

令和4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

総括・分担研究報告書

研究代表者

星薬科大学薬学部

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5年（2023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	10
2. 牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究	
工藤由起子	94
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	136

# I. 総括研究報告

研究代表者 榎山浩

(星薬科大学薬学部)

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または腎臓の物質について筋肉を対象とした分析法を確立し、妥当性を評価することを目的とした。本年度は、鶏の筋肉を対象として14分析法（ドラメクチン分析法、レバミゾール分析法、トリクラベンダゾール分析法、ピペラジン分析法、アンプロロリウム分析法、エトパベート分析法、ナイカルバジン及びハロフジノン分析法、モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン分析法、カルバルル分析法、ペルメトリン分析法、シフルトリン及びフルメトリン分析法、フルニキシン分析法、DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 $\alpha$ -HCH、 $\beta$ -HCH並びに $\gamma$ -HCH分析法、PCB分析法；27化合物）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73.4～109.7%、併行精度1.3～11.7%、室内精度3.4～19.9%となり、良好な結果が得られた。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、14分析法は鶏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物質が鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに鶏の筋肉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。1. 牛枝肉のSTEC調査では、2022年5月から2023年1月に5施設の協力のもとに牛枝肉合計137検体から7血清群（O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157）のSTECを対象とした調査を行った。また、他1施設を加えた6施設の協力のもとに牛枝肉合計161検体について生菌数測定を行なった。供試検体を増菌培養後、STEC7血清群マルチプレックスリアルタイムPCRを行い、分離株の血清凝集試験および生化学的性状試験を行った。この結果、1検体(0.7%)からSTEC O157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。また、2. 牛肉の消毒効果の検討では、消毒薬として、過酢酸（100 ppm、200 ppm、500 ppm）および乳酸（4%）を選択し、牛肉でのSTEC（O157）の消毒効果を検証した。加えて、消毒効果の向上を期待して55°Cに加温した消毒液、酸臭の軽減対策として消毒後の滅菌水洗浄を試みた。結果として、滅菌水よりも消毒液によるかけ流しの方がSTECの減少効果があった。また、消毒液を55°Cに加温することによる減少効果は認められなかった。しかし、酸臭軽減の効果があることが判明した。さらに、消毒後の滅菌水洗浄は、酸臭の軽減対策として有効であった。

## 研究分担者

志田(齊藤)静夏(国立医薬品食品衛生研究所  
食品部第三室長)

## 研究分担者

工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

## 研究協力機関

(一財)日本食品分析センター

## 研究協力者

星薬科大学 伊藤里恵

研究協力者 (\*牛枝肉の STEC 調査研究について)

島田光平(北海道保健福祉部健康安全局食品衛生課\*)

児山綾子(北海道東藻琴食肉衛生検査所\*)

北海道早来食肉衛生検査所\*

石田祥士

北海道帯広食肉衛生検査所\*

吉田千央、鈴木竹彦、笹谷優子

徳島県食肉衛生検査所\*

片山直人、飛梅三喜

佐賀県食肉衛生検査所\*

瀧下恵里子、大澤加奈子

長崎県諫早食肉衛生検査所\*

樋渡佐知子、松尾保雄

国立医薬品食品衛生研究所 廣瀬昌平、千葉由美、都丸亜希子、池内隼佑

## 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、欧州理事會指令 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、 $\beta$ -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は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 4 年度(3 年目)は、抗菌性物質以外の B 物質のうち、鶏においてモニタリング対象部位が肝臓又は腎臓の物質(ドラメクチン等の 27 化合物)について、鶏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

### 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

鶏の筋肉は、インターネット経由で岩手県産(ペラジン分析法は神奈川県川崎市)のスーパーで四国産、PCB 分析法はインターネット経由で青森県産)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。

- ・ドラメクチン分析法
- ・レバミゾール試験法
- ・トリクラベンダゾール試験法
- ・ピペラジン試験法
- ・アンプロリウム試験法
- ・エトパペート試験法
- ・ナイカルバジン及びハロフジノン試験法
- ・モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン試験法
- ・カルバリル試験法
- ・ペルメトリン試験法
- ・シフルトリン及びフルメトリン試験法
- ・フルニキシン試験法
- ・DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 $\alpha$ -HCH、 $\beta$ -HCH 並びに  $\gamma$ -HCH 試験法
- ・PCB(28、52、101、138、153 及び 180 の総和)分析法)

の 14 分析法について添加回収実験を行い、妥当性評価試験を行った。

## II 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

2022 年5月から 2023 年1月に国内の食肉検査所6ヶ所にて、ウシ 161 頭からサンプリングを行った。なお、N 施設からの検体では、生菌数測定のみを実施した。

### 2. 牛肉の消毒効果の検討

#### (1) 文献調査

牛屠体の消毒として使う方法のうち科学的な根拠がある方法を調べることを目的として、Carcasses (屠体)、Dressed Cattle (精肉)、Block Meat (ブロック肉)、Disinfection (消毒)、Decontamination (除菌)、Disinfectants (消毒剤)、acids (酸)、hot water (熱水)、steam (蒸気)、Microorganisms (微生物)、

bacteria (細菌)、*E. coli* (大腸菌)、STEC (志賀毒素産生性大腸菌)をキーワードとして、PubMed で文献調査を行った。

#### (2) 菌株

消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証では STEC のうち血清群 O157(ESC425)のみを供試した。

#### (3) 牛肉検体

牛肉は、小売店から購入したブロック肉を用いた。牛肉表面の筋膜をつけたままの検体(筋膜あり)については、クリーンベンチ内でブロック肉の表面の筋膜部分(厚さ約 1 cm)を切りとり、さらに約5 cm 角(約 25 g)に無菌的に切り分けて作製した。切り分けた検体は、重量を測定し、ラップに包みサンプリングバックに入れてシールし、冷凍保存した。使用する前日に4°Cに戻して供試した。解凍時に生成したドリップは滅菌した綿でふき取った。

#### (4) 接種菌液の調製

半流動性のカジトン培地に室温保存されている菌株を、10 mL の Tryptone soya broth (TSB) に植菌し、37°C で 18 時間静置培養した。このうち 8 mL を、4°C、5,000 rpm、15 分間遠心し、滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 8 mL 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で保管された。

なお、これら接種菌液中の菌数を以下の方法にて確認した。まずは、接種菌液を PBS にて、 $10^{-7}$ まで 10 倍階段希釈を行い、 $10^{-6}$  希釈液(約  $1 \times 10^2$  CFU/mL)および  $10^{-7}$  希釈液(約  $1 \times 10^1$  CFU/mL) 0.1 mL ずつを Tryptone soya agar (TSA) およびクロモアガーSTEC に5枚に塗抹し、TSA は 37°C で 24 時間、クロモアガーSTEC は 37°C で 20 時間、培養し、生育したコロニーを計測した。

#### (5) 消毒液の調製

昨年の結果から、最も効果的な手法は 500 mL のかけ流しであった。また、酢酸臭は残るが、牛肉

の変色がなく、STEC の減少効果が高かった過酢酸を引き続き検討した。また、従前より国内で使用が認められている指定添加物であり、米国では食肉処理の最後に枝肉表面に残っている細菌を殺菌するための有機酸洗浄として最も一般に使われている乳酸も検討した。なお、各消毒液の pH を使用前に測定した。

過酢酸製剤は昨年と同様に「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 ppm、200 ppm、500 ppm に調製し、供試した。

乳酸としては「DL-乳酸（シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社）」を用いた。製品の説明書には、乳酸濃度が 85.0 – 92.0%と記されているため、濃度を 90%とみなした。これを滅菌水で希釈して 4% に調製し、供試した。

なお、対照用溶液は滅菌水を用いた。

#### (6) 消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証

##### 1) 25°C 消毒液 500 mL かけ流しの方法（洗浄なし）

滅菌した 1 本の竹串に 1 検体を刺し、菌液を 10  $\mu$ L ずつ 5 か所（合計 50  $\mu$ 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た。検体ごとに 25°C に加温したそれぞれの消毒液 50 mL をシリンジで 10 回（合計 500 mL）かけ流しを行い、室温で 5 分間立てた状態で、消毒液の液切りを行った。

各検体から竹串を外し、それぞれストマッカー袋に入れた。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。これらの乳剤を、それぞれ 0.9 mL の PBS にて  $10^{-3}$  まで 10 倍階段希釈を行った。原液から  $10^{-3}$  希釈液 0.1 mL ずつを、TSA およびクロモアガー STEC に塗抹し、それぞれ 37°C で 24 時間および 20 時間培養し、コロニーを計測した。

##### 2) 25°C 消毒液 500 mL かけ流しならびにかけ流し後の洗浄方法（洗浄あり）

「1) 25°C 消毒液 500 mL かけ流しの方法（洗浄なし）」と同様に検体ごとにそれぞれの消毒液でかけ流しを行い、消毒液の液切りを行った後に、滅菌水による洗浄を行った。洗浄は、液切り後の検体に常温 (23.5 – 24.0°C) の滅菌水 50 mL をシリンジで 10 回（合計 500 mL）かけ流しを行い、室温で 5 分間立てた状態で、洗浄滅菌水の液の液切りを行った。以下、「1) 25°C 消毒液 500 mL かけ流しの効果（洗浄なし）」と同様に行った。

##### 3) 55°C 消毒液 500 mL かけ流しの方法（洗浄なし）

55°C に加温した消毒液を用いて「1) 25°C 消毒液 500 mL かけ流しの方法（洗浄なし）」と同様に行った。

##### 4) 55°C 消毒液 500 mL かけ流しならびにかけ流し後の洗浄方法（洗浄あり）

55°C に加温した消毒液を用いて「2) 25°C 消毒液 500 mL かけ流し後に洗浄滅菌水 500 mL かけ流しの方法（洗浄あり）」と同様に行った。

##### (7) 消毒液による肉の変色と臭味

「(6) 消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証」の消毒液かけ流しおよび洗浄方法について、菌を接種していない検体にて肉の変色と臭味を確認した。

## C 研究結果

### I 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

鶏の筋肉を対象として、以下の 14 分析法を確立し、B 物質 27 化合物について妥当性評価試験を実施した。

- ・ドラメクチン分析法
- ・レバミゾール試験法
- ・トリクラベンダゾール試験法
- ・ピペラジン試験法

- ・アンプロリウム試験法
- ・エトパベート試験法
- ・ナイカルバジン及びハロフジノン試験法
- ・モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン試験法
- ・カルバリル試験法
- ・ペルメトリン試験法
- ・シフルトリン及びフルメトリン試験法
- ・フルニキシシン試験法
- ・DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 $\alpha$ -HCH、 $\beta$ -HCH並びに $\gamma$ -HCH試験法
- ・PCB (28、52、101、138、153 及び 180 の総和) 分析法)

その結果、真度 73.4~109.7%、併行精度 1.3~11.7%、室内精度 3.4~19.9%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、14 分析法は鶏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。

## II 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

#### (1) 生菌数

調査した検体 161 頭はすべての検体から生菌数が測定され、その平均は  $1,334 \pm 8,095.2$  (平均 $\pm$ SD) CFU/cm<sup>2</sup>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 F 施設であった。平均生菌数は  $4,786.1 \pm 19,398.1$  CFU/cm<sup>2</sup>であり、1,000 CFU/cm<sup>2</sup>を超えるウシは 3 頭であった。

#### (2) STEC7 血清群の分離

供試検体 137 検体のうち、34 検体が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の少なくとも片方が陽性で

あり、両遺伝子のいずれもが陽性となった検体はそのうち 11 検体であった。上記 34 検体のうち、7 検体が STEC 7 血清群のいずれかで陽性となり、同一検体で複数の O 血清群で陽性となった検体は J71 の 1 検体のみであり、Ct 値は O26 (37.9)および O45 (29.0)であった。

*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陽性であった検体は合計で 11 検体であり、これらの検体において、分離陽性検体は STEC O157 が分離された 1 検体のみであった。リアルタイム PCR で血清群 O157 が陽性となった検体は J23 および J34 の計 2 検体であり、分離陽性検体となったのは最終的に J23 の 1 検体のみであった。血清群 O26 および O45 についてリアルタイム PCR 陽性であった検体は菌株の分離には至らなかった。

(3) STEC7 血清群以外で *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方あるいは片方を保有する大腸菌および、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陰性である STEC7 血清群の大腸菌の分離

供試検体 137 検体のうち、34 検体が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の少なくとも片方が陽性であり、両遺伝子のいずれもが陽性となった検体はそのうち 11 検体であった。*stx* 遺伝子のみが陽性であった検体は 9 検体、*eae* 遺伝子のみが陽性であった検体は 14 検体であった。

#### (4) STEC 7 血清群の定量

*stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子および O157 遺伝子のすべてが非検出であった。STEC O157 の定量値は、検出限界以下となる試験液 100mL あたり 3 MPN 未満あるいはガーゼ表面積 100 cm<sup>2</sup> あたり 0.33 MPN 未満であった。

### 2. 牛肉の消毒効果の検討

#### (1) 文献調査

検索の結果、31 報見つかった。効果が認められた消毒液は、乳酸 (8 報)、過酢酸 (2 報)、



カプリル酸（1報）であった。消毒効果のある温度は55℃（4報）、50℃（1報）、45℃（2報）であった。そのうち、比較的多い条件は、消毒液としては乳酸および過酢酸であり、温度としては55℃であった（10報）。以下の4つのカテゴリーにまとめた。

## （2）消毒液の牛肉汚染 STEC への効果

供試した消毒液はすべて酸性であり、過酢酸は濃度が高いほど pH は低く、乳酸が最も低い値であった。

牛肉表面の変色に関しては、過酢酸では変色は認められなかったが、乳酸では茶褐色に変色した。臭味に関しては、過酢酸では濃度が高いほど酸臭が強くなる傾向があったが、両温度の消毒液ともに滅菌水による洗浄によって酸臭は軽減した。一方、乳酸では酸臭は認められなかった。

## D. 考察

### I 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

今年度に検討した 14 分析法は鶏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。このことから輸出再開に向けた検査に適用できると考えられる。

### II 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

本調査では牛枝肉からガーゼを用いた 137 検体中、1 検体（0.7%）から STEC7 血清群のひとつである STEC O157 が分離された。STEC O157 が分離された 1 検体を含む 7 検体（5.1%）は、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方ならびに STEC7 血清群のいずれかがリアルタイム PCR で陽性であった。と畜場でのウシの糞便からは STEC O157 が高頻度に検出されていることと

比較すると、その汚染率は低率であった。その一方、令和3年度の結果（0.6%、1/168）と同等の汚染程度であったことならびに定量試験において、STEC O157 陽性検体は MPN 法により、検出限界以下であったことから、さらなる汚染低減にはその制御法の確立が課題となるであろう。

測定された生菌数は季節的な影響が大きいと考えられた。また、ウシの種類について、特にアンガス種 5 検体のうち 3 検体では生菌数が 10,000 CFU/cm<sup>2</sup> 以上を示してり、高度に汚染されていたことから、これらウシの種類に対しても衛生状態のさらなる向上に努める必要がある。

*stx*、*eae*、7 血清群のいずれかの遺伝子が PCR 陽性の培養液から分離された菌株は STEC 7 血清群ではない菌株が大部分を占めていた。*stx* 遺伝子が陽性であった株は 特定の施設に由来する株が多かったことから、特定の施設において *stx* 遺伝子保有株が分離される要因について、明らかにする必要がある。これらの菌株の病原性についてさらなる検討を行う必要もある。さらに、*stx* あるいは *eae* 遺伝子を保有している菌を指標菌とし食肉の衛生管理に用いることも検討したい。

牛肉の STEC による汚染の低減は食の安全に関わる重要な課題となっている。と畜場での牛肉の汚染は低率であるものの、牛肉の取り扱いには十分な注意が必要である。また、と畜場での衛生管理や施設での消毒処理等は、STEC の主要な汚染防止策であることから、STEC 汚染についての調査を継続するに加えて、それらの管理や消毒方法を改良していく必要があると考えられた。

#### 2. 牛肉の消毒効果の検討

今回の文献調査において、比較的多い消毒条件（10報）の国別の内訳は、米国（5報）、アル

ゼンチン（2報）、チェコ共和国（2報）、大韓民国（1報）であった。これら10報すべてにおいて、効果の有無にかかわらず乳酸による消毒効果を検討していた。

乳酸は、米国では食肉処理の最後に枝肉表面に残っている細菌を大幅に殺菌するために一般的に使われている有機酸である。過酢酸は強力な殺菌効果のある酸化剤として米国や日本で許可されている。乳酸と異なり微生物の耐性反応の誘導は知られていない。過酢酸の殺菌効果については数多くの研究が報告されている。

過酢酸による消毒では、昨年度の結果から、牛肉表面を変色させないが酸臭が残ることが難点であった。そこで、酸臭を軽減させるため、消毒後の滅菌水洗浄を試みた。滅菌水洗浄は酸臭を軽減させ、さらに、消毒液を55°Cに加熱することによって酸臭の軽減に相乗効果があることが判明した。乳酸による消毒では、酸臭は認められなかったが、牛肉表面が茶褐色に変色した。しかし、乳酸消毒による肉質への影響はないとする報告もある。肉表面の変色はトリミングなどによって除去できることを考慮すると、乳酸は消毒剤として有効であると考えられる。

## E. 結論

鶏の筋肉を対象として抗菌性物質以外のB物質27化合物の分析法（14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、鶏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物質が鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに鶏の筋肉（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。

1. 牛枝肉のSTEC調査では、2022年5月から2023年1月に5施設の協力のもとに牛枝肉合計137検体を供試した。また、別の1施設については、計24検体を生菌数の測定のみで供試した。1検体(0.7%)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。培養液から分離されたSTEC 7血清群に該当しない*stx* 遺伝子または*eae* 遺伝子を保有する菌株も分離されたことから指標菌とし食肉の衛生管理に役立つことも考えられた。今後も、と畜場において解体処理工程では注意深い取り扱いが必要である。

2. 牛肉の消毒効果の検討では、消毒薬として、過酢酸（100 ppm、200 ppm、500 ppm）および乳酸（4%）を選択し、牛肉でのSTEC（O157）の消毒効果を検証した。加えて、消毒効果の向上を期待して55°Cに加熱した消毒液、酸臭の軽減対策として消毒後の滅菌水洗浄を試みた。結果として、滅菌水よりも消毒液によるかけ流しの方がSTECの減少効果があった。また、消毒液を55°Cに加熱することによる減少効果は認められなかった。しかし、酸臭軽減の効果があることが判明した。さらに、消毒後の滅菌水洗浄は、酸臭の軽減対策として有効であった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

（誌上発表）

なし

（学会発表）

廣瀬昌平、都丸亜希子、穂山浩、工藤由起子。  
牛肉の志賀毒素産生大腸菌汚染に対する消

毒液の効果の検討. 日本食品衛生学会第  
118 回学術講演会, 長崎市, 令和 4 年 11  
月 11 日.

**H. 知的所有権の取得状況・登録状況**

なし

**F. 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

研究分担者 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 へ動物性食品を輸出する際は、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 A 物質が検出された場合は、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）での検査を行い、基準値を超過した場合に原因等の調査が求められる。したがって、B 物質はモニタリング部位に加えて筋肉を対象とした分析法が必要であるが、一部の物質については筋肉を対象とした分析法が整備されていない。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または腎臓の物質について筋肉を対象とした分析法を確立し、妥当性を評価することを目的とした。本年度は、鶏の筋肉を対象として 14 分析法（ドラメクチン分析法、レバミゾール分析法、トリクラベンダゾール分析法、ピペラジン分析法、アンプロリウム分析法、エトパベート分析法、ナイカルバジン及びハロフジノン分析法、モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン分析法、カルバルル分析法、ペルメリン分析法、シフルトリン及びフルメリン分析法、フルニキシン分析法、DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 $\alpha$ -HCH、 $\beta$ -HCH 並びに  $\gamma$ -HCH 分析法、PCB 分析法; 27 化合物)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 73.4~109.7%、併行精度 1.3~11.7%、室内精度 3.4~19.9%となり、良好な結果が得られた。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、14 分析法は鶏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 物質が鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに鶏の筋肉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。

**研究協力機関**

(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 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、 $\beta$ -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 4 年度(3 年目)は、抗菌性物質以外の B 物質のうち、鶏においてモニタリング対象部位が肝臓又は腎臓の物質(ドラメクチン等の 27 化合物)について、鶏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： 鶏の筋肉は、インターネット経由で岩手県産(ピペラジン分析法は神奈川県川崎市のスーパーで四国産、PCB 分析法はインターネット経由で青森県産)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。

### 1. ドラメクチン分析法

#### ① 試薬・試液

ドラメクチン標準品:純度 98.7%(Sigma-Aldrich 製)  
酢酸エチル:残留農薬試験用(関東化学製)

メタノール、アセトニトリル:HPLC 用(関東化学製)  
ギ酸、酢酸アンモニウム、メタノール:特級(関東化学製)

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカ  
ゲル積層ミニカラム:InertSep GC/NH2

(500 mg/500 mg/20 mL、ジーエルサイエンス製)

酢酸エチル及びギ酸の混液(100:1):酢酸エチル  
100 mL 及びギ酸 1 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:ドラメクチン標準品約 10 mg を精秤し、  
メタノール(HPLC 用)で溶解して 100 mg/L 溶液を  
調製した。

添加用標準溶液:ドラメクチン標準原液をメタノ  
ール(HPLC 用)で希釈して 0.5 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 1-1)

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

ドラメクチン標準原液をメタノール(HPLC  
用)で希釈して 0.25、0.5、1、2.5 及び 5 µg/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ドラメクチ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(0.5 mg/L)0.1 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 1-1)

ドラメクチンを試料からメタノールで抽出し、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層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採り、メタノール (特級) 100 mL を加えた。ホモジナイザーで 1 分間攪拌した後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙(直径 60 mm、No. 4、桐山製作所製)を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物をメタノール (特級) 50 mL で洗浄し、ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、メタノール (特級) で定容した。

##### b. 精製

抽出液 4 mL(試料 0.2 g 相当)をグラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム [InertSep GC/NH<sub>2</sub>(500 mg/500 mg/20 mL)] (あらかじめメタノール (HPLC 用) 10 mL で洗浄したもの)に負荷した後、酢酸エチル及びギ酸の混液(100 : 1)20 mL で溶出し、溶出液を遠心管に受けた。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。残留物をメタノール (HPLC 用) 2 mL に溶解したものを試験溶液とした。

#### ⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度(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. レバミゾール分析法

### ① 試薬・試液

レバミゾール塩酸塩標準品：純度 100%(富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル、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)

ギ酸：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)

メンブランフィルター：PTFE シリンジフィルター(0.22 µm、中部科学機器製)

アセトニトリル飽和ヘキサン：ヘキサン 500 mL とアセトニトリル(残留農薬試験用)100 mL を混合し、5 分間振とう後静置してヘキサン層を分取した。

水及びアセトニトリルの混液(3 : 2)：水 120 mL 及びアセトニトリル(HPLC 用)80 mL を混合した。

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

標準原液：レバミゾール塩酸塩標準品をレバミゾールとして約 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：レバミゾール標準原液をメタノールで希釈して 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)

遠心分離機：H-107DF 及び H-80Rα (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)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-2)

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

### ③ 定量

レバミゾール標準原液を水及びアセトニトリルの混液(3 : 2)で希釈して 0.125、0.25、0.5、1、2.5 及び 5 µg/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レバミゾールの含量を算出した。

### 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)

レバミゾールを試料からアセトニトリルで抽出し、ヘキサンで洗浄した後、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(残留農薬試験用)60 mL 及び無水硫酸ナトリウム 20 g を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、アセトニトリル層を綿栓ろ過した。残留物にアセトニトリル(残留農薬試験用)40 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、アセトニトリル層を綿栓ろ過した。

#### b. 精製

a. で得られたろ液を合わせ、アセトニトリル飽和ヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう後、アセトニトリル層を 200 mL 容全量フラスコにとり、アセトニトリル(残留農薬試験用)で定容した。抽出液 1 mL(試料 0.05 g 相当)を遠沈管に分取し、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。残留物を水及びアセトニトリルの混液(3 : 2)1 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 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値濃度(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。

## 3. トリクラベンダゾール分析法

### 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 98.4%(富士フィルム和光純薬製)

メタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、酢酸、水酸化ナトリウム、塩酸、酢酸アンモ



ニウム：特級(富士フィルム和光純薬製)  
 エタノール：特級(キシダ化学製)  
 メタノール：LC-MS用(富士フィルム和光純薬製)  
 30%過酸化水素水：精密分析用(富士フィルム和光純薬製)  
 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：Millex-LG(0.2 μm、MILLIPORE 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 450 mL に水を加えて 1000 mL とした。  
 エタノール及び酢酸の混液(1：1)：エタノール 50 mL 及び酢酸 50 mL を混合した(用時調製)。  
 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。  
 アセトニトリル及び水の混液(1：1)：アセトニトリル 1000 mL 及び水 1000 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 38.54 g を量り、水を加えて溶かし 500 mL とした。  
 0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液：水 1000 mL 及び 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 0.5 mL 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シソン標準品約 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。  
 添加用標準原液：トリクラベンダゾール標準品約 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：添加用標準原液をメタノール

ルで希釈して 2 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-1000(東京理化学器械製)

遠心分離機：H-1000FR(コクサン製)

振とう機：EL(スギヤマゲン製)

ブロックヒーター：MG-3200(東京理化学器械製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-3)

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

ケト-トリクラベンダゾール標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製し、さらに、アセトニトリル及び水の混液(1：1)で希釈して 0.05、0.1、0.2、0.5 及び 1 μg/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。

$$* 1.091 = \frac{\text{トリクラベンダゾールの分子量 } 359.66}{\text{ケト-トリクラベンダゾールの分子量 } 329.57}$$

## ④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液(2 mg/L)0.05 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 1-3)

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。エタノール及び酢酸混液の溶液とした後、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、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

試料 10 g を 50 mL 容分解容器(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。

#### b. 抽出

放冷後、内容物を 250 mL 容広口ポリ瓶に移し、先の分解容器内をメタノール 5 mL で洗浄し、洗液を内容物と合わせた。5 mol/L 塩酸 12 mL 及び酢酸エチル 40 mL を加え、10 分間振とうした。3500 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。

3500 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 0.5 mL(試料 0.05 g 相当)をねじ口試験管に分取して、室温で窒素ガスを通じ溶媒を

除去した。

#### c. 酸化反応

残留物をエタノール及び酢酸の混液(1 : 1)5 mL に溶解し、過酸化水素水 25 µL を加えて密栓をし、90°C で 16 時間加熱した。

#### d. 精製

試験管を放冷した後、反応物をメタノール 10 mL を用いてなす形フラスコに移し、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)5 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。なす形フラスコ内を同混液 5 mL で洗い、洗液をカラムに負荷、洗浄した。

メタノール 20 mL で溶出し、なす型フラスコに受けた。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。

残留物をアセトニトリル及び水の混液(1 : 1)4 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 妥当性評価試験

鶏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。

## 4. ピペラジン分析法

### ① 試薬・試液

ピペラジン標準品:純度 98.0%(Dr.Ehrenstorfer 製)  
酢酸エチル、ヘキサン:残留農薬試験用(関東化学製)

メタノール:HPLC 用(富士フイルム和光純薬製)

トリクロロ酢酸:生化学用(富士フイルム和光純薬製)

25%アンモニア水:試薬特級(富士フイルム和光純薬製)

酢酸アンモニウム:試薬特級(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 cc、Waters 製)

メンブランフィルター(0.2 μm)付きバイアル:(ジエールサイエンス製)

10%トリクロロ酢酸:トリクロロ酢酸 50 g を超純水に溶解し、500 mL に定容した。

メタノール及び 25%アンモニア水の混液(95:5):メタノール 190 mL と 25%アンモニア水 10 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 15.41 g に超純水を 200 mL 加え溶解した。

10 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 10 mL と超純水 990 mL を混合した。

標準原液:ピペラジン標準品約 2.5 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。

## ② 装置

ホモジナイザー: NS-52 PHYSCOTRON(マイクロテック・ニチオン製)

遠心分離機: H-80F(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 4500	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

## ③ 定量

ピペラジン標準原液をメタノール及び 25%アンモニア水の混液(95:5)で希釈して 0.5、1、5、10 及び 20 μg/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ピペラジ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)0.05 mL[メタノール及び 25%アンモニア水の混液(95:5)]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)

ピペラジンを試料から 10%トリクロロ酢酸で抽出と同時にヘキサン及び酢酸エチルで洗浄し、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 で定量した。

### a. 抽出

試料 5 g を 50 mL 容ポリプロピレン製試験管に量り取り、10%トリクロロ酢酸 30 mL、ヘキサン 5 mL 及び酢酸エチル 5 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、10%トリクロロ酢酸層を綿栓ろ過した。残留物に 10%トリクロロ酢酸 15 mL、ヘキサン 2 mL 及び酢酸エチル 2 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、10%トリクロロ酢酸層を綿栓ろ過した。ろ液を 50 mL 容全量フラスコに入れ、10%トリクロロ酢酸で定容した。

### b. 精製

抽出液を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 cc)] (あらかじめメタノール及び 25%アンモニア水の混液(95:5)10 mL、メタノール 5 mL、水 5 mL 及び 10%トリクロロ酢酸 10 mL で洗浄したものに)抽出液 10 mL(試料 1 g 相当)を負荷した。メタノール及び 25%アンモニア水の混液 7.5 mL で溶出し、15 mL 容ポリプロピレン製試験管に受けた。溶出液をメタノール及び 25%アンモニア水の混液で 10 mL に定容し、メンブランフィルター付きバイアルでろ過したものを試験溶液とした。

#### ⑥ 妥当性評価試験

鶏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。

### 5. アンプロロリウム分析法

#### ① 試薬・試液

アンプロロリウム塩酸塩標準品:純度 99.3%(富士フイルム和光純薬製)

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)

ギ酸:特級(関東化学製)

ギ酸アンモニウム:特級(関東化学製)

カルボキシジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム:Oasis WCX(150 mg/6 mL、Waters 製)

50 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 4.5):ギ酸アンモニウム 3.15 g を超純水 990 mL に加えて溶解し、ギ酸でpH4.5に調整した後、超純水で1000 mL とした。

水、アセトニトリル及びギ酸の混液(90:10:2):超純水 900 mL、アセトニトリル(HPLC用)100 mL 及びギ酸 20 mL を混合した。

標準原液:アンプロロリウム塩酸塩標準品約 29 mg(アンプロロリウム 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。

添加用標準溶液:アンプロロリウム標準原液をメタノールで希釈して 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)

遠心分離機: H-80Ra(コクサン製)

振とう機: EL(スギヤマゲン製)

pH 計: D-13(堀場製作所製)

LC-MS/MS (測定条件:表 1-5)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	AB SCIEX
LC	ExionLC AD	AB SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

#### ③ 定量

アンプロロリウム標準原液を水、アセトニトリル及びギ酸の混液(90:10:2)で希釈して 0.5、1、2.5、5 及び 10 µg/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アンプロロリウムの含量を算出した。

#### 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[メタノール溶液]を添加した。

#### ⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-5)

アンプロリウムを試料からアセトニトリルで抽出し、カルボキシジビニルベンゼン-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 容広口ポリ瓶に量り取り、アセトニトリル（残留農薬試験用）50 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。3000 r/min で 10 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（残留農薬試験用）20 mL を加え 5 分間振とうし、3000 r/min で 10 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに入れ、アセトニトリル（残留農薬試験用）で定容した。

b. 精製

抽出液 10 mL をカルボキシジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis WCX(150 mg/6 mL)] (あらかじめアセトニトリル（残留農薬試験用）10 mL で洗浄したもの)に負荷した。カラムをアセトニトリル（残留農薬試験用）5 mL で洗浄した後、水、アセトニトリル及びギ酸の混液(90 : 10 : 2) 10 mL で溶出し、10 mL 容全量フラスコに受けた。同混液で定容したものを試験溶液とした。

