

I. 総括研究報告

星薬科大学

穂山 浩

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

令和7年度 総括研究報告書

動物性食品輸出の規制対策の強化に資する研究

研究代表者 穂山 浩

研究要旨: **課題 1:** 牛肉等の食肉を EU へ輸出する際には、動物用医薬品等のモニタリング検査を実施する必要がある。また、輸出先である EU で行われる輸入時検査において A 物質が検出された場合には、我が国においても検査を実施し、原因調査を行う必要がある。EU での輸入時検査において A 物質が検出された場合に、その原因を調査するための分析法として、鶏筋肉中のニトロイミダゾール類分析法及び牛／鶏筋肉中の β -作動薬分析法を開発し、妥当性評価試験を実施した。ニトロイミダゾール類分析法として、試料からアセトン及び酢酸で抽出した後、強酸性陽イオン交換ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を確立した。鶏筋肉を用いて添加濃度 $0.1 \mu\text{g/kg}$ (ジメトリダゾール、ロニダゾール、2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾールは $0.2 \mu\text{g/kg}$) で妥当性評価試験を実施した結果、真度、併行精度、室内精度及び選択性の目標値を満たした。また、 β -作動薬 (クレンプテロール、ラクトパミン、サルブタモール、ジルバテロール、シマテロール) 分析法として、試料からアセトンで抽出した後、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を確立した。牛及び鶏筋肉を用いて添加濃度 $0.5 \mu\text{g/kg}$ (クレンプテロールは $0.05 \mu\text{g/kg}$ 、シマテロールは $0.1 \mu\text{g/kg}$) で妥当性評価試験を実施した結果、真度、併行精度、室内精度及び選択性の目標値を満たした。これらの結果から、ニトロイミダゾール類分析法及び β -作動薬分析法はいずれも残留分析法として妥当であることが示された。**課題 2:** 牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減のための研究を実施した。1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査では、2025 年 4 月から 3 施設の協力のもとに牛枝肉合計 156 検体から 7 血清群 (026、045、0103、0111、0121、0145、0157) の STEC およびサルモネラ属菌を対象とした調査を行った。また、衛生指標として生菌数についても測定を行なった。供試検体を増菌培養後、または施設にて増菌培養した培養液の二次増菌培養後、STEC7 血清群マルチプレックスリアルタイム PCR およびサルモネラ特異的リアルタイム PCR に供試した。スクリーニングを行い、STEC7 血清群については、*stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、045 血清群、0121 血清群いずれも陽性となった培養液が 1 検体あり、菌分離を行ったが、STEC045 または 0121 は分離されなかった。サルモネラ属菌については、リアルタイム PCR 陽性検体はなかった。また、2. MLG 掲載または第 3 者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行では、菌液および菌添加牛肉培養液からのキットを用いた DNA の抽出および検出を実施した。使用マニュアルを作成したので、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられる。**課題 3:** 「輸出食肉認定施設における検査実施要領」に基づき、米国等向け輸出食肉の検証を担う新任指名検査員が、業務遂行に必要な知識および技術を効率的に習得するために、HACCP の基礎的な知識に関するオンデマンド教材、と畜・解体工程等を題材とした演習教材、米国 FSIS 関連法令の邦訳資料、妥当性確認及び検証に用いる科学的根拠文献と概要の一覧等を作成した。教材を用いて、2 か所の食肉衛生検査所において、HACCP の基礎的な研修を実施した結果、オンデマンド教材の視聴および対面演習を通じて参加者の理解度向上が確認され、オンデマンド教材の利便性及び演習の有効性が示された。さらに、指名検査員のパフォーマンス評価実施要領に基づき、新任指名検査員向け研修プログラム案を作成し、各検査所における体系的な人材育成に資する研修の枠組みを提示した。新任指名検査員向け教材及び参考資料を作成し、研修案を提示したので、各検査所で運用し、さらに指名検査員全体の研修体制の充実に資する仕組みについて検討を進めることが望まれる。**課題 4:** 対米輸出向け食肉の STEC 検査において報告された誤判定事例を踏まえ、市販の STEC 検査キットであるクオリバックス Q7 システムおよび RapidFinder について、誤判定がどのような条件で発生しうるのであるかを検証した。クオリバックス Q7 システムでは、開封後一定期間経過した試薬の一部で偽陽性、偽陰性および判定不能が認められた一方、開封直後の試薬ではこれらは認められなかったことから、試薬の保存条件が判定結果に影響する可能性が示唆された。RapidFinder では報告のあった偽陰性は再現されなかったが、高濃度の菌存在下の検体で *eae* の蛍光強度低下が認められ、これが偽陰性の一因となる可能性が考えられた。また、検体の希釈により蛍光強度低下が軽減されたことから、必要に応じた希釈操作が偽陰性の改善に有効であることが示唆された。以上より、適切な試薬管理および必要に応じた検体の希釈が検査精度の確保に重要であると考えられた。

