

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

令和 7 年度 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 8 年(2026 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
亀山 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	----- 24
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	----- 65
工藤 由起子	
3. 国内の食肉輸出施設の監視指導検査員の研修プログラムの充実	----- 88
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	----- 101
廣瀬 昌平	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 110

I. 総括研究報告

星薬科大学

穂山 浩

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7年度 総括研究報告書

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: **課題 1:** 牛肉等の食肉を 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。また、輸出先である EU で行われる輸入時検査において 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、原因調査を行う必要がある。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、鶏筋肉中のニトロイミダゾール類分析法及び牛／鶏筋肉中の β -作動薬分析法を開発し、妥当性評価試験を実施した。ニトロイミダゾール類分析法として、試料からアセトン及び酢酸で抽出した後、強酸性陽イオン交換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。鶏筋肉を用いて添加濃度 $0.1 \mu\text{g/kg}$ (ジメトリダゾール、ロニダゾール、2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾールは $0.2 \mu\text{g/kg}$) で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。また、 β -作動薬 (クレンプテロール、ラクトパミン、サルブタモール、ジルバテロール、シマテロール) 分析法として、試料からアセトンで抽出した後、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を確立した。牛及び鶏筋肉を用いて添加濃度 $0.5 \mu\text{g/kg}$ (クレンプテロールは $0.05 \mu\text{g/kg}$ 、シマテロールは $0.1 \mu\text{g/kg}$) で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、ニトロイミダゾール類分析法及び β -作動薬分析法はいずれも残留分析法として妥当であることが示された。**課題 2:** 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、2025 年 4 月から 3 施設の協力のもとに牛枝肉合計 156 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、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、STEC7 血清群については、*stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、045 血清群、0121 血清群いずれも陽性となった培養液が 1 検体あり、菌分離を行ったが、STEC045 または 0121 は分離されなかった。サルモネラ属菌については、リアルタイム PCR 陽性検体はなかった。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。使用マニュアルを作成したので、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。**課題 3:** 「輸出食肉認定施設における検査実施要領」に基づき、米国等向け輸出食肉の検証を担う新任指名検査員が、業務遂行に必要な知識および技術を効率的に習得するために、HACCP の基礎的な知識に関するオンデマンド教材、と畜・解体工程等を題材とした演習教材、米国 FSIS 関連法令の邦訳資料、妥当性確認及び検証に用いる科学的根拠文献と概要の一覧等を作成した。教材を用いて、2 か所の食肉衛生検査所において、HACCP の基礎的な研修を実施した結果、オンデマンド教材の視聴および対面演習を通じて参加者の理解度向上が確認され、オンデマンド教材の利便性及び演習の有効性が示された。さらに、指名検査員のパフォーマンス評価実施要領に基づき、新任指名検査員向け研修プログラム案を作成し、各検査所における体系的な人材育成に資する研修の枠組みを提示した。新任指名検査員向け教材及び参考資料を作成し、研修案を提示したので、各検査所で運用し、さらに指名検査員全体の研修体制の充実に資する仕組みについて検討を進めることが望まれる。**課題 4:** 対米輸出向け食肉の STEC 検査において報告された誤判定事例を踏まえ、市販の STEC 検査キットであるクオリバックス Q7 システムおよび RapidFinder について、誤判定がどのような条件で発生しうるのであるかを検証した。クオリバックス Q7 システムでは、開封後一定期間経過した試薬の一部で偽陽性、偽陰性および判定不能が認められた一方、開封直後の試薬ではこれらは認められなかったことから、試薬の保存条件が判定結果に影響する可能性が示唆された。RapidFinder では報告のあった偽陰性は再現されなかったが、高濃度の菌存在下の検体で *eae* の蛍光強度低下が認められ、これが偽陰性の一因となる可能性が考えられた。また、検体の希釈により蛍光強度低下が軽減されたことから、必要に応じた希釈操作が偽陰性の改善に有効であることが示唆された。以上より、適切な試薬管理および必要に応じた検体の希釈が検査精度の確保に重要であると考えられた。

研究分担者

志田(齊藤)静夏(国立医薬品食品衛生研究所
食品部第三室長)

工藤由起子(星薬科大学教授)

吉富真理(国立保健医療科学院上席主任研究
官)

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

遠藤裕美(岩手県食肉衛生検査所)

永島琴美、田中倖恵(栃木県食肉衛生検査所)

日本フードパッカー株式会社

天野壮俊、伊藤彩花、佐伯英莉衣、佐藤菜々美、
森谷悠衣、鏡山雅人、本多伽衣、大塚佳代子、奥
輝明、築地 信(星薬科大学)

大塚 衣映(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)

森田 幸雄(麻布大学)

山崎 栄樹(国立医薬品食品衛生研究所)

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での輸入時検査においてA
物質であるβ-作動薬及びニトロイミダゾール類が
検出された場合に、その原因調査のために必要な
分析法を検討した。

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. 研究方法

課題 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

[1] ニトロイミダゾール類(ジメトリダゾール、ロニダ
ゾール、メトロニダゾール、イプロニダゾール、2-ヒド
ロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール、1-(2-ヒ
ドロキシエチル)-2-ヒドロキシメチル-5-ニトロイミダ
ゾール、1-メチル-2-(2'-ヒドロキシイソプロピル)-5-ニ
トロイミダゾール)分析法

1. 試料

鶏の筋肉は、インターネット経由で千葉県産を購
入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクープブリー
クサーを用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

ジメトリダゾール標準品:純度 99.6%(富士フイルム
和光純薬製)(DTZ 標準品)

ロニダゾール標準品:純度 98.95%(Dr.Ehrenstorfer

製) (RNZ 標準品)

メロニダゾール標準品:純度 100.0%(富士フイルム和光純薬製) (MNZ 標準品)

イプロニダゾール標準品:純度 99.2%(富士フイルム和光純薬製) (INZ 標準品)

ジメトリダゾール代謝産物 A 標準品:純度 99.5% (富士フイルム和光純薬製) (HMMNI 標準品)

メロニダゾール-OH 標準品:純度 99.1%(Sigma-Aldrich 製) (MNZOH 標準品)

イプロニダゾール代謝産物 B 標準品:純度 99.8% (富士フイルム和光純薬製) (INZOH 標準品)

ジメトリダゾール-d₃:(富士フイルム和光純薬製) (DTZ-d₃)

ロニダゾール-d₃:(林純薬工業製) (RNZ-d₃)

メロニダゾール-d₄:(林純薬工業製) (MNZ-d₄)

イプロニダゾール-d₃:(Sigma-Aldrich 製) (INZ-d₃)

ヒドロキシジメトリダゾール-d₃:(Toronto Research Chemicals 製) (HMMNI-d₃)

ヒドロキシメロニダゾール-d₄:(Toronto Research Chemicals 製) (MNZOH-d₄)

ヒドロキシイプロニダゾール-d₃:(Toronto Research Chemicals 製) (INZOH-d₃)

メタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、酢酸:特級(富士フイルム和光純薬製)

アセトン、28%アンモニア水:特級(関東化学製)

ギ酸:LC-MS 用(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)

強酸性陽イオン交換ミニカラム: Bond Elut SCX(500 mg/3 mL、Agilent 製)

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

水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1):水 900 mL、メタノール 100 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。

酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1):酢酸エチル 95 mL 及び酢酸 5 mL を混合した。

アセトニトリル及び 28%アンモニア水の混液

(49:1):アセトニトリル(特級)98 mL 及び 28%アンモニア水 2 mL を混合した。

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

標準原液:DTZ 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。RNZ 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。MNZ 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。INZ 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。HMMNI 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。MNZOH 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。INZOH 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。

内標準原液:10 mg 容量の DTZ-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量の RNZ-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量の MNZ-d₄をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量の INZ-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。5 mg 容量の HMMNI-d₃をメタノールで洗いこみ、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 MNZOH-d₄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。2.5 mg 容量の INZOH-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液:DTZ 標準原液、RNZ 標準原液及び HMMNI 標準原液をメタノールで希釈して 10 mg/L 混合溶液を調製した。MNZ 標準原液、INZ 標準原液、MNZOH 標準原液及び INZOH 標準原液をメタノールで希釈して 5 mg/L 混合溶液を調製した。さらに、これら溶液を水、メタノール及びギ酸

の混液(900:100:1)で希釈して 2 µg/L(DTZ、RNZ 及び HMMNI)及び 1 µg/L(MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH)混合溶液を調製した。

添加用内標準溶液:DTZ-d₃ 内標準原液、RNZ-d₃ 内標準原液及びHMMNI-d₃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。MNZ-d₄ 内標準原液、INZ-d₃ 内標準原液、MNZOH-d₄ 内標準原液及び INZOH-d₃ 内標準原液をメタノールで希釈して 0.5 mg/L 溶液を調製した。さらに、これら溶液を水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)で希釈して 20 µg/L(DTZ-d₃、RNZ-d₃ 及び HMMNI-d₃) 及び 10 µg/L(MNZ-d₄、INZ-d₃、MNZOH-d₄ 及び INZOH-d₃)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(東京理化工械製)

遠心分離機: H-60R(コクサン製)

LC-MS/MS

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

4. 定量

DTZ 標準原液、RNZ 標準原液及び HMMNI 標準原液をメタノールで希釈して 10 mg/L 混合溶液を調製した。MNZ 標準原液、INZ 標準原液、MNZOH 標準原液及び INZOH 標準原液をメタノールで希釈して 5 mg/L 混合溶液を調製した。DTZ-d₃ 内標準原液、RNZ-d₃ 内標準原液及び HMMNI-d₃ 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。MNZ-d₄ 内標準原液、INZ-

d₃ 内標準原液、MNZOH-d₄ 内標準原液及び INZOH-d₃ 内標準原液をメタノールで希釈して 0.5 mg/L 溶液を調製した。さらに、これら溶液を水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)で希釈して内標準混合標準溶液を調製した。

DTZ、MNZ 及び INZ はこの溶液 0.4 µL を、RNZ、HMMNI、MNZOH 及び INZOH は 4 µL を LC-MS/MS に注入して、得られた DTZ-d₃ のピーク面積に対する DTZ、RNZ-d₃ のピーク面積に対する RNZ、MNZ-d₄ のピーク面積に対する MNZ、INZ-d₃ のピーク面積に対する INZ、HMMNI-d₃ のピーク面積に対する HMMNI、MNZOH-d₄ のピーク面積に対する MNZOH 及び INZOH-d₃ のピーク面積に対する INZOH のピーク面積の比を用いて検量線を作成した。DTZ、MNZ 及び INZ は試験溶液 0.4 µL を、RNZ、HMMNI、MNZOH 及び INZOH は 4 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から内部標準法により DTZ、RNZ、MNZ、INZ、HMMNI、MNZOH 及び INZOH の含量を算出した。

5. 添加試料の調製

試料 10 g に添加用混合標準溶液[2 µg/L(DTZ、RNZ 及び HMMNI)及び 1 µg/L(MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH)]1000 µL[水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)]及び添加用内標準溶液[20 µg/L(DTZ-d₃、RNZ-d₃ 及び HMMNI-d₃)及び 10 µg/L(MNZ-d₄、INZ-d₃、MNZOH-d₄ 及び INZOH-d₃)]500 µL[水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)]を添加し、30 分間放置した。

6. 試験溶液の調製

概要

DTZ、RNZ、MNZ、INZ、HMMNI、MNZOH 及び INZOH を試料からアセトン及び酢酸で抽出した後、ベンゼンスルホン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。

(1)抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り採り、アセトン 50 mL 及び酢酸 1 mL を加えた後、ホモジナイザーで撹拌した。2250 ×g で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。次いで残留物にアセトン 30 mL を加え、ホモジナイザーで撹拌した。2250 ×g 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、アセトンで定容した。

(2)精製

抽出液 5 mL (試料 0.5 g 相当) に酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1) 5 mL を混合した液をベンゼンスルホンルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Bond Elut SCX(500 mg/3 mL)] (あらかじめメタノール 3 mL、酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1) 3 mL で洗浄したもの) に負荷した。アセトン 5 mL、メタノール 5 mL 及びアセトニトリル 5 mL で洗浄した後、アセトニトリル及び 28% アンモニア水の混液 (49:1) 15 mL で溶出した。溶出液をナス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、メタノール及びギ酸の混液 (900:100:1) 0.5 mL に溶解し、メンブレンフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

7. マトリックス添加標準溶液の調製

「6. 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 0.2 µg/L(DTZ, RNZ 及び HMMNI) 及び 0.1 µg/L(MNZ, INZ, MNZOH 及び INZO) 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。

8. 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度 [0.2 µg/kg(DTZ, RNZ 及び HMMNI) 及び 0.1 µg/kg(MNZ, INZ, MNZOH 及び INZO)] 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] β-作動薬(クレンプテロール、ラクトパミン、サルブタモール、ジルパテロール、シマテロール)分析法

1. 試料

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

鶏の筋肉は、インターネット経由で千葉県産を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクープブリクサーを用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

クレンプテロール標準品: 純度 99.9% (林純薬工業製) (CBT 標準品)

ラクトパミン塩酸塩標準品: 純度 96.3% (Sigma-Aldrich 製) (RCP 塩酸塩標準品)

サルブタモール標準品: 純度 99.99% (Sigma-Aldrich 製) (SAL 標準品)

ジルパテロール塩酸塩標準品: 純度 96.7% (Sigma-Aldrich 製) (ZPT 塩酸塩標準品)

シマテロール標準品: 純度 100.0% (Sigma-Aldrich 製) (CMT 標準品)

クレンプテロール-d₉: (Sigma-Aldrich 製) (CBT-d₉)

ラクトパミン-d₆ 塩酸塩: (Toronto Research Chemicals 製) (RCP-d₆ 塩酸塩)

サルブタモール-d₉: (Toronto Research Chemicals 製) (SAL-d₉)

ジルパテロール-(イソプロピル- $^{13}\text{C}_3$)塩酸塩:
(Sigma-Aldrich 製) (ZPT- $^{13}\text{C}_3$ 塩酸塩)
シマテロール- d_7 :(Sigma-Aldrich 製) (CMT- d_7)
メタノール:LC-MS 用(富士フイルム和光純薬製)
ギ酸:LC-MS 用(富士フイルム和光純薬製)
メタノール、酢酸アンモニウム、25%アンモニア水:
特級(富士フイルム和光純薬製)
アセトン:特級(関東化学製)
スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロ
リドン共重合体ミニカラム:Oasis MCX (500 mg/6
mL、Waters 製)
メンブレンフィルター:TORAST Disc(0.22 μm 、島
津ジーエルシー製)
メタノール及び水の混液(1:1):メタノール(特級)500
mL 及び水 500 mL を混合した。
水及びメタノールの混液(95:5):水 950 mL 及びメ
タノール(特級)50 mL を混合した。
水及び 25%アンモニア水の混液(98:2):水 98 mL
及び 25%アンモニア水 2 mL を混合した。
メタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2):メ
タノール(特級)98 mL 及び 25%アンモニア水 2 mL
を混合した。
水、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液及びギ酸の混
液(1000:2:1):水 1000 mL、1 mol/L 酢酸アンモニ
ウム溶液 2 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。
標準原液:CBT 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。
RCP 塩酸塩標準品約 11.7 mg(RCP 10 mg 相当)
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。SAL 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。
ZPT 塩酸塩標準品約 5.9 mg(ZPT 5 mg 相当)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。CMT 標準品約 5 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:10 mg 容量の CBT- d_9 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 RCP- d_6 塩酸
塩をメタノール(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。2.5 mg 容
量の SAL- d_9 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。
10 mg 容量の ZPT- $^{13}\text{C}_3$ 塩酸塩をメタノール(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 CMT- d_7 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。

添加用標準溶液:CBT 標準原液をメタノール(特
級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。RCP 標準
原液、SAL 標準原液及び ZPT 標準原液をメタノー
ル(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。CMT
標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶
液を調製した。さらに、これら溶液を水及びメタノー
ルの混液(95:5)で希釈して 5 $\mu\text{g/L}$ (CBT)、50
 $\mu\text{g/L}$ (RCP、SAL 及び ZPT)及び 10 $\mu\text{g/L}$ (CMT)混
合溶液を調製した。

添加用内標準溶液:CBT- d_9 内標準原液及び
CMT- d_7 内標準原液を水及びメタノールの混液
(95:5)で希釈して 0.1 mg/L 溶液を調製した。RCP-
 d_6 内標準原液、SAL- d_9 内標準原液及び ZPT- $^{13}\text{C}_3$
内標準原液を水及びメタノールの混液(95:5)で希
釈して 0.5 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(95:5)で希釈して 10
 $\mu\text{g/L}$ (CBT- d_9 及び CMT- d_7)及び 50 $\mu\text{g/L}$ (RCP- d_6 、
SAL- d_9 及び ZPT- $^{13}\text{C}_3$)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(東京理化工
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 6500+	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

4. 定量

CBT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。RCP 標準原液、SAL 標準原液及び ZPT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。CMT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。これら溶液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.625 µg/L(CBT)、6.25 µg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 1.25 µg/L(CMT)混合溶液、及び 0.0625 µg/L(CBT)、0.625 µg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.125 µg/L(CMT)混合溶液を調製した。CBT-d₉ 内標準原液及び CMT-d₇ 内標準原液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.1 mg/L 溶液を調製した。RCP-d₆ 内標準原液、SAL-d₉ 内標準原液及び ZPT-¹³C₃ 内標準原液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.5 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(95:5)で希釈して 2.5 µg/L(CBT-d₉ 及び CMT-d₇) 及び 12.5 µg/L(RCP-d₆、SAL-d₉ 及び ZPT-¹³C₃)混合溶液を調製した。さらに、これら溶液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して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 CBT-d₉ のピーク面積に対する CBT、RCP-d₆ のピーク面積に対する RCP、SAL-d₉ のピーク面積に対する SAL、ZPT-¹³C₃ のピーク面積に対する ZPT、CMT-d₇ のピーク面積に対する CMT 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 CBT、RCP、SAL、ZPT 及び CMT の含量を算出した。

5. 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液[5 µg/L(CBT)、50 µg/L(RCP、SAL 及び ZPT) 及び 10 µg/L(CMT)]100 µL[水及びメタノールの混液(95:5)]及び添加用内標準溶液[10 µg/L(CBT-d₉ 及び CMT-d₇)及び 50 µg/L(RCP-d₆、SAL-d₉ 及び ZPT-¹³C₃)]500 µL[水及びメタノールの混液(95:5)]を添加し、30 分間放置した。

6. 試験溶液の調製

概要

CBT、RCP、SAL、ZPT 及び CMT を試料からアセトンで抽出した後、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認した。

(1)抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り採り、アセトン 100 mL を加えた後、ホモジナイザーで撹拌した。2250 ×g で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。次いで残留物にアセトン 50 mL を加え、ホモジナイザーで撹拌した。2250 ×g で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせ、アセトンで定容した。

(2)精製

抽出液 10 mL (試料 0.5 g 相当)に酢酸 500 µL を混合した液をスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis MCX (500 mg/6 mL)] [あらかじめメタノール(特級)5 mL、水及びメタノールの混液(1:1)5 mL で洗浄したもの]に負荷した。水及びメタノールの混液(1:1)5 mL、メタノール(特級)10 mL、水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)及びメタノール(特級)5 mL で洗浄した後、メタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)15 mL で溶出した。溶出液をナス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(95:5)2 mL

に溶解し、メンブレンフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

7. マトリックス添加標準溶液の調製

「6. 試験溶液の調製」に記載した方法に従い牛及び鶏の筋肉のブランク試料を濃縮(溶媒除去)操作まで行い、残留物に 0.0125 µg/L(CBT)、0.125 µg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.025 µg/L(CMT) 混合溶液 2 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。

8. 妥当性評価試験

牛及び鶏の筋肉を対象に定量限界濃度[0.05 µg/kg(CBT)、0.5 µg/kg(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.1 µg/kg(CMT)]で妥当性評価試験を実施した。牛の筋肉については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。また、鶏の筋肉については妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 5 回(5 併行)行い、各性能パラメータを評価した。

課題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

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

2025 年 4 月から 2026 年 3 月に国内の食肉衛生検査所 3 ヶ所にて、ウシ 156 頭からサンプリングを行った。

(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 156 検体であった。

(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(156 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

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2mL を Tryptone soya broth (TSB) 8mL 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 Assay1 (*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/O157) では 16SrRNA 遺伝子および O157 遺伝子を、Assay3 (O26/O111)では O26 遺伝子および O111 遺伝子

を、Assay4 (O45/O121) では O45 遺伝子および O121 遺伝子を、Assay5 (O103/O145) では O103 遺伝子および O145 遺伝子を検出する。

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 Assay1、2 を行った。その結果、*stx* 陽性かつ *eae* 陽性の検体は、続けて Assay3、4、5 を同時に行い、7 血清群 O 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 O 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 O 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 O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157「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、Assay1 および目的とする O 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 O 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 O 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 O26、O45、O103、O111、O121、O145 および O157 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、抗 H 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

1) 試験検体

STEC 試験で調製した mTSB 培養液 156 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。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 (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) へ画線塗抹するのと同時に、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」(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

サルモネラ属菌が分離された検体について、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

以下の2種類を供試した。

① SureTect 試薬シリーズの STEC 検出

キット(ThermoFisherScientific[米国]、サーモフィッシュャーサイエンティフィック)

• Sure Tect E. coli O157 and STEC Screening PCR Assay[試料液中の検出対象微生物細胞の溶菌試薬、遺伝子検出試薬: *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子検出]

• Sure Tect E. coli STEC Identification PCR Assay [*E. coli* O26, O45, O103, O111, O121, O145, O157 の各血清型抗原遺伝子検出]

② Molecular Detection Assay2-STECS Gene Screen (Neogen[米国]、ネオジェンジャパン)

Molecular Detection Assay2-STECS Gene Screen(*stx* and *eae*)[試料液中の検出対象微生物細胞の溶菌試薬、遺伝子検出試薬: *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子検出]

(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 O26:1 株(VT1)、O45:1 株(VT1)、O103:1 株(VT1)、O111:1 株(VT1 & 2)、O121:1 株(VT2)、O145:1 株(VT1)、O157:2 株(VT2、VT1 & 2)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。

さらに、希釈を細分化した菌希釈検体を作製した。O26 の 10⁻⁴ 希釈菌液を 4 倍希釈および 6 倍希釈した。O45 の 10⁻⁴ 希釈菌液を 1.5 倍希釈および 2 倍希釈した。O45 の 10⁻⁴ 牛肉培養液を 1.5 倍希釈および 2 倍希釈した。O103 の 10⁻⁴ 希釈菌液を 4

倍希釈した。O111 の 10^{-4} 希釈菌液を 6 倍希釈した。O111 の 10^{-4} 牛肉培養液を 2 倍希釈および 6 倍希釈した。O145 の 10^{-4} 希釈菌液を 2 倍希釈、3 倍希釈および 6 倍希釈した。O145 の 10^{-4} 牛肉培養液を 6 倍希釈した。O157(VT2)の 10^{-4} 希釈菌液を 3.5 倍希釈および 7 倍希釈した。O157(VT2)の 10^{-4} 牛肉培養液を 7 倍希釈した。

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℃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。

(4) キット使用のためのマニュアル作成

食肉衛生検査所でのキット導入に必要な使用マニュアルを作成した。試薬構成、必要機材、キットの使用法の動作詳細の写真を主にし、初心者でもわかりやすい内容にした。

課題 3: 国内の食肉輸出施設の監視指導検査員の研修プログラムの充実

新任指名検査員向け研修教材及び参考資料を作成し、それらを活用した研修により教材の検証を行った。また、新任指名検査員向けプログラム案を作成した。

1. 研修教材及び参考資料の作成

1.1 講義資料のオンデマンド教材化及び演習教材の作成

HACCP の基礎的な講義について、昨年度作成した講義資料に参考資料を追加し、自主学習用のオンデマンド教材を作成した。

また、指名検査員が実施する検証のうち、微生物検査の意義と評価方法について、学習する機会がないことから、オンデマンド教材に追加した。

演習は、CCP 工程がわかりやすい加熱食肉製

品の製造工程について実施後、と畜・解体工程について行うこととし、各製造工程の動画と演習で用いる資料、ワークシートを作成した。

1.2 食肉処理に係る検証の動画教材の作成

令和6年度に作成したと畜・解体工程の検証の動画教材と同様、対象者を検査実施要領に基づく検証の経験がほとんどない新規着任者として設定し、食肉処理工程の検証について、作成した。

1.3 業務参考資料の作成及び整備

1.3.1 輸出先国の食肉の衛生管理に係る法令及び通知等の邦訳

教材の補助資料の作成及び輸出先国の法令として昨年度に引き続き、アメリカ合衆国農務省食品検査局(以下、FSIS)の HACCP 規則等の邦訳し、必要に応じて解説を付けた。

1.3.2 妥当性確認及び検証の参考資料

と畜・解体工程の HACCP に基づく衛生管理の妥当性確認または検証に関する論文等の情報収集を行った。

2. 教材を用いた研修の検証

1.1 の教材を用いて、令和8年1～3月に、2 か所の食肉衛生検査所で検査実施要領の指名検査員検証の基礎研修(以下、基礎研修)を実施し、教材の効果を検証した。実施計画は以下のとおり。

2.1 参加者

指名検査員の経験が数年以内で、グループワークに必要な4～6名が参加できる食肉衛生検査所の職員。

2.2 オンデマンド教材の視聴

・オンデマンド教材の視聴可能期間:1か月

・参考テキスト: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)

・参考情報: CODEX 食品衛生の一般原則 2022 の対訳(公益社団法人日本食品衛生協会)

<https://www.n-shokuei.jp/eisei/pdf/>

ippangensoku_22.pdf

・課題:教材視聴後、教材内容について3問以上の質問の提出

2.3 グループワーク演習

方式:対面

演習題材:加熱食肉製品及びと畜・解体工程

ファシリテーター:研究班員

2.4 研修に関するアンケート調査

オンデマンド教材視聴後及び演習終了後に、参加者の理解度の変化及び教材の評価・意見を把握するためのアンケート調査を実施。

3. 研修プログラム案の作成

本分担研究を通じて作成した教材・参考資料を用いた新規着任者向け研修の内容と実施時期について検討した。

課題 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

1. STEC スクリーニング検査で用いるクオリバックス Q7 システムの判定についての検証

(1) スクリーニング検査試薬

クオリバックス Q7 システムでのスクリーニング検査には、BAX® System Real-Time PCR Assay for STEC Screening、BAX® System Real-Time PCR Assay for *E. coli* O157:H7、BAX® System Real-Time PCR Assay for STEC Panel 1 および BAX® System Real-Time PCR Assay for STEC Panel 2 を供試した。各検査試薬は、使用期限内の開封後1ヶ月から6ヶ月経過した製品を供試した。その結果、偽陽性、偽陰性および判定不能が認められた検査試薬については、BAX システムの機器本体のメンテナンスを実施した後に開封直後の製品を供試して再度試験を実施した。

(2) 偽陽性判定の検証

牛肉 50 g に変法トリプトソイブロス培地 (mTSB)

150 mL を添加し、ストマッカー処理を1分間実施し、42℃で22時間培養し、牛肉培養液とした。BAX System のプロトコルに従い、牛肉培養液および mTSB を各検査試薬 (各 8 well) で検査した。

(3) 偽陰性判定の検証

STEC O26、O45、O103、O111、O121、O145 および O157 菌株を供試した。トリプトソイブロス培地 (TSB) に接種し、37℃で18時間培養した。

培養後の菌液を混合し、DNA を熱抽出し、7血清型 STEC DNA とした。BAX System のプロトコルに従い、7血清型 STEC DNA を各検査試薬 (5~40 well) で検査した。

2. STEC スクリーニング検査で用いる RapidFinder の判定についての検証

(1) スクリーニング検査試薬

RapidFinder でのスクリーニング検査には、RapidFinder™ STEC Screening Assay を供試した。各検査試薬は、使用期限内の開封直後の製品を供試した。

(2) 偽陰性判定の検証

RapidFinder では偽陰性判定のみが報告されていたため、偽陰性判定について検証した。菌株は、STEC O157 *stx1/2* 保有株および STEC O157 *stx2* 保有株を供試した。供試菌株を TSB に接種し、37℃で18時間培養し、菌液とした。また、牛肉 25 g に mTSB 225 mL を加え、ストマッカー処理後に 42℃で22時間培養し、牛肉培養液とした。さらに、牛肉 25 g に 50 CFU の供試菌株を接種し、TSB 225 mL を加えてストマッカー処理後に 42℃で22時間培養し、菌接種牛肉培養液とした。菌液を TSB および牛肉培養液で 10^7 、 10^8 および 10^9 CFU/mL に希釈した。菌接種牛肉培養液は、TSB で 10 倍および 10^2 倍に希釈した。菌液の各希釈液および菌接種牛肉培養液の原液および希釈液から RapidFinder のプロトコルに従って DNA を抽出

した。抽出した DNA を検査試薬(各 2 well)で検査した。

C. 結果

課題 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

[1] ニトロイミダゾール類(ジメトリダゾール、ロニダゾール、メトロニダゾール、イプロニダゾール、2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール、1-(2-ヒドロキシエチル)-2-ヒドロキシメチル-5-ニトロイミダゾール、1-メチル-2-(2'-ヒドロキシイソプロピル)-5-ニトロイミダゾール)分析法

1. 分析カラムの検討

分析時間の短縮を目的に、告示試験法の HPLC から UHPLC への測定法の変更を試み、分析カラムの検討を行った。ACQUITY UPLC BEH C18(内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μm)、Shim-pack Scepter C18-120(内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.9 μm)及び Shim-pack Scepter C18-120 [Metal free](内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.9 μm)の 3 種類について検討した。ACQUITY UPLC BEH C18 では HMMNI の確認イオンで夾雑物との良好な分離が得られなかった。Shim-pack Scepter C18-120 では DTZ の内標準物質の回収率が 40%程度と良くなかった。そのため、夾雑物との分離が最も良好で、高回収率が得られた Shim-pack Scepter C18-120 [Metal free]を選択した。

2. 精製カラムの検討

告示試験法では DTZ 及び INZ は減圧濃縮操作により回収率が低下することが示唆されており、また抽出液がアセトンであることから、抽出後の精製工程がヘキサン洗浄、ミニカラム精製、酢酸エチルによる転溶と煩雑である。そこで減圧濃縮操作の回数を減らし、精製工程はミニカラム精製のみとする試験法を試みた。

強酸性陽イオン交換ミニカラムである Bond Elut SCX (500 mg/3 mL)、告示試験法で使用されているスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis MCX (500 mg/6 mL)]及び MCX とは異なる物理的特性を持つスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[EVOLUTE EXPRESS CX(500 mg/6 mL)]の 3 種を比較検討した。