⑥ 妥当性評価試験

鶏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。

6. エトパペート分析法

① 試薬・試液

エトパペート標準品:純度 99.4%(富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル、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)  
ギ酸: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)

メンブランフィルター:PTFE シリンジフィルター (0.22 µm、中部科学機器製)

アセトニトリル飽和ヘキサン:ヘキサン 500 mL とアセトニトリル(残留農薬試験用)100 mL を混合し、5分間振とう後静置してヘキサン層を分取した。

水及びアセトニトリルの混液(3:2):水 120 mL 及びアセトニトリル(HPLC用)80 mL を混合した。

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

標準原液:エトパペート標準品約 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:エトパペート標準原液をアセトニトリル(HPLC用)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 及び H-80Rα (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)

LC-MS/MS (測定条件 : 表 1-6)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

### ③ 定量

エトパベート標準原液を水及びアセトニトリルの混液(3:2)で希釈して 0.1、0.2、0.5、1 及び 2 µg/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エトパベートの含量を算出した。

### ④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液(0.1 mg/L)1 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 1-6)

エトパベートを試料からアセトニトリルで抽出と同時にヘキサンで洗浄した後、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(残留農薬試験用) 60 mL、アセトニトリル飽和ヘキサン 40 mL 及び無水硫酸ナトリウム 20 g を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、液層を綿栓ろ過し、アセトニトリル層を分取した。残留物及びヘキサン層にアセトニトリル(残留農薬試験用) 40 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、液層を綿栓ろ過し、アセトニトリル層を分取した。アセトニトリル層を 200 mL 容量フラスコに合わせて、アセトニトリル(残留農薬試験用) で定容した。抽出液 4 mL(試料 0.2 g 相当)を遠沈管に分取し、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

物を水及びアセトニトリルの混液(3:2)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 妥当性評価試験

鶏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。

## 7. ナイカルバジン及びハロフジノン分析法

### ① 試薬・試液

ナイカルバジン標準品:純度 99.7%(富士フィルム和光純薬製)

ハロフジノン臭化水素酸標準品:純度 98.5%(SIGMA-ALDRICH 製)

アセトニトリル、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)

ギ酸: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)

メンブランフィルター:PTFE シリンジフィルター(0.22 µm、中部科学機器製)

アセトニトリル飽和ヘキサン:ヘキサン 500 mL とアセトニトリル(残留農薬試験用)100 mL を混合し、5 分間振とう後静置してヘキサン層を分取した。

水及びアセトニトリルの混液(3:2):水 120 mL 及びアセトニトリル(HPLC 用)80 mL を混合した。

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

標準原液:ナイカルバジン標準品を 4,4'-ジニトロカルバニリドとして約 12.5 mg を精秤し、N,N-ジメチルホルムアミドを加えて溶解した後アセトニトリル(HPLC 用)で 250 mg/L 溶液を調製した。ハロフジノン臭化水素酸標準品をハロフジノンとして約 10.0

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:4,4'-ジニトロカルバニリド標準原液をアセトニトリル(HPLC用)で希釈して1 mg/L溶液を調製した。ハロフジノン標準原液をメタノールで希釈して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)

遠心分離機 : H-107DF 及び H-80Rα(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)

LC-MS/MS (測定条件 : 表 1-7)

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

## ③ 定量

4,4'-ジニトロカルバニリド標準原液及びハロフジノン標準原液を水及びアセトニトリルの混液(3 : 2)で希釈して0.125、0.25、0.5、1、2.5及び5 µg/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4,4'-ジニトロカルバニリド及びハロフジノンの含量を算出した。

## ④ 添加試料の調製

試料10 gに4,4'-ジニトロカルバニリド添加用標準溶液(1 mg/L)100 µL[アセトニトリル溶液]及びハロフジノン添加用標準溶液(1 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 1-7)

4,4'-ジニトロカルバニリド及びハロフジノンを試料からアセトニトリルで抽出し、ヘキサンで洗浄した後、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(残留農薬試験用)60 mL及び無水硫酸ナトリウム20 gを加えた後、ホモジナイザーで1分間攪拌した。3000 r/minで5分間遠心分離した後、アセトニトリル層を綿栓ろ過した。残留物にアセトニトリル(残留農薬試験用)40 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、アセトニトリル層を綿栓ろ過した。

### b. 精製

a.で得られたろ液を合わせ、アセトニトリル飽和ヘキサン100 mLを加え5分間振とう後、アセトニトリル層を200 mL容全量フラスコにとり、アセトニトリル(残留農薬試験用)で定容した。抽出液1 mL(試料0.05 g相当)を遠沈管に分取し、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。残留物を水及びアセトニトリルの混液(3 : 2)1 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 妥当性評価試験

鶏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。

## 8. モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン分析法

### ① 試薬・試液

モネンシンナトリウム水和物標準品：純度 98.7% (Dr.Ehrenstorfer 製)

ラサロシド A ナトリウム塩標準液(100 mg/L)：純度 100%(Dr.Ehrenstorfer 製)

ナラシン A 標準品：純度 86.1%(Sigma Aldrich 製)

サリノマイシンナトリウム塩標準品：純度 79.6% (Dr.Ehrenstorfer 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 及び水 100 mL を混合した。

水及びメタノールの混液(1:1)：水 100 mL 及びメタノール 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：モネンシンナトリウム水和物標準品を約 21.0 mg(モネンシン 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。ラサロシド標準原液は市販の 100 mg/L 溶液を使用した。ナラシン A 標準品約 29.1 mg(ナラシン A 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。

サリノマイシンナトリウム塩標準品約 32.3 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。

添加用標準溶液：モネンシン標準原液、ラサロシド標準原液、ナラシン標準原液及びサリノマイシン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)

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

モネンシン標準原液、ナラシン標準原液、サリノマイシン標準原液及びラサロシド標準原液をメタノールで希釈して、モネンシン、ナラシン及びラサロシドについては 0.1、0.25、0.5、1 及び 2.5 µg/L、サリノマイシンについては 0.05、0.1、0.25、0.5 及び 1 µg/L の混合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モネンシン、ナラシン、サリノマイシン及びラサロシドの含量を算出した。

### ④ 添加試料の調製

モネンシン、ナラシン及びラサロシドについては、試料 10 g に添加用標準溶液 (0.1 mg/L) 0.5 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。サリノマイシンについては、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、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)

モネンシン、ナラシン、サリノマイシン及び  
ビラサロシド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。  
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  
トリル及び水の混液(9 : 1)60 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 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に、定量限界濃度 (モネン  
シン、ナラシン及びビラサロシドについては 5  
µg/kg、サリノマイシンについては 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。

## 9. カルバリル分析法

### ① 試薬・試液

カルバリル標準品:純度 99.4%(関東化学製)

アセトン: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)

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、ジューエルサイエンス  
製)

水及びメタノールの混液(8:2):水 800 mL 及びメタ  
ノール 200 mL を混合した。

メタノール及び水の混液(8:2):メタノール 800 mL  
及び水 200 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:カルバリル標準品約 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:カルバリル標準原液をアセトン  
で希釈して 0.2 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 1-9)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX

データ処理	Analyst	SCIEX
-------	---------	-------

### ③ 定量

カルバリル標準原液をメタノール及び水の混液(8:2)で希釈して0.5、1、2、5及び10 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カルバリルの含量を算出した。

### ④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液(1 mg/L)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)

カルバリルを試料からアセトンで抽出し、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 10 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、アセトン 100 mL を加えた。ホモジナイザーで 1 分間攪拌した後、ろ紙(直径 60 mm、No. 4、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ン 50 mL で洗浄し、ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトンで定容した。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 1 mL まで濃縮した。

#### b. 精製

濃縮液に水 20 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。水及びメタ

ノールの混液(8:2)10 mL で洗浄した後、メタノール及び水の混液(8:2)10 mL で溶出した。溶出液を 10 mL 容全量フラスコに採り、メタノール及び水の混液(8:2)で定容したものを試験溶液とした。

### ⑥ 妥当性評価試験

鶏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。

## 10. ペルメトリン分析法

### 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工業製)

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

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):Florisol 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-80Rα(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 1-10)

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

## ③ 定量

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 5、10、20、40 及び 60 μ/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 1-10)

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 をのせたら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。この溶液を分液漏斗に移した後、ヘキサン 25 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°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。残留物をヘキサン 5 mL に溶解した。

#### b. 精製

a. 得られた溶液をカラムクロマトグラフィ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 妥当性評価試験

鶏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。

### 11. シフルトリン及びフルメトリン分析法

#### ① 試薬・試液

シフルトリン標準品:純度 99%(富士フイルム和光純薬工業製)

フルメトリン標準品:純度 98.5%(Dr.Ehrenstorfer 製)

アセトン、ヘキサン、ジエチルエーテル: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)

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

ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(96:4):ヘキサン 960 mL 及びジエチルエーテル 40 mL を混

合した。

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

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム: Sep-Pak Plus florisil(910 mg、Waters 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:シフルトリン標準品約 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。フルメトリン標準品約 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。

添加用標準溶液:シフルトリン標準原液及びフルメトリン標準原液をアセトンで希釈して 0.05 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)

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)

LC-MS/MS (測定条件:表 1-11)

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

#### ③ 定量

シフルトリン標準原液及びフルメトリン標準原液をアセトニトリルで希釈して、0.25、0.5、1、2.5 及び 5 µg/L の混合標準溶液を調製

した。この溶液 5  $\mu$ 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  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりシフルトリン及びフ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(0.05 mg/L)1 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)

シフルトリン及びフルメトリンを試料からアセトンで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び合成ケイ酸マグネシウム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、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 2 mL(試料 0.05 g 相当)を遠心管に分取し、ロータリーエバポレーター(40  $^{\circ}$ 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)5 mL に溶解した。

##### b. 精製

a. で得られた溶液を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、アセ

トニトリル及び水の混液(1 : 1)5 mL で洗浄したものに負荷した。遠心管内をアセトニトリル及び水の混液(1 : 1)5 mL で洗い、洗液をカラムに負荷した。アセトニトリル 15 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  $^{\circ}$ 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。残留物をヘキサン及びジエチルエーテルの混液(96:4)10 mL に溶解し、合成ケイ酸マグネシウムミニカラム [Sep-Pak Plus florisil(910 mg) (あらかじめヘキサン 10 mL で洗浄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(96:4)20 mL で溶出し、溶出液を遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター(40  $^{\circ}$ 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 1 mL に溶解したものを試験溶液とした。

#### ⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値濃度(10  $\mu$ 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。

## 12. フルニキシシン分析法

### ① 試薬・試液

フルニキシシンメグルミン標準品:純度 100%(富士フイルム和光純薬製)

アセトニトリル、ヘキサン、メタノール:残留農薬試験用(関東化学製)

アセトニトリル:HPLC 用(関東化学製)

ギ酸: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)

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:ヘキサン 200 mL とアセトニトリル(残留農薬試験用)40 mL を混合し、5 分間振とう後静置してヘキサン層を分取した。

メタノール及びアセトニトリルの混液(3:2):メタノール 120 mL 及びアセトニトリル(残留農薬試験用)80 mL を混合した。

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

標準原液:フルニキシンメグルミン標準品約 21 mg(フルニキシン 12.5 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。

添加用標準溶液:フルニキシン標準原液をメタノール及びアセトニトリルの混液(3:2)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 : ULTRA-TURRAX T25 basic (IKA ジャパン製)

遠心分離機 : H-80 α (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 1-12)

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

フルニキシン標準原液をメタノール及びアセトニトリルの混液(3:2)で希釈して 0.1、0.2、0.5、1 及び 2 μg/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ルニキ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(1 mg/L) 50 μL[メタノール及びアセトニトリルの混液(3:2)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)

フルニキシンを試料からアセトニトリルで抽出と同時にヘキサンで洗浄した後、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、アセトニトリル (残留農薬試験用) 30 mL、アセトニトリル飽和ヘキサン 20 mL 及び無水硫酸ナトリウム 10 g を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、液層を綿栓ろ過し、アセトニトリル層を分取した。残留物及びヘキサン層にアセトニトリル (残留農薬試験用) 20 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、液層を綿栓ろ過し、アセトニトリル層を分取した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに合わせて、アセトニトリル (残留農薬試験用) で定容した。抽出液 4 mL(試料 0.2 g 相当)を 10 mL 容全量フラスコに採り、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 妥当性評価試験

鶏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。

### 13. DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 $\alpha$ -HCH、 $\beta$ -HCH 並びに $\gamma$ -HCH 分析法

#### ① 試薬・試液

o,p'-DDT 標準品:純度 97.6%(Dr.Ehrenstorfer 製)

p,p'-DDE 標準品:純度 99.9%(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 96.5%( Dr.Ehrenstorfer 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)

$\alpha$ -HCH 標準品:純度 98.6%( Dr.Ehrenstorfer 製)

$\beta$ -HCH 標準品:純度 97.7%(Dr.Ehrenstorfer 製)

$\gamma$ -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  $\mu$ m):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: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、 $\beta$ -HCH 標準品及び  $\gamma$ -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  $\alpha$ -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、 $\alpha$ -HCH 標準原液、 $\beta$ -HCH 標準原液及び  $\gamma$ -HCH 標準原液をアセトンで希釈して 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-80R $\alpha$ (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 1-13)

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、 $\alpha$ -HCH 標準原液、 $\beta$ -HCH 標準原液及び  $\gamma$ -HCH 標準原液を混合、ヘキサンで希釈して 0.25、0.5、1、2.5 及び 5  $\mu\text{g/L}$  の混合標準溶液を調製した。この溶液 2  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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、 $\alpha$ -HCH、 $\beta$ -HCH 及び  $\gamma$ -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(1 mg/L)50  $\mu\text{L}$ [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 1-13)

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、 $\alpha$ -HCH、 $\beta$ -HCH 及び  $\gamma$ -HCH を試料からアセトンで抽出、ヘキサンに転溶した。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. 得られた溶液をカラムクロマトグラフィ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1g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 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界相当(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。

### 14. PCB分析法

#### ① 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([<sup>13</sup>C12]PCB28、[<sup>13</sup>C12]PCB52、[<sup>13</sup>C12]PCB101、[<sup>13</sup>C12]PCB138、[<sup>13</sup>C12]PCB153 及び [<sup>13</sup>C12]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(富士フィルム和光純薬製)

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、富士フィルム和光純薬製)

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 1 µg/L 溶液及び 10 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 10 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。

#### ② 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 1-14)

装置	型式	メーカー
MS	Agilent 5977A	Agilent Technologies
GC	Agilent 7890B	Agilent Technologies
データ処理	GC/MSD ChemStation	Agilent Technologies

③ 定量

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	[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]PCB28
PCB52	[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]PCB52
PCB101	[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]PCB101
PCB138	[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]PCB138
PCB153	[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]PCB153
PCB180	[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]PCB180

④ 添加試料の調製

0.07 µg/kg 添加：試料 1 g に添加用標準溶液(1 µg/L) 70 µL [デカン溶液]を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

0.13 µg/kg 添加：試料 1 g に添加用標準溶液(1

µg/L) 130 µL [デカン溶液]を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

0.2 µg/kg 添加：試料 1 g に添加用標準溶液(10 µg/L) 20 µL [デカン溶液]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 1-14)

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、10 µg/L 内標準溶液を 50 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 °C 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 100 mL を加えた。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 °C)で約 5 mL 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 2.0 cm のクロマトグラム管に Florisil PR 20 g 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 2 mL で 3 回洗い、洗液をカラムに負荷した。ヘキサン 200 mL で溶出し、なす形フラスコに受けた。溶出液をロ

ーターエバポレーター(40℃)で約5 mLまで減圧濃縮した。あらかじめ10 µg/L内標準(シリジスパイク)混合溶液50 µLを入れたスピッツ管に濃縮液を移した。なす形フラスコ内をヘキサン約1 mLで3回洗い、洗液をスピッツ管に合わせ、室温で窒素ガスを通じて50 µLまで濃縮し、試験溶液とした。

#### ⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値の0.5倍、1倍及び1.5倍相当(各0.07、0.13及び0.2 µg/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。なお、脂質をソックスレー抽出法により測定したところ、1.3 g/100gであった。

### C. 結果及び考察

#### 1. ドラメクチン分析法

##### ① 選択性

ブランク試料を本分析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25%未満、室内精度30%未満)を満たした。

##### ③ 検量線の直線性

0.25~5 µg/Lの範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.997$ となり、良好な直線性が得られた。

##### ④ 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。

#### 2. レバミゾール分析法

##### ① 選択性

ブランク試料を本分析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 検量線の直線性

0.125~5 µg/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。

##### ④ 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。

#### 3. トリクラベンダゾール分析法

##### ① 選択性

ブランク試料を本分析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)。

##### 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 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 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

##### ④ 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。

から得られたピークは  $S/N \geq 10$  であった。

#### 4. ピペラジン分析法

##### ① 選択性

ブランク試料を本分析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 2-4)。

##### 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 2-4 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 25%未満、室内精度 30%未満)を満たした。

##### ③ 検量線の直線性

0.5~20  $\mu\text{g/L}$  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。

##### ④ 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。

#### 5. アンプロリウム分析法

##### ① 選択性

ブランク試料を本分析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)。

##### 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 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 検量線の直線性

0.5~10  $\mu\text{g/L}$  の範囲で検量線を作成した。決定係数  $r^2 > 0.997$  となり、良好な直線性が得られた。

##### ④ 定量限界

定量限界濃度のマトリックス添加標準溶液

#### 6. エトパペート分析法

##### ① 選択性

ブランク試料を本分析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 2-6)。

##### 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 2-6 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 検量線の直線性

0.1~2  $\mu\text{g/L}$  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。

##### ④ 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。

#### 7. ナイカルバジン及びハロフジノン分析法

##### ① 選択性

ブランク試料を本分析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 2-7-1、2-7-2)。

##### 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 2-7-1、2-7-2 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 検量線の直線性

0.125~5  $\mu\text{g/L}$  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。

##### ④ 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。

## 8. モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン分析法

### ① 選択性

ブランク試料を本分析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 2-8-1~2-8-4)。

### 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 2-8-1~2-8-4 に示した。真度の目標値 (70~120%) 及び精度の目標値 (併行精度 25%未満、室内精度 30%未満) を満たした。

### ③ 検量線の直線性

モネンシン、ナラシン及びラサロシドについては  $0.1 \sim 2.5 \mu\text{g/L}$  の範囲で、サリノマイシンについては  $0.05 \sim 1 \mu\text{g/L}$  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。

### ④ 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。

## 9. カルバリル分析法

### ① 選択性

ブランク試料を本分析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)。

### 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 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 検量線の直線性

$0.5 \sim 10 \mu\text{g/L}$  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。

### ④ 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。

## 10. ペルメトリン分析法

### ① 選択性

ブランク試料を本分析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 2-10)。

### 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 2-10 に示した。真度の目標値 (70~120%) 及び精度の目標値 (併行精度 15%未満、室内精度 20%未満) を満たした。

### ③ 検量線の直線性

$5 \sim 60 \mu\text{g/L}$  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。

### ④ 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。

## 11. シフルトリン及びフルメトリン分析法

### ① 選択性

ブランク試料を本分析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い、又は許容範囲内であった (図 2-11-1、2-11-2)。

### 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 2-11-1、2-11-2 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 検量線の直線性

0.25～5 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数  $r^2 > 0.9953$  となり、良好な直線性が得られた。

### ④ 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。

## 12. フルニキシン分析法

### ① 選択性

ブランク試料を本分析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 25%未満、室内精度 30%未満)を満たした。

### ③ 検量線の直線性

0.1～2 µg/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。

### ④ 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。

## 13. DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 $\alpha$ -HCH、 $\beta$ -HCH 並びに $\gamma$ -HCH 分析法

### ① 選択性

ブランク試料を本分析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い又は許容範囲内であった（図 2-13-1～2-13-13）。

### 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 2-13-1～2-13-13 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 検量線の直線性

0.25～5 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。

### ④ 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。

## 14. PCB 分析法

### ① 選択性

ブランク試料を本分析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 2-14-1～2-14-5）。

### 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 2-14-1～2-14-6 に示した。真度の目標値(70～120%)及び精度の目標値(併行精度 30%未満、室内精度 35%未満)を満たした。

また、内標準物質として用いた [13C12]PCB28、[13C12]PCB52、[13C12]PCB101、[13C12]PCB138、[13C12]PCB153 及び [13C12]PCB180 の回収率はいずれも 50%以上 120%未満であった。

### ③ 検量線の直線性

0～50 µg/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。

### ④ 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。

#### **D. 結論**

鶏の筋肉を対象として B 物質 27 化合物の分析法 (14 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、鶏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 物質が鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに鶏の筋肉 (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 なし
2. 学会発表 なし

#### **F. 知的財産権の出願・登録状況** なし

表 1-1 測定条件（ドラメクチン分析法）

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)	0.3																										
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	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>1.00</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>10.00</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>10.01</td> <td>2</td> <td>98</td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>2</td> <td>98</td> </tr> <tr> <td>20.01</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>25.00</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.00	30	70	1.00	20	80	10.00	20	80	10.01	2	98	20.00	2	98	20.01	30	70	25.00	30	70
時間(分)	A 液 (%)	B 液 (%)																									
0.00	30	70																									
1.00	20	80																									
10.00	20	80																									
10.01	2	98																									
20.00	2	98																									
20.01	30	70																									
25.00	30	70																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
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)	400																										
ネブライザーガス	空気、60 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)	916.4→331.2[DP:111 (V)、コリジョンエネルギー:33 (eV)]																										
定性イオン (m/z)	916.4→593.3[DP:111 (V)、コリジョンエネルギー:21 (eV)]																										
保持時間 (min)	ドラメクチン 6.1																										



**秤 取**

↓ 試料 10 g

**抽出**

↓ メタノール 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ 残留物をメタノール 50 mL で洗浄

↓ ろ液を合わせ、メタノールで 200 mL に定容

**グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム [InertSep GC/NH<sub>2</sub>(500 mg/500 mg/20 mL)]**

↓ メタノール 10 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 4 mL 注入

↓ 酢酸エチル及びギ酸の混液(100:1)20 mL で溶出(全溶出液を採る)

**濃縮(溶媒除去)**

↓ 残留物をメタノール 2 mL に溶解

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-1 ドラメクチン分析法の分析法フローチャート

表 1-2 測定条件 (レバミゾール分析法)

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)	5																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A液 : 水及びギ酸の混液(1000:1) B液 : アセトニトリル(HPLC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>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>18.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>18.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>23.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	90	10	15.0	10	90	18.0	10	90	18.1	90	10	23.0	90	10
時間(分)	A液(%)	B液(%)																			
0.0	90	10																			
15.0	10	90																			
18.0	10	90																			
18.1	90	10																			
23.0	90	10																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																				
イオン化モード	ESI(+)																				
bb イオンスプレー電圧 (V)	5500																				
ヒーター温度 (°C)	700																				
ネブライザーガス	空気、60 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)	205.0→178.0[DP:91 (V)、コリジョンエネルギー:31 (eV)]																				
定性イオン(m/z)	205.0→91.0[DP:91 (V)、コリジョンエネルギー:55 (eV)]																				
保持時間 (min)	4.7																				

### 秤 取

↓ 試料 10 g

### 抽 出

↓ アセトニトリル 60 mL 及び無水硫酸ナトリウム 20 g を加え

↓ 1 分間ホモジナイズ

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過、アセトニトリル層を採る

↓ 残留物にアセトニトリル 40 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、アセトニトリル層を採る

↓ ろ液を合わせる

### ヘキサン洗浄

↓ アセトニトリル飽和ヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採りアセトニトリルで 200 mL 定容

↓ 抽出液 1 mL 分取

### 濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物を水及びアセトニトリルの混液(3:2)1 mL に溶解

### 試験溶液

↓

### LC-MS/MS

図 1-2 レバミゾール分析法の分析法フローチャート

表 1-3 測定条件 (トリクラベンダゾール分析法)

LC 条件																					
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 $\mu$ m : Waters 製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.35																				
注入量 ( $\mu$ L)	5																				
カラム温度 ( $^{\circ}$ C)	40																				
移動相	A液 : 0.5 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	<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>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>6.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>13.50</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>13.51</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>16.50</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	70	30	6.0	5	95	13.50	5	95	13.51	70	30	16.50	70	30
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																			
0.0	70	30																			
6.0	5	95																			
13.50	5	95																			
13.51	70	30																			
16.50	70	30																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																				
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 ( $^{\circ}$ C)	650																				
ネブライザーガス	空気、30 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)	326.9 $\rightarrow$ 181.9[DP:-95(V)、コリジョンエネルギー:-30(eV)]																				
定性イオン(m/z)	326.9 $\rightarrow$ 145.9[DP:-95(V)、コリジョンエネルギー:-42(eV)]																				
保持時間 (min)	5.6																				

**秤 取**

↓ 試料 10 g

**加水分解**

↓ 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

**抽 出**

↓ メタノール 5 mL、5 mol/L 塩酸 12 mL 及び酢酸エチル 40 mL を加え、10 分間振とう

↓ 3500 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

↓ 3500 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 0.5 mL 分取

**濃縮(溶媒除去)**

↓ 残留物をエタノール及び酢酸の混液(1:1)5 mL に溶解

**酸化反応**

↓ 過酸化水素水 25  $\mu$ L を加え 90°C で 16 時間加熱

**濃縮(溶媒除去)**

↓ 残留物をメタノール及び水の混液(7:3)5 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

↓ 上記で得られた溶液を注入

↓ メタノール及び水の混液(7:3)5 mL で洗浄

↓ メタノール 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)4 mL に溶解

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-3 トリクラベンダゾール分析法の分析法フローチャート

表 1-4 測定条件 (ピペラジン分析法)

LC 条件																											
カラム	TSKgel VMPak-25 (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 7 μm :東ソー製)																										
移動相流速 (mL/min)	0.3																										
注入量 (μL)	5																										
カラム温度 (°C)	40																										
移動相	A液 : 10 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>1.40</td> <td>15</td> <td>85</td> </tr> <tr> <td>2.70</td> <td>35</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>11.50</td> <td>35</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>11.51</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>17.50</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>17.51</td> <td>15</td> <td>85</td> </tr> <tr> <td>22.50</td> <td>5</td> <td>85</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	1.40	15	85	2.70	35	65	11.50	35	65	11.51	95	5	17.50	95	5	17.51	15	85	22.50	5	85
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																									
1.40	15	85																									
2.70	35	65																									
11.50	35	65																									
11.51	95	5																									
17.50	95	5																									
17.51	15	85																									
22.50	5	85																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
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)	700																										
ネブライザーガス	空気、80 psi																										
ターボガス	空気、80 psi																										
コリジョンガス	窒素																										
定量イオン (m/z)	86.9→44.1 [DP:86(V)、コリジョンエネルギー:86(eV)]																										
定性イオン (m/z)	設定せず																										
保持時間 (min)	7.1																										

**秤 取**

↓ 試料 5 g

**抽出**

- ↓ 10%トリクロロ酢酸 30 mL、ヘキサン 3 mL 及び酢酸エチル 3 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ ヘキサン層及び酢酸エチル層を廃棄
- ↓ 10%トリクロロ酢酸層を分取
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ 10%トリクロロ酢酸 15 mL、ヘキサン 2 mL 及び酢酸エチル 2 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 2500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 10%トリクロロ酢酸層を分取
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ ろ液を合わせて 10%トリクロロ酢酸で 50 mL に定容

**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 cc)]**

- ↓ メタノール及び 25%アンモニア水の混液(95:5)10 mL、メタノール 5 mL、
- ↓ 超純水 5 mL 及び 10%トリクロロ酢酸 10 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出液 10 mL を注入
- ↓ 水 5 mL を 2 回及びメタノール 10 mL で洗浄
- ↓ メタノール及び 25%アンモニア水の混液(95:5)7.5 mL で溶出(全溶出液を採取)

**定容**

- ↓ メタノール及び 25%アンモニア水の混液(95:5)で 10 mL に定容

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-4 ピペラジン分析法の分析法フローチャート

表 1-5 測定条件 (アンプロリウム分析法)

LC 条件																					
カラム	XBridge BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 $\mu$ m : Waters 製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 ( $\mu$ L)	2																				
カラム温度 ( $^{\circ}$ C)	40																				
移動相	A液 : 50 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液(pH 4.5) 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>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>7.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>12.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	90	10	7.0	40	60	12.0	40	60	12.1	90	10	20.0	90	10
時間(分)	A液(%)	B液(%)																			
0.0	90	10																			
7.0	40	60																			
12.0	40	60																			
12.1	90	10																			
20.0	90	10																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																				
イオン化モード	ESI(+)																				
イオンスプレー電圧 (V)	4000																				
ヒーター温度 ( $^{\circ}$ C)	400																				
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 ( $m/z$ )	243.0 $\rightarrow$ 150.0 [DP: 16(V)、コリジョンエネルギー: 15(eV)]																				
定性イオン ( $m/z$ )	243.0 $\rightarrow$ 94.0 [DP: 16(V)、コリジョンエネルギー: 17(eV)]																				
保持時間 (min)	4.4																				



**秤 取**

↓ 試料 10 g

**抽出**

- ↓ アセトニトリル 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 3000 r/min で 10 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ アセトニトリル 20 mL を加え 10 分間振とう
- ↓ 3000 r/min で 10 分間遠心分離
- ↓ 綿栓ろ過
- ↓ ろ液を合わせてアセトニトリルで 100 mL に定容

**カルボキシジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis WCX(150 mg/6 mL)]**

- ↓ アセトニトリル 10 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出液 10 mL を注入
- ↓ アセトニトリル 5 mL で洗浄
- ↓ 水、アセトニトリル及びギ酸の混液(90:10:2)10 mL で溶出(全溶出液を採る)
- ↓ 水、アセトニトリル及びギ酸の混液(90:10:2)で 10 mL に定容

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-5 アンプロリウム分析法の分析法フローチャート

表 1-6 測定条件 (エトパペート分析法)

LC 条件																					
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm :ジュ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 : 水及びギ酸の混液(1000 : 1) B液 : アセトニトリル (HPLC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>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>15.01</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	80	20	10.0	10	90	15.0	10	90	15.01	80	20	20.0	80	20
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																			
0.0	80	20																			
10.0	10	90																			
15.0	10	90																			
15.01	80	20																			
20.0	80	20																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																				
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)	450																				
ネブライザーガス	空気、60 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)	238.0→206.0[DP:11 (V)、コリジョンエネルギー:17 (eV)]																				
定性イオン (m/z)	238.0→136.0[DP:11 (V)、コリジョンエネルギー:37 (eV)]																				
保持時間 (min)	6.0																				

**秤 取**

↓ 試料 10 g

**抽出**

↓ アセトニトリル 60 mL、アセトニトリル飽和ヘキサン 40 mL 及び無水硫酸ナトリウム 20 g を加え

↓ 1 分間ホモジナイズ

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過、アセトニトリル層を採る

↓ 残留物及びヘキサン層にアセトニトリル 40 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、アセトニトリル層を採る

↓ ろ液を合わせてアセトニトリルで 200 mL に定容

↓ 抽出液 4 mL 分取

**濃縮(溶媒除去)**

↓ 残留物を水及びアセトニトリルの混液(3:2)10 mL に溶解

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-6 エトパペート分析法の分析法フローチャート

表 1-7 測定条件 (ナイカルバジン及びハロフジノン分析法)

