I. 総合研究報告

動物性食品輸出の規制対策の強化に資する研究

研究代表者 穐山浩

（星薬科大学薬学部）

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 5～7 年度 総合研究報告書

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 穐山 浩

研究要旨 課題 1 モニタリング検査または EU における輸入時検査において A 物質が検出された場合に原因究明に資する分析法を整備した。令和 5 年度は、EU 向けに動物性食品を輸出する際に求められるモニタリング検査において A 物質が検出された場合の原因調査に資する分析法として、牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシル分析法を確立した。また、同様の目的で、牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類分析法を確立した。令和 6 年度は、輸出先である EU で行われる検査で牛肉から A 物質が検出された場合の原因調査に資する分析法として、牛肉中のステロイド類分析法及びスチルベン類分析法を開発した。令和 7 年度は、EU での輸入時検査において A 物質が検出された場合の原因調査に資する分析法として、鶏筋肉中のニトロイミダゾール類分析法及び牛／鶏筋肉中の β-作動薬分析法を確立した。妥当性評価試験の結果、本課題で確立したすべての分析法は、真度、併行精度、室内精度及び選択性の目標値を満たし、迅速な原因究明及び輸出再開に資する分析法として妥当であることが確認された。**課題 2** 牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減のための研究を実施した。1．牛枝肉の腸管出血性大腸菌（STEC）およびサルモネラ属菌調査では、令和 5 年度は 5 施設の協力のもとに集収した牛枝肉培養液を STEC 7 血清群については 40 検体およびサルモネラ属菌については 86 検体を試験に供試したが、いずれも検出されなかった。続いて、令和 6 年度および令和 7 年度は 3 施設の協力のもとに集収した枝肉密着ガーゼ検体合計 255 検体を試験し、サルモネラ属菌が 1 検体から検出され、血清型は Dublin であった。しかし、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。検体採取としては、ガーゼを枝肉に密着させて回収する方が検出感度が優れる可能性が示された。また、生菌数についても測定を行ない、施設や月ごとに解析した。2．STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査では、STEC 検査およびサルモネラ検査において、遺伝子検査での判定時のトラブルを改善する必要があると考えられた。3．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。また、使用マニュアルを作成したので、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられる。**課題 3** 本研究では、輸出食肉認定施設における指名検査員の研修の現状を把握し、効果的な研修教材および研修プログラムの整備を目的として調査・検討を行った。国内の輸出食肉認定施設を管轄する食肉衛生検査所を対象としたアンケートおよびインタビュー調査の結果、研修は主に OJT を中心に実施されている一方、教材や評価方法にばらつきがあり、体系的な知識・技術の習得が困難であることが明らかとなった。これを踏まえ、輸出食肉認定施設における検査実施要領に基づき、と畜検査、HACCP、指名検査員による検証等を対象とした動画教材およびオンデマンド教材を作成し、海外規制官庁の法令等を参考資料として整理したうえで、検査実施要領を踏まえた研修プログラム案を作成した。さらに、作成教材を用いた基礎研修の試行を通じて理解度の向上が確認され、教材の有効性が示唆された。以上より、本研究で整備した教材および研修プログラム案は、新任指名検査員研修の標準化および質の向上に資する基礎的資料となると考えられた。**課題 4**：対米輸出向け食肉施設における 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、国内対米輸出認定施設で運用されている標準作業手順書（SOP）の調査および検査手法の精度検証を実施した。SOP 調査では、国内 10 施設を対象として STEC 検査およびサルモネラ検査に関する聞き取り調査および SOP 内容の比較を行った。その結果、施設ごとに運用上の差異は認められたものの、いずれも施設の処理工程や検査体制に即した内容であり、試験法逸脱は認められなかった。一方で、判定時のトラブルや SOP 作成時の判断に迷う事例が複数施設から報告された。聞き取り調査で報告された STEC 検査に用いられる免疫磁気ビーズ法の血清型非特異的濃縮の可能性について検証を行った結果、特定の血清型の組み合わせにおいて非特異的濃縮が生じることが示唆された。さらに、同様に報告された市販 STEC 検査キットのクオリバックス Q7 システムの偽陽性、偽陰性および判定不能事例および RapidFinder の偽陰性判定事例について、発生条件を検証した。クオリバックス Q7 システムでは開封後一定期間経過した試薬の一部で偽陽性、偽陰性および判定不能が認められたが、開封直後の試薬ではそれらの誤判定は認められなかった。RapidFinder では偽陰性は認められなかったが、高濃度菌存在下で *eae* の蛍光強度低下が認められ、検体の希釈で蛍光強度低下は軽減された。以上より、適切な試薬管理、検査波形の確認、必要に応じた検体希釈および免疫磁気ビーズ法の特性理解が、対米輸出検査の精度維持に重要であると考えられた。

研究分担者

志田（齊藤）静夏（国立医薬品食品衛生研究所　食品部第三室長）

工藤由起子（星薬科大学　教授）

吉冨真理（国立保健医療科学院　上席主任研究官）

廣瀬昌平（国立医薬品食品衛生研究所　衛生微生物部第二室長）

研究協力機関

（一財）日本食品分析センター

研究協力者（*STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査についてのみ協力）

鈴木竹彦、松本斉子（北海道帯広食肉衛生検査所*）

久松暢子、北村洸人、阿部嘉智、遠藤裕美（岩手県食肉衛生検査所）

越　勝男（岐阜県飛騨食肉衛生検査所）

関口明子、永島琴美、田中倖恵（栃木県食肉衛生検査所）

川見明日香（京都市衛生環境研究所食肉検査部門*）

橋本朋美（姫路市食肉衛生検査センター*）

小林将英（熊本県食肉衛生検査所）

渡邉春香、吉田史子（大分県食肉衛生検査所）

越野慶太（宮崎県高崎食肉衛生検査所*）

廣瀬昌平、千葉由美（国立医薬品食品衛生研究所）

日本フードパッカー株式会社

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

北山 友子（北海道帯広食肉衛生検査所）

山崎 昭子（群馬県食肉衛生検査所）

三浦 理恵子、大塚 衣映、赤松 玲子（栃木県食肉衛生検査所）

坂下 幸久、塚本 真由美（岐阜県飛騨食肉衛生検査所）

川見 明日香（京都市衛生環境研究所食肉衛生部門）

今井 真司、安達 恵、高澤 木綿子（姫路市食肉衛生検査センター）

角谷 玲雄（大分県食肉衛生検査所）

松本 一俊（熊本県食肉衛生検査所）

津江 友紀（宮崎県都農食肉衛生検査所）

指宿 明星（宮崎県高崎食肉衛生検査所）

西屋 秀樹（鹿児島県阿久根食肉衛生検査所）

中島 靖剛（スターゼンミートプロセッサー株式会社　品質管理部）

森田 幸雄（麻布大学）

山崎　栄樹（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

海外での和牛の需要の高まりや日本政府および業界関係者による和牛輸出促進の影響のため、海外への和牛輸出量が増加している。 輸出促進のためには食品衛生管理の対策に関する検討を行う必要がある。そこで4つの課題に関して検討を行うことを目的とする。

第 1 の課題では、モニタリング検査または EU における輸入時検査において A 物質が検出された場合に原因究明に資する分析法を整備した。

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

第 3 の課題では、食肉衛生検査所の指名検査員等に対し定期的に研修を行い、公的監査の知識や技術等を修得する必要があるが、体系的に整理された研修プログラム及び教材はない。輸出先国等の動物性食品の衛生管理の監査担当職員

向け研修プログラムの調査、国内の監視指導検査員の研修の実態調査等を行い、実施可能な監視指導検査員等向けの研修プログラム及び教材を作成することを目的とする。

第4の課題では、対米輸出食肉取扱施設で実施される牛肉の STEC およびサルモネラ属菌の検査の標準作業手順書(SOP)について検証し、各食肉衛生検査所で実施される検査の妥当性評価および試験逸脱防止を検討する。

B. 研究方法

課題 1:動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

［令和 5 年度］

［1］2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシル分析法

EU への牛肉輸出時のモニタリング検査で 2-チオウラシルが検出された場合の原因調査に資するため、牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルの分析法を確立した。牛尿を対象に添加濃度 10 μg/L で性能評価試験を実施した。

［2］ レゾルシル酸ラクトン類分析法

牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類（α-ZAL、β-ZAL、ZAN 及び ZEN）の分析法を確立した。

牛尿を対象に添加濃度 1 及び 2 μg/L で性能評価試験を実施した。

［令和 6 年度］

［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

牛肉中のステロイド類（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）分析法を確立した。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。

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

スチルベン類（ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール及びヘキセストロール）分析法を確立した。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。

