

飼料研究報告

第43号

平成30年

Research Report of Animal Feed

Vol. 43
2018



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、平成 19 年 4 月、肥料・飼料、農薬、食品のそれぞれを担っていた 3 つの検査・分析機関が、共通する科学的技術を基盤に統合し“農場から食卓まで”の一貫した食の安全と消費者の信頼の確保を担う機関として新たな一步を踏み出しました。

これまで FAMIC は統合のメリットを打ち出し、それぞれの機関で蓄えてきた知見と経験を合わせ、様々な課題に取り組んできました。このような経験を踏まえこれからは、より質の高い技術力で、社会の要請に応え行政を支える第一線の機関として更に飛躍するべく努力を続ける所存です。

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って、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。

平成 30 年 9 月

理事長 木村 真人

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 29 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 30 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 薬学部 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 肉骨粉中のシカ由来 DNA の PCR による検出法の確立
奥村 寿章, 井上 直, 橋本 仁康, 関口 好浩, 橋本 亮…… 1
- 2 肉骨粉中のシカ由来たん白質の ELISA キットによる検出法の確立
武田 然也, 宮野谷 杏, 橋本 仁康, 関口 好浩, 橋本 亮… 10

技術レポート

- 1 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
鈴木 知華, 安田 紗紀恵…………… 17
- 2 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
新井 詠子, 三枝 尚子, 山本 克己 …… 22
- 3 稲わら及び粳米中のヒドロキシイソキサゾールの液体クロマトグラフ質量分析計
による定量法の開発
矢野 愛子, 榊原 良成 …… 36
- 4 飼料中のカルバリル, カルボフラン及びフェノブカルブ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共同試験
田中 里美, 桑原 正良 …… 48
- 5 飼料中の 3-OH カルボフランの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による
定量法の共同試験
義本 将之, 齊木 雅一 …… 58
- 6 飼料用イネ中のイミダクロプリドを飼料分析基準既収載法『クロチアニジン, ジ
ノテフラン及びチアメトキサム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』の分析対象化合物に追加するための妥当性確認
立石 洋暢, 桑原 正良 …… 65

精度管理

- 1 平成 29 年度飼料等の共通試料による分析鑑定について
安田 紗紀恵, 齊木 雅一, 三枝 尚子, 加藤 まどか,
沼田 歩美, 榊原 良成 …… 78

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 29 年度）
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課，飼料鑑定第二課 …… 106
- 2 特定添加物検定結果等について（平成 29 年度）
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課 …………… 128

他誌掲載論文（抄録）

- 1 Development and inter-laboratory study of a method for quantifying ochratoxin A in pet foods
T. Wada, H. Saito, K. Aoyama, S. Saito and M. Shibukawa
(World Mycotoxin Journal, 10 (1), 53-61 (2017).) …………… 141
- 2 Sterigmatocystin and aflatoxin B₁ contamination of corn, soybeanmeal, and formula feed in Japan
M. Nomura, K. Aoyama, T. Ishibashi
(Mycotoxin Research, 34 (1), 21-27 (2018).) …………… 141

CONTENTS

1	Development of Detection Method for Deer DNA in Meat and Bone Meal Using Polymerase Chain Reaction-based Method	Toshiaki OKUMURA, Tadashi INOUE Yoshiyasu HASHIMOTO, Yoshihiro SEKIGUCHI and Sayaka HASHIMOTO	1
2	Validation Study on Detection Method for Deer Protein in Meat and Bone Meal by ELISA	Zenya TAKEDA, Kyo MIYANOYA, Yoshiyasu HASHIMOTO, Yoshihiro SEKIGUCHI and Sayaka HASHIMOTO	10
§ Technical report			
1	Study of Crude Fat Measurement Methods in Dried Whole Milk and Formula Feed Using it as a Main Ingredient	Chika SUZUKI and Sakie YASUDA	17
2	Development of Determination Method of Ferimzone in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS	Eiko ARAI, Naoko SAEGUSA and Katsumi YAMAMOTO	22
3	Development of Determination of Hydroxyisoxazol in Rice Straw and Paddy Rice for Feed by LC-MS	Aiko YANO and Yoshinari SAKAKIBARA	36
4	Collaborative Study on Simultaneous Determination Method of Carbaryl, Carbofuran and Fenobucarb in Feed by LC-MS/MS	Satomi TANAKA and Masayoshi KUWABARA	48
5	Collaborative Study on Determination Method of 3-Hydroxycarbofuran in Feed by LC-MS/MS	Masayuki YOSHIMOTO and Masakazu SAIKI	58
6	Validation Study on Analyte Expansion to the Simultaneous Determination Method for Clothianidin, Dinotefuran and Thiamethoxam in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice by LC-MS/MS for Imidacloprid	Hironobu TATEISHI and Masayoshi KUWABARA	65

§ Proficiency test

1 Proficiency Test (in the Fiscal Year 2017)

Sakie YASUDA, Masakazu Saiki, Naoko SAEGUSA, Madoka KATO, Ayumi NUMATA and Yoshinari SAKAKIBARA	78
---	----

§ Investigative report

1 Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2017)

Feed Analysis 1st Division and 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	106
---	-----

2 Results of Official Testing of Specified Feed Additives (in the Fiscal Year 2017)

Feed Analysis 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	128
--	-----

§ Papers accepted in other journals (abstract)

1 Development and inter-laboratory study of a method for quantifying ochratoxin A in pet foods

T. Wada, H. Saito, K. Aoyama, S. Saito and M. Shibukawa (World Mycotoxin Journal, 10 (1), 53-61 (2017).)	141
---	-----

2 Sterigmatocystin and aflatoxin B₁ contamination of corn, soybeanmeal, and formula feed in Japan

M. Nomura, K. Aoyama, T. Ishibashi (Mycotoxin Research, 34 (1), 21-27 (2018).)	141
---	-----

1 肉骨粉中のシカ由来 DNA の PCR による検出法の確立

奥村 寿章^{*1}, 井上 直^{*2}, 橋本 仁康^{*2}, 関口 好浩^{*1}, 橋本 亮^{*1}

Development of Detection Method for Deer DNA in Meat and Bone Meal Using Polymerase Chain Reaction-based Method

Toshiaki OKUMURA^{*1}, Tadashi INOUE^{*2},

Yoshiyasu HASHIMOTO^{*2}, Yoshihiro SEKIGUCHI^{*1} and Sayaka HASHIMOTO^{*1}

(*¹ Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),

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

For detecting the deer DNA in meat and bone meal (MBM), an analytical method based on polymerase chain reaction (PCR) was developed.

The deer mitochondrial DNA in a sample was extracted using a kit (mtDNA Extractor CT Kit, Wako Pure Chemical Industries; Osaka, Japan). PCR amplification was performed in a reaction solution which contained the extracted DNA, primer pair for detecting deer DNA (Hokkaido System Science; Sapporo, Japan) and DNA polymerase (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) etc. PCR products were separated by electrophoresis through 2.5 w/v% agarose gel, and stained with ethidium bromide. After electrophoresis, the test results were judged by the presence of PCR amplification products with the identical size of the positive target deer DNA fragment.

The specificity of this PCR-based method which uses primer pair for detecting the deer DNA was examined in wild boar raw meat, wild boar meat meal and bear raw meat. At the result, those samples were detected deer negative. This indicates that the primer pair for detecting the deer DNA has a sufficient specificity.

The sensitivity of the PCR-based method in pork MBM and pork and poultry MBM containing deer meat meal (DMM) was examined at three levels (0.01 %, 0.05 % and 0.1 % DMM). All samples at all levels in pork MBM were identified deer positive. However, a part of samples at 0.01 % DMM in pork and poultry MBM was found deer negative. This means the sensitivity of this method for DMM contained in pork and poultry MBM was lower than that in pork MBM. The sensitivity at 0.01 %, 0.02 %, 0.05 % and 0.1 % DMM in pork and poultry MBM was 63 % (10 out of 16 samples), 80 % (8 out of 10 samples), 100 % (26 out of 26 samples) and 100 % (6 out of 6 samples) respectively.

A collaborative study was conducted in eight laboratories, which used pork and poultry MBM with DMM additive concentration of 0 %, 0.05 % and 0.1 % each as samples. The sensitivity and the false-negative rates of this method in all samples containing DMM were 100 % and 0 % respectively. This reveals that the LOD of this method is 0.05 % DMM in MBM. Besides, the specificity and the false-positive rates of this method in the blank sample (with no DMM) were 100 % and 0 % respectively. Those results demonstrate that this method fulfills requirements for a qualitative analytical method.

This method was thus validated and established for use in the inspection of deer protein in MBM, etc.

^{*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 神戸センター

Key words: deer protein; polymerase chain reaction (PCR); mitochondrial DNA; meat and bone meal; collaborative study

キーワード：シカ由来たん白質；ポリメラーゼ連鎖反応；ミトコンドリア DNA；肉骨粉；共同試験

1 緒 言

我が国で牛海綿状脳症（BSE）の発生が確認されて以来，飼料原料として利用できる動物由来たん白質は制限されているところであるが¹⁾，近年における野生鳥獣による農作物の被害拡大に伴い，イノシシの捕獲頭数が急増し，捕獲された個体の処理が緊急の課題となり，平成 28 年 9 月 20 日よりイノシシを豚と同等と見なし，飼料の原料として利用できるようになった²⁾。

イノシシをと殺，解体処理する獣肉処理施設（食品衛生法に基づく食肉処理業の許可を受けた施設）の大半は，シカのと殺，解体処理も行っていることから³⁾，イノシシ由来たん白質を飼料の原料として利用するに当たっては，農林水産大臣の確認手続⁴⁾の下で，伝達性海綿状脳症の発生の予防の観点から飼料の原料としての利用が禁止されているシカ残さとの分別管理を徹底することが重要となる。

この分別管理が適切に行われていることを確認するためには，イノシシを原料とする肉骨粉等にシカ由来たん白質が混入していないことを確認するための試験方法を確立する必要がある。その試験方法として，たん白質を検出する ELISA 法とポリメラーゼ連鎖反応（以下「PCR」という。）を利用し DNA を検出する試験方法が考えられた。

そこで，ここでは飼料分析基準⁵⁾に記載されている動物由来 DNA の検出法を基とする，シカ DNA 検出用合成 DNA⁶⁾を用いたシカ由来 DNA の検出法について，特異性及び感度を確認し，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 試 料

1) シカ肉粉及びイノシシ肉粉

ホンシュウジカ及びイノシシのもも肉を精肉店より入手し，以下の方法で肉粉を調製した。

各生肉を 1~2 cm 角に切り，133 °C で 20 分間高圧蒸気滅菌し，105 °C で恒量になるまで乾燥した後，目開き 1 mm のふるいを通るまでミルサーで粉碎した。

2) 豚肉骨粉，チキンミール及び原料混合肉骨粉

豚肉骨粉及びチキンミールは，国内の飼料製造業者より入手したものを目開き 1 mm のふるいを通るまでミルサーで粉碎したものをを用いた。原料混合肉骨粉は，粉碎した豚肉骨粉とチキンミールを等量混合して調製した。

3) シカ肉粉添加試料

シカ肉粉とイノシシ肉粉を乳鉢で混合し，10 %シカ肉粉添加試料を調製した。10 %シカ肉粉添加試料を基に，豚肉骨粉及び原料混合肉骨粉でそれぞれ段階希釈し，0.01 %，0.02 %，0.05 %，0.1 %，0.5 %及び 1 %シカ肉粉添加試料を調製した。

4) クマ生肉

ツキノワグマのもも赤身ブロックを精肉店より入手し，表面から 2 cm 程度を切除した側面の中心部分からくりぬいた肉を用いた。

2.2 試薬

- 1) ミトコンドリア DNA 抽出キット mtDNA エキストラクターCT キット 和光純薬工業製
- 2) 陽性対照 DNA シカ陽性対照は、ホンシュウジカ及びエゾシカ生肉約 100 mg からミトコンドリア DNA (以下, 「mtDNA」という.) 抽出キットを用いて抽出した mtDNA を TE 緩衝液で溶かし, 1 mL 中に DNA として 10 µg を含有するように調製したものをを用いた. なお, 3.1 特異性試験及び 3.2 感度試験の一部分にはホンシュウジカ由来 DNA を, それ以外の 3.2 感度試験にはエゾシカ由来 DNA を陽性対照に用いた.

DNA の抽出確認には, 豚ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール (BEX 製) 又は鶏ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール (BEX 製) を用いた.

- 3) プライマー シカ DNA 検出用合成 DNA (2 µmol/L) deer54, deer33⁶⁾ 北海道システム・サイエンス製, 豚 DNA 検出用合成 DNA (2 µmol/L) pig5-6, pig3-6 BEX 製, 鶏 DNA 検出用合成 DNA (2 µmol/L) chick5-1, chick3-1 BEX 製
- 4) TE 緩衝液 pH8.0 ニッポンジーン製
- 5) PCR 緩衝液 10X PCR Gold buffer Applied Biosystems 製
- 6) 2 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液 dNTP Mix Applied Biosystems 製
- 7) 25 mmol/L 塩化マグネシウム溶液 MgCl₂ Applied Biosystems 製
- 8) 電気泳動用色素溶液 6×Loading Buffer タカラバイオ製
- 9) DNA 分子量マーカー 100 bp DNA Ladder タカラバイオ製
- 10) DNA ポリメラーゼ液 Ampli Taq Gold Applied Biosystems 製
- 11) 2-プロパノール 分子生物用 和光純薬製
- 12) Tris-acetate, EDTA (TAE) 緩衝液 50×TAE (ニッポンジーン製) を 50 倍に希釈したもの
- 13) アガロースゲル Agarose S Tablet ニッポンジーン製
- 14) ゲル染色液 EtBr Dropper Bottle (Apex 製) を臭化エチジウム濃度が 0.5 µg/mL になるように希釈したもの
- 15) 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) を高圧蒸気滅菌 (121 °C, 15 min 以上) で処理したもの

2.3 装置及び器具

- 1) ミルサー: IFM-300DG 岩谷産業製
- 2) ビーズ式細胞破碎機: BC-20 湘南産機製
- 3) 高速冷却遠心器: MX-307 トミー精工製
- 4) DNA 増幅装置: PE9700 型 Applied Biosystems 製
- 5) 電気泳動装置: Mupid-exu アドバンス製
- 6) 電気泳動パターン撮影システム: AE-6932GXES-U アトー製

2.4 試験方法

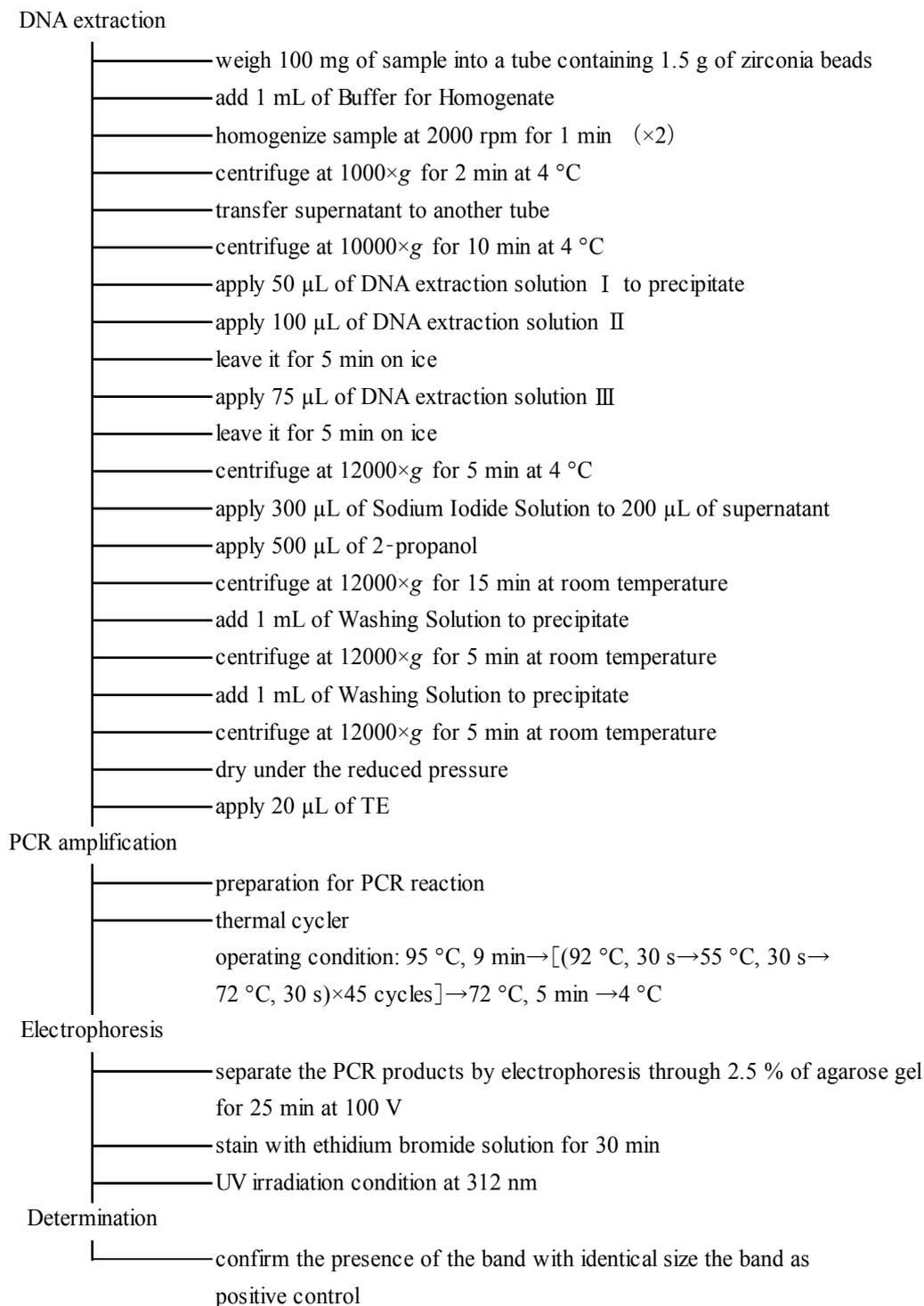
飼料分析基準第 16 章第 2 節の方法 (以下「本法」という.) に従って分析した. ただし, 陽性対照 DNA 及びプライマーはそれぞれ 2.2 の 2) 及び 3) のものをを用いた.

なお, 試験法の概要を Scheme 1 に示した.

2.5 判定方法

電気泳動の結果, 陽性対照と同一サイズの PCR 増幅産物の有無で陽性又は陰性と判定した.

なお、陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合及び試料溶液中で豚検出用の増幅産物が検出されなかった場合は PCR 操作から再分析することとした。



Scheme 1 Analytical procedure for detection of deer DNA in meat and bone meal (PCR-based method)

3 結果及び考察

3.1 特異性試験

シカ由来 DNA 検出用合成 DNA (以下「シカ検出用プライマー」という.) の特異性については、これまでシカ (ホンシュウジカ, エゾシカ, アカシカ, トナカイ), ウシ (黒毛和種, 乳牛, アカウシ, アンガス種), ヒツジ及びヤギの反すう動物, ウマ, ブタ (ミニブタ, メキシカンヘアレス, バークシャー, 中ヨークシャー, デュロック, ランドレース), ウサギ, ラット, マウス及びクジラのは乳動物, 鳥類 (ニワトリ, ウズラ, アイガモ), 毛ガニ, アサリ, エビ, イカ, トウモロコシ, ヒト及び魚類 (10 品種) で確認されており, そのうちシカについてのみ検出することが報告されている^{6), 7)}. 一方, シカと同じ施設で解体・食肉処理を行う可能性があるイノシシ及びクマについては確認されていない. そこで, イノシシの生肉と肉粉及びクマ生肉について, 本法により特異性試験を実施した. その結果, 全ての試料で陰性と判定され, シカ検出用プライマーの高い特異性が確認された (Table 1). なお, シカは反すう動物であるので, 飼料分析基準に規定されている反すう動物由来 DNA 検出用プライマー⁵⁾でも検出可能であるが, 動物種の特異性が困難なことから, シカ由来 DNA の PCR による検出法には, 既に開発されているシカ検出用プライマー⁶⁾を利用することとした.

Table 1 Specificity confirmation of the PCR method taken with primer pair for detecting deer DNA

Materials	Number of samples (Detected / Tested)
Wild boar raw meat	0/2
Wild boar meat meal	0/2
Bear raw meat	0/2
Poultry by-product meal	0/2
Pork MBM ^{a)}	0/2
Pork and poultry MBM ^{b)}	0/2

a) Meat and bone meal

b) Pork and poultry MBM was prepared by mixing equal amounts of pork MBM and poultry by-product meal.

3.2 感度試験

3.2.1 試料による感度比較

獣肉処理施設における不適切な分別管理によりシカの混入が起りうる飼料原料である豚肉骨粉及び原料混合肉骨粉について, シカ肉粉の原物重量が 0.01 %, 0.05 %及び 0.1 %となるように添加した試料を用いて, 本法の感度を確認した. 試験の結果 (Table 2), 添加したシカ肉粉について, 豚肉骨粉は全ての添加濃度で陽性と判定された. 原料混合肉骨粉は, 0.05 %及び 0.1 %添加試料で全て陽性と判定されたが, 0.01 %添加試料の 6 検体中 2 検体で陰性 (感度 67 %) と判定された. この結果は原料混合肉骨粉に混合されているチキンミールに含まれる成分が DNA 増幅阻害等を引き起こしている可能性を示したことから, 更にチキンミールにシカ肉粉 0.05 %添加した試料を調製し, シカ DNA が検出できるか確認した. その結果, 検出率

は 100 % であり, 0.05 % の添加濃度において, チキンミールはシカ DNA の検出に影響を及ぼさないことを確認した.

感度試験の結果から, 豚肉骨粉は原料混合肉骨粉よりシカの検出率が高くなる可能性があり, シカの混入が起こりうる肉骨粉を代表する試料としては不適当と考え, 検出率が低かった原料混合肉骨粉を共同試験用試料とすることとした.

Table 2 Sensitivity of the PCR method taken with primer pair for detecting deer DNA in pork MBM^{a)} and pork and poultry MBM^{b)} containing DMM^{c)} at different levels

Kind of samples	Spiked level	Number of samples (Detected / Tested)	Sensitivity (%)
Pork MBM	0.01 % DMM	6/6	100
	0.05 % DMM	6/6	100
	0.1 % DMM	6/6	100
Pork and poultry MBM	0.01 % DMM	4/6	67
	0.05 % DMM	6/6	100
	0.1 % DMM	6/6	100
Poultry by-product meal	0.05 % DMM	6/6	100

a) Meat and bone meal

b) Pork and poultry MBM was prepared by mixing equal amounts of pork MBM and poultry by-product meal.

c) Deer meat meal

3.2.2 検出下限の推定

シカ肉粉添加濃度の検出下限の推定を目的に, 0.01 %, 0.02 % 及び 0.05 % 添加試料を分析し, Table 2 の結果にデータを追加した (Table 3). 0.1 % 及び 0.05 % 添加試料は, 分析した全ての試料で陽性と判定された (感度 100 %). 一方, 0.01 % 添加試料は 16 検体中 10 検体が陽性と判断され (感度 63 %), 0.02 % 添加試料は 10 検体中 8 検体が陽性と判断された (感度 80 %).

定性分析法の性能指標について, EU では少なくとも 95 % の感度が要求されている⁸⁾. 試験の結果 (Table 3), この性能指標を満たすシカ肉粉添加濃度である 0.05 % を本法の検出下限と推定し, 共同試験試料に添加するシカ肉粉濃度を 0.05 % 及び 0.1 % と設定した.

Table 3 Sensitivity of the PCR method taken with primer pair for detecting deer DNA in pork and poultry MBM^{a)} containing DMM^{b)} at different levels

Kind of sample	DMM level	Number of samples (Detected / Tested)	Sensitivity (%)
Pork and poultry MBM	0.01 % DMM	10/16	63
	0.02 % DMM	8/10	80
	0.05 % DMM	26/26	100
	0.1 % DMM	6/ 6	100

a) Pork and poultry MBM (meat and bone meal) was prepared by mixing equal amounts of pork MBM and poultry by-product meal.

b) Deer meat meal

3.3 共同試験

本法の感度等を確認するため、非明示の6点反復で共通試料による共同試験を実施した。共通試料には、シカ肉粉を添加した原料混合肉骨粉（添加濃度：0.05 %、0.1 %及び無添加）を用いた。参加試験室は一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、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8試験室）であった。

シカ由来 DNA の PCR による検出法における共同試験の結果を Table 4 に示した。シカ肉粉を添加した全ての試料（0.05 %、0.1 %）は、全ての参加試験室でシカ陽性と判定され、シカ肉粉無添加試料は、全ての試験室で陰性と判定された。従って、シカ肉粉を添加した全ての試料（0.05 %、0.1 %）における本法の感度は 100 %、偽陰性率は 0 %、シカ肉粉無添加試料における本法の特異性は 100 %、偽陽性率は 0 %であった。これらの結果から、本法における肉骨粉中のシカ肉粉としての検出下限は 0.05 %であることが示された。

共同試験に用いた機器及び電気泳動パターン撮影時に照射した紫外線波長を Table 5 に示した。今回用いられた紫外線波長は、7 試験室で 312 nm、1 試験室で 302 nm であり、この波長の違いによる試験結果への影響は見られなかった。

定性分析法の性能指標について、陽性であることが既知の試料において、規制値の合否を判定する定性法の感度は 95 %以上、偽陰性率は 5 %未満であることが要求されている⁸⁾。また、陰性であることが既知の試料において、定性法の特異性は 95 %以上、偽陽性率は 5 %未満であることが要求されている⁹⁾。今回の共同試験の結果、これらの要求事項を全て満たしていた。

Table 4 Collaborative study for DMM^{a)} contained in MBM^{b)}

Lab No.	Blind test ^{c)}																		Correct results ^{d)}
	Test samples (positives)												Test sample (negatives)						
	0.05 % DMM ^{b)}						0.1 % DMM						0 % DMM						
	Replicate number						Replicate number						Replicate number						
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
Sensitivity, %	100						100						-						
Specificity, %	-						-						100						
False-positive rates, %	-						-						0						
False-negative rates, %	0						0						-						

a) Deer meat meal

b) MBM (meat and bone meal) was prepared by mixing equal amounts of pork MBM and poultry by-product meal

c) +: positive, -: negative

d) Number of correct results in each laboratory

Table 5 Instruments and UV wavelength for producing color used in the collaborative study

Lab No.	Thermal cycler	Gel documentation system	
		Model of instrument	UV (nm)
1	GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems	AE-6932GXES-U, ATTO	312
2	GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems	WUV-M20, ATTO	312
3	Thermal Cycler Dice, TAKARA BIO	AE-6932GXES-US, ATTO	312
4	GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems	AE-6932GXES-U, ATTO	312
5	GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems	AE-6932GXES-U, ATTO	312
6	GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems	AE-6932GXES-U, ATTO	312
7	GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems	AE-6932GXES-U, ATTO	312
8	ProFlex PCR System, Thermo Fisher Scientific	Gel Doc XR, Bio-RAD	302

4 まとめ

肉骨粉中のシカ由来 DNA の PCR による検出法について、共同試験等の実施により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、適用が可能であると考えられた。

- シカ検出用プライマーによる特異性試験の結果、イノシシ及びクマに由来する全ての試料でシカ陰性と判定され、シカ検出用プライマーの高い特異性が確認された。
- 本法における肉骨粉中のシカ肉粉 (0.05 %, 0.1 %) としての感度は 100 %, 偽陰性率は 0 %, シカ肉粉無添加試料の特異性は 100 %, 偽陽性率は 0 %であった。

- 3) 本法における肉骨粉中のシカ肉粉としての検出下限は 0.05 %であった。

謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センターにおける関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 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).
- 2) 農林水産省令：飼料及び飼料添加物の成分規格に関する省令の一部を改正する省令，平成 28 年 9 月 20 日，農林水産省令第 60 号 (2016).
- 3) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部監視安全課長通知：野生鳥獣肉の衛生管理等に関する実態調査の結果について，平成 28 年 9 月 21 日，生食監発 0921 第 1 号 (2016).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の規定に基づく動物由来たん白質及び動物性油脂の農林水産大臣の確認手続について，平成 17 年 3 月 11 日，消安第 9574 号 (2005).
- 5) 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).
- 6) 特許登録：特許第 5682074 号，特許出願番号：特願 2013-185418，発明の名称 動物由来 DNA 検出用プライマー配列.
- 7) Naoki Shinoda: The studies on PCR for detection of animal derived materials in feed, Tokyo University, Ph.D. thesis (2011).
- 8) EU: Commission decision of 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF>, cited 15 Dec. 2017.
- 9) AOAC Int: AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (2002).

2 肉骨粉中のシカ由来たん白質の ELISA キットによる検出法の確立

武田 然也^{*1}, 宮野谷 杏^{*2}, 橋本 仁康^{*3}, 関口 好浩^{*1}, 橋本 亮^{*1}

Validation Study on Detection Method for Deer Protein in Meat and Bone Meal by ELISA

Zenya TAKEDA^{*1}, Kyo MIYANOYA^{*2},

Yoshiyasu HASHIMOTO^{*3}, Yoshihiro SEKIGUCHI^{*1} and Sayaka HASHIMOTO^{*1}

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

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

^{*3} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Kobe Regional Center, FAMIC))

An ELISA method to detect deer protein in meat and bone meal (MBM) was validated. It uses Morinaga Heat-treated Bovine Protein ELISA kit Ver.2 (Morinaga kit Ver.2, Morinaga Institute of Biological Science Inc., Yokohama, Japan) which is listed in the Feed Analysis Standard of Japan for the qualitative detection of bovine protein.

The specificity of the Morinaga kit Ver.2 was assessed by testing deer raw meat, deer meat meal (DMM), wild boar raw meat, wild boar meat meal, bear raw meat, bear meat meal, pork MBM, poultry by-product meal, and pork and poultry MBM respectively. Only samples of deer raw meat and DMM were identified positive. This result indicates that the Morinaga kit Ver.2 is suitable for the detection of deer protein in addition to bovine protein.

The sensitivity of the Morinaga kit Ver.2 was assessed using samples of pork and poultry MBM added with 0.02 %, 0.03 % and 0.05 % of DMM. The LOD of the Morinaga kit Ver.2 was 0.05 % of DMM in pork and poultry MBM.

This method was thus validated for use in the inspection of deer protein in MBM, etc.

Key words: deer protein, ELISA, Morinaga Heat-treated Bovine Protein ELISA Kit Ver.2, meat and bone meal

キーワード：シカ由来たん白質；ELISA；モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2；肉骨粉

1 緒 言

我が国で牛海綿状脳症（BSE）の発生が確認されて以来、飼料原料として利用できる動物由来たん白質は制限されているところであるが¹⁾、近年における野生鳥獣による農作物の被害拡大に伴い、イノシシの捕獲頭数が急増し、捕獲された個体の処理が緊急の課題となり、平成 28 年 9 月 20 日より、イノシシを豚と同等とみなし、飼料の原料として利用できるようになった²⁾。

イノシシをと殺、解体処理する獣肉処理施設（食品衛生法に基づく食肉処理業の許可を受けた施設。）の大半は、シカのと殺、解体処理も行っていることから³⁾、イノシシ由来たん白質を飼料の原料として利用するに当たっては、農林水産大臣の確認手続⁴⁾の下で、伝達性海綿状脳症の発生の

^{*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 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肥飼料安全検査部，現 神戸センター

予防の観点から飼料の原料としての利用が禁止されているシカ残さとの分別管理を徹底することが重要となる。この分別管理が適切に行われていることを確認するためには、イノシシを原料とする肉骨粉等にシカ由来たん白質が混入していないことを確認するための試験方法を確立する必要がある。その試験方法としては、たん白質を検出する ELISA 法とポリメラーゼ連鎖反応を利用し DNA を検出する試験法が考えられた。

森永生科学研究所製「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2」（以下「モリナガキット Ver.2」という。）は、ウシミオグロビンに対するモノクローナル抗体を用いた市販キットであり⁵⁾、牛由来たん白質の検出に用いられるキットとして飼料分析基準⁶⁾に定められている。ウシミオグロビンのアミノ酸配列について、National Center for Biotechnology Information の相同性検索プログラム⁷⁾を用いて相同性検索を行ったところ、シカ由来のミオグロビンのアミノ酸配列と相同性が極めて高かったことから、モリナガキット Ver.2 はシカ由来たん白質の検出にも利用できると考えられた。

そこで、イノシシを原料とする肉骨粉等からシカ由来原料を検出する試験方法として、モリナガキット Ver.2 を用いた ELISA による方法の適用性を検討したので、その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

1) シカ生肉及び肉粉

ホンシュウジカ (*Cervus nippon centralis*) のもも肉及びエゾシカ (*Cervus nippon yesoensis*) のロース肉を精肉店より入手し用いた。肉粉はそれぞれの生肉を 1~2 cm 角に切り、133 °C で 20 分間、高圧蒸気滅菌し、105 °C で恒量となるまで乾燥した後、1 mm 程度の粒径になるまでミルサーにより粉砕した。

2) イノシシ生肉及び肉粉

イノシシのもも肉を精肉店より入手し用いた。肉粉は生肉を 1~2 cm 角に切り、133 °C で 20 分間、高圧蒸気滅菌し、105 °C で恒量となるまで乾燥した後、目開き 1 mm のふるいを通るまでミルサーにより粉砕した。

3) クマ生肉及び肉粉

ツキノワグマのもも肉を精肉店より入手し用いた。肉粉は生肉を 1~2 cm 角に切り、133 °C で 20 分間、高圧蒸気滅菌し、105 °C で恒量となるまで乾燥した後、目開き 1 mm のふるいを通るまでミルサーにより粉砕した。

4) 豚肉骨粉、チキンミール及び原料混合肉骨粉

豚肉骨粉及びチキンミールは、国内の飼料製造業者より入手したものを目開き 1 mm のふるいを通るまでミルサーにより粉砕したものとした。原料混合肉骨粉は、粉砕した豚肉骨粉とチキンミールを等量混合して調製した。

5) シカ肉粉添加試料

シカ肉粉とイノシシ肉粉を乳鉢で混合し、10 %シカ肉粉添加試料を調製した。10 %シカ肉粉添加試料をさらに原料混合肉骨粉で段階希釈し、0.02 %、0.03 %、0.05 %、0.1 %、0.5 %及び 1 %シカ肉粉添加試料を調製した。

2.2 試薬

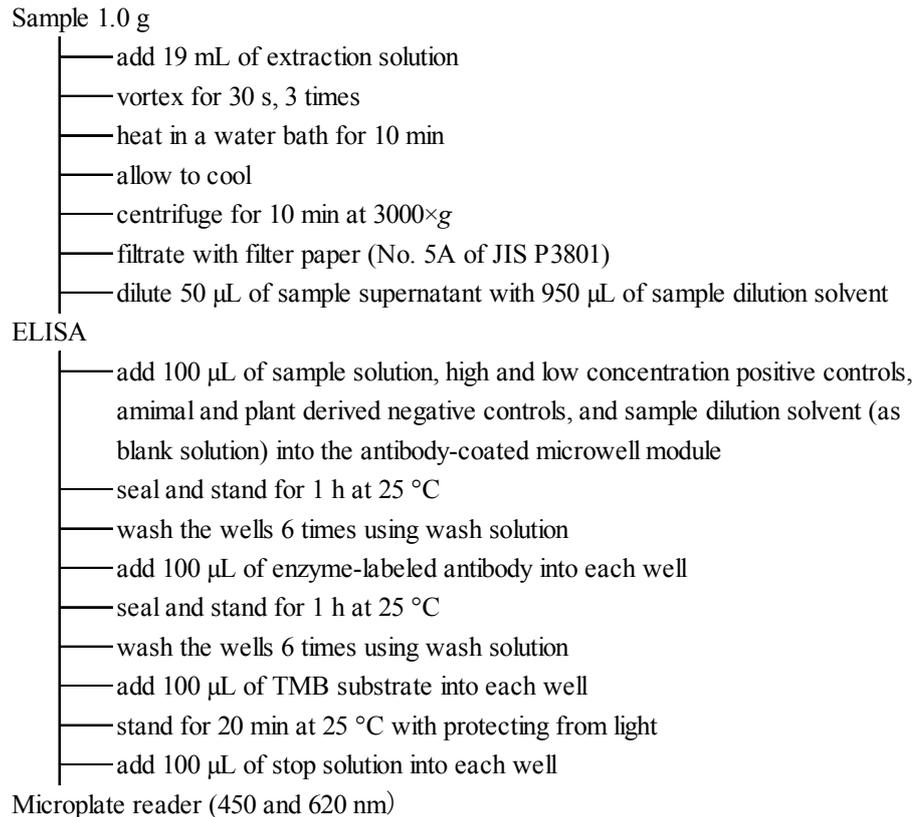
- 1) ELISA キット モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2 森永生科学研究所製
- 2) 抽出溶媒 ELISA キットに付属の抽出溶媒濃縮液 A 液 100 mL, 抽出溶媒濃縮液 B 液 100 mL 及び抽出溶媒濃縮液 C 液 100 mL を混合し, 蒸留水を加えて 1000 mL とした.
- 3) 洗浄液 ELISA キットに付属の洗浄液 (20 倍濃縮液) 50 mL に蒸留水を加えて 1000 mL とした.
- 4) 検体希釈液 ELISA キットに付属の検体希釈液 (10 倍濃縮液) 5 mL に蒸留水を加えて 50 mL とした.
- 5) 高濃度陽性対照液, 低濃度陽性対照液, 動物由来陰性対照液, 植物由来陰性対照液, 抗体固相化モジュール, 酵素標識抗体溶液, 酵素基質溶液及び反応停止液は, ELISA キットに付属のものを用いた.

2.3 装置及び器具

- 1) ミルサー : IFM-300DG 岩谷産業製
- 2) 振とう機 : VORTEX-GENIE2 Scientific Industries 製
- 3) 遠心分離機 : 5500 久保田製作所製
- 4) マイクロプレートリーダー : Sunrise Rainbow Thermo TECAN 製
- 5) プレートウォッシャー : 簡易型 96 穴プレート洗浄器 ファスマック製
- 6) 8 チャンネルピストン式ピペット : Research M (30~300 μ L) Eppendorf 製

2.4 試験方法

飼料分析基準第 17 章第 2 節 1.1 の(3)に記載されている方法に基づき実施した。試験法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Procedure of Heat-treated Bovine Protein ELISA Kit (Morinaga kit Ver.2) assay

3 結果及び考察

3.1 特異性試験

シカ肉、イノシシ肉、クマ肉、豚肉骨粉、チキンミール及び原料混合肉骨粉を用いてモリナガキット Ver.2 の反応性を確認した。シカについては、種類による反応性の違いがないことを確認するため、日本で食肉処理される主なシカの種類として、ホンシュウジカ及びエゾシカの2種類のシカ肉を用いて試験を行った。また、イノシシと同じ施設で解体・食肉処理を行う可能性のある動物としては、シカの他にクマも考えられたため、クマ肉についても試験を行った。その結果は Table 1 のとおり、イノシシ生肉及び肉粉、クマ生肉及びクマ肉粉、豚肉骨粉、チキンミール並びに原料混合肉骨粉についてはいずれも陰性と判定された。ホンシュウジカ及びエゾシカ由来の生肉及び肉粉については、いずれも陽性と判定され、シカの種類による反応性の違いは見られなかった。このことから、モリナガキット Ver.2 はシカ由来たん白質の検出にも適用できることが確認された。

Table 1 Specificity tests of Morinaga kit Ver.2^{a)} assay for various animal meat and meal

Sample	O.D. ^{d)}		Number of samples (Detected ^{e)} / Tested)
	Min	Max	
Boar raw meat	0.010	0.012	0/2
Boar meat meal	0.022	0.024	0/2
Bear raw meat	0.011	0.029	0/2
Bear meat meal	0.023	0.034	0/2
Pork MBM ^{b)}	0.015	0.015	0/2
Poultry by-product meal	0.007	0.008	0/2
Pork and poultry MBM ^{c)}	0.010	0.011	0/2
Deer meat (<i>Cervus nippon centralis</i>)	0.460	0.500	2/2
Deer meat meal (<i>Cervus nippon centralis</i>)	3.531	3.535	2/2
Deer meat (<i>Cervus nippon yesoensis</i>)	0.474	0.507	2/2
Deer meat meal (<i>Cervus nippon yesoensis</i>)	3.525	3.561	2/2

a) Heat-treated Bovine Protein ELISA Kit (Morinaga Institute of Biological Science Inc., Yokohama, Japan)

b) Meat and bone meal

c) Pork and poultry MBM was prepared by mixing equal amounts of pork MBM and poultry by-product meal.

d) Difference between absorbance at 450 nm and 620 nm

e) Cut-off value is mean O.D. of the low positive control. The values were 0.064 to 0.086 in these tests.

