

飼料研究報告

第44号

令和元年

Research Report of Animal Feed

Vol. 44
2019



独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
Food and Agricultural Materials Inspection Center
(Incorporated Administrative Agency)
OIE Collaborating Centre for Animal Feed Safety and Analysis
Saitama, Japan

はしがき

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC）は、農林水産行政と密接に連携しつつ、農業生産資材（肥料、農薬、飼料及び飼料添加物並びに土壌改良資材）や食品を対象として科学的な検査・分析を行い、農業生産資材の安全の確保、食品等の品質の改善・表示の適正化等に技術で貢献することを使命に掲げ、検査等業務に取り組んでいます。

飼料及びペットフードについては、農林水産省等の関係府省が「飼料安全法」及び「ペットフード安全法」に基づく基準規格（残留農薬、有害物質、添加物など）を設定し、飼料等の関係事業者がこの基準規格を遵守することにより、飼料等の安全確保が図られています。これらの法律に基づく基準規格の設定に当たっては、先ずはその目的に応じた性能（選択性、検量線の直線性、真度、精度、検出限界と定量限界など）を有する試験法により、科学的に信頼できるデータを得ることが重要です。

このため、FAMIC では飼料等の分析法の開発、改良等を行うとともに、分析法の妥当性確認を行い、公定分析法を確立しています。また、確立した公定分析法を用いて飼料等のサーベイランス・モニタリングを行い、有害物質による汚染実態の把握や基準規格の遵守状況の確認を行うことを通じて、飼料等の安全確保に貢献しています。さらに、FAMIC の飼料部門は、国際獣疫事務局（OIE）の「飼料の安全と分析」分野のコラボレーティング・センターとして、飼料の安全と分析に関する技術情報の発信や研修等の実施などを通じて、安全な畜産物の国際取引の確保等に寄与しています。

『飼料研究報告』は、FAMIC の飼料部門における飼料及び飼料添加物並びにペットフードの分析及び鑑定技術の改善、検査手法・試験法の開発又は改良等を目指して実施した調査・研究成果や学術雑誌等に投稿等して公表した研究成果を取りまとめたものです。これらの研究成果は「飼料分析基準」（平成 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号。農林水産省消費・安全局長通知）又は「愛玩動物用飼料等の検査法」（平成 21 年 9 月 1 日付け 21 消技第 1764 号。FAMIC 理事長制定）に記載されるほか、『飼料分析法・解説 -2009-』（飼料分析基準研究会編書）の改訂の際に掲載される予定です。

最後に、本研究報告が飼料及び飼料添加物並びにペットフードの安全の確保の一助となることを期待するとともに、関係各位の皆様には、FAMIC の技術レベルの更なる向上のために、引き続き、御指導、御鞭撻を賜りますよう、お願い申し上げます。

令和元年 9 月

理事長 木内 岳志

謝 辞

本報告に掲載した分析法の開発及び報告書の作成に当たり、助言賜りました下記の飼料分析基準検討会の各委員に感謝申し上げます。

平成 30 年度飼料分析基準検討会委員
(敬称略。五十音順。役職は平成 31 年 3 月現在。)

- | | |
|--------|--|
| 石黒 瑛一 | 一般財団法人日本食品分析センター 顧問 |
| 内田 一成 | 一般財団法人生物科学安全研究所 事業部 部長代行 |
| 永西 修 | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
畜産研究部門 企画管理部 企画連携室長 |
| 小田中 芳次 | 公益財団法人日本植物調節剤研究協会 研究所 技術顧問 |
| 小池 良治 | 農林水産省動物医薬品検査所 検査第二部 総括上席研究官 |
| 後藤 哲久 | AOAC インターナショナルフェロー |
| 中島 正博 | 名古屋市衛生研究所 食品部長 |
| 永山 敏廣 | 明治薬科大学 特任教授 |
| 堀江 正一 | 大妻女子大学 家政学部 食物学科 教授 |
| 松井 徹 | 国立大学法人京都大学大学院 農学研究科 教授 |
| 松井 利郎 | 国立大学法人九州大学 農学研究院 教授 |
| 安井 明美 | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
食品研究部門 アドバイザー |

目 次

1 愛玩動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムの液体クロマトグラフによる定量法の開発及び共同試験	杉本 泰俊, 伊藤 紗織, 桑原 正良	1
2 飼料中のサルモネラ 7 血清型のマルチプレックス PCR 法による迅速同定法の開発及び共同試験	関口 好浩, 近藤 勝, 笠原 正輝, 嶋村 知紗, 浅尾 美由起, 山多 利秋	17
技術レポート		
1 飼料中のシアヌル酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の検討	長久保 眞平, 野村 昌代, 青山 幸二	38
2 全脂粉乳及びこれを原料とする配合飼料中の粗脂肪の測定法の開発	安田 紗紀恵, 鈴木 知華, 沼田 歩美	49
3 飼料中のクロルプロファム及びフィプロニルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発	矢野 愛子, 佐藤 憲大, 土井 雄悟, 榊原 良成	57
4 愛玩動物用飼料中のデオキシニバレノール, ニバレノール, HT-2 トキシン及び T-2 トキシンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法の開発	立石 洋暢, 加藤 耕一, 桑原 正良	75
5 飼料及び愛玩動物用飼料中の砒素, カドミウム, 鉛及び水銀の迅速・多元素同時定量法の開発	田端 麻里, 野村 昌代, 鈴木 知華	95
6 飼料用稲中のフェリムゾンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の追加検討及び共同試験	鈴木 知華, 新井 詠子, 三枝 尚子	105
7 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法の適用範囲をとうもろこしサイレージに拡大するための妥当性確認	高橋 雄一, 嶋村 知紗	121

8 含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の妥当性確認 ～N-アセチルグリホサートの追加並びに大豆及び大豆油かすへの適用拡大～ 齊木 雅一, 廣井 利明	136
---	-----

精度管理

1 平成 30 年度飼料等の共通試料による分析鑑定について 沼田 歩美, 船水 悦子, 三枝 尚子, 嶋村 知紗, 高津 文香, 佐藤 憲大	151
--	-----

調査資料

1 飼料中の有害物質等のモニタリング等の結果について (平成 30 年度) 肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課	180
2 動物質性飼料原料等の腸球菌の薬剤耐性モニタリング調査 (平成 30 年度) 浅尾 美由起, 奥山 紀子	202
3 特定添加物検定結果等について (平成 30 年度) 肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課	212

CONTENTS

1	Development and Collaborative Study of Determination Method of Sodium Nitrite in Pet Food by LC Yasutoshi SUGIMOTO, Saori ITOU and Masayoshi KUWABARA	1
2	Development and Collaborative Study of Rapid Identification Method of Seven Serovars of <i>Salmonella</i> in Feed Using Multiplex PCR Yoshihiro SEKIGUCHI, Masaru KONDO, Masaki KASAHARA, Chisa SHIMAMURA, Miyuki ASAO and Toshiaki YAMATA	17
§ Technical report		
1	Study of Determination Method of Cyanuric Acid in Feed by LC-MS/MS Shinpei NAGAKUBO, Masayo NOMURA and Koji AOYAMA	38
2	Development of Crude Fat Measurement Methods in Dried Whole Milk and Dried Whole Milk-Based Formula Feed Sakie YASUDA, Chika SUZUKI and Ayumi NUMATA	49
3	Development of Determination Method of Chlorpropham and Fipronil in Feed by LC-MS/MS Aiko YANO, Norihiro SATO, Yugo DOI and Yoshinari SAKAKIBARA	57
4	Development of the Simultaneous Determination Method of Deoxynivalenol, Nivalenol, HT-2 Toxin and T-2 Toxin in Pet Food by LC-MS/MS Hironobu TATEISHI, Koichi KATO and Masayoshi KUWABARA	75
5	Development of the Rapid Simultaneous Determination Method of Arsenic, Cadmium, Lead and Mercury in Feed and Pet Food by ICP-MS Mari TABATA, Masayo NOMURA and Chika SUZUKI	95
6	Additional Consideration and Collaborative Study of Determination Method of Ferimzone in Rice Straw, Whole-Crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS Chika SUZUKI, Eiko ARAI and Naoko SAEGUSA	105

7	Validation Study on Application of the Simultaneous Determination Method of Aflatoxins by LC to Corn Silage	Yuichi TAKAHASHI and Chisa SHIMAMURA	121
8	Validation Study on Analyte Expansion of the Simultaneous Determination Method for Glyphosate, Glufosinate and its Metabolites in Feed by LC-MS/MS to include <i>N</i> -acetylglyphosate, Soybean and Soybean Meal	Masakazu SAIKI and Toshiaki HIROI	136
§ Proficiency test			
1	Proficiency Test (in the Fiscal Year 2018)	Ayumi NUMATA, Etsuko FUNAMIZU, Naoko SAEGUSA, Chisa SHIMAMURA, Fumika TAKATSU and Norihiro SATO	151
§ Investigative report			
1	Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2018)	Feed Analysis 1st Division and 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	180
2	Monitoring Results of Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Feed Ingredients (in the Fiscal Year 2018)	Miyuki ASAO and Noriko OKUYAMA	202
3	Results of Official Testing of Specified Feed Additives (in the Fiscal Year 2018)	Feed Analysis 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	212

1 愛玩動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムの液体クロマトグラフによる定量法の開発及び共同試験

杉本 泰俊^{*1}, 伊藤 紗織^{*2}, 桑原 正良^{*3}

Development and Collaborative Study of Determination Method of Sodium Nitrite in Pet Food by LC

Yasutoshi SUGIMOTO^{*1}, Saori ITOU^{*2} and Masayoshi KUWABARA^{*3}

(^{*1} Kobe Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

(Now Nagoya Regional Center, FAMIC),

^{*2} Kobe Regional Center, FAMIC (Now Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC),

^{*3} Kobe Regional Center, FAMIC)

We have developed a quantitative determination method the concentration of sodium nitrite in pet foods using a liquid chromatograph with ultraviolet (LC-UV), and conducted a collaborative study.

Sodium nitrite was extracted with ammonium acetate solution. The sample solution was deproteinized with zinc sulfate solution and sodium hydroxide solution before its filtration. The filtrate was further purified with a SPE mini-column (graphitized carbon cartridge, Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA), and injected into a LC-UV to determine the concentration of sodium nitrite. LC-UV separation was then carried out on a NH₂ column (Asahipak NH2P-50 4E, 4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 µm from Showa Denko K.K.; Tokyo, Japan) using phosphoric acid buffer as a mobile phase.

Recovery tests were conducted on eight kinds of pet foods. Dry food for cats, formed jerky for dogs and dried jerky for dogs (hard type) were added with 20 and 100 mg/kg of sodium nitrite respectively. Semi-dry food for dogs and dried jerky for cats (soft type) were added with 20 and 200 mg/kg of sodium nitrite respectively. Confectionery (biscuit) for dogs and milk powder for dogs were added with 20, 100 and 200 mg/kg of sodium nitrite respectively. Wet food for cats was added with 5, 30 and 100 mg/kg of sodium nitrite respectively. The resulting mean recoveries ranged from 92.4 % to 108 % for sodium nitrite. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 7.0 % for sodium nitrite.

A collaborative study was conducted by eleven laboratories using six kinds of pet foods, all of which were added with sodium nitrite according to the following specifications: 160 mg/kg for dry food for cats, 80 mg/kg for semi-dry food for dogs, 30 mg/kg for wet food for cats, 120 mg/kg for formed jerky for dogs, 50 mg/kg for confectionery (biscuit) for dogs, 20 mg/kg for milk powder for dogs. The resulting range of mean recoveries, repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD_r and RSD_R), and HorRat, were 95.2 % to 102 %, less than 4.6 % and less than 7.6 %, and less than 0.93 respectively.

This method was thus validated and established as adequate for use in inspections of sodium nitrite in pet foods.

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター, 現 名古屋センター

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター, 現 肥飼料安全検査部

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

Key words: sodium nitrite; liquid chromatograph with ultraviolet (LC-UV); pet food; collaborative study

キーワード：亜硝酸ナトリウム；液体クロマトグラフ；愛玩動物用飼料；共同試験

1 緒 言

亜硝酸ナトリウムはヘモグロビン等に作用して、加熱等により変色しにくい赤色を呈するといった発色効果があり、国内においては食品添加物（発色剤）に指定され¹⁾、広く食肉加工品等に使用されている。また、ボツリヌス菌等の微生物の発育阻止作用も認められている。

国内における食品中の規制値²⁾は、亜硝酸根としての最大残存量として食肉製品及び鯨肉ベーコンで 0.070 g/kg、魚肉ソーセージ及び魚肉ハムで 0.050 g/kg 並びにいくら、すじこ及びたらこで 0.0050 g/kg とされている。愛玩動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムについては、愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令³⁾において、亜硝酸ナトリウムとして 100 g/t の基準値が定められている。なお、飼料における基準値はない。

愛玩動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムの定量法としては、甲斐⁴⁾及び杉村ら⁵⁾が検討した愛玩動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムの分光光度計による定量法が既に愛玩動物用飼料等の検査法⁶⁾に記載されているが、アスコルビン酸等の還元物質を添加された愛玩動物用飼料では回収率が低下するという問題があり、また、粉ミルクは適用対象になっていない。

今回、一般財団法人日本冷凍食品検査協会が平成 27 年度愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業において開発した液体クロマトグラフ（以下「LC」という。）を用いた定量法⁷⁾（以下「冷食協法」という。）を基に、還元物質を添加された愛玩動物用飼料及び粉ミルクにも適用可能な分析法を開発するとともに、共通試料を用いた共同試験を実施し、愛玩動物用飼料等の検査法への適用の可否を検討したのでその概要を報告する。

2 実験方法

2.1 分析法開発

2.1.1 試 料

愛玩動物用飼料（ドライ製品（猫用）、セミドライ製品（犬用）、成型ジャーキー（犬用）、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ（犬用）及びソフトタイプ（猫用））、菓子類（犬用ビスケット）及び粉ミルク（犬用））は 1 mm 以下になるまで粉碎（粒度が 1 mm 以下であった粉ミルクを除く。）した。なお、ジャーキーで有姿のままでは粉碎が困難な試料は、はさみ等を用いて裁断したのち粉碎した。愛玩動物用飼料（ウェット製品（猫用））はフードプロセッサで粉碎した。

なお、検討に用いた愛玩動物用飼料を Table 1 に示した。

Table 1 Composition of pet foods

Pet food types	Ingredients
Dry food for cats	Brans (wheat bran, rice bran), beans (soybean meal), starches (tapioca), vegetable protein extracts (corn gluten meal), meats (poultry byproduct), oils and fats (chicken oil, vegetable oil), fishes (bonito meal), yucca extracts, vegetables (dried carrot, broccoli powder), minerals (Fe, Mn, Zn, K, Co, Na, Ca, Cl, Se), amino acids (DL-methionine, taurine), vitamins (V. A, V. B ₁ , V. B ₂ , niacin, pantothenic acid, V. B ₆ , V. B ₁₂ , V. C, biotin, folic acid, choline), coloring (food yellow no. 5, food blue no. 1), antioxidant (mixed tocopherol)
Semi-dry food for dogs	Grains (wheat flour, etc.), meats (chicken, etc.), sugars, potatoes (sweet potato, etc.), vegetables (carrot, pumpkin, spinach, etc.), minerals (P, Na, Ca, Mg, K, Fe, Zn, Cu, Mn, I), quality preservation agent (propylene glycol), thickening agent (glyceline), preservative (potassium sorbate), amino acids (L-lysine hydrochloride), vitamins (choline, V. E, V. C, niacin, pantothenic acid, V. A, V. B ₆ , V. B ₁ , V. B ₂ , folic acid, V. B ₁₂ , V. D), pH adjuster, antioxidant (sodium erythorbate, mixed tocopherol, rosemary extracts), coloring (titanium dioxide, food yellow no. 5, food red no. 106, food yellow no. 4, food blue no. 1)
Wet food for cats	Bonito, chicken, oligosaccharide, minerals (Ca, Cu, Mn, Zn), vitamins (V. A, V. E, V. K, V. B ₁ , V. B ₂ , folic acid, biotin)
Formed jerky for dogs	Meats (chicken, beef), wheat flour, defatted soybean, brans, vegetable oil, sorbitol, propylene glycol, minerals (Na), sodium polyphosphate, seasoning, antioxidant (potassium sorbate), pH adjuster, sodium metaphosphate, coloring (food red no. 102, food red no. 106, food yellow no. 5, food blue no. 1)
Dried jerky for dogs (hard type)	Deer meat
Dried jerky for cats (soft type)	Chicken (white meat), glycerin (humectants), propylene glycol (quality pretention agent), antioxidant (sodium sulfite)
Confectionery (biscuit) for dogs	Wheat flour, margarine, caster sugar, chicken egg, rice embryo and fermented soybean extracts, tree extracts, galacto-oligosaccharide, protein concentrated whey powder (dairy products), dried skim milk, milk oligosaccharide, vegetable oil, sweetener (D-sorbitol), calcium carbonate, green tea extract, antioxidant (V. E, rosemary extracts)
Milk powder for dogs	Milk protein, dextrin, animal fat, dried skim milk, vegetable oil, dietary fiber, glucose, bifidus bacteria for animal, dry yeast, chondroitin sulfate, glucosamin, DL-methionine, L-arginine, L-cystine, L-carnitine, milk oligosaccharide, pH adjuster, emulsifier, vitamins (V. A, V. D, V. E, V. B ₁ , V. B ₂ , V. B ₆ , V. B ₁₂ , V. C, pantothenic acid, niacin, folic acid, biotin, choline, carotene), minerals (Ca, P, K, Cl, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I), inositol, nucleotide, flavour (butter, milk cream)

2.1.2 試 薬

- 1) 亜硝酸ナトリウム, アンモニア水 (質量分率 28%), 酢酸アンモニウム, 水酸化ナトリウム, 硫酸亜鉛七水和物, リン酸水素二ナトリウム十二水和物, リン酸二水素ナトリウム二水和物及び過塩素酸ナトリウム一水和物は特級を用いた. 水は Milli-Q Element A10 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた.

2) 酢酸アンモニウム緩衝液

酢酸アンモニウム 80 g を水に溶かして 1 L とし、アンモニア水 (1+4) で pH を 9.0 に調整した。使用に際して、この液の一定量を水で 10 倍に希釈した。

3) 硫酸亜鉛溶液 (10 w/v%)

硫酸亜鉛七水和物 178 g を水に溶かして 1 L とした。

4) 水酸化ナトリウム溶液 (30 w/v%)

水酸化ナトリウム 30 g を水に溶かして 100 mL とした。

5) リン酸緩衝液

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 1.79 g, リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.78 g 及び過塩素酸ナトリウム一水和物 14.04 g を水に溶かして 1 L とした。

6) 亜硝酸ナトリウム標準液

亜硝酸ナトリウム (105 °C で 4 時間乾燥したもの) 500 mg を正確に量って 500 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて亜硝酸ナトリウム標準原液を調製した (この液 1 mL は、亜硝酸ナトリウムとして 1 mg を含有する。) 。

使用に際して、標準原液の一定量をリン酸緩衝液で正確に希釈し、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8 及び 10 µg を含有する各標準液を調製した。

2.1.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機 : ZM 200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)
- 2) フードプロセッサー : MK-K80 パナソニック製
- 3) グラファイトカーボンミニカラム : ENVI-Carb (充てん剤量 500 mg リザーバー容量 6 mL) Sigma-Aldrich 製
- 4) メンブランフィルター : HLC-DISK 13 水系 (孔径 0.45 µm) 関東化学製
- 5) LC : Prominence 島津製作所製

2.1.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 5 g を正確に量って 200 mL の首太全量フラスコに入れ、酢酸アンモニウム緩衝液 150 mL を加え、密栓して振り混ぜた後、80 °C の水浴中で 10 分間静置した。続いて硫酸亜鉛溶液 (10 w/v%) 20 mL を加え、密栓して振り混ぜた後、80 °C の水浴中で 5 分間静置した。更に氷中で 5 分間静置した後、水酸化ナトリウム溶液 (30 w/v%) 2 mL を加え、密栓して振り混ぜた後、10 分間静置した。首太全量フラスコの標線までリン酸緩衝液を加え、ろ紙 (5 種 C) でろ過し、初めのろ液約 20 mL を捨て、その後のろ液 5 mL 以上を試料溶液とした。

2) カラム処理

グラファイトカーボンミニカラムを水 5 mL で洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、自然流下させ、初めの流出液 3 mL を捨てた。10 mL の試験管をカラムの下に置き、その後の流出液 2 mL を受けた。

この液をメンブランフィルター (孔径 0.45 µm) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

3) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各亜硝酸ナトリウム標準液各 20 μ L を LC に注入しクロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 に示した。

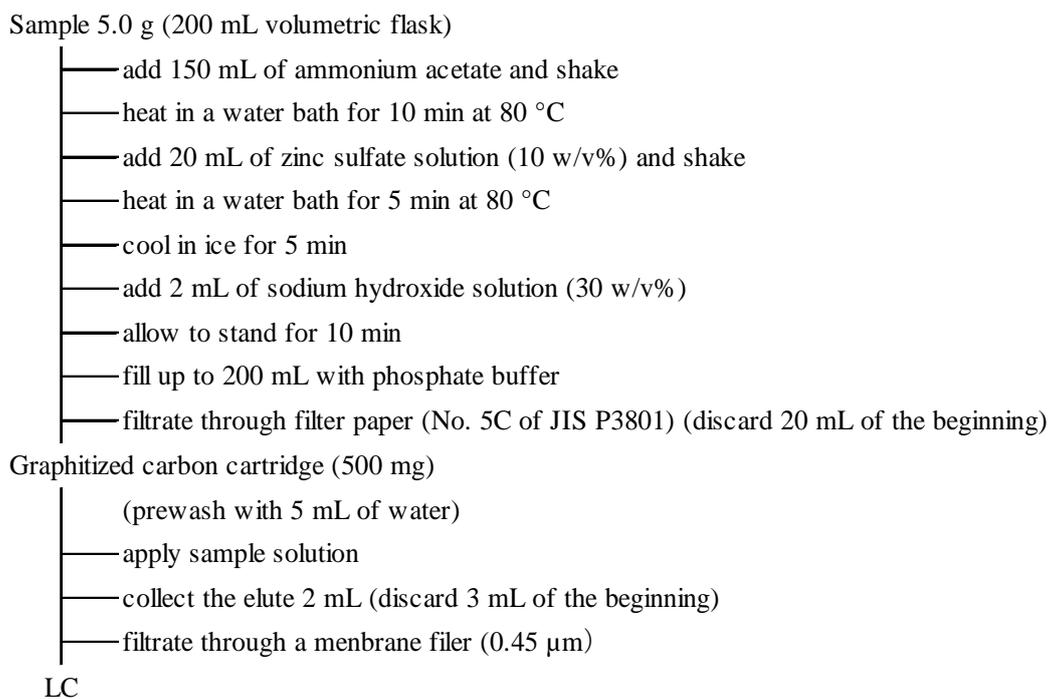
Table 2 Operating condition of LC

Column	Asahipak NH2P-50 4E (4.6 mm i.d. \times 250 mm, 5 μ m), Showa Denko K.K
Mobile phase	Phosphoric acid buffer
Flow rate	0.8 mL/min
Detector	UV detector (Wavelength: 220 nm)
Column temperature	40 $^{\circ}$ C

4) 計 算

得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の亜硝酸ナトリウム量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for sodium nitrite in pet foods

2.1.5 夾雑ピークの検討用溶液

1) ブランク溶液

試料を用いないで 2.1.4 の 1)及び 2)に従い調製した。

2) 酢酸アンモニウム/リン酸緩衝液

2.1.2 の 2)の酢酸アンモニウム緩衝液を 2.1.4 の 1)の試料溶液中の濃度と同じになるようにリン酸緩衝液で希釈した。

3) 硫酸亜鉛/リン酸緩衝液

2.1.2 の 3)の硫酸亜鉛溶液 (10 w/v%) を 2.1.4 の 1)の試料溶液中の濃度と同じになるようにリン酸緩衝液で希釈した。

4) 水酸化ナトリウム/リン酸緩衝液

2.1.2 の 4)の水酸化ナトリウム溶液 (30 w/v%) を 2.1.4 の 1)の試料溶液中の濃度と同じになるようにリン酸緩衝液で希釈した。

5) ドライ製品/リン酸緩衝液

Table 1 のドライ製品 (猫用) 5.0 g を正確に量って 500 mL の共栓三角フラスコに入れ、リン酸緩衝液 250 mL で 20 分間振り混ぜて抽出した。抽出液をろ紙 (5 種 C) でろ過した後、ろ液の一定量をリン酸緩衝液で 50 倍に希釈した。

2.1.6 添加回収試験

2.1.2 の 6)の亜硝酸ナトリウム標準原液をリン酸緩衝液で正確に希釈し添加に用いた。

ドライ製品 (猫用)、成型ジャーキー (犬用) 及び素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用) について、20 及び 100 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 2.5 µg/mL)、セミドライ製品 (犬用) 及び素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (猫用) について、20 及び 200 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 5 µg/mL)、菓子類 (犬用ビスケット) 及び粉ミルク (犬用) について、20、100 及び 200 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5、2.5 及び 5 µg/mL)、ウェット製品 (猫用) について、5、30 及び 100 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.125、0.75 及び 2.5 µg/mL) になるように添加後よく混合し、直ちに 2.1.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

2.2 共同試験

2.2.1 共同試験用試料

2.1 の試料のうち、ドライ製品 (猫用)、セミドライ製品 (犬用)、ウェット製品 (猫用)、成型ジャーキー (犬用)、菓子類 (犬用ビスケット) 及び粉ミルク (犬用) について、約 6 g ずつ小分けしたもの (試料名は非明示) 各 2 袋を試験用試料として計 12 袋を各試験室に配付した。

2.2.2 配付試薬

1) 亜硝酸ナトリウム標準原液

亜硝酸ナトリウム (105 °C で 4 時間乾燥したもの) 1000 mg を正確に量って 500 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて亜硝酸ナトリウム標準原液を調製した (この液 1 mL は、亜硝酸ナトリウムとして 2000 µg を含有する。) 。

2) 検量線作成用標準原液

1)で調製した亜硝酸ナトリウム標準原液 125 mL を 250 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までリン酸緩衝液を加え、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 1000 µg を含有する検量線作成用標準原液を調製した。

3) ドライ製品添加用標準液

1)で調製した亜硝酸ナトリウム標準原液 80 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 1600 µg を含有するドライ製品添加用標準液を調製した。

4) セミドライ製品添加用標準液

1)で調製した亜硝酸ナトリウム標準原液 40 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 800 µg を含有するセミドライ製品添加用標準液を調製した。

5) ウェット製品添加用標準液

1)で調製した亜硝酸ナトリウム標準原液 15 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 300 µg を含有するウェット製品添加用標準液を調製した。

6) 成型ジャーキー添加用標準液

1)で調製した亜硝酸ナトリウム標準原液 60 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 1200 µg を含有する成型ジャーキー添加用標準液を調製した。

7) 菓子類添加用標準液

1)で調製した亜硝酸ナトリウム標準原液 25 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 500 µg を含有する菓子類添加用標準液を調製した。

8) 粉ミルク添加用標準液

1)で調製した亜硝酸ナトリウム標準原液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 200 µg を含有する粉ミルク添加用標準液を調製した。

2)を1本及び3)~8)を各2本、濃度は非通知で2.2.1の試験用試料と併せて各試験室に配付した。

2.2.3 分析試料

非明示の2点反復で、2.2.1の試験用試料を用いた。分析試料としては、亜硝酸ナトリウムとしてドライ製品（猫用）に160 mg/kg相当量（試験用試料5gに対してドライ製品添加用標準液0.5 mL添加）を、セミドライ製品（犬用）に80 mg/kg相当量（試験用試料5gに対してセミドライ製品添加用標準液0.5 mL添加）を、ウェット製品（猫用）に30 mg/kg相当量（試験用試料5gに対してウェット製品添加用標準液0.5 mL添加）を、成型ジャーキー（犬用）に120 mg/kg相当量（試験用試料5gに対して成型ジャーキー添加用標準液0.5 mL添加）を、菓子類（犬用ビスケット）に50 mg/kg相当量（試験用試料5gに対して菓子類添加用標準液0.5 mL添加）を、粉ミルク（犬用）に20 mg/kg相当量（試験用試料5gに対して粉ミルク添加用標準液0.5 mL添加）を、各試験室にて分析開始の直前に添加して調製した試料を用いた。

2.2.4 定量方法

2.1.4によった。

2.2.5 報告方法

2.2.3の分析試料12点の分析値は、分析試料中濃度（mg/kg）で表し、4桁目を四捨五入して有効桁数3桁まで報告させることとした。

2.2.6 分析実施期間

平成31年1月7日から平成31年2月1日まで

2.2.7 解析方法

結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{8), 9)}を参考に、Cochran 検定, single Grubbs 検定及び paired Grubbs 検定を行い、外れ値の有無を確認した上で平均回収率, 繰返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出し、得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式¹⁰⁾を用いて HorRat を求めた。

2.2.8 参加試験室

JA 東日本くみあい飼料株式会社品質保証部分析・開発センター, ジーエルサイエンス株式会社, 一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター, 一般財団法人日本食品検査首都圏事業所, 一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 同札幌センター, 同仙台センター, 同名古屋センター, 同神戸センター及び同福岡センター (計 11 試験室)

3 結果及び考察

3.1 分析法開発

3.1.1 検量線

2.1.2 の 6)により調製した亜硝酸ナトリウム標準液各 20 µL を LC に注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した。

得られた検量線の一例は Fig. 1 のとおりであり、亜硝酸ナトリウムとして 0.1~10 µg/mL (注入量として 0.002~0.2 µg 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、亜硝酸ナトリウムを 4~400 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の亜硝酸ナトリウムの濃度範囲に相当する。

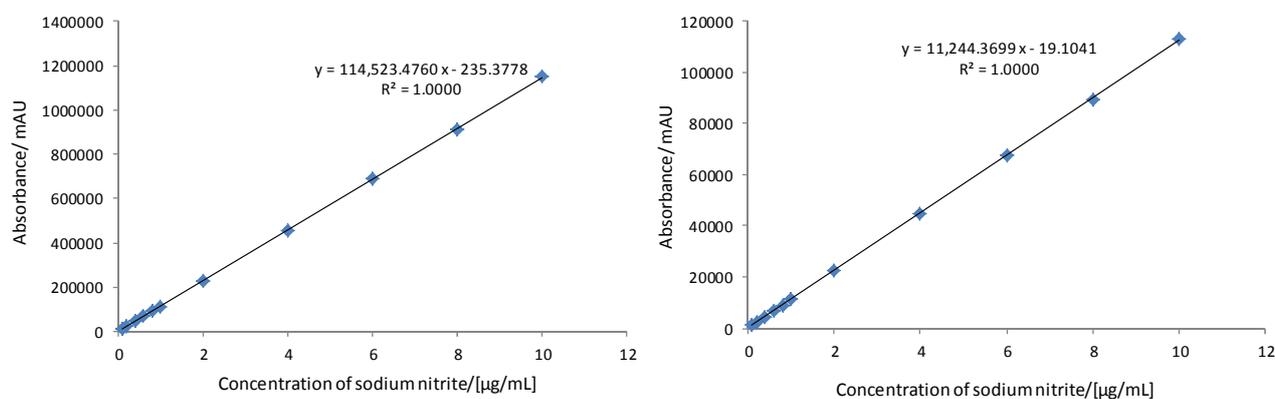


Fig. 1 Calibration curves of sodium nitrite by peak area (left) and peak height (right)

3.1.2 グラファイトカーボンミニカラムからの流出画分の確認

成型ジャーキー5.0 g を 2.1.4 の 1)により調製したカラム処理に供する試料溶液に、亜硝酸ナトリウムとして 100 mg/kg 相当量を添加 (最終試料溶液中で 2.5 µg/mL 相当量) し、グラファイトカーボンミニカラムからの流出画分を確認した。その結果は Table 3 のとおりであり、亜硝酸ナトリウムは流出液 2~8 mL の画分では 98.7 %以上の流出を認めた。このため、冷食協法と同様に初めの流出液 3 mL を捨て、その後の 2 mL を用いることとした。

Table 3 Elution pattern of sodium nitrite from graphitized carbon cartridge

Target	(%) ^{a)}			
	0~2 mL	2~4 mL	4~6 mL	6~8 mL
Sodium nitrite	26.0	98.7	99.8	99.9

$n = 1$

a) Quantitated concentration in sample solution after column treatment /
Concentration in sample solution before column treatment $\times 100$

3.1.3 妨害物質の検討

Table 1 の愛玩動物用飼料各 1 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC に注入し、得られたクロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においても亜硝酸ナトリウムの定量を妨げるピークは認められなかった。なお、得られたクロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

また、Fig. 2 の B~F では、保持時間の約 25~35 分頃に大きなピークが出現し、その後、吸光度がマイナスの値を示す挙動が確認された。このことについて、2.1.5 で調製した各溶液を LC に注入し、試料及び試薬類の有無によるクロマトグラムの違いについて確認した。その結果、Fig. 3 のとおり、ブランク溶液及び硫酸亜鉛/リン酸緩衝液の硫酸亜鉛を含む溶液でのみ同様の挙動が確認されたことから、この挙動を示す原因は試料溶液中に含まれる硫酸亜鉛に由来するものと示唆された。このため、本条件で試料溶液を測定する場合は、1 本あたりの測定時間を長くとり、この挙動が収まりクロマトグラムのベースラインが安定することを確認する必要があると考えられた。

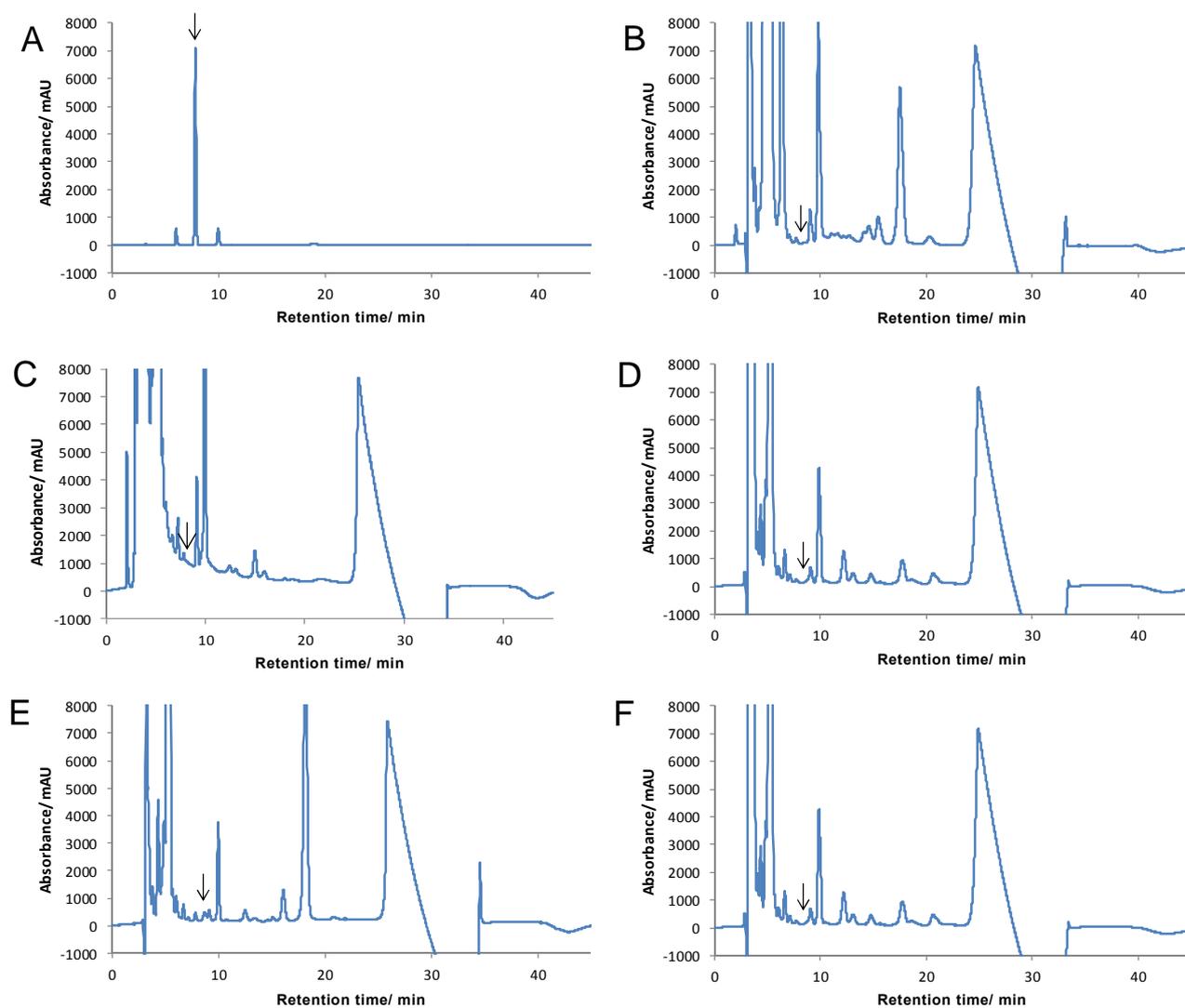


Fig. 2 Chromatograms of standard solution and blank sample solutions (LC operating conditions are shown in Table 2. Arrows indicate the retention time of sodium nitrite.)

A: Standard solution (0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 12 μg as sodium nitrite)

B: Dry type for cats

C: Wet type for cats

D: Formed jerky for dogs

E: Confectionery (biscuit) for dogs

F: Milk powder for dogs

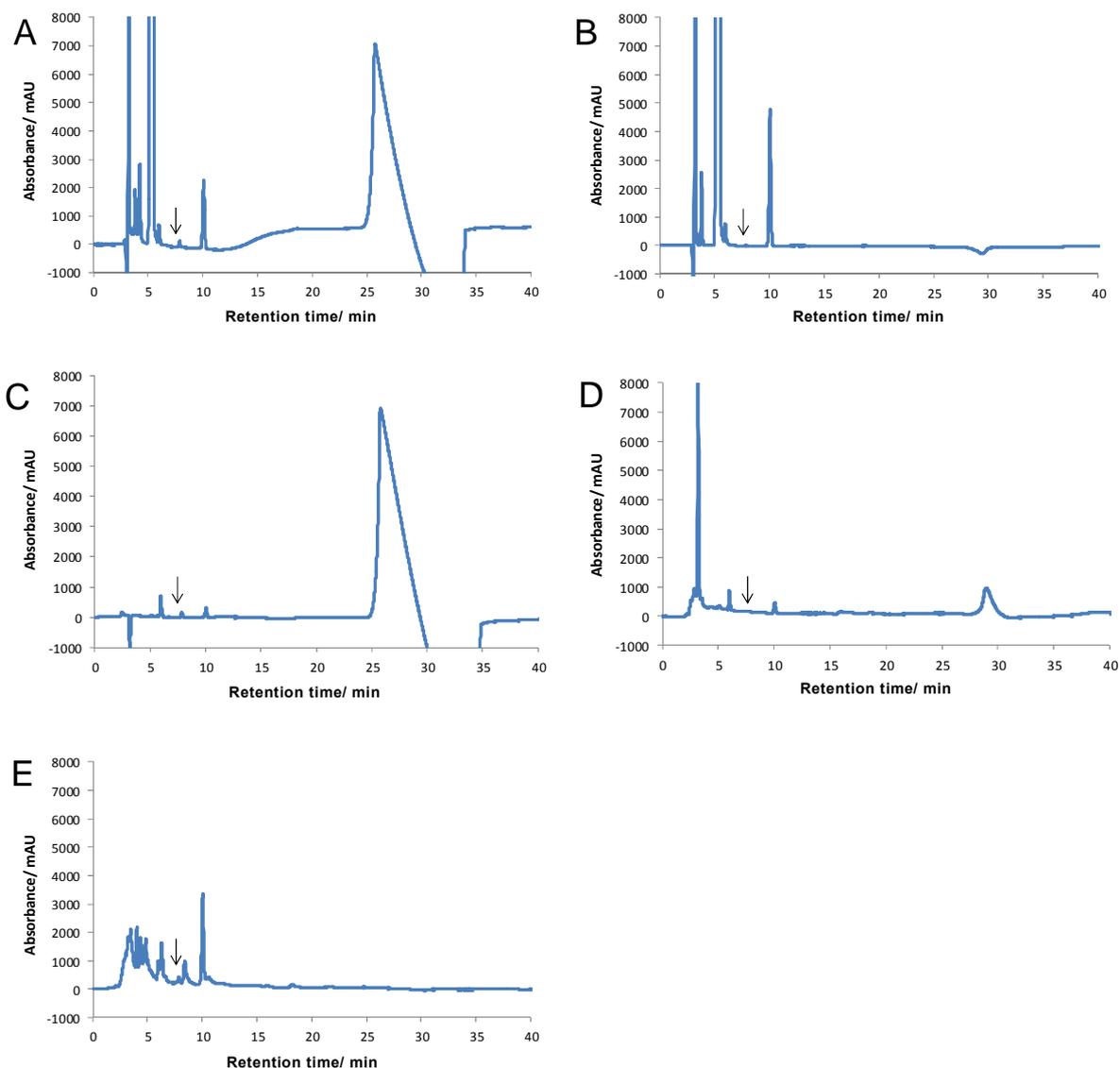


Fig. 3 Chromatograms of blank solution, reagent solutions and sample solution (LC operating conditions are shown in Table 2. Arrows indicate the retention time of sodium nitrite.)

A : Blank solution

B : Ammonium acetate / Phosphoric acid buffer

C : Zinc sulfate / Phosphoric acid buffer

D : Sodium hydroxide / Phosphoric acid buffer

E : Dry type for cats / Phosphoric acid buffer

3.1.4 添加回収試験

2.1.6 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 4 のとおり，平均回収率は 92.4~108 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 7.0 % 以下の成績が得られ，愛玩動物用飼料等の検査法第 11 章試験法の妥当性確認法（以下「試験法の妥当性確認法」という。）に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。

なお，得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 4 Recoveries for sodium nitrite in pet foods

Samples	Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Dry type for cats	20	93.0	7.0
	100	101	1.6
Semi-dry type for dogs	20	108	1.2
	200	100	0.7
Wet food for cats	5	108	2.7
	30	92.4	1.3
	100	94.7	1.3
Formed jerky for dogs	20	107	1.4
	100	103	1.6
Dried jerky for dogs (hard type)	20	102	1.7
	100	97.3	0.7
Dried jerky for cats (soft type)	20	102	1.1
	200	93.2	0.8
Confectionery (biscuit) for dogs	20	105	0.2
	100	101	0.7
	200	102	0.4
Milk powder for dogs	20	108	1.4
	100	103	2.8
	200	101	0.7

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

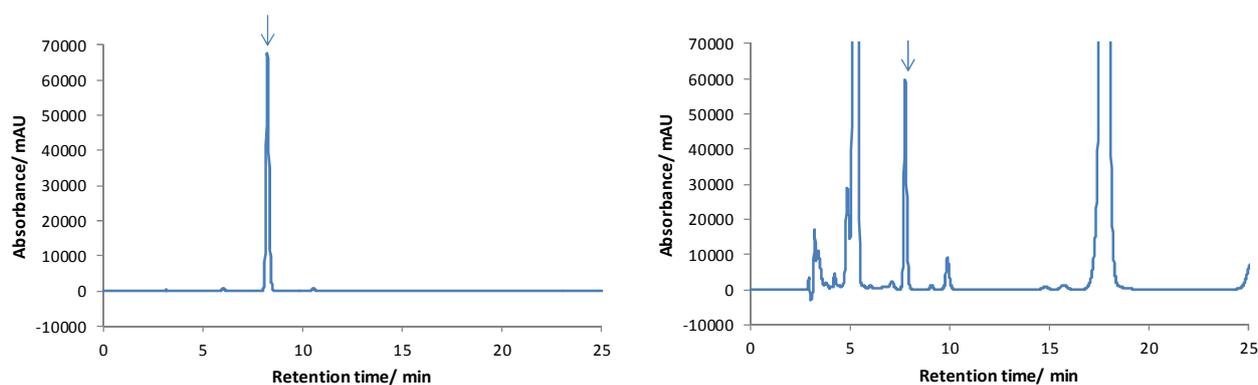


Fig. 4 Chromatograms of sodium nitrite

(Arrows indicate the peaks of sodium nitrite peak.)

Left: Standard solution (6 µg/mL: 0.12 ng as sodium nitrite.)

Right: Sample solution of dried jerky for cats (soft type) (spiked at 200 mg/kg of sodium nitrite (0.1 ng as sodium nitrite))

3.1.5 定量限界（下限）及び検出限界の検討

亜硝酸ナトリウムの検量線が直線性を示した範囲，0.1~10 µg/mL の下端付近となる濃度（ウ

エット製品以外は 20 mg/kg 相当量（最終試料液中濃度 0.5 µg/mL 相当量），ウエット製品は 5 mg/kg 相当量（最終試料液中濃度 0.125 µg/mL 相当量）の添加回収試験の結果，得られたピークの *SN* 比が 10 以上であったため，これらを亜硝酸ナトリウムの定量限界（下限）の濃度とした．なお，定量限界（下限）濃度における添加回収試験結果は Table 4 のとおり良好であった．この濃度は，愛玩動物用飼料中の基準値（100 mg/kg）に対して，1/5（ウエット製品は水分含有量 10% に換算した場合）であり，試験法の妥当性確認法に定められた目標を満たしていた．

本法の検出限界を確認するため，添加回収試験により得られたピークの *SN* 比が 3 となる濃度を求めた．その結果，検出限界は，ウエット製品以外は 6 mg/kg，ウエット製品は 2 mg/kg であった．この濃度は，同様に試験法の妥当性確認法に定められた目標を満たしていた．

3.2 共同試験

開発した分析法の室間再現精度を確認するため，2.2 により共同試験を実施した．

結果は Table 5 のとおりであり，ドライ製品（猫用），セミドライ製品（犬用），ウエット製品（猫用），成型ジャーキー（犬用），菓子類（犬用ビスケット）及び粉ミルク（犬用）について，平均回収率は 95.2, 102, 97.1, 100, 101 及び 99.5 %， RSD_f は 1.4, 2.2, 4.4, 1.5, 1.8 及び 4.6 %， RSD_R は 5.3, 7.6, 7.2, 2.6, 5.3 及び 7.1 %，*HorRat* は 0.70, 0.93, 0.76, 0.34, 0.60 及び 0.70 であり，試験法の妥当性確認法に定められた室間再現精度の目標値を満たす良好な結果が得られた．

参考のため，各試験室で使用した LC の機種を Table 6 に示した．また，LC カラムは全ての試験室で Asahipak NH2P-50 4E（内径 4.6 mm，長さ 250 mm，粒径 5 µm，昭和電工製）を使用した．

Table 5 Collaborative study for sodium nitrite

Lab. No.	Dry type for cats		Semi-dry type for dogs		Wet food for cats		Formed jerky for dogs		Dried jerky for dogs (hard type)		MilK powder for dogs	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	137	135	84.8	82.5	25.9	25.2	121	121	46.0	45.6	13.4 ^{c)}	14.0 ^{c)}
2	140	144	90.8	89.5	28.2	29.9	126	124	50.4	48.6	19.5	19.2
3	143 ^{a)}	162 ^{a)}	78.7	77.5	28.9	32.5	119	120	54.2	54.9	21.3	21.3
4	159	156	68.3	68.1	28.4	25.6	118	118	48.1	49.6	16.7	18.1
5	154	153	85.7	80.3	30.2	32.4	120	116	49.0	48.7	18.6	19.8
6	162	157	74.6	77.9	27.4	26.7	116	119	50.6	48.6	19.4	21.7
7	155	151	87.6	84.5	29.1	27.5	118	120	70.7 ^{b)}	69.9 ^{b)}	28.4 ^{c)}	28.7 ^{c)}
8	157	159	83.8	80.8	31.5	30.7	125	125	53.2	55.3	20.9	21.3
9	150	147	87.4	89.6	29.3	29.9	115	120	50.3	50.8	19.4	19.4
10	159	160	82.3	83.4	31.0	29.7	124	120	50.6	51.5	19.5	19.8
11	156	154	79.8	79.4	30.7	29.9	118	118	50.4	50.0	19.9	22.4
Spiked level (mg/kg)	160		80		30		120		50		20	
No. labs ^{d)}	10		11		11		11		10		9	
No. outliers ^{e)}	1		0		0		0		1		2	
Mean value (mg/kg)	152		81.7		29.1		120		50.3		19.9	
Mean recovery (%)	95.2		102		97.1		100		101		99.5	
RSD _r ^{f)} (%)	1.4		2.2		4.4		1.5		1.8		4.6	
RSD _R ^{g)} (%)	5.3		7.6		7.2		2.6		5.3		7.1	
PRSD _R ^{h)} (%)	7.5		8.2		9.6		7.8		8.8		10	
HorRat	0.70		0.93		0.76		0.34		0.60		0.70	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Data excluded by paired Grubbs test

d) Number of laboratories retained after eliminating outliers

e) Number of outlier laboratories removed in parentheses

f) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

g) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

h) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 6 Instruments used in the collaborative study

Lab.No	LC
1	Prominence, Shimadzu
2	LC-2000Plus series, JASCO
3	Prominence, Shimadzu
4	Waters2487, Waters
5	Prominence, Shimadzu
6	Prominence, Shimadzu
7	Prominence, Shimadzu
8	1260Infinity, Agilent Technologies
9	Prominence, Shimadzu
10	Alliance 2695, Waters
11	Alliance 2695, Waters

4 まとめ

愛玩動物用飼料に含まれる亜硝酸ナトリウムについて、冷食協法を基に、還元物質を添加された愛玩動物用飼料及び粉ミルクにも適用可能な LC を用いた定量法を開発するとともに、共同試験を実施し、愛玩動物用飼料等の検査法への適用の可否について検討したところ、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 検量線は、0.1~10 µg/mL（注入量として 0.002~0.2 µg 相当量）の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線の濃度範囲は、亜硝酸ナトリウムを 4~400 mg/kg を含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の濃度範囲に相当する。
- 2) 今回用いた試料について、本法に従って得られたクロマトグラムにおいて、定量を妨げる妨害ピークは認められなかった。
- 3) 亜硝酸ナトリウムとしてドライ製品（猫用）、成型ジャーキー（犬用）及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）に 20 及び 100 mg/kg 相当量、セミドライ製品（犬用）及び素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（猫用）に 20 及び 200 mg/kg 相当量、菓子類（犬用ビスケット）及び粉ミルク（犬用）に 20, 100 及び 200 mg/kg 相当量、ウェット製品（猫用）に 5, 30 及び 100 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ試験法の妥当性確認法に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 4) 本法の亜硝酸ナトリウムの定量限界（下限）は、20 mg/kg（ウェット製品は 5 mg/kg）であった。検出限界は 6 mg/kg（ウェット製品は 2 mg/kg）であった。設定した定量限界（下限）及び検出限界は、試験法の妥当性確認法に定められた目標を満たしていた。
- 5) 亜硝酸ナトリウムとしてドライ製品（猫用）に 160 mg/kg 相当量を、セミドライ製品（犬用）に 80 mg/kg 相当量を、ウェット製品（猫用）に 30 mg/kg 相当量を、成型ジャーキー（犬用）に 120 mg/kg 相当量を、菓子類（犬用ビスケット）に 50 mg/kg 相当量を、粉ミルク（犬用）に 20 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 11 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、試験法の妥当性確認法に定められた室間再現精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。

謝 辞

共同試験に参加していただいた JA 東日本くみあい飼料株式会社品質保証部分析・開発センター、ジーエルサイエンス株式会社、一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター、一般財団法人日本食品検査首都圏事業所、一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 厚生省令：食品衛生法施行規則，昭和 23 年 7 月 13 日，厚生省令第 23 号 (1948)。
- 2) 厚生省告示：食品、添加物等の規格基準，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959)。
- 3) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009)。
- 4) 甲斐 茂浩：愛がん動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムの分光光度計による定量法の共同試験，飼料研究報告, 36, 120-125 (2011)。

- 5) 杉村 靖, 森口 里美, 浪越 充司, 山西 正将, 若宮 洋市, 永原 貴子: 愛玩動物用飼料等の検査法収載法のスナック製品等への適用のための妥当性確認～カドミウム, 水銀, 鉛, ヒ素, エトキシキン, ジブチルヒドロキシトルエン, ブチルヒドロキシアニソール及び亜硝酸ナトリウムについて～, 飼料研究報告, **40**, 123-140 (2015).
- 6) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知: 「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について, 平成 21 年 9 月 1 日, 21 消技第 1764 号 (2009).
- 7) 一般財団法人日本冷凍食品検査協会: 平成 27 年度愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業 (2015).
- 8) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331-343 (1995).
- 9) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 10) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).

2 飼料中のサルモネラ 7 血清型のマルチプレックス PCR 法による迅速同定法の開発及び共同試験

関口 好浩^{*1}, 近藤 勝^{*1}, 笠原 正輝^{*1},
嶋村 知紗^{*2}, 浅尾 美由起^{*3}, 山多 利秋^{*4}

Development and Collaborative Study of Rapid Identification Method of Seven Serovars *Salmonella* in Feed Using Multiplex PCR

Yoshihiro SEKIGUCHI^{*1}, Masaru KONDO^{*1}, Masaki KASAHARA^{*1},
Chisa SHIMAMURA^{*2}, Miyuki ASAO^{*3} and Toshiaki YAMATA^{*4}

(^{*1} Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)
(Now Kobe Regional Center, FAMIC),

^{*2} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC,

^{*3} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Audit Office, FAMIC),

^{*4} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Food Safety and Consumer Affairs Bureau,
Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)

We have developed a rapid identification method of seven serovars of *Salmonella* (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis (*S. Choleraesuis*), *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, and *S. Typhimurium*) in feeds using multiplex PCR, and conducted a collaborative study.

In the multiplex PCR method, a sample was incubated in buffered peptone water at 35~37 °C for 18~24 hours. Then, DNA extraction from the supernatant with InstaGene matrix (Bio-Rad Laboratories; California, USA) and Ethachinmate (Nippon Gene; Tokyo, Japan) was performed. The PCR was conducted in a reaction solution which contained the extracted DNA, seven multiplex primer sets for detecting target-serovar (Hokkaido System Science; Sapporo, Japan) and KOD-FX (Toyobo; Osaka, Japan). The amplicon was subsequently separated by the electrophoresis through 2.5 w/v% agarose gel, and stained with ethidium bromide. After the electrophoresis, the test result was examined according to the presence of the amplicons with the identical size of the positive target serovar DNA fragment.

The seven multiplex primer sets were able to determine whether 128 *Salmonella* strains with 50 serovars (including 102 strains isolated from feeds) were the relevant serovars. Minimum concentrations of *Salmonella* in buffered peptone water with which we could successfully identify *Salmonella* serovars using multiplex PCR method ranged 10³~10⁶ CFU/mL for almost all of eight sample feed ingredients and seven feed samples.

A collaborative study was conducted in six laboratories, which used five sample feed ingredients and three feed samples inoculated with *Salmonella*. All laboratories correctly detected the seven serovars of *Salmonella* inoculated in samples.

Furthermore, a comparison between multiplex PCR method and reference method (culture

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 神戸センター

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 業務監査室

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*4} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 農林水産省消費・安全局

method) was performed for 272 commercial feed samples. Excluding two samples which inhibited PCR, 270 samples were correctly identified as negative to seven serovars. While rapid *Salmonella* detection with *invA* gene was also studied, it was found further investigations were necessary because of high false positive ratio of 4.9 % to 14.3 %.

However, the multiplex PCR method mentioned above was thus validated and established as adequate for use in inspections of *Salmonella* in feed.

Key words: feeds; *Salmonella* Choleraesuis; *Salmonella* Dublin; *Salmonella* Enteritidis; *Salmonella* Gallinarum; *Salmonella* Hadar; *Salmonella* Infantis; *Salmonella* Typhimurium; multiplex PCR; rapid identification; collaborative study

キーワード: 飼料; *Salmonella* Choleraesuis; *Salmonella* Dublin; *Salmonella* Enteritidis; *Salmonella* Gallinarum; *Salmonella* Hadar; *Salmonella* Infantis; *Salmonella* Typhimurium; マルチプレックス PCR; 迅速同定法; 共同試験

1 緒 言

飼料のサルモネラ汚染は、家畜・家きんのサルモネラ感染源となり、また、畜産食品が汚染されることにより人の食中毒の原因ともなり得ることから、家畜衛生だけでなく公衆衛生の面からも重要な問題である¹⁾。

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という。）は、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律³⁾に基づき、飼料中のサルモネラのモニタリング検査を1976年から実施しており、その試験法としては飼料分析基準⁴⁾第18章1の1.1の培養法（以下「培養法」という。）を用いている。

家畜伝染病予防法²⁾では、サルモネラのうち、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum (biovar Pullorum 及び biovar Gallinarum を含む)（以下「*S. Gallinarum*」と略記する。他の血清型も以下同様に略記する。）が家畜伝染病の病原体、*S. Choleraesuis*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis* 及び *S. Typhimurium* が届出伝染病の病原体として指定されている。これらが飼料から検出された場合には、家畜の伝染性疾病の発生予防及びまん延防止のための迅速な対応が必要となるが、培養法では、結果が判明するまでに4~6日間を要し、陽性の場合、分離菌の血清型別までは10日間程度を要することから、より短期間でサルモネラの血清型を同定する方法が求められている。

サルモネラの血清型を迅速に同定する方法としては、マルチプレックス PCR を使った方法が報告されている^{5), 6)}。秋庭ら⁷⁾は、食の安全と動物の健康に脅威を及ぼすことが知られている主要な血清型として、上記5血清型に *S. Hadar* 及び *S. Infantis* を加えた7血清型のサルモネラ（以下「主要血清型」という。）を迅速に同定できるプライマーを開発した。

そこで、本研究では、飼料中の主要血清型を迅速に同定する方法として、秋庭らの開発したプライマーを用いたマルチプレックス PCR 法による迅速同定法及び飼料中のサルモネラの有無を迅速に判定する方法として、*invA* 検出用プライマーを用いたサルモネラの迅速検出法を開発するとともに、共通試料による共同試験を実施し、飼料分析基準への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 分析法開発

2.1.1 試験菌株

Table 1 のとおり，FAMIC で実施している飼料のモニタリングにおいて飼料から分離された菌株並びに北里大学，農林水産省動物医薬品検査所及び独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所（現：国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門）から分与された菌株の計 128 株（50 血清型）を検討に用いた．試験菌株は，試験開始まで 10 % スキムミルク中で -80°C で凍結保存した．

Table 1 Serovars of *Salmonella* used in this study

Serovar	Number of strains used in this study	Number of strains isolated from feed	Serovar	Number of strains used in this study	Number of strains isolated from feed
Agona	8	8	Livingstone	8	8
Albert	1	1	London	1	0
Amsterdam	1	1	Mbandaka	1	1
Anatum	2	2	Meleagridis	1	0
Bareilly	9	9	Menston	1	1
Blockley	1	0	Minnesota	1	1
Cerro	7	7	Montevideo	2	2
Choleraesuis	1	0	Muenster	1	1
Cubana	1	0	Newport	2	2
Derby	1	1	Ohio	2	2
Dublin	1	0	Orion	1	1
Enteritidis	1	0	Oslo	1	0
Fyris	2	2	Putten	1	1
Gallinarum	1	0	Rissen	1	1
Gaminara	2	2	Senftenberg	13	13
Give	1	0	Singapore	1	0
Hadar	1	0	Sofia	1	0
Havana	9	9	Tennessee	6	6
Heidelberg	1	0	Thompson	1	0
Infantis	4	4	Typhimurium	11	6
Isangi	3	3	Weltevreden	4	4
Krefeld	1	0	Wippra	1	0
Lexington	1	0	Worthington	1	0
Lille	1	0	O18:z4,z23:-	1	1
Liverpool	1	0	O3,10:g,m,s	2	2
			Total	128	102

2.1.2 試料

検討に用いた試料は，全て試験開始まで冷蔵庫中 4°C で保管した．

1) 抽出方法及び菌濃度検討用試料

飼料等製造工場において採取した飼料原料 8 種類 11 点及び配混合飼料 7 種類 8 点の計 19 点を試料として用いた。これらは、あらかじめ培養法に従いサルモネラが陰性であることを確認した。

2) 陽性試料

平成 10 年度から平成 25 年度までに FAMIC が採取した試料のうち、培養法により陽性とされた試料 44 点（配混合飼料 14 点、動物性飼料原料 26 点、植物性飼料原料 4 点）を用いた。

3) モニタリング用試料

平成 26 年 4 月から 12 月までに FAMIC が採取した試料 272 点（配混合飼料 111 点、動物性飼料原料 122 点及び植物性飼料原料 39 点）を用いた。

2.1.3 試薬

- 1) 水酸化ナトリウム、塩酸及び塩化ナトリウムは試薬特級を用いた。水は、RFD230RA (ADVANTEC 製) により精製した蒸留水 (JIS K0211 の 5213 に定義された蒸留水)、Direct-Q 3 UV (Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) 及び超純水を高圧蒸気滅菌 (121 °C, 15 分間以上) で処理した滅菌超純水を用いた。
- 2) ブレインハートインフュージョン寒天培地 Brain Heart Infusion Agar (Difco 製) 52 g に水を加えて 1000 mL とし、沸騰水浴中で加熱して溶かした。これをペトリ皿に一樣に広がるように 20 mL 分注し、水平に静置させて凝固させた後、倒置してふたをわずかにずらし、35~37 °C で 1 時間静置して培地表面を乾燥させた。
- 3) ハートインフュージョン寒天培地 Heart Infusion Agar (Difco 製) 40 g を水 1000 mL に加え、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌し、これをペトリ皿に一樣に広がるように 20 mL 分注した。水平に静置して凝固させた後、培地表面を乾燥させた。
- 4) トリプトソイブイオン培地 トリプトソイブイオン培地 (栄研化学製) 30 g を水 1000 mL に溶かし、中試験管に 10 mL ずつ分注した後、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。
- 5) 25 mmol/L 水酸化ナトリウム溶液 水酸化ナトリウム 0.1 g に超純水 100 mL を加えて溶かし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。
- 6) 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (生化学用) 12.1 g に超純水 60 mL を加え、更に塩酸 4.2 mL を加えて溶かし、塩酸で pH を 7.9~8.1 に調整した後、更に超純水を加えて 100 mL とし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。
- 7) 生理食塩液 塩化ナトリウムを 0.9 w/v% となるように超純水を加えて溶かし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。
- 8) Ethachinmate ニッポンジーン製
- 9) MonoFas バクテリアゲノム DNA 抽出キット VII ジーエルサイエンス製
- 10) QIAamp DNA stool QIAGEN 製
- 11) DNeasy Blood & Tissue QIAGEN 製
- 12) MagExtractor 東洋紡製
- 13) InstaGene Matrix Bio-Rad Laboratories 製
- 14) TE 緩衝液 TE pH 8.0 ニッポンジーン製
- 15) プライマー 血清型毎に 4 つの特異的な遺伝子配列を増幅させる *S. Choleraesuis* 検出用プライマーセット, *S. Dublin* 検出用プライマーセット, *S. Enteritidis* 検出用プライマーセット,

S. Gallinarum 検出用プライマーセット, *S. Hadar* 検出用プライマーセット, *S. Infantis* 検出用プライマーセット, *S. Typhimurium* 検出用プライマーセット⁷⁾ (全て北海道システム・サイエンス製) を用いた。

16) 10 $\mu\text{mol/L}$ プライマー混合溶液 プライマーを TE 緩衝液で 100 $\mu\text{mol/L}$ に溶解した後, 血清型毎に必要なプライマーと滅菌超純水とを混合し 10 $\mu\text{mol/L}$ プライマー混合溶液とした。

17) PCR 緩衝液 2 \times PCR Buffer for KOD FX 東洋紡製

18) 2 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液 2 mmol/L dNTPs 東洋紡製

19) DNA ポリメラーゼ液 KOD FX (1.0 unit/ μL) 東洋紡製

20) 陽性対照 陽性対照調製のための標準菌株として, 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所から分与された *S. Choleraesuis*, *S. Dublin*, *S. Gallinarum*, *S. Hadar* 及び *S. Typhimurium*, 北里大学から分与された *S. Enteritidis*, FAMIC が飼料から分離した *S. Infantis* をそれぞれ用いた。

これら標準菌株をそれぞれブレインハートインフュージョン寒天培地で培養した後, 得られた集落を 1 個釣菌し, 25 mmol/L 水酸化ナトリウム溶液 50 μL 中に懸濁させた。懸濁させた菌液をアルミブロック恒温槽で 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 分間加熱した後放冷した。1 mol/L トリス塩酸緩衝液 4 μL を混合して中和した後, 10000 $\times g$ で 5 分間遠心分離した上澄み液に滅菌超純水を加え, 1 mL 中に DNA として 10 μg 以上を含有する各血清型の陽性対照を調製した。

21) PCR 反応液 滅菌超純水 1 μL , PCR 緩衝液 25 μL , 2 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液 10 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ プライマー混合溶液 12 μL 及び DNA ポリメラーゼ液 1 μL を PCR チューブ 1 本あたりの必要量とした。これらの試薬について, 必要本数分の量をそれぞれプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に加えて調製した。

22) PCR 反応液 (阻害確認用) 21)において滅菌超純水 1 μL を陽性対照 1 μL に代えて調製したものを用いた。

23) TAE 緩衝液 50 \times TAE (ニッポンジーン製) 20 mL を水で希釈して 1000 mL とした。

24) 2.5 %アガロースゲル Agarose L03「TaKaRa」(タカラバイオ製) 2.5 g を TAE 緩衝液 100 mL に加え, 沸騰水浴中で加熱して溶かし, ゲルの厚さが 3~4 mm になるようゲル形成型に流し込み, ゲルとコームの間には気泡が入らないよう慎重にコームを差し込み, 室温で静置して固化させた。

25) 電気泳動用色素溶液 6 \times Loading dye タカラバイオ製

26) DNA 分子量マーカー 100 bp DNA Ladder タカラバイオ製

27) ゲル染色液 臭化エチジウム 10 mg を水 1 mL に溶かして臭化エチジウム原液を調製し, 使用時にこの原液 50 μL に TAE 緩衝液 1000 mL を加えて染色液とした。

2.1.4 装置及び器具

1) アルミブロック恒温槽: Dry Thermo Unit DTU-2C タイテック製

2) DNA 増幅装置: PE9700 型 Applied Biosystems 製

3) 電気泳動装置: Mupid2 又は Mupid-exU アドバンス製

4) 電気泳動パターン撮影システム: AE-6911CX 又は AE-6932GXES-U アトー製

2.1.5 試験方法

1) 前増菌培養

培養法の前増菌培養の方法によった。

2) DNA 抽出

1)で得られた前増菌培養液の上澄み液 200 μL をマイクロチューブ（容量 1.5 mL）に入れ、13000 $\times g$ で 1 分間遠心分離した後、上澄み液を除去した。更に、1 mL の生理食塩液を添加し攪拌により懸濁後、13000 $\times g$ で 1 分間遠心分離し、上澄み液を除去した。

上澄み液を取り除いたマイクロチューブに InstaGene Matrix 200 μL を先のマイクロチューブに添加し、懸濁させた後、水浴中で 56 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間加温を行った。10 秒間攪拌した後、アルミブロック恒温槽で 100 $^{\circ}\text{C}$ 、8 分間加熱・溶菌した。10 秒間攪拌した後、13000 $\times g$ で 3 分間遠心分離し、上澄み液 100 μL を新しいマイクロチューブ（容量 1.5 mL）に移した。

分取した上澄み液に 3 mol/L 酢酸ナトリウム 3.3 μL を加えて混合した後、Ethachinmate 1 μL を加えて 10 秒間攪拌した。エタノール 250 μL を加え、10 秒間攪拌した後、12000 $\times g$ で 5 分間遠心分離した。上澄み液を除去し、70 v/v%エタノール 1 mL を加えて DNA ペレットを洗浄し、12000 $\times g$ で 5 分間遠心分離した。上澄み液を除去し、減圧乾燥した後、超純水 20 μL を加えて溶かしたものを DNA 試料液として用いた。

3) 試料溶液等の調製

各血清型につき、PCR 反応液 49 μL を PCR チューブ（容量 200 μL ）に入れ、DNA 試料液 1.0 μL を加えて振り混ぜ、PCR 反応に供する試料溶液とした。また、PCR 反応液（阻害確認用）49 μL を別の PCR チューブに入れ、DNA 試料液 1.0 μL を加えて同様に操作し、阻害確認用試料溶液を調製した。同時に、陽性対照 1.0 μL 及び滅菌した超純水 1.0 μL をあらかじめ PCR 反応液 49 μL を入れたそれぞれ別の PCR チューブに加えて同様に操作し、陽性対照液及び陰性対照液を調製した。なお、本研究において、阻害確認用試料溶液は実試料によるモニタリングでのみ調製した。

4) PCR 反応

各試料溶液、阻害確認用試料溶液、陽性対照液及び陰性対照液の入った PCR チューブを DNA 増幅装置に入れ、PCR 反応を行った。反応条件を Table 2 に示した。

Table 2 Reaction conditions of PCR

Thermal cycler	GeneAmp System 9700
Cycle conditions	94 $^{\circ}\text{C}$ (hold for 2 min) \rightarrow [98 $^{\circ}\text{C}$ (hold for 10 s) \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$ (hold for 30 s) \rightarrow 68 $^{\circ}\text{C}$ (hold for 30 s)] \times 35 cycles
Mode	9600 Emulation

5) 電気泳動

TAE 緩衝液又は TBE 緩衝液を入れた電気泳動装置にアガロースゲルを入れ、100 V の定電圧で 10 分間予備泳動を行った。PCR 反応の終了した試料溶液、阻害確認用試料溶液、陽性対照液及び陰性対照液及び DNA 分子量マーカー各 5 μL に電気泳動用色素溶液 1 μL をそれぞれ加えて混合し、各液の全量を先のアガロースゲルのそれぞれ別のウェルに注入し、100 V の定電圧でブロモフェノールブルーがウェルから 4~5 cm 移動するまで電気泳動を行った。電気泳

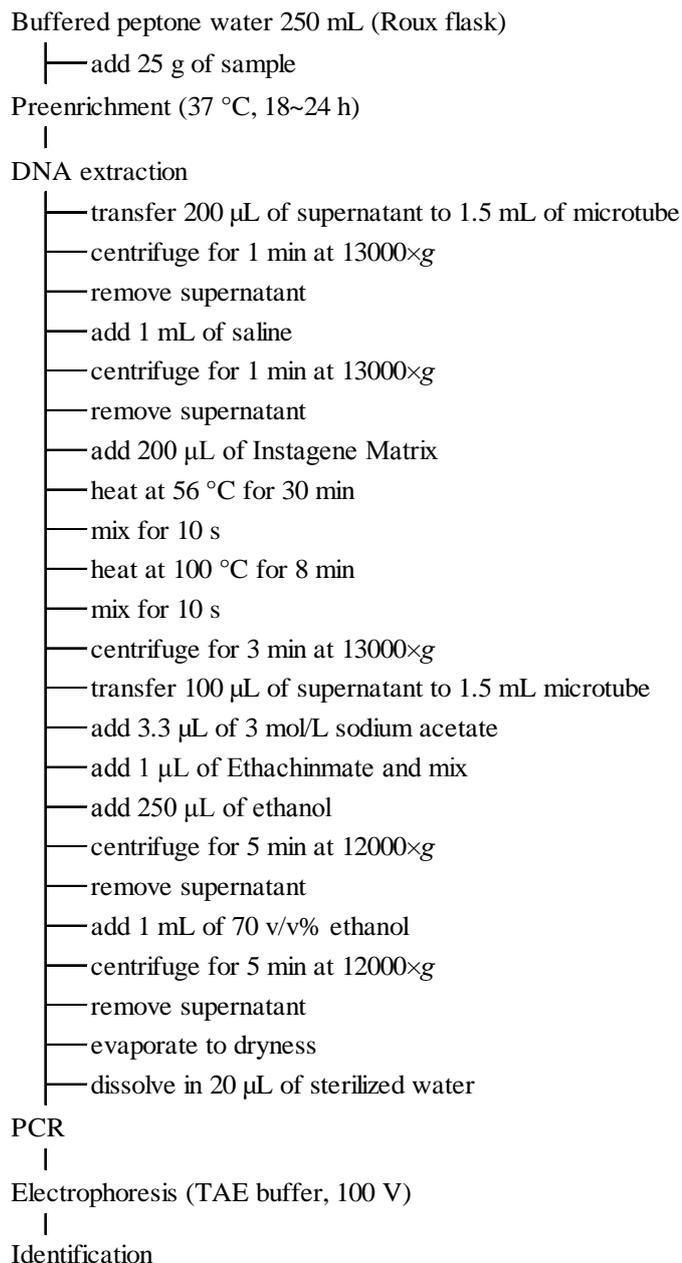
動の終了したアガロースゲルをゲル染色液に入れ、約 30 分間浸した後、電気泳動パターン撮影システムで 365 nm 又は 312 nm の紫外線を照射し、PCR 増幅産物の有無を確認した。

6) 判定

陽性対照液において各血清型に対応する 4 つの検出サイズの PCR 増幅産物がすべて検出され、陰性対照液において PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において各血清型検出用プライマーセットに対応する 4 つの検出サイズの PCR 増幅産物がすべて検出された場合に、当該血清型検出用プライマーに対応するサルモネラが陽性と判定した。ただし、阻害確認用試料溶液で PCR 増幅産物が検出されない場合は、PCR 反応を阻害する成分が含まれている疑いがあることから、当該試料溶液についての判定は行わなかった。

陽性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合及び陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合には、PCR 反応が正常に行われていない可能性があるため、PCR 反応以降の再試験を行った。

なお、本法の概要を Scheme 1 に示した。また、各血清型検出用プライマーセットによる増幅産物のサイズは Table 3 のとおりであり、各血清型検出用プライマーセットには、ほとんど全てのサルモネラが持っている侵入性関連遺伝子 *invA* を検出するプライマーが含まれている。



Scheme 1 Analytical procedure for *Salmonella* in feeds

Table 3 Amplicon size of each serovar detecting primer set^{a)}

<i>Salmonella</i> serovar	Amplicon size/base pairs
Choleraesuis	100, 198, 305, 605
Dublin	105, 203, 296, 605
Enteritidis	101, 203, 299, 605
Gallinarum	97, 206, 301, 605
Hadar	105, 199, 303, 605
Infantis	95, 198, 304, 605
Typhimurium	94, 196, 303, 605

a) All multiplex primer sets include common primer pair to detect *invA* gene (amplicon size: 605 base pairs).