［令和 7 年度］

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

ニトロイミダゾール類(ジメトリダゾール、ロニダゾール、メトロニダゾール、イプロニダゾール、2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール、1-(2-ヒドロキシエチル)-2-ヒドロキシメチル-5-ニトロイミダゾール、1-メチル-2-(2'-ヒドロキシイソプロピル)-5-ニトロイミダゾール)分析法を確立した。鶏の筋肉を対象に定量限界濃度［0.2 μg/kg(DTZ、RNZ 及び HMMNI)及び 0.1 μg/kg(MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH)］で妥当性評価試験を実施した。

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

β-作動薬(クレンブテロール、ラクトパミン、サルブタモール、ジルパテロール、シマテロール)分析法を確立した。牛及び鶏の筋肉を対象に定量限界

濃度［0.05 μg/kg(CBT)、0.5 μg/kg(RCP、SAL及びZPT)及び0.1 μg/kg(CMT)］で妥当性評価試験を実施した。

課題2：牛肉のSTECおよびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

１．牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

令和５（2023）年 11 月から令和 8（2026）年 3 月に国内の食肉衛生検査所計５施設にて、ウシ計 455 頭からサンプリングを行った。

（１）と畜場での作業

令和 5 年度については、5 施設の STEC 試験培養液残液 40 検体およびサルモネラ試験培養液残液 86 検体を宅配便（冷蔵）によって国立医薬品食品衛生研究所へ、令和 6 年度および令和 7 年度については、滅菌リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に浸漬した 30 cm×30 cm サイズの滅菌ガーゼを枝肉に密着させ回収したガーゼ検体合計 255 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

食肉衛生検査所の培養液残液では、Tryptone soya broth（TSB）にて 42℃で 18 時間培養（二次増菌培養）し検体液とした。ガーゼ検体では、Modified tryptone soya broth (mTSB) 300 mL を加え、検体液とした。

２）生菌数測定

検体液を適宜 10 倍階段希釈し、標準寒天培地に塗抹し、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

食肉衛生検査所の培養液残液およびガーゼ検体の増菌培養液（42± 1 ℃で 15-24 時間）から DNA をアルカリ熱抽出した。この DNA 抽出液をマルチプレックスリアルタイム PCR に用いた。STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR［Assay１（*stx/eae*）: 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）、Assay２（16S/O157）: 16SrRNA 遺伝子および O157 遺伝子、Assay３（O26/O111）: O26 遺伝子および O111 遺伝子、Assay４（O45/O121）: O45 遺伝子および O121 遺伝子、Assay５（O103/O145）: O103 遺伝子および O145 遺伝子］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。Assay１、２の結果、*stx* 陽性かつ *eae* 陽性の検体は、続けて Assay３、４、５を同時に行い、７血清群 O 遺伝子が陽性になるかを確認し、陽性となった O 血清型について免疫磁気ビーズ法を行った。なお、7 血清群 O 遺伝子が陽性にならなかった場合は STEC ７血清群陰性とした。ビーズ濃縮液をセフィキシム・亜テルル酸（CT）添加クロモアガーSTEC などで培養し、疑わしいコロニーについては前述の STEC ７血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR を行い、*stx* 陽性、*eae* 陽性かつ血清群 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。さらに、O 血清型および H 血清型を血清凝集反応によって確認した。

４）サルモネラ属菌の検出方法

STEC 試験で調製したアルカリ熱抽出 DNA をサルモネラ属菌特異的 *ttr* 遺伝子を検出するリアルタイム PCR に用いた。反応条件は、95℃で 10 分を 1 サイクル、次いで 95℃で 15 秒、59℃で１分の組み合わせを 45 サイクルとした。*ttr* 遺伝子がない場合はサルモネラ属菌陰性とした。*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液をテトラチオネート（TT）培地および Rappaport-Vassiliadis R10（RV）培地に接種し、42℃で 18

～24 時間培養した。それらを DHL 寒天培地および CHROMagar Salmonella にて培養し、典型的コロニーについては生化学的性状や血清型の試験を行なった。なお、典型的なコロニーが認められない場合は、陰性と判断した。さらに、サルモネラ属菌が分離されたガーゼ検体については、４℃で保存しておいた培養前の検体液を用いて、MPN 測定法（３本法）を行い、サルモネラ属菌の汚染菌数を測定した。

２．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。

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

（１）試薬キット

以下の３種類を供試し、各専用機器にて使用した。

①GENE-UP 試薬シリーズの STEC 検出キット５種（bioMérieux［フランス］ビオメリュー・ジャパン国内対応）、②SureTect 試薬シリーズの STEC 検出キット２種（ThermoFisherScientific[米国]、サーモフィッシャーサイエンティフィック国内対応）、③Molecular Detection Assay2　STEC Gene Screen(*stx* and *eae*)（Neogen[米国]、ネオジェンジャパン国内対応）

（２）検体作製

１）菌株および牛肉の培養

腸管出血性大腸菌（血清群 O26：２株、O45：１株、O103：１株、O111：１株、O121：１株、O145：１株、O157：２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 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。また、必要に応じて適宜希釈した。なお、PBS で希釈した 10^{-7} および 10^{-6} 希釈菌液 0.1 mL を TSA に塗沫し、37℃で 18 時間培養し、生育したコロニー数を測定し、菌液の菌数を算出した。

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

各キットの使用手順に従って、実施した。

（４）キット使用のためのマニュアル作成

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

課題 3:国内の食肉輸出施設の監視指導検査員の研修プログラムの充実

１．指名検査員の研修に関する調査

令和５年８月～令和６年３月に、国内の 15 か所の輸出食肉施設を管轄する検査所がある自治体を通じて、書面アンケートを送付し、11 検査所より回答を得た。そのうち、協力を得られた 9 検査所の研修責任者または研修担当者に半構造化インタビューを実施した。調査項目及び分析方法の詳細については令和５年分担研究報告書を参照されたい。

倫理面への配慮として、本調査は国立保健医療科学院の人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針の承認（承認番号：NIPH―IBRA＃23009）を受けて実施した。対象者には研究の目的、方法、内容等を説明

し、研究協力および同意撤回の自由、個人情報の保護等について説明し、書面での同意を得た。

２．研修教材

新任指名検査員を対象とし、検査実施要領の検査の知識・技術を習得するための研修教材として、動画を利用した以下の教材を作成した。

・と畜検査

・HACCP の基礎的な講義のオンデマンド教材

・加熱食肉製品及びと畜・解体工程の HACCP 演習で用いる教材

・と畜・解体工程及び食肉処理工程の検証

・腸管出血性大腸菌（STEC）の検査手技

３．参考資料

3.1.　輸出先国等の食肉の衛生管理の法令及び研修資料

教材及び検査業務の参考資料の作成のために、以下の公開資料を確認し、仮訳した。

・国際連合食糧農業機関（FAO）：Good Hygiene Practices (GHP) and HACCP Toolbox for Food Safety（以下、「FAO Toolbox」という。）

・動物性食品に係る米国連邦規則：9CFR

・FSIS Directives：公衆衛生獣医師及び検査官向け指令

・FSIS 公衆衛生獣医師及び検査官向けトレーニングシリーズ：Inspection Methods 1800

3.2 妥当性確認及び検証の参考資料

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

また、スチームバキューム（SV）処理による牛肉の E. coli 削減の妥当性確認試験として、国内で処理された牛ブロック肉（筋膜未除去）を用い、*E. coli* K12 株を接種後、SV により 0～5 回処理後、大腸菌数の変化を培養試験と統計解析により評価した。

4. 教材を用いた研修の検証

2. の教材を用いて、令和8年1～3月に、2 か所の検査所で検査実施要領の米国等向け輸出食肉に係る指名検査員による検証の基礎研修（以下、基礎研修）を実施し、教材の効果を検証した。実施計画の詳細については令和7年分担研究報告書を参照されたい。

5. 研修プログラム案の作成

2. 及び3. の教材・参考資料を用いた新規着任者向け研修の内容と実施時期について検討した。

課題 4:食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

１．STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

令和５年度に協力を得た国内の対米輸出認定食肉取扱施設９ヶ所に加え、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 STEC 検査およびサルモネラ検査について内容の詳細に関する聞き取り調査を実施した。

２．STEC 免疫磁気ビーズの濃縮工程の検証

１．の聞き取り調査で STEC 検査における免

疫磁気ビーズ処理での血清型非特異的な濃縮の可能性について報告を受けたため、検証を実施した。STEC 026、045、0103、0111、0121、0145、0157 を供試菌株とし、トリプトソイブロス培地（TSB）に接種し、37℃で一晩培養した。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。この懸濁液を希釈し、トリプトソイアガー培地（TSA）に塗抹して培養し、平板上に生育したコロニー数から菌数を算出した。

