

令和 6 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強化
に資する研究

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 静夏

星薬科大学薬学部

工藤由起子

国立保健医療科学院生活環境研究部

吉富 真理

国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部

廣瀬 昌平

令和 7 年(2025 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強化に資する研究	-----	1
穐山 浩		
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	-----	18
志田 静夏		
2. 牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究	-----	59
工藤 由起子		
3. 食肉衛生検査所の研修教材の作成	-----	82
吉富 真理		
4. 食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止	-----	95
廣瀬 昌平		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	106

I. 総括研究報告

星薬科大学

穂山 浩

動物性食品輸出の規制対策の強化に資する研究

研究代表者 穂山 浩

研究要旨: EU向けに動物性食品を輸出する際に求められるモニタリング検査やEUでの輸入時検査においてA物質(スチルベン類等)が検出された場合に、その原因を調査するための分析法として、牛肉中のステロイド類及びスチルベン類分析法を開発した。ステロイド類分析法は、試料からヘキサノール抽出及びヘキサノール洗浄を行った後、グラファイトカーボン/エチレンジアミン- γ -プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで測定する方法である。また、スチルベン類分析法は、試料からエタノール及び水の混液(9:1)で抽出し、 β -グルクロニダーゼで加水分解を行った後、親水性基修飾SDBミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで測定する方法である。妥当性評価試験を実施した結果、真度、併行精度、室内精度及び選択性の目標値を満たした。これらの結果から、いずれの分析法も牛肉中の残留分析法(定量限界0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)として妥当であることが示された。

牛肉のSTECおよびサルモネラ属菌汚染リスク低減のための研究を実施した。牛枝肉のSTECおよびサルモネラ属菌調査では、2024年9月から4施設の協力のもとに牛枝肉合計108検体から7血清群(026、045、0103、0111、0121、0145、0157)のSTECおよびサルモネラ属菌を対象とした調査を行った。また、このうち3施設については衛生指標として生菌数についても測定を行なった。供試検体を増菌培養後、または施設にて増菌培養した培養液の二次増菌培養後、STEC7血清群マルチプレックスリアルタイムPCRおよびサルモネラ特異的リアルタイムPCRに供試した。スクリーニングを行い、陽性になった検体については菌分離を行った。分離された株については生化学的性状試験および血清型別を行った。この結果、1検体(0.9%)からサルモネラ属菌が分離されたが、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。なお、STEC7血清群は検出されなかった。また、MLG掲載または第三者認定を受けたSTECスクリーニング方法についての試行では、菌液および菌添加牛肉培養液からのキットを用いたDNAの抽出および検出を実施した。今後、より詳細な使用手順が整備されることによって、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられた。

アメリカ合衆国・EU等向け輸出向け食肉取扱施設を管轄する食肉衛生検査所の指名検査員の研修に必要な教材として、輸出食肉認定施設における検査実施要領の業務遂行に求められる知識及び技術を新規着任者が習得することを設定し、新規着任者が一人でも学習できる動画に使用する教材とした。その講義資料として、指名検査員による検証を理解するための基礎知識として、と畜場及び食肉処理場のHACCPに基づく衛生管理を踏まえた資料を作成した。また、指名検査員が実施すると畜検査及び検証に解説を加える動画教材を作成した。さらに、これらの学習で基礎的な知識習得後に参考となる、国際連合食糧農業機関(FAO)のガイダンス文書及びアメリカ合衆国の食品衛生管理に係る法令等を翻訳した。今後は、HACCPに基づく衛生管理を踏まえた講義資料に対応する演習資料の開発とこれらの教材を用いた研修を実施し、指名検査員の知識及び技術の習得度の変化を確認する必要がある。

対米輸出向け食肉施設における腸管出血性大腸菌(STEC)およびサルモネラ属菌検査の信頼性向上を目的として、各施設で使用されている標準作業手順書(SOP)を収集し比較するとともに、検査手技および手法に関する精度検証を実施した。令和5年度に協力を得た国内9施設に加えて、令和6年度には新たに1施設の協力を得て、計10施設からSOPを収集した。SOPの内容には施設ごとの差異があるものの、各施設の処理工程に即しており試験法の逸脱等は認められなかった。また、聞き取り調査で各施設から寄せられたSTEC検査における問題点の報告を受け、STEC検査に使用される免疫磁気ビーズのSTEC非特異的濃縮の検証を実施した。菌液と免疫磁気ビーズの血清型の組み合わせによっては、非特異的濃縮が生じることが示唆された。今後さらに検証を進め、改善案を提示する必要があると考えられた。

研究分担者

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)

吉富 真理 (国立保健医療科学院 上席主任研究官)

工藤由起子(星薬科大学・薬学部・教授)

廣瀬昌平(国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部第二室長)

研究協力機関

(一財)日本食品分析センター

日本フードパッカー株式会社

研究協力者：

田口貴章 (国立医薬品食品衛生研究所)

阿部嘉智(岩手県食肉衛生検査所)

関口明子(栃木県食肉衛生検査所)

吉田史子(大分県食肉衛生検査所)

本多伽衣、天野壮俊、鏡山雅人、内場健斗、大塚佳代子、奥輝明、築地信、渡辺はるな、伊藤里恵、岩崎雄介 (星薬科大学)

赤松 玲子 (栃木県食肉衛生検査所)

塚本 真由美(岐阜県飛騨食肉衛生検査所)

安達 恵、高澤 木綿子(姫路市食肉衛生検査センター)

西屋 秀樹(鹿児島県阿久根食肉衛生検査所)

中島 靖剛(スターゼンミートプロセッサー株式会社 品質管理部)

A. 研究目的

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。輸出促進のためには食品衛生管理の対策に関する検討を行う必要が

ある。そこで4つの課題に関して検討を行うことを目的とする。

第1の課題では、EUに動物性食品を輸出する際に必要なモニタリング検査のための分析法を確立する。牛や鶏のモニタリング検査またはEUでの輸入時検査においてA物質(スチルベン類等)が検出された場合に原因調査を行うための分析法を開発し、輸出再開に向け迅速な対応が取れる体制を整備することを検討する

第2の課題では、対米輸出食肉取扱施設や食肉検査所では、牛肉の腸管出血性大腸菌(STEC)およびサルモネラ属菌の検査を輸出先国の試験法で実施している。本研究では、各検査所とは異なる方法によって腸管出血性大腸菌やサルモネラ属菌特異的遺伝子検出を行い、衛生指標として評価し、フィードバックして処理工程の改善検討等に役立てることを目的とする。また、第3者認定を受けた方法について食肉衛生検査所での導入の参考になる試行を行う。

第3の課題では、食肉衛生検査所の指名検査員等に対し定期的に研修を行い、公的監査の知識や技術等を修得する必要があるが、体系的に整理された研修プログラム及び教材はない。輸出先国等の動物性食品の衛生管理の監査担当職員向け研修プログラムの調査、国内の監視指導検査員の研修の実態調査等を行い、実施可能な監視指導検査員等向けの研修プログラム及び教材を作成することを目的とする。

第4の課題では、対米輸出食肉取扱施設で実施される牛肉の STEC およびサルモネラ属菌の検査の標準作業手順書

(SOP) について検証し、各食肉衛生検査所で実施される検査の妥当性評価および試験逸脱防止を検討する。

B. 研究結果及び考察

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

[1] ステロイド類(エストラジオール、テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、酢酸トレンボロン、デキサメタゾン及びメドロキシプロゲステロン)分析法

1. 試験溶液の調製

1.1 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL 及びヘキサン 50 mL を加え、ホモジナイザーで攪拌した後、さらに無水硫酸ナトリウム 20 g を加えホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離し、上層を捨てた後、下層を綿栓ろ過した。次いで残留物にアセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに合わせ、アセトニトリルで定容した。

1.2 精製

抽出液 20 mL (試料 2 g 相当) をグラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム [InertSep GC/PSA(500 mg/500 mg/6 mL)] (あらかじめアセトニトリル 5 mL で洗浄したもの) に負荷し、溶出液を 50 mL 遠心管に受けた。次いで、アセトニトリル及びトルエンの混液(3:1)10 mL で溶出し、先の遠心管に合わせた。全溶出液を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。

残留物を水及びメタノールの混液(1:1) 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。

2. 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界濃度(0.5 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] スチルベン類(ジエネストール、ジエチルスチルベストール及びヘキサステロール)分析法

1. 試験溶液の調製

1.1 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、エタノール及び水の混液(9:1)50 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。次いで残留物にエタノール及び水の混液(9:1)30 mL を加え、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに合わせ、エタノール及び水の混液(9:1)で定容した。

1.2 加水分解反応

抽出液 5 mL (試料 0.5 g 相当) を 50 mL 容遠心管に分取し、0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液(pH 5.0)10 mL 及びβ-グルクロニダーゼ溶液 100 µL を加え、37°Cの水浴中で 60 分間振とうし、加水分解反応を行った。

1.3 精製

反応液を親水性基修飾 SDB ミニカラム [EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)] (あらかじめ

メタノール 5 mL、水 10 mL で洗浄したもの)に負荷した。遠心管内を 5 mL の水で洗い、洗液をカラムに負荷した。水及びメタノールの混液(11:9)5 mL で洗浄した後、1 分間吸引した。次いでヘキササン 5 mL で洗浄した後、1 分間吸引した。親水性基修飾 SDB ミニカラム[EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)]の下にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak Plus NH₂(360 mg)](あらかじめ酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)5 mL で洗浄したもの)を接続し、酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)15 mL で溶出した。溶出液をなす形フラスコに入れて、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。残留物を水及びメタノールの混液(1:1)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。

2. 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界濃度(0.5 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。

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

2024 年 9 月から 2025 年 3 月に国内の食肉衛生検査所 4 ヶ所にて、ウシ 108 頭からサンプリングを行った。

(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、氷上もしくは 2～4 °C で保存し、宅配便 (冷蔵) によって星薬科大学へ送付した。

なお、1 施設については、当該施設での STEC 試験に伴い発生する培養液残液 9 検体を宅配便 (冷蔵) によって星薬科大学へ送付した。

(2) STEC・サルモネラ属菌検出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 °C 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) 300 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 37 mL を別容器に分注し 4 °C に保管した。

2) 生菌数測定

検体液を 10 倍階段希釈にて 10⁻² 希釈液まで作製し、検体液原液は 0.2 mL ずつを標準寒天培地 5 枚に塗抹し、10⁻¹ および 10⁻² 希釈液については 0.1 mL ずつを標準寒天培地にそれぞれ 2 枚ずつ塗抹し、37°C

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

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、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$ で 15-24 時間培養を行った。この培養液から DNA アルカリ熱抽出を行った。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。

また、食肉衛生検査所 1 施設から分与された培養液残液については、培養液残液 2 mL を Tryptone soya broth (TSB) 8 mL に添加して 42°C で 18 時間培養(二次増菌培養)した。この培養液の DNA 抽出液をリアルタイム 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。

リアルタイム PCR の反応条件は、 95°C で 10 分を 1 サイクル、次いで 95°C で 15 秒、 59°C で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。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 (1 N 塩酸) を加え、ローターで 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、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 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。

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) サルモネラ属菌の検出方法

1) 試験検体

STEC 試験に使用した mTSB 培養液 99 検体を供した。また、1 施設については、当該施設での STEC 試験に伴い発生する培養液残液 9 検体を供した。この培養液残液 2 mL に Tryptone soya

broth (TSB) 8 mL を添加して、42°C で 18 時間培養 (二次増菌培養) し試料とした。

2) 検体の増菌培養液または培養液残液の二次増菌培養からの DNA 抽出

前述 1) の試験検体から DNA アルカリ熱抽出を行った。この DNA 抽出液を以下に示すリアルタイム PCR のテンプレートとして用いた。

3) サルモネラ属菌特異的遺伝子の検出

プライマーセット (*ttr*/16S) ではサルモネラ属菌特異的 *ttr* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子を検出する。16S rRNA 検出用プライマーおよびプローブは、

(1) の 5) に示した 16S Assay2 と同じ配列を用いた。

リアルタイム PCR の反応条件は、95°C で 10 分を 1 サイクル、次いで 95°C で 15 秒、59°C で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。*ttr* 遺伝子がない場合はサルモネラ属菌陰性とした。

4) 選択培地を用いたサルモネラ属菌の分離

3) で *ttr* 遺伝子が陽性だった検体の増菌培養液または培養液残液の二次増菌培養 0.5 mL をテトラチオネート (TT) 培地 10 mL に、同液 0.1 mL を Rappaport-Vassiliadis R10 (RV) 培地 10 mL に接種し、42°C で 18~24 時間培養した。TT 培地および RV 培地での培養液を攪拌後、1 白金耳を DHL 寒天培地および CHROMagar Salmonella にそ

れぞれ画線塗抹し、35℃で18～24時間培養した。DHL 寒天培地と CHROMagar Salmonella に単離された疑わしいコロニーを観察し、DHL 寒天培地は黒色 (H₂S 陽性)、CHROMagar Salmonella は紫色コロニーを選択した。疑わしいコロニーがある場合は、各プレート2コロニー以上を目安として Tryptone Soya Agar (TSA) へ画線塗抹すると同時に、4分画した DHL 寒天培地と CHROMagar Salmonella にもそれぞれ画線し、35℃で18～24時間培養した。コロニーの密集によって単離が難しい場合は、DHL 寒天培地あるいは CHROMagar Salmonella へ適宜画線塗抹し単離した。典型的なコロニーが認められない平板は、陰性と判断した。

5) サルモネラ属菌の同定

TSA 上のシングルコロニーを用いて、デンカ生研の「サルモネラ LA」で凝集試験を行った。凝集試験陽性のコロニーは、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) に、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) に培養して、生化学的性状試験を行った。

6) 血清型別試験

サルモネラ属菌と同定された菌株は、サルモネラ免疫血清「生研」(0群, Vi 血清) とサルモネラ免疫血清「生

研」H 血清を用いて血清型を決定した。

7) サルモネラ属菌の汚染菌数の定量

上記の菌株が、サルモネラ属菌であった場合、4℃で保存しておいた培養前の検体液を用いて、MPN 測定 (3本法) を行った。mTSB を用いて希釈段3段とし、37±1℃で15-24時間培養した。前培養液は TT 培地および RV 培地で選択増菌培養し、4) 選択培地を用いたサルモネラ属菌の分離に従った。

2. MLG 掲載または第3者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行

(1) 試薬キットおよび機器

GENE-UP シリーズの STEC 検出キットを使用した。なお、機器は専用機器を使用した。

(2) 検体作製

1) 菌株および牛肉の培養

腸管出血性大腸菌 (血清群 026: 2株、045: 1株、0103: 1株、0111: 1株、0121: 1株、0145: 1株、0157: 2株) を Trypticase soy broth (TSB) 中にて 37℃で18時間培養した。また、市販の牛スライス肉を9倍量の mTSB 中にて 42℃で18時間培養した。

2) 菌希釈検体の作製

各菌株の培養液を滅菌リン酸緩衝液 (PBS) にて 10⁻⁷ まで10倍階段希釈し、菌液を作製した。また、それら10倍階段希釈菌液を9倍量の牛肉培養液にて10倍希釈し、菌添加牛肉培養液を作製した。

3) 菌数測定

PBS で希釈した 10^{-7} および 10^{-6} 希釈菌液 0.1 mL を TSA に塗抹し、37°C で 18 時間培養し、生育したコロニー数を測定し、菌液の菌数を算出した。

(3) 菌液および菌添加牛肉培養液からのキットを用いた DNA の抽出および検出

各キットの使用手順に沿って、実施した。

食肉衛生検査所の研修教材の作成

教材については、前年の研究で検討した指名検査員等向けの教材の形式及び内容を踏まえ、対象者を検査実施要領に基づくと畜検査及び検証の経験がほとんどない新規着任者を設定し、作成した。

参考資料については、教材の補助資料の作成及び輸出先国の法令等の翻訳を行った。

食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

1. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

令和 5 年度には、国内の対米輸出認定食肉取扱施設 9 ヶ所の協力を得た。令和 6 年度には、新たに対米輸出認定食肉取扱施設 1 ヶ所の協力を得て STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査を実施し、令和 5 年度の結果と統合して計 10 施設の結果として表にまとめた。まず、各施設で使用している SOP を収集し、その内容について項目ごとに整理し

た。次に、各対米輸出認定食肉取扱施設を訪問し、食肉取扱施設内で食肉処理行程の詳細な説明を受け、STEC およびサルモネラ検査に関連する項目として検体の採材場所および手法等について聞き取り調査を実施した。続いて、整理した SOP の内容をふまえて各食肉衛生検査所で検査業務担当職員に以下の調査項目について聞き取り調査を実施した。

(1) STEC 検査

調査項目は、1 ロットの定義、検体採取法、前培養条件、遺伝子検出のための使用機器、偽陰性・偽陽性・判定不能等の判定時のトラブル、陽性対照 DNA 溶液の作成方法、病原因子確認試験の方法および免疫磁気ビーズのプロトコルとした。

(2) サルモネラ検査

調査項目は、検体採取法、前培養条件、遺伝子検出のための使用機器、判定時のトラブルおよび陽性対照株の管理方法とした。

2. STEC 免疫磁気ビーズの濃縮工程の検証

(1) 供試菌株および増菌培養

STEC 026、045、0103、0111、0121、0145、0157 を供試した。供試菌株をトリプトソイブロス培地 (TSB) に接種し、37°C で一晩培養した。

(2) 免疫磁気ビーズ法

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。STEC 026、045、0103、0111、0121 および 0157 の増菌液は、免疫磁気ビーズ 0145 と反応させ、STEC 0145 は免疫磁気ビーズ 0103 と反応させた。また、STEC O103 の増菌液(10^9 CFU/mL) は、TSB 培地で 10^2 倍希釈液 (10^7 CFU/mL) および 10^4 倍希釈液 (10^5 CFU/mL) を作成し、原液および各希釈液を免疫磁気ビーズ 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 と反応させた。免疫磁気ビーズ 1 滴に増菌液および希釈液 1 mL を添加し、ローテーターで 10 分間反応させた。マグネチックスタンドで 5 分間吸着させた後、上清を除去して滅菌生理食塩水で洗浄後、E バッファー 1 mL で懸濁した。この懸濁液を滅菌生理食塩水で 10^{-5} 倍まで希釈し、トリプトソイアガー培地(TSA)に塗抹し、 36 ± 1 °C で 18~24 時間培養した。培養後に平板上に生育したコロニー数をカウントした。

C. 研究結果

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

[1] ステロイド類(エストラジオール、テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、酢酸トレンボロン、デキサメタゾン及びメドロキシプロゲステロン)分析法

1. LC-MS/MS 条件の検討

全測定対象成分の中で最もピーク強度が小さい 17 β -エストラジオール、エチニルエス

トラジオールの測定条件を最適化するように測定条件を検討した。酸性条件下では両物質ともに十分なピーク強度が得られなかったため、以下の中性~塩基性条件の水系移動相を検討した。

- ①0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH7 程度)
- ②0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH8 程度)
- ③0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH9.5 程度)
- ④水
- ⑤水及びアンモニア水の混液(1000:1) (pH10 程度)
- ⑥0.5 mmol/L 炭酸水素アンモニウム溶液 (pH7.5 程度)

結果として、④が最も高いピーク強度を示し、次いで⑤⑥が同程度のピーク強度となった。ただし、④⑤は注入の再現性が悪く、測定中の感度変動も起こりやすかったため不採用とした。⑥は④にピーク強度は劣るが、比較的安定して測定することが可能であった。以上より、最も良好に両物質を測定できた⑥の 0.5 mmol/L 炭酸水素アンモニウム溶液を採用とした。

2. 試料前処理の検討

抽出法は酢酸トレンボロン、デキサメタゾン及びベタメタゾンの告示試験法と同様に、試料からヘキサン飽和アセトニトリルで抽出と同時にヘキサンで洗浄する方法とした。加えて、試料マトリックスの除去を目的としてミニカラムによる精製を検討した。

2.1 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラ

ム及び陰イオン交換ミニカラムを用いた精製
オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム
である InertSep C18 (1000 mg)及びトリメチル
アミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジ
アミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミ
ニカラムである InertSep SAX/PSA (500
mg/500 mg)のいずれもアセトニトリル 30 mL
で溶出が可能であった。オクタデシルシリル
化シリカゲルミニカラムの下部にトリメチルア
ミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジア
ミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニ
カラムを連結し、アセトニトリル 30 mL で溶出
するという試験設計が可能と考えられた。

2.2 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シ リカゲルミニカラムによる精製

農薬一斉分析等で広く使用されている積
層カラムであるグラファイトカーボン/エチレン
ジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層
ミニカラムについても適用可能か検討するこ
ととした。まず、エチレンジアミン-*N*-プロピル
シリル化シリカゲルミニカラムである InertSep
PSA(1000 mg)を用いた順相条件での溶出
が可能か検討した。アセトン及びヘキサンの
混液(1:19)を用いて各測定対象成分をミニ
カラムに負荷し、アセトンの比率を上げて順
次溶出した結果、極性に大きく幅があるため、
洗浄区を作ることは難しいと判断した。アセ
トン及びヘキサンの混液(1:1)でいずれの成
分も概ね溶出可能であった。

2.3 グラファイトカーボンミニカラムによる精 製

グラファイトカーボンミニカラムである
InertSep GC (300 mg)を用いた逆相条件で

の溶出が可能か検討した。メタノール及び酢
酸エチルでは一部の成分が溶出できなかつ
たが、アセトン及びヘキサンの混液(1:1)又
はアセトニトリル及びトルエンの混液(7:3)で
全成分溶出可能であった。なお、本検討で
はアセトニトリル及びトルエンの混液比率は
(7:3)を用いたが、農薬一斉分析等で広く使
用されているアセトニトリル及びトルエンの混
液(3:1)を用いることとした。

2.4 グラファイトカーボン/エチレンジアミン- *N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカ ラムによる精製

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-
N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで
ある InertSep GC/PSA(500 mg/500 mg)を用
いた溶出が可能か検討した。濃縮操作を減
らした簡便な精製法とするため、抽出液のア
セトニトリル溶液 20 mL をカラムに負荷した
後、溶出溶媒で溶出させる方法を検討した。
アセトン及びヘキサンの混液(1:1)20 mL、ア
セトニトリル及びトルエンの混液(3:1)20 mL
のいずれの混液でも全成分の溶出が可能
であったが、より溶出力の強いアセトニトリル
及びトルエンの混液(3:1)を用いることとし
た。

2.1 及び 2.4 のいずれの方法でも精製が
可能と考えられたが、2.4 は積層カラム 1 本
のみで精製が可能であり、連結カラムを使用
する 2.1 よりもより簡便な方法となったため、
この方法を採用することとした。

3. 妥当性評価試験結果

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

ピークは検出されなかった。また、真度、併行精度及び室内精度の目標値を満たした。内標準物質の回収率はいずれも 40%以上であった。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。以上の結果から、本分析法は牛の筋肉を対象とした残留分析法(定量限界 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)として妥当であることが示された。

[2] スチルベン類(ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール及びヘキサステロール)分析法

1. LC-MS/MS条件の検討

告示試験法においては水系移動相に 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液を用いているが、より S/N が良好であった水及び酢酸の混液(10000:1)を選択した。分離カラムについては数種類のオクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)充填カラムを比較・検討したが、ジエチルスチルベストロールとマトリクス由来の妨害ピークとの分離が不十分であったため、アダマンチル基を有し、ODS カラムとは異なる分離を示す CAPCELL CORE ADME(内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 2.7 μm)を選択した。

2. 試料前処理の検討

2.1 エタノール存在下でのグルクロン酸抱合体の加水分解条件の検討

告示試験法開発の報告書において、濃縮操作条件によってはジエチルスチルベストロールの回収率の低下が確認されている。告示試験法では抽出液[エタノール及び水の混液(9:1)]を 10 mL 分取し、約 5 mL まで

減圧濃縮した後、加水分解操作を行っているが、濃縮によるジエチルスチルベストロールの回収率の低下に注意する必要がある。そこで抽出液[エタノール及び水の混液(9:1)]を 5 mL 分取し濃縮せずに加水分解操作を行うために、エタノール共存下における酵素加水分解について検討した。その結果、ジエチルスチルベストロールとしての回収率は、エタノール及び水の混液(9:1)を 5 mL 分取した場合(エタノール 4.5 mL 共存): 94.5%、エタノール及び水の混液(9:1) 10 mL を約 5 mL まで減圧濃縮した場合(エタノール約 4 mL 共存): 93.4%であり、4.5 mL 程度のエタノールが共存した場合であっても、加水分解反応の効率には大きな影響はないことが確認された。

2.2 親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製

告示試験法において加水分解反応液を有機溶媒に転溶させ、減圧濃縮した後、弱塩基性陰イオン交換体ミニカラムを用いた精製を行っているが、減圧濃縮操作を避けるため、加水分解反応液をそのまま固相カラムに注入し精製を行う試験設計を検討した。

親水性ポリマーベース固相カラムであるジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis HLB(150 mg/6 mL)]及び親水性基修飾 SDB ミニカラム[EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)](あらかじめヘキサソール、水及びメタノールの混液(11:9)5 mL 及び水 5 mL で洗浄したもの)にジエネストロール、ジエチルスチルベストロール及びヘキセ

ステロールを各 0.0125 µg、ジエネストロール-d₆、[²H₈]-ジエチルスチルベストロール及びヘキセステロール-d₄を各 0.0125 µg 供した。水及びメタノールの混液(11:9)及びヘキサンにて洗浄を行った後、各カラムの下部にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak Plus NH2(360 mg)](あらかじめ酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)5 mL で洗浄したもの)を連結し、酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)で溶出した。その結果、いずれの固相カラムも洗浄液[水及びメタノールの混液(11:9)5 mL またはヘキサン 5 mL]では溶出せず、酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)15 mL までにほぼ 90%以上が溶出された。

次に、牛の筋肉にジエネストロール、ジエチルスチルベストロール、ヘキセステロール、ジエネストロール-d₆、[²H₈]-ジエチルスチルベストロール及びヘキセステロール-d₄を添加して、抽出、加水分解反応後に同様にカラム精製を行った。その結果、試料マトリックス存在下では親水性基修飾 SDB ミニカラム [EVOLUTE ABN (150 mg/6 mL)]を用いた場合の方がより良好な内標準物質回収率が得られた。

以上の結果より、親水性基修飾 SDB ミニカラム [EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)]とアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak Plus NH2(360 mg)]の連結カラムによる精製方法を選択した。

3. 妥当性評価試験結果

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

ピークは検出されなかった。また、真度、併行精度及び室内精度の目標値を満たした。内標準物質の回収率はいずれも 40%以上であった。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。以上の結果から、本分析法は牛の筋肉を対象とした残留分析法(定量限界 0.5 µg/kg)として妥当であることが示された。

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

(1) 生菌数

調査した検体 99 頭のうち 55 頭の検体から生菌数が測定され、その平均は 1,704.6 \pm 10,772.1 (平均 \pm SD) CFU/cm²であった。

雌雄で比較すると、オスの 57 頭は 61.7 \pm 117.3 CFU/cm²であるのに対して、メスの 27 頭では 3,408.4 \pm 15,331.9 CFU/cm²であった。

ウシの種類別で比較すると、ホルスタインの平均値が 4,669 \pm 17,755.4 CFU/cm²で最も多く、次いで交雑種、黒毛和種、日本短角種の 12.9 \pm 35.9 CFU/cm²、12.3 \pm 21.6 CFU/cm²、3.2 \pm 3.2 CFU/cm²であった。ホルスタインは、生菌数 100 CFU/cm²を超えるウシが 16 頭、1,000 CFU/cm²を超えるウシが 4 頭、約 80,000 CFU/cm²のウシが 1 頭含まれていた。

施設別の生菌数の結果を表 1 - 7 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 C 施設であった。平均生菌数は $4,455.6 \pm 17,333.5$ CFU/cm² であり、100 CFU/cm² を超えるウシが 13 頭、1,000 CFU/cm² を超えるウシが 3 頭であった。

月別で算出した生菌数では 10 月が最も高く $8,859.0 \pm 26,544.3$ 、次いで 11 月が $1,240.4 \pm 3,388.2$ であった。両月の平均生菌数が高いのは、C 施設のホルスタインで、10 月採取のウシ 1 頭が約 80,000 CFU/cm²、11 月採取のウシ 1 頭が約 10,000 CFU/cm² であったことによる。

(2) STEC7 血清群の分離

定性的な検出を行い、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 で試験した。供試検体 108 検体のうち、11 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 4 検体であった。この 4 検体のうち 1 検体が STEC 7 血清群の O45 で陽性となり、Ct 値は 29.7 であった (検体番号 24-105)。

検体番号 24-105 から分離された菌株は、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子を保有せず、O45 血清群のみを保有していた。この検体は、生菌数が 33.2 CFU/cm² で、ホルスタイン種の 19 ヶ月齢から採取された。

(3) サルモネラ属菌の検出

定性的な検出を行い、増菌培養液が *ttr* 遺伝子陽性となった検体は 1 検体 (検体番号 24-27) で、CT 値は 35.6 であった。

ttr 遺伝子陽性となった検体番号 24-27 の培養液から分離した菌株は、TSI 寒天培地で斜面赤色、高層黄色、硫化水素産生、LIM 培地でリジン陽性、インドール陰性、運動性陽性の典型的なサルモネラ属菌の性状を示した。血清型は、*Salmonella* Dublin であった。

検体番号 24-27 の検体は、10 月に黒毛和種のオス、30 ヶ月齢から採取された。

(4) サルモネラの定量

定性試験で *Salmonella* Dublin が分離された検体番号 24-27 の検体については、定量的な試験を行った。検体の生菌数は 3.3 CFU/cm²、サルモネラ MPN は 3 未満/試験液 100mL であり、ガーゼ表面積 100 cm² あたり 0.33 MPN 未満であった。

2. MLG 掲載または第 3 者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行

実施結果については、別途とりまとめた。

食肉衛生検査所の研修教材の作成

1. 動画教材の作成

1.1 と畜検査の方法の教材

指名検査員が実施する生体検査及びと殺後検査を撮影し、検査実施要領の項目及び内容を字幕や説明画像を付した動画教材を作成した。必要に応じて、米国 USDA FSIS の公衆衛生獣医師及び検査官向け研修資料 (以下、「FSIS 研修資料」という。) から引用した説明を加えた。

1.2 HACCP の基礎知識

すでに HACCP の導入研修及び指導者養成研修で使用されている教材をもとに、講義動画の映写用資料を作成した。本教材では、個々のハザードの詳細については受講生のニーズに合わせるため記載されていないことから、本教材では牛のと畜・解体工程におけるハザードを設定した。また、必要に応じて、FSIS 研修資料から引用した説明を加えた。

1.3 米国等向け輸出食肉に係る指名検査員による検証の教材

検査実施要領に基づき指名検査員が実施する検証のうち、とさつ・解体処理に係る検証（とさつから枝肉保管庫まで）の作業前点検及び作業中点検と、人道的な獣畜の取り扱い及びとさつに係る検証の観察による点検を撮影し、検査実施要領の点検方法、および「アメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱（以下、「対米要綱」という。）の要求事項を字幕として付した。必要に応じて、FSIS 研修資料から引用した説明を加えた。

1.4 微生物検査の教材

対米要綱に基づき食肉衛生検査所が実施する腸管出血性大腸菌の検査について、検査の手技及び検査結果の例を撮影し、検査法の内容及び留意点の字幕や説明画像を付した動画教材を作成した。

食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

1. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

(1) STEC 検査

1 ロットの定義は、同一カット日が 1 施設、同一と畜日が 1 施設、同一農場・同一と畜日が 5 施設、同一農場・同一と畜日・同一カット日が 3 施設であった。検体採取法は、全施設が N60 サンプルング法であり、検体は複数の個体または枝肉の混合であった。前培養条件は、通知法に準拠が 3 施設、米国農務省が発行している Microbiology Laboratory Guidebook (MLG) に準拠が 1 施設、AOAC に準拠が 6 施設だった。遺伝子検出のための使用機器は、クオリバックス Q7 システムが 7 施設、RapidFinder が 3 施設だった。判定時のトラブルは、7 施設で認められ、陽性対照 DNA 溶液の偽陰性等が挙げられた。陽性対照 DNA 溶液の作成方法は、通知法に準拠が 9 施設、通知法を一部改正して実施が 1 施設だった。病原因子確認試験の方法は、概ね通知法に準拠が 9 施設、クオリバックスの説明書に準拠が 1 施設だった。免疫磁気ビーズのプロトコルは、全施設で「生研」デンカを使用しており、キットのプロトコルに準拠が 8 施設、一部改変が 2 施設だった。

