

飼料研究報告

第45号

令和2年

Research Report of Animal Feed

Vol. 45
2020



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

はしがき

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

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

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

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

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

令和 2 年 10 月

理事長 木内 岳志

謝 辞

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

令和元年度飼料分析基準検討会委員
(敬称略。五十音順。役職は令和2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 |
| 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 家畜代謝栄養研究領域 研究領域長 |
| 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 |
| 坂 真智子 | 一般財団法人残留農薬研究所 試験事業部 副部長 |
| 永山 敏廣 | 明治薬科大学 特任教授 |
| 堀江 正一 | 大妻女子大学 家政学部 食物学科 教授 |
| 松井 徹 | 国立大学法人京都大学大学院 農学研究科 教授 |
| 松井 利郎 | 国立大学法人九州大学 農学研究院 教授 |
| 安井 明美 | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
食品研究部門 アドバイザー |

目 次

1 飼料用稲中のプロクロラズのカスクロマトグラフ質量分析計による定量法の開発及び共同試験	
齊木 雅一	1
2 飼料中のフィプロニルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発	
矢野 愛子, 佐藤 憲大, 小野 雄造	18
3 脱脂粉乳中のシアヌル酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発	
沼田 歩美, 高橋 雄一, 長久保 眞平	28
4 とうもろこしサイレーヅ中のデオキシニバレノール及びゼアラレノ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	
大島 慎司, 田端 麻里, 青山 幸二	39
5 愛玩動物用飼料中のデオキシニバレノール, ニバレノール, HT-2 トキシン及びT-2 トキシンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法の開発	
立石 洋暢, 加藤 耕一, 桑原 正良	51
6 飼料及び愛玩動物用飼料中の砒素, カドミウム, 鉛及び水銀の迅速・多元素同時定量法の開発	
野村 昌代, 伊藤 紗織, 田端 麻里	67
7 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追加検討及び共同試験	
鈴木 知華	84
8 含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の妥当性確認 ～N-アセチルグリホサートの穀類, 稲わら及び稲発酵粗飼料への適用～	
齊木 雅一, 宮野谷 杏	93
9 愛玩動物用飼料中のサルモネラ検査法の適用範囲を成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ) に拡大するための妥当性確認	
高橋 亜紀子, 橋本 仁康, 渡辺 ちとせ, 増井 亮太	103

精度管理

- 1 令和元年度飼料等の共通試料による分析鑑定について
沼田 歩美, 船水 悦子, 中村 信仁, 武田 然也,
福田 沙樹子, 土井 雄悟 …………… 116

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（令和元年度）
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課 …… 144
- 2 飼料原料及び配合飼料中の腸球菌の薬剤耐性モニタリング調査（令和元年度）
浅尾 美由起, 奥山 紀子, 山上 陽平 …………… 164
- 3 特定添加物検定結果等について（令和元年度）
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課 …………… 179

CONTENTS

1	Development and Collaborative Study of Determination Method of Prochloraz in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by GC-MS	Masakazu SAIKI	1
2	Development of Determination Method of Fipronil in Feed by LC-MS/MS	Aiko YANO, Norihiro SATO and Yuzo ONO	18
3	Development of Determination Method of Cyanuric Acid in Dried Skim Milk by LC-MS/MS	Ayumi NUMATA, Yuichi TAKAHASHI and Shinpei NAGAKUBO	28
4	Development of Determination Method of Deoxynivalenol and Zearalenone in Corn Silage by LC-MS/MS	Shinji OSHIMA, Mari TABATA and Koji AOYAMA	39
5	Development of Simultaneous Determination Method of Deoxynivalenol, Nivalenol, HT-2 Toxin and T-2 Toxin in Pet Food by LC-MS/MS	Hironobu TATEISHI, Koichi KATO and Masayoshi KUWABARA	51
6	Development of Rapid Simultaneous Determination Method of Arsenic, Cadmium, Lead and Mercury in Feed and Pet Food by ICP-MS	Masayo NOMURA, Saori ITOU and Mari TABATA	67
7	Additional Consideration and Collaborative Study of Measurement Method of Crude Fat in Dried Whole Milk and Formula Feed Including Dried Whole Milk	Chika SUZUKI	84
8	Validation Study of Simultaneous Determination Method of Phosphorus-Containing Amino Acid-Based Pesticides in Feed by LC-MS/MS ~Application of <i>N</i> -acetylglyphosate to Grains, Rice straw and Whole-Crop Rice Silage~	Masakazu SAIKI and Kyo MIYANOYA	93
9	Validation Study on Application of <i>Salmonella</i> Detection Method for Pet Food to Formed Jerky and Dried Jerky (Hard Type and Soft Type)	Akiko TAKAHASHI, Yoshiyasu HASHIMOTO, Chitose WATANABE and Ryota MASUI	103

§ Proficiency test

1 Proficiency Test (in the Fiscal Year 2019)

Ayumi NUMATA, Etsuko FUNAMIZU, Nobuhito NAKAMURA, Zenya TAKEDA, Sakiko FUKUDA and Yugo DOI	116
--	-----

§ Investigative report

1 Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2019)

Feed Analysis 1st Division and 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	144
---	-----

2 Monitoring Results of Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Feed Ingredients and Formula Feed (in the Fiscal Year 2019)

Miyuki ASAO, Noriko OKUYAMA and Yohei YAMAGAMI	164
---	-----

3 Results of Official Testing of Specified Feed Additives (in the Fiscal Year 2019)

Feed Analysis 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	179
--	-----

1 飼料用稲中のプロクロラズのカクロマトグラフ質量分析計による定量法の開発及び共同試験

齊木 雅一*

Development and Collaborative Study of Determination Method of Prochloraz in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by GC-MS

Masakazu SAIKI*

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

This paper presents the results of a validation and a collaborative study that I have conducted for developing a quantitative determination method of the concentration of prochloraz in rice straw, whole-crop rice silage (WCRS) and paddy rice for feed using a gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS).

Having added water to a sample, prochloraz was extracted with acetone, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a volume of 200 mL. The diluted solution was purified with Chem Elut (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA). Having decomposed to 2,4,6-trichlorophenol in pyridinium chloride, purified with liquid-liquid partition, trimethylsilylated, and injected into a GC-MS to determine the concentration of 2,4,6-trichlorophenol. The GC separation was then carried out on a fused silica capillary column (DB-1MS, 0.32 mm i.d. × 30 m, 0.25 µm film thickness, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA). The mass spectrometer was operated in electron ionization (EI) mode.

Recovery tests were conducted on rice straw, WCRS and paddy rice. Prochloraz was intentionally added at the levels of 0.02 and 0.2 mg/kg for rice straw, 0.00889 and 0.0889 mg/kg for WCRS in original matter, and 0.02 and 2 mg/kg for paddy rice respectively. 2,4,6-trichlorophenol was intentionally added at the levels of 0.01 and 0.1 mg/kg for rice straw, 0.0044 and 0.044 mg/kg for WCRS in original matter, and 0.01 and 1 mg/kg for paddy rice respectively. The resulting mean recoveries ranged from 101 % to 117 % for prochloraz and 99.3 % to 117 % for 2,4,6-trichlorophenol respectively. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 15 % for prochloraz and less than 12 % for 2,4,6-trichlorophenol respectively.

A collaborative study was conducted by eleven laboratories using rice straw, WCRS and paddy rice, all of which were added with prochloraz according to the following specifications: 0.2 mg/kg for rice straw, 0.2 mg/kg for WCRS and 2 mg/kg for paddy rice respectively. The resulting mean recoveries ranged from 97.6 % to 101 %. The repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were less than 10 % and less than 18 % respectively. The HorRat was less than 1.2.

This method was thus validated as useful for inspections of prochloraz in rice straw, WCRS and paddy rice for feed.

Key words: prochloraz ; 2,4,6-trichlorophenol ; gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS); rice for feed; rice straw; whole-crop rice silage; paddy rice; collaborative study

* 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

キーワード：プロクロラズ；2,4,6-トリクロロフェノール；ガスクロマトグラフ質量分析計；飼料用稲；稲わら；稲発酵粗飼料；粳米；共同試験

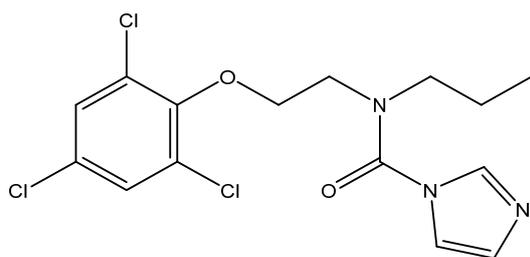
1 緒 言

プロクロラズは、Boots 社が開発したイミダゾール系の殺菌剤である¹⁾。エルゴステロール生合成を阻害し、子囊菌類及び大部分の不完全菌類に対して抗菌活性を示す¹⁾。浸透性に優れ、稲のいもち病、ばか苗病等の防除を主とした種子消毒、その他に小麦、らっきょう、チューリップ等の殺菌防除に使用されている¹⁾。

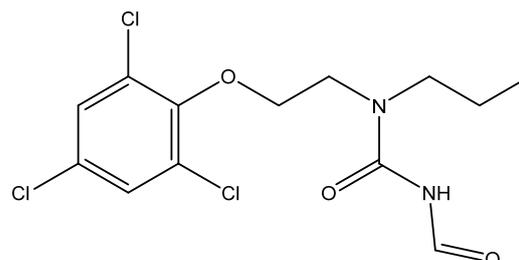
飼料中のプロクロラズの管理基準値は、稲わらで0.2 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で0.1 mg/kg²⁾、食品、添加物等の規格基準における残留基準値は、米（玄米）で2 ppm、小麦、大麦及びライ麦で0.5 ppmである³⁾。プロクロラズは環境中や植物体中で代謝され、イミダゾール環が開裂して尿素骨格をもつ *N*-ホルミル-*N'*-1-プロピル-*N'*-[2-(2,4,6-トリクロロフェノキシ)エチル]尿素及び *N*-プロピル-*N*-[2-(2,4,6-トリクロロフェノキシ)エチル]尿素となり、更に加水分解を受けて2,4,6-トリクロロフェノールになることが明らかになっている⁴⁾。

今回、財団法人日本食品分析センターが「平成21年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業」において開発したガスクロマトグラフ質量分析計（以下「GC-MS」という。）を用いた定量法⁵⁾（以下「JFRL法」という。）を基に、飼料用稲中のプロクロラズのGC-MSを用いた定量法を開発するとともに、共通試料を用いた共同試験を実施し、飼料分析基準⁶⁾への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考にプロクロラズ及びその代謝物の構造式等をFig. 1に示した。本法は食品の試験法⁷⁾と同様、プロクロラズ及びその代謝物を2,4,6-トリクロロフェノールに分解して定量するため、これらの物質が共存している場合には定量値は全ての合計量として算出されるが、*N*-ホルミル-*N'*-1-プロピル-*N'*-[2-(2,4,6-トリクロロフェノキシ)エチル]尿素及び *N*-プロピル-*N*-[2-(2,4,6-トリクロロフェノキシ)エチル]尿素については標準品が入手困難であったため、本検討は2,4,6-トリクロロフェノール及びプロクロラズを用いて実施した。



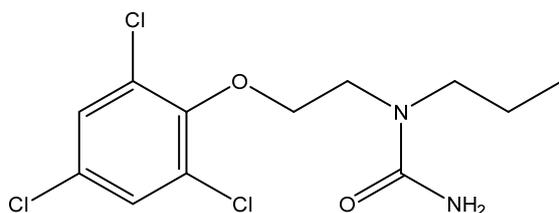
Prochloraz



N-formyl-N'-1-propyl-N'-[2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethyl]urea

N-propyl-N-[2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethyl]imidazole-1-carboxamide

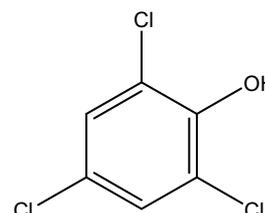
$C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$ MW: 376.7 CAS No.: 67747-09-5



N-propyl-N-[2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethyl]urea

$C_{12}H_{15}Cl_3N_2O_2$ MW: 325.6

$C_{13}H_{15}Cl_3N_2O_3$ MW: 353.6



2,4,6-trichlorophenol

$C_6H_3Cl_3O$ MW: 197.4 CAS No.: 88-06-2

Fig. 1 Chemical structures of prochloraz and the metabolites

2 実験方法

2.1 分析法開発

2.1.1 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 5 時間乾燥後、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉砕した。

2.1.2 試薬

1) 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。N,O-ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセトアミドはガスクロマトグラフ用（和光純薬工業製）を用いた。ジエチレングリコール及び塩酸は試薬特級を用いた。塩化ピリジニウムは和光一級（和光純薬工業製）を用いた。水は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

2) プロクロラズ標準原液

プロクロラズ標準品（和光純薬工業製，純度 98 %）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プロクロラズ標準原液を調製した（この液 1 mL は，プロクロラズとして 0.5 mg を含有する．）。

3) 2,4,6-トリクロロフェノール標準液

2,4,6-トリクロロフェノール標準品（和光純薬工業製，純度 99 %）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 2,4,6-トリクロロフェノール標準原液を調製した（この液 1 mL は，2,4,6-トリクロロフェノールとして 0.5 mg を含有する．）。

使用に際して、2,4,6-トリクロロフェノール標準原液の一定量を、ヘキサンで正確に希釈し、1 mL 中に2,4,6-トリクロロフェノールとしてそれぞれ0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 及び100 ng を含有する各2,4,6-トリクロロフェノール標準液を調製した。

4) 検量線作成用標準液

3)の各2,4,6-トリクロロフェノール標準液各1 mL をGC-MS用バイアルに正確に入れ、これに*N,O*-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド50 µL を加え、ふたをして軽く振り混ぜ、GC-MSによる測定に供する各検量線作成用標準液とした。

2.1.3 装置及び器具

1) 粉砕機：

粉砕機1(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)

粉砕機2(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)

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

3) 多孔性ケイソウ土カラム：Chem Elut (20 mL 保持用) Agilent Technologies 製

4) ドライブロックバス：THB-1 アズワン販売

5) 反応管：Vacuum Hydrolysis Tube (19 × 100 mm) Wilmad-LabGlass 製

6) GC-MS：

GC部：GC-2010 島津製作所製

MS部：GCMS-QP2010 Plus 島津製作所製

2.1.4 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分間静置した後、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3 mL 以下まで減圧濃縮し、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラムに入れ、10分間静置した。300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル20 mL ずつで3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下してプロクロラズを溶出させた。更に酢酸エチル100 mL をカラムに加えて同様に溶出させた。溶出液にアセトン-ジエチレングリコール(49+1)1 mL を加え、40 °C 以下の水浴で約1 mL まで減圧濃縮し、5 mL の全量フラスコに入れた。溶出液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル1 mL ずつで3回洗浄し、洗液を順次先の全量フラスコに合わせた。更に全量フラスコの標線まで酢酸エチルを加え、分解に供する試料溶液とした。

3) 分解

試料溶液 1 mL を反応管に正確に入れ、40 °C 以下で加温しながら窒素ガスを送って乾固させた。残留物に塩化ピリジニウム 1 g を加え、真空ポンプで吸引して反応管内を減圧した後密封した。これをドライブロックバスを用いて 200 °C で 3 時間加熱した後放冷し、ヘキサン転溶に供した。

4) ヘキサン転溶

反応管を開封し、塩酸 (1+50) 5 mL を加えて内容物を溶かし、内容物を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れた。反応管を塩酸 (1+50) 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次共栓遠心沈殿管に加えた。ヘキサン 4 mL を共栓遠心沈殿管に正確に加え、5 分間振り混ぜた。1000×g で 5 分間遠心分離し、更にヘキサン層の一部を 5000×g で 5 分間遠心分離した。上澄み液 1 mL を GC-MS 用バイアルに正確に入れた。これに *N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド 50 µL を加え、ふたをして軽く振り混ぜ、GC-MS による測定に供する試料溶液とした。

5) GC-MS による測定

試料溶液及び各検量線作成用標準液各 2 µL を GC-MS に注入し、選択イオン検出 (以下「SIM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 に示した。

Table 1 Operation conditions of GC-MS

Column	DB-1MS (0.32 mm i.d. × 30 m, 0.25 µm film thickness), Agilent Technologies
Column temperature	50 °C (hold for 1 min) → ramp 20 °C/min → 280 °C (hold for 10 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection port temperature	250 °C
Carrier gas	He 1.5 mL/min
Transferline temperature	250 °C
Ion source temperature	230 °C
Ionization	Electron ionization
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	<i>m/z</i> 253 (for quantification) , 217 (for confirmation)

6) 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 2,4,6-トリクロロフェノール量を算出し、これに 1.91 を乗じて試料中のプロクロラズ量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Sample 10.0 g (300 mL Erlenmeyer flask)

- added 30 mL of water (paddy rice: 20 mL) and allowed to stand for 30 min
- added 120 mL of acetone (paddy rice: 100 mL) and shook for 30 min
- filtrated through No. 5B under reduced pressure
- washed with 50 mL of acetone
- filled up to 200 mL with acetone
- transferred 20 mL of sample solution to eggplant flask
- evaporated to the volume of 3 mL under 40 °C

Chem Elut

- applied sample solution to Chem Elut and allowed to stand for 10 min
- washed the eggplant flask with 20 mL of ethyl acetate and eluted (three times)
- eluted with 100 mL of ethyl acetate
- added 1 mL of acetone – diethylene glycol (49:1)
- evaporated to the volume of 1 mL under 40 °C
- transferred to 5 mL volumetric flask
- washed with 1 mL of ethyl acetate (three times)
- filled up to 5 mL with ethyl acetate

Decomposition

- 1 mL of sample solution
- dried with nitrogen
- added 1 g of pyridinium chloride and vacuumed
- heated to 200 °C for 3 hours
- dissolved in 5 mL of hydrochloric acid (1:50) and transferred to 50 mL centrifuge tube
- washed with 5 mL of hydrochloric acid (1:50) (three times)
- added 4 mL of hexane and shook for 5 min
- centrifuged at 1000×g and transferred hexane layer to tube
- centrifuged at 5000×g and transferred 1 mL of supernatant to GC-MS vial
- added 50 µL of *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide

GC-MS

Scheme 1 Analytical procedure for prochloraz in rice straw, whole-crop rice silage (WCRS) and paddy rice for feed

2.1.5 窒素乾固における損失の防止の検討

2,4,6-トリクロロフェノール標準原液の一定量を酢酸エチルで正確に希釈し、1 mL 中に 2,4,6-トリクロロフェノールとして 5 ng を含有する標準液を調製した。標準液 2 mL ずつを 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、窒素ガスを吹き付け乾固させた後、更にそれぞれ窒素ガスを 0 秒間、30 秒間及び 60 秒間吹き付けたものを調製した。同様に標準液 2 mL ずつを 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、アセトン–ジエチレングリコール (49+1) 0.1 mL を加え窒素ガスを吹き付け乾固させた後、更にそれぞれ窒素ガスを 0 秒間、30 秒間及び 60 秒間吹き付けたものを調製した。ヘキサン 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、その 1 mL を GC-MS 用バイアルに正確に入れた。*N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド 50 µL を加え、ふたをして軽く振り混ぜ、GC-MS による測定に供する試料溶液とした。

2.1.6 添加回収試験

2.1.2 の 2) のプロクロラズ標準原液及び 3) の 2,4,6-トリクロロフェノール標準原液をアセトン

で正確に希釈し添加に用いた。

プロクロラズとして、稲わらに 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2,4,6-トリクロロフェノールとして 0.524 及び 5.24 ng/mL），WCRS に原物換算して 0.00889 及び 0.0889 mg/kg 相当量（同 0.524 及び 5.24 ng/mL），粳米に 0.02 及び 2 mg/kg 相当量（同 0.524 及び 52.4 ng/mL），2,4,6-トリクロロフェノールとして、稲わらに 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.5 及び 5 ng/mL），WCRS に原物換算して 0.00444 及び 0.0444 mg/kg 相当量（同 0.5 及び 5 ng/mL），粳米に 0.01 及び 1 mg/kg 相当量（同 0.5 及び 50 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に本法に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、本法はプロクロラズを 2,4,6-トリクロロフェノールに分解して定量するため、添加回収試験はプロクロラズ及び 2,4,6-トリクロロフェノールをそれぞれ単独で添加して実施した。

また、WCRS において、添加は風乾物試料に対してプロクロラズとして 0.02 及び 0.2 mg/kg，2,4,6-トリクロロフェノールとして 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 %及び 10 %と想定して、原物（水分含有量 60 %）中濃度＝風乾物（水分含有量 10 %）中濃度／2.25 の式により行った。

2.2 共同試験

2.2.1 試料

プロクロラズ（代謝物を含む）を含有しないことを確認した稲わら及び粳米を、目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。また、WCRS を 60 °C 以下で 5 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。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 6 袋を各試験室に配付した。

2.2.2 試薬

1) アセトン、酢酸エチル及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用又はこれ以上のものを用いた。N,O-ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセトアミドはガスクロマトグラフ用（和光純薬工業製）を用いた。ジエチレングリコール及び塩酸は試薬特級又はこれ以上の純度のものを用いた。塩化ピリジニウムは試薬一級又はこれ以上の純度のものを用いた。水は超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）又は市販の液体クロマトグラフ用又はこれ以上のものを用いた。

2) プロクロラズ標準原液

2.1.2 の 2)と同様にプロクロラズ標準原液を調製した。

3) 2,4,6-トリクロロフェノール標準原液

2.1.2 の 3)と同様に 2,4,6-トリクロロフェノール標準原液を調製した。

4) 検量線作成用標準原液

3)で調製した 2,4,6-トリクロロフェノール標準原液 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ンを加えて、1 mL 中に 2,4,6-トリクロロフェノールとして 5 µg を含有する検量線作成用標準原液を調製した。

5) 稲わら及び WCRS 添加用標準液

2)で調製したプロクロラズ標準原液 2 mL を 500 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 中にプロクロラズとして 2 µg を含有する稲わら及び WCRS 添加用標準液

を調製した。

6) 粃米添加用標準液

2)で調製したプロクロラズ標準原液 10 mL を 250 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 中にプロクロラズとしてそれぞれ 20 μg を含有する粃米添加用標準液を調製した。

1)の *N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド並びに濃度を非表示にした 4)の 1 本, 5)の 4 本及び 6)の 2 本を, 2.2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した。

2.2.3 分析試料

非明示の 2 点反復で, 2.2.1 の試験用試料を用いた。分析試料としては, プロクロラズとして稲わら及び WCRS にそれぞれ 0.2 mg/kg 相当量 (試験用試料 10 g に対して稲わら及び WCRS 添加用標準液 1 mL 添加) を, 粃米にそれぞれ 2 mg/kg 相当量 (試験用試料 10 g に対して粃米添加用標準液 1 mL 添加) を, 各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用いた。

2.2.4 定量方法

2.1.4 によった。

2.2.5 報告方法

2.2.3 の分析試料 6 点の分析値は, 分析試料中濃度 (mg/kg) で表し, 4 桁目を四捨五入して有効桁数 3 桁まで報告させることとした。

2.2.6 分析実施期間

平成 28 年 12 月 14 日から平成 29 年 2 月 3 日まで

2.2.7 解析方法

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

2.2.8 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, JA 東日本くみあい飼料株式会社 品質安全部 分析・開発センター, 一般財団法人マイコトキシン検査協会, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 同札幌センター, 同仙台センター, 同名古屋センター, 同神戸センター及び同福岡センター (計 11 試験室)

3 結果及び考察

3.1 分析法開発

3.1.1 検量線

2.1.2 の 4)に従って調製した 2,4,6-トリクロロフェノール標準液の各検量線作成用標準液各 2 μL を GC-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. 2 のとおりであり, 2,4,6-トリクロロフェノールは 0.2~10 ng/mL (注入量として 0.04~20 pg 相当量) 及び 10~100 ng/mL (注入量として 20~200 pg 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、プロクロラズを 0.0076~0.38 mg/kg 及び 0.38~3.8 mg/kg 又は 2,4,6-トリクロロフェノールを 0.004~0.2 mg/kg 及び 0.2~2 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の 2,4,6-トリクロロフェノール濃度範囲に相当する。

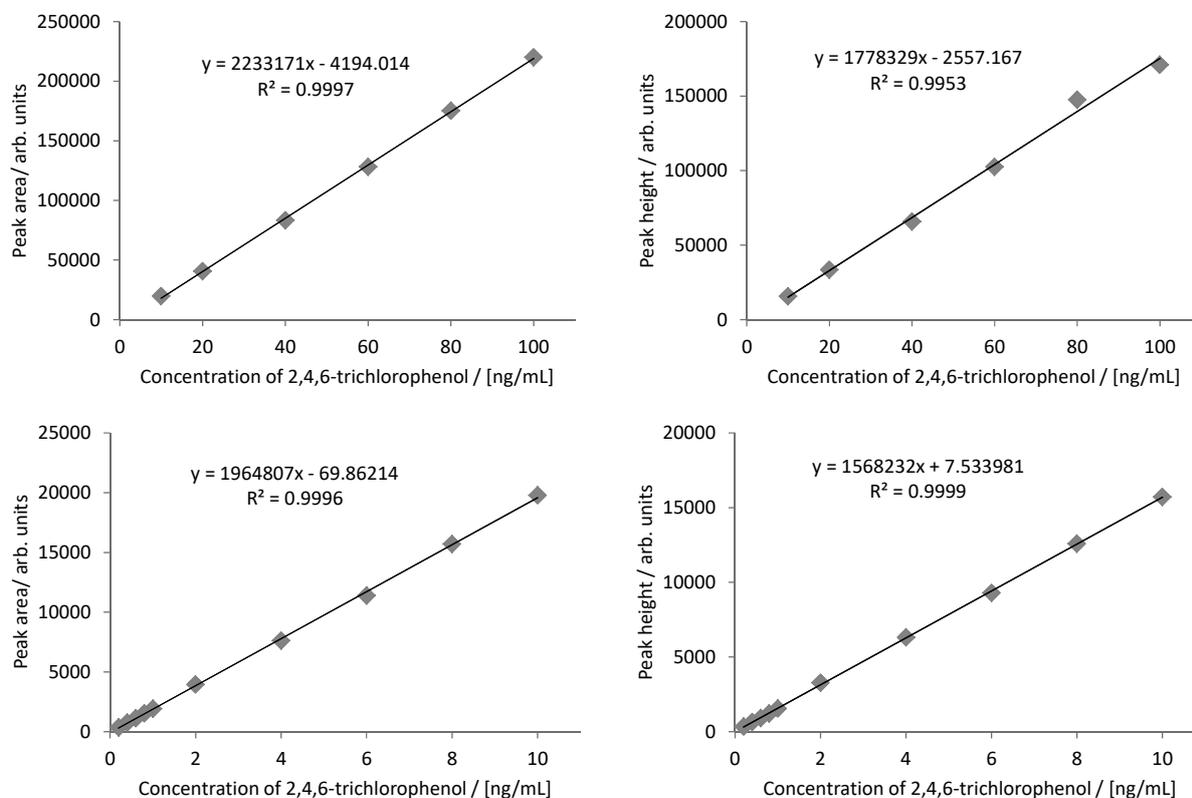


Fig. 2 Calibration curves of 2,4,6-trichlorophenol derivative
Peak area (left), peak height (right), 10~100 ng/mL (upper), 0.2~10 ng/mL (lower)

3.1.2 多孔性ケイソウ土カラムによる精製の適用の検討

2.1.4 の 1)により調製した試料溶液を JFRL 法に従い 500 mL の分液漏斗を用いて液液分配に供したところ、稲わら及び WCRS でエマルジョンが発生した。エマルジョンは静置しておけば消滅するものであったが、消滅するのに 15 分以上かかるものもあり、液液分配の操作に長時間を要した。そこで、多孔性ケイソウ土カラムの使用を検討した。

2.1.4 の 1)により調製したカラム処理に供する試料溶液にプロクロラズとして 200 ng（最終試料溶液中で 2,4,6-トリクロロフェノールとして 5.24 ng/mL 相当量）及び 2,4,6-トリクロロフェノールとして 100 ng（最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量）をそれぞれ添加し、多孔性ケイソウ土カラムからの溶出画分を確認した。その結果は Table 2 のとおりであり、プロクロラズ及び 2,4,6-トリクロロフェノールは酢酸エチル 160 mL で全て溶出した。このことから、JFRL 法の液液分配の代わりに多孔性ケイソウ土カラムによる精製を行うこととし、溶出溶媒は酢酸エチル 160 mL とした。

Table 2 Elution pattern of prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol from Chem Elut

Feed types	Spiked components	Recovery ^{a)} (%)						Total
		Ethyl acetate (mL)						
		0~100	100~120	120~140	140~160	160~180	180~200	
Rice Straw	Prochloraz	94	3	3	1	0	0	101
	2,4,6-Trichlorophenol	98	7	2	0	0	0	107
WCRS	Prochloraz	91	1	1	0	0	0	93
	2,4,6-Trichlorophenol	87	1	0	0	0	0	88
Paddy rice	Prochloraz	86	12	6	3	0	0	107
	2,4,6-Trichlorophenol	101	0	0	0	0	0	101

a) Mean ($n = 2$)

3.1.3 分解に供する試料溶液の調製方法の変更

JFRL 法では酢酸エチル転溶後に減圧濃縮，窒素乾固，アセトン 2 mL で溶解し，その 1 mL を分解に供している．しかし，稲わら及び WCRS では，窒素乾固時に約 0.5 mL 程度の残留物が生じ，多孔性ケイソウ土カラムを用いた方法でも同程度の残留物が生じた．これをアセトン 2 mL で溶解し，その 1 mL を分解に供することは，定量操作において不正確であることから，カラム処理後の溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮した試料液を，5 mL の全量フラスコで定容し，その 1 mL を分解に供することとした．

3.1.4 窒素乾固における損失の防止

窒素気流による乾固操作における分析対象成分の損失の有無を確認するため，プロクロラズ標準液及び 2,4,6-トリクロロフェノール標準液をそれぞれ反応管に入れ窒素乾固し分解したところ，プロクロラズの回収率はほぼ 100 %であったが，2,4,6-トリクロロフェノールは 0 %に近い低回収率であった．

そこで，2.1.5 に従い検討を行ったところ，Table 3 のとおり，アセトン-ジエチレングリコール (49+1) を加えることにより，2,4,6-トリクロロフェノールの損失を防止することができた．そこで，カラム処理後の溶出液にアセトン-ジエチレングリコール (49+1) 1 mL を加えることとした．

Table 3 Loss of 2,4,6-trichlorophenol due to dryness

Acetone – diethylene glycol (49:1)	Recovery ^{a)} (%)		
	Duration of N ₂ gas spray after drying up		
	0 s	30 s	60 s
Spiked	114	105	94
Not spiked	22.6	6.3	0.0

a) Mean ($n = 2$)

3.1.5 妨害物質の検討

稲わら 2 検体，WCRS 2 検体及び粃米 2 検体を試料として，2.1.4 により調製した試料溶液を GC-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，WCRS 1 検体において妨害ピーク（風乾物試料に対して 0.001 mg/kg）が認められた．他の試料については定量を妨げるピ

ークは認められなかった。

そこで検出したピークの定量イオンと確認イオンの強度比を確認したところ、プロクロラズ (2,4,6-トリクロロフェノール) ではなく、妨害ピークと判断した。しかし、その面積は 3.1.8 で確認された定量下限に相当するピーク面積の 1/10 未満であり、飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン (以下「妥当性確認法ガイドライン」という。) に定める選択性の許容範囲であることから、試験に支障のないものと判断した。

なお、得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

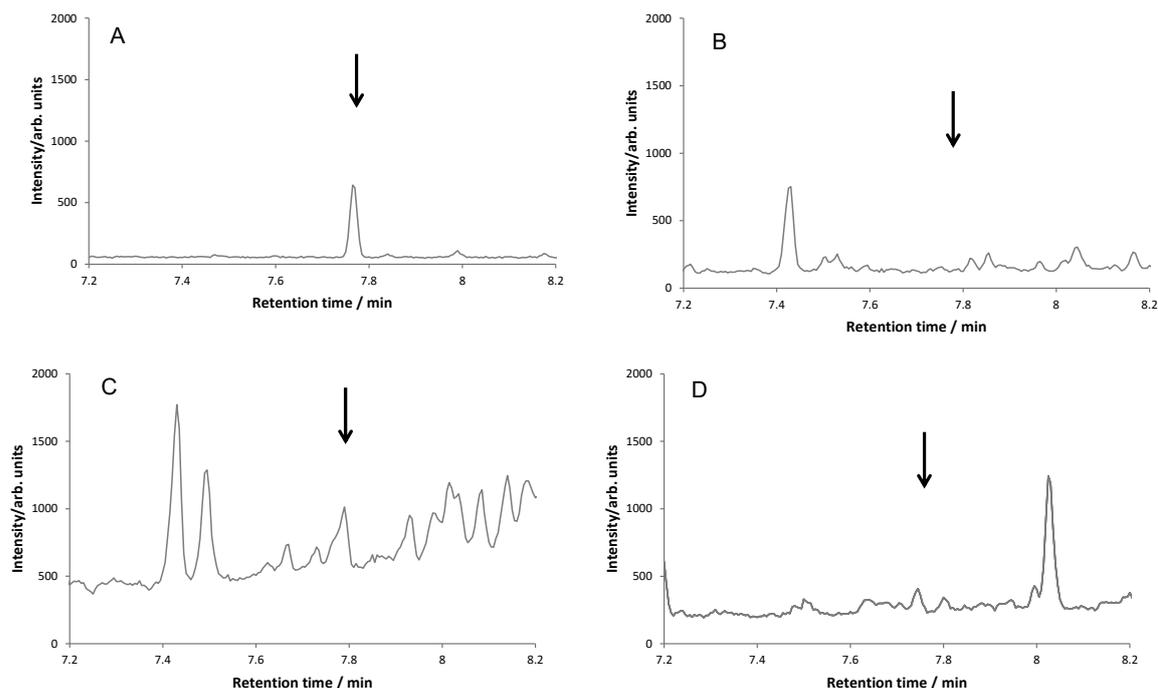


Fig. 3 Typical Selected Ion Monitoring (SIM) chromatograms of 2,4,6-trichlorophenol derivative in standard and blank sample solutions (GC-MS conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the retention time of 2,4,6-trichlorophenol derivative.)

A: Standard solution (0.2 ng/mL)

B: Blank sample solution (rice straw)

C: Blank sample solution (WCRS)

D: Blank sample solution (paddy rice)

3.1.6 マトリックス効果の確認

2.1.4 の 1) から 4)により調製した稲わら, WCRS 及び粳米の *N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミドを加える前のブランク試料溶液 1 mL に, 2,4,6-トリクロロフェノールとして 0.1 mg/kg 相当量 (プロクロラズとして 0.191 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 5 ng/mL) 及び *N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド 50 μ L をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について, ヘキサン 1 mL に 2,4,6-トリクロロフェノールとして 0.1 mg/kg 相当量 (同 0.191 mg/kg 相当量, 同 5 ng/mL) 及び *N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド 50 μ L をそれぞれ添加した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、2,4,6-トリクロロフェノ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。

Table 4 Matrix effect study

Samples	Concentration of 2,4,6-trichlorophenol		Matrix effect ^{b)} (%)
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample ^{a)} as prochloraz (mg/kg)	
Rice straw	5	0.191	109
WCRS	5	0.191 ^{c)}	110
Paddy rice	5	0.191	115

$n = 1$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak area of 2,4,6-trichlorophenol in the presence of matrix to that in the absence of matrix

c) mg/kg air-dry matter

3.1.7 添加回収試験

2.1.6 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 5 のとおり、プロクロラズについては平均回収率 101~117 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 15 %以下，2,4,6-トリクロロフェノールについては平均回収率 99.3~117 %， RSD_r として 12 %以下の成績が得られ，妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値（真度：70 %以上 120 %以下，精度：0.01，0.02 及び 0.1 mg/kg では 22 %以下，0.2 mg/kg では 20 %以下，1 mg/kg では 16 %以下，2 mg/kg では 14 %以下）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. 4 に示した。

Table 5 Recoveries for prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol

Spiked components	Spiked level (mg/kg as fed basis)	Rice Straw		WCRS ^{c)}		Paddy rice	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Prochloraz	0.00889	—	—	108	13	—	—
	0.02	114	12	—	—	102	15
	0.0889	—	—	117	4.8	—	—
	0.2	109	11	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	101	5.5
2,4,6-Trichlorophenol	0.00444	—	—	117	6.4	—	—
	0.01	109	4.3	—	—	117	6.4
	0.0444	—	—	110	12	—	—
	0.1	99.3	3.0	—	—	—	—
	1	—	—	—	—	114	7.6

—: Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction.

The spiked levels were 0.02 and 0.2 mg/kg as air-dry basis for prochloraz, and 0.01 and 0.1 mg/kg as air-dry basis for 2,4,6-trichlorophenol respectively. The levels of prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol in as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % as fed basis and 10 % as air-dry basis.

The levels of prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol as fed basis (moisture 60 %)

= the levels of prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol as air-dry basis (moisture 10 %) / 2.25

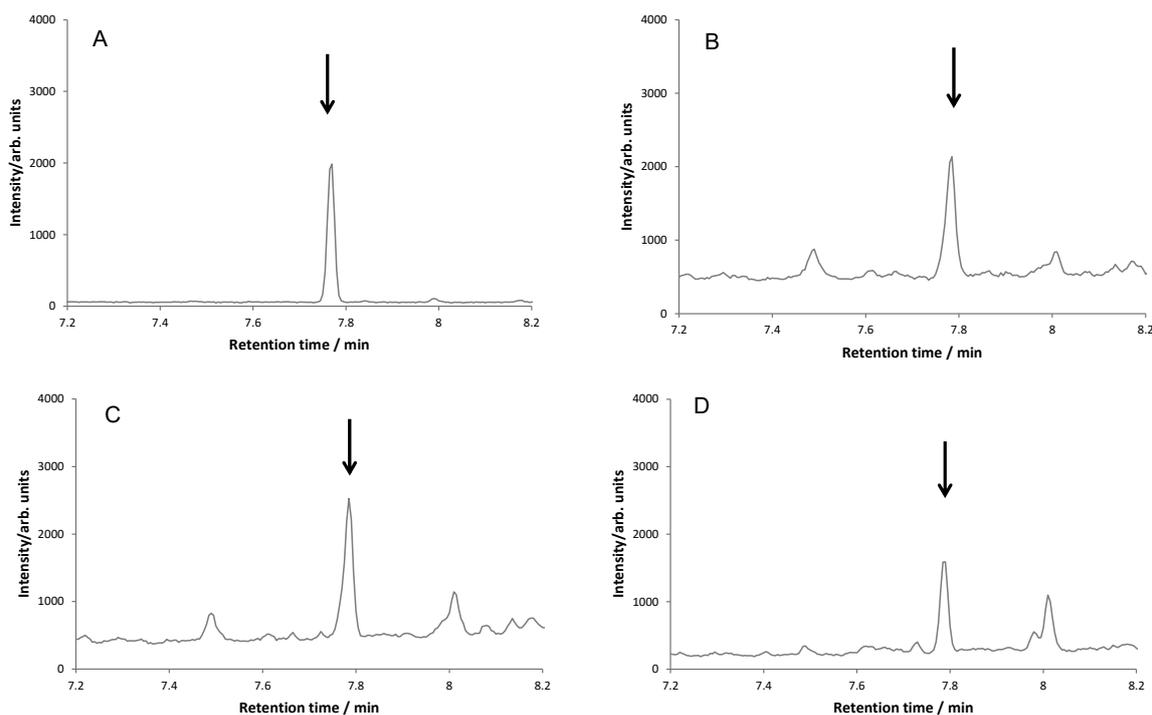


Fig. 4 Typical SIM chromatograms of 2,4,6-trichlorophenol derivative
in standard and spiked sample solutions

(GC-MS conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the retention time of 2,4,6-trichlorophenol derivative.)

- A: Standard solution (The concentration is 0.6 ng/mL as 2,4,6-trichlorophenol.)
 B: Sample solution of rice straw spiked at 0.02 mg/kg of prochloraz (The concentration in the sample solution is about 0.5 ng/mL as 2,4,6-trichlorophenol.)
 C: Sample solution of WCRS spiked at 0.02 mg/kg of prochloraz (The concentration in the sample solution is about 0.5 ng/mL as 2,4,6-trichlorophenol.)
 D: Sample solution of paddy rice spiked at 0.02 mg/kg of prochloraz (The concentration in the sample solution is about 0.5 ng/mL as 2,4,6-trichlorophenol.)

3.1.8 定量下限及び検出下限

2,4,6-トリクロロフェノールの検量線が直線性を示した範囲、2,4,6-トリクロロフェノールとして0.2~100 ng/mLの下端付近となる濃度（稲わら、WCRS風乾物及び粳米にプロクロラズとして0.02 mg/kg相当量（最終試料溶液中で2,4,6-トリクロロフェノールとして0.5 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、プロクロラズの定量下限は稲わら、WCRS風乾物及び粳米で0.02 mg/kgとした。この濃度は、プロクロラズの稲わらの管理基準値及びWCRSの管理基準値の風乾物中換算値（それぞれ0.2及び0.225 mg/kg）に対してそれぞれ1/10及び1/11であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（1/5以下）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。

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験により得られたピークのSN比が3となる濃度を求めた。その結果、検出下限は稲わら、WCRS風乾物及び粳米でプロクロラズとして0.006

mg/kg であり、同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (1/10 以下) を満たしていた。

3.2 共同試験

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

結果は Table 6 のとおりであった。稲わら、WCRS 及び粃米についてそれぞれ、平均回収率は 99.1, 101 及び 97.6 %, RSD_r は 10, 4.3 及び 4.6 %, RSD_R は 14, 18 及び 18 %, HorRat は 0.68, 0.91 及び 1.2 であり、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 (稲わら及び WCRS については 41 %以下, 粃米については 29 %以下) 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 7 に示した。

Table 6 Collaborative study for prochloraz

Lab. No.	Rice straw		WCRS		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.166	0.206	0.196	0.183	1.79	1.99
2	0.218	0.225	0.225	0.206	2.12	2.27
3	0.296 ^{b)}	0.310 ^{b)}	0.277	0.296	2.62	2.68
4	0.241	0.213	0.213	0.192	1.92	1.78
5	0.193	0.188	0.186	0.182	1.80	1.86
6	0.206	0.209	0.203	0.197	1.90	1.88
7	0.152	0.155	0.150	0.154	1.31	1.30
8	0.178	0.183	0.212	0.202	2.11	2.02
9	0.224	0.224	0.219	0.214	1.97	2.12
10	0.198	0.172	0.162	0.162	1.90	1.70
11	0.170	0.243	0.187 ^{a)}	0.252 ^{a)}	1.71 ^{a)}	2.45 ^{a)}
Spiked level (mg/kg)	0.2		0.2		2	
No. labs ^{c)}	10		10		10	
No. outliers ^{d)}	1		1		1	
Mean value (mg/kg)	0.198		0.202		1.95	
Mean recovery (%)	99.1		101		97.6	
RSD_r ^{e)} (%)	10		4.3		4.6	
RSD_R ^{f)} (%)	14		18		18	
$PRSD_R$ ^{g)} (%)	20		20		14	
HorRat	0.68		0.91		1.2	

a) Data excluded by Cochran test.

b) Data excluded by single Grubbs test.

c) Number of laboratories retained after eliminating outliers

d) Number of outlier laboratories removed in parentheses

e) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

f) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 7 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	GC column (i.d. × length, film thickness)
1	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-1MS, Agilent Technologies (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
2	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-1MS, Agilent Technologies (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)
3	GC: 6890N, Agilent Technologies MS: 597 inertMSD, Agilent Technologies	DB-1MS, Agilent Technologies (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
4	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-1MS, Agilent Technologies (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
5	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-1MS, Agilent Technologies (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
6	GC: 6890, Agilent Technologies MS: 5973, Agilent Technologies	HP-5MS, Agilent Technologies (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)
7	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C Inert XL MSD, Agilent Technologies	Rxi-1MS, Restek (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)
8	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-1MS, Agilent Technologies (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
9	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	HP-1MS, Agilent Technologies (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)
10	GCMS-QP2010, Shimadzu	DB-1MS, Agilent Technologies (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
11	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-1MS, Agilent Technologies (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)

4 まとめ

飼料用稲に残留するプロクロラズについて、JFRL法を基に、GC-MSを用いた定量法を開発するとともに、共同試験を実施し、飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、①液液分配をケイソウ土カラムによる精製に変更、②酢酸エチル転溶後のアセトン 2 mL 添加を 5 mL の全量フラスコを用いた定容に変更、③カラム処理後の溶液にアセトン-ジエチレングリコール (49+1) 0.1 mL を加えることで、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 検量線は、0.2~10 ng/mL (注入量として 0.4~20 pg 相当量) 及び 10~100 ng/mL (注入量として 20~200 pg 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、プロクロラズを 0.0076~0.38 mg/kg 及び 0.38~3.8 mg/kg 又は 2,4,6-トリクロロフェノール 0.004~0.2 mg/kgg 及び 0.2~2 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の 2,4,6-トリクロロフェノール濃度範囲に相当する。

- 2) 稲わら、WCRS 及び粳米について、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、2,4,6-トリクロロフェノ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。

- 4) プロクロラズとして、稲わらに 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量, WCRS に原物換算して 0.00889 及び 0.0889 mg/kg 相当量, 粳米に 0.02 及び 2 mg/kg 相当量, 2,4,6-トリクロロフェノールとして稲わらに 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量, WCRS に原物換算して 0.00444 及び 0.0444 mg/kg 相当量, 粳米に 0.01 及び 1 mg/kg 相当量を添加し, 本法に従って 5 点併行分析を実施し, 回収率及び繰返し精度を求めたところ, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた.
- 5) 本法のプロクロラズの定量下限は試料中で 0.02 mg/kg, 検出下限は 0.006 mg/kg であった. 設定した定量下限及び検出下限は, 妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた.
- 6) 稲わら, WCRS 及び粳米にプロクロラズとしてそれぞれ 0.2, 0.2 及び 2 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, JA 東日本くみあい飼料株式会社 品質安全部 分析・開発センター, 一般財団法人マイコトキシン検査協会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, 東京, 日本植物防疫協会, (2016) (ISBN: 978-4-88926-146-2).
- 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, 添加物等の規格基準, 昭和 34 年 12 月 28 日, 厚生省告示第 370 号 (1959).
- 4) 布施 淳一, 金森 久幸, 井手吉 範久: GC による野菜・果実中のプロクロラズの分析法, 食品衛生学雑誌, 41, 61-65 (2000).
- 5) 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 (飼料中の有害物質等の分析法の開発) (2010).
- 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) 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, 食安発第 0124001 号 (2005).
- 8) William Horwitz: Protocol for design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, 67(2), 331-343 (1995).
- 9) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 10) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, 125, 385-386 (2000).

2 飼料中のフィプロニルの液体クロマトグラフトアンデム型質量分析計による定量法の開発

矢野 愛子^{*1}, 佐藤 憲大^{*2}, 小野 雄造^{*3}

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

Aiko YANO^{*1}, Norihiro SATO^{*2} and Yuzo ONO^{*3}

(*¹ Fukuoka Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) (Now Kyushu Regional Agricultural Administration Office, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan),

^{*2} Fukuoka Regional Center, FAMIC (Now Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan), ^{*3} Fukuoka Regional Center, FAMIC)

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

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

As documented in the previous report, whereas we conducted the recovery test on rice straw, the mean recovery of fipronil did not comply with the validation standard stipulated in the Feed Analysis Standard of Japan. On the other hand, in this report, we investigated the possible cause of the low recovery of fipronil. We found that the low fipronil recovery was caused by a water soluble material in rice straw matrix, and the effect of the material can be removed by the use of NaOH solution (0.5 w/v%) instead of phosphate buffer in liquid-liquid partition.

Recovery tests were carried out on rice straw. Fipronil was intentionally added at the levels of 0.01 and 0.2 mg/kg, and the resulting mean recoveries ranged from 76.7 % to 84.8 %, and the repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 13 % for fipronil.

Formula feed for layers, corn, alfalfa hay and whole-crop rice silage (WCRS) were also brought to recovery tests in order to determine the limit of quantification of fipronil in feed. Fipronil was intentionally added at the levels of 0.0008 mg/kg for formula feed for layers and corn, 0.01 mg/kg for alfalfa hay, and 0.004 mg/kg for WCRS in original matter respectively. The resulting data together with the data obtained from the previous report thus enabled us to determine the limit of quantification of fipronil in feed.

Key words: fipronil; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice straw;

*¹ 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, 現 農林水産省九州農政局

*² 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, 現 農林水産省消費・安全局

*³ 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

キーワード：フィプロニル；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；稲わら

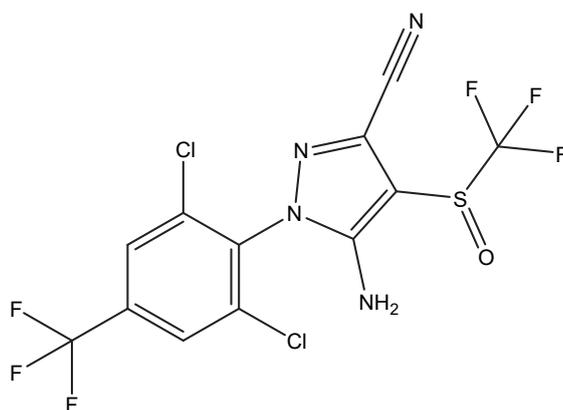
1 緒 言

フィプロニルは、フェニルピラゾール系の殺虫剤であり、昆虫に対して神経興奮抑制を阻害することにより殺虫作用を示すと考えられている¹⁾。我が国では1996年に初回農薬登録され、適用農作物等は水稲及び野菜等である¹⁾。飼料中の基準値としては、牛、めん羊、山羊及びしか用配合飼料並びに豚用配合飼料で0.02 mg/kg、鶏及びうずら用配合飼料で0.01 mg/kg、牧草で0.2 mg/kg と設定されている²⁾。また、飼料中の管理基準値として、稲わらで0.2 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で0.1 mg/kg と定められている³⁾。

飼料中のフィプロニルの分析法としては、飼料分析基準⁴⁾においてガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法が収載されており、定量下限は0.01 mg/kg である。今般、飼料中のフィプロニルについて、設定基準値及び対象飼料の変更が検討されており、基準値に対して十分な精確さを持つ分析法の開発が急務となっている。

昨年度に筆者らは、一般財団法人日本食品検査が開発した分析法⁵⁾を基に、飼料中のフィプロニルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）による定量法の飼料分析基準への適用の可否を検討したところ、稲わら以外の試料については飼料分析基準別表3の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた真度及び精度の目標値を満たす結果であった。稲わらについては真度の目標値を満たさなかったため、今回、その原因究明及び定量法の改良を検討したので、その概要を報告する。また、稲わら以外の試料について、昨年度未検討であった定量下限及び検出下限を検討したので併せて報告する。

参考にフィプロニルの構造式等を Fig. 1 に示した。



Fipronil

5-amino-1-(2,6-dichloro-4- α,α,α -trifluoro-4-*p*-tolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile
 $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ MW: 437.1 CAS No.: 120068-37-3

Fig. 1 Chemical structure of fipronil

2 実験方法

2.1 試料

成鶏飼育用配合飼料，とうもろこし，アルファルファ乾草及び稲わらはそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した．WCRS は 60 °C で 10 時間乾燥後，更に室内に静置して風乾した後，同様に粉碎した．

なお，検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した．

Table 1 Composition of the formula feed

Formula feed type	Ingredient type	Proportion (%)	Ingredients
For layers	Grains	61	Corn
	Brans	1	Rice bran
	Oil seed meal	22	Soybean meal, corn gluten meal, rapeseed meal
	Animal by-products	6	Pork and chicken meal, fish meal, feather meal
	Others	10	Calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, oyster shell, feed additives

2.2 試薬

1) アセトニトリル，アセトン及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた．メタノールは LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）を用いた．アンモニア水，塩化ナトリウム，塩酸，酢酸，酢酸アンモニウム，硝酸，水酸化ナトリウム，トリクロロ酢酸，トリフルオロ酢酸ナトリウム，リン酸水素二カリウム，リン酸二水素カリウム，硫酸亜鉛七水和物及び硫酸ナトリウム（無水）は試薬特級を用いた．トリフルオロ酢酸は SAJ 特級（Sigma-Aldrich 製）を用いた．1 mol/L 酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用（富士フィルム和光純薬製）を用いた．水は LC-MS 用の超純水（富士フィルム和光純薬製又は関東化学製）を用いた．

2) 0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）

リン酸水素二カリウム 52.7 g 及びリン酸二水素カリウム 30.2 g を量り，水約 500 mL に溶解し，1 mol/L 塩酸又は 1 mol/L 水酸化ナトリウムを用いて pH を 7.0 に調整した後，水を加えて 1 L とした．

3) フィプロニル標準液

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

使用に際して，フィプロニル標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し，1 mL 中にフィプロニルとして 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8 及び 10 ng を含有する検量線作成用フィプロニル標準液を調製した．

2.3 装置及び器具

1) 粉碎機：

粉碎機 1（配合飼料及びとうもろこし用）：

ZM-200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，使用時回転数 18000 rpm）

粉碎機 2 (乾牧草, 稲わら及び WCRS 用) :

SM-100 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm)

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

3) ろ紙: 5 種 B 桐山製作所製

4) グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (以下「ミニカラム」という.) : InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg) ジーエルサイエンス製

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

6) LC-MS/MS :

LC 部: ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部: ACQUITY TQ Detector Waters 製

2.4 定量方法

1) 抽出

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

2) 液液分配

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

3) カラム処理

ミニカラムをアセトン 10 mL 及びヘキサン 10 mL で順次洗浄した. 試料溶液をミニカラムに入れ, 液面が充てん剤の上端に達するまで自然流下した. 試料溶液の入っていた 100 mL のなす形フラスコをヘキサン 5 mL ずつで 2 回洗浄し, 洗液を順次ミニカラムに加え, 同様に流出させた. 50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き, ヘキサン-アセトン (4+1) 15 mL をミニカラムに加えてフィプロニルを溶出させた. 溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した. メタノール 1 mL (乾牧草, 稲わら及び WCRS にあっては 10 mL) を正確に加えて残留物を溶かした後, メンブランフィルターでろ過し, LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした.

4) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各フィプロニル標準液各 5 μL を LC-MS/MS に注入し, 選択反応検出 (SRM)

クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operation conditions of LC-MS/MS

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

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>)		
Fipronil	435	330	—	25	15
		—	250	25	30

5) 計 算

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

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

2.5 添加回収試験

2.2 の 3) のフィプロニル標準原液をメタノールで正確に希釈し添加に用いた。

フィプロニルとして、成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしに 0.0008 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.8 ng/mL），アルファルファ乾草に 0.01 mg/kg 相当量（同 0.5 ng/mL），WCRS に原物換算して 0.004 mg/kg 相当量（同 0.5 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求めた。

なお、WCRS への添加は風乾物試料に対してフィプロニルとして 0.01 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。

Sample 10.0 g (5.0 g for grass hay, rice straw and whole-crop rice silage (WCRS) (200 mL Erlenmeyer flask))

- added 15 mL of water and allowed to stand for 30 min
- added 100 mL of acetonitrile and shook for 30 min
- filtered through filter paper (No. 5B of JIS P3801) under reduced pressure
- washed with 50 mL of acetonitrile
- filled up to 200 mL with acetonitrile

Transferred 20 mL of sample solution to a 100 mL separating funnel

- added 10 g of sodium chloride and 20 mL of 0.5 mol/L phosphate buffer (pH 7.0) (20 mL of NaOH solution (0.5 w/v%) for rice straw)
- shook for 10 min and allowed to stand for a while
- discarded the water layer and transferred the acetonitrile layer to a 100 mL Erlenmeyer flask
- added some amount of sodium sulfate and dehydrated the acetonitrile layer
- filtrated to a 100 mL eggplant flask
- washed the Erlenmeyer flask with acetonitrile and filtrated to the eggplant flask
- evaporated to dryness under 40 °C
- dissolved in 2 mL of hexane

GC/PSA column (500 mg/500 mg)

- prewashed with 10 mL of acetone and 10 mL of hexane
- applied sample solution and let it flow out
- washed the eggplant flask and eluted with 5 mL of hexane (twice)
- set a reciever (50 mL eggplant flask)
- eluted with 15 mL of hexane-acetone (4:1)
- evaporated to dryness under 40 °C
- dissolved in 1 mL of methanol (10 mL for grass hay, rice straw and WCRS)
- filtrated through hydrophilic PTFE membrane filter (pore size: 0.2 μm)

LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for fipronil

3 結果及び考察

3.1 稲わらでの低回収率の原因の究明

昨年度、稲わらについてフィプロニルの回収率が低い原因を検討したところ、液液分配に問題がある可能性が高いことが示唆された。そこで、原因物質の推定及び回収率の改善方法を検討したところ、以下のことが判明した。

- ① 低回収率の原因物質は、高温処理に対して安定な水溶性物質である。
- ② 除たん白に用いられるいくつかの試薬により回収率が改善される。
- ③ 酸よりもアルカリの方が、回収率の改善効果が高い。
- ④ 回収率改善のために添加する試薬は、抽出時ではなく、液液分配時に添加する必要がある。

これらの検討の結果、液液分配時に、リン酸緩衝液の代わりに水酸化ナトリウム溶液を添加した場合が最も良好な回収率となった。

そこで、液液分配時の水酸化ナトリウム溶液の最適濃度を検討した。稲わらにフィプロニルとして 0.2 mg/kg 相当量を添加後、本法に従って調製した抽出液 20 mL を用い、0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) に代えて 0.1, 0.5, 1, 2 又は 5 w/v% 水酸化ナトリウム溶液 20 mL を使用して、本法に従って液液分配以降の操作を行った。対照として先の抽出液 20 mL に本法に従って 0.5

mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 mL を使用し、液液分配以降の操作を行った。その結果、Table 4 のとおり、フィプロニルは水酸化ナトリウム溶液 (0.5 w/v%) を使用した場合に最も高回収率であった。したがって、液液分配に使用する水酸化ナトリウムの最適濃度は 0.5 w/v% と考えられた。

以上の結果から、稲わらについては液液分配時に 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) の代わりに水酸化ナトリウム溶液 (0.5 w/v%) を用いることとした。

Table 4 Optimal concentration of NaOH in liquid-liquid partition (LLP)

Sample	Recovery (%)					
	Phosphate buffer	NaOH (w/v%)				
		0.1	0.5	1	2	5
Rice straw 1	53.0	83.6	87.4	81.5	70.9	71.7

$n = 1$

3.2 稲わらにおける妨害物質の検討

稲わら 5 検体を試料として、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. 2 に示した。

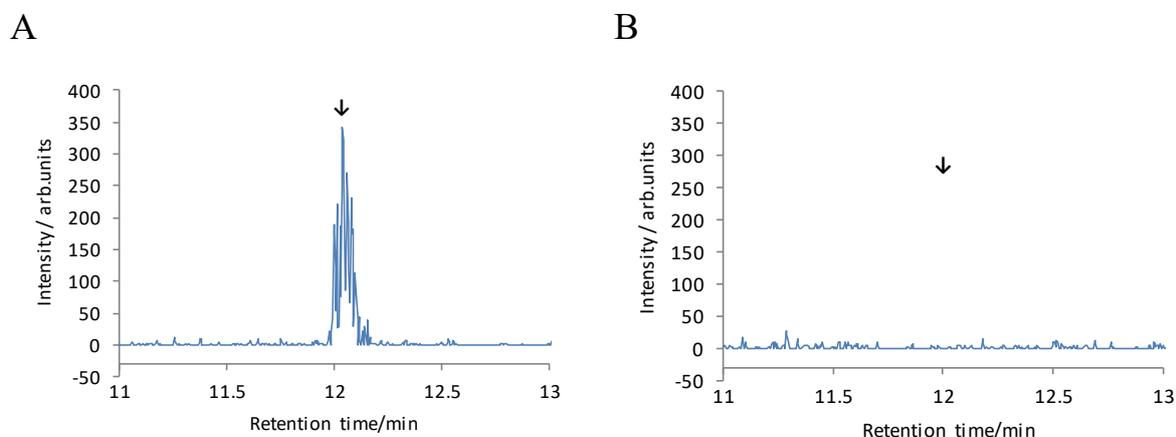


Fig. 2 Typical Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of fipronil in standard and blank sample solutions

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

A: Standard solution (0.1 ng/mL)

B: Blank sample solution (rice straw)

3.3 稲わらにおける添加回収試験

稲わら 5.0 g にフィプロニルとして 0.01 又は 0.2 mg/kg 相当量を添加後よく混合し、一夜静置した後、本法に従って定量し、フィプロニルの平均回収率及び繰返し精度を求めた。その結果、Table 5 のとおり、フィプロニルの平均回収率は 76.7~84.8 %、その繰返し精度は相対標準偏差

(RSD_r) として 13 %以下の成績であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び精度の目標値 (真度: 70 %以上 120 %以下, 精度: 22 %以下 (0.01 mg/kg), 20 %以下 (0.2 mg/kg)) を満たしていた.