研究分担者

志田(齊藤)静夏(国立医薬品食品衛生研究所
食品部第三室長)

工藤由起子(星薬科大学教授)

吉富真理(国立保健医療科学院上席主任研究
官)

廣瀬昌平(国立医薬品食品衛生研究所 衛生微
生物部第二室長)

研究協力機関

(一財)日本食品分析センター

遠藤裕美(岩手県食肉衛生検査所)

永島琴美、田中倖恵(栃木県食肉衛生検査所)

日本フードパッカー株式会社

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

大塚 衣映(栃木県食肉衛生検査所)

塚本 真由美(岐阜県飛騨食肉衛生検査所)

安達 恵、高澤 木綿子(姫路市食肉衛生検査セ
ンター)

西屋 秀樹(鹿児島県阿久根食肉衛生検査所)

中島 靖剛(スターゼンミートプロセッサー株式会
社 品質管理部)

森田 幸雄(麻布大学)

山崎 栄樹(国立医薬品食品衛生研究所)

A. 研究目的

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

第1の課題では、EUでの輸入時検査においてA
物質であるβ-作動薬及びニトロイミダゾール類が
検出された場合に、その原因調査のために必要な
分析法を検討した。

第2の課題では、対米輸出食肉取扱施設や食
肉検査所では、牛肉の腸管出血性大腸菌

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

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

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

B. 研究方法

課題 1:動物性食品中の残留物質及び汚染物質 の分析法の確立と妥当性評価

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

1. 試料

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

2. 試薬・試液

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

ロニダゾール標準品:純度 98.95%(Dr.Ehrenstorfer

製) (RNZ 標準品)

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

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

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

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

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

ジメトリダゾール-d₃:(富士フイルム和光純薬製) (DTZ-d₃)

ロニダゾール-d₃:(林純薬工業製) (RNZ-d₃)

メロニダゾール-d₄:(林純薬工業製) (MNZ-d₄)

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

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

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

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

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

アセトン、28%アンモニア水:特級(関東化学製)

ギ酸:LC-MS 用(富士フイルム和光純薬製)

アセトニトリル:LC-MS 用(関東化学製)

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

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

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

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

アセトニトリル及び 28%アンモニア水の混液

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

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

標準原液:DTZ 標準品約 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。RNZ 標準品約 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。MNZ 標準品約 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。INZ 標準品約 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。HMMNI 標準品約 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。MNZOH 標準品約 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。INZOH 標準品約 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

内標準原液:10 mg 容量の DTZ-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量の RNZ-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量の MNZ-d₄をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。10 mg 容量の INZ-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。5 mg 容量の HMMNI-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。1 mg 容量の MNZOH-d₄をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 50 mg/L 溶液を調製した。2.5 mg 容量の INZOH-d₃をメタノールで洗いこみ、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

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

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

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

3. 装置

ホモジナイザー: NS-52(マイクロテック・ニチオン製)

ロータリーエバポレーター: N-1000V(東京理器械製)

遠心分離機: H-60R(コクサン製)

LC-MS/MS

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

4. 定量

DTZ 標準原液、RNZ 標準原液及び HMMNI 標準原液をメタノールで希釈して 10 mg/L 混合溶液を調製した。MNZ 標準原液、INZ 標準原液、MNZOH 標準原液及び INZOH 標準原液をメタノールで希釈して 5 mg/L 混合溶液を調製した。DTZ-d₃ 内標準原液、RNZ-d₃ 内標準原液及び HMMNI-d₃ 内標準原液をメタノールで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。MNZ-d₄ 内標準原液、INZ-