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

1. の聞き取り調査で STEC 検査におけるクオリバックス Q7 システム遺伝子スクリーニング検査での誤判定および判定不能事例について報告されたため、検証を実施した。

（１）スクリーニング検査試薬

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

（２）偽陽性判定の検証

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

（３）偽陰性判定の検証

STEC 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 菌株を供試した。TSB で一晩培養後の菌液を混合し、DNA を熱抽出し、7 血清型 STEC DNA とした。BAX System のプロトコルに従い、7 血清型 STEC DNA を各検査試薬で検査した。

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

1. の聞き取り調査で STEC 検査における RapidFinder 遺伝子スクリーニング検査での偽陰性判定事例が報告されたため、検証を実施した。

（１）スクリーニング検査試薬

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

（２）偽陰性判定の検証

STEC O157 *stx1/2* 保有株および STEC O157 *stx2* 保有株を TSB で一晩培養し、菌液とした。また、牛肉 25 g に mTSB 225 mL を加え、スト

マッカー処理後に 42℃で 22 時間培養し、牛肉培養液とした。さらに、牛肉 25 g に 50 CFU の供試菌株を接種し、TSB 225 mL を加えてストマッカー処理後に 42℃で 22 時間培養し、菌接種牛肉培養液とした。菌液を TSB および牛肉培養液で 10^7、10^8 および 10^9 CFU/mL に希釈した。菌接種牛肉培養液は、TSB で 10 倍および 10^2 倍に希釈した。菌液の各希釈液および菌接種牛肉培養液の原液および希釈液から RapidFinder のプロトコルに従って DNA を抽出した。抽出した DNA を検査試薬で検査した。

C. 研究結果

課題 1：動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

［令和 5 年度］

［1］ 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシル分析法

1. LC-MS/MS 条件の検討

1.1 MS 条件

2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルは LC-MS（ESI 法及び APCI 法）で測定可能であるが、感度が低い。このため、3-ヨードベンジルブロミドや 4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン等で誘導体化後、LC-MS/MS で測定するのが一般的である。本検討では 3-ヨードベンジルブロミドで誘導体化後、LC-MS/MS で測定することとした。各化合物の 3-ヨードベンジルブロミド誘導体化物をフルスキャン測定した。その結果、いずれも ESI(＋)及び ESI(－)モードで測定が可能であったが、ESI(－)モードの方がバックグラウンドが低く、高い S/N が得られたため、ESI(－)モードで測定することとした。2-チオウラシル及び 4-チオウラシルは位置異性体であるため、 ESI（－）モードではいずれも *m/z* 343（$[M-H]^-$）が検出された。本イオンをプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、2-チオウラシルでは *m/z* 309、4-チオウラシルでは *m/z* 249 が観測され、両化合物で異なるイオンが検出された。このため、*m/z* 309 及び 249 をそれぞれ 2-チオウラシル及び 4-チオウラシルの定量用プロダクトイオンとした。その他の S/N が高いプロダクトイオンは両化合物で共通のイオンであったが、保持時間の違いにより両化合物を分離することが可能であるため、最も S/N が高い *m/z* 127 を定性用プロダクトイオンとすることとした。

1.2 LC 条件

Blokland ら[1]の LC 条件と同一の移動相（0.1% ギ酸含有水/メタノール）、分析カラム（Acquity UPLC BEH C18；内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.7 µm；Waters 製）及びグラジエント条件で 3-ヨードベンジルブロミド誘導体化物の測定を行った。その結果、本条件では 2-チオウラシル及び 4-チオウラシルの誘導体化物を分離することができなかった。そこで、LC 条件（移動相、分析カラム及びグラジエント条件）を変更することとした。水系溶媒として 0.01 vol%酢酸、有機溶媒としてアセトニトリルを用いたところ、2-チオウラシル及び 4-チオウラシルの誘導体化物の分離及び S/N が向上した。また、分析カラムとして Shim-pack Scepter C18-120（内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.9 µm）を用いたところ、2-チオウラシル及び 4-チオウラシルの誘導体化物のピークの分離度は 1.5 以上となり、良好な分離が得られた。6-メチル-2-チオウラシルの誘導体化物についても本 LC 条件で良好なピーク形状及び強度が得られた。これらの結果から、移動相として 0.01 vol%酢酸及びアセトニトリル、分析カラムとして Shim-

pack Scepter C18-120 を用いて測定を行うこととした。

2．試験溶液調製方法の検討

2.1　前処理

2-チオウラシル等は pH 3 以上の尿中では安定性が低い。また、尿中に銅イオン等の金属イオンが共存すると、チオール基と相互作用して分解することが知られている。このため、尿中の 2-チオウラシル等の分析では、分解を抑えるため、試料を塩酸等で pH 1 以下に調整し、エチレンジアミン四酢酸を加えた後、誘導体化等を行うことが多い。本検討においても牛尿に塩酸及びエチレンジアミン四酢酸を加えた後、誘導体化を行うこととした。

2.2　誘導体化反応

各化合物の誘導体化反応は Blokland ら [1)]の方法を参考にした。3-ヨードベンジルブロミドを加え、40℃で 60 分間加熱する方法を採用しているため、本条件で誘導体化反応が進行するか確認を行った。

まず、牛尿の代わりに水を試料として用いて検討を行った。塩酸及び 0.25 mol/L エチレンジアミン四酢酸溶液を加えた後、試料中濃度 100 μg/L 相当となるように 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルを添加し、誘導体化反応及び精製を行った。ただし、誘導体化の反応時間は 20～120 分間とした。いずれの化合物も反応時間 60 分以上では 97%以上となった。

次に、牛尿を試料として用いて誘導体化の反応時間（50～120 分）の検討を行った。その結果、いずれの化合物も反応時間 60 分以上では 94%以上となった。これらの結果より、Blokland ら [1)]の方法と同様に、3-ヨードベンジルブロミドを加えた後、40℃の水浴中で 60 分間加熱することで十分反応が進行すると考えられた。このため、本条件で各化合物を 3-ヨードベンジルブロミド誘導体化物へ変換することとした。

2.3　精製方法

Blokland ら [1)] は誘導体化後、反応液をケイソウ土が充填された 96 ウェルプレートに負荷し、酢酸エチルで溶出した後、溶媒を除去し、アセトニトリル/水に再溶解して LC-MS/MS で測定する方法を採用している。しかし、本方法では酢酸エチルの除去操作が必要であった。そこで、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）を用いて溶媒の除去を必要としない方法を検討した。牛尿の代わりに水を試料として用いて、塩酸 10 μL 及び 0.25 mol/L エチレンジアミン四酢酸溶液 100 μL を加えた後、 試料中濃度 100 μg/L 相当の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルを添加し、誘導体化反応を行った。得られた反応液を Oasis HLB（あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL でコンディショニングしたもの）に負荷し、水 5 mL 及び水/メタノール（3 : 2）5 mL で順次洗浄した後、アセトニトリルで溶出した。その結果、アセトニトリル 20 mL で 2-チオウラシルは 98%、4-チオウラシルは 89%、6-メチル-2-チオウラシルは 93%が溶出され、アセトニトリル 20～25 mL の画分にはいずれの化合物も溶出されなかった。これらの結果から、アセトニトリル約 25 mL で溶出することとした。

3．性能評価

牛尿を対象に 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルについて添加濃度 10 μg/L で 1 日 2 併行、5 日間の添加回収試験を行い、確立した分析法の性能を評価した。なお、妥当性評価ガイドラインでは尿を対象としていないが、本ガイドラインに従って評価を行い、0.01 ppm での目標値を参照した。

無添加試料を分析したところ、飼料由来と考えられる 2-チオウラシルのピークが検出されたが、定量限界の 1/3 未満であった。4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルはクロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されず、選択性に問題はないことが確認された。

真度 95～100%、併行精度 5%未満及び室内精度 8%未満となり、妥当性評価ガイドラインの 0.01 ppm での目標値（真度 70～120%、併行精度 25%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 [^{13}C,^{15}N$_2$]-2-チオウラシル、[^{13}C,^{15}N$_2$]-4-チオウラシル、[^{13}C5,^{15}N$_2$]-6-メチル-2-チオウラシルの回収率はいずれも 90%以上であった。0.5～10 μg/L（試料中濃度 5～100 μg/L 相当）の範囲で検量線を作成したところ、いずれの化合物も決定係数 r^2>0.997 となり、良好な直線性が得られた。