Table 5 Recoveries of fipronil with NaOH in LLP

Spiked level (mg/kg)	Rice straw 1		Rice straw 2	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
0.01	77.4	13	84.8	9.0
0.2	84.6	1.3	76.7	2.6

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.4 稲わらにおける定量下限及び検出下限の検討

フィプロニルの検量線が直線性を示した範囲 0.1~10 ng/mL の下端付近となる濃度 (稲わらで 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 ng/mL 相当量)) における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, これを稲わら中のフィプロニルの定量下限とした. この濃度は, 稲わら中のフィプロニルの管理基準値 (0.2 mg/kg) に対して 1/20 であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (1/5 以下) 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.

本法の検出下限を確認するため, 添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた. その結果, 検出下限は 0.004 mg/kg であり, 同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (1/10 以下) を満たしていた.

3.5 稲わら以外の試料における定量下限及び検出下限の検討

1) 添加回収試験

2.5 により添加回収試験を実施した. その結果は Table 6 のとおり, 平均回収率は 81.3~102 %, その繰返し精度は RSD_r として 12 %以下の成績であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び精度の目標値 (真度: 70 %以上 120 %以下, 精度: 22 %以下 (0.0008~0.11 mg/kg), 20 %以下 (0.2 mg/kg)) を満たす結果であった. なお, Table 6 には, 参考のために昨年度に実施した添加回収試験の結果を併せて記載した.

Table 6 Recoveries for fipronil

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layers		Wheat		Corn		Alfalfa hay		WCRS ^{d)}	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.0008	102 ^{c)}	3.9 ^{c)}	81.3	8.9	91.1 ^{c)}	12 ^{c)}	—	—	—	—
0.002	—	—	86.2	6.7	—	—	—	—	—	—
0.004	—	—	—	—	—	—	—	—	102 ^{c)}	7.0 ^{c)}
0.008	—	—	—	—	85.8	6.6	—	—	—	—
0.01	83.2	7.1	—	—	—	—	81.6 ^{c)}	5.5 ^{c)}	—	—
0.018	—	—	—	—	—	—	—	—	87.5	7.2
0.02	81.3	7.0	—	—	90.0	1.8	—	—	—	—
0.04	—	—	—	—	—	—	86.7	4.1	—	—
0.11	—	—	—	—	—	—	—	—	85.6	5.2
0.2	—	—	—	—	—	—	85.8	6.7	—	—

—: Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Test results conducted in this report. Others were conducted in the previous report.

d) Fipronil was spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.04 and 2.5 mg/kg as air-dry basis for fipronil. The levels of fipronil as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % as fed basis and 10 % as air-dry basis.

$$\begin{aligned} & \text{The levels of fipronil as fed basis (moisture 60 \%)} \\ & = \text{the levels of fipronil as air-dry basis (moisture 10 \%)} / 2.25 \end{aligned}$$

2) 定量下限及び検出下限

フィプロニルの検量線が直線性を示した範囲, 0.1~10 ng/mL の下端付近となる濃度 (成鶏飼育用配合飼料, 小麦及びとうもろこしは 0.0008 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.8 ng/mL 相当量) 並びにアルファルファ乾草及び WCRS (風乾物中) は 0.01 mg/kg 相当量 (同 0.5 ng/mL 相当量)) における添加回収試験の結果, 得られたピークの SN 比が 10 以上であったため, これらをフィプロニルの定量下限とした. これらの濃度は, 配合飼料における基準値の最小値である鶏及びうずら用配合飼料中のフィプロニルの基準値 (0.01 mg/kg) に対して 2/25, 牧草中のフィプロニルの基準値 (0.2 mg/kg) に対して 1/20, WCRS 中のフィプロニルの管理基準値の風乾物中換算値 (0.2 mg/kg) に対して 1/20 であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (基準値 0.1 mg/kg 未満: 2/5 以下, 基準値 0.1 mg/kg 以上: 1/5 以下) を満たしていた. なお, Table 6 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.

本法の検出下限を確認するため, 添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた. その結果, 検出下限は成鶏飼育用配合飼料, 小麦及びとうもろこしで 0.0002 mg/kg, アルファルファ乾草及び WCRS (風乾物中) で 0.004 mg/kg であり, 同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (基準値 0.1 mg/kg 未満: 1/5 以下, 基準値 0.1 mg/kg 以上: 1/10 以下) を満たしていた.

4 まとめ

飼料中に残留するフィプロニルについて、LC-MS/MS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。稲わらについては、昨年度の検討においてフィプロニルの回収率が低かった原因の究明及び定量法の改良を検討し、稲わら以外の試料については、昨年度未実施であった定量下限及び検出下限を検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 稲わら中のフィプロニルは、稲わら中の水溶性夾雑物の影響により低回収率となること及び液体分配時に水酸化ナトリウム溶液を用いることにより回収率が改善することが明らかとなった。
- 2) 稲わらを用いて本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) 稲わらに、フィプロニルとして 0.01 又は 0.2 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たしていた。
- 4) 本法のフィプロニルの定量下限は、成鶏飼育用配合飼料、小麦及びとうもろこしで 0.0008 mg/kg, アルファルファ乾草、稲わら及び WCRS（風乾物中）で 0.01 mg/kg, 検出下限は成鶏飼育用配合飼料、小麦及びとうもろこしで 0.0002 mg/kg, アルファルファ乾草、稲わら及び WCRS（風乾物中）で 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値を満たしていた。

文 献

- 1) 食品安全委員会農薬専門調査会：フィプロニル農薬・動物用医薬品評価書，平成 28 年 1 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) 一般財団法人日本食品検査：平成 29 年度生産資材安全確保対策委託事業（飼料中の農薬分析法開発委託事業） (2018).

3 脱脂粉乳中のシアヌル酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発

沼田 歩美*, 高橋 雄一*, 長久保 眞平*

Development of Determination Method of Cyanuric Acid in Dried Skim Milk by LC-MS/MS

Ayumi NUMATA*, Yuichi TAKAHASHI* and Shinpei NAGAKUBO*

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

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

Having added water to a sample, it was sonicated. Next, cyanuric acid in the sample was extracted with acetonitrile, and the extracted solution was centrifuged. The supernatant (2 mL) was then diluted with acetonitrile-water (1:1) to a volume of 10 mL. The diluted solution was applied to strong anion exchange mini-column (Oasis MAX, Waters Co.; Milford, MA, USA), which was then rinsed with acetonitrile and ammonia water. The purified solution was subsequently injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of cyanuric acid.

LC separation was then carried out on a hydrophilic interaction chromatography column (SeQuant ZIC-HILIC, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Merck Millipore Inc.; Burlington, MA, USA) with a gradient of acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate solution (19:1) and 10 mmol/L ammonium acetate dissolved in acetonitrile-water (1:1) as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the negative mode electrospray ionization (ESI-) was used.

Recovery tests were conducted on three kinds of dried skim milk. Cyanuric acid was intentionally added at the levels of 0.5 mg/kg and 2.5 mg/kg to samples respectively. The resulting mean recoveries ranged from 94.6 % to 107 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD) was less than 15 %.

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

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

1 緒 言

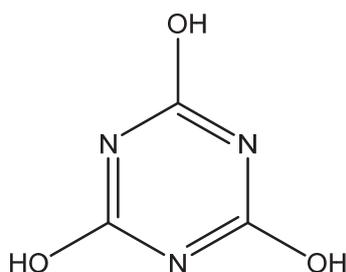
シアヌル酸は、一般にプラスチックに添加する難燃剤や消毒剤の原料、プールの塩素安定剤として使用されている¹⁾。シアヌル酸及び類似化合物であるメラミンは、安価で入手が容易であり、窒素原子を多く含んでいるため、食品等に添加され、見かけのたん白質含量を高める欺瞞剤として用いられることがある¹⁾。シアヌル酸及びメラミンは、単独で摂取した場合の急性毒性は比較的低いが、同時に摂取した場合、腎不全を誘発する結晶を形成することが示唆されている¹⁾。2007年に米国において、メラミン関連化合物に汚染されたペットフードを摂取したイヌとネコにおける腎不全症例が大規模に発生した。また中国においては、メラミン関連化合物が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

* 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

調製粉乳が原因と思われる乳幼児等の腎結石等の被害が報告されている²⁾。日本において、令和元年8月6日付けで飼料の有害物質の指導基準及び管理基準³⁾が改正され、尿素を除く飼料（飼料原料を含む。）中のメラミン及びシアヌル酸（イソシアヌル酸）として管理基準値が2.5 mg/kg と設定された（令和2年2月6日施行）。しかし、シアヌル酸については、その分析法が飼料分析基準⁴⁾に収載されていないことから、分析法の確立が急務となっている。

昨年度、長久保らは、米国食品医薬品局（FDA）から示されている液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）による定量法⁵⁾（以下「FDA 法」という。）を基に、飼料中のシアヌル酸の LC-MS/MS による定量法を開発した⁶⁾。その際、脱脂粉乳での添加回収試験において飼料分析基準別表3の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた併行精度を満たさない結果となり、また内標準である安定同位体元素標識シアヌル酸（以下「シアヌル酸-¹³C₃」という。）の回収率も低い結果であったことから、更なる検討が必要とされた。そこで今回、脱脂粉乳を対象としてシアヌル酸の定量法の改良について検討したので、その概要を報告する。

参考にシアヌル酸の構造式等を Fig. 1 に示した。



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

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

Fig. 1 Chemical structure of cyanuric acid

2 実験方法

2.1 試料

脱脂粉乳は 1 mm のふるいを通じたものを用いた。

2.2 試薬

1) アセトニトリルは LC-MS 用、アンモニア水は特級（質量分率 28%）、ギ酸は LC-MS 用（質量分率 99%）、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は高速液体クロマトグラフ用を用いた（いずれも富士フイルム和光純薬製）。水は Milli-Q Integral 5（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

2) シアヌル酸標準原液

シアヌル酸標準品（富士フイルム和光純薬製、純度 99.2%）10 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてシアヌル酸標準原液を調製した（この液 1 mL は、シアヌル酸として 500 µg を含有する。）。

3) シアヌル酸-¹³C₃ 内標準原液

シアヌル酸-¹³C₃ 標準品（林純薬工業製、純度 ¹³C₃ 97.3%）5 mg を正確に量って 20 mL の全

量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準原液を調製した（この液 1 mL は、シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ として 250 μg を含有する．）．

4) 検量線作成用シアヌル酸標準液

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

5) シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準液

使用に際して、シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準原液の一定量を水で正確に希釈し、1 mL 中にシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ として 4 μg を含有する内標準液を調製した（用時調製）．

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

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

2.3 装置及び器具

1) 超音波洗浄機：MCS-6 アズワン販売

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

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

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

5) 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 1 g を正確に量って 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、水 10 mL を加えた後、15 分間超音波処理した．この遠心沈殿管にアセトニトリル 10 mL を加え、更にシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準液 250 μL を正確に加えた後、ホモジナイザーで 1 分間かき混ぜて抽出した．抽出液を 1600 \times g で 10 分間遠心分離し、上澄み液 2 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れた．全量フラスコの標線までアセトニトリル-水（1+1）を加え、カラム処理に供する試料溶液とした．

2) カラム処理

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

3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各検量線作成用シアヌル酸標準液各 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出（以下「SRM」という。）クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 及び 2 に示した。

Table 1 LC-MS/MS operating conditions

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

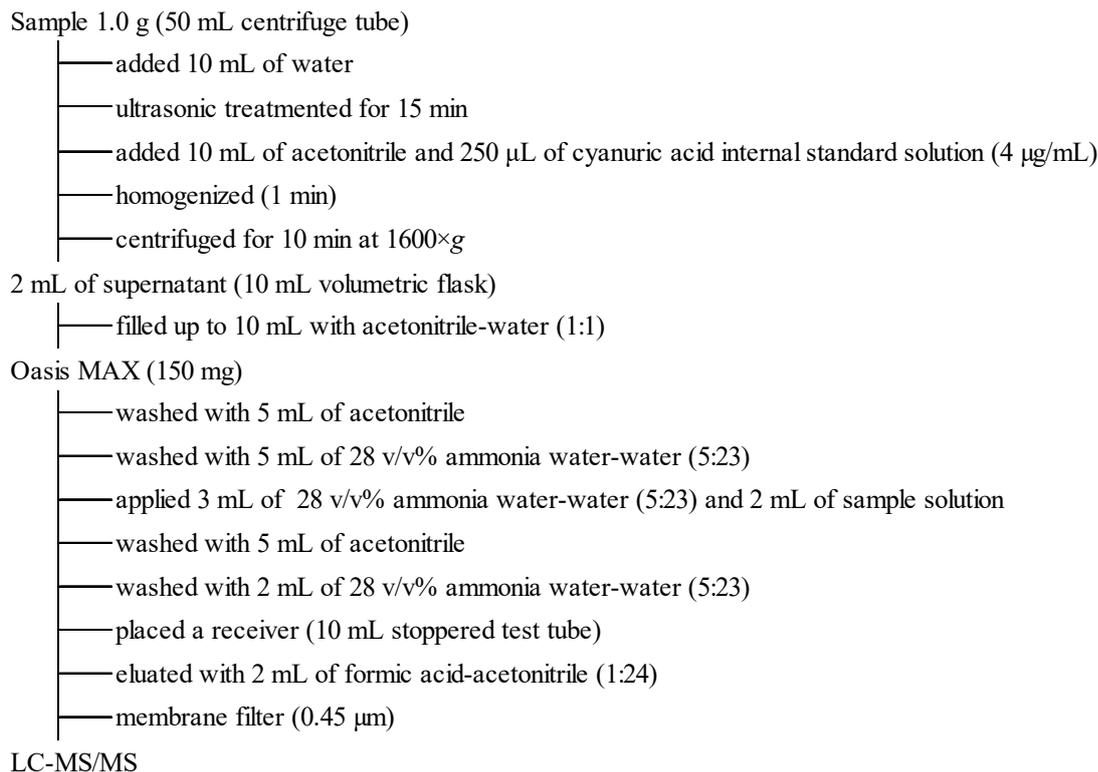
Table 2 MS/MS parameters

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

4) 計 算

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

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for cyanuric acid in dried skim milk

2.5 カラム処理の検討方法

2.4 の 1) に従って抽出を行い、遠心分離後の上澄み液 1, 2 及び 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れた後、シアヌル酸 (2.5 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 12.5, 25 及び 50 ng/mL) 及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ (1 mg/kg 相当量, 同 2.5, 5 及び 10 ng/mL 相当量) を加え、以下、2.4 の 1) から 2) に従って試料溶液をミニカラムに負荷した。更にアンモニア水-水 (5+23) 5 mL をミニカラムに加えて全量を流出させた (流速は 1~2 mL/min 程度となるように吸引マニホールドを使用した。以下同様。) 後、アセトニトリル 5 mL をミニカラムに加えて全量を流出させた。又は、アセトニトリル 5 mL をミニカラムに加えて全量を流出させた後、アンモニア水-水 (5+23) 5 mL をミニカラムに加えて全量を流出させた。以下、2.4 の 2) から 4) に従い操作した。

シアヌル酸及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の回収率は絶対検量線法により算出した。なお、シアヌル酸の回収率は各試料のブランク値を差し引いて算出した。

2.6 アンモニア水-水 (5+23) による洗浄液量の検討で用いた定量方法

2.4 により調製した上澄み液 2 mL を正確に入れた 10 mL の全量フラスコに、シアヌル酸を 0.5 又は 2.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 5 又は 25 ng/mL 相当量), シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ を 1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量) を添加し、以下、2.4 の 1) の全量フラスコの定容から 2) の操作を行った。ただし、2.4 の 2) のアセトニトリルの洗浄後のアンモニア水-水 (5+23) の洗浄液量は、2 mL 及び 5 mL とした。更に 2.4 の 3) に従い LC-MS/MS で測定した後、絶対検量線法によりシアヌル酸の回収率を求めた。なお、シアヌル酸の回収率は各試料のブランク値を差し引いて算出した。

2.7 妨害物質の検討で用いた定量方法

2.4 に従って得られたピークに妨害ピークが重なっているか確認するため、LC-MS/MS 測定条

件のうちカラム及びグラジェントを以下のとおり変更することにより確認を行った。なお、液体クロマトグラフ部の測定条件以外は 2.4 に従った。

カラム：TSK gel Amide-80（内径 2.1 mm，長さ 150 mm，粒径 3 μm ） 東ソー製
溶離液：10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル（19+1）（8 min 保持） \rightarrow
2 min \rightarrow （2+3）（10 min 保持） \rightarrow 2 min \rightarrow （19+1）（5 min 保持）
流速：0.3 mL/min
カラム槽温度：40 $^{\circ}\text{C}$

2.8 添加回収試験

2.2 の 2) のシアヌル酸標準原液を水で正確に希釈し添加に用いた。

シアヌル酸として、0.5 及び 2.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 25 ng/mL 相当量）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に本法に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。なお、シアヌル酸の回収率は各試料のブランク値を差し引いて算出した。

3 結果及び考察

3.1 シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ が低回収率となった原因の究明

昨年度実施した脱脂粉乳を用いた添加回収試験の結果、シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の回収率が 30.9 % 以下であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（40 % 以上）を満たしていなかった。そこで、前処理のどの段階がシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の低回収率の原因となっているのかを、シアヌル酸を指標として次の方法で確認した。

2.4 の各段階（下記 1)~4)）で 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量）の標準液を添加した場合のシアヌル酸の回収率を絶対検量線法により算出した。ただし、2.4 の 1) において、遠心分離後の上澄み液の採取量は 4 mL とした。また、2.4 の 2) において、アンモニア水-水（5+23）2 mL でミニカラムを洗浄する操作は実施していない。

- 1) 試料を入れた 50 mL の共栓遠心沈殿管に水 10 mL を加えた後、シアヌル酸を添加。
- 2) 15 分間超音波処理した後、シアヌル酸を添加。
- 3) 遠心分離後の上澄み液 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れた後、シアヌル酸を添加。
- 4) ミニカラム処理後の溶出液をメンブランフィルターでろ過したろ液にシアヌル酸を添加。

その結果、1)~4) におけるシアヌル酸の回収率は 29.6~34.4 % であった。回収率がいずれも同程度に低かったことから、シアヌル酸が低回収率となった主な原因は、LC-MS/MS 測定時のイオン化阻害にあると考えられ、昨年度実施した添加回収試験においてシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ が低回収率となった原因も同様であると考えられた。

3.2 カラム処理の検討

LC-MS/MS 測定時の共存成分の影響によるイオン化阻害を軽減するため、カラム処理において昨年度の方法から以下の 2 点の変更について検討した。まず、昨年度の方法では、遠心分離後の上澄み液を 2.5 倍希釈した試料溶液をカラム処理に供していたことから、更に上澄み液を希釈することでシアヌル酸の回収率が向上するか検討した。次に、イオン化阻害をもたらす共存成分が水溶性であると推測し、これを除去するためアセトニトリルによるミニカラムの洗浄に加え、アンモニア水-水（5+23）での洗浄を追加することとした。洗浄操作を追加するに当たり、アセトニトリル及びアンモニア水-水（5+23）のミニカラムへの通液の順番がシアヌル酸の回収率

に影響を与えないか検討した。内標準法ではシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ によりシアヌル酸の回収率が補正されるため精製操作での損失やイオン化阻害による見かけの回収率の低下を把握しづらいことから、検討の際にはシアヌル酸の回収率は絶対検量線法により算出した。

脱脂粉乳を用いて 2.5 によりシアヌル酸の回収率を求めたところ、Table 3 の結果が得られた。シアヌル酸の回収率が最も良好な結果であったことから、5 倍希釈した上澄み液をカラム処理に供することとし、試料溶液負荷後のミニカラムの洗浄はアセトニトリル、アンモニア水-水 (5+23) の順で行うこととした。なお、絶対検量線法により算出したシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の回収率は、全ての試験区においてシアヌル酸と同程度であった。

Table 3 Effect of washing mini column on recoveries of cyanuric acid and cyanuric acid- $^{13}\text{C}_3$

Order of washing solution flow	Dilution factor of supernatant	Recovery ^{a)} (%)	
		Cyanuric acid	Cyanuric acid- $^{13}\text{C}_3$
Acetonitrile	2.5	46.5	44.4
→	5	79.8	78.4
Ammonia water-water (5:23)	10	75.7	71.0
Ammonia water-water (5:23)	2.5	36.7	34.4
→	5	66.2	63.6
Acetonitrile	10	75.4	73.9

a) Mean ($n = 2$)

3.3 アンモニア水-水 (5+23) による洗浄液量の検討

3.2 の検討において、アンモニア水-水 (5+23) 5 mL でミニカラムを洗浄した後、ギ酸-アセトニトリル (1+24) 2 mL でシアヌル酸を溶出した際、溶出液の白濁が散見された。これは、アンモニア水-水 (5+23) の液量が多かったためと考え、液量を減らすことにより白濁が解消されるか 2.6 により確認した。なお、洗浄液量を減らすことにより水溶性夾雑物の洗浄が不十分となり、イオン化阻害の影響を大きく受けることが考えられた。そこで、洗浄液量を減らすことによりシアヌル酸の回収率が低下しないか確認するため、絶対検量線法によりシアヌル酸の回収率を算出することとした。

その結果、アンモニア水-水 (5+23) 2 mL でミニカラムを洗浄することにより、溶出液の白濁は解消された。また、Table 4 のとおり、ミニカラムの洗浄に用いるアンモニア水-水 (5+23) の液量を 2 mL としても、シアヌル酸の回収率が低下することはなかった。また、試験試料液とシアヌル酸標準液中のシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ のピーク面積の比からシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の平均回収率を求めたところ、洗浄液量が 2 mL 及び 5 mL の場合において、それぞれ 78.9 %以上、74.5 %以上の結果であった。よって、以降の検討はアンモニア水-水 (5+23) 2 mL でミニカラムを洗浄することとした。

Table 4 Effect of wash volume on recoveries of cyanuric acid

Wash volume of ammonia water-water (5:23) (mL)	Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)
2	0.5	85.3
	2.5	93.0
5	0.5	82.5
	2.5	91.7

a) Mean ($n = 3$)

3.4 妨害物質の検討

脱脂粉乳 3 検体を用い、2.4 により調製（ただしシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準液は添加せず。）した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認した。なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。その結果、全てシアヌル酸と同じ保持時間にピークが認められ（0.06~0.08 mg/kg）、定量イオンと確認イオンの比も標準液と同等であった。さらに、2.7 に従ってカラム及びグラジェント条件を変更して確認を行ったところ、その定量値に大きな違いがなかったことから、シアヌル酸であると判断した。

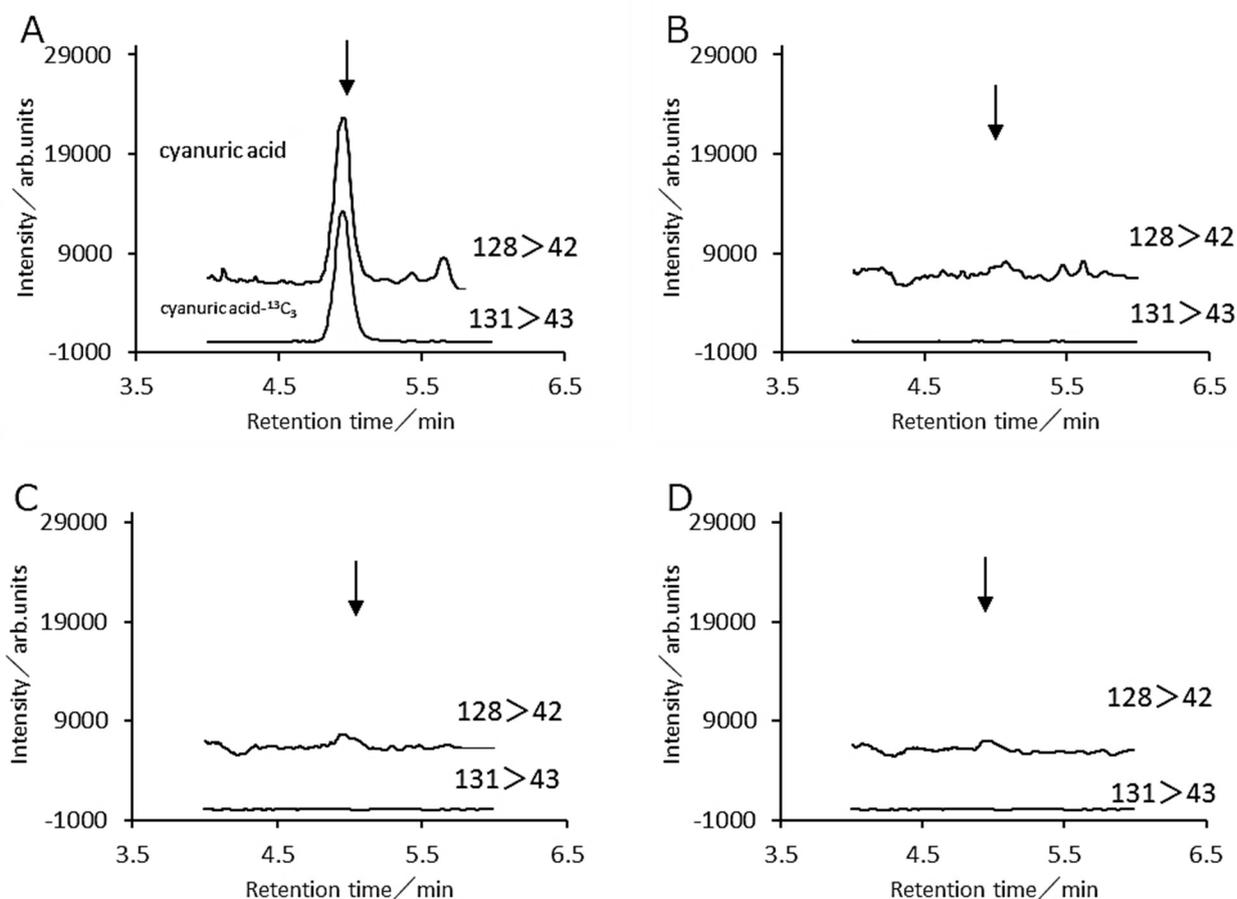


Fig. 2 Typical Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of cyanuric acid and cyanuric acid-¹³C₃ in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the retention times of cyanuric acid.)

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

B~D: Blank sample solutions (dried skim milk)

3.5 添加回収試験

2.8により添加回収試験を実施した。その結果はTable 5のとおり、シアヌル酸の平均回収率は94.6~107%，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD_r）として15%以下の成績が得られた。また、添加回収試験試料液とシアヌル酸標準液のピーク面積の比からシアヌル酸-¹³C₃の平均回収率を求めたところ66.0%以上の結果であった。これらは、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（真度：70%以上120%以下，内標準の回収率：40%以上，精度：17.7%以下（添加濃度：0.5 mg/kg）又は13.9%以下（添加濃度：2.5 mg/kg））を満たす良好な結果であった。

なお、得られたSRMクロマトグラムの一例をFig. 3に示した。

Table 5 Recoveries for cyanuric acid

Spiked level (mg/kg)	Dried skim milk 1		Dried skim milk 2		Dried skim milk 3	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.5	101	15	107	11	94.6	6.1
2.5	105	2.2	96.7	1.7	97.6	2.0

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

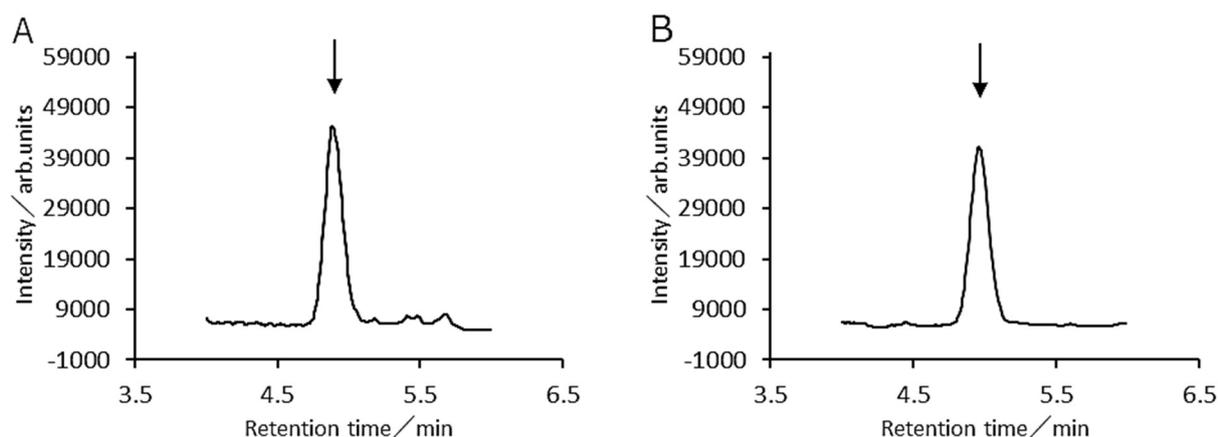


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of cyanuric acid in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the peaks of cyanuric acid.)

A: Standard solution (25 ng/mL: 0.125 ng as cyanuric acid)

B: Sample solution of dried skim milk (spiked at 2.5 mg/kg of cyanuric acid (as 0.25 ng/mL in sample solution))

3.6 定量下限及び検出下限の検討

シアヌル酸検量線が直線性を示した範囲, 各 2.5~200 ng/mL の下端付近となる濃度 (試料中で 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中濃度 5 ng/mL 相当量)) の添加回収試験の結果, 得られたピークの SN 比が 10 以上であったため, シアヌル酸の定量下限の濃度は試料中で 0.5 mg/kg とした. この濃度は, 飼料中のシアヌル酸の基準値 2.5 mg/kg に対して 1/5 であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (1/5 以下) を満たしていた.

本法の検出下限を確認するため, 添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた. その結果, 検出下限は試料中でシアヌル酸 0.15 mg/kg であり, 同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (1/10 以下) 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.

4 まとめ

脱脂粉乳中に残留するシアヌル酸について, LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ, 遠心分離後の上澄み液の希釈倍率の変更及びアンモニア水による強塩基性陰イオン交換体ミニカラムの洗浄を追加することで, 以下の結果が得られ, 適用が可能で

あると考えられた。

- 1) 脱脂粉乳 3 検体について、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 2) 脱脂粉乳にシアヌル酸として 0.5 及び 2.5 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 3) 本法のシアヌル酸の定量下限は 0.5 mg/kg, 検出下限は 0.15 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。

文 献

- 1) E. Braekevelt, B. P.-Y. Lau, S. Feng, C. Ménard and S. A. Tittlemier : Determination of melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid in infant formula purchased in Canada by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Additives and Contaminants*, **28**, 698-704 (2011).
- 2) Sherri Turnipseed, Christine Casey, Cristina Nochetto and David N. Heller : Determination of melamine and cyanuric acid residues in infant formula using LC-MS/MS, *Laboratory Information Bulletin No.4421*, **24**, 1-14 (2008), U.S. Food and Drug Administration.
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) Michael Smoker and Alexander J. Krynitsky : Interim method for determination of melamine and cyanuric acid residues in foods using LC-MS/MS: Version 1.0, *Laboratory Information Bulletin No.4422*, 1-26 (2008), U.S. Food and Drug Administration.
- 6) 長久保 眞平, 野村 昌代, 青山 幸二 : 飼料中のシアヌル酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の検討, *飼料研究報告*, **44**, 38-48 (2019).

4 とうもろこしサイレージ中のデオキシニバレノール及びゼアラレノ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

大島 慎司*, 田端 麻里*, 青山 幸二*

Development of Determination Method of Deoxynivalenol and Zearalenone in Corn Silage by LC-MS/MS

Shinji OSHIMA*, Mari TABATA* and Koji AOYAMA*

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

We have developed a quantitative determination method of the concentration of deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) in corn silage using a liquid chromatograph-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometer (LC-APCI-MS/MS).

DON and ZEN were extracted with acetonitrile-water (21:4), and the extracted solution was centrifuged. The supernatant (1 mL) was then diluted with acetonitrile-water (21:4) to a volume of 20 mL. The diluted solution was purified with a SPE column (InertSep VRA-3, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), and the purified solution was used for LC-MS/MS determination of ZEN. As for DON, the purified solution was further purified with graphite carbon to obtain a sample solution of DON. Sample solutions thus obtained from each process of DON and ZEN were respectively injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of DON and ZEN. LC separation was then carried out on an ODS column (InertSustain C18, 3.0 mm i.d. × 50 mm, 2 μm, GL Sciences Inc.) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and 2 mmol/L ammonium acetate methanol solution for DON, and 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile for ZEN as a mobile phase respectively. In the MS/MS analysis, the negative mode atmospheric pressure chemical ionization (APCI-) was used.

Recovery tests were conducted on corn silages. Corn silage was added with 0.2 and 4 mg/kg of DON, and 0.02 and 1 mg/kg of ZEN respectively. The resulting mean recoveries ranged from 89.3 % to 116 %, and the repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 8.7 % for DON, while the mean recoveries ranged from 101 % to 112 %, and RSD_r was less than 12 % for ZEN.

Key words: deoxynivalenol; zearalenone; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); atmospheric pressure chemical ionization (APCI); corn silage

キーワード：デオキシニバレノール；ゼアラレノン；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；大気圧化学イオン化法；とうもろこしサイレージ

1 緒 言

飼料自給率の向上は、食糧自給率向上の重要な施策として位置付けられ、とうもろこしサイレージを含む国産粗飼料の増産対策が積極的に行われている。その一方で、国産とうもろこしサイレージからデオキシニバレノール（以下「DON」という。）、ゼアラレノン（以下「ZEN」という。）等のかび毒が検出されており¹⁾、農林水産省が委託事業として平成24年度から汚染実態調査事業を実施している。飼料分析基準²⁾に記載されている DON 及び ZEN を含むかび毒一斉分析法はとうも

* 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

ろこしサイレージへの適用が困難であることが確認されており³⁾, 上記の汚染実態調査事業では, 事業者が独自に開発した分析法が用いられている.

飼料の有害物質の指導基準及び管理基準⁴⁾において, DON については反すう動物 (ほ乳期のものを除く.) に給与される飼料中で 4 mg/kg 並びに家畜 (反すう動物 (ほ乳期のものを除く.) を除く.) 及び家きんに給与される飼料中で 1 mg/kg, ZEN については家畜及び家きんに給与される飼料中で 1 mg/kg の管理基準値が設定されており, 将来的に国産粗飼料が管理基準値を遵守していることを確認するための分析法を定めておく必要があると考えられる.

そこで, 汚染実態調査事業において, 平成29年度に一般財団法人日本食品検査が用いた分析法⁵⁾ (以下「JFIC 法」という.) 及び平成30年度に一般社団法人日本海事検定協会が用いた分析法⁶⁾ (以下「NKKK 法」という.) を基に, とうもろこしサイレージ中の DON 及び ZEN の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (以下「LC-MS/MS」という.) による定量法の飼料分析基準への適用の可否を検討したので, その概要を報告する.

参考に DON 及び ZEN の構造式等を Fig. 1 に示した.

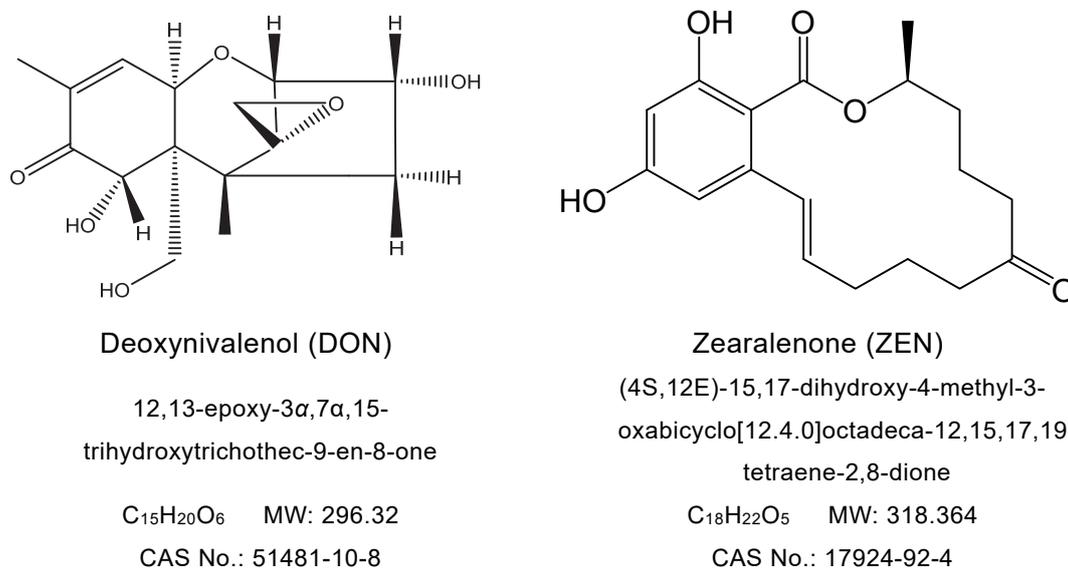


Fig. 1 Chemical structures of DON and ZEN

2 実験方法

2.1 試料

とうもろこしサイレージは 60 °C で 18~24 時間乾燥後, 更に室内に静置して風乾した後, 目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した.

2.2 試薬

1) 酢酸アンモニウムは試薬特級, アセトニトリル及びメタノールは LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製), グラファイトカーボン は Supelclean ENVI-Carb SPE Bulk Packing (Sigma-Aldrich 製), 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は高速液体クロマトグラフ用 (富士フィルム和光純薬製) を用いた. 水は Milli-Q Integral 5 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた.

2) DON 標準液

DON 標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 100.0 %）2 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリルを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えて DON 標準原液を調製した（この液 1 mL は，DON として 0.1 mg を含有する．）．

使用に際して，DON 標準原液 1 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ，更に標線までアセトニトリル-水（21+4）を加えて，1 mL 中に DON として 2 µg を含有する標準液を調製した．この標準液の一定量を，水-メタノール-アセトニトリル（18+1+1）で正確に希釈し，1 mL 中に DON としてそれぞれ 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100 ng を含有する各標準液を調製した．

3) ZEN 標準液

ZEN 標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 100.0 %）2 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリルを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えて ZEN 標準原液を調製した（この液 1 mL は，ZEN として 0.1 mg を含有する．）．

使用に際して，ZEN 標準原液 1 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ，更に標線までアセトニトリル-水（21+4）を加えて，1 mL 中に ZEN として 2 µg を含有する標準液を調製した．この標準液の一定量を，アセトニトリル-水（21+4）で正確に希釈し，1 mL 中に ZEN 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 を含有する各標準液を調製した．

2.3 装置及び器具

- 1) 粉砕機：ZM 200 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 振とう機：ストロングシェイカーSR-2DW タイテック製（使用時振とう数 300 rpm）
- 3) 多機能カラム：InertSep VRA-3（リザーバー容量 6 mL）ジーエルサイエンス製
- 4) メンブランフィルター：13HP020AN（孔径 0.20 µm，直径 13 mm，ポリテトラフルオロエチレン） 東洋濾紙製
- 5) 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 25.0 g を量って 500 mL の共栓三角フラスコに入れ，アセトニトリル-水（21+4）250 mL を加え，60 分間振り混ぜて抽出した．抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ，1600×g で 5 分間遠心分離し，上澄み液 1 mL を 20 mL の全量フラスコに正確に入れた．全量フラスコの標線までアセトニトリル-水（21+4）を加え，カラム処理に供する試料溶液とした．

2) カラム処理

試料溶液を多機能カラムに入れ，初めの流出液 1 mL を捨てた．10 mL の試験管をカラムの下に置き，その後の流出液 1 mL を受け，LC-MS/MS による ZEN の測定に供する試料溶液とした．更に，別の 10 mL の試験管をカラムの下に置き，その後の流出液 3 mL を受け，精製に供する試料溶液とした．

3) 精製

試料溶液をあらかじめグラファイトカーボン 200 mg を入れた 15 mL の遠心チューブに入れ、1 分間振り混ぜた。1600×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液 2 mL を 10 mL の試験管に正確に入れ、窒素ガスを送って乾固した。水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) 0.5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルターでろ過し、LC-MS/MS による DON の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、各 DON 標準液及び各 ZEN 標準液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (以下「SRM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 及び 2 に示した。液体クロマトグラフ部において、DON 及び ZEN の溶離液の条件を変え、Table 1 のとおりそれぞれ溶離液 1 及び 2 の条件で測定した。

Table 1 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	InertSustain C18 (3.0 mm i.d. × 50 mm, 2 µm), GL Sciences
Mobile phase 1 (DON)	2 mmol/L ammonium acetate-2 mmol/L ammonium acetate methanol solution (19:1) (hold for 1 min) → 9 min → (1:19) (hold for 5.5 min) → 0.1 min → (19:1) (hold for 4.4 min)
Mobile phase 2 (ZEN)	2 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (7:3) (hold for 1 min) → 4 min → (1:19) (hold for 7 min) → 0.1 min → (7:3) (hold for 4.9 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	Air (4 L/min)
Drying gas	N ₂ (5 L/min)
Interface temperature	350 °C
Heat block temperature	200 °C
Desolvation line temperature	250 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

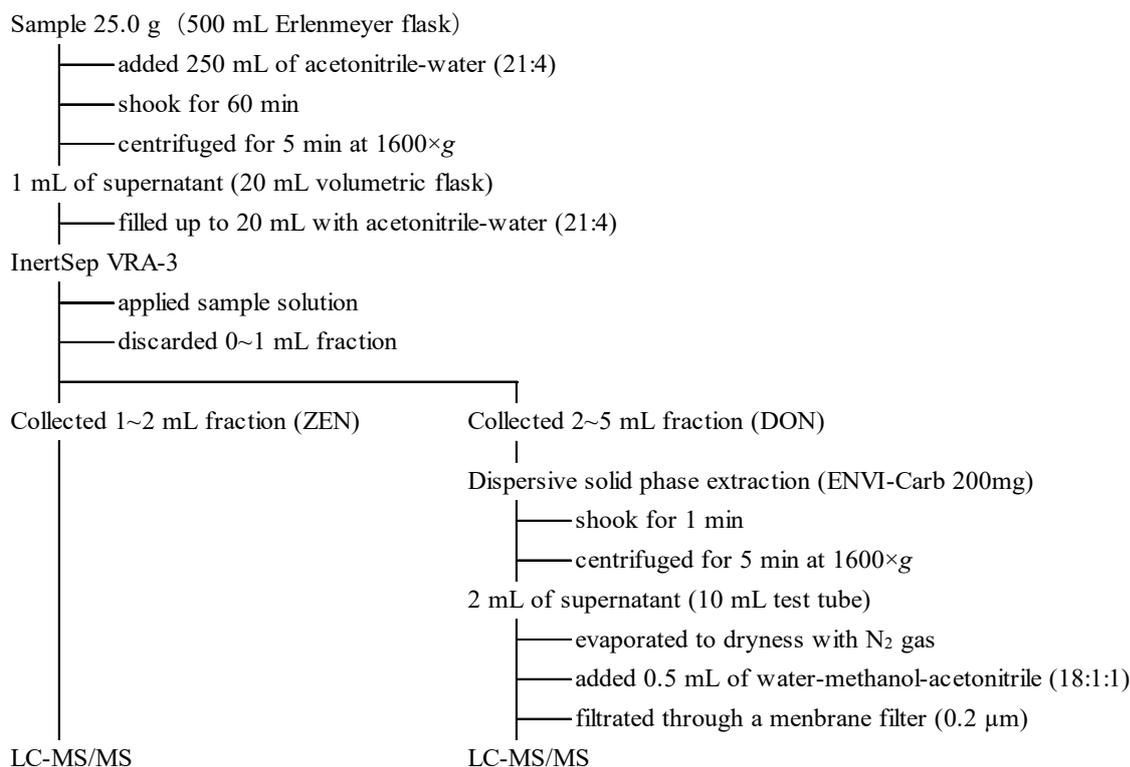
Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (m/z)	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier (m/z)	Qualifier (m/z)	
DON	295	265	-	10
	355	-	265	13
ZEN	317	131	-	30
		-	175	22

5) 計算

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

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for DON and ZEN in corn silage

2.5 多機能カラムからの流出画分の確認方法

1) ZEN の多機能カラムからの流出画分の確認方法

とうもろこしサイレージ 12.5 g をアセトニトリル-水 (21+4) 125 mL で抽出し、遠心分離した上澄み液 2.5 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れ、これに ZEN として 1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 50 ng/mL 相当量) を添加した後、全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (21+4) を加え、カラム処理に供する試料溶液を調製した。試料溶液を多機能カラムに入れ、0~1 mL, 1~2 mL, 2~3 mL, 3~4 mL の流出画分を採取し、LC-MS/MS による測定に供した。

2) ZEN の多機能カラムからの流出画分における希釈効果の確認方法

とうもろこしサイレージを用いて 2.5 の 1)と同様に抽出、遠心分離した上澄み液 1 mL を 10 mL 及び 20 mL の全量フラスコにそれぞれ正確に入れ、これらに ZEN としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 20 ng/mL 及び 10 ng/mL 相当量) を添加した後、全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (21+4) を加え、カラム処理に供する試料溶液を調製した。以降の操作は 2.5 の 1)と同様に行った。

2.6 添加回収試験

DON は、DON 標準品 (富士フィルム和光純薬製、純度 100.0 %) 9 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて DON 添加用標準液を調製した (この液 1 mL は、DON として 0.45 mg を含有する。)。同標準液をアセトニトリルで正確に希釈し添加した。

ZEN は、2.2 の 2) の ZEN 標準原液をアセトニトリルで正確に希釈し添加した。

とうもろこしサイレージについて、DON として、原物換算して 0.2 及び 4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 8 及び 180 ng/mL）、ZEN として、原物換算して 0.02 及び 1 mg/kg 相当量（同 0.2 及び 10 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に 2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、添加は風乾物試料に対して DON として 0.4 及び 9 mg/kg 相当量、ZEN として 0.04 及び 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。

3 結果及び考察

3.1 試料の調製方法

JFIC 法及び NKKK 法における試料の調製方法は、飼料分析基準に規定された方法と異なり、試料を風乾せずに原物のまま 2 mm スクリーンで粗粉碎する方法である。とうもろこしサイレージには子実部分や茎部分が混在しており、粉碎粒度が粗く、かつ、供試する乾物量が少ない原物中の分析では、分析値のばらつきが大きくなることが懸念されたことから、飼料分析基準に規定された試料の調製方法を用いることとした。

3.2 抽出溶媒量の検討

とうもろこしサイレージの風乾物 25.0 g に、JFIC 法及び NKKK 法と同様にアセトニトリル-水 (21+4) 100 mL を加えたところ、抽出溶媒を吸収して振り混ぜられない試料があった。最大で 225 mL の抽出溶媒を必要とする試料があったことから、余裕を持たせて抽出溶媒量を 250 mL とした。

なお、検討に用いることのできる分析試料が十分量確保できなかったことから、3.3 以降の検討は試料採取量及び抽出溶媒量を半量にして実施した。

3.3 LC-MS/MS 測定条件の検討

とうもろこしサイレージ 12.5 g をアセトニトリル-水 (21+4) 125 mL で抽出し、以降 JFIC 法に従って調製した試料溶液を、NKKK 法の条件に従って LC-MS/MS で測定し、得られた SRM クロマトグラムを確認した。その結果、DON において定量を妨げるピークが認められたことから、LC-MS/MS の測定条件の変更を検討した。

DON の定量イオン及び確認イオンをそれぞれ m/z : 295 > 265 及び m/z : 355 > 265 に変更して測定した結果、定量を妨げるピークは認められなかったことから、当該測定条件を用いることとした。

3.4 検量線

2.2 の 2) 及び 3) により調製した DON 及び ZEN 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. 2-1 及び 2-2 のとおりであり、DON は 4~100 ng/mL（注入量として 0.02~0.5 ng 相当量）、ZEN は 0.1~50 ng/mL（同 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、DON を 0.2~5 mg/kg 及び ZEN を 0.02~10 mg/kg 含有する分析

用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各かび毒濃度範囲に相当する。

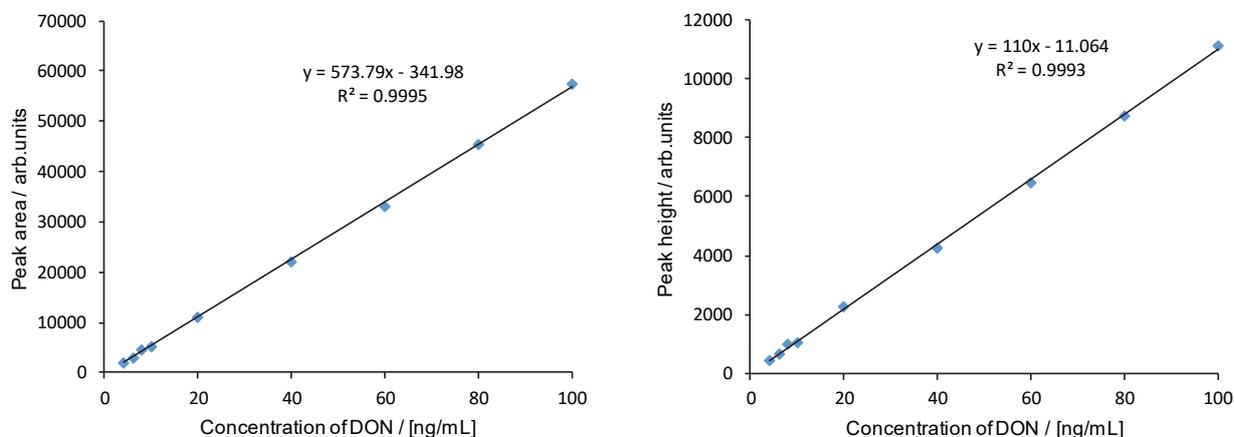


Fig. 2-1 Calibration curves of DON by peak area (left) and peak height (right)

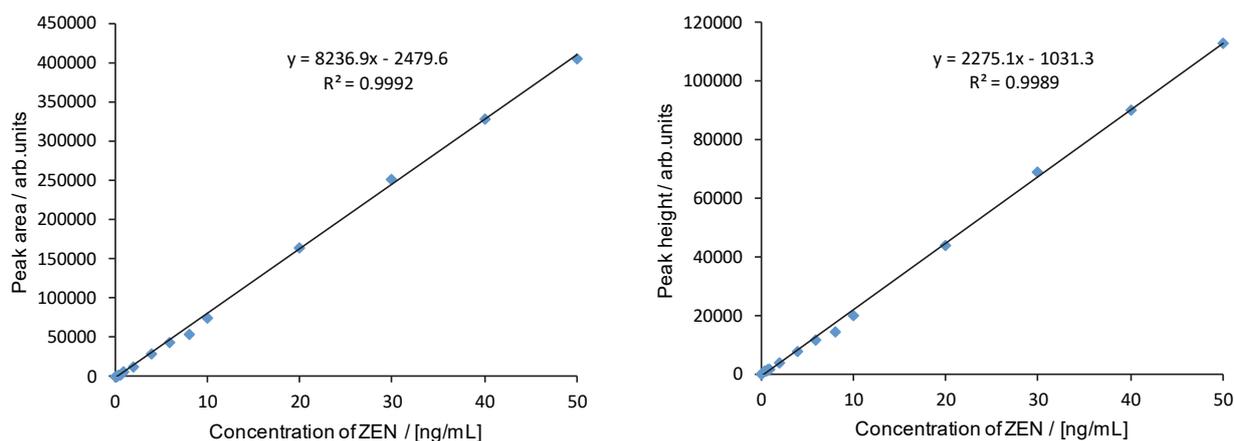


Fig. 2-2 Calibration curves of ZEN by peak area (left) and peak height (right)

3.5 多機能カラムからの流出画分の確認

1) ZEN の多機能カラムからの流出画分の確認

2.5 の 1)により ZEN の多機能カラムからの流出画分を確認した。その結果は Table 3 のとおり、0~1 mL の画分で 54.6 %、1 mL 以上の画分ではそれぞれ 143 %以上の流出であった。

Table 3 Outflow pattern of ZEN from InertSep VRA-3

Mycotoxin	Dilution ratio	Concentration (ng/mL)	(%) ^{a)}			
			0~1 mL	1~2 mL	2~3 mL	3~4 mL
ZEN	4	50	54.6	143	147	150

n = 1

a) Quantitated concentration in sample solution after column treatment / Concentration in sample solution before column treatment × 100

2) ZEN の多機能カラムからの流出画分における希釈効果の確認

1)における結果の原因は、夾雑成分による影響であると推定し、夾雑成分の低減を期待して、2.5 の 2)によりカラム処理に供する試料溶液の希釈倍率について検討を行った。その結果は Table 4 のとおり、0~1 mL の画分では、10 倍希釈及び 20 倍希釈でそれぞれ 51.3 及び 46.9 % であり、低い値のままであった。1 mL 以上の画分では希釈により 100 % に近づく傾向が認められ、10 倍希釈と比較して 20 倍希釈の方が良好な結果となった。このことから、抽出液を 20 倍希釈した液をカラム処理に供する試料溶液に用いることとした。

Mycotoxin	Dilution ratio	Concentration (ng/mL)	Concentration (%) ^{a)}			
			0~1 mL	1~2 mL	2~3 mL	3~4 mL
ZEN	10	20	51.3	121	117	106
	20	10	46.9	113	114	113

$n = 1$

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

3) DON の多機能カラムからの流出画分の確認

とうもろこしサイレージ 12.5 g を本法 2.4 の 1)により調製したカラム処理に供する試料溶液に DON として 4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 80 ng/mL 相当量）を添加し、多機能カラムからの流出画分を確認した。流出画分は、操作性を考慮し 2 mL ずつの採取とし、0~6 mL 及び 1~7 mL の範囲で確認した。その結果は Table 5 のとおり、JFIC 法で採取している流出液 2~4 mL 及び 3~5 mL の画分で 106 % の流出を認めた。

Mycotoxin	Dilution ratio	Concentration (ng/mL)	Concentration (%) ^{a)}			Concentration (%) ^{a)}		
			0~2 mL	2~4 mL	4~6 mL	1~3 mL	3~5 mL	5~7 mL
DON	20	80	97.2	106	99.1	93.0	106	102

$n = 1$

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

1)~3)の結果から、多機能カラムからの流出画分については、初めの 1 mL を捨て、1~2 mL の画分を ZEN を測定するための LC-MS/MS に供する試料溶液とし、2~5 mL の画分を JFIC 法と同様に DON を測定するための精製に供する試料溶液とした。

3.6 妨害物質の検討

とうもろこしサイレージ 4 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結果、定量を妨げるピークは認められなかった。なお、DON は一部の試料、ZEN は全ての試料でそれぞれ DON 及び ZEN と同じ保持時間にピークが認められた。これらのピークについて、定量イオンと確認イオンの比を確認したところ、標準液と同等であったことから、DON 及び ZEN であると判断した。

本検討により得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

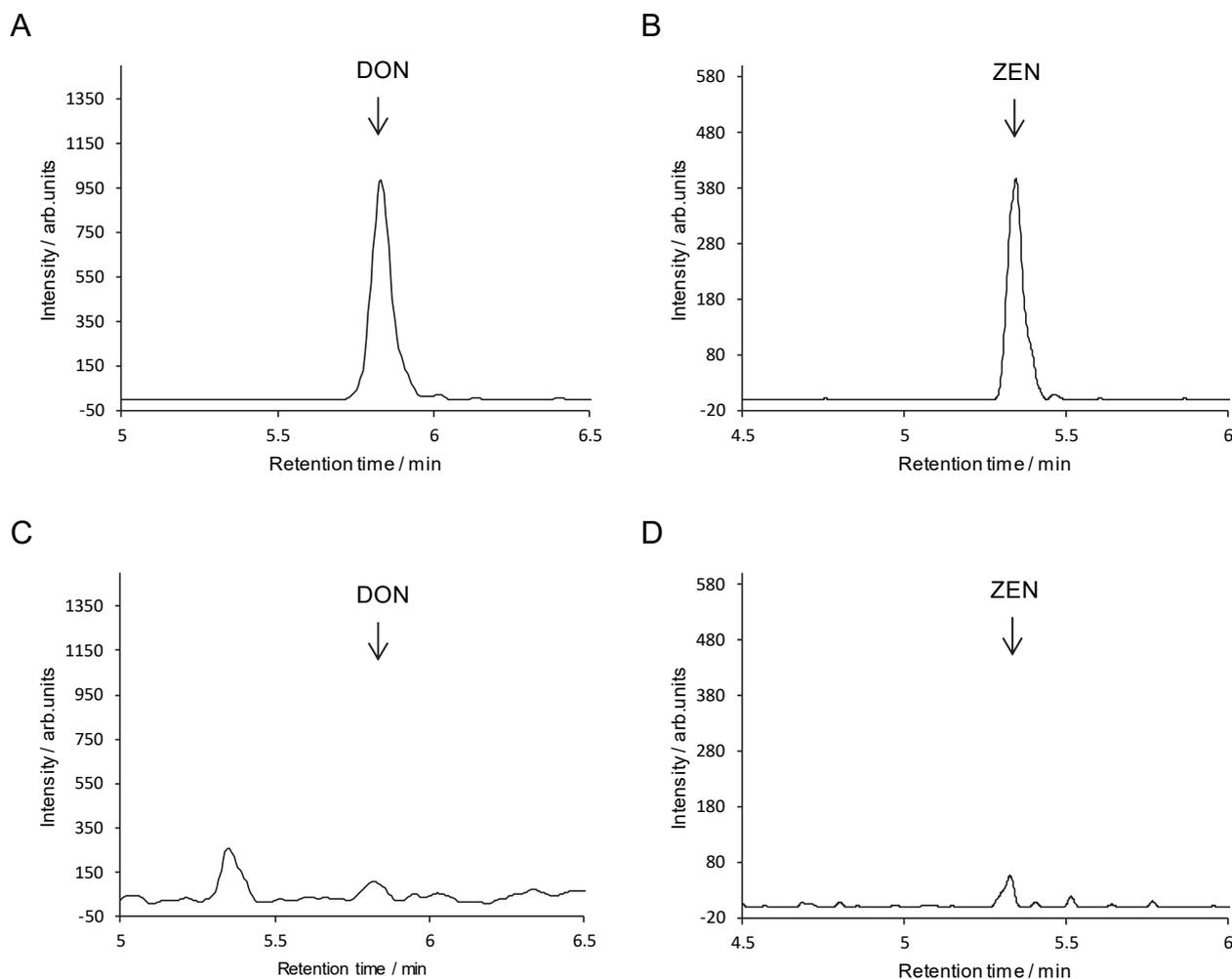


Fig. 3 Typical Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of DON and ZEN in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the retention times of mycotoxin.)

