

# I. 総括研究報告

動物性食品輸出の規制対策のための研究

研究代表者 穂山 浩

**研究要旨**

EU へ動物性食品を輸出する際は、残留物質モニタリング計画に基づき、A 物質（スチルベン類等）及び B 物質（抗菌性物質等）のモニタリング検査を行う必要がある。モニタリング検査において A 物質が検出された場合は、原因等を調査して必要な措置をとるまでの間、EU へ輸出することはできない。一方、B 物質がモニタリング部位（肝臓、腎臓等）から検出された場合は筋肉（可食部位）での検査を行い、基準値を超過した場合に原因等の調査が求められる。したがって、B 物質はモニタリング部位に加えて筋肉を対象とした分析法が必要であるが、一部の物質については筋肉を対象とした分析法が整備されていない。本研究では B 物質のうち、牛及び鶏においてモニタリング部位が肝臓または腎臓の物質について筋肉を対象とした分析法を確立し、妥当性を評価することを目的とした。本年度は、鶏の筋肉を対象として 12 分析法(抗菌性物質 29 化合物)を確立し、これらの分析法の妥当性評価試験を実施した。その結果、真度 77.3~115.7%、併行精度 1.8~9.3%、室内精度 2.4~14.2%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。これらの結果から、12 分析法は鶏の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。本研究で確立した分析法を用いることにより、B 物質のうち抗菌性物質が鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに鶏の筋肉（可食部位）の検査を実施することができ、EU へ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と考えられる。牛肉の STEC 汚染リスク低減のための研究を実施した。牛枝肉の STEC 調査では、2021 年 4 月から 2022 年 2 月に 7 施設の協力のもとに牛枝肉合計 163 検体について 7 血清群（026、045、0103、0111、0121、0145、0157）の STEC を対象とした調査を行った。供試検体を増菌培養後、STEC7 血清群マルチプレックスリアルタイム PCR を行い、分離株の血清凝集試験および生化学的性状試験を行った。また、検体の生菌数の計測を行った。この結果、1 検体(0.6%)から STEC 0157 が分離されたが、1 検体のみであったことからウシの種類や性別などの特徴については考察には至らなかった。STEC 0157 が分離された検体および施設において生菌数が比較的高い値を示したことから、施設の環境状況の要因の可能性が考えられた。また、牛肉の消毒効果の検討では、消毒薬として、酸性の過酢酸製剤、酸性化した亜塩素酸ナトリウムおよび過酸化水素、アルカリ性の次亜塩素酸ナトリウム（次亜塩素酸ソーダ）、中性のエタノール（エチルアルコール）を選択し、牛肉での STEC の消毒効果を検証した。消毒液の使用量を増やすことや濃度を高めることにより菌数減少の傾向が認められた。消毒薬の種類としては、肉表面に変化を起こさない過酢酸が最も優れていると考えられた。

## 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(国立医薬品食品衛生研究所  
食品部主任研究官)

### 研究協力機関

(一財)日本食品分析センター

## 2. 牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

### 研究分担者

工藤由起子(国立医薬品食品衛生研究所  
衛生微生物部)

研究協力者(\*牛枝肉の STEC 調査研究について)

北海道保健福祉部健康安全局食品衛生課\*

島田光平

北海道東藻琴食肉衛生検査所\*

児山綾子

北海道早来食肉衛生検査所\*

石田祥士

青森県十和田食肉衛生検査所\*

高橋むつみ

岐阜県飛騨食肉衛生検査所\*

塚本真由美、苅谷俊宏、山崎翔矢

徳島県食肉衛生検査所\*

片山直人

宮崎県都農食肉衛生検査所\*

黒木麻衣

国立医薬品食品衛生研究所

池内隼佑、千葉由美、都丸亜希子、廣瀬昌平

## A. 研究目的

### 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 へ動物性食品を輸出する際は、欧州理事会指令 96/23/EC および規則(EU)2017/625 に従って

作成した残留物質モニタリング計画に基づき、A 物質(スチルベン類、抗甲状腺薬、ステロイド類、レゾルシン酸ラクトン類、 $\beta$ -作動薬、Council Regulation (EEC) 2377/90 AnnexIV に掲げられた禁止物質(クロラムフェニコール、ニトロフラン類、ニトロイミダゾール等))及び B 物質(抗菌性物質、駆虫剤、抗コクシジウム剤、非ステロイド性抗炎症薬、カルバマゼート系農薬、ピレスロイド系農薬、有機塩素系農薬、PCB、有機リン系農薬、重金属・有害元素、マイコトキシン)のモニタリング検査を行う必要がある。モニタリング検査において A 物質が検出された場合は、原因等を調査して必要な措置をとるまでの間、EU へ輸出することはできない。一方、B 物質がモニタリング部位(肝臓、腎臓等)から検出された場合は筋肉(可食部位)での検査を行い、基準値を超過した場合に原因等の調査が求められる。このため、B 物質についてはモニタリング部位を対象とした分析法に加え、筋肉を対象とした分析法も必要となる。しかしながら、一部の物質については筋肉を対象とした分析法が整備されていない。本研究では、B 物質のうち、牛及び鶏においてモニタリング部位が肝臓又は腎臓となっている物質について、筋肉を対象とした分析法を確立し、モニタリング検査で検出された場合に輸出再開に向けた迅速な対応が取れる体制を整備することを目的とした。令和 3 年度(2 年目)は、B 物質のうち、鶏においてモニタリング対象部位が肝臓又は腎臓の物質(抗菌性物質 29 化合物)について、鶏の筋肉を対象とした分析法を確立し、妥当性評価を実施した。

## 2. 牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

### 1. 牛枝肉の STEC 調査

2021 年 4 月から 2022 年 2 月に国内の食肉検査所 7 ヶ所にて、ウシ 163 頭からサンプリング

を行った。サンプリングに供したウシの情報  
を表 1-1 に示す。また、STEC の検出の流れ  
について定性的な検出方法を図 1-1 に、定  
量的な検出方法を図 1-2 に示す。まず、定  
性的に STEC を検出し、定性検出陽性の場合に  
定量的な検出を開始し、同時に進める手順で  
検出を行った。対象とした 0 血清群は、026、  
045、0103、0111、0121、0145、0157 の 7 血清  
群とした。

#### (1) と畜場での作業

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

#### (2) STEC 検出方法および生菌数測定

##### 1) 検体の調製

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

##### 2) 生菌数の計数

検体液を 10 倍階段希釈にて 10<sup>-2</sup> 希釈液まで  
作製し、検体液原液は 0.2 mL ずつを標準寒天

培地 5 枚に塗抹し、10<sup>-1</sup> および 10<sup>-2</sup> 希釈液につ  
いては 0.1 mL ずつを標準寒天培地にそれぞれ  
2 枚ずつ塗抹し、37℃で 48 時間培養を行い、  
生育コロニーの計数を行った。

##### 3) 定性的な STEC 7 血清群の検出

定性的な検出方法の流れを図 1-1 に示す。

##### 3-1) 検体の増菌液からの DNA 抽出

検体液はサンプリングバッグのまま、  
42±1℃で 15-24 時間培養を行った。この培養  
液から DNA アルカリ熱抽出を行った。この DNA  
抽出液をマルチプレックスリアルタイム PCR の  
テンプレートとして用いた。

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

プライマーセット Assay1 (*stx/eae*) ではペ  
ロ毒素遺伝子 (*stx* 遺伝子) およびインチミン  
タンパク質遺伝子 (*eae* 遺伝子) を、Assay2  
(16S/0157) では 16SrRNA 遺伝子および 0157  
遺伝子を、Assay3 (026/0111) では 026 遺伝子  
および 0111 遺伝子を、Assay4 (045/0121) で  
は 045 遺伝子および 0121 遺伝子を、Assay5  
(0103/0145) では 0103 遺伝子および 0145 遺  
伝子を検出する。プライマーセット、プライ  
マーおよびプローブの組み合わせおよび配列  
を表 1-2 に示す。

Assay1 から Assay5 の反応溶液の組成および量  
を表 1-3-1 から表 1-3-5 に示す。リ  
アルタイム PCR の反応条件は、95℃で 10 分を  
1 サイクル、次いで 95℃で 15 秒、59℃で 1 分  
の組み合わせを 45 サイクルとした。

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

免疫磁気ビーズ法は、免疫磁気ビーズ 026、  
045、0103、0111、0121、0145、0157 「生研」  
(デンカ株式会社) を用いて行った。最終的  
に E バッファー 1 mL に懸濁したものをビーズ

懸濁液とした。

さらに、酸処理ビーズ懸濁液を作製し、ローテーターで1時間反応させた。

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

#### 3-4) 分離株の血清型別

基本的には、血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 の血清型別は、病原大腸菌免疫血清「生研」（デンカ株式会社）を用い、状況によっては市販のラテックス凝集試験薬を用いた。7血清群に凝集したものについては、必要に応じてH-genotyping (Iguchi *et al.*) および抗血清を用いてH血清型を決定した。また、7血清群以外についてはO血清群をO-genotyping (Iguchi *et al.*) および抗血清にて決定した。

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

コロニーを0.1 mLのTE緩衝液（PH8）に懸濁し、DNA抽出をした。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、陰性の場合には陰性と判定し、陽性の場合には3-6)の非選択培地による単離を行った。

#### 3-6) 単離したコロニーの STEC 7 血清群の

マルチプレックスリアルタイムPCRによる判定  
典型的なコロニーから、3-5)と同様にDNAを熱抽出し、Assay1 および目的とするO群について、3-2)と同様にリアルタイムPCRで確認した。

#### 3-7) STEC 7 血清群の生化学的性状試験

ブドウ糖、乳糖および白糖の発酵およびガス産生、硫化水素産生を観察するためにTriple sugar iron agar (TSI寒天培地)を、リジン脱炭酸産生、インドール産生、運動性を観察するためにLysine Indole motility medium (LIM培地)の培養を行った。

#### 4) 定量的な STEC 7 血清群の検出

定量的な検出方法の流れを図1-2に示す。

#### 4-1) STEC 7 血清群のMPN測定

血清凝集試験およびラテックス凝集試験により推定陽性と判断した、培養前の1日目に4 $^{\circ}$ Cで保存しておいた検体懸濁液を用いて、MPN測定（3本法）を行った。mTSBを用いて希釈段3段とし、42 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cで15-24時間培養した。

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

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

3-5)と同様にDNAを熱抽出し、Assay1 および目的とするO群について、3-2)と同様にリアルタイムPCRで確認した。Assay1 陽性かつO群陽性の場合、陽性判定となったO群抗体による免疫磁気ビーズ法を行った。

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

3-3)の免疫磁気ビーズ法（酸処理は行わない）と同様に、濃縮し、CT-SMAC 培地およびCT-クロモアガー-STECC 培地2枚ずつ塗抹し、36 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cで18-24時間培養した。これらの培地

上に増殖した疑わしいコロニーに関して、血清凝集試験およびラテックス凝集試験を行った。

4-4) STEC 7 血清群の血清凝集試験およびラテックス凝集試験

目的とする O 群抗体を用いて、3-4) と同様の手順に従って凝集試験において、凝集が見られたコロニーは、以下のリアルタイム PCR による確認を行った。

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

3-5) と同様に、リアルタイム PCR で確認した。Assay1 陽性かつ O 群陽性の場合、3-6) と同様に非選択培地による単離を行った。4-6) 単離したコロニーの STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定典型的なコロニーから、3-5) と同様に DNA を熱抽出し、Assay1 および目的とする O 群について、3-2) と同様にリアルタイム PCR で確認した。

4-7) 生化学的性状試験

3-7) と同様に、TSI 寒天培地および LIM 培地による性状確認を行った。

5) *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方または片方が陽性であった検体からの大腸菌の分離

上記 1) から 4) の一連の検出方法において、7 血清群の STEC が分離されなかった検体のうち、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方または片方が陽性であった検体について、増菌培養液でのリアルタイム PCR の結果と合致する大腸菌の分離を行った。まず、1) で  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存しておいた溶液を室温で解凍し、この溶液  $500\ \mu\text{L}$  に対して  $4.5\ \text{mL}$  の Tryptone soya broth (TSB) を加え、 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 18 時間増菌培養した。この増菌培養液を PBS で  $10^{-6}$  まで 10 倍階段希釈し、各希釈液それぞれ  $100\ \mu\text{L}$

ずつを 4 種類の培地 (SMAC 培地、CT-SMAC 培地、クロモアガー STEC 培地、クロモアガー STEC、CT-クロモアガー STEC 培地) に 1 枚ずつ塗抹し、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 18-24 時間培養した。これらの培地上に増殖した疑わしいコロニーに関して、3-5) と同様にリアルタイム PCR をおこなった。

この結果、陽性検体に関して 3-6) と同様に単離したコロニーのリアルタイム PCR による *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の保有の判定を行い、3-7) と同様に生化学的性状試験を行って大腸菌であることを確認した。

## 2. 牛肉の消毒効果の検討

### (1) 菌株

消毒液の STEC への直接効果の検証では、026、0103、0111、0157 の 4 血清群の STEC を対象とし、国立医薬品食品衛生研究所保有している菌株 (026:ESC97、0103:ESC548、0111:ESC469、0157:ESC425) を供試した。また、消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証では STEC のうち血清群 0157 (ESC425) のみを供試した。

### (2) 牛肉検体

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

### (3) 接種菌液の調製

半流動性のカジトン培地に室温保存されている各菌株を、それぞれ 10 mL の TSB に植菌し、37°C で 18 時間静置培養した。このうち 8 mL を、4°C、5,000 rpm、15 分間遠心し、滅菌した PBS 8 mL に再懸濁することを 2 回行ったものを接種菌液とした。試験を行うまで、これらの菌液は氷上もしくは 4°C で保管された（最長 3 日間）。

なお、これら接種菌液中の菌数を以下の方法にて確認した。まずは、接種菌液を PBS にて、 $10^{-6}$  まで 10 倍階段希釈を行い、 $10^{-5}$  希釈液（約  $1 \times 10^3$  CFU/mL）および  $10^{-6}$  希釈液（約  $1 \times 10^2$  CFU/mL）0.1 mL ずつを TSA およびクロモアガー STEC に 5 枚に塗抹し、TSA は 37°C で 24 時間、クロモアガー STEC は 37°C で 20 時間、培養し、生育したコロニーを計測した。

#### （4）消毒液の調製

酸性の消毒液として「食品、添加物等の規格基準」（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）に平成 28 年に使用基準が改正された過酢酸製剤および酸性化した亜塩素酸ナトリウム、従前より使用が認められている指定添加物である過酸化水素を、アルカリ性の消毒液として同規格基準に記載され使用が認められている指定添加物である次亜塩素酸ナトリウム（次亜塩素酸ソーダ）を、中性の消毒液として一般飲食物添加物であるエタノール（エチルアルコール）を用いた。なお、使用時の各 pH は表 2-1 に示した。

過酢酸製剤は「ダイヤパワー（低濃度過酢酸）（三菱ガス化学株式会社）」（過酢酸 6%、過酸化水素 8%、酢酸 32%、水 54%）を用いた。滅菌した純水（滅菌水）で希釈して 50、100、1,000 ppm に調製し、供試した。この消毒液によって肉の表面は変色しないが、酢酸臭が残ることが難点である（表 2-1）。

亜塩素酸ナトリウムは「Keeper Pro®（バイオサイド・インターナショナル社）」（高純度亜塩素酸ナトリウム 8.35%）にクエン酸（食品添加物 富士フィルム和光純薬（株））を添加し酸性化した亜塩素酸ナトリウム水として、200、500、1,200 ppm に調製し、供試した。この消毒液によって肉の表面はやや白く変色し、やや塩素臭が残ることが難点である（表 2-1）。

過酸化水素（食品添加物 35.0 - 36.0% 富士フィルム和光純薬（株））は純水で 10 倍に希釈し、供試した（3.5%）。この消毒液によって肉の表面は白く変色し、やや柔らかくなる傾向があることが難点であるが、臭いはない（表 2-1）。

次亜塩素酸ナトリウムは「ピューラックス（株式会社オーヤラックス）」（次亜塩素酸ナトリウム 6%）を用いた。過酢酸製剤と同様に、純水で希釈して 600 ppm に調製し、供試した。この消毒液によって肉の表面はやや白く変色し、塩素臭が残ることが難点である（表 2-1）。

エタノールは「消毒用エタノール『コザカイ・M』」（小堺製薬株式会社）（15°C で 76.9 - 81.4 vol%）用い、販売濃度で供試した。この消毒液によって肉の表面は若干白く変色するが、アルコール臭はすぐに消失する（表 2-1）。

なお、対照用溶液は滅菌水を用いた。

#### （5）消毒液の STEC への直接効果の検証

PBS 懸濁菌液での消毒液の効果を令和 2 年度と同様に検証した。供試した消毒液の種類と濃度を表 2-2 に示した。

各接種菌液を 100  $\mu$ L ずつ 50 mL チューブに分注し、試験を実施するまで氷上もしくは 4°C で保存した。菌液が入ったそのチューブにそ

それぞれの消毒液を 10 mL 添加し、ピペッティングにより混和した(原液)。消毒液添加 30 秒後に 0.1 mL をとり、この原液を TSA に塗抹した。対照用溶液である滅菌水の場合は、0.9 mL の PBS にて  $10^{-4}$  まで 10 倍階段希釈を行い、原液から  $10^{-4}$  希釈液 0.1 mL ずつを TSA に塗抹した。それらを 37°C で 24 時間培養し、コロニーを計測した。

#### (6) 消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証

消毒液の効果の検証方法を図 2-1 および表 2-2 に示す。

##### 1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果

滅菌した 1 本の竹串に 1 検体を刺し、菌液を 10  $\mu$ L ずつ 5 カ所 (合計 50  $\mu$ L) に接種し、15 分間室温保存することによって菌液を検体に浸透させた。この菌汚染検体を 4 個作製し、3 個は刺した竹串を垂直に固定し、検体ごとに各消毒液を 60 回噴霧 (420 mL) し、室温で 5 分間立てた状態で、消毒液の液切りを行った。

各検体から竹串を外してそれぞれストマッカー袋に入れ、それぞれ検体の 10 倍量になるように滅菌済みの PBS を添加し、1 分間ストマッカーを行ったものを乳剤とした。これらの乳剤を、それぞれ 0.9 mL の PBS にて  $10^{-3}$  まで 10 倍階段希釈を行った。原液から  $10^{-3}$  希釈液 0.1 mL ずつを、TSA とクロモアガー STEC に塗抹し、37°C で 24 時間培養し、コロニーを計測した。

##### 2) 消毒液 100 mL かけ流しの効果 (かけ流し 100 mL)

「1) 消毒液 60 回噴霧の効果」と同様に検体を竹串に刺した汚染検体を作製した。消毒液を噴霧する代わりに、検体ごとにそれぞれの消毒液 20 mL をシリンジで 5 回 (合計 100 mL) かけ流しを行った。以下、「1) 消毒液 2 回噴霧の効果」と同様に行った。

##### 3) 消毒液 500 mL かけ流しの効果 (かけ流し 500 mL)

「1) 消毒液 60 回噴霧の効果」と同様に検体を竹串に刺した汚染検体を作製した。「2) 消毒液 100 mL かけ流しの効果」より大きいシリンジを用いて、検体ごとにそれぞれの消毒液 50 mL をシリンジで 10 回 (合計 500 mL) かけ流しを行った。以下、「1) 消毒液 2 回噴霧の効果」と同様に行った。また、下に流れ落ちた消毒液および滅菌水中の STEC 菌数を計測した。まず 0.9 mL の PBS にて  $10^{-3}$  まで 10 倍階段希釈を行った。原液から  $10^{-3}$  希釈液 0.1 mL ずつを、TSA とクロモアガー STEC に塗抹し、37°C で 24 時間培養し、コロニーを計測した。

## B. 研究結果

### 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

鶏の筋肉を対象として、以下の 12 分析法を確立し、B 物質 29 化合物について妥当性評価試験を実施した。

- ①タイロシン及びチルミコシン分析法
- ②チルバロシン分析法
- ③リンコマイシン分析法
- ④ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシン分析法
- ⑤カナマイシン分析法
- ⑥スルファメトキサゾール、スルファモノメトキシ、スルファキノキサリン、トリメプリーム及びチアンフェニコール分析法
- ⑦エンロフロキサシン(シプロフロキサシンとの和)及びノルフロキサシン分析法
- ⑧クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン及びドキシサイクリン分析法
- ⑨フロルフェニコール分析法

⑩アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリン分析法

⑪ノシヘプタイド分析法

⑫エンラマイシン分析法

その結果、真度 77.3~115.7%、併行精度 1.8~9.3%、室内精度 2.4~14.2%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。これらの結果から、確立した分析法は鶏の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。

## 2.牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

### 1. 牛枝肉の STEC 調査

#### (1) 生菌数

調査した検体 163 頭のうち、生菌数が検出された 150 頭の生菌数の平均は  $62.8 \pm 437.2$  (平均  $\pm$  SD) CFU/cm<sup>2</sup> であった。

雌雄で比較すると、オスは 110 頭のうち生菌数が検出されない 9 頭を除いた 101 頭では  $82.0 \pm 534.0$  CFU/cm<sup>2</sup> であるのに対して、メスは 53 頭のうち生菌数が検出されない 4 頭を除いた 49 頭では  $23.1 \pm 30.7$  CFU/cm<sup>2</sup> であった。

ウシの種類別で比較すると、ホルスタインの平均値が 3 桁であり他の種類と比べて高い値となり、 $130.3 \pm 684.4$  CFU/cm<sup>2</sup> であった。これらには、生菌数 1,000 CFU/cm<sup>2</sup> を超えるウシが 2 頭含まれている。

採材期間を通して、平均生菌数が最も多かった施設は E 施設であった。平均生菌数は  $218.1 \pm 860.4$  CFU/cm<sup>2</sup> であり、100 CFU/cm<sup>2</sup> を超えるウシは 5 頭であった。

7 月が最も高く  $452.4 \pm 1,311.1$ 、次いで 8 月が  $39.6 \pm 72.3$  であり、気温が高い夏に高い傾向が見られた。1,000 CFU/cm<sup>2</sup> を超えるウシは 7 月に 2 頭、100 CFU/cm<sup>2</sup> を超えるウシは 7 月に 1 頭、8 月に 2 頭であった。

#### (2) STEC7 血清群の分離

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 を行った。供試検体 163 検体のうち、39 検体が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の少なくとも片方が陽性であり、両遺伝子のいずれもが陽性となった検体はそのうち 11 検体であった。

STEC 7 血清群保有かつ *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陽性で分離が可能であった検体は D68 のみであり、その血清型は 0157:H7 であった。

*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陽性であった検体は合計で 11 検体であり、これらの検体において、分離陽性検体は STEC 0157 が分離された 1 検体のみであった。リアルタイム PCR で血清群 0157 が陽性となった検体は D41 および D68 の計 2 検体であり、分離陽性検体となったのは最終的に D68 の 1 検体のみであった。血清群 026、045 および 0103 はリアルタイム PCR 陽性であったが菌株の分離には至らなかった。

STEC 0157 が分離されたのは、2021 年 8 月に採材された E 施設からの交雑種であった。

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

*stx* 遺伝子のみが陽性であった検体は 13 検体、*eae* 遺伝子のみが陽性であった検体は 15 検体であった。陽性となった遺伝子の Ct 値は、*stx* 遺伝子については最低値 16.3、最高値 36.2 であり、*eae* 遺伝子については最低値 21.2、最高値 43.1 であった。

リアルタイム PCR でいずれかの遺伝子が陽性となった培養液から分離した菌株の O 血清群と保有遺伝子を解析した。分離株の O 血清群は OUT を含む多様なものであり、施設あるいはウシの種類との関連性などの特徴はなかった。

検体の生菌数は、非検出から 5,111 CFU/cm<sup>2</sup>までと幅が大きく、0 血清群ごとに特徴的な違いはみられなかった。

#### (4) STEC7 血清群の定量

定性試験で *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子陽性の 0157 が分離された検体 D68 については、定量的な試験を行った。MPN 法 (3 本法) での定量で 1 段目において、3 本のうち 2 本が *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子および 0157 遺伝子のすべてがリアルタイム PCR 陽性となった。1 段目の残り 1 本、2 段目および 3 段目については *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子および 0157 遺伝子のすべて非検出であった。STEC 0157 の定量値は、試験液 100mL あたり 11 MPN あるいはガーゼ表面積 100 cm<sup>2</sup> あたり 1.02 MPN であった。

## 2. 牛肉の消毒効果の検討

### (1) 消毒液の STEC への直接効果の検証

PBS 中の STEC への各消毒液の効果 (30 秒後) を検討した。

過酸化水素 (3.5%) を除いた全ての消毒液では、全血清群は検出されなかった。過酸化水素では、血清群 026、0103、0111、0157 は、それぞれ 5.9±0.0、5.8±0.1、5.7±0.1、5.8±0.0 log CFU/mL であった。

滅菌水では、血清群 026、0103、0111、0157 は、それぞれ 6.0±0.0、6.0±0.0、5.8±0.0、5.9±0.1 log CFU/mL であった。

### (2) 消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証

#### 1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果

筋膜ありの牛肉では、過酢酸 1,000 ppm、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm、エタノール、亜塩素酸ナトリウム 500 ppm と 1,200 ppm、過酸化水素の効果を検証した。この結果、最も効果があった亜塩素酸ナトリウム 1,200 ppm では 5.9±0.6 log CFU/片であり、次に効果があっ

たものは過酢酸 1,000 ppm の 6.0±0.4 log CFU/片であった。

筋膜なしの牛肉では、亜塩素酸ナトリウム 500 ppm と 1,200 ppm、過酸化水素の効果を検証した。この結果、最も効果があった亜塩素酸ナトリウム 1,200 ppm では 7.0±0.1 log CFU/片であった。

2) 消毒液 100 mL かけ流しの効果 (かけ流し 100 mL)

筋膜ありの牛肉では、「1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果」(筋膜あり) と同様の消毒液で検証した。この結果、最も効果があった消毒液は「1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果」の「筋膜あり」とは異なり過酢酸 1,000 ppm で 5.7±0.3 log CFU/片であり、次に効果があったものは亜塩素酸ナトリウム 500 ppm と 1,200 ppm の 5.9±0.3 log CFU/片と 5.9±0.4 log CFU/片であった。

筋膜なしの牛肉では、「1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果」(筋膜なし) と同様の消毒液で検証した。この結果、最も効果があった消毒液は「1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果」の「筋膜なし」と同様に最も効果があった亜塩素酸ナトリウム 1,200 ppm で 6.8±0.1 log CFU/片であった。

3) 消毒液 500 mL かけ流しの効果 (かけ流し 500 mL)

「1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果」(筋膜あり) と同様の消毒液、および、過酢酸 50、100、200、500 ppm、亜塩素酸ナトリウム 200 ppm を追加して検証した。この結果、最も効果があった消毒液は「2) 消毒液 100 mL かけ流しの効果」と同様に過酢酸 1,000 ppm で 4.8±0.9 log CFU/片であった。

## D. 考察

## 1.動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

確立した分析法は鶏の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。

## 2.牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

### 1. 牛枝肉の STEC 調査

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

本調査では牛枝肉からガーゼを用いた 163 検体中、1 検体 (0.6%) から STEC7 血清群のひとつである STEC 0157 が分離された。この 1 検体を含む 5 検体 (3.1%) は、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方ならびに STEC7 血清群のいずれかがリアルタイム PCR で陽性であった。と畜場におけるウシの糞便からも高率に STEC が分離されていることと比較して、汚染率は低いことが明らかとなった。これらの陽性検体であったウシとそうでないウシでの特徴の違いを見いだすことはできなかったが、これら検体の元のウシの腸管内容物における STEC の有無を調査すれば有益と考えられる。

牛枝肉の STEC7 血清群の汚染は施設の衛生状態も関連していることも示唆された。施設ごとの生菌数についても、E 施設以外の平均生菌数は  $10^{1-2}$  CFU/cm<sup>2</sup> 程度であるのに対して、E 施設では平均生菌数が  $10^3$  CFU/cm<sup>2</sup> と 1 桁多くなっている。さらには、STEC 0157 が分離された施設は E 施設であり、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方ならびに STEC 7 血清群のいずれかがリアルタイム PCR で陽性となった 5 検体のうち 4 検体が E 施設であった。したがって、施設内の作業の変化によっては、牛枝肉への STEC7 血清群の汚染頻度が上昇することも考えられ、食肉処理過程や牛肉の保管には十分な注意が必要である。

分離された菌株は STEC 7 血清群ではない菌株が大部分を占めていた。*eae* 遺伝子を保有している菌株が複数の施設から分離されていることから、これらの菌株の病原性についてさらなる検討を行う必要もある。また、指標菌とし食肉の衛生管理に役立つことも考えられた。

本調査では、比較的牛枝肉の汚染が低率であったが、枝肉にガーゼを密着させたのちに剥がして検体としていることから、ガーゼに移行した菌のみが検体に含まれており、枝肉表面にあった他の菌が検体に含まれていない可能性がある。牛肉の表面から数センチを切り取り牛肉自体の培養を行うことにより、より深部に浸潤した菌体について分離が可能となると考えられる。

分離された季節に関しては、ウシの STEC 0157 : H7 の保有率はヒトと同様に温帯気候では春の終わりから秋の初めに比較的高いといわれている。今後は、季節的な要因についてもさらなる検討を行う必要がある。

### 2. 牛肉の消毒効果の検討

消毒液の STEC への直接効果の検証を行った結果、供試した消毒液の種類と濃度では菌が検出されなかったことから、これらの条件は牛肉での消毒効果が期待されると考えられた。

消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証では、牛肉検体として筋膜あり検体と筋膜なし検体を供試したが、最終的な用途が筋膜のある枝肉であることから、特に、筋膜あり検体の結果に注目し、以下のように考察する。なお、全体的に筋膜なしの検体では筋膜ありの検体と比べて消毒効果が弱い傾向であった。

滅菌水を用いて検証方法の比較をすると、噴霧およびかけ流し (100 mL) では、接種菌数

から約1桁弱減少したが、かけ流し(500 mL)では、それらよりも若干減少し、3つの検証方法の中ではかけ流し(500 mL)が効果的と考えられた。

次に、消毒薬を用いて検証した。

消毒液60回噴霧(420 mL)では、亜塩素酸ナトリウム1,200 ppmおよび過酢酸1,000 ppmでは滅菌水と1桁弱の減少があったが、その他の消毒液では滅菌水との差は認められなかった。

消毒液かけ流し100 mLは、消毒液60回噴霧(420 mL)よりも確実に検体に消毒液が接触し、また洗い流し効果が高い条件であると考えて行った。その結果、供試した消毒液の多くで滅菌水と比べて菌数が約1桁減少することが認められた。また、消毒液60回噴霧(420 mL)と比較すると、かけ流し100 mLの方が液量が約1/4量であるにもかかわらず、噴霧より効果がある傾向であった。

このため、さらなる洗い流し効果を狙って、500 mLにかけ流し量を増加して試みた。その結果、滅菌水を500 mLかけ流すだけでも接種菌数が約1桁減少し、さらに消毒液では2桁弱減少した。3つの検証方法の中ではかけ流し(500 mL)が最も効果的と考えられた。

消毒薬の効果を比較すると、いずれの検証方法においても、過酢酸(1,000 ppm)が最も大きな菌数減少を示した。次に、亜塩素酸ナトリウム(500 ppmおよび1,200 ppm)が大きな減少を示した。しかし、次亜塩素酸ナトリウム(600 ppm)、エタノールおよび過酸化水素では、減少はしたものの上記の消毒薬よりも効果が弱かった。

また、いずれの検証方法においても、亜塩素酸ナトリウムは低濃度設定の500 ppmでも肉表面が変色し、塩素臭が若干あった。また、過酢酸(1,000 ppm)は、肉表面の変色が認め

られなかったものの、酢酸臭が確認された。肉表面の変色がないことから、過酢酸の方が用途に適すると考えられた。このため、できるだけ低い濃度で消毒効果を検証するために、100 ppmと50 ppmにて試験した。しかし、菌数減少は1,000 ppmと比較して約1桁以上小さかった。今後、過酢酸1,000 ppmと100 ppmの間の濃度で、消毒効果が高く、臭いが洗い流せる濃度を検討したい。

## E. 結論

鶏の筋肉を対象としてB物質の抗菌性物質分析法(12分析法、29化合物)を確立し、妥当性評価試験を実施した。その結果、いずれの分析法も良好な結果(真度、併行精度、室内精度及び選択性)が得られ、鶏の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。本研究で確立した分析法を用いることにより、B物質のうち抗菌性物質が鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに鶏の筋肉(可食部位)の検査を実施することができ、EUへ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と考えられる。

1. 牛枝肉のSTEC調査では、2021年4月から2022年2月に7施設の協力のもとに牛枝肉合計163検体を供試した。検体を増菌培養後、STEC7血清群マルチプレックスリアルタイムPCRを行い、分離株の血清凝集試験および生化学的性状試験を行った。また、検体の生菌数の計測を行った。この結果、1検体(0.6%)からSTEC 0157:H7が分離されたが、1検体のみであったことからウシの種類や性別などの特徴については考察には至らなかった。STEC 0157:H7が分離された検体および施設において生菌数が比較的高い値を示したことから、

施設の環境状況の要因の可能性が考えられた。培養液から分離された STEC7 血清群に該当しない *stx* 遺伝子または *eae* 遺伝子を保有する菌株も分離されたことから指標菌とし食肉の衛生管理に役立つことも考えられた。

2. 牛肉の消毒効果の検討では、消毒薬として、酸性の過酢酸製剤、酸性化した亜塩素酸ナトリウムおよび過酸化水素、アルカリ性の次亜塩素酸ナトリウム（次亜塩素酸ソーダ）、中性のエタノール（エチルアルコール）を選択し、牛肉での STEC の消毒効果を検証した。結果として、消毒液の使用量を増やすことや濃度を高めることにより菌数減少の傾向が認められた。消毒薬の種類としては、肉表面に変化を起こさない過酢酸が最も優れていると考えられた。今後、使用後の酢酸臭を流水で除去できる過酢酸濃度を検討したい。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

**Akiyama H, Takagi A, Inoue K, Suzuki Y, Ito R, Wakui N, Asai M, Sugiura J.** Evaluation of a risk communication program for pesticide residues, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 62, 187-192 (2021).