LC 条件																			
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm :ジールサイエンス製)																		
移動相流速 (mL/min)	0.2																		
注入量 (μL)	5																		
カラム温度 (°C)	40																		
移動相	A液 : 水及びギ酸の混液(1000:1) B液 : アセトニトリル(HPLC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>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>18.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>18.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>23.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	90	10	15.0	10	90	18.0	10	90	18.1	90	10	23.0	90	10
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																	
0.0	90	10																	
15.0	10	90																	
18.0	10	90																	
18.1	90	10																	
23.0	90	10																	
MS 条件																			
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																		
イオン化モード	ESI(-)、ESI(+)																		
イオンスプレー電圧 (V)	-4500、5500																		
ヒーター温度 (°C)	700																		
ネブライザーガス	空気、60 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)、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)													
4,4'-ジニトロカルバニリド	301.1	-14	137.1	-18	107.0	-44													
ハロフジノン	415.0	88	100.0	37	121.0	30													
保持時間 (min)	4,4'-ジニトロカルバニリド 12.3、ハロフジノン 6.9																		

### 秤 取

↓ 試料 10 g

### 抽出

↓ アセトニトリル 60 mL 及び無水硫酸ナトリウム 20 g を加え

↓ 1 分間ホモジナイズ

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過、アセトニトリル層を採る

↓ 残留物にアセトニトリル 40 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、アセトニトリル層を採る

↓ ろ液を合わせる

### ヘキサン洗浄

↓ アセトニトリル飽和ヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ アセトニトリル層を採りアセトニトリルで 200 mL 定容

↓ 抽出液 1 mL 分取

### 濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物を水及びアセトニトリルの混液(3:2)1 mL に溶解

### 試験溶液

↓

### LC-MS/MS

図 1-7 ナイカルバジン及びハロフジノン分析法の分析法フローチャート

表 1-8 測定条件 (モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン分析法)

LC 条件																																																			
カラム	InertSustain C18 PEEK (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm :ジールサイエンス製)																																																		
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	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>6.00</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>12.00</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>12.01</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> </tbody> </table>	時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.00	40	60	6.00	5	95	12.00	5	95	12.01	40	60	15.00	40	60																																
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																																																	
0.00	40	60																																																	
6.00	5	95																																																	
12.00	5	95																																																	
12.01	40	60																																																	
15.00	40	60																																																	
MS 条件																																																			
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																																																		
イオン化モード	ESI(+又は-)																																																		
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、60 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)、定性イオン(m/z)																																																			
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th></th> <th>プリカーサー イオン(m/z)</th> <th>プロダクト イオン(m/z)</th> <th>DP (V)</th> <th>コリジョンエ ネルギー (eV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">モネンシン</td> <td>(定量用)</td> <td>688.3</td> <td>635.5</td> <td>1</td> <td>27</td> </tr> <tr> <td>(定性用)</td> <td>693.3</td> <td>675.3</td> <td>1</td> <td>51</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">ラサロシド</td> <td>(定量用)</td> <td>589.3</td> <td>235.1</td> <td>-1</td> <td>-46</td> </tr> <tr> <td>(定性用)</td> <td>589.3</td> <td>173.1</td> <td>-1</td> <td>-58</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">ナラシン</td> <td>(定量用)</td> <td>782.4</td> <td>747.0</td> <td>1</td> <td>29</td> </tr> <tr> <td>(定性用)</td> <td>787.4</td> <td>431.3</td> <td>1</td> <td>69</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">サリノマイシン</td> <td>(定量用)</td> <td>768.3</td> <td>733.4</td> <td>1</td> <td>27</td> </tr> <tr> <td>(定性用)</td> <td>773.3</td> <td>431.3</td> <td>1</td> <td>67</td> </tr> </tbody> </table>			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)	モネンシン	(定量用)	688.3	635.5	1	27	(定性用)	693.3	675.3	1	51	ラサロシド	(定量用)	589.3	235.1	-1	-46	(定性用)	589.3	173.1	-1	-58	ナラシン	(定量用)	782.4	747.0	1	29	(定性用)	787.4	431.3	1	69	サリノマイシン	(定量用)	768.3	733.4	1	27	(定性用)	773.3	431.3	1	67
		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)																																														
モネンシン	(定量用)	688.3	635.5	1	27																																														
	(定性用)	693.3	675.3	1	51																																														
ラサロシド	(定量用)	589.3	235.1	-1	-46																																														
	(定性用)	589.3	173.1	-1	-58																																														
ナラシン	(定量用)	782.4	747.0	1	29																																														
	(定性用)	787.4	431.3	1	69																																														
サリノマイシン	(定量用)	768.3	733.4	1	27																																														
	(定性用)	773.3	431.3	1	67																																														
保持時間 (min)	モネンシン 9.0、ナラシン 9.9、サリノマイシン 9.3、ラサロシド 7.5																																																		

**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

↓ 吸引ろ過

↓ 残留物をアセトニトリル及び水の混液(9:1)60 mL で洗浄

↓ 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 で洗浄

↓ 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 1-8 モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン分析法の分析法フローチャート

表 1-9 測定条件 (カルバリル分析法)

LC 条件																					
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 $\mu$ m :ジューエルサイエンス製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 ( $\mu$ L)	4																				
カラム温度 ( $^{\circ}$ 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	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>10.00</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>15.01</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.00	60	40	10.00	20	80	15.00	20	80	15.01	60	40	20.00	60	40
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																			
0.00	60	40																			
10.00	20	80																			
15.00	20	80																			
15.01	60	40																			
20.00	60	40																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																				
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)	450																				
ネブライザーガス	空気、60 psi																				
ターボガス	空気、60 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン ( $m/z$ )	202.1 $\rightarrow$ 145.1[DP:66(V)、コリジョンエネルギー:16(eV)]																				
定性イオン ( $m/z$ )	202.1 $\rightarrow$ 127.1[DP:66(V)、コリジョンエネルギー:39(eV)]																				
保持時間 (min)	8.3																				



**秤 取**

↓ 試料 10 g

**抽出**

↓ アセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ 残留物をアセトン 50 mL で洗浄

↓ ろ液を合わせ、アセトンで 200 mL に定容

↓ 抽出液 10 mL 分取

**濃縮**

↓ 約 1 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)]**

↓ メタノール及び水各 5 mL でコンディショニング

↓ 濃縮液に水 20 mL を加えて注入

↓ 水及びメタノールの混液(8:2)10 mL で洗浄

↓ メタノール及び水の混液(8:2)10 mL で溶出(全溶出液を採る)

↓ メタノール及び水の混液(8:2)で 10 mL に定容

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-9 カルバリル分析法の分析法フローチャート

表 1-10 測定条件 (ペルメトリン分析法)

GC 条件	
検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 $\mu$ m: Agilent Technologies 製)
カラム温度( $^{\circ}$ C)	80 $^{\circ}$ C (2 min) – 30 $^{\circ}$ C/min – 190 $^{\circ}$ C – 2 $^{\circ}$ C/min – 280 $^{\circ}$ C (5 min)
注入口温度( $^{\circ}$ C)	250
検出器温度( $^{\circ}$ 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( $\mu$ L)	1
保持時間(min)	<i>cis</i> -ペルメトリン 29.6、 <i>trans</i> -ペルメトリン 30.6

## 秤 取

↓ 試料 5 g

## アセトン抽出

- ↓ 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 25 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  $\mu$  m)、
- ↓ 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]
- ↓ 溶解液を注入
- ↓ 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 1-10 ペルメトリン分析法の分析法フローチャート

表 1-11 測定条件 (シフルトリン及びフルメトリン分析法)

LC 条件																										
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 $\mu$ m :ジューエルサイエンス製)																									
移動相流速(mL/min)	0.2																									
注入量( $\mu$ L)	5																									
カラム温度( $^{\circ}$ C)	40																									
移動相	シフルトリン: A液:2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B液:メタノール フルメトリン: 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	<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>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> </tbody> </table>	時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	10	90	8.0	10	90																
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																								
0.0	10	90																								
8.0	10	90																								
MS 条件																										
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																									
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)	150																									
ネブライザーガス	空気、60 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)、定性イオン(m/z)																										
	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th rowspan="2">プリカーサー イオン</th> <th rowspan="2">DP (V)</th> <th colspan="2">プロダクトイオン① (定量用)</th> <th colspan="2">プロダクトイオン② (定性用)</th> </tr> <tr> <th>(m/z)</th> <th>コリジョン エネルギー(eV)</th> <th>(m/z)</th> <th>コリジョン エネルギー(eV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>シフルトリン</td> <td>451.0</td> <td>31</td> <td>191.0</td> <td>21</td> <td>434.0</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>フルメトリン</td> <td>527.0</td> <td>31</td> <td>267.0</td> <td>21</td> <td>239.0</td> <td>33</td> </tr> </tbody> </table>		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)	シフルトリン	451.0	31	191.0	21	434.0	13	フルメトリン	527.0	31	267.0	21	239.0	33
	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)																				
シフルトリン	451.0	31	191.0	21	434.0	13																				
フルメトリン	527.0	31	267.0	21	239.0	33																				
保持時間(min)	シフルトリン 3.9、フルメトリン 4.3																									

## 秤 取

↓ 試料 5 g

## アセトン抽出

- ↓ 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 2 mL 分取

## 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)5 mL に溶解

## 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 5 mL、アセトニトリル及び水(1:1)5 mL でコンディショニング
- ↓ 溶解液を注入
- ↓ アセトニトリル及び水の混液(1:1)5 mL で洗浄
- ↓ アセトニトリル 15 mL で溶出(全溶出液を採る)

## 濃縮(溶媒除去)

- ↓ 残留物をヘキサン及びジエチルエーテルの混液(96:4)10 mL に溶解

## 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム [Sep-Pak Plus florisil(910 mg)]

- ↓ ヘキサン 10 mL でコンディショニング
- ↓ 溶解液を注入
- ↓ ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(96:4)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 1 mL に溶解

## 試験溶液

↓

## LC-MS/MS

図 1-11 シフルトリン及びフルメトリン分析法の分析法フローチャート

表 1-12 測定条件 (フルニキシン分析法)

LC 条件																					
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm :ジューエルサイエンス製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 (μL)	5																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A液 : 水及びギ酸の混液(1000 : 1) B液 : アセトニトリル (HPLC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>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>13.0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>13.01</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>18.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	50	50	8.0	0	100	13.0	0	100	13.01	50	50	18.0	50	50
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																			
0.0	50	50																			
8.0	0	100																			
13.0	0	100																			
13.01	50	50																			
18.0	50	50																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																				
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、3.00 L/min																				
ドライイングガス	窒素、10.00 L/min																				
ヒーティングガス	空気、10.00 L/min																				
コリジョンガス	アルゴン																				
定量イオン(m/z)	297.1→279.2[コリジョンエネルギー:22(eV)]																				
定性イオン(m/z)	297.1→264.2[コリジョンエネルギー:35(eV)]																				
保持時間(min)	5.1																				

**秤 取**

↓ 試料 5 g

**抽出**

↓ アセトニトリル 30 mL、アセトニトリル飽和ヘキサン 20 mL 及び無水硫酸ナトリウム 10g を加え

↓ 1 分間ホモジナイズ

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過、アセトニトリル層を採る

↓ 残留物及びヘキサン層にアセトニトリル 20 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、アセトニトリル層を採る

↓ ろ液を合わせてアセトニトリルで 100 mL に定容

↓ 抽出液 4 mL 分取、メタノールで 10 mL に定容

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-12 フルニキシン分析法の分析法フローチャート

表 1-13 測定条件 (DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 $\alpha$ -HCH、 $\beta$ -HCH並びに $\gamma$ -HCH分析法)

検出器	ECD
カラム	DB-1701 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 $\mu$ m : Agilent Technologies 製)
カラム温度( $^{\circ}$ C)	80 $^{\circ}$ C(2 min)–30 $^{\circ}$ C/min–190 $^{\circ}$ C–3.6 $^{\circ}$ C/min–280 $^{\circ}$ C(5 min)
注入口温度( $^{\circ}$ C)	250
検出器温度( $^{\circ}$ 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( $\mu$ L)	2
保持時間(min)	7.9( $\alpha$ -HCH) 8.7( $\gamma$ -HCH) 9.1(ヘプタクロル) 9.7(アルドリン) 10.4( $\beta$ -HCH) 11.5( <i>cis</i> -ヘプタクロルエポキシド) 11.6( <i>trans</i> -ヘプタクロルエポキシド) 13.0( <i>p,p'</i> -DDE) 13.5(ディルドリン) 14.2(エンドリン) 14.5( <i>o,p'</i> -DDT) 15.8( <i>p,p'</i> -DDD) 16.4( <i>p,p'</i> -DDT)



### 秤 取

↓ 試料 5 g

### アセトン抽出

↓ 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

↓ [Florasil PR(粒径 150~250  $\mu$ m)、

↓ 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]

↓ 溶解液を注入

↓ 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 1-13 DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 $\alpha$ -HCH、 $\beta$ -HCH 並びに  $\gamma$ -HCH 分析法の分析法フローチャート

表 1-14 測定条件 (PCB 分析法)

GC 条件																																																	
カラム	Fused Silica HT8-PCB (内径 0.25 mm、長さ 60 m: 関東化学製)																																																
カラム温度(°C)	100°C(1 min)–20°C/min–180°C(0 min)–5°C/min–300°C(0 min)																																																
注入口温度(°C)	250																																																
インターフェース温度(°C)	300																																																
キャリアーガス	ヘリウム																																																
キャリアーガス流量(mL/min)	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	MS、選択イオン検出																																																
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(°C)	230																																																
四重極温度(°C)	150																																																
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)																																																	
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>定量イオン (m/z)</th> <th>定性イオン (m/z)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PCB28</td> <td>256.0</td> <td>258.0</td> </tr> <tr> <td>[<sup>13</sup>C<sub>12</sub>]PCB28</td> <td>268.0</td> <td>270.0</td> </tr> <tr> <td>MBP-19</td> <td>268.0</td> <td>270.0</td> </tr> <tr> <td>PCB52</td> <td>289.9</td> <td>291.9</td> </tr> <tr> <td>[<sup>13</sup>C<sub>12</sub>]PCB52</td> <td>302.0</td> <td>304.0</td> </tr> <tr> <td>MBP-70</td> <td>302.0</td> <td>304.0</td> </tr> <tr> <td>PCB101</td> <td>325.9</td> <td>327.9</td> </tr> <tr> <td>[<sup>13</sup>C<sub>12</sub>]PCB101</td> <td>337.9</td> <td>339.9</td> </tr> <tr> <td>MBP-111</td> <td>337.9</td> <td>339.9</td> </tr> <tr> <td>PCB138 及び PCB153</td> <td>359.8</td> <td>361.8</td> </tr> <tr> <td>[<sup>13</sup>C<sub>12</sub>] PCB138 及び [<sup>13</sup>C<sub>12</sub>] PCB153</td> <td>371.9</td> <td>373.9</td> </tr> <tr> <td>MBP-159</td> <td>371.9</td> <td>373.9</td> </tr> <tr> <td>PCB180</td> <td>395.8</td> <td>393.8</td> </tr> <tr> <td>[<sup>13</sup>C<sub>12</sub>]PCB180</td> <td>407.8</td> <td>405.8</td> </tr> <tr> <td>MBP-170</td> <td>407.8</td> <td>405.8</td> </tr> </tbody> </table>		定量イオン (m/z)	定性イオン (m/z)	PCB28	256.0	258.0	[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]PCB28	268.0	270.0	MBP-19	268.0	270.0	PCB52	289.9	291.9	[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]PCB52	302.0	304.0	MBP-70	302.0	304.0	PCB101	325.9	327.9	[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]PCB101	337.9	339.9	MBP-111	337.9	339.9	PCB138 及び PCB153	359.8	361.8	[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ] PCB138 及び [ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ] PCB153	371.9	373.9	MBP-159	371.9	373.9	PCB180	395.8	393.8	[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]PCB180	407.8	405.8	MBP-170	407.8	405.8
	定量イオン (m/z)	定性イオン (m/z)																																															
PCB28	256.0	258.0																																															
[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]PCB28	268.0	270.0																																															
MBP-19	268.0	270.0																																															
PCB52	289.9	291.9																																															
[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]PCB52	302.0	304.0																																															
MBP-70	302.0	304.0																																															
PCB101	325.9	327.9																																															
[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]PCB101	337.9	339.9																																															
MBP-111	337.9	339.9																																															
PCB138 及び PCB153	359.8	361.8																																															
[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ] PCB138 及び [ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ] PCB153	371.9	373.9																																															
MBP-159	371.9	373.9																																															
PCB180	395.8	393.8																																															
[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]PCB180	407.8	405.8																																															
MBP-170	407.8	405.8																																															
保持時間(min)	PCB28 16.3、PCB52 17.2、PCB101 20.4、PCB138 24.9、PCB153 23.8、PCB180 27.4																																																

### 秤 取

- ↓ 試料 1 g
- ↓ 10 µg/L 内標準溶液を 50 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
- ↓ 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濃縮液を移す
- ↓ ヘキサン約 1 mL でなす形フラスコ内を 3 回洗い、洗液をスピッツ管に合わせる
- ↓ 窒素ガスを通じて 50 µL まで濃縮

### 試験溶液

↓

### GC-MS

図 1-14 PCB 分析法の分析法フローチャート

(1) ドラメクチン分析法

表2-1 ドラメクチンの真度、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			
5	1回目	5.79	5.36	4.76	5.30	4.36	5.02	100.3	7.4	11.3
	2回目	4.89	5.36	5.34	5.07	3.94				

(2) レバミゾール分析法

表2-2 レバミゾールの真度、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			
10	1回目	9.5	9.8	9.9	9.1	9.7	9.6	95.9	2.1	3.4
	2回目	9.4	9.3	9.9	9.3	10.0				

(3) トリクラベンダゾール分析法

表2-3 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 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	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			
10	1回目	8.1	9.1	7.7	8.0	8.9	8.2	81.8	6.2	8.2
	2回目	7.1	9.0	8.0	8.3	7.7				

(4) ピペラジン分析法

表2-4 ピペラジンの真度、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			
10	1回目	7.4	11.3	7.9	8.3	9.3	8.8	87.8	10.3	19.9
	2回目	7.1	11.3	7.3	10.4	7.5				

(5) アンプロリウム分析法

表2-5 アンプロリウムの真度、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	日目			
10	1回目	10.2	9.4	9.4	10	10.2	10.2	101.5	5.7	6.4
	2回目	11.2	10.5	9.9	9.6	11.2				

(6) エトパベート分析法

表2-6 エトパベートの真度、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	9.5	9.9	10.1	10.0	10.3	9.9	99.0	3.5	4.2
	2回目	9.4	9.9	9.3	10.7	10.0				

(7) エトパベート分析法

表2-7-1 4,4'-ジニトロカルバニリドの真度、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	7.2	8.7	9.2	9.8	8.0	8.7	86.8	5.7	10.0
	2回目	7.7	8.4	9.1	9.3	9.4				

表2-7-2 ハロフジノンの真度、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	8.7	8.1	8.0	9.3	7.1	8.0	80.0	11.7	11.7
	2回目	7.1	7.5	9.5	7.4	7.2				

(8) モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン分析法

表2-8-1 モネンシンの真度、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			
5	1回目	4.17	3.66	4.20	4.20	4.77	4.19	83.7	2.6	8.4
	2回目	4.27	3.77	4.26	3.98	4.57				

表2-8-2 ナラシンの真度、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			
5	1回目	3.83	4.41	4.96	4.57	5.16	4.73	94.6	4.8	11.0
	2回目	4.18	4.64	5.04	5.07	5.44				

表2-8-3 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	1.76	1.51	2.03	1.84	1.57	1.77	88.6	5.4	12.0
	2回目	1.73	1.48	1.97	2.02	1.80				

表2-8-4 ラサロシドの真度、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			
5	1回目	4.40	4.11	4.33	4.43	4.01	4.23	84.6	3.9	6.0
	2回目	4.03	3.85	4.57	4.51	4.06				

(9) カルバリル分析法

表2-9 カルバリルの真度、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	47.0	48.0	51.0	48.9	46.9	49.0	98.0	2.6	4.2
	2回目	50.1	47.4	52.8	50.4	47.7				

(10) ペルメトリン分析法

表2-10 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	45.0	54.5	41.0	52.6	53.9	49.4	98.9	9.3	15.0
	2回目	57.1	52.8	35.0	47.5	55.0				

(11) シフルトリン及びフルメトリン分析法

表2-11-1 シフルトリンの真度、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			
10	1回目	9.9	9.7	10.9	8.8	10.2	10.0	99.7	3.6	6.8
	2回目	9.5	10.0	10.5	9.4	10.8				

表2-11-2 フルメトリンの真度、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			
10	1回目	9.1	11.1	12.0	10.1	10.8	11.0	109.7	5.1	9.5
	2回目	10.1	12.0	12.0	10.6	11.9				

(12) フルニキシン分析法

表2-12 フルニキシンの真度、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			
10	1回目	9.3	8.9	8.8	10.0	9.0	9.1	91.3	1.3	5.4
	2回目	9.3	8.7	8.7	9.8	8.8				

(13) DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 $\alpha$ -HCH、 $\beta$ -HCH並びに $\gamma$ -HCH分析法

表 2-13-1  $o,p'$ -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	10.5	9.2	9.3	8.2	8.9	9.5	95.0	4.8	9.3
	2回目	10.8	10.2	10.0	8.8	9.0				

表 2-13-2  $p,p'$ -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	8.8	8.5	8.4	7.6	7.8	8.3	83.2	2.3	7.2
	2回目	9.3	8.7	8.7	7.7	7.8				

表 2-13-3  $p,p'$ -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	9.9	9.9	9.2	8.5	8.4	9.3	93.5	3.0	8.3
	2回目	10.5	10.0	9.6	9.1	8.4				

表 2-13-4  $p,p'$ -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	10.3	9.6	9.2	8.1	8.1	9.4	93.7	6.1	12.6
	2回目	11.6	9.9	9.8	9.2	7.9				



表 2-13-5 アルドリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu$ g/kg)	測定値 ( $\mu$ 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	7.7	7.3	6.9	6.7	7.8	7.3	73.4	2.6	6.0
	2回目	7.4	7.7	7.0	7.1	7.9				

表 2-13-6 ディルドリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu$ g/kg)	測定値 ( $\mu$ 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	9.4	9.7	8.8	8.6	7.9	9.0	90.4	3.2	8.6
	2回目	9.9	10.0	9.4	8.7	8.1				

表 2-13-7 エンドリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu$ g/kg)	測定値 ( $\mu$ 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	9.5	9.7	8.8	9.2	7.1	8.9	89.2	3.8	13.0
	2回目	10.3	9.6	9.4	8.7	6.9				

表 2-13-8 ヘプタクロルの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu$ g/kg)	測定値 ( $\mu$ 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	8.6	7.9	7.9	7.2	6.6	7.9	79.1	5.6	10.4
	2回目	8.9	8.4	8.7	8.0	7.0				

表 2-13-9 *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 ( $\mu$ g/kg)	測定値 ( $\mu$ 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	9.5	10.4	9.2	9.1	9.9	10.0	100.0	6.1	6.1
	2回目	10.7	10.8	10.2	10.1	10.1				

表 2-13-10 *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 ( $\mu$ g/kg)	測定値 ( $\mu$ 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	8.7	9.2	8.3	7.9	7.3	8.6	86.2	6.5	8.5
	2回目	9.7	9.2	9.0	8.7	8.2				

表 2-13-11  $\alpha$ -HCH の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu$ g/kg)	測定値 ( $\mu$ 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	9.1	8.5	8.3	7.9	8.8	87.9	4.2	6.2
	2回目	9.6	9.3	9.1	8.7	8.5				

表 2-13-12  $\beta$ -HCH の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu$ g/kg)	測定値 ( $\mu$ 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	9.8	8.8	9.0	7.9	9.1	91.5	3.7	7.8
	2回目	10.0	9.7	9.2	9.6	8.2				

表 2-13-13  $\gamma$ -HCH の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu$ g/kg)	測定値 ( $\mu$ 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	9.0	8.5	8.3	9.3	8.7	87.4	6.8	6.9
	2回目	9.4	8.9	9.1	8.2	7.5				

(14) PCB分析法

表2-14-1 PCB28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 (%)	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			
0.07	1日目	0.0610	0.0728	0.0691	0.0688	0.0596	0.0659	0.0692	98.9	7.4	7.9
	2日目	0.0744	0.0693	0.0750	0.0637	0.0739	0.0728				
	3日目	0.0722	0.0607	0.0763	0.0713	0.0648	0.0741				
0.13	1日目	0.1396	0.1270	0.1313	0.1379	0.1392	0.1321	0.1338	102.9	7.4	7.4
	2日目	0.1350	0.1242	0.1322	0.1413	0.1399	0.1415				
	3日目	0.1422	0.1278	0.1053	0.1423	0.1438	0.1250				
0.2	1日目	0.190	0.217	0.199	0.192	0.210	0.204	0.207	103.4	3.8	4.1
	2日目	0.204	0.219	0.214	0.197	0.204	0.212				
	3日目	0.212	0.215	0.207	0.204	0.211	0.214				

表2-14-2 PCB52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 (%)	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			
0.07	1日目	0.0718	0.0747	0.0641	0.0616	0.0610	0.0667	0.0700	100.0	6.0	7.1
	2日目	0.0727	0.0750	0.0757	0.0703	0.0716	0.0714				
	3日目	0.0680	0.0744	0.0707	0.0739	0.0734	0.0636				
0.13	1日目	0.1423	0.1421	0.1243	0.1345	0.1417	0.1298	0.1351	103.9	4.0	4.0
	2日目	0.1407	0.1323	0.1322	0.1363	0.1357	0.1362				
	3日目	0.1276	0.1345	0.1385	0.1341	0.1383	0.1298				
0.2	1日目	0.196	0.202	0.195	0.215	0.198	0.196	0.203	101.5	3.7	3.7
	2日目	0.208	0.207	0.210	0.204	0.200	0.209				
	3日目	0.205	0.190	0.199	0.193	0.209	0.217				

表 2-14-3 PCB101 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 (%)	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			
0.07	1日目	0.0698	0.0725	0.0693	0.0746	0.0710	0.0661	0.0721	103.0	3.8	4.5
	2日目	0.0728	0.0675	0.0755	0.0718	0.0713	0.0689				
	3日目	0.0723	0.0751	0.0755	0.0784	0.0723	0.0731				
0.13	1日目	0.1326	0.1319	0.1396	0.1224	0.1419	0.1282	0.1324	101.8	5.7	5.7
	2日目	0.1185	0.1289	0.1372	0.1312	0.1386	0.1324				
	3日目	0.1356	0.1179	0.1398	0.1394	0.1360	0.1307				
0.2	1日目	0.206	0.214	0.210	0.198	0.198	0.213	0.205	102.5	3.8	3.8
	2日目	0.204	0.210	0.195	0.215	0.195	0.194				
	3日目	0.201	0.207	0.212	0.217	0.203	0.198				

表2-14-4 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			
0.07	1日目	0.0607	0.0744	0.0743	0.0664	0.0709	0.0637	0.0698	99.7	6.8	6.8
	2日目	0.0737	0.0709	0.0659	0.0738	0.0766	0.0702				
	3日目	0.0693	0.0711	0.0626	0.0708	0.0651	0.0752				
0.13	1日目	0.1112	0.1231	0.1263	0.1355	0.1320	0.1221	0.1288	99.1	5.3	5.6
	2日目	0.1365	0.1236	0.1315	0.1285	0.1395	0.1323				
	3日目	0.1272	0.1375	0.1335	0.1228	0.1326	0.1224				
0.2	1日目	0.208	0.202	0.207	0.208	0.219	0.192	0.207	103.3	4.6	4.6
	2日目	0.218	0.216	0.208	0.210	0.210	0.205				
	3日目	0.191	0.213	0.187	0.214	0.215	0.196				

表2-14-5 PCB153の真度、併行精度及び室内精度

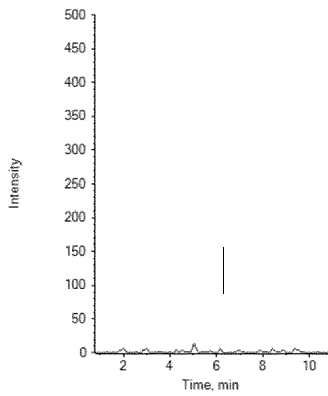
添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )								平均回収率 (%)	並行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
0.07	1日目	0.0607	0.0749	0.0579	0.0605	0.0674	0.0743	0.0708	101.1	6.8	8.6
	2日目	0.0681	0.0747	0.0728	0.0742	0.0758	0.0740				
	3日目	0.0734	0.0762	0.0733	0.0734	0.0679	0.0747				
0.13	1日目	0.1325	0.1311	0.1319	0.1334	0.1231	0.1282	0.1345	103.4	3.5	4.3
	2日目	0.1295	0.1424	0.1388	0.1289	0.1370	0.1419				
	3日目	0.1422	0.1347	0.1405	0.1317	0.1360	0.1366				
0.2	1日目	0.193	0.204	0.219	0.211	0.201	0.217	0.203	101.5	4.0	4.2
	2日目	0.202	0.194	0.205	0.212	0.189	0.211				
	3日目	0.200	0.204	0.204	0.198	0.194	0.196				

表 2-14-6 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			
0.07	1日目	0.0702	0.0650	0.0734	0.0670	0.0659	0.0701	0.0673	96.2	8.2	8.2
	2日目	0.0711	0.0627	0.0701	0.0639	0.0624	0.0742				
	3日目	0.0745	0.0761	0.0606	0.0645	0.0587	0.0618				
0.13	1日目	0.1338	0.1353	0.1303	0.1204	0.1203	0.1269	0.1277	98.3	4.7	4.7
	2日目	0.1252	0.1238	0.1343	0.1276	0.1209	0.1181				
	3日目	0.1361	0.1315	0.1322	0.1195	0.1309	0.1318				
0.2	1日目	0.194	0.207	0.206	0.208	0.201	0.211	0.199	99.7	5.3	5.4
	2日目	0.204	0.211	0.179	0.205	0.189	0.183				
	3日目	0.190	0.196	0.212	0.209	0.200	0.183				

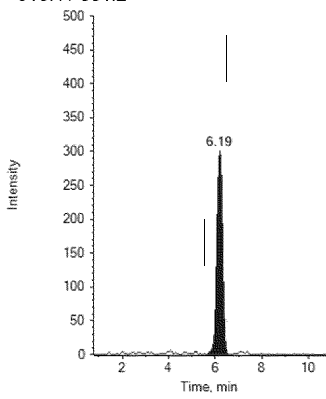
ブランク試料

7/22/2022 9:18:31 PM  
916.4 / 331.2



添加試料

7/22/2022 9:44:06 PM  
916.4 / 331.2



標準溶液 (0.5 µg/L)

7/22/2022 8:52:58 PM  
916.4 / 331.2

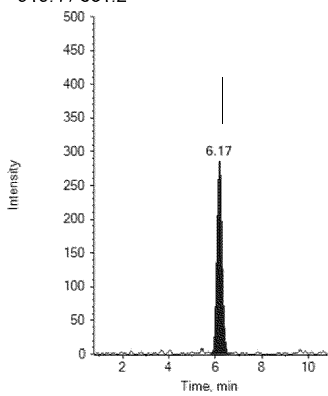
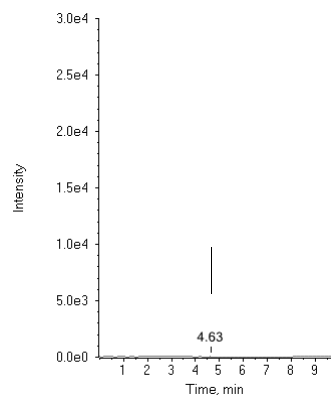