A: Standard solution (8 ng/mL as DON)

B: Standard solution (0.2 ng/mL as ZEN)

C: Sample solution of DON from corn silage (blank)

D: Sample solution of ZEN from corn silage (blank)

3.7 マトリックス効果の確認

2.4の1)~3)により調製したとうもろこしサイレージのブランク試料溶液にDONとして4 mg/kg相当量(最終試料溶液中で80 ng/mL相当量)を添加したマトリックス標準液, 2.4の1)~2)により調製したとうもろこしサイレージのブランク試料溶液にZENとして2 mg/kg相当量(同10 ng/mL相当量)を添加したマトリックス標準液について, 2.2の2)及び3)に従って調製した同濃度の各かび毒標準液に対するピーク面積比を確認したところ, Table 6のとおりであり, 各かび毒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 study

Mycotoxins	Concentration of mycotoxins		Matrix effect ^{b)} (%)	
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample ^{a)} (mg/kg air-dry matter)	Corn silage 1	Corn silage 2
DON	80	4	102	108
ZEN	10	2	103	105

$n = 1$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

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

3.8 添加回収試験

2.6 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 7 のとおり、DON については平均回収率 89.3~116 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 8.7 %以下，ZEN については平均回収率 101~112 %，RSD_rは 12 %以下の成績が得られ，飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた 1)及び 2)の真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。

1) 真度：70 %以上 120 %以下

2) 併行精度：22 %以下（添加濃度 0.02 mg/kg），20 %以下（同 0.2 mg/kg），16 %以下（同 1 mg/kg），13 %以下（同 4 mg/kg）

なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 7 Recoveries for DON and ZEN

Mycotoxin	Spiked level (mg/kg as fed basis) ^{a)}	Com silage 1		Com silage 2		Com silage 3		Com silage 4	
		Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)
DON	4	89.3	5.9	89.4	8.7	—	—	—	—
	0.2	—	—	—	—	114	7.9	116	6.0

Mycotoxin	Spiked level (mg/kg as fed basis) ^{a)}	Com silage 1		Com silage 2		Com silage 3		Com silage 5	
		Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)
ZEN	1	101	4.0	106	4.2	—	—	—	—
	0.02	—	—	—	—	110	8.7	112	12

—: Not tested

a) The mycotoxins were spiked to air-dried corn silage samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.4 and 9 mg/kg as air-dry basis for DON, and 0.04 and 2 mg/kg as air-dry basis for ZEN respectively. The levels of mycotoxins as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of corn silage samples was 60 % as fed basis and 10 % as air-dry basis.

The levels of mycotoxins as fed basis (moisture 60 %)

= the levels of mycotoxins as air-dry basis (moisture 10 %) / 2.25

b) Mean ($n = 5$)

c) Relative standard deviation of repeatability

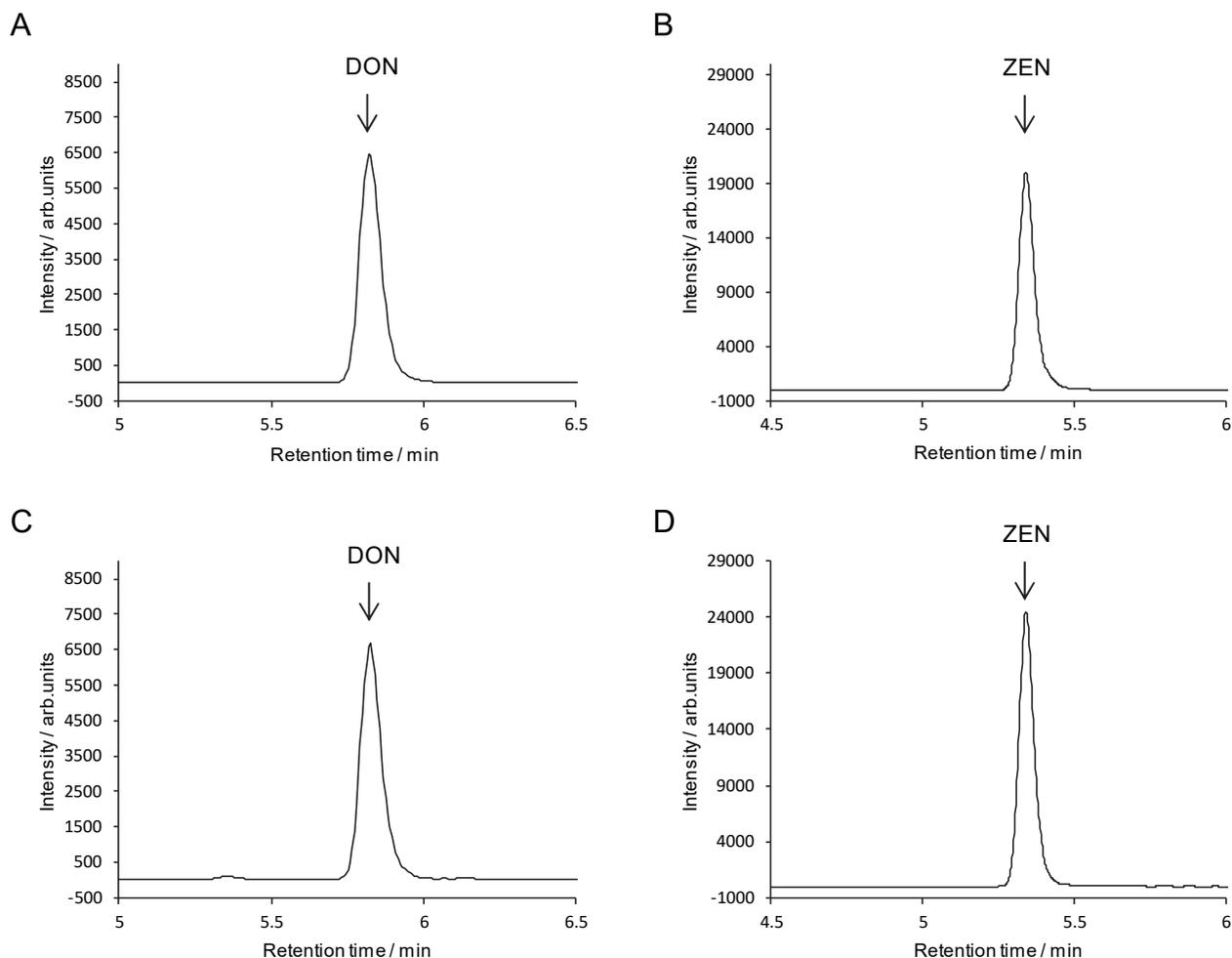


Fig. 4 Typical SRM chromatograms of DON and ZEN in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the peaks of mycotoxin.)

A: Standard solution (60 ng/mL of DON (0.3 ng as injection amount))

B: Standard solution (10 ng/mL of ZEN (0.05 ng as injection amount))

C: Sample solution of corn silage (spiked at 1.3 mg/kg original matter of DON (0.3 ng as injection amount))

D: Sample solution of corn silage (spiked at 1 mg/kg original matter of ZEN (0.05 ng as injection amount))

3.9 定量下限及び検出下限の検討

検量線が直線性を示した範囲, DON においては 4~100 ng/mL の下端付近となる濃度 (とうもろこしサイレージ風乾物中で 0.4 mg/kg 相当量 (最終試料液中濃度 8 ng/mL 相当量)), ZEN においては 0.1~50 ng/mL の下端付近となる濃度 (とうもろこしサイレージ風乾物中で 0.04 mg/kg 相当量 (最終試料液中濃度 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, DON 及び ZEN の定量下限の濃度はとうもろこしサイレージの風乾物中でそれぞれ 0.4 及び 0.04 mg/kg とした. この濃度は, DON 及び ZEN のとうもろこしサイレージ中の管理基準値 (DON については最も低い値) の風乾物中換算値 (2 mg/kg) に対してそれぞれ 1/5 及び 1/50 であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (1/5 以下) を満たして

いた。

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた。その結果、検出下限は風乾物中で DON 0.1 mg/kg , ZEN 0.01 mg/kg であり、同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (1/10 以下) を満たしていた。

なお、Table 7 に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった。

4 まとめ

とうもろこしサイレージ中の DON 及び ZEN について、JFIC 法及び NKKK 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、抽出溶媒量、カラム処理に供する試料溶液の希釈倍率及び多機能カラム処理における採取する流出画分を変更することで、以下の結果が得られた。

1) 検量線は、DON は 4~100 ng/mL (注入量として 0.02~0.5 ng 相当量) , ZEN は 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、ZEN を 0.02~10 mg/kg 及び DON を 0.2~5 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各かび毒濃度範囲に相当する。

2) 本検討で用いたとうもろこしサイレージについて、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。

3) 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、DON 及び ZEN 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) とうもろこしサイレージに、DON として原物換算して 0.2 及び 4 mg/kg 相当量、ZEN として原物換算して 0.02 及び 1 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。

5) 本法の DON の定量下限は風乾物中で 0.4 mg/kg, 検出下限は 0.1 mg/kg, ZEN の定量下限は風乾物中で 0.04 mg/kg, 検出下限は 0.01 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。

文 献

- 1) 平岡久明：飼料中のマイコトキシン汚染状況，臨床獣医，25(6)，10-17 (2007)。
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008)。
- 3) 伊藤 千晶，佐藤 憲大：とうもろこしサイレージ中のかび毒定量法に関する検討～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～，飼料研究報告，42，87-100 (2017)。
- 4) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988)。
- 5) 一般財団法人日本食品検査：平成 29 年度生産資材安全確保対策事業（国産飼料中のかび毒含有実態調査）報告書，平成 30 年 1 月 (2018)。
- 6) 一般社団法人日本海事検定協会：平成 30 年度生産資材安全確保対策事業（国産飼料中のかび毒含有実態調査）成果報告書，平成 31 年 1 月 (2019)。

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

立石 洋暢*, 加藤 耕一*, 桑原 正良*

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

Hironobu TATEISHI*, Koichi KATO* and Masayoshi KUWABARA*

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

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

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

Recovery tests were conducted on dry food for cats, semi dry food for dogs, formed jerky for dogs, dried jerky for dogs (soft and hard), confectionery (biscuit for dogs), milk powder for cats and wet food for dogs. DON was intentionally added at the levels of 0.1 and 1 mg/kg for the pet foods except wet food, and 0.02 and 0.1 mg/kg for wet food respectively. NIV was intentionally added at the levels of 0.1 and 0.5 mg/kg for the pet foods except wet food and milk powder, 0.5 and 1.0 mg/kg for milk powder, and 0.02 and 0.05 mg/kg for wet food respectively. The resulting mean recoveries ranged from 80.2 % to 108 % for DON, and 85.5 % to 102 % for NIV respectively. The repeatability in the form of the relative standard deviations (RSD_r) was less than 15 % for DON, and less than 17 % for NIV.

Note that HT-2 and T-2 were excluded from the analysis because of their tendency of excessive recovery.

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

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

1 緒 言

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

* 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

下「NIV」という.) は8位の炭素にカルボニル基を有するタイプ B に属する. NIV はデオキシニバレノール (以下「DON」という.) の類縁化合物であり, 共にフザリウム属のかびにより産生され, 穀類 (特に小麦, 大麦及びとうもろこし) を汚染することが知られている¹⁾.

国内では, NIV については食品, 飼料ともに基準値はなく, 同タイプに属する DON については食品用小麦で $1.1 \mu\text{g/g}$ ²⁾, 家畜及び家きんに給与される飼料で 1 mg/kg (反すう動物 (ほ乳期のものを除く.) に給与される飼料は 4 mg/kg (配合飼料は 3 mg/kg))³⁾の基準値が設定されているほか, 愛玩動物用飼料では犬用で $2 \mu\text{g/g}$, 猫用で $1 \mu\text{g/g}$ の基準値⁴⁾が定められている.

愛玩動物用飼料中の DON の分析法としては, 愛玩動物用飼料等の検査法⁵⁾において液体クロマトグラフ質量分析計を用いた単成分分析法が記載されており, 定量限界 (下限) はウェット製品以外の試料で 0.1 mg/kg であり, ウェット製品 (原物) では 0.02 mg/kg である.

平成30年度に, 筆者らは一般財団法人日本食品分析センターが開発した分析法⁶⁾ (以下「JFRL法」という.) を基に, DON, NIV, HT-2トキシン (以下「HT-2」という.) 及び T-2トキシン (以下「T-2」という.) の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (以下「LC-MS/MS」という.) による同時定量法の検討を行った (以下「前報」という.)⁷⁾. その結果, ウェット製品については愛玩動物用飼料等の検査法第11章試験法の妥当性確認法 (以下「試験法の妥当性確認法」という.) の目標値を満たす良好な結果が得られたが, ドライ製品, セミドライ製品, 成型ジャーキー, 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ) 並びに菓子類では NIV の回収率が低く, また, 粉ミルクでは NIV が過回収の傾向にあり, 更なる検討が必要であった.

そこで今回, 前報の抽出条件を改良し, 回収率の改善を図ったのでその概要を報告する. 参考に, 各分析対象物の構造式等を Fig. 1 に示した.

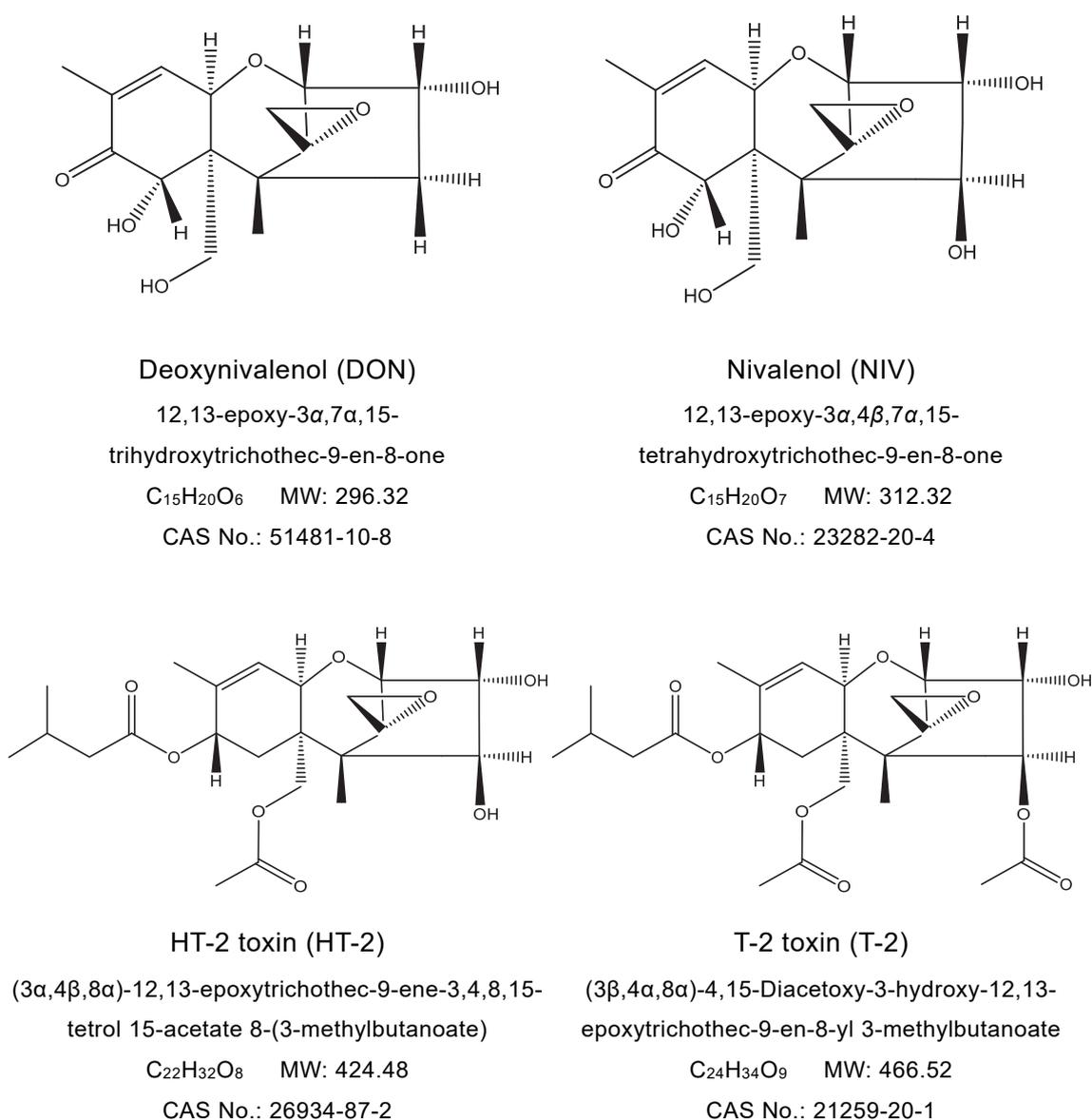


Fig. 1 Chemical structures of DON, NIV, HT-2 and T-2

2 実験方法

2.1 試料

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

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

Table 1 Ingredients list of pet foods used in this study

Pet food types	Ingredients
Dry food for cats	Chicken raw meat, dried chicken, coarsely ground rice, pea protein, brown rice, chicken oil, alfalfa meal, potato protein, beet pulp, linseed, protein hydrolysate, oats fiber, soybean oil, yucca extract, vitamins (V. A, V. B ₁ , V. B ₂ , V. B ₆ , V. B ₁₂ , V. C, V. D ₃ , V. E, choline, niacin, pantothenic acid, biotin, folic acid), minerals (K, Cl, Se, Na, Mn, I, Zn, Fe, Cu), amino acids (taurine, methionine), antioxidant (mix tocopherol, rosemary extract), green tea extract, spearmint extract
Semi dry food for dogs	Meat (chicken, etc.), sugars, beans, starches, grains, fishery products, oils and fats, vegetables (carrot, pumpkin, spinach, etc.), dietary fiber, minerals (P, Ca, Cl, Na, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn, I), thickening stabilizer (glycerin, casein sodium), quality improving agent (propylene glycol), preservative (sorbic acid potassium), pH regulator, vitamins (choline, V. C, V. A, V. E, nicotinic acid, pantothenic acid, V. B ₁₂ , V. B ₆ , V. B ₁ , V. B ₂ , folic acid, V. D), food color (titanium dioxide, yellow 5, red 106, blue 1, yellow 4, red 102), color former (sodium nitrite)
Wet food for dogs	Chicken white meat, vegetables (potato, carrot, green peas), sugar, chicken liver, chicken wings, soybean oil, oligosaccharide, salt, refined fish oil containing DHA and EPA, chondroitin protein complex, glucosamine hydrochloride, plant lactic acid bacterium K71, thickening stabilizer, minerals, taurine, vitamins
Formed jerky for dogs	Beef tongue skin, chicken, wheat starch, soy flour, modified sugar, dietary fiber, salt, sorbitol, propylene glycol, polyphosphoric acid Na, food color (red 102, yellow 5, red 106, yellow 1)
Dried jerky for dogs (hard type)	Deer meat
Dried jerky for dogs (soft type)	Chicken (white meat), glycerin (humectant), propylene glycol (quality maintenance agent), antioxidant (nitrite Na)
Confectionery (biscuit) for dogs	Wheat flour, glucose, shortening, cornstarch, sweet potato, oligosaccharide, yeast
Milk powder for cats	Milk (powdered skim milk, casein), oils and fats (plant oil, animal fats, γ -linolenic acid), soy protein, egg yolk powder, oligosaccharide, L-carnitine, minerals (Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Co), emulsifier, flavor, vitamins (V. A, V. B ₁ , V. B ₂ , V. B ₆ , V. B ₁₂ , V. D, V. E, V. K, nicotinic acid, pantothenic acid, folic acid, choline), taurine

2.2 試薬

1) アセトニトリル (LC-MS/MS 測定時の溶離液のみ LC-MS 用 (富士フイルム和光純薬製)) 及びメタノールは残留農薬・PCB 試験用を用いた。酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用 (1 mol/L 溶液, 富士フイルム和光純薬製) を用いた。水は LC-MS 用の超純水 (富士フイルム和光純薬製) を用いた。

2) 各かび毒標準品

DON, NIV, HT-2 及び T-2 の標準品は全て Trilogy Analytical Laboratory 製、純度 98.0 % のものを用いた。

3) 各かび毒標準原液

2.2 の 2) に示した市販の各かび毒ドライアップ製品に、指定された量のアセトニトリルを加えて溶かし、各標準原液を調製した（これらの各標準原液 1 mL は、各かび毒として 0.1 mg を含有する。）。

4) かび毒混合標準液

各標準原液の一定量を混合し、アセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に各かび毒として 10 µg を含有する混合標準原液を調製した。

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

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM 200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン、使用時回転数 14000 rpm）
- 2) フードプロセッサ：MK-K80 パナソニック製
- 3) 振とう機：理研式シェーカー MW-DRV 宮本理研工業製（使用時振とう数 300 rpm）
- 4) 定温乾燥機：FC-410 アドバンテック製
- 5) 多機能カラム：MultiSep 227 Trich+カートリッジ Romer Labs 製
- 6) メンブランフィルター：

DISMIC-13HP（孔径 0.2 µm, 直径 13 mm） 東洋濾紙製

Ekicrodisc 13CR（孔径 0.2 µm, 直径 13 mm） PALL 製

7) LC-MS/MS

LC 部：ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部：ACQUITY TQ Detector Waters 製

2.4 定量方法

1) 抽出

i ウェット製品

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

ii ウェット製品以外

分析試料 25.0 g を量って 500 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (21+4) 200 mL を加え、密栓して 60 °C で 60 分間静置後、室温で 60 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

試料溶液を多機能カラムに入れ、初めの流出液 3 mL を捨て、その後の流出液 3 mL（ウェット

製品では 5 mL) を 10 mL の試験管に受けた. この液の 2 mL (ウェット製品では 4 mL) を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した. 水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし, メンブランフィルターを用いてろ過し, LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした.

なお, 粉ミルクについては, LC-MS/MS による測定に供する試料溶液の一定量を水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) で正確に 5 倍希釈し, 別途, NIV 測定用の試料溶液とした.

3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各かび毒混合標準液各 10 µL を 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 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm i.d. × 150 mm, 5 µm), Agilent Technologies
Mobile phase	10 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (19:1) (hold for 1 min) → 14 min → (1:19) (hold for 10 min) → 1 min → (19:1) (hold for 9 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ (800 L/h, 400 °C)
Capillary voltage	Positive mode: 3.5 kV, Negative mode: 1.5 kV
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

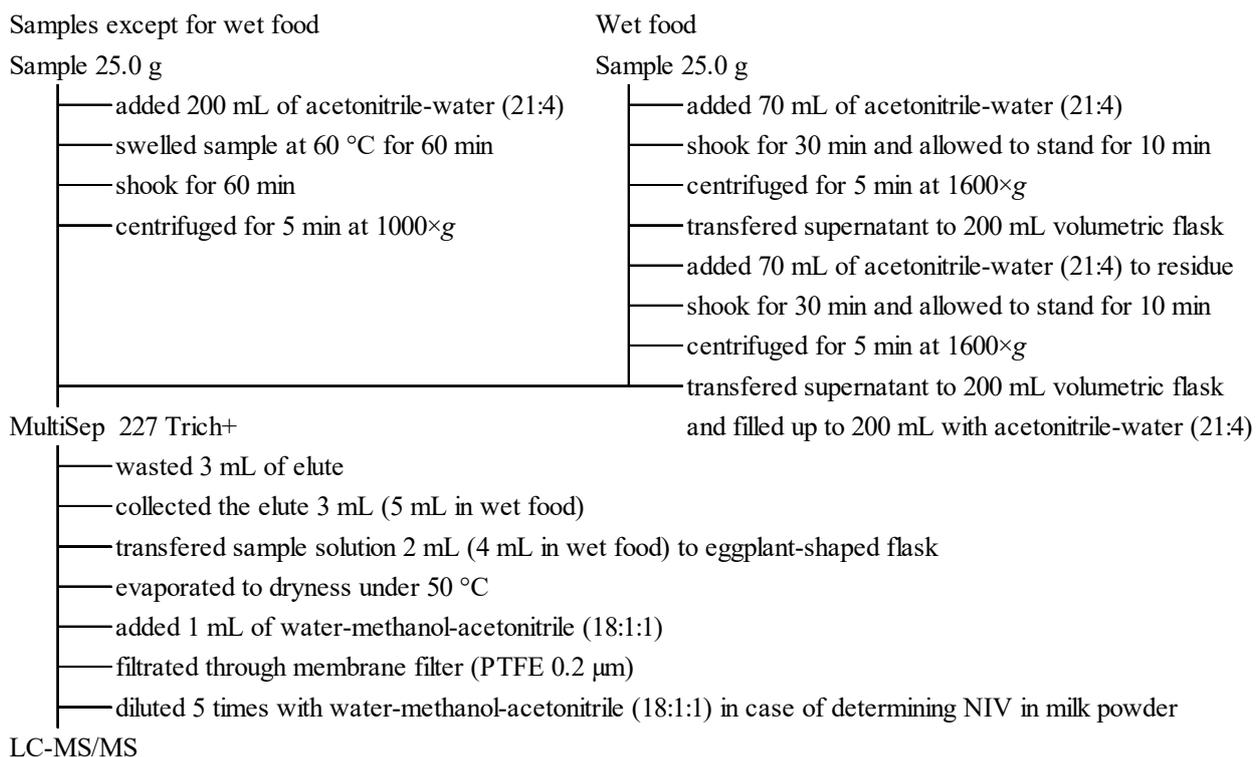
Table 3 MS/MS parameters

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

4) 計 算

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

なお, 定量法の概要を Scheme 1 に示した.



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

2.5 メンブランフィルターの検討方法

水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) で調製した 25 ng/mL のかび毒混合標準液を用い、東洋濾紙製及び PALL 製のメンブランフィルター (材質: PTFE) に通してろ過した標準液とろ過しない標準液を LC-MS/MS により測定し、得られた各かび毒のピーク面積を比較した。

2.6 ウェット製品以外を対象とした JFRL 法の抽出条件の改良で用いた定量法

素材乾燥ジャーキーハードタイプに各かび毒として 0.1 mg/kg 相当量を添加した分析試料について、以下の 1)~3) に基づき各 3 点併行で操作し、各々の回収率を比較した。

- 1) 分析試料 25.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (21+4) 100 mL を加え、密栓して 60 °C で 60 分間静置後、室温で 60 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液の一定量をアセトニトリル-水 (21+4) で正確に 2 倍希釈し、カラム処理に供する試料溶液とした。以降は 2.4 の 2), 3) 及び 4) に従い定量した。
- 2) 1) の操作のうち、共栓三角フラスコを 200 mL から 300 mL に変更し、同様の操作を行った。
- 3) 2.4 の 1) ii, 2), 3) 及び 4) に従い定量した。

2.7 粉ミルク試料溶液の希釈倍率の検討

2.4 の 1) 及び 2) により調製した粉ミルクのブランク試料溶液に、NIV として 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 125 ng/mL 相当量) を添加したマトリックス標準液及びこのマトリックス標準液を水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) で正確に 5 倍及び 10 倍希釈した試料溶液を調製し、2.2 の 4) に従って調製した同濃度の NIV 標準液に対するピーク面積比を確認した。

2.8 添加回収試験

2.2 の 3) の DON 標準原液及び NIV 標準原液をアセトニトリルで正確に希釈し添加に用いた。

DONとして、ウェット製品以外の試料に0.1及び1 mg/kg相当量（最終試料溶液中で25及び250 ng/mL）、ウェット製品（原物）に0.02及び0.1 mg/kg相当量（同10及び50 ng/mL）、NIVとして、粉ミルク及びウェット製品以外の試料に0.1及び0.5 mg/kg相当量（同25及び125 ng/mL）、粉ミルクに0.5及び1 mg/kg相当量（同25及び50 ng/mL）、ウェット製品（原物）に0.02及び0.05 mg/kg相当量（同10及び25 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、ウェット製品以外については一夜静置、ウェット製品については30分間ほど静置した後に、本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

3 結果及び考察

3.1 検量線

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

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

3.2 メンブランフィルターの検討

前報において、最終試料溶液は5000×gで5分間遠心分離後の上澄み液としていたが、この最終試料溶液をLC-MS/MSに注入したところ、カラムの詰まりがみられた。そこで、最終試料溶液中の不溶成分の除去操作について、遠心分離からメンブランフィルターに変更し、2.5に従い各かび毒の吸着の有無を確認した。その結果はTable 4のとおり、各メンブランフィルターのピーク面積比は、東洋濾紙製は97.0~101%、PALL製は94.8~103%であり、メンブランフィルターへの吸着による影響は問題ないものであった。

Table 4 Adsorption of each mycotoxin by membrane filter

	DON		NIV		HT-2		T-2	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)						
Toyo Roshi Kaisha, Ltd	101	1.5	97.0	7.3	100	4.3	99.8	4.9
PALL Corporation	98.4	8.3	103	9.4	96.8	6.6	94.8	2.1

a) Mean ($n = 3$)

Ratio of peak area of mycotoxin after filtration to that before filtration

b) Relative standard deviation of repeatability

3.3 抽出条件の検討

前報において、ウェット製品以外のNIVの回収率が試験法の妥当性確認法の目標値を下回る結果となった原因は、試料量に対する溶媒量や容器容量が適当ではなく、振り混ぜが不十分なことによる抽出効率の低下に問題があると考えられた。このため、2.6に従い、抽出操作時の溶媒量及び容器容量を変えて、各条件における抽出効率を比較した。

その結果は Table 5 のとおり、NIV の回収率は抽出溶媒量 200 mL 及び容器容量 500 mL の抽出条件において 90.5 % となり、前報と比較して良好な結果であった。また、DON の回収率についても、102 % と良好な結果が得られた。一方、T-2 は各抽出方法において過回収となり、また、HT-2 においても過回収の傾向であった。

これらの結果から、ウェット製品以外の抽出条件は抽出溶媒量 200 mL 及び容器容量 500 mL に変更し、分析対象から HT-2 及び T-2 を除外して、以降の検討を行うこととした。

Table 5 Recoveries for mycotoxins in dried jerky for dogs (hard type) under various extraction conditions

Name	Spiked level (mg/kg)	Extractant volume (mL)	Flask volume (mL)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
DON	0.1	100	200	78.6	7.4
			300	81.3	8.5
		200	500	102	4.0
NIV	0.1	100	200	68.7	3.8
			300	71.8	6.7
		200	500	90.5	4.0
HT-2	0.1	100	200	114	2.6
			300	108	2.8
		200	500	109	3.4
T-2	0.1	100	200	138	6.1
			300	129	4.5
		200	500	127	3.8

In dark cell, mean recovery is less than 80 % or more than 110 %

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.4 粉ミルク試料溶液の希釈倍率の検討

前報において、粉ミルクのマトリックス効果試験では NIV について過回収の傾向が見られた。今回、抽出条件を変更したことから、NIV に対する粉ミルク試料溶液中の夾雑成分に由来するイオン化促進の影響を 2.7 に従い確認した。

その結果は Table 6 のとおり、試料溶液を希釈しなかった場合では過回収の傾向が見られたが、希釈することにより、マトリックスの影響が低減された。

以上の結果から、粉ミルクの NIV の定量においては、カラム処理後の試料溶液を 5 倍希釈して LC-MS/MS に供することとした。

Table 6 Effect of matrix effect on NIV detection in milk powder for cats

Dilution rate (-fold)	NIV concentration		Matrix effect ^{b)} (%)
	in matrix standard solution	in sample ^{a)}	
	(ng/mL)	(mg/kg)	
no	125	0.5	136
5	25	0.5	112
10	12.5	0.5	98.1

$n = 3$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

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

3.5 多機能カラムからの流出画分の確認

ドライ製品（猫用）25.0 g を 2.4 の 1) ii) により調製したカラム処理に供する試料溶液に、DON 及び NIV として各 1 mg/kg 相当量を添加（最終試料溶液中で 250 ng/mL 相当量）し、多機能カラムからの流出画分を確認した。その結果は Table 7 のとおりであり、DON 及び NIV は流出液 3 mL 以上の画分では 88.7% 以上の流出を認めた。このため、JFRL 法と同様にウェット製品以外については初めの流出液 3 mL を捨て、その後の 3~6 mL の画分から 2 mL を採取することとした。なお、ウェット製品については前報で確認済みのため検討は省略した。

Table 7 Elution patterns of DON and NIV from MultiSep 227 Trich+

Types	Target	(%) ^{a)}						
		0~1 mL	1~2 mL	2~3 mL	3~4 mL	4~5 mL	5~6 mL	6~7 mL
Dry food for cats	DON	35.7	84.6	110	90.5	91.5	93.9	95.2
	NIV	0.1	23.5	61.0	88.7	98.7	101	109

$n = 1$

a) Concentration of the target component in efflux after the column processing / that in the sample solution before the column processing $\times 100$

3.6 妨害物質の検討

ウェット製品以外の 7 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においても DON 及び NIV の選択性を妨げるピークは認められなかった。ウェット製品については前報で確認済みのため検討は省略した。

なお、得られた SRM クロマトグラムを Fig. 2 に示した。

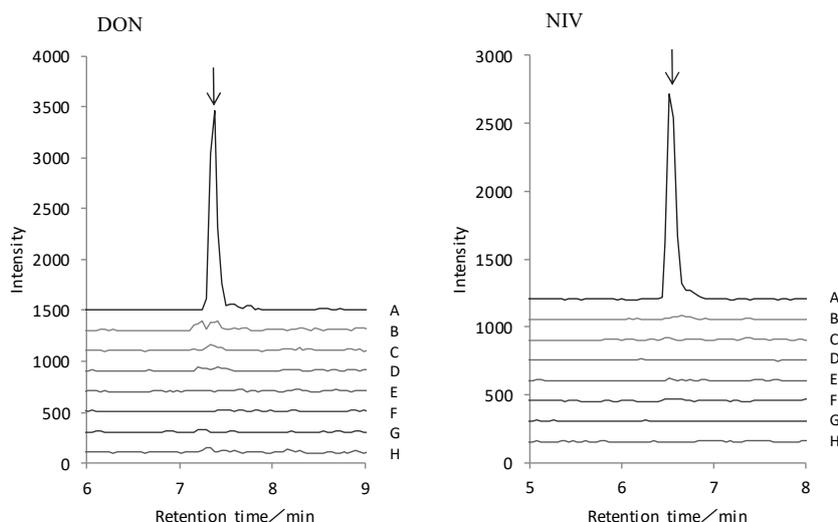


Fig. 2 Typical Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of DON and NIV in standard and blank sample solutions

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

A: Standard solution (25 ng/mL each as DON and NIV)

B~H: Blank sample solution (B: dry food for cats, C: semi dry food for dogs, D: formed jerky for dogs, E: dried jerky for dogs (hard), F: dried jerky for dogs (soft), G: biscuit for dogs, H: milk powder for cats)

3.7 マトリックス効果の確認

2.4 の 1) ii, 2)及び 3)により調製したウェット製品以外の愛玩動物用飼料のブランク試料溶液に DON として 1.0 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 250 ng/mL 相当量), NIV として 0.5 mg/kg 相当量 (同 125 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加した. 粉ミルクの NIV については, 上記添加溶液を水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) で 5 倍希釈して最終試料溶液中で 25 ng/mL 相当量とした各マトリックス標準液を作成し, 2.2 の 4)に従って調製した同濃度の各かび毒標準液に対するピーク面積比を確認したところ, Table 8 のとおりであり, 各かび毒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 8 Matrix effect study

Types	Concentration				Matrix effect ^{b)}	
	in matrix standard		in sample ^{a)}		(%)	
	(ng/mL)		(mg/kg)		DON	NIV
	DON	NIV	DON	NIV		
Dry food for cats	250	125	1.0	0.5	102	100
Semi dry food for dogs	250	125	1.0	0.5	89.8	97.2
Formed jerky for dogs	250	125	1.0	0.5	95.1	101
Dried jerky for dogs (hard)	250	125	1.0	0.5	89.3	94.9
Dried jerky for dogs (soft)	250	125	1.0	0.5	94.5	89.1
Biscuit for dogs	250	125	1.0	0.5	94.6	97.7
Milk powder for cats	250	25	1.0	0.5	99.6	112

$n = 3$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

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

3.8 添加回収試験

2.8 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 9 のとおり、DON の平均回収率は 80.2~108 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 15 %以下，NIV の平均回収率は 85.5~102 %， RSD_r は 17 %以下の成績が得られたことから，試験法の妥当性確認法に定められた真度及び併行精度の目標値（真度：80~110 %（添加濃度が 1，0.5 及び 0.1 mg/kg の場合），60~115 %（添加濃度が 0.02 及び 0.05 mg/kg の場合），精度：16 %以下（添加濃度が 1 mg/kg の場合），22 %以下（添加濃度が 0.5，0.1，0.05 及び 0.02 mg/kg の場合））を満たしていた。

なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 9 Recoveries for DON and NIV

Mycotoxins	Spiked level (mg/kg)	Dry food for cats		Semi dry food for dogs		Wet food for dogs		Formed jerky for dogs	
		Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}						
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
DON	0.02	—	—	—	—	89.8	14	—	—
	0.1	106	6.2	106	4.2	101	1.5	108	5.0
	1.0	89.2	2.2	100	15	—	—	80.2	8.7
NIV	0.02	—	—	—	—	85.5	11	—	—
	0.05	—	—	—	—	87.9	5.3	—	—
	0.1	97.1	11	102	3.0	—	—	92.7	1.1
	0.5	90.7	3.7	89.1	17	—	—	94.9	13

Mycotoxins	Spiked level (mg/kg)	Dried jerky for dogs (hard)		Dried jerky for dogs (soft)		Biscuit for dogs		Milk powder for cats	
		Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
DON	0.1	83.7	4.7	82.1	2.2	88.4	5.5	104	3.4
	1.0	100	1.9	98.0	1.2	102	0.4	89.3	2.8
NIV	0.1	90.9	11	91.9	3.2	85.9	14	—	—
	0.5	99.4	1.6	92.3	2.7	95.8	2.3	88.6	9.1
	1.0	—	—	—	—	—	—	89.9	2.6

— : Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

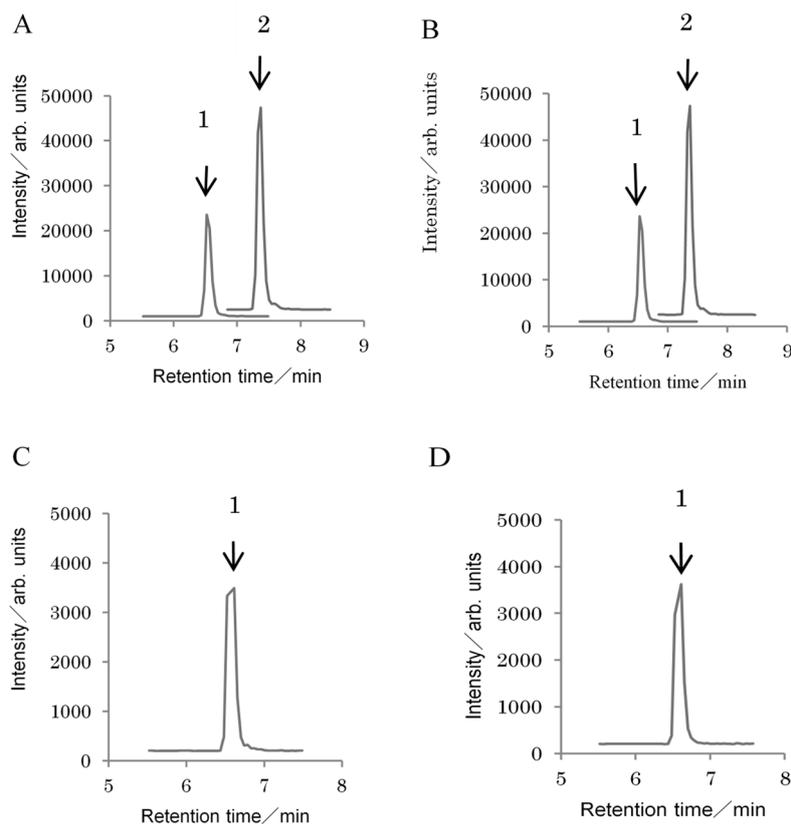


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of DON and NIV in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention time of 1: NIV, 2: DON. The baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (The concentration is 250 ng/mL of DON (2.5 ng as injection amount) and 125 ng/mL of NIV (1.25 ng as injection amount).)

B: Dry food for cats (spiked at 1.0 mg/kg of DON (2.5 ng as injection amount) and 0.5 mg/kg of NIV (1.25 ng as injection amount))

C: Standard solution (The concentration is 25 ng/mL of NIV (0.25 ng as injection amount).)

D: Milk powder for cats (spiked at 0.5 mg/kg of NIV (0.25 ng as injection amount))

3.9 定量限界（下限）及び検出限界の検討

DON及びNIVの検量線が直線性を示した範囲、各2~1000 ng/mLの下端付近となる濃度（DONにおいてはウェット製品以外で0.1 mg/kg相当量（最終試料溶液中で25 ng/mL相当量）、ウェット製品（原物）で0.02 mg/kg相当量（同10 ng/mL相当量）、NIVにおいては粉ミルク及びウェット製品以外で0.1 mg/kg相当量（最終試料液中濃度25 ng/mL相当量）、粉ミルクで0.5 mg/kg相当量（同25 ng/mL相当量）及びウェット製品（原物）で0.02 mg/kg相当量（同10 ng/mL相当量））の添加回収試験の結果、得られた分析値の標準偏差の10倍となる濃度を求めた。

その結果、DONの定量限界（下限）濃度はウェット製品以外で0.1 mg/kg及びウェット製品（原物）で0.02 mg/kgとした。これらの濃度は愛玩動物用飼料中の基準値の最も低い値（猫用：1 µg/g）に対して1/10（ウェット製品以外）及び1/5（ウェット製品）であり、試験法の妥当性確認法に定められた目標値（基準値の1/5以下（ウェット製品以外）、基準値の1/2以下（ウェッ

ト製品（水分含有量 10 %に換算したものに対して））を満たしていた。また、NIV の定量限界（下限）濃度は粉ミルク及びウェット製品以外で 0.1 mg/kg, 粉ミルクで 0.5 mg/kg 及びウェット製品（原物）で 0.02 mg/kg とした。

本法の検出下限を確認するため、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 倍を求めた。その結果、DON の検出限界濃度はウェット製品以外で 0.03 mg/kg, ウェット製品（原物）で 0.01 mg/kg とした。これらの濃度は愛玩動物用飼料中の基準値の最も低い値（猫用：1 µg/g）に対して 1/33（ウェット製品以外）及び 1/11（ウェット製品）であり、試験法の妥当性確認法に定められた目標値（基準値の 1/10 以下（ウェット製品以外）、基準値の 1/3 以下（ウェット製品（水分含有量 10 %に換算したものに対して）））を満たしていた。NIV の検出限界濃度は粉ミルク及びウェット製品以外で 0.05 mg/kg, 粉ミルクで 0.2 mg/kg, ウェット製品（原物）で 0.008mg/kg であった。

なお、Table 9 に示したとおり、当該定量限界（下限）濃度における添加回収試験結果は良好であった。

4 まとめ

愛玩動物用飼料中のトリコテセン系かび毒の DON, NIV, HT-2 及び T-2 について、前報を基に LC-MS/MS を用いた同時定量法の愛玩動物用飼料等の検査法への適用の可否について検討したところ、分析対象のかび毒を 4 種類から 2 種（DON 及び NIV）に変更、抽出溶媒量及び抽出容器容量の変更、粉ミルク中の NIV のマトリックスによる影響を低減するため最終試料溶液を 5 倍希釈することで、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類並びに粉ミルクについて、本法に従って得られた SRM クロマトグラムには、選択性を妨げるピークは認められなかった。
- 2) 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、DON 及び NIV 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。
- 3) DON としてウェット製品以外の試料に 0.1 及び 1 mg/kg 相当量、ウェット製品（原物）に 0.02 及び 0.1 mg/kg 相当量、NIV として粉ミルク及びウェット製品以外の試料に 0.1 及び 0.5 mg/kg 相当量、粉ミルクに 0.5 及び 1.0 mg/kg 相当量、ウェット製品（原物）に 0.02 及び 0.05 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、試験法の妥当性確認法に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 4) 本法の DON の定量限界（下限）濃度はウェット製品以外で 0.1 mg/kg, ウェット製品（原物）で 0.02 mg/kg, 検出限界濃度はウェット製品以外で 0.03 mg/kg, ウェット製品（原物）で 0.01 mg/kg, NIV の定量限界（下限）濃度は粉ミルク及びウェット製品以外で 0.1 mg/kg, 粉ミルクで 0.5 mg/kg 及びウェット製品（原物）で 0.02 mg/kg, 検出限界濃度は粉ミルク及びウェット製品以外で 0.05 mg/kg, 粉ミルクで 0.2 mg/kg, ウェット製品（原物）で 0.008 mg/kg であった。

設定した DON の定量限界（下限）及び検出限界は、試験法の妥当性確認法に定められた目標値を満たしていた。

文 献

- 1) 宇田川 俊一, 田端 節子, 中里 光男: 食品安全性セミナー5 マイコトキシン, 中央法規出版, 130-131 (2002) (ISBN 978-4-8058-2125-1).
- 2) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知: 小麦のデオキシニバレノールに係る暫定的な基準値の設定について, 平成 14 年 5 月 21 日食発第 0521001 号 (2002).
- 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) 農林水産省令・環境省令: 愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令, 平成 21 年 4 月 28 日, 農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009).
- 5) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知: 「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について, 平成 21 年 9 月 1 日, 21 消技第 1764 号 (2009).
- 6) 一般財団法人日本食品分析センター: 平成 29 年度愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業報告書, 平成 30 年 3 月, (2018).
- 7) 立石 洋暢, 加藤 耕一, 桑原 正良: 愛玩動物用飼料中のデオキシニバレノール, ニバレノール, HT-2 トキシン及び T-2 トキシンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法の開発, 飼料研究報告, 44, 75-94 (2019).

6 飼料及び愛玩動物用飼料中の砒素, カドミウム, 鉛及び水銀の迅速・多元素同時定量法の開発

野村 昌代*, 伊藤 紗織*, 田端 麻里*

Development of Rapid Simultaneous Determination Method of Arsenic, Cadmium, Lead and Mercury in Feed and Pet Food by ICP-MS

Masayo NOMURA*, Saori ITOU* and Mari TABATA*

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

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

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

Recovery tests were conducted on formula feed (for finishing period broilers, growing pigs and beef cattle), fish meal, chicken meal, rice straw, dry and wet food for dogs. The resulting mean recoveries ranged from 89.0 % to 101 % for arsenic, 90.4 % to 102 % for cadmium, 88.0 % to 95.2 % for lead, and 84.1 % to 97.8 % for mercury. The repeatability in the form of the relative standard deviations (RSD_r) was less than 4.8 % for arsenic, less than 2.3 % for cadmium, less than 6.7 % for lead, and less than 2.3 % for mercury.

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

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

1 緒 言

飼料及び愛玩動物用飼料中の有害重金属等（カドミウム, 水銀, 鉛及び砒素）については, 飼料の有害物質の指導基準及び管理基準¹⁾並びに愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令²⁾において Table 1のとおり基準値が定められている.

飼料分析基準³⁾及び愛玩動物用飼料等の検査法⁴⁾（以下「PF 検査法」という.）には, 有害重金属等の定量法として, 試料の灰化（水銀及び砒素を除く.）の後, 酸による湿式分解を行い, 水銀については還元気化水銀測定装置により, またカドミウム, 鉛及び砒素については原子吸光光度計により測定する方法が記載されている. これらの分析法は, 前処理に時間を要し, 測定も元素ごとに個別に行う必要があるため迅速性に欠ける. 近年, 食品検査等の分野では, マイクロ波分解装置を用いた前処理時間の短縮化, 誘導結合プラズマ質量分析計（以下「ICP-MS」という.）による多元素同時分析が実用化されている.

* 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

そこで昨年度は、肥料等試験法⁵⁾（以下「肥料試験法」という。）及び AOAC Official Method 2015.01⁶⁾（以下「AOAC法」という。）を基に有害重金属等の ICP-MS による定量法を検討し、魚粉、チキンミール及び稲わらについて真度及び併行精度を確認した。

今年度は、昨年度の検討における鉛の定量下限の推定値（0.8 mg/kg 程度）が、飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた定量下限の目標値（0.4 mg/kg）を満たしていなかったことから、鉛の低濃度範囲での検量線の改善のための検討を行い、また、飼料の一部（配合飼料等）及び愛玩動物用飼料の一部（ドライ製品等）に対する妥当性確認を実施したので、その概要を報告する。

Table 1 Maximum levels of arsenic, cadmium, lead and mercury

Feed types	Maximum levels (feed: mg/kg, pet food: µg/g)			
	Arsenic	Cadmium	Lead	Mercury
Formula feed	2	0.8	2	0.2
Grass hay (except for rice straw)	2	1	3	0.4
Rice straw	7	1	3	0.4
Fish meal	15	3	7	1
Meat and bone meal	7	3	7	1
Pet foods	15	1	3	—

—: Maximum level is not set.

2 実験方法

2.1 試料

1) 飼料及び愛玩動物用飼料

配合飼料（ブロイラー肥育後期用，子豚育成用，肉用牛肥育用及び乳用牛飼育用），ポークチキンミール，魚粉，チキンミール，稲わら及び愛玩動物用飼料のドライ製品はそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。愛玩動物用飼料のウェット製品はフードプロセッサで粉砕した。

なお，検討に用いた配合飼料を Table 2 に，愛玩動物用飼料を Table 3 に示した。

Table 2 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For finishing period broilers	Grains	65	Corn, brown rice
	Oil seed meal	26	Soybean meal, rapeseed meal, corn gluten meal
	Brans	1	Rice bran
	Others	8	Vegetable fat, calcium carbonate, salt, calcium phosphate, feed additives
For growing pigs	Grains	71	Corn, polished rice, wheat flour, bread meal, wheat, milo
	Oil seed meal	16	Soybean meal, rapeseed meal, corn germ meal
	Brans	2	Wheat bran
	Animal by-products	2	Fish meal, pork and chicken meal
	Others	9	Food industry by-product, molasses, corn steep liquor, calcium carbonate, calcium phosphate, salt, vegetable fat, betaine, citric acid, animal fat, feed additives
For beef cattle	Grains	76	Heat-treated barley, heat-treated corn, corn
	Brans	16	Wheat bran, corn gluten feed, soybean hulls
	Oil seed meal	7	Soybean meal, rapeseed meal
	Others	1	Calcium carbonate, salt, isomaltoligo saccharide syrup, citric acid, feed additives
For dairy cattle	Grains	61	Heat-treated corn, barley, corn, extruded soybeans
	Oil seed meal	14	Soybean meal
	Brans	8	Wheat bran, corn gluten feed, soybean hull
	Others	17	Cotton seed, alfalfa meal, soybean curd residue, molasses, salt, calcium carbonate, feed additives

Table 3 Ingredients list of pet foods used in this study

Pet food types	Ingredients
Dry food for dogs	Corn, chicken, rice, corn gluten meal, chicken fat, beet pulp, protein hydrolysate, soybean lecithin, fish oil, dried tomato, yeast, whole grain linseed, mannan oligosaccharide, dried chicory, yucca extracts, L-carnitine, vitamins (V. A, V. D ₃ , V. E, V. C, V. B ₁ , V. B ₂ , pantothenic acid, niacin, V. B ₆ , folic acid, biotin, V. B ₁₂ , choline), minerals (P, Na, Cl, Ca, K, Fe, Zn, Mn, Se, I), antioxidants (V. E)
Dry food for cats	Grains (corn, white medium soft sugar, corn gluten meal, wheat flour, hominy feed), meats (meat meal, chicken meal), fishes (fish meal, fish powder, dried tuna, whitebait, imitation crab meat chips, shrimp), animal fat, soybean meal, seaweed, oligosaccharide, vegetables (cabbage powder, carrot powder, spinach powder, pumpkin powder), minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, Zn, I), vitamins (V. A, V. D, V. E, V. K, V. B ₁ , V. B ₂ , V. B ₆ , pantothenic acid, niacin, folic acid, choline), amino acids (methionine, taurine), food yellow no.5, food red no.3, food yellow no.4, food blue no.1, food red no.102, monascus color, antioxidants (rosemary extracts)
Wet food for dogs 1	Meats (chicken, beef, pork, beef extracts), vegetables (carrot, corn, green pea), starches (corn starch), oils and fats (beef oil), sugars (oligosaccharide), polysaccharide thickener (carrageenan), minerals (Na, Cl, Ca, Cu, K, I, Mg, Zn, Fe, Mn), vitamins (choline, V. E, V. B ₁ , V. D, V. B ₆ , folic acid), chondroitin sulfate, glucosamine
Wet food for dogs 2	Tuna (white meat, dark meat), polished rice, tuna extracts

2) FAPAS 試料

The Food and Environment Research Agency で主催している、Food Analysis Performance Assessment Scheme (以下「FAPAS」という。)の Proficiency test 07353 の分析用試料 T07353 (Metallic contaminants in Animal Feed) を使用した。

2.2 試薬

- 1) 塩酸及び硝酸は Ultrapur-100 (関東化学製) を用いた。過酸化水素及び酢酸は Ultrapur (関東化学製) を用いた。L-システイン酸は和光特級 (富士フイルム和光純薬製) を用いた。水は Milli-Q Integral 5 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。
- 2) 希釈溶媒 (10 µg/mL L-システイン酸含有塩酸-酢酸-硝酸-水 (5+6+10+179))
L-システイン酸 1 mg を 100 mL の Digi 製チューブに入れ、水 70 mL を加えて溶かした後、塩酸 2.5 mL, 酢酸 3 mL 及び硝酸 5 mL を加え、更に標線まで水を加えて希釈溶媒を調製した。
- 3) 標準原液
砒素, カドミウム, 鉛, 水銀, レニウム, ロジウム, 金及びルテチウムの標準原液は、Table 4 に示した供給業者、規格のものをを用いた。

Table 4 Standards used in this study

	Certified value ($\mu\text{g/mL}$)	Manufacturers	Specification
Arsenic standard solution	99.4	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Cadmium standard solution	100.2, 99.3	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Lead standard solution	100.1	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Mercury standard solution	100.3	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Rhenium standard solution	1005.1	ACROS ORGANICS	for atomic absorption spectrochemical analysis
Rhodium standard solution	1002	Kanto Chemical	for atomic absorption spectrochemical analysis
Gold standard solution	1004	Kanto Chemical	for atomic absorption spectrochemical analysis
Lutetium standard solution	1004	Kanto Chemical	for atomic absorption spectrochemical analysis

4) 重金属等混合標準原液

砒素, カドミウム, 鉛及び水銀標準原液各 750 μL を 15 mL の Digi 製チューブに正確に入れて混合し, 更に標線まで希釈溶媒を加えて重金属等混合標準原液を調製した (この液 1 mL は, 各重金属等としてそれぞれ 5 μg を含有する.) .

5) 混合内標準液

レニウム及びロジウム標準原液各 75 μL を 15 mL の Digi 製チューブに入れて混合し, 更に標線まで硝酸 (1+19) を加えて混合内標準原液を調製した (この液 1 mL は, 各内標準としてそれぞれ 5 μg を含有する.) . 更に混合内標準原液 300 μL を 15 mL の Digi 製チューブに入れ, 標線まで硝酸 (1+19) を加えて混合内標準液を調製した (この液 1 mL は, 各内標準としてそれぞれ 100 ng を含有する.) .

6) 金-ルテチウム混合液

金及びルテチウム標準原液各 1.5 mL を 15 mL の Digi 製チューブに入れて混合し, 更に標線まで硝酸 (1+19) を加えて金-ルテチウム混合液を調製した (この液 1 mL は, 金及びルテチウムとしてそれぞれ 100 μg を含有する.) .

7) 金溶液

金標準原液 1.5 mL を 15 mL の Digi 製チューブに入れ, 標線まで硝酸 (1+19) を加えて金溶液を調製した (この液 1 mL は, 金として 100 μg を含有する.) .

8) 重金属等混合標準液

重金属等混合標準原液及び混合内標準液並びに金溶液又は金-ルテチウム混合液の一定量を 15 mL の Digi 製チューブに入れて混合し, 更に標線まで希釈溶媒を加えて正確に希釈し, 1 mL 中に各重金属等として 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8 及び 10 ng, 各内標準として 1 ng, 金として又は金及びルテチウムとして 200 ng を含有する重金属等混合標準液を調製した.

同時に重金属等混合標準原液を加えずに同様に操作し, 各内標準として 1 ng, 金として又は金及びルテチウムとして 200 ng を含有する濃度 0 ng/mL の重金属等混合標準液を調製した.

9) 酢酸無添加希釈溶媒 (10 µg/mL L-システイン酸含有塩酸-硝酸-水 (1+2+37))

L-システイン酸 1 mg を 100 mL の Digi 製チューブに入れ、水 70 mL を加えて溶かした後、塩酸 2.5 mL 及び硝酸 5 mL を加え、更に標線まで水を加えて酢酸無添加希釈溶媒を調製した。

2.3 装置及び器具

1) 粉碎機 :

粉碎機 1 (稲わら以外の試料用) :

ZM-200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 14000 rpm)

粉碎機 2 (稲わら用) :

SM-100 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm)

2) 高圧分解容器 : テフロン TFM 容器 100 mL Anton-Paar 製

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

4) チューブ

i Sample vials 50 mL ポリプロピレン Thermo Fisher Scientific 製 (以下「Thermo 製チューブ」という.)

ii Centrifuge Tubes with screw caps 50 mL ポリプロピレン Labcon 製 (以下「Labcon 製チューブ」という.)

iii ポリプロピレン製バイアル 50 mL ポリプロピレン ビーエルテック製

iv Digi TUBEs 15 mL, 50 mL 及び 100 mL ポリプロピレン Digi 製 (以下「Digi 製チューブ」という.)