2.1.6 各血清型検出用プライマーセットのサルモネラに対する感度及び特異性

2.1.1 の試験菌株をブレインハートインフュージョン寒天培地上で 37 °C で 18~24 時間培養した後、得られた集落を 1 個釣菌し、25 mmol/L 水酸化ナトリウム溶液 50 µL に懸濁させた後、2.1.7 の 1) のアルカリ熱抽出法により DNA を抽出した後、2.1.5 の 3) から 6) により血清型の同定を行った。

2.1.7 DNA 抽出方法の検討

2.1.2 の 1) の試料のうち米ぬかを用い、2.1.5 の 1) により前増菌培養した *S. Choleraesuis* をトリプトソイブイオン培地で 37 °C で 20~24 時間培養し、前増菌培養の上澄み液を用いて段階希釈し 10^5 ~ 10^6 CFU/mL の菌液を調製した。得られた菌液を、2.1.5 の 2) 及び次の 1) から 7) の計 8 通りの方法で DNA を抽出した後、2.1.5 の 3) から 6) により血清型の同定を行った。

1) アルカリ熱抽出法

菌液 50 µL を 3000×g で 20 分間遠心分離し上澄み液を除去したものに 25 mmol/L 水酸化ナトリウム溶液 50 µL を加えて懸濁させた。懸濁させた菌液をアルミブロック恒温槽で 95 °C、5 分間加熱した後放冷した。1 mol/L トリス塩酸緩衝液 4 µL を混合して中和した後、10000×g で 5 分間遠心分離した上澄み液を DNA 試料液として用いた。10 倍希釈については、この上澄み液を滅菌超純水で 10 倍希釈した。

2) アルカリ熱抽出-Ethachinmate 抽出法

1) に従い調製した遠心分離後の上澄み液 20 µL を新しいマイクロチューブ（容量 1.5 mL）に移し、3 mol/L 酢酸ナトリウム 0.66 µL を加えて混合した後、Ethachinmate 1 µL を加えて 10 秒間攪拌した。エタノール 50 µL を加え、10 秒間攪拌した後、12000×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を除去した。上澄み液を除去したマイクロチューブに 70 v/v% エタノールを 1 mL 加えて DNA ペレットを洗浄し、12000×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を除去し、減圧乾燥した後、滅菌超純水 20 µL を加えて溶かしたものを DNA 試料液として用いた。

3) MonoFas バクテリアゲノム DNA 抽出キット VII 抽出法

マイクロチューブ（容量 1.5 mL）に菌液 200 µL を入れ、20000×g で 2 分間遠心分離し上澄み液を除去した後、キット添付の説明書に従い DNA 試料液を調製した。

4) QIAamp DNA stool 抽出法

マイクロチューブ（容量 2.0 mL）に菌液 200 µL を入れ、キット添付の説明書に従い DNA 試料液を調製した。

5) DNeasy Blood & Tissue 抽出法

マイクロチューブ（容量 1.5 mL）に菌液 200 µL を入れ、5000×g で 10 分間遠心分離し上澄み液を除去した後、キット添付の説明書に従い DNA 試料液を調製した。

6) MagExtractor 抽出法

マイクロチューブ（容量 1.5 mL）に菌液 200 µL を入れ、6000×g で 5 分間遠心分離し上澄み液を除去した後、キット添付の説明書に従い DNA 試料液を調製した。

7) InstaGene Matrix 抽出法

マイクロチューブ（容量 1.5 mL）に菌液 200 µL を入れ、13000×g で 1 分間遠心分離した後、上澄み液を除去し、生理食塩液 1 mL を添加し攪拌により懸濁後、13000×g で 1 分間遠心分離

し、上澄み液を除去した。

上澄み液を取り除いたマイクロチューブに InstaGene Matrix 200 μL を添加し、懸濁させた後、水浴中で 56 °C で 30 分間加温を行った。加温後、10 秒間攪拌した後、アルミブロック恒温槽で 100 °C で 8 分間加熱・溶菌し、10 秒間攪拌した後、13000 $\times\text{g}$ で 1 分間遠心分離し、上澄み液を DNA 試料液として用いた。

2.1.8 前増菌培養液中での検出可能な菌濃度の検討

2.1.2 の 1) の試料を 2.1.5 の 1) により前増菌培養した。各主要血清型をトリプトソイブイオン培地で 37 °C で 20~24 時間培養し、前増菌培養の上澄み液を用いて段階希釈し $10^2\sim 10^6$ CFU/mL の菌液を調製した。得られた菌液を用い、2.1.5 の 2) 又は 2.1.7 の 1) により DNA 抽出を行った後、2.1.5 の 3) から 6) により血清型の同定を行った。

2.1.9 *invA* を指標としたサルモネラ迅速検出法（以下「迅速検出法」という。）

S. Enteritidis 検出用プライマーセット及び *S. Typhimurium* 検出用プライマーセットのみを用いて、2.1.5 の 1) から 5) により試験を行った。

判定は、陽性対照液において *invA* 検出用プライマーに対応する PCR 増幅産物が検出され、陰性対照液において PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において *invA* 検出用プライマーに対応する PCR 増幅産物が検出された場合に、サルモネラ陽性と判定した。

陽性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合及び陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合には、PCR 反応が正常に行われていない可能性があるため、PCR 反応以降の再試験を行った。

2.1.10 2.1.7 及び 2.1.8 で用いた菌液の菌濃度の測定

2.1.7 の検討においては、トリプトソイブイオン培地で培養した菌液を、2.1.8 の検討においては前増菌培養の上澄み液を菌数の測定に用いる菌液とした。

菌液を生理食塩液で $10^1\sim 10^9$ 倍に段階希釈した後、滅菌ペトリ皿に $10^5\sim 10^9$ 倍の希釈菌液 1 mL を滴下し、ハートインフュージョン寒天培地 9 mL と混和し固めた。表面の水滴が消えるまで乾燥した後、さらにハートインフュージョン寒天培地 10 mL を分注し固めた。同様に培地表面を乾燥し、35~37 °C で 18~24 時間ペトリ皿を倒置して培養した。各希釈濃度あたり 3 枚調製した。

培養後、30~300 個の集落を形成したペトリ皿の平均集落数を求め、その希釈倍率から菌濃度を求めた。

2.2 共同試験

2.2.1 共同試験用試料

1) 菌液添加用試料

培養法によりサルモネラ陰性であることを確認した成鶏飼育用配合飼料及び魚粉を約 100 g ずつ小分けしたもの（試料名は非明示）各 1 袋を菌液添加用試料として各試験室に送付した。

2) DNA 抽出液

培養法によりサルモネラ陰性であることを確認したビールかす、肉用牛肥育用配合飼料、肉豚肥育用配合飼料、チキンミール、フェザーミール及び大豆油かすを 2.1.5 の 1) により前増菌培養した。標準菌株の *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin*, *S. Gallinarum* 及び *S. Hadar* 各 1 白金耳をトリプトソイブイオン培地 10 mL で 35~37 °C で 18~24 時間培養した後、75 °C

の水浴で 1 分間以上加熱することにより死滅させた。前増菌培養液の上澄み 4.5 mL に、死滅させた菌液又は生理食塩液 500 μ L を添加し混合した。肉用牛肥育用配合飼料には *S. Typhimurium*，肉豚肥育用配合飼料には *S. Choleraesuis*，チキンミールには *S. Dublin*，フェザーミールには *S. Gallinarum*，大豆油かすには *S. Hadar*，ビールかすには生理食塩液をそれぞれ添加し、2.1.5 の 2) に従い DNA 試料液を調製した。これらを約 20 μ L ずつ小分けしたもの（試料名は非明示）を DNA 抽出液として各試験室に送付した。

なお、各標準菌株のトリプトソイブイオン培地での培養後の菌濃度は、2.1.10 により測定した。

2.2.2 配付試薬

- 1) Ethachinmate
- 2) InstaGene Matrix
- 3) 10 μ mol/L プライマー混合溶液
2.1.3 の 16) と同様に調製した。
- 4) PCR 緩衝液
- 5) 2 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液
- 6) DNA ポリメラーゼ液
- 7) 陽性対照
2.1.3 の 20) と同様に調製した。
- 8) 添加用菌液

標準菌株の *S. Enteritidis* 及び *S. Infantis* 各 1 白金耳をトリプトソイブイオン培地 10 mL で 35~37 $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養した後、75 $^{\circ}$ C の水浴で 1 分間以上加熱することにより死滅させたもの、並びに生理食塩液を約 5 mL ずつ小分けしたもの（菌種名は非明示）を添加用菌液として各試験室に送付した。

なお、各標準菌株のトリプトソイブイオン培地での培養後の菌濃度は、2.1.10 により測定した。

2.2.3 分析試料

各試験室において、菌液添加用試料を 2.1.5 の 1) により前増菌培養した後、培養液の上澄み液 4.5 mL を添加用菌液 500 μ L と混合したものを 2.1.5 の 2) の DNA 抽出に用いた（試料 2 種類と菌液 3 種類で計 6 点）。DNA 抽出液は、そのまま 2.1.5 の 3) の DNA 試料液として用いた。

2.2.4 試験方法

本法によった。

2.2.5 報告方法

各試料について、*S. Enteritidis* 検出用プライマーセット及び *S. Typhimurium* 検出用プライマーセットを用いて試験を行い、対応する 4 つの検出サイズの PCR 増副産物がすべて検出された場合に「+」、*invA* に対応する PCR 増幅産物が検出された場合には「A」、不検出の場合は「-」を報告させることとした。結果が「A」となった試料については、さらに *S. Choleraesuis* 検出用プライマーセット、*S. Dublin* 検出用プライマーセット、*S. Gallinarum* 検出用プライマーセット、*S. Hadar* 検出用プライマーセット及び *S. Infantis* 検出用プライマーセットを用いて試験を行い同様に報告させることとした。

2.2.6 分析実施期間

平成 25 年 11 月 20 日～平成 25 年 12 月 6 日

2.2.7 解析方法

各試料及び各血清型検出用プライマーセット毎に、対応する 4 つの検出サイズの PCR 増副産物がすべて検出された数、*invA* に対応する PCR 増副産物が検出された数を集計した。

2.2.8 参加試験室

FAMIC 肥飼料安全検査部，同札幌センター，同仙台センター，同名古屋センター，同神戸センター及び同福岡センター（計 6 試験室）

3 結果及び考察

3.1 分析法開発

3.1.1 各血清型検出用プライマーセットのサルモネラに対する感度及び特異性

各血清型検出用プライマーセットのサルモネラに対する感度及び特異性を確認するために、2.1.6 により試験菌株 128 株を正しく判定できるか確認した。

その結果は Table 4 のとおり，主要血清型は，*S. Infantis* が 4 株，*S. Typhimurium* が 11 株，残りの 5 血清型が 1 株と目的の血清型の株数は少ないが，全て陽性，その他の試験菌は全て陰性であり，正しく判定できた。

Table 4 Sensitivity and specificity of each primer sets

<i>Salmonella</i> serovar	Number of strains tested	Number of positive results of target serovar detecting primer pair set						
		Choleraesuis	Dublin	Enteritidis	Gallinarum	Hadar	Infantis	Typhimurium
Choleraesuis	1	1	0	0	0	0	0	0
Dublin	1	0	1	0	0	0	0	0
Enteritidis	1	0	0	1	0	0	0	0
Gallinarum	1	0	0	0	1	0	0	0
Hadar	1	0	0	0	0	1	0	0
Infantis	4	0	0	0	0	0	4	0
Typhimurium	11	0	0	0	0	0	0	11
Others	108	0	0	0	0	0	0	0
Sensitivity (%)		100	100	100	100	100	100	100
Specificity (%)		100	100	100	100	100	100	100

3.1.2 抽出方法の検討

始めに，2.1.2 の 1)にそれぞれ主要血清型を添加した試料を用い，2.1.7 の 1)のアルカリ熱抽出法による DNA 抽出を検討したが，スメアリングにより判定が難しい試料及び菌種があったため，DNA 精製が必要であることがわかった。そのため，アルカリ熱抽出法で特に判定が困難であった試料として米ぬか，菌種として *S. Choleraesuis* を用い，2.1.7 により抽出方法の検討を行った。

その結果は Fig. 1 のとおり，InstaGene Matrix と Ethachinmate を用いた抽出方法（Fig. 1 のレーン 9 及び 20）が最も判定が容易であり， 10^5 CFU/mL でも濃いバンドが得られたため，この抽出方法を採用した。

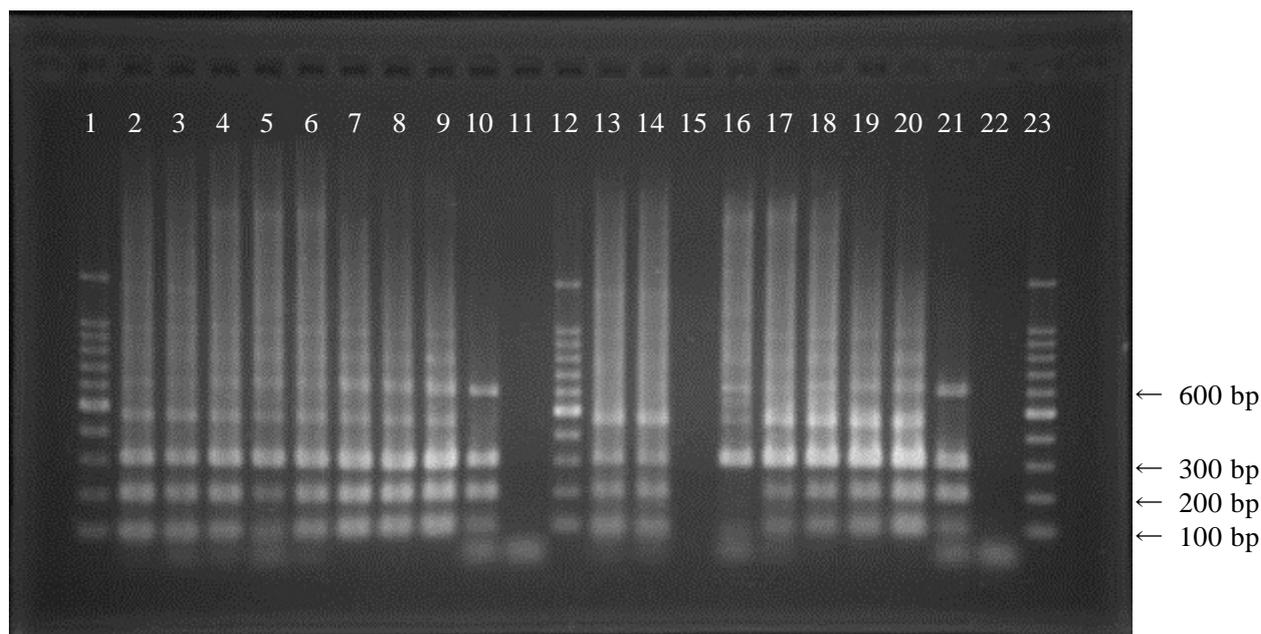


Fig. 1 Comparison of DNA extraction methods of *Salmonella Choleraesuis* mixed with rice bran

a) Rice bran was incubated in pre-enrichment broth at 37 °C for 16 hours and then mixed with *Salmonella Choleraesuis*. The DNAs were extracted with 8 extraction method. *Choleraesuis* detecting primer set was used in PCR.

b) Lane 1, 12, 23: 100 bp Ladder. Lane 2~9: 10^6 CFU/mL of *Salmonella Choleraesuis* in pre-enrichment broth. Lane 13~20: 10^5 CFU/mL of *Salmonella Choleraesuis* in pre-enrichment broth. Lane 10, 21: Positive control. Lane 11, 22: Negative control. Lane 2, 13: Alkali-heat treatment. Lane 3, 14: Alkali-heat treatment and Ethachinmate. Lane 4, 15: MonoFas Bacterial genom DNA extraction kit VII. Lane 5, 16: QIAamp DNA stool. Lane 6, 17: Dneasy Blood & Tissue. Lane 7, 18: MagExtractor. Lane 8, 19: InstaGene Matrix. Lane 9, 20: InstaGene Matrix and Ethachinmate.

3.1.3 前増菌培養液中での検出可能な菌濃度の検討

2.1.8 により検出可能な菌濃度を確認した。

その結果は Table 5 のとおり，前増菌培養液中で概ね 10^3 ~ 10^6 CFU/mL まで菌濃度が増えていれば，検出可能であった。本法の抽出法により DNA を精製することで，アルカリ熱抽出法では検出不能であった *S. Choleraesuis* についても 10^6 CFU/mL 以上の菌濃度であれば同定できた。また，アルカリ熱抽出法において DNA 抽出溶液の希釈をしないと検出できなかった試料については，本法の抽出法では DNA 抽出溶液の希釈をせずとも検出できた。アルカリ熱抽出法と本法の抽出法での検出可能な最小菌濃度を比較すると，多くの試料では本法の抽出法の方が少ない菌濃度でも検出できた。なお，サルモネラを添加しない前増菌培養液についても同時に試験を行ったが，全てを正しく陰性と判定できた。

Table 5 Minimum concentration of *Salmonella* to be identifiable in pre-enrichment broth^{a), b)}

Sample	Minimum concentration of <i>Salmonella</i> (CFU/mL)									
	<i>S. Choleraesuis</i>		<i>S. Dublin</i>	<i>S. Enteritidis</i>		<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Hadar</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	
	Method A	Method B	Method A	Method A	Method B	Method A	Method A	Method A	Method A	Method B
Corn gluten meal	1.9×10 ⁶	1.5×10 ⁵	4.0×10 ³	8.8×10 ⁴	6.5×10 ²	9.6×10 ⁴	6.0×10 ⁵	9.0×10 ³	<u>1.1×10⁵</u>	6.0×10 ³
Rice bran 1	U	NT	NT	8.8×10 ⁴	NT	NT	NT	NT	<u>1.1×10⁶</u>	NT
Rice bran 2	NT	1.3×10 ⁶	U	NT	6.3×10 ³	9.6×10 ⁵	<u>6.0×10⁴</u>	9.0×10 ⁵	NT	5.9×10 ⁴
Rapeseed meal	1.9×10 ⁶	1.5×10 ⁴	4.0×10 ⁵	8.8×10 ⁴	6.5×10 ³	9.6×10 ⁵	6.0×10 ⁵	9.0×10 ⁵	<u>1.1×10⁶</u>	6.0×10 ³
Brewers grains	1.9×10 ⁴	1.4×10 ⁵	4.0×10 ⁴	8.8×10 ⁴	6.5×10 ⁴	9.6×10 ⁴	6.0×10 ⁵	9.0×10 ³	1.1×10 ⁵	7.9×10 ⁴
Meat bone meal 1	1.9×10 ⁴	NT	4.0×10 ⁴	8.8×10 ⁴	NT	9.6×10 ⁴	6.0×10 ⁵	NT	1.1×10 ⁵	NT
Meat bone meal 2	NT	1.6×10 ⁴	NT	NT	7.6×10 ⁴	NT	NT	9.0×10 ⁵	NT	1.1×10 ³
Chicken meal	1.9×10 ⁴	3.0×10 ⁴	4.0×10 ⁴	8.8×10 ⁴	3.6×10 ⁵	9.6×10 ⁴	6.0×10 ⁵	9.0×10 ³	1.1×10 ⁵	2.9×10 ⁴
Fether meal	1.9×10 ⁴	1.3×10 ⁴	4.0×10 ⁴	8.8×10 ⁴	1.1×10 ³	9.6×10 ⁴	6.0×10 ⁵	9.0×10 ³	1.1×10 ⁴	6.9×10 ³
Fish meal 1	1.9×10 ⁴	NT	4.0×10 ⁴	8.8×10 ⁴	NT	9.6×10 ⁴	>6.0×10 ⁵	NT	1.1×10 ⁴	NT
Fish meal 2	NT	1.6×10 ⁴	NT	NT	1.2×10 ³	NT	NT	9.0×10 ⁵	NT	1.1×10 ⁵
Molasses adsorption feed	U	1.6×10 ⁶	U	8.8×10 ⁴	1.5×10 ⁵	9.6×10 ⁵	6.0×10 ⁵	9.0×10 ⁵	<u>1.1×10⁶</u>	1.6×10 ⁵
Mixed feed	1.9×10 ⁵	1.4×10 ⁵	4.0×10 ⁴	8.8×10 ⁴	8.7×10 ³	9.6×10 ⁴	>6.0×10 ⁵	9.0×10 ⁵	1.1×10 ⁶	8.8×10 ⁵
Formula feed for layer	U	1.6×10 ⁶	U	8.8×10 ⁴	1.5×10 ⁵	9.6×10 ⁵	<u>6.0×10⁵</u>	9.0×10 ⁵	1.1×10 ⁶	1.6×10 ⁵
Formula feed for broiler	1.9×10 ⁶	1.4×10 ⁵	U	8.8×10 ⁴	6.5×10 ³	U	6.0×10 ⁵	9.0×10 ⁵	1.1×10 ⁶	7.9×10 ⁴
Formula feed for finishing beef cattle 1	1.9×10 ⁶	NT	4.0×10 ⁵	8.8×10 ⁴	NT	9.6×10 ⁴	<u>6.0×10⁵</u>	NT	1.1×10 ⁶	NT
Formula feed for finishing beef cattle 2	NT	1.6×10 ⁴	NT	NT	1.2×10 ⁵	NT	NT	9.0×10 ⁵	NT	1.0×10 ⁴
Formula feed for dairy cattle	1.9×10 ⁵	1.4×10 ⁵	4.0×10 ⁴	8.8×10 ⁴	8.7×10 ³	9.6×10 ⁴	6.0×10 ⁵	9.0×10 ⁴	1.1×10 ⁵	8.8×10 ⁴
Formula feed for finishing pig	<u>1.9×10⁶</u>	1.3×10 ⁵	NT	8.8×10 ⁴	1.1×10 ⁴	<u>9.6×10⁵</u>	6.0×10 ⁵	9.0×10 ⁵	1.1×10 ⁶	6.9×10 ⁴

a) Each sample was mixed with *Salmonella* after incubation in buffered peptone water at 37 °C for 16 hours. DNA extracts were performed with alkali-heat treatment (Method A) or combination of InstaGene Matrix and Ethachinmate (Method B) and then multiplex PCR was performed.

b) Each value represents the minimum concentration of *Salmonella* with positive result. "NT" indicates that the sample was not tested; "U" indicates that the serovar of *Salmonella* inoculated in the sample was not identified; and underline indicates that the result was in the case of 10-fold diluted DNA extract.

3.1.4 陽性試料に対する迅速検出法の適用性の検討

主要血清型を迅速に同定することは重要であるが、飼料中にサルモネラが含まれているかどうかを迅速に判定することも重要である。そこで、2.1.9 の迅速検出法により試験を行い、各血清

型検出用プライマーセットに含まれている *invA* 検出用プライマーによる *invA* の増幅を確認することで、サルモネラの検出に使用できないか確認した。

2.1.2 の 2) のサルモネラの陽性試料 44 点を確認に用いた。これらの試料は、主要血清型は含まれていない。また、試料は長期冷蔵保存されたものであるため、培養法により改めてサルモネラの生菌の存在を確認した。

迅速検出法では操作の簡便性を考え、2.1.3 の 15) の中から 2 種類のプライマーセットを選択し用いることとした。一つは畜産物由来の食中毒を引き起こすリスクが高いことから *S. Enteritidis* 検出用プライマーセットを、もう一つは過去に飼料からの検出例があることから *S. Typhimurium* 検出用プライマーセットを選択した。

その結果は Table 6 のとおり、培養法で再度陽性となった試料 17 点のうち両方のプライマーセットで *invA* 陽性であったのが 16 点であり、両方のプライマーセットで *invA* 陰性であったのは 1 点のみであった。培養法で改めて陰性となった 27 点のうち両方のプライマーセットで *invA* 陰性であったのが 23 点であり、*S. Enteritidis* 検出用プライマーセットのみ *invA* 陽性が 1 点、*S. Typhimurium* 検出用プライマーセットのみ *invA* 陽性が 3 点であった。

培養法及び迅速検出法でともに陰性と判定された試料は、長期保存中にサルモネラが死滅した、あるいは検出可能な濃度にまでサルモネラが増菌していない可能性が示唆された。

培養法で陰性と判定され、迅速検出法で陽性と判定された試料は、他の陽性となった試料の電気泳動の結果と比較すると、*invA* に対応する増幅産物のバンドが薄かったため、抽出された DNA 量が少なかったことが原因として考えられた。このことから、死菌の微量な DNA を迅速検出法で検出した、*invA* とは異なる DNA を増幅した誤検出及び試料中のサルモネラが検出限界以下⁸⁾であった可能性が示唆された。

一方、*S. Enteritidis* 検出用プライマーセットと比較して、*S. Typhimurium* 検出用プライマーセットで偽陽性がより多く確認された。これは、前述の可能性のほかに、*S. Typhimurium* 検出用プライマーセットと *S. Enteritidis* 検出用プライマーセットでは用いた 4 つのプライマー対のうち *invA* に対応するプライマー対以外のプライマーが異なっており、特異性に差が生じた可能性も示唆された。

なお、培養法で陽性と判定され、迅速検出法で陰性と判定された 1 試料は、再度両試験法を実施したが、どちらも陰性と判定され、再現性がなかった。このことから、当該試料中にサルモネラが局在していた、あるいは試料中のサルモネラ菌数が微量であった可能性が考えられた。

以上の結果から、迅速検出法は、培養法と高い一致率を示しており、飼料中のサルモネラを迅速にスクリーニングする方法としても有用と考えられた。

Table 6 Relative accuracy of multiplex PCR method compared to reference method (culture method) ^{a)}

		Enteritidis detecting primer set		Typhimurium detecting primer set	
		<i>invA</i> positive	<i>invA</i> negative	<i>invA</i> positive	<i>invA</i> negative
Reference method (Culture)	Positive	16	1	16	1
	Negative	1	26	3	24
Agreement		42		40	
Accuracy (%) ^{b)}		95.5		90.9	

a) All samples in this table had been once determined Salmonella-positive by the reference method.

All samples were re-tested using reference method because of long term storage.

b) Accuracy: percentage of the results consistent with reference method

3.2 共同試験

本法及び迅速検出法の室間再現精度を検証するため、2.2により共同試験を実施した。

その結果は Table 7 のとおり、本法については、全てのプライマーセットで全ての試験室が血清型を正しく同定できた。また、迅速検出法については、魚粉の前増菌培養液に *S. Infantis* を添加したものを *S. Hadar* 検出用プライマーセットでマルチプレックス PCR を行った結果で、6 試験室中 1 試験室のみ *invA* 陰性となった。サルモネラ陰性試料については、全ての試験室が全てのプライマーセットで正しく判定できた。この *invA* 不検出の原因の一つは、今回添加した菌濃度である 10^5 CFU/mL が *S. Hadar* 検出用プライマーセットの検出下限を下回る事が考えられたほか、実施試験室での DNA の抽出効率が悪かったために、検出可能な量の増幅産物が得られなかった可能性が考えられた。しかし、目的とする *S. Hadar* を添加した試料については検出できていたこと、また、*S. Typhimurium* 検出用プライマーセットと *S. Enteritidis* 検出用プライマーセットをスクリーニング用プライマーセットとすることを想定したことから、サルモネラの陽性・陰性判定には問題ないと考えられた。

Table 7 Results of collaborative study^{a)}

Sample	Inoculation		Type of distribution ^{b)}	Number of positive results/number of samples tested (number of <i>invA</i> positive results) ^{c)}						
	Kind of serovar	Level (CFU/mL)		<i>S. Choleraesuis</i>	<i>S. Dublin</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Hadar</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>S. Typhimurium</i>
Formula feed for layer	Saline	-	Sterilized	NT ^{d)}	NT	0/6 (0)	NT	NT	NT	0/6 (0)
	<i>S. Enteritidis</i>	1.67×10 ⁵	Sterilized	NT	NT	6/6 (6)	NT	NT	NT	0/6 (6)
	<i>S. Infantis</i>	1.80×10 ⁵	Sterilized	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	6/6 (6)	0/6 (6)
Fish meal	Saline	-	Sterilized	NT	NT	0/6 (0)	NT	NT	NT	0/6 (0)
	<i>S. Enteritidis</i>	1.67×10 ⁵	Sterilized	NT	NT	6/6 (6)	NT	NT	NT	0/6 (6)
	<i>S. Infantis</i>	1.80×10 ⁵	Sterilized	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (5)	6/6 (6)	0/6 (6)
Brewers grains	Saline	-	DNA	NT	NT	0/6 (0)	NT	NT	NT	0/6 (0)
Formula feed for finishing beef cattle	<i>S. Typhimurium</i>	1.65×10 ⁵	DNA	NT	NT	0/6 (6)	NT	NT	NT	6/6 (6)
Formula feed for finishing pig	<i>S. Choleraesuis</i>	2.60×10 ⁵	DNA	6/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)
Chicken meal	<i>S. Dublin</i>	3.13×10 ⁵	DNA	0/6 (6)	6/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)
Fether meal	<i>S. Gallinarum</i>	1.97×10 ⁵	DNA	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	6/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)
Soybean meal	<i>S. Hadar</i>	1.86×10 ⁵	DNA	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	6/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)

a) The collaborative study was performed with 6 laboratories. The thermal cyclers that all laboratories used were PE9700 (Applied Biosystems).

b) Sterilized Salmonella and DNA of Salmonella were distributed to each laboratory. In the case of sterilized Salmonella, the sterilized strains were mixed after incubation of Salmonella negative samples in buffered peptone water at 35-37 °C for 18-24 hours, then DNA extraction and multiplex PCR were performed (Sterilized). In the case of DNA of Salmonella, DNA solutions which were extracted from Salmonella-inoculated feeds were analyzed as template DNA (DNA).

c) Results are expressed as "number of laboratories who reported target serovar positive/number of laboratories who reported *invA* positive".

d) Not tested.

3.3 実試料によるモニタリング結果

本法及び迅速検出法の有用性を確かなものとするために、FAMIC が実施している飼料のサルモネラのモニタリングにおいて培養法と並行して本法及び迅速検出法による試験も行い、培養法と比較した。試料は 2.1.2 の 3)を用いた。

その結果は Table 8 のとおり、培養法では試料 272 点中 4 点がサルモネラ陽性と判定されたが、そのうち主要血清型に当たるものはなかった。

本法では試料 272 点のうちチキンミール 1 点及び糖蜜吸着飼料 1 点で PCR 反応の阻害が認められたが、その割合は約 0.7 %と低く、本法で採用した抽出法は飼料中のサルモネラ迅速同定法に用いるのに支障はないと考えられた。なお、PCR 阻害の原因としては、DNA を抽出する際に、PCR 反応を阻害する成分を十分に除去できなかった可能性が考えられた。阻害のなかった試料 270 点については、本法でも主要血清型に該当するサルモネラは存在しないと正しく判定された。

迅速検出法に関しては、*S. Hadar* 検出用プライマーセットを除いて偽陰性は認められなかったが、全てのプライマーセットで偽陽性が認められたことから、更なる検討が必要であると考えられた。偽陽性が認められた原因としては、死菌の DNA が増幅された、*invA* と異なる DNA が非特異的に増幅された、あるいは前増菌培養液中のサルモネラが同定可能な菌量に達していなかったことが示唆された。

Table 8 Comparison between reference method and multiplex PCR method for commercial feeds

Objective	Reference method (Culture method)	Multiplex PCR	Primer set						
			<i>S. Choleraesuis</i>	<i>S. Dublin</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Hadar</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>S. Typhimurium</i>
Target serovar positive ^{a)}	Target serovar positive	0	0	0	0	0	0	0	0
	Target serovar negative	0	0	0	0	0	0	0	0
Identification of serovar of <i>Salmonella</i>	Target serovar positive	0	0	0	0	0	0	0	0
	Target serovar negative	270	270	270	270	270	270	270	270
Total ^{b)}		272	272	272	272	272	272	272	272
Agreement (%)		100	100	100	100	100	100	100	100
Sensitivity (%)		-	-	-	-	-	-	-	-
Specificity (%)		100	100	100	100	100	100	100	100
Positive	<i>invA</i> positive	4	4	4	4	4	3	4	4
	<i>invA</i> negative	0	0	0	0	0	1	0	0
Negative	<i>invA</i> positive	20	38	13	37	6	17	26	26
	<i>invA</i> negative	246	228	253	229	260	249	240	240
Total		272	272	272	272	272	272	272	272
Agreement (%)		91.9	85.3	94.5	85.7	96.7	93.0	89.7	89.7
Sensitivity (%)		100	100	100	100	75.0	100	100	100
Specificity (%)		92.5	85.7	95.1	86.1	97.7	93.6	90.2	90.2

a) None of *S. Choleraesuis*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Hadar*, *S. Infantis* and *S. Typhimurium* was detected by the culture method.

b) Multiplex PCR were inhibited for two samples in a total.

4 まとめ

飼料中のサルモネラ 7 血清型のマルチプレックス PCR による迅速同定法について、飼料分析基準への適用の可否を検討したところ、以下の結果が得られ、適用が可能であり、その有用性が確認できた。また、迅速検出法についても検討したが、さらなる検討が必要であることがわかった。

- 1) 各血清型検出用プライマーセットのサルモネラに対する感度及び特異性は、すべて 100 %であった。
- 2) 前増菌培養液からの DNA 抽出は、InstaGeneMatrix と Ethachinmate を用いた抽出法が最も判定が容易であった。
- 3) 一部試料を除き、サルモネラの菌濃度が前増菌培養液中 $10^3\sim 10^6$ CFU/mL であれば本法により同定可能であった。
- 4) 共同試験の結果、全てのプライマーセットで全ての試験室が血清型を正しく同定できた。
- 5) 実試料を用いた培養法との比較の結果、PCR 阻害が認められた 2 点を除き、270 点全ての試料について主要血清型に該当するサルモネラは存在しないと正しく判定された。迅速検出法については、*S. Hadar* 検出用プライマーセットにおいて偽陰性が認められ、全てのプライマーセットにおいて偽陽性が認められた。

なお、本法は、*S. Hadar* 及び *S. Infantis* を除いた監視伝染病の病原体である 5 血清型の迅速同定法として、平成 27 年 6 月 16 日付けで飼料分析基準に収載された⁹⁾。

謝 辞

本研究を行うに当たり菌株を提供していただいた北里大学、農林水産省動物医薬品検査所及び国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門並びに本研究に対して御助言御指導を賜った国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門の秋庭正人先生に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 佐藤静夫：飼料のサルモネラ汚染と対策，鶏病研究会報，**39**，113-132 (2003).
- 2) 法律：家畜伝染病予防法，昭和 26 年 5 月 31 日，法律第 166 号 (1951).
- 3) 法律：飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律，昭和 28 年 4 月 11 日，法律第 35 号 (1953).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) Chunhong Zhu, Min Yue, Shelley Rankin, François-Xavier Weill, Joachim Frey and Dieter M. Schifferli: One-step identification of five prominent chicken *Salmonella* serovars and biotypes, *J. Clin. Microbiol.*, **53**(12), 3881-3883 (2015).
- 6) Kamela Charmaine S. Ng and Windell L. Rivera: Multiplex PCR-based serogrouping and serotyping of *Salmonella enterica* from tonsil and jejunum with jejunal lymph nodes of slaughtered swine in metro Manila, Philippines, *J. Food Prot.*, **78**(5), 873-880 (2015).

- 7) Masato Akiba, Masahiro Kusumoto and Taketoshi Iwata: Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR, *J. Microbiol. Methods*, **85**, 9-15 (2011).
- 8) 千原哲夫, 関口好浩, 橋本仁康, 大島慎司, 杉本泰俊, 本広昭, 木村晃一, 上橋健三: クオリボックス TM システムによる飼料中のサルモネラの迅速検出法の検討, *日本食品微生物学会雑誌*, **25** (3), 109-119 (2008).
- 9) 農林水産省消費・安全局長通知: 飼料分析基準の一部改正について, 平成 27 年 6 月 16 日, 27 消安第 1181 号 (2015).

技術レポート**1 飼料中のシアヌル酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の検討**

長久保 眞平*, 野村 昌代*, 青山 幸二*

Study of Determination Method of Cyanuric Acid in Feed by LC-MS/MS

Shinpei NAGAKUBO*, Masayo NOMURA* and Koji AOYAMA*

(* Fertilizer and Feed inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

We have studied a quantitative determination method of the cyanuric acid concentration in feed using a liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Cyanuric acid was extracted with acetonitrile-water (1:1), and the extracted solution was centrifuged. 4 mL of the supernatant was then diluted with acetonitrile-water (1:1) to a volume of 10 mL. The diluted solution was purified with a SPE column (Oasis MAX, Waters Co.; Milford, MA, USA), and injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of cyanuric acid. LC separation was then carried out on a hydrophilic interaction chromatography column (SeQuant ZIC-HILIC, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Merck Millipore Inc.; Burlington, MA, USA) with a gradient of acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate solution (19:1) and 10 mmol ammonium acetate dissolved in acetonitrile-water (1:1) as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the negative mode electrospray ionization (ESI-) was used.

Recovery tests were conducted on two kinds of formula feed, fish meal, soybean meal and dried skim milk. Cyanuric acid was intentionally added at the levels of 0.5 mg/kg and 2.5 mg/kg to samples respectively. The resulting mean recoveries ranged from 79.0 % to 111 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 14 % on two kinds of formula feed, fish meal and soybean meal, and less than 31 % on dried skim milk.

Key words: cyanuric acid; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); formula feed; fish meal; soybean meal; dried skim milk

キーワード: シアヌル酸; 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計; エレクトロスプレーイオン化法; 配合飼料; 魚粉; 大豆油かす; 脱脂粉乳

1 緒 言

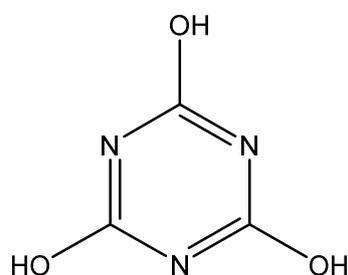
シアヌル酸は、一般にプラスチック製造や消毒剤、プールの塩素安定剤として使用されている¹⁾。シアヌル酸及び類似化合物であるメラミンは、安価で入手が容易であり、窒素原子を多く含んでいるため、たん白質含量を多く見せる欺瞞剤として用いられることがある¹⁾。シアヌル酸及びメラミンは、単独で摂取した場合の急性毒性は比較的低い¹⁾が、同時に摂取した場合、腎不全を誘発する結晶を形成することが示唆されている¹⁾。2007年に米国において、メラミン関連化合物に汚染されたペットフードを摂取したイヌとネコにおける腎不全症例が大規模に発生した。中国においては、

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

メラミン関連化合物が不正に混入された乳幼児用調製粉乳が原因と思われる乳幼児等の腎結石等の被害が報告された²⁾。日本において、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準³⁾の中で、家畜等用飼料（飼料原料（尿素を除く）を含む）中のメラミンの管理基準値は 2.5 mg/kg と設定されている。最近では、ベトナム産イカミール等からシアヌル酸が検出される事例も発生している。これを受けて、急遽、シアヌル酸の管理基準等を設定してモニタリングを行う必要が生じた。しかし、シアヌル酸については、その分析法が飼料分析基準⁴⁾に記載されていないため、分析法の確立が急務となった。

今回、米国食品医薬品局（FDA）から示されている液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法⁵⁾（以下「FDA 法」という。）を基に、飼料中のシアヌル酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）による定量法の飼料分析基準への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考にシアヌル酸の構造式等を Fig 1 に示した。



1,3,5-triazinane-2,4,6-trione

C₃H₃N₃O₃ MW: 129.075 CAS No.: 108-80-5

Fig. 1 Chemical structure of cyanuric acid

2 実験方法

2.1 試料

配合飼料（ブロイラー肥育後期用，成鶏飼育用，子豚育成用，肉豚肥育用，あゆ育成用及びあまご育成用），魚粉，イカミール，エビミール及び大豆油かすをそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。脱脂粉乳については 1 mm のふるいを通させた。エビミール 2 点はマレーシア産及びベトナム産を用いた。イカミール 2 点の産地は不明であった。その他の試料は国産を用いた。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For broiler finishing chick	Grains	65	Corn, brown rice
	Oil seed meal	26	Soybean meal, rapeseed meal, corn gluten meal
	Brans	1	Rice bran
	Others	8	Vegetable oil, calcium phosphate, calcium carbonate, salt, feed additives
For layers	Grains	60	Corn, milled rice
	Oil seed meal	19	Soybean meal, rapeseed meal, corn gluten meal, enzyme-treated soybean, palm meal
	Brans	7	Distiller's dried grains with solubles, rice bran
	Animal by-products	1	Fish meal
	Others	13	Calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, glucose, lactic acid bacterium, fructo-oligo saccharide syrup, fructo-oligo saccharide, paprika extract, silicic acid, silicic anhydride, bifidobacteria, feed additives
For growing pigs	Grains	71	Corn, milled rice, wheat flour, bread crumb, wheat, milo
	Oil seed meal	16	Soybean meal, rapeseed meal, corn germ meal
	Brans	2	Wheat bran
	Animal by-products	2	Fish meal, bone and meat meal (derived from pork and chicken)
	Others	9	Food industry by-product, molasses, corn steep liquor, calcium carbonate, calcium phosphate, salt, vegetable oil, betaine, silicic acid, animal fat, feed additives
For pork pigs	Grains	73	Heat and press-treated corn, milo, corn, heat-treated corn, heat-treated barley
	Oil seed meal	22	Heat and press-treated soybean meal, rapeseed meal, soybean meal
	Others	5	Animal fat, calcium carbonate, salt, calcium phosphate, vegetable oil, feed additives
For sweet fish	Animal by-products	56	Fish meal, krill meal
	Grains	31	Wheat flour
	Oil seed meal	7	Soybean meal
	Others	6	Calcium phosphate, seaweed powder, feed yeast, wheat germ, shelly fossil powder, garlic powder, calcium carbonate, soybean lecithin, silicic acid, feed additives
For oncorhynchus rhodurus	Animal by-products	56	Fish meal
	Grains	26	Wheat flour
	Oil seed meal	7	Soybean meal
	Brans	6	Defatted rice bran
	Others	5	Feed yeast, calcium phosphate, seaweed powder, calcium carbonate, feed additives

2.2 試薬

- 1) アセトニトリルは LC-MS 用, アンモニア水は特級 (質量分率 28%), ギ酸は LC-MS 用 (質量分率 99%), ジエチルアミンは特級, 酢酸アンモニウム溶液は 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 LC 用を用いた (いずれも富士フイルム和光純薬製). 水は Milli-Q Integral 5 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた.
- 2) シアヌル酸標準原液
シアヌル酸標準品 (富士フイルム和光純薬製, 純度 99.2%) 10 mg を正確に量って 20 mL

の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてシアヌル酸標準原液を調製した（この液 1 mL は、シアヌル酸として 500 μg を含有する．）．

3) 安定同位体元素標識シアヌル酸（シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ ）内標準原液

シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 標準品（林純薬工業製，純度 $^{13}\text{C}_3$ 97.3 %）5 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準原液を調製した（この液 1 mL は、シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ として 250 μg を含有する．）．

4) 検量線作成用シアヌル酸標準液

使用に際して、シアヌル酸標準原液及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準原液の一定量をギ酸-アセトニトリル（1+24）で正確に希釈し、1 mL 中にシアヌル酸として 2.5, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 及び 200 ng を含有し、かつシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ として 10 ng を含有する各検量線作成用シアヌル酸標準液を調製した（用時調製）．

5) 安定同位体元素標識シアヌル酸（シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ ）内標準液

使用に際して、シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準原液の一定量を水で正確に希釈し、1 mL 中にシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ として 2 μg を含有する内標準液を調製した（用時調製）．

6) 溶離液 A アセトニトリル-10 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液（19+1）

7) 溶離液 B 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 10 mL にアセトニトリル-水（1+1）を加えて 1 L とした．

2.3 装置及び器具

1) 粉砕機：ZM 200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）

2) 超音波洗浄機：MCS-6 アズワン販売

3) ホモジナイザー：POLYTRON PT20SK KINEMATICA 製

4) 強塩基性陰イオン交換体ミニカラム（以下「ミニカラム」という．）：Oasis MAX（充てん剤量 150 mg，リザーバー容量 6 mL，粒径 60 μm ）Waters 製

5) メンブランフィルター：13HP045AN（孔径 0.45 μm ，直径 13 mm，ポリテトラフルオロエチレン）東洋濾紙製

6) LC-MS/MS：

LC 部：Nexera X2 島津製作所製

MS 部：LCMS-8040 島津製作所製

2.4 定量方法

1) 抽出

i 脱脂粉乳 分析試料 1 g を正確に量って 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、水 10 mL を加えた後、15 分間超音波処理した．この遠心沈殿管にアセトニトリル 10 mL を加え、更にシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準液 250 μL を正確に加えた後、ホモジナイザーで 1 分間かき混ぜて抽出した．抽出液を 1600 \times g で 10 分間遠心分離し、上澄み液 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れた．全量フラスコの標線までアセトニトリル-水（1+1）を加え、カラム処理に供する試料溶液とした．

ii その他の飼料 分析試料 1 g を正確に量って 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、アセトニトリル-水（1+1）20 mL を加えた．更にこの遠心沈殿管にシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準液 250 μL を正確に加えた後、ホモジナイザーで 1 分間かき混ぜて抽出した．抽出液を 1600 \times g で 10

分間遠心分離し、上澄み液 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れた。全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (1+1) を加え、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

ミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及びアンモニア水-水 (5+23) 5 mL で順次洗浄した。試料溶液 2 mL をあらかじめアンモニア水-水 (5+23) 3 mL を入れたミニカラムに加え混和し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。更にアセトニトリル 5 mL をミニカラムに加えて全量を流出させた (流速は 1~2 mL/min 程度となるように吸引マニホールドを使用した。以下同様。)。10 mL の共栓試験管をミニカラムの下に置き、ギ酸-アセトニトリル (1+24) 2 mL をミニカラムに正確に加えてシアヌル酸を溶出させた。溶出液をメンブランフィルターでろ過し、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各検量線作成用シアヌル酸標準液各 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (以下「SRM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	SeQuant ZIC-HILIC (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 5 μ m), MERCK
Mobile phase	Solution A – solution B (19:1) (hold for 8 min) \rightarrow 2 min \rightarrow (2:3) (hold for 10 min) \rightarrow 2 min \rightarrow (19:1) (hold for 5 min) Solution A: acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate solution (19:1) Solution B: 10 mmol ammonium acetate dissolved in acetonitrile-water (1:1)
Flow rate	0.3 mL/min
Column temperature	40 $^{\circ}$ C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	N ₂ (3 L/min)
Drying gas	N ₂ (15 L/min)
Interface temperature	350 $^{\circ}$ C
Heat block temperature	300 $^{\circ}$ C
Desolvation line temperature	250 $^{\circ}$ C

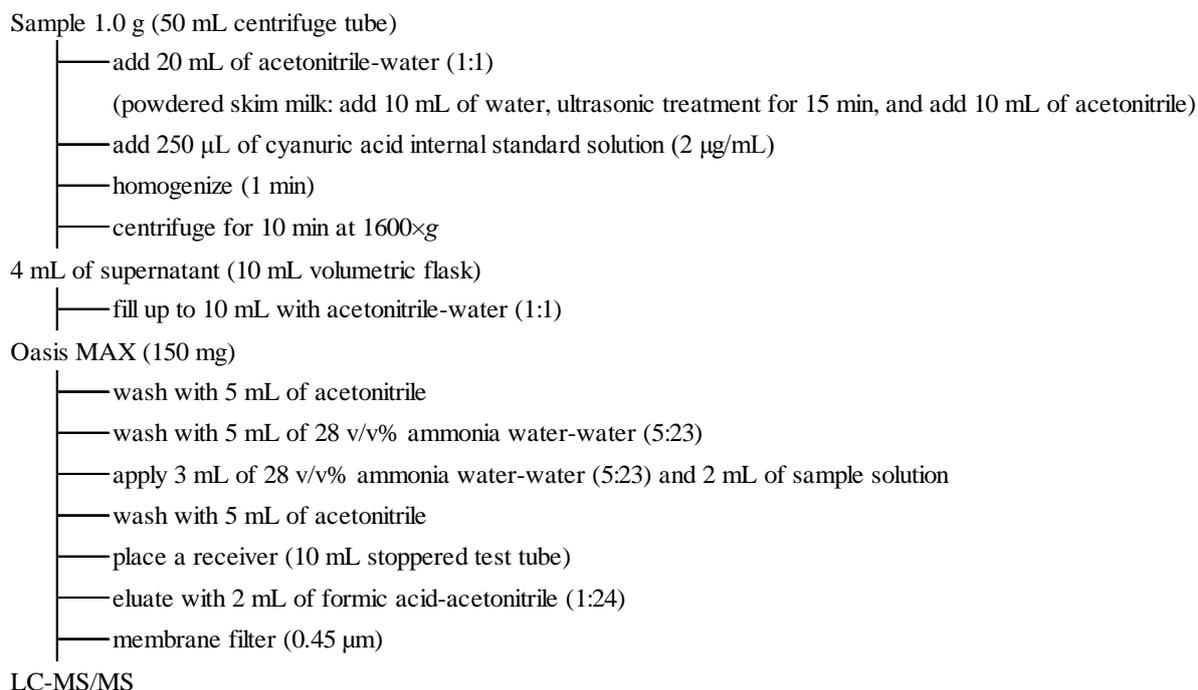
Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
Cyanuric acid	128	42	-	17
		-	85	10
Cyanuric acid- ¹³ C ₃	131	43	-	16
		-	87	11

4) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからシアヌル酸及びシアヌル酸-¹³C₃ のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のシアヌル酸量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for cyanuric acid in feed

2.5 妨害物質の検討で用いた定量方法

2.4 に従って得られたピークに妨害ピークが重なっているか確認するため、2.4 の 3)の LC-MS/MS 測定条件のうちカラム及びグラジエントを以下のとおり変更して測定することにより確認を行った。

カラム：TSK gel Amide-80（内径 2.1 mm，長さ 150 mm，粒径 3 μ m） 東ソー製

溶離液：10 mmol/L 酢酸アンモニウム-アセトニトリル（19+1）（8 min 保持）→ 2 min →
（2+3）（10 min 保持）→ 2 min →（19+1）（5 min 保持）

2.6 添加回収試験

2.2 の 2)のシアヌル酸標準原液を水で正確に希釈し添加に用いた。

配合飼料（成鶏飼育用及びあまご育成用），大豆油かす，魚粉及び脱脂粉乳について，シアヌル酸として，0.5 及び 2.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 50 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し，一夜静置した後に本法に従って添加回収試験を実施し，平均回収率及び繰返し精度を求めた。なお，回収率は各試料のブランク値を差し引いて算出した。

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 4)により調製した各検量線作成用シアヌル酸標準液各 5 μ L を LC-MS/MS に注入し，得られた SRM クロマトグラムからシアヌル酸及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ のピーク面積比を求めて検量線を作成した。

得られた検量線の一例は Fig 2 のとおりであり，シアヌル酸として 2.5~200 ng/mL（注入量と

して 0.0125~1 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、シアヌル酸を 0.125~10 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中のシアヌル酸濃度範囲に相当する。

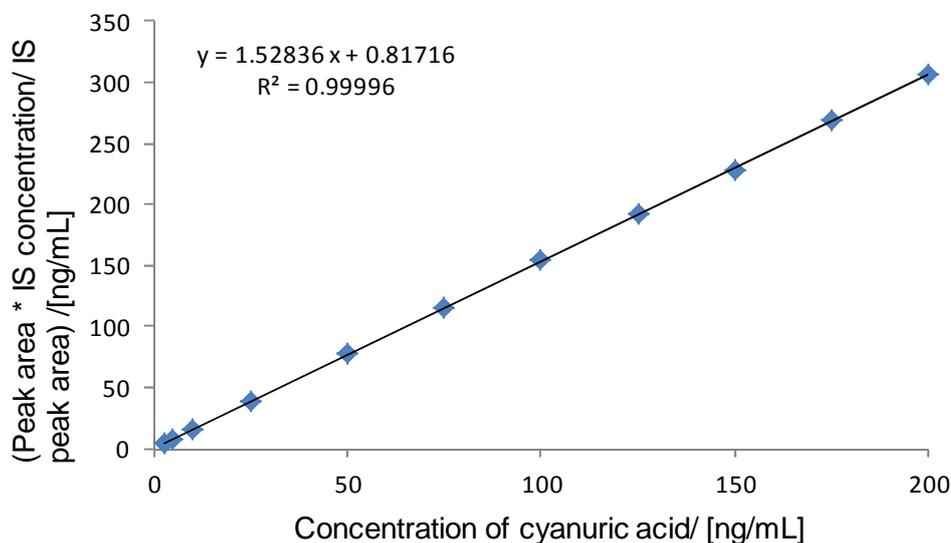


Fig. 2 Internal standard calibration curves of cyanuric acid by peak area

3.2 妨害物質の検討

鶏用配合飼料 2 検体 (ブロイラー肥育後期用及び成鶏飼育用), 豚用配合飼料 2 検体 (子豚育成用及び肉豚肥育用), 養魚用配合飼料 2 検体 (あゆ育成用及びあまご育成用), 大豆油かす 2 検体, 魚粉 2 検体, イカミール 2 検体, エビミール 2 検体及び脱脂粉乳 2 検体を用い, 2.4 により調製 (シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準液の添加は行わなかった.) した試料溶液を LC-MS/MS に注入し, 得られた SRM クロマトグラムを確認した. なお, 得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig 3-1 及び Fig 3-2 に示した. その結果, 全てシアヌル酸と同じ保持時間にピークが認められ (0.07~0.28 mg/kg), 定量イオンと確認イオンの比も標準液と同等であった. そこで, 2.5 に従ってカラム及びグラジエント条件を変更して確認を行ったところ, その定量値に大きな違いがなかったことから, シアヌル酸であると判断した. また, その他に定量を妨げるピークは認められなかった.

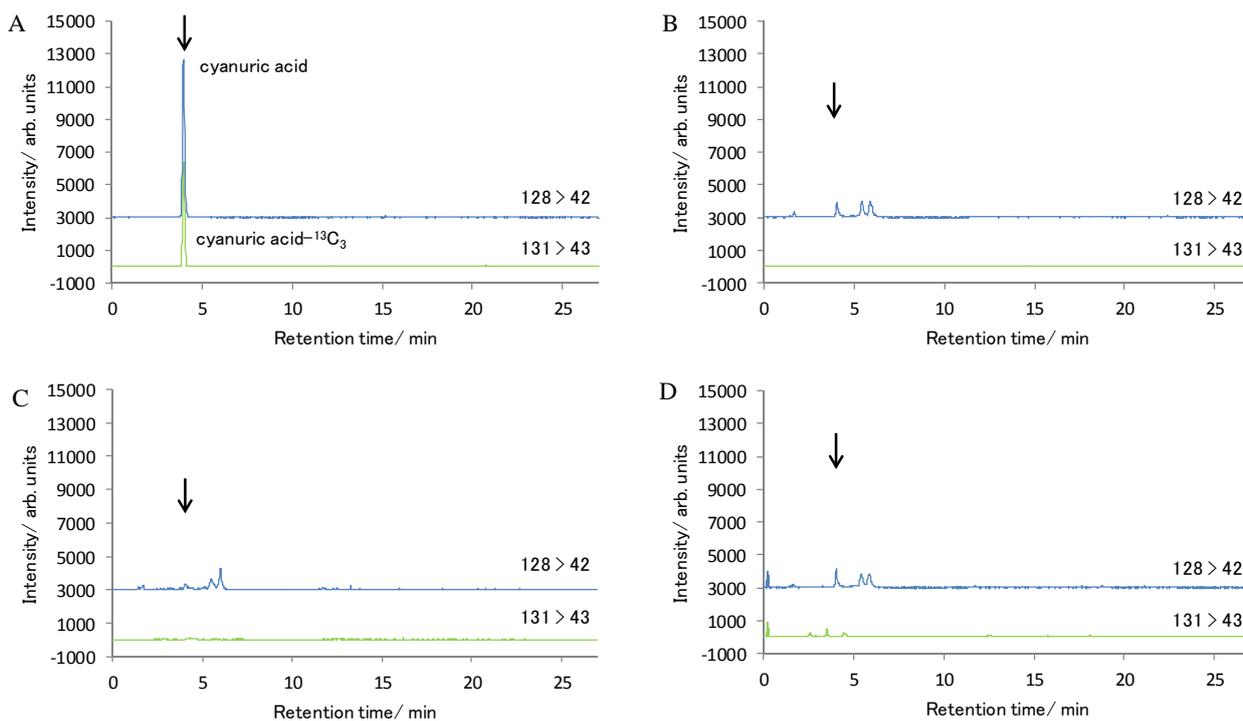


Fig. 3-1 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention times of cyanuric acid.)

A: Standard solution (10 ng/mL: 0.05 ng as cyanuric acid)

B~D: Blank sample solutions (B: formula feed for layer, C: formula feed for pork pig,

D: formula feed for oncorhynchus rhodurus)

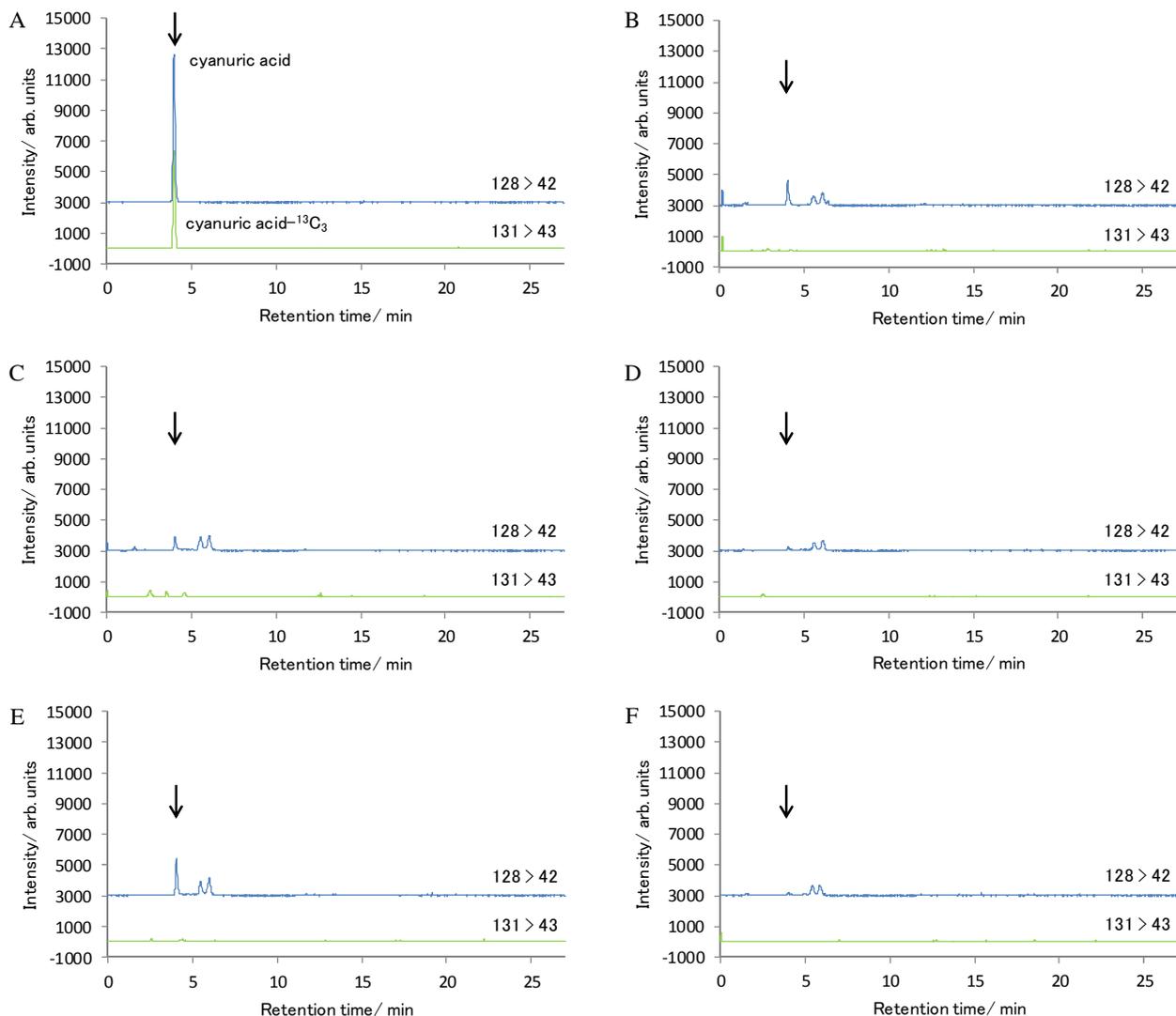


Fig. 3-2 SRM chromatograms of standard and blank sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention times of cyanuric acid.)

A: Standard solution (10 ng/mL: 0.05 ng as cyanuric acid)

B~F: Blank sample solutions (B: soybean meal, C: fish meal, D: squid meal, E: shrimp meal, F: powdered skim milk)

3.3 添加回収試験

2.6により添加回収試験を実施した。その結果はTable 4のとおり、脱脂粉乳を除く4試料の平均回収率は79.0~111%，その繰返し精度は相対標準偏差（ RSD_r ）として14%以下の成績が得られ、飼料分析基準別表3の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。

脱脂粉乳については、平均回収率は81.0~108%， RSD_r は31%以下の成績が得られ、妥当性確認法ガイドラインに定められた併行精度の目標値に対して超過するものがあつた。また、脱脂粉乳でのシアヌル酸- $^{13}C_3$ 回収率は31%以下と低かつた。これらのことから、脱脂粉乳の繰返し精度及びシアヌル酸- $^{13}C_3$ 回収率を改善するため、分析法の更なる検討が必要であると考えられた。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 4 Recoveries for cyanuric acid

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layers			Formula feed for oncorhynchus rhodurus		
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery of cyanuric acid- ¹³ C ₃ ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery of cyanuric acid- ¹³ C ₃ ^{a)} (%)
0.5	99.3	4.6	74.0	79.0	5.4	73.0
2.5	95.8	0.9	60.3	95.6	3.1	65.3

Spiked level (mg/kg)	Soybean meal			Fish meal		
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery of cyanuric acid- ¹³ C ₃ ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery of cyanuric acid- ¹³ C ₃ ^{a)} (%)
0.5	103	7.6	75.1	111	14	64.3
2.5	94.8	3.6	63.8	97.7	1.7	65.3

Spiked level (mg/kg)	Powdered skim milk		
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery of cyanuric acid- ¹³ C ₃ ^{a)} (%)
0.5	81.0	31	30.9
2.5	108	16	22.8

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

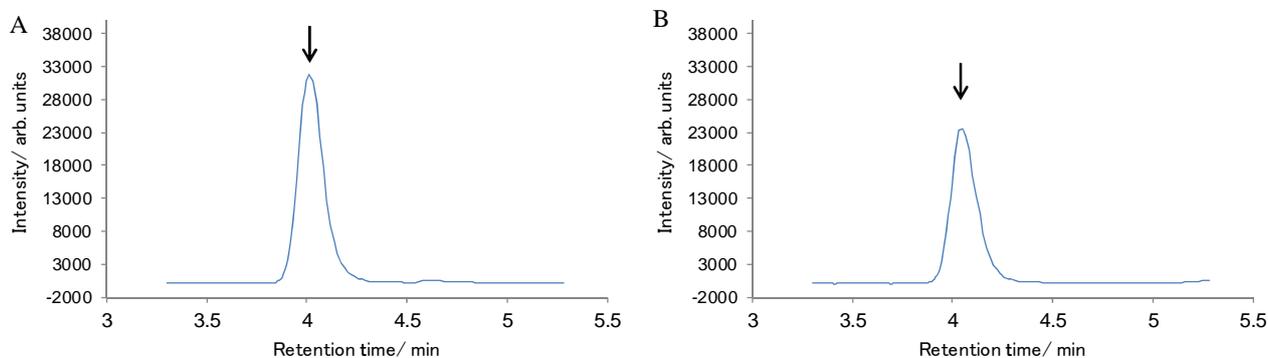


Fig. 4 SRM chromatograms on recovery test

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of cyanuric acid.)

A: Standard solution (50 ng/mL: 0.25 ng as cyanuric acid)

B: Sample solution of fish meal (spiked at 2.5 mg/kg of cyanuric acid (as 50 ng/mL in sample solution))

3.4 定量下限及び検出下限の検討

シアヌル酸検量線が直線性を示した範囲 2.5~200 ng/mL の下端付近となる濃度（試料中で 0.5 mg/kg 相当量（最終試料液中濃度 10 ng/mL 相当量））の添加回収試験の結果、得られたピークの SN 比が 10 以上であったため、シアヌル酸の定量下限の濃度は試料中で 0.5 mg/kg とした。

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた。その結果、検出下限は試料中で 0.15 mg/kg であった。

なお、Table 4 に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は脱脂粉乳を除いて良好であった。

4 まとめ

飼料中に残留するシアヌル酸について、FDA 法を基に、LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 検量線は 2.5~200 ng/mL (注入量として 0.0125~1 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、シアヌル酸を 0.125~10 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中のシアヌル酸濃度範囲に相当する。

- 2) 鶏用配合飼料 2 検体 (ブロイラー肥育後期用及び成鶏飼育用)、豚用配合飼料 2 検体 (子豚育成用及び肉豚肥育用)、養魚用配合飼料 2 検体 (あゆ育成用及びあまご育成用)、大豆油かす 2 検体、魚粉 2 検体、イカミール 2 検体、エビミール 2 検体及び脱脂粉乳 2 検体について、本法に従って得られたクロマトグラムを確認したところ、全てシアヌル酸と同じ保持時間にピークが認められたが、定量イオンと確認イオンの比が標準液と同等であったこと、カラム及びグラジェント条件を変更しても定量値に大きな違いが認められなかったことから、当該ピークはシアヌル酸であると判断した。また、その他に定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) 配合飼料 (成鶏飼育用及びあまご育成用)、大豆油かす、魚粉及び脱脂粉乳にシアヌル酸として 0.5 及び 2.5 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、脱脂粉乳以外の試料については、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。脱脂粉乳については、併行精度の目標値を満たさない結果となり、シアヌル酸-¹³C₃ の回収率も低い結果であったことから、分析法の更なる検討が必要であると考えられた。
- 4) 本法のシアヌル酸の定量下限は 0.5 mg/kg、検出下限は 0.15 mg/kg であった。

文 献

- 1) E. Braekevelt, B. P.-Y. Lau, S. Feng, C. Ménard and S. A. Tittlemier: Determination of melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid in infant formula purchased in Canada by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Addit Contam*, 28,698-704 (2011).
- 2) Sherri Turnipseed, Christine Casey, Cristina Nochetto and David N. Heller: Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues in Infant Formula using LC-MS/MS, *Laboratory Information Bulletin No. 4421*, 24,1-14 (2008), U.S. Food and Drug Administration.
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について、昭和 63 年 10 月 14 日、63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について、平成 20 年 4 月 1 日、19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) Michael Smoker and Alexnder J. Krynitsky: Interim Method for Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues In Foods using LC-MS/MS: Version 1.0, *Laboratory Information Bulletin No. 4422*, 1-26 (2008), U.S. Food and Drug Administration.

技術レポート

2 全脂粉乳及びこれを原料とする配合飼料中の粗脂肪の測定法の開発

安田 紗紀恵^{*1}, 鈴木 知華^{*2}, 沼田 歩美^{*1}Development of Crude Fat Measurement Method in Dried Whole Milk
and Dried Whole Milk-Based Formula FeedSakie YASUDA^{*1}, Chika SUZUKI^{*2} and Ayumi NUMATA^{*1}(*¹ Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),^{*2} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Sendai Regional Center, FAMIC))

We have investigated the applicability of Rose-Gottlieb (RG) method and acid hydrolysis and ether extraction (AH/EE) method for the measurement of crude fat in dried whole milk for feed and formula feed mainly composed of dried whole milk.

In the AH/EE method, a sample was transferred into a tall beaker, dissolved in hydrochloric acid (4:1), and heated in a water bath of 70 °C to 80 °C for 1 hour. The mixture was then transferred to a separating funnel, and the liberated fat was liquid-liquid extracted with diethyl ether. Having washed diethyl ether layer with water, the diethyl ether was evaporated. In the improved AH/EE method, we changed the amount of water for washing the diethyl ether layer from 20 mL to 60 mL. The residue was dried at 95 °C to 100 °C for 3 hours, and the crude fat was weighed.

In order to improve the operability of the RG method, we changed the container of extraction from a Majonnier flask to a separating funnel. A sample was transferred into a tall beaker, added with 8.5 mL of water and 1.5 mL of 28 v/v% ammonia water, and heated in a water bath of 60 °C to 70 °C for 15 minutes. The mixture was then transferred into a separating funnel. The tall beaker was washed with ethanol, diethyl ether and petroleum ether. Then the cleaning solution was transferred into the separating funnel for liquid-liquid extraction by shake. Subsequently, diethyl ether and petroleum ether layer were transferred into another tall beaker and evaporated. The residue was dried at 100 °C to 105 °C for 1 hour, and weighed as crude fat.

RG and improved AH/EE methods were applied to dried whole milk, formula feed mainly composed of dried whole milk, and reference material respectively. A comparative study of measured values of these methods was subsequently conducted. The result of the *t*-test was: $t(8) = 0.448$ and $p = 0.666$, which did not indicate any significant differences.

We also made the similar comparison between measured values which had been acquired by two different RG methods: the one using a Majonnier flask and the other using a separating funnel, both of which had been applied to the same materials mentioned above. The result of the *t*-test was: $t(6) = 2.153$ and $p = 0.075$, which did not indicate any significant differences.

Key words: crude fat; Rose-Gottlieb method; acid hydrolysis and ether extraction method; dried whole milk

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 仙台センター

キーワード：粗脂肪；レーゼ・ゴットリーブ法；酸分解ジエチルエーテル抽出法；全脂粉乳

1 緒 言

飼料中の粗脂肪の測定法としては、飼料分析基準¹⁾にジエチルエーテル抽出法及び酸分解ジエチルエーテル抽出法（以下「酸分解法」という。）が記載されており、現在、全脂粉乳については前者の適用となっている。しかし、全脂粉乳及び全脂粉乳を主原料とする配合飼料においてジエチルエーテル抽出法では十分に粗脂肪が抽出されないことが飼料製造業者から示唆され、酸分解法の適用拡大又は分析法の改良が要請されている。一方、全脂粉乳中の脂肪の測定法としては、アルカリ加水分解を行うレーゼ・ゴットリーブ法（以下「RG法」という。）がAOAC INTERNATIONAL²⁾等の国際的な標準分析法として広く用いられており、我が国の乳及び乳製品の成分規格等に関する省令³⁾（以下「乳等省令」という。）にも記載されている。このため、平成29年度に鈴木らは、RG法及び酸分解法の二法間の測定値の同等性及び二法の適用性の検討を行った⁴⁾。その結果、RG法に対する酸分解法の測定値の比は1.001~1.041であり、有意水準5%で二方法間の測定値に有意な差が認められた。酸分解法がRG法よりも高い測定値を示したことは、分解物が水とともにエーテル層に混入しているためと考えられた。そこで今回、酸分解法のエーテル層を洗浄する水の量を20 mLで3回から60 mLで3回に変更した方法とRG法の比較検討を行ったので、その概要を報告する。

また、RG法で分析を行う際の操作性の向上を目的とし、脂肪抽出容器をマジョニア管から分液漏斗に変更が可能かどうかについても併せて検討を行ったので、その概要についても報告する。

2 実験方法

2.1 試料

1 mmの網ふるいを通過した7種類の全脂粉乳及び3種類の全脂粉乳を主原料とする配合飼料を用いた。また、粉乳標準物質は、公益社団法人日本分析化学会が販売し、脂質としてRG法により値付けされている粉末状の調製粉乳（付与値19.26 g/100 g、不確かさ0.95 g/100 g）を用いた。

なお、検討に用いた配合飼料の例をTable 1に示した。

Table 1 Ingredients of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For suckling pigs 1	Animal products	98	Dried whole milk, whey protein concentrate, milk protein concentrate,
	Others	2	Dry yeast cell wall, lactic acid bacteria
For suckling pigs 2	Animal products	93	Dried whole milk, dried skim milk, dried whey,
	Others	7	Glucose, dry yeast cell wall, lactic acid bacteria, fructooligosaccharide syrup, silicon dioxide
For milk replacer for suckling calves	Animal products	95	Dried whole milk, dried skim milk,
	Others	5	Glucose, dry yeast cell wall, lactic acid bacteria

2.2 試薬

- 1) アンモニア水（質量分率 28 %），エタノール，塩酸，ジエチルエーテル，石油エーテル及びフェノールフタレインは特級を用いた。水は Milli-Q Integral 5（Merck Millipore 製）により精製した精製水（JIS K 0557 の A3 に分類される水）を用いた。
- 2) フェノールフタレイン試液
フェノールフタレイン 1 g をエタノールに溶かして 100 mL とした。

2.3 測定方法

- 1) マジョニア管使用 RG 法（以下「マジョニア管 RG 法」という。）

分析試料 1 g を正確に量ってマジョニア管に入れ、水 8.5 mL を加え、加温しながら振り混ぜて試料を溶かした後、アンモニア水 1.5 mL を加え、60~70 °C の水浴中でときどき振り混ぜながら 15 分間加熱した後放冷した。

エタノール 10 mL を加えて振り混ぜた後、フェノールフタレイン試液 3 滴及びジエチルエーテル 25 mL を加え、手で 1 分間激しく振り混ぜた。さらに、石油エーテル 25 mL を加え、同様に振り混ぜた後静置し、上層（ジエチルエーテル・石油エーテル層）を 200 mL のトールビーカー（あらかじめ 100~105 °C で 1 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの）に入れた。

マジョニア管にエタノール 4 mL を加え、手で 15 秒間激しく振り混ぜた。ジエチルエーテル 15 mL を加え、1 分間激しく振り混ぜ、更に石油エーテル 15 mL を加え、同様に振り混ぜた後静置し、上層を先のトールビーカーに加える操作を 2 回行った。

次に、先のトールビーカー内の溶媒を 75 °C 以下で除去し、100~105 °C で 1 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量り、試料中の粗脂肪量を算出した。

なお、測定法の概要を Scheme 1 に示した。

- 2) 分液漏斗使用 RG 法（以下「分液漏斗 RG 法」という。）

分析試料 1 g を正確に量って 100 mL のトールビーカーに入れ、水 8.5 mL を加え、ガラス棒でかき混ぜて試料を溶かした後、アンモニア水 1.5 mL を加えて時計皿で覆い、60~70 °C の水浴中でときどきかき混ぜながら 15 分間加熱した後放冷した。

先のトールビーカーの内容物を 200 mL の分液漏斗に入れ、トールビーカーをエタノール 10 mL で洗浄し、洗液を分液漏斗に加えて 1 分間激しく振り混ぜた後、フェノールフタレイン試液 3 滴を加えた。次に、ジエチルエーテル 25 mL でトールビーカーを洗浄し、洗液を分液漏斗に加え、1 分間激しく振り混ぜた。さらに、石油エーテル 25 mL でトールビーカーを洗浄し、洗液を分液漏斗に加え、同様に振り混ぜた後静置した。上層（ジエチルエーテル・石油エーテル層）を 5 mL の駒込ピペットでとり、200 mL のトールビーカー（あらかじめ 100~105 °C で 1 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの）に入れた。

先の分液漏斗にエタノール 4 mL を加え、15 秒間激しく振り混ぜた。ジエチルエーテル 15 mL を加え、1 分間激しく振り混ぜ、更に石油エーテル 15 mL を加え、同様に振り混ぜた後静置し、上層を先のトールビーカーに合わせる操作を更に 2 回行った。

次に、先のトールビーカー内の溶媒を 75 °C 以下で除去し、100~105 °C で 1 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量り、試料中の粗脂肪量を算出した。

なお、測定法の概要を Scheme 2 に示した。

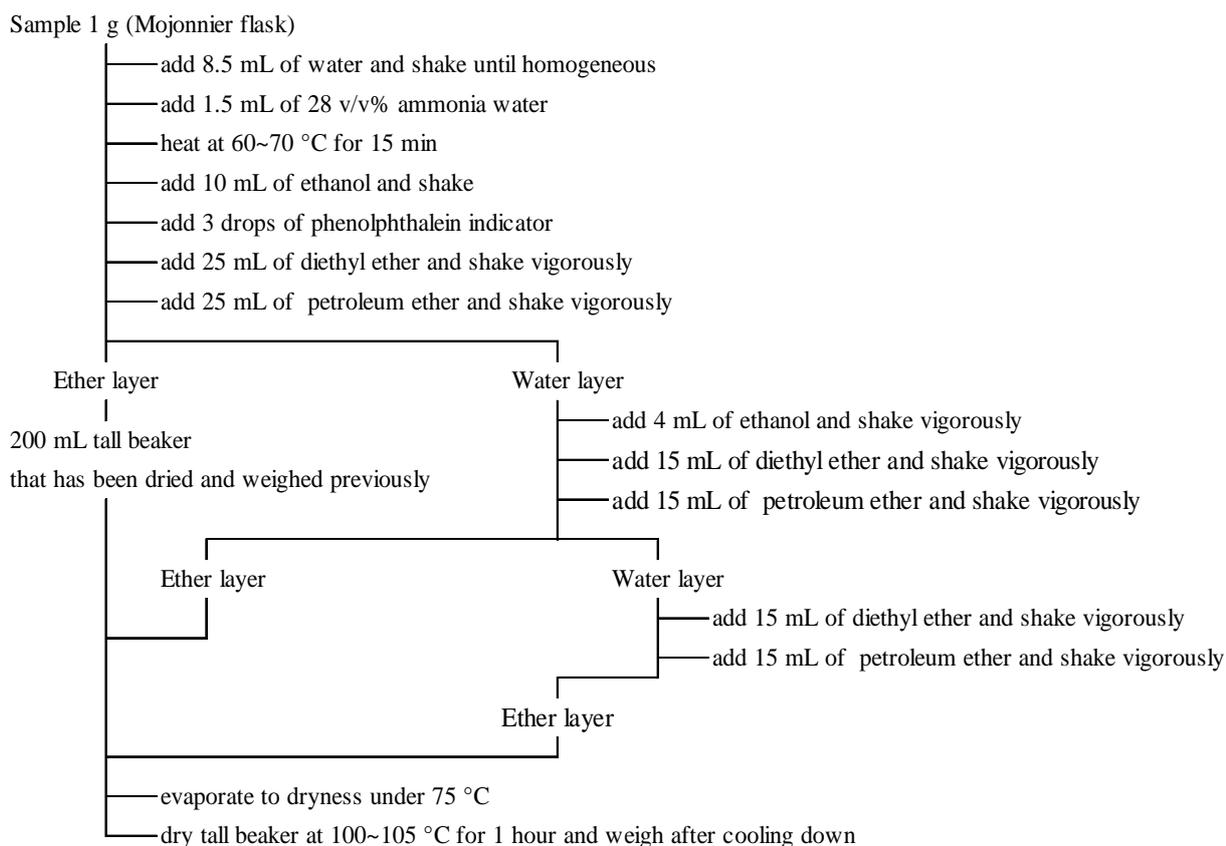
3) 酸分解法

飼料分析基準第3章 3.2の方法によった. エーテル層洗浄操作に用いる分液漏斗 B は, 規定どおり 300 mL 容のものを用いた.

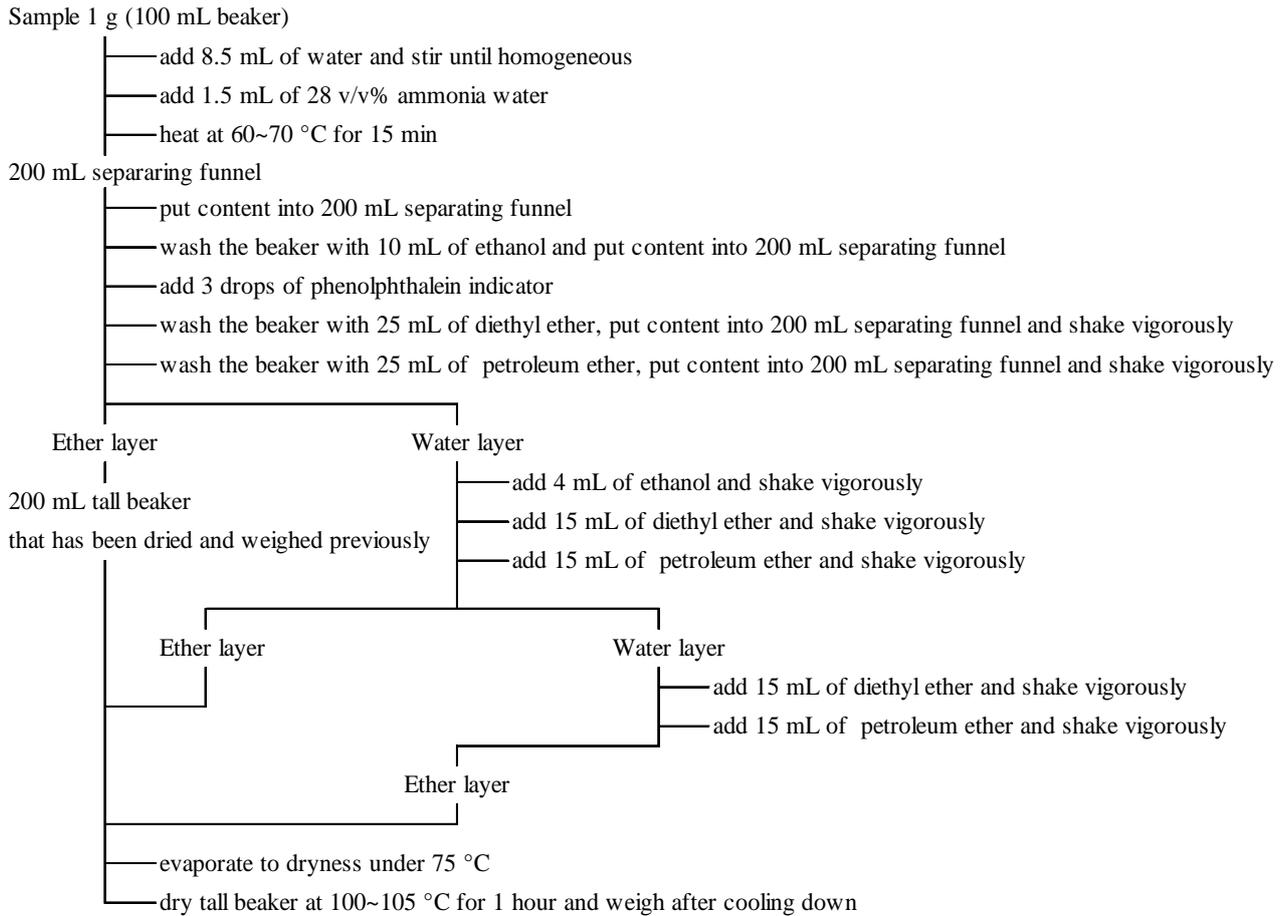
4) 酸分解法の洗浄水量を増やした方法 (以下「酸分解改良法」という.)

飼料分析基準第3章 3.2の方法から, エーテル層を洗浄する水の量を 20 mL で3回から 60 mL で3回に変更した. また, これに伴いエーテル層洗浄操作に用いる分液漏斗 B は, 500 mL 容のものに変更した.

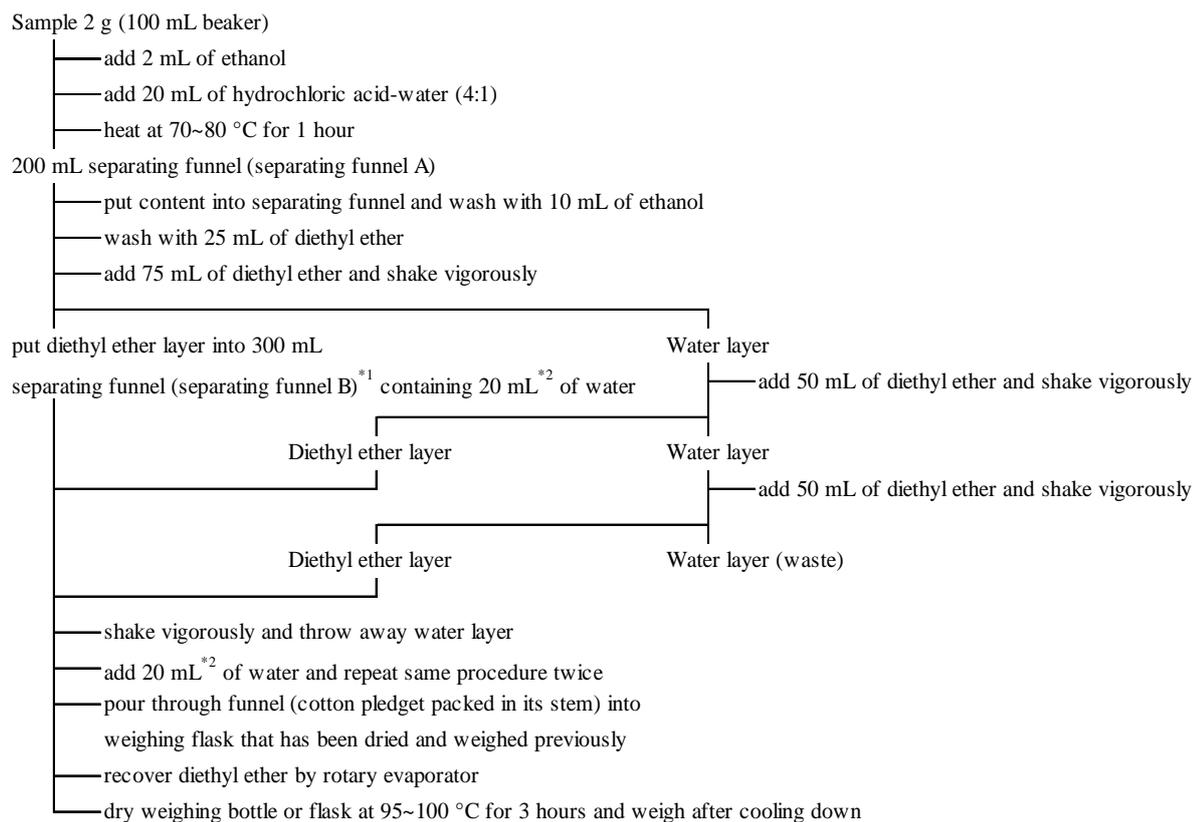
なお, 3) 及び 4) の測定法の概要を Scheme 3 に示した.