(2) サルモネラ検査

検体採取法および前培養条件は、全施設が MLG および農林水産省が公開しているアメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱に準拠していた。遺伝子検出のための使用機器は、クオリバックス Q7 システムが 8 施設、3M Molecular Detection

System が 2 施設だった。判定時のトラブルは、クオリボックス Q7 システムを使用している 5 施設で認められた。陽性対照株は様々な血清型が供試されており、培地への植菌量は、施設によって様々であった。

2. STEC 免疫磁気ビーズの濃縮工程の検証

STEC O26、O111 および O157 の各菌液において免疫磁気ビーズ O145 で濃縮後の菌数は、各血清型特異的免疫磁気ビーズで濃縮した場合と比較して 1.9~2.5 log₁₀ 低下した。また、STEC O145 菌液を免疫磁気ビーズ O157 で濃縮した場合は、O145 特異的免疫磁気ビーズで濃縮した場合に比べて菌数が 1.7 log₁₀ 低下した。一方で、STEC O45、O103 および O121 の各菌液については、免疫磁気ビーズ O145 と各血清型特異的免疫磁気ビーズとの菌数差は 1.0 log₁₀ 以下であった。

また、STEC O103 の菌液を 3 種類の菌濃度 (10⁵ CFU/mL、10⁷ CFU/mL および 10⁹ CFU/mL) で各種血清型特異的免疫磁気ビーズを用いて濃縮したところ、どの菌濃度においても免疫磁気ビーズ O103 で濃縮後の菌数が他の血清型免疫磁気ビーズでの濃縮後の菌数よりも高かった。免疫磁気ビーズ O103 濃縮後と他の血清型免疫磁気ビーズ濃縮後との菌数差は、10⁹ CFU/mL の菌液よりも 10⁵ CFU/mL および 10⁷ CFU/mL の菌液でより大きくなる傾向が認められた。O103 以外の血清型免疫磁気ビーズ間で濃縮後の菌数に大きな差は

認められなかった。

D. 考察

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

牛筋肉中のステロイド類分析法、スチルベン類分析法を開発し、いずれも牛の筋肉を対象とした残留分析法 (定量限界 0.5 µg/kg) として妥当であることが示された。

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

本調査では牛枝肉からガーゼを用いた 99 検体および培養液残液 9 検体からは STEC は分離されなかった。リアルタイム PCR で *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、O45 血清群いずれも陽性となった培養液が 1 検体あったが、分離できた菌株は O45 血清群のみ陽性で、STEC ではなかった。より効果的な分離方法の検討が必要である。

一方、108 検体中 1 検体から *Salmonella* Dublin が分離された。2023 年度に行った同様の調査では、サルモネラ属菌は検出されていない。また、2020 年度から 2022 年度の調査ではサルモネラ属菌は検出対象でなかったため、今回の調査で検出されたことは今後の牛肉の衛生管理において重要な対象となることが考えられる。ただし、今回のサルモネラ定量試験において、MPN 法により、検出限界以下であったことから、汚染濃度は低いことが推察される。

測定された生菌数は施設の影響が大き

いと考えられた。生菌数の多かった施設は、調査した 21 検体中すべてから生菌数が検出され、また牛の種類は殆どがホルスタインであった。令和 2 年度から 4 年度の調査において、ホルスタインの平均生菌数は、各々 2.9 CFU/cm²、130.3 CFU/cm²、1,948.7 CFU/cm²であったのに比べると、今年度 4,669.1 CFU/cm²と高かった。

この理由として、特に施設 C の生菌数が高かったことが影響したと考えられた。

2. MLG 掲載または第 3 者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行

本キットシリーズは、STEC7 血清群が効率的に検出できるコンセプトになっていることが確認された。今後、より詳細な使用手順が整備されることによって、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられる。

食肉衛生検査所の研修教材の作成

今年度は、アメリカ合衆国・EU 等向け輸出向け食肉取扱施設を管轄する食肉衛生検査所の指名検査員の検査業務を適切に実施するための教材として、検査実施要領のと畜検査及び検証について、基礎的な講義資料、動画を利用した教材、及び参考資料を作成した。

1. HACCP の基礎的な講義資料

「HACCP システムについて相当程度の知識」の習得で必要とされる講習会で行われる講義資料を参考にしたうえで、理解の助けのための解説や、特に輸出向け

食肉取扱施設の検証を行うために必要と考えられる解説を FSIS の研修資料等から加えた。これを音声教材とすることで、新規着任者が一人で学習することが可能になると考える。しかし、「HACCP システムについて相当程度の知識」の習得には、講義だけでなく演習と組み合わせる必要があるため、次年度はグループで行う演習のための教材を作成する必要がある。また、講義内容の理解度を確保するためのテストがあることが望ましいと考える。

2. 動画を利用した教材

動画教材で、検査実施要領に基づくと畜検査及び検証の方法、視点を繰り返し確認することで、現場で行う OJT の前に知識のインプットができるようになる。また、OJT の後に動画教材を視聴しながら、OJT の際の疑問点の確認を講師担当の職員と行うことにも利用することで、より新規着任者の知識が深まり技術の習得のスピードを上げることが期待できると考える。

次年度は、検査実施要領に基づき指名検査員が実施する検証のうち、枝肉の冷蔵保管以降の工程である食肉処理に係る検証の作業前点検及び作業中点検、製品再検査等について、動画教材を作成する必要がある。

3. 参考資料

FSIS の研修動画、アメリカ合衆国の食肉の衛生管理に係る法令及び通知等に邦訳を付けたことにより、基礎的な講義及び動画教材の補足となり、食肉衛生検査

所の多忙な業務のなかで利用しやすい参考資料になると考える。

次年度も未翻訳の輸出先国の食肉の衛生管理に係る法令及び通知等に邦訳を付ける必要がある。

4. その他

今年度作成した教材及び次年度作成する教材を用いて、食肉衛生検査所の新規着任者を対象に研修を実施し、検査実施要領の業務遂行に必要な知識及び技術の変化を明らかにする必要がある。

食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査では、令和5年度から追加で1施設の結果が加わった。令和5年度と同様に複数の項目において施設ごとに異なる点が認められたが、内容は各食肉取扱施設の処理工程および処理頭数等の状況に合わせて適切に設定されており、問題は無いと考えられた。一方で、各施設において記載内容および基準設定に迷う箇所があるとの相談を受けることは多く、特に新規登録施設では、既存の登録施設と SOP を共有する機会を設けることが可能であれば、正確な検査法の逸脱防止および検査員の負担軽減に繋がると考えられた。また、クオリボックス Q7 システムおよび RapidFinder での STEC 判定時のトラブルは、10 施設中 7 施設で認められており、今後、判定時のトラブルが発生した状況および供試した試薬の保管方法等の詳細な情報を追加で聞き取る必要が

あると考えられた。STEC 免疫磁気ビーズの濃縮工程の検証では、STEC O45、O103 および O121 の菌液を免疫磁気ビーズ O145 で濃縮後の菌数とその他の血清型の免疫磁気ビーズで濃縮後の菌数との差が $1.0 \log_{10}$ 以下であったことから、STEC 菌液の血清型と免疫磁気ビーズの組み合わせによっては、非特異的濃縮が生じることが示唆された。3つの菌濃度の STEC O103 菌液を用いた試験では、 10^9 CFU/mL よりも 10^5 CFU/mL および 10^7 CFU/mL での免疫磁気ビーズ濃縮で血清型特異的濃縮と非特異的濃縮の差が大きかったことから、濃縮前の菌数が多いほど非特異的濃縮が顕著に生じることが推察された。そのため、精度管理試験等で特定の血清型の STEC のみに汚染され、その他の大腸菌等の汚染が少ない牛肉検体を用いた場合、培養液中の当該 STEC の菌数が 10^9 CFU/mL に近くなり、免疫磁気ビーズでの濃縮で非特異的濃縮が生じやすくなると考えられた。

C. 結論

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

牛の筋肉中のステロイド類分析法として、試料からヘキサン飽和アセトニトリル抽出及びヘキサン洗浄を行った後、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で測定する方法を確立した。また、スチルベン類分析法として、試料からエタノ

ール及び水の混液(9:1)で抽出し、 β -グルクロニダーゼで加水分解を行った後、親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MS で測定する方法を確立した。妥当性評価試験を実施した結果、真度、併行精度、室内精度及び選択性の目標値を満たした。これらの結果から、いずれの分析法も牛の筋肉中の残留分析法(定量限界 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)として妥当であることが示された。

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減のための研究を実施した。1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査では、2024 年9月から4施設の協力のもとに牛枝肉合計 108 検体から7血清群(O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157)の STEC およびサルモネラ属菌を対象とした調査を行った。また、このうち3施設については衛生指標として生菌数についても測定を行なった。供試検体を増菌培養後、または施設にて増菌培養した培養液の二次増菌培養後、STEC7 血清群マルチプレックスリアルタイム PCR およびサルモネラ特異的リアルタイム PCR に供試した。スクリーニングを行い、陽性になった検体については菌分離を行った。分離された株については生化学的性状試験および血清型別を行った。この結果、1 検体(0.9%)からサルモネラ属菌が分離されたが、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。なお、STEC7 血清群は検出されなかった。また、2. MLG 掲載または第3者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行では、菌液および菌添加牛肉培養液からのキットを用いた DNA の抽出および検出を実施した。今後、より詳細な使用手順が整備されることによって、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられた。

食肉衛生検査所の研修教材の作成

アメリカ合衆国・EU 等向け輸出向け食肉取扱施設を管轄する食肉衛生検査所の指名検査員の研修に必要な教材を作成した。新規着任者が一人でも学習できる動画に使用する教材として、指名検査員による検証を理解するための基礎知識として、と畜場及び食肉処理場の HACCP に基づく衛生管理を踏まえた講義資料を作成した。また、指名検査員が実施すると畜検査及び検証に解説を加える動画教材を作成した。さらに、これらの学習で基礎的な知識習得後に参考となる、国際連合食糧農業機関 (FAO) のガイダンス文書及びアメリカ合衆国の食品衛生管理に係る法令等を翻訳した。

次年度に取り組むべき内容として、以下の内容が挙げられた。1) HACCP の基礎的な講義資料と対応する演習教材及び理解度テストを作成する。2) 食肉処理に係る検証の動画教材を作成する。3) 輸出先国の食肉の衛生管理に係る法令及び通知等に邦訳を付ける。4) 教材を用

いた研修を実施し、受講前後の検査実施要領の業務遂行に必要な知識及び技術の変化を明らかにする。

食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

日本の対米輸出認定食肉取扱施設の STEC 検査およびサルモネラ検査において、各施設の SOP は異なる記載はあるものの、問題点は認められなかった。免疫磁気ビーズ濃縮では、特定の血清型の STEC と免疫磁気ビーズの組み合わせで非特異的濃縮が起こりやすいことが示唆された。今後検証を進め、改善策を提示する必要があると考えられた。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 畑寛子, 池側智香子, 飯塚誠一郎, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穠山浩, 志田(齊藤)静夏. 牛尿中の 2-チオウラシル, 4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法の確立および妥当性評価: 欧州連合への牛肉輸出時のモニタリング検査のための分析法. 食品衛生学雑誌 65, 178-184 (2024)
- 2) 高木千陽, 中村歩, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穠山浩, 志田(齊藤)静夏. 欧州連合への日本産牛肉輸出時のモニタリング検査のための牛尿中レゾルシル酸ラクトン類分析法の確立および性能評価. 食品衛生学雑誌 66, 32-38 (2025).

- 3) Hirose, S., Tomaru, A., Akiyama, H., Hara-Kudo, Y. Effective decontamination methods for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on beef carcass surfaces for application in beef carcass hygiene. J. Food Prot. 87(11), 100366 (2024) doi: 10.1016/j.jfp.2024.100366.
- 4) Akiyama, H., Iwasaki, Y., Ito, R., Basic Principles for Setting MRLs for Pesticides in Food Commodities in Japan. Food Safety, 12, 34-51 (2024)

2. 学会発表

- 1) 畑寛子, 池側智香子, 飯塚誠一郎, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穠山浩, 志田(齊藤)静夏. 牛尿中の 2-チオウラシル, 4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法の確立. 日本食品衛生学会第 120 回学術講演会 (2024.11.7)
- 2) 高木千陽, 中村歩, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穠山浩, 志田(齊藤)静夏. イムノアフィニティーカラムを用いた牛尿中におけるレゾルシル酸ラクトン類の同時分析法開発. 日本食品衛生学会第 120 回学術講演会 (2024.11.6)
- 3) 畑寛子, 池側智香子, 飯塚誠一郎, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穠山浩, 志田(齊藤)静夏. 牛尿中の 2-チオウラシル, 4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法の確立. 第 7 回日本食品衛生学会近畿ブロック勉強会 (2025.2.14)
- 4) Ikeuchi, S. Hirose, S., Chiba, Y., Akiyama, H., Hayashidani, H., and Hara-Kudo, Y. Shiga

toxin-producing *Escherichia coli*
contamination on the surfaces of beef
carcasses in slaughterhouses in Japan. IAFP
Annual Meeting 2024. 2024 年 7 月 15 日
米国.

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 第三室長

研究要旨

牛肉をEUへ輸出する際には動物用医薬品等のモニタリング検査を実施する必要がある。ステロイド類やスチルベン類等の禁止・未承認物質(A物質)は牛尿等の検査が必要である。また、輸出先であるEUで行われる検査で牛肉からA物質が検出された場合には、我が国でも牛肉の検査を実施し、原因調査が必要となる。本研究ではEU向けに動物性食品を輸出する際に求められるモニタリング検査やEUでの輸入時検査においてA物質が検出された場合に、その原因を調査するための分析法として、牛肉中のステロイド類分析法及びスチルベン類分析法を開発した。ステロイド類(17β-エストラジオール、17β-テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、α-トレンボロン、β-トレンボロン、デキサメタゾン及び酢酸メドロキシプロゲステロン)分析法として、試料からヘキサン飽和アセトニトリル抽出及びヘキサン洗浄を行った後、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を確立した。牛肉を用いて妥当性評価試験(添加濃度 0.5 µg/kg)を実施した結果、真度、併行精度、室内精度及び選択性の目標値を満たした。また、スチルベン類(ジエネストール、ジエチルスチルベストール及びヘキサステロール)分析法として、試料からエタノール及び水の混液(9:1)で抽出し、β-グルクロニダーゼで加水分解を行った後、親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を確立した。牛肉を用いて妥当性評価試験(添加濃度 0.5 µg/kg)を実施した結果、真度、併行精度、室内精度及び選択性の目標値を満たした。これらの結果から、ステロイド類分析法、スチルベン類分析法のいずれも、牛肉中の残留分析法(定量限界 0.5 µg/kg)として妥当であることが示された。

研究協力機関

(一財)日本食品分析センター

研究協力者

田口貴章(国立医薬品食品衛生研究所)

A. 研究目的

近年、日本における少子高齢化による人口減少に伴い、国内の食料市場規模は縮小傾向にある。一方、世界的には人口増加や経済成長により食料需要の大幅な増加が予測されている。この状況に対応するため、日本の農林水産業においては、

農林水産物および食品の国際競争力を強化し、海外市場の獲得を図ることが喫緊の課題となっている。特に、輸出拡大に際しては、輸出先国の食品安全規制への適合が重要な要件となる。こうした背景を踏まえ、政府は2020年4月に「農林水産物及び食品の輸出の促進に関する法律」(令和元年法律第57号)を施行し、農林水産省を中心に「農林水産物・食品の輸出拡大実行戦略」の下、輸出拡大の取り組みを推進している。

牛肉は海外市場での需要が増加しており、同戦略において輸出重点品目の一つに指定されてい

る。現在、日本産牛肉の主要輸出先は香港や台湾を含むアジア諸国であるが、食肉市場規模の大きい欧州連合 (EU) はさらなる輸出拡大が期待される地域である。牛肉等の動物性食品を EU へ輸出するには、欧州議会および理事会規則 (EU) 2017/625、欧州委員会委任規則 (EU) 2022/1644、および欧州委員会施行規則 (EU) 2022/1646 に準拠した残留物質モニタリング計画に基づき、動物用医薬品等のモニタリング検査を実施する必要がある。検査対象となる薬理活性物質は、禁止・未承認物質である A 物質 (スチルベン類、抗甲状腺薬、ステロイド類、レゾルシル酸ラクトン類、 β -作動薬等) と、使用が認可された B 物質 (抗菌性物質、駆虫剤、鎮静剤、非ステロイド性抗炎症薬、抗コクシジウム剤等) に分類される。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の追加検査を行い、基準値超過が確認されると原因調査が求められる。一方、A 物質がモニタリング部位 (尿、肝臓、腎臓等) から検出された場合は、原因究明と必要な措置の完了まで輸出が禁止される。また、輸出先である EU での検査で牛肉から A 物質が検出された場合には我が国においても検査を実施し、原因の調査が必要となる。

本研究では、モニタリング検査または EU における輸入時検査において A 物質が検出された場合の分析法を開発し、迅速な輸出再開を可能とする体制の整備を目的とする。本年度は、EU での輸入時検査で牛肉から A 物質が検出された場合の原因調査のための分析法として、牛筋肉中のステロイド類 (8 化合物) 分析法およびスチルベン類 (3 化合物) 分析法を開発し、妥当性評価試験を実施した。

B. 研究方法

[1] ステロイド類 (エストラジオール、テストステロン、

エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、酢酸トレンボロン、デキサメタゾン及びメドロキシプロゲステロン) 分析法

1. 試料

牛の筋肉は、インターネット経由で群馬県産を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクーブブリスサーを用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

17 β -エストラジオール標準品：純度99.3%(関東化学製)

17 β -テストステロン標準品：純度99.6%(Sigma-Aldrich製)

エチニルエストラジオール標準品：純度99.7%(Sigma-Aldrich製)

酢酸メレンゲステロール標準品：純度98.1%(富士フィルム和光純薬製)

メチルテストステロン標準品：純度99.7%(富士フィルム和光純薬製)

α -トレンボロン標準品：純度99.7%(富士フィルム和光純薬製)

β -トレンボロン標準品：純度96.9%(林純薬工業製)

デキサメタゾン標準品：純度99.7%(富士フィルム和光純薬製)

酢酸メドロキシプロゲステロン標準品：純度98.9%(Sigma-Aldrich製)

17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 ：純度99%(CDN Isotopes製)

17 β -テストステロン-16,16,17- d_3 ：純度99%(CDN Isotopes製)

エチニルエストラジオール-2,4,16,16- d_4 ：純度97%(Toronto Research Chemicals製)

酢酸メレンゲステロール- d_3 ：純度99.50%(Toronto Research Chemicals製)

メチルテストステロン- d_3 : 純度98.4%(CDN Isotopes製)

[$^2\text{H}_5$]- α -トレンボロン: 純度95.5%(ALSACHIM製)

[$^2\text{H}_5$]- β -トレンボロン: 純度98.8%(ALSACHIM製)

デキサメタゾン-4,6 α ,21,21- d_4 : 純度98.2%(CDN Isotopes製)

酢酸メドロキシプロゲステロン- d_6 : 純度97%(Toronto Research Chemicals製)

メタノール: LC-MS用(富士フイルム和光純薬製)
アセトニトリル、エタノール(95%)、ヘキサン、メタノール、炭酸水素アンモニウム: 特級(富士フイルム和光純薬製)

無水硫酸ナトリウム: 特級(キシダ化学製)

トルエン: 特級(関東化学製)

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム: InertSep GC/PSA(500 mg/500 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製)

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)

ヘキサン飽和アセトニトリル: アセトニトリル400 mL及びヘキサン100 mLを混合し、5分間振とうを行った。放置後、分離したアセトニトリル層を分取した。
アセトニトリル及び水の混液(1:1): アセトニトリル500 mL及び水500 mLを混合した。

水及びメタノールの混液(1:1): 水500 mL及びメタノール500 mLを混合した。

アセトニトリル及びトルエンの混液(3:1): アセトニトリル45 mL及びトルエン15 mLを混合した。

1 mol/L炭酸水素アンモニウム溶液: 炭酸水素アンモニウム7.91 gを量り、水を加えて溶かし正確に100 mLとした。

0.5 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液: 1 mol/L炭酸水素アンモニウム500 μL 及び水1000 mLを混合した。

標準原液: 17 β -エストラジオール標準品約10 mgを精秤し、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。17 β -テストステロン標準品約10 mgを精秤し、アセトニトリル及び水の混液(1:1)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。エチニルエストラジオール標準品約10 mgを精秤し、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。酢酸メレンゲステロール標準品約10 mgを精秤し、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。メチルテストステロン標準品約10 mgを精秤し、エタノール(95%)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。 α -トレンボロン標準品約10 mgを精秤し、アセトニトリル及び水の混液(1:1)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。 β -トレンボロン標準品約10 mgを精秤し、アセトニトリル及び水の混液(1:1)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。デキサメタゾン標準品約10 mgを精秤し、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。酢酸メドロキシプロゲステロン標準品約10 mgを精秤し、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。

内標準原液: 17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 約10 mgを精秤し、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。10 mg容量の17 β -テストステロン-16,16,17- d_3 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。1 mg容量のエチニルエストラジオール-2,4,16,16- d_4 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して50 mg/L溶液を調製した。5 mg容量の酢酸メレンゲステロール- d_3 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。10 mg容量のメチルテストステロン- d_3 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。1 mg容量の[$^2\text{H}_5$]- α -トレンボロンをアセトニトリルで洗いこみ、アセトニトリルで溶解して50 mg/L溶液を調製した。1

mg容量の $^{2}\text{H}_5$ - β -トレンボロンをアセトニトリルで洗いこみ、アセトニトリルで溶解して50 mg/L溶液を調製した。10 mg容量のデキサメタゾン-4,6 α ,21,21- d_4 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して100 mg/L溶液を調製した。1 mg容量の酢酸メドロキシprogesteron- d_6 をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して50 mg/L溶液を調製した。

添加用標準溶液： 17 β -エストラジオール標準原液、17 β -テストステロン標準原液、エチニルエストラジオール標準原液、酢酸メレンゲステロール標準原液、メチルテストステロン標準原液、 α -トレンボロン標準原液、 β -トレンボロン標準原液、デキサメタゾン標準原液及び酢酸メドロキシprogesteron標準原液をメタノール(特級)で希釈して0.1 mg/L混合溶液を調製した。

添加用内標準溶液： 17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 内標準原液、17 β -テストステロン-16,16,17- d_3 内標準原液、エチニルエストラジオール-2,4,16,16- d_4 内標準原液、酢酸メレンゲステロール- d_3 内標準原液、メチルテストステロン- d_3 内標準原液、 $^{2}\text{H}_5$ - α -トレンボロン内標準原液、 $^{2}\text{H}_5$ - β -トレンボロン内標準原液、デキサメタゾン-4,6 α ,21,21- d_4 内標準原液及び酢酸メドロキシprogesteron- d_6 内標準原液をメタノール(特級)で希釈して1 mg/L混合溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー： NS-52(マイクロテック・ニチオン製)

ロータリーエバポレーター： N-1000V(東京理化学器械製)

遠心分離機： H-60R(コクサン製)

LC-MS/MS

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

4. 測定条件

Table 1に示した。

5. 定量

17 β -エストラジオール標準原液、17 β -テストステロン標準原液、エチニルエストラジオール標準原液、酢酸メレンゲステロール標準原液、メチルテストステロン標準原液、 α -トレンボロン標準原液、 β -トレンボロン標準原液、デキサメタゾン標準原液及び酢酸メドロキシprogesteron標準原液をメタノール(特級)で希釈して0.1 mg/L溶液を調製した。17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 内標準原液、17 β -テストステロン-16,16,17- d_3 内標準原液、エチニルエストラジオール-2,4,16,16- d_4 内標準原液、酢酸メレンゲステロール- d_3 内標準原液、メチルテストステロン- d_3 内標準原液、 $^{2}\text{H}_5$ - α -トレンボロン内標準原液、 $^{2}\text{H}_5$ - β -トレンボロン内標準原液、デキサメタゾン-4,6 α ,21,21- d_4 内標準原液及び酢酸メドロキシprogesteron- d_6 内標準原液をメタノール(特級)で希釈して1 mg/L溶液を調製した。さらに、水及びメタノールの混液(1:1)で希釈し、0.1 mg/L溶液を調製した。これら溶液を水及びメタノールの混液(1:1)で希釈し、0.0005、0.001、0.002、0.0035及び0.005 mg/L(内標準溶液濃度0.01 mg/L)内標準混合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17 β -エストラジオール-2,4,16,16- d_4 のピーク面積に対する17 β -エストラジオール、17 β -テストステロン-16,16,17- d_3 のピーク面積に対する17 β -テストステロン、エチニルエストラジオール-2,4,16,16- d_4 のピーク面積に対するエチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール- d_3 のピーク面積に対する酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン- d_3 のピーク面積に対するメチルテストステロ

ン、 $[^2\text{H}_5]$ - α -トレンボロンのピーク面積に対する α -トレンボロン、 $[^2\text{H}_5]$ - β -トレンボロンのピーク面積に対する β -トレンボロン、デキサメタゾン-4,6 α ,21,21- d_4 のピーク面積に対するデキサメタゾン及び酢酸メドロキシプロゲステロン- d_6 のピーク面積に対する酢酸メドロキシプロゲステロンのピーク面積の比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、検量線から内部標準法により17 β -エストラジオール、17 β -テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、 α -トレンボロン、 β -トレンボロン、デキサメタゾン及び酢酸メドロキシプロゲステロンの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

試料10 gに添加用標準溶液(0.1 mg/L)50 μL [メタノール(特級)]を添加し、30分間放置した。その後、添加用内標準溶液(1 mg/L)50 μL [メタノール(特級)]を添加した。

7. 試験溶液の調製

概要

17 β -エストラジオール、17 β -テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、 α -トレンボロン、 β -トレンボロン、デキサメタゾン及び酢酸メドロキシプロゲステロンを試料からヘキサン飽和アセトニトリルで抽出し、同時にヘキサンで洗浄を行った。その後、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-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。

分析法フローチャートを Fig 1 に示した。

7.1 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL 及びヘキサン 50 mL を加え、ホモジナイザーで攪拌した後、さらに無水硫酸ナトリウム 20 g を加えホモジナイザーで攪

拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離し、上層を捨てた後、下層を綿栓ろ過した。次いで残留物にアセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに合わせ、アセトニトリルで定容した。

7.2 精製

抽出液 20 mL (試料 2 g 相当)をグラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム [InertSep GC/PSA(500 mg/500 mg/6 mL)](あらかじめアセトニトリル 5 mL で洗浄したものに)負荷し、溶出液を 50 mL 遠心管に受けた。次いで、アセトニトリル及びトルエンの混液(3:1)10 mL で溶出し、先の遠心管に合わせた。全溶出液を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。残留物を水及びメタノールの混液(1:1)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。

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液 0.5 mL を遠心管に分取し、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。0.001 mg/L の 17 β -エストラジオール、17 β -テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、 α -トレンボロン、 β -トレンボロン、デキサメタゾン及び酢酸メドロキシプロゲステロン混合標準溶液 0.5 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

9. 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界濃度(0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回(2併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

[2] スチルベン類(ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール及びヘキサステロール)分析法

1. 試料

牛の筋肉は、大阪府内の店舗で徳島県産を購入した。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。

2. 試薬・試液

ジエネストロール標準品：純度96.11%(LGC製)

ジエチルスチルベストロール標準品：純度99.9%(富士フイルム和光純薬製)

ヘキサステロール標準品：純度99.50%(LGC製)

ジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体：純度95.2%(Toronto Research Chemicals製)

ジエネストロール- d_6 ：(WITEGA製)

[$^2\text{H}_8$]-ジエチルスチルベストロール：(ALSACHIM製)

ヘキサステロール- d_4 ：(Toronto Research Chemicals製)

メタノール、エタノール(99.5%)、酢酸エチル、ヘキササン、酢酸、酢酸ナトリウム三水和物：特級(富士フイルム和光純薬製)

アセトニトリル：LC-MS用(関東化学製)

β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼ溶液：EC 3.2.1.31/EC 3.1.6.1(*Helix pomatia*由来、Roche製)

β -グルクロニダーゼ100000ユニット/mL及びアシルスルファターゼ800000ユニット/mLを含む(ただし、 β -グルクロニダーゼにあつては38°C、pH4.5~5.0で1時間にフェノールフタレイン- β -D-グルクロニドからフェノールフタレインを1 μg 遊離させる酵素量を1ユニットとする。アシルスルファターゼにあつては38°C、pH6.2で1時間に2-ヒドロキシ-5-ニトロフェニル硫酸から2-ヒドロキシ-5-ニトロフェノールを1 μg 遊離させる酵素量を1ユニットとする)。

親水性基修飾SDBミニカラム：EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL、Biotage製)

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：Sep-Pak Plus NH2(360 mg、Waters製)

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

0.1 mol/L酢酸ナトリウム溶液(pH 5.0)：第1液：酢酸ナトリウム三水和物0.82 gを量り、水を加えて溶かし正確に100 mLとした。第2液：酢酸0.60 gを量り、水を加えて正確に100 mLとした。第1液に第2液を加えて混和し、pHを5.0に調整した。

エタノール及び水の混液(9:1)：エタノール(99.5%)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500 mL及びメタノール500 mLを混合した。

水及びメタノールの混液(11:9)：水550 mL及びメタノール450 mLを混合した。

酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)：酢酸エチル900 mL及びメタノール100 mLを混合した。

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

標準原液：ジエネストロール標準品約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。ジエチルスチルベストロール標準品約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。ヘキサステロール標準品約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。1 mg容量のジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して50 mg/L溶液を調製した。

内標準原液：ジエネストロール- d_6 約5 mgを精秤し、アセトニトリルで溶解して100 mg/L溶液を調製した。1 mg容量の[$^2\text{H}_8$]-ジエチルスチルベストロールをメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して10 mg/L溶液を調製した。1 mg容量のヘキサステロール- d_4

をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して50 mg/L溶液を調製した。

添加用標準溶液：ジエネストロール標準原液、ジエチルスチルベストール標準原液及びヘキサステロール標準原液をメタノールで希釈して5 mg/L溶液を調製し、さらに、水及びメタノールの混液(1:1)で希釈して0.01 mg/L混合溶液を調製した。

添加用内標準溶液：ジエネストロール- d_6 内標準原液を水及びメタノールの混液(1:1)で希釈して1 mg/L溶液を調製した。 $[^2H_8]$ -ジエチルスチルベストール内標準原液及びヘキサステロール- d_4 内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。さらに、これら溶液を水及びメタノールの混液(1:1)で希釈して0.1 mg/L混合溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：NS-52(マイクロテック・ニチオン製)

ロータリーエバポレーター：N-1000V(東京理化学器械製)

遠心分離機：H-60R(コクサン製)

pH計：F-72(堀場アドバンスドテクノ)

振とう恒温水槽：BT101(ヤマト科学製)

LC-MS/MS

装置	型式	メーカー
MS	Triple Quad 5500 Triple Quad 6500+	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

装置	型式	メーカー
MS	Xevo TQ-XS	Waters
LC	ACQUITY Premier QSM	Waters
データ処理	MassLynx	Waters

4. 測定条件

Triple Quad 5500 及び Triple Quad 6500+の測定

条件を Table 2、Xevo TQ-XS の測定条件を Table 3 に示した。

5. 定量

ジエネストロール標準原液、ジエチルスチルベストール標準原液及びヘキサステロール標準原液をメタノールで希釈して5 mg/L溶液を調製した。ジエネストロール- d_6 内標準原液を水及びメタノールの混液(1:1)で希釈して 1 mg/L 溶液を調製し、 $[^2H_8]$ -ジエチルスチルベストール内標準原液及びヘキサステロール- d_4 内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。さらに、これら溶液を水及びメタノールの混液(1:1)で希釈して 0.125、0.25、0.5、1.25 及び 2.5 μ g/L(内標準溶液濃度 1.25 μ g/L)の内標準混合標準溶液を調製した。この溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入して、得られたジエネストロール- d_6 のピーク面積に対するジエネストロール、 $[^2H_8]$ -ジエチルスチルベストールのピーク面積に対するジエチルスチルベストール及びヘキサステロール- d_4 のピーク面積に対するヘキサステロールのピーク面積の比を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、検量線から内部標準法によりジエネストロール、ジエチルスチルベストール及びヘキサステロールの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液(0.01 mg/L)500 μ L[水及びメタノールの混液(1:1)]及び添加用内標準溶液(0.1 mg/L)250 μ L[水及びメタノールの混液(1:1)]を添加した。