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

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

5. 添加試料の調製

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

6. 試験溶液の調製

概要

DTZ、RNZ、MNZ、INZ、HMMNI、MNZOH 及び INZOH を試料からアセトン及び酢酸で抽出した後、ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確

認した。

(1)抽出

試料 10 g を 250 mL 容広口ポリ瓶に量り採り、アセトン 50 mL 及び酢酸 1 mL を加えた後、ホモジナイザーで撹拌した。2250 ×g で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。次いで残留物にアセトン 30 mL を加え、ホモジナイザーで撹拌した。2250 ×g で 5 分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液を 100 mL 容全量フラスコに合わせ、アセトンで定容した。

(2)精製

抽出液 5 mL (試料 0.5 g 相当) に酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1) 5 mL を混合した液をベンゼンスルホンルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Bond Elut SCX(500 mg/3 mL)] (あらかじめメタノール 3 mL、酢酸エチル及び酢酸の混液(19:1) 3 mL で洗浄したもの) に負荷した。アセトン 5 mL、メタノール 5 mL 及びアセトニトリル 5 mL で洗浄した後、アセトニトリル及び 28% アンモニア水の混液 (49:1) 15 mL で溶出した。溶出液をナス形フラスコに入れて、ロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水、メタノール及びギ酸の混液 (900:100:1) 0.5 mL に溶解し、メンブレンフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

7. マトリックス添加標準溶液の調製

「6. 試験溶液の調製」に記載した方法に従いブランク試料を濃縮(溶媒除去)操作まで行い、残留物に 0.2 µg/L (DTZ、RNZ 及び HMMNI) 及び 0.1 µg/L (MNZ、INZ、MNZOH 及び INZO) 混合標準溶液 0.5 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

8. 妥当性評価試験

鶏の筋肉を対象に定量限界濃度 [0.2 µg/kg (DTZ、RNZ 及び HMMNI) 及び 0.1 µg/kg (MNZ、INZ、MNZOH 及び INZO)] で妥当性評価試験を実施した。妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回 (2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。

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

1. 試料

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

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

2. 試薬・試液

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

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

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

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

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

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

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

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

ジルパテロール-(イソプロピル- $^{13}\text{C}_3$)塩酸塩：
(Sigma-Aldrich 製) (ZPT- $^{13}\text{C}_3$ 塩酸塩)
シマテロール- d_7 :(Sigma-Aldrich 製) (CMT- d_7)
メタノール:LC-MS 用(富士フイルム和光純薬製)
ギ酸:LC-MS 用(富士フイルム和光純薬製)
メタノール、酢酸アンモニウム、25%アンモニア水：
特級(富士フイルム和光純薬製)
アセトン:特級(関東化学製)
スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロ
リドン共重合体ミニカラム:Oasis MCX (500 mg/6
mL、Waters 製)
メンブレンフィルター:TORAST Disc(0.22 μm 、島
津ジーエルシー製)
メタノール及び水の混液(1:1):メタノール(特級)500
mL 及び水 500 mL を混合した。
水及びメタノールの混液(95:5):水 950 mL 及びメ
タノール(特級)50 mL を混合した。
水及び 25%アンモニア水の混液(98:2):水 98 mL
及び 25%アンモニア水 2 mL を混合した。
メタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2):メ
タノール(特級)98 mL 及び 25%アンモニア水 2 mL
を混合した。
水、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液及びギ酸の混
液(1000:2:1):水 1000 mL、1 mol/L 酢酸アンモニウ
ム溶液 2 mL 及びギ酸 1 mL を混合した。
標準原液:CBT 標準品約 10 mg を精秤し、メタノー
ル(特級)で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。
RCP 塩酸塩標準品約 11.7 mg(RCP 10 mg 相当)
を精秤し、メタノール(特級)で溶解して 100 mg/L 溶
液を調製した。SAL 標準品約 10 mg を精秤し、メ
タノール(特級)で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。
ZPT 塩酸塩標準品約 5.9 mg(ZPT 5 mg 相当)を
精秤し、メタノール(特級)で溶解して 100 mg/L 溶
液を調製した。CMT 標準品約 5 mg を精秤し、メ
タノール(特級)で溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。
内標準原液:10 mg 容量の CBT- d_9 をメタノール(特