Scheme 1 Measurement procedure (Rose-Gottlieb method with Mojonnier flask)



Scheme 2 Measurement procedure (Rose-Gottlieb method with separating funnel)



*1: use a 500 mL separating funnel in the improving method

*2: wash the diethyl ether layer with 60 mL of water and repeat washing two more times

Scheme 3 Measurement procedure (acid hydrolysis and ether extraction method and its improving method)

3 結果及び考察

3.1 酸分解法のエーテル層洗浄水量の違いによる比較

鈴木らが行った酸分解法及び RG 法による測定値を比較した結果は、酸分解法が RG 法よりも高い測定値を示し、測定値に有意な差が認められた⁴⁾。この原因として、酸分解法では分解物が水とともにエーテル層に混入しているためと考えられたことから、酸分解法のエーテル層を洗浄する水の量を増やすことにより、残存する分解物を除去できないか確認することとした。そこで、洗浄する水の量を 2.3 の 4) に示した酸分解改良法のとおり変更し、Table 2 に示した 9 種類の試料の粗脂肪を RG 法及び酸分解改良法で測定して RG 法との比較検討を行った。

その結果は Table 2 のとおりであり、RG 法及び酸分解改良法による測定値について *t*-検定を行った結果、 $t(8) = 0.448$, $p = 0.666$ であり、有意な差は認められなかった。この結果から、酸分解法のエーテル層の洗浄を水 20 mL で 3 回から水 60 mL で 3 回に変更することにより、酸分解法では除去できなかった分解物が除去されているものと考えられた。

Table 2 Content of crude fat measured by Rose-Gottlieb method and acid hydrolysis and ether extraction method (improving method)

Sample types	Rose-Gottlieb method		Acid hydrolysis method (improving method)		Ratio of the measured value (acid hydrolysis method (improving method) /Rose-Gottlieb method)
	Crude fat ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Crude fat ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	
Dried whole milk 3	26.55	0.2	26.46	0.1	0.997
Dried whole milk 5	25.90	0.2	25.97	1.0	1.003
Dried whole milk 6	26.32	0.2	26.55	0.5	1.009
Dried whole milk 7	25.43	0.0	25.43	0.3	1.000
Dried whole milk 8	25.83	0.2	25.76	0.1	0.997
Formula feed for suckling pigs 1	20.86	0.4	20.89	0.5	1.001
Formula feed for suckling pigs 2	20.01	0.2	20.01	1.2	1.000
Formula feed for milk replacer for suckling calves	20.63	0.1	20.62	0.9	0.999
Reference material	20.18	0.4	20.16	0.0	0.999

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.2 RG法で使用する脂肪抽出容器の比較

鈴木らは、RG法の脂肪抽出容器としてマジョニア管を使用した。分析法の適用性を広げるために、酸分解法と同様に脂肪抽出容器として分液漏斗を使用する2.3の2)に示した分液漏斗RG法を検討した。7種類の試料の粗脂肪をマジョニア管RG法及び分液漏斗RG法で測定し比較した結果はTable 3のとおりであった。マジョニア管RG法及び分液漏斗RG法の測定値についてt検定を行った結果、 $t(6) = 2.153$ 、 $p = 0.075$ であり、有意な差は認められなかった。

Table 3 Rose-Gottlieb method with Majonnier flask and separating funnel

Sample types	Rose-Gottlieb method with Majonnier flask		Rose-Gottlieb method with separating funnel		Ratio of the measured value (Majonnier flask /separating funnel)
	Crude fat ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Crude fat ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	
Dried whole milk 1	25.46	0.1	25.31	0.2	1.006
Dried whole milk 3	26.55	0.2	26.50	0.2	1.002
Dried whole milk 4	26.43	0.2	26.14	0.2	1.011
Dried whole milk 5	25.90	0.2	25.87	0.2	1.001
Formula feed for suckling pigs 1	20.86	0.4	20.70	0.4	1.008
Formula feed for suckling pigs 2	20.01	0.2	20.11	0.2	0.995
Formula feed for milk replacer for suckling calves	20.63	0.1	20.46	0.1	1.009

以上の結果から、RG法及び酸分解改良法の二法間の測定値は同等であると考えられた。また、RG法で使用する脂肪抽出容器は、マジョニア管及び分液漏斗のいずれも使用可能であると考えられた。

これらのことから、RG法及び酸分解改良法のいずれも飼料分析基準への適用が可能であると考えられるが、既に飼料分析基準に収載され、国内の飼料分析に広く用いられている酸分解法を改良した酸分解改良法が、飼料分析基準への収載により適した方法であると考えられた。

4 まとめ

全脂粉乳及び全脂粉乳を主原料とする配合飼料において、RG法及び酸分解法の同等性を確認したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 酸分解法のエーテル層の洗浄を水 20 mL で 3 回から水 60 mL で 3 回に変更することにより RG法と同等の測定値が得られた。
- 2) RG法及び酸分解改良法による測定値について t -検定を行った結果、 $t(8) = 0.448$, $p = 0.666$ であり測定値に有意な差は認められなかった。
- 3) RG法について、マジョニア管を使用した場合と分液漏斗を使用した場合とを比較し t -検定を行った結果、 $t(6) = 2.153$, $p = 0.075$ であり測定値に有意な差は認められなかった。
- 4) RG法及び酸分解改良法のいずれも飼料分析基準への適用が可能であると考えられるが、既に飼料分析基準に収載され、国内の飼料分析に広く用いられている酸分解法を改良した酸分解改良法が、飼料分析基準への収載により適した方法であると考えられた。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 2) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th edition, AOAC official method 932.02 fat (crude) or ether extract in dried milk products. Gaithersburg, MD, USA.
- 3) 厚生省令：乳及び乳製品の成分規格等に関する省令，昭和 26 年 12 月 27 日，厚生省令第 52 号 (1951).
- 4) 鈴木 知華，安田 紗紀恵：全脂粉乳及びこれを原料とする配合飼料中の粗脂肪の測定法の開発，飼料研究報告，43，17-21 (2018).

技術レポート

3 飼料中のクロルプロファム及びフィプロニルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発

矢野 愛子*, 佐藤 憲大*, 土井 雄悟*, 榎原 良成*

Development of Determination Method of Chlorpropham and Fipronil in Feed by LC-MS/MS

Aiko YANO*, Norihiro SATO*, Yugo DOI* and Yoshinari SAKAKIBARA*

(* Fukuoka Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

We have developed a quantitative determination method of the concentration of chlorpropham and fipronil in feed using a liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Having added water to a sample, chlorpropham and fipronil were extracted with acetonitrile, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then purified with liquid-liquid partition and SPE column (InertSep GC/PSA, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), and injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of chlorpropham and fipronil. LC separation was then carried out on an ODS column (Capcell Pak C18 MG II, 2.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm, Osaka Soda Co. Ltd.; Osaka, Japan) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and 2 mmol/L ammonium acetate methanol solution as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) for chlorpropham, and the negative mode electrospray ionization (ESI-) for fipronil were respectively used.

Recovery tests were conducted on formula feeds for layers and suckling pigs, barley, wheat, corn, alfalfa hay, rice straw and whole-crop rice silage (WCRS). Chlorpropham was intentionally added at the levels of 0.01 and 0.4 mg/kg for formula feed for layers, 0.01 and 0.2 mg/kg for formula feed for suckling pigs, 0.008 and 0.04 mg/kg for barley, 0.008 and 0.02 mg/kg for wheat, and 0.02 and 0.05 mg/kg for corn respectively. Fipronil was intentionally added at the levels of 0.01 and 0.02 mg/kg for formula feed for layers, 0.0008 and 0.002 mg/kg for wheat, 0.008 and 0.02 mg/kg for corn, 0.04 and 0.2 mg/kg for alfalfa hay, 0.2 mg/kg for rice straw, and 0.018 and 0.11 mg/kg for WCRS in original matter respectively. The resulting mean recoveries ranged from 84.7 % to 101 % and the repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 8.5 % for chlorpropham, and the mean recoveries ranged from 81.3 % to 90.0 % and RSD_r was less than 8.9 % for fipronil except in rice straw. The mean recovery was 44.8 % and RSD_r was 12 % for fipronil in rice straw.

Key words: chlorpropham; fipronil; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); barley; wheat; corn; alfalfa hay; rice straw; whole-crop rice silage

キーワード：クロルプロファム；フィプロニル；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；大麦；小麦；とうもろこし；アルファルファ乾草；稲わら；稲発酵粗飼料

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

1 緒 言

クロルプロファムはカーバメート系の除草剤及び植物成長調整剤であり、細胞分裂阻害作用により殺草効果を示すと考えられている¹⁾。海外においてはジャガイモの保存・輸送中の発芽抑制剤として収穫後に使用されている。我が国では1954年に初回農薬登録され、適用農作物等は麦、雑穀、野菜、豆及び花き等である¹⁾。飼料中の基準値としては、大麦、小麦、とうもろこし及びライ麦で0.05 mg/kgと設定されている²⁾。飼料中のクロルプロファムの分析法としては、飼料分析基準³⁾において、アルカリ熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフを用いた系統的分析法及びガスクロマトグラフ質量分析計を用いた一斉分析法が記載されており、定量下限はそれぞれの分析法について0.02及び0.05 mg/kgである。

フィプロニルは、フェニルピラゾール系の殺虫剤であり、昆虫に対して神経興奮抑制を阻害することにより殺虫作用を示すと考えられている⁴⁾。我が国では1996年に初回農薬登録され、適用農作物等は水稻及び野菜等である⁴⁾。飼料中の基準値としては、牛、めん羊、山羊及びしか用配合飼料並びに豚用配合飼料で0.02 mg/kg、鶏及びうずら用配合飼料で0.01 mg/kg、牧草で0.2 mg/kg、稲わらで0.2 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で0.1 mg/kgと設定されている^{2) 5)}。飼料中のフィプロニルの分析法としては、飼料分析基準においてガスクロマトグラフ質量分析計を用いた一斉分析法が記載されており、定量下限は0.01 mg/kgである。

現在、飼料中のクロルプロファム及びフィプロニルについて、設定基準値及び対象飼料の見直しが検討されており、基準値に対して十分な精確さを持つ分析法の開発が急務となっている。

今回、農林水産省の平成29年度生産資材安全確保対策委託事業（飼料中の農薬分析法開発委託事業）において、一般財団法人日本食品検査が開発した分析法⁶⁾（以下「JFIC法」という。）を基に、飼料中のクロルプロファム及びフィプロニルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の飼料分析基準への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考にクロルプロファム及びフィプロニルの構造式等をFig. 1に示した。

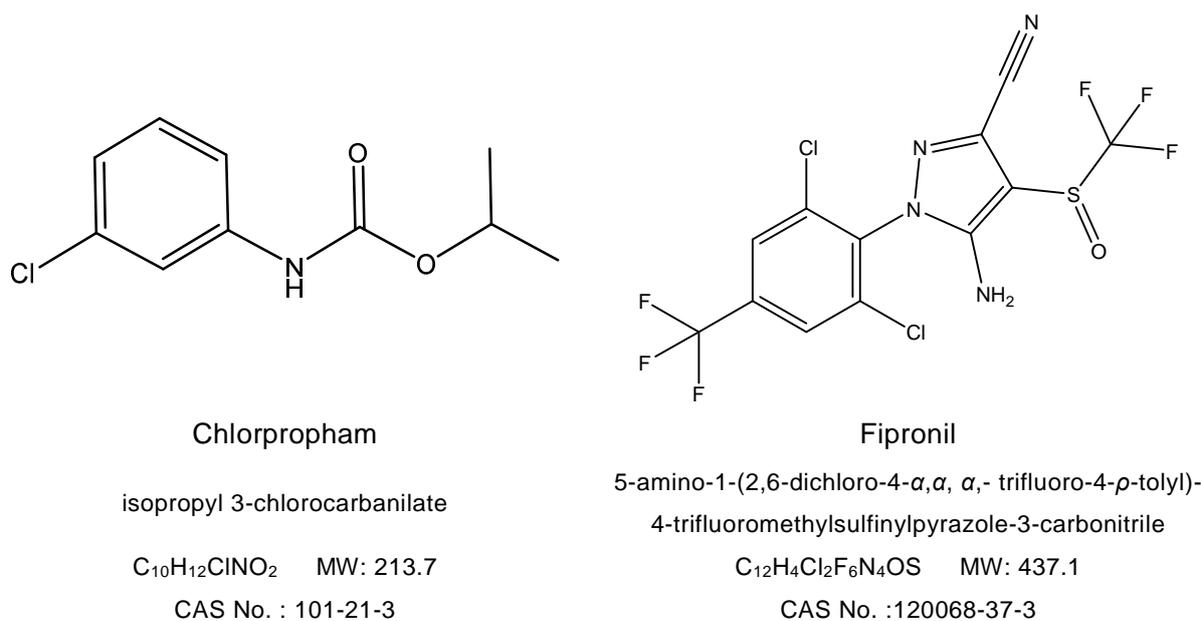


Fig. 1 Chemical structures of chlorpropham and fipronil

2 実験方法

2.1 試料

配合飼料（成鶏飼育用，ほ乳期子豚育成用，子豚育成用，乳用牛飼育用及び肉用牛肥育用），大麦，小麦，とうもろこし，ライ麦，ポテトグルテンフィード，アルファルファ乾草，チモシー乾草及び稲わらはそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。WCRS は 60 °C で 10 時間乾燥後，更に室内に静置して風乾した後，同様に粉碎した。

なお，検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For layers	Grains	61	Corn
	Brans	1	Rice bran
	Oil seed meal	22	Soybean meal, corn gluten meal, rapeseed meal
	Animal by-products	6	Pork and chicken meal, fish meal, feather meal
	Others	10	Calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, oyster shell, feed additives
For suckling pigs	Grains	62	Corn, bread meal, wheat flour, roasted soybean flour
	Oil seed meal	10	Fermented soybean meal, concentrated soybean protein, soybean meal
	Animal by-products	15	Dried whey, fish meal, concentrated whey protein
	Others	13	Confectionery meal, calcium phosphate, animal oil, glucose, lactose, calcium carbonate, feed additives
For growing pigs	Grains	72	Corn, wheat
	Brans	3	Bran
	Oil seed meal	21	Soybean meal, corn germ meal
	Others	4	Calcium carbonate, animal oil, molasses, salt, calcium phosphate, garlic powder, feed additives
For dairy cattle	Grains	37	Corn, barley, rice, wheat flour
	Brans	33	Bran, rice bran, Corn gluten feed, poteto gluten feed
	Oil seed meal	26	Rapeseed meal, soybean meal
	Others	4	Molasses, calcium carbonate, feed additives
For beef cattle	Grains	81	Corn, barley
	Brans	13	Poteto gluten feed, bran
	Oil seed meal	3	Rapeseed meal, soybean meal
	Others	3	Molasses, calcium carbonate, beer yeast, feed additives

2.2 試薬

1) アセトニトリル，アセトン及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノールは LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。塩化ナトリウム，酢酸，酢酸ナトリウム（無水），リン酸水素二カリウム，リン酸二水素カリウム及び硫酸ナトリウム（無水）は試薬特級を用いた。1 mol/L 酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。水は Ultra Pure Water System RFU354BA（東洋製作所製）により精製した超

純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。

2) 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0)

リン酸水素二カリウム 52.7 g 及びリン酸二水素カリウム 30.2 g を量り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とした。

3) 0.5 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 5.0)

酢酸 2.41 mL 及び酢酸ナトリウム (無水) 6.84 g を量り、水約 200 mL に溶解し、1 mol/L 塩酸を用いて pH を 5.0 に調整した後、水を加えて 250 mL とした。

4) クロロプロファム標準原液

クロロプロファム標準品 (Sigma-Aldrich 製, 純度 99.4 %) 20 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてクロロプロファム標準原液を調製した (この液 1 mL は、クロロプロファムとして 0.2 mg を含有する。).

5) フィプロニル標準原液

フィプロニル標準品 (富士フィルム和光純薬製, 純度 99.4 %) 20 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてフィプロニル標準原液を調製した (この液 1 mL は、フィプロニルとして 0.2 mg を含有する。).

6) 混合標準液

クロロプロファム標準原液 10 mL 及びフィプロニル標準原液 1 mL を 200 mL の全量フラスコに入れて混合し、更に標線までメタノールを加えて混合標準原液を調製した (この液 1 mL は、クロロプロファムとして 10 µg 及びフィプロニルとして 1 µg を含有する。).

使用に際して、混合標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にクロロプロファムとして 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100 ng, フィプロニルとして 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8 及び 10 ng を含有する各混合標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

1) 粉砕機 :

粉砕機 1 (配合飼料, とうもろこし及び麦類用) : ZM-100 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)

粉砕機 2 (乾牧草, 稲わら及び WCRS 用) : SM-100 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm)

2) 振とう機 : レシプロシェーカー SR-2DW タイテック製 (使用時振とう数 300 rpm)

3) ろ紙 : 5 種 B 桐山製作所製

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 (以下「ミニカラム」という。) : InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg) ジーエルサイエンス製

5) メンブランフィルター : DISMIC-25HP (孔径 0.20 µm, 直径 25 mm, 親水性 PTFE) 東洋ろ紙製

6) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部 : ACQUITY TQ Detector Waters 製

7) 多孔性ケイソウ土カラム (以下「ケイソウ土カラム」という。) : Chem Elut カートリッジ (20 mL 保持用) Agilent Technologies 製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g (乾牧草, 稲わら及び WCRS は 5.0 g) を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ, 水 15 mL を加え, 30 分間静置後, 更にアセトニトリル 100 mL を加え, 30 分間振り混ぜて抽出した. 200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き, 抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後, 先の三角フラスコ及び残さを順次アセトニトリル 50 mL で洗浄し, 同様に吸引ろ過した. さらに全量フラスコの標線までアセトニトリルを加えた. この液 20 mL を, 液液分配に供する試料溶液とした.

2) 液液分配

試料溶液 20 mL をあらかじめ塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 mL を入れた 100 mL の分液漏斗に正確に加え, 10 分間振り混ぜた後静置し, アセトニトリル層 (上層) を 100 mL の三角フラスコに入れた. アセトニトリル層を適量の硫酸ナトリウム (無水) で脱水し 100 mL のなす形フラスコにろ紙 (5 種 B) でろ過した後, 先の三角フラスコ及びろ紙を順次少量のアセトニトリルで洗浄し, ろ液を合わせた. ろ液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した. ヘキサン 2 mL を加えて残留物を溶かし, カラム処理に供する試料溶液とした.

3) カラム処理

ミニカラムをアセトン 10 mL 及びヘキサン 10 mL で順次洗浄した. 試料溶液をミニカラムに入れ, 液面が充てん剤の上端に達するまで自然流下させた. 試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 5 mL ずつで 2 回洗浄し, 洗液を順次ミニカラムに加え, 同様に流出させた. 50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き, ヘキサン-アセトン (4+1) 15 mL をミニカラムに加えてクロルプロファム及びフィプロニルを溶出させた. 溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した. メタノール 1 mL (乾牧草, 稲わら及び WCRS にあっては 10 mL) を正確に加えて残留物を溶かした後メンブランフィルターでろ過し, LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした.

4) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各混合標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し, 選択反応検出 (SRM) クロマトグラムを得た. 測定条件を Table 2 及び 3 に示した.

Table 2 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Capcell Pak C18 MGII (2.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm), Osaka soda
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate solution - 2 mmol/L ammonium acetate methanol solution (7:3) (hold for 0.2 min) → 12.5 min → (5:95) (hold for 2.5 min) → 2 min → (7:3) (hold for 12 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive (chlorpropham), Negative (fipronil)
Source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ (700 L/h, 350 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)
Capillary voltage	Positive: 3.0 kV, Negative: 2.5 kV

Table 3 MS/MS parameters

Target	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
			Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)		
Chlorpropham	+	214	172	—	20	10
			—	154	20	20
Fipronil	-	435	330	—	25	15
			—	250	25	30

5) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中のクロルプロファム量及びフィプロニル量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

- Sample 10.0 g (5.0 g for grass hay, rice straw and whole-crop rice silage (WCRS)) (200 mL Erlenmeyer flask)
- add 15 mL of water and allow to stand for 30 min
 - add 100 mL of acetonitrile and shake for 30 min
 - filter through filter paper (No. 5B of JIS P3801) under reduced pressure
 - wash with 50 mL of acetonitrile
 - fill up to 200 mL with acetonitrile
- Transfer 20 mL of sample solution to a 100 mL separating funnel
- add 20 mL of 0.5 mol/L phosphate buffer (pH 7.0) and 10 g of sodium chloride
 - shake for 10 min and allow to stand for a while
 - discard the water layer and transfer the acetonitrile layer to a 100 mL Erlenmeyer flask
 - add some amount of sodium sulfate and dehydrate the acetonitrile layer
 - filtrate to a 100 mL eggplant flask
 - wash the Erlenmeyer flask with acetonitrile and filtrate to the eggplant flask
 - evaporate to dryness under 40 °C
 - dissolve in 2 mL of hexane
- GC/PSA column (500 mg/500 mg)
- prewash with 10 mL of acetone and 10 mL of hexane
 - apply sample solution and let it flow out
 - wash the eggplant flask and elute with 5 mL of hexane (twice)
 - set a receiver (50 mL eggplant flask)
 - elute with 15 mL of hexane-acetone (4:1)
 - evaporate to dryness under 40 °C
 - dissolve in 1 mL of methanol (10 mL for grass hay, rice straw and WCRS)
 - filtrate through hydrophilic PTFE membrane filter (pore size: 0.2 μm)

LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for chlorpropham and fipronil

2.5 ケイソウ土カラムによる精製方法（以下「ケイソウ土カラム法」という。）

ほ乳期子豚育成用配合飼料 10.0 g を 200 mL の共栓三角フラスコに秤量した。抽出操作は 2.4 の 1)と同様に行い、ろ液を 300 mL のなす形フラスコで受けた。試料溶液を 40 °C 以下の水浴で約 15 mL になるまで減圧濃縮し、試料溶液の全量をケイソウ土カラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 5 mL で洗浄し、洗液をケイソウ土カラムに負荷した。5 分間静置した後、ヘキサン-酢酸エチル (1+1) 計 100 mL で溶出し、溶出液を 300 mL のなす形フラスコで受けた。溶出液を 40 °C 以下の水浴で減圧濃縮後、窒素ガスを送って乾固した。ヘキサン 2 mL を加えて残留物を溶かし、以降のカラム精製操作は 2.4 の 3)と同様に行った。

なお、ケイソウ土カラム法では最終試料溶液濃度が JFIC 法の 10 倍となるため、検量線の濃度範囲内に収まるようメタノールで適宜希釈し、LC-MS/MS による測定に供した。

2.6 添加回収試験

2.2 の 4)~5)のクロルプロファム標準原液及びフィプロニル標準原液をメタノールで正確に希釈し添加に用いた。

1) クロルプロファム

クロルプロファムとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.01 及び 0.4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 400 ng/mL）、ほ乳期子豚育成用配合飼料に 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試

料溶液中で 10 及び 200 ng/mL 相当量), 大麦に 0.008 及び 0.04 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 8 及び 40 ng/mL 相当量), 小麦に 0.008 及び 0.02 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 8 及び 20 ng/mL 相当量), とうもろこしに 0.02 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 20 及び 50 ng/mL 相当量) になるようにそれぞれ添加後よく混合し, 一夜静置した後に本法に従って定量し, 平均回収率及び繰返し精度を求めた. なお, 検量線範囲を超える添加濃度については, 検量線の濃度範囲内に収まるよう最終試料溶液をメタノールで適宜希釈して測定した.

2) フィプロニル

フィプロニルとして, 成鶏飼育用配合飼料に 0.01 及び 0.02 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 10 及び 20 ng/mL 相当量), 小麦に 0.0008 及び 0.002 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.8 及び 2 ng/mL 相当量), とうもろこしに 0.008 及び 0.02 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 8 及び 20 ng/mL 相当量), アルファルファ乾草に 0.04 及び 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 2 及び 10 ng/mL 相当量), 稲わらに 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 10 ng/mL), WCRS には原物換算して 0.018 及び 0.11 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.9 及び 5.5 ng/mL 相当量) になるようにそれぞれ添加後よく混合し, 一夜静置した後に本法に従って定量し, 平均回収率及び繰返し精度を求めた. WCRS への添加は風乾物試料に対してフィプロニルとして, 0.04 及び 0.25 mg/kg 相当量になるように行い, 原物中濃度への換算は, 原物中及び風乾物中の水分含有量を 60% 及び 10% と想定して, 原物 (水分含有量 60%) 中濃度 = 風乾物 (水分含有量 10%) 中濃度 / 2.25 の式により行った. なお, 検量線範囲を超える添加濃度については, 検量線の濃度範囲内に収まるよう最終試料溶液をメタノールで適宜希釈して測定した.

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 6) に従って調製した各混合標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し, 得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した. 得られた検量線の一例は Fig. 2-1 及び Fig. 2-2 のとおりであり, クロルプロファムは 1~100 ng/mL (注入量として 0.005~0.5 ng 相当量) 及びフィプロニルは 0.1~10 ng/mL (注入量として 0.0005~0.05 ng 相当量) の範囲で直線性を示した.

なお, 当該検量線の濃度範囲は, クロルプロファムを 0.001~0.1 mg/kg 及びフィプロニルを 0.0001~0.01 mg/kg 含有する分析用試料 (乾牧草, 稲わら及び WCRS にあってはフィプロニルを 0.002~0.2 mg/kg 含有する分析用試料) を本法に従い調製した最終試料溶液中の各濃度範囲に相当する.

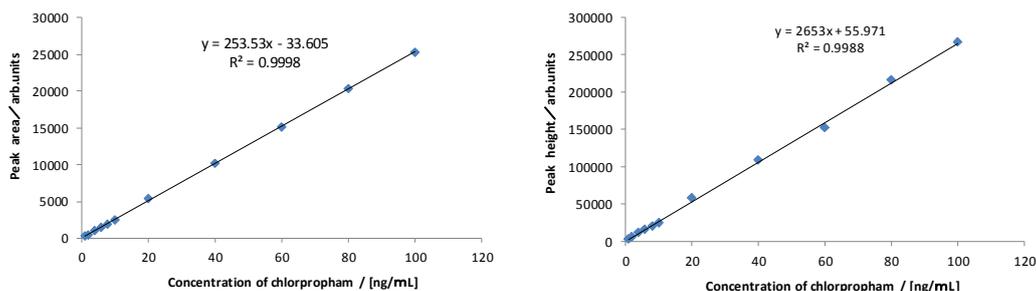


Fig. 2-1 Calibration curves of chlorpropham by peak area (left) and peak height (right)

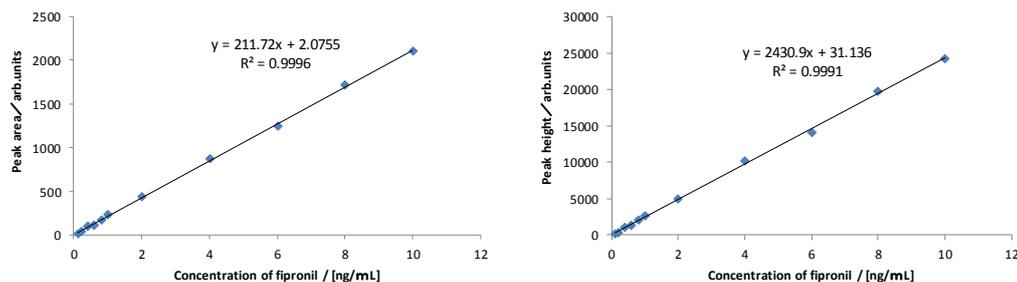


Fig. 2-2 Calibration curves of fipronil by peak area (left) and peak height (right)

3.2 ケイソウ土カラム法による添加回収試験

JFIC 法では精製過程の液液分配で分液漏斗を使用しているが、分液漏斗の使用は、分析技術の習熟を必要とし個人差による分析値のばらつき的重要因素となり得るため、飼料分析基準収載の「農薬のガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法」（以下「農薬一斉法」という。）で使用するケイソウ土カラムを用いて分液漏斗による操作を簡略化できるか検討した。ケイソウ土カラムによる精製方法は、農薬一斉法を参考に、2.5の方法で行った。

試料 10.0 g に対して、クロルプロファムとして 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2000 ng/mL）、フィプロニルとして 0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 200 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後にケイソウ土カラム法により分析を実施した。ケイソウ土カラム法による添加回収試験を行った結果を Table 4 にまとめた。フィプロニルは良好な回収率を示したが、クロルプロファムは低回収率であった。

Table 4 Recoveries of pesticides using diatomaceous earth column

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Formula feed for suckling pigs
		Recovery (%)
Chlorpropham	0.2	10.0
Fipronil	0.02	95.1

n = 1

ケイソウ土カラムによる精製操作は農薬一斉法でも行われているが、同法の検討時に実施された添加回収試験におけるクロルプロファムの回収率は全て 100 % を超える結果である。このため、クロルプロファム低回収率の原因は、ケイソウ土カラム及び 2.4 の 3) のカラム処理以降の精製

方法によって除けなかった夾雑物の影響と考えられた。

また、ケイソウ土カラム法で調製した試料溶液を LC-MS/MS で測定後、標準液のピークが割れるあるいはテーリングすることがあった。ケイソウ土カラム法で調製した試料溶液中に残留する夾雑物が LC カラムに悪影響を及ぼしている可能性があるため、精製操作又は希釈操作の追加を検討する必要があると考えられた。

3.3 液液分配における転溶の確認

とうもろこしを用いて 2.4 の 1)により調製した試料溶液 20 mL にクロルプロファム 100 ng (0.1 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 100 ng/mL 相当量) 及びフィプロニル 10 ng (0.01 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量) を加え, 2.4 の 2)から 3)により操作し, 液液分配における転溶の確認を行った。なお, 1 回目の液液分配で分離した水層にアセトニトリルを再度加えることにより, 2 回目の確認を行った。その結果 Table 5 のとおり, クロルプロファム及びフィプロニルは 1 回の液液分配により回収できることを確認した。

Table 5 Recoveries of the pesticides on liquid-liquid partition in corn matrix

Pesticide	Recovery (%)		
	Acetonitrile		Total
	First 20 mL	Second 20 mL	
Chlorpropham	89.0	0.0	89.0
Fipronil	91.0	0.0	91.0

n = 1

3.4 ミニカラムからの溶出画分の確認

とうもろこしを用いて 2.4 の 1)から 2)により調製した試料溶液にクロルプロファム 100 ng (0.1 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 100 ng/mL 相当量) 及びフィプロニル 10 ng (0.01 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量) を加え, 2.4 の 3)により操作してミニカラムからの溶出画分の確認を行った。Table 6 のとおり, クロルプロファム及びフィプロニルはヘキサンによっては溶出せず, ヘキサン-アセトン (4+1) 15 mL により溶出することを確認した。

Table 6 Elution pattern of the pesticides in corn matrix using InertSep GC/PSA

Pesticide	Recovery (%)						Total
	Hexane		Hexane-acetone (4:1)				
	0~ 5 mL	5~ 10 mL	0~ 5 mL	5~ 10 mL	10~ 15 mL	15~ 20 mL	
Chlorpropham	0.0	0.0	93.4	1.2	0.0	0.0	94.6
Fipronil	0.0	0.0	87.0	1.5	0.0	0.0	88.5

n = 1

3.5 妨害物質の検討

配合飼料 (成鶏飼育用, ほ乳期子豚育成用, 子豚育成用, 乳用牛飼育用及び肉用牛肥育用), 大麦, 小麦, とうもろこし, ライ麦, ポテトグルテンフィード, アルファルファ乾草, チモシー

乾草、稲わら及び WCRS を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においてもクロルプロファム及びフィプロニルの定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3-1 及び Fig. 3-2 に示した。

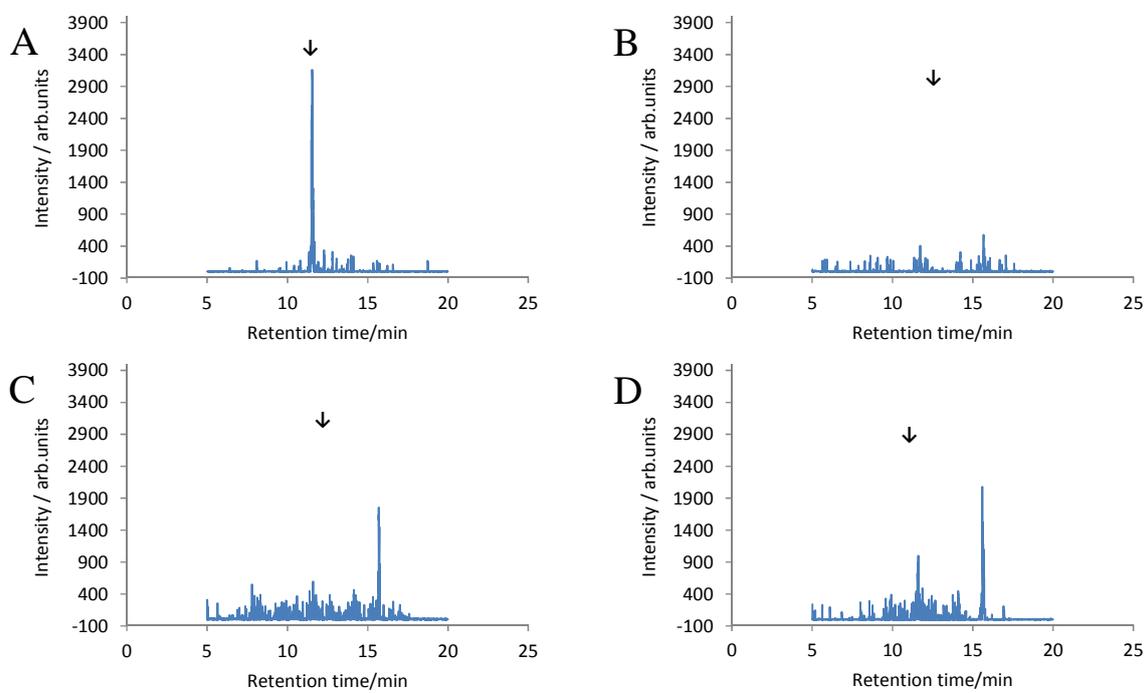


Fig. 3-1 Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention time of chlorpropham.)

- A: Standard solution (1 ng/mL as chlorpropham)
- B: Blank sample solution (formula feed for layers)
- C: Blank sample solution (barley)
- D: Blank sample solution (corn)

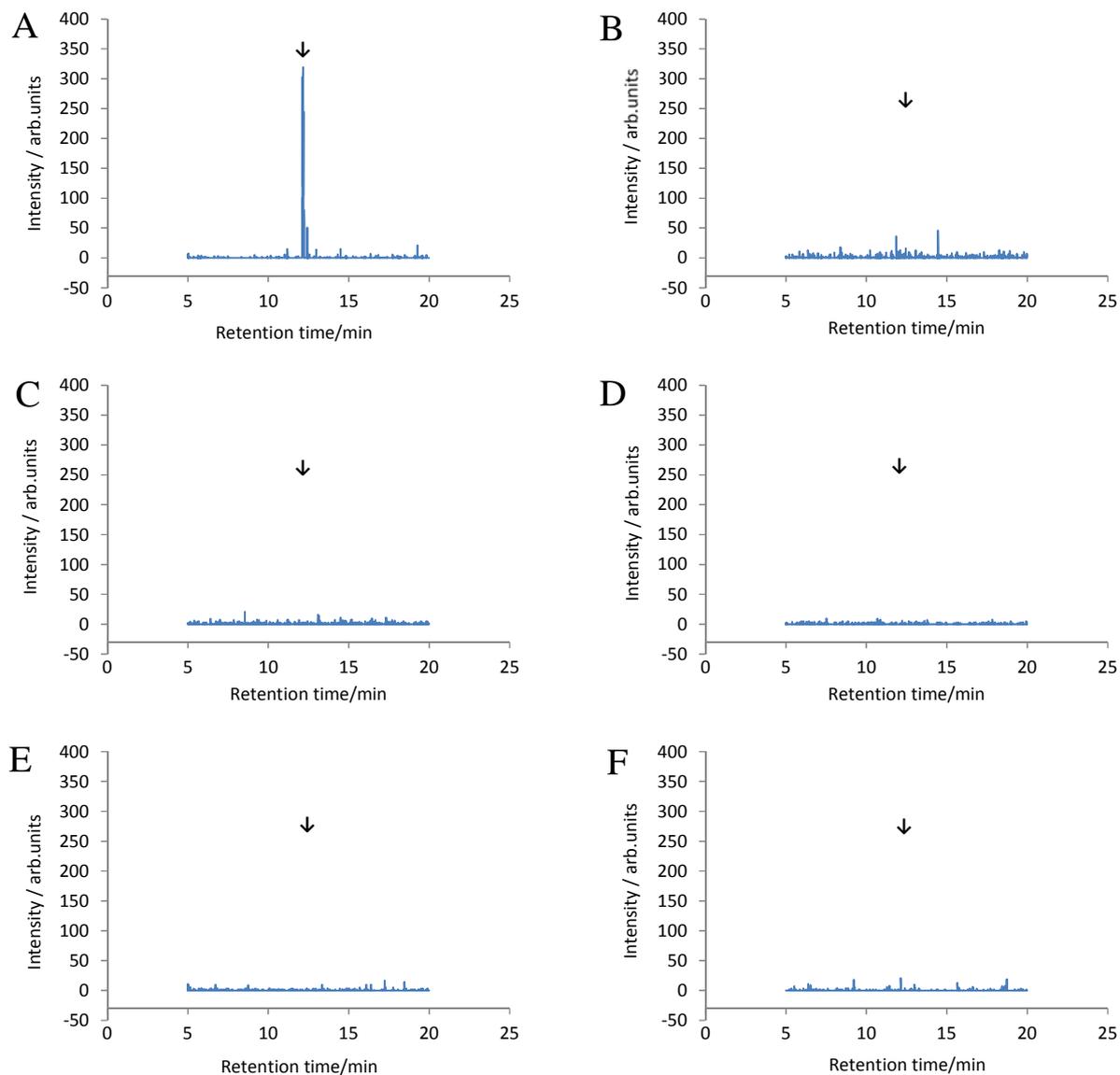


Fig. 3-2 SRM chromatograms of standard and blank sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention time of fipronil.)

- A: Standard solution (0.1 ng/mL as fipronil)
- B: Blank sample solution (formula feed for layers)
- C: Blank sample solution (barley)
- D: Blank sample solution (corn)
- E: Blank sample solution (alfalfa hay)
- F: Blank sample solution (rice straw)

3.6 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 3)により調製した小麦及びとうもろこしのブランク試料溶液にクロルプロファムとして 0.02 及び 0.025 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 20 及び 25 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について, 2.2 の 6)に従って調製した同濃度の各農薬標準液に対するピーク面積比を確認したところ, Table 7 のとおりであった. また, 同様に調製した小麦, と

うもろこし、アルファルファ乾草及び稲わらのブランク試料溶液にフィプロニルとして 0.002, 0.01, 0.4 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2, 10, 20 及び 10 ng/mL 相当量）をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について、2.2 の 6) に従って調製した同濃度の各農薬標準液に対するピーク面積比を確認したところ、Table 8 のとおりであった。各農薬は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

Table 7 Matrix effect to chlorpropham

Matrix	Concentration of chlorpropham		Matrix effect ^{b)} (%)
	in the matrix solution (ng/mL)	in the sample ^{a)} (mg/kg)	
Wheat	20	0.02	103
Corn	25	0.025	99

$n = 1$

a) Converted from the concentration in the matrix solution

b) Ratio of the peak area of chlorpropham in the presence of matrix to that in the absence of matrix

Table 8 Matrix effect to fipronil

Matrix	Concentration of fipronil		Matrix effect ^{b)} (%)
	in the matrix solution (ng/mL)	in the sample ^{a)} (mg/kg)	
Wheat	2	0.002	101
Corn	10	0.01	99
Alfalfa hay	20	0.4	91
Rice straw	10	0.2	102

$n = 1$

a) Converted from the concentration in the matrix solution

b) Ratio of the peak area of fipronil in the presence of matrix to that in the absence of matrix

3.7 添加回収試験

1) クロルプロファム

2.6 の 1) により添加回収試験を実施した。その結果、Table 9 のとおり、平均回収率は 84.7~101 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 8.5 % 以下の成績であり、飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた真度及び精度の目標値を満たした。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 9 Recoveries for chlorpropham

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layers		Formula feed for suckling pigs		Barley		Wheat		Corn	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.008	—	—	—	—	95.4	4.4	85.2	8.5	—	—
0.01	96.0	2.1	101	5.8	—	—	—	—	—	—
0.02	—	—	—	—	—	—	96.0	2.9	84.7	1.7
0.04	—	—	—	—	95.6	3.3	—	—	—	—
0.05	—	—	—	—	—	—	—	—	95.7	0.7
0.2	—	—	93.0	5.3	—	—	—	—	—	—
0.4	94.7	4.7	—	—	—	—	—	—	—	—

—: Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

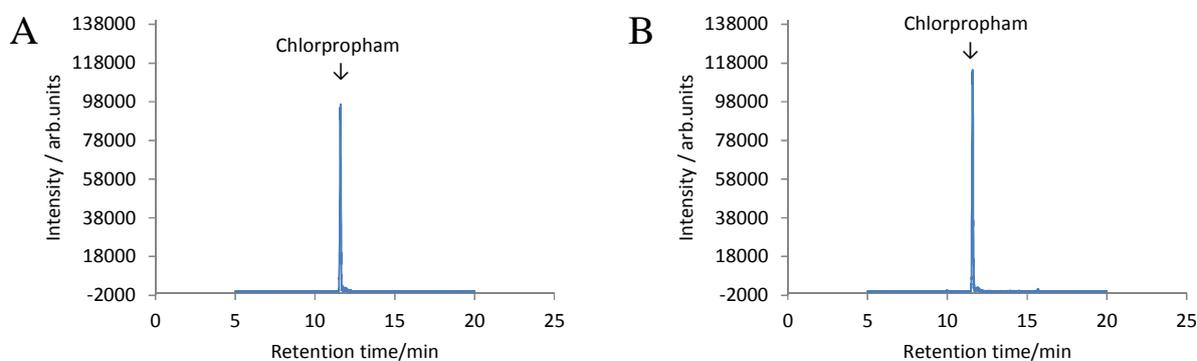


Fig. 4 SRM chromatograms on recovery test

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3.)

A: Standard solution (40 ng/mL: 0.2 ng as chlorpropham)

B: Sample solution of corn (spiked at 0.05 mg/kg of chlorpropham (The concentration in the sample solution is 50 ng/mL as chlorpropham.))

2) フィプロニル

2.6 の 2)により添加回収試験を実施した。その結果、Table 10 のとおり、稲わら以外の試料について平均回収率は 81.3~90.0 %，RSD_rは 8.9 %以下の成績であり，妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び精度の目標値を満たした。稲わらについては，平均回収率は 44.8 %，RSD_rは 12 %の成績であり真度の目標値を満たさなかった。

なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

Table 10 Recoveries for fipronil

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layers		Wheat		Corn		Alfalfa hay		Rice straw		WCRS ^{c)}	
	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0.0008	—	—	81.3	8.9	—	—	—	—	—	—	—	—
0.002	—	—	86.2	6.7	—	—	—	—	—	—	—	—
0.008	—	—	—	—	85.8	6.6	—	—	—	—	—	—
0.01	83.2	7.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.018	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	87.5	7.2
0.02	81.3	7.0	—	—	90.0	1.8	—	—	—	—	—	—
0.04	—	—	—	—	—	—	86.7	4.1	—	—	—	—
0.11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	85.6	5.2
0.2	—	—	—	—	—	—	85.8	6.7	44.8	12	—	—

—: Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Fipronil was spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.04 and 0.25 mg/kg air-dry matter for fipronil. The levels of fipronil in original matter were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % for original matter and 10 % for air-dry matter.

The levels of fipronil in original matter (moisture 60 %)

= the levels of fipronil in air-dry matter (moisture 10 %) / 2.25

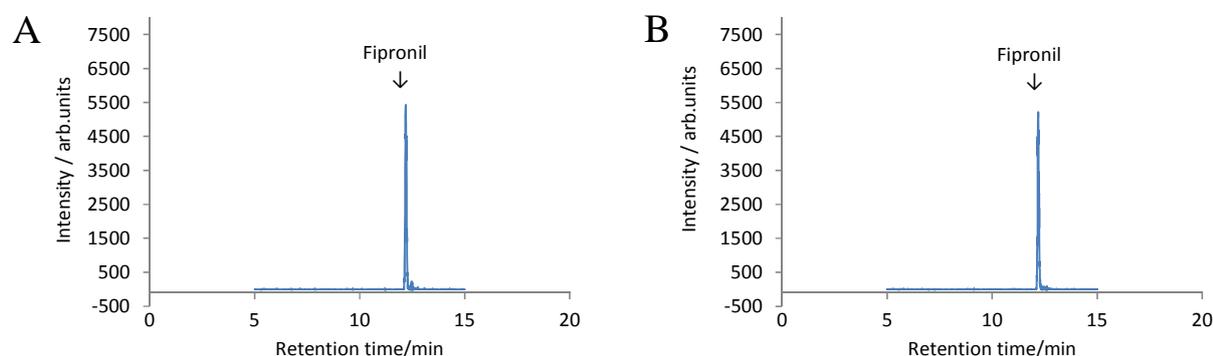


Fig. 5 SRM chromatograms on recovery test

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3.)

A: Standard solution (2 ng/mL: 0.01 ng as fipronil)

B: Sample solution of corn (spiked at 0.02 mg/kg of fipronil (The concentration in the sample solution is 20 ng/mL as fipronil.)) Sample solution was diluted ten times by methanol before the injection into a LC-MS/MS.

3.8 稲わら低回収率の原因の検討について

稲わらを用いたフィプロニルの添加回収試験の結果、妥当性確認法ガイドラインに定める真度の目標値を下回った原因を究明するために以下の検討を行った。

1) 時間経過によるフィプロニル減衰の確認

フィプロニルが稲わらへの添加後に時間の経過とともに減衰した可能性を考え、フィプロニル添加後速やかに抽出精製を行ったところ、Table 11 のとおり添加回収率は添加後一晩静置し

たものと同程度であった。フィプロニルの低回収率は、添加後の時間経過の問題ではないと考えられた。

Table 11 Recoveries for fipronil from rice straw

Spiked level (mg/kg)	Spiked timing	
	One night before ^{a)}	Just before ^{b)}
	Recovery (%)	Recovery (%)
0.2	43.1	47.6

$n = 1$

a) Rice straw was spiked at fipronil one night before the analysis.

b) Rice straw was spiked at fipronil just before the analysis.

2) ミニカラムからの溶出画分の確認

稲わらのマトリックス共存下で、ミニカラム精製においてフィプロニルの保持及び溶出が影響を受けた可能性を考え、稲わらを用いて 2.4 の 1) から 2) に従って操作した後フィプロニル 100 ng (0.2 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量) を加え、2.4 の 3) に従って操作しミニカラムからの溶出画分を確認した。その結果、Table 12 のとおり、フィプロニルの溶出パターン及び回収率は Table 6 と同程度であり、特に問題無い結果であった。

Table 12 Elution pattern of fipronil in rice straw matrix using InertSep GC/PSA

Pesticide	Recovery (%)							Total
	Hexane	Hexane-acetone (4:1)						
	0~ 10 mL	0~ 5 mL	5~ 10 mL	10~ 15 mL	15~ 20 mL	20~ 25 mL	25~ 30 mL	
Fipronil	0.0	85.5	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	86.6

$n = 1$

3) 転溶の確認

稲わらマトリックス等の影響により、液液分配時に 1 回目のアセトニトリル 20 mL だけではフィプロニルを回収できなかった可能性を考え、3.3 に準じ、稲わらを用いた試料溶液 20 mL にフィプロニル 100 ng (0.2 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量) を加え、液液分配における転溶の確認を行った。対照としてアルファルファ乾草を用いて同様に操作した。その結果、Table 13 のとおり、1 回目のアセトニトリル 20 mL によってアルファルファ乾草試料溶液中のフィプロニルは全て回収されたが、稲わら試料溶液中のフィプロニルは低回収率であり、2 回目のアセトニトリルからはフィプロニルは検出されなかった。

稲わらでは液液分配時にフィプロニルが水層に残った可能性を考え、稲わらを用いて同様に操作した後、2 回目の抽出操作としてアセトニトリルより極性の低い酢酸エチル 20 mL を用いてフィプロニルを回収できるか別途確認したが、フィプロニルは 1 回目のアセトニトリル層からのみ低回収率で検出され、2 回目の酢酸エチル層からは検出されなかった。

Table 13 Recoveries for fipronil on liquid-liquid partition

Sample	Recovery (%)		
	Acetonitrile		Total
	First 20 mL	Second 20 mL	
Rice straw	58.6	0.0	58.6
Alfalfa hay	97.8	0.0	97.8

$n = 1$

また、同じ稲わら由来である WCRS の添加回収試験結果に問題は認められなかったことから、分液操作時の pH 条件が影響している可能性を考え、リン酸緩衝液より低 pH の酢酸緩衝液を用いて同様に転溶の確認を行った。対照として WCRS 及びリン酸緩衝液を用いた。その結果、Table 14 のとおり、酢酸緩衝液を用いた場合も、稲わらにおけるフィプロニルは低回収率であった。

Table 14 Recoveries for fipronil on liquid-liquid partition in the acetate buffer

Sample	Recovery (%)	
	Acetonitrile (20 mL)	
	Acetate buffer pH 5.0	Phosphate buffer pH 7.0
Rice straw	49.5	48.6
WCRS	95.1	93.5

$n = 1$

以上の検討により、稲わらを用いたフィプロニル添加回収試験における低回収率の原因として、液液分配に何らかの問題がある可能性が高いと考えられた。液液分配のどこに問題があるのか、今のところ不明であるため、引き続き原因究明が必要であると考えられた。

4 まとめ

飼料中に残留するクロルプロファム及びフィプロニルについて、LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 検量線は、クロルプロファムは 1~100 ng/mL (注入量として 0.005~0.5 ng 相当量) 及びフィプロニルは 0.1~10 ng/mL (注入量として 0.0005~0.05 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、クロルプロファムを 0.001~0.1 mg/kg 及びフィプロニルを 0.0001~0.01 mg/kg 含有する分析用試料 (乾牧草、稲わら及び WCRS にあってはフィプロニルを 0.002~0.2 mg/kg 含有する分析用試料) を本法に従い調製した最終試料溶液中の各濃度範囲に相当する。

- 2) 配合飼料 (成鶏飼育用、ほ乳期子豚育成用、子豚育成用、乳用牛飼育用及び肉用牛肥育用)、大麦、小麦、とうもろこし、ライ麦、ポテトグルテンフィード、アルファルファ乾草、チモシー乾草、稲わら及び WCRS を用い、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。

- 3) 本法に従い得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、クロルプロファム及びフィプロニルは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。
- 4) クロルプロファムとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.01 及び 0.4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 400 ng/mL）、ほ乳期子豚育成用配合飼料に 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 200 ng/mL 相当量）、大麦に 0.008 及び 0.04 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 8 及び 40 ng/mL 相当量）、小麦に 0.008 及び 0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 8 及び 20 ng/mL 相当量）、とうもろこしに 0.02 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 20 及び 50 ng/mL 相当量）を添加し、本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び精度の目標値を満たす結果であった。
- 5) フィプロニルとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.01 及び 0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 20 ng/mL 相当量）、小麦に 0.0008 及び 0.002 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.8 及び 2 ng/mL 相当量）、とうもろこしに 0.008 及び 0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 8 及び 20 ng/mL 相当量）、アルファルファ乾草に 0.04 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2 及び 10 ng/mL 相当量）、稲わらに 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 ng/mL）、WCRS は原物中に換算して 0.018 及び 0.11 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.9 及び 5.5 ng/mL 相当量）を添加し、本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めたところ、稲わら以外の試料については、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び精度の目標値を満たす結果であった。稲わらについては真度の目標値を満たさなかった。
- 6) 稲わらを用いたフィプロニルの添加回収試験における低回収率は、ミニカラム処理やマトリックス効果によるものではなく、液液分配に何らかの問題があることによる可能性が高いと考えられた。

文 献

- 1) 環境省中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会（第 57 回）：水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準として環境大臣の定める基準の設定に関する資料，平成 29 年 5 月 22 日 (2017).
- 2) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 4) 食品安全委員会農薬専門調査会：農薬・動物用医薬品評価書 フィプロニル，平成 28 年 1 月，(2016).
- 5) 農林水産省畜産局長通達：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 6) 一般財団法人日本食品検査：平成 29 年度生産資材安全確保対策委託事業（飼料中の農薬分析法開発委託事業） (2018).

技術レポート

4 愛玩動物用飼料中のデオキシニバレノール、ニバレノール、HT-2 トキシン及び T-2 トキシンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法の開発

立石 洋暢*, 加藤 耕一*, 桑原 正良*

Development of the Simultaneous Determination Method of Deoxynivalenol, Nivalenol, HT-2 Toxin and T-2 Toxin in Pet Food by LC-MS/MS

Hironobu TATEISHI*, Koichi KATO* and Masayoshi KUWABARA*

(* Kobe Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

We have developed a simultaneous quantitative determination method of the concentration of deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), HT-2 toxin (HT-2) and T-2 toxin (T-2) in pet foods using a liquid chromatograph-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

DON, NIV, HT-2 and T-2 were extracted with water-containing acetonitrile. The extracted solution was purified with a multifunctional column (MultiSep 227 Trich+, Romer Labs.; Getzersdorf, Lower Austria, Austria), and injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of each mycotoxin. LC separation was then carried out on ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 3.0 mm i.d. × 150 mm, 5 µm, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) with a gradient of 10 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the negative mode electrospray ionization (ESI-) for DON and NIV, and the positive mode electrospray ionization (ESI+) for HT-2 and T-2 were used.

Recovery tests were conducted on dry food for cats, semi-dry food for dogs, formed jerky for dogs, dried jerky for dogs (soft and hard), confectionary (biscuit for dogs), milk powder for cats and wet food for dogs. DON and NIV were intentionally added at the levels of 0.1 and 1 mg/kg for the pet foods except for wet food, 0.02 and 0.2 mg/kg for wet food respectively. HT-2 and T-2 were added at the levels of 0.04, 0.1 and 0.5mg/kg for the pet foods except for wet food, 0.01, 0.02 and 0.1 mg/kg for wet food respectively. The resulting mean recoveries ranged from 81.6 % to 106 % for DON, 64.9 % to 145 % for NIV, 96.0 % to 113 % for HT-2, and 87.7 % to 117 % for T-2 respectively. The repeatability in the form of the relative standard deviations (RSD_r) was less than 13 % for DON, less than 20 % for NIV, less than 9.3 % for HT-2, and less than 7.1 % for T-2.

.Key words: mycotoxin; deoxynivalenol; nivalenol; HT-2 toxin; T-2 toxin; liquid chromatograph-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); pet food

キーワード：かび毒；デオキシニバレノール；ニバレノール；HT-2 トキシン；T-2 トキシン；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；愛玩動物用飼料

1 緒 言

トリコテセン系かび毒は、化学構造の違いにより、タイプ A から D に分類され、ニバレノール

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

(以下「NIV」という。)は8位の炭素にカルボニル基を有するタイプBに属する。NIVはデオキシニバレノール(以下「DON」という。)の類縁化合物であり、共にフザリウム属のかびにより産生され、麦類等の穀類を汚染することが知られている。これらかび毒の汚染低減対策については、「麦類のデオキシニバレノール・ニバレノール汚染低減のための指針の策定・普及について」に基づき推進されているところである¹⁾。食品安全委員会は2010年に、NIV及びDONの食品健康影響評価を実施し、NIV及びDONの耐容一日摂取量をそれぞれ0.4及び1 µg/kg体重/日と設定している²⁾。

一方、HT-2トキシシン(以下「HT-2」という。)及びT-2トキシシン(以下「T-2」という。)はタイプAに分類されるトリコテセン系かび毒である。FAO/WHO合同食品添加物専門家会議(JECFA)は2016年に、HT-2、T-2及びジアセトキシスシルペノール(DAS)のグループ暫定最大耐容一日摂取量(group PMTDI)を60 ng/kg体重/日(0.06 µg/kg体重/日)(HT-2、T-2及びDASの合計)と設定している³⁾。

国内では、現在、NIVについては食品、飼料ともに規制値はなく、DONについては食品用小麦で1.1 µg/g⁴⁾、家畜等用飼料で1 µg/g(生後3か月以上の牛用にあつては4 µg/g)⁵⁾の規制値が設定されているほか、愛玩動物用飼料では犬用で2 µg/g、猫用で1 µg/gの規制値⁶⁾が定められている。また、HT-2及びT-2の規制値は設定されていない。

家畜等用飼料中のトリコテセン系かび毒の分析法は、飼料分析基準⁷⁾に各種の方法が収載されている。一方、愛玩動物用飼料については、DONの分析法のみが愛玩動物用飼料等の検査法⁸⁾に収載されており、NIV、HT-2及びT-2の汚染実態を把握できない状況であることから分析法の確立が急務となっている。

今回、一般財団法人日本食品分析センターが「平成29年度愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業」において開発した液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(以下「LC-MS/MS」という。)を用いた愛玩動物用飼料中のDON及びNIVの同時定量法⁹⁾(以下「JFRL法」という。)を基に、DON、NIV、HT-2及びT-2の同時定量法を検討したのでその概要を報告する。参考に、各分析対象物の構造式等をFig. 1に示した。

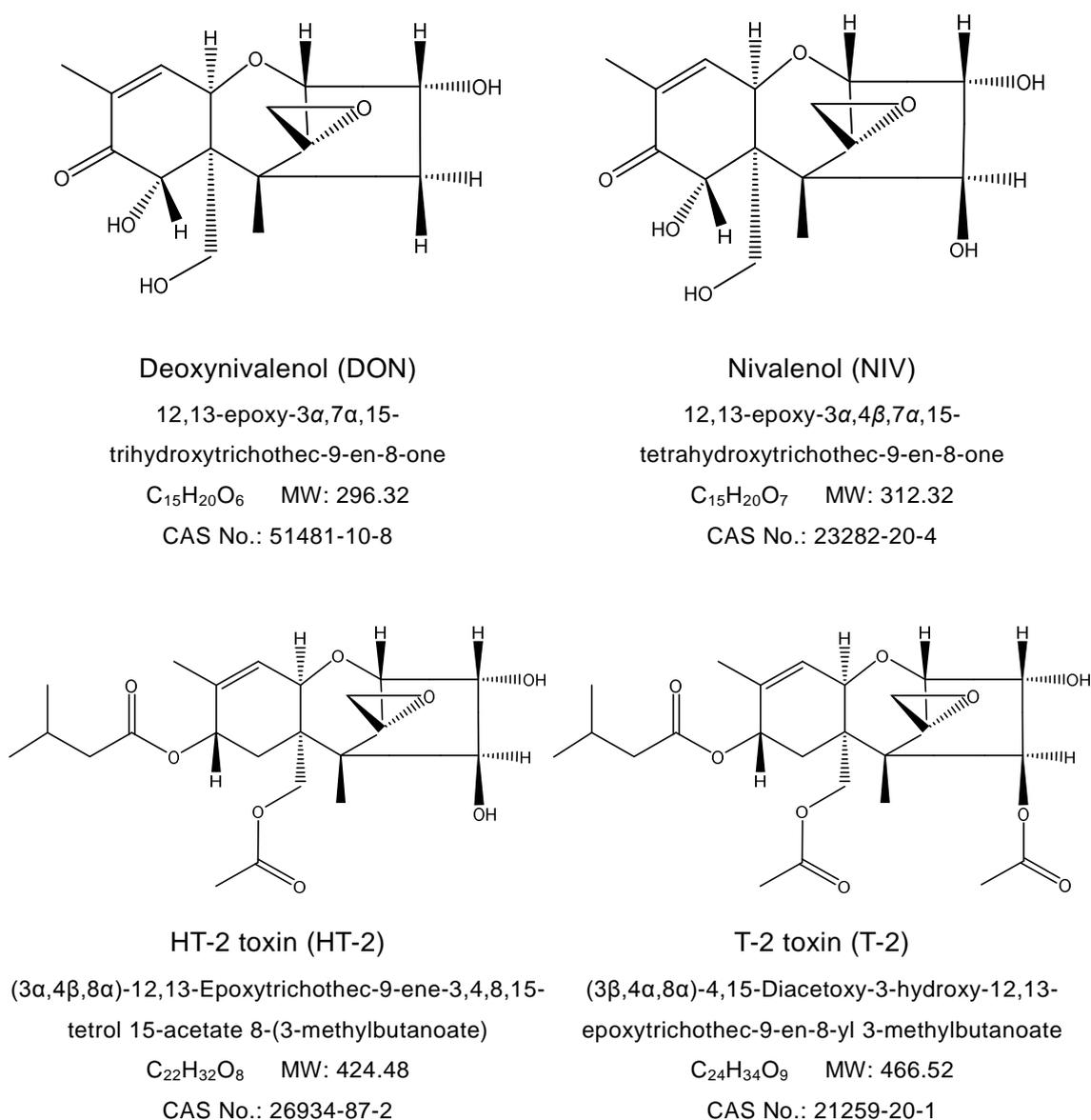


Fig. 1 Chemical structures of DON, NIV, HT-2 and T-2

2 実験方法

2.1 試料

愛玩動物用飼料（ドライ製品（猫用），セミドライ製品（犬用），成型ジャーキー（犬用），素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ（犬用）及びソフトタイプ（犬用）），菓子類（犬用ビスケット）及び粉ミルク（猫用））は目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕（粒度が 1 mm 以下であった粉ミルクを除く。）し，混合して用いた．なお，そのままでは粉砕が困難なジャーキー類は，はさみ等を用いて裁断したのち粉砕した．愛玩動物用飼料（ウェット製品（犬用））はフードプロセッサー等で破砕し，混合して用いた．

検討に用いた試料の種類及びその原材料名を Table 1 に示した．原材料名は検討に用いた各試料に表記されていた名称に準拠した．

Table 1 Ingredients list of pet foods used in this study

Pet food types	Ingredients
Dry food for cats	Chicken raw meat, dried chicken, coarsely ground rice, pea protein, brown rice, chicken oil, alfalfa meal, potato protein, beet pulp, linseed, protein hydrolysate, oats fiber, soybean oil, yucca extract, vitamins (V. A, V. B ₁ , V. B ₂ , V. B ₆ , V. B ₁₂ , V. C, V. D ₃ , V. E, choline, niacin, pantothenic acid, biotin, folic acid), minerals (K, Cl, Se, Na, Mn, I, Zn, I, Co), amino acids (taurine, methionine), antioxidant (mix tocopherol, rosemary extract), green tea extract, spearmint extract
Semi-dry food for dogs	Meat (chicken, etc.), sugars, beans, starches, grains, fishery products, oils and fats, vegetables (carrot, pumpkin, spinach, etc.), dietary fiber, minerals (P, Ca, Cl, Na, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn, I), thickening stabilizer (glycerin, casein sodium), quality improving agent (propylene glycol), preservative (sorbic acid potassium), pH regulator, vitamins (choline, V. C, V. A, V. E, nicotinic acid, pantothenic acid, V. B ₁₂ , V. B ₆ , V. B ₁ , V. B ₂ , folic acid, V. D), food color (titanium dioxide, yellow 5, red 106, blue 1, yellow 4, red 102), color former (sodium nitrite)
Wet food for dogs	Chicken white meat, potato, carrot, sugar, green peas, chicken, chicken liver, soybean oil, salt, oligosaccharide, chondroitin protein complex, glucosamine hydrochloride, lactic acid bacterium, thickening stabilizer, minerals, vitamins
Formed jerky for dogs	Beef tongue skin, chicken, wheat starch, soy flour, modified sugar, dietary fiber, salt, sorbitol, propylene glycol, polyphosphoric acid Na, food color (red 102, yellow 5, red 106, yellow 1)
Dried jerky for dogs (hard type)	Deer meat
Dried jerky for dogs (soft type)	Chicken (white meat), glycerin (humectant), propylene glycol (quality maintenance agent), antioxidant (nitrite Na)
Confectionery (biscuit) for dogs	Wheat flour, glucose, shortening, cornstarch, sweet potato, oligosaccharide, yeast
Milk powder for cats	Milk (powdered skim milk, casein), oils and fats (plant oil, animal fats, γ -linolenic acid), soy protein, egg yolk powder, oligosaccharide, L-carnitine, minerals (Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Co), emulsifier, flavor, vitamins (V. A, V. B ₁ , V. B ₂ , V. B ₆ , V. B ₁₂ , V. D, V. E, V. K, nicotinic acid, pantothenic acid, folic acid, choline), taurine

2.2 試薬

- 1) アセトニトリル (LC-MS/MS 測定時の溶離液のみ LC-MS 用 (富士フイルム和光純薬製)) 及びメタノールは残留農薬・PCB 試験用を用いた。酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフィー用 (1 mol/L 溶液, 富士フイルム和光純薬製) を用いた。水は Milli-Q Element A10 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。
- 2) 各かび毒標準品
DON, NIV, HT-2 及び T-2 の標準品は Table 2 に示した供給業者, 純度のものを用いた。

Table 2 Mycotoxin standards used in this study

Name	Manufactures	Formula	MW	CAS No.	Purity (%)
DON	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296.32	51481-10-8	98.0
NIV solution (100 µg/mL in acetonitrile)	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	313.32	23282-20-4	*
HT-2	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	412.53	26934-87-2	97.0
T-2	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	466.52	21259-20-1	98.0

*: 100.2 µg/mL (certificate of analysis)

3) 各かび毒標準原液

NIV は Table 2 に示した市販の標準液を標準原液 (100.2 µg/mL) とした。DON, HT-2 及び T-2 は各標準品 5 mg を正確に量ってそれぞれ 25 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて各標準原液を調製した (これらの各標準原液 1 mL は、各かび毒として 0.2 mg を含有する。)

4) かび毒混合標準液

各標準原液の一定量を混合し、アセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に各かび毒として 25 µg を含有する混合標準原液を調製した。

使用に際して、混合標準原液の一定量を水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各かび毒として 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800 及び 1000 ng を含有する混合標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機 : ZM 200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)
- 2) フードプロセッサ : MK-K80 パナソニック製
- 3) 振とう機 : 理研式シェーカー MW-DRV 宮本理研工業製 (使用時振とう数 300 rpm)
- 4) 多機能カラム : MultiSep 227 Trich+カートリッジ Romer Labs 製
- 5) LC-MS/MS

LC-MS/MS 1

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部 : ACQUITY TQ Detector Waters 製

LC-MS/MS 2

LC 部 : Nexera X2 島津製作所製

MS 部 : LCMS-8040 島津製作所製

2.4 定量方法

1) 抽出

i ウェット製品以外

分析試料 25.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (21+4) 100 mL を加え、密栓して 60 °C で 60 分間静置後、60 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を 50

mL の共栓遠心沈殿管に入れ、 $1000\times g$ で 5 分間遠心分離し、上澄み液の一定量をアセトニトリル-水 (21+4) で正確に 2 倍希釈し、カラム処理に供する試料溶液とした。

ii ウェット製品

分析試料 25.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (21+4) 70 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した後、10 分間静置した。抽出液を 100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、 $1600\times g$ で 5 分間遠心分離し、上澄み液を 200 mL の全量フラスコに入れた。共栓遠心沈殿管をアセトニトリル-水 (21+4) 70 mL で洗浄し、洗液を順次先の共栓三角フラスコに移し、同様に 30 分間振り混ぜて抽出した。内容物を先の共栓遠心沈殿管に入れ、 $1600\times g$ で 5 分間遠心分離し、上澄み液を先の全量フラスコに加え、更に全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (21+4) を加え、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

試料溶液を多機能カラムに入れ、初めの流出液 3 mL を捨て、その後の流出液 3 mL (ウェット製品では 5 mL) を 10 mL の試験管に受けた。この液の 2 mL (ウェット製品では 4 mL) を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、この液をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ、 $5000\times g$ で 5 分間遠心分離し、上澄み液を LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各かび毒混合標準液各 10 μL を 2.3 の 5) の LC-MS/MS 1 に注入し、選択反応検出 (以下「SRM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 3-1 及び 3-2 に示した。

Table 3-1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm i.d. \times 150 mm, 5 μm), Agilent Technologies
Mobile phase	10 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (19:1) (hold for 1 min) \rightarrow 15 min \rightarrow (1:19) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	$40\text{ }^{\circ}\text{C}$
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Source temperature	$120\text{ }^{\circ}\text{C}$
Desolvation gas	N_2 (800 L/h, $400\text{ }^{\circ}\text{C}$)
Capillary voltage	Positive mode: 3.5 kV, Negative mode: 1.5 kV
Cone gas	N_2 (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

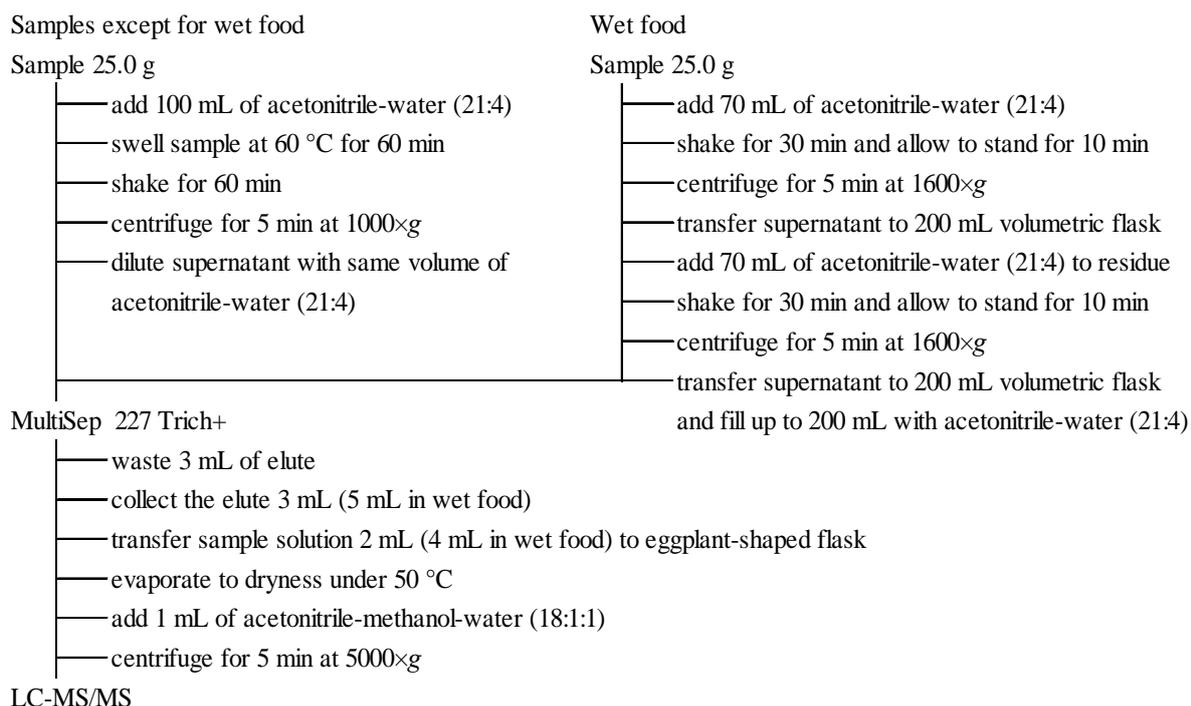
Table 3-2 MS/MS parameters

Target	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
			Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)		
DON	-	355	265	-	10	15
			-	295	10	10
NIV	-	371	281	-	10	15
			-	311	10	10
HT-2	+	442	215	-	20	20
			-	263	20	15
T-2	+	484	185	-	34	22
			-	305	20	15

4) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の DON, NIV, HT-2 及び T-2 量を算出した。

なお、分析法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for DON, NIV, HT-2 and T-2 in pet foods

2.5 LC-MS/MS 測定条件におけるイオン化法の検討

2.2 の 3) の NIV 標準原液をアセトニトリルで正確に希釈して調製した 250 ng/mL の標準液を、LC-MS/MS 1 を用いて 2.4 の 3) の測定条件の ESI 法及び大気圧化学イオン化 (APCI) 法で測定し、イオン化法の違いを検証した。また、参考として、同溶液を 2.3 の 5) の LC-MS/MS 2 を用いて APCI 法で測定し、LC-MS/MS 1 との機種間の相違を検証した。LC-MS/MS 1 及び LC-MS/MS 2 における APCI 法によるタンデム型質量分析計部の測定条件を Table 4-1 及び 4-2 並びに 5-1 及び

5-2 に示した.