図 2-1 ドラメクチンの SRM クロマトグラム

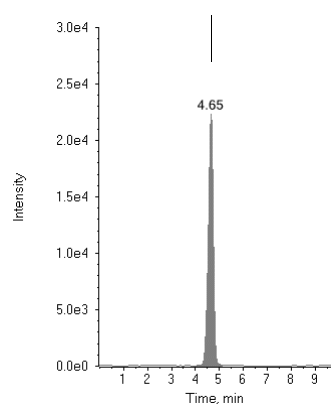
(m/z 916.4→331.2)

添加濃度 : 5 µg/kg

### ブランク試料



### 添加試料



### 標準溶液(0.5 $\mu$ g/L)

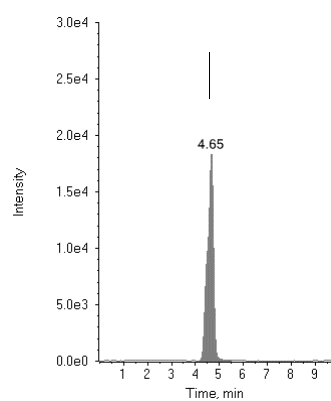
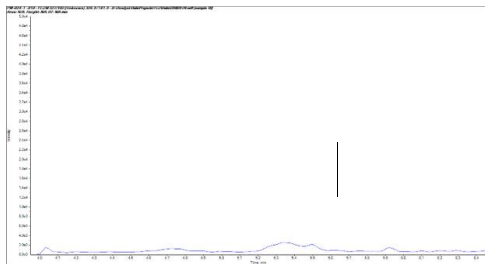
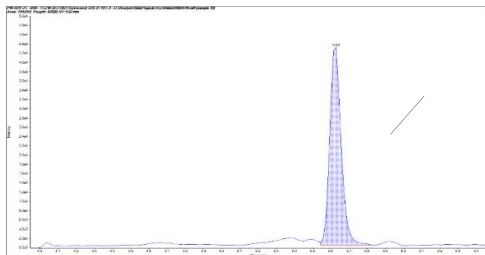


図 2-2 レバミゾールの SRM クロマトグラム  
(m/z 205.0→178.0)  
添加濃度 : 10  $\mu$ g/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.1 µg/L)

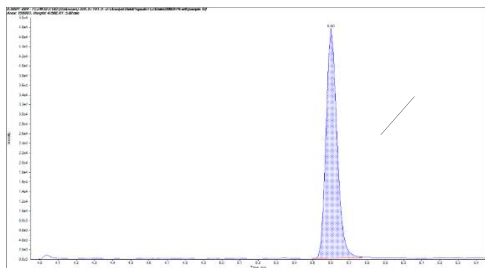
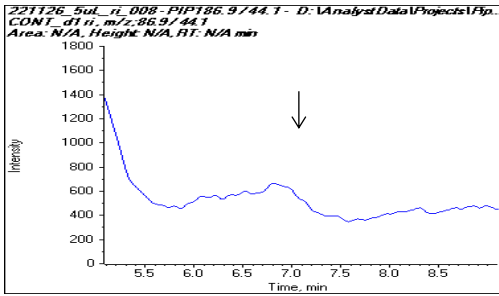


図 2-3 ケト-トリクラベンダゾールの SRM クロマトグラム

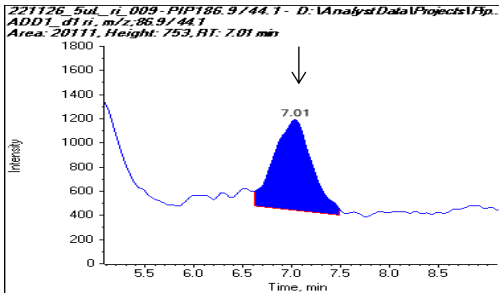
(m/z 326.9→181.9)

添加濃度 : 10 µg/kg

### ブランク試料



### 添加試料



### 標準溶液 (1 µg/L)

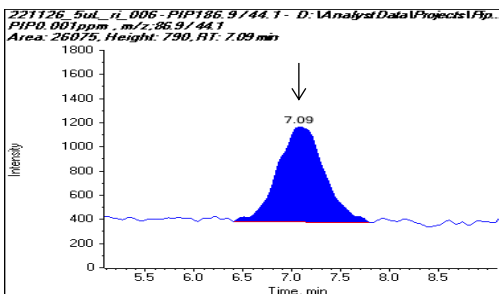
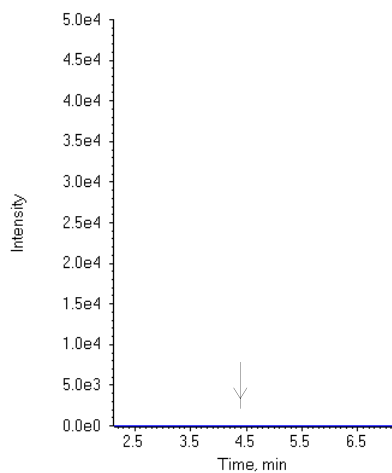


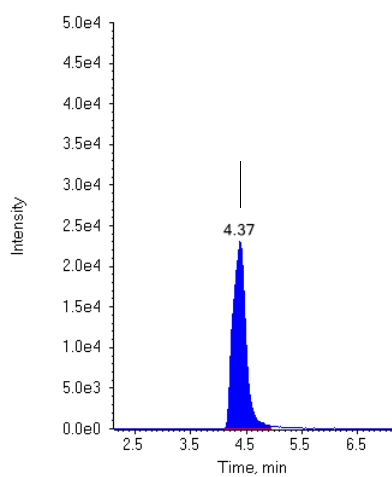
図 2-4 ピペラジンの SRM クロマトグラム  
(m/z 86.9→44.1)  
添加濃度 : 10 µg/k g



### ブランク試料



### 添加試料



### 標準溶液 (1 µg/L)

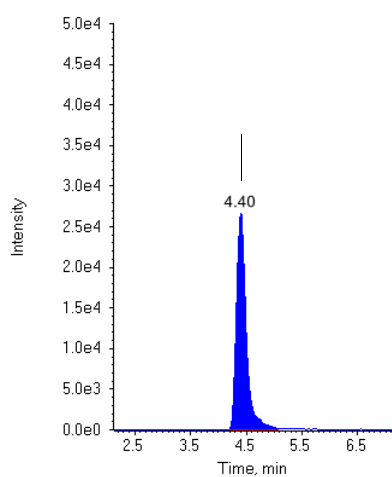


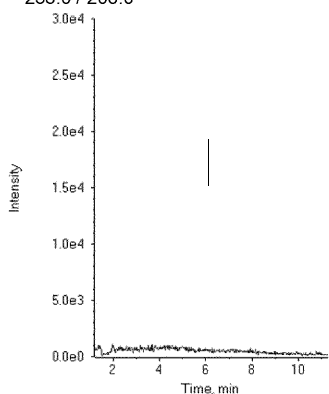
図 2-5 アンプロリウムの SRM クロマトグラム

(m/z 243.0.→150.0)

添加濃度 : 10 µg/k g

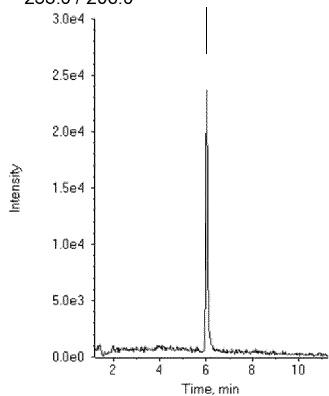
### ブランク試料

8/8/2022 3:28:45 PM  
238.0 / 206.0



### 添加試料

8/8/2022 3:49:18 PM  
238.0 / 206.0



### 標準溶液 (0.2 µg/L)

8/8/2022 2:47:39 PM  
238.0 / 206.0

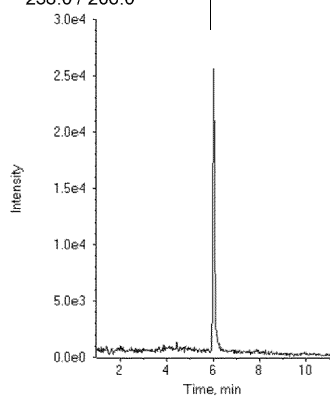
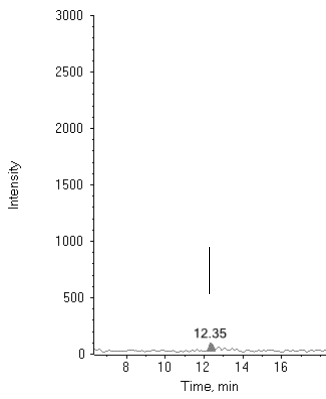


図 2-6 エトパペートの SRM クロマトグラム

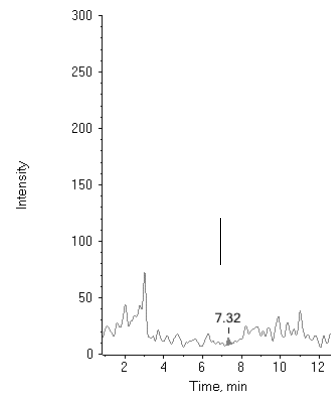
(m/z 238.0→206.0)

添加濃度 : 10 µg/kg

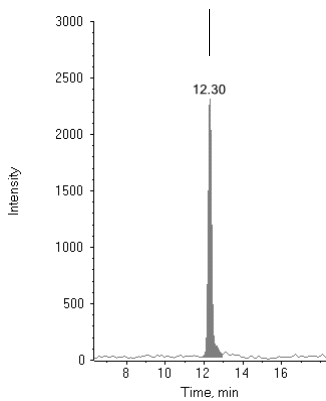
ブランク試料



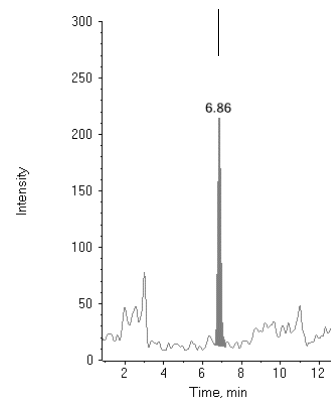
ブランク試料



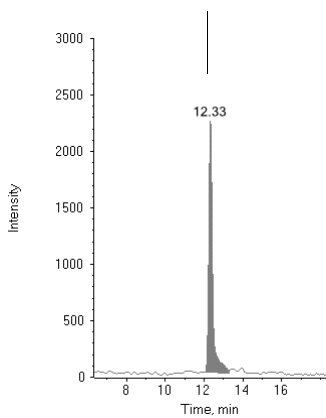
添加試料



添加試料



標準溶液(0.5 µg/L)



標準溶液(0.5 µg/L)

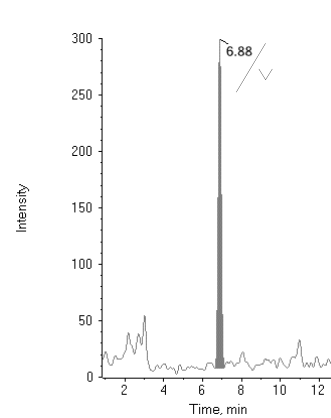
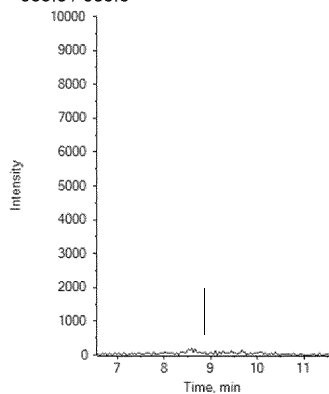


図 2-7-1 4,4'-ジニトロカルバニリドの  
SRM クロマトグラム  
( $m/z$  301.1→137.1)  
添加濃度: 10 µg/kg

図 2-7-2 ハロフジノンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  415.0→100.0)  
添加濃度: 10 µg/kg

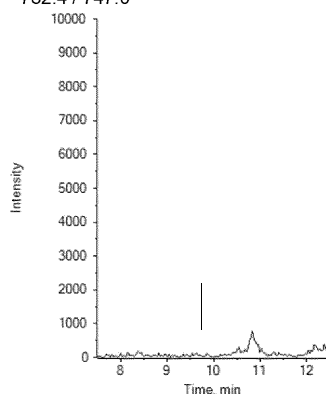
ブランク試料

8/12/2022 1:02:51 AM  
688.3 / 635.5



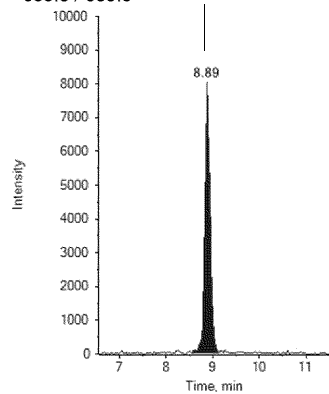
ブランク試料

8/12/2022 1:02:51 AM  
782.4 / 747.0



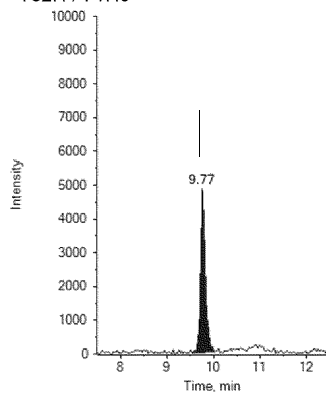
添加試料

8/12/2022 1:18:24 AM  
688.3 / 635.5



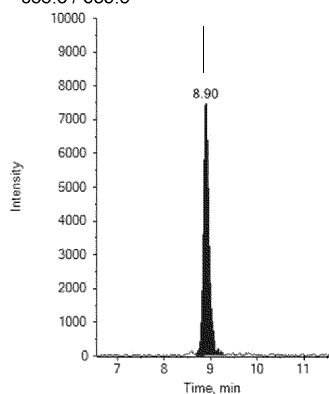
添加試料

8/12/2022 1:33:58 AM  
782.4 / 747.0



標準溶液(0.25 µg/L)

8/11/2022 11:29:22 PM  
688.3 / 635.5



標準溶液(0.25 µg/L)

8/11/2022 11:29:22 PM  
782.4 / 747.0

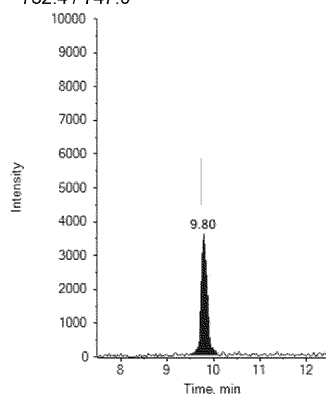


図 2-8-1 モネンシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  688.3→635.5)

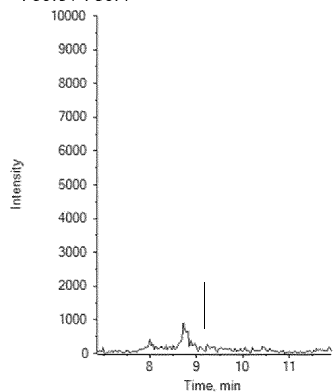
添加濃度:5 µg/kg

図 2-8-2 ナラシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  782.4→747.0)

添加濃度:5 µg/kg

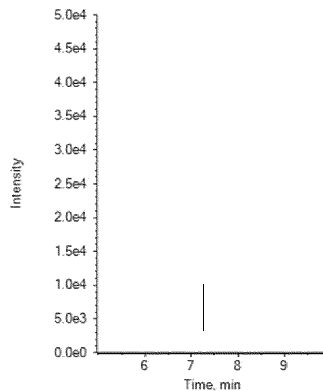
ブランク試料

8/12/2022 1:02:51 AM  
768.3 / 733.4



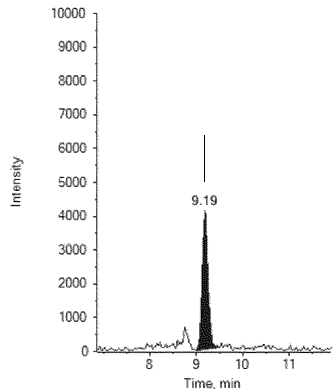
ブランク試料

8/12/2022 1:02:51 AM  
589.3 / 235.1



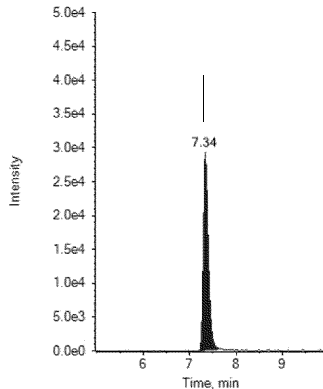
添加試料

8/12/2022 1:33:58 AM  
768.3 / 733.4



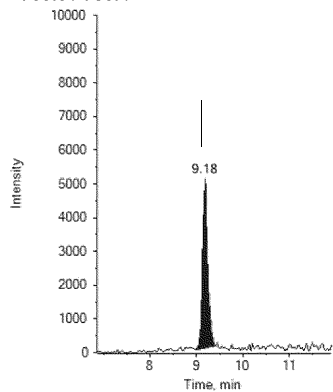
添加試料

8/12/2022 1:18:24 AM  
589.3 / 235.1



標準溶液(0.1 µg/L)

8/11/2022 11:44:55 PM  
768.3 / 733.4



標準溶液(0.25 µg/L)

8/11/2022 11:29:22 PM  
589.3 / 235.1

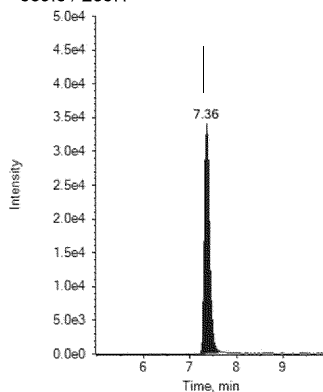


図 2-8-3 サリノマイシンの SRM クロマトグラム

( $m/z$  768.3→733.4)

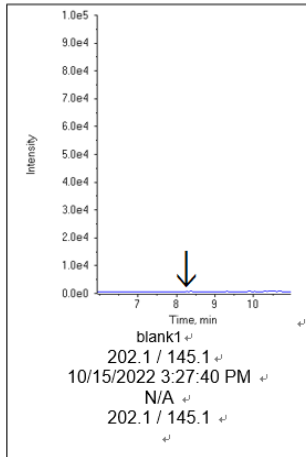
添加濃度:2 µg/kg

図 2-8-4 ラサロシドの SRM クロマトグラム

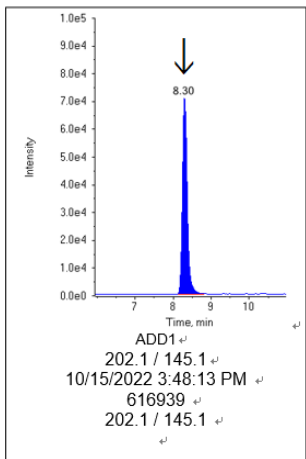
( $m/z$  589.3→235.1)

添加濃度:5 µg/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液(2 µg/L)

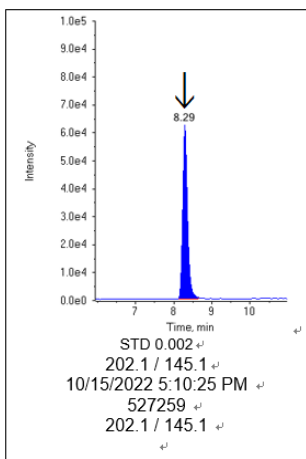
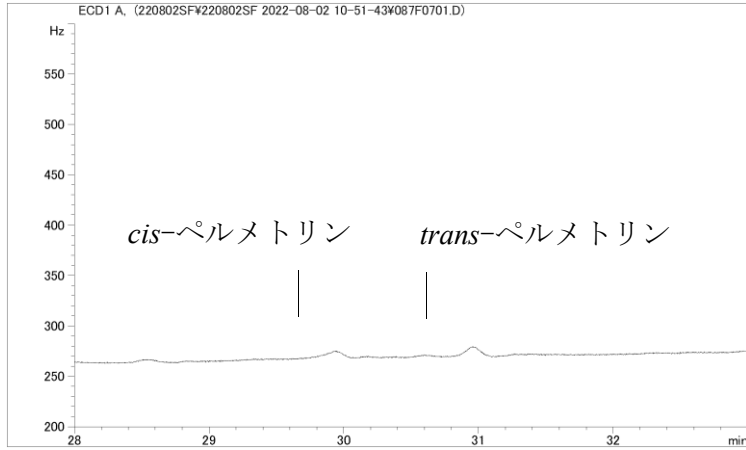


図 2-9 カルバリルの SRM クロマトグラム

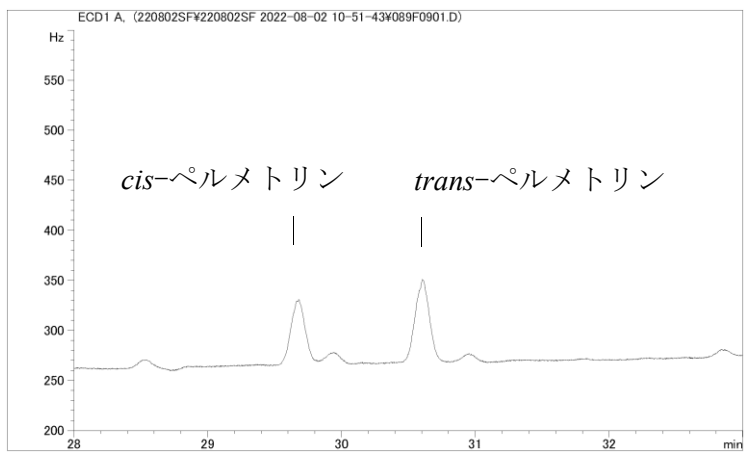
( $m/z$  202.1→145.1)

添加濃度: 50 µg/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液(10 µg/L)

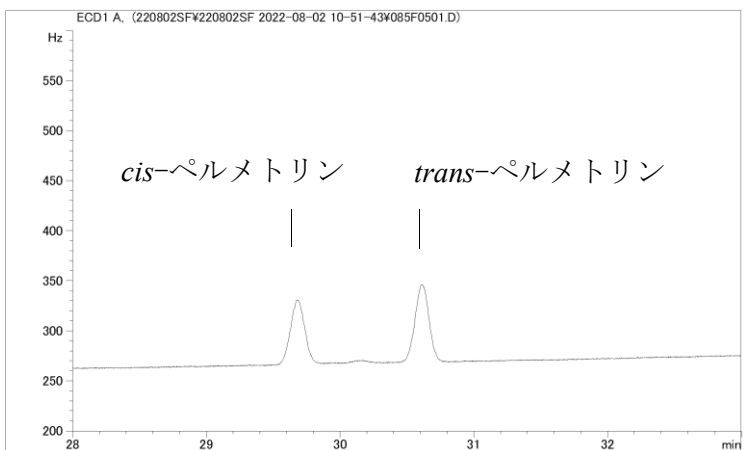
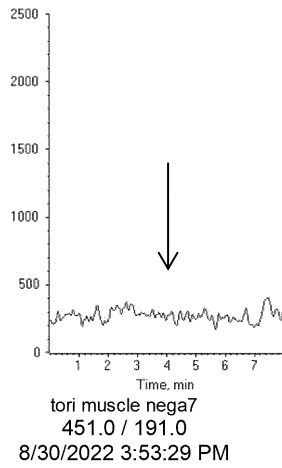
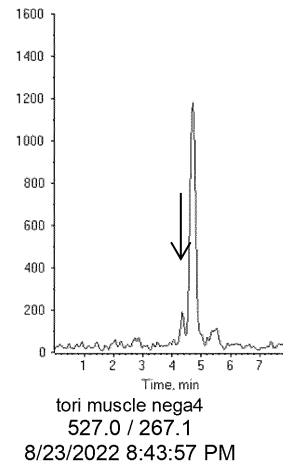


図 2-10 *cis*-ペルメトリン及び *trans*-ペルメトリンのクロマトグラム  
添加濃度: 50 µg/kg

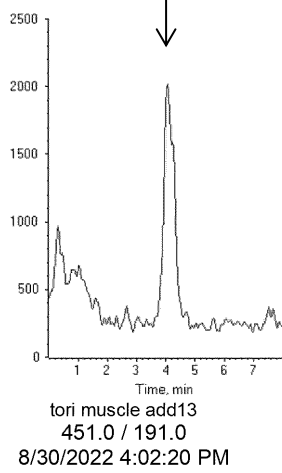
ブランク試料



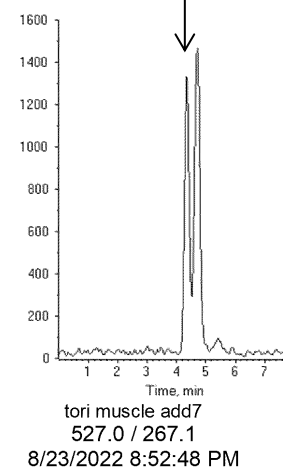
ブランク試料



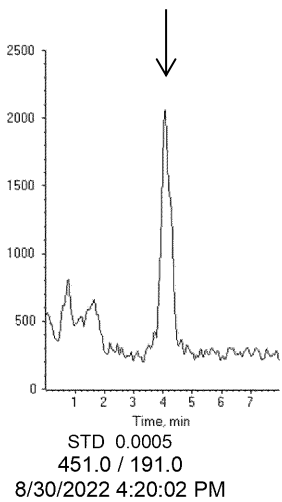
添加試料



添加試料



標準溶液(0.5 µg/L)



標準溶液(0.5 µg/L)

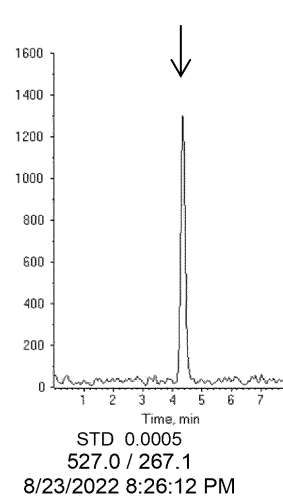


図 2-11-1 シフルトリンの SRM クロマトグラム

( $m/z$  451.0→191.0)

添加濃度: 10 µg/kg

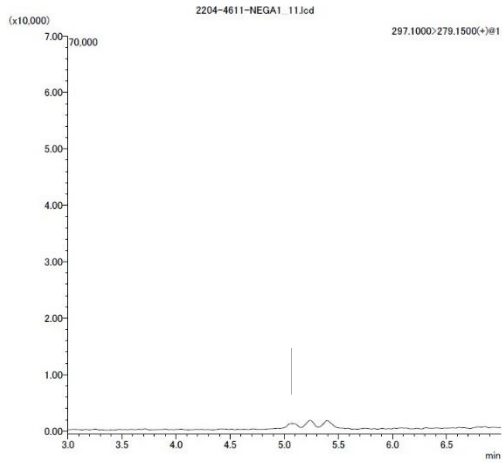
図 2-11-2 フルトリンの SRM クロマトグラム

( $m/z$  527.0→267.0)

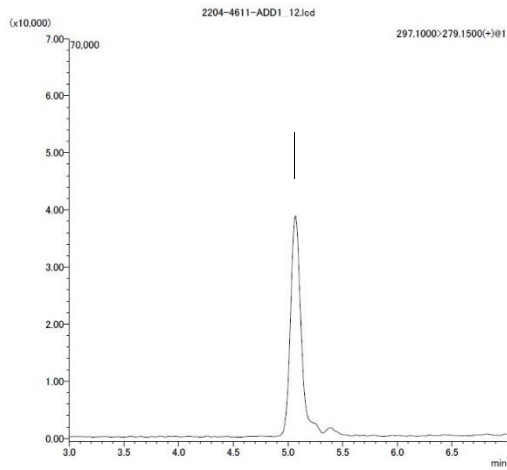
添加濃度: 10 µg/kg



ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.2 µg/L)

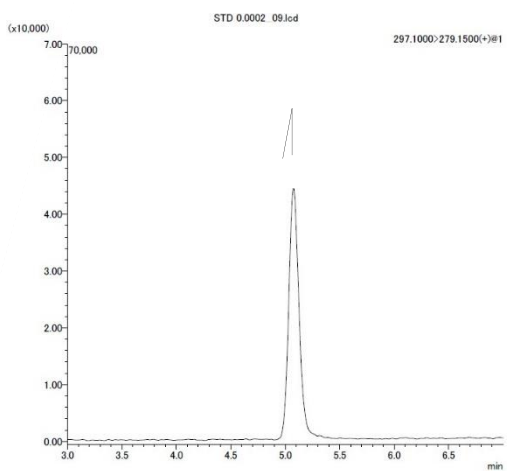
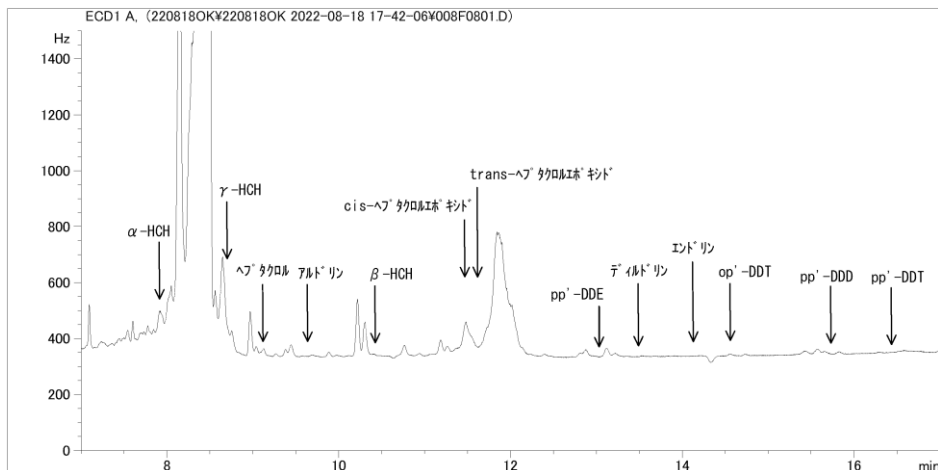


図 2-12 フルニキシンの SRM クロマトグラム

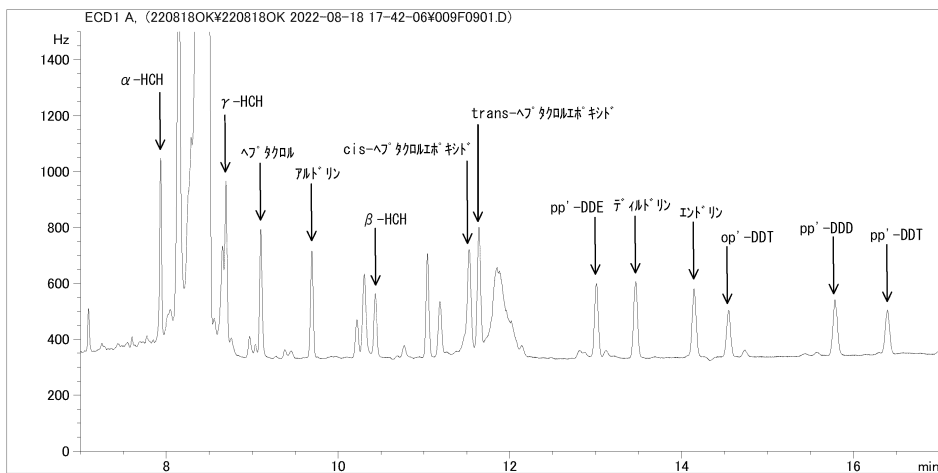
( $m/z$  297.1→279.2)