5) 全量フラスコ

i Volumetric Flasks 50 mL ポリプロピレン VITLAB 製

ii Volumetric Flasks 50 mL ペルフルオロアルコキシフッ素樹脂 VITLAB 製

iii PP メスフラスコ (プラグ栓付) 50 mL ポリプロピレン アズワン製

iv Volumetric Flask 50 mL ポリプロピレン Thermo Fisher Scientific 製 (以下「Thermo 製全量フラスコ」という.)

6) ICP-MS :

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

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

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 0.5 g を正確に量って高圧分解容器に入れ、硝酸 5 mL, 過酸化水素 2 mL 及び金溶液 0.4 mL を加え、発泡がおさまった後マイクロ波分解装置を用いて Table 5 の分解プログラムによって分解した (分解時の温度は約 140~200 °C であった.) . 放冷後、分解液を 15 mL の Digi 製チューブに水で移し込み、更に Digi 製チューブの標線まで水を加え、1,700×g で 5 分間遠心分離した. 上澄み液 3.75 mL 及び混合内標準液 0.5 mL を 50 mL の Digi 製チューブに正確に入れ、希釈溶媒を Digi 製チューブの標線まで加え、ICP-MS による測定に供する試料溶液とした.

同時に試料を用いないで同一の操作を行い、空試験溶液を調製した.

Table 5 Operation condition of microwave digestion equipment

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

2) ICP-MS による測定

試料溶液, 各重金属等混合標準液及び空試験溶液を ICP-MS に導入し, 各モニターイオンにおけるイオンカウント値を得た. 測定条件を Table 6 に示した.

Table 6 Operation conditions of ICP-MS

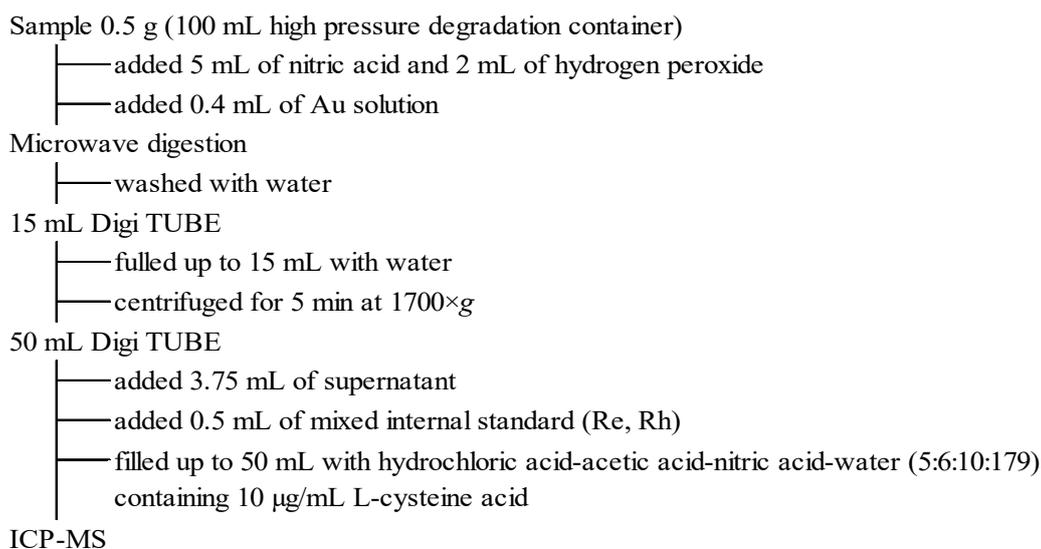
Nebulizer gas	Ar (1.08 L/min)
Plasma gas	Ar (14.0 L/min)
Auxiliary gas	Ar (0.80 L/min)
Collision gas	He (4.34 L/min)
High-frequency output	1550 W
Monitor ion	^{75}As , ^{114}Cd , ^{208}Pb , ^{202}Hg , ^{103}Rh , ^{187}Re

3) 計 算

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

空試験溶液について, 正の値が得られた場合は結果を差し引いた.

なお, 定量法の概要を Scheme 1 に示した.



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

2.5 ルテチウム添加の有無の比較方法

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

稲わらについて、砒素として 7 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 17.5 ng/mL），カドミウムとして 1 mg/kg 相当量（同 2.5 ng/mL），鉛として 3 mg/kg 相当量（同 7.5 ng/mL），水銀として 0.4 mg/kg 相当量（同 1.0 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に以下の方法により 2 点併行試験を実施した。

- ①ルテチウム添加：2.4 に従い、金溶液については金-ルテチウム混合液で実施した。
- ②ルテチウム無添加：2.4 に従った。

分析者及び分析日を変更することにより併行精度及び中間精度を算出し、更にそれぞれの定量値について *t*-検定を行った。

2.6 容器の比較方法

未使用の 50 mL のチューブ及び全量フラスコを用い、それぞれに酢酸無添加希釈溶媒を 15 mL 程度入れ、1 日経過後に鉛のイオンカウント値を測定した。

2.7 容器洗浄効果の確認方法

未使用の 50 mL の Digi 製チューブを用いた。使用前洗浄ありは、JIS K 8007 に準じて硝酸（1+3）又は希釈溶媒を 50 mL 入れ、12 時間以上浸した後、超純水で十分すすぐ操作を行った。それぞれの 50 mL の Digi 製チューブに希釈溶媒を 15 mL 程度入れ、2 時間半経過後又は 1 日経過後に鉛のイオンカウント値を測定した。得られたイオンカウント値についてスミルノフ・グラブズ検定を行い、外れ値の有無を確認した上でイオンカウント値の平均値及び繰り返し精度（RSD_r）を求めた。

2.8 添加回収試験

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

配合飼料（ブロイラー肥育後期用、子豚育成用及び肉用牛肥育用）、魚粉、チキンミール、稲わら及び愛玩動物用飼料（ドライ製品（犬用）、ウェット製品（犬用）1 及びウェット製品（犬用）2）について、各重金属等をそれぞれ添加後よく混合し、ウェット製品については 30 分静置した後、それ以外の試料については一夜静置した後に本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰り返し精度を求めた。

なお、同時に重金属等を添加しないで同一の操作を行い、ブランク溶液を調製し、回収率は各試料のブランク値を差し引いて算出した。

3 結果及び考察

3.1 希釈溶媒の変更

ICP-MS の試料溶液中に炭素が残存した場合、砒素の見かけの感度が増感する。その増感効果を標準液と揃えるために、AOAC 法には酢酸等の炭素源を添加するように記載されている。そこで、標準液及び試料溶液に酢酸を 3 %以上添加することにより、砒素の見かけの感度の増感を補正できるとの報告⁷⁾を参考に、本法でも酢酸を 3 %添加した希釈溶媒を使用することとした。

3.2 ルテチウム添加の有無の比較

AOAC 法では、マイクロ波分解時の試料の損失確認のためにルテチウムを添加している。そこで、ルテチウム添加の必要性を確認するため、重金属等を添加した稲わらについて 2.5 に従い 2 点併行試験により併行精度及び中間精度を算出した。その結果、Table 7 のとおり、いずれの結果も、妥当性確認法ガイドラインに定められた併行精度及び中間精度の目標値を満たす良好な結

果であった。また、*t*-検定の結果、ルテチウムの添加時及び無添加時の分析値に有意な差は認められなかった。そのため、今後の検討では、ルテチウムを添加しないこととした。

Table 7 Comparison with and without lutetium

Heavy metals and others	Spiked level (mg/kg)	Recovery (%)	Repeatability (%)	Intermediate precision (%)	Reference value		
					Repeatability (%)	Intermediate precision (%)	
Without lutetium ^{a)}	Arsenic	7	98.5	0.7	1.4	12	15
	Cadmium	1	99.1	1.1	2.2	16	20
	Lead	3	94.7	1.9	5.8	14	17
	Mercury	0.4	92.7	1.1	2.7	19	23
With lutetium ^{a)}	Arsenic	7	97.7	1.1	2.7	12	15
	Cadmium	1	98.3	1.8	1.8	16	20
	Lead	3	93.6	1.1	2.9	14	17
	Mercury	0.4	92.3	0.8	1.7	19	23

a) Degrees of freedom: 4, $n = 2$

3.3 鉛の低濃度範囲の検量線の検討

昨年度の検討において、鉛の検量線の低濃度範囲 (0.05~1 ng/mL) では相関係数が 0.995 を下回るため、鉛の検量線の範囲を 1~10 ng/mL としており、このため鉛の定量下限の推定値は 0.8 mg/kg 程度と見積もられていた。この値は妥当性確認法ガイドラインの目標値 (0.4 mg/kg) を満たさないため、鉛の低濃度範囲の検量線の改善のための検討を行うこととした。

1) 容器の比較

低濃度範囲で相関係数が低くなる原因として、昨年度の検討において鉛のイオンカウント値が濃度 0 ng/mL の標準液で 50000~140000 cps 程度と高かったことから、ガラス製の器具からの鉛の溶出によるバックグラウンド値の上昇によるものと考えられた。そこで、本検討に使用可能な樹脂製のチューブ及び全量フラスコを確認するため、2.6 に従い、鉛のイオンカウント値を比較した。

その結果、Table 8 に示すように、Thermo 製チューブ、Labcon 製チューブ、Digi 製チューブ及び Thermo 製全量フラスコのイオンカウント値が比較的 low だった。これらのうち、定量に用いることができる Digi 製チューブ及び Thermo 製全量フラスコがガラス製全量フラスコの代替として本法に使用可能と考えられたが、Thermo 製全量フラスコは使用後の洗浄が必要であるため、使い捨て可能な Digi 製チューブを使用するのが適当と考えられた。Thermo 製全量フラスコは、50 mL のみの製造であったが、Digi 製チューブは、50 mL の他に 15 mL 及び 100 mL の製造があり、溶媒の液量に応じて使い分けることが可能である。また、2.2 の 8) に従い、Digi 製チューブを用いて調製したところ、ルテチウム無添加の濃度 0 ng/mL 標準液でイオンカウント値を 1200~6800 cps 程度に抑えることができた。以上のことから、今後、本法では Digi 製チューブを用いることとした。

Table 8 Comparison of ion count value of lead (Comparison with vessels)

Vessel	Manufacturers	Quantification availability	Material	Ion count value (cps)
Tube	Thermo Fisher Scientific	×	PP	3381
	Labcon	×	PP	3601
	BL TEC K.K.	○	PP	16353
	Digi	○	PP	5153
Volumetric flask	VITLAB	○	PP	24168
		○	PFA	29083
	AS ONE	○	PP	33952
	Thermo Fisher Scientific	○	PP	4224

$n = 1$

PP: Polypropylene

PFA: Tetrafluoroethylene/perfluoro (alkyl vinyl ether) copolymer

2) 容器洗浄効果の確認

Digi 製チューブの使用前洗浄が必要か確認するため、2.7 に従い、鉛のイオンカウント値を比較した。

その結果、Table 9 のとおり、使用前洗浄なしと使用前洗浄を行ったものとの間で、いずれもイオンカウント値に大きな差は見られなかったことから、使用前の洗浄は行わないこととした。

Table 9 Comparison of ion count value of lead (Confirmation of effects of vessel washing)

Assay date	The solvent for vessels washing	Ion count value (cps)	RSD _r ^{b)} (%)
After 2.5 hours	Without washing	3310 ^{a)}	7.7
	Nitric acid (1+3)	3268 ^{a)}	0.8
	Diluent solvent	3185 ^{a)}	3.7
The following day	Without washing	3104 ^{a)}	6.7
	Nitric acid (1+3)	3112 ^{a)}	2.0
	Diluent solvent	2949 ^{c)}	2.8

a) Mean ($n = 4$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Mean of data retained after eliminating outliers excluded by Smirnov-Grubbs test ($n = 3$)

3) 鉛の低濃度範囲の検量線

3.3 の 1)及び 2)の結果を基に、2.2 の 8)により鉛の低濃度範囲 (0.05~1 ng/mL) の検量線を作成した。その結果、相関係数が改善し、直線性を示した。得られた検量線の一例を Fig. 1 に示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、鉛を 0.02~0.4 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の鉛の濃度範囲に相当する。

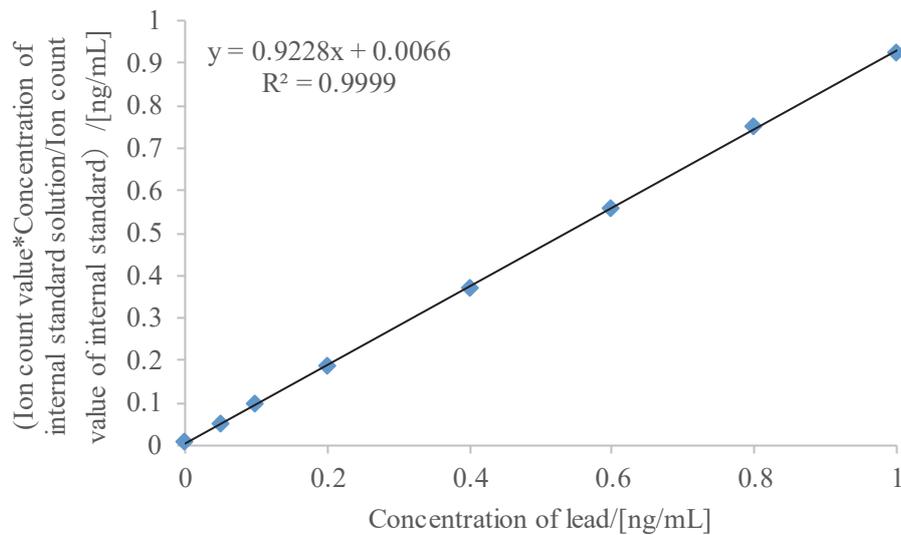


Fig. 1 Calibration curve of lead in low concentration

3.4 検量線

3.3の結果を基に、2.2の8)により各重金属等の検量線を作成した。その結果、いずれの重金属等においても0.05~10 ng/mLの範囲で直線性を示した。得られた検量線の一例をFig. 2に示した。

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

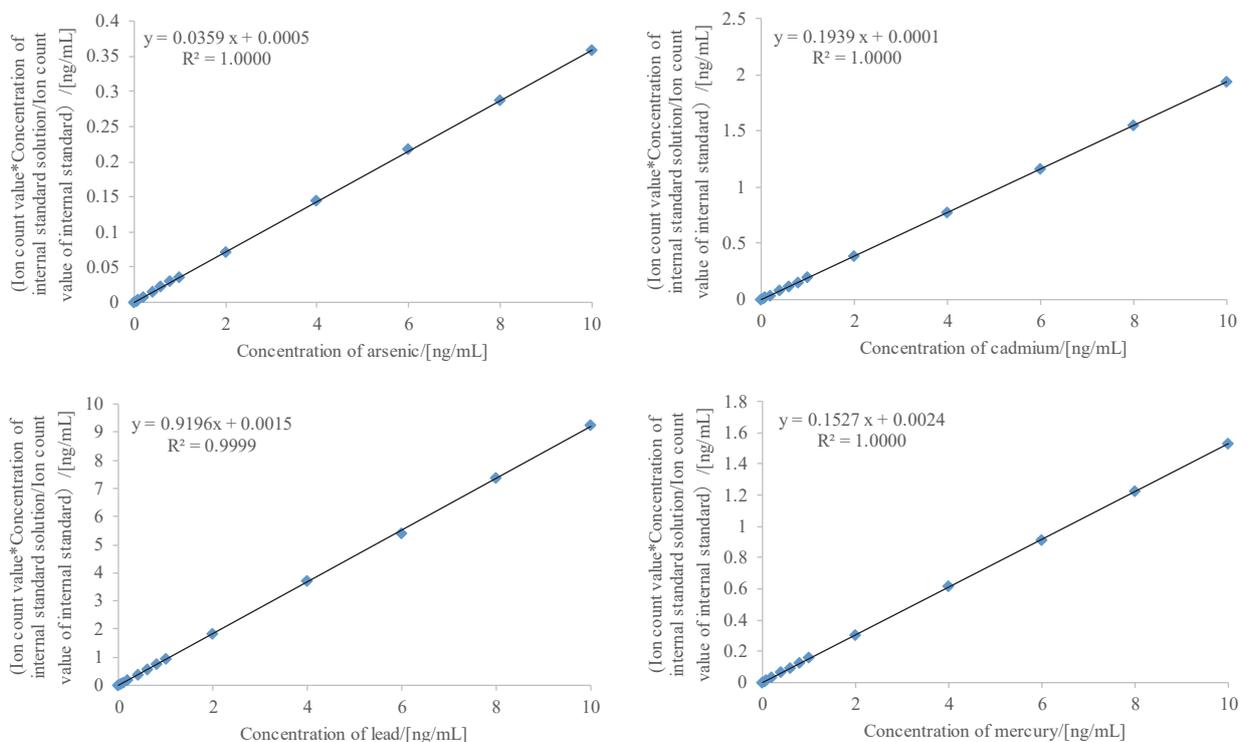


Fig. 2 Calibration curves of arsenic, cadmium, lead and mercury

3.5 選択性の確認

配合飼料（ブロイラー肥育後期用，子豚育成用及び乳用牛飼育用），チキンミール，ポークチキンミール，稲わら及び愛玩動物用飼料（ドライ製品（猫用）及びウェット製品（犬用））各 1 検体並びに魚粉 2 検体を用い，本法により試料中の砒素，カドミウム，鉛及び水銀量を算出した．その結果，複数の試料について砒素，カドミウム，鉛及び水銀が検出された．

そこで，砒素，カドミウム，鉛及び水銀が検出された試料について，飼料分析基準又は PF 検査法に従い分析した．その結果は Table 10 のとおりである．砒素，カドミウム及び鉛では，飼料分析基準又は PF 検査法よりも本法の方が高感度であり，水銀はその逆であるため，感度が低い分析法では不検出となる試料が認められた．定量下限未満の値はばらつきがあることを考慮すると，本法で得られた定量値は分析対象の自然汚染のものと考えられ，本法の選択性に問題はないと考えられた．

なお，稲わら中のカドミウムについては，Table 10 のとおり，本法と比較して飼料分析基準の方が，定量値が小さくなる傾向が認められた．稲わらはケイ酸含有量が多く突沸しやすいため，飼料分析基準では通常（200 °C 以上）より低い温度（185 °C）でしか加熱できなかった．そのため，分解不十分となり，定量値に差が生じたと考えられた．

Table 10 Quantitative results of this method and analytical standards method of feeds or inspection method for pet foods

Sample types	Analytical methods	Arsenic	Cadmium	Lead	Mercury
		Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)
For finishing period broilers	I	0.095	0.025	0.033	ND
	II	(0.079)	(0.029)	(0.029)	(0.004)
For growing pigs in all stage	I	0.069	0.031	0.063	ND
	II	(0.032)	<LOD	(0.078)	(0.017)
For dairy cattle	I	0.023	0.038	0.025	ND
	II	<LOD	(0.046)	<LOD	<LOD
Rice straw	I	0.269	0.211	0.271	0.005
	II	0.250	0.175	(0.330) ^{a)}	(0.004)
Fish meal 1	I	5.66	1.01	0.329	0.370
	II	5.79	1.07	(0.370)	0.398
Fish meal 2	I	4.24	0.772	0.208	0.255
	II	4.28	0.772	(0.220)	0.271
Chicken meal	I	0.080	0.076	0.106	0.008
	II	(0.111) ^{a)}	(0.064) ^{a)}	(0.131) ^{a)}	(0.003)
Pork and chicken meal	I	0.060	0.030	0.179	0.003
	II	<LOD	<LOD	<LOD	(0.023)
Dry food for cats	I	0.628	0.112	0.070	0.039
	III	0.629	0.107 ^{b)}	<LOD	0.036
Wet food for dogs 2	I	1.14	0.013	ND	0.034
	III	1.28 ^{a)}	(0.015)	<LOD	0.037
Analytical standards	Limit of quantification (mg/kg)	0.2	0.10	0.5	0.03
Method of feeds and inspection method for pet foods	Limit of detection (mg/kg)	0.05	0.03	0.2	0.01 ^{c)}
					0.02 ^{d)}

I: This method

II: Analytical standards method of feeds

III: Inspection method for pet foods

Except where noted: $n = 1$

ND: Not detected

(): Less than the limit of quantification

<LOD: Less than the limit of detection

a) Mean ($n = 3$)

b) Mean ($n = 2$)

c) Limit of detection by Analytical standards method of feeds

d) Limit of detection by Inspection method for pet foods

3.6 FAPAS 試料の分析

本法の妥当性を確認するため、FAPAS 試料を用いて 2.4 に従って定量を行った。
その結果、Table 11 に示すように、いずれの結果も z -スコア 2 以下の結果であった。

Table 11 Quantitative results of FAPAS sample

	Arsenic	Cadmium	Lead	Mercury
FAPAS assigned value (mg/kg)	321	204	2176	35.7 ^{a)}
Quantitative value (mg/kg)	297	203	2111	23.6 ^{a)}
z -Score	-0.39	-0.02	-0.21	-1.54

a) Less than the limit of quantification

3.7 添加回収試験

2.8 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 12 のとおり、砒素については平均回収率 89.0~101 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 4.8 %以下，カドミウムについては平均回収率 90.4~102 %， RSD_r は 2.3 %以下，鉛については平均回収率 88.0~95.2 %， RSD_r は 6.7 %以下，水銀については平均回収率 84.1~97.8 %， RSD_r は 2.3 %以下の成績が得られ，妥当性確認法ガイドライン及び PF 検査法第 11 章試験法の妥当性確認法（以下「PF 検査法の妥当性確認法」という。）に定められた 1) 及び 2) の真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。

1) 真度：

70 %以上 120 %以下（飼料）

60 %以上 115 %以下（愛玩動物用飼料における添加濃度 0.04 mg/kg）

80 %以上 110 %以下（同 0.6 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 7 mg/kg 及び 15 mg/kg）

2) 精度：

22 %以下（添加濃度 0.04 mg/kg）

17 %以下（同 0.6 mg/kg）

14 %以下（同 2 mg/kg 及び 3 mg/kg）

12 %以下（同 7 mg/kg）

11 %以下（同 15 mg/kg）

Table 12 Recoveries for arsenic, cadmium, lead and mercury

Sample types	Arsenic				Cadmium			
	Natural contamination	Spiked level	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Natural contamination	Spiked level	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)
For finishing period broilers	0.095	2	97.6	1.1	0.021	0.04	97.7	0.9
					0.025	0.8	102	1.0
For growing pigs in all stage	0.069	2	96.7	1.4	0.030	0.04	93.2	1.1
					0.031	0.8	101	1.1
For dairy cattle	0.018	0.04	92.4	4.8	0.021	0.04	102	2.2
	0.015	2	94.2	0.5	0.027	0.8	98.4	0.9
Rice straw	0.269	7	101	0.8	0.211	1	101	1.5
Fish meal 2	4.24	15	97.2	1.7	0.772	3	99.3	1.4
Chicken meal	0.080	7	96.8	0.9	0.076	3	98.2	0.5
Dry food for dogs	0.240	15	99.1	0.7	0.055	1	101	0.9
Wet food for dogs 1	0.003	0.04	96.6	2.3	0.003	0.04	95.2	1.9
	0.003	3	89.0	1.3	0.003	0.2	94.5	1.4
Wet food for dogs 2	—	—	—	—	0.015	0.04	90.4	2.3

Sample types	Lead				Mercury			
	Natural contamination	Spiked level	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Natural contamination	Spiked level	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)
For finishing period broilers	0.033	2	92.7	0.4	ND	0.04	86.3	1.5
					ND	0.2	86.4	1.0
For growing pigs in all stage	0.063	2	92.6	0.8	ND	0.04	90.1	0.8
					ND	0.2	90.6	1.5
For dairy cattle	0.008	0.04	91.2	6.7	ND	0.04	84.1	1.0
	0.010	2	91.8	0.9	ND	0.2	84.4	0.9
Rice straw	0.271	3	95.2	0.6	0.003	0.04	91.7	2.3
					0.005	0.4	94.6	0.7
Fish meal 2	0.208	7	90.8	1.1	0.255	1	90.6	0.8
Chicken meal	0.106	7	88.0	0.6	0.008	0.04	92.3	2.2
					0.008	1	89.3	1.0
Dry food for dogs	0.144	3	93.1	1.0	0.007	0.04	91.3	2.0
					0.006	1	95.5	0.5
Wet food for dogs 1	0.232	0.6	91.8	2.6	ND	0.04	93.2	1.3
					ND	0.2	92.9	0.7
Wet food for dogs 2	ND	0.04	90.2	1.0	0.033	0.04	97.8	1.3

—: Not tested

ND: Not detected

a) $100 \times (\text{mean of quantitative values of the five samples} - \text{natural contamination}) / \text{spiked level}$

b) Relative standard deviation of repeatability

3.8 定量下限及び検出下限

各重金属等の検量線が直線性を示した範囲、各 0.05~10 ng/mL の下端付近となる濃度（0.04 mg/kg 相当量（最終試料液中濃度 0.1 ng/mL 相当量））における添加回収試験を実施したところ、その結果は良好であり、かつ、標準偏差の 10 倍は当該濃度を超えていなかった。従って、各重金属等の定量下限の濃度は 0.04 mg/kg とした。

また、検出下限は、先の標準偏差に自由度 4、片側有意水準 0.05 の Student の t -値を乗じた値の 2 倍（= 4.26）、すなわち定量下限の 4.26/10 倍、0.02 mg/kg とした。

この定量下限及び検出下限の濃度は飼料中の重金属等の管理基準値に対して 1/5 以下及び 1/10 以下、愛玩動物用飼料の重金属等の管理基準値に対して 1/25 以下及び 1/50 以下であり、妥当性確認法ガイドライン及び PF 検査法の妥当性確認法に定められた 1) 及び 2) の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ていた。

- 1) 定量下限：1/5（飼料及びウェット製品以外の愛玩動物用飼料）、1/2（ウェット製品（水分含有量 10% に換算したもの））
- 2) 検出下限：1/10（飼料及びウェット製品以外の愛玩動物用飼料）、1/3（ウェット製品（水分含有量 10% に換算したもの））

なお、Table 12 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

飼料及び愛玩動物用飼料に含まれる有害重金属等（砒素、カドミウム、鉛及び水銀）の定量について、肥料試験法及び AOAC 法を基に昨年度開発した ICP-MS を用いた多元素同時定量法の飼料分析基準及び PF 検査法への適用の可否について検討したところ、希釈溶媒への酢酸の追加、マイクロ波分解時のルテチウム添加の省略及び全量フラスコを Digi 製チューブへ変更することで、以下の結果が得られた。

- 1) 検量線は、それぞれ 0.05~10 ng/mL の範囲で直線性を示した。

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

- 2) 配合飼料（ブロイラー肥育後期用、子豚育成用及び乳用牛飼育用）、魚粉、チキンミール、ポークチキンミール、稲わら及び愛玩動物用飼料（ドライ製品及びウェット製品）について、本法に従って得られたイオンカウント値から内標準法により試料中の各重金属等の量を算出した結果、複数の試料について各重金属等が検出されたが、本法で得られた定量値は分析対象の自然汚染のものと考えられ、本法の選択性に問題はないと考えられた。
- 3) FAPAS 試料を用いて本法の妥当性を確認したところ、 z -スコア 2 以下の結果が得られた。
- 4) 配合飼料（ブロイラー肥育後期用、子豚育成用、肉用牛肥育用）、魚粉、チキンミール、稲わら及び愛玩動物用飼料（ドライ製品及びウェット製品）について各重金属等を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドライン及び PF 検査法の妥当性確認法に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。

- 5) 本法の各重金属等の定量下限の濃度は 0.04 mg/kg, 検出下限は 0.02 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及び PF 検査法の妥当性確認法に定められた目標値を満たしていた.

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準の制定について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 2) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009).
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 4) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消安第 1764 号 (2009).
- 5) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：肥料等試験法 (2019).
- 6) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Edition, AOAC official method 2015.01 heavy metals in food. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 7) 藤崎 浩二，藤田 治子，松本 宏志，箸本 弘一，鍵 裕明：ICP-MS による調製粉乳中ミネラルの迅速一斉分析，食品衛生学雑誌，52，336-339 (2011).

7 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追加検討及び共同試験

鈴木 知華*

Additional Consideration and Collaborative Study of Measurement Method of Crude Fat in Dried Whole Milk and Formula Feed Including Dried Whole Milk

Chika SUZUKI*

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

This paper presents the result of a collaborative study I have conducted for validating the measurement of crude fat in dried whole milk for feed and formula feed including dried whole milk.

A sample was transferred into a tall beaker, added 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 extracted with diethyl ether. Having washed diethyl ether layer with water, the diethyl ether was evaporated. The residue was dried, and the crude fat was weighed.

A collaborative study was conducted by twelve laboratories using dried whole milk, formula feed for suckling pigs, milk replacers for suckling calves, and milk replacers for suckling calves and suckling pigs. The resulting repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were less than 2.0 % and less than 4.1 % respectively. The HorRat were less than 2.0.

This method was thus validated as useful for inspection of crude fat in dried whole milk for feed and formula feed including dried whole milk.

Key words: crude fat; acid hydrolysis and ether extraction method; dried whole milk; collaborative study

キーワード：粗脂肪；酸分解ジエチルエーテル抽出法；全脂粉乳；共同試験

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。）が収載されており、現在全脂粉乳については前者の適用となっている。しかし、全脂粉乳及び全脂粉乳を主原料とする配合飼料においてジエチルエーテル抽出法では十分に粗脂肪が抽出されないことが飼料製造業者から示唆され、酸分解法の適用拡大又は分析法の改良が要請されている。一方、全脂粉乳中の脂肪の測定法としては、アルカリ加水分解を行うレーゼ・ゴットリーブ法（以下「RG法」という。）がAOAC INTERNATIONAL²⁾等の国際的な標準分析法として広く用いられており、我が国の乳及び乳製品の成分規格等に関する省令³⁾にも収載されている。このため、平成29年度に鈴木らは、全脂粉乳及び全脂粉乳を原料とする配合飼料を用い、RG法及び酸分解法の二法間の測定値の同等性及び二法の適用性の検討を行った⁴⁾。その結果、RG法に対する酸分解法の測定値の比は1.001~1.041であり、有意水準5%で二方法間の測定値に有意な差が認められた。酸分解法がRG法よりも高い測定値を示した原因は、分解物

* 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

が水とともにエーテル層に混入しているためと考えられたことから、平成30年度に安田らは、酸分解法のエーテル層を洗浄する水の量を20 mL から60 mL で3回に変更した方法（以下「酸分解改良法」という。）とRG法の比較検討を行い、二方法間の測定値に有意な差が認められないことを確認した⁵⁾。

今回、前回とは異なる全脂粉乳を原料とする数種の配合飼料を用いて、追加で酸分解改良法とRG法の比較検討を実施するとともに、共通試料を用いた共同試験を実施し、飼料分析基準への適用の可否について検討したので、その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 追加検討

2.1.1 試料

1 mm の網ふるいを通過した3種類の全脂粉乳を含む配合飼料を用いた。
なお、検討に用いた配合飼料をTable 1に示した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For suckling pigs	Grains	2	Wheat flour, dextrin, starch, potato starch
	Oil seed meal	2	Wheat gluten enzyme degradation
	Animal products	76	Dried skim milk, dried whole milk, whey protein concentrate, casein
	Others	20	Glucose, vegetable oil, fructose, lactose, yeast extracts, calcium carbonate, lecithin, silicate, bread yeast, licorice extracts, dry yeast cell wall, egg powder, stevia, <i>Bacillus coagulans</i> , oligosaccharide, dextran fermentation by-product concentrate, silicic anhydride, bentonite, citric acid, lactic acid, feed yeast, medium chain fatty acid calcium, milk thistle extracts, <i>Saccharomyces cerevisiae boulardii</i> , vegetable hardened oil, feed additives
For milk replacer for suckling calves 1	Grains	3	Dextrin, potato starch, corn starch
	Animal products	65	Dried skim milk, dried whole milk, whey protein concentrate, casein
	Others	32	Vegetable oil, lactose, silicic anhydride, lecithin, licorice extracts, brewers yeast, bread yeast, egg powder, lactoferrin concentrate, glucose, stevia, salt, calcium carbonate, zeolite, lactic acid bacteria, butyric acid bacteria, oligosaccharide, saccharification bacteria, natural aluminum silicate, galacto-oligosaccharide, garlic powder, cumin powder, thyme, licorice powder, feed additives
For milk replacer for suckling calves and suckling pigs	Grains	1	Dextrin, potato starch, corn starch
	Animal products	88	Whey protein concentrate, dried whole milk, dried skim milk, casein
	Others	11	Vegetable oil, lactose, egg powder, licorice extracts, brewers yeast, bread yeast, glucose, stevia, calcium carbonate, zeolite, lactic acid bacteria, butyric acid bacteria, oligosaccharide, saccharification bacteria, lecithin, silicic anhydride, natural aluminum silicate, galacto-oligosaccharide, feed additives

2.1.2 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 Elix Essential 5（Merck Millipore 製）により精製した精製水（JIS K 0557 の A3 に分類される水）を用いた。

2) フェノールフタレイン試液

フェノールフタレイン 1 g をエタノールに溶かして 100 mL とした。

2.1.3 測定方法

1) RG 法

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

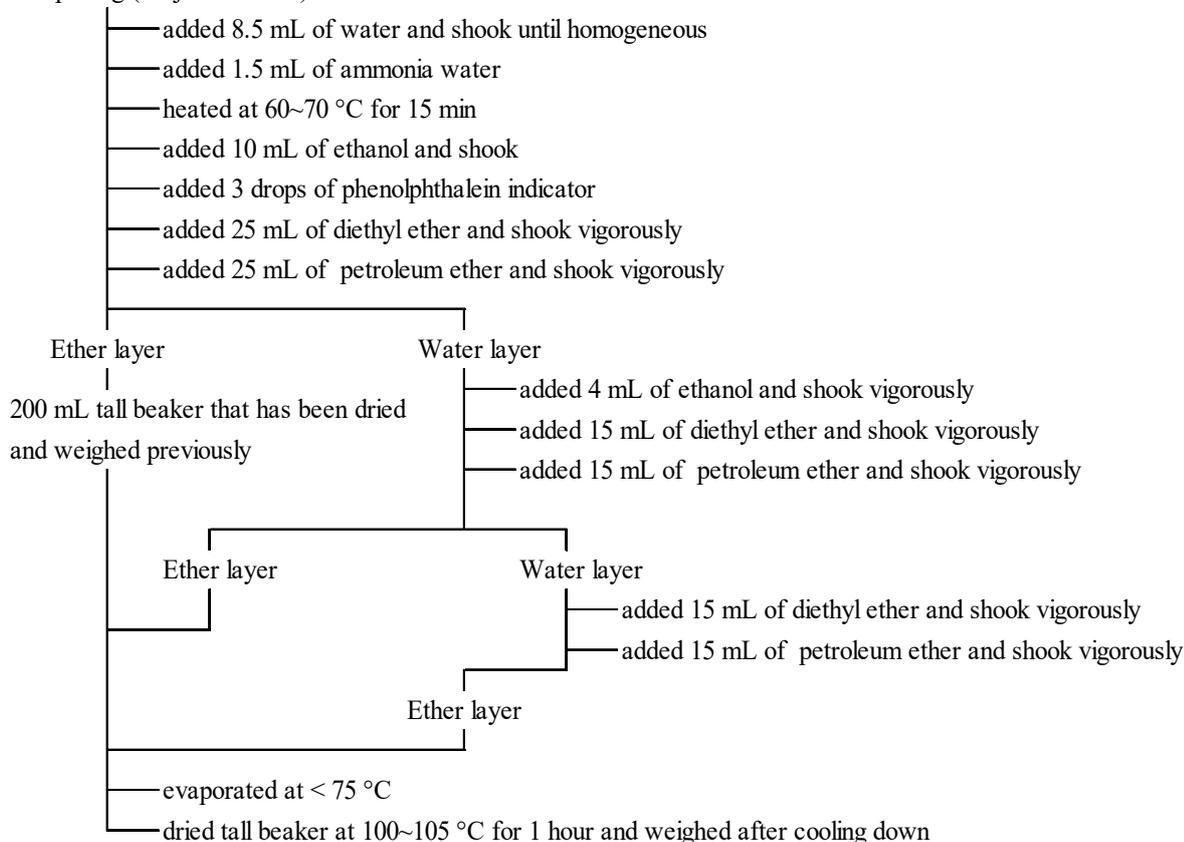
エタノール 10 mL を加えて振り混ぜた後、フェノールフタレイン試液 3 滴及びジエチルエーテル 25 mL を加え、手で 1 分間激しく振り混ぜた。さらに、石油エーテル 25 mL を加え、同様に振り混ぜた後静置し、上層（ジエチルエーテル・石油エーテル層）を 200 mL のトールビーカー（あらかじめ 100~105 °C で 1 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの）に入れた。

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

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

なお、測定法の概要を Scheme 1 に示した。

Sample 1 g (Mojonnier flask)

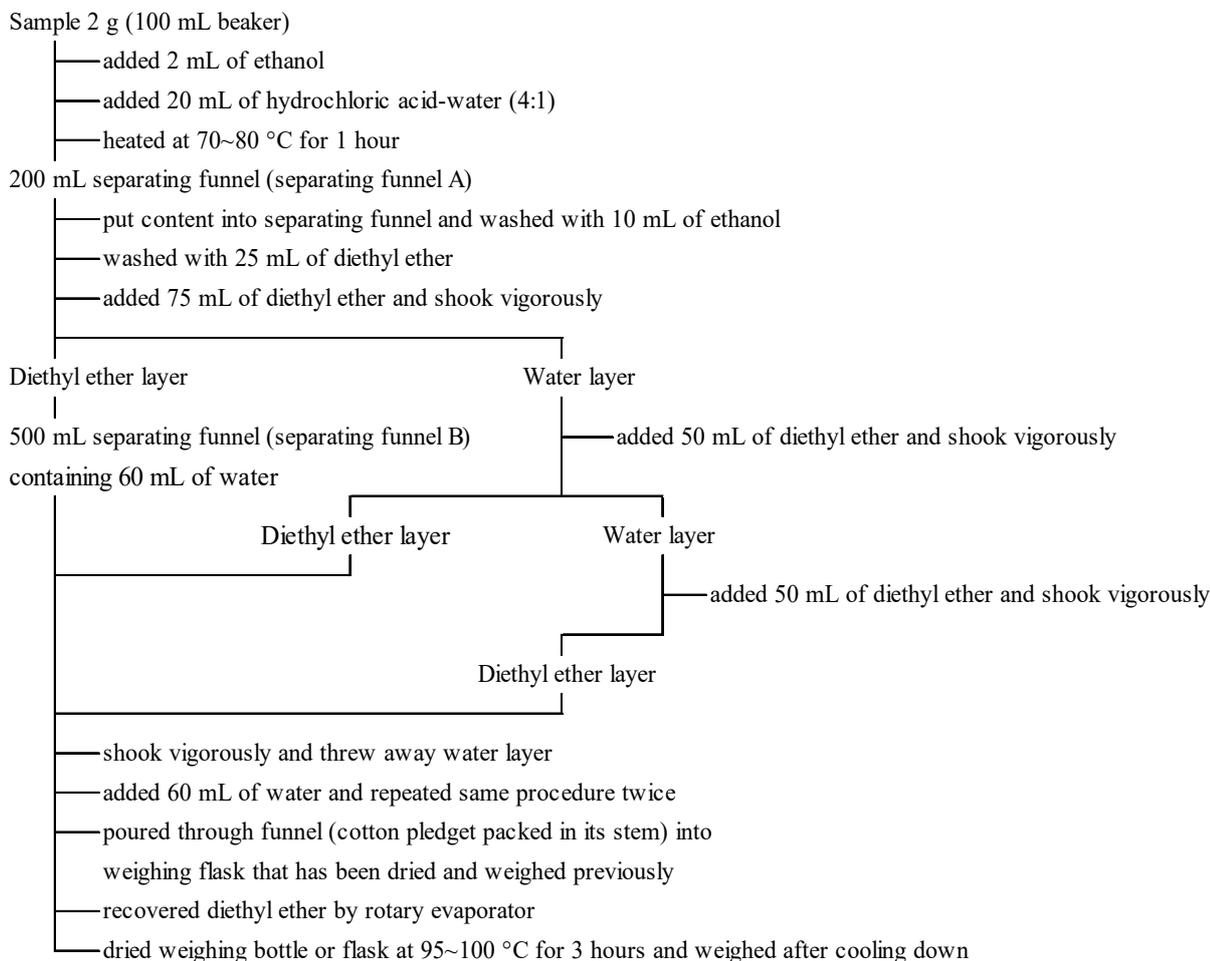


Scheme 1 Measurement procedure (Rose-Gottlieb method)

2) 酸分解改良法

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

なお，測定法の概要を Scheme 2 に示した。



Scheme 2 Measurement procedure
(Acid hydrolysis-ether extraction method (modified method))

2.2 共同試験

2.2.1 試料

1 mm の網ふるいを通過した全脂粉乳 2 種類及び全脂粉乳を原料とする配合飼料 4 種類を約 3 g ずつ小分けしたもの（試料名は非明示）各 2 袋を試験用試料として計 12 袋を各試験室に配付した。

なお，試験に用いた配合飼料は 2.1.1 及び Table 2 に示したものをを用いた。

Table 2 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For milk replacer	Animal products	95	Dried whole milk, dried skim milk
for suckling calves 2	Others	5	Glucose, dry yeast cell wall, lactic acid bacteria

2.2.2 試薬

エタノール、塩酸、ジエチルエーテル及び硫酸ナトリウム（無水）は特級又はこれ以上のものを用いた。水は JIS K 0557 の A3 に分類される精製水又はこれ以上のものを用いた。

2.2.3 分析試料

非明示の 2 点反復で、2.2.1 の試験用試料を用い、各 2.00 g を量り分析試料とした。

2.2.4 測定方法

2.1.3 の 2) によった。

2.2.5 報告方法

2.2.3 の分析試料 12 点の分析値は、分析試料中濃度 (%) で表し、5 桁目を四捨五入して有効桁数 4 桁まで報告させることとした。

2.2.6 分析実施期間

令和元年 12 月 23 日から令和 2 年 1 月 31 日まで

2.2.7 解析方法

結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{6), 7)}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⁸⁾を用いて HorRat を求めた。

2.2.8 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、日清丸紅飼料株式会社総合研究所検査グループ、一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、一般財団法人日本食品分析センター大阪支所、日本農産工業株式会社品質保証部品質管理グループ、フィード・ワン株式会社研究所、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 12 試験室）

3 結果及び考察

3.1 追加検討

全脂粉乳及び全脂粉乳を含む配合飼料について、鈴木らが行った酸分解法及び RG 法による測定値を比較した結果は、酸分解法が RG 法よりも高い測定値を示し、測定値に有意な差が認められた⁴⁾。この原因として、酸分解法では分解物が水とともにエーテル層に混入しているためと考えられたことから、安田らは酸分解法のエーテル層を洗浄する水の量を 2.1.3 の 2) に示した酸分解改良法のとおり変更し、RG 法との比較検討を行った。その結果、測定値に有意な差は認められなかった⁵⁾。

安田らが検討に用いた配合飼料はいずれも全脂粉乳を主原料とし、粗脂肪を約 20 % 含む配合飼料であったが、今回、全脂粉乳の配合割合が異なる、粗脂肪を約 10 % から 30 % 含む 3 種類の

配合飼料を用いて、酸分解改良法と RG 法との比較検討を行った。

その結果は Table 3 のとおり、RG 法及び酸分解改良法による測定値について *t*-検定を行った結果はそれぞれ $p = 0.319$, 0.429 及び 0.122 であり、有意水準 5 % で二方法間の測定値に有意な差は認められなかった。

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

Table 3 Content of crude fat measured by Rose-Gottlieb method and acid hydrolysis-ether extraction method (modified method) and *t*-test results

Sample types	Rose-Gottlieb method		Acid hydrolysis method (modified method)		Ratio of the measured value (acid hydrolysis method (modified method) /Rose-Gottlieb method)	<i>p</i> value	Significant difference
	Crude fat ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Crude fat ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)			
Formula feed for suckling pigs	10.02	0.51	10.07	0.88	1.005	0.319	No
Formula feed for milk replacer for suckling calves 1	30.69	0.03	30.75	0.30	1.002	0.429	No
Formula feed for milk replacer for suckling calves and suckling pigs	18.14	0.34	18.07	0.19	0.996	0.122	No

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.2 共同試験

酸分解改良法の室間再現精度を確認するため、2.2 により共同試験を実施した。

結果は Table 4-1及び4-2のとおりであった。全脂粉乳1, 全脂粉乳2, ほ乳期子豚育成用配合飼料, ほ乳期子牛育成用代用乳用 1, ほ乳期子牛育成用代用乳用 2及びほ乳期子牛育成用代用乳用・ほ乳期子豚育成用配合飼料について、それぞれ RSD_rは2.0, 0.73, 0.94, 1.1, 1.2及び1.7%, RSD_Rは3.8, 1.2, 4.1, 3.1, 2.7及び3.0%, HorRat は2.0, 0.62, 1.5, 1.7, 1.2及び1.3であり、AOACの共同試験に関するガイドライン⁷⁾に定められた室間再現精度の目標値 ($0.5 < \text{HorRat} \leq 2$) を満たしていた。HorRat については、1.5を超えるものが散見されたが、安定した測定値を得るにはある程度試験に慣れる必要があり、多くの試験室が本法を実施した経験がないことが原因として考えられた。

Table 4-1 Collaborative study for crude fat (1)

Lab. No.	Dried whole milk 1		Dried whole milk 2		Formula feed for suckling pigs	
	(%)		(%)		(%)	
1	27.05	26.64	25.82	25.87	10.12 ^{a)}	10.67 ^{a)}
2	26.84	26.86	25.70	25.74	10.19	10.28
3	26.77	26.92	26.15	26.31	10.00	10.13
4	25.32 ^{c)}	25.49 ^{c)}	25.23	24.99	11.03	11.21
5	27.18	26.33	26.02	25.66	10.21	10.41
6	24.39 ^{d)}	25.64 ^{d)}	23.59 ^{b)}	24.37 ^{b)}	9.835	9.765
7	27.08	26.97	25.91	25.77	9.930	9.932
8	26.76	26.92	25.74	25.95	10.52	10.28
9	26.86	26.78	25.59	25.42	10.40	10.23
10	26.98	26.96	25.59	25.51	10.00	9.905
11	25.13 ^{d)}	23.24 ^{d)}	25.74	25.44	10.36	10.29
12	27.09	26.60	26.14	25.53	9.520	9.522
No. labs ^{e)}	12		11		11	
No. outliers ^{f)}	0		1		1	
Mean value (%)	26.37		25.72		10.18	
RSD _r ^{g)} (%)	2.0		0.73		0.94	
RSD _R ^{h)} (%)	3.8		1.2		4.1	
PRSD _R ⁱ⁾ (%)	1.9		2.0		2.8	
HorRat	2.0		0.62		1.5	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Not excluded by single Grubbs test, as more than 2/9 of the laboratories flagged for removal.

d) Not excluded by paired Grubbs test, as more than 2/9 of the laboratories flagged for removal.

e) Number of laboratories retained after eliminating outliers

f) Number of outlier laboratories removed in parentheses

g) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

h) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 4-2 Collaborative study for crude fat (2)

Lab. No.	Formula feed for milk replacer for suckling calves 1		Formula feed for milk replacer for suckling calves 2		Formula feed for milk replacer for suckling calves and suckling pigs	
	(%)		(%)		(%)	
1	30.69	31.00	19.63	20.41	18.11	18.05
2	30.47	30.33	19.90	19.95	18.02	17.91
3	32.58	32.93	19.40	19.35	20.99 ^{a)}	21.78 ^{a)}
4	31.17	32.03	20.03	19.90	17.49	16.90
5	30.86	30.53	19.54	19.78	18.27	18.42
6	29.71	29.10	18.67	18.55	17.30	17.37
7	30.04	30.33	19.38	19.89	18.45	18.15
8	30.73	30.45	20.72	20.16	18.32	17.53
9	30.06	30.02	20.01	19.97	17.56	17.63
10	30.55	30.57	20.07	19.92	18.16	18.13
11	29.33	29.89	18.82	18.93	16.61	17.56
12	30.43	29.43	19.66	19.72	18.65	18.42
No. labs ^{b)}	12		12		11	
No. outliers ^{c)}	0		0		1	
Mean value (%)	30.55		19.68		17.86	
RSD _r ^{d)} (%)	1.1		1.2		1.7	
RSD _R ^{e)} (%)	3.1		2.7		3.0	
PRSD _R ^{f)} (%)	1.8		2.3		2.4	
HorRat	1.7		1.2		1.3	

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

4 まとめ

全脂粉乳を原料とする配合飼料を用いた RG 法及び酸分解改良法の比較検討を追加で実施するとともに、酸分解改良法の共同試験を実施し、飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) RG 法及び酸分解改良法による測定値について t -検定を行った結果、測定値に有意な差は認められなかった。
- 2) 全脂粉乳及び全脂粉乳を原料とする配合飼料を用いて 12 試験室において酸分解改良法の共同試験を実施したところ、AOAC の共同試験に関する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，日清丸紅飼料株式会社総合研究所検査グループ，一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，一般財団法人日本食品分析センター大阪支所，日本農産工業株式会社品質保証部品質管理グループ及びフィード・ワン株式会社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) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 2) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Edition, AOAC official method 932.02 fat (crude) or ether extract in dried milk products. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 3) 厚生省令：乳及び乳製品の成分規格等に関する省令，昭和 26 年 12 月 27 日，厚生省令第 52 号 (1951).
- 4) 鈴木 知華，安田 紗紀恵：全脂粉乳及びこれを原料とする配合飼料中の粗脂肪の測定法の開発，飼料研究報告，**43**，17-21 (2018).
- 5) 安田 紗紀恵，鈴木 知華，沼田 歩美：全脂粉乳及びこれを原料とする配合飼料中の粗脂肪の測定法の開発，飼料研究報告，**44**，49-56 (2019).
- 6) Willian Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies, Pure & Appl. Chem., **67**(2), 331-343 (1995).
- 7) 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).
- 8) 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).

8 含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の妥当性確認

～*N*-アセチルグリホサートの穀類、稲わら及び稲発酵粗飼料への適用～

齊木 雅一^{*1}, 宮野谷 杏^{*2}

Validation Study of Simultaneous Determination Method of Phosphorus-Containing Amino Acid-Based Pesticides in Feed by LC-MS/MS

～Application of *N*-acetylglyphosate to Grains, Rice straw and Whole-Crop Rice Silage～

Masakazu SAIKI^{*1} and Kyo MIYANOYA^{*2}

(^{*1} Sapporo Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center,

^{*2} Sapporo Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center

(Now Nagoya Regional Center))

We have made a validation study on the inclusion of grains, rice straw and whole-crop rice silage (WCRS) in the analytes of *N*-acetylglyphosate for the simultaneous determination method of phosphorus-containing amino acid-based pesticides contained in feed. The method, which uses a liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS), has been listed in the Feed Analysis Standard of Japan.

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

Recovery tests were conducted on oat, barley, rice straw and WCRS. *N*-acetylglyphosate was intentionally added at the following levels: 0.04 and 20 mg/kg for oat and barley; 0.04 and 0.2 mg/kg for rice straw; and 0.02, 0.04 and 0.2 mg/kg for WCRS in original matter respectively. The resulting mean recoveries ranged from 101 % to 114 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 14 %.

This method was thus validated as useful for inspections of *N*-acetylglyphosate in grains, rice straw and WCRS.

Key words: glyphosate; *N*-acetylglyphosate; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); grains; oat; barley; rice straw; whole-crop rice silage

キーワード：グリホサート；*N*-アセチルグリホサート；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；穀類；えん麦；大麦；稲わら；稲発酵粗飼料

^{*1} 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

^{*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，現 名古屋センター

1 緒 言

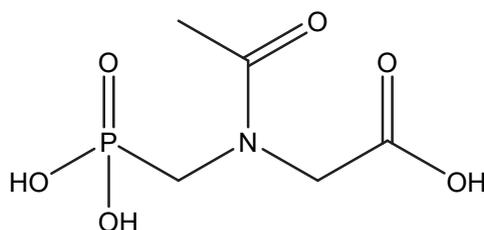
グリホサート（以下「GLYP」という．）は Monsanto Company（米国）が開発した非選択性茎葉処理型のアミノ酸系除草剤であり，たん白質合成に必須の芳香族アミノ酸の合成を阻害することにより殺草活性を示す．GLYP 耐性遺伝子組換え植物中では *N*-アセチルグリホサートに代謝されることが知られている¹⁾．

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

GLYP の国内における飼料中の残留基準値³⁾は，大麦，えん麦及びマイロで 20 mg/kg，小麦で 5 mg/kg，とうもろこしで 1 mg/kg，ライ麦で 0.2 mg/kg 並びに牧草で 120 mg/kg と定められている．また，農林水産省局長通知による飼料の有害物質の管理基準値⁴⁾は，稲わら及び稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という．）で 0.2 mg/kg と定められている．現在は GLYP のみが対象となっているが，基準値の見直しに当たり，*N*-アセチルグリホサートも対象に含めるよう検討されている．

そこで筆者らは，飼料分析基準⁵⁾に記載されている含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法について，とうもろこし中の *N*-アセチルグリホサートの妥当性の確認を行い，報告したところである⁶⁾．今回，とうもろこし以外の穀類，稲わら及び WCRS 中の *N*-アセチルグリホサートの妥当性の確認を行ったのでその概要を報告する．

参考に *N*-アセチルグリホシネートの構造式等を Fig. 1 に示した．



N-acetylglyphosate

2-[acetyl(phosphonomethyl)amino]acetic acid

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

Fig. 1 Chemical structures of *N*-acetylglyphosate

2 実験方法

2.1 試 料

えん麦，大麦，小麦，マイロ及び稲わらはそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した．WCRS は 60 °C で 10 時間乾燥後，更に室内に静置して風乾した後，同様に粉砕した．

2.2 試 薬

1) メタノール，アセトン及び酢酸エチルは残留農薬・PCB 試験用を用いた．オルト酢酸トリメチルは東京化成工業製（純度 98.0 % 以上）を用いた．酢酸は試薬特級を用いた．アセトニトリルは LC-MS 用（関東化学製）を用いた．ギ酸は LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）を用いた．水は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた．

2) GLYP 標準原液

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

3) *N*-アセチルグリホサート標準原液

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

4) 検量線作成用標準原液

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

5) 0.01 v/v% ギ酸溶液

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

2.3 装置及び器具

1) 粉碎機：

粉碎機 1（えん麦，大麦，小麦及びマイロ用）：

ZM 200 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数 14000 rpm）

粉碎機 2（稲わら及び WCRS 用）：

SM 100 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数（仕様）1430 rpm）

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

3) ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis HLB カートリッジ（充てん剤量 500 mg）にリザーバー（容量 6 mL）を連結したもの Waters 製4) スルホン酸修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis Plus MCX カートリッジ（充てん剤量 225 mg） Waters 製5) アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：Sep-Pak Plus NH₂ カートリッジ（充てん剤量 360 mg）Waters 製にリザーバー（容量 10 mL）を連結したもの

6) シリカゲルミニカラム：Sep-Pak Plus Silica カートリッジ（充てん剤量 690 mg） Waters 製

7) LC-MS/MS：

LC 部：ACQUITY UPLC Waters 製

MS 部：Quattro Premier XE Waters 製

2.4 定量方法

1) 抽出

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

2) カラム処理 I

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（500 mg）の下にスルホン酸修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（225 mg）を連結し，メタノー

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

3) 誘導体化

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

4) カラム処理 II

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) の下にシリカゲルミニカラム (690 mg) を連結し、酢酸エチル 10 mL で洗浄した（吸引マニホールドを使用し、流速 2~3 mL/min とした。以下同じ。）。試料溶液 2 mL をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。更に、酢酸エチル 18 mL をミニカラムに加え、同様に流出させた。

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

5) 標準液の誘導体化

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

6) LC-MS/MS による測定

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

Table 1 Operation conditions of LC-MS/MS

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

Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)		
Glyphosate (GLYP) derivative ^{a)}	254	102	-	22	17
		-	152	22	17

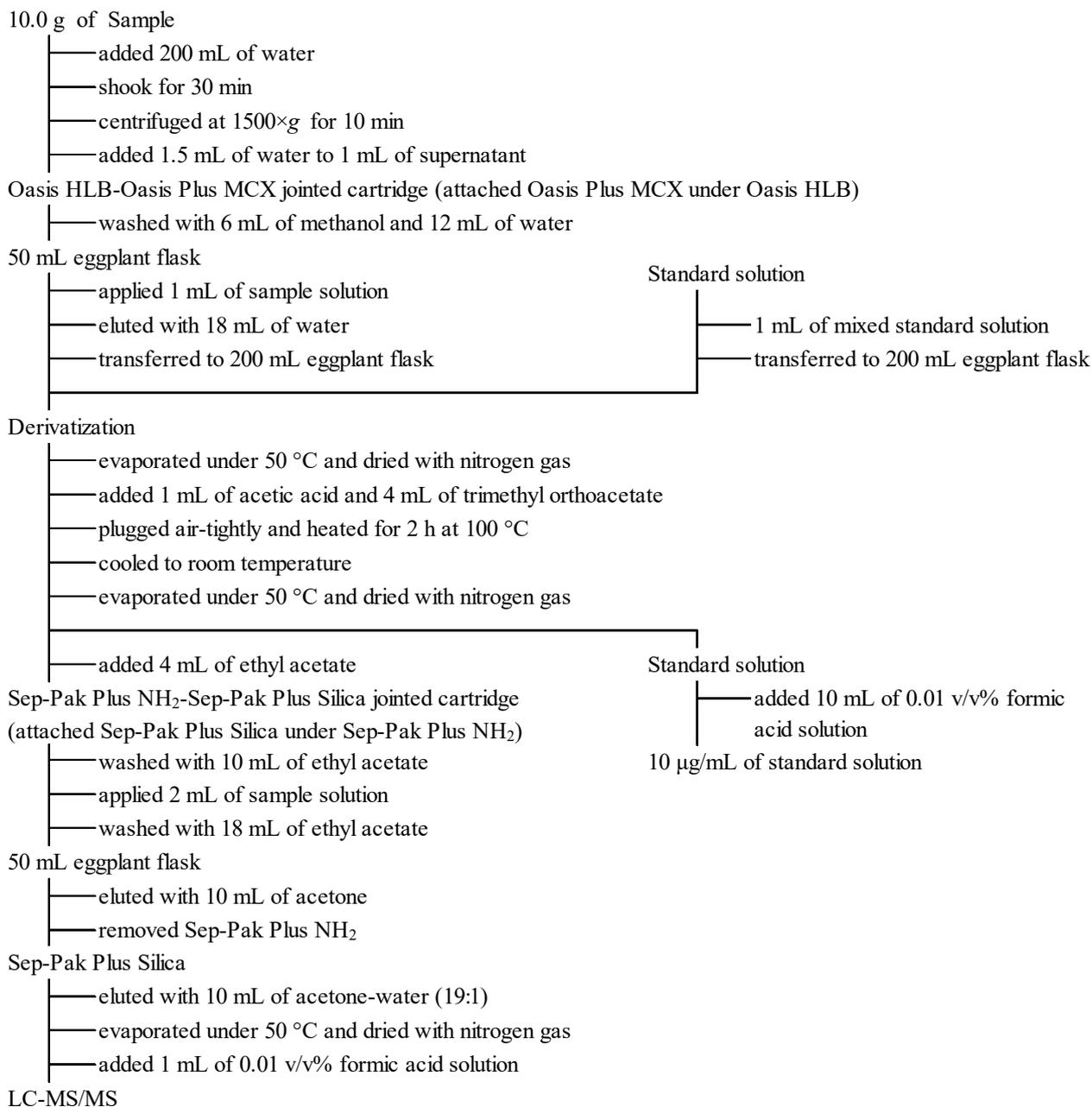
a) Derivative of GLYP and *N*-acetylglyphosate

7) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の GLYP 量 (*N*-アセチルグリホサート由来を含む) を算出した。

また、2.4 の 3) の誘導体化により GLYP 及び *N*-アセチルグリホサートは GLYP 誘導体になることから、添加回収試験を行った際の回収率 (%) の計算は、検量線から求めた GLYP の濃度 (mg/kg) を *N*-アセチルグリホサートの濃度 (mg/kg) に換算し、添加した *N*-アセチルグリホサートの濃度 (mg/kg) で除してその割合を求めることにより行った。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Scheme 1 Analytical procedure for *N*-acetylglyphosate

2.5 添加回収試験

2.2 の 3) の *N*-アセチルグリホサート標準原液を水で正確に希釈し添加に用いた。

えん麦及び大麦に *N*-アセチルグリホサートとして 0.04 及び 20 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で GLYP として 0.32 及び 160 ng/mL 相当量），稲わらに *N*-アセチルグリホサートとして 0.04 及び 0.2 mg/kg 相当量（同 GLYP として 0.32 及び 1.6 ng/mL 相当量）並びに WCRS に原物換算して *N*-アセチルグリホサートとして 0.02, 0.04 及び 0.2 mg/kg 相当量（同 GLYP として 0.36, 0.72 及び 3.6 ng/mL 相当量）になるようにそれぞれ添加後よく混合し，一夜静置した後に本法に従って添加回収試験を実施し，平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお，WCRS において，添加は風乾物試料に対して *N*-アセチルグリホサートとして 0.045, 0.09 及び 0.45 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。

3 結果及び考察

3.1 妨害物質の検討

えん麦 1 検体、大麦 6 検体、小麦 3 検体、マイロ 3 検体、稲わら 1 検体及び WCRS1 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、大麦 4 検体、小麦 2 検体及びマイロ 3 検体について GLYP 誘導体と同じ保持時間にピークが確認されたが、定量イオンだけでなく確認イオンでも定量を行ったところ、定量値が両者でほぼ一致したことから残留 GLYP 又は *N*-アセチルグリホサートに由来するピークと判断され、いずれの試料においても *N*-アセチルグリホサートの定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig.2 に示した。

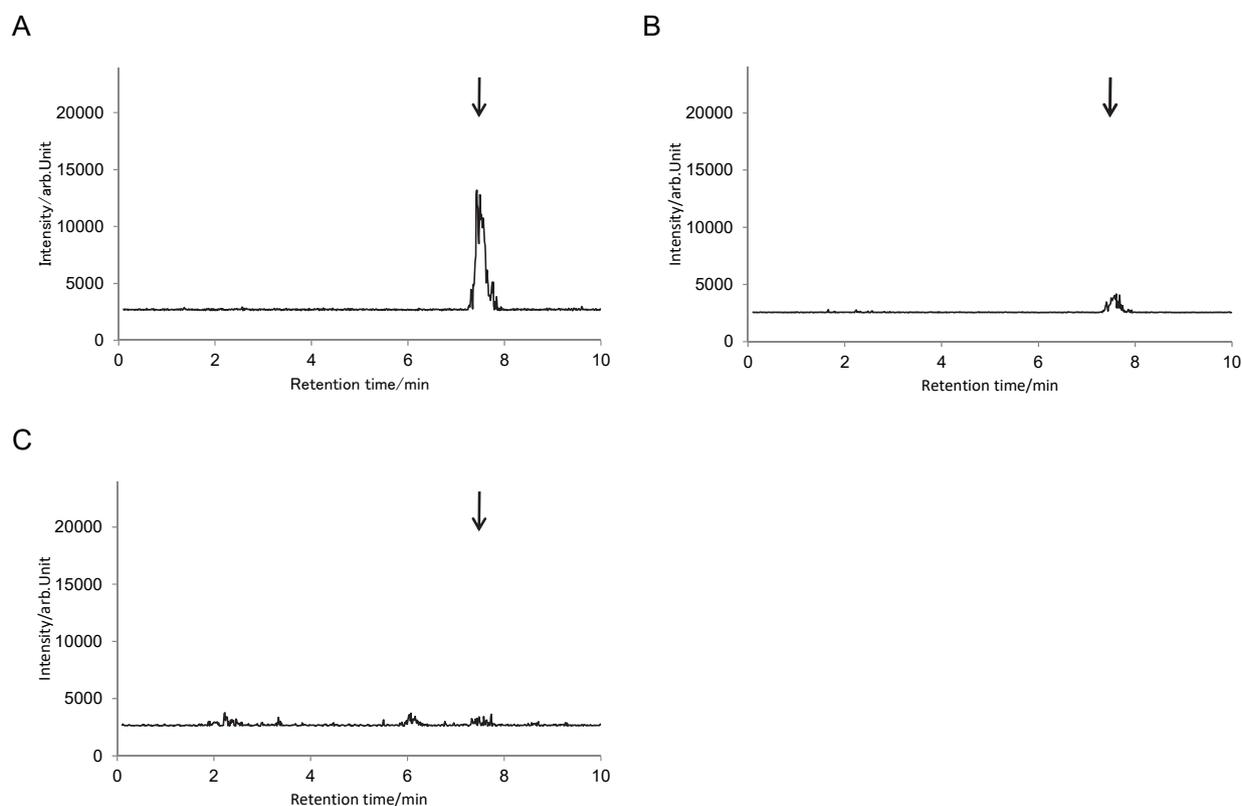


Fig.2 Typical Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of GLYP derivative in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrow indicates the retention time of GLYP derivative.)