Table 4-1 Operating conditions of LC-MS/MS 1

Ionization	Atomospheric pressure chemical ionization (APCI)
Source temperature	150 °C
Desolvation gas	N ₂ (900 L/h)
APCI probe temperature	450 °C
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

Table 4-2 MS/MS parameters

Target	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
			Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)		
NIV	-	371	281	-	25	22
			-	311	20	13

Table 5-1 Operating conditions of LC-MS/MS 2

Ionization	Atomospheric pressure chemical ionization (APCI)
Nebulizer gas	Air (4 L/min)
Drying gas	N ₂ (3 L/min)
Interface temperature	330 °C
Heat block temperature	150 °C
DL temperature	180 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

Table 5-2 MS/MS parameters

Target	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
			Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
NIV	-	371	281	-	14
			-	311	12

2.6 添加回収試験

2.2 の 4)に従って調製したかび毒混合標準原液をアセトニトリルで正確に希釈し添加に用いた。ウェット製品以外の試料に DON 及び NIV として 0.1 及び 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 25 及び 250 ng/mL），HT-2 及び T-2 として 0.04, 0.1 及び 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10, 25 及び 125 ng/mL），ウェット製品に DON 及び NIV として 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 100 ng/mL），HT-2 及び T-2 として 0.01, 0.02 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5, 10 及び 50 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

3 結果及び考察

3.1 LC-MS/MS におけるイオン化法の検討

2.5 に基づき、LC-MS/MS 1 による APCI 法と ESI 法の *SN* 比について比較検討をした。その結果、APCI 法では *SN* 比は 36 となり、ESI 法では *SN* 比は 366 となった。このことから、ESI 法は APCI 法より低濃度の測定が期待できること、また、ESI 法は APCI 法に比べより汎用的なイオン化法であることから、本検討においては ESI 法を採用することとした。参考までに、2.5 に基づき、LC-MS/MS 2 の APCI 法により測定を実施したところ、*SN* 比は 4831 となり機種間で差が認められた。

3.2 モニターイオンの設定

DON, NIV, HT-2 及び T-2 のマススペクトル例を Fig. 2 に、プロダクトイオンスペクトル例を Fig. 3 に示した。各かび毒のプリカーサーイオン及びプロダクトイオンからモニターイオンを Table 3-2 のとおり定めた。

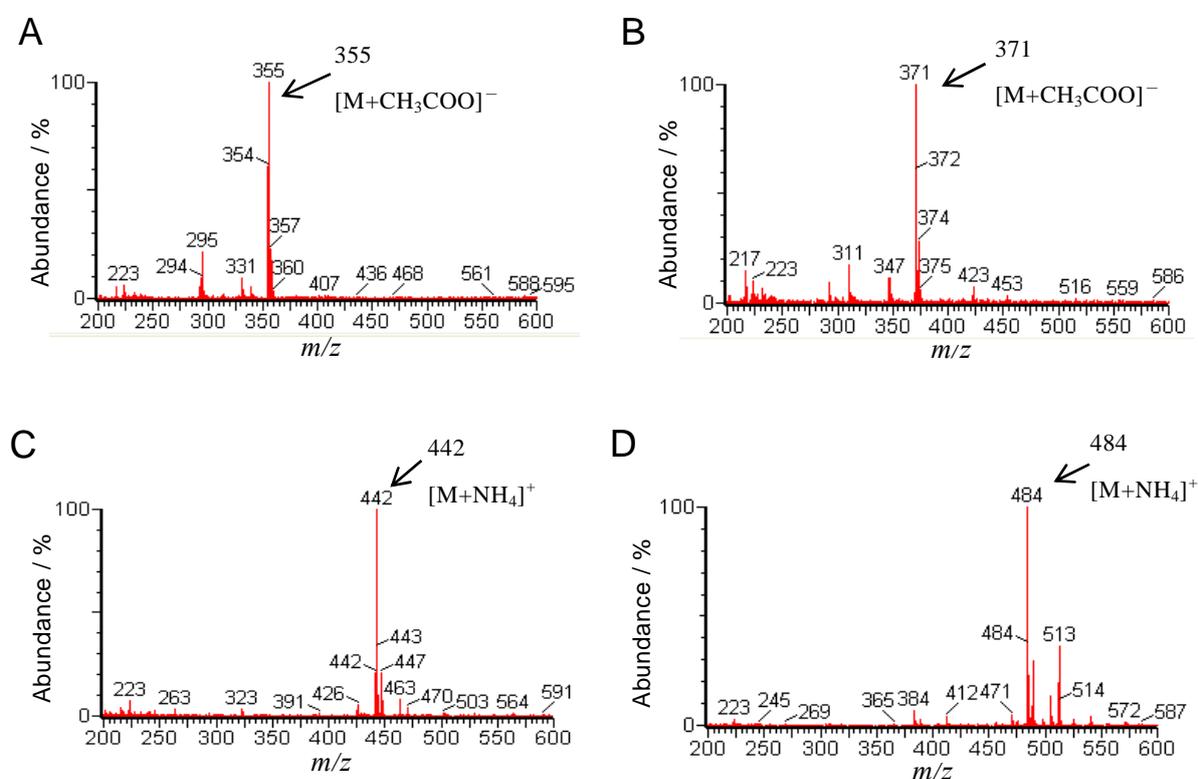


Fig. 2 Mass spectrum of DON, NIV, HT-2 and T-2

A: DON, B: NIV, C: HT-2, D: T-2

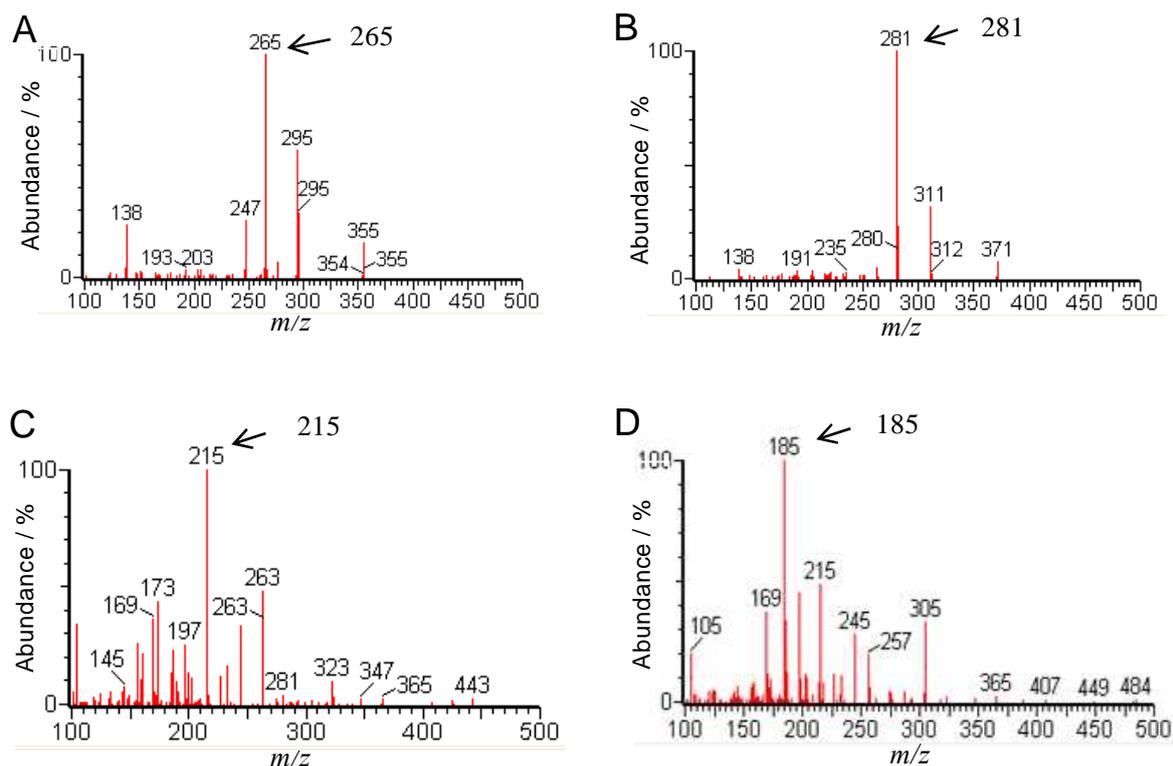


Fig. 3 Product ion spectrum of DON, NIV, HT-2 and T-2

- A: DON (precursor ion: m/z 355, collision energy: 15 eV)
 B: NIV (precursor ion: m/z 371, collision energy: 15 eV)
 C: HT-2 (precursor ion: m/z 442, collision energy: 20 eV)
 D: T-2 (precursor ion: m/z 484, collision energy: 22 eV)

3.3 検量線

2.2 の 4)により調製した各かび毒混合標準液の各 10 μ L を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した。

得られた検量線の一例は Fig. 4 のとおりであり、DON 及び NIV は 2~1000 ng/mL (注入量として 0.02~10 ng 相当量)、HT-2 及び T-2 は 0.5~1000 ng/mL (注入量として 0.005~10 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線の濃度範囲は、ウェット製品以外では DON 及び NIV を 0.008~4 mg/kg、HT-2 及び T-2 を 0.002~4 mg/kg 含有する試料、ウェット製品では DON 及び NIV を 0.004~2 mg/kg、HT-2 及び T-2 を 0.001~2 mg/kg 含有する試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各かび毒濃度範囲に相当する。

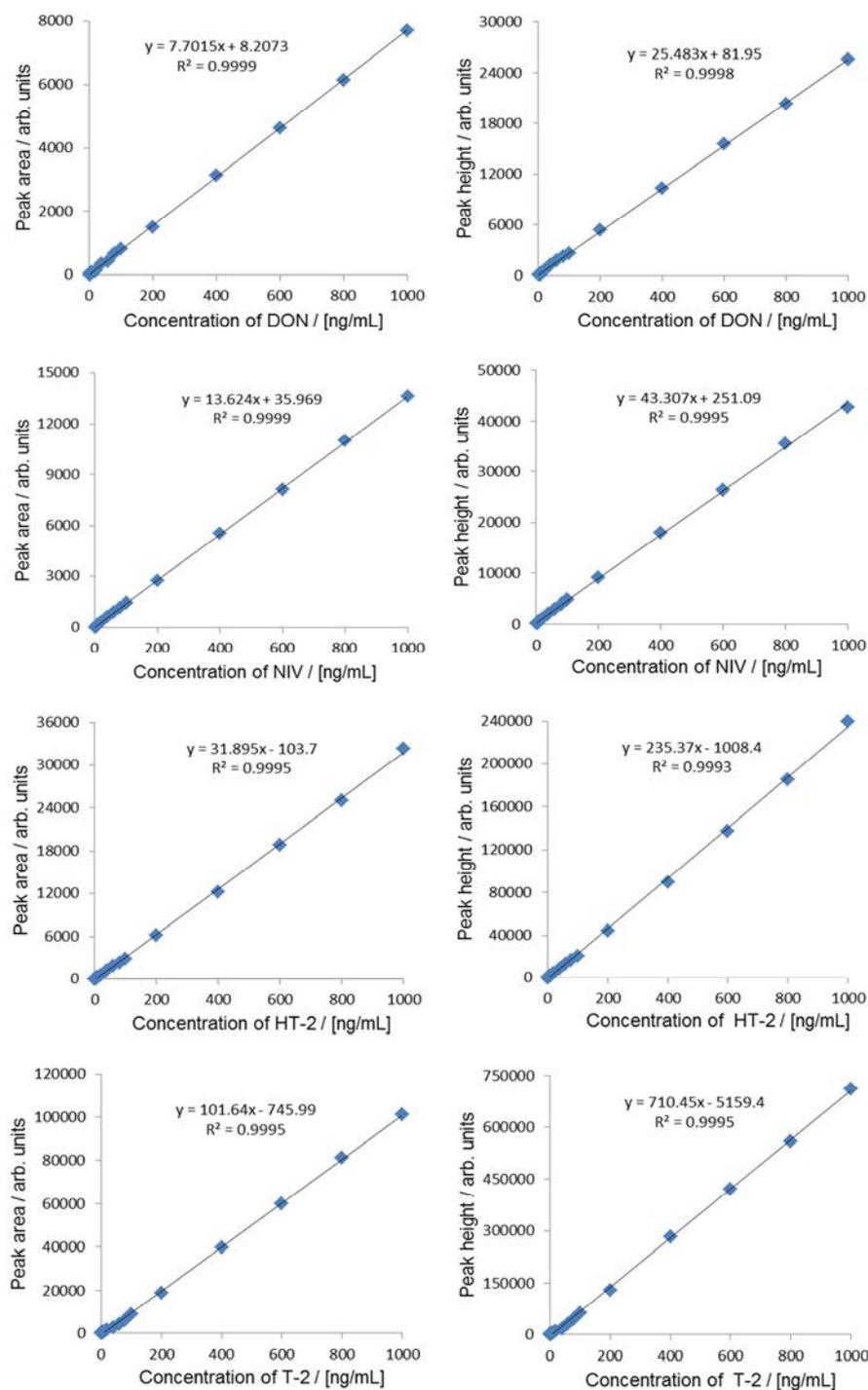


Fig. 4 Calibration curves of DON, NIV, HT-2 and T-2 by peak area (left) and peak height (right)

3.4 多機能カラムからの流出画分の確認

2.4 の 1)に従って調製したカラム処理に供するドライ製品（猫用）及びウェット製品（犬用）の試料溶液に DON, NIV, HT-2 及び T-2 として、それぞれ各 1 mg/kg 及び各 0.2 mg/kg 相当量を添加し、多機能カラムからの流出画分を確認した。その結果は Table 6 のとおりであり、ドライ製品及びウェット製品とも 3 mL 以上の画分で良好な回収率であったため、JFRL 法のとおり、ドライ製品では 3~6 mL の画分から 2 mL を採取、ウェット製品では 3~8 mL の画分から 4 mL を

採取することとした。

Table 6 Outflow pattern of DON, NIV, HT-2 and T-2 from MultiSep 227 Trich+

Types	Target	Concentration (ng/mL)	Concentration (%) ^{a)}								
			0~1 mL	1~2 mL	2~3 mL	3~4 mL	4~5 mL	5~6 mL	6~7 mL	7~8 mL	8~9 mL
Dry food for cats	DON	125	37.1	89.9	100	104	98.4	95.6	103	105	97.9
	NIV	125	—	31.3	79.2	90.6	94.9	84.9	102	104	101
	HT-2	125	32.2	80.6	91.8	90.8	95.6	89.6	93.5	90.7	91.9
	T-2	125	43.9	74.2	84.4	86.8	88.1	86.2	91.2	90.3	90.7
Wet food for dogs	DON	25	52.2	66.5	71.3	98.4	84.1	92.0	85.9	88.3	84.9
	NIV	25	25.5	72.6	89.6	94.5	103	92.1	98.4	97.4	101
	HT-2	25	63.5	83.9	96.5	99.2	93.4	92.3	98.3	102	103
	T-2	25	54.6	82.6	91.2	95.6	98.4	98.2	95.0	96.6	99.8

$n = 1$

—: Not detected

a) Quantitated concentration in sample solution after column treatment / Concentration in sample solution before column treatment $\times 100$

3.5 妨害物質の検討

本法の選択性を確認するため、8種類の愛玩動物用飼料（ドライ製品（猫用）、セミドライ製品（犬用）、ウェット製品（犬用）、成型ジャーキー（犬用）、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ（犬用）及びソフトタイプ（犬用））、菓子類（犬用ビスケット）及び粉ミルク（猫用）各1検体）について、本法に従い分析したところ、定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られたSRMクロマトグラムの一例をFig. 5-1及び5-2に示した。

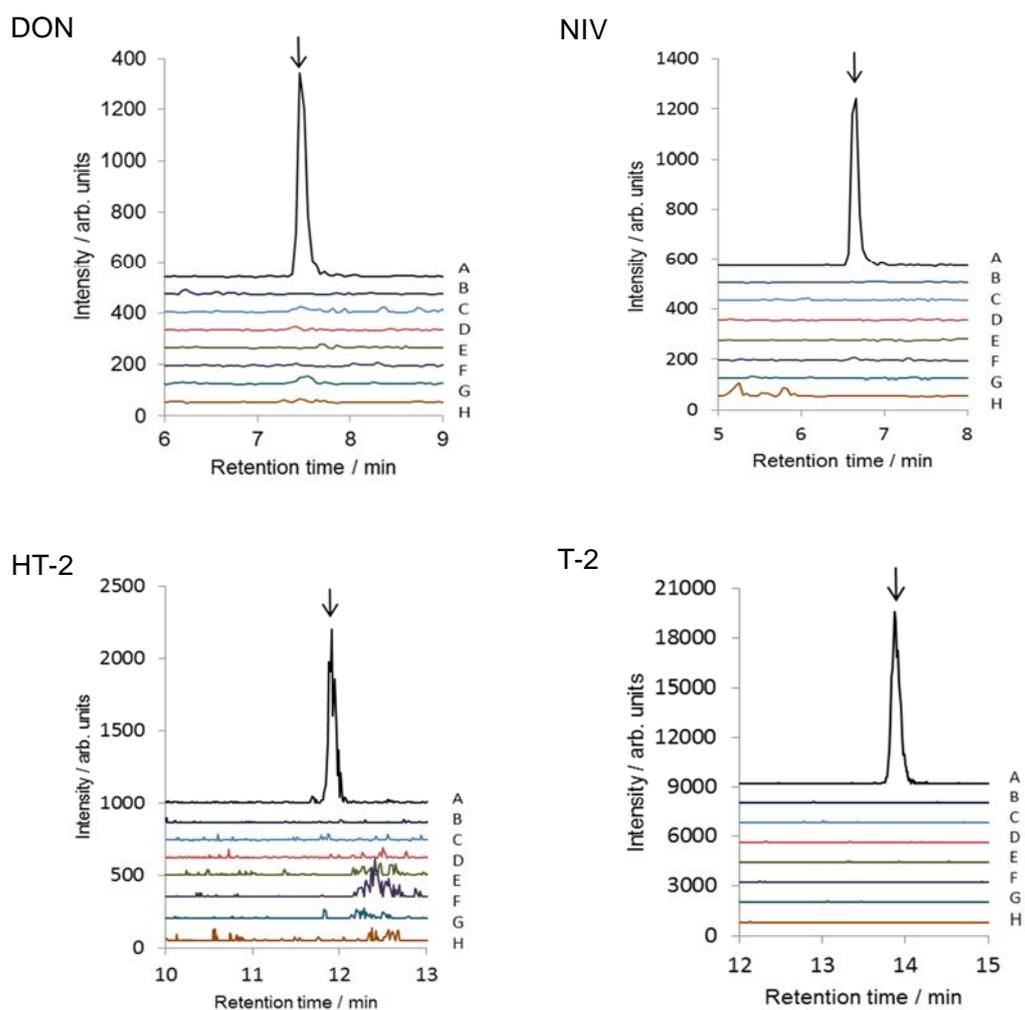


Fig. 5-1 SRM chromatograms of standard solution and blank sample solutions (without wet type pet food)

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 3-1 and 3-2. Arrows indicate the retention time of mycotoxins. The baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (25 ng/mL each as DON and NIV, 10 ng/mL each as HT-2 and T-2)

B: Dry food for cats

C: Semi dry food for dogs

D: Formed jerky for dogs

E: Dried jerky for dogs (hard type)

F: Dried jerky for dogs (soft type)

G: Confectionery (biscuit) for dogs

H: Milk powder for cats

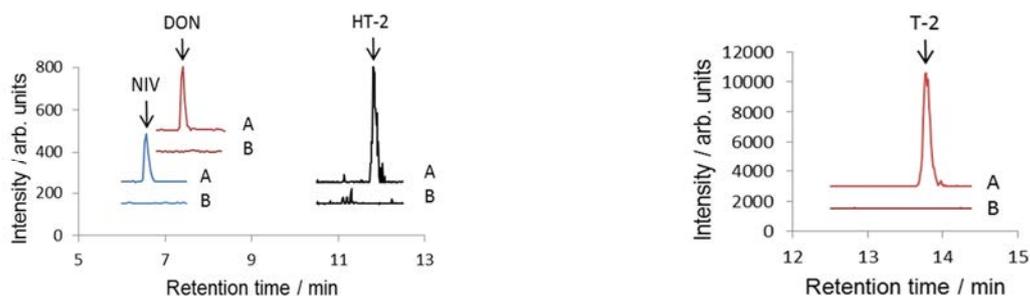


Fig. 5-2 SRM chromatograms of standard solution and blank sample solution (wet type pet food) (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 3-1 and 3-2. Arrows indicate the retention time of mycotoxin. The baselines were shifted for display)

A: Standard solution (10 ng/mL each as DON and NIV, 5 ng/mL each as HT-2 and T-2)

B: Wet food for dogs

3.6 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 2)により調製したウェット製品以外のブランク試料溶液に DON, NIV, HT-2 及び T-2 として各 0.1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 25 ng/mL 相当量), ウェット製品のブランク試料溶液に DON, NIV, HT-2 及び T-2 として各 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 5 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について, 2.2 の 4)に従って調製した同濃度の各かび毒標準液に対するピーク面積比を確認した. 結果は, Table 7 のとおり, 素材乾燥ジャーキーハードタイプ (犬用) に添加した DON, 粉ミルク (猫用) に添加した NIV 及びすべての種類に添加した T-2 は試料マトリックスによる影響があった.

試料マトリックスにより影響があった NIV 及び T-2 の粉ミルク (猫用) について, ブランク試料溶液の希釈操作によって改善が認められないかを検討したところ, T-2 では 5 倍希釈によって改善されたが, NIV では 10 倍希釈によっても改善されなかった.

Table 7 Matrix effect study

Types	Concentration		Matrix effect ^{b)}			
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample ^{a)} (mg/kg)	(%)			
			DON	NIV	HT-2	T-2
Dry food for cats	25	0.1	108	109	105	121
Semi dry food for dogs	25	0.1	99	94	106	116
Wet food for dogs	5	0.01	101	90	108	119
Formed jerky for dogs	25	0.1	106	93	107	119
Dried jerky for dogs (hard type)	25	0.1	112	103	105	125
Dried jerky for dogs (soft type)	25	0.1	107	102	104	121
Confectionery (biscuit) for dogs	25	0.1	110	88	108	117
Milk powder for cats	25	0.1	102	163	110	125
Milk powder for cats (5 times dilution) ^{c)}	25	0.1	96	135	97	82
Milk powder for cats (10 times dilution) ^{c)}	25	0.1	100	125	91	77

$n = 3$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak area of mycotoxin in the presence of matrix to that in the absence of matrix

c) Blank solution (milk powder) diluted by water-methanol-acetonitrile (18:1:1)

3.7 添加回収試験

2.6 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 8 のとおり、DON の平均回収率は 81.6~106 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 13 % 以下，NIV の平均回収率は 64.9~145 %， RSD_r として 20 % 以下，HT-2 の平均回収率は 96.0~113 %， RSD_r として 9.3 % 以下，T-2 の平均回収率は 87.7~117 %， RSD_r として 7.1 % 以下の成績が得られた。NIV はウェット製品（犬用）を除く 7 種類の愛玩動物用飼料において，低回収率又は過回収率となった。T-2 はドライ製品（猫用）及び素材乾燥ジャーキーハードタイプ（犬用）で過回収率となった。その他の試験区は愛玩動物用飼料等の検査法⁸⁾第 11 章試験法の妥当性確認法（以下「試験法の妥当性確認法」という。）に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。NIV の低回収は多機能カラム及びマトリックス効果の検討で問題が無かったことから抽出方法の改良が必要であると考えられた。また，粉ミルク（猫用）の NIV の過回収は，マトリックス効果で検討した希釈操作においても改善が認められなかったことから，分析法の改良が必要であると考えられた。なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig.6-1 及び 6-2 に示した。

Table 8 Recoveries for DON, NIV, HT-2 and T-2

Mycotoxins	Spiked level (mg/kg)	Dry food for cats		Semi dry food for dogs		Wet food for dogs		Formed jerky for dogs	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
DON	0.02	—	—	—	—	99.2	7.8	—	—
	0.1	106	8.6	96.7	7.1	—	—	103	3.6
	0.2	—	—	—	—	98.4	3.2	—	—
	1	103	0.8	93.3	1.7	—	—	89.5	1.6
NIV	0.02	—	—	—	—	84.5	8.8	—	—
	0.1	80.2	5.2	69.8	13	—	—	71.8	12
	0.2	—	—	—	—	95.8	3.2	—	—
	1	79.4	7.3	76.8	1.8	—	—	70.3	2.5
HT-2	0.01	—	—	—	—	106	5.3	—	—
	0.02	—	—	—	—	96.0	4.2	—	—
	0.04	102	6.5	110	5.5	—	—	107	3.9
	0.1	105	3.7	104	4.0	99.7	1.7	106	5.2
	0.5	107	1.2	107	1.9	—	—	109	2.1
T-2	0.01	—	—	—	—	88.9	4.4	—	—
	0.02	—	—	—	—	93.4	2.5	—	—
	0.04	106	2.5	105	2.0	—	—	108	2.2
	0.1	114	3.8	104	4.0	89.6	1.4	108	6.4
	0.5	101	1.9	96.2	2.4	—	—	102	2.7

Mycotoxins	Spiked level (mg/kg)	Dried jerky for dogs (hard type)		Dried jerky for dogs (soft type)		Confectionery (biscuit) for dogs		Milk powder for cats	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
DON	0.1	90.5	13	81.6	11	99.0	13	103	9.5
	1	93.5	1.7	85.5	3.1	92.5	1.6	98.5	1.6
NIV	0.1	64.9	20	72.7	6.6	84.5	6.6	145	9.1
	1	73.7	1.3	73.1	1.0	72.0	2.7	108	2.5
HT-2	0.04	110	4.8	104	7.4	113	2.8	106	5.3
	0.1	109	2.8	103	3.6	108	5.1	108	9.3
	0.5	108	2.3	100	3.5	104	1.9	109	1.2
T-2	0.04	115	5.9	103	1.2	106	2.4	111	2.3
	0.1	117	2.1	108	3.3	105	2.8	110	1.6
	0.5	96.0	3.2	87.7	4.3	88.7	7.1	101	1.6

— : Not tested

In dark cell, mean recovery (spiked level: more than 0.1 mg/kg) is less than 80 % or more than 110 %.

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

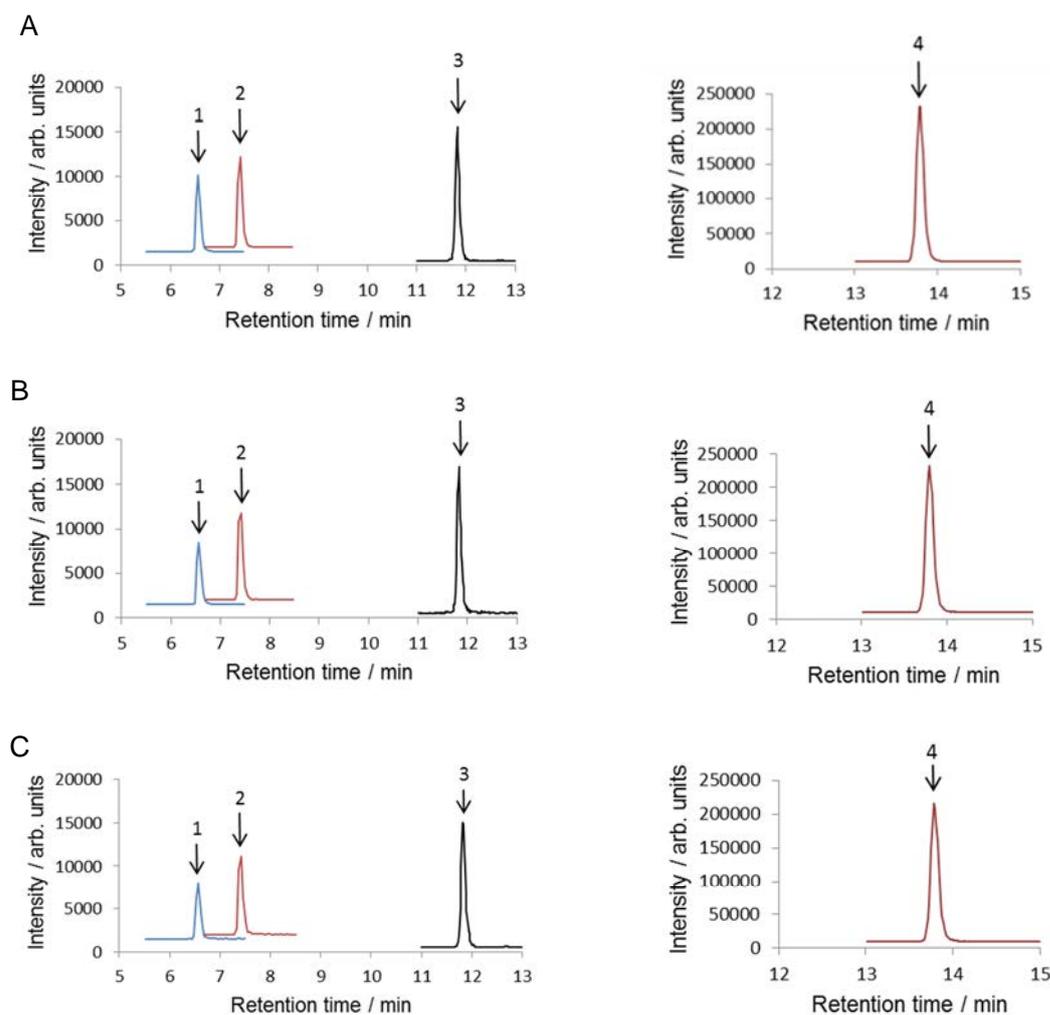


Fig. 6-1 SRM chromatograms of standard solution and spiked samples (dry food and semi-dry food)

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 3-1 and 3-2. Arrows indicate the retention time of 1: NIV, 2: DON, 3: HT-2 and 4: T-2. The baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (The concentration is 250 ng/mL of DON and NIV each (2.5 ng as injection amount) and 125 ng/mL of HT-2 and T-2 each (1.25 ng as injection amount))

B: Dry food for cats (spiked at 1 mg/kg of DON and NIV each (2.5 ng as injection amount) and 0.5 mg/kg of HT-2 and T-2 each (1.25 ng as injection amount))

C: Semi-dry food for dogs (spiked at 1 mg/kg of DON and NIV each (2.5 ng as injection amount) and 0.5 mg/kg of HT-2 and T-2 each (1.25 ng as injection amount))

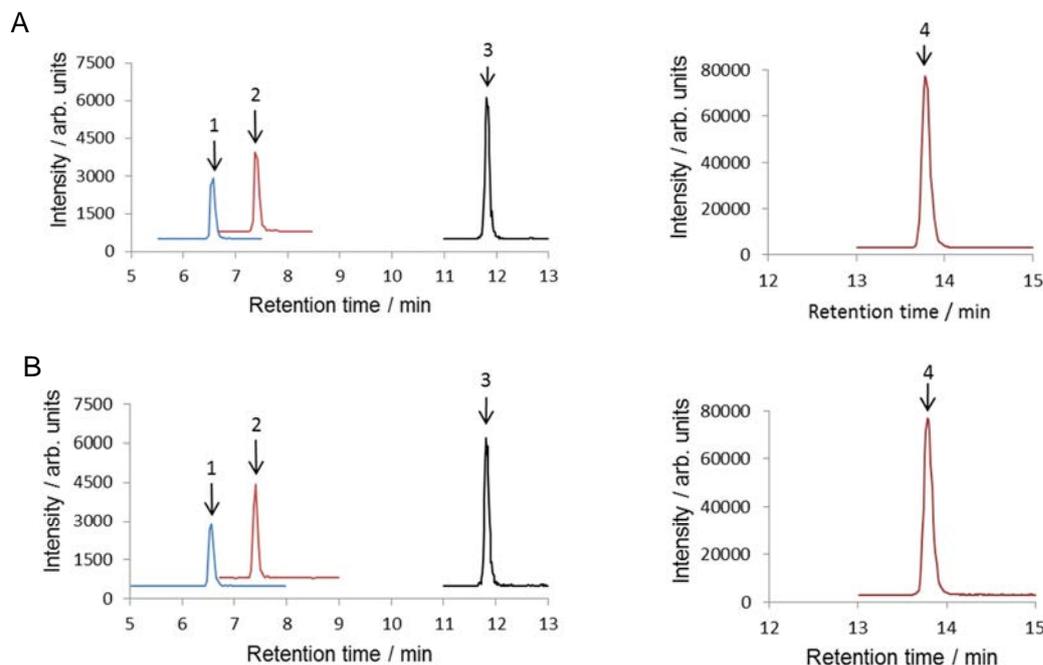


Fig. 6-2 SRM chromatograms of standard solution and spiked sample (wet food) (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 3-1 and 3-2. Arrows indicate the retention time of 1: NIV, 2: DON, 3: HT-2 and 4: T-2. The baselines were shifted for display.)

- A: Standard solution (The concentration is 100 ng/mL of DON and NIV each (1.0 ng as injection amount) and 50 ng/mL of HT-2 and T-2 each (0.5 ng as injection amount))
 B: Wet food for dogs. (spiked at 0.2 mg/kg of DON and NIV each (1.0 ng as injection amount) and 0.1 mg/kg of HT-2 and T-2 each (0.5 ng as injection amount))

3.8 定量限界（下限）及び検出限界の検討

各かび毒の検量線が直線性を示した範囲，DON及びNIVにおいては2~1000 ng/mLの下端付近となる濃度（ウェット製品以外で0.1 mg/kg相当量（最終試料液中濃度25 ng/mL相当量），ウェット製品で0.02 mg/kg相当量（最終試料液中濃度10 ng/mL相当量）），HT-2及びT-2においては0.5~1000 ng/mLの下端付近となる濃度（ウェット製品以外で0.04 mg/kg相当量（最終試料液中濃度10 ng/mL相当量），ウェット製品で0.01 mg/kg相当量（最終試料液中濃度5 ng/mL相当量））の添加回収試験の結果から，得られた分析値の標準偏差の10倍となる濃度を求めた。その結果，DON及びNIVの定量限界（下限）濃度はウェット製品以外で0.1 mg/kg，ウェット製品で0.02 mg/kg，HT-2及びT-2の定量限界（下限）濃度はウェット製品以外で0.04 mg/kg，ウェット製品で0.01 mg/kgであった。なお，Table 8に示したとおり，当該定量限界（下限）濃度における添加回収試験結果はDON，HT-2及びT-2は8種類すべての愛玩動物用飼料，NIVはドライ製品，ビスケット及びウェット製品において良好であった。

検出限界は，上記添加回収試験により得られた分析値の標準偏差にStudentの t -値を乗じた値の2倍とした。その結果，DON及びNIVの検出限界濃度はウェット製品以外で0.06 mg/kg，ウェット製品で0.01 mg/kg，HT-2及びT-2はウェット製品以外で0.01 mg/kg，ウェット製品で0.002 mg/kgであった。

4 まとめ

愛玩動物用飼料中のトリコテセン系かび毒 4 種類 (DON, NIV, HT-2 及び T-2) について、JFRL 法を基に LC-MS/MS を用いた同時定量法を検討し、以下の結果が得られた。

- 1) 検量線は、DON 及び NIV は 2~1000 ng/mL (注入量として 0.02~10 ng 相当量) , HT-2 及び T-2 は 0.5~1000 ng/mL (注入量として 0.005~10 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線の濃度範囲は、ウェット製品以外では DON 及び NIV を 0.008~4 mg/kg, HT-2 及び T-2 を 0.002~4 mg/kg 含有する試料, ウェット製品では DON 及び NIV を 0.004~2 mg/kg, HT-2 及び T-2 を 0.001~2 mg/kg 含有する試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各かび毒濃度範囲に相当する。
- 2) 今回用いた試料について、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) DON 及び NIV として 0.1 及び 1 mg/kg 相当量 (ウェット製品では 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量) , HT-2 及び T-2 として 0.04, 0.1 及び 0.5 mg/kg 相当量 (ウェット製品では 0.01, 0.02 及び 0.1 mg/kg 相当量) を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、DON 及び HT-2 は 8 種類すべての愛玩動物用飼料, NIV はウェット製品, T-2 はドライ製品及び素材乾燥ジャーキーハードタイプを除く 6 種類の愛玩動物用飼料において、試験法の妥当性確認法に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 4) 本法による DON 及び NIV の定量限界 (下限) は 0.1 mg/kg (ウェット製品では 0.02 mg/kg) , 検出限界は 0.06 mg/kg (ウェット製品では 0.01 mg/kg) , HT-2 及び T-2 の定量限界 (下限) は 0.04 mg/kg (ウェット製品では 0.01 mg/kg) , 検出限界は 0.01 mg/kg (ウェット製品では 0.002 mg/kg) であった。
- 5) T-2 の過回収については、最終溶液の希釈が有効と考えられたが、NIV の過回収については、マトリックス効果で検討した希釈操作においても改善が認められなかったことから、分析法の改良が必要であると考えられた。また、NIV の低回収については、多機能カラム及びマトリックス効果の検討で問題が認められなかったことから、抽出方法の改良が必要であると考えられた。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長, 生産局長通知: 麦類のデオキシニバレノール・ニバレノール汚染低減のための指針の策定・普及について, 平成 20 年 12 月 17 日, 20 消安第 8915 号, 20 生産第 5731 号 (2008).
- 2) 食品安全委員会: かび毒評価書 デオキシニバレノール及びニバレノール, 2010 年 11 月 (2010).
- 3) JECFA: Evaluation of certain contaminants in food, eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO technical report series 1002 (2017) (ISBN: 978-92-4-121002-7).
- 4) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知: 小麦のデオキシニバレノールに係る暫定的な基準値の設定について, 平成 14 年 5 月 21 日食発第 0521001 号(2002).
- 5) 農林水産省畜産局長通知: 飼料の有害物質の指導基準の制定について, 昭和 63 年 10 月 14 日, 63 畜 B 第 2050 号 (1988).

- 6) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009).
- 7) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 8) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消技第 1764 号 (2009).
- 9) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 29 年度愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業報告書，平成 30 年 3 月，(2018).

技術レポート**5 飼料及び愛玩動物用飼料中の砒素, カドミウム, 鉛及び水銀の迅速・多元素同時定量法の開発**田端 麻里^{*1}, 野村 昌代^{*1}, 鈴木 知華^{*2}**Development of the Rapid Simultaneous Determination Method of Arsenic, Cadmium, Lead and Mercury in Feed and Pet Food by ICP-MS**Mari TABATA^{*1}, Masayo NOMURA^{*1} and Chika SUZUKI^{*2}(^{*1} Fertilizer and Feed inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),
^{*2} Sendai Regional Center, FAMIC)

We have developed a rapid simultaneous quantitative determination method of the concentration of arsenic, cadmium, lead and mercury in feed and pet food using an inductively coupled plasma-mass spectrometer (ICP-MS).

Having added 5 mL of nitric acid, 2 mL of hydrogen peroxide and 0.4 mL of gold-lutetium mixed solution to the samples, they were digested by a microwave digestion system at 1400W for 40 minutes. Having further added rhodium and rhenium as inner standard elements to the digested samples, arsenic, cadmium, lead and mercury were quantified by ICP-MS.

Recovery tests were conducted on fish meal, poultry by-product meal and rice straw. Fish meal was added with 15 mg/kg of arsenic, 3 mg/kg of cadmium, 7 mg/kg of lead, and 1 mg/kg of mercury. Poultry by-product meal was added with 7 mg/kg of arsenic, 3 mg/kg of cadmium, 7 mg/kg of lead, and 1 mg/kg of mercury. Rice straw was added with 7 mg/kg of arsenic, 1 mg/kg of cadmium, 3 mg/kg of lead, and 0.4 mg/kg of mercury. The resulting mean recoveries ranged from 98.8 % to 107 % for arsenic, 98.7 % to 105 % for cadmium, 93.1 % to 96.7 % for lead, and 89.5 % to 92.4 % for mercury. The repeatability in the form of the relative standard deviations (RSD_r) was less than 2.4 % for arsenic, less than 3.6% for cadmium, less than 2.1 % for lead, and less than 3.3 % for mercury.

Key words: arsenic; cadmium; lead; mercury; inductively coupled plasma-mass spectrometer (ICP-MS); feed; pet food

キーワード：砒素；カドミウム；鉛；水銀；誘導結合プラズマ質量分析計；飼料；愛玩動物用飼料

1 緒 言

飼料及び愛玩動物用飼料中の有害重金属等（カドミウム, 水銀, 鉛及び砒素）については, 飼料の有害物質の指導基準及び管理基準¹⁾並びに愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令²⁾において基準値が定められており, カドミウムは配合飼料, 乾牧草等で 1 mg/kg, 魚粉, 肉粉及び肉骨粉で 3 mg/kg, 愛玩動物用飼料で 1 µg/g, 水銀は配合飼料, 乾牧草等で 0.4 mg/kg, 魚粉, 肉粉及び肉骨

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 仙台センター

粉で 1 mg/kg, 鉛は配合飼料, 乾牧草等で 3 mg/kg, 魚粉, 肉粉及び肉骨粉で 7 mg/kg, 愛玩動物用飼料で 3 µg/g, 砒素は配合飼料, 乾牧草等(稲わらを除く.) で 2 mg/kg, 稲わらで 7 mg/kg, 魚粉で 15 mg/kg, 肉粉及び肉骨粉で 7 mg/kg, 愛玩動物用飼料で 15 µg/g である. 定量法としては, 試料の灰化(水銀及び砒素を除く.) の後, 酸による湿式分解を行い, 水銀については還元気化水銀測定装置により測定, カドミウム, 鉛及び砒素については原子吸光光度計により測定する方法が飼料分析基準³⁾及び愛玩動物用飼料等の検査法⁴⁾に記載されている. これらの分析法は, 前処理に時間を要し, 測定も元素ごとに個別に行う必要があるため迅速性に欠ける.

近年, 食品検査等の分野では, マイクロ波分解装置を用いた前処理時間の短縮化, 誘導結合プラズマ質量分析計(以下「ICP-MS」という.) による多元素同時分析が実用化されている. そこで, 今回, 肥料等試験法⁵⁾(以下「肥料試験法」という.) 及び AOAC Official Method 2015.01⁶⁾(以下「AOAC 法」という.) を基に, 飼料及び愛玩動物用飼料中の有害重金属等の ICP-MS による迅速・多元素同時定量法を開発し, 飼料分析基準及び愛玩動物用飼料等の検査法への適用の可否を検討したので, その概要を報告する.

2 実験方法

2.1 試料

1) 飼料及び愛玩動物用飼料

魚粉, チキンミール, アルファルファ乾草, 稲わら, 愛玩動物用飼料(ドライ製品(犬用), ウェット製品(犬用), 成形ジャーキー(犬用), 素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用))は 1 mm 以下になるまで粉砕した. なお, ジャーキーで有姿のままでは粉砕が困難な試料は, はさみ等を用いて裁断したのち粉砕した. 愛玩動物用飼料(ウェット製品(犬用))はフードプロセッサで粉砕した. 粒度が 1 mm 以下であった粉ミルク(犬用)はそのまま使用した.

なお, 検討に用いた愛玩動物用飼料の原材料を Table 1 に示した.

2) 認証標準物質

認証標準物質として, BCR-627 (IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements, EU) 供給, マグロミール) を使用した.

Table 1 Ingredients list of the pet foods used in this study

Pet food types	Ingredients
Dry food for dogs	Grains (corn, wheat flour, bread crumbs, corn gluten meal, brown rice), meats (chicken meal, minced chicken meats, chicken extracts), fishes (fish meal, dried minnows), animal fat, beans (soybean, soybean extracts), vegetables (beet pulp, carrot powdery, spinach powdery), beer yeast, cheese, oligosaccharide, minerals (Ca, Cl, Cu, I, K, Na, Zn), sorbitol, glyceline, vitamins (V. A, V. B ₁ , V. B ₂ , V. B ₅ , V. B ₁₂ , V. D, V. E, V. K, choline, pantothenic acid), glucosamine hydrochloride, preservative (potassium), fumaric acid, coloring (titanium dioxide, food red no.106, food yellow no.4, food yellow no.5, food blue no.1), antioxidants (sodium erythorbate, mixed tocopherol, herbal extracts), chondroitin sulfate
Wet food for dogs	Meats (beef, chicken, mutton), wheat flour, carrot, green pea, potato, oligosaccharide, tomato paste, seasoning, minerals, polysaccharide thickener, coloring (titanium dioxide, iron sesquioxide), emulsifier, vitamins, antioxidant (EDTA-Ca·Na), glucosamine, color former (sodium nitrite)
Formed jerky for dogs	Wheat flour, meats (chicken, beef, chicken white meat), cheese, sugar, gelatin, glyceline, propylene glycol, coloring (oxidized titanium, food yellow no.4, food red no.106), sorbitol, preservative (potassium sorbate), mineral (Na), pH adjuster, swelling agent, flavour, antioxidant (sodium erythorbate)
Dried jerky for dogs (hard type)	Deer meat
Milk powder for dogs	Milks (non-fat dry milk, casein), oils and fats (vegetable oil, animal fat, γ -linolenic acid), egg yolk powder, soybean protein, oligosaccharide, L-carnitine, minerals (Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Co), emulsifier, vitamins (V. A, V. B ₁ , V. B ₂ , V. B ₆ , V. B ₁₂ , V. D, V. E, V. K, nicotinic acid, pantothenic acid, folic acid, choline), flavour, taurine

2.2 試薬

- 1) 塩酸及び硝酸は Ultrapur-100 (関東化学製) を用いた。過酸化水素は原子吸光分析用 (富士フイルム和光純薬製) を用いた。L-システイン酸は和光特級 (富士フイルム和光純薬製) を用いた。水は Milli-Q Integral 5 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。
- 2) 希釈溶媒 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-システイン酸含有塩酸-硝酸-水 (1+2+37))
L-システイン酸 8 mg に水 740 mL, 塩酸 20 mL 及び硝酸 40 mL を加えて 800 mL とした。
- 3) 標準原液
砒素, カドミウム, 金, 鉛, ルテチウム, 水銀, レニウム及びロジウムの標準原液は, Table 2 に示した供給業者, 規格のものをを用いた。

Table 2 Standards used in this study

	Guaranteed value ($\mu\text{g/mL}$)	Manufacturers	Specification
Arsenic standard solution	99.4	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Cadmium standard solution	100.2	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Gold standard solution	1004	Kanto Chemical	for Atomic absorption spectrochemical analysis
Lead standard solution	100.3	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Lutetium standard solution	1003	Kanto Chemical	for Atomic absorption spectrochemical analysis
Mercury standard solution	100.3	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Rhenium standard solution	1005.1	ACROS ORGANICS	for Atomic absorption spectrochemical analysis
Rhodium standard solution	1007	Kanto Chemical	for Atomic absorption spectrochemical analysis

4) 重金属等混合標準原液

砒素，カドミウム，鉛及び水銀標準原液 1 mL を 20 mL 全量フラスコに正確に入れて混合し，更に標線まで希釈溶媒を加えて重金属等混合標準原液を調製した（この液 1 mL は，各重金属等としてそれぞれ 5 μg を含有する．）。

5) 混合内標準液

レニウム及びロジウム標準原液各 100 μL を 20 mL の全量フラスコに入れて混合し，更に標線まで硝酸（1+19）を加えて混合内標準原液を調製した（この液 1 mL は，各重金属等としてそれぞれ 5 μg を含有する．）。更に混合内標準原液 1 mL を 50 mL の全量フラスコに入れ，標線まで硝酸（1+19）を加えて混合内標準液を調製した（この液 1 mL は，各重金属等としてそれぞれ 100 ng を含有する．）。

6) 金-ルテチウム混合液

金及びルテチウム標準原液各 1 mL を 10 mL の全量フラスコに入れて混合し，更に標線まで硝酸（1+19）を加えて金-ルテチウム混合液を調製した（この液 1 mL は，各重金属等としてそれぞれ 100 μg を含有する．）。

7) 重金属等混合標準液

重金属等混合標準原液，混合内標準液及び金-ルテチウム混合液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し，1 mL 中に各重金属等として 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100 ng，各内標準として 1 ng，金及びルテチウムとして 200 ng を含有する重金属等混合標準液を調製した。

同時に重金属等混合標準原液を加えずに同様に操作し，濃度 0 ng/mL の重金属等混合標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

1) 粉砕機：

粉砕機 1（粉砕機 2 及び 3 以外の試料用）：ZM 200 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）

粉砕機 2（稲わら用）：SM 100 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数（仕様）1690 rpm）

粉砕機 3（ジャーキー用）：GM 200 Retsch 製（使用時回転数 10000 rpm）

2) マイクロ波分解装置：Multiwave 3000 Anton-Paar 製

3) ポリロート：ケニス製（口径 30 mm）

4) スポイト：エコノスポイト 2 mL サンプラテック製

5) 遠心沈殿管 : 50 mL Super clear Labcon 製

6) ICP-MS :

オートサンプラー部 : ASX-560 Teledyne Technologies 製

誘導結合プラズマ質量分析計部 : iCAP RQ ICP-MS Thermo Fisher Scientific 製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 0.5 g を正確に量ってテフロン TFM 製の高压分解容器に入れ, 硝酸 5 mL, 過酸化水素 2 mL 及び金-ルテチウム混合液 0.4 mL を加え, 発泡がおさまった後マイクロ波分解装置を用いて Table 3 の分解プログラムによって分解した. 放冷後, 分解液を 20 mL の全量フラスコに水で移し込み, 更に全量フラスコの標線まで水を加えた. この液の全量を 50 mL の遠心沈殿管に入れ, 1700×g で 5 分間遠心分離した. 上澄み液 1 mL 及び混合内標準液 0.1 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れ, 希釈溶媒を全量フラスコの標線まで加え, ICP-MS による測定に供する試料溶液とした.

同時に試料を用いないで同一操作を行い, 空試験溶液を調製した.

Table 3 Operating conditions of microwave digestion equipment

Process	Electric power (W)	Time (min)
step 1 (Heating)	0→1400	10
step 2 (Fixed electric power)	1400	40
step 3 (Cool)	0	30

2) ICP-MS による測定

試料溶液及び各重金属等混合標準液を ICP-MS に導入し, 各モニターイオンにおけるイオンカウント値を得た. 測定条件を Table 4 に示した.

Table 4 Operating conditions of ICP-MS

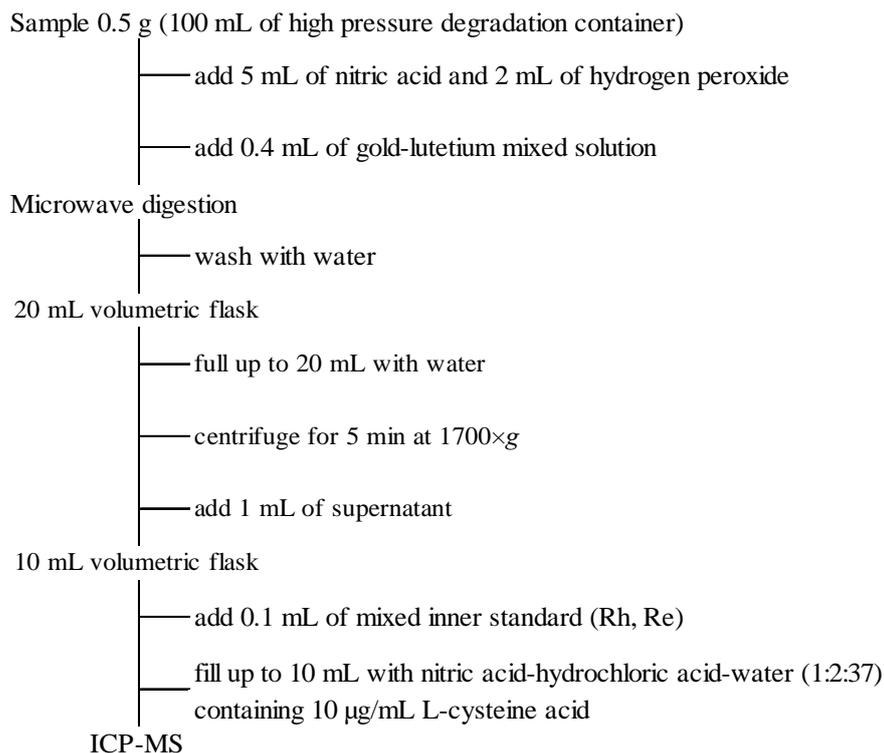
Nebulizer gas	Ar (1.08 L/min)
Plasma gas	Ar (14.0 L/min)
Auxiliary gas	Ar (0.80 L/min)
Collision gas	He (4.34 L/min)
High-frequency output	1550 W
Monitor ion	^{114}Cd , ^{202}Hg , ^{208}Pb , ^{75}As , ^{103}Rh , ^{187}Re

3) 計算

得られたイオンカウント値から砒素及びカドミウムはロジウムで, 鉛及び水銀はレニウムで内標準補正し, 試料中の砒素, カドミウム, 鉛及び水銀量を算出した.

空試験溶液について, 正の値が得られた場合は結果を差し引いた.

なお, 定量法の概要を Scheme 1 に示した.



Scheme 1 Analytical procedure for arsenic, cadmium, lead and mercury in feed and pet food

2.5 添加回収試験

2.2 の 4)の重金属等混合標準原液を希釈溶媒で正確に希釈し添加に用いた。

魚粉について、砒素として 15 mg/kg 相当量（最終試料溶液中 37.5 ng/mL），カドミウムとして 3 mg/kg 相当量（最終試料溶液中 7.5 ng/mL），鉛として 7 mg/kg 相当量（最終試料溶液中 17.5 ng/mL）及び水銀として 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中 2.5 ng/mL），チキンミールについて、砒素として 7 mg/kg 相当量（最終試料溶液中 17.5 ng/mL），カドミウムとして 3 mg/kg 相当量（最終試料溶液中 7.5 ng/mL），鉛として 7 mg/kg 相当量（最終試料溶液中 17.5 ng/mL）及び水銀として 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中 2.5 ng/mL）並びに稲わらについて、砒素として 7 mg/kg 相当量（最終試料溶液中 17.5 ng/mL），カドミウムとして 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中 2.5 ng/mL），鉛として 3 mg/kg 相当量（最終試料溶液中 7.5 ng/mL）及び水銀として 0.4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中 1 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。なお、回収率は各試料のブランク値を差し引いて算出した。

3 結果及び考察

3.1 検量線の検討

肥料試験法を参考に調製した 0.05~100 ng/mL 各重金属等混合標準液（各内標準として 1 ng/mL を含有する）を ICP-MS に導入し、得られたイオンカウント値から内標準法により検量線を作成した。肥料試験法では、標準液を硝酸（1+19）で希釈しているが、水銀は ICP-MS で測定していない。標準液を硝酸（1+19）で希釈したところ、水銀の検量線は直線性を示さず、全体的にばらつきが認められたため、水銀の肥料試験法で使用している L-システイン酸を加えることとし、

10 µg/mL L-システイン酸含有硝酸 (1+19) で希釈した。得られた検量線の一例は Fig 1-1 のとおり、水銀の高濃度側のばらつきは改善したが、水銀として、0.05~100 ng/mL の範囲で検量線が直線性を示さなかった。また、水銀はメモリー効果の影響が大きく、100 ng/mL 標準液を測定した直後に測定した硝酸 (1+19) は、1 ng/mL 標準液と同程度のイオンカウント値となった。

そこで、メモリー効果を軽減するため、各重金属等の濃度を 10 ng/mL までとし、AOAC 法を参考に 200 ng/mL となるように金-ルテチウム混合液を加えた後、塩酸を追加した希釈溶媒で重金属等混合標準液を 2.2 の 7) により調製した。その結果、0.05~10 ng/mL の範囲で直線性を示したが、鉛の低濃度範囲 (0.05~1 ng/mL) では相関係数が 0.995 を下回ることがあり、経時変化及び容器等使用器具からの鉛の溶出等の可能性が示唆されたため、鉛については検量線の範囲を 1~10 ng/mL とすることとした。得られた検量線の一例を Fig 1-2 に示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、各重金属等を 0.02~4 mg/kg (鉛は 0.4~4 mg/kg) 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各重金属等濃度範囲に相当する。

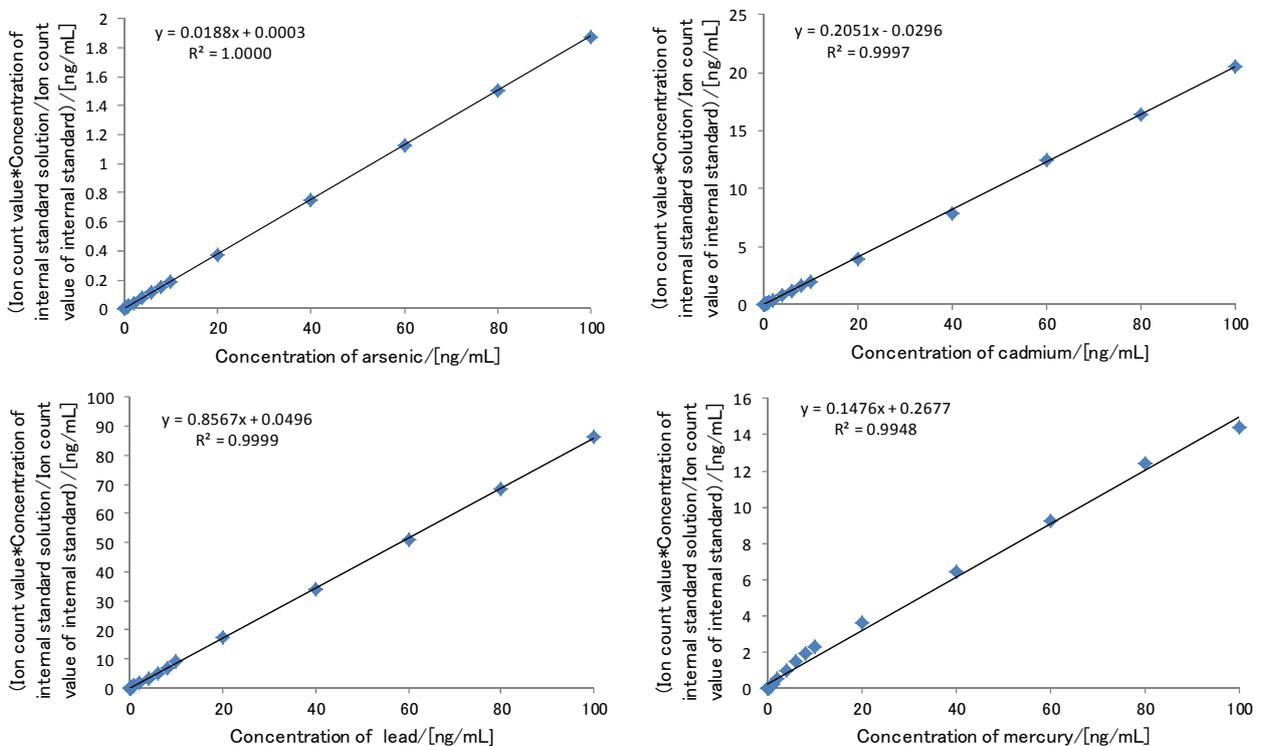


Fig. 1-1 Calibration curves of arsenic, cadmium, lead and mercury (Diluted with nitric acid (1:19) containing 10 µg/mL L-cysteine acid)

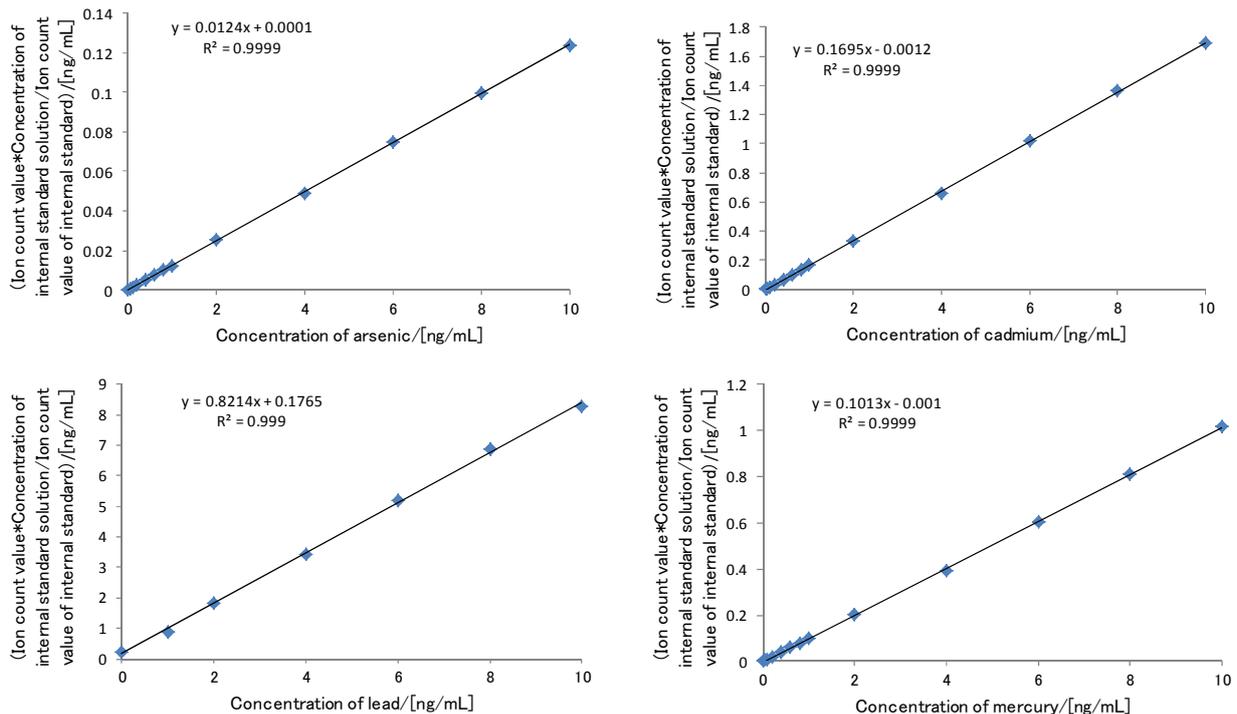


Fig. 1-2 Calibration curves of arsenic, cadmium, lead and mercury
 (Diluted with nitric acid-hydrochloric acid-water (1:2:37) containing 10 $\mu\text{g/mL}$ L-cysteine acid)
 (Containing 200 ng/mL gold and lutetium)
 (Concentration range of lead: 1~10 ng/mL)

3.2 予備試験

予備的に 2.1 の 1)の試料を用い、肥料試験法を基に操作の確認を行った。肥料試験法の抽出条件は、試料（液状肥料 20.0 g（水分含有量から換算して 20.0 g 中の固形分含有量は 0.5 g 程度を上限とする。））。固形肥料中のカドミウムの分析法については 0.2 g）に硝酸 2.5 mL 及び過酸化水素 2 mL を加え、マイクロ波分解装置で 1400 W で 10 分以上加熱する方法である。肥料試験法の条件では、一部の試料（チキンミール及び稲わら）において、分解液の着色及び混濁又は黒褐色沈殿物が認められ、マイクロ波分解装置による分解が不十分であった。そのため、硝酸 5 mL 及び過酸化水素 2 mL を加え、マイクロ波分解装置で 1400 W で 40 分間加熱（この時の分解温度は約 140~200 $^{\circ}\text{C}$ であった。）するように変更した。さらに、AOAC 法を参考にしてマイクロ波分解装置での分解前に金-ルテチウム混合液 0.4 mL を加えるよう変更した。また、操作由来の重金属等の測定値が出る可能性があることから、空試験溶液を調製するよう変更した。さらに、器具由来の重金属等が検出される可能性があることから、濃度 0 ng/mL の標準液を作成するように肥料試験法から変更した。

器具由来の重金属等の測定値を抑えるため、器具は、可能な限りポリプロピレン等の樹脂製を使用し、使用前に硝酸 (1+3) に 12 時間以上浸した後、超純水で十分すすいでから用いた。全量フラスコ等のガラス器具を用いる場合は、無砒素のホウケイ酸ガラス製のものを用い、JIS K 8007 に準じて硝酸 (1+1) で 1 日間以上浸した後、超純水で十分すすいでから使用した。

3.3 BCR 認証標準物質の分析

本法の真度を確認するため, 認証標準物質 BCR-627 を用いて 5 点併行で 2.4 に従って定量を行った。

その結果, Table 5 に示すように砒素は本法では 4.6 mg/kg となり, 認証値との間に有意差は認められなかった。

Table 5 Determination of a BCR certified reference material

Arsenic	
Certified value of BCR-627 (mg/kg)	4.8 ± 0.3 ^{a)}
Determined value ^{b)} (mg/kg)	4.6
RSD _r ^{c)} (%)	1.8

a) Uncertainty: half width of the 95 % confidence interval

b) Mean ($n = 5$)

c) Relative standard deviation of repeatability

3.4 添加回収試験

2.5 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 6 のとおり, 砒素については平均回収率は 98.8~107 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 2.4 % 以下, カドミウムについては平均回収率は 98.7~105 %, RSD_r は 3.6 % 以下, 鉛については平均回収率は 93.1~96.7 %, RSD_r は 2.1 % 以下, 水銀については平均回収率は 89.5~92.4 %, RSD_r は 3.3 % 以下の成績が得られ, 飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン (以下「妥当性確認法ガイドライン」という。) に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。

Table 6 Recoveries for arsenic, cadmium, lead and mercury

Spiked level (mg/kg)	Fish meal		Poultry by-product meal		Rice straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Arsenic	7	—	107	0.5	98.8	1.4
	15	104	—	—	—	—
Cadmium	1	—	—	—	98.7	1.4
	3	105	102	3.6	—	—
Lead	3	—	—	—	93.1	2.1
	7	95.7	96.7	2.0	—	—
Mercury	0.4	—	—	—	89.5	0.5
	1	92.4	91.2	3.3	—	—

—: Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

4 まとめ

飼料及び愛玩動物用飼料に含まれる有害重金属等の定量について, 肥料試験法及び AOAC 法を基に, ICP-MS を用いた迅速・多元素同時定量法の飼料分析基準及び愛玩動物用飼料等の検査法へ

の適用の可否について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 200 ng/mL となるように金-ルテチウム混合液を加えた後、希釈溶媒で調製した標準液を測定して得られた検量線は、砒素、カドミウム及び水銀では各 0.05~10 ng/mL (注入量として 0.02~4 mg/kg) , 鉛では 1~10 ng/mL 相当量 (注入量として 0.4~4 mg/kg) の範囲で直線性を示した。
なお、当該検量線の濃度範囲は、各重金属等を 0.02~4 mg/kg (鉛は 0.4~4 mg/kg) 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各重金属等濃度範囲に相当する。
- 2) 抽出条件は、硝酸 5 mL, 過酸化水素 2 mL 及び金-ルテチウム混合液 0.4 mL を添加後、マイクロ波分解装置で 1400 W, 40 分間加熱するよう肥料試験法から変更した。また、操作由来の重金属等の測定値が出る可能性があることから、空試験溶液を調製するよう変更した。さらに、器具由来の重金属等が検出される可能性があることから、濃度 0 ng/mL の標準液を作成するように変更した。
- 3) 認証標準物質を分析して、本法による砒素の分析値の正確さを確認したところ、標準試料の砒素の認証値との間に有意差は認められなかった。
- 4) 魚粉、チキンミール及び稲わらに、砒素として 7 又は 15 mg/kg 相当量、カドミウムとして 1 又は 3 mg/kg 相当量、鉛として 3 又は 7 mg/kg 相当量、水銀として 0.4 又は 1 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について、昭和 63 年 10 月 14 日、63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 2) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令、平成 21 年 4 月 28 日、農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009).
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について、平成 20 年 4 月 1 日、19 消安第 14729 号 (2008).
- 4) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について、平成 21 年 9 月 1 日、21 消技第 1764 号 (2009).
- 5) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：肥料等試験法 (2018).
- 6) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th edition, AOAC official method 2015.01 heavy metals in food, Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).

技術レポート

6 飼料用稲中のフェリムゾンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の追加検討及び共同試験

鈴木 知華^{*1}, 新井 詠子^{*2}, 三枝 尚子^{*2}

Additional Consideration and Collaborative Study of Determination Method of Ferimzone in Rice Straw, Whole-Crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS

Chika SUZUKI^{*1}, Eiko ARAI^{*2} and Naoko SAEGUSA^{*2}(*¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), Sendai Regional Center,*² FAMIC, Sendai Regional Center (Now Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan))

We have conducted a collaborative study for validating the determination method of (*E*)-ferimzone and (*Z*)-ferimzone in rice straw, whole-crop rice silage (WCRS) and paddy rice for feed using a liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Having added water to a sample, ferimzone was extracted with acetone, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a volume of 200 mL. The diluted solution was purified with a SPE column (InertSep Slim-J C18-B, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), and injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of ferimzone. LC separation was then carried out on an ODS column (Inertsil ODS-SP, 2.1 mm i.d. × 100 mm, 3 μm, GL Sciences Inc.) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

A collaborative study was conducted by eleven laboratories using rice straw, WCRS and paddy rice, all of which were added with (*E*)-ferimzone and (*Z*)-ferimzone according to the following specifications: 2 and 20 mg/kg for rice straw, 5 and 30 mg/kg for WCRS, 0.5 and 10 mg/kg for paddy rice. The resulting mean recoveries, repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD_r and RSD_R), and HorRat, were 85.6 % to 96.0 %, less than 5.9 % and less than 10 %, and less than 1.0 for (*E*)-ferimzone, and 91.8 % to 97.3 %, less than 4.8 % and less than 6.6 %, and less than 0.64 for (*Z*)-ferimzone respectively.

This method was thus validated as useful for inspections of (*E*)-ferimzone and (*Z*)-ferimzone in rice straw, WCRS and paddy rice for feed.

Key words: ferimzone; (*E*)-ferimzone; (*Z*)-ferimzone; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice for feed; rice straw; whole-crop rice silage; paddy rice; collaborative study

キーワード：フェリムゾン；フェリムゾン *E* 体；フェリムゾン *Z* 体；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料用稲；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

*¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター*² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター，現 農林水産省消費・安全局

1 緒 言

フェリムゾン¹⁾は、イネ病害の防除を目的として武田薬品工業が開発し、1991年に国内登録されたピリミジン系殺菌剤である¹⁾。我が国では、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準²⁾において、稲わら中で20 mg/kg、稲発酵粗飼料及び粳米中で5 mg/kgの管理基準値が設定されている。また、厚生労働省の食品、添加物等の規格基準における残留農薬基準値³⁾は、玄米についてフェリムゾン及びその変化生成物である(*E*)-2'-メチルアセトフェノン-4,6-ジメチルピリミジン-2-イルヒドラゾン(本法においてはそれぞれフェリムゾン*Z*体、フェリムゾン*E*体と呼称する。)の和として2 ppmと設定されている。定量法としては、厚生労働省より液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)による農薬等の一斉試験法Ⅰ(農産物)が示されているが、飼料分析基準⁴⁾に記載された飼料中の定量法はなく、その確立が急務となっている。

そのため、財団法人日本食品分析センターが平成20年度飼料中の有害物質分析法開発委託事業において開発した液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(以下「LC-MS/MS」という。)を用いた定量法⁵⁾(以下「JFRL法」という。)を基に、当センターにおいて、飼料用稲中のフェリムゾンのLC-MS/MSを用いた定量法⁶⁾を開発したところであるが、更に今回、追加検討及び共通試料を用いた共同試験を実施し、飼料分析基準への適用の可否について検討したので、その概要を報告する。

参考にフェリムゾン*E*体及び*Z*体の構造式等をFig. 1に示した。

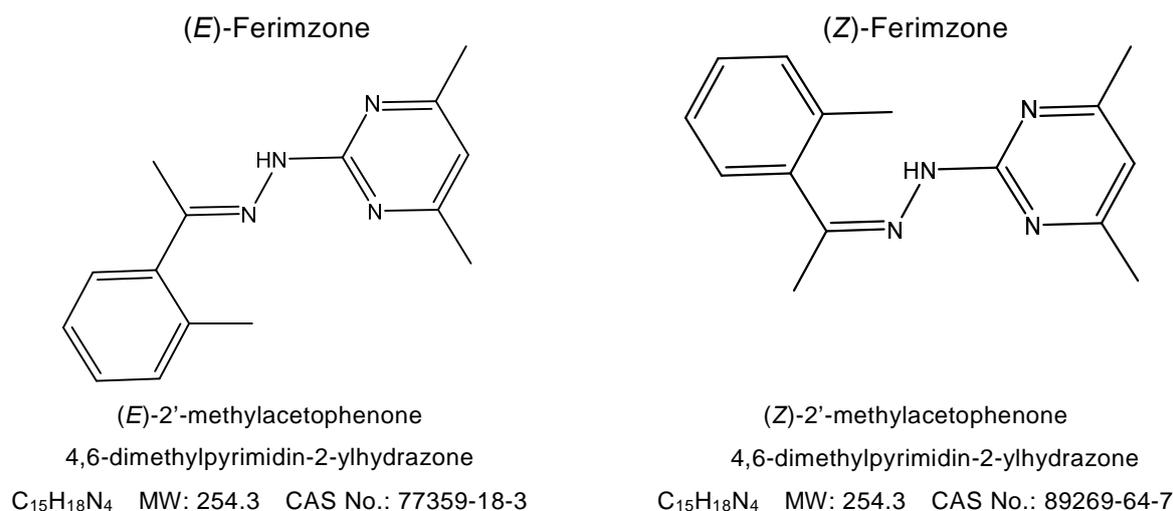


Fig. 1 Chemical structure of (*E*)-ferimzone and (*Z*)-ferimzone

2 実験方法

2.1 追加検討

2.1.1 試料

稲わらを目開き1 mmのスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。

2.1.2 試薬

- 1) アセトニトリルは残留農薬・PCB試験用(LC-MS/MS測定時の溶離液のみLC/MS用(富士フィルム和光純薬製))を用いた。アセトンは残留農薬・PCB試験用を用いた。酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用(1 mol/L溶液, 富士フィルム和光純薬製)を用いた。水はMilli-Q Advantage(Merck Millipore製)により精製した超純水(JIS K 0211の5218に定義された超純水)

を用いた。

2) フェリムゾン E 体標準原液

フェリムゾン E 体標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 99.3 %）25 mg を正確に量って 50 mL の褐色全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてフェリムゾン E 体標準原液を調製した（この液 1 mL は，フェリムゾン E 体として 0.5 mg を含有する．）。

3) フェリムゾン Z 体標準原液

フェリムゾン Z 体標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 100 %）25 mg を正確に量って 50 mL の褐色全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてフェリムゾン Z 体標準原液を調製した（この液 1 mL は，フェリムゾン Z 体として 0.5 mg を含有する．）。

4) フェリムゾン混合標準液

フェリムゾン E 体標準原液及びフェリムゾン Z 体標準原液各 1 mL を 50 mL の褐色全量フラスコに正確に入れ，更に標線までアセトンを加えて，1 mL 中にフェリムゾン E 体及び Z 体としてそれぞれ 10 µg を含有するフェリムゾン混合標準原液を調製した．使用に際して，混合標準原液の一定量をアセトニトリル-水（3+2）で正確に希釈し，1 mL 中にフェリムゾン E 体及び Z 体としてそれぞれ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 及び 50 ng を含有する各混合標準液を調製した．

2.1.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：SM-100 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，回転数（仕様）1430 rpm）
- 2) 振とう機：レシプロシェーカー SR-2W タイテック製（使用時振動数 300 rpm）
- 3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep Slim-J C18-B（充てん剤量 500 mg）ジューエルサイエンス製にリザーバーを連結したもの
- 4) LC-MS/MS：
LC 部：Nexera X2 島津製作所製
MS 部：LCMS-8040 島津製作所製

2.1.4 定量方法

本法は，遮光条件下で行った。

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ，水 30 mL（粃米は 20 mL）を加え 30 分間静置後，更にアセトン 120 mL（粃米は 100 mL）を加え，30 分間振り混ぜて抽出した．200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き，抽出液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後，先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 50 mL で洗浄し，同様に吸引ろ過した．更に全量フラスコの標線までアセトンを加え，この液の一部をアセトンで正確に 10 倍希釈した後，希釈液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ，水 20 mL を加えてカラム処理に供する試料溶液とした．

2) カラム処理

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄した．試料溶液をミニカラムに入れ，流速 1 mL/min 程度で吸引し，液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた．試料溶液の入っていたなす形フラスコを水-アセトニトリル（9+1）5 mL

ずつで2回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させた。10 mLの褐色全量フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル-水 (3+2) 9 mLをミニカラムに加えて、フェリムゾン溶解させた。更に、褐色全量フラスコの標線まで同溶媒を加えた後、この液の一定量を5000×gで5分間遠心分離し、上澄み液をLC-MS/MSによる測定に供する試料溶液とした。

3) LC-MS/MSによる測定

試料溶液及び各フェリムゾン混合標準液各5 µLをLC-MS/MSに注入し、選択反応検出(SRM)クロマトグラムを得た。測定条件をTable 1及び2に示した。

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Inertsil ODS-SP (2.1 mm i.d. x 100 mm, 3 µm), GL Sciences
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate solution - acetonitrile (13:7) (hold for 14 min) → 1 min → (1:9) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	N ₂ (1.5 L/min)
Drying gas	N ₂ (10 L/min)
Heat block temperature	350 °C
DL temperature	150 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

Table 2 MS/MS parameters

Target	Monitor ion (<i>m/z</i>)		Collision energy (eV)
	Precursor ion	product ion	
(E)-Ferimzone and (Z)-Ferimzone	255	132 (quantifier)	21
		91 (qualifier)	35

4) 計 算

得られたSRMクロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中のフェリムゾンE体量及びフェリムゾンZ体量を算出した。

なお、定量法の概要をScheme 1に示した。

- Sample 10.0 g (300 mL amber Erlenmeyer flask)
- add 30 mL of water (paddy rice: 20 mL) and allow to stand for 30 min
 - add 120 mL of acetone (paddy rice: 100 mL) and shake for 30 min
 - filtrate through No. 5B (JIS P3801) under reduced pressure
 - wash with 50 mL of acetone
 - fill up to 200 mL with acetone
 - dilute 10-fold
- 2 mL of sample solution (50 mL eggplant flask)
- add 20 mL of water
- InertSep Slim-J C18-B (500 mg)
- (prewash with 5 mL of acetonitrile and with 5 mL of water)
 - apply sample solution
 - wash with 5 mL of water-acetonitrile (9:1) (twice)
 - place a receiver (10 mL amber volumetric flask)
 - elute with 9 mL of acetonitrile-water (3:2)
 - fill up to 10 mL with acetonitrile-water (3:2)
 - centrifuge for 5 min at 5000×g
- LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for (*E*)-ferimzone and (*Z*)-ferimzone

2.2 共同試験

2.2.1 共同試験用試料

フェリムゾン *E* 体及び *Z* 体を含有しないことを確認した 2 種類の稲わら及び粳米を、1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。また、2 種類の稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）を 60 °C 以下で 20 時間乾燥し、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉砕した。これらについて、約 12 g ずつ小分けしたもの（試料名は非明示）各 2 袋を試験用試料として計 12 袋を各試験室に配付した。

2.2.2 配付試薬

1) フェリムゾン *E* 体標準原液

フェリムゾン *E* 体標準品（関東化学製，純度 99.9 %）200 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてフェリムゾン *E* 体標準原液を調製した（この液 1 mL は，フェリムゾン *E* 体として 10 mg を含有する.）。

2) フェリムゾン *Z* 体標準原液

フェリムゾン *Z* 体標準品（関東化学製，純度 100 %）200 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてフェリムゾン *Z* 体標準原液を調製した（この液 1 mL は，フェリムゾン *Z* 体として 10 mg を含有する.）。

3) 検量線作成用標準原液

1)及び2)で調製した各標準原液 2.5 mL をそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までアセトンを加えて，1 mL 中にフェリムゾン *E* 体及びフェリムゾン *Z* 体としてそれぞれ 500 µg を含有する液を調製した。これらの液 2 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までアセトンを加え，1 mL 中にフェリムゾン *E* 体及びフェリムゾン *Z* 体としてそれぞれ 10 µg を含有

する検量線作成用標準原液を調製した。

4) 稲わら 1 添加用標準液

1)及び2)で調製した各標準原液 4 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加え、1 mL 中にフェリムゾン E 体及びフェリムゾン Z 体としてそれぞれ 200 µg を含有する稲わら 1 添加用標準液を調製した。

5) 稲わら 2 添加用標準液

4)で調製した稲わら 1 添加用標準液 20 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加え、1 mL 中にフェリムゾン E 体及びフェリムゾン Z 体としてそれぞれ 20 µg を含有する稲わら 2 添加用標準液を調製した。

6) WCRS 1 添加用標準液

1)及び2)で調製した各標準原液 6 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加え、1 mL 中にフェリムゾン E 体及びフェリムゾン Z 体としてそれぞれ 300 µg を含有する WCRS 1 添加用標準液を調製した。

7) WCRS 2 添加用標準液

1)及び2)で調製した各標準原液 1 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加え、1 mL 中にフェリムゾン E 体及びフェリムゾン Z 体としてそれぞれ 50 µg を含有する WCRS 2 添加用標準液を調製した。

8) 粳米 1 添加用標準液

1)及び2)で調製した各標準原液 2 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加え、1 mL 中にフェリムゾン E 体及びフェリムゾン Z 体としてそれぞれ 100 µg を含有する粳米 1 添加用標準液を調製した。

9) 粳米 2 添加用標準液

7)で調製した WCRS 2 添加用標準液 20 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加え、1 mL 中にフェリムゾン E 体及びフェリムゾン Z 体としてそれぞれ 5 µg を含有する粳米 2 添加用標準液を調製した。

3)を 1 本及び4)~9)を各 2 本、濃度は非通知で 2.2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した。

2.2.3 分析試料

非明示の 2 点反復で、2.2.1 の試験用試料を用いた。分析試料としては、フェリムゾン E 体及びフェリムゾン Z 体として稲わら 1 にそれぞれ 20 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して稲わら 1 添加用標準液 1 mL 添加）を、稲わら 2 にそれぞれ 2 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して稲わら 2 添加用標準液 1 mL 添加）を、WCRS 1 にそれぞれ 30 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して WCRS 1 添加用標準液 1 mL 添加）を、WCRS 2 にそれぞれ 5 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して WCRS 2 添加用標準液 1 mL 添加）を、粳米 1 にそれぞれ 10 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して粳米 1 添加用標準液 1 mL 添加）を、粳米 2 にそれぞれ 0.5 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して粳米 2 添加用標準液 1 mL 添加）を、各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用いた。

2.2.4 定量方法

2.1.4 によった。

2.2.5 報告方法

2.2.3 の分析試料 12 点の分析値は、分析試料中濃度 (mg/kg) で表し、4 桁目を四捨五入して有効桁数 3 桁まで報告させることとした。

2.2.6 分析実施期間

平成 30 年 11 月 27 日から平成 30 年 12 月 25 日まで

2.2.7 解析方法

結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{7), 8)}を参考に、Cochran 検定, single Grubbs 検定及び paired Grubbs 検定を行い、外れ値の有無を確認した上で平均回収率, 繰返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出し、得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式⁹⁾を用いて HorRat を求めた。

2.2.8 参加試験室

JA 東日本くみあい飼料株式会社品質安全部分析・開発センター, ジーエルサイエンス株式会社, 一般社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター, 一般財団法人日本穀物検定協会中央研究所, 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 同札幌センター, 同仙台センター, 同名古屋センター, 同神戸センター及び同福岡センター (計 11 試験室)

3 結果及び考察

3.1 追加検討

3.1.1 異性体の分離についての検討

フェリムゾン E 体及び Z 体の同時定量において、二つの異性体のピークの変離の可否が分析カラムの種類に依存することから、Table 3 に示した分析カラムについて変離度を確認した。また、変離度は次式によって求めた。

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(W_1 + W_2)/2} = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{W_{1/2,1} + W_{1/2,2}}$$

t_{R1} : 前のピークの保持時間 t_{R2} : 後ろのピークの保持時間
 W_1 : 前のピークのピーク幅 W_2 : 後ろのピークのピーク幅
 $W_{1/2,1}$: 前のピークの半値幅 $W_{1/2,2}$: 後ろのピークの半値幅

2.1.2 の 4) に従って調製した各 20 ng/mL の混合標準液 5 μ L を LC-MS/MS に注入し測定したところ、Table 3 及び Fig. 2 のとおりの変離度及び SRM クロマトグラフが得られた。Inertsil ODS-SP (150 mm), Inertsil ODS-SP (100 mm), InertSustain C18 (150 mm), InertSustain C18 (100 mm) 及び Inertsil ODS-3 の変離度はそれぞれ 2.213, 1.654, 1.511, 1.261 及び 1.809 であり、変離度が 1.5 以上の分析カラムを用いることで面積での測定が可能と考えられた。

また、Table 3 のカラムのうち変離度の良い Inertsil ODS-SP (150 mm), Inertsil ODS-SP (100 mm) 及び Inertsil ODS-3 を用いて、2.1.2 の 4) に従って調製した各フェリムゾン混合標準液 (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 及び 50 ng/mL) 5 μ L を LC-MS/MS に注入し測定し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを用いてフェリムゾン E 体及び Z 体

それぞれについて検量線を作成した。得られた検量線は Fig. 3-1~3-3 のとおりであり、いずれも 0.1~50 ng/mL 相当量の範囲で直線性を示した。このことから、面積及び高さでの定量が可能であると考えられた。

更に、本法又は他の分析において繰返し使用している分析カラムについて 2.1.2 の 4) に従って調製した各 20 ng/mL の混合標準液 5 μ L を LC-MS/MS に注入し測定したところ、Table 4 のとおりの分離度が得られ、カラムの特性及び使用状況等が分離度に関与すると考えられた。

Table 3 Column and resolution (Use new columns)

Column ^{a)}	Manufacturer	i.d.×length (mm) × (mm)	Particle size (μ m)	Surface area (m ² /g)	Pore diameter (nm)	Pore volume (mL/g)	Functional group	Endcap	Carbon loading (%)	Retention time		Resolution
										(Z)-Ferimzone (min)	(E)-Ferimzone (min)	
Inertsil ODS-SP	GL Sciences	2.1 × 150	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	8.5	16.291	17.609	2.213
Inertsil ODS-SP	GL Sciences	2.1 × 100	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	8.5	10.664	11.535	1.654
InertSustain C18	GL Sciences	2.1 × 150	3	350	10	0.85	Octadecyl	Yes	14	15.342	16.200	1.511
InertSustain C18	GL Sciences	2.1 × 100	3	350	10	0.85	Octadecyl	Yes	14	10.253	10.822	1.261
Inertsil ODS-3	GL Sciences	2.1 × 150	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	15	18.572	19.768	1.809

a) Columns started to be used in this study

Table 4 Column and resolution (Use columns repeatedly used)

Column ^{a)}	Manufacturer	i.d.×length (mm) × (mm)	Particle size (μ m)	Surface area (m ² /g)	Pore diameter (nm)	Pore volume (mL/g)	Functional group	Endcap	Carbon loading (%)	Retention time		Resolution
										(Z)-Ferimzone (min)	(E)-Ferimzone (min)	
Inertsil ODS-SP	GL Sciences	2.1 × 100	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	8.5	11.873	12.819	1.296
InertSustain C18	GL Sciences	2.1 × 150	3	350	10	0.85	Octadecyl	Yes	14	15.446	16.293	1.394
Inertsil ODS-3	GL Sciences	2.1 × 150	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	15	18.781	20.032	1.669
Inertsil ODS-4	GL Sciences	3.0 × 150	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	11	16.035	17.860	1.427
Atlantis T3	Waters	2.1 × 150	3	330	10	1.00	Octadecyl (Trifunctional)	Yes	14	16.702	18.211	2.277
Atlantis dC18	Waters	2.1 × 150	3	330	10	1.00	Octadecyl (Difunctional)	Yes	12		9.228	Without separation
Shim-pak XR-ODS II	Shimadzu	3.0 × 150	2.2	470	8	1.00	Octadecyl (Monofunctional)	Yes	20.2	7.380	8.863	1.344
CAPCELL PAK C18 AQ	Osaka Soda	2.0 × 150	5	300	8	Unknown	Octadecyl	— ^{b)}	11	13.015	14.183	1.820
ZORBAX Eclipse Plus C18	Agilent Technologies	2.1 × 150	3.5	160	9.5	Unknown	Octadecyl	Yes (double)	9	12.318	13.220	1.525
ZORBAX Eclipse XDB-C18	Agilent Technologies	2.1 × 150	5	180	8	Unknown	Octadecyl	Yes (double)	10	11.982	12.600	0.748
Mightsil RP-18 GP	Kanto Chemical	2.0 × 150	3	330	12.5	Unknown	Octadecyl (Monofunctional)	Yes	19	12.438	12.885	1.059

a) Columns repeatedly used in this study or other analysis

b) Coated with a mono-layer silicone-polymer

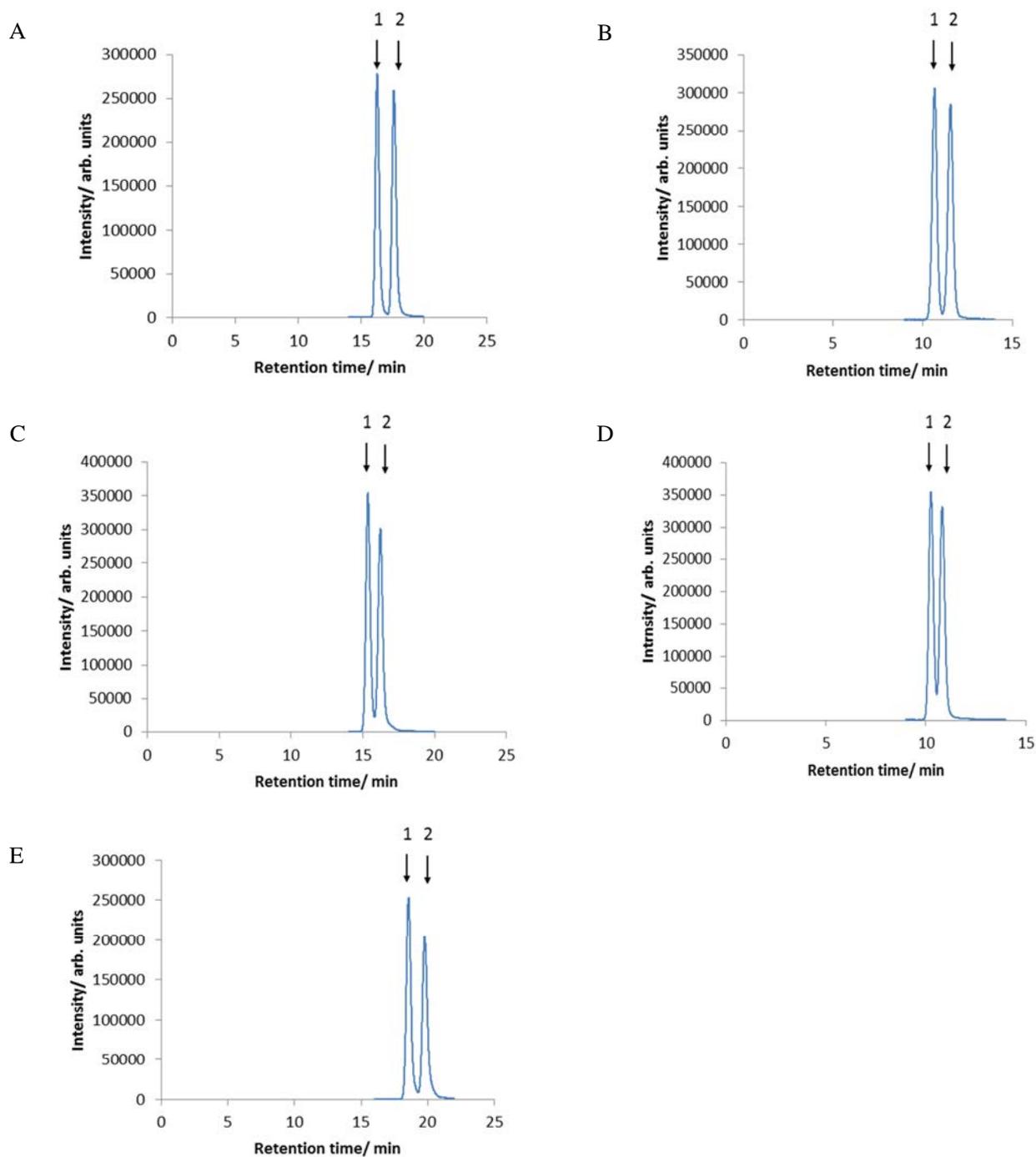


Fig. 2 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of (*E*)-ferimzone and (*Z*)-ferimzone by each column

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the retention times of 1: (*Z*)-ferimzone and 2: (*E*)-ferimzone.)

A: Inertsil ODS-SP (150 mm)

B: Inertsil ODS-SP (100 mm)

C: InertSustain C18 (150 mm)

D: InertSustain C18 (100 mm)

E: Inertsil ODS-3 (150 mm)

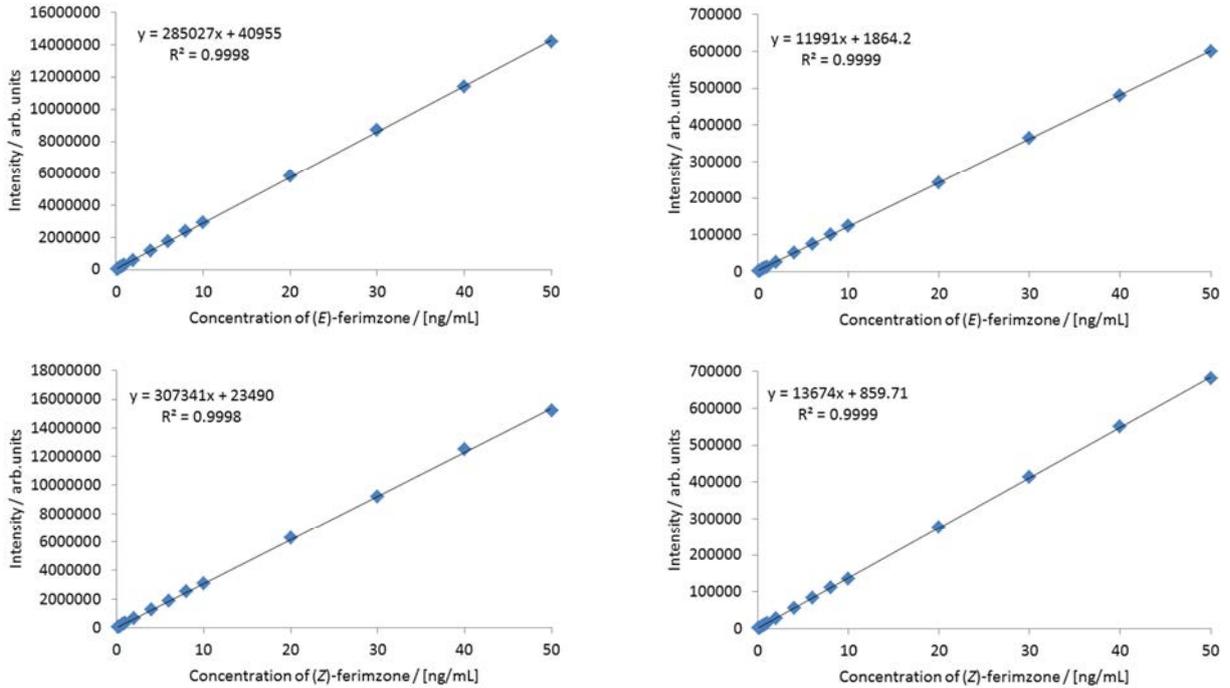


Fig. 3-1 Calibration curves of (E)-ferimzone and (Z)-ferimzone by peak area (left) and height (right) (Used column: Inertsil ODS-SP (150 mm))

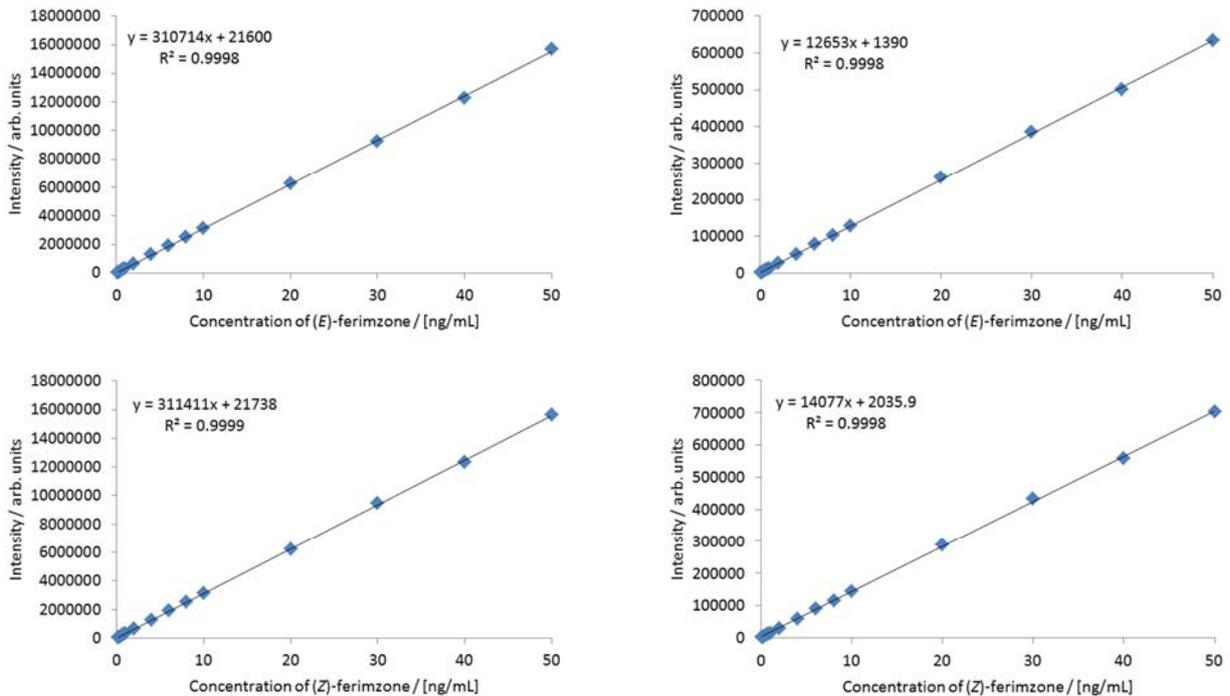


Fig. 3-2 Calibration curves of (E)-ferimzone and (Z)-ferimzone by peak area (left) and height (right) (Used column: Inertsil ODS-SP (100 mm))

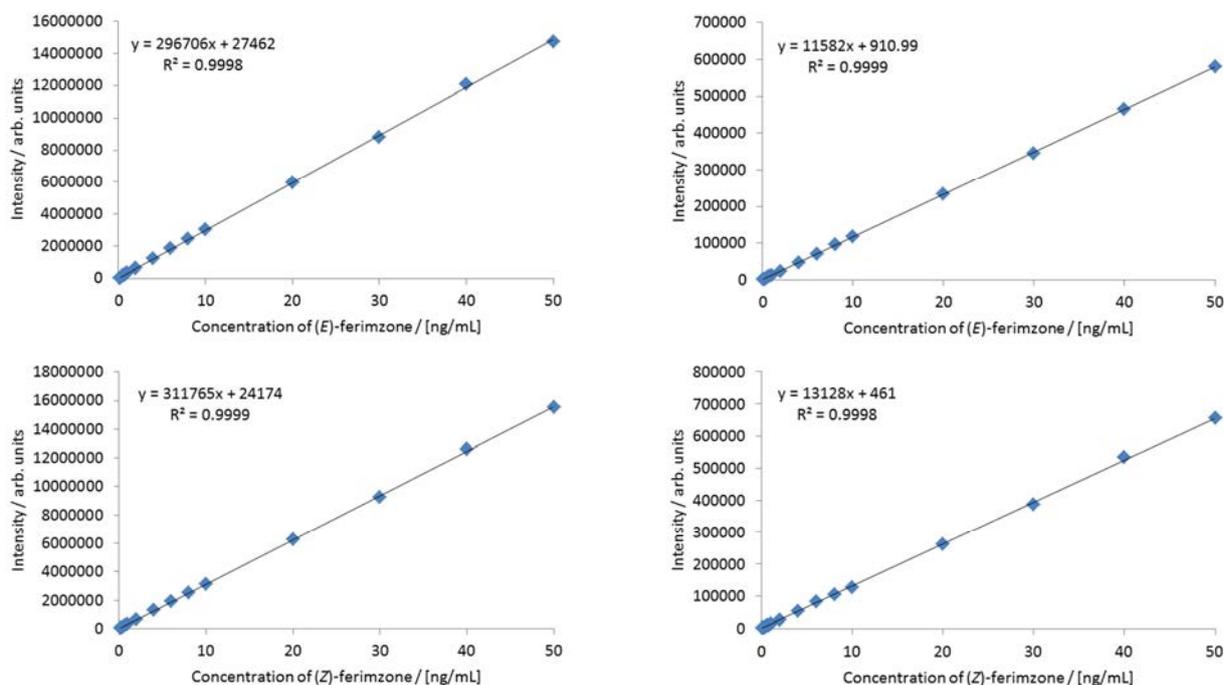


Fig. 3-3 Calibration curves of (E)-ferimzone and (Z)-ferimzone by peak area (left) and height (right) (Used column: Inertsil ODS-3 (150 mm))

3.1.2 操作時間の定量に対する影響の確認

フェリムゾン E 体及び Z 体は時間経過に伴って相互に変換（以下「異性化」という。）し、この現象が正確な定量の妨げとなる可能性があるため、操作中の時間経過による異性化の定量への影響を確認した。2.1.2 の 2) から 4) に従って調製したフェリムゾン混合標準原液をアセトンで希釈し添加に用いた。2.1.4 の 1) に従って得られた稲わらの空白抽出液に、20 mg/kg 相当量のフェリムゾン混合標準液を添加し、2.1.4 の 1) に従ってカラム処理に供する試料溶液を得た。2.1.4 の 2) に従ってカラムを洗浄した後、カラム処理中の時間経過が定量結果に与える影響を確認するため、吸引マニホールドを用いて流速 1 mL/min 程度で流出及び溶出させたもの、同様に吸引マニホールドを用いるが試料溶液を液面が充てん剤の上端に達するまで流出させたところで中断したもの、吸引マニホールドを用いず自然流下によって流出及び溶出させたものについて、2.1.4 に従って測定溶液を得た。カラム処理にはそれぞれ、3 時間、7 時間及び 7 時間を要した。これを測定して定量結果を比較したところ、Table 5 のとおり、いずれも飼料分析基準別表 3 の妥当性確認ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた真度及び併行精度の目標値を満たしていた。このことから、カラム処理中の時間経過は妥当性確認法ガイドラインの真度及び精度を満たす範囲で定量結果に影響しないと考えられた。

Table 5 Influence of time required for column processing on quantification

Operation	Time required	Spiked level (mg/kg)	Spiked components			
			(E)-ferimzone		(Z)-ferimzone	
			Recovery (%)	RSD _r ^{a)} (%)	Recovery (%)	RSD _r ^{a)} (%)
Vacuum suction	3 h	20	101	1.1	104	2.8
Vacuum suction and standstill for 4 h	7 h	20	102	0.5	106	1.5
Gravity flow	7 h	20	102	1.2	107	2.0

$n = 3$

a) Relative standard deviation of repeatability

3.2 共同試験

開発した分析法の室間再現精度を確認するため、2.2により共同試験を実施した。

フェリムゾン E 体の結果は Table 6 のとおりであった。稲わら 1, 稲わら 2, WCRS 1, WCRS 2, 粃米 1 及び粃米 2 についてそれぞれ、平均回収率は 91.2, 85.6, 92.2, 91.0, 96.0 及び 94.1 %, RSD_r は 5.9, 3.3, 1.7, 2.6, 3.7 及び 2.5 %, RSD_R は 10, 3.3, 6.2, 7.2, 5.0 及び 3.9 %, HorRat は 1.0, 0.22, 0.64, 0.56, 0.43 及び 0.22 であった。

フェリムゾン Z 体の結果は Table 7 のとおりであった。稲わら 1, 稲わら 2, WCRS 1, WCRS 2, 粃米 1 及び粃米 2 についてそれぞれ、平均回収率は 93.7, 91.8, 96.4, 96.0, 97.3 及び 95.2 %, RSD_r は 2.5, 3.3, 4.8, 2.3, 1.3 及び 1.7 %, RSD_R は 6.6, 3.3, 5.9, 6.0, 2.8 及び 5.0 %, HorRat は 0.64, 0.22, 0.62, 0.48, 0.25 及び 0.28 であり、それぞれの成分ともに、妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値を満たしていた。HorRat については、0.5 を下回るものが散見されたが、分析操作が比較的簡便であるためと考えられた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 8 に示した。また、各試験室で使用したカラムの特性を Table 9 に示した。

Table 6 Collaborative study for (E)-ferimzone

Lab. No.	Rice straw 1		Rice straw 2		WCRS 1		WCRS 2		Paddy rice 1		Paddy rice 2	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	17.5	16.5	1.70	1.73	27.0	27.3	4.78	4.82	9.73	9.68	0.476	0.476
2	18.9	19.0	1.63	1.73	29.4	28.0	4.58	4.63	9.77	9.89	0.486	0.494
3	18.4	18.9	1.77	1.71	28.4	27.1	4.63	4.62	9.62	9.78	0.481	0.474
4	18.7	18.1	1.75	1.59	26.8	26.8	4.68	4.45	9.60	9.47	0.463	0.454
5	18.4	19.4	1.66	1.76	27.8	27.8	4.28	4.55	9.42	9.75	0.446	0.472
6	18.5	18.5	1.72	1.72	27.6	27.9	4.69	4.54	9.62	9.45	0.473	0.499
7	20.2	20.4	2.06 ^{b)}	1.98 ^{b)}	31.1	30.9	5.06	4.98	10.3 ^{d)}	10.6 ^{d)}	0.551 ^{b)}	0.539 ^{b)}
8	16.5	12.7	1.73	1.76	24.9	25.6	4.65	4.38	8.13 ^{c)}	9.65 ^{c)}	0.470	0.466
9	18.8	21.6	1.33 ^{b)}	1.34 ^{b)}	27.1 ^{a)}	32.4 ^{a)}	3.78	3.87	9.56	9.62	0.419 ^{b)}	0.369 ^{b)}
10	19.5	18.8	1.71	1.78	28.7	29.0	4.81	4.82	9.73	9.79	0.484	0.480
11	15.8	16.3	1.68	1.67	25.7	25.3	4.38	4.12	9.21 ^{d)}	8.88 ^{d)}	0.424	0.453
Spiked level (mg/kg)	20		2		30		5		10		0.5	
No. labs ^{e)}	11		9		10		11		11		9	
No. outliers ^{f)}	0		2		1		0		0		2	
Mean value (mg/kg)	18.2		1.71		27.7		4.55		9.60		0.471	
Mean recovery (%)	91.2		85.6		92.2		91.0		96.0		94.1	
RSD _w ^{g)} (%)	5.9		3.3		1.7		2.6		3.7		2.5	
RSD _R ^{h)} (%)	10		3.3		6.2		7.2		5.0		3.9	
PRSD _R ⁱ⁾ (%)	10		15		9.7		13		11		18	
HorRat	1.0		0.22		0.64		0.56		0.43		0.22	

- a) Data excluded by Cochran test
b) Data excluded by paired Grubbs test
c) Data excluded by Cochran test but effective as the exclusion laboratories exceeded 2/9
d) Data excluded by paired Grubbs test but effective as the exclusion laboratories exceeded 2/9
e) Number of laboratories retained after eliminating outliers
f) Number of outlier laboratories removed in parentheses
g) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
h) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
i) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 7 Collaborative study for (Z)-ferimzone

Lab. No.	Rice straw 1		Rice straw 2		WCRS 1		WCRS 2		Paddy rice 1		Paddy rice 2	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	18.6	17.5	1.86	1.83	28.8	29.4	5.08	5.04	10.2	10.1	0.513	0.514
2	20.1	19.4	1.76	1.90	31.1	29.5	4.88	5.14	9.92	10.0	0.492	0.505
3	19.2	19.6	1.88	1.84	29.4	29.0	4.88	4.92	9.66	9.82	0.442	0.447
4	19.7	19.9	1.92	1.78	28.7	29.6	5.21	5.19	9.69	10.1	0.472	0.495
5	18.6	19.4	1.82	1.83	28.5	28.0	4.52	4.69	9.25	9.32	0.442	0.449
6	19.6	19.2	1.82	1.85	29.6	29.5	4.89	4.76	9.74	9.76	0.486	0.488
7	19.2	19.0	1.94	1.81	29.8	29.5	4.94	4.85	9.66	9.67	0.469	0.470
8	17.1	16.0	1.70 ^{b)}	1.54 ^{b)}	25.6 ^{d)}	26.6 ^{d)}	4.72	4.41	9.01 ^{a)}	10.3 ^{a)}	0.495	0.475
9	19.5 ^{a)}	22.8 ^{a)}	1.50 ^{b)}	1.44 ^{b)}	27.5 ^{c)}	33.5 ^{c)}	4.19	4.36	9.72	9.69	0.432 ^{a)}	0.385 ^{a)}
10	19.7	19.4	1.80	1.87	29.6	29.9	4.92	4.98	9.78	9.84	0.486	0.477
11	16.5	17.2	1.78	1.77	27.0 ^{d)}	26.2 ^{d)}	4.55	4.45	9.50	9.19	0.452	0.447
Spiked level (mg/kg)	20		2		30		5		10		0.5	
No. labs ^{e)}	10		9		11		11		10		10	
No. outliers ^{f)}	1		2		0		0		1		1	
Mean value (mg/kg)	18.7		1.84		28.9		4.80		9.73		0.476	
Mean recovery (%)	93.7		91.8		96.4		96.0		97.3		95.2	
RSD _r ^{g)} (%)	2.5		3.3		4.8		2.3		1.3		1.7	
RSD _R ^{h)} (%)	6.6		3.3		5.9		6.0		2.8		5.0	
PRSD _R ⁱ⁾ (%)	10		15		9.6		13		11		18	
HorRat	0.64		0.22		0.62		0.48		0.25		0.28	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Data excluded by Cochran test but effective as the exclusion laboratories exceeded 2/9

d) Data excluded by paired Grubbs test but effective as the exclusion laboratories exceeded 2/9

e) Number of laboratories retained after eliminating outliers

f) Number of outlier laboratories removed in parentheses

g) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

h) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

i) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 8 Instruments used in the collaborative study

Lab.No	LC-MS/MS	LC colume
		(i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
2	LC: Nexera X2, Shimadzu	InertSustain C18, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 5 µm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters	InertSustain C18, GL Sciences
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
7	LC: Nexera X2, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8045, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
8	LC: Nexera X2, Shimadzu	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: 4000Q TRAP, AB SCIEX	(2.1 mm×100 mm, 3 µm)
9	LC: Prominence, Shimadzu	YMC-Triart C18, YMC
	MS/MS: API4000Q, AB SCIEX	(2.1 mm×100 mm, 3 µm)
10	LC: Prominence, Shimadzu	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
11	LC: Nexera X2, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8050, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)

Table 9 Characteristics of column used in the collaborative study

Column	Manufacturer	i.d.×length (mm) × (mm)	Particle size (µm)	Surface area (m ² /g)	Pore diameter (nm)	Pore volume (mL/g)	Functional group	Endcap	Carbon loading (%)
Inertsil ODS-SP	GL Sciences	2.1 × 150	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	8.5
Inertsil ODS-SP	GL Sciences	2.1 × 150	5	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	8.5
Inertsil ODS-SP	GL Sciences	2.1 × 100	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	8.5
InertSustain C18	GL Sciences	2.1 × 150	3	350	10	0.85	Octadecyl	Yes	14
Inertsil ODS-3	GL Sciences	2.1 × 150	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	15
YMC-Triart C18	YMC	2.1 × 100	3	360	12	Unknown	Octadecyl (Trifunctional)	Yes	20

4 まとめ

飼料用稲に残留するフェリムゾン E 体及び Z 体について、JFRL 法を基に開発した LC-MS/MS を用いた定量法について、追加検討及び共同試験を実施し、飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 5 種類の分析カラムを用い、ピーク面積及び高さを用いてフェリムゾン E 体及び Z 体それぞれについて異性体の分離を確認した結果、分離度が 1.5 以上の分析カラムを用いることで面積での測定が可能と考えられ、検量線はいずれも 0.1~50 ng/mL の範囲で直線性を示した。

- 2) 精製カラム処理中の時間経過に伴う異性化の定量への影響を確認したところ、遮光条件下において、妥当性確認法ガイドラインの真度及び精度を満たす範囲で定量結果に影響しないと考えられた。
- 3) 稲わらにフェリムゾン E 体及び Z 体としてそれぞれ 20 及び 2 mg/kg 相当量, WCRS にフェリムゾン E 体及び Z 体としてそれぞれ 30 及び 5 mg/kg 相当量, 粳米にフェリムゾン E 体及び Z 体としてそれぞれ 10 及び 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 11 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ, 良好な結果が得られた。

謝 辞

共同試験に参加していただいた JA 東日本くみあい飼料株式会社品質安全部分析・開発センター, ジーエルサイエンス株式会社, 一般社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター, 一般財団法人日本穀物検定協会中央研究所及び一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 食品安全委員会：農薬評価書 フェリムゾン（第 2 版），平成 24 年 2 月（2012）。
- 2) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号（1988）。
- 3) 厚生省告示：食品，添加物等の基準規格，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号（1959）。
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号（2008）。
- 5) 財団法人日本食品分析センター：平成 20 年度飼料中の有害物質分析法開発委託事業（2009）。
- 6) 新井 詠子，三枝 尚子，山本 克己：飼料用イネ中のフェリムゾンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発，飼料研究報告，43，22-35（2018）。
- 7) Willian Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies, Pure & Appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).
- 8) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 9) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, Analyst, 125, 385-386 (2000).

技術レポート

7 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法の適用範囲を
とうもろこしサイレージに拡大するための妥当性確認高橋 雄一^{*1}, 嶋村 知紗^{*2}Validation Study on Application of the Simultaneous Determination Method of Aflatoxins
by LC to Corn SilageYuichi TAKAHASHI^{*1} and Chisa SHIMAMURA^{*2}(^{*1} Nagoya Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

(Now Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC),

^{*2} Nagoya Regional Center, FAMIC (Now Audit Office, FAMIC))

We have made a validation study on the applicability of a simultaneous determination method of four aflatoxins (B₁, B₂, G₁ and G₂) in formula feed and corn using a liquid chromatograph with fluorescence (LC-FD) to corn silage. The method has been listed in the Feed Analysis Standard of Japan.

In the existing method, since the extraction solvent has been absorbed by the sample, we changed the volume of the sample and extraction solvent to 25 g and 150 mL respectively.

Aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ (AFs) were extracted with acetonitrile-water (9:1), and the extracted solution was centrifuged. The supernatant was purified with a SPE column (MycoSep 226 AflaZon+, Romer Labs Inc.; Union, MO, USA.), and the eluted solution was concentrated to dryness. For derivatization, trifluoroacetic acid was added to the residue, and the sample solution was injected into the LC-FD to determine the concentration of AFs. The LC-FD separation was then carried out on an ODS column (Mightysil PR-18 GP, 4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm, Kanto Chemical Inc.; Tokyo, Japan) with an isocratic of water-methanol (3:2) as a mobile phase.

Recovery tests were conducted on corn silages. Corn silage was added with 0.0013~0.044 mg/kg of aflatoxin (AF) B₁, B₂ and G₁, and 0.00022~0.044 mg/kg of AFG₂ respectively. The resulting mean recoveries ranged from 85.0 % to 116 % for AFB₁, 84.0 % to 119 % for AFB₂, 88.1 % to 106 % for AFG₁ and 82.6 % to 101 % for AFG₂. The repeatability in the form of relative standard deviations (RSD_r) was less than 4.4 % for AFB₁, less than 4.2 % for AFB₂, less than 3.3 % for AFG₁, and less than 10 % for AFG₂.

This method was thus validated as useful for inspections of AFs in corn silage.

The limit of detection of AFs by the existing method for formula feed and corn was 0.0001 mg/kg each in the samples.

Key words: aflatoxin (AF) B₁, B₂, G₁ and G₂; liquid chromatograph with fluorescence (LC-FD); corn silage

キーワード：アフラトキシンの液体クロマトグラフ；とうもろこしサイレージ

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター，現 肥飼料安全検査部

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター，現 業務監査室

1 緒 言

飼料自給率の向上は、食料自給率向上の重要な施策として位置づけられ、とうもろこしサイレージを含む粗飼料の増産対策が積極的に行われている。その一方で、平成 24 年度から農林水産省は調査事業として国産粗飼料中の重金属及びかび毒の含有実態調査を実施している。国産粗飼料について、将来的に飼料の有害物質の指導基準及び管理基準¹⁾に管理基準値が定められた場合に備えて、管理基準の遵守状況を確認するための分析法を整備することが必要となっているが、飼料分析基準²⁾に記載されているアフラトキシンの液体クロマトグラフ（以下「LC」という。）による同時分析法（以下「収載法」という。）の適用範囲は配合飼料及びとうもろこしであり、とうもろこしサイレージを対象としていない。

そこで、今回、とうもろこしサイレージへの収載法の適用の可否を検討したので、その概要を報告する。また、未設定であった収載法による配合飼料及びとうもろこし中のアフラトキシンの B₁、B₂、G₁ 及び G₂ の検出下限を求めたので併せて報告する。

参考にアフラトキシンの B₁、B₂、G₁ 及び G₂ の構造式等を Fig. 1 に示した。

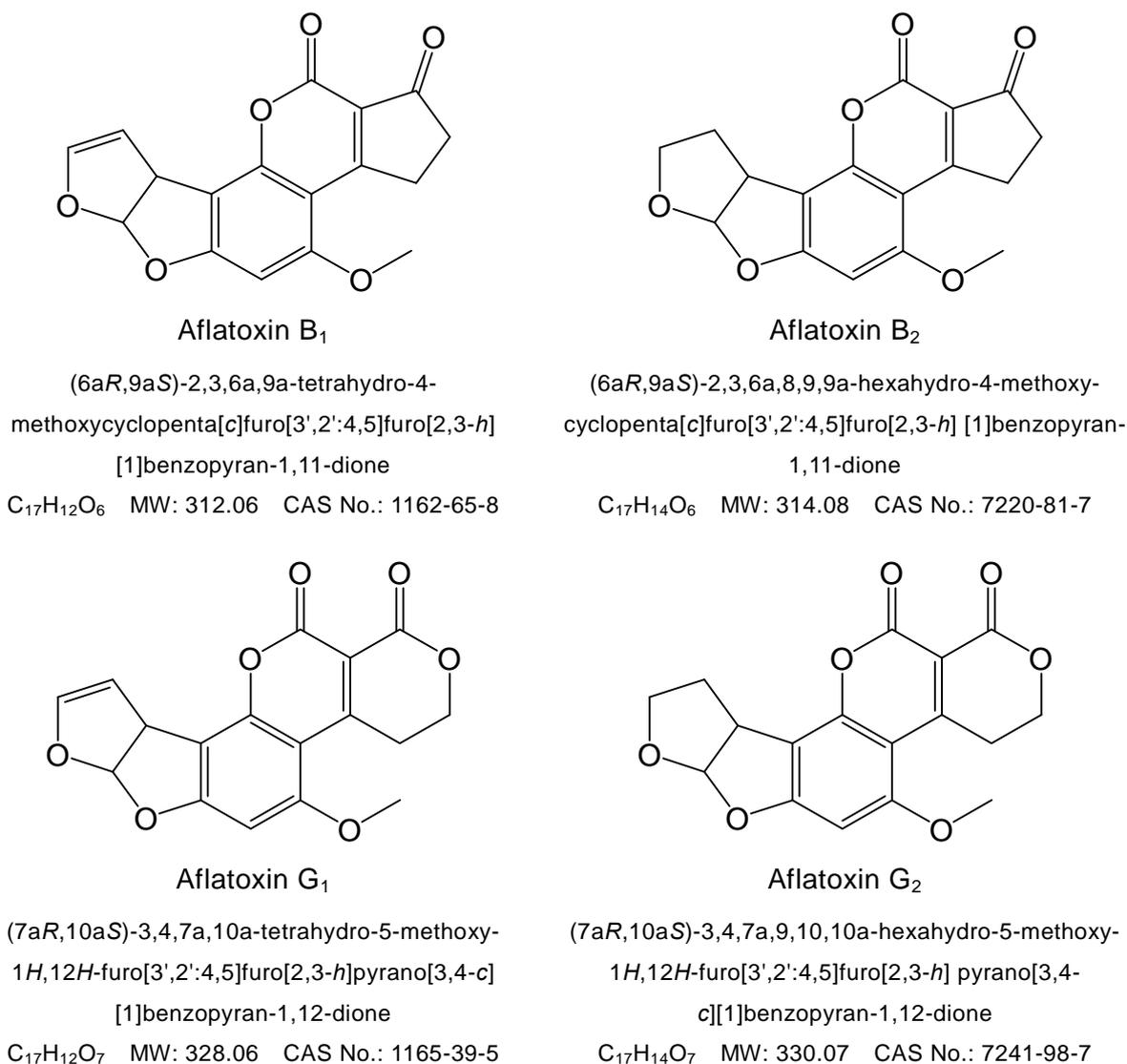


Fig. 1 Chemical structures of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂

2 実験方法

2.1 試料

配合飼料（鶏用及びほ乳期子牛育成用代用乳用）及びとうもろこしはそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。とうもろこしサイレージは 60 °C で 6 時間乾燥後、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉砕した。

なお、検討に用いた配合飼料を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For poultry	Grains	58	Corn, brown rice
	Oil seed meals	28	Soybean meal, rapeseed meal, corn gluten meal
	Bran	8	Rice bran
	Animal by-product	2	Fish meal
	Others	4	Calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, fermented milk powder, feed additives
For calf milk replacer	Animal by-products	72	Dried skim milk, concentrated whey protein
	Others	28	Vegetable oil, trehalose, glucose, calcium carbonate, lactose, vegetable gum-like substance, fructooligosaccharide syrup, dry yeast cell wall, fodder yeast, desugared sugarcane extract, albumin powder, fatty acid calcium, cellulose, salt, fermented milk powder, lactec acid bacteria, bifidobacteria, melon extract, feed additives

2.2 試薬

1) アセトニトリル及びメタノールは高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）を用いた。トリフルオロ酢酸は Reagent Plus（Sigma-Aldrich 製）を用いた。水は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

2) アフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ 混合標準液

アフラトキシシン（B₁, B₂, G₁ 及び G₂）混合標準液（各 25 µg/mL, 富士フィルム和光純薬製）をアフラトキシシン混合標準原液とした。混合標準原液 1 mL を 50 mL の全量フラスコに入れ、標線までアセトニトリルを加えてアフラトキシシン混合標準液を調製した（この液 1 mL は、アフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ として各 0.5 µg を含有する。）。

使用に際して、アフラトキシシン混合標準液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中にアフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ として各 20 ng を含有する混合標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉砕機： ZM 200 Retsch 製（1 mm スクリーン、使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 振とう機： レシプロシエーカー SR-2W タイテック製（使用時振動数 300 rpm）
- 3) 多機能カラム： MycoSep 226 AflaZon+ Romer Labs 製

4) LC :

LC 部 : 1515 Series Waters 製

蛍光検出器部 : 2475 Multi λ Fluorescence Detector Waters 製

5) 試験管濃縮装置 : MGS- 2200G 東京理化学器械製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 25.0 g を量って 300 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ, アセトニトリル-水 (9+1) 150 mL を加え, 30 分間振り混ぜて抽出した. 抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ, 650 \times g で 5 分間遠心分離し, 上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とした.

2) カラム処理

試料溶液 4.5 mL を試験管に入れ, 多機能カラムをゆっくり押し込み, 充てん剤を通過した流出液を誘導体化反応に供する試料溶液とした.

3) 誘導体化反応

試料溶液 1 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 40 $^{\circ}$ C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した. 残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加え, なす形フラスコを密栓した後 15 分間静置し, 更に水-アセトン (9+1) 0.9 mL を先のなす形フラスコに正確に加えて振り混ぜた. この液をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ, 5000 \times g で 5 分間遠心分離し, 上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした.

同時にアフラトキシン混合標準液 (0.5 μ g/mL) 2, 10, 20, 30, 40, 50 及び 60 μ L 並びに混合標準液 (20 ng/mL) 2.5, 5, 10 及び 25 μ L をそれぞれ 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ, トリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加えた. 以下試料溶液と同様に操作し, 1 mL 中にアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ としてそれぞれ 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25 及び 30 ng 相当量を含有する各標準液を調製した.

4) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各アフラトキシン混合標準液各 20 μ L を LC に注入し, Table 2 の測定条件に従って, クロマトグラムを得た.

Table 2 Operating conditions of LC

Column	Mightysil PR-18 GP (4.6 mm i.d. \times 250 mm, 5 μ m), Kanto Chemical
Mobile phase	Water-methanol (3:2)
Flow rate	0.8 mL/min
Column temperature	40 $^{\circ}$ C
Detector	Fluorescence detector (Ex: 365 nm, Em: 450 nm)

5) 計 算

得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し, 試料中のアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ 量を算出した.

なお, 定量法の概要を Scheme 1 に示した.

Under the light-shielding conditions

Sample 25.0 g (300 mL amber Erlenmeyer flask)

- add 150 mL of acetonitrile-water (9:1)
- shake for 30 min
- centrifuge for 5 min at 650×g

Mycosep 226 AflaZon+

- transfer 4.5 mL of supernatant into test tube
- push Mycosep 226 AflaZon+ column into test tube

50 mL eggplant flask

- transfer 1 mL of effluent solution through Mycosep 226 AflaZon+ column
- evaporate under 40 °C and dry with N₂ gas

Derivatization

- add 0.1 mL of trifluoroacetic acid
- allow to stand for 15 min
- add 0.9 mL of water-acetone (9:1)
- centrifuge for 5 min at 5000×g

LC-fluorescence detector

Scheme 1 Analytical procedure for aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in corn silage

2.5 妨害物質の検討で用いた定量方法

LCによる測定時に2.4の4)の溶離液を水-メタノール(7+3)に変更して測定した。

2.6 添加回収試験

2.2の2)のアフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ 混合標準原液をアセトニトリルで正確に希釈し添加に用いた。

とうもろこしサイレージについて、アフラトキシシン B₁, B₂ 及び G₁ として、原物換算して 0.0013, 0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量(最終試料溶液中で 0.5~17 ng/mL), アフラトキシシン G₂ として、原物換算して 0.00022, 0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量(最終試料溶液中で 0.083~17 ng/mL) になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、添加は風乾物試料に対してアフラトキシシン B₁, B₂ 及び G₁ として 0.003, 0.025, 0.05 及び 0.1 mg/kg 相当量, アフラトキシシン G₂ として 0.0005, 0.025, 0.05 及び 0.1 mg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と想定して、原物(水分含有量 60 %) 中濃度 = 風乾物(水分含有量 10 %) 中濃度 / 2.25 の式により行った。

2.7 収載法の検出下限の検討で用いた定量方法

飼料分析基準第5章第3節2の方法により定量した。振り混ぜることが困難な試料については、試料採取量を 25.0 g とした。

2.8 10 mL 容褐色共栓試験管を用いた誘導体化法の検討で用いた定量方法

2.4の2)で得られた試料溶液 1 mL を 10 mL の褐色共栓試験管に正確に入れ、40 °C 以下に設定した試験管濃縮装置で窒素ガスを送って濃縮乾固した。残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加え、褐色共栓試験管を密栓し、タッチミキサーで 10 秒程度振り混ぜた後 15 分間静置し、更に水-アセトン(9+1) 0.9 mL を先の褐色共栓試験管に正確に加え、タッチミキサーで 10 秒

程度振り混ぜた。この液をプラスチック製遠心沈殿管（容量 1.5 mL）に入れ、5000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

同時にアフラトキシン混合標準液（0.5 µg/mL）2, 4, 10, 20 及び 30 µL をそれぞれ 10 mL の褐色共栓試験管に正確に入れ、トリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加えた。以下試料溶液と同様に操作し、1 mL 中にアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ としてそれぞれ 1, 2, 5, 10 及び 15 ng 相当量を含む各標準液を調製した。測定及び計算は、2.4 の 4) 及び 5) により行った。

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 2) 及び 2.4 の 3) により調製した各混合標準液各 20 µL を LC に注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した。

得られた検量線の一例は Fig. 2 のとおりであり、各 0.05~30 ng/mL（注入量として 0.001~0.6 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ を 0.0003~0.18 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各アフラトキシン濃度範囲に相当する。

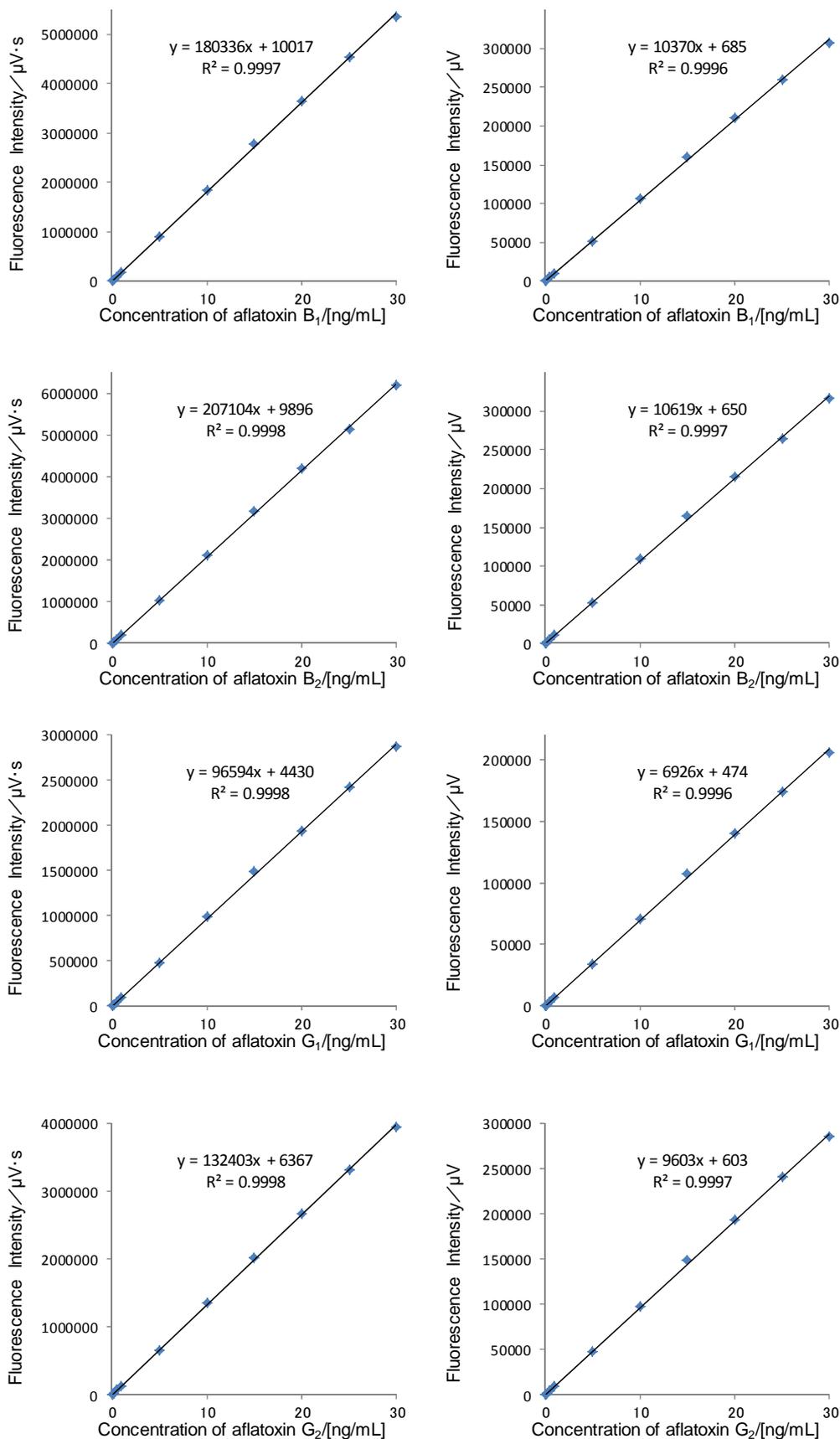


Fig. 2 Calibration curves of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ by peak area (left) and peak height (right)

3.2 抽出溶媒量の検討

最初に、飼料分析基準第 5 章第 3 節 2 に従い、抽出操作を行った。抽出操作は、分析試料 50.0 g を量りとり、抽出溶媒を 100 mL 加えて行うと規定されているが、とうもろこしサイレージに抽出溶媒が吸収され振り混ぜることが困難であった。そこで、飼料分析基準第 5 章第 3 節 2 の注 1 のとおり試料採取量を 25.0 g としたが、同様に振り混ぜることが困難であったため抽出溶媒量を 150 mL とした。

3.3 妨害物質の検討

とうもろこしサイレージ 3 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC に注入し、得られたクロマトグラムを確認したところ、Fig. 3 のように、全ての検体でアフラトキシン B₁ 及び B₂ について、各ピークの直前に妨害ピーク（風乾物試料に対して最大 0.0006 mg/kg）が、アフラトキシン G₁ について、定量ピークの直後に妨害ピーク（風乾物試料に対して最大 0.0006 mg/kg）が認められた。アフラトキシン G₂ について、定量を妨げるピークは認められなかった。

そこで、確認された各ピークがアフラトキシン B₁, B₂ 又は G₁ のピークか否か確認するため LC による測定条件を 2.5 に変更して測定したところ、Fig. 4 のとおり、アフラトキシン B₁, B₂ 及び G₁ の保持時間にピークは認められなかった。このことから、妨害ピークであると判断した。しかし、その面積は 3.5 で確認された定量下限に相当するピーク面積の 1/3 未満であり、飼料分析基準別表 3 の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定める選択性の許容範囲であることから、試験に支障のないものと判断した。

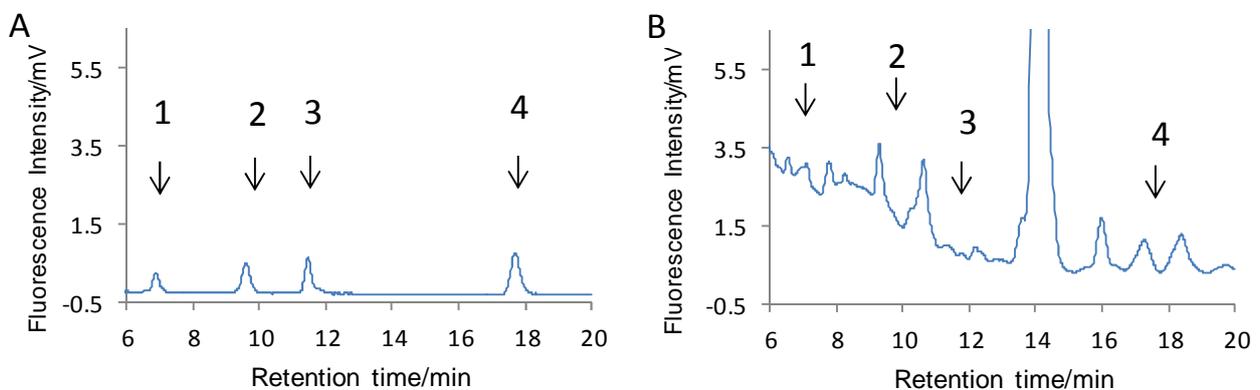


Fig. 3 Chromatograms of standard solution and blank sample solution

(LC conditions are shown in Table 2. Arrows indicate the retention times of 1:

afatoxin G₁, 2: aflatoxin B₁, 3: aflatoxin G₂ and 4: aflatoxin B₂)

A: Standard solution (The concentrations of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ are 0.1 ng/mL, respectively)

B: Sample solution of corn silage

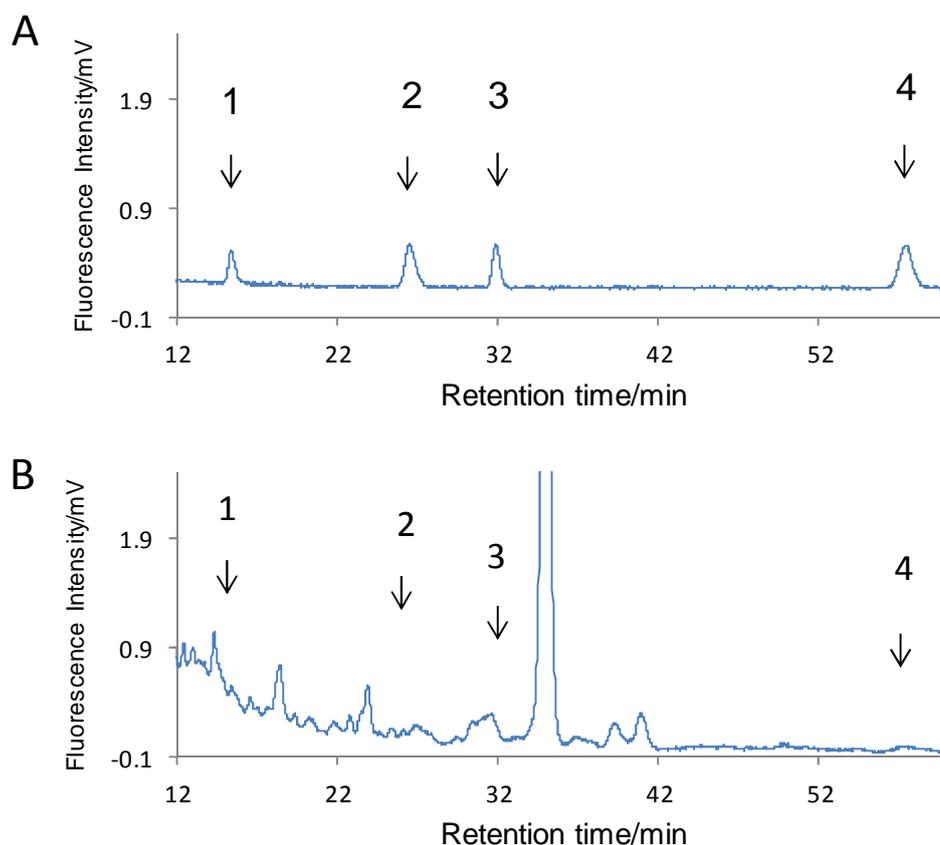


Fig. 4 Chromatograms of standard solution and blank sample solution (LC conditions except mobile phase are shown in Table 2. Mobile phase is water-methanol (7:3). Arrows indicate the retention times of 1: aflatoxin G₁, 2: aflatoxin B₁, 3: aflatoxin G₂ and 4: aflatoxin B₂)

A: Standard solution (The concentrations of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ are 0.1 ng/mL, respectively)

B: Sample solution of corn silage

3.4 添加回収試験

アフラトキシシン B₁, B₂ 及び G₁ には, 3.3 で妨害ピークが確認された. 妥当性確認法ガイドラインに定める選択性を満たすには妨害ピークの面積は定量下限に相当するピーク面積の 1/3 未満であることが必要となる. よって, アフラトキシシン B₁, B₂ 及び G₁ の最低添加濃度は, 3.3 で確認された妨害ピークの最大濃度 (原物換算して最大 0.00027 mg/kg, 風乾物試料に対して最大 0.0006 mg/kg) の 5 倍となる 0.0013 mg/kg (原物換算値. 風乾物中で 0.003 mg/kg) とした. アフラトキシシン G₂ については, 妨害ピークは確認されなかったことから, 収載法の定量下限 (試料中 0.0005 mg/kg) を参考に, 最低添加濃度を原物換算して 0.00022 mg/kg (風乾物中で 0.0005 mg/kg) と設定した.

2.6 に従って添加回収試験を実施した. その結果は Table 3 のとおり, アフラトキシシン B₁ については, 平均回収率は 85.0~116 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 4.4 % 以下, アフラトキシシン B₂ については, 平均回収率は 84.0~119 %, RSD_r は 4.2 % 以下, アフラトキシシン G₁ については, 平均回収率は 88.1~106 %, RSD_r は 3.3 % 以下, アフラトキシシン G₂ については,

平均回収率は 82.6~101 %, RSD_r は 10 % 以下の成績が得られた。この結果は、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。

なお、得られたクロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

Table 3 Recoveries for aflatoxins in corn silages

Aflatoxin	Spiked level (mg/kg original matter)	Corn silage 1		Corn silage 2		Corn silage 3	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
B ₁	0.0013	116	2.1	93.0	1.4	97.8	4.4
	0.011	—	—	92.5	1.6	—	—
	0.022	89.2	1.4	—	—	85.0	3.5
	0.044	92.7	1.7	—	—	—	—
B ₂	0.0013	104	2.1	119	2.2	113	4.2
	0.011	—	—	89.9	1.5	—	—
	0.022	88.7	1.1	—	—	84.0	3.2
	0.044	89.7	1.6	—	—	—	—
G ₁	0.0013	103	3.3	106	3.3	96.0	3.3
	0.011	—	—	96.1	2.3	—	—
	0.022	91.6	1.4	—	—	88.1	3.1
	0.044	95.3	2.2	—	—	—	—
G ₂	0.00022	93.8	6.3	94.8	10	82.6	2.6
	0.011	—	—	93.9	3.5	—	—
	0.022	91.7	0.8	—	—	87.5	2.6
	0.044	94.0	1.7	—	—	—	—

— : Not tested

a) The aflatoxins were spiked to air-dried corn silage samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.003, 0.025, 0.05 and 0.1 mg/kg air-dry matter for aflatoxin B₁, B₂ and G₁, and 0.0005, 0.025, 0.05 and 0.1 mg/kg air-dry matter for aflatoxin G₂, respectively. The levels of aflatoxins in original matter were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of corn silage samples was 60 % for original matter and 10 % for air-dry matter.

The levels of aflatoxins in original matter (moisture 60 %)

= the levels of aflatoxins in air-dry matter (moisture 10 %) / 2.25

b) Mean ($n = 5$)

c) Relative standard deviation of repeatability

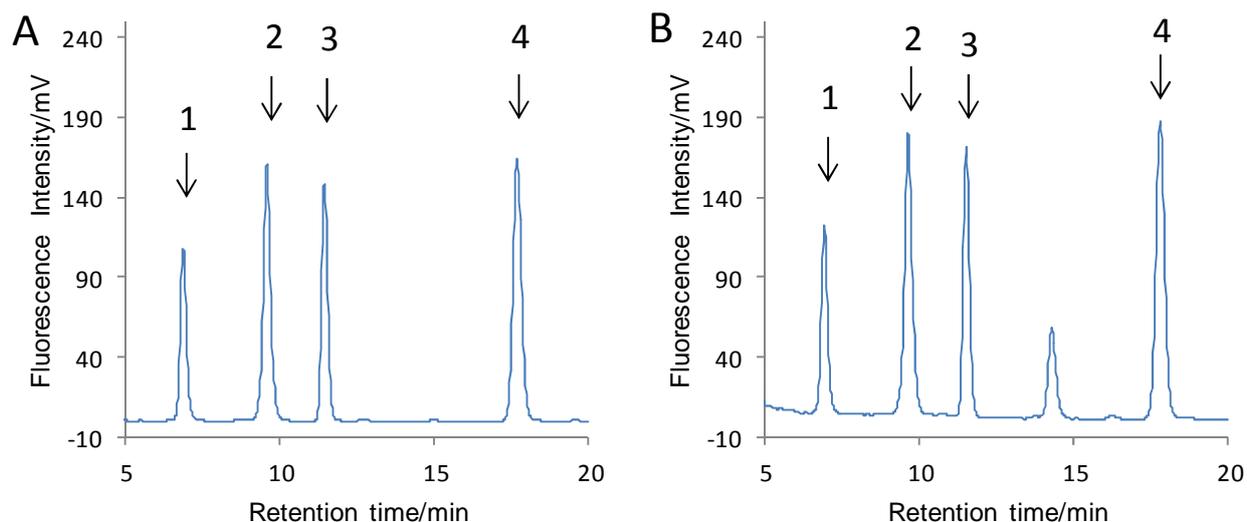


Fig. 5 Chromatograms of standard solution and spiked sample (LC conditions are shown in Table 2. Arrows indicate the retention times of 1: aflatoxin G₁, 2: aflatoxin B₁, 3: aflatoxin G₂ and 4: aflatoxin B₂)
 A: Standard solution (The concentrations of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ are 15 ng/mL, respectively)
 B: Sample solution of corn silage (spiked at 0.044 mg/kg original matter of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ (corresponding to 16.7 ng/mL))

3.5 定量下限及び検出下限の検討

アフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の検量線が直線性を示した範囲, 各 0.05~30 ng/mL の下端付近となる濃度 (アフラトキシシン B₁, B₂ 及び G₁ については, とうもろこしサイレージ風乾物中で 0.003 mg/kg 相当量 (最終試料液中濃度 0.5 ng/mL 相当量), アフラトキシシン G₂ については, とうもろこしサイレージ風乾物中で 0.0005 mg/kg 相当量 (最終試料液中濃度 0.083 ng/mL 相当量)) の添加回収試験の結果から本法の定量下限及び検出下限を求めた. Fig. 3 のとおり, 各アフラトキシシンのピークの前後において妨害物質のピークが多数存在していることから, 定量値の標準偏差の 10 倍及び 4.26 倍 (自由度 4 の *t* 分布の 0.95 分位点の 2 倍) から定量下限及び検出下限を求めたところ, アフラトキシシン B₁, B₂ 及び G₁ の定量下限は風乾物中で 0.003 mg/kg, 検出下限は風乾物中で 0.001 mg/kg であり, アフラトキシシン G₂ の定量下限は風乾物中で 0.0005 mg/kg, 検出下限は風乾物中で 0.0002 mg/kg であった.

また, 配合飼料及びとうもろこしを対象とした収載法の検出下限が未設定であったため, 併せて検討を行った. 収載法では試料採取量は 50.0 g としているが, 抽出時に振り混ぜることが困難な試料については試料採取量を 25.0 g にしている.

2.2 の 2) のアフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ 混合標準液 (0.5 µg/mL) をアセトニトリルで正確に希釈し添加に用いた.

配合飼料 (鶏用及びほ乳期子牛育成用代用乳用) 及びとうもろこしについて, アフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ として 0.0005 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.25 ng/mL. 振り混ぜることが困難で 25.0 g 採取としたほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料については 0.125 ng/mL) になるようにそれぞれ添加後よく混合し, 一夜静置した後に 2.7 に従って添加回収試験を実施した. そ

の結果から得られるピークの SN 比が 3 以上となる濃度を求めたところ、配合飼料及びとうもろこし中のアフラトキシン B_1 , B_2 , G_1 及び G_2 の検出下限は、試料中で 0.0001 mg/kg であった。この濃度は、配合飼料における最も低いアフラトキシン B_1 の管理基準値 0.01 mg/kg に対して 1/100, とうもろこしのアフラトキシン B_1 の管理基準値である 0.02 mg/kg に対して 1/200 であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた基準値に対する検出下限の目標値を満たしていた。

なお、Table 4 のとおり、添加回収試験結果は良好であった。得られたクロマトグラムの一例を Fig. 6 に示した。

Table 4 Recoveries for aflatoxins in corn and formula feeds

Aflatoxin	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Formula feed for poultry		Formula feed for calf milk replacer ^{c)}		Corn	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
B_1	0.0005	91.8	4.5	96.6	4.7	94.2	2.7
B_2	0.0005	88.9	2.5	90.2	2.5	87.5	1.7
G_1	0.0005	94.9	3.7	83.5	8.5	91.9	1.6
G_2	0.0005	93.5	2.4	89.9	5.3	91.4	0.8

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Weighed volume set to 25.0 g

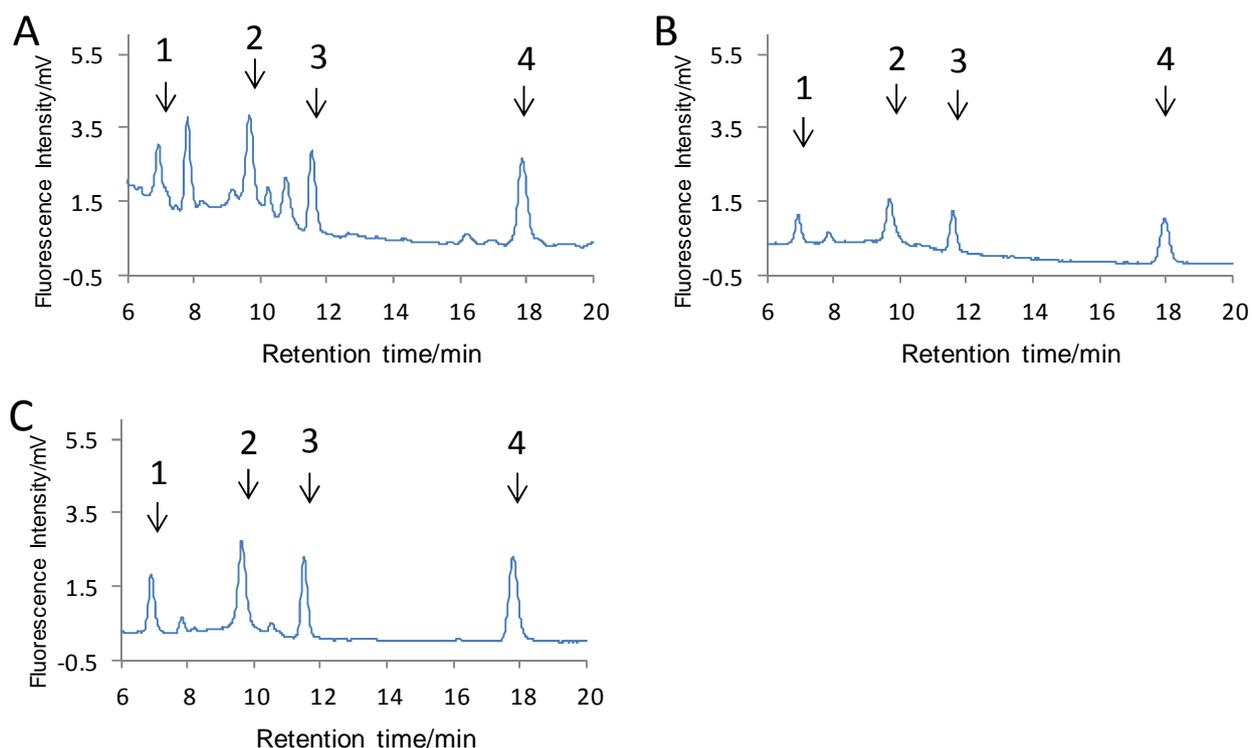


Fig. 6 Chromatograms of spiked samples

(LC conditions are shown in Table 2. Arrows indicate the retention times of 1: aflatoxin G₁, 2: aflatoxin B₁, 3: aflatoxin G₂ and 4: aflatoxin B₂)

A: Sample solution of formula feed for poultry (spiked at 0.0005 mg/kg of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ (corresponding to 0.25 ng/mL))

B: Sample solution of formula feed for calf milk replacer (spiked at 0.0005 mg/kg of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ (corresponding to 0.125 ng/mL))

C: Sample solution of corn (spiked at 0.0005 mg/kg of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ (corresponding to 0.25 ng/mL))

3.6 誘導体化反応容器の比較

本法では、50 mL のなす形フラスコを使用して誘導体化反応を行っている。ここで、より小型の容器が誘導体化反応に適していると考えられたことから、誘導体化反応に使用する容器の容量の違いによる定量値への影響を検討した。

2.2 の 2) のアフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ 混合標準液をアセトニトリルで正確に希釈し添加に用いた。

とうもろこしサイレージについて、各アフラトキシシンとして、0.025 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 4.2 及び 8.3 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に本法及び 2.8 に従って添加回収試験を実施し、平均定量値及び繰返し精度を求めた。

その結果は Table 5 のとおりであり、10 mL の褐色共栓試験管を使用した場合のアフラトキシシンの平均回収率は 84.9~96.4 %，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 3.0 % 以下、50 mL のなす形フラスコを使用した場合のアフラトキシシンの平均回収率は 84.0~96.1 %，その繰返し精度は、RSD_r として 3.5 % 以下であり、いずれも妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たした。

また、誘導体化反応時に使用する容器の容量の違いによる定量値に有意な差があるか確認するため、有意水準 5 % で両側検定の t -検定を行った。その結果、アフラトキシン B₁ については $t(2) = -0.692$, $p = 0.560$, アフラトキシン B₂ については $t(2) = 7.432$, $p = 0.0176$, アフラトキシン G₁ については $t(2) = 0.659$, $p = 0.577$, アフラトキシン G₂ については $t(2) = 3.548$, $p = 0.071$ であり、アフラトキシン B₂ については 10 mL の褐色共栓試験管を使用した方が平均定量値が高く有意な差が認められ、それ以外では有意な差は認められなかった。

これらのことから、誘導体化反応の際は、50 mL のなす形フラスコを 10 mL の褐色共栓試験管に変更しても同等又はそれ以上の結果が得られることから、より小型の容器に変更しても差し支えないと考えられた。

Table 5 Comparison of reaction containers used for derivatization reaction

Aflatoxin	Feed types	Spiked level (mg/kg air dry matter)	Reaction container					
			10 mL brown stoppered test tube			50 mL eggplant flask		
			Quantitative value ^{a)} (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Quantitative value ^{a)} (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
B ₁	Corn silage 1	0.05	0.0450	90.0	1.8	0.0446	89.2	1.4
	Corn silage 2	0.025	0.0223	89.3	2.0	0.0231	92.5	1.6
	Corn silage 3	0.05	0.0424	84.9	2.4	0.0425	85.0	3.5
B ₂	Corn silage 1	0.05	0.0463	92.7	1.6	0.0443	88.7	1.1
	Corn silage 2	0.025	0.0231	92.5	1.8	0.0225	89.9	1.5
	Corn silage 3	0.05	0.0434	86.7	3.0	0.0420	84.0	3.2
G ₁	Corn silage 1	0.05	0.0471	94.2	2.9	0.0458	91.6	1.4
	Corn silage 2	0.025	0.0236	94.4	2.7	0.0240	96.1	2.3
	Corn silage 3	0.05	0.0448	89.7	2.4	0.0440	88.1	3.1
G ₂	Corn silage 1	0.05	0.0480	96.0	2.0	0.0459	91.7	0.8
	Corn silage 2	0.025	0.0241	96.4	1.6	0.0235	93.9	3.5
	Corn silage 3	0.05	0.0445	89.0	2.2	0.0438	87.5	2.6

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

4 まとめ

とうもろこしサイレージ中のアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の定量法として、収載法の適用の可否について検討したところ、試料採取量を 50.0 g から 25.0 g, 抽出溶媒量を 100 mL から 150 mL に変更することで、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

また、未設定であった配合飼料及びとうもろこし中の収載法によるアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の検出下限について検討したところ、以下の結果が得られた。

1) 検量線はそれぞれ 0.05~30 ng/mL 相当量 (注入量として 0.001~0.6 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ を 0.0003~0.18 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各アフラトキシン濃度範囲に相当する。

- 2) アフラトキシシ B_1 , B_2 及び G_1 について, 本法に従って得られたクロマトグラムに定量を妨げるピークが認められたが, 妥当性確認法ガイドラインに定める選択性を満たしていた. アフラトキシシ G_2 について, 本法に従って得られたクロマトグラムに定量を妨げるピークは認められなかった.
- 3) 原物中に換算してアフラトキシシ B_1 , B_2 及び G_1 として 0.0013, 0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量, アフラトキシシ G_2 として 0.00022, 0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量を添加し, 本法に従って 5 点併行分析を実施し, 回収率及び繰返し精度を求めたところ, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた.
- 4) 本法のとうもろこしサイレージ中のアフラトキシシ B_1 , B_2 及び G_1 の定量下限は風乾物中で 0.003 mg/kg, 検出下限は 0.001 mg/kg, アフラトキシシ G_2 の定量下限は風乾物中で 0.0005 mg/kg, 検出下限は 0.0002 mg/kg であった.
- 5) 収載法における配合飼料及びとうもろこし中のアフラトキシシ B_1 , B_2 , G_1 及び G_2 の検出下限は, 試料中で 0.0001 mg/kg であった. この濃度は妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた.
- 6) 誘導体化反応の際, 10 mL の褐色共栓試験管を用いて添加回収試験を実施し, 回収率及び繰返し精度を求めたところ, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた.

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知: 飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について, 昭和 63 年 10 月 14 日, 63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知: 飼料分析基準の制定について, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安 第 14729 号 (2008).

技術レポート**8 含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の妥当性確認**～*N*-アセチルグリホサートの追加並びに大豆及び大豆油かすへの適用拡大～

齊木 雅一*, 廣井 利明*

Validation Study on Analyte Expansion of the Simultaneous Determination Method for Glyphosate, Glufosinate and its Metabolites in Feed by LC-MS/MS to Include *N*-acetylglyphosate, Soybean and Soybean Meal

Masakazu SAIKI* and Toshiaki HIROI*

(* Sapporo Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

We have made a validation study on the inclusion of *N*-acetylglyphosate in analyte compounds, and soybean and soybean meal in analyte samples for the simultaneous determination method of glyphosate (GLYP), glufosinate (GLUF), 3-(methyl phosphinico)propanoic acid (MPPA), *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate contained in feed. The method, which uses a liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS), has been listed in the Feed Analysis Standard of Japan.

N-acetylglyphosate in corn and GLYP, GLUF, MPPA, *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate in soybean and soybean meal were extracted with water, and the extracted solution was purified with two types of SPE columns (Oasis HLB and Oasis Plus MCX, Waters Co.; Milford, MA, USA). Having derivatized these compounds with trimethyl orthoacetate, the sample solution was purified with two types of SPE columns (Sep-Pak Plus NH2 and Silica, Waters Co.; Milford, MA, USA), and injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of these compounds. The LC separation was then carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) with a gradient of 0.01 v/v % formic acid solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on corn. *N*-acetylglyphosate was intentionally added to corn at the levels of 0.04, 1 and 5 mg/kg. The resulting mean recoveries ranged from 96.0 % to 118 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 7.1 %.

Recovery tests were also conducted on soybean and soybean meal. Soybean meal was added with 20 mg/kg of GLYP and *N*-acetylglyphosate, and 2 mg/kg of GLUF, MPPA and *N*-acetylglufosinate respectively. The resulting mean recoveries ranged from 98.0 % to 133 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 7.1 %. Soybean was unmeasurable because it could not have been purified with column for cloudiness of its extract.

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

Key words: glyphosate; glufosinate; 3-(methyl phosphinico)propanoic acid; *N*-acetylgllyphosate; *N*-acetylglufosinate; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); corn; soybean; soybean meal

キーワード：グリホサート；グルホシネート；3-メチルホスフィニコプロピオン酸；*N*-アセチルグリホサート；*N*-アセチルグルホシネート；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；とうもろこし；大豆；大豆油かす

1 緒 言

グリホサート（以下「GLYP」という．）は Monsanto Company（米国）が開発した非選択性茎葉処理型のアミノ酸系除草剤であり，たん白質合成に必須の芳香族アミノ酸の合成を阻害することにより殺草活性を示す．GLYP 耐性遺伝子組換え植物中では *N*-アセチルグリホサートに代謝されることが知られている¹⁾．

グルホシネート（以下「GLUF」という．）は Hoechst AG（ドイツ）が開発した非選択性茎葉処理型のアミノ酸系除草剤であり，植物中でグルタミン合成酵素を阻害することにより殺草活性を示す．また，GLUF は，非遺伝子組換え植物中では 3-メチルホスフィニコプロピオン酸（以下「MPPA」という．），GLUF 耐性遺伝子組換え植物中では *N*-アセチルグルホシネートに代謝されることが知られている．

現在，飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律²⁾に基づき農林水産大臣が確認した GLYP 耐性遺伝子及び GLUF 耐性遺伝子を持つとうもろこしや大豆が飼料用として流通している．

GLYP の国内における飼料中の残留基準値³⁾は，大麦，えん麦及びマイロで 20 mg/kg，小麦で 5 mg/kg，とうもろこしで 1 mg/kg，ライ麦で 0.2 mg/kg 並びに牧草で 120 mg/kg と定められている．また，農林水産省局長通知による飼料の有害物質の管理基準値⁴⁾は，稲わら及び稲発酵粗飼料で 0.2 mg/kg と定められている．さらに，厚生労働省の食品，添加物等の規格基準⁵⁾における残留基準値は，農産物（大豆，とうもろこし及びなたね）及び畜産物については，GLYP 及び *N*-アセチルグリホサートを GLYP に換算したものの総和となっている．

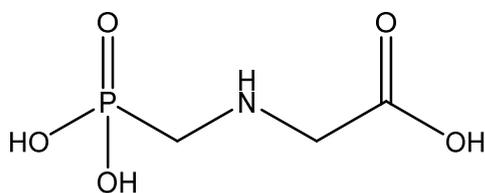
GLUF の飼料中の残留基準値は，穀類においては GLUF，MPPA を GLUF に換算したものと及び *N*-アセチルグルホシネートを GLUF に換算したものの総和として定められており，大麦で 0.5 mg/kg，小麦で 0.2 mg/kg 及びとうもろこしで 0.1 mg/kg である．また，飼料の有害物質の管理基準値は，稲わらで 0.5 mg/kg と定められている．

これら GLYP，GLUF，MPPA 及び *N*-アセチルグルホシネートの飼料中の定量法としては，飼料分析基準⁶⁾に記載された穀類，乾牧草及び稲わら中の GLUF，MPPA 及び *N*-アセチルグルホシネートの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という．）による同時定量法⁷⁾並びに穀類，稲わら及び稲発酵粗飼料中のグリホサートの LC-MS/MS による同時定量法⁸⁾がある．しかし，*N*-アセチルグリホサートについては分析法がなく，また，大豆及び大豆油かす中の GLYP，GLUF，MPPA 及び *N*-アセチルグルホシネートについても妥当性の確認を行っていない．

そこで，とうもろこしに残留する *N*-アセチルグリホサート並びに大豆及び大豆油かす中に残留する GLYP，GLUF，MPPA，*N*-アセチルグリホサート及び *N*-アセチルグルホシネートについて，飼料分析基準に記載されている分析法の妥当性を確認したので，その概要を報告する．

なお，飼料分析基準では，単に GLUF と記載した場合はアンモニウム塩を指すと規定されていることから，本検討内でも GLUF と記載した場合には同様の扱いとした．

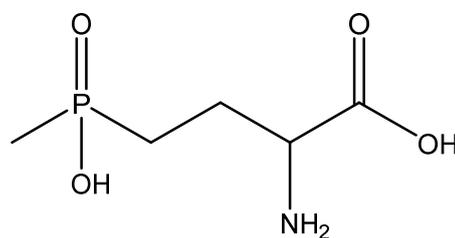
参考に GLYP, GLUF, MPPA, *N*-アセチルグリホサート及び *N*-アセチルグルホシネートの構造式等を Fig. 1 に示した.