### 2. 学会発表

Shizuka Saito-Shida, Seiichiro Iizuka, Ayumu Nakamura, Satoshi Isagawa, Satoru Nemoto, Hiroshi Akiyama. Development and validation of an analytical method for determining total florfenicol residues as florfenicol amine in bovine muscle using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2021 AOAC INTERNATIONAL、令和3年8月27日

## F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## G. 健康危険情報

なし

## H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

## Ⅱ. 分担研究報告

動物性食品輸出の規制対策のための研究

研究分担者 志田(齊藤) 静夏

動物性食品輸出の規制対策のための研究

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

研究分担者 志田(齊藤)静夏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 主任研究官

**研究要旨**

EU へ動物性食品を輸出する際は、残留物質モニタリング計画に基づき、A 物質（スチルベン類等）及び B 物質（抗菌性物質等）のモニタリング検査を行う必要がある。モニタリング検査において A 物質が検出された場合は、原因等を調査して必要な措置をとるまでの間、EU へ輸出することはできない。一方、B 物質がモニタリング部位（肝臓、腎臓等）から検出された場合は筋肉（可食部位）での検査を行い、基準値を超過した場合に原因等の調査が求められる。したがって、B 物質はモニタリング部位に加えて筋肉を対象とした分析法が必要であるが、一部の物質については筋肉を対象とした分析法が整備されていない。本研究では B 物質のうち、牛及び鶏においてモニタリング部位が肝臓または腎臓の物質について筋肉を対象とした分析法を確立し、妥当性を評価することを目的とした。本年度は、鶏の筋肉を対象として 12 分析法(抗菌性物質 29 化合物)を確立し、これらの分析法の妥当性評価試験を実施した。その結果、真度 77.3～115.7%、併行精度 1.8～9.3%、室内精度 2.4～14.2%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。これらの結果から、12 分析法は鶏の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。本研究で確立した分析法を用いることにより、B 物質のうち抗菌性物質が鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに鶏の筋肉（可食部位）の検査を実施することができ、EU へ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と考えられる。

**研究協力機関**

(一財) 日本食品分析センター

**A. 研究目的**

EU へ動物性食品を輸出する際は、欧州理事会指令 96/23/EC および規則 (EU) 2017/625 に従って作成した残留物質モニタリング計画に基づき、A 物質(スチルベン類、抗甲状腺薬、ステロイド類、レゾルシン酸ラクトン類、 $\beta$ -作動薬、Council Regulation (EEC) 2377/90 AnnexIV に掲げられた禁止物質(クロラムフェニコール、ニトロフラン類、ニトロイミダゾール等))及び B 物質(抗菌性物質、駆虫剤、抗

コクシジウム剤、非ステロイド性抗炎症薬、カルバマゼート系農薬、ピレスロイド系農薬、有機塩素系農薬、PCB、有機リン系農薬、重金属・有害元素、マイコトキシン)のモニタリング検査を行う必要がある。モニタリング検査において A 物質が検出された場合は、原因等を調査して必要な措置をとるまでの間、EU へ輸出することはできない。一方、B 物質がモニタリング部位(肝臓、腎臓等)から検出された場合は筋肉(可食部位)での検査を行い、基準値を超過した場合に原因等の調査が求められる。このため、B 物質についてはモニタリング部位を対象とした分析法に加え、筋肉を対象とした分析法も必要となる。

しかしながら、一部の物質については筋肉を対象とした分析法が整備されていない。本研究では、B物質のうち、牛及び鶏においてモニタリング部位が肝臓又は腎臓となっている物質について、筋肉を対象とした分析法を確立し、モニタリング検査で検出された場合に輸出再開に向けた迅速な対応が取れる体制を整備することを目的とした。令和3年度(2年目)は、B物質のうち、鶏においてモニタリング対象部位が肝臓又は腎臓の物質(抗菌性物質29化合物)について、鶏の筋肉を対象とした分析法を確立し、妥当性評価を実施した。

## B. 研究方法

試料：鶏の筋肉は、インターネット経由で青森県産を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボクープブrikサーを用いて細切均一化した。

### 1. タイロシン及びチルミコシン試験法

#### ① 試薬・試液

タイロシン標準品：純度97.2%(富士フィルム和光純薬製)

チルミコシン標準品：純度98.1%(富士フィルム和光純薬製)

ヘキササン：残留農薬試験用(関東化学製)

アセトニトリル、メタノール：HPLC用(関東化学製)

リン酸水素二ナトリウム十二水和物、リン酸水素二カリウム、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物、ギ酸：特級(関東化学製)

クエン酸一水和物：特級(富士フィルム和光純薬製)

リン酸二水素カリウム、リン酸：特級(小

宗化学薬品製)

pH試験紙：pH-indicator strips (pH0-14、Merck製)

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

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

クエン酸緩衝液 (pH 4.0)：クエン酸一水和物 1.3 g、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.8 g 及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 3.7 g を量り、水約 750 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 4.0 に調整し、水を加えて正確に 1000 mL とした。

リン酸塩緩衝液 (pH 8.0)：リン酸二水素カリウム 0.5 g 及びリン酸水素二カリウム 16.7 g を量り、水約 750 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 8.0 に調整し、水を加えて正確に 1000 mL とした。

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

水及びメタノールの混液 (3:1)：水 150 mL 及びメタノール 50 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：タイロシン標準品約 25 mg を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。チルミコシン標準品約 25 mg を精秤し、メタノールで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：タイロシン及びチルミコシン標準原液をメタノールで希釈して 0.7 mg/L 混合溶液を調製した。

#### ② 装置

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

遠心分離機： H-107DF 及び H-80R $\alpha$  (コクサン製)

振とう機： EL (スギヤマゲン製)

pH 計： D-13 (堀場製作所製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-1)

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

### ③ 定量

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

### ④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (0.7 mg/L) 0.5 mL [メタノール溶液] を添加した。

### ⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-1)

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

#### a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 及びメタノール

の混液 (1 : 1) 95 mL を加えた、ホモジナイザーで攪拌した。ヘキサン 100 mL を加え、5 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、下層 10 mL (試料 0.5 g 相当) を遠心管に分取した。リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 30 mL を加えた後、pH 試験紙で pH 8 を確認し、3000 r/min で 5 分間遠心分離した。

#### b. 精製

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

### ⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値濃度 (70  $\mu$ g/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

## 2. チルバロシン試験法

### ① 試薬・試液

チルバロシン標準液： 100  $\mu$ g/mL、純度 91.6% (Analytical standard solutions 製)

3-*O*-アセチルタイロシン標準品： 純度 96.0% (Toronto Research Chemicals 製)

アセトン： 残留農薬試験用 (関東化学製)

アセトニトリル、メタノール： HPLC 用 (関東化学製)

ギ酸： 特級（関東化学製）

りん酸： 特級（小宗化学製）

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

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

水及びメタノールの混液（3：2）： 水 600 mL 及びメタノール 400 mL を混合した。

水及びりん酸の混液（9：1）： 水 90 mL 及びりん酸 10 mL を混合した。

標準原液： チルバロシン標準液 1 mL を精密に量り、メタノールで希釈して 10 mg/L 溶液を調製した。3-*O*-アセチルタイロシン標準品約 1 mg を精秤し、メタノールで溶解して 10 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液： チルバロシン標準原液及び 3-*O*-アセチルタイロシン標準原液をメタノールで希釈して 0.1 mg/L 混合溶液を調製した。

## ② 装置

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

ロータリーエバポレーター： N-1300（東京理化工学製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-2）

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

## ③ 定量

チルバロシン標準原液及び 3-*O*-アセチルタイロシン標準原液をメタノールで希釈して 0.0001、0.0002、0.0005、0.001 及び 0.002 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりチルバロシン及び 3-*O*-アセチルタイロシンの含量を算出した。

## ④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液（0.1 mg/L）1 mL [メタノール溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

## ⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-2）

チルバロシン及び 3-*O*-アセチルタイロシンを試料からりん酸酸性下アセトンで抽出した。その後、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

### a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、水及びりん酸の混液（9：1）10 mL 及びアセトン 100 mL を加え、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した後、吸引ろ過した。ろ過器上の残留物を広口ポリ瓶に戻し、アセトン 50 mL を加えてホモジナイザーで 1 分間攪拌した後、吸引ろ過した。得られたろ液を 200 mL 容全量フラスコに合わせ、アセトンで定容した。

### b. 精製

抽出液 4 mL（試料 0.2 g 相当）を遠沈管に分

取し、水 15 mL を加え、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (200 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 10 mL、水及びメタノールの混液 (3 : 2) 10 mL で洗浄したもの) に負荷した。遠心管内を水及びメタノールの混液 (3 : 2) 5 mL で洗い、洗液をカラムに負荷、洗浄する操作を 2 回繰り返した。メタノール 9 mL で溶出し、10 mL 容量全量フラスコに受けた。メタノールで定容したものを試験溶液とした。

#### ⑥ 妥当性評価試験

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

### 3. リンコマイシン試験法

#### ① 試薬・試液

リンコマイシン塩酸塩一水和物標準品： 純度 99.6% (Dr.Ehrenstorfer 製)

リンコマイシン-*d*<sub>3</sub> 標準品： 純度 95% (Tronto Research Chemicals 製)

メタノール： 残留農薬試験用 (関東化学製)

アセトニトリル： HPLC 用 (関東化学製)

ギ酸、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム十二水和物： 特級 (関東化学製)

硫酸アンモニウム： 特級 (小宗化学製)

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム： InertSep PLS-2 (500 mg/6mL、ジーエルサイエンス製)

メンブランフィルター： PTFE シリンジフィ

ルター (0.22 µm、中部科学機器製)

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

水、アセトニトリル及びギ酸の混液 (900 : 100 : 0.9)： 水及びギ酸の混液 (1000 : 1) 900 mL 並びにアセトニトリル 100 mL を混合した。

水及びメタノールの混液 (3 : 1)： 水 75 mL 及びメタノール 25 mL を混合した。

リン酸緩衝液 (pH 7.0)： リン酸二水素カリウム 6.4 g 及びリン酸水素二ナトリウム十二水和物 18.9 g を水 750 mL に溶解し、1000 mL に定容した。

標準原液： リンコマイシン塩酸塩一水和物標準品約 28.35 mg (リンコマイシン 25 mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

内標準原液： リンコマイシン-*d*<sub>3</sub> 標準品約 5 mg をメタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

#### ② 装置

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

ロータリーエバポレーター： N-1300 (東京理化工機製)

遠心分離機： H-107DF 及び H-80R α (コクサン製)

振とう機： EL (スギヤマゲン製)

pH 計： D-13 (堀場製作所製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-3)

装置	型式	メーカー
----	----	------

MS	QTRAP 5500	SCIEX
LC	ExionLC AD	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

### ③ 定量

リンコマイシン標準原液及びリンコマイシン- $d_3$  内標準原液を水、アセトニトリル及びギ酸の混液 (900 : 100 : 0.9) で希釈し、0.00025、0.0005、0.001、0.005 及び 0.01 mg/L (内標準溶液濃度 0.005 mg/L) 内標準混合標準溶液を調製した。この溶液 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入して、得られたリンコマイシン- $d_3$  のピーク面積に対するリンコマイシンのピーク面積の比を用いて検量線を作成した。試験溶液 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、検量線から内部標準法によりリンコマイシンの含量を算出した。

### ④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (1 mg/L) 0.5 mL [メタノール溶液] を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

### ⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-3)

リンコマイシンを試料からメタノールで抽出し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

#### a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、5 mg/L 添加用内標準溶液 100  $\mu$ L 及びメタノール 50 mL を加え、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清み液 5 mL (試料 0.5 g 相当) をなす形フラ

スコに分取し、ロータリーエバポレーター (40  $^{\circ}$ C) で濃縮乾固した。

#### b. 精製

残留物にリン酸緩衝液 (pH7.0) 及び硫酸アンモニウム 10 g を加え、5 分間振とう後、綿栓ろ過し、ろ液をスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2 (500 mg/6mL)] [あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL 及びリン酸緩衝液 (pH7.0) 5 mL で洗浄したもの] に負荷した。水 10 mL、水及びメタノールの混液 (3:1) 10 mL で洗浄後、メタノール 10 mL で溶出し、溶出液を遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40  $^{\circ}$ C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水、アセトニトリル及びギ酸の混液 (900 : 100 : 0.9) 10 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

### ⑥ 妥当性評価試験

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

## 4. ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシン試験法

### ① 試薬・試液

ストレプトマイシン硫酸塩標準品 : 754  $\mu$ g (力価) /mg (USP)

ジヒドロストレプトマイシン硫酸塩標準品 : 753  $\mu$ g (力価) /mg (USP)

アセトニトリル : LC-MS 用 (関東化学製)

1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム： イオンペ  
アクロマトグラフ用（富士フィルム和光純薬  
製）

ヘプタフルオロ酪酸（約 0.5 mol/L 水溶液）：

LC-MS 用（東京化成工業製）

メタノール、リン酸、クロロホルム、トリク  
ロ酢酸、水酸化ナトリウム、塩化ナトリウ  
ム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナ  
トリウム十二水和物： 特級（富士フィルム  
和光純薬製）

メタケイ酸アルミン酸マグネシウム： ノイ  
シリン NS<sub>2</sub>N（富士化学工業製）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラ  
ム： Sep-Pak C18 Classic（360 mg、Waters 製）

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

リン酸塩緩衝液（pH 6.0）： リン酸二水素カ  
リウム 7.0 g 及びリン酸水素二ナトリウム十二  
水和物 6.0 g を量り、水 750 mL を加えて溶かし  
た後、リン酸で pH を 6.0 に調整し、水を加え  
て正確に 1000 mL とした。これを 121°C で 15 分  
間、高圧蒸気滅菌器で滅菌し、滅菌水で 2 倍希  
釈した。

トリクロロ酢酸溶液： トリクロロ酢酸 20 g を  
量り、水 1000 mL を加えて溶かした。

6 mol/L 水酸化ナトリウム溶液： 水酸化ナト  
リウム 120 g を量り、水 375 mL を加えて溶か  
した後、水を加えて正確に 500 mL とした。

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液： 水酸化ナト  
リウム 20 g を量り、水 375 mL を加えて溶かし

た後、水を加えて正確に 500 mL とした。

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液： 水酸化ナ  
トリウム 2 g を量り、水 375 mL を加えて溶か  
した後、水を加えて正確に 500 mL とした。

1/15 リン酸溶液： リン酸 20 mL 及び水 280 mL  
を混合した。

3%塩化ナトリウム溶液： 塩化ナトリウム 15  
g を量り、水 485 mL を加えて溶かした。

1 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム溶液：  
1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム 37.64 g を量  
り、水 150 mL を加えて溶かした後、水を加え  
て正確に 200 mL とした。

0.05 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有  
リン酸緩衝液（pH 2.0）： リン酸水素二ナト  
リウム 3.55 g 及び 1-ヘキサンスルホン酸ナト  
リウム 9.41 g を量り、水 750 mL を加えて溶かし  
た後、リン酸で pH を 2.0 に調整し、水を加え  
て正確に 1000 mL とした。

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

水及びヘプタフルオロ酪酸（約 0.5 mol/L 水溶  
液）の混液（1000：10）： 水 1000 mL 及びヘ  
プタフルオロ酪酸（約 0.5 mol/L 水溶液）10 mL  
を混合した。

アセトニトリル及びヘプタフルオロ酪酸（約  
0.5 mol/L 水溶液）の混液（1000：10）： アセ  
トニトリル 1000 mL 及びヘプタフルオロ酪酸  
（約 0.5 mol/L 水溶液）10 mL を混合した。

標準原液： ストレプトマイシン硫酸塩標準  
品を減圧下（0.67 kPa 以下）、60°C で 3 時間乾燥

した後、約 66 mg (ストレプトマイシン 50 mg (力価) 相当) を精秤し、リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) で溶解して 1000 mg (力価) /L 溶液を調製した。ジヒドロストレプトマイシン硫酸塩標準品を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60°C で 3 時間乾燥した後、約 132 mg (ジヒドロストレプトマイシン 100 mg (力価) 相当) を精秤し、リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) で溶解して 1000 mg (力価) /L 溶液を調製した。

添加用標準溶液： ストレプトマイシン標準原液及びジヒドロストレプトマイシン標準原液を水で希釈して 4 mg/L 混合溶液を調製した。

## ② 装置

ホモジナイザー： BM-2 (日本精機製作所製)

ロータリーエバポレーター：N-1000V (東京理化器械製)

遠心分離機： H-60R (コクサン製)

振とう機： EL (スギヤマゲン製)

pH 計： F-72 (堀場アドバンスドテクノ)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-4)

装置	型式	メーカー
MS	4000 Q TRAP	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

## ③ 定量

ストレプトマイシン標準原液及びジヒドロストレプトマイシン標準原液を水及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000 : 10) で希釈して 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 及び 0.4 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入して、得ら

れたピーク面積を用いて検量線を作成した。

試験溶液 2 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンの含量を算出した。

## ④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用混合標準溶液 (4 mg/L) 0.125 mL [水] を添加した。

## ⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-4)

ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンを試料からトリクロロ酢酸溶液で抽出し、クロロホルムで洗浄後、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

### a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、トリクロロ酢酸溶液 45 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。クロロホルム 100 mL を加え、振とう機で 5 分間振とうした。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、水層 20 mL (試料 2 g 相当) を遠心管に分取し、0.1、1 及び 6 mol/L 水酸化ナトリウム溶液及び 1/15 リン酸溶液で pH 7.0 に調整した。

### b. 精製

抽出液をメタケイ酸アルミン酸マグネシウムカラム (あらかじめ 1 cm のクロマトグラム管にノイシリン NS<sub>2</sub>N を水に懸濁させて、その 3 mL を充填したもの) に負荷した。遠心管内を水 20 mL で洗い、洗液でクロマトグラム管を

洗浄した。3%塩化ナトリウム溶液 20 mL で溶出し、遠心管に受けた。溶出液に 1 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム溶液 1 mL 及び 0.05 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有リン酸緩衝液 (pH 2.0) 10 mL を加え、よく混合し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak C18 Classic (360 mg)] (あらかじめメタノール 10 mL、水 10 mL、0.05 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有リン酸緩衝液 (pH 2.0) 5 mL で洗浄したもの) に負荷した。カラムを水で洗浄し、洗浄液の pH が 4~4.5 付近になったところで水及びメタノールの混液 (1 : 1) 10 mL で溶出し、なす形フラスコに受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000 : 10) 10 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

#### ⑥ 妥当性評価試験

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

### 5. カナマイシン試験法

#### ① 試薬・試液

カナマイシン硫酸塩標準品 : 790 µg/mg (USP)

アセトニトリル : LC-MS 用 (関東化学製)

ヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) : LC-MS 用 (東京化成工業製)

メタノール、リン酸、ヘキサン、リン酸水素二ナトリウム十二水和物、リン酸二水素カリウム、トリクロロ酢酸、25%アンモニア水 : 特級 (富士フイルム和光純薬製)

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

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

リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) : リン酸二水素カリウム 7.0 g 及びリン酸水素二ナトリウム十二水和物 6.0 g を量り、水 750 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 6.0 に調整し、水を加えて正確に 1000 mL とした。これを 121°C で 15 分間、高圧蒸気滅菌器で滅菌し、滅菌水で 2 倍希釈した。

トリクロロ酢酸溶液 : トリクロロ酢酸 50 g を量り、水 1000 mL を加えて溶かした。

水、メタノール及び 25%アンモニア水の混液 (6 : 3 : 1) : 水 120 mL、メタノール 60 mL 及び 25%アンモニア水 20 mL を混合した。

水及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000 : 10) : 水 1000 mL 及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) 10 mL を混合した。

アセトニトリル及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000 : 10) : アセトニトリル 1000 mL 及びヘプタフルオロ酪酸

(約 0.5 mol/L 水溶液) 10 mL を混合した。

標準原液： カナマイシン硫酸塩標準品を約 31 mg (カナマイシン A 25 mg 相当) を精秤し、リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) で溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液： カナマイシン A 標準原液を水で希釈して 2 mg/L 溶液を調製した。

## ② 装置

ホモジナイザー： BM-2 (日本精機製作所製)

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)

振とう機： EL (スギヤマゲン製)

pH 計： F-72 (堀場アドバンスドテクノ)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-5)

装置	型式	メーカー
MS	4000 Q TRAP	SCIEX
LC	Nexera X2	島津製作所
データ処理	Analyst	SCIEX

## ③ 定量

カナマイシン A 標準原液を水及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000 : 10) で希釈して、ブランク試験溶液の溶媒を除去したものに添加し、0.005、0.01、0.02、0.05 及び 0.1 mg/L のマトリックス標準溶液を調製した。この溶液 10 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 10 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりカナマイシン A の含量を算出した。

## ④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (2 mg/L) 0.25 mL[水]を添加した。

## ⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-5)

カナマイシン A を試料からトリクロロ酢酸溶液で抽出し、ヘキサンで洗浄後、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

### a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、トリクロロ酢酸溶液 45 mL を加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/min で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 250 mL 容の広口ポリ瓶に入れ、ヘキサン 50 mL を加え、振とう機で 5 分間振とうした。3500 r/min で 5 分間遠心分離した。

### b. 精製

水層 10 mL (試料 1 g 相当) 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 (150 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL で洗浄したもの) に負荷した。カラムを水 10 mL、メタノール 5 mL で洗浄した後、水、メタノール及び 25%アンモニア水の混液 (6 : 3 : 1) 10 mL で溶出し、なす形フラスコに受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水及びヘプタフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000 : 10) 10 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

## ⑥ 妥当性評価試験

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

## 6. スルファメトキサゾール、スルファモノメトキシシン、スルファキノキサリン、トリメトプリム及びチアンフェニコール試験法

### ① 試薬・試液

スルファメトキサゾール標準品： 純度 99.9% (関東化学製)

スルファモノメトキシシン一水和物標準品： 純度 99.6% (富士フィルム和光純薬製)

スルファキノキサリン標準品： 純度 99.0% (Sigma-Aldrich 製)

トリメトプリム標準品： 純度 99.9% (富士フィルム和光純薬製)

チアンフェニコール標準品： 純度 99.7% (富士フィルム和光純薬製)

メタノール、アセトニトリル、ヘキサン、ギ酸、酢酸アンモニウム： 特級 (富士フィルム和光純薬製)

メタノール： HPLC 用 (富士フィルム和光純薬製)

メタノール、ギ酸： LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製)

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

メンブランフィルター： Millex-LG (0.2 µm、

MILLIPORE 製)

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

アセトニトリル、水及びギ酸の混液 (100 : 100 : 1)： アセトニトリル 500 mL、水 500 mL 及びギ酸 (LC-MS 用) 5 mL を混合した。

アセトニトリル及びギ酸の混液 (100 : 1)： アセトニトリル 100 mL 及びギ酸 (LC-MS 用) 1 mL を混合した。

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液： 酢酸アンモニウム 38.54 g を量り、水 350 mL を加えて溶かした後、水を加えて正確に 500 mL とした。

0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液： 水 1000 mL 及び 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 0.5 mL を混合した。

標準原液： スルファメトキサゾール標準品約 10 mg を精秤し、メタノール (HPLC 用) で溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。スルファモノメトキシシン一水和物標準品約 10 mg を精秤し、メタノール (HPLC 用) で溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。スルファキノキサリン標準品約 10 mg を精秤し、メタノール (HPLC 用) で溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。トリメトプリム標準品約 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。チアンフェニコール標準品約 10 mg を精秤し、アセトニトリルで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液： スルファメトキサゾール標準原液、スルファモノメトキシニー水和物標準原液、スルファキノキサリン標準原液、トリメトプリム標準原液及びチアンフェニコール標準原液をメタノール（特級）で希釈して1 mg/L溶液を調製し、さらに、アセトニトリル、水及びギ酸の混液（100：100：1）で希釈して0.2 mg/L混合溶液を調製した。

## ② 装置

ホモジナイザー： BM-2（日本精機製作所製）

遠心分離機： H-60R（コクサン製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-6）

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

## ③ 定量

スルファメトキサゾール標準原液、スルファモノメトキシニー水和物標準原液、スルファキノキサリン標準原液、トリメトプリム標準原液及びチアンフェニコール標準原液をメタノール（特級）で希釈して1 mg/L溶液を調製し、さらに、アセトニトリル、水及びギ酸の混液（100：100：1）で希釈して0.000125、0.00025、0.0005、0.00125及び0.0025 mg/Lの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、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液5 µLをLC-MS/MSに注入し、検量線から絶対検量線法によりスルファメトキサゾール、スルファモノメトキシニン、スルファキノキサリン、トリメトプリム及びチアンフェニコールの含量を算

出した。

## ④ 添加試料の調製

試料10 gに添加用混合標準溶液（0.2 mg/L）0.5 mL [アセトニトリル、水及びギ酸の混液（100：100：1）]を添加した。

## ⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-6）

スルファメトキサゾール、スルファモノメトキシニン、スルファキノキサリン、トリメトプリム及びチアンフェニコールを試料からアセトニトリルで抽出と同時にアセトニトリル飽和ヘキサンで洗浄し、ギ酸（特級）を加えて、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

### a. 抽出

試料10 gを250 mL容広口ポリ瓶に量り取り、アセトニトリル80 mL及びアセトニトリル飽和ヘキサン80 mLを加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/minで5分間遠心分離した後、下層を綿栓ろ過した。ろ液を100 mL容全量フラスコに入れ、ギ酸（特級）1 mLを加えた後、アセトニトリルで定容した。

### b. 精製

抽出液5 mL（試料0.5 g相当）をアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep NH2 FF（500 mg/6 mL）]（あらかじめアセトニトリル5 mLで洗浄したもの）に負荷し、溶出液を20 mL容全量フラスコに受けた。次いで、アセトニトリル及びギ酸の混液（100：1）5 mLで溶出し、先の全量フラスコに合わせた後、

水で定容し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

#### ⑥ 妥当性評価試験

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

### 7. エンロフロキサシン (シプロフロキサシンとの和) 及びノルフロキサシン試験法

#### ① 試薬・試液

エンロフロキサシン標準品：純度 99.8% (富士フィルム和光純薬製)

シプロフロキサシン塩酸塩標準品：純度 100% (富士フィルム和光純薬製)

ノルフロキサシン標準品：純度 99.9% (富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル、メタノール：残留農薬試験用 (関東化学製)

アセトニトリル、メタノール：HPLC 用 (関東化学製)

塩酸、ギ酸、酢酸アンモニウム、水酸化ナトリウム：特級 (関東化学製)

メタリン酸：鹿特級 (関東化学製)

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

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

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム 15.43 g を量り、水 200 mL に溶解した。

1 vol% ギ酸含有 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液：1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 50 mL 及び

ギ酸 10 mL に水を加えて正確に 1000 mL とした。

0.2%メタリン酸溶液：メタリン酸 2 g を量り、水 1000 mL に溶解した。

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

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

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

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 10 mL と水 90 mL を混合した。

標準原液：エンロフロキサシン標準品約 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

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

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

#### ② 装置

ホモジナイザー：T 25 digital ULTRA-TURRAX

(IKA ジャパン製)

ロータリーエバポレーター：N-1300（東京理化器械製）

遠心分離機：H-107DF（コクサン製）

LC-MS/MS（測定条件：表 1-7）

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

### ③ 定量

エンロフロキサシン標準原液、シプロフロキサシン標準原液及びノルフロキサシン標準原液を水、メタノール及び塩酸の混液（500：500：1）で希釈して、0.00025、0.0005、0.001、0.0025 及び 0.005 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 2  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 2  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりエンロフロキサシン、シプロフロキサシン及びノルフロキサシンの含量を算出した。

### ④ 添加試料の調製

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

### ⑤ 試験溶液の調製

概要（図 1-7）

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

で定量及び確認した。

#### a. 抽出

試料 5 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り取り、0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液（3：2）80 mL を加えた後、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、抽出液の上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに入れ、0.2%メタリン酸及びアセトニトリルの混液（3：2）で定容した。抽出液 10 mL（試料 0.5 g 相当）をなす形フラスコに分取し、ロータリーエバポレーター（40°C）で約 3 mL まで減圧濃縮した。

#### b. 精製

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

### ⑥ 妥当性評価試験

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

## 8. クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン及びドキシサイクリン試験法

① 試薬・試液

クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品： 純度 99.2% (和光純薬製)

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

オキシテトラサイクリン塩酸塩標準品： 純度 99.4% (和光純薬製)

4-*epi*-オキシテトラサイクリン標準品： 純度 95% (Toronto Research Chemicals 製)

テトラサイクリン塩酸塩標準品： 純度 99.1% (和光純薬製)

4-*epi*-テトラサイクリン塩酸塩標準品： 純度 99.4% (Honeywell 製)

ドキシサイクリンヒクラー特標準品： 純度 98.1% (和光純薬製)

アセトニトリル、メタノール： HPLC 用 (関東化学製)

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

クエン酸一水和物： 特級 (富士フイルム和光純薬製)

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

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

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

ム溶液 20 mL、水 180 mL 及びメタノール 800 mL を混合した。

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

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

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

標準原液： クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品約 26.9 mg (クロルテトラサイクリン 25mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。4-*epi*-クロルテトラサイクリン塩酸塩標準品約 26.9 mg (4-*epi*-クロルテトラサイクリン 25mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。オキシテトラサイクリン塩酸塩標準品約 27.0 mg (オキシテトラサイクリン 25mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。4-*epi*-オキシサイクリン標準品約 25mg を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。テトラサイクリン塩酸塩標準品約 27.1 mg (テトラサイクリン 25mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。4-*epi*-テトラサイクリン塩酸塩標準品約 27.1 mg (4-*epi*-テトラサイクリ

ン 25mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。ドキシサイクリンヒクラー特標準品約 28.9 mg (ドキシサイクリン 25mg 相当) を精秤し、メタノールで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

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

## ② 装置

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

遠心分離機： H-107DF (コクサン製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-8)

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

## ③ 定量

クロルテトラサイクリン標準原液、4-*epi*-クロルテトラサイクリン標準原液、オキシテトラサイクリン標準原液、4-*epi*-オキシテトラサイクリン標準原液、テトラサイクリン標準原液、4-*epi*-テトラサイクリン標準原液及びドキシサイクリン標準原液を 20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4 : 1) で希釈して 0.0005、0.001、0.0015、0.005、0.01

及び 0.015 mg/L の混合標準溶液を調製した。この溶液 1 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 1 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりクロルテトラサイクリン、4-*epi*-クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、4-*epi*-オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、4-*epi*-テトラサイクリン及びドキシサイクリンの含量を算出した。

## ④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (1 mg/L) 0.25 mL [20 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール及び水の混液 (4 : 1) 溶液] を添加した後、30 分間放置した。

## ⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-8)

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

### a. 抽出

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

### b. 精製

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

#### ⑥ 妥当性評価試験

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

### 9. フロルフェニコール試験法

#### ① 試薬・試液

フロルフェニコール標準品： 純度 98.8% (富士フィルム和光純薬製)

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

アセトニトリル： HPLC 用 (関東化学製)

酢酸エチル、ヘキサン、メタノール： 残留農薬試験用 (関東化学製)

アセトン、塩化ナトリウム、酢酸、水酸化ナトリウム： 特級 (関東化学製)

塩酸： 特級 (小宗化学薬品製)

25%アンモニア水： 特級 (富士フィルム和光純薬製)

ケイソウ土： セライト 545 (関東化学製)

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

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

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

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

7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液： 水酸化ナトリウム 60 g を量り、水 200 mL 加え、マグネチックスターラーで攪拌し、溶解した。

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

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

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

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

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

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

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

した。

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

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

添加用標準溶液： 添加用標準原液をメタノールで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

## ② 装置

オイルバス： THERMO MINDER SH-12 (タイテック製)

振とう機： EL (スギヤマゲン製)

遠心分離機： H-1000FR (コクサン製)

ロータリーエバポレーター： N-1300 (東京理化器械製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-9)

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

## ③ 定量

フロルフェニコールアミン標準原液を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (9 : 1) で希釈して 0.0005、0.001、0.0025、0.005 及び 0.01 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-

MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりフロルフェニコールアミンの含量を算出した。

## ④ 添加試料の調製

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

## ⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-9)

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

### a. 加水分解及び抽出

試料 10 g を 100 mL 容の遠心管に量り取り、6 mol/L 塩酸 20 mL を加え、密栓して 100°C のオイルバスで 3 時間 (15 分間置きに攪拌) 加水分解した。30 分間放冷後、試料溶液を 200 mL 容の遠心管に移し、100 mL 容の遠心管内を水 10 mL 及びヘキサン 40 mL で洗い、洗液を 200 mL 容の遠心管に合わせた後、振とう機で 5 分間振とうした。3000 r/min で 5 分間遠心分離した後、ヘキサン層を捨てた。抽出液にケイソウ土 [セライト 545] 2 g を加え混合し、吸引ろ過器を用いて抽出液をろ過した後、遠心管内及び残留物をアセトン及び水の混液 (1 : 1) 20 mL で洗い、洗液をろ過した。全ろ液を 100 mL 容

全量フラスコに合わせて水で定容した。

#### b. 精製

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

残留物を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (1 : 1) 1 mL に溶解し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX (150 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 2 mL 及び 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (1 : 1) 3 mL で洗浄したもの) に負荷した。遠心管内を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (1 : 1) 3 mL で洗い、洗液をカラムに負荷した。遠心管内をメタノール 2 mL で洗い、洗液をカラムに負荷した。メタノール及び 25% アンモニア水の混液 (99 : 1) 5 mL で溶出し、50 mL 容の遠心管に受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (9 : 1) 2.5 mL に溶解し、メンブ

ンフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

#### ⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値濃度 (100 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。なお、添加試料については残留物を 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (9 : 1) 5 mL に溶解したものを試験溶液とした。

### 10. アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリン試験法

#### ① 試薬・試液

アモキシシリン三水和物標準品： 純度 99.8% (富士フィルム和光純薬製)

アンピシリン三水和物標準品： 純度 98.9% (Sigma-Aldrich 製)

ベンジルペニシリンナトリウム標準品： 純度 100.0% (関東化学製)

アモキシシリン-*d*<sub>4</sub>： (Toronto Research Chemicals 製)

アンピシリン-*d*<sub>5</sub>： (Toronto Research Chemicals 製)

ペニシリン G-*d*<sub>7</sub> N-エチルピペリジニウム塩： (Sigma-Aldrich 製)

メタノール： LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製)

アセトン、リン酸水素二カリウム： 特級 (関東化学製)

アセトニトリル、クロロホルム、タングステ

ン (VI) 酸ナトリウム二水和物、酢酸アンモニウム、リン酸水素二ナトリウム十二水和物、リン酸二水素カリウム、リン酸、25%アンモニア水、酢酸： 特級（富士フィルム和光純薬製）

硫酸： 特級（Sigma-Aldrich 製）

炭酸水素アンモニウム： 一級（富士フィルム和光純薬製）

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム： InertSep HLB（200 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製）

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

リン酸塩緩衝液（pH 6.0）①： リン酸二水素カリウム 7 g 及びリン酸水素二ナトリウム十二水和物 6 g を量り、水 750 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 6.0 に調整し、水を加えて正確に 1000 mL とした。

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液： 酢酸アンモニウム 38.54 g を量り、水 350 mL を加えて溶かした後、水を加えて正確に 500 mL とした。

50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液： 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 50 mL 及び水 950 mL を混合した。

0.17 mol/L 硫酸： 硫酸 4.8 mL に水を加えて正確に 500 mL とした。

5%タングステン酸ナトリウム溶液： タングステン (VI) 酸ナトリウム二水和物 25 g を量り、水 475 mL を加えて溶かした。

リン酸塩緩衝液（pH 6.0）②： リン酸二水素

カリウム 8 g 及びリン酸水素二カリウム 2 g を量り、水 750 mL を加えて溶かした後、リン酸で pH を 6.0 に調整し、水を加えて正確に 1000 mL とした。

アセトン及びリン酸塩緩衝液（pH 6.0）②の混液（1：1）： アセトン 150 mL 及びリン酸塩緩衝液（pH 6.0）②150 mL を混合した。

0.1 mol/L 炭酸アンモニウム溶液： 炭酸水素アンモニウム 7.91 g を量り、水 1000 mL を加えて溶かした後、25%アンモニア水で pH を 8.0 に調整した。

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

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

メタノール及び酢酸の混液（1000：1）： メタノール 1000 mL 及び酢酸 1 mL を混合した。

標準原液： アモキシシリン三水和物標準品約 58 mg（アモキシシリン 50 mg 相当）を精秤し、リン酸塩緩衝液（pH 6.0）①で溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。アンピシリン三水和物標準品約 59 mg（アンピシリン 50 mg 相当）を精秤し、リン酸塩緩衝液（pH 6.0）①で溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。ベンジルペニシリンナトリウム標準品約 21 mg（ベンジルペニシリン 20 mg 相当）を精秤し、リン酸塩緩衝液（pH 6.0）①で溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

内標準原液： 1 mg 容量のアモキシシリン-d<sub>4</sub> 標準品を水で 10 mL 容全量フラスコに洗いこん

だ後、溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。1 mg 容量のアmpiシリン-*d*<sub>5</sub> 標準品をリン酸塩緩衝液 (pH 6.0) ①で 10 mL 容全量フラスコに洗いこんだ後、溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量のペニシリン G-*d*<sub>7</sub> N-エチルピペリジニウム塩標準品をリン酸塩緩衝液 (pH 6.0) ①で 40 mL 容全量フラスコに洗いこんだ後、溶解して 250 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液： アモキシシリン標準原液、アmpiシリン標準原液及びベンジルペニシリン標準原液を 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液で希釈して 0.5 mg/L 混合溶液を調製した。

添加用内標準溶液： アモキシシリン内標準原液、アmpiシリン内標準原液及びベンジルペニシリン内標準原液をそれぞれ 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。

## ② 装置

ホモジナイザー： BM-2 (日本精機製作所製)

ロータリーエバポレーター： N-1000V (東京理化器械製)

遠心分離機： H-60R (コクサン製)

振とう機： EL (スギヤマゲン製)

pH 計： F-72 (堀場アドバンスドテクノ製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-10)

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

## ③ 定量

アモキシシリン標準原液及びアモキシシリン

内標準原液、アmpiシリン標準原液及びアmpiシリン内標準原液、ベンジルペニシリン標準原液及びベンジルペニシリン内標準原液を 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液で希釈し、0.00005、0.0001、0.0002、0.0005 及び 0.001 mg/L (内標準溶液濃度 0.0025 mg/L) 内標準混合標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたアモキシシリン-*d*<sub>4</sub> のピーク面積に対するアモキシシリンのピーク面積の比、アmpiシリン-*d*<sub>5</sub> のピーク面積に対するアmpiシリンのピーク面積の比、ペニシリン G-*d*<sub>7</sub> のピーク面積に対するベンジルペニシリンのピーク面積の比を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から内部標準法によりアモキシシリン、アmpiシリン及びベンジルペニシリンの含量を算出した。

## ④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用混合標準溶液 (0.5 mg/L) 0.2 mL [50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液] を添加した。

## ⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-10)

アモキシシリン、アmpiシリン及びベンジルペニシリンを試料からアセトン及びリン酸塩緩衝液 (pH 6.0) ②の混液 (1 : 1) で抽出し、クロロホルムで洗浄後、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