級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して 100
mg/L 溶液を調製した。1 mg 容量の RCP- d_6 塩酸
塩をメタノール(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)
で溶解して 50 mg/L 溶液を調製した。2.5 mg 容
量の SAL- d_9 をメタノール(特級)で洗いこみ、メ
タノール(特級)で溶解して 50 mg/L 溶液を調製した。
10 mg 容量の ZPT- $^{13}\text{C}_3$ 塩酸塩をメタノール(特級)
で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して 100 mg/L
溶液を調製した。10 mg 容量の CMT- d_7 をメタノー
ル(特級)で洗いこみ、メタノール(特級)で溶解して
100 mg/L 溶液を調製した。

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

添加用内標準溶液:CBT- d_9 内標準原液及び
CMT- d_7 内標準原液を水及びメタノールの混液
(95:5)で希釈して 0.1 mg/L 溶液を調製した。RCP-
 d_6 内標準原液、SAL- d_9 内標準原液及び ZPT- $^{13}\text{C}_3$
内標準原液を水及びメタノールの混液(95:5)で希
釈して 0.5 mg/L 溶液を調製した。さらに、これら溶
液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 10
 $\mu\text{g/L}$ (CBT- d_9 及び CMT- d_7)及び 50 $\mu\text{g/L}$ (RCP- d_6 、
SAL- d_9 及び ZPT- $^{13}\text{C}_3$)混合溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー:NS-52(マイクロテック・ニチオン
製)

ロータリーエバポレーター:N-1000V(東京理化工
械製)

遠心分離機:H-60R(コクサン製)

LC-MS/MS

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

4. 定量

CBT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。RCP 標準原液、SAL 標準原液及び ZPT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。CMT 標準原液をメタノール(特級)で希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。これら溶液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.625 µg/L(CBT)、6.25 µg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 1.25 µg/L(CMT)混合溶液、及び 0.0625 µg/L(CBT)、0.625 µg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.125 µg/L(CMT)混合溶液を調製した。CBT-d₉ 内標準原液及び CMT-d₇ 内標準原液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.1 mg/L 溶液を調製した。RCP-d₆ 内標準原液、SAL-d₉ 内標準原液及び ZPT-¹³C₃ 内標準原液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 0.5 mg/L 溶液を調製した。これら溶液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して 2.5 µg/L(CBT-d₉ 及び CMT-d₇) 及び 12.5 µg/L(RCP-d₆、SAL-d₉ 及び ZPT-¹³C₃)混合溶液を調製した。さらに、これら溶液を水及びメタノールの混液(95:5)で希釈して内標準混合標準溶液を調製した。

この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られた CBT-d₉ のピーク面積に対する CBT、RCP-d₆ のピーク面積に対する RCP、SAL-d₉ のピーク面積に対する SAL、ZPT-¹³C₃ のピーク面積に対する ZPT、CMT-d₇ のピーク面積に対する CMT のピーク面積の比を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から内部標準法により CBT、RCP、SAL、ZPT 及び CMT の含量を算出した。

5. 添加試料の調製

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

6. 試験溶液の調製

概要

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

(1)抽出

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

(2)精製

抽出液 10 mL (試料 0.5 g 相当)に酢酸 500 µL を混合した液をスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis MCX (500 mg/6 mL)] [あらかじめメタノール(特級)5 mL、水及びメタノールの混液(1:1)5 mL で洗浄したもの]に負荷した。水及びメタノールの混液(1:1)5 mL、メタノール(特級)10 mL、水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)及びメタノール(特級)5 mL で洗浄した後、メタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)15 mL で溶出した。溶出液をナス形フラスコに入れて、ロータリーエバポレーター(40°C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水及びメタノールの混液(95:5)2 mL

に溶解し、メンブレンフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

7. マトリックス添加標準溶液の調製

「6. 試験溶液の調製」に記載した方法に従い牛及び鶏の筋肉のブランク試料を濃縮(溶媒除去)操作まで行い、残留物に 0.0125 µg/L(CBT)、0.125 µg/L(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.025 µg/L(CMT) 混合溶液 2 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