添加濃度: 10 µg/kg

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.5 μg/L)

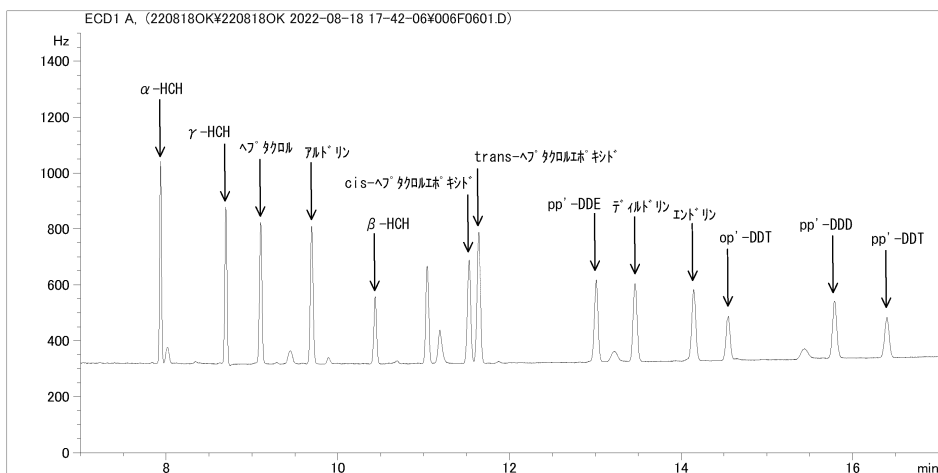
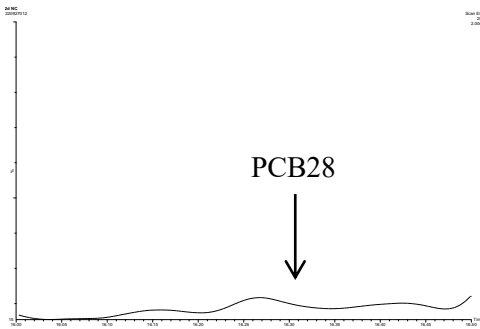
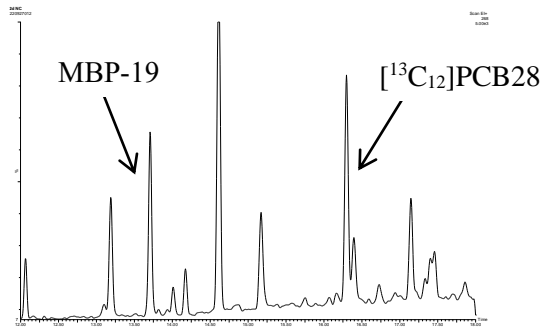


図 2-13 *o,p'*-DDT、*p,p'*-DDE、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDT、アルドリン、デイルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、*cis*-ヘプタクロルエポキシド、*trans*-ヘプタクロルエポキシド、 $\alpha$ -HCH、 $\beta$ -HCH 及び  $\gamma$ -HCH のクロマトグラム  
 添加濃度: 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$

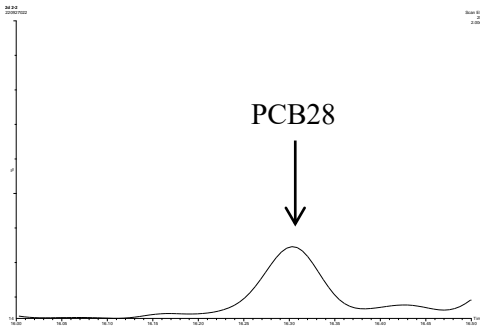
ブランク試料



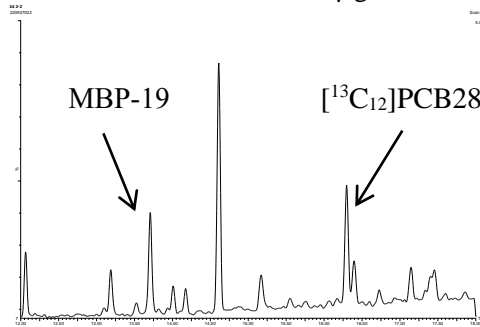
ブランク試料の内標準物質(10 µg/L)



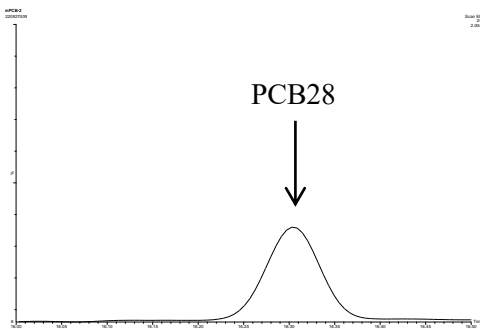
添加試料



添加試料の内標準物質(10 µg/L)



標準溶液(2 µg/L)



標準溶液(2 µg/L)の内標準物質(10 µg/L)

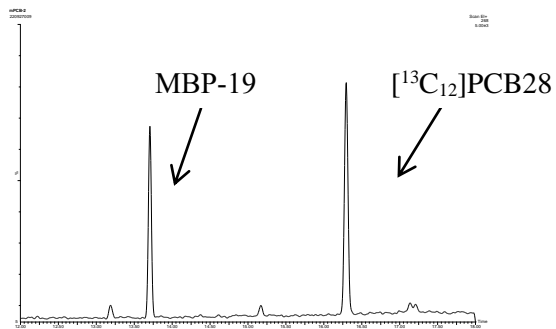
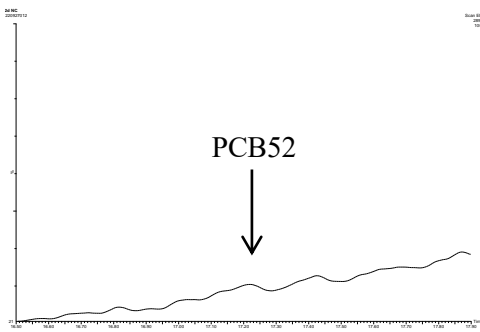


図 2-14-1 PCB28 の SIM クロマトグラム

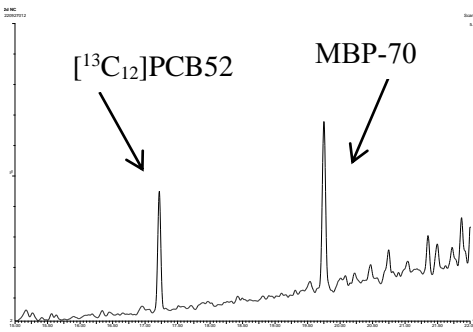
( $m/z$  256.0)

添加濃度: 0.13 µg/kg

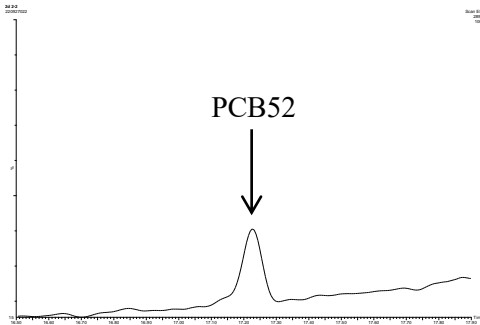
ブランク試料



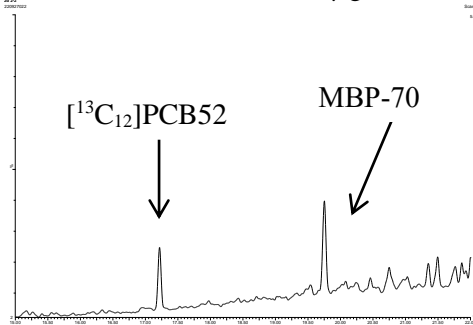
ブランク試料の内標準物質(10 μg/L)



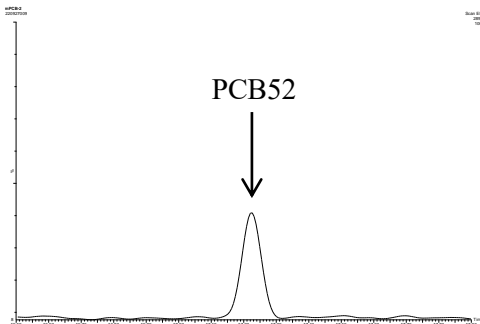
添加試料



添加試料の内標準物質(10 μg/L)



標準溶液(2 μg/L)



標準溶液(2 μg/L)の内標準物質(10 μg/L)

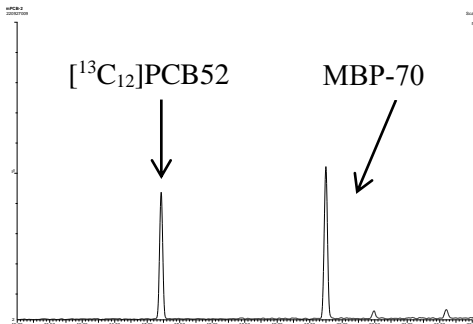
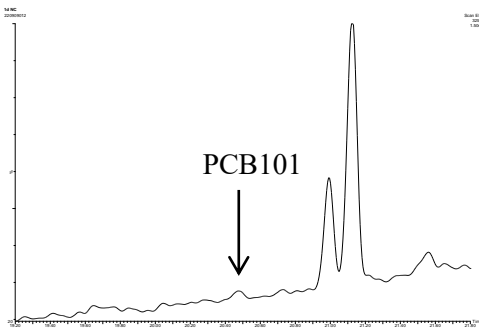


図 2-14-2 PCB52 の SIM クロマトグラム

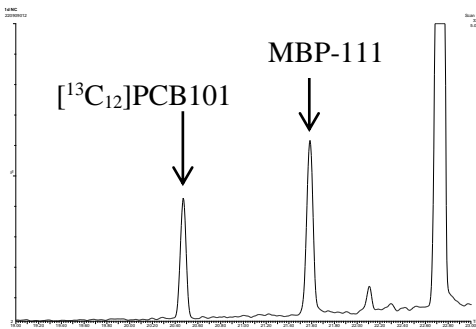
( $m/z$  289.9)

添加濃度: 0.13 μg/kg

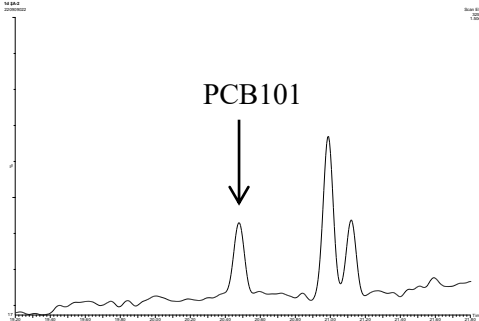
ブランク試料



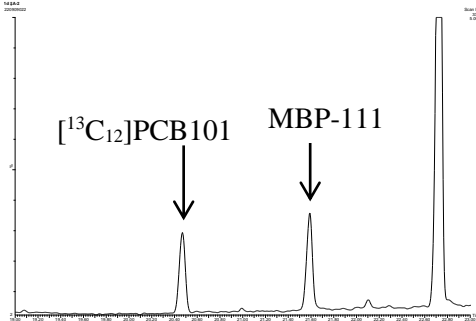
ブランク試料の内標準物質(10 μg/L)



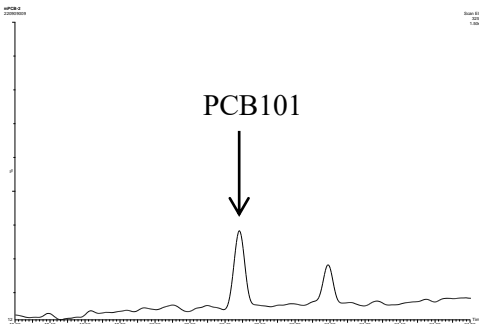
添加試料



添加試料の内標準物質(10 μg/L)



標準溶液(2 μg/L)



標準溶液(2 μg/L)の内標準物質(10 μg/L)

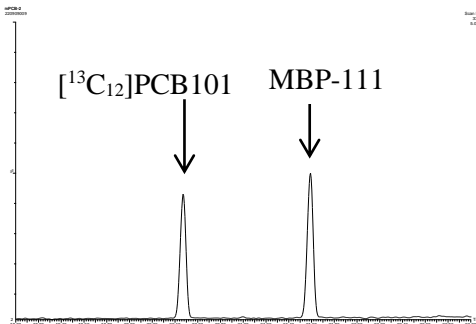
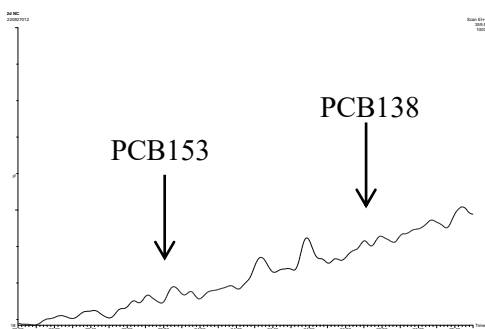


図 2-14-3 PCB101 の SIM クロマトグラム

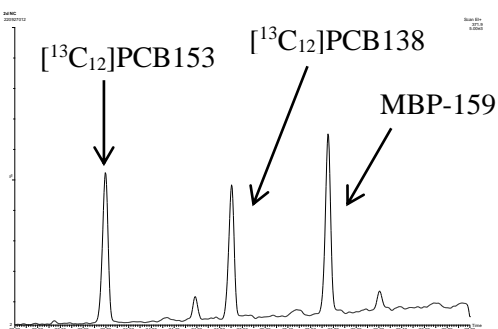
( $m/z$  325.9)

添加濃度: 0.13 μg/kg

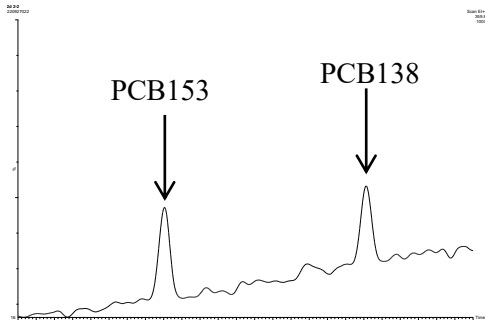
ブランク試料



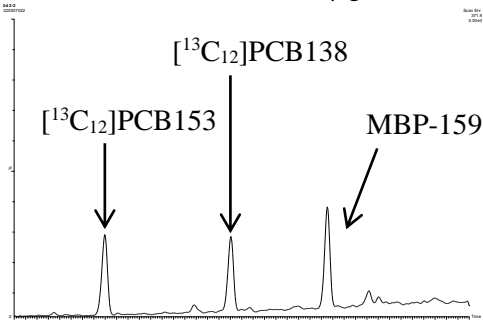
ブランク試料の内標準物質(10 μg/L)



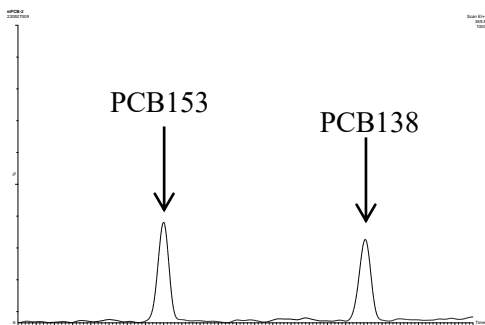
添加試料



添加試料の内標準物質(10 μg/L)



標準溶液(2 μg/L)



標準溶液(2 μg/L)の内標準物質(10 μg/L)

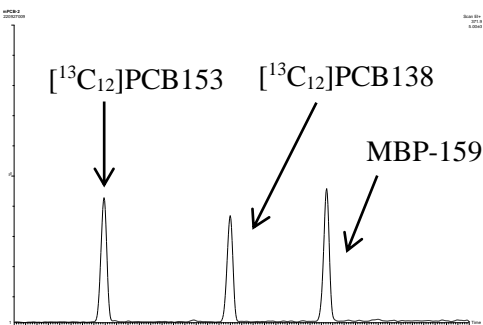
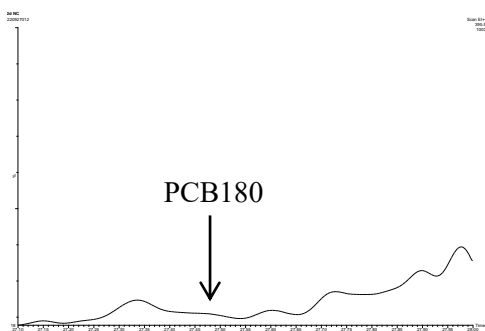


図 2-14-4 PCB138 及び PCB153 の SIM クロマトグラム

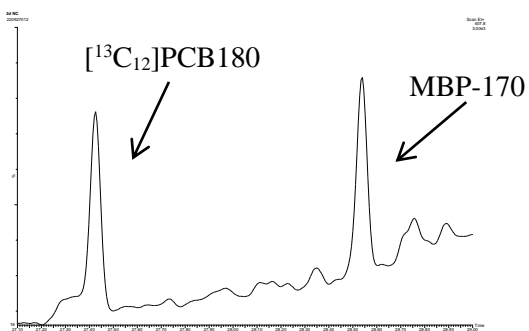
( $m/z$  359.8)

添加濃度: 0.13 μg/kg

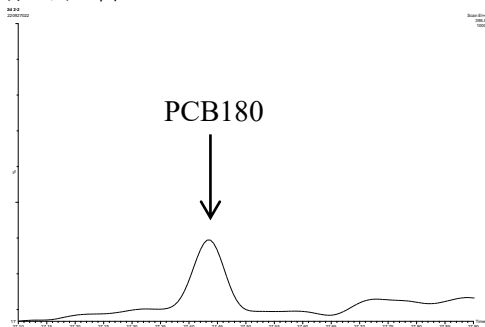
ブランク試料



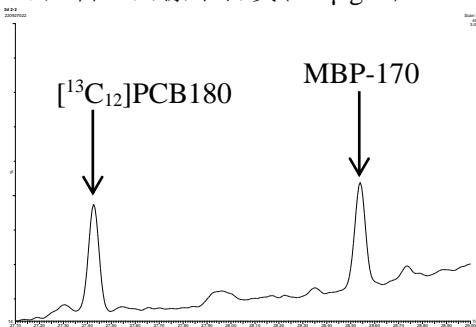
ブランク試料の内標準物質(10 μg/L)



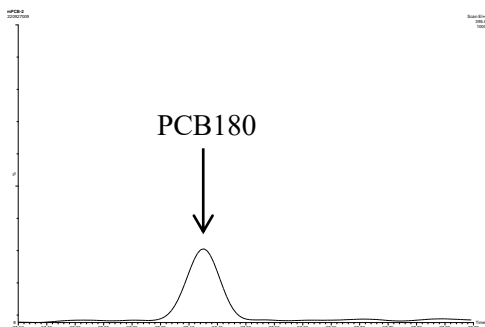
添加試料



添加試料の内標準物質(10 μg/L)



標準溶液(2 μg/L)



標準溶液(2 μg/L)の内標準物質(10 μg/L)

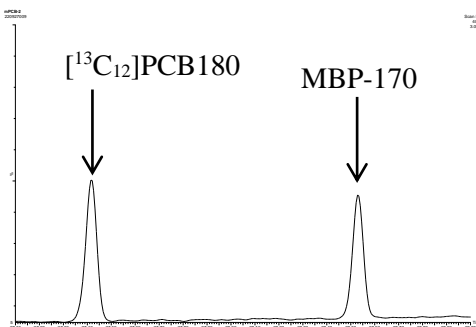


図 2-14-5 PCB180 の SIM クロマトグラム

( $m/z$  395.8)

添加濃度: 0.13 μg/kg

### III. 分担研究報告

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

衛生微生物部



令和4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 穠山 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、2022年5月から2023年1月に5施設の協力のもとに牛枝肉合計137検体から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。また、他1施設を加えた6施設の協力のもとに牛枝肉合計161検体について生菌数測定を行なった。供試検体を増菌培養後、STEC7血清群マルチプレックスリアルタイムPCRを行い、分離株の血清凝集試験および生化学的性状試験を行った。この結果、1検体(0.7%)から STEC 0157 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。また、2. 牛肉の消毒効果の検討では、消毒薬として、過酢酸(100 ppm、200 ppm、500 ppm)および乳酸(4%)を選択し、牛肉での STEC (0157) の消毒効果を検証した。加えて、消毒効果の向上を期待して55℃に加温した消毒液、酸臭の軽減対策として消毒後の滅菌水洗浄を試みた。結果として、滅菌水よりも消毒液によるかけ流しの方が STEC の減少効果があった。また、消毒液を55℃に加温することによる減少効果は認められなかった。しかし、酸臭軽減の効果があることが判明した。さらに、消毒後の滅菌水洗浄は、酸臭の軽減対策として有効であった。

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*	島田光平
北海道東藻琴食肉衛生検査所*	児山綾子
北海道早来食肉衛生検査所*	石田祥士
北海道帯広食肉衛生検査所*	吉田千央、鈴木竹彦、笹谷優子
徳島県食肉衛生検査所*	片山直人、飛梅三喜
佐賀県食肉衛生検査所*	瀧下恵里子、大澤加奈子
長崎県諫早食肉衛生検査所*	樋渡佐知子、松尾保雄
国立医薬品食品衛生研究所	廣瀬昌平、千葉由美、都丸亜希子、池内隼佑

## 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、国内に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 年度から始めた本研究では、令和 2 年度・3 年度それぞれ 1 検体から STEC O157:H7 が分離された。このため令和 4 年度も引き続き調査を継続した。また、昨年度効果的であった過酢酸および米国で消毒として一般に使われている乳酸について、牛肉での STEC の消毒効果を検証し、肉表面の変色や消毒薬由来の臭味を含め、実用的な消毒方法を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 牛枝肉の STEC 調査

2022 年 5 月から 2023 年 1 月に国内の食肉検査所 6 ヶ所にて、ウシ 161 頭からサンプリングを行った。なお、N 施設からの検体では、生菌数測定のみを実施した。

#### (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、

滅菌リン酸緩衝生理食塩水（PBS）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、宅配便（冷蔵）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、定量的検出用として 35mL を別容器に分注し 4℃に保管した。

#### 2) 生菌数測定

検体液を 10 倍階段希釈にて 10<sup>-2</sup> 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<sup>-1</sup> および 10<sup>-2</sup> 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 時間培養後、生菌数測定を行った。

#### 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) 検体の増菌液からの DNA 抽出

検体液はサンプリングバッグのまま、42±1℃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。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 Assay 1 (*stx/eae*) ではベロ毒遺伝子 (*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、Assay 2 (16S/0157) では 16SrRNA 遺伝子および 0157

遺伝子を、Assay 3 (026/0111) では 026 遺伝子および 0111 遺伝子を、Assay 4 (045/0121) では 045 遺伝子および 0121 遺伝子を、Assay 5 (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 1-2 に示す。

Assay 1 から Assay 5 の反応溶液の組成および量を表 1-3-1 から表 1-3-5 に示す。リアルタイム PCR の反応条件は、95℃で 10 分を 1 サイクル、次いで 95℃で 15 秒、59℃で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。まず初めに Assay 1、2 を行った。その結果、*stx* 陽性かつ *eae* 陽性の検体は、続けて Assay 3、4、5 を同時に行い、7 血清群 0 遺伝子が陽性になるかを確認した。STEC 7 血清群陽性の検体は、陽性となった 0 血清型について免疫磁気ビーズ法を以下のように行った。7 血清群 0 遺伝子がない場合は STEC 7 血清群陰性とした。

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

免疫磁気ビーズ法は、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。最終的に E バッファー 1 mL に懸濁したものをビーズ濃縮液とした。このビーズ濃縮液を E バッファーで 10 倍および 100 倍希釈し、各希釈液 0.1 mL をソルビトールマッコンキー寒天 (SMAC) 培地、セフィキシム・亜テルル酸加ソルビトールマッコンキー寒天 (CT-SMAC) 培地、クロモアガー STEC 培地およびセフィキシム・亜テルル酸加クロモアガー STEC (CT-クロモアガー STEC) 培地にそれぞれ 1 枚ずつ塗抹した。

さらに、酸 (1N 塩酸) を加え、ローテーターで 1 時間反応させたものを酸処理ビーズ濃縮液とした。この酸処理ビーズ濃縮液は E バッファーで 2 倍および 20 倍に希釈した液 0.1 mL ずつを SMAC 培地、CT-SMAC 培地、クロモアガー STEC 培地、および CT-クロモアガー STEC 培地に 1 枚ずつ塗抹し、36±1℃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 STEC 7 血清群の確認を行った。

3-4) 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 0.1 mL の TE 緩衝液 (PH 8) に懸濁し、DNA 熱抽出を行なった。この抽出液をテンプレートとして、Assay 1 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、7 血清群 0 遺伝子が陰性となったこのコロニーを STEC 7 血清群陰性と判定した。*Stx* 陽性かつ *eae* 陽性、血清群 0 遺伝子が陽性のコロニーは、STEC 7 血清群陽性と判定し、必要に応じて同様の操作を行った。

3-5) STEC 分離株の血清型の再確認

基本的には、血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 の血清型別は、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ株式会社) または市販のラテックス凝集試薬を用いた。7 血清群に凝集したものについては、H 血清型を抗血清および H-genotyping (1) を用いて H 血清型を決定した。なお、7 血清群以外については 0 血清群を抗血清および 0-genotyping (2) にて決定した。

3-6) 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。

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 血清群の汚染菌数の定量

上記の菌株が、STEC 7 血清群であった場合、4℃で保存しておいた培養前の検体濃縮液を用いて、MPN 測定 (3 本法) を行った。mTSB を用いて希釈段 3 段とし、42±1℃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、以下の Assay 1 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

3-1) と同様に DNA を熱抽出し、Assay 1 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。*Stx* 陽性かつ *eae* 陽性、7 血清群 0 遺伝子が陽性となった検体は、陽性となった 0 血清型について免疫磁気ビーズ法を以下のように行った。

#### 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を行った。このビーズ濃縮液を E バッファーで 10 倍および 100 倍希釈し、0.1 mL ずつを SMAC 培地、CT-SMAC 培地、クロモアガー-STEPC 培地および CT-クロモアガー-STEPC 培地に 1 枚ずつ塗抹し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$  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 STEC 7 血清群の確認を行った。ただし、酸処理の手法は行わなかった。

#### 4-4) 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 0.1 mL の TE 緩衝液 (PH 8) に懸濁し、DNA 熱抽出を行なった。この抽出液をテンプレートとして、Assay 1 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、7 血清群 0 遺伝子が陰性となったこのコロニーを STEC 7 血清群陰性と判定した。*Stx* 陽性かつ *eae* 陽性、7 血清群 0 遺伝子が陽性判定のコロニーは、STEPC 7 血清群陽性と判定し、必要に応じて同様の操作を行った。

#### 4-5) STEC 分離株の血清型の再確認

基本的には、血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 の血清型別は、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ株式会社)を用い、状況によっては市販のラテックス凝集試薬を用いた。7 血清群に凝集したものについ

ては、必要に応じて抗血清および H 血清型 H-genotyping を用いて H 血清型を決定した。また、7 血清群以外については 0 血清群を抗血清および 0-genotyping にて決定した。

#### 4-6) 生化学的性状試験

3-6) 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* および *eae* の両方または片方が陽性であった検体からの大腸菌の分離

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検体のうち、*stx* および *eae* の両方または片方が陽性であった検体について、増菌培養液でのリアルタイム PCR の結果と合致する大腸菌の分離を行った。まず、この増菌培養液を PBS で  $10^{-3}$  まで 10 倍階段希釈し、各希釈液それぞれ 0.1 mL ずつを SMAC 培地、CT-SMAC 培地、クロモアガー-STEPC 培地、および CT-クロモアガー-STEPC 培地に 1 枚ずつ塗抹し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$  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、3-4) と同様にリアルタイム PCR をおこなった。この結果、*stx* および *eae* 陽性検体に関して、必要に応じて同様の操作を行った。また 3-6) と同様に生化学的性状試験を行って大腸菌であることを確認した。

## 2. 牛肉の消毒効果の検討

### (1) 文献調査

牛屠体の消毒として使う方法のうち科学的な根拠がある方法を調べることを目的として、Carcasses (屠体)、Dressed Cattle (精肉)、Block Meat (ブロック肉)、Disinfection (消毒)、Decontamination (除菌)、Disinfectants (消毒剤)、acids (酸)、hot water (熱水)、steam (蒸気)、Microorganisms (微生物)、bacteria (細菌)、*E. coli* (大腸菌)、STEPC (志賀毒素産生性大腸菌) をキーワードとして、PubMed で文献調査を行った。

### (2) 菌株

消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証では STEC のうち血清群 0157 (ESC425) のみを供試した。

### (3) 牛肉検体

牛肉は、小売店から購入したブロック肉を用いた。牛肉表面の筋膜をつけたままの検体（筋膜あり）については、クリーンベンチ内でブロック肉の表面の筋膜部分（厚さ約 1 cm）を切りとり、さらに約 5 cm 角（約 25 g）に無菌的に切り分けて作製した。切り分けた検体は、重量を測定し、ラップに包みサンプリングバックに入れてシールし、冷凍保存した。使用する前日に 4℃ に戻して供試した。解凍時に生成したドリップは滅菌した綿でふき取った。

### (4) 接種菌液の調製

半流動性のカジトン培地に室温保存されている菌株を、10 mL の Tryptone soya broth (TSB) に植菌し、37℃ で 18 時間静置培養した。このうち 8 mL を、4℃、5,000 rpm、15 分間遠心し、滅菌した PBS 8 mL 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℃ で保管された。

なお、これら接種菌液中の菌数を以下の方法にて確認した。まずは、接種菌液を PBS にて、 $10^{-7}$  まで 10 倍階段希釈を行い、 $10^{-6}$  希釈液（約  $1 \times 10^2$  CFU/mL）および  $10^{-7}$  希釈液（約  $1 \times 10^1$  CFU/mL）0.1 mL ずつを Tryptone soya agar (TSA) およびクロモアガー STEC に 5 枚に塗抹し、TSA は 37℃ で 24 時間、クロモアガー STEC は 37℃ で 20 時間、培養し、生育したコロニーを計測した。

### (5) 消毒液の調製

昨年の結果から、最も効果的な手法は 500 mL のかけ流しであった。また、酢酸臭は残るが、牛肉の変色がなく、STEC の減少効果が高かった過酢酸を引き続き検討した（表 2-1）。また、従前より国内で使用が認められている指定添加物であり、米国では食肉処理の最後

に枝肉表面に残っている細菌を殺菌するための有機酸洗浄として最も一般に使われている乳酸も検討した（表 2-1）。なお、各消毒液の pH を使用前に測定した。

過酢酸製剤は昨年と同様に「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 ppm、200 ppm、500 ppm に調製し、供試した。

乳酸としては「DL-乳酸（シグマ アルドリッチジャパン合同会社）」を用いた。製品の説明書には、乳酸濃度が 85.0 - 92.0% と記されているため、濃度を 90% とみなした。これを滅菌水で希釈して 4% に調製し、供試した。

なお、対照用溶液は滅菌水を用いた。

### (6) 消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証

消毒液の効果の検証方法を図 2-1 および消毒試験条件を表 2-1 に示す。

1) 25℃ 消毒液 500 mL かけ流しの方法（洗浄なし）

滅菌した 1 本の竹串に 1 検体を刺し、菌液を 10  $\mu$ L ずつ 5 カ所（合計 50  $\mu$ 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た。検体ごとに 25℃ に加温したそれぞれの消毒液 50 mL をシリンジで 10 回（合計 500 mL）かけ流しを行い、室温で 5 分間立てた状態で、消毒液の液切りを行った。