試料マトリックスの測定への影響を評価するため、1 μg/L（試料中濃度 10 μg/L 相当）において溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比を求めた。その結果、1.01～1.03 であったことから、いずれの化合物も試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定できることが示された。また、添加試料から得られたピークはいずれも S/N≧10 であった。以上の結果から、本分析法は牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシル分析法（定量限界はいずれの化合物も 10 μg/L）として妥当であると考えられた。牛肉輸出時のモニタリング検査において本分析法を適用することにより、2-チオウラシルが検出された場合に、2-チオウラシルの不正使用によるものか、アブラナ科植物を含む飼料を与えたことによるものかを判別することが可能と考えられた。

［2］　レゾルシル酸ラクトン類分析法

1．LC-MS/MS条件の検討

カラムとしてInertSustain C18（内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm）、ガードカラムとしてInertSustain C18（内径2.1 mm、長さ10 mm、粒子径 3 μm）を用いて測定条件を検討した。移動相の添加剤は、酢酸アンモニウムを用いると、酢酸と比べて感度が向上することが知られているため、水系移動相として10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液を用いることとした。移動相の有機溶媒は、メタノールよりもアセトニトリルの方が、ベースラインが低くなることが報告されている。そこで、アセトニトリルとアセトニトリル/メタノール（4 : 1）を比較したところ、アセトニトリル/メタノール（4 : 1）の方がピーク形状、ピークの分離、再現性及びピーク強度のいずれも良好な結果が得られた。これらの結果から、10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル/メタノール（4 : 1）を移動相として用いることとした。

2.　試験溶液調製方法の検討

レゾルシル酸ラクトン類は抱合体として存在している場合があるため、LC-MS/MS測定を行う前に加水分解を行う必要がある。しかし、本研究ではレゾルシル酸ラクトン類の抱合体の標準品を入手できず、加水分解条件を検討することはできなかった。このため、加水分解反応はArrizabalaga-Larrañagaらの方法に従い、β-グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼを加えて55℃で2時間振とうすることとした。

牛や豚の尿中のレゾルシル酸ラクトン類の分析では、加水分解後の溶液を液々分配、C18ミニカラム及びNH2ミニカラムを用いて精製する方法や、液々分配、HLBミニカラム及びNH2ミニカラムを用いて精製する方法、多孔性ケイソウ土カラム及びNH2ミニカラムによって精製する方法等が報告されているが、操作が煩雑

であった。一方、飼料や食品中のフザリウムトキシン（ZEN等）の分析ではイムノアフィニティーカラムを用いた方法も報告されている。そこで本検討では操作を簡便化するため、イムノアフィニティーカラムを用いた精製を尿中のレゾルシル酸ラクトン類の分析に用いることとした。加水分解後の溶液をそのままイムノアフィニティーカラム（ZearalaTest WB）に負荷して精製する方法を検討した。

まず、カラムへ負荷後の洗浄方法を検討するため、水/メタノール混液（10 mL）を洗浄溶媒として用いた場合の溶出状況を確認した。水20 mLにα-ZAL、β-ZAL、ZAN及びZEN（各0.1 μg）を添加し、ZearalaTest WBへ負荷した後、水/メタノール混液（9 : 1）、（8 : 2）、（7 : 3）、（6 : 4）及び（5 : 5）各10 mLで順次溶出した。その結果、水/メタノール（9 : 1）の画分にはいずれの化合物も溶出しなかったが、（8 : 2）～（5 : 5）の画分には溶出が認められた。このため、カラムに負荷後、水/メタノール（9 : 1）で洗浄を行うこととした。

次に、洗浄溶媒量を検討するため、水20 mLにα-ZAL、β-ZAL、ZAN及びZEN（各0.1 μg）を添加し、ZearalaTest WBへ負荷した後、水/メタノール（9 : 1）40 mLを注入し、各化合物の溶出状況を確認した。その結果、いずれの化合物も水/メタノール（9 : 1）40 mLまでは溶出しないことが確認された。

ZearalaTest WBからの溶出溶媒の検討を行った。水20 mLにα-ZAL、β-ZAL、ZAN及びZEN（各0.1 μg）を添加し、ZearalaTest WBへ負荷した後、メタノールで溶出した。その結果、いずれの化合物もメタノール5 mLでカラムから十分に溶出された。これらの結果から、加水分解後の溶液をZearalaTest WBへ負荷後、水/メタノール（9 : 1）で洗浄し、メタノール（5 mL）で溶出することとした。

そこで、水/メタノール（9 : 1）による洗浄の効果を確認するため、牛尿（2 mL）にα-ZAL、β-ZAL、ZAN及びZEN（各0.002 μg）を添加後、加水分解を行い、得られた溶液をイムノアフィニティーカラムへ負荷し、水/メタノール（9 : 1）10、20、30及び40 mLで洗浄した後、メタノール5 mLで溶出した。

その結果、いずれの化合物も洗浄に用いた水/メタノール（9 : 1）の量は回収率に影響しなかった。しかし、洗浄に用いる水/メタノール（9 : 1）の量を増やすほど、α-及びβ-ZALの定性イオンのクロマトグラムにおいて、α-及びβ-ZALの保持時間付近に認められた夾雑成分のピークが小さくなった。洗浄溶媒量30 mLと40 mLでは夾雑成分のピーク強度に差は認められなかった。このため、洗浄に用いる水/メタノール（9 : 1）の溶媒量は30 mLとすることとした。以上の結果から、加水分解後の溶液をZearalaTest WBへ負荷し、水/メタノール（9 : 1）30 mLで洗浄した後、メタノール5 mLで溶出することとした。

3. 性能評価

EU では、牛尿中の β-ZAL 及び ZEN の minimum method performance requirements（MMPR）はそれぞれ 1 及び 2 ppb（1 及び 2 μg/L）と設定されている。このため、牛尿を対象に α-ZAL、β-ZAL、ZAN 及び ZEN について添加濃度 1 及び 2 μg/L で 1 日 2 併行、5 日間の添加回収試験を行い、確立した分析法の性能を評価した。なお、妥当性評価ガイドラインでは尿を対象としていないが、本ガイドラインに従って評価を行い、0.01 ppm での目標値を参照した。

無添加試料を分析したところ、飼料由来フザリウムトキシンと考えられる ZEN のピークが検出されたが、定量限界の 1/3 未満であった。いずれの化合物もクロマトグラム上に定量を妨

害するピークは認められず、選択性に問題はないことが確認された。

真度 92～101%、併行精度 9%未満及び室内精度 13%未満となり、妥当性評価ガイドラインの 0.01 ppm での目標値（真度 70～120%、併行精度 25%未満、室内精度 30%未満）を満たした。0.5～10 μg/L（試料中濃度 0.5～10 μg/L 相当）の範囲で検量線を作成したところ、いずれの化合物も決定係数 r^2>0.998 となり、良好な直線性が得られた。

試料マトリックスの測定への影響を評価するため、1 及び 2 μg/L（試料中濃度 1 及び 2 μg/L に相当）において溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比を求めた。その結果、いずれの化合物も 1 μg/L においては 0.93～1.01、2 μg/L においては 0.99～1.05 であったことから、試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定できることが示された。また、定量限界濃度（1 μg/L）を添加した試料から得られたピークはいずれも S/N≧10 であった。以上の結果から、本分析法は牛尿中の α-ZAL、β-ZAL、ZAN 及び ZEN 分析法（定量限界はいずれの化合物も 1 μg/L）として妥当であると考えられた。

［令和 6 年度］

［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

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

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

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

2．試料前処理の検討

抽出法は酢酸トレンボロン、デキサメタゾン及びベタメタゾンの告示試験法と同様に、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）からそれぞれアセトニトリルで負荷、溶出した。いずれもアセトニトリル 30 mL で溶出が可能であった。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムを連結し、アセトニトリル 30 mL で溶出す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。極性に大きく幅があるため、洗浄区を作ることは難しいと判断した。アセトン及びヘキサンの混液(1：1)でいずれの成分も概ね溶出可能であった。

2.3 グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムである InertSep GC(300 mg)を用いた逆相条件での溶出が可能か検討した。各測定対象成分をメタノールでミニカラムに負荷した後、酢酸エチルで溶出した場合と、アセトン及びヘキサンの混液(1:1)で負荷、溶出した場合と、アセトニトリル及びトルエンの混液(7:3)で負荷、溶出した場合を検討した。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ったが、アセトン及びヘキサンの混液(1：1)又はアセトニトリル及びトルエンの混液(7:3)で全成分溶出可能であった。なお、本検討ではアセトニトリル及びトルエンの混液比率は(7:3)を用いたが、2.4 の検討では、農薬一斉分析等で広く使用されているアセトニトリル及びトルエンの混液(3：1)を用いることとした。