7. 試験溶液の調製

概要

ジエネストロール、ジエチルスチルベストール及びヘキサステロールを試料からエタノール及び水の混液(9:1)で抽出し、 β -グルクロニダーゼで加水分解を行った後、親水性基修飾 SDB ミニカラム

及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

分析法フローチャートを Fig 2 に示した。

7.1 抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、エタノール及び水の混液(9:1)50 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。次いで残留物にエタノール及び水の混液(9:1)30 mL を加え、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに合わせ、エタノール及び水の混液(9:1)で定容した。

7.2 加水分解反応

抽出液 5 mL(試料 0.5 g 相当)を 50 mL 容遠心管に分取し、0.1 mol/L 酢酸ナトリウム溶液(pH 5.0)10 mL 及び β -グルクロニダーゼ溶液 100 μ L を加え、37°Cの水浴中で 60 分間振とうし、加水分解反応を行った。

7.3 精製

反応液を親水性基修飾 SDB ミニカラム [EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)](あらかじめメタノール 5 mL、水 10 mL で洗浄したもの)に負荷した。遠心管内を 5 mL の水で洗い、洗液をカラムに負荷した。水及びメタノールの混液(11:9)5 mL で洗浄した後、1 分間吸引した。次いでヘキサン 5 mL で洗浄した後、1 分間吸引した。親水性基修飾 SDB ミニカラム [EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)]の下にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak Plus NH₂(360 mg)](あらかじめ酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)5 mL で洗浄したものを)を接続し、酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)15 mL で溶出した。溶出液をなす形フラスコに入れて、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。

残留物を水及びメタノールの混液(1:1)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。

8. マトリックス添加標準溶液の調製

「7. 試験溶液の調製」に記載した方法に従いブランク試料を濃縮(溶媒除去)操作まで行い、残留物に 0.25 μ g/L のジエネストール、ジエチルステルベストロール及びヘキサステロール混合標準溶液 1 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

9. 妥当性評価試験

牛の筋肉を対象に定量限界濃度(0.5 μ g/kg)で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回(2併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

C. 結果及び考察

[1] ステロイド類(エストラジオール、テストステロン、エチニルエストラジオール、酢酸メレンゲステロール、メチルテストステロン、酢酸トレンボロン、デキサメタゾン及びメドロキシプロゲステロン)分析法

1. LC-MS/MS 条件の検討

17 β -エストラジオール及びエチニルエストラジオールは ESI(-)モードで、その他の分析対象化合物は ESI(+)モードでの測定が可能であった。全測定対象成分の中で最もピーク強度が小さい17 β -エストラジオール、エチニルエストラジオール(他成分のピーク強度の 1/5 以下)の測定条件を最適化するように測定条件を検討した。酸性条件下では両物質ともに十分なピーク強度が得られなかったため、以下の中性～塩基性条件の水系移動相を検討した。

①0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH7 程度)

②0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH8 程度)

③0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH9.5 程度)

④水

⑤水及びアンモニア水の混液(1000:1)(pH10程度)

⑥0.5 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液(pH7.5程度)

結果として、酢酸アンモニウムを使用した①②③は移動相の pH によらずいずれも十分なピーク強度が得られなかった。このことから、酢酸イオンが両物質の感度を低下させていると推測された。よって①②③は不採用とした。④が最も高いピーク強度を示し、次いで⑤⑥が同程度のピーク強度となった。ただし、④⑤は注入の再現性が悪く、測定中の感度変動も起こりやすかったため不採用とした。⑥は④にピーク強度は劣るが、比較的安定して測定することが可能であった。以上より、最も良好に両物質を測定できた⑥の 0.5 mmol/L 炭酸水素アンモニウム溶液を採用とした。なお、0.5 mmol/L より炭酸水素アンモニウム濃度を上げてもピーク強度の上昇は得られず、10 mmol/L 程度から逆に低下が確認されたため、濃度は 0.5 mmol/L とした。有機溶媒系移動相にはメタノールを用いた。

2. 試料前処理の検討

抽出法は酢酸トレンボロン、デキサメタゾン及びベタメタゾンの告示試験法^{1),2)}と同様に、試料からヘキサン飽和アセトニトリルで抽出と同時にヘキサンの洗浄する方法とした。加えて、試料マトリックスの除去を目的としてミニカラムによる精製を検討した。

2.1 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び陰イオン交換ミニカラムを用いた精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムである InertSep C18(1000 mg)及びトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムである InertSep SAX/PSA(500 mg/500 mg)からそれぞれアセトニ

トリルで負荷、溶出した結果を Table 4 及び Table 5 に示した。いずれもアセトニトリル 30 mL で溶出が可能であった。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムを連結し、アセトニトリル 30 mL で溶出すという試験設計が可能と考えられた。

2.2 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製

農薬一斉分析等で広く使用されている積層カラムであるグラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムについても適用可能か検討することとした。まず、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムである InertSep PSA(1000 mg)を用いた順相条件での溶出が可能か検討した。アセトン及びヘキサンの混液(1:19)を用いて各測定対象成分をミニカラムに負荷し、アセトンの比率を上げて順次溶出した結果を Table 6 に示した。極性に大きく幅があるため、洗浄区を作ることは難しいと判断した。アセトン及びヘキサンの混液(1:1)でいずれの成分も概ね溶出可能であった。

2.3 グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムである InertSep GC(300 mg)を用いた逆相条件での溶出が可能か検討した。各測定対象成分をメタノールでミニカラムに負荷した後、酢酸エチルで溶出した結果を Table 7 に、アセトン及びヘキサンの混液(1:1)で負荷、溶出した結果を Table 8、アセトニトリル及びトルエンの混液(7:3)で負荷、溶出した結果を Table 9 に示した。メタノール及び酢酸エチルでは一部の成分が溶出できなかったが、アセトン及びヘキサンの混液(1:1)又はアセトニトリル及びトルエンの混液(7:3)で全成分溶出可能であった。なお、本検討ではアセトニトリル及びトルエンの混液比率は(7:3)を

用いたが、2.4の検討では、農薬一斉分析等で広く使用されているアセトニトリル及びトルエンの混液(3:1)を用いることとした。

2.4 グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムによる精製

2.2 及び 2.3 の検討結果から、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムである InertSep GC/PSA(500 mg/500 mg)を用いた溶出が可能か検討した。濃縮操作を減らした簡便な精製法とするため、抽出液のアセトニトリル溶液 20 mL をカラムに負荷した後、溶出溶媒で溶出させる方法を検討した。各測定対象成分をアセトニトリル 20 mL でミニカラムに負荷した後、それぞれアセトン及びヘキサンの混液(1:1)20 mL で溶出した結果を Table 10、アセトニトリル及びトルエンの混液(3:1)20 mL で溶出した結果を Table 11 に示した。いずれの混液でも全成分の溶出が可能であったが、より溶出力の強いアセトニトリル及びトルエンの混液(3:1)を用いることとした。なお、アセトニトリルの溶出区に一部の成分が溶出したためアセトニトリル溶出区も合わせた全溶出液をとる方法とした。

2.1 及び 2.4 のいずれの方法でも精製が可能と考えられたが、2.4 は積層カラム 1 本のみで精製が可能であり、連結カラムを使用する 2.1 よりもより簡便な方法となったため、この方法を採用することとした。開発した試験法で牛の筋肉について試験を行った結果、3.3 より、ESI(+)モードで測定する成分は試料由来のマトリックスの影響を受けていたが、内標準物質の回収率はいずれも 40%以上であったため、内標準物質による補正を行って定量する方法とした。

3. 妥当性評価試験結果

3.1 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、

クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった。

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 Table 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 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 17 β -エストラジオール-2,4,16,16-*d*₄、17 β -テストステロン-16,16,17-*d*₃、エチニルエストラジオール-2,4,16,16-*d*₄、酢酸メレンゲステロール-*d*₃、メチルテストステロン-*d*₃、[²H₅]- α -トレンボロン、[²H₅]- β -トレンボロン、デキサメタゾン-4,6,21,21-*d*₄ 及び酢酸メドロキシプロゲステロン-*d*₆の回収率はいずれも 40%以上であった。

3.3 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を Table 13 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。その結果、ピーク面積比は、17 β -エストラジオールで 1.01、17 β -テストステロンで 0.65、エチニルエストラジオールで 0.98、酢酸メレンゲステロールで 0.63、メチルテストステロンで 0.61、 α -トレンボロンで 0.66、 β -トレンボロンで 0.72、デキサメタゾンで 0.64、酢酸メドロキシプロゲステロンで 0.66 であった。以上のことから、本法では 17 β -エストラジオール及びエチニルエストラジオール以外の分析対象化合物は試料由来のマトリックスの影響を受けていると考えられた。

3.4 検量線の直線性

0.0005~0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.992$ となり、良好な直線性が得られた。

3.5 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得られた

ピークは $S/N \geq 10$ であった。

4. 考察

妥当性評価試験結果から、本分析法は牛の筋肉を対象とした残留分析法(定量限界 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$)として妥当であることが示された。

[2] スチルベン類(ジエネストール、ジエチルスチルベストール及びヘキサステロール)分析法

1. LC-MS/MS条件の検討

告示試験法^{3,4)}においては水系移動相に $2 \text{ mmol}/\text{L}$ 酢酸アンモニウム溶液を用いているが、より S/N が良好であった水及び酢酸の混液(10000:1)を選択した。分離カラムについては数種類のオクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)充填カラムを比較・検討したが、ジエチルスチルベストールとマトリクス由来の妨害ピークとの分離が不十分であったため、アダマンチル基を有し、ODSカラムとは異なる分離を示す CAPCELL CORE ADME(内径 2.1 mm 、長さ 150 mm 、粒子径 $2.7 \mu\text{m}$)を選択した。

2. 試料前処理の検討

2.1 エタノール存在下でのグルクロン酸抱合体の加水分解条件の検討

告示試験法開発の報告書⁴⁾において、濃縮操作条件によってはジエチルスチルベストールの回収率の低下が確認されている。告示試験法では抽出液[エタノール及び水の混液(9:1)]を 10 mL 分取し、約 5 mL まで減圧濃縮した後、加水分解操作を行っているが、濃縮によるジエチルスチルベストールの回収率の低下に注意する必要がある。そこで抽出液[エタノール及び水の混液(9:1)]を 5 mL 分取し濃縮せずに加水分解操作を行うために、エタノール共存下における酵素加水分解について以下の方法で検討した。

ジエチルスチルベストールグルクロン酸抱合体 25 ng (ジエチルスチルベストールとして約 15 ng 相当)及び $[^2\text{H}_8]$ -ジエチルスチルベストール 25 ng を添加したエタノール及び水の混液(9:1) 5 mL に $0.1 \text{ mol}/\text{L}$ 酢酸ナトリウム溶液(pH 5.0) 10 mL 及び β -グルクロニダーゼ溶液 $100 \mu\text{L}$ を加え、 37°C の水浴中で 60 分間振とうし、加水分解反応を行った。また比較対照として、ジエチルスチルベストールグルクロン酸抱合体及び $[^2\text{H}_8]$ -ジエチルスチルベストールを同濃度添加したエタノール及び水の混液(9:1) 10 mL を約 5 mL まで減圧濃縮した後、 $0.1 \text{ mol}/\text{L}$ 酢酸ナトリウム溶液(pH 5.0) 10 mL 及び β -グルクロニダーゼ溶液 $100 \mu\text{L}$ を加え、 37°C の水浴中で 60 分間振とうし、加水分解反応を行った。各加水分解後の溶液は、7. 試験溶液の調製の項の 7.3 精製の操作を行いジエチルスチルベストールの回収率を求めた。

その結果、ジエチルスチルベストールとしての回収率は、エタノール及び水の混液(9:1)を 5 mL 分取した場合(エタノール 4.5 mL 共存): 94.5% 、エタノール及び水の混液(9:1) 10 mL を約 5 mL まで減圧濃縮した場合(エタノール約 4 mL 共存): 93.4% であり、 4.5 mL 程度のエタノールが共存した場合であっても、加水分解反応の効率には大きな影響はないことが確認された。なお、各点は試行数 2 で行い、平均値を用いた。

2.2 親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製

告示試験法において加水分解反応液を有機溶媒に転溶させ、減圧濃縮した後、弱塩基性陰イオン交換体ミニカラムを用いた精製を行っているが、減圧濃縮操作を避けるため、加水分解反応液をそのまま固相カラムに注入し精製を行う試験設計を検討した。

親水性ポリマーベース固相カラムであるジビニ

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(150 mg/6 mL)]及び親水性基修飾 SDB ミニカラム[EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)](あらかじめヘキサン 5 mL、水及びメタノールの混液 (11:9)5 mL 及び水 5 mL で洗浄したものにジエネ ストロール、ジェチルスチルベストール及びヘキ セステロールを各 0.0125 µg、ジエネストール-*d*₆、 [²H₈]-ジェチルスチルベストール及びヘキセステ ロール-*d*₄を各 0.0125 µg 供した。水及びメタノール の混液(11:9)及びヘキサンにて洗浄を行った後、 各カラムの下部にアミノプロピルシリル化シリカゲ ルミニカラム[Sep-Pak Plus NH₂(360 mg)](あらかじ め酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)5 mL で 洗浄したものを)を連結し、酢酸エチル及びメタノー ルの混液(9:1)で溶出した。

結果を Table 14 に示した。いずれの固相カラム も洗浄液[水及びメタノールの混液(11:9)5 mL また はヘキサン 5 mL]では溶出せず、酢酸エチル及び メタノールの混液(9:1)15 mL までにほぼ 90%以上 が溶出された。

次に、牛の筋肉にジエネストール、ジェチルス チルベストール、ヘキセステロール、ジエネストロ ール-*d*₆、 [²H₈]-ジェチルスチルベストール及びヘ キセステロール-*d*₄を添加して、抽出、加水分解反 応後に同様にカラム精製を行った。

結果を Table 15 に示した。試料マトリックス存在 下では親水性基修飾 SDB ミニカラム[EVOLUTE ABN (150 mg/6 mL)]を用いた場合の方がより良好 な内標準物質回収率が得られた。なお、マトリッ クス存在下で分析操作中にジェチルスチルベストールの *trans* 体から *cis* 体への異性化が確認され たことから、内標準物質を用いて補正を行うこととし た。またアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak Plus NH₂(360 mg)]を省いた場合、試験 溶液に濁りがみられサプレッションが大きくなった。

以上の結果より、親水性基修飾 SDB ミニカラム [EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)]とアミノプロピルシ リル化シリカゲルミニカラム[Sep-Pak Plus NH₂(360 mg)]の連結カラムによる精製方法を選択した。

3. 妥当性評価試験結果

3.1 選択性

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

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 Table 16 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ジエネストール-*d*₆、 [²H₈]-ジェチルスチルベストール及びヘキセステ ロール-*d*₄の回収率はいずれも 40%以上であった。

3.3 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討し た結果を Table 17 に示した。添加回収試験におけ る回収率 100%相当濃度になるように調製したマト リックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピー ク面積比を求めた。その結果、ピーク面積比は、 ジエネストールで 0.99、ジェチルスチルベストール で 1.04、ヘキセステロールで 0.96 であった。 以上のことから、本法は試料由来のマトリックスの 影響をほとんど受けずに測定することが可能と考 えられた。

3.4 検量線の直線性

0.125~2.5 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。

3.5 定量限界

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

4. 考察

妥当性評価試験結果から、本分析法は牛の筋肉を対象とした残留分析法(定量限界 0.5 µg/kg)として妥当であることが示された。

D. 結論

牛の筋肉中のステロイド類分析法として、試料からヘキササン飽和アセトニトリル抽出及びヘキササン洗浄を行った後、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で測定する方法を確立した。また、スチルベン類分析法として、試料からエタノール及び水の混液(9:1)で抽出し、β-グルクロニダーゼで加水分解を行った後、親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MS で測定する方法を確立した。妥当性評価試験を実施した結果、真度、併行精度、室内精度及び選択性の目標値を満たした。これらの結果から、いずれの分析法も牛の筋肉中の残留分析法(定量限界 0.5 µg/kg)として妥当であることが示された。

[参考文献]

- 1) 食品、添加物等の規格基準(昭和 34 年厚生省告示第 370 号)に規定する試験法“酢酸トレンボロン試験法”
- 2) 食品、添加物等の規格基準(昭和 34 年厚生省告示第 370 号)に規定する試験法“デキサメタゾン及びベタメタゾン”
- 3) 食品、添加物等の規格基準(昭和 34 年厚生省告示第 370 号)に規定する試験法“ジエチルスチルベストール試験法”
- 4) 残留農薬等に関するポジティブリスト制度導入に係る分析法開発 ジエチルスチルベストール試

験法(畜水産物)

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 畑寛子, 池側智香子, 飯塚誠一郎, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穂山浩, 志田(齊藤)静夏. 牛尿中の 2-チオウラシル, 4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法の確立および妥当性評価: 欧州連合への牛肉輸出時のモニタリング検査のための分析法. 食品衛生学雑誌 65, 178-184 (2024)

2) 高木千陽, 中村歩, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穂山浩, 志田(齊藤)静夏. 欧州連合への日本産牛肉輸出時のモニタリング検査のための牛尿中レゾルシル酸ラクトン類分析法の確立および性能評価. 食品衛生学雑誌 (2025) (in press)

2. 学会発表

1) 畑寛子, 池側智香子, 飯塚誠一郎, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穂山浩, 志田(齊藤)静夏. 牛尿中の 2-チオウラシル, 4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法の確立. 日本食品衛生学会第 120 回学術講演会 (2024.11.7)

2) 高木千陽, 中村歩, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穂山浩, 志田(齊藤)静夏. イムノアフィニティーカラムを用いた牛尿中におけるレゾルシル酸ラクトン類の同時分析法開発. 日本食品衛生学会第 120 回学術講演会 (2024.11.6)

3) 畑寛子, 池側智香子, 飯塚誠一郎, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穂山浩, 志田(齊藤)静夏. 牛尿中の 2-チオウラシル, 4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法の確立. 第 7 回日本食品衛生学会近畿ブロック勉強会 (2025.2.14)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1. ステロイド類の測定条件

LC 条件																											
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μ m: Waters 製)																										
移動相流速(mL/min)	0.3																										
注入量(μ L)	5																										
カラム温度($^{\circ}$ C)	40																										
移動相	A液:0.5 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液 B液:メタノール(LC-MS用)																										
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>2.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>15</td> <td>85</td> </tr> <tr> <td>12.01</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.01</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	2.0	50	50	12.0	15	85	12.01	5	95	15.0	5	95	15.01	50	50	18.0	50	50
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																									
0.0	50	50																									
2.0	50	50																									
12.0	15	85																									
12.01	5	95																									
15.0	5	95																									
15.01	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(+又は-)																										
イオンスプレー電圧(V)	4500 又は-4500																										
ヒーター温度($^{\circ}$ C)	600																										
ネブライザーガス	空気、50 psi																										
ターボガス	空気、70 psi																										
コリジョンガス	窒素																										

定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)

	プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)	
			(m/z)	コリジョン エネルギー(eV)	(m/z)	コリジョン エネルギー(eV)
17β-エストラ ジオール	271	-120	145	-52	183	-56
17β-エストラジ オール-2,4,16,16- <i>d</i> ₄	275	-120	147	-52	—	—
17β-テストステ ロン	289	30	97	27	109	31
17β-テストステ ロン-16,16,17- <i>d</i> ₃	292	30	97	31	—	—
エチニル エストラジ オール	295	-120	145	-54	143	-76
エチニル エストラジ オール- 2,4,16,16- <i>d</i> ₄	299	-120	147	-52	—	—
酢酸 メレンゲス テロール	397	30	337	19	279	27
酢酸メレン ゲステ ロール- <i>d</i> ₃	400	30	337	19	—	—
メチル テストステ ロン	303	30	97	27	109	37
メチル テストステ ロン- <i>d</i> ₃	306	30	97	27	—	—
α-トレンボ ロン	271	30	253	29	178	65
[² H ₅]- α-トレンボ ロン	276	30	258	29	—	—
β-トレンボ ロン	271	30	253	29	178	65
[² H ₅]- β-トレンボ ロン	276	30	258	29	—	—
デキサメタ ゾン	393	30	373	13	355	17
デキサメタ ゾン- 4,6 _α ,21,21- <i>d</i> ₄	397	30	377	13	—	—
酢酸メドロ キシ プロゲステ ロン	387	30	327	19	123	49
酢酸メドロ キシ プロゲステ ロン- <i>d</i> ₆	393	30	330	19	—	—

保持時間(min)

17β-エストラジオール 6.3、17β-テストステロン 6.9、
エチニルエストラジオール 6.5、
酢酸メレンゲステロール 9.2、メチルテストステロン 7.7、
α-トレンボロン 5.9、β-トレンボロン 5.3、デキサメタゾン 5.0、
酢酸メドロキシプロゲステロン 9.0

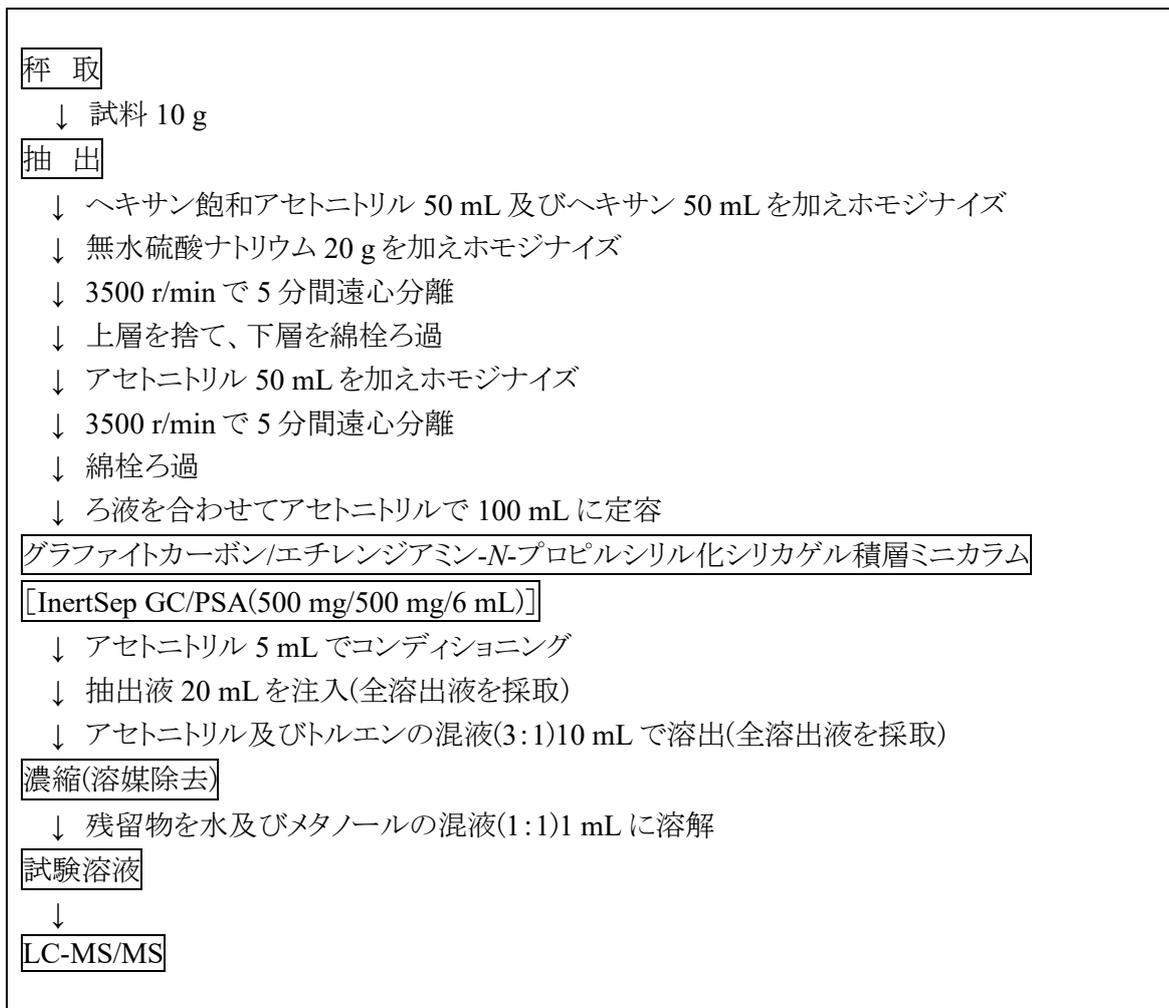


Fig 1. ステロイド類分析法フローチャート

Table 2. スチルベン類の測定条件 (Triple Quad 5500 及び Triple Quad 6500+)

LC 条件																											
カラム	CAPCELL CORE ADME (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 2.7 μm : 大阪ソーダ製)																										
移動相流速(mL/min)	0.4																										
注入量(μL)	5																										
カラム温度($^{\circ}\text{C}$)	40																										
移動相	A液: 水及び酢酸の混液(10000:1) 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>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>6.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>6.01</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>9.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>9.01</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>						時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	50	50	6.0	50	50	6.01	5	95	9.0	5	95	9.01	50	50	12.0	50	50
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																									
0.0	50	50																									
6.0	50	50																									
6.01	5	95																									
9.0	5	95																									
9.01	50	50																									
12.0	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(-)																										
イオンスプレー電圧(V)	-4500																										
ヒーター温度($^{\circ}\text{C}$)	600																										
ネブライザーガス	空気、70 psi																										
ターボガス	空気、70 psi																										
コリジョンガス	窒素																										
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)																											
Triple Quad 5500																											
	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)																					
ジエネストロール	265	-80	93	-40	236	-26																					
ジエネストロール- d_6	271	-80	94	-40	—	—																					
ジエチル スチルベストロール	267	-75	222	-42	237	-34																					
[$^2\text{H}_8$]-ジエチル スチルベストロール	275	-75	245	-40	—	—																					
ヘキサステロール	269	-60	134	-22	119	-50																					
ヘキサステロール- d_4	273	-65	136	-22	—	—																					
Triple Quad 6500+																											
	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)																					

ジエネストロール	265	-100	93	-40	236	-26
ジエネストロール- <i>d</i> ₆	271	-100	94	-40	—	—
ジエチル スチルベストロール	267	-95	222	-42	237	-34
[² H ₈]-ジエチル スチルベストロール	275	-95	245	-40	—	—
ヘキセステロール	269	-80	134	-22	119	-50
ヘキセステロール- <i>d</i> ₄	273	-85	136	-22	—	—
保持時間(min)	ジエネストロール 3.6、ジエチルスチルベストロール 3.5、 ヘキセステロール 3.6					

Table 3. スチルベン類の測定条件 (Xevo TQ-XS)

LC 条件						
カラム	CAPCELL CORE ADME (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 2.7 μm : 大阪ソーダ製)					
移動相流速(mL/min)	0.4					
注入量(μL)	5					
カラム温度(°C)	40					
移動相	A 液: 水及び酢酸の混液(10000:1) B 液: アセトニトリル					
グラジエント条件	時間(分)		A 液(%)	B 液(%)		
	0.0		50	50		
	6.0		50	50		
	6.01		5	95		
	9.0		5	95		
	9.01		50	50		
	12.0		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(-)					
キャピラリ電圧(V)	1500					
ソース温度(°C)	150					
脱溶媒温度(°C)	600					
コーンガス	窒素、150 L/hr					
脱溶媒ガス	窒素、1100 L/hr					
コリジョンガス	アルゴン					
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)						
	プリカーサー イオン	コーン 電圧 (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)
ジエネストロール	265	48	93	26	236	20
ジエネストロール-d ₆	271	48	94	26	—	—
ジエチル スチルベストール	267	48	222	32	237	30
[² H ₈]-ジエチル スチルベストール	275	48	245	30	—	—
ヘキセステロール	269	34	134	16	119	34
ヘキセステロール-d ₄	273	34	136	16	—	—
保持時間(min)	ジエネストロール 3.9、ジエチルスチルベストール 3.9、 ヘキセステロール 4.0					

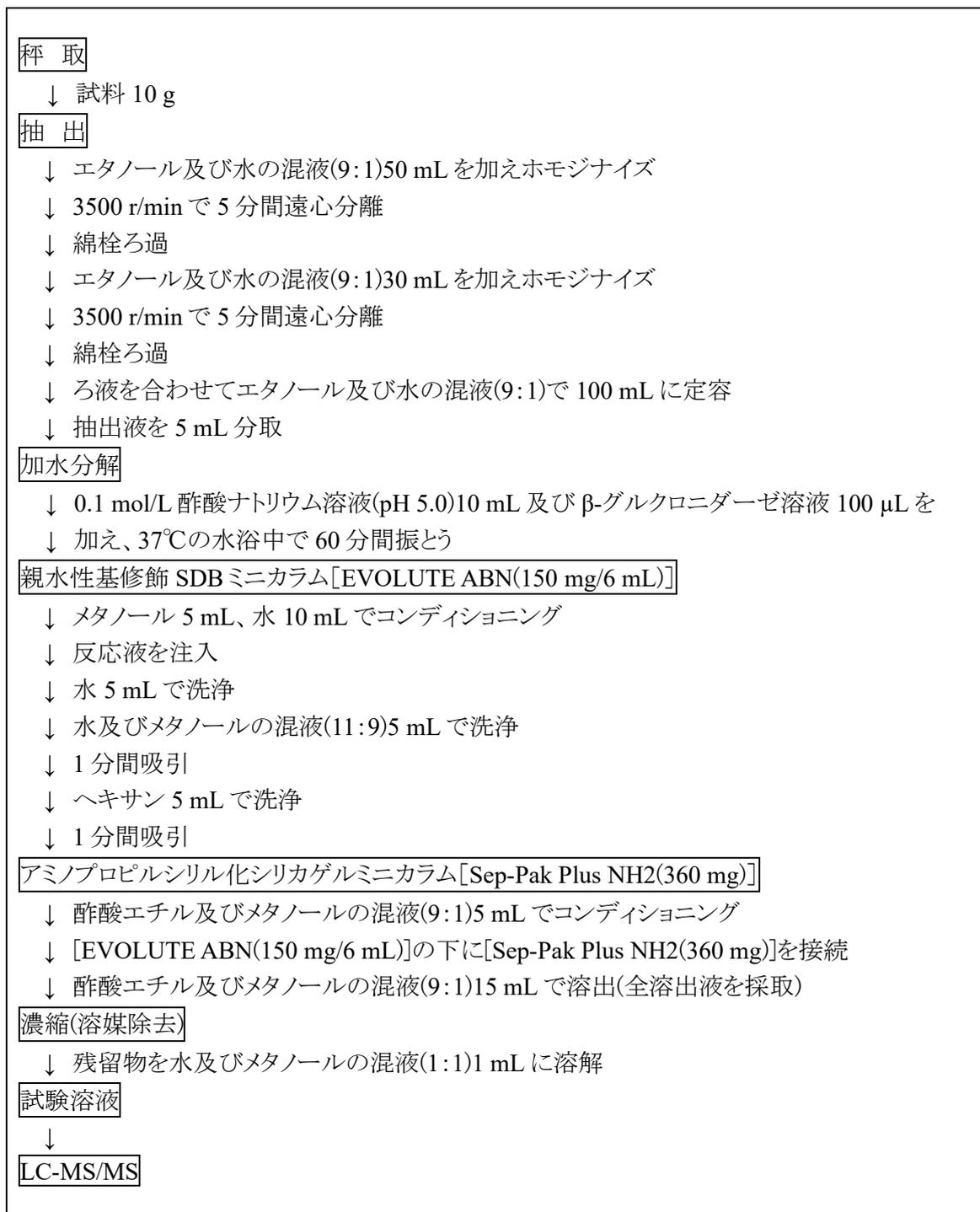


Fig2. スチルベン類の分析法フローチャート

Table 4. オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep C18 1000 mg	アセトニトリル		合計
	0-20 mL	20-30 mL	
17β-エストラジオール	91	6	97
17β-テストステロン	93	6	99
エチニルエストラジオール	89	4	93
酢酸メレンゲステロール	90	5	95
メチルテストステロン	87	5	92
α-トレンボロン	91	4	95
β-トレンボロン	96	5	101
デキサメタゾン	106	5	111
酢酸メドロキシプロゲステロン	97	5	102