3.2 感度試験

原料混合肉骨粉にホンシュウジカ肉粉又はエゾシカ肉粉をそれぞれ 0.02 %、0.03 %及び 0.05 %添加した試料を用いて、感度試験を実施した。その結果は Table 2 のとおり、0.05 %シカ肉粉添加試料については全て陽性と判定された。0.03 %シカ肉粉添加試料については、ホンシュウジカ肉粉添加試料では全て陽性と判定されたが、エゾシカ肉粉添加試料ではおよそ半数が陰性と判定された。全般的にエゾシカ肉粉添加試料がホンシュウジカ肉粉添加試料と比較して測定値が低い傾向を示したが、これは、用いたホンシュウジカ肉及びエゾシカ肉がそれぞれもも肉及びロース肉であり、各肉粉に含まれる脂肪分に違いがあることから、試料中のたん白質含量の差が測定値に影響したと考えられた。イノシシを解体・食肉処理を行う過程で混入する可能性があるシカ由来たん白質は、シカの様々な部位に由来することが考えられる。シカ肉の部位等により測定値にばらつきがあることを考慮すると、シカ肉粉としての検出下限は 0.05 %程度と推定された。

Table 2 Sensitivity tests of Morinaga kit Ver.2^{a)} assay for detection of DMM^{b)} contained in pork and poultry MBM^{c)}

Sample	Spiked level of DMM	O.D. ^{d)}		Number of samples (Detected ^{e)} / Tested)
		Min	Max	
Pork and poultry MBM containing DMM (<i>Cervus nippon centralis</i>)	0.02 %	0.035	0.088	10/20
	0.03 %	0.060	0.117	20/20
	0.05 %	0.103	0.182	20/20
Pork and poultry MBM containing DMM (<i>Cervus nippon yesoensis</i>)	0.02 %	0.040	0.065	2/20
	0.03 %	0.052	0.084	11/20
	0.05 %	0.075	0.163	20/20

a) Heat-treated Bovine Protein ELISA Kit (Morinaga Institute of Biological Science Inc., Yokohama, Japan)

b) Deer meat meal

c) Pork and poultry MBM (meat and bone meal) was prepared by mixing equal amounts of pork MBM and poultry by-product meal.

d) Difference between absorbance at 450 nm and 620 nm

e) Cut-off value is mean O.D. of the low positive control. The values were 0.047 to 0.084 in these tests.

4 まとめ

肉骨粉中のシカ由来たん白質の検出法について、モリナガキット Ver.2 を用いた ELISA 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、次の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) シカ肉、イノシシ肉、クマ肉、豚肉骨粉、チキンミール及び原料混合肉骨粉を用いて当該キットの反応性を確認したところ、シカ肉由来の試料のみが陽性と判定された。
- 2) シカ肉粉を添加した原料混合肉骨粉を用いて感度試験を行った結果、検出下限はシカ肉粉として 0.05 %程度であった。

文 献

- 1) 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).
- 2) 農林水産省令：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，平成 28 年 9 月 20 日，農林水産省令第 60 号 (2016).
- 3) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部監視安全課長通知：野生鳥獣肉の衛生管理等に関する実態調査の結果について，平成 28 年 9 月 21 日，生食監発 0921 第 1 号 (2016).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の規定に基づく動物由来たん白質及び動物性油脂の農林水産大臣の確認手続について，平成 17 年 3 月 11 日，16 消安第 9574 号 (2005).
- 5) Takayuki Yamamoto, Masatoshi Kato, Kiwamu Endo, Satoshi Kotoura and Zenya Takeda: Detection of ruminant meat and bone meal in feeds by sandwich ELISA with monoclonal antibodies, The Journal of Veterinary Medical Science, 77 (12), 1605-1609 (2015).

-
- 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) National Center for Biotechnology Information: Basic Local Alignment Search Tool,
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, cited 18 Dec. 2017

技術レポート**1 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**

鈴木 知華*, 安田 紗紀恵*

**Study of Crude Fat Measurement Methods in Dried Whole Milk
and Formula Feed Using it as a Main Ingredient**

Chika SUZUKI* and Sakie YASUDA*

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

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 was investigated.

In the RG method, a sample was weighed and transferred into a Mojonnier flask, 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. Then, the liberated fat was liquid-liquid extracted with diethyl ether and petroleum ether. After diethyl ether and petroleum ether were evaporated, the residue was dried at 100 °C to 105 °C for 1 hour, and the crude fat was weighed. 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. After washing diethyl ether layer with water, the diethyl ether was evaporated. The residue was dried at 95 °C to 100 °C for 3 hours, and the crude fat was weighed.

Measured values which had been made available by the RG and AH/EE methods from the dried whole milk, formula feed mainly composed of dried whole milk, and a reference material were compared. The ratio of the measured value of the AH/EE method to the RG method ranged from 1.00 to 1.04. The result of the paired *t*-test was: $t(12) = 5.244$ and $p = 0.0002$, which indicated a significant difference. This suggests the AH/EE method requires some modifications to obtain equivalent results to the RG method.

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

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、飼料製造事業者から、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あることを理由に、酸

* 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

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、レーゼ・ゴットリーブ法が国際的な標準分析法として広く用いられており²⁾、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。）にも収載されている。このため、レーゼ・ゴットリーブ法及び酸分解法による上記飼料に対する粗脂肪の測定値の改善並びに二法間の測定値の同等性を評価し、レーゼ・ゴットリーブ法及び酸分解法の適用性を確認したので、その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

1 mm の網ふるいを通過した 9 種類の全脂粉乳及び全脂粉乳を主原料とする 3 種類の配合飼料を用いた。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、脂質としてレーゼ・ゴットリーブ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

- 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。
- 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) レーゼ・ゴットリーブ法

分析試料 1.0 g を量ってマジョニア管に入れ、水 8.5 mL を加え、加温しながら溶解するまで振とうした後、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 を加え混合し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。更に石油エーテル 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 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、75 °C 以下の水浴で乾固した。

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後、ジエチルエーテル 15 mL を加え、手で 1 分間激しく振り混ぜた。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、75 °C 以下の水浴で乾固した。

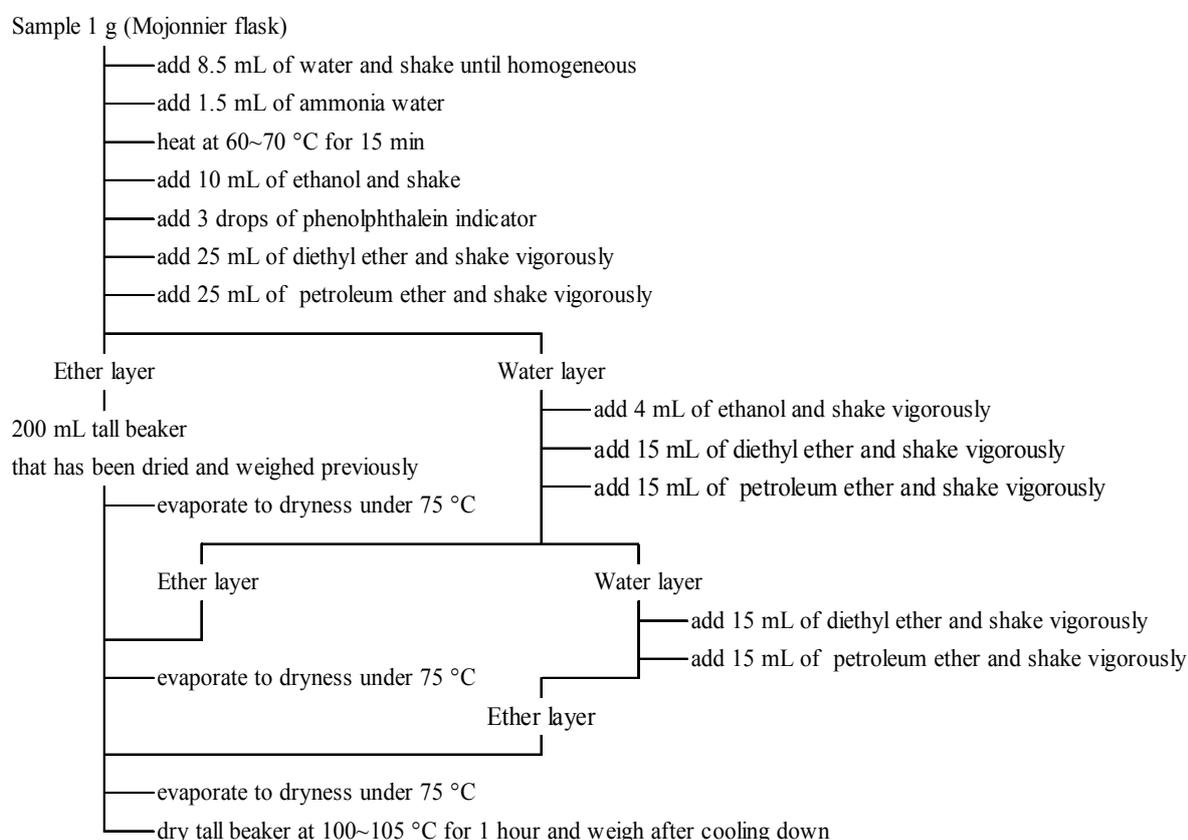
次に、エタノールの添加を省略し、同様に操作した。トールビーカー内の溶媒を 75 °C 以下の水浴で乾固し、100~105 °C で 1 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量り、試料中の粗脂肪量を算出した。

なお、測定法の概要を Scheme 1 に示した。

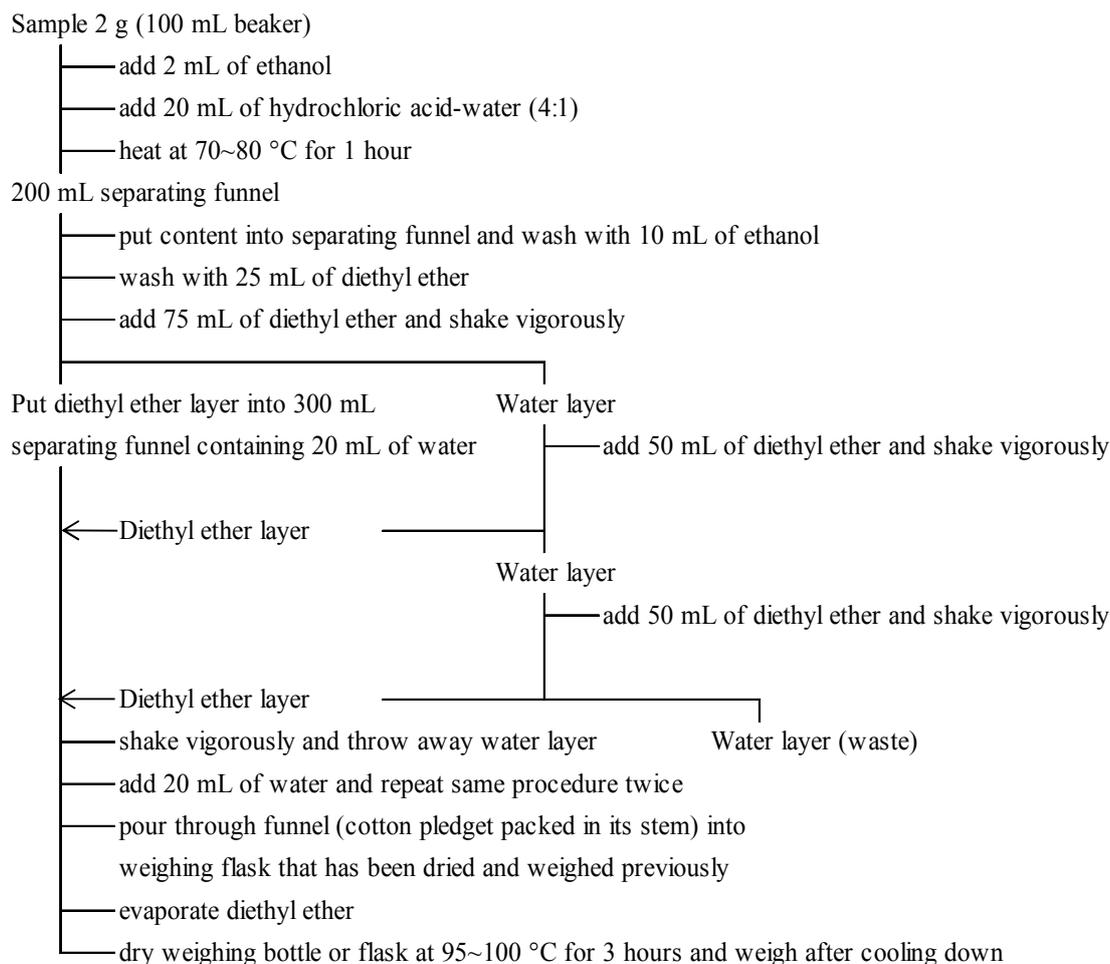
2) 酸分解法

飼料分析基準第 3 章 3.2 の方法によった。

なお、測定法の概要を Scheme 2 に示した。



Scheme 1 Measurement procedure (Rose-Gottlieb method)



Scheme 2 Measurement procedure (acid hydrolysis and ether extraction method)

3 結果及び考察

9 種類の全脂粉乳及び全脂粉乳を主原料とする 3 種類の配合飼料を用い、2.3 に従って粗脂肪の測定値を得た。なお、乳等省令に定められている全脂粉乳中の乳脂肪分の成分規格は 25.0 %以上（全脂粉乳 2 は山羊の乳であるため除く）であり、このときの配合飼料の設計値はほ乳期子豚育成用 1 で 19.25 %，ほ乳期子豚育成用 2 及びほ乳期子牛育成用代用乳用では 18.75 %である。結果は Table 2 のとおりであり、両法ともに成分規格及び設計値を上回る結果であった。また、レーゼ・ゴットリーブ法に対する酸分解法の測定値の比は 1.00~1.04 であった。測定値について対応のある t -検定を行った結果、 $t(12) = 5.244$, $p = 0.0002$ であり、有意水準 5 %で測定値に有意な差が認められた。酸分解法がレーゼ・ゴットリーブ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、レーゼ・ゴットリーブ法と同等の結果を得るには、酸分解法の改良が必要であることを示唆した。

なお、レーゼ・ゴットリーブ法の繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 0.40 %以下、酸分解ジエチルエーテル抽出法の繰返し精度は、 RSD_r として 1.4 %以下であった。

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

Sample types	Rose-Gottlieb method		Acid hydrolysis method		Ratio of the measured value (Acid hydrolysis method /Rose-Gottlieb method)
	Crude fat ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Crude fat ^{a)}	RSD _r ^{b)}	
	(%)	(%)	(%)	(%)	
Dried whole milk 1	25.46	0.13	25.64	0.25	1.01
Dried whole milk 2	30.89	0.11	31.06	0.27	1.01
Dried whole milk 3	26.55	0.18	27.07	0.17	1.02
Dried whole milk 4	26.43	0.17	26.58	0.39	1.01
Dried whole milk 5	25.90	0.20	26.25	0.44	1.01
Dried whole milk 6	26.32	0.22	26.91	0.31	1.02
Dried whole milk 7	25.43	0.04	26.01	0.35	1.02
Dried whole milk 8	25.83	0.19	26.21	0.38	1.01
Dried whole milk 9	25.81	0.08	26.28	0.47	1.02
Formula feed for suckling pigs 1	20.86	0.37	20.88	0.46	1.00
Formula feed for suckling pigs 2	20.01	0.17	20.67	0.42	1.03
Formula feed for milk replacer for suckling calves	20.63	0.12	20.82	0.27	1.01
Reference material	20.18	0.40	21.01 ^{c)}	1.4	1.04

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Mean ($n = 6$)

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、レーゼ・ゴットリーブ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) 9種類の全脂粉乳及び全脂粉乳を主原料とする3種類の配合飼料について、レーゼ・ゴットリーブ法及び酸分解法による測定を行った結果、測定値の比は1.00~1.04であった。
- 2) レーゼ・ゴットリーブ法及び酸分解法による測定値について対応のある t -検定を行った結果、 $t(12) = 5.244$, $p = 0.0002$ であり測定値に有意な差が認められた。
- 3) 酸分解法は、レーゼ・ゴットリーブ法と同等の結果を得るには、改良が必要であることが示唆された。
- 4) レーゼ・ゴットリーブ法の繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 0.40 %以下、酸分解ジエチルエーテル抽出法の繰返し精度は RSD_r として 1.4 %以下であった。

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) AOAC Int. (2016). AOAC Official Method 932.02 Fat (crude) or Ether Extract in Dried Milk Products. In official methods of analysis of AOAC Int. 20 ed., 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).

技術レポート

2 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

新井 詠子^{*1}, 三枝 尚子^{*1}, 山本 克己^{*2}Development of Determination Method of Ferimzone
in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MSEiko ARAI^{*1}, Naoko SAEGUSA^{*1} and Katsumi YAMAMOTO^{*2}(*¹ Sendai Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),*² Sendai Regional Center, FAMIC (Now Kobe Regional Center, FAMIC))

For determining the concentration of (*Z*)-ferimzone and (*E*)-ferimzone in rice straw, whole-crop rice silage (WCRS) and paddy rice for feed, a quantitative method using a liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS) was developed.

After adding water to a sample, ferimzones were 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 carried out on an ODS column (Inertsil ODS-SP, 2.1 mm i.d. × 100 mm, 3 μm, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on rice straw, WCRS and paddy rice. (*Z*)-ferimzone and (*E*)-ferimzone were intentionally added at the levels of 0.2 and 20 mg/kg for rice straw, 0.2 and 5 mg/kg for paddy rice, and 0.1 and 9 mg/kg for WCRS respectively. The resulting mean recoveries ranged from 88.9 % to 94.5 % for (*Z*)-ferimzone, and 83.5 % to 90.9 % for (*E*)-ferimzone respectively. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 8.0 % for (*Z*)-ferimzone, and less than 7.4 % for (*E*)-ferimzone.

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

キーワード：フェリムゾン；フェリムゾン *Z* 体；フェリムゾン *E* 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；飼料用イネ；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米

1 緒 言

フェリムゾンは、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、粃米中で 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、

*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 神戸センター

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* 体及びフェリムゾン *E* 体と呼称する。）の和（以下「総フェリムゾン」という。）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、飼料中の定量法はなく、その確立が急務となっている。

今回、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等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⁴⁾（以下「JFRL 法」という。）を基に、飼料用イネ（稲わら、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）及び粃米）中のフェリムズンを対象とした飼料分析基準⁵⁾への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考として、フェリムゾン *Z* 体及び *E* 体の構造式等を Fig. 1 に示した。

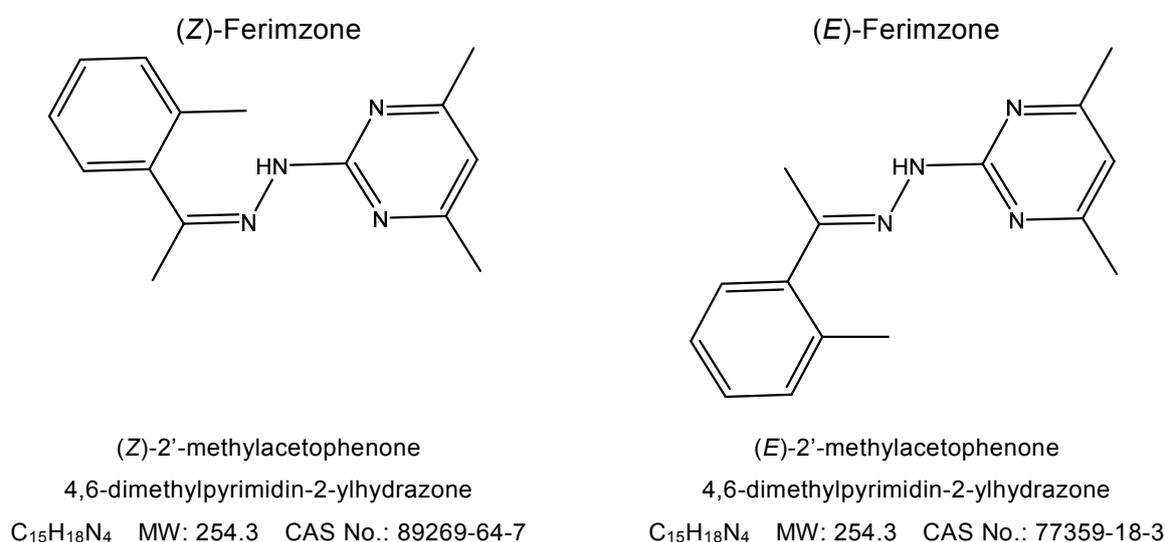


Fig. 1 Chemical structures of (*Z*)-ferimzone and (*E*)-ferimzone

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び粃米は、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 以下で 20 時間乾燥し、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉碎した。

2.2 試薬

1) アセトンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。アセトニトリルは LC/MS 用（関東化学製）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 *Z* 体標準原液

フェリムゾン *Z* 体標準品（和光純薬工業製，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。）。

3) フェリムゾン E 体標準原液

フェリムゾン E 体標準品（和光純薬工業製，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．）．

4) フェリムゾン混合標準液

使用に際して，各標準原液 1 mL を 50 mL の褐色全量フラスコに入れて混合し，更に標線までアセトンを加えてフェリムゾン混合標準原液を調製した．（この液 1 mL は，フェリムゾン Z 体及び E 体として各 10 µg を含有する．）．フェリムゾン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 Z 体及び E 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．

2.3 装置及び器具

1) 粉砕機

粉砕機 1（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）1430 rpm）

粉砕機 2（粳米用）：ZM-100 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，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) 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

2.4 定量方法

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（粳米は 20 mL）を加え，30 分間静置後，更にアセトン 120 mL（粳米は 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 程度で吸引して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，フェリムゾンを溶出させた．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. × 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	
(Z)-Ferimzone and (E)-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高さを求めて検量線を作成し、試料中のフェリムゾン Z 体量及びフェリムゾン E 体量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Under the light-shielding conditions

Sample 10.0 g (200 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 (No. 5B of JIS P 3801) 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 (*Z*)-ferimzone and (*E*)-ferimzone

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 4) に従って調製した各混合標準液各 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ピーク高さを用いてフェリムゾン *Z* 体及び *E* 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. 2-1 及び 2-2 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。

なお、当該検量線の濃度範囲は、フェリムゾン *Z* 体及び *E* 体としてそれぞれ 0.1~50 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各フェリムゾン濃度範囲に相当する。

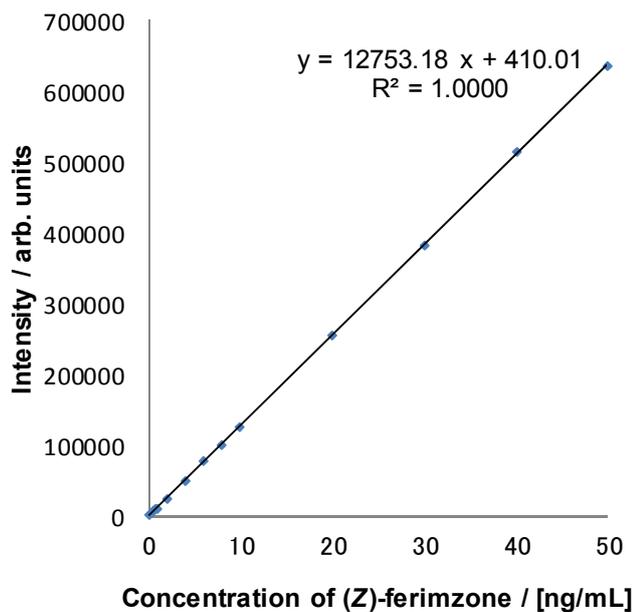


Fig. 2-1 Calibration curve of (Z)-ferimzone by peak height

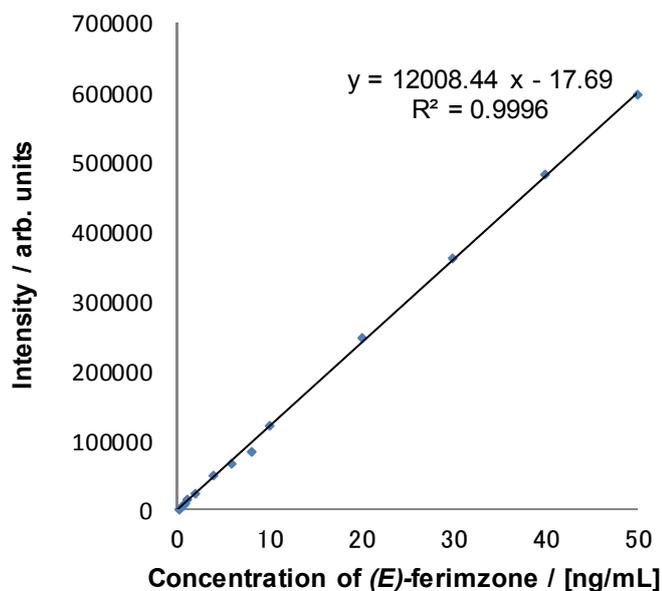


Fig. 2-2 Calibration curve of (E)-ferimzone by peak height

3.2 異性化に関する検討

フェリムゾン Z 体及び E 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。そこで異性化を抑えるため、定量操作条件を検討した。2.2 の 2) 及び 3) に従って調製したフェリムゾン Z 体標準原液及び E 体標準原液について、アセトニトリル-水 (3+2) で 20 ng/mL の標準液となるよう希釈し、Fig. 3 のとおり、単独のピークが得られることを確認した。また各標準原液をアセトンで希釈し、フェリムゾン Z 体又は E 体として、粳米について 5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 ng/mL）になるようにそれぞれ添加してよく混合し、遮光条件下で一夜静置した後、日光の入らない試験室において、遮光条件下（紫外線カット照明下で共栓三角フラスコ及び全量フラスコは褐色ガラス製）及び遮光せず（白色蛍

光灯下で共栓三角フラスコ及び全量フラスコは透明ガラス製) に定量した. その結果, 定量操作で得られた測定溶液ではいずれも添加していない異性体のピークが検出されたことから, 定量結果への異性化の影響を確認するため, 総フェリムゾンとしての平均回収率及び繰返し精度を算出した. 添加したフェリムゾン (フェリムゾン *Z* 体又は *E* 体) 及びその異性体のそれぞれのピークについて, 検量線に基づき濃度を決定した後足し合わせたものを総フェリムゾン濃度とし, その添加量に対する割合を総フェリムゾンの回収率とした.

結果は Table 3 のとおり, 特にフェリムゾン *E* 体において遮光することにより平均回収率及び繰返し精度の改善が認められ, また総フェリムゾンの平均回収率に対するフェリムゾン *E* 体の平均回収率の割合が改善された. これらのことは, 遮光することにより異性化が軽減されたことを示唆している. したがって, 本法における定量操作はすべて遮光条件下で行うこととした.

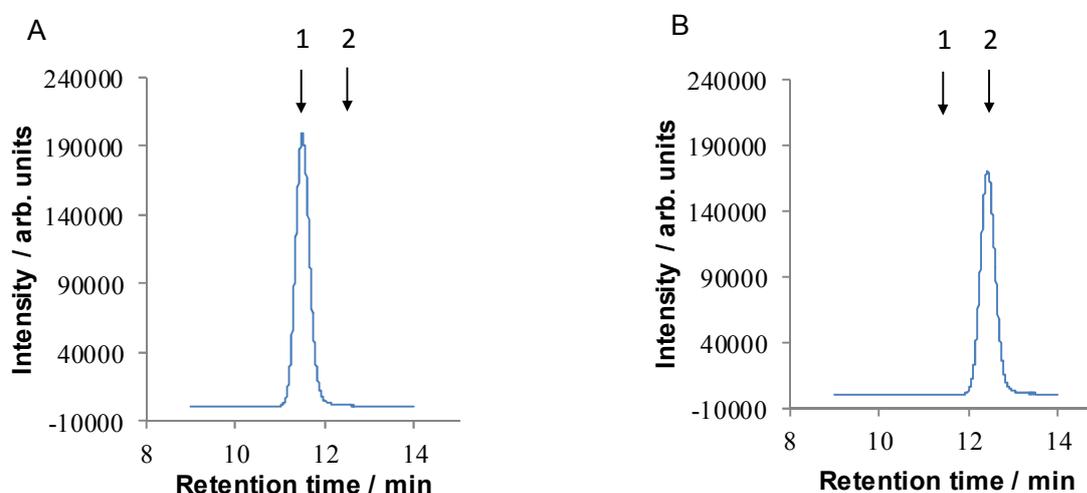


Fig. 3 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of standard solution of (*Z*)-ferimzone and (*E*)-ferimzone

(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: Standard solution of (*Z*)-ferimzone (20 ng/mL)

B: Standard solution of (*E*)-ferimzone (20 ng/mL)

Table 3 Comparison of recoveries between lighting conditions

Spiked isomer of ferimzones	Condition of room lighting	Spiked level (mg/kg)	Spiked isomer		Total ferimzones ^{a)}	
			Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)
(Z)-Ferimzone	shading ^{d)}	5	91.7	1.4	98.4	1.6
	no shading ^{e)}		90.0	1.2	95.8	1.2
(E)-Ferimzone	shading ^{d)}	5	88.2	2.0	95.3	2.0
	no shading ^{e)}		70.9	16	81.7	14

a) Calculated from the total amount of (Z)-ferimzone and (E)-ferimzone

b) Mean ($n = 5$)

c) Relative standard deviation of repeatability

d) Conducted under the lighting having been removed ultraviolet rays, in a laboratory that daylight doesn't enter, and using brown glass apparatuses

e) Conducted under the fluorescent lighting, and using clear glass apparatuses

3.3 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分の確認

稲わら, WCRS 及び粃米を 2.4 の 1) に従って吸引ろ過まで操作し, 得られたろ液にフェリムゾン Z 体及び E 体を, 稲わら及び WCRS について各 10 mg/kg 相当量 (WCRS は風乾物中濃度, 最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量), 粃米について各 2.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量) 添加した後, 標線までアセトンを加えた. これを 2.4 の 1) 及び 2) に従って調製し, オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分を確認した. 溶出液量について, JFRL 法においては 10 mL のアセトニトリル-水 (3+2) をミニカラムに加えて溶出させているが, 本法においては標線を越えることがないよう 9 mL とした.

結果は Table 4 のとおりであり, 稲わら, WCRS 及び粃米について, いずれの農薬も 0~9 mL の画分に大部分が溶出したが, 9~14 mL の画分においても溶出が見られたため, 15 mL のアセトニトリル-水 (3+2) による溶出を検討した. 溶出液量による回収率の違いを確認するため, フェリムゾン Z 体及び E 体を稲わら及び WCRS について各 20 mg/kg 相当量, 粃米について各 5 mg/kg 相当量添加し, 2.4 の 1) 及び 2) に従って調製して, 9 mL 及び 15 mL のアセトニトリル-水 (3+2) でそれぞれ溶出し, 同溶媒で 10 mL 及び 20 mL にそれぞれ定容して, 回収率を求めた. 結果は Table 5 のとおりであり, 溶出液量による回収率の違いは見られなかった.

また, 溶出液量によるマトリックス効果の違いを確認するため, 稲わら, WCRS 及び粃米を 2.4 の 1) 及び 2) に従って調製し, 9 mL 及び 15 mL のアセトニトリル-水 (3+2) でそれぞれ溶出して得られた液に, フェリムゾン Z 体及び E 体を稲わら及び WCRS については各 200 ng (試料中濃度として 20 mg/kg, WCRS は風乾物中濃度), 粃米については各 50 ng (試料中濃度として 5 mg/kg) 添加した. それぞれについてアセトニトリル-水 (3+2) で 10 mL 及び 20 mL に定容し, 2.2 の 4) に従って調製した同濃度のフェリムゾン Z 体及び E 体標準液に対するピーク高さ比を確認したところ, 結果は Table 5 のとおりであり, 溶出液量によるマトリックス効果の違いは見られなかった.

全てのマトリックスで, 9~14 mL の画分においてフェリムゾン Z 体及び E 体の溶出が見られたが, 溶出液量を 15 mL とした場合と同程度の添加回収率が得られたことから, 溶出液量は 9 mL とした.

Table 4 Elution pattern of (Z)-ferimzone and (E)-ferimzone from InertSep Slim-J C18-B

Samples	Recovery (%)						Total
	0~8 mL	8~9 mL	9~10 mL	10~14 mL	14~18 mL		
(Z)-Ferimzone	Rice straw	94.6	Tr.	1.1	Tr.	N.D.	95.7
	WCRS	102	Tr.	1.1	Tr.	N.D.	103
	Paddy rice	94.7	Tr.	Tr.	Tr.	N.D.	94.7
(E)-Ferimzone	Rice straw	91.7	Tr.	Tr.	Tr.	N.D.	91.7
	WCRS	95.8	Tr.	Tr.	Tr.	N.D.	95.8
	Paddy rice	93.0	0.5	0.5	Tr.	N.D.	94.0

$n = 1$

Tr.: S/N of the peak was less than 10, N.D.: Not detected

WCRS: whole-crop rice silage

Table 5 Effect of elution volume on recovery and matrix effect

Applied volume (mL)	Recovery (%)			Matrix effect ^{a)} (%)		
	Spiked level (mg/kg)	(Z)-Ferimzone	(E)-Ferimzone	Spiked level (ng)	(Z)-Ferimzone	(E)-Ferimzone
Rice straw	20	106	100	200	101	100
WCRS	9	20	110	200	101	102
Paddy rice	5	105	99.4	50	100	102
Rice straw	20	108	101	200	101	100
WCRS	15	20	107	200	100	100
Paddy rice	5	106	103	50	100	98.6

$n = 1$

WCRS: whole-crop rice silage

a) Calculated by the ratio of the peak height

3.4 妨害物質の検討

稲わら 2 検体, WCRS2 検体及び粳米 2 検体を試料として, 2.4 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. 4 に示した。

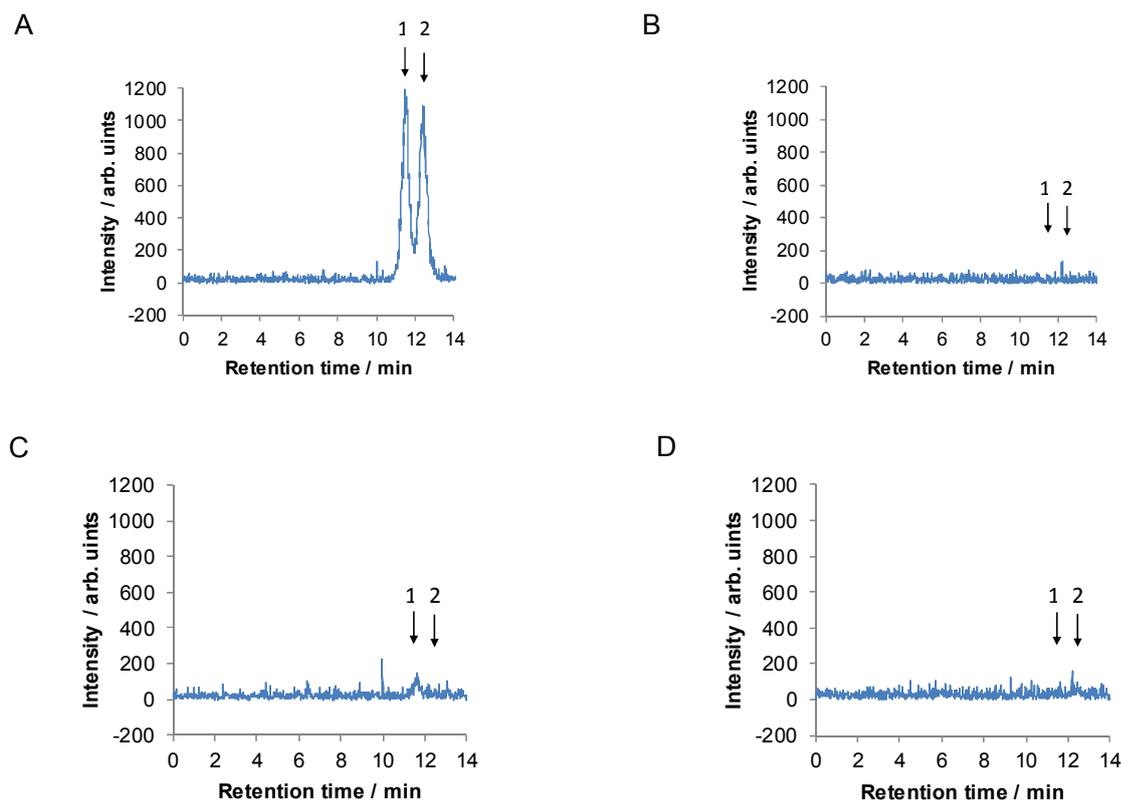


Fig. 4 SRM chromatograms of standard and blank solution

(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: Standard solution (0.2 ng/mL each),

B~D: Blank sample solution (B: rice straw, C: whole-crop rice silage (WCRS) and D: paddy rice)

3.5 マトリックス効果の確認

2.4の1)及び2)により10 mL褐色全量フラスコで受けた稲わら、WCRSのミニカラム溶出液に、1 mL中にフェリムゾンZ体及びE体を各400 ng含有する標準液を0.5 mL添加した。同様に粃米のミニカラム溶出液に、1 mL中にフェリムゾンZ体及びE体を各100 ng含有する標準液を0.5 mL添加した。それぞれ褐色全量フラスコの標線までアセトニトリル-水(3+2)を加えた後5000×gで5分間遠心分離し、上澄み液をマトリックス標準液とした。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フェリムゾンZ体及びE体標準液に対するピーク高さ比を確認したところ、Table 6のとおりであり、フェリムゾンZ体及びE体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 6 Matrix effect

Samples	Concentration of ferimzone		Matrix effect ^{b)}	
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample ^{a)} (mg/kg)	(%)	
			(Z)-ferimzone	(E)-ferimzone
Rice straw	0.2	0.2	104	104
	20	20	99	99
WCRS	0.2	0.2 ^{c)}	107	102
	20	20 ^{c)}	100	100
Paddy rice	0.2	0.2	105	102
	5	5	102	100

$n = 3$

WCRS: whole-crop rice silage

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak height of ferimzones in the presence of matrix to that in the absence of matrix

c) mg/kg air-dry matter

3.6 添加回収試験

2.2 の 2) 及び 3) に従って調製したフェリムゾン Z 体標準原液及び E 体標準原液をアセトンで正確に希釈し添加に用いた。

フェリムゾン Z 体又は E 体として、稲わらに 0.2 及び 20 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.2 及び 20 ng/mL），WCRS に原物換算して 0.1 及び 9 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.2 及び 20 ng/mL），粳米に 0.2 及び 5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.2 及び 5 ng/mL）になるようにそれぞれ添加してよく混合し、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得た。

なお、WCRS において、添加は風乾物試料に対してフェリムゾン Z 体又は E 体として 0.2 mg/kg 及び 20 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。

結果は Table 7 のとおりであり、フェリムゾン Z 体については平均回収率は 88.9~94.5 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD_r）として 8.0 % 以下，フェリムゾン E 体については平均回収率は 83.5~90.9 %，その繰返し精度は RSD_r として 7.4 % 以下の成績が得られ、いずれも飼料分析基準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ていた。なお、フェリムゾン Z 体を添加した場合の総フェリムゾンの平均回収率は 92.1~98.6 %，その繰返し精度は RSD_r として 7.1 % 以下，フェリムゾン E 体を添加した場合の総フェリムゾンの平均回収率は 89.2~99.2 %，その繰返し精度は RSD_r として 7.5 % 以下であった。

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 7 Recoveries of (Z)-ferimzone and (E)-ferimzone

Samples	Spiked level (mg/kg)	Spiked components							
		(Z)-Ferimzone				(E)-Ferimzone			
		Recovery of (Z)-ferimzone ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery of ferimzones ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery of (E)-ferimzone ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery of ferimzones ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Rice straw	0.2	89.3	8.0	92.1	7.1	89.6	1.8	91.0	3.4
	20	88.9	1.3	92.3	1.6	83.5	2.3	91.5	1.1
WCRS ^{c)}	0.1	94.5	3.7	98.6	4.4	90.9	5.2	99.2	4.3
	9	92.2	2.4	97.2	1.8	84.3	0.7	97.3	0.6
Paddy rice	0.2	90.5	4.6	94.3	5.1	85.4	7.4	89.2	7.5
	5	91.7	1.4	98.4	1.6	88.2	2.0	95.2	2.0

WCRS: whole-crop rice silage

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) The ferimzones were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.2 and 20 mg/kg air-dry matter for (Z)-ferimzone and (E)-ferimzone, respectively. The levels of ferimzones 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 ferimzones in original matter (moisture 60 %)

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

3.7 定量下限及び検出下限

フェリムゾン Z 体及び E 体の検量線が直線性を示した範囲、各 0.1~50 ng/mL の下端付近となる濃度（稲わら、WCRS（風乾物）及び粃米について 0.2 mg/kg 相当量、最終試料溶液中で 0.2 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、これをフェリムゾン Z 体及び E 体の定量下限の濃度とした。この濃度は、稲わら及び粃米のフェリムゾンの管理基準値（それぞれ 20 及び 5 mg/kg）に対してそれぞれ 1/100 及び 1/25、WCRS のフェリムゾンの管理基準値の風乾物中換算値（20 mg/kg）に対して 1/100 であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標を満たしていた。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の結果は良好であった。

また、本法の検出下限として添加回収試験により得られたピークから SN 比が 3 となる濃度を算出した結果、稲わら、WCRS（風乾物）及び粃米における検出下限は 0.04 mg/kg であった。

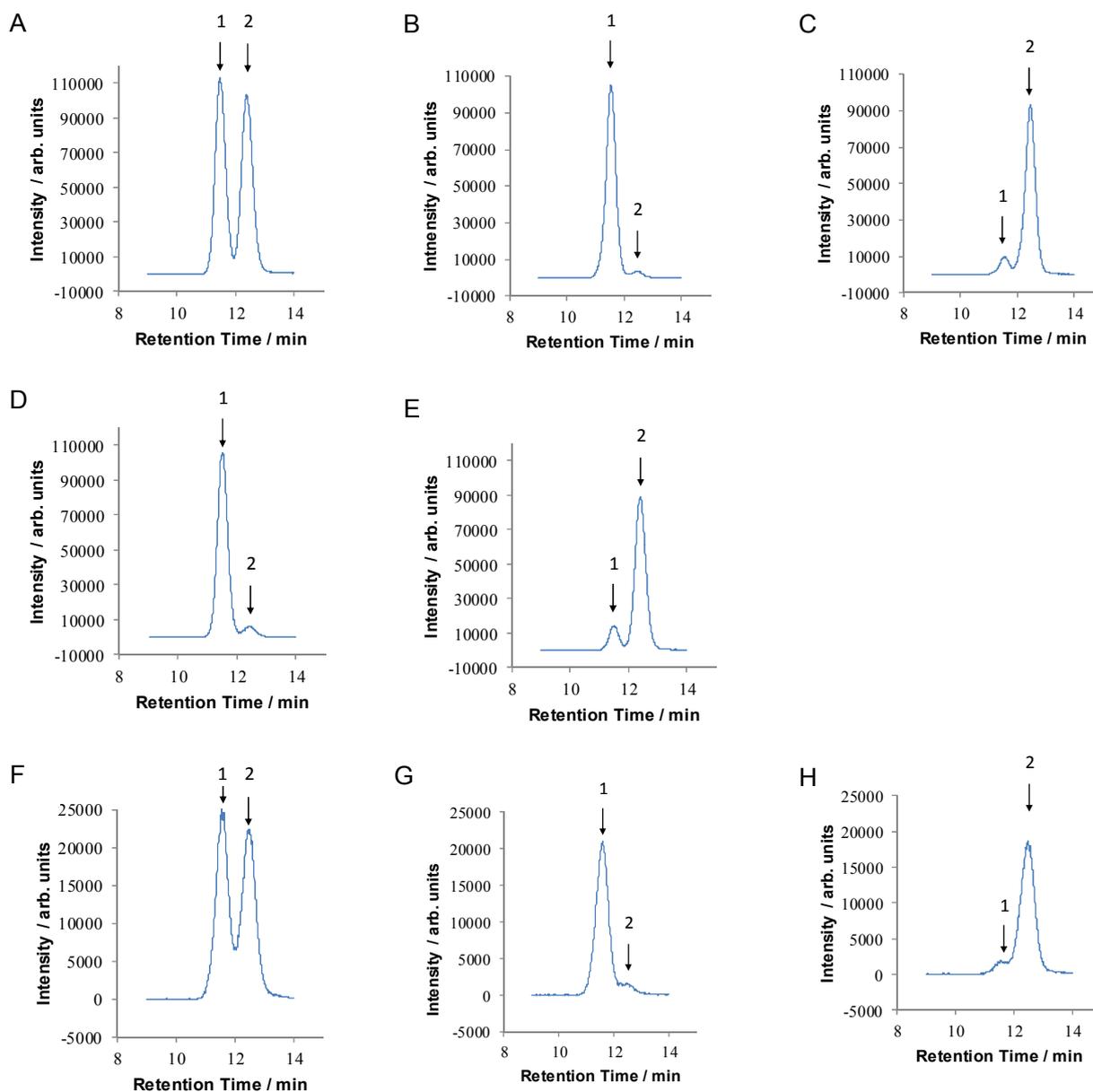


Fig. 5 SRM chromatograms on recovery test

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

- A: Standard solution of (*Z*)-ferimzone and (*E*)-ferimzone (20 ng/mL: 0.1 ng each)
- B: Sample solution of rice straw spiked at 20 mg/kg of (*Z*)-ferimzone (as 20 ng/mL in sample solution)
- C: Sample solution of rice straw spiked at 20 mg/kg of (*E*)-ferimzone (as 20 ng/mL in sample solution)
- D: Sample solution of WCRS spiked at 9 mg/kg original matter of (*Z*)-ferimzone (as 20 ng/mL in sample solution)
- E: Sample solution of WCRS spiked at 9 mg/kg original matter of (*E*)-ferimzone (as 20 ng/mL in sample solution)
- F: Standard solution of (*Z*)-ferimzone and (*E*)-ferimzone (5 ng/mL: 0.025 ng each)
- G: Sample solution of paddy rice spiked at 20 mg/kg of (*Z*)-ferimzone (as 5 ng/mL in sample solution)
- H: Sample solution of paddy rice spiked at 20 mg/kg of (*E*)-ferimzone (as 5 ng/mL in sample solution)

4 まとめ

飼料中に残留するフェリムゾン Z 体及び E 体について、JFRL 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、遮光条件下で実施すること及びミニカラム処理における溶出溶媒量を 10 mL から 9 mL に変更することで以下の結果が得られた。

1) 検量線はそれぞれ 0.1~50 ng/mL (注入量として 0.0005~0.25 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、フェリムゾン Z 体及び E 体としてそれぞれ 0.1~50 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) 稲わら、WCRS 及び粃米について、本法に従って得られたクロマトグラムにはフェリムゾン Z 体及び E 体の定量を妨げるピークは認められなかった。

3) 本法に従って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、フェリムゾン Z 体及び E 体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定量可能であった。

4) フェリムゾン Z 体又は E 体として、稲わらについて 0.2 及び 20 mg/kg, WCRS について原物中濃度に換算して 0.1 及び 9 mg/kg, 粃米について 0.2 及び 5 mg/kg 相当量をそれぞれ添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施して回収率及び繰返し精度を求めたところ、良好な結果が得られた。

5) 稲わら、WCRS 風乾物及び粃米について、本法のフェリムゾン Z 体及び E 体の定量下限はそれぞれ 0.2 mg/kg, 検出下限は 0.04 mg/kg であった。

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) 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等分析法開発委託事業 (2009).
- 5) 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

3 稲わら及び粃米中のヒドロキシイソキサゾールの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法の開発

矢野 愛子*, 榊原 良成*

Development of Determination of Hydroxyisoxazol in Rice Straw and Paddy Rice for Feed by LC-MS

Aiko YANO* and Yoshinari SAKAKIBARA*

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

For determining the concentration of hydroxyisoxazol in rice straw and paddy rice for feed, a quantitative method using liquid chromatograph-electrospray ionization-mass spectrometer (LC-ESI-MS) was developed.

After adding water to a sample, hydroxyisoxazol was extracted with acetone, and the sample solution was filtered. The filtrate was then purified with liquid-liquid extraction, and the purified sample solution was injected into the LC-MS to determine the concentration of hydroxyisoxazol. LC separation was carried out on a polymer column (MSPak GF-310 4D, 4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from Showa Denko Inc.; Tokyo, Japan) using 0.1 v/v % formic acid solution-methanol (6:4) as a mobile phase. In the MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on rice straw and paddy rice to which hydroxyisoxazol was added intentionally: 0.05 mg/kg and 1 mg/kg for rice straw, and 0.05 mg/kg and 0.5 mg/kg for paddy rice respectively. The mean recoveries of hydroxyisoxazol ranged from 71.4 % to 95.5 %, and the repeatability in the form of relative standard deviation (RSD_r) was less than 11 %.

Key words: hydroxyisoxazol; liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS); electrospray ionization (ESI); rice for feed; rice straw; paddy rice

キーワード: ヒドロキシイソキサゾール; 液体クロマトグラフ質量分析計; エレクトロスプレーイオン化法; 飼料用イネ; 稲わら; 粃米

1 緒 言

ヒドロキシイソキサゾール (ヒメキサゾール) は、イソキサゾール骨格を有する土壌殺菌剤・植物生長調整剤である¹⁾。国内での初回登録は1969年であり、稲をはじめとして、野菜や花卉等幅広い植物に適用されている。厚生労働省の定める「食品、添加物等の規格基準」においては、玄米及び大豆で0.5 mg/kg、大麦、小麦及びライ麦等で0.02 mg/kgの基準値が定められている²⁾。飼料中のヒドロキシイソキサゾールについては、「飼料の有害物質の指導基準及び管理基準」において、稲わら中で1 mg/kg、粃米中で0.5 mg/kg及び稲発酵粗飼料中で0.1 mg/kgの管理基準が設定されている³⁾。

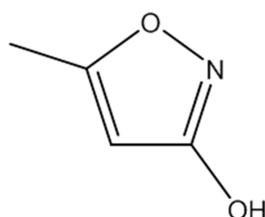
ヒドロキシイソキサゾールの定量法としては、厚生労働省通知試験法として高感度窒素リン検出

* 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

器付きガスクロマトグラフ，アルカリ熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフ及びガスクロマトグラフ質量分析計を用いる定量法⁴⁾が定められている。また，環境省の排出水に係る標準分析方法に液体クロマトグラフ質量分析計（以下「LC-MS」という。）を用いる定量法⁵⁾が定められている。一方，飼料中のヒドロキシイソキサゾールの定量法については飼料分析基準⁶⁾に記載されておらず，分析法の確立が急務となっている。

今回，「平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業」において財団法人日本食品分析センターが開発した分析法⁷⁾（以下「JFRL 法」という。）をもとに，飼料用イネ中のヒドロキシイソキサゾールの液体クロマトグラフ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。

参考にヒドロキシイソキサゾールの構造式等を Fig. 1 に示した。



5-Methylisoxazol-3-ol

C₄H₅NO₂ MW: 99.1 CAS No.: 10004-44-1

Fig. 1 Chemical structure of hydroxyisoxazol

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び籾米はそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。稲発酵粗飼料は 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。

2.2 試薬

1) アセトン，ジエチルエーテル及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノール及びギ酸は液体クロマトグラフ用（和光純薬工業製）を用いた。硫酸ナトリウム，塩化ナトリウム，炭酸水素ナトリウムは試薬特級を用いた。6 mol/L 塩酸は容量分析用（和光純薬工業製）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) ヒドロキシイソキサゾール標準液

ヒドロキシイソキサゾール標準品（和光純薬工業製，純度 99.7 %）25 mg を正確に量って 50 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ヒドロキシイソキサゾール標準原液を調製した（この液 1 mL は，ヒドロキシイソキサゾールとして 0.5 mg を含有する。）。

使用に際して，ヒドロキシイソキサゾール標準原液の一定量を水で正確に希釈し，1 mL 中にヒドロキシイソキサゾールとしてそれぞれ 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300 及び 400 ng を含有する各標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

1) 粉砕機 :

粉砕機 1 (稲わら及び稲発酵粗飼料用) : SM-100 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm)

粉砕機 2 (粳米用) : ZM-100 Retsch 製 (目開き 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-2DW タイテック製 (使用時振とう数 280 rpm)

3) ガラス繊維ろ紙 : GFP-95 桐山製作所製

4) pH 試験紙 : アズワン販売

5) メンブランフィルター : DISMIC-25HP (孔径 0.45 μm , 直径 25 mm, 親水性 PTFE) 東洋ろ紙製

6) LC-MS :

LC 部 : Prominence 島津製作所製

MS 部 : LCMS-2010EV 島津製作所製

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 30 mL (粳米は 20 mL) を加え, 30 分間静置後, 更にアセトン 120 mL (粳米は 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, 抽出液をガラス繊維ろ紙で吸引ろ過した後, 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た. この液 20 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下の水浴で約 3 mL (粳米は約 2 mL) まで減圧濃縮し, ヘキサン洗浄に供する試料溶液とした.

2) ヘキサン洗浄

試料溶液を 2 %炭酸水素ナトリウム溶液 40 mL 及びヘキサン 40 mL を用いて, あらかじめ塩化ナトリウム 5 g を入れた 300 mL の分液漏斗 A に移した. 5 分間振り混ぜた後, 静置し, 水層 (下層) を別の 300 mL の分液漏斗 B に移した.

3) ジエチルエーテルによる精製

6 mol/L 塩酸を用いて分液漏斗 B に移した水層の pH を 2 以下に調整した後, ジエチルエーテル 100 mL を加えた. 5 分間振り混ぜた後, 静置し, 水層 (下層) を更に別の 300 mL の分液漏斗 C に移し, ジエチルエーテル層 (上層) は 300 mL の三角フラスコに入れた. ジエチルエーテル 50 mL を分液漏斗 C に加えて同様の操作を行い, ジエチルエーテル層 (上層) を合わせた. 適量の硫酸ナトリウムを加えてときどき振り混ぜながら 15 分間程度静置した後, ろ紙 (5 種 A) で 300 mL のなす形フラスコにろ過した. 300 mL の三角フラスコ及び硫酸ナトリウムを順次ジエチルエーテル 30 mL で洗浄し洗液を合わせた. 水 2 mL を加え 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下の水浴で減圧濃縮した後, 窒素ガスを送ってジエチルエーテルを除去した. 残留物を水を用いて 5 mL の全量フラスコに移し, 更に標線まで水を加えた. この液の一定量をメンブランフィルターでろ過し, LC-MS による測定に供する試料溶液とした.

4) LC-MS による測定

試料溶液及び各ヒドロキシイソキサゾール標準液各 10 μL を LC-MS に注入し, 選択イオン

検出 (SIM) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 に示した。

Table 1 Operating conditions of LC-MS

Column	MSPak GF-310 4D (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm), Showa Denko
Mobile phase	0.1 v/v% formic acid solution-methanol (6:4)
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)
CDL temperature	250 °C
Heat block temperature	200 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 100

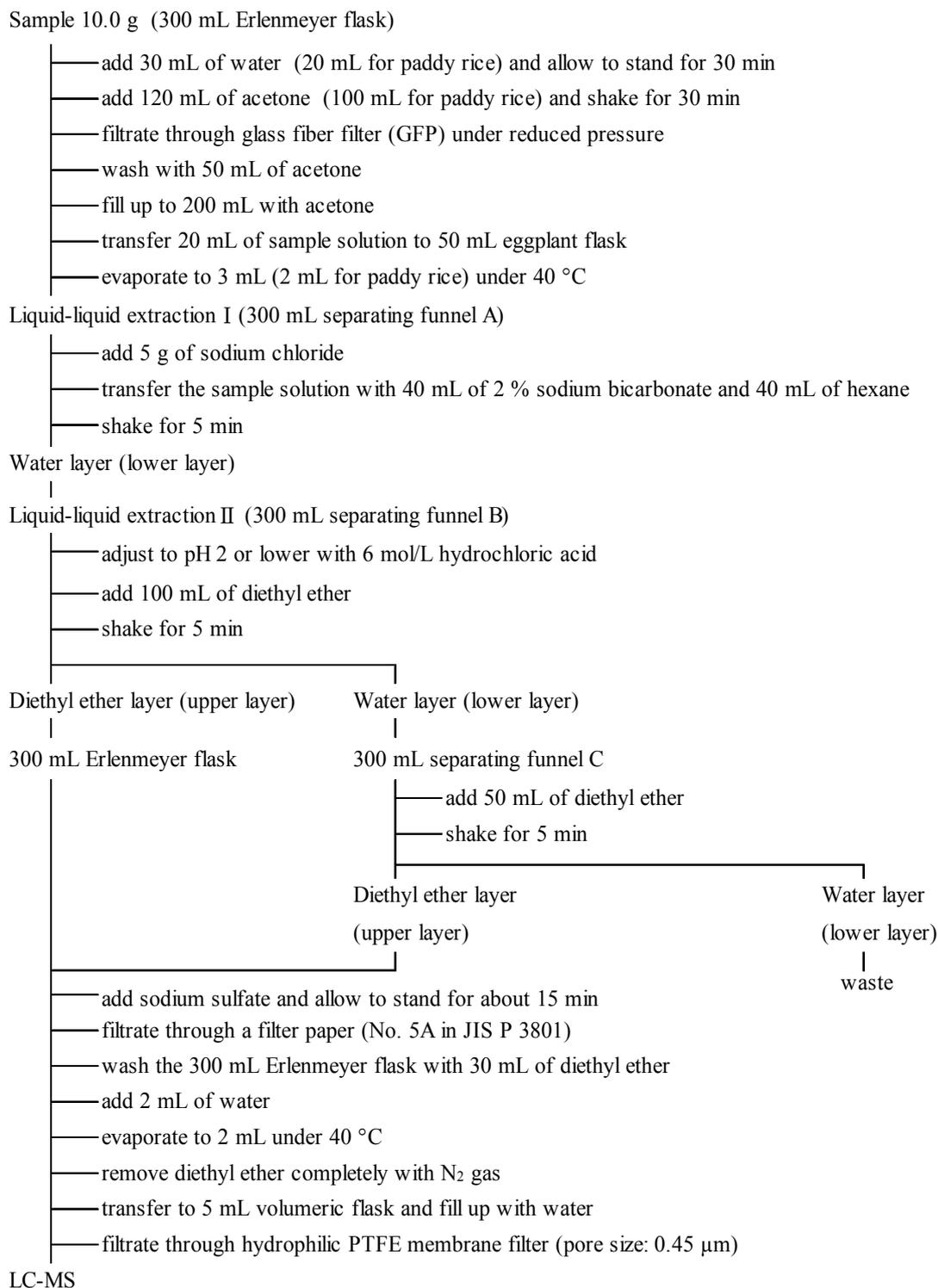
5) 計 算

得られた SIM 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、試料中のヒドロキシイソキサゾール量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

2.5 親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) カラムを用いた定量方法

分析試料 10.0 g を量り、2.4 の 1)から 2)に従って試料溶液を調製した後、3) に従って操作し、ろ過後の 300 mL のなす形フラスコに水 1.5 mL を加えた。40 °C 以下の水浴で減圧濃縮した後、窒素ガスを送ってジエチルエーテルを除去した。残留物を水 0.5 mL を用いてあらかじめ 3 mL のアセトニトリルを入れた 5 mL の全量フラスコに移し定容した。この液の一定量をメンブランフィルターでろ過し、LC-MS による測定に供する試料溶液とした。LC-MS による測定では、HILIC カラムを用いて HILIC の移動相条件により、2.4 の 4)から 5)に従って定量した。



Scheme 1 Analytical procedure for hydroxyisoxazol in rice straw and paddy rice

3 結果及び考察

3.1 予備検討

ヒドロキシイソキサゾールは蒸気圧が高い¹⁾ため揮発しやすく、試料調製時の予備乾燥等の条件（60 °C 以下、乾燥するまで静置）によって揮発し含有量が減衰する可能性が考えられた。そのため、稲わらにヒドロキシイソキサゾールとして 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 200

ng/mL) を添加後よく混合し、常温及び 60 °C で一夜静置した後、本法に従って添加回収試験を実施した。また、対照試験として稲わらにヒドロキシイソキサゾールを同様に添加後よく混合した後、速やかに添加回収試験を実施した。その結果、Table 2 のとおり、ヒドロキシイソキサゾールは常温及び 60 °C の一夜静置でそれぞれ減衰することが認められたため、ヒドロキシイソキサゾールは添加回収試験の直前に添加することにした。また、ヒドロキシイソキサゾールは 60 °C で著しく減衰したため、分析用試料の調製に当たって予備乾燥が必要な稲発酵粗飼料については本検討の対象から除外した。

Table 2 Recoveries of hydroxyisoxazol from rice straw

Spiked level (mg/kg)	Conditions after the spike with hydroxyisoxazol		
	Room temperature ^{b)}	Room temperature, overnight ^{c)}	60 °C, overnight ^{c)}
	Recovery ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)
1	71.4	48.4	10.5
	79.3	44.8	11.8

a) Two times trial

b) Hydroxyisoxazol was extracted soon after the spike at room temperature.

c) Rice straw sample spiked with hydroxyisoxazol was allowed to stand overnight at room temperature or 60 °C.

また、JFRL 法の LC-MS による測定で用いられたカラムは、ゲル濾過クロマトグラフィー用であり汎用性が低いため、極性化合物の分離に適するとされる HILIC カラム 3 種類の使用を試みた。ZIC-HILIC (Merck 製) カラム及び YMC-Triart Diol-HILIC (ワイエムシィ製) カラムについては、ヒドロキシイソキサゾールは保持が弱く、面積値として 100 倍以上にもなる巨大な妨害ピークと重なったため分離も難しく、定量できなかった。YMC-Pack Diol-60-NP (ワイエムシィ製) カラムはヒドロキシイソキサゾールを定量可能であったが、稲わらを用いて予備的に添加回収試験を実施したところ添加回収率の著しい低下がみられた (16 及び 19 %)。妨害成分によるマトリックス抑制によるものと考えられたことから、移動相条件を変更して妨害成分と分離することを検討したが、添加回収率の大きな改善は見られなかった。以上のことから、カラムの変更は行わないことにした。なお、YMC-Pack Diol-60-NP カラムを用い、妨害成分との分離検討前の移動相条件により得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

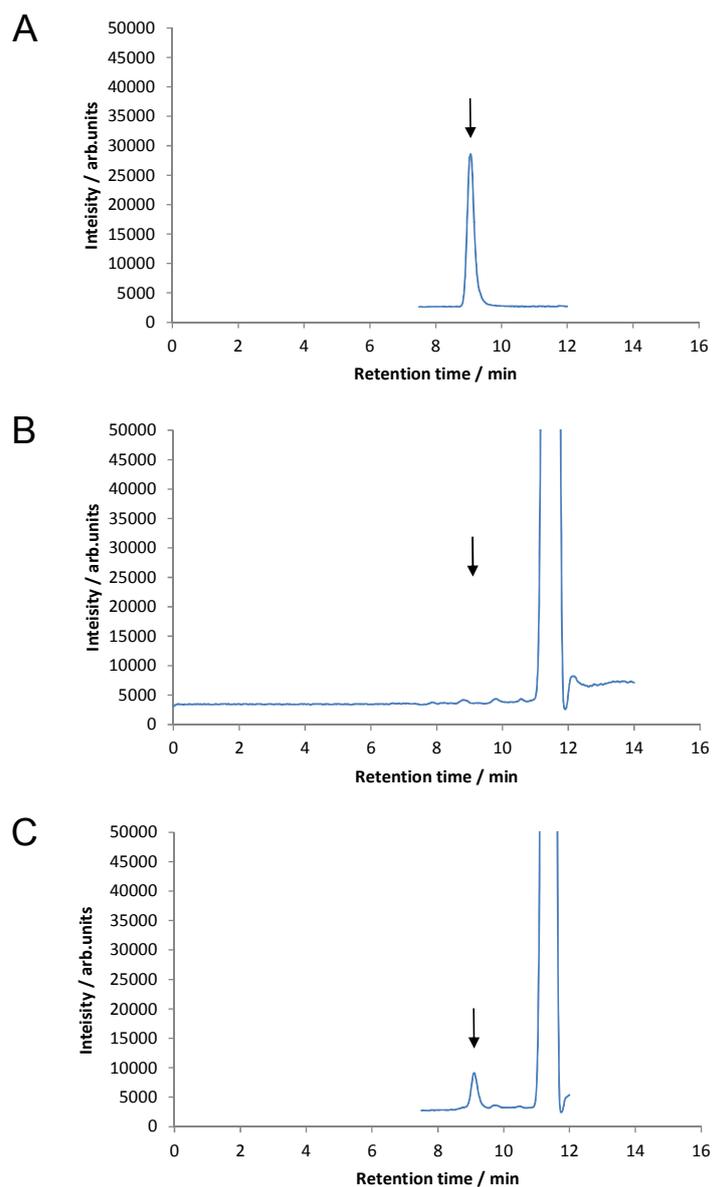


Fig. 2 Selected ion monitoring (SIM) chromatograms of hydroxyisoxazol standard solution and blank sample solution on HILIC column study

(LC-MS conditions except for column and mobile phase are shown in Table 1. Arrows indicate the retention time of hydroxyisoxazol.)

Column; YMC-Pack Diol-60-NP (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm), YMC,

Mobile phase; 0.1 v/v% formic acid solution-acetonitrile (1:9) → 7 min → (9:1) (hold for 5 min) → 18 min → (1:9) (hold for 30 min)

A: Standard solution (200 ng/mL of hydroxyisoxazol)

B: Blank sample solution of rice straw

C: Sample solution of rice straw (spiked at 1 mg/kg of hydroxyisoxazol (as 200 ng/mL in the sample solution))

3.2 検量線

2.2 の 2)により調製した各ヒドロキシイソキサゾール標準液各 10 μ L を LC-MS に注入し，得られた SIM 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. 3 のとおりであり，各 5~400 ng/mL（注入量として 0.05~4 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，ヒドロキシイソキサゾールとして 0.025~2 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。

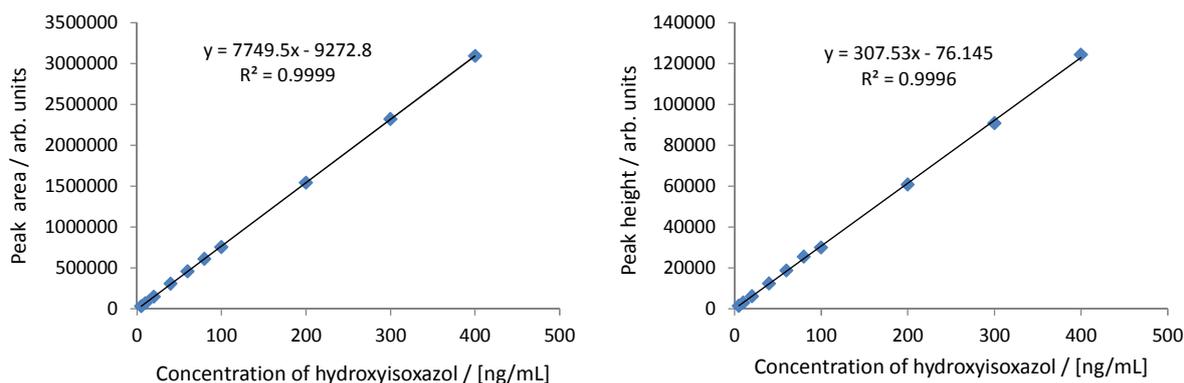


Fig. 3 Calibration curves of hydroxyisoxazol by peak area (left) and peak height (right)

3.3 ヘキサン及びジエチルエーテルへの転溶の確認

2%炭酸水素ナトリウム溶液 40 mL にヒドロキシイソキサゾール 1 μ g を添加し，2.4 の 2)及び 3)によりヒドロキシイソキサゾールのヘキサン及びジエチルエーテルへの転溶を確認した。その結果，Table 3 に示す回収率のとおり，ヒドロキシイソキサゾールはアルカリ性下でヘキサンに転溶せず，酸性下でジエチルエーテル 150 mL により回収できることが確認できた。

Table 3 Extraction pattern of hydroxyisoxazol

Pesticide	Recovery (%)				Total
	Hexane		Diethyl ether		
	40 mL	100 mL	50 mL	50 mL	
Hydroxyisoxazol	0	81	11	0	92

n = 1

3.4 妨害物質の検討

稲わら 4 検体及び籾米 3 検体を試料として，2.4 により調製した試料溶液を LC-MS に注入し，得られた SIM 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ヒドロキシイソキサゾー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 SIM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

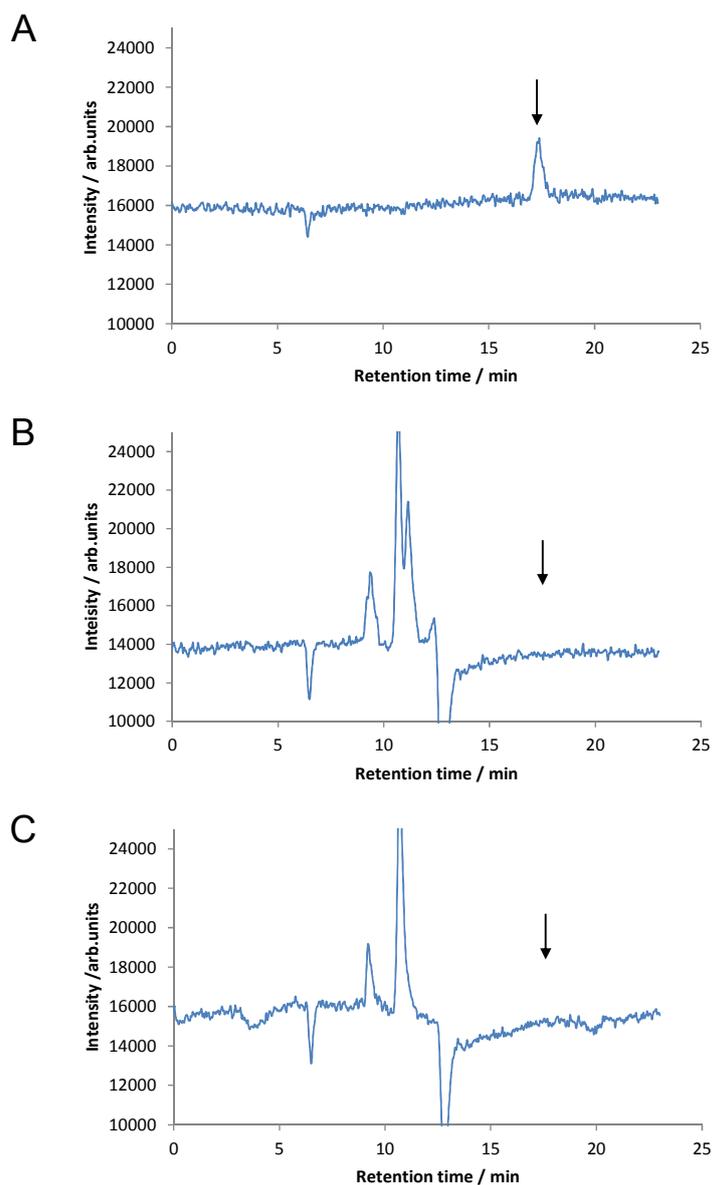


Fig. 4 SIM chromatograms of standard and blank sample solutions (LC-MS conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the retention time of hydroxyisoxazol.)

A: Standard solution (10 ng/mL of hydroxyisoxazol)

B: Blank sample solution of rice straw

C: Blank sample solution of paddy rice

3.5 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 3)により調製した稲わら及び粳米のブランク試料溶液にヒドロキシイソキサゾールとして1及び0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で200及び100 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 2)に従って調製したヒドロキシイソキサゾール標準液に対するピーク面積比を確認した。その結果、Table 4 のとおりヒドロキシイソキサゾールはマトリックスによる大きな影響なく測定が可能であった。

Table 4 Results of matrix effect

Matrix	Concentration of hydroxyisoxazol		Matrix effect ^{b)} (%)
	in the matrix standard solution (ng/mL)	in the sample ^{a)} (mg/kg)	
Rice straw	200	1	84
Paddy rice	100	0.5	93

$n = 1$

a) Converted from the concentration in the matrix standard solution

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

3.6 添加回収試験

2.2 の 2)に従って調製したヒドロキシイソキサゾール標準原液を水で正確に希釈し添加に用いた。

ヒドロキシイソキサゾールとして稲わらに 0.05 及び 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 200 ng/mL），籾米に 0.05 及び 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 100 ng/mL）になるようにそれぞれ添加してよく混合した後，速やか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。

その結果は Table 5 のとおり，平均回収率は 71.4~95.5 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD_r）として 11 %以下の成績が得られ，飼料分析基準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ていた。

なお，得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

Table 5 Recoveries for hydroxyisoxazol

Spiked level (mg/kg)	Sample types							
	Rice straw 1		Rice straw 2		Paddy rice 1		Paddy rice 2	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)						
0.05	89.7	4.7	78.7	9.6	86.9	2.9	94.1	7.2
0.5	—	—	—	—	95.5	9.8	82.2	7.6
1	71.4	9.9	80.0	11	—	—	—	—

—: Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

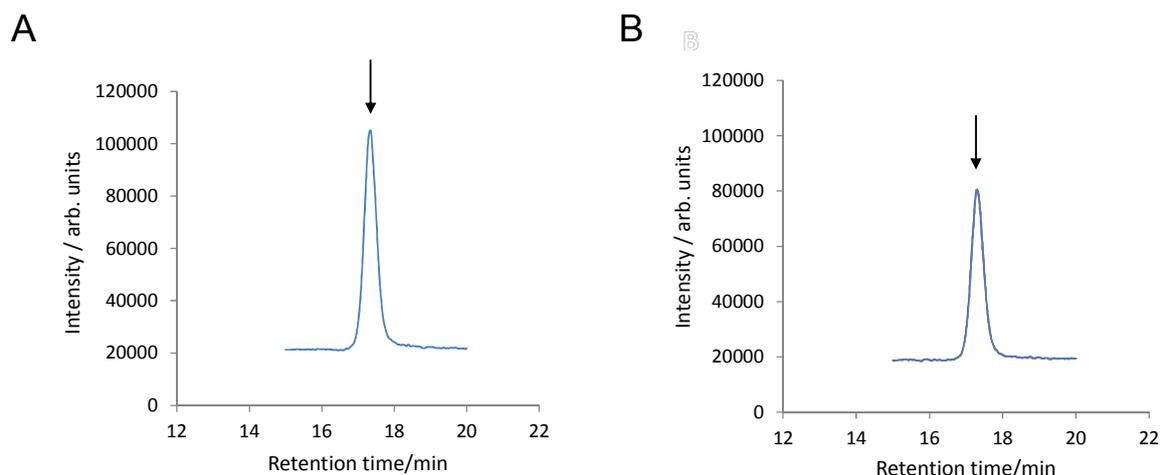


Fig. 5 SIM chromatograms on recovery test

(LC-MS conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the peak of hydroxyisoxazol.)

A: Standard solution (200 ng/mL: 2 ng as hydroxyisoxazol)

B: Sample solution of rice straw (spiked at 1 mg/kg of hydroxyisoxazol (as 200 ng/mL in the sample solution))

3.7 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、稲わら及び粳米にヒドロキシイソキサゾールを添加し、添加回収試験により得られるピークの *SN* 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

その結果、*SN* 比が 10 及び 3 となる濃度は、0.05 mg/kg 及び 0.02 mg/kg であったため、この濃度を定量下限及び検出下限とした。この濃度は稲わらの管理基準値 1 mg/kg に対して 1/20 及び 1/50、粳米の管理基準値 0.5 mg/kg に対して 1/10 及び 1/25 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定量下限及び検出下限の目標値を満たした。

なお、Table 5 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

飼料用稲わら、粳米及び稲発酵粗飼料中のヒドロキシイソキサゾールについて、JFRL 法をもとに、LC-MS による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、以下の結果を得た。

- 1) ヒドロキシイソキサゾールは試料調製時の予備乾燥条件により著しく減衰したため、稲発酵粗飼料については本検討の対象から除外した。
- 2) 検量線は 5~400 ng/mL 相当量（注入量として 0.05~4 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。
- 3) 本法に従って得られた SIM クロマトグラムでは、2 種類の飼料原料（稲わら及び粳米）において定量を妨げるピークは認められなかった。
- 4) 稲わら及び粳米を用いて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、ヒドロキシイソキサゾー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。
- 5) ヒドロキシイソキサゾールとして稲わらに 0.05 及び 1 mg/kg 相当量、粳米に 0.05 及び 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料について本法に従って 5 点併行分析を実施し、平均回収率及び併行

精度を求めたところ、平均回収率は 71.4~95.5 %，その併行精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 11 %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目標値を満たした。

- 6) 本法によるヒドロキシイソキサゾールの定量下限は 0.05 mg/kg，検出下限は 0.02 mg/kg 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 43 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が定める基準の設定に関する資料，平成 26 年 12 月 17 日 (2014).
- 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，第 370 号 (1959).
- 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) 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，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号 (2005).
- 5) 環境庁水質保全局長通知：ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針，平成 2 年 5 月 24 日，環水土第 77 号 (1990).
- 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) 財団法人日本食品分析センター：平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業 (2009).

技術レポート**4 飼料中のカルバリル, カルボフラン及びフェノブカルブの液体クロマトグラフトンデム型質量分析計による同時定量法の共同試験**

田中 里美*, 桑原 正良*

Collaborative Study on Simultaneous Determination Method of Carbaryl, Carbofuran and Fenobucarb in Feed by LC-MS/MS

Satomi TANAKA* and Masayoshi KUWABARA*

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

For validating the simultaneous determination method of carbaryl, carbofuran and fenobucarb in feed using a liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS), a collaborative study was conducted.

After adding water to a sample, carbaryl, carbofuran and fenobucarb were extracted with acetone, and the solution was filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a volume of 200 mL. The sample 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 carbaryl, carbofuran and fenobucarb. LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

A collaborative study was conducted by eleven laboratories using formula feed for finishing beef cattle, wheat, corn, milo and oats hay. Formula feed for finishing beef cattle was added with 0.1 mg/kg of carbaryl and carbofuran, and 0.3 mg/kg of fenobucarb. Wheat was added with 2 mg/kg of carbaryl, 0.2 mg/kg of carbofuran and 0.3 mg/kg of fenobucarb. Corn was added with 0.1 mg/kg of carbaryl, 0.05 mg/kg of carbofuran and 0.3 mg/kg of fenobucarb. Milo was added with 10 mg/kg of carbaryl, 0.1 mg/kg of carbofuran and 0.3 mg/kg of fenobucarb. Oats hay was added with 10 mg/kg of carbaryl, carbofuran and fenobucarb. The resulting mean recoveries, repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD_f and RSD_R), and HorRat, were 94.9 % to 99.4 %, less than 7.2 % and less than 16 %, and less than 0.96 for carbaryl, 94.0 % to 98.7 %, less than 5.6 % and less than 9.9 %, and less than 0.54 for carbofuran, and 92.5 % to 97.8 %, less than 6.0 % and less than 8.3 %, and less than 0.61 for fenobucarb respectively.

This method was thus validated as useful for inspection of carbaryl, carbofuran and fenobucarb in feed.