A: Standard solution (0.5 ng/mL GLYP: 0.005 ng as GLYP)

B: Sample solution of oat (blank)

C: Sample solution of WCRS (blank)

3.2 添加回収試験

2.5により添加回収試験を実施した。その結果はTable 3のとおり、*N*-アセチルグリホサートについて、えん麦では平均回収率は104~107%，その繰返し精度は相対標準偏差（ RSD_r ）として11%以下、大麦では平均回収率は101~111%， RSD_r は5.3%以下、稲わらでは平均回収率は104~114%， RSD_r は10%以下、WCRSでは平均回収率は101~107%， RSD_r は14%以下の成績が得られ、飼料分析基準別表3の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた真度及び併行精度の目標値（真度：70%以上120%以下，精度：0.02及び0.04 mg/kgでは22%以下，0.2 mg/kgでは20%以下，20 mg/kgでは10%以下）を満たす良好な結果であった。

なお，得られたSRMクロマトグラムの一例をFig. 3に示した。

Table 3 Recoveries for *N*-acetylglyphosate

Spiked level (mg/kg as fed basis)	Oat		Barley		Rice straw		WCRS ^{a)}	
	recovery ^{b)} (%)	RSD_r ^{c)} (%)						
0.02	-	-	-	-	-	-	105	10
0.04	104	11	101	4.7	104	10	101	14
0.2	-	-	-	-	114	5.0	107	9.3
20	107	6.1	111	5.3	-	-	-	-

—: Not tested

a) *N*-acetylglyphosate was spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.045, 0.09 and 0.45 mg/kg as air-dry basis for *N*-acetylglyphosate. The levels of *N*-acetylglyphosate as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60% as fed basis and 10% as air-dry basis.

The levels of *N*-acetylglyphosate as fed basis (moisture 60%)

= the levels of *N*-acetylglyphosate as air-dry basis (moisture 10%) / 2.25

b) Mean ($n = 5$)

c) Relative standard deviation of repeatability

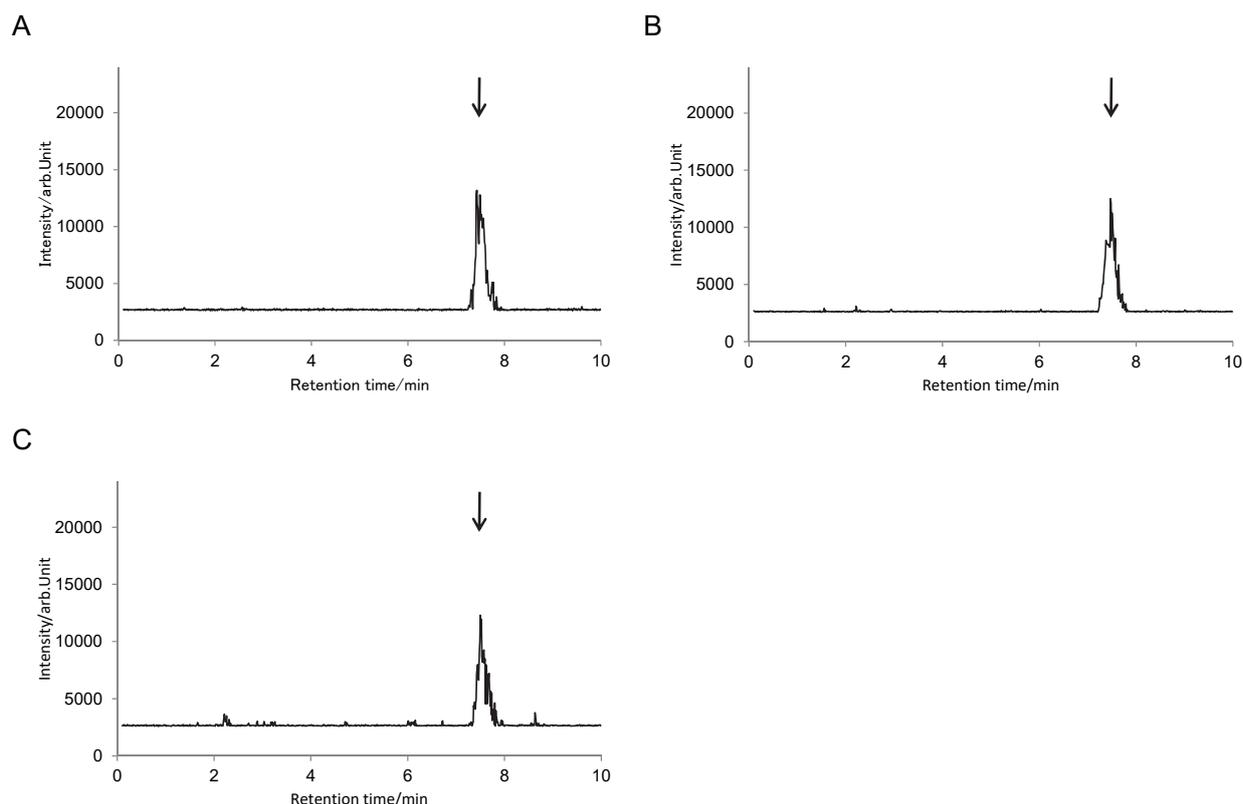


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of GLYP derivative in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrow indicates the retention time of GLYP derivative.)

A: Standard solution (0.5 ng/mL GLYP: 0.005 ng as GLYP)

B: Sample solution of oat (spiked at 0.04 mg/kg of *N*-acetylglufosinate (as 0.32 ng/mL as GLYP in sample solution).

C: Sample solution of WCRS (spiked at 0.04 mg/kg of *N*-acetylglufosinate (as 0.32 ng/mL as GLYP in sample solution).

3.3 定量下限及び検出下限

GLYP 誘導体の検量線が直線性を示した範囲、GLYP として 0.3~300 ng/mL の下端付近となる濃度（えん麦、大麦、稲わら及び WCRS 風乾物に *N*-アセチルグリホサートとして 0.04 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で GLYP として 0.32 ng/mL 相当量）の添加回収試験の結果、得られたピークの *SN* 比が 10 以上であったため、*N*-アセチルグリホサートの定量下限はえん麦、大麦、稲わら及び WCRS 風乾物で 0.04 mg/kg とした。この濃度は、えん麦及び大麦中の GLYP の基準値 20 mg/kg (*N*-アセチルグリホサートとして 25 mg/kg) に対して 1/625、稲わら中の GLYP の管理基準値 0.2 mg/kg (*N*-アセチルグリホサートとして 0.25 mg/kg) に対して 1/6、WCRS 中の GLYP の管理基準値の風乾物中換算値 0.45 mg/kg (*N*-アセチルグリホサートとして 0.56 mg/kg) に対して 1/14 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の目標値（1/5 以下）を満たしていた。なお、Table 3 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。

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験により得られたピークの *SN* 比が 3 となる濃度

を求めた。その結果、検出下限はえん麦、大麦、稲わら及び WCRS 風乾物で *N*-アセチルグリホサートとして 0.01 mg/kg であり、同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (1/10 以下) を満たしていた。

4 まとめ

穀類、稲わら及び WCRS に残留する *N*-アセチルグリホサートについて、飼料分析基準に記載されている分析法の妥当性を確認したところ、以下の結果が得られ、従来の方法がそのまま適用可能であると考えられた。

- 1) 穀類、稲わら及び WCRS について、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 2) えん麦及び大麦に 0.04 及び 20 mg/kg 相当量、稲わらに 0.04 及び 0.2 mg/kg 相当量、WCRS に原物換算して 0.02, 0.04 及び 0.2 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 3) 本法の *N*-アセチルグリホサートの定量下限は試料中で 0.04 mg/kg、検出下限は 0.01 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。

文 献

- 1) 食品安全委員会：グリホサート農薬評価書，平成 28 年 7 月 (2016).
- 2) 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律，昭和 28 年 4 月 11 日，法律第 35 号 (1953).
- 3) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 4) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 5) 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) 齊木雅一，廣井利明：含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の妥当性確認～*N*-アセチルグリホサートの追加並びに大豆及び大豆油かすへの適用拡大～，飼料研究報告，44，136-150 (2019).

9 愛玩動物用飼料中のサルモネラ検査法の適用範囲を成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）に拡大するための妥当性確認

高橋 亜紀子^{*1}, 橋本 仁康^{*1}, 渡辺 ちとせ^{*2}, 増井 亮太^{*1}

Validation Study on Application of *Salmonella* Detection Method for Pet Food to Formed Jerky and Dried Jerky (Hard Type and Soft Type)

Akiko TAKAHASHI^{*1}, Yoshiyasu HASHIMOTO^{*1}, Chitose WATANABE^{*2} and Ryota MASUI^{*1}

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

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

We have made a validation study on the applicability of an existing *Salmonella* detection method for pet food to jerky type pet food.

For this purpose, we first tried the use of sterilized scissors or similar tools for cutting jerky type pet food, and weighing out samples of 25 g each. It was, however, not possible to aseptically cut out all samples of dried jerky (hard type) using scissors or others.

On the other hand, *Salmonella* spike test was performed by adding 1 mL of *Salmonella* bacteria solution (100, 10, 1 CFU/mL) to 25 g of formed jerky and dried jerky (hard type and soft type). As a result, in the tests in which *Salmonella* bacterium solutions of 100 CFU/mL and 10 CFU/mL were added, *Salmonella* was detected from all samples. In contrast, in the tests in which 1 CFU/mL of *Salmonella* was added, *Salmonella* was not detected in 6 of 25 samples. The detection sensitivity was about 10 CFU in 25 g of formed jerky and dried jerky (hard type and soft type), which was equivalent to that of dry food, semi-dry food and wet food.

Detection method of salmonella in pet food was thus validated as useful for formed jerky and dried jerky (hard type and soft type), except for some dried jerky (hard type) that cannot be cut out aseptically.

As for three samples of dry jerky (hard type) that cannot be cut out aseptically, pieces of about 25 g each of them were put into a sterilized stomacher bag individually, and buffered peptone water and the surfactant solution were added, and subsequently pre-enrichment culture without stomacher processing was conducted. As a result of the *Salmonella* spike test of the dried jerky (hard type) that cannot be cut out aseptically, 10 CFU of *Salmonella* was successfully detected on a 25 g sample surface.

Key words: *Salmonella*; pet food; formed jerky; dried jerky; validation study

キーワード：サルモネラ；愛玩動物用飼料；成型ジャーキー；素材乾燥ジャーキー；妥当性確認

1 緒 言

サルモネラは、家畜、家きん及びペット等の腸管内をはじめ、河川や下水等自然界に広く分布し

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

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

ている細菌であり，その一部は病原性の高さから家畜衛生や公衆衛生上の大きな問題となっている．平成30年9月に第161回日本獣医学会学術集会において，国内で流通する一部の犬用ジャーキー製品からサルモネラが検出されたとの発表¹⁾があり，これを受けて農林水産省において市販のジャーキー製品（成型ジャーキー，素材乾燥ジャーキー）のサルモネラ汚染の実態調査を実施し，その結果，100製品中，素材乾燥ジャーキー4製品からサルモネラが確認された²⁾．

ペットフードを対象としたサルモネラの検査法は，愛玩動物用飼料等の検査法³⁾にドライ製品，セミドライ製品及びウェット製品を適用範囲とする方法（以下「ドライ製品等検査法」という．）が収載されているが，サルモネラの汚染事例が認められたジャーキー製品は対象となっていなかったため，ジャーキー製品を対象とするサルモネラの検査法の確立が必要となっていた．そこで今回，ドライ製品等検査法をジャーキー製品へ適用拡大するための妥当性確認を行ったので，その概要について報告する．

2 実験方法

2.1 試料

市販の愛玩動物用飼料（成型ジャーキー9 検体，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ 10 検体及びソフトタイプ 9 検体））を用いた．

なお，検討に用いた愛玩動物用飼料を Table 1-1 及び 1-2 に示した．

Table 1-1 List of pet foods (formed jerky) used in this study

Pet food types	Ingredients
Formed jerky for dogs 1	Meats (chicken, beef), wheat flour, wheat protein, D-sorbitol, glyceline, flavour, salt, seasoning, phosphates (Na, K), preservative (sorbic acid), antioxidants (sorbic acid, extracted V. E, V. C, Na), color former (sodium nitrite)
Formed jerky for dogs 2	Beef tongue, beef cattle, wheat flour, soybean protein, sugar, salt, starch, sorbitol, propylene glycol, sodium polyphosphate, coloring (food red no.102, food yellow no.5, food red no.106, food blue no.1)
Formed jerky for dogs 3	White fish, meat (chicken), gelatin, defatted soybean, pork collagen, modified starch, D-sorbitol, glyceline, propylene glycol, baking powder, phosphates (Na, K), salt, seasoning, oligosaccharide, preservative (sorbic acid), antioxidant (extracted V. E)
Formed jerky for dogs 4	Meats (chicken, pork), gelatin, defatted soybean, yeast, pork collagen, modified starch, D-sorbitol, glyceline, propylene glycol, baking powder, phosphates (Na,K), salt, seasoning, flavour, oligosaccharide, antioxidants (V. C Na, extracted V. E), preservative (sorbic acid), color former (sodium nitrite), coloring (food red no.106)
Formed jerky for dogs 5	Meats (chicken, mutton, lamb), gelatin, defatted soybean, yeast, pork collagen, modified starch, D-sorbitol, glyceline, propylene glycol, baking powder, phosphates (Na, K), salt, seasoning, flavour, oligosaccharide, antioxidants (V. C Na, extracted V. E), preservative (sorbic acid), color former (sodium nitrite), coloring (food red no.106)
Formed jerky for dogs 6	Grain, meats (chicken, cartilage etc.), vegetables (carrot, pumpkin, etc.), thickening stabilizer (glyceline), flavour, preservative (potassium sorbate), coloring (food red no.40, food yellow no.4)
Formed jerky for dogs 7	Meats (beef, gelatin), soybean protein, bread crumb, wheat flour, saccharides, vegetable oil, glyceline, sorbitol, propylene glycol, mineral (Na), preservatives (sorbic acid, sodium dehydroacetate), smoked liquid, sodium polyphosphate, color former (sodium nitrite), antioxidant (V. E), coloring (food red no.106)
Formed jerky for cats 1	Meats (chicken, beef), soybean protein, wheat flour, fish meat, beef tallow, actinidia polygama, glyceline, thickening stabilizer (modified starch), sorbitol, minerals (Ca, P, Na), preservatives (sorbic acid, sodium dehydroacetate), seasoning, color former (sodium nitrite), sodium polyacrylate, coloring (caramel, food red no.106), V. E
Formed jerky for cats 2	Meats (chicken, beef), soybean protein, saccharides, wheat flour, fish meat, oils and fats, chicken extract, glyceline, sorbitol, thickening stabilizer (modified starch, sodium polyacrylate), dietary fibers (cellulose, CMC-Na), minerals (Ca, Na), seasoning, preservatives (sorbic acid, sodium dehydroacetate), sodium polyphosphate, color former (sodium nitrite), coloring (caramel, food red no.106), V. E

Table 1-2 List of pet foods (dried jerky) used in this study

Pet food types	Ingredients
Dried jerky for dogs (hard type) 1	Ribs of calf, soybean protein, glyceline, propylene glycol, sorbitol, mineral (Na), color former (sodium nitrite), antioxidants (V. C, sodium erythorbate), phosphate (Na), preservative (potassium sorbate), V. E
Dried jerky for dogs (hard type) 2	Chicken breast meat, propylene glycol, glyceline, salt, sodium dehydroacetate, preservative (potassium sorbate), antioxidant (sodium erythorbate), color former (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs (hard type) 3	Chicken breast meat, starch, plant protein, glyceline, sorbitol, calcium carbonate, phosphate, minerals (Na, Cl), color former (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs (hard type) 4	Chicken breast meat, starches, soybean meal, albumen powder, pork collagen, trehalose, glyceline, minerals (Na, Ca), phosphate (Na)
Dried jerky for dogs (hard type) 5	Cervus hortulorum meat, D-sorbitol, glyceline, phosphate (Na), preservative (potassium sorbate), color former (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs (hard type) 6	Turkey muscle, salt, glyceline, phosphate (Na), antioxidant (V. C), color former (sodium nitrite), seasoning (amino acid)
Dried jerky for dogs (hard type) 7	Pork ears
Dried jerky for dogs (hard type) 8	Beef muscle
Dried jerky for dogs and cats (hard type) 1	Cod, preservative (sodium dehydroacetate)
Dried jerky for dogs and cats (hard type) 2	Cod, preservative (sodium dehydroacetate)
Dried jerky for dogs (soft type) 1	Chicken breast meat, salt, sorbitol, glyceline, sodium lactate, propylene glycol, antioxidant (sodium erythorbate), preservative (potassium sorbate), color former (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs (soft type) 2	Chicken gizzard, salt, sorbitol, glyceline, propylene glycol, color former (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs (soft type) 3	Cartilage containing veal, soybean protein, glyceline, sorbitol, mineral (Na), antioxidants (sodium erythorbate, V. C, V. E), phosphate (Na), preservative (potassium sorbate), color former (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs (soft type) 4	Chicken cartilage containing collagen, beef extract, salt, vegetable glyceline, propylene glycol, preservative (potassium sorbate), antioxidant (V. C), color former (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs (soft type) 5	Chicken breast meat, glyceline, propylene glycol, sodium hexametaphosphate, salt, preservative (potassium sorbate), sodium polyphosphate, antioxidant (sodium erythorbate), color former (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs (soft type) 6	Chicken breast meat, salt, propylene glycol, glyceline, sorbitol, color former (sodium nitrite)
Dried jerky for cats (soft type)	Chicken breast meat, skipjack extract, scallop extract, glyceline, sodium lactate, pH adjuster, phosphates (Na, K), taurine, flavour, antioxidant (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs (soft type, two types materials) 1	Chicken breast meat, Sheet of cod, propylene glycol, trehalose, sodium lactate, vegetable oil, phosphates (Na, K), salt, preservative (sorbic acid)
Dried jerky for dogs (soft type, two types materials) 2	Chicken breast meat, sweet potato, soybean meal, corn starch, trehalose, glyceline, propylene glycol, phosphates (K, Na), salt, preservatives (potassium sorbate, sodium dehydroacetate), antioxidant (sodium erythorbate), color former (sodium nitrite)

2.2 試薬

- 1) 界面活性剤溶液, ヨウ素・ヨウ化カリウム溶液, 生理食塩液及び緩衝ペプトン水は, ドライ製品等検査法に記載のとおり調製した. 水は AQUARIUS RFD240RA (東洋製作所製) により蒸留した蒸留水 (JIS K 0211 の 5213 に定義された蒸留水) を用い, 必要に応じ, 121 ° C で 15 分間高圧蒸気滅菌し滅菌水として用いた. なお, 調製に用いた試薬は, 等級があるものは特級を用いた.

また, 以下の市販の培地を用いた.

ハーナ・テトラチオン酸塩培地 (ハーナ・テトラチオン酸塩基礎培地 “栄研”, 栄研化学製, 以下「HTT 培地」という.)

ラパポート・バシリアディス培地 (RAPPAPORT-VASSILIADIS (RV) ENRICHMENT BROTH, Oxoid 製, 以下「RV 培地」という.)

DHL 寒天培地 (パールコア DHL 寒天培地 “栄研”, 栄研化学製)

ブリリアントグリーン寒天培地 (Difco Brilliant Green Agar, Becton, Dickinson and Company 製, 以下「BG 寒天培地」という.)

クロモアガーサルモネラ寒天培地 (CHROMagar Salmonella, CHROMagar 製, 以下「CAS 寒天培地」という.)

- 2) ブレインハートインフュージョン寒天培地 (以下「BHI 寒天培地」という.) Brain Heart Infusion Agar (Becton, Dickinson and Company 製) 52 g 又は Brain Heart Infusion (Becton, Dickinson and Company 製) 37 g 及び Bacto Agar (Becton, Dickinson and Company 製) 15 g を水 1000 mL に加え, 121 ° C で 15 分間高圧蒸気滅菌し, これをプラスチック製滅菌シャーレに一様に広がるように 20 mL 分注し, 水平に静置して凝固させた後, 倒置してふたをわずかにずらし, 37 ° C で 1 時間静置して培地表面を乾燥させた.
- 3) ハートインフュージョン液体培地 (以下「HI 液体培地」という.) Heart Infusion Broth (Becton, Dickinson and Company 製) 25 g を水 1000 mL に溶かし, 大試験管に 20 mL ずつ分注した後, 121 ° C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.
- 4) ハートインフュージョン寒天培地 (以下「HI 寒天培地」という.) Heart Infusion Agar (Becton, Dickinson and Company 製) 40 g を水 1000 mL に溶かし, 121 ° C で 15 分間高圧蒸気滅菌し, 菌数測定用培地に用いた.
- 5) リファンピシン原液 リファンピシン (生化学試験用, 富士フイルム和光純薬製) 1 g を 200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ, メタノール 100 mL を加えてかき混ぜて溶かし, 0.20 µm の滅菌済みセルロースアセテートフィルターでろ過し, リファンピシン原液 (10 mg/mL) を調製した. 使用に際して, リファンピシン原液を滅菌水で 10 倍希釈し, リファンピシン添加用溶液 (1 mg/mL) を調製した.
- 6) リファンピシン添加 HI 液体培地 3) の HI 液体培地 20 mL にリファンピシン添加用溶液 (1 mg/mL) を 2 mL 加えた.
- 7) サルモネラ培養液 北里大学から分与されたリファンピシン耐性の *Salmonella enterica* serovar Enteritidis HY-1rif^r 株 (以下「SE」という.) を BHI 寒天培地に画線塗抹し, 倒置して 37 ° C で 18~24 時間培養した. BHI 寒天培地表面の SE の集落 1 個を釣菌し, 生理食塩液 30 µL に希釈した. 希釈菌液の 1 白金耳を BHI 寒天培地に画線塗抹し, 倒置して 37 ° C で 18~24 時間

純粋培養した。純粋培養した BHI 寒天培地表面の SE の集落を 1 白金耳リファンピシン添加 HI 液体培地に加え，37 °C で 20 時間静置して培養し，サルモネラ培養液を調製した。

使用に際し，生理食塩水で 10^{-1} ， 10^{-2} ， 10^{-3} ， 10^{-4} ， 10^{-5} ， 10^{-6} ， 10^{-7} ， 10^{-8} 及び 10^{-9} 希釈菌液を調製した。

- 8) リファンピシン添加 DHL 寒天培地 DHL 寒天培地 63 g を水 1000 mL に加え，110 °C で 10 分間高圧蒸気滅菌して溶かした。これを，あらかじめリファンピシン添加用溶液 (1 mg/mL) 2 mL を分注したプラスチック製滅菌シャーレに一様に広がるように 18 mL 分注してリファンピシン添加用溶液と混合し，水平に静置して凝固させた後，倒置してふたをわずかにずらし，37 °C で 1 時間静置して培地表面を乾燥させ，リファンピシン添加 DHL 寒天培地 (リファンピシン濃度 100 µg/mL) を調製した。
- 9) リファンピシン添加 BG 寒天培地 BG 寒天培地 58 g を水 1000 mL に加え，110 °C で 10 分間高圧蒸気滅菌して溶かした。以下 8) と同様に操作し，リファンピシン添加 BG 寒天培地 (リファンピシン濃度 100 µg/mL) を調製した。
- 10) リファンピシン添加 CAS 寒天培地 CAS 寒天培地 34.9 g を水 1000 mL に加え，沸騰水浴中で加熱して溶かした。以下 8) と同様に操作し，リファンピシン添加 CAS 寒天培地 (リファンピシン濃度 100 µg/mL) を調製した。

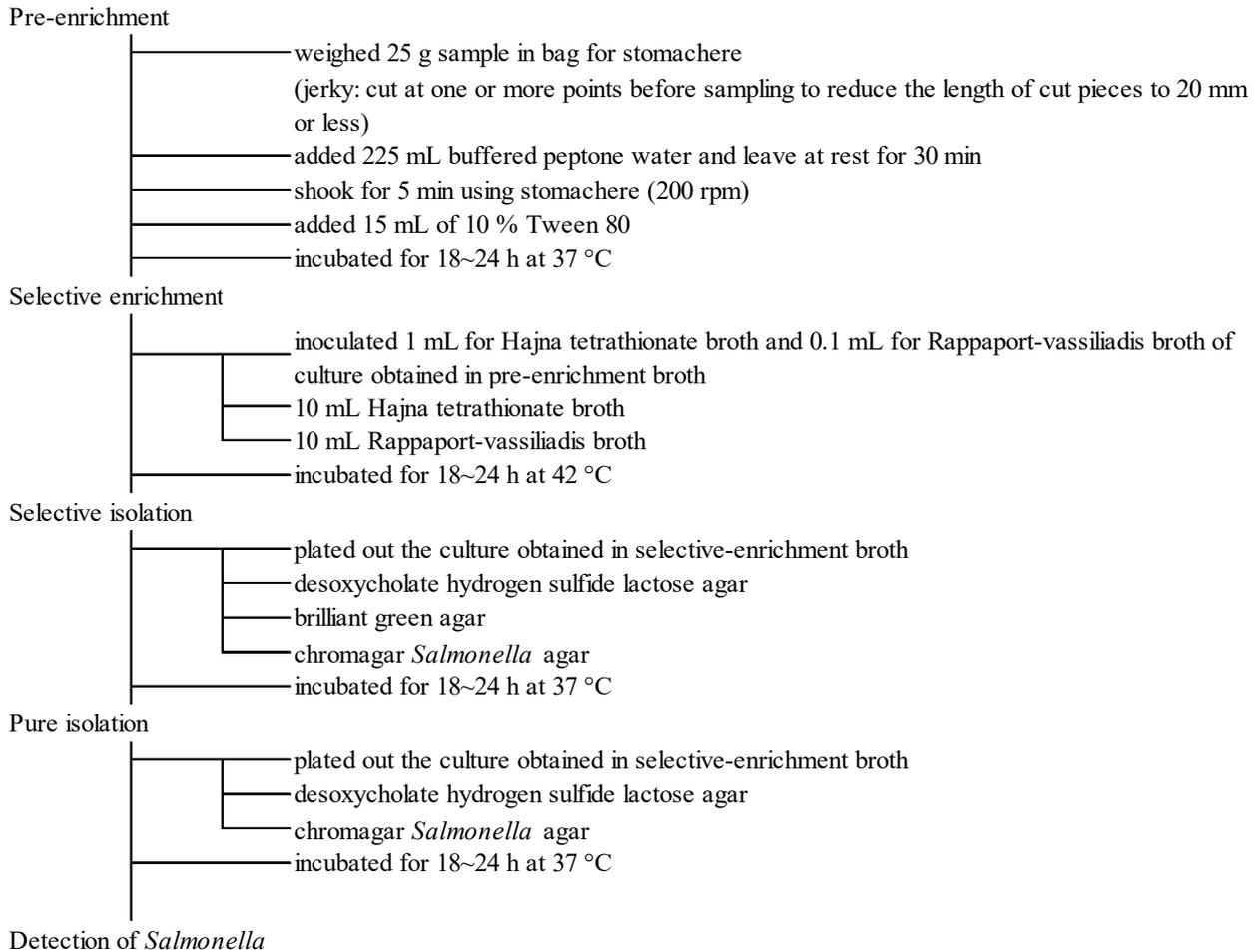
2.3 装置及び器具

- 1) インキュベーター：LTI-1001ED 東京理科器械製，REX-C410 佐竹化学機械工業製，FMU-130I 福島工業製
- 2) ストマッカー：EXNIZER400 オルガノ製
- 3) ストマッカー袋：CWB ワイヤバック 3019 (γ線滅菌済) セントラル科学貿易製
- 4) その他：試験に用いた器具のうち，試料，培地及び菌液に接触するものは，滅菌済みのものを用いた。

2.4 試験方法

ドライ製品等検査法 (愛玩動物用飼料等検査法 第 8 章の 1，令和 2 年 4 月 1 日付け改正前の方法) によった。ただし，切断可能な試料は滅菌済みのはさみを用いて無菌的に 1 カ所以上を切断し，切断片の辺の長さを 20 mm 以下とした後に 25 g を量ってストマッカー袋に入れた。

なお，試験方法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure of Salmonella in pet foods inspection method

2.5 サルモネラ添加試験

成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）を 2.4 の方法で 25 g 量ってストマッカー袋に入れ、サルモネラ培養液の 10^{-7} 希釈菌液、 10^{-8} 希釈菌液及び 10^{-9} 希釈菌液を 1 mL を添加し、ドライ製品等検査法のとおり前増菌培養及び選択増菌培養を行った。各選択増菌培養液をリファンピシン添加 DHL 寒天培地、リファンピシン添加 BG 培地及びリファンピシン添加 CAS 寒天培地に画線塗抹し、倒置して 37°C で 18~24 時間培養し、サルモネラの集落が確認された場合、陽性と判断した。

なお、添加に用いたサルモネラ培養液中の菌数は平板混積培養法⁴⁾により測定した。

3 結果及び考察

3.1 ドライ製品等検査法によるサルモネラ試験

2.1 の試料について 2.4 によりサルモネラ検出試験を行い、同時に前増菌培養段階の試料の状態を観察した。子牛肋骨を原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）1、豚の耳を原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）7 及び牛筋を原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）8 の 3 検体は、滅菌済みののはさみ等により無菌的な切断が行えなかった。これらの試料は、ストマッカー処理によりストマッカー袋の破れやストマッカーの動作不良が生じるため、ストマッカー処理は行わないこととし、25 g 程度となる量をストマッカ

一袋に入れ、緩衝ペプトン水を 225 mL 及び界面活性剤溶液 15 mL を加え、前増菌培養を行った。

ドライ製品等検査法によるサルモネラ検出試験の結果、全ての試料においてサルモネラと疑われる菌の集落は検出されなかった。

ストマッカー処理による試料の崩壊状態を確認した結果、Table 2 のとおり、崩壊が不十分な試料があることが認められた。成型ジャーキーは、ストマッカー処理により全ての試料が完全に崩壊した。切断できた素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）は、ストマッカー処理により完全に崩壊しない試料があったが、切断面及び一部崩壊した部分において緩衝ペプトン水と組織内部が接触し、組織の膨潤が認められた。切断できずストマッカー処理を行わなかった素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）は、前増菌培養後には組織表面は柔らかくなっていたが、緩衝ペプトン水の組織内部までの浸透は確認できなかった。素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）は、ストマッカー処理による崩壊が不十分な試料があったが、切断面及び一部崩壊した部分において緩衝ペプトン水と試料内部が接触し、組織の膨潤が認められた。

以上より、切断可能なジャーキー製品については、ドライ製品等検査法にはさみ等を用いて無菌的に切断する操作を加えることで、試料表面及び内部のサルモネラの検出が可能であると考えられた。

はさみ等を用いて無菌的に切断及びストマッカー処理を行えない牛肋骨、豚の耳及び牛筋等の硬い組織を原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）は、試料内部のサルモネラの検出は難しく、ドライ製品等検査法の適用はできないが、試料表面のサルモネラの検出は可能と考えられた。通常、菌は動物体内においては気道や消化管に存在し、愛玩動物用飼料に用いる筋肉及び骨には生息していないため、愛玩動物用飼料のサルモネラ汚染は、製造、保管及び流通段階における接触汚染の可能性が高いと考えられる。素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）は、ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品及び成型ジャーキーのように原料を混合する工程が無いため、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）の内部のみが微生物汚染している可能性は低いと考えられる。一方、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）の試料表面は、農林水産省のサルモネラ汚染の実態調査においてサルモネラが確認された4製品が鶏ささみ等の素材のみを原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）であった⁵⁾ことから微生物汚染の可能性は高いと考えられる。よって、汚染の可能性の高い素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）表面のサルモネラの汚染確認は、愛玩動物用飼料のサルモネラ汚染実態の把握を効率的に行える手段と考えられる。

Table 2 Collapse of sample by pet foods inspection method

Pet food types	Cutting with scissors	Collapse by stomacher processing
Formed jerky for dogs 1	Possible	○
Formed jerky for dogs 2	Possible	○
Formed jerky for dogs 3	Possible	○
Formed jerky for dogs 4	Possible	○
Formed jerky for dogs 5	Possible	○
Formed jerky for dogs 6	Possible	○
Formed jerky for dogs 7	Possible	○
Formed jerky for cats 1	Possible	○
Formed jerky for cats 2	Possible	○
Dried jerky for dogs (hard type) 1	Impossible	Not processing
Dried jerky for dogs (hard type) 2	Possible	○
Dried jerky for dogs (hard type) 3	Possible	○
Dried jerky for dogs (hard type) 4	Possible	○
Dried jerky for dogs (hard type) 5	Possible	△
Dried jerky for dogs (hard type) 6	Possible	△
Dried jerky for dogs (hard type) 7	Impossible	Not processing
Dried jerky for dogs (hard type) 8	Impossible	Not processing
Dried jerky for dogs and cats (hard type) 1	Possible	○
Dried jerky for dogs and cats (hard type) 2	Possible	△
Dried jerky for dogs (soft type) 1	Possible	△
Dried jerky for dogs (soft type) 2	Possible	×
Dried jerky for dogs (soft type) 3	Possible	△
Dried jerky for dogs (soft type) 4	Possible	△
Dried jerky for dogs (soft type) 5	Possible	○
Dried jerky for dogs (soft type) 6	Possible	○
Dried jerky for cats (soft type)	Possible	○
Dried jerky for dogs (soft type, two types materials) 1	Possible	○
Dried jerky for dogs (soft type, two types materials) 2	Possible	○

○: completely collapsed, △: partially collapsed, ×: Did not collapse

3.2 サルモネラ添加試験

2.1 の試料について 2.5 によりサルモネラ添加試験を実施した。滅菌済みのはさみ等を用いて無菌的に切断を行えない、子牛肋骨を原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）1、豚の耳を原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）7 及び牛筋を原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）8 の 3 検体は、25 g 程度となる量をストマッカー袋に入れ、サルモネラ培養液の希釈菌液を 1 mL 添加し、試料 25 g に対して緩衝ペプトン水 225 mL 及び界面活性剤溶液 15 mL の割合で加え、振り混ぜた後、前増菌培養を行った。サルモネラ培養液中の菌数の測定結果は、 1.0×10^9 CFU/mL から 1.8×10^9 CFU/mL であり、 10^{-7} 希釈菌液、 10^{-8} 希釈菌液及び 10^{-9} 希釈菌液 1 mL には、それぞれ 100 CFU、10 CFU 及び 1 CFU 程度サルモネラが含まれていた。サルモネラ添加試験の結果は Table 3 のとおり、試料 25 g にサルモネラを 100 及び 10 CFU 相当量を添加した場合は、全ての試料でサルモネラが検出された。1 CFU 相当量を添加した場合は、切断した試料 25 試料中 6 試料、切断できなかった試料 3 試料中 2 試料からサルモネラは検出されなかった。検討に用いた試料の原料（Table 1-1 及び 1-2）を確認した結果、サルモネラの検出率に影響する原料の違いは認められなかった。

よって、検出感度は、ジャーキー 25 g 中に 10 CFU 程度であり、ドライ製品、セミドライ製品及びウェット製品の結果⁶⁾と同等であり、分析試料 25 g を量る前に、はさみ等を用いて無菌的に切断する操作を加えることで、ドライ製品等検査法をジャーキー製品に適用可能と考えられた。

はさみ等を用いて無菌的に切断ができない素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）については、試料内部のサルモネラの検出が難しいためドライ製品等検査法を適用できなかったが、その検出感度は、試料 25 g 程度の表面に 10 CFU 程度であり、試料表面のサルモネラの汚染確認に使用可能と考えられた。

Table 3 Results of *Salmonella* ^{a)} spike test

Pet food types	Test result		
	100 CFU ^{b)}	10 CFU ^{c)}	1 CFU ^{d)}
Formed jerky for dogs 1	+	+	+
Formed jerky for dogs 2	+	+	+
Formed jerky for dogs 3	+	+	+
Formed jerky for dogs 4	+	+	+
Formed jerky for dogs 5	+	+	+
Formed jerky for dogs 6	+	+	-
Formed jerky for dogs 7	+	+	+
Formed jerky for cats 1	+	+	+
Formed jerky for cats 2	+	+	+
Dried jerky for dogs (hard type) 1 ^{e)}	+	+	-
Dried jerky for dogs (hard type) 2	+	+	+
Dried jerky for dogs (hard type) 3	+	+	-
Dried jerky for dogs (hard type) 4	+	+	+
Dried jerky for dogs (hard type) 5	+	+	+
Dried jerky for dogs (hard type) 6	+	+	+
Dried jerky for dogs (hard type) 7 ^{e)}	+	+	+
Dried jerky for dogs (hard type) 8 ^{e)}	+	+	-
Dried jerky for dogs and cats (hard type) 1	+	+	-
Dried jerky for dogs and cats (hard type) 2	+	+	+
Dried jerky for dogs (soft type) 1	+	+	+
Dried jerky for dogs (soft type) 2	+	+	+
Dried jerky for dogs (soft type) 3	+	+	+
Dried jerky for dogs (soft type) 4	+	+	-
Dried jerky for dogs (soft type) 5	+	+	+
Dried jerky for dogs (soft type) 6	+	+	-
Dried jerky for cats (soft type)	+	+	+
Dried jerky for dogs (soft type, two types materials) 1	+	+	+
Dried jerky for dogs (soft type, two types materials) 2	+	+	+

+: detected of *Salmonella* colonise, -: absenced of *Salmonella* colonise

a) Rifampicin resistant *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

b) *Salmonella* culture solutions (1.0×10^9 CFU/mL ~ 1.8×10^9 CFU/mL) were diluted 10⁷-fold and 1 mL added to sample 25 g.

c) *Salmonella* culture solutions (1.0×10^9 CFU/mL ~ 1.8×10^9 CFU/mL) were diluted 10⁸-fold and 1 mL added to sample 25 g.

d) *Salmonella* culture solutions (1.0×10^9 CFU/mL ~ 1.8×10^9 CFU/mL) were diluted 10⁹-fold and 1 mL added to sample 25 g.

e) Aseptic cutting was not possible. About 25 g of the sample was put into a sterilized stomacher bag, buffered peptone water and the surfactant solution were added, and pre-enrichment culture was performed without stomacher treatment.

4 まとめ

ドライ製品等検査法の適用範囲を成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）に拡大するための妥当性確認を行った結果、分析試料 25 g を量る前に、滅菌済みのはさみ等を用いて無菌的に切断する操作を加えることで、以下の結果が得られ、切断ができない一部の素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）を除いてドライ製品等検査法の適用が可能と考えられた。

また、はさみ等を用いて無菌的に切断を行えない素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）については、試料内部のサルモネラの検出が難しいためドライ製品等検査法を適用できなかったが、25 g 程度となる量をストマッカー袋に入れ、試料 25 g に対して緩衝ペプトン水 225 mL 及び界面活性剤溶液 15 mL の割合で加え、振り混ぜた後、前増菌培養を行うことにより、試料表面のサルモネラの汚染確認に使用できると考えられた。

1) 成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）のサルモネラ検出試験を行い、同時に前増菌培養段階の試料の状態を観察した。素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）のうち、子牛肋骨、豚の耳及び牛筋を原料とする 3 検体は、はさみ等を用いて無菌的に切断する操作を行えなかった。これらの試料は、25 g 程度となる量をストマッカー袋に入れ、緩衝ペプトン水を 225 mL 及び界面活性剤溶液 15 mL を加え、ストマッカー処理を行わず前増菌培養を行った。全ての試料においてサルモネラ不検出であった。

切断可能なジャーキー製品については、ドライ製品等検査法にはさみ等を用いて無菌的に切断する操作を加えることで、ジャーキー製品中のサルモネラの検出が可能であると考えられた。切断ができない一部の素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）については、組織内部のサルモネラ汚染の検出は、難しいと考えられた。

2) 成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）にサルモネラ培養液の 10^7 希釈菌液、 10^8 希釈菌液及び 10^9 希釈菌液を 1 mL（これら希釈菌液には、それぞれ 100 CFU, 10 CFU, 1 CFU 程度のサルモネラが含まれていた。）添加し、サルモネラ検出試験を行った結果、試料 25 g にサルモネラを 100 及び 10 CFU 相当量を添加した場合は、全ての試料でサルモネラは検出された。1 CFU 相当量を添加した場合は、切断した試料 25 試料中 6 試料、切断できなかった試料 3 試料中 2 試料からサルモネラは検出されなかった。検出感度は、成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）25 g 中に 10 CFU 程度であり、ドライ製品、セミドライ製品及びウェット製品と同等であった。

はさみ等を用いて無菌的に切断ができない素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）の検出感度については、試料 25 g 程度の表面に 10 CFU 程度であった。

謝 辞

本研究を行うにあたり菌株を提供していただいた北里大学並びに本研究に対して御助言いただいた一般財団法人生物科学安全研究所参与の宮崎茂先生、信頼性保証室の丸山賀子先生、公益社団法人中央畜産会の高木昌美先生に感謝の意を表します。

文 献

1) 湯川 尚一郎, 内田 郁夫, 田村 豊, 大島 誠之助, 長谷川 貴史: 日本におけるイヌ用トリーツのサルモネラ属菌汚染状況, 第 161 回日本獣医学会学術集会講演要旨集, 391 (2018).

- 2) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知：ペットフードの病原微生物汚染防止対策の徹底について，令和元年7月12日，元消安第1178号(2019).
- 3) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について，平成21年9月1日(2009).
- 4) 東京大学医科学研究所学友会編：第2版微生物学実習提要，東京，丸善，60(1998). (ISBN4-621-04465-6).
- 5) 一般財団法人東京顕微鏡院，平成30年度愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業（ペットフード（犬猫用おやつ製品）からのサルモネラ属菌の分離調査）報告書(2018).
- 6) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：平成20年度ペットフードの安全監視体制構築に係る予備調査(2009).

精度管理**1 令和元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 2019)**

沼田 歩美^{*1}, 船水 悦子^{*2}, 中村 信仁^{*3},
武田 然也^{*4}, 福田 沙樹子^{*5}, 土井 雄悟^{*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・・・幼令肉用牛育成・肉用牛肥育用配合飼料
- 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**

令和元年 6 月 20 日及び 6 月 21 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幼令肉用牛育成・肉用牛肥育用配合飼料 80 kg を用い, 以下の手順により試料を調製した。

試料をよく混合した後, 9 等分した。その中の 4 区画を一つに合わせてよく混合した後, 4 等分して元に戻した。この操作を表 1 の混合区画表により 7 回繰り返した後, 各区画より一定量 (約 20 g) ずつとり, 1 袋当たり約 180 g 入りの試料 340 個を調製した。

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

^{*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

^{*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

^{*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
	2	6	9	2	6	8	2
区画番号	9	4	4	9	8	7	7
	1	7	5	6	1	2	3
	5	1	3	8	3	4	5

2) B 試料

目開き 1 mm のふるいを通させた魚粉 80 kg を用い、A 試料と同様に試料 340 個を調製した。

3) C 試料

各原料中の夾雑物を除去した後、必要に応じて粉碎し、表 2 に示した 10 種類の原料を同表の混合割合で混ぜ合わせた試料（総量 80 kg）を用い、A 試料と同様に試料 340 個を調製した。

表 2 C 試料の原料及びその混合割合

原料名	混合割合 (%)	原料名	混合割合 (%)
とうもろこし	30	なたね油かす	10
大麦	20	ビートパルプ	3
米ぬか油かす	10	魚粉	3
ふすま	10	りん酸カルシウム	2
DDGS	10	食塩	2

4) D 試料

ほ乳期子豚育成用プレミックス 80 kg を用い、A 試料と同様に試料 340 個を調製した。

4 分析鑑定項目及び実施要領

4.1 分析鑑定項目

A 試料・・・水分，粗たん白質，粗脂肪，粗繊維，粗灰分，カルシウム，リン及びモネンシンナトリウム

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

「令和元年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領」（143 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 protocol ¹⁾ 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	18.56	18.93	5.55	5.79	66.21	66.16	17.45	17.55	39.08	40.17	41.69	44.63
2	18.49	18.73	5.68	5.49	66.55	66.38	17.61	17.45	39.45	40.39	44.65	44.20
3	19.18	19.18	5.78	5.68	66.26	66.36	17.33	17.51	39.73	40.32	41.08	43.91
4	18.33	18.94	5.84	5.74	66.20	67.01	17.42	17.46	39.61	39.69	40.36	42.89
5	19.45	19.08	5.74	5.73	65.98	66.47	17.53	17.55	40.79	39.91	44.22	41.30
6	18.45	19.81	5.77	5.80	66.33	66.84	17.61	17.47	40.11	40.72	43.64	42.98
7	19.04	19.34	5.81	5.73	66.90	66.44	17.58	17.57	41.55	39.63	45.09	41.92
8	18.93	18.63	5.79	5.75	66.52	66.94	17.58	17.48	39.97	38.22	42.62	39.12
9	19.15	18.53	5.65	5.62	67.08	66.28	17.31	17.48	40.08	40.82	41.22	43.92
10	19.04	19.36	5.73	5.55	66.21	66.70	17.51	17.67	40.45	39.76	41.31	40.68

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	1.1957	9	0.1329	0.83	3.02
	粗たん白質 分析誤差 E	1.6099	10	0.1610		
	総計 T	2.8056	19			
	粗灰分				1.37	3.02
B試料	粗たん白質				0.62	3.02
					0.1223	
					1.14	3.02
	粗灰分				0.0077	
D試料	銅				0.76	3.02
					0.5658	
					0.82	3.02
	亜鉛				3.1119	

6 参加試験室

- 6.1 総数 215
 うち 飼料検査指導機関…44
 飼料製造業者関係…141
 飼料添加物製造業者関係…11
 民間分析機関等…19
- 6.2 試料別参加試験室数
 A 試料…210
 B 試料…211
 C 試料…116
 D 試料…74

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		MN(管理分析法)		MN(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 (g(力価)/t)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score								
1	12.73	1 -2.69	19.31	4 0.63	2.99	1 0.81			5.72	1 -0.55								
2	13.20	1 -0.65	19.13	3 -0.03	3.04	1 1.16	6.38	2 0.43	5.93	1 1.11	0.896	2 0.77	0.532	1 0.04	26.2	1 -2.37		
3	13.26	1 -0.39	19.38	3 0.89	3.03	1 1.09	6.25	2 0.19	5.74	1 -0.39	0.830	2 -0.98	0.525	1 -0.58	29.6	1 -0.35		
4	13.36	1 0.04	18.89	3 -0.93	2.74	2 -0.88									30.0	2 -0.11		
5	13.48	1 0.56	19.12	3 -0.07	2.83	2 -0.27			5.72	1 -0.55	0.874	2 0.18	0.527	1 -0.40				
7	13.17	1 -0.78	19.29	3 0.55	3.29	2 2.86	5.16	3 -1.81	5.55	1 -1.90	0.818	3 -1.30	0.533	1 0.13	32.1	2 1.13		
8	13.51	1 0.69	19.56	3 1.56					5.82	1 0.23	0.846	2 -0.55	0.530	1 -0.13				
9	13.42	1 0.30	19.29	1 0.55	2.97	1 0.68			5.96	1 1.34								
10	13.25	1 -0.43	19.07	3 -0.26	2.95	2 0.54	6.36	2 0.39	5.55	1 -1.90	0.862	2 -0.13	0.533	1 0.13			26.3	3 -0.24
12	13.29	1 -0.26	19.52	3 1.41	2.71	1 -1.09	6.44	2 0.54	5.84	1 0.39	0.880	2 0.34	0.530	1 -0.13	26.6	2 -2.13		
14	13.72	1 1.61	19.36	3 0.81					5.79	1 0.00	0.852	2 -0.39	0.538	1 0.58	31.0	1 0.47		
15	13.44	1 0.39	19.56	4 1.56	2.54	2 -2.25			5.72	1 -0.55								
16	13.35	1 0.00	19.03	3 -0.40	2.63	2 -1.63	6.11	2 -0.06	5.82	1 0.23	0.890	1 0.61	0.537	1 0.49			25.8	3 -0.72
17	13.07	1 -1.21	19.80	3 2.45	2.73	2 -0.95			5.71	1 -0.63	0.910	2 1.14	0.533	1 0.13			26.3	3 -0.24
18	12.88	1 -2.04	19.35	3 0.78	2.95	1 0.54			5.61	1 -1.42								
19	13.45	1 0.43	19.44	3 1.11					5.76	1 -0.23					29.2	1 -0.59		
21	13.36	1 0.04	19.09	3 -0.18	2.91	2 0.27	6.59	2 0.81	5.94	1 1.19	0.855	2 -0.31	0.530	1 -0.13			25.8	3 -0.72
28	13.28	1 -0.30	19.69	3 2.04	2.86	1 -0.06	5.37	2 -1.42	5.90	1 0.87	0.893	2 0.69	0.536	1 0.40			27.4	3 0.81
31	13.25	1 -0.43	18.79	3 -1.30	3.00	2 0.88	6.81	3 1.22	5.85	1 0.47	0.880	2 0.34	0.520	1 -1.03			27.2	3 0.62
32	13.40	2 0.21	20.11	4 <u>3.60</u>	2.75	2 -0.81												
33	13.50	1 0.65	19.20	3 0.22	2.52	2 -2.39	5.71	3 -0.80	5.82	1 0.23	0.954	1 2.31	0.539	1 0.67			26.7	3 0.13
34			20.26	2 <u>4.16</u>														
35	13.60	1 1.08	19.47	3 1.22	2.68	2 -1.29	5.91	3 -0.43	5.85	1 0.47	0.930	2 1.67	0.552	1 1.84			28.0	3 1.39
36	13.99	1 2.78	19.55	3 1.52	2.89	2 0.13			5.80	1 0.07								
37	13.56	1 0.91	19.19	3 0.18	2.93	1 0.40			5.88	1 0.71	0.895	2 0.74	0.520	1 -1.03				
38	13.76	1 1.78	18.68	4 -1.71	9.11	1 <u>42.62</u>			5.65	1 -1.11								
39	13.04	1 -1.34	19.31	3 0.63	2.65	2 -1.50			6.19	1 <u>3.17</u>	0.866	2 -0.02	0.525	1 -0.58				
40	13.45	1 0.43	19.01	1 -0.48					5.81	1 0.15								
41	13.29	1 -0.26	18.98	3 -0.59					5.83	1 0.31	0.914	2 1.24	0.543	1 1.03	31.5	1 0.77		
42	13.30	1 -0.21	18.83	3 -1.15	2.78	2 -0.61	6.85	3 1.29	5.86	1 0.55	0.836	2 -0.82	0.523	1 -0.76			26.5	3 -0.04
43	13.11	1 -1.04	19.09	3 -0.18	2.92	1 0.34	6.63	2 0.89	5.89	1 0.79	0.855	2 -0.31	0.551	1 1.75	30.8	1 0.36		
44	13.75	1 1.74	19.23	3 0.33					5.37	1 <u>-3.33</u>								
45	13.11	1 -1.04	19.25	4 0.40	2.96	2 0.61			5.80	1 0.07								
46	13.43	1 0.34	18.95	3 -0.70	2.90	1 0.20			6.08	1 2.30								
47	12.94	1 -1.78	18.74	4 -1.48	2.91	1 0.27			6.03	1 1.90								
48	13.16	1 -0.82	19.23	4 0.33	2.84	1 -0.20			5.77	1 -0.15			0.576	1 <u>4.00</u>				
49	13.42	1 0.30	19.15	4 0.03	2.94	1 0.47			5.77	1 -0.15								
50	13.31	1 -0.17	19.38	3 0.14			6.03	2 -0.21	5.98	1 1.50							25.5	3 -1.01
51	13.24	2 -0.47	19.35	3 0.78					5.68	2 -0.87								
52	13.11	1 -1.04	20.11	1 <u>3.60</u>	3.06	1 1.29	4.43	2 <u>-3.15</u>	5.56	1 -1.82	0.840	2 -0.71	0.570	1 <u>3.46</u>				
53	13.23	1 -0.52	19.18	2 0.14	2.85	1 -0.13	6.29	3 0.26	5.81	1 0.15	0.865	2 -0.05	0.540	1 0.76				
54	13.28	1 -0.30	18.75	3 -1.45	2.60	2 -1.84	5.97	3 -0.32	5.74	1 -0.39	0.959	2 2.44	0.521	1 -0.94				
55	13.67	1 1.39	18.18	4 <u>-3.57</u>	2.84	1 -0.20	6.40	3 0.46	5.53	1 -2.06	0.908	2 1.08	0.552	1 1.84				
56	11.94	1 <u>-6.13</u>	20.75	4 <u>5.99</u>	2.57	2 -2.04			5.71	1 -0.63								
57	13.11	1 -1.04	19.14	4 0.00	2.84	2 -0.20	7.29	3 2.10	6.05	1 2.06	0.861	2 -0.15	0.510	1 -1.93				
58	13.54	1 0.82	19.43	3 1.07	2.91	1 0.27	5.57	1 -1.05	5.87	1 0.63	0.841	2 -0.69	0.539	1 0.67			25.4	3 -1.10
62	13.37	1 0.08	19.15	3 0.03	2.68	2 -1.29	5.77	2 -0.69	5.57	1 -1.74	0.827	2 -1.06	0.523	1 -0.76			26.1	3 -0.43
63	13.39	1 0.17	19.12	1 -0.07	2.90	1 0.20	5.29	2 -1.57	5.79	1 0.00	0.928	2 1.62	0.534	1 0.22				
63			19.16	3 0.07														
64	13.46	1 0.47	19.47	3 1.22	3.03	2 1.09			5.71	1 -0.63	0.833	2 -0.90	0.525	1 -0.58				
66	13.27	1 -0.34													31.1	1 0.53		
67	13.30	1 -0.21													32.3	1 1.24		
69	13.29	1 -0.26	19.94	3 2.97	2.73	2 -0.95			5.73	1 -0.47	0.850	1 -0.45	1.079	1 <u>49.23</u>				
70			18.90	3 -0.89														
71			19.16	3 0.07	2.76	2 -0.75	6.44	3 0.54										
72	13.68	1 1.43	19.18	3 0.14	2.63	2 -1.63			5.78	1 -0.07								
73	13.32	1 -0.13	18.87	4 -1.00	2.87	1 0.00	6.03	3 -0.21	5.78	1 -0.07	0.848	2 -0.50	0.529	1 -0.22	32.3	1 1.24	27.2	3 0.62
74	13.17	1 -0.78	19.27	3 0.48	2.99	1 0.81	6.54	1 0.72	5.87	1 0.63	0.876	2 0.23	0.531	1 -0.04				
76	13.40	1 0.21	19.25	3 0.40	2.98	2 0.75	6.21	2 0.11	5.87	1 0.63	0.789	2 -2.07	0.526	1 -0.49			26.0	3 -0.52
77	13.77	1 1.82	18.82	2 -1.19	2.88	1 0.06	6.88	1 1.35	5.77	1 -0.15	0.888	2 0.55	0.529	1 -0.22				
78	13.40	1 0.21	19.73	3 2.19	2.96	2 0.61	6.33	2 0.34	5.81	1 0.15	0.863	2 -0.10	0.538	1 0.58				
78							6.30	3 0.28										
78							6.03	4 -0.21										
79	13.83	1 2.08	19.24	3 0.37	2.70	2 -1.16			5.95	1 1.26	0.881	2 0.37	0.537	1 0.49				
80	13.44	1 0.39	19.33	1 0.70	2.79	1 -0.54	5.32	2 -1.51	5.36	1 <u>-3.41</u>	0.855	2 -0.31	0.533	1 0.13				
81	13.54	1 0.82	19.20	3 0.22	2.87	2 0.00	6.49	2 0.63	5.88	1 0.71	0.844	2 -0.61	0.523	1 -0.76			30.3	1 0.05
82	13.52	1 0.73	19.09	3 -0.18	2.77	1 -0.68	6.17	1 0.04	5.81	1 0.15	0.840	2 -0.71	0.544	1 1.12				
83	13.32	1 -0.13	19.22	3 0.29	2.82	1 -0.34	6.35	3 0.37	5.94	1 1.19	0.894	2 0.71	0.545	1 1.21	29.1	1 -0.67		
84	13.23	1 -0.52	18.67	3 -1.74	2.69	1 -1.22	5.58	2 -1.04	6.01	1 1.74	0.869	2 0.05	0.565	1 <u>3.01</u>				
85	13.35	1 0.00	19.27	3 0.48	3.16	1 1.98	5.75	2 -0.72	5.86	1 0.55	0.847	2 -0.53	0.543	1 1.03				