予備洗浄:アセトニトリル 5 mL、供試量:各 0.5 μg

Table 5. トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep SAX/PSA 500 mg/500 mg	アセトニトリル		合計
	0-20 mL	20-30 mL	
17β-エストラジオール	84	15	99
17β-テストステロン	86	9	95
エチニルエストラジオール	84	14	98
酢酸メレンゲステロール	90	7	97
メチルテストステロン	85	7	92
α-トレンボロン	85	8	93
β-トレンボロン	91	9	100
デキサメタゾン	83	17	100
酢酸メドロキシプロゲステロン	93	8	101

予備洗浄:アセトニトリル 5 mL、供試量:各 0.5 μg

Table 6. エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep PSA 1000 mg	アセトン及びヘキサンの混液						合計
	1:19	1:9	1:4	3:7	2:3	1:1	
	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	
17β-エストラジオール	0	0	10	79	0	0	89
17β-テストステロン	0	24	71	2	0	0	97
エチニルエストラジオール	0	0	0	92	4	0	96
酢酸メレンゲステロール	1	76	2	0	0	0	79
メチルテストステロン	0	92	6	1	0	0	99
α-トレンボロン	0	0	80	4	1	0	85
β-トレンボロン	0	0	100	3	1	0	104
デキサメタゾン	0	0	0	0	11	63	74
酢酸メドロキシプロゲステロン	0	101	4	1	0	0	106

予備洗浄:ヘキサン 5 mL、供試量:各 0.1 μg

Table 7. グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep GC 300 mg	メタノール		酢酸エチル			合計
	0-5 mL	5-10 mL	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
17β-エストラジオール	0	0	0	0	0	0
17β-テストステロン	0	0	83	19	1	103
エチニルエストラジオール	0	0	14	0	0	14
酢酸メレンゲステロール	0	0	96	0	0	96
メチルテストステロン	0	0	111	0	0	111
α-トレンボロン	3	39	59	0	0	101
β-トレンボロン	0	0	103	0	0	103
デキサメタゾン	0	9	57	7	5	78
酢酸メドロキシプロゲステロン	0	0	99	0	0	99

予備洗浄:メタノール 5 mL、供試量:各 0.25 μg

Table 8. グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep GC 300 mg	アセトン及びヘキサンの混液(1:1)			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
17β-エストラジオール	86	2	0	88
17β-テストステロン	101	0	0	101
エチニルエストラジオール	90	0	0	90
酢酸メレンゲステロール	100	0	0	100
メチルテストステロン	101	0	0	101
α-トレンボロン	95	0	0	95
β-トレンボロン	88	0	0	88
デキサメタゾン	86	0	0	86
酢酸メドロキシプロゲステロン	104	0	0	104

予備洗浄:アセトン及びヘキサンの混液(1:1) 5 mL、供試量:各 0.1 μg

Table 9. グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep GC 300 mg	アセトニトリル及びトルエンの混液(7:3)			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
17β-エストラジオール	97	0	0	97
17β-テストステロン	101	2	0	103
エチニルエストラジオール	90	0	0	90
酢酸メレンゲステロール	89	1	0	90
メチルテストステロン	97	1	0	98
α-トレンボロン	96	1	0	97
β-トレンボロン	92	1	0	93
デキサメタゾン	117	0	0	117
酢酸メドロキシプロゲステロン	100	1	0	101

予備洗浄:アセトニトリル及びトルエンの混液(7:3) 5 mL、供試量:各 0.1 μg

Table 10. グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep GC/PSA	アセトニトリル	アセトン及びヘキサンの混液(1:1)		合計
		20 mL	0-10 mL	
500 mg/500 mg	20 mL	0-10 mL	10-20 mL	
17β-エストラジオール	0	85	0	85
17β-テストステロン	0	87	1	88
エチニルエストラジオール	10	73	0	83
酢酸メレンゲステロール	0	87	0	87
メチルテストステロン	0	88	0	88
α-トレンボロン	37	50	0	87
β-トレンボロン	4	87	0	91
デキサメタゾン	5	52	26	83
酢酸メドロキシプロゲステロン	0	87	0	87

予備洗浄:アセトニトリル 5 mL、供試量:各 0.05 μg

Table 11. グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからの溶出状況(%) (ステロイド類)

InertSep GC/PSA	アセトニトリル	アセトニトリル及びトルエンの混液(3:1)		合計
		20 mL	0-10 mL	
500 mg/500 mg	20 mL	0-10 mL	10-20 mL	
17β-エストラジオール	0	80	0	80
17β-テストステロン	0	95	0	95
エチニルエストラジオール	30	63	0	93
酢酸メレンゲステロール	0	97	0	97
メチルテストステロン	1	91	0	92
α-トレンボロン	93	1	0	94
β-トレンボロン	13	76	0	89
デキサメタゾン	14	63	1	78
酢酸メドロキシプロゲステロン	1	94	0	95

予備洗浄:アセトニトリル 5 mL、供試量:各 0.05 μg

Table 12.1 17 β -エストラジオールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.533	0.478	0.498	0.425	0.474	0.484	96.8	2.4	7.6
	2回目	0.542	0.462	0.486	0.452	0.488				

Table 12.2 17 β -テストステロンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.495	0.456	0.511	0.497	0.508	0.487	97.3	2.4	4.5
	2回目	0.467	0.452	0.489	0.491	0.501				

Table 12.3 エチニルエストラジオールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.484	0.496	0.436	0.413	0.390	0.445	89.1	7.4	13.2
	2回目	0.570	0.440	0.422	0.417	0.384				

Table 12.4 酢酸メレンゲステロールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.473	0.477	0.495	0.474	0.505	0.487	97.3	0.9	2.7
	2回目	0.486	0.482	0.493	0.475	0.506				

Table 12.5 メチルテストステロンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μ g/kg)	測定値 (μ g/kg)							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.500	0.451	0.519	0.474	0.503	0.492	98.3	2.3	5.4
	2回目	0.507	0.460	0.497	0.477	0.527				

Table 12.6 α-トレンボロンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μg/kg)	測定値(μg/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			
0.5	1回目	0.463	0.486	0.493	0.482	0.513	0.492	98.4	3.8	3.8
	2回目	0.520	0.474	0.502	0.476	0.510				

Table 12.7 β-トレンボロンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μg/kg)	測定値(μg/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			
0.5	1回目	0.520	0.504	0.490	0.492	0.500	0.494	98.8	2.3	3.0
	2回目	0.510	0.480	0.486	0.475	0.483				

Table 12.8 デキサメタゾンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μg/kg)	測定値(μg/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			
0.5	1回目	0.480	0.466	0.531	0.498	0.457	0.490	97.9	1.6	5.5
	2回目	0.482	0.489	0.528	0.501	0.464				

Table 12.9 酢酸メドロキシプロゲステロンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 (μg/kg)	測定値(μg/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			
0.5	1回目	0.476	0.439	0.467	0.467	0.482	0.465	92.9	1.8	3.8
	2回目	0.455	0.444	0.460	0.462	0.495				

Table 13. 試料マトリックスの測定への影響 (ステロイド類)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (μg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (μg/kg)	標準溶液 濃度 ¹ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ²										備考
							面積又は 高さの別	ブランク ³	マトリックス添加標準溶液 ⁴			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁵		
							n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均					
1	17β-エストラジオール	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	9888	9820	9854	10215	9331	9773	1.01		
2	17β-テストステロン	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	435503	429753	432628	669636	654218	661927	0.65		
3	エチニルエストラジオール	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	5371	5468	5420	5214	5817	5516	0.98		
4	酢酸メレンゲステロール	牛の筋肉	0.5	0.001	0.5	0.001	面積	0	272177	252680	262429	424344	415316	419830	0.63		
5	メチルテストステロン	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	240014	224851	232433	388172	378709	383441	0.61		
6	α-トレンボロン	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	337608	323479	330544	499522	498959	499241	0.66		
7	β-トレンボロン	牛の筋肉	0.5	0.002	0.5	0.001	面積	0	158242	156060	157151	214630	220388	217509	0.72		
8	デキサメタゾン	牛の筋肉	0.5	0.001	0.5	0.001	面積	0	12547	12123	12335	20450	18297	19374	0.64		
9	酢酸メドロキシプロゲステロン	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.001	面積	0	231024	234715	232870	360658	348484	354571	0.66		

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

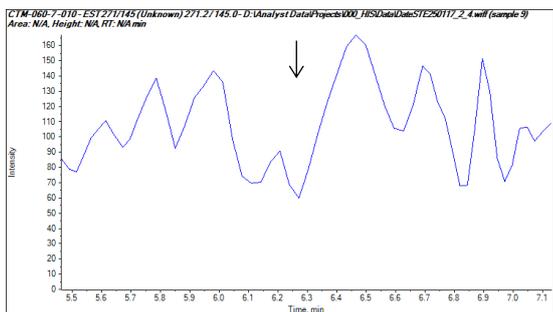
*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

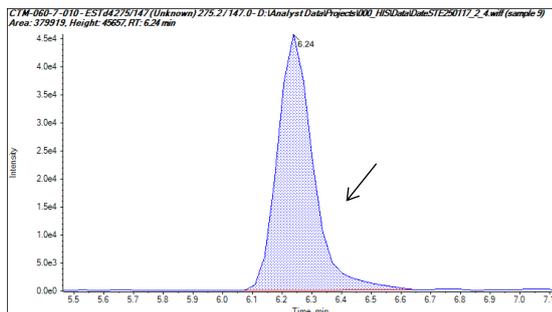
*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

代表的なクロマトグラム

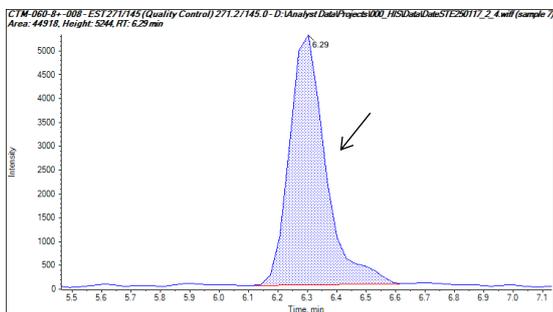
ブランク試料



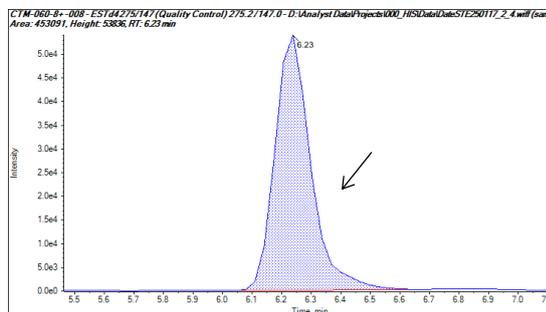
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



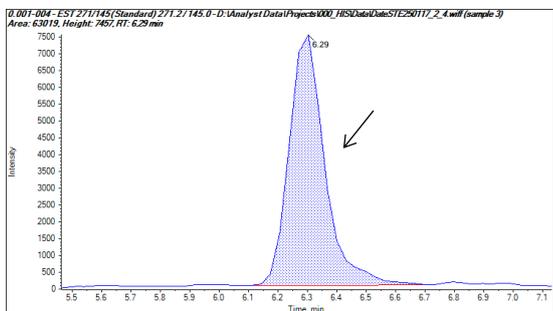
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

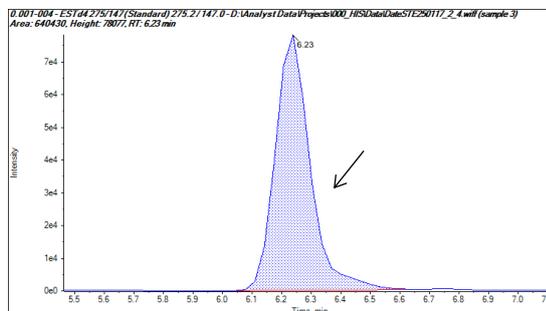
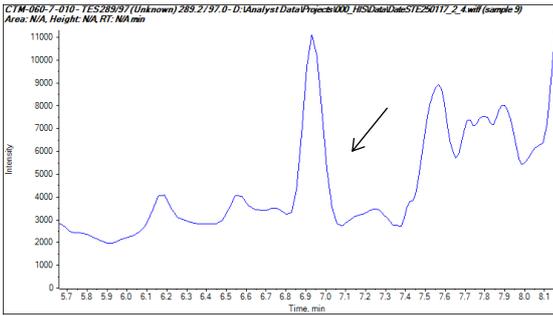


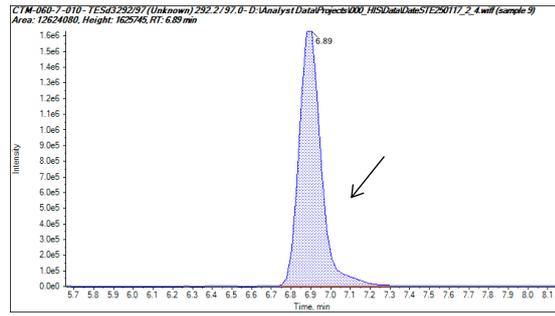
Fig3.1 17β-エストラジオールの SRM クロマトグラム(m/z 271→145)

添加濃度: 0.5 μg/kg

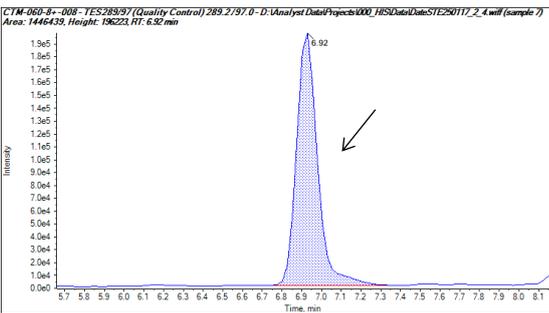
ブランク試料



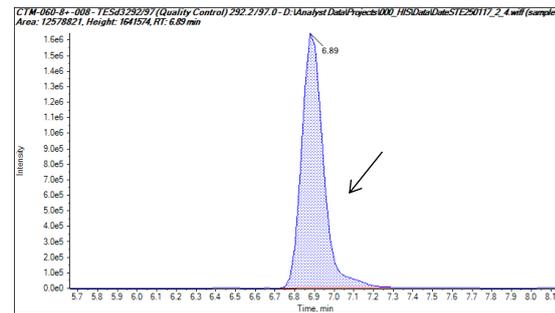
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



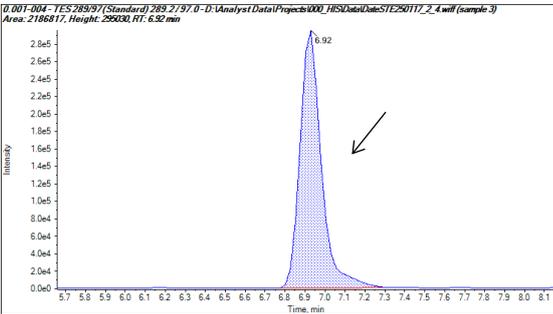
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

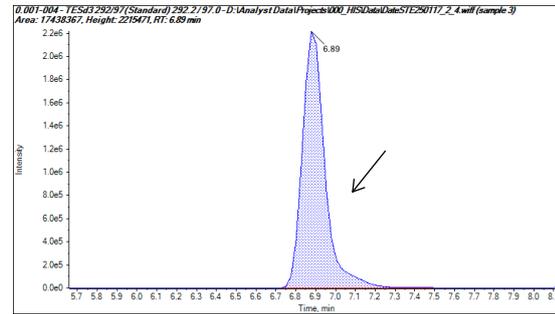
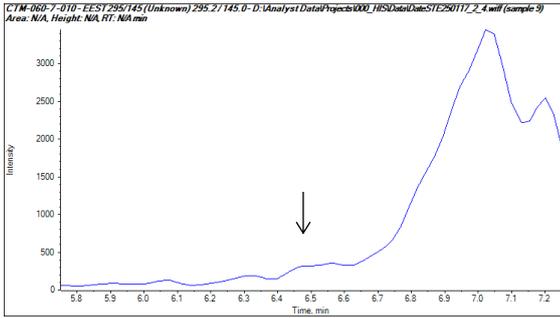


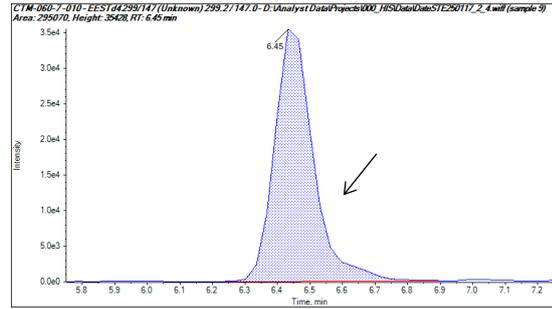
Fig3.2 17β-テストステロンの SRM クロマトグラム(m/z 289→97)

添加濃度:0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

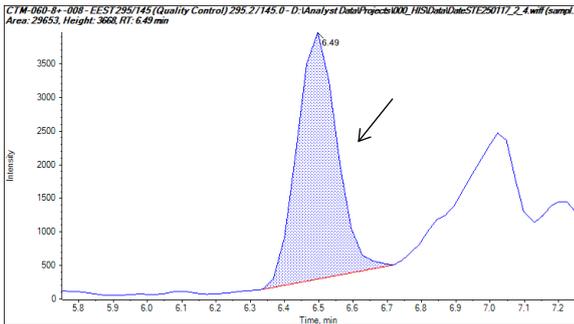
ブランク試料



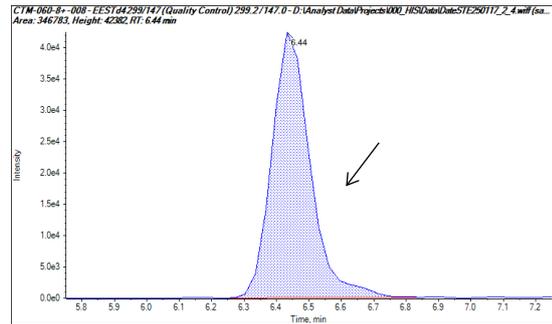
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



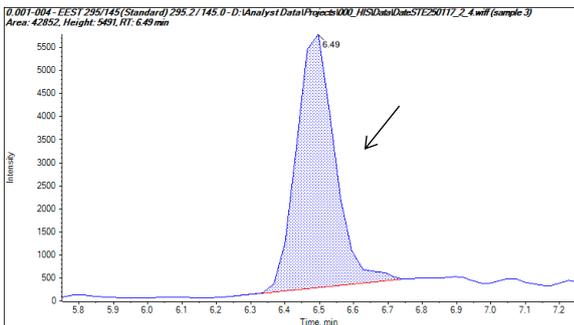
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

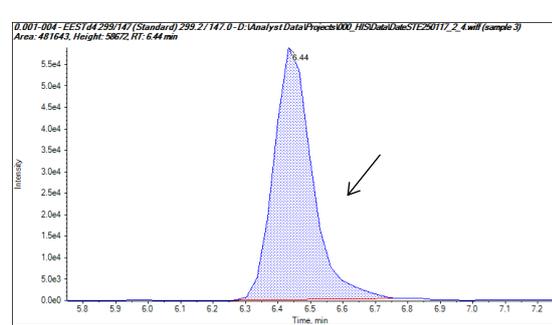
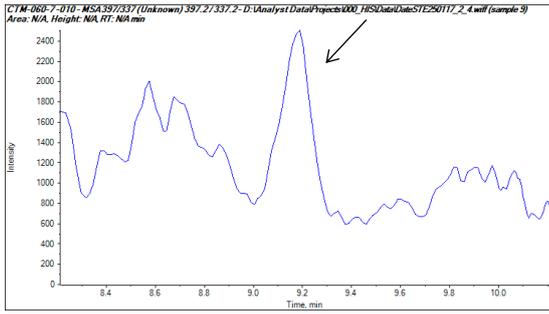


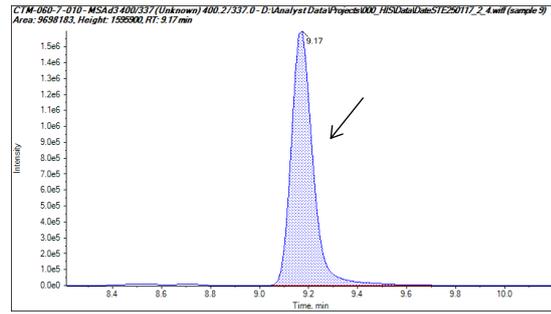
Fig3.3 エチルエストラジオールの SRM クロマトグラム(m/z 295→145)

添加濃度:0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

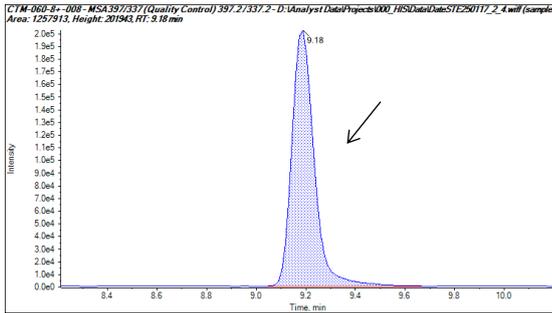
ブランク試料



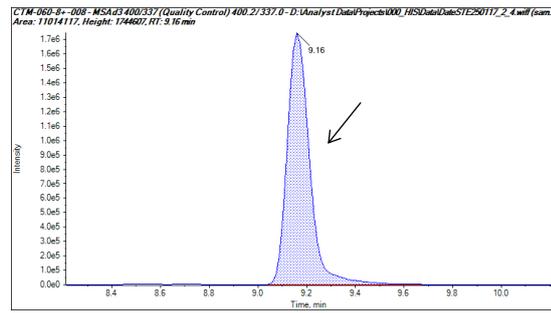
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



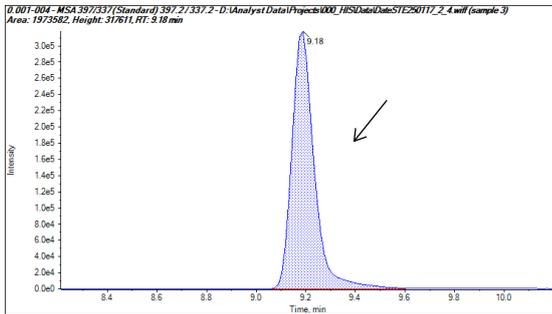
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

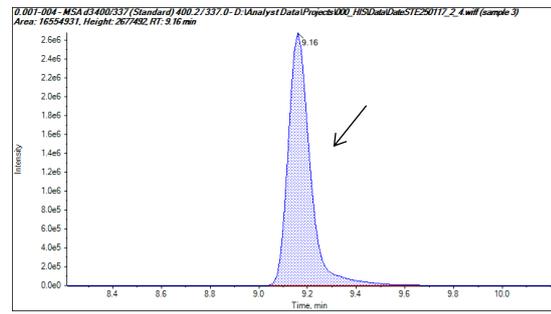
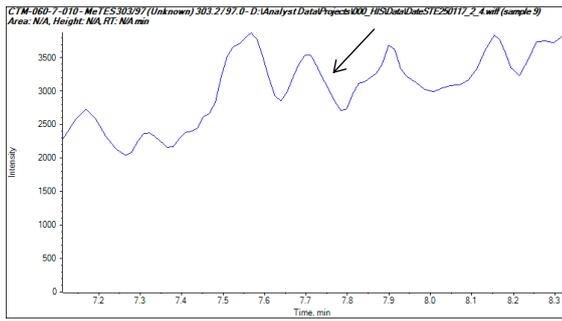


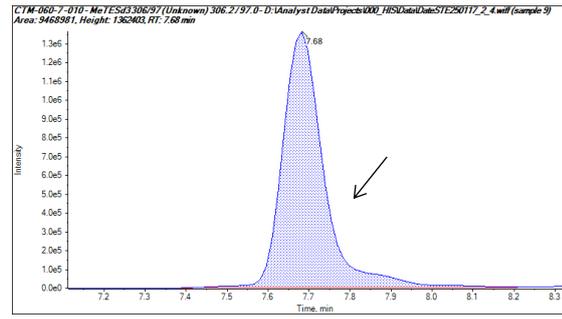
Fig3.4 酢酸メレンゲステロールの SRM クロマトグラム(m/z 397→337)

添加濃度: 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

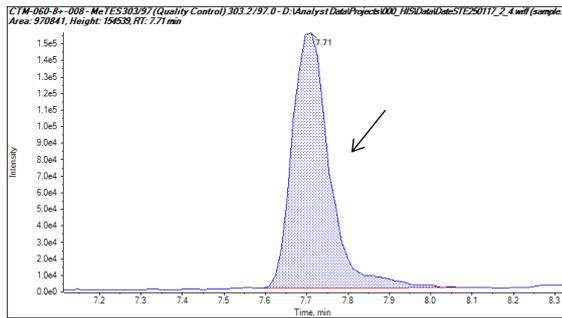
ブランク試料



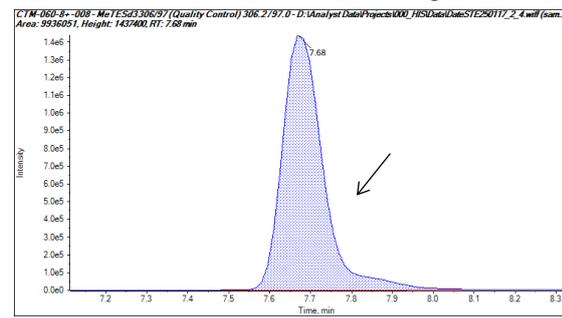
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



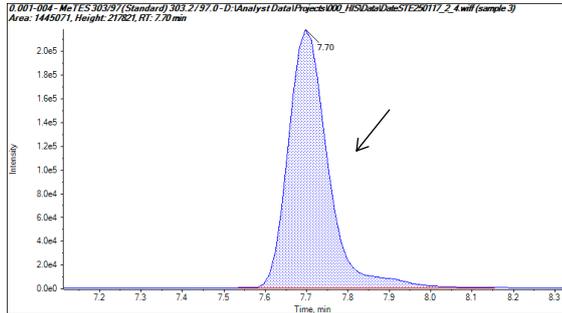
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

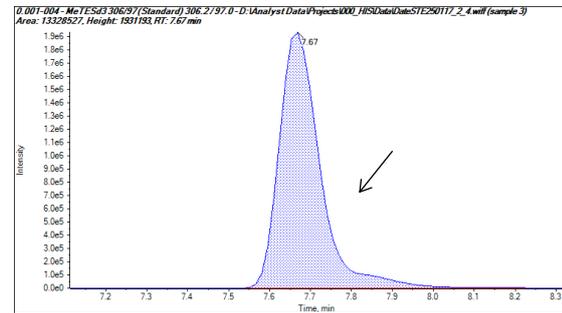
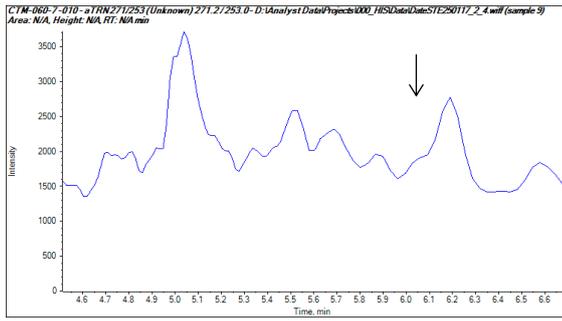


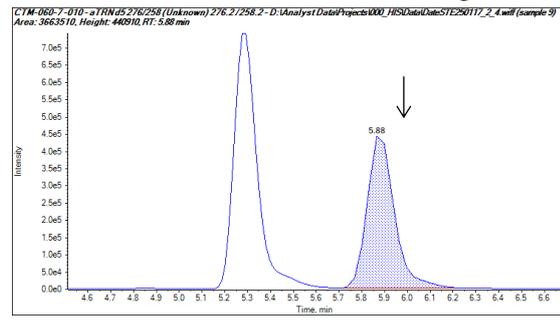
Fig3.5 メチルテストステロンの SRM クロマトグラム(m/z 303→97)

添加濃度: 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

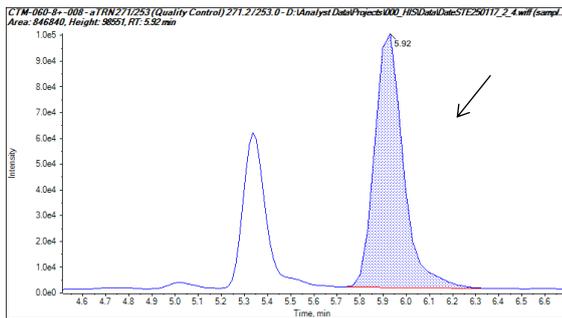
ブランク試料



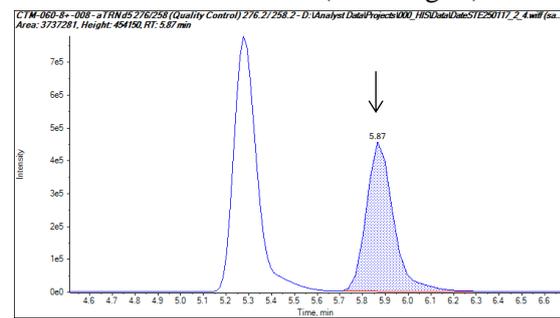
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



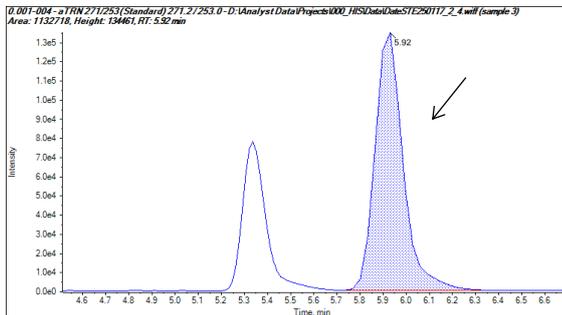
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

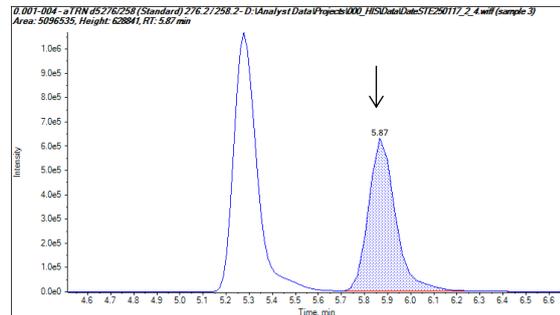
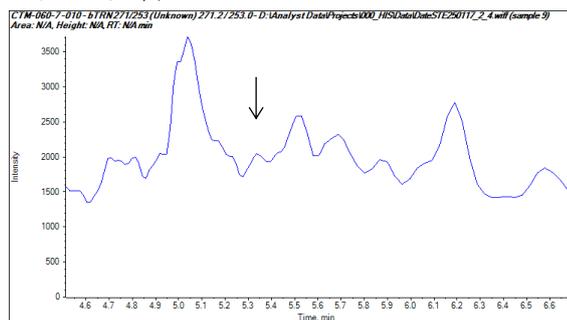


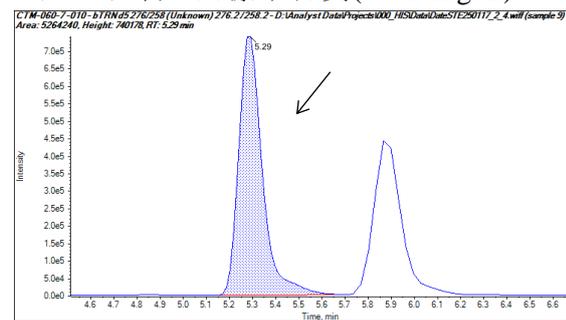
Fig3.6 α -トレンボロンの SRM クロマトグラム(m/z 271→253)