Glyphosate (GLYP)

N-(phosphonomethyl)glycine

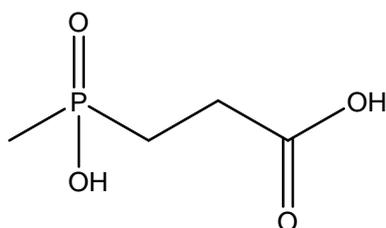
C₃H₈NO₅P MW: 169.1 CAS No.: 1071-83-6



Glufosinate (GLUF)

(2*RS*)-2-amino-4-[hydroxy(methyl)phosphinoyl]butyric acid

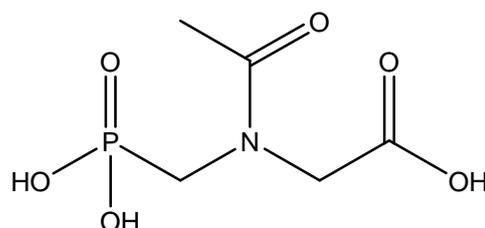
C₅H₁₂NO₄P MW: 181.1 CAS No.: 51276-47-2



3-(methylphosphinico)propionic acid (MPPA)

3-(methylphosphinico)propionic acid

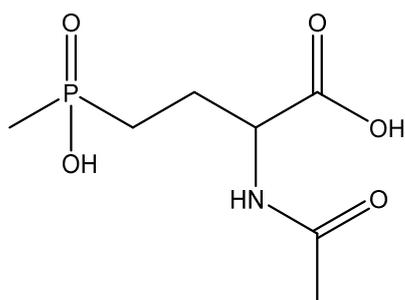
C₄H₉O₄P MW: 152.1 CAS No.: 15090-23-0



N-acetylglyphosate

2-[acetyl(phosphonomethyl)amino]acetic acid

C₅H₁₀NO₆P MW: 211.1 CAS No.: 129660-96-4



N-acetylglufosinate

(2*RS*)-2-acetamido-4-[hydroxy(methyl)phosphinoyl]butyric acid

C₇H₁₄NO₅P MW: 223.2 CAS No.: 73634-73-8

Fig. 1 Chemical structures of glyphosate (GLYP), glufosinate (GLUF), 3-(methylphosphinico)propionic acid (MPPA), *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate

2 実験方法

2.1 試料

大豆，大豆（加熱圧ぺん），とうもろこし及び大豆油かすはそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した．きな粉はそのまま使用した．

2.2 試薬

1) 酢酸エチル，アセトン及びメタノールは残留農薬・PCB 試験用を用いた．アセトニトリルは液体クロマトグラフ用（関東化学製）を用いた．オルト酢酸トリメチルは東京化成工業製（純度 98.0 % 以上）を用いた．ギ酸は Merck 製（純度 98 % 以上）を用いた．酢酸は試薬特級を用いた．水は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた．

2) GLYP 標準原液

グリホサート標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 99.3 %）25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ，水を加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えて GLYP 標準原液を調製した（この液 1 mL は，GLYP として 1 mg を含有する．）．

3) GLUF 標準原液

グルホシネートアンモニウム標準品（Dr.Ehrenstorfer GmbH 製，純度 99.2 %）25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ，水を加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えて GLUF 標準原液を調製した（この液 1 mL は，GLUF として 1 mg を含有する．）．

4) MPPA 標準原液

MPPA 標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 99.9 %）25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ，水を加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えて MPPA 標準原液を調製した（この液 1 mL は，MPPA として 1 mg を含有する．）．

5) *N*-アセチルグリホサート標準原液

N-アセチルグリホサート標準品（Tronto Research Chemicals 製，純度 97 %）25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ，水を加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えて *N*-アセチルグリホサート標準原液を調製した（この液 1 mL は，*N*-アセチルグリホサートとして 1 mg を含有する．）．

6) *N*-アセチルグルホシネート標準原液

N-アセチルグルホシネートナトリウム標準品（Tronto Research Chemicals 製，純度 95 %）25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ，水を加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えて *N*-アセチルグルホシネート標準原液を調製した（この液 1 mL は，*N*-アセチルグルホシネートとして 0.836 mg を含有する．）．

7) 検量線作成用混合標準原液

GLYP 標準原液，GLUF 標準原液及び MPPA 標準原液 1 mL を 10 mL の全量フラスコに入れて混合し，更に標線まで水を加えて検量線作成用混合標準原液を調製した（この液 1 mL は，GLYP，GLUF 及び MPPA として各 100 µg を含有する．）．

8) 0.01 v/v% ギ酸溶液

ギ酸 1 mL に水を加えて 1 L とし，更にこの液 100 mL に水を加えて 1 L とした．

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM 200 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 振とう機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振動数 300 rpm）
- 3) 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 カートリッジ（充てん剤量 500 mg）Waters 製にリザーバー（容量 6 mL）を連結したもの
- 4) スルホン酸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 Plus MCX カートリッジ（充てん剤量 225 mg）Waters 製
- 5) 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 カートリッジ（充てん剤量 360 mg）Waters 製にリザーバー（容量 10 mL）を連結したもの
- 6) シリカゲルミニカラム：Sep-Pak Plus Silica カートリッジ（充てん剤量 690 mg）Waters 製
- 7) 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：BOND ELUT LRC-PSA カートリッジ（充てん剤量 500 mg）Agilent Technologies 製
- 8) フロリジルミニカラム：Sep-Pak Plus Florisil カートリッジ（充てん剤量 910 mg）Waters 製
- 9) LC-MS/MS：
LC 部：ACQUITY UPLC Waters 製
MS 部：Quattro Premier XE Waters 製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ，水 200 mL を加え，30 分間振り混ぜて抽出した．抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ，1500×g で 10 分間遠心分離し，上澄み液の一定量を水で正確に 2.5 倍に希釈し，カラム処理 I に供する試料溶液とした．

2) カラム処理 I

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（500 mg）の下にスルホン酸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（225 mg）を連結し，メタノール 6 mL 及び水 12 mL で順次洗浄した（吸引マニホールドを使用し，流速 2~3 mL/min とした．以下同じ．）．50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き，試料溶液 1 mL をミニカラムに正確に入れ，液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた．更に，水 18 mL をミニカラムに加え，同様に流出させた．流出液を少量の水で 200 mL のなす形フラスコに移し，誘導体化に供する試料溶液とした．

3) 誘導体化

試料溶液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後，窒素ガスを送って乾固した．酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし，この容器を密栓して 100 °C で 2 時間加熱した後，放冷し，50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後，窒素ガスを送って乾固した．酢酸エチル 4 mL を正確に加えて残留物を溶かし，カラム処理 II に供する試料溶液とした．

4) カラム処理 II

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg）の下にシリカゲルミニカラム（690 mg）を連結し，酢酸エチル 10 mL で洗浄した（吸引マニホールドを使用し，流速 2 ~ 3 mL/min とした．以下同じ．）．試料溶液 2 mL をミニカラムに正確に入れ，液面が充てん剤

の上端に達するまで流出させた。更に、酢酸エチル 18 mL をミニカラムに加え、同様に流出させた。

50 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、アセトン 10 mL をミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させ、GLYP 誘導体及び MPPA 誘導体を溶出させた。次に、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムをはずし、アセトン-水 (19+1) 10 mL をシリカゲルミニカラムに加え、MPPA 誘導体及び GLUF 誘導体を溶出させた。溶出液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。0.01 v/v% ギ酸溶液 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

5) 標準液の誘導体化

検量線作成用農薬混合標準原液 1 mL を 200 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。酢酸 1 mL 及び オルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし、なす形フラスコを密栓して 100 °C で 2 時間加熱した後、放冷した。この液を、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。0.01 v/v% ギ酸溶液 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、更に同溶媒で正確に希釈し、1 mL 中に GLYP, GLUF 及び MPPA として 0.3, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 及び 300 ng 相当量を含む標準液を調製した。

6) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (以下「SRM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 及び 2 に示した。

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm), Agilent Technologies
Mobile phase	0.01 v/v% formic acid aqueous solution – acetonitrile (93:7) (hold for 12 min) → 3 min → (5:95) (hold for 10 min) → 6 min → (93:7) (hold for 8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ (600 L/h, 400 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	3.0 kV
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

Table 2 MS/MS parameters

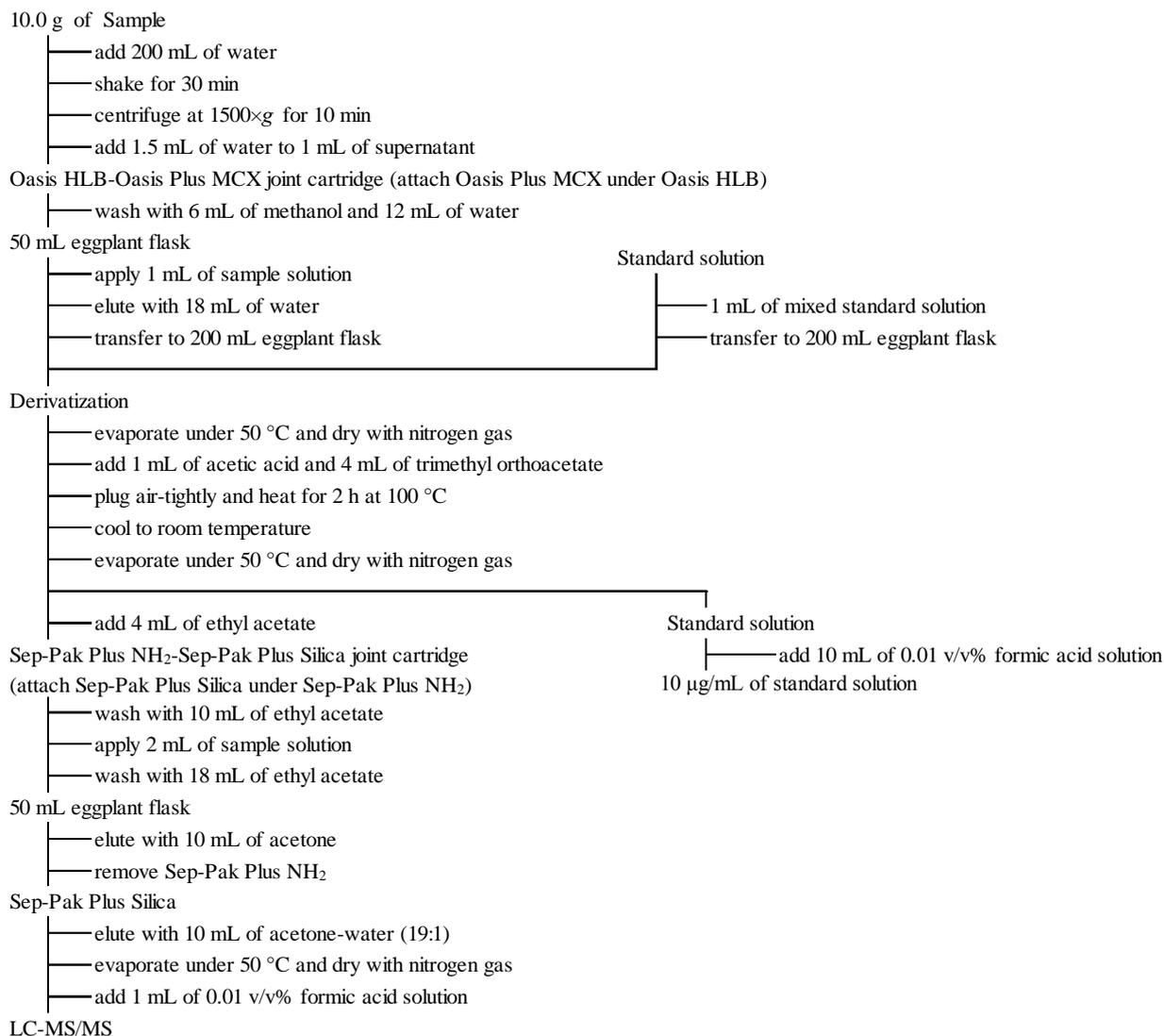
Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)		
GLYP derivative	254	102	-	22	17
		-	152	22	17
GLUF derivative	252	210	-	26	14
		-	150	26	14
MPPA derivative	181	149	-	21	14
		-	93	21	14

7) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の GLYP 量 (*N*-アセチルグリホサート由来を含む)、GLUF 量 (*N*-アセチルグルホシネート由来を含む) 及び MPPA 量を算出した。

また、GLYP 及び *N*-アセチルグリホサートは 2.4 の 3) の誘導体化により同一の誘導体 (以下「GLYP 誘導体」という。) に、GLUF 及び *N*-アセチルグルホシネートは 2.4 の 3) の誘導体化により同一の誘導体 (以下「GLUF 誘導体」という。) になることから、*N*-アセチルグリホサート又は *N*-アセチルグルホシネートを添加して添加回収試験を行った際の回収率 (%) の計算は、検量線から求めた GLYP 又は GLUF の濃度 (mg/kg) を *N*-アセチルグリホサート又は *N*-アセチルグルホシネートの濃度 (mg/kg) に換算し、添加した *N*-アセチルグリホサート又は *N*-アセチルグルホシネートの濃度 (mg/kg) で除してその割合を求めることにより行った。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme1 Analytical procedure for GLYP, GLUF, MPPA, *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate

2.5 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大豆油かすの精製の検討方法

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 (500 mg) を, アセトン 5 mL 及び酢酸エチル 5 mL で順次洗浄した (吸引マニホールドを使用し, 流速 2~3 mL/min とした. 以下同じ.). 2.4 の 5)により調製した 1 mL 中に GLYP, GLUF 及び MPPA として各 100 ng 相当量を含む各誘導体標準液 1 mL を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固し, 酢酸エチル-アセトン (18+2) 又は (17+3) 5 mL を正確に加えて溶かした. 誘導体標準液 2 mL をミニカラムに正確に入れ, 液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた. 50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き, 同溶媒を加え, GLYP 誘導体, GLUF 誘導体及び MPPA 誘導体を溶出させた. 溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した. 0.01 v/v% ギ酸溶液 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし, LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした.

2.6 フロリジルミニカラムによる大豆油かすの精製の検討方法

フロリジルミニカラム (910 mg) を、アセトン 5 mL で洗浄した (吸引マニホールドを使用し、流速 2~3 mL/min とした。以下同じ。)。2.4 の 5)により調製した 1 mL 中に GLYP, GLUF 及び MPPA として各 100 ng 相当量を含む各誘導体標準液 1 mL を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固し、アセトン 5 mL を正確に加えて溶かした。誘導体標準液 2 mL をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトン 13 mL を加え、GLYP 誘導体、GLUF 誘導体及び MPPA 誘導体を溶出させた。さらに、アセトン-メタノール (17+3) を加え溶出させて、溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。0.01 v/v% ギ酸溶液 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

大豆油かす 10.0 g を 2.4 の 1)から 4)により調製した試料溶液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固し、誘導体標準液 2 mL を正確に加えて溶かした。誘導体標準液を加えたブランク試料溶液 2 mL をミニカラムに入れ液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。誘導体標準液を加えたブランク試料溶液が入っていたなす形フラスコをアセトン 2 mL で 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させた。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトン 9 mL を加え、GLYP 誘導体、GLUF 誘導体及び MPPA 誘導体を溶出させた。さらに、アセトン-メタノール (17+3) を加え溶出させて、溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。0.01 v/v% ギ酸溶液 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

2.7 添加回収試験

2.2 の 5)の *N*-アセチルグリホサート標準原液を水で正確に希釈し添加に用いた。

とうもろこしについて、*N*-アセチルグリホサートとして、0.04, 1 及び 5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で GLYP として 0.32, 8 及び 40 ng/mL) になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

3 結果及び考察

3.1 飼料分析基準の適用性の検討

とうもろこしに *N*-アセチルグリホサートとして 1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で GLYP として 8 ng/mL 相当量) 添加した試料、大豆及び大豆油かすに GLYP として 20 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 200 ng/mL 相当量)、GLUF として 2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 20 ng/mL 相当量) 及び MPPA として 2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 20 ng/mL 相当量) 添加した試料並びに大豆油かすに *N*-アセチルグリホサートとして 20 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で GLYP として 160 ng/mL 相当量) 及び *N*-アセチルグルホシネート 2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で GLUF として 15 ng/mL 相当量) 添加した試料を用いて、2.4 に従って検討を行った。その結果、Table 3 のとおり、とうもろこしについては、飼料分析基準別表 3 の妥当性確認法ガイドライン (以下「妥当性確認法ガイドライン」という。) に定められた真度及び併行精度の目標値を満たし、飼料分析基準の適用が見込まれた。大豆油かすについては GLUF 及び *N*-アセチルグルホシネートの回収率

が 133 % 及び 121 % と高く、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度の目標値を満たさなかった。また、大豆、加熱圧ぺん大豆（2 検体）及びきな粉については、抽出液が白濁しており、カラム処理 I においてカラムの目詰まりが生じて以降の操作が行えなかった。

Table 3 Recoveries of GLYP, GLUF, MPPA, *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate

Compounds	Spiked level (mg/kg)	Corn		Soybean meal		Soybean ^{c)}
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	
GLYP	20	—	—	117	5.1	unmeasurable
GLUF	2	—	—	133	7.1	unmeasurable
MPPA	2	—	—	98.0	6.8	unmeasurable
<i>N</i> -Acetylglyphosate	1	118	6.8	—	—	—
	20	—	—	115	1.4	—
<i>N</i> -Acetylglufosinate	2	—	—	121	1.4	—

—: Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) $n = 1$

大豆油かすの GLUF 及び *N*-アセチルグルホシネートの回収率が高くなったことの原因究明のため、マトリックス効果の確認を行った。2.4 の 1) から 4) により調製した大豆油かすのブランク試料溶液に 2.4 の 5) に従って調製した GLYP 誘導体 (GLYP として 0.05 及び 20 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 200 ng/mL 相当量))、GLUF 誘導体 (GLUF として 0.05 及び 2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 20 ng/mL 相当量)) 及び MPPA 誘導体 (MPPA として 0.05 及び 2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 20 ng/mL 相当量)) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について、2.4 の 5) に従って調製した同濃度の GLYP、GLUF、MPPA 各誘導体標準液に対するピーク面積比を確認した。その結果、Table 4 のとおり、GLYP 誘導体の 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 ng/mL 相当量) 及び GLUF 誘導体の 0.05 及び 2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 20 ng/mL 相当量) においてイオン化促進が確認された。このことから、大豆及び大豆油かすについては、抽出方法又は精製方法の改良が必要であると考えられた。

Table 4 Matrix effect of soybean meal

Compounds	Concentration		Matrix effect ^{b)} (%)
	in matrix standard solution	in sample ^{a)}	
	(ng/mL)	(mg/kg)	
GLYP derivative	0.5	0.05	192
	200	20	115
GLUF derivative	0.5	0.05	159
	20	2	140
MPPA derivative	0.5	0.05	106
	20	2	98.7

$n = 1$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak area of compounds in the presence of matrix to that in the absence of matrix

3.2 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大豆油かすの精製の検討
畜水産物中のグリホサート試験法⁹⁾を参考に大豆油かすの精製について検討を行った。この試験法はエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びフロリジルミニカラムを使用した GLYP のみの試験法であるため、GLUF 及び MPPA にも適用できるかどうかを確認した。

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からの溶出を確認するため、2.5 により GLYP 誘導体、GLUF 誘導体及び MPPA 誘導体の溶出画分の確認を行った。その結果、Table 5 のとおり GLYP 誘導体及び MPPA 誘導体は酢酸エチルルーアセトン (18+2) 又は (17+3) 10 mL でほぼ 100 % 溶出したが、GLUF 誘導体は同溶媒 25 mL 加えても 80 % 以下しか溶出しなかった。このことから、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を使用せず、フロリジルミニカラムで検討することとした。

Table 5 Elution pattern from BOND ELUT LRC-PSA

Elution solvent	Compounds	Recovery (%)				Total
		0~10 mL	10~15 mL	15~20 mL	20~25 mL	
Ethyl acetate-acetone (18:2)	GLYP derivative	95	0	0	0	95
	GLUF derivative	69	3	1	0	74
	MPPA derivative	103	0	0	0	103
Ethyl acetate-acetone (17:3)	GLYP derivative	92	0	0	0	93
	GLUF derivative	74	3	1	0	79
	MPPA derivative	94	0	0	0	94

$n = 3$

3.3 フロリジルミニカラムによる大豆油かすの精製の検討

フロリジルミニカラムからの溶出を確認するために、2.6 により操作して GLYP 誘導体、GLUF 誘導体及び MPPA 誘導体の溶出画分の確認を行った。その結果、Table 6 のとおり標準液

についてはアセトン 15 mL では溶出せず、アセトン-メタノール (17+3) 20 mL でほぼ 100 % 溶出した。しかし、大豆油かすのマトリックスを含んだ試料溶液については、アセトン 15 mL 及びアセトン-メタノール (17+3) 20 mL の溶出で GLYP 誘導体が 117 %, GLUF 誘導体が 124 % とマトリックス効果によるイオン化促進が除去できていないとみられる結果となった。

Table 6 Elution pattern from Sep-Pak Plus Florisil

Matrix	Compounds	Recovery (%)				Total
		Acetone	Acetone-methanol (17:3)			
		0~15 mL	0~10 mL	10~15 mL	15~20 mL	
None	GLYP derivative	0	92	1	0	94
	GLUF derivative	0	84	9	1	95
	MPPA derivative	0	97	2	1	99
Soybean meal	GLYP derivative	2	112	2	1	117
	GLUF derivative	0	106	15	3	124
	MPPA derivative	1	104	2	1	107

$n = 3$

3.4 妨害物質の検討

とうもろこし 2 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においても *N*-アセチルグリホサートの定量を妨げるピークは認められなかった。

大豆油かす 7 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、5 検体において GLYP として 1.0~3.2 mg/kg 相当量、GLUF として 0.05~0.38 mg/kg 相当量のピークが検出された (MPPA は未測定)。定量イオンだけでなく確認イオンでも定量を行ったところ、両者がほぼ一致したため GLYP 及び GLUF の残留によるものと判断した。残りの 2 検体においては GLYP (*N*-アセチルグリホサートを含む)、GLUF (*N*-アセチルグルホシネートを含む) 及び MPPA の定量を妨げるピークは認められなかった。この 2 検体は非遺伝子組換えの大豆油かすだった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

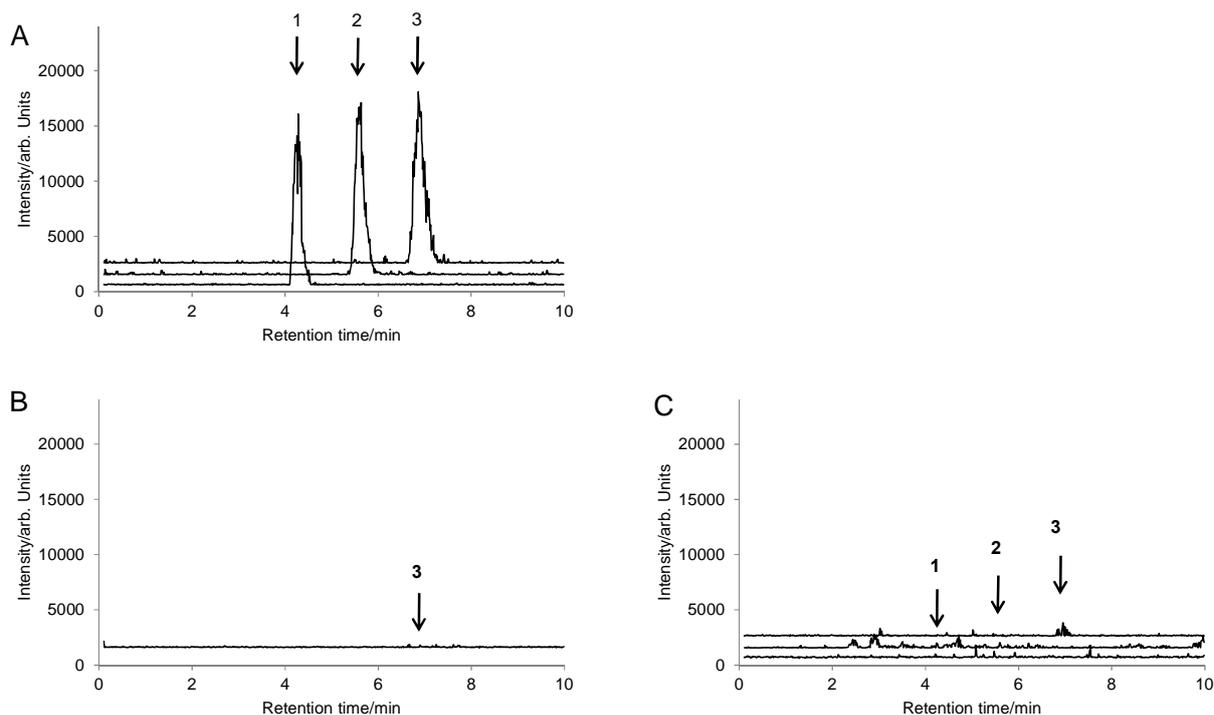


Fig. 2 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the retention times of 1: GLUF derivative, 2: MPPA derivative and 3: GLYP derivative. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (1 ng/mL for GLUF, MPPA and GLYP; 0.005 ng as GLUF, MPPA and GLYP)

B: Sample solution of corn (blank)

C: Sample solution of soybean meal (blank)

3.5 添加回収試験

2.7 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 7 のとおり、平均回収率は 96.0~118 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 7.1 %以下の成績が得られ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 7 Recoveries for *N*-acetylglyphosate in corn

Compound	Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
<i>N</i> -Acetylglyphosate	0.04	102	7.1
	1	118	6.8
	5	96.0	7.0

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

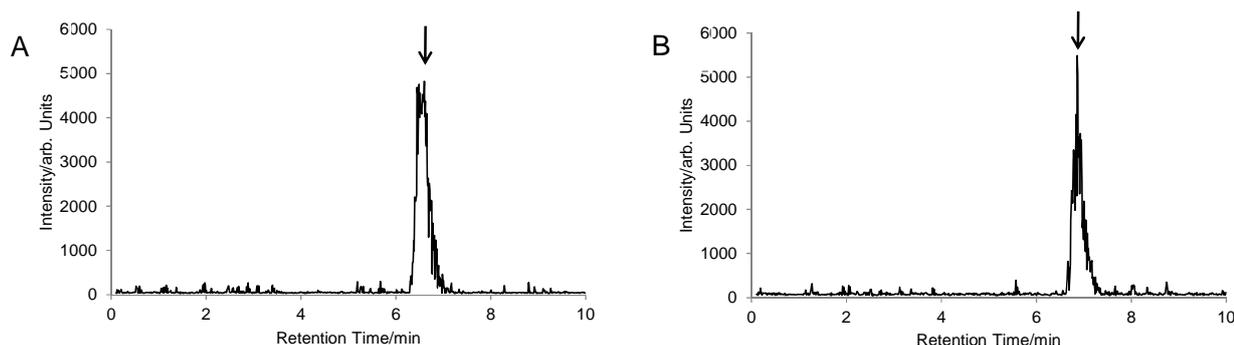


Fig. 3 SRM chromatograms on recovery test

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrow indicates the peak of GLYP derivative.)

A: Standard solution (0.5 ng/mL: 0.0025 ng as GLYP derivative)

B: Sample solution of corn (spiked at 0.04 mg/kg original matter of *N*-acetylglyphosate (as 0.32 ng/mL as GLYP in sample solution)).

3.6 定量下限及び検出下限の検討

GLYP 誘導体の検量線が直線性を示した範囲、GLYP として 0.3~300 ng/mL の下端付近となる濃度（とうもろこし中で *N*-アセチルグリホサートとして 0.04 mg/kg 相当量（最終試料溶液中濃度 GLYP として 0.32 ng/mL 相当量））の添加回収試験の結果、得られたピークの SN 比が 10 以上であったため、*N*-アセチルグリホサートの定量下限は 0.04 mg/kg とした。この濃度は、GLYP のとうもろこし中の残留基準値（1 mg/kg, *N*-アセチルグリホサートとして 1.2 mg/kg）に対して 1/30 であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた。その結果、検出下限は *N*-アセチルグリホサートとして 0.01 mg/kg であり、同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。

なお、Table 7 に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった。

4 まとめ

とうもろこしに残留する *N*-アセチルグリホサート並びに大豆及び大豆油かす中に残留する GLYP, GLUF, MPPA, *N*-アセチルグリホサート及び *N*-アセチルグルホシネートについて、飼料分析基準に記載されている分析法の妥当性を確認したところ、以下の結果が得られ、とうもろこしについては、適用可能であると考えられた。また、大豆及び大豆油かすについては、抽出方法又は精製方法の改良が必要であると考えられた。

- 1) とうもろこし及び大豆油かすについて、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 2) とうもろこしに *N*-アセチルグリホサートとして 0.04, 1 及び 5 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 3) 本法のとうもろこし中の *N*-アセチルグリホサートの定量下限は 0.04 mg/kg, 検出下限は 0.01 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。

- 4) 大豆，加熱圧ぺん大豆及びきな粉について，本法に従って分析を実施したところ，抽出液が白濁シカラム処理 I が行えず，測定できなかった。
- 5) 大豆油かすについて，本法に従って分析を実施したところ，マトリックス効果によるイオン化促進のため，回収率が妥当性確認法ガイドラインに定められた真度の目標値を満たさなかった。また，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及びフロリジルミニカラムによる精製を検討したが，マトリックス効果によるイオン化促進が除去できなかった。

文 献

- 1) 食品安全委員会：グリホサート農薬評価書，平成 28 年 7 月 (2016)。
- 2) 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律，昭和 28 年 4 月 11 日，法律第 35 号 (1953)。
- 3) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976)。
- 4) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988)。
- 5) 厚生省告示：食品，添加物等の基準規格，昭和 34 年 12 月 28 日，告示第 370 号 (1959)。
- 6) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008)。
- 7) 牧野大作，若宮洋市，榊原良成，上野山智洋：穀類，乾牧草及び稲わら中のグルホシネート，3-メチルホスフィニコプロピオン酸及び *N*-アセチルグルホシネートの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法，飼料研究報告，**38**，89-107 (2013)。
- 8) 牧野大作，若宮洋市，榊原良成，舟木紀夫：穀類，稲わら及び稲発酵粗飼料中のグリホサートの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法，飼料研究報告，**39**，30-43 (2014)。
- 9) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について，平成 17 年 1 月 24 日，食安発 0124001 号 (2005)。

精度管理**1 平成 30 年度飼料等の共通試料による分析鑑定について****Proficiency Test (in the Fiscal Year 2018)**

沼田 歩美^{*1}, 船水 悦子^{*2}, 三枝 尚子^{*3},
嶋村 知紗^{*4}, 高津 文香^{*5}, 佐藤 憲大^{*6}

1 目 的

飼料検査指導機関, 飼料・飼料添加物製造等業者, 民間分析機関等を対象に, 飼料等の共通試料による分析鑑定を行うことにより, 分析及び鑑定技術の維持向上を図り, 併せて分析誤差を把握し, 飼料等の適正な製造及び品質管理の実施に資する。

2 共通試料の内容

- A 試料・・・中すう育成用配合飼料
- B 試料・・・魚 粉
- C 試料・・・鑑定用飼料原料混合試料
- D 試料・・・ほ乳期子豚育成用プレミックス

3 共通試料の調製**3.1 調製年月日**

平成 30 年 6 月 25 日及び 6 月 26 日

3.2 調製場所

独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

3.3 調製方法**1) A 試料**

目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎器で粉碎した中すう育成用配合飼料 80 kg を用い, 以下の手順により試料を調製した。

試料をよく混合した後, 9 等分した。その中の 4 区画を一つに合わせてよく混合した後, 4 等分して元に戻した。この操作を表 1 の混合区画表により 7 回繰り返した後, 各区画より一定量 (約 20 g) ずつとり, 1 袋当たり約 180 g 入りの試料 340 個を調製した。

*1 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

*2 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

*3 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター, 現 農林水産省消費・安全局

*4 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター, 現 業務監査室

*5 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター, 現 農林水産省消費・安全局

*6 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

表 1 混合区画表

回数	I	II	III	IV	V	VI	VII
	5	5	9	1	5	8	2
区画番号	6	1	7	2	8	3	6
	4	8	3	5	4	7	4
	9	3	1	6	9	2	7

2) B 試料

目開き 1 mm のふるいを通させた魚粉 80 kg を用い、A 試料と同様に試料 340 個を調製した。

3) C 試料

各原料中の夾雑物を除去した後、必要に応じて粉碎し、表 2 に示した 10 種類の原料を同表の混合割合で混ぜ合わせた試料（総量 80 kg）を用い、A 試料と同様に試料 340 個を調製した。

表 2 C 試料の原料及びその混合割合

原料名	混合割合 (%)	原料名	混合割合 (%)
とうもろこし	30	なたね油かす	8
小麦	20	魚粉	4
マイロ	10	アルファルファミール	3
米ぬか油かす	10	炭酸カルシウム	3
大豆油かす	10	食塩	2

4) D 試料

ほ乳期子豚育成用プレミックス 80 kg を用い、A 試料と同様に試料 340 個を調製した。

4 分析鑑定項目及び実施要領

4.1 分析鑑定項目

A 試料・・・水分，粗たん白質，粗脂肪，粗繊維，粗灰分，カルシウム，リン及びサリノマイシンナトリウム

B 試料・・・水分，粗たん白質，粗灰分，カドミウム及びエトキシキン

C 試料・・・飼料原料の検出及びその混合割合の推定

D 試料・・・銅，亜鉛及びクエン酸モランテル

4.2 実施要領

「平成 30 年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領」（175 ページ）による。

5 共通試料の均質性確認

A 及び B 試料では粗たん白質及び粗灰分, D 試料では銅及び亜鉛の分析によって, Thompson らの harmonized protocol¹⁾に基づき, 各試料の均質性を確認した.

ランダムに抜き取った 10 袋で各 2 点併行分析した結果を表 3 に, また, その結果に基づく一元配置の分散分析結果を表 4 に示した.

いずれの試料においても, 分散比 F_0 は F 境界値を下回り, 有意水準 5 %において試料間に有意な差は認められず, 試料の均質性に問題はないと判断した.

表 3 A, B 及び D 試料の分析結果

試料 No.	A試料				B試料				D試料			
	粗たん白質 (%)		粗灰分 (%)		粗たん白質 (%)		粗灰分 (%)		銅 (g/kg)		亜鉛 (g/kg)	
	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2
1	18.67	18.70	4.97	4.99	67.12	67.13	19.86	19.77	52.97	52.19	54.76	54.93
2	18.67	18.49	4.92	4.97	68.19	67.14	19.95	19.62	53.28	52.06	55.13	54.78
3	18.60	18.83	4.94	4.92	67.12	67.11	19.85	20.02	52.70	51.91	53.86	53.45
4	18.76	19.04	5.00	4.86	67.74	68.36	19.85	19.69	53.78	52.60	55.95	54.82
5	18.52	18.74	4.99	4.90	67.48	67.06	19.71	19.89	52.10	52.81	53.87	55.48
6	18.98	19.28	4.93	4.92	67.25	66.30	20.07	19.95	53.45	52.70	55.54	53.86
7	19.31	18.41	4.91	5.06	66.58	66.73	19.83	20.06	51.75	52.49	54.06	54.71
8	18.79	18.71	4.94	4.98	67.36	66.81	19.94	20.00	52.33	52.73	53.53	54.57
9	18.44	18.63	4.94	4.99	68.08	67.70	20.01	19.51	52.10	51.87	53.41	54.27
10	18.92	18.46	4.94	4.99	67.74	67.88	20.15	19.90	52.58	52.90	54.14	54.77

表4 A, B及びD試料の分散分析結果

成分名	要因	偏差平方和	自由度	不偏分散	分散比	F境界値
		S	φ	$V = S/\varphi$	$F_0 = V_A/V_E$	$F(\alpha = 0.05)$
A試料	試料間	0.5578	9	0.0620	0.90	3.02
	粗たん白質分析誤差	0.6882	10	0.0688		
	総計	1.2460	19			
	A	0.0081	9	0.0009	0.30	3.02
	粗灰分	0.0301	10	0.0030		
	T	0.0382	19			
B試料	A	3.0787	8	0.3848	2.58	3.23
	粗たん白質	1.3401	9	0.1489		
	T	4.4187	17			
	A	0.1988	9	0.0221	0.75	3.02
	粗灰分	0.2937	10	0.0294		
	T	0.4925	19			
D試料	A	2.6159	9	0.2907	0.96	3.02
	銅	3.0214	10	0.3021		
	T	5.6373	19			
	A	5.0939	9	0.5660	1.17	3.02
	亜鉛	4.8258	10	0.4826		
	T	9.9197	19			

6 参加試験室

- 6.1 総数 232
 うち 飼料検査指導機関…44
 飼料製造業者関係…146
 飼料添加物製造業者関係…11
 民間分析機関等…22
- 6.2 試料別参加試験室数
 A 試料…218
 B 試料…216
 C 試料…117
 D 試料…84

7 分析成績及び解析結果並びに鑑定成績

7.1 分析成績及び解析結果

A, B 及び D 試料について, その分析成績を表 5 に, ヒストグラムを図 1 に, また, 解析結果を表 6~8 に示した.

分析値の解析は, ロバスト法に基づき以下の手順により行った.

式 1 により頑健な標準偏差の推定量として NIQR (Normalised inter quartile range; 標準四分位範囲) を求めた後, 式 2 により各分析値の z -スコアを求めた. なお, 各四分位数は, 表計算ソフト

トウェア Microsoft Excel の関数 QUARTILE.INC を用いて求めた.

$$\text{NIQR} = \frac{(c-a)}{1.349} \dots\dots\dots \text{式 1}$$

a : 第 1 四分位数

c : 第 3 四分位数

$$z\text{-スコア} = \frac{(x-b)}{\text{NIQR}} \dots\dots\dots \text{式 2}$$

x : 各試験室の分析値

b : 中央値

また, z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値を異常値と判断し, これを棄却した後, 平均値の 95 %信頼区間を求めた.

7.2 鑑定成績

C 試料について, その鑑定成績を表 9 及び 10 に示した.

表5 A, B 及び D 試料

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		SL(管理分析法)		SL(飼料分析基準)	
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score												
1	12.37	1 -0.22	18.89	3 0.00	4.82	2 -0.46	4.11	2 0.66	5.09	1 1.07	0.750	2 -0.03	0.679	1 1.12				
3	12.41	1 -0.09	18.87	3 -0.09	5.11	2 1.23	3.00	3 -1.44	4.93	1 -0.35	0.765	3 0.45	0.653	1 -1.21				
4	12.00	1 -1.43	19.07	3 0.82	4.73	2 -0.99			4.73	1 -2.15	0.776	2 0.81	0.695	1 2.56			49.3	3 -0.51
5	12.97	1 1.72	18.87	3 -0.09					5.03	1 0.53	0.760	2 0.29	0.656	1 -0.94				
6	12.06	1 -1.23	18.84	1 -0.22	5.09	1 1.11			4.86	1 -0.98								
7	12.16	1 -0.91	18.88	4 -0.04	4.99	1 0.52			4.95	1 -0.17								
8	12.79	1 1.13	18.73	4 -0.73			4.24	2 0.91	4.97	1 0.00	0.750	2 -0.03	0.667	1 0.04				
10	12.36	1 -0.26	18.90	3 0.04	5.03	1 0.76	3.70	2 -0.11	4.98	1 0.08	0.712	2 -1.27	0.655	1 -1.03				
11	12.66	1 0.71	18.77	4 -0.54	4.68	2 -1.29	3.75	3 -0.01	5.05	1 0.71	0.760	1 0.29	0.671	1 0.40			51.9	3 0.82
12	12.64	1 0.65	19.02	3 0.59	4.83	1 -0.41			4.89	1 -0.71					51.7	1 0.11		
13	12.44	1 0.00	19.31	3 1.92	4.78	2 -0.70			4.88	1 -0.80	0.737	2 -0.45	0.672	1 0.49	51.3	2 -0.13		
14	12.28	1 -0.52	18.84	3 -0.22	5.50	1 3.51	4.46	2 1.33	4.55	1 -3.77	0.742	2 -0.29	0.659	1 -0.67			49.6	3 -0.36
15	12.66	1 0.71	18.94	3 0.22					5.07	1 0.89	0.777	2 0.85	0.666	1 -0.04				
16	11.25	1 -3.86	18.90	3 0.04	5.03	1 0.76			5.00	1 0.26								
20	12.77	1 1.07	18.81	3 -0.36	4.72	2 -1.05												
21	13.15	1 2.30	19.33	4 2.01	4.71	2 -1.11			4.94	1 -0.26								
22	12.19	1 -0.81	18.78	3 -0.50	4.84	1 -0.35	4.27	2 0.96	5.12	1 1.34	0.758	2 0.22	0.663	1 -0.31				
24	12.26	1 -0.58	18.58	3 -1.41	4.92	1 0.11	4.34	2 1.10	5.00	1 0.26	0.670	2 -2.64	0.680	1 1.21				
30	12.37	1 -0.22	18.89	3 0.00	4.71	1 -1.11	3.35	2 -0.77	5.07	1 0.89	0.772	2 0.68	0.674	1 0.67			49.5	3 -0.41
31	12.66	1 0.71	18.48	1 -1.87	5.55	1 3.81	3.68	2 -0.15	4.87	1 -0.89	0.755	2 0.13	0.669	1 0.22				
32	12.33	1 -0.35	19.26	2 1.69	4.89	1 -0.05	3.86	3 0.19	4.94	1 -0.26	0.764	2 0.42	0.644	1 -2.02				
33	12.29	1 -0.48	18.72	3 -0.77	4.68	2 -1.29	3.82	3 0.11	4.94	1 -0.26	0.769	2 0.58	0.668	1 0.13				
34	12.66	1 0.71	18.07	4 -3.74	4.85	1 -0.29	4.01	3 0.47	4.86	1 -0.98	0.027	2 -23.67	0.672	1 0.49				
35	12.11	1 -1.07	19.40	4 2.33	4.72	2 -1.05	4.39	3 1.19	4.84	1 -1.16								
36	12.28	1 -0.52	18.75	4 -0.64	4.67	2 -1.34	4.39	3 1.19	5.11	1 1.25	0.672	2 -2.58	0.675	1 0.76				
37	12.31	1 -0.42	18.90	3 0.04	5.01	2 0.64	4.94	3 2.24	5.00	1 0.26	0.760	2 0.29	0.670	1 0.31			49.2	3 -0.56
38			19.30	1 1.87														
39	11.96	1 -1.56	19.02	3 0.59	4.81	2 -0.52	3.31	3 -0.85	4.93	1 -0.35	0.755	1 0.13	0.668	1 0.13			51.2	3 0.44
40			19.24	2 1.60														
41	12.60	1 0.52	18.97	2 0.36	4.92	2 0.11	3.98	3 0.41	4.98	1 0.08	0.784	2 1.07	0.696	1 2.65			53.3	3 1.55
42	12.40	1 -0.13	18.72	4 -0.77					5.00	1 0.26					50.9	1 -0.35		
43	12.56	1 0.39	18.83	3 -0.27	4.87	1 -0.17			4.87	1 -0.89	0.736	2 -0.49	0.655	1 -1.03			52.2	3 0.96
44	12.60	1 0.52	19.13	3 1.09	4.88	2 -0.11			5.01	1 0.35	0.742	2 -0.29	0.665	1 -0.13	50.2	1 -0.77		
45	12.37	1 -0.22	19.09	2 0.91			4.76	2 1.90	4.97	1 0.00								
46	12.36	1 -0.26	19.03	3 0.64					4.78	1 -1.70	0.742	2 -0.29	0.681	1 1.30				
47	12.33	1 -0.35	18.88	3 -0.04	4.85	2 -0.29	4.53	3 1.46	4.99	1 0.17	0.791	2 1.30	0.661	1 -0.49			53.1	3 1.44
48	12.85	1 1.33	18.89	3 0.00	5.01	1 0.64	4.16	2 0.76	5.14	1 1.52	0.730	2 -0.68	0.671	1 0.40	51.1	1 -0.23		
49	12.63	1 0.61	18.99	3 0.45					4.76	1 -1.88					51.9	1 0.23		
50	12.18	1 -0.84	18.88	4 -0.04	5.19	2 1.70			4.94	1 -0.26								
51	12.15	1 -0.94	18.99	2 0.45	4.96	1 0.35			5.44	1 4.22								
52	12.05	1 -1.26	18.67	4 -1.00	4.96	1 0.35			4.95	1 -0.17			0.664	1 -0.22				
53	12.78	1 1.10	18.88	4 -0.04	4.98	1 0.46	3.53	2 -0.43	4.95	1 -0.17								
54	12.41	1 -0.09	18.98	3 0.41					5.05	1 0.71							48.4	3 -0.98
55	12.39	1 -0.16	19.04	3 0.68	4.85	1 -0.29			5.00	1 0.26								
56	12.72	2 0.91	18.92	3 0.13					4.91	2 -0.53								
58	12.57	1 0.42	19.08	3 0.86	5.17	1 1.58	4.30	2 1.02	4.95	1 -0.17	0.728	2 -0.75	0.666	1 -0.04			52.0	4 0.88
61	12.34	1 -0.32	18.48	1 -1.87	4.66	1 -1.40	3.19	2 -1.08	5.25	1 2.51	0.705	2 -1.50	0.487	1 -16.14				
62			18.20	1 -3.15	4.86	1 -0.23	3.70	1 -0.11	4.97	1 0.00	0.759	1 0.26	0.668	1 0.13				
63			18.69	3 -0.91														
64							3.58	3 -0.34										
65	11.82	1 -2.01	19.32	3 1.96	4.86	2 -0.23	3.49	2 -0.51	5.05	1 0.71	0.780	2 0.94	0.673	1 0.58				
66	12.50	1 0.19	19.46	3 2.60	5.00	1 0.58	3.31	2 -0.85	4.68	1 -2.60								
66			19.22	4 1.50														
67	12.11	1 -1.07	18.70	2 -0.86	4.73	1 -0.99	3.20	3 -1.06	5.04	1 0.62	0.764	2 0.42	0.619	1 -4.27				
68	12.66	1 0.71	18.35	1 -2.46	4.87	1 -0.17	3.53	2 -0.43	4.70	1 -2.42	0.745	2 -0.19	0.663	1 -0.31				
69			19.15	3 1.18	4.95	2 0.29	4.74	3 1.86										
70	12.92	1 1.56	18.34	4 -2.51	4.69	1 -1.23			4.94	1 -0.26								
71	12.01	1 -1.39													53.9	1 1.42		
72	12.35	1 -0.29							5.00	1 0.26	0.818	2 2.19	0.676	1 0.85	51.6	1 0.05		
73	12.62	1 0.58	18.99	1 0.45	4.94	1 0.23	3.76	2 0.00	4.72	1 -2.24	0.753	2 0.06	0.663	1 -0.31				
74	12.70	1 0.84	18.56	4 -1.50	5.09	1 1.11			5.05	1 0.71	0.761	2 0.32	0.651	1 -1.39				
75	12.40	1 -0.13	18.94	3 0.22			3.46	2 -0.57	5.00	1 0.26	0.730	1 -0.68	0.678	1 1.03	51.4	1 -0.05		
77	12.91	1 1.52	18.50	4 -1.78	4.72	2 -1.05	3.41	3 -0.66	4.91	1 -0.53	0.741	1 -0.32	0.658	1 -0.76				
78	12.85	1 1.33	18.62	4 -1.23	4.84	1 -0.35	3.28	2 -0.91	4.99	1 0.17	0.763	2 0.39	0.674	1 0.67				
79	12.51	1 0.22	19.13	3 1.09	4.73	2 -0.99	3.61	2 -0.28	5.06	1 0.80	0.798	2 1.53	0.661	1 -0.49				
79							3.86	3 0.19										
80	12.92	1 1.56	19.10	3 0.96	4.56	2 -1.99			5.04	1 0.62								
81	12.56	1 0.39	18.74	4 -0.68	4.69	1 -1.23	3.83	3 0.13	4.92	1 -0.44	0.746	2 -0.16	0.652	1 -1.30			50.0	3 -0.15
82	12.43	1 -0.03	18.80	3 -0.41	4.79	2 -0.64	4.37	2 1.15	4.96	1 -0.08	0.787	2 1.17	0.663	1 -0.31				
83	12.46	1 0.06	19.04	3 0.68	4.89	1 -0.05	4.09	1 0.62	5.11	1 1.25	0.748	2 -0.09	0.668	1 0.13				
83			18.85	4 -0.18														
84	12.54	1 0.32	19.01	3 0.54	5.30	1 2.34			5.04	1 0.62			0.716	1 4.45				
85	12.39	1 -0.16	19.07	3 0.82	5.01	2 0.64	3.36	4 -0.76	4.82	1 -1.34	0.751	2 0.00	0.676	1 0.85				
86	12.14	1 -0.97	19.21	3 1.46	4.85	1 -0.29	4.66	2 1.71	4.71	1 -2.33	0.716	1 -1.14	0.660	1 -0.58				
87	12.34	1 -0.32	18.79	3 -0.45	5.01	1 0.64			5.07	1 0.89	0.758	2 0.22	0.671	1 0.40	47.6	2 -2.31		

表5 A, B 及び D 試料

試料 番号	水分			粗たん白質			粗脂肪			粗繊維			粗灰分			カルシウム			リン			SL(管理分析法)			SL(飼料分析基準)		
	分析値 (%)	No.	z-score	分析値 (%)	No.	z-score	分析値 (%)	No.	z-score	分析値 (%)	No.	z-score	分析値 (%)	No.	z-score	分析値 (%)	No.	z-score	分析値 (%)	No.	z-score	分析値 (g(力価)/t)	No.	z-score	分析値 (g(力価)/t)	No.	z-score
88	12.58	1	0.45	19.11	3	1.00	5.12	2	1.29				5.01	1	0.35	0.733	1	-0.58	0.656	1	-0.94						
89	12.54	1	0.32	18.35	3	-2.46	4.91	1	0.05																		
90	12.71	1	0.87	18.53	2	-1.64	4.57	1	-1.93	3.93	2	0.32	4.88	1	-0.80	0.715	2	-1.17	0.684	1	1.57	54.3	1	1.66	50.6	3	0.15
91	12.75	1	1.00	18.77	3	-0.54	4.70	2	-1.17	3.74	2	-0.03	4.95	1	-0.17												
93	12.57	1	0.42	19.04	3	0.68	5.09	1	1.11	3.32	3	-0.83	5.07	1	0.89	0.736	2	-0.49	0.669	1	0.22						
94	12.77	1	1.07	18.64	3	-1.14	4.57	2	-1.93	4.44	3	1.29	5.04	1	0.62	0.757	2	0.19	0.638	1	-2.56						
96	12.68	1	0.78	18.84	4	-0.22	5.06	1	0.93	4.17	3	0.77	5.09	1	1.07	0.773	2	0.71	0.660	1	-0.58						
97	12.54	1	0.32	18.80	1	-0.41	4.85	1	-0.29	3.50	1	-0.49	5.10	1	1.16	0.752	1	0.03	0.675	1	0.76						
98													6.38	2	<u>12.68</u>	0.716	3	-1.14	0.862	2	<u>17.58</u>						
99	12.30	1	-0.45	18.63	1	-1.18	5.12	1	1.29	4.21	2	0.85	4.75	1	-1.97	0.798	2	1.53	0.670	1	0.31						
102	12.38	1	-0.19	19.14	3	1.14																					
103	12.38	1	-0.19	18.78	3	-0.50	5.64	1	<u>4.34</u>	5.51	3	<u>3.32</u>	5.44	1	<u>4.22</u>												
109	11.94	1	-1.62	17.72	2	<u>-5.35</u>	5.03	2	0.76	2.73	2	-1.95	5.03	1	0.53												
113	12.73	1	0.94	19.34	3	2.05							5.04	1	0.62	0.769	2	0.58	0.662	1	-0.40				48.8	3	-0.77
120	13.19	1	2.43	18.75	4	-0.64	4.70	1	-1.17				5.02	1	0.44												
121	12.77	1	1.07	19.00	3	0.50	4.84	1	-0.35	3.55	3	-0.39	4.87	1	-0.89	0.753	2	0.06	0.671	1	0.40				49.1	3	-0.62
122	12.57	1	0.42	19.04	3	0.68	5.03	2	0.76				4.94	1	-0.26	0.790	2	1.27	0.660	1	-0.58	56.3	1	2.86			
123	12.61	1	0.55	18.80	3	-0.41	5.11	1	1.23	3.73	2	-0.05	4.92	1	-0.44	0.751	2	0.00	0.671	1	0.40				49.8	3	-0.25
123				18.70	4	-0.86																					
124	12.50	1	0.19	18.83	3	-0.27	4.79	2	-0.64	3.51	2	-0.47	4.81	1	-1.43	0.715	2	-1.17	0.654	1	-1.12				49.3	3	-0.51
126	12.62	1	0.58	18.92	3	0.13	4.90	2	0.00	3.72	2	-0.07	5.01	1	0.35	0.694	2	-1.86	0.651	1	-1.39				50.2	3	-0.05
128	12.72	1	0.91	18.95	3	0.27				3.93	2	0.32	4.96	1	-0.08	0.747	2	-0.13	0.659		-0.67				52.8	1	0.77
130	11.84	1	-1.95																								
132	12.61	2	0.55	18.80	3	-0.41							4.97	2	0.00												
133	12.67	1	0.74	18.73	3	-0.73							5.07	1	0.89	0.764	2	0.42	0.666	1	-0.04						
135	12.55	1	0.35	18.88	3	-0.04	4.93	1	0.17	3.97	3	0.39	4.95	1	-0.17	0.727	2	-0.78	0.653	1	-1.21				52.0	3	0.88
136	12.57	1	0.42	19.00	3	0.50	4.86	1	-0.23	3.86	4	0.19	4.98	1	0.08	0.740	2	-0.35	0.666	1	-0.04						
137	12.56	1	0.39	19.01	3	0.54	4.95	2	0.29	3.75	2	-0.01	5.07	1	0.89	0.740	2	-0.35	0.656	1	-0.94	50.7	1	-0.47			
140	12.60	1	0.52	19.01	3	0.54	4.81	1	-0.52	3.98	1	0.41	5.00	1	0.26	0.749	2	-0.06	0.670	1	0.31						
141	12.41	1	-0.09	19.07	3	0.82	4.95	1	0.29	3.86	3	0.19	5.38	1	<u>3.68</u>	0.730	2	-0.68	0.670	1	0.31	46.0	1	<u>-3.26</u>			
142	12.47	1	0.09	18.91	3	0.09	5.02	1	0.70	4.08	3	0.60	5.00	1	0.26	0.724	1	-0.88	0.672	1	0.49	50.4	1	-0.65			
143	12.67	1	0.74	19.05	2	0.73	5.08	1	1.05	4.09	2	0.62	4.91	1	-0.53	0.682	2	-2.25	0.671	1	0.40						
144	12.70	1	0.84	18.93	3	0.18	4.74	2	-0.93	5.11	1	1.25	5.11	1	1.25	0.743	2	-0.26	0.660	1	-0.58				50.5	3	0.10
145	13.21	1	2.50	18.94	4	0.22							4.95	1	-0.17										47.7	3	-1.34
146	12.39	1	-0.16	19.46	3	2.60	4.85	2	-0.29	4.55	3	1.50	4.78	1	-1.70	0.734	1	-0.55	0.664	1	-0.22	48.3	1	-1.89			
147	12.43	1	-0.03	19.04	4	0.68							4.88	1	-0.80												
148	12.34	1	-0.32	19.43	3	2.46				2.92	2	-1.59	4.89	1	-0.71												
149	12.01	1	-1.39										4.84	2	-1.16												
150	11.96	1	-1.56	18.54	2	-1.60	4.97	1	0.41	3.96	2	0.38	5.04	1	0.62	0.746	2	-0.16	0.661	1	-0.49						
151	12.05	1	-1.26	19.17	4	1.28	5.54	1	<u>3.75</u>	3.45	1	-0.58	5.06	1	0.80	0.724	2	-0.88	0.680	1	1.21						
152	12.11	1	-1.07	18.79	4	-0.45	5.31	2	2.40	4.16	2	0.76	4.88	1	-0.80	0.814	2	2.06	0.635	1	-2.83						
153	12.71	1	0.87				5.76	1	<u>5.04</u>	4.69	1	1.76	5.68	1	<u>6.38</u>	0.865	2	<u>3.72</u>	0.769	1	<u>9.21</u>						
154	12.66	1	0.71	18.87	4	-0.09	4.86	2	-0.23	3.44	3	-0.60	4.98	1	0.08	0.765	1	0.45	0.680	1	1.21				52.4	3	1.08
155	12.62	1	0.58	19.70	3	<u>3.70</u>	4.77	1	-0.76				5.03	1	0.53	0.679	2	-2.35	0.634	1	-2.92						
156																											
157	12.39	1	-0.16	18.83	3	-0.27							5.10	1	1.16										48.3	3	-1.03
158	12.33	1	-0.35	18.97	4	0.36	4.94	1	0.23	3.87	2	0.20	4.88	1	-0.80	0.752	2	0.03	0.662	1	-0.40				52.0	3	0.88
159	12.92	1	1.56	18.73	1	-0.73	4.99	1	0.52				4.81	1	-1.43												
160	12.10	1	-1.10	18.52	5	-1.69	4.94	3	0.23																		
161	11.17	1	<u>-4.12</u>	18.37	4	-2.37	4.79	1	-0.64	4.23	1	0.89	5.03	1	0.53				1.392	1	<u>65.24</u>						
162	12.57	1	0.42	18.28	4	-2.78	4.93	1	0.17	2.77	2	-1.88	4.93	1	-0.35	1.138	1	<u>12.65</u>	0.631	1	<u>-3.19</u>						
163	12.23	1	-0.68	18.89	3	0.00							4.85	1	-1.07	0.726	3	-0.81	0.681	2	1.30						
164	12.74	1	0.97	18.93	3	0.18	4.76	2	-0.82	4.28	3	0.98	5.02	1	0.44	0.744	2	-0.22	0.646	1	-1.84				50.4	3	0.05
165	12.20	1	-0.78	18.61	3	-1.28	4.62	2	-1.64				4.66	1	-2.78				0.676	2	0.85						
166	12.49	1	0.16	19.18	3	1.32							4.99	1	0.17	0.759	2	0.26	0.670	1	0.31						
167	12.06	1	-1.23				4.81	1	-0.52				5.02	1	0.44												
168	12.33	1	-0.35	19.10	1	0.96	5.08	1	1.05	3.57	1	-0.36	5.05	1	0.71												
169	12.87	1	1.39	18.62	1	-1.23	4.96	1	0.35				4.93	1	-0.35				0.644	2	-2.02						
170	12.49	1	0.16	18.89	3	0.00	4.95	1	0.29				4.99	1	0.17												
171	12.23	1	-0.68	19.03	3	0.64	4.99	2	0.52				4.97	1	0.00	0.781	2	0.98	0.672	1	0.49	54.2	2	1.60			
172	11.85	1	-1.91	18.76	3	-0.59	5.29	1	2.28	2.52	2	-2.35	4.67	1	-2.69												
173	12.21	1	-0.74																								

の分析成績 (2)

B試料					D試料					試料 番号														
水分 分析値 (%)	No.	z-score	粗たん白質 分析値 (%)	No.	z-score	粗灰分 分析値 (%)	No.	z-score	カドミウム 分析値 (g/トン)		No.	z-score	エトキシキン 分析値 (g/トン)	No.	z-score	銅 分析値 (g/kg)	No.	z-score	亜鉛 分析値 (g/kg)	No.	z-score	クエン酸モロニテル 分析値 (g/kg)	No.	z-score
5.82	1	0.09	68.29	3	1.27	19.64	1	-1.47				229.0	1	-8.89										88
5.80	1	0.00	67.19	3	-0.58																			89
5.86	1	0.28	67.14	2	-0.66	19.72	1	-0.81	1.03	2	-1.61	353.4	1	-0.69	50.18	1	-1.86	50.57	1	-1.00	14.5	1	-1.31	90
5.94	1	0.67	67.97	3	0.73	19.90	1	0.65																91
5.79	1	-0.04	68.33	3	1.34	19.86	1	0.32	1.12	2	-0.40	352.1	1	-0.78	105.07	1	44.70	101.09	1	29.15	14.9	1	-0.73	93
6.01	1	1.01	67.78	3	0.41	19.84	1	0.16							55.98	1	3.05							94
5.97	1	0.81	67.41	4	-0.21	19.88	1	0.49	1.12	1	-0.40	367.0	1	0.19	55.62	1	2.74	52.59	1	0.20				96
5.99	1	0.91	66.89	1	-1.09	19.86	1	0.32	0.94	2	-2.83	377.9	1	0.91										97
5.37	1	-2.07	66.34	1	-2.02	17.10	2	-22.23	0.67	3	-6.47				46.61	2	-4.89	47.93	2	-2.57				98
			69.23	3	2.86	19.62	1	-1.63	1.11	2	-0.53				52.81	1	0.36	52.51	1	0.15				99
5.38	1	-2.02	63.55	2	-6.74	19.72	1	-0.81																102
5.86	1	0.28	68.57	3	1.75	19.94	1	0.98							52.78	1	0.33	54.45	1	1.31	15.9	1	0.73	119
6.08	1	1.34	66.88	4	-1.10	19.75	1	-0.57																120
5.82	1	0.09	67.93	3	0.66	19.86	1	0.32							53.85	1	1.24	51.64	1	-0.36	15.4	1	0.00	121
5.94	1	0.67	67.06	3	-0.80	19.66	1	-1.30																122
5.77	1	-0.14	67.44	3	-0.16	19.80	1	-0.16	1.11	2	-0.53	371.4	1	0.48	52.22	1	-0.13	52.72	1	0.28	15.4	1	0.00	123
			67.22	4	-0.53																			123
6.04	1	1.15	67.33	3	-0.34	19.82	1	0.00	1.20	2	0.67	363.8	1	-0.01	51.76	1	-0.52	50.02	1	-1.33	14.9	1	-0.73	124
5.92	1	0.57	67.66	3	0.21	19.76	1	-0.49																126
6.03	1	1.10	67.73	3	0.32	19.81	1	-0.08	1.17	2	0.26				51.92	1	-0.39	52.04	1	-0.12	15.5	1	0.14	128
5.47	1	-1.58													55.34	1	2.51	53.04	1	0.47	15.5	1	0.14	130
5.99	2	0.91	67.71	3	0.29	19.72	2	-0.81																132
5.96	1	0.77	67.87	3	0.56	19.83	1	0.08																133
5.84	1	0.19	67.21	3	-0.54	19.89	1	0.57	1.14	2	-0.13	290.1	1	-4.86	53.50	1	0.95	52.80	1	0.32	14.8	1	-0.87	135
5.97	1	0.81	67.76	3	0.38	19.78	1	-0.32							52.14	1	-0.20	51.18	1	-0.63				136
5.84	1	0.19	67.63	3	0.16	19.82	1	0.00							52.09	1	-0.24	51.21	1	-0.62				137
5.79	1	-0.04	67.71	3	0.29	19.83	1	0.08																140
5.77	1	-0.14	68.27	3	1.24	19.90	1	0.65							57.42	1	4.27	52.10	1	-0.08				141
5.79	1	-0.04	67.57	3	0.05	19.82	1	0.00																142
5.78	1	-0.09	67.52	2	-0.02	19.83	1	0.08	1.13	2	-0.26				52.78	1	0.33	52.63	1	0.22				143
5.78	1	-0.09	67.31	3	-0.38	20.24	1	3.43							56.30	1	3.32	56.56	1	2.57				144
6.42	1	2.98	67.39	4	-0.24	19.70	1	-0.98													15.4	1	0.00	145
5.92	1	0.57	68.16	3	1.05	19.46	1	-2.94																146
5.87	1	0.33	67.80	4	0.44	19.75	1	-0.57																147
5.46	1	-1.63	67.79	3	0.43	20.18	1	2.94																148
5.31	1	-2.36				19.90	2	0.65																149
5.64	1	-0.77	66.56	2	-1.64	19.74	1	-0.65																150
5.57	1	-1.10	67.40	4	-0.22	19.91	1	0.73																151
5.66	1	-0.67	67.35	4	-0.31	19.79	1	-0.24																152
5.99	1	0.91				21.09	1	10.38																153
5.69	1	-0.52	67.28	4	-0.43	19.94	1	0.98				361.4	1	-0.17							14.5	1	-1.31	154
5.71	1	-0.43	69.29	3	2.96	19.72	1	-0.81				275.3	1	-5.84	53.22	1	0.71	54.17	1	1.14				155
												313.0	1	-3.36										156
5.70	1	-0.48	67.21	3	-0.54	19.65	1	-1.38																157
5.63	1	-0.81	66.99	4	-0.92	19.92	1	0.81				353.3	1	-0.70	53.40	1	0.86	52.25	1	0.00	15.3	1	-0.14	158
5.90	1	0.48	67.66	1	0.21	19.90	1	0.65																159
5.61	1	-0.91	66.25	5	-2.17																			160
4.87	1	-4.48	67.55	4	0.02	20.19	1	3.02																161
5.76	1	-0.19	66.57	4	-1.63	19.46	1	-2.94																162
5.88	1	0.38	68.03	3	0.83	19.70	1	-0.98																163
6.03	1	1.10	67.62	3	0.14	19.75	1	-0.57							52.01	1	-0.31	51.10	1	-0.68	15.6	1	0.29	164
5.72	1	-0.38	66.91	3	-1.05	19.83	1	0.08																165
5.76	1	-0.19				19.79	1	-0.24																166
5.91	1	0.52	67.88	1	0.58	19.85	1	0.24																167
6.05	1	1.20	66.47	1	-1.80	19.89	1	0.57																168
5.90	1	0.48	67.48	3	-0.09	19.81	1	-0.08																169
5.74	1	-0.28	67.03	3	-0.85	19.72	1	-0.81																171
5.64	1	-0.77	66.42	2	-1.88	19.94	1	0.98	1.18	2	0.40	357.8	1	-0.40	52.26	2	-0.10	53.39	2	0.68	16.1	1	1.02	173
5.70	1	-0.48	67.18	4	-0.60	20.00	1	1.47																186
6.17	1	1.78	67.19	4	-0.58	19.71	1	-0.89																187
5.84	2	0.19	67.01	4	-0.88	19.67	1	-1.22																188
5.81	1	0.04	67.37	3	-0.27	19.98	1	1.30																189
5.65	1	-0.72	66.57	4	-1.63	19.91	1	0.73																190
5.66	1	-0.67	67.21	4	-0.54	20.11	1	2.37	1.21	1	0.80	344.1	1	-1.31										191
5.82	1	0.09	66.49	4	-1.76	19.77	1	-0.40																192
5.65	1	-0.72	67.66	3	0.21	19.61	1	-1.71																193
5.73	1	-0.33	66.83	4	-1.19	19.78	1	-0.32							51.28	1	-0.93	53.49	1	0.74	17.1	1	2.49	194
5.77	1	-0.14	67.58	3	0.07	20.09	1	2.20																195
5.63	1	-0.81	66.98	3	-0.93	19.74	1	-0.65							47.52	1	-4.12	52.29	1	0.02				196

表5 A, B 及び D 試料

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		SL(管理分析法)		SL(飼料分析基準)		
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score													
197	12.65	1 0.68	18.71	4 -0.82	4.90	1 0.00	3.08	2 -1.29	4.98	1 0.08	0.757	1 0.19	0.673	1 0.58			50.8	3 0.25	
198	12.25	1 -0.61	18.80	3 -0.41			3.25	2 -0.96	4.88	1 -0.80	0.737	2 -0.45	0.680	1 1.21			50.1	3 -0.10	
199	12.55	1 0.35	18.90	3 0.04	4.87	1 -0.17	3.80	2 0.07	5.02	1 0.44	0.700	1 -1.66	0.651	1 -1.39					
201	12.72	1 0.91					3.02	2 -1.40	5.01	1 0.35					47.0	1 -2.66			
202	12.24	1 -0.65	18.46	3 -1.96	4.81	1 -0.52	5.07	1 0.99	5.04	1 0.62	0.696	2 -1.79	0.653	1 -1.21	51.8	2 0.17			
204	12.87	1 1.39	18.94	3 0.22			3.55	1 -0.39	4.98	1 0.08	0.671	1 -2.61	0.667	1 0.04					
205	12.61	1 0.55	18.81	2 -0.36	5.01	1 0.64	3.64	2 -0.22	4.89	1 -0.71	0.751	1 0.00	0.643	1 -2.11					
207	12.53	1 0.29	18.83	3 -0.27	4.95	2 0.29	3.58	2 -0.34	4.98	1 0.08	0.695	2 -1.83	0.609	1 -5.17			54.0	3 1.91	
208	13.51	1 3.47	18.95	3 0.27	4.92	1 0.11	4.86	2 2.09	4.69	1 -2.51									
209	11.87	1 -1.85	19.08	3 0.86	4.80	1 -0.58	4.59	2 1.57	4.76	1 -1.88									
210	12.72	1 0.91	18.47	4 -1.92	5.10	1 1.17	4.28	2 0.98	4.78	1 -1.70	0.665	2 -2.81	0.660	1 -0.58					
211	12.31	1 -0.42	18.93	2 0.18	5.25	1 2.05	3.67	2 -0.17	5.03	1 0.53	0.777	2 0.85	0.668	1 0.13					
213																			
214	11.61	1 -2.69	18.51	2 -1.73	5.30	1 2.34	4.94	2 2.24	4.88	1 -0.80	0.502	2 -8.14	0.851	1 16.59					
215	11.88	1 -1.82	18.61	4 -1.28	4.39	1 -2.99			4.51	1 -4.13									
216	11.33	1 -3.60	18.79	3 -0.45	4.77	1 -0.76	3.13	2 -1.19	4.98	1 0.08					53.8	1 1.38			
217	12.75	1 1.00	18.84	4 -0.22	5.01	1 0.64	3.24	2 -0.98	4.97	1 0.00	0.752	2 0.03	0.666	1 -0.04					
218	12.23	1 -0.68			4.97	1 0.41	3.22	2 -1.02	5.04	1 0.62	0.850	2 3.23	0.669	1 0.22					
219	12.33	1 -0.35	18.49	3 -1.82	4.64	2 -1.52	4.91	2 2.18	4.95	1 -0.17									
220	12.14	1 -0.97	19.28	2 1.78	4.89	1 -0.05													
221	12.73	1 0.94	18.85	4 -0.18	4.80	2 -0.58	3.72	1 -0.07	5.09	1 1.07	0.774	2 0.75	0.660	1 -0.58			51.7	3 0.72	
223																			
224																			
225	12.46	1 0.06	18.90	3 0.04	4.82	1 -0.46	3.60	2 -0.30	4.91	1 -0.53	0.763	2 0.39	0.667	1 0.04					
226	12.55	1 0.35	19.15	3 1.18			4.95	1 -0.17											
227	12.85	1 1.33	19.00	2 0.50	4.93	1 0.17	5.05	1 0.71											
228	12.74	1 0.97	18.30	3 -2.69	5.02	1 0.70	4.28	3 0.98	4.74	1 -2.06	0.762	2 0.35	0.672	1 0.49					
229	12.35	1 -0.29	18.88	4 -0.04	4.77	2 -0.76	3.72	2 -0.07	4.98	1 0.08	0.825	1 2.42	0.690	1 2.11			47.6	3 -1.39	
244	12.55	1 0.35	18.59	2 -1.37	5.04	1 0.82	3.85	2 0.17	5.06	1 0.80	0.816	2 2.12	0.658	1 -0.76	54.0	1 1.48	49.5	4 -0.41	
244																		48.4	3 -0.98
245	12.64	1 0.65	18.53	4 -1.64	5.17	2 1.58			4.94	1 -0.26									
246	12.22	1 -0.71	18.88	3 -0.04	4.89	2 -0.05	3.63	2 -0.24	4.76	1 -1.88	0.738	2 -0.42	0.673	1 0.58	49.4	1 -1.24			
247	11.92	1 -1.69	18.86	4 -0.13	5.19	1 1.70	4.53	2 1.46	5.19	1 1.97	0.695	2 -1.83	0.614	1 -4.72					
248	12.42	1 -0.06	18.82	4 -0.32	4.90	1 0.00	3.27	2 -0.93	4.71	1 -2.33									
249	11.96	1 -1.56	19.48	3 2.69															
250	13.24	1 2.60	18.97	2 0.36	5.17	1 1.58			4.96	1 -0.08	0.766	2 0.49	0.694	1 2.47					
251	11.06	1 -4.48							5.08	1 0.98							49.5	3 -0.41	
252	12.56	1 0.39	18.67	3 -1.00	5.60	1 4.10			5.06	1 0.80	0.658	2 -3.04	0.697	1 2.74			49.8	3 -0.25	
253	12.62	1 0.58	19.21	3 1.46	4.67	2 -1.34	3.26	2 -0.95	5.03	1 0.53	0.697	2 -1.76	0.661	1 -0.49					
254	12.22	1 -0.71	18.66	3 -1.05	4.82	2 -0.46			5.05	1 0.71	0.812	2 1.99	0.663	1 -0.31	50.3	2 -0.71			
255	11.99	1 -1.46	18.99	3 0.45	4.76	2 -0.82			4.84	1 -1.16	0.770	2 0.62	0.590	1 -6.87					
256	11.58	1 -2.79							4.70	1 -2.42	0.809	2 1.89	0.668	1 0.13					
257	12.29	1 -0.48	18.62	3 -1.23	5.02	1 0.70	3.40	2 -0.68	4.82	1 -1.34	0.703	2 -1.56	0.639	1 -2.47			50.8	3 0.25	
258	11.99	1 -1.46	19.38	3 2.24	4.57	2 -1.93	4.13	3 0.70	4.99	1 0.17	0.768	2 0.55	0.677	1 0.94	50.3	1 -0.71			
259	11.73	1 -2.30	18.81	2 -0.36	4.94	1 0.23	3.83	1 0.13	4.90	1 -0.62	0.726	2 -0.81	0.636	1 -2.74					
260	12.51	1 0.22	19.37	3 2.19	4.26	1 -3.75	3.63	3 -0.24	4.37	1 -5.39	0.750	2 -0.03	0.670	1 0.31					
261	12.11	1 -1.07	18.61	2 -1.28	4.97	1 0.41			5.01	1 0.35	0.735	2 -0.52	0.666	1 -0.04					
262	12.66	1 0.71	19.28	3 1.78	4.82	2 -0.46	4.04	3 0.53	4.95	1 -0.17	0.850	2 3.23	0.670	1 0.31			46.8	3 -1.81	
263	12.68	1 0.78	18.87	3 -0.09	4.77	2 -0.76	3.29	2 -0.89	4.96	1 -0.08	0.780	2 0.94	0.660	1 -0.58					
264	12.63	1 0.61	18.95	3 0.27					4.95	1 -0.17					52.7	1 0.71			
265	12.79	1 1.13	18.85	4 -0.18	5.06	1 0.93	4.66	2 1.71	4.99	1 0.17	0.730	2 -0.68	0.651	1 -1.39					
266	12.11	1 -1.07	19.09	3 0.91					5.05	1 0.71	0.772	2 0.68	0.663	1 -0.31					
267	12.72	1 0.91	19.00	2 0.50	4.66	1 -1.40			4.92	1 -0.44									
268	12.61	1 0.55	19.18	3 1.32	4.90	2 0.00	4.49	1 1.38	5.12	1 1.34	0.824	2 2.38	0.651	1 -1.39	51.6	2 0.05	48.6	3 -0.88	
269	12.10	1 -1.10	18.65	3 -1.09	4.92	1 0.11			4.75	1 -1.97									
270	12.87	1 1.39	20.14	3 5.71	4.28	2 -3.63			4.88	1 -0.80									
271	12.28	1 -0.52	19.14	3 1.14	5.08	2 1.05	3.96	3 0.38	4.83	1 -1.25	0.739	2 -0.39	0.645	1 -1.93					
272	12.24	1 -0.65	18.66	4 -1.05	4.63	1 -1.58	3.65	4 -0.20	4.91	1 -0.53	1.160	2 13.37	0.665	1 -0.13					
273																			
274	12.23	1 -0.68	19.46	3 2.60	4.74	2 -0.93	3.63	3 -0.24	5.07	1 0.89	0.896	1 4.74	0.672	1 0.49	50.8	1 -0.41			
275	12.41	1 -0.09	19.07	3 0.82	4.75	2 -0.87	2.97	1 -1.50	4.84	1 -1.16	0.770	2 0.62	0.647	1 -1.75	56.2	1 2.78			
276	12.31	1 -0.42	18.68	1 -0.96	5.20	1 1.75			5.04	1 0.62			0.684	1 1.57					
277	12.61	1 0.55	18.51	4 -1.73	5.09	1 1.11	3.28	2 -0.91	4.79	1 -1.61	0.781	2 0.98	0.634	1 -2.92			52.2	3 0.98	
278	12.56	1 0.39	18.74	2 -0.68	5.34	1 2.58	3.73	2 -0.05	4.95	1 -0.17	0.721	2 -0.98	0.678	1 1.03					
279	12.55	1 0.35	19.34	3 2.05	5.16	2 1.52	3.19	2 -1.08	5.08	1 0.98	0.752	2 0.03	0.663	1 -0.31					
280	12.49	1 0.16	18.68	3 -0.96					5.01	1 0.35					50.4	2 -0.65			
281	12.02	1 -1.36	18.75	3 -0.64	4.87	1 -0.17	3.46	2 -0.57	4.96	1 -0.08	0.739	2 -0.39	0.665	1 -0.13			50.9	4 0.31	
282	12.18	1 -0.84	18.82	3 -0.32	4.89	1 -0.05			4.94	1 -0.26	0.690	2 -1.99	0.670	1 0.31			52.1	3 0.93	
283	12.51	1 0.22													50.1	1 -0.83			
284	12.00	2 -1.43	17.90	4 -4.52	5.90	2 5.86			4.60	2 -3.32									
285	12.44	1 0.00	18.92	3 0.13	4.69	2 -1.23			4.92	1 -0.44									
286	12.38	1 -0.19	19.03	3 0.64					4.93	1 -0.35	0.765	2 0.45	0.671	1 0.40					
287	12.08	1 -1.17	18.86	2 -0.13	4.95	1 0.29	4.37	2 1.15	5.02	1 0.44									
288	12.19	1 -0.81	18.90	3 0.04	4.97	2 0.41	3.35	1 -0.77	4.95	1 -0.17	0.631	2 -3.92	0.685	1 1.66					
289	12.28	1 -0.52	19.09	3 0.91	4.83	1 -0.41	4.71	2 1.80	4.94	1 -0.26	0.750	2 -0.03	0.840	1 15.60	52.3	2 0.47			

の分析成績 (3)

B試料				D試料				試料 番号														
水分 分析値 (%)	No. z-score	粗たん白質 分析値 (%)	No. z-score	粗灰分 分析値 (%)	No. z-score	カドミウム 分析値 (g/トン)	No. z-score		銅 分析値 (g/kg)	No. z-score	亜鉛 分析値 (g/kg)	No. z-score	クエン酸モロランテル 分析値 (g/kg)	No. z-score								
5.96	1	0.77	67.26	4	-0.46	19.80	1	-0.16		52.98	1	0.50	52.38	1	0.07	15.8	1	0.58	197			
5.60	1	-0.96	67.88	3	0.58	19.90	1	0.65											198			
5.83	1	0.14	68.00	3	0.78	19.87	1	0.40											199			
5.97	1	0.81				19.91	1	0.73	348.4	1	-1.02	51.76	1	-0.52	51.41	1	-0.50	14.9	1	-0.73	201	
5.42	1	-1.83	67.63	3	0.16	19.80	1	-0.16												202		
5.88	1	0.38	68.13	3	1.00	19.87	1	0.40												204		
																				205		
5.81	1	0.04	66.99	3	-0.92	19.74	1	-0.65				51.17	1	-1.02	51.33	1	-0.54	16.0	1	0.87	207	
																				208		
5.49	1	-1.49	67.80	3	0.44	19.44	1	-3.10												209		
5.90	1	0.48	64.79	4	-4.64	19.65	1	-1.38												210		
5.83	1	0.14	67.25	2	-0.48	19.78	1	-0.32	1.21	1	0.80		54.93	1	2.16	57.20	1	2.95		211		
																				213		
5.58	1	-1.05	65.34	2	-3.71	19.71	1	-0.89												214		
5.24	1	-2.69	66.50	4	-1.75	19.32	1	-4.08												215		
5.02	1	-3.75	67.77	3	0.39	20.03	1	1.71												216		
5.84	1	0.19	67.18	4	-0.60	19.82	1	0.00	1.09	1	-0.80	415.9	1	3.41	52.98	1	0.50	52.94	1	0.41	217	
5.58	1	-1.05				19.61	1	-1.71												218		
6.17	1	1.78	67.76	3	0.38	19.71	1	-0.89												219		
5.61	1	-0.91	69.32	2	3.01															220		
5.86	1	0.28	66.95	4	-0.98	20.03	1	1.71												221		
5.55	1	-1.20				19.97	1	1.22												223		
									1.18	1	0.40									224		
5.72	1	-0.38	68.21	3	1.14	19.71	1	-0.89	1.05	2	-1.34	278.8	1	-5.61	47.65	1	-4.01	47.30	1	-2.95	225	
5.66	1	-0.67	68.00	3	0.78	19.85	1	0.24												226		
5.93	1	0.62	66.76	2	-1.31	19.86	1	0.32	1.14	2	-0.13									227		
5.95	1	0.72	68.35	3	1.37	19.86	1	0.32												228		
5.57	1	-1.10	67.91	4	0.63	19.86	1	0.32										15.8	1	0.58	229	
5.63	1	-0.81	68.56	2	1.73	19.80	1	-0.16	1.16	2	0.13	370.9	1	0.45	52.10	1	-0.23	50.94	1	-0.78	244	
																				244		
6.01	1	1.01	66.12	4	-2.39	19.89	1	0.57				382.1	1	1.19						245		
5.75	1	-0.24	67.85	3	0.53	19.76	1	-0.49										16.0	1	0.87	246	
5.65	1	-0.72	66.42	4	-1.88	20.25	1	3.51	1.79	1	8.63		48.88	1	-2.96	41.84	1	-6.21		247		
5.89	1	0.43	67.03	4	-0.85	19.63	1	-1.55												248		
5.66	1	-0.67	68.77	3	2.08															249		
6.41	1	2.93	67.41	2	-0.21	19.96	1	1.14				54.53	1	1.82	53.70	1	0.86			250		
5.54	1	-1.25				19.76	1	-0.49				52.68	1	0.25	47.69	1	-2.72	16.2	1	1.17	251	
5.82	1	0.09	68.10	3	0.95	19.96	1	1.14										15.5	1	0.14	252	
5.87	1	0.33	67.16	3	-0.63	19.80	1	-0.16												253		
5.64	1	-0.77	66.90	3	-1.07	19.89	1	0.57												254		
5.34	1	-2.21	67.88	3	0.58	19.80	1	-0.16												255		
5.17	1	-3.03				19.66	1	-1.30	1.01	2	-1.88		51.34	1	-0.88	41.68	1	-6.30		256		
5.79	1	-0.04	66.86	3	-1.14	19.72	1	-0.81				407.3	1	2.85				16.1	1	1.02	257	
5.33	1	-2.26	68.15	3	1.04	19.82	1	0.00	1.44	1	3.91		50.38	1	-1.69	53.79	1	0.91	15.4	1	0.00	258
5.64	1	-0.77	66.81	2	-1.22	19.74	1	-0.65												259		
5.79	1	-0.04	70.64	3	5.25	18.57	1	-10.21												260		
5.96	1	0.77	65.53	2	-3.39	19.79	1	-0.24					57.92	1	4.70	53.70	1	0.86		261		
6.03	1	1.10	67.33	3	-0.34	19.74	1	-0.65												262		
5.79	1	-0.04	67.84	3	0.51	19.75	1	-0.57					57.71	1	4.52	51.40	1	-0.50		263		
6.08	1	1.34	68.21	3	1.14	19.77	1	-0.40												264		
																				265		
6.00	1	0.96	67.27	4	-0.44	19.99	1	1.38												266		
5.85	1	0.24	68.30	3	1.29	19.92	1	0.81												267		
6.23	1	2.07	67.45	2	-0.14	19.72	1	-0.81												268		
5.86	1	0.28	68.68	3	1.93	19.68	1	-1.14				52.04	1	-0.28	46.90	1	-3.19	15.2	1	-0.29	268	
5.54	1	-1.25	67.40	3	-0.22	19.49	1	-2.69												269		
6.19	1	1.87	67.69	3	0.26	19.68	1	-1.14												270		
5.85	1	0.24	68.31	3	1.31	19.78	1	-0.32				53.20	1	0.69	51.08	1	-0.69	15.4	1	0.00	271	
5.88	1	0.38	66.61	4	-1.56	19.77	1	-0.40												272		
																				273		
5.47	1	-1.58	67.93	3	0.66	19.92	1	0.81												274		
																				275		
5.75	1	-0.24	69.30	3	2.98	19.81	1	-0.08				52.10	1	-0.23	50.80	1	-0.86	13.6	1	-2.63	275	
5.76	1	-0.19	67.81	1	0.46	19.84	1	0.16												276		
5.89	1	0.43	66.17	4	-2.30	19.61	1	-1.71				46.35	1	5.11	49.23	1	-1.80			277		
5.87	1	0.33	65.89	2	-2.78	19.71	1	-0.89												278		
5.82	1	0.09	68.00	3	0.78	20.10	1	2.28				408.5	1	2.93	51.93	1	-0.38	51.22	1	-0.61	279	
5.96	1	0.77	69.28	3	2.95	19.84	1	0.16												280		
5.57	1	-1.10	67.98	3	0.75	19.91	1	0.73	1.17	2	0.26	375.4	1	0.75	54.43	1	1.73	52.82	1	0.34	281	
5.53	1	-1.30	67.88	3	0.58	19.95	1	1.06												282		
5.75	1	-0.24										363.6	1	-0.02	52.38	1	0.00	51.16	1	-0.65	283	
5.50	2	-1.44	67.10	4	-0.73	18.70	2	-9.15												284		
5.89	1	0.43	68.42	3	1.49	19.70	1	-0.98												285		
5.82	1	0.09	68.06	3	0.88	19.72	1	-0.81												286		
5.64	1	-0.77	66.58	2	-1.61	20.07	1	2.04												287		
5.80	1	0.00	66.69	3	-1.42	19.90	1	0.65				63.58	1	9.50	59.23	1	4.16			288		
5.86	1	0.28	67.74	3	0.34	19.84	1	0.16				54.41	1	1.72	49.97	1	-1.36			289		

表5 A, B 及び D 試料

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		SL(管理分析法)		SL(飼料分析基準)	
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score												
290	12.70	1 0.84	19.20	3 1.41	4.94	1 0.23			4.89	1 -0.71								
291	12.35	1 -0.29	18.75	3 -0.64	5.03	1 0.76	3.83	2 0.13	5.03	1 0.53	0.698	1 -1.73	0.658	1 -0.76			50.2	3 -0.05
292	12.15	1 -0.94	18.76	3 -0.59	4.87	2 -0.17	4.49	3 1.38	4.90	1 -0.62	0.757	2 0.19	0.673	1 0.58				
293	12.33	1 -0.35	19.15	3 1.18	4.86	2 -0.23	5.03	3 2.41	5.06	1 0.80	0.790	2 1.27	0.830	1 14.70	51.8	1 0.17		
294	12.51	1 0.22	18.90	3 0.04					4.86	1 -0.98					51.6	2 0.05		
315	12.65	1 0.68	18.91	1 0.09	5.06	1 0.93	3.22	2 -1.02	5.01	1 0.35	0.753	2 0.06	0.674	1 0.67				
315			19.23	3 1.55														
315			18.87	4 -0.09														

注1: z-scoreの欄に下線を付したものは、絶対値が3以上のものである。

注2: 各試料のNo.欄は、分析法を示す。対応は以下のとおりである。

水分	粗たん白質	粗脂肪	粗繊維	粗灰分	カルシウム	リン	サリノマイシンナトリウム (SL)
No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法
1 飼料分析基準	1 硫酸標準液吸 取法	1 飼料分析基準	1 静置法	1 飼料分析基準	1 シュウ酸アンモ ニウム法	1 飼料分析基準	1 迅速定量法
2 その他	2 ホウ酸溶液吸 取法	2 自動分析機	2 ろ過法	2 その他	2 原子吸光度 法	2 その他	2 フローインジェク ション法
	3 燃焼法	3 その他	3 自動分析機	3 その他			3 液体クロマトグラフ法
	4 自動分析機		4 その他				4 微生物学的定量法
	5 その他						

の分析成績 (4)

B試料						D試料						試料 番号				
水分		粗たん白質		粗灰分		カドミウム		エトキシキン		銅			亜鉛		クエン酸モランテル	
分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/トン)	No. z-score	分析値 (g/トン)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	
5.96	1 0.77	68.49	3 1.61	20.04	1 1.79			364.2	1 0.01					14.7	1 -1.02	290
5.62	1 -0.86	67.62	3 0.14	19.84	1 0.16			370.8	1 0.44	52.45	1 0.05	49.51	1 -1.63			291
5.56	1 -1.15	67.62	4 0.14	19.70	1 -0.98	1.10	2 -0.67			54.70	1 1.96	50.12	1 -1.27	12.1	1 -4.83	292
5.82	1 0.09	67.71	3 0.29	19.91	1 0.73											293
5.89	1 0.43	67.47	3 -0.10	19.75	1 -0.57											294
5.84	1 0.19	67.64	1 0.17	19.90	1 0.65	1.23	1 1.07	353.9	1 -0.66	53.99	1 1.36	53.31	1 0.63			315
		67.41	3 -0.21													315
		67.37	4 -0.27													315

カドミウム	エトキシキン	銅	亜鉛	クエン酸モランテル
No. 分析方法				
1 溶媒抽出法	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準
2 簡易法	2 その他	2 その他	2 その他	2 その他
3 その他				

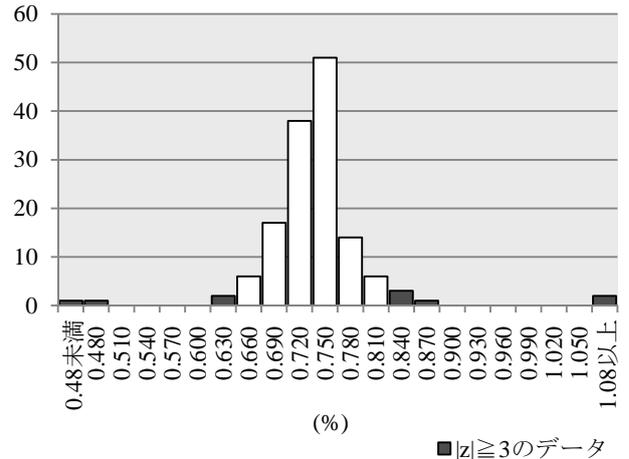
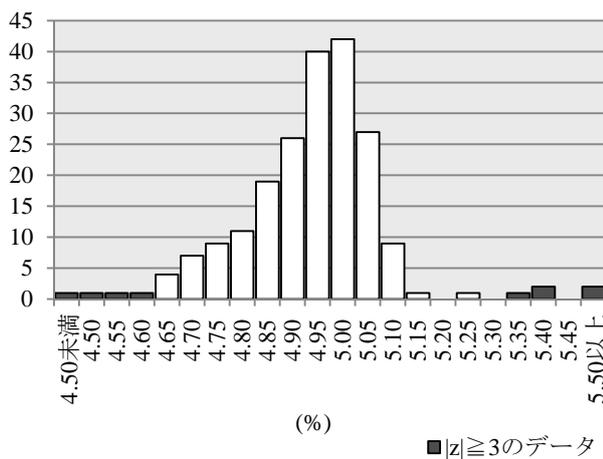
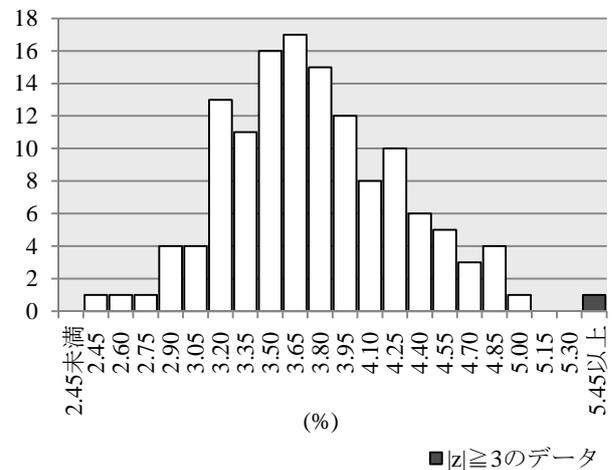
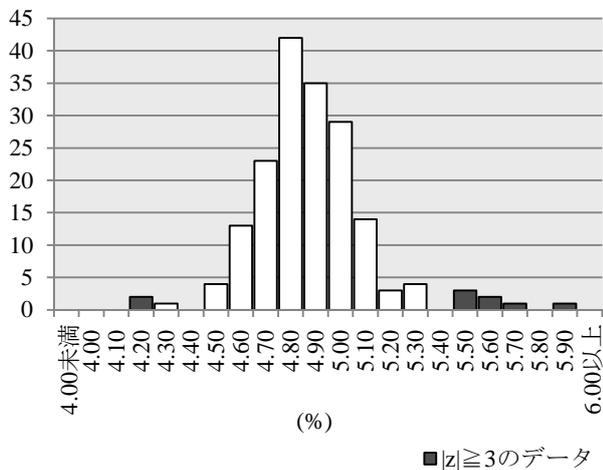
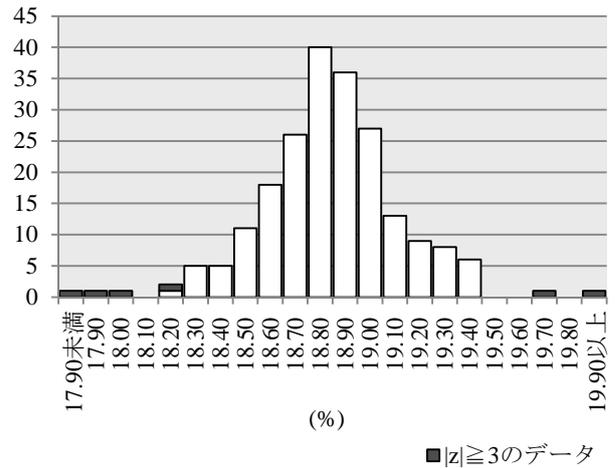
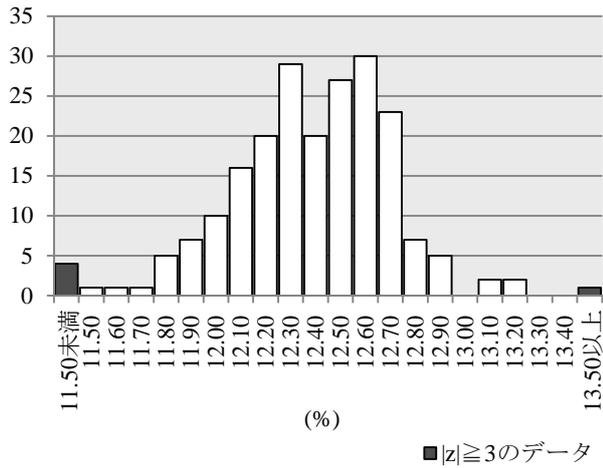


図1 分析成績のヒストグラム (1)

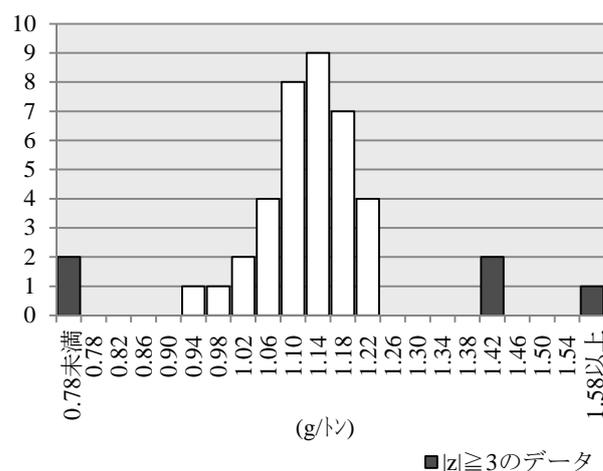
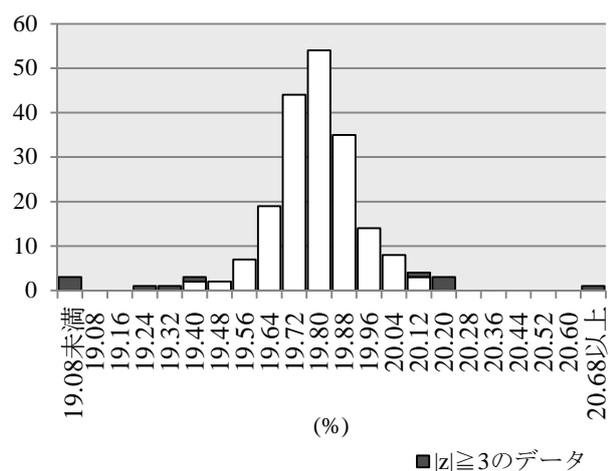
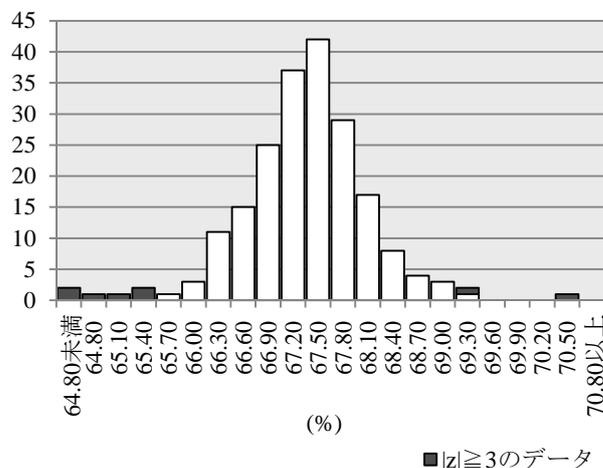
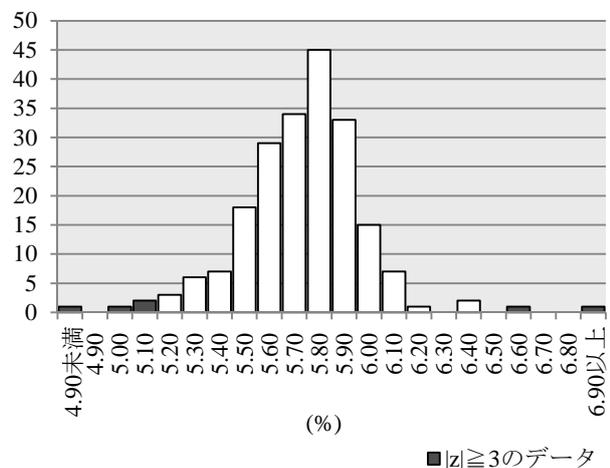
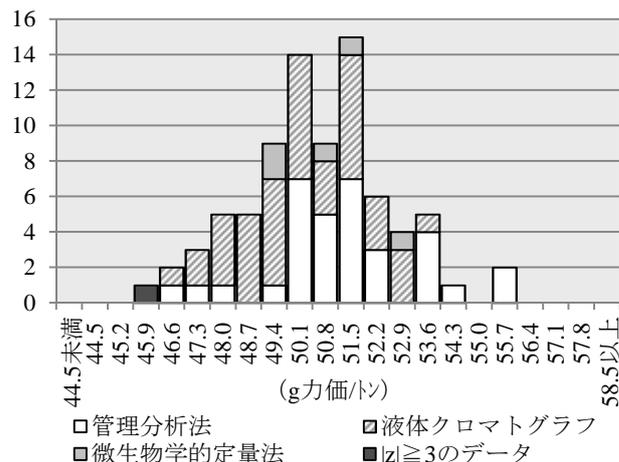
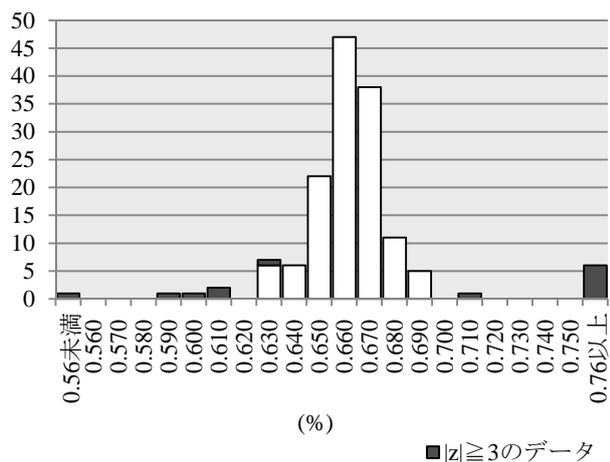
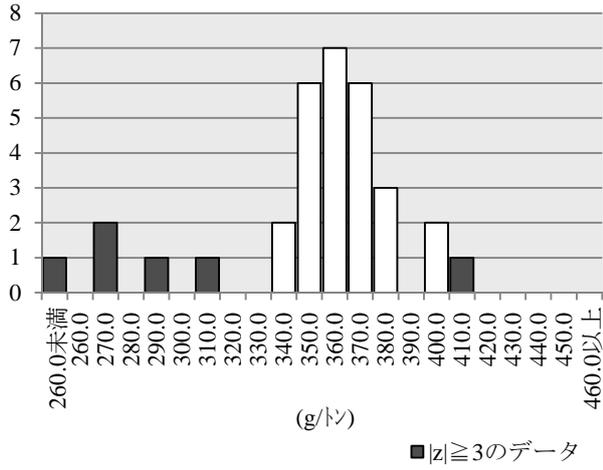
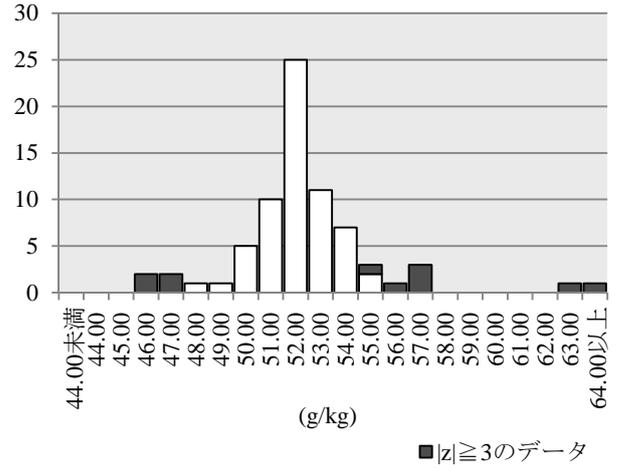


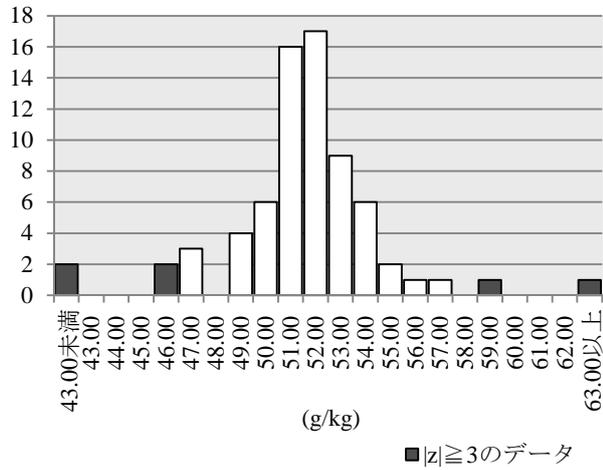
図 1 分析成績のヒストグラム (2)



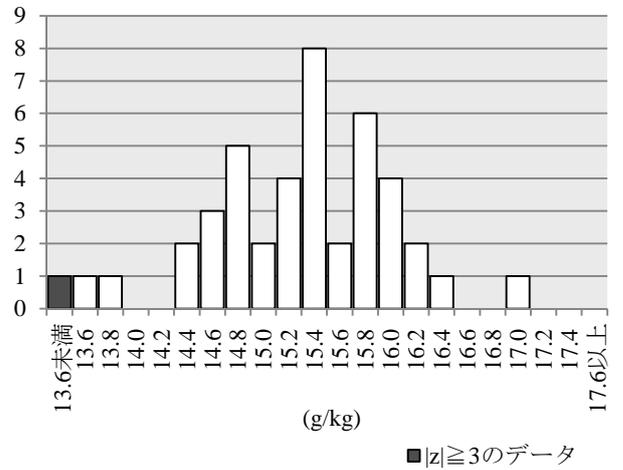
Etokishin (B 試料)



銅 (D 試料)



亜鉛 (D 試料)



クエン酸モランテル (D 試料)

図1 分析成績のヒストグラム (3)

表 6 A 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	水分 (%)	粗たん白質 (%)	粗脂肪 (%)	粗繊維 (%)	粗灰分 (%)
データ数	211	211	177	133	205
1 中央値	12.44	18.89	4.90	3.76	4.97
1 下限境界値 ^{注2}	11.52	18.23	4.39	2.18	4.64
1 上限境界値	13.36	19.55	5.41	5.34	5.30
2 平均値	12.44	18.89	4.91	3.82	4.96
2 標準偏差	0.29	0.24	0.17	0.51	0.11
2 変動係数 (%)	2.4	1.3	3.4	13.5	2.2
95%信頼区間	12.40~12.48	18.86~18.92	4.88~4.93	3.74~3.91	4.94~4.97

区 分	カルシウム (%)	リン (%)	SL(管理分析法) ^{注3} (g(力価)/トン)	SL(飼料分析基準) ^{注4} (g(力価)/トン)
データ数	142	148	34	47
1 中央値	0.751	0.667	51.5	50.3
1 下限境界値 ^{注2}	0.659	0.633	46.4	44.5
1 上限境界値	0.843	0.700	56.6	56.1
2 平均値	0.748	0.665	51.6	50.5
2 標準偏差	0.033	0.012	2.1	1.7
2 変動係数 (%)	4.4	1.9	4.1	3.4
95%信頼区間	0.742~0.753	0.663~0.668	50.9~52.3	50.0~51.0

注 1 区分 1 の数値は報告された分析値から算出した結果であり、区分 2 は区分 1 で算出した z-スコアの絶対値が 3 以上の異常値を除外して算出した結果である。

2 z-スコアの絶対値が 3 の境界値である。

3 SL (管理分析法) は、サリノマイシンナトリウムの迅速定量法及びフローインジェクション法を集計した結果である。

4 SL (飼料分析基準) は、サリノマイシンナトリウムの液体クロマトグラフ法及び微生物学的定量法を集計した結果である。

表 7 B 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	水分 (%)	粗たん白質 (%)	粗灰分 (%)	カドミウム (g/トン)	エトキシキン (g/トン)
データ数	206	204	199	41	32
1 中央値	5.80	67.54	19.82	1.15	364.0
1 下限境界値 ^{注2}	5.18	65.76	19.45	0.93	318.5
1 上限境界値	6.42	69.31	20.19	1.37	409.5
2 平均値	5.79	67.53	19.83	1.14	368.0
2 標準偏差	0.21	0.63	0.13	0.07	15.9
2 変動係数 (%)	3.6	0.9	0.6	5.8	4.3
95%信頼区間	5.76~5.82	67.44~67.62	19.81~19.85	1.12~1.16	361.9~374.2

注 1 区分 1 の数値は報告された分析値から算出した結果であり、区分 2 は区分 1 で算出した z-スコアの絶対値が 3 以上の異常値を除外して算出した結果である。

2 z-スコアの絶対値が 3 の境界値である。

表 8 D 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	銅 (g/kg)	亜鉛 (g/kg)	クエン酸モランテル (g/kg)
データ数	73	71	43
1 中央値	52.38	52.25	15.4
下限境界値 ^{注2}	48.84	47.22	13.4
上限境界値	55.92	57.28	17.4
2 平均値	52.53	52.18	15.4
標準偏差	1.34	1.93	0.7
変動係数 (%)	2.5	3.7	4.4
95%信頼区間	52.20~52.87	51.72~52.65	15.2~15.6

注 1 区分 1 の数値は報告された分析値から算出した結果であり，区分 2 は区分 1 で算出した z-スコアの絶対値が 3 以上の異常値を除外して算出した結果である。

2 z-スコアの絶対値が 3 の境界値である。

表 9 混合した原料の鑑定成績

原 料 名	混合割合 (%)	試 験 室 数					検出率 (%)
		検 出			不検出	計	
		多量 ^{注1}	中量 ^{注2}	少量 ^{注3}			
とうもろこし	30	114	3	0	117	0	100
小麦	20	41	66	3	110	7	94
マ イ ロ	10	17	97	3	117	0	100
米ぬか油かす	10	2	32	34	68	49	58
大豆油かす	10	6	92	15	113	4	97
なたね油かす	8	4	90	18	112	5	96
魚粉	4	1	4	95	100	17	85
アルファルファミール	3	0	4	47	51	66	44
炭酸カルシウム	3	0	2	90	92	25	79
食塩	2	0	1	114	115	2	98

注 1 検出した原料の推定される混合割合が 15%以上と報告されたもの。

2 検出した原料の推定される混合割合が 5%以上 15%未満と報告されたもの。

3 検出した原料の推定される混合割合が 1%以上 5%未満と報告されたもの。

表 10 混合した原料以外に検出と報告されたもの

検出原料名	多量 ^{注1}	中量 ^{注2}	少量 ^{注3}	計
大麦	2	8	4	14
精白米	0	5	4	9
キャッサバ	0	4	2	6
玄米	0	4	2	6
ライ麦	0	2	4	6
ふすま	0	23	18	41
コーングルテンフィード	0	1	8	9
麦ぬか	0	1	4	5
スクリーニングペレット	0	2	2	4
ホミニーフィード	0	2	1	3
ビールかす	0	1	1	2
あまに油かす	0	2	6	8
ごま油かす	0	2	4	6
コーングルテンミール	0	2	3	5
やし油かす	0	2	2	4
綿実油かす	0	0	3	3
カポック油かす	0	0	2	2
サフラワー油かす	0	0	1	1
チキンミール	0	3	8	11
かに殻粉末	0	0	1	1
肉骨粉	0	0	1	1
リン酸カルシウム	0	0	22	22
ビートパルプ	0	1	1	2
かき殻	0	0	1	1
ゼオライト	0	0	1	1
尿素	0	0	1	1
パイナップルかす	0	0	1	1

注 1 検出した原料の推定される混合割合が 15 %以上と報告されたもの。

2 検出した原料の推定される混合割合が 5 %以上 15 %未満と報告されたもの。

3 検出した原料の推定される混合割合が 1 %以上 5 %未満と報告されたもの。

8 各試料の解析結果及び鑑定成績

以下、分析法別の解析結果では、分析法別に分けたデータでロバスト法に基づく z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上の分析値を異常値として棄却し、平均値、標準偏差及び相対標準偏差を求めた。

8.1 A 試料（中すう育成用配合飼料）の解析結果

1) 水分

分析値は 211 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 5 件であった。これらを除いた平均値は 12.44 %で、この 95 %信頼区間は 12.40~12.48 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、207 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 5 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 12.44 %、0.29 %及び 2.4 %であった。

その他の方法では、定温乾燥機以外の機器を用いた 4 件の報告があった。

2) 粗たん白質

分析値は 211 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件で

あった。これらを除いた平均値は 18.89 %で、この 95 %信頼区間は 18.86~18.92 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・硫酸標準液吸収法では、14 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 18.72 %、0.30 %及び 1.6 %であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法では、23 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 18.87 %、0.24 %及び 1.3 %であった。

飼料分析基準・燃焼法では、123 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 18.95 %、0.22 %及び 1.2 %であった。

自動分析機による方法では、50 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 18.77 %、0.18 %及び 1.0 %であった。

3) 粗脂肪

分析値は 177 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 9 件であった。これらを除いた平均値は 4.91 %で、この 95 %信頼区間は 4.88~4.93 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、111 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 7 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 4.95 %、0.15 %及び 3.1 %であった。

自動分析機による方法では、66 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 4.85 %、0.17 %及び 3.4 %であった。

4) 粗繊維

分析値は 133 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件であった。これらを除いた平均値は 3.82 %で、この 95 %信頼区間は 3.74~3.91 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・静置法では、16 件の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 3.79 %、0.44 %及び 11.7 %であった。

飼料分析基準・ろ過法では、76 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 3.76 %、0.54 %及び 14.4 %であった。

自動分析機による方法では、37 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 4.02 %、0.54 %及び 13.4 %であった。

その他の方法では、自動分析ではない粗繊維測定用機器を用いた方法等の 4 件の報告があった。

5) 粗灰分

分析値は 205 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 9 件で

あった。これらを除いた平均値は 4.96 % で、この 95 % 信頼区間は 4.94~4.97 % であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、200 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 7 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 4.96 %、0.11 % 及び 2.2 % であった。

その他の方法では、自動分析装置による測定等の 5 件の報告があった。

6) カルシウム

分析値は 142 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 10 件であった。これらを除いた平均値は 0.748 % で、この 95 % 信頼区間は 0.742~0.753 % であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・シュウ酸アンモニウム法では、22 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.745 %、0.030 % 及び 4.0 % であった。

飼料分析基準・原子吸光光度法では、116 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 8 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.749 %、0.033 % 及び 4.4 % であった。

その他の方法では、ICP による測定、キレート滴定法等の 4 件の報告があった。

7) リン

分析値は 148 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 13 件であった。これらを除いた平均値は 0.665 % で、この 95 % 信頼区間は 0.663~0.668 % であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、143 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 12 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.665 %、0.012 % 及び 1.8 % であった。

その他の方法では、ICP による測定、モリブデン青吸光光度法等の 5 件の報告があった。

8) サリノマイシンナトリウム

管理分析法では、分析値はサリノマイシンナトリウム無添加試料（未配布）のブランク値による補正が必要であるが、今回は補正されない分析値の報告であるため、飼料分析基準による分析値との間に差が生じる可能性があったことから、これらを分離して集計した。

管理分析法（迅速定量法及びフローインジェクション法）では、分析値は 34 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件であった。その平均値は 51.6 g(力価)/トンで、この 95 % 信頼区間が 50.9~52.3 g(力価)/トンであった。

飼料分析基準（液体クロマトグラフ法及び微生物学的定量法）では、分析値は 47 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件であった。その平均値は 50.5 g(力価)/トンで、この 95 % 信頼区間は 50.0~51.0 g(力価)/トンであった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

管理分析法・迅速定量法では、25 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 51.5 g(力価)/トン、2.5 g(力価)/トン及び 4.8 % であった。

管理分析法・フローインジェクション法では、9 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 51.7 g(力価)/ト

ン、1.2 g(力価)/トン及び2.4 %であった。

飼料分析基準・液体クロマトグラフ法では、42 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 50.5 g(力価)/トン、1.7 g(力価)/トン及び 3.4 %であった。

飼料分析基準・微生物学的定量法では、5 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 51.1 g(力価)/トン、1.7 g(力価)/トン及び 3.3 %であった。

8.2 B 試料（魚粉）の解析結果

1) 水分

分析値は 206 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件であった。これらを除いた平均値は 5.79 %で、この 95 %信頼区間は 5.76~5.82 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、202 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 5.78 %、0.20 %及び 3.5 %であった。

その他の方法では、定温乾燥機以外の機器を用いた場合等の 4 件の報告があった。

2) 粗たん白質

分析値は 204 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 8 件であった。これらを除いた平均値は 67.53 %で、この 95 %信頼区間は 67.44~67.62 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・硫酸標準液吸収法では、12 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 67.15 %、0.56 %及び 0.8 %であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法では、22 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 4 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 66.96 %、0.77 %及び 1.1 %であった。

飼料分析基準・燃焼法では、118 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 67.77 %、0.45 %及び 0.7 %であった。

自動分析機による方法では、51 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 67.04 %、0.50 %及び 0.7 %であった。

3) 粗灰分

分析値は 199 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 11 件であった。これらを除いた平均値は 19.83 %で、この 95 %信頼区間は 19.81~19.85 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、194 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 9 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 19.83 %、0.12 %及び 0.6 %であった。

その他の方法では、自動分析装置による測定等の 5 件の報告があった。

4) カドミウム

分析値は 41 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 5 件であった。これらを除いた平均値は 1.14 g/トンで、この 95 %信頼区間は 1.12~1.16 g/トンであった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・溶媒抽出法では、11 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 1.23 g/トン、0.12 g/トン及び 9.8%であった。

飼料分析基準・簡易法では、29 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 1.14 g/トン、0.06 g/トン及び 4.9 %であった。

その他の方法では、ICP による測定のみ 1 件の報告があった。

5) エトキシキン

分析値は 32 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件であった。これらを除いた平均値は 368.0 g/トンで、この 95 %信頼区間は 361.9~374.2 g/トンであった。

分析値はすべて飼料分析基準による報告であり、その標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 15.9 g/トン及び 4.3 %であった。

8.3 D 試料（ほ乳期子豚育成用プレミックス）の解析結果

1) 銅

分析値は 73 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 11 件であった。これらを除いた平均値は 52.53 g/kg で、この 95 %信頼区間は 52.20~52.87 g/kg であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、71 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 10 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 52.65 g/kg, 1.47 g/kg 及び 2.8 %であった。

その他の方法では、ICP による測定等の 2 件の報告があった。

2) 亜鉛

分析値は 71 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件であった。これらを除いた平均値は 52.18 g/kg で、この 95 %信頼区間は 51.72~52.65 g/kg であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、69 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 52.23 g/kg, 1.68 g/kg 及び 3.2 %であった。

その他の方法では、ICP による測定等の 2 件の報告があった。

3) クエン酸モランテル

分析値は 43 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件であった。これらを除いた平均値は 15.4 g/kg で、この 95 %信頼区間は 15.2~15.6 g/kg であった。

分析値はすべて飼料分析基準による報告であり、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.7

g/kg 及び 4.4 % であった。

8.5 C 試料（鑑定用試料）の鑑定成績

混合した 10 種類の原料の検出とその混合割合の推定を行った。原料混合割合の推定は、15 % 以上を多量、5 % 以上 15 % 未満を中量、1 % 以上 5 % 未満を少量として報告を求めた。

117 件の報告があり、混合した原料以外に検出と報告があった原料は 27 種類であった。

混合した原料について、とうもろこし（混合割合 30 %）は、117 件（検出率 100 %）の報告があり、原料混合割合の推定の内訳は多量が 114 件、中量が 3 件であった。

小麦（混合割合 20 %）は、110 件（検出率 94 %）の報告があり、その内訳は多量が 41 件、中量が 66 件、少量が 3 件であった。

マイロ（混合割合 10 %）は、117 件（検出率 100 %）の報告があり、その内訳は多量が 17 件、中量が 97 件、少量が 3 件であった。

米ぬか油かす（混合割合 10 %）は、68 件（検出率 58 %）の報告があり、その内訳は多量が 2 件、中量が 32 件、少量が 34 件であった。

大豆油かす（混合割合 10 %）は、113 件（検出率 97 %）の報告があり、その内訳は多量が 6 件、中量が 92 件、少量が 15 件であった。

なたね油かす（混合割合 8 %）は、112 件（検出率 96 %）の報告があり、その内訳は多量が 4 件、中量が 90 件、少量が 18 件であった。

魚粉（混合割合 4 %）は、100 件（検出率 85 %）の報告があり、その内訳は多量が 1 件、中量が 4 件、少量が 95 件であった。

アルファルファミール（混合割合 3 %）は、51 件（検出率 44 %）の報告があり、その内訳は中量が 4 件、少量が 47 件であった。

炭酸カルシウム（混合割合 3 %）は、92 件（検出率 79 %）の報告があり、その内訳は中量が 2 件、少量が 90 件であった。

食塩（混合割合 2 %）は、115 件（検出率 98 %）の報告があり、その内訳は中量が 1 件、少量が 114 件であった。

誤って検出された原料としては、ふすまが最も多く、41 件の報告があった。次いで、リン酸カルシウムが 22 件、大麦が 14 件と続いた。

文 献

- 1) Michael Thompson, Stephen L.R. Ellison, Roger Wood: The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories, *Pure Appl. Chem.*, **78**(1), 145-196 (2006).

(参考)

平成 30 年度飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領

1. 目的

飼料検査指導機関、飼料・飼料添加物製造等業者、民間分析機関等を対象に、飼料等の共通試料による分析鑑定を行うことにより、分析及び鑑定技術の維持向上を図り、併せて分析誤差を把握し、飼料等の適正な製造及び品質管理の実施に資する。

2. 共通試料の内容

- A 試料…中すう育成用配合飼料
- B 試料…魚粉
- C 試料…鑑定用飼料原料混合試料
- D 試料…ほ乳期子豚育成用プレミックス

3. 分析鑑定項目

- A 試料・・・水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム、リン及びサリノマイシンナトリウム
- B 試料・・・水分、粗たん白質、粗灰分、カドミウム及びエトキシキン
- C 試料・・・飼料原料の検出及び混合割合の推定
- D 試料・・・銅、亜鉛及びクエン酸モランテル

4. 分析鑑定要領

- (1) 試料の分析鑑定方法は、「飼料分析基準」（平成 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号農林水産省消費・安全局長通知）に定める方法及び「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」（昭和 53 年 9 月 5 日付け 53 畜 B 第 2173 号、53 水振第 464 号農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知）の別記にあるサリノマイシンナトリウム又はモネンシンナトリウムを含む飼料の管理方法に準拠してください。

なお、参考までにこれらの分析法の抜粋（飼料分析基準等（抜粋））を添付します。

また、各分析法の末尾に、試料採取量等の一例を記載しましたので、参考として下さい。

- (2) 上記 3 に示した分析鑑定項目のうち、各試験室において実施可能な項目（全項目でなくても可）について分析及び鑑定を行い、報告してください。
- (3) B 試料のエトキシキンの分析に用いる標準品は、今回配付したものを使用してください。（当該標準品は冷蔵庫に保管してください。）
- (4) 共通試料は冷蔵庫に保管し、使用する際には、常温に戻してください。
- (5) 複数の分析法（例えば、粗たん白質におけるケルダール法及び燃焼法）によって分析した場合は、それぞれの分析値を報告してください。

5. 分析鑑定成績の報告

- (1) 各分析値及び鑑定結果については、別添の「平成 30 年度飼料等の共通試料による分析鑑定結果報告書」に記入し、報告してください。

(2) 分析値は、水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム及びリンについては%で、サリノマイシンナトリウムについては g(力価)/トンで、銅、亜鉛及びクエン酸モランテルについては g/kg で、カドミウム、エトキシキンについては g/トンの単位で表記してください。

水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カドミウム、銅及び亜鉛の分析値は、小数点以下第3位を四捨五入して同第2位まで、カルシウム及びリンの分析値は小数点以下第4位を四捨五入して同第3位まで、サリノマイシンナトリウム、エトキシキン及びクエン酸モランテルの分析値は小数点以下第2位を四捨五入して同第1位まで記入してください。

分析法及び用いた分析機器等は、備考欄の該当番号に○印を付し、その詳細を報告書様式に従い、記入してください。

また、分析上の特記事項等があれば、その旨も記入してください。

水分について、定温乾燥機を用いて飼料分析基準の条件により測定した場合には、「1. 飼料分析基準」を選択してください。定温乾燥機以外の機器を用いた場合や、定温乾燥機を用いたが、加熱温度、時間が飼料分析基準の条件と異なる場合は、「2. その他の方法」を選択し、用いた機器のメーカー、測定条件等の詳細を記入してください。

粗たん白質について、古典的なガラス器具製の蒸留装置を用いて蒸留し、ビュレット等を用いて滴定した場合には「1. 飼料分析基準（ケルダール法（硫酸標準液吸収法））」または「2. 飼料分析基準（ケルダール法（ホウ酸溶液吸収法））」を選択してください。自動蒸留装置等で蒸留後、滴定した場合は「4. 自動分析機」を選択してください。

なお、クエン酸モランテル、エトキシキン及びサリノマイシンナトリウム（液体クロマトグラフ法）を分析した場合には、標準液及び試料溶液のクロマトグラム各1図を添付してください。

(3) 鑑定結果は、検出した原料名を報告書（4）の下欄の検出原料名の選択肢から選んで検出原料名欄に記入し、推定される混合割合は、多量（15%以上）、中量（5%以上15%未満）及び少量（1%以上5%未満）の欄に○印を付してください。1%未満と推定される検出物は、検出原料名欄には記入しないでください。なお、C試料には10種類の原料を混合しています。

検出方法は、該当する番号に○印を付してください。（複数回答可）

(4) 分析の一部を別の試験室等で実施した場合は、その試験室名を備考欄に記入してください。

(5) 平成30年9月21日（金）までに報告してください。

(6) 報告書は、所属する飼料品質改善協議会等により下表に従った報告先に送付してください。

表省略

平成 30 年度飼料等の共通試料による分析鑑定結果報告書 (様式)

試験室名

担当者

TEL

(1) A 試料 分析結果

試料番号

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
粗たん白質	(%)	1. 飼料分析基準 (ケルダール法 (硫酸標準液吸収法)) 2. 飼料分析基準 (ケルダール法 (ホウ酸溶液吸収法)) 3. 飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4. 自動分析機 (メーカー) (型式) 5. その他の方法 ()
粗脂肪	(%)	1. 飼料分析基準 2. 自動分析機 (メーカー) (型式) 3. その他の方法 ()
粗繊維	(%)	1. 飼料分析基準 (静置法) 2. 飼料分析基準 (ろ過法) 3. 自動分析機 (メーカー) (型式) 4. その他の方法 ()
粗灰分	(%)	1. 飼料分析基準 灰化温度 () 2. その他の方法 ()
カルシウム	(%)	1. 飼料分析基準 (シュウ酸アンモニウム法) 2. 飼料分析基準 (原子吸光光度法) 3. その他の方法 ()
リン	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
サリノマイ シンナトリ ウム	(g(カ匳)/トン)	1. 迅速定量法 2. 迅速定量法 (フローインジェクション法) 3. 液体クロマトグラフ法 LC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 4. 微生物学的定量法

(2) B試料 分析結果

試料番号

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
粗たん白質	(%)	1. 飼料分析基準 (ケルダール法 (硫酸標準液吸収法)) 2. 飼料分析基準 (ケルダール法 (ホウ酸溶液吸収法)) 3. 飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4. 自動分析装置 (メーカー) (型式) 5. その他の方法 ()
粗灰分	(%)	1. 飼料分析基準 灰化温度 () 2. その他の方法 ()
カドミウム	(g/ト)	1. 飼料分析基準 (溶媒抽出法) 2. 飼料分析基準 (簡易法) 3. その他の方法 ()
エトキシキン	(g/ト)	1. 飼料分析基準 測定条件 LC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 2. その他の方法 ()

(3) D試料 分析結果

試料番号

分析成分名	分析値	備 考
銅	(g/kg)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
亜鉛	(g/kg)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
クエン酸 モランテル	(g/kg)	1. 飼料分析基準 測定条件 LC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 2. その他の方法 ()

(4) C 試料 鑑定結果

試料番号 _____

検出原料名	混合割合	検出方法
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()

多量…15%以上、中量…5%以上 15%未満、少量…1%以上 5%未満

注) 10 種類の原料を混合しています。

検出原料名の選択肢

大麦	えん麦	ライ麦	小麦	小麦粉
とうもろこし	マイロ	玄米	精白米	キャッサバ
ふすま	麦ぬか	米ぬか	ビールかす	コーングルテンフィード
スクリーニングペレット	ホミニーフード	コーングルテンミール	あまに油かす	サフラワー油かす
なたね油かす	綿実油かす	やし油かす	ごま油かす	大豆油かす
カポック油かす	肉骨粉	いかミール	チキンミール	魚粉
アルファルファミール	ビートパルプ	パイナップルかす	尿素	かに殻粉末
かき殻	ゼオライト	食塩	炭酸カルシウム	リン酸カルシウム

(5) 来年度の実施項目等「飼料等の共通試料による分析鑑定」に関して、意見、質問、要望等があれば記入してください。(別紙でも可)

調査資料**1 飼料中の有害物質等のモニタリング等の結果について（平成 30 年度）****Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2018)**

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課
飼料鑑定第二課

1 目 的

飼料等の使用が原因となって、有害畜産物（家畜等の肉，乳，その他の食用に供される生産物で人の健康をそこなうおそれがあるもの）が生産され，又は家畜等に被害が生じることにより畜産物の生産が阻害されることを防止する見地から，飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律¹⁾（以下「飼料安全法」という．）第3条第1項の規定に基づき，飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令²⁾（以下「成分規格等省令」という．）において，飼料中の有害物質等の成分規格（以下「省令基準値」という．）が定められ，また，飼料の有害物質の指導基準及び管理基準³⁾（以下「指導基準通知」という．）において，飼料中の有害物質等の指導基準値及び管理基準値（以下「指導基準値等」という．）が定められている．

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という．）では，飼料分析基準⁴⁾等に規定された方法を用いて，農林水産省が毎年定めている「食品の安全性に関する有害化学物質のサーベイランス・モニタリング年次計画」等に基づき，省令基準値及び指導基準値等の適合状況のモニタリング及び省令基準値，指導基準値等が設定されていない有害物質等の含有実態を把握するためのサーベイランス（以下「モニタリング等」という．）を実施している．今回，平成 30 年度のモニタリング等の結果を取りまとめたので報告する．

2 方 法**2.1 モニタリング等の対象試料**

平成 30 年 4 月から平成 31 年 3 月までの間に，農政局又は農政事務所が飼料安全法第 56 条の規定に基づき，港湾サイロに対して立入検査を実施した際に収去した飼料，FAMIC 肥飼料安全検査部，札幌センター，仙台センター，名古屋センター，神戸センター及び福岡センターが，飼料安全法第 57 条の規定に基づき，単体飼料工場，配混合飼料工場，港湾サイロ等に対して立入検査を実施した際に採取した飼料等並びにサーベイランスに協力いただいた飼料製造事業場に FAMIC が調査を実施した際に採取した飼料を対象とした．

モニタリング等の対象とした試料及び点数を表 1 に示した．

2.2 モニタリング等の対象成分

以下の成分をモニタリング等の対象とした．なお，各試料に対するモニタリング等実施成分の選定にあたっては，飼料の原産国，過去の検出実態等を勘案するとともに，配混合飼料の対象家畜等，使用されている原料等にも留意した．

1) 有害物質

i かび毒（25 成分）

ア 指導基準値等が定められているもの（3 成分）

とうもろこし及び配混合飼料に指導基準値又は管理基準値が定められているアフラトキシン B₁、家畜用飼料に管理基準値が定められているゼアラレノン及び家畜等用飼料に管理基準値が定められているデオキシニバレノールを対象とした。

イ ア以外のかび毒等（22 成分）

飼料分析基準に方法が規定されている以下のかび毒 22 成分を対象とした。

アフラトキシン B₂、G₁、G₂、ステリグマトシスチン、HT-2 トキシン、T-2 トキシン、ネオソラニオール、フザレノン-X、3-アセチルデオキシニバレノール、15-アセチルデオキシニバレノール、ニバレノール、フモニシン B₁、B₂、B₃、オクラトキシン A、 α -ゼアララノール、 β -ゼアララノール、ゼアララノン、 α -ゼアラレノール、 β -ゼアラレノール、ジアセトキシシルペノール及びデオキシニバレノール-3-グルコシド

ii 重金属等（4 成分）

管理基準値が定められているカドミウム、水銀、鉛及びヒ素を対象とした。

iii 農薬（126 成分）

ア 省令基準値が定められているもの

成分規格等省令別表第 1 の 1 の(1)に省令基準値が定められている農薬 61 成分のうちの 35 成分を対象とした。

イ ア以外の農薬

飼料分析基準に方法が規定されている農薬のうちの 89 成分を対象とした。

iv その他の有害物質（4 成分）

管理基準値が定められているメラミンのほか、指導基準値等は定められていないが、飼料中に含まれて問題を起す可能性のある以下の有害物質 3 成分を対象とした。

ア 硝酸態窒素

イ 亜硝酸態窒素

ウ ヒスタミン

2) BSE 発生防止に係る成分

i 動物由来たん白質

成分規格等省令別表第 1 の 2 に規定された牛等を対象とする飼料、動物由来たん白質又は動物由来たん白質を原料とする飼料中のほ乳動物等由来たん白質を対象とした。

ii 不溶性不純物

成分規格等省令別表第 1 の 5 の(1)に規定された動物性油脂及び特定動物性油脂を対象とした。

3) 病原微生物（サルモネラ）

配混合飼料及び単体飼料を対象とした。

表 1 モニタリング等を実施した試料及び点数（続き）

モニタリング等の対象試料	試料 点数	項目別の試料点数											
		有害物質						BSE発生防止に係る試験			病原 微生物		
		かび毒	重金属	農薬	メラ ミン	硝酸態・ 亜硝酸 態窒素	ヒスタ ミン	動物由来たん白質					
顕微鏡 鑑定	ELISA 試験							PCR 試験	不溶性 不純物	サルモ ネラ			
植物性 油かす 類	あまに油かす	1		1									
	ごま油かす	1		1									
	コーングルテンミール	16	16	15									
	コーンジャムミール	2	2	2									
	大豆油かす	48	40	41								2	
	なたね油かす	25	15	25									
	パーム油かす	1		1									
小 計	94	73	86									2	
動物質性 飼料	イカエキス	1	1	1				1	1	1			
	チキンミール	29						29	29	29		21	
	カニ殻粉末	1						1	1	1			
	魚介類すり身	2						2	2	2		2	
	魚粉	71		17		14		14	70	70	70	63	
	原料混合肉骨粉（ポークチキンミール）	24							24	24		9	
	酵素処理魚抽出物	4							4	4	4		
	肉骨粉（ポークミール）	2		1						2	2	2	
	フェザーミール	15							15	15	15	7	
ホタテ抽出物	1							1	1	1			
小 計	150	1	18	1	14		14	123	149	149		104	
乾 牧 草	アルファルファ	1		1		1							
	ウイートヘイ	1		1	1								
	オーツヘイ	1		1	1								
	クレイングラス	1		1	1								
	スーダングラス	5		2	5		5						
	チモシー	5		3	5								
	バミューダグラス	1			1								
小 計	15		8	15		6							
そ の 他	カカオ豆殻	1											
	乾燥酵母細胞壁	1						1	1	1			
	飼料用酵母	2						2	2	2			
	動物性油脂	75										75	
	特定動物性油脂	1										1	
	マリーゴールド花卉粉末	1						1	1	1			
	綿実	1			1								
やし中果皮	1	1		1									
小 計	83	1		2				4	4	4		76	
合 計	800	371	116	382	29	6	14	288	303	303		76	201

2.3 サンプルング方法等

1) 有害物質及び病原微生物の分析用試料

試料は、飼料等検査実施要領⁵⁾により、採取、保管した。とうもろこし及び牧草は、飼料中の農薬の検査に係る通知⁶⁾により、採取した。

分析用試料は、飼料分析基準第 2 章の規定により調製した。

2) 動物由来たん白質等の分析用試料

試料は、飼料分析基準第 16 章第 1 節の規定により、採取、保管及び調製した。

3) 不溶性不純物の分析用試料

基準油脂分析試験法⁷⁾の試料採取方法に準拠した次の方法⁸⁾により採取した。

動物性油脂を積み込んだタンクローリー車の上部のふたを開け、ポンプサンプラー（容量約 300 mL）を用いてハッチの上部，中部及び下部の 3 箇所から動物性油脂を採取し，これらを混合して試料とした。

2.4 試験方法

1) 有害物質

i かび毒

飼料分析基準第 5 章に規定された方法により実施した。

ii 重金属等

飼料分析基準第 4 章第 1 節に規定された方法により実施した。

iii 農薬

飼料分析基準第 6 章に規定された方法により実施した。

iv メラミン

飼料分析基準第 7 章 7.1 に規定された方法により実施した。

v 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素

飼料分析基準第 4 章第 2 節 3 に規定された方法により実施した。

vi ヒスタミン

飼料分析基準第 7 章 5.1 に規定された方法により実施した。

2) 飼料への動物由来たん白質等の混入確認

以下の 3 法を併用して実施した。なお，混入確認の結果は，牛を対象とする飼料の抽出検査の取扱いに係る事務連絡⁹⁾の判定手順（例）（以下「混入確認判定手順」という。）に基づき，総合的に判定した。

i 顕微鏡鑑定

飼料分析基準第 19 章 1.1 比重分別及び 1.2 顕微鏡検査を応用した鑑定方法¹⁰⁾により，獣骨（肉骨粉由来組織）の有無を確認した。鑑定方法の概要を図 1 に示した。

ii ELISA 試験

飼料分析基準第 17 章第 2 節 1.1 の(3)に規定された方法により実施した。

iii PCR 試験

魚粉等及び牛用配混合飼料は，飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.1 に規定された方法により，ほ乳動物由来 DNA を対象に混入の有無を確認した。チキンミール等，肉骨粉等及び輸入飼料の一部は，飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.2 に規定された方法により，反すう動物由来 DNA を対象に混入の有無を確認した。なお，乳製品等が原料として使用又は混入の可能性のある試料は，飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.1 付記に規定された方法により，乳製品等除去処理を行った後，上記試験を実施した。

3) 不溶性不純物

成分規格等省令別表第 1 の 5 の (1) のアに規定された方法により実施した。

4) サルモネラ

飼料分析基準第 18 章 1 に規定された方法により実施した。なお，分離したサルモネラは，

血清型別を実施した。

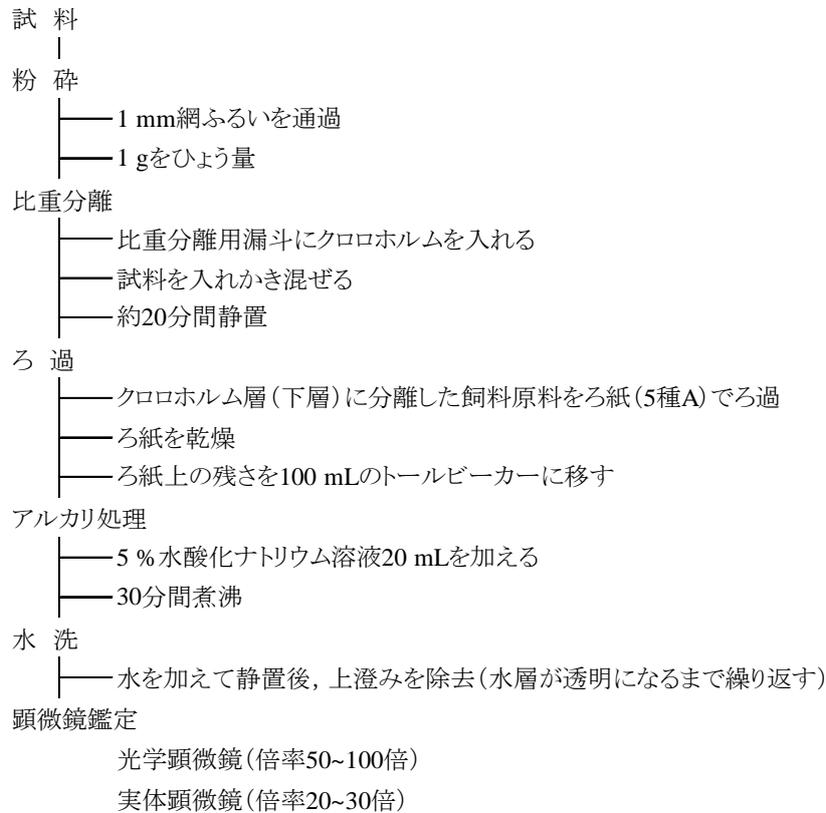


図 1 試料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

3 結 果

3.1 有害物質

1) かび毒

配混合飼料 132 点及び単体飼料 239 点に対し、指導基準値等が定められているアフラトキシン B₁、ゼアラレノン及びデオキシニバレノールを含む計 27 成分についてモニタリング等を実施した。

指導基準値等が定められている 3 成分のモニタリング等の結果を表 2-1 に、指導基準値等が定められていないかび毒のモニタリング等の結果を表 2-2 に示した。主なかび毒についての結果は、以下のとおりであった。

i アフラトキシン B₁

配混合飼料 124 点中 13 点から検出され（検出率 10 %），最大値は 0.009 mg/kg，検出されたものの平均値（以下同様）は 0.001 mg/kg であり，指導基準値（乳用牛用 0.01 mg/kg）及び管理基準値（幼すう用，ブロイラー前期用，ほ乳期子豚用及びほ乳期子牛用は 0.01 mg/kg，それ以外の配混合飼料は 0.02 mg/kg.）を超えるものはなかった。

とうもろこし 57 点中 12 点から検出され（検出率 21 %），最大値は 0.008 mg/kg，平均値は 0.002 mg/kg であり，管理基準値（0.02 mg/kg）を超えるものはなかった。

ii ゼアラレノン

配混合飼料 124 点中 119 点から検出され（検出率 96 %），最大値は 0.13 mg/kg，平均値は 0.026 mg/kg であり，管理基準値（家畜用飼料で 1 mg/kg）を超えるものはなかった。

単体飼料の指導基準値等は定められていないが，とうもろこし 57 点中 52 点から検出され（検出率 91 %），最大値は 0.33 mg/kg，平均値は 0.038 mg/kg であった。

iii デオキシニバレノール

配混合飼料 124 点中 114 点から検出され（検出率 92 %），最大値は 0.70 mg/kg，平均値は 0.22 mg/kg であり，管理基準値（生後 3 ヶ月以上の牛を除く家畜等用飼料は 1 mg/kg，生後 3 ヶ月以上の牛用飼料は 4 mg/kg）を超えるものはなかった。

単体飼料の指導基準値等は定められていないが，とうもろこし 51 点中 50 点から検出され（検出率 98 %），最大値は 0.97 mg/kg，平均値は 0.28 mg/kg であった。とうもろこしの加工副産物の一部では定量値の高いものがあり，コーングルテンフィードの平均値は 1.5 mg/kg（最大値 2.8 mg/kg），DDG の平均値は 1.9 mg/kg（最大値 2.0 mg/kg）及び DDGS の平均値は 1.3 mg/kg（最大値 2.1 mg/kg）であった。

表2-1 指導基準値等が定められているかび毒のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象試料	アフラトキシンB ₁ (検出下限 ¹⁾ 0.0003 mg/kg)					ゼアラレノン (検出下限 ²⁾ 0.0003 mg/kg)					デオキシニバレノール (検出下限 ³⁾ 0.003 mg/kg)						
	管理/指導基準値 (mg/kg)	試験料点数	うち検出されたもの (%)	平均値 (mg/kg)	管理基準値 (mg/kg)	試験料点数	うち検出されたもの (%)	平均値 (mg/kg)	管理基準値 (mg/kg)	試験料点数	うち検出されたもの (%)	平均値 (mg/kg)	管理基準値 (mg/kg)	試験料点数	うち検出されたもの (%)	平均値 (mg/kg)	
(アフラトキシンB ₁ のみ)																	
配合飼料 (乳用牛用)	指 0.01	36	4	11	0.001	0.0007											
配合飼料 (表外 ¹⁾ に示す飼料)	管 0.01	19	0	0			1	90	85	94	0.13	0.026	1	70	61	87	0.53
配合飼料 (上記以外の配合飼料)	管 0.02	66	9	14	0.009	0.002		31	31	100	0.10	0.025	4	51	50	98	0.70
その他の混合飼料	-	3	0	0			-	3	3	100	0.025	0.018	-	3	3	100	0.17
配合飼料小計	管 0.02	124	13	10	0.009	0.001		124	119	96	0.13	0.026		124	114	92	0.70
とうもろこし	-	57	12	21	0.008	0.002		57	52	91	0.33	0.038		51	50	98	0.97
圧ぺん大麦	-	1	0	0			-	1	1	0	0		-	1	0	0	
マイロ	-	5	0	0			-	5	4	80	0.25	0.073		5	2	40	0.025
玄米	-	1	0	0			-	1	1	100	0.004	0.004		1	0	0	
小麦	-	1	0	0			-	1	0	0				1	0	0	
小麦粉	-	3	0	0			-	3	2	67	0.0007	0.0005		3	3	100	0.11
未粉	-	2	0	0			-	2	2	100	0.001	0.0008		2	2	100	0.34
精白米	-	1	0	0			-	1	0	0				1	0	0	
米ぬか	-						-										
米ぬか油かす	-	10	0	0			-	10	9	90	0.022	0.009					
コーングルテンフィード	-						-	19	19	100	0.39	0.16		24	24	100	2.8
しょう油かす	-						-							1	1	100	0.032
DDG	-						-	1	1	100	0.16	0.16		2	2	100	2.0
DDGS	-	6	1	17	0.0008	0.0008		8	8	100	0.21	0.13		11	11	100	2.1
ふすま	-	41	0	0			-	41	35	85	0.073	0.005		41	37	90	0.80
ホミニーフイード	-						-							1	1	100	0.68
コーングルテンミール	-						-	10	10	100	0.35	0.21		16	13	81	0.95
コーンジャムミール	-						-							2	2	100	0.19
大豆油かす	-	40	2	5	0.0007	0.0006		40	37	93	0.022	0.005		40	5	13	0.18
なたね油かす	-						-							15	1	7	0.057
カカオ豆殻	-						-							1	1	100	0.054
やし中果皮	-						-							1	1	100	0.23
総計		292	28	10				324	299	92				345	270	78	

1) 該当する配合飼料の種類は以下のとおり。

アフラトキシンB₁: 幼すう用, プロイラー肥育前期用, ほ乳期子豚用及びほ乳期子牛用

ゼアラレノン: 家畜 (豚及び牛) 用

デオキシニバレノール: 家畜等 (鶏, 豚及び牛 (生後3ヶ月以上の牛を除く。)) 用

2) 複数の試験法がある成分については、低い方の検出下限を記載した。

表 2-2 指導基準値等が定められていないかび毒のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象成分	検出下限* (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			
			点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)
アフラトキシンB ₂	0.0003	292	6	2.1	0.0008	0.0005
アフラトキシンG ₁	0.0003	292	1	0.3	0.0004	0.0004
アフラトキシンG ₂	0.0003	292	0	0		
ステリグマトシスチン	0.0003	283	73	26	0.006	0.0009
HT-2トキシン	0.002	126	54	43	0.039	0.013
T-2トキシン	0.002	345	123	36	0.057	0.007
ネオソラニオール	0.002	345	10	2.9	0.005	0.003
ジアセトキシシルペノール	0.002	126	6	4.8	0.004	0.003
フザレノン-X	0.003	345	0	0		
ニバレノール	0.002	270	61	23	0.044	0.011
3-アセチルデオキシニバレノール	0.006	126	7	5.6	0.18	0.047
15-アセチルデオキシニバレノール	0.006	126	96	76	0.57	0.15
デオキシニバレノール-3-グルコシド	0.002	126	93	74	0.33	0.081
フモニシンB ₁	0.0006	81	81	100	3.6	0.39
フモニシンB ₂	0.0006	81	80	99	1.1	0.13
フモニシンB ₃	0.0006	81	77	95	0.47	0.061
オクラトキシンA	0.002	31	2	6.5	0.006	0.004
α -ゼアララノール	0.002	296	0	0		
β -ゼアララノール	0.002	296	0	0		
ゼアララノン	0.002	296	15	5.1	0.039	0.006
α -ゼアラレノール	0.003	296	5	1.7	0.004	0.004
β -ゼアラレノール	0.003	296	18	6.1	0.009	0.005

*複数の試験法がある成分については、低い方の検出下限を記載した。

2) 重金属等

カドミウムについて、管理基準値の定められている配混合飼料、乾牧草等及び魚粉等（魚粉及び肉骨粉）のモニタリング並びに魚用配合飼料のサーベイランスを実施した（計 105 点）。また、水銀、鉛及びヒ素について、管理基準値の定められている配混合飼料、乾牧草等及び魚粉等のモニタリングを実施した（水銀及びヒ素はそれぞれ計 73 点、鉛は計 72 点。）。その結果を表 3 に示した。

結果の概要は、以下のとおりであった。

i カドミウム

魚用を除く配混合飼料 58 点中 34 点から検出され（検出率 59 %）、最大値は 0.31 mg/kg、平均値は 0.08 mg/kg であった。乾牧草等 5 点中 4 点から検出され（検出率 80 %）、最大値は 0.17 mg/kg、平均値は 0.08 mg/kg であった。いずれも管理基準値（1 mg/kg）を超えるものはなかった。

動物質性飼料では、魚粉では 17 点全てから検出され、最大値は 2.1 mg/kg、平均値は 1.0 mg/kg であった。肉骨粉 1 点からは検出されなかった。いずれも、管理基準値（3 mg/kg）

を超えるものはなかった。

サーベイランスとして実施した魚用配合飼料では 24 点全点から検出され、最大値は 1.1 mg/kg、平均値は 0.47 mg/kg であった。

ii 水銀

配混合飼料 50 点中 26 点から検出され（検出率 52 %）、最大値は 0.04 mg/kg、平均値は 0.02 mg/kg であった。乾牧草等 7 点中 3 点から検出され（検出率 43 %）、最大値は 0.03 mg/kg、平均値は 0.02 mg/kg であった。いずれも管理基準値（0.4 mg/kg）を超えるものはなかった。

動物質性飼料では、魚粉では 15 点全てから検出され、最大値は 0.65 mg/kg、平均値は 0.31 mg/kg であった。肉骨粉 1 点からは 0.03 mg/kg が検出された。いずれも管理基準値（1 mg/kg）を超えるものはなかった。

iii 鉛

配混合飼料 50 点中 6 点から検出され（検出率 12 %）、最大値は 0.8 mg/kg、平均値は 0.6 mg/kg であった。乾牧草等 5 点からは検出されなかった。いずれも管理基準値（3 mg/kg）を超えるものはなかった。

動物質性飼料では、魚粉 16 点中 8 点から検出され（検出率 50 %）、最大値は 1.1 mg/kg、平均値は 0.6 mg/kg であった。肉骨粉 1 点からは検出されなかった。いずれも、管理基準値（7 mg/kg）を超えるものはなかった。

iv ひ素

配混合飼料 51 点中 31 点から検出され（検出率 61 %）、最大値は 0.61 mg/kg、平均値は 0.17 mg/kg であった。乾牧草等 5 点中 3 点から検出され（検出率 60 %）、最大値は 0.44 mg/kg、平均値は 0.24 mg/kg であった。いずれも管理基準値（2 mg/kg）を超えるものはなかった。

動物質性飼料では、魚粉では 16 点全てから検出され、最大値は 7.7 mg/kg、平均値は 5.1 mg/kg であった。肉骨粉 1 点からは検出されなかった。いずれも管理基準値（魚粉は 15 mg/kg、肉骨粉は 7 mg/kg）を超えるものはなかった。

表 3 重金属等のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象成分	管理基準値 (mg/kg)	モニタリング等の対象試料	試料点数	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
カドミウム	1	配混合飼料 (魚用を除く)	58	34	59	0.31	0.08	0.03
		乾牧草等	5	4	80	0.17	0.08	
	3	魚粉	17	17	100	2.1	1.0	
		肉骨粉	1	0	0			
	—	魚用配合飼料	24	24	100	1.1	0.47	
	総計	105	79	75	2.1	0.40		
水銀	0.4	配混合飼料	50	26	52	0.04	0.02	0.01
		乾牧草等	7	3	43	0.03	0.02	
	1	魚粉	15	15	100	0.65	0.31	
		肉骨粉	1	1	100	0.03	0.03	
		総計	73	45	62	0.65	0.12	
鉛	3	配混合飼料	50	6	12	0.8	0.6	0.2
		乾牧草等	5	0	0			
	7	魚粉	16	8	50	1.1	0.6	
		肉骨粉	1	0	0			
	総計	72	14	19	1.1	0.6		
ひ素	2	配混合飼料	51	31	61	0.61	0.17	0.05
		乾牧草等 (稲わらを除く)	5	3	60	0.44	0.24	
	15	魚粉	16	16	100	7.7	5.1	
	7	肉骨粉	1	0	0			
		総計	73	50	68	7.7	1.7	

3) 農薬

飼料等 382 点に対し、省令基準値が定められている農薬 35 成分及び省令基準値が定められていない農薬 89 成分の計 124 成分についてモニタリング等を実施した。その結果を表 4 及び表 5 に示した。

省令基準値を超過したものはなかった。

全般に、とうもろこし及びその加工副産物、麦類の加工副産物並びに牧草からの検出率が高かった。結果の概要は以下のとおりであった。

i クロルピリホスメチル

省令基準値が定められている穀類 3 種類 (大麦, とうもろこし及びマイロ) 63 点について、モニタリングを実施した結果、大麦及びとうもろこしからは検出されなかった。マイロは 5 点中 1 点から検出された (検出率 20 %, 0.070 mg/kg) が、省令基準値を超えるものはなかった。

また、配混合飼料を中心に省令基準値が定められていない飼料 314 点について、サーベイランスを実施した結果、5 点から検出された。その内訳は、ふすま 36 点中 4 点 (検出率 11 %, 最大値 0.088 mg/kg), コーングルテンフィード 23 点中 1 点 (検出率 4.3 %, 0.052 mg/kg) であった。

ii ピリミホスメチル

省令基準値が定められている穀類 3 種類 63 点について、モニタリングを実施した結果、大麦からは検出されなかった。とうもろこしは 57 点中 2 点から検出され（検出率 3.5 %，最大値 0.32 mg/kg），マイロは 5 点中 1 点から検出された（検出率 20 %，0.11 mg/kg）が、省令基準値を超えるものはなかった。

また、配混合飼料を中心に省令基準値が定められていない飼料 314 点について、サーベイランスを実施した結果、10 点から検出された。その内訳は、配混合飼料 118 点中 6 点（検出率 5.1 %，最大値 0.11 mg/kg），コーングルテンフィード 23 点中 1 点（検出率 4.3 %，0.24 mg/kg），コーングルテンミール 15 点中 2 点（検出率 13 %，最大値 0.66 mg/kg），ふすま 36 点中 1 点（検出率 2.7 %，0.046 mg/kg）であった。

iii マラチオン

省令基準値が定められている穀類 3 種類 63 点及び牧草 15 点について、モニタリングを実施した結果、大麦、マイロ及び牧草からは検出されなかった。とうもろこしでは 57 点中 1 点から検出（検出率 1.8 %，0.025 mg/kg）されたが、省令基準値を超えるものはなかった。

また、配混合飼料を中心に省令基準値が定められていない飼料 299 点について、サーベイランスを実施した結果、8 点から検出された。その内訳は、ふすま 36 点中 4 点（検出率 11 %，最大値 0.066 mg/kg），コーングルテンフィード 23 点中 1 点（検出率 4.3 %，0.22 mg/kg），コーングルテンミール 15 点中 2 点（検出率 13 %，最大値 0.10 mg/kg），配混合飼料 118 点中 1 点（検出率 0.8 %，0.035 mg/kg）であった。

iv その他の検出された農薬

① 穀類

シハロトリン（とうもろこし），フェニトロチオン（とうもろこし）及びビフェントリン（とうもろこし）

② 乾牧草

クロルピリホス（アルファルファ），フェンバレレート（チモシー），ペンディメタリン（スーダングラス），エトフェンプロックス（チモシー），クロルタルジメチル（スーダングラス）及びフルトリアホール（ウィートヘイ）

③ 原料

クロルピリホス（ホミニーフード，ふすま及びコーングルテンミール），シハロトリン（コーングルテンフィード及びコーングルテンミール），デルタメトリン及びトラロメトリン（ふすま），フェニトロチオン（コーングルテンフィード及びコーングルテンミール），ペルメトリン（コーングルテンミール及びふすま），ビフェントリン（コーングルテンフィード及びコーングルテンミール），フルソトリネート（DDGS 及びコーングルテンフィード）並びにプロピコナゾール（ふすま）

④ 配混合飼料

デルタメトリン及びトラロメトリン

表4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められている成分）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			検出 下限 (mg/kg)	
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)		平均値 (mg/kg)
γ-BHC（リンデン）	配混合飼料（鶏・うずら、豚用）	0.05	65	0	0			
	配混合飼料（牛等用）	0.4	51	0	0			
	牧草	0.4	15	0	0		0.005	
	基準値のない飼料	—	247	0	0			
	計	—	378	0	0			
BHC	配混合飼料	0.005	116	0	0			
	牧草	0.02	15	0	0		0.005	
	基準値のない飼料	—	247	0	0			
	計	—	378	0	0			
DDT	配混合飼料	0.1	116	0	0			
	牧草	0.1	15	0	0		0.02	
	基準値のない飼料	—	247	0	0			
	計	—	378	0	0			
アトラジン	大麦	0.02	1	0	0			
	とうもろこし	0.2	57	0	0			
	マイロ	0.02	5	0	0		0.02	
	牧草	15	15	0	0			
	基準値のない飼料	—	299	0	0			
計	—	377	0	0				
アラクロール	とうもろこし	0.02	57	0	0			
	マイロ	0.05	5	0	0			
	牧草	0.05	15	0	0		0.02	
	基準値のない飼料	—	301	0	0			
計	—	378	0	0				
アルドリン及び ディルドリン	配混合飼料	0.02	116	0	0			
	牧草	0.02	15	0	0		0.02	
	基準値のない飼料	—	247	0	0			
計	—	378	0	0				
イソフェンホス	とうもろこし	0.02	57	0	0			
	基準値のない飼料	—	321	0	0		0.02	
計	—	378	0	0				
イマザピック	大豆油かす	0.5	4	0	0		0.002	
イマザピル	大豆油かす	7	4	0	0		0.002	
エチオン	牧草	20	15	0	0			
	基準値のない飼料	—	363	0	0		0.02	
計	—	378	0	0				
エンドリン	配混合飼料	0.01	116	0	0			
	牧草	0.01	15	0	0		0.01	
	基準値のない飼料	—	247	0	0			
計	—	378	0	0				
クロルピリホス	大麦	0.2	1	0	0			
	とうもろこし	0.1	57	0	0			
	マイロ	0.75	5	0	0			
	牧草	13	15	1	6.7	0.95	0.95	0.01
	基準値のない飼料	—	299	3	1.0	0.028	0.025	
	計	—	377	4	1.1	0.95	0.26	

表 4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められている成分，続き）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	試料点数	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
クロルピリホスメチル	大麦	6	1	0	0			
	とうもろこし	7	57	0	0			
	マイロ	10	5	1	20	0.070	0.070	0.02
	基準値のない飼料	—	314	5	1.6	0.088	0.046	
	計	—	377	6	1.6	0.088	0.050	
クロルフェンビンホス	とうもろこし	0.05	57	0	0			
	基準値のない飼料	—	320	0	0			0.02
	計	—	377	0	0			
クロルプロファム	大麦	0.05	1	0	0			
	とうもろこし	0.05	57	0	0			
	基準値のない飼料	—	319	0	0			0.02
	計	—	377	0	0			
クロルベンジレート	とうもろこし	0.02	57	0	0			
	基準値のない飼料	—	321	0	0			0.02
	計	—	378	0	0			
シハロトリン	大麦	0.2	1	0	0			
	とうもろこし	0.04	57	1	1.8	0.036	0.036	
	マイロ	0.2	5	0	0			
	牧草	0.6	15	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	299	2	0.7	0.13	0.094	
計	—	377	3	0.8	0.13	0.074		
ジメトエート	大麦	0.04	1	0	0			
	とうもろこし	1	57	0	0			
	マイロ	0.2	5	0	0			
	牧草	2	15	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	299	0	0			
計	—	377	0	0				
ダイアジノン	大麦	0.1	1	0	0			
	とうもろこし	0.02	57	0	0			
	マイロ	0.1	5	0	0			
	牧草	10	15	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	299	0	0			
計	—	377	0	0				
デルタメトリン及び トラロメトリン	大麦	1	1	0	0			0.03
	とうもろこし	1	57	0	0			0.03
	マイロ	1	5	0	0			0.03
	牧草	5	15	0	0			0.045
	基準値のない飼料	—	299	4	1.3	0.10	0.059	0.03
計	—	377	4	1.1	0.10	0.059		
テルブホス	大麦	0.01	1	0	0			
	とうもろこし	0.01	57	0	0			
	マイロ	0.05	5	0	0			
	牧草	1	15	0	0			0.005
	基準値のない飼料	—	299	0	0			
計	—	377	0	0				

表4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められている成分，続き）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	試料点数	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
パラチオン	大麦	0.5	1	0	0			0.02
	とうもろこし	0.3	57	0	0			
	マイロ	0.08	5	0	0			
	牧草	5	15	0	0			
	基準値のない飼料	—	299	0	0			
	計	—	377	0	0			
ピリミホスメチル	大麦	1	1	0	0			0.02
	とうもろこし	1	57	2	3.5	0.32	0.23	
	マイロ	1	5	1	20	0.11	0.11	
	基準値のない飼料	—	314	10	3.2	0.66	0.16	
	計	—	377	13	3.4	0.66	0.17	
フィプロニル	配混合飼料（鶏・うずら用）	0.01	32	0	0			0.003
	配混合飼料（牛等、豚用）	0.02	84	0	0			
	牧草	0.2	15	0	0			
	基準値のない飼料	—	247	0	0			
	計	—	378	0	0			
フェニトロチオン	大麦	5	1	0	0			0.02
	とうもろこし	1	57	1	1.8	0.10	0.10	
	マイロ	1	5	0	0			
	牧草	10	15	0	0			
	基準値のない飼料	—	299	3	1.0	0.21	0.091	
	計	—	377	4	1.1	0.21	0.094	
フェントエート	大麦	0.4	1	0	0			0.02
	とうもろこし	0.4	57	0	0			
	マイロ	0.4	5	0	0			
	基準値のない飼料	—	314	0	0			
	計	—	377	0	0			
フェンバレレート	配混合飼料（鶏・うずら用）	0.5	32	0	0			0.02
	配混合飼料（豚用）	4	33	0	0			
	配混合飼料（牛等用）	8	51	0	0			
	牧草	13	15	1	6.7	0.42	0.42	
	基準値のない飼料	—	247	0	0			
	計	—	378	1	0.3	0.42	0.42	
フェンプロパトリン	牧草	20	15	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	363	0	0			
	計	—	378	0	0			
ヘプタクロル	配混合飼料	0.02	116	0	0			0.02
	牧草	0.02	15	0	0			
	基準値のない飼料	—	247	0	0			
	計	—	378	0	0			
ペルメトリン	大麦	2	1	0	0			0.02
	とうもろこし	2	57	0	0			
	マイロ	2	5	0	0			
	牧草	55	15	0	0			
	基準値のない飼料	—	299	2	0.7	0.21	0.15	
	計	—	377	2	0.5	0.21	0.15	
ペンディメタリン	大麦	0.2	1	0	0			0.02
	とうもろこし	0.2	57	0	0			
	マイロ	0.1	5	0	0			
	牧草	15	15	1	6.7	0.056	0.056	
	基準値のない飼料	—	299	0	0			
	計	—	377	1	0.3	0.056	0.056	

表 4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められている成分，続き）

モニタリング等の 対象成分	モニタリング等の 対象試料	省令 基準値 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			検出 下限 (mg/kg)	
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)		平均値 (mg/kg)
ホスメット	大麦	0.05	1	0	0		0.02	
	とうもろこし	0.05	57	0	0			
	マイロ	0.05	5	0	0			
	牧草	40	15	0	0			
	基準値のない飼料	—	299	0	0			
	計	—	377	0	0			
ホレート	大麦	0.05	1	0	0		0.02	
	とうもろこし	0.05	57	0	0			
	マイロ	0.05	5	0	0			
	牧草	1.5	15	0	0			
	基準値のない飼料	—	299	0	0			
	計	—	377	0	0			
マラチオン	大麦	2	1	0	0		0.02	
	とうもろこし	2	57	1	1.8	0.025		0.025
	マイロ	2	5	0	0			
	牧草	135	15	0	0			
	基準値のない飼料	—	299	8	2.7	0.22		0.078
	計	—	377	9	2.4	0.22		0.072
メチダチオン	大麦	0.02	1	0	0		0.02	
	とうもろこし	0.1	57	0	0			
	マイロ	0.2	5	0	0			
	牧草	12	15	0	0			
	基準値のない飼料	—	299	0	0			
	計	—	377	0	0			

表5 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められていない成分）

モニタリング等の対象成分	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	最大値 (mg/kg)	検出率 (%)	試験点数	モニタリング等の対象成分	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	最大値 (mg/kg)	検出率 (%)	試験点数					
	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)							検出下限 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	最大値 (mg/kg)	検出率 (%)						試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	検出下限 (mg/kg)
EPN	378	0	0	0	0.02				378	シラフルオフェン	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
アセトクロール	378	0	0	0	0.02				378	ターバシル	378	0	0	0	0.02				378	3	0.8	0.30	0.14	0.02
アニロホス	378	0	0	0	0.02				378	チオベンカルブ	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
アメトリン	378	0	0	0	0.02				378	テクナゼン	378	0	0	0	0.02				378	1	0.3	0.053	0.053	0.02
アードクロール	378	0	0	0	0.02				378	テトラクロルピルホス	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
アレスリン	378	0	0	0	0.02				378	テトラコナゾール	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
イサゾホス	378	0	0	0	0.02				378	テトラジホン	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
イソプロチオラン	378	0	0	0	0.02				378	テブコナゾール	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
イプロベンホス	378	0	0	0	0.02				378	テブアエンピラド	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
エタルフルラリン	378	0	0	0	0.02				378	テフルトリン	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
エディフェンホス	378	0	0	0	0.02				378	テルブトリン	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
エトフェンプロックス	378	1	0.3	0.14	0.02	0.14			378	トリアジメホソ	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
エトフメセート	378	0	0	0	0.02				378	トリアレート	378	0	0	0	0.02				378	3	0.8	0.066	0.043	0.02
エトプロホス	378	0	0	0	0.02				378	トリフルラリン	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
エトリジアゾール	378	0	0	0	0.02				378	トリフロキシストロビン	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
エトリムホス	378	0	0	0	0.02				378	ナプロロミド	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
オキサジアゾン	378	0	0	0	0.02				378	パラチオンメチル	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
カズサホス	378	0	0	0	0.02				378	ハルフェンプロックス	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
カルフェントラゾンエチル	378	0	0	0	0.02				378	ピフェントリン	378	5	1.3	0.20	0.02	0.12			378	0	0	0	0.02	
キントゼン	378	0	0	0	0.02				378	ピペロホス	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
クレンキシムメチル	378	0	0	0	0.02				378	ピリダフェンチオン	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
クロルタールジメチル	378	1	0.3	0.023	0.02	0.023			378	ピリダベン	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
クロルデン	378	0	0	0	0.02				378	ピリプロキシフェン	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
クロルフェナピル	378	0	0	0	0.02				378	ピングロゾリン	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
ジクロホップメチル	378	0	0	0	0.02				378	フェナリモル	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
ジクロラン	378	0	0	0	0.02				378	フェノチオカルブ	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
ジフェナミド	378	0	0	0	0.02				378	フェノトリリン	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
ジフェノコナゾール	378	0	0	0	0.02				378	フェンチオン	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
ジメチナミド	378	0	0	0	0.02				378	フェンプロコナゾール	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	
ジメピペレート	378	0	0	0	0.02				378	ブタミホス	378	0	0	0	0.02				378	0	0	0	0.02	

4) その他の有害物質

管理基準値が定められているメラミンのほか、指導基準値等は定められていないが、飼料中に多量に含まれると家畜事故を生じるおそれがある 3 成分の有害物質について、計 55 点のモニタリング等を実施した。その結果を表 6 に示した。

各成分の結果は、以下のとおりであった。

i メラミン

魚用配合飼料及び魚粉のモニタリングを実施した結果、魚用配合飼料 15 点からは検出されなかった。魚粉は 14 点中 1 点から検出され（検出率 7.1 %，0.07 mg/kg），管理基準値（2.5 mg/kg）を超えるものはなかった。

ii 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素

牧草 6 点（アルファルファ 1 点，スーダングラス 5 点）のサーベイランスを実施した結果、全ての試料から硝酸態窒素が検出された（最大値 740 mg/kg）。また、いずれの試料からも亜硝酸態窒素は検出されなかった。いずれも輸入の際の品質管理による受入れの目安¹¹⁾（0.1 %）を超えるものはなかった。

iii ヒスタミン

魚粉のサーベイランスを実施した結果、14 点中 12 点から検出（検出率 86 %，最大値 800 mg/kg）されたが、直ちに家畜事故を生じるおそれがあると認められるものはなかった。

表 6 その他の有害物質のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象成分	管理基準値 (mg/kg)	モニタリング等の対象試料	試料点数	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
メラミン	2.5	魚用配合飼料	15	0	0			0.06
		魚粉	14	1	7.1	0.07	0.07	
		計	29	1	3.4	0.07	0.07	
硝酸態窒素	—	アルファルファ	1	1	100	580	580	10
		スーダングラス	5	5	100	740	276	
		計	6	6	100	740	327	
亜硝酸態窒素	—	アルファルファ	1	0	0			10
		スーダングラス	5	0	0			
		計	6	0	0			
ヒスタミン	—	魚粉	14	12	86	800	234	3

3.2 飼料への動物由来たん白質等の混入確認

国内で製造された魚粉 70 点及びその他の魚介類由来たん白質 9 点，並びにチキンミール 29 点及びフェザーミール 15 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった。なお，PCR 試験において魚粉 6 点から反すう動物由来 DNA が検出されたが，ELISA 試験において同一試料から牛由来たん白質が検出されなかったことから，混入確認判定手順に基づき牛由来たん白質の混入は認められないと総合的に判定した。肉骨粉（ポークミール）2 点及び原料混合肉骨粉 24 点について，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった。なお，ELISA 試験において原料混合

肉骨粉 2 点から牛由来たん白質が検出されたが、PCR 試験において同一試料から反すう動物由来 DNA が検出されなかったことから、混入確認判定手順に基づき牛由来たん白質の混入は認められないと総合的に判定した。また、PCR 試験において原料混合肉骨粉 1 点から反すう動物由来 DNA が検出されたが、ELISA 試験において同一試料から牛由来たん白質が検出されなかったことから、混入確認判定手順に基づき牛由来たん白質の混入は認められないと総合的に判定した。これらの結果を表 7 及び表 8 に示した。

表 7 動物由来たん白質のモニタリング等の結果（魚粉等）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出点数
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			反すう動物由来DNA			
	試験点数	検出点数	検出率 (%)	試験点数	検出点数	検出率 (%)	試験点数	検出点数	検出率 (%)	
魚粉	70	0	0	70	0	0	70	6	8.6	0
酵素処理魚抽出物	4	0	0	4	0	0	4	0	0	0
魚介類すり身	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0
イカエキス	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
かに殻粉末	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ホタテ抽出物	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0

表 8 動物由来たん白質のモニタリング等の結果（チキンミール，肉骨粉等）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出点数
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			反すう動物由来DNA			
	試験点数	検出点数	検出率 (%)	試験点数	検出点数	検出率 (%)	試験点数	検出点数	検出率 (%)	
チキンミール	29	0	0	29	0	0	29	0	0	0
フェザーミール	15	0	0	15	0	0	15	0	0	0
原料混合肉骨粉				24	2	8.3	24	1	4.2	0
肉骨粉（ポークミール）				2	0	0	2	0	0	0

国内で製造されたほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料 3 点，ほ乳期子牛育成用配合飼料 2 点，若令牛育成用配合飼料 12 点，乳用牛飼育用配合飼料 38 点，肉用牛肥育用配合飼料 26 点，乳肉用牛飼育用配合飼料 1 点，肉牛繁殖用配合飼料 7 点，種牛飼育用配合飼料 1 点，牛複数ステージ用配合飼料 16 点，牛用二種混合飼料 1 点，糖蜜吸着飼料 1 点及びその他の牛用混合飼料 18 点について、顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験による確認を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった。なお，ELISA 試験において乳用牛飼育用配合飼料 1 点から牛由来たん白質が検出されたが，PCR 試験において同一試料からほ乳動物由来 DNA が検出されなかったことから，混入確認判定手順に基づき牛由来たん白質の混入は認められないと総合的に判定した。国内で製造されたその他の畜種向けの配混合飼料（動物質原料を含むもの）10 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験による確認を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった。これらの結果を表 9 に示した。

輸入された牛用混合飼料 25 点，マリーゴールド花卉粉末 1 点，乾燥酵母細胞壁 1 点及び飼料用酵母 2 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験による確認を実施した結果，牛由

来たん白質の混入は認められなかった。その結果を表10に示した。

表9 動物由来たん白質のモニタリング等の結果（国内製造牛用飼料等）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数			
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			ほ乳動物由来DNA				反すう動物由来DNA		
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)		試験 点数	検出 点数	検出率 (%)
牛用飼料等													
ほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料	3	0	0										0
ほ乳期子牛育成用配合飼料	2	0	0	2	0	0	2	0	0				0
若令牛育成用配合飼料	12	0	0	12	0	0	12	0	0				0
乳用牛飼育用配合飼料	38	0	0	32	1	3.1	32	0	0				0
肉用牛肥育用配合飼料	26	0	0	24	0	0	24	0	0				0
乳肉用牛飼育用配合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
肉牛繁殖用配合飼料	7	0	0	7	0	0	7	0	0				0
種牛飼育用配合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
牛複数ステージ用飼料	16	0	0	16	0	0	16	0	0				0
二種混合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
糖蜜吸着飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
その他の混合飼料	18	0	0	18	0	0	18	0	0				0
その他の畜種向け飼料 (動物質原料を含むもの)													
魚用配合飼料	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
フィッシュソリュブル吸着飼料	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
その他の混合飼料	8	0	0	8	0	0				8	1	0.1	0

表10 動物由来たん白質のモニタリング等の結果（輸入飼料等）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			反すう動物由来DNA			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
牛用混合飼料										
アメリカ合衆国	13	0	0	13	0	0	13	0	0	0
中華人民共和国	3	0	0	3	0	0	3	0	0	0
イタリア	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
英国	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
シンガポール	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
大韓民国	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
台湾	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
デンマーク	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ブラジル	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
フランス	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ポルトガル	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
マリーゴールド花卉粉末										
中華人民共和国	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
乾燥酵母細胞壁										
英国	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
飼料用酵母										
アメリカ合衆国	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0

3.3 不溶性不純物

飼料用として出荷，流通している動物性油脂（確認済動物性油脂，回収食用油，混合油脂等）75点及び特定動物性油脂1点について，不溶性不純物の含有量を測定した結果，不溶性不純物の成分規格を超えるものはなかった。そのモニタリング等の結果を表11に示した。

表 11 不溶性不純物のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象試料	成分規格	試料点数	最大値 (%)	平均値 (%)
動物性油脂	0.15 % 以下	75	0.051	0.0002
特定動物性油脂	0.02 % 以下	1	0.006	0.006

3.4 サルモネラ

国内で製造された単体飼料 120 点及び配混合飼料 81 点についてモニタリングを実施した結果、単体飼料ではサルモネラは検出されなかった。なお、前年度の検出率は 1.4%，前々年度の検出率は 1.3 % であった。配混合飼料では 81 点中 1 点からサルモネラが検出された（検出率 1.2 %）。なお、前年度の検出率は 1.1 %，前々年度の検出率は 5.4 % であった。これらの結果を表 12 及び表 13 に示した。

検出されたサルモネラの血清型は表 14 に示すとおりであり、過去 5 年以内に飼料から分離された事例はなかった。

なお、病原微生物検出情報¹²⁾によると、飼料から分離されたこの血清型は、国内で発生したサルモネラ食中毒の原因菌としてヒトからも分離されており、ここ数年分離された上位 15 血清型に含まれるものである。

表 12 サルモネラのモニタリング等の結果（単体飼料の種類別）

モニタリング等の対象試料	試験点数	検出点数	検出率 (%)
動物質性飼料			
魚粉	63	0	0
チキンミール	21	0	0
原料混合肉骨粉	9	0	0
フェザーミール	7	0	0
魚介類すり身	2	0	0
豚肉骨粉	2	0	0
小計	104	0	0
穀類			
きな粉	1	0	0
小計	1	0	0
そうこう類			
ふすま	5	0	0
米ぬか油かす	4	0	0
麦ぬか	2	0	0
大豆皮	1	0	0
ホミネーフィード	1	0	0
小計	13	0	0
植物性油かす類			
大豆油かす	2	0	0
小計	2	0	0
合計	120	0	0

表 13 サルモネラのモニタリング等の結果（配混合飼料の種類別）

モニタリング等の対象試料	試験点数	検出点数	検出率 (%)
牛用配合飼料	34	0	0
鶏用配合飼料	25	1	4.0
豚用配合飼料	16	0	0
動物性たん白質混合飼料	1	0	0
その他の混合飼料	5	0	0
合計	81	1	1.2

表 14 検出試料から分離されたサルモネラの血清型

血清型	検出された飼料の種類
	鶏用配合飼料
S. Infantis	1
合計	1

文 献

- 1) 法律：飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律，昭和 28 年 4 月 11 日，法律第 35 号 (1953).
- 2) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，省令第 35 号 (1976).
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) 農林省畜産局長通知：飼料等検査実施要領の制定について，昭和 52 年 5 月 10 日，52 畜 B 第 793 号 (1977).
- 6) 農林水産省消費・安全局畜産安全管理課長通知：飼料中の農薬の検査について，平成 18 年 5 月 26 日，18 消安第 2322 号 (2006).
- 7) 日本油化学会規格試験法委員会編：2.1.1 試料採取方法，基準油脂分析試験法 2013 年版，日本油化学会 (2013) (ISBN: 9784931249066).
- 8) 泉 和夫，石橋 隆幸，青山 幸二，石黒 瑛一：飼料研究報告，27，233 (2002).
- 9) 農林水産省生産局畜産部飼料課課長補佐（検査指導班担当）事務連絡：牛を対象とする飼料の抽出検査の取扱いについて，平成 14 年 11 月 8 日 (2002).
- 10) 農林水産省生産局長通知：反すう動物用飼料への反すう動物等由来たん白質の混入防止に関するガイドラインの制定について，平成 13 年 6 月 1 日，13 生畜第 1366 号 (2001).
- 11) 農林水産省消費・安全局畜産安全管理課長：輸入乾牧草の安全性確保について，平成 19 年 5 月 7 日，19 消安第 1297 号 (2007).
- 12) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr.html>, cited 11 Jun. 2019

調査資料**2 動物質性飼料原料等の腸球菌の薬剤耐性モニタリング調査（平成 30 年度）**

浅尾 美由起*, 奥山 紀子*

**Monitoring Results of Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Feed Ingredients
(in the Fiscal Year 2018)**

Miyuki ASAO* and Noriko OKUYAMA*

(* Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

We have made an antimicrobial susceptibility test on enterococci isolated from soybean meal and animal byproducts ingredients.

In order to isolate the enterococci from samples, their selective enrichment culture in AC broth, selective culture on Enterococcosel agar and two-time pure isolations on Brain Heart Infusion agar were conducted in due order. Then isolated gram-positive cocci were detected by the cultivation in Heart Infusion broth with 6.5 % NaCl. Having confirmed the biochemical characteristics of the catalase test, PYR test, mobility and pigment production, enterococci was identified with Rapid ID 32 STREP API. The minimum inhibitory concentration (MIC) was subsequently measured by using the broth micro-dilution method according to the guideline of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Isolation rate of enterococci from soybean meal, fish meal, poultry by-product meal, and pork and poultry meat and bone meal (MBM) were 45.5 %, 25.5 %, 16.0 % and 37.5 % respectively. The most common strain was *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) at 35.7 % (20 of 56 strains) followed by *E. faecium* at 32.1 % (18 of 56 strains). The antimicrobial resistance rates were 0.0 % to 15.0 % (*E. faecalis*), 0.0 % to 61.1 % (*E. faecium*) and 0.0 % to 22.2 % (other strains).

Key words: soybean meal; fish meal; poultry by-product meal; pork and poultry meat and bone meal (MBM); *Enterococcus faecalis*; *Enterococcus faecium*; antimicrobial susceptibility testing; broth microdilution method; minimum inhibitory concentration (MIC); antimicrobial resistance rates

キーワード：大豆油かす；魚粉；チキンミール；豚鶏混合肉骨粉；*Enterococcus faecalis*；*Enterococcus faecium*；薬剤感受性試験；微量液体希釈法；MIC（最小発育阻止濃度）；薬剤耐性率

1 緒 言

近年、新規の抗菌剤の開発が滞っている中で、薬剤耐性菌による感染症の増加が世界的に懸念されている。このため、WHO は 2015 年 5 月の総会で薬剤耐性に対する国際行動計画を採択し、これを受け、日本では関係省庁・関係機関等がワンヘルス・アプローチ（人と動物等の保健衛生の一体的な推進）の視野に立ち、協働して集中的に取り組む「薬剤耐性（AMR）対策に関するアクシ

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

「ヨンプラン 2016-2020」¹⁾を策定した。畜産分野の主な取組は「慎重使用の推進等の強化、薬剤耐性の動向調査・監視を強化、養殖水産動物用医薬品の使用に専門家が関与する仕組みを導入、アジア地域における国際協力の強化」がある²⁾。このうち、薬剤耐性菌の動向調査は平成 11 年度から健康動物由来食品媒介性病原細菌及び指標細菌の全国的な薬剤耐性調査を JVARM（動物由来薬剤耐性菌モニタリング）として実施し、独立行政法人農林水産消費安全技術センターは、腸球菌を担当している。

JVARM では農場（平成 11 年度から平成 27 年度）や、と畜場及び食鳥処理場（平成 24 年度から）で採材した直腸便又は盲腸便から分離される腸球菌を対象としている一方で、飼料から分離される腸球菌については、海外において鶏用飼料と原料からの分離率が、それぞれ 100 % と 66 % で、耐性率が、それぞれ 1.2~69.1 % と 0.1~59.8 % であったという報告³⁾はあるが、日本における、飼料から分離される腸球菌の分離率や耐性の動向に関する知見や研究事例が少ないことから、本調査を実施した。

2 実験方法

2.1 試料

平成 30 年 4 月から平成 31 年 1 月までの 10 ヶ月間の間に、大豆油かす、魚粉、チキンミール及び豚鶏混合肉骨粉を微生物試験用の試料の採取方法⁴⁾で採取した。採取場所は大豆油かす及び輸入魚粉については配合飼料工場、その他については各製造事業場であった。試料受け入れ後から試験開始までは、冷蔵で保存し、採材後 2 週間以内に試験に供した。

2.2 試薬

1) 水は RFD240RA（アドバンテック製）により蒸留した蒸留水（JIS K 0211 の 5213 に定義された蒸留水）を用いた。なお、調製に用いた試薬は、等級があるものは特級を用いた。

2) 生理食塩液

塩化ナトリウム溶液（0.9 w/v%）を 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

3) 1.6 w/v% ブロモクレゾールパープルエタノール溶液

ブロモクレゾールパープル 0.8 g を無水エタノール 47.5 mL に溶かし、蒸留水 2.5 mL を加えて調製した。遮光して、室温で保存した。

4) AC 培地

AC ブイヨン基礎培地（日水製薬製）50.5 g 及びアジ化ナトリウム（和光純薬工業製）0.25 g を蒸留水 1000 mL に溶かし、500 mL 培養瓶に 250 mL 分注して、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

5) エンテロココセル寒天培地（以下「ECS 培地」という。）

ECS 培地（Difco 製）56 g を蒸留水 1000 mL に溶かし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。これを 60 °C まで冷却した後、ペトリ皿に一様に広がるように 15 mL 分注し、水平に静置して凝固させた後、倒置してふたをわずかにずらし、37 °C で 1 時間静置して培地表面を乾燥させた。

6) ブレインハートインフュージョン寒天培地（以下「BHI 寒天培地」という。）

BHI Agar（Difco 製）52 g を蒸留水 1000 mL に溶かし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。以下、5) によった。

7) グラム染色液

フェイバーG「ニッスイ」(日水製薬製)の染色液 A (ビクトリアブルー), 脱色液 (ピクリン酸・エタノール液) 及び染色液 B (サフラニン)

8) 6.5 w/v%塩化ナトリウム加ハートインフュージョン培地 (以下「6.5 %NaCl 加 HI 培地」という。)

HI Broth (Difco 製) 25 g, 塩化ナトリウム 65 g, ブドウ糖 1 g 及び 1.6 %プロモクレゾールパープルエタノール溶液 1 mL を蒸留水 1000 mL に溶かした。これを小試験管に 3 mL 程度分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

9) ミュラーヒントン半流動培地 (以下「MH 半流動培地」という。)

Muller Hinton Broth (Difco 製) 21 g 及び Bacto-Agar (Difco 製) 2.5 g を蒸留水 1000 mL に溶かした。これを小試験管に 3 mL 程度分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後, 高層に凝固させた。

10) 3 v/v%過酸化水素水 過酸化水素水 (30 %) を 10 倍希釈した。

11) スワブカラー「イワキ」PYR (イワキ製)

12) Rapid ID32 STREP API (シスメックス・ビオメリュー製)

13) ミュラーヒントン半流動培地 (以下「MH 半流動培地」という。)

Muller Hinton Broth (Difco 製) 21 g 及び Bacto-Agar (Difco 製) 2.5 g を蒸留水 1000 mL に溶かした。これを小試験管に 3 mL 程度分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後, 高層に凝固させた。

14) 20 w/v% スキムミルク (以下「20 %スキムミルク」という。)

スキムミルク (Difco 製) 20 g を蒸留水 1000 mL に溶かし, 中試験管に 2 mL 程度分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

15) 薬剤感受性試験用フローズンプレート「栄研」(オーダープレート) (栄研化学製)

培地には Ca^{2+} 及び Mg^{2+} を添加した Muller Hinton Broth を用いた。供試薬剤と薬剤濃度域については Table 1 のとおり。試薬受け入れ後から使用までは, -80 °C で保存した。

Table 1 Kind, concentration range and break point of antimicrobial agents

Group	Antimicrobial agent	Abbreviation	Range ($\mu\text{g/mL}$)	Break Point (BP)
Aminoglycosides	Dihydrostreptomycin	DSM	0.25 ~ 512	128
Aminoglycosides	Kanamycin	KM	0.25 ~ 512	128
Fluoroquinolones	Enrofloxacin	ERFX	0.12 ~ 64	4
Lincomycins	Lincomycin	LCM	0.12 ~ 256	128
Macrolides	Erythromycin	EM	0.12 ~ 128	8 ^{a)}
Macrolides	Tylosin	TS	0.12 ~ 256	64
Penicillins	Ampicillin	ABPC	0.12 ~ 128	16 ^{a)}
Tetracyclines	Oxytetracycline	OTC	0.12 ~ 64	16

a) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of CLSI

16) ハートインフュージョン寒天培地 (以下「HI 寒天培地」という。)

HI Agar (Difco 製) 40 g を蒸留水 1000 mL に溶かし, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

以下、5)によった。

17) トリプチケースソイ培地（以下「TSB 培地」という。）

トリプチケースソイ（Difco 製）30 g を蒸留水 1000 mL に溶かし，小試験管に 4 mL 程度分注し，121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

2.3 装置及び器具

- 1) ペトリ皿：ガンマ滅菌済み，内径 90 mm，高さ 20 mm のもの
- 2) 白金耳：ポリプロピレン製，ガンマ滅菌済み，1 µL ディスポーループ
- 3) インキュベーター：庫内温度を 35~45 °C（管理精度：±1 °C）に設定できるもの
- 4) その他：試験に用いた器具のうち，培地及び菌液に接触するものは，乾熱滅菌又は高圧蒸気滅菌済みのもの

2.4 分離及び同定方法

1) 選択増菌培養

分析試料 25 g を量って AC 培地に入れ，振り混ぜた後，37 °C で 18~24 時間培養した。

2) 選択分離培養

選択増菌培養液の 1 白金耳を ECS 培地に画線塗抹し，倒置して 37 °C で 48~72 時間培養した。

3) 純粋分離培養

ECS 培地表面の腸球菌と疑われる集落（周囲が黒褐色又は黒色帯で，中心が半透明のコロニー）を 2 個釣菌し，それぞれ生理食塩液 15 µL 程度に懸濁した。各懸濁液の 1 白金耳を BHI 寒天培地に画線塗抹し，倒置して 37 °C で 18~24 時間培養した。

培養後，BHI 寒天培地表面の集落を 1 個釣菌し，上記と同様に操作した。

4) 確認培養

BHI 寒天培地表面の集落を 1 個釣菌し，MH 半流動培地に穿刺した後，6.5 % NaCl 加 HI 培地に接種した。MH 半流動培地は 37 °C で 18~24 時間，6.5 % NaCl 加 HI 培地は 45 °C で 18~24 時間培養した。

5) 確認同定

上記 2 種類の確認培地，グラム染色，カタラーゼ試験，PYR で Table 2 の生化学的性状を確認した。

Table 2 Biochemical confirmation test of *Enterococcus*

Biochemical confirmation	Culture	Culture medium	Character of <i>Enterococcus</i>
High NaCl concentration	18~24 h at 45 ± 1 °C	HI ^{a)} broth with 6.5 w/v% NaCl	+
High temperature	18~24 h at 45 ± 1 °C	HI ^{a)} broth with 6.5 w/v% NaCl	+
Motility	18~24 h at 37 ± 1 °C	Mueller-Hinton semisolid agar	+ / -

a) Heart Infusion

Biochemical confirmation	Reagent	Character of <i>Enterococcus</i>
Gram stain	Faber G " Nissui "	Gram positive
Catalase test	3 v/v% hydrogen peroxide water	-
PYR test	Swab color " IWAKI " PYR	+
Pigmentation	-	+ / -

Strains presumed to be enterococci in property tests are identified by Rapid ID32 STREP API

グラム染色 スライドガラスをエタノールに一晩以上浸漬し、バーナーで軽く焼き、冷ました。その上に、2回目の純粋分離培養塗抹用の菌液 10 µL を分注し、薄く広げた。乾燥後、火炎固定した塗抹面に染色液 A を十分添加し、1 分間静置した。染色液を水洗後、脱色液で染色液 A の青色が溶け出さなくなるまで脱色した。脱色液を水洗後、塗抹面に染色液 B を十分添加し、1 分間静置した。染色液を水洗後、ろ紙で水気をふき取り、光学顕微鏡で観察した。

カタラーゼ試験 純粋分離培養した菌を少量かき取り、スライドガラス上に 1 滴滴下した 3 v/v% 過酸化水素水と混和し、発泡の有無を確認した。

PYR 試験 添加試薬 1 を 1 滴滴下したテストスワブで純粋分離培養した菌をかき取り、菌塊の色を観察する。常温で 3~5 分静置後、添加試薬 2 を 1 滴滴下し、色の変化を観察した。

上記の生化学的性状で腸球菌の性状を示した菌について、Rapid ID32 STREP API で菌種同定を行った。

Rapid ID32 STREP API サスペンションメディウム 2 mL に McFarland 濁度 4 になるように菌を接種した。調製した菌液をプレートの各カップに 55 µL ずつ分注し、蓋をして 37 °C で 4~4.5 時間培養した。キットの添付文書のとおり判定し、判定結果を APIWEB 同定ソフトウェアに入力し、菌種同定を行った。菌種同定された菌株は、HI 培地と 20 % スキムミルクを等量ずつ混合した保存用培地で -80 °C で保存した。

2.5 薬剤感受性試験（微量液体希釈法）

1) 精度管理株

Staphylococcus aureus ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 を精度管理株として被験菌株と同時に試験し、精度管理株の MIC（最小発育阻止濃度：Minimum Inhibitory Concentration）が Table 3 の規格値に入ることを確認した。

Table 3 Quality control limit of quality control strains

Antimicrobial agent	Quality control strains			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
DSM	1 – 2	16 – 64	1 – 4	4 – 32
KM ^{a)}	1 – 4	16 – 64	1 – 4	*
ERFX ^{a)}	≤ 0.125	0.12 – 1	< 0.125	*
LCM	0.25 – 4	8 – 32	≥ 256	≥ 256
EM ^{a)}	0.25 – 1	1 – 4	*	*
TS ^{a)}	0.5 – 4	0.5 – 4	> 32	> 32
ABPC ^{a)}	0.5 – 2	0.5 – 2	2 – 8	*
OTC	≤ 1	4 – 16	0.25 – 2	2 – 16

*: No quality control limit

a) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (CLSI)

2) 菌液の調製

保存菌株を HI 寒天培地に画線塗抹し、倒置して 37 °C で 18~24 時間培養した。HI 寒天培地表面の集落を 4~5 個釣菌し、TSB 培地に接種し、37 °C で 18~24 時間培養した。培養後の TSB 培地を滅菌生理食塩液で 10 倍希釈し、McFarland 濁度 1 に合わせ、その菌液をさらに滅菌生理食塩液で 10 倍希釈して、フローズンプレート接種用の菌液とした。

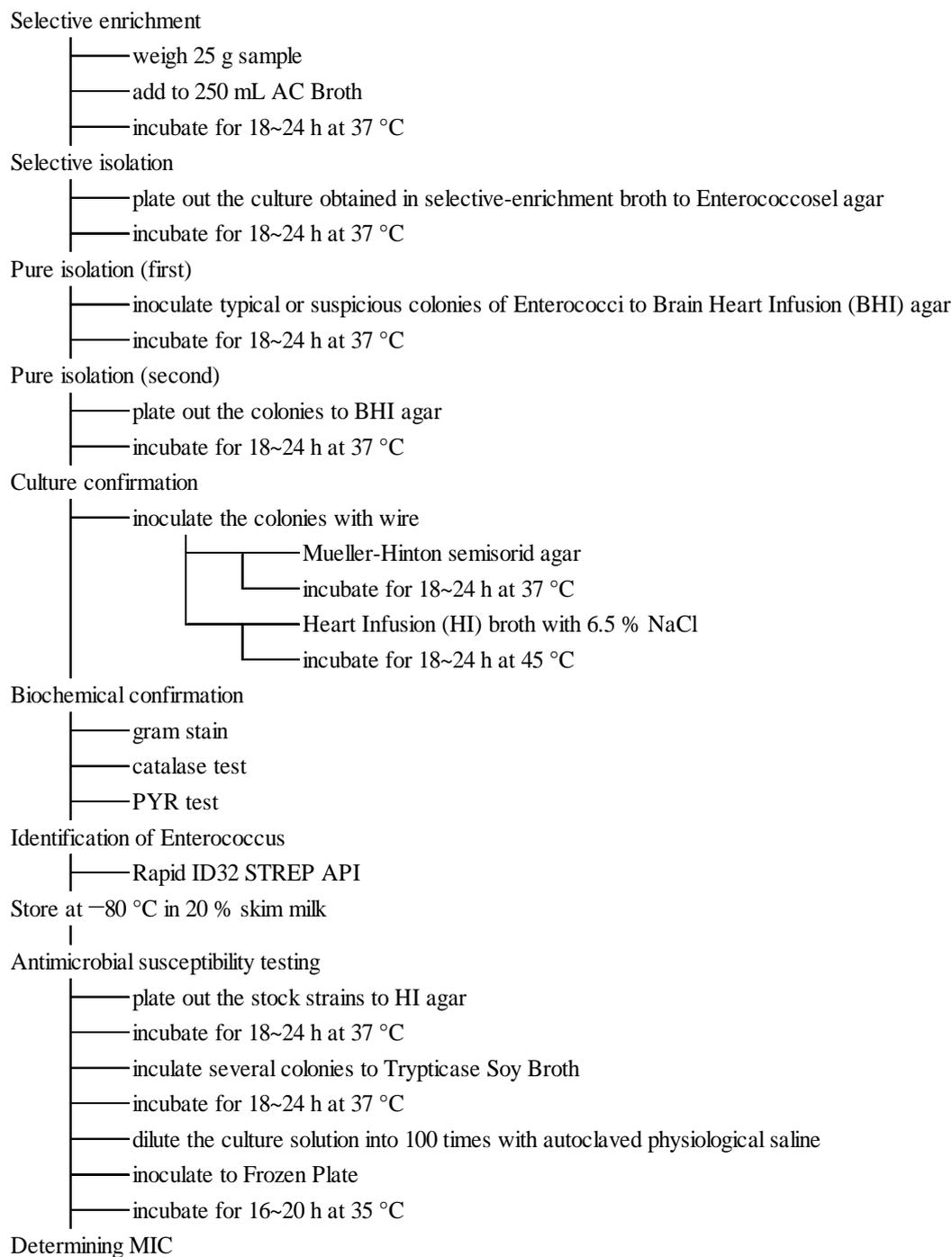
3) フローズンプレートへの接種及び培養

2)で調製した菌液（全量）をトランスファーセットのトレイに入れ、96 ピンプレートに浸し、96 ピンプレートにフローズンプレートの容器に接種した。フローズンプレートに蓋をして、35 °C で 16~20 時間培養した。

4) 判定

リーディングミラーの上にフローズンプレートを置き、肉眼的に懸濁又は沈殿が認められない場合及び沈殿物があっても 1 mm 未満で 1 個の場合は発育阻止とみなした。接種菌の発育が阻止された薬剤の最低濃度を MIC とした。

なお、分離同定から感受性試験までの概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Antimicrobial susceptibility testing of *Enterococcus* spp. isolated from feed ingredients

3 結果及び考察

3.1 分離状況

平成 30 年 4 月から平成 31 年 1 月までに採取した試料の点数や分離された試料の点数等は Table 4 のとおりである。腸球菌はほ乳動物の腸管内の常在菌であるが、外界へ排出された後も生残性が高く、また、ほ乳動物以外に鳥類、は虫類、昆虫、植物、土壌、水環境等にも生息している。今回採取した飼料原料は一般的に製造工程において加熱や加圧、溶媒抽出等が行われるた

め、加工後から袋詰めされるまでの間又は保管若しくは輸送の間に汚染されたと考えられる。

Table 4 Isolation of *Enterococcus* (for each feed ingredient)

	Number of samples	Number of positive	Isolated rate ^{a)} (%)	Number ^{b)} of <i>Enterococci</i>
Soybean meal	33	15	45.5	21
Fish meal	55	14	25.5	20
Poultry by-product meal	25	4	16.0	6
Pork and poultry MBM ^{c)}	16	6	37.5	9
Total	129	39	30.2	56

a) Ratio of the number of samples to the number of the test samples

b) Isolated up to 2 strains from 1 sample

c) Meat and bone meal

次に、分離された腸球菌の菌種を Table 5 に示す。最も多かったのは *E. faecalis* が 20 株で、次いで *E. faecium* が 18 株であった。飼料の種類別では、大豆油かすからは 6 菌種、動物質性飼料原料からは主に 2 菌種が分離された。腸球菌は Table 6 のように菌種により生息域⁵⁾が異なる。試料により分離された菌種が異なる明確な要因は不明だが、汚染のされやすさ（作業員、ハエなどの昆虫、ネズミなどの害獣との接触）などの違いがあると考えられる。

Table 5 Number of *Enterococcus* spp. isolated from each feed ingredient

	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. sp.</i> ^{a)}
Soybean meal	3	5	6	1	1	4	1
Fish meal	8	8	1	0	0	0	3
Poultry by-product meal	6	0	0	0	0	0	0
Pork and poultry MBM	3	5	1	0	0	0	0
Total	20	18	8	1	1	4	4

a) Judged " Identification to the genus " by Rapid ID32 STREP API

Table 6 Species of the genus *Enterococcus* and their currently known habitats⁵⁾

Species	Known habitats	Human pathogen
<i>E. faecalis</i>	Human, animal (multiple), plant, insect	Yes
<i>E. faecium</i>	Human, animal (multiple), plant, insect	Yes
<i>E. hirae</i>	Animal (multiple), plant	
<i>E. avium</i>	Human, animal (multiple)	Yes
<i>E. gallinarum</i>	Human, animal (multiple), insect	Yes
<i>E. casseliflavus</i>	Plant, soil, human, animal (multiple)	Yes

3.2 薬剤感受性試験の結果

試料 39 点から分離された腸球菌 56 株（1 試料から最大 2 株分離）の薬剤感受性試験の結果を Table 7 に、耐性を示した菌株の詳細を Table 8 に示した。

MIC は細菌の発育が認められなかった濃度の最小値である。MIC₅₀ 及び MIC₉₀ はそれぞれ

50 %及び90 %の菌株の発育を阻止した MIC である。MIC₉₀ が低い場合は、大部分の株が感受性（一部耐性菌が出現している場合もある）、MIC₅₀ が高い場合は、大部分が耐性化していると判断できる。また、MIC₉₀ と MIC₅₀ の幅が広い場合は、耐性株が増加、あるいは、耐性化傾向にあると考えられる⁶⁾。

今回分離された全ての菌株が ERFX, ABPC 及び TS に感受性であった。KM, EM 及び OTC に対する耐性率はそれぞれ *E. faecalis* で 10.0 %, 0.0 %及び15.0 %, *E. faecium* で 61.1 %, 33.3 % 及び0.0 %, その他の菌種で 11.1 %, 22.2 %及び5.6 %であり、菌種により耐性の傾向に違いが見られた。その他の薬剤に対しては耐性株が0~1株であり、特に違いは見られなかった。

耐性を示した菌種は *E. faecium* が11株で最も多かった。2薬剤への多剤耐性菌は、*E. faecium* で6株、*E. faecalis* で2株、*E. sp.*で2株であり、3薬剤への多剤耐性菌は *E. faecalis* で1株であった。

Table 7 Antimicrobial susceptibility of enterococci 56 isolates from each feed ingredient

	<i>E. faecalis</i> (n = 20)				<i>E. faecium</i> (n = 18)				others (n = 18)			
	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	Resistance Number	Resistance (%)	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	Resistance Number	Resistance (%)	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	Resistance Number	Resistance (%)
DSM	64	64	1	5.0	32	64	0	0.0	32	64	0	0.0
KM	32	64	2	10.0	128	256	11	61.1	32	256	2	11.1
ERFX	1	1	0	0.0	1	1	0	0.0	0.5	1	0	0.0
LCM	32	64	1	5.0	16	32	0	0.0	16	32	0	0.0
EM	2	4	0	0.0	4	8	6	33.3	0.3	8	4	22.2
TS	2	4	0	0.0	8	16	0	0.0	2	8	0	0.0
ABPC	1	1	0	0.0	1	2	0	0.0	0.5	2	0	0.0
OTC	1	64	3	15.0	0.5	1	0	0.0	0.5	1	1	5.6

Table 8 Antimicrobial resistance patterns in *Enterococcus* spp. isolated from feed ingredients

Kind of feed ingredient	Species	Antimicrobial resistance pattern	Kind of feed ingredient	Species	Antimicrobial resistance
Soybean meal	<i>E. faecium</i>	KM	Fish meal	<i>E. faecalis</i>	OTC, LCM
Soybean meal	<i>E. faecium</i>	KM	Fish meal	<i>E. faecium</i>	KM
Soybean meal	<i>E. faecium</i>	KM, EM	Fish meal	<i>E. faecium</i>	KM
Soybean meal	<i>E. faecium</i>	KM, EM	Fish meal	<i>E. faecium</i>	KM, EM
Soybean meal	<i>E. faecium</i>	KM, EM	Fish meal	<i>E. faecium</i>	KM, EM
Soybean meal	<i>E. casseliflavus</i>	OTC	Fish meal	<i>E. faecium</i>	KM, EM
Soybean meal	<i>E. sp.</i>	KM, EM	Fish meal	<i>E. sp.</i>	EM
Poultry by-product meal	<i>E. faecalis</i>	KM, OTC	Fish meal	<i>E. sp.</i>	EM
Poultry by-product meal	<i>E. faecalis</i>	KM, DSM, OTC	Fish meal	<i>E. sp.</i>	KM, EM
Pork and poultry MBM	<i>E. faecium</i>	KM			

4 まとめ

平成30年4月から平成31年1月までの10ヶ月の間に、採取した飼料原料（大豆油かす、魚粉、チキンミール及び豚鶏混合肉骨粉）から分離した腸球菌の同定と微量液体希釈法による薬剤感受性試験を行い、飼料原料における腸球菌の薬剤耐性の実態調査を行った。

- 1) 大豆油かす, 魚粉, チキンミール及び豚鶏混合肉骨粉からの腸球菌の分離率は, それぞれ 45.5 %, 25.5 %, 16.0 % 及び 37.5 % であった.
- 2) 腸球菌の菌種は植物質性原料と動物質性原料で異なり, 大豆油かすからは 6 菌種, その他の動物質性飼料原料からは主に 2 菌種が分離された. 最も多かった菌種は *E. faecalis* で 35.7 % (56 株中 20 株), 次いで *E. faecium* が 32.1 % (56 株中 18 株) であった.
- 3) 薬剤感受性試験の結果は, KM, EM 及び OTC に対する耐性率はそれぞれ *E. faecalis* で 10.0 %, 0.0 % 及び 15.0 %, *E. faecium* で 61.1 %, 33.3 % 及び 0.0 %, その他の菌種で 11.1 %, 22.2 % 及び 5.6 % であり, 菌種により耐性傾向が異なった. ERFX, ABPC 及び TS に対しては全ての菌株が感受性を示した.
- 4) 耐性を示した菌種は *E. faecium* が 11 株と最も多く, 多剤耐性菌は, *E. faecium* で 6 株, *E. faecalis* で 3 株, *E. sp.* で 2 株であった.

文 献

- 1) 公益社団法人日本動物用医薬品協会: 薬剤耐性 (AMR) 対策の推進について - 動物用抗菌剤の慎重使用 -, 平成 29 年 3 月 (2017).
- 2) 農林水産省: 薬剤耐性対策アクションプランについて,
http://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/yakuzi/pdf/setsumei_shiryu.pdf, cited 9 Apr. 2019
- 3) Paulo Martins da Costa, Manuela O., Alexandra B., Paulo Vand Fernando B.: Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from poultry feed and feed ingredients, *Vet Microbiol*, 120, 122-131 (2007).
- 4) 農林水産省畜産局長通知: 飼料等検査実施要領の制定について, 昭和 52 年 5 月 10 日, 52 畜 B 第 793 号 (1977).
- 5) Muruleedhara N. Byappanahalli, Meredith B. Nevers, Asja Korajkic, Zachery R. Staley, Valerie J. Harwood: Enterococci in the Environment, *Microbiol Mol Biol Rev*, 76, 685-706 (2012).
- 6) 動物用抗菌剤研究会: 最新データ 動物用抗菌剤マニュアル第 2 版, 平成 25 年 4 月 12 日 (2013).

調査資料**3 特定添加物検定結果等について（平成 30 年度）**

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課

Results of Official Testing of Specified Feed Additives (in the Fiscal Year 2018)

特定添加物とは、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和 28 年法律第 35 号．以下「飼料安全法」という．）第 3 条第 1 項の規定に基づき規格が定められた飼料添加物のうち、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律施行令（昭和 51 年政令第 198 号）第 2 条第 2 号に定められた抗菌性物質製剤をいう．特定添加物は、飼料安全法第 5 条第 1 項の規定により、独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という．）が行う検定を受け、検定合格証紙が付されたものでなければ販売してはならないこととされている．ただし、飼料安全法第 7 条第 1 項の登録を受けた特定飼料等製造業者（以下「登録特定飼料等製造業者」という．）が製造し、同法第 16 条第 1 項の表示が付されたもの及び同法第 21 条第 1 項の登録を受けた外国特定飼料等製造業者が製造し、同条第 2 項の表示が付されたものについては、この限りではない．

平成 30 年度に FAMIC に対して検定の申請があり、これに合格した特定添加物について、結果をとりまとめたのでその概要を報告する．また、平成 30 年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等についても併せて報告する．なお、平成 30 年度末の時点で、外国特定飼料等製造業者の登録はない．

1 特定添加物の検定申請業者及び品名等

平成 30 年度に検定に合格した特定添加物について、その種類及び品名等を申請業者別に表 1 に示した．

申請は 5 業者（前年度 7 業者）からあり、その製造形態等は、①製剤の製造のみを行っているのが 3 業者、②製造用原体の輸入及び製剤の製造を行っているのが 1 業者、③製剤の輸入のみを行っているのが 1 業者であり、製造用原体は全て輸入品であった．

平成 30 年度に検定に合格した特定添加物は 6 種類、8 銘柄（前年度 9 種類、14 銘柄）であった．

製造用原体又は製剤の輸入先国は、①エンラマイシン（製造用原体）、ノシヘプタイド（製造用原体）が中国、②アピラマイシン（製剤）が英国、③ナラシン（製剤）が米国、④モネンシン（製造用原体）がブルガリア、⑤サリノマイシンナトリウム（製造用原体）が中国及びブルガリアで、4 カ国（前年度 5 カ国）であった．

表 1 検定申請業者及び品名等一覧
（平成 30 年度）

管区※1	申請業者名	製造事業場名	特定添加物の種類	飼料級に 該当	申請品名	含有力価 (mg(力価)/g)
本部	ニッチク薬品工業株式会社	相模工場	サリノマイシンナトリウム	○	サリノマイシンTZ100	100
			モネンシンナトリウム		モネンシンTZ20	200
	日本ニュートリション株式会社	鹿島工場	サリノマイシンナトリウム	○	サコックス100	100
			エンラマイシン	○	エンラマイシン8%R	80
ロック化学製品株式会社	御殿場工場	サリノマイシンナトリウム	○	サリノ10%R-K	100	
神戸	株式会社科学飼料研究所	龍野工場	ノシヘプタイド		ノシヘプタイド40	40
	エランコジャパン株式会社※2	-	アピラマイシン	○	サーマックス200	200
			ナラシン	○	モンデパン100	100
計	5業者	5事業場	6種類		8銘柄	

※1 本部管区：関東・甲信越・静岡，神戸管区：近畿・中国（山口除く）・四国

※2 輸入業者に該当

2 特定添加物の種類別の検定合格件数等

平成 30 年度の特定添加物の種類別の検定合格件数，合格数量及び実量力価換算量を平成 28 年度及び平成 29 年度の結果とともに表 2 に示した。

平成 30 年度の検定合格件数は 126 件，合格数量は 590 トンで実量力価換算量は 69 トン(力価)であった。件数，数量及び実量力価換算量の対前年度比は，それぞれ 82.9 %，81.4 %，84.5 %となり，件数，数量及び実量力価換算量ともに減少した。

平成 30 年度の検定合格数量を種類別にみると，サリノマイシンナトリウムが全体の 37.1 %（前年度 33.8 %）で最も多く，次いでナラシン 25.4 %（前年度 31.8 %），アピラマイシン 22.2 %（前年度 13.7 %），ノシヘプタイド 12.3 %（前年度 8.6 %）となった。また，実量力価換算量については，今年度はアピラマイシンが全体の 38.1 %（前年度 24.3 %）で最も多く，次いでサリノマイシンナトリウム 31.8 %（前年度 30.0 %），ナラシン 21.8 %（前年度 28.3 %），ノシヘプタイド 4.2 %（前年度 3.1 %）となった。

平成 30 年度の検定合格数量及び実量力価換算量を前年度と比較すると，エンラマイシン，ノシヘプタイド，モネンシンナトリウム及びアピラマイシンは増加した一方，サリノマイシンナトリウム及びナラシンは減少し，前年度検定の実績があった硫酸コリスチン，リン酸タイロシン及びフラボフォスフォリポールは申請がなかった。また，平成 30 年 4 月 1 日から令和元年 5 月 31 日までの間に農林水産省において，「抗菌性飼料添加物のリスク管理措置策定指針」に基づき，指定取消しされた特定添加物を表 3 に示した。4 種類の特定添加物が指定取消となっている。

アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン及びクロルテトラサイクリンは平成 29 年度から，亜鉛バシトラシンは平成 28 年度から，ラサロシドナトリウムは平成 22 年度から，バージニアマイシンは平成 20 年度から，センデュラマイシンナトリウムは平成 19 年度から，エフロトマイシンは平成 17 年度から，ピコザマイシンは平成 11 年度から検定の申請がなく，これらは平成 30 年度も申請がなかった。なお，ラサロシドナトリウムは，後述の表 5 に示したとおり，登録特定飼料等製造業者による製造実績があった。

表 2 検定合格件数、合格数量および実量力価換算量（種類別）
（平成28年度～平成30年度）

類 別	特定添加物の種類	平成28年度			平成29年度			平成30年度		
		合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価換算量 (kg/力価)) 構成比 (%)	合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価換算量 (kg/力価)) 構成比 (%)	合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価換算量 (kg/力価)) 構成比 (%)
ポリペプチド系	亜鉛バシトラスリン	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	エンラマイシン	2	4,820	0.6	2	4,940	0.7	2	5,380	0.9
	ノシヘブタイド	15	60,000	6.9	20	62,200	8.6	18	72,720	12.3
	硫酸コリスチン	55	212,680	24.4	15	60,800	8.4	—	—	—
	小 計	72	277,500	31.9	37	127,940	17.7	20	78,100	13.2
テトラサイクリン系	アルキルトリメチルアノモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン	1	1,400	0.2	—	—	—	—	—	—
	クロルテトラサイクリン	3	14,000	1.6	—	—	—	—	—	—
	小 計	4	15,400	1.8	0	0	0.0	0	0	0.0
	リン酸タイロシン	1	5,039	0.6	3	12,611	1.7	—	—	—
マクロライド系	小 計	1	5,039	0.6	3	12,611	1.7	—	—	—
	フラボフオスフォール	1	1,250	0.1	1	1,250	0.2	—	—	—
	小 計	1	1,250	0.1	1	1,250	0.2	—	—	—
	サリノマイシンナトリウム	72	289,487	33.3	60	244,487	33.8	53	218,560	37.1
ポリエーテル系	センデユラマイシンナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ナラシン	18	197,500	22.7	22	230,550	31.8	14	149,825	25.4
	モネンシンナトリウム	4	11,500	1.3	2	8,020	1.1	3	12,160	2.1
	ラサロシドナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	小 計	94	498,487	57.3	84	483,057	66.7	70	380,545	64.5
その他	アピラマイシン	20	72,950	8.4	27	99,050	13.7	36	130,975	22.2
	エプロトマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	バロジニアマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ピコザマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	小 計	20	72,950	8.4	27	99,050	13.7	36	130,975	22.2
総 計	192	870,626	100.0	152	723,908	100.0	126	589,620	100.0	
対 前 年 度 比 (%)	106.1	110.7	105.2	79.2	83.1	87.5	82.9	81.4	84.5	

—：実績なし

表 3 農林水産省における指定取消し一覧

特定添加物の種類	指定取消年月日
バージニアマイシン	平成30年7月1日
硫酸コリスチン	平成30年7月1日
エフロトマイシン	平成30年12月27日
リン酸タイロシン	令和元年5月1日
4種類	

3 特定添加物の精製級及び飼料級別の検定合格件数等

特定添加物は、培養後の製造方法の違いにより、精製級と飼料級に区分される。前者は、抗生物質の有効成分のみを培養液から抽出及び精製した高純度の製造用原体に由来するもので、後者は、抗生物質の有効成分、製造に用いた培地成分及び菌体成分を含む培養液を乾燥した製造用原体に由来するものである。

平成 30 年度の特定添加物の精製級及び飼料級別の検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量を表 4 に示した。

精製級と飼料級の割合を比較すると、飼料級が検定合格件数全体の 83.3 %（前年度 73.7 %）、検定合格数量全体の 85.6 %（前年度 80.2 %）、実量力価換算量全体の 92.2 %（前年度 83.3 %）を占め、前年度より増加した。

ノシヘプタイド及びサリノマイシンナトリウムは、精製級と飼料級の両規格が設定されているが、平成 30 年度は、ノシヘプタイドは精製級のみ、サリノマイシンナトリウムは飼料級のみ検定の実績があった。

表 4 検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量（精製級・飼料級別）
（平成 30 年度）

類 別	特 定 添 加 物 の 種 類	精 製 級 [※]			飼 料 級 [※]		
		合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))	合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))
ポリペプチド系	亜鉛バシトラシン				—	—	—
	エンラマイシン				2	5,380	430
	ノシヘプタイド	18	72,720	2,909	—	—	—
	硫酸コリスチン	—	—	—	—	—	—
テトラサイクリン系	アルキルトリメチルアンモニウム カルシウムオキシテトラサイクリン	—	—	—			
	クロルテトラサイクリン				—	—	—
マクロライド系	リン酸タイロシン	—	—	—			
ホスホグリコリビッド系	フラボフォスフォリボール				—	—	—
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	—	—	—	53	218,560	21,856
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—			
	ナラシン				14	149,825	14,983
	モネンシンナトリウム	3	12,160	2,432			
	ラサロシドナトリウム	—	—	—			
その他	アピラマイシン				36	130,975	26,195
	エフロトマイシン	—	—	—			
	バージニアマイシン	—	—	—			
	ピコザマイシン	—	—	—			
合 計	21	84,880	5,341	105	504,740	63,464	
割 合 (%)	16.7	14.4	7.8	83.3	85.6	92.2	

—：実績なし

※ 斜線は、当該区分の規格がないことを示す。

4 特定添加物の類別の検定合格数量等の推移

平成 21 年度から平成 30 年度までの過去 10 年間における特定添加物の類別の検定合格数量及び実量力価換算量の推移をそれぞれ図 1 及び図 2 に示した。

検定合格数量は、増減はあるものの減少傾向で推移し、直近 2 年は前年比 2 割減と大幅に減少した。また、実量力価換算量も前年比 1.5 割減で同様の傾向であった。

検定合格数量を類別にみると、ポリエーテル系が全体の 50 % 以上で推移し（平成 22 年度を除く）、平成 29 年度まではポリエーテル系、ポリペプチド系の順に多かったが、平成 30 年度は、ポリエーテル系が 64.5 %（前年度 66.7 %）、次いでその他が 22.2 %（前年度 13.7 %）、ポリペプチド系が 13.2 %（前年度 17.7 %）となった。

類別の実量力価換算量も検定合格数量と同様の傾向だが、その他とポリペプチド系の順位が逆転したのは平成 29 年度であった。平成 30 年度は、ポリエーテル系が 57.1 %（前年度 60.3 %）、次いでその他が 38.1 %（前年度 24.3 %）、ポリペプチド系が 4.9 %（前年度 11.0 %）となった。

その他とポリペプチド系の順位が逆転した要因として、硫酸コリスチン（ポリペプチド系）の指定取消やアビラマイシン（その他）の申請増加が考えられる。また、平成 30 年度はマクロライド系、テトラサイクイン系及びホスホグリコリピッド系の申請実績はなかった。

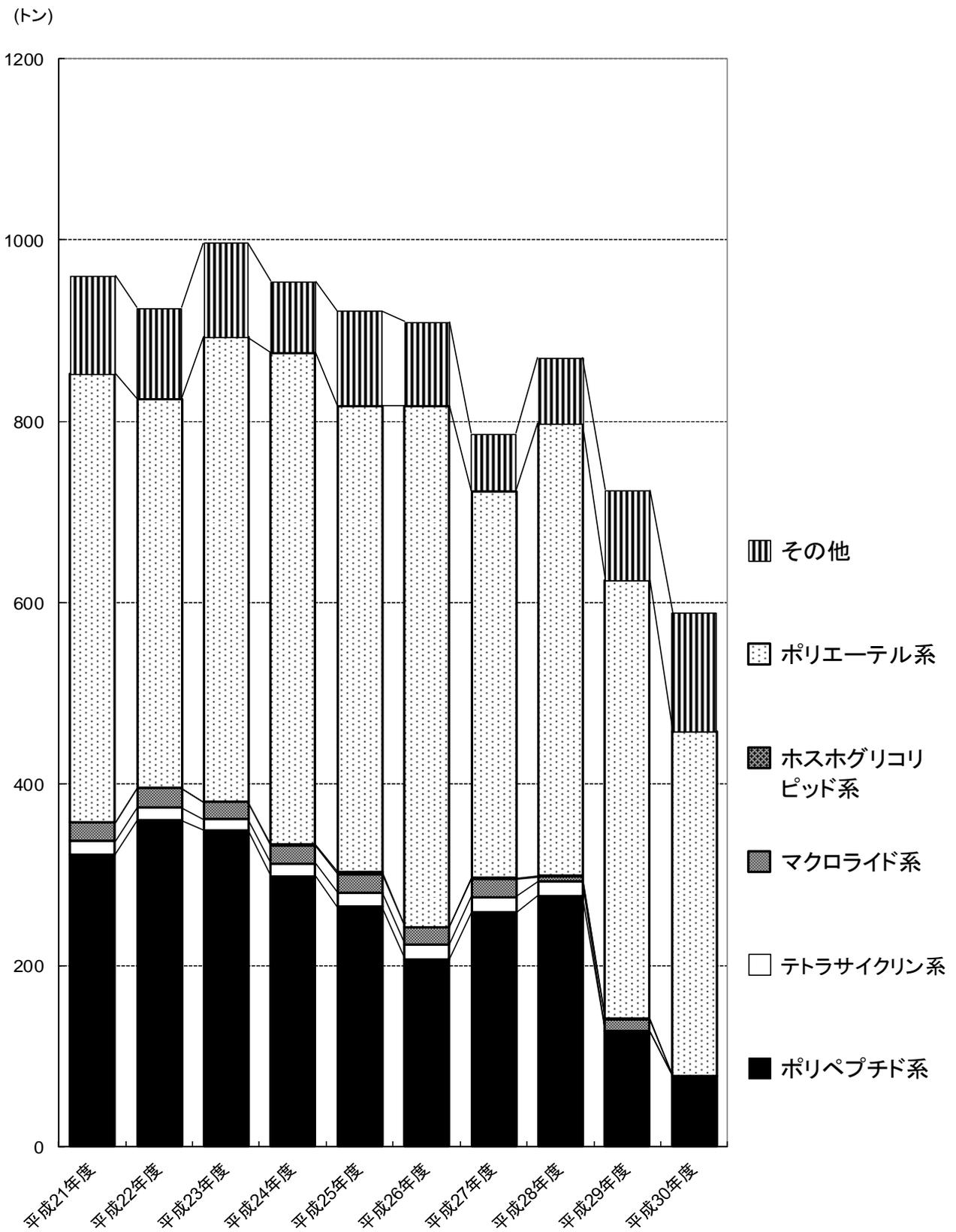


図1 特定添加物の検定合格数量の推移（類別）

(トン(カ価))

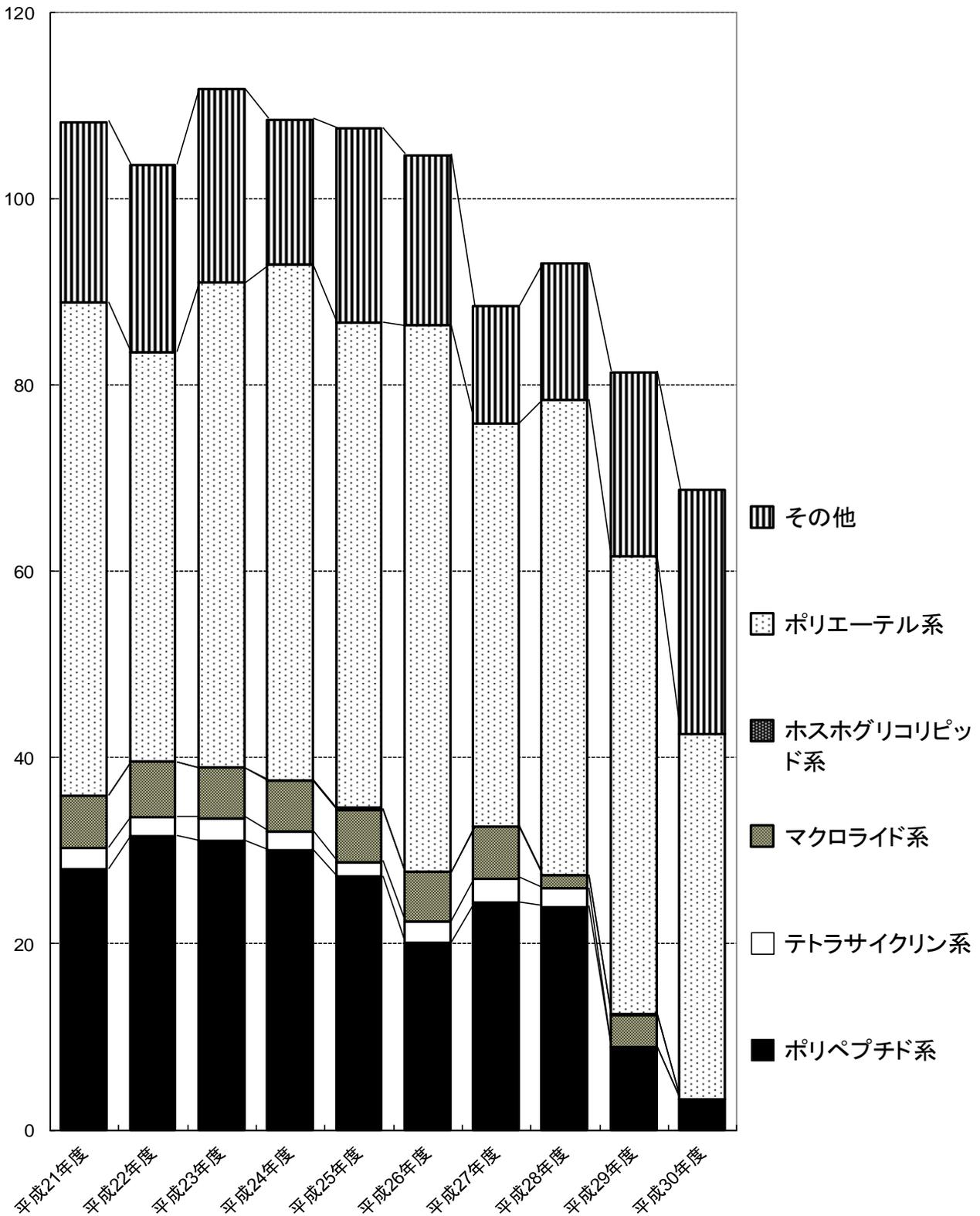


図2 特定添加物の検定合格の実量カ価換算量の推移（類別）

5 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等

平成 30 年度末の時点で、株式会社科学飼料研究所龍野工場がエンラマイシン、サリノマイシンナトリウム、ノシヘプタイド、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウム、コーキン化学株式会社九州工場第三工場がノシヘプタイドに係る登録特定飼料等製造業者の事業場として登録されている。なお、平成 29 年度から平成 30 年度においてコーキン化学株式会社九州工場第三工場による製造実績はなかった。

平成 30 年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量及び実量力価換算量を表 5 に示した。なお、ラサロシドナトリウムは、表 2 で示したとおり検定実績はなかったが、登録特定飼料等製造業者による製造実績があった。

平成 30 年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量は 907 トン（対前年度比 106.4 %）、実量力価換算量は 128 トン(力価)（対前年度比 104.2 %）であった。

平成 30 年度の製造数量は、サリノマイシンナトリウム、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、エンラマイシンの順に多かった。また、実量力価換算量は、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、エンラマイシンの順に多かった。

表 5 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等
（平成 29・30 年度）

類 別	特定添加物の種類	平成29年度		平成30年度	
		製造数量※ (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))	製造数量※ (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))
ポリペプチド系	エンラマイシン	76,300	6,104	75,340	6,027
	ノシヘプタイド	—	—	—	—
	硫酸コリスチン	1,120	112	—	—
	小 計	77,420	6,216	75,340	6,027
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	315,780	31,578	396,260	39,626
	モネンシンナトリウム	318,800	63,760	336,800	67,360
	ラサロシドナトリウム	140,280	21,042	98,160	14,724
	小 計	774,860	116,380	831,220	121,710
総 計		852,280	122,596	906,560	127,737
対 前 年 度 比 (%)		101.1	104.8	106.4	104.2

※ 各登録特定飼料等製造業者より聞き取り

6 特定添加物の総数量等

平成 30 年度の特定添加物の検定合格数量（製造及び輸入）と登録特定飼料等製造業者による製造数量の総計（以下「総数量」という。）及びその実量力価換算量を表 6 に示した。

平成 30 年度に製造及び輸入された特定添加物は 7 種類あり、総数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム（41.1 %）、モネンシンナトリウム（23.3 %）、ナラシン（10.0 %）の順に多く、類別ではポリエーテル系が最も多く、1,212 トン（検定：381 トン、登録：831 トン）と全体の 81.0 %を占めた。また、実量力価換算量を種類別にみると、モネンシンナトリウム（35.5 %）、サリノマイシンナトリウム（31.3 %）、アピラマイシン（13.3 %）の順に多く、類別でもポリエーテル系が最も多く、161 トン(力価)（検定：39 トン(力価)、登録：122 トン(力価)）と全体の 81.9 %を占めた。

次に、平成 21 年度から平成 30 年度までの過去 10 年間における特定添加物の総数量及び実量力価換算量の類別の推移をそれぞれ図 3 及び図 4 に示した。

登録特定飼料等製造業者による製造は平成 19 年度から開始されており、平成 21 年度には、登録銘柄の大幅な追加があった影響で、登録特定飼料等製造業者による製造の割合が増加した。その後も年々増加し、平成 29 年度以降検定合格数量を上回り、平成 30 年度は、特定添加物の総数量全体の 60.6 % (前年度 54.1 %)，実量力価換算量全体の 65.0 % (前年度 60.1 %) を登録特定飼料等製造業者による製造が占めた。

検定合格数量は減少しているが、登録特定飼料等製造業者による製造が増加していることから、特定添加物の総数量は 1,600 トン前後、実量力価換算量は 200 トン(力価)前後で推移している。

表 6 特定添加物の総数量等
(平成 30 年度)

類 別	特定添加物の種類	総数量※1		実量力価換算量※2	
		(kg)	構成比 (%)	(kg(力価))	構成比 (%)
ポリペプチド系	亜鉛バシトラシン	—	—	—	—
	エンラマイシン	80,720	5.4	6,457	3.3
	ノシヘプチド	72,720	4.9	2,909	1.5
	硫酸コリスチン	—	—	—	—
	小 計	153,440	10.3	9,366	4.8
テトラサイクリン系	アルキルトリメチルアンモニウム カルシウムオキシテトラサイクリン	—	—	—	—
	クロルテトラサイクリン	—	—	—	—
	小 計	0	0.0	0	0.0
マクロライド系	リン酸タイロシン	—	—	—	—
	小 計	0	0.0	0	0.0
ポリサッカライド系	フラボフォスフォリポール	—	—	—	—
	小 計	0	0.0	0	0.0
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	614,820	41.1	61,482	31.3
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—
	ナラシン	149,825	10.0	14,983	7.6
	モネンシンナトリウム	348,960	23.3	69,792	35.5
	ラサロシドナトリウム	98,160	6.6	14,724	7.5
	小 計	1,211,765	81.0	160,981	81.9
その他	アビラマイシン	130,975	8.8	26,195	13.3
	エフロトマイシン	—	—	—	—
	バージニアマイシン	—	—	—	—
	ピコザマイシン	—	—	—	—
	小 計	130,975	8.8	26,195	13.3
総 計	1,496,180	100.0	196,542	100.0	

—：実績なし

※1 検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造数量の総計

※2 検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造の実量力価換算量の総計

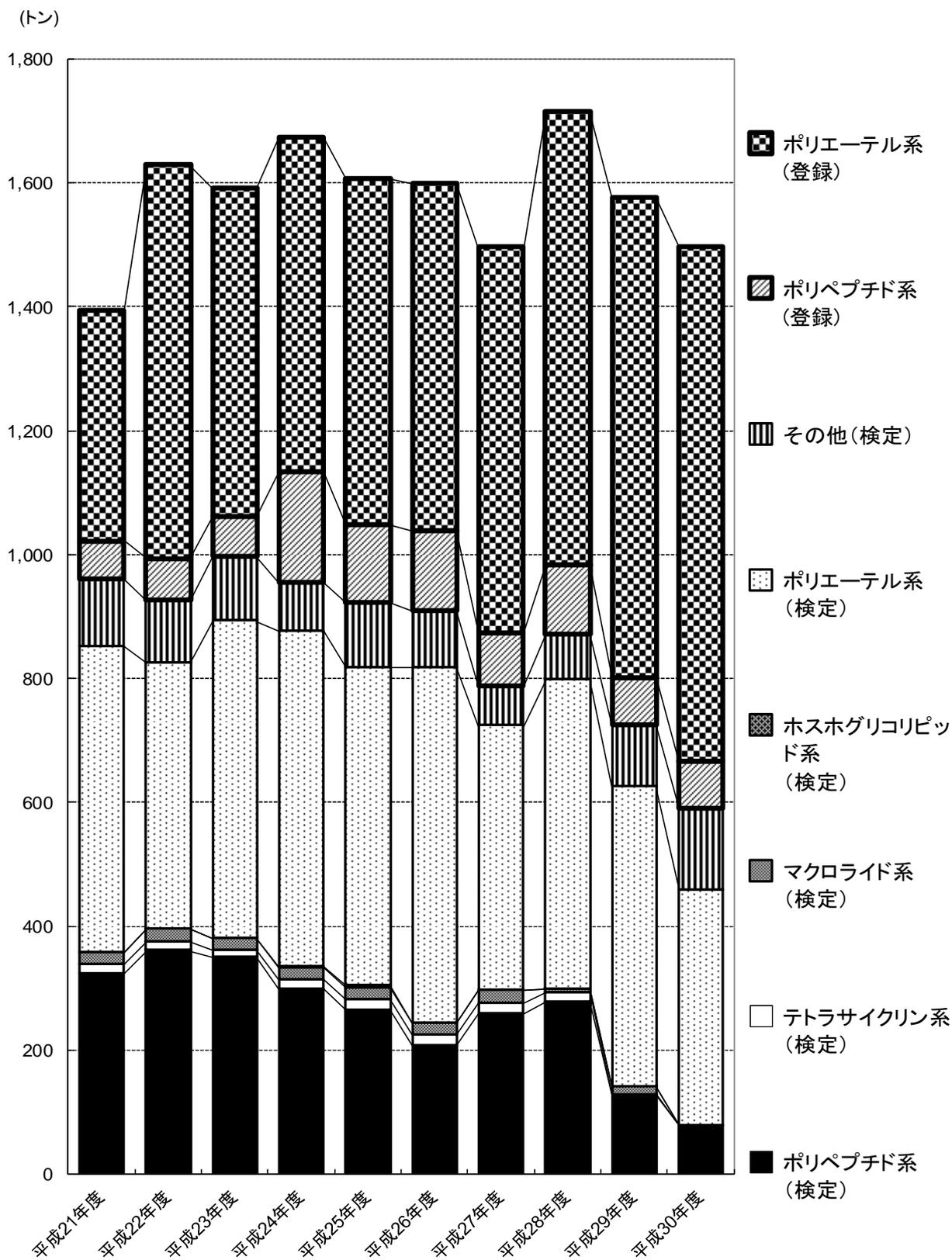


図3 特定添加物の総数量の推移（類別）

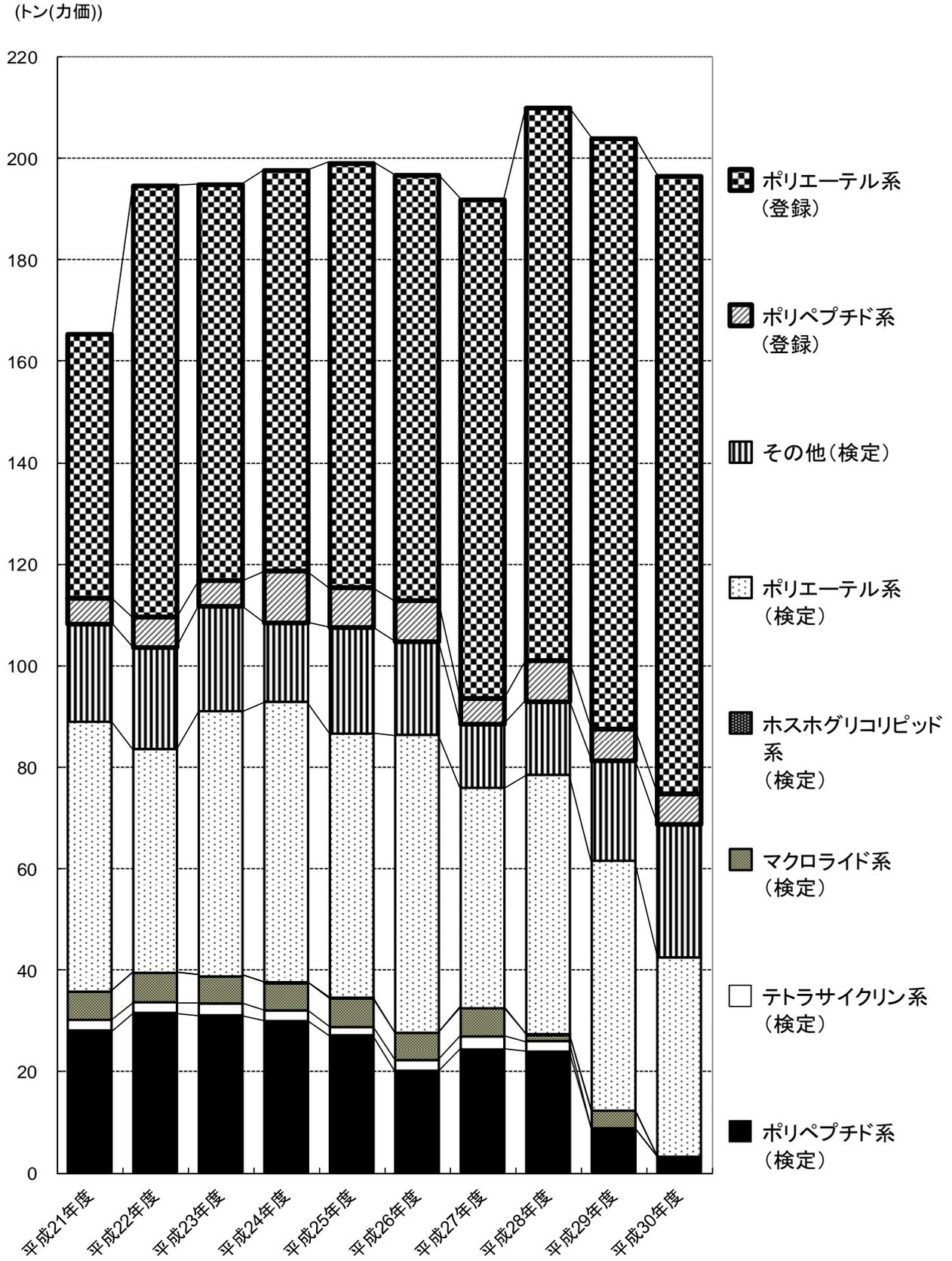


図4 特定添加物の総数の実量カ価換算量の推移(類別)

7 要 約

- 1) 平成 30 年度の特定添加物の検定の結果は、以下のとおりである。
 - i 検定に合格した特定添加物は、5 業者から申請された、6 種類、8 銘柄であった。
 - ii 検定合格件数は 126 件、合格数量は 590 トン、実量力価換算量は 69 トン(力価)で、前年度に比べて、件数、数量及び実量力価換算量ともに減少した。
 - iii 検定合格数量の精製級と飼料級の割合を比較すると、飼料級が全体の 85.6 %を占めた。また、実量力価換算量では、飼料級が 92.2 %を占めた。
 - iv 検定合格数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム、ナラシン、アビラマイシンの順に多かった。また、実量力価換算量は、アビラマイシン、サリノマイシンナトリウム、ナラシンの順に多かった。
 - v 検定合格数量を類別にみると、ポリエーテル系、その他、ポリペプチド系の順に多かった。また、実量力価換算量も同様の結果であった。
- 2) 平成 30 年度の登録特定飼料等製造業者による製造の結果は、以下のとおりである。
 - i 登録特定飼料等製造業者に登録されているのは 2 業者 2 工場であった。
 - ii 製造実績は 1 業者 1 工場、4 種類、製造数量は 907 トン、実量力価換算量は 128 トン(力価)で、前年度に比べて、種類は減少したが、数量及び実量力価換算量は増加した。
 - iii 製造数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウムの順に多かった。また、実量力価換算量は、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウムの順に多かった。
- 3) 平成 30 年度の特定添加物の総数量等の結果は、以下のとおりである。
 - i 平成 30 年 4 月 1 日から令和元年 5 月 31 日の間に 4 種類の特定添加物が指定取消された。
 - ii 特定添加物の検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造数量とを合計した総数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム、モネンシンナトリウム、ナラシンの順に多かった。また、実量力価換算量では、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、アビラマイシンの順に多かった。
 - iii 検定合格数量は減少傾向に、登録特定飼料等製造業者による製造数量は増加傾向にあり、特定添加物の総数量は 1,600 トン前後、実量力価換算量は 200 トン(力価)前後で推移している。

飼料研究報告編集委員

委員長	功刀 豊	副委員長	荻窪 恭明
	青山 幸二		須永 善行
	石田 有希恵		高橋 亜紀子
	石橋 隆幸		高橋 雄一
	大島 慎司		橋本 亮
	風間 鈴子		橋本 仁康
	小林 理絵子		原 秀樹
	設楽 賢治		日比野 洋

飼料研究報告 第44号

発行 独立行政法人農林水産消費安全技術センター
埼玉県さいたま市中央区新都心2番地1
さいたま新都心合同庁舎検査棟
TEL 050-3797-1857
FAX 048-601-1179
<http://www.famic.go.jp/>

令和元年9月

編集 飼料研究報告編集委員会

印刷 名取印刷工業有限会社
東京都新宿区新小川町7番11号 名取第2ビル
TEL 03-3260-4767