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

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

も合わせた全溶出液をとる方法とした。

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

3. 妥当性評価試験結果

3.1 選択性

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

3.2 真度、併行精度及び室内精度

真度の目標値(70～120%)及び精度の目標値(併行精度 30%未満、室内精度 35%未満)を満たした。

また、内標準物質として用いた 17β-エストラジオール-2,4,16,16-d_4、17β-テストステロン-16,16,17-d_3、エチニルエストラジオール-2,4,16,16-d_4、酢酸メレンゲステロール-d_3、メチルテストステロン-d_3、[$^2H_5$]-α-トレンボロン、[$^2H_5$]-β-トレンボロン、デキサメタゾン-4,6α,21,21-d_4 及び酢酸メドロキシプロゲステロン-d_6 の回収率はいずれも 40%以上であった。

3.3 試料マトリックスの測定への影響

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

3.4 検量線の直線性

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

3.5 定量限界

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

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

1. LC-MS/MS条件の検討

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

2. 試料前処理の検討

2.1 エタノール存在下でのグルクロン酸抱合体の加水分解条件の検討

告示試験法開発の報告書において、濃縮操作条件によってはジエチルスチルベストロールの回収率の低下が確認されている。告示試験法

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

ジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体 25 ng(ジエチルスチルベストロールとして約 15 ng 相当）及び[$^2H_8$]-ジエチルスチルベストロール 25 ng を添加したエタノール及び水の混液(9：1）5 mL に 0.1 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。また比較対照として、ジエチルスチルベストロールグルクロン酸抱合体及び[$^2H_8$]-ジエチルスチルベストロールを同濃度添加したエタノール及び水の混液(9：1）10 mL を約 5 mL まで減圧濃縮した後、0.1 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。各加水分解後の溶液は、精製の操作を行いジエチルスチルベストロールの回収率を求めた。

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

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

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

親水性ポリマーベース固相カラムであるジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis HLB(150 mg/6 mL)]及び親水性基修飾 SDB ミニカラム[EVOLUTE ABN(150 mg/6 mL)](あらかじめヘキサン 5 mL、水及びメタノールの混液(11：9)5 mL 及び水 5 mL で洗浄したもの)にジエネストロール、ジエチルスチルベストロール及びヘキセストロールを各 0.0125 μg、ジエネストロール-d_6、[$^2H_8$]-ジエチルスチルベストロール及びヘキセストロール-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。

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

次に、牛の筋肉にジエネストロール、ジエチルスチルベストロール、ヘキセストロール、ジエネストロール-d_6、[$^2H_8$]-ジエチルスチルベストロール及びヘキセストロール-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。

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

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

3. 妥当性評価試験結果

3.1 選択性

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

3.2 真度、併行精度及び室内精度

真度の目標値(70～120%)及び精度の目標値(併行精度 30%未満、室内精度 35%未満)を満たした。

また、内標準物質として用いたジエネストロール-d_6、[$^2H_8$]-ジエチルスチルベストロール及びヘキセストロール-d_4 の回収率はいずれも 40%以上であった。

3.3 試料マトリックスの測定への影響

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

3.4 検量線の直線性

0.125～2.5 μg/L の範囲で検量線を作成した。決定係数 r^2>0.998 となり、良好な直線性が得られた。

3.5 定量限界

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

［令和 7 年度］

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

1. 分析カラムの検討

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

2. 精製カラムの検討

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

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

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

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

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

3. 妥当性評価試験結果

(1)選択性

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

(2)真度、併行精度及び室内精度

真度の目標値(70～120%)及び精度の目標値(併行精度 30%未満、室内精度 35%未満)を満たした。

また、内標準物質として用いた DTZ-d_3、RNZ-d_3、MNZ-d_4、INZ-d_3、HMMNI-d_3、MNZOH-d_4 及び INZOH-d_3 の回収率はいずれも 40%以上であった。

(3)試料マトリックスの測定への影響

添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。その結果、ピーク面積比は、DTZ で 0.97、RNZ で 1.44、MNZ で 0.98、INZ で 0.98、HMMNI で 1.05、MNZOH で 0.98、INZOH で 0.95 であった。本法では RNZ において試料由来のマトリックスの影響を受けていたため、内標準物質による補正を行って定量する方法とした。

(4)検量線の直線性

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

(5)定量限界

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

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

1. LC-MS/MS 条件の検討

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

2. 試料前処理の検討

CBT 告示試験法は抽出後の転溶操作に加え、二工程のミニカラム精製を要し、操作が煩雑である。そこで、精製工程の簡略化を目的とした検討を行った。 β-作動薬は塩基性化合物であることから、CBT の告示試験法で使用されている強陽イオン交換カラムを用いた精製を選択した。CBT の告示試験法と同等のベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム[Bond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)]、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis MCX (500 mg/6 mL)]及び MCX とは異なる物理的特性を持つスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[EVOLUTE EXPRESS CX(150 mg/6 mL)]の 3 種を比較検討した。各ミニカラムをあらかじめメタノール(特級)5 mL、水及びメタノールの混液(1:1)5 mL で洗浄した後、アセトン 10 mL に酢酸 500 μL を混合した液に標準溶液[1.25 μg/L(CBT 及び CMT)及び 6.25 μg/L(RCP、SAL 及び ZPT)]200 μL[水及びメタノールの混液(95:5)]を添加した液を供し、水及びメタノールの混液(1:1)5 mL、メタノール(特級)10 mL、水及び 25%アンモニア水の混液(98:2) 5 mL 及びメタノール(特級)5 mL で洗浄した後、メタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)10 mL で溶出し、さらにメタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)5 mL で追加溶出した。各画分をナス形フラ

スコに採り、ロータリーエバポレーター(40℃)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水及びメタノールの混液(95:5)2 mL に溶解し、LC-MS/MS を用いて各溶液中の分析対象化合物量を求めた。Bond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)では水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)洗浄後のメタノール洗浄区間においていずれの物質も 9～32%の溶出が認められ、かつ RCP の合計回収率が 13 %と著しく低かった。EVOLUTE EXPRESS CX(150 mg/6 mL)は Bond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)に比べて合計回収率は向上したものの、水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)洗浄後のメタノール洗浄時の ZPT が 34%溶出していた。これらに対して、Oasis MCX (500 mg/6 mL)は 3 種類のミニカラムの中で最も良好な保持挙動を示した。RCP 及び CMT の合計回収率はそれぞれ 73%、75%に留まったものの、負荷時及び洗浄時における流出はほとんど認められなかった。

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

3. 妥当性評価試験結果

(1)選択性

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

(2)真度、併行精度及び室内精度

牛の筋肉において、真度の目標値(70～120%)及び精度の目標値(併行精度 30%未満、室内精度 35%未満)を満たした。また、鶏に筋肉において、内標準物質として用いた CBT-d_9、RCP-d_6、SAL-d_9、ZPT-$^{13}C_3$ 及び CMT-d_7 の回収率はいずれも 40%以上であった。

(3)試料マトリックスの測定への影響

牛及び鶏の筋肉において試料マトリックスの測定への影響について検討した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。その結果、牛の筋肉におけるピーク面積比は、CBT で 0.90、RCP で 0.84、SAL で 0.83、ZPT で 0.91、CMT で 0.91 であった。また、鶏の筋肉におけるピーク面積比は、CBT で 0.94、RCP で 0.89、SAL で 0.93、ZPT で 0.91、CMT で 0.93 であった。本法ではいずれの分析対象化合物も試料由来のマトリックスの影響を若干受けていたが、内標準物質による補正を行う方法としたため定量性に問題はないと判断した。

(4)検量線の直線性

0.00625～0.0625 μg/L(CBT)、0.0625～0.625 μg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.0125～0.125 μg/L(CMT)の範囲で検量線を作成した。決定係数 r^2>0.998 となり、良好な直線性が得られた。