### a. 抽出

試料5 gを250 mL容の遠心管に量り取り、0.17

mol/L硫酸5 mL及び5%タングステン酸ナトリウム溶液5 mLを加えてスパーテルでよく混合した。アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリンの5 mg/L添加用内標準溶液0.125 mL、アセトン及びリン酸塩緩衝液 (pH 6.0) ②の混液 (1 : 1) 40 mLを加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/minで5分間遠心分離した後、上清をろ紙 (直径125 mm、No. 5A、ADVANTEC製) でろ過した。抽出液2 mL (試料0.2 g相当) を50 mL容の遠心管に分取し、0.1 mol/L炭酸アンモニウム溶液20 mLを加えた後、クロロホルム20 mLを加えて振とう機で5分間振とうした。3500 r/minで5分間遠心分離した後、上層をなす形フラスコに分取し、窒素ガスでクロロホルムを留去した。

#### b. 精製

aで得られた溶液をジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [InertSep HLB (200 mg/6 mL)] (あらかじめアセトニトリル 10 mL、水 10 mL、0.1 mol/L炭酸アンモニウム溶液 10 mLで洗浄したもの) に負荷した。なす形フラスコ内を 0.1 mol/L炭酸アンモニウム溶液 5 mLで洗い、洗液をカラムに負荷した。さらに、カラムを 0.1 mol/L炭酸アンモニウム溶液 5 mLで2回洗浄した。アセトニトリル及び水の混液 (1 : 1) 5 mLで溶出し、なす形フラスコに受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を 50 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 4 mLに溶解した

ものを 2 mL分取し、50 mmol/L酢酸アンモニウム溶液で 5 mLに定容し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

#### ⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に基準値濃度 (20 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回 (2併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

### 11. ノシヘプタイド試験法

#### ① 試薬・試液

ノシヘプタイド標準品：純度 960 µg (力価) /mg (農林水産消費安全技術センター製)

アセトン：残留農薬試験用 (関東化学製)

メタノール：HPLC用 (関東化学製)

酢酸：特級 (関東化学製)

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep C18 (1,000 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製)

5%酢酸：水 950 mL及び酢酸 50 mLを混合した。

水、メタノール及び酢酸の混液 (50 : 50 : 1)：水 50 mL、メタノール 50 mL及び酢酸 1 mLを混合した。

メタノール及び酢酸の混液 (99 : 1)：メタノール 495 mL及び酢酸 5 mLを混合した。

メタノール、水及び酢酸の混液 (95 : 5 : 1)：メタノール 95 mL、水 5 mL及び酢酸 1 mLを混合した。

メタノール、水及び酢酸の混液 (65 : 35 :

1) : メタノール 650 mL、水 350 mL 及び酢酸 10 mL を混合した。

標準原液 : ノシヘプタイド標準品約 10 mg を精秤し、メタノール及び酢酸の混液 (99 : 1) で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液 : ノシヘプタイド標準原液をメタノール及び酢酸の混液 (99 : 1) で希釈して 0.1 mg/L 溶液を調製した。

## ② 装置

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

HPLC (測定条件 : 表 1-11)

装置	型式	メーカー
LC	Prominence LC-20AD	島津製作所
検出器	RF-10A <sub>XLS</sub>	島津製作所
データ処理	LabSolutions	島津製作所

## ③ 定量

ノシヘプタイド標準原液をメタノール、水及び酢酸の混液 (95 : 5 : 1) で希釈して 0.0005、0.001、0.002、0.005 及び 0.01 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 20 µL を HPLC に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 20 µL を HPLC に注入し、検量線から絶対検量線法によりノシヘプタイドの含量を算出した。

## ④ 添加試料の調製

試料 10 g に添加用標準溶液 (0.1 mg/L) 1 mL [メタノール及び酢酸の混液 (99 : 1) の溶液] を添加した。

## ⑤ 試験溶液の調製

概要 (図 1-11)

ノシヘプタイドを試料から 5%酢酸及びアセトンで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、HPLC で定量した。

### a. 抽出

試料 10 g を 250 mL 容の広口ポリ瓶に量り取り、5%酢酸 20 mL 及びアセトン 100 mL を加え、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した後、吸引ろ過した。ろ過器上の残留物を広口ポリ瓶に戻し、アセトン 50 mL を加えてホモジナイザーで 1 分間攪拌した後、吸引ろ過した。得られたろ液を 200 mL 容全量フラスコにあわせ、アセトンで定容した。

### b. 精製

抽出液 10 mL (試料 0.5 g 相当) を遠心管に分取し、水 50 mL 及び酢酸 0.5 mL を加え、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18 (1,000 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 5 mL、5%酢酸 5 mL で洗浄したもの) に負荷した。水、メタノール及び酢酸の混液 (50 : 50 : 1) 10 mL で洗浄後、メタノール、水及び酢酸の混液 (95 : 5 : 1) 5 mL で溶出し、5 mL 容全量フラスコに受けた。水、メタノール及び酢酸の混液 (50 : 50 : 1) で定容したものを試験溶液とした。

## ⑥ 妥当性評価試験

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

## 12. エンラマイシン試験法

### ① 試薬・試液

エンラマイシン A 標準品： 純度 96.426%  
(TOKU-E 製)

アセトニトリル： LC-MS 用 (関東化学製)

ジクロロメタン、メタノール、酢酸、塩化ナトリウム： 特級 (富士フィルム和光純薬製)

クエン酸一水和物： 特級 (関東化学製)

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム： InertSep HLB (200 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製)

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム： Sep-Pak Plus NH<sub>2</sub> (360 mg、Waters 製)

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

クエン酸抽出液： クエン酸一水和物 50 g を量り、水 950 mL を加えて溶かした後、このクエン酸溶液 600 mL 及びメタノール 1200 mL を混合した。この混合溶液に飽和量の塩化ナトリウムを加えてかき混ぜ、上澄み液を使用した。

メタノール及び水の混液 (4 : 1)： メタノール 800 mL 及び水 200 mL を混合した。

水及びメタノールの混液 (7 : 3)： 水 700 mL 及びメタノール 300 mL を混合した。

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

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

アセトニトリル及び酢酸の混液 (1000 : 1)：

アセトニトリル 1000 mL 及び酢酸 1 mL を混合した。

標準原液： エンラマイシン A 標準品約 5 mg を精秤し、メタノール及び水の混液 (4 : 1) で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：エンラマイシン A 標準原液を水及びメタノールの混液 (1 : 1) で希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

### ② 装置

ホモジナイザー： BM-2 (日本精機製作所製)  
ロータリーエバポレーター： N-1000V (東京理化学器械製)

遠心分離機： H-60R (コクサン製)

振とう機： EL (スギヤマゲン製)

LC-MS/MS (測定条件：表 1-12)

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

### ③ 定量

エンラマイシン A 標準原液を水及びメタノールの混液 (1 : 1) で希釈して 0.00125、0.0025、0.005、0.0125 及び 0.025 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 μL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりエンラマイシン A の含量を算出した。

### ④ 添加試料の調製

試料 5 g に添加用標準溶液 (1 mg/L) 0.150 mL [水及びメタノールの混液 (1 : 1)] を添加

し、よく混合した後、30 分間放置した。

## ⑤ 試験溶液の調製

### 概要 (図 1-12)

エンラマイシンAを試料からクエン酸抽出液で抽出し、ジクロロメタンで洗浄後、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

#### a. 抽出

試料5 gを250 mL容の遠心管に量り取り、クエン酸抽出液50 mL及びジクロロメタン25 mLを加えた後、ホモジナイザーで攪拌した。3500 r/minで5分間遠心分離した後、上清を100 mL容三角フラスコに分取し、残留物にクエン酸抽出液25 mLを加えた後、振とう機で5分間振とうした。3500 r/minで5分間遠心分離した後、上清を100 mL容三角フラスコに合わせた。

抽出液をガラスろ紙 (直径40 mm、GA-200、ADVANTEC製) で吸引ろ過した。ろ液を100 mL容全量フラスコに合わせて、クエン酸抽出液で定容した。抽出液5 mL (試料0.25 g相当) をなす形フラスコに分取し、窒素ガスでジクロロメタンを留去した。

#### b. 精製

a で得られた溶液に水 7 mL を加え、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [InertSep HLB (200 mg/6 mL)] (あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL で洗浄したものに) 負荷した。なす形フラスコ内を水及びメタノールの混液 (7 : 3) 5 mL で洗い、洗液をカ

ラムに負荷した。さらに、カラムを水及びメタノールの混液 (7 : 3) 5 mL で洗浄した。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の下にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak Plus NH<sub>2</sub> (360 mg)] (あらかじめメタノール 5 mL、メタノール及び水の混液 (4 : 1) 5 mL で洗浄したものを) 接続し、メタノール及び水の混液 (4 : 1) 5 mL で溶出し、なす形フラスコに受けた。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水及びメタノールの混液 (1 : 1) 2.5 mLに溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

## ⑥ 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度 (30 µg/kg) で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1日1回 (2 併行)、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

## C. 結果及び考察

### 1. タイロシン及びチルミコシン試験法

#### ① 選択性

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

#### ② 真度、併行精度及び室内精度

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

### ③ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数  $r^2 > 0.997$  となり、良好な直線性が得られた。

### ④ 定量限界

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

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 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  での残留分析として妥当であると評価された。

## 2. チルバロシン試験法

### ① 選択性

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

### ② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-3及び表2-4に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度25%未満、室内精度30%未満）を満たした。

### ③ 検量線の直線性

0.0001～0.002mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数  $r^2 > 0.998$  となり、良好な直線性が得られた。

### ④ 定量限界

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

## 3. リンコマイシン試験法

### ① 選択性

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

### ② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-5に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度30%未満）を満たした。

また、内標準物質として用いたリンコマイシン- $d_3$  の回収率はいずれも 40%以上であった。

### ③ 検量線の直線性

0.00025～0.01 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数  $r^2 > 0.998$  となり、良好な直線性が得られた。

### ④ 定量限界

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

## 4. ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシン試験法

### ① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-6及び図2-7）。

### ② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-6及び表2-7に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度20%未満）を満たした。

### ③ 検量線の直線性

0.01～0.4 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数  $r^2 > 0.997$  となり、良好な直線性が得られた。

### ④ 定量限界

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

## 5. カナマイシン試験法

### ① 選択性

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

#### ② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-8に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度20%未満）を満たした。

#### ③ 検量線の直線性

0.005～0.1 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数  $r^2 > 0.993$  となり、良好な直線性が得られた。

#### ④ 定量限界

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

### 6. スルファメトキサゾール、スルファモノメトキシリン、スルファキノキサリン、トリメトプリム及びチアンフェニコール試験法

#### ① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった。（図2-9～図2-13）。

#### ② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-9～表2-13に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度25%未満、室内精度30%未満）を満たした。

#### ③ 検量線の直線性

0.000125～0.0025 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数  $r^2 > 0.998$  となり、良好な直線性が得られた。

#### ④ 定量限界

定量限界濃度を添加した添加試料から得ら

れたピークは  $S/N \geq 10$  であった。

### 7. エンロフロキサシン（シプロフロキサシンとの和）及びノルフロキサシン試験法

#### ① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-14～16）。

#### ② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-14～16に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度20%未満）を満たした。

#### ③ 検量線の直線性

0.00025～0.005 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数  $r^2 > 0.997$  となり、良好な直線性が得られた。

#### ④ 定量限界

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

### 8. クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン及びドキシサイクリン試験法

#### ① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-17～図2-23）。

#### ② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-17～表2-23に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度20%未満）を満たした。

#### ③ 検量線の直線性

0.0005～0.015 mg/L の範囲で検量線を作成した。テトラサイクリンについては決定係数  $r^2 > 0.998$ 、クロ

ルテトラサイクリン、4-*epi*-クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、4-*epi*-オキシテトラサイクリン、4-*epi*-テトラサイクリン及びドキシサイクリンについては決定係数  $r^2 > 0.999$  となり良好な直線性が得られた。

#### ④ 定量限界

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

### 9. フロルフェニコール試験法

#### ① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-24）。

#### ② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-24に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度20%未満）を満たした。

#### ③ 検量線の直線性

0.0005～0.01 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数  $r^2 > 0.999$  となり、良好な直線性が得られた。

#### ④ 定量限界

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

### 10. アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリン試験法

#### ① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-25～図2-27）。

#### ② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-25

～表2-27に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度20%未満）を満たした。

また、内標準物質として用いたアモキシシリン-*d*<sub>4</sub>、アンピシリン-*d*<sub>5</sub>及びペニシリンG-*d*<sub>7</sub>の回収率はいずれも40%以上であった。

#### ③ 検量線の直線性

0.00005～0.001 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数  $r^2 > 0.999$  となり、良好な直線性が得られた。

#### ④ 定量限界

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

### 11. ノシヘプタイド試験法

#### ① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図2-28）。

#### ② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-28に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度25%未満、室内精度30%未満）を満たした。

#### ③ 検量線の直線性

0.0005～0.01 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数  $r^2 > 0.999$  となり、良好な直線性が得られた。

#### ④ 定量限界

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

### 12. エンラマイシン試験法

#### ① 選択性

ブランク試料を本試験法に従って分析した

ところ、クロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されなかった（図 2-29）。

#### ② 真度、併行精度及び室内精度

真度、併行精度及び室内精度の結果を表2-29に示した。真度の目標値（70～120%）及び精度の目標値（併行精度15%未満、室内精度20%未満）を満たした。

#### ③ 検量線の直線性

0.00125～0.025 mg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数  $r^2 > 0.999$  となり、良好な直線性が得られた。

#### ④ 定量限界

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

### D. 結論

鶏の筋肉を対象として B 物質の抗菌性物質分析法（12 分析法、29 化合物）を確立し、妥当性評価試験を実施した。その結果、いずれの分析法も良好な結果（真度、併行精度、室内精度及び選択性）が得られ、鶏の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。本研究で確立した分析法を用いることにより、B 物質のうち抗菌性物質が鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに鶏の筋肉（可食部位）の検査を実施することができ、EU へ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と考えられる。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

#### 2. 学会発表

Shizuka Saito-Shida, Seiichiro Iizuka, Ayumu Nakamura, Satoshi Isagawa, Satoru Nemoto, Hiroshi

Akiyama. Development and validation of an analytical method for determining total florfenicol residues as florfenicol amine in bovine muscle using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2021 AOAC INTERNATIONAL、令和 3 年 8 月 27 日

### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし



表 1-1 測定条件 (タイロシン及びチルミコシン試験法)

LC 条件																												
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 $\mu$ m : ジーエルサイエンス製)																											
移動相流速 (mL/min)	0.2																											
注入量 ( $\mu$ L)	2																											
カラム温度 ( $^{\circ}$ C)	40																											
移動相	A液: 水及びギ酸の混液(1000 : 1) B液: アセトニトリル																											
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>10.01</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.01</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.02</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>	時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	80	20	10.0	40	60	10.01	5	95	15.01	5	95	15.02	80	20	20.0	80	20						
時間(分)	A液(%)	B液(%)																										
0.0	80	20																										
10.0	40	60																										
10.01	5	95																										
15.01	5	95																										
15.02	80	20																										
20.0	80	20																										
MS 条件																												
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																											
イオン化モード	ESI(+)																											
イオンスプレー電圧 (V)	5500																											
ヒーター温度 ( $^{\circ}$ C)	700																											
ネブライザーガス	空気、60 psi																											
ターボガス	空気、60 psi																											
コリジョンガス	窒素																											
定量イオン ( $m/z$ )、定性イオン ( $m/z$ )																												
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>プリカーサー イオン (<math>m/z</math>)</th> <th>プロダクト イオン (<math>m/z</math>)</th> <th>DP (V)</th> <th>コリジョンエ ネルギー (eV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">タイロシン</td> <td>(定量用)</td> <td>916.0</td> <td>174.0</td> <td>36</td> <td>47</td> </tr> <tr> <td>(定性用)</td> <td>916.0</td> <td>772.0</td> <td>36</td> <td>41</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">チルミコシン</td> <td>(定量用)</td> <td>869.3</td> <td>696.4</td> <td>81</td> <td>55</td> </tr> <tr> <td>(定性用)</td> <td>435.0</td> <td>174.0</td> <td>71</td> <td>35</td> </tr> </tbody> </table>		プリカーサー イオン ( $m/z$ )	プロダクト イオン ( $m/z$ )	DP (V)	コリジョンエ ネルギー (eV)	タイロシン	(定量用)	916.0	174.0	36	47	(定性用)	916.0	772.0	36	41	チルミコシン	(定量用)	869.3	696.4	81	55	(定性用)	435.0	174.0	71	35
	プリカーサー イオン ( $m/z$ )	プロダクト イオン ( $m/z$ )	DP (V)	コリジョンエ ネルギー (eV)																								
タイロシン	(定量用)	916.0	174.0	36	47																							
	(定性用)	916.0	772.0	36	41																							
チルミコシン	(定量用)	869.3	696.4	81	55																							
	(定性用)	435.0	174.0	71	35																							
保持時間 (min)	タイロシン 7.4、チルミコシン 5.5																											

**秤 取**

↓ 試料 5 g

**抽出**

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

**ヘキサン洗浄**

↓ ヘキサン 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 下層 10 mL 分取

**pH 調整**

↓ リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 30 mL を加え pH 試験紙で pH 8 を確認

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

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

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

↓ 上清を注入

↓ 水及びメタノールの混液 (3:1) 10 mL で洗浄

↓ メタノール 9 mL で溶出 (全溶出液を採取)

↓ メタノールで 10 mL に定容

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-1 タイロシン及びチルミコシン試験法の分析法フローチャート

表 1-2 測定条件 (チルバロシン試験法)

LC 条件																								
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm : ジーエルサイエンス製)																							
移動相流速 (mL/min)	0.2																							
注入量 (μL)	2																							
カラム温度 (°C)	40																							
移動相	A液: 水及びギ酸の混液 (1000 : 1) B液: アセトニトリル																							
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.1</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>						時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	70	30	10.0	5	95	15.0	5	95	15.1	70	30	20.0	70	30
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																						
0.0	70	30																						
10.0	5	95																						
15.0	5	95																						
15.1	70	30																						
20.0	70	30																						
MS 条件																								
測定モード	MS/MS																							
イオン化モード	ESI (+)																							
イオンスプレー電圧 (V)	5500																							
ヒーター温度 (°C)	450																							
ネブライザーガス	空気、50 psi																							
ターボガス	空気、70 psi																							
コリジョンガス	窒素																							
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)																								
	プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																			
			(m/z)	コリジョン エネルギー (eV)	(m/z)	コリジョン エネルギー (eV)																		
	チルバロシン	1042.4	46	814.4	45	174.1	51																	
	3-O-アセチルタ イロシン	958.2	11	772.1	45	173.8	45																	
保持時間 (min)	チルバロシン 6.4、3-O-アセチルタイロシン 5.0																							

**秤 取**

↓ 試料 10 g

**抽 出**

↓ 水及びりん酸の混液(9:1) 10 mL 及びアセトン 100 mL を加えホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ ろ過器上の残留物にアセトン 50 mL を加えホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容

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

↓ メタノール 10 mL、水及びメタノールの混液(3:2) 10 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 4 mL に水 15 mL を加えたものを注入

↓ 水及びメタノールの混液(3:2) 10 mL で洗浄

↓ メタノール 9 mL で溶出(全溶出液を採取)

↓ メタノールで 10 mL に定容

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-2 チルバロシン試験法の分析法フローチャート

表 1-3 測定条件 (リンコマイシン試験法)

LC 条件																											
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm : ジーエルサイエンス製)																										
移動相流速 (mL/min)	0.2																										
注入量 (μL)	5																										
カラム温度 (°C)	40																										
移動相	A液: 水及びギ酸の混液 (1000:1) B液: アセトニトリル																										
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>5.00</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>5.01</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10.00</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10.01</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>						時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.00	90	10	5.00	70	30	5.01	10	90	10.00	10	90	10.01	90	10	15.00	90	10
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																									
0.00	90	10																									
5.00	70	30																									
5.01	10	90																									
10.00	10	90																									
10.01	90	10																									
15.00	90	10																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
イオン化モード	ESI (+)																										
イオンスプレー電圧 (V)	5500																										
ヒーター温度 (°C)	550																										
ネブライザーガス	空気、60 psi																										
ターボガス	空気、60 psi																										
コリジョンガス	窒素																										
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)																											
	プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																						
			(m/z)	コリジョン エネルギー (eV)	(m/z)	コリジョン エネルギー (eV)																					
リンコマイシン	407.1	66	126.0	33	359.1	25																					
リンコマイシン-d <sub>3</sub>	410.2	66	129.2	35	362.1	27																					
保持時間 (min)	リンコマイシン 4.6																										

**秤 取**

- ↓ 試料 5 g
- ↓ 5 mg/L 添加用内標準溶液 100  $\mu$ L 添加

**抽 出**

- ↓ メタノール 50 mL を加え 1 分間ホモジナイズ
- ↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 上澄み液 5 mL を分取(試料 0.5 g 相当)

**濃縮 (溶媒除去)**

- ↓ 残留物をリン酸緩衝液 (pH7.0) 10 mL に溶解
- ↓ 硫酸アンモニウム 10 g を加え 5 分間振とう
- ↓ 綿栓ろ過

**スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2 (500 mg/6mL) ]**

- ↓ メタノール 5 mL、水 5 mL 及びリン酸緩衝液 (pH7.0) 5 mL でコンディショニング
- ↓ 全量注入
- ↓ 水 10 mL、水及びメタノールの混液 (3:1) 10 mL で洗浄
- ↓ メタノール 10 mL で溶出

**濃縮 (溶媒除去)**

- ↓ 残留物を水、アセトニトリル及びギ酸の混液 (900:100:0.9) 10 mL に溶解

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-3 リンコマイシン試験法の分析法フローチャート

表 1-4 測定条件 (ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシン試験法)

LC 条件																											
カラム	TSKgel SuperODS (内径 2.0 mm、長さ 100 mm、粒子径 2.3 $\mu$ m : 東ソー製)																										
移動相流速 (mL/min)	0.2																										
注入量 ( $\mu$ L)	2																										
カラム温度 ( $^{\circ}$ C)	40																										
移動相	A液: 水及びヘプタフルオロ酪酸 (約0.5 mol/L水溶液) の混液 (1000:10) B液: アセトニトリル及びヘプタフルオロ酪酸 (約0.5 mol/L水溶液) の混液 (1000:10)																										
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>1.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>16.0</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>17.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>27.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>						時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	95	5	1.0	95	5	10.0	20	80	16.0	20	80	17.0	95	5	27.0	95	5
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																									
0.0	95	5																									
1.0	95	5																									
10.0	20	80																									
16.0	20	80																									
17.0	95	5																									
27.0	95	5																									
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 ( $^{\circ}$ C)	450																										
ネブライザーガス	空気、55 psi																										
ターボガス	空気、70 psi																										
コリジョンガス	窒素																										
定量イオン ( $m/z$ )、定性イオン ( $m/z$ )																											
	プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクトイオン ① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																						
			( $m/z$ )	コリジョン エネルギー (eV)	( $m/z$ )	コリジョン エネルギー (eV)																					
ストレプトマイシン	582	120	263	45	246	45																					
ジヒドロストレプトマイシン	584	120	263	43	246	43																					
保持時間 (min)	ストレプトマイシン 5.7、ジヒドロストレプトマイシン 5.7																										

**秤 取**

↓ 試料 5 g

**抽 出**

↓ トリクロロ酢酸溶液 45 mL を加えホモジナイズ

↓ クロロホルム 100 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 上層 20 mL 分取

**pH 調整**

↓ 0.1、1 及び 6 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液及び 1/15 リン酸溶液を加え pH 7.0 に調整

**メタケイ酸アルミン酸マグネシウムカラム**

↓ [ノイシリン NS<sub>2</sub>N、水に懸濁し 3 mL を湿式充填、内径 1 cm]

↓ 抽出液を注入

↓ 水 20 mL で洗浄

↓ 3% 塩化ナトリウム溶液 20 mL で溶出(全溶出液を採取)

↓ 1 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム溶液 1 mL 及び

↓ 0.05 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有リン酸緩衝液(pH 2.0) 10 mL を加え混合

**オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak C18 Classic (360 mg)]**

↓ メタノール 10 mL、水 10 mL 及び

↓ 0.05 mol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有リン酸緩衝液(pH 2.0) 5 mL でコンディショニング

↓ 上記で得られた溶液を注入

↓ 流出液の pH が 4~4.5 付近になるまで水で洗浄

↓ 水及びメタノールの混液(1:1) 10 mL で溶出(全溶出液を採取)

**濃縮(溶媒除去)**

↓ 残留物を水及びヘプタフルオロ酪酸(約 0.5 mol/L 水溶液)の混液(1000:10) 10mL に

溶解

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-4 ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシン試験法の分析法フローチャート

表 1-5 測定条件 (カナマイシン試験法)

LC 条件																						
カラム	TSKgel SuperODS (内径 2.0 mm、長さ 100 mm、粒子径 2.3 $\mu$ m : 東ソー製)																					
移動相流速 (mL/min)	0.2																					
注入量 ( $\mu$ L)	10																					
カラム温度 ( $^{\circ}$ C)	40																					
移動相	A液: 水及びヘプタフルオロ酪酸 (約0.5 mol/L水溶液) の混液 (1000:10) B液: アセトニトリル及びヘプタフルオロ酪酸 (約0.5 mol/L水溶液) の混液 (1000:10)																					
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>1.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>16.0</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>17.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>27.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	95	5	1.0	95	5	10.0	20	80	16.0	20	80	17.0	95	5	27.0	95	5
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																				
0.0	95	5																				
1.0	95	5																				
10.0	20	80																				
16.0	20	80																				
17.0	95	5																				
27.0	95	5																				
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 ( $^{\circ}$ C)	450																					
ネブライザーガス	空気、55 psi																					
ターボガス	空気、70 psi																					
コリジョンガス	窒素																					
定量イオン ( $m/z$ )	485.3 $\rightarrow$ 163.2 [DP: 106 (V)、コリジョンエネルギー: 35 (eV)]																					
定性イオン ( $m/z$ )	485.3 $\rightarrow$ 324.1 [DP: 106 (V)、コリジョンエネルギー: 23 (eV)]																					
保持時間 (min)	6.1																					

**秤 取**

↓ 試料 5 g

**抽 出**

↓ トリクロロ酢酸溶液 45 mL を加えホモジナイズ

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

↓ ヘキサン 50 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

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

↓ メタノール 5 mL、水 5 mL でコンディショニング

↓ 水層 10 mL を注入

↓ 水 10 mL で洗浄

↓ メタノール 5 mL で洗浄

↓ 水、メタノール及び 25%アンモニア水の混液 (6:3:1) 10 mL で溶出 (全溶出液を採取)

**濃縮 (溶媒除去)**

↓ 残留物を水及びヘptaフルオロ酪酸 (約 0.5 mol/L 水溶液) の混液 (1000:10) 10 mL に溶解

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-5 カナマイシン試験法の分析法フローチャート

表 1-6 測定条件 (スルファメトキサゾール、スルファモノメトキシシ、スルファキノキサリン、トリメトプリム及びチアンフェニコール試験法)

LC 条件																																															
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 $\mu$ m : Waters 製)																																														
移動相流速 (mL/min)	0.35																																														
注入量 ( $\mu$ L)	5																																														
カラム温度 ( $^{\circ}$ C)	40																																														
移動相	A液: 0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B液: メタノール (LC-MS用)																																														
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>1.9</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>5.71</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>8.60</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>8.61</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>11.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	95	5	1.9	70	30	5.71	10	90	8.60	10	90	8.61	95	5	11.0	95	5																									
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																																													
0.0	95	5																																													
1.9	70	30																																													
5.71	10	90																																													
8.60	10	90																																													
8.61	95	5																																													
11.0	95	5																																													
MS 条件																																															
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																																														
イオン化モード	ESI (+又は-)																																														
イオンスプレー電圧 (V)	5500 又は -4500																																														
ヒーター温度 ( $^{\circ}$ C)	650																																														
ネブライザーガス	空気、60 psi																																														
ターボガス	空気、70 psi																																														
コリジョンガス	窒素																																														
定量イオン ( $m/z$ )、定性イオン ( $m/z$ )																																															
	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th rowspan="2">プリカーサー イオン</th> <th rowspan="2">DP (V)</th> <th colspan="2">プロダクトイオン① (定量用)</th> <th colspan="2">プロダクトイオン② (定性用)</th> </tr> <tr> <th><math>m/z</math></th> <th>コリジョン エネルギー (eV)</th> <th><math>m/z</math></th> <th>コリジョン エネルギー (eV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>スルファメトキサゾール</td> <td>254.0</td> <td>81</td> <td>92.1</td> <td>37</td> <td>108.1</td> <td>33</td> </tr> <tr> <td>スルファモノメトキシシ</td> <td>280.9</td> <td>81</td> <td>156.0</td> <td>23</td> <td>108.0</td> <td>33</td> </tr> <tr> <td>スルファキノキサリン</td> <td>301.1</td> <td>96</td> <td>156.1</td> <td>25</td> <td>92.0</td> <td>45</td> </tr> <tr> <td>トリメトプリム</td> <td>291.0</td> <td>101</td> <td>123.0</td> <td>33</td> <td>230.0</td> <td>33</td> </tr> <tr> <td>チアンフェニコール</td> <td>354.0</td> <td>-45</td> <td>185.0</td> <td>-28</td> <td>289.9</td> <td>-18</td> </tr> </tbody> </table>		プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)		$m/z$	コリジョン エネルギー (eV)	$m/z$	コリジョン エネルギー (eV)	スルファメトキサゾール	254.0	81	92.1	37	108.1	33	スルファモノメトキシシ	280.9	81	156.0	23	108.0	33	スルファキノキサリン	301.1	96	156.1	25	92.0	45	トリメトプリム	291.0	101	123.0	33	230.0	33	チアンフェニコール	354.0	-45	185.0	-28	289.9	-18
	プリカーサー イオン				DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																																							
		$m/z$	コリジョン エネルギー (eV)	$m/z$		コリジョン エネルギー (eV)																																									
スルファメトキサゾール	254.0	81	92.1	37	108.1	33																																									
スルファモノメトキシシ	280.9	81	156.0	23	108.0	33																																									
スルファキノキサリン	301.1	96	156.1	25	92.0	45																																									
トリメトプリム	291.0	101	123.0	33	230.0	33																																									
チアンフェニコール	354.0	-45	185.0	-28	289.9	-18																																									
保持時間 (min)	スルファメトキサゾール 3.1、スルファモノメトキシシ 3.4、 スルファキノキサリン 4.0、トリメトプリム 4.1、 チアンフェニコール 3.3																																														

**秤 取**

↓ 試料 10 g

**抽 出**

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

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 下層を綿栓ろ過

↓ ギ酸(特級) 1 mL を加えてアセトニトリルで 100 mL に定容

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

↓ アセトニトリル 5 mL で予備洗浄

↓ 抽出液 5 mL を注入(全溶出液を採取)

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

↓ 水で 20 mL に定容

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-6 スルファメキサゾール、スルファモノメキシシ、スルファキノキサリン、トリメプリーム及びチアンフェニコール試験法の分析法フローチャート

表 1-7 測定条件 (エンロフロキサシン (シプロフロキサシンとの和) 及びノルフロキサシン試験法)

LC 条件																																	
カラム	Mightysil RP-18GP (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm : 関東化学製)																																
移動相流速(mL/min)	0.2																																
注入量(μL)	2																																
カラム温度(°C)	40																																
移動相	A液: 1 vol%ギ酸含有50 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B液: アセトニトリル																																
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>18.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>18.01</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>25.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	90	10	8.0	50	50	12.0	10	90	18.0	10	90	18.01	90	10	25.0	90	10											
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																															
0.0	90	10																															
8.0	50	50																															
12.0	10	90																															
18.0	10	90																															
18.01	90	10																															
25.0	90	10																															
MS 条件																																	
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																																
イオン化モード	ESI(+)																																
イオンスプレー電圧(V)	5500																																
ヒーター温度(°C)	300																																
ネブライザーガス	空気、50 psi																																
ターボガス	空気、80 psi																																
コリジョンガス	窒素																																
定量イオン(m/z)、定性イオン(m/z)																																	
	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th rowspan="2">プリカーサーイオン</th> <th rowspan="2">DP (V)</th> <th colspan="2">プロダクトイオン① (定量用)</th> <th colspan="2">プロダクトイオン② (定性用)</th> </tr> <tr> <th>(m/z)</th> <th>コリジョンエネルギー(eV)</th> <th>(m/z)</th> <th>コリジョンエネルギー(eV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>エンロフロキサシン</td> <td>360.1</td> <td>46</td> <td>316.1</td> <td>27</td> <td>245.1</td> <td>37</td> </tr> <tr> <td>シプロフロキサシン</td> <td>332.2</td> <td>9</td> <td>314.2</td> <td>31</td> <td>231.1</td> <td>49</td> </tr> <tr> <td>ノルフロキサシン</td> <td>320.0</td> <td>66</td> <td>302.0</td> <td>23</td> <td>276.0</td> <td>23</td> </tr> </tbody> </table>		プリカーサーイオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)		(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)	(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)	エンロフロキサシン	360.1	46	316.1	27	245.1	37	シプロフロキサシン	332.2	9	314.2	31	231.1	49	ノルフロキサシン	320.0	66	302.0	23	276.0	23
	プリカーサーイオン				DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																									
		(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)	(m/z)		コリジョンエネルギー(eV)																											
エンロフロキサシン	360.1	46	316.1	27	245.1	37																											
シプロフロキサシン	332.2	9	314.2	31	231.1	49																											
ノルフロキサシン	320.0	66	302.0	23	276.0	23																											
保持時間(min)	エンロフロキサシン 5.6、シプロフロキサシン 5.2、ノルフロキサシン 5.0																																

**秤 取**

↓ 試料 5 g

**抽 出**

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

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 綿栓ろ過

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

↓ 抽出液を 10 mL 分取

**濃 縮**

↓ 約 3 mL まで濃縮

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

↓ メタノール 5 mL、水 10 mL でコンディショニング

↓ 濃縮液を注入

↓ 水 5 mL で洗浄

↓ メタノール 5 mL で溶出(全溶出液を採取)

↓

**濃縮(溶媒除去)**

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

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-7 エンロフロキサシン (シプロフロキサシンとの和) 及びノルフロキサシン試験法の分析法フローチャート

表 1-8 測定条件 (クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン及びドキシサイクリン試験法)

LC 条件					
カラム	L-column2 ODS (メタルフリー) (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm : 化学物質評価研究機構製)				
移動相流速 (mL/min)	0.2				
注入量 (μL)	1				
カラム温度 (°C)	30				
移動相	A 液: 水及び酢酸の混液 (1000:1) B 液: アセトニトリル				
グラジエント条件	時間 (分)		A 液 (%)	B 液 (%)	
	0.00		95	5	
	10.00		0	100	
	12.00		0	100	
	12.01		95	5	
	16.00		95	5	
MS 条件					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出				
イオン化モード	ESI (+)				
インターフェイス電圧 (kV)	4.0				
インターフェイス温度 (°C)	300				
脱溶媒管温度 (°C)	250				
ヒートブロック温度 (°C)	400				
ネブライザーガス	窒素、3 L/hr				
ドライイングガス	窒素、10 L/hr				
ヒーティングガス	空気、10 L/hr				
コリジョンガス	アルゴン				
定量イオン (m/z)、定性イオン (m/z)					
		プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)	
		(m/z)	コリジョン エネルギー (eV)	(m/z)	コリジョン エネルギー (eV)
クロルテトラサイクリン	479.0	444.1	21	154.1	28
4- <i>epi</i> -クロルテトラサイクリン					
オキシテトラサイクリン	461.0	426.2	21	443.2	14
4- <i>epi</i> -オキシテトラサイクリン					
テトラサイクリン	445.0	410.2	20	427.2	15
4- <i>epi</i> -テトラサイクリン					
ドキシサイクリン	445.0	428.2	20	154.1	30
保持時間 (min)	クロルテトラサイクリン 5.0、4- <i>epi</i> -クロルテトラサイクリン 4.4、				

オキシテトラサイクリン 4.3、4- <i>epi</i> -オキシテトラサイクリン 4.0、 テトラサイクリン 4.4、4- <i>epi</i> -テトラサイクリン 3.9、ドキシサイクリン 5.0
--

**秤 取**

↓ 試料 5 g

**10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有マッキルベイン緩衝液 (pH 4.0) 抽出**

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

↓ 1 分間ホモジナイズ

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

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

↓ メタノール及び水各 5 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 10 mL を注入

↓ 水 20 mL で洗浄

↓ 水及びメタノールの混液 (4:1) 10 mL で洗浄

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

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

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-8 クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン及びドキシサイクリン試験法の分析法フローチャート

表 1-9 測定条件 (フロルフェニコール試験法)

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

秤 取

↓ 試料 10 g

加水分解及び抽出

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

↓ 30 分間放冷

↓ 水 10 mL 及びヘキサン 40 mL を加え、5 分間振とう

↓ 3000 r/min で 5 分間遠心分離

↓ ヘキサン層除去

↓ 抽出液にケイソウ土 [セライト 545] 2 g 加え混合

↓ 吸引ろ過

↓ アセトン及び水の混液 (1:1) 20 mL で洗浄

↓ ろ液を合わせて水で 100 mL に定容

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

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

↓ 混合液を注入、30 分間放置

↓ 酢酸エチル 30 mL で溶出 (全溶出液を採取)

濃縮 (溶媒除去)

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

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

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

↓ 溶解液を注入

↓ 0.1 vol% 酢酸及びメタノールの混液 (1:1) 3 mL で洗浄

↓ メタノール 2 mL で洗浄

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

濃縮 (溶媒除去)

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

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1-9 フロルフェニコール試験法の分析法フローチャート

表 1-10 測定条件 (アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリン試験法)

LC 条件																											
カラム	ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.8 $\mu\text{m}$ :Agilent Technologies 製)																										
移動相流速 (mL/min)	0.4																										
注入量 ( $\mu\text{L}$ )	5																										
カラム温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	40																										
移動相	A液:水及び酢酸の混液(1000:1) B液:メタノール及び酢酸の混液(1000:1)																										
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>12.01</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>16.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>						時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	100	0	5.0	85	15	10.0	5	95	12.0	5	95	12.01	100	0	16.0	100	0
時間(分)	A液(%)	B液(%)																									
0.0	100	0																									
5.0	85	15																									
10.0	5	95																									
12.0	5	95																									
12.01	100	0																									
16.0	100	0																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
イオン化モード	ESI(+)																										
イオンスプレー電圧 (V)	5500																										
ヒーター温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	350																										
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 ( $m/z$ )、定性イオン ( $m/z$ )																											
	プリカーサーイオン	DP (V)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)																						
			( $m/z$ )	コリジョンエネルギー (eV)	( $m/z$ )	コリジョンエネルギー (eV)																					
アモキシシリン	366.0	16	113.9	25	349.0	11																					
アモキシシリン- $d_4$	370.0	21	353.0	13	-	-																					
アンピシリン	350.0	26	105.9	21	114.0	41																					
アンピシリン- $d_5$	355.0	26	110.9	23	-	-																					
ベンジルペニシリン	334.9	36	160.0	15	176.0	17																					
ペニシリン G- $d_7$	342.0	41	183.0	19	-	-																					
保持時間 (min)	アモキシシリン 3.5、アンピシリン 7.2、ベンジルペニシリン 9.0																										

### 秤取

↓ 試料 5 g

↓ 0.17 mol/L 硫酸 5 mL 及び 5% タングステン酸ナトリウム溶液 5 mL を加えスパークルで混合

↓ 5 mg/L 内標準溶液を 0.125 mL 添加

### 抽出

↓ アセトン及びリン酸塩緩衝液 (pH 6.0) ②の混液 (1:1) 40 mL を加えホモジナイズ

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ ろ紙 (直径 125 mm、No. 5A、ADVANTEC 製) でろ過

↓ ろ液 2 mL 分取

### pH 調整

↓ 0.1 mol/L 炭酸アンモニウム溶液 20 mL を加え pH 8.0 を確認

### クロロホルム洗浄

↓ クロロホルム 20 mL を加え 5 分間振とう

↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離

↓ 上層分取

↓ 窒素ガスでクロロホルムを留去

### 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 [InertSep HLB (200 mg/6 mL)]

↓ アセトニトリル 10 mL、水 10 mL、0.1 mol/L 炭酸アンモニウム溶液 10 mL でコンディショニング

↓ 上記で得られた溶液を注入

↓ 0.1 mol/L 炭酸アンモニウム溶液 5 mL で 3 回洗浄

↓ アセトニトリル及び水の混液 (1:1) 5 mL で溶出 (全溶出液を採取)

### 濃縮 (溶媒除去)

↓ 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 4 mL に溶解

↓ 2 mL 分取し、50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液で 5 mL に定容

### 試験溶液

↓

### LC-MS/MS

図1-10 アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリン試験法の分析法フローチャート

表 1-11 測定条件（ノシヘプタイト試験法）

LC 条件	
カラム	Mightysil RP-18 GP (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm : 関東化学株式会社製)
検出器	蛍光光度型検出器 (FL)
移動相流速 (mL/min)	1.0
注入量 (μL)	20
カラム温度 (°C)	40
移動相	メタノール、水及び酢酸の混液 (65:35:1)
励起波長 (nm)	365
蛍光波長 (nm)	515
保持時間	9.0

秤 取

↓ 試料 10 g

抽 出

↓ 5%酢酸 20 mL 及びアセトン 100 mL を加え 1 分間ホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ ろ過器上の残留物にアセトン 50 mL を加え 1 分間ホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18 (1,000 mg/6 mL)]

↓ メタノール 5 mL、5%酢酸 5 mL でコンディショニング

↓ 抽出液 10 mL に水 50 mL 及び酢酸 0.5 mL を加えて負荷

↓ 水、メタノール及び酢酸の混液 (50:50:1) 10 mL で洗浄

↓ メタノール、水及び酢酸の混液 (95:5:1) 5 mL で溶出 (全溶出液を採取)

↓ メタノール、水及び酢酸の混液 (95:5:1) で 5 mL に定容

試験溶液

↓

HPLC

図 1-11 ノシヘプタイト試験法の分析法フローチャート

表 1-12 測定条件 (エンラマイシン試験法)

LC 条件																					
カラム	ACQUITY UPLC BEH C8 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 $\mu$ m : Waters 製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.4																				
注入量 ( $\mu$ L)	5																				
カラム温度 ( $^{\circ}$ C)	40																				
移動相	A液: 水及び酢酸の混液 (1000:1) B液: アセトニトリル及び酢酸の混液 (1000:1)																				
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>1.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>6.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>6.01</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	95	5	1.0	95	5	6.0	40	60	6.01	95	5	10.0	95	5
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																			
0.0	95	5																			
1.0	95	5																			
6.0	40	60																			
6.01	95	5																			
10.0	95	5																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																				
イオン化モード	ESI(+)																				
イオンスプレー電圧 (V)	4500																				
ヒーター温度 ( $^{\circ}$ C)	500																				
ネブライザーガス	空気、30 psi																				
ターボガス	空気、70 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン ( $m/z$ )	785.9 $\rightarrow$ 1089.2 [DP:91 (V)、コリジョンエネルギー:35 (eV)]																				
定性イオン ( $m/z$ )	785.9 $\rightarrow$ 179.1 [DP:91 (V)、コリジョンエネルギー:35 (eV)]																				
保持時間 (min)	3.7																				

**秤 取**

↓ 試料 5 g

**抽 出**

- ↓ クエン酸抽出液 50 mL 及びジクロロメタン 25 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 上清分取
- ↓ 残留物にクエン酸抽出液 25 mL を加え 5 分間振とう
- ↓ 3500 r/min で 5 分間遠心分離
- ↓ 上清を合わせガラスろ紙(直径 40 mm、GA-200、ADVANTEC 製)で吸引ろ過
- ↓ ろ液をクエン酸抽出液で 100 mL に定容
- ↓ 5 mL 分取
- ↓ 窒素ガスでジクロロメタンを留去

**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 [InertSep HLB (200 mg/6 mL)]**

- ↓ メタノール 5 mL、水 5 mL でコンディショニング
- ↓ 上記で得られた溶液に水 7 mL を加え注入
- ↓ 水及びメタノールの混液(7:3) 5 mL で 2 回洗浄

**アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak Plus NH<sub>2</sub> (360 mg)]**

- ↓ メタノール 5 mL、メタノール及び水の混液(4:1) 5 mL でコンディショニング
- ↓ 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の下に接続
- ↓ メタノール及び水の混液(4:1) 5 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(1:1) 2.5 mL に溶解

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

図 1-12 エンラマイシン試験法の分析法フローチャート

(1) タイロシン及びチルミコシン試験法

表2-1 タイロシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
70	1回目	60.07	63.47	66.58	74.92	66.03	65.52	93.6	5.1	6.5
	2回目	65.37	64.29	66.23	67.78	60.50				

表2-2 チルミコシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
70	1回目	75.93	77.52	81.55	77.14	77.02	76.90	109.9	3.2	3.2
	2回目	77.20	76.70	74.96	77.76	73.26				

(2) チルバロシン試験法

表2-3 チルバロシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.88	10.26	9.19	9.19	8.65	9.25	92.5	7.0	7.0
	2回目	9.29	8.43	9.35	9.86	8.40				

表2-4 3-O-アセチルタイロシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.65	9.19	8.76	8.40	7.79	8.82	88.2	5.6	7.1
	2回目	9.58	8.06	9.17	8.89	8.67				

(3) リンコマイシン試験法

表2-5 リンコマイシン真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	105.76	98.96	97.04	98.04	93.72	98.91	98.9	2.6	3.3
	2回目	100.44	98.12	96.80	101.52	98.72				

(4) ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシン試験法

表2-6 ストレプトマイシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	99	87	102	108	100	95	94.9	9.3	9.3
	2回目	90	92	97	96	78				

表2-7 ジヒドロストレプトマイシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	86	94	111	108	84	95	95.1	5.5	14.2
	2回目	95	89	109	104	72				

(5) カナマイシン試験法

表 2-8 カナマイシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	109	107	108	124	120	116	115.7	3.2	7.2
	2回目	108	114	115	127	126				

(6) スルファメトキサゾール、スルファモノメトキシシ、スルファキノキサリン、トリメトプリム及びチアンフェニコール試験法

表2-9 スルファメトキサゾールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.5	8.9	8.4	8.7	7.9	8.9	88.7	3.7	11.0
	2回目	10.2	9.1	7.6	9.1	8.3				

表2-10 スルファモノメトキシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.5	8.8	8.5	8.0	9.1	9.0	89.5	6.0	8.1
	2回目	9.5	8.2	8.6	9.3	9.0				

表2-11 スルファキノキサリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.7	8.7	8.3	8.5	8.4	8.6	86.4	4.6	6.2
	2回目	8.9	8.7	7.8	8.4	9.2				

表2-12 トリメトプリムの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.9	8.1	8.1	8.3	8.7	8.5	84.7	4.7	4.7
	2回目	8.5	9.2	8.0	8.4	8.4				

表2-13 チアンフェニコールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	9.2	9.3	9.9	9.7	8.5	9.1	91.1	7.3	7.3
	2回目	9.1	7.8	8.7	9.7	9.1				

(7) エンロフロキサシン（シプロフロキサシンとの和）及びノルフロキサシン試験法

表 2-14 エンロフロキサシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.5	9.7	9.4	9.5	11.2	9.7	97.2	7.6	7.6
	2回目	10.2	9.9	9.5	9.9	9.6				

表 2-15 ノルフロキサシン真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	7.8	8.2	8.2	7.9	9.5	8.2	82.5	5.1	7.5
	2回目	8.7	8.0	7.5	7.8	8.9				

表2-16 ノルフロキサシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	8.9	8.6	9.4	8.5	9.3	8.7	87.2	8.0	8.0
	2回目	9.7	8.9	7.8	8.2	8.1				

(8) クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン及びドキシサイクリン試験法

表2-17 クロルテトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	50.2	54.0	50.4	47.7	51.0	51.1	102.2	2.0	5.4
	2回目	51.5	55.9	52.5	47.5	50.2				

表2-18 4-*epi*-クロルテトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	47.2	49.5	45.8	43.7	45.1	46.6	93.2	3.2	4.8
	2回目	49.3	47.5	48.6	45.7	43.7				

表2-19 オキシテトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	55.7	56.6	54.8	50.9	53.1	54.8	109.5	2.5	4.4
	2回目	57.5	55.5	58.0	52.8	52.7				

表 2-20 4-*epi*-オキシテトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	53.4	55.8	53.3	49.6	53.5	54.1	108.1	2.8	5.1
	2回目	56.7	57.5	56.3	50.1	54.5				

表2-21 テトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	55.7	57.3	53.6	52.0	53.0	54.5	109.1	2.3	5.0
	2回目	58.6	56.6	55.6	50.8	52.2				

表2-22 4-*epi*-テトラサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	49.3	51.8	50.1	46.9	49.5	50.7	101.4	3.6	4.6
	2回目	51.8	53.2	54.4	48.5	51.6				

表2-23 ドキシサイクリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
50	1回目	46.5	49.2	45.0	43.2	45.5	46.3	92.6	2.6	5.9
	2回目	48.3	50.1	48.0	42.2	45.2				

(9) フロルフェニコール試験法

表2-24 フロルフェニコールの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
100	1回目	95	98	94	86	87	92	91.5	2.2	4.6
	2回目	91	93	95	88	89				

(10) アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリン試験法

表2-25 アモキシシリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
20	1回目	19.5	19.5	19.6	20.5	20.6	19.9	99.6	1.8	2.4
	2回目	19.4	20.3	19.7	19.7	20.4				

表2-26 アンピシリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
20	1回目	18.4	17.8	18.7	19.4	18.7	18.6	92.9	3.2	4.8
	2回目	17.7	18.6	18.4	20.5	17.5				

表2-27 ベンジルペニシリンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
20	1回目	18.7	19.5	18.9	20.7	20.9	19.7	98.5	2.4	4.4
	2回目	18.7	19.3	20.1	20.1	20.2				

(11) ノシヘプタイド試験法

表2-28 ノシヘプタイドの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
10	1回目	10.31	9.01	9.68	10.14	8.45	9.67	96.7	4.7	7.3
	2回目	10.77	9.18	10.08	9.51	9.59				

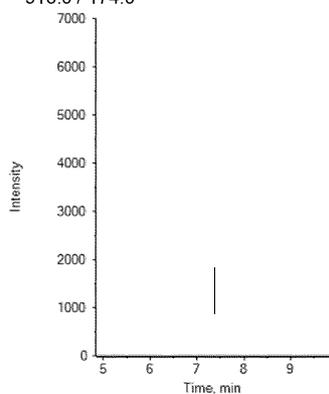
(12) エンラマイシン試験法

表 2-29 エンラマイシンの真度、併行精度及び室内精度

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	測定値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )							平均回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	試行	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均			
30	1回目	21.6	22.0	26.2	21.2	21.4	23.2	77.3	7.6	8.2
	2回目	23.4	21.7	24.9	25.6	23.9				

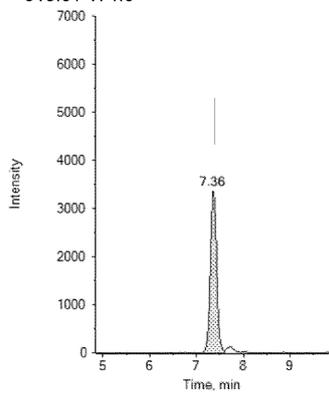
ブランク 試料

8/20/2021 5:34:43 AM  
916.0 / 174.0



添加試料

8/20/2021 5:55:16 AM  
916.0 / 174.0



標準溶液 (0.0025 mg/L)

8/20/2021 3:31:19 AM  
916.0 / 174.0

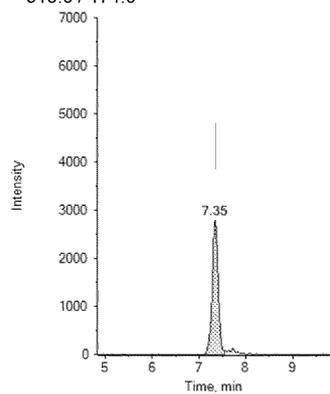
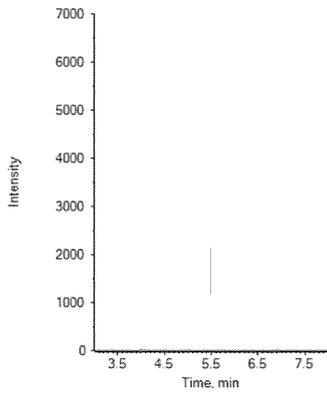


図 2-1 タイロシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  916.0→174.0)  
添加濃度 : 70  $\mu\text{g}/\text{kg}$

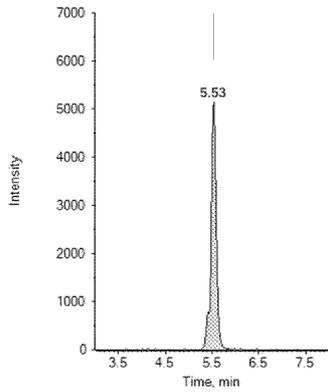
ブランク 試料

8/20/2021 5:34:43 AM  
869.3 / 696.4



添加試料

8/20/2021 5:55:16 AM  
869.3 / 696.4



標準溶液 (0.0025 mg/L)

8/20/2021 3:31:19 AM  
869.3 / 696.4

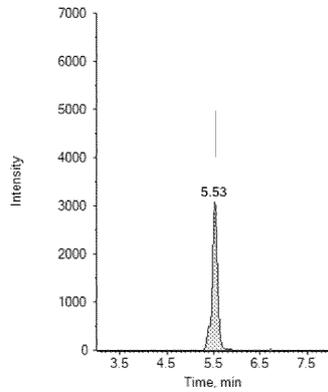
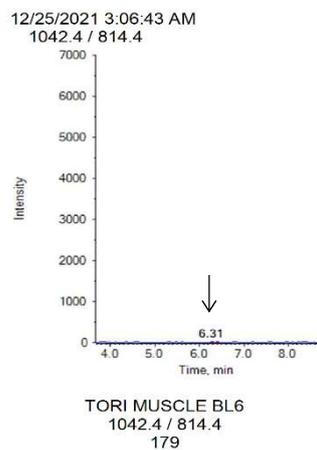


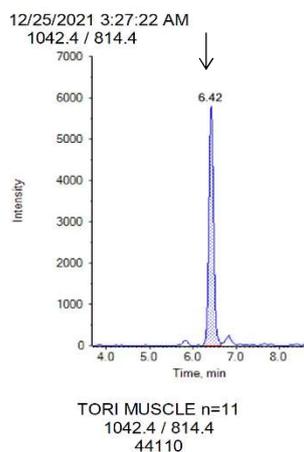
図 2-2 チルミコシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  869.3→696.4)

添加濃度 : 70  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.2  $\mu\text{g}/\text{L}$ )

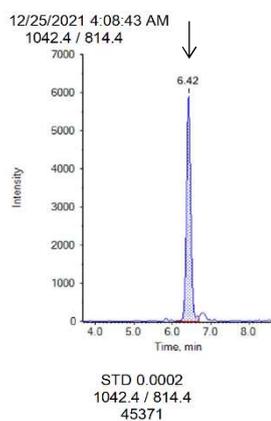
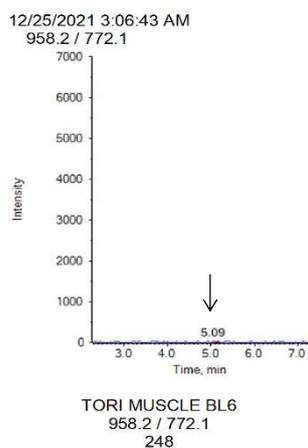


図 2-3 チルバロシンの SRM クロマトグラム

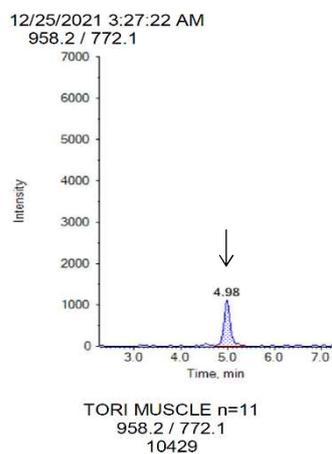
( $m/z$  1042.4→814.4)

添加濃度 : 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.2  $\mu\text{g}/\text{L}$ )

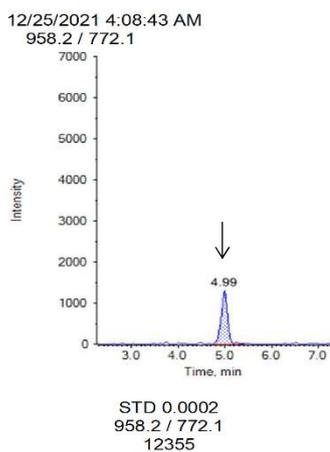


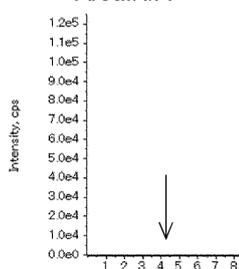
図 2-4 3-O-アセチルタイロシンの SRM クロマトグラム

( $m/z$  958.2→772.1)

添加濃度 : 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$

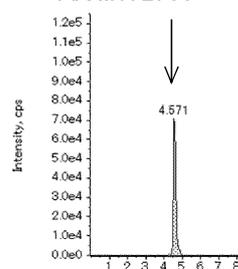
ブランク試料

Mass:407.1 / 126.0  
Area:N/A



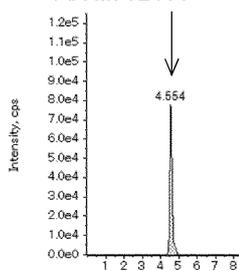
ブランク試料の内標準物質 (0.005 mg/L)

Mass:410.2 / 129.2  
Area:672736



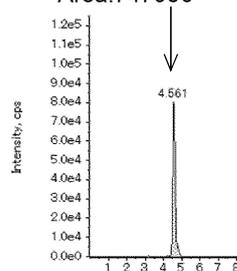
添加試料

Mass:407.1 / 126.0  
Area:702100



添加試料の内標準物質 (0.005 mg/L)

Mass:410.2 / 129.2  
Area:747956



標準溶液 (0.005 mg/L)  
(0.005 mg/L)

標準溶液 (0.005 mg/L) の内標準物質

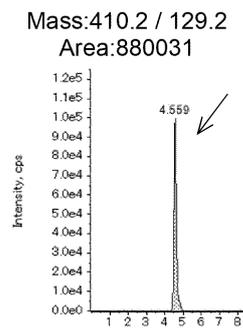
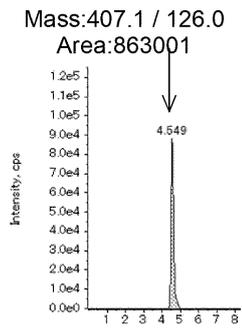
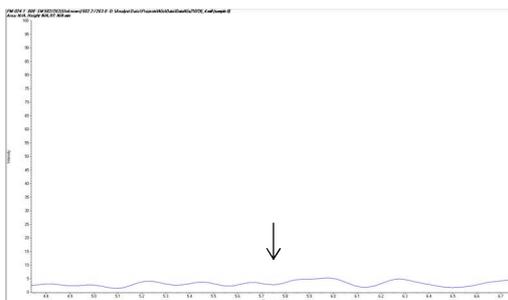
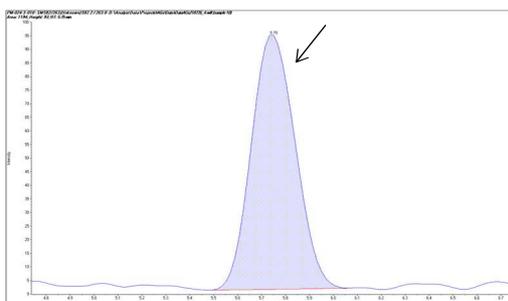


図 2-5 リンコマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  407.1→126.0)  
添加濃度 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.02 mg/L)

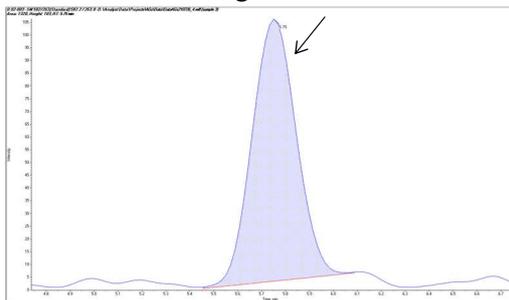
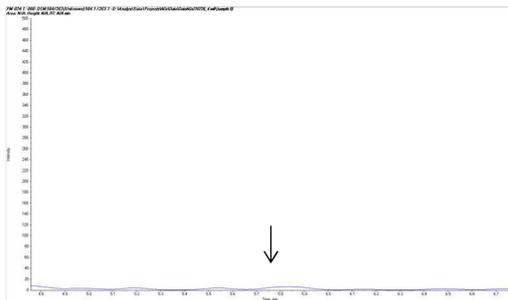
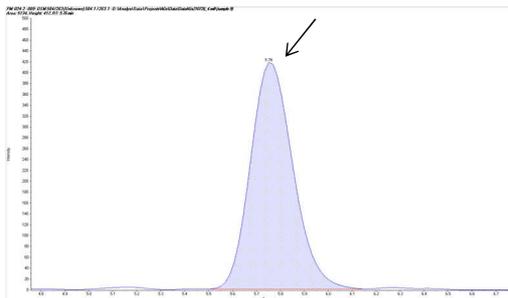


図 2-6 ストレプトマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  582.2→263.0)  
添加濃度 : 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.02 mg/L)

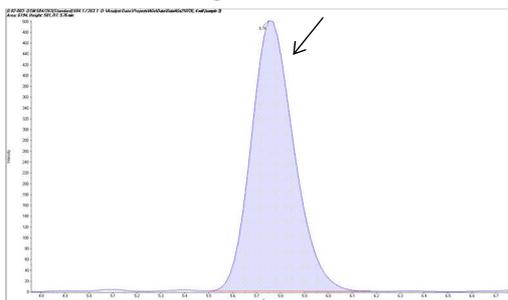
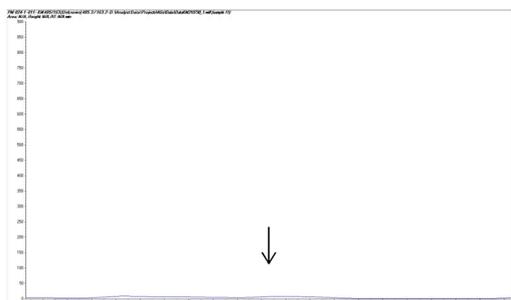
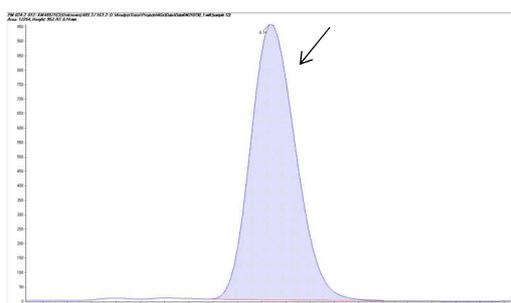


図 2-7 ジヒドロストレプトマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  584.1→263.1)  
添加濃度: 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.01 mg/L)

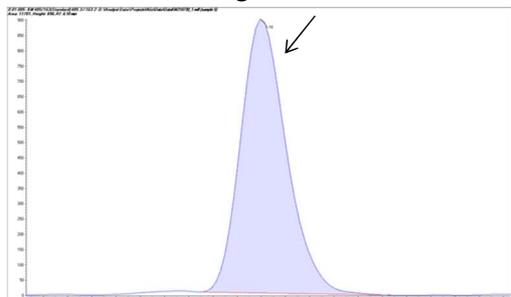
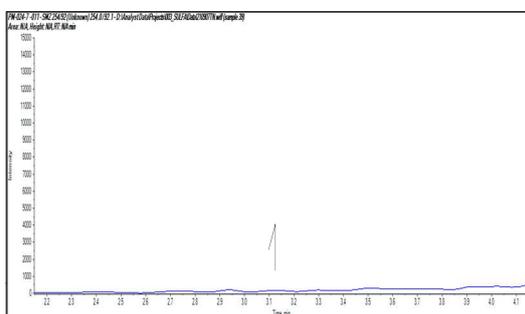


図 2-8 カナマイシン A の SRM クロマトグラム

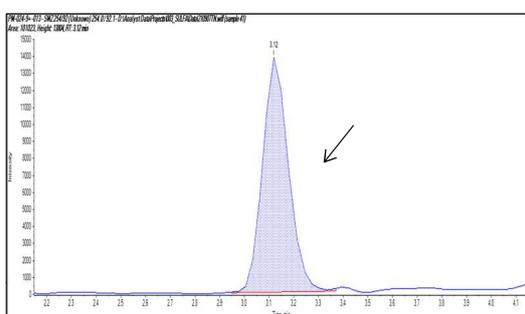
( $m/z$  485.3 $\rightarrow$ 163.2)

添加濃度 : 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$

### ブランク試料



### 添加試料



### 標準溶液 (0.00025 mg/L)

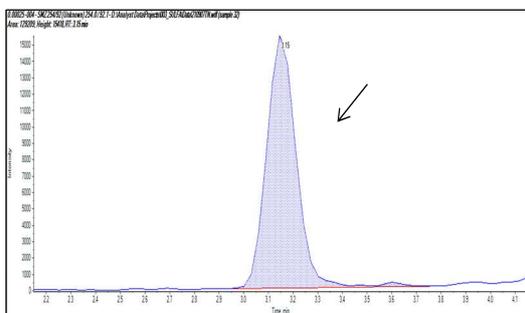
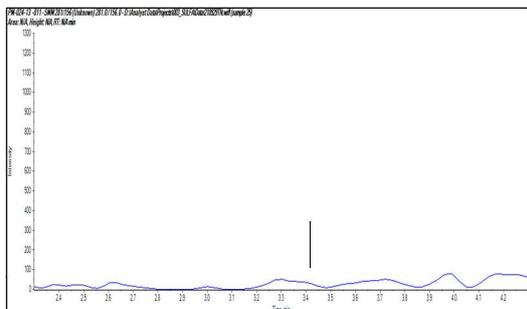
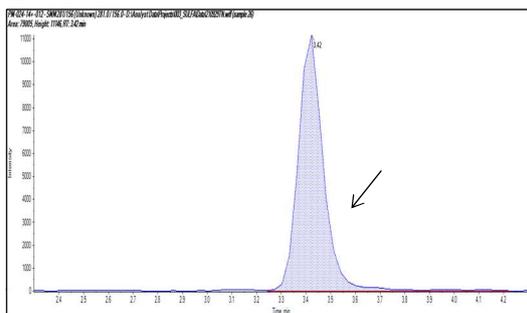


図 2-9 スルファメトキサゾールの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  254.0 $\rightarrow$ 92.1)  
添加濃度 : 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$

### ブランク試料



### 添加試料



### 標準溶液 (0.00025 mg/L)

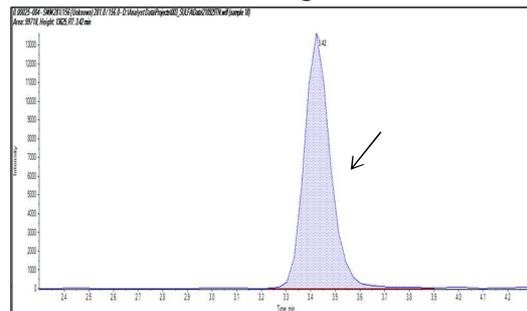
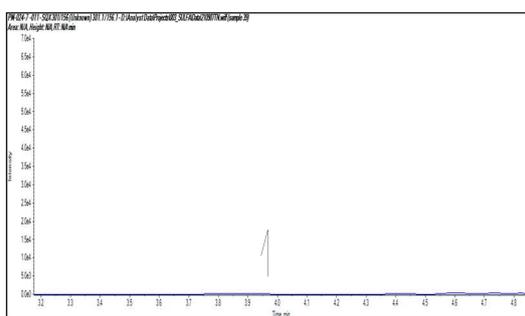
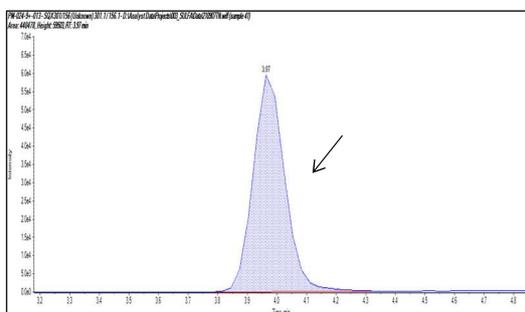


図 2-10 スルファモノメトキシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  280.9→156.0)  
添加濃度 : 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$

### ブランク試料



### 添加試料



### 標準溶液 (0.00025 mg/L)

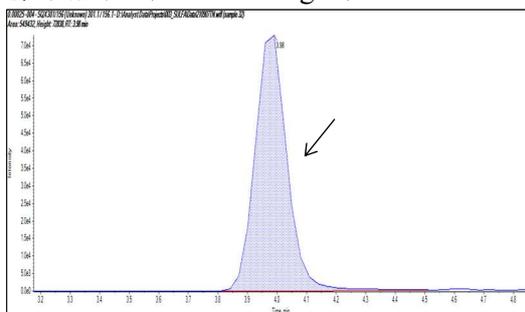
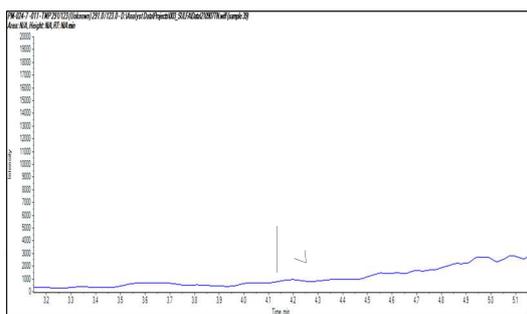


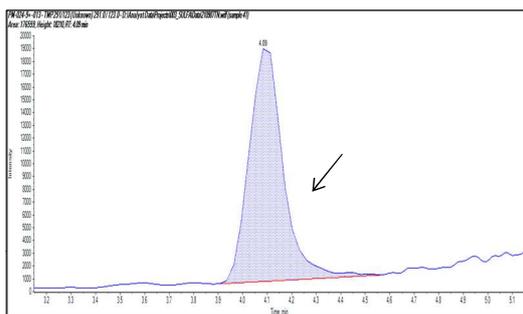
図 2-11 スルファキノキサリンの SRM クロマトグラム

( $m/z$  301.1 $\rightarrow$ 156.1)  
添加濃度 : 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.00025 mg/L)

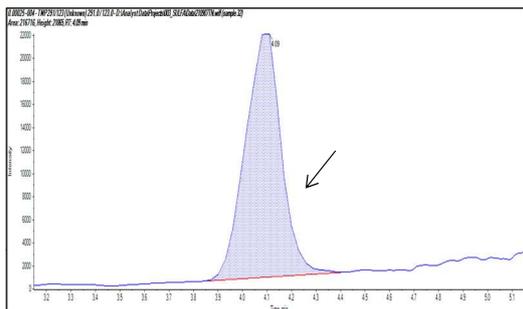
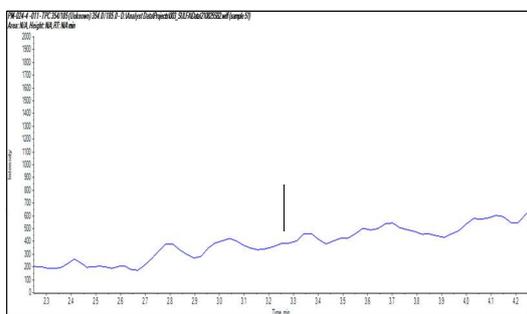
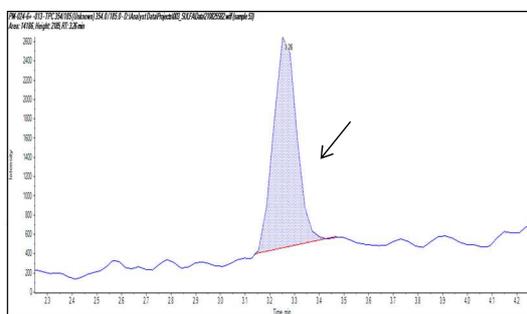


図 2-12 トリメトプリムの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  291.0→123.0)  
添加濃度：10  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.00025  $\text{mg}/\text{L}$ )

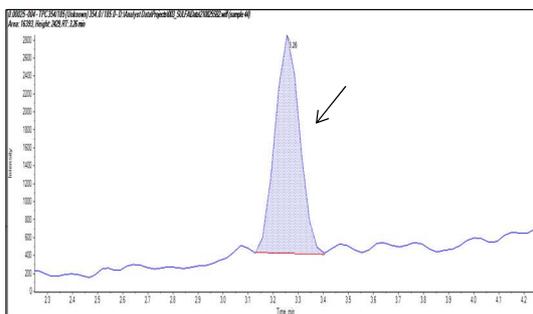
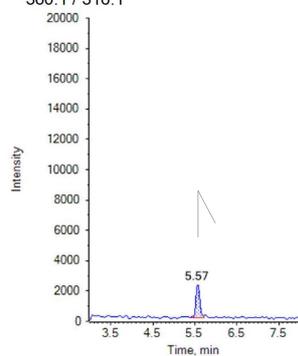