Key words: carbaryl; carbofuran; fenobucarb; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); feed; collaborative study

キーワード：カルバリル；カルボフラン；フェノブカルブ；液体クロマトグラフト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；共同試験

* 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

1 緒 言

カルバリルは、米国 Union Carbide 社が開発したカーバメート系の殺虫剤であり、我が国では 1959 年に登録されている¹⁾。カルボフランは米国 FMC 社が導入したカーバメート系の殺虫剤であり、国内登録はされておらず、米国でも使用が中止されている²⁾。フェノブカルブはクミアイ化学が開発したカーバメート系の殺虫剤であり、1968 年に国内登録されている^{1),3)}。

これらの農薬の我が国における飼料中の残留基準としては、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令⁴⁾において、カルバリルはえん麦及びマイロで 10 mg/kg、大麦及びライ麦で 5 mg/kg、小麦で 2 mg/kg、とうもろこしで 0.1 mg/kg 及び牧草で 250 mg/kg、カルボフランは、カルボフラン及び 3-OH カルボフランをカルボフラン含量に換算したものの和と規定され⁵⁾、えん麦、マイロ及びライ麦で 0.1 mg/kg、大麦及び小麦で 0.2 mg/kg、とうもろこしで 0.05 mg/kg 及び牧草で 13 mg/kg、フェノブカルブはえん麦、大麦、小麦、とうもろこし、マイロ及びライ麦ともに 0.3 mg/kg の基準値が設定されている。また、フェノブカルブは、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準⁶⁾において飼料用イネ（稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米）の管理基準値が設定されている。

飼料（飼料用イネを除く。）中の当該 3 成分を含むカーバメート系農薬の同時定量法としては、飼料分析基準⁷⁾にポストカラム蛍光誘導体化液体クロマトグラフで定量する分析法が記載されている。しかし、この方法は上記基準値を念頭に置いた妥当性確認が実施されていない。また、測定機器についても、より汎用性のあるものが望ましい。

そのため、当センターにおいて、飼料（飼料用イネを除く。）中のカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブ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。）を用いた定量法⁸⁾を開発したところであるが、更に今回、共通試料を用いた共同試験を行ったので、その結果を報告する。

2 試験方法

2.1 試料

カルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブが残留していないことを確認した肉用牛肥育用配合飼料、小麦、とうもろこし、マイロ及びオーツ乾草をそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。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 10 袋を各試験室に配付した。

なお、試験に用いた肉用牛肥育用配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For finishing beef cattle	Grains	56	Barley, corn, corn starch, potato starch
	Oil seed meal	5	Soybean meal
	Brans	38	Wheat bran, hominy feed, soybean hulls, corn gluten feed, rice bran, brewers grains
	Others	1	Molasses, calcium carbonate, salt, lactic acid bacteria, brewers yeast, butyric acid bacteria, saccharification bacteria, natural aluminum silicate, light silicic acid, galacto-oligosaccharide, glucose, zeolite, calcium propionate

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 (和光純薬工業製)), 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, 和光純薬工業製) を用いた. 水は DIRECT-Q UV 3 (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) カルバリル標準原液
カルバリル標準品 (関東化学製, 純度 99.8 %) 50 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カルバリル標準原液を調製した (この液 1 mL は, カルバリルとして 0.5 mg を含有する.) .
- 3) カルボフラン標準原液
カルボフラン標準品 (関東化学製, 純度 99.8 %) 25 mg を正確に量って 50 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カルボフラン標準原液を調製した (この液 1 mL は, カルボフランとして 0.5 mg を含有する.) .
- 4) フェノブカルブ標準原液
フェノブカルブ標準品 (関東化学製, 純度 98.4 %) 25 mg を正確に量って 50 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ノブカルブ標準原液を調製した (この液 1 mL は, フェノブカルブとして 0.5 mg を含有する.) .
- 5) 各農薬標準液
2), 3)及び 4)で調製したカルバリル, カルボフラン及びフェノブカルブ各標準原液の一定量をそれぞれアセトンで正確に 10 倍希釈し, 1 mL 中にカルバリル, カルボフラン及びフェノブカルブとしてそれぞれ 50 µg を含有する各農薬標準液を調製した.
- 6) 検量線作成用標準原液
各農薬標準液各 5 mL を 250 mL の全量フラスコに入れて混合し, 更に標線までアセトンを加えて, 検量線作成用標準原液を調製した (この液 1 mL は, カルバリル, カルボフラン及びフェノブカルブとして各 1 µg を含有する.) .
- 7) 肉用牛肥育用配合飼料添加用標準液
5)で調製したカルバリル標準液及びカルボフラン標準液 4 mL 並びにフェノブカルブ標準液 12 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 中にカルバリル

及びカルボフランとしてそれぞれ 1 µg 並びにフェノブカルブとして 3 µg を含有する肉用牛肥育用配合飼料添加用標準液を調製した。

8) 小麦添加用標準液

2)で調製したカルバリル標準原液 8 mL, 5)で調製したカルボフラン標準液 8 mL 及びフェノブカルブ標準液 12 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 中にカルバリルとして 20 µg, カルボフランとして 2 µg 及びフェノブカルブとして 3 µg を含有する小麦添加用標準液を調製した。

9) とうもろこし添加用標準液

5)で調製したカルバリル標準液 4 mL, カルボフラン標準液 2 mL 及びフェノブカルブ標準液 12 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 中にカルバリルとして 1 µg, カルボフランとして 0.5 µg 及びフェノブカルブとして 3 µg を含有するとうもろこし添加用標準液を調製した。

10) マイロ添加用標準液

2)で調製したカルバリル標準原液 40 mL, 5)で調製したカルボフラン標準液 4 mL 及びフェノブカルブ標準液 12 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 中にカルバリルとして 100 µg, カルボフランとして 1 µg 及びフェノブカルブとして 3 µg を含有するマイロ添加用標準液を調製した。

11) オーツ乾草添加用標準液

2), 3)及び 4)で調製したカルバリル, カルボフラン及びフェノブカルブ各標準原液各 40 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 中にカルバリル, カルボフラン及びフェノブカルブとしてそれぞれ 100 µg を含有するオーツ乾草添加用標準液を調製した。

6)の検量線作成用標準原液及び 7)~11)の各添加用標準液 (各 2 本, 濃度は非通知) を 2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した。

2.3 定量方法

田中らの方法⁸⁾によった。

2.4 分析試料

非明示の 2 点反復で, 2.1 の試験用試料を用いた。分析試料としては, 肉用牛肥育用配合飼料にカルバリル及びカルボフランとしてそれぞれ 0.1 mg/kg 相当量並びにフェノブカルブとして 0.3 mg/kg 相当量 (試験用試料 10 g に対して 1 mL 中にカルバリル及びカルボフランとしてそれぞれ 1 µg 並びにフェノブカルブとして 3 µg を含有する肉用牛肥育用配合飼料添加用標準液 1 mL 添加) を, 小麦にカルバリルとして 2 mg/kg 相当量, カルボフランとして 0.2 mg/kg 相当量及びフェノブカルブとして 0.3 mg/kg 相当量 (試験用試料 10 g に対して 1 mL 中にカルバリルとして 20 µg, カルボフランとして 2 µg 及びフェノブカルブとして 3 µg を含有する小麦添加用標準液 1 mL 添加) を, とうもろこしにカルバリルとして 0.1 mg/kg 相当量, カルボフランとして 0.05 mg/kg 相当量及びフェノブカルブとして 0.3 mg/kg 相当量 (試験用試料 10 g に対して 1 mL 中にカルバリルとして 1 µg, カルボフランとして 0.5 µg 及びフェノブカルブとして 3 µg を含有するとうもろこし添加用標準液 1 mL 添加) を, マイロにカルバリルとして 10 mg/kg 相当量, カルボフランとして 0.1 mg/kg 相当量及びフェノブカルブとして 0.3 mg/kg 相当量 (試験用試料 10

g に対して 1 mL 中にカルバリルとして 100 μg 、カルボフランとして 1 μg 及びフェノブカルブとして 3 μg を含有するマイロ添加用標準液 1 mL 添加) を、オーツ乾草にカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブとしてそれぞれ 10 mg/kg 相当量 (試験用試料 10 g に対して 1 mL 中にカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブとしてそれぞれ 100 μg を含有するオーツ乾草添加用標準液 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。

2.5 報告方法

2.1 の分析試料 10 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。

2.6 分析実施期間

平成 29 年 6 月 5 日から平成 29 年 6 月 30 日まで

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^{9), 10)}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_f) 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¹¹⁾を用いて HorRat を求めた。

3 参加試験室

一般財団法人食品環境検査協会東京事業所, 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, ジーエルサイエンス株式会社, 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)

4 結果及び考察

カルバリルの結果は Table 2 のとおりであり、肉用牛肥育用配合飼料, 小麦, とうもろこし, マイロ及びオーツ乾草について、平均回収率は 99.4, 95.4, 99.1, 97.9 及び 94.9 %, RSD_f は 7.2, 5.9, 4.6, 2.6 及び 5.3 %, RSD_R は 15, 9.4, 16, 6.5 及び 11 %, HorRat は 0.68, 0.46, 0.74, 0.58 及び 0.96 であった。

カルボフランの結果は Table 3 のとおりであり、肉用牛肥育用配合飼料, 小麦, とうもろこし, マイロ及びオーツ乾草について、平均回収率は 96.5, 94.2, 96.8, 98.7 及び 94.0 %, RSD_f は 3.1, 5.6, 3.4, 2.3 及び 2.2 %, RSD_R は 7.5, 7.0, 9.9, 5.2 及び 6.1 %, HorRat は 0.34, 0.34, 0.45, 0.24 及び 0.54 であった。

フェノブカルブの結果は Table 4 のとおりであり、肉用牛肥育用配合飼料, 小麦, とうもろこし, マイロ及びオーツ乾草について、平均回収率は 94.9, 92.5, 96.3, 97.8 及び 95.4 %, RSD_f は 4.7, 6.0, 3.4, 3.2 及び 2.8 %, RSD_R は 5.6, 7.2, 8.3, 6.7 及び 7.0 %, HorRat は 0.29, 0.37, 0.43, 0.35 及び 0.61 であった。

それぞれの成分ともに、飼料分析基準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 5 に示した。

Table 2 Collaborative study for carbaryl

Lab. No.	Feed types									
	Formula feed for finishing beef cattle		Wheat		Corn		Milo		Oats hay	
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
1	0.0887	0.0862	1.90	1.86	0.0949	0.0919	8.30	8.37	8.96	8.96
2	0.0967	0.0915	2.04	1.97	0.0894	0.0940	10.3	10.4	9.61	9.53
3	0.0893	0.0909	1.85	1.75	0.0920	0.0899	10.3	9.55	9.23	9.06
4	0.104	0.0892	1.88	1.99	0.0999	0.100	9.63	9.92	9.58	9.72
5	0.124	0.106	2.28	1.89	0.120	0.108	9.90	9.26	9.60	8.98
6	0.0979	0.100	1.88	1.92	0.104	0.102	9.94	10.1	10.0	9.98
7	0.103	0.103	1.80	1.95	0.104	0.0981	9.90	10.2	9.90	7.88
8	0.104	0.119	2.06	2.08	0.107	0.119	10.9	10.6	10.7	10.6
9	0.0920	0.0875	1.69	1.62	0.0877	0.0903	9.23	9.05	8.11	8.97
10	0.118	0.110	2.13	2.13	0.106	0.112	9.90	10.0	11.7	11.4
11	0.0880	0.0973	1.78	1.52	0.0832	0.0872	14.1 ^{a)}	14.6 ^{a)}	8.44	7.91
Spiked level (mg/kg)	0.1		2		0.1		10		10	
No. labs ^{b)}	11		11		11		10		11	
No. outliers ^{c)}	0		0		0		1		0	
Mean value (mg/kg)	0.0994		1.91		0.0991		9.79		9.49	
Mean recovery (%)	99.4		95.4		99.1		97.9		94.9	
RSD _r ^{d)} (%)	7.2		5.9		4.6		2.6		5.3	
RSD _R ^{e)} (%)	15		9.4		16		6.5		11	
PRSD _R ^{f)} (%)	22		14		22		11		11	
HorRat	0.68		0.46		0.74		0.58		0.96	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Number of laboratories retained after eliminating outliers

c) Number of outlier laboratories removed in parentheses

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 3 Collaborative study for carbofuran

Lab. No.	Feed types									
	Formula feed for finishing beef cattle		Wheat		Corn		Milo		Oats hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0835	0.0856	0.180	0.175	0.0427	0.0391	0.0895	0.0899	8.99	9.22
2	0.0956	0.0938	0.188	0.184	0.0469	0.0468	0.0960	0.101	9.43	9.69
3	0.0947	0.0906	0.186	0.177	0.0440	0.0451	0.0913	0.0918	9.42	9.64
4	0.0985	0.0986	0.193	0.194	0.0496	0.0494	0.101	0.102	9.79	9.72
5	0.115	0.103	0.233	0.186	0.0530	0.0590	0.101	0.103	9.46	9.10
6	0.101	0.102	0.194	0.192	0.0559	0.0551	0.0984	0.104	9.58	9.40
7	0.0950	0.0975	0.182	0.190	0.0482	0.0483	0.0984	0.0994	9.67	9.62
8	0.107	0.104	0.202	0.206	0.0523	0.0530	0.108	0.106	10.6	10.4
9	0.0901	0.0892	0.174	0.178	0.0457	0.0456	0.0957	0.0945	8.68	9.16
10	0.0970	0.0949	0.189	0.188	0.0482	0.0461	0.0971	0.103	9.43	9.31
11	0.0942	0.0921	0.175	0.179	0.0448	0.0464	0.0984	0.101	8.52	7.97
Spiked level (mg/kg)	0.1		0.2		0.05		0.1		10	
No. labs ^{a)}	11		11		11		11		11	
No. outliers ^{b)}	0		0		0		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.0965		0.188		0.0484		0.0987		9.40	
Mean recovery (%)	96.5		94.2		96.8		98.7		94.0	
RSD _r ^{c)} (%)	3.1		5.6		3.4		2.3		2.2	
RSD _R ^{d)} (%)	7.5		7.0		9.9		5.2		6.1	
PRSD _R ^{e)} (%)	22		20		22		22		11	
HorRat	0.34		0.34		0.45		0.24		0.54	

a) Number of laboratories retained after eliminating outliers

b) Number of outlier laboratories removed in parentheses

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 4 Collaborative study for fenobucarb

Lab. No.	Feed types									
	Formula feed for finishing beef cattle		Wheat		Corn		Milo		Oats hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.293	0.297	0.282	0.305	0.299	0.292	0.297	0.317	9.50	9.98
2	0.290	0.276	0.272	0.269	0.291	0.280	0.289	0.272	9.56	9.86
3	0.284	0.277	0.267	0.273	0.234	0.231	0.268	0.270	9.24	9.55
4	0.295	0.268	0.280	0.282	0.319	0.287	0.308	0.303	10.6	10.5
5	0.319	0.271	0.342	0.271	0.302	0.305	0.318	0.289	9.41	8.87
6	0.280	0.279	0.269	0.282	0.300	0.302	0.284	0.294	9.50	9.49
7	0.279	0.290	0.268	0.280	0.289	0.293	0.294	0.293	9.42	9.70
8	0.320	0.304	0.292	0.307	0.328	0.317	0.327	0.330	10.6	10.5
9	0.282	0.279	0.263	0.265	0.288	0.281	0.311	0.295	8.82	9.37
10	0.255	0.266	0.259	0.259	0.266	0.274	0.267	0.271	9.44	9.40
11	0.285	0.276	0.257	0.263	0.302	0.277	0.281	0.275	8.61	7.97
Spiked level (mg/kg)	0.3		0.3		0.3		0.3		10	
No. labs ^{a)}	11		11		11		11		11	
No. outliers ^{b)}	0		0		0		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.285		0.278		0.289		0.293		9.54	
Mean recovery (%)	94.9		92.5		96.3		97.8		95.4	
RSD _r ^{c)} (%)	4.7		6.0		3.4		3.2		2.8	
RSD _R ^{d)} (%)	5.6		7.2		8.3		6.7		7.0	
PRSD _R ^{e)} (%)	19		19		19		19		11	
HorRat	0.29		0.37		0.43		0.35		0.61	

a) Number of laboratories retained after eliminating outliers

b) Number of outlier laboratories removed in parentheses

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 5 Instruments used in the collaborative study

Lab.No	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quattro premier XE, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
2	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Xevo TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
7	LC: Prominence, Shimadzu MS/MS: API4000, Applied Biosystems	ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
8	LC: Prominence, Shimadzu MS/MS: LCMS-8060, Shimadzu	Symmetry C18, Waters (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
9	LC: 1260 Infinity, Agilent Technologies MS/MS: 6490 Triple Quadrupole LC/MS Agilent Technologies	ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
10	LC: 1200 Series, Agilent Technologies MS/MS: API-3200 Q TRAP, AB SCIEX	ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
11	LC: LC800, GL Sciences MS/MS: 4000 Q TRAP, AB SCIEX	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 μm)

5 まとめ

飼料に残留するカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブについて、肉用牛肥育用配合飼料にカルバリル及びカルボフランとしてそれぞれ 0.1 mg/kg 相当量並びにフェノブカルブとして 0.3 mg/kg 相当量、小麦にカルバリルとして 2 mg/kg 相当量、カルボフランとして 0.2 mg/kg 相当量及びフェノブカルブとして 0.3 mg/kg 相当量、とうもろこしにカルバリルとして 0.1 mg/kg 相当量、カルボフランとして 0.05 mg/kg 相当量及びフェノブカルブとして 0.3 mg/kg 相当量、マイロにカルバリルとして 10 mg/kg 相当量、カルボフランとして 0.1 mg/kg 相当量及びフェノブカルブとして 0.3 mg/kg 相当量、オーツ乾草にカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブとしてそれぞれ 10

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、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一般財団法人食品環境検査協会東京事業所，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及びジーエルサイエンス株式会社における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 一般社団法人日本植物防疫協会：農薬ハンドブック 2016 年版（改訂新版），420-421，日本植物防疫協会，東京，(2016) (ISBN: 978-4-88926-146-2).
- 2) 内閣府食品安全委員会：食品安全総合情報システム、
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/foodSafetyMaterial/show/syu02850270108>, cited 9 Apr. 2018.
- 3) 食品安全委員会農薬専門調査会，食品安全委員会動物用医薬品専門調査会：農薬・動物用医薬品評価書 (2013).
- 4) 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).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：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の施行について，平成 18 年 5 月 26 日，18 消安第 2321 号 (2006).
- 6) 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).
- 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) 田中 里美，桑原 正良：飼料中のカルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブ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，飼料研究報告，42，20-33 (2017).
- 9) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & Appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).
- 10) 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).
- 11) 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**5 飼料中の 3-OH カルボフラ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共同試験**

義本 将之*, 齊木 雅一*

Collaborative Study on Determination Method of 3-Hydroxycarbofuran in Feed by LC-MS/MS

Masayuki YOSHIMOTO* and Masakazu SAIKI*

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

For validating the determination method of 3-hydroxycarbofuran in feed using a liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS), a collaborative study was conducted.

3-hydroxycarbofuran in a sample was extracted by boiling hydrochloric acid (1:29) and the solution was filtered. The filtrate was diluted with hydrochloric acid (1:29) to a volume of 200 mL. The sample solution was purified with two types of SPE columns (InertSep K-solute, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan and Sep-Pak Plus Silica cartridge, Waters Co.; Milford, MA, USA), and injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of 3-hydroxycarbofuran. LC separation was carried out on an ODS column (Mightysil RP-18 GP, 2.0 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from Kanto Chemical Co., Inc.; Tokyo, Japan) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

A collaborative study was conducted by nine laboratories using formula feed for dairy cattle, wheat, corn, alfalfa hay and rice straw, all of which were added with 3-hydroxycarbofuran according to the following specifications: 0.1 mg/kg for formula feed for dairy cattle, 0.01 mg/kg for wheat, 0.05 mg/kg of for corn, 10 mg/kg for alfalfa hay and 4 mg/kg for rice straw. The resulting range of mean recoveries, repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R), and HorRat were 81.4 % to 95.7 %, less than 5.8 % and less than 24 %, and less than 1.1 respectively.

This method was thus validated as useful for inspection of 3-hydroxycarbofuran in feed.

Key words: 3-Hydroxycarbofuran; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); feed; wheat; alfalfa hay; rice straw; formula feed for dairy cattle; corn; collaborative study

キーワード：3-OH カルボフラン；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；飼料；小麦；アルファルファ乾草；稲わら；乳用牛飼育用配合飼料；とうもろこし；共同試験

1 緒 言

3-OH カルボフラン (3-ヒドロキシカルボフラン) は、カーバメート系殺虫剤であるカルボフラン誘導体のカルボスルファン、フラチオカルブ及びベンフラカルブの代謝物である^{1), 2)}。カルボス

* 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

ルフアンは米国 FMC 社，フラチオカルブは Ciba-Geigy 社（現：Syngenta 社），ベンフラカルブは大塚化学株式会社（現：OAT アグリオ株式会社）によって開発された²⁾。カルボフランも FMC 社によって開発された農薬であるが，日本での登録はない。また，フラチオカルブは 2006 年 1 月に国内での登録が失効している³⁾。

飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令⁴⁾において，上記農薬 4 成分のうち，カルボフランに飼料中の残留基準が設定されている。カルボフランの基準値は，カルボフラン及び 3-OH カルボフランをカルボフラン含量に換算したものの和と規定され⁵⁾，牧草で 13 mg/kg，大麦及び小麦で 0.2 mg/kg，えん麦，マイロ及びライ麦で 0.1 mg/kg，とうもろこしで 0.05 mg/kg となっている。また，飼料の有害物質の指導基準及び管理基準⁶⁾において，上記農薬 4 成分のうち，カルボスルファンに管理基準が設定されており，稲わらで 0.7 mg/kg，稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で 1 mg/kg となっている。更に，厚生労働省の食品，添加物等の規格基準⁷⁾において，カルボスルファン及びカルボフランに残留基準が設定されており，カルボスルファンが検出された場合に限り，カルボスルファン（カルボフラン及び 3-OH カルボフランをカルボスルファン含量に換算したものを含む。）として，玄米で 0.2 mg/kg となっている。また，カルボフラン又は 3-OH カルボフランが検出され，加えてカルボスルファン，フラチオカルブ又はベンフラカルブが検出されなかった場合に限り，カルボフラン及び 3-OH カルボフランをカルボフラン含量に換算したものの和として，玄米で 0.1 mg/kg となっている。

3-OH カルボフランは植物体中に一部配糖体として存在し，有機溶媒では完全に抽出することができない。そのため，塩酸を添加して加熱することで配糖体を加水分解し，抽出する方法が採用されており⁸⁾⁻¹²⁾，飼料分析基準¹²⁾には既に，ポストカラム蛍光誘導体化液体クロマトグラフで定量する方法が記載されている。しかし，この方法は，開発当時，飼料用イネを検討対象としていなかった。また，測定機器についても，より汎用性のあるものが望ましい。

そのため，当センターにおいて保田らが，飼料中の 3-OH カルボフラン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。）を用いた定量法¹³⁾を開発したところであるが，更に今回，共通試料を用いた共同試験を行ったので，その結果を報告する。

2 試験方法

2.1 試料

3-OH カルボフランが残留していないことを確認した小麦，アルファルファ乾草，稲わら，乳用牛飼育用配合飼料及びとうもろこしをそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。これらについて約 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 10 袋を各試験室に配付した。

なお，試験に用いた乳用牛飼育用配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed type	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For dairy cattle	Grains	48	Heat-treated corn, wheat flour, corn, milo
	Brans	24	Wheat bran, corn gluten feed, rice bran
	Oil seed meal	23	Soybean meal, rapeseed meal
	Others	5	Molasses, calcium carbonate, salt, 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。アセトン、酢酸エチル及びヘキサンは残留農薬・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 水溶液、和光純薬工業製）を用いた。塩酸は試薬特級を用いた。沸騰石は化学用（和光純薬工業製）を用いた。シリコン油は SRX310（東レ・ダウコーニング製）を用いた。水は Milli-Q Direct 8（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) 3-OH カルボフラン標準原液

3-OH カルボフラン標準品（和光純薬工業製、純度 98.0 %）10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて 3-OH カルボフラン標準原液を調製した（この液 1 mL は、3-OH カルボフランとして 0.1 mg を含有する。）。

3) 検量線作成用標準原液

2)で調製した 3-OH カルボフラン標準原液 50 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 50 µg 含有する液を調製した。この液 2.5 mL を 250 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 0.5 µg 含有する液を調製した。この液 50 mL を 250 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 0.1 µg 含有する検量線作成用標準原液を調製した（小麦、アルファルファ乾草及び稲わら）。

2)で調製した 3-OH カルボフラン標準原液 10 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 5 µg 含有する検量線作成用標準原液を調製した（乳用牛飼育用配合飼料及びとうもろこし）。

4) 小麦添加用標準液

2)で調製した 3-OH カルボフラン標準原液 50 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 50 µg 含有する液を調製した。この液 2.5 mL を 250 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 0.5 µg 含有する液を調製した。この液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 0.05 µg 含有する小麦添加用標準液を調製した。

5) アルファルファ乾草添加用標準液

2)で調製した 3-OH カルボフラン標準原液 50 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標

線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 50 μg 含有するアルファルファ乾草添加用標準液を調製した。

6) 稲わら添加用標準液

2)で調製した 3-OH カルボフラン標準原液 50 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 50 μg 含有する液を調製した。この液 4 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 2 μg 含有する稲わら添加用標準液を調製した。

7) 乳用牛飼育用配合飼料添加用標準液

2)で調製した 3-OH カルボフラン標準原液 4 mL を 20 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までメタノールを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 20 μg 含有する液を調製した。この液 5 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までメタノールを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 0.5 μg 含有する乳用牛飼育用配合飼料添加用標準液を調製した。

8) とうもろこし添加用標準液

2)で調製した 3-OH カルボフラン標準原液 4 mL を 20 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までメタノールを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 20 μg 含有する液を調製した。この液 2.5 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までメタノールを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 0.25 μg 含有するとうもろこし添加用標準液を調製した。

3)の検量線作成用標準原液及び 4)~8)の各添加用標準液（各 2 本、濃度は非通知）を 2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した。

2.3 定量方法

保田らの方法¹³⁾によった。

2.4 分析試料

非明示の 2 点反復で、2.1 の試験用試料を用いた。分析試料としては、小麦、アルファルファ乾草、稲わら、乳用牛飼育用配合飼料及びとうもろこしに 3-OH カルボフランとしてそれぞれ 0.01 mg/kg 相当量、10 mg/kg 相当量、0.4 mg/kg 相当量、0.1 mg/kg 相当量及び 0.05 mg/kg 相当量（試験用試料 5.0 g に対して 1 mL 中にそれぞれ 0.05 μg 、50 μg 、2 μg 、0.5 μg 及び 0.25 μg を含有する標準液 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。

2.5 報告方法

2.1 の分析試料 10 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。

2.6 分析実施期間

平成 29 年 11 月 6 日から平成 29 年 12 月 5 日まで（小麦、アルファルファ乾草及び稲わら）及び平成 30 年 1 月 29 日から平成 30 年 2 月 23 日まで（乳用牛飼育用配合飼料及びとうもろこし）

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^{14), 15)}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_f) 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¹⁶⁾を用いて HorRat を求めた。

3 参加試験室

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9試験室）

4 結果及び考察

結果は Table 2 のとおりであった。小麦，アルファルファ乾草，稲わら，乳用牛飼育用配合飼料及びとうもろこしについて，平均回収率はそれぞれ 87.4，95.7，87.6，81.4 及び 89.5 %， RSD_r はそれぞれ 3.0，2.8，2.2，5.8 及び 3.4 %， RSD_R はそれぞれ 24，12，11，11 及び 5.8 %，HorRat はそれぞれ 1.1，1.0，0.58，0.50 及び 0.27 であった。これらは飼料分析基準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。）に定められた室間再現精度の目標値を満たしていた。

参考のため，各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 3 に示した。

Table 2 Collaborative study for 3-Hydroxycarbofuran

Lab. No.	Feed types									
	Wheat		Alfalfa hay		Rice straw		Formula feed for dairy cattle		Corn	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.00848	0.00801	7.68	8.42	0.328	0.339	0.0751	0.0614	0.0443	0.0402
2	0.00916	0.00972	10.4	10.3	0.387	0.386	0.0935	0.0928	0.0499	0.0463
3	0.0114	0.0115	10.8	10.7	0.378	0.375	0.0833	0.0867	0.0448	0.0460
4	0.00892	0.00908	9.41	9.37	0.327	0.336	0.0764	0.0754	0.0432	0.0417
5	0.00638	0.00656	8.81	8.77	0.321	0.320	0.0861	0.0859	0.0449	0.0445
6	0.00926	0.00980	9.29	9.84	0.369	0.394	0.0837	0.0835	0.0469	0.0457
7	0.00455	0.00443	7.91	8.05	0.268	0.279	0.0730	0.0683	0.0418	0.0402
8	0.0101	0.0106	11.1	10.5	0.377	0.370	0.0883	0.0877	0.0463	0.0477
9	0.00952	0.00982	10.5	10.4	0.373	0.377	0.0889	0.0754	0.0463	0.0446
Spiked level (mg/kg)	0.01		10		0.4		0.1		0.05	
No. labs ^{a)}	9		9		9		9		9	
No. outliers ^{b)}	0		0		0		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.00874		9.57		0.350		0.0814		0.0447	
Mean recovery (%)	87.4		95.7		87.6		81.4		89.5	
RSD_r ^{c)} (%)	3.0		2.8		2.2		5.8		3.4	
RSD_R ^{d)} (%)	24		12		11		11		5.8	
$PRSD_R$ ^{e)} (%)	22		11		19		22		22	
HorRat	1.1		1.0		0.58		0.50		0.27	

- Number of laboratories retained after eliminating outliers
- Number of outlier laboratories removed in parentheses
- Relative standard deviation of repeatability within laboratory
- Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
- Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 3 Instruments used in the collaborative study

Lab.No	LC-MS/MS	LC column
		(i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quattro premier XE, Waters	Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
		ZORBAX Eclipse XDB-C18 Kanto Chemical (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
2	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
		ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Xevo TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
		ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
		Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
		CAPCELL PAK C18 MGIII Waters (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
		Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
7	LC: Prominence, Shimadzu MS/MS: LCMS-8050, Shimadzu	Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
		Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
8	LC: Prominence, Shimadzu MS/MS: LCMS-8060, Shimadzu	Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
		Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
9	LC: 1200 Series, Agilent Technologies MS/MS: API-3200 Q TRAP, AB SCIEX	Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
		Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)

5 まとめ

飼料中の 3-OH カルボフランについて、小麦、アルファルファ乾草、稲わら、乳用牛飼育用配合飼料及びとうもろこしに 3-OH カルボフランとしてそれぞれ 0.01 mg/kg 相当量、10 mg/kg 相当量、0.4 mg/kg 相当量、0.1 mg/kg 相当量及び 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 9 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、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における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 内閣府食品安全委員会：共通代謝物を有する農薬の評価方法について（案），
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/meetingMaterial/show/kai20060719no1>, cited 12 Apr. 2018.
- 2) 農薬ハンドブック 2005 年版編集委員会：農薬ハンドブック 2005 年版，東京，日本植物防疫協会，51-56 (2005) (ISBN: 978-4889260991).
- 3) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：登録失効有効成分，
<http://www.acis.famic.go.jp/toroku/sikkouseibun.htm>, cited 12 Apr. 2018.
- 4) 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).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：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の施行について，平成 18 年 5 月 26 日，18 消安第 2321 号 (2006).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 上路 雅子，小林 裕子，中村 幸二：残留農薬分析法，東京，ソフトサイエンス社，90-94 (2001) (ISBN 4-8817-1097-4).
- 9) 農薬残留分析法研究班編：最新農薬の残留分析法，東京，中央法規出版，110-112 (1995) (ISBN 4-8058-1321-0).
- 10) 後藤 真康，加藤 誠哉：増補 残留農薬分析法，東京，ソフトサイエンス社，32-35 (1987).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) 保田 伊世，長久保 眞平：飼料中の 3-OH カルボフラ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，**42**，34-46 (2017).
- 14) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 15) 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).
- 16) 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**6 飼料用イネ中のイミダクロプリドを飼料分析基準既収載法『クロチア ニジン, ジノテフラン及びチアメトキサム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』の分析対象化合物に追加するための 妥当性確認**

立石 洋暢*, 桑原 正良*

Validation Study on Analyte Expansion to the Simultaneous Determination Method for Clothianidin, Dinotefuran and Thiamethoxam in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice by LC-MS/MS for Imidacloprid

Hironobu TATEISHI* and Masayoshi KUWABARA*

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

A study to validate the inclusion of imidacloprid in analytes for the simultaneous determination method of clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam contained in rice straw, whole-crop rice silage (WCRS) and paddy rice was conducted. 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.

After adding water to a sample, imidacloprid and other pesticides were extracted with acetone, and the resulting solution was filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a volume of 200 mL. The solution was purified with two types of SPE columns (Chem Elut, 5mL, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA and InertSep GC/NH₂, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), and injected into a LC-MS/MS for determination of the concentration of pesticides including imidacloprid. LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from Agilent Technologies Inc.) with a gradient of 5 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on rice straw, WCRS and paddy rice to which imidacloprid had been added intentionally: 0.01 and 10 mg/kg for rice straw, 0.004 and 3.1 mg/kg for WCRS, and 0.01 and 1 mg/kg to paddy rice respectively. The resulting mean recoveries ranged from 83.1 % to 97.7 %, and the repeatability in the form of relative standard deviation (RSD_r) was less than 9.0 %.

This method was thus validated for use in the inspection of imidacloprid in rice straw, WCRS and paddy rice for feed.

Key words: imidacloprid; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice straw; whole-crop rice silage; paddy rice

キーワード：イミダクロプリド；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；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米

* 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

1 緒 言

イミダクロプリドは、1985年に日本特殊農薬製造株式会社（現：バイエルクロップサイエンス株式会社）により開発されたクロロニコチニル系殺虫剤であり、日本では1992年に初めて農薬登録されている¹⁾。飼料の残留基準値²⁾は、えん麦、大麦、小麦、とうもろこし及びマイロで0.05 mg/kg、牧草で0.5 mg/kgとされ、飼料の有害物質の管理基準値は稲わらで10 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）及び粳米で3 mg/kgとなっている³⁾。

イミダクロプリドの定量法は、穀類及び乾牧草を適用範囲とする分析法（以下「イミダクロプリド単成分分析法」という。）が飼料分析基準⁴⁾に記載されている。稲わら及びWCRSを対象とする分析法は記載されていない。中村らは、平成28年度にイミダクロプリド単成分分析法の適用範囲に稲わら及びWCRSを含めるための妥当性確認試験を行ったが、稲わらにおいて良好な回収率を得ることができなかった⁵⁾。このため、稲わら及びWCRSを対象とするイミダクロプリドの分析法の確立が急務となっていた。

今回、飼料分析基準に記載されているクロロニコチニル系殺虫剤であるクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサム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。）による同時分析法⁶⁾（以下「飼料分析基準既収載法」という。）にイミダクロプリドを追加することの可否を検討したので、その概要を報告する。

参考にクロチアニジン、ジノテフラン、イミダクロプリド及びチアメトキサムの構造式等をFig. 1に示した。

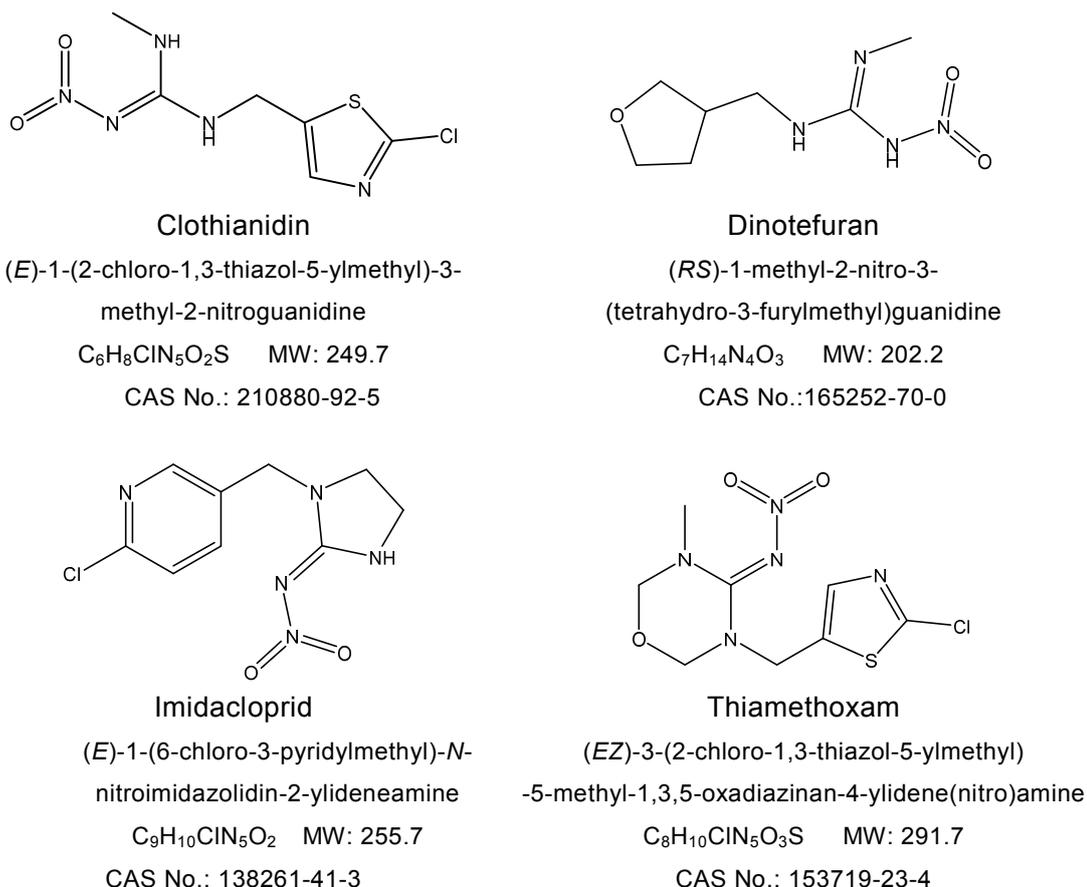


Fig. 1 Chemical structures of clothianidin, dinotefuran, imidacloprid and thiamethoxam

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び籾米はそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。WCRS は 60 °C で 10~21 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。

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 (和光純薬工業製)), アセトン, 酢酸エチル, ヘキサン及びメタノールは, 残留農薬・PCB 試験用を用いた。酢酸アンモニウムは 1 mol/L 溶液 (和光純薬工業製) 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) 各農薬標準品

クロチアニジン, ジノテフラン, イミダクロプリド及びチアメトキサムの標準品は, Table 1 に示した供給業者, 純度のものを用いた。

3) 各農薬標準原液

農薬標準品各 25 mg を正確に量ってそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ, クロチアニジン及びチアメトキサムについてはアセトンを加えて溶かし, ジノテフラン及びイミダクロプリドについてはメタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて各農薬標準原液を調製した (これらの液各 1 mL は, 各農薬として 0.5 mg を含有する。)

4) 農薬混合標準液

4 成分の各農薬標準原液の一定量を混合し、水-メタノール (9+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬として 10 µg を含有する農薬混合標準原液を調製した。

使用に際して、農薬混合標準原液の一定量を、水-メタノール (9+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬として 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100 ng を含有する各検量線作成用農薬混合標準液を調製した。

Table 1 Pesticides standards used in this study

Pesticides	Manufacturers	Chemical formula	MW	CAS No.	Purity (%)
Clothianidin	Dr.Ehrenstorfer	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S	249.7	210880-92-5	99.2
Dinotefuran	Wako Pure Chemical Industries	C ₇ H ₁₄ N ₄ O ₃	202.2	165252-70-0	99.0
Imidacloprid	Kanto Chemical	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	255.7	138261-41-3	99.6
Thiamethoxam	Wako Pure Chemical Industries	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	291.7	153719-23-4	99.8

2.3 装置及び器具

1) 粉砕機 :

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

粉砕機 2 (稲わら及び WCRS 用) : SM 2000 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm)

2) 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)

3) 多孔性ケイソウ土カラム : Chem Elut, 5 mL (5 mL 保持用) Agilent Technologies 製

4) グラファイトカーボン/アミノ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/NH₂ (500 mg/500 mg) ジーエルサイエンス製

5) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS/MS 部 : ACQUITY TQ Detector 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 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た。この液 20 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 2 mL まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

2) カラム処理 I

試料溶液を多孔性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 2 mL で洗浄し、洗液をカラムに加えた後、10 分間静置した。先のなす形フラスコをヘキサン 25 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。

200 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、先のなす形フラスコを酢酸エチル 20 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加えて各農薬を溶出させた。

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。アセトニトリル 5 mL を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。

3) カラム処理 II

ミニカラムをアセトニトリル 10 mL で洗浄した。100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、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流下し、各農薬を流出させた。試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル 10 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。

流出液を 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。水-メタノール (9+1) 20 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。

4) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各農薬混合標準液各 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 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm), Agilent Technologies
Mobile phase	5 mmol/L ammonium acetate solution-acetonitrile (9:1) → 15 min → acetonitrile (2 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Ion source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ (800 L/h, 500 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	0.5 kV
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

Table 3 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>)		
Clothianidin	250	132	—	15	15
		—	169	15	15
Dinotefuran	203	129	—	15	10
		—	157	15	10
Imidacloprid	256	175	—	25	20
		—	209	25	15
Thiamethoxam	292	211	—	20	15
		—	132	20	15

5) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のクロチアニジン、ジノテフラン、イミダクロプリド及びチアメトキサム量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Sample 10.0 g

- add 30 mL of water (paddy rice: 20 mL)
- allow to stand for 30 min
- add 120 mL of acetone (paddy rice: 100 mL)
- shake for 30 min
- filtrate with suction filter (No. 5B of JIS P 3801)
- wash with 50 mL of acetone
- fill up to 200 mL with acetone
- evaporate 20 mL of sample solution to the volume of about 2 mL under 40 °C

Chem Elut cartridge

- apply concentrated sample solution
- wash with 2 mL of water
- allow to stand for 10 min
- wash with 25 mL of hexane (twice)
- elute with 40 mL of ethyl acetate
- evaporate to dryness under 40 °C
- dissolve in 5 mL of acetonitrile

InertSep GC/NH₂

- prewash with 10 mL of acetonitrile
- apply sample solution
- wash with 10 mL of acetonitrile (twice)
- evaporate to dryness under 40 °C
- dissolve in 20 mL of water-methanol (9:1)

LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for clothianidin, dinotefuran, imidacloprid and thiamethoxam in rice straw, whole-crop rice silage (WCRS) and paddy rice

3 結果及び考察

3.1 LC-MS/MS による測定条件

液体クロマトグラフ部の測定条件は、飼料分析基準既収載法のとおりとした。イミダクロプリドの質量分析の測定条件については、Fig. 2 に示すマススペクトルよりプリカーサーイオンを m/z 256 に選定し、Fig. 3 に示すプリカーサーイオン (m/z 256) のプロダクトイオンスペクトルから、プロダクトイオン m/z 175 を定量用に、 m/z 209 を確認用に用いることとした。

また、その他の質量分析条件（イオン源温度，デソルベーション温度，キャピラリー電圧，コーン電圧及びコリジョンエネルギー）について当試験室で使用した機器への最適化を行った。

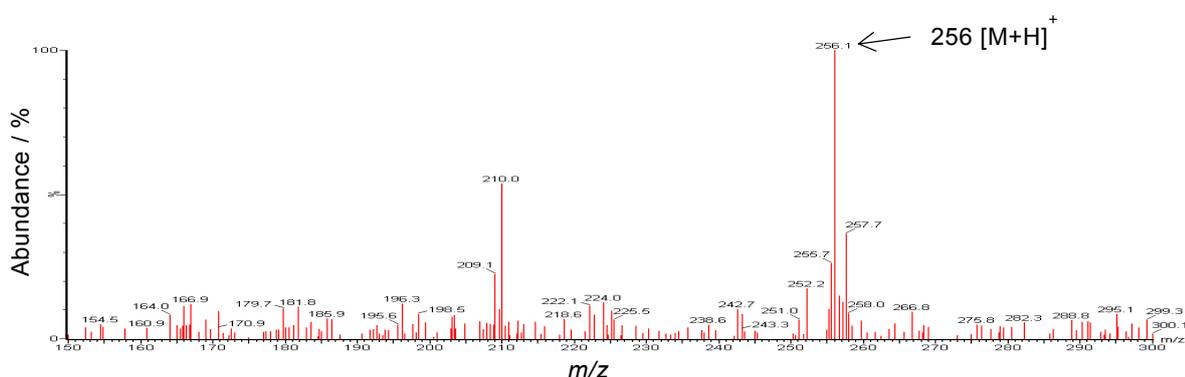


Fig. 2 Mass spectrum of imidacloprid (m/z 150~300)

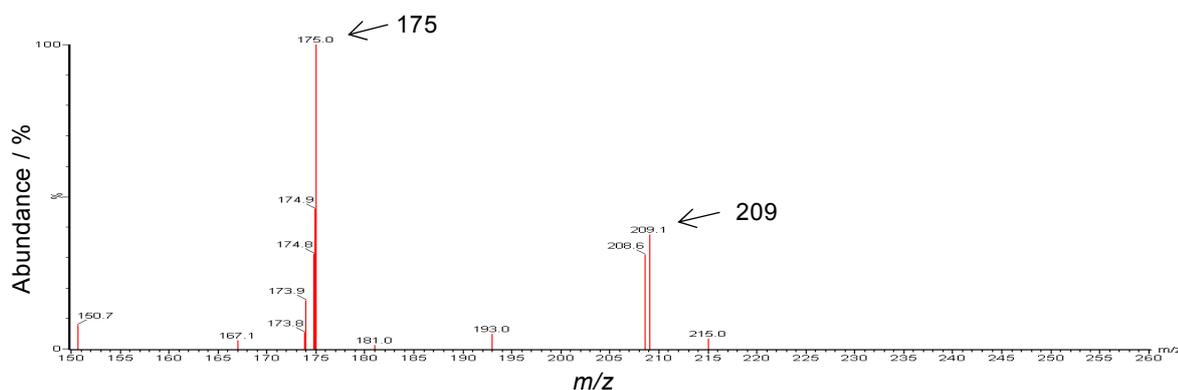


Fig. 3 Product ion spectrum of imidacloprid
(precursor ion m/z 256, collision energy 20eV, m/z 150~260)

3.2 検量線

2.2 の 4) に従って調製した各検量線作成用農薬混合標準液各 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、イミダクロプリドは 0.1~100 ng/mL（注入量として 0.0005~0.5 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、イミダクロプリドとして 0.002~2 mg/kg を含有する分析試料を本法に従い調製した最終試料溶液中のイミダクロプリド濃度範囲に相当する。

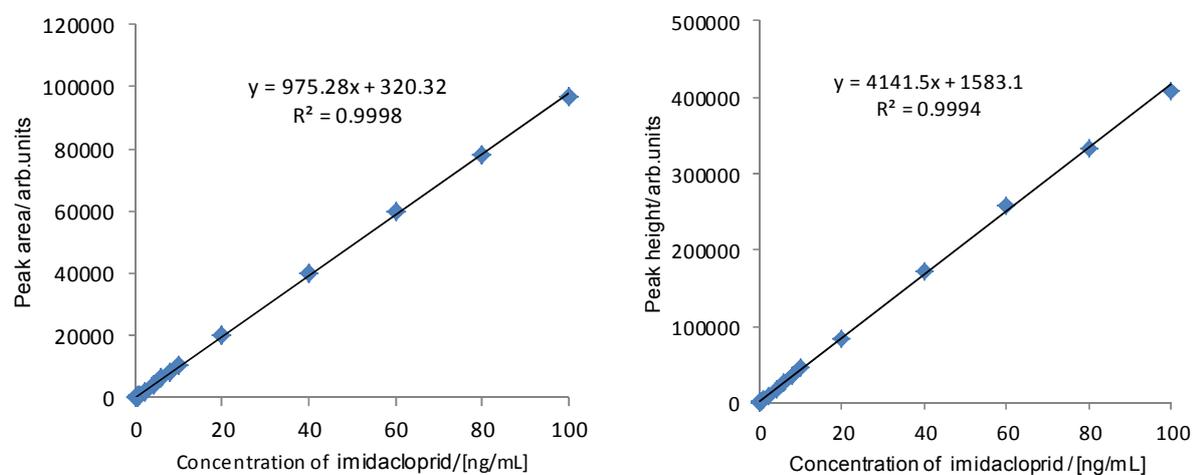


Fig. 4 Calibration curves of imidacloprid by peak area (left) and peak height (right)

3.3 妨害物質の検討

稲わら 2 検体、WCRS 4 検体及び粳米 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イミダクロプリド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. 5 に示した。

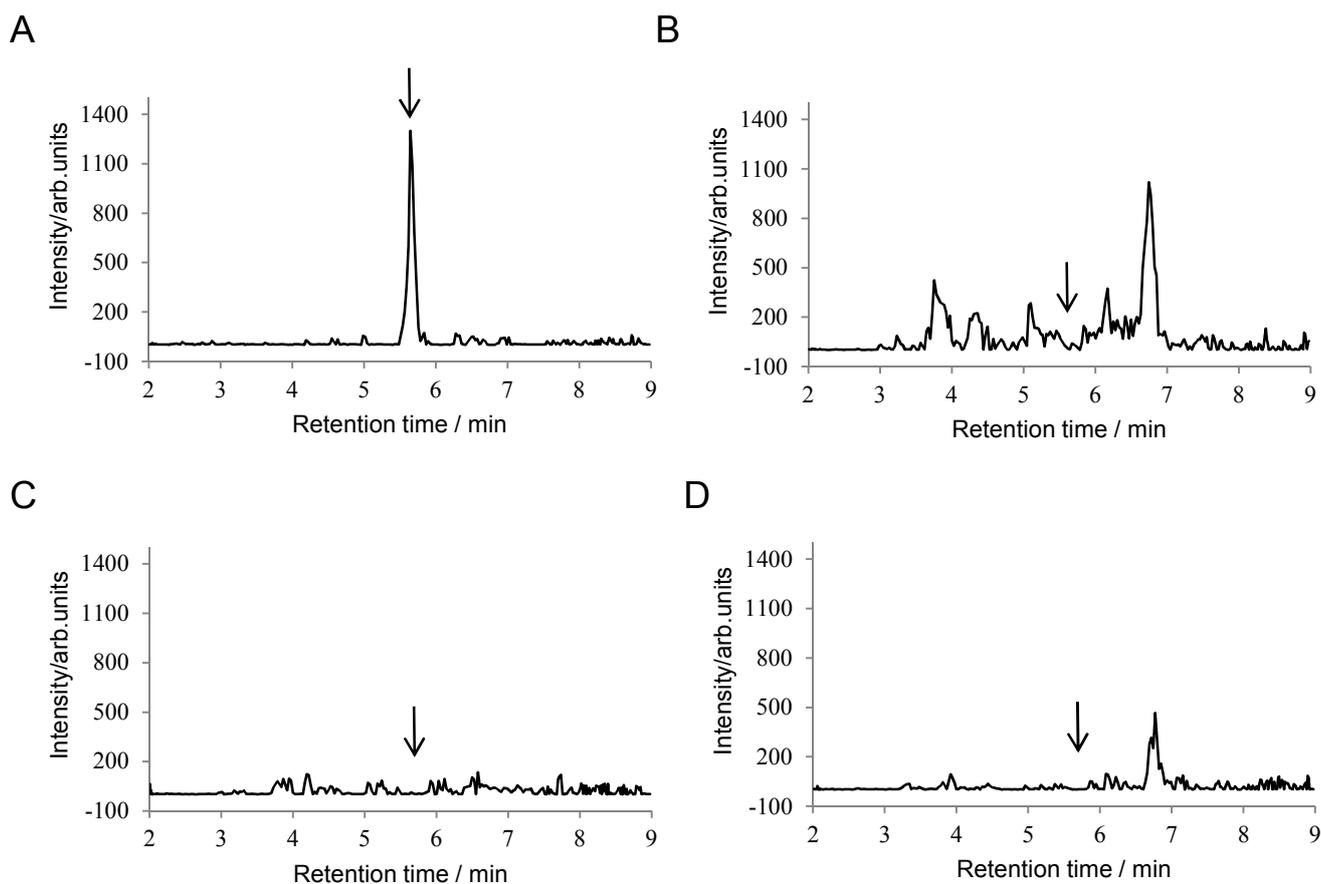


Fig. 5 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of standard and blank sample solutions

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

A: Standard solution (0.5 ng/mL: 2.5 pg as imidacloprid)

B~D: Blank samples (B: Rice straw, C: Whole-crop rice silage (WCRS), D: Paddy rice)

3.4 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 3)により調製した稲わら, WCRS 及び粳米のブランク試料溶液にクロチアニジン, ジノテフラン, イミダクロプリド及びチアメトキサムとして 0.1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 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農薬標準液に対するピーク面積比を確認したところ, Table 4 のとおりであり, 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 4 Results of matrix effect study

Pesticides	Rice straw			WCRS			Paddy rice		
	Concentration of pesticides		Matrix effect ^{b)} (%)	Concentration of pesticides		Matrix effect ^{b)} (%)	Concentration of pesticides		Matrix effect ^{b)} (%)
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample ^{a)} (mg/kg)		in matrix standard solution (ng/mL)	in sample ^{a)} (mg/kg air-dry matter)		in matrix standard solution (ng/mL)	in sample ^{a)} (mg/kg)	
Clothianidin	5	0.1	85	5	0.1	86	5	0.1	95
Dinotefuran	5	0.1	100	5	0.1	101	5	0.1	98
Imidacloprid	5	0.1	92	5	0.1	97	5	0.1	97
Thiamethoxam	5	0.1	92	5	0.1	94	5	0.1	99

$n = 3$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

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

3.5 添加回収試験

2.2 の 3)により調製したクロチアニジン標準原液，ジノテフラン標準原液，イミダクロプリド標準原液及びチアメトキサム標準原液をアセトンで正確に希釈し添加に用いた。

稲わらについて，イミダクロプリドとして 0.01 及び 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.5 ng/mL 及び 500 ng/mL），クロチアニジン及びジノテフランとして 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 500 ng/mL），チアメトキサムとして 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 ng/mL），WCRS について，イミダクロプリドとして 0.004 及び 3.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.5 及び 350 ng/mL），クロチアニジンとして 0.9 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 100 ng/mL），ジノテフランとして 4.9 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 550 ng/mL），チアメトキサムとして 0.09 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 ng/mL），粳米について，イミダクロプリドとして 0.01 及び 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.5 及び 50 ng/mL），クロチアニジンとして 5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 250 ng/mL），ジノテフランとして 15 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 750 ng/mL），チアメトキサムとして 3 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 150 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。ただし，最終試料溶液中の農薬濃度が検量線範囲を超える場合は，最終試料溶液を水-メタノール（9+1）で 10 倍希釈し，測定を行った。

なお，WCRS への添加は，風乾物試料に対してイミダクロプリドとして 0.01 及び 7 mg/kg 相当量，クロチアニジンとして 2 mg/kg 相当量，ジノテフランとして 11 mg/kg 相当量，チアメトキサムとして 0.2 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。

その結果は Table 5 のとおり，イミダクロプリドについては平均回収率は 83.1~97.7%，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD_r）として 9.0%以下の成績が得られ，飼料分析基準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ていた。また，クロチアニジン，ジノテフラン，イミダクロプリド及びチアメ

トキサムを同時に添加した場合でも各農薬の定量値への影響は認められないことから、飼料分析基準既収載法の分析対象化合物としてイミダクロプリド追加することが可能と考えられた。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 6 に示した。

Table 5 Recoveries for pesticides

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Sample					
		Rice straw		WCRS ^{c)}		Paddy rice	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Clothianidin	0.9 ^{d)}	—	—	87.1	5.7	—	—
	5	—	—	—	—	94.3	1.4
	10	90.6	1.4	—	—	—	—
Dinotefuran	4.9 ^{e)}	—	—	93.4	1.7	—	—
	10	91.4	1.1	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	91.4	5.5
Imidacloprid	0.004 ^{f)}	—	—	90.6	8.0	—	—
	0.01	83.1	5.9	—	—	97.7	9.0
	1	—	—	—	—	93.0	2.3
	3.1 ^{g)}	—	—	91.5	2.0	—	—
	10	90.3	1.8	—	—	—	—
Thiamethoxam	0.09 ^{h)}	—	—	90.3	3.7	—	—
	0.2	89.5	4.0	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	94.1	0.8

—: Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Pesticides were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The levels of pesticides 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 pesticides in original matter (moisture 60 %)

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

d) The spiked level was 2 mg/kg air-dry matter.

e) The spiked level was 11 mg/kg air-dry matter.

f) The spiked level was 0.01 mg/kg air-dry matter.

g) The spiked level was 7 mg/kg air-dry matter.

h) The spiked level was 0.2 mg/kg air-dry matter.

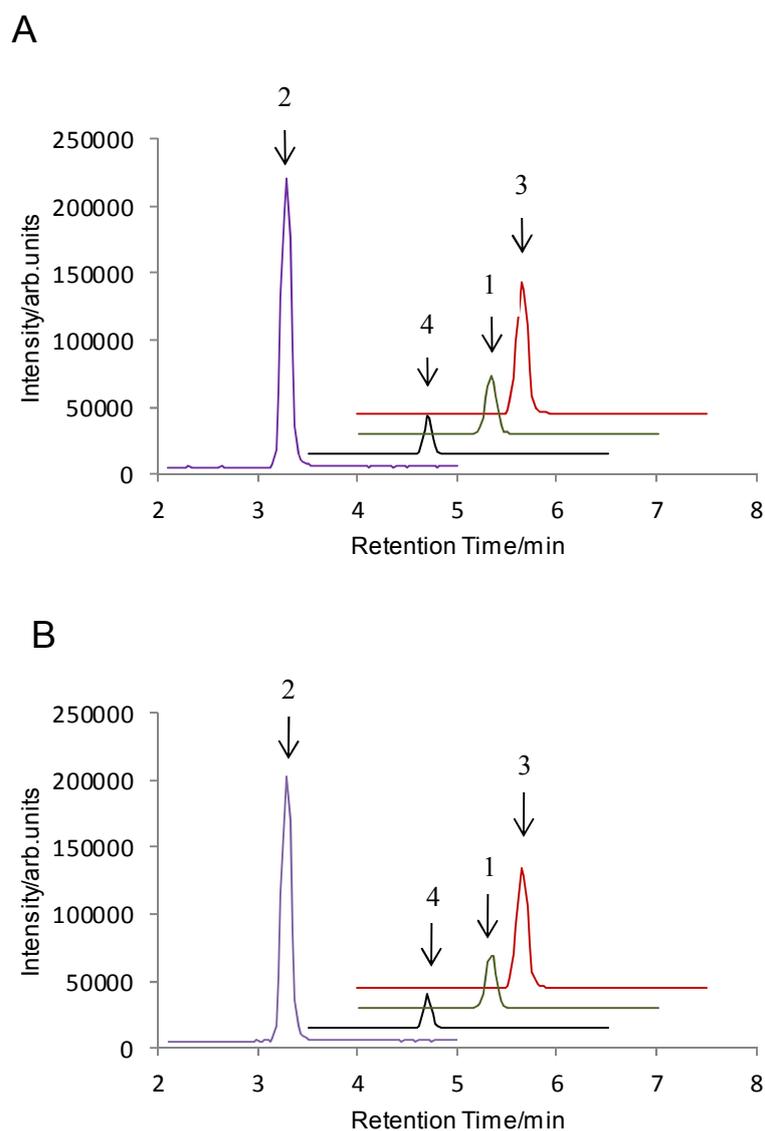


Fig. 6 SRM chromatograms on recovery test

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of 1: clothianidin, 2: dinotefuran, 3: imidacloprid and 4: thiamethoxam. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (50 ng/mL: 0.25 ng as clothianidin, dinotefuran and imidacloprid and 10 ng/mL: 0.05 ng as thiamethoxam)

B: Sample solution of rice straw (spiked at 10 mg/kg original matter of clothianidin, dinotefuran and imidacloprid (as 50 ng/mL in 10-fold diluted sample solution), and 0.2 mg/kg original matter of thiamethoxam (as 10 ng/mL in sample solution))

3.6 定量下限及び検出下限の検討

イミダクロプリドの検量線が直線性を示した範囲, 0.1~100 ng/mL の下端付近となる濃度 (稲わら, WCRS (風乾物中) 及び粃米で 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料液中濃度 0.5 ng/mL 相当量)) の添加回収試験の結果 (Table 5), 得られた分析値の標準偏差の 10 倍となる濃度は, 稲わら, WCRS (風乾物中) 及び粃米で, それぞれ 0.005 mg/kg, 0.007 mg/kg 及び 0.009 mg/kg であった

ため、イミダクロプリドの定量下限の濃度は 0.01 mg/kg とした。この濃度は、イミダクロプリドの稲わらの管理基準値 (10 mg/kg) , WCRS 中の管理基準値の風乾物中換算値 (6.75 mg/kg) 及び粃米の管理基準値 (3 mg/kg) に対してそれぞれ 1/1000, 1/675 及び 1/300 であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標を満たしていた。なお、Table 5 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。

検出下限は、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 倍を参考に 0.004 mg/kg とした。この濃度は、同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標を満たしていた。

4 まとめ

飼料用イネに残留するイミダクロプリドについて、飼料分析基準既収載法を基に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 0.1~100 ng/mL (注入量として 0.0005~0.5 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。
- 2) 稲わら、WCRS 及び粃米について、本法に従って得られた SRM 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、クロチアニジン、ジノテフラン、イミダクロプリド及びチアメトキサム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) 稲わら、WCRS 及び粃米における添加回収試験では、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。
- 5) 本法のイミダクロプリドの定量下限は稲わら、WCRS (風乾物中) 及び粃米で 0.01 mg/kg、検出下限は 0.004 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を満たしていた。

文 献

- 1) 食品安全委員会：農薬評価書 イミダクロプリド (第 3 版) , 平成 28 年 7 月 (2016).
- 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) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準の制定について, 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) 中村 哲, 井上 智江：飼料中のイミダクロプリドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法の妥当性確認, 飼料研究報告, **41**, 47-55 (2016).
- 6) 杉本 泰俊：飼料用イネ中のクロチアニジン, ジノテフラン及びチアメトキサムの液体クロマトグラフ質量分析計による同時定量法, 飼料研究報告, **37**, 1-18 (2012).

精度管理**1 平成 29 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 2017)**

安田 紗紀恵^{*1}, 齊木 雅一^{*2}, 三枝 尚子^{*3},
加藤 まどか^{*4}, 沼田 歩美^{*5}, 榊原 良成^{*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 29 年 6 月 22 日及び 6 月 23 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 370 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

^{*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 肥飼料安全検査部

^{*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 肥飼料安全検査部

^{*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 370 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 11 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 370 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	ふすま	7
マイロ	12	チキンミール	4
大麦	10	アルファルファミール	3
精白米	10	リン酸カルシウム	3
大豆油かす	10	食塩	2
コーングルテンミール	9		

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 370 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 29 年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領」（101 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	18.69	18.51	5.57	5.72	63.28	63.06	23.16	23.11	58.35	58.70	63.24	66.58
2	18.96	18.56	5.57	5.52	62.51	63.49	23.64	22.95	58.43	58.49	60.84	65.54
3	19.16	18.71	5.69	5.57	62.73	63.35	23.04	22.67	59.31	58.13	63.37	62.44
4	18.68	18.84	5.59	5.77	63.49	63.32	23.25	23.19	58.36	58.77	60.85	61.08
5	18.21	18.90	5.57	5.60	62.36	62.81	22.93	23.92	58.58	58.19	59.56	61.63
6	18.88	18.28	5.68	5.60	62.21	63.56	23.52	23.35	58.21	58.24	59.42	63.95
7	18.43	18.40	5.65	5.56	63.23	60.93	23.29	23.21	57.99	58.16	63.88	63.34
8	18.64	19.02	5.71	5.50	63.55	63.22	22.93	23.27	58.38	58.64	61.84	60.16
9	18.53	18.80	5.74	5.56	63.03	63.22	23.08	22.94	58.21	58.17	62.85	62.59
10	18.68	18.81	5.57	5.61	62.95	62.16	23.23	22.72	57.97	58.36	61.37	65.03

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 S	自由度 ϕ	不偏分散 $V = S/\phi$	分散比 $F_0 = V_A/V_E$	F境界値 $F(\alpha = 0.05)$
A試料	試料間 A	0.4087	9	0.0454	0.60	3.02
	粗たん白質 分析誤差 E	0.7521	10	0.0752		
	総計 T	1.1607	19			
B試料	A	0.0275	9	0.0031	0.37	3.02
	粗灰分 E	0.0827	10	0.0083		
	T	0.1102	19			
B試料	A	3.0553	9	0.3395	0.71	3.02
	粗たん白質 E	4.7653	10	0.4765		
	T	7.8206	19			
D試料	A	0.6575	9	0.0731	0.72	3.02
	粗灰分 E	1.0149	10	0.1015		
	T	1.6724	19			
D試料	A	0.7870	9	0.0874	0.84	3.02
	銅 E	1.0449	10	0.1045		
	T	1.8319	19			
D試料	A	34.2267	9	3.8030	1.01	3.02
	亜鉛 E	37.7732	10	3.7773		
	T	71.9999	19			

6 参加試験室

- 6.1 総数 232
- うち 飼料検査指導機関…46
 - 飼料製造業者関係…149
 - 飼料添加物製造業者関係…15
 - 民間分析機関等…22
- 6.2 試料別参加試験室数
- A 試料…225
 - B 試料…222
 - C 試料…121
 - D 試料…80

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	11.50	1 -1.47	18.64	3 0.09	5.70	2 -1.34			5.21	1 -4.51	1.035	2 0.42	0.658	1 2.14			48.5	3 0.31
2	11.81	1 -0.45	18.41	3 -0.97	5.93	1 0.00	4.92	2 0.62	5.74	1 0.98	1.012	2 -0.16	0.612	1 -1.50				
3	11.52	1 -1.40	18.71	4 0.41	6.11	1 1.05			5.69	1 0.46								
4	12.06	1 0.35	18.61	4 -0.04	5.83	2 -0.58	5.11	3 1.05	5.69	1 0.46	1.090	1 1.83	0.619	1 -0.95			51.1	3 1.49
5	11.97	1 0.06	18.36	4 -1.20	5.61	2 -1.87	5.02	2 0.85	5.72	1 0.77	1.091	2 1.86	0.629	1 -0.15				
6	12.22	1 0.88	18.90	3 1.30	5.89	1 -0.23			5.59	1 -0.57					50.0	2 0.00		
8	11.68	1 -0.88	18.61	3 -0.04	5.80	1 -0.76	4.43	2 -0.47	5.70	1 0.57	0.935	2 -2.14	0.640	1 0.71				
9	11.99	1 0.13	18.56	3 -0.27	5.75	1 -1.05	4.92	2 0.62	5.76	1 1.19	1.005	2 -0.34	0.649	1 1.42				
12	12.24	1 0.94	19.08	4 2.13	5.82	2 -0.64			5.52	1 -1.29								
14	12.44	1 1.60	18.30	4 -1.48					5.64	1 -0.05	1.005	2 -0.34	0.615	1 -1.26				
15			18.71	3 0.41	6.13	1 1.17			5.79	1 1.50								
16	11.59	1 -1.17	18.71	3 0.41	6.69	1 4.45	4.24	2 -0.89	5.76	1 1.19	0.986	2 -0.83	0.623	1 -0.63				
17	12.07	1 0.39	18.66	3 0.18					5.74	1 0.98	1.028	2 0.24	0.623	1 -0.63				
18	11.53	1 -1.37	18.72	1 0.46	6.25	1 1.87			5.62	1 -0.25								
20	12.04	1 0.29	18.65	3 0.13	5.86	1 -0.41	5.13	2 1.10	5.64	1 -0.05	1.076	2 1.47	0.636	1 0.39			48.1	3 0.13
21	11.85	1 -0.32	18.51	4 -0.51	5.85	2 -0.46	4.46	3 -0.40	5.65	1 0.05	1.031	3 0.32	0.649	1 1.42				
22	12.12	1 0.55	18.65	3 0.13	5.86	2 -0.41			5.68	1 0.36								
23	11.77	1 -0.58	18.64	3 0.09	6.04	1 0.64	4.40	2 -0.53	5.63	1 -0.15	1.050	2 0.80	0.623	1 -0.63				
24	12.02	1 0.22	18.63	3 0.04	5.79	2 -0.82			5.52	1 -1.29	0.998	2 -0.52	0.622	1 -0.71	55.6	2 2.47		
29	11.55	1 -1.30	19.11	3 2.27	5.93	1 0.00	4.26	2 -0.85	5.69	1 0.46	0.997	2 -0.55	0.634	1 0.23			46.7	3 -0.49
32	11.70	1 -0.81	18.80	3 0.83	5.79	2 -0.82	5.56	3 2.06	5.75	1 1.08	1.020	2 0.03	0.630	1 -0.07			45.6	3 -0.99
33	11.90	1 -0.16	18.59	3 -0.13	5.80	2 -0.76	4.93	3 0.65	5.68	1 0.36	0.983	1 -0.91	0.631	1 0.00			47.0	3 -0.36
34			18.83	2 0.97														
35	11.81	1 -0.45	18.40	1 -1.02	5.82	2 -0.64	4.96	3 0.71	5.61	1 -0.36	1.063	2 1.14	0.651	1 1.58			46.2	3 -0.72
36	11.99	1 0.13	18.59	4 -0.13	5.90	2 -0.17	4.84	3 0.44	5.46	1 -1.91	1.049	3 0.78	0.610	1 -1.66	48.4	1 -0.70		
37	12.30	1 1.14	18.47	3 -0.69	6.05	1 0.70			5.60	1 -0.46	1.006	2 -0.32	0.631	1 0.00			48.0	3 0.10
38	11.90	1 -0.16	18.01	4 -2.83	5.97	1 0.23			5.42	1 -2.33								
39	10.24	2 -5.59																
40	11.68	1 -0.88	18.88	3 1.20	6.17	2 1.40			5.76	1 1.19	1.011	2 -0.19	0.630	1 -0.07	46.9	1 -1.37		
42	12.11	1 0.52	18.66	2 0.18	6.18	1 1.46	4.50	2 -0.31	5.73	1 0.88	1.087	2 1.76	0.635	1 0.31				
43	11.77	1 -0.58	18.97	3 1.62					5.56	1 -0.88	1.052	2 0.86	0.644	1 1.03				
44	11.92	1 -0.09	18.61	3 -0.04	5.81	2 -0.70	5.37	3 1.64	5.63	1 -0.15	1.050	2 0.80	0.637	1 0.47			47.9	3 0.04
45	12.18	1 0.75	18.59	3 -0.13	5.89	1 -0.23	4.70	2 0.13	5.68	1 0.36	1.057	2 0.98	0.637	1 0.47	48.4	1 -0.70		
31	11.94	1 -0.03	18.76	3 0.65					5.24	1 -4.20					50.4	1 0.17		
46	11.70	1 -0.81	18.59	4 -0.13	6.02	2 0.52			5.63	1 -0.15								
47	11.70	1 -0.81	18.75	3 0.60	5.93	1 0.00			5.62	1 -0.25								
48	11.12	1 -2.71	18.36	2 -1.20	6.13	1 1.17			5.72	1 0.77								
49	11.36	1 -1.92	18.33	4 -1.34	5.94	1 0.05			5.69	1 0.46			0.637	1 0.47				
50	11.94	1 -0.03	18.45	4 -0.79	6.02	1 0.52			5.67	1 0.25								
51	11.80	1 -0.49	19.07	3 2.09					5.83	1 1.91							46.9	3 -0.40
52			18.69	3 0.32	5.90	2 -0.17	5.04	3 0.89										
53	11.75	2 -0.65	18.84	3 1.02					5.63	2 -0.15								
54	11.92	1 -0.09	17.83	1 -3.67	6.29	1 2.11	4.46	2 -0.40	5.44	1 -2.12	1.017	2 -0.03	0.636	1 0.39				
55	11.74	1 -0.68	18.83	2 0.97	5.91	1 -0.11	4.87	3 0.51	5.58	1 -0.67	1.018	2 -0.01	0.625	1 -0.47				
56	11.81	1 -0.45	18.81	3 0.88	6.16	2 1.34	4.87	3 0.51	5.49	1 -1.60	1.019	2 0.01	0.624	1 -0.55				
57	12.38	1 1.40	18.29	4 -1.53	6.13	1 1.17	5.29	3 1.46	5.58	1 -0.67	1.005	2 -0.34	0.637	1 0.47				
58	11.48	1 -1.53	18.67	4 0.23	5.88	2 -0.29	4.71	3 0.15	5.79	1 1.50								
59	11.29	1 -2.15	18.22	4 -1.86	5.64	2 -1.70	5.29	3 1.46	5.77	1 1.29	0.861	2 -4.04	0.628	1 -0.23				
60	12.02	1 0.22	18.93	3 1.44	6.24	1 1.81	4.07	2 -1.28	5.67	1 0.25	0.950	2 -1.76	0.635	1 0.31			49.2	4 0.63
61									5.91	2 2.74	0.805	3 -5.48	0.742	2 8.80				
65	12.25	1 0.98	18.47	4 -0.69	6.06	1 0.76			5.81	1 1.71	1.012	2 -0.16	0.643	1 0.95				
70	12.14	1 0.62	18.56	1 -0.27	6.09	1 0.93	4.18	2 -1.03	5.62	1 -0.25	1.018	2 -0.01	0.636	1 0.39				
70			18.46	3 -0.74														
70			18.59	4 -0.13														
71	12.00	1 0.16	18.18	1 -2.04	6.09	1 0.93	4.40	2 -0.53	5.67	1 0.25	1.028	2 0.24	0.627	1 -0.31				
71			18.63	3 0.04														
72	11.63	1 -1.04	19.12	1 2.32	6.03	1 0.58	4.86	2 0.49	5.31	1 -3.47	1.030	2 0.29	0.641	1 0.79				
75	11.59	1 -1.17	18.19	2 -2.00	5.77	1 -0.93	4.62	3 -0.04	5.65	1 0.05	0.944	2 -1.91	0.592	1 -3.09				
76			18.12	1 -2.32	5.95	1 0.11	4.72	1 0.17	5.68	1 0.36	1.016	1 -0.06	0.628	1 -0.23				
77	12.34	1 1.27	18.64	3 0.09	6.37	2 2.58	5.31	3 1.50	5.71	1 0.67	1.079	2 1.55	0.605	1 -2.06				
78	11.74	1 -0.68	18.76	3 0.65	5.82	2 -0.64	4.25	4 -0.87	5.40	1 -2.54	1.021	2 0.06	0.638	1 0.55				
79	12.21	1 0.85	18.63	3 0.04	5.85	1 -0.46	5.16	1 1.16	5.45	1 -2.02	1.007	3 -0.29	0.654	1 1.82				
81	11.71	1 -0.78							5.71	1 0.67	1.021	2 0.06	0.631	1 0.00			53.8	4 2.72
82	12.01	1 0.19	18.53	3 -0.41	5.92	2 -0.05			5.66	1 0.15	1.120	2 2.60	0.633	1 0.15	48.7	1 -0.57		
83	11.99	1 0.13	18.71	3 0.41					5.73	1 0.88	1.003	2 -0.39	0.631	1 0.00			45.4	3 -1.08
84	11.91	1 -0.13	19.24	3 2.88	5.90	1 -0.17	4.38	2 -0.58	5.32	1 -3.37								
84			18.40	4 -1.02														
85	12.09	1 0.45	19.04	2 1.95	5.91	1 -0.11	4.81	2 0.38	5.61	1 -0.36	1.010	2 -0.21	0.645	1 1.11	49.0	1 -0.44	46.8	3 -0.45
85																	51.0	4 1.45
86			18.69	3 0.32	5.90	2 -0.17	5.04	3 0.89										
87	12.14	1 0.62	18.99	3 1.72	6.04	2 0.64			5.60	1 -0.46	1.312	1 7.54	0.635	1 0.31				
88			18.50	3 -0.55														
89	11.95	1 0.00	18.15	1 -2.18	5.99	1 0.35	4.26	2 -0.85	5.15	1 -5.13	1.004	2 -0.37	0.632	1 0.07				
90	11.77	1 -0.58	17.64	2 -4.55	4.79	1 -6.68	4.24	1 -0.89	5.65	1 0.05	0.987	2 -0.80	0.628	1 -0.23				
91	11.48	1 -1.53													51.9	1 0.84		

の分析成績 (1)

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	クエン酸モランブル 分析値 (g/kg) No. z-score	
9.65 1 -0.93	63.67 3 1.81	22.81 1 -2.36						1
9.68 1 -0.76	62.30 3 -0.15	23.42 1 1.33				59.62 1 0.72	59.77 1 -0.72	2
9.81 1 0.00	62.37 4 -0.05	23.11 1 -0.54						3
9.79 1 -0.11	62.38 4 -0.04	23.01 1 -1.15					14.4 1 -1.51	4
9.86 1 0.29	60.97 4 -2.07	23.09 1 -0.66						5
9.84 1 0.17	62.52 3 0.15	23.16 1 -0.24						6
9.73 1 -0.46	63.47 3 1.52	23.12 1 -0.48						8
9.91 1 0.58	62.41 3 0.00	23.34 1 0.84				57.39 1 -0.66	62.06 1 -0.12	9
9.53 1 -1.64	63.80 4 2.00	22.90 1 -1.81						12
10.02 1 1.23	61.91 4 -0.71	23.30 1 0.60						14
	62.45 3 0.05	23.22 1 0.12						15
9.13 1 -3.98	63.60 3 1.71	23.60 1 2.42	0.28 2 -0.34					16
9.82 1 0.05	63.10 3 0.99	23.72 1 3.15				58.91 1 0.28	70.02 1 1.92	17
9.85 1 0.23	62.56 1 0.21	23.29 1 0.54						18
9.97 1 0.93	62.52 3 0.15	23.15 1 -0.30				58.12 1 -0.21	65.28 1 0.70	20
9.96 1 0.87	62.13 4 -0.40	23.19 1 -0.06						21
9.93 1 0.70	61.92 3 -0.70	23.32 1 0.72						22
9.77 1 -0.23	62.69 3 0.40	23.26 1 0.36						23
9.75 1 -0.35	62.62 3 0.30	23.08 1 -0.72						24
9.53 1 -1.64	62.74 3 0.47	22.98 1 -1.33	0.32 2 1.03	53.3 1 -1.29		59.00 1 0.33	62.20 1 -0.09	29
9.57 1 -1.40	62.98 3 0.82	23.27 1 0.42					15.1 1 -0.33	32
9.77 1 -0.23	63.03 3 0.89	23.05 1 -0.90					16.1 1 1.34	33
	62.02 2 -0.56							34
9.93 1 0.70	61.32 1 -1.56	23.27 1 0.42	0.29 2 0.00			57.16 1 -0.81	57.81 1 -1.22	35
10.10 1 1.70	61.22 4 -1.71	23.03 1 -1.03						36
9.91 1 0.58	62.42 3 0.01	23.01 1 -1.15						37
9.66 1 -0.87	60.13 4 -3.28	22.73 1 -2.84						38
9.35 2 -2.69								39
9.75 1 -0.35	63.51 3 1.58	23.10 1 -0.60						40
9.82 1 0.05	61.68 2 -1.05	23.19 1 -0.06	0.26 2 -1.03			51.90 1 -4.09	54.69 1 -2.03	42
9.64 1 -0.99	63.79 3 1.98	23.11 -0.54						43
9.76 1 -0.29	62.35 3 -0.08	23.32 1 0.72					15.1 1 -0.30	44
9.72 1 -0.52	62.73 3 0.46	23.11 1 -0.54						45
9.86 1 0.29	62.25 3 -0.23	22.91 1 -1.75						31
9.67 1 -0.82	61.62 4 -1.13	23.19 1 -0.06						46
9.68 1 -0.76	62.80 3 0.56	23.21 1 0.06						47
9.08 1 -4.28	61.76 2 -0.93	23.41 1 1.27						48
9.67 1 -0.82	63.18 4 1.10	23.20 1 0.00						49
9.53 1 -1.64	61.88 4 -0.76	23.26 1 0.36						50
9.83 1 0.11	62.75 3 0.48	23.29 1 0.54						51
	62.95 3 0.77							52
9.76 2 -0.29	62.78 3 0.53	23.09 2 -0.66						53
9.88 1 0.41	62.09 1 -0.46	23.11 1 -0.54	0.29 1 0.00			60.27 1 1.13	71.06 1 2.19	54
9.90 1 0.52	63.24 2 1.19	22.87 1 -2.00						55
9.32 1 -2.87	62.62 3 0.30	23.55 1 2.12	0.32 2 0.89			58.21 1 -0.15	62.65 1 0.02	56
10.19 1 2.22	60.45 4 -2.82	23.36 1 0.97						57
9.58 1 -1.34	61.04 4 -1.97	23.18 1 -0.12						58
9.67 1 -0.82	59.81 4 -3.74	23.59 1 2.36	0.37 2 2.76			58.90 1 0.27	59.87 1 -0.69	59
9.85 1 0.23	63.33 3 1.32	23.19 1 -0.06	0.30 2 0.48	58.0 1 -0.52		58.95 1 0.30	63.01 1 0.11	60
		23.89 2 4.18	0.00 3 -10.03			5.35 2 -33.16	4.18 2 -15.10	61
9.95 1 0.82	61.88 4 -0.76	23.25 1 0.30	0.26 1 -1.03	61.4 1 0.03		59.44 1 0.61	60.31 1 -0.58	65
9.81 1 0.00	62.11 1 -0.43	23.16 1 -0.24	0.29 1 0.00			57.81 1 -0.40	61.12 1 -0.37	70
	62.76 3 0.50							70
	62.11 4 -0.43							70
9.97 1 0.93	60.58 1 -2.63	22.93 1 -1.63	0.29 2 0.00			60.20 1 1.08	64.10 1 0.39	71
	63.94 3 2.20							71
9.51 1 -1.75	62.43 1 0.02	23.05 1 -0.90	0.29 2 0.00			57.82 1 -0.39	67.48 1 1.27	72
9.41 1 -2.34	61.87 2 -0.77	23.28 1 0.48	0.26 2 -1.03			59.17 1 0.44	63.25 1 0.17	75
								76
10.02 1 1.23	62.27 3 -0.20	23.36 1 0.97				58.77 1 0.19		77
9.68 1 -0.76	63.11 3 1.00	23.02 1 -1.09			70.0 1 1.44	57.40 1 -0.66	65.33 1 0.71	78
								79
9.64 1 -0.99		23.34 1 0.84	0.34 2 1.72			55.16 1 -2.06	60.46 1 -0.54	81
9.84 1 0.17	62.52 3 0.15	23.29 1 0.54					16.5 1 2.02	82
9.96 1 0.87	62.46 3 0.07	23.23 1 0.18				60.69 1 1.39	63.56 1 0.25	83
9.79 1 -0.11	63.68 3 1.82	22.90 1 -1.81						84
	61.40 4 -1.45							84
9.95 1 0.82	61.31 2 -1.58	23.21 1 0.06	0.28 1 -0.34	61.2 1 0.00		58.66 1 0.12	63.91 1 0.34	85
	62.95 3 0.77							86
9.91 1 0.58	63.51 3 1.58	23.07 1 -0.78			64.0 1 0.46			87
	62.57 3 0.23							88
						57.43 1 -0.64	61.55 1 -0.26	89
9.87 1 0.35	65.49 2 4.43	23.29 1 0.54	0.31 2 0.69			56.79 1 -1.04	63.67 1 0.28	90
9.67 1 -0.82						62.40 1 2.46	64.18 1 0.41	91