各ミニカラムをあらかじめメタノール 3 mL、酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1)3 mL で洗浄し、アセトン 5 mL、酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1) 5 mL 及び酢酸 50 μL の混合液に各分析対象化合物を 50 ng(DTZ、RNZ 及び HMMNI)及び 25 ng(MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH)添加した液を供し、酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1) 5 mL を注入し、ミニカラムからの溶出液を採り、これを負荷区とした。さらにアセトン 5 mL、メタノール 5 mL 及びアセトニトリル 5 mL を順次注入し、各溶出液を採り洗浄区とした。その後、アセトニトリル及び 28%アンモニア水の混液(49:1)5 mL ずつ 4 回順次注入し各溶出液を採り溶出区とした。各溶出液を水及びギ酸の混液(10001)で 50 mL に定容し、LC-MS/MS を用いて各溶出液中の分析対象化合物量を求めた。なお負荷区は濃縮操作を行い、酢酸エチル及びアセトンを除去し系内を酢酸のみの状態とした後、定容を行った。測定については、注入量は全て 2 μL で行い、HMMNI の定量には感度の良好なイオン m/z 158 $\rightarrow$ 55(コーン電圧:3 V、コリジョンエネルギー:12 eV)を用いた。コーン電圧について DTZ は 34 V、RNZ は 2 V とした。

負荷区では EVOLUTE EXPRESS CX のみ RNZ で 1%の溶出が認められたが、他は溶出していなかった。洗浄区(アセトン 5 mL、メタノール 5 mL 及びアセトニトリル 5 mL)ではいずれのミニカラムからも溶出せず、これらの溶液は洗浄操作に使用することが可能であることが示された。溶出区では、

Bond Elut SCX はアセトニトリル及び 28%アンモニア水の混液(49:1)15 mL までにいずれの物質も 98～103%溶出され良好な結果であった。一方で、Oasis MCX 及び EVOLUTE EXPRESS CX では RNZ の回収率が、それぞれ 79%、69%と低かった。

以上の結果より、全分析対象化合物に対応可能であった Bond Elut SCX(500 mg/3 mL)による精製法を選択した。

3. 妥当性評価試験結果

(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。

(2)真度、併行精度及び室内精度

いずれも真度の目標値(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DTZ-d₃、RNZ-d₃、MNZ-d₄、INZ-d₃、HMMNI-d₃、MNZOH-d₄及びINZOH-d₃の回収率はいずれも40%以上であった。

(3)試料マトリックスの測定への影響

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、DTZ で 0.97、RNZ で 1.44、MNZ で 0.98、INZ で 0.98、HMMNI で 1.05、MNZOH で 0.98、INZOH で 0.95 であった。本法では RNZ において試料由来のマトリックスの影響を受けていたため、内標準物質による補正を行って定量する方法とした。

(4)検量線の直線性

DTZ、RNZ 及び HMMNI は 0.1～1 µg/L、MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH は 0.05～0.5 µg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

(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。

[2] β-作動薬(クレンブテロール、ラクトパミン、サルブタモール、ジルパテロール、シマテロール)分析法

1. LC-MS/MS条件の検討

CBT の告示試験法に基づき、水系移動相に水及びギ酸の混液を用いて検討を行ったが、β-作動薬(5 化合物)の同時分析では、CMT の検量線は十分な直線性を示さなかった。そこで、塩基性化合物のカラムへの吸着抑制及びピーク形状の改善を目的とし、移動相にギ酸及び酢酸アンモニウムを添加した条件を検討した。その結果、CMT を含む全ての分析対象化合物において良好な直線性が確認されたため、本条件を水系移動相として採用した。

2. 試料前処理の検討

CBT 告示試験法は抽出後の転溶操作に加え二工程のミニカラム精製を要し、操作が煩雑である。そこで、精製工程の簡略化を目的とした検討を行った。β-作動薬は塩基性化合物であることから、CBT の告示試験法で使用されている強陽イオン交換カラムを用いた精製を選択した。CBT の告示試験法と同等のベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム[Bond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)]、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis MCX (500 mg/6 mL)]及び MCX とは異なる物理的特性を持つスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[EVOLUTE EXPRESS CX(150 mg/6 mL)]の 3 種を比較検討した。各ミニカラムをあらかじめメタノール(特級)5 mL、水及びメタノールの混液(1:1)5 mL で洗浄した後、アセトン 10 mL に酢酸 500 µL を混合した液に標準溶液[1.25 µg/L(CBT 及び CMT)及び 6.25

μg/L(RCP、SAL 及び ZPT)]200 μL[水及びメタノールの混液(95:5)]を添加した液を供し、水及びメタノールの混液(1:1)5 mL、メタノール(特級)10 mL、水及び 25%アンモニア水の混液(98:2) 5 mL 及びメタノール(特級)5 mL で洗浄した後、メタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)10 mL で溶出し、さらにメタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)5 mL で追加溶出した。各画分をナス形フラスコに採り、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(95:5)2 mL に溶解し、LC-MS/MS を用いて各溶液中の分析対象化合物量を求めた。Bond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)では水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)洗浄後のメタノール洗浄区間においていずれの物質も 9~32%の溶出が認められ、かつ RCP の合計回収率が 13%と著しく低かった。EVOLUTE EXPRESS CX(150 mg/6 mL)は Bond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)に比べて合計回収率は向上したものの、水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)洗浄後のメタノール洗浄時の ZPT が 34%溶出していた。これらに対して、Oasis MCX (500 mg/6 mL)は 3 種類のミニカラムの中で最も良好な保持挙動を示した。RCP 及び CMT の合計回収率はそれぞれ 73%、75%に留まったものの、負荷時及び洗浄時における流出はほとんど認められなかった。

以上の結果より、全分析対象化合物に対応可能であった Oasis MCX (500 mg/6 mL)による精製法を選択した。なお、実試料を用いる際に、内標準物質による補正を行うことで定量性を確保することとした。

3. 妥当性評価試験結果

(1)選択性

牛及び鶏の筋肉の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。

(2)真度、併行精度及び室内精度

牛の筋肉において、いずれも真度の目標値(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 CBT-d₉、RCP-d₆、SAL-d₉、ZPT-¹³C₃ 及び CMT-d₇ の回収率はいずれも 40%以上であった。

(3)真度

鶏の筋肉において、いずれも真度の目標値(70~120%)を満たした。また、内標準物質として用いた CBT-d₉、RCP-d₆、SAL-d₉、ZPT-¹³C₃ 及び CMT-d₇ の回収率はいずれも 40%以上であった。

(4)試料マトリックスの測定への影響

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、牛の筋肉におけるピーク面積比は、CBT で 0.90、RCP で 0.84、SAL で 0.83、ZPT で 0.91、CMT で 0.91 であった。また、鶏の筋肉におけるピーク面積比は、CBT で 0.94、RCP で 0.89、SAL で 0.93、ZPT で 0.91、CMT で 0.93 であった。本法ではいずれの分析対象化合物も試料由来のマトリックスの影響を若干受けていたが、内標準物質による補正を行う方法としたため定量性に問題はないと判断した。

(5)検量線の直線性

0.00625~0.0625 μg/L(CBT)、0.0625~0.625 μg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.0125~0.125 μg/L(CMT)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。

(6)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。

課題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

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 156 頭のうち 94 頭の検体では生菌が認められ、その平均は $81,949.0 \pm 454,117.7$ (平均 $\pm$ SD) CFU/cm² であった。

雌雄で比較すると、オスの 42 頭は $57,186.9 \pm 370,321.1$ CFU/cm² であるのに対して、メスの 52 頭では $101,949.2 \pm 514,677.4$ CFU/cm² であった。

ウシの種類別で比較すると、黒毛和種の平均値が $202,634.2 \pm 702,306.9$ CFU/cm² で最も多く、次いでホルスタイン、交雑種、日本短角種、褐色和種の 68.7 ± 163.9 CFU/cm²、 49.9 ± 124.4 CFU/cm²、 2.2 ± 2.5 CFU/cm²、 0.4 ± 0.1 であった。黒毛和種は、生菌数約 2,600,000 CFU/cm² のウシが 1 頭含まれていた。

採材期間を通して、平均生菌数が最も多かった施設は B 施設であった。平均生菌数は $163,831.9 \pm 635,002.2$ CFU/cm² であり、約 2,600,000 CFU/cm² のウシが 1 頭含まれていた。

7 月が最も高く $770,107.0 \pm 1,241,833.5$ 、次いで 8 月が 152.6 ± 252.8 であった。両月の平均生菌数が高いのは、B 施設の黒毛和種で、7 月採取のウシ 1 頭が約 2,600,000 CFU/cm²、C 施設のホルスタインで 8 月採取のウシ 1 頭が約 620 CFU/cm² であったことによる。

(2) STEC7 血清群の分離

供試検体 156 検体のうち、18 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 および O121 で陽性となり、それぞれの Ct 値は 38.9 および 36.0 であった(検体番号 25-107)。しかし、CT-クロモアガー STEC 培地で分離されたコロニーはリアルタイム PCR で陰性のため、O45 血清群、O121 血清群の判定は陰

性とした。

(3) サルモネラ属菌の検出

増菌培養液が *ttr* 遺伝子陽性となった検体はなかった。

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。また、使用マニュアルを作成した。

課題 3: 国内の食肉輸出施設の監視指導検査員の研修プログラムの充実

1. 研修教材及び参考資料

1.1 研修教材

オンデマンド教材は、受講の際に短時間でも確認しやすいように、章ごとに分けた。講義の説明は、音声 AI を用いたため、音声に沿った文章の表示や、アンダーラインまたは文字の色を変える等の強調をすることで、講師のポインターの指示の代わりとした。

加熱食肉製品の演習用教材は、厚生労働省の「食品製造における HACCP による衛生管理普及のための HACCP モデル」(<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000126913.html>)の【食肉製品】ウインナーソーセージの事例を参考に、製造工程の動画及び工程説明、フローダイアグラム、製品説明書等の資料を作成した。

と殺・解体工程の演習用教材は、昨年度作成したと畜・解体工程の検証の動画教材を演習用に加工し、工程説明、フローダイアグラム、製品説明書等は、「と畜場におけるとさつ・解体処理の衛生管理計画作成のための手引書(令和2年3月 公益財団法人日本食肉生産技術開発センター)」(<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000626328.pdf>)を参考に作成した。

1.2 参考資料

米国の連邦規則9CFR(家畜及び動物性食品)のうち HACCP に係る規則及び FSIS 指令を邦訳し、背景等の情報が必要な部分については注釈を加えた。また、用語集を作成した。

と畜・解体工程の HACCP に基づく衛生管理の妥当性確認の科学的根拠、または検証の参考に資する公表論文等を確認し、概要を作成した。

2. 教材及び研修の検証

基礎研修により、教材及び研修の効果を検証した。

2.1 スケジュール及び参加者の背景

参加者は 10 名で、食肉衛生検査の経験年数は、1～4年であった。8 名が基礎研修の内容について、所内または外部研修の受講経験があり、2名が経験なしだった。

2.2 オンデマンド教材の視聴について

オンデマンド教材の視聴回数は、2 回(6 名)、1 回(2 名)、不明(2 名)であった。オンデマンド教材のみを視聴(3 名)、参考テキストを見ながら視聴(7 名)であった。

2.3 オンデマンド教材の評価について

参加者に、オンデマンド教材の満足度を 5 段階で評価してもらった結果、平均 3.5 であった。

評価の理由の概要は、以下のとおりである。

- ・理解しづらい用語など、自分に合わせて繰り返し動画を視聴し、理解を深められる点が良かった
- ・隙間時間を活用して学習を中断・再開しやすい点や、再生速度を調整できる点は利用しやすい
- ・記載例がある点、基本用語を丁寧に説明している点、参考書籍に沿った構成であるため、わかりやすい
- ・スライドと音声解説の連携が弱く集中しにくい
- ・対面講義に比較して、説明の意図や強調点がつかみにくい
- ・動画を見ただけでは自分で取り組めるイメージ

が湧かない

・FSIS とと畜場法の衛生要求の関係性が分かりにくい

2.4 理解度の変化

参加者に、HACCP7原則の原則2～7について、HACCP 研修受講前の自分の知識を1とした場合に、オンデマンド講義視聴後と演習受講後のそれぞれの理解度を 5 段階で自己評価してもらった。

理解度の平均は、オンデマンド教材視聴後および演習終了後の自己評価による理解度は、それぞれ平均 2.3、3.4となり、段階的な向上が認められた。。

特に原則 3、4、6 において演習による理解度向上が大きかった。一方、原則7については、他の原則と比較して演習による効果が小さい傾向がみられた。

2.5 研修終了後の評価

研修終了後に自由記載で、参加者の演習及び研修全体に対する意見を把握した。

意見の概要は以下のとおりである。

- ・ 動画視聴に比べ、対面演習では失敗しながら学べたことで理解が深まった
- ・ 具体例(と畜工程)を用いた演習により、HACCP プラン作成の流れが理解しやすくなった
- ・ 少人数だったため、参加者同士で議論しながら理解を深めることができた
- ・ 改めて管轄施設の HACCP プランを読み直す必要性を認識できた
- ・ オンデマンド教材だけでは重要ポイントを理解しにくく、対面演習が必須である
- ・ 一度の演習では習得が難しく、反復学習・追加演習が必要
- ・ 参加者の知識や経験値の差によっては、一般衛生管理や 7S 等の基礎知識不足、管轄

施設の HACCP プランを十分把握できていないことがあり、理解度に差があったと思う

- ・ 事前に管轄施設の HACCP プランや現場の流れを確認できるとよかった
- ・ 講師主体で HACCP プランを作成したが、参加者同士で意見を出し合いそれを修正していただくと、より主体的に参加できるのではないかと思う。

3. 新任指名検査員向け研修プログラム案の作成

対米等輸出向け食肉取扱施設を管轄する食肉衛生検査所における指名検査員の業務評価については、検査実施要領の「IV 指名検査員の検査等業務に係るパフォーマンス評価実施要領」（以下、パフォーマンス評価実施要領）に規定されている。本要領の評価項目に基づき、業務遂行に必要な知識・技術等、教材・参考資料を利用した研修例、及び各研修の実施時期について検討し、作成した。

課題 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

1. STEC スクリーニング検査で用いるクオリバックス Q7 システムの判定についての検証

(1) 偽陽性判定の検証

開封後1ヶ月から6ヶ月経過した検査試薬では、以下の結果であった。STEC screening および *E. coli* O157:H7 では、mTSB および牛肉培養液ともに偽陽性および判定不能は認められなかった。panel 1 では、mTSB で偽陽性(1 well/8 well)、牛肉培養液で偽陽性(1 well/8 well)および判定不能(1 well/8 well)が認められた。panel 2 では、偽陽性は認められなかったが、mTSB および牛肉培養液で判定不能(1 well/8 well)が認められた。開封直後の panel 1 および panel 2 では、偽陽性および判

定不能は認められなかった。

(2) 偽陰性判定の検証

開封後1ヶ月から6ヶ月経過した検査試薬では、以下の結果であった。STEC screening では、偽陰性(1 well/40 well)が認められた。*E. coli* O157:H7、panel 1 および panel 2 では、mTSB および牛肉培養液ともに偽陰性および判定不能は認められなかった。開封直後の STEC screening では、偽陰性および判定不能は認められなかった。

2. STEC スクリーニング検査で用いる RapidFinder の判定についての検証

RapidFinder™ STEC Screening Assay では、菌液および菌接種牛肉培養液の偽陰性判定は認められなかった。しかし、 10^9 CFU/mL 菌液および菌接種牛肉培養液の原液では、一度立ち上がった *eae* の蛍光強度の cycle 数後半での低下が認められた。*eae* の蛍光強度低下は、*stx2* 単独保有株よりも *stx1/2* 両保有株で強く、 10^7 および 10^8 CFU/mL 菌液ならびに菌接種牛肉培養液の 10 倍および 10^2 倍希釈液では非常に弱いかあるいは認められなかった。また、*stx1/2* 両保有株の TSB での希釈菌液は、牛肉培養液での希釈菌液と比較して *eae* の蛍光強度低下がやや強い傾向であった。

D. 考察

課題 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

ニトロイミダゾール類分析法を確立した。また、 β -作動薬分析法を確立した。妥当性評価試験結果から、ニトロイミダゾール類分析法は鶏の筋肉を対象とした定量限界 0.2 $\mu\text{g/kg}$ (DTZ、RNZ 及び HMMNI)及び 0.1 $\mu\text{g/kg}$ (MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH)での残留分析として妥当であると評価された。

β -作動薬分析法の妥当性評価試験結果から、本試験は牛及び鶏の筋肉を対象とした定量限界

0.05 µg/kg(CBT)、0.5 µg/kg(RCP、SAL 及び ZPT) 及び 0.1 µg/kg(CMT)での残留分析として妥当であると評価された。

ニトロイミダゾール類分析法及び β-作動薬分析法はいずれも残留分析法として妥当であることが示されたことから、EU への牛肉等の輸出入に関して本分析法を使用することにより迅速に対応できると示唆された。

課題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

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

本調査では、STEC は 156 検体から分離されなかった。リアルタイム PCR で *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、O45 血清群、O121 血清群いずれも陽性となった培養液が 1 検体あったが、CT-クロモアガー STEC 培地で分離された O45 または O121 と疑われるコロニーは、リアルタイム PCR で O45 血清群、O121 血清群の遺伝子が陰性だった。この検体の mTSB 培養液中の O45 血清群、O121 血清群の遺伝子の Ct 値は、いずれも 36 以上であり、培養液中の菌数レベルが低く、分離が困難であったと考えられる。STEC 045 および O121 は mTSB 中である程度は増殖することが考えられること、Ct 値が低いことを考えあわせると、培養液中に STEC ではない血清群が 045 および O121 の一般的大腸菌が存在したことが推定される。また、*stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子が陽性であったことは、これら遺伝子の片方または両方を保有する他の大腸菌が培養液中に存在したことも推定される。

施設別の平均生菌数は A 施設が 0.1 CFU/cm²、B 施設が 163,831.9 CFU/cm² および C 施設が 86.3 CFU cm² だった。全体の生菌数の平均は 81,949.0 CFU cm² であり、B 施設の生菌数の影響が大きかったと考えられた。特に、B 施設の 7 月の平均生菌数が 1,283,334.0 CFU/cm² であり、他の月の平均生

菌数が約 1.9 CFU/cm² であったため、B 施設の 7 月が、全体の平均生菌数に大きく関与していると考えた。

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。使用マニュアルを作成したので、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。

課題 3:国内の食肉輸出施設の監視指導検査員の研修プログラムの充実

教材及び参考資料は、本研究の初年度に実施した「食品衛生検査所の研修に関する実態調査」で明らかにした「食肉衛生検査所の指名検査員等向け教材」の形式、内容を満たすことを目指した。教材は、オンデマンド教材及び演習等で用いる動画で構成し、参考資料は米国の連邦規則 9CFR 等を仮訳し、解説を付けたことで、上記の形式及び内容を充足することができた。また、と畜・解体工程の衛生管理に関する妥当性確認及び検証を検討した文献等のとりまとめは、研修及び業務の参考に活用できると考える。

作成した教材について、検証として実施した基礎研修の結果から以下のとおり、考察する。

オンデマンド教材の視聴と演習の各段階的で、理解度の改善が認められ、研修教材の効果を確認できた。

オンデマンド教材については、参加者の評価から、自分の理解度、確保時間の長さに合わせて学習調整ができるオンデマンド教材の利便性が評価されているものとする。教材では理解しづらいとする評価については、教材としての不足もあるが、食品製造工程の衛生管理システムである HACCP は、講義による知識習得だけでは概念の理解まで

が限界であるためと考える。実際に、演習では講義内容の実践を行うため、理解度は講義より演習の方が上回った。また、HACCPは演習と反復学習が必要であることを参加者が認識したことは、研修の有効性を示すものとする。

なお、今回の検証は、2 か所の食肉衛生検査所の計 10 名を対象として実施したものであり、結果の一般化には一定の制約がある。また、本演習は研究班員がファシリテーターを務めたため、各検査所職員が主体となって実施した場合の効果については、今後の検証が必要である。

また、他の教材を用いた研修について、今後の検証、それぞれの検証結果による教材、研修方法の改善を検討していく必要がある。

さらに、本研究は対象を新任指名検査員としたため、例えば、HACCP に関しては、検証活動の実践向けの教材は作成されていない。今後、新任指名検査員研修の受講修了者向けの研修についても検討していく必要がある。

新任指名検査員向け研修プログラム案は、パフォーマンス評価実施要領の評価項目に基づき作成したことで、検査所の研修責任者、研修を受講する検査員が把握しやすいものであると考える。一方、今回は、概要の検討までであるため、各検査所で、新任指名検査員の研修を計画する際の参考、または出発点として利用したうえで、今後、実際の運用に必要な内容について、さらに検討が必要と考える。

課題 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

2024 年度から 2025 年度における対米輸出向け食肉取扱施設および食肉検査所に対する聞き取り調査で、クオリバックス Q7 システムでは、偽陽性、偽陰性判定および判定不能、RapidFinder では、偽陰性判定の事例が報告された。そのため、本研究では、各キットの誤判定の再現および発生

条件の検証を実施した。クオリバックス Q7 システムのキットでは、誤判定事例の聞き取り時に保管方法についても問い合わせがあったため、本検証では、開封後一定期間経過後のキットおよび開封直後のキットを用いて検討した。判定結果については、開封後一定期間が経過したキットの一部で偽陰性、偽陽性および判定不能が確認された。しかし、開封直後のキットでは、偽陰性、偽陽性および判定不能が認められなかったことから、開封後のキットの保存期間がこれらの判定結果に影響する可能性が推察された。吸湿性の高いキット試薬については、保管方法も含めた施設での運用方法の確認が必要と考えられた。

RapidFinder では、今回の検証では偽陰性判定は再現できなかったが、検体に高濃度の STEC が存在する場合に cycle 数後半での *eae* の蛍光強度低下が認められた。各施設からの偽陰性の報告では、全 cycle 終了までに *eae* の蛍光強度が閾値以下になっており、この蛍光強度低下が RapidFinder で偽陰性判定となる原因と推定された。 10^7 および 10^8 CFU/mL 菌液ならびに菌接種牛肉培養液の 10 倍希釈液では蛍光強度の低下が弱まったことから、検体の希釈は偽陰性判定の改善に有効であると考えられた。また、蛍光強度の低下は、*stx2* 単独保有株よりも *stx1/2* 両保有株で強かったことから、*stx* の保有状況と *eae* の蛍光強度低下の関連が推察された。RapidFinder での STEC スクリーニング検査では、判定結果のみではなく波形も確認し、必要に応じて検体を希釈して検査を実施する必要があると考えられた。

E. 結論

課題 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

EU での輸入時検査において 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、鶏筋肉

中のニトロイミダゾール類分析法及び牛・鶏筋肉中の β -作動薬分析法を開発した。ニトロイミダゾール類分析法は、試料をアセトン及び酢酸で抽出した後、ベンゼンスルホン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。また、 β -作動薬(クレンブテロール、ラクトパミン、サルブタモール、ジルパテロール、シマテロール)については、試料をアセトンで抽出した後、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を確立した。妥当性評価試験の結果、これらの方法はいずれも残留分析法として妥当であることが示された。

課題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

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、2025 年 4 月から 3 施設の協力のもとに牛枝肉合計 156 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、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、STEC7 血清群については、*stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、O45 血清群、O121 血清群いずれも陽性となった培養液が 1 検体あり、菌分離を行ったが、STEC O45 または O121 は分離されなかった。サルモネラ属菌については、リアルタイム PCR 陽性検体はなかった。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。使

用マニュアルを作成したので、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。

課題 3:国内の食肉輸出施設の監視指導検査員の研修プログラムの充実

新任指名検査員を対象として、輸出食肉に係る検証業務に必要な知識および技術の習得を目的とした教材および業務参考資料を、検査所の実務で活用しやすい形式で作成した。

作成した教材を用いた基礎研修においては、参加者の理解度向上が認められ、特に演習の有効性が確認された。さらに、パフォーマンス評価実施要領に基づく新任指名検査員向け研修プログラム案を作成し、各検査所における体系的な人材育成の基礎資料を提示することができた。

今後は、各検査所での運用結果を踏まえ、教材および研修内容の改善を図るとともに、指名検査員全体の研修体制の充実に資する仕組みについて検討を進めることが望まれる。

課題 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

STEC 検査で用いられるクオリバックス Q7 システムにおいて、キットの保存期間が判定時のトラブルに影響することが推察された。また、RapidFinder において、必要に応じて検体を希釈して検査を実施する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 亀山浩、食品中の残留農薬等のレギュラトリーサイエンス、フードケミカル、481(5), 28-33, 2025.
- 2) 亀山浩、食品中の残留農薬等の基準値設定

の流れ, PHARM TECH JAPAN, 40, 101-103,
(2024)

2. 学会発表

- 1) 小椋和彦、畑寛子、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.LC-MS/MSによる牛筋肉中の高感度ステロイド類一斉分析法の検討. 日本食品衛生学会第 121 回学術講演会（2025.10.16）
- 2) 池側智香子、畑寛子、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. 牛筋肉中のスチルベン類（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セステロール）分析法の検討. 日本食品衛生学会第 121 回学術講演会（2025.10.16）
- 3) 鏡山雅人、天野壮俊、本多伽衣、大塚佳代子、奥輝明、築地信、内田和之、菊地真由美、穂山浩、工藤由起子. 対米輸出和牛の国内試験への新規遺伝子検出法導入のための評価. 第 121 回日本食品衛生学会学術講演会. 2025 年 10 月 16-17 日. 東京都.
- 4) 穂山浩、「食品に関わるリスク管理の新展開」残留農薬等のリスク管理について最近の動向と課題. 日本薬学会第 146 年会、2026 年 3 月 28 日. 大阪
- 5) 穂山浩、「食品安全行政を支えるアカデミアの人材育にむけて」リスク管理：食品衛生規格基準におけるアカデミアの役割. 日本薬学会第 146 年会、2026 年 3 月 29 日. 大阪
- 6) 中島 優衣, 岸 百恵, 木村 陽菜子, 五十嵐 結菜, 伊藤 里恵, 岩崎 雄介, 穂山 浩, 鶏肉中の総アフラトキシンの簡易分析法の開発, 日本薬学会第 146 年会、2026 年 3 月 28 日. 大阪
- 7) 岸 百恵, 中島 優衣, 五十嵐 結菜, 木村 陽

菜子, 藤本 友紀, 岩崎 雄介, 伊藤 里恵, 穂山 浩, 国産牛肉中の総アフラトキシシン分析法の開発について, 日本薬学会第 146 年会、2026 年 3 月 28 日. 大阪

H. 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

牛肉等の食肉を 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。また、輸出先である EU で行われる輸入時検査において 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、原因調査を行う必要がある。本研究では、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、鶏筋肉中のニトロイミダゾール類分析法及び牛／鶏筋肉中の β -作動薬分析法を開発し、妥当性評価試験を実施した。ニトロイミダゾール類分析法として、試料からアセトン及び酢酸で抽出した後、強酸性陽イオン交換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。鶏筋肉を用いて添加濃度 0.1 $\mu\text{g/kg}$ (ジメトリダゾール、ロニダゾール、2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾールは 0.2 $\mu\text{g/kg}$)で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。また、 β -作動薬(クレンブテロール、ラクトパミン、サルブタモール、ジルパテロール、シマテロール)分析法として、試料からアセトンで抽出した後、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を確立した。牛及び鶏筋肉を用いて添加濃度 0.5 $\mu\text{g/kg}$ (クレンブテロールは 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 、シマテロールは 0.1 $\mu\text{g/kg}$)で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、ニトロイミダゾール類分析法及び β -作動薬分析法はいずれも残留分析法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

食肉を 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、その他の 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が完了するまで輸出が禁止される。また、輸出先である EU での検査で 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での輸入時検査において筋肉から 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、ニトロイミダゾール類(7 化合物)分析法および β -作動薬(5 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] ニトロイミダゾール類(ジメトリダゾール、ロニダゾール、メロニダゾール、イプロニダゾール、2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール、1-(2-ヒドロキシエチル)-2-ヒドロキシメチル-5-ニトロイミダゾール、1-メチル-2-(2'-ヒドロキシイソプロピル)-5-ニトロイミダゾール)分析法

1. 試料

鶏の筋肉は、インターネット経由で千葉県産を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクーブブrikサーを用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

ジメトリダゾール標準品:純度 99.6%(富士フィルム和光純薬製) (DTZ 標準品)

ロニダゾール標準品:純度 98.95%(Dr.Ehrenstorfer 製) (RNZ 標準品)

メロニダゾール標準品:純度 100.0%(富士フィルム和光純薬製) (MNZ 標準品)

イプロニダゾール標準品:純度 99.2%(富士フィルム和光純薬製) (INZ 標準品)

ジメトリダゾール代謝産物 A 標準品:純度 99.5%(富士フィルム和光純薬製) (HMMNI 標準品)

メロニダゾール-OH 標準品:純度 99.1%(Sigma-Aldrich 製) (MNZOH 標準品)

イプロニダゾール代謝産物 B 標準品:純度 99.8%(富士フィルム和光純薬製) (INZOH 標準品)

ジメトリダゾール- d_3 :(富士フィルム和光純薬製) (DTZ- d_3)

ロニダゾール- d_3 :(林純薬工業製) (RNZ- d_3)

メロニダゾール- d_4 :(林純薬工業製) (MNZ- d_4)

イプロニダゾール- d_3 :(Sigma-Aldrich 製) (INZ- d_3)

ヒドロキシジメトリダゾール- d_3 :(Toronto Research Chemicals 製) (HMMNI- d_3)

ヒドロキシメロニダゾール- d_4 :(Toronto Research Chemicals 製) (MNZOH- d_4)

ヒドロキシイプロニダゾール- d_3 :(Toronto Research Chemicals 製) (INZOH- d_3)

メタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、酢酸:特級(富士フィルム和光純薬製)

アセトン、28%アンモニア水:特級(関東化学製)

ギ酸:LC-MS 用(富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル:LC-MS 用(関東化学製)

強酸性陽イオン交換ミニカラム:Bond Elut SCX(500 mg/3 mL、Agilent 製)

メンブレンフィルター:Millex-LG(0.2 μ m、MILLIPORE 製)

水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1):水 900 mL、メタノール 100 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。
酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1):酢酸エチル 95 mL 及び酢酸 5 mL を混合した。