8. 妥当性評価試験

牛及び鶏の筋肉を対象に定量限界濃度[0.05 µg/kg(CBT)、0.5 µg/kg(RCP、SAL 及び ZPT)及び 0.1 µg/kg(CMT)]で妥当性評価試験を実施した。牛の筋肉については妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 1 回(2 併行)、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを評価した。また、鶏の筋肉については妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 5 回(5 併行)行い、各性能パラメータを評価した。

課題2:牛肉のSTECおよびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

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

(1)と畜場での作業

3施設において、処理された異なるウシ3頭から枝肉を各1本ずつ選定し、選定した枝肉ごとに頸部から胸部の任意の3箇所を選び、滅菌リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で浸漬した30 cm×30 cm サイズの滅菌したガーゼを密着させることによって検体の採取を行った。サンプリングを行ったガーゼは、それぞれ滅菌済みポリエチレン袋(サンプリングバッグ)に入れ、冷蔵で保存し、宅配便(冷蔵)によって星薬科大学へ送付した。合計 156 検体であった。

(2)STEC・サルモネラ属菌検出法および生菌数測

定

1) 検体の調製

枝肉に密着させたガーゼ検体(156 検体)は、試験に使用するまで冷蔵で保管された。サンプリングバッグを無菌的に開封し、Modified tryptone soya broth (mTSB) 300 mL を加え、バックの外からよく手で揉み、検体液とした。この検体液から、3 mL を生菌数測定用に使用した。また、定量的検出用として 37 mL を別容器に分注し4℃に保管した。

2) 生菌数測定

検体液を 10 倍階段希釈にて 10⁻² 希釈液まで作製し、検体液原液は 0.2 mL ずつを標準寒天培地 5 枚に塗抹し、10⁻¹ および 10⁻² 希釈液については 0.1 mL ずつを標準寒天培地にそれぞれ 2 枚ずつ塗抹し、37℃で 48 時間培養後、生菌数測定を行った。

3) 定性的な STEC 7 血清群の検出

3-1) 検体の増菌液からの DNA 抽出

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

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

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

プライマーセット Assay1 (*stx/eae*) ではベロ毒遺伝子(*stx* 遺伝子)およびインチミンタンパク質遺伝子(*eae* 遺伝子)を、Assay 2 (16S/O157) では 16SrRNA 遺伝子および O157 遺伝子を、Assay3 (O26/O111)では O26 遺伝子および O111 遺伝子

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

リアルタイム PCR の反応条件は、95℃で 10 分を 1 サイクル、次いで 95℃で 15 秒、59℃で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。まず初めに Assay1、2を行った。その結果、*stx* 陽性かつ *eae* 陽性の検体は、続けて Assay3、4、5を同時に行い、7血清群 O 遺伝子が陽性になるかを確認した。STEC 7 血清群陽性の検体は、陽性となった O 血清型について免疫磁気ビーズ法を以下のように行った。7血清群 O 遺伝子がない場合は STEC 7血清群陰性とした。

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

免疫磁気ビーズ法は、免疫磁気ビーズ O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157「生研」(デンカ株式会社)を用いて行った。最終的に滅菌リン酸緩衝液(PBS) 1 mL に懸濁したものをビーズ濃縮液とした。このビーズ濃縮液を 0.1 mL をソルビトールマッコンキー寒天(SMAC)培地、セフィキシム・亜テルル酸加ソルビトールマッコンキー寒天(CT-SMAC)培地、クロモアガーSTEC 培地またはセフィキシム・亜テルル酸加クロモアガーSTEC (CT-クロモアガーSTEC)培地に塗抹した。これらを 36±1℃で 18-24 時間培養し、培地上に増殖した疑わしいコロニーに関して、以下の STEC 7血清群の確認を行った。

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

コロニーを 0.1 mL の TE 緩衝液(pH8)に懸濁し、DNA 熱抽出を行なった。この抽出液をテンプレートとして、Assay1および目的とする O 群によるプライマーを用いて、3-2)と同様にリアルタイム PCR を行った。この結果、7血清群 O 遺伝子が陰性となったこのコロニーを STEC 7血清群陰性と判