添加濃度:0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

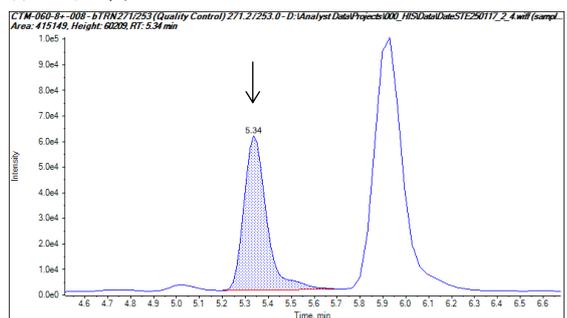
ブランク試料



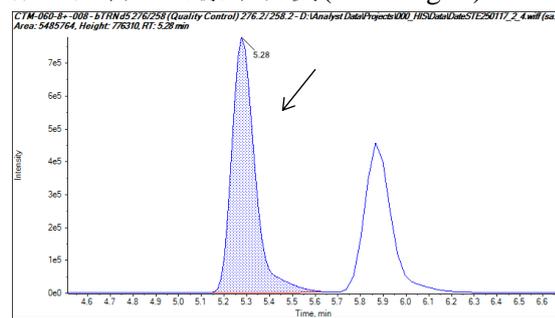
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



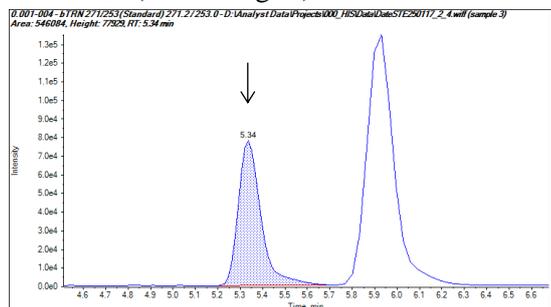
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

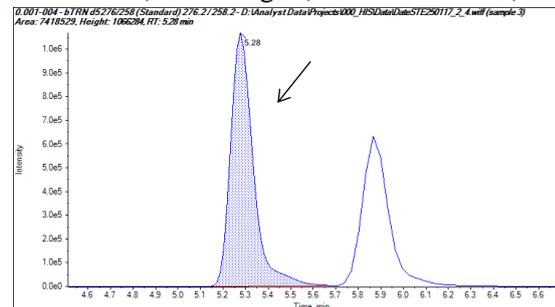
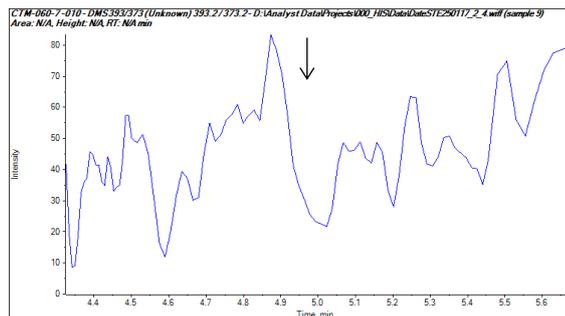


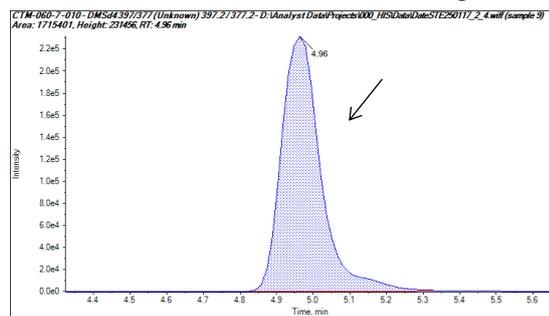
Fig3.7 β-トレンボロンの SRM クロマトグラム(m/z 271→253)

添加濃度: 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

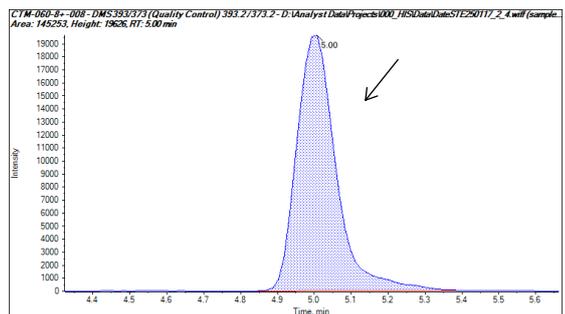
ブランク試料



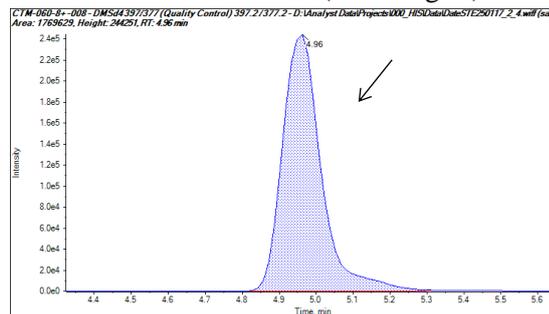
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



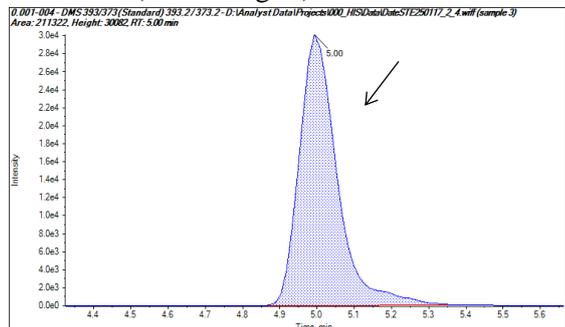
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

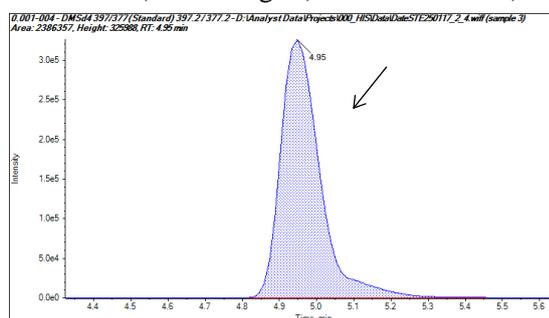
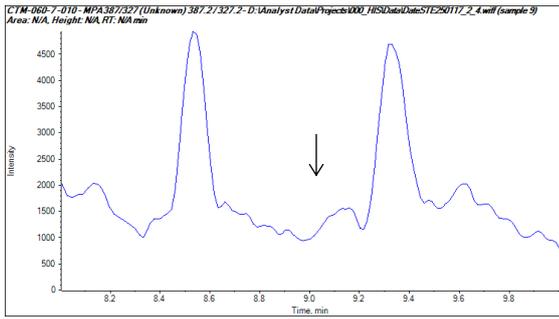


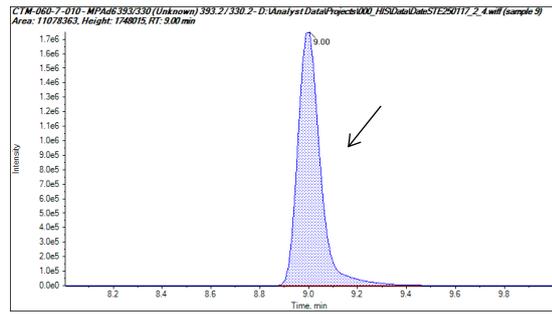
Fig3.8 デキサメタゾンの SRM クロマトグラム(m/z 393→373)

添加濃度:0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

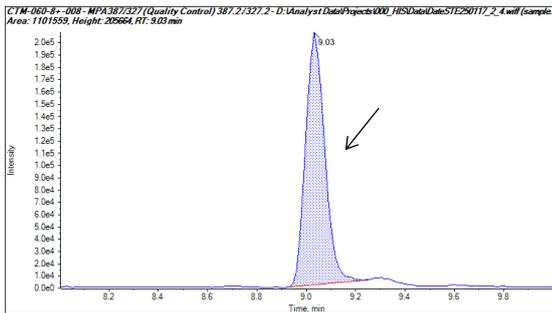
ブランク試料



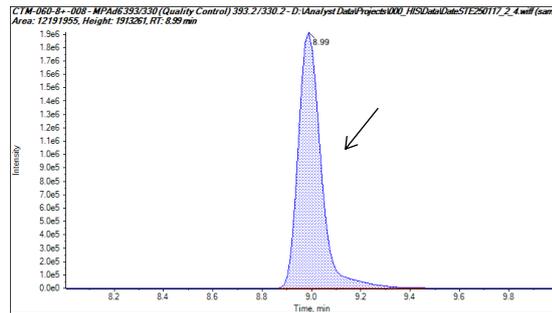
ブランク試料の内標準物質(0.01 mg/L)



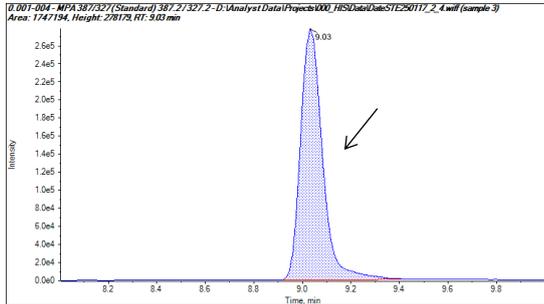
添加試料



添加試料の内標準物質(0.01 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)



標準溶液(0.001 mg/L)の内標準物質(0.01 mg/L)

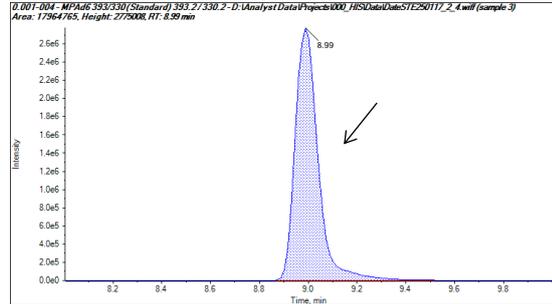
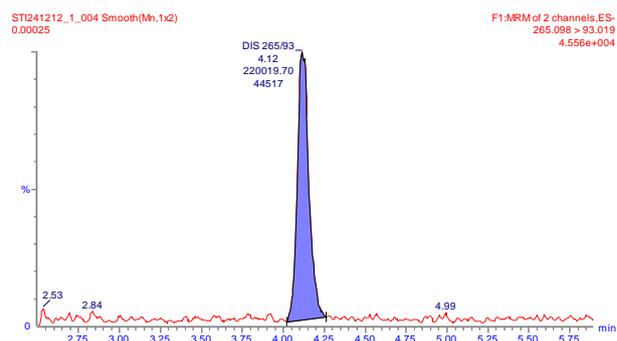
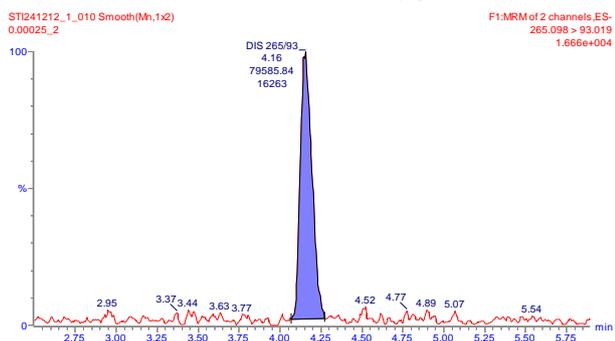


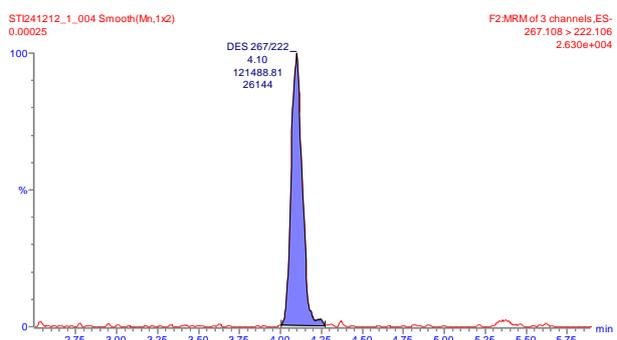
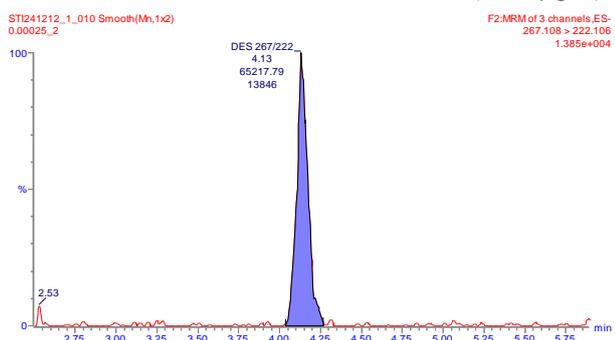
Fig3.9 酢酸メドロキシprogesteroneの SRM クロマトグラム(m/z 387→327)

添加濃度:0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ジエネストール標準溶液(0.25 µg/L)



ジエチルスチルベストール標準溶液(0.25 µg/L)



ヘキサステロール標準溶液(0.25 µg/L)

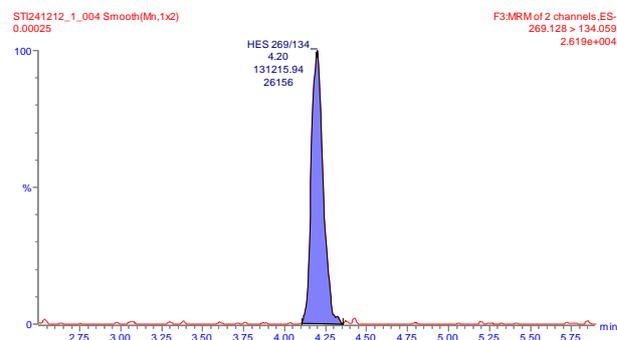
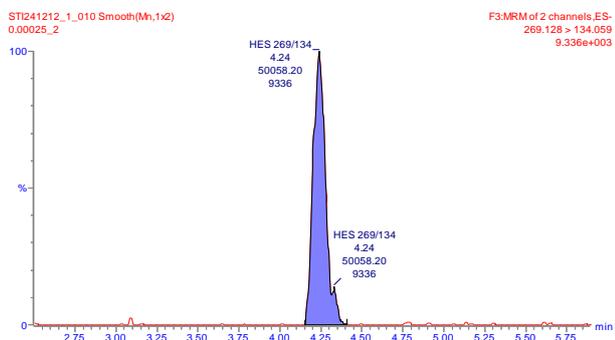


Fig4. ジエネストール(m/z 265→93)、ジエチルスチルベストール(m/z 267→222)及びヘキサステロール(m/z 269→134)の SRM クロマトグラム
左: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル(1:1)
右: 水及び酢酸の混液(10000:1)及びアセトニトリル(1:1)

Table 14.1 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及び

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況(%)

Oasis HLB(150 mg/6 mL)及び		水及びメタノールの混液(11:9)	ヘキサン	酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)		合計
Sep-Pak Plus NH2(360 mg)		0-5 mL	0-5 mL	0-10 mL	10-15 mL	
ジエネストロール	1回目	0	0	86	0	86
	2回目	0	0	95	0	95
ジエチルスチルベストール	1回目	0	0	98	0	98
	2回目	0	0	100	0	100
ヘキセステロール	1回目	0	0	102	0	102
	2回目	0	0	97	0	97

Table 14.2 親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの

溶出状況(%) (スチルベン類)

EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)及び		水及びメタノールの混液(11:9)	ヘキサン	酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)		合計
Sep-Pak Plus NH2(360 mg)		0-5 mL	0-5 mL	0-10 mL	10-15 mL	
ジエネストロール	1回目	0	0	90	4	94
	2回目	0	0	87	7	94
ジエチルスチルベストール	1回目	0	0	94	3	97
	2回目	0	0	89	5	94
ヘキセステロール	1回目	0	0	102	4	106
	2回目	0	0	90	6	96

Table 15.1 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及び

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた牛筋肉中の添加回収試験結果 (スチルベン類)

Oasis HLB(150 mg/6 mL)及び	内標準物質回収率(%)		添加回収率(%)	
	マトリックス無	マトリックス有	マトリックス無	マトリックス有
Sep-Pak Plus NH2(360 mg)				
ジエネストロール	84	78	100	106
ジエチルスチルベストール	85	53	104	113
ヘキセステロール	97	86	98	99

Table 15.2 親水性基修飾 SDB ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた

牛筋肉中の添加回収試験結果 (スチルベン類)

EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)及び	内標準物質回収率(%)		添加回収率(%)	
	マトリックス無	マトリックス有	マトリックス無	マトリックス有
Sep-Pak Plus NH2(360 mg)				
ジエネストロール	86	96	98	98
ジエチルスチルベストール	103	72	97	108
ヘキセステロール	105	103	105	106

Table 16.1 ジエネストロールの真度、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			
0.5	1回目	0.516	0.470	0.457	0.504	0.520	0.491	98.3	2.1	5.9
	2回目	0.513	0.448	0.474	0.489	0.522				

Table 16.2 ジエチルスチルベストロールの真度、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			
0.5	1回目	0.453	0.434	0.448	0.437	0.513	0.471	94.2	4.5	7.0
	2回目	0.487	0.471	0.468	0.469	0.532				

Table 16.3 ヘキサステロールの真度、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			
0.5	1回目	0.480	0.483	0.514	0.465	0.523	0.499	99.7	4.3	7.8
	2回目	0.482	0.525	0.549	0.428	0.538				

Table 17 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	試料名	定量限界 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	基準値 (ppm)	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	標準溶液 濃度 ¹⁾ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	ピーク面積(高さ) ²⁾							備考		
							面積又は 高さの別	ブランク ³⁾	マトリックス添加標準溶液 ⁴⁾			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁵⁾	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2			平均
1	ジエネストロール	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.25	面積	0	86446	89566	88006	88363	89012	88688	0.99	
2	ジエチルスチルベストロール	牛の筋肉	0.5	不検出	0.5	0.25	面積	0	37793	38839	38316	34431	39187	36809	1.04	
3	ヘキサステロール	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.25	面積	0	27962	25882	26922	27437	28679	28058	0.96	

*1 添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

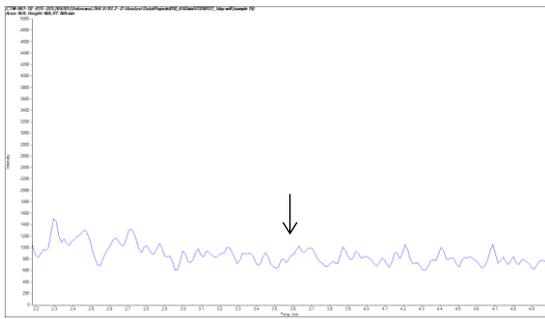
*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

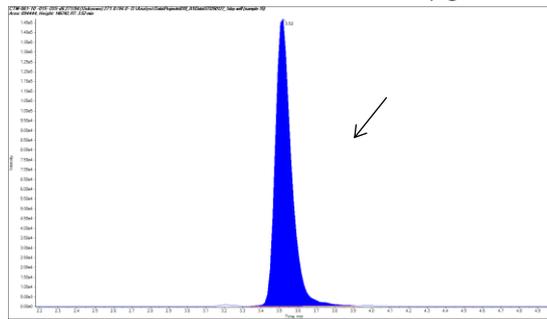
*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

代表的なクロマトグラム

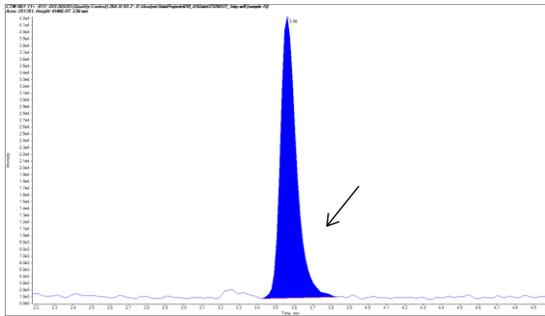
ブランク試料



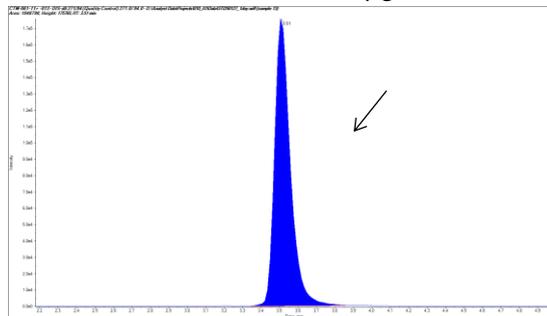
ブランク試料の内標準物質(1.25 µg/L)



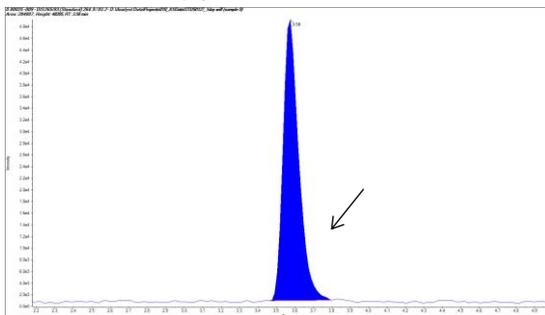
添加試料



添加試料の内標準物質(1.25 µg/L)



標準溶液(0.25 µg/L)



標準溶液(0.25 µg/L)の内標準物質(1.25 µg/L)

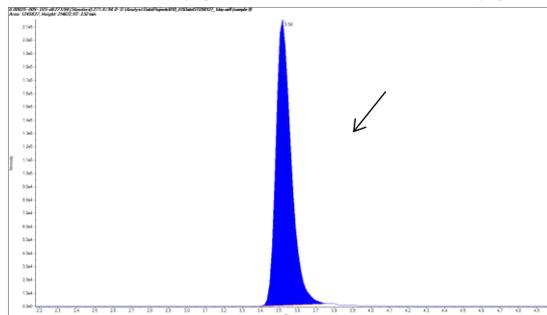
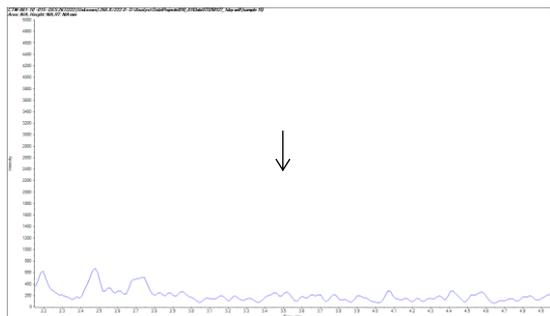


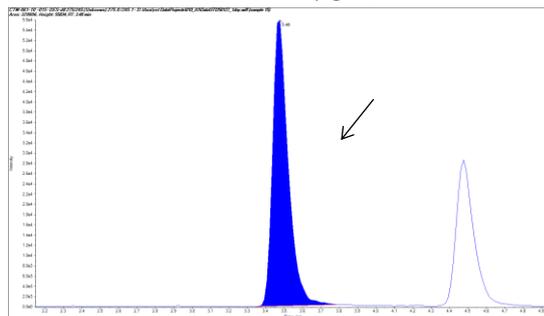
Fig5.1 ジエネストールの SRM クロマトグラム(m/z 265→93)

添加濃度:0.5 µg/kg

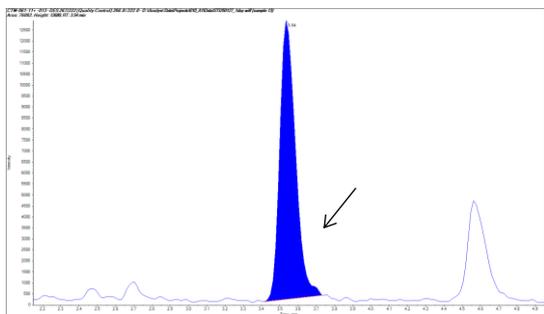
ブランク試料



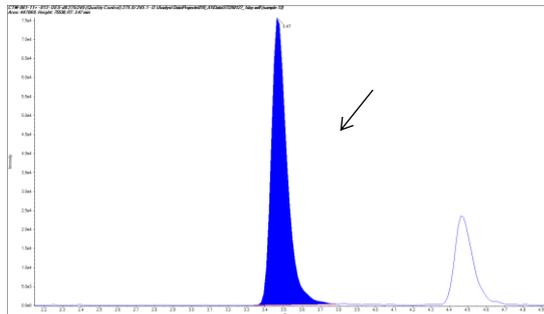
ブランク試料の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)



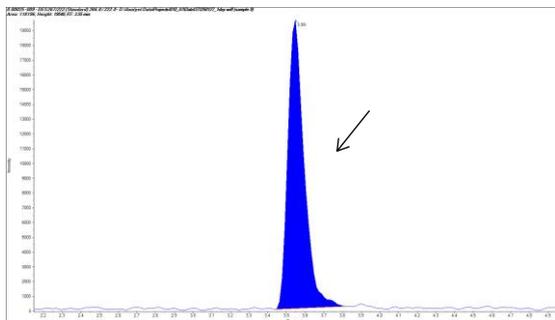
添加試料



添加試料の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.25 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.25 $\mu\text{g/L}$)の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)

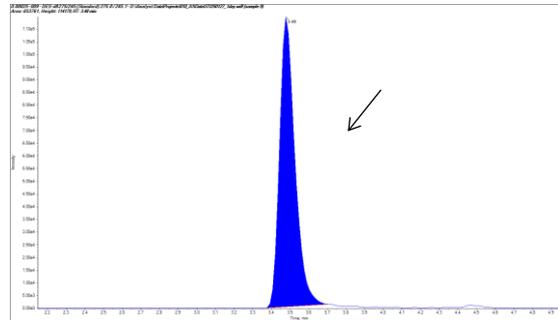
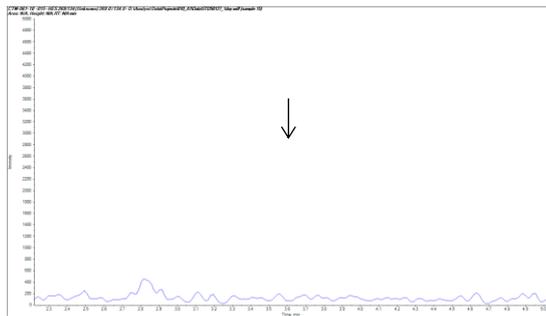
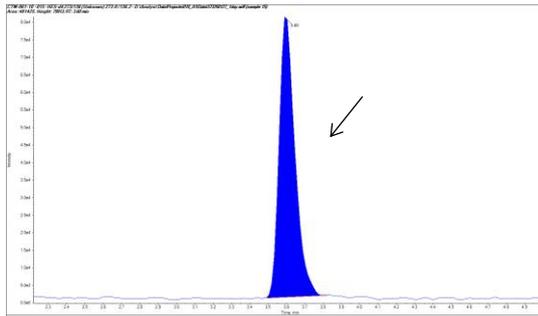


Fig5.2 ジエチルスチルベストールの SRM クロマトグラム(m/z 267 \rightarrow 222)
添加濃度:0.5 $\mu\text{g/kg}$

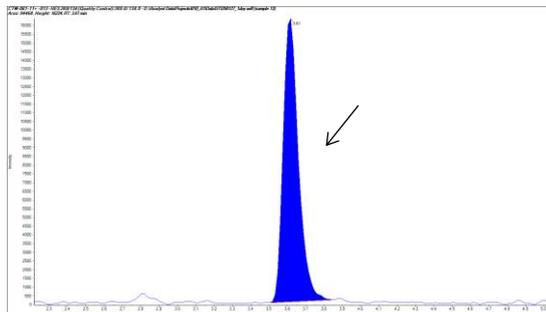
ブランク試料



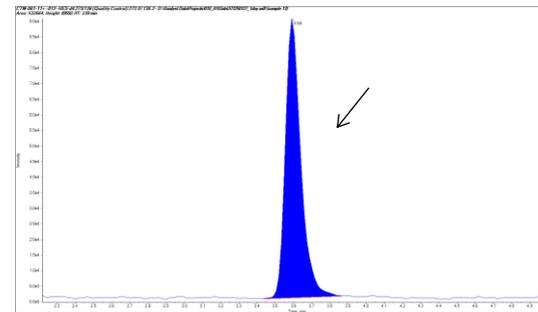
ブランク試料の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)



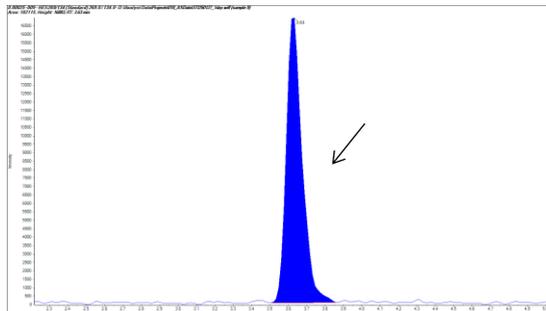
添加試料



添加試料の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.25 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.25 $\mu\text{g/L}$)の内標準物質(1.25 $\mu\text{g/L}$)

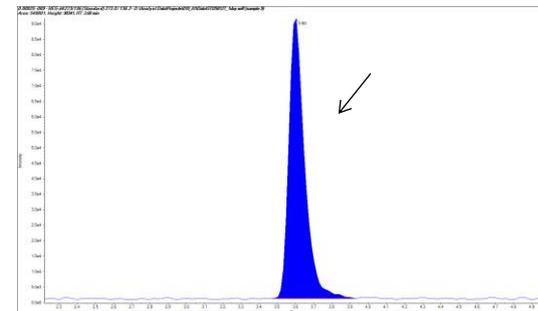


Fig5.3 ヘキサステロールの SRM クロマトグラム(m/z 269 \rightarrow 134)
添加濃度:0.5 $\mu\text{g/kg}$

Ⅱ. 分担研究報告

2. 牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

研究分担者 工藤由起子

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)

令和6年度 分担研究報告書

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

研究分担者 工藤由起子 星薬科大学

研究要旨：

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減のための研究を実施した。

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査では、2024年9月から4施設の協力のもとに牛枝肉合計 108 検体から7血清群(026、045、0103、0111、0121、0145、0157)の STEC およびサルモネラ属菌を対象とした調査を行った。また、このうち3施設については衛生指標として生菌数についても測定を行った。供試検体を増菌培養後、または施設にて増菌培養した培養液の二次増菌培養後、STEC7血清群マルチプレックスリアルタイム PCR およびサルモネラ特異的リアルタイム PCR に供試した。スクリーニングを行い、陽性になった検体については菌分離を行った。分離された株については生化学的性状試験および血清型別を行った。この結果、1検体(0.9%)からサルモネラ属菌が分離されたが、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。なお、STEC7血清群は検出されなかった。また、

2. MLG 掲載または第3者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行では、菌液および菌添加牛肉培養液からのキットを用いた DNA の抽出および検出を実施した。今後、より詳細な使用手順が整備されることによって、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられた。

研究協力者

岩手県食肉衛生検査所

阿部嘉智

栃木県食肉衛生検査所

関口明子

大分県食肉衛生検査所

吉田史子

日本フードパッカー株式会社

星薬科大学

本多伽衣、天野壮俊、鏡山雅人、内場健斗、

大塚佳代子、奥 輝明、築地 信

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、米国への輸出においては、米国の示す腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌 *Shiga toxin-producing Escherichia coli*; STEC）およびサルモネラ属菌の検査が必要である。対米輸出食肉取扱施設や食肉検査所では、牛肉の腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌の検査を輸出先国の試験法で実施している。本研究では、一定の方法で腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌が陽性ではない検体でも汚染リスクが潜むことを考え、より精度高く腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌の検出指標を変えて検体の汚染リスクを検討した。令和5年度には、各食肉衛生検査所での牛肉検体培養液を研究班に送付としたが、陽性検体は認められなかった。一方、令和2年度から4年度に実施した各食肉衛生検査所で滅菌ガーゼを枝肉表面に密着させて回収する方法では複数検体から腸管出血性大腸菌 0157 が分離された。このことから今年度は滅菌ガーゼを密着させ回収したガーゼを検体とすることにした。結果について、処理工程の改善検討等に役立てられることを期待して、即時にフィードバックすることとした。

また、対米輸出食品での試験法は、MLG掲載 (<https://www.fsis.usda.gov/news-events/publications/microbiology-laboratory-guidebook>) または第3者認定を受けた方法 (https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/documents/Validated-Test-Kit.pdf) が認

められており、それらは国内試験法とは異なるため知識や手技の高度な習得が必要である。2024年9月には、MLG 5C.04 (https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/documents/MLG-5C.04.pdf) の更新があり、特に、遺伝子スクリーニング法が変更になったため、その方法と第3者認定を受けた方法のうち国内流通可能な方法について、今年度から食肉衛生検査所での導入の参考になる試行を開始した。

B. 研究方法

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

2024年9月から2025年3月に国内の食肉衛生検査所4ヶ所にて、ウシ108頭からサンプリングを行った。

試験に供試されたウシの種類と月齢を表1-1に示す。

(1) と畜場での作業

3施設において、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検体の採取を行った。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、冷蔵で保存し、宅配便 (冷蔵) によって星薬科大学へ送付した。合計99検体であった。