アセトニトリル及び 28%アンモニア水の混液(49:1):アセトニトリル(特級)98 mL 及び 28%アンモニア水 2 mL を混合した。

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

標準原液:DTZ 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。RNZ 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。MNZ 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。INZ 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。HMMNI 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。MNZOH 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。INZOH 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。

内標準原液:10 mg 容量の DTZ-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量の RNZ-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量の MNZ-d₄をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量の INZ-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。5 mg 容量の HMMNI-d₃をメタノールで洗いこみ、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 MNZOH-d₄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。2.5 mg 容量の INZOH-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液:DTZ 標準原液、RNZ 標準原液及び HMMNI 標準原液をメタノールで希釈して 10 mg/L 混合溶液を調製した。MNZ 標準原液、INZ 標準原液、MNZOH 標準原液及び INZOH 標準原液をメタノールで希釈して 5 mg/L 混合溶液を調製した。さらに、これら溶液を水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)で希釈して 2 µg/L(DTZ、RNZ 及び HMMNI)及び 1 µg/L(MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH)混合溶液を調製した。

添加用内標準溶液:DTZ-d₃ 内標準原液、RNZ-d₃ 内標準原液及び HMMNI-d₃ 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。MNZ-d₄ 内標準原液、INZ-d₃ 内標準原液、MNZOH-d₄ 内標準原液及び INZOH-d₃ 内標準原液をメタノールで希釈して 0.5 mg/L 溶液を調製した。さらに、これら

溶液を水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)で希釈して 20 µg/L(DTZ-d₃、RNZ-d₃ 及び HMMNI-d₃)及び 10 µg/L(MNZ-d₄、INZ-d₃、MNZOH-d₄ 及び INZOH-d₃)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(東京理化工機製)

遠心分離機: H-60R(コクサン製)

LC-MS/MS

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

4. 測定条件

表1に示した。

5. 定量

DTZ 標準原液、RNZ 標準原液及び HMMNI 標準原液をメタノールで希釈して 10 mg/L 混合溶液を調製した。MNZ 標準原液、INZ 標準原液、MNZOH 標準原液及び INZOH 標準原液をメタノールで希釈して 5 mg/L 混合溶液を調製した。DTZ-d₃ 内標準原液、RNZ-d₃ 内標準原液及び HMMNI-d₃ 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。MNZ-d₄ 内標準原液、INZ-d₃ 内標準原液、MNZOH-d₄ 内標準原液及び INZOH-d₃ 内標準原液をメタノールで希釈して 0.5 mg/L 溶液を調製した。さらに、これら溶液を水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)で希釈して表 3 の①～⑤の内標準混合標準溶液を調製した。

DTZ、MNZ及びINZはこの溶液0.4 µLを、RNZ、HMMNI、MNZOH及びINZOHは4 µLをLC-MS/MSに注入して、得られたDTZ-d₃のピーク面積に対するDTZ、RNZ-d₃のピーク面積に対するRNZ、MNZ-d₄のピーク面積に対するMNZ、INZ-d₃のピーク面積に対するINZ、HMMNI-d₃のピーク面積に対するHMMNI、MNZOH-d₄のピーク面積に対するMNZOH及びINZOH-d₃のピーク面積に対するINZOHのピーク面積の比を用いて検量線を作成した。DTZ、MNZ及びINZは試験溶液0.4 µLを、RNZ、HMMNI、MNZOH及びINZOHは4 µLをLC-MS/MSに注入し、検量線から内部標準法によりDTZ、RNZ、MNZ、INZ、HMMNI、MNZOH及びINZOHの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

試料10 gに添加用混合標準溶液[2 µg/L(DTZ、RNZ及びHMMNI)及び1 µg/L(MNZ、INZ、MNZOH及びINZOH)]1000 µL[水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)]及び添加用内標準溶液[20 µg/L(DTZ-d₃、RNZ-d₃及びHMMNI-d₃)及び10 µg/L(MNZ-d₄、INZ-d₃、MNZOH-d₄及びINZOH-d₃)]500 µL[水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)]を添加し、30分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

DTZ、RNZ、MNZ、INZ、HMMNI、MNZOH及びINZOHを試料からアセトン及び酢酸で抽出した後、ベンゼンスルホン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図1に示した。

(1)抽出

試料10 gを250 mL容広口ポリ瓶に量り採り、ア

セトン50 mL及び酢酸1 mLを加えた後、ホモジナイザーで撹拌した。2250 ×gで5分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。次いで残留物にアセトン30 mLを加え、ホモジナイザーで撹拌した。2250 ×g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、アセトンで定容した。

(2)精製

抽出液5 mL(試料0.5 g相当)に酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1)5 mLを混合した液をベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム[Bond Elut SCX(500 mg/3 mL)](あらかじめメタノール3 mL、酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1)3 mLで洗浄したもの)に負荷した。アセトン5 mL、メタノール5 mL及びアセトニトリル5 mLで洗浄した後、アセトニトリル及び28%アンモニア水の混液(49:1)15 mLで溶出した。溶出液をナス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、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)0.5 mLに溶解し、メンブレ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0.2 µg/L(DTZ、RNZ及びHMMNI)及び0.1 µg/L(MNZ、INZ、MNZOH及びINZOH)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

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度[0.2 µg/kg(DTZ、RNZ 及び HMMNI)及び 0.1 µg/kg(MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH)]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] β-作動薬(クレンプテロール、ラクトパミン、サルブタモール、ジルパテロール、シマテロール)分析法

1. 試料

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

鶏の筋肉は、インターネット経由で千葉県産を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクープブライクサーを用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

クレンプテロール標準品:純度 99.9%(林純薬工業製)(CBT 標準品)

ラクトパミン塩酸塩標準品:純度 96.3%(Sigma-Aldrich 製)(RCP 塩酸塩標準品)

サルブタモール標準品:純度 99.99%(Sigma-Aldrich 製)(SAL 標準品)

ジルパテロール塩酸塩標準品:純度 96.7%(Sigma-Aldrich 製)(ZPT 塩酸塩標準品)

シマテロール標準品:純度 100.0%(Sigma-Aldrich 製)(CMT 標準品)

クレンプテロール-d₉:(Sigma-Aldrich 製)(CBT-d₉)

ラクトパミン-d₆ 塩酸塩:(Toronto Research Chemicals 製)(RCP-d₆ 塩酸塩)

サルブタモール-d₉:(Toronto Research Chemicals 製)(SAL-d₉)

ジルパテロール-(イソプロピル-¹³C₃)塩酸塩:(Sigma-Aldrich 製)(ZPT-¹³C₃ 塩酸塩)

シマテロール-d₇:(Sigma-Aldrich 製)(CMT-d₇)

メタノール:LC-MS 用(富士フイルム和光純薬製)

ギ酸:LC-MS 用(富士フイルム和光純薬製)

メタノール、酢酸アンモニウム、25%アンモニア水:特級(富士フイルム和光純薬製)

アセトン:特級(関東化学製)

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

メンブレンフィルター:TORAST Disc(0.22 µm、島津ジーエルシー製)

メタノール及び水の混液(1:1):メタノール(特級)500 mL 及び水 500 mL を混合した。

水及びメタノールの混液(95:5):水 950 mL 及びメタノール(特級)50 mL を混合した。

水及び 25%アンモニア水の混液(98:2):水 98 mL 及び 25%アンモニア水 2 mL を混合した。

メタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2):メタノール(特級)98 mL 及び 25%アンモニア水 2 mL を混合した。

水、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液及びギ酸の混液(1000:2:1):水 1000 mL、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 2 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。

標準原液:CBT 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。RCP 塩酸塩標準品約 11.7 mg(RCP 10 mg 相当)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。SAL 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。ZPT 塩酸塩標準品約 5.9 mg(ZPT 5 mg 相当)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。CMT 標準品約 5 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:10 mg 容量の CBT-d₉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 RCP-d₆塩酸塩をメタノール(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。2.5 mg 容量の SAL-d₉ 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。10 mg 容量の ZPT-¹³C₃ 塩酸塩をメタノール(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 CMT-d₇ 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。

添加用標準溶液:CBT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。RCP 標準原液、SAL 標準原液及び ZPT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。CMT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。さらに、これら溶液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 5 µg/L(CBT)、50 µg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 10 µg/L(CMT)混合溶液を調製した。

添加用内標準溶液:CBT-d₉ 内標準原液及び CMT-d₇ 内標準原液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.1 mg/L 溶液を調製した。RCP-d₆ 内標準原液、SAL-d₉ 内標準原液及び ZPT-¹³C₃ 内標準原液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.5 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(95:5)で希釈して 10 µg/L(CBT-d₉ 及び CMT-d₇)及び 50 µg/L(RCP-d₆、SAL-d₉ 及び ZPT-¹³C₃)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 6500+	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

4. 測定条件

表 2 に示した。

5. 定量

CBT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。RCP 標準原液、SAL 標準原液及び ZPT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。CMT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。これら溶液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.625 µg/L(CBT)、6.25 µg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 1.25 µg/L(CMT)混合溶液、及び 0.0625 µg/L(CBT)、0.625 µg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.125 µg/L(CMT)混合溶液を調製した。CBT-d₉ 内標準原液及び CMT-d₇ 内標準原液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.1 mg/L 溶液を調製した。RCP-d₆ 内標準原液、SAL-d₉ 内標準原液及び ZPT-¹³C₃ 内標準原液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.5 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(95:5)で希釈して 2.5 µg/L(CBT-d₉ 及び CMT-d₇)及び 12.5 µg/L(RCP-d₆、SAL-d₉ 及び ZPT-¹³C₃)混合溶液を調製した。さらに、これら溶液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して表 7 の①～⑤の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 CBT-d₉ のピーク面積に対する CBT、RCP-d₆ のピーク面積に対する RCP、SAL-d₉ のピーク面積に

対する SAL、ZPT- $^{13}\text{C}_3$ のピーク面積に対する ZPT、CMT- d_7 のピーク面積に対する CMT 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 CBT、RCP、SAL、ZPT 及び CMT 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[5 $\mu\text{g/L}$ (CBT)、50 $\mu\text{g/L}$ (RCP、SAL 及び ZPT)及び 10 $\mu\text{g/L}$ (CMT)]100 μL [水及びメタノールの混液(95:5)]及び添加用内標準溶液[10 $\mu\text{g/L}$ (CBT- d_9 及び CMT- d_7)及び 50 $\mu\text{g/L}$ (RCP- d_6 、SAL- d_9 及び ZPT- $^{13}\text{C}_3$)]500 μL [水及びメタノールの混液(95:5)]を添加し、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

CBT、RCP、SAL、ZPT 及び CMT を試料からアセトンで抽出した後、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認した。

分析法フローチャートを図 2 に示した。

(1)抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り採り、アセトン 100 mL を加えた後、ホモジナイザーで撹拌した。2250 $\times g$ で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。次いで残留物にアセトン 50 mL を加え、ホモジナイザーで撹拌した。2250 $\times g$ で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせ、アセトンで定容した。

(2)精製

抽出液 10 mL (試料 0.5 g 相当)に酢酸 500 μL を混合した液をスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis MCX (500 mg/6 mL)][あらかじめメタノール(特級)5 mL、水及びメタノールの混液(1:1)5 mL で洗淨した

もの]に負荷した。水及びメタノールの混液(1:1)5 mL、メタノール(特級)10 mL、水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)及びメタノール(特級)5 mL で洗淨した後、メタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)15 mL で溶出した。溶出液をナス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(95:5)2 mL に溶解し、メンブレ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牛及び鶏の筋肉のブランク試料を濃縮(溶媒除去)操作まで行い、残留物に 0.0125 $\mu\text{g/L}$ (CBT)、0.125 $\mu\text{g/L}$ (RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.025 $\mu\text{g/L}$ (CMT)混合溶液 2 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

牛及び鶏の筋肉を対象に定量限界濃度[0.05 $\mu\text{g/kg}$ (CBT)、0.5 $\mu\text{g/kg}$ (RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.1 $\mu\text{g/kg}$ (CMT)]で妥当性評価試験を実施した。牛の筋肉については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。また、鶏の筋肉については妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 5 回(5 併行)行い、各性能パラメータを評価した。

C. 結果及び考察

[1] ニトロイミダゾール類(ジメトリダゾール、ロニダゾール、メトロニダゾール、イプロニダゾール、2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール、1-(2-ヒドロキシエチル)-2-ヒドロキシメチル-5-ニトロイミダゾール、1-メチル-2-(2'-ヒドロキシイソプロピル)-5-ニトロイミダゾール)分析法

1. 分析カラムの検討

分析時間の短縮を目的に、告示試験法の HPLC から UHPLC への測定法の変更を試み、分析カラムの検討を行った。ACQUITY UPLC BEH C18(内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μm)、Shim-pack Scepter C18-120(内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.9 μm)及び Shim-pack Scepter C18-120 [Metal free](内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.9 μm)の 3 種類について検討した。ACQUITY UPLC BEH C18 では HMMNI の確認イオンで夾雑物との良好な分離が得られなかった。Shim-pack Scepter C18-120 では DTZ の内標準物質の回収率が 40%程度と良くなかった。そのため、夾雑物との分離が最も良好で、高回収率が得られた Shim-pack Scepter C18-120 [Metal free]を選択した。

2. 精製カラムの検討

告示試験法では DTZ 及び INZ は減圧濃縮操作により回収率が低下することが示唆されており、また抽出液がアセトンであることから、抽出後の精製工程がヘキサン洗浄、ミニカラム精製、酢酸エチルによる転溶と煩雑である。そこで減圧濃縮操作の回数を減らし、精製工程はミニカラム精製のみとする試験法を試みた。

強酸性陽イオン交換ミニカラムである Bond Elut SCX (500 mg/3 mL)、告示試験法で使用されているスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis MCX (500 mg/6 mL)]及び MCX とは異なる物理的特性を持つスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[EVOLUTE EXPRESS CX(500 mg/6 mL)]の 3 種を比較検討した。

各ミニカラムをあらかじめメタノール 3 mL、酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1)3 mL で洗浄し、アセトン 5 mL、酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1) 5 mL 及び酢酸 50 μL の混合液に各分析対象化合物を

50 ng(DTZ、RNZ 及び HMMNI)及び 25 ng(MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH)添加した液を供し、酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1) 5 mL を注入し、ミニカラムからの溶出液を採り、これを負荷区とした。さらにアセトン 5 mL、メタノール 5 mL 及びアセトニトリル 5 mL を順次注入し、各溶出液を採り洗浄区とした。その後、アセトニトリル及び 28%アンモニア水の混液(49:1)5 mL ずつ 4 回順次注入し各溶出液を採り溶出区とした。各溶出液を水及びギ酸の混液(1000:1)で 50 mL に定容し、LC-MS/MSを用いて各溶出液中の分析対象化合物量を求めた。なお負荷区は濃縮操作を行い、酢酸エチル及びアセトンを除去し系内を酢酸のみの状態とした後、定容を行った。測定については、注入量は全て 2 μL で行い、HMMNI の定量には感度の良好なイオン m/z 158 $\rightarrow$ 55(コーン電圧:3 V、コリジョンエネルギー:12 eV)を用いた。コーン電圧について DTZ は 34 V、RNZ は 2 V とした。

結果を表 4 に示した。負荷区では EVOLUTE EXPRESS CX のみ RNZ で 1%の溶出が認められたが、他は溶出していなかった。洗浄区(アセトン 5 mL、メタノール 5 mL 及びアセトニトリル 5 mL)ではいずれのミニカラムからも溶出せず、これらの溶液は洗浄操作に使用することが可能であることが示された。溶出区では、Bond Elut SCX はアセトニトリル及び 28%アンモニア水の混液(49:1)15 mL までにいずれの物質も 98~103%溶出され良好な結果であった。一方で、Oasis MCX 及び EVOLUTE EXPRESS CX では RNZ の回収率が、それぞれ 79%、69%と低かった。

以上の結果より、全分析対象化合物に対応可能であった Bond Elut SCX(500 mg/3 mL)による精製法を選択した。

3. 妥当性評価試験結果

(1)選択性

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

(2) 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表5に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度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DTZ-d₃、RNZ-d₃、MNZ-d₄、INZ-d₃、HMMNI-d₃、MNZOH-d₄及びINZOH-d₃の回収率はいずれも40%以上であった。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表6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、DTZで0.97、RNZで1.44、MNZで0.98、INZで0.98、HMMNIで1.05、MNZOHで0.98、INZOHで0.95であった。本法ではRNZにおいて試料由来のマトリックスの影響を受けていたため、内標準物質による補正を行って定量する方法とした。

(4) 検量線の直線性

DTZ、RNZ及びHMMNIは0.1~1 µg/L、MNZ、INZ、MNZOH及びINZOHは0.05~0.5 µg/Lの範囲で検量線を作成した。決定係数 $r^2 > 0.999$ となり、良好な直線性が得られた。

(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、本試験は鶏の筋肉を対象とした定量限界0.2 µg/kg(DTZ、RNZ及びHMMNI)及び0.1 µg/kg(MNZ、INZ、MNZOH及

びINZOH)での残留分析として妥当であると評価された。

[2] β-作動薬(クレンブテロール、ラクトパミン、サルブタモール、ジルパテロール、シマテロール)分析法

1. LC-MS/MS条件の検討

CBTの告示試験法に基づき、水系移動相に水及びギ酸の混液を用いて検討を行ったが、β-作動薬(5化合物)の同時分析では、CMTの検量線は十分な直線性を示さなかった。そこで、塩基性化合物のカラムへの吸着抑制及びピーク形状の改善を目的とし、移動相にギ酸及び酢酸アンモニウムを添加した条件を検討した。その結果、CMTを含む全ての分析対象化合物において良好な直線性が確認されたため、本条件を水系移動相として採用した。

2. 試料前処理の検討

CBT告示試験法は抽出後の転溶操作に加え二工程のミニカラム精製を要し、操作が煩雑である。そこで、精製工程の簡略化を目的とした検討を行った。β-作動薬は塩基性化合物であることから、CBTの告示試験法で使用されている強陽イオン交換カラムを用いた精製を選択した。CBTの告示試験法と同等のベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム[Bond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)]、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis MCX(500 mg/6 mL)]及びMCXとは異なる物理的特性を持つスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[EVOLUTE EXPRESS CX(150 mg/6 mL)]の3種を比較検討した。各ミニカラムをあらかじめメタノール(特級)5 mL、水及びメタノールの混液(1:1)5 mLで洗浄した後、

アセトン 10 mL に酢酸 500 μ L を混合した液に標準溶液[1.25 μ g/L(CBT 及び CMT)及び 6.25 μ g/L(RCP、SAL 及び ZPT)]200 μ L[水及びメタノールの混液(95:5)]を添加した液を供し、水及びメタノールの混液(1:1)5 mL、メタノール(特級)10 mL、水及び 25%アンモニア水の混液(98:2) 5 mL 及びメタノール(特級)5 mL で洗浄した後、メタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)10 mL で溶出し、さらにメタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)5 mL で追加溶出した。各画分をナス形フラスコに採り、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(95:5)2 mL に溶解し、LC-MS/MSを用いて各溶液中の分析対象化合物量を求めた。結果を表 8 に示した。Bond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)では水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)洗浄後のメタノール洗浄区間においていずれの物質も 9~32%の溶出が認められ、かつ RCP の合計回収率が 13%と著しく低かった。EVOLUTE EXPRESS CX(150 mg/6 mL)は Bond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)に比べて合計回収率は向上したものの、水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)洗浄後のメタノール洗浄時の ZPT が 34%溶出していた。これらに対して、Oasis MCX (500 mg/6 mL)は 3 種類のミニカラムの中で最も良好な保持挙動を示した。RCP 及び CMT の合計回収率はそれぞれ 73%、75%に留まったものの、負荷時及び洗浄時における流出はほとんど認められなかった。

以上の結果より、全分析対象化合物に対応可能であった Oasis MCX (500 mg/6 mL)による精製法を選択した。なお、実試料を用いる際に、内標準物質による補正を行うことで定量性を確保することとした。

3. 妥当性評価試験結果

(1)選択性

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

(2)真度、併行精度及び室内精度

牛の筋肉において真度、併行精度及び室内精度の結果を表 9 に示した。真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 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 CBT-d₉、RCP-d₆、SAL-d₉、ZPT-¹³C₃ 及び CMT-d₇ の回収率はいずれも 40%以上であった。

(3)真度

鶏の筋肉において真度の結果を表 10 に示した。真度の目標値(70~120%)を満たした。

また、内標準物質として用いた CBT-d₉、RCP-d₆、SAL-d₉、ZPT-¹³C₃ 及び CMT-d₇ の回収率はいずれも 40%以上であった。

(4)試料マトリックスの測定への影響

牛及び鶏の筋肉において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表 11 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、牛の筋肉におけるピーク面積比は、CBT で 0.90、RCP で 0.84、SAL で 0.83、ZPT で 0.91、CMT で 0.91 であった。また、鶏の筋肉におけるピーク面積比は、CBT で 0.94、RCP で 0.89、SAL で 0.93、ZPT で 0.91、CMT で 0.93 であった。本法ではいずれの分析対象化合物も試料由来のマトリックスの影響を若干受けていたが、内標準物質による補正を行う方法としたため定量性に問題はないと判断した。

(5)検量線の直線性

0.00625~0.0625 μ g/L(CBT)、0.0625~0.625

μg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.0125～0.125 μg/L(CMT)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。

(6)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、本試験は牛及び鶏の筋肉を対象とした定量限界 0.05 μg/kg(CBT)、0.5 μg/kg(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.1 μg/kg(CMT)での残留分析として妥当であると評価された。

D. 結論

本研究では、EUでの輸入時検査において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、鶏筋肉中のニトロイミダゾール類分析法及び牛・鶏筋肉中のβ-作動薬分析法を開発した。ニトロイミダゾール類分析法は、試料をアセトン及び酢酸で抽出した後、ベンゼンスルホニル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。また、β-作動薬(クレンブテロール、ラクトパミン、サルブタモール、ジルパテロール、シマテロール)については、試料をアセトンで抽出した後、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を確立した。妥当性評価試験の結果、これらの方法はいずれも残留分析法として妥当であることが示された。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 小椋和彦、畑寛子、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. LC-MS/MSによる牛筋肉中の高感度ステロイド類一斉分析法の検討. 日本食品衛生学会第121回学術講演会(2025.10.16)

2) 池側智香子、畑寛子、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. 牛筋肉中のスチルベン類(ジェネストロール、ジェチルスチルベストロール及びヘキセステロール)分析法の検討. 日本食品衛生学会第121回学術講演会(2025.10.16)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 ニトロイミダゾール類の測定条件

LC 条件																														
カラム	Shim-pack Scepter C18-120 [Metal free] (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.9 μm : 島津製作所)																													
移動相流速(mL/min)	0.4																													
注入量(μL)	DTZ、MNZ 及び INZ:0.4 RNZ、HMMNI、MNZOH 及び INZOH:4																													
カラム温度(℃)	40																													
移動相	A 液:水及びギ酸の混液(1000:1) B 液:アセトニトリル(LC-MS 用)																													
グラジエント条件	<table><tr><td>時間(分)</td><td>A 液(%)</td><td>B 液(%)</td></tr><tr><td>0.0</td><td>98</td><td>2</td></tr><tr><td>3.0</td><td>93</td><td>7</td></tr><tr><td>5.5</td><td>70</td><td>30</td></tr><tr><td>8.5</td><td>70</td><td>30</td></tr><tr><td>8.51</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>12.0</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>12.01</td><td>98</td><td>2</td></tr><tr><td>14.5</td><td>98</td><td>2</td></tr></table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	98	2	3.0	93	7	5.5	70	30	8.5	70	30	8.51	0	100	12.0	0	100	12.01	98	2	14.5	98	2
	時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																											
	0.0	98	2																											
	3.0	93	7																											
	5.5	70	30																											
	8.5	70	30																											
	8.51	0	100																											
	12.0	0	100																											
	12.01	98	2																											
14.5	98	2																												
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(+)																													
キャピラリー電圧(V)	300																													
ソース温度(℃)	150																													
脱溶媒温度(℃)	600																													
コーンガス	窒素、150 L/hr																													
脱溶媒ガス	窒素、1000 L/hr																													
コリジョンガス	アルゴン																													
定量イオン(<i>m/z</i>)、定性イオン(<i>m/z</i>)																														
	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)																									
			(<i>m/z</i>)	コリジョンエネルギー(eV)	(<i>m/z</i>)	コリジョンエネルギー(eV)																								
DTZ	142	2	95	23	96	14																								
DTZ-d ₃	145	2	98	22	—	—																								
RNZ	201	25	140	10	94	28																								
RNZ-d ₃	204	25	143	10	—	—																								
MNZ	172	16	82	22	128	14																								
MNZ-d ₄	176	2	128	12	—	—																								
INZ	170	8	109	24	124	18																								
INZ-d ₃	173	6	112	22	—	—																								
HMMNI	158	3	111	26	94	21																								
HMMNI-d ₃	161	3	58	12	—	—																								
MNZOH	188	30	123	12	68	22																								
MNZOH-d ₄	192	2	127	12	—	—																								

INZOH	186	2	121	25	107	24
INZOH-d ₃	189	2	124	26	—	—
保持時間(min)	DTZ 4.9、RNZ 5.3、MNZ 4.5、INZ 7.8、HMMNI 4.2、MNZOH 3.4、INZOH 6.6					

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

↓ アセトン 50 mL 及び酢酸 1 mL を加え、ホモジナイズ

↓ 2250 ×g で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ アセトン 30 mL を加え、ホモジナイズ

↓ 2250 ×g で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ ろ液を合わせてアセトンで 100 mL に定容

ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Bond Elut SCX(500 mg/3 mL)]

↓ メタノール 3 mL、酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1)3 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 5 mL 及び酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1) 5 mL の混合液を注入

↓ アセトン 5 mL で洗浄

↓ メタノール 5 mL で洗浄

↓ アセトニトリル 5 mL で洗浄

↓ アセトニトリル及び 28%アンモニア水の混液(49:1)15 mL で溶出(全溶出液を採取)

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物を水、メタノール及びギ酸の混液(900:100:1)0.5 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1 ニトロイミダゾール類の分析法フローチャート

表 2 β -作動薬類の測定条件

LC 条件																														
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 μm: Waters 製)																													
移動相流速(mL/min)	0.35																													
注入量(μL)	5																													
カラム温度(°C)	40																													
移動相	A 液: 水、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液及びギ酸の混液(1000:2:1) B 液: メタノール(LC-MS 用)																													
グラジエント条件	<table><tr><td>時間(分)</td><td>A 液(%)</td><td>B 液(%)</td></tr><tr><td>0.0</td><td>97</td><td>3</td></tr><tr><td>3.0</td><td>97</td><td>3</td></tr><tr><td>11.0</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>11.01</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>15.00</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>15.01</td><td>97</td><td>3</td></tr><tr><td>18.5</td><td>97</td><td>3</td></tr></table>						時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	97	3	3.0	97	3	11.0	50	50	11.01	5	95	15.00	5	95	15.01	97	3	18.5	97	3
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																												
0.0	97	3																												
3.0	97	3																												
11.0	50	50																												
11.01	5	95																												
15.00	5	95																												
15.01	97	3																												
18.5	97	3																												
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)	5000																													
ヒーター温度(°C)	600																													
ネブライザーガス	空気、70 psi																													
ターボガス	空気、50 psi																													
コリジョンガス	窒素																													
定量イオン(<i>m/z</i>)、定性イオン(<i>m/z</i>)																														
	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)																									
			<i>m/z</i>	コリジョンエネルギー (eV)	<i>m/z</i>	コリジョンエネルギー (eV)																								
CBT	277	26	203	21	168	37																								
CBT-d ₉	286	41	204	25	—	—																								
RCP	302	61	164	23	107	51																								
RCP-d ₆	308	41	168	23	—	—																								
SAL	240	56	148	25	222	15																								
SAL-d ₉	249	46	149	27	—	—																								
ZPT	262	61	185	33	202	27																								
ZPT- ¹³ C ₃	265	56	185	33	—	—																								
CMT	220	21	143	31	160	21																								
CMT-d ₇	227	60	161	30	—	—																								
保持時間(min)	CBT 9.3、RCP 8.7、SAL 6.1、ZPT 6.0、CMT 5.5																													

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

↓ アセトン 100 mL を加え、ホモジナイズ

↓ 2250 ×g で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ アセトン 50 mL を加え、ホモジナイズ

↓ 2250 ×g で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容

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

↓ メタノール(特級)5 mL、水及びメタノールの混液(1:1)5 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 10 mL 及び酢酸 500 μL の混合液を注入

↓ 水及びメタノールの混液(1:1)5 mL で洗浄

↓ メタノール(特級)10 mL で洗浄

↓ 水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)5 mL で洗浄

↓ メタノール(特級)5 mL で洗浄

↓ メタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)15 mL で溶出(全溶出液を採取)

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物を水及びメタノールの混液(95:5)2 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 2 β-作動薬類の分析法フローチャート

表 3 内標準混合標準溶液（ニトロイミダゾール類）

測定物質	濃度(μg/L)				
	①	②	③	④	⑤
DTZ、RNZ及びHMMNI	0.1	0.2	0.3	0.4	1
MNZ、INZ、MNZOH及びINZOH	0.05	0.1	0.15	0.2	0.5
DTZ-d ₃ 、RNZ-d ₃ 及びHMMNI-d ₃	1	1	1	1	1
MNZ-d ₄ 、INZ-d ₃ 、MNZOH-d ₄ 及びINZOH-d ₃	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

表 4-1 Bond Elut SCX (500 mg/3 mL)からの溶出状況(%)（ニトロイミダゾール類）

	負荷	アセト ン	メタ ノール	アセト ニトリル	アセトニトリル及び 28%アンモニア水 の混液(49:1)			合計	
		0-5 mL	0-5 mL	0-5 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL		15-20 mL
DTZ	0	0	0	0	9	94	0	0	103
RNZ	0	0	0	0	9	90	0	0	99
MNZ	0	0	0	0	9	91	0	0	100
INZ	0	0	0	0	9	94	0	0	103
HMMNI	0	0	0	0	9	90	1	0	100
MNZOH	0	0	0	0	7	90	1	0	98
INZOH	0	0	0	0	8	91	2	1	102

表 4-2 Oasis MCX (500 mg/6 mL)からの溶出状況(%)（ニトロイミダゾール類）

	負荷	アセト ン 0-5 mL	メタ ノール 0-5 mL	アセト ニトリル 0-5 mL	アセトニトリル及び 28%アンモニア水 の混液(49:1) 0-5 mL 5-10 mL 10-15 mL 15-20 mL			合計	
DTZ	0	0	0	0	94	10	0	0	104
RNZ	0	0	0	0	70	9	0	0	79
MNZ	0	0	0	0	81	16	1	0	98
INZ	0	0	0	0	92	11	0	0	103
HMMNI	0	0	0	0	85	15	0	0	100
MNZOH	0	0	0	0	21	77	1	0	99
INZOH	0	0	0	0	91	13	0	0	104

表 4-3 EVOLUTE EXPRESS CX(500 mg/6 mL)からの溶出状況(%) (ニトロイミダゾール類)

		アセト ン	メタ ノール	アセト ニトリル	アセトニトリル及び 28%アンモニア水 の混液(49:1)				合計
	負荷	0-5 mL	0-5 mL	0-5 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	
DTZ	0	0	0	0	101	1	0	0	102
RNZ	1	0	0	0	67	1	0	0	69
MNZ	0	0	0	0	95	3	0	0	98
INZ	0	0	0	0	100	1	0	0	101
HMMNI	0	0	0	0	98	1	0	0	99
MNZOH	0	0	0	0	91	4	0	0	95
INZOH	0	0	0	0	102	1	0	0	103

J

表5-1 DTZ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			
0.2	1回目	0.149	0.233	0.215	0.232	0.211	0.208	103.9	5.0	14.3
	2回目	0.167	0.208	0.225	0.230	0.208				

表5-2 RNZ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			
0.2	1回目	0.190	0.186	0.192	0.208	0.207	0.196	98.1	2.7	4.4
	2回目	0.196	0.193	0.189	0.194	0.208				

表5-3 MNZ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			
0.1	1回目	0.104	0.095	0.101	0.099	0.101	0.098	97.5	3.4	3.9
	2回目	0.099	0.091	0.098	0.093	0.095				

表5-4 INZ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			
0.1	1回目	0.100	0.103	0.100	0.101	0.102	0.101	100.5	2.3	2.3
	2回目	0.101	0.097	0.099	0.103	0.100				

表5-5 HMMNI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			
0.2	1回目	0.225	0.168	0.195	0.182	0.205	0.194	96.9	6.0	11.1
	2回目	0.222	0.188	0.164	0.184	0.205				

表5-6 MNZOH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			
0.1	1回目	0.102	0.112	0.118	0.109	0.106	0.108	108.1	2.3	6.1
	2回目	0.101	0.105	0.118	0.108	0.102				

表5-7 INZOH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			
0.1	1回目	0.097	0.100	0.104	0.100	0.097	0.099	99.2	1.4	2.4
	2回目	0.097	0.101	0.100	0.100	0.096				

表 6 試料マトリックスの測定への影響(ニトロイミダゾール類)

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⁾ (μg/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⁾
1	DTZ	鶏の筋肉	0.2	不検出	0.2	0.2	面積	0	100717	96435	98576	99564	104376	101970	0.97	
2	RNZ	鶏の筋肉	0.2	不検出	0.2	0.2	面積	0	6232697	6230853	6231775	4351571	4314694	4333133	1.44	
3	MNZ	鶏の筋肉	0.1	不検出	0.1	0.1	面積	0	136358	138021	137190	138986	139702	139344	0.98	
4	INZ	鶏の筋肉	0.1	不検出	0.1	0.1	面積	0	382946	389336	386141	394192	395052	394622	0.98	
5	HMMNI	鶏の筋肉	0.2	不検出	0.2	0.2	面積	0	73516	74494	74005	70008	71267	70638	1.05	
6	MNZOH	鶏の筋肉	0.1	不検出	0.1	0.1	面積	0	794709	793718	794214	819621	802192	810907	0.98	
7	INZOH	鶏の筋肉	0.1	不検出	0.1	0.1	面積	0	1065599	1063208	1064404	1123921	1117923	1120922	0.95	

*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。)

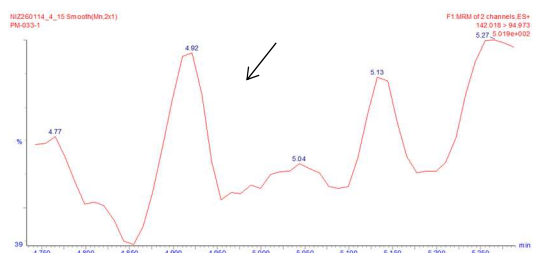
*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*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。

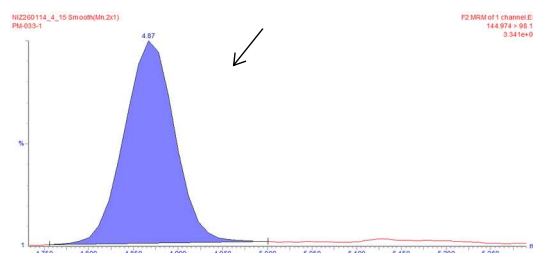
*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

代表的なクロマトグラム

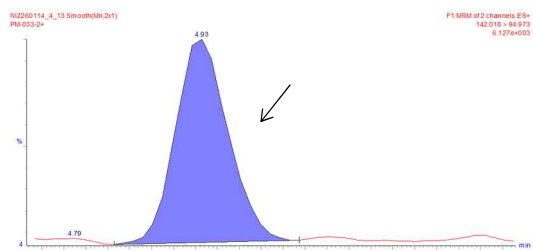
ブランク試料



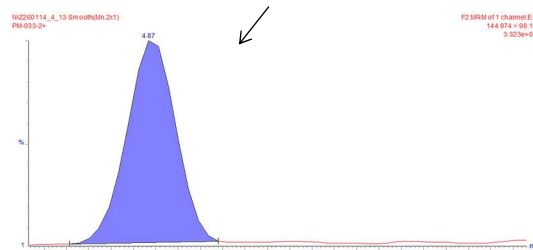
ブランク試料の内標準物質(1 µg/L)



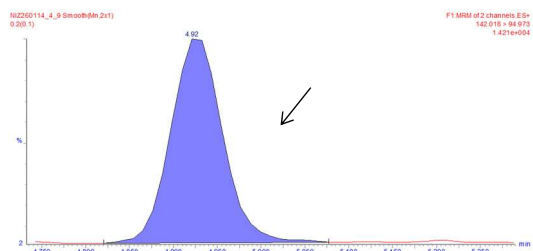
添加試料



添加試料の内標準物質(1 µg/L)



標準溶液(0.2 µg/L)



標準溶液(0.2 µg/L)の内標準物質(1 µg/L)

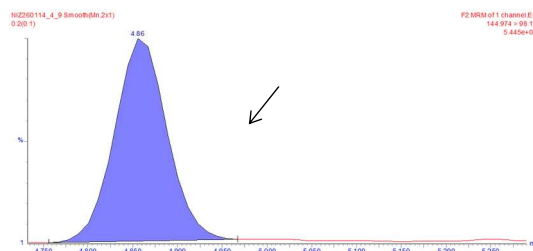
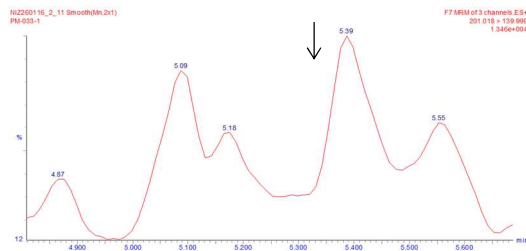


図 3-1 DTZ の SRM クロマトグラム

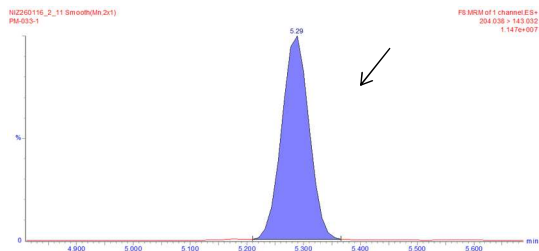
(m/z 142→95)

添加濃度: 0.2 µg/kg

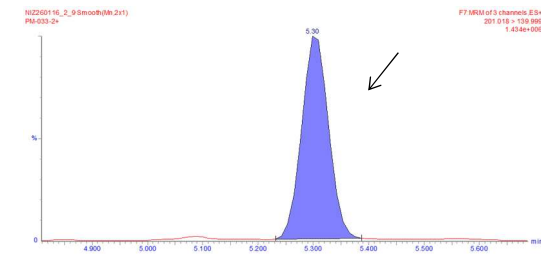
ブランク試料



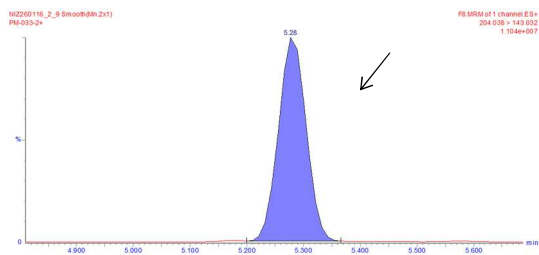
ブランク試料の内標準物質(1 µg/L)



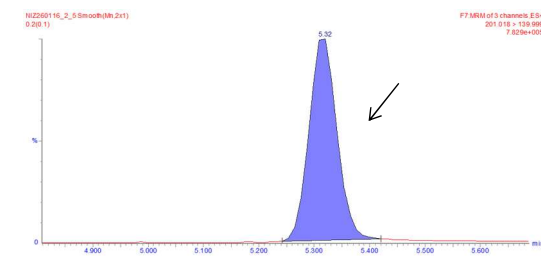
添加試料



添加試料の内標準物質(1 µg/L)



標準溶液(0.2 µg/L)



標準溶液(0.2 µg/L)の内標準物質(1 µg/L)

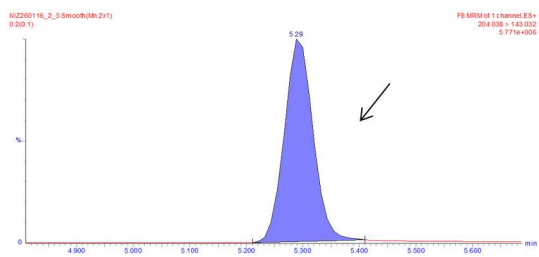
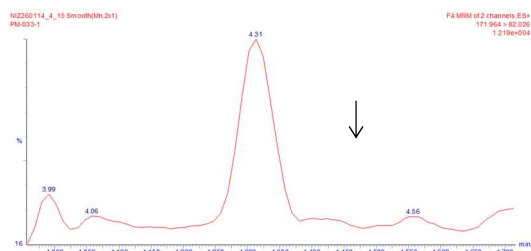


図 3-2 RNZ の SRM クロマトグラム

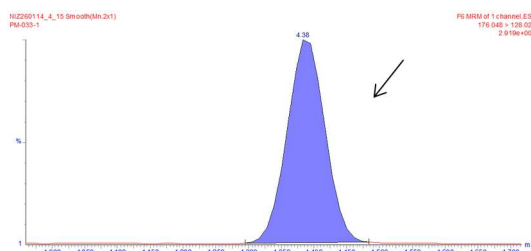
(m/z 201→140)

添加濃度: 0.2 µg/kg

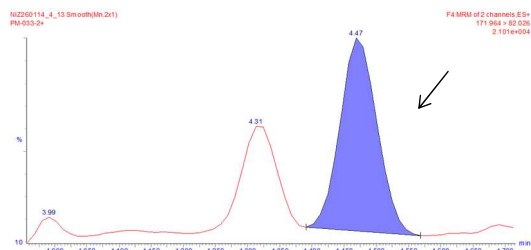
ブランク試料



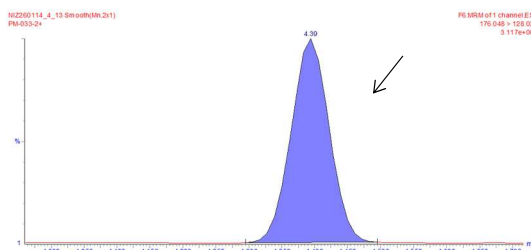
ブランク試料の内標準物質(0.5 µg/L)



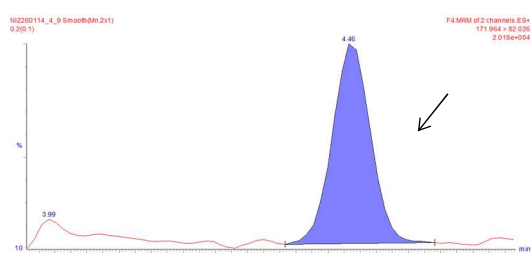
添加試料



添加試料の内標準物質(0.5 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)の内標準物質(0.5 µg/L)

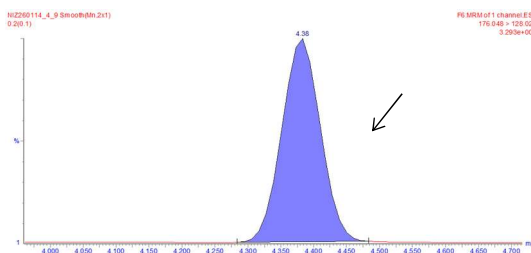
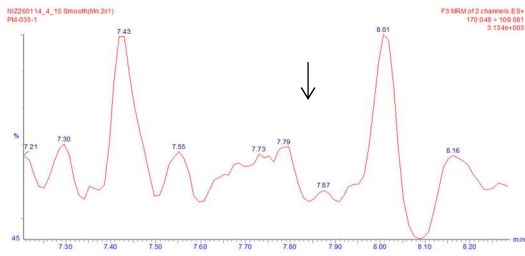


図 3-3 MNZ の SRM クロマトグラム

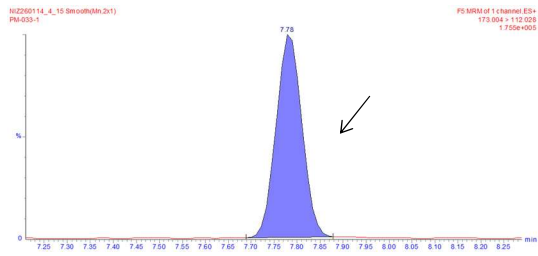
(m/z 172→82)

添加濃度:0.1 µg/kg

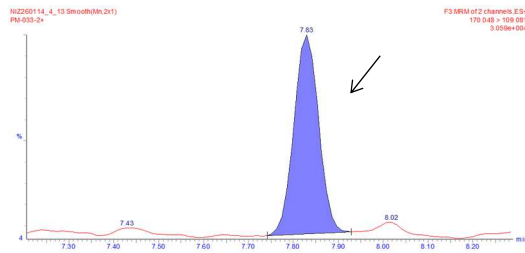
ブランク試料



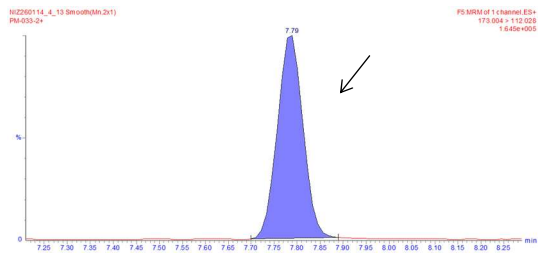
ブランク試料の内標準物質(0.5 µg/L)



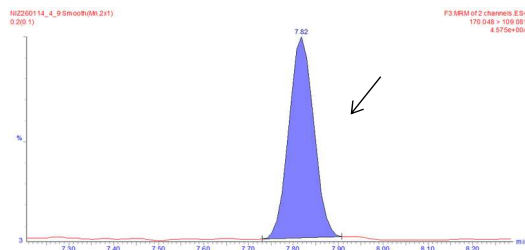
添加試料



添加試料の内標準物質(0.5 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)の内標準物質(0.5 µg/L)

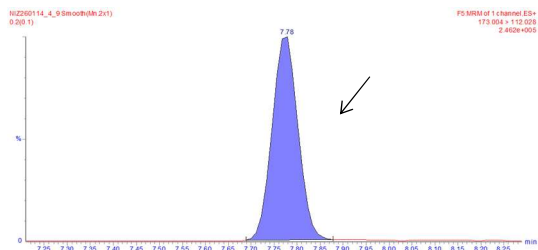
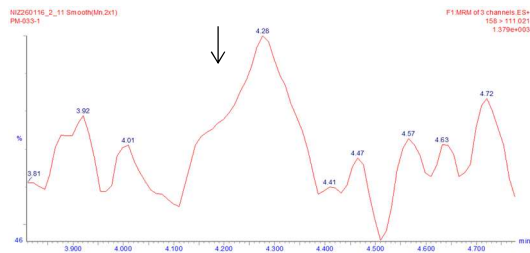


図 3-4 INZ の SRM クロマトグラム

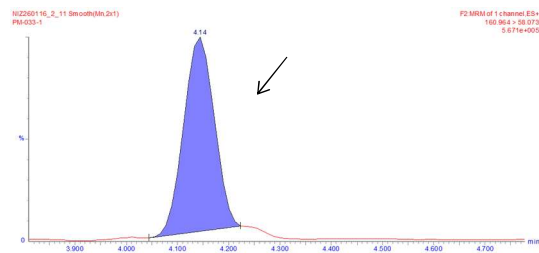
(m/z 170→109)

添加濃度 : 0.1 µg/kg

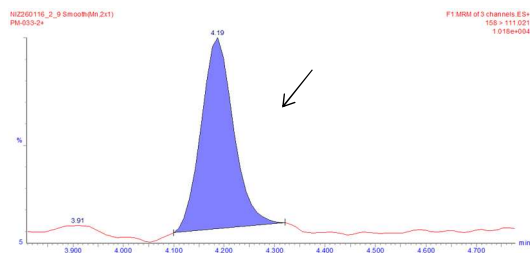
ブランク試料



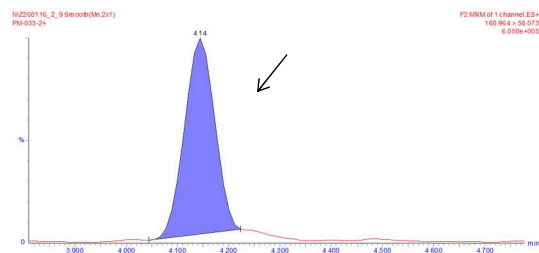
ブランク試料の内標準物質(1 µg/L)



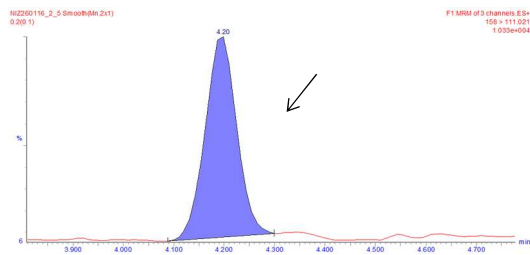
添加試料



添加試料の内標準物質(1 µg/L)



標準溶液(0.2 µg/L)



標準溶液(0.2 µg/L)の内標準物質(1 µg/L)

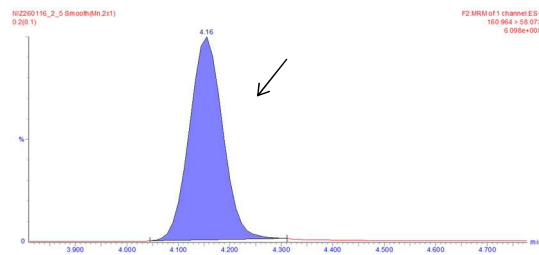
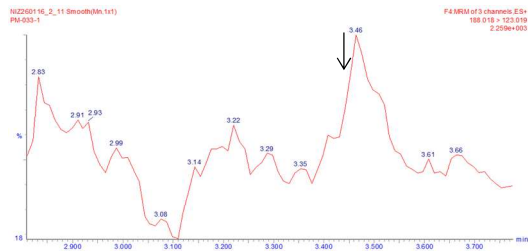


図 3-5 HMMNI の SRM クロマトグラム

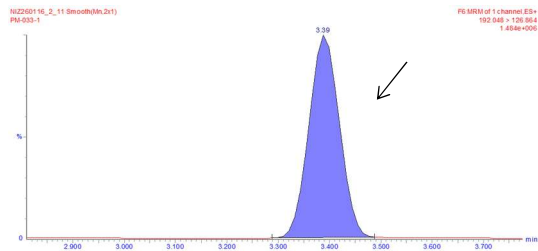
(m/z 158→111)

添加濃度 : 0.2 µg/kg

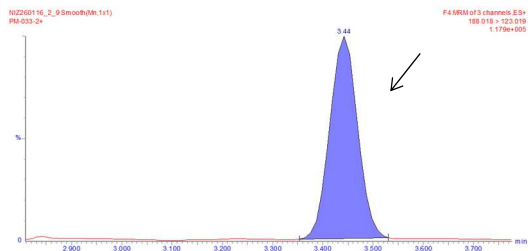
ブランク試料



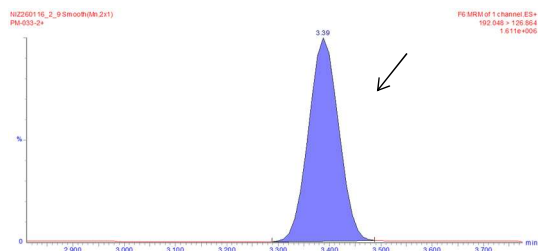
ブランク試料の内標準物質(0.5 µg/L)



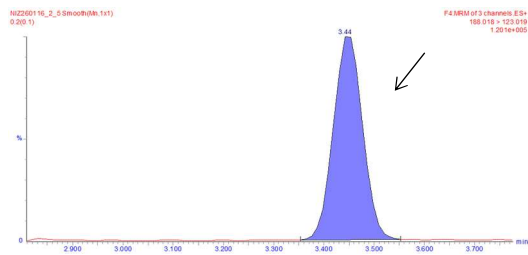
添加試料



添加試料の内標準物質(0.5 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)の内標準物質(0.5 µg/L)

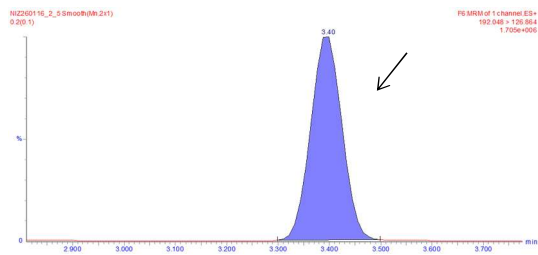
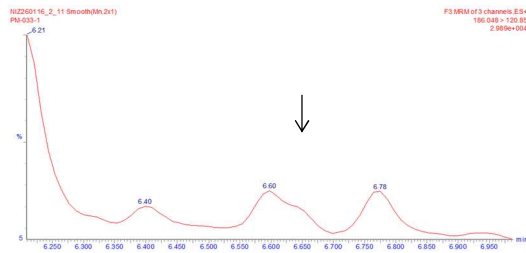


図 3-6 MNZOH の SRM クロマトグラム

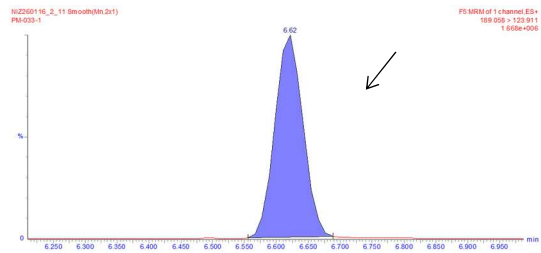
(m/z 188→123)

添加濃度 : 0.1 µg/kg

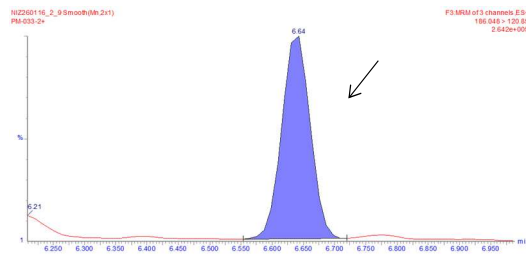
ブランク試料



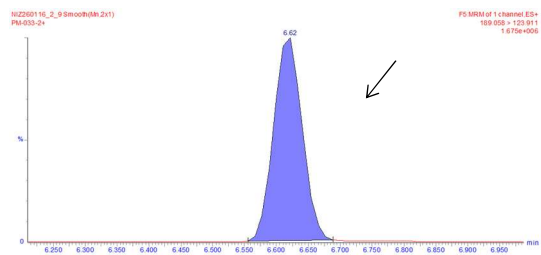
ブランク試料の内標準物質(0.5 µg/L)



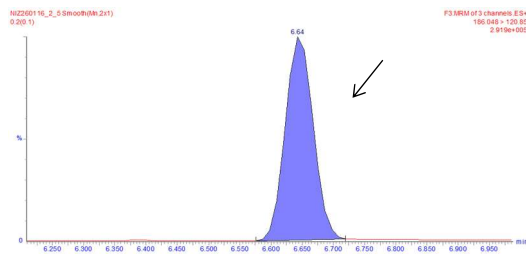
添加試料



添加試料の内標準物質(0.5 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)



標準溶液(0.1 µg/L)の内標準物質(0.5 µg/L)

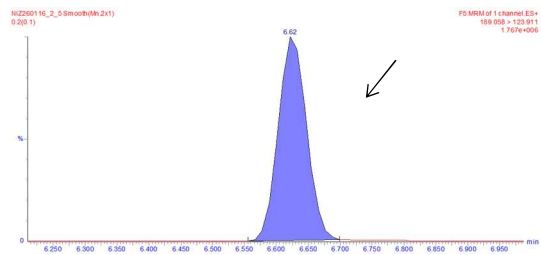


図 3-7 INZOH の SRM クロマトグラム

(m/z 186→121)

添加濃度 : 0.1 µg/kg

表 7 内標準混合標準溶液 (β-作動薬類)

測定物質	濃度(μg/L)				
	①	②	③	④	⑤
CBT	0.00625	0.0125	0.01875	0.025	0.0625
RCP、SAL及びZPT	0.0625	0.125	0.1875	0.25	0.625
CMT	0.0125	0.025	0.0375	0.05	0.125
CBT-d ₉ 及びCMT-d ₇	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
RCP-d ₆ 、SAL-d ₉ 及び ZPT- ¹³ C ₃	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625

表 8-1 Bond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)からの溶出状況(%) (β-作動薬類)

	負荷	水及びメタノールの 混液(1:1)	メタノール	水及び25%アンモンニア水 の混液(98:2)	メタノール	メタノール及び25%アンモンニア水 の混液(98:2)	合計
		0-5 mL	0-10 mL	0-5 mL	0-5 mL	0-10 mL 10-15 mL	
CBT	0	0	0	0	24	52 0	76
RCP	0	0	0	2	9	2 0	13
SAL	0	0	0	1	17	18 1	37
ZPT	0	0	0	0	32	4 0	36
CMT	0	0	0	0	23	61 0	84

表 8-2 EVOLUTE EXPRESS CX(150 mg/6 mL)からの溶出状況(%) (β-作動薬類)

	負荷	水及びメタノールの 混液(1:1)	メタノール	水及び25%アンモンニア水 の混液(98:2)	メタノール	メタノール及び25%アンモンニア水 の混液(98:2)	合計
		0-5 mL	0-10 mL	0-5 mL	0-5 mL	0-10 mL 10-15 mL	
CBT	0	0	0	0	0	60 1	61
RCP	0	0	0	0	2	63 0	65
SAL	0	0	0	1	3	83 0	87
ZPT	0	0	0	0	34	62 0	96
CMT	0	0	0	0	0	72 1	73

表 8-3 Oasis MCX (500 mg/6 mL)からの溶出状況(%) (β-作動薬類)

	負荷	水及びメタノールの 混液(1:1)	メタノール	水及び25%アンモンニア水 の混液(98:2)	メタノール	メタノール及び25%アンモンニア水 の混液(98:2)	合計
		0-5 mL	0-10 mL	0-5 mL	0-5 mL	0-10 mL 10-15 mL	
CBT	0	0	0	0	2	81 3	86
RCP	0	0	0	0	0	72 1	73
SAL	0	0	0	0	0	80 1	81
ZPT	0	0	0	0	0	99 1	100
CMT	0	0	0	0	0	72 3	75

表 9-1 CBT 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			
0.05	1回目	0.0469	0.0473	0.0464	0.0520	0.0448	0.0485	97.0	5.6	5.6
	2回目	0.0490	0.0522	0.0481	0.0483	0.0501				

表 9-2 RCP の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.476	0.490	0.497	0.488	0.510	0.491	98.1	0.8	2.2
	2回目	0.481	0.484	0.489	0.486	0.504				

表 9-3 SAL の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.438	0.463	0.457	0.478	0.494	0.464	92.8	2.5	3.5
	2回目	0.453	0.453	0.468	0.473	0.465				

表 9-4 ZPT の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.5	1回目	0.487	0.504	0.486	0.500	0.500	0.493	98.6	2.9	3.0
	2回目	0.464	0.484	0.517	0.500	0.487				

表 9-5 CMT の真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
0.1	1回目	0.096	0.100	0.110	0.099	0.093	0.098	98.2	6.3	6.7
	2回目	0.092	0.097	0.094	0.108	0.091				

表 10-1 CBT の真度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)						平均 回収率 (%)
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	全平均	
0.05	0.0528	0.0474	0.0513	0.0514	0.0490	0.0504	100.8

表 10-2 RCP の真度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)						平均 回収率 (%)
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	全平均	
0.5	0.494	0.488	0.505	0.502	0.488	0.495	99.1

表 10-3 SAL の真度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)						平均 回収率 (%)
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	全平均	
0.5	0.453	0.470	0.456	0.466	0.462	0.461	92.3

表 10-4 ZPT の真度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)						平均 回収率 (%)
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	全平均	
0.5	0.495	0.499	0.491	0.491	0.500	0.495	99.1

表 10-5 CMT の真度

添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	測定値 ($\mu\text{g/kg}$)						平均 回収率 (%)
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	全平均	
0.1	0.098	0.089	0.086	0.093	0.088	0.091	90.9

表 11-1 牛の筋肉における試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 ($\mu\text{g/kg}$)	基準値 (ppm)	添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	標準溶液 濃度 ¹⁾ ($\mu\text{g/L}$)	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	CBT	牛の筋肉	0.05	0.0002	0.05	0.0125	面積	0	45995	51420	48708	52832	55976	54404	0.90	—
2	RCP	牛の筋肉	0.5	0.01	0.5	0.125	面積	0	598481	599843	599162	712757	706151	709454	0.84	—
3	SAL	牛の筋肉	0.5	—	0.5	0.125	面積	0	611095	593260	602178	722015	734216	728116	0.83	—
4	ZPT	牛の筋肉	0.5	0.01	0.5	0.125	面積	0	494338	493059	493699	536003	543885	539944	0.91	—
5	CMT	牛の筋肉	0.1	—	0.1	0.025	面積	0	66837	65811	66324	75026	71532	73279	0.91	—

*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。

表 11-2 鶏の筋肉における試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 ($\mu\text{g/kg}$)	基準値 (ppm)	添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	標準溶液 濃度 ¹ ($\mu\text{g/L}$)	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	CBT	鶏の筋肉	0.05	不検出	0.05	0.0125	面積	0	48241	49941	49091	52369	52306	52338	0.94	—
2	RCP	鶏の筋肉	0.5	—	0.5	0.125	面積	0	621291	617223	619257	698654	698976	698815	0.89	—
3	SAL	鶏の筋肉	0.5	—	0.5	0.125	面積	0	668495	658650	663573	710853	720418	715636	0.93	—
4	ZPT	鶏の筋肉	0.5	—	0.5	0.125	面積	0	497741	487385	492563	528022	548679	538351	0.91	—
5	CMT	鶏の筋肉	0.1	—	0.1	0.025	面積	0	70530	65492	68011	72522	73771	73147	0.93	—

*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。)

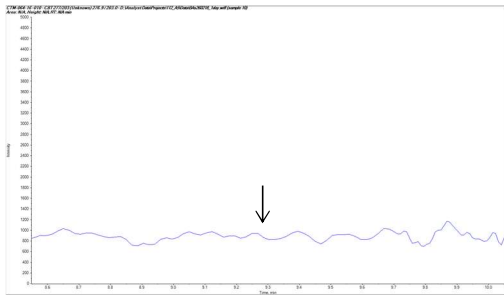
*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*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。

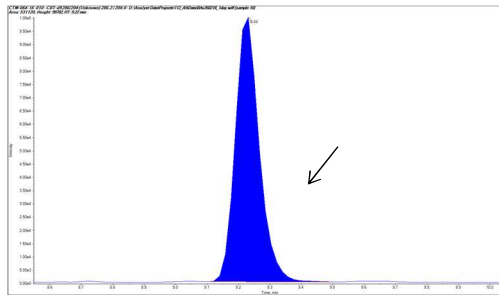
*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

代表的なクロマトグラム

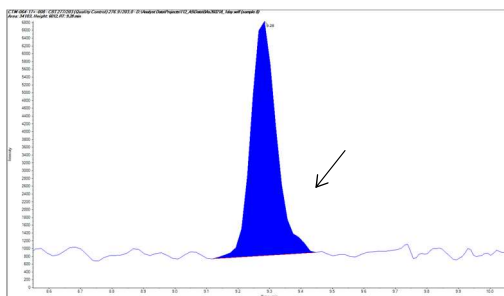
ブランク試料



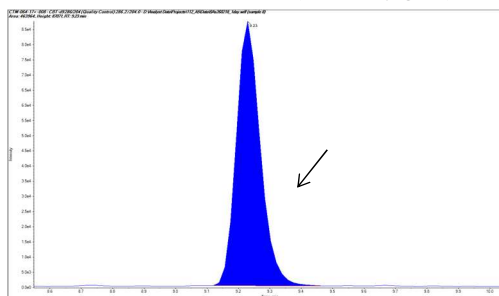
ブランク試料の内標準物質(0.125 µg/L)



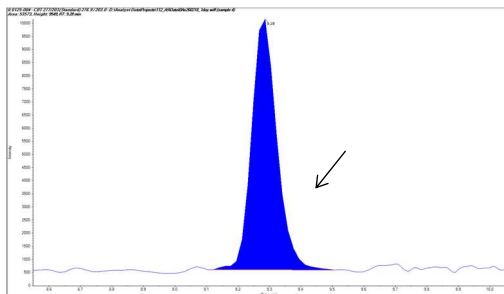
添加試料



添加試料の内標準物質(0.125 µg/L)



標準溶液(0.0125 µg/L)



標準溶液(0.0125 µg/L)の内標準物質(0.125 µg/L)

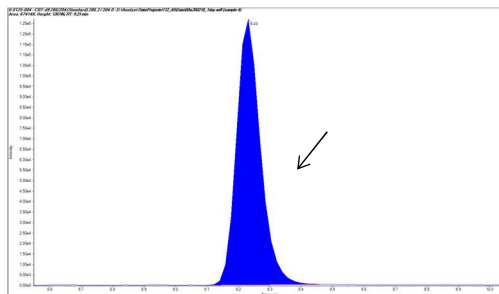


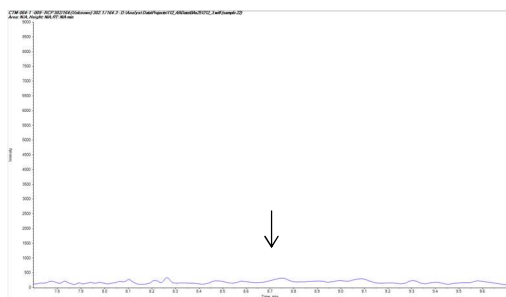
図 4-1 CBT の SRM クロマトグラム

(m/z 277→203)

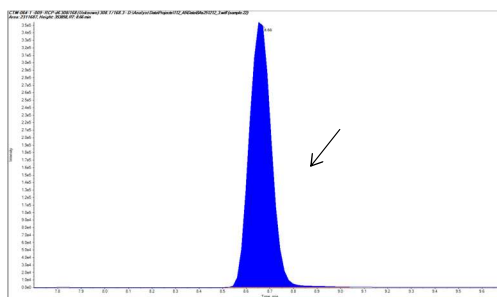
ブランク試料: 牛の筋肉

添加濃度: 0.05 µg/kg

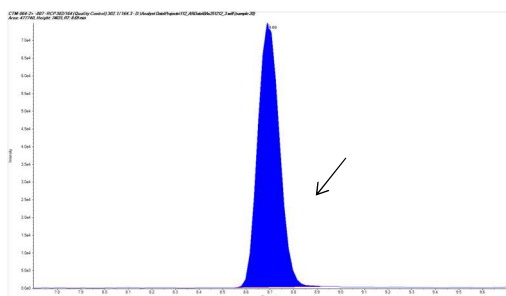
ブランク試料



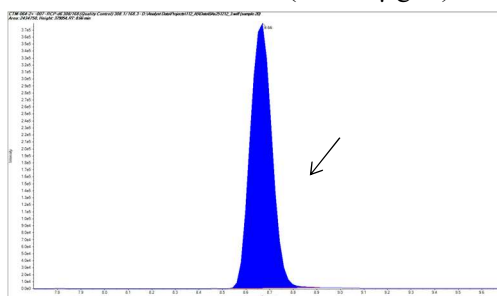
ブランク試料の内標準物質(0.625 µg/L)



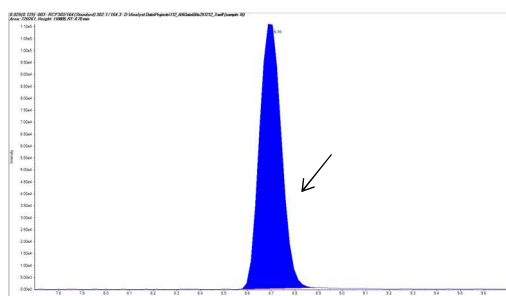
添加試料



添加試料の内標準物質(0.625 µg/L)



標準溶液(0.125 µg/L)



標準溶液(0.125 µg/L)の内標準物質(0.625 µg/L)

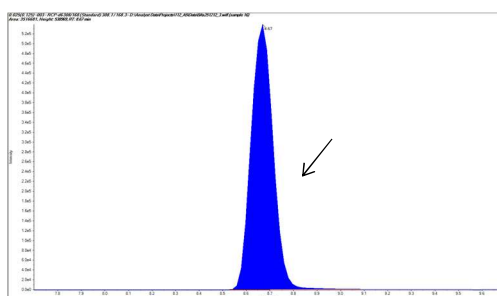


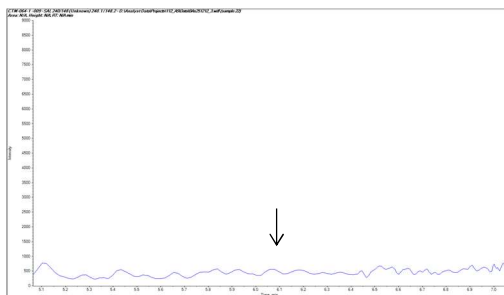
図 4-2 RCP の SRM クロマトグラム

(m/z 302→164)

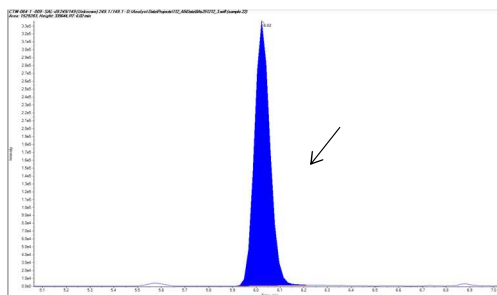
ブランク試料: 牛の筋肉

添加濃度: 0.5 µg/kg

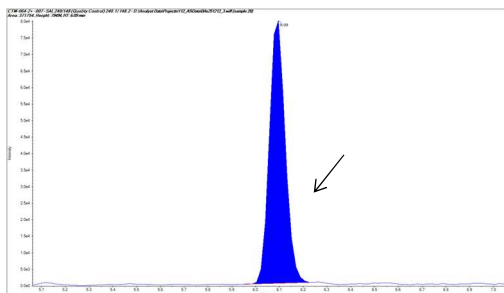
ブランク試料



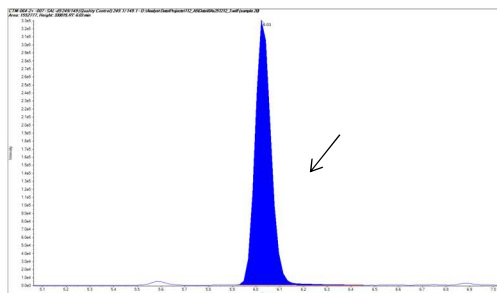
ブランク試料の内標準物質(0.625 µg/L)



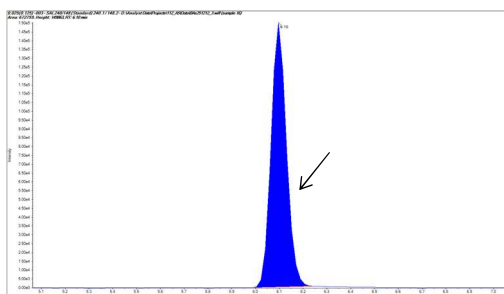
添加試料



添加試料の内標準物質(0.625 µg/L)



標準溶液(0.125 µg/L)



標準溶液(0.125 µg/L)の内標準物質(0.625 µg/L)

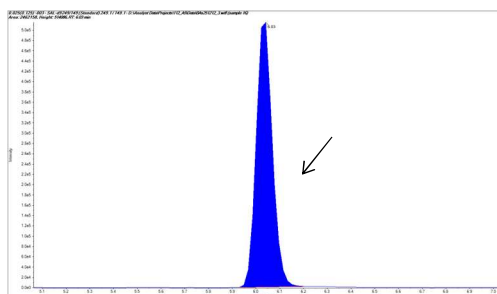


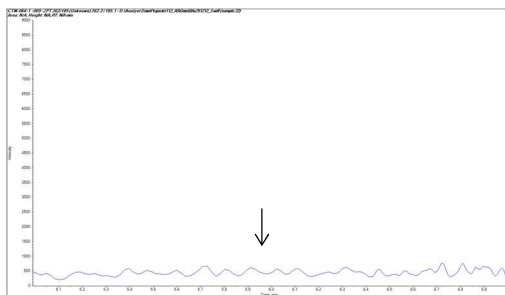
図 4-3 SAL の SRM クロマトグラム

(m/z 240→148)

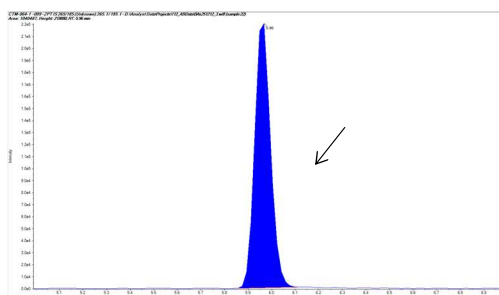
ブランク試料: 牛の筋肉

添加濃度: 0.5 µg/kg

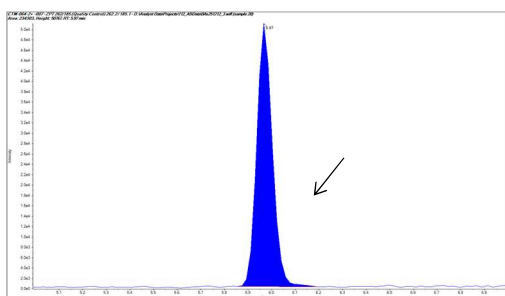
ブランク試料



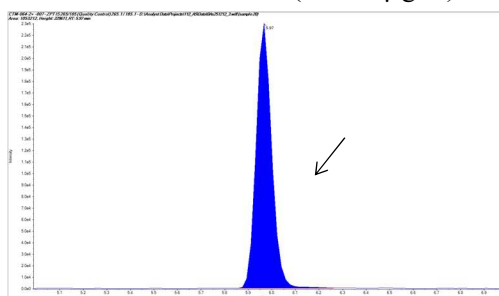
ブランク試料の内標準物質(0.625 µg/L)



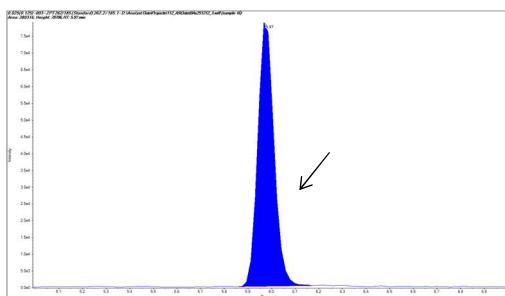
添加試料



添加試料の内標準物質(0.625 µg/L)



標準溶液(0.125 µg/L)



標準溶液(0.125 µg/L)の内標準物質(0.625 µg/L)

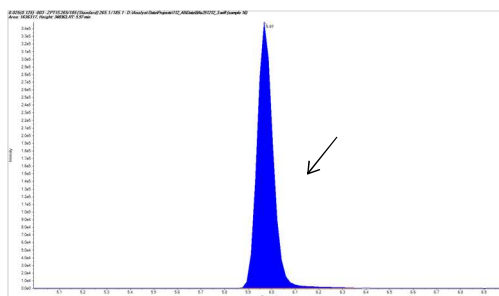


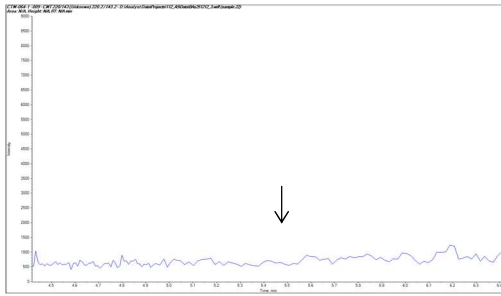
図 4-4 ZPT の SRM クロマトグラム

(m/z 262→185)

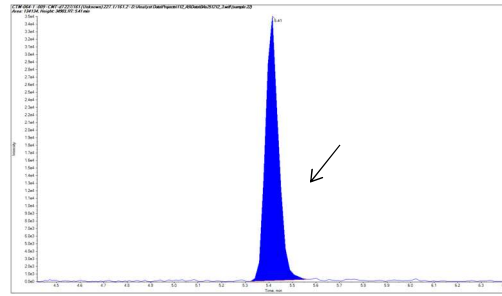
ブランク試料: 牛の筋肉

添加濃度: 0.5 µg/kg

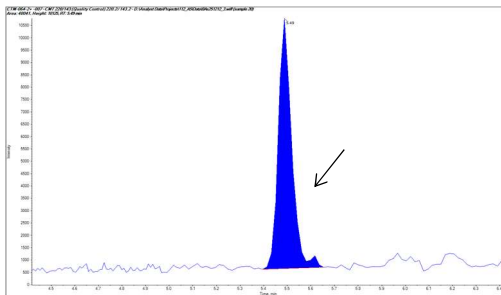
ブランク試料



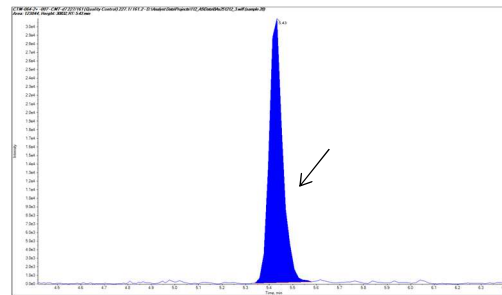
ブランク試料の内標準物質(0.125 µg/L)



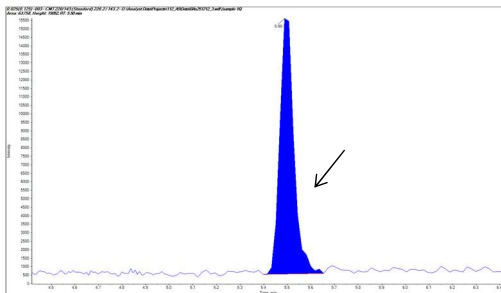
添加試料



添加試料の内標準物質(0.125 µg/L)



標準溶液(0.025 µg/L)



標準溶液(0.025 µg/L)の内標準物質(0.125 µg/L)

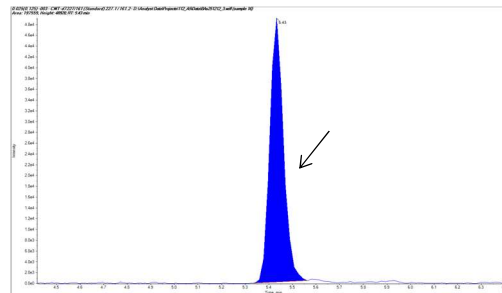


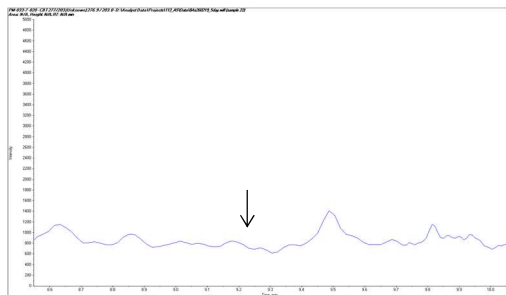
図 4-5 CMT の SRM クロマトグラム

(m/z 220→143)

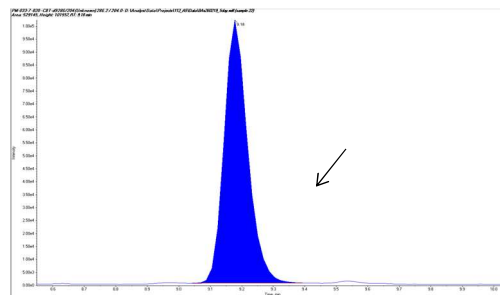
ブランク試料: 牛の筋肉

添加濃度: 0.1 µg/kg

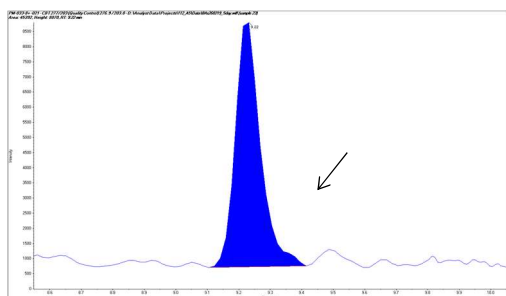
ブランク試料



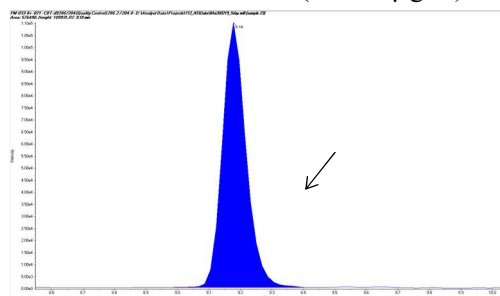
ブランク試料の内標準物質(0.125 µg/L)



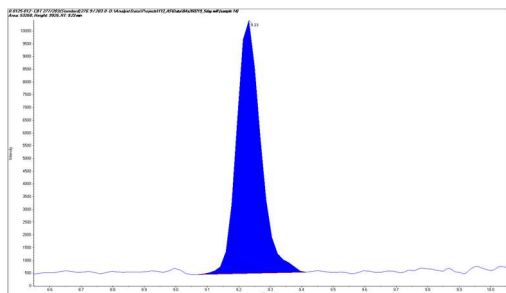
添加試料



添加試料の内標準物質(0.125 µg/L)



標準溶液(0.0125 µg/L)



標準溶液(0.0125 µg/L)の内標準物質(0.125 µg/L)

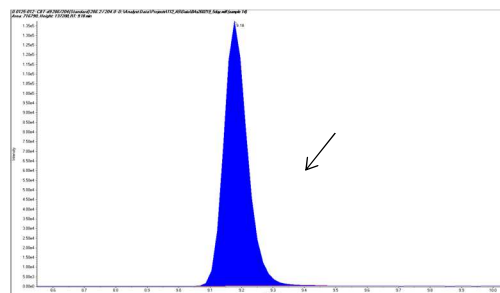


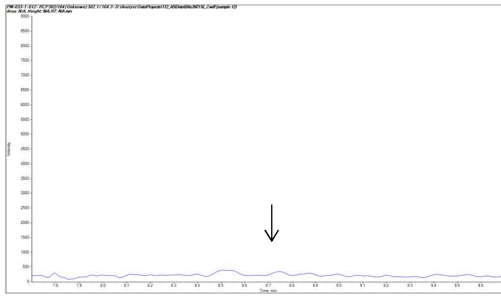
図 4-6 CBT の SRM クロマトグラム

(m/z 277→203)

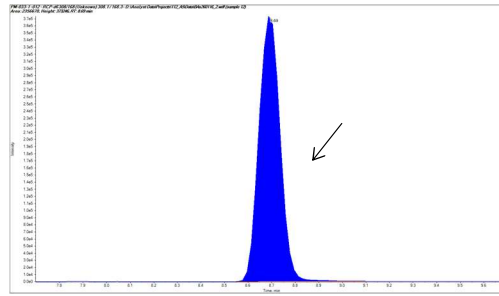
ブランク試料: 鶏の筋肉

添加濃度: 0.05 µg/kg

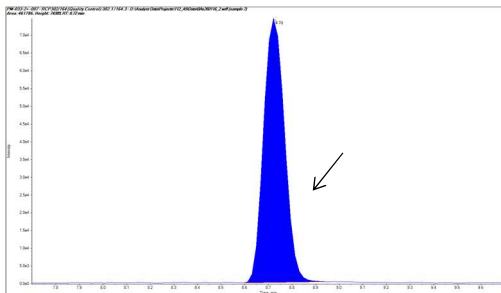
ブランク試料



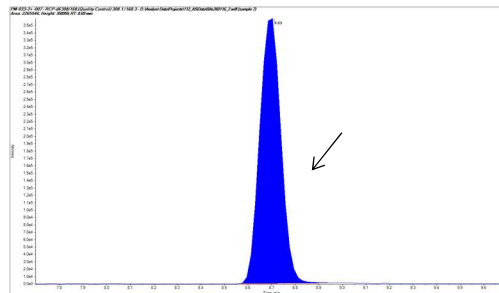
ブランク試料の内標準物質(0.625 $\mu\text{g/L}$)



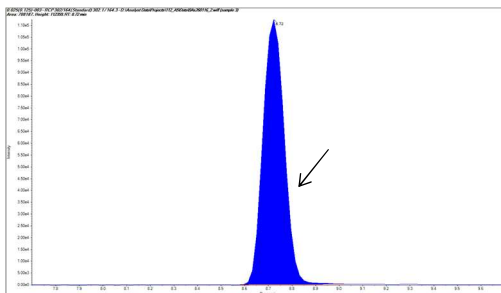
添加試料



添加試料の内標準物質(0.625 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.125 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.125 $\mu\text{g/L}$)の内標準物質(0.625 $\mu\text{g/L}$)

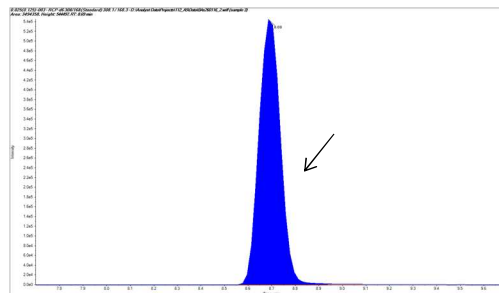


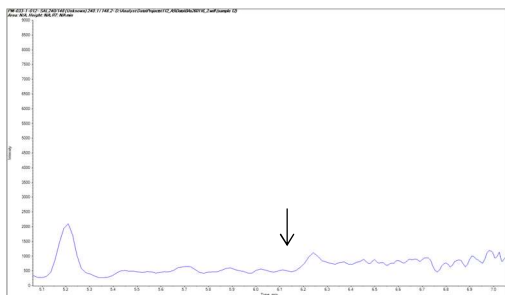
図 4-7 RCP の SRM クロマトグラム

(m/z 302 $\rightarrow$ 164)

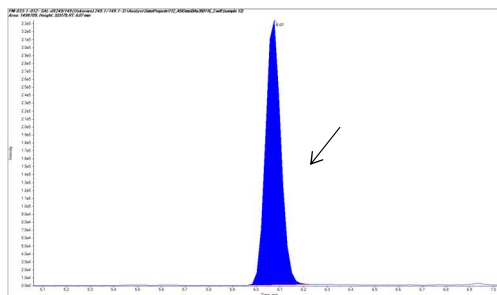
ブランク試料: 鶏の筋肉

添加濃度: 0.5 $\mu\text{g/kg}$

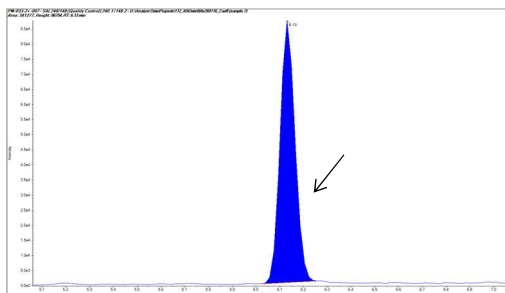
ブランク試料



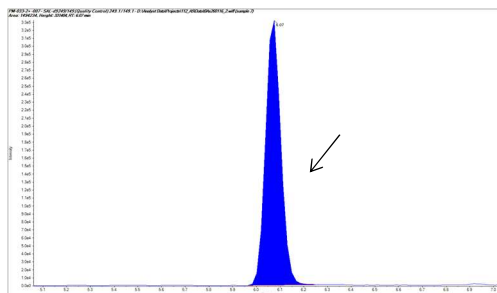
ブランク試料の内標準物質(0.625 $\mu\text{g/L}$)



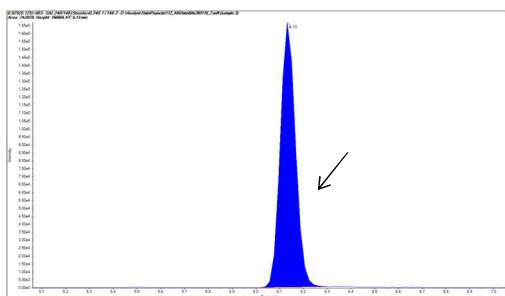
添加試料



添加試料の内標準物質(0.625 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.125 $\mu\text{g/L}$)



標準溶液(0.125 $\mu\text{g/L}$)の内標準物質(0.625 $\mu\text{g/L}$)

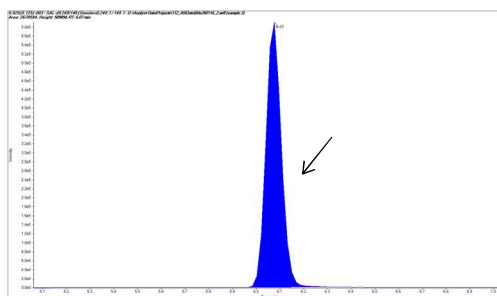


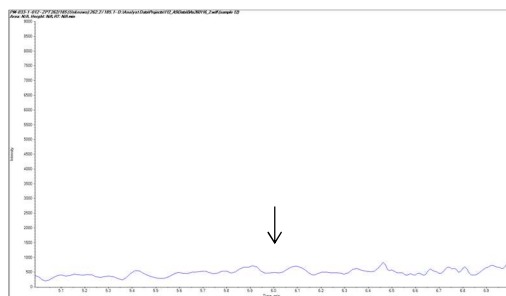
図 4-8 SAL の SRM クロマトグラム

(m/z 240 $\rightarrow$ 148)

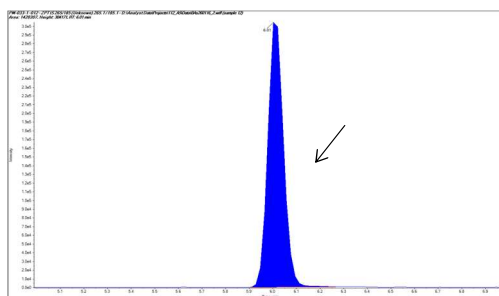
ブランク試料: 鶏の筋肉

添加濃度: 0.5 $\mu\text{g/kg}$

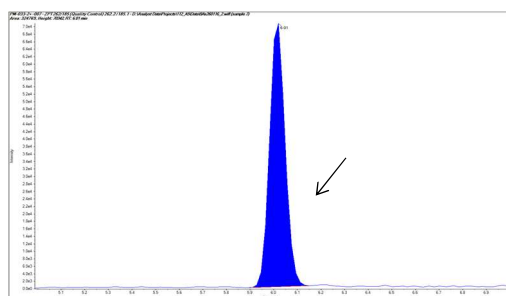
ブランク試料



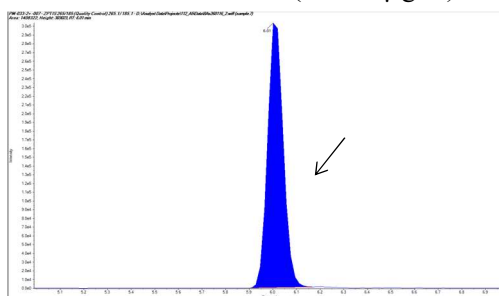
ブランク試料の内標準物質(0.625 µg/L)



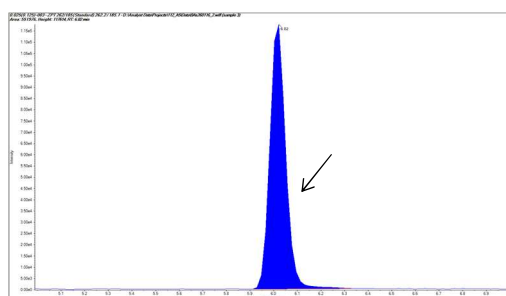
添加試料



添加試料の内標準物質(0.625 µg/L)



標準溶液(0.125 µg/L)



標準溶液(0.125 µg/L)の内標準物質(0.625 µg/L)

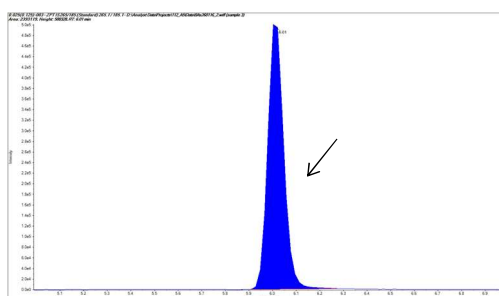


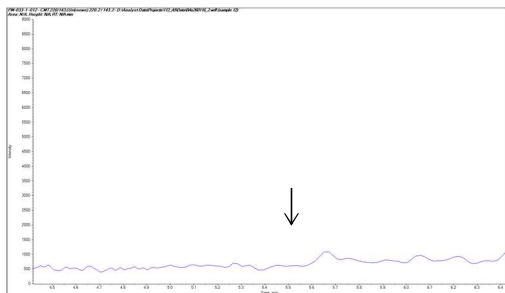
図 4-9 ZPT の SRM クロマトグラム

(m/z 262→185)

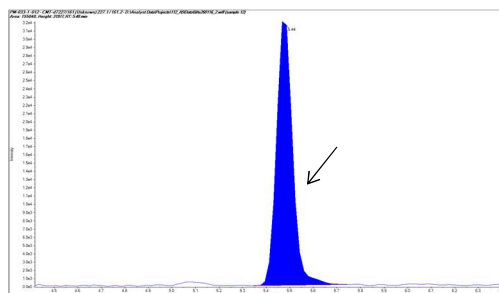
ブランク試料: 鶏の筋肉

添加濃度: 0.5 µg/kg

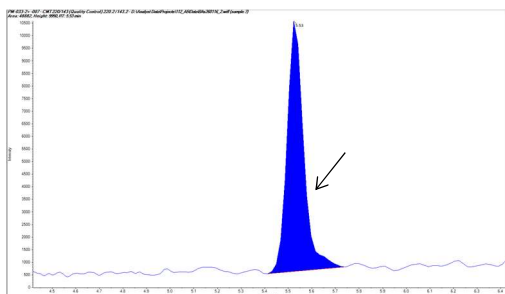
ブランク試料



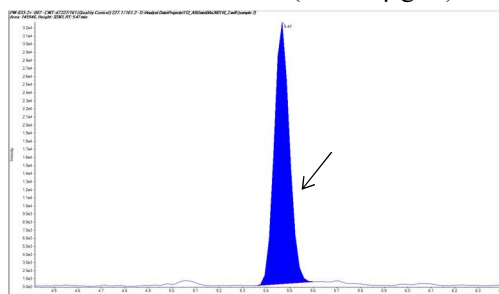
ブランク試料の内標準物質(0.125 µg/L)



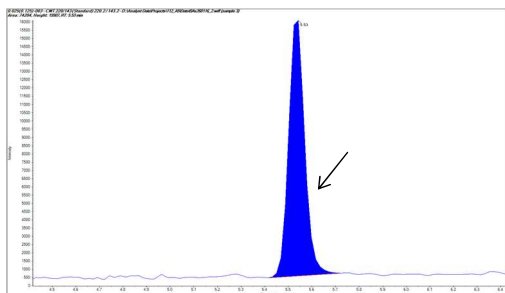
添加試料



添加試料の内標準物質(0.125 µg/L)



標準溶液(0.025 µg/L)



標準溶液(0.025 µg/L)の内標準物質(0.125 µg/L)

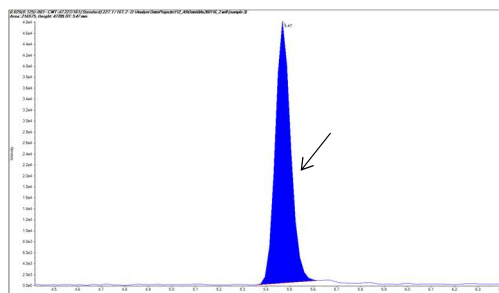


図 4-10 CMT の SRM クロマトグラム

(m/z 220→143)

ブランク試料: 鶏の筋肉

添加濃度: 0.1 µg/kg

II. 分担研究報告

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

令和 7 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

研究代表者 穂山 浩 (星薬科大学)

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、2025 年 4 月から 3 施設の協力のもとに牛枝肉合計 156 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、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、STEC7 血清群については、*stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、045 血清群、0121 血清群いずれも陽性となった培養液が 1 検体あり、菌分離を行ったが、STEC045 または 0121 は分離されなかった。サルモネラ属菌については、リアルタイム PCR 陽性検体はなかった。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。使用マニュアルを作成したので、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。

研究協力者

岩手県食肉衛生検査所

遠藤裕美

栃木県食肉衛生検査所

永島琴美、田中倭恵

日本フードパッカー株式会社

星薬科大学

天野壮俊、伊藤彩花、佐伯英莉衣、佐藤菜々美、
森谷悠衣、鏡山雅人、本多伽衣、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。このことから令和6年度からは滅菌ガーゼを密着させ回収したガーゼを検体として、腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌の検出を実施したところ、サルモネラ属菌が1検体から検出された。このため、今年度も同様のガーゼ検体を対象にして実施した。結果については、処理工程の改善検討等に役立てられることを期待して、迅速に結果をフィードバックした。

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-](https://www.fsis.usda.gov/news-events/publications/microbiology-laboratory-guidebook)

[laboratory-guidebook](https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/documents/Validated-Test-Kit.pdf)) 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、食肉衛生検査所での導入の参考になる試行を令和6年度から開始した。今年度は、第3者認定を受けた令和6年度とは異なる方法を試行した。

B. 研究方法

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

2025年4月から2026年3月に国内の食肉衛生検査所3ヶ所にて、ウシ156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 156 検体であった。

（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（156 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、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$ 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。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°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 (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、抗 H 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 156 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) へ画線塗抹するのと同時に、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」(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。

サルモネラ属菌が分離された検体について、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

以下の 2 種類を供試した。

① SureTect 試薬シリーズの STEC 検出

キット(ThermoFisherScientific[米国]、サーモフィッシャーサイエンティフィック国内対応)

- Sure Tect E. coli 0157 and STEC Screening PCR Assay [溶菌・核酸抽出試薬、遺伝子検出試薬: *stx* および *eae* 検出、ならびに *E. coli* 0157:H7 検出]

- Sure Tect E. coli STEC Identification PCR Assay [遺伝子検出試薬: *E. coli* 026, 045, 0103, 0111, 0121, 0145 検出]

② Molecular Detection Assay2 STEC Gene Screen(*stx* and *eae*) [溶菌・核酸抽出試薬、遺伝子検出試薬: *stx* および *eae* 検出]

(Neogen[米国]、ネオジェンジャパン国内対応)

両キットとも各専用機器にて使用した。

(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 026:1 株(VT1)、045:1 株(VT1)、0103:1 株(VT1)、0111:1 株(VT1&2)、0121:1 株(VT2)、0145:1 株(VT1)、0157:2 株(VT2、VT1 & 2) 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。

さらに、希釈を細分化した菌希釈検体を作製した。026 の 10⁻⁴希釈菌液を 4 倍希釈および 6 倍希釈した。045 の 10⁻⁴希釈菌液を 1.5 倍希釈および 2 倍希釈した。045 の 10⁻⁴

牛肉培養液を 1.5 倍希釈および 2 倍希釈した。0103 の 10^{-4} 希釈菌液を 4 倍希釈した。0111 の 10^{-4} 希釈菌液を 6 倍希釈した。0111 の 10^{-4} 牛肉培養液を 2 倍希釈および 6 倍希釈した。0145 の 10^{-4} 希釈菌液を 2 倍希釈、3 倍希釈および 6 倍希釈した。0145 の 10^{-4} 牛肉培養液を 6 倍希釈した。0157(VT2) の 10^{-4} 希釈菌液を 3.5 倍希釈および 7 倍希釈した。0157(VT2) の 10^{-4} 牛肉培養液を 7 倍希釈した。

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℃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。

(4) キット使用のためのマニュアル作成

食肉衛生検査所でのキット導入に必要な使用マニュアルを作成した。試薬構成、必要機材、キットの使用方法的動作詳細を写真を主にし、初心者でもわかりやすい内容にした。

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 156 頭のうち 94 頭の検体では生菌が認められ、その平均は $81,949.0 \pm 454,117.7$ (平均 $\pm$ SD) CFU/cm² であった (表 1-6)。

雌雄で比較すると、オスの 42 頭は $57,186.9 \pm 370,321.1$ CFU/cm² であるのに対して、メスの 52 頭では $101,949.2 \pm 514,677.4$ CFU/cm² であった

(表 1-6)。

ウシの種類別で比較すると、黒毛和種の平均値が $202,634.2 \pm 702,306.9$ CFU/cm² で最も多く、次いでホルスタイン、交雑種、日本短角種、褐色和種の 68.7 ± 163.9 CFU/cm²、 49.9 ± 124.4 CFU/cm²、 2.2 ± 2.5 CFU/cm²、 0.4 ± 0.1 CFU/cm² であった。黒毛和種は、生菌数約 2,600,000 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 B 施設であった。平均生菌数は $163,831.9 \pm 635,002.2$ CFU/cm² であり、約 2,600,000 CFU/cm² のウシが 1 頭含まれていた。

月別で算出した生菌数の結果を表 1-8 に示す。7 月が最も高く $770,107.0 \pm 1,241,833.5$ CFU/cm²、次いで 8 月が 152.6 ± 252.8 CFU/cm² であった。両月の平均生菌数が高いのは、B 施設の黒毛和種で、7 月採取のウシ 1 頭が約 2,600,000 CFU/cm²、C 施設のホルスタインで 8 月採取のウシ 1 頭が約 620 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 156 検体のうち、18 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 および 0121 で陽性となり、それぞれの Ct 値は

38.9 および 36.0 であった（検体番号 25-107）。しかし、CT-クロモアガーSTEC培地で分離されたコロニーはリアルタイム PCR で陰性のため、045 血清群、0121 血清群の判定は陰性とした。

（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なかった。

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。また、使用マニュアルを作成した。

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、STEC は 156 検体から分離されなかった。リアルタイム PCR で *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、045 血清群、0121 血清群いずれも陽性となった培養液が 1 検体あったが、CT-クロモアガーSTEC培地で分離された 045 または 0121 と疑われるコロニーは、リアルタイム PCR で 045 血清群、0121 血清群の遺伝子が陰性だった。この検体の mTSB 培養液中の 045 血清群、0121 血清群の遺伝子の Ct 値は、いずれも 36 以上であり、培養液中の菌数レベルが低く、分離が困難であったと考えられる。STEC 045 および 0121 は mTSB 中である程度は増殖することが考えられること、Ct 値が低いことを考えあわせると、培養液中に STEC ではない血清群が 045 および 0121 の一般的大腸菌が存在したことが推定される。また、*stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子が陽性であったことは、これら遺伝子の片方または両方を保有する他の大腸菌が培

養液中に存在したことも推定される。

施設別の平均生菌数は A 施設が 0.1 CFU/cm²、B 施設が 163,831.9 CFU/cm² および C 施設が 86.3 CFU/cm² だった。全体の生菌数の平均は 81,949.0 CFU/cm² であり、B 施設の生菌数の影響が大きかったと考えられた。特に、B 施設の 7 月の平均生菌数が 1,283,334.0 CFU/cm² であり、他の月の平均生菌数が約 1.9 CFU/cm² であったため、B 施設の 7 月が、全体の平均生菌数に大きく関与していると考えた（表 1-7）。

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。使用マニュアルを作成したので、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、2025 年 4 月から 3 施設の協力のもとに牛枝肉合計 156 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、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、STEC7 血清群については、*stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、045 血清群、0121 血清群いずれも陽性となった培養液が

1 検体あり、菌分離を行ったが、STEC045 または 0121 は分離されなかった。サルモネラ属菌については、リアルタイム PCR 陽性検体はなかった。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。使用マニュアルを作成したので、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(学会発表)

鏡山雅人、天野壮俊、本多伽衣、大塚佳代子、奥輝明、築地信、内田和之、菊地真由美、穂山浩、工藤由起子. 対米輸出和牛の国内試験への新規遺伝子検出法導入のための評価. 第 121 回日本食品衛生学会学術講演会. 2025 年 10 月 16-17 日. 東京都.

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

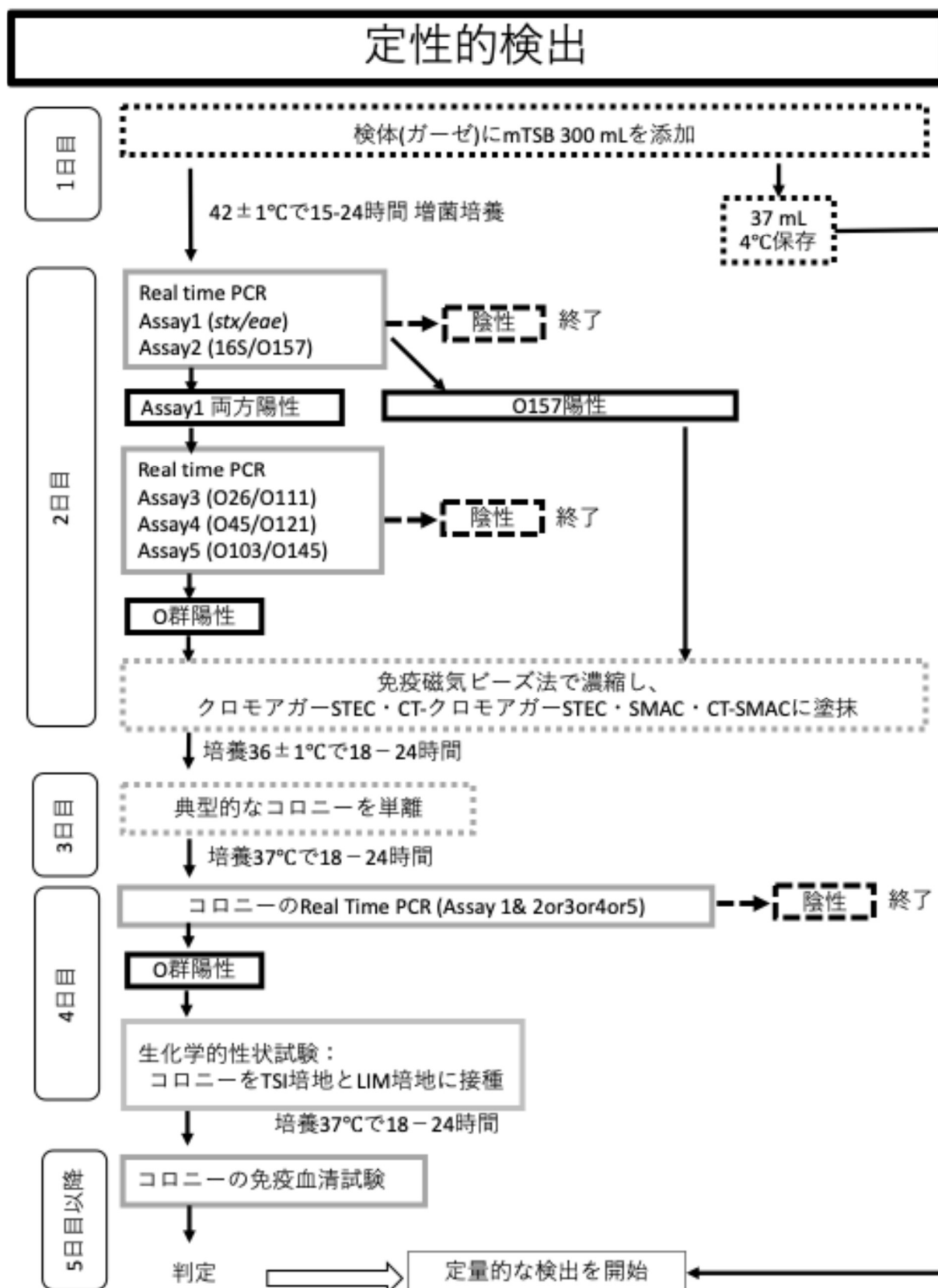


図1-1 志賀毒素産生性大腸菌（STEC）の定性的な検出方法

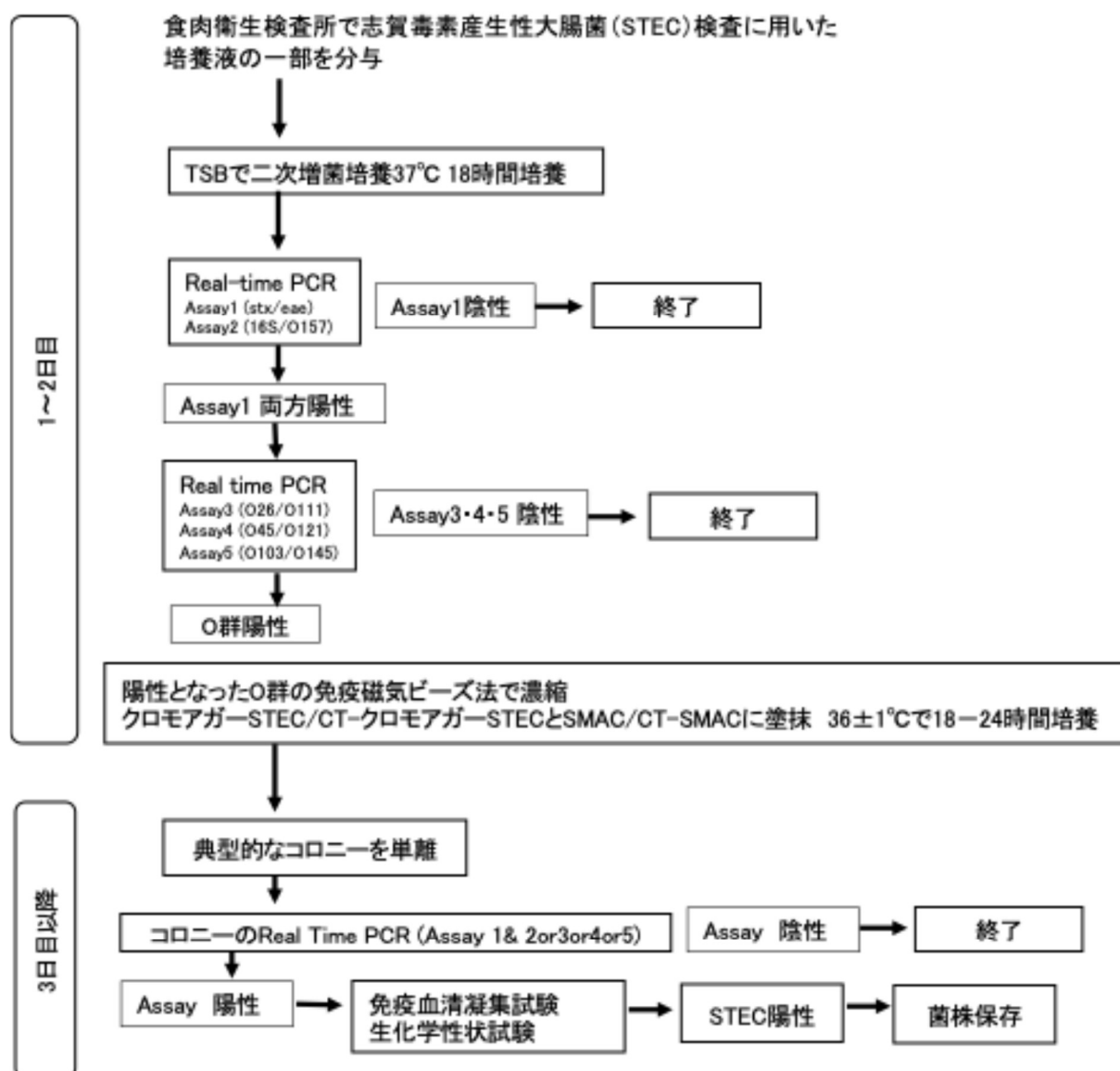


図1-2 志賀毒素産生性大腸菌（STEC）の検出・分離方法

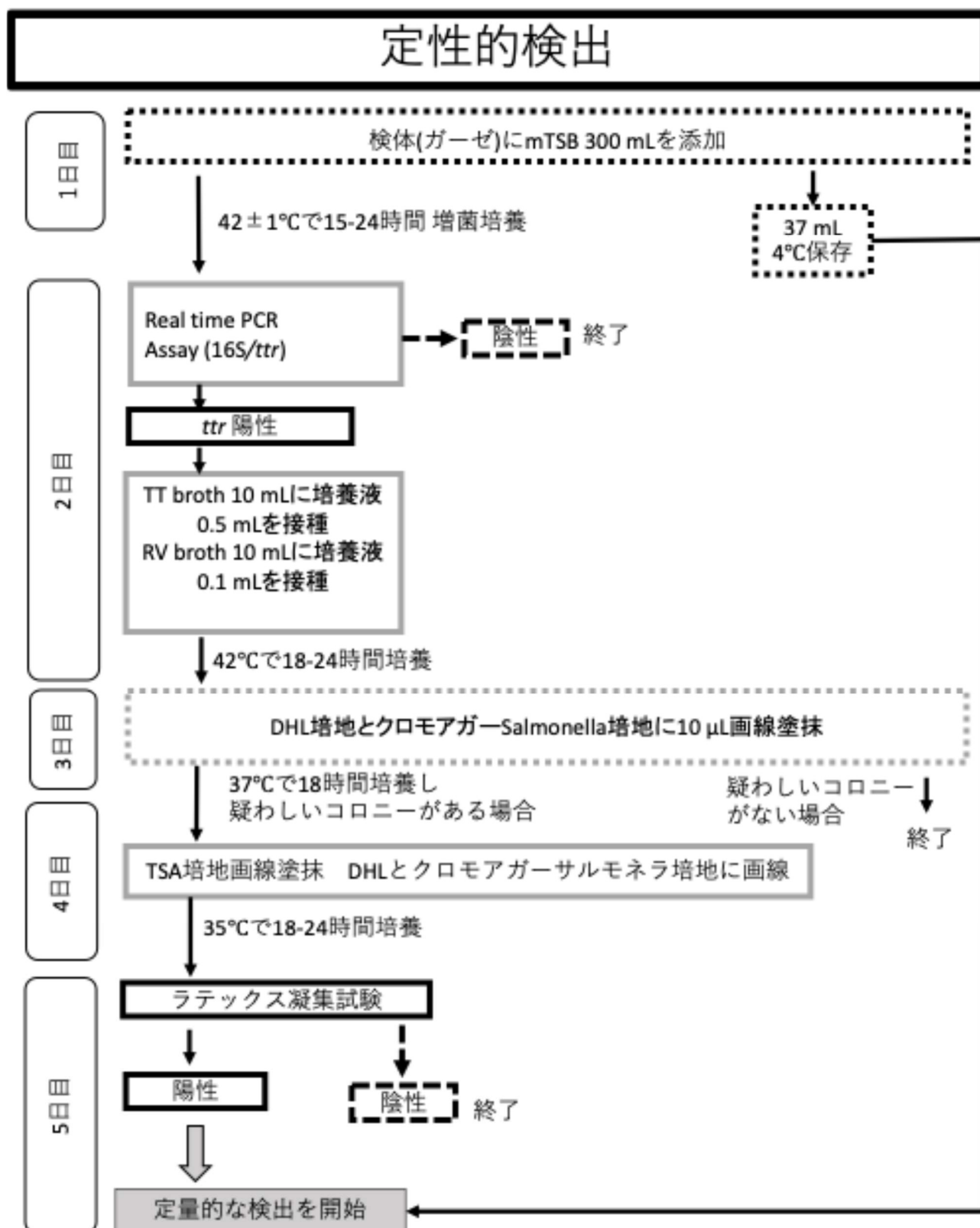


図1-3. サルモネラ属菌の定性的な検出方法

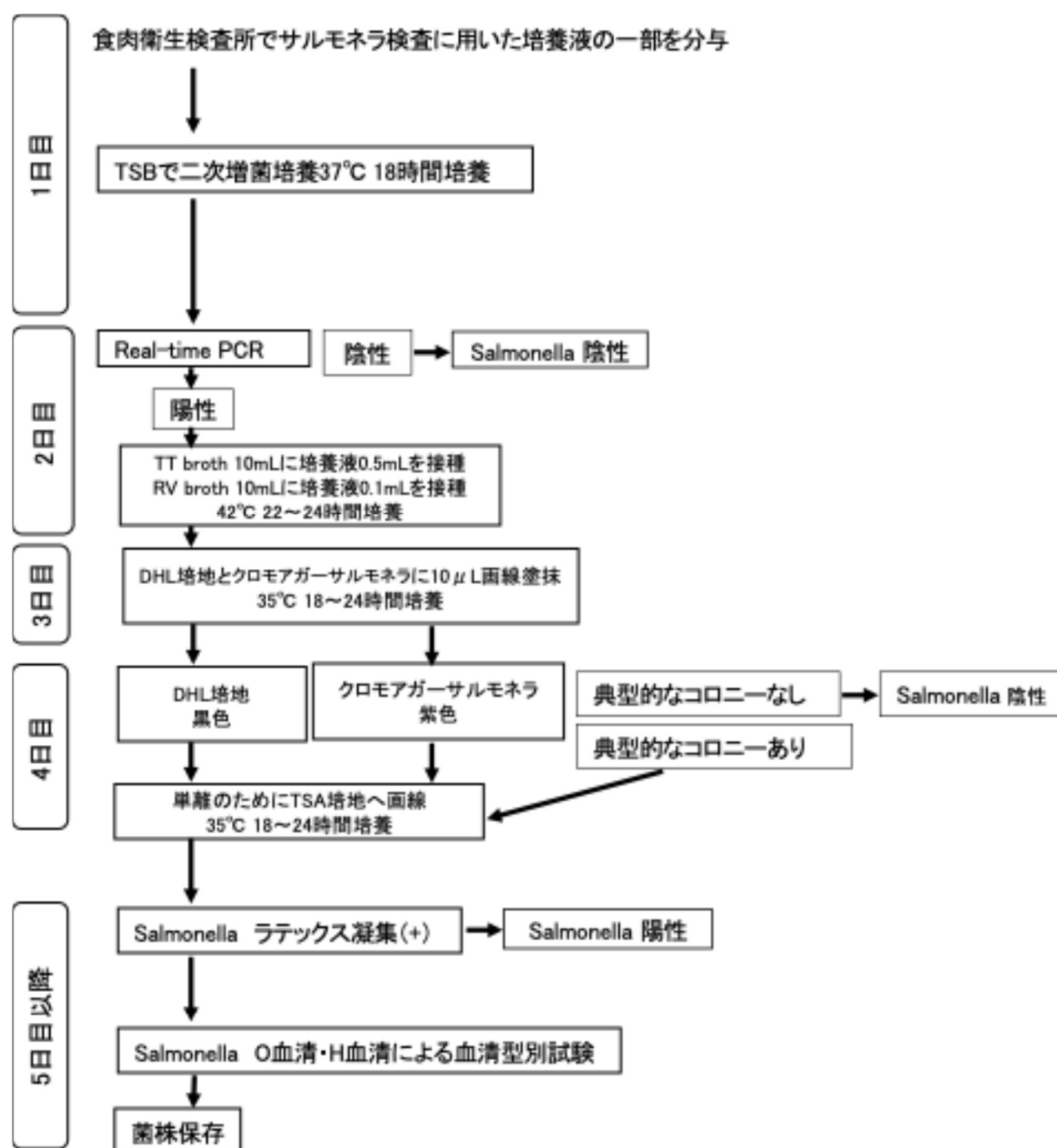


図1-4 サルモネラ属菌の検出・分離方法

定量的検出

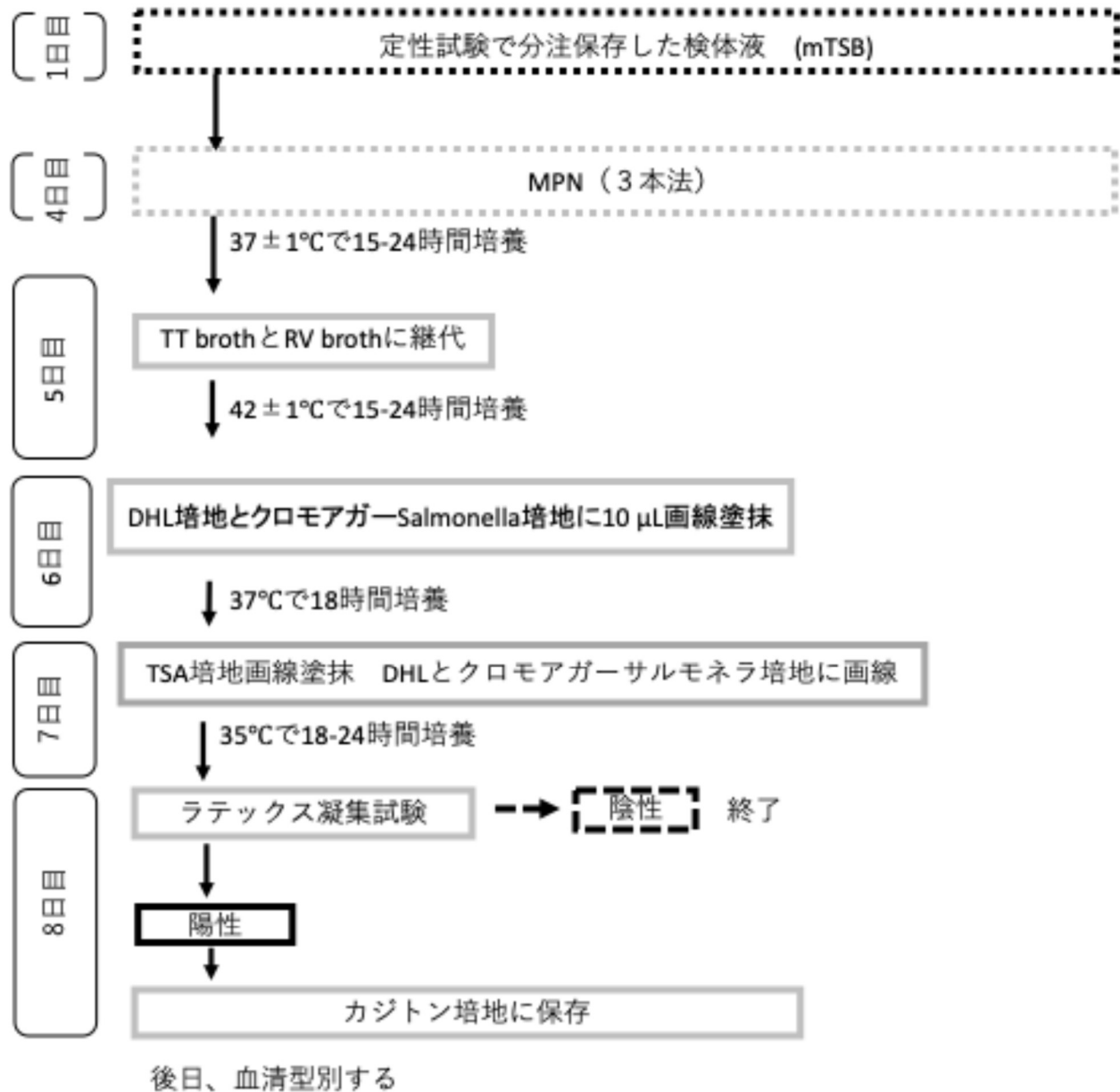


図1-5. サルモネラ属菌の定量的な検出方法

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	39	オス	12	17 - 24	20未満	5
					20以上30未満	7
					30以上	0
		メス	27	18 - 127	20未満	1
					20以上30未満	2
					30以上	24
黒毛和種	53	オス	31	20 - 32	20未満	0
					20以上30未満	16
					30以上	15
		メス	22	25 - 163	20未満	0
					20以上30未満	12
					30以上	10
交雑種	60	オス	29	22 - 27	20未満	0
					20以上30未満	29
					30以上	0
		メス	31	21 - 28	20未満	0
					20以上30未満	31
					30以上	0
日本短角種	2	オス	1	26	20未満	0
					20以上30未満	1
					30以上	0
		メス	1	19	20未満	1
					20以上30未満	0
					30以上	0
褐色和種	2	オス	1	43	20未満	0
					20以上30未満	0
					30以上	1
		メス	1	32	20未満	0
					20以上30未満	0
					30以上	1

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' TTTGTACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG 3'	USDA
		Stx-R	5'CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACDTC 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'	
	WbdIO111	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 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2 × Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer stx F (50 μM)	0.63	1.25	
Primer stx R (50 μM)	0.63	1.25	
Primer Eae F (50 μM)	0.50	1.00	
Primer Eae R (50 μM)	0.50	1.00	
Probe stx1 P (5 μM)	1.25	0.25	FAM
Probe stx2 P (5 μM)	1.25	0.25	FAM
Probe Eae-P (5 μM)	1.00	0.20	HEX
滅菌蒸留水	1.74		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-3-2 Assay2 O157、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 MastermixMaster Mix	12.50		
Primer 16SRna-F (20 μM)	0.20	0.16	
Primer 16SRna-R (20μM)	0.20	0.16	
Primer RfbE-O157-F (20μM)	0.25	0.20	
Primer RfbE-O157-R (20μM)	0.25	0.20	
Probe 16SrRNA-P (5 μM)	0.50	0.10	HEX
Probe RfbE-O157-P (5 μM)	0.25	0.05	FAM
滅菌蒸留水	5.85		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-3-3 Assay3 O26、O111 gene の 1well あたりの反応溶液組成

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

表 1-3-4 Assay4 O45、O121gene の 1well あたりの反応溶液組成

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

表 1-3-5 Assay5 O103、O145 gene の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2 × Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O103 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O103 R (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O145 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O145 R (20 μM)	0.31	0.25	
Probe Wzx O103 P (5 μM)	1.00	0.20	HEX
Probe Wzx O145 P (2 μM)	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)	AGCTCAGACCAAAAGTGACCATC	
		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 MastermixMaster Mix	12.50		
Primer 16SRna-F (20 μM)	0.20	0.16	
Primer 16SRna-R (20μM)	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	39	27 (69.2)	68.7 ± 163.9
	黒毛和種	53	38(71.7)	202634.3 ± 702306.9
	交雑種	60	25(41.7)	49.9 ± 124.4
	日本短角種	2	2(100)	2.2 ± 2.5
	褐色和種	2	2(100)	0.4 ± 0.1
性別	オス	74	42(56.8)	57186.9 ± 370321.1
	メス	82	52(63.4)	101949.2 ± 514677.4
全体		156	94 (60.3)	81949.0 ± 454117.7

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	—		—		—	
	5	—		—		—	
	6	6		1		0.2	
	7	6		1		0.1	
	8	6		1		0.1	
	9	6	60	1	11	0.1	0.1±0.1
	10	6		—		—	
	11	6		1		0.1	
	12	6		—		—	
	1	6		—		—	
	2	6		3		0.2±0.1	
	3	6		3		0.2±0.1	
B施設	4	—		—		—	
	5	—		—		—	
	6	6		6		1.9±2.0	
	7	6		6		1283334.0±1409136.1	
	8	6		6		1.0±1.3	
	9	6	60	4	47	1.7±1.4	163831.9±635002.2
	10	6		5		0.2±0.1	
	11	6		4		0.3±0.1	
	12	6		6		10.8±23.9	
	1	6		3		0.3±0.3	
	2	6		2		0.3±0.2	
	3	6		5		0.7±1.2	
C施設	4	3		3		25.4±13.4	
	5	3		3		72.8±45.7	
	6	3		3		17.0±16.5	
	7	3		3		355.2±150.8	
	8	3		3		506.7±138.0	
	9	3	36	3	36	16.1±17.8	86.3±168.3
	10	3		3		12.9±8.3	
	11	3		3		1.7±2.0	
	12	3		3		11.7±11.2	
	1	3		3		2.3±3.0	
	2	3		3		1.9±2.4	
	3	3		3		11.9±13.9	

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
2025	4	ホルスタイン	1		1		13.3	
		黒毛和種	—		—		—	
		交雑種	2	3	2	3	31.4±11.9	25.4±13.4
		日本短角種	—		—		—	
		褐色和種	—		—		—	
	5	ホルスタイン	2		2		67.5±63.2	
		黒毛和種	—		—		—	
		交雑種	1	3	1	3	83.3	72.8±45.6
		日本短角種	—		—		—	
		褐色和種	—		—		—	
	6	ホルスタイン	3		3		17.0±16.5	
		黒毛和種	4		4		1.8±2.1	
		交雑種	6	15	1	10	0.2	6.3±10.9
		日本短角種	1		1		3.9	
		褐色和種	1		1		0.3	
	7	ホルスタイン	3		—		—	
		黒毛和種	7		7		1100000.6±1374772.2	
		交雑種	5	15	3	10	355.2±150.7	770107.0±1241833.5
		日本短角種	—		—		—	
		褐色和種	—		—		—	
	8	ホルスタイン	9		4		380.0±277.2	
		黒毛和種	5		5		1.1±1.4	
		交雑種	1	15	1	10	0.6	152.6±252.8
		日本短角種	—		—		—	
		褐色和種	—		—		—	
	9	ホルスタイン	4		3		16.1±17.8	
		黒毛和種	4		3		1.0±0.1	
		交雑種	7	15	2	8	2.0±2.6	6.9±12.2
		日本短角種	—		—		—	
		褐色和種	—		—		—	
	10	ホルスタイン	3		3		12.9±8.3	
		黒毛和種	5		4		0.2±0.1	
		交雑種	7	15	1	8	0.4	5.0±7.9
		日本短角種	—		—		—	
		褐色和種	—		—		—	
	11	ホルスタイン	4		4		0.4±0.4	
		黒毛和種	7		2		2.2±2.6	
		交雑種	3	15	1	8	0.1	0.8±1.3
		日本短角種	1		1		0.4	
		褐色和種	—		—		—	
	12	ホルスタイン	—		—		—	
		黒毛和種	6		6		12.2±23.5	
		交雑種	9	15	3	9	9.0±13.0	11.1±19.7
		日本短角種	—		—		—	
		褐色和種	—		—		—	
2026	1	ホルスタイン	1		1		5.8	
		黒毛和種	5		3		0.3±0.3	
		交雑種	9	15	2	6	0.6±0.1	1.3±2.2
		日本短角種	—		—		—	
		褐色和種	—		—		—	
	2	ホルスタイン	3		3		1.9±2.4	
		黒毛和種	5		—		—	
		交雑種	6	15	4	8	0.2±0.1	0.9±1.5
		日本短角種	—		—		—	
		褐色和種	1		1		0.4	
	3	ホルスタイン	6		3		11.9±13.9	
		黒毛和種	5		4		0.8±1.3	
		交雑種	4	15	4	11	0.2±0.1	3.6±8.2
		日本短角種	—		—		—	
		褐色和種	—		—		—	

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*										
		STEC										サルモネラ
		eae	stx	16S	O157	O26	O111	O45	O121	O103	O145	
25-28	C施設	29.9	31.8	17.0	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
25-30	C施設	26.7	42.0	16.4	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
25-86	B施設	31.0	27.1	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
25-107	B施設	28.9	24.7	UD	UD	UD	UD	38.9	36.0	UD	UD	UD

* 数値はCT値、UDは非検出、NTは非試験

* 25-107は、CT-クロモアガーSTEC培地で分離したコロニーからのリアルタイムPCRで陰性のため、O45、O121の判定は陰性とした。

II. 分担研究報告

国内の食肉輸出施設の監視指導検査員の研修 プログラムの充実

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）
分担報告書（令和 7 年度）

国内の食肉輸出施設の監視指導検査員の研修プログラムの充実

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

本研究は、「輸出食肉認定施設における検査実施要領」に基づき、米国等向け輸出食肉の検証を担う新任指名検査員が、業務遂行に必要な知識および技術を効率的に習得できる研修教材および業務参考資料を作成することを目的として実施した。

HACCP の基礎的な知識に関するオンデマンド教材、と畜・解体工程等を題材とした演習教材、米国 FSIS 関連法令の邦訳資料、妥当性確認及び検証に用いる科学的根拠文献と概要の一覧等を作成した。

教材を用いて、2 か所の食肉衛生検査所において、HACCP の基礎的な研修を実施した結果、オンデマンド教材の視聴および対面演習を通じて参加者の理解度向上が確認され、オンデマンド教材の利便性及び演習の有効性が示された。さらに、指名検査員のパフォーマンス評価実施要領に基づき、新任指名検査員向け研修プログラム案を作成し、各検査所における体系的な人材育成に資する研修の枠組みを提示した。

新任指名検査員向け教材及び参考資料を作成し、研修案を提示したので、各検査所で運用し、さらに指名検査員全体の研修体制の充実に資する仕組みについて検討を進めることが望まれる。

研究協力者：

大塚 衣映（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）

森田 幸雄（麻布大学）

山崎 栄樹（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

本研究の主な目的は、「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（以下、指名検査員検証という）」に基づき、米国等向け輸出食肉の検証を担う新任指名検査員が、業務遂行に必要な知識及び技術を効率的に習得できる研修教材及び業務参考資料を作成することである。

併せて、作成した教材の一部を活用した基礎研修を試行し、その有効性を検証すると

ともに、新任指名検査員向け研修プログラム案を作成することを目的とした。

B. 研究方法

以下を通じて、新任指名検査員向け研修教材及び参考資料を作成し、それらを活用した研修により教材の検証を行った。また、新任指名検査員向けプログラム案を作成した。

1. 研修教材及び参考資料の作成

1.1 講義資料のオンデマンド教材化及び演習教材の作成

HACCP の基礎的な講義について、昨年度作成した講義資料に参考資料を追加し、自主学習用のオンデマンド教材を作成した。

また、指名検査員が実施する検証のうち、微生物検査の意義と評価方法について、学習する機会がないことから、オンデマンド教材に追加した。

演習は、CCP 工程がわかりやすい加熱食肉製品の製造工程について実施後、と畜・解体工程について行うこととし、各製造工程の動画と演習で用いる資料、ワークシートを作成した。

1.2 食肉処理に係る検証の動画教材の作成

令和6年度に作成したと畜・解体工程の検証の動画教材と同様、対象者を検査実施要領に基づく検証の経験がほとんどない新規着任者として設定し、食肉処理工程の検証について、作成した。

1.3 業務参考資料の作成及び整備

1.3.1 輸出先国の食肉の衛生管理に係る法令及び通知等の邦訳

教材の補助資料の作成及び輸出先国の法令として昨年度に引き続き、アメリカ合衆国農務省食品検査局（以下、FSIS）の

HACCP 規則等の邦訳し、必要に応じて解説を付けた。

1.3.2 妥当性確認及び検証の参考資料

と畜・解体工程の HACCP に基づく衛生管理の妥当性確認または検証に関する論文等の情報収集を行った。

2. 教材を用いた研修の検証

1.1 の教材を用いて、令和8年1～3月に、2 か所の食肉衛生検査所で検査実施要領の指名検査員検証の基礎研修（以下、基礎研修）を実施し、教材の効果を検証した。実施計画は以下のとおり。

2.1 参加者

指名検査員の経験が数年以内で、グループワークに必要な4～6名が参加できる食肉衛生検査所の職員。

2.2 オンデマンド教材の視聴

・オンデマンド教材の視聴可能期間：1か月

・参考テキスト：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）

・参考情報：CODEX 食品衛生の一般原則 2022 の対訳（公益社団法人日本食品衛生協会）https://www.n-shokuei.jp/eisei/pdf/ippangensoku_22.pdf

・課題：教材視聴後、教材内容について 3 問以上の質問の提出

2.3 グループワーク演習

方式：対面

演習題材：加熱食肉製品及びと畜・解体工程

ファシリテーター：研究班員

2.4 研修に関するアンケート調査

オンデマンド教材視聴後及び演習終了後に、参加者の理解度の変化及び教材の評価・意見を把握するためのアンケート調査を実施。

3. 研修プログラム案の作成

本分担研究を通じて作成した教材・参考資料を用いた新規着任者向け研修の内容と実施時期について検討した。

C. 結果

1. 研修教材及び参考資料

1.1 研修教材

オンデマンド教材は、受講の際に短時間でも確認しやすいように、章ごとに分けた。講義の説明は、音声 AI を用いたため、音声に沿った文章の表示や、アンダーラインまたは文字の色を変える等の強調をすることで、講師のポインターの指示の代わりとした。

加熱食肉製品の演習用教材は、厚生労働省の「食品製造における HACCP による衛生管理普及のための HACCP モデル」(<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000126913.html>)の【食肉製品】ウインナーソーセージの事例を参考に、製造工程の動画及び工程説明、フローダイアグラム、製品説明書等の資料を作成した。

と畜・解体工程の演習用教材は、昨年度作成したと畜・解体工程の検証の動画教材を演習用に加工し、工程説明、フローダイアグラム、製品説明書等は、「と畜場におけると畜・解体処理の衛生管理計画作成のための手引書(令和2年3月 公益財団法人日本食肉生産技術開発センター)」(<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000626328.pdf>)を参考に作成した。

同教材及び演習用教材の構成は表1に示す。

1.2 参考資料

米国の連邦規則9CFR(家畜及び動物性食品)のうち HACCP に係る規則及び FSIS 指令を邦訳し、背景等の情報が必要な部分については注釈を加えた(表2)。また、用語集を作成した。

と畜・解体工程の HACCP に基づく衛生管理の妥当性確認の科学的根拠、または検証の参考に資する公表論文等を確認し、概要を作成した(表3)。

2. 教材及び研修の検証

基礎研修により、教材及び研修の効果を検証した。

2.1 スケジュール及び参加者の背景

基礎研修のスケジュールは表4のとおり実施した。参加者は 10 名で、食肉衛生検査の経験年数は、1～4年であった。

8名が基礎研修の内容について、所内または外部研修の受講経験があり、2名が経験なしだった。

2.2 オンデマンド教材の視聴について

オンデマンド教材の視聴回数は、2 回(6 名)、1 回(2 名)、不明(2 名)であった。オンデマンド教材のみを視聴(3 名)、参考テキストを見ながら視聴(7 名)であった。

2.3 オンデマンド教材の評価について

参加者に、オンデマンド教材の満足度を 5 段階で評価してもらった結果、平均 3.5 であった。

評価の理由の概要は、以下のとおりである。

・理解しづらい用語など、自分に合わせて繰り返し動画を視聴し、理解を深められる点良かった

・隙間時間を活用して学習を中断・再開しやすい点や、再生速度を調整できる点は利用しやすい

・記載例がある点、基本用語を丁寧に説明している点、参考書籍に沿った構成であるため、わかりやすい

・スライドと音声解説の連携が弱く集中しにくい

・対面講義に比較して、説明の意図や強調点がつかみにくい

・動画を見ただけでは自分で取り組めるイメージが湧かない

・FSIS とと畜場法の衛生要求の関係性が分かりにくい

2.4 理解度の変化

参加者に、HACCP7原則の原則2～7について、HACCP 研修受講前の自分の知識を1とした場合に、オンデマンド講義視聴後と演習受講後のそれぞれの理解度を5段階で自己評価してもらった。

理解度の平均は、オンデマンド教材視聴後および演習終了後の自己評価による理解度は、それぞれ平均 2.3、3.4 となり、段階的な向上が認められた。(図1)。特に原則 3、4、6 において演習による理解度向上が大きかった。一方、原則 7 については、他の原則と比較して演習による効果が小さい傾向がみられた。

2.5 研修終了後の評価

研修終了後に自由記載で、参加者の演習及び研修全体に対する意見を把握した。

意見の概要は以下のとおりである。

- ・ 動画視聴に比べ、対面演習では失敗しながら学べたことで理解が深まった
- ・ 具体例(と畜工程)を用いた演習により、

HACCP プラン作成の流れが理解しやすくなった

- ・ 少人数だったため、参加者同士で議論しながら理解を深めることができた
- ・ 改めて管轄施設の HACCP プランを読み直す必要性を認識できた
- ・ オンデマンド教材だけでは重要ポイントを理解しにくく、対面演習が必須である
- ・ 一度の演習では習得が難しく、反復学習・追加演習が必要
- ・ 参加者の知識や経験値の差によっては、一般衛生管理や 7S 等の基礎知識不足、管轄施設の HACCP プランを十分把握できていないことがあり、理解度に差があったと思う
- ・ 事前に管轄施設の HACCP プランや現場の流れを確認できるとよかった
- ・ 講師主体で HACCP プランを作成したが、参加者同士で意見を出し合いそれを修正していただくと、より主体的に参加できるのではないかと思う。

3. 新任指名検査員向け研修プログラム案の作成

対米等輸向け食肉取扱施設を管轄する食肉衛生検査所における指名検査員の業務評価については、検査実施要領の「IV 指名検査員の検査等業務に係るパフォーマンス評価実施要領」(以下、パフォーマンス評価実施要領)に規定されている。本要領の評価項目に基づき、業務遂行に必要な知識・技術等、教材・参考資料を利用した研修例、及び各研修の実施時期について検討し、作成した(図2)。

D. 考察

教材及び参考資料は、本研究の初年度に実施した「食品衛生検査所の研修に関する実態調査」で明らかにした「食肉衛生検査所の指名検査員等向け教材」の形式、内容を満たすことを目指した。教材は、オンデマンド教材及び演習等で用いる動画で構成し、参考資料は米国の連邦規則 9CFR 等を仮訳し、解説を付けたことで、上記の形式及び内容を充足することができた。また、と畜・解体工程の衛生管理に関する妥当性確認及び検証を検討した文献等のとりまとめは、研修及び業務の参考に活用できると考える。

作成した教材について、検証として実施した基礎研修の結果から以下のとおり、考察する。

オンデマンド教材の視聴と演習の各段階的で、理解度の改善が認められ、研修教材の効果を確認できた。

オンデマンド教材については、参加者の評価から、自分の理解度、確保時間の長さに合わせて学習調整ができるオンデマンド教材の利便性が評価されているものと考ええる。教材では理解しづらいとする評価については、教材としての不足もあるが、食品製造工程の衛生管理システムである HACCP は、講義による知識習得だけでは概念の理解までが限界であるためと考える。実際に、演習では講義内容の実践を行うため、理解度は講義より演習の方が上回った。また、HACCP は演習と反復学習が必要であることを参加者が認識したことは、研修の有効性を示すものと考ええる。

なお、今回の検証は、2 か所の食肉衛生検査所の計 10 名を対象として実施したものであり、結果の一般化には一定の制約があ

る。また、本演習は研究班員がファシリテーターを務めたため、各検査所職員が主体となって実施した場合の効果については、今後の検証が必要である。

また、他の教材を用いた研修について、今後の検証、それぞれの検証結果による教材、研修方法の改善を検討していく必要がある。

さらに、本研究は対象を新任指名検査員としたため、例えば、HACCP に関しては、検証活動の実践向けの教材は作成されていない。今後、新任指名検査員研修の受講修了者向けの研修についても検討していく必要がある。

新任指名検査員向け研修プログラム案は、パフォーマンス評価実施要領の評価項目に基づき作成したことで、検査所の研修責任者、研修を受講する検査員が把握しやすいものであると考える。一方、今回は、概要の検討までであるため、各検査所で、新任指名検査員の研修を計画する際の参考、または出発点として利用したうえで、今後、実際の運用に必要な内容について、さらに検討が必要と考える。

E. 結論

本研究では、新任指名検査員を対象として、輸出食肉に係る検証業務に必要な知識および技術の習得を目的とした教材および業務参考資料を、検査所の実務で活用しやすい形式で作成した。

作成した教材を用いた基礎研修においては、参加者の理解度向上が認められ、特に演習の有効性が確認された。さらに、パフォーマンス評価実施要領に基づく新任指名検査員向け研修プログラム案

を作成し、各検査所における体系的な人材育成の基礎資料を提示することができた。

今後は、各検査所での運用結果を踏まえ、教材および研修内容の改善を図るとともに、指名検査員全体の研修体制の充実に資する仕組みについて検討を進めることが望まれる。

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7年9月19日最終改正)

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 教材及び演習用教材

HACCPの基礎について			
No.	タイトル	内容	時間(m：s)
0	はじめに	検査員がHACCPを学ぶ理由、資料目次	5:23
1	HACCPシステムとは	HACCPの歴史 前提条件プログラムとHACCPシステムの関係 日本のHACCP制度化の構造、HACCPシステムの特徴	9:46
2	用語及び定義	PRP、GHP、HACCPプラン、HACCPシステム等用語及び定義について	4:21
3	ハザードとは	ハザードとは、生物学的ハザード、 化学的ハザード、物理的ハザード	21:59
4	HACCPシステム適用の7原則12手順	HACCPシステム適用の7原則、HACCPシステム適用のための7原則・12手順	1:41
5	前提条件プログラム/一般衛生管理プログラム（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、なぜ必要なのか、一般衛生管理事項、手順書の作成・文書化のポイント・内容・作成上の注意点、手順書に基づく衛生管理実施上の注意点等	11:37
6	HACCPプラン作成の準備段階	HACCPシステム導入の基点、HACCPチームの編成、製品の記述、意図される用途および使用者の特定、フローダイアグラムの作成、フローダイアグラムの現場確認	11:00
7	ハザード分析の実施	ハザード分析とは、ハザード分析の必要性・目的・実施	13:00
8	重要管理点（CCP）の決定	CCPとは、適切な箇所にCCPを設定する必要性、CCPの決定方法・具体例	9:00
9	妥当性確認された管理基準（CL）の設定	CLとは、CL設定の具体例	9:30
10	モニタリングシステムの設定	モニタリングとは モニタリングの必要性、要件、 モニタリングシステム構築の要素	7:20
11	改善措置の設定	改善措置とは、改善措置の必要性和規定の必要性・文書化	6:40
12	HACCPプランの妥当性確認及び検証手順	妥当性確認とは、妥当性確認の必要性、検証とは、検証の必要性、HACCPシステムの検証の内容、検証計画に規定しておく事項	15:00
13	文書及び記録方法の設定	記録付け・文書保存の必要性、 どのように記録を付け、保存するか	7:00
微生物検査の評価			
No.	内容		時間(m：s)
1	微生物検査の意義：外部検証と製品評価の違い		5:30
2	外部検証の微生物検査における“合格”のコンセプト		4:40
3	微生物検査の評価基準の設定方法①		27:00
4	微生物検査の評価基準の設定方法②		14:00
演習用資料			
No.	内容		時間(m：s)
1	動画で見る食肉製品の製造ソーセージ編		28:00
2	と畜・解体工程		28:00

表2 仮訳した米国連邦規則及びFSIS Directives

CFR Title 9 Animals and Animal Products			
No.	Part	Title	タイトル
1	301	Terminology; Adulteration and Misbranding Standards	用語、Adulterationおよび誤表示基準
2	309	Ante-Mortem Inspection	生体検査
3	310	Post-Mortem Inspection	とさつ後検査
4	311	Disposal of Diseased or Otherwise Adulterated Carcasses and Parts	疾病またはその他不純物の混じった枝肉および部位の処分
5	312	Official Marks, Devices and Certificates	公式マーク、識別具および証明書
6	313	Humane Slaughter of Livestock	家畜の人道的と畜
7	327	Imported Products	輸入製品
	416	SANITATION PERFORMANCE STANDARDS	衛生性能規準
8	416.1	General Rules	一般規則
9	416.2	Establishment Grounds and Facilities	施設の敷地および設備
10	416.3	Equipment and Utensils	機器および用具
11	416.4	Sanitary Operations	衛生的作業
12	416.5	Employee Hygiene	従業員の衛生
		SANITATION STANDARD OPERATING PROCEDURES	衛生管理標準作業手順
13	416.11	General Rules	一般規則
14	416.12	Development of Sanitation SOP's	衛生標準作業手順書（SOP）の作成
15	416.13	Implementation of SOP's.	SOPの実施
16	416.14	Maintenance of Sanitation SOP's	衛生SOPの維持
17	416.15	Corrective Actions	是正（改善）措置
18	416.16	Recordkeeping Requirements	記録保持の要件
19	416.17	Agency Verification	当局による検証
	417	Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems	ハザード分析および重要管理点（HACCP）システム
20	417.1	Definitions	定義
21	417.2	Hazard Analysis and HACCP Plan	ハザード分析及び HACCP 計画
22	417.3	Corrective Actions	是正（改善）措置
23	417.4	Validation, Verification, Reassessment	妥当性確認、検証、再評価
24	417.5	Records	記録
25	417.6	Inadequate HACCP System	不適切な HACCP システム
26	417.7	Training	訓練
27	417.8	Agency Verification	当局による検証
	418	RECALL	リコール
28	418.2	Notification	通知
29	418.3	Preparation and Maintenance of Written Recall Procedures	書面によるリコール手順の作成および維持
30	418.4	Records	記録
	500	RULES OF PRACTICE	執行規則
31	500.1	Definitions	定義
32	500.2	Regulatory Control Action	規制に関する管理措置
33	500.3	Withholding Action or Suspension without Prior Notification	事前通知のない一時停止措置または停止
34	500.4	Withholding Action or Suspension with Prior Notification	事前通知による一時停止措置または停止
35	500.5	Notification, Appeals, and Actions Held in Abeyance	通知、意義申し立て、および一時停止の措置
36	500.6	Withdrawal of Inspection.	検査の撤回
37	500.7	Refusal to Grant Inspection	検査許可の拒否
38	500.8	Procedures for Rescinding or Refusing Approval of Marks, Labels, and Containers	マーク、ラベルおよび容器の承認を取り消し、または承認を拒否するための手順
FSIS Directives			
No.	Part	Title	タイトル
1	5000.1	Verifying an Establishment's Food Safety System	施設の食品安全システムの検証
2	5000.4	Performing The Pre-Operational Sanitation Standard Operating Procedures Verification Task	作業前の衛生標準作業手順の検証業務の実施
3	5000.6	Performance of the Hazard Analysis Verification Task	ハザード分析検証業務の実施
4	6100.2	Post-Mortem Livestock Inspection	と殺後家畜検査
5	6420.2	Verification of Procedures for Controlling Fecal Material, Ingesta, and Milk in Livestock Slaughter Operations	家畜のと畜作業における糞便、消化管内容物、乳汁を管理するための手順の検証
6	6900.2	Humane Handling and Slaughter of Livestock	家畜の人道的取り扱い及びと殺
7	6100.1	Ante-Mortem Livestock Inspection	生体検査
8	6100.4	Verification Instructions Related to Specified Risk Materials in Cattle of All Ages	全年齢の牛における特定リスク物質に関する検証指示
9	6410.1	Verifying Sanitary Dressing and Process Control Procedures by off- Line Inspection Program Personnel(IPP)in Slaughter Operations of Cattle of Any Age	あらゆる月齢の牛のと畜作業における衛生的な解体処理と工程管理手順のオフライン検査員（IPP）による検証
10	10010.1	Sampling Verification Activities for Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli in Raw Beef Products	生牛肉製品中の志賀毒素産生大腸菌(STEC)のサンプリングによる検証活動
11	10010.2	Verification Activities for Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli in Raw Beef Products	生の牛肉製品におけるSTECの検証活動
12	10010.3	Traceback Methodology for Escherichia Coli (E. Coli) O157:H7 in Raw Ground Beef Products and Bench Trim	生のひき肉製品およびベンチトリム肉におけるE.coli O157:H7のトレースバックの方法

表 3. 妥当性確認及び検証の参考資料

1. 妥当性確認 (Validation) に用いる論文

「と畜工程・工程での消毒等の介入が科学的に有効である」ことの根拠

No.	Title	タイトル
1	Nutsch, A. L., et al. (1998). Steam Pasteurization of Beef Carcasses: Evaluation of Bacterial Populations. Journal of Food Protection, 61(7), 930-935.	牛枝肉の蒸気殺菌：細菌群数減少の評価
2	Castillo, A., et al. (1998). Use of Hot Water for Beef Carcass Decontamination. Journal of Food Protection, 61(1), 19-23.	牛枝肉の除菌における温水処理の利用
3	Schafer D. E. et al.(1996), Steam Pasteurization of Beef Carcasses. Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports, 0(1), 1-3.	牛枝肉の蒸気殺菌
4	Gill, C. O., et al. (2001). Effects of Hot Water Pasteurizing Treatments on the Microbiological Condition of Manufacturing Beef used for Hamburger Patty Manufacture. International Journal of Food Microbiology. 63(3), 243-256.	ハンバーガーパティ製造用牛肉の製造過程における微生物の温湯殺菌処理の効果
5	Delmore, R. J. Jr., et al.(2000). Interventions to Reduce Microbiological Contamination of Beef Variety Meats. Journal of Food Protection, 63(1), 44-50.	牛の各種肉・内臓等における微生物汚染を低減するための介入
6	Young, I., et al. (2016). A Rapid Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Slaughter and Processing Interventions to Control Non-Typhoidal Salmonella in Beef and Pork. Journal of Food Protection. 79(12), 2196-2210.	牛肉と豚肉の非チフス性サルモネラ菌を制御するためのと畜および加工の有効性に関システムティックレビューとメタ解析
7	Thomas, C. L., et al. (2019). Validation of Antimicrobial Interventions for Reducing Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Surrogate Populations during Goat Slaughter and Carcass Chilling. Journal of Food Protection, 82(3), 364-370.	ヤギと畜およびと体冷却中の志賀毒素産生大腸菌代替菌の減少を目的とした抗菌介入法の検証
8	Cap, M., et al. (2019). Inactivation of Shiga toxin-producing Escherichia coli in Fresh Beef by Electrolytically-generated Hypochlorous Acid, Peroxyacetic Acid, Lactic Acid and Caprylic Acid. Meat Science, 157, 107886.	電解生成した次亜塩素酸、過酢酸、乳酸、カプリル酸による新鮮な牛肉中の志賀毒素産生大腸菌の不活性化