各検体から竹串を外し、それぞれストマッカー袋に入れた。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。これらの乳剤を、それぞれ 0.9 mL の PBS にて  $10^{-3}$  まで 10 倍階段希釈を行った。原液から  $10^{-3}$  希釈液 0.1 mL ずつを、TSA およびクロモアガー STEC に塗抹し、それぞれ 37℃ で 24 時間および 20 時間培養し、コロニーを計測した。

2) 25℃ 消毒液 500 mL かけ流しならびにかけ

流し後の洗浄方法（洗浄あり）

「1）25℃消毒液 500 mL かけ流しの方法（洗浄なし）」と同様に検体ごとにそれぞれの消毒液でかけ流しを行い、消毒液の液切りを行った後に、滅菌水による洗浄を行った。洗浄は、液切り後の検体に常温（23.5 - 24.0℃）の滅菌水 50 mL をシリンジで 10 回（合計 500 mL）かけ流しを行い、室温で 5 分間立てた状態で、洗浄滅菌水の液の液切りを行った。以下、「1）25℃消毒液 500 mL かけ流しの効果（洗浄なし）」と同様に行った。

3）55℃消毒液 500 mL かけ流しの方法（洗浄なし）

55℃に加温した消毒液を用いて「1）25℃消毒液 500 mL かけ流しの方法（洗浄なし）」と同様に行った。

4）55℃消毒液 500 mL かけ流しならびにかけ流し後の洗浄方法（洗浄あり）

55℃に加温した消毒液を用いて「2）25℃消毒液 500 mL かけ流し後に洗浄滅菌水 500 mL かけ流しの方法（洗浄あり）」と同様に行った。

（7）消毒液による肉の変色と臭味

「（6）消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証」の消毒液かけ流しおよび洗浄方法について、菌を接種していない検体にて肉の変色と臭味を確認した。

## C. 研究結果

### 1. 牛枝肉の STEC 調査

#### （1）生菌数

調査した検体 161 頭はすべての検体から生菌数が測定され、その平均は  $1,334 \pm 8,095.2$ （平均±SD）CFU/cm<sup>2</sup>であった（表 1-4）。

雌雄で比較すると、オスの 90 頭は  $2,063.5 \pm 10,684.9$ CFU/cm<sup>2</sup> であるのに対して、メスの 71 頭では  $409.3 \pm 1,756.2$  CFU/cm<sup>2</sup> であった（表 1-4）。

ウシの種類別で比較すると、アンガスの平均値が  $13,130.1 \pm 10,868.2$ CFU/cm<sup>2</sup> であった（表 1-4）。これらには、生菌数 10,000

CFU/cm<sup>2</sup>を超えるウシが 3 頭含まれていた。

施設別の生菌数の結果を表 1-5 に示す。採材期間を通して、平均生菌数が最も多かった施設は F 施設であった。平均生菌数は  $4,786.1 \pm 19,398.1$  CFU/cm<sup>2</sup> であり、1,000 CFU/cm<sup>2</sup>を超えるウシは 3 頭であった。

月別で算出した生菌数の結果を表 1-6 に示す。7 月が最も高く  $8,878.1 \pm 21,561.4$ 、次いで 6 月が  $1,437.1 \pm 4,448.7$  であり、気温が高い夏に高い傾向が見られた。10,000 CFU/cm<sup>2</sup>を超えるウシは 6 月に 1 頭、7 月に 5 頭であった。10,000 CFU/cm<sup>2</sup>未満かつ 1,000 CFU/cm<sup>2</sup>を超えるウシは 6 月に 2 頭、7 月に 2 頭、8 月に 2 頭、9 月および 11 月に 1 頭であった。

#### （2）STEC7 血清群の分離

定性的な検出を図 1-1 に示すように行い、増菌培養液が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方あるいは片方が陽性であった検体の STEC7 血清群のリアルタイム PCR の結果を表 1-7 に示す。供試検体 137 検体のうち、34 検体が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の少なくとも片方が陽性であり、両遺伝子のいずれもが陽性となった検体はそのうち 11 検体であった。上記 34 検体のうち、7 検体が STEC 7 血清群のいずれかで陽性となり、同一検体で複数の 0 血清群で陽性となった検体は J71 の 1 検体のみであり、Ct 値は 026（37.9）および 045（29.0）であった。血清型 0157 のみが陽性となった検体は検体番号 J23 および J34 であり、Ct 値は J23 で 22.4、J34 で 26.9 であった。血清型 045 のみが陽性となった検体は検体番号 J7、J11、J28 および J150 であり、Ct 値は J7 で 36.0、J11 で 31.5、J28 で 30.8、J150 で 35.0 であった。

リアルタイム PCR でいずれかの遺伝子が陽性となった培養液から分離した菌株の 0 血清群と保有遺伝子を表 1-8 に示す。STEC 7 血清群保有かつ *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陽性で分離が可能であった検体は J23 のみであり、その血清型は 0157:H7 であった。J23 の生菌数は  $109.1$ CFU/cm<sup>2</sup> であり、分離が可能であったその

他の検体と比較して、生菌数が 10,000 CFU/cm<sup>2</sup> を超えていた J35 を除くと、平均的な値に近かった。J23 から分離された STEC 0157:H7 は、*stx1* 遺伝子を保有せず、*stx2* 遺伝子のみを保有していた。また、本菌株の生化学的性状は、一般的な STEC 0157:H7 と一致した（表 1-9）

*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陽性であった検体、STEC7 血清群のリアルタイム PCR 陽性検体から STEC7 血清群が分離された検体を表 1-10 にまとめた。*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陽性であった検体は合計で 11 検体であり、これらの検体において、分離陽性検体は STEC 0157 が分離された 1 検体のみであった。リアルタイム PCR で血清群 0157 が陽性となった検体は J23 および J34 の計 2 検体であり、分離陽性検体となったのは最終的に J23 の 1 検体のみであった。血清群 026 および 045 についてリアルタイム PCR 陽性であった検体は菌株の分離には至らなかった。

ウシの種類、施設および採材年月のカテゴリ別に STEC7 血清群分離個体を表 1-11 にまとめた。STEC 0157 が分離されたのは、2022 年 6 月に採材された M 施設からの黒毛和種であった。この施設においては、枝肉の消毒等の適切な措置が講じられた。

(3) STEC7 血清群以外で *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方あるいは片方を保有する大腸菌および、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陰性である STEC7 血清群の大腸菌の分離

表 1-7 に示すように供試検体 137 検体のうち、34 検体が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の少なくとも片方が陽性であり、両遺伝子のいずれもが陽性となった検体はそのうち 11 検体であった。*stx* 遺伝子のみが陽性であった検体は 9 検体、*eae* 遺伝子のみが陽性であった検体は 14 検体であった。陽性となった遺伝子の Ct 値は、*stx* 遺伝子については最低値 18.3、最高値 44.1 であり、*eae* 遺伝子については最低値 19.3、最高値 39.0 であった。

リアルタイム PCR でいずれかの遺伝子が陽

性となった培養液から分離した菌株の O 血清群と保有遺伝子を表 1-8 に示す。分離株の O 血清群は OUT を含む多様なものであり、施設あるいはウシの種類との関連性などの特徴はなかった。検体の生菌数は、1.00 から 24,167 CFU/cm<sup>2</sup> までと幅が大きく、O 血清群ごとに特徴的な違いはみられなかった。また、*stx* のサブタイプについて、*stx2* 遺伝子が陽性である分離株は 7 株みられ、*stx1* 遺伝子が陽性である分離株は 1 株みられた。

#### (4) STEC 7 血清群の定量

定性試験で *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子陽性の 0157 が分離された検体 J23 については、定量的な試験を行った（図 1-2）。MPN 法（3 本法）での定量結果を表 1-12 に示す。1 段目、2 段目および 3 段目について *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子および 0157 遺伝子のすべてが非検出であった。STEC 0157 の定量値は、検出限界以下となる試験液 100mL あたり 3 MPN 未満あるいはガーゼ表面積 100 cm<sup>2</sup> あたり 0.33 MPN 未満であった。

## 2. 牛肉の消毒効果の検討

### (1) 文献調査

検索の結果、31 報見つかった。効果が認められた消毒液は、乳酸（8 報）、過酢酸（2 報）、カプリル酸（1 報）であった。消毒効果のある温度は 55°C（4 報）、50°C（1 報）、45°C（2 報）であった。そのうち、比較的多い条件は、消毒液としては乳酸および過酢酸であり、温度としては 55°C であった（10 報）。以下の 4 つのカテゴリにまとめた。

「55°C の乳酸の効果あり（表 2-2）」では、55°C での、自動塗布による 3% 乳酸で効果があり、スプレーによる 4% 乳酸で効果があり、また、ミストによる 2% 乳酸の方が 2% 酢酸より効果があった。

「55°C の乳酸・過酢酸の効果あり（表 2-3）」では、55°C での、スプレーによる 2.5% および 5% 乳酸、また、室温でのスプレーによる 400 ppm 過酢酸で効果があった。

「55℃以外の乳酸の効果あり（表2-4）」では、スプレーによる2%乳酸で効果があり、スプレーによる3%乳酸は3%酢酸よりも効果があり、スプレーによる5%乳酸は、5%酢酸および5%クエン酸より効果があった。

「55℃以外のカプリル酸・過酢酸・次亜塩素酸および71℃温水の効果あり（表2-5）」では、リンスによる3%カプリル酸は2%乳酸および200 ppm ペルオキシ酸より効果があり、スプレーによる400 ppm 過酢酸、600 ppm 次亜塩素酸および71℃温水で効果があった。

#### （2）消毒液の牛肉汚染 STEC への効果

各消毒液の pH の測定結果を表2-6に示した。供試した消毒液はすべて酸性であり、過酢酸は濃度が高いほど pH は低く、乳酸が最も低い値であった。

「1）25℃消毒液 500 mL かけ流しの効果（洗浄なし）」では、洗浄なしの対照用溶液である滅菌水、過酢酸 100 ppm、200 ppm、500 ppm および乳酸4%で、それぞれ  $6.8 \pm 0.6$ 、 $5.5 \pm 0.7$ 、 $5.7 \pm 0.5$ 、 $5.5 \pm 0.6$  および  $5.4 \pm 1.7$  log CFU/片であり、滅菌水より消毒液の方が STEC の減少効果が認められた（図2-2）。消毒液の種類および濃度の違いによる差は認められなかった（図2-2）。なお、牛肉に供試し、下に流れ落ちた消毒液からは STEC および生菌は検出されなかった（図2-3）。

「2）25℃消毒液 500 mL かけ流し後に洗浄滅菌水 500 mL かけ流しの効果（洗浄あり）」では、それぞれ  $6.3 \pm 0.3$ 、 $5.7 \pm 0.5$ 、 $5.2 \pm 0.3$ 、 $5.7 \pm 0.5$  および  $5.2 \pm 0.5$  log CFU/片であり、滅菌水洗浄なしの場合と同様に、滅菌水より消毒液の方が STEC の減少効果が認められた（図2-4）。ばらつきはあるが、過酢酸では 500 ppm が最も効果があり、4%乳酸と同様の効果があった（図2-4）。なお、牛肉に供試し、下に流れ落ちた消毒液と洗浄滅菌水の混合液からは STEC および生菌は検出されなかった（図2-5）。

「3）55℃消毒液 500 mL かけ流しの効果

（洗浄なし）」では、洗浄なしの対照用溶液である滅菌水、過酢酸 100 ppm、200 ppm、500 ppm および乳酸4%で、それぞれ  $6.3 \pm 0.1$ 、 $5.5 \pm 0.7$ 、 $5.7 \pm 0.5$ 、 $5.5 \pm 0.6$  および  $5.4 \pm 1.7$  log CFU/片であり、ばらつきは大きい。25℃洗浄なしの場合と同様に、滅菌水より消毒液の方が STEC の減少効果が認められた（図2-6）。消毒液の種類および濃度の違いによる差は認められなかった（図2-6）。滅菌水では 25℃洗浄なしの場合と比較して、55℃に加温することによって STEC の減少効果が若干あったが、消毒液では認められなかった（図2-2 および図2-6）。なお、牛肉に供試し、下に流れ落ちた消毒液からは STEC および生菌は検出されなかった（図2-7）。

「4）55℃消毒液 500 mL かけ流し後に洗浄滅菌水 500 mL かけ流しの効果（洗浄あり）」では、それぞれ  $6.4 \pm 0.2$ 、 $5.7 \pm 0.5$ 、 $5.2 \pm 0.3$ 、 $5.7 \pm 0.5$  および  $5.2 \pm 0.5$  log CFU/片であり、ばらつきはあるが洗浄なしの場合と同様に、滅菌水より消毒液の方が STEC の減少効果が認められた（図2-8）。消毒液の種類および濃度の違いによる差は認められなかった（図2-8）。55℃洗浄なしの場合と異なり、滅菌水および消毒液、いずれも 55℃に加温することによる STEC の減少効果は認められなかった（図2-4 および図2-8）。なお、牛肉に供試し、下に流れ落ちた消毒液と洗浄滅菌水の混合液からは STEC および生菌は検出されなかった（図2-9）。

消毒液による肉の変色と臭いの結果を表2-6に示した。牛肉表面の変色に関しては、過酢酸では変色は認められなかったが、乳酸では茶褐色に変色した。臭いに関しては、過酢酸では濃度が高いほど酸臭が強くなる傾向があったが、両温度の消毒液ともに滅菌水による洗浄によって酸臭は軽減した。また、55℃の消毒液では、25℃の消毒液よりも肉の酸臭が弱かった。一方、乳酸では酸臭は認められなかった。



## D. 考察

### 1. 牛枝肉の STEC 調査

本調査では牛枝肉からガーゼを用いた 137 検体中、1 検体 (0.7%) から STEC7 血清群のひとつである STEC 0157 が分離された。STEC 0157 が分離された 1 検体を含む 7 検体 (5.1%) は、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方ならびに STEC7 血清群のいずれかがリアルタイム PCR で陽性であった。と畜場でのウシの糞便からは STEC 0157 が高頻度に検出されていること (3) と比較すると、その汚染率は低率であった。その一方、令和 3 年度の結果 (0.6%、1/168) と同等の汚染程度であったことならびに定量試験において、STEC 0157 陽性検体は MPN 法により、検出限界以下であったことから、さらなる汚染低減にはその制御法の確立が課題となってくるであろう。また、リアルタイム PCR 陽性検体および陰性検体のウシには特徴的な差異は見られなかったが、各々の検体についてウシの腸管内容物での STEC の有無等を調べることで、より詳細な情報が得られると考えられた。

測定された生菌数は季節的な影響が大きいと考えられた。平均生菌数は 7 月が  $8.9 \times 10^4$  CFU/cm<sup>2</sup> で最も多く次いで 6 月、8 月であり、その他の月のほとんどは生菌数が  $10^2$  CFU/cm<sup>2</sup> 程度にとどまっていた。したがって、夏季においては牛肉の衛生状態の低下が推測された。また、STEC 0157 が分離された検体の採取月は平均生菌数が二番目に多い月である 6 月であったことから、夏季が汚染時期であることを示している。令和 4 年度における全体の平均生菌数が  $1,334$  CFU/cm<sup>2</sup> であり (表 1-4)、サンプリング時期が同じであった令和 3 年度の平均生菌数が  $62.8$  CFU/cm<sup>2</sup> であったことと比べて 21.4 倍高かった。この理由として、特に施設 E・F の生菌数 (表 1-5) が高かったことが影響したと考えられた。それらの施設以外では、衛生管理が適切に行われていたと考え

られたが、生菌数が高い施設では、汚染防止策などを含む衛生管理を確実に実施する必要がある、衛生状態を改善することが求められる。また、ウシの種類について、特にアンガス種 5 検体のうち 3 検体では生菌数が  $10,000$  CFU/cm<sup>2</sup> 以上を示してり、高度に汚染されていたことから、これらウシの種類に対しても衛生状態のさらなる向上に努める必要がある。

*stx*、*eae*、7 血清群のいずれかの遺伝子が PCR 陽性の培養液から分離された菌株は STEC 7 血清群ではない菌株が大部分を占めていた。*stx* 遺伝子が陽性であった株は特定の施設に由来する株が多かったことから、特定の施設において *stx* 遺伝子保有株が分離される要因について、明らかにする必要がある。分離された菌株の半数が *eae* 遺伝子を保有していたが、分離される時期は夏季が多く、由来となる施設および牛の種類は多様であった。*eae* 遺伝子を保有している菌株が複数の施設から分離されていることから、これらの菌株の病原性についてさらなる検討を行う必要もある。さらに、*stx* あるいは *eae* 遺伝子を保有している菌を指標菌とし食肉の衛生管理に用いることも検討したい。

牛肉の STEC による汚染の低減は食の安全に関わる重要な課題となっている。と畜場での牛肉の汚染は低率であるものの、牛肉の取り扱いには十分な注意が必要である。また、と畜場での衛生管理や施設での消毒処理等は、STEC の主要な汚染防止策であることから、STEC 汚染についての調査を継続するに加えて、それらの管理や消毒方法を改良していく必要があると考えられた。

### 2. 牛肉の消毒効果の検討

今回の文献調査において、比較的多い消毒条件 (10 報) (表 2-2、表 2-3、表 2-4、表 2-5) の国別の内訳は、米国 (5 報)、アルゼンチン (2 報)、チェコ共和国 (2 報)、大韓民国 (1 報) であった。これら 10 報すべてにおいて、効果の有無にかかわらず乳酸に

よる消毒効果を検討していた。有機酸である乳酸は、従前より国内での使用が認められている指定添加物であり、国内でも利用できる消毒液として効果の検討を行う必要があると考えた。また、米国およびアルゼンチンでは消毒液を 55℃ (130℉) に加温した効果を検討していた。このことを加味し、消毒効果の向上を期待して 55℃ に加温した消毒液による効果の検討を考えた。

米国農務省食品安全検査局 (United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, USDA FSIS) の「Industry Guideline for Minimizing the Risk of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (STEC) in Beef including Veal) Slaughter Operations 021 Guideline」には、枝肉表面の微生物汚染の洗浄のために次亜臭素酸、水酸化ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウムを含んだ界面活性剤、塩素を含んだ水、有機酸 (酢酸、乳酸、クエン酸)、また、熱水や蒸気による洗浄および乾燥を記載している (4)。EU は 2013 年に微生物汚染を低減させることを目的として、屠殺場での乳酸の利用 (2-5% 濃度、55℃ までの加温) を認めた (5)。

乳酸は、米国では食肉処理の最後に枝肉表面に残っている細菌を大幅に殺菌するために一般的に使われている有機酸である (4)。

過酢酸は強力な殺菌効果のある酸化剤として米国 (6) や日本で許可されている。乳酸と異なり微生物の耐性反応の誘導は知られていない (7)。過酢酸の殺菌効果については数多くの研究が報告されている (表 2-2、表 2-3、表 2-5)。

これらのことを鑑みて、昨年度に最も効果のあった方法である 500 mL のかけ流しを採用し、消毒効果の向上を期待して 55℃ に加温した消毒液、酸臭の軽減対策として消毒後の滅菌水洗浄を加えて STEC (O157) の減少効果を検討した。過酢酸は 200-400 ppm、乳酸は 3-

4% が妥当であると提案する総論 (7) や昨年度までの結果から、今年度は過酢酸を 100 - 500 ppm の範囲 (昨年度は 50 - 1,000 ppm) で、乳酸は 4% で消毒を行った。

ばらつきはあるが、消毒液の方 (約 2 桁減少) が、滅菌水のみ (約 1 桁減少) より STEC の減少効果が認められた (図 2-2、図 2-4、図 2-6、図 2-8)。滅菌水では 55℃ に加温することにより STEC の減少効果が若干あったが、消毒液では加温することによって STEC の減少効果は認められなかった (図 2-4、図 2-6、図 2-8)。また、処理後の消毒液を含んだ混合液中には STEC を含んだ微生物は検出されなかった (図 2-3、図 2-5、図 2-7、図 2-9)。これらのことから、消毒液による一定の効果が期待できる。

効果的な除菌には、薬剤との接触時間や接触間隔、濃度、pH、温度、圧力、滞留時間などの組み合わせと装置の設定が関係する (4, 7)。本研究での結果は、食肉処理場の消毒に参考になると考えられる。

過酢酸による消毒では、昨年度の結果から、牛肉表面を変色させないが酸臭が残ることが難点であった (表 2-6)。そこで、酸臭を軽減させるため、消毒後の滅菌水洗浄を試みた。滅菌水洗浄は酸臭を軽減させ、さらに、消毒液を 55℃ に加温することによって酸臭の軽減に相乗効果があることが判明した (表 2-6)。乳酸による消毒では、酸臭は認められなかったが、牛肉表面が茶褐色に変色した。しかし、乳酸消毒による肉質への影響はないとする報告もある (表 2-3、表 2-4)。肉表面の変色はトリミングなどによって除去できることを考慮すると、乳酸は消毒剤として有効であると考えられる。

## E. 結論

1. 牛枝肉の STEC 調査では、2022 年 5 月から 2023 年 1 月に 5 施設の協力のもとに牛枝肉合計 137 検体を供試した。また、別の 1 施設につ

いては、計 24 検体を生菌数の測定のみ以供試した。1 検体(0.7%)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。培養液から分離された STEC 7 血清群に該当しない *stx* 遺伝子または *eae* 遺伝子を保有する菌株も分離されたことから指標菌とし食肉の衛生管理に役立つことも考えられた。今後も、と畜場において解体処理工程では注意深い取り扱いが必要である。

2. 牛肉の消毒効果の検討では、消毒薬として、過酢酸 (100 ppm、200 ppm、500 ppm) および乳酸 (4%) を選択し、牛肉での STEC (0157) の消毒効果を検証した。加えて、消毒効果の向上を期待して 55°C に加温した消毒液、酸臭の軽減対策として消毒後の滅菌水洗浄を試みた。結果として、滅菌水よりも消毒液によるかけ流しの方が STEC の減少効果があった。また、消毒液を 55°C に加温することによる減少効果は認められなかった。しかし、酸臭軽減の効果があることが判明した。さらに、消毒後の滅菌水洗浄は、酸臭の軽減対策として有効であった。

#### 【 参考文献 】

1. Banjo M, Iguchi A, Seto K, Kikuchi T, Harada T, Scheutz F, Iyoda S; Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. *Escherichia coli* H-Genotyping PCR: a Complete and Practical Platform for Molecular H Typing. *J Clin Microbiol.* 2018;56:e00190-18.
2. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, *et al.* *Escherichia coli* O-Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2427-2432.
3. Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, *et al.* Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 prevalence in

feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2999-3003.

4. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service Industry (USDA FSIS). Guideline for Minimizing the Risk of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) in Beef (including Veal) Slaughter Operations 2021 Guideline.
5. Commission Regulation EU No 101/2013. Official Journal of the European Union. 2013;L34/1
6. Code of Federal Regulations. Title 21 Parts 170 § 173.370 Peroxyacids 2012:152.
7. Han J, Dong P, Holman BWB, *et al.* Processing interventions for enhanced microbiological safety of beef carcasses and beef products: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2022;23:1-25.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

(誌上発表)

なし

(学会発表)

廣瀬昌平、都丸亜希子、穂山浩、工藤由起子.  
牛肉の志賀毒素産生大腸菌汚染に対する消毒液の効果の検討. 日本食品衛生学会第 118 回学術講演会, 長崎市, 令和 4 年 11 月 11 日.

#### H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし



# 定性的検出

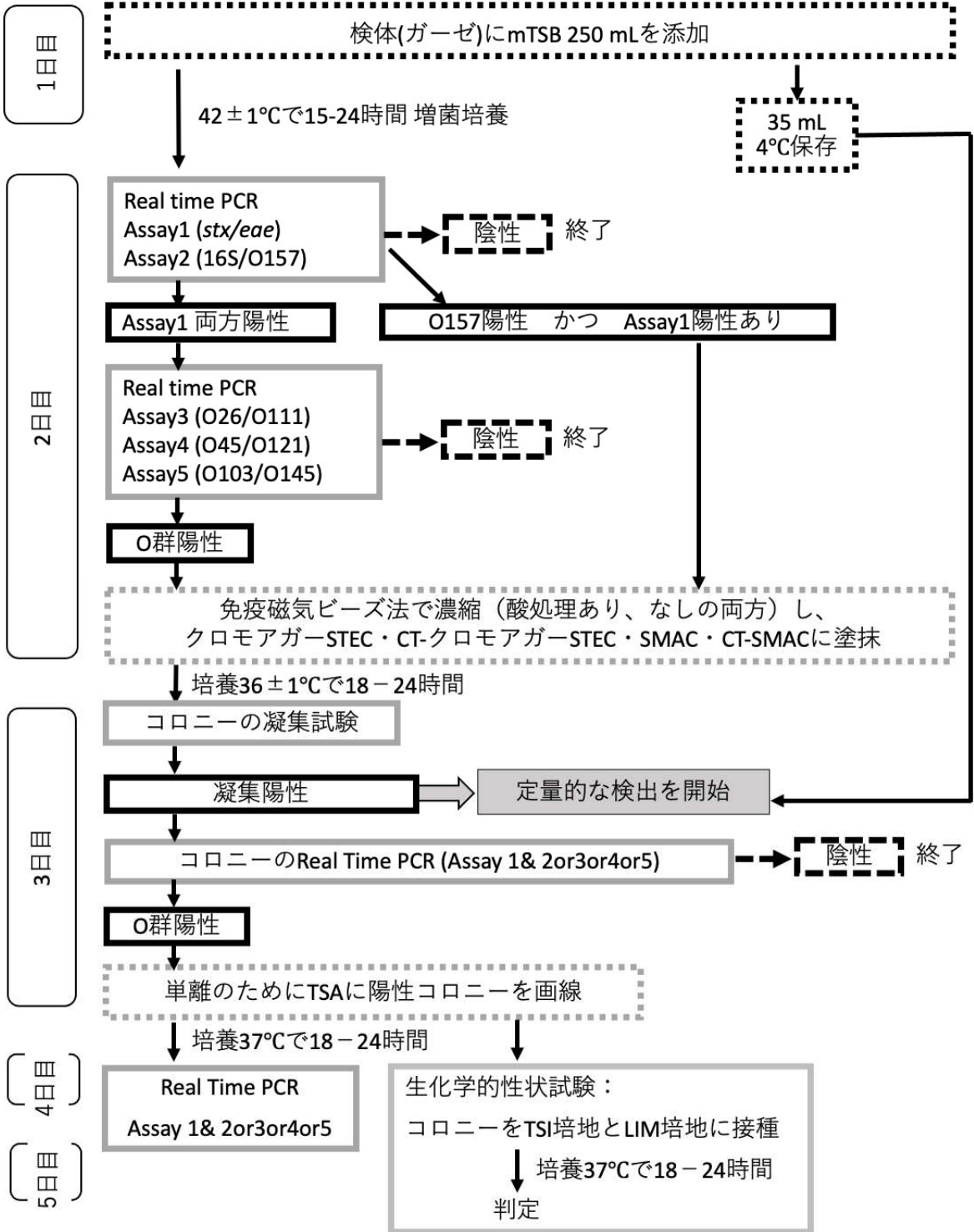


図 1-1 定性的な検出方法

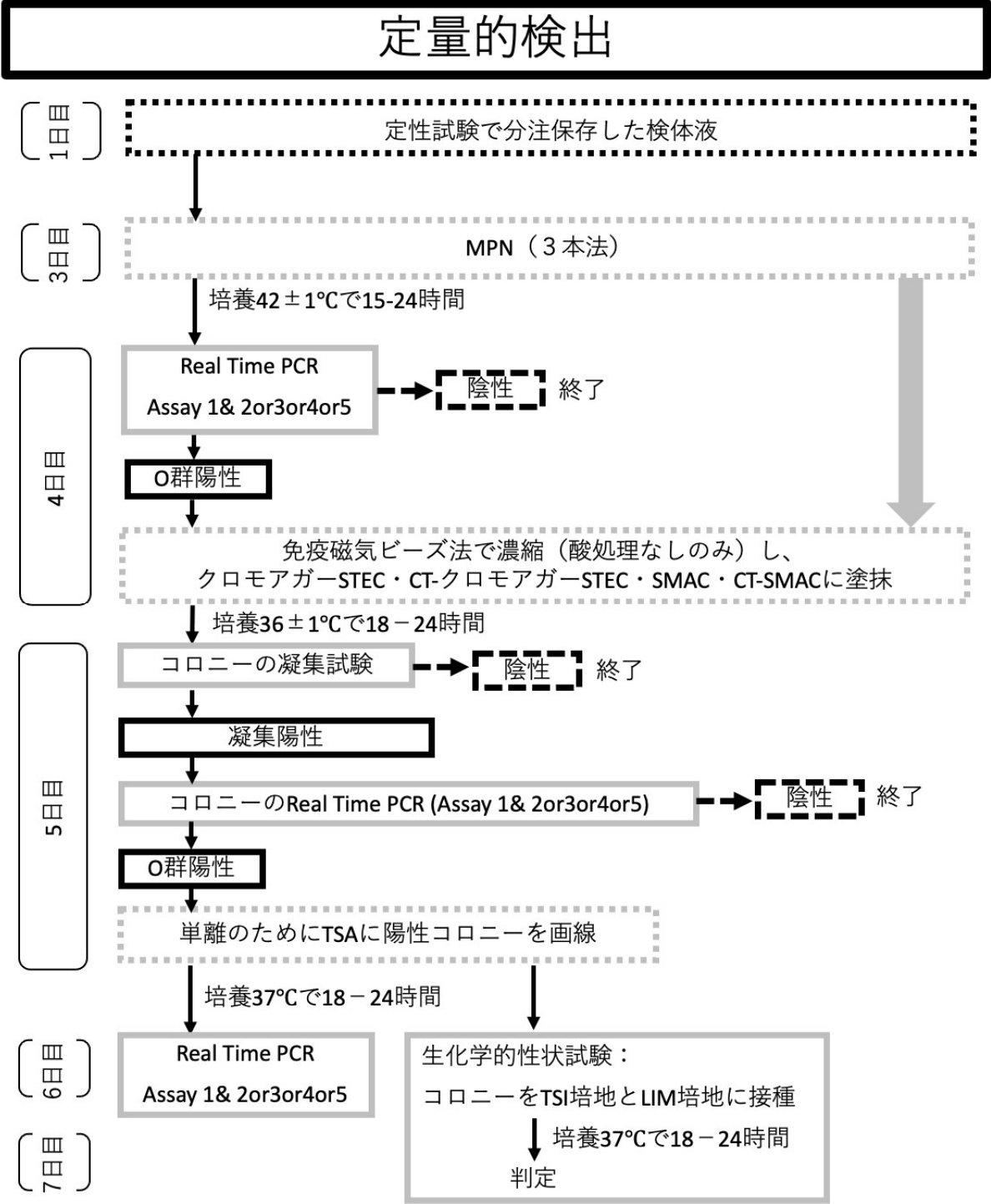


図 1-2 定量的な検出方法

表 1-1 供試検体のウシ種類、性別、齢および個体数

ウシの種類	合計 個体数	性別	個体数	月齢の幅	月齢別	個体数
ホルスタイン	74	オス	51	13 - 21	20未満	43
					20以上30未満	8
					30以上	0
		メス	23	15 - 119	20未満	1
					20以上30未満	3
					30以上	19
黒毛和種	35	オス	22	24 - 30	20未満	0
					20以上30未満	20
					30以上	2
		メス	13	23 - 139	20未満	0
					20以上30未満	9
					30以上	4
交雑種	32	オス	11	23 - 25	20未満	0
					20以上30未満	11
					30以上	0
		メス	21	22 - 35	20未満	0
					20以上30未満	17
					30以上	4
褐毛和種	15	オス	1	28	20未満	0
					20以上30未満	1
					30以上	0
		メス	14	27 - 30	20未満	0
					20以上30未満	13
					30以上	1
アングス	5	オス	5	26 - 34	20未満	0
					20以上30未満	2
					30以上	3
		メス	0	-	20未満	0
					20以上30未満	0
					30以上	0