の分析成績 (1)

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									
7.81	1	-1.41	66.66	4	-0.30	17.41	1	-0.46								1								
7.87	1	-1.04	66.54	3	-0.55	17.53	1	0.77			39.68	1	-0.32	47.23	1	1.80	2							
7.96	1	-0.49	67.18	3	0.76	17.43	1	-0.25									3							
8.01	1	-0.18	67.18	3	0.76												4							
8.12	1	0.49	67.38	3	1.17	17.50	1	0.46			41.91	1	1.62	44.87	1	0.65	5							
8.09	1	0.30	66.52	3	-0.59	17.30	1	-1.60									7							
8.25	1	1.28	67.07	3	0.53	17.44	1	-0.15			40.96	1	0.79	51.73	1	<u>3.98</u>	8							
7.95	1	-0.55	66.64	1	-0.35	17.50	1	0.46									9							
7.87	1	-1.04	66.43	3	-0.78	17.33	1	-1.29			39.71	1	-0.29	47.25	1	1.81	10							
8.03	1	-0.06	66.97	3	0.32	17.54	1	0.88									12							
8.27	1	1.41	66.56	3	-0.51	17.46	1	0.05									14							
8.09	1	0.30	67.48	4	1.37	17.32	1	-1.40									15							
7.93	1	-0.67	67.08	3	0.55	17.47	1	0.15						19.0	1	-2.36	16							
7.81	1	-1.41	67.21	3	0.82	17.45	1	-0.05									17							
7.33	1	<u>-4.35</u>	66.49	3	-0.65	17.42	1	-0.36									18							
8.06	1	0.12	66.76	3	-0.10	17.44	1	-0.15									19							
7.94	1	-0.61	66.55	3	-0.53	17.56	1	1.08			40.00	1	-0.04	46.05	1	1.23	21							
8.00	1	-0.24	67.37	3	1.15	17.37	1	-0.88	0.73	2	0.33	263.8	1	-0.12	39.74	1	-0.27	28						
7.90	1	-0.85	66.64	3	-0.35	17.59	1	1.40								21.4	1	1.13	31					
8.80	2	<u>4.66</u>	66.75	4	-0.12														32					
7.98	1	-0.36	67.07	3	0.53	17.46	1	0.05									20.6	1	-0.06	33				
			66.40	2	-0.84															34				
8.20	1	0.98	66.91	3	0.20	17.39	1	-0.67	0.72	2	0.11			44.17	1	<u>3.60</u>	42.49	1	-0.49	35				
8.44	1	2.45	66.99	3	0.37	17.49	1	0.36												36				
8.16	1	0.73	66.94	3	0.26	17.52	1	0.67												37				
8.27	1	1.41	65.63	4	-2.43	17.26	1	-2.02												38				
7.49	1	<u>-3.37</u>	67.09	3	0.57	17.50	1	0.46												39				
8.17	1	0.79	66.15	1	-1.35	17.47	1	0.15									20.0	1	-0.91	40				
7.92	1	-0.73	67.80	3	2.03	17.54	1	0.88												41				
8.02	1	-0.12	66.67	3	-0.28	17.50	1	0.46									20.5	1	-0.18	42				
8.01	1	-0.18	66.62	3	-0.39	17.58	1	1.29												43				
8.25	1	1.28	66.51	3	-0.61	17.52	1	0.67												44				
7.86	1	-1.10	65.87	4	-1.93	17.36	1	-0.98												45				
7.96	1	-0.49	66.81	3	0.00	17.57	1	1.19												46				
7.47	1	<u>-3.49</u>	66.04	4	-1.58	17.63	1	1.81												47				
7.89	1	-0.91	66.03	4	-1.60	17.55	1	0.98												48				
8.15	1	0.67	65.99	4	-1.68	17.56	1	1.08												49				
8.15	1	0.67	66.54	3	-0.55	17.54	1	0.88												50				
7.89	2	-0.91	66.96	3	0.30	17.46	2	0.05												51				
8.19	1	0.91	68.91	1	<u>4.32</u>	17.35	1	-1.08												52				
8.02	1	-0.12	67.32	2	1.05	17.51	1	0.57												53				
8.01	1	-0.18	66.58	3	-0.47	17.52	1	0.67	0.76	2	1.01			39.46	1	-0.51	42.83	1	-0.32	54				
8.17	1	0.79	63.49	4	<u>-6.83</u>	17.42	1	-0.36												55				
6.72	1	<u>-8.09</u>	66.61	4	-0.41	17.46	1	0.05												56				
7.80	1	-1.47	65.80	4	-2.08	17.58	1	1.29	0.72	2	0.11			40.28	1	0.20	44.13	1	0.30	57				
7.97	1	-0.42	67.46	3	1.33	17.53	1	0.77	0.69	2	-0.56	281.0	1	0.61	40.30	1	0.21	43.35	1	-0.07	58			
8.15	1	0.67	66.68	3	-0.26	17.40	1	-0.57	0.91	2	<u>4.38</u>	272.6	1	0.25	35.87	1	<u>-3.66</u>	38.41	1	-2.47	62			
8.04	1	0.00	66.18	1	-1.29	17.57	1	1.19	0.75	1	0.78	238.6	1	-1.22						63				
			66.84	3	0.06															63				
8.03	1	-0.06	66.53	3	-0.57	17.41	1	-0.46												64				
8.06	1	0.12																		66				
8.00	1	-0.24																		67				
7.82	1	-1.34	67.65	3	1.73	17.42	1	-0.36			202.5	1	-2.78	40.05	1	0.00	41.45	1	-0.99	21.0	1	0.54	69	
			66.57	3	-0.49																70			
			67.37	3	1.15																71			
8.30	1	1.59	66.82	3	0.02	17.45	1	-0.05													72			
8.16	1	0.73	66.44	4	-0.76	17.35	1	-1.08	0.69	2	-0.56			39.40	1	-0.56	41.98	1	-0.74	20.8	1	0.31	73	
7.97	1	-0.42	66.86	3	0.10	17.51	1	0.57						40.76	1	0.62	43.28	1	-0.11				74	
8.09	1	0.30	67.04	3	0.47	17.58	1	1.29													20.7	1	0.16	76
7.60	1	-2.69	67.68	2	1.79	17.61	1	1.60	0.69	2	-0.56			38.70	1	-1.18	44.22	1	0.34				77	
7.93	1	-0.67	66.32	3	-1.00	17.45	1	-0.05						38.42	1	-1.42	41.85	1	-0.80				78	
																					78			
																					78			
8.39	1	2.14	66.82	3	0.02	17.60	1	1.50						37.33	1	-2.38	43.76	1	0.12				79	
														40.56	1	0.44	42.62	1	-0.43				80	
8.04	1	0.00	66.94	3	0.26	17.43	1	-0.25																81
8.13	1	0.55	67.19	3	0.78	17.44	1	-0.15						40.58	1	0.46	41.38	1	-1.03				82	
8.05	1	0.06	67.36	3	1.13	17.56	1	1.08																83
7.98	1	-0.36	62.17	3	<u>-9.55</u>	17.66	1	2.12	0.64	2	-1.68			40.47	1	0.36	47.62	1	1.99				84	
8.10	1	0.36	67.50	3	1.42	17.47	1	0.15	0.67	2	-1.01	239.9	1	-1.16	39.58	1	-0.41	45.01	1	0.72	20.5	1	-0.18	85

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		MN(管理分析法)		MN(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
85			18.81	4 -1.22														
87	13.52	1 0.73	18.92	3 -0.81	2.82	1 -0.34	6.50	3 0.65	5.67	1 -0.95	0.903	2 0.95	0.537	1 0.49			26.3	3 -0.24
88	13.29	1 -0.26	19.22	3 0.29	2.72	2 -1.02	6.38	2 0.43	5.79	1 0.00	0.877	2 0.26	0.522	1 -0.85	29.1	2 -0.67	27.3	3 0.73
90	13.37	1 0.08	19.58	3 1.63	2.92	1 0.34	6.19	3 0.08	5.88	1 0.71	0.861	2 -0.15	0.537	1 0.49				
91	13.56	1 0.91	18.85	3 -1.07	2.72	2 -1.02	7.03	3 1.62	5.86	1 0.55	0.936	2 1.83	0.512	1 -1.75	31.9	2 1.00		
93	13.31	1 -0.17	18.69	4 -1.67	3.04	1 1.16	6.54	3 0.72	5.69	1 -0.79	0.869	2 0.05	0.554	1 2.02				
97	13.38	1 0.13	19.12	1 -0.07	2.82	1 -0.34	6.03	2 -0.21	5.49	1 -2.38	0.898	2 0.82	0.520	1 -1.03				
98	13.43	1 0.34	18.31	3 <u>-3.08</u>	2.91	1 0.27	6.97	3 1.51	5.37	1 <u>-3.33</u>	0.790	2 -2.04	0.540	1 0.76				
99	13.47	1 0.52	21.46	2 <u>8.63</u>	2.65	2 -1.50			5.26	1 <u>-4.20</u>			0.535	1 0.31				
102	13.39	1 0.17	20.17	3 <u>3.83</u>	3.10	1 1.57			5.96	1 1.34			0.547	1 1.39				
103	13.02	1 -1.43	19.32	3 0.66	2.55	2 -2.18	3.99	4 <u>-3.96</u>	5.73	1 -0.47	0.882	2 0.39	0.538	1 0.58				
104	11.79	1 <u>-6.78</u>	19.08	4 -0.22	2.82	1 -0.34			5.93	1 1.11	0.930	2 1.67	0.530	1 -0.13				
105	13.09	1 -1.13	18.83	4 -1.15	3.09	1 1.50			5.97	1 1.42	0.851	2 -0.42	0.544	1 1.12				
106	13.52	1 0.73	19.66	3 1.93	2.73	1 -0.95	6.41	1 0.48	5.55	1 -1.90	0.876	3 0.23						
108	13.29	1 -0.26	19.29	3 0.55	2.91	1 0.27			6.10	1 2.45	0.920	2 1.40	0.555	1 2.11	30.1	2 -0.05		
109	13.36	1 0.04	19.42	3 1.04	2.85	2 -0.13	5.36	3 -1.44	5.84	1 0.39	0.958	2 2.41	0.540	1 0.76				
110			17.63	1 <u>-5.61</u>	2.87	1 0.00	5.88	1 -0.48	5.94	1 1.19	0.892	1 0.66	0.526	1 -0.49				
112	13.51	1 0.69	18.83	3 -1.15	5.77	2 -0.69			5.83	1 0.31	0.864	1 -0.07	0.538	1 0.58				
114	13.47	1 0.52	18.71	4 -1.60	2.80	2 -0.47	6.01	3 -0.24	5.39	1 <u>-3.17</u>	0.874	1 0.18	0.521	1 -0.94				
115	13.62	1 1.17	19.14	3 0.00	2.85	1 -0.13	6.28	4 0.24	5.78	1 -0.07	0.880	2 0.34						
116	13.25	1 -0.43							5.87	1 0.63	0.891	2 0.63	0.536	1 0.40	28.6	1 -0.94		
118	13.35	2 0.00	19.02	3 -0.44					5.73	2 -0.47								
119	13.36	1 0.04	18.81	1 -1.22	2.94	1 0.47	6.06	2 -0.15	5.78	1 -0.07	0.917	2 1.32	0.529	1 -0.22				
119			19.16	3 0.07														
120	13.44	1 0.39	18.88	3 -0.96	3.02	1 1.02	6.33	3 0.34	5.90	1 0.87	0.863	2 -0.10	0.525	1 -0.58			27.1	3 0.52
121	13.14	1 -0.91	18.64	3 -1.86			5.93	2 -0.39	5.56	1 -1.82	0.825	1 -1.11	0.554	1 2.02	27.3	1 -1.70		
122	13.62	1 1.17	19.15	3 0.03			6.46	2 0.58	5.75	1 -0.31	0.847	2 -0.53	0.528	1 -0.31				
123	13.25	1 -0.43	19.78	3 2.38	2.84	1 -0.20	5.58	2 -1.04	5.55	1 -1.90								
123			19.55	4 1.52														
124	13.72	1 1.61	18.73	2 -1.52					5.82	1 0.23	0.834	2 -0.87	0.543	1 1.03				
125	13.30	1 -0.21	19.00	2 -0.52	2.98	1 0.75	6.14	2 0.00	5.64	1 -1.19	0.877	2 0.26	0.544	1 1.12			25.3	3 -1.20
126	13.29	1 -0.26	19.04	3 -0.37	2.96	1 0.61	6.46	3 0.58	5.77	1 -0.15	0.908	1 1.08	0.546	1 1.30	31.4	1 0.71		
128	13.35	1 0.00	19.91	3 2.86					5.72	1 -0.55	0.850	2 -0.45	0.523	1 -0.76			26.6	3 0.04
129	13.44	1 0.39	18.97	4 -0.63	2.96	2 0.61	6.02	3 -0.23	5.44	1 -2.77	0.852	1 -0.39	0.523	1 -0.76				
130	12.98	1 -1.61	18.90	2 -0.89	2.56	1 -2.11	5.98	3 -0.30	5.86	1 0.55	0.836	2 -0.82	0.497	1 <u>-3.10</u>				
145	13.27	1 -0.34	18.97	2 -0.63	2.92	1 0.34	5.72	2 -0.78	5.95	1 1.26	0.862	2 -0.13	0.529	1 -0.22				
146	12.23	1 <u>-4.87</u>	19.13	2 -0.03	2.73	1 -0.95	5.59	2 -1.02	5.75	1 -0.31	0.850	2 -0.45	0.593	1 <u>5.53</u>				
147	12.80	1 -2.39	19.00	3 -0.52	2.90	1 0.20	6.10	2 -0.08	5.77	1 -0.15	0.820	2 -1.24	0.710	1 <u>16.05</u>				
148																		
149	12.32	1 <u>-4.48</u>	18.67	4 -1.74	3.17	1 2.04	5.20	1 -1.74	5.80	1 0.07	0.858	2 -0.23	0.528	1 -0.31				
150	13.48	1 0.56	18.87	4 -1.00	3.07	1 1.36	6.17	2 0.04	5.87	1 0.63	0.861	2 -0.15	0.492	1 <u>-3.55</u>				
151	13.61	1 1.13	18.97	4 -0.63	3.21	1 2.32	5.66	2 -0.89	5.94	1 1.19	0.827	2 -1.06	0.531	1 -0.04				
152	12.21	1 <u>-4.96</u>	19.36	1 0.81	3.64	1 <u>5.25</u>			5.31	1 <u>-3.80</u>								
153	13.38	1 0.13	19.08	5 -0.22														
154	12.92	2 -1.87	18.04	4 <u>-4.09</u>	2.76	1 -0.75	7.31	1 2.14	5.60	1 -1.50			0.390	1 <u>-12.72</u>				
155	13.52	1 0.73	19.17	4 0.11	2.80	1 -0.47	6.52	2 0.69	5.79	1 0.00	1.195	1 <u>8.71</u>	0.494	1 <u>-3.37</u>				
156	13.37	1 0.08	19.92	3 2.90					5.89	1 0.79	0.855	3 -0.31	0.567	2 <u>3.19</u>				
157	13.61	1 1.13	19.18	3 0.14	2.75	2 -0.81	6.66	3 0.94	5.86	1 0.55	0.855	2 -0.31	0.515	1 -1.48			26.6	3 0.04
158	13.06	1 -1.26	18.71	3 -1.60	2.67	2 -1.36			5.65	1 -1.11			0.537	2 0.49				
159	13.28	1 -0.30	19.44	3 1.11					5.79	1 0.00	0.857	2 -0.26	0.536	1 0.40	29.4	1 -0.47		
160	13.24	1 -0.47			2.87	1 0.00			5.76	1 -0.23								
161	13.54	1 0.82	19.18	3 0.14	2.51	2 -2.45	5.84	3 -0.56	5.85	1 0.47	0.810	1 -1.51	0.540	1 0.76				
162	13.18	1 -0.73	19.73	1 2.19	2.59	1 -1.91	5.45	1 -1.27	5.83	1 0.31								
163	13.68	1 1.43	18.92	1 -0.81	2.84	1 -0.20			5.93	1 1.11			0.524	2 -0.67				
164	13.11	1 -1.04	18.95	3 -0.70					5.68	1 -0.87							26.6	3 0.04
165	13.42	1 0.30	18.72	4 -1.56	2.95	1 0.54	6.05	2 -0.17	5.61	1 -1.42	0.886	2 0.50	0.529	1 -0.22			27.0	3 0.43
166	13.47	1 0.52	19.13	3 -0.03	2.90	1 0.20			5.78	1 -0.07								
167	13.16	1 -0.82	19.18	3 0.14	2.77	1 -0.68			5.79	1 0.00	0.877	2 0.26	0.519	1 -1.12				
168	13.51	1 0.69	19.03	3 -0.40	2.82	2 -0.34			5.78	1 -0.07	0.917	2 1.32	0.527	1 -0.40				
169	13.30	1 -0.21	20.02	3 <u>3.27</u>	3.16	1 1.98	5.56	2 -1.07	5.53	1 -2.06								
170	12.76	2 -2.56	19.08	4 -0.22					5.76	1 -0.23								
171	13.54	1 0.82	18.89	3 -0.93	2.70	2 -1.16			5.78	1 -0.07								
172	13.28	1 -0.30	19.12	3 -0.07					5.65	1 -1.11					27.4	1 -1.66		
173	12.73	1 -2.69	19.35	3 0.78			6.24	2 0.17	5.82	1 0.23								
174	13.20	1 -0.65	19.03	1 -0.40					5.57	2 -1.74								
185	13.18	1 -0.73	19.02	2 -0.44	2.89	1 0.13	6.39	2 0.45	6.02	1 1.82	0.930	2 1.67	0.532	1 0.04			25.5	3 -1.01
186	12.52	1 <u>-3.61</u>	18.27	4 <u>-3.23</u>	2.78	2 -0.61	7.11	3 1.77	5.66	1 -1.03	0.841	2 -0.69	0.534	1 0.22				
187	13.41	1 0.26	19.10	3 -0.14	2.91	1 0.27	5.95	2 -0.35	5.81	1 0.15	0.841	2 -0.69	0.533	1 0.13				
188	13.28	2 -0.30	18.86	4 -1.04	2.95	1 0.54	5.89	2 -0.46	5.72	1 -0.55	0.905	2 1.01	0.502	1 -2.65			27.6	3 1.01
189	13.51	1 0.69			5.19	2 -1.75			5.78	1 -0.07					30.4	1 0.11		

の分析成績 (2)

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	
		66.14	4 -1.37													85
8.16	1 0.73	67.19	3 0.78	17.51	1 0.57					41.25	1 1.05	42.41	1 -0.53	19.8	1 -1.20	87
7.96	1 -0.49	66.79	3 -0.04	17.41	1 -0.46											88
8.08	1 0.24	67.20	3 0.80	17.45	1 -0.05	0.70	2 -0.33	268.9	1 0.09	36.78	1 -2.86	33.34	1 -4.92			90
8.15	1 0.67	67.01	3 0.41	17.45	1 -0.05					39.20	1 -0.74					91
8.15	1 0.67	66.10	4 -1.46	17.51	1 0.57	0.71	1 -0.11	284.8	1 0.78	40.74	1 0.60	42.48	1 -0.49			93
8.11	1 0.42	66.64	1 -0.35	17.39	1 -0.67	0.67	2 -1.01			41.37	1 1.15	44.08	1 0.27			97
																98
8.07	1 0.18	67.33	3 1.07	17.32	1 -1.40											99
8.09	1 0.30	67.43	3 1.27	17.56	1 1.08											102
																103
7.77	1 -1.65	66.89	3 0.16	17.40	1 -0.57			326.3	1 2.58	40.60	1 0.48	42.18	1 -0.64	20.7	1 0.10	104
6.44	1 -9.81	65.06	4 -3.60	17.51	1 0.57	0.74	2 0.56									105
8.01	1 -0.18	66.02	4 -1.62	17.59	1 1.40	0.72	1 0.11	303.5	1 1.59	40.03	1 -0.01	41.72	1 -0.86			106
																108
8.03	1 -0.06	66.64	3 -0.35	17.54	1 0.88											109
8.12	1 0.49	67.23	3 0.86	17.53	1 0.77	0.72	2 0.11									110
																112
8.19	1 0.91	66.83	3 0.04	17.42	1 -0.36											114
8.16	1 0.73	66.65	4 -0.32	17.19	1 -2.74											115
8.16	1 0.73	66.94	3 0.26	17.37	1 -0.88					40.21	1 0.14	44.94	1 0.69			116
8.06	1 0.12			17.49	1 0.36	0.42	2 -6.63			36.17	1 -3.39	42.14	1 -0.66	19.9	1 -1.05	118
8.14	2 0.61	66.80	3 -0.02	17.38	2 -0.77											119
8.06	1 0.12	63.82	1 -6.15	17.53	1 0.77	0.65	2 -1.46			40.03	1 -0.01	43.63	1 0.05			120
		67.94	3 2.32													121
8.18	1 0.85	66.94	3 0.26	17.46	1 0.05	0.70	2 -0.33	249.2	1 -0.76	39.01	1 -0.91	43.65	1 0.06	20.3	1 -0.47	122
7.99	1 -0.30	66.49	3 -0.65	17.54	1 0.88											123
8.15	1 0.67	66.97	3 0.32	17.48	1 0.25					41.00	1 0.83	45.18	1 0.80			123
8.08	1 0.24	67.00	3 0.39	17.29	1 -1.71											124
		67.88	4 2.20													125
8.33	1 1.77	67.33	3 1.07	17.37	1 -0.88											126
						0.82	1 2.36	261.3	1 -0.23	39.84	1 -0.18	42.80	1 -0.34	21.3	1 0.98	128
8.13	1 0.55	67.11	2 0.61	17.36	1 -0.98											129
8.08	1 0.24	66.51	3 -0.61	17.54	1 0.88											130
8.27	1 1.41	66.86	3 0.10	17.28	1 -1.81					37.97	1 -1.82	43.68	1 0.08	21.5	1 1.27	131
7.99	1 -0.30	66.04	4 -1.58	17.25	1 -2.12											132
7.67	1 -2.26	65.68	2 -2.32	17.61	1 1.60											133
7.99	1 -0.30	65.45	2 -2.80	17.51	1 0.57	0.70	1 -0.33	273.3	1 0.28	40.05	1 0.00	42.04	1 -0.71	20.8	1 0.25	134
8.00	1 -0.24	65.97	2 -1.73	16.77	1 -7.10											135
																136
																137
																138
																139
6.68	1 -8.33	66.66	4 -0.30	17.50	1 0.46											140
																141
																142
																143
																144
																145
																146
																147
																148
																149
																150
7.88	1 -0.98	66.20	4 -1.25	17.44	1 -0.15											151
8.20	1 0.98	65.68	4 -2.32	17.43	1 -0.25											152
7.29	1 -4.59	66.87	1 0.12	17.18	1 -2.85											153
8.11	1 0.42	65.13	5 -3.46													154
7.63	2 -2.51	66.89	4 0.16	17.29	1 -1.71											155
8.08	1 0.24	64.74	4 -4.26	17.39	1 -0.67											156
8.02	1 -0.12	67.20	3 0.80	17.40	1 -0.57											157
8.18	1 0.85	66.98	3 0.35	17.49	1 0.36					41.51	1 1.27	44.67	1 0.56	20.7	1 0.10	158
																159
7.92	1 -0.73	66.89	3 0.16	17.50	1 0.46											160
																161
7.99	1 -0.30			17.51	1 0.57											162
8.12	1 0.49	67.30	3 1.00	17.55	1 0.98			276.8	1 0.43					21.7	1 1.56	163
8.04	1 0.00	67.98	1 2.40	17.52	1 0.67											164
8.22	1 1.10	66.01	1 -1.64	17.45	1 -0.05											165
8.14	1 0.61	66.71	3 -0.20	17.42	1 -0.36											166
8.00	1 -0.24	65.87	4 -1.93	17.47	1 0.15					40.90	1 0.74	42.26	1 -0.60	20.6	1 -0.03	167
8.14	1 0.61	66.50	3 -0.63	17.53	1 0.77											168
8.09	1 0.30	67.18	3 0.76	17.34	1 -1.19											169
8.38	1 2.08	67.15	3 0.70	17.41	1 -0.46					262.8	1 -0.17	38.02	1 -1.77	43.51	1 0.00	170
																171
																172
																173
																174
																175
7.78	2 -1.59	66.69	4 -0.24	17.38	1 -0.77									20.6	1 -0.03	185
8.16	1 0.73	66.60	3 -0.43	17.30	1 -1.60											186
8.05	1 0.06	66.81	3 0.00	17.35	1 -1.08											187
7.72	1 -1.96	67.52	3 1.46	17.57	1 1.19											188
8.04	1 0.00			17.17	2 -2.95											189
7.90	1 -0.85	66.18	2 -1.29	17.57	1 1.19	0.76	2 1.01	277.5	1 0.46	41.59	1 1.34	47.16	1 1.76	19.2	1 -2.07	185
7.48	1 -3.43	64.39	4 -4.98	17.57	1 1.19											186
8.21	1 1.04	66.87	3 0.12	17.52	1 0.67	0.67	1 -1.01	263.0	1 -0.16	39.90	1 -0.13	43.71	1 0.09			187
7.95	2 -0.55	66.20	4 -1.25	17.32	1 -1.40											188
8.44	1 2.45			17.42	1 -0.36											189
								261.3	1 -0.23	39.22	1 -0.72	42.90	2 -0.29	20.0	1 -0.91	189

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		MN(管理分析法)		MN(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
190	12.87	1 -2.08	18.44	3 -2.60	2.88	1 0.06	6.38	2 0.43	5.81	1 0.15								
191	13.45	1 0.43	19.32	3 0.66	2.62	2 -1.70	6.05	4 -0.17	6.09	1 2.38	0.851	1 -0.42	0.525	1 -0.58			27.4	3 0.81
192	13.47	1 0.52	18.83	3 -1.15	2.78	2 -0.61			5.95	1 1.26								
193	13.56	1 0.91	19.29	3 0.55	2.90	1 0.20	5.02	2 -2.07	5.98	1 1.50								
194	13.10	1 -1.08	19.10	3 -0.14	2.84	2 -0.20			6.03	1 1.90	0.823	2 -1.16	0.513	1 -1.66				
195	13.40	1 0.21	19.15	4 0.03	3.11	1 1.63			5.90	1 0.87								
196	13.56	1 0.91	19.09	2 -0.18	3.44	1 <u>3.89</u>	5.73	2 -0.76	5.81	1 0.15	0.846	2 -0.55	0.527	1 -0.40				
197	13.51	1 0.69	19.01	3 -0.48	2.84	2 -0.20			5.94	1 1.19								
198	13.30	1 -0.21	19.15	4 0.03	3.05	1 1.22	6.13	1 -0.02	5.69	1 -0.79	0.875	1 0.21	0.518	1 -1.21				
199	13.59	1 1.04	19.19	3 0.18	3.20	1 2.25	5.32	1 -1.51	5.85	1 0.47	0.845	1 -0.58	0.516	1 -1.39				
200	13.36	1 0.04	18.78	3 -1.33	2.91	1 0.27	6.42	2 0.50	5.82	1 0.23	0.756	2 -2.95	0.515	1 -1.48				
201	13.04	1 -1.34	19.03	2 -0.40	2.83	1 -0.27												
202	13.47	1 0.52	19.06	3 -0.29	2.83	1 -0.27	5.42	2 -1.33	5.83	1 0.31	0.914	1 1.24	0.529	1 -0.22			25.6	3 -0.91
203																		
204	6.52	1 <u>-29.72</u>	20.39	3 <u>4.65</u>	3.20	1 2.25	7.07	3 1.70	5.85	1 0.47								
206	13.10	1 -1.08	19.00	4 -0.52	3.13	1 1.77	6.89	2 1.37	5.26	1 <u>-4.20</u>	0.865	2 -0.05	0.528	1 -0.31	31.5	2 0.77		
208	13.59	1 1.04	19.28	3 0.52	2.73	1 -0.95			6.12	1 2.61	0.884	2 0.45	0.532	1 0.04				
209																		
210	13.22	1 -0.56	18.47	3 -2.49	2.64	1 -1.57	6.31	2 0.30	5.92	1 1.03	0.897	2 0.79	0.546	1 1.30			27.4	3 0.81
211	13.69	1 1.47	19.55	2 1.52	2.79	1 -0.54			5.86	1 0.55								
212	13.22	1 -0.56	19.00	4 -0.52	2.78	2 -0.61	5.47	2 -1.24	6.01	1 1.74	1.057	1 <u>5.05</u>	0.524	1 -0.67			25.5	3 -1.01
213	13.15	1 -0.87	17.87	2 <u>-4.72</u>	2.91	1 0.27	5.94	2 -0.37	5.69	1 -0.79			0.412	1 <u>-10.74</u>				
214	13.36	1 0.04	19.25	4 0.40	2.77	2 -0.68	6.00	1 -0.26	5.93	1 1.11	0.921	2 1.43	0.526	1 -0.49				
215	13.41	1 0.26	18.94	3 -0.74	2.85	1 -0.13	6.30	2 0.28	5.85	1 0.47	0.920	1 1.40	0.532	1 0.04				
217	13.28	1 -0.30	19.13	3 -0.03	2.86	2 -0.06	6.23	2 0.15	5.95	1 1.26	0.896	2 0.77	0.525	1 -0.58			25.7	3 -0.81
218	13.16	1 -0.82	18.78	4 -1.33	2.79	1 -0.54	6.18	1 0.06	5.67	1 -0.95	0.883	2 0.42	0.516	1 -1.39				
219	13.35	1 0.00	19.26	3 0.44	3.00	2 0.88	6.00	3 -0.26	5.95	1 1.26	0.962	2 2.52	0.525	1 -0.58				
220	13.28	1 -0.30			3.01	1 0.95	6.15	2 0.00	5.79	1 0.00	2.177	2 <u>34.82</u>	0.534	1 0.22				
221	13.42	1 0.30	19.14	2 0.00	2.94	1 0.47	5.66	2 -0.89	5.72	1 -0.55	0.855	1 -0.31	0.526	1 -0.49				
222	13.29	1 -0.26	18.97	3 -0.63	3.07	1 1.36	7.24	3 2.01	5.72	1 -0.55	0.870	2 0.07	0.529	1 -0.22				
245	13.37	1 0.08	18.67	3 -1.74	2.80	2 -0.47	5.37	2 -1.42	5.78	1 -0.07	0.823	2 -1.16	0.535	1 0.31				
246	13.83	1 2.08	19.20	3 0.22	2.55	2 -2.18	5.23	1 -1.68	5.85	1 0.47	0.830	2 -0.98	0.506	1 -2.29	31.2	1 0.59		
247	13.11	1 -1.04	19.18	2 0.14	2.86	1 -0.06			5.81	1 0.15	0.764	2 -2.73	0.519	1 -1.12				
248	13.35	1 0.00	19.14	3 0.00	2.83	2 -0.27	6.55	3 0.74	5.87	1 0.63	0.865	2 -0.05	0.544	1 1.12				
249	13.66	1 1.34	19.14	3 0.00	3.12	2 1.70	6.52	2 0.69	5.67	1 -0.95	0.860	2 -0.18	0.530	1 -0.13				
250	12.53	1 <u>-3.56</u>			3.00	2 0.88	7.85	3 <u>3.13</u>	6.38	1 <u>4.68</u>								
251	13.26	1 -0.39	19.52	3 1.41					5.88	1 0.71	0.945	2 2.07	0.540	1 0.76				
252	13.52	1 0.73	19.10	3 -0.14	2.91	1 0.27	6.80	2 1.20	5.98	1 1.50	0.831	2 -0.95	0.531	1 -0.04	32.1	2 1.12		
253	13.49	1 0.60	19.49	3 1.30	2.94	1 0.47			5.68	1 -0.87								
254	13.10	1 -1.08	19.95	3 <u>3.01</u>	2.86	1 -0.06			5.84	1 0.39	0.845	2 -0.58	0.530	1 -0.13				
255	13.03	1 -1.39	19.09	3 -0.18	3.29	2 2.86	6.62	3 0.87	5.80	1 0.07	0.920	2 1.40	0.540	1 0.76	29.2	1 -0.60		
256	13.31	1 -0.17	19.36	2 0.81	3.01	1 0.95	6.92	2 1.42	5.94	1 1.19								
257	13.08	1 -1.17	18.91	2 -0.85	2.90	1 0.20	5.15	1 -1.83	5.32	1 <u>-3.72</u>	1.001	2 <u>3.56</u>	0.526	1 -0.49				
258	13.54	1 0.82	18.62	4 -1.93	2.83	2 -0.27			5.72	1 -0.55								
259																		
260	13.23	1 -0.52	19.25	4 0.40	2.87	1 0.00	5.70	2 -0.81	5.41	1 <u>-3.01</u>								
261	13.52	1 0.73	19.16	3 0.07	2.53	2 -2.32	5.25	1 -1.64	5.78	1 -0.07	0.960	2 2.47	0.530	1 -0.13				
262	13.21	1 -0.60	19.86	3 2.67	3.01	1 0.95	5.70	2 -0.81	5.59	1 -1.58	0.919	2 1.38	0.537	1 0.49				
263	13.01	1 -1.47	12.13	4 <u>-26.08</u>	3.62	1 <u>5.12</u>	5.06	3 -1.99	5.70	1 -0.71								
264	13.40	1 0.21	19.42	3 1.04	3.11	1 1.63			5.82	1 0.23	0.853	2 -0.37	0.553	1 1.93				
265	13.72	1 1.61	19.43	3 1.07					5.60	1 -1.50								
266	12.74	1 -2.65	19.03	3 -0.40	2.66	2 -1.43			5.65	1 -1.11	0.868	2 0.02	0.568	1 <u>3.28</u>				
267	12.88	1 -2.04	18.96	3 -0.66					6.68	1 <u>7.06</u>					34.6	2 2.61		
268	13.60	1 1.08	19.28	3 0.52	2.44	2 -2.93	4.65	2 -2.75	5.67	1 -0.95	0.824	2 -1.14	0.580	1 <u>4.36</u>				
269	13.24	1 -0.47	18.61	3 -1.97	2.70	2 -1.16			5.67	1 -0.95								
270	13.16	1 -0.82	19.19	3 0.18	2.81	2 -0.40			6.15	1 2.85	0.850	2 -0.45	0.529	1 -0.22	29.6	2 -0.35		
271	12.95	1 -1.74	19.06	3 -0.29	2.93	2 0.40	6.70	3 1.02	5.82	1 0.23	0.869	2 0.05	0.546	1 1.30				
272	13.53	1 0.78	19.30	3 0.59					5.75	1 -0.31								
273	13.60	2 1.08	20.30	4 <u>4.31</u>	3.30	2 2.93			4.50	2 <u>-10.23</u>								
274																		
275	12.40	1 <u>-4.13</u>	19.14	3 0.00	2.91	1 0.27			5.28	1 <u>-4.04</u>								
276	13.91	1 2.43	19.19	4 0.18	2.83	1 -0.27			5.70	1 -0.71	0.826	2 -1.08	0.531	1 -0.04				
277	13.60	1 1.08	19.05	4 -0.33	3.02	3 1.02	7.08	2 1.72	5.79	2 0.00	0.819	2 -1.27	0.485	2 <u>-4.18</u>				
278	12.78	1 -2.48	19.56	3 1.56	2.72	2 -1.02	6.46	4 0.58	5.73	1 -0.47	0.980	1 <u>3.00</u>	0.547	1 1.39				
279	13.17	1 -0.78	18.48	3 -2.45	3.23	1 2.45	5.65	2 -0.91	5.81	1 0.15	0.887	2 0.53	0.533	1 0.13				
280	13.29	1 -0.26	19.02	3 -0.44	2.77	2 -0.68	6.19	2 0.08	5.80	1 0.07	0.820	2 -1.24	0.520	1 -1.03	31.4	1 0.71		
281	12.11	1 <u>-5.39</u>	19.00	2 -0.52	3.15	1 1.91	5.82	2 -0.59	5.75	1 -0.31	0.937	2 1.86	0.549	1 1.57				
282	12.54	1 <u>-3.52</u>							5.78	1 -0.07								
283	13.32	1 -0.13													29.0	1 -0.71		
284	13.43	1 0.34	18.24	3 <u>-3.34</u>	2.84	1 -0.20	6.62	3 0.87	5.67	1 -0.95	1.208	2 <u>9.06</u>	0.534	1 0.22			26.3	3 -0.24

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		MN(管理分析法)		MN(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 (g(力値)/t)	No. z-score	分析値 (g(力値)/t)	No. z-score								
285	13.45	1 0.43	18.82	3 -1.19	2.56	2 -2.11	5.87	1 -0.50	5.94	1 1.19	0.897	2 0.79	0.453	1 <u>-7.05</u>			26.8	3 0.24
286	13.26	1 -0.39	19.12	3 -0.07	2.82	2 -0.34	5.94	2 -0.37	5.73	1 -0.47	0.863	2 -0.10	0.536	1 0.40	29.2	1 -0.59		
287	13.41	1 0.26	18.96	4 -0.66	3.24	1 2.52	6.33	2 0.34	6.05	1 2.06								
288	13.15	1 -0.87	18.60	3 -2.00	2.87	2 0.00	6.96	3 1.50	5.70	1 -0.71	0.857	2 -0.26	0.529	1 -0.22				
289	13.35	1 0.00	19.27	3 0.48					5.64	1 -1.19	0.873	2 0.15	0.541	0.85				
290	13.51	1 0.69	19.43	2 1.07	3.03	1 1.09			5.79	1 0.00								
291	13.42	1 0.30	19.33	3 0.70	2.80	1 -0.47	6.41	2 0.48	5.77	1 -0.15	1.056	1 <u>5.02</u>	0.547	1 1.39			28.0	3 1.39
292	13.55	1 0.87	19.23	3 0.33	2.66	2 -1.43			5.89	1 0.79								
293	13.48	1 0.56	18.99	1 -0.55	2.90	2 0.20			6.04	1 1.98			0.516	1 -1.39				
294	12.99	1 -1.56							5.14	1 <u>-5.15</u>	0.822	2 -1.19	0.533	1 0.13				
295	13.49	1 0.60	19.35	3 0.78	2.86	2 -0.06	6.17	3 0.04	5.73	1 -0.47	0.990	2 <u>3.26</u>	0.540	1 0.76				

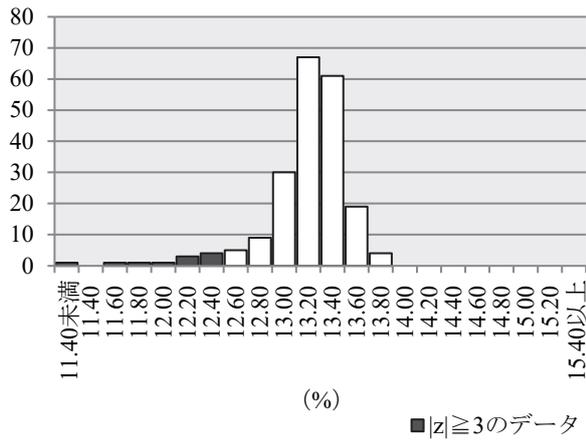
注1: z-scoreの欄に下線を付したものは、絶対値が3以上のものである。
 注2: 各試料のNo.欄は、分析法を示す。対応は以下のとおりである。

水分	粗たん白質	粗脂肪	粗繊維	粗灰分	カルシウム	リン	モネンシンシンナトリウム (MN)
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						

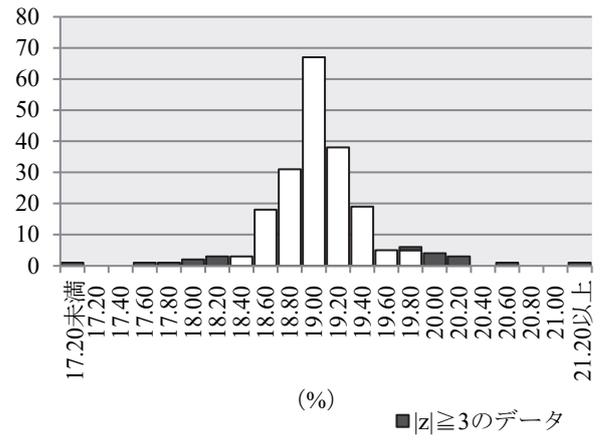
の分析成績 (4)

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	
8.17	1 0.79	67.13	3 0.65	17.54	1 0.88					41.97	1 1.68	43.71	1 0.09	21.0	1 0.54	285
8.14	1 0.61	67.10	3 0.59	17.51	1 0.57					44.10	1 <u>3.54</u>	46.70	1 1.54	20.1	1 -0.76	286
8.13	1 0.55	66.11	4 -1.44	17.72	1 2.74											287
7.97	1 -0.42	67.13	3 0.65	17.44	1 -0.15	0.41	2 -6.85	267.0	1 0.01	41.91	1 1.62	45.17	1 0.80	20.1	1 -0.76	288
8.23	1 1.16	66.85	3 0.08	17.44	1 -0.15											289
8.27	1 1.41	66.98	2 0.35	17.37	1 -0.88											290
8.11	1 0.42	66.98	3 0.35	17.24	1 -2.23			281.5	1 0.64					24.3	1 <u>5.35</u>	291
8.15	1 0.67	66.29	3 -1.07	17.47	1 0.15											292
8.16	1 0.73	65.85	1 -1.97	17.52	1 0.67											293
7.70	1 -2.08			17.17	1 -2.95	0.70	2 -0.33			41.25	1 1.05	46.10	1 1.25			294
8.24	1 1.22	66.87	3 0.12	17.49	1 0.36											295

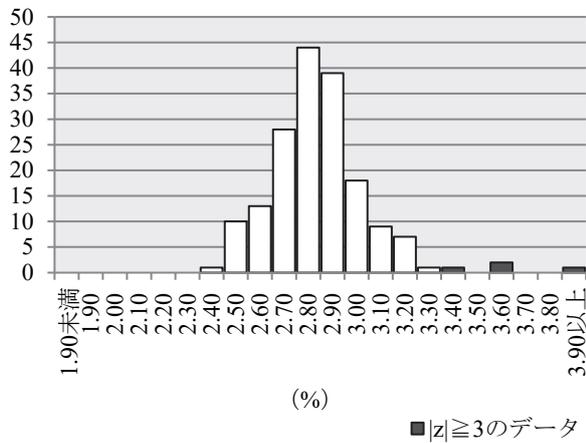
カドミウム	エトキシキン	銅	亜鉛	クエン酸モランテル
No. 分析方法				
1 溶媒抽出法	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準
2 簡易法	2 その他	2 その他	2 その他	2 その他
3 その他				



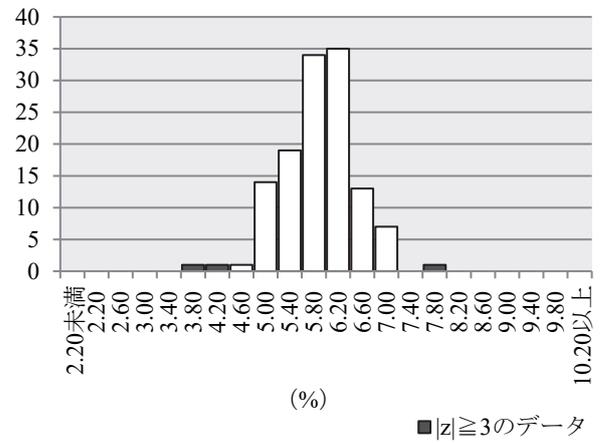
水分 (A 試料)



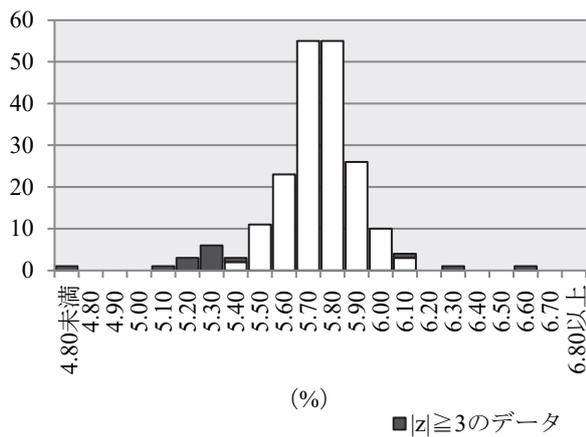
粗たん白質 (A 試料)



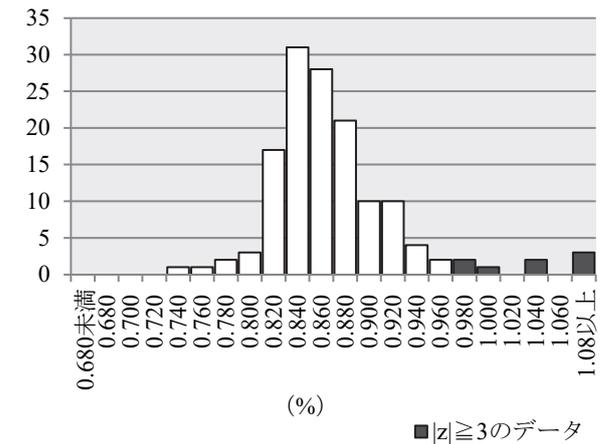
粗脂肪 (A 試料)



粗繊維 (A 試料)

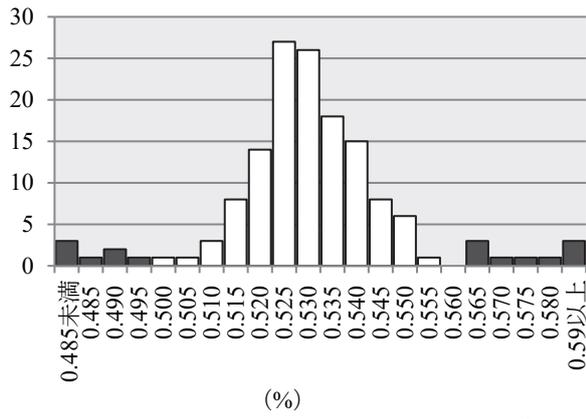


粗灰分 (A 試料)

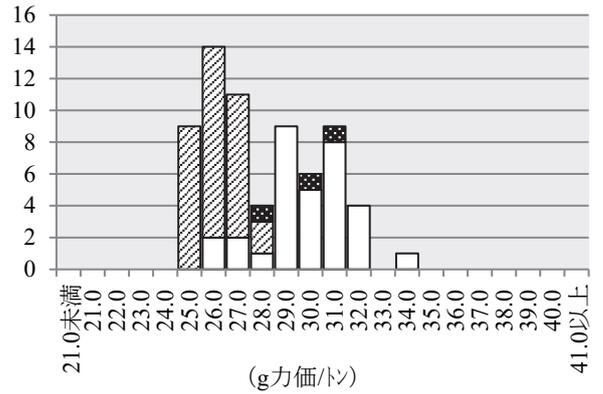


カルシウム (A 試料)

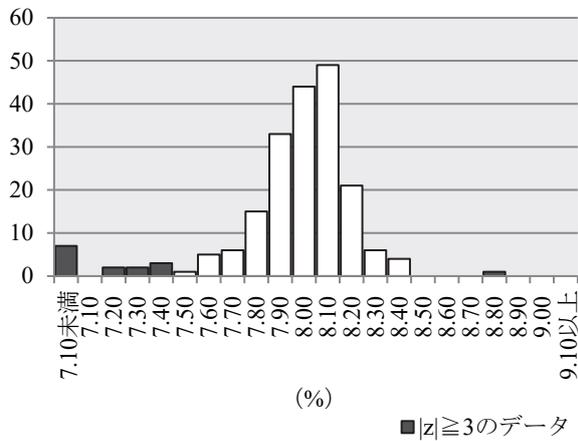
図1 分析成績のヒストグラム (1)



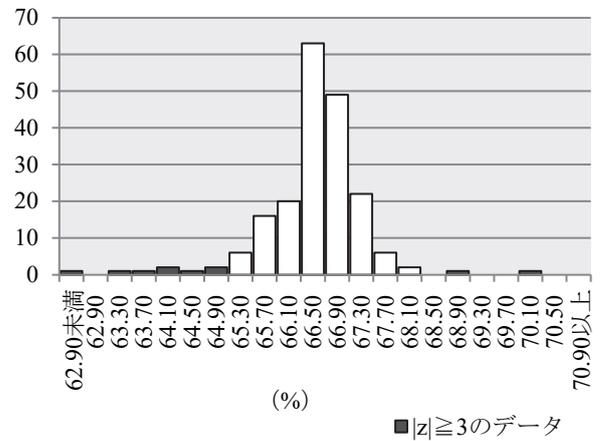
リン (A 試料)



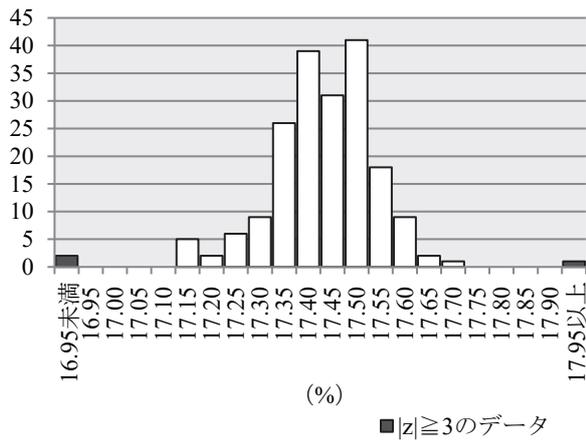
モネンシナトリウム (A 試料)



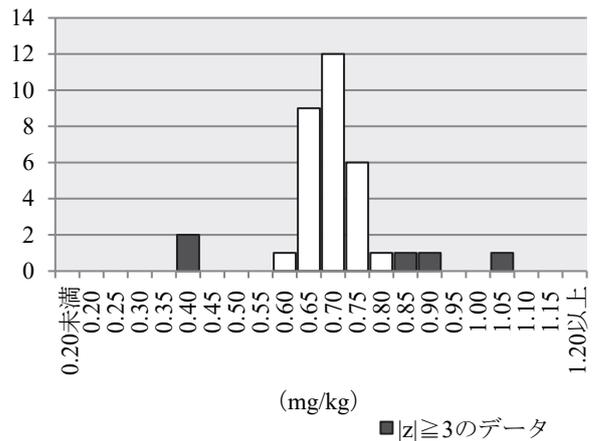
水分 (B 試料)



粗たん白質 (B 試料)

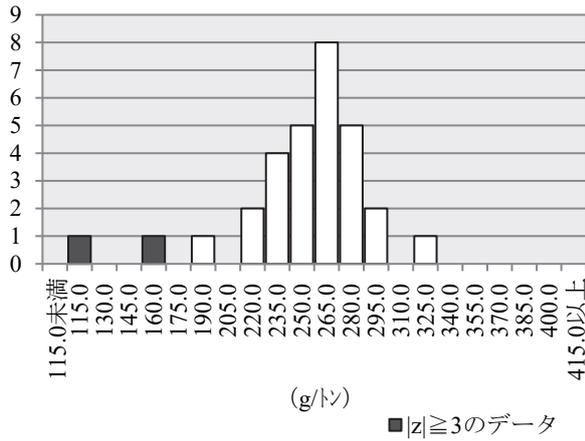


粗灰分 (B 試料)

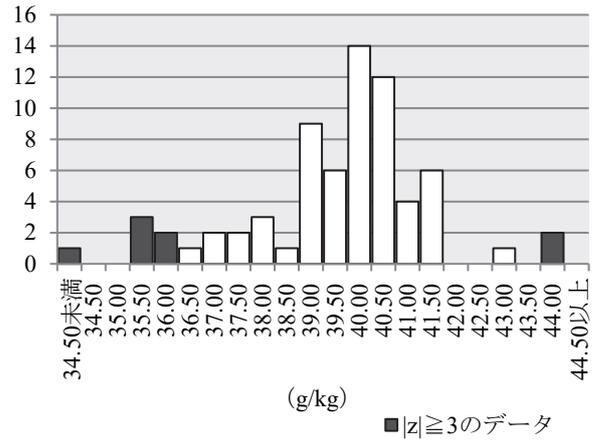


カドミウム (B 試料)

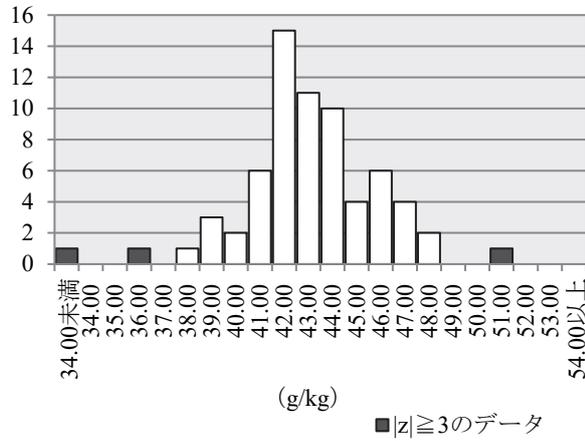
図1 分析成績のヒストグラム (2)



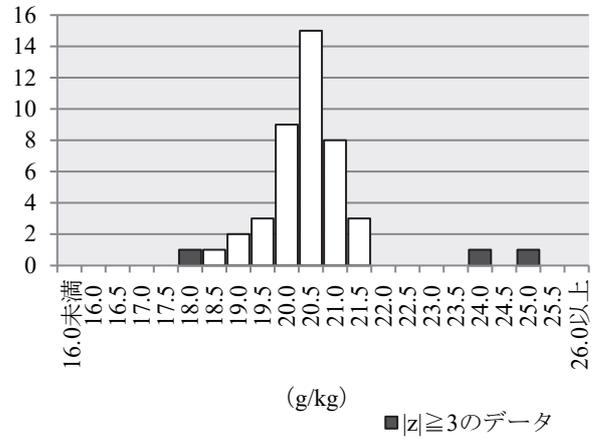
エトキシキン (B 試料)



銅 (D 試料)



亜鉛 (D 試料)



クエン酸マンガン (D 試料)

図1 分析成績のヒストグラム (3)

表6 A 試料の解析結果

区分 ^{注1}	水分 (%)	粗たん白質 (%)	粗脂肪 (%)	粗繊維 (%)	粗灰分 (%)
データ数	206	204	174	126	200
1 中央値	13.35	19.14	2.87	6.15	5.79
1 下限境界値 ^{注2}	12.66	18.33	2.43	4.52	5.41
1 上限境界値	14.04	19.95	3.31	7.77	6.17
2 平均値	13.34	19.13	2.87	6.11	5.80
2 標準偏差	0.23	0.28	0.17	0.54	0.13
2 変動係数 (%)	1.7	1.5	5.9	8.8	2.2
95%信頼区間	13.31~13.38	19.09~19.18	2.84~2.89	6.02~6.21	5.78~5.82

区分	カルシウム (%)	リン (%)	MN(管理分析法) ^{注3} (g(力価)/トン)	MN(飼料分析基準) ^{注4} (g(力価)/トン)
データ数	138	144	32	32
1 中央値	0.867	0.532	30.2	26.6
1 下限境界値 ^{注2}	0.754	0.498	25.1	23.4
1 上限境界値	0.980	0.565	35.3	29.7
2 平均値	0.870	0.532	30.2	26.5
2 標準偏差	0.039	0.010	1.8	0.8
2 変動係数 (%)	4.5	2.0	6.1	3.0
95%信頼区間	0.863~0.876	0.530~0.534	29.5~30.8	26.3~26.8