なお、別の1施設については、当該施設での STEC 試験に伴い発生する培養液残液9検体を宅配便 (冷蔵) によって星薬科大学へ送付した。

(2) STEC・サルモネラ属菌検出法および生菌数測定

1) 検体の調製

枝肉に密着させたガーゼ検体 (99 検体) は、試験に使用するまで冷蔵で保管された。サンプリングバッグを無菌的に開封し、Modified tryptone soya broth (mTSB) 300 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 37 mL 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^{-2} 希釈液まで作製し、検体液原液は 0.2 mL ずつを標準寒天培地 5 枚に塗抹し、 10^{-1} および 10^{-2} 希釈液については 0.1 mL ずつを標準寒天培地にそれぞれ 2 枚ずつ塗抹し、37℃ で 48 時間培養後、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。また、食肉衛生検査所 1 施設から分与された培養液残液の検査方法の流れを図 1-2 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。また、食肉衛生検査所 1 施設から分与された培養液残液については、培養液残液 2 mL を Tryptone soya broth (TSB) 8 mL に添加して 42℃ で 18 時間培養 (二次増菌培養) した。この培養液の DNA 抽出液をリアルタイム 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。最終的に滅菌リン酸緩衝液 (PBS) 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 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培地またはセフィキシム・亜テルル酸加クロモアガーSTEC (CT-クロモアガーSTEC) 培地に塗抹した。これらを 36±1℃で 18-24 時間培養し、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 (PH8) 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 血清型を抗血清を用いて H 血清型を決定した。

(3) サルモネラ属菌の検出方法

検出方法の流れを図 1-3、図 1-4 に示す。

1) 試験検体

STEC 試験で調製した mTSB 培養液 99 検体および 1 施設での STEC 試験に伴い発生する培養液残液の二次増菌培養 9 検体を供した。

2) 検体の増菌培養液または培養液残液の二次増菌培養からの DNA 抽出

STEC 試験で抽出した培養液からの DNA 抽出液を以下に示すリアルタイム PCR のテンプレートとして用いた。

3) サルモネラ属菌特異的遺伝子の検出

プライマーセット (*ttr*/16S) ではサルモネラ属菌特異的 *ttr* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子を検出する。16S rRNA 検出用プライマーおよびプローブは、表 1-3-2 に示した 16S Assay2 と同じ配列を用いた。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 1-4 に示す。反応溶液の組成および量を表 1-5 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。*ttr* 遺伝子がない場合はサルモネラ属菌陰性とした。

4) 選択培地を用いたサルモネラ属菌の分離

3) で *ttr* 遺伝子が陽性だった検体の増菌培養液または培養液残液の二次増菌培養 0.5 mL をテトラチオネート (TT) 培地 10 mL に、同液 0.1 mL を Rappaport-Vassiliadis R10 (RV) 培地 10 mL に接種し、42℃で 18-24 時間培養した。TT 培地および RV 培地での培養液を攪拌後、1 白金耳を DHL 寒天培地および CHROMagar Salmonella にそれぞれ画線塗抹し、35℃で 18-24 時間培養した。DHL 寒天培地と CHROMagar Salmonella に単離された疑わしいコロニーを観察し、DHL 寒天培地は黒色 (H_2S 陽性)、CHROMagar Salmonella は紫色コロニーを選択した。疑わしいコロニーがある場合は、各プレート 2 コロニー以上を目安として Tryptone Soya Agar (TSA) へ画線塗抹すると同時に、4 分画した DHL 寒天培地と CHROMagar

Salmonella にもそれぞれ画線し、35°Cで18～24時間培養した。コロニーの密集によって単離が難しい場合は、DHL寒天培地あるいはCHROMagar Salmonellaへ適宜画線塗抹し単離した。典型的なコロニーが認められない平板は、陰性と判断した。

5) サルモネラ属菌の同定

TSA上のシングルコロニーを用いて、デンカ生研の「サルモネラLA」で凝集試験を行った。凝集試験陽性のコロニーは、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)に、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)に培養して、生化学的性状試験を行った。

6) 血清型別試験

サルモネラ属菌と同定された菌株は、サルモネラ免疫血清「生研」(O群, Vi血清)とサルモネラ免疫血清「生研」H血清を用いて血清型を決定した。

7) サルモネラ属菌の汚染菌数の定量

定量的な検出方法の流れを図1-5に示す。

上記の菌株が、サルモネラ属菌であった場合、4°Cで保存しておいた培養前の検体液を用いて、MPN測定(3本法)を行った。mTSBを用いて希釈段3段とし、37±1°Cで15-24時間培養した。前培養液はTT培地およびRV培地で選択増菌培養し、4) 選択培地を用いたサルモネラ属菌の分離に従った。

2. MLG掲載または第三者認定を受けたSTEC

スクリーニング方法についての試行

(1) 試薬キットおよび機器

GENE-UP 試薬シリーズのSTEC検出キット

(bioMérieux [フランス]、ビオメリュー・ジャパン国内対応)を使用した。なお、機器は専用機器を使用した。

STEC検出キット[検出対象: *Escherichia coli* 0157:H7 & non-0157 STEC Top 6]には、以下を使用した。

- GENE-UP LYSIS KIT [用途: 試料液中の検出対象微生物細胞の溶菌]
- GENE-UP STEC STX & EAE (EH1) [検出対象: STEC (*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子)]
- GENE-UP *E. coli* 0157:H7 (EC0) [検出対象: *E. coli* 0157:H7]
- GENE-UP Pathogenic *E. coli* (PEC) [検出対象: EHEC (*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子との共局在と高い相関性のある病原因子遺伝子)]
- GENE-UP STEC-TOP 6 (EH2) [検出対象: *E. coli* 026, 045, 0103, 0111, 0121, 0145]

(2) 検体作製

1) 菌株および牛肉の培養

腸管出血性大腸菌(血清群026: 2株、045: 1株、0103: 1株、0111: 1株、0121: 1株、0145: 1株、0157: 2株)をTrypticase soy broth (TSB)中にて37°Cで18時間培養した。また、市販の牛スライス肉を9倍量のmTSB中にて42°Cで18時間培養した。

2) 菌希釈検体の作製

各菌株の培養液を滅菌リン酸緩衝液(PBS)にて 10^{-7} まで10倍階段希釈し、菌液を作製した。また、それら10倍階段希釈菌液を9倍量の牛肉培養液にて10倍希釈し、菌添加牛肉培養液を作製した。

3) 菌数測定

PBSで希釈した 10^{-7} および 10^{-6} 希釈菌液0.1 mLをTSAに塗抹し、37°Cで18時間培養

し、生育したコロニー数を測定し、菌液の菌数を算出した。

(3) 菌液および菌添加牛肉培養液からのキットを用いた DNA の抽出および検出
各キットの使用手順に従って、実施した。

C. 研究結果

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

(1) 生菌数

調査した検体 99 頭のうち 55 頭の検体から生菌数が測定され、その平均は $1,704.6 \pm 10,772.1$ (平均 \pm SD) CFU/cm² であった (表 1-6)。

雌雄で比較すると、オスの 57 頭は 61.7 ± 117.3 CFU/cm² であるのに対して、メスの 27 頭では $3,408.4 \pm 15,331.9$ CFU/cm² であった (表 1-6)。

ウシの種類別で比較すると、ホルスタインの平均値が $4,669 \pm 17,755.4$ CFU/cm² で最も多く、次いで交雑種、黒毛和種、日本短角種の 12.9 ± 35.9 CFU/cm²、 12.3 ± 21.6 CFU/cm²、 3.2 ± 3.2 CFU/cm² であった。ホルスタインは、生菌数 100 CFU/cm² を超えるウシが 16 頭、1,000 CFU/cm² を超えるウシが 4 頭、約 80,000 CFU/cm² のウシが 1 頭含まれていた。

施設別の生菌数の結果を表 1-7 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 C 施設であった。平均生菌数は $4,455.6 \pm 17,333.5$ CFU/cm² であり、100 CFU/cm² を超えるウシが 13 頭、1,000 CFU/cm² を超えるウシが 3 頭であった。

月別で算出した生菌数の結果を表 1-8 に示す。10 月が最も高く

$8,859.0 \pm 26,544.3$ 、次いで 11 月が $1,240.4 \pm 3,388.2$ であった。両月の平均生菌数が高いのは、C 施設のホルスタインで、10 月採取のウシ 1 頭が約 80,000 CFU/cm²、11 月採取のウシ 1 頭が約 10,000 CFU/cm² であったことによる。

(2) STEC7 血清群の分離

定性的な検出を図 1-1 および図 1-2 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 1-9 に示す。供試検体 108 検体のうち、11 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 4 検体であった。この 4 検体のうち 1 検体が STEC 7 血清群の 045 で陽性となり、Ct 値は 29.7 であった (検体番号 24-105)。

リアルタイム PCR で *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子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 1-10 に示す。検体番号 24-105 から分離された菌株は、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子を保有せず、045 血清群のみを保有していた。この検体は、生菌数が 33.2 CFU/cm² で、ホルスタイン種の 19 ヶ月齢から採取された。

(3) サルモネラ属菌の検出

定性的な検出を図 1-3 および図 1-4 に示すように行い、増菌培養液が *ttr* 遺伝子陽性となった検体は 1 検体 (検体番号 24-27) で、CT 値は 35.6 であった (表 1-9)。

ttr 遺伝子陽性となった検体番号 24-27 の培養液から分離した菌株は、TSI 寒天培地で斜面赤色、高層黄色、硫化水素産生、LIM 培地でリジン陽性、インドール陰性、運動性

陽性の典型的なサルモネラ属菌の性状を示した(表1-11)。血清型は、*Salmonella* Dublinであった(表1-12)。

検体番号24-27の検体は、10月に黒毛和種のオス、30ヵ月齢から採取された(表1-12)。

(4) サルモネラの定量

定性試験で *Salmonella* Dublin が分離された検体番号 24-27 の検体については、定量的な試験を行った(図1-5)。MPN法(3本法)での定量結果を表1-12に示す。検体の生菌数は3.3 CFU/cm²、サルモネラMPNは3未満/試験液100mLであり、ガーゼ表面積100 cm²あたり0.33MPN未満であった。

2. MLG掲載または第3者認定を受けたSTECスクリーニング方法についての試行実施結果については、別途とりまとめた。

D. 考察

1. 牛枝肉のSTECおよびサルモネラ属菌調査

本調査では牛枝肉からガーゼを用いた99検体および培養液残液9検体(合計108検体)からはSTECは分離されなかった。リアルタイムPCRで *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、045血清群いずれも陽性となった培養液が1検体あったが、分離できた菌株は045血清群のみ陽性で、STECではなかった。より効果的な分離方法の検討が必要であると考えられる。

一方、108検体中1検体から *Salmonella* Dublin が分離された。令和5年度に行った同様の調査では、サルモネラ属菌は検出されていない。また、令和2年度から4年度の調査ではサルモネラ属菌は検出対象でなかったため、今回の調査で検出されたこと

は今後の牛肉の衛生管理において重要な対象となることが考えられる。ただし、今回のサルモネラ定量試験において、MPN法により、検出限界以下であったことから、汚染濃度は低いことが推察される。

測定された生菌数は施設の影響が大きいと考えられた。生菌数の多かった施設は、調査した21検体中すべてから生菌数が検出され、また牛の種類は殆どがホルスタインであった。令和2年度から4年度の調査において、ホルスタインの平均生菌数は、各々2.9 CFU/cm²、130.3 CFU/cm²、1,948.7 CFU/cm²であったのに比べると、今年度4,669.1 CFU/cm²と高かった。

この理由として、特に施設Cの生菌数(表1-7)が高かったことが影響したと考えられた。

2. MLG掲載または第3者認定を受けたSTECスクリーニング方法についての試行

本キットシリーズは、STEC7血清群が効率的に検出できるコンセプトになっていることが確認された。今後、より詳細な使用手順が整備されることによって、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられる。

E. 結論

牛肉のSTECおよびサルモネラ属菌汚染リスク低減のための研究を実施した。1. 牛枝肉のSTECおよびサルモネラ属菌調査では、2024年9月から4施設の協力のもとに牛枝肉合計108検体から7血清群(026、045、0103、0111、0121、0145、0157)のSTECおよびサルモネラ属菌を対象とした調査を行った。また、このうち3施設については衛生指標として生菌数についても測

定を行なった。供試検体を増菌培養後、または施設にて増菌培養した培養液の二次増菌培養後、STEC7血清群マルチプレックスリアルタイム PCR およびサルモネラ特異的リアルタイム PCR に供試した。スクリーニングを行い、陽性になった検体については菌分離を行った。分離された株については生化学的性状試験および血清型別を行った。この結果、1検体(0.9%)からサルモネラ属菌が分離されたが、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。なお、STEC7血清群は検出されなかった。また、2. MLG掲載または第3者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行では、菌液および菌添加牛肉培養液からのキットを用いた DNA の抽出および検出を実施した。今後、より詳細な使用手順が整備されることによって、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられた。

F. 研究発表

(誌上発表)

Hirose, S., Tomaru, A., Akiyama, H., Hara-Kudo, Y. Effective decontamination methods for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on beef carcass surfaces for application in beef carcass hygiene. J. Food Prot. 2024 Nov;87(11):100366.
doi: 10.1016/j.jfp.2024.100366.

(学会発表)

Ikeuchi, S. Hirose, S., Chiba, Y., Akiyama, H., Hayashidani, H., and Hara-Kudo, Y. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* contamination on the surfaces of beef carcasses in slaughterhouses in Japan. IAFP Annual Meeting 2024. 2024年7月15日 米国.

G. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

定性的検出

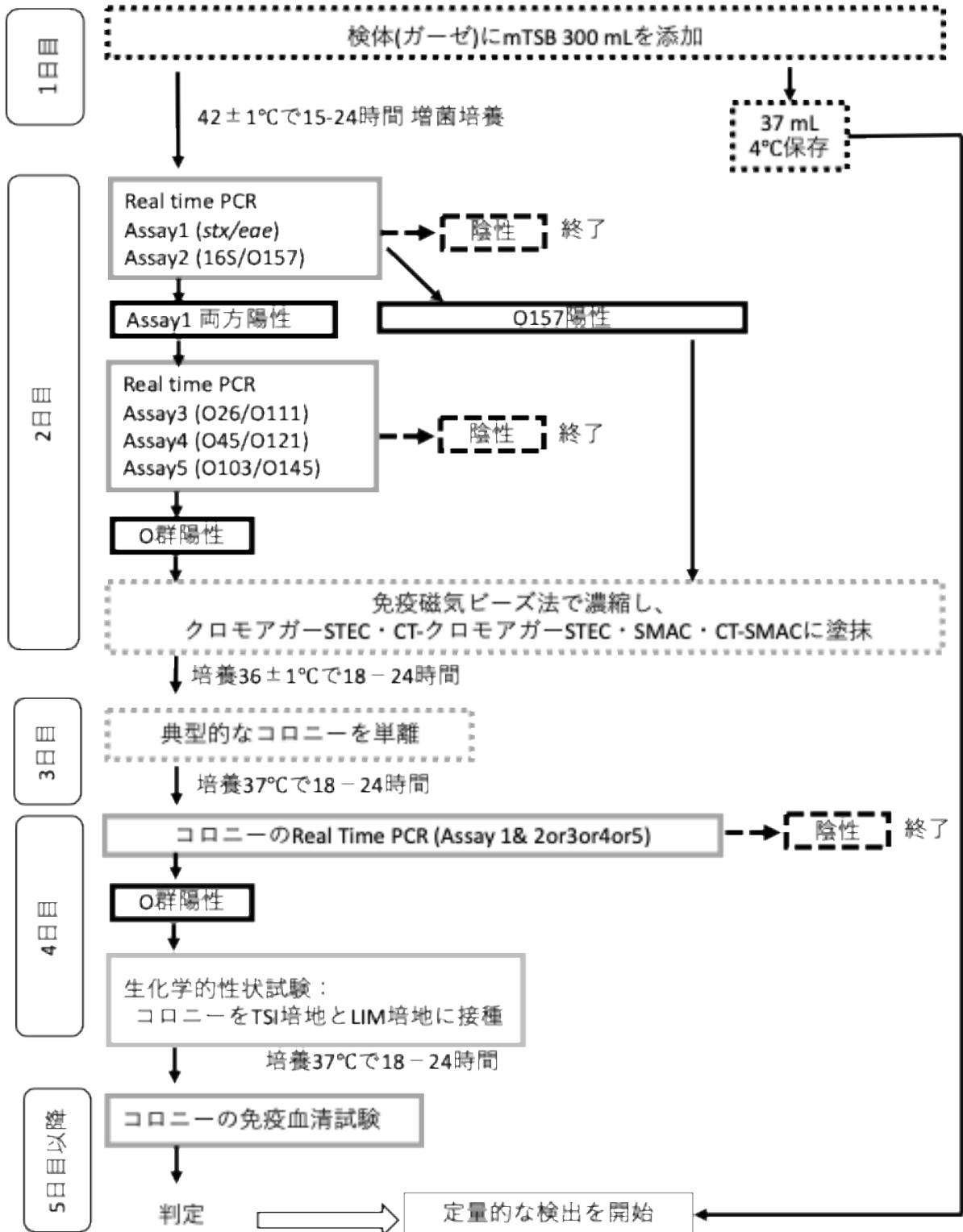


図1-1 志賀毒素産生性大腸菌 (STE^C) の定性的な検出方法

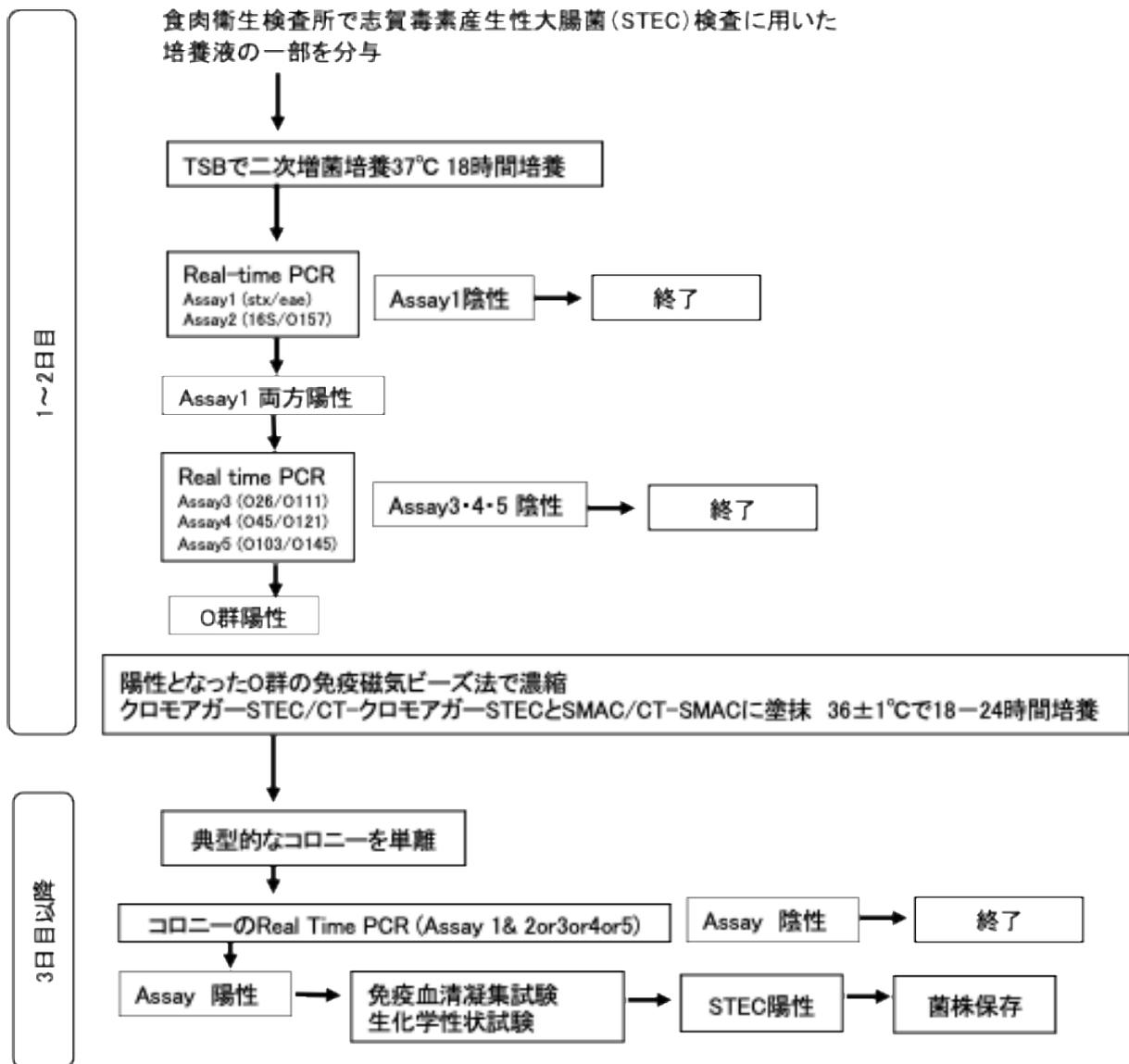


図1-2 志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の検出・分離方法

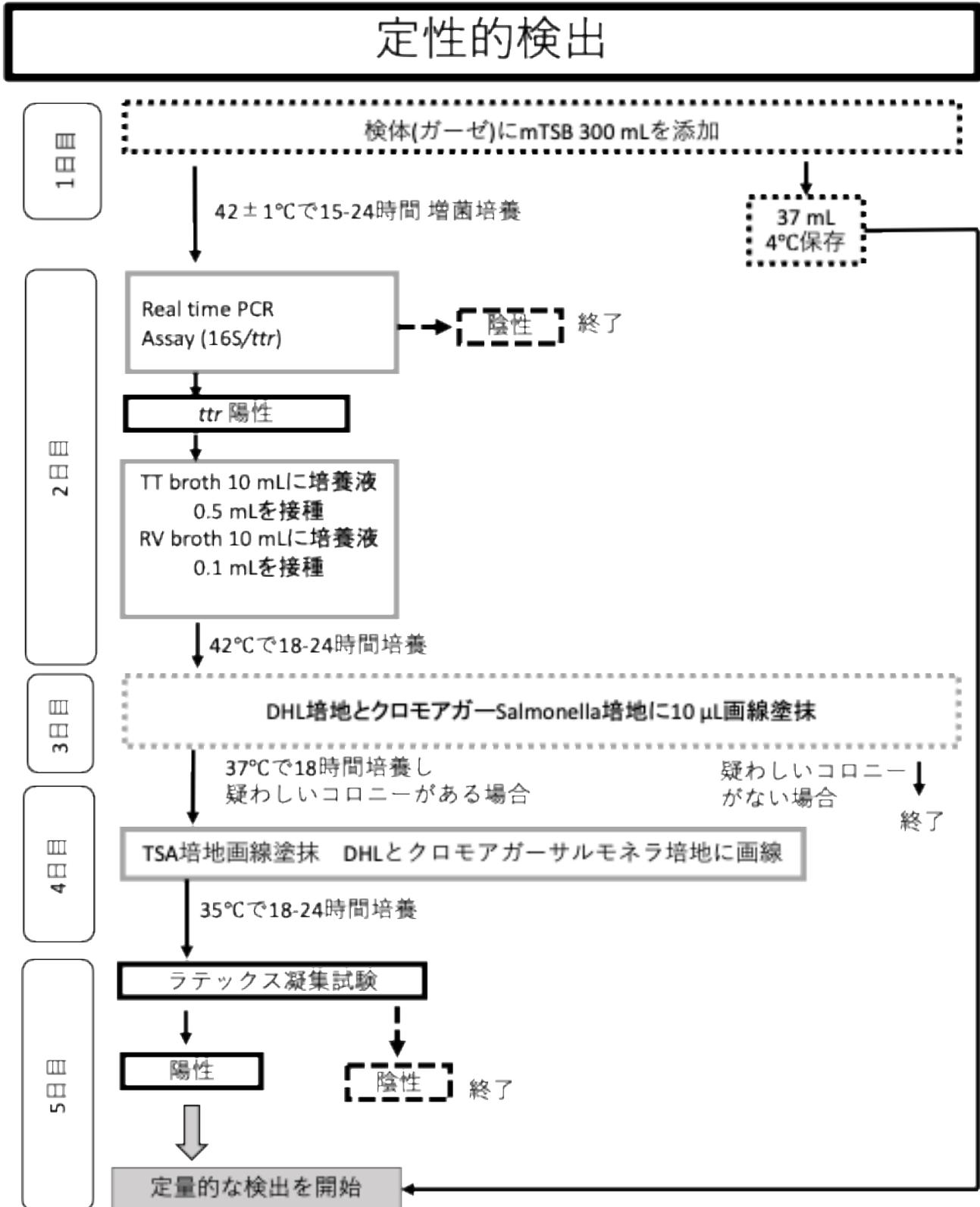


図1-3. サルモネラ属菌の定性的な検出方法

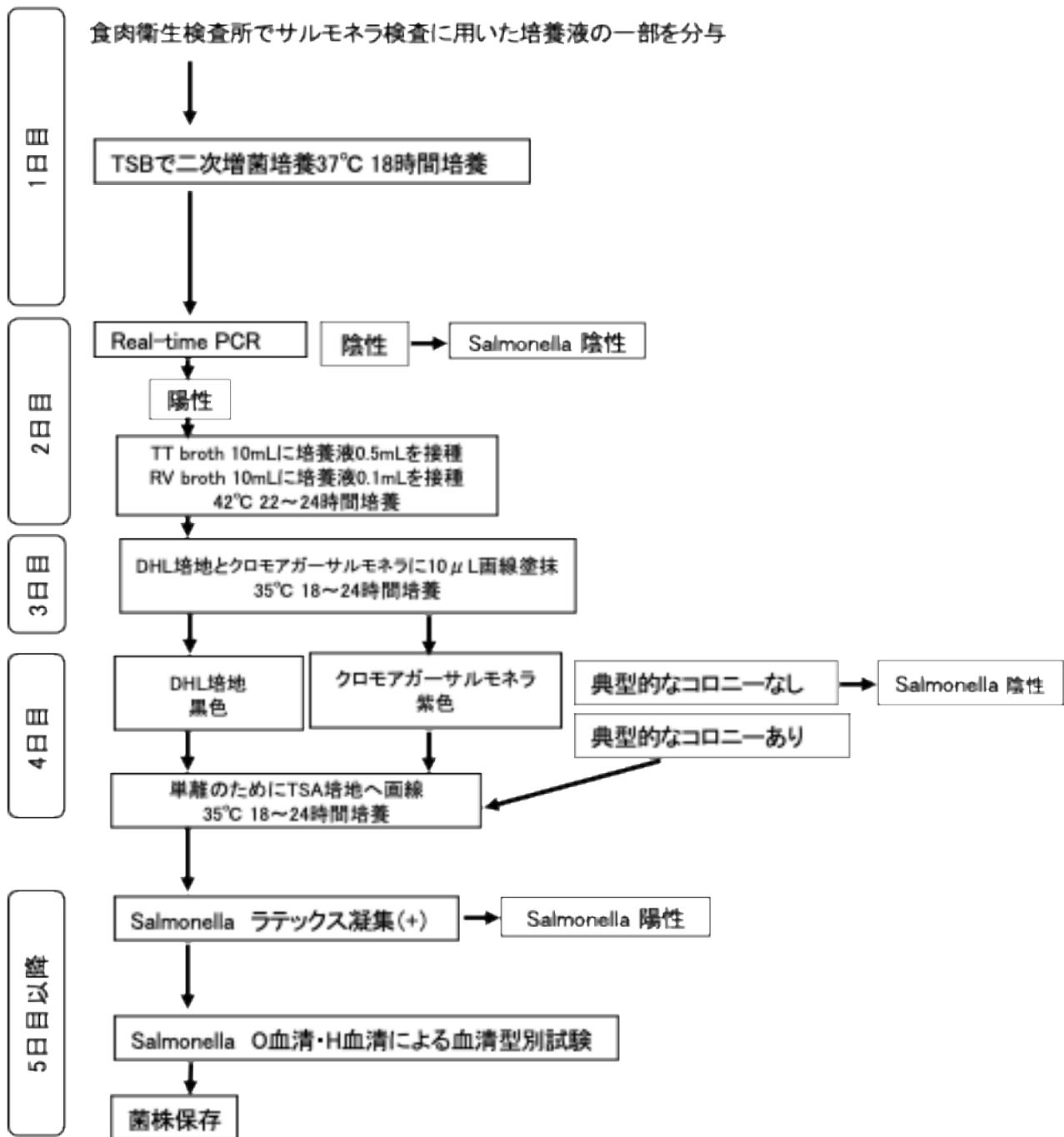


図1-4 サルモネラ属菌の検出・分離方法

定量的検出

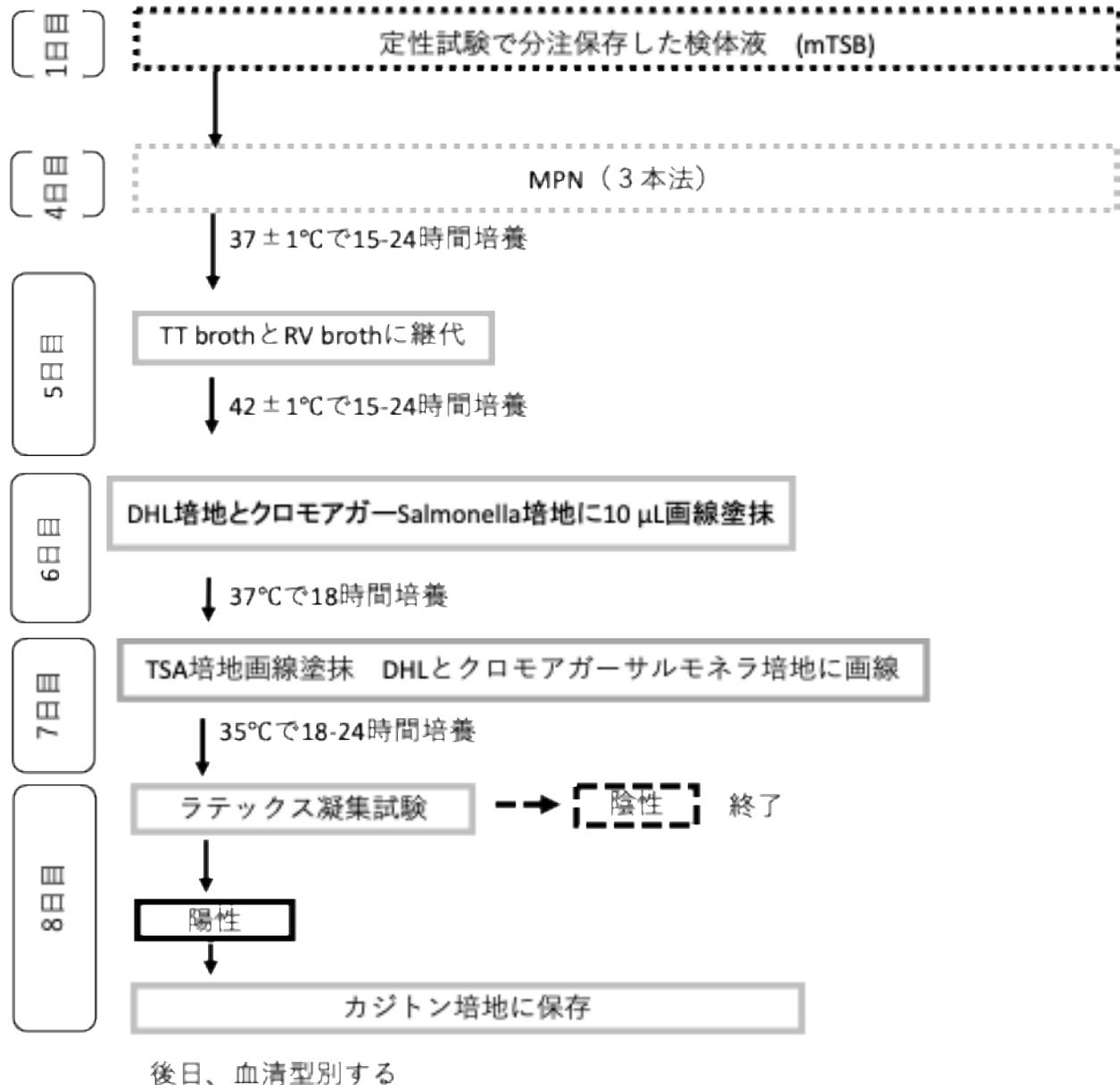


図1-5. サルモネラ属菌の定量的な検出方法

表 1-1 ウシの種類別、性別、齢別の個体数

種類	合計 個体数	性別	個体数	齢の幅 (ヶ月)	齢 (ヶ月)	
						個体数
ホルスタイン	24	オス	9	17 - 19	20未満	9
					20以上30未満	0
					30以上	0
		メス	15	34 - 95	20未満	0
					20以上30未満	0
					30以上	15
黒毛和種	34	オス	18	25 - 33	20未満	0
					20以上30未満	14
					30以上	4
		メス	16	27 - 70、不明	20未満	0
					20以上30未満	5
					30以上	10
				不明	1	
交雑種	31	オス	21	21 - 30	20未満	0
					20以上30未満	20
					30以上	1
		メス	10	24 - 93	20未満	0
					20以上30未満	8
					30以上	2
日本短角種	9	オス	9	22-35	20未満	0
					20以上30未満	4
					30以上	5
		メス	0	—	20未満	0
					20以上30未満	0
					30以上	0
ジャージー種	1	オス	0	—	20未満	0
					20以上30未満	0
					30以上	0
		メス	1	45	20未満	0
					20以上30未満	0
					30以上	1
肉用牛	1	不明	1	不明	不明	1
不明	8	不明	8	119、不明	30以上	1
					不明	7