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													
175	11.93	1 -0.06	18.30	2 -1.48	5.99	1 0.35	4.36	2 -0.62	5.69	1 0.46	1.003	2 -0.39	0.629	1 -0.15			49.6	4 0.81	
175																			
195	11.76	1 -0.62	18.49	2 -0.60	5.78	1 -0.87	4.25	2 -0.87	5.69	1 0.46	1.072	2 1.36	0.637	1 0.46					
196	11.64	1 -1.01	18.51	4 -0.51	5.74	1 -1.11	4.11	2 -1.19	5.62	1 -0.25	1.053	1 0.88	0.642	1 0.87			47.1	3 -0.31	
197	12.18	1 0.75	18.34	3 -1.30	6.07	1 0.82	4.50	2 -0.31	5.65	1 0.05	1.010	2 -0.21	0.620	1 -0.87					
198	12.25	1 0.98	18.83	3 0.97	5.92	2 -0.05			5.68	1 0.36									
199	11.60	1 -1.14	18.76	3 0.65	5.83	2 -0.58	3.24	2 <u>-3.14</u>	5.71	1 0.67	1.005	2 -0.34	0.630	1 -0.07			50.9	3 1.40	
201	12.50	1 1.79			5.97	1 0.23	4.41	2 -0.51	4.79	1 <u>-8.87</u>			0.601	1 -2.38					
202																			
203	12.21	1 0.85	18.73	2 0.51	6.04	1 0.64	4.36	2 -0.62	5.38	1 -2.74	1.062	2 1.11	0.631	1 0.00					
204	11.50	1 -1.47	18.32	2 -1.39					5.13	1 <u>-5.34</u>									
205																			
206	11.77	1 -0.58					4.08	2 -1.25	5.62	1 -0.25					48.1	1 -0.84			
207	11.62	1 -1.07	18.59	2 -0.13	6.06	1 0.76	4.74	1 0.22	5.63	1 -0.15	0.970	2 -1.24	0.645	1 1.11					
208	12.01	1 0.19	18.66	3 0.18	5.66	2 -1.58	4.95	2 0.69	5.75	1 1.08									
209	11.95	1 0.00	18.73	2 0.51	5.64	1 -1.70	3.95	2 -1.55	5.62	1 -0.25	1.116	2 2.50	0.666	1 2.77					
210	12.54	1 1.92	18.02	4 -2.79	5.92	1 -0.05	4.97	2 0.74	5.29	1 <u>-3.68</u>	0.981	2 -0.96	0.616	1 -1.19					
211	12.26	1 1.01	18.83	3 0.97	6.17	1 1.40	4.51	1 -0.29	5.67	1 0.25	0.905	1 -2.91	0.632	1 0.07					
213	11.95	1 0.00	18.75	3 0.60	6.07	1 0.82			5.67	1 0.25	1.098	2 2.04	0.638	1 0.55	47.7	2 -1.01			
214	12.32	1 1.21	18.64	4 0.09	5.88	1 -0.29	4.72	1 0.17	5.61	1 -0.36									
215	11.89	1 -0.19	19.00	3 1.76	5.90	1 -0.17	5.23	2 1.32	5.63	1 -0.15	0.987	1 -0.80	0.630	1 -0.07					
216	12.14	1 0.62	18.43	3 -0.88	6.09	1 0.93	4.30	2 -0.76	5.64	1 -0.05	1.110	2 2.35	0.609	1 -1.74			48.7	3 0.40	
217	12.09	2 0.45	18.61	4 -0.04	5.96	1 0.17	4.63	2 -0.02	5.55	1 -0.98	1.048	2 0.75	0.562	1 <u>-5.47</u>			48.7	3 0.40	
218	11.66	1 -0.94	19.12	3 2.32	6.18	1 1.46	5.72	3 2.42	5.09	1 <u>-5.75</u>	1.893	2 <u>22.47</u>	0.532	1 <u>-7.85</u>					
219	12.20	1 0.81	18.81	3 0.88	6.06	1 0.76	4.53	2 -0.24	5.64	1 -0.05	0.988	2 -0.78	0.645	1 1.11			50.5	3 1.21	
220	12.00	1 0.16	18.65	3 0.13	5.94	1 0.05	4.56	2 -0.17	5.68	1 0.36	1.030	1 0.29	0.618	1 -1.03					
221			18.69	3 0.32	5.90	2 -0.17	5.04	3 0.89											
222	11.56	1 -1.27	18.66	2 0.18	6.18	1 1.46													
223	11.86	1 -0.29	18.55	4 -0.32	5.93	1 0.00	4.60	1 -0.08	5.52	1 -1.29	1.082	1 1.63	0.626	1 -0.39					
224	11.90	1 -0.16	17.36	1 <u>-5.86</u>	4.75	1 <u>-6.92</u>			5.31	1 <u>-3.47</u>									
225	11.83	1 -0.39	18.62	3 0.00	6.12	1 1.11	4.61	2 -0.06	5.56	1 -0.88									
226	12.10	1 0.49	18.60	2 -0.09	6.03	1 0.58	4.55	2 -0.20	5.58	1 -0.67	0.976	1 -1.09	0.601	1 -2.38					
227	12.29	1 1.11	18.34	2 -1.30	5.99	1 0.35	4.01	2 -1.41	5.49	1 -1.60	1.034	1 0.39	0.633	1 0.15			46.0	3 -0.81	
228	12.03	1 0.26	18.62	3 0.00	6.08	1 0.87	4.20	2 -0.98	5.64	1 -0.05					50.8	1 0.33			
229	11.43	1 -1.70	18.00	4 -2.88	5.62	2 -1.81	5.65	3 2.27	5.55	1 -0.98	1.081	2 1.60	0.631	1 0.00					
230	12.20	1 0.81	18.50	4 -0.55	5.88	2 -0.29	4.34	1 -0.67	5.65	1 0.05	1.023	2 0.11	0.625	1 -0.47			46.6	3 -0.54	
231	12.22	1 0.88	18.81	3 0.88	5.86	2 -0.41			5.70	1 0.57									
232	12.15	1 0.65	18.56	4 -0.27	5.83	2 -0.58	5.01	4 0.83	5.64	1 -0.05	1.001	1 -0.44	0.623	1 -0.63			52.6	3 2.17	
233	12.11	1 0.52	18.41	4 -0.97	5.99	1 0.35	4.14	2 -1.12	5.34	1 <u>-3.16</u>									
234	10.46	1 <u>-4.87</u>	17.90	2 <u>-3.34</u>	5.93	1 0.00	5.66	2 2.29	5.51	1 -1.40	1.529	2 <u>13.11</u>	0.665	1 2.69					
235	12.03	1 0.26	18.88	2 1.20	5.93	1 0.00			5.64	1 -0.05									
236	11.95	1 0.00	18.82	3 0.93	5.91	2 -0.11			5.73	1 0.88	1.018	2 -0.01	0.640	1 0.71			50.4	3 1.17	
254	11.75	1 -0.65	18.48	2 -0.65	6.10	1 0.99	4.78	2 0.31	5.70	1 0.57	1.075	2 1.45	0.637	1 0.47			49.6	4 0.81	
255	12.15	1 0.65	18.82	3 0.93	5.81	2 -0.70	5.02	3 0.85	5.61	1 -0.36	1.100	2 2.09	0.640	1 0.71	49.5	1 -0.22			
256	12.11	1 0.52	18.79	2 0.79	5.94	1 0.05			5.99	1 <u>3.58</u>									
257	11.92	1 -0.09	17.98	2 -2.97	6.06	1 0.76			5.80	1 1.60	0.872	2 <u>-3.76</u>	0.620	1 -0.87					
258	12.16	1 0.68	18.47	4 -0.69	6.49	1 <u>3.28</u>	3.09	1 <u>-3.48</u>	5.58	1 -0.67	1.009	2 -0.24	0.623	1 -0.63					
259	12.11	1 0.52	18.79	4 0.79	6.12	1 1.11			5.73	1 0.88	1.003	2 -0.39	0.652	1 1.66					
260	11.48	1 -1.53	18.10	3 -2.41	5.90	2 -0.17	4.66	1 0.04	5.65	1 0.05	1.030	2 0.29	0.642	1 0.87					
261	11.71	1 -0.78	18.67	3 0.23	6.03	1 0.58	5.04	2 0.89	5.42	1 -2.33	0.972	2 -1.19	0.679	1 <u>3.80</u>			45.0	3 -1.26	
262	12.20	1 0.81	18.81	3 0.88	5.83	1 -0.58			5.67	1 0.25	1.043	2 0.62	0.473	1 <u>-12.53</u>					
263	10.57	1 <u>-4.51</u>							5.86	1 2.23							47.6	3 -0.09	
264	11.82	1 -0.42							5.25	1 <u>-4.09</u>	1.111	2 2.37	0.641	1 0.79					
265	11.98	1 0.09	19.18	3 2.60	6.76	1 <u>4.86</u>	5.81	3 2.63	6.30	1 <u>6.79</u>	1.139	2 <u>3.09</u>	0.743	1 <u>8.88</u>					
266	11.91	1 -0.13	18.50	4 -0.55	6.08	1 0.87	3.94	2 -1.57	5.74	1 0.98									
267	11.45	1 -1.63	18.50	3 -0.55	5.34	1 <u>-3.46</u>	4.44	2 -0.44	5.41	1 -2.43	1.006	2 -0.32	0.615	1 -1.26	55.1	2 2.25			
268	11.81	1 -0.45	18.46	3 -0.74	5.85	1 -0.46			5.31	1 <u>-3.47</u>									
269	12.10	1 0.49	18.35	3 -1.25	6.11	1 1.05	4.02	2 -1.39	5.70	1 0.57	0.938	2 -2.06	0.619	1 -0.95			46.6	3 -0.54	
270	11.84	1 -0.35	18.54	3 -0.37	5.86	2 -0.41	4.02	2 -1.39	5.49	1 -1.60	0.930	2 -2.27	0.570	1 <u>-4.84</u>			49.2	1 -0.35	
271	11.37	1 -1.89	18.75	3 0.60	6.64	1 <u>4.16</u>			5.39	1 -2.64									
272	12.23	1 0.91	18.94	3 1.48	5.91	2 -0.11	4.18	2 -1.03	5.67	1 0.25	1.027	2 0.21	0.621	1 -0.79					
273	11.27	1 -2.22	18.70	3 0.37	5.80	2 -0.76	5.07	3 0.96	5.74	1 0.98	1.044	2 0.65	0.637	1 0.47	46.1	1 -1.72			
274	11.99	1 0.13	19.06	3 2.04					5.41	1 -2.43					52.8	1 1.25			
275	11.59	1 -1.17	18.19	4 -2.00	5.86	1 -0.41	5.20	2 1.25	5.83	1 1.91	1.317	2 <u>7.67</u>	0.557	1 <u>-5.87</u>					
276	12.09	1 0.45	18.63	3 0.04	5.76	1 -0.99	4.20	1 -0.98	5.68	1 0.36	1.033	2 0.37	0.541	1 <u>-7.14</u>	47.8	2 -0.97	46.8	3 -0.45	
277	12.10	1 0.49	18.24	4 -1.76	5.86	1 -0.41	5.01	2 0.83	5.36	1 -2.95									
278	11.84	1 -0.35	18.91	3 1.34	5.77	2 -0.93	4.34	2 -0.67	5.75	1 1.08	0.948	2 -1.81	0.620	1 -0.87					
279	11.95	1 0.00	18.38	3 -1.11	5.72	2 -1.23	4.55	3 -0.20	5.35	1 <u>-3.06</u>	0.911	2 -2.76	0.568	1 <u>-4.99</u>					
280	11.67	1 -0.91	18.65	3 0.13	5.84	2 -0.52			5.60	1 -0.46									
281	11.27	1 -2.22	17.80	2 <u>-3.81</u>	6.39	1 2.69	4.99	2 0.78	5.58	1 -0.67									
282	11.75	1 -0.65	18.87	3 1.16	5.84	2 -0.52	4.46	2 -0.40	5.42	1 -2.33	1.055	2 0.93	0.638	1 0.55	50.0	1 0.00			
283	11.66	1 -0.94	19.09	3 2.18					5.67	1 0.25	1.025	2 0.16	0.649	1 1.42					
284	11.66	1 -0.94	18.39	3 -1.06	5.99	1 0.35	4.64	2 0.00	5.54	1 -1.08	1.066	2 1.22	0.627	1 -0.31			49.2	4 0.63	
285																			

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	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	クエン酸モランナル 分析値 (g/kg) No. z-score			
9.76 1 -0.29	61.46 2 -1.36	23.27 1 0.42	0.30 1 0.34 0.31 2 0.69	61.9 1 0.11	58.78 1 0.19	63.04 1 0.12	15.5 1 0.33	175		
9.40 1 -2.40	61.68 2 -1.05	23.12 1 -0.48						175		
9.75 1 -0.35	61.85 4 -0.80	23.10 1 -0.60					14.8 1 -0.84	195		
9.80 1 -0.05	62.50 3 0.12	23.30 1 0.60						196		
9.88 1 0.41	62.63 3 0.31	23.52 1 1.94						197		
9.82 1 0.05	62.12 3 -0.41	23.20 1 0.00			58.46 1 0.00	61.83 1 -0.18	14.5 1 -1.34	198		
9.41 1 -2.34		22.85 1 -2.12		65.5 1 0.70				199		
9.96 1 0.87	62.16 2 -0.35	23.32 1 0.72	0.32 1 1.03		56.33 1 -1.33	64.00 1 0.37		201		
9.69 1 -0.70	61.14 2 -1.82	22.61 1 -3.57						202		
9.69 1 -0.70		23.49 1 1.75						203		
9.83 1 0.11		23.10 1 -0.60		72.3 1 1.82	57.32 1 -0.71	60.60 1 -0.50	14.9 1 -0.67	204		
9.80 1 -0.05	62.51 2 0.14	23.43 1 1.39						205		
9.98 1 0.99	62.72 3 0.44	23.11 1 -0.54						206		
9.87 1 0.35	62.12 2 -0.41	22.98 1 -1.33	0.29 1 0.00		59.89 1 0.89	71.31 1 2.26		207		
9.91 1 0.58	61.13 4 -1.84	23.03 1 -1.03						208		
9.88 1 0.41	62.70 3 0.41	23.20 1 0.00						209		
9.92 1 0.64	61.70 3 -1.02	22.95 1 -1.51						210		
9.72 1 -0.52	61.40 4 -1.45	23.20 1 0.00						211		
9.80 1 -0.05	63.24 3 1.19	23.26 1 0.36	0.28 2 -0.34	49.2 1 -1.97	55.42 1 -1.89	57.02 1 -1.43		212		
9.89 1 0.46	63.13 3 1.03	23.21 1 0.06			54.14 1 -2.69	56.71 1 -1.51		213		
9.82 2 0.05	62.27 4 -0.20	23.26 1 0.36						214		
9.65 1 -0.93	63.25 3 1.20	22.90 1 -1.81						215		
9.67 1 -0.82	62.71 3 0.43	23.13 1 -0.42			60.50 1 1.27	65.18 1 0.67	15.9 1 0.96	216		
9.75 1 -0.35	62.76 3 0.50	23.30 1 0.60						217		
	62.95 3 0.77							218		
9.62 1 -1.11	62.75 2 0.48							219		
9.82 1 0.05	61.96 4 -0.64	23.20 1 0.00						220		
8.69 1 -6.56	58.31 1 -5.89	22.63 1 -3.45						221		
9.73 1 -0.46	60.82 3 -2.28	23.08 1 -0.72						222		
9.96 1 0.87	61.99 2 -0.60	23.19 1 -0.06	0.30 1 0.34	62.0 1 0.13	57.28 1 -0.73	61.44 1 -0.28	15.3 1 0.00	223		
9.89 1 0.46	62.39 3 -0.02	22.91 1 -1.75						224		
9.18 1 -3.69	61.67 4 -1.06	23.08 1 -0.72						225		
9.96 1 0.87	61.77 4 -0.92	23.33 1 0.78						226		
9.88 1 0.41	62.52 3 0.15	23.52 1 1.94						227		
9.83 1 0.11	61.28 4 -1.62	23.54 1 2.06		50.1 1 -1.82			15.4 1 0.16	228		
9.92 1 0.64	61.34 4 -1.53	23.28 1 0.48	0.39 1 3.45	59.7 1 -0.24				229		
8.24 1 -9.20	60.01 2 -3.45	23.12 1 -0.48						230		
9.76 1 -0.29	62.00 2 -0.58	23.30 1 0.60	0.25 2 -1.38					231		
9.86 1 0.29	62.73 3 0.46	23.22 1 0.12		59.5 1 -0.27	60.71 1 1.40	60.16 1 -0.62	16.2 1 1.51	232		
9.74 1 -0.41	62.33 2 -0.11	23.43 1 1.39	0.33 1 1.38	56.4 1 -0.78	60.43 1 1.23	65.70 1 0.81	14.5 1 -1.34	233		
10.19 1 2.22	62.76 3 0.50	23.38 1 1.09						234		
9.97 1 0.93	62.53 2 0.17	23.13 1 -0.42						235		
9.75 1 -0.35	59.50 2 -4.18	23.62 1 2.54			57.29 1 -0.73	70.89 1 2.15		236		
9.98 1 0.99	62.45 4 0.05	23.22 1 0.12						237		
9.81 1 0.00	63.59 2 1.69	23.35 1 0.90			61.64 1 1.98	65.55 1 0.77		238		
9.62 1 -1.11	62.76 3 0.50	23.35 1 0.90			50.18 1 -5.17	57.83 1 -1.22		239		
9.70 1 -0.64	62.81 3 0.57	23.18 1 -0.12		55.6 1 -0.92			14.3 1 -1.68	240		
9.59 1 -1.29	63.36 3 1.36	23.54 1 2.06						241		
8.44 1 -8.03		23.22 1 0.12			61.10 1 1.64	57.13 1 -1.40	16.2 1 1.51	242		
9.72 1 -0.52		22.76 1 -2.66	0.22 2 -2.42		58.33 1 -0.08	51.60 1 -2.83		243		
9.96 1 0.87	61.61 3 -1.15	25.90 1 16.36						244		
10.05 1 1.40	61.83 4 -0.83	23.33 1 0.78						245		
9.82 1 0.05	63.00 3 0.84	22.95 1 -1.51			57.89 1 -0.35	64.07 1 0.39		246		
9.79 1 -0.11	63.04 3 0.90	23.23 1 0.18						247		
9.71 1 -0.58	62.34 3 -0.10	23.11 1 -0.54					14.6 1 -1.18	248		
9.61 1 -1.17	62.75 3 0.48	23.27 1 0.42			58.30 1 -0.09	65.30 1 0.70	11.6 1 -6.23	249		
9.86 1 0.29	62.26 3 -0.21	23.59 1 2.36						250		
9.81 1 0.00	62.55 3 0.20	23.37 1 1.03			59.07 1 0.38	64.93 1 0.61		251		
9.38 1 -2.52	63.15 3 1.06	23.05 1 -0.90	0.67 1 13.14		58.29 1 -0.10	63.54 1 0.25	14.7 1 -1.01	252		
9.65 1 -0.93	63.38 3 1.39	23.17 1 -0.18						253		
10.00 1 1.11	60.71 4 -2.44	23.56 1 2.18	0.28 1 -0.34		58.13 1 -0.20	57.43 1 -1.32		254		
9.79 1 -0.11	63.69 3 1.84	23.22 1 0.12			59.76 1 0.81	58.01 1 -1.17	16.1 1 1.34	255		
9.94 1 0.76	61.32 4 -1.56	22.84 1 -2.18						256		
9.65 1 -0.93	62.30 3 -0.15	23.37 1 1.03			59.68 2 0.76	59.02 2 -0.91		257		
9.46 1 -2.05	62.19 3 -0.31	23.47 1 1.63			56.08 1 -1.48	54.71 1 -2.03	15.4 1 0.16	258		
9.82 1 0.05	63.23 3 1.17	23.28 1 0.48						259		
8.86 1 -5.57	60.58 2 -2.63	23.02 1 -1.09						260		
9.78 1 -0.17	62.97 3 0.80	23.29 1 0.54					14.5 1 -1.34	261		
9.53 1 -1.64	62.88 3 0.67	23.48 1 1.69						262		
9.79 1 -0.11	62.66 3 0.35	23.12 1 -0.48	0.28 2 -0.34	61.0 1 -0.03	59.94 1 0.92	65.69 1 0.80	15.2 1 -0.16	263		
9.87 1 0.35	62.61 3 0.28	23.33 1 0.78						264		
9.79 1 -0.11	61.71 4 -1.00	23.31 1 0.66						265		

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
287	12.56	1 1.99	17.86	1 <u>-3.53</u>	6.02	1 0.52			5.78	1 1.40			0.635	1 0.31				
288	12.13	1 0.58	18.75	2 0.60	5.99	1 0.35	4.62	2 -0.04	5.46	1 -1.91	1.063	1 1.14	0.612	1 -1.50				
289	11.65	1 -0.98	18.43	4 -0.88	6.28	1 2.05	4.57	1 -0.15	5.72	1 0.77	1.043	2 0.62	0.600	1 -2.45				
290	12.02	1 0.22	18.76	3 0.65					5.70	1 0.57	1.006	2 -0.32	0.641	1 0.79				
291	12.33	1 1.24	18.32	4 -1.39	6.24	2 1.81			5.67	1 0.25								
292	11.50	1 -1.47	18.67	3 0.23	5.50	2 -2.52	5.49	3 1.91	5.84	1 2.02	0.930	2 -2.27	0.630	1 -0.07	49.7	1 -0.13		
293	11.37	1 -1.89	18.31	4 -1.44	5.68	1 -1.46	4.29	2 -0.78	5.70	1 0.57	1.049	2 0.78	0.584	1 <u>-3.72</u>			47.7	3 -0.04
294	12.04	1 0.29	18.67	3 0.23					5.37	1 -2.85					50.2	2 0.08		
295	11.77	1 -0.58	19.11	3 2.27	5.82	2 -0.64	4.82	3 0.40	5.66	1 0.15	0.960	1 -1.50	0.647	1 1.26	51.9	1 0.84		
296	11.58	1 -1.21													51.0	1 0.44		
297			18.69	3 0.32	5.90	2 -0.17	5.04	3 0.89										
298																		
299	11.90	1 -0.16	18.78	3 0.74	6.02	1 0.52			5.40	1 -2.54	0.969	2 -1.27	0.632	1 0.07			51.3	3 1.58
300	12.10	1 0.49	18.64	3 0.09	5.75	2 -1.05	4.27	2 -0.83	5.64	1 -0.05	0.993	2 -0.65	0.620	1 -0.87				
301	12.18	1 0.75	18.73	3 0.51					5.64	1 -0.05					44.6	2 -2.38		
302	11.73	1 -0.71	18.77	3 0.69	6.13	2 1.17	4.89	3 0.56	5.65	1 0.05	1.022	2 0.08	0.639	1 0.63				
303	12.18	1 0.75	18.33	3 -1.34	6.02	1 0.52	4.82	2 0.40	5.58	1 -0.67	1.052	1 0.86	0.605	1 -2.06			51.9	3 1.85
304	12.10	2 0.49	19.00	4 1.76	6.90	2 <u>5.68</u>			3.50	2 -22.25								
305	12.22	1 0.88	18.45	3 -0.79	5.55	2 -2.22			5.68	1 0.36								
306	12.05	1 0.32	18.34	2 -1.30	6.30	1 2.17	4.60	2 -0.08	5.62	1 -0.25	0.967	2 -1.32	0.578	1 <u>-4.20</u>				

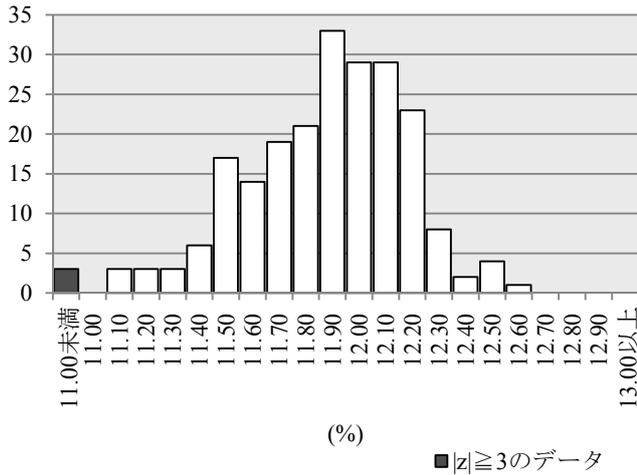
注1: z-scoreの欄に下線を付したものは、絶対値が3以上のものである。
 注2: 各試料のNo.欄は、分析法を示す。対応は以下のとおりである。

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 硫酸標準液吸収法	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 ホウ酸溶液吸収法	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						

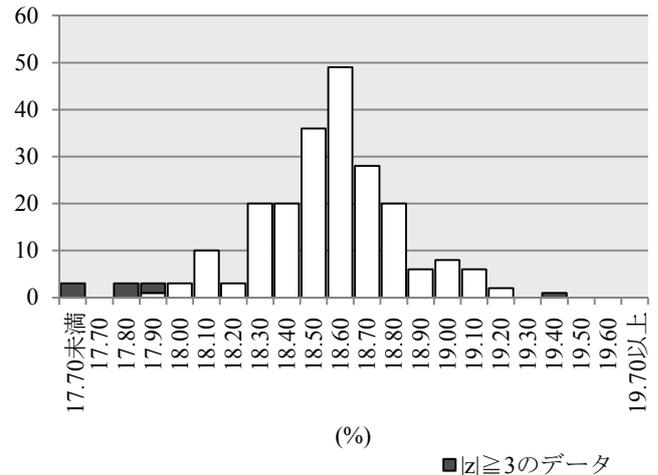
の分析成績 (4)

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	
9.98	1 0.99	61.45	1 -1.38	23.49	1 1.75											287
9.76	1 -0.29	62.53	2 0.17	23.27	1 0.42											288
9.62	1 -1.11	61.56	4 -1.22	23.15	1 -0.30											289
9.95	1 0.82	63.96	3 2.23	22.94	1 -1.57											290
10.10	1 1.70	60.77	4 -2.35	23.08	1 -0.72			69.1	1 1.29							291
9.42	1 -2.28	61.82	3 -0.84	23.24	1 0.24					55.44	1 -1.88	68.50	1 1.53	15.0	1 -0.50	292
9.59	1 -1.29	60.99	4 -2.04	23.03	1 -1.03					53.71	1 -2.96	57.85	1 -1.21			293
9.87	1 0.35	62.27	3 -0.20	23.07	1 -0.78											294
9.67	1 -0.82	62.45	3 0.05	23.10	1 -0.60											295
9.39	1 -2.46	62.95	3 0.77							59.66	1 0.74	66.32	1 0.97	15.5	1 0.33	296
																297
								65.6	1 0.72							298
9.93	1 0.70	62.69	3 0.40	23.30	1 0.60					58.98	1 0.32					299
9.72	1 -0.52	62.27	3 -0.20	23.02	1 -1.09			65.7	1 0.74	59.10	1 0.39	60.41	1 -0.55	14.9	1 -0.67	300
10.00	1 1.11	62.52	3 0.15	23.06	1 -0.84											301
9.52	1 -1.70	62.73	3 0.46	23.30	1 0.60	0.39	2 3.45			56.81	1 -1.03	63.70	1 0.29	15.7	1 0.67	302
9.92	1 0.64	62.59	3 0.25	22.91	1 -1.75			59.1	1 -0.34					16.3	1 1.68	303
9.60	2 -1.23	62.00	4 -0.58	26.00	2 16.97											304
9.84	1 0.17	63.42	3 1.45	23.19	1 -0.06											305
9.84	1 0.17	61.68	2 -1.05	23.13	1 -0.42											306

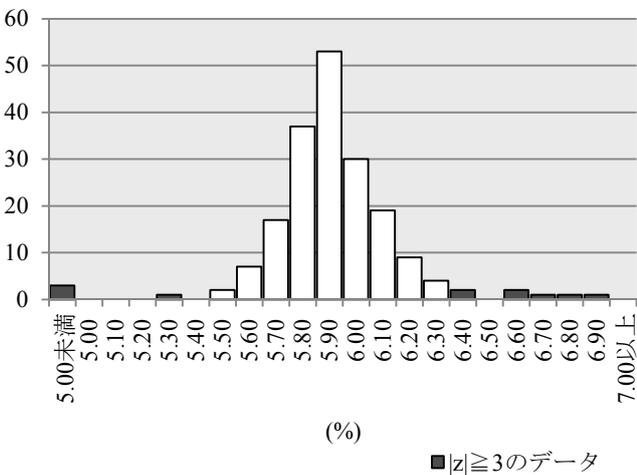
カドミウム	エトキシキン	銅	亜鉛	クエン酸モランテル
No. 分析方法				
1 溶媒抽出法	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準
2 簡易法	2 その他	2 その他	2 その他	2 その他
3 その他				



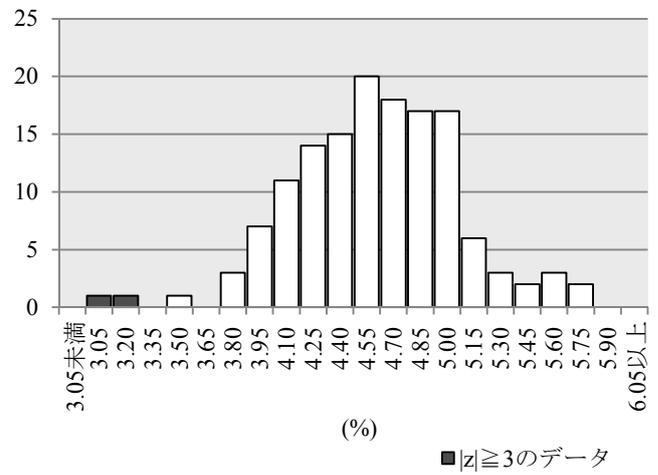
水分 (A 試料)



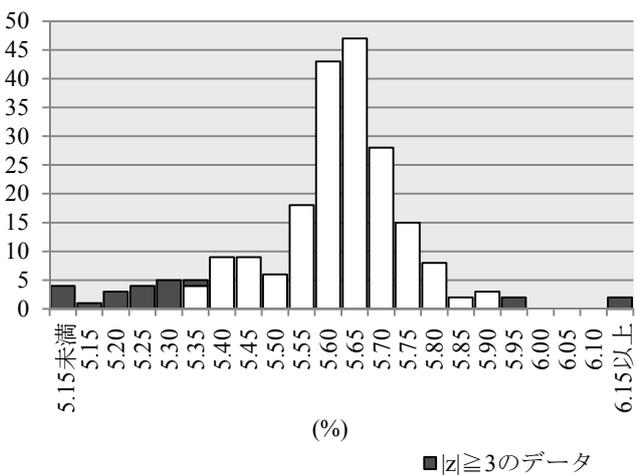
粗たん白質 (A 試料)



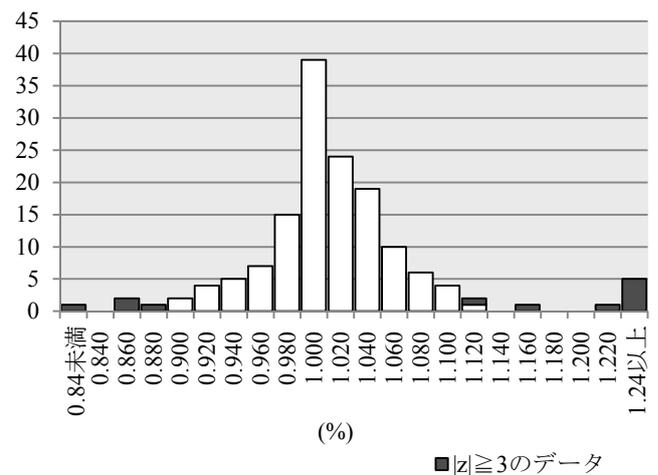
粗脂肪 (A 試料)



粗繊維 (A 試料)



粗灰分 (A 試料)



カルシウム (A 試料)

図 1 分析成績のヒストグラム (1)

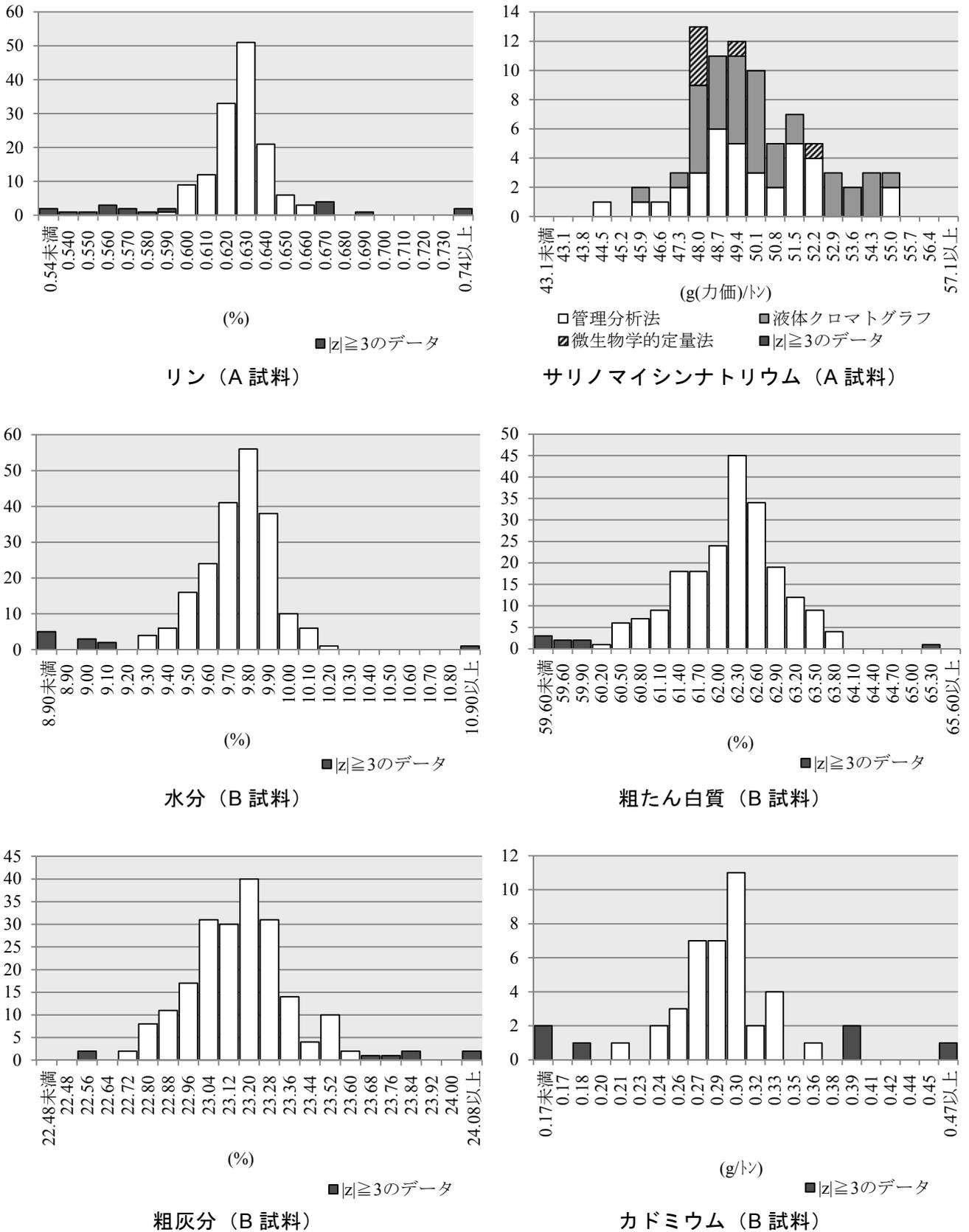


図 1 分析成績のヒストグラム (2)