定した。*Stx* 陽性かつ *eae* 陽性、血清群 O 遺伝子が陽性のコロニーは、STEC 7血清群陽性と判定した。

3-5) STEC 分離株の血清型の再確認

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

(3)サルモネラ属菌の検出方法

1) 試験検体

STEC 試験で調製した mTSB 培養液 156 検体を供した。

2) 検体の増菌培養液または培養液残液の二次増菌培養からの DNA 抽出

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

3) サルモネラ属菌特異的遺伝子の検出

プライマーセット(*ttr*/16S)ではサルモネラ属菌特異的 *ttr* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子を検出する。リアルタイム PCR の反応条件は、95℃で 10 分を 1 サイクル、次いで 95℃で 15 秒、59℃で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。*ttr* 遺伝子がない場合はサルモネラ属菌陰性とした。

4) 選択培地を用いたサルモネラ属菌の分離

3)で *ttr* 遺伝子が陽性だった検体の増菌培養液または培養液残液の二次増菌培養 0.5 mL をテトラチオネート(TT)培地 10 mL に、同液 0.1 mL を Rappaport-Vassiliadis R10(RV)培地 10 mL に接種し、42℃で 18-24 時間培養した。TT 培地および RV 培地での培養液を攪拌後、1 白金耳を DHL 寒天培地および CHROMagar Salmonella にそれぞれ画線塗抹し、35℃で 18-24 時間培養した。DHL 寒天培地と CHROMagar Salmonella に単離された

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

5) サルモネラ属菌の同定

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

6) 血清型別試験

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

7) サルモネラ属菌の汚染菌数の定量

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

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

(1) 試薬キットおよび機器

以下の2種類を供試した。

① SureTect 試薬シリーズの STEC 検出

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

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

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

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

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

(2) 検体作製

1) 菌株および牛肉の培養

腸管出血性大腸菌血清群 O26:1 株(VT1)、O45:1 株(VT1)、O103:1 株(VT1)、O111:1 株(VT1 & 2)、O121:1 株(VT2)、O145:1 株(VT1)、O157:2 株(VT2、VT1 & 2)を Trypticase soy broth (TSB)中にて 37℃で 18 時間培養した。また、市販の牛スライス肉を9倍量の mTSB 中にて 42℃で 18 時間培養した。

2) 菌希釈検体の作製

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

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

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

3) 菌数測定

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

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

各キットの使用手順に従って、実施した。

(4) キット使用のためのマニュアル作成

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

課題 3: 国内の食肉輸出施設の監視指導検査員の研修プログラムの充実

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

1. 研修教材及び参考資料の作成

1.1 講義資料のオンデマンド教材化及び演習教材の作成

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

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

演習は、CCP 工程がわかりやすい加熱食肉製

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

1.2 食肉処理に係る検証の動画教材の作成

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

1.3 業務参考資料の作成及び整備

1.3.1 輸出先国の食肉の衛生管理に係る法令及び通知等の邦訳

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

1.3.2 妥当性確認及び検証の参考資料

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

2. 教材を用いた研修の検証

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

2.1 参加者

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

2.2 オンデマンド教材の視聴

- ・オンデマンド教材の視聴可能期間: 1か月

- ・参考テキスト: 改訂新版 HACCP 導入と運用の基本—Codex 食品衛生の一般原則—2020 年改訂対応—(公益社団法人日本食品衛生協会)

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

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

・課題:教材視聴後、教材内容について3問以上の質問の提出

2.3 グループワーク演習

方式:対面

演習題材:加熱食肉製品及びと畜・解体工程

ファシリテーター:研究班員

2.4 研修に関するアンケート調査

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

3. 研修プログラム案の作成

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

課題 4:食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

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

(1) スクリーニング検査試薬

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

(2) 偽陽性判定の検証

牛肉 50 g に変法トリプトソイブロス培地 (mTSB)