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	Stx	Stx-F	5' TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG 3'	USDA
		Stx-R	5'CCCCAGTTCCARWGTRAGRTCMACDTC 3'	
		Stx1-P	5' FAM-CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTA A-BHQ_1 3'	
		Stx2-P	5' FAM-TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC- MGB 3'	
eaeA		Eae-F	5' CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA 3'	USDA
		Eae-R	5' CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTM 3'	
		Eae-P	5' HEX-ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC-BHQ_1 3'	
Assay2	16S rRNA gene	16S rRNA-F	5' CCT CTT GCC ATC GGA TGT G 3'	USDA
		16S rRNA-R	5' GGC TGG TCA TCC TCT CAG ACC 3'	
		16S rRNA-P	5' HEX-GTG GGG TAA CGG CTC ACC TAG GCG AC- BHQ_1 3'	
RfbEO157		RfbE O157-F	5'-TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCA A-3'	EFSA
		RfbE O157-R	5'-CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT-3'	
		RfbE O157-P	5' FAM-AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG-BHQ_1 3'	
Assay3	WzxO26	Wzx O26-F	5' GTA TCG CTG AAA TTA GAA GCG C 3'	USDA
		Wzx O26-R	5' AGT TGA AAC ACC CGT AAT GGC 3'	
		Wzx O26-P	5' 56-FAM-TGG TTC GGT TGG ATT GTC CAT AAG AGG G- 3BHQ_1 3'	
WbdI0111		WbdI O111-F	5' TGT TCC AGG TGG TAG GAT TCG 3'	USDA
		WbdI O111-R	5' TCA CGA TGT TGA TCA TCT GGG 3'	
		WbdI O111-P	5' 5MAXN - TGA AGG CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GC- 3IABkFQ 3'	
Assay4	WzxO45	Wzx O45-F	5' CGT TGT GCA TGG TGG CAT 3'	USDA
		Wzx O45-R	5' TGG CCA AAC CAA CTA TGA ACT G 3'	
		Wzx O45-P	5' 56-FAM- ATT TTT TGC TGC AAG TGG GCT GTC CA-3BHQ_1 3'	
WzxO121		Wzx O121-F	5' AGG CGC TGT TTG GTC TCT TAG A 3'	USDA
		Wzx O121-R	5' GAA CCG AAA TGA TGG GTG CT 3'	
		Wzx O121-P	5' 5MAXN - CGC TAT CAT GGC GGC ACA ATG ACA GTG C- 3IABkFQ 3'	
Assay5	WzxO103	Wzx O103-F	5' TTG GAG CGT TAA CTG GAC CT 3'	USDA
		Wzx O103-R	5' ATA TTC GCT ATA TCT TCT TGC GGC 3'	
		Wzx O103-P	5' HEX- AGG CTT ATC TGG CTG TTC TTA CTA CGG C-BHQ-1 3'	
WzxO145		Wzx O145-F	5' AAA CTG GGA TTG GAC GTG G 3'	USDA
		Wzx O145-R	5' CCC AAA ACT TCT AGG CCC G 3'	
		Wzx O145-P	5' FAM-TGC TAA TTG CAG CCC TTG CAC TAC GAG GC-BHQ_1 3'	
Assay6	16S rRNA gene	16S_br_F	5'TCCTACGGGAGGCAGCAGT 3'	Nadkarni MA et al., 2002.
		16S_br_R	5'GGACTACCAGGTATCTAATCCTGTT 3'	
		16S_br_P	5' FAM- CGTATTACCGCGCTGCTGGCAC-BHQ_1 3'	

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

EFSA: EFSA Journal. 11:3138、2013

表 1-3-1 Assay1 stx1&2、eae gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μ l)	終濃度 (μ M)	標識
2 × Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer stx F (50 μ M)	0.63	1.25	
Primer stx R (50 μ M)	0.63	1.25	
Primer Eae F (50 μ M)	0.50	1.00	
Primer Eae R (50 μ M)	0.50	1.00	
Probe stx1 P (5 μ M)	1.25	0.25	FAM
Probe stx2 P (5 μ M)	1.25	0.25	FAM
Probe Eae-P (5 μ M)	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 O157、16SrRNA gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μ l)	終濃度 (μ M)	標識
2 × Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer 16SRna-F (20 μ M)	0.20	0.16	
Primer 16SRna-R (20 μ M)	0.20	0.16	
Primer RfbE-O157-F (20 μ M)	0.25	0.20	
Primer RfbE-O157-R (20 μ M)	0.25	0.20	
Probe 16SrRNA-P (5 μ M)	0.50	0.10	HEX
Probe RfbE-O157-P (5 μ M)	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 O26、O111 gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μ l)	終濃度 (μ M)	標識
2 × Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O26 F (20 μ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O26 R (20 μ M)	0.31	0.25	
Primer WbdI O111 F (20 μ M)	0.31	0.25	
Primer WbdI O111 R (20 μ M)	0.31	0.25	
Probe Wzx O26 P (2 μ M)	1.88	0.15	FAM
Probe WbdI O111 P (5 μ M)	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 O45、O121gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μ l)	終濃度 (μ M)	標識
2 × Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O45 F (20 μ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O45 R (20 μ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O121 F (20 μ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O121 R (20 μ M)	0.31	0.25	
Probe Wzx O45 P (2 μ M)	2.34	0.19	FAM
Probe Wzx O121 P (5 μ 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 O103、O145 gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μ l)	終濃度 (μ M)	標識
2 × Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O103 F (20 μ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O103 R (20 μ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O145 F (20 μ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O145 R (20 μ M)	0.31	0.25	
Probe Wzx O103 P (5 μ M)	1.00	0.20	HEX
Probe Wzx O145 P (2 μ 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 プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせと配列

アッセイ名	標的 遺伝子	プライマー とプローブ	配列	出典
サルモネラ属菌	16S rRNA gene	16S rRNA-F	CCTCTTGCCATCGGATGTG	USDA
		16S rRNA-R	GGCTGGTCATCCTCTCAGACC	
		16S rRNA-P	GTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGAC	
	ttr	ttr-6 (forward)	CTCACCAGGAGATTACAACATGG	Appl Environ Microbiol. 2006 Jul;72(7):4545-53. doi: 10.1128/AEM.00131-06.
		ttr-4 (reverse)	AGCTCAGACCAAAAAGTGACCATC	
		ttr-5 (Target probe)	CACCGACGGCGAGACCGACTTT	

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

表 1-5 サルモネラ属 Assay *ttr*、16SrRNA gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2 × Taqman Environmental Mastermix Master Mix	12.50		
Primer 16SRna-F (20 μM)	0.20	0.16	
Primer 16SRna-R (20 μM)	0.20	0.16	
Primer ttr-6 F (20 μM)	0.50	0.40	
Primer ttr-4 R (20 μM)	0.50	0.40	
Probe 16SrRNA-P (5 μM)	0.50	0.10	HEX
Probe ttr-5 (5 μM)	1.25	0.25	FAM
滅菌蒸留水	4.35		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-6 ウシの種類別、性別の生菌数

		試験 個体数	生菌検出* 個体数 (%)	生菌数** (平均±SD CFU/cm ²)
ウシの種類	ホルスタイン	24	20 (83.3)	4669.1±17755.4
	黒毛和種	34	16(47.1)	12.3±21.6
	交雑種	31	12(38.7)	12.9±35.9
	日本短角種	9	7(77.8)	3.2±3.2
	ジャージー種	1	0(0)	—
性別	オス	57	28(49.1)	61.7±117.3
	メス	42	27(64.3)	3408.4±15331.9
全体		99	55 (55.6)	1704.6±10772.1

SD: standard deviation

*：非検出は、0.11 CFU/cm²未満

**：検出個体のみの平均±SD

表 1-7 施設別の生菌数

施設	月	個体数		生菌検出 個体数*		生菌数** (平均±SD CFU/cm ²)	
		月ごと	合計	月ごと	合計	月ごと	施設合計
A施設	4	—		—		—	
	6	—		—		—	
	7	—		—		—	
	8	—		—		—	
	9	6		3		14.2±21.1	
	10	6	42	1	11	9.2	5.4±11.4
	11	6		—		—	
	12	6		4		0.3±0.3	
	1	6		1		5.6	
	2	6		1		0.1	
B施設	3	6		1		0.1	
	4	—		—		—	
	5	—		—		—	
	6	—		—		—	
	7	—		—		—	
	8	—		—		—	
	9	3	36	—	23	—	5.6±16.0
	10	6		5		1.1±1.3	
	11	6		5		1.0±0.9	
	12	6		4		4.8±5.3	
C施設	1	6		4		20.4±38.3	
	2	6		5		3.4±3.0	
	3	3					
	4	—		—		—	
	5	—		—		—	
	6	—		—		—	
	7	—		—		—	
	8	—		—		—	
	9	3	21	3	21	146.3±78.3	4455.6±17333.5
	10	3		3		26571.9±45885.3	
D施設	11	3		3		3306.1±5471.7	
	12	3		3		739.22±995.2	
	1	3		3		295.3±226.7	
	2	3		3		62.4±55.2	
	3	3		3		60.1±56.7	
	4	—		—		—	
	5	—		—		—	
	6	—		—		—	
	7	—		—		—	
	8	—		—		—	
9	1	9	—		—		
10	1		—		—		
11	2		—		—		
12	2		—		—		
1	2		—		—		
2	1		—		—		

SD: standard deviation、*：非検出は、0.11 CFU/cm²未満、**：検出個体のみの平均±SD

表 1-8 月別の生菌数

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 ²)	
			種類ごと	合計	種類ごと	合計	種類ごと	月の合計
2024	9	ホルスタイン	3		3		146.3±78.3	
		黒毛和種	6		3		14.2±21.1	
		交雑種	3	12	—	6	—	80.3±88.7
		日本短角種	—		—		—	
		ジャージー種	—		—		—	
10		ホルスタイン	5		3		26571.9±45885.3	
		黒毛和種	4		3		2.0±2.0	
		交雑種	6	15	3	9	0.6±0.6	8859.0±26511.3
		日本短角種	—		—		—	
		ジャージー種	—		—		—	
11		ホルスタイン	3		3		3306.1±5471.7	
		黒毛和種	5		2		1.1±1.4	
		交雑種	7	15	3	8	0.9±0.8	1240.4±3388.2
		日本短角種	—		—		—	
		ジャージー種	—		—		—	
12		ホルスタイン	6		5		443.6±811.8	
		黒毛和種	3		1		11.4	
		交雑種	3	15	2	11	0.4±0.5	203.5±562.6
		日本短角種	3		3		2.6±3.6	
		ジャージー種	—		—		—	
1		ホルスタイン	3		3		295.3±226.7	
		黒毛和種	9		4		21.8±37.4	
		交雑種	3	15	1	8	0.11	121.6±189.8
		日本短角種	—		—		—	
		ジャージー種	—		—		—	
2		ホルスタイン	1		—		—	
		黒毛和種	3		2		20.0±28.1	
		交雑種	6	15	3	9	50.0±66.0	22.7±40.7
		日本短角種	4		4		3.6±3.4	
		ジャージー種	1		—		—	
3		ホルスタイン	3		3		68.3±54.6	
		黒毛和種	4		1		0.1	
		交雑種	3	12	—	4	—	51.2±56.1
		日本短角種	2		—		—	
		ジャージー種	—		—		—	

SD: standard deviation、*：非検出は、0.11 CFU/cm²未満、**：検出個体のみの平均±SD

表 1-9 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	リアルタイムPCRの結果*										サルモネラ ttr	
		eae	stx	16S	O157	O26	O111	O45	O121	O103	O145		
24-11	C施設	24.0	36.0	UD	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NA
24-27	B施設	UD	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	35.6
24-68	C施設	27.9	24.7	NT	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	NA
24-96	B施設	20.0	15.0	NT	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
24-105	C施設	17.6	42.0	NT	NT	UD	UD	29.7	UD	UD	UD	UD	UD

*数値はCT値、CDは非検出、NTは非試験

表 1-10 *stx*&*eae* 陽性検体のうち 7 血清群陽性検体

項目	リアルタイムPCR陽性検体		ウシの種類	月齢 (ヶ月)	生菌数 (CFU/cm ²)	分離株
	検体数	検体番号				分離コロニー数
<i>stx</i> (+) & <i>eae</i> (+) & O45 (+)	1	24-105	ホルスタイン	19	33.2	8 (<i>stx</i> (-)& <i>eae</i> (-)&O45(+))

表 1-11 サルモネラの生化学的性状

培地	検体24-27からの分離株		参考
			サルモネラの性状
TSI	斜面	赤色	赤色
	高層	黄色	黄色
	硫化水素産生	+	+(非定型-)
	ガス産生	-	+
LIM	リジン	+	+(非定型-)
	インドール	-	-
	運動性	+	+(非定型-)

表 1-12 リアルタイム PCR で *ttr* 遺伝子が陽性の培養液からサルモネラが分離された検体

血清型	検体 番号	採材日	施設記号	生菌数 (CFU/cm ²)	サルモネラMPN 値 (100cm ²)	ウシの種類	月齢 (ヶ月)	性別
S. Dublin	24-27	241021	B施設	3.3	<0.33	黒毛和種	30	オス

Ⅱ. 分担研究報告

3. 食肉衛生検査所の研修教材の作成

研究分担者 吉富 真理

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）
令和6年度 分担研究報告書

食肉衛生検査所の研修教材の作成

研究分担者 吉富 真理 国立保健医療科学院 上席主任研究官

研究要旨

アメリカ合衆国・EU 等向け輸出向け食肉取扱施設を管轄する食肉衛生検査所の指名検査員の研修に必要な教材として、輸出食肉認定施設における検査実施要領の業務遂行に求められる知識及び技術を新規着任者が習得することを設定し、作成した。

新規着任者が一人でも学習できる動画に使用する教材として、指名検査員による検証を理解するための基礎知識である、と畜場及び食肉処理場の HACCP に基づく衛生管理を踏まえた講義資料を作成した。また、指名検査員が実施すると畜検査及び検証に解説を加える動画教材を作成した。さらに、これらの学習で基礎的な知識習得後に参考となる、国際連合食糧農業機関（FAO）のガイダンス文書及びアメリカ合衆国の食品衛生管理に係る法令等を翻訳した。

今後は、HACCP に基づく衛生管理を踏まえた講義資料に対応する演習資料の開発とこれらの教材を用いた研修を実施し、指名検査員の知識及び技術の習得度の変化を確認する必要がある。

研究協力者：

赤松 玲子（栃木県食肉衛生検査所）
塚本 真由美（岐阜県飛騨食肉衛生検査所）
安達 恵、高澤 木綿子（姫路市食肉衛生検査センター）
西屋 秀樹（鹿児島県阿久根食肉衛生検査所）
中島 靖剛（スターゼンミートプロセッサ株式会社 品質管理部）

A. 研究目的

「輸出食肉認定施設における検査実施要領」（以下、「検査実施要領」という。）の「Ⅰと畜検査の方法」、「Ⅱ米国

等向け輸出食肉に係る指名検査員による検証」の業務遂行に必要な知識及び技術を身に付けるための教材の開発及び業務の参考資料を整備することを目的とした。

B. 研究方法

教材については、前年の研究で検討した指名検査員等向けの教材の形式及び内容を踏まえ、対象者を検査実施要領に基づくと畜検査及び検証の経験がほとんどない新規着任者を設定し、作成した。

参考資料については、教材の補助資料の作成及び輸出先国の法令等の翻訳を

行った。

C.結果

1. 動画教材の作成

1.1 と畜検査の方法の教材

指名検査員が実施する生体検査及びと殺後検査を撮影し、検査実施要領の項目及び内容を字幕や説明画像を付した動画教材を作成した。必要に応じて、米国 USDA FSIS の公衆衛生獣医師及び検査官向け研修資料（以下、「FSIS 研修資料」という。）から引用した説明を加えた。（図 1）

1.2 HACCP の基礎知識

すでに HACCP の導入研修及び指導者養成研修で使用されている教材をもとに、講義動画の映写用資料を作成した。本教材では、個々のハザードの詳細については受講生のニーズに合わせるため記載されていないことから、本教材では牛のと畜・解体工程におけるハザードを設定した。また、必要に応じて、FSIS 研修資料から引用した説明を加えた（図 2）。

1.3 米国等向け輸出食肉に係る指名検査員による検証の教材

検査実施要領に基づき指名検査員が実施する検証のうち、とさつ・解体処理に係る検証（とさつから枝肉保管庫までの作業前点検及び作業中点検と、人道的な獣畜の取り扱い及びとさつに係る検証の観察による点検を撮影し、検査実施要領の点検方法、および「アメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱（以下、「対米要綱」という。）の要求事項を字幕として付した。必要に応じて、FSIS 研修資

料から引用した説明を加えた。（図 3）

1.4 微生物検査の教材

対米要綱に基づき食肉衛生検査所が実施する腸管出血性大腸菌の検査について、検査の手技及び検査結果の例を撮影し、検査法の内容及び留意点の字幕や説明画像を付した動画教材を作成した。（図 4）

2. 参考資料

2.1 FSIS のオンラインセミナー資料の翻訳

2023 年に FSIS が主催したオンラインによる各国政府担当者向けセミナー Virtual Food Safety and Inspection Seminar において、食肉、食鳥肉、卵製品の安全性の保証に関する FSIS の任務について説明した動画に、講師の説明の邦訳字幕を付した。（図 5）

2.2 対米要綱に関連する FSIS Directives の翻訳

FSIS Directives（公衆衛生獣医師及び検査官向け指令）の 5000 及び 6000 シリーズの一部を邦訳し、背景等の情報が必要な部分については解説を加えた。

2.3 国際連合食糧農業機関 (FAO) のガイダンス文書の翻訳

FAO が 2023 年に公開した Good Hygiene Practices (GHP) and HACCP Toolbox for Food Safety の HACCP の背景と原則を体系的に説明したガイダンス文書（<https://www.fao.org/good-hygiene-practices-haccp-toolbox/en>）を邦訳した。

D.考察

今年度は、アメリカ合衆国・EU 等向

け輸出向け食肉取扱施設を管轄する食肉衛生検査所の指名検査員の検査業務を適切に実施するための教材として、検査実施要領のと畜検査及び検証について、基礎的な講義資料、動画を利用した教材、及び参考資料を作成した。

1. HACCP の基礎的な講義資料

「HACCP システムについて相当程度の知識」の習得で必要とされる講習会で行われる講義資料を参考にしうえて、理解の助けのための解説や、特に輸出向け食肉取扱施設の検証を行うために必要と考えられる解説を FSIS の研修資料等から加えた。これを音声教材とすることで、新規着任者が一人で学習することが可能になると考える。しかし、「HACCP システムについて相当程度の知識」の習得には、講義だけでなく演習と組み合わせる必要があるため、次年度はグループで行う演習のための教材を作成する必要がある。また、講義内容の理解度を確認するためのテストがあることが望ましいと考える。

2. 動画を利用した教材

動画教材で、検査実施要領に基づくと畜検査及び検証の方法、視点を繰り返し確認することで、現場で行う OJT の前に知識のインプットができるようになる。また、OJT の後に動画教材を視聴しながら、OJT の際の疑問点の確認を講師担当の職員と行うことにも利用することで、より新規着任者の知識が深まり技術の習得のスピードを上げることが期待できると考える。

次年度は、検査実施要領に基づき指名検査員が実施する検証のうち、枝肉の冷

蔵保管以降の工程である食肉処理に係る検証の作業前点検及び作業中点検、製品再検査等について、動画教材を作成する必要がある。

3. 参考資料

FSIS の研修動画、アメリカ合衆国の食肉の衛生管理に係る法令及び通知等に邦訳を付けたことにより、基礎的な講義及び動画教材の補足となり、食肉衛生検査所の多忙な業務のなかで利用しやすい参考資料になると考える。

次年度も未翻訳の輸出先国の食肉の衛生管理に係る法令及び通知等に邦訳を付ける必要がある。

4. その他

今年度作成した教材及び次年度作成する教材を用いて、食肉衛生検査所の新規着任者を対象に研修を実施し、検査実施要領の業務遂行に必要な知識及び技術の変化を明らかにする必要がある。

E. 結論

次年度に取り組むべき内容として、以下の内容が挙げられた。

1) HACCP の基礎的な講義資料と対応する演習教材及び理解度テストを作成する。

2) 食肉処理に係る検証の動画教材を作成する。

3) 輸出先国の食肉の衛生管理に係る法令及び通知等に邦訳を付ける。

4) 教材を用いた研修を実施し、受講前後の検査実施要領の業務遂行に必要な知識及び技術の変化を明らかにする。

参考文献

- ・「輸出食肉認定輸出食肉施設における検査実施要領」(令和6年8月9日最終改正)
- ・ FSIS Inspection Methods 1800Series
<https://www.fsis.usda.gov/inspection/inspection-training-videos/inspection-mission-training>
- ・改訂新版 HACCP 導入と運用の基本―「Codex 食品衛生の一般原則」2020年改訂対応―(公益社団法人日本食品衛生協会)
- ・アメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱(令和7年3月26日更新)
- ・アメリカ合衆国向け輸出食肉認定施設における牛肉からの腸管出血性大腸菌 O26、O45、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について(アメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱 別紙 US-A1-1、最終改正日:令和4年12月27日)

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1



HACCPの基礎

はじめに

指名検査員がHACCPを学ぶ理由

■事業者が行う食肉処理におけるHACCPを含めた衛生管理方法について、指名検査員が評価するためには、検証する指名検査員にもHACCPに沿った衛生管理の視点が求められます。このため、講義及び演習を行うことにより、HACCPに関する相当程度の知識を習得し、指名検査員の検証における評価・指導の力量の向上を目指します。

■本教材でひととおり学んだ後は、グループワークによる演習に参加しましょう。

※：「HACCPシステムについて相当程度の知識を持つと認められる者」（平成9年2月3日付け衛食第31号・衛乳第36号、厚生省生活衛生局食品保健・乳肉衛生課長連名通知）

指名検査員がHACCPを学ぶ理由

■FSIS Inspection Methods 1800Series のワークブックより

●食品の微生物学的基準に関する国家諮問委員会（NACMCF）の作業部会は、収穫から消費までの食品の安全を保証する効果的かつ合理的な手段として、ガイドラインを作成し、HACCPの7つの基本原則を再定義しました。

●作業部会は1997年8月にHACCPの原則と適用ガイドライン文書を発表しました。この文書は規制文書ではありませんが、HACCP規制が策定され連邦官報に掲載された際にFSISによって適用されました。

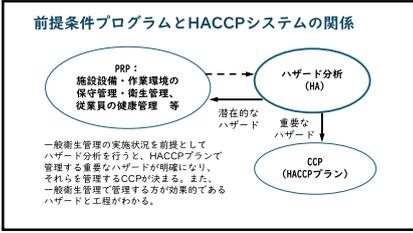
●規制当局として、あなた方（IPP：検査官）はHACCP規制の遵守を確認する責任があります。HACCPガイドラインの7原則は強制力のある文書ではありませんが、検査担当者やHACCP計画策定の職務を担う者に対しては、Title 9 Code of Federal Regulation (CFR) Part 417の下で役立ちます。

教材の目次

- I. HACCPとは
- II. 用語および定義
- III. ハザードとは
- IV. HACCPシステム適用の7原則・12手順
- V. 前提条件プログラム/一般衛生管理プログラム
- VI. HACCPプラン作成の準備段階
- VII. ハザード分析の実施（手順6・原則1）
- VIII. 重要管理点（CCP）の決定（手順7・原則2）
- IX. 委任性確認された管理基準（LL）の設定（手順8・原則3）
- X. モニタリングシステムの設定（手順9・原則4）
- XI. 改善措置の設定（手順10・原則5）
- XII. HACCPプランの食品特種誌および検証手順の設定（手順11・原則6）
- XIII. 文書および記録方法の設定（手順12・原則7）

※ テキストまたはCode食品衛生の一般原則2020の翻訳などをご参照ください。

I. HACCPシステムとは



III. ハザードとは

1. ハザードとは
2. 生物的ハザード
3. 化学的ハザード
4. 物理的ハザード

I. ハザードとは

■定義：健康への悪影響を引き起こす可能性のある食品中に存在する生物的、化学的、物理的要因。

- 生物的：食品中に含まれる病原細菌、ウイルス、寄生虫およびそれらの産生する毒素
- 化学的：食品中に含まれる有害化学物質（食物アレルギーを含む）
- 物理的：食品中に含まれる異物

注 「健康への悪影響をもたらす」とは、人の疾病や創傷を起こしうること
昆虫・毛髪・汚物等の混入、製品の腐敗・変質・損傷、安全性とは直接関連しない食品の規格違反等は含まれない状態だが、ハザードとして扱うものではない。
(GMPやHACCP以外の他の管理プログラムで扱う。)

2. (2)と畜・解体工程等の生物的ハザード

■FSISのHazard Control Guideでは、と畜・解体工程及び食肉処理工程の生物的ハザードは以下のとおりとしている。

	Salmonella	STEC	Campylobacter	SRM
Beef	+	+		+
Pork	+			
Poultry	+		+	

●STEC 株：大腸菌 O157:H7、O26、O45、O103、O111、O121、又は O145 を有し、2 つの特定の毒性遺伝子 (stx および eae) を含む株
 ●牛は腸管内に STEC の芽生えの菌を保有している可能性があり、表皮や蹄にも付着している可能性がある。

V. 前提条件プログラム/一般衛生管理プログラム

(Prerequisite Programme: PRP)

前提条件プログラム/一般衛生管理プログラムとは何か

■前提条件プログラム/一般衛生管理プログラムの必要性

- HACCPシステムは、それ単独で機能するものではなく、包括的な衛生管理システムの一部であり、HACCPシステムを効果的に機能させるためには、その前提条件となる一般衛生管理プログラムが必要
- 前提条件プログラム/一般衛生管理の役割は、特定のハザードだけでなく、幅広い汚染物質による汚染防止、混入防止あるいは増大(増加)を防ぐことなどである。

コーデックスの「食品衛生の一般原則」(CXC 1-1969, Rev.2022)

- 序文
- 目的
- 適用範囲
- 用語(略称)
- 一般原則
- 定義

Good Hygiene Practices (適正衛生規範)

- と畜及び食品ハザードのコントロール
- 二次生産
- 施設：設備及び機器のデザイン
- トレーニング及び力量
- 施設のメンテナンス、洗浄・消毒およびペストコントロール
- 従業員衛生
- 食品等の取扱い
- 製造の情報及び消費者の認識
- 輸送

ハザード分析及び重要管理点(HACCP)システムとその適用のための指針

- HACCPの原理
- HACCPシステムの原則
- HACCPシステム適用のための一般指針
- 適用

別添 I ~ IV

6. HACCPプラン作成の準備段階(手順1~5)

HACCPシステムの導入の基点

■食品安全文化の確立、維持そして醸成 (GPHI CXC11969, Rev.2022, 5, 一般原則)

- ① 安全な食品の生産および取扱いに対して、経営者およびすべての従業員によるコミットメント
- ② 正しい方向性を設定し、すべての従業員を食品安全の実践に従事させるためのリーダーシップ
- ③ 事業に携わるすべての従業員による食品衛生の重要性の認識
- ④ 食品事業のすべての従業員の間で、遠隔および期待に関するコミュニケーションを含む、オープンで明確なコミュニケーション
- ⑤ 食品衛生システムの効果的な機能確保するための十分な資源の利用可能性
- ⑥ 経営者は、実施されている食品衛生システムの有効性を確保すべきである。

HACCPチームの役割

ア) 一般衛生管理プログラムを実行するための手順書の作成
 イ) HACCPプランの作成(妥当性確認を含む)
 ウ) HACCPプランの実施のための担当者に対するトレーニング
 エ) 検証の実施
 オ) 外部査察(監査)への対応
 カ) 原材料、製品の組成、製造加工工程等の変更の把握およびそれに伴う一般衛生管理プログラムおよびHACCPプランの見直し、修正または変更
 キ) 検証(査察・監査)の結果に基づき、必要に応じてHACCPプランの見直し、修正または変更

★検証について
 HACCPチームには検証が適切に実施されることに対する責任がある。HACCPにおける検証活動は広範囲にわたる。

VII. ハザード分析の実施(手順6・原則1)

1. ハザード分析とは
2. なぜハザード分析が必要か
3. ハザード分析の目的
4. ハザード分析の実施

4. ハザード分析の実施

(1) ハザード分析に必要な情報、データの収集

(2) ハザード分析のステップ

ステップ1:原材料および製造または加工工程に由来する潜在的なハザードの列挙
 ステップ2:列挙されたハザードの起こりやすさ、起こった場合の重大性を評価して、重要なハザードの絞り込み
 ステップ3:重要なハザードの発生源の特定
 ステップ4:重要なハザードに対する管理手段の特定

図 2

ハザード分析の留意点

項目	内容	留意点	確認事項
1. 対象工程	① 加工工程の抽出 ② 工程の抽出	① 工程の抽出は、工程の抽出が適切であること ② 工程の抽出は、工程の抽出が適切であること	① 工程の抽出が適切であること ② 工程の抽出が適切であること
2. 有害物質	① 有害物質の抽出 ② 有害物質の抽出	① 有害物質の抽出は、有害物質の抽出が適切であること ② 有害物質の抽出は、有害物質の抽出が適切であること	① 有害物質の抽出が適切であること ② 有害物質の抽出が適切であること
3. 有害物質の抽出	① 有害物質の抽出 ② 有害物質の抽出	① 有害物質の抽出は、有害物質の抽出が適切であること ② 有害物質の抽出は、有害物質の抽出が適切であること	① 有害物質の抽出が適切であること ② 有害物質の抽出が適切であること
4. 有害物質の抽出	① 有害物質の抽出 ② 有害物質の抽出	① 有害物質の抽出は、有害物質の抽出が適切であること ② 有害物質の抽出は、有害物質の抽出が適切であること	① 有害物質の抽出が適切であること ② 有害物質の抽出が適切であること

検討の過程及び検討結果を記録、文書化し、保存する

HACCPプランの見直しに役立てる

8. 重要管理点 (CCP) の決定 (手順7・原則2)

1. CCPとは
2. 適切な箇所にCCPを設定する必要性
3. CCPの決定方法
4. CCPの具体例

3. CCPの決定方法

●ハザード分析よりリストアップした各工程におけるハザードの発生について

- ① それらのハザードを除去または許容範囲まで低下させるために、特に製造加工工程に導入した工程 (例: 食肉製品や牛乳の加熱殺菌工程等) をまずCCPとする。
- ② それらのハザードを一般衛生管理によってコントロールできている、あるいはコントロールせざるを得ない。→ その管理手段はCCPの対象から外し、ハザード分析を見直す。
- ③ ①以外の工程であっても、工程ごとに確認を行う。

ある工程で生じるハザードが、その工程または (結果的に) 最終製品でハザードの目標基準を達成できない可能性があり、しかもその工程以降の工程でコントロールできない可能性がある場合は、その工程をCCPとする。

CCPを決定するツール
食品衛生法(昭和25年)第119条(昭和2022)において、CCPを決定するデシジョンツールの開発がされている。当該標準の策定事項が満たされている限り、決定方法は他のツールでも良い。

3. CCPの決定方法

項目	内容	留意点	確認事項
1. 対象工程	① 加工工程の抽出 ② 工程の抽出	① 工程の抽出は、工程の抽出が適切であること ② 工程の抽出は、工程の抽出が適切であること	① 工程の抽出が適切であること ② 工程の抽出が適切であること
2. 有害物質	① 有害物質の抽出 ② 有害物質の抽出	① 有害物質の抽出は、有害物質の抽出が適切であること ② 有害物質の抽出は、有害物質の抽出が適切であること	① 有害物質の抽出が適切であること ② 有害物質の抽出が適切であること
3. 有害物質の抽出	① 有害物質の抽出 ② 有害物質の抽出	① 有害物質の抽出は、有害物質の抽出が適切であること ② 有害物質の抽出は、有害物質の抽出が適切であること	① 有害物質の抽出が適切であること ② 有害物質の抽出が適切であること
4. 有害物質の抽出	① 有害物質の抽出 ② 有害物質の抽出	① 有害物質の抽出は、有害物質の抽出が適切であること ② 有害物質の抽出は、有害物質の抽出が適切であること	① 有害物質の抽出が適切であること ② 有害物質の抽出が適切であること

9. 妥当性確認された管理基準 (CL) の設定 (手順8・原則3)

1. CLとは
2. CL設定の具体例

1. CLとは

■定義
●CCPの管理手段に関連し、食品の許容性や非許容性を分ける観察可能または測定可能な基準

■なぜCLを設定する必要があるのか
●CLは、ハザード分析で特定された重要なハザードがCCPにおいて適切にコントロールされているかを判断するための基準として設定される。
●CCPがコントロールされているか、いないかを明確に判断する
●すべてのCCPに対し1つ以上のCLが設定されなければならない

2. CL設定の具体例 (例:加熱食肉製品の蒸気工程)

選択肢1 ハザード: 病原菌の生残
CCP: 蒸気
CL: 病原菌不検出

●この選択肢は通常最過とはいえない。CLに微生物基準を設定するのは実務的でない。
✓微生物検査の検体サンプリングは困難
✓検査結果が得られるまでに数日かかる→タイムリーなモニタリングができていない。
✓微生物汚染は通常、数秒的であり、統計学的に意味のある結果を得るためには、多数の検体を検査する必要がある。
✓実務上使用できる感度と迅速性を有する検査法は極めて乏しい。

10. モニタリングシステムの設定 (手順9・原則4)

1. モニタリングとは
2. なぜモニタリングを行う必要があるのか
3. モニタリングの要件
4. モニタリングシステム構築の要素 (モニタリング記録様式の必要事項)

1. モニタリングとは

●CCPが正しくコントロールされていることを確認するとともに、後に実施する検証時に使用できる正確な記録をつけるために、観察、測定または試験検査を行うこと。

●CCPのモニタリングは、CCPIにおいて、スケジュールに基づくCLと比較する測定または観察である。

3. モニタリングの要件

1.1. 改善措置の設定 (手順10・原則5)

1. 改善措置とは何か
2. なぜ改善措置を行う必要があるのか
3. なぜ変更された改善措置を規定するか
4. 改善措置の実施結果の記録

2. なぜ改善措置を行う必要があるのか

- ① 各々のCCPにおいて、モニタリングによってCLからの逸脱が判明した場合、健康被害を招くまたはそのおそれのある食品が流通段階に入ることが迅速かつ的確に阻止する。
- ② CCPのコントロールを正常に戻し、その時点から先のハザードをコントロールする。

1.2. HACCPプランの妥当性確認及び検証手順 (手順11・原則6)

1. 妥当性確認とは
2. なぜ妥当性確認が必要か
3. 検証とは
4. なぜ検証を行う必要があるのか
5. HACCPシステムの検証の内容
6. 検証計画に規定しておく事項

HACCPプランの妥当性確認及び検証の種類

1. HACCPプランの妥当性確認
 - CL設定時におけるHACCPシステムのすべての要素の有効性の確認
 - 変更があったときの有効性の再妥当性確認
2. CCPごとの検証活動 (HACCPプランごと)
 - モニタリング計器の校正または正確さの点検
 - 目的を定めたサンプリングと試験
 - モニタリング、改善措置、校正および目的を定めたサンプリングと試験並びにそれらの記録の見直し
3. HACCPシステムの検証 (監査)
 - 内部検証 (監査) (観察と見直し)
 - 最終製品の試験検査
4. 外部検証
 - 第二、三者による審査・監査など
5. 規制当局による検証

2. なぜ妥当性確認が必要か

次のHACCPプランの要素を合わせて、食品事業にとって適切な重要なハザードをコントロールする能力があることを保証するためである：

- ハザード (重要なハザード) の特定
- CCP
- CL
- 管理手段
- モニタリングの頻度と方法
- 改善措置
- 検証の頻度および種類
- 記録すべき情報の種類

CCP	重要度	CL	モニタリング	管理手段	頻度	方法
			視覚	計器点検	1日1回	目視

1.2. 文書及び記録方法の設定 (手順12・原則7)

1. なぜ記録を付け、保存する必要があるのか
2. 記録および保存文書
3. どのように記録を付け、保存するか

1. なぜ記録を付け、保存する必要があるのか

- ① 正確な記録を保存することは、HACCPシステムの本質 (essential) である。工程管理がHACCPシステムの原則に基づき、プランに規定されたとおり実施されたという証拠は記録にある。
 - ✓ 記録は自主管理の貴重な証拠である。
 - ✓ 行政による監視指導において、施設の衛生管理、工程管理の状態を調査するうえで有用な資料となる。
- ② 万一、食品の安全に係わる問題が生じた場合でも、製造または衛生管理の状況をトレースバックして原因究明を容易にする。
- ③ 製品の回収が必要な場合は、原材料、包装資材、最終製品等のロット特定の助けとなる。

2. 記録および保存文書

- ① HACCPプランの実施に関する記録
 - ✓モニタリングの記録
 - ✓改善措置の実施結果
 - ✓検証の実施結果
 - ✓一般衛生管理プログラムの実施結果

- 一般衛生管理プログラムの記録の必要事項
 - 記録様式の名前
 - 事業者の氏名または法人の名称
 - 一般衛生管理プログラムの実施状況
 - 実施状況を確認した者のサインまたはイニシャルおよび確認した日時
 - 実施状況を確認した結果に基づき措置を講じた場合は、その内容と実施者のサインまたはイニシャルおよび実施日

図 3

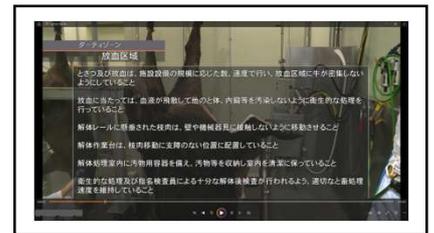
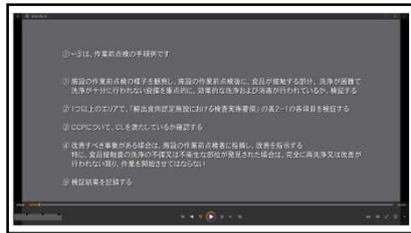
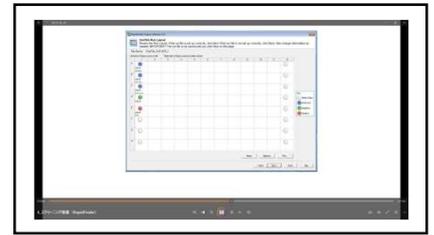


図 4



5

Event Producer: Jennifer Conrad, Daniel Oestmann, Melissa Moore, William Griffin

USDA Food Safety and Inspection Service
U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE

FSIS Inspection Methods

Ms. Melissa Moore
FSIS, OFO Executive Associate for Regulatory Operations

Dr. William Griffin
FSIS, OFO Executive Associate for Regulatory Operations

Day 2 USDA FSIS 2023_R7/March
水を使った清掃が行われる床が防水でない場合、製品残渣や湿気が溜まる可能性があります。

Construction—§416.2(b)(1)

- Buildings, including structures, rooms, and compartments are made of materials and constructed in a manner that permits thorough cleaning to prevent insanitary conditions
- Rooms, compartments, and structures are large enough for orderly processing, handling, and storage of product which prevents the creation of insanitary conditions
- The structure of the establishment, its rooms, and compartments remains in good repair

Floor subject to wet cleaning operations that are not watertight may allow

Day 2 USDA FSIS 2023_R7/March
可能性があると施設またはFSISが判断した場合には、適切な是正措置を講じなければなりません。

Corrective Action

- (a) Each official establishment shall take appropriate corrective action(s) when either the establishment or FSIS determines that the establishment's Sanitation SOP's or the procedures specified therein, or the implementation or maintenance of the Sanitation SOP's, may have failed to prevent direct contamination or adulteration of product(s).
- (b) Corrective actions include procedures to ensure appropriate disposition of product(s) that may be contaminated, restore sanitary conditions, and prevent the recurrence of direct contamination or adulteration of product(s), including appropriate reevaluation and modification of the Sanitation SOP's and the procedures specified therein or appropriate improvements in the execution of the Sanitation SOP's or the procedures specified therein.

s o P or procedures specified therein or the implementation or maintenance

Day 2 USDA FSIS 2023_R7/March
417.5 (b)の遵守状況を確認するために、IPPは次の質問を追加します。

Step 5 - Verify Recordkeeping

- 417.2(c)(6)
 - (6) Provide for a recordkeeping system that documents the monitoring of the critical control points. The records shall contain the actual values and observations obtained during monitoring.
- 417.5(a)(3)
 - (3) Records documenting the monitoring of CCP's and their critical limits, including the recording of actual times, temperatures, or other quantifiable values, as prescribed in the establishment's HACCP plan; the calibration of process-monitoring instruments; corrective actions, including all actions taken in response to a deviation; verification procedures and results; product code(s), product name or identity, or slaughter production lot. Each of these records shall include the date the record was made.
- 417.5(b)
 - (b) Each entry on a record maintained under the HACCP plan shall be made at the time the specific event occurs, shall be recorded, and shall be signed or initialed by the establishment employee making the entry.

So in order to verify compliance with 417.5 B

Ⅱ. 分担研究報告

4. 食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

研究分担者 廣瀬昌平

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)
令和6年度分担研究報告書

食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

研究分担者 廣瀬昌平 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

本研究は、対米輸出向け食肉施設における腸管出血性大腸菌（STEC）およびサルモネラ属菌検査の信頼性向上を目的として、各施設で使用されている標準作業手順書（SOP）を収集し比較するとともに、検査手技および手法に関する精度検証を実施した。令和5年度に協力を得た国内9施設に加えて、令和6年度には新たに1施設の協力を得て、計10施設からSOPを収集した。SOPの内容には施設ごとの差異があるものの、各施設の処理工程に即しており試験法の逸脱等は認められなかった。また、聞き取り調査で各施設から寄せられたSTEC検査における問題点の報告を受け、STEC検査に使用される免疫磁気ビーズのSTEC非特異的濃縮の検証を実施した。菌液と免疫磁気ビーズの血清型の組み合わせによっては、非特異的濃縮が生じることが示唆された。今後さらに検証を進め、改善案を提示する必要があると考えられた。

研究協力者 星薬科大学 工藤由起子

A. 研究目的

対米輸出向け食肉取扱施設および食肉検査所では、牛肉の腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌：STEC）およびサルモネラ属菌の検査を輸出先国が指定する試験法に従って実施している。しかし、国内の一般的な試験法と手法や基準が異なるため、担当者には高度な技術と知識の習得が求められる。検査担当者は、通知法および輸出先国がウェブ上で公開している試験法を参照し、標準作業手順書（SOP）を独自に作成している。しかし、緻密で専門性の高い試験手順に関する知識習得にかかる時間的制約および慢性的な人員不足などが原因で、記載内容の十分な精査が困難となっている。

そのため、専門的な知識を有する第三者による客観的な検査体制の確認が必要とされている。本研究では、令和5年度に引き続き、各検査所のSOP収集および検査体制についての聞き取り調査を行い、対米輸出検査における逸脱防止対策を一層強化することを目的とした。また、令和5年度に実施した各検査所への聞き取り調査において、特定の血清型を対象とした免疫磁気ビーズでの非特異的なSTECの濃縮が報告された。検査の再実施による検査員作業時間の浪費を防止し、検査の信頼性を確保するため、免疫磁気ビーズでの濃縮法における非特異的な濃縮の発生について検証した。

B. 研究方法

1. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

令和5年度には、国内の対米輸出認定食肉取扱施設9ヶ所の協力を得た。令和6年度には、新たに対米輸出認定食肉取扱施設1ヶ所の協力を得て STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査を実施し、令和5年度の結果と統合して計10施設の結果として表にまとめた。まず、各施設で使用している SOP を収集し、その内容について項目ごとに整理した。次に、各対米輸出認定食肉取扱施設を訪問し、食肉取扱施設内で食肉処理行程の詳細な説明を受け、STEC およびサルモネラ検査に関連する項目として検体の採材場所および手法等について聞き取り調査を実施した。続いて、整理した SOP の内容をふまえて各食肉衛生検査所で検査業務担当職員に以下の調査項目について聞き取り調査を実施した。

(1) STEC 検査

調査項目は、1ロットの定義、検体採取法、前培養条件、遺伝子検出のための使用機器、偽陰性・偽陽性・判定不能等の判定時のトラブル、陽性対照 DNA 溶液の作成方法、病原因子確認試験の方法および免疫磁気ビーズのプロトコルとした。

(2) サルモネラ検査

調査項目は、検体採取法、前培養条件、遺伝子検出のための使用機器、判定時のトラブルおよび陽性対照株の管理方法とした。

2. STEC 免疫磁気ビーズの濃縮工程の検証

(1) 供試菌株および増菌培養

STEC 026、045、0103、0111、0121、0145、0157 を供試した。供試菌株をトリプトソイブロス培地 (TSB) に接種し、37°C で一晩培養した。

(2) 免疫磁気ビーズ法

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。STEC 026、045、0103、0111、0121 および 0157 の増菌液は、免疫磁気ビーズ 0145 と反応させ、STEC 0145 は免疫磁気ビーズ 0103 と反応させた。また、STEC 0103 の増菌液(10^9 CFU/mL) は、TSB 培地で 10^2 倍希釈液(10^7 CFU/mL) および 10^4 倍希釈液(10^5 CFU/mL)を作成し、原液および各希釈液を免疫磁気ビーズ 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 と反応させた。免疫磁気ビーズ 1 滴に増菌液および希釈液 1 mL を添加し、ローテーターで 10 分間反応させた。マグネチックスタンドで 5 分間吸着させた後、上清を除去して滅菌生理食塩水で洗浄後、E バッファー 1 mL で懸濁した。この懸濁液を滅菌生理食塩水で 10^{-5} 倍まで希釈し、トリプトソイアガー培地 (TSA) に塗抹し、 36 ± 1 °C で 18 ~ 24 時間培養した。培養後に平板上に生育したコロニー数をカウントした。

C. 研究結果

1. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

(1) STEC 検査

1 ロットの定義は、同一カット日が 1 施設、同一と畜日が 1 施設、同一農場・

同一と畜日が5施設、同一農場・同一と畜日・同一カット日が3施設であった(表1)。検体採取法は、全施設がN60サンプリング法であり、検体は複数の個体または枝肉の混合であった。前培養条件は、通知法に準拠が3施設、米国農務省が発行している Microbiology Laboratory Guidebook (MLG)に準拠が1施設、AOACに準拠が6施設だった(表2)。遺伝子検出のための使用機器は、クオリボックス Q7 システムが7施設、RapidFinder が3施設だった。判定時のトラブルは、7施設で認められ、陽性対照 DNA 溶液の偽陰性等が挙げられた。陽性対照 DNA 溶液の作成方法は、通知法に準拠が9施設、通知法を一部改正して実施が1施設だった(表3)。病原因子確認試験の方法は、概ね通知法に準拠が9施設、クオリボックスの説明書に準拠が1施設だった(表4)。免疫磁気ビーズのプロトコルは、全施設で「生研」デンカを使用しており、キットのプロトコルに準拠が8施設、一部改変が2施設だった(表5)。

(2) サルモネラ検査

検体採取法および前培養条件は、全施設が MLG および農林水産省が公開しているアメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱に準拠していた(表6)。遺伝子検出のための使用機器は、クオリボックス Q7 システムが8施設、3M Molecular Detection System が2施設だった(表7)。判定時のトラブルは、クオリボックス Q7 システムを使用している5施設で認められた。陽性対照株は様々な血清型が供試されており、培地への植菌量は、施設に

よって様々であった(表8)。

2. STEC 免疫磁気ビーズの濃縮工程の検証

STEC 026、0111 および 0157 の各菌液において免疫磁気ビーズ 0145 で濃縮後の菌数は、各血清型特異的免疫磁気ビーズで濃縮した場合と比較して $1.9 \sim 2.5 \log_{10}$ 低下した(図1)。また、STEC 0145 菌液を免疫磁気ビーズ 0157 で濃縮した場合は、0145 特異的免疫磁気ビーズで濃縮した場合に比べて菌数が $1.7 \log_{10}$ 低下した。一方で、STEC 045、0103 および 0121 の各菌液については、免疫磁気ビーズ 0145 と各血清型特異的免疫磁気ビーズとの菌数差は $1.0 \log_{10}$ 以下であった。

また、STEC 0103 の菌液を3種類の菌濃度 (10^5 CFU/mL、 10^7 CFU/mL および 10^9 CFU/mL) で各種血清型特異的免疫磁気ビーズを用いて濃縮したところ、どの菌濃度においても免疫磁気ビーズ 0103 で濃縮後の菌数が他の血清型免疫磁気ビーズでの濃縮後の菌数よりも高かった(図2)。免疫磁気ビーズ 0103 濃縮後と他の血清型免疫磁気ビーズ濃縮後との菌数差は、 10^9 CFU/mL の菌液よりも 10^5 CFU/mL および 10^7 CFU/mL の菌液でより大きくなる傾向が認められた。0103 以外の血清型免疫磁気ビーズ間で濃縮後の菌数に大きな差は認められなかった。

D. 考察

STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査では、令和5年度から追加で1施設の結果が加わった。令和5年度と同様に複数の項目において施設ごとに異なる点が認められたが、内容は各食肉取扱施設の処理工程および処理頭数等の状況に合わ

せて適切に設定されており、問題はないと考えられた。一方で、各施設において記載内容および基準設定に迷う箇所があるとの相談を受けることは多く、特に新規登録施設では、既存の登録施設と SOP を共有する機会を設けることが可能であれば、より正確な検査法の逸脱防止および検査員の負担軽減に繋がると考えられた。また、クオリボックス Q7 システムおよび RapidFinder での STEC 判定時のトラブルは、10 施設中 7 施設で認められており、今後、判定時のトラブルが発生した状況および供試した試薬の保管方法等の詳細な情報を追加で聞き取る必要があると考えられた。STEC 免疫磁気ビーズの濃縮工程の検証では、STEC 045、0103 および 0121 の菌液を免疫磁気ビーズ 0145 で濃縮後の菌数とその他の血清型の免疫磁気ビーズで濃縮後の菌数との差が 1.0 log₁₀ 以下であったことから、STEC 菌液の血清型と免疫磁気ビーズの組み合わせによっては、非特異的濃縮が生じることが示唆された。3つの菌濃度の STEC 0103 菌液を用いた試験では、10⁹ CFU/mL よりも 10⁵ CFU/mL および 10⁷ CFU/mL での免疫磁気ビーズ濃縮で血清型特異的濃縮と非特異的濃縮の差が大きかったことから、濃縮前の菌数が多いほど非特異的濃縮が顕著に生じることが推察された。そのため、精度管理試験等で特定の血清型の STEC のみに汚染され、その他の大腸菌等の汚染が少ない牛肉検体を用いた場合、培養液中の当該 STEC の菌数が 10⁹ CFU/mL に近くなり、免疫磁気ビーズでの濃縮で非特異的濃縮が生じやすくなると考えられた。

E. 結論

日本の対米輸出認定食肉取扱施設の

STEC 検査およびサルモネラ検査において、各施設の SOP は異なる記載はあるものの、問題点は認められなかった。免疫磁気ビーズ濃縮では、特定の血清型の STEC と免疫磁気ビーズの組み合わせで非特異的濃縮が起こりやすいことが示唆された。今後検証を進め、改善策を提示する必要があると考えられた。

F. 研究発表

(誌上発表)

Hirose, S., Tomaru, A., Akiyama, H., Hara-Kudo, Y. Effective decontamination methods for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on beef carcass surfaces for application in beef carcass hygiene. J. Food Prot. 2024 Nov;87(11):100366. doi: 10.1016/j.jfp.2024.100366.

(学会発表)

Ikeuchi, S. Hirose, S., Chiba, Y., Akiyama, H., Hayashidani, H., and Hara-Kudo, Y. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* contamination on the surfaces of beef carcasses in slaughterhouses in Japan. IAFP Annual Meeting 2024. 2024年7月15日 米国.

G. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

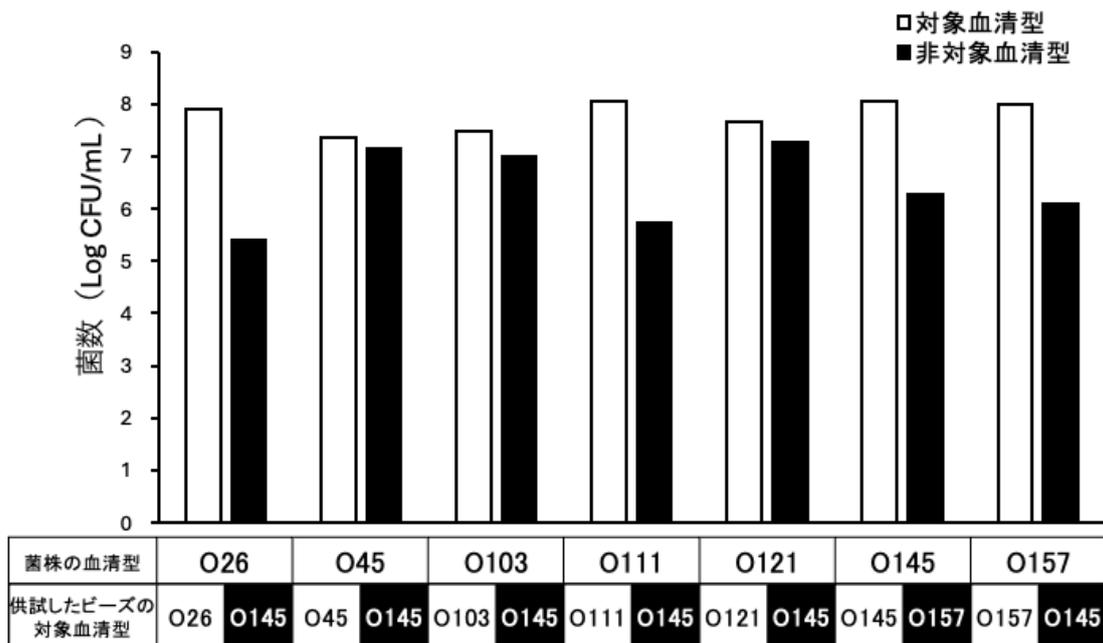


図1 STEC O26、O45、O103、O111、O121、O145 および O157 菌液の当該血清型免疫磁気ビーズおよび免疫磁気ビーズ O145 での濃縮後の菌数

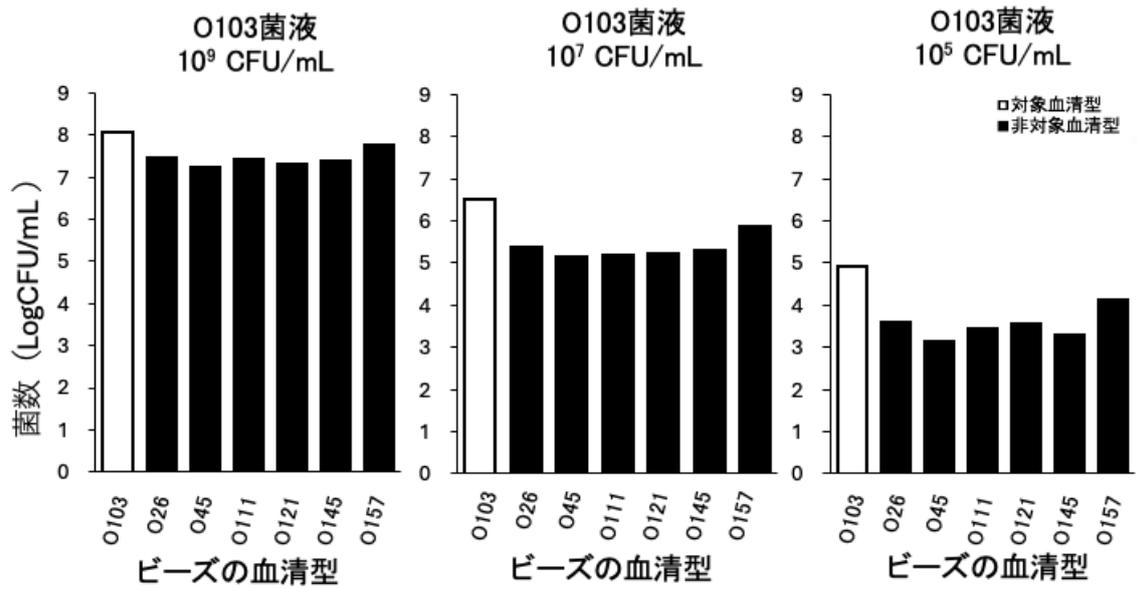


図2 菌濃度ごとの STEC O103 菌液の各血清型免疫磁気ビーズでの濃縮後の菌数

表1. STEC検査1ロットの定義および検体採取方法

項目	施設数
1ロットの定義	
同一カット日	1
同一と畜日	1
同一農場および同一と畜日	5
同一農場、同一と畜日および同一カット日	3
検体	
複数の個体または枝肉	10
検体採取方法	
N60法	10

表2. STEC検査の検体培養条件、遺伝子検出方法および判定時のトラブル

項目	施設数
検体培養要件	
通知法 例1 MLG	1
通知法 例2 AOAC	6
通知法 例3	3
遺伝子検出使用機器	
Applied BioSystems Rapid Finder STEC (AOAC)	3
BAXクオリボックスQ7 (MLG)	7
遺伝子検出キット	
STEC Ditection Workflow (AOAC061602)	3
STEC Screening(AOAC091301)	
E.coli O157:H7(AOAC031002)	6
STEC Panel 1&2(AOAC022203)	
判定時のトラブル (Applied BioSystems Rapid Finder STEC)	
あり	2
なし	1
判定時のトラブル (BAXクオリボックスQ7)	
あり	5
なし	2

表3. 陽性対照DNA溶液の作製方法

項目	施設数
作製方法の根拠	
通知法	9
通知法から一部改変	1
増菌培地	
mTSB	8
TSB	1
羊血液寒天培地 (MLG)	1

表4. コロニーからの病原因子確認試験の方法

項目	施設数
DNA抽出方法の根拠	
通知法	9
BAXクオリボックスQ7	1
抽出方法	
1 コロニーを100 μ l の滅菌蒸留水に懸濁し、97 \pm 2 $^{\circ}$ C、10 分間加後 14,000 \times g の遠心処理した上清をキットへ	9
1 コロニーを100 μ l の滅菌蒸留水に懸濁し、検体培養液と同様の操作で キットへ	1

表5. 免疫磁気ビーズのプロトコル

項目	施設数
免疫磁気ビーズ試薬	
「生検」デンカ	10
免疫磁気ビーズの洗浄回数	
1 回	8
2 回以上	1
3 回	1

表6. サルモネラ件あ の検体採取法および培養法

項目	施設数
検体	
去勢／未経産 82	4
去勢／未経産 82 + 廃用／種雄 58	6
検体採取方法	
牛枝肉表面3か所（腹部、胸部及び臀部）それぞれ100 cm ² を滅菌 mTSB培地 10 mlを含ませたスポンジで拭き取り	10
増菌培地	
mTSB 60 mL（検体採取時にスポンジに染み込ませた10 mLを含む）	10
検体の培養条件	
42°C ± 1°Cで15~24時間	8
42°C ± 0.5°Cで22~24時間	2

表7. サルモネラ属遺伝子検出のための使用機器および判定時のトラブル

項目	施設数
サルモネラ属菌遺伝子検出機器	
BAXクオリボックスQ7（AOAC）	8
3M Molecular Detection System (MLG)	2
サルモネラ属菌遺伝子検出キット	
エンドポイント試薬サルモネラ2	8
3M病原菌検出アッセイサルモネラ属菌用	2
判定時のトラブル（BAXクオリボックスQ7）	
あり	5
なし	1
聞き取り未調査	2
判定時のトラブル（3M Molecular Detection System）	
あり	0
なし	2

表8. サルモネラ陽性対照株の管理方法

項目	施設数
サルモネラ陽性対照株の増菌培地	
mTSB 60 mL	10
植菌量	
マクファーランド0.5に希釈した培養液を1 μ L	4
マクファーランド0.5に希釈した培養液を1白金耳	1
3M病原菌検出アッセイサルモネラ属菌用	1
培養液を1白金耳	1
保存培養液の約13倍希釈液を1 mL	1
マイクロバンクビーズ1粒	1
1白金耳 (10 μ L) あるいはマイクロバンクビーズ1粒	1
サルモネラ陽性対照株 (<i>Salmonella enterica</i>) の血清型	
AbaetetubaおよびCholeraesuis	1
AbaetetubaおよびEnteritidis	1
AboyおよびEnteritidis	1
AboyおよびEnteritidisあるいはCholeraesuis	1
BaetetubaおよびSenftenberg	1
DerbyおよびHarder	1
EnteritidisおよびCholeraesuis	1
TyphimuriumおよびInfantis	1
TyphimuriumおよびMuenchen	1
SOPに記載なし	1
保存方法	
マクファーランド0.5に希釈した培養液を-20°C以下で保存	3
普通寒天斜面培地で4°C保存	2
カジトン培地で4°C保存	1
マイクロバンクビーズを冷凍保存	1
マイクロバンクビーズを-70°C以下で保存あるいは培養液を-75°C以下で保存	1
スキムミルク中 10^5 から 10^6 CFU/mLで-20°Cに保存	1
培養液を10倍希釈し-70°C以下で保存	1

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
該当なし							

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
畑寛子, 池側智香子, 飯塚誠一郎, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穂山浩, 志田(齊藤)静夏.	牛尿中の2-チオウラシル, 4-チオウラシルおよび6-メチル-2-チオウラシル分析法の確立および妥当性評価: 欧州連合への牛肉輸出時のモニタリング検査のための分析法	食品衛生学雑誌	65	178-184	2024
高木千陽, 中村歩, 河野洋一, 伊藤里恵, 堤智昭, 穂山浩, 志田(齊藤)静夏.	欧州連合への日本産牛肉輸出時のモニタリング検査のための牛尿中レゾルシル酸ラクトン類分析法の確立および性能評価	食品衛生学雑誌	66	32-38	2025
Hirose, S., Tomaru, A., Akiyama, H., Hara-Kudo, Y.	Effective decontamination methods for Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> on beef carcass surfaces for application in beef carcass hygiene.	J. Food Prot.	87	100366	2024
Hiroshi Akiyama, Yusuke Iwasaki, Rie Ito	Basic Principles for Setting MRLs for Pesticides in Food Commodities in Japan	Food Safety	12	34-51	2024

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

機関名 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6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強化に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬学部・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) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「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7年3月21日

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

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 本間 正充

次の職員の令和6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強化に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品部 ・ 第三室長

(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) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「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
—(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
—(国立保健医療科学院長)—

機関名 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6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強化に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬学部・教授

(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) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「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7年3月31日

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

機関名 国立保健医療科学院

所属研究機関長 職名 院長

氏名 曾根 智史

次の職員の令和6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強化に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 生活環境研究部・上席主任研究官

(氏名・フリガナ) 吉富 真理・ヨシトミ マリ

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) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「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7年3月21日

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

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 本間 正充

次の職員の令和6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強化に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 衛生微生物部 ・ 主任研究官

(氏名・フリガナ) 廣瀬 昌平 ・ ヒロセ ショウヘイ

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。