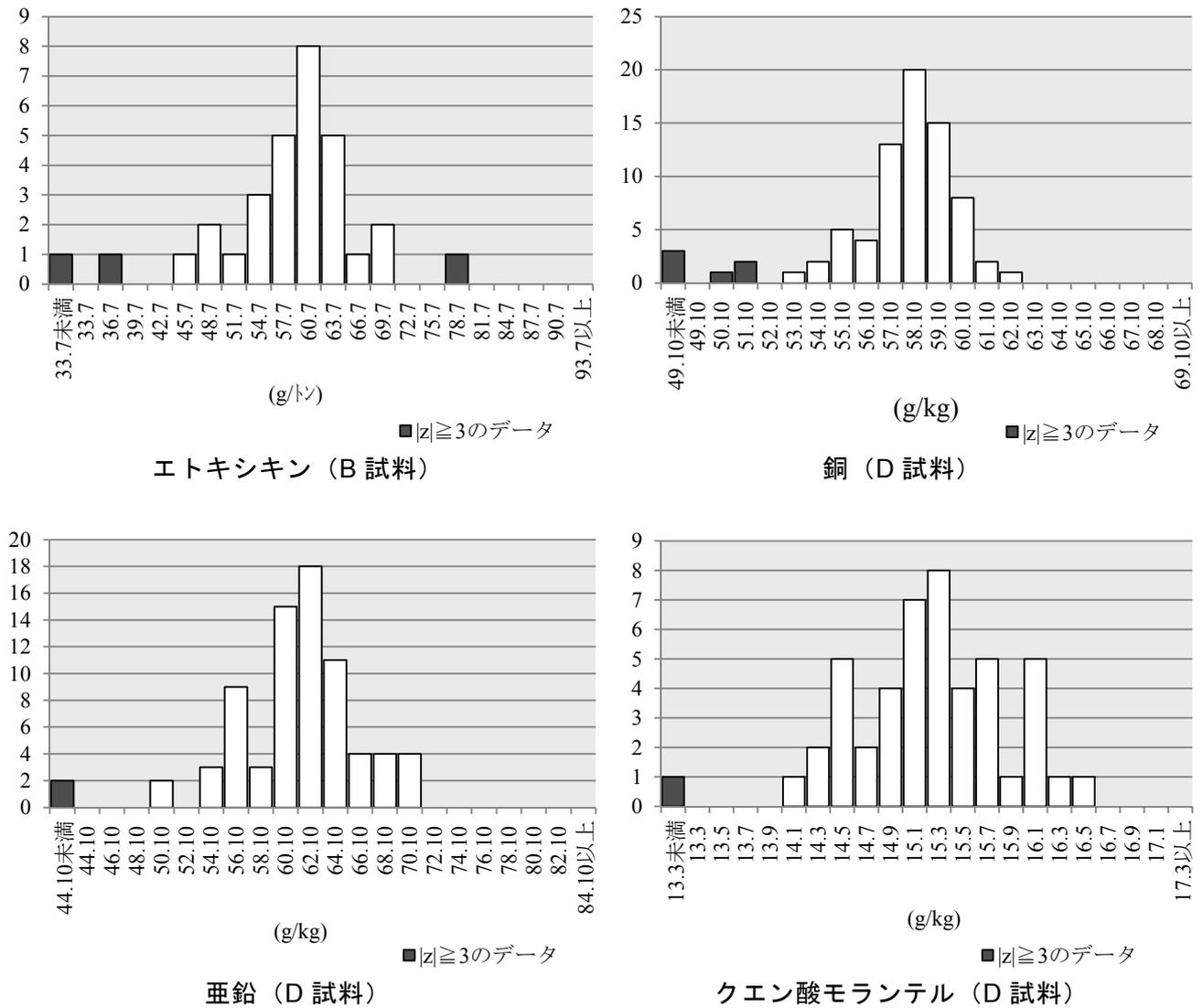


図 1 分析成績のヒストグラム (3)

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	218	221	189	141	214
1 中央値	11.95	18.62	5.93	4.64	5.65
1 下限境界値 ^{注2}	11.03	17.98	5.42	3.31	5.36
1 上限境界値	12.87	19.26	6.44	5.97	5.93
2 平均値	11.92	18.61	5.95	4.69	5.64
2 標準偏差	0.29	0.24	0.16	0.42	0.11
2 変動係数 (%)	2.4	1.3	2.7	9.1	1.9
95%信頼区間	11.89~11.96	18.58~18.65	5.93~5.98	4.61~4.76	5.63~5.66

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	148	154	35	46
1 中央値	1.019	0.631	50.0	47.8
1 下限境界値 ^{注2}	0.902	0.593	43.2	41.2
1 上限境界値	1.135	0.669	56.8	54.4
2 平均値	1.019	0.631	50.1	48.3
2 標準偏差	0.042	0.013	2.3	2.3
2 変動係数 (%)	4.1	2.1	4.6	4.7
95%信頼区間	1.012~1.026	0.629~0.633	49.4~50.9	47.6~48.9

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	213	214	208	44	31
1 中央値	9.81	62.41	23.20	0.29	61.2
1 下限境界値 ^{注2}	9.30	60.33	22.71	0.20	43.0
1 上限境界値	10.32	64.49	23.69	0.38	79.4
2 平均値	9.80	62.35	23.19	0.29	60.6
2 標準偏差	0.17	0.75	0.18	0.03	6.0
2 変動係数 (%)	1.7	1.2	0.8	9.9	9.9
95%信頼区間	9.77~9.82	62.25~62.45	23.17~23.22	0.29~0.30	58.4~62.8

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	77	75	47
1 中央値	58.46	62.56	15.3
1 下限境界値 ^{注2}	53.66	50.96	13.5
1 上限境界値	63.26	74.16	17.1
2 平均値	58.42	62.49	15.3
2 標準偏差	1.76	4.30	0.6
2 変動係数 (%)	3.0	7.0	3.8
95%信頼区間	58.01~58.83	61.49~63.50	15.1~15.5

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			計	不検出	検出率 (%)
		多量 ^{注1}	中量 ^{注2}	少量 ^{注3}			
とうもろこし	30	118	3	0	121	0	100
マ イ ロ	12	7	84	28	119	2	98
大 麦	10	61	51	3	115	6	95
精 白 米	10	20	92	9	121	0	100
大 豆 油 か す	10	5	87	17	109	12	90
コーングルテンミール	9	2	56	54	112	9	93
ふ す ま	7	8	79	15	102	19	84
チ キ ン ミ ー ル	4	0	1	22	23	98	19
アルファルファミール	3	1	83	34	118	3	98
リン酸カルシウム	3	0	0	95	95	26	79
食 塩	2	0	0	113	113	8	93

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
小麦	5	14	13	32
ライ麦	1	4	5	10
小麦粉	0	2	0	2
えん麦	0	0	2	2
玄米	0	0	1	1
米ぬか	2	12	10	24
麦ぬか	1	0	3	4
ビールかす	0	1	1	2
スクリーニングペレット	0	1	0	1
コーングルテンフィード	0	0	1	1
なたね油かす	0	4	19	23
あまに油かす	0	3	5	8
ごま油かす	0	1	4	5
やし油かす	0	1	2	3
綿実油かす	0	2	0	2
カポック油かす	0	0	2	2
魚粉	0	0	37	37
肉骨粉	0	0	3	3
いかミール	0	0	1	1
かに殻粉末	0	0	1	1
炭酸カルシウム	0	0	14	14
かき殻	0	0	2	2
ビートパルプ	0	1	0	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 218 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 3 件であった。これらを除いた平均値は 11.92 %で、この 95 %信頼区間は 11.89~11.96 %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、213 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 11.92 %、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 5 件の報告があった。

2) 粗たん白質

分析値は 221 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 18.61 %で、この 95 %信頼区間は 18.58~18.65 %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、15 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 18.48 %、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、30 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 18.54 %、0.26 %及び 1.4 %であった。

飼料分析基準・燃焼法では、124 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 18.70 %、0.21 %及び 1.1 %であった。

自動分析機による方法では、52 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 18.49 %、0.23 %及び 1.2 %であった。

3) 粗脂肪

分析値は 189 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 5.95 %で、この 95 %信頼区間は 5.93~5.98 %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、124 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 6.00 %、0.15 %及び 2.5 %であった。

自動分析機による方法では、64 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 5.87 %、0.15 %及び 2.6 %であった。

4) 粗繊維

分析値は 141 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 2 件であった。これらを除いた平均値は 4.69 %で、この 95 %信頼区間は 4.61~4.76 %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 4.56 %、0.30 %及び 6.5 %であった。

飼料分析基準・ろ過法では、82 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 4.53 %、0.37 %及び 8.3 %であった。

自動分析機による方法では、40 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 5.05 %、0.34 %及び 6.6 %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 3 件の報告があった。

5) 粗灰分

分析値は 214 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 22 件

であった。これらを除いた平均値は 5.64 %で、この 95 %信頼区間は 5.63~5.66 %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、209 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 20 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 5.64 %、0.11 %及び 1.9 %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 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 12 件であった。これらを除いた平均値は 1.019 %で、この 95 %信頼区間は 1.012~1.026 %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 1.020 %、0.046 %及び 4.5 %であった。

飼料分析基準・原子吸光光度法では、121 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 1.019 %、0.042 %及び 4.1 %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 5 件の報告があった。

7) リン

分析値は 154 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 18 件であった。これらを除いた平均値は 0.631 %で、この 95 %信頼区間は 0.629 ~0.633 %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、150 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 15 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 0.631 %、0.013 %及び 2.1 %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 4 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 35 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 50.1 g(力価)/トンで、この 95 %信頼区間が 49.4~50.9 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 46 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 48.3 g(力価)/トンで、この 95 %信頼区間は 47.6~48.9 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 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 50.0 g(力価)/トン、1.9 g(力価)/トン及び 3.7 %であった。

管理分析法・フローインジェクション法では、10 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 50.4 g(力価)/

トン, 3.3 g(力価)/トン及び 6.6 %であった.

飼料分析基準・液体クロマトグラフ法では, 40 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 48.0 g(力価)/トン, 2.2 g(力価)/トン及び 4.6 %であった.

飼料分析基準・微生物学的定量法では, 6 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 50.4 g(力価)/トン, 1.8 g(力価)/トン及び 3.6 %であった.

8.2 B 試料 (魚粉) の解析結果

1) 水分

分析値は 213 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 9.80 %で, この 95 %信頼区間は 9.77~9.82 %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, 197 件 (うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 11 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 9.80 %, 0.16 %及び 1.7 %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 5 件の報告があった.

2) 粗たん白質

分析値は 214 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 62.35 %で, この 95 %信頼区間は 62.25~62.45 %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, 13 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 61.90 %, 0.70 %及び 1.1 %であった.

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法では, 29 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 61.90 %, 0.72 %及び 1.2 %であった.

飼料分析基準・燃焼法では, 120 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 62.72 %, 0.52 %及び 0.8 %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 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 61.82 %, 0.74 %及び 1.2 %であった.

3) 粗灰分

分析値は 208 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 23.19 %で, この 95 %信頼区間は 23.17~23.22 %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 23.19 %, 0.20 %及び 0.8 %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 44 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 0.29 g/トンで、この 95 %信頼区間は 0.29~0.30 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、13 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 0.29 g/トン、0.02 g/トン及び 7.0 %であった。

飼料分析基準・簡易法では、28 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 0.30 g/トン、0.03 g/トン及び 11.6 %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。

5) エトキシキン

分析値は 31 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 3 件であった。これらを除いた平均値は 60.6 g/トンで、この 95 %信頼区間は 58.4~62.8 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 6.0 g/トン及び 9.9 %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 77 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 58.42 g/kg で、この 95 %信頼区間は 58.01~58.83 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、74 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 58.40 g/kg, 1.77 g/kg 及び 3.0 %であった。

その他の方法では、ICP による測定等の 3 件の報告があった。

2) 亜鉛

分析値は 75 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 2 件であった。これらを除いた平均値は 62.49 g/kg で、この 95 %信頼区間は 61.49~63.50 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、72 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 62.70 g/kg, 4.19 g/kg 及び 6.7 %であった。

その他の方法では、ICP による測定等の 3 件の報告があった。

3) クエン酸モランテル

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 1 件であった。これらを除いた平均値は 15.3 g/kg で、この 95 %信頼区間は 15.1~15.5 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 0.6

g/kg 及び 3.8 %であった。

8.4 C 試料（鑑定用試料）の鑑定成績

混合した 11 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。

121 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 23 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、121 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 118 件、中量が 3 件であった。

マイロ（混合割合 12 %）は、119 件（検出率 98 %）の報告があり、その内訳は多量が 7 件、中量が 84 件、少量が 28 件であった。

大麦（混合割合 10 %）は、115 件（検出率 95 %）の報告があり、その内訳は多量が 61 件、中量が 51 件、少量が 3 件であった。

精白米（混合割合 10 %）は、121 件（検出率 100 %）の報告があり、その内訳は多量が 20 件、中量が 92 件、少量が 9 件であった。

大豆油かす（混合割合 10 %）は、109 件（検出率 90 %）の報告があり、その内訳は多量が 5 件、中量が 87 件、少量が 17 件であった。

コーングルテンミール（混合割合 9 %）は、112 件（検出率 93 %）の報告があり、その内訳は多量が 2 件、中量が 56 件、少量が 54 件であった。

ふすま（混合割合 7 %）は、102 件（検出率 84 %）の報告があり、その内訳は多量が 8 件、中量が 79 件、少量が 15 件であった。

チキンミール（混合割合 4 %）は、23 件（検出率 19 %）の報告があり、その内訳は中量が 1 件、少量が 22 件であった。

アルファルファミール（混合割合 3 %）は、118 件（検出率 98 %）の報告があり、その内訳は多量が 1 件、中量が 83 件、少量が 34 件であった。

リン酸カルシウム（配合割合 3 %）は、95 件（検出率 79 %）の報告があり、その内訳は少量が 95 件であった。

食塩（混合割合 2 %）は、113 件（検出率 93 %）の報告があり、その内訳は少量が 113 件であった。

誤って検出された原料としては、魚粉が最も多く、37 件の報告があった。次いで、小麦が 32 件、米ぬかが 24 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 29 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 29 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11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29年9月22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。

表削除

平成 29 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 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(カ匁)/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 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 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) 11 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 29 年度）****Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2017)**

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，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 29 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 29 年 4 月から平成 30 年 3 月までの間に，関東農政局，東海農政局，近畿農政局及び九州農政局が，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，並びに 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 かび毒及びエンドファイト産生毒素（27 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（24 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 成分及びエンドファイト産生毒素 2 成分を対象とした。

かび毒：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

エンドファイト産生毒素：エルゴバリン及びロリトレム B

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 91 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こ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

モニタリング等の対象試料	項目別の試料点数										
	種類	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
幼すう育成用	1			1							1
中すう育成用	4	2		3							1
大すう育成用	1			1							
成鶏飼育用	39	19	12	25							18
ブロイラー肥育前期用	3	1		2							2
ブロイラー肥育後期用	15	6	4	9							1
鶏複数ステージ用	1	1									
ほ乳期子豚育成用	10	9	2	5							5
子豚育成用	11	4	4	6							5
肉豚肥育用	23	15	7	13							10
種豚育成用	2	1		1							1
種豚飼育用	9	7	1	6							4
豚複数ステージ用	1	1									
配 混 合 飼 料	ほ乳期子牛育成用代用乳用	4	4	2	4			4			2
	ほ乳期子牛育成用	3	1		1			3	3	3	
	若令牛育成用	11	5	1	5			11	11	11	3
	乳用牛飼育用	45	31	10	10			45	37	37	14
	幼令肉用牛育成用	3		1	2			3	3	3	1
	肉用牛肥育用	33	13	4	15			33	32	32	7
	肉牛繁殖用	9	3	3	3			9	9	9	2
	種牛飼育用配合飼料	1	1					1	1	1	1
	牛複数ステージ用	19	11	1	6			19	14	14	4
	魚用	14				13		1	1	1	
	とうもろこし・魚粉二種混合飼料	1		1							
	圧ぺんとうもろこし・アルファルファ二種混合飼料	1	1					1	1	1	
	二種混合飼料(上記以外のもの)	1			1			1	1	1	1
	動物性たん白質混合飼料	11						11	11	11	
	フィッシュソリュブル吸着飼料	1						1	1	1	1
	糖蜜吸着飼料	1						1	1	1	1
	上記以外の混合飼料	42	1		1			42	42	42	2
小 計		320	137	53	120	13		186	168	168	87
穀 類	大麦	1	1		1						
	圧ぺん大麦	1			1						
	きな粉	1			1						
	グレイソルガム(マイロ)	5	5		5						
	玄米	2	2								
	小麦	4	3		4						
	小麦粉	4	3		4						
	末粉	3	2		3						
	圧ぺん大豆	1	1		1						
	とうもろこし	58	58		58						
小 計		80	75		78						
そ う こ う 類	あわぬか	1	1		1						
	米ぬか	5	1		5						
	米ぬか油かす	15	14		12						5
	コーングルテンフィード	22	20		19						
	しょうちゅうかす	1			1						
	大豆皮	1	1		1						
	とうもろこしジスチラーズグレイソリュブル (DDGS)	15	14		9						
	ビールかす	3	1		2						2
	ふすま	49	36		39						15
	ホミネーフィード	1	1		1						
	麦ぬか	1	1		1						
小 計		114	90		91						22

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	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	
		試験 点数	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			不溶性 不純物	サルモ ネラ				
									顕微鏡 鑑定	ELISA 試験	PCR試 験						
あまに油かす	1				1												
ごま油かす	6	2			4												2
植物性油かす類																	
小麦グルテン酵素分解物	2	2			2												
コーングルテンミール	14	12			11												2
コーンジャムミール	1				1												
大豆油かす	46	41			38												1
なたね油かす	20	11			20												
濃縮大豆たん白	1	1			1												
やし油かす	1	1			1												
小 計	92	70			79												5
イカ内臓溶解液	1									1	1	1					
えび粉末	1									1	1	1					1
動物性飼料																	
酵素処理魚抽出物	1									1	1	1					
チキンミール	29									29	29	29					18
魚粉	67		15			11		10		67	67	67					58
肉骨粉(ボークミール)	2										2	2					1
原料混合肉骨粉	23		1								23	23					8
フェザーミール	16									16	16	16					7
小 計	140		16			11		10		115	140	140					93
乾牧草																	
アルファルファ	4		3	4				4									
稲わら	2		2														
オーツヘイ	4		1	4													
クレイグラス	3		3	3													
スーダングラス	8		5	8				8									
チモシー	6		4	6													
バミューダグラス	1		1	1													
フェスク	2	2	1	2													
ライグラス	1	1	1	1													
小 計	31	3	21	29				12									
飼料用酵母	1									1	1	1					
動物性油脂	75																75
その他																	
特定動物性油脂	1																1
ビートパルプ	1			1													
綿実	2			2													
小 計	80			3						1	1	1					76
合計	857	375	90	400	24	12	10			302	309	309				76	207

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 かび毒及びエンドファイト産生毒素
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。

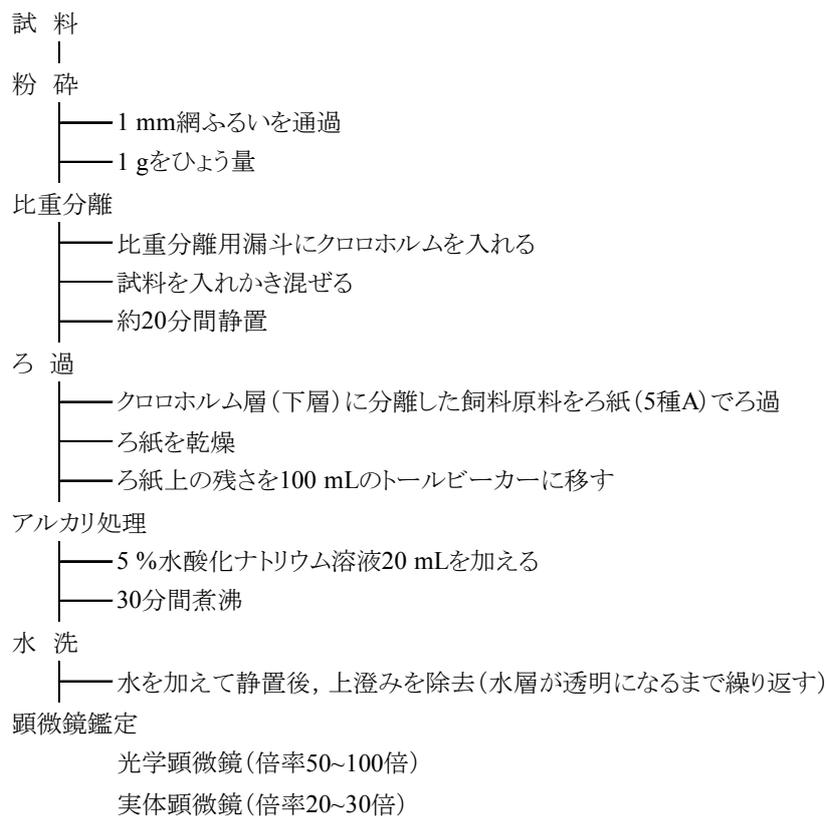


図 1 試料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

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。

3 結 果

3.1 有害物質

1) かび毒及びエンドファイト産生毒素

配混合飼料 137 点，単体飼料 235 点及び乾牧草 3 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，のべ 5840 点の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及びエンドファイト産生毒素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 129 点中 23 点から検出され（検出率 18 %），検出されたものの最大値は，0.003 mg/kg，平均値は 0.0008 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 58 点中 14 点から検出され (検出率 24 %) , 検出されたものの最大値は 0.006 mg/kg, 平均値は 0.0012 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.

また, とうもろこしの加工副産物 (DDGS) 7 点中 1 点からは 0.0003 mg/kg 検出された.

ii ゼアラレノン

配混合飼料 129 点中 124 点から検出され (検出率 96 %) , 最大値は 0.33 mg/kg, 平均値は 0.060 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 58 点中 57 点から検出され (検出率 98 %) , 検出されたものの最大値は 0.33 mg/kg, 平均値は 0.059 mg/kg であった.

iii デオキシニバレノール

配混合飼料 129 点中 121 点から検出され (検出率 94 %) , 検出されたものの最大値は 2.0 mg/kg (種牛飼育用配合飼料) , 平均値は 0.40 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 57 点中 52 点から検出され (検出率 91 %) , 検出されたものの最大値は 1.8 mg/kg, 平均値は 0.49 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, 1 mg/kg を超えて検出されたものは, コーングルテンフィード 18 点中 18 点 (最大値 4.3 mg/kg) 及び DDGS 12 点中 11 点 (最大値 4.8 mg/kg) であった.

上記以外では, 小麦, 小麦粉, 小麦グルテン酵素分解物及び末粉計 10 点中 7 点から検出され, 検出されたものの最大値は 0.26 mg/kg, 平均値は 0.18 mg/kg であった. また小麦の加工副産物であるふすま 36 点中 34 点から検出され (検出率 94 %) , 最大値は 1.0 mg/kg, 平均値は 0.47 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 0.0003 mg/kg)				ゼアラレノン (検出下限 0.0003 mg/kg)				デオキシニパノール (検出下限 0.01 mg/kg)									
	管理/指導 基準値 (mg/kg)	うち検出されたもの			管理 基準値 (mg/kg)	うち検出されたもの			試料 点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	試料 点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)		
		点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)		平均値 (mg/kg)	点数	検出率 (%)									最大値 (mg/kg)	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	40	12	30	0.002	0.0008												
配合飼料	管 0.01	15	1	7	0.0004	0.0004	1	101	96	0.32	0.062	1	68	60	88	1.1	0.28	
(表外 ¹⁾ に示す飼料)	管 0.02	73	10	14	0.003	0.001	-	27	27	100	0.33	0.055	4	60	100	2.0	0.52	
上記以外の配合飼料)	-	1	0	0	-	-	-	1	1	100	0.015	0.015	-	1	100	0.46	0.46	
その他の混合飼料	-	129	23	18	0.003	0.0008	-	129	124	96	0.33	0.060	-	129	121	94	2.0	0.40
配合飼料小計	管 0.02	58	14	24	0.006	0.0012	-	58	57	98	0.33	0.059	-	57	52	91	1.8	0.49
とうもろこし	-	-	-	-	-	-	-	16	16	100	0.90	0.35	-	18	18	100	4.3	2.9
コーングルテンファイード	-	-	-	-	-	-	-	11	11	100	1.0	0.50	-	10	10	100	0.27	0.12
コーングルテンミール	-	-	-	-	-	-	-	11	11	100	0.86	0.36	-	12	12	100	4.8	2.6
DDGS	-	7	1	14	0.0003	0.0003	-	-	-	-	-	-	1	1	100	1.0	1.0	
ホミニーフイード	-	-	-	-	-	-	-	5	4	80	0.33	0.12	-	5	3	60	0.11	0.064
マイロ	-	5	2	40	0.0008	0.0008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
大麦	-	1	0	0	-	-	-	1	0	0	-	-	-	1	100	0.035	0.035	
圧べん大麦	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
小麦	-	3	0	0	-	-	-	3	3	100	0.003	0.002	-	3	2	67	0.24	0.16
小麦粉	-	3	0	0	-	-	-	3	2	67	0.004	0.003	-	3	2	67	0.26	0.24
小麦グルテン酵素分解物	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	100	0.19	0.15	
米粉	-	2	0	0	-	-	-	2	1	50	0.002	0.002	-	2	1	50	0.14	0.14
ふすま	-	36	1	3	0.0004	0.0004	-	36	31	86	0.036	0.008	-	36	34	94	1.0	0.47
玄米(新規需要米)	-	2	0	0	-	-	-	2	0	0	-	-	-	2	0	0	-	-
米ぬか	-	1	0	0	-	-	-	1	1	100	0.009	0.009	-	1	1	100	0.009	0.009
米ぬか油かす	-	14	0	0	-	-	-	14	13	93	0.029	0.014	-	1	1	100	0.022	0.022
大豆油かす	-	41	9	22	0.002	0.0008	-	41	38	93	0.028	0.006	-	41	5	12	0.042	0.027
圧べん大豆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	100	0.009	0.009	
大豆皮	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	100	0.022	0.022	
濃縮大豆たん白	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	
あわぬか	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	100	0.12	0.12	
ごま油かす	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	-	-	
なたね油かす	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	4	36	0.051	0.038	
ビールかす	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	100	0.008	0.008	
麦ぬか	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	100	1.2	1.2	
やし油かす	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	
総 計		302	50	17				333	312	94			342	273	80			

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:幼子用,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
 デオキシニパノール:家畜等(鶏,豚及び牛(生後3ヶ月以上の牛を除く。))用

表 2-2 指導基準値等が定められていないかび毒及びエンドファイト産生毒素の
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	302	2	0.7	0.001	0.0007
アフラトキシンG ₁	0.0003	302	0	0		
アフラトキシンG ₂	0.0003	302	0	0		
ステリグマトシスチン	0.0003	282	90	32	0.008	0.001
HT-2トキシン	0.002	119	64	54	0.055	0.017
T-2トキシン	0.002	342	98	29	0.031	0.007
ネオソラニオール	0.002	342	11	3.2	0.004	0.003
ジアセトキシスシルペノール	0.002	120	4	3.3	0.004	0.003
フザレノン-X	0.003	341	6	1.8	0.029	0.016
ニバレノール	0.002	265	99	37	1.0	0.053
3-アセチルデオキシニバレノール	0.006	120	19	16	0.17	0.044
15-アセチルデオキシニバレノール	0.006	120	84	70	0.0	0.22
デオキシニバレノール-3-グルコシド	0.002	120	95	79	0.65	0.15
フモニシンB ₁	0.0006	72	67	93	3.4	0.64
フモニシンB ₂	0.0006	72	67	93	1.0	0.19
フモニシンB ₃	0.0006	72	64	89	0.38	0.086
オクマトキシンA	0.002	34	1	2.9	0.002	0.002
α-ゼアララノール	0.002	306	0	0		
β-ゼアララノール	0.002	306	1	0.3	0.004	0.004
ゼアララノン	0.002	306	46	15	0.029	0.005
α-ゼアラレノール	0.003	306	14	4.6	0.023	0.007
β-ゼアラレノール	0.003	306	46	15	0.024	0.008
エルゴバリン	0.01	3	2	67	0.12	0.078
ロトリムB	0.01	3	1	33	0.61	0.61

*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

カドミウム及び鉛について、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，チキンミール及び肉骨粉）計 87 点のモニタリング等を実施した。水銀について、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計 88 点のモニタリング等を実施した。また、ひ素について、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計 87 点のモニタリング等を実施した。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

配混合飼料 53 点中 38 点から検出され（検出率 72 %），検出されたものの最大値は 0.26 mg/kg，平均値は 0.09 mg/kg であった。乾牧草等 18 点中 12 点から検出され（検出率 67 %），検出されたものの最大値は 0.31 mg/kg，平均値は 0.11 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 15 点全てから検出され、最大値は 1.6 mg/kg、平均値は 0.82 mg/kg であった。原料混合肉骨粉 1 点からは 0.09 mg/kg が検出された。いずれも、管理基準値（3 mg/kg）を超えるものはなかった。

ii 水銀

配混合飼料 53 点中 24 点から検出され（検出率 45 %）、検出されたものの最大値は 0.08 mg/kg、平均値は 0.03 mg/kg であった。乾牧草 19 点中 15 点から検出され（検出率 79 %）、検出されたものの最大値は 0.07 mg/kg、平均値は 0.03 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 0.54 mg/kg、平均値は 0.28 mg/kg であった。原料混合肉骨粉 1 点からは 0.18 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 53 点中 9 点から検出され（検出率 17 %）、検出されたものの最大値は 2.5 mg/kg、平均値は 0.6 mg/kg であった。乾牧草等 18 点中 4 点から検出され（検出率 22 %）、検出されたものの最大値は 1.0 mg/kg、平均値は 0.5 mg/kg であった。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 15 点中 5 点から検出され（検出率 33 %）、検出されたものの最大値は 1.4 mg/kg、平均値は 0.6 mg/kg であった。原料混合肉骨粉 1 点からは 0.4 mg/kg が検出された。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 53 点中 29 点から検出され（検出率 55 %）、検出されたものの最大値は 1.1 mg/kg、平均値は 0.33 mg/kg であった。稲わらを除く乾牧草等 16 点中 7 点から検出され（検出率 44 %）、検出されたものの最大値は 0.88 mg/kg、平均値は 0.34 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。

稲わらでは 2 点全てから検出され、最大値は 5.2 mg/kg、平均値は 3.9 mg/kg であり、管理基準値（7 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 8.3 mg/kg、平均値は 5.0 mg/kg であった。原料混合肉骨粉 1 点からは 1.1 mg/kg が検出された。いずれも管理基準値（魚粉は 15 mg/kg、原料混合肉骨粉は 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	53	38	72	0.26	0.09	0.03
		乾牧草等	18	12	67	0.31	0.11	
	3	魚粉	15	15	100	1.6	0.82	
		肉骨粉	1	1	100	0.09	0.09	
	総計	87	66	76	1.6	0.26		
水銀	0.4	配混合飼料	53	24	45	0.08	0.03	0.01
		乾牧草等	19	15	79	0.07	0.03	
	1	魚粉	15	15	100	0.54	0.28	
		肉骨粉	1	1	100	0.18	0.18	
	総計	88	55	63	0.54	0.10		
鉛	3	配混合飼料	53	9	17	2.5	0.6	0.2
		乾牧草等	18	4	22	1.0	0.5	
	7	魚粉	15	5	33	1.4	0.6	
		肉骨粉	1	1	100	0.4	0.4	
	総計	87	19	22	2.5	0.6		
ひ素	2	配混合飼料	53	29	55	1.1	0.33	0.05
		乾牧草等 (稲わらを除く)	16	7	44	0.88	0.34	
	7	稲わら	2	2	100	5.2	3.9	
	15	魚粉	15	15	100	8.3	5.0	
		肉骨粉	1	1	100	1.1	1.1	
総計	87	54	62	8.3	1.8			

3) 農薬

飼料等 400 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 91 成分の計 126 成分について、のべ 49385 点の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、麦類及びその加工副産物を中心に有機リン系農薬の検出率が高く、牧草では、検出率は低いものの多種類の農薬が検出された。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 64 点について、モニタリング等を実施した結果、大麦、とうもろこし及びマイロからは検出されなかった。

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 330 点について、モニタリング等を実施した結果、13 点から検出された。その内訳は、ふすま 39 点中 8 点 (検出率 21 %、最大値 0.094 mg/kg)、小麦粉 4 点中 2 点 (検出率 50 %、最大値 0.033 mg/kg)、末粉 3 点中 1 点 (検出率 33 %、0.043 mg/kg)、配混合飼料 118 点中 2 点 (検出率 1.7 %、最大値 0.50 mg/kg (成鶏飼育用)) 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 64 点について、モニタリング等を実施した結果、大麦からは検出されなかった。とうもろこしは 58 点中 7 点から検出され（検出率 12 %，最大値 0.27 mg/kg），マイロは 5 点中 1 点から検出された（検出率 20 %，0.087 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 330 点について，モニタリング等を実施した結果，21 点から検出された。その内訳は，小麦グルテン酵素分解物 2 点中 1 点（検出率 50 %，0.13 mg/kg），配混合飼料 118 点中 20 点（検出率 17 %，最大値 0.14 mg/kg（肉豚肥育用））であった。

iii フェニトロチオン

省令基準値が定められている穀類 3 種類 64 点及び牧草 29 点について，モニタリング等を実施した結果，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 58 点中 3 点から検出（検出率 5.2 %，最大値 0.057 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 301 点について，モニタリング等を実施した結果，2 点から検出された。その内訳は，コーングルテンフィード 19 点中 1 点（検出率 5.3 %，0.037 mg/kg），配混合飼料 118 点中 1 点（検出率 0.8 %，0.030 mg/kg（種豚飼育用））であった。

iv マラチオン

省令基準値が定められている穀類 3 種類 64 点及び牧草 29 点について，モニタリング等を実施した結果，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 58 点中 4 点から検出（検出率 6.9 %，最大値 0.064 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 301 点について，モニタリング等を実施した結果，12 点から検出された。その内訳は，ふすま 39 点中 8 点（検出率 21 %，最大値 0.063 mg/kg），コーングルテンフィード 19 点中 2 点（検出率 11 %，最大値 0.045 mg/kg），コーングルテンミール 11 点中 1 点（検出率 9.1 %，0.038 mg/kg），配混合飼料 118 点中 1 点（検出率 0.8 %，0.29 mg/kg（肉豚肥育用））であった。

v その他の検出された農薬

① 穀類

ピフェントリン（とうもろこし）及びプロピコナゾール（小麦及び末粉）

② 乾牧草

アトラジン（フェスク），シハロトリン（チモシー），デルタメトリン及びトラロメトリン（アルファルファ），ピフェントリン（ライグラス），プロピコナゾール（フェスク及びライグラス）並びにペンディメタリン（クレイングラス）

③ 原料

イソプロチオラン（米ぬか油かす），イマザピック（大豆油かす），クロルピリホス（コーングルテンミール），ペルメトリン（ふすま）

④ 配混合飼料

クロルプロファム, デルタメトリン及びトラロメトリン並びにビフェントリン

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)	
γ-BHC (リンデン)	配混合飼料(鶏・うずら、豚用)	0.05	72	0	0		
	配混合飼料(牛等用)	0.4	46	0	0		
	牧草	0.4	29	0	0		0.005
	基準値のない飼料	—	252	0	0		
	計	—	399	0	0		
BHC	配混合飼料	0.005	118	0	0		
	牧草	0.02	29	0	0		0.005
	基準値のない飼料	—	252	0	0		
	計	—	399	0	0		
DDT	配混合飼料	0.1	118	0	0		
	牧草	0.1	29	0	0		0.02
	基準値のない飼料	—	252	0	0		
	計	—	399	0	0		
アトラジン	大麦	0.02	1	0	0		
	とうもろこし	0.2	58	0	0		
	マイロ	0.02	5	0	0		
	牧草	15	29	1	3.4	0.024	0.024
	基準値のない飼料	—	301	0	0		0.02
	計	—	394	1	0.3	0.024	0.024
アラクロール	とうもろこし	0.02	58	0	0		
	マイロ	0.05	5	0	0		
	牧草	0.05	29	0	0		0.02
	基準値のない飼料	—	307	0	0		
	計	—	399	0	0		
アルドリン及び ディルドリン	配混合飼料	0.02	118	0	0		
	牧草	0.02	29	0	0		0.02
	基準値のない飼料	—	252	0	0		
	計	—	399	0	0		
イソフェンホス	とうもろこし	0.02	58	0	0		
	基準値のない飼料	—	341	0	0		0.02
	計	—	399	0	0		
イマザピック	大豆油かす	0.5	4	1	25	0.002	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	29	0	0		
	基準値のない飼料	—	370	0	0		0.02
	計	—	399	0	0		
エンドリン	配混合飼料	0.01	118	0	0		
	牧草	0.01	29	0	0		0.01
	基準値のない飼料	—	252	0	0		
	計	—	399	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)	
クロルピリホス	大麦	0.2	1	0	0			0.01
	とうもろこし	0.1	58	0	0			
	マイロ	0.75	5	0	0			
	牧草	13	29	0	0			
	基準値のない飼料	—	301	1	0.3	0.067	0.067	
	計	—	394	1	0.3	0.067	0.067	
クロルピリホスメチル	大麦	7	1	0	0			0.02
	とうもろこし	7	58	0	0			
	マイロ	10	5	0	0			
	基準値のない飼料	—	330	13	3.9	0.50	0.073	
	計	—	394	13	3.3	0.50	0.073	
	クロルフェンピホス	とうもろこし	0.05	58	0	0		
基準値のない飼料		—	337	0	0			
計		—	395	0	0			
クロルプロファム	大麦	0.05	1	0	0			0.02
	とうもろこし	0.05	58	0	0			
	基準値のない飼料	—	335	1	0.3	0.16	0.16	
	計	—	394	1	0.3	0.16	0.16	
クロルベンジレート	とうもろこし	0.02	58	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	341	0	0			
	計	—	399	0	0			
シハロトリン	大麦	0.2	1	0	0			0.02
	とうもろこし	0.04	58	0	0			
	マイロ	0.2	5	0	0			
	牧草	0.6	29	1	3.4	0.033	0.033	
	基準値のない飼料	—	301	0	0			
	計	—	394	1	0.3	0.033	0.033	
ジメトエート	大麦	0.04	1	0	0			0.02
	とうもろこし	1	58	0	0			
	マイロ	0.2	5	0	0			
	牧草	2	29	0	0			
	基準値のない飼料	—	301	0	0			
	計	—	394	0	0			
ダイアジノン	大麦	0.1	1	0	0			0.02
	とうもろこし	0.02	58	0	0			
	マイロ	0.1	5	0	0			
	牧草	10	29	0	0			
	基準値のない飼料	—	301	0	0			
	計	—	394	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	58	0	0			
	マイロ	1	5	0	0			
	牧草	5	29	1	3.4	0.39	0.39	
	基準値のない飼料	—	301	3	1.0	0.092	0.078	
	計	—	394	4	1.0	0.39	0.16	
テルブホス	大麦	0.01	1	0	0			0.005
	とうもろこし	0.01	58	0	0			
	マイロ	0.05	5	0	0			
	牧草	1	29	0	0			
	基準値のない飼料	—	301	0	0			
	計	—	394	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	58	0	0			
	マイロ	0.08	5	0	0			
	牧草	5	29	0	0			
	基準値のない飼料	—	301	0	0			
	計	—	394	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	58	7	12	0.27		0.15
	マイロ	1	5	1	20	0.087		0.087
	基準値のない飼料	—	330	21	6.4	0.14		0.075
	計	—	394	29	7.4	0.27		0.093
フィプロニル	配混合飼料(鶏・うずら用)	0.01	41	0	0		0.003	
	配混合飼料(牛等、豚用)	0.02	77	0	0			
	牧草	0.2	29	0	0			
	基準値のない飼料	—	252	0	0			
	計	—	399	0	0			
フェントロチオン	大麦	5	1	0	0		0.02	
	とうもろこし	1	58	3	5.2	0.057		0.050
	マイロ	1	5	0	0			
	牧草	10	29	0	0			
	基準値のない飼料	—	301	2	0.7	0.037		0.034
	計	—	394	5	1.3	0.057	0.044	
フェントエート	大麦	0.4	1	0	0		0.02	
	とうもろこし	0.4	58	0	0			
	マイロ	0.4	5	0	0			
	基準値のない飼料	—	330	0	0			
	計	—	394	0	0			
フェンバレレート	配混合飼料(鶏・うずら用)	0.5	41	0	0		0.02	
	配混合飼料(豚用)	4	31	0	0			
	配混合飼料(牛等用)	8	46	0	0			
	牧草	13	29	0	0			
	基準値のない飼料	—	252	0	0			
	計	—	399	0	0			
フェンプロパトリン	牧草	20	29	0	0		0.02	
	基準値のない飼料	—	370	0	0			
	計	—	399	0	0			
ヘプタクロル	配混合飼料	0.02	118	0	0		0.02	
	牧草	0.02	29	0	0			
	基準値のない飼料	—	252	0	0			
	計	—	399	0	0			
ベルメトリン	大麦	2	1	0	0		0.02	
	とうもろこし	2	58	0	0			
	マイロ	2	5	0	0			
	牧草	55	29	0	0			
	基準値のない飼料	—	301	1	0.3	0.063		0.063
	計	—	394	1	0.3	0.063		0.063
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	58	0	0			
	マイロ	0.1	5	0	0			
	牧草	15	29	1	3.4	0.057		0.057
	基準値のない飼料	—	301	0	0			
	計	—	394	1	0.3	0.057		0.057