(5)定量限界

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

課題2:牛肉のSTECおよびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

1．牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

令和 5 年度には、検体培養液は STEC およびサルモネラ属菌のいずれも陰性であった。また、培養液のため、検体の生菌数測定の実施対象にはならなかった。

以下、令和 6 年度および令和 7 年度について

の結果を取りまとめて示す。

（１）生菌数

調査した検体 255 頭のうち 148 頭の検体から生菌が認められ、その平均は 52,682.2±363,333.6（平均±SD）CFU/cm^{2}であった。雌雄で比較すると、オス計 131 頭では 34,336.9±286,848.7 CFU/cm^{2}であるのに対して、メス計 124 頭では 69,146.0±42,155.4CFU/cm^{2}であった。ウシの種類別で比較すると、黒毛和種の平均値が 4,628,307.1±32,956,476.2 CFU/cm^{2}で最も多く、次いでホルスタイン、交雑種、日本短角種、褐色和種の平均値がそれぞれ 2,063.3±11,641.1 CFU/cm^2、37.9±105.0 CFU/cm^2、3.0±3.0 CFU/cm^2、0.4±0.1 CFU/cm^{2}であった。施設別で比較すると、採材期間を通して、平均生菌数が最も多かった施設は B 施設であった。平均生菌数は 110,003.3±524,237.9 CFU/cm^{2}であった。次いで C 施設、A 施設の平均生菌数がそれぞれ 1,696.1±10,575.6 CFU/cm^2、2.9±8.5 CFU/cm^{2}であった。月別で算出し比較すると、2025 年 7 月が最も高く 770,107.0±1,241,833.5 CFU/cm^2、次いで 2024 年 10 月が 8,859.0±26,511.3 CFU/cm^{2}であった。2025 年 7 月の平均生菌数が高いのは、B 施設の黒毛和種 3 頭が約 2,600,000 CFU/cm^{2}であったことによる。さらに、2024 年 10 月の平均生菌数が高いのは、C 施設のホルスタイン 1 頭が約 80,000 CFU/cm^{2}であったことによる。

（２）STEC7 血清群の分離

供試検体 255 検体のうち、増菌培養液が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方が陽性となった 8 検体のうち 2 検体が STEC 7 血清群の O45 で陽性となり、それぞれ Ct 値は 29.7（検体番号 24-105）、38.9(検体番号 25-107)であった。さらに、検体番号 24-105 の検体では、O121 も陽性となり、Ct 値は 36.0 であった。

（３）サルモネラ属菌の検出

増菌培養液が *ttr* 遺伝子陽性となった検体は１検体（検体番号 24-27）で、CT 値は 35.6 であった。この検体は、10 月に黒毛和種のオス、30 ヵ月齢から採取されたものであり、その検体から *Salmonella* Dublin が分離された。検体の生菌数は 3.3 CFU/cm^2、サルモネラ MPN は３未満/試験液 100mL であり、ガーゼ表面積 100 cm^{2}あたり 0.33MPN 未満であった。

２．STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

検体採取法は、全施設が N60 サンプリング法であり、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６施設、RapidFinder が３施設だった。クオリバックス Q7 システムが６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。

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

実施結果については、別途とりまとめた。また、各キットの使用マニュアルを作成し、作成時に厚生労働省に提出した。

課題 3:国内の食肉輸出施設の監視指導検査員の研修プログラムの充実

１．指名検査員の研修に関する調査

1.1 検査所の研修実態

インタビュー調査を実施した９検査所において、指名検査員を含む職員への研修について、検査所内の研修の規程文書及び研修計画を作成していた検査所は５か所であった。研修責任者が規定または認識されていた検査所は６か所であった。

検査実施要領のと畜検査及び検証に関する研修について、11 検査所すべてで対米・EU

要綱に基づく検査の習得を目的として、研修を実施していた。研修資料は「検査所作成の業務マニュアル」、「対米・EU 要綱」、及び「検査実施要領」の他、各検査所で異なっていた。

研修方法は、座学（講義）を 1～2 日間のうちに行い、その後、１～数か月間、講師担当職員と OJT を実施し、評価者の確認により一人でできるようになったと評価されていた。講師担当職員は９検査所において、「検査１～２年以上の経験者数名で分担」していた。

研修の評価者及び評価方法は各検査所で異なっていた。

研修の規程、内容、方法及び評価の詳細については令和 5 年度分担報告書を参照されたい。

1.2 指名検査員研修の教材、仕組み等への要望について

望ましい教材形式は、「新任者が一人で受講できる e-ラーニング教材」、「理解度テストがついている教材」が挙げられた。その内容は、「対米・EU 要綱の各項目に関する研修」、「海外規制官庁の法令・規則等の翻訳（解説付き）」、「動物福祉」、「ISO17025 に基づく試験の管理」、「HACCP」、「検査実施要領に基づくと畜検査」「（国内の）関係法令」「研修のためのガイドブック」が挙げられた。

望ましい仕組みとして、「検査所間の意見交換・情報共有」、「海外規制庁のオンライン研修受講」、「グループワークと組み合わせた研修」等が挙げられた。

厚生労働省が主催する研修について、現在、1 年に 1 回程度の頻度で、1 日間が実施されているが、内容の要望として、「地方厚生局の指摘事項を例にしたグループワーク演習」、「輸出食肉施設を見学し、グループワーク演習及び意見交換」、「輸出先国の規制や微生物検査手順」、「STEC 検査や残留物質等モニタリング陽性時の対応についてのシミュレーション」が挙げられた。

その他、「指名検査員に必要なすべての研修」、「基礎的な導入研修」が挙げられた。

指名検査員研修の教材、仕組み等への要望の詳細については令和 5 年度分担報告書を参照されたい。

2. 研修教材

と畜検査、と畜・解体工程と食肉処理工程の検証について、経験豊富な指名検査員が実施する様子を撮影した動画に、字幕で検査実施要領の項目及び内容をつけ、必要に応じて説明画像を挿入した。同様にして、STEC 検査について、研究班員の検査手技を撮影し、字幕を付けた。

HACCP の基礎的な講義のオンデマンド教材は、受講の際に短時間でも確認しやすいように、章ごとに分けた。講義の説明は、音声 AI を用いたため、音声に沿った文章の表示や、アンダーラインまたは文字の色を変える等により強調した。

HACCP 演習で用いる教材は、厚生労働省の HACCP モデル及び手引書を参考に、加熱食肉製品及びと殺・解体工程の演習用動画と、工程説明、フローダイアグラム及び製品説明書等の資料を作成した。

研修教材の詳細は令和 6 及び 7 年度分担報告書を参考にされたい。

３．参考資料

3.1 輸出先国等の食肉の衛生管理の法令及び研修資料

2023 年に公開された FAO Toolbox は、Codex 食品衛生の一般原則が解説されており、GHP 及び HACCP の知識を提供するため

に作成されていることから、仮訳した。

９CFR 及び FSIS Directives のうち、と畜検査及び HACCP 規則関連について確認し、仮訳し、背景等の情報が必要な部分については注釈を加えた。（令和７年度分担報告書表２）。また、用語集を作成した。

IM1800 は FSIS の新規採用の獣医師及び検査官が受講する、FSIS が管轄する食品製造施設の検査検証業務に必要な基本的知識を身に付けるためのトレーニングコースである。公開されている 50 以上の研修資料のうち、指名検査員の業務に関連すると考えられる 23 の資料を一覧にまとめた（令和 5 年度分担報告書）。

また、2023 年に FSIS が主催した各国政府担当者向けオンラインセミナー （Virtual Food Safety and Inspection Seminar）の動画に、講師の説明を仮訳し字幕を付した。（令和６年度分担報告書図５）

3.2 妥当性確認及び検証の参考資料

と畜・解体工程の HACCP に基づく衛生管理の妥当性確認の科学的根拠、または検証の参考に資する公表論文等を確認し、概要を作成した（令和７年度分担報告書）。

また、E. coli K12 株接種牛肉を用い、SV 処理 0～5 回による菌数変化について 2 回の試験で比較した試験では、2 試験とも処理回数の増加に伴い菌数は減少したが、特に 1～2 回処理で約 1～2 log cfu/25 ㎠の有意な低減が確認された。

本試験の詳細は令和5年度分担報告書を参考にされたい。

４．教材を用いた研修の検証

基礎研修を実施し、２．の教材及び研修の効果を検証した。

研修参加者は 10 名で、内８名は基礎研修の受講経験があり、食肉衛生検査の経験年数は１～4 年であった。

HACCP のオンデマンド教材は、１～２回視聴され、教材の満足度は 5 段階評価で平均 3.5 であった。

HACCP７原則の理解度の変化について、研修受講前の自分の知識を１として、オンデマンド教材視聴後と演習受講後の各理解度を 5 段階で自己評価してもらった。その結果、オンデマンド教材視聴後および演習終了後の自己評価による理解度は、それぞれ平均 2.3、3.4 で、段階的な向上が認められた。

研修の検証の詳細は令和７年度分担報告書を参考にされたい。

５．新任指名検査員向け研修プログラム案の作成

検査実施要領の「Ⅳ 指名検査員の検査等業務に係るパフォーマンス評価実施要領」の評価項目に基づき、業務遂行に必要な知識・技術等、２．の教材及び３．の参考資料を利用した研修例、及び各研修の実施時期について検討し、作成した（令和７年度分担報告書図２）。

課題 4:食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

１．STEC 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 026、0111 および 0157 の各菌液において免疫磁気ビーズ 0145 で濃縮後の菌数は、各血清型特異的免疫磁気ビーズで濃縮した場合と比較して 1.9～2.5 log10 低下した。また、STEC 0145 菌液を免疫磁気ビーズ 0157 で濃縮した場合は、0145 特異的免疫磁気ビーズで濃縮した場合に比べて菌数が 1.7 log10 低下した。一方で、STEC 045、0103 および 0121 の各菌液については、免疫磁気ビーズ 0145 と各血清型特異的免疫磁気ビーズとの菌数差は 1.0 log10 以下であった。

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

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

（１）偽陽性判定の検証

開封後１ヶ月から６ヶ月経過した検査試薬では、以下の結果であった。STEC screening および *E. coli* 0157:H7 では、mTSB および牛肉培養液ともに偽陽性および判定不能は認められなかった。panel 1 では、mTSB で偽陽性（1 well/8 well)、牛肉培養液で偽陽性（1 well/8 well）および判定不能（1 well/8 well）が認められた。panel 2 では、偽陽性は認められなかったが、mTSB および牛肉培養液で判定不能（1 well/8 well）が認められた。開封直後の panel 1 および panel 2 では、偽陽性および判定不能は認められなかった。

（２）偽陰性判定の検証

開封後１ヶ月から６ヶ月経過した検査試薬では、以下の結果であった。STEC screening では、偽陰性（1 well/40 well）が認められた。*E. coli* 0157:H7、panel 1 および panel 2 で

は、mTSB および牛肉培養液ともに偽陰性および判定不能は認められなかった。開封直後の STEC screening では、偽陰性および判定不能は認められなかった。

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

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

D. 考察

課題 1: 動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシル分析法は牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシル分析法（定量限界はいずれの化合物も 10 μg/L）として妥当であると考えられた。牛肉輸出時のモニタリング検査において本分析法を適用することにより、2-チオウラシルが検出された場合に、2-チオウラシルの不正使用によるものか、アブラナ科植物を含む飼料を与えたことによるものかを判別することが可能と考えられた。レゾルシル酸ラクトン類分析法は牛尿中の α-ZAL、β-ZAL、ZAN 及び ZEN 分析法（定量限界はいずれの化合物も 1 μg/L）として妥当であると考えられた。ステロイド類の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。スチルベン類の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。ニトロイミダゾール類の分析法は鶏の筋肉を対象とした定量限界 0.2 μg/kg(DTZ、RNZ 及び HMMNI)及び 0.1 μg/kg (MNZ、INZ、MNZOH 及び INZOH)での残留分析として妥当であると評価された。β-作動薬の分析法法は牛及び鶏の筋肉を対象とした定量限界 0.05 μg/kg(CBT)、0.5 μg/kg(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.1 μg/kg(CMT)での残留分析として妥当であると評価された。

課題2:牛肉のSTECおよびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

１．牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

R6 年と R7 年において、本調査では牛枝肉からガーゼを用いた 255 検体および培養液残液 9 検体（合計 108 検体）からは STEC は分離されなかった。リアルタイム PCR で *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、045 血清群または／かつ 0121 血清群が陽性の検体あったが、該当する STEC は検出されなかった。より効果的な分離方法の検討が必要であると考えられる。

一方、255 検体中 1 検体から *Salmonella* Dublin が分離された。また、令和２年度から４年度の調査ではサルモネラ属菌は検出対象でなかったため、今回の調査で検出されたことは今後の牛肉の衛生管理において重要な対象となることが考えられる。ただし、今回のサルモネラ定量試験において、MPN 法により、検出限界以下であったことから、汚染濃度は低いことが推察される。

検体採取としては、令和５年度の各食肉衛生検査所の培養液を検体とした試験で陰性であったことから、ガーゼを枝肉に密着させて回収した検体を使用した方が感度が優れる可能性が示された。

生菌数は季節の影響が大きいと考えられた。1 月から 5 月の平均生菌数は、それぞれ 121.6±189.8CFU/cm^2 、 22.7±40.7CFU/cm^2 、68.3±54.6CFU/cm^2 、 25.4±13.4CFU/cm^2 、72.8±45.6CFU/cm^2であり、気温が低いと生菌数が低いことが認められた。

２．STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

複数の項目において施設ごとに異なる点が認められた。STEC 検査およびサルモネラ検査において、クオリバックス Q7 システムおよび RapidFinder での判定時のトラブルが複数の施設で認められたため、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。

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

供試したキットシリーズは、STEC7 血清群が効率的に検出できるコンセプトになっていることが確認された。使用マニュアルを作成したので、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられる。

課題 3:国内の食肉輸出施設の監視指導検査員の研修プログラムの充実

令和５年度の本研究調査により、調査した検査所では、対米・EU 要綱や検査実施要領を基にした資料と OJT を中心とする研修により、新任指名検査員等が一定の検査業務を習得していた。一方で、講義時間の確保が困難であること、教材を各検査所が独自に作成していることによる内容のばらつき、業務の背景や科学的根拠を理解しにくい点、さらに講師の経験年数に研修の質が左右される可能性があることが課題として明らかとなった。

また、いわゆる座学の講義が１日以内であり、OJT による研修中は検査員間のミーティング等を利用して新任研修生のフォローアップがされていたが、知識の定着が不十分となる可能性があり、体系的な知識を繰り返し学習できる仕組みが求められる。

教材内容としては、検査実施要領の業務の目的や考え方を理解し、対米・ＥＵ等要綱だけでなく、海外規制官庁の法令・規則についても理解できるようになることが重要である。

以上より、検査所間で共通に利用できる研修教材を整備し、e ラーニング等の動画を活用した教材を基本としつつ、検査所の要望に挙がった方法や内容についても検討することが妥当であると考えられた。また、海外規制官庁の法令・規則については、翻訳や解説を加えたものが研修や業務の参考資料となると考えられた。

令和６及び７年度の本研究調査において、研修教材は、オンデマンド教材及び演習や OJT の事前学習・確認等で用いる動画で構成した。

参考資料は、FAO Toolbox、米国連邦規則 9 CFR 及び FSIS Directives 等及び FSIS の研修動画に仮訳を付け、必要に応じて解説を付けた。研修教材の補足または業務の参考資料として、指名検査員が利用しやすく、令和５年度の本研究調査で明らかになった、検査所の要望を充足することができた。

また、作成教材の検証として実施した基礎研修の結果、オンデマンド教材の視聴及び演習の各段階的で、理解度の改善が認められ、

研修教材の効果を確認できた。

オンデマンド教材については、参加者の評価から、自分の理解度、確保時間の長さに合わせて学習調整ができる同教材の利便性が評価されているものと考える。同教材では理解しづらいとする評価については、教材としての不足もあるが、食品製造工程の衛生管理システムである HACCP は、講義による知識習得だけでは概念の理解までが限界であるためと考える。実際に、演習では講義内容について実践するため、理解度は講義より演習の方が上回った。

なお、今回の検証は、受講者 10 名であり、結果の一般化には一定の制約がある。また、本演習は研究班員がファシリテーターを務めたため、検査所職員が主体となって実施した場合の効果については、今後の検証が必要である。

また、本研究では検証をしていない教材について、今後の検証、それぞれの検証結果による教材、研修方法の改善を検討していく必要がある。

さらに、本研究は対象を新任指名検査員としたため、今後、新任指名検査員研修の受講修了者向けの研修についても検討していく必要がある。

令和７年度の本研究調査において、検査実施要領のパフォーマンス評価実施要領の評価項目に基づき、新任指名検査員向け研修プログラム案を作成した。本研究調査では、概要の検討にとどまったことから、各検査所で、新規着任者の研修を計画する際の参考、または出発点として利用したうえで、今後、実際の運用に必要な内容について、さらに検討が必要と考える。

課題 4:食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査では、令和５年度から追加で１施設の結果が加わった。令和５年度と同様に複数の項目において施設ごとに異なる点が認められたが、内容は各食肉取扱施設の処理工程および処理頭数等の状況に合わせて適切に設定されており、問題はないと考えられた。一方で、各施設において記載内容および基準設定に迷う箇所があるとの相談を受けることは多く、特に新規登録施設では、既存の登録施設と SOP を共有する機会を設けることが可能であれば、より正確な検査法の逸脱防止および検査員の負担軽減に繋がると考えられた。STEC 免疫磁気ビーズの濃縮工程の検証では、STEC 045、0103 および 0121 の菌液を免疫磁気ビーズ 0145 で濃縮後の菌数とその他の血清型の免疫磁気ビーズで濃縮後の菌数との差が 1.0 log10 以下であったことから、STEC 菌液の血清型と免疫磁気ビーズの組み合わせによっては、非特異的濃縮が生じることが示唆された。３つの菌濃度の STEC 0103 菌液を用いた試験では、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。