表 1-2 リアルタイム PCR のプライマーおよびプローブ

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	<i>stx</i>	Stx-F	5' TTTGTACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG 3'	USDA
		Stx-R	5'CCCCAGTTCARWGTTRAGRTCMACDTC 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'	
	<i>eae</i>	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'	
	<i>rfbE0157</i>	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	<i>wzx026</i>	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'	
	<i>wbdI0111</i>	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	<i>wzx045</i>	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'	
	<i>wzx0121</i>	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	<i>wzx0103</i>	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'	
	<i>wzx0145</i>	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 1-3-1 Assay1 の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	蛍光標識
2× Taqman Environmental MastermixMaster Mix	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 1-3-2 Assay2 の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	蛍光標識
2× Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer 16SRna-F (20 μM)	0.20	0.16	
Primer 16SRna-R (20 μM)	0.20	0.16	
Primer RfbE-O157-F (20 μM)	0.25	0.20	
Primer RfbE-O157-R (20 μM)	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 1-3-3 Assay3 の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	蛍光標識
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 1-3-4 Assay4 の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 ( $\mu$ l)	終濃度 ( $\mu$ M)	標識
2×Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O45 F (20 $\mu$ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O45 R (20 $\mu$ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O121 F (20 $\mu$ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O121 R (20 $\mu$ M)	0.31	0.25	
Probe Wzx O45 P (2 $\mu$ M)	2.34	0.19	FAM
Probe Wzx O121 P (5 $\mu$ M)	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 1-3-5 Assay5 の 1well あたりの反応溶液組成

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

表 1-4 供試検体のウシの種類別、性別での生菌数

ウシ	個体数	生菌検出* 個体数 (%)	生菌数** (平均 ± SD CFU/cm <sup>2</sup> )	
ウシの種類	ホルスタイン	74	74 (100)	1,948.7 ± 11,198.5
	黒毛和種	35	35 (100)	65.6 ± 172.8
	交雑種	32	32 (100)	59.2 ± 82.4
	褐毛和種	15	15 (100)	48.3 ± 66.9
	アングス	5	5 (100)	13,130.1 ± 10,868.2
性別	オス	90	90 (100)	2,063.5 ± 10,684.9
	メス	71	71 (100)	409.3 ± 1,756.2
全体	161	161 (100)	1,334 ± 8,095.2	

SD: standard deviation

\* : 非検出は、0.11 CFU/cm<sup>2</sup>未満

\*\* : 検出個体のみでの平均 ± SD

表 1-5 施設別の生菌数

(表1-5 1/2)

施設	月	個体数		生菌検出 個体数*		生菌数** (平均±SD CFU/cm <sup>2</sup> )	
		月ごと	合計	月ごと	合計	月ごと	施設合計
E施設	4	—		—		—	
	5	5		5		121.8 ± 95.4	
	6	5		5		4,795.6 ± 7,693.1	
	7	5		5		12,850 ± 9,757.1	
	8	5		5		710.8 ± 548.4	
	9	5	45	5	45	438.5 ± 858.1	2,129.1 ± 5,564.0
	10	5		5		74.7 ± 73.9	
	11	5		5		25.8 ± 22.4	
	12	5		5		133.7 ± 168.6	
	1	5		5		11.2 ± 13.7	
	2	—		—		—	
	F施設	4	—		—		—
5		—		—		—	
6		3		3		15.0 ± 19.4	
7		3		3		37,394.7 ± 50,038.9	
8		3		3		142.9 ± 68.2	
9		3	24	3	24	320.4 ± 191.0	4,786.1 ± 19,398.1
10		3		3		9.3 ± 1.6	
11		3		3		43.9 ± 9.7	
12		3		3		12.7 ± 8.4	
1		3		3		349.9 ± 550.8	
2		—		—		—	
G施設		4	—		—		—
	5	3		3		13.6 ± 5.6	
	6	3		3		12.6 ± 6.9	
	7	3		3		21.3 ± 6.4	
	8	3		3		21.7 ± 22.7	
	9	3	27	3	27	33.1 ± 46.1	17.5 ± 20.7
	10	3		3		38.0 ± 28.6	
	11	3		3		10.7 ± 14.1	
	12	3		3		2.3 ± 0.8	
	1	3		3		4.1 ± 4.4	
	2	—		—		—	

(表1-5のつづき 2/2)

	4	—	—	—	—		
	5	3	3	3	2.3 ± 1.7		
	6	—	—	—	—		
	7	3	3	3	73.3 ± 46.8		
	8	3	3	3	149.8 ± 67.9		
I施設	9	—	20	—	20	—	42.5 ± 62.1
	10	2	2	2	9.9 ± 4.3		
	11	3	3	3	5.8 ± 2.7		
	12	3	3	3	39.6 ± 59.7		
	1	3	3	3	6.0 ± 6.1		
	2	—	—	—	—		
	4	—	—	—	—		
	5	—	—	—	—		
	6	3	3	3	60.2 ± 43.0		
	7	3	3	3	127.4 ± 31.4		
	8	3	3	3	8.8 ± 1.1		
M施設	9	3	21	3	21	5.3 ± 3.3	82.4 ± 216.6
	10	3	3	3	6.0 ± 3.2		
	11	3	3	3	359.1 ± 560.2		
	12	—	—	—	—		
	1	3	3	3	9.9 ± 12.0		
	2	—	—	—	—		
	4	—	—	—	—		
	5	—	—	—	—		
	6	3	3	3	63.1 ± 52.6		
	7	3	3	3	154.2 ± 49.3		
	8	3	3	3	24.6 ± 11		
N施設	9	3	24	3	24	30.6 ± 36.5	43.4 ± 53.6
	10	3	3	3	26.7 ± 19.2		
	11	3	3	3	14.9 ± 14.1		
	12	3	3	3	1.6 ± 0.7		
	1	3	3	3	31.2 ± 39.2		
	2	—	—	—	—		

SD: standard deviation

\*: 非検出は、0.11 CFU/cm<sup>2</sup>未満

\*\*: 検出個体のみの平均 ± SD

表 1-6 月別の生菌数

(表1-6 1/2)

年 月	ウシの種類	個体数		生菌検出 個体数*		生菌数** (平均±SD CFU/cm <sup>2</sup> )		月の統計
		種類 ごと	合計	種類 ごと	合計	種類ごと		
2022 4	ホルスタイン	—		—		—		—
	黒毛和種	—		—		—		
	交雑種	—	—	—	—	—		
	褐毛和種	—		—		—		
	アングス	—		—		—		
5	ホルスタイン	7		7		57.1 ± 65.6		59.7 ± 84.8
	黒毛和種	1		1		250 ± 0		
	交雑種	—	11	—	11	—		
	褐毛和種	3		3		2.3 ± 1.7		
	アングス	—		—		—		
6	ホルスタイン	8		8		336.0 ± 832.6		1,437.1 ± 4,448.7
	黒毛和種	3		3		60.2 ± 43.0		
	交雑種	3	17	3	17	63.1 ± 52.6		
	褐毛和種	—		—		—		
	アングス	3		3		7,124.1 ± 9,841.5		
7	ホルスタイン	9		9		14,691.1 ± 30,574.4		8,878.1 ± 21,561.4
	黒毛和種	3		3		127.4 ± 31.4		
	交雑種	3	20	3	20	154.2 ± 49.3		
	褐毛和種	3		3		73.3 ± 46.8		
	アングス	2		2		22,139.0 ± 2,868.0		
8	ホルスタイン	11		11		368 ± 480.9		229.9 ± 385.5
	黒毛和種	3		3		8.8 ± 1.1		
	交雑種	3	20	3	20	24.6 ± 11.0		
	褐毛和種	3		3		149.8 ± 67.9		
	アングス	—		—		—		
9	ホルスタイン	10		10		316.5 ± 604.2		197.7 ± 476.7
	黒毛和種	4		4		26 ± 41.5		
	交雑種	3	17	3	17	30.6 ± 36.5		
	褐毛和種	—		—		—		
	アングス	—		—		—		
10	ホルスタイン	11		11		46.8 ± 56.4		33.3 ± 46.0
	黒毛和種	5		5		17.8 ± 18.3		
	交雑種	1	19	1	19	9.2 ± 0		
	褐毛和種	2		2		9.9 ± 4.3		
	アングス	—		—		—		

(表1-6のつづき 2/2)

2022	ホルスタイン	3		3		10.7 ± 14.1	
	黒毛和種	6		6		182.4 ± 403.7	
	11 交雑種	11	20	11	20	27.8 ± 19.7	71.6 ± 220.7
	褐毛和種	—		—		—	
	アンガス	—		—		—	
12	ホルスタイン	6		6		7.5 ± 7.8	
	黒毛和種	5		5		22.8 ± 47.8	
	12 交雑種	5	17	5	17	133.7 ± 168.6	49.2 ± 104.4
	褐毛和種	1		1		9.6 ± 0	
	アンガス	—		—		—	
2023	ホルスタイン	9		9		121.3 ± 324.5	
	黒毛和種	5		5		11.3 ± 12.6	
	1 交雑種	3	20	3	20	31.2 ± 39.2	63.0 ± 218.0
	褐毛和種	3		3		6.0 ± 6.1	
	アンガス	—		—		—	
2	ホルスタイン	—		—		—	
	黒毛和種	—		—		—	
	2 交雑種	—	—	—	—	—	—
	褐毛和種	—		—		—	
	アンガス	—		—		—	

SD: standard deviation

\*: 非検出は、0.11 CFU/cm<sup>2</sup>未満

\*\*: 検出個体のみ平均 ± SD

表 1-7 増菌培養がリアルタイム PCR 陽性となった検体

検体 番号	施設 記号	リアルタイムPCRの結果*									
		<i>stx</i>	<i>eae</i>	16S	O157	O26	O111	O45	O121	O103	O145
J004	E施設	28.7	UD	17.1	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J005	E施設	23.0	UD	16.8	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J006	E施設	UD	25.0	13.4	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J007	E施設	24.7	39.0	16.9	UD	UD	UD	36.0	UD	UD	UD
J011	G施設	26.0	19.3	13.6	UD	UD	UD	31.5	UD	UD	UD
J013	F施設	UD	29.1	16.0	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J014	F施設	UD	24.7	16.2	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J023	M施設	25.0	24.0	14.5	22.4	UD	UD	UD	UD	UD	UD
J024	M施設	UD	22.2	13.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J025	M施設	26.6	UD	14.6	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J028	G施設	33.0	33.2	17.0	UD	UD	UD	30.8	UD	UD	UD
J034	E施設	44.1	32.0	16.4	26.9	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J035	E施設	28.0	30.9	18.0	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
J038	F施設	UD	23.9	15.6	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J043	I施設	UD	21.1	14.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J044	I施設	UD	27.3	14.6	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J045	I施設	UD	24.5	13.8	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J058	I施設	25.6	UD	14.0	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J061	M施設	34.1	25.9	13.6	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
J070	E施設	UD	38.9	14.7	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J071	E施設	32.1	35.7	14.6	UD	37.9	UD	29.0	UD	UD	UD
J081	M施設	UD	23.0	14.0	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J089	E施設	UD	26.0	14.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J091	E施設	27.8	28.8	14.9	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
J111	E施設	UD	37.1	14.7	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J112	E施設	30.0	31.8	14.7	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
J114	E施設	18.3	UD	14.6	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
J115	E施設	UD	25.2	14.3	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J117	M施設	22.9	UD	14.0	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J124	G施設	29.0	UD	13.8	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J133	I施設	UD	23.6	13.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J137	F施設	29.2	UD	14.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J150	F施設	35.0	34.0	16.1	UD	UD	UD	35.0	UD	UD	UD
J155	E施設	29.6	UD	14.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT

\*数値はCT値、UDは非検出、NTは非試験



表 1-8 リアルタイム PCR で *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、7 血清群のいずれかが陽性の培養液から菌株が分離された検体

O血清	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	検体 番号	採材日	施設 記号	生菌数 (CFU/cm <sup>2</sup> )	ウシの種類	月齢 (ヶ月)	性別	経産 の有無	去勢 の有無
O10	-	-	+	J43	220726	I施設	127.1	褐毛和種	30	メス	-	-
O113	-	+	-	J114	221125	E施設	7.67	交雑種	25	オス	-	有
O128	-	-	+	J24	220627	M施設	28.6	黒毛和種	27	オス	-	有
O145	-	-	+	J43	220726	I施設	127.1	褐毛和種	30	メス	-	-
O145	-	-	+	J44	220726	I施設	51.2	褐毛和種	28	メス	-	-
O156	-	-	+	J14	220603	F施設	5.11	ホルスタイン	13	オス	-	有
O156	-	-	+	J133	221213	I施設	9.56	褐毛和種	28	オス	-	有
O157	-	+	+	J23	220627	M施設	109.1	黒毛和種	28	オス	-	有
O157	-	-	-	J32	220722	E施設	522.2	ホルスタイン	119	メス	有	-
O157	-	-	-	J85	220927	G施設	1	ホルスタイン	18	オス	-	有
O157	-	-	-	J138	221220	F施設	22.2	ホルスタイン	20	オス	-	有
O177	-	-	+	J7	220527	E施設	250	黒毛和種	47	メス	有	-
O181	-	+	-	J5	220527	E施設	74.3	ホルスタイン	94	メス	有	-
O181	-	+	-	J7	220527	E施設	250	黒毛和種	47	メス	有	-
O183	+	-	-	J117	221128	M施設	1,005	黒毛和種	28	オス	-	有
O186	-	-	+	J11	220531	G施設	10.2	ホルスタイン	18	オス	-	有
OUT	-	+	-	J35	220722	E施設	24,167	アングス	28	オス	-	有
OUT(Og171)	-	+	-	J71	220909	E施設	1,972	ホルスタイン	20	オス	-	有
OUT(OgGp7)	-	+	-	J137	221220	F施設	9.56	ホルスタイン	20	オス	-	有

表 1-9 J23 由来 STEC O157:H7 の生化学的性状

培地	J23からの分離株		参考		
	血清型 O157: H7		血清型 O157: H7	血清型 O157: H-	その他の主な血清型
TSI寒天	斜面	黄色	黄色	黄色	黄色
	高層	黄色	黄色	黄色	黄色
	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 1-10 *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子陽性検体、そのうちの 7 血清群陽性検体

項目	リアルタイムPCR陽性検体		分離陽性検体		定量値
	検体数	検体番号 (試験コロニー数)	検体数	検体番号 (分離コロニー数)	
<i>stx</i> (+) & <i>eae</i> (+)	11	J7 (28), J11 (46), J23 (43), J28 (22), J34 (50), J35 (25), J61 (24), J71 (69), J91 (25), J112 (24), J150 (53)	1	J23 (40)	
上記のうち					
O26 (+)	1	J71 (69)	0	分離コロニーなし	NA
O45 (+)	5	J7 (28), J11 (46), J28 (22), J71 (69), J150 (53)	0	分離コロニーなし	NA
O157 (+)	2	J23(43), J34(50)	1	J23 (40)	< 0.33 MPN/100cm <sup>3</sup>

NA:非該当

表 1-11 分類項目別の 7 血清群 STEC の分離結果

分類項目		試験個体数	陽性個体数	血清型
ウシの種類	ホルスタイン	74	0	—
	黒毛和種	29	1	O157:H7
	交雑種	14	0	—
	褐毛和種	15	0	—
	アングス	5	0	—
施設	早来	45	0	—
	東藻琴	27	0	—
	帯広	24	0	—
	徳島	20	0	—
	佐賀	21	1	O157:H7
年月	2022年4月	0	0	—
	2022年5月	11	0	—
	2022年6月	14	1	O157:H7
	2022年7月	17	0	—
	2022年8月	17	0	—
	2022年9月	14	0	—
	2022年10月	16	0	—
	2022年11月	17	0	—
	2022年12月	14	0	—
	2023年1月	17	0	—
	2023年2月	0	0	—

表 1-12 STEC O157 が定性試験で分離された検体(J23)での定量試験結果

遺伝子	試験結果									定量値 (MPN)	
	1段目			2段目			3段目			／試験液100mL	／表面積100 cm <sup>2</sup>
<i>stx</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 3	< 0.33
	UD	NT	NT	UD	NT	UD	NT	NT	NT		
<i>eae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 3	< 0.33
	UD	NT	NT	UD	NT	UD	NT	NT	NT		
O157	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 3	< 0.33
	UD	NT	NT	UD	NT	UD	NT	NT	NT		

\*UDは非検出

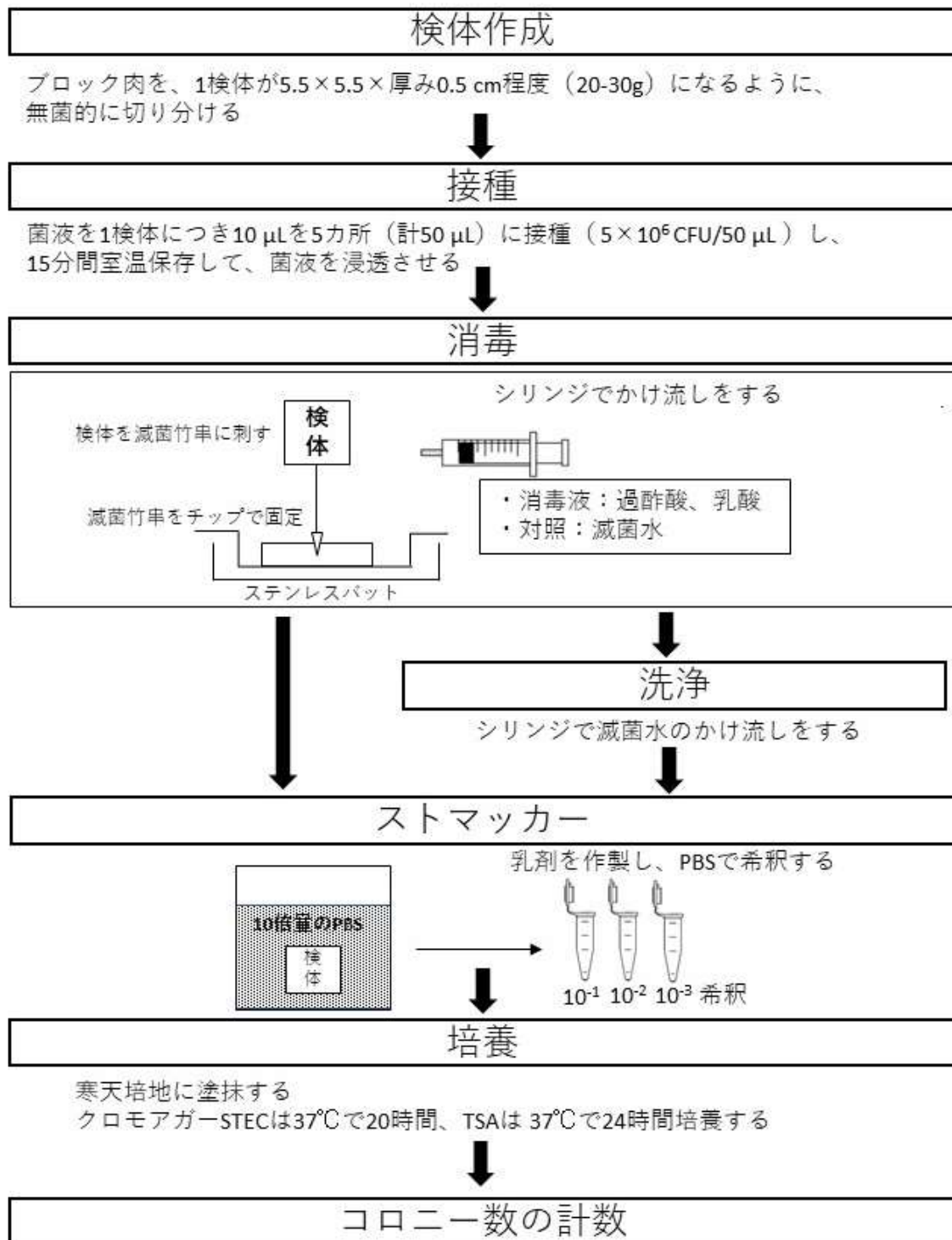


図 2-1 消毒液の効果の検証方法

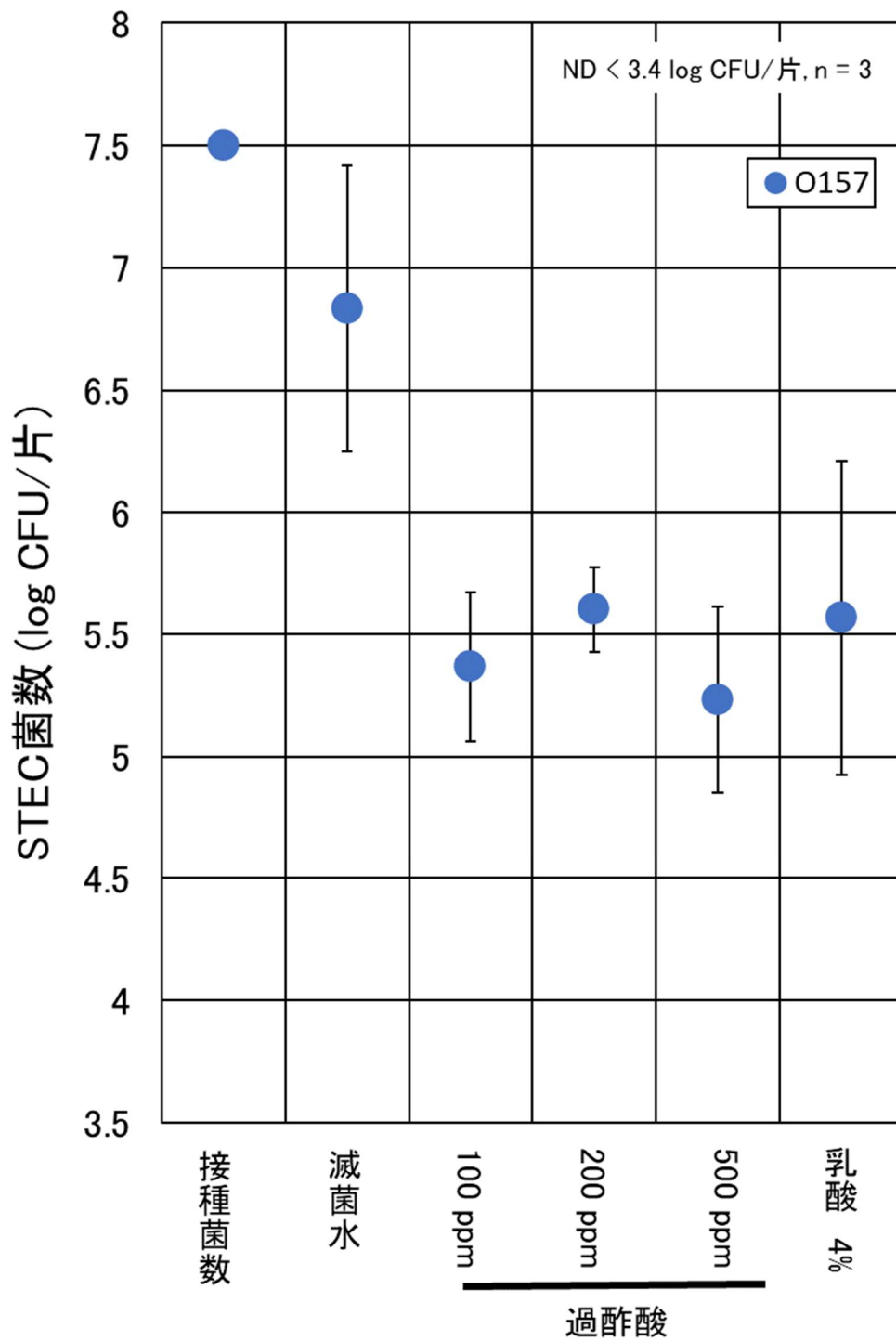


図 2-2 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証  
(25°C、筋膜あり検体、消毒液かけ流し 500 mL)

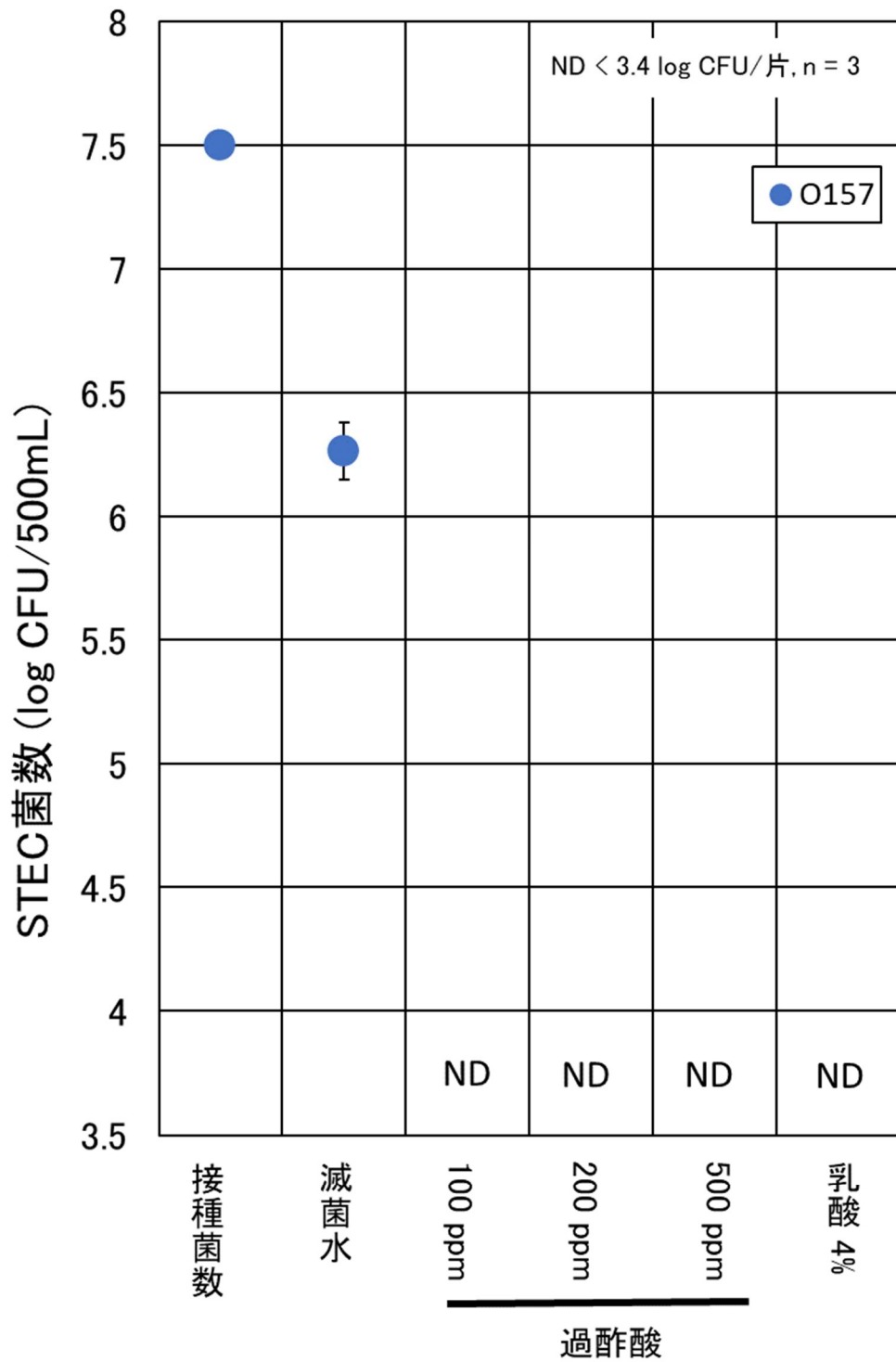


図 2-3 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証  
 (25℃、筋膜あり検体、消毒液かけ流し後の消毒液 500 mL)

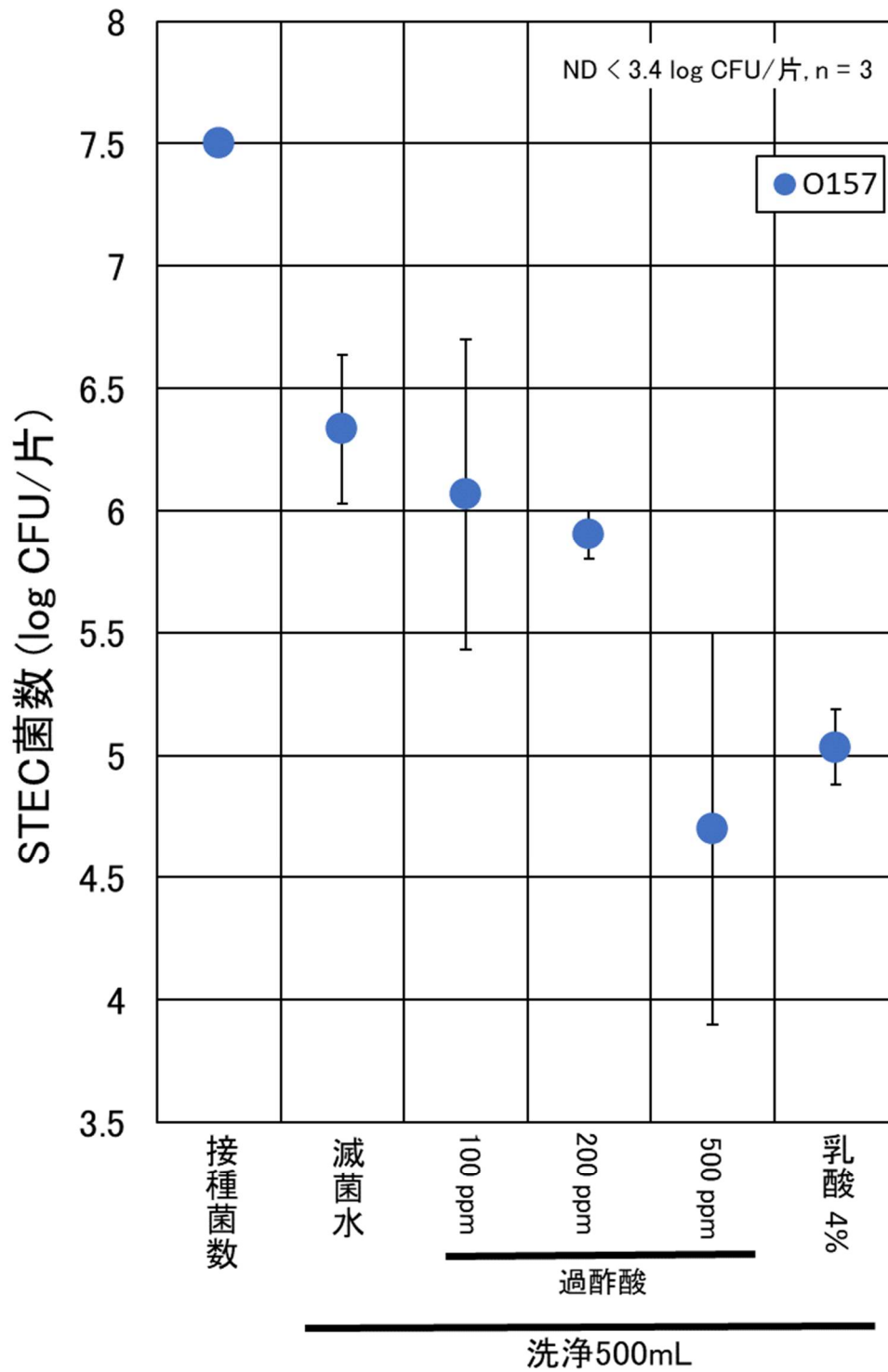


図 2-4 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証  
 (25°C、筋膜あり検体、消毒液かけ流し 500 mL、消毒後の洗浄滅菌水 500 mL)

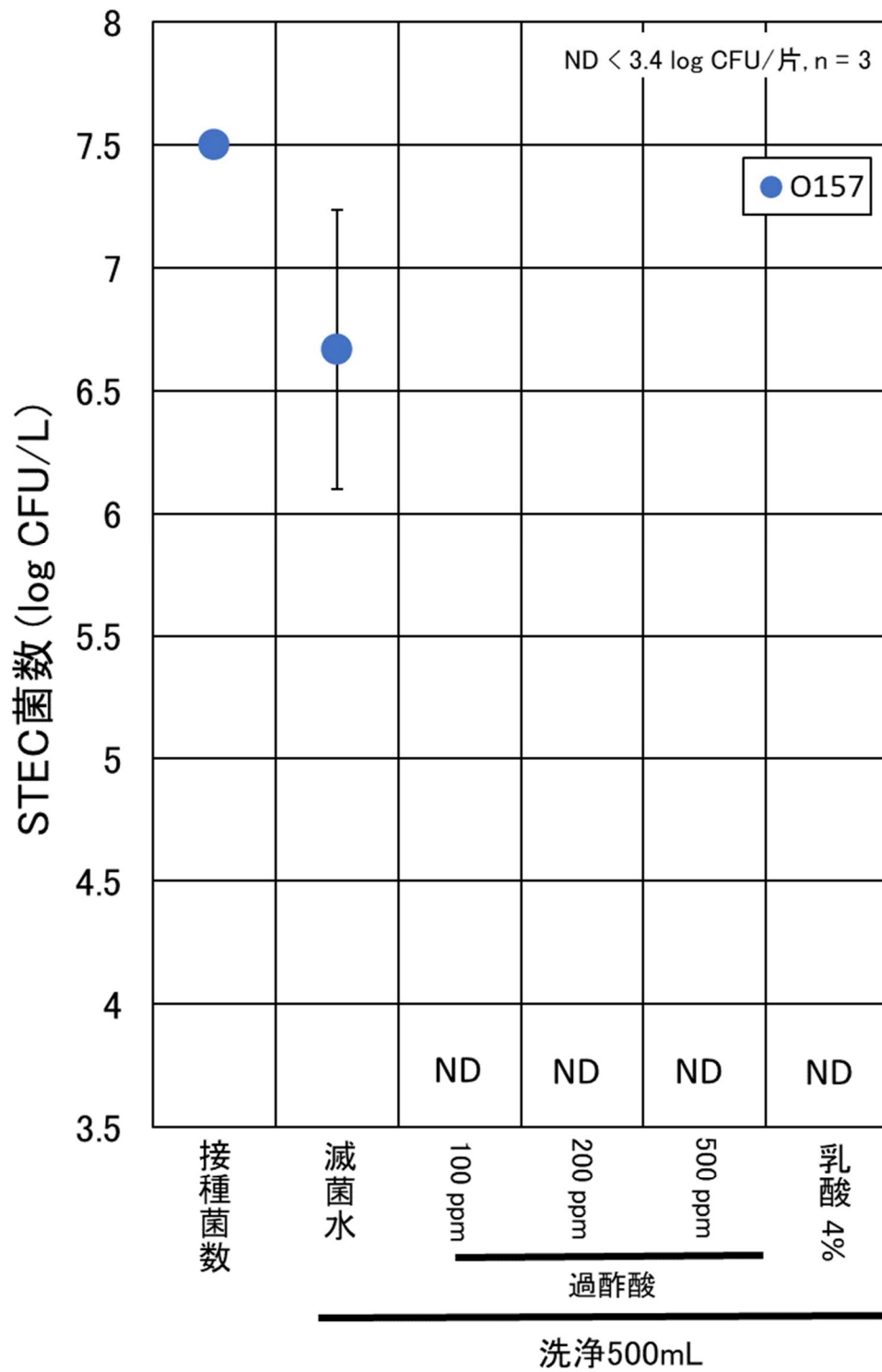


図 2-5 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証  
 (25°C、筋膜あり検体、消毒液かけ流し後の消毒液および洗浄滅菌水1 L 中)



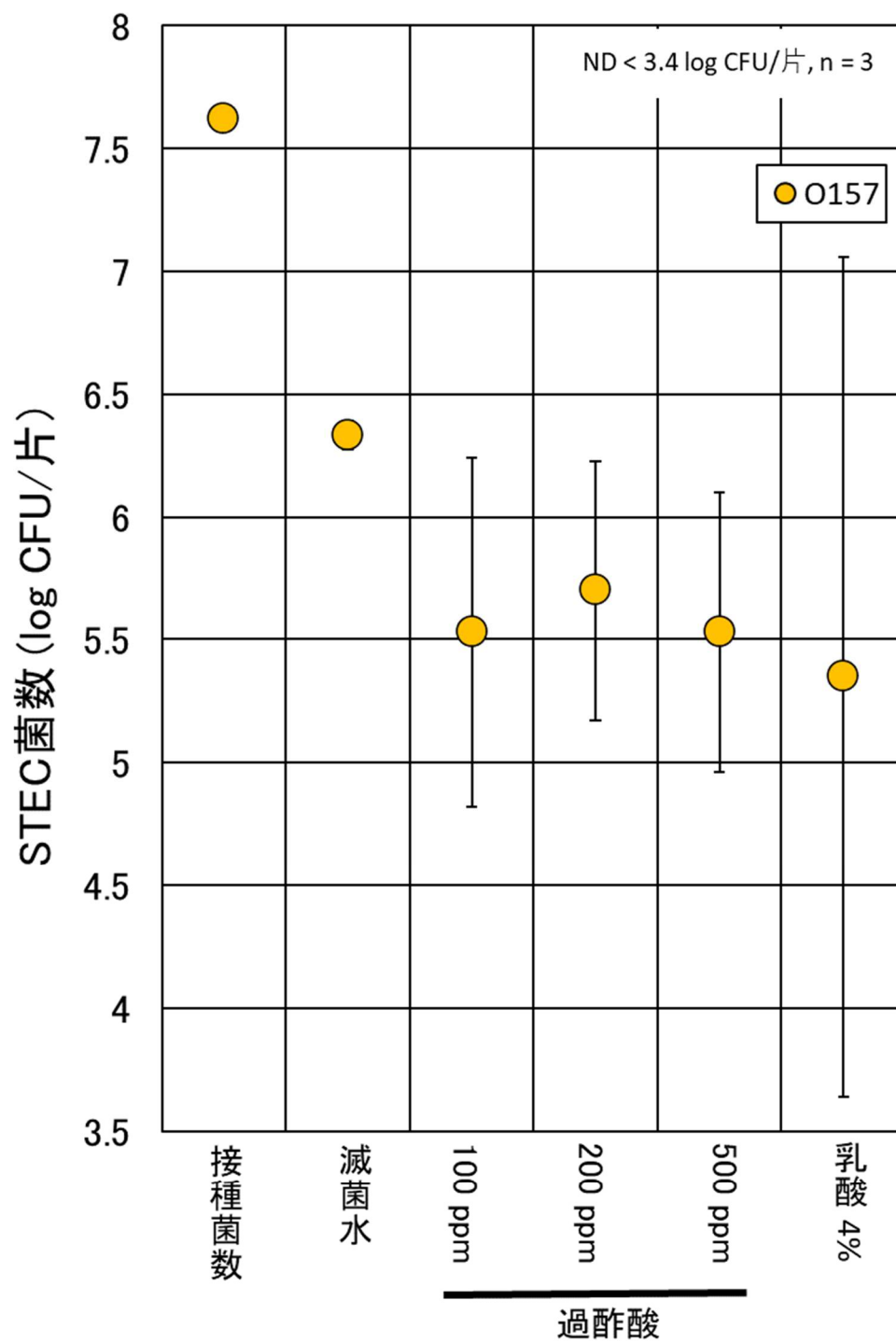


図 2-6 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証  
 (55°C、筋膜あり検体、消毒液かけ流し 500 mL)

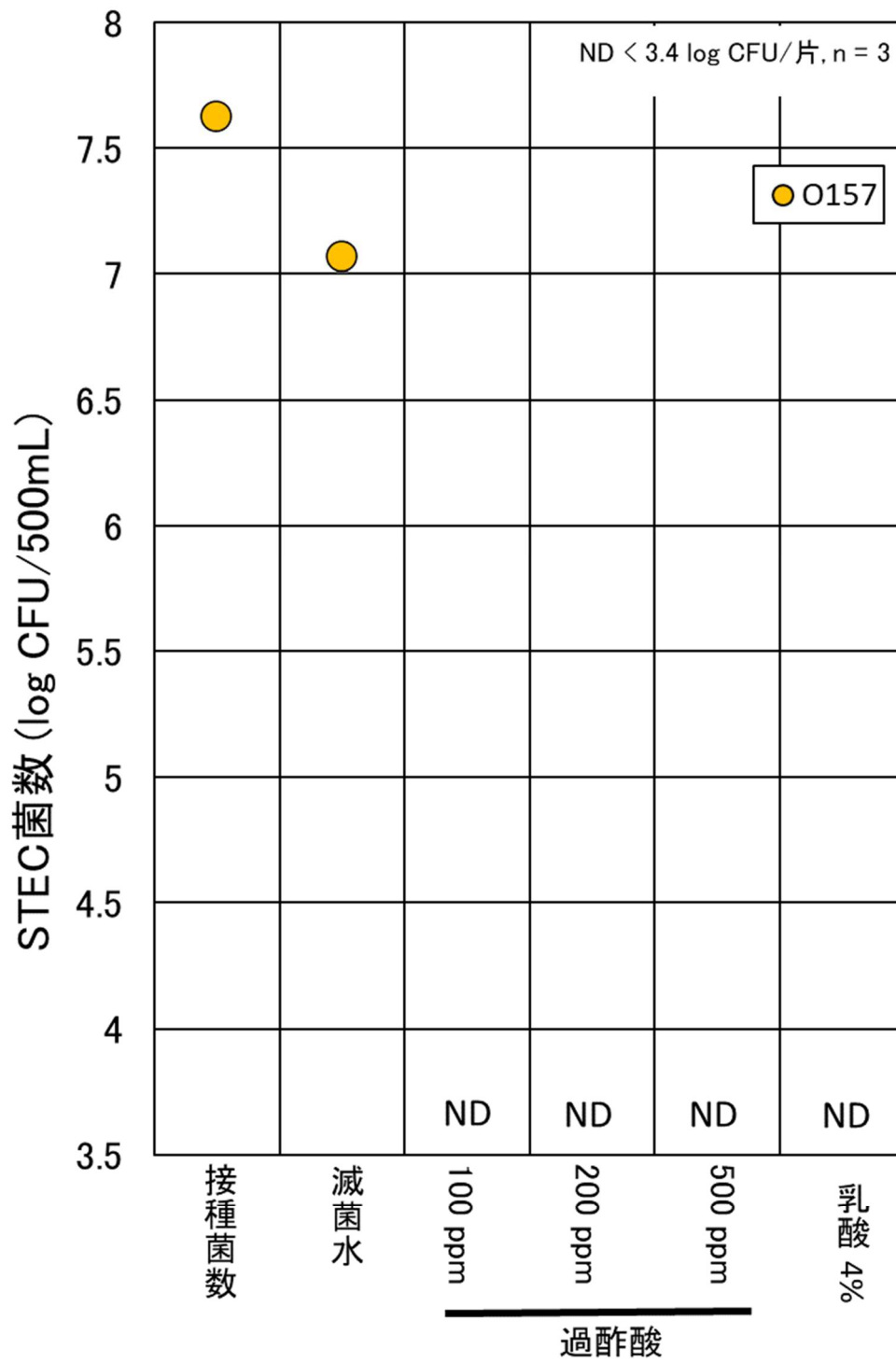


図 2-7 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証  
 (55°C、筋膜あり検体、消毒液かけ流し後の消毒液 500 mL 中)

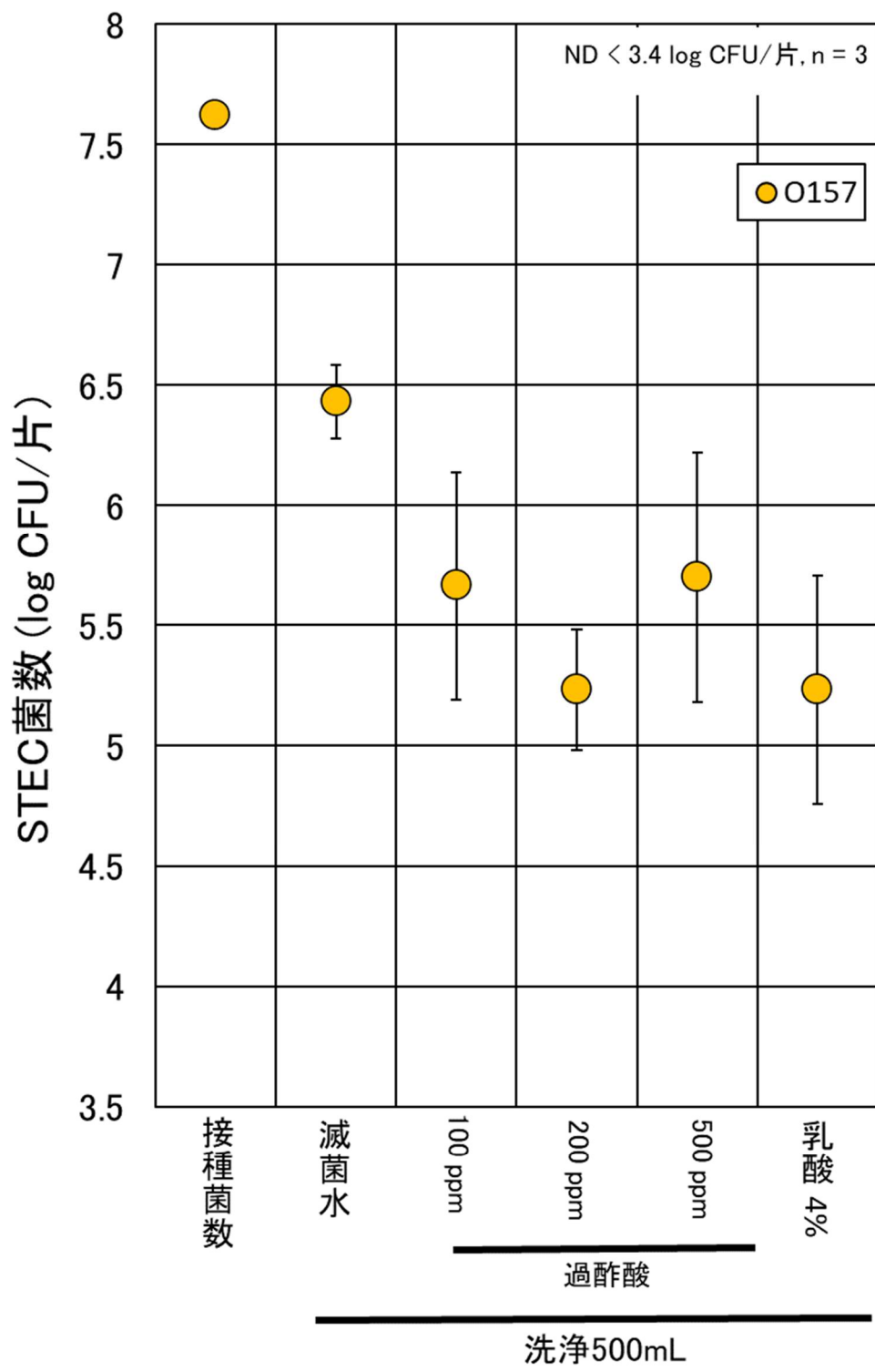


図 2-8 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証  
 (55°C、筋膜あり検体、消毒液かけ流し 500 mL、消毒後の洗浄滅菌水 500 mL)

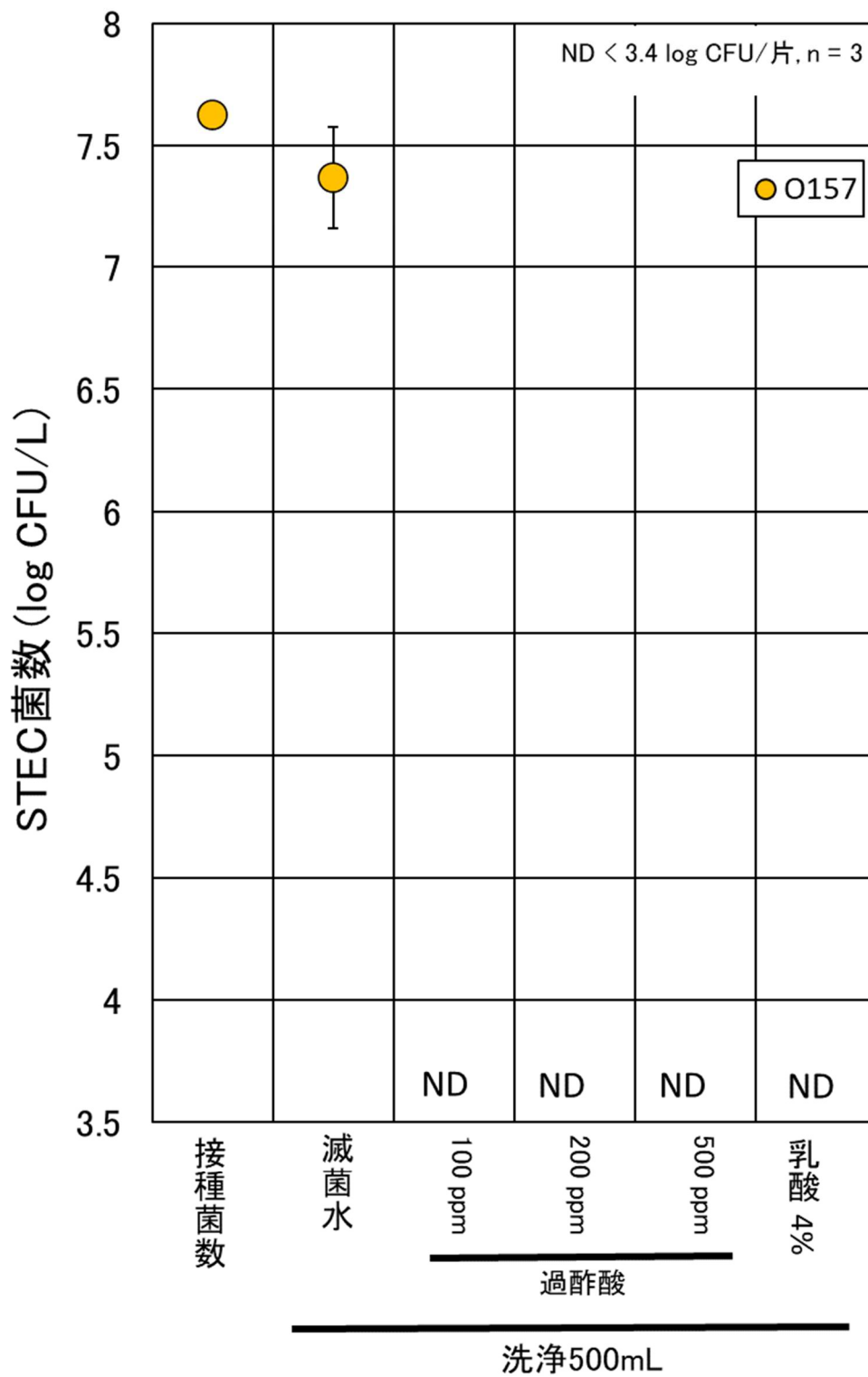


図 2-9 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証  
 (55°C、筋膜あり検体、消毒液かけ流し後の消毒液および洗浄滅菌水1 L 中)

表 2-1 消毒試験条件

消毒液	濃度	25°C		55°C	
		洗浄 なし	洗浄 あり	洗浄 なし	洗浄 あり
過酢酸	100 ppm	T	T	T	T
	200 ppm	T	T	T	T
	500 ppm	T	T	T	T
乳酸	4 %	T	T	T	T

T: 実施

表 2-2 55°Cの乳酸の効果あり

論文 No.	著者	タイトル	雑誌	国	概要
1	Signorini, M. ら	Evaluation of decontamination efficacy of commonly used antimicrobial interventions for beef carcasses against Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i>	MEAT SCIENCE Vol. 142 p. 44-51 2018年	アルゼンチン	<p>検体: 牛枝肉 温度条件: 55°C 薬剤: 3%乳酸</p> <p>効果: 30-60分の換気後2%乳酸を自動塗布、および55°Cでの3%乳酸自動塗布が最も効果的。2%乳酸手動塗布は効果なし。3%乳酸手動塗布は結果なし。</p> <p>システム: 電動ポンプ (220V) およびステンレスキャビネット (自動塗布)</p> <p><a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.009">http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.009</a></p>
2	Castillo, A. ら	Lactic acid sprays reduce bacterial pathogens on cold beef carcass surfaces and in subsequently produced ground beef	JOURNAL OF FOOD PROTECTION Vol. 64 No. 1 p. 58-62 2001年	米国	<p>検体: 牛枝肉 温度条件: 55°C 薬剤: 4%乳酸</p> <p>効果: 乳酸を使用したプレチル処理およびポストチル処理の消毒効果の検討。プレチル処理では55°C250ml30秒2%乳酸を塗布。ポストチル処理では55°C500ml30秒4%乳酸を塗布。プレチル処理により、<i>Escherichia coli</i> O157:H7および<i>Salmonella Typhimurium</i>は、水洗浄のみでは3.3~3.4 log cycle、水洗浄と4%乳酸では5.2 log cycle減少した。ポストチル処理を加えることにより、<i>E. coli</i> O157:H7は2.0-2.4 log cycle、<i>Salmonella Typhimurium</i>は1.6-1.9 log cycleの追加の消毒効果がみられた。4%乳酸スプレー塗抹のポストチル処理をプレチル処理に組み合わせることで、合計6.8-7.2 log cycle減少が達成された。</p> <p>システム: なし</p> <p><a href="http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-64.1.58">http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-64.1.58</a></p>
3	HARDIN, MD. ら	Comparison of methods for decontamination from beef carcass surfaces	JOURNAL OF FOOD PROTECTION Vol. 58 No. 4 p. 368-374 1995年	米国	<p>検体: 牛枝肉 温度条件: 55°C 薬剤: 2%乳酸</p> <p>効果: 枝肉表面から80cm離れた地点からミスト (200ml、40psi、55°C) で11秒間塗布。2%乳酸は2%酢酸よりも有意に大腸菌O157:H7を減少させたが、サルモネラ菌の減少に対する両有機酸の消毒効果の差は顕著ではなかった。</p> <p>システム: なし</p> <p><a href="http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-58.4.368">http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-58.4.368</a></p>

表2-3. 55°Cの乳酸・過酢酸の効果あり

論文 No.	著者	タイトル	雑誌	国	概要
4	Eastwood, LC. ら	Efficacy of antimicrobial interventions in reducing <i>Salmonella enterica</i> , Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> , <i>Campylobacter</i> , and <i>Escherichia coli</i> biotype I surrogates on non-chilled and chilled, skin-on and skinless pork	MEAT SCIENCE Vol. 172 108309 2021年	米国	検体: 豚枝肉 (皮付き、皮なし、ノンチルド、チルド) 温度条件: 55°C 薬剤: 5%乳酸 効果: 2.5%および5%乳酸のスプレー塗布によるSTECの減少は0.8から1.7 log10CFU/cm <sup>2</sup> であった。ノンチルド皮なし枝肉に最も消毒効果があった。乳酸およびPAA処理は、処理した豚肉の客観的および官能的な色彩評価では、豚肉の色彩への悪影響は最小限であった。 システム: なし <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108309">http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108309</a>

表2-4. 55°C以外の乳酸の効果あり

論文 No.	著者	タイトル	雑誌	国	概要
5	Pipek, P. ら	Microbial decontamination of beef carcasses by combination of steaming and lactic acid spray	JOURNAL OF FOOD ENGINEERING Vol. 67 p. 309-315 2005年	チェコ共和国	検体: 牛枝肉 温度条件: 45°C 薬剤: 蒸気および2%乳酸 効果: 使用した薬剤は2%乳酸のみ。本文では、蒸気と2%乳酸を組み合わせた消毒法の有効性を検討している。本消毒法では、牛枝肉表面の微生物数(低温細菌および中温細菌)が減少し、消毒後の低温保存中の微生物増殖を遅延させることを示した。枝肉や食肉の保存期間を大幅に延長することができるとしている。 システム: なし <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.04.033">http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.04.033</a>
6	Ba, HV. ら	The effects of pre-and post-slaughter spray application with organic acids on microbial population reductions on beef carcasses	MEAT SCIENCE Vol. 137 p. 16-23 2018年	大韓民国	検体: 牛 温度条件: 室温(記載なし) 薬剤: 3%乳酸 効果: 2回に分けたスプレー噴霧の消毒効果の検討。屠殺前に手動スプレーで噴霧(1L)し、屠殺後最終工程に手動スプレーで噴霧(0.5L)した。3%乳酸および3%酢酸の噴霧は有意に消毒効果があるとし、2種の有機酸のうち、3%乳酸がより高い消毒効果を示した。  システム: なし <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.11.006">http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.11.006</a>
7	CUTTER, CN. ら	Efficacy of organic-acids against escherichia-coli o157-h7 attached to beef carcass tissue using a pilot-scale model carcass washer	JOURNAL OF FOOD PROTECTION Vol. 57 No. 2 p. 97-103 1994年	米国	検体: 牛枝肉から切取した赤身と脂肪組織(7.5 cm x 7.5 cm x 0.5cm) 温度: 24°C 薬剤: 5%乳酸 効果: 乳酸、酢酸及びクエン酸を異なる濃度(1, 3, 5%)で牛肉塊に噴霧し、組織中の <i>Escherichia coli</i> O157:H7 および <i>Pseudomonas fluorescens</i> の消毒効果を検討。5%乳酸は、組織の種類に関わらずに、用いた薬剤の中で最も効果があった。その他の薬剤についても最も濃度の高い5%が最も消毒効果があった。消毒後の表面pHの結果から、細菌数の減少は酸性pHの影響によるものである可能性が示唆された。  システム: CAPER unit <a href="http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-57.2.97">http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-57.2.97</a>
8	Pipek, P. ら	Decontamination of pork carcasses by steam and lactic acid	JOURNAL OF FOOD ENGINEERING Vol. 74 p. 224-231 2006年	チェコ共和国	検体: 豚枝肉 温度条件: 45°C 薬剤: 蒸気および2%乳酸 効果: 使用した薬剤は2%乳酸のみ。通し番号28と同一の方法で検討を行っており、蒸気と2%乳酸を組み合わせた消毒法の有効性を検討している。本消毒法では、豚枝肉表面の微生物数(低温細菌および中温細菌)が減少し、消毒後の低温保存中の微生物増殖を遅延させることを示した。また、その効果は、より汚染された枝肉でより良く、牛肉枝肉と比較してより顕著であった。 システム: なし <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.015">http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.015</a>



表2-5. 55°C以外のカプリル酸・過酢酸・次亜塩素酸および71°C温水の効果あり

論文 No.	著者	タイトル	雑誌	国	概要
9	Cap, M. ら	Inactivation of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> in fresh beef by electrolytically-generated hypochlorous acid, peroxyacetic acid, lactic acid and caprylic acid	MEAT SCIENCE Vol. 157 107886 2019年	アルゼンチン	検体: 牛もも塊肉 (アイオブラウンド) 温度: 50° C 薬剤: 3%カプリル酸 効果: 15秒間100mlのリンス試験において、3%カプリル酸が最も有効であり、次いで2%乳酸、200ppmペルオキシ酢酸となり、電解水は効果を示さなかった。官能分析では、カプリル酸で処理したサンプルとコントロールサンプルの間で、風味および色のいずれにおいても有意差は認められなかった。 システム: なし <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107886">http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107886</a>
10	Pozuelo, KC. ら	Validation of post-harvest antimicrobial interventions to control Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (STEC) on market hog carcass surfaces	INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY Vol. 358 109421 2021年	米国	検体: 豚枝肉 温度条件: 常温 薬剤: 酸性化過酢酸 (pH1.2) 効果: 低用量塗布 (3L) のみでの比較した場合、400ppm 酸性化過酢酸 (pH1.2) の処理後の消毒効果は2.3 log10CFU/cm <sup>2</sup> で最も効果があった。大容量塗布 (60L) の検討では、71°Cの温水、400ppm 過酢酸および600ppm次亜塩素酸で効果があった。検討されたすべての消毒は枝肉の色に影響を与えなかった。 システム: Chad carcass cabinet <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109421">http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109421</a>

表 2-6 供試した消毒液による牛肉表面の変色と臭味

温度 (°C)	消毒後 の洗浄 (500mL、 1回)	消毒液	濃度	pH	牛肉表面の変色 (部位による)	臭味
25	なし	純水		6.9	ほとんどなし	なし
		過酢酸	100 ppm	4.2	ほとんどなし	なし
			200 ppm	4	ほとんどなし	弱い酢酸臭
			500 ppm	3.8	ほとんどなし	酢酸臭
			乳酸	4%	2.7	茶褐色
	あり	純水		6.9	ほとんどなし	なし
		過酢酸	100 ppm	4.2	ほとんどなし	弱い酢酸臭を感じる場合もある
			200 ppm	4	ほとんどなし	弱い酢酸臭を感じる場合もある
			500 ppm	3.8	ほとんどなし	弱い酢酸臭を感じる場合もある
			乳酸	4%	2.7	茶褐色
55	なし	純水		6.7	ほとんどなし	なし
		過酢酸	100 ppm	3.9	ほとんどなし	なし
			200 ppm	3.7	ほとんどなし	若干酢酸臭を感じる場合もある
			500 ppm	3.5	ほとんどなし	若干酢酸臭を感じる場合もある
			乳酸	4%	2.4	茶褐色
	あり	純水		6.7	ほとんどなし	なし
		過酢酸	100 ppm	3.9	ほとんどなし	なし
			200 ppm	3.7	ほとんどなし	若干臭いを感じる場合もある
			500 ppm	3.5	ほとんどなし	若干臭いを感じる場合もある
			乳酸	4%	2.4	茶褐色

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

#### 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
なし					

厚生労働大臣厚生労働大臣 殿

機関名 星薬科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 牛島 俊和

次の職員の令和4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 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）

2. 研究課題名 動物性食品輸出の規制対策のための研究（20KA1005）

3. 研究者名（所属部署・職名）薬学部 薬品分析化学研究室・教授

（氏名・フリガナ） 穂山 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）
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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

次の職員の令和4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 (所属部署・職名) 食品部・室長  
(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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 5 年 3 月 9 日

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

次の職員の令和4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 (所属部署・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み記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。