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	58	0	0			
	マイロ	0.05	5	0	0			
	牧草	40	29	0	0			
	基準値のない飼料	—	301	0	0			
	計	—	394	0	0			
ホレート	大麦	0.05	1	0	0		0.02	
	とうもろこし	0.05	58	0	0			
	マイロ	0.05	5	0	0			
	牧草	1.5	29	0	0			
	基準値のない飼料	—	301	0	0			
	計	—	394	0	0			
マラチオン	大麦	2	1	0	0		0.02	
	とうもろこし	2	58	4	6.9	0.064		0.041
	マイロ	2	5	0	0			
	牧草	135	29	0	0			
	基準値のない飼料	—	301	12	4.0	0.29		0.055
	計	—	394	16	4.1	0.29		0.052
メチダチオン	大麦	0.02	1	0	0		0.02	
	とうもろこし	0.1	58	0	0			
	マイロ	0.2	5	0	0			
	牧草	12	29	0	0			
	基準値のない飼料	—	301	0	0			
	計	—	394	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)	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)	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)
	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)			試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)			試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
EPN	399	0			0.02	タマシ	399	0			0.02	フルトリン	399	0			0.02
アセトクロール	399	0			0.02	チオベンカルブ	399	0			0.02	フルトラニル	399	0			0.02
アニロホス	399	0			0.02	テクナゼン	399	0			0.02	フルトリアホール	399	0			0.02
アメトリン	399	0			0.02	ネトラクロルピリンホス	399	0			0.02	フルバリネート	399	0			0.02
アリドグロール	399	0			0.02	ネトラコナゾール	399	0			0.02	フルミオキサジン	399	0			0.02
アレスリン	399	0			0.02	ネトラジホシ	399	0			0.02	フルミクロラックベンチル	399	0			0.02
イサゾホス	399	0			0.02	ネブコナゾール	399	0			0.02	プロシミドン	399	0			0.02
イソプロチオラン	399	1	0.057	0.057	0.02	ネブフェンピラド	399	0			0.02	プロバクロー	399	0			0.02
イプロベンホス	399	0			0.02	テフルトリン	399	0			0.02	プロバジン	399	0			0.02
エタルフルラリン	399	0			0.02	テルブトリン	399	0			0.02	プロバニル	399	0			0.02
エディフェンホス	399	0			0.02	トリアジメホシ	399	0			0.02	プロバキソト	399	0			0.02
エトフェンプロックス	399	0			0.02	トリアレート	399	0			0.02	プロピコナゾール	399	5	1.3	3.6	1.3
エトフメセート	399	0			0.02	トリフルラリン	399	0			0.02	プロアム	399	0			0.02
エトプロホス	399	0			0.02	トリフロキシストロビン	399	0			0.02	プロフェノホス	399	0			0.02
エトリジアゾール	399	0			0.02	トリフルリアニド	399	0			0.02	プロベタンホス	399	0			0.02
エトリムホス	399	0			0.02	ナプロバミド	399	0			0.02	プロモブチド	399	0			0.02
オキサジアゾン	399	0			0.02	パラチオンメチル	399	0			0.02	プロモプロピレート	399	0			0.02
カズサホス	399	0			0.02	ハルフェンプロックス	399	0			0.02	プロモホス	399	0			0.02
カルフェントラゾンエチル	399	0			0.02	ピフェントリン	399	3	0.8	0.028	0.026	ヘキサコナゾール	399	0			0.02
キントゼン	399	0			0.02	ピペロホス	399	0			0.02	ベキサコール	399	0			0.02
クレソキシムメチル	399	0			0.02	ピリダフェンチオン	399	0			0.02	ペンコナゾール	399	0			0.02
クロルタールジメチル	399	0			0.02	ピリダベン	399	0			0.02	ペンフルラリン	399	0			0.02
クロルデン	399	0			0.02	ピリアロキシフェン	399	0			0.02	ホサロン	399	0			0.02
クロルフェナピル	399	0			0.02	ピリクロゾリン	399	0			0.02	ホスチアゼート	399	0			0.02
ジクロホップメチル	399	0			0.02	フェナリホル	399	0			0.02	メタグリホス	399	0			0.02
ジクロラン	399	0			0.02	フェノチオカルブ	399	0			0.02	メキシクロ	399	0			0.02
ジフェナミド	399	0			0.02	フェントリン	399	0			0.02	メミノストロビン	399	0			0.02
ジフェノコナゾール	399	0			0.02	フェンチオン	399	0			0.02	メトラクロール	399	0			0.02
ジメテナミド	399	0			0.02	フェンプロナゾール	399	0			0.02	メビホス	399	0			0.02
ジメペレレート	399	0			0.02	ブタミホス	399	0			0.02						
シラフルオフェン	399	0			0.02	フラムプロップメチル	399	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ことが知られる 3 成分の有害物質について、計 58 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

養魚用飼料及び魚粉のモニタリング等を実施した結果、養魚用配合飼料は 13 点中 3 点から検出され（検出率 23 %，最大値 0.18 mg/kg），魚粉 11 点からは検出されなかった。いずれも管理基準値（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 12 点（アルファルファ 4 点，スーダングラス 8 点）のモニタリング等を実施した結果、アルファルファは全ての試料から硝酸態窒素が検出され（最大値 520 mg/kg），スーダングラスは 8 点中 7 点から硝酸態窒素が検出された（検出率 88 %，最大値 910 mg/kg）。また、アルファルファ 4 点中 1 点から亜硝酸態窒素が検出された（検出率 25 %，34 mg/kg）。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

魚粉のモニタリング等を実施した結果、10 点中 9 点から検出（検出率 90 %，最大値 290 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	養魚用配合飼料	13	3	23	0.18	0.11	0.06
		魚粉	11	0	0			
		計	24	3	13	0.18	0.11	
硝酸態窒素	—	アルファルファ	4	4	100	520	320	10
		スーダングラス	8	7	88	910	359	
		計	12	11	92	910	345	
亜硝酸態窒素	—	アルファルファ	4	1	25	34	34	10
		スーダングラス	8	0	0			
		計	12	1	8.3	34	34	
ヒスタミン	—	魚粉	10	9	90	290	150	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 67 点及びその他の魚介類由来たん白質 3 点，並びにチキンミール 29 点及びフェザーミール 16 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。また，肉骨粉（ポークミール）2 点及び原料混合肉骨粉 23 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 試験において魚粉 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。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	67	0	0	67	1	1.5	67	0	0	0
イカ内臓溶解液	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
えび粉末	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
酵素処理魚抽出物	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	16	0	0	16	0	0	16	0	0	0
原料混合肉骨粉				23	0	0	23	0	0	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 4 点, ほ乳期子牛育成用配合飼料 3 点, 若令牛育成用配合飼料 11 点, 乳用牛飼育用配合飼料 45 点, 幼令肉用牛育成用配合飼料 3 点, 肉用牛肥育用配合飼料 33 点, 肉牛繁殖用配合飼料 9 点, 種牛飼育用配合飼料 1 点, 牛複数ステージ用配合飼料 19 点, 牛用混合飼料 17 点及び糖蜜吸着飼料 1 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. また, 動物由来たん白質を含む混合飼料等 13 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 27 点及び飼料用酵母 1 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						
	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)				
牛用飼料等													
ほ乳期子牛育成用代乳用配合飼料	4	0	0							0			
ほ乳期子牛育成用配合飼料	3	0	0	3	0	0	3	0	0	0			
若令牛育成用配合飼料	11	0	0	11	0	0	11	0	0	0			
乳用牛飼育用配合飼料	45	0	0	37	0	0	37	0	0	0			
幼令肉用牛育成用配合飼料	3	0	0	3	0	0	3	0	0	0			
肉用牛肥育用配合飼料	33	0	0	32	0	0	32	0	0	0			
肉牛繁殖用配合飼料	9	0	0	9	0	0	9	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	19	0	0	14	0	0	14	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	17	0	0	17	0	0	17	0	0	0			
その他の畜種向け飼料 (動物質原料を含むもの)													
混合飼料等	13	0	0	13	0	0				13	0	0	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			ほ乳動物由来DNA			
	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	
牛用混合飼料										
アメリカ合衆国	12	0	0	12	0	0	12	0	0	0
イタリア	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0
スペイン	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
中華人民共和国	3	0	0	3	0	0	3	0	0	0
ドイツ	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ブラジル	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0
フランス	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0
メキシコ	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
飼料用酵母										
アメリカ合衆国	1	0	0	1	0	0	1	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	0.07	0.0002
特定動物性油脂	0.02 %以下	1	0.00	0.00

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 87 点についてモニタリングを実施した結果、単体飼料で 120 点中 1 点からサルモネラが検出された（検出率 0.8 %（前年度 1.6 %，前々年度 1.3 %））。区分別にみると，動物質性飼料で 93 点中 1 点から検出（検出率 1.1 %（前年度 2.1 %，前々年度 1.9 %））されており，植物性油かす類及びそうこう類では前年度及び前々年度と同様にサルモネラは検出されなかった。これらの結果を表 12 に示した。

配混合飼料では 87 点中 1 点からサルモネラが検出された（検出率 1.1 %）。なお，前年度及び前々年度の検出率は，それぞれ 5.4 %及び 0 %であった。その結果を表 13 に示した。

これらの飼料から分離された各血清型を表 14 に示した。これらの血清型について，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れら 2 種の血清型は，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 血清型には入っていないものの，飼料の製造・品質管理におけるサルモネラ対策について引き続き留意する必要がある。

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	試料点数	検出点数	検出率 (%)
動物質性飼料			
魚粉	58	1	1.7
チキンミール	18	0	0
原料混合肉骨粉	8	0	0
フェザーミール	7	0	0
肉骨粉(ポークミール)	1	0	0
えび粉末	1	0	0
小計	93	1	1.1
そうこう類			
ふすま	15	0	0
米ぬか油かす	5	0	0
ビールかす	2	0	0
小計	22	0	0
植物性油かす類			
ごま油かす	2	0	0
コーングルテンミール	2	0	0
大豆油かす	1	0	0
小計	5	0	0
合計	120	1	0.8

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	試料点数	検出点数	検出率 (%)
牛用配合飼料	34	0	0
豚用配合飼料	25	0	0
鶏用配合飼料	23	1	4.3
動物性たん白質混合飼料	1	0	0
その他の混合飼料	4	0	0
合計	87	1	1.1

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	
	魚粉	鶏用配合飼料
<i>S. Kedougou</i>	1	
<i>S. Oranienburg</i>		1
合計	1	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. 2018

調査資料

2 特定添加物検定結果等について（平成 29 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 2017)

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 29 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 29 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 29 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 29 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 7 業者（前年度 8 業者）からあり、その製造形態等は、①輸入した製造用原体を用いて製剤の製造のみを行っているのが 3 業者、②製造用原体を用いた製剤製造及び製剤の小分け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 2 業者、④輸入した製造用原体を用いた製剤の製造及び製剤の輸入を行っているのが 1 業者であった．

平成 29 年度に検定に合格した特定添加物は 9 種類、14 銘柄であり（前年度 11 種類、19 銘柄）、製造用原体の製造を海外に依存していた．

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）及び硫酸コリスチン（製造用原体）が中国、②アビラマイシン（製剤）が英国、③ナラシン（製剤）及びリン酸タイロシン（製剤）が米国、④フラボフォスフォリポール（製剤）及びモネンシン（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、⑥硫酸コリスチン（製剤）が韓国で、5 カ国（前年度 6 カ国）であった．

表 1 検定申請業者及び品名等一覧
（平成 29 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
			ミヤリサン製薬株式会社 ^{※2}	—	フラボフォスフォリボル	○
ロック化学製品株式会社	御殿場工場	エンラマイシン	○	エンラマイシン8%R	80	
		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
			硫酸コリスチン		コリスチン10%G「明治」	100
			リン酸タイロシン		タイラン275	275
	日本イーライリリー株式会社/ エランコジャパン株式会社 ^{※2※3}	—	アピラマイシン	○	サーマックス200	200
ナラシン			○	モンデバン100	100	
福岡	株式会社科学飼料研究所	日向工場	リン酸タイロシン		タイロシン275	275
			硫酸コリスチン		硫酸コリスチン「科研」10%G	100
			コーキン化学株式会社	九州工場	ノシヘプタイド	
日本ニュートリション株式会社 ^{※2}	—	硫酸コリスチン		硫酸コリスチン10%	100	
計	7業者	9事業場	9種類		14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, 福岡管区:山口・九州・沖縄

※2 輸入業者に該当

※3 平成29年7月1日付け, 日本イーライリリー株式会社エランコアニマルヘルス事業部をエランコジャパン株式会社に法人統合

2 特定添加物の種類別の検定合格件数等

平成 29 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 27 年度及び平成 28 年度の結果とともに表 2 に示した。

平成 29 年度の検定合格件数は 152 件, 合格数量は 724 トンで実量力価換算量は 81 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 79.2 %, 83.1 %, 87.5 %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 29 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 33.8 % (前年度 33.3 %) で最も多く, 次いでナラシン 31.8 % (前年度 22.7 %), アピラマイシン 13.7 % (前年度 8.4 %), ノシヘプタイド 8.6 % (前年度 6.9 %) 硫酸コリスチン 8.4 % (前年度 24.4 %) となった。また, 実量力価換算量についても, サリノマイシンナトリウムが全体の 30.0 % (前年度 31.1 %) で最も多く, 次いでナラシン 28.3 % (前年度 21.2 %), アピラマイシン 24.3 % (前年度 15.7 %), 硫酸コリスチン 7.5 % (前年度 22.8 %), ノシヘプタイド 3.1 % (前年度 2.6 %) となった。

平成 29 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, リン酸タイロシン, ナラシン及びアピラマイシンは増加し, 一方, 硫酸コリスチン, サリノマイシンナトリウム及びモネンシンナトリウムは減少した。また, 前年度検定の実績があった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申請がなかった。

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, ビ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 29 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，合格数量及び実量力価換算量（種類別）
（平成 27 年度～平成 29 年度）

類 別	特 定 添 加 物 の 種 類	平成27年度					平成28年度					平成29年度				
		合格 件数 (件)	合格数量 (kg)	構成比 (%)	実量力価 換算量 (kg(力価))	構成比 (%)	合格 件数 (件)	合格数量 (kg)	構成比 (%)	実量力価 換算量 (kg(力価))	構成比 (%)	合格 件数 (件)	合格数量 (kg)	構成比 (%)	実量力価 換算量 (kg(力価))	構成比 (%)
ポリペプチド系	亜鉛バシトリン	2	9,500	1.2	950	1.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	エンラマイシン	3	3,720	0.5	298	0.3	2	4,820	0.6	386	0.4	2	4,940	0.7	395	0.5
	ノシヘプタイド	6	22,000	2.8	880	1.0	15	60,000	6.9	2,400	2.6	20	62,200	8.6	2,488	3.1
	硫酸コリスチン	58	223,820	28.5	22,382	25.3	55	212,680	24.4	21,268	22.8	15	60,800	8.4	6,080	7.5
	小 計	69	259,040	32.9	24,510	27.7	72	277,500	31.9	24,054	25.8	37	127,940	17.7	8,963	11.0
テトラサイクリン系	アルキル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	1	3,000	0.4	1,200	1.4	1	1,400	0.2	560	0.6	—	—	—	—	—
	クロルテトラサイクリン	3	14,000	1.8	1,400	1.6	3	14,000	1.6	1,400	1.5	—	—	—	—	—
	小 計	4	17,000	2.2	2,600	2.9	4	15,400	1.8	1,960	2.1	0	0	0.0	0	0.0
マクロライド系	リン酸タイロシン	4	19,994	2.5	5,498	6.2	1	5,039	0.6	1,386	1.5	3	12,611	1.7	3,468	4.3
	小 計	4	19,994	2.5	5,498	6.2	1	5,039	0.6	1,386	1.5	3	12,611	1.7	3,468	4.3
ポリサッカライド系	フラボフオスフォリボール	1	1,250	0.2	100	0.1	1	1,250	0.1	100	0.1	1	1,250	0.2	100	0.1
	小 計	1	1,250	0.2	100	0.1	1	1,250	0.1	100	0.1	1	1,250	0.2	100	0.1
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	71	288,780	36.7	28,878	32.6	72	289,487	33.3	28,949	31.1	60	244,487	33.8	24,449	30.0
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ナラシン	12	131,625	16.7	13,163	14.9	18	197,500	22.7	19,750	21.2	22	230,550	31.8	23,055	28.3
	モネンシンナトリウム	3	6,080	0.8	1,216	1.4	4	11,500	1.3	2,300	2.5	2	8,020	1.1	1,604	2.0
	ラサロシドナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
小 計	86	426,485	54.2	43,257	48.9	94	498,487	57.3	50,999	54.8	84	483,057	66.7	49,108	60.3	
その他	アピラマイシン	17	62,675	8.0	12,535	14.2	20	72,950	8.4	14,590	15.7	27	99,050	13.7	19,810	24.3
	エフトマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	バージニアマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ピコザマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	小 計	17	62,675	8.0	12,535	14.2	20	72,950	8.4	14,590	15.7	27	99,050	13.7	19,810	24.3
総 計	181	786,444	100.0	88,499	100.0	192	870,626	100.0	93,088	100.0	152	723,908	100.0	81,449	100.0	
対前年度比 (%)	100.6	86.5	—	84.5	—	106.1	110.7	—	105.2	—	79.2	83.1	—	87.5	—	

—:実績なし

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 29 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 3 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 73.7 %（前年度 60.4 %），検定合格数量全体の 80.2 %（前年度 66.6 %），実量力価換算量全体の 83.3 %（前年度 70.0 %）を占め，前年度より増加した．

ノシヘプタイド，硫酸コリスチン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 29 年度は，ノシヘプタイド及び硫酸コリスチンは精製級のみ，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 3 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 29 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	亜鉛バシトリン	/	/	/	—	—	—
	エンラマイシン	/	/	/	2	4,940	395
	ノシヘプチド	20	62,200	2,488	—	—	—
	硫酸コリスチン	15	60,800	6,080	—	—	—
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	3	12,611	3,468	/	/	/
ポリサッカライド系	フラボフォスフォリボール	/	/	/	1	1,250	100
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	—	—	—	60	244,487	24,449
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	/	/	/
	ナラシン	/	/	/	22	230,550	23,055
	モネンシンナトリウム	2	8,020	1,604	/	/	/
	ラサロシドナトリウム	—	—	—	/	/	/
その他	アピラマイシン	/	/	/	27	99,050	19,810
	エフロマイシン	—	—	—	/	/	/
	バージニアマイシン	—	—	—	/	/	/
	ピコザマイシン	—	—	—	/	/	/
合 計		40	143,631	13,640	112	580,277	67,809
割 合 (%)		26.3	19.8	16.7	73.7	80.2	83.3

—: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 20 年度から平成 29 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。

検定合格数量全体では，平成 21 年度に一部銘柄において登録特定飼料等製造業者による製造へ移行した影響で大幅な減少が見られたが，それ以降は増減はあるものの減少傾向で推移している。また，実量力価換算量についても同様の傾向であった。

特定添加物の検定合格数量を類別にみると，いずれの年度もポリエーテル系が最も多く，平成 22 年度に 50 %を切ったものの，その他の年度は全体の 50 %以上を占める割合で推移しており，平成 29 年度は，ポリエーテル系が全体の 67 %（前年度 57 %），次いでポリペプチド系が 18 %（前年度 32 %）を占めた。

また，実量力価換算量でも同様にポリエーテル系が最も多く，平成 19 年度から平成 20 年度までは全体の 60 %前後で推移し，平成 21 年度以降も 50 %前後を推移している。平成 29 年度は，ポリエーテル系が 60 %（前年度 55 %），次いでポリペプチド系が 11 %（前年度 26 %）を占めた。

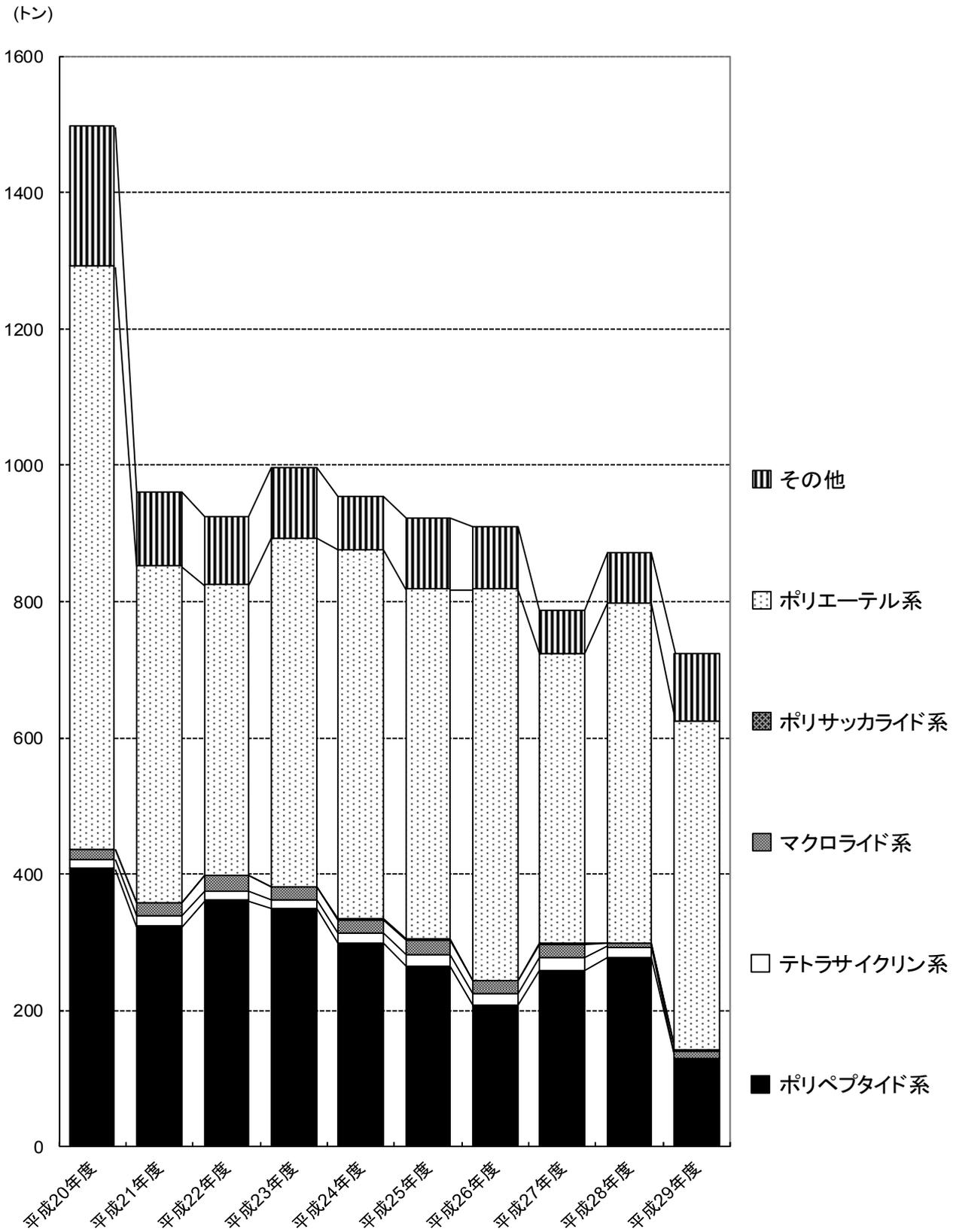


図1 特定添加物の検定合格数量の推移 (類別)

(トン(カ価))

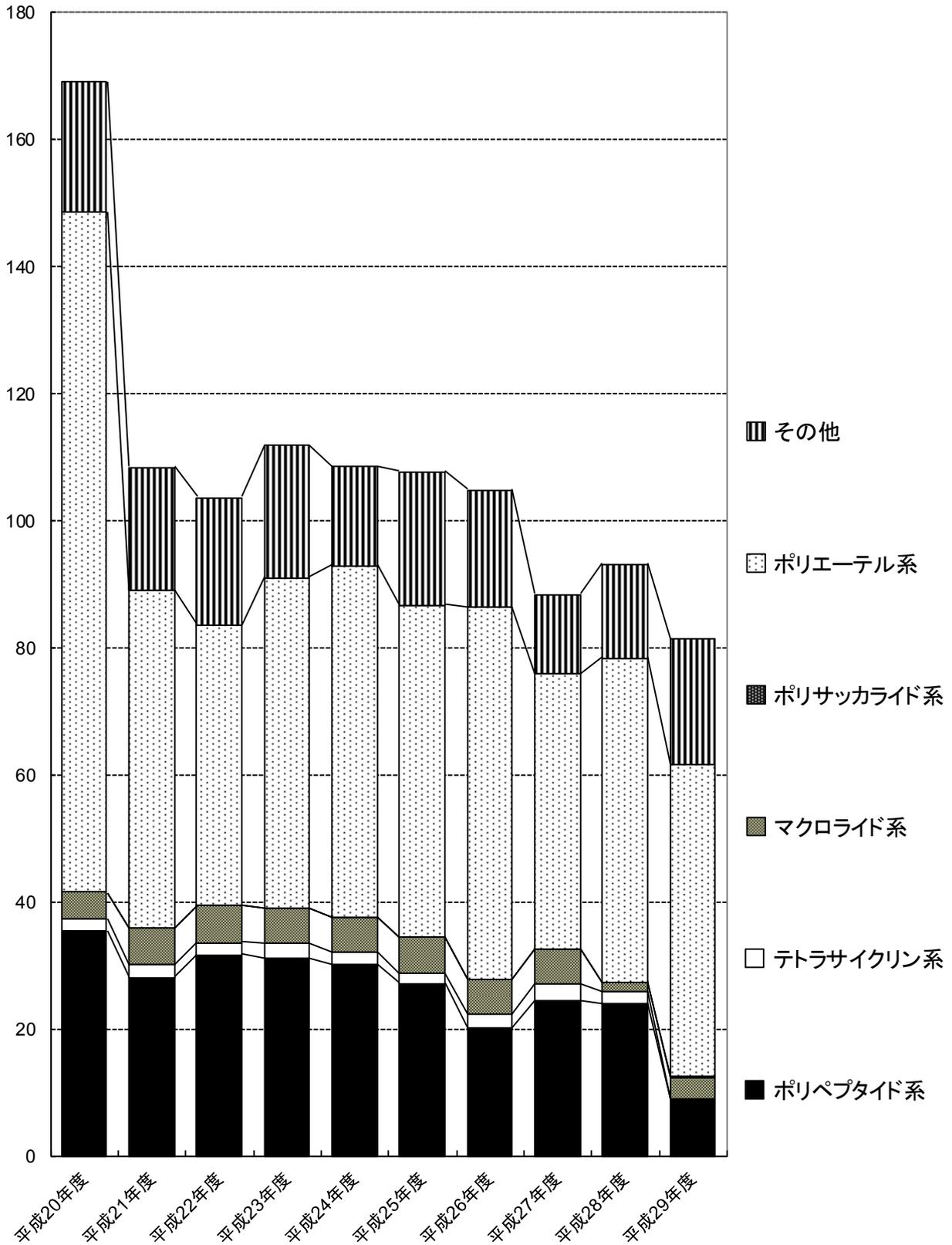


図 2 特定添加物の検定合格の実量カ価換算量の推移（類別）

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 29 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、ラサロシドナトリウム及び硫酸コリスチン、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。平成 29 年度の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 29 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 4 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 29 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 852 トン（対前年度比 101 %）、実量力価換算量は 123 トン（力価）（対前年度比 105 %）であった。

平成 29 年度の製造数量は、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、硫酸コリスチンの順に多かった。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、硫酸コリスチンの順に多かった。

表 4 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 28・29 年度)

類別	特定添加物の種類	平成28年度		平成29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	76,680	6,134	76,300	6,104
	ノシヘプタイド	27,720	1,109	—	—
	硫酸コリスチン	8,120	812	1,120	112
	小 計	112,520	8,055	77,420	6,216
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	314,240	31,424	315,780	31,578
	モネンシンナトリウム	299,560	59,912	318,800	63,760
	ラサロシドナトリウム	117,060	17,559	140,280	21,042
	小 計	730,860	108,895	774,860	116,380
総 計		843,380	116,950	852,280	122,596
対前年度比 (%)		119	113	101	105

※ 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 29 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 5 に示した。

平成 29 年度の特定添加物の総数量を類別にみると、ポリエーテル系が最も多く、1,258 トン（検定：483 トン、登録：775 トン）と全体の 79.8 %を占め、種類別ではサリノマイシンナトリウム（35.5 %）、モネンシンナトリウム（20.7 %）、ナラシン（14.6 %）の順に多かった。また、実量力価換算量を類別にみると、同様にポリエーテル系が 165 トン（力価）（検定：49 トン（力価）、登録：116 トン（力価））と全体の 81.1 %を占め最も多く、種類別ではモネンシンナトリウム（32.0 %）、サリノマイシンナトリウム（27.5 %）、ナラシン（11.3 %）の順に多かつ

た。

次に、平成 20 年度から平成 29 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。

特定添加物の総数量及び実量力価換算量ともに、平成 22 年度に増加した後、総数量は 1,600 トン前後、実量力価換算量は 200 トン前後で推移している。

平成 29 年度は、特定添加物の総数量全体の 54 %（前年度 49 %）、実量力価換算量全体の 60 %（前年度 56 %）を登録特定飼料等製造業者による製造が占めた。

表 5 特定添加物の総数量等
（平成 29 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	81,240	5.2	6,499	3.2
	ノシヘプチド	62,200	3.9	2,488	1.2
	硫酸コリスチン	61,920	3.9	6,192	3.0
	小 計	205,360	13.0	15,179	7.4
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	12,611	0.8	3,468	1.7
	小 計	12,611	0.8	3,468	1.7
ポリサッカライド系	フラボフォスフォリポール	1,250	0.1	100	0.0
	小 計	1,250	0.1	100	0.0
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	560,267	35.5	56,027	27.5
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—
	ナラシン	230,550	14.6	23,055	11.3
	モネンシンナトリウム	326,820	20.7	65,364	32.0
	ラサロシドナトリウム	140,280	8.9	21,042	10.3
	小 計	1,257,917	79.8	165,488	81.1
その他	アビラマイシン	99,050	6.3	19,810	9.7
	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	99,050	6.3	19,810	9.7
総 計		1,576,188	100.0	204,045	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

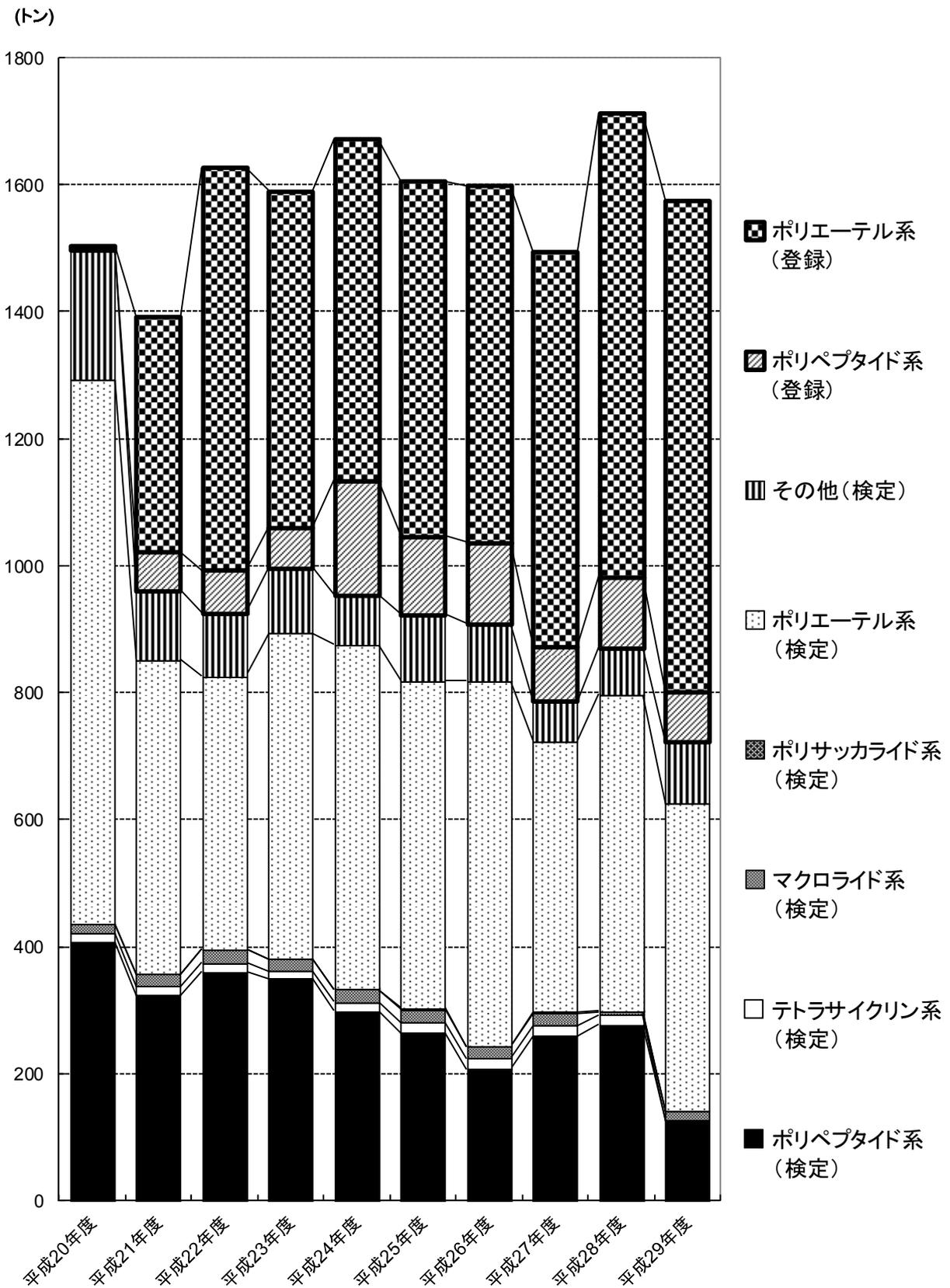


図3 特定添加物の総数量の推移 (類別)

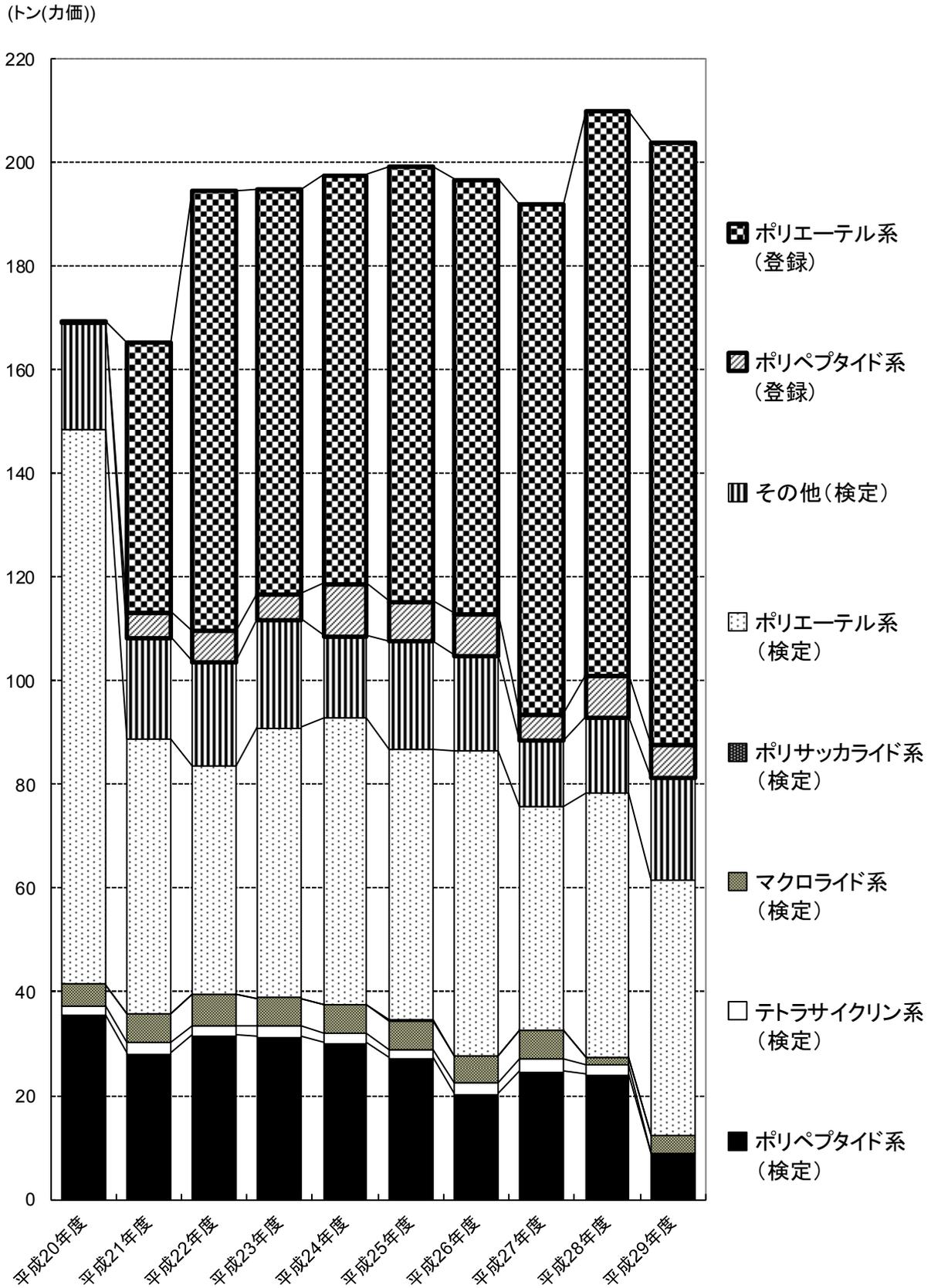


図 4 特定添加物の総数の実量カ価換算量の推移（類別）

7 要 約

平成 29 年度の特定添加物の検定及び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。

- 1) 検定に合格した特定添加物は、7 業者から申請された、9 種類、14 銘柄であった。
- 2) 特定添加物の検定合格件数は 152 件、合格数量は 724 トン、実量力価換算量は 81 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。
- 3) 特定添加物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、ナラシン、アピラマイシンの順に多かった。また、実量力価換算量についても、サリノマイシンナトリウム、ナラシン、アピラマイシンの順に多かった。
- 4) 特定添加物の検定合格数量について、精製級と飼料級の割合を比較すると、飼料級が全体の 80 %を占めた。また、実量力価換算量では、飼料級が 83 %を占めた。
- 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を種類別にみると、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。また、実量力価換算量については、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。
- 6) 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、ナラシンの順に多かった。

他誌掲載論文

(抄録)

1 Development and inter-laboratory study of a method for quantifying ochratoxin A in pet foods

T. Wada, H. Saito, K. Aoyama, S. Saito and M. Shibukawa
World Mycotoxin Journal, 10 (1), 53-61 (2017).

2 Sterigmatocystin and aflatoxin B₁ contamination of corn, soybean meal, and formula feed in Japan

M. Nomura, K. Aoyama, T. Ishibashi
Mycotoxin Research, 34 (1), 21-27 (2018).

飼料研究報告編集委員

委員長	山本 実	副委員長	荻野 喜江
	青山 幸二		武田 然也
	石橋 隆幸		橋本 亮
	大島 慎司		原 秀樹
	小野 雄造		日比野 洋
	須永 善行		淵上 佐知子
	関口 好浩		松崎 学
	高橋 亜紀子		

飼料研究報告 第43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/>

平成30年9月

編集 飼料研究報告編集委員会