施設に対する聞き取り調査で、クオリバックス Q7 システムでは、偽陽性、偽陰性判定および判定不能、RapidFinder では、偽陰性判定の事

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

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

E. 結論

課題 1：動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

モニタリング検査または EU における輸入時検査において A 物質が検出された場合に原因究明に資する分析法を整備した。令和 5 年度は、EU への牛肉輸出時のモニタリング検査で 2-チオウラシルが検出された場合の原因調査に資するため、牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシルの分析法を確立した。また、レゾルシル酸ラクトン類が検出された場合の原因調査に資するため、牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類（α-ZAL、β-ZAL、ZAN 及び ZEN）の分析法を確立した。令和 6 年度は、EU での輸入時検査において A 物質が検出された場合の原因調査に資する牛肉中のステロイド類（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）分析法及びスチルベン類（ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール及びヘキセストロール）分析法を確立した。さらに令和 7 年度は、鶏筋肉中のニトロイミダゾール類分析法及び牛／鶏筋肉中の β-作動薬（クレンブテロール、ラクトパミン、サルブタモール、ジルパテロール、シマテロール）分析法を確立した。妥当性評価試験の結果、本課題で確立したすべての分析法は、真度、併行精度、室内精度及び選択性の目標値を満たし、迅速な原因究明及び輸出再開に資する残留分析法として妥当であることが確認された。

課題2：牛肉のSTECおよびサルモネラ属菌汚染リ

スク低減に関する研究

牛肉のSTECおよびサルモネラ属菌汚染リスク低減のための研究を実施した。１．牛枝肉のSTECおよびサルモネラ属菌調査では、令和５年度は５施設の協力のもとに収集した牛枝肉培養液をSTEC７血清群(026、045、0103、0111、0121、0145、0157）については40検体およびサルモネラ属菌については 86 検体を試験に供試したが、いずれも検出されなかった。続いて、令和６年度および令和７年度は3施設の協力のもとに集収した枝肉密着ガーゼ検体合計255検体を試験し、サルモネラ属菌が1検体から検出され、血清型は Dublin であった。しかし、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。検体採取としては、ガーゼを枝肉に密着させて回収する方が検出感度が優れる可能性が示された。また、生菌数についても測定を行ない、施設や月ごとに解析した。２．STEC検査およびサルモネラ検査のSOPに関する調査では、STEC検査およびサルモネラ検査において、遺伝子検査での判定時のトラブルを改善することが必要があると考えられた。３．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。また、使用マニュアルを作成したので、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられる。

課題 3:国内の食肉輸出施設の監視指導検査員の研修プログラムの充実

輸出食肉認定施設における指名検査員の研修の現状について調査を行った結果、研修体系を構成するための基礎的な知識・技術及び教材の整理がなされていないため、各検査所における指名検査員への研修が適切に実施されていないことを明らかにした。これを踏まえ、海外の規制官庁等の研修資料を参考に、体系づけられた研修の前提となる基礎的な知識及び技術を整理するとともに、新任指名検査員が効率的に習得できる研修教材を作成した。また、検査所の実務で活用しやすい形式で教材および業務の参考資料を作成した。さらに、これらの研修教材及び参考資料を用いた新任指名検査員向け研修プログラム案を提示した。

作成した教材の一部を用いた基礎研修を試行した結果、教材の有効性が示唆された。

本研究で整備した教材及び参考資料等は、今後の新任指名検査員向け研修の検討・改善に資する基礎的資料として位置づけられる。なお、本研究は新任指名検査員を対象とした基礎的内容に焦点を当てたものであり、研修体系全体の構築や運用方法については、今後の検証及び検討が必要である。

課題 4:食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Akiyama, H., Iwasaki, Y., Ito, R. Basic Principles for Setting MRLs for Pesticides in Food Commodities in Japan. Food safety, 2024; 12, 34-51.
2. 畑寛子、池側智香子、飯塚誠一郎、河野洋一、伊藤里恵、堤智昭、穐山浩、志田(齊藤)静夏. 牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 6-メチル-2-チオウラシル分析法の確立及び妥当性評価：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 2024; 65(6), 178-184.
3. 高木千陽、中村歩、河野洋一、伊藤里恵、堤智昭、穐山浩、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及び性能評価. 食品衛生学雑誌 2025; 66(2), 32-38
4. Ikeuchi S, Hirose S, Shimada K, Koyama A, Ishida S, Katayama N, Suzuki T, Tokairin A, Tsukamoto M, Tsue Y, Yamaguchi K, Osako H, Hiwatashi S, Chiba Y, Akiyama H, Hayashidani H, Hara-Kudo Y. Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from the Surfaces of Beef Carcasses in Slaughterhouses in Japan. J Food Prot. 2024;87:100263.
5. Hirose, S., Tomaru, A., Akiyama, H., Hara-Kudo, Y. Effective decontamination methods for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on beef carcass surfaces for application in beef carcass hygiene. J. Food Prot. 2024;87:100366.
6. 穐山浩、食品中の残留農薬等のレギュラトリーサイエンス，フードケミカル，481(5)，28−33, 2025.
7. 穐山浩, 食品中の残留農薬等の基準値設定の流れ, PHARM TECH JAPAN, 40, 101-103, (2024)

2. 学会発表

1) 志田静香、残留農薬検査における課題と展望について第 21 回食品安全フォーラム、令和 5 年 12 月 8 日、東京都。
2) Akiyama H, Suzuki Y, Tsutsumi T, Food safety risk management in Japan, International Conference on Food Safety and 38th KoSFos Annual Meeting, 令和 5 年 11 月 30 日、韓国済州島
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、穐山浩、志田(齊藤)静夏. 牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 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）
4) 高木千陽、中村歩、河野洋一、伊藤里恵、堤智昭、穐山浩、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）
5) 畑寛子、池側智香子、飯塚誠一郎、河野洋一、伊藤里恵、堤智昭、穐山浩、志田(齊藤)静夏. 牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシル及び 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）
6) 小椋和彦、畑寛子、飯塚誠一郎、河野洋一、

伊藤里恵、堤智昭、穐山浩、志田(齊藤)静夏. LC-MS/MS による牛筋肉中の高感度ステロイド類一斉分析法の検討. 日本食品衛生学会第 121 回学術講演会（2025.10.16）

7） 池側智香子、畑寛子、飯塚誠一郎、河野洋一、伊藤里恵、堤智昭、穐山浩、志田(齊藤)静夏. 牛筋肉中のスチルベン類（ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール及びヘキセステロール）分析法の検討. 日本食品衛生学会第 121 回学術講演会（2025.10.16）

8） 廣瀬昌平，池内隼佑，島田光平，児山綾子，石田祥士，吉田千央，東海林明子，髙橋むつみ，山口健一，大迫英夫，塚本真由美，津江友紀，片山直人，瀧下恵里子，樋渡佐知子，林谷秀樹，穐山浩，工藤由起子. 国内食肉処理施設における牛枝肉の志賀毒素産生性大腸菌保有状況調査. 日本食品衛生学会第 119 回学術講演会. 令和 5 年 10 月 12 日-13 日. 東京

9） 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.

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

11） 穐山浩、「食品に関わるリスク管理の新展開」残留農薬等のリスク管理について最近の動向と課題. 日本薬学会第 146 年会、2026 年 3 月 28 日. 大阪

12） 穐山浩、「食品安全行政を支えるアカデミアの人材育にむけて」リスク管理：食品衛生規格基準におけるアカデミアの役割. 日本薬学会第 146 年会、2026 年 3 月 29 日. 大阪

13） 中島 優衣, 岸 百恵, 木村 陽菜子, 五十嵐 結菜, 伊藤 里恵, 岩崎 雄介, 穐山 浩, 鶏肉中の総アフラトキシンの簡易分析法の開発, 日本薬学会第 146 年会、2026 年 3 月 28 日. 大阪

14） 岸 百恵, 中島 優衣, 五十嵐 結菜, 木村 陽菜子, 藤本 友紀, 岩崎 雄介, 伊藤 里恵, 穐山 浩, 国産牛肉中の総アフラトキシン分析法の開発について, 日本薬学会第 146 年会、2026 年 3 月 28 日. 大阪

15）

H. 知的財産権の出願･登録状況

なし