図 2-13 チアンフェニコールの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  354.0→185.0)  
添加濃度 : 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料

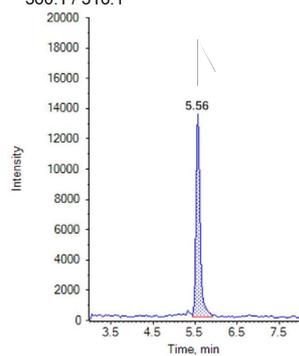
8/20/2021 2:31:46 AM  
360.1 / 316.1



tori DAY1 NEGA  
ERFX1  
14457

添加試料

8/20/2021 2:57:19 AM  
360.1 / 316.1



tori DAY1 ADD1  
ERFX1  
90737

標準溶液(0.5  $\mu\text{g/L}$ )

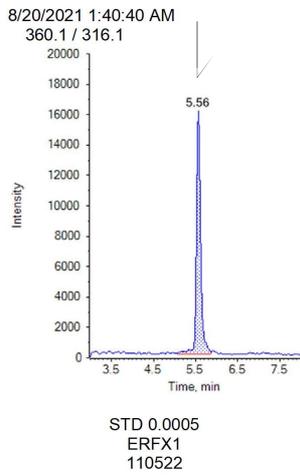
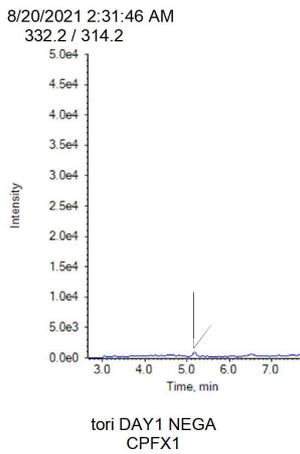


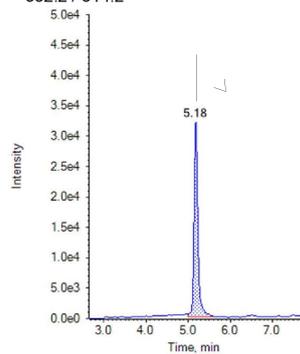
図 2-14 エンロフロキサシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  360.1→316.1)  
添加濃度: 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料

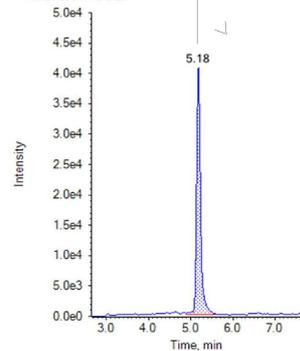
8/20/2021 2:57:19 AM  
332.2 / 314.2



tori DAY1 ADD1  
CPFX1  
204496

標準溶液(0.5  $\mu\text{g/L}$ )

8/20/2021 1:40:40 AM  
332.2 / 314.2



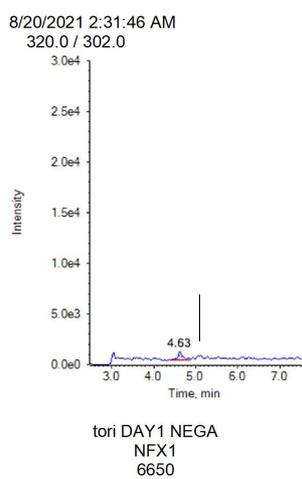
STD 0.0005  
CPFX1  
270353

図 2-15 シプロフロキサシンの SRM クロマトグラム

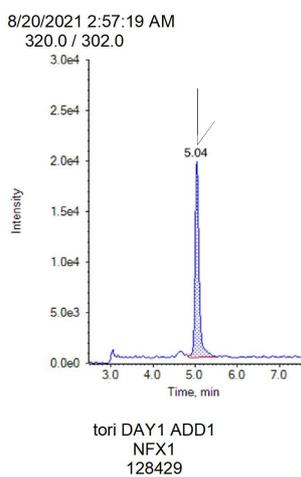
( $m/z$  332.2 $\rightarrow$ 314.2)

添加濃度: 10  $\mu\text{g/kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液(0.5 µg/L)

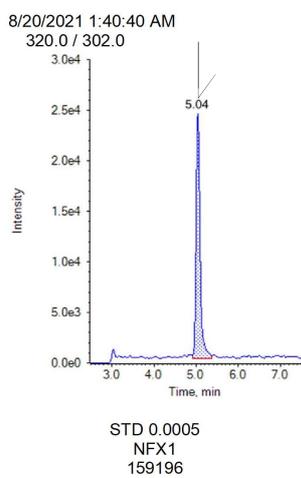
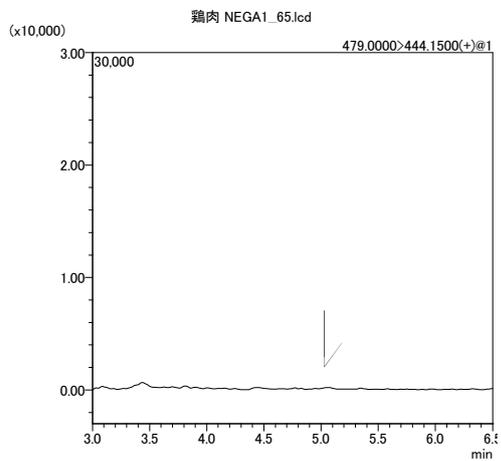


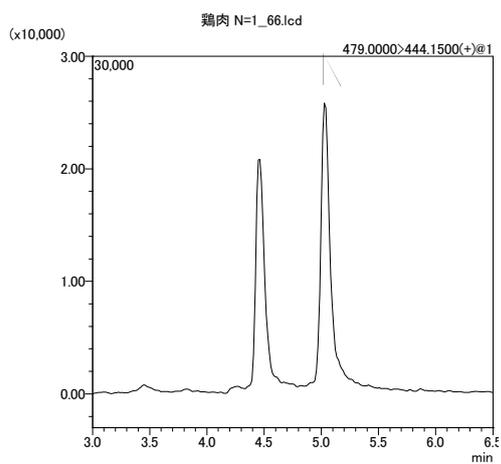
図 2-16 ノルフロキサシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  320.0→302.0)

添加濃度: 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

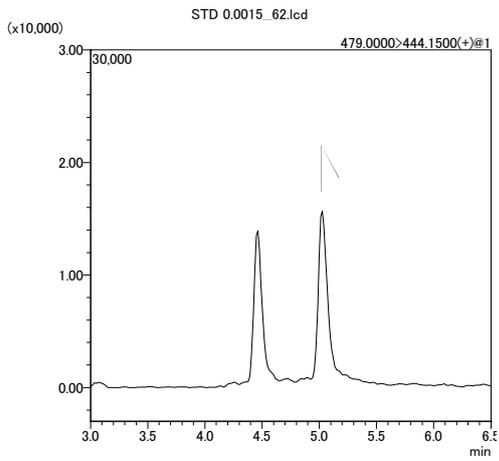
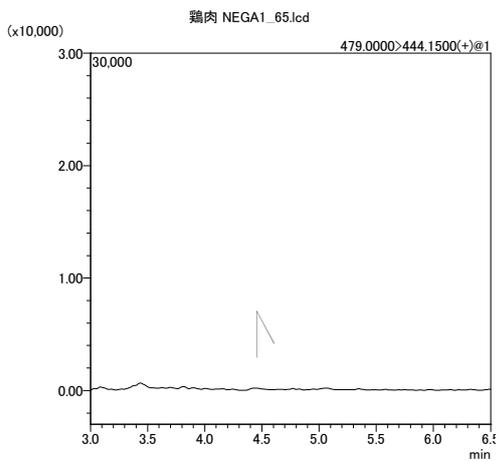
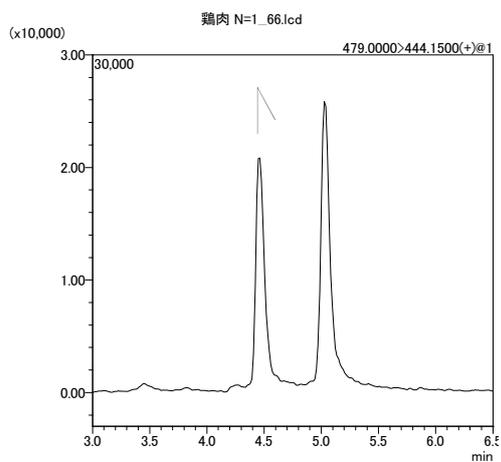


図 2-17 クロルテトラサイクリンの SRM クロマトグラム  
 ( $m/z$  479.0→444.1)  
 添加濃度：50  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

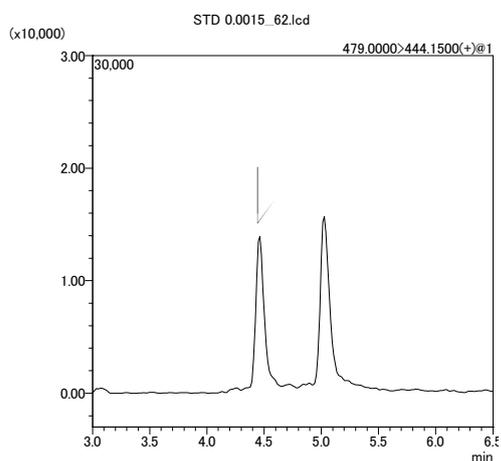
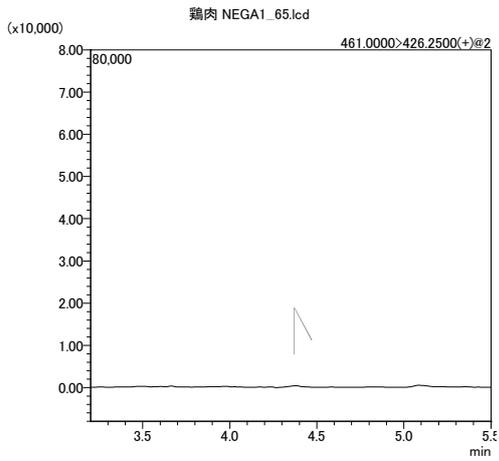
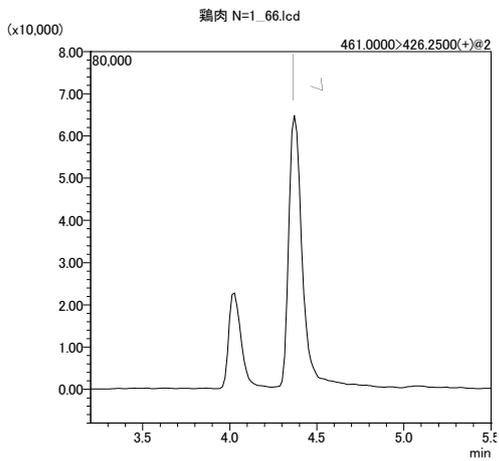


図 2-18 4-*epi*-クロルテトラサイクリンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  479.0→444.1)  
添加濃度 : 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

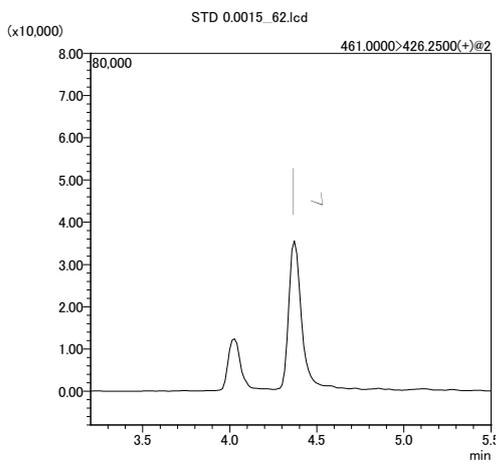
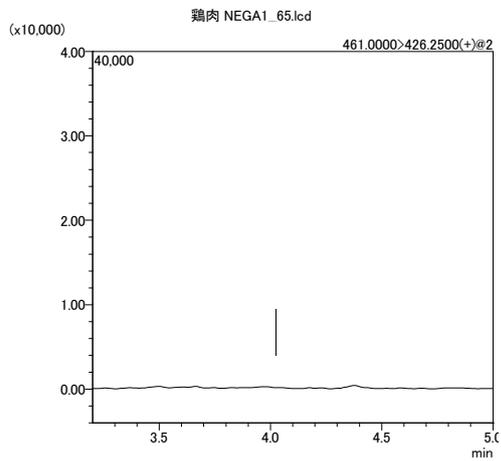


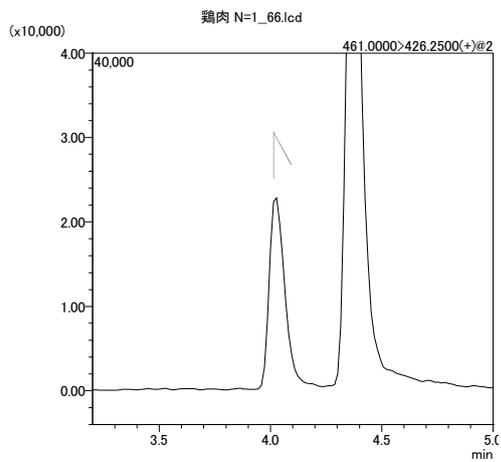
図 2-19 オキシテトラサイクリンの SRM クロマトグラム

( $m/z$  461.0→426.2)  
添加濃度 : 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

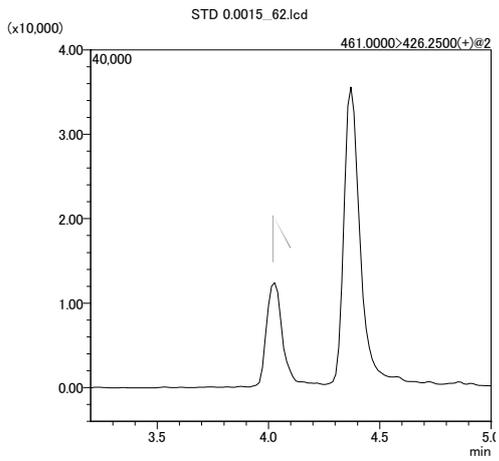
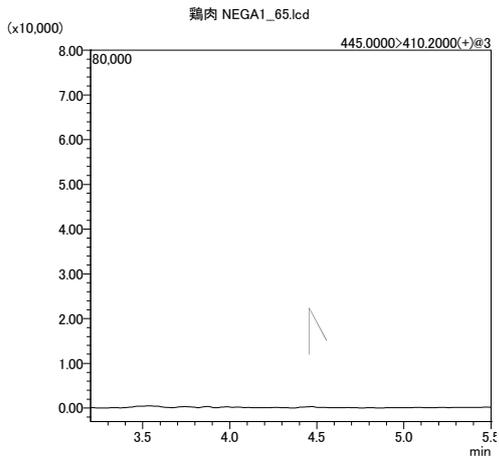
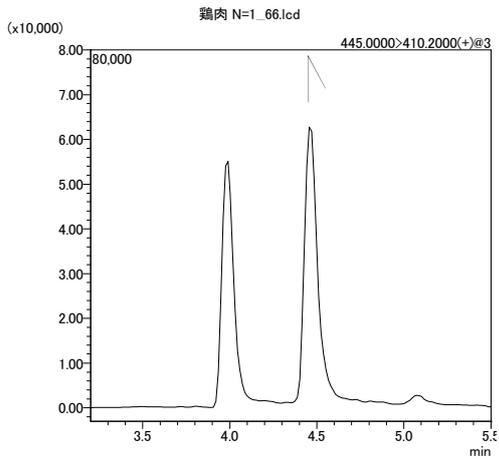


図 2-20 4-*epi*-オキシテトラサイクリンの SRM クロマトグラム  
 ( $m/z$  461.0→426.2)  
 添加濃度：50  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

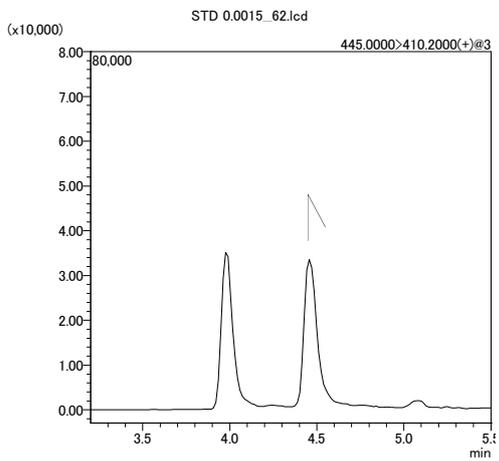
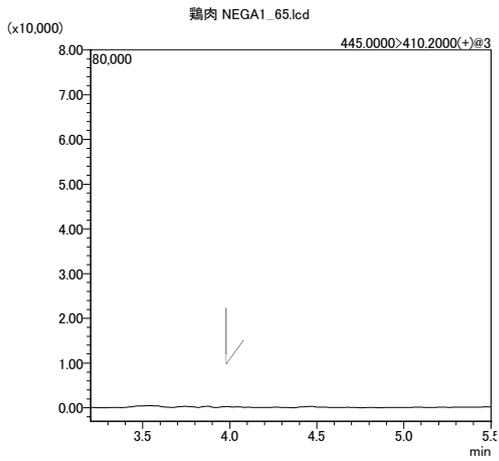
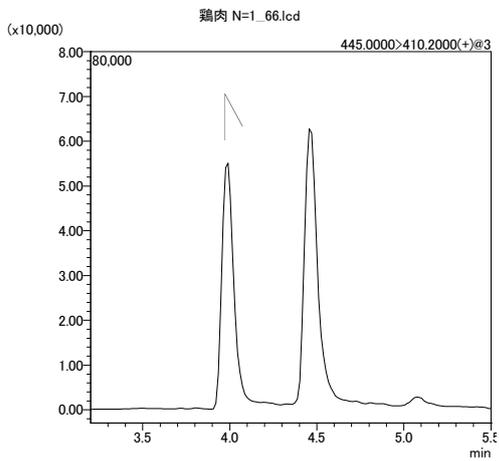


図 2-21 テトラサイクリンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  445.0→410.2)  
添加濃度 : 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク 試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

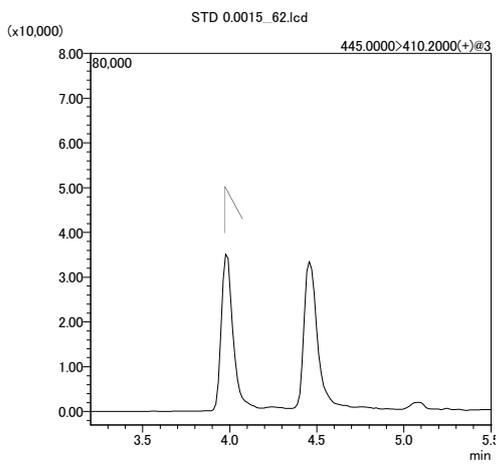
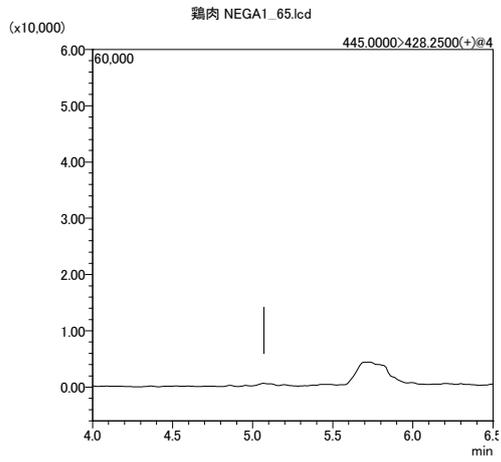


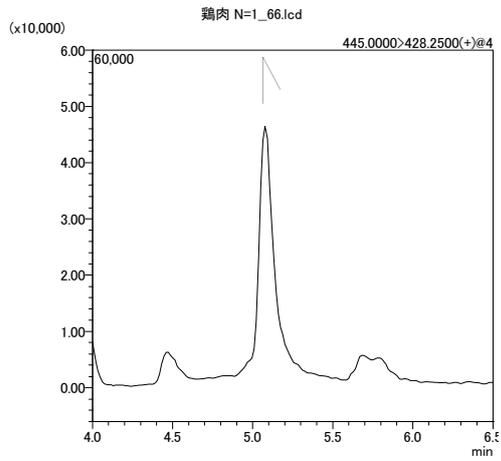
図 2-22 4-*epi*-テトラサイクリンの SRM クロマトグラム

( $m/z$  445.0→410.2)  
添加濃度 : 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0015 mg/L)

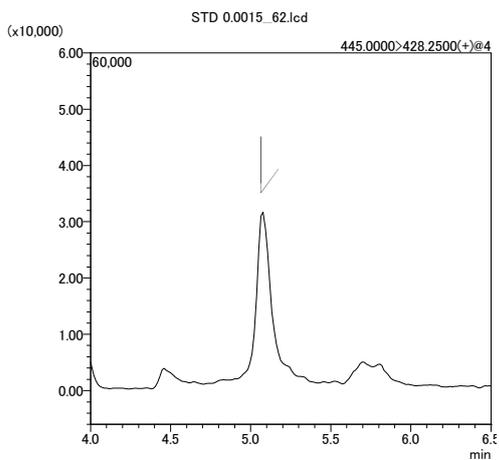
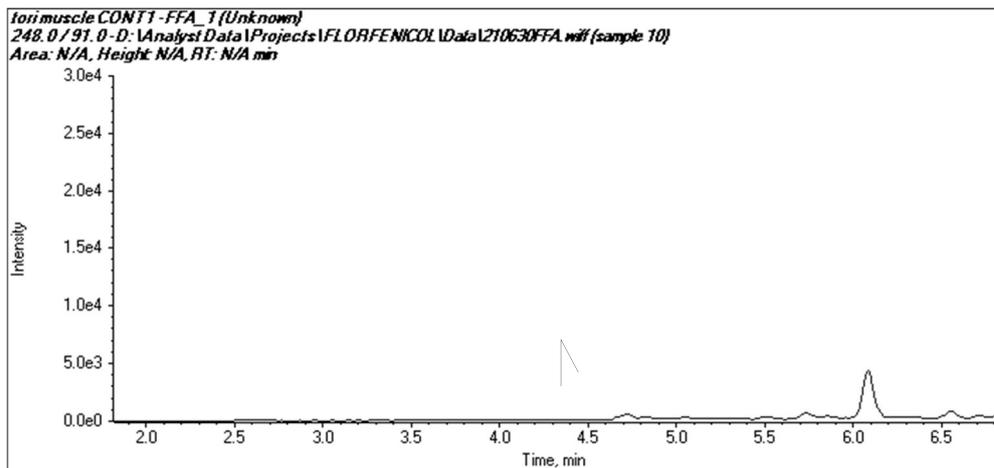
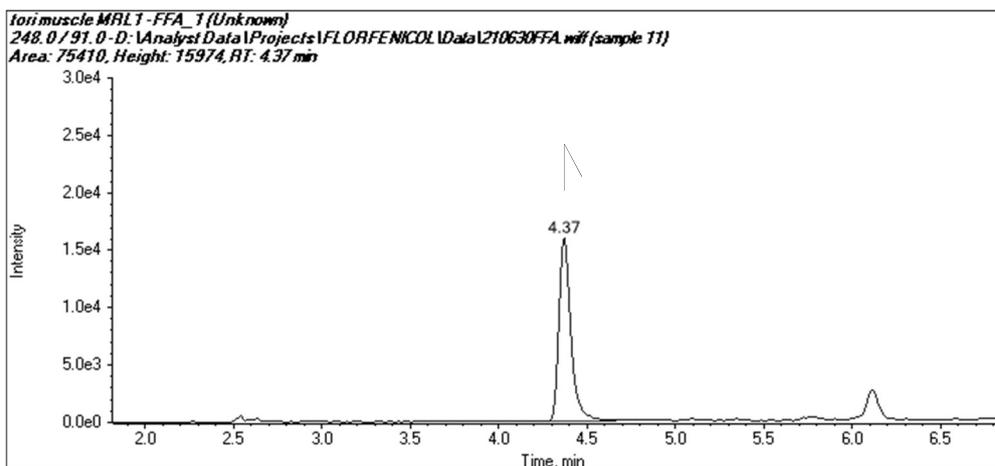


図 2-23 ドキシサイクリンの SRM クロマトグラム  
 ( $m/z$  445.0→428.2)  
 添加濃度 : 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.005 mg/L)

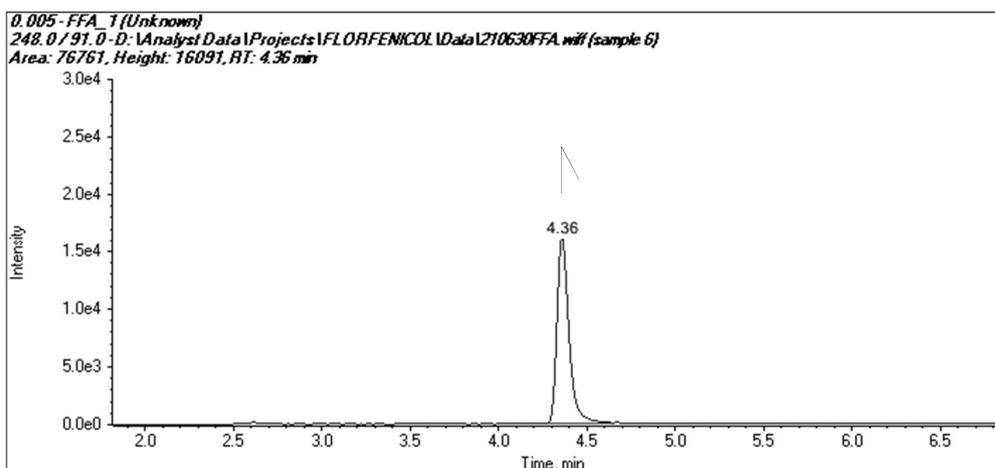
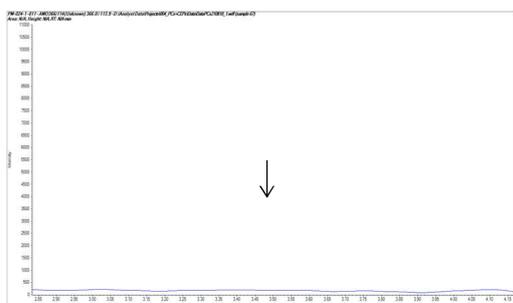
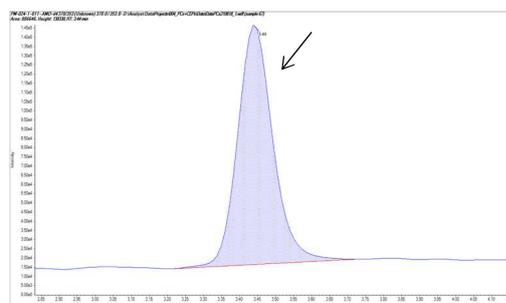


図 2-24 フロルフェニコールアミンの SRM クロマトグラム  
 ( $m/z$  248.0→91.0)  
 添加濃度 : 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料  
 L)

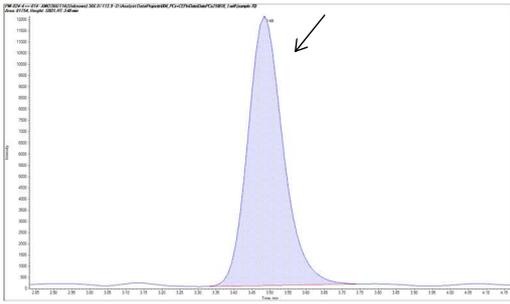


ブランク試料の内標準物質 (0.0025 mg/L)

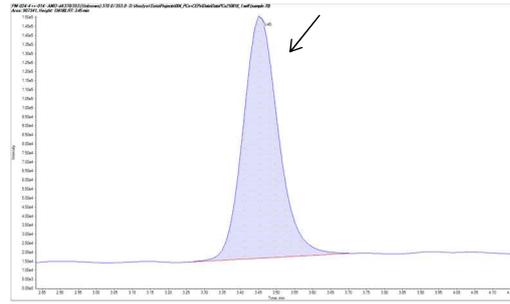


添加試料

添加試料の内標準物質 (0.0025 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L)  
025 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L) の内標準物質 (0.025 mg/L)

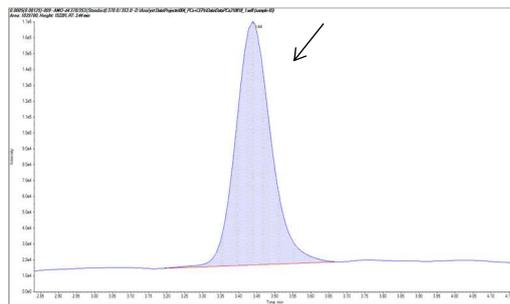
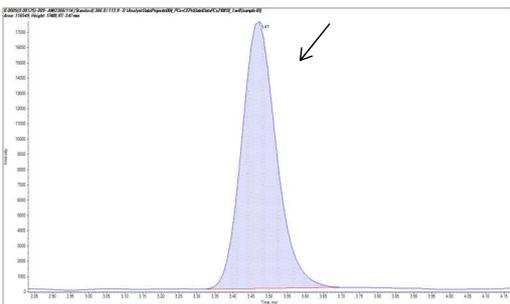
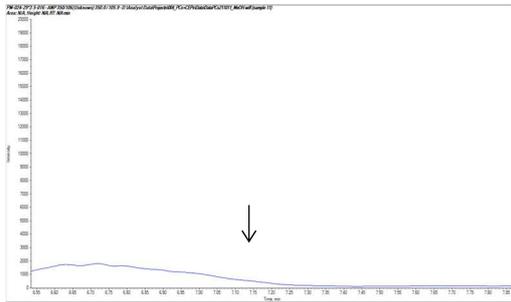
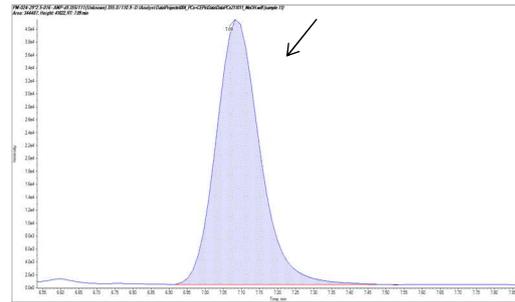


図 2-25 アモキシシリンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  366.0→113.9)  
添加濃度 : 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$

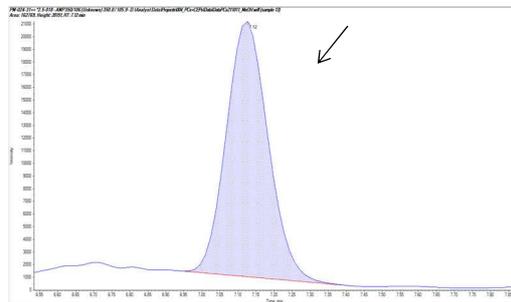
ブランク試料



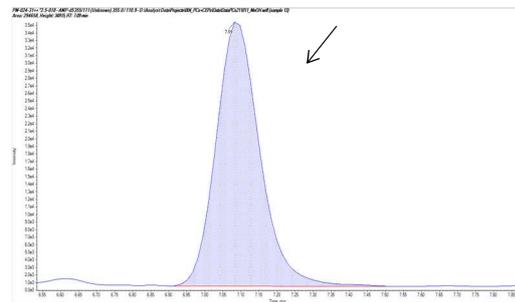
ブランク試料の内標準物質 (0.0025 mg/L)



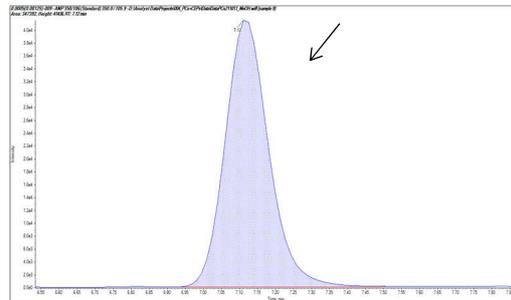
添加試料



添加試料の内標準物質 (0.0025 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L)  
0025 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L) の内標準物質 (0.

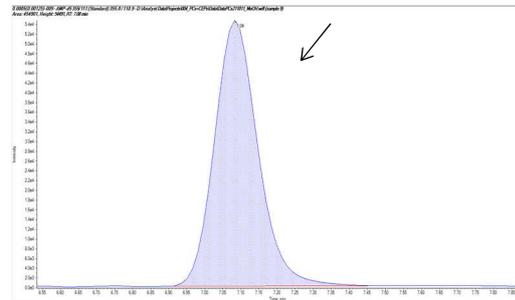
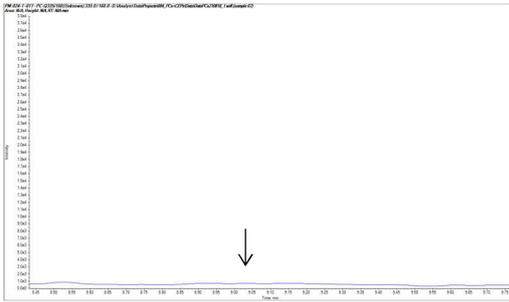
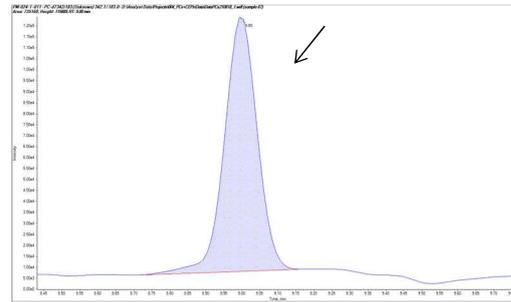


図 2-26 アンピシリンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  350.0 $\rightarrow$ 105.9)  
添加濃度 : 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$

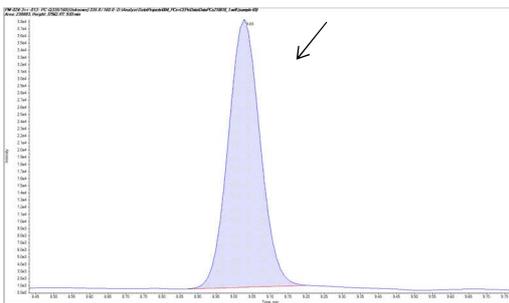
ブランク試料



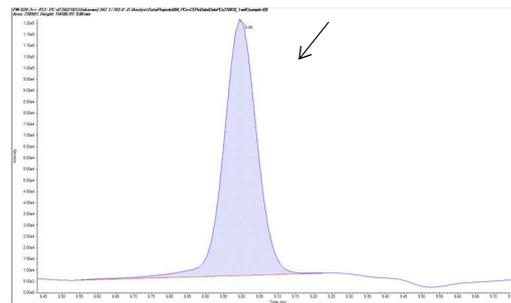
ブランク試料の内標準物質 (0.0025 mg/L)



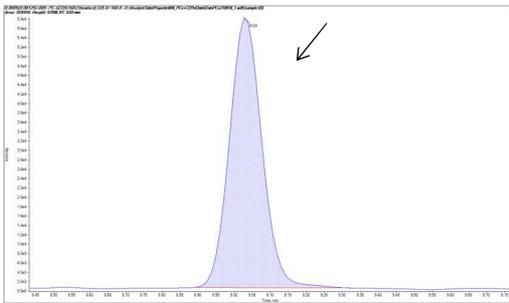
添加試料



添加試料の内標準物質 (0.0025 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L)  
025 mg/L)



標準溶液 (0.0005 mg/L) の内標準物質 (0.0

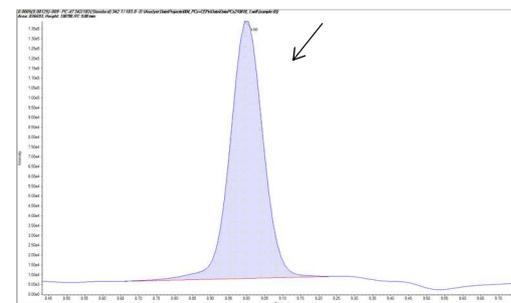
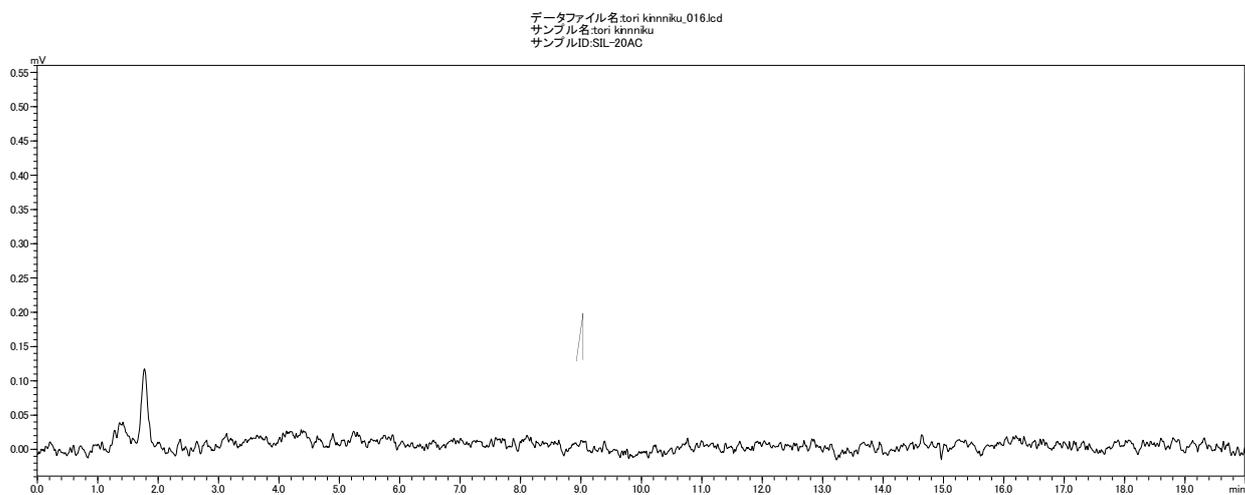
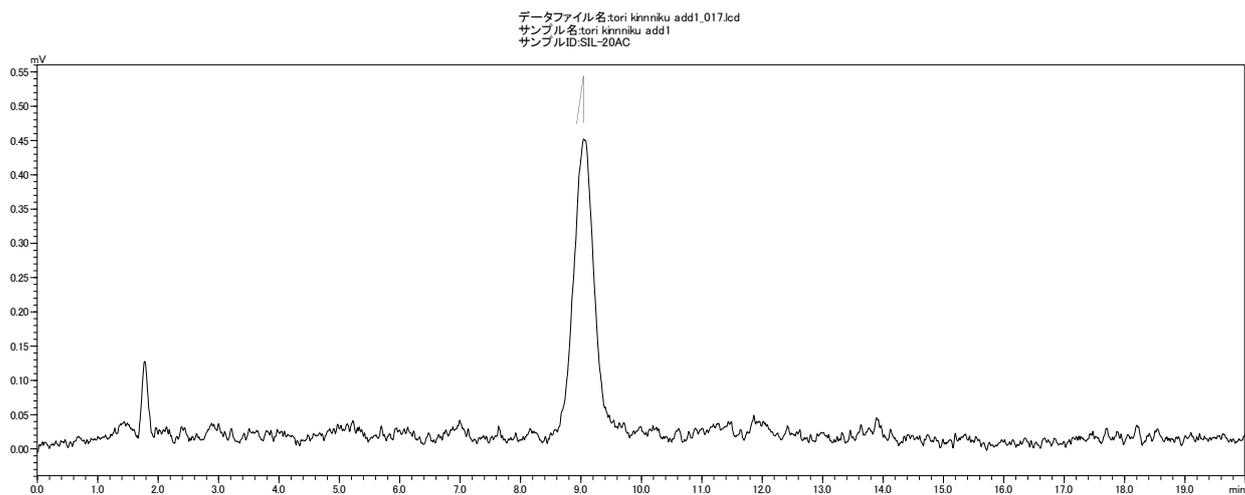


図 2-27 ベンジルペニシリンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  334.9 $\rightarrow$ 160.0)  
添加濃度 : 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$

## ブランク試料



## 添加試料



## 標準溶液 (0.001 mg/L)

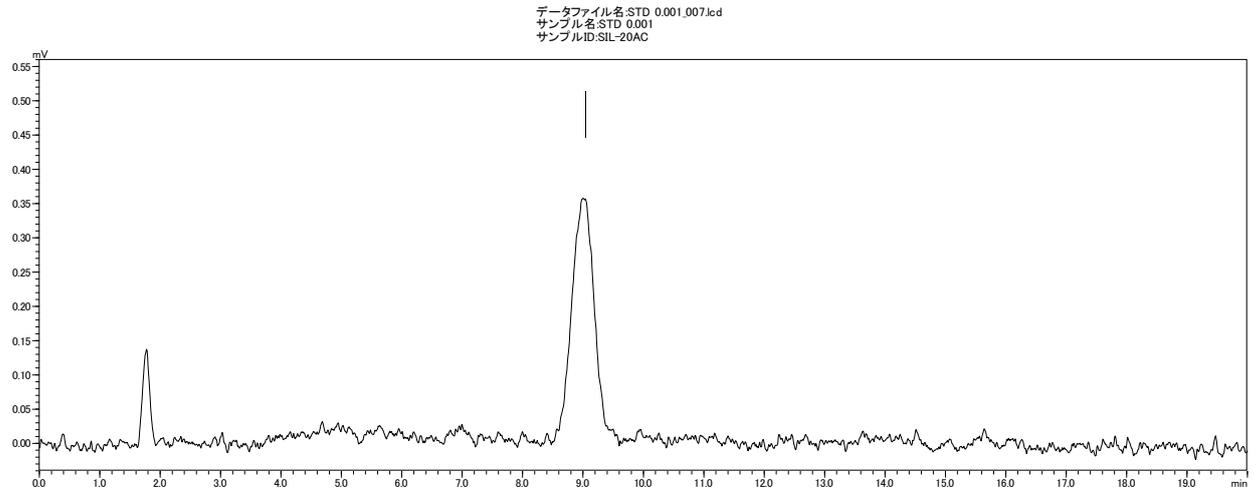
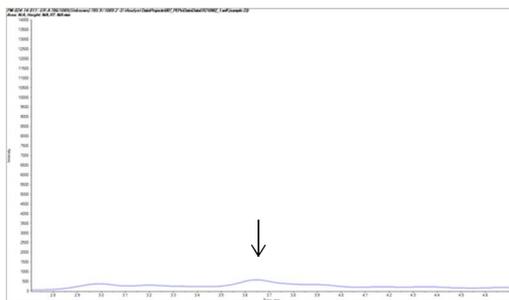
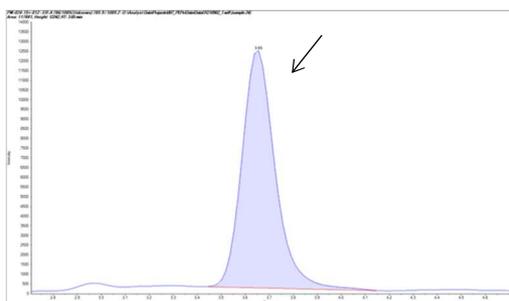


図 2-28 ノシヘプタイドのクロマトグラム  
 添加濃度 : 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$

ブランク試料



添加試料



標準溶液 (0.0025 mg/L)

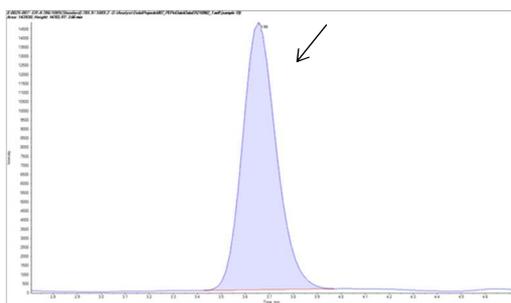


図 2-29 エンラマイシン A の SRM クロマトグラム  
( $m/z$  785.9→1089.2)  
添加濃度 : 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$

### III. 分担研究報告

牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

研究分担者 工藤由起子

国立医薬品食品衛生研究所

衛生微生物部

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)  
動物性食品輸出の規制対策のための研究  
研究代表者 穂山 浩 (星薬科大学)

#### 分担研究報告書

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

#### 研究要旨

牛肉の STEC 汚染リスク低減のための研究を実施した。1. 牛枝肉の STEC 調査では、2021年4月から2022年2月に7施設の協力のもとに牛枝肉合計163検体について7血清群(026、045、0103、0111、0121、0145、0157)の STEC を対象とした調査を行った。供試検体を増菌培養後、STEC7血清群マルチプレックスリアルタイムPCRを行い、分離株の血清凝集試験および生化学的性状試験を行った。また、検体の生菌数の計測を行った。この結果、1検体(0.6%)から STEC 0157 が分離されたが、1検体のみであったことからウシの種類や性別などの特徴については考察には至らなかった。STEC 0157 が分離された検体および施設において生菌数が比較的高い値を示したことから、施設の環境状況の要因の可能性が考えられた。また、2. 牛肉の消毒効果の検討では、消毒薬として、酸性の過酢酸製剤、酸性化した亜塩素酸ナトリウムおよび過酸化水素、アルカリ性の次亜塩素酸ナトリウム(次亜塩素酸ソーダ)、中性のエタノール(エチルアルコール)を選択し、牛肉での STEC の消毒効果を検証した。結果として、消毒液の使用量を増やすことや濃度を高めることにより菌数減少の傾向が認められた。消毒薬の種類としては、肉表面に変化を起こさない過酢酸が最も優れていると考えられた。今後、使用後の酢酸臭を流水で除去できる過酢酸濃度を検討したい。

#### 研究協力者 (\*牛枝肉の STEC 調査研究について)

北海道保健福祉部健康安全局食品衛生課*	島田光平
北海道東藻琴食肉衛生検査所*	児山綾子
北海道早来食肉衛生検査所*	石田祥士
青森県十和田食肉衛生検査所*	高橋むつみ
岐阜県飛騨食肉衛生検査所*	塚本真由美、苅谷俊宏、山崎翔矢
徳島県食肉衛生検査所*	片山直人
宮崎県都農食肉衛生検査所*	黒木麻衣
国立医薬品食品衛生研究所	池内隼佑、千葉由美、都丸亜希子、 廣瀬昌平

## A. 研究目的

昨今の海外での和牛の需要の高まりや日本政府および業界関係者による和牛輸出促進の影響のため、海外への和牛輸出量が増加している。特に、米国への輸出は 2005 年から解禁されているが、近年、米国では腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌 *Shiga toxin-producing Escherichia coli*; STEC）食中毒防止対策のひとつとして牛肉の STEC 検査を行い、検出した関連製品については米国向けに輸出ができないため、現在は国内の加熱加工原料向けに転用している。和牛は畜産食品のなかでも単価の高い高級食材であり、国内で限られた数の対米輸出食肉取扱施設でのと畜、食肉処理による生産量を考えると、加熱加工原料のみならず、効果的な殺菌方法による食中毒の発生予防措置をとった上で、加熱加工原料用以外の転用を可能にすることは、国内生産者や食肉処理関係者の継続的な生産・関連業務にもつながることが期待される。

令和 2 年度（2020 年 11 月から 2021 年 2 月）には、国内食肉処理施設において、180 検体の牛枝肉表面の STEC について定性的・定量的検出を行い、1 検体から STEC 0157:H7 が分離された。分離された株は *stx2* 陽性および *eae* 陽性であった。令和 3 年度も引き続き牛枝肉表面からの STEC 検出を継続した。また、各種消毒薬および消毒方法について、牛肉での STEC の消毒効果を検証し、肉表面の変色や消毒薬由来の臭味を含め、実用的な消毒方法を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 牛枝肉の STEC 調査

2021 年 4 月から 2022 年 2 月に国内の食肉検査所 7 ヶ所にて、ウシ 163 頭からサンプリングを行った。

#### （1）と畜場での作業

検体の採取は、処理された異なるウシ 3 頭から枝肉を各 1 本ずつ選定し、選定した枝肉ごとに頸部から胸部の任意の 3 箇所を選び、滅菌リ

ン酸緩衝生理食塩水（PBS）で浸漬した 30 cm×30 cm サイズの滅菌したガーゼを密着させることによって行った。サンプリングを行ったガーゼは、それぞれ滅菌済みポリエチレン袋（サンプリングバッグ）に入れ、国立医薬品食品衛生研究所に送付するまで氷上もしくは 2~4℃で保存し、宅配便（冷蔵）によって国立医薬品食品衛生研究所へ送付された。

### （2）STEC 検出方法および生菌数測定

#### 1) 検体の調製

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

#### 2) 生菌数の計数

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

#### 3) 定性的な STEC 7 血清群の検出

定性的な検出方法の流れを図 1-1 に示す。

##### 3-1) 検体の増菌液からの 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。

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

プライマーセット Assay1 (*stx/eae*) ではベロ毒素遺伝子 (*stx* 遺伝子) およびインチミンタンパク質遺伝子 (*eae* 遺伝子) を、Assay2

(16S/0157) では 16SrRNA 遺伝子および 0157 遺伝子を、Assay3 (026/0111) では 026 遺伝子および 0111 遺伝子を、Assay4 (045/0121) では 045 遺伝子および 0121 遺伝子を、Assay5 (0103/0145) では 0103 遺伝子および 0145 遺伝子を検出する。プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせおよび配列を表 1-2 に示す。

Assay1 から Assay5 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。

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

免疫磁気ビーズ法は、免疫磁気ビーズ 026、045、0103、0111、0121、0145、0157 「生研」(デンカ株式会社) を用いて行った。最終的に E バッファー 1 mL に懸濁したものをビーズ懸濁液とした。

さらに、酸処理ビーズ懸濁液を作製し、ローテーターで 1 時間反応させた。

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

3-4) 分離株の血清型別

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

は、必要に応じて H-genotyping (Iguchi *et al.*) および抗血清を用いて H 血清型を決定した。また、7 血清群以外については O 血清群を O-genotyping (Iguchi *et al.*) および抗血清にて決定した。

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

コロニーを 0.1 mL の TE 緩衝液 (PH8) に懸濁し、DNA 抽出をした。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、陰性の場合には陰性と判定し、陽性の場合には 3-6) の非選択培地による単離を行った。

3-6) 単離したコロニーの STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定  
典型的なコロニーから、3-5) と同様に DNA を熱抽出し、Assay1 および目的とする O 群について、3-2) と同様にリアルタイム PCR で確認した。

3-7) STEC 7 血清群の生化学的性状試験

ブドウ糖、乳糖および白糖の発酵およびガス産生、硫化水素産生を観察するために Triple sugar iron agar (TSI 寒天培地) を、リジン脱炭酸産生、インドール産生、運動性を観察するために Lysine Indole motility medium (LIM 培地) の培養を行った。

4) 定量的な STEC 7 血清群の検出

定量的な検出方法の流れを図 1-2 に示す。

4-1) STEC 7 血清群の MPN 測定

血清凝集試験およびラテックス凝集試験により推定陽性と判断した、培養前の 1 日目に 4°C で保存しておいた検体懸濁液を用いて、MPN 測定 (3 本法) を行った。mTSB を用いて希釈段 3 段とし、42 $\pm$ 1°C で 15-24 時間培養した。

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

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

3-5)と同様にDNAを熱抽出し、Assay1および目的とする0群について、3-2)と同様にリアルタイムPCRで確認した。Assay1陽性かつ0群陽性の場合、陽性判定となった0群抗体による免疫磁気ビーズ法を行った。

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

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

4-4) STEC 7 血清群の血清凝集試験およびラテックス凝集試験

目的とする0群抗体を用いて、3-4)と同様の手順に従って凝集試験において、凝集が見られたコロニーは、以下のリアルタイムPCRによる確認を行った。

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

3-5)と同様に、リアルタイムPCRで確認した。Assay1陽性かつ0群陽性の場合、3-6)と同様に非選択培地による単離を行った。4-6)単離したコロニーの STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイムPCRによる判定典型的なコロニーから、3-5)と同様にDNAを熱抽出し、Assay1および目的とする0群について、3-2)と同様にリアルタイムPCRで確認した。

4-7) 生化学的性状試験

3-7)と同様に、TSI寒天培地およびLIM培地による性状確認を行った。

5) *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方または片方が陽性であった検体からの大腸菌の分離

上記1)から4)の一連の検出方法において、7血清群の STEC が分離されなかった検体のうち、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方または片方が陽性であった検体について、増菌

培養液でのリアルタイムPCRの結果と合致する大腸菌の分離を行った。まず、1)で $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存しておいた溶液を室温で解凍し、この溶液 $500\mu\text{L}$ に対して $4.5\text{ mL}$ のTryptone soya broth (TSB)を加え、 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ で18時間増菌培養した。この増菌培養液をPBSで $10^{-6}$ まで10倍階段希釈し、各希釈液それぞれ $100\mu\text{L}$ ずつを4種類の培地(SMAC培地、CT-SMAC培地、クロモアガーSTEC培地、クロモアガーSTEC、CT-クロモアガーSTEC培地)に1枚ずつ塗抹し、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で18-24時間培養した。これらの培地上に増殖した疑わしいコロニーに関して、3-5)と同様にリアルタイムPCRをおこなった。

この結果、陽性検体に関して3-6)と同様に単離したコロニーのリアルタイムPCRによる *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の保有の判定を行い、3-7)と同様に生化学的性状試験を行って大腸菌であることを確認した。

## 2. 牛肉の消毒効果の検討

### (1) 菌株

消毒液の STEC への直接効果の検証では、026、0103、0111、0157の4血清群の STEC を対象とし、国立医薬品食品衛生研究所保有している菌株(026:ESC97、0103:ESC548、0111:ESC469、0157:ESC425)を供試した。また、消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証では STEC のうち血清群0157(ESC425)のみを供試した。

### (2) 牛肉検体

牛肉は、小売店から購入したブロック肉を用いた。牛肉表面の筋膜をつけたままの検体(筋膜あり)については、クリーンベンチ内でブロック肉の表面の筋膜部分(厚さ約 $1\text{ cm}$ )を切りとり、さらに約 $5\text{ cm}$ 角(約 $25\text{ g}$ )に無菌的に切り分けて作製した。牛肉表面の筋膜を取り除いた検体(筋膜なし)については、筋膜を取り除いたブロック肉を厚さ約 $1\text{ cm}$ 、約 $5\text{ cm}$ 角(約 $25\text{ g}$ )切り分けて作製した。切り分けた検体は、重量を測定し、ラップに包みサンプルバックに入れてシールし、冷凍保

存した。使用する前日に 4℃に戻して供試した。解凍時に生成したドリップは滅菌した綿でふき取った。

### (3) 接種菌液の調製

半流動性のカジトン培地に室温保存されている各菌株を、それぞれ 10 mL の TSB に植菌し、37℃で 18 時間静置培養した。このうち 8 mL を、4℃、5,000 rpm、15 分間遠心し、滅菌した PBS8 mL に再懸濁することを 2 回行ったものを接種菌液とした。試験を行うまで、これらの菌液は氷上もしくは 4℃で保管された（最長 3 日間）。

なお、これら接種菌液中の菌数を以下の方法にて確認した。まずは、接種菌液を PBS にて、 $10^{-6}$ まで 10 倍階段希釈を行い、 $10^{-5}$ 希釈液（約  $1 \times 10^3$  CFU/mL）および  $10^{-6}$ 希釈液（約  $1 \times 10^2$  CFU/mL）0.1 mL ずつを TSA およびクロモアガーSTEC に 5 枚に塗抹し、TSA は 37℃で 24 時間、クロモアガーSTEC は 37℃で 20 時間、培養し、生育したコロニーを計測した。

### (4) 消毒液の調製

酸性の消毒液として「食品、添加物等の規格基準」（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）に平成 28 年に使用基準が改正された過酢酸製剤および酸性化した亜塩素酸ナトリウム、従前より使用が認められている指定添加物である過酸化水素を、アルカリ性の消毒液として同規格基準に記載され使用が認められている指定添加物である次亜塩素酸ナトリウム（次亜塩素酸ソーダ）を、中性の消毒液として一般飲食物添加物であるエタノール（エチルアルコール）を用いた。なお、使用時の各 pH は表 2-1 に示した。

過酢酸製剤は「ダイヤパワー（低濃度過酢酸）（三菱ガス化学株式会社）」（過酢酸 6%、過酸化水素 8%、酢酸 32%、水 54%）を用いた。滅菌した純水（滅菌水）で希釈して 50、100、1,000 ppm に調製し、供試した。この消毒液によって肉の表面は変色しないが、酢酸臭が残ることが難点である（表 2-1）。

亜塩素酸ナトリウムは「Keeper Pro®（バイオサイド・インターナショナル社）」（高純度亜塩素酸ナトリウム 8.35%）にクエン酸（食品添加物 富士フィルム和光純薬（株））を添加し酸性化した亜塩素酸ナトリウム水として、200、500、1,200 ppm に調製し、供試した。この消毒液によって肉の表面はやや白く変色し、やや塩素臭が残ることが難点である（表 2-1）。

過酸化水素（食品添加物 35.0 - 36.0% 富士フィルム和光純薬（株））は純水で 10 倍に希釈し、供試した（3.5%）。この消毒液によって肉の表面は白く変色し、やや柔らかくなる傾向があることが難点であるが、臭いはない（表 2-1）。

次亜塩素酸ナトリウムは「ピューラックス（株式会社オーヤラックス）」（次亜塩素酸ナトリウム 6%）を用いた。過酢酸製剤と同様に、純水で希釈して 600 ppm に調製し、供試した。この消毒液によって肉の表面はやや白く変色し、塩素臭が残ることが難点である（表 2-1）。

エタノールは「消毒用エタノール『コザカイ・M』」（小堺製薬株式会社）（15℃で 76.9 - 81.4 vol%）用い、販売濃度で供試した。この消毒液によって肉の表面は若干白く変色するが、アルコール臭はすぐに消失する（表 2-1）。

なお、対照用溶液は滅菌水を用いた。

### (5) 消毒液の STEC への直接効果の検証

PBS 懸濁菌液での消毒液の効果を令和 2 年度と同様に検証した。供試した消毒液の種類と濃度を表 2-2 に示した。

各接種菌液を 100  $\mu$ L ずつ 50 mL チューブに分注し、試験を実施するまで氷上もしくは 4℃で保存した。菌液が入ったそのチューブにそれぞれの消毒液を 10 mL 添加し、ピペッティングにより混和した（原液）。消毒液添加 30 秒後に 0.1 mL をとり、この原液を TSA に塗抹した。対照用溶液である滅菌水の場合は、0.9 mL の

PBSにて $10^{-4}$ まで10倍階段希釈を行い、原液から $10^{-4}$ 希釈液0.1 mLずつをTSAに塗抹した。それらを $37^{\circ}\text{C}$ で24時間培養し、コロニーを計測した。

(6) 消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証  
消毒液の効果の検証方法を図2-1および表2-2に示す。

#### 1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果

滅菌した1本の竹串に1検体を刺し、菌液を $10\mu\text{L}$ ずつ5カ所(合計 $50\mu\text{L}$ )に接種し、15分間室温保存することによって菌液を検体に浸透させた。この菌汚染検体を4個作製し、3個は刺した竹串を垂直に固定し、検体ごとに各消毒液を60回噴霧(420 mL)し、室温で5分間立てた状態で、消毒液の液切りを行った。

各検体から竹串を外してそれぞれストマッカー袋に入れ、それぞれ検体の10倍量になるように滅菌済みのPBSを添加し、1分間ストマッカーを行ったものを乳剤とした。これらの乳剤を、それぞれ0.9 mLのPBSにて $10^{-3}$ まで10倍階段希釈を行った。原液から $10^{-3}$ 希釈液0.1 mLずつを、TSAとクロモアガーSTECに塗抹し、 $37^{\circ}\text{C}$ で24時間培養し、コロニーを計測した。

#### 2) 消毒液 100 mL かけ流しの効果 (かけ流し 100 mL)

「1) 消毒液 60 回噴霧の効果」と同様に検体を竹串に刺した汚染検体を作製した。消毒液を噴霧する代わりに、検体ごとにそれぞれの消毒液20 mLをシリンジで5回(合計100 mL)かけ流しを行った。以下、「1) 消毒液 2 回噴霧の効果」と同様に行った。

#### 3) 消毒液 500 mL かけ流しの効果 (かけ流し 500 mL)

「1) 消毒液 60 回噴霧の効果」と同様に検体を竹串に刺した汚染検体を作製した。「2) 消毒液 100 mL かけ流しの効果」より大きいシリンジを用いて、検体ごとにそれぞれの消毒液50 mLをシリンジで10回(合計500 mL)かけ流しを行った。以下、「1) 消毒液 2 回噴霧

の効果」と同様に行った。また、下に流れ落ちた消毒液および滅菌水

中の STEC 菌数を計測した。まず0.9 mLのPBSにて $10^{-3}$ まで10倍階段希釈を行った。原液から $10^{-3}$ 希釈液0.1 mLずつを、TSAとクロモアガーSTECに塗抹し、 $37^{\circ}\text{C}$ で24時間培養し、コロニーを計測した。

### C. 研究結果

#### 1. 牛枝肉の STEC 調査

##### (1) 生菌数

調査した検体163頭のうち、生菌数が検出された150頭の生菌数の平均は $62.8 \pm 437.2$  (平均 $\pm$ SD) CFU/cm<sup>2</sup>であった(表1-4)。

雌雄で比較すると、オスは110頭のうち生菌数が検出されない9頭を除いた101頭では $82.0 \pm 534.0$  CFU/cm<sup>2</sup>であるのに対して、メスは53頭のうち生菌数が検出されない4頭を除いた49頭では $23.1 \pm 30.7$  CFU/cm<sup>2</sup>であった(表1-4)。

ウシの種類別で比較すると、ホルスタインの平均値が3桁であり他の種類と比べて高い値となり、 $130.3 \pm 684.4$  CFU/cm<sup>2</sup>であった。これらには、生菌数1,000 CFU/cm<sup>2</sup>を超えるウシが2頭含まれている(表1-4)。

施設別の生菌数の結果を表1-5に示す。採材期間を通して、平均生菌数が最も多かった施設はE施設であった。平均生菌数は $218.1 \pm 860.4$  CFU/cm<sup>2</sup>であり、100 CFU/cm<sup>2</sup>を超えるウシは5頭であった。

月別で算出した生菌数の結果を表1-6に示す。7月が最も高く $452.4 \pm 1,311.1$ 、次いで8月が $39.6 \pm 72.3$ であり、気温が高い夏に高い傾向が見られた。1,000 CFU/cm<sup>2</sup>を超えるウシは7月に2頭、100 CFU/cm<sup>2</sup>を超えるウシは7月に1頭、8月に2頭であった。

##### (2) STEC7 血清群の分離

定性的な検出を図1-1に示すように行い、増菌培養液が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方あるいは片方が陽性であった検体の STEC7 血清

群のリアルタイム PCR の結果を表 1-7 に示す。供試検体 163 検体のうち、39 検体が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の少なくとも片方が陽性であり、両遺伝子のいずれもが陽性となった検体はそのうち 11 検体であった。上記 39 検体のうち、5 検体が STEC 7 血清群のいずれかで陽性となり、同一検体で複数の O 血清群で陽性となった検体は D41、D42 および D68 の 3 検体であり、それぞれの Ct 値は検体 D41 で 0157 (Ct 値 : 29.4)、026 (30.5)、045 (29.4) および 0103 (33.0)、検体 D42 では 026 (33.8) および 045 (26.0)、また、検体 D68 では 0157 (27.3)、026 (36.2) および 045 (37.4) であった。血清群 0103 のみが陽性となった検体は D4 および D118 であり、Ct 値は D4 で 25.4、D118 で 24.2 であった。

リアルタイム PCR でいずれかの遺伝子が陽性となった培養液から分離した菌株の O 血清群と保有遺伝子を表 1-8 に示す。STEC 7 血清群保有かつ *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陽性で分離が可能であった検体は D68 のみであり、その血清型は 0157:H7 であった。この株の生化学的性状は、一般的な STEC 0157:H7 と一致した (表 1-9) また、分離された STEC 0157 は、*stx1* 遺伝子を保有せず、*stx2* 遺伝子のみを保有していた。生菌数について、D68 は 272 CFU/cm<sup>2</sup> であり、同じ施設からの検体 D41 を除いて、菌株の分離が可能であったその他の検体と比較して 10<sup>1</sup>-10<sup>2</sup> の単位で生菌数が高い値であった。

*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陽性であった検体、STEC7 血清群のリアルタイム PCR 陽性検体から STEC7 血清群が分離された検体を表 1-10 にまとめた。*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陽性であった検体は合計で 11 検体であり、これらの検体において、分離陽性検体は STEC 0157 が分離された 1 検体のみであった。リアルタイム PCR で血清群 0157 が陽性となった検体は D41 および D68 の計 2 検体であり、分離陽性検体となったのは最終的に D68 の 1 検体のみ

であった。血清群 026、045 および 0103 はリアルタイム PCR 陽性であったが菌株の分離には至らなかった。なお、STEC 7 血清群に該当しない菌株として、D4 および D41 から *eae* 遺伝子および 0103 遺伝子陽性の菌株が分離され、D118 から 0103 遺伝子のみ陽性の菌株が分離された。

ウシの種類、施設および採材年月のカテゴリ一別に STEC7 血清群分離個体を表 1-11 にまとめた。STEC 0157 が分離されたのは、2021 年 8 月に採材された E 施設からの交雑種であった。

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

表 1-7 に示すように供試検体 163 検体のうち、39 検体が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の少なくとも片方が陽性であり、両遺伝子のいずれもが陽性となった検体はそのうち 11 検体であった。*stx* 遺伝子のみが陽性であった検体は 13 検体、*eae* 遺伝子のみが陽性であった検体は 15 検体であった。陽性となった遺伝子の Ct 値は、*stx* 遺伝子については最低値 16.3、最高値 36.2 であり、*eae* 遺伝子については最低値 21.2、最高値 43.1 であった。

リアルタイム PCR でいずれかの遺伝子が陽性となった培養液から分離した菌株の O 血清群と保有遺伝子を表 1-8 に示す。分離株の O 血清群は OUT を含む多様なものであり、施設あるいはウシの種類との関連性などの特徴はなかった。検体の生菌数は、非検出から 5,111 CFU/cm<sup>2</sup> までと幅が大きく、O 血清群ごとに特徴的な違いはみられなかった。

(4) STEC7 血清群の定量

定性試験で *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子陽性の 0157 が分離された検体 D68 については、定量的な試験を行った (図 1-2)。MPN 法 (3 本法) での定量結果を表 1-12 に示す。1 段目において、3 本のうち 2 本が *stx* 遺伝子、*eae* 遺

伝子および 0157 遺伝子のすべてがリアルタイム PCR 陽性となった。1 段目の残り 1 本、2 段目および 3 段目については *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子および 0157 遺伝子のすべて非検出であった。STEC 0157 の定量値は、試験液 100mL あたり 11 MPN あるいはガーゼ表面積 100 cm<sup>2</sup> あたり 1.02 MPN であった。

## 2. 牛肉の消毒効果の検討

### (1) 消毒液の STEC への直接効果の検証

PBS 中の STEC への各消毒液の効果 (30 秒後) を検討した。

過酸化水素 (3.5%) を除いた全ての消毒液では、全血清群は検出されなかった (表 2-3)。過酸化水素では、血清群 026、0103、0111、0157 は、それぞれ  $5.9 \pm 0.0$ 、 $5.8 \pm 0.1$ 、 $5.7 \pm 0.1$ 、 $5.8 \pm 0.0$  log CFU/mL であった。

滅菌水では、血清群 026、0103、0111、0157 は、それぞれ  $6.0 \pm 0.0$ 、 $6.0 \pm 0.0$ 、 $5.8 \pm 0.0$ 、 $5.9 \pm 0.1$  log CFU/mL であった。

### (2) 消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証

#### 1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果

筋膜ありの牛肉では、過酢酸 1,000 ppm、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm、エタノール、亜塩素酸ナトリウム 500 ppm と 1,200 ppm、過酸化水素の効果を検証した。この結果 (図 2-2)、最も効果があった亜塩素酸ナトリウム 1,200 ppm では  $5.9 \pm 0.6$  log CFU/片であり、次に効果があったものは過酢酸 1,000 ppm の  $6.0 \pm 0.4$  log CFU/片であった。最も効果がなかった過酸化水素では  $6.7 \pm 0.4$  log CFU/片であった。対照となる滅菌水では  $6.8 \pm 0.2$  log CFU/片であった。

筋膜なしの牛肉では、亜塩素酸ナトリウム 500 ppm と 1,200 ppm、過酸化水素の効果を検証した。この結果 (図 2-3)、最も効果があった亜塩素酸ナトリウム 1,200 ppm では  $7.0 \pm 0.1$  log CFU/片であり、最も効果がなかった過酸化水素では  $7.2 \pm 0.1$  log CFU/片であった。対照となる滅菌水では  $7.4 \pm 0.1$  log CFU/片で

あった。

#### 2) 消毒液 100 mL かけ流しの効果 (かけ流し 100 mL)

筋膜ありの牛肉では、「1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果」 (筋膜あり) と同様の消毒液で検証した。この結果 (図 2-4)、最も効果があった消毒液は「1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果」の「筋膜あり」とは異なり過酢酸 1,000 ppm で  $5.7 \pm 0.3$  log CFU/片であり、次に効果があったものは亜塩素酸ナトリウム 500 ppm と 1,200 ppm の  $5.9 \pm 0.3$  log CFU/片と  $5.9 \pm 0.4$  log CFU/片であった。最も効果がなかった消毒液は「1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果」の「筋膜あり」と同様に過酸化水素で  $6.2 \pm 0.2$  log CFU/片であった。対照となる滅菌水では  $6.9 \pm 0.2$  log CFU/片であった。

筋膜なしの牛肉では、「1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果」 (筋膜なし) と同様の消毒液で検証した。この結果 (図 2-5)、最も効果があった消毒液は「1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果」の「筋膜なし」と同様に最も効果があった亜塩素酸ナトリウム 1,200 ppm で  $6.8 \pm 0.1$  log CFU/片であり、最も効果がなかった消毒液は「1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果」の「筋膜なし」と異なり亜塩素酸ナトリウム 500 ppm で  $7.1 \pm 0.3$  log CFU/片であった。対照となる滅菌水では  $7.4 \pm 0.3$  log CFU/片であった。

#### 3) 消毒液 500 mL かけ流しの効果 (かけ流し 500 mL)

「1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果」 (筋膜あり) と同様の消毒液、および、過酢酸 50、100、200、500 ppm、亜塩素酸ナトリウム 200 ppm を追加して検証した。この結果 (図 2-6)、最も効果があった消毒液は「2) 消毒液 100 mL かけ流しの効果」と同様に過酢酸 1,000 ppm で  $4.8 \pm 0.9$  log CFU/片であり、最も効果がなかった消毒液は過酢酸 50 ppm で  $6.0 \pm 0.4$  log CFU/片であった。対照となる滅菌水では  $6.6 \pm 0.5$  log CFU/片であった。

なお、牛肉に供試し、下に流れ落ちた消毒液からは STEC および生菌は検出されなかった (図 2-7)。

#### D. 考察

##### 1. 牛枝肉の STEC 調査

牛など反芻動物は、STEC 0157 : H7 の保菌動物として重要とされており (1、2)、ヒトでの本菌感染にウシに関連する食品が報告されている (3)。ウシの STEC 0157 : H7 の保菌率は、これまで 0 - 27.3% であるといわれている (4) が、ほとんどのウシ由来の株 (bovine strains) はヒトが発病する病原因子を持っていないことも知られている (1) 牛枝肉の STEC 汚染には、糞便が関わっているとされる。糞便中の STEC 0157 : H7 の濃度は、 $10^2$  から  $10^6$  CFU/g と個体によって異なり (5)、 $10^7$  CFU/g の高濃度が検出されることもあるが、ほとんどの場合 10~100 CFU/g 未満である (6、7)。牛枝肉汚染および牛糞中の含有率は相関がある (8) という報告があるが、細菌が腸外に潜伏するために、糞便の排出と牛枝肉汚染はほとんど相関がない (9) ともいわれている。また、ウシの STEC 0157 保菌には年齢と出産が関係し、保菌率は 2 歳の牛で最も高く、それ以上の年齢の動物では減少し、未経産牛 (1 歳以上の動物) は保菌率が低く (10)、菌の排出は、生後 2 か月未満および生後 6 か月以上の子牛と比較して生後 2~6 か月の子牛で最も高いとの報告がある (11)。

本調査では牛枝肉からガーゼを用いた 163 検体中、1 検体 (0.6%) から STEC7 血清群のひとつである STEC 0157 が分離された。この 1 検体を含む 5 検体 (3.1%) は、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方ならびに STEC7 血清群のいずれかがリアルタイム PCR で陽性であった。と畜場におけるウシの糞便からも高率に STEC が分離されていること (12) と比較して、汚染率は低いことが明らかとなった。これらの陽性検体であったウシとそうでないウシでの特徴

の違いを見いだすことはできなかったが、これら検体の元のウシの腸管内容物における STEC の有無を調査すれば有益と考えられる。

牛枝肉の STEC7 血清群の汚染は施設の衛生状態も関連していることも示唆された。施設ごとの生菌数についても、E 施設以外の平均生菌数は  $10^{1-2}$  CFU/cm<sup>2</sup> 程度であるのに対して、E 施設では平均生菌数が  $10^3$  CFU/cm<sup>2</sup> と 1 桁多くなっている (表 1-5)。さらには、STEC 0157 が分離された施設は E 施設であり、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方ならびに STEC 7 血清群のいずれかがリアルタイム PCR で陽性となった 5 検体のうち 4 検体が E 施設であった。したがって、施設内の作業の変化によっては、牛枝肉への STEC7 血清群の汚染頻度が上昇することも考えられ、食肉処理過程や牛肉の保管には十分な注意が必要である。

分離された菌株は STEC 7 血清群ではない菌株が大部分を占めていた (表 1-8)。*eae* 遺伝子は、病原性大腸菌が腸管上皮細胞に接着した後の菌体の上皮細胞への固定化に関与している。*eae* 遺伝子を保有している菌株が複数の施設から分離されていることから、これらの菌株の病原性についてさらなる検討を行う必要もある。また、指標菌とし食肉の衛生管理に役立つことも考えられた。

本調査では、比較的牛枝肉の汚染が低率であったが、枝肉にガーゼを密着させたのちに剥がして検体としていることから、ガーゼに移行した菌のみが検体に含まれており、枝肉表面にあった他の菌が検体に含まれていない可能性がある。STEC 0157 : H7 の牛肉内浸潤に関する検討 (13) では、表面に接種した STEC 0157 : H7 は表面から 5-10mm の部位においても浸潤していたことから、採材時の負担との兼ね合いもあるが、牛肉の表面から数センチを切り取り牛肉自体の培養を行うことにより、より深部に浸潤した菌体について分離が可能となると考えられる。

分離された季節に関しては、ウシの STEC

0157 : H7 の保有率はヒトと同様に温帯気候では春の終わりから秋の初めに比較的高いといわれている (1, 14)。今回分離された STEC 0157 : H7 は 8 月に採材された検体からであったこと (表 1 - 11) から、採材について、夏季に集中的に行う等により STEC の汚染状況について詳細に明らかにできる可能性も考えられる。今後は、季節的な要因についてもさらなる検討を行う必要がある。

## 2. 牛肉の消毒効果の検討

消毒液の STEC への直接効果の検証を行った結果、供試した消毒液の種類と濃度 (表 2 - 3) では菌が検出されなかったことから、これらの条件は牛肉での消毒効果が期待されると考えられた。

消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証では、牛肉検体として筋膜あり検体と筋膜なし検体を供試したが、最終的な用途が筋膜のある枝肉であることから、特に、筋膜あり検体の結果に注目し、以下のように考察する。なお、全体的に筋膜なしの検体では筋膜ありの検体と比べて消毒効果が弱い傾向であった。

滅菌水を用いて検証方法の比較をすると、噴霧およびかけ流し (100 mL) では、接種菌数から約 1 桁弱減少したが、かけ流し (500 mL) では、それらよりも若干減少し、3 つの検証方法の中ではかけ流し (500 mL) が効果的と考えられた。

次に、消毒薬を用いて検証した。

消毒液 60 回噴霧 (420 mL) では、亜塩素酸ナトリウム 1,200 ppm および過酢酸 1,000 ppm では滅菌水と 1 桁弱の減少があったが、その他の消毒液では滅菌水との差は認められなかった。

消毒液かけ流し 100 mL は、消毒液 60 回噴霧 (420 mL) よりも確実に検体に消毒液が接触し、また洗い流し効果が高い条件であると考えて行った。その結果、供試した消毒液の多くで滅菌水と比べて菌数が約 1 桁減少することが認められた。また、消毒液 60 回噴霧 (420 mL)

と比較すると、かけ流し 100 mL の方が液量が約 1/4 量であるにもかかわらず、噴霧より効果がある傾向であった。

このため、さらなる洗い流し効果を狙って、500 mL にかけて流し量を増加して試みた。その結果、滅菌水を 500 mL かけ流すだけでも接種菌数が約 1 桁減少し、さらに消毒液では 2 桁弱減少した。3 つの検証方法の中ではかけ流し (500 mL) が最も効果的と考えられた。

消毒薬の効果を比較すると、いずれの検証方法においても、過酢酸 (1,000 ppm) が最も大きな菌数減少を示した。次に、亜塩素酸ナトリウム (500 ppm および 1,200 ppm) が大きな減少を示した。しかし、次亜塩素酸ナトリウム (600 ppm)、エタノールおよび過酸化水素では、減少はしたものの上記の消毒薬よりも効果が弱かった。

また、いずれの検証方法においても、亜塩素酸ナトリウムは低濃度設定の 500 ppm でも肉表面が変色し、塩素臭が若干あった。また、過酢酸 (1,000 ppm) は、肉表面の変色が認められなかったものの、酢酸臭が確認された。肉表面の変色がないことから、過酢酸の方が用途に適すると考えられた。このため、できるだけ低い濃度で消毒効果を検証するために、100 ppm と 50 ppm にて試験した。しかし、菌数減少は 1,000 ppm と比較して約 1 桁以上小さかった。今後、過酢酸 1,000 ppm と 100 ppm の間の濃度で、消毒効果が高く、臭いが洗い流せる濃度を検討したい。

## E. 結論

1. 牛枝肉の STEC 調査では、2021 年 4 月から 2022 年 2 月に 7 施設の協力のもとに牛枝肉合計 163 検体を供試した。検体を増菌培養後、STEC7 血清群マルチプレックスリアルタイム PCR を行い、分離株の血清凝集試験および生化学的性状試験を行った。また、検体の生菌数の計測を行った。この結果、1 検体 (0.6%) から STEC 0157 : H7 が分離されたが、1 検体のみで

あったことからウシの種類や性別などの特徴については考察には至らなかった。STEC 0157:H7 が分離された検体および施設において生菌数が比較的高い値を示したことから、施設的环境状況の要因の可能性が考えられた。培養液から分離された STEC7 血清群に該当しない *stx* 遺伝子または *eae* 遺伝子を保有する菌株も分離されたことから指標菌とし食肉の衛生管理に役立つことも考えられた。

2. 牛肉の消毒効果の検討では、消毒薬として、酸性の過酢酸製剤、酸性化した亜塩素酸ナトリウムおよび過酸化水素、アルカリ性の次亜塩素酸ナトリウム（次亜塩素酸ソーダ）、中性のエタノール（エチルアルコール）を選択し、牛肉での STEC の消毒効果を検証した。結果として、消毒液の使用量を増やすことや濃度を高めることにより菌数減少の傾向が認められた。消毒薬の種類としては、肉表面に変化を起こさない過酢酸が最も優れていると考えられた。今後、使用後の酢酸臭を流水で除去できる過酢酸濃度を検討したい。

#### 【 参考文献 】

1. Ferens WA, Hovde CJ. *Escherichia coli* 0157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog Dis* 2011;8:465-87.
2. Munns KD, Selinger LB, Stanford K et al. Perspectives on supershedding of *Escherichia coli* 0157:H7 by cattle. *Foodborne Pathog Dis* 2015;199-103.
3. Callaway TR, Carr MA, Edrington TS et al. Diet, *Escherichia coli* 0157:H7, and cattle: a review after 10 years. *Curr Issues Mol Biol* 2009;11:67-79.
4. Hussein HS, Bollinger LM. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *J Food Prot* 2005;68:2224-2241.
5. Zhao T, Doyle MP, Shere J, Garber L. Prevalence of *Escherichia coli* 0157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1290-1293.
6. Fegan N, Vanderlinde P, Higgs G, Desmarchelier P. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* 0157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J Appl Microbiol* 2004;97:362-370.
7. Widiastih DA, Ido N, Omoe K, et al. Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol Infect* 2004;132:67-75.
8. Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, et al. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2999-3003.
9. Boqvist S, Aspan A, and Eriksson E. Prevalence of verotoxigenic *Echerichia coli* 0157:H7 in fecal and ear samples from slaughtered cattle in Sweden. *J Food Prot* 2009;72:1709-1712.
10. Mir RA, Weppelmann TA, Kang M et al. Association between animal age and the prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a cohort of beef cattle. *Vet Microbiol* 2015;175:325-31.
11. Nielsen EM, Tegtmeier C, Andersen HJ et al. Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of Verocytotoxin producing *Escherichia coli* 0157 in Danish dairy farms. *Vet Microbiol* 2002;88:245-57.
12. Fukushima, H., Seki, R. High numbers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine faeces

collected at slaughter in Japan. FEMS Microbiol. Letters 2004;238:189-197.

13. 厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒・乳肉水産食品合同部会（平成 23 年 7 月 6 日開催）資料 4 腸管出血性大腸菌 0157 の牛肉内浸潤と加熱処理による低減効果に関する検討

14. Cobbold RN, Rice DH, Szymanski M, et al. Comparison of Shiga-toxigenic Escherichia coli prevalences among dairy, feedlot, and cow-calf herds in Washington State. Appl Environ Microbiol 2004;70:4375-4378.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

（誌上発表）

なし

（学会発表）

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

# 定性的検出

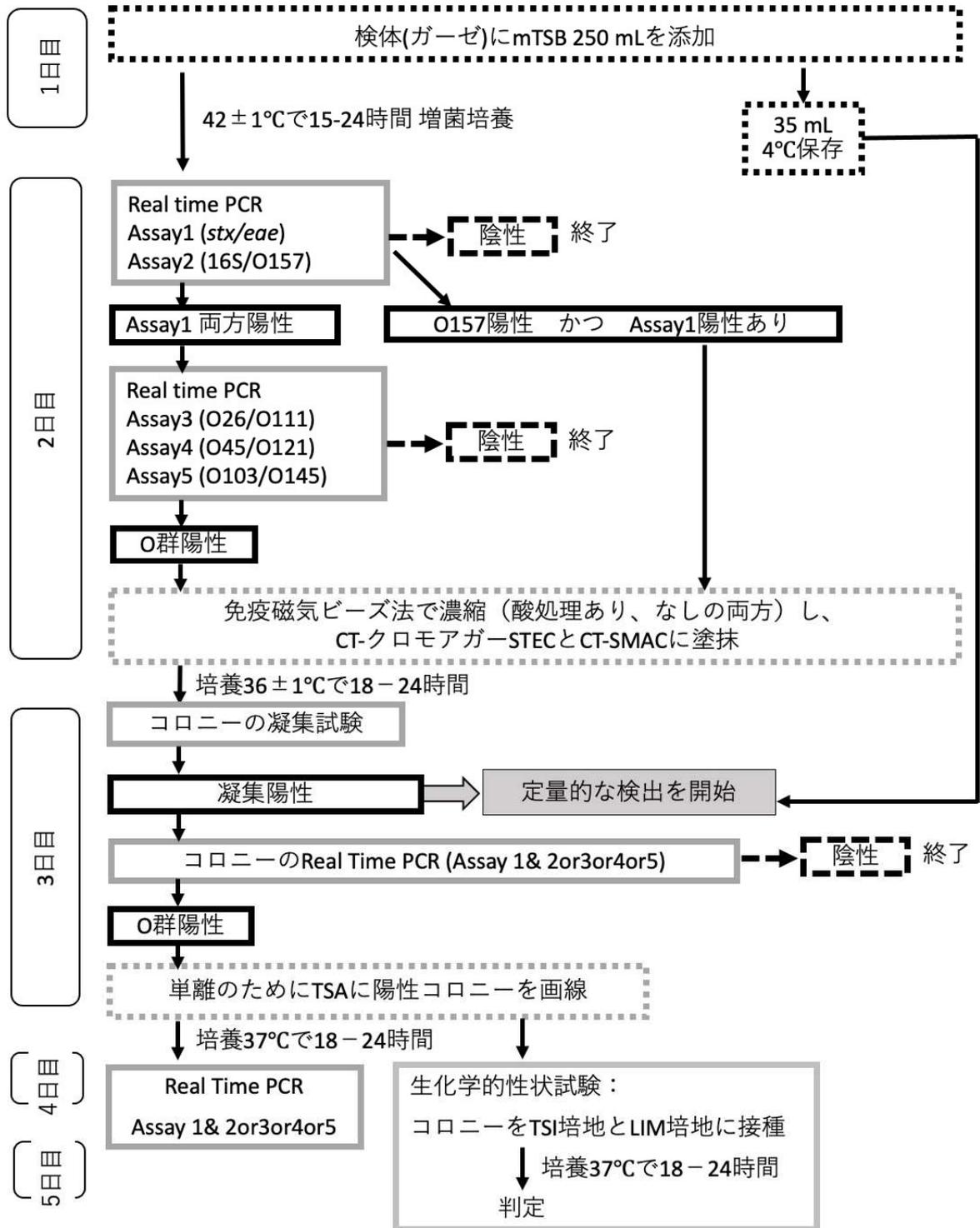


図 1-1 定性的な検出方法

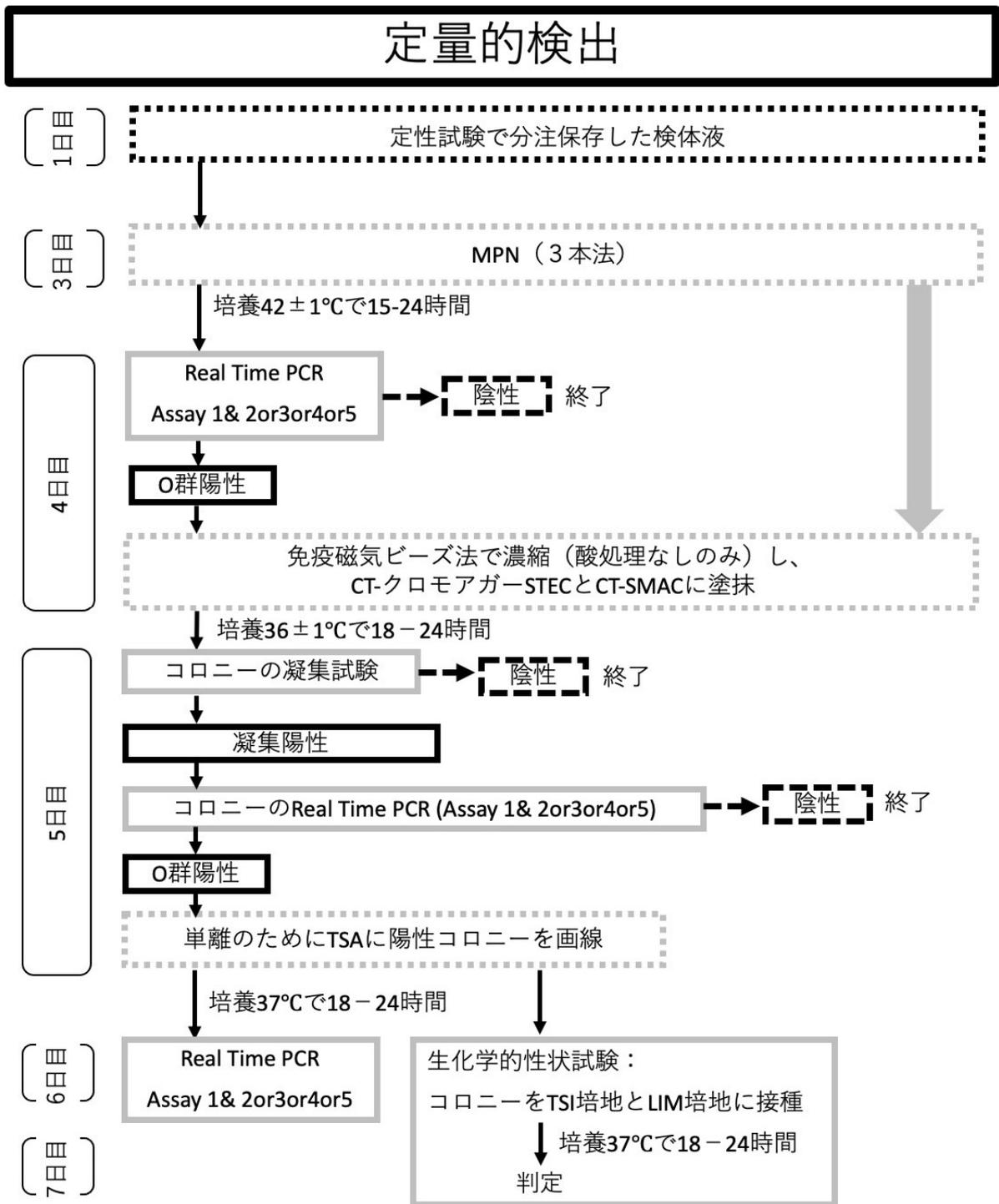


図 1-2 定量的な検出方法

表 1-1 供試検体のウシ種類、性別、齢および個体数

ウシの種類	合計 個体数	性別	個体数	月齢の幅	月齢別	個体数
ホルスタイン	66	オス	64	14 - 24	20未満	58
					20以上30未満	6
					30以上	0
		メス	2	23 - 120	20未満	0
					20以上30未満	0
					30以上	2
黒毛和種	65	オス	36	25 - 30	20未満	0
					20以上30未満	34
					30以上	2
		メス	29	24 - 203	20未満	0
					20以上30未満	23
					30以上	6
交雑種	14	オス	8	23 - 28	20未満	1
					20以上30未満	7
					30以上	0
		メス	6	23 - 35	20未満	3
					20以上30未満	3
					30以上	0
褐毛和種	16	オス	1	25	20未満	0
					20以上30未満	1
					30以上	0
		メス	15	24-43	20未満	0
					20以上30未満	14
					30以上	1
アングス	2	オス	1	28	20未満	0
					20以上30未満	1
					30以上	0
		メス	1	27	20未満	0
					20以上30未満	1
					30以上	0

表 1-2 リアルタイム PCR のプライマーおよびプローブ

アッセイ名	標的遺伝子	プライマーとプローブ	配列	出典
Assay1	<i>stx</i>	Stx-F	5' TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG 3'	USDA
		Stx-R	5'CCCCAGTTTCARWGTRAGRTCACDTC 3'	
		Stx1-P	5' FAM-CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTA A-BHQ_1 3'	
		Stx2-P	5' FAM-TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC-MGB 3'	
	<i>eae</i>	Eae-F	5' CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA 3'	USDA
		Eae-R	5' CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTM 3'	
Eae-P		5' HEX-ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC-BHQ_1 3'		
Assay2	16S rRNA gene	16S rRNA-F	5' CCT CTT GCC ATC GGA TGT G 3'	USDA
		16S rRNA-R	5' GGC TGG TCA TCC TCT CAG ACC 3'	
		16S rRNA-P	5' HEX-GTG GGG TAA CGG CTC ACC TAG GCG AC-BHQ_1 3'	
	<i>rfbEO157</i>	RfbE O157-F	5'-TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCA A-3'	EFSA
		RfbE O157-R	5'-CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT-3'	
		RfbE O157-P	5' FAM-AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG-BHQ_1 3'	
Assay3	<i>wzxO26</i>	Wzx O26-F	5' GTA TCG CTG AAA TTA GAA GCG C 3'	USDA
		Wzx O26-R	5' AGT TGA AAC ACC CGT AAT GGC 3'	
		Wzx O26-P	5' 56-FAM-TGG TTC GGT TGG ATT GTC CAT AAG AGG G- 3BHQ_1 3'	
	<i>wbdO111</i>	WbdI O111-F	5' TGT TCC AGG TGG TAG GAT TCG 3'	USDA
		WbdI O111-R	5' TCA CGA TGT TGA TCA TCT GGG 3'	
		WbdI O111-P	5' 5MAXN - TGA AGG CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GC- 3IABkFQ 3'	
Assay4	<i>wzxO45</i>	Wzx O45-F	5' CGT TGT GCA TGG TGG CAT 3'	USDA
		Wzx O45-R	5' TGG CCA AAC CAA CTA TGA ACT G 3'	
		Wzx O45-P	5' 56-FAM- ATT TTT TGC TGC AAG TGG GCT GTC CA-3BHQ_1 3'	
	<i>wzxO121</i>	Wzx O121-F	5' AGG CGC TGT TTG GTC TCT TAG A 3'	USDA
		Wzx O121-R	5' GAA CCG AAA TGA TGG GTG CT 3'	
		Wzx O121-P	5' 5MAXN - CGC TAT CAT GGC GGG ACA ATG ACA GTG C- 3IABkFQ 3'	
Assay5	<i>wzxO103</i>	Wzx O103-F	5' TTG GAG CGT TAA CTG GAC CT 3'	USDA
		Wzx O103-R	5' ATA TTC GCT ATA TCT TCT TGC GGC 3'	
		Wzx O103-P	5' HEX- AGG CTT ATC TGG CTG TTC TTA CTA CGG C-BHQ-1 3'	
	<i>wzxO145</i>	Wzx O145-F	5' AAA CTG GGA TTG GAC GTG G 3'	USDA
		Wzx O145-R	5' CCC AAA ACT TCT AGG CCC G 3'	
		Wzx O145-P	5' FAM-TGC TAA TTG CAG CCC TTG CAC TAC GAG GC-BHQ_1 3'	

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

EFSA: EFSA Journal. 11:3138, 2013

表 1-3-1 Assay1 の 1wellあたりの反応溶液組成

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

表 1-3-2 Assay2 の 1wellあたりの反応溶液組成

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

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

表 1-3-4 Assay4 の 1well あたりの反応溶液組成

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

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

表 1-4 供試検体のウシの種類別、性別での生菌数

ウシ		個体数	生菌検出* 個体数 (%)	生菌数** (平均±SD CFU/cm <sup>2</sup> )
ウシの種類	ホルスタイン	66	61 (92.4)	130.3±684.4
	黒毛和種	65	59 (90.8)	11.6±19.0
	交雑種	14	12 (85.7)	32.8±77.8
	褐毛和種	16	16 (100.0)	20.5±25.2
	アングス	2	2 (100.0)	31.3±2.2
性別	オス	110	101 (91.8)	82.0±534
	メス	53	49 (92.5)	23.1±30.7
全体		163	150 (92)	62.8±437.2

SD: standard deviation

\*: 非検出は、0.11 CFU/cm<sup>2</sup>未満

\*\*: 検出個体のみの平均±SD

表 1-5 施設別の生菌数

(表1-5 1/3)

施設	月	個体数		生菌検出 個体数*		生菌数** (平均±SD CFU/cm <sup>2</sup> )	
		月ごと	合計	月ごと	合計	月ごと	施設総計
A施設	4	—		—		—	6.3±11.1
	5	—		—		—	
	6	6		6		8.4±9.4	
	7	3		3		4.2±2.1	
	8	3		3		16.7±24.3	
	9	3	21	3	19	1.7±2.7	
	10	3		1		0.2	
	11	3		3		0.7±0.9	
	12	—		—		—	
	1	—		—		—	
	2	—		—		—	
	B施設	4	—		—		
5		—		—		—	
6		3		3		1.6±1.2	
7		3		3		1.3±1.2	
8		3		3		4.7±7.3	
9		3	18	2	14	2.1±0.9	
10		3		1		14.7	
11		3		2		10.3	
12		—		—		—	
1		—		—		—	
2		—		—		—	
E施設		4	—		—		—
	5	—		—		—	
	6	3		0		0	
	7	3		3		2,301.4±2,562.3	
	8	6		6		96.8±115.8	
	9	3	41	3	38	0.9±0.9	
	10	6		6		0.4±0.3	
	11	5		5		64.0±59.2	
	12	5		5		47.9±21.3	
	1	—		—		—	
	2	10		10		23.9±17.2	

(表1-5のつづき 2/3)

	4	-	-	-	-		
	5	-	-	-	-		
	6	3	3	0.7±0.3			
	7	3	3	89.9±76.5			
	8	3	3	1.6±1.0			
G施設	9	3	24	3	24	27.4±18.9	17.6±37.7
	10	3	3	7.6±10.4			
	11	3	3	10.5±14.7			
	12	3	3	0.7±0.5			
	1	3	3	2.4±1.7			
	2	-	-	-			
	4	-	-	-			
	5	3	3	3.9±2.1			
	6	3	3	1.1±1.1			
	7	3	2	1.7			
	8	3	3	0.7±0.6			
H施設	9	3	30	3	28	6.7±6.4	2.3±2.9
	10	3	3	1.3±0.2			
	11	3	3	1.0±0.2			
	12	3	3	4.6±1.4			
	1	3	3	1.1±1.8			
	2	3	2	0.1			
	4	3	2	0.3			
	5	3	3	7.4±4.0			
	6	3	3	1.8±1.3			
	7	2	2	22.2			
	8	3	3	60.1±26.4			
I施設	9	-	26	-	26	-	18.1±22.1
	10	3	3	29.8±20.2			
	11	3	3	5.9±7.3			
	12	3	3	25.2±14			
	1	-	-	-			
	2	3	3	5.8±4.3			

(表1-5のつづき 3/3)

	4	-		-		-	
	5	3		2		0.7	
	6	-		-		-	
	7	-		-		-	
	8	-		-		-	
J施設	9	-	3	-	2	-	0.7
	10	-		-		-	
	11	-		-		-	
	12	-		-		-	
	1	-		-		-	
	2	-		-		-	

SD: standard deviation

\*: 非検出は、0.11 CFU/cm<sup>2</sup>未満

\*\*: 検出個体のみ平均±SD

表 1-6 月別の生菌数

(表1-6 1/2)

年	月	ウシの種類	個体数		生菌検出 個体数*		生菌数** (平均±SD CFU/cm <sup>2</sup> )	
			種類 ごと	合計	種類ご と	合計	種類ごと	月の総計
2021	4	ホルスタイン	—	—	—	—	—	0.3
		黒毛和種	3	3	2	2	0.3	
		交雑種	—		—		—	
		褐毛和種	—		—		—	
		アングス	—		—		—	
	5	ホルスタイン	—		—		—	—
		黒毛和種	6	9	5	8	2.6±2.3	
		交雑種	—		—		—	
		褐毛和種	3		3		7.4±4.0	
		ジャージー	—		—		—	
	6	ホルスタイン	12		21		9	18
		黒毛和種	8	8		1.6±1.1		
		交雑種	—	—		—		
		褐毛和種	1	1		0.6		
		アングス	—	—		—		
	7	ホルスタイン	9	17	9	16	798.5±1,707.3	452.4±1,311.1
		黒毛和種	5		4		12.0±15.9	
		交雑種	3		3		1.3±1.2	
		褐毛和種	—		—		—	
		アングス	—		—		—	
8	ホルスタイン	9	21	9	21	30.0±68.9	39.6±72.3	
	黒毛和種	6		6		2.7±5.1		
	交雑種	3		3		121.7±131.5		
	褐毛和種	3		3		60.1±26.4		
	アングス	—		—		—		
9	ホルスタイン	7	15	7	14	12.9±17.5	8.2±13.3	
	黒毛和種	3		3		6.7±6.4		
	交雑種	5		4		1.0±0.8		
	褐毛和種	—		—		—		
	アングス	—		—		—		
10	ホルスタイン	12	21	10	17	2.5±6.0	7.8±13.8	
	黒毛和種	6		4		4.7±6.7		
	交雑種	—		—		—		
	褐毛和種	3		3		29.8±20.2		
	アングス	—		—		—		

(表1-6のつづき 2/2)

2021	ホルスタイン	8		8		26.5±55.2	
	黒毛和種	4		4		20.6±39.2	
	11 交雑種	3	20	2	19	10.3	20.8±39.2
	褐毛和種	3		3		5.9±7.3	
	アンガス	2		2		31.3	
2022	ホルスタイン	6		6		17.3±19.1	
	黒毛和種	8		8		28.4±28.2	
	12 交雑種	—	14	—	14	—	23.7±24.5
	褐毛和種	—		—		—	
	アンガス	—		—		—	
2022	ホルスタイン	3		3		2.4±1.7	
	黒毛和種	3		3		1.1±1.8	
	1 交雑種	—	6	—	6	—	1.8±1.7
	褐毛和種	—		—		—	
	アンガス	—		—		—	
2022	ホルスタイン	—		—		—	
	黒毛和種	13		12		19.9±18.1	
	2 交雑種	—	16	—	15	—	17.1±16.6
	褐毛和種	3		3		5.8±4.3	
	アンガス	—		—		—	

SD: standard deviation

\*: 非検出は、0.11 CFU/cm<sup>2</sup>未満

\*\*: 検出個体のみ平均±SD

表 1-7 増菌培養がリアルタイム PCR 陽性となった検体

検体 番号	施設 記号	リアルタイムPCRの結果*									
		<i>stx</i>	<i>eae</i>	16S	O157	O26	O111	O45	O121	O103	O145
D4	I施設	<b>23.5</b>	<b>28.0</b>	14.9	UD	UD	UD	UD	UD	<b>25.4</b>	UD
D6	I施設	UD	<b>22.7</b>	15.2	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
D26	I施設	UD	<b>29.7</b>	14.5	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D28	A施設	<b>25.9</b>	<b>23.8</b>	13.8	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
D29	A施設	<b>24.0</b>	<b>21.2</b>	15.0	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
D41	E施設	<b>26.7</b>	<b>29.9</b>	14.7	<b>29.4</b>	<b>30.5</b>	UD	<b>29.4</b>	UD	<b>33.0</b>	UD
D42	E施設	<b>28.1</b>	<b>25.2</b>	14.5	UD	<b>33.8</b>	UD	<b>26.0</b>	UD	UD	UD
D46	I施設	<b>23.4</b>	UD	14.6	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D47	I施設	UD	<b>22.5</b>	15.4	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D49	G施設	<b>29.5</b>	UD	14.2	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D52	E施設	<b>32.5</b>	UD	14.4	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D54	H施設	UD	<b>40.4</b>	13.8	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D59	A施設	UD	<b>40.3</b>	14.6	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D64	I施設	<b>24.7</b>	<b>22.0</b>	15.9	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
D65	I施設	<b>26.7</b>	<b>23.3</b>	16.9	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
D67	E施設	UD	<b>21.6</b>	15.4	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
D68	E施設	<b>27.8</b>	<b>26.3</b>	15.5	<b>27.3</b>	<b>36.2</b>	UD	<b>37.4</b>	UD	UD	UD
D70	G施設	<b>25.9</b>	UD	14.4	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D75	H施設	<b>22.3</b>	UD	13.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D76	H施設	UD	<b>25.1</b>	13.5	UD	NT	<b>NT</b>	NT	NT	NT	NT
D79	A施設	UD	<b>42.8</b>	15.6	UD	NT	<b>NT</b>	NT	NT	NT	NT
D81	B施設	<b>16.3</b>	UD	13.7	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D84	G施設	<b>24.7</b>	UD	14.3	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D86	G施設	<b>21.8</b>	UD	14.4	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D96	I施設	<b>23.9</b>	<b>25.2</b>	15.1	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
D98	I施設	UD	<b>41.9</b>	15.5	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D101	A施設	<b>19.8</b>	UD	19.5	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D114	E施設	UD	<b>39.9</b>	15.4	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D116	E施設	UD	<b>43.1</b>	14.5	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D117	E施設	<b>24.4</b>	UD	14.5	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
D118	E施設	<b>35.8</b>	<b>32.4</b>	15.5	UD	UD	UD	UD	UD	<b>24.2</b>	UD
D126	G施設	UD	<b>41.9</b>	15.1	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D128	H施設	<b>21.8</b>	UD	13.8	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D132	E施設	<b>28.1</b>	UD	13.6	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D133	E施設	<b>36.2</b>	UD	13.8	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D135	E施設	<b>30.9</b>	<b>29.0</b>	13.9	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
D146	G施設	UD	<b>21.9</b>	14.2	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D154	E施設	UD	<b>23.2</b>	12.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D159	E施設	UD	<b>21.9</b>	13.7	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT

\*数値はCT値、UDは非検出、NTは非試験

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

O血清	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	検体番号	採材日	施設記号	生菌数 (CFU/cm <sup>2</sup> )	ウシの種類	月齢 (ヶ月)	性別	経産の有無	去勢の有無
O10	-	-	+	D81	210927	B施設	非検出	交雑種	27	メス	-	-
O71	-	-	+	D29	210628	A施設	26.3	ホルスタイン	19	オス	-	有
O76	-	-	+	D86	210928	G施設	5.67	ホルスタイン	18	オス	-	有
O103	-	-	+	D4	210510	I施設	9.77	褐毛和種	27	メス	-	-
O103	-	-	+	D41	210712	E施設	5111	ホルスタイン	18	オス	-	有
O103	-	-	-	D118	211119	E施設	17	ホルスタイン	40	メス	有	-
O113	-	+	-	D67	210830	E施設	27.6	交雑種	20	オス	-	有
O113	-	+	-	D76	210916	H施設	2.66	黒毛和種	29	オス	-	有
O113	-	+	-	D154	220204	E施設	7.22	黒毛和種	29	メス	-	-
O113	-	+	-	D159	220204	E施設	22.2	黒毛和種	73	メス	有	-
O150	-	+	-	D47	210727	I施設	9.22	黒毛和種	27	メス	-	-
O156	-	-	+	D46	210727	I施設	35.2	黒毛和種	28	メス	-	-
O156	-	-	+	D96	211019	I施設	24.4	褐毛和種	28	メス	-	-
O156	-	-	+	D101	211025	A施設	0.22	ホルスタイン	19	オス	-	有
O157	-	+	+	D68	210830	E施設	272	交雑種	20	オス	-	有
O159	-	+	-	D146	220118	G施設	2.89	ホルスタイン	17	オス	-	有
O168	+	-	-	D4	210510	I施設	9.77	褐毛和種	27	メス	-	-
O171	-	+	-	D29	210628	A施設	26.3	ホルスタイン	19	オス	-	有
O171	-	+	-	D135	211210	E施設	78.3	黒毛和種	29	メス	-	-
O182	-	-	+	D128	211209	H施設	4.89	黒毛和種	28	オス	-	有
OUT	+	+	-	D6	210510	I施設	9.55	褐毛和種	143	メス	有	-

表 1-9 D68 由来 STEC O157:H7 の生化学的性状

培地	D68からの分離株		参考	
	血清型 O157: H7	血清型 O157: H7	血清型 O157: H-	その他の主な血清型
TSI寒天	斜面	黄色	黄色	黄色
	高層	黄色	黄色	黄色
	硫化水素産生	-	-	-
	ガス産生	+	+	+
LIM培地	リジン脱炭酸	+	+	+
	インドール産生	+	+	+
	運動性	+	+	-

表 1-10 *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子陽性検体、そのうちの 7 血清群陽性検体

項目	リアルタイムPCR陽性検体		分離陽性検体		定量値
	検体数	検体番号 (試験コロニー数)	検体数	検体番号 (分離コロニー数)	
<i>stx</i> (+) & <i>eae</i> (+)	11	D4 (43), D28 (26), D29 (26), D41 (105), D42 (75), D64 (14), D65 (14), D68 (50), D96 (30), D118 (30), D135 (20)	NA	NA	NA
上記のうち					
O26 (+)	3	D41 (105), D42(75), D68(10)	0	NA	NA
O45 (+)	3	D41 (105), D42(75), D68(10)	0	NA	NA
O103 (+)	3	D4(43), D41 (105), D118 (30)	0	NA*	NA
O157 (+)	2	D41 (105), D68(30)	1	D68 (30)	1.02 MPN/ 100cm <sup>3</sup>

\*:D4 Stx(-) eae(+) O103(+)  
O103(+)  
を4株分離. D41 Stx(-) eae(+) O103(+)  
を1株分離. D118 Stx(-) eae(-) O103(+)  
を5株分離

NA:非該当

表 1-11 分類項目別の7血清群 STEC の分離結果

分類項目		個体数	陽性個体数	血清型
ウシの種類	ホルスタイン	66	0	—
	黒毛和種	65	0	—
	交雑種	14	1	O157:H7
	褐毛和種	16	0	—
	アングス	2	0	—
施設	A施設	21	0	—
	B施設	18	0	—
	E施設	41	1	O157:H7
	G施設	24	0	—
	H施設	30	0	—
	I施設	26	0	—
	J施設	3	0	—
年月	2021年4月	3	0	—
	2021年5月	9	0	—
	2021年6月	21	0	—
	2021年7月	17	0	—
	2021年8月	21	1	O157:H7
	2021年9月	15	0	—
	2021年10月	21	0	—
	2021年11月	20	0	—
	2021年12月	14	0	—
	2022年1月	6	0	—
	2022年2月	16	0	—

表 1-12 STEC O157 が定性試験で分離された検体(D68)での定量試験結果

遺伝子	試験結果						定量値 (MPN)				
	1段目			2段目			3段目			／試験液100mL	／表面積100 cm <sup>2</sup>
<i>stx</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	11	1.02
	(28.3)*	UD	(24.7)	UD	UD	UD	UD	UD	UD		
<i>eae</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	11	1.02
	(29.3)	UD	(25.1)	UD	UD	UD	UD	UD	UD		
O157	+	-	+	-	-	-	-	-	-	11	1.02
	(26.8)	UD	(24.0)	UD	UD	UD	UD	UD	UD		

\*()はCt値、UDは非検出

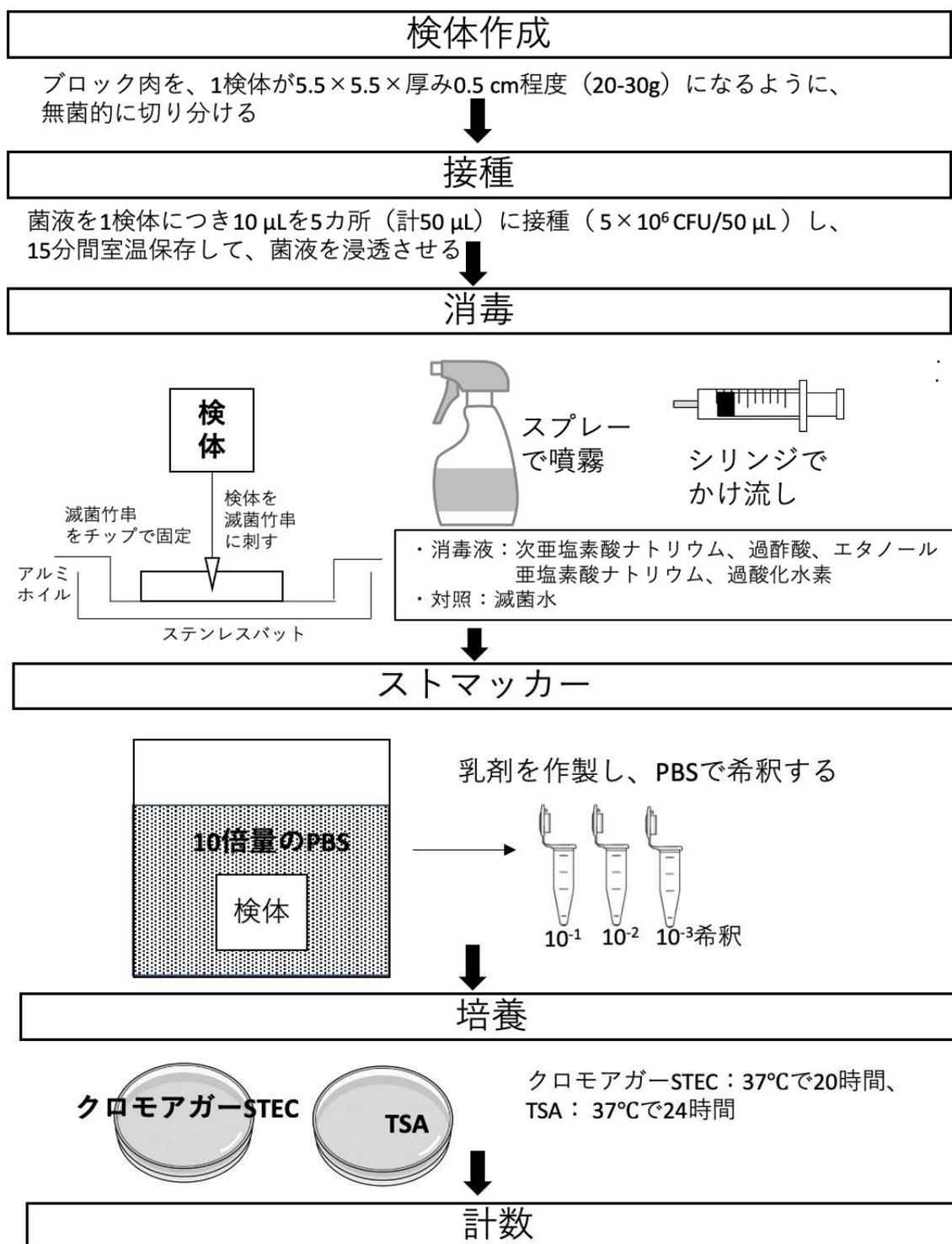


図 2-1 消毒液の効果の検証方法

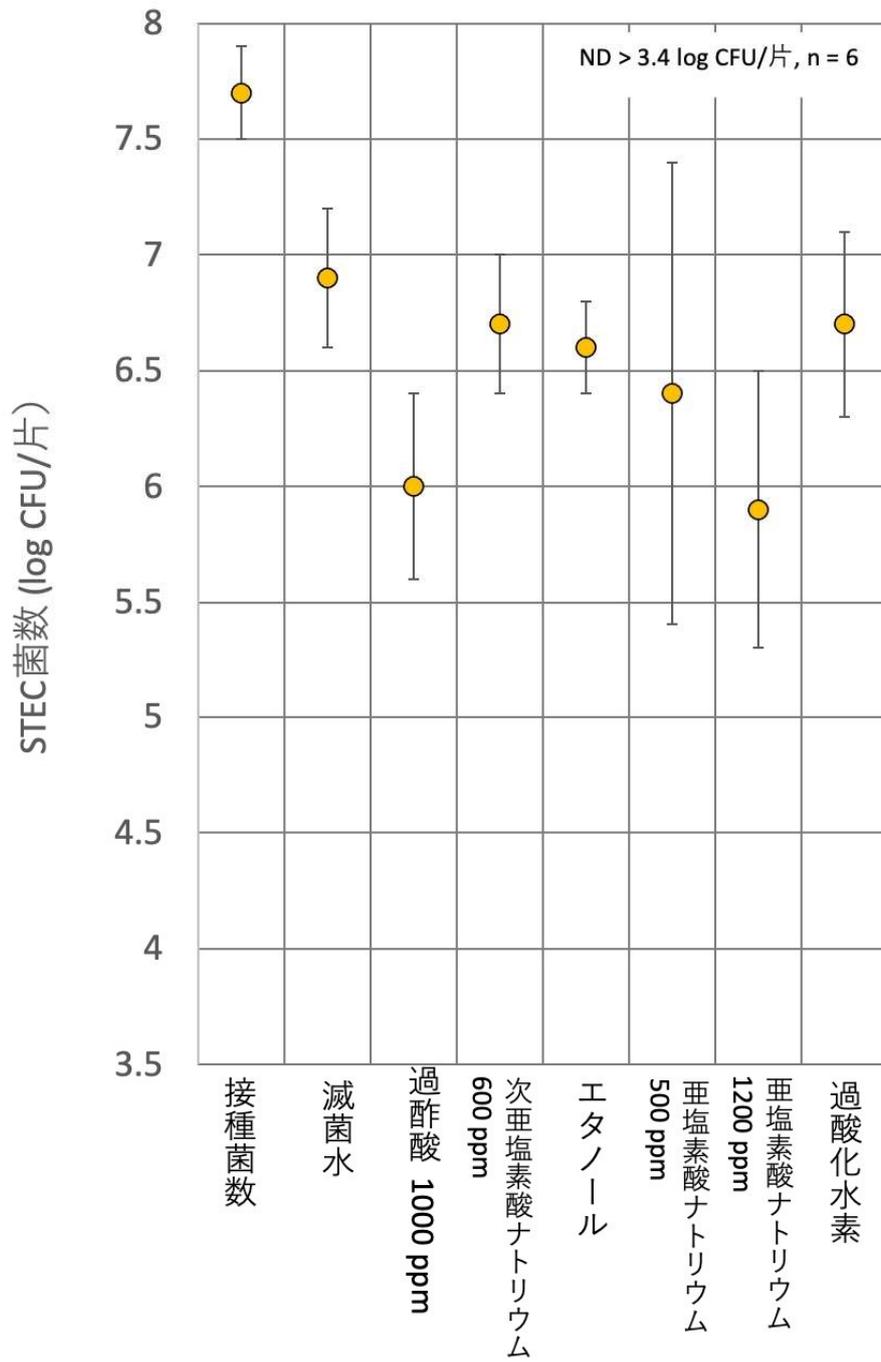


図 2-2 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証  
(筋膜あり検体、60回噴霧)

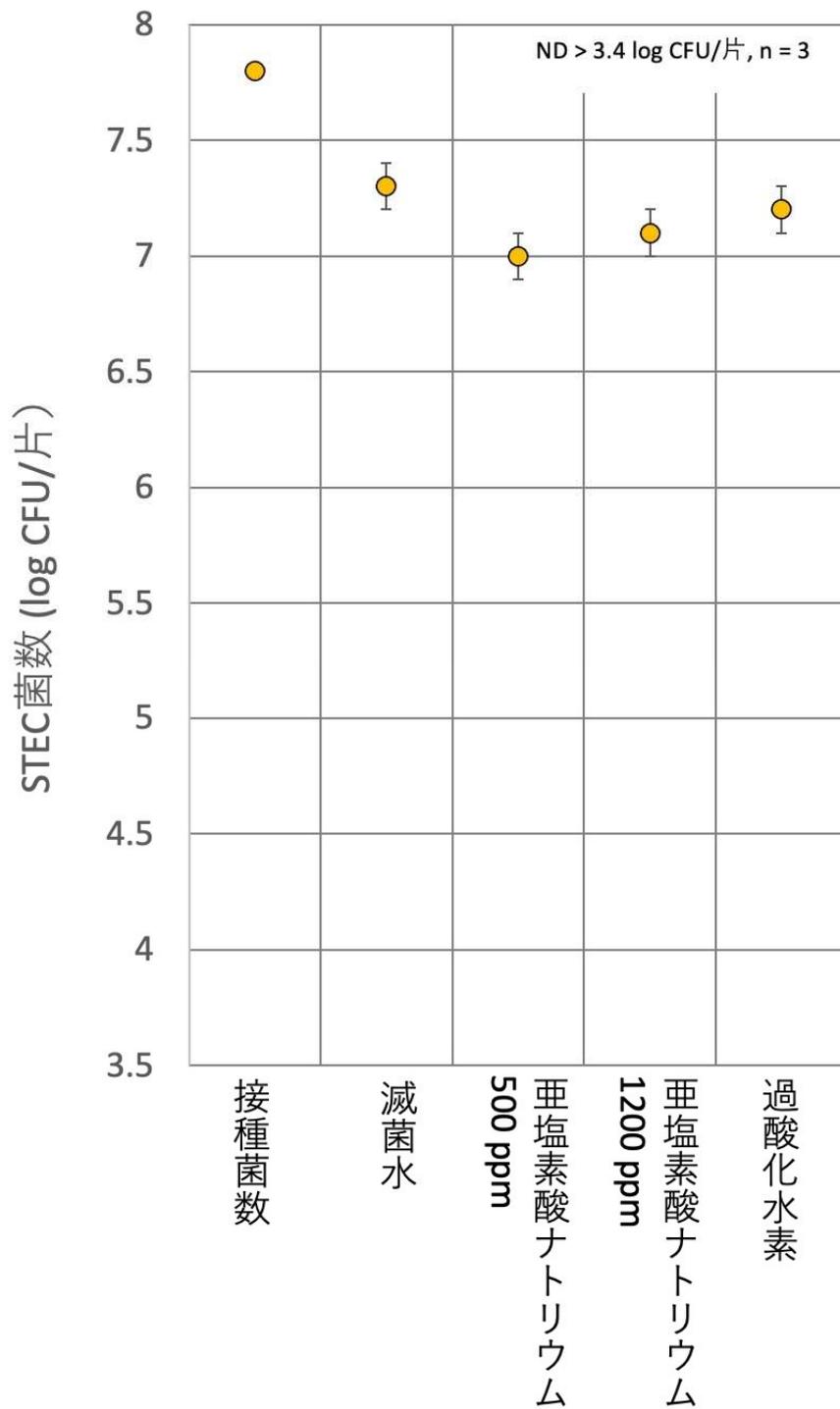


図 2-3 牛肉 STEC への消毒効果の検証  
(筋膜なし検体、60 回噴霧)

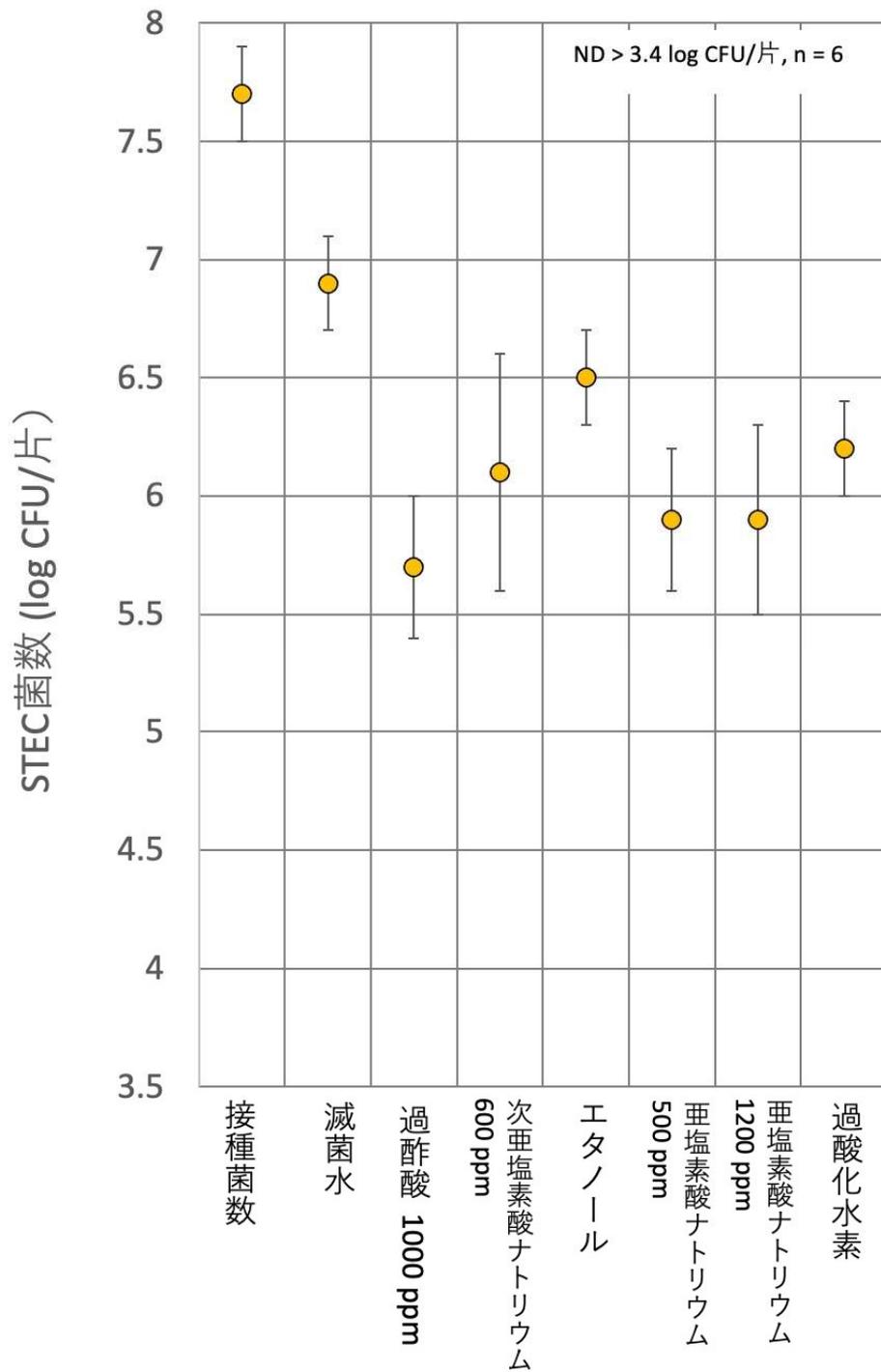


図 2-4 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証  
(筋膜あり検体、かけ流し 100 mL)

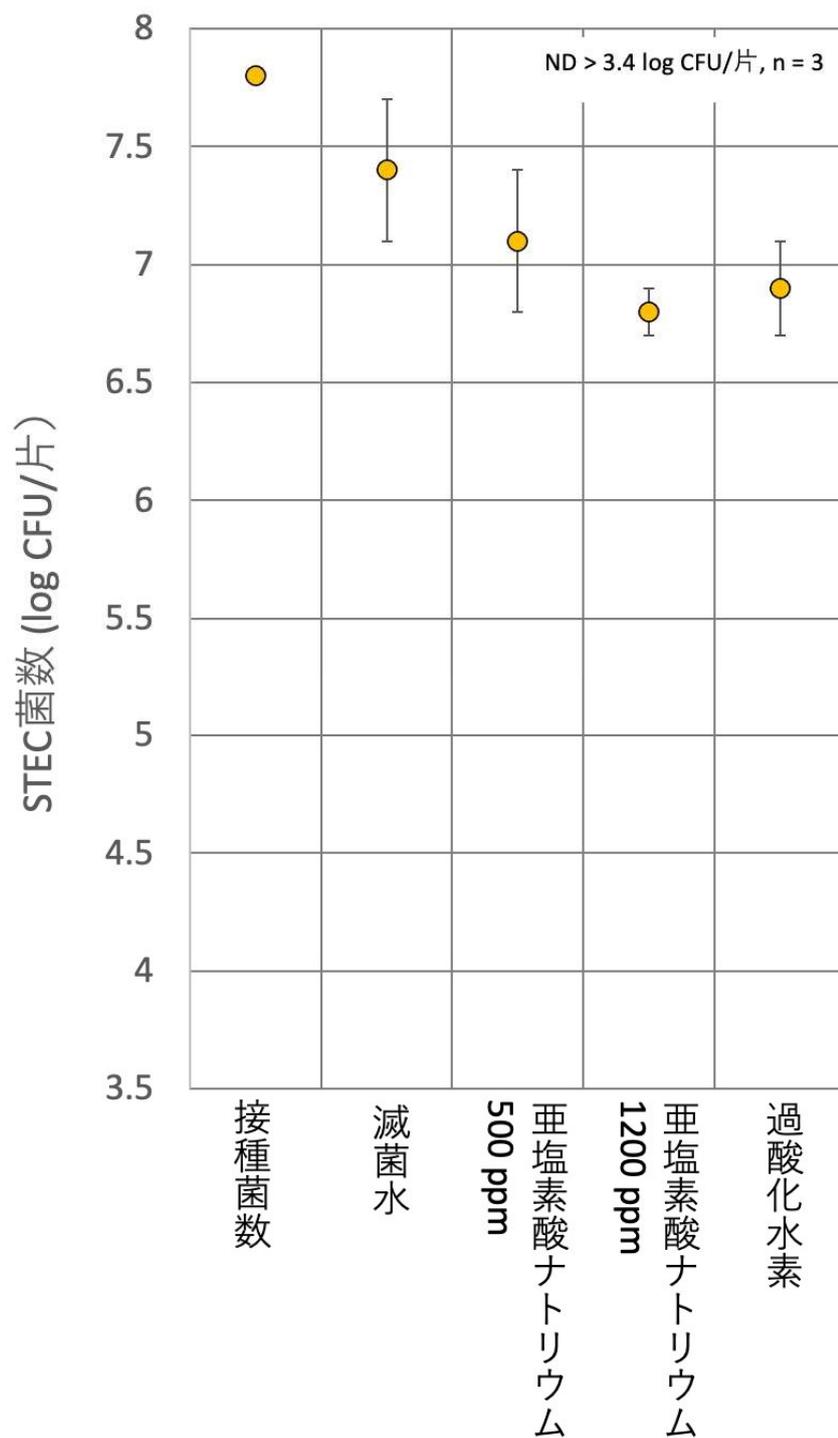


図 2-5 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証  
 (筋膜なし検体、かけ流し 100 mL)

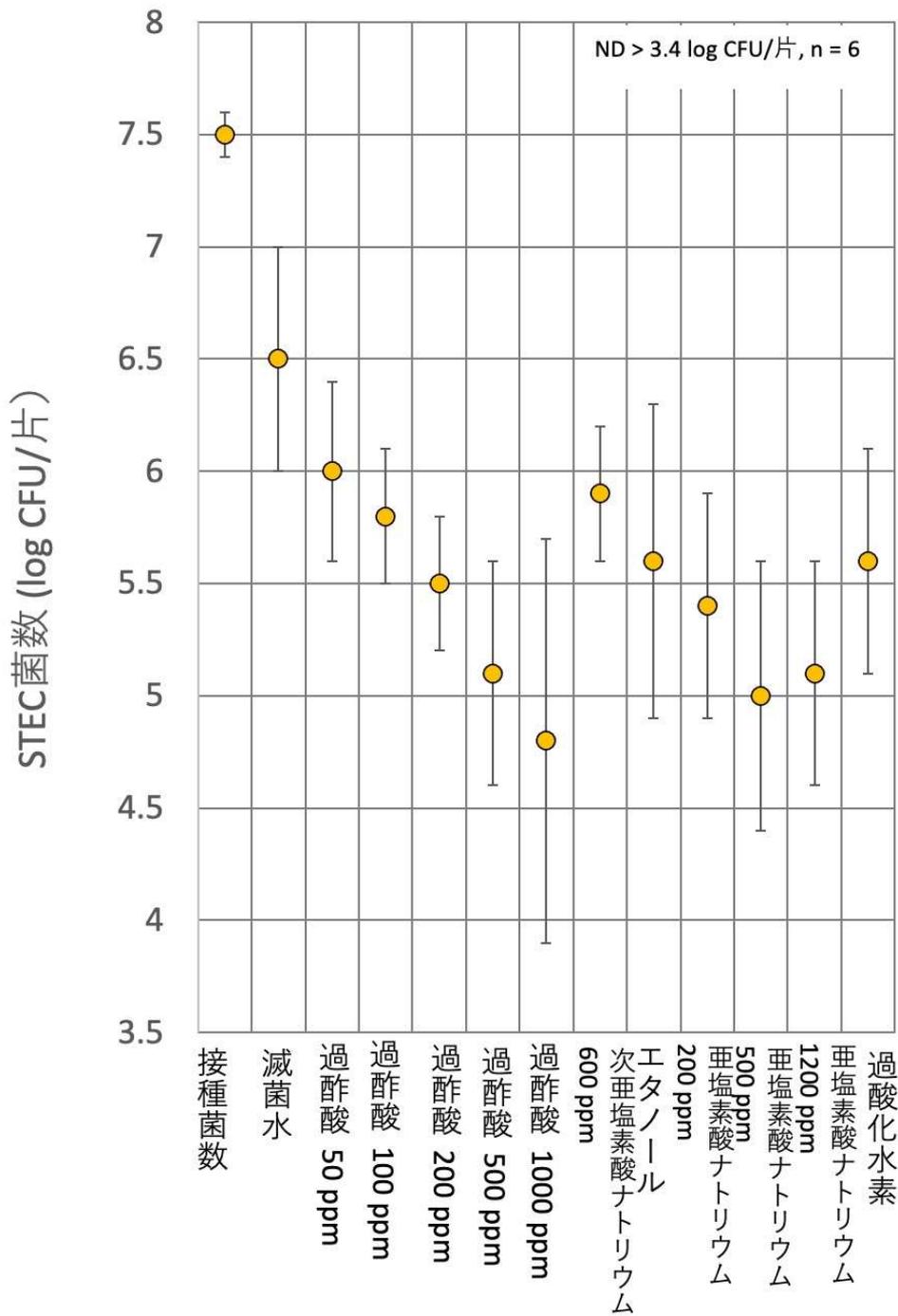


図 2-6 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証  
(筋膜あり検体、かけ流し 500 mL)

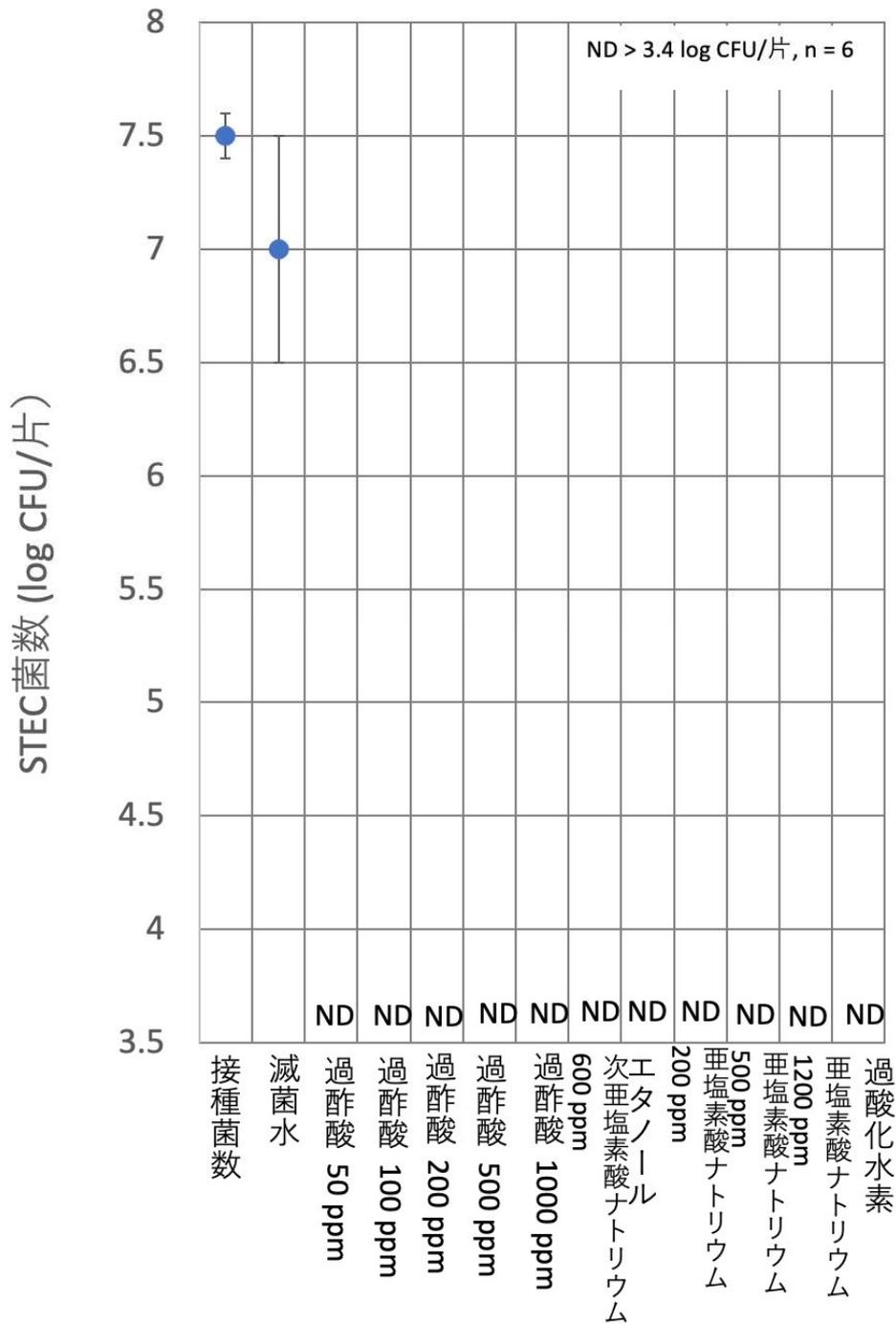


図 2-7 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証  
(筋膜あり検体、かけ流し後の消毒液)

表 2-1 供試した消毒液による牛肉表面の変色と臭味

消毒液	濃度	pH	牛肉表面の変色	臭味
過酢酸	50 ppm	4	ほとんどなし	弱い酢酸臭
	100 ppm	3.9	ほとんどなし	弱い酢酸臭
	200 ppm	3.7	ほとんどなし	酢酸臭
	500 ppm	3.7	ほとんどなし	強い酢酸臭
	1000 ppm	2.8	ほとんどなし	強い酢酸臭
亜塩素酸ナトリウム	200 ppm	2.8	白茶ける	弱い塩素臭
	500 ppm	2.7	白茶ける	弱い塩素臭
	1200 ppm	2.5	白茶ける	弱い塩素臭
過酸化水素	3.5 %	5.5	白っぽくなる	なし
次亜塩素酸ナトリウム	600 ppm	9.3	白茶ける	塩素臭
エタノール	70 %	6.7	やや白茶ける	アルコール臭

表 2-2 消毒試験条件

消毒液	濃度	STEC 懸濁液	牛肉検体					
			筋膜あり			筋膜なし		
			スプレー	かけ流し		スプレー	かけ流し	
			420 mL	100 mL	500 mL	420 mL	100 mL	500 mL
過酢酸	50 ppm	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
	200 ppm	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
	500 ppm	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
	100 ppm	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
	1000 ppm	T	T	T	T	NT	NT	NT
次亜塩素酸 ナトリウム	600 ppm	T	T	T	T	NT	NT	NT
エタノール	70 %	T	T	T	T	NT	NT	NT
亜塩素酸 ナトリウム	200 ppm	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
	500 ppm	T	T	T	T	T	T	NT
	1200 ppm	T	T	T	T	T	T	NT
過酸化水素	3.5 %	T	T	T	T	T	T	NT

T: 実施

NT: 非実施

表 2-3 消毒液の STEC への直接効果の検証

消毒液	濃度	血清群			
		O26	O103	O111	O157
過酢酸	50 ppm	NT	NT	NT	ND
	200 ppm	NT	NT	NT	ND
	500 ppm	NT	NT	NT	ND
	100 ppm	ND	ND	ND	ND
	1000 ppm	ND	ND	ND	ND
次亜塩素酸 ナトリウム	600 ppm	ND	ND	ND	ND
エタノール	70 %	ND	ND	ND	ND
亜塩素酸 ナトリウム	200 ppm	ND	ND	ND	ND
	500 ppm	ND	ND	ND	ND
	1200 ppm	ND	ND	ND	ND
過酸化水素	3.5 %	5.9±0.0	5.8±0.0	5.7±0.1	5.8±0.0
滅菌水		6.0±0.0	6.0±0.0	5.8±0.0	5.9±0.1
接種菌液		7.10	6.97	6.94	7.07

平均±SD (log CFU/mL)

NT: No test

ND: Not detected (検出限界<2)

### III. 分担研究報告

#### 研究総括

研究分担者 穉山浩

星薬科大学薬学部

国立医薬品食品衛生研究所

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3年度 分担研究報告書

動物性食品輸出の規制対策のための研究  
食肉中のアフラトキシンの分析

研究分担者 穂山浩 星薬科大学薬学部 薬品分析化学研究

### 研究要旨

EU へ動物性食品を輸出する際は、牛肉中のアフラトキシンの分析による検査を行う必要がある。筋肉を対象としたアフラトキシンの分析法が必要であるが、アフラトキシンの分析法が整備されていない。牛筋肉を対象としたアフラトキシンの分析法の確立を検討した。試料の前処理に Captiva EMR-Lipid を使用した結果、カラムの汚染や試料溶液の懸濁が改善された。検量線は、0.05~5 ng/mL の濃度範囲で AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> いずれも  $r=0.999$  以上となり良好な直線性が得られた。定量下限値(MQL :  $S/N>10$ )はそれぞれ 0.006、0.024、0.012、0.018 および 0.006 ng/g であった。各 2.5 ng/g で添加回収実験を行ったが、平均回収率、併行精度、室内精度とも良好であった。

研究協力機関 (一財) 日本食品分析センター

#### A. 研究目的

EU へ動物性食品を輸出する際は、欧州理事会指令 96/23/EC および規則(EU)2017/625 に従って作成した残留物質モニタリング計画に基づき、B 物質(抗菌性物質、駆虫剤、抗コクシジウム剤、非ステロイド性抗炎症薬、カルバメート系農薬、ピレスロイド系農薬、有機塩素系農薬、PCB、有機リン系農薬、重金属・有害元素、マイコトキシン)のモニタリング検査を行う必要がある。アフラトキシンの類(AFs)は、*Aspergillus* 属の一部が産生するかび毒であり、主に AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub> および AFG<sub>2</sub> などがあり、これらは強い発がん性を有している。本研究では、牛筋肉を対象としたアフラトキシンの分析法を確立し、迅速な対応が取れる体制を整備することを目的とした。

#### B. 研究方法

1. 試薬および試料 AFs (AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub> および AFG<sub>2</sub> 混合液、各 25 µg/mL) は和光純薬工業株式会社製を用いた。アセトニトリルおよびメタノール(いずれも HPLC 用)は富士フィルム和光純薬工業株式会社製を用いた。TFA(特級)は和光

純薬工業株式会社製を用いた。超純水は大和化研製を用いた。AfalaPat は GLSciences 社製のものを用いた。試料には、市販の国産和牛肉を用いた。使用した器具の洗浄は、予め次亜塩素酸ナトリウム(化学用)和光純薬工業株式会社製を 1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に調製したもので 2 時間以上浸漬して AFs を十分に分解した後、中性洗剤で洗浄した。

2. 標準溶液の調製 AFs 混合液は、AFs 混合液(25 µg/mL)を 1 mL 正確に量り取り、アセトニトリルで 100 mL にメスアップしたものを標準原液(250 ng/mL)とした。この標準原液から精製水で適宜希釈したものを標準溶液とした。これらの標準原液と標準溶液は 10°C 以下で保存した。

#### 3. 抽出操作

国産和牛肉を 50 g を量り取り、高速ホモジェナイズし均質化した。そこに標準溶液を 500 µL 添加した。抽出液としてアセトニトリル 200 mL を加え、高速ホモジェナイズした。吸引ろ過により得たる液約 200 mL を試料溶液とした。

#### 4. 固相分散抽出法(SPDE)

Captiva Lipid チューブに試料溶液 6 mL 分取し、5 分かけて自然落下で抽出ろ過を行った。この操作を 4 回行った。次に、Captiva Lipid のろ液 6 mL を AfalaPat に分取し、2 分かけて自然落下にて抽出を行い、初めのろ液が約 2 mL になった時点で滴下を止めた。同様の操作を 3 回行った。AfalaPat のろ液約 2 mL から正確に 2 mL をチューブに分取し、45°C で窒素乾固した。同じチューブを用いて、2 mL 分取し乾固するという操作を同様に 3 回行った。計 6 mL の窒素乾固を行い濃縮した。

#### 5. 蛍光誘導体化法

濃縮を行ったチューブに TFA 0.1 mL を添加し、30 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した。室温暗所で 15 分間放置した。ACN 0.9 mL を加えて全量を 1 mL とし、その 20  $\mu$ L を HPLC-FL で測定した。

#### 6. 分析装置および測定条件

装置：HPLC-FL

##### 【HPLC 条件】

ポンプ : GLSciences DG660B-2  
Degussing Unit  
分析カラム : L-column3 ODS (2.1 mm $\times$ 150 mm i.d., 3  $\mu$ m)  
移動相 : 精製水/アセトニトリル/メタノール混液(70:15:15, v/v)  
流速 : 0.2 mL/min  
カラム温度 : 40°C  
注入量 : 20  $\mu$ L

##### 【FL 条件】

蛍光検出器 : 日本分光 FP-4025  
励起波長 : 365 nm  
蛍光波長 : 435 nm

#### C. 研究結果及び考察

本研究では、輸出向け国産和牛肉中総 AFs 残留分析法を検討した。LC 分離において、既存の残留分析法を参考に、AFs の検出の際には精製水/アセトニトリル/メタノール混液(70:15:15, v/v)を使用した。

蛍光検出に際しても、既存の残留分析法を参考に、波長を設定した。試料溶液の調製において、試料抽出液が懸濁したため本法では、Captiva EMR-Lipid を使用した。その結果、カラムの汚染や試料溶液の懸濁が改善された。検出限界(MDL :  $S/N=3$ )は 4 ng/g、定量下限値(MQL :  $S/N>10$ )は 8 ng/g であった。

構築した方法で性能評価を検討したところ、検量線は、0.05~5 ng/mL の濃度範囲で AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> いずれも  $r=0.999$  以上となり良好な直線性が得られた。また、検出限界(MDL :  $S/N=3$ )はそれぞれ 0.002、0.008、0.004、0.006 および 0.002 ng/g、定量下限値(MQL :  $S/N>10$ )はそれぞれ 0.006、0.024、0.012、0.018 および 0.006 ng/g であった。

各 2.5 ppb 添加で AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> の各平均回収率は 102%、99%、118%、96%で、各併行精度は、6.3%、3.4%、6.0%、6.3%、各室内精度は、8.3%、3.2%、10.0%、7.2%であった。

#### D. 結論

本法は、国産和牛肉中の総 AFs の一斉分析に適用可能であることが確認された。今後、日本産の和牛を輸出する際の分析に適応できると考えられ、食品衛生分野での貢献が期待される。

E. 健康危険情報 なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

G. 研究発表

(論文発表)

**Akiyama H, Takagi A, Inoue K, Suzuki Y, Ito R, Wakui N, Asai M, Sugiura J.** Evaluation of a risk communication program for pesticide residues, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 62, 187-192 (2021).

(学会発表) なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況なし