2. 妥当性確認(Validation) + 検証(Verification)に用いる論文

「工程（剥皮・内臓摘出・洗浄・介入）で汚染移行が抑えられる」という科学的根拠とCFRの米国の牛枝肉の微生物汚染に対する工程管理の検証基準

No.	Title	タイトル
9	Bosilevac, J. M., (2005). Development and Evaluation of an On-line Hide Decontamination Procedure for Use in a Commercial Beef Processing Plant. Journal of Food Protection., 68 (2) , 286-272.	牛肉処理工程における皮由来汚染低減を目的としたオンライン皮除染手法の開発と評価
10	Brichta-Harhay, D. M., et al. (2008). Salmonella and Escherichia coli O157:H7 Contamination on Hides and Carcasses of Cull Cattle Presented for Slaughter in the United States: an Evaluation of Prevalence and Bacterial Loads by Immunomagnetic Separation and Direct Plating Methods. Applied and Environmental Microbiology, 74(20), 6,289-6,297.	米国においてと畜に供された廃用牛の皮および枝肉における Salmonella ならびに Escherichia coli O157:H7 の汚染状況－免疫磁気分離法および直接平板培養法による有病率および菌数の評価－
11	Bacon, R. T., et al. (2000). Microbial Populations on Animal Hides and Beef Carcasses at Different Stages of Slaughter in Plants Employing Multiple-Sequential Interventions for Decontamination. Journal of Food Protection, 63(8), 1,080-1,086.	複数の段階的汚染処理介入を導入していると畜処理施設におけると畜工程各段階での動物皮および牛枝肉の微生物汚染状況
12	Antic D., et al. (2021). Beef Abattoir Interventions in a Risk-based Meat Safety Assurance System. Meat Science,182, 108622.	リスク評価に基づく食肉安全保証システムにおける牛と畜場での衛生介入措置
13	Antic, D., et al.(2020). Meta-analysis of the Efficacy of Interventions Applied during Primary Processing to Reduce Microbiological Contamination in Beef. FSA Project FS430388.	牛と畜・一次処理工程における衛生介入の微生物汚染低減効果：メタ解析 リバプール大学による英国FSAプロジェクトによるメタ分析報告書（2020）：一次処理（primary processing）の介入効果
No.	Title	タイトル
14	McEvoy, J. M., et al. (2000). Contamination of Beef Carcasses During Hide Removal and Use of a Test Bacterial Decontamination System on Beef Hide. Agriculture and Food Development Authority, Project Armis, No. 4577, Final Report.	剥皮工程における枝肉汚染と、皮由来汚染低減を目的とした試験的牛皮除染システムの検討 E.U., 農業・食品開発庁（Agriculture and Food Development Authority）プロジェクト Armis（No.4577）最終報告書
15	Zweifel, C., et al. (2014). Microbiological Contamination of Cattle Carcasses at Different Stages of Slaughter in Two Abattoirs. Meat Science, 98(2), 198-202.	2施設における、と畜工程段階別の牛枝肉微生物汚染状況

16	Casas, D., et al. (2019). In-Plant Validation Study of Harvest Process Controls in Two Beef Processing Plants in Honduras. Journal of Food Protection, 82(4), 677-683.	ホンジュラスの2つの牛肉処理施設におけると畜工程管理のインプラント妥当性確認
17	9 CFR (米国連邦規則集) 310.25 (up to date as of 12/29/2025) Contamination with microorganisms; process control verification criteria.	微生物汚染に対する工程管理の検証基準

3. 検証(Verification)に関するFSIS Directive(指令)

No.	Title	タイトル
18	FSIS Directive (指令) , 5000.1 Rev. 5, (4/4/2017) Verifying an Establishment's Food Safety System.	食品安全管理システムの検証
19	FSIS Directive (指令) , 6420.2 Rev. 2, (12/19/2019) Verification of Procedures for Controlling Fecal Material, Ingesta, and Milk in Livestock Slaughter Operations.	家畜と畜作業において、糞便・消化管内容物および乳を管理するための手順の検証

表4：基礎研修スケジュール

(1) オンデマンド教材「HACCPの基礎」視聴期間：約4週間

事前課題送付期限：教材視聴期間終了後1週間

(2) 演習：2日間

1日目：加熱食肉製品、2日目：と畜・解体工程

1日のスケジュール例

内容	実施者	作業時間	開始時間	終了時間	備考
参加者の自己紹介 動画教材について質疑応答		0:30	10:00	10:30	1日目のみ
演習の進め方等の説明	ファシリテーター	0:20	10:30	10:50	
休憩	各自	0:10	10:50	11:00	
演習動画視聴 ハザード分析	グループ＋ファシリ テーター	1:00	11:00	12:00	
昼休憩	各自	1:00	12:00	13:00	
ハザード分析・CCPの決定	グループ＋ファシリ テーター	1:00	13:00	14:00	
休憩	各自	0:10	14:00	14:10	
HACCPプランの作成	グループ＋ファシリ テーター	2:00	14:10	16:10	
休憩	各自	0:10	16:10	16:20	
演習について振り返り、質疑応答等	グループ＋ファシリ テーター	0:50	16:20	17:10	

図1：理解度の変化

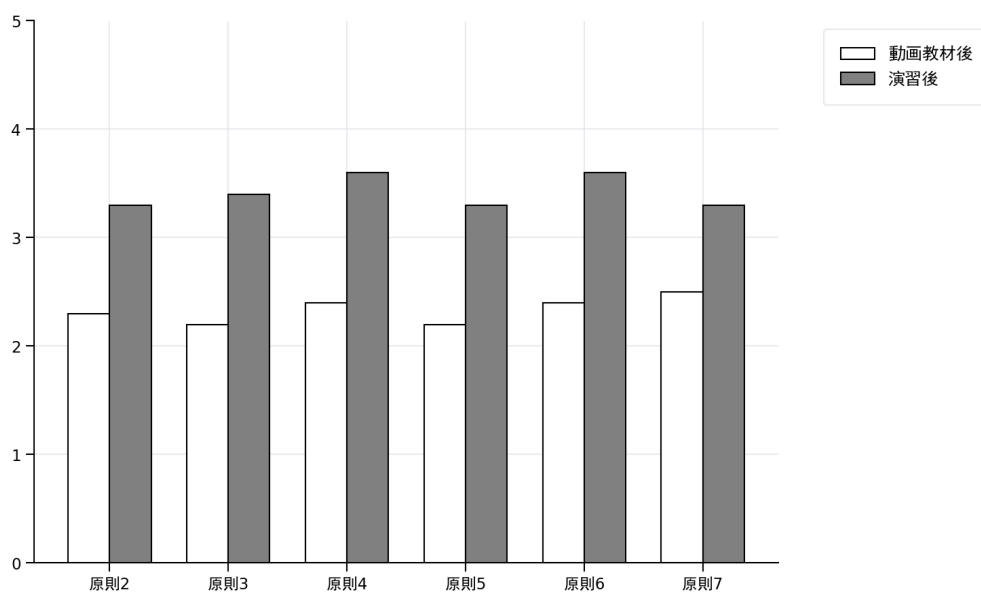


図2：新任指名検査員研修プログラム案

定義

受講生：研修を受講する検査員
講師：講義またはOJTで講師を担当する検査所職員

留意事項

・研修の実施時期・期間は、各検査所で研修の責任者が計画する。
・各研修は基本的に、講義・動画等の視聴→（ある場合は）演習→OJTの順に実施する。

輸出食肉認定施設における検査実施要領	Ⅳア) パフォーマンス評価項目	業務遂行に必要な知識・技術等	研修に新教材を用いた例
Ⅰ と畜検査の方法	(ア) と畜検査	・「と畜検査実施要領」に基づくと畜検査ができる ・各国要綱の基準に基づく生体検査及びとさつ後検査、及び検査結果に基づく措置ができる	○と畜検査研修：各検査所が従来から実施していると畜検査研修に以下を取り入れる 講義前：受講生がE1を視聴 講義後またはOJTの期間に、必要に応じて講師がE1を用いて補足説明を行う
Ⅱ 米国等向け輸出食肉に係る指名検査員による検証（第4及び8を除く）	(イ) 一般衛生管理の検証 (ウ) HACCP方式による衛生管理の検証 (エ) とさつ・解体処理の検証 (カ) 製品再検査	・HACCPの7原則12手順等の基礎的な知識 ・危害要因分析とHACCPプランの構築等ができる	○HACCPの基礎（導入）研修 ①E2及びE6を視聴。テキスト（改訂新版 HACCP導入と運用の基本）を確認しながら視聴することが望ましい。 ②E3-1及びE3-2を用いたグループワーク演習を受講。 ・グループワークは、受講生4～6人/班で構成。経験年数に幅（1～3年）がある方が良い。 ・講師は、演習のファシリテーターを務める。受講生の、①についての理解不足部分については、演習中に講師が説明、グループメンバーとの討議で取り上げて、理解の向上を図る。 ・①と②の間に、管轄施設のHACCPに基づく衛生管理に関する講義を受講した方が望ましい。 ・自治体または民間団体等によるHACCP講習会（令和5年12月22日厚生労働省健康・生活衛生局食品監視安全課長通知「HACCPシステムに係る講習会について」相当）の受講済者は、①の指定箇所の視聴及び②E3-2の演習のみでも可。
		・HACCPの検証ができる（新規指名検査員には基礎的な知識・技術まで）	○HACCPの基礎（検証）研修 HACCPの基礎（導入）研修の受講後、 ・受講生が、対米等要綱、検査実施要領を確認しながら、E4を視聴。 ・作業前・作業中点検のOJT ・E4視聴後またはOJTの期間に、必要に応じて、講師がE4を用いて補足説明を行う。 ・講師の指導を受けながら作業前・作業中点検が概ねできるようになった受講生は、E5を視聴。視聴時に、R1、R2を適宜確認する。 ・STEC検査担当の受講生は、E7を視聴。
Ⅱ 米国等向け輸出食肉に係る指名検査員による検証 第4人道的な獣畜の取り扱い及びとさつに係る指名検査員の検証	(オ) 人道的な獣畜の取り扱い及びとさつの検証	・輸出先国のアニマルウェルフェアの管理に関する知識	○人道的な獣畜の取り扱い及びとさつの検証の研修 HACCPの基礎（導入）研修の受講後、 ・受講生が、対米等要綱、検査実施要領を確認しながら、R4を読む。講師が、必要に応じて、補足説明を行う。 ・OJT

教材及び参考資料一覧

E	動画教材
E1	と畜検査（生体検査・と殺後検査）
E2	HACCPの基礎（e-ラーニング教材）
E3	HACCP演習用動画
E3-1	b-1)加熱食肉製品の製造工程
E3-2	b-2)と畜・解体工程
E4	作業前及び作業中点検（と畜・解体・食肉処理工程）
E5	FSISの研修（2023年2日目）動画(翻訳字幕付)
E6	微生物検査の評価法
E7	STEC検査の手法
R	参考資料（英語の文書は全て仮訳）
R1	9 CFR
R2	FSIS Directives（注釈付き）
R3	FSIS Meat and Poultry Hazards and Controls Guide (March 2018)
R4	FSISのAnimal welfareの研修資料
R5	翻訳用語集
R6	妥当性確認及び検証に用いる論文概要リスト
R7	FAO Tool Box(CODEX 食品衛生の一般原則2022対応)

Ⅱ．分担研究報告

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
衛生微生物部

令和 7 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
研究代表者 穂山 浩 (星薬科大学)

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

本研究では、対米輸出向け食肉の STEC 検査において報告された誤判定事例を踏まえ、市販の STEC 検査キットであるクオリバックス Q7 システムおよび RapidFinder について、誤判定がどのような条件で発生しうるのかを検証した。クオリバックス Q7 システムでは、開封後一定期間経過した試薬の一部で偽陽性、偽陰性および判定不能が認められた一方、開封直後の試薬ではこれらは認められなかったことから、試薬の保存条件が判定結果に影響する可能性が示唆された。RapidFinder では報告のあった偽陰性は再現されなかったが、高濃度の菌存在下の検体で *eae* の蛍光強度低下が認められ、これが偽陰性の一因となる可能性が考えられた。また、検体の希釈により蛍光強度低下が軽減されたことから、必要に応じた希釈操作が偽陰性の改善に有効であることが示唆された。以上より、適切な試薬管理および必要に応じた検体の希釈が検査精度の確保に重要であると考えられた。

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。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。新任の検査担当者も含めた一定の検査水準の維持および検査担当者の作業効率化が必要とされるため、各施設では、市販されている STEC 検査キットが使用されている。令和 5 年度から 6 年度に実施した各検査所への聞き取り調査において、検査キットを

供試した STEC スクリーニング検査における偽陽性判定および偽陰性判定が報告された。そこで、本研究では、対米輸出検査における逸脱防止対策として、検査の再実施による作業時間の浪費を防止し、検査の信頼性を確保するため、報告のあった検査キットについて誤判定がどのような条件で発生しうるのか検証した。

B. 研究方法

1. STEC スクリーニング検査で用いるクオリバックス Q7 システムの判定についての検証

(1) スクリーニング検査試薬

クオリバックス Q7 システムでのスクリーニング検査には、BAX® System Real-Time PCR Assay for STEC Screening、BAX® System Real-Time PCR Assay for *E. coli* 0157:H7、BAX® System Real-Time PCR Assay for STEC Panel 1 および BAX® System Real-Time PCR Assay for STEC Panel 2 を供試した。各検査試薬は、使用期限内の開封後 1 ヶ月から 6 ヶ月経過した製品を供試した。その結果、偽陽性、偽陰性および判定不能が認められた検査試薬については、BAX システムの機器本体のメンテナンスを実施した後に開封直後の製品を供試して再度試験を実施した。

(2) 偽陽性判定の検証

牛肉 50 g に変法トリプトソイブロス培地 (mTSB) 150 mL を添加し、ストマッカー処理を 1 分間実施し、42℃で 22 時間培養し、牛肉培養液とした。BAX System のプロトコルに従い、牛肉培養液および mTSB を各検査試薬 (各 8 well) で検査した。

(3) 偽陰性判定の検証

STEC 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 菌株を供試した。トリプトソイブロス培地 (TSB) に接種し、37℃で 18 時間培養した。

培養後の菌液を混合し、DNA を熱抽出し、7 血清型 STEC DNA とした。BAX System のプロトコルに従い、7 血清型 STEC DNA を各検査試薬 (5~40 well) で検査した。

2. STEC スクリーニング検査で用いる RapidFinder の判定についての検証

(1) スクリーニング検査試薬

RapidFinder でのスクリーニング検査には、RapidFinder™ STEC Screening

Assay を供試した。各検査試薬は、使用期限内の開封直後の製品を供試した。

(2) 偽陰性判定の検証

RapidFinder では偽陰性判定のみが報告されていたため、偽陰性判定について検証した。菌株は、STEC 0157 *stx1/2* 保有株および STEC 0157 *stx2* 保有株を供試した。供試菌株を TSB に接種し、37℃で 18 時間培養し、菌液とした。また、牛肉 25 g に mTSB 225 mL を加え、ストマッカー処理後に 42℃で 22 時間培養し、牛肉培養液とした。さらに、牛肉 25 g に 50 CFU の供試菌株を接種し、TSB 225 mL を加えてストマッカー処理後に 42℃で 22 時間培養し、菌接種牛肉培養液とした。菌液を TSB および牛肉培養液で 10^7 、 10^8 および 10^9 CFU/mL に希釈した。菌接種牛肉培養液は、TSB で 10 倍および 10^2 倍に希釈した。菌液の各希釈液および菌接種牛肉培養液の原液および希釈液から RapidFinder のプロトコルに従って DNA を抽出した。抽出した DNA を検査試薬 (各 2 well) で検査した。

C. 研究結果

1. STEC スクリーニング検査で用いるクオリバックス Q7 システムの判定についての検証

(1) 偽陽性判定の検証

開封後 1 ヶ月から 6 ヶ月経過した検査試薬では、以下の結果であった。STEC screening および *E. coli* 0157:H7 では、mTSB および牛肉培養液ともに偽陽性および判定不能は認められなかった (表 1)。panel 1 では、mTSB で偽陽性 (1 well/8

well)、牛肉培養液で偽陽性 (1 well/8 well) および判定不能 (1 well/8 well) が認められた。panel 2 では、偽陽性は認められなかったが、mTSB および牛肉培養液で判定不能 (1 well/8 well) が認められた。開封直後の panel 1 および panel 2 では、偽陽性および判定不能は認められなかった (表 2)。

(2) 偽陰性判定の検証

開封後 1 ヶ月から 6 ヶ月経過した検査試薬では、以下の結果であった。STEC screening では、偽陰性 (1 well/40 well) が認められた (表 3)。 *E. coli* 0157:H7、panel 1 および panel 2 では、mTSB および牛肉培養液ともに偽陰性および判定不能は認められなかった。開封直後の STEC screening では、偽陰性および判定不能は認められなかった (表 4)。

2. STEC スクリーニング検査で用いる RapidFinder の判定についての検証

RapidFinder™ STEC Screening Assay では、菌液および菌接種牛肉培養液の偽陰性判定は認められなかった (表 5 および 6)。しかし、 10^9 CFU/mL 菌液および菌接種牛肉培養液の原液では、一度立ち上がった *eae* の蛍光強度の cycle 数後半での低下が認められた (図 1-3)。*eae* の蛍光強度低下は、*stx2* 単独保有株よりも *stx1/2* 両保有株で強く、 10^7 および 10^8 CFU/mL 菌液ならびに菌接種牛肉培養液の 10 倍および 10^2 倍希釈液では非常に弱いかあるいは認められなかった (図 1-3)。また、*stx1/2* 両保有株の TSB での希釈菌液は、牛肉培養液での希釈菌液と比較して *eae* の蛍光強度低下がやや強い傾向であった (図 1-3)。

D. 考察

令和 5 年度から 6 年度における対米輸出向け食肉取扱施設および食肉検査所に対する聞き取り調査で、クオリボックス Q7 システムでは、偽陽性、偽陰性判定および判定不能、RapidFinder では、偽陰性判定の事例が報告された。そのため、本研究では、各キットの誤判定の再現および発生条件の検証を実施した。クオリボックス Q7 システムのキットでは、誤判定事例の聞き取り時に保管方法についても問い合わせがあったため、本検証では、開封後一定期間経過後のキットおよび開封直後のキットを用いて検討した。判定結果については、開封後一定期間が経過したキットの一部で偽陰性、偽陽性および判定不能が確認された。しかし、開封直後のキットでは、偽陰性、偽陽性および判定不能が認められなかったことから、開封後のキットの保存期間がこれらの判定結果に影響する可能性が推察された。吸湿性の高いキット試薬については、保管方法も含めた施設での運用方法の確認が必要と考えられた。

RapidFinder では、今回の検証では偽陰性判定は再現できなかったが、検体に高濃度の STEC が存在する場合に cycle 数後半での *eae* の蛍光強度低下が認められた。各施設からの偽陰性の報告では、全 cycle 終了までに *eae* の蛍光強度が閾値以下になっており、この蛍光強度低下が RapidFinder で偽陰性判定となる原因と推定された。 10^7 および 10^8 CFU/mL 菌液ならびに菌接種牛肉培養液の 10 倍希釈液では蛍光強度の低下が弱まったことから、検体の希釈は偽陰性判定の改善に有効であると考えられた。また、蛍光強度の低下は、*stx2* 単独保有

株よりも *stxI/2* 両保有株で強かったことから、*stx* の保有状況と *eae* の蛍光強度低下の関連が推察された。RapidFinder での STEC スクリーニング検査では、判定結果のみではなく波形も確認し、必要に応じて検体を希釈して検査を実施する必要があると考えられた。

E. 結論

STEC 検査で用いられるクオリボックス Q7 システムにおいて、キットの保存期間が判定時のトラブルに影響することが推察された。また、RapidFinder において、必要に応じて検体を希釈して検査を実施する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

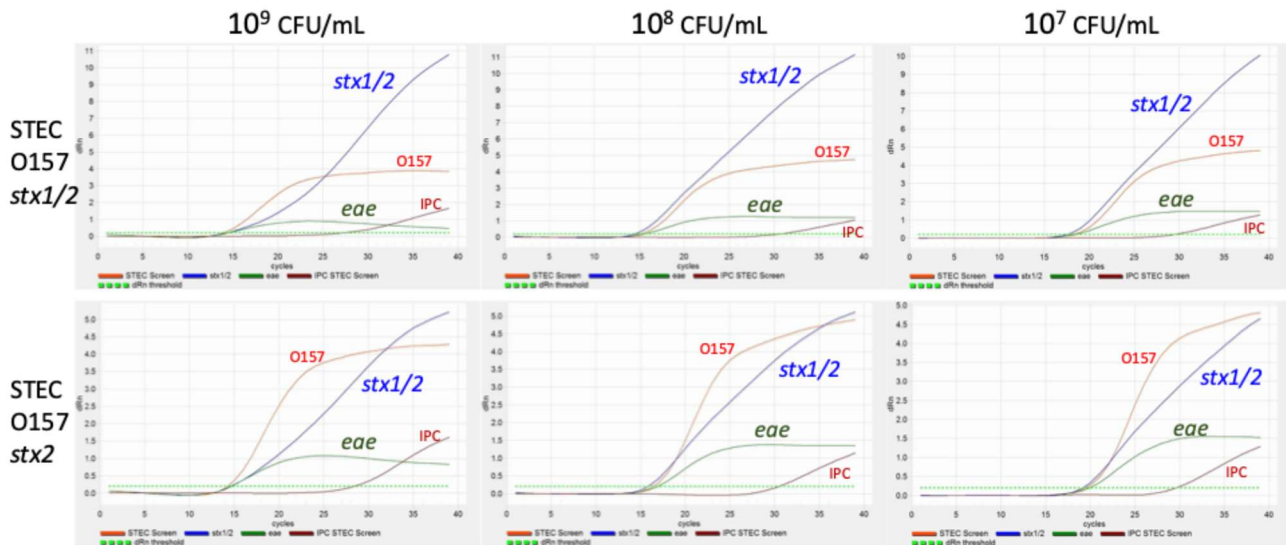


図 1 RapidFinder での TSB 希釈菌液の Amplification Plot

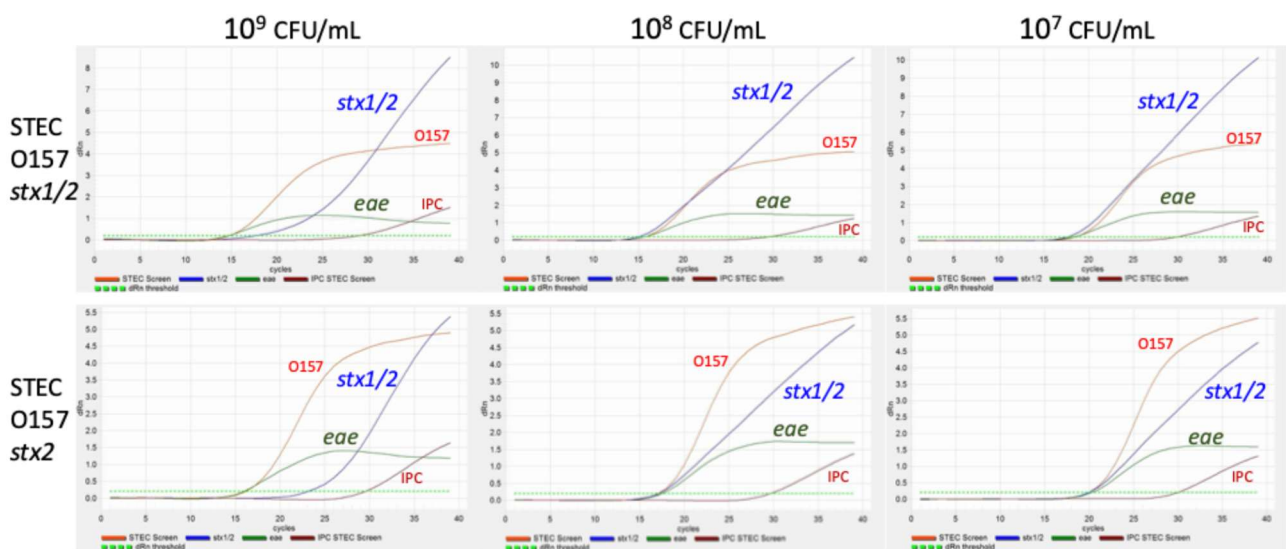


図 2 RapidFinder での牛肉培養液希釈菌液の Amplification Plot

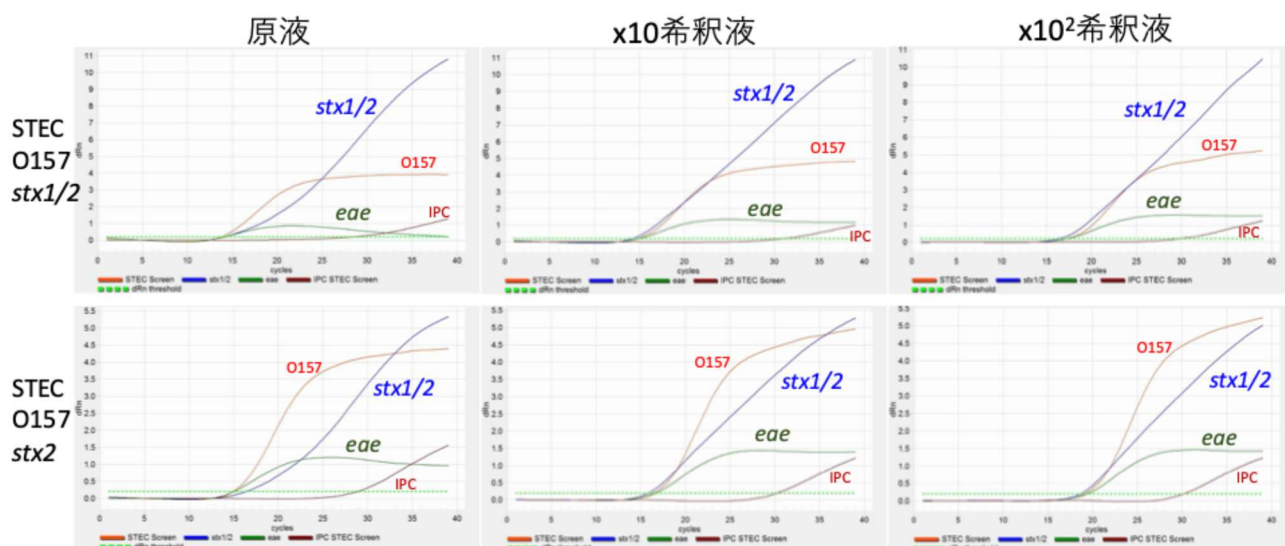


図3 RapidFinder での菌接種牛肉培養液の Amplification Plot

表1. 開封後一定期間経過したBAXキットでのmTSBおよび牛肉培養液の偽陽性および判定不能

キット	偽陽性 (判定well/供試well)		判定不能 (判定well/供試well)	
	mTSB	牛肉培養液	mTSB	牛肉培養液
STEC screening	0/8	0/8	0/8	0/8
<i>E. coli</i> O157:H7	0/8	0/8	0/8	0/8
panel1 (O26, O111, O121)	1/8	1/8	0/8	1/8
panel2 (O45, O103, O145)	0/8	0/8	1/8	1/8

表2. 開封直後のBAXキットでの培地および牛肉培養液の偽陽性および判定不能

キット	偽陽性 (判定well/供試well)		判定不能 (判定well/供試well)	
	mTSB	牛肉培養液	mTSB	牛肉培養液
panel1 (O26, O111, O121)	0/8	0/8	0/8	0/8
panel2 (O45, O103, O145)	0/8	0/8	0/8	0/8

表3. 開封後一定期間経過したBAXキットでの陽性対照DNA溶液の偽陰性および判定不能

キット	偽陰性 (判定well/供試well)	判定不能 (判定well/供試well)
STEC screening	1/40	0/40
<i>E. coli</i> O157:H7	0/6	0/6
panel1 (O26, O111, O121)	0/5	0/5
panel2 (O45, O103, O145)	0/9	0/9

表4. 開封直後のBAXキットでの陽性対照DNA溶液の偽陰性および判定不能

キット	偽陰性 (判定well/供試well)	判定不能 (判定well/供試well)
STEC screening	0/24	0/24

表5. RapidFinderでの菌液の偽陰性判定

供試菌株	TSB希釈			牛肉培養液希釈		
	10 ⁹ *	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷
STEC O157 <i>stx1/2</i>	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
STEC O157 <i>stx2</i>	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

*希釈後菌濃度 (CFU/mL)

表6. RapidFinderでの菌接種牛肉培養液の偽陰性判定

供試菌株	希釈倍率		
	x1 (原液)	x10	x10 ²
STEC O157 <i>stx1/2</i>	0/2	0/2	0/2
STEC O157 <i>stx2</i>	0/2	0/2	0/2

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
穂山浩	食品中の残留農薬等の基準値設定の流れ	レギュラトリーサイエンス研究会	例から学ぶレギュラトリーサイエンス	じほう	東京	2025	153-156

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
穂山浩	食品中の残留農薬等のレギュラトリーサイエンス	フードケミカル	481	28-33	2025
穂山浩	食品中の残留農薬等の基準値設定の流れ	PHARM TECH JAPAN	40	101-103	2024

令和8年5月26日

厚生労働大臣 殿

機関名 星薬科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 牛島 俊和

次の職員の令和7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(23KA1007)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 星薬科大学 薬学部・教授
- (氏名・フリガナ) 亀山 浩 (アキヤマ ヒロシ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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：)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する口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8年3月18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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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8年5月26日

厚生労働大臣 殿

機関名 星薬科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 牛島 俊和

次の職員の令和7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(23KA1007)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 星薬科大学 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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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 8 年 3 月 3 1 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 浅沼 一成

次の職員の令和7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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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8年3月18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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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 第二室長
- (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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。