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

(3) 偽陰性判定の検証

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

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

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

(1) スクリーニング検査試薬

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

(2) 偽陰性判定の検証

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

した。抽出した DNA を検査試薬(各 2 well)で検査した。

C. 結果

課題 1 動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

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

1. 分析カラムの検討

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

2. 精製カラムの検討

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

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

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

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

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

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

3. 妥当性評価試験結果

(1)選択性

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

(2)真度、併行精度及び室内精度

いずれも真度の目標値(70～120%)及び精度の目標値(併行精度30%未満、室内精度35%未満)を満たした。また、内標準物質として用いたDTZ-d₃、RNZ-d₃、MNZ-d₄、INZ-d₃、HMMNI-d₃、MNZOH-d₄及びINZOH-d₃の回収率はいずれも40%以上であった。

(3)試料マトリックスの測定への影響

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

(4)検量線の直線性

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

(5)定量限界

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

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

1. LC-MS/MS条件の検討

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

2. 試料前処理の検討

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

μg/L(RCP、SAL 及び ZPT)]200 μL[水及びメタノールの混液(95:5)]を添加した液を供し、水及びメタノールの混液(1:1)5 mL、メタノール(特級)10 mL、水及び 25%アンモニア水の混液(98:2) 5 mL 及びメタノール(特級)5 mL で洗浄した後、メタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)10 mL で溶出し、さらにメタノール及び 25%アンモニア水の混液(98:2)5 mL で追加溶出した。各画分をナス形フラスコに採り、ロータリーエバポレーター(40°C)で濃縮乾固し、室温で窒素ガスを通じ残存溶媒を除去した。残留物を水及びメタノールの混液(95:5)2 mL に溶解し、LC-MS/MS を用いて各溶液中の分析対象化合物量を求めた。Bond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)では水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)洗浄後のメタノール洗浄区間においていずれの物質も 9~32%の溶出が認められ、かつ RCP の合計回収率が 13%と著しく低かった。EVOLUTE EXPRESS CX(150 mg/6 mL)は Bond Elut SCX HF(500 mg/3 mL)に比べて合計回収率は向上したものの、水及び 25%アンモニア水の混液(98:2)洗浄後のメタノール洗浄時の ZPT が 34%溶出していた。これらに対して、Oasis MCX (500 mg/6 mL)は 3 種類のミニカラムの中で最も良好な保持挙動を示した。RCP 及び CMT の合計回収率はそれぞれ 73%、75%に留まったものの、負荷時及び洗浄時における流出はほとんど認められなかった。

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

3. 妥当性評価試験結果

(1)選択性

牛及び鶏の筋肉のブランク試料を本試験法に従って分析したところ、クロマトグラム上に定量を妨

害するピークは検出されなかった。

(2)真度、併行精度及び室内精度

牛の筋肉において、いずれも真度の目標値(70~120%)及び精度の目標値(併行精度 30%未満、室内精度 35%未満)を満たした。また、内標準物質として用いた CBT-d₉、RCP-d₆、SAL-d₉、ZPT-¹³C₃ 及び CMT-d₇ の回収率はいずれも 40%以上であった。

(3)真度

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

(4)試料マトリックスの測定への影響

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

(5)検量線の直線性

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

(6)定量限界

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

課題2:牛肉のSTECおよびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

(1) 生菌数

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

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

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

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

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

(2) STEC7 血清群の分離

供試検体 156 検体のうち、18 検体が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の少なくとも片方が陽性であり、両遺伝子のいずれもが陽性となった検体はそのうち 4 検体であった。この 4 検体のうち 1 検体が STEC 7 血清群の O45 および O121 で陽性となり、それぞれの Ct 値は 38.9 および 36.0 であった(検体番号 25-107)。しかし、CT-クロモアガー STEC 培地で分離されたコロニーはリアルタイム PCR で陰性のため、O45 血清群、O121 血清群の判定は陰

性とした。

(3) サルモネラ属菌の検出

増菌培養液が *ttv* 遺伝子陽性となった検体はなかった。

2. MLG 掲載または第 3 者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行
実施結果については、別途とりまとめた。また、使用マニュアルを作成した。

課題 3: 国内の食肉輸出施設の監視指導検査員の研修プログラムの充実

1. 研修教材及び参考資料

1.1 研修教材

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

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

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

1.2 参考資料

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

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

2. 教材及び研修の検証

基礎研修により、教材及び研修の効果を検証した。

2.1 スケジュール及び参加者の背景

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

2.2 オンデマンド教材の視聴について

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

2.3 オンデマンド教材の評価について

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

評価の理由の概要は、以下のとおりである。

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

が湧かない

・FSIS とと畜場法の衛生要求の関係性が分かりにくい

2.4 理解度の変化

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

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

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

2.5 研修終了後の評価

研修終了後に自由記載で、参加者の演習及び研修全体に対する意見を把握した。

意見の概要は以下のとおりである。

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

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

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

3. 新任指名検査員向け研修プログラム案の作成

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

課題 4: 食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

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

(1) 偽陽性判定の検証

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

定不能は認められなかった。

(2) 偽陰性判定の検証

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

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

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

D. 考察

課題 1 動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

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

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

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

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

課題2:牛肉のSTECおよびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

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

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

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

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

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

課題 3:国内の食肉輸出施設の監視指導検査員の研修プログラムの充実

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

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

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

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

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

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

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

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

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

課題 4:食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

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

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

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

E. 結論

課題 1 動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

EU での輸入時検査において A 物質が検出された場合の原因調査のための分析法として、鶏筋肉

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

課題2:牛肉のSTECおよびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減のための研究を実施した。1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査では、2025 年 4 月から 3 施設の協力のもとに牛枝肉合計 156 検体から 7 血清群 (O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157) の STEC およびサルモネラ属菌を対象とした調査を行った。また、衛生指標として生菌数についても測定を行なった。供試検体を増菌培養後、または施設にて増菌培養した培養液の二次増菌培養後、STEC7 血清群マルチプレックスリアルタイム PCR およびサルモネラ特異的リアルタイム PCR に供試した。スクリーニングを行い、STEC7 血清群については、*stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、O45 血清群、O121 血清群いずれも陽性となった培養液が 1 検体あり、菌分離を行ったが、STECO45 または O121 は分離されなかった。サルモネラ属菌については、リアルタイム PCR 陽性検体はなかった。また、2. MLG 掲載または第 3 者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行では、菌液および菌添加牛肉培養液からのキットを用いた DNA の抽出および検出を実施した。使

用マニュアルを作成したので、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられる。

課題 3: 国内の食肉輸出施設の監視指導検査員の研修プログラムの充実

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

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

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

課題 4: 食肉輸出施設で実施される微生物検査の妥当性評価および逸脱防止

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

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

2. 学会発表

- 1) 小椋和彦、畑寛子、飯塚誠一郎、河野洋一、伊藤里恵、堤智昭、穂山浩、志田（齊藤）静夏.LC-MS/MSによる牛筋肉中の高感度ステロイド類一斉分析法の検討. 日本食品衛生学会第121回学術講演会（2025.10.16）
- 2) 池側智香子、畑寛子、飯塚誠一郎、河野洋一、伊藤里恵、堤智昭、穂山浩、志田（齊藤）静夏. 牛筋肉中のスチルベン類（ジエネストロール、ジェチルスチルベストロール及びヘキセステロール）分析法の検討. 日本食品衛生学会第121回学術講演会（2025.10.16）
- 3) 鏡山雅人、天野壮俊、本多伽衣、大塚佳代子、奥輝明、築地信、内田和之、菊地真由美、穂山浩、工藤由起子. 対米輸出和牛の国内試験への新規遺伝子検出法導入のための評価. 第121回日本食品衛生学会学術講演会. 2025年10月16-17日. 東京都.
- 4) 穂山浩、「食品に関わるリスク管理の新展開」残留農薬等のリスク管理について最近の動向と課題. 日本薬学会第146年会、2026年3月28日. 大阪
- 5) 穂山浩、「食品安全行政を支えるアカデミアの人材育にむけて」リスク管理：食品衛生規格基準におけるアカデミアの役割. 日本薬学会第146年会、2026年3月29日. 大阪
- 6) 中島 優衣, 岸 百恵, 木村 陽菜子, 五十嵐 結菜, 伊藤 里恵, 岩崎 雄介, 穂山 浩, 鶏肉中の総アフラトキシンの簡易分析法の開発, 日本薬学会第146年会、2026年3月28日. 大阪
- 7) 岸 百恵, 中島 優衣, 五十嵐 結菜, 木村 陽

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

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし