

I. 総括研究報告

星薬科大学

梶山 浩

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

令和 6 年度 総括研究報告書

動物性食品輸出の規制対策の強化に資する研究

研究代表者 穂山 浩

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

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

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

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

研究分担者

研究分担者

志田(齊藤) 静夏(国立医薬品食品衛生研究所 食品部第三室長)

吉富 真理 (国立保健医療科学院 上席主任研究官)

工藤由起子(星薬科大学・薬学部・教授)

廣瀬昌平(国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部第二室長)

研究協力機関

(一財) 日本食品分析センター

日本フードパッカー株式会社

研究協力者：

田口貴章 (国立医薬品食品衛生研究所)

阿部嘉智(岩手県食肉衛生検査所)

関口明子(栃木県食肉衛生検査所)

吉田史子(大分県食肉衛生検査所)

本多伽衣、天野壮俊、鏡山雅人、内場健斗、

大塚佳代子、奥輝明、築地信、渡辺はるな、

伊藤里恵、岩崎雄介 (星薬科大学)

赤松 玲子 (栃木県食肉衛生検査所)

塚本 真由美(岐阜県飛騨食肉衛生検査所)

安達 恵、高澤 木綿子(姫路市食肉衛生検査センター)

西屋 秀樹(鹿児島県阿久根食肉衛生検査所)

中島 靖剛(スターゼンミートプロセッサー株式会社 品質管理部)

A. 研究目的

海外での和牛の需要の高まりや日本政府および業界関係者による和牛輸出促進の影響のため、海外への和牛輸出量が増加している。輸出促進のためには食品衛生管理の対策に関する検討を行う必要が

ある。そこで4つの課題に関して検討を行うことを目的とする。

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

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

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

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

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

B. 研究結果及び考察

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の 分析法の確立と妥当性評価

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

1. 試験溶液の調製

1.1 抽出

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

1.2 精製

抽出液 20 mL (試料 2 g 相当) をグラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム [InertSep GC/PSA(500 mg/500 mg/6 mL)] (あらかじめアセトニトリル 5 mL で洗浄したもの) に負荷し、溶出液を 50 mL 遠心管に受けた。次いで、アセトニトリル及びトルエンの混液(3:1)10 mL で溶出し、先の遠心管に合わせた。全溶出液をなす形フラスコに移し、ロータリーエバポレーター(40℃)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。

残留物を水及びメタノールの混液(1:1) 1 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

2. 妥当性評価試験

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

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

1. 試験溶液の調製

1.1 抽出

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

1.2 加水分解反応

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

1.3 精製

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

メタノール 5 mL、水 10 mL で洗浄したもの)に負荷した。遠心管内を 5 mL の水で洗い、洗液をカラムに負荷した。水及びメタノールの混液(11:9)5 mL で洗浄した後、1 分間吸引した。次いでヘキササン 5 mL で洗浄した後、1 分間吸引した。親水性基修飾 SDB ミニカラム[EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)]の下にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム[Sep-Pak Plus NH₂(360 mg)](あらかじめ酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)5 mL で洗浄したもの)を接続し、酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)15 mL で溶出した。溶出液をなす形フラスコに入れて、ロータリーエバポレーター(40℃)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水及びメタノールの混液(1:1)1 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

2. 妥当性評価試験

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

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

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

(1) と畜場での作業

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

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

(2) STEC・サルモネラ属菌検出法および生菌数測定

1) 検体の調製

検体は、試験に使用するまで氷上もしくは 4℃に保管された。サンプリングバッグを無菌的に開封し、Modified tryptone soya broth (mTSB) 300 mL を加え、バックの外からよく手で揉み、検体液とした。この検体液から、3 mL を生菌数測定用に使用した。また、定量的検出用として 37 mL を別容器に分注し 4℃に保管した。

2) 生菌数測定

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

で 48 時間培養後、生菌数測定を行った。

3) 定性的な STEC 7 血清群の検出

3-1) 検体の増菌液からの DNA 抽出

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

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

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

プライマーセット Assay 1 (*stx/eae*) ではベロ毒遺伝子 (*stx* 遺伝子) およびインチミンタンパク質遺伝子 (*eae* 遺伝子) を、Assay 2 (16S/0157) では 16SrRNA 遺伝子および 0157 遺伝子を、Assay 3 (026/0111) では 026 遺伝子および 0111 遺伝子を、Assay 4 (045/0121) では 045 遺伝子および 0121 遺伝子を、Assay 5 (0103/0145) では 0103 遺伝子および 0145 遺伝子を検出する。

リアルタイム PCR の反応条件は、 95°C で 10 分を 1 サイクル、次いで 95°C で 15 秒、 59°C で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。まず初めに Assay 1、2 を行った。その結果、*stx* 陽性かつ *eae* 陽性の検体

は、続けて Assay 3、4、5 を同時に行い、7 血清群 0 遺伝子が陽性になるかを確認した。STEC 7 血清群陽性の検体は、陽性となった 0 血清型について免疫磁気ビーズ法を以下のように行った。7 血清群 0 遺伝子がない場合は STEC 7 血清群陰性とした。

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

免疫磁気ビーズ法は、免疫磁気ビーズ 026、045、0103、0111、0121、0145、0157 「生研」(デンカ株式会社)を用いて行った。最終的に E バッファー 1 mL に懸濁したものをビーズ濃縮液とした。このビーズ濃縮液を E バッファーで 10 倍および 100 倍希釈し、各希釈液 0.1 mL をソルビトールマッコンキー寒天 (SMAC) 培地、セフィキシム・亜テルル酸加ソルビトールマッコンキー寒天 (CT-SMAC) 培地、クロモアガーSTEC 培地およびセフィキシム・亜テルル酸加クロモアガーSTEC (CT-クロモアガーSTEC) 培地にそれぞれ 1 枚ずつ塗抹した。

さらに、酸 (1 N 塩酸) を加え、ローターで 1 時間反応させたものを酸処理ビーズ濃縮液とした。この酸処理ビーズ濃縮液は E バッファーで 2 倍および 20 倍に希釈した液 0.1 mL ずつを SMAC 培地、CT-SMAC 培地、クロモアガーSTEC 培地および CT-クロモアガーSTEC 培地に 1 枚ずつ塗抹し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 18-24 時間培養した。

これらの培地上に増殖した疑わしいコ

コロニーに関して、以下の STEC 7 血清群の確認を行った。

3-4) コロニーの STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

コロニーを 0.1 mL の TE 緩衝液 (pH 8) に懸濁し、DNA 熱抽出を行なった。この抽出液をテンプレートとして、Assay 1 および目的とする O 群によるプライマーを用いて、3-2) と同様にリアルタイム PCR を行った。この結果、7 血清群 O 遺伝子が陰性となったこのコロニーを STEC 7 血清群陰性と判定した。*Stx* 陽性かつ *eae* 陽性、血清群 O 遺伝子が陽性のコロニーは、STEC 7 血清群陽性と判定した。

3-5) STEC 分離株の血清型の再確認

基本的には、血清群 O26、O45、O103、O111、O121、O145 および O157 の血清型別は、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ株式会社) または市販のラテックス凝集試薬を用いた。7 血清群に凝集したものについては、H 血清型を抗血清および H-genotyping (1) を用いて H 血清型を決定した。なお、7 血清群以外については O 血清群を抗血清および O-genotyping (2) にて決定した。

(3) サルモネラ属菌の検出方法

1) 試験検体

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

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

2) 検体の増菌培養液または培養液残液の二次増菌培養からの DNA 抽出

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

3) サルモネラ属菌特異的遺伝子の検出

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

(1) の 5) に示した 16S Assay2 と同じ配列を用いた。

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

4) 選択培地を用いたサルモネラ属菌の分離

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

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

5) サルモネラ属菌の同定

TSA 上のシングルコロニーを用いて、デンカ生研の「サルモネラ LA」で凝集試験を行った。凝集試験陽性のコロニーは、ブドウ糖、乳糖および白糖の発酵およびガス産生、硫化水素産生を観察するために Triple sugar iron agar (TSI 寒天培地) に、リジン脱炭酸産生、インドール産生、運動性を観察するために Lysine Indole motility medium (LIM 培地) に培養して、生化学的性状試験を行った。

6) 血清型別試験

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

研」H 血清を用いて血清型を決定した。

7) サルモネラ属菌の汚染菌数の定量

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

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

(1) 試薬キットおよび機器

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

(2) 検体作製

1) 菌株および牛肉の培養

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

2) 菌希釈検体の作製

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

3) 菌数測定

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

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

各キットの使用手順に沿って、実施した。

食肉衛生検査所の研修教材の作成

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

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

食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

1. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

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

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

(1) STEC 検査

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

(2) サルモネラ検査

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

2. STEC 免疫磁気ビーズの濃縮工程の検証

(1) 供試菌株および増菌培養

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

(2) 免疫磁気ビーズ法

免疫磁気ビーズ法は、免疫磁気ビーズ 026、045、0103、0111、0121、0145、0157「生研」(デンカ株式会社)を用い

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

C. 研究結果

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

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

1. LC-MS/MS 条件の検討

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

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

①0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH7 程度)

②0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH8 程度)

③0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH9.5 程度)

④水

⑤水及びアンモニア水の混液 (1000:1) (pH10 程度)

⑥0.5 mmol/L 炭酸水素アンモニウム溶液 (pH7.5 程度)

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

2. 試料前処理の検討

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

2.1 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラ

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

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

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

2.3 グラファイトカーボンミニカラムによる精製

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

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

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

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

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

3. 妥当性評価試験結果

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

ピークは検出されなかった。また、真度、併行精度及び室内精度の目標値を満たした。内標準物質の回収率はいずれも 40%以上であった。定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。以上の結果から、本分析法は牛の筋肉を対象とした残留分析法(定量限界 0.5 $\mu\text{g/kg}$)として妥当であることが示された。

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

1. LC-MS/MS条件の検討

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

2. 試料前処理の検討

2.1 エタノール存在下でのグルクロン酸抱合体の加水分解条件の検討

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

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

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

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

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

ステロールを各 0.0125 µg、ジエネストロール- d_6 、 $[^2H_8]$ -ジェチルスチルベストロール及びヘキセステロール- d_4 を各 0.0125 µg 供した。水及びメタノールの混液(11:9)及びヘキサンにて洗浄を行った後、各カラムの下部にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-Pak Plus NH2(360 mg)](あらかじめ酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)5 mL で洗浄したもの)を連結し、酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)で溶出した。その結果、いずれの固相カラムも洗浄液[水及びメタノールの混液(11:9)5 mL またはヘキサン 5 mL]では溶出せず、酢酸エチル及びメタノールの混液(9:1)15 mL までにほぼ 90%以上が溶出された。

次に、牛の筋肉にジエネストロール、ジェチルスチルベストロール、ヘキセステロール、ジエネストロール- d_6 、 $[^2H_8]$ -ジェチルスチルベストロール及びヘキセステロール- d_4 を添加して、抽出、加水分解反応後に同様にカラム精製を行った。その結果、試料マトリックス存在下では親水性基修飾 SDB ミニカラム [EVOLUTE ABN (150 mg/6 mL)]を用いた場合の方がより良好な内標準物質回収率が得られた。

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

3. 妥当性評価試験結果

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

ピークは検出されなかった。また、真度、併行精度及び室内精度の目標値を満たした。内標準物質の回収率はいずれも 40%以上であった。定量限界濃度を添加した添加試料から得られたピークは $S/N \geq 10$ であった。以上の結果から、本分析法は牛の筋肉を対象とした残留分析法(定量限界 0.5 µg/kg)として妥当であることが示された。

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

(1) 生菌数

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

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

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

施設別の生菌数の結果を表 1 - 7 に示す。採材期間を通して、平均生菌数が最も

多かった施設は C 施設であった。平均生菌数は $4,455.6 \pm 17,333.5$ CFU/cm² であり、100 CFU/cm² を超えるウシが 13 頭、1,000 CFU/cm² を超えるウシが 3 頭であった。

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

(2) STEC7 血清群の分離

定性的な検出を行い、増菌培養液が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方あるいは片方が陽性であった検体の STEC7 血清群のリアルタイム PCR で試験した。供試検体 108 検体のうち、11 検体が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の少なくとも片方が陽性であり、両遺伝子のいずれもが陽性となった検体はそのうち 4 検体であった。この 4 検体のうち 1 検体が STEC 7 血清群の O45 で陽性となり、Ct 値は 29.7 であった（検体番号 24-105）。

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

(3) サルモネラ属菌の検出

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

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

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

(4) サルモネラの定量

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

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

実施結果については、別途とりまとめた。

食肉衛生検査所の研修教材の作成

1. 動画教材の作成

1.1 と畜検査の方法の教材

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

1.2 HACCP の基礎知識

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

1.3 米国等向け輸出食肉に係る指名検査員による検証の教材

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

1.4 微生物検査の教材

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

食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

1. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

（１）STEC 検査

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

（２）サルモネラ検査

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

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

2. STEC 免疫磁気ビーズの濃縮工程の検証

STEC O26、O111 および O157 の各菌液において免疫磁気ビーズ O145 で濃縮後の菌数は、各血清型特異的免疫磁気ビーズで濃縮した場合と比較して $1.9 \sim 2.5 \log_{10}$ 低下した。また、STEC O145 菌液を免疫磁気ビーズ O157 で濃縮した場合は、O145 特異的免疫磁気ビーズで濃縮した場合に比べて菌数が $1.7 \log_{10}$ 低下した。一方で、STEC O45、O103 および O121 の各菌液については、免疫磁気ビーズ O145 と各血清型特異的免疫磁気ビーズとの菌数差は $1.0 \log_{10}$ 以下であった。

また、STEC O103 の菌液を 3 種類の菌濃度 (10^5 CFU/mL、 10^7 CFU/mL および 10^9 CFU/mL) で各種血清型特異的免疫磁気ビーズを用いて濃縮したところ、どの菌濃度においても免疫磁気ビーズ O103 で濃縮後の菌数が他の血清型免疫磁気ビーズでの濃縮後の菌数よりも高かった。免疫磁気ビーズ O103 濃縮後と他の血清型免疫磁気ビーズ濃縮後との菌数差は、 10^9 CFU/mL の菌液よりも 10^5 CFU/mL および 10^7 CFU/mL の菌液でより大きくなる傾向が認められた。O103 以外の血清型免疫磁気ビーズ間で濃縮後の菌数に大きな差は

認められなかった。

D. 考察

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

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

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

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

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

測定された生菌数は施設の影響が大き

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

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

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

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

食肉衛生検査所の研修教材の作成

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

1. HACCP の基礎的な講義資料

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

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

また、講義内容の理解度を確認するためのテストがあることが望ましいと考える。

2. 動画を利用した教材

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

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

3. 参考資料

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

所の多忙な業務のなかで利用しやすい参考資料になると考える。

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

4. その他

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

食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

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

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

C. 結論

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

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

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

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減のための研究を実施した。1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査では、2024 年 9 月から 4 施設の協力のもとに牛枝肉合計 108 検体から 7 血清群 (O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157) の STEC およびサルモネラ属菌を対象とした調査を行った。また、このうち 3 施設については衛生指標として生菌数についても測定を行なった。供試検体を増菌培養後、または施設にて増菌培養した培養液の二次増菌培養後、STEC7 血清群マルチプレックスリアルタイム PCR およびサルモネラ特異的リアルタイム PCR に供試した。スクリーニングを行い、陽性になった検体については菌分離を行った。分離された株については生化学的性状試験および血清型別を行った。この結果、1 検体(0.9%)からサルモネラ属菌が分離されたが、1 検体のみであったことからウシの種類や性別など

の特徴については考察には至らなかった。なお、STEC7 血清群は検出されなかった。また、2. MLG 掲載または第 3 者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行では、菌液および菌添加牛肉培養液からのキットを用いた DNA の抽出および検出を実施した。今後、より詳細な使用手順が整備されることによって、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられた。

食肉衛生検査所の研修教材の作成

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

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

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

食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

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

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

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

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

- 4) Akiyama, H., Iwasaki, Y., Ito, R., Basic Principles for Setting MRLs for Pesticides in Food Commodities in Japan. Food Safety, 12, 34-51 (2024)

2. 学会発表

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

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

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし