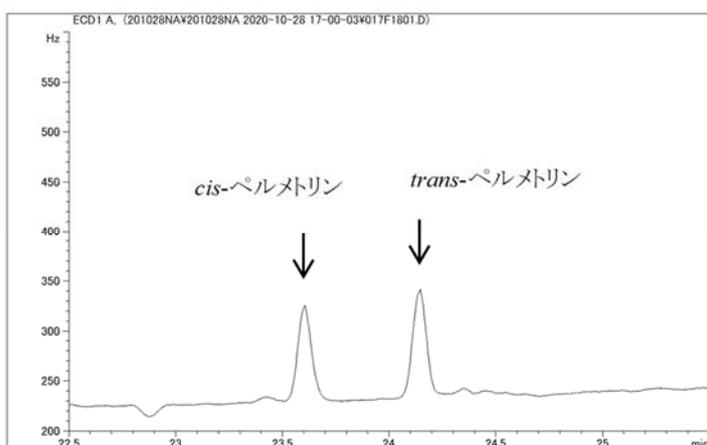


図 2-11 トルトラズリルスルホンの SRM クロマトグラム
(m/z 456.0→42.0)
添加濃度 : 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.01 mg/L)

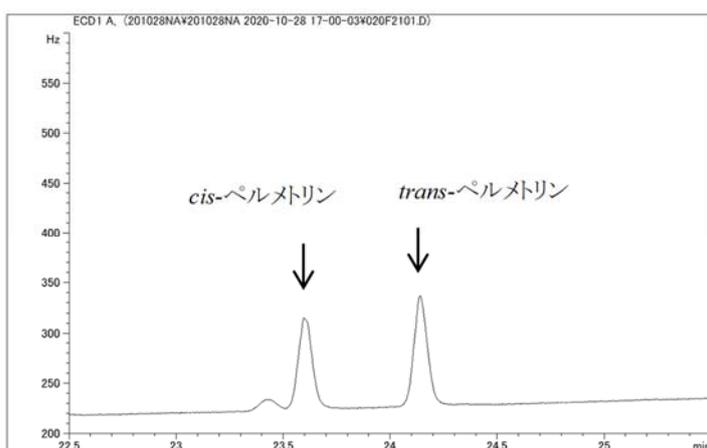
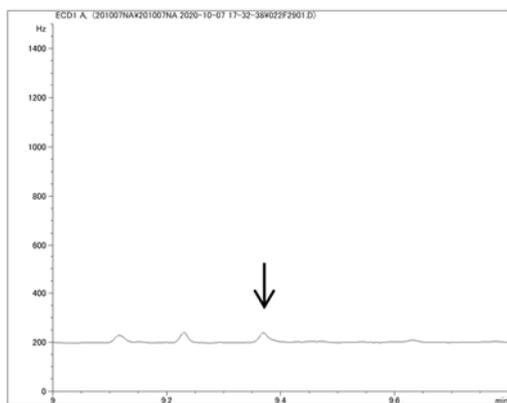
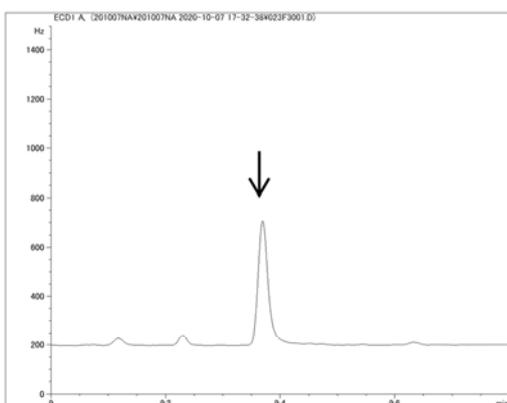


図 2-12 *cis*-ペルメトリン及び *trans*-ペルメトリンのクロマトグラム
添加濃度: 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.001 mg/L)

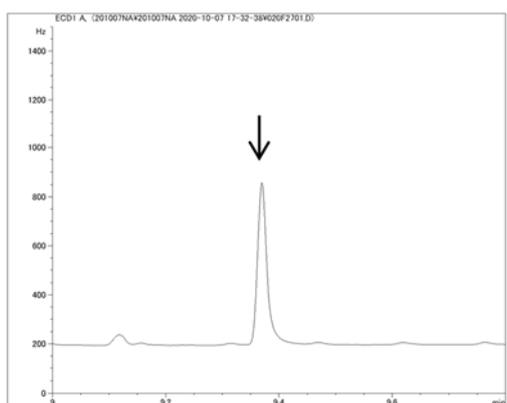
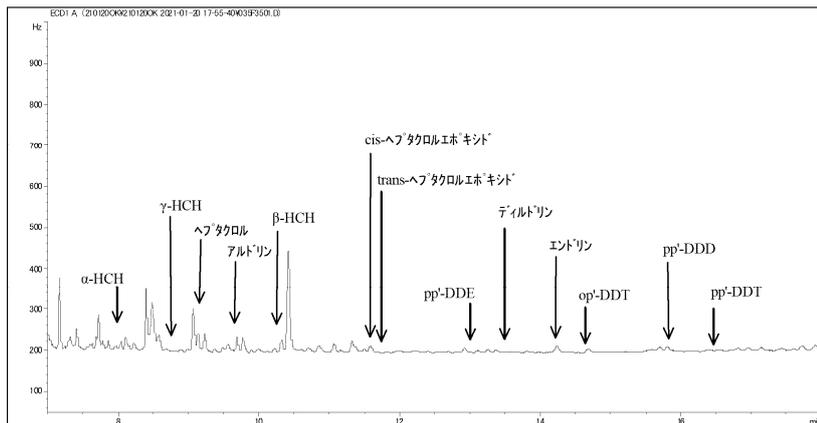


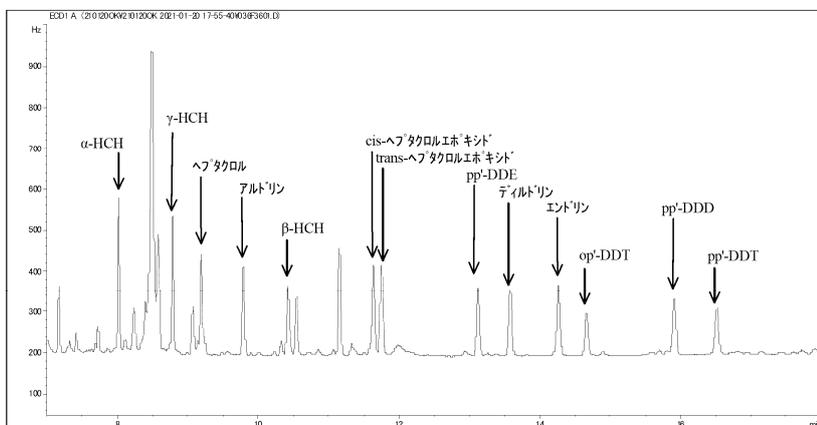
図 2-13 HCB のクロマトグラム

添加濃度： 5 μ g/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0005 mg/L)

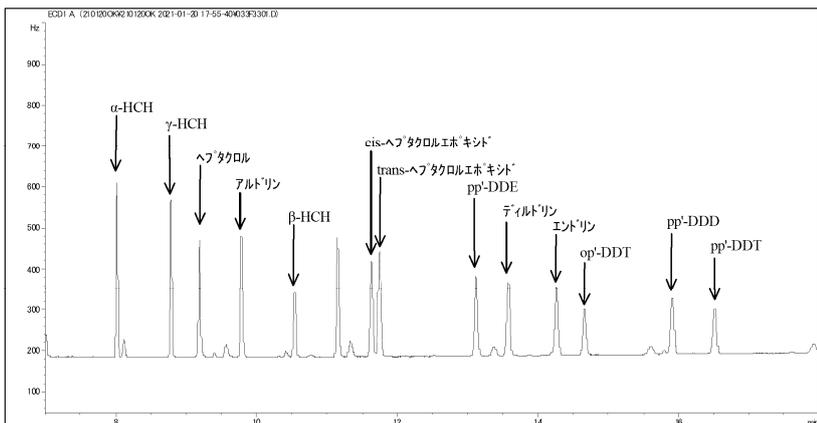
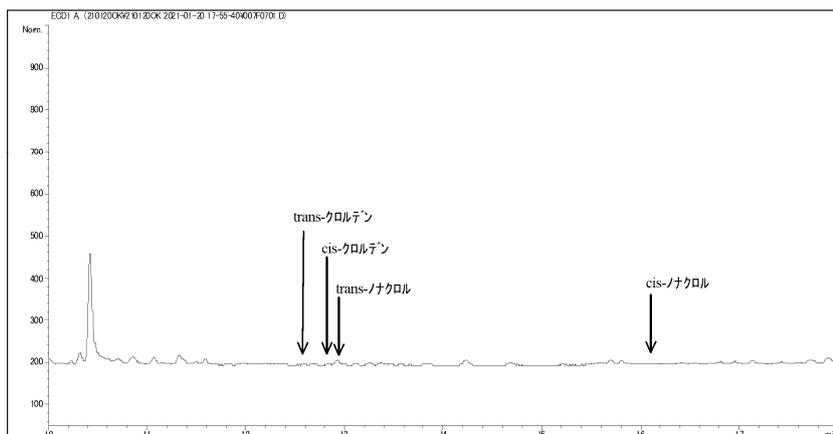


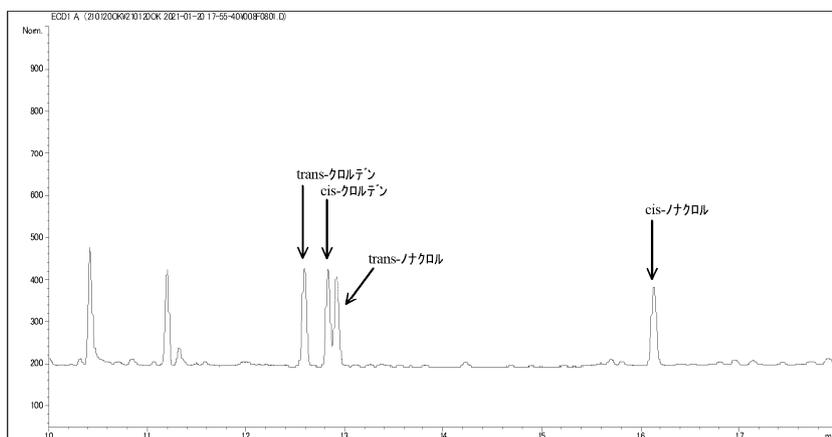
図 2-14 *o,p'*-DDT、*p,p'*-DDE、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDT、アルドリン、デイルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、*cis*-ヘプタクロルエポキシド、*trans*-ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH のクロマトグラム

添加濃度 : 10 μ g/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0005 mg/L)

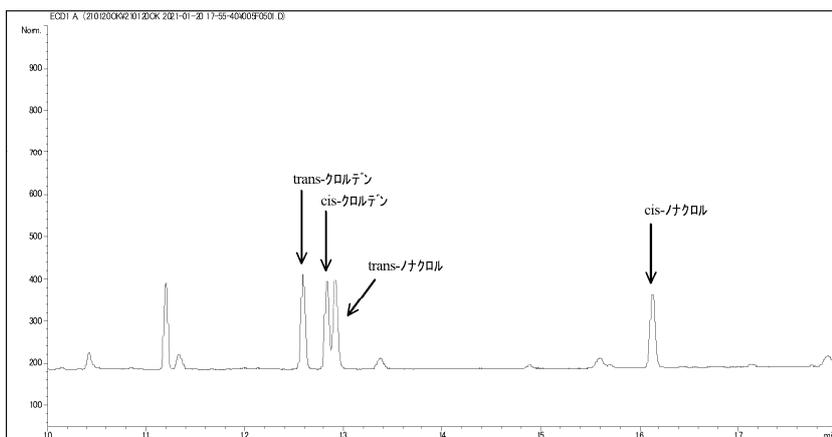
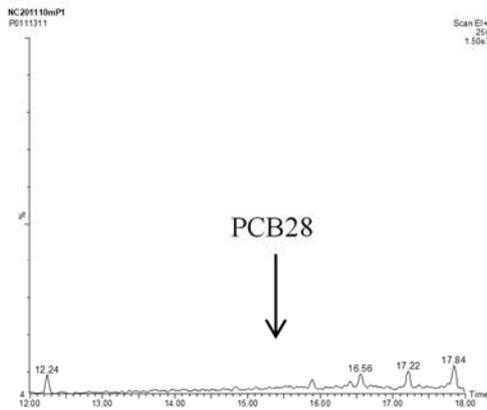
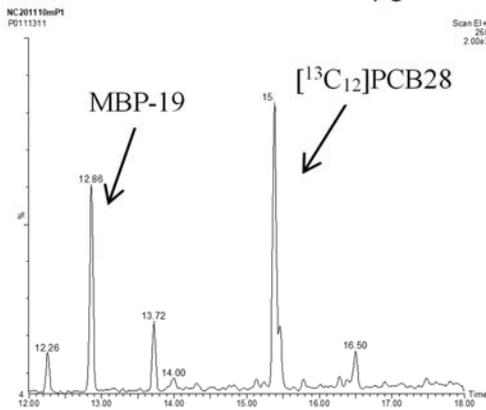


図2-15 *cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、*cis*-ナクロル及び*trans*-ナクロルのクロマトグラム
添加濃度：10 µg/kg

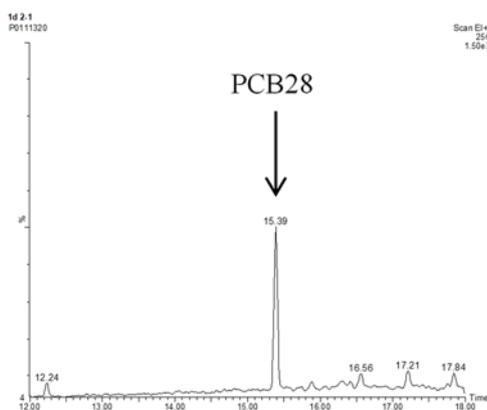
ブランク試料



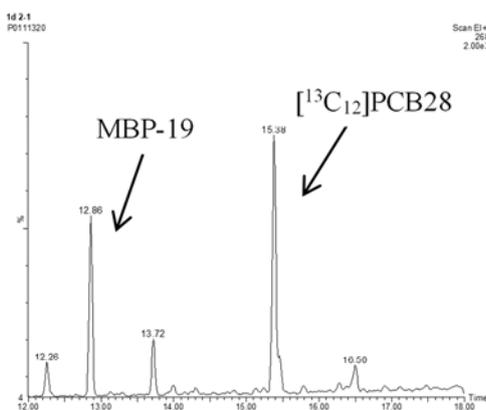
ブランク試料の内標準物質(10 μg/L)



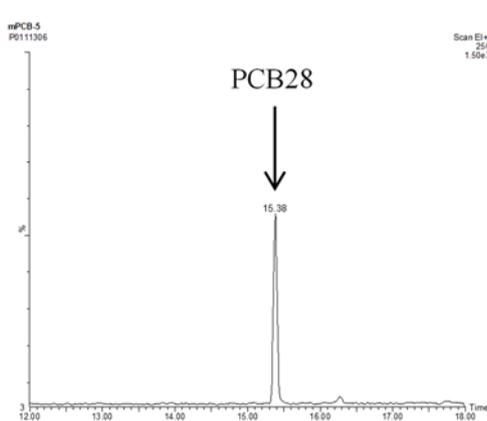
添加試料



添加試料の内標準物質(10 μg/L)



標準溶液(5 μg/L)



標準溶液(5 μg/L)の内標準物質(10 μg/L)

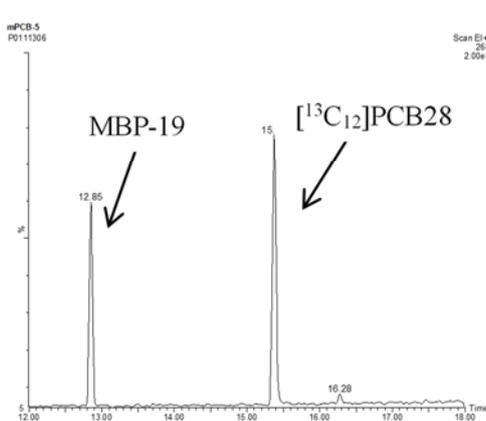


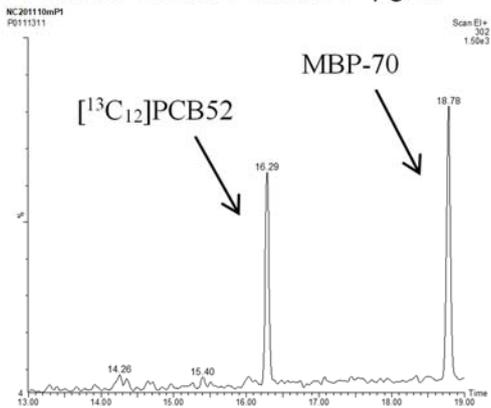
図 2-16 PCB28 の SIM クロマトグラム
(*m/z* 256.0)

添加濃度: 1.2 μg/kg

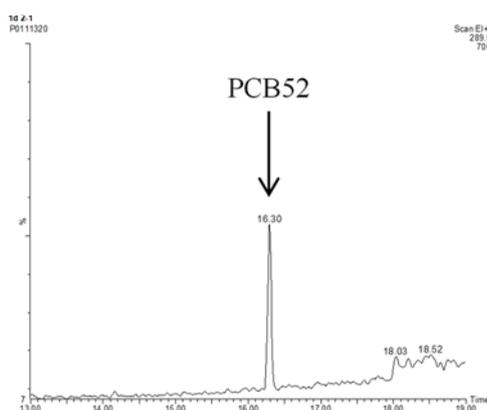
ブランク試料



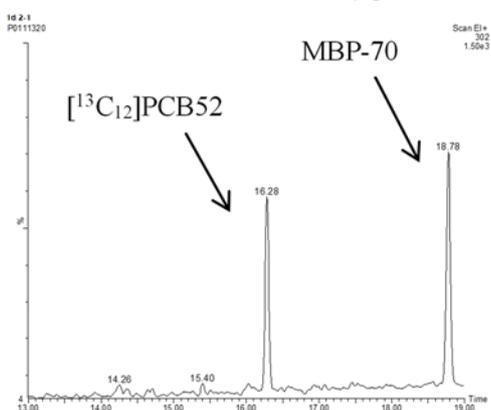
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



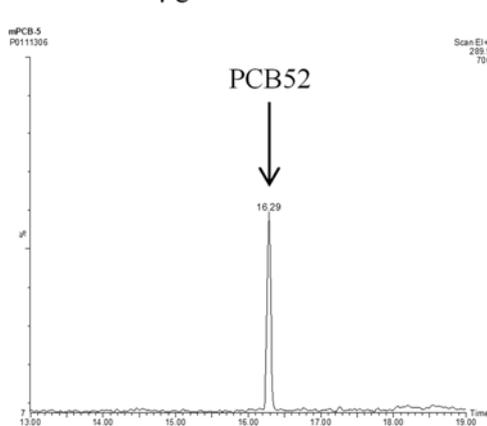
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

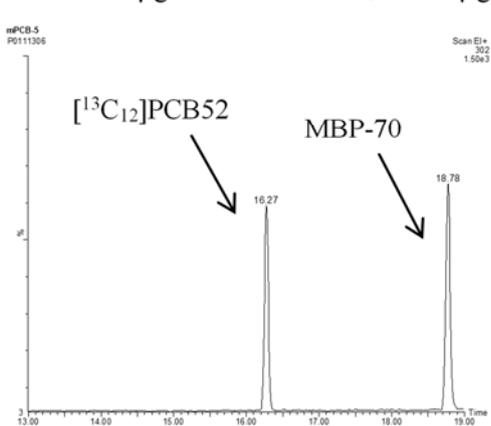
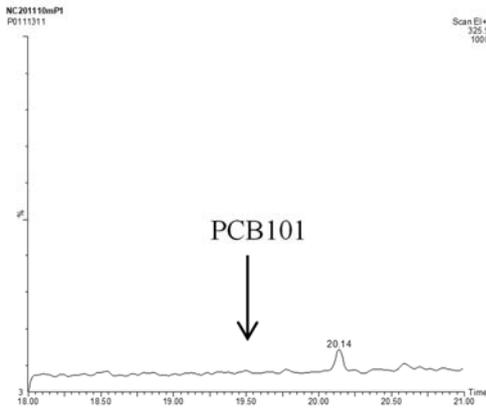


図 2-17 PCB52 の SIM クロマトグラム

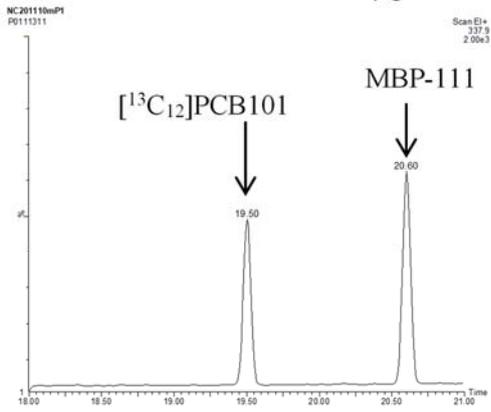
(*m/z* 289.9)

添加濃度: 1.2 µg/kg

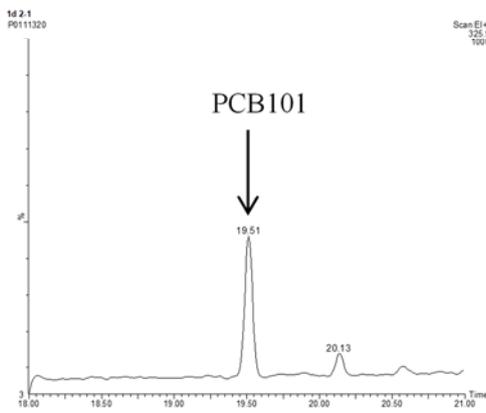
ブランク試料



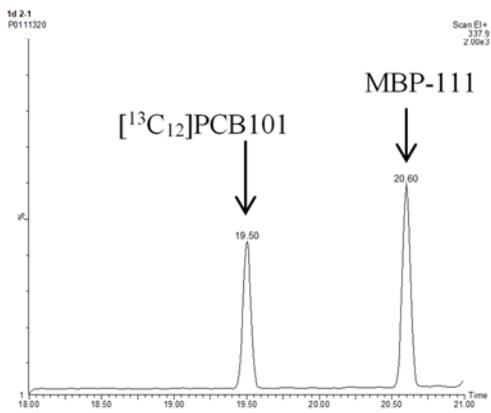
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



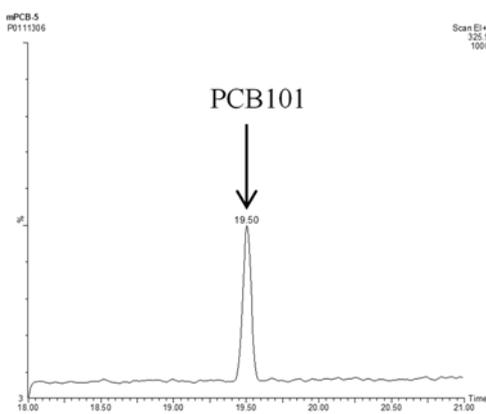
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

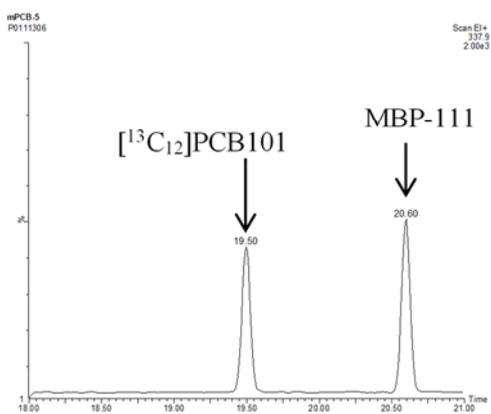
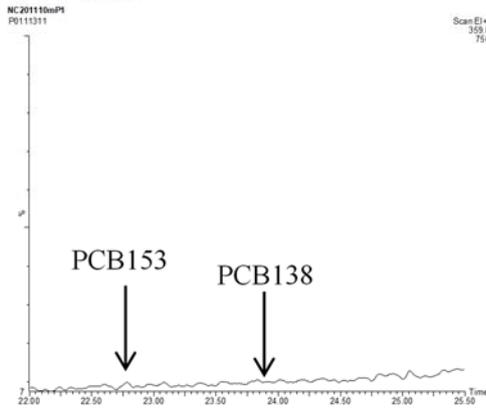


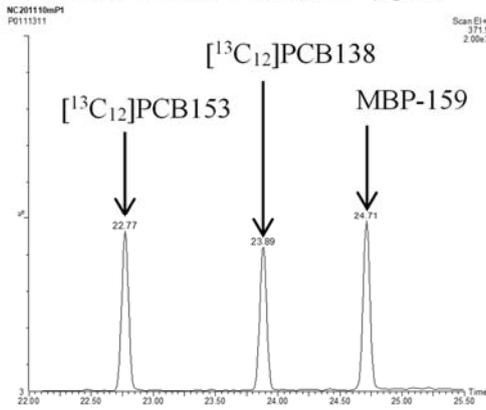
図 2-18 PCB101 の SIM クロマトグラム
(m/z 325.9)

添加濃度: 1.2 µg/kg

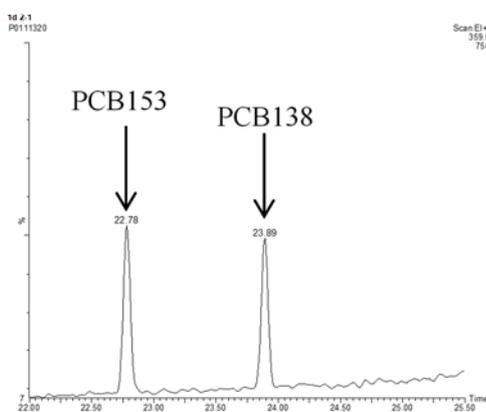
ブランク試料



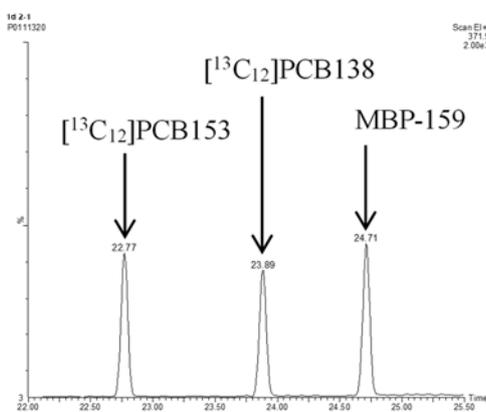
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



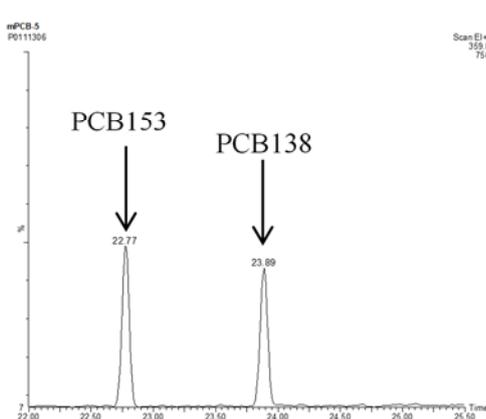
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

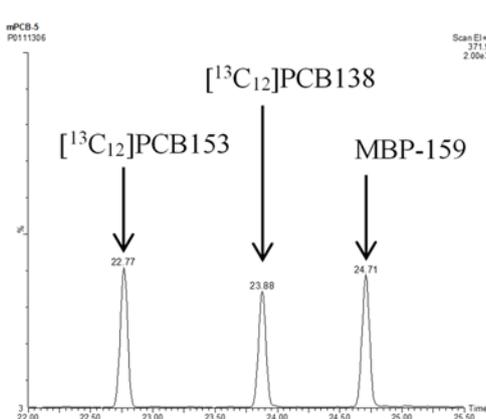
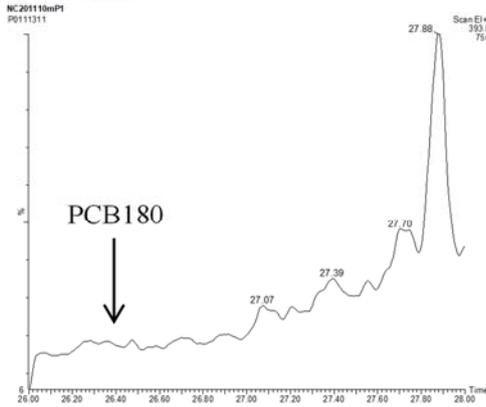


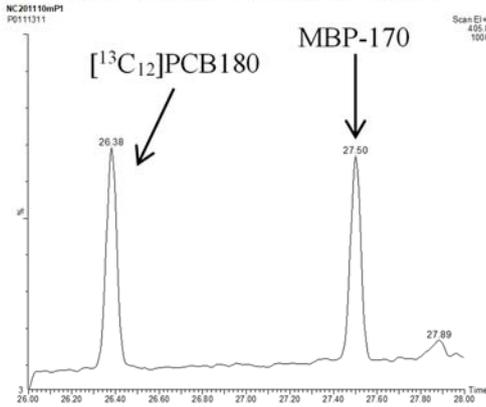
図 2-19 PCB138 及び PCB153 の SIM クロマトグラム
(m/z 359.8)

添加濃度: 1.2 µg/kg

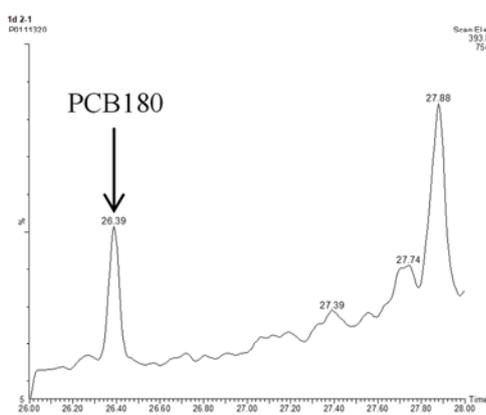
ブランク試料



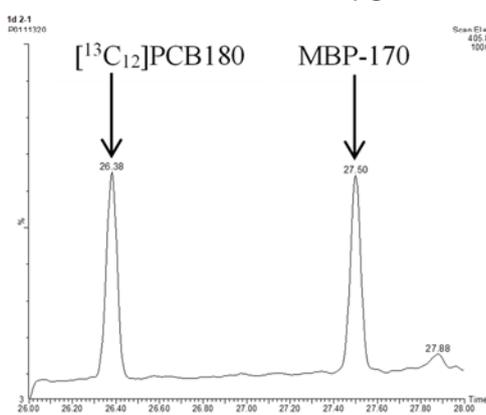
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



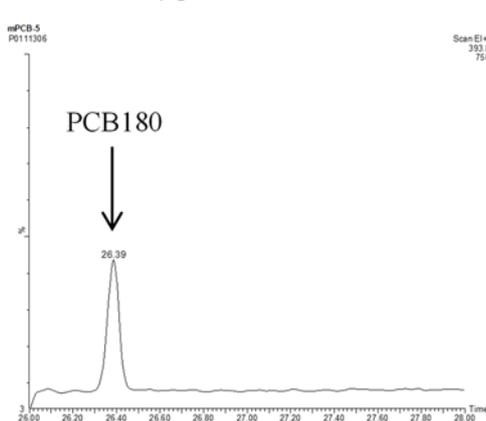
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)



標準溶液(5 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

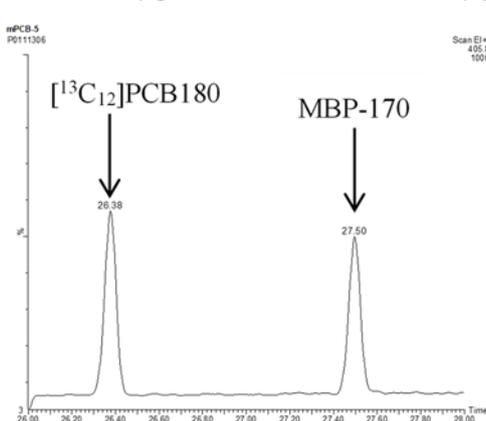


図 2-20 PCB180 の SIM クロマトグラム
(m/z 393.8)

添加濃度: 1.2 µg/kg

II. 分担研究報告 2

牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

工藤 由起子

令和 2 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
動物性食品輸出の規制対策のための研究
研究代表者 穂山 浩（星薬科大学）

分担研究報告書

牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究
研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

牛肉の STEC 汚染リスク低減のための研究を実施した。1. 牛枝肉の STEC 調査では、2020 年 11 月から 2021 年 2 月に 7 施設の協力のもとに牛枝肉合計 180 検体について 7 血清群（026、045、0103、0111、0121、0145、0157）の STEC を対象とした調査を行った。検体を増菌培養後、マルチプレックスリアルタイム PCR 法、血清凝集試験および生化学的性状試験にて STEC の検出・分離を行った。また、同時に生菌数の計数を行った。この結果、1 検体から STEC 0157:H7 が分離されたが、1 検体のみであったことからウシの種類や性別などの特徴については考察には至らなかった。STEC 0157:H7 が分離された検体において生菌数が比較的高い値を示したことから、ウシや環境状況の要因の可能性が考えられた。また、2. 牛肉の消毒効果の検討のために、消毒薬として、酸性の過酢酸製剤、アルカリ性の次亜塩素酸ナトリウム（次亜塩素酸ソーダ）、中性のエタノール（エチルアルコール）を選択し、生理食塩水や液体培地中の STEC 浮遊液での消毒効果を検証した。結果として、十分な消毒効果が認められ、STEC 接種牛肉においても消毒液の量を増やすことにより菌数は減る傾向が認められた。

研究協力者（*牛枝肉の STEC 調査研究について）

北海道保健福祉部健康安全局食品衛生課*	豊岡大輔
十和田食肉衛生検査所検査第二課*	東海林明子
十和田食肉衛生検査所検査第三課*	高橋むつみ
秋田市食肉衛生検査所*	山口健一
熊本県食肉衛生検査所*	大迫英夫
国立医薬品食品衛生研究所	千葉由美、都丸亜希子、毛利拓子、廣瀬昌平

A. 研究目的

昨今の海外での和牛の需要の高まりや日本政府および業界関係者による和牛輸出促進の影響のため、海外への和牛輸出量が増加している。特に、米国への輸出は 2005

年から解禁されているが、近年、米国では腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; STEC）食中毒防止対策のひとつとして牛肉の STEC 検査を行い、検出した関連製品につ

いては米国向けに輸出ができないため、現在は国内の加熱加工原料向けに転用している。和牛は畜産食品のなかでも単価の高い高級食材であり、国内で限られた数の対米輸出食肉取扱施設でのと畜、食肉処理による生産量を考えると、加熱加工原料のみならず、効果的な殺菌方法による食中毒の発生予防措置をとった上で、加熱加工原料用以外の転用を可能にすることは、国内生産者や食肉処理関係者の継続的な生産・関連業務にもつながることが期待される。

令和2年度には、国内食肉処理施設において、牛枝肉表面の STEC について定性的・定量的検出を行う。方法としては、USDA/FSIS の試験法を参考に志賀毒素遺伝子・大腸菌 O 抗原遺伝子検出のスクリーニングを行い、分離株の血清型別、毒素型別等の解析を行うこととした。また、各種殺菌剤について、生理食塩水や液体培地中の STEC 浮遊液での消毒効果を検証し、加えて牛肉での効果を予備的に検証することとした。

B. 研究方法

1. 牛枝肉の STEC 調査

2020 年 11 月～2021 年 2 月に国内の食肉検査所 7 か所にて、ウシ 180 頭からサンプリングを行った。実施機関、採取日、サンプリングに供した牛の情報を表 1-1 と表 1-2 に示す。また、STEC の検出の流れについて定性的な検出方法を図 1-1 に、定量的な検出方法を図 1-2 に示す。まず、定性的に STEC を検出し、定性検出陽性の場合に定量的な検出を開始し、同時に進める手順で検出を行った。対象とした O 血清群は、O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157 の

7 血清群とした。

(1) と畜場での作業

検体の採取は、処理された異なるウシ 3 頭から枝肉を各 1 本ずつ選定し、選定した枝肉ごとに頸部から胸部の任意の 3 箇所を選び、滅菌水で浸漬した 30 cm×30 cm サイズの滅菌したガーゼを密着させることによって行った。サンプリングを行ったガーゼは、それぞれ滅菌済みポリエチレン袋（サンプリングバッグ）に入れ、国立医薬品食品衛生研究所に送付するまで氷上もしくは 2～4℃で保存し、クール宅急便によって国立医薬品食品衛生研究所へ送付された。

(2) STEC 検出方法および生菌数測定

1) 検体の調製

検体は、試験に使用するまで氷上もしくは 4℃に保管された。サンプリングバッグを無菌的に開封し、Modified tryptone soya broth (mTSB) 250 mL を加え、バックの外からよく手で揉み、検体液とした。この検体液から、3 mL を生菌数測定用に使用した。また、1 mL をチューブに取り DMSO 0.1 mL を入れ-80℃で凍結保存した。さらに、残りの検体液を定性的および定量的検出に使用した。なお、使用するまで氷上もしくは 4℃に保管した。

2) 生菌数の計数

検体液を 10 倍階段希釈にて 10^{-2} 希釈液まで作製し、検体液原液は 0.2 mL ずつを標準寒天培地 5 枚に塗抹し、 10^{-1} および 10^{-2} 希釈液については 0.1 mL ずつを標準寒天培地にそれぞれ 2 枚ずつ塗抹し、37℃で 48 時間培養を行い、生育コロニーの計数を行った。

3) 定性的な STEC 7 血清群の検出

定性的な検出方法の流れを図 1-1 に示

す。

3-1) 検体からの DNA 抽出

検体液はサンプリングバッグのまま、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$ で15-24時間培養を行った。この培養液から DNA アルカリ熱抽出を行った。培養液 $100 \mu\text{L}$ をマイクロチューブに入れ、 $10,000 \text{ g}$ で10分間遠心し、上清を取り除き、 50 mM の水酸化ナトリウム $85 \mu\text{L}$ に懸濁した。 100°C のヒートブロックで10分間加熱し氷で急冷後、 1M Tris-HCl (pH 7.0) を $15 \mu\text{L}$ 添加して中和した。 $10,000 \text{ g}$ で10分間遠心した上清 $100 \mu\text{L}$ を新しいマイクロチューブに移したものを DNA 抽出液とした。この DNA 抽出液をマルチプレックスリアルタイム PCR のテンプレートとして用いた。

3-2) STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

プライマーセット Assay1 (*stx/eae*) ではベロ毒素遺伝子 (*stx* 遺伝子) およびインチミンタンパク質遺伝子 (*eae* 遺伝子) を、Assay2 (16S/0157) では 16SrRNA 遺伝子および 0157 遺伝子、Assay3 (026/0111) では 026 遺伝子および 0111 遺伝子、Assay4 (045/0121) では 045 遺伝子および 0121 遺伝子、Assay5 (0103/0145) では 0103 遺伝子および 0145 遺伝子を検出する。プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせおよび配列を表 1-3 に示す。反応液は、DNA 抽出液 $5 \mu\text{L}$ 、 $2 \times$ Environmental Master Mix (サーモフィッシュャー サイエントフィック) $12.5 \mu\text{L}$ 、プライマーおよびプローブを加え、超純水で合計 $25 \mu\text{L}$ になるように調製した。Assay1 から Assay5 の反応溶液の組成および量を表 1-4-1 から表 1-4-5 に示

す。リアルタイム PCR の反応条件は、 95°C で10分を1サイクル、次いで 95°C で15秒、 59°C で1分の組み合わせを45サイクルとした。この増幅反応は Applied Biosystems 7500 を用いて行った。

まず、プライマーセット Assay1 (*stx/eae*) および Assay2 (16S/0157) で増幅を行った。この結果、いずれの遺伝子でも陰性の場合には陰性と判定した。*stx* 遺伝子陰性または *eae* 遺伝子陰性であるが、0157 遺伝子陽性の場合には、0157 抗体の免疫磁気ビーズ法を以下の 3-3) の手順にしたがって行った。*stx* 遺伝子陽性かつ *eae* 遺伝子陽性の場合には、プライマーセット Assay3 (026/0111)、Assay4 (045/0121)、Assay5 (0103/0145) を用いて、上述と同様にリアルタイム PCR を行った。この結果、いずれの 0 群の遺伝子でも陰性の場合には陰性と判定した。いずれかの 0 群の遺伝子で陽性の場合、陽性判定となった 0 群抗体による免疫磁気ビーズ法を以下の 3-3) の手順にしたがって行った。

3-3) STEC 7 血清群の免疫磁気ビーズ法による濃縮および選択培地による単離

免疫磁気ビーズは、免疫磁気ビーズ 026、045、0103、0111、0121、0145、0157「生研」(デンカ株式会社) を用いて行った。マイクロチューブに $25 \mu\text{L}$ の目的とする 0 群抗体の免疫磁気ビーズと培養液 1 mL を入れ転倒混和し、さらに、10分ごとに転倒混和し、30分間反応させた。このマイクロチューブをマグネチックスタンドにセットし、5分間吸着させ、培地を除去し、滅菌した PBS を入れることによりビーズの洗浄を行った。繰り返し洗浄した後、E バッファー(牛血清アルブミン 5 g 、緩衝ペプトン水

に調製し、孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ のフィルターでろ過（滅菌） $1\ \text{mL}$ に懸濁したものをビーズ懸濁液とした。

さらに、酸処理ビーズ懸濁液を作製した。ビーズ懸濁液から $450\ \mu\text{L}$ をマイクロチューブにとり、 1N 塩酸 $25\ \mu\text{L}$ に加えボルテックスミキサーで攪拌し、ローテーターで 1 時間反応させた。

ビーズ懸濁液を E バッファーで 10 倍および 100 倍希釈し、各希釈液 $100\ \mu\text{L}$ をセフィキシム・亜テルル酸 (CT) 加ソルビトールマッコンキー寒天 (SMAC) 培地および CT-クロモアガー-STE C 培地の 2 枚ずつ塗抹した。酸処理ビーズ懸濁液は E バッファーで 2 倍および 20 倍に希釈した液を CT-SMAC 培地および CT-クロモアガー-STE C 培地 2 枚ずつ塗抹した。これらを $36\pm 1^\circ\text{C}$ で 18 – 24 時間培養した。これらの培地上に増殖した疑わしいコロニーに関して、以下の血清凝集試験およびラテックス凝集試験を行った。

3–4) STEC 7 血清群の血清凝集試験およびラテックス凝集試験

血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 の血清は、病原大腸菌免疫血清「生研」（デンカ株式会社）を用い、026、0111、0157 のラテックス凝集試験はスライドラテックス凝集反応による大腸菌 026、0111、0157 鑑別試薬 E. coli 026、0111、0157-F「生研」（デンカ株式会社）を用いて行った。また、7 血清群に凝集試験したものについては、必要に応じて H 抗原の試験を行った。さらに、リアルタイム PCR による確認および最確数 (MPN) 法による定量的な検出を行った。

3–5) コロニーの STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

コロニーを $50\ \mu\text{L}$ の滅菌水に懸濁し、懸濁液を作製した。このコロニーの懸濁液から $25\ \mu\text{L}$ をマイクロチューブにとり、 100°C のヒートブロックで 10 分間加熱し氷で急冷した。これを $10,000\ \text{g}$ で 10 分間遠心し、再度滅菌水に懸濁して DNA 抽出を行った。この抽出液をテンプレートとして、Assay1 および目的とする 0 群によるプライマーを用いて、3–2) と同様にリアルタイム PCR を行った。この結果、陰性の場合には陰性と判定し、陽性の場合には 3–6) の非選択培地による単離を行った。

3–6) コロニー懸濁液からのコロニー再単離

3–5) の懸濁液の残りの $25\ \mu\text{L}$ を Tryptone soya agar (TSA) に画線し、 37°C 、 24 時間培養を行い、コロニーを単離した。コロニーを以下のリアルタイム PCR および性状確認のための生化学的試験に供試した。3–7) 単離したコロニーの STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

3–6) の典型的なコロニーから、3–5) と同様に DNA を熱抽出し、Assay1 および目的とする 0 群について、3–2) と同様にリアルタイム PCR で確認した。

3–8) STEC 7 血清群の生化学的性状試験
ブドウ糖、乳糖および白糖の発酵およびガス産生、硫化水素産生を観察するために Triple sugar iron agar (TSI 寒天培地) を、リジン脱炭酸産生、インドール産生、運動性を観察するために Lysine Indole motility medium (LIM 培地) の培養を行った。なお、STEC の生化学的性状を表 1–5 に示す。試験は 3–7) のリアルタイム PCR に供したコロニーを用いて行った。TSI 寒天

培地および LIM 培地で 37°C、18~24 時間培養を行い、菌の性状を確認した。

4) 定量的な STEC 7 血清群の検出

定量的な検出方法の流れを図 1-2 に示す。

4-1) STEC 7 血清群の MPN 測定

血清凝集試験およびラテックス凝集試験により推定陽性と判断した、培養前の 1 日目に 4°C で保存しておいた検体懸濁液を用いて、MPN 測定を行った。mTSB によって 2 希釈段階 3 本ずつ作成し、42±1°C で 15-24 時間培養した。

細菌の増殖が認められた培養液を用いて、Assay1 および目的とする 0 群のリアルタイム PCR を行った。

4-2) STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

「4-1)」で増殖した培養液 25 μL をマイクロチューブにとり、3-5) と同様に DNA を熱抽出し、Assay1 および目的とする 0 群について、3-2) と同様にリアルタイム PCR で確認した。Assay1 陽性かつ 0 群陽性の場合、陽性判定となった 0 群抗体による免疫磁気ビーズ法を行った。

4-3) STEC 7 血清群の免疫磁気ビーズ法による濃縮および選択培地による単離

3-3) の免疫磁気ビーズ法 (酸処理は行わない) と同様に、濃縮し、CT-SMAC 培地および CT-クロモアガー STEC 培地 2 枚ずつ塗抹し、36±1°C で 18-24 時間培養した。これらの培地上に増殖した疑わしいコロニーに関して、血清凝集試験およびラテックス凝集試験を行った。

4-4) STEC 7 血清群の血清凝集試験およびラテックス凝集試験

目的とする 0 群抗体を用いて、3-4)

と同様の手順に従って凝集試験において、凝集が見られたコロニーは、以下のリアルタイム PCR による確認を行なわれた。

4-5) コロニーの STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

3-5) と同様に、コロニーを 50 μL の滅菌水に懸濁し、懸濁液を作製し、DNA を熱抽出し、Assay1 および目的とする 0 群について、3-2) と同様にリアルタイム PCR で確認した。Assay1 陽性かつ 0 群陽性の場合、3-6) と同様に非選択培地による単離を行った。

4-6) コロニー懸濁液からのコロニー再単離

4-5) の懸濁液の残りの 25 μL を 3-6) と同様に TSA 培地に画線し、37°C、24 時間培養を行い、コロニーを単離した。コロニーを以下のリアルタイム PCR および性状確認のための生化学的試験に供試した。

4-7) 単離したコロニーの STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

4-6) の典型的なコロニーから、3-5) と同様に DNA を熱抽出し、Assay1 および目的とする 0 群について、3-2) と同様にリアルタイム PCR で確認した。

4-8) 生化学的性状試験

3-8) と同様に、TSI 寒天培地および LIM 培地による性状確認を行った。

5) *stx* 遺伝子陽性かつ *eae* 遺伝子陽性の 7 血清以外の大腸菌の分離

上記 1) から 4) の一連の検出方法において、7 血清群の STEC が分離されなかった推定陽性検体について、増菌培養でのリアルタイム PCR の結果と合致する大腸菌があるか否か、再検討を行った。まず、1) で一

80°Cで凍結保存しておいた溶液を室温で解凍し、この溶液 500 μ L に対して 4.5 mL の TBS を加え、42 \pm 1°C で 18 時間増菌培養した。この増菌培養液を任意の血清群を用いて 3-3) と同様に免疫ビーズ法によって濃縮を行った。このビーズ懸濁液は E バッファーで 10⁻⁶ まで 10 倍階段希釈し、各希釈液それぞれ 100 μ L ずつを SMAC 培地、CT-SMAC 培地クロモアガー-STECC 培地、CT-クロモアガー-STECC 培地に 1 枚ずつ塗抹し、36 \pm 1°C で 18-24 時間培養した。これらの培地上に増殖した疑わしいコロニーに関して、3-5) と同様にリアルタイム PCR をおこなった。

この結果、陽性検体に関して 3-6) と同様に非選択培地による単離を行い、3-7) と同様に単離したコロニーのリアルタイム PCR による判定を行い、3-8) と同様に生化学的性状試験を行った。

2. 牛肉の消毒効果の検討

(1) 菌株

026、045、0103、0111、0121、0145、0157 の 7 血清群の STECC を対象とし、国立医薬品食品衛生研究所保有している菌株 (ESC97、ESC425、ESC469、ESC530、ESC545、ESC548、ESC555) を供試した。

(2) 牛肉検体、

検体として供試する牛肉は、小売店から購入したブロック肉 (豪州産) を用いた。このブロック肉を約 5.5 cm 角、厚さ約 0.5 cm (約 20 - 30 g) にクリーンベンチ内で無菌的に切り分けた。切り分けた検体は、重量を測定した。

(3) 接種菌液の調製

接種菌液は、半流動性のカジトン培地に室温保存されている各菌株を、それぞれ 10

mL の Tryptone soya broth (TSB) に植菌し、37°C で 18 時間静置培養したものを用いた。これらの菌液を、4°C、5,000 rpm、15 分間遠心し、滅菌した PBS または TSB に再懸濁することを 2 回行ったものを接種菌液とした。試験を行うまで、これらの菌液は氷上もしくは 4°C で使用するまで保存した (最長 3 日間)。

なお、これら接種菌液中の菌数は、平板培養法で計数した。接種菌液を PBS 1.8 mL を 6 本用いて 10 倍階段希釈を行い、10⁻⁶ 希釈液までを作製し、10⁻⁵ 希釈液 (約 1 \times 10³ CFU/mL) および 10⁻⁶ 希釈液 (約 1 \times 10² CFU/mL) 0.1 mL ずつを TSA およびクロモアガー-STECC に 5 枚に塗抹し、TSA は 37°C で 24 時間、クロモアガー-STECC は 37°C で 20 時間、培養し計数した。

(4) 消毒液の調製

効果を検証する消毒液は、酸性の消毒液として「食品、添加物等の規格基準」(昭和 34 年厚生省告示第 370 号) に平成 25 年以降に新たに指定添加物として使用が認められた過酢酸製剤を、アルカリ性の消毒液として同規格基準に記載され従前より使用が認められている指定添加物である次亜塩素酸ナトリウム (次亜塩素酸ソーダ) を、中性の消毒液として一般飲食物添加物であるエタノール (エチルアルコール) を用いた。なお、使用時の各 pH は表 2-1 に示したように、過酢酸は約 pH 3 から 4、次亜塩素酸ナトリウムは約 pH 9、エタノールは約 pH 6.7 であった。

過酢酸製剤は「ダイヤパワー (低濃度過酢酸) (三菱ガス化学株式会社)」(過酢酸 6%、過酸化水素 8%、酢酸 32%、水 54%) を用いた。滅菌した純水 (滅菌水) で希釈して

100、200、500、1,000 ppm に調製し、供試した。

次亜塩素酸ナトリウムは「ピューラックス（株式会社オーヤラックス）」（次亜塩素酸ナトリウム6%）を用いた。過酢酸製剤と同様に、滅菌した純水（滅菌水）で希釈して100、200、300、600 ppm に調製し、供試した。

エタノールは「消毒用エタノール『コザカイ・M』」（小塚製薬株式会社）（15℃で76.9 - 81.4 vol%）用い、販売濃度で供試した。

なお、対照用溶液は滅菌水を用いた。

（5）消毒液の STEC への直接効果の検証

1）PBS 懸濁菌液での消毒液の効果

消毒液および菌液は、上述の方法に従って作製したものを供試した。検体である牛肉に接種する状態の菌液（PBS 懸濁）について、各消毒液の効果の確認を行った。過酢酸および次亜塩素酸ナトリウムはともに最も低い濃度である 100 ppm のみで試験を行った。

各菌液を 100 μ L ずつポリスチレンチューブ（PS チューブ）に分注し、試験を実施するまで氷上もしくは4℃で保存した。菌液が入った PS チューブにそれぞれの消毒液を 10 mL 添加し、ピペッティングにより混合した。消毒液添加 30 秒後に 0.1 mL とり、この原液を TSA に塗抹し、滅菌水の場合は、0.9 mL の PBS 4 本を用いて 10 倍階段希釈を行い、 10^{-4} 希釈液までを作製し、原液から 10^{-4} 希釈液 0.1 mL ずつを TSA に塗抹し、37℃で 24 時間培養し、コロニー数計数を行った。消毒液の効果は、この計数の結果から判定した。

2）TSB 懸濁菌液での消毒液の効果

「1）PBS 懸濁菌液での消毒液の効果」の

PBS の代わりに、有機物が豊富な TSB に菌を懸濁し、各消毒液の効果は「1）PBS 懸濁菌液での消毒液の効果」と同様に検証した。

（6）消毒液の肉汚染 STEC への効果の検証

1）消毒液 2 回噴霧の効果

消毒液噴霧の効果の検証方法を図 2-1 に示す。検体は、上述の「（2）牛肉検体」の方法に従って切り分けた牛肉を用いた。菌液は、上述の「（3）接種菌液の調製」の方法に従って作製し PBS に再懸濁した。

滅菌した 1 本の竹串に 1 検体を刺し、菌液を 10 μ L ずつ 5 カ所（合計 50 μ L）に接種し、15 分間室温保存することによって菌液を検体に浸透させた。この菌汚染検体を 4 個作製し、3 個は刺した竹串を垂直に固定し、検体ごとに各消毒液を 2 回噴霧し、消毒液が流れ落ちない状態になるまで室温で 5 分間立てた状態で、消毒液の液切れを行った。

各検体から竹串を外してそれぞれストマッカー袋に入れ、それぞれ検体の 10 倍量になるように滅菌済みの PBS を添加し、1 分間ストマッカーを行ったものを乳剤とした。なお、過酢酸による消毒処理の場合は、0.1%のチオ硫酸ナトリウムで中和してからストマッカーを行った。これらの乳剤を、それぞれ 0.9 mL の PBS 3 本を用いて 10 倍階段希釈を行い、 10^{-3} 希釈液までを作製した。非処理検体については 10^{-1} から 10^{-3} 希釈液 0.1 mL ずつを、処理検体については、原液から 10^{-4} 希釈液 0.1 mL ずつを、TSA とクロモアガー STEC に塗抹し、37℃で 24 時間培養し計数した。

2）消毒液 10 回噴霧の効果

「1）消毒液 2 回噴霧の効果」の回数を 10 回に変更し、消毒液の液切り時間も 10 分間

に延長した。さらに、検体を筋に沿って切り分ける方法（枝肉表面）で切り分けたものを供した。この検体の大きさは、「1）消毒液2回噴霧の効果」の検体とほぼ同じ大きさにした。

これらを用いて、「1）消毒液2回噴霧の効果」と同様の方法（図2-1）で、噴霧回数を10回に変更して噴霧効果の試験を行い、同様に乳剤を作製し、菌数の計数を行った。

3）消毒液浸漬の効果（浸漬）

消毒液浸漬の効果の検証方法を図2-2に示す。検体は、上述の「（2）牛肉検体」の方法に従って切り分けた牛肉を用いた。切り分けた検体に、「1）消毒液2回噴霧の効果」と同様に菌液を接種し、菌液を浸透させた。この菌汚染検体を滅菌ピンセットで50 mLの消毒液に沈めてから持ち上げることを20秒間で10回繰り返した。消毒液が流れ落ちない状態になったものをストッカー袋に入れ、「1）消毒液2回噴霧の効果」と同様に乳剤を作製し、計数を行った。

4）消毒液かけ流しの効果（かけ流し）

「1）消毒液2回噴霧の効果」と同様に検体を竹串に刺した汚染検体を作製した。消毒液を噴霧する代わりに、検体ごとにそれぞれの消毒液20 mLをシリンジで5回（合計100 mL）かけ流しを行った（図2-1）。乳剤の作製は、かけ流し5分後および1時間後に行い、「1）消毒液2回噴霧の効果」と同様に乳剤を作製し、計数を行った。

C. 研究結果

1. 牛枝肉のSTEC調査

（1）生菌数

全ての検体の生菌数の結果を採材日、施

設記号および牛の情報とともに表1-6に示す。検体の生菌数は、750 CFU/cm²から非検出（0.11 CFU/cm²未満）まであり、値のばらつきは大きかった。生菌数が検出されない27頭を除いた153頭の生菌数は12.2 ± 63.10（平均±SD）CFU/cm²であり変動係数（CV）=5.17であった（表1-7）。

雌雄で比較すると、オスは118頭のうち生菌数が検出されない22頭を除いた96頭では16.1 ± 79.15 CFU/cm²（CV=4.92）であるのに対して、メスは62頭のうち生菌数が検出されない5頭を除いた57頭では5.6 ± 8.07 CFU/cm²（CV=1.45）であった（表1-7）。オスの方がメスより生菌数の値が高く、そのばらつきが大きいといえる。しかし、オスでは、100 CFU/cm²を超えるウシが、検体B19（11月16日に採材した黒毛和種、30か月、去勢有）から750 CFU/cm²、検体B24（11月23日に採材した褐毛和種、29か月、去勢有）から171.7 CFU/cm²、検体B57（12月7日に採材した褐毛和種、29か月、去勢有）から119.3 CFU/cm²、検体B94（1月12日に採材した交雑種、27か月、去勢有）から107.8 CFU/cm²が検出され、雌雄合計の180頭中4頭（2.2%）が100 CFU/cm²を超えた。ちなみに、これらの生菌数の値を除いたオス92頭で平均値およびSDを算出した。その結果、4.3 ± 8.55 CFU/cm²（CV=2.0）となり、メスの5.6 ± 8.07 CFU/cm²（CV=1.45）と近い値となった。全ての検体の生菌数は、100 CFU/cm²を超える4頭の値を除いた149頭で算出すると4.8 ± 8.39 CFU/cm²（CV=1.76）となった。

ウシの種類別の生菌数を表1-7に示す。黒毛和種および褐毛和種の値がともに平均値が2桁であり他の種類と比べて高い値と

なり、それぞれ 20.4 ± 104.58 CFU/cm² (CV=5.13)、 67.0 ± 66.50 CFU/cm² (CV=0.99) であった。これらには、生菌数 100 CFU/cm² を超えるウシが黒毛和種には 1 頭 (B19)、褐毛和種には 2 頭 (B24、B57) 含まれている。これらの値を除いて平均値を算出すると、黒毛和種は 5.5 ± 8.54 CFU/cm² (CV=1.56)、褐毛和種は 14.7 ± 6.36 CFU/cm² (CV=0.43) となった。褐毛和種は、D 施設で採材の褐毛和種 2 頭 (B3、B56 の値がやや高い値ではあるが、黒毛和種はほかの種類牛とはほぼ同様な値となった。

施設別の生菌数の結果を表 1-8 に示す。A 施設は、36 頭中の 13 頭から生菌数が検出されず、生菌数非検出の頭数が最も多かった。検出した生菌数も最も少なく 0.5 ± 0.95 CFU/cm² であった。採材期間を通して、平均生菌数が最も多かった施設は D 施設であった。平均生菌数は 43.9 ± 124.58 CFU/cm² であり、100 CFU/cm² を超える頭が 4 頭あった。この施設の生菌数は採材月の 11 月から 2 月にかけて減少した。100 CFU/cm² を超えるウシは、11 月に 2 頭、12 月と 1 月に 1 頭ずつ検出されており、各月の生菌数は 88.3 ± 204.41 CFU/cm²、 33.0 ± 40.62 CFU/cm²、 18.6 ± 32.40 CFU/cm² であった。100 CFU/cm² を超えるウシの生菌数を除いた値で算出すると、それぞれ 13.7 ± 10.02 CFU/cm²、 15.8 ± 13.90 CFU/cm²、 7.5 ± 7.94 CFU/cm² となり、11 月から 2 月の平均生菌数も 13.4 ± 11.62 CFU/cm² となったが、他の施設に比較すると若干高い傾向である。

月別で算出した生菌数の結果を表 1-9 に示す。11 月から 2 月の平均生菌数は、 26.9 ± 117.44 CFU/cm² (CV=4.37)、 10.2 ± 26.08 CFU/cm² (CV=2.56)、 5.95 ± 15.29

CFU/cm² (CV=2.57)、 6.06 ± 9.89 CFU/cm² (CV=1.63) であり、月を追うごとに減少する傾向がみられるが、100 CFU/cm² を超えるウシが 11 月に 2 頭 (B19：黒毛和種および B24：褐毛和種、12 月に 1 頭 (B57、褐毛和種)、1 月に 1 頭 (B94、交雑種) が検出された。100 CFU/cm² を超えるウシの生菌数を除いた値で算出すると、11 月は 4.6 ± 7.61 CFU/cm² (CV=1.65)、12 月は 4.8 ± 9.46 CFU/cm² (CV=1.99)、1 月は 4.2 ± 7.47 CFU/cm² (CV=1.78) となり、2 月の生菌数の値に近い値であった。

(2) 血清群 0157 大腸菌の分離

定性的な検出 (図 1-1) のうち、検体を mTSB によって増菌培養し、STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR を行った結果を表 1-10 に示す。

リアルタイム PCR を行ったもののうち、Assay2 の 0157 遺伝子が陽性かつ、Assay1 の *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子がともに陽性であった検体は、B56 (2020 年 12 月 7 日に D 施設で採材した褐毛和種、30 か月、雄、去勢有) であり、Assay1 の *eae* 遺伝子のみ陽性であった検体は、B67 (2020 年 12 月 14 日に D 施設で採材した黒毛和種、29 か月、雄、去勢有) であった。

これらの検体増菌培養液を 3-3) による濃縮後、CT-SMAC 培地および CT-クロモアガー-STEC 培地に塗抹、培養し、生育したコロニーのうち血清群 0157 と疑われるコロニーを釣菌し、3-4) に従って 0157 のラテックス凝集試験を行い、リアルタイム PCR の Assay1 および Assay2 を実施した。

また、定量的な検出 (図 1-2) も同時に行った。4-1) および 4-2) に従って MPN 測定およびリアルタイム PCR を行った

結果を表1-11に示す。MPN測定で濁りの認められたチューブ3本に対して、リアルタイムPCRのAssay1およびAssay2を実施したが、全て陰性であったため、定量試験は終了した。

検体B56では、釣菌した33コロニーのうち3コロニーは*stx*遺伝子、*eae*遺伝子、0157遺伝子ともに陰性であったが、30コロニーは*stx*遺伝子、*eae*遺伝子、0157遺伝子ともに陽性であった。また、これら30コロニーは、血清型0157:H7であった(表1-13)。検体B67は釣菌した3コロニーすべて*stx*遺伝子、*eae*遺伝子、0157遺伝子ともに陰性であった。

(3) 0157以外の血清群の大腸菌の分離

「(2) 血清群0157大腸菌の分離」と同様に、定性的な検出(図1-1)として、検体をmTSBによって増菌培養し、STEC7血清群のマルチプレックスリアルタイムPCRを行った結果を表1-10に示す。

リアルタイムPCRを行ったもののうち、16SrRNA遺伝子(Assay2)が陽性かつ、Assay1の*stx*遺伝子および*eae*遺伝子が共に陽性であった検体は、検体B1(2020年11月9日にD施設で採材したホルスタイン、92か月、雌、産経有)および検体B3(2020年11月9日にD施設で採材した褐毛和種、43か月、雌、産経有)、検体B21(2020年11月16日にD施設で採材した黒毛和種、30か月、雄、去勢有)、検体B24(2020年11月23日にD施設で採材した褐毛和種、29か月、雄、去勢有)、検体B88(2021年1月12日にA施設で採材したホルスタイン、20か月、雄、去勢有)、検体B120(2021年1月19日にF施設で採材した交雑種、26か月、雄、去勢無)、検体B130(2021年1月25日

にB施設で採材した黒毛和種、28か月、雄、去勢有)、検体B148(2021年2月1日にA施設で採材したホルスタイン、19か月、雄、去勢有)の8検体であった(表1-10)。これらの検体には、Assay3、4、5を行った。

その結果、検体B3はAssay5の0103遺伝子、検体B120はAssay4の045遺伝子が陽性であったため、各検体の増菌培養液を「(2) 血清群0157大腸菌の分離」と同様に、各血清群の免疫磁気ビーズによる濃縮法を行い、得られた濃縮液をCT-SMAC培地およびCT-クロモアガー-STEC培地に塗抹し、培養した。これらの培地に生育したコロニーを釣菌し、検体B3には0103血清、検体B120には045血清で凝集試験を行い、検体B3にはAssay1、2、5、検体B120にはAssay1、2、4を行った。

検体B3では、釣菌した10コロニーのうち、5コロニーは*stx*遺伝子、*eae*遺伝子、0103遺伝子いずれも陰性であり、残りの5コロニーは*eae*遺伝子および0103遺伝子で陽性であったが、*stx*遺伝子が陰性であったため、検体B3は0103陰性と判定した。

検体B120では、釣菌した18コロニーのうち、1コロニーで*stx*遺伝子および*eae*遺伝子ともに陽性であるが045遺伝子は陰性、3コロニーで*eae*遺伝子陽性あるが*stx*遺伝子および045遺伝子はともに陰性、14コロニーで*stx*遺伝子、*eae*遺伝子、045遺伝子のいずれも陰性であったため、検体B120は045陰性と判定した。

検体B3は、凝集結果および0103遺伝子が陽性であったため、定量的な検出(図1-2)を行った。MPN測定および、これらのリアルタイムPCRの結果を表1-11に示す。MPN測定で濁りの認められたチューブ7本

に対して、Assay1 および Assay5 を実施したが、全て陰性であったため定量試験を終了した。

(4) *stx* 陽性および *eae* 陽性の 7 血清以外の菌株の分離

検体 B3、検体 B67 および検体 B120 の増菌培養後のリアルタイム PCR の結果を表 1-13 に示す。

検体 B3 の増菌培養した培養液のリアルタイム PCR の結果は、Assay1 の *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子、Assay5 の 0103 遺伝子が陽性であった (表 1-10) が、この 3 つの遺伝子がともに陽性である株は上述のように分離されなかった。そこで、「1) 検体の調製」で-80℃に保存してあった検体溶液から各遺伝子のいずれかが陽性である株の分離を検討した。-80℃に保存してあった検体溶液を増菌培養した培養液のリアルタイム PCR を行った結果は、表 1-10 と同様に *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子および 0103 遺伝子がいずれも陽性であった (表 1-13)。この増菌培養液を 3-3) および 3-4) に従って免疫ビーズ法で濃縮後、4 つの選択培地に塗抹し、出現した約 730 コロニーに関して 3-5) に従ってリアルタイム PCR の Assay1 および Assay5 を行った。陽性コロニーを 3-6) に従って単離を行った。単離コロニーを 3-7) に従ってリアルタイム PCR の Assay1 および Assay5 で確認を行うとともに、3-8) に従って生化学性状試験を行った。この結果、TSI および LIM 培地において大腸菌であると判定されたコロニーを保存株とし、*stx*(-)/*eae*(+)/0103(+) の 9 株、*stx*1(+)*stx*2(-)/*eae*(-)/0103(-) の 5 株を保存した (表 1-13)。

検体 B67 は、Assay1 の *eae* 遺伝子および

Assay2 の 0157 遺伝子が陽性であった (表 1-10) が、-80℃に保存してあった検体溶液を増菌培養した培養液のリアルタイム PCR の結果は、0157 遺伝子のみが陽性であった。検体 B3 と同様に濃縮し、選択培地で増殖した 6 コロニーについて検討した結果、1 コロニーで *stx*(-)/*eae*(-)/0157(+) として検出された。このコロニーを検体 B3 と同様に非選択培地で単離し、リアルタイム PCR および生化学性状試験を行った結果、陽性であると判定されたため、この 1 株を保存した (表 1-13)。

検体 B120 は、Assay1 の *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子、Assay4 の 045 遺伝子が陽性であった (表 1-10) が、-80℃に保存してあった検体溶液を増菌培養した培養液のリアルタイム PCR の結果は、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陽性であった。検体 B3 と同様に濃縮し、選択培地で増殖した約 350 コロニーで検体 B3 と同様に検討した結果、2 コロニーで *stx*(-)/*eae*(+)/045(-) として検出された。これらのコロニーを検体 B3 と同様に非選択培地で単離し、リアルタイム PCR および生化学性状試験を行った結果、陽性であると判定されたため、これら 2 株を保存した (表 1-13)。

2. 牛肉の消毒効果の検討

(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証

1) PBS 懸濁菌液での消毒液の効果

実験 1-1 では、検体牛肉に供する状態の菌液 (PBS 懸濁) の各消毒液の効果を検討した。消毒液に関しては対象とするすべての血清群について試験を行い、対照となる滅菌水に関しては、血清群 045、0121、0145、0157 について試験を行った。

この結果 (表 2-2)、全ての STEC の血

清株について、消毒液を添加では菌は検出されなかった。滅菌水の添加の場合は、血清群 045、0121、0145、0157 は、それぞれ 8.9 ± 0.02 、 9.0 ± 0.04 、 8.7 ± 0.54 、 8.7 ± 0.05 log CFU/mL であった。

2) TSB 懸濁菌液での消毒液の効果

さらに、豊富に有機物を含む TSB に再懸濁して各消毒液の効果を検討した。有機物による消毒効果の低減を考慮したためである。消毒液および対照となる滅菌水に関してすべての血清群について試験を行った。

この結果(表 2-2)、「1) PBS 懸濁」と同様に、全ての STEC の血清株について、消毒液を添加では菌は検出されなかった。滅菌水の添加の場合は、血清群 026、045、0103、0111、0121、0145、0157 は、それぞれ 9.0 ± 0.08 、 8.9 ± 0.05 、 8.8 ± 0.08 、 8.8 ± 0.08 、 8.9 ± 0.05 、 8.9 ± 0.01 、 8.9 ± 0.06 log CFU/mL であった。

最も低い濃度で菌が検出されなかったことから、試験に用いるすべての消毒液に消毒効果があることが確認された。

(2) 消毒液の肉汚染 STEC への効果の検証

STEC を PBS に再懸濁し接種した汚染牛肉に対する消毒効果を検討した。噴霧効果による検証では、噴霧による消毒を行った。1 回あたりの噴霧量は表 2-1 にあるように、いずれの消毒液も約 0.8 mL である。

1) 消毒液 2 回噴霧の効果

過酢酸に関しては「(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証」の 5 倍濃度 (500 ppm) で、次亜塩素酸ナトリウムに関しては 6 倍濃度 (600 ppm) で、計算上「(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証」の菌液あたりの消毒効果は 1.6 倍と 0.96 倍と見積もられる。

すべての血清群に関して、過酢酸の 500 ppm と 1,000 ppm、エタノールおよび対照となる滅菌水の噴霧を行った。この結果、過酢酸(表 2-3)の 500 ppm では TSA は $7.2 - 7.4$ log CFU/片、クロモアガー STEC は $7.1 - 7.3$ log CFU/片であり、1,000 ppm では TSA は $7.2 - 7.5$ log CFU/片、クロモアガー STEC は $7.0 - 7.3$ log CFU/片であり、滅菌水(表 2-6)では TSA は $7.3 - 7.6$ log CFU/片、クロモアガー STEC は $7.3 - 7.8$ log CFU/片であり、対照となる滅菌水と消毒液での差は認められなかった。

次亜塩素酸ナトリウムに関しては、高濃度(300ppm および 600ppm)について、0103 と 0157 で試験を行った。この結果、次亜塩素酸ナトリウム(表 2-4)の 300 ppm では、0103 の TSA は 7.5 ± 0.10 log CFU/片、クロモアガー STEC は 7.5 ± 0.28 log CFU/片であり、0157 の TSA は 7.5 ± 0.08 log CFU/片、クロモアガー STEC は 7.4 ± 0.14 log CFU/片であり、600 ppm では、0103 の TSA は 7.5 ± 0.05 log CFU/片、クロモアガー STEC は 7.4 ± 0.18 log CFU/片であり、0157 の TSA は 7.3 ± 0.10 log CFU/片、クロモアガー STEC は 7.3 ± 0.15 log CFU/片であった。これらの値は対照となる滅菌水とほぼ同じであり、過酢酸と同様に、消毒効果は認められなかった。

エタノールでは、2 回噴霧(約 1.6 mL)

「(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証」の 0.32 倍の消毒効力と見積もられる。対象とした全ての血清群について試験を行った。この結果(表 2-5)、検出された菌数は TSA で $7.3 - 7.4$ log CFU/片、クロモアガー STEC で $7.2 - 8.1$ log CFU/片であった。これらの値は対照となる滅菌水とほぼ同じで

あり、過酢酸、次亜塩素酸ナトリウムと同様に、消毒効果は認められなかった。

2) 消毒液 10 回噴霧の効果

10 回噴霧の量は、「(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証」の 1.3 倍の消毒液量を菌体に接触させる計算となる。過酢酸および次亜塩素酸ナトリウムで最も高い濃度（それぞれ、1,000 ppm と 600 ppm）に関して、0157 で試験を行った。この結果、過酢酸 1,000 ppm（表 2-3）では TSA は 7.3 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 7.2 log CFU/片であり、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm（表 2-4）では TSA およびクロモアガーSTEC はともに 7.4 log CFU/片であった。いずれの場合も「1) 消毒液 2 回噴霧の効果」とほぼ同じ値であり、消毒効果は認められなかった。

そこで、牛肉片の状態および菌液の浸透状態を考慮し、枝肉に類似するように筋に沿った切り方の肉片で、過酢酸および次亜塩素酸ナトリウムで最も高い濃度（それぞれ、1,000 ppm および 600 ppm）、エタノール、滅菌水で同様な 10 回噴霧による消毒を試みた。この結果、過酢酸 1,000 ppm（表 2-3）では TSA は 7.3 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 7.2 log CFU/片、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm（表 2-4）では TSA は 7.0 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 6.9 log CFU/片、エタノール（表 2-5）では TSA は 7.2 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 7.1 log CFU/片、対照となる滅菌水（表 2-6）では TSA は 7.2 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 7.3 log CFU/片の菌数が検出された。対照となる滅菌水と各消毒液の値はほぼ同じであり、消毒効果は認められなかった。

3) 消毒液浸漬の効果（浸漬）

これは、「(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証」の 10 倍量の消毒液に菌体を接触させる計算であり、汚染検体のほぼ倍量の消毒液に検体を浸漬させる試験である。すべての消毒液の全濃度に関して、0157 を用いて試験を行った。この結果、過酢酸（表 2-3）の TSA では 100、200、500、1,000 ppm でそれぞれ 7.0、6.9、6.8、6.7 log CFU/片、クロモアガーSTEC ではそれぞれ 7.1、6.9、6.8、6.7 log CFU/片であり、濃度が高くなるにつれ菌の検出数が低くなる傾向が見られた。次亜塩素酸ナトリウム（表 2-4）の TSA では 100、200、300 ppm はともに 7.1 log CFU/片、600 ppm は 7.0 log CFU/片であり、クロモアガーSTEC では 100 および 200 ppm はともに 7.1 log CFU/片、300 ppm は 7.0 log CFU/片、600 ppm は 6.9 log CFU/片であった。最も高い濃度（600 ppm）でも過酢酸の 100 および 200 ppm とほぼ同様の菌数であったが、濃度が高くなるにつれ菌の検出数が若干低くなる傾向が見られた。

エタノール（表 2-5）では TSA およびクロモアガーSTEC はともに 6.8 log CFU/片であり、過酢酸の 500 ppm とほぼ同様の菌数であった。この値は次亜塩素酸ナトリウムの最も高い濃度（600 ppm）より若干低い値である。

対照となる滅菌水（表 2-6）では TSA は 7.2 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 7.0 log CFU/片であり、「1) 消毒液 2 回噴霧の効果」と同様に接種菌液の菌数とほぼ同じであった。

検体の倍量の消毒液に検体を浸漬させた場合、高濃度の過酢酸およびエタノールで、

若干の消毒効果が見られた。

4) 消毒液かけ流しの効果 (かけ流し)

「1) 消毒液2回噴霧の効果」、「2) 消毒液10回噴霧の効果」および「3) 消毒液浸漬の効果 (浸漬)」の結果を踏まえて、菌体が消毒液と接触する量をさらに増やし、

「(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証」の20倍量の消毒液を菌体に接触させた。さらに、消毒液に菌体を留めることによる消毒効果の低減を避けるため、菌体の洗い流しによる除去効果を狙って、消毒液によるかけ流しを行った。また、乾燥による殺菌効果も期待し、消毒終了5分後および1時間後で菌数の測定を行った。過酢酸および次亜塩素酸ナトリウムでは最も高い濃度 (それぞれ、1,000 ppm および 600 ppm) および対照となる滅菌水について、0157 で試験を行った。

かけ流し5分後の結果は、過酢酸 1,000 ppm (表2-3) では TSA は 5.4 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 5.5 log CFU/片であり、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm (表2-4) では TSA およびクロモアガーSTEC はともに 5.8 log CFU/片であり、対照となる滅菌水では TSA は 6.1 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 6.0 log CFU/片であった。いずれの場合も接種菌液より約1桁の減少がみられた。

かけ流し1時間後の結果は、過酢酸 1,000 ppm (表2-3) では TSA は 5.7 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 5.6 log CFU/片であり、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm (表2-4) では TSA とクロモアガーSTEC はともに 5.9 log CFU/片であり、対照となる滅菌水では TSA は 5.8 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 5.9 log CFU/片であり、1時間後

の菌数は、過酢酸、次亜塩素酸ナトリウム、滅菌水において検出菌数の差はみられず、また、1時間後の方が、5分後の値より、若干高い傾向があった。

D. 考察

1. 牛枝肉の STEC 調査

牛など反芻動物は、STEC 0157:H7 の保菌動物として重要とされており (1、2)、ヒトでの本菌感染にウシに関連する食品が報告されている (3)。ウシの STEC 0157:H7 の保菌率は、これまで 0 - 27.3% であるといわれている (4) が、ほとんどのウシ由来の株 (bovine strains) はヒトが発病する病原因子を持っていないことも知られている (1)。

糞便中の STEC 0157:H7 の濃度は、 10^2 から 10^6 CFU/g と個体によって異なり (5)、 10^7 CFU/g の高濃度が検出されることもあるが、ほとんどの場合 10~100 CFU/g 未満である (6、7)。牛枝肉汚染および牛糞中の含有率は相関がある (8) という報告があるが、細菌が腸外に潜伏するために、糞便の排出と牛枝肉汚染はほとんど相関がない (9) ともいわれている。また、ウシの STEC 0157 保菌には年齢と出産が関係し、保菌率は2歳の牛で最も高く、それ以上の年齢の動物では減少し、未経産牛 (1歳以上の動物) は保菌率が低く (10)、菌の排出は、生後2か月未満および生後6か月以上の子牛と比較して生後2~6か月の子牛で最も高いとの報告がある (11)。

今回、STEC 0157 の検出されたウシの糞便中の STEC の有無の調査をしていないため生体の保菌について不明だが、調査すれば有益と考えられる。また、この検体の生

菌数は、他の検体に比較して1から2桁高かったこと(表1-8)から、と畜段階の環境の影響の可能性も考えられる。

季節性に関しては、ウシのSTEC 0157の保有率はヒトと同様に温帯気候では春の終わりから秋の初めに比較的高いといわれている(1, 12)。今回は、サンプリング期間が冬季の連続した4か月であったが、月別の生菌数の変動(表1-9)はみられなかった。今後は、他の季節での調査を行う必要がある。

2. 牛肉の消毒効果の検討

検証を行った消毒液の特徴として、過酢酸は、すべての微生物に対して即効性を有することである(25)。特有な特徴として、分解生成物は、酢酸、水、酸素、過酸化水素であり、有害な分解生成物が生じないことであり、残留物が残らない、有機物の除去が促進されること(26)などがあげられる。銅、真鍮、青銅、普通銅、亜鉛メッキ鋼板を腐食させるが、腐食作用は、添加物やpH調製剤により抑制できる。希釈した場合は、不安定であるとされ、1%溶液の濃度は加水分解により6日間で半減するが、40%過酢酸の有効成分の減少は1か月あたり1-2%である(27)。

作用機序については、ほとんどわかっていない(25)が、他の酸化剤と同様に、タンパク質を変性させる、細胞壁の透過性を変化させる、酵素やほかの代謝物のスルフヒドリル基および硫黄結合を酸化させるなど(27)といわれている。殺菌作用として、グラム陽性およびグラム陰性菌、真菌、および酵母を100 ppm未満、5分以内で不活性化する。有機物の存在下では200から500 ppmが必要である

次亜塩素酸塩は、最も広く使用されている塩素消毒液あり、次亜塩素酸ナトリウムのような液状のものと次亜塩素酸カルシウムなどの固形のものがあるが市販されている。もっとも普及している塩素製品は、次亜塩素酸ナトリウム水溶液の「ブリーチ」と称された家庭用漂白剤である。特徴として、広域スペクトルの抗菌活性があり、有毒な残渣を残さない、水の硬度に影響されない、安価で即効性がある(28)、乾燥または固着した微生物やバイオフィルムを表面から除去できる(29)、重大な毒性率が低い(30、31)であるが、高濃度(>500 ppm)での金属に対する腐食性、有機物による不活性化、漂白作用、アンモニアまたは酸との混合による有毒ガスの発生(20、21)、相対的安定性があること(22)などは、欠点としてあげられる。

塩素性の殺菌作用の大部分は非解離型次亜塩素酸(HClO)によるものであり、HClOの解離は、pHに依存しているため、塩素の消毒効果は、pHが上昇するとともに低下する(24、25)。微生物に対する正確な作用機序は明らかにされていない(25)が、微生物の不活性化はいくつもの要因によって、あるいは重要部位への作用によって生じると考えられている(23)。スルフヒドリル基やアミノ基の酸化、アミノ酸環の塩素置換、細胞成分の減少、栄養分の取り込み低下、呼吸成分の酸化、ATPの産生減少、DNA損傷、DNA合成の抑制などである(24、23)。

低濃度の遊離塩素は、有機負荷がない場合、栄養型の細菌(5 μm未満)は数秒で殺菌作用を示す(24、26)。AOACの使用希釈倍率法による100 ppmの遊離塩素(6%次亜塩素酸ナトリウムを含む家庭用漂白剤)では60

倍希釈に相当) によって、 10^6 - 10^7 の黄色ブドウ球菌、*Salmonella choleraesuis*、緑膿菌は10分未満で死滅する(22)。

消毒薬としてのアルコールは、エチルアルコール(エタノール)とイソプロピルアルコールであり、栄養型細菌に対しては迅速な殺菌作用を示すが、殺菌活性は50%以下の濃度に希釈した場合急激に低下し、至適殺菌濃度は60から90%水溶液(v/v)である(27、28)。エタノールの殺菌活性はさまざまな濃度で調査され(27)、緑膿菌は30-100%(v/v)で、セラチア、大腸菌、チフス菌は40-100%によって、10秒で死滅した。グラム陽性球菌はわずかに抵抗性があり、65-95%によって10秒で死滅した。

アルコールの作用機序としては、タンパク質の変性が妥当な説明である(25)。これは、無水エタノールや脱水剤より、水の存在下の方が急激に変性すること(28、29)からも裏付けられる。

このような知見を踏まえ、「(1)消毒液のSTECへの直接効果の検証」を過酢酸および次亜塩素酸ナトリウムは100 ppmで、エタノールは市販の使用濃度で行った。この結果、有機物を含まないPBS懸濁菌液および有機物を含有するTSB懸濁菌液、ともに検討したすべての菌液でSTECは死滅した。次亜塩素酸ナトリウムは、有機物による効力の低下があるとされ、エタノールは希釈による効果の低減が言われているが、今回の有機物濃度や希釈倍率では、利用したすべての消毒薬への効力低減の影響はなく、従来の知見と合致した。

過酢酸製剤の食品に対する使用基準(30)は、過酢酸では「鶏の食肉にあつては浸漬液又は噴霧液1 kgにつき2.0 g(2,000 ppm)

以下、牛および豚の食肉にあつては浸漬液又は噴霧液1 kgにつき1.80 g(1,800 ppm)以下、果実および野菜にあつては浸漬液又は噴霧液1 kgにつき0.080 g(800 ppm)以下」である。そこで、本研究では1,000 ppmを上限とし、100、200、500、1,000 ppmを使用濃度とした。

次亜塩素酸ナトリウムの食品に対する使用基準は「ごまに使用してはならない。」(30)とされるだけであり、濃度の基準はない。医療現場では、5.25-6.15%の市販品を10から100倍に希釈して利用し、手指に対しては500 ppmを上限に使用されている。牛肉表面の殺菌を目的としたSally et al.(2012)の試験では600 ppmを上限として行っているため、本研究では600 ppmを上限とし、100、200、300、600 ppmを使用濃度とした。

消毒液の噴霧効果として、まず、高濃度消毒液2回噴霧である「(1)消毒液2回噴霧の効果」を行ったが、いずれの消毒液でも滅菌水との差は認められなかった(表2-3から4)。そこで、噴霧回数を10回に増やした「(2)消毒液10回噴霧の効果」を行った。この場合、消毒液の効力は「(1)消毒液のSTECへの直接効果の検証」と比較して、過酢酸1,000 ppmでは16倍、次亜塩素酸ナトリウム600 ppmでは9.6倍、エタノールでは1.6倍に相当するが、いずれの場合も「(1)消毒液2回噴霧の効果」とほぼ変わりがなく、消毒効果は認められなかった(表2-3から4)。なお、細菌懸濁液の浸透の程度を考慮し、牛肉の筋に沿った切り方、また、処理後の時間配分を変えた場合でも、同様に効果は認められなかった(表2-3から4)。

これらの結果から、噴霧ではなく、食鳥処理場等においてカンピロバクターの汚染低減策（31）で試みられた消毒液への浸漬による効果「3）消毒液浸漬の効果（浸漬）」を検討した。消毒液の量は菌液に対して「（1）消毒液の STEC への直接効果の検証」の 10 倍量としたため、菌液当たりの消毒効力は「（1）消毒液の STEC への直接効果の検証」と比較して、過酢酸 200、500、1,000 ppm では、それぞれ 20、50、100 倍、次亜塩素酸ナトリウム 300、600 ppm では、それぞれ 30、60 倍、エタノールでは 10 倍に相当する。この結果、過酢酸では 200 ppm でわずかに減少の傾向がみられ、濃度が高くなるほど減少する傾向が見られた（表 2-3）。次亜塩素酸ナトリウムでも、300 ppm より 600 ppm の方が減少する傾向がみられた（表 2-4）。エタノールでも減少する傾向が見られ、浸漬効果はあることが考えられた（表 2-5）。

有機物の影響が大きいと考えられる次亜塩素酸ナトリウムは、浸漬では牛肉による有機物の影響が大きいと考え、多量の消毒液を掛け流すことによる効果を検証した。

「3）消毒液浸漬の効果（浸漬）」との比較のため、過酢酸 1,000 ppm、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm で行い、掛け流す量は「3）消毒液浸漬の効果（浸漬）」の倍量とした。この結果、いずれの場合も、「3）消毒液浸漬の効果（浸漬）」の細菌残存数より 1 桁低い値となった（表 2-3 と 2-4）。

以上のことから、今回のようなスモールスケールでは、エタノールの消毒効力最も高い傾向であり、次亜塩素酸ナトリウムが今回使用した諸毒薬の中では最も有機物の影響を受けやすい結果であった。消毒液の

接触手法は、かけ流しによる効果が最も効果的であったが、消毒液の量が影響しているのか、接触のさせ方の影響であるのかは今回の結果からは結論できない。

E. 結論

1. 牛枝肉の STEC 調査では、2020 年 11 月から 2021 年 2 月に 7 施設の協力のもとに牛枝肉合計 180 検体を供試した。検体を増菌培養後、マルチプレックスリアルタイム PCR 法、血清凝集試験および生化学的性状試験を併用し、同時に生菌数の計数を行った。この結果、1 検体から STEC O157:H7 が分離されたが、1 検体のみであったことからウシの種類や性別などの特徴については考察には至らなかった。STEC O157:H7 が分離された検体において生菌数が比較的高い値を示した。また、全体として検体の生菌数は、15% で検出されず、検出された検体では平均値 17.5 ± 63.50 (平均 \pm SD) CFU/cm² であった。施設による生菌数の違いがあり、ウシや環境状況の要因の可能性が考えられた。今回は冬でのサンプリングであったが、今後、他の季節についての調査も必要と考えられた。

2. 牛肉の消毒効果の検討では、消毒薬として、酸性の過酢酸製剤、アルカリ性の次亜塩素酸ナトリウム（次亜塩素酸ソーダ）、中性のエタノール（エチルアルコール）を選択し、生理食塩水や液体培地中の STEC 浮遊液での消毒効果を検証した。結果として、十分な消毒効果が認められ、STEC 接種牛肉においても消毒液の量を増やすことにより菌数は減る傾向が認められた。今後、さらに消毒方法の検討を行う予定である。

【 参考文献 】

1. Ferens WA, Hovde CJ. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog Dis* 2011;8:465-87.
2. Munns KD, Selinger LB, Stanford K et al. Perspectives on supershedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle. *Foodborne Pathog Dis* 2015;199-103.
3. Callaway TR, Carr MA, Edrington TS et al. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. *Curr Issues Mol Biol* 2009;11:67-79.
4. Hussein HS, Bollinger LM. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *J Food Prot* 2005;68:2224-2241.
5. Zhao T, Doyle MP, Shere J, Garber L. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1290-1293.
6. Fegan N, Vanderlinde P, Higgs G, Desmarchelier P. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J Appl Microbiol* 2004;97:362-370.
7. Widiasih DA, Ido N, Omoe K, et al. Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol Infect* 2004;132:67-75.
8. Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, et al. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2999-3003.
9. Boqvist S, Aspan A, and Eriksson E. Prevalence of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in fecal and ear samples from slaughtered cattle in Sweden. *J Food Prot* 2009;72:1709-1712.
10. Mir RA, Weppelmann TA, Kang M et al. Association between animal age and the prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a cohort of beef cattle. *Vet Microbiol* 2015;175:325-31.
11. Nielsen EM, Tegtmeier C, Andersen HJ et al. Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of Verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms. *Vet Microbiol* 2002;88:245-57.
12. Cobbold RN, Rice DH, Szymanski M, et al. Comparison of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* prevalences among dairy, feedlot, and cow-calf herds in Washington State. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:4375-4378.
13. 医療施設における消毒と滅菌のための CDC ガイドライン 2008 満田 年宏 訳 ヴァン メディカル 2009年3月1日初版

14. Tucker RC, Lestini BJ, Marchent RE. Surface analysis of clinically used expanded PTFE endoscopic tubing treated by the STERIS PROCESS. *ASAIO J.* 1996; 42: 306-13
15. Block SS. Peroxygen compounds. In: Block SS, ed. *Disinfection sterilization, and preservation.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 185-204.
16. Rutala WA, Weber DJ. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10: 597-610.
17. Merritt K, Hitchins VM, Brown SA. Safty and cleaning of medical materials and devices. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 53:131-6.
18. Jakobsson SW, Rajs J, Jonsson JA, Persson H. Poisoning with sodium hypochlorite solution. Report of a fatal care, supplemented with an experimental and clinic-epidemiological study. *Ann. J. Forensic Med. Pathol.* 1991; 12: 320-7.
19. Hoy RH. Accidental systemic exposure to sodium hypochlorite (Clorox) during hemodialysis. *Am. J. Hosp. Pharm.* 1981; 38: 1512-4.
20. Mrvos R, Dean BS, Krenzelok EP. Home exposures to chlorine / chloramine gas: review of 216 cases. *South Med. J.* 1993; 86: 654-7.
21. Gapanavicius M, Yellin A, Almog S, Tirosh M. Pneumomediastinum. A complication of chlorine exposure from mixing household cleaning agents. *JAMA* 1982; 248: 349-50.
22. Rutala WA, Cole EC, Thomann CA, Weber DJ. Stability and bacterial activity of chlorine solutions. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1998; 19: 323-7.
23. Gerba CP, Rusin P. Relationship between the use of antiseptics/disinfection and the development of antimicrobial resistance. In: Rutala WA, ed. *Disinfection, sterilization and antisepsis: principles and practices in healthcare facilities.* Washinton, DC: Association for Professional in Infection Control and Epidemiology, 2001: 187-94.
24. Rutala WA, Cole EC, Thomann CA, Weber DJ. Stability and bacterial activity of chl Dychdala CR. Chlorine and chlorine compounds. In: Block SS, ed. *Disinfection sterilization, and preservation.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 135-157
25. Hoffman PN, Death Coaters D. The stability of sodium hypochlorite solution. In: Collins CH, Allwood MC, Bloomfield SF, Fox A. eds. *Disinfections: their use and evaluation of effectiveness.* London: Academic Press, 1981: 77-83.

26. Lee DH, Miles RJ, Perry BF. The mycoplasmacidal properties of sodium hypochlorite. J. Hyg. (Lond). 1985; 95: 243-53. なし
27. Morton HE. The relationship of concentration and germicide efficiency of ethyl alcohol. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1950; 53: 191-96.
28. Ali Y, Dolan MJ, Fender EI, Lason EL. Alcohols. In: Block SS, ed. Disinfection sterilization, and preservation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 229-54.
29. Morton HE. Alcohols. In: Block SS, ed. Disinfection sterilization, and preservation. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983: 225-239.
30. 厚生省 (1959) 食品、添加物等の規格基準 (昭和 34 年厚生省告示第 370 号)
31. 厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課 (2019) 厚生労働科学研究補助金事業および食鳥肉の汚染低減実証事業により得られた食鳥処理工程における微生物汚染低減策に関する事例集

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

なし

(学会発表)

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

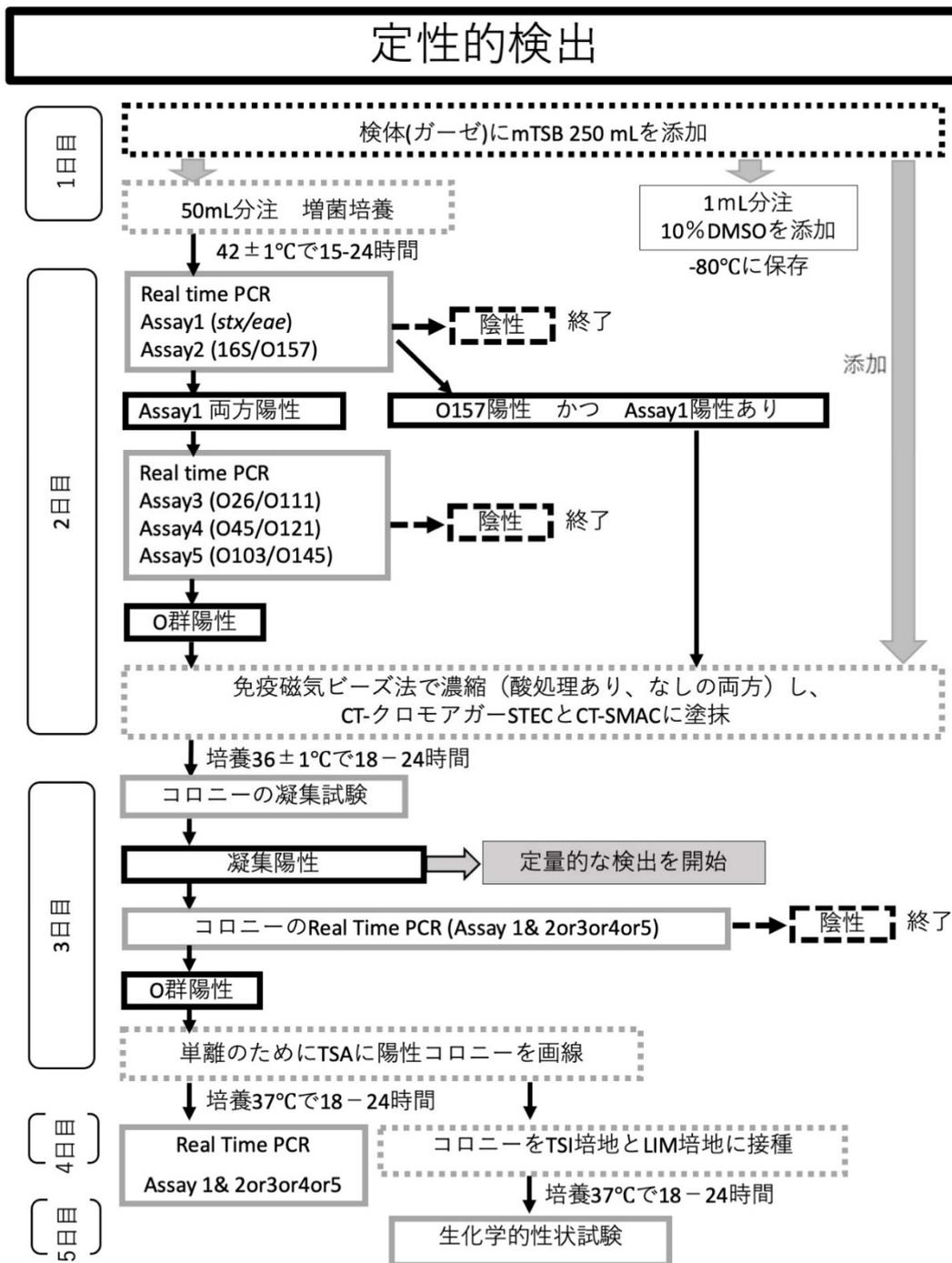


図1-1. 定性的な検出方法

図1-1. 定性的な検出方法

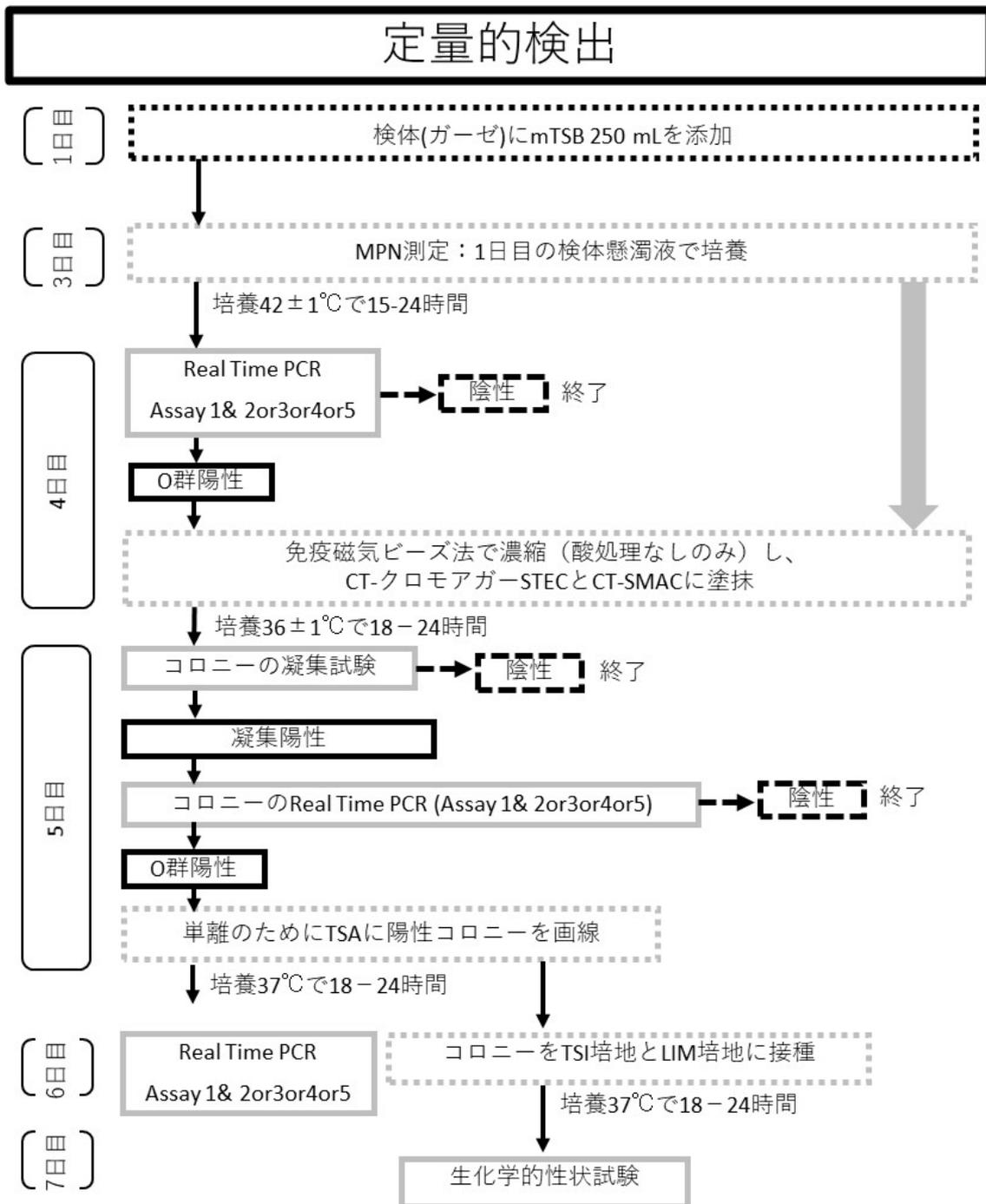


図1-2. 定量的な検出方法

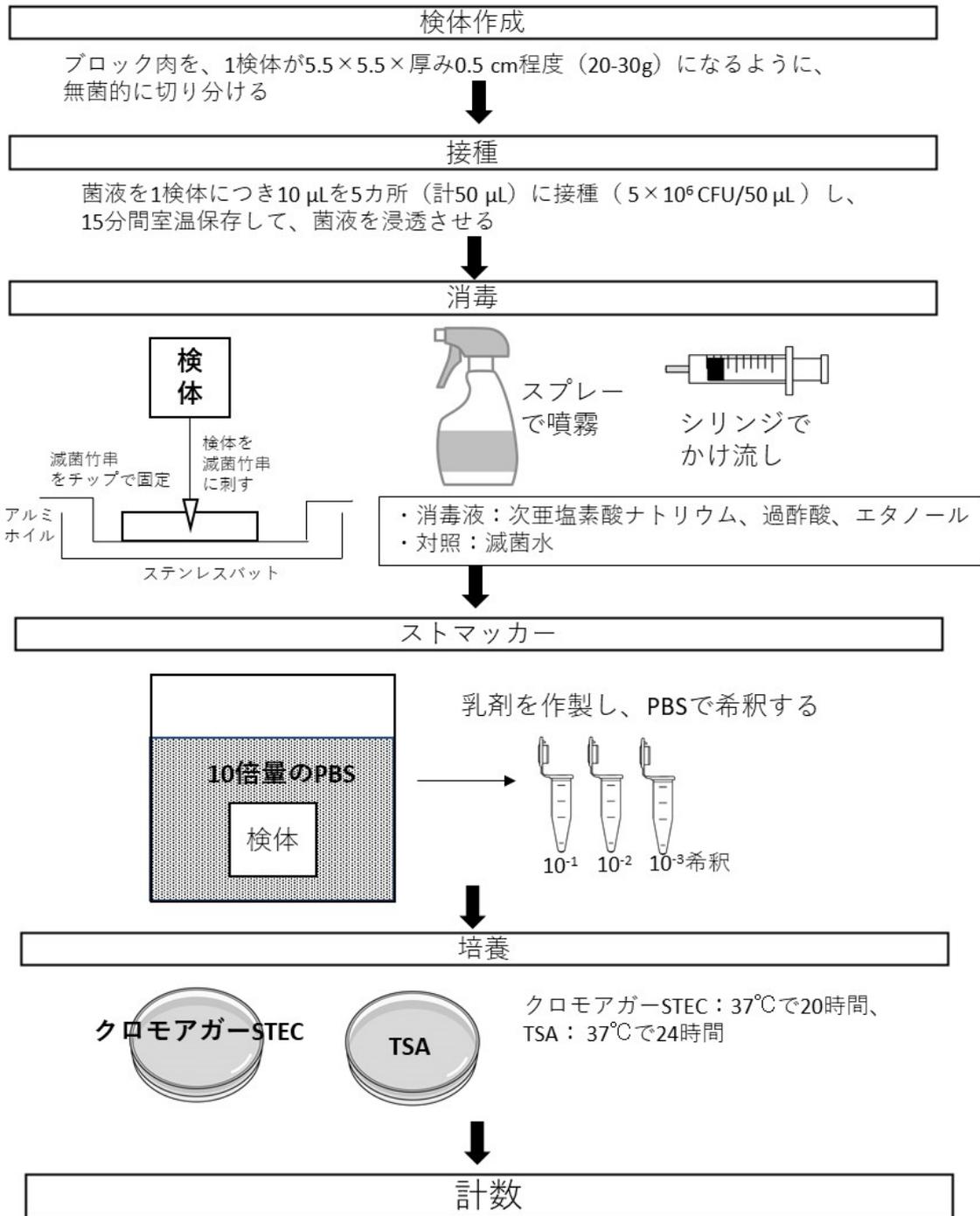


図2-1. 消毒液噴霧およびかけ流しの効果の方法

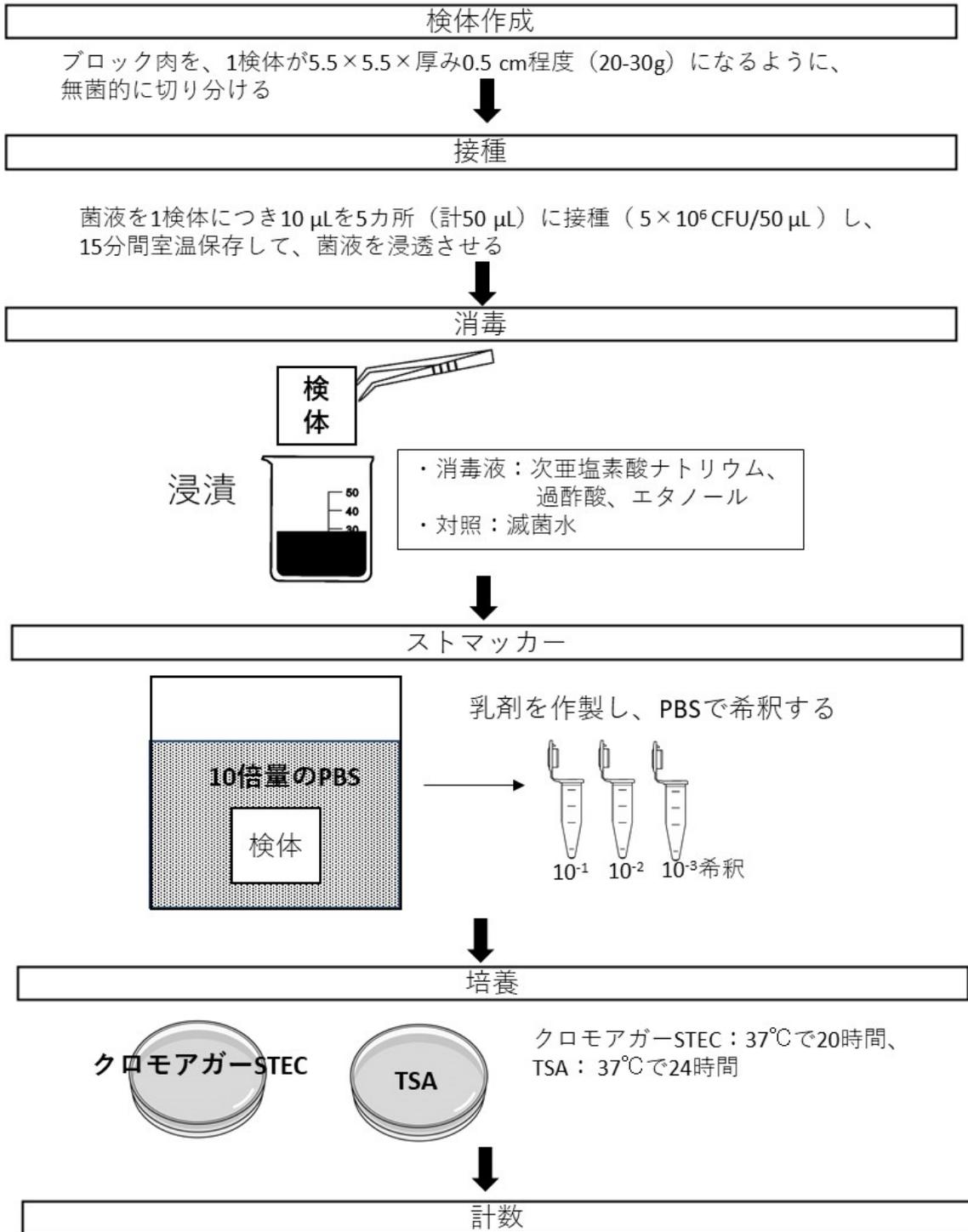


図2-2. 消毒液浸漬の効果の方法

表 1-1. 実施機関、採取日およびウシの情報

No.	採材日	施設記号	牛の種類	月齢 (ヶ月)	性別	経産 の有無	去勢 の有無
B1	2020年11月9日	D施設	ホルスタイン	92	雌	有	-
B2			ホルスタイン	73	雌	有	-
B3			褐毛和種	43	雌	有	-
B4	2020年11月10日	B施設	ホルスタイン	18	雄	-	有
B5			ホルスタイン	18	雄	-	有
B6			ホルスタイン	18	雄	-	有
B7	2020年11月10日	A施設	ホルスタイン	19	雄	-	有
B8			ホルスタイン	19	雄	-	有
B9			ホルスタイン	18	雄	-	有
B10	2020年11月16日	A施設	ホルスタイン	20	雄	-	有
B11			ホルスタイン	20	雄	-	有
B12			ホルスタイン	19	雄	-	有
B13	2020年11月16日	B施設	黒毛和種	26	雄	-	有
B14			黒毛和種	27	雄	-	有
B15			黒毛和種	28	雄	-	有
B16	2020年11月16日	C施設	交雑種	35	雌	無	-
B17			交雑種	29	雌	無	-
B18			交雑種	27	雌	無	-
B19	2020年11月16日	D施設	黒毛和種	30	雄	-	有
B20			黒毛和種	30	雄	-	有
B21			黒毛和種	30	雄	-	有
B22	2020年11月23日	D施設	黒毛和種	26	雄	-	有
B23			黒毛和種	26	雄	-	有
B24			褐毛和種	29	雄	-	有
B25	2020年11月24日	B施設	交雑種	28	雄	-	有
B26			交雑種	23	雌	無	-
B27			交雑種	27	雄	-	有
B28	2020年11月24日	A施設	ホルスタイン	17	雄	-	有
B29			ホルスタイン	18	雄	-	有
B30			ホルスタイン	18	雄	-	有
B31	2020年11月25日	C施設	交雑種	25	雌	無	-
B32			交雑種	25	雌	無	-
B33			交雑種	24	雌	無	-
B34	2020年11月30日	B施設	黒毛和種	26	雄	-	有
B35			黒毛和種	26	雄	-	有
B36			黒毛和種	28	雄	-	有
B37	2020年11月30日	A施設	ホルスタイン	19	雄	-	有
B38			ホルスタイン	18	雄	-	有
B39			ホルスタイン	18	雄	-	有

No.	採材日	施設名	牛の種類	月齢 (ヶ月)	性別	経産 の有無	去勢 の有無
B40	2020年11月30日	C施設	交雑種	29	雌	無	-
B41			交雑種	25	雌	無	-
B42			交雑種	35	雌	無	-
B43	2020年11月30日	D施設	ホルスタイン	87	雌	有	-
B44			ホルスタイン	93	雌	有	-
B45			褐毛和種	24	雌	無	-
B46	2020年12月7日	C施設	交雑種	26	雌	無	-
B47			交雑種	26	雌	無	-
B48			黒毛和種	27	雄	-	有
B49	2020年12月8日	B施設	交雑種	27	雌	無	-
B50			交雑種	26	雌	無	-
B51			交雑種	27	雌	無	-
B52	2020年12月8日	A施設	ホルスタイン	19	雄	-	有
B53			ホルスタイン	20	雄	-	有
B54			ホルスタイン	18	雄	-	有
B55	2020年12月7日	D施設	ホルスタイン	69	雌	有	-
B56			褐毛和種	30	雄	-	有
B57			褐毛和種	29	雄	-	有
B58	2020年12月14日	C施設	黒毛和種	28	雄	-	有
B59			黒毛和種	27	雄	-	有
B60			黒毛和種	28	雄	-	有
B61	2020年12月14日	B施設	黒毛和種	27	雄	-	有
B62			黒毛和種	36	雌	無	-
B63			黒毛和種	32	雌	無	-
B64	2020年12月14日	A施設	ホルスタイン	18	雄	-	有
B65			ホルスタイン	18	雄	-	有
B66			ホルスタイン	18	雄	-	有
B67	2020年12月14日	D施設	黒毛和種	29	雄	-	有
B68			黒毛和種	29	雄	-	有
B69			黒毛和種	29	雄	-	有
B70	2021年1月4日	C施設	黒毛和種	27	雄	-	有
B71			黒毛和種	28	雄	-	有
B72			黒毛和種	29	雄	-	有
B73	2021年1月5日	A施設	ホルスタイン	19	雄	-	有
B74			ホルスタイン	18	雄	-	無
B75			ホルスタイン	19	雄	-	有
B76	2021年1月5日	B施設	交雑種	26	雄	-	有
B77			交雑種	25	雄	-	有
B78			交雑種	25	雄	-	有
B79	2021年1月4日	E施設	ホルスタイン	18.09	雄	-	有
B80			ホルスタイン	19.03	雄	-	有
B81			ホルスタイン	18.22	雄	-	有

No.	採材日	施設名	牛の種類	月齢 (ヶ月)	性別	経産 の有無	去勢 の有無
B82	2021年1月5日	F施設	ホルスタイン種	30	雌	無	-
B83			ホルスタイン種	46	雌	無	-
B84			ホルスタイン種	31	雌	無	-
B85	2021年1月12日	C施設	黒毛和種	160	雌	有	-
B86			黒毛和種	127	雌	有	-
B87			黒毛和種	104	雌	有	-
B88	2021年1月12日	A施設	ホルスタイン	20	雄	-	有
B89			ホルスタイン	20	雄	-	有
B90			ホルスタイン	24	雄	-	有
B91	2021年1月12日	B施設	黒毛和種	28	雄	-	有
B92			黒毛和種	28	雄	-	有
B93			黒毛和種	28	雄	-	有
B94	2021年1月12日	D施設	交雑種	27	雄	-	有
B95			交雑種	27	雄	-	有
B96			交雑種	27	雄	-	有
B97	2021年1月12日	E施設	ジャージー	107	雌	有	-
B98			ホルスタイン	64	雌	有	-
B99			ホルスタイン	120	雌	有	-
B100	2021年1月12日	F施設	ホルスタイン	14	雄	-	有
B101			ホルスタイン	14	雄	-	有
B102			ホルスタイン	14	雄	-	有
B103	2021年1月18日	C施設	黒毛和種	30	雄	-	有
B104			黒毛和種	26	雌	無	-
B105			黒毛和種	27	雌	無	-
B106	2021年1月18日	A施設	ホルスタイン	20	雄	-	有
B107			ホルスタイン	19	雄	-	有
B108			ホルスタイン	20	雄	-	有
B109	2021年1月18日	B施設	黒毛和種	28	雄	-	有
B110			黒毛和種	27	雄	-	有
B111			黒毛和種	29	雄	-	有
B112	2021年1月18日	D施設	ホルスタイン	49	雌	無	-
B113			黒毛和種	91	雌	有	-
B114			黒毛和種	154	雌	有	-
B115	2021年1月18日	E施設	ホルスタイン	18	雄	-	有
B116			ホルスタイン	18	雄	-	有
B117			ホルスタイン	18	雄	-	有
B118	2021年1月19日	F施設	交雑種	25	雌	無	-
B119			交雑種	26	雌	無	-
B120			交雑種	26	雌	無	-
B121	2021年1月19日	G施設	ホルスタイン	17	雄	-	有
B122			ホルスタイン	17	雄	-	有
B123			ホルスタイン	17	雄	-	有

No.	採材日	施設名	牛の種類	月齢 (ヶ月)	性別	経産 の有無	去勢 の有無
B124	2021年1月25日	C施設	ホルスタイン	56	雌	有	-
B125			ホルスタイン	36	雌	無	-
B126			黒毛和種	203	雌	有	-
B127	2021年1月25日	A施設	ホルスタイン	18	雄	-	有
B128			ホルスタイン	18	雄	-	有
B129			ホルスタイン	18	雄	-	有
B130	2021年1月25日	B施設	黒毛和種	28	雄	-	有
B131			黒毛和種	29	雄	-	有
B132			黒毛和種	31	雌	無	-
B133	2021年1月25日	D施設	ホルスタイン	61	雌	有	-
B134			ホルスタイン	38	雌	有	-
B135			ホルスタイン	97	雌	有	-
B136	2021年1月25日	E施設	交雑種	24.18	雄	-	有
B137			交雑種	24.01	雄	-	有
B138			交雑種	23.24	雄	-	有
B139	2021年1月26日	F施設	ホルスタイン種	40.22	雌	無	-
B140			ホルスタイン種	28.29	雌	無	-
B141			ホルスタイン種	25.22	雌	無	-
B142	2021年1月26日	G施設	ホルスタイン	18	雄	-	有
B143			ホルスタイン	17	雄	-	有
B144			ホルスタイン	17	雄	-	有
B145	2021年2月1日	C施設	ホルスタイン	23	雌	無	-
B146			黒毛和種	28	雄	-	有
B147			黒毛和種	28	雄	-	有
B148	2021年2月1日	A施設	ホルスタイン	19	雄	-	有
B149			ホルスタイン	18	雄	-	有
B150			ホルスタイン	18	雄	-	有
B151	2021年2月1日	B施設	黒毛和種	28	雄	-	有
B152			黒毛和種	29	雄	-	有
B153			黒毛和種	29	雄	-	有
B154	2021年2月1日	D施設	黒毛和種	24	雌	無	-
B155			黒毛和種	24	雌	無	-
B156			黒毛和種	24	雌	無	-
B157	2021年2月2日	G施設	ホルスタイン	18	雄	-	有
B158			ホルスタイン	18	雄	-	有
B159			ホルスタイン	18	雄	-	有
B160	2021年2月8日	C施設	短角	30	雄	-	有
B161			短角	30	雄	-	有
B162			短角	30	雄	-	有
B163	2021年2月8日	A施設	ホルスタイン	20	雄	-	有
B164			ホルスタイン	20	雄	-	有
B165			ホルスタイン	20	雄	-	有

No.	採材日	施設名	牛の種類	月齢 (ヶ月)	性別	経産 の有無	去勢 の有無
B166	2021年2月8日	B施設	黒毛和種	28	雌	無	－
B167			黒毛和種	28	雌	無	－
B168			黒毛和種	28	雄	－	有
B169	2021年2月8日	D施設	黒毛和種	25	雄	－	有
B170			黒毛和種	24	雌	無	－
B171			黒毛和種	24	雌	無	－
B172	2021年2月15日	C施設	黒毛和種	72	雌	有	－
B173			交雑種	28	雌	無	－
B174			交雑種	25	雌	無	－
B175	2021年2月16日	G施設	ホルスタイン	18	雄	－	有
B176			ホルスタイン	18	雄	－	有
B177			ホルスタイン	18	雄	－	有
B178	2021年2月22日	D施設	交雑種	28	雄	－	有
B179			交雑種	27	雄	－	有
B180			交雑種	28	雄	－	有

表 1-2. 牛の種類、性、齢 および 個体数

種類	合計 個体数	性別	個体数	齢の幅 (ヶ月)	齢 (ヶ月)	
						個体数
ホルスタイン	80	雄	60	14 - 24	20未満	49
					20以上30未満	11
					30以上	0
		雌	20	23 - 120	20未満	0
					20以上30未満	3
					30以上	17
黒毛和種	57	雄	38	25 - 30	20未満	0
					20以上30未満	34
					30以上	4
		雌	19	24 - 203	20未満	0
					20以上30未満	9
					30以上	10
交雑種	34	雄	14	23 - 28	20未満	0
					20以上30未満	14
					30以上	0
		雌	20	23 - 35	20未満	0
					20以上30未満	18
					30以上	2
褐毛和種	5	雄	3	29 - 30	20未満	0
					20以上30未満	2
					30以上	1
		雌	2	24-43	20未満	0
					20以上30未満	1
					30以上	1
短角	3	雄	3	30	20未満	0
					20以上30未満	0
					30以上	3
		雌	0	-	20未満	-
					20以上30未満	-
					30以上	-
ジャージー種	1	雄	0	-	20未満	-
					20以上30未満	-
					30以上	-
		雌	1	107	20未満	0
					20以上30未満	0
					30以上	1

表 1-3. プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせと配列

アッセイ名	標的 遺伝子	プライマー とプローブ	配列	出典
Assay1	Stx	Stx-F	5' TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG 3'	USDA
		Stx-R	5'CCCCAGTTCARWGTRAGRTC MACDTC 3'	
		Stx1-P	5' FAM-CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTA A-BHQ_1 3'	
		Stx2-P	5' FAM-TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC- MGB 3'	
eaeA		Eae-F	5' CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA 3'	USDA
		Eae-R	5' CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTM 3'	
		Eae-P	5' HEX-ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC-BHQ_1 3'	
Assay2	16S rRNA gene	16S rRNA-F	5' CCT CTT GCC ATC GGA TGT G 3'	USDA
		16S rRNA-R	5' GGC TGG TCA TCC TCT CAG ACC 3'	
		16S rRNA-P	5' HEX-GTG GGG TAA CGG CTC ACC TAG GCG AC- BHQ_1 3'	
	RfbEO157	RfbE O157-F	5'-TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCA A-3'	EFSA
RfbE O157-R	5'-CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT-3'			
RfbE O157-P	5' FAM-AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG-BHQ_1 3'			
Assay3	WzxO26	Wzx O26-F	5' GTA TCG CTG AAA TTA GAA GCG C 3'	USDA
		Wzx O26-R	5' AGT TGA AAC ACC CGT AAT GGC 3'	
		Wzx O26-P	5' 56-FAM-TGG TTC GGT TGG ATT GTC CAT AAG AGG G- 3BHQ_1 3'	
	WbdIO11 1	WbdI O111-F	5' TGT TCC AGG TGG TAG GAT TCG 3'	USDA
		WbdI O111-R	5' TCA CGA TGT TGA TCA TCT GGG 3'	
		WbdI O111-P	5' 5MAXN - TGA AGG CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GC- 3IABkFQ 3'	
Assay4	WzxO45	Wzx O45-F	5' CGT TGT GCA TGG TGG CAT 3'	USDA
		Wzx O45-R	5' TGG CCA AAC CAA CTA TGA ACT G 3'	
		Wzx O45-P	5' 56-FAM- ATT TTT TGC TGC AAG TGG GCT GTC CA- 3BHQ_1 3'	
	WzxO121	Wzx O121-F	5' AGG CGC TGT TTG GTC TCT TAG A 3'	USDA
		Wzx O121-R	5' GAA CCG AAA TGA TGG GTG CT 3'	
		Wzx O121-P	5' 5MAXN - CGC TAT CAT GGC GGG ACA ATG ACA GTG C- 3IABkFQ 3'	
Assay5	WzxO103	Wzx O103-F	5' TTG GAG CGT TAA CTG GAC CT 3'	USDA
		Wzx O103-R	5' ATA TTC GCT ATA TCT TCT TGC GGC 3'	
		Wzx O103-P	5' HEX- AGG CTT ATC TGG CTG TTC TTA CTA CGG C- BHQ-1 3'	
	WzxO145	Wzx O145-F	5' AAA CTG GGA TTG GAC GTG G 3'	USDA
		Wzx O145-R	5' CCC AAA ACT TCT AGG CCC G 3'	
		Wzx O145-P	5' FAM-TGC TAA TTG CAG CCC TTG CAC TAC GAG GC-BHQ_1 3'	

USDA: USDA, Laboratory Guidebook, MLG 5C Appendix 4.01

EFSA: EFSA Journal. 11:3138, 2013

表 1-4-1. Assay1 stx1&2, eae gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2×Taqman Environmental Mastermix	12.50		
Primer stx F (50 μM)	0.63	1.25	
Primer stx R (50 μM)	0.63	1.25	
Primer Eae F (50 μM)	0.50	1.00	
Primer Eae R (50 μM)	0.50	1.00	
Probe stx1 P (5 μM)	1.25	0.25	FAM
Probe stx2 P (5 μM)	1.25	0.25	FAM
Probe Eae-P (5 μM)	1.00	0.20	HEX
滅菌蒸留水	1.74		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-4-2. Assay2 0157, 16S rRNA gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2×Taqman Environmental Mastermix	12.50		
Primer 16SRna-F (20 μM)	0.20	0.16	
Primer 16SRna-R (20μM)	0.20	0.16	
Primer RfbE-O157-F (20μM)	0.25	0.20	
Primer RfbE-O157-R (20μM)	0.25	0.20	
Probe 16SrRNA-P (5 μM)	0.50	0.10	HEX
Probe RfbE-O157-P (5 μM)	0.25	0.05	FAM
滅菌蒸留水	5.85		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-4-3. Assay3 026, 0111 gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2× Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O26 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O26 R (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wbdl O111 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wbdl O111 R (20 μM)	0.31	0.25	
Probe Wzx O26 P (2 μM)	1.88	0.15	FAM
Probe Wbdl O111 P (5 μM)	1.00	0.20	HEX
滅菌蒸留水	3.38		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-4-4. Assay4 045, 0121 gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2× Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O45 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O45 R (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O121 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O121 R (20 μM)	0.31	0.25	
Probe Wzx O45 P (2 μM)	2.34	0.19	FAM
Probe Wzx O121 P (5 μM)	1.00	0.20	HEX
滅菌蒸留水	2.92		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-4-5. Assay5 0103, 0145 gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2 × Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O103 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O103 R (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O145 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O145 R (20 μM)	0.31	0.25	
Probe Wzx O103 P (5 μM)	1.00	0.20	FAM
Probe Wzx O145 P (2 μM)	2.50	0.20	HEX
滅菌蒸留水	2.76		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-5. 大腸菌の生化学的性状

培地	血清型			
	O157: H7	O157: H-	その他の主な血清型	
TSI寒天	斜面	+	+	+
	高層	+	+	+
	硫化水素産生	-	-	-
	ガス産生	+	+	+
LIM培地	リジン	+	+	+
	インドール	+	+	+
	運動性	+	-	+

表 1-6. 生菌数と牛の情報

No.	採材日	施設記号	牛の種類	月齢 (ヶ月)	性別	生菌数 (CFU/cm ²)
B1	2020年11月9日	D施設	ホルスタイン	92	雌	10.63
B2			ホルスタイン	73	雌	5.67
B3			褐毛和種	43	雌	20.89
B4	2020年11月10日	B施設	ホルスタイン	18	雄	1.22
B5			ホルスタイン	18	雄	1.78
B6			ホルスタイン	18	雄	1.00
B7	2020年11月10日	A施設	ホルスタイン	19	雄	0.11
B8			ホルスタイン	19	雄	0.11
B9			ホルスタイン	18	雄	0.56
B10	2020年11月16日	A施設	ホルスタイン	20	雄	0.22
B11			ホルスタイン	20	雄	0.11
B12			ホルスタイン	19	雄	0.22
B13	2020年11月16日	B施設	黒毛和種	26	雄	2.22
B14			黒毛和種	27	雄	0.67
B15			黒毛和種	28	雄	非検出
B16	2020年11月16日	C施設	交雑種	35	雌	1.56
B17			交雑種	29	雌	1.80
B18			交雑種	27	雌	0.11
B19	2020年11月16日	D施設	黒毛和種	30	雄	750.00
B20			黒毛和種	30	雄	27.11
B21			黒毛和種	30	雄	13.56
B22	2020年11月23日	D施設	黒毛和種	26	雄	27.33
B23			黒毛和種	26	雄	25.00
B24			褐毛和種	29	雄	171.66
B25	2020年11月24日	B施設	交雑種	28	雄	0.22
B26			交雑種	23	雌	0.67
B27			交雑種	27	雄	1.33
B28	2020年11月24日	A施設	ホルスタイン	17	雄	0.33
B29			ホルスタイン	18	雄	0.67
B30			ホルスタイン	18	雄	非検出
B31	2020年11月25日	C施設	交雑種	25	雌	2.56
B32			交雑種	25	雌	1.33
B33			交雑種	24	雌	5.89
B34	2020年11月30日	B施設	黒毛和種	26	雄	0.67
B35			黒毛和種	26	雄	2.44
B36			黒毛和種	28	雄	非検出
B37	2020年11月30日	A施設	ホルスタイン	19	雄	非検出
B38			ホルスタイン	18	雄	0.22
B39			ホルスタイン	18	雄	0.11

No.	採材日	施設記号	牛の種類	月齢 (ヶ月)	性別	生菌数 (CFU/cm ²)
B40	2020年11月30日	C施設	交雑種	29	雌	11.00
B41			交雑種	25	雌	1.78
B42			交雑種	35	雌	1.11
B43	2020年11月30日	D施設	ホルスタイン	87	雌	1.33
B44			ホルスタイン	93	雌	3.11
B45			黒毛和種	24	雌	2.78
B46	2020年12月7日	C施設	交雑種	26	雌	1.78
B47			交雑種	26	雌	1.44
B48			黒毛和種	27	雄	0.56
B49	2020年12月8日	B施設	交雑種	27	雌	0.56
B50			交雑種	26	雌	0.11
B51			交雑種	27	雌	非検出
B52	2020年12月8日	A施設	ホルスタイン	19	雄	非検出
B53			ホルスタイン	20	雄	非検出
B54			ホルスタイン	18	雄	0.11
B55	2020年12月7日	D施設	ホルスタイン	69	雌	38.70
B56			褐毛和種	30	雄	20.40
B57			褐毛和種	29	雄	119.30
B58	2020年12月14日	C施設	黒毛和種	28	雄	1.22
B59			黒毛和種	27	雄	0.78
B60			黒毛和種	28	雄	1.11
B61	2020年12月14日	B施設	黒毛和種	27	雄	3.33
B62			黒毛和種	36	雌	0.33
B63			黒毛和種	32	雌	3.78
B64	2020年12月14日	A施設	ホルスタイン	18	雄	0.78
B65			ホルスタイン	18	雄	0.11
B66			ホルスタイン	18	雄	0.22
B67	2020年12月14日	D施設	黒毛和種	29	雄	17.00
B68			黒毛和種	29	雄	0.89
B69			黒毛和種	29	雄	1.78
B70	2021年1月4日	C施設	黒毛和種	27	雄	2.89
B71			黒毛和種	28	雄	2.22
B72			黒毛和種	29	雄	0.22
B73	2021年1月5日	A施設	ホルスタイン	19	雄	非検出
B74			ホルスタイン	18	雄	2.89
B75			ホルスタイン	19	雄	0.11
B76	2021年1月5日	B施設	交雑種	26	雄	35.20
B77			交雑種	25	雄	0.78
B78			交雑種	25	雄	30.90
B79	2021年1月4日	E施設	ホルスタイン	18	雄	0.33
B80			ホルスタイン	19	雄	1.00
B81			ホルスタイン	18	雄	非検出

No.	採材日	施設記号	牛の種類	月齢 (ヶ月)	性別	生菌数 (CFU/cm ²)
B82	2021年1月5日	F施設	ホルスタイン	30	雌	0.22
B83			ホルスタイン	46	雌	21.70
B84			ホルスタイン	31	雌	0.67
B85	2021年1月12日	C施設	黒毛和種	160	雌	0.22
B86			黒毛和種	127	雌	2.67
B87			黒毛和種	104	雌	2.89
B88	2021年1月12日	A施設	ホルスタイン	20	雄	4.00
B89			ホルスタイン	20	雄	非検出
B90			ホルスタイン	24	雄	0.33
B91	2021年1月12日	B施設	黒毛和種	28	雄	非検出
B92			黒毛和種	28	雄	0.67
B93			黒毛和種	28	雄	1.22
B94	2021年1月12日	D施設	交雑種	27	雄	107.80
B95			交雑種	27	雄	7.22
B96			交雑種	27	雄	27.10
B97	2021年1月12日	E施設	ジャージー	107	雌	0.83
B98			ホルスタイン	64	雌	非検出
B99			ホルスタイン	120	雌	1.33
B100	2021年1月12日	F施設	ホルスタイン	14	雄	3.78
B101			ホルスタイン	14	雄	10.20
B102			ホルスタイン	14	雄	8.89
B103	2021年1月18日	C施設	黒毛和種	30	雄	非検出
B104			黒毛和種	26	雌	0.11
B105			黒毛和種	27	雌	非検出
B106	2021年1月18日	A施設	ホルスタイン	20	雄	0.22
B107			ホルスタイン	19	雄	非検出
B108			ホルスタイン	20	雄	0.22
B109	2021年1月18日	B施設	黒毛和種	28	雄	0.22
B110			黒毛和種	27	雄	0.44
B111			黒毛和種	29	雄	0.11
B112	2021年1月18日	D施設	ホルスタイン	49	雌	8.33
B113			黒毛和種	91	雌	2.44
B114			黒毛和種	154	雌	2.00
B115	2021年1月18日	E施設	ホルスタイン	18	雄	非検出
B116			ホルスタイン	18	雄	非検出
B117			ホルスタイン	18	雄	非検出
B118	2021年1月19日	F施設	交雑種	25	雌	0.67
B119			交雑種	26	雌	11.00
B120			交雑種	26	雌	13.10
B121	2021年1月19日	G施設	ホルスタイン	17	雄	0.33
B122			ホルスタイン	17	雄	5.89
B123			ホルスタイン	17	雄	0.44

No.	採材日	施設記号	牛の種類	月齢 (ヶ月)	性別	生菌数 (CFU/cm ²)
B124	2021年1月25日	C施設	ホルスタイン	56	雌	1.33
B125			ホルスタイン	36	雌	非検出
B126			黒毛和種	203	雌	非検出
B127	2021年1月25日	A施設	ホルスタイン	18	雄	非検出
B128			ホルスタイン	18	雄	非検出
B129			ホルスタイン	18	雄	非検出
B130	2021年1月25日	B施設	黒毛和種	28	雄	0.22
B131			黒毛和種	29	雄	0.11
B132			黒毛和種	31	雌	0.22
B133	2021年1月25日	D施設	ホルスタイン	61	雌	1.11
B134			ホルスタイン	38	雌	2.89
B135			ホルスタイン	97	雌	8.89
B136	2021年1月25日	E施設	交雑種	24	雄	0.11
B137			交雑種	24	雄	0.11
B138			交雑種	23	雄	0.22
B139	2021年1月26日	F施設	ホルスタイン	40	雌	4.56
B140			ホルスタイン	28	雌	1.22
B141			ホルスタイン	25	雌	5.44
B142	2021年1月26日	G施設	ホルスタイン	18	雄	0.44
B143			ホルスタイン	17	雄	0.44
B144			ホルスタイン	17	雄	0.11
B145	2021年2月1日	C施設	ホルスタイン	23	雌	5.67
B146			黒毛和種	28	雄	0.22
B147			黒毛和種	28	雄	0.78
B148	2021年2月1日	A施設	ホルスタイン	19	雄	0.33
B149			ホルスタイン	18	雄	非検出
B150			ホルスタイン	18	雄	0.11
B151	2021年2月1日	B施設	黒毛和種	28	雄	非検出
B152			黒毛和種	29	雄	3.78
B153			黒毛和種	29	雄	0.56
B154	2021年2月1日	D施設	黒毛和種	24	雌	9.33
B155			黒毛和種	24	雌	5.44
B156			黒毛和種	24	雌	26.70
B157	2021年2月2日	G施設	ホルスタイン	18	雄	0.67
B158			ホルスタイン	18	雄	1.78
B159			ホルスタイン	18	雄	1.22
B160	2021年2月8日	C施設	短角	30	雄	0.22
B161			短角	30	雄	14.00
B162			短角	30	雄	0.44
B163	2021年2月8日	A施設	ホルスタイン	20	雄	非検出
B164			ホルスタイン	20	雄	非検出
B165			ホルスタイン	20	雄	0.33

No.	採材日	施設記号	牛の種類	月齢 (ヶ月)	性別	生菌数 (CFU/cm ²)
B166	2021年2月8日	B施設	黒毛和種	28	雌	2.22
B167			黒毛和種	28	雌	0.56
B168			黒毛和種	28	雄	1.78
B169	2021年2月8日	D施設	黒毛和種	25	雄	13.70
B170			黒毛和種	24	雌	21.80
B171			黒毛和種	24	雌	29.00
B172	2021年2月15日	C施設	黒毛和種	72	雌	3.33
B173			交雑種	28	雌	0.89
B174			交雑種	25	雌	0.44
B175	2021年2月16日	G施設	ホルスタイン	18	雄	0.56
B176			ホルスタイン	18	雄	0.33
B177			ホルスタイン	18	雄	0.22
B178	2021年2月22日	D施設	交雑種	28	雄	1.78
B179			交雑種	27	雄	4.78
B180			交雑種	28	雄	41.00

非検出は、0.11 CFU/cm²未満

表 1-7. ウシの種類別、性別の生菌数

		試験 個体数	生菌検出* 個体数	生菌数** (平均±SD CFU/cm ²)
ウシの種類	ホルスタイン	80	61	2.9±5.92
	黒毛和種	57	50	20.4±104.58
	交雑種	34	33	9.6±20.41
	褐毛和種	5	5	67.0±66.50
	短角	3	3	4.9±6.44
	ジャージー	1	1	0.8
性別	雌	62	57	5.6±8.07
	雄	118	96	16.1±79.15
全体		180	153	12.2±63.10

SD: standard deviation

*: 非検出は、0.11 CFU/cm²未満

** : 検出個体のみの平均±SD

表 1-8. 施設別の生菌数

施設	月	試験個体数		生菌検出 個体数*		生菌数** (平均±SD CFU/cm ²)	
		月ごと	合計	月ごと	合計	月ごと	総合
A施設	11	12	36	10	23	0.2±0.19	0.5±0.93
	12	6		4		0.2±0.28	
	1	12		6		1.4±1.55	
	2	6		3		0.10±0.10	
B施設	11	12	36	10	31	1.2±0.69	3.2±7.92
	12	6		5		1.6±1.59	
	1	12		11		6.4±12.61	
	2	6		5		1.8±1.2	
C施設	11	9	36	9	32	3.0±3.20	2.3±3.01
	12	6		6		1.2±0.40	
	1	12		8		1.6±1.17	
	2	9		9		2.9±4.30	
D施設	11	9	36	12	36	88.3±204.41	43.9±124.58
	12	6		6		33.0±40.62	
	1	12		9		18.6±32.40	
	2	9		9		17.1±12.57	
E施設	11	—	12	—	7	—	0.6±0.45
	12	—		—		—	
	1	12		7		0.6±0.45	
	2	—		—		—	
F施設	11	—	12	—	12	—	6.8±6.20
	12	—		—		—	
	1	12		12		6.8±6.20	
	2	—		—		—	
G施設	11	—	12	—	12	—	1.0±1.53
	12	—		—		—	
	1	6		6		1.3±2.07	
	2	6		6		0.8±0.54	

SD: standard deviation

*: 非検出は、0.11 CFU/cm²未満

**: 検出個体のみの平均±SD

表 1-9. 月別の生菌数

年	月	ウシの種類	試験個体数		生菌検出 個体数*		生菌数** (平均±SD CFU/cm ²)	
			種類	合計	種類	合計	種類	総合
2020	11	ホルスタイン	19	45	17	41	1.6±2.65	26.9±117.44
		黒毛和種	11		9		94.3±232.07	
		交雑種	12		12		2.5±2.95	
		褐毛和種	3		3		65.1±75.70	
		短角	—		—		—	
	ジャージー	—	—	—	—			
	12	ホルスタイン	7	24	5	21	8.0±15.36	10.2±26.08
		黒毛和種	10		10		3.1±4.77	
		交雑種	5		4		1.0±0.67	
		褐毛和種	2		2		69.9±49.45	
短角		—	—		—			
ジャージー	—	—	—	—				
2021	1	ホルスタイン	41	75	29	59	3.4±4.61	6.0±15.29
		黒毛和種	21		17		1.1±1.09	
		交雑種	12		12		19.5±29.33	
		褐毛和種	—		—		—	
		短角	—		—		—	
	ジャージー	1	1	0.83	—			
	2	ホルスタイン	13	36	10	32	1.1±1.59	6.1±9.90
		黒毛和種	15		14		8.5±9.83	
		交雑種	5		5		9.8±15.68	
		褐毛和種	—		—		—	
短角		3	3		4.9±6.44			
ジャージー	—	—	—	—				

SD: standard deviation

*: 非検出は、0.11 CFU/cm²未満

**: 検出個体のみの平均±SD

表 1-10. 増菌培養の結果

検体	Assay									
	1		2		3		4		5	
	Stx	eae	16S	O157	O26	O111	O45	O121	O103	O145
B1	20.4	29.8	14.1	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
B2	20.2	UD	15.4	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B3	25.1	27.8	13.5	UD	UD	UD	UD	UD	31.9	UD
B19	UD	25.3	14.3	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B20	UD	26.0	13.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B21	27.0	19.2	14.6	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
B24	29.7	27.4	14.7	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
B27	40.7	UD	17.1	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B29	40.7	UD	14.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B38	19.8	UD	14.3	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B48	42.0	UD	22.0	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B54	17.9	UD	14.6	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B55	24.0	UD	14.2	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B56	25.0	25.6	14.1	27.4	UD	UD	UD	UD	UD	UD
B57	21.4	UD	14.4	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B67	UD	40.3	13.9	24.9	UD	UD	UD	UD	UD	UD
B69	UD	22.8	14.0	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B73	27.3	UD	14.2	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B74	UD	41.0	14.6	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B87	UD	37.4	14.9	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
B88	32.8	27.0	14.7	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
B120	26.8	30.0	13.9	UD	UD	UD	32.0	UD	UD	UD
B124	UD	40.9	14.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B125	39.4	UD	38.3	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B128	42.9	UD	33.6	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B130	38.7	39.4	14.2	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
B132	UD	38.9	17.6	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B133	UD	39.9	16.4	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B148	27.2	35.8	12.8	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
B149	UD	40.0	12.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B150	40.3	UD	13.0	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B153	UD	39.1	13.7	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B166	UD	40.0	14.0	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B169	UD	16.7	14.4	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B170	UD	17.0	14.5	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B171	UD	17.7	14.5	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
上記			13.6							
以外の	UD	UD	~	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
検体			44.0							
			UD*							

*: 培養後の濁りがなかった検体 ; UD: undetermined ; NT: No test

表 1-11. 検体 B3 および B56 での MPN の結果

検体	Assay	遺伝子	MPN									判定
			1段目			2段目			3段目			
B3	1	<i>Stx</i>	UD	UD	UD	UD	UD	UD	NT	UD	NT	<3MPN/10 g
		<i>eae</i>	UD	UD	UD	UD	UD	UD	NT	UD	NT	<3MPN/10 g
	5	O103	UD	UD	UD	UD	UD	UD	NT	UD	NT	<3MPN/10 g
B56	1	<i>Stx</i>	UD	UD	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT	<3MPN/10 g
		<i>eae</i>	UD	UD	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT	<3MPN/10 g
	2	O157	UD	UD	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT	<3MPN/10 g

表 1-12. カテゴリー別での 7 血清群 STEC の分離結果

カテゴリー		試験個体数	陽性個体数	血清型
ウシの種類	ホルスタイン	80	0	—
	黒毛和種	57	0	—
	交雑種	34	0	—
	褐毛和種	5	1	O157:H7
	短角	3	0	—
	ジャージー	1	0	—
施設	A施設	36	0	—
	B施設	36	0	—
	C施設	36	0	—
	D施設	36	1	O157:H7
	E施設	12	0	—
	F施設	12	0	—
	G施設	12	0	—
年月	2020年11月	45	0	—
	2020年12月	24	1	O157:H7
	2021年1月	75	0	—
	2021年2月	36	0	—

表 1-13. 大腸菌分離株

検体	増菌培養後		分離株		
	遺伝子	CT値	1	2	3
B3	<i>stx</i>	30.3	<i>stx</i> (-)	<i>stx</i> (-)	<i>stx1</i> (+)
	<i>eae</i>	30.5	<i>eae</i> (-)	<i>eae</i> (+)	<i>stx2</i> (-)
	O103	31.2	O103(-)	O103(+)	<i>eae</i> (-)
	保存株数		3株	9株	O103(-)
B56	<i>stx</i>	25.0	<i>stx</i> (+)		
	<i>eae</i>	25.6	<i>eae</i> (+)		
	O157	27.4	O157(+)		
	保存株数		30株		
B67	<i>stx</i>	UD	<i>stx</i> (-)		
	<i>eae</i>	UD	<i>eae</i> (-)		
	O157	26.4	O157(+)		
	保存株数		1株		
B120	<i>stx1</i>	UD	<i>stx</i> (-)		
	<i>stx2</i>	29.9	<i>eae</i> (+)		
	<i>eae</i>	30.8	O45(-)		
	O45	UD			
	保存株数		2株		

UD: undetermined

表 2-1. 各消毒液の濃度とスプレー1回あたりの噴霧重量

消毒液	濃度	pH	1噴霧あたりの重量 (g)
過酢酸	100 ppm	3.92	0.8±0.04
	200 ppm	3.72	0.8±0.07
	500 ppm	3.72	0.8±0.05
	1000 ppm	2.83	0.8±0.03
次亜塩素酸	100 ppm	8.79	0.8±0.02
	200 ppm	9.16	0.8±0.03
ナトリウム	300 ppm	9.16	0.7±0.01
	600 ppm	9.27	0.8±0.05
エタノール	70%	6.72-6.77	0.8±0.01

表 2-2. STEC への直接効果の検証

STEC 菌液	種類	濃度	平均±SD (log CFU/mL)							
			血清群							
			O26	O45	O103	O111	O121	O145	O157	
PBS懸濁	過酢酸	100 ppm	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	次亜塩素酸 ナトリウム	100 ppm	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	エタノール	70%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	滅菌水		NT	8.9 ±0.02	NT	NT	9.0 ±0.04	8.7 ±0.54	8.7 ±0.05	
TSB懸濁	過酢酸	100 ppm	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	次亜塩素酸 ナトリウム	100 ppm	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	エタノール	70%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	滅菌水		9.0 ±0.08	8.9 ±0.05	8.8 ±0.08	8.8 ±0.08	8.9 ±0.05	8.9 ±0.01	8.9 ±0.06	
接種菌液		8.8 ±0.13	8.9 ±0.02	8.9 ±0.08	8.8 ±0.00	9.1 ±0.04	9.0 ±0.02	8.9 ±0.08		

N.T.: No test

N.D.: Not detected (検出限界<3)

表 2-3. STEC 汚染肉への効果の検証 (過酢酸)

			平均±SD (log CFU/片)							
種類	濃度	手法	血清群							
			O26		O103		O111		O157	
			クロモ							
			TSA アガー STEC							
過酢酸	100 ppm	スプレー 2回5分	7.3 ±0.10	7.3 ±0.02	N.T.	N.T.	7.4 ±0.02	7.0 ±0.54	N.T.	N.T.
		50mLに 20秒浸漬	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7.0	7.1
	200 ppm	スプレー 2回5分	7.3 ±0.07	7.1 ±0.03	N.T.	N.T.	7.2 ±0.23	7.0 ±0.26	N.T.	N.T.
		50mLに 20秒浸漬	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6.9	6.9
	500 ppm	スプレー 2回5分	7.4 ±0.11	7.3 ±0.06	7.3 ±0.18	7.1 ±0.08	7.2 ±0.15	7.2 ±0.25	7.3 ±0.12	7.2 ±0.10
		50mLに 20秒浸漬	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6.8	6.8
	1000 ppm	スプレー 2回5分	7.5 ±0.05	7.3 ±0.06	7.3 ±0.02	7.2 ±0.04	7.1 ±0.03	7.0 ±0.02	7.2 ±0.12	7.2 ±0.15
		スプレー 10回10分	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7.3	7.2
		スプレー 10回10分 (枝肉表面)	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7.3	7.2
		50mLに 20秒浸漬	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6.7	6.7
		100mL かけ流し 5分	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	5.4	5.5
		100mL かけ流し 1時間	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	5.7	5.6
接種菌数			7.3 ±0.03	7.2 ±0.02	7.4 ±0.07	7.3 ±0.05	7.3 ±0.01	8.1 ±0.11	7.3 ±0.07	7.2 ±0.20

N.T.: No test

表 2-4. STEC 汚染肉への効果の検証（次亜塩素酸ナトリウム）

			平均±SD (log CFU/片)							
種類	濃度	手法	血清群							
			O26		O103		O111		O157	
			クロモ							
			TSA アガー STEC							
次亜塩素酸 ナトリウム	100 ppm	50mLに 20秒浸漬	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7.1	7.1
	200 ppm	50mLに 20秒浸漬	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7.1	7.1
	300 ppm	スプレー 2回5分	N.T.	N.T.	7.5 ±0.10	7.5 ±0.28	N.T.	N.T.	7.5 ±0.08	7.4 ±0.14
		50mLに 20秒浸漬	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7.1	7.0
	600 ppm	スプレー 2回5分	N.T.	N.T.	7.5 ±0.05	7.4 ±0.18	N.T.	N.T.	7.3 ±0.10	7.3 ±0.15
		スプレー 10回10分	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7.4	7.4
		スプレー 10回10分 (枝肉表面)	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7.0	6.9
		50mLに 20秒浸漬	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7.0	6.9
		100mL かけ流し 5分	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	5.8	5.8
		100mL かけ流し 1時間	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	5.9	5.9
接種菌数			7.3 ±0.03	7.2 ±0.02	7.4 ±0.07	7.3 ±0.05	7.3 ±0.01	8.1 ±0.11	7.3 ±0.07	7.2 ±0.20

N.T.: No test

表 2-5. STEC 汚染肉への効果の検証（エタノール）

			平均±SD (log CFU/片)							
種類	濃度	手法	血清群							
			O26		O103		O111		O157	
			クロモ	クロモ	クロモ	クロモ	クロモ	クロモ	クロモ	クロモ
			TSA	アガー	TSA	アガー	TSA	アガー	TSA	アガー
			STEC	STEC	STEC	STEC	STEC	STEC		
エタノール	70%	スプレー	7.3	7.2	7.4	7.3	7.3	8.1	7.3	7.2
		2回5分	±0.03	±0.02	±0.07	±0.05	±0.01	±0.11	±0.07	±0.20
		スプレー								
		10回10分	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7.2	7.1
		(枝肉表面)								
		50mLに								
		20秒浸漬	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6.8	6.8
接種菌数			7.3	7.2	7.4	7.3	7.3	8.1	7.3	7.2
			±0.03	±0.02	±0.07	±0.05	±0.01	±0.11	±0.07	±0.20

N.T.: No test

表 2-6. STEC 汚染肉への効果の検証 (滅菌水)

		平均±SD (log CFU/片)							
種類	手法	血清群							
		O26		O103		O111		O157	
		クロモ							
		TSA アガー STEC							
滅菌水	スプレー 2回5分	7.6 ±0.05	7.5 ±0.01	7.4 ±0.08	7.3 ±0.01	7.3 ±0.21	7.8 ±0.56	7.4 ±0.04	7.3 ±0.09
	スプレー 10回10分 (枝肉表面)	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7.2	7.3
	50mLに 20秒浸漬	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7.2	7.0
	100mL かけ流し 5分	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6.1	6.0
	100mL かけ流し 1時間	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	5.8	5.9
	接種菌数	7.3 ±0.03	7.2 ±0.02	7.4 ±0.07	7.3 ±0.05	7.3 ±0.01	8.1 ±0.11	7.3 ±0.07	7.2 ±0.20

N.T.: No test

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saito-Shida S., Kashiwabara N., Nemoto S., Akiyama H.	Determination of 8 α -hydroxy mutilin as a marker residue for tiamulin in swine tissue by liquid chromatography-t andem mass spectrometry.	Food Analytical Methods	14	845-855	2021

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣
—(国立医薬品食品衛生研究所長)— 殿
—(国立保健医療科学院長)—

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
所属研究機関長 職 名 所長
氏 名 合田 幸広 印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 動物性食品輸出の規制対策のための研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品部 部長
(氏名・フリガナ) 稲山 浩 ・アキヤマ ヒロシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣
—(国立医薬品食品衛生研究所長)— 殿
—(国立保健医療科学院長)—

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
所属研究機関長 職 名 所長
氏 名 合田 幸広 印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 動物性食品輸出の規制対策のための研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品部 主任研究官
(氏名・フリガナ) 志田 静夏 ・シダ シズカ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
 所属研究機関長 職名 所長
 氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 動物性食品輸出の規制対策のための研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 衛生微生物部・部長
 (氏名・フリガナ) 工藤 由起子 (クドウ ユキコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合の(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。