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。

3 MN(管理分析法)は、モネン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 MN(飼料分析基準)は、モネンシンナトリウムの液体クロマトグラフ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 (mg/kg)	エトキシキン (g/トン)
データ数	199	194	192	34	30
1 中央値	8.04	66.81	17.46	0.72	266.8
1 下限境界値 ^{注2}	7.55	65.35	17.17	0.58	197.6
1 上限境界値	8.53	68.27	17.74	0.85	335.9
2 平均値	8.05	66.80	17.45	0.71	266.7
2 標準偏差	0.16	0.53	0.10	0.04	26.0
2 変動係数 (%)	2.0	0.8	0.6	5.7	9.8
95%信頼区間	8.03~8.08	66.72~66.87	17.44~17.47	0.70~0.73	257.1~276.3

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	69	67	44
1 中央値	40.05	43.51	20.6
下限境界値 ^{注2}	36.63	37.32	18.6
上限境界値	43.47	49.70	22.7
2 平均値	40.04	43.67	20.6
標準偏差	1.25	2.24	0.6
変動係数 (%)	3.1	5.1	3.1
95%信頼区間	39.72~40.35	43.12~44.22	20.4~20.8

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 9 混合した原料の鑑定成績

原 料 名	混合割合 (%)	試 験 室 数				検 出 率 (%)	
		検 出			不 検 出		
		多量 ^{注1}	中量 ^{注2}	少量 ^{注3}			計
とうもろこし	30	111	4	1	116	0	100
大麦	20	89	13	1	103	13	89
米ぬか油かす	10	2	42	34	78	38	67
ふすま	10	5	55	17	77	39	66
DDGS	10	1	38	20	59	57	51
なたね油かす	10	3	95	14	112	4	97
ビートパルプ	3	1	36	34	71	45	61
魚粉	3	0	4	81	85	31	73
リン酸カルシウム	2	0	0	93	93	23	80
食塩	2	0	1	112	113	3	97

注 1 検出した原料の推定される混合割合が 15%以上と報告されたもの。

2 検出した原料の推定される混合割合が 5%以上~15%未満と報告されたもの。

3 検出した原料の推定される混合割合が 1%以上~5%未満と報告されたもの。

表 10 混合した原料以外に検出と報告されたもの

検出原料名	多量 ^{注1}	中量 ^{注2}	少量 ^{注3}	計
大豆油かす	4	47	12	63
コーングルテンミール	0	24	22	46
小麦	10	13	6	29
アルファルファミール	1	2	11	14
炭酸カルシウム	0	0	13	13
ごま油かす	0	4	5	9
チキンミール	0	1	8	9
マイロ	3	3	3	9
麦ぬか	1	7	1	9
精白米	0	2	6	8
コーングルテンフィード	0	4	3	7
玄米	2	2	1	5
綿実油かす	0	1	3	4
やし油かす	0	3	1	4
えん麦	0	2	1	3
キャッサバ	0	2	1	3
肉骨粉	0	0	3	3
あまに油かす	0	0	2	2
フェザーミール	0	0	2	2
ライ麦	0	1	1	2
かに殻粉末	0	0	1	1
カポック油かす	0	1	0	1
スクリーニングペレット	0	1	0	1
ゼオライト	0	0	1	1
尿素	0	0	1	1
ホミニーフード	0	0	1	1

注 1 検出した原料の推定される混合割合が 15 %以上と報告されたもの。

2 検出した原料の推定される混合割合が 5 %以上~15 %未満と報告されたもの。

3 検出した原料の推定される混合割合が 1 %以上~5 %未満と報告されたもの。

8 各試料の解析結果及び鑑定成績

以下、分析法別の解析結果では、分析法別に分けたデータでロバスト法に基づく z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上の分析値を異常値として棄却し、平均値、標準偏差及び相対標準偏差を求めた。

8.1 A 試料（幼令肉用牛育成・肉用牛肥育用配合飼料）の解析結果

1) 水分

分析値は 206 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 11 件であった。これらを除いた平均値は 13.34 %で、この 95 %信頼区間は 13.31~13.38 %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、199 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 13.35 %、0.22 %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7件の報告があった。

2) 粗たん白質

分析値は204件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が3以上のものは18件であった。これらを除いた平均値は19.13%で、この95%信頼区間は19.09~19.18%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19.16%、0.26%及び1.3%であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法では、20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19.08%、0.21%及び1.1%であった。

飼料分析基準・燃焼法では、131件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは9件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ19.15%、0.28%及び1.4%であった。

自動分析機による方法では、41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18.94%、0.33%及び1.8%であった。

3) 粗脂肪

分析値は174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4件であった。これらを除いた平均値は2.87%で、この95%信頼区間は2.84~2.89%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、103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2.92%、0.14%及び4.7%であった。

自動分析機による方法では、71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2.77%、0.15%及び5.2%であった。

4) 粗繊維

分析値は126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6.11%で、この95%信頼区間は6.02~6.21%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、17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5.91%、0.63%及び10.7%であった。

飼料分析基準・ろ過法では、71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2.77%、0.15%及び5.2%であった。

自動分析機による方法では、37件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは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6.42%、0.59%及び9.2%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5件の報告があった。

5) 粗灰分

分析値は200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15件であった。これらを除いた平均値は5.80%で、この95%信頼区間は5.78~5.82%であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、195件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは14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5.80%、0.13%及び2.2%であった。

その他の方法では、自動分析装置による測定等の5件の報告があった。

6) カルシウム

分析値は138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0.870%で、この95%信頼区間は0.863~0.876%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、20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0.880%、0.045%及び5.1%であった。

飼料分析基準・原子吸光光度法では、115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0.870%、0.040%及び4.5%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3件の報告があった。

7) リン

分析値は144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16件であった。これらを除いた平均値は0.532%で、この95%信頼区間は0.530~0.534%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、140件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは14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0.532%、0.010%及び2.0%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) モネンシナトリウム

管理分析法では、分析値はモネンシ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。

また本年度は飼料分析基準の微生物学的定量法と液体クロマトグラフ法を分離して集計した。液体クロマトグラフ法においてはモネンシン A 量をモネンシナトリウム量としているが、本年度 A 試料に含有されたモネンシナトリウム中のモネンシン A の割合がやや低いことが示唆され、微生物学的定量法による分析値との差が大きかったため、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32件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が3以上のものは0件であった。その平均値は30.2 g(力価)/トンで、この95%信頼区間が29.5~30.8 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）では、分析値は32件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が3以上のものは0件であった。その平均値は26.5 g(力価)/トンで、この95%信頼区間は26.3~26.8 g(力価)/トンであった。

飼料分析基準（微生物学的定量法）では、分析値は3件の報告があり、報告数が少ないためロバスト法による解析はせず、参考値として平均値を算出した結果、29.9 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、22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29.9 g(力価)/トン、1.6 g(力価)/トン及び5.4%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30.8 g(力価)/トン、2.2 g(力価)/トン及び7.1%であった。

飼料分析基準・液体クロマトグラフ法では、32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26.5 g(力価)/トン、0.8 g(力価)/トン及び3.0%であった。

飼料分析基準・微生物学的定量法では、3件の報告があり、報告数が少ないためロバスト法による解析はせず、参考値として平均値を算出した結果、29.9 g(力価)/トンであった。

8.2 B 試料（魚粉）の解析結果

1) 水分

分析値は199件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が3以上のものは15件であった。これらを除いた平均値は8.05%で、この95%信頼区間は8.03~8.08%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、192件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは14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8.06%、0.16%及び2.0%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7件の報告があった。

2) 粗たん白質

分析値は194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66.80%で、この95%信頼区間は66.72~66.87%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、10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66.54%、0.68%及び1.0%であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法では、17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66.23%、0.89%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66.97%、0.37%及び0.6%であった。

自動分析機による方法では、42件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは4件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ66.27%、0.55%及び0.8%であった。

3) 粗灰分

分析値は192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17.45%で、この95%信頼区間は17.44~17.47%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、187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17.46%、0.10%及び0.5%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34件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が3以上のものは5件であった。これらを除いた平均値は0.71 g/トンで、この95%信頼区間は0.70~0.73 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、10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0.74 g/トン、0.05 g/トン及び6.1%であった。

飼料分析基準・簡易法では、24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0.70 g/トン、0.03 g/トン及び4.7%であった。

その他の方法では、ICPによる測定等の1件の報告があった。

5) エトキシキン

分析値は30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266.7 g/トンで、この95%信頼区間は257.1~276.3 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26.0 g/トン及び9.8%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69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40.04 g/kgで、この95%信頼区間は39.72~40.35 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、68件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは8件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ40.09 g/kg、1.20 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1件の報告があった。

2) 亜鉛

分析値は67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43.67 g/kgで、この95%信頼区間は43.12~44.22 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、65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43.75 g/kg、2.20 g/kg及び5.0%であった。

その他の方法では、ICPによる測定等の2件の報告があった。

3) クエン酸モランテル

分析値は 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 4 件であった。これらを除いた平均値は 20.6 g/kg で、この 95 %信頼区間は 20.4~20.8 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 3.1 %であった。

8.5 C 試料（鑑定用試料）の鑑定成績

混合した 10 種類の原料の検出とその混合割合の推定を行った。原料混合割合の推定は、15 %以上を多量、5 %以上 15 %未満を中量、1 %以上 5 %未満を少量として報告を求めた。

116 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 26 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、116 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 111 件、中量が 4 件、少量が 1 件であった。

大麦（混合割合 20 %）は、103 件（検出率 89 %）の報告があり、その内訳は多量が 89 件、中量が 13 件、少量が 1 件であった。

米ぬか油かす（混合割合 10 %）は、78 件（検出率 67 %）の報告があり、その内訳は多量が 2 件、中量が 42 件、少量が 34 件であった。

ふすま（混合割合 10 %）は、77 件（検出率 66 %）の報告があり、その内訳は多量が 5 件、中量が 55 件、少量が 17 件であった。

DDGS（混合割合 10 %）は、59 件（検出率 51 %）の報告があり、その内訳は多量が 1 件、中量が 38 件、少量が 20 件であった。

なたね油かす（混合割合 10 %）は、112 件（検出率 97 %）の報告があり、その内訳は多量が 3 件、中量が 95 件、少量が 14 件であった。

ビートパルプ（混合割合 3 %）は、71 件（検出率 61 %）の報告があり、その内訳は多量が 1 件、中量が 36 件、少量が 34 件であった。

魚粉（混合割合 3 %）は、85 件（検出率 73 %）の報告があり、その内訳は中量が 4 件、少量が 81 件であった。

リン酸カルシウム（混合割合 2 %）は、93 件（検出率 80 %）の報告があり、その内訳は少量が 93 件であった。

食塩（混合割合 2 %）は、113 件（検出率 97 %）の報告があり、その内訳は中量が 1 件、少量が 112 件であった。

誤って検出された原料としては、大豆油かすが最も多く、63 件の報告があった。次いで、コーングルテンミールが 46 件、小麦が 29 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)

令和元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…幼令肉用牛育成・肉用牛肥育用配合飼料

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、リン及びモネンシンナトリウム

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）に定める方法並びに「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」（昭和 63 年 5 月 11 日付け 63 畜 B 第 996 号農林水産省畜産局長通知）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 60 年 10 月 15 日付け 60 畜 B 第 2928 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牛用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、必ず今年度の報告書様式にて、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「令和元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、モネン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、エトキシキンについてはg/トンで、カドミウムについてはmg/kg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、モネンシンナトリウム、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。

粗灰分について、飼料分析基準にて実施した場合は、灰化温度を記入してください。

なお、クエン酸モランテル、エトキシキン及びモネンシンナトリウム（液体クロマトグラフ法）を分析した場合には、標準液及び試料溶液のクロマトグラム各1図を添付してください。

(3) 鑑定結果は、検出した原料名を報告書（4）の下欄の検出原料名の選択肢から選んで検出原料名欄に記入し、推定される混合割合は、多量（15%以上）、中量（5%以上15%未満）及び少量（1%以上5%未満）の欄に○印を付してください。1%未満と推定される検出物は、検出原料名欄には記入しないでください。なお、C試料には10種類の原料を混合しています。

検出方法は、該当する番号に○印を付してください。（複数回答可）

(4) 分析の一部を別の試験室等で実施した場合は、その試験室名を備考欄に記入してください。

(5) 令和元年9月27日（金）までに報告してください。

(6) 報告書は、所属する飼料品質改善協議会等により下表に従った報告先に送付してください。

表省略

令和元年度飼料等の共通試料による分析鑑定結果報告書 (様式)

試験室名 _____

担当者 _____

TEL _____

(1) A 試料 分析結果

試料番号 _____

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
粗たん白質	(%)	1. 飼料分析基準 (ケルダール法 (硫酸標準液吸収法)) 2. 飼料分析基準 (ケルダール法 (ホウ酸溶液吸収法)) 3. 飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4. 自動分析機 (メーカー) (型式) 5. その他の方法 ()
粗脂肪	(%)	1. 飼料分析基準 2. 自動分析機 (メーカー) (型式) 3. その他の方法 ()
粗繊維	(%)	1. 飼料分析基準 (静置法) 2. 飼料分析基準 (ろ過法) 3. 自動分析機 (メーカー) (型式) 4. その他の方法 ()
粗灰分	(%)	1. 飼料分析基準 灰化温度 () 2. その他の方法 ()
カルシウム	(%)	1. 飼料分析基準 (シュウ酸アンモニウム法) 2. 飼料分析基準 (原子吸光光度法) 3. その他の方法 ()
リン	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
モネンシン ナトリウム	(g(カラム)/トン)	1. 迅速定量法 2. 迅速定量法 (フローインジェクション法) 3. 液体クロマトグラフ法 LC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 4. 微生物学的定量法

(2) B試料 分析結果

試料番号

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
粗たん白質	(%)	1. 飼料分析基準 (ケルダール法 (硫酸標準液吸収法)) 2. 飼料分析基準 (ケルダール法 (ホウ酸溶液吸収法)) 3. 飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4. 自動分析装置 (メーカー) (型式) 5. その他の方法 ()
粗灰分	(%)	1. 飼料分析基準 灰化温度 () 2. その他の方法 ()
カドミウム	(mg/kg)	1. 飼料分析基準 (溶媒抽出法) 2. 飼料分析基準 (簡易法) 3. その他の方法 ()
エトキシキン	(g/ト)	1. 飼料分析基準 測定条件 LC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 2. その他の方法 ()

(3) D試料 分析結果

試料番号

分析成分名	分析値	備 考
銅	(g/kg)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
亜鉛	(g/kg)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
クエン酸 モランテル	(g/kg)	1. 飼料分析基準 測定条件 LC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 2. その他の方法 ()

(4) C 試料 鑑定結果

試料番号

検出原料名	混合割合	検出方法
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()

多量…15%以上、中量…5%以上 15%未満、少量…1%以上 5%未満

注) 10 種類の原料を混合しています。

検出原料名の選択肢

大麦	えん麦	ライ麦	小麦	小麦粉
とうもろこし	マイロ	玄米	精白米	キャッサバ
ふすま	麦ぬか	米ぬか油かす	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	DDGS	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
カボック油かす	肉骨粉	フェザーミール	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（令和元年度）****Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2019)**

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課
飼料鑑定第二課

1 目 的

飼料等の使用が原因となって、有害畜産物（家畜等の肉、乳、その他の食用に供される生産物で人の健康をそこなうおそれがあるもの）が生産され、又は家畜等に被害が生じることにより畜産物の生産が阻害されることを防止する見地から、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律¹⁾（以下「飼料安全法」という。）第3条第1項の規定に基づき、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令²⁾（以下「成分規格等省令」という。）において、飼料中の有害物質等の成分規格（以下「省令基準値」という。）が定められ、また、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準³⁾（以下「指導基準通知」という。）において、飼料中の有害物質等の指導基準値及び管理基準値（以下「指導基準値等」という。）が定められている。

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という。）では、飼料分析基準⁴⁾等に規定された方法を用いて、農林水産省が毎年定めている「食品の安全性に関する有害化学物質のサーベイランス・モニタリング年次計画」等に基づき、省令基準値及び指導基準値等の適合状況のモニタリング及び省令基準値、指導基準値等が設定されていない有害物質等の含有実態を把握するためのサーベイランス（以下「モニタリング等」という。）を実施している。今回、令和元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31年4月から令和2年3月までの間に、農政局又は農政事務所が飼料安全法第56条の規定に基づき、港湾サイロに対して立入検査を実施した際に収去した飼料、FAMIC 肥飼料安全検査部、札幌センター、仙台センター、名古屋センター、神戸センター及び福岡センターが、飼料安全法第57条の規定に基づき、単体飼料工場、配混合飼料工場、港湾サイロ等に対して立入検査を実施した際に採取した飼料等並びにサーベイランスに協力いただいた飼料製造事業場において採取した飼料を対象とした。

モニタリング等の対象とした試料及び点数を表1に示した。

2.2 モニタリング等の対象成分

以下の成分をモニタリング等の対象とした。なお、各試料に対するモニタリング等実施成分の選定にあたっては、飼料の原産国、過去の検出実態等を勘案するとともに、配混合飼料の対象家畜等、使用されている原料等にも留意した。

1) 有害物質

i かび毒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）

とうもろこし又は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、ゼアラレノン及び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, ジアセトキシスシルペノール, デオキシニバレノール-3-グルコシド, 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 -ゼアラレノール及び β -ゼアラレノール

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（122 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
33 成分を対象とした。

イ ア以外の農薬

飼料分析基準に方法が規定されている農薬のうち 89 成分を対象とした。

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							
		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	動物由来たん白質			サルモネラ	
顕微鏡鑑定	ELISA試験				PCR試験	不溶性不純物			
種類	試料点数								
	幼すう育成用	2	2	2	2				2
	中すう育成用	2	1	1	1				1
	成鶏飼育用	21	17	12	14				10
	ブロイラー肥育前期用	4	3	2	3				2
	ブロイラー肥育後期用	7	6		5				5
	ほ乳期子豚育成用	6	4	2	4				3
	子豚育成用	5	5		2				
	肉豚肥育用	15	14	7	11				6
	種豚飼育用	6	4	3	5				2
	豚複数ステージ用	2	2						1
	ほ乳期子牛育成用代用乳用	4	2	1	1	4			
配 混 合 飼 料	ほ乳期子牛育成用	2	2	1	2	2	2	2	1
	若令牛育成用	7	5	1	4	7	6	6	3
	乳用牛飼育用	31	22	8	14	31	29	29	9
	幼令肉用牛育成用	1	1			1	1	1	1
	肉用牛肥育用	32	23	4	20	32	32	32	5
	肉牛繁殖用	5	3	2	1	5	5	5	1
	種牛飼育用	1	1	1	1	1	1	1	
	乳用牛・羊飼育用	2				2	2	2	
	牛複数ステージ用	15	5	1	3	15	14	14	5
	養殖水産動物用	33		33					
	圧べんとうもろこし・アルファルファ二種混合飼料	1	1			1	1	1	1
	動物性たん白質混合飼料	9				9	9	9	4
	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	2				2	2	2	1
	上記以外の混合飼料	55	5	1	4	55	54	54	3
	小 計	271	128	82	97	168	159	159	67
穀 類	圧べん大麦	2	2		2				
	きな粉	1			1				
	グレインソルガム (マイロ)	2	2		2				
	小麦	2	2		2				
	小麦粉	5	3		5				
	末粉	3	3		3				
	精白米	1	1		1				
	とうもろこし	52	52		52				
	小 計	68	65		68				
	そ う こ う 類	米ぬか	4	4		4			
米ぬか油かす		6	4		5				1
コーングルテンフィード		26	26		25				
しょう油かす		1	1		1				
大豆皮		2			2				
とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル (DDGS)		22	22		22				
ふすま		51	49		48				1
ホミニーフード		2	2		2				
麦ぬか		2	2		2				
小 計		116	110		111				2

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		
		種 類	試料 点数	かび毒	重金属	農薬	動物由来たん白質			サルモ ネラ
顕微鏡 鑑定	ELISA 試験						PCR 試験	不溶性 不純物		
植物 性 油 か す 類	ごま油かす	1	1		1					
	コーングルテンミール	19	19		19					
	大豆油かす	50	49		46				2	
	大豆たん白	1	1		1					
	なたね油かす	17	16		17					
小 計	88	86		84					2	
動物 質 性 飼 料	チキンミール	27				27	27	27		17
	魚粉	80		39		56	56	56		46
	原料混合肉骨粉（ポークチキンミール）	20		1			20	20		13
	蒸製骨粉	1					1	1		
	肉骨粉（ポークミール）	4					4	4		4
	フェザーミール	14				14	14	14		9
	ホタテ抽出物	3				3	3	3		
小 計	149		40		100	125	125		89	
乾 牧 草	アルファルファ	1		1	1					
	ウィートヘイ	2		2	2					
	オーツヘイ	2		1	2					
	クレイングラス	1		1	1					
	スーダングラス	5		5	5					
	チモシー	2		2	2					
	ライグラス	1	1	1	1					
小 計	14	1	13	14						
そ の 他	カカオ豆殻	1	1		1					
	コーンコブミール	1	1		1					
	飼料用酵母	1				1	1	1		
	とう乳かす	1								1
	とうふかす	1	1		1					
	動物性油脂	71							71	
	特定動物性油脂	2							2	
	綿実	2	2		2					
	やし中果皮	1	1		1					
	りんごジュースかす	1	1		1					
小 計	82	7		7	1	1	1	73	1	
合 計	788	397	135	381	269	285	285	73	161	

2.3 サンプルング方法等

1) 有害物質及び病原微生物の分析用試料

試料は、飼料等検査実施要領⁵⁾により、採取、保管した。とうもろこし及び牧草は、飼料中の農薬の検査に係る通知⁶⁾により、採取した。

分析用試料は、飼料分析基準第2章の規定により調製した。

2) 動物由来たん白質等の分析用試料

試料は、飼料分析基準第16章第1節の規定により、採取、保管及び調製した。

3) 不溶性不純物の分析用試料

基準油脂分析試験法⁷⁾の試料採取方法に準拠した次の方法⁸⁾により採取した。

動物性油脂を積み込んだタンクローリー車の上部のふたを開け、ポンプサンプラー（容量約 300 mL）を用いてハッチの上部、中部及び下部の 3 箇所から動物性油脂を採取し、これらを混合して試料とした。

2.4 試験方法

1) 有害物質

i かび毒

飼料分析基準第 5 章に規定された方法により実施した。

ii 重金属等

飼料分析基準第 4 章第 1 節に規定された方法により実施した。

iii 農薬

飼料分析基準第 6 章に規定された方法により実施した。

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 比重選別及び 1.2 顕微鏡検査を応用した鑑定方法¹⁰⁾により、獣骨（肉骨粉由来組織）の有無を確認した。鑑定方法の概要を図 1 に示した。

ii ELISA 試験

飼料分析基準第 17 章第 2 節 1.1 の(3)に規定された方法により実施した。

iii PCR 試験

魚粉等及び牛用配混合飼料は、飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.1 に規定された方法により、ほ乳動物由来 DNA を対象に混入の有無を確認した。チキンミール等、肉骨粉等及び輸入飼料の一部は、飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.2 に規定された方法により、反すう動物由来 DNA を対象に混入の有無を確認した。なお、乳製品等が原料として使用又は混入の可能性のある試料は、飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.1 付記に規定された方法により、乳製品等除去処理を行った後、上記試験を実施した。

3) 不溶性不純物

成分規格等省令別表第 1 の 5 の (1) のアに規定された方法により実施した。

4) サルモネラ

飼料分析基準第 18 章 1 に規定された方法により実施した。なお、分離したサルモネラは、血清型別を実施した。

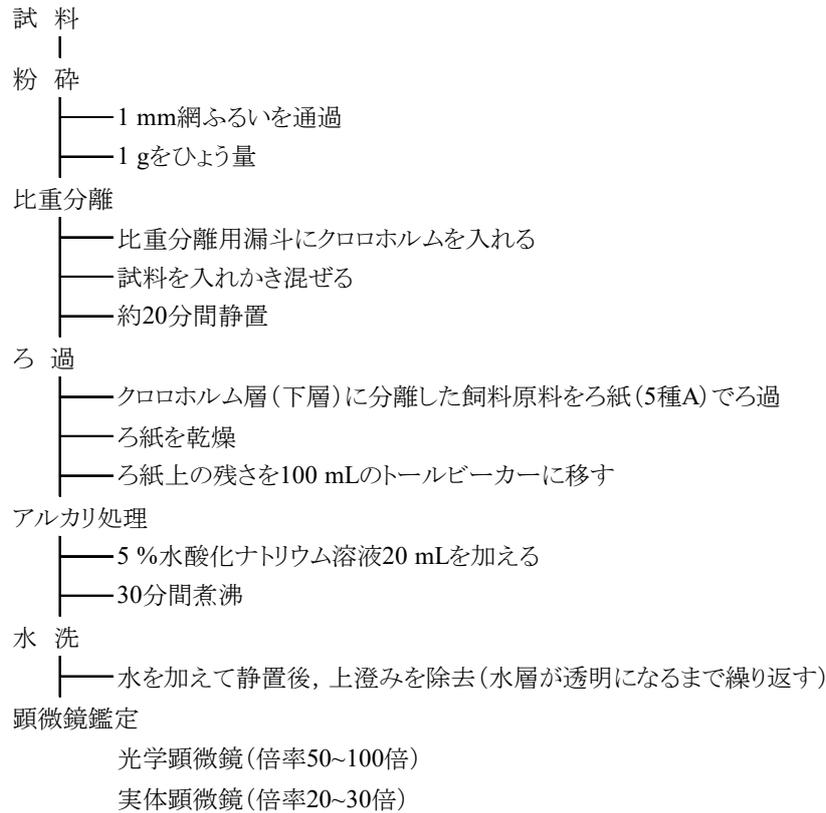


図1 試料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

3 結果

3.1 有害物質

有害物質のモニタリング等の結果について、省令基準値及び指導基準値等の有無によりそれぞれ取りまとめた。なお、令和元年8月6日にかび毒及び重金属等の指導基準値等が一部改正¹¹⁾され、令和2年2月6日に施行されたが、取りまとめの都合上、改正前の指導基準値等に従い整理した。

1) かび毒及びエンドファイト産生毒素

配混合飼料 128 点，単体飼料 268 点及び乾牧草 1 点について，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の 3 成分のモニタリング及びサーベイランス，並び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 24 成分のサーベイランスを実施した。指導基準値等が定められている 3 成分の結果を表 2-1 に，指導基準値等が定められていない 24 成分の結果を表 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 93 点中 10 点から検出され（検出率 11%），最大値は 0.0009 mg/kg，検出されたものの平均値（以下同様）は 0.0005 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 52 点中 16 点から検出され（検出率 31%），最大値は 0.005 mg/kg，平均値

は 0.001 mg/kg であり，管理基準値 (0.02 mg/kg) を超えるものはなかった。

ii ゼアラレノン

配混合飼料 93 点中 92 点から検出され (検出率 99 %)，最大値は 0.32 mg/kg，平均値は 0.038 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 52 点中 50 点から検出され (検出率 96 %)，最大値は 0.15 mg/kg，平均値は 0.034 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，DDGS の平均値は 0.41 mg/kg (最大値 1.1 mg/kg) 及びコーングルテンミールの平均値は 0.53 mg/kg (最大値 1.1 mg/kg) であった。

iii デオキシニバレノール

配混合飼料 94 点中 84 点から検出され (検出率 89 %)，最大値は 1.6 mg/kg，平均値は 0.24 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) を超えたものが 1 点 (1.6 mg/kg，子豚育成用配合飼料) あった。

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 52 点中 41 点から検出され (検出率 79 %)，最大値は 0.69 mg/kg，平均値は 0.26 mg/kg であった。とうもろこしの加工副産物の一部では定量値の高いものがあり，コーングルテンフィードの平均値は 1.6 mg/kg (最大値 3.3 mg/kg)，DDGS の平均値は 2.4 mg/kg (最大値 6.6 mg/kg) 及びコーングルテンミールの平均値は 0.23 mg/kg (最大値 1.9 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及びサーベイランスの結果

モニタリング等の対象試験料	アフラトキシンB ₁ (検出下限 ¹⁾ 0.0003 mg/kg)				ゼアラレノン (検出下限 ²⁾ 0.0003 mg/kg)				デオキシニパレノール (検出下限 ²⁾ 0.003 mg/kg)									
	管理基準値 (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		管理基準値 (mg/kg)		うち検出されたもの							
	試験料 点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	試験料 点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	試験料 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	4	22	0.0006	0.0005	—	—	—	—	—	—	—						
配合飼料	管 0.01	9	11	0.0005	0.0005	1	70	70	100	0.32	0.038	1	45	39	87	1.6	0.22	
(表外 ¹)に示す飼料)	管 0.02	61	5	8	0.0009	0.0005	—	18	18	100	0.11	0.040	4	43	41	95	0.52	0.26
配合飼料 (上記以外の配合飼料)	—	5	0	0	—	—	—	5	4	80	0.029	0.016	—	6	4	67	0.52	0.22
その他の混合飼料	—	93	10	11	0.0009	0.0005	—	93	92	99	0.32	0.038	—	94	84	89	1.6	0.24
配合飼料小計	管 0.02	52	16	31	0.005	0.001	—	52	50	96	0.15	0.034	—	52	41	79	0.69	0.26
とうもろこし	—	2	0	0	—	—	—	2	2	100	0.011	0.006	—	2	2	100	0.61	0.43
圧べん大麦	—	2	0	0	—	—	—	2	0	0	—	—	—	2	2	100	0.25	0.15
小麦	—	2	0	0	—	—	—	2	1	50	0.004	0.004	—	3	3	100	0.33	0.15
小麦粉	—	2	0	0	—	—	—	2	0	0	—	—	—	3	3	100	0.21	0.15
米粉	—	1	0	0	—	—	—	1	0	0	—	—	—	1	0	0	—	—
精白米	—	2	1	50	0.004	0.004	—	2	2	100	0.14	0.079	—	2	2	100	0.056	0.036
マイロ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
コーングルテンフィード	—	—	—	—	—	—	—	21	21	100	0.37	0.19	—	24	23	96	3.3	1.6
コーンコブミール	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0	0	—	—
米ぬか	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	4	100	0.093	0.035
米ぬか油かす	—	4	0	0	—	—	—	4	4	100	0.019	0.010	—	—	—	—	—	—
しょう油かす	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DDGS	—	14	1	7	0.002	0.002	—	20	20	100	1.1	0.41	—	1	1	100	0.046	0.046
とうふかす	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	20	20	100	6.6	2.4
ふすま	—	49	0	0	—	—	—	49	35	71	0.043	0.006	—	49	45	92	0.67	0.20
ホミニーフイード	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	100	0.64	0.43
麦ぬか	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	100	0.43	0.23
コーングルテンミール	—	—	—	—	—	—	—	19	19	100	1.1	0.53	—	17	14	82	1.9	0.23
ごま油かす	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0	0	—	—
大豆油かす	—	49	2	4	0.001	0.0009	—	49	46	94	0.056	0.019	—	49	19	39	0.20	0.036
なたね油かす	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16	2	13	0.053	0.032
カカオ豆殻	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0	0	—	—
大豆たん白	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0	0	—	—
綿実	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	100	0.041	0.027
やし中果皮	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0	0	—	—
りんごジュースかす	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0	0	—	—
総計	—	272	30	11	—	—	—	318	292	92	—	—	—	352	271	77	—	—

1) 該当する配合飼料の種類は以下のとおり。

アフラトキシンB₁：幼すう用，ブローラー肥育前期用，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

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

2) 複数の試験法がある成分については、低い方の検出下限を記載した。

表 2-2 指導基準値等が定められていないかび毒のサーベイランスの結果

サーベイランスの対象成分	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	272	3	1	0.0007	0.0005
アフラトキシンG ₁	0.0003	272	1	0.4	0.0004	0.0004
アフラトキシンG ₂	0.0003	272	0	0		
ステリグマトシスチン	0.0003	264	75	28	0.006	0.0008
HT-2トキシシ	0.002	218	54	25	0.14	0.019
T-2トキシシ	0.002	352	92	26	0.067	0.009
ネオソラニオール	0.002	352	10	3	0.012	0.004
フザレノン-X	0.003	352	4	1	0.044	0.026
3-アセチルデオキシニバレノール	0.006	218	23	11	0.22	0.057
15-アセチルデオキシニバレノール	0.006	218	140	64	0.76	0.12
ニバレノール	0.002	254	67	26	0.22	0.033
ジアセトキシシルペノール	0.002	218	12	6	0.021	0.005
デオキシニバレノール-3-グルコシド	0.002	218	163	75	1.2	0.11
フモニシンB ₁	0.0006	98	96	98	1.7	0.56
フモニシンB ₂	0.0006	98	95	97	1.4	0.22
フモニシンB ₃	0.0006	98	93	95	0.5	0.09
オクラトキシンA	0.002	34	3	9	0.004	0.003
α -ゼアララノール	0.002	275	0	0		
β -ゼアララノール	0.002	275	1	0.4	0.002	0.002
ゼアララノン	0.002	275	30	11	0.020	0.007
α -ゼアラレノール	0.003	275	30	11	0.012	0.006
β -ゼアラレノール	0.003	275	46	17	0.024	0.007
エルゴバリン	0.01	1	1	100	0.16	0.16
ロリトレムB	0.01	1	1	100	0.65	0.65

*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

配混合飼料（養殖水産動物用を除く）49点、乾牧草等13点、魚粉等（魚粉及び肉骨粉）40点及び養殖水産動物用配合飼料33点について、管理基準値が定められている重金属等4成分のモニタリング及びサーベイランスを実施した。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

養殖水産動物用を除く配混合飼料49点中29点から検出され（検出率59%）、最大値は0.17 mg/kg、平均値は0.07 mg/kgであった。乾牧草等6点中3点から検出され（検出率50%）、最大値は0.23 mg/kg、平均値は0.18 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39点中38点から検出され（検出率97%）、最大値は2.1

mg/kg, 平均値は0.86 mg/kgであった。肉骨粉1点からは0.07 mg/kg 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。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では 33 点中 32 点から検出され（検出率 97%），最大値は 1.1 mg/kg, 平均値は 0.56 mg/kg であった。

ii 水銀

養殖水産動物用を除く配混合飼料 49 点中 12 点から検出され（検出率 24%），最大値は 0.03 mg/kg, 平均値は 0.02 mg/kg であった。乾牧草等 6 点中 3 点から検出され（検出率 50%），最大値は 0.04 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 39 点中 38 点から検出され（検出率 97%），最大値は 0.94 mg/kg, 平均値は 0.26 mg/kg であった。肉骨粉 1 点からは 0.22 mg/kg 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。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では 33 点全点から検出され、最大値は 0.29 mg/kg, 平均値は 0.12 mg/kg であった。

iii 鉛

養殖水産動物用を除く配混合飼料 49 点中 7 点から検出され（検出率 14%），最大値は 2.1 mg/kg, 平均値は 0.9 mg/kg であった。乾牧草等 5 点からは検出されなかった。いずれも管理基準値（3 mg/kg）を超えるものはなかった。

動物質性飼料では、魚粉 39 点中 16 点から検出され（検出率 41%），最大値は 1.0 mg/kg, 平均値は 0.4 mg/kg であった。肉骨粉 1 点からは検出されなかった。いずれも、管理基準値（7 mg/kg）を超えるものはなかった。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では 33 点中 9 点から検出され（検出率 27%），最大値は 0.6 mg/kg, 平均値は 0.4 mg/kg であった。

iv ひ素

養殖水産動物用を除く配混合飼料 49 点中 19 点から検出され（検出率 39%），最大値は 0.70 mg/kg, 平均値は 0.21 mg/kg であった。乾牧草等 5 点中 1 点から検出され（検出率 20%），その値は 0.17 mg/kg であった。いずれも管理基準値（2 mg/kg）を超えるものはなかった。

動物質性飼料では、魚粉では 39 点全てから検出され、最大値は 12 mg/kg, 平均値は 4.0 mg/kg であった。肉骨粉 1 点からは 0.07 mg/kg 検出された。いずれも管理基準値（魚粉は 15 mg/kg, 肉骨粉は 7 mg/kg）を超えるものはなかった。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では 33 点全点から検出され、最大値は 4.4 mg/kg, 平均値は 1.9 mg/kg であった。

表3 重金属等のモニタリング及びサーベイランスの結果

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 (養殖水産動物用を除く)	49	29	59	0.17	0.07	0.03
		乾牧草等	6	3	50	0.23	0.18	
	3	魚粉	39	38	97	2.1	0.86	
		肉骨粉	1	1	100	0.07	0.07	
	—	養殖水産動物用配合飼料	33	32	97	1.1	0.56	
	総計		128	103	80	2.1	0.52	
水銀	0.4	配混合飼料 (養殖水産動物用を除く)	49	12	24	0.03	0.02	0.01
		乾牧草等	6	3	50	0.04	0.03	
	1	魚粉	39	38	97	0.94	0.26	
		肉骨粉	1	1	100	0.22	0.22	
	—	養殖水産動物用配合飼料	33	33	100	0.29	0.12	
	総計		128	87	68	0.94	0.16	
鉛	3	配混合飼料 (養殖水産動物用を除く)	49	7	14	2.1	0.9	0.2
		乾牧草等	5	0	0			
	7	魚粉	39	16	41	1.0	0.4	
		肉骨粉	1	0	0			
	—	養殖水産動物用配合飼料	33	9	27	0.6	0.4	
	総計		127	32	25	2.1	0.5	
ひ素	2	配混合飼料 (養殖水産動物用を除く)	49	19	39	0.70	0.21	0.05
		乾牧草等 (稲わらを除く)	5	1	20	0.17	0.17	
	15	魚粉	39	39	100	12	4.0	
	7	肉骨粉	1	1	100	0.07	0.07	
	—	養殖水産動物用配合飼料	33	33	100	4.4	1.9	
	総計		127	93	73	12	2.4	

3) 農薬

飼料等 381 点について、省令基準値が定められている農薬 33 成分及び省令基準値が定められていない農薬 89 成分の計 122 成分についてモニタリング及びサーベイランスを実施した。省令基準値が定められている 33 成分の結果を表 4 に、省令基準値が定められていない 89 成分の結果を表 5 に示した。全般に、牧草及びとうもろこしからの検出率が高かった。結果の概要は以下のとおりであった。

i クロルピリホス

省令基準値が定められているとうもろこし、マイロ及び牧草 (計 68 点) についてモニタリングを実施した結果、とうもろこしは 52 点中 2 点から検出 (検出率 4 %、最大値 0.344 mg/kg)、マイロは 2 点中 1 点から検出 (0.038 mg/kg) され、とうもろこしで省令基準値 (0.1 mg/kg) を超えたものが 2 点 (0.167 及び 0.344 mg/kg) あった。

また、省令基準値が定められていない飼料 309 点についてサーベイランスを実施した結果、2 点から検出された。その内訳は、配混合飼料 97 点中 1 点 (検出率 1 %、0.17 mg/kg)、りんごジュースかす 1 点中 1 点 (0.27 mg/kg) であった。

ii ピリミホスメチル

省令基準値が定められているとうもろこし及びマイロ（計 54 点）についてモニタリングを実施した結果、とうもろこしは 52 点中 11 点から検出（検出率 21 %，最大値 0.56 mg/kg），マイロは 2 点中 1 点から検出（0.24 mg/kg）されたが、省令基準値を超えるものはなかった。

また、省令基準値が定められていない飼料 323 点についてサーベイランスを実施した結果、24 点から検出された。その内訳は、配混合飼料 97 点中 19 点（検出率 20 %，最大値 0.19 mg/kg），コーングルテンフィード 25 点中 2 点（検出率 8 %，最大値 0.19 mg/kg），コーングルテンミール 19 点中 3 点（検出率 16 %，最大値 0.052 mg/kg）であった。

iii マラチオン

省令基準値が定められているとうもろこし、マイロ及び牧草（計 68 点）についてモニタリングを実施した結果、牧草からは検出されなかった。とうもろこしは 52 点中 1 点から検出（検出率 2 %，0.28 mg/kg），マイロは 2 点中 1 点から検出（0.098 mg/kg）されたが、省令基準値を超えるものはなかった。

また、省令基準値が定められていない飼料 309 点についてサーベイランスを実施した結果、9 点から検出された。その内訳は、配混合飼料 97 点中 3 点（検出率 3 %，最大値 0.13 mg/kg），ふすま 48 点中 5 点（検出率 10 %，最大値 0.033 mg/kg），コーングルテンミール 19 点中 1 点（検出率 5 %，最大値 0.065 mg/kg）であった。

iv その他の検出された農薬

① 穀類

デルタメトリン及びトラロメトリン（とうもろこし及びマイロ），ビフェントリン（とうもろこし）並びにフェニトロチオン（とうもろこし）

② 牧草

アトラジン，エトフェンプロックス，プロシミドン，プロピコナゾール及びペンディメタリン

③ その他の原料

イソプロチオラン（米ぬか），クロルピリホスメチル（ふすま），デルタメトリン及びトラロメトリン（ふすま），ビフェントリン（コーングルテンフィード）並びにペルメトリン（コーングルテンフィード及びコーングルテンミール）

④ 配混合飼料

シハロトリン並びにデルタメトリン及びトラロメトリン

表4 農薬のモニタリング及びサーベイランスの結果（省令基準値が定められている成分）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	試料点数	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
γ-BHC (リンデン)	配混合飼料 (鶏・うずら、豚用)	0.05	47	0	0			
	配混合飼料 (牛等用)	0.4	46	0	0			
	牧草	0.4	14	0	0			0.005
	基準値のない飼料	—	274	0	0			
	計	—	381	0	0			
BHC	配混合飼料	0.005	93	0	0			
	牧草	0.02	14	0	0			0.005
	基準値のない飼料	—	274	0	0			
	計	—	381	0	0			
DDT	配混合飼料	0.1	93	0	0			
	牧草	0.1	14	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	274	0	0			
	計	—	381	0	0			
アトラジン	とうもろこし	0.2	52	0	0			
	マイロ	0.02	2	0	0			
	牧草	15	14	1	7	0.024	0.024	0.02
	基準値のない飼料	—	309	0	0			
	計	—	377	1	0.3	0.024	0.024	
アラクロール	とうもろこし	0.02	52	0	0			
	マイロ	0.05	2	0	0			
	牧草	0.05	14	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	313	0	0			
	計	—	381	0	0			
アルドリン及び ディルドリン	配混合飼料	0.02	93	0	0			
	牧草	0.02	14	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	274	0	0			
	計	—	381	0	0			
イソフェンホス	とうもろこし	0.02	52	0	0			
	基準値のない飼料	—	329	0	0			0.02
	計	—	381	0	0			
エチオン	牧草	20	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	367	0	0			0.02
	計	—	381	0	0			
エンドリン	配混合飼料	0.01	93	0	0			
	牧草	0.01	14	0	0			0.01
	基準値のない飼料	—	274	0	0			
	計	—	381	0	0			
クロルピリホス	とうもろこし	0.1	52	2	4	0.344	0.26	
	マイロ	0.75	2	1	50	0.038	0.038	
	牧草	13	14	0	0			0.01
	基準値のない飼料	—	309	2	0.6	0.27	0.22	
	計	—	377	5	1	0.344	0.20	
クロルピリホスメチル	とうもろこし	7	52	0	0			
	マイロ	10	2	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	323	5	2	0.050	0.037	
	計	—	377	5	1	0.050	0.037	
クロルフェンビンホス	とうもろこし	0.05	52	0	0			
	基準値のない飼料	—	327	0	0			0.02
	計	—	379	0	0			
クロルプロファム	とうもろこし	0.05	52	0	0			
	基準値のない飼料	—	325	0	0			0.02
	計	—	377	0	0			

表4 農薬のモニタリング及びサーベイランスの結果（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)	
クロルベンジレート	とうもろこし	0.02	52	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	329	0	0			
	計	—	381	0	0			
シハロトリン	とうもろこし	0.04	52	0	0			0.02
	マイロ	0.2	2	0	0			
	牧草	0.6	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	309	1	0.3	0.088	0.088	
計	—	377	1	0.3	0.088	0.088		
ジメトエート	とうもろこし	1	52	0	0			0.02
	マイロ	0.2	2	0	0			
	牧草	2	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	309	0	0			
計	—	377	0	0				
ダイアジノン	とうもろこし	0.02	52	0	0			0.02
	マイロ	0.1	2	0	0			
	牧草	10	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	309	0	0			
計	—	377	0	0				
デルタメトリン及び トラロメトリン	とうもろこし	1	52	1	2	0.044	0.044	0.03
	マイロ	1	2	1	50	0.32	0.32	0.03
	牧草	5	14	0	0			0.045
	基準値のない飼料	—	309	2	0.6	0.20	0.12	0.03
計	—	377	4	1	0.32	0.15		
テルブホス	とうもろこし	0.01	52	0	0			0.005
	マイロ	0.05	2	0	0			
	牧草	1	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	309	0	0			
計	—	377	0	0				
パラチオン	とうもろこし	0.3	52	0	0			0.02
	マイロ	0.08	2	0	0			
	牧草	5	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	309	0	0			
計	—	377	0	0				
ピリミホスメチル	とうもろこし	1	52	11	21	0.56	0.23	0.02
	マイロ	1	2	1	50	0.24	0.24	
	基準値のない飼料	—	323	24	7	0.19	0.069	
	計	—	377	36	10	0.56	0.12	
フィプロニル	配混合飼料（鶏・うずら用）	0.01	25	0	0			0.003
	配混合飼料（牛等、豚用）	0.02	68	0	0			
	牧草	0.2	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	274	0	0			
計	—	381	0	0				
フェニトロチオン	とうもろこし	1	52	2	4	0.19	0.11	0.02
	マイロ	1	2	0	0			
	牧草	10	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	309	0	0			
計	—	377	2	0.5	0.19	0.11		
フェントエート	とうもろこし	0.4	52	0	0			0.02
	マイロ	0.4	2	0	0			
	基準値のない飼料	—	323	0	0			
	計	—	377	0	0			

表4 農薬のモニタリング及びサーベイランスの結果（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)	
フェンバレレート	配混合飼料（鶏・うずら用）	0.5	25	0	0		
	配混合飼料（豚用）	4	22	0	0		
	配混合飼料（牛等用）	8	46	0	0		
	牧草	13	14	0	0		0.02
	基準値のない飼料	—	274	0	0		
	計	—	381	0	0		
フェンプロパトリン	牧草	20	14	0	0		
	基準値のない飼料	—	367	0	0		0.02
	計	—	381	0	0		
ヘプタクロル	配混合飼料	0.02	93	0	0		
	牧草	0.02	14	0	0		
	基準値のない飼料	—	274	0	0		0.02
	計	—	381	0	0		
ペルメトリン	とうもろこし	2	52	0	0		
	マイロ	2	2	0	0		
	牧草	55	14	0	0		0.02
	基準値のない飼料	—	309	2	0.6	0.27	0.17
	計	—	377	2	0.5	0.27	0.17
ペンディメタリン	とうもろこし	0.2	52	0	0		
	マイロ	0.1	2	0	0		
	牧草	15	14	1	7	0.12	0.12
	基準値のない飼料	—	309	0	0		0.02
	計	—	377	1	0.3	0.12	0.12
ホスメット	とうもろこし	0.05	52	0	0		
	マイロ	0.05	2	0	0		
	牧草	40	14	0	0		0.02
	基準値のない飼料	—	309	0	0		
	計	—	377	0	0		
ホレート	とうもろこし	0.05	52	0	0		
	マイロ	0.05	2	0	0		
	牧草	1.5	14	0	0		0.02
	基準値のない飼料	—	309	0	0		
	計	—	377	0	0		
マラチオン	とうもろこし	2	52	1	2	0.28	0.28
	マイロ	2	2	1	50	0.098	0.098
	牧草	135	14	0	0		0.02
	基準値のない飼料	—	309	9	3	0.13	0.054
	計	—	377	11	3	0.28	0.079
メチダチオン	とうもろこし	0.1	52	0	0		
	マイロ	0.2	2	0	0		
	牧草	12	14	0	0		0.02
	基準値のない飼料	—	309	0	0		
	計	—	377	0	0		

表5 農薬のサーベイランスの結果（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				うち検出されたもの				うち検出されたもの				
	試験点数	検出点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	検出下限 (mg/kg)	モニタリング等の対象成分	試験点数	検出点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	検出下限 (mg/kg)
EPN	381	0	0			0.02	シラフルオフェン	381	0	0			0.02
アセトクロール	381	0	0			0.02	ターバシル	381	0	0			0.02
アニコホス	381	0	0			0.02	チオベンカルブ	381	0	0			0.02
アメトリン	381	0	0			0.02	テクナゼン	381	0	0			0.02
アリドクロール	381	0	0			0.02	テトラクロルピホス	381	0	0			0.02
アレスリン	381	0	0			0.02	テトラコナゾール	381	0	0			0.02
イサゾホス	381	0	0			0.02	テトラジホシ	381	0	0			0.02
イソプロチオラン	381	2	0.5	0.026	0.026	0.02	テブコナゾール	381	0	0			0.02
イプロベンホス	381	0	0			0.02	テブフェンピラド	381	0	0			0.02
エタルフルラリン	381	0	0			0.02	テフルトリン	381	0	0			0.02
エディフェンホス	381	0	0			0.02	テルブトリン	381	0	0			0.02
エトフェンプロックス	381	1	0.3	0.091	0.091	0.02	トリアジメホシ	381	0	0			0.02
エトフェセート	381	0	0			0.02	トリアレート	381	0	0			0.02
エトプロホス	381	0	0			0.02	トリアルラリン	381	0	0			0.02
エトリジアゾール	381	0	0			0.02	トリプロキシストロピン	381	0	0			0.02
エトリムホス	381	0	0			0.02	ナプロパミド	381	0	0			0.02
オキサジアゾン	381	0	0			0.02	パラチオンメチル	381	0	0			0.02
カズサホス	381	0	0			0.02	ハルフェンプロックス	381	0	0			0.02
カルフェントラゾンエチル	381	0	0			0.02	ピフェントリン	381	2	0.5	0.043	0.032	0.02
キントゼン	381	0	0			0.02	ピベロホス	381	0	0			0.02
クレソキシムメチル	381	0	0			0.02	ピリダフェンチオン	381	0	0			0.02
クロルタルジメチル	381	0	0			0.02	ピリダベン	381	0	0			0.02
クロルデン	381	0	0			0.02	ピリプロキシフェン	381	0	0			0.02
クロルフェナピル	381	0	0			0.02	ピンクロゾリン	381	0	0			0.02
ジクロホップメチル	381	0	0			0.02	フェナリモル	381	0	0			0.02
ジクロラン	381	0	0			0.02	フェノチオカルブ	381	0	0			0.02
ジフェナミド	381	0	0			0.02	フェノトリン	381	0	0			0.02
ジフェノコナゾール	381	0	0			0.02	フェンチオン	381	0	0			0.02
ジメテナミド	381	0	0			0.02	フェンプロナゾール	381	0	0			0.02
ジメピベレート	381	0	0			0.02	ブタミホス	381	0	0			0.02

うち検出されたもの

うち検出されたもの

うち検出されたもの

うち検出されたもの

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 56 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 27 点及びフェザーミール 14 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった．なお，PCR 試験において魚粉 2 点から反すう動物由来 DNA が検出されたが，ELISA 試験において同一試料から牛由来たん白質が検出されなかったことから，混入確認判定手順に基づき牛由来たん白質の混入は認められないと総合的に判定した．肉骨粉（ポークミール）4 点，原料混合肉骨粉 20 点及び蒸製骨粉 1 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．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	56	0	0	56	0	0	56	2	3.6	0
ホタテ抽出物	3	0	0	3	0	0	3	0	0	0
計	59	0	0	59	0	0	59	2	3.4	0

表 8 動物由来たん白質のモニタリングの結果（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	27	0	0	27	0	0	27	0	0	0
フェザーミール	14	0	0	14	0	0	14	0	0	0
肉骨粉（ポークミール）				4	0	0	4	0	0	0
原料混合肉骨粉				20	0	0	20	0	0	0
蒸製骨粉				1	0	0	1	0	0	0
計	41	0	0	66	0	0	66	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 2 点，若令牛育成用配合飼料 7 点，乳用牛飼育用配合飼料 31 点，幼令肉用牛育成用配合飼料 1 点，肉用牛肥育用配合飼料 32 点，種牛飼育用配合飼料 1 点，肉牛繁殖用配合飼料 5 点，乳用牛・羊飼育用配合飼料 2 点，牛複数ステージ用配合飼料 15 点，牛用二種混合飼料 1 点，糖蜜吸着飼料 1 点及びその他の牛用混合飼料 21 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．国内で製造されたその他の畜種向けの混合飼料（動物質原料を含むもの）10 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験による確認を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった．これらの結果を表 9 に示した．

輸入された牛用混合飼料 35 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の結果（国内製造牛用飼料等）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数			
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			ほ乳動物由来DNA				反すう動物由来DNA		
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)		試験 点数	検出 点数	検出率 (%)
牛用飼料等													
ほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料	4	0	0										0
ほ乳期子牛育成用配合飼料	2	0	0	2	0	0	2	0	0				0
若令牛育成用配合飼料	7	0	0	6	0	0	6	0	0				0
乳用牛飼育用配合飼料	31	0	0	29	0	0	29	0	0				0
幼令肉用牛育成用配合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
肉用牛肥育用配合飼料	32	0	0	32	0	0	32	0	0				0
種牛飼育用配合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
肉牛繁殖用配合飼料	5	0	0	5	0	0	5	0	0				0
乳用牛・羊飼育用配合飼料	2	0	0	2	0	0	2	0	0				0
牛複数ステージ用配合飼料	15	0	0	14	0	0	14	0	0				0
二種混合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
糖蜜吸着飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
その他の混合飼料	21	0	0	20	0	0	20	0	0				0
小計	123	0	0	114	0	0	114	0	0				0
その他の畜種向け飼料 (動物質原料を含むもの)													
フィッシュソリュブル吸着飼料	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
その他の混合飼料	9	0	0	9	0	0				9	0	0	0
小計	10	0	0	10	0	0				10	0	0	0

表 10 動物由来たん白質のモニタリングの結果（輸入飼料等）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			反すう動物由来DNA			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
牛用混合飼料										
アメリカ合衆国	18	0	0	18	0	0	18	0	0	0
中華人民共和国	5	0	0	5	0	0	5	0	0	0
タイ	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0
フランス	2	0	0	2	0	0	2	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
英国	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
アイルランド	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ポルトガル	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
スペイン	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
イタリア	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ブラジル	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
小計	35	0	0	35	0	0	35	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
小計	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
合計	36	0	0	36	0	0	36	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）71点及び特定動物性油脂2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．その結果を表11に示した．

表11 不溶性不純物のモニタリングの結果

モニタリングの対象試料	成分規格	試料点数	最大値 (%)	平均値 (%)
動物性油脂	0.15%以下	71	0.129	0.015
特定動物性油脂	0.02%以下	2	0.008	0.004

3.4 サルモネラ

国内で製造された単体飼料94点及び配混合飼料67点についてモニタリングを実施した結果，単体飼料では1点からサルモネラが検出された（検出率1.1%）．なお，前年度の検出率は0%，前々年度の検出率は1.4%であった．配混合飼料ではサルモネラは検出されなかった．なお，前年度の検出率は1.2%，前々年度の検出率は1.1%であった．これらの結果を表12及び表13に示した．

検出されたサルモネラの血清型は表14に示すとおりであり，過去5年以内に飼料から分離された事例はなかった．

なお，病原微生物検出情報¹²⁾によると，飼料から分離されたこの血清型は，国内で発生したサルモネラ食中毒の原因菌としてヒトからも分離されており，ここ数年分離された上位15血清型に含まれるものであった．

表12 サルモネラのモニタリングの結果（単体飼料の種類別）

モニタリングの対象試料	試験点数	検出点数	検出率 (%)
動物質性飼料			
魚粉	46	0	0
チキンミール	17	0	0
フェザーミール	9	1	11
豚肉骨粉	4	0	0
原料混合肉骨粉	13	0	0
そうこう類			
米ぬか油かす	1	0	0
ふすま	1	0	0
植物性油かす類			
大豆油かす	2	0	0
その他			
とう乳かす	1	0	0
計	94	1	1.1

表 13 サルモネラのモニタリングの結果（配混合飼料の種類別）

モニタリングの対象試料	試験点数	検出点数	検出率 (%)
牛用配合飼料	25	0	0
鶏用配合飼料	20	0	0
豚用配合飼料	12	0	0
動物性たん白質混合飼料	5	0	0
その他の混合飼料	5	0	0
計	67	0	0

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
	フェザーミール
<i>S. Agona</i>	1
計	1

文 献

- 1) 法律：飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律，昭和 28 年 4 月 11 日，法律第 35 号 (1953).
- 2) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，省令第 35 号 (1976).
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) 農林省畜産局長通知：飼料等検査実施要領の制定について，昭和 52 年 5 月 10 日，52 畜 B 第 793 号 (1977).
- 6) 農林水産省消費・安全局畜水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」の一部改正について，令和元年 8 月 6 日，元消安第 1605 号 (2019).
- 12) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr.html>, cited 11 Jun. 2019

調査資料

2 飼料原料及び配合飼料中の腸球菌の薬剤耐性モニタリング調査（令和元年度）

浅尾 美由起^{*1}, 奥山 紀子^{*2}, 山上 陽平^{*2}

Monitoring Results of Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Feed Ingredients and Formula Feed (in the Fiscal Year 2019)

Miyuki ASAO^{*1}, Noriko OKUYAMA^{*2} and Yohei YAMAGAMI^{*2}(*¹ Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)
(Now Planning and Coordination Department, FAMIC),*² Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

We have made an antimicrobial susceptibility test on enterococci isolated from soybean meal, fish meal, poultry by-product meal and formula feed for poultry.

In order to isolate the enterococci from samples, their selective enrichment culture in AC broth, selective culture on Enterococcosel agar and two-time pure isolations on Brain Heart Infusion agar were conducted in due order. Then isolated gram-positive cocci were detected by the cultivation in Heart Infusion broth with 6.5 % NaCl. Having confirmed the biochemical characteristics of the mobility and pigment production, enterococci was identified with Rapid ID 32 STREP API. The minimum inhibitory concentration (MIC) was subsequently measured by using the broth microdilution method according to the guideline of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Enterococci isolated from feed ingredients and formula feed were 11 *Enterococcus faecalis*, 6 *E. faecium* and 12 other species. The antimicrobial resistance rates were 0.0 % to 9.1 % for *E. faecalis*, 0.0 % to 50.0 % for *E. faecium* and 0.0 % to 8.3 % for other species.

The concentration of viable bacteria in soybean meal, fish meal, poultry by-product meal and formula feed for poultry was $5.8 \times 10^2 \sim 1.9 \times 10^5$ CFU/g, $3.2 \times 10^2 \sim 4.4 \times 10^5$ CFU/g, $0 \sim 2.1 \times 10^5$ CFU/g and $2.5 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^6$ CFU/g respectively.

Key words: antimicrobial resistance; soybean meal; fish meal; poultry by-product meal; formula feed for poultry; *Enterococcus faecalis*; *Enterococcus faecium*; minimum inhibitory concentration (MIC); colony forming units (CFU)

キーワード：薬剤耐性；大豆油かす；魚粉；チキンミール；鶏用配合飼料；*Enterococcus faecalis*；*Enterococcus faecium*；最小発育阻止濃度（MIC）；生菌数（CFU）

1 緒 言

薬剤耐性菌に対する国際行動計画が2015年にWHOで採択され、日本では「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン 2016-2020」¹⁾が策定された。畜産分野では「慎重使用の推進等の強化、薬剤耐性の動向調査・監視を強化、養殖水産動物用医薬品の使用に専門家が関与する仕組みを導入、ア

*¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 企画調整部

*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

ジア地域における国際協力の強化」などに取り組んでいる。独立行政法人農林水産消費安全技術センターは、平成11年度から実施されているJVARM（動物由来薬剤耐性菌モニタリング）の中で農場（平成11年度から平成27年度）や、と畜場（平成24年度から）で採材した直腸便又は盲腸便から分離される腸球菌を担当しているが、飼料等から分離される腸球菌は対象外である。また、飼料中の腸球菌の薬剤耐性の動向に関する知見や研究事例が少ないことから、平成30年度²⁾より飼料原料から分離される腸球菌の薬剤感受性の調査を実施している。

本年度は、昨年度に引き続き大豆油かす、魚粉及びチキンミールを調査対象とし、新たに鶏用配合飼料を加えた4種類の試料から分離した腸球菌の薬剤感受性を調査したので報告する。また、飼料の微生物による汚染状況を調べるために生菌数の測定も行ったので合わせて報告する。

2 実験方法

2.1 試料

平成31年4月から令和元年12月までの9ヶ月の間に、大豆油かす、魚粉、チキンミール及び鶏用配合飼料を飼料等検査実施要領の微生物試験用の飼料の採取方法³⁾で採取した。採取場所は大豆油かすについては配合飼料工場、その他については各製造事業場であった。試料受け入れ後から試験開始までは、冷蔵庫中4℃で保存し、腸球菌の分離は採材後5週間以内に行った。

また、上記の試料から各種類15点を任意に抽出し、採材後3週間以内に生菌数の測定を行った。

2.2 試薬

1) 水はRFD240RA（東洋製作所製）により蒸留した蒸留水（JIS K 0211の5213に定義された蒸留水）を用いた。なお、調製に用いた試薬は、等級があるものは特級を用いた。

2) 生理食塩液

塩化ナトリウム溶液（0.9 w/v%）を121℃で15分間高圧蒸気滅菌した。

3) 1.6 w/v%ブロモクレゾールパープルエタノール溶液

ブロモクレゾールパープル 0.8 gを無水エタノール 47.5 mLに溶かし、蒸留水 2.5 mLを加えて調製した。

4) AC培地

ACブイオン基礎培地（日水製薬製）50.5 g及びアジ化ナトリウム（和光純薬工業製）0.25 gを蒸留水 1000 mLに溶かし、500 mL培養瓶に250 mL分注して、121℃で15分間高圧蒸気滅菌した。

5) エンテロコッコセル寒天培地（以下「ECS培地」という。）

ECS培地（Becton, Dickinson and Company製）56 g又は（極東製薬工業製）58 gを蒸留水 1000 mLに溶かし、121℃で15分間高圧蒸気滅菌した。これを60℃まで冷却した後、プラスチック製滅菌シャーレに一様に広がるように15 mL分注し、水平に静置して凝固させた後、倒置してふたをわずかにずらし、37℃で1時間静置して培地表面を乾燥させた。

6) ブレインハートインフュージョン寒天培地（以下「BHI寒天培地」という。）

BHI Agar（Becton, Dickinson and Company製）52 gを蒸留水 1000 mLに溶かし、121℃で15分間高圧蒸気滅菌した。以下、5)によった。

7) グラム染色液

フェイバーG「ニッスイ」(日水製薬製)の染色液 A (ビクトリアブルー), 脱色液 (ピクリン酸・エタノール液) 及び染色液 B (サフラニン)

8) 6.5 w/v%塩化ナトリウム加ハートインフュージョン培地 (以下「6.5 %NaCl 加 HI 培地」という.)

HI Broth (Difco 製) 25 g, 塩化ナトリウム 60 g, ブドウ糖 1 g 及び 1.6 %プロモクレゾールパープルエタノール溶液 1 mL を蒸留水 1000 mL に溶かした. これを試験管に 3 mL 程度分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.

9) ミュラーヒントン半流動培地 (以下「MH 半流動培地」という.)

Muller Hinton Broth (Becton, Dickinson and Company 製) 21 g 及び Bacto-Agar (Becton, Dickinson and Company 製) 2.5 g を蒸留水 1000 mL に溶かした. これを試験管に 3 mL 程度分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後, 高層に凝固させた.

10) Rapid ID32 STREP API (ビオメリユー製)

11) サスペンションメディアウム 2mL (ビオメリユー製)

12) ハートインフュージョン培地 (以下「HI 培地」という.)

HI Broth (Becton, Dickinson and Company 製) 25 g を蒸留水 1000 mL に溶かし, 試験管に 2 mL 程度分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.

13) 20 w/v% スキムミルク (以下「20 %スキムミルク」という.)

スキムミルク (Becton, Dickinson and Company 製) 20 g を蒸留水 1000 mL に溶かし, 試験管に 2 mL 程度分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.

14) 薬剤感受性試験用フローズンプレート「栄研」(オーダープレート) (栄研化学製)

培地には Ca^{2+} 及び Mg^{2+} を添加した Muller Hinton Broth を用いた. 供試薬剤と薬剤濃度域については Table 1 のとおり. 試薬受け入れ後から使用までは, -80 °C で保存した. なお, 今年度, JVARM において測定薬剤が見直されたことに伴い, 本調査でも昨年度の測定薬剤から一部変更を行った.

15) ハートインフュージョン寒天培地 (以下「HI 寒天培地」という.)

HI Agar (Becton, Dickinson and Company 製) 40 g を蒸留水 1000 mL に溶かし, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した. 以下, 5) によった.

16) ミュラーヒントンプロス (以下「MHB 培地」という.)

Mueller Hinton Broth (Becton, Dickinson and Company 製) 21 g を蒸留水 1000 mL に溶かし, 試験管に 4 mL 程度分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.

17) 0.1 %ペプトン加生理食塩水

Peptone (Becton, Dickinson and Company 製) 1 g 及び塩化ナトリウム 8.5 g を蒸留水 1000 mL に溶かし, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.

18) 標準寒天培地

ペプトン (Becton, Dickinson and Company 製) 5 g, 酵母エキス (Becton, Dickinson and Company 製) 2.5 g, ブドウ糖 1 g 及び Bacto-Agar (Becton, Dickinson and Company 製) 15 g を蒸留水 1000 mL に溶かし, 水酸化ナトリウム 1 mol/L 又は塩酸 1 mol/L を用いて pH7.0~7.2 に調整した後, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した. 滅菌後は 50 °C で保温した.

Table 1 Kind, concentration range and break point of antimicrobial agents

Group	Antibiotics	Abbreviation	Range ($\mu\text{g/mL}$)	Break Point (BP)
Aminoglycosides	Gentamicin	GM	0.12 – 256	32
Aminoglycosides	Kanamycin	KM	0.25 – 512	128
Aminoglycosides	Streptomycin	SM	0.25 – 512	—
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	CPFX	0.12 – 128	4 ^{a)}
Glycopeptide	Vancomycin	VCM	0.12 – 128	32 ^{a)}
Lincomycins	Lincomycin	LCM	0.25 – 512	128
Macrolides	Azithromycin	AZM	0.25 – 64	—
Macrolides	Erythromycin	EM	0.12 – 128	8 ^{a)}
Macrolides	Tylosin	TS	0.12 – 256	64
Penicillins	Ampicillin	ABPC	0.12 – 128	16 ^{a)}
Phenicol	Chloramphenicol	CP	0.25 – 512	32 ^{a)}
Polyether	Salinomycin Sodium	SNM	0.12 – 32	—
Polypeptide	Zinc Bacitracin	BC	0.25 – 512	—
Quinolone	Nalidixic acid	NA	0.12 – 256	—
Tetracyclines	Tetracycline	TC	0.12 – 64	16 ^{a)}

a) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of CLSI

2.3 装置及び器具

- 1) インキュベーター：庫内温度を 35~45 °C（管理精度： ± 1 °C）に設定できるもの
- 2) プラスチック製滅菌シャーレ（以下「シャーレ」という。）：内径 90 mm，高さ 15 mm
- 3) 白金耳：ポリプロピレン製，ガンマ滅菌済み，1 μL ディスポールプ
- 4) トランファーセット：STEM 製，ポリプロピレン製，ガンマ滅菌済み
- 5) ストマッカー：EXNIZER400 オルガノ製
- 6) その他：試験に用いた器具のうち，培地及び菌液に接触するものは，乾熱滅菌又は高圧蒸気滅菌済みのものを用いた。

2.4 分離及び同定方法

1) 分離

i 選択増菌培養

分析試料 25 g を量って AC 培地に入れ，振り混ぜた後，37 °C で 24~48 時間培養した。

ii 選択分離培養

選択増菌培養液の 1 白金耳を ECS 培地に画線塗抹し，倒置して 37 °C で 24~48 時間培養した。

iii 純粋分離培養

ECS 培地表面の腸球菌と疑われる集落（周囲が黒褐色又は黒色帯で，中心が半透明のコロニー）を 2 個釣菌し，それぞれ生理食塩液 15 μL 程度に懸濁した。各懸濁液の 1 白金耳を BHI 寒天培地に画線塗抹し，倒置して 37 °C で 18~24 時間培養した。

培養後，BHI 寒天培地表面の集落を 1 個釣菌し，上記と同様に操作した。

2) 同定

i 生化学的性状試験

以下のア～ウにより Table 2 の生化学的性状を確認した。

ア 確認培養

BHI 寒天培地表面の集落を 1 個釣菌し，MH 半流動培地に穿刺した後，6.5 % NaCl 加 HI 培地に接種した。MH 半流動培地は 37 °C で 18~24 時間，6.5 % NaCl 加 HI 培地は 45 °C で 18~24 時間培養した。

イ グラム染色

スライドガラスをエタノールに一晩以上浸漬し，バーナーで軽く焼き，冷ました。その上に，2 回目の純粋分離培養塗抹用の菌液 10 μ L を分注し，薄く広げた。乾燥後，火炎固定した塗抹面に染色液 A を十分添加し，1 分間静置した。染色液を水洗後，脱色液で染色液 A の青色が溶け出さなくなるまで脱色した。脱色液を水洗後，塗抹面に染色液 B を十分添加し，1 分間静置した。染色液を水洗後，ろ紙で水気をふき取り，光学顕微鏡で観察した。

ウ 色素産生性

BHI 寒天培地上の集落を綿棒で掻き取り，色素産生の有無を確認した。

Table 2 Biochemical confirmation test of *Enterococcus*

Biochemical confirmation	Culture	Culture medium	Character of <i>Enterococcus</i>
High NaCl concentration	18~24 h at 45 \pm 1 °C	HI ^{a)} broth with 6.5 w/v%NaCl	+
High temperature	18~24 h at 45 \pm 1 °C	HI ^{a)} broth with 6.5 w/v%NaCl	+
Motility	18~24 h at 37 \pm 1 °C	Mueller-Hinton semisolid agar	+ ^{b)} / -

Biochemical confirmation	Reagent	Character of <i>Enterococcus</i>
Gram stain	Faber G "Nissui"	Gram positive
Pigmentation	—	+ ^{c)} / -

a) Heart Infusion

b) *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*c) *E. casseliflavus*

上記の生化学的性状試験で腸球菌の性状を示した菌のうち，1 試料につき 1 株を Rapid ID32 STREP API で菌種を同定した。

ii Rapid ID32 STREP API (以下「API」という。)

サスペンションメディウム 2 mL に McFarland 濁度 4 になるように菌を接種した。調製した菌液をプレートの各カップに 55 μ L ずつ分注し，ふたをして 37 °C で 4~4.5 時間培養した。キットの添付文書のとおり判定し，判定結果を APIWEB 同定ソフトウェアに入力し，菌種を同定した。

iii 菌種の決定

まず，API の結果は同定確率が 80 %id 以上のものを採用することとした。このうち，API で判定された菌種と性状試験の結果が一致した株は，API の結果を同定結果としたが，同定

精度に対するコメントが「Identification to the genus」となった株は「*E. sp.*」とした。また、API で判定された菌種と性状試験の結果が一致しなかった株は「確定せず」とした。この他、腸球菌以外の菌種と同定された株やコメントが「unacceptable」や「doubtful」であった株は「分離なし」とした。菌種が決定した株は感受性試験菌株として、HI 培地と 20 %スキムミルクを等量ずつ混合した保存用培地に-80 °C で保存した。

iv 再分離・同定

上記で「*E. sp.*」又は「確定せず」となった株は、2 回目の純粋分離培養の BHI 培地から釣菌した菌を ECS 培地に塗抹し、再度、分離・同定試験を実施し、前述の菌種の決定方法で菌種を決定した。

なお、API を実施する前のグラム染色でコンタミネーションが確認された株は、この時点で再分離を実施したため、「*E. sp.*」又は「確定せず」となった場合でも再々分離は実施しなかった。

2.5 薬剤感受性試験（微量液体希釈法）

1) 精度管理株

Staphylococcus aureus ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 を精度管理株として感受性試験菌株と同時に試験し、精度管理株の MIC（最小発育阻止濃度：Minimum Inhibitory Concentration）が Table 3 の精度管理限界値に入ることを確認した。

2) 菌液の調製

感受性試験菌株を HI 寒天培地に画線塗抹し、倒置して 37 °C で 18~24 時間培養した。HI 寒天培地表面の集落を 4~5 個釣菌し、MHB 培地に接種し、37 °C で 18~24 時間培養した。培養後の MHB 培地を生理食塩液で 10 倍希釈し、McFarland 濁度 0.5 に合わせ、その菌液をさらに生理食塩液で 10 倍希釈して、フローズンプレート接種用の菌液とした。

3) フローズンプレートへの接種及び培養

2) で調製した菌液の全量をトランスファーセットのトレイに入れ、96 ピンプレートを浸し、96 ピンプレートをフローズンプレートの容器に接種した。フローズンプレートに蓋をして、35 °C で 16~20 時間培養した。

4) 判定

リーディングミラーの上にフローズンプレートを置き、肉眼で懸濁又は沈殿が認められない場合及び沈殿物があっても 1 mm 未満で 1 個の場合は発育阻止とみなした。接種菌の発育が阻止された薬剤の最低濃度を MIC とした。

なお、分離同定から感受性試験までの概要を Scheme 1 に、菌種の決定方法を Scheme 2 に示した。

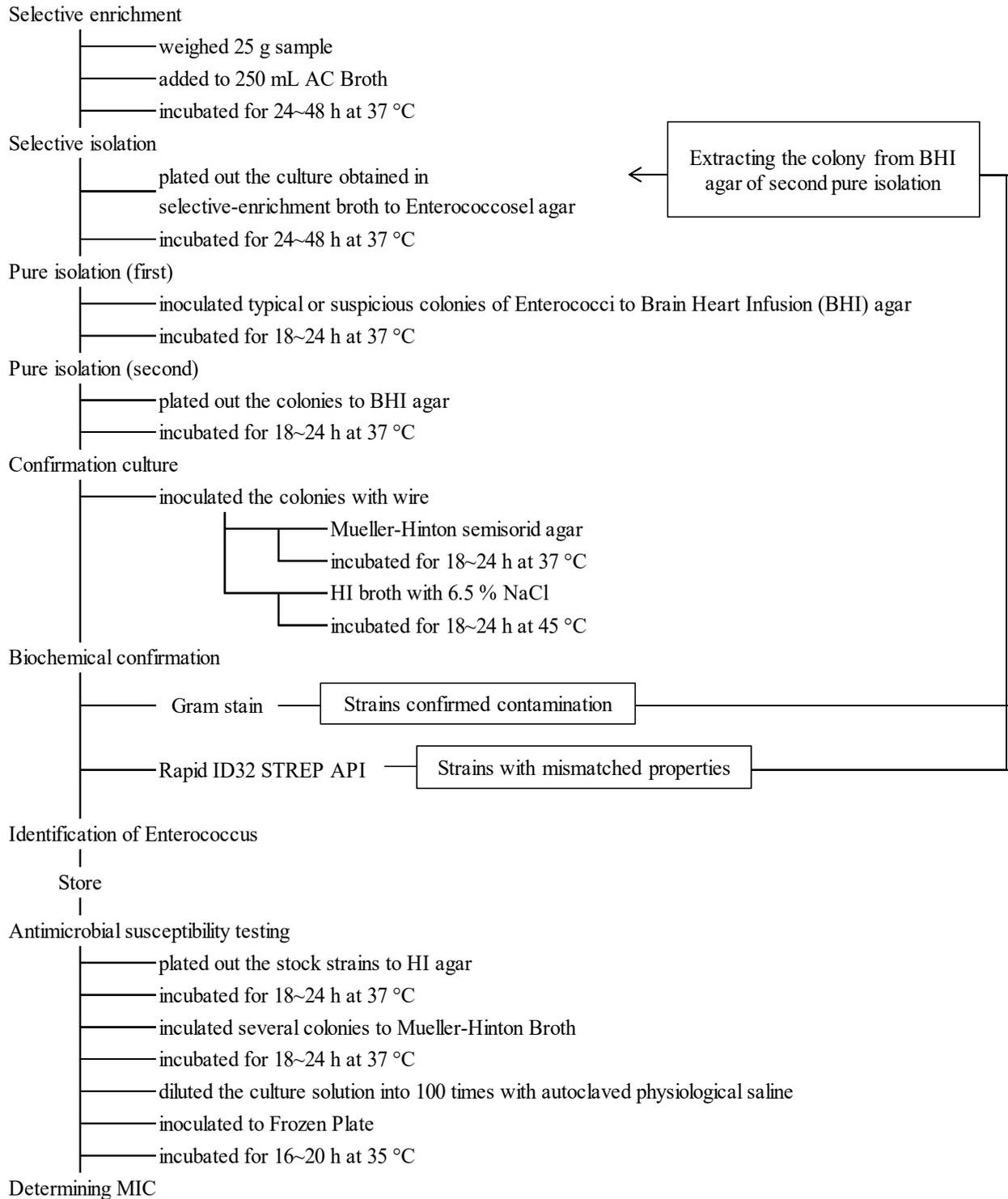
Table 3 Quality control limit of quality control strains ($\mu\text{g/mL}$)

Antimicrobial agent	Quality Control Strains			
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
GM ^{a)}	0.12 – 1	4 – 16	0.25 – 1	0.5 – 2
KM ^{a)}	1 – 4	16 – 64	1 – 4	*
SM	*	*	*	*
CPFX ^{a)}	0.12 – 0.5	0.25 – 2	<0.125 ^{b)}	0.25 – 1
VCM ^{a)}	0.5 – 2	1 – 4	*	*
LCM	0.25 – 2	8 – 32	≥ 256	≥ 256
AZM ^{a)}	0.5 – 2	*	*	*
EM ^{a)}	0.25 – 1	1 – 4	*	*
TS	0.5 – 4	0.5 – 4	> 32	> 32
ABPC ^{a)}	0.5 – 2	0.5 – 2	2 – 8	*
CP ^{a)}	2 – 16	4 – 16	2 – 8	*
SNM	0.5 – 2	0.25 – 2	*	*
BC	32 – 128	32 – 128	≥ 256	≥ 256
NA ^{a)}	*	*	1 – 4	*
TC ^{a)}	0.12 – 1	8 – 32	0.5 – 2	8 – 32

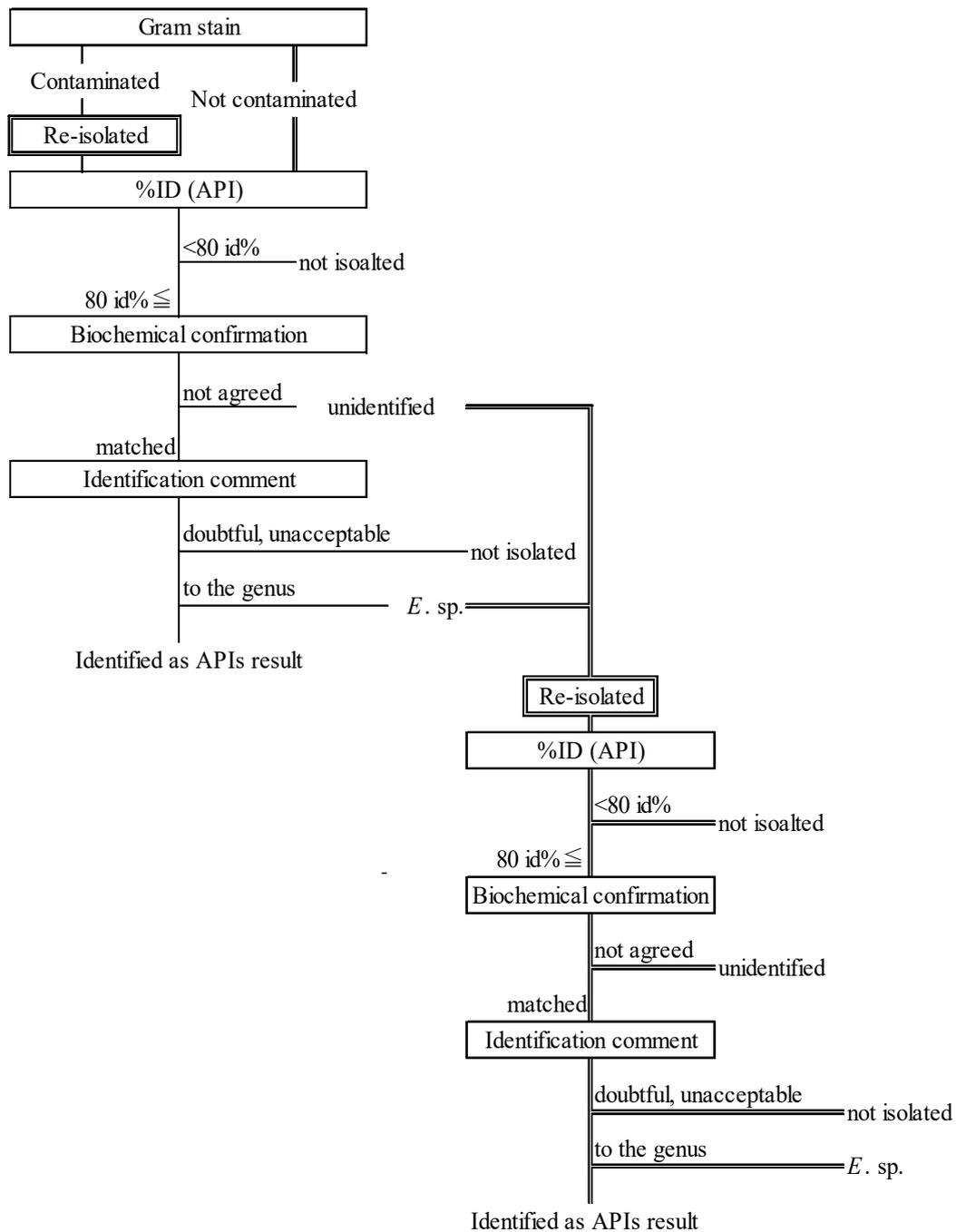
* : No quality control limit

a) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (CLSI)

b) According to the CLSI regulations, it is 0.004 $\mu\text{g/mL}$ to 0.015 $\mu\text{g/mL}$, but this time only 0.125 $\mu\text{g/mL}$ is measured, so "<0.125 $\mu\text{g/mL}$ " was set as the quality control limit value.



Scheme 1 Antimicrobial susceptibility testing of *Enterococcus* spp. isolated from feed ingredients and formula feed



Scheme 2 Flow of the identification

2.6 生菌数の測定方法

1) 試料の調製

分析試料 25 g を量って滅菌ストマッカー袋に入れ、0.1%ペプトン加生理食塩水 225 mL を加え、ストマッカーにより 200 rpm で 1 分間攪拌及び混合した試料液を生理食塩液で 10^{-1} から 10^{-5} まで希釈した。

2) 培養

同一希釈段階について 2 枚ずつシャーレを用意した。シャーレに試料液又は各希釈液 1 mL を分注し、標準寒天培地 15~20 mL を注いで、直ちに静かに混和し、固化するまで静置した。

固化後、ふたをずらして倒置し、35 °C の培養器の中で培地表面を乾燥させた。乾燥後、倒置して35 °C で22~26 時間培養した。培養後、直ちに集落数を測定できない場合は、ラップフィルムに包んで冷蔵庫中4 °C に保存し、24 時間以内に菌数を測定した。

3) 測定及び算出

培養後、シャーレ1枚当たり30~300個の集落が認められた希釈段階のシャーレの発育集落を計測し、2枚のシャーレの集落数の平均値に希釈倍数を乗じて試料1g当たりの生菌数を算出した。

3 結果及び考察

3.1 再分離

昨年度から菌種の同定にはRapid ID32 STREP APIを使用しているが、APIにより運動性がある菌種の*E. gallinarum*又は*E. casseliflavus*と判定される株(同定確率が80%以上)の中に、性状試験では運動性が陰性の株が多数あり、性状試験の結果とAPIの判定結果が不一致であった株は「分離なし」としていた。判定結果が不一致であった原因をコンタミネーションと考え、今年度は、判定結果が不一致であった株及びコメントが「Identification to the genus」となった株は再度、ECS培地に塗抹し、再分離、同定を行った。その結果はTable 4のとおりである。

再分離は33株実施(グラム染色でコンタミネーションが確認され再分離を実施した株を除く)した。再分離前に判定結果が不一致であった株は29株で、そのうちの27株がAPIの判定結果では*E. gallinarum*であった。また、再分離の結果、33株のうち4株は*E. faecium*、3株は*E. sp.*と同定された。残りの26株はAPIで運動性がある菌種の*E. gallinarum*又は*E. casseliflavus*と判定されたが、性状試験では運動性が陰性であったため、再分離を実施しても菌種を確定できなかった。

Table 4 API identification before / after isolation

Strains that changed the API identification after reisolation

	Before reisolation	After reisolation	species	No. of strains
Identified	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	4
	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i> (to the genus)	<i>E. sp.</i>	1
Unidentified	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>	-	2
	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	-	2
	<i>E. faecium</i> (to the genus)	<i>E. gallinarum</i>	-	2

Strains that not changed the API identification after reisolation

	Before/After reisolation	species	No. of strains
Identified	<i>E. faecium</i> (to the genus)	<i>E. sp.</i>	1
	<i>E. hirae</i> (to the genus)	<i>E. sp.</i>	1
Unidentified	<i>E. gallinarum</i>	-	20

3.2 腸球菌分離状況

平成31年4月から令和元年12月までに収集した試料の点数及び分離された腸球菌の株数はTable 5のとおりである。最も多く分離された菌種は*E. faecalis*で11株、次いで*E. faecium*と*E. hirae*が6株ずつであった。*E. faecalis*は主に動物質性原料から分離され、*E. faecium*及び*E. hirae*

は植物質性と動物質性の両方の原料から分離された。

Table 5 Number of *Enterococcus* spp. isolated from feeds

	No. of samples	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. sp.</i> ^{a)}	Unidentified ^{b)}
Soybean meal	30	0	1	0	2	1	0	14
Fish meal	43	5	3	1	1	0	2	12
Poultry by-product meal	26	4	0	0	2	1	1	1
Formula feed for poultry	27	2	2	0	1	0	0	14
Total	126	11	6	1	6	2	3	41

a) Judged "Identification to the genus" by Rapid ID32 STREP API

b) API result and biochemical confirmation did not agreed

3.3 薬剤感受性試験

試料 126 点から分離された腸球菌 29 株（1 試料から 1 株分離）の薬剤感受性試験の結果を、全菌種並びに耐性の性状が異なる *E. faecalis* 及び *E. faecium* の菌種別に Table 6 に示した。

MIC は細菌の発育が認められなかった濃度の最小値である。MIC₅₀及び MIC₉₀はそれぞれ50 % 及び90 %の菌株の発育を阻止した MIC であり、薬剤耐性菌の調査結果を大まかに把握できる。MIC₉₀が低い場合には、大部分の株が感受性（一部耐性菌が出現している場合もある）で、MIC₅₀が高い場合には、大部分が耐性化していると判断できる。また、MIC₉₀と MIC₅₀の幅が広い場合には、耐性株が増加、あるいは、耐性化傾向にあると考えられる⁴⁾。

供試薬剤のうちブレイクポイントが設定されている薬剤の耐性状況は、耐性率が最も高かったのは KM の 13.8 %（大豆油かす由来 1 株，魚粉由来 2 株，鶏用配合飼料由来 1 株），次いで TC の 3.4 %（魚粉由来 1 株）であり、その他の薬剤に対しては全ての株が感受性を示した。ただし、EM は MIC₅₀と MIC₉₀の間に 3 管の差があり、耐性化傾向にあると考えられた。

ブレイクポイントが設定されていないため耐性率が算出されない薬剤のうち、NA には全ての株の MIC が >256 µg/mL となったが、これは、NA がグラム陰性桿菌に有効な薬剤のためと考えられた。また、BC はグラム陽性菌に対して強い抗菌作用を有するが、MIC₅₀が 256 µg/mL となった。

次に菌種別にみると、*E. faecalis* は TC に、*E. faecium* は KM に耐性があった。また、MIC の分布を比較すると、Fig. 1 及び Fig. 2 のとおり、AZM と EM で分布の違いが見られ、*E. faecium* の方が MIC₅₀と MIC₉₀の幅が広く、耐性化傾向にあることが分かった。その他の薬剤については、ほぼ同じような分布となった。

Table 6 Antimicrobial susceptibility of enterococci 29 isolates from each feed ingredient and formula feed

	<i>E. spp. (n = 29)</i>					
	Range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Resistance Number	Resistance (%)	
GM	0.25 ~ 16	8	16	0	0.0	
KM	2 ~ 128	64	128	4	13.8	
SM	4 ~ 128	64	128			
CPFX	\leq 0.12 ~ 2	1	2	0	0.0	
VCM	\leq 0.12 ~ 8	1	2	0	0.0	
LCM	0.25 ~ 32	16	32	0	0.0	
AZM	0.25 ~ 8	2	8			
EM	\leq 0.12 ~ 4	0.5	4	0	0.0	
TS	0.25 ~ 8	2	8	0	0.0	
ABPC	\leq 0.12 ~ 2	1	2	0	0.0	
CP	2 ~ 8	8	8	0	0.0	
SNM	0.25 ~ 8	2	4			
BC	1 ~ > 512	256	> 512			
NA	> 256 ~ > 256	> 256	> 256			
TC	\leq 0.12 ~ 64	0.5	0.5	1	3.4	

	<i>E. faecalis (n = 11)</i>						<i>E. faecium (n = 6)</i>					
	Range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Resistance Number	Resistance (%)		Range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Resistance Number	Resistance (%)	
GM	8 ~ 16	16	16	0	0.0		4 ~ 8	8	8	0	0.0	
KM	32 ~ 64	64	64	0	0.0		64 ~ 128	64	128	3	50.0	
SM	64 ~ 128	64	128				32 ~ 64	32	64			
CPFX	1 ~ 2	1	2	0	0.0		0.5 ~ 1	0.5	1	0	0.0	
VCM	1 ~ 2	1	2	0	0.0		0.5 ~ 1	0.5	1	0	0.0	
LCM	0.5 ~ 32	16	32	0	0.0		0.5 ~ 16	16	16	0	0.0	
AZM	2 ~ 8	4	8				0.25 ~ 4	0.5	4			
EM	0.5 ~ 2	2	2	0	0.0		\leq 0.12 ~ 4	0.25	4	0	0.0	
TS	2 ~ 2	2	2	0	0.0		4 ~ 8	4	8	0	0.0	
ABPC	1 ~ 1	1	1	0	0.0		1 ~ 2	2	2	0	0.0	
CP	4 ~ 8	8	8	0	0.0		4 ~ 8	8	8	0	0.0	
SNM	1 ~ 2	2	2				2 ~ 8	2	8			
BC	128 ~ 512	256	512				128 ~ > 512	512	> 512			
NA	> 256 ~ > 256	> 256	> 256				> 256 ~ > 256	> 256	> 256			
TC	0.5 ~ 64	0.5	0.5	1	9.1		0.25 ~ 0.5	0.25	0.5	0	0.0	

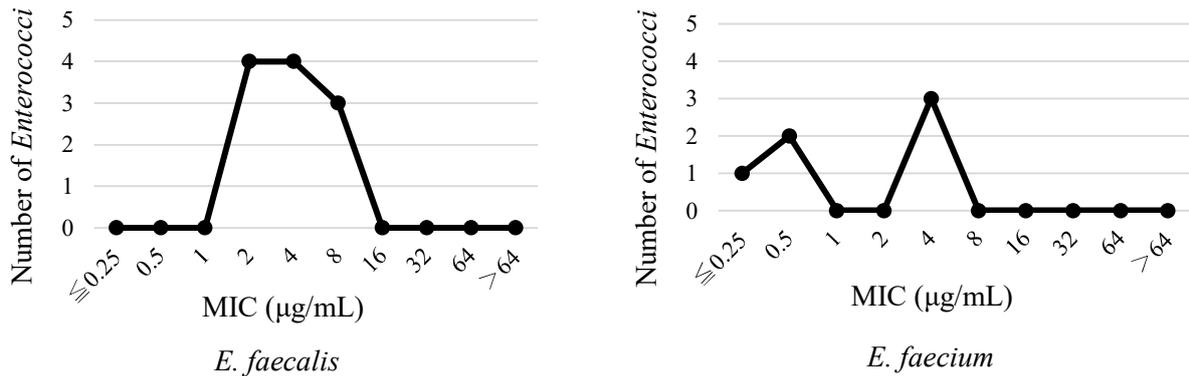


Fig. 1 MIC distribution of *E. faecalis* and *E. faecium* for AZM

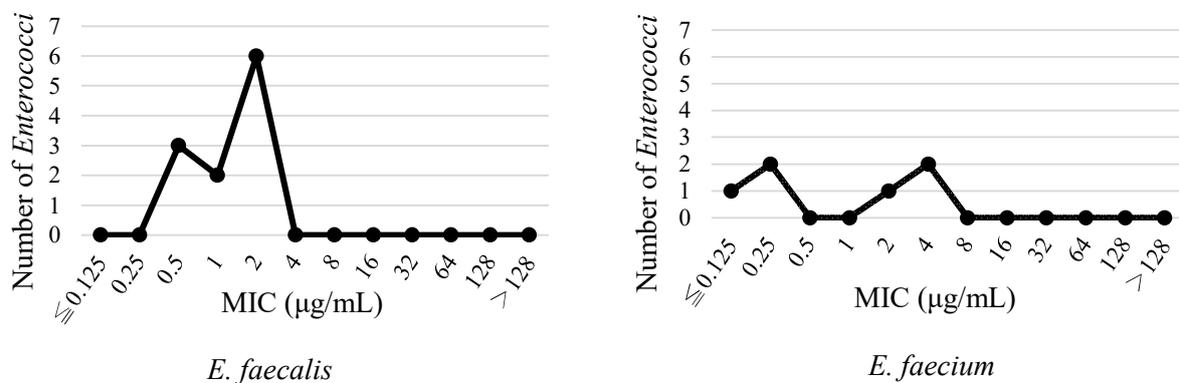


Fig. 2 MIC distribution of *E. faecalis* and *E. faecium* for EM

3.4 生菌数

昨年度の調査において129試料中41試料でECS培地に発育が見られなかったことから、微生物汚染自体がない可能性を考え、微生物による汚染状況を調べた。その結果はFig. 3のようになり、各試料の生菌数は、大豆油かすは $5.8 \times 10^2 \sim 1.9 \times 10^5$ CFU/g、魚粉は $3.2 \times 10^2 \sim 4.4 \times 10^5$ CFU/g、チキンミールは $0 \sim 2.1 \times 10^5$ CFU/g及び鶏用配合飼料は $2.5 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^6$ CFU/gで、チキンミール1点以外は微生物に汚染されていることが確認できた。また、汚染の程度は伊藤らの報告⁵⁾⁶⁾と同様に配合飼料の方が原料よりも著しい傾向であった。

今年度、生菌数を測定した60試料のうち6試料がECS培地に発育が見られなかった。それらの生菌数は $0 \sim 1.3 \times 10^4$ CFU/gであり、ほとんどの試料は微生物に汚染されており、ECS培地に発育が見られなかったのは、腸球菌による汚染がなかったためと考えられた。

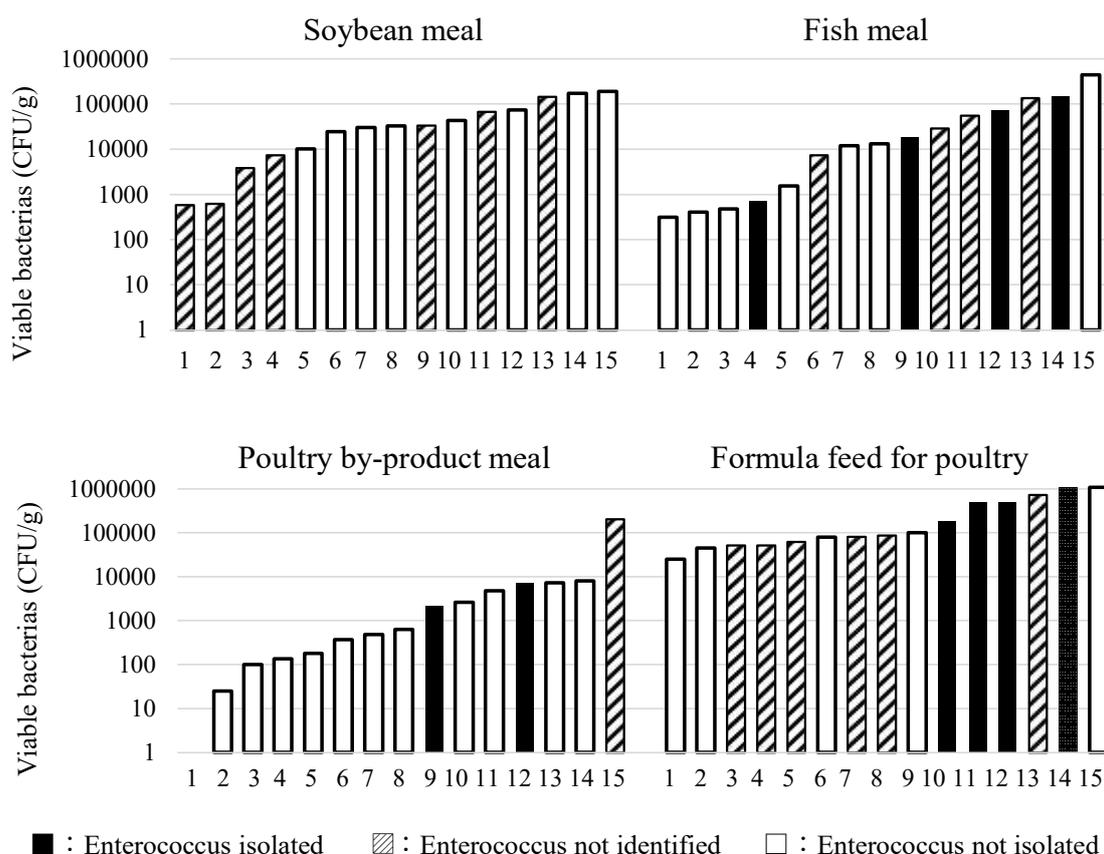


Fig. 3 Concentration of viable bacteria in feed samples

4 まとめ

平成31年4月から令和元年12月までの9ヶ月の間に、採取した飼料（大豆油かす、魚粉、チキンミール及び鶏用配合飼料）から分離した腸球菌の同定と微量液体希釈法による薬剤感受性試験を行い、飼料における腸球菌の薬剤耐性の実態調査と、供試試料の生菌数測定を行った。

- 1) 飼料（大豆油かす、魚粉、チキンミール及び鶏用配合飼料）126点から分離された腸球菌は、*E. faecalis* が11株、*E. faecium* が6株、その他の菌種（*E. sp.*を含む）が12株で、その他にAPIの判定結果と性状試験の結果が一致せず、菌種が確定できなかった株が41株あった。
- 2) 菌種が同定された29株（*E. sp.*を含む）の薬剤感受性試験の結果のうち、ブレイクポイントが設定されている薬剤では、KMの耐性率が13.8%で最も高く、次いでTCが3.4%であった。その他の薬剤に対しては全て感受性を示し多剤耐性菌はなかった。ブレイクポイントが設定されていない薬剤では、NAとBCのMIC₅₀の値が、それぞれ>256 µg/mLと256 µg/mLであった。
- 3) *E. faecalis* と *E. faecium* を菌種別に比較すると、AZMとEMに対して *E. faecium* の方が耐性化傾向にあった。
- 4) 生菌数は、大豆油かすは $5.8 \times 10^2 \sim 1.9 \times 10^5$ CFU/g、魚粉は $3.2 \times 10^2 \sim 4.4 \times 10^5$ CFU/g、チキンミールは $0 \sim 2.1 \times 10^5$ CFU/g 及び鶏用配合飼料は $2.5 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^6$ CFU/g であり、配合飼料の方が原料よりも微生物による汚染が著しかった。

文 献

- 1) 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議：薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン 2016-2020, 平成 28 年 4 月 5 日 (2016).
- 2) 浅尾 美由起, 奥山 紀子：動物質性飼料原料等の腸球菌の薬剤耐性モニタリング調査（平成 30 年度）, 飼料研究報告, **44**, 202-211(2019).
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料等検査実施要領の制定について, 昭和 52 年 5 月 10 日, 52 畜 B 第 793 号 (1977).
- 4) 農林水産省 動物医薬品検査所 検査第二部抗生物質製剤検査室：薬剤耐性菌についての Q&A, 第二版 平成 22 年 1 月 7 日 (2010).
- 5) Hitoshi Ito, Tamikazu Kume, Masaaki Takehisa, Hiroshi Iizuka: Distribution of microorganisms in animal feeds and their disinfection by radiation, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **55**, 1081-1087 (1981).
- 6) Hitoshi Ito, Anwara Begum, Tamikazu Kume, Masaaki Takehisa: Distribution of microorganisms in fish meal of animal feed and their disinfection by radiation, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **57**, 9-16 (1983).

調査資料

3 特定添加物検定結果等について（令和元年度）

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 2019)

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．

令和元年度に 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、令和元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、令和元年度末の時点で、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

令和元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 6 業者（前年度 5 業者）からあり、その製造形態等は、①製剤の製造のみを行っているのが 2 業者、②製造用原体の輸入及び製剤の製造を行っているのが 1 業者、③製剤の輸入のみを行っているのが 3 業者であり、製造用原体は全て輸入品であった．

令和元年度に検定に合格した特定添加物は 5 種類、8 銘柄（前年度 6 種類、8 銘柄）であった．

製造用原体又は製剤の輸入先国は、①アビラマイシン（製剤）が英国、②ナラシン（製剤）が米国、③モネンシン（製造用原体及び製剤）がブルガリア、④フラボフォスフォリポール（製剤）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サリノマイシンナトリウム（製剤）がブルガリアで、4 カ国（前年度 4 カ国）であった．

表 1 検定申請業者及び品名等一覧
(令和元年度)

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		
			ロック化学製品株式会社	御殿場工場	サリノマイシンナトリウム	○	サリノ10%R-K	100
			ミヤリサン製薬株式会社 ^{※2}	—	フラボフォスフォリポール	○	フラボマイシン80	80
神戸	Huvepharma Japan株式会社 ^{※2}	—	サリノマイシンナトリウム	○	サコックス100	100		
			モネンシンナトリウム		モノテック200	200		
			フラボフォスフォリポール	○	フラボマイシン80	80		
	エランコジャパン株式会社 ^{※2}	—	アピラマイシン	○	サーマックス200	200		
			ナラシン	○	モンテパン100	100		
計	6業者	3事業場	5種類		8銘柄			

※1 本部管区：関東・甲信越・静岡，神戸管区：近畿・中国（山口除く）・四国

※2 輸入業者に該当

2 特定添加物の種類別の検定合格件数等

令和元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 29 年度及び平成 30 年度の結果とともに表 2 に示した。

令和元年度の検定合格件数は 122 件，合格数量は 623 トンで実量力価換算量は 75 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 96.8 %，105.7 %，108.3 %となり，件数は減少したが，数量及び実量力価換算量は増加した。

令和元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 44.1 %（前年度 37.1 %）で最も多く，次いでナラシン 30.7 %（前年度 25.4 %），アピラマイシン 14.2 %（前年度 22.2 %），モネンシンナトリウム 6.4 %（前年度 2.1 %），フラボフォスフォリポール 4.7 %（前年度 0.0 %）となった。また，実量力価換算量については，令和元年度はサリノマイシンナトリウムが全体の 36.8 %（前年度 31.8 %）で最も多く，次いでナラシン 25.6 %（前年度 21.8 %），アピラマイシン 23.7 %（前年度 38.1 %），モネンシンナトリウム 10.7 %（前年度 3.5 %），フラボフォスフォリポール 3.1 %（前年度 0.0 %）となった。

令和元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，サリノマイシンナトリウム，モネンシンナトリウム及びナラシンは増加したが，アピラマイシンは減少し，前年度検定実績があったエンラマイシン，ノシヘプタイドは申請がなかった一方，前年度検定実績がなかったフラボフォスフォリポールは申請があった。また，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，クロルテトラサイクリン及びリン酸タイロシンは，農林水産省における「抗菌性飼料添加物のリスク管理措置策定指針」に基づき，特定添加物の指定が表 3 に示す日付で取消となっている。

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，センデュラマイシンナトリウムは平成 19 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，これらは令和元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29年度～令和元年度）

類 別	特定添加物の種類	平成29年度			平成30年度			令和元年度			
		合格 件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))	構成比 (%)	合格数量 (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))	構成比 (%)	合格数量 (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))	構成比 (%)
ポリペプチド 系	亜鉛バシトリン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	エンラマイシン	2	4,940	395	0.5	2	5,380	0.9	430	0.6	-
	ノシヘブタイド	20	62,200	2,488	3.1	18	72,720	12.3	2,909	4.2	-
	小 計	37	127,940	8,963	11.0	20	78,100	13.2	3,339	4.9	0.0
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	0	0.0	0	0.0	0.0
マクロライド 系	リン酸ダイロシン	3	12,611	3,468	4.3	-	-	-	-	-	-
	小 計	3	12,611	3,468	4.3	0	0	0.0	0	0.0	0.0
	フラボフオスフロリポール	1	1,250	100	0.1	-	-	-	-	-	-
ホスホグリコ リピッド系	小 計	1	1,250	100	0.1	0	0	0.0	0	0.0	0.0
	サリノマイシンナトリウム	60	244,487	24,449	30.0	53	218,560	37.1	21,856	31.8	36.8
	センデラマイシンナトリウム	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ポリエーテル 系	ナラシン	22	230,550	23,055	28.3	14	149,825	25.4	14,983	21.8	25.6
	モネンシンナトリウム	2	8,020	1,604	2.0	3	12,160	2.1	2,432	3.5	10.7
	ラロシドナトリウム	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	小 計	84	483,057	49,108	60.3	70	380,545	64.5	39,271	57.1	73.2
その他	アピラマイシン	27	99,050	19,810	24.3	36	130,975	22.2	26,195	38.1	23.7
	ピコザマイシン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	小 計	27	99,050	19,810	24.3	36	130,975	22.2	26,195	38.1	23.7
総 計	152	723,908	81,449	100.0	126	589,620	100.0	68,805	100.0	100.0	
対前年度比 (%)	79.2	83.1	87.5	82.9	81.4	84.5	96.8	105.7	108.3		

-：実績なし

表3 農林水産省における指定取消し一覧

特定添加物の種類	指定取消年月日
リン酸タイロシン	令和元年5月1日
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	令和元年12月27日
クロルテトラサイクリン	令和元年12月27日
3種類	

3 特定添加物の精製級及び飼料級別の検定合格件数等

特定添加物は、培養後の製造方法の違いにより、精製級と飼料級に区分される。前者は、抗生物質の有効成分のみを培養液から抽出及び精製した高純度の製造用原体に由来するもので、後者は、抗生物質の有効成分、製造に用いた培地成分及び菌体成分を含む培養液を乾燥した製造用原体に由来するものである。

令和元年度の特定添加物の精製級及び飼料級別の検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量を表4に示した。

精製級と飼料級の割合を比較すると、飼料級が検定合格件数全体の95.9%（前年度83.3%）、検定合格数量全体の93.6%（前年度85.6%）、実量力価換算量全体の89.3%（前年度92.2%）を占めた。

ノシヘプタイド及びサリノマイシンナトリウムは、精製級と飼料級の両規格が設定されているが、令和元年度は、ノシヘプタイドは精製級と飼料級のどちらも検定の実績がなく、サリノマイシンナトリウムは飼料級のみ検定の実績があった。

表4 検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量（精製級・飼料級別）
（令和元年度）

類別	特定添加物の種類	精製級 [※]			飼料級 [※]		
		合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))	合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))
ポリペプチド系	亜鉛バシトラシン	/	/	/	-	-	-
	エンラマイシン	/	/	/	-	-	-
	ノシヘプタイド	-	-	-	-	-	-
テトラサイクリン系	アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン	-	-	-	/	/	/
	クロルテトラサイクリン	/	/	/	-	-	-
マクロライド系	リン酸タイロシン	-	-	-	/	/	/
ホスホグリコリビッド系	フラボフォスフォリポール	/	/	/	8	29,250	2,340
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	-	-	-	64	274,626	27,463
	センデュラマイシンナトリウム	-	-	-	/	/	/
	ナラシン	/	/	/	21	191,000	19,100
	モネンシンナトリウム	5	39,960	7,992	/	/	/
	ラサロシドナトリウム	-	-	-	/	/	/
その他	アピラマイシン	/	/	/	24	88,175	17,635
	ピコザマイシン	-	-	-	/	/	/
合	計	5	39,960	7,992	117	583,051	66,538
割	合 (%)	4.1	6.4	10.7	95.9	93.6	89.3

-: 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 22 年度から令和元年度までの過去 10 年間における特定添加物の類別の検定合格数量及び実量力価換算量の推移をそれぞれ図 1 及び図 2 に示した。

検定合格数量は、増減はあるものの全体として減少傾向で推移しており、平成 29 年度と平成 30 年度にはそれぞれ前年比 2 割減と大幅に減少した。また、実量力価換算量も同様の傾向であった。

検定合格数量を類別にみると、ポリエーテル系が全体の 50 %以上で推移し（平成 22 年度を除く）、平成 29 年度まではポリエーテル系、ポリペプチド系の順に多かったが、平成 30 年度以降は、ポリエーテル系が 81.2 %（前年度 64.5 %）、次いでその他が 14.2 %（前年度 22.2 %）となった。

類別の実量力価換算量も検定合格数量と同様の傾向だが、その他とポリペプチド系の順位が逆転したのは平成 29 年度であった。令和元年度は、ポリエーテル系が 73.2%（前年度 57.1 %）、次いでその他が 23.7 %（前年度 38.1%）となった。

また、令和元年度はポリペプチド系、テトラサイクリン系及びマクロライド系の申請実績はなかった。

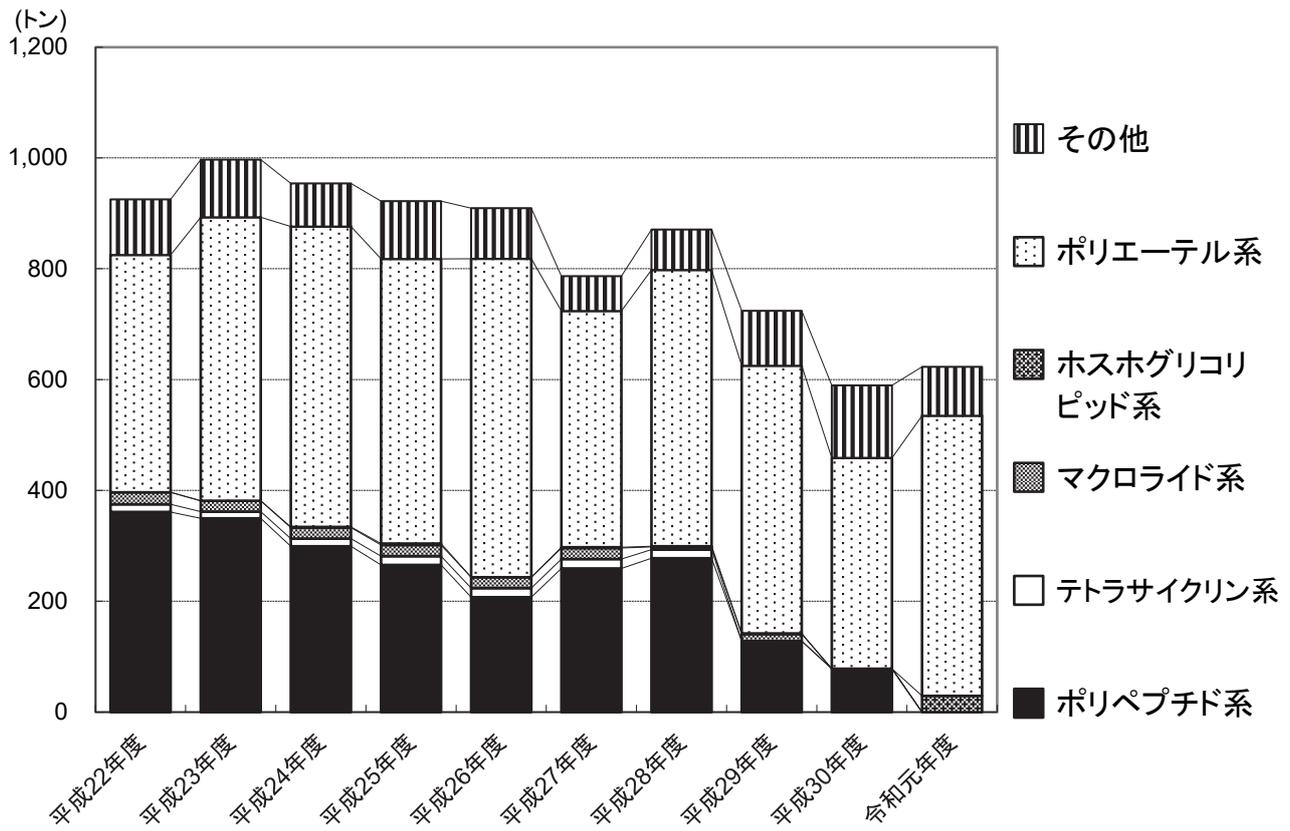


図1 特定添加物の検定合格数量の推移（類別）

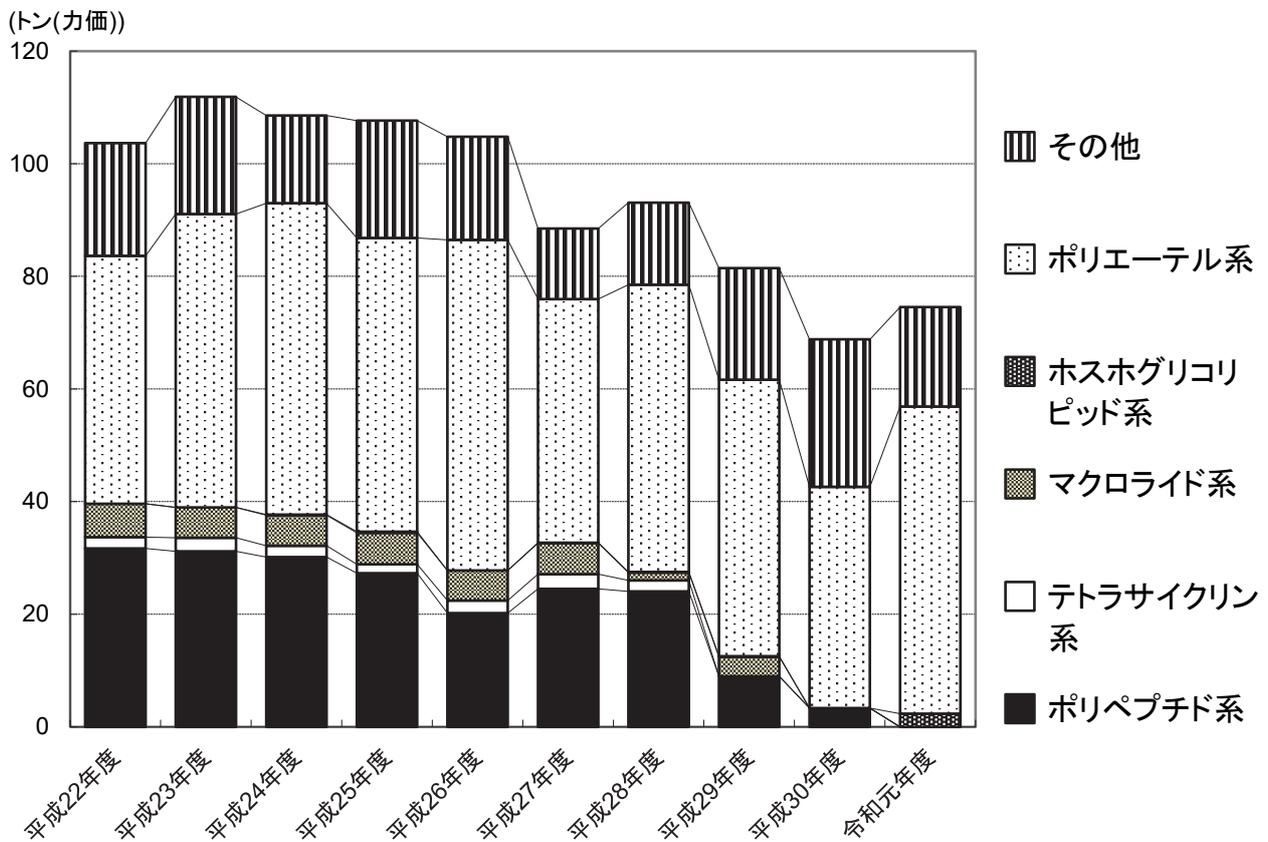


図2 特定添加物の検定合格の実量カ価換算量の推移（類別）

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

令和元年度末の時点で、株式会社科学飼料研究所龍野工場がエンラマイシン、サリノマイシンナトリウム、ノシヘプタイド、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウム、コーキン化学株式会社九州工場第三工場がノシヘプタイドに係る登録特定飼料等製造業者の事業場として登録されている。なお、平成 29 年度から令和元年度においてコーキン化学株式会社九州工場第三工場による製造実績はなかった。

令和元年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量及び実量力価換算量を表 5 に示した。なお、ラサロシドナトリウムは、表 2 で示したとおり検定実績はなかったが、登録特定飼料等製造業者による製造実績があった。

令和元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 908 トン（対前年度比 100.2%）、実量力価換算量は 126 トン(力価)（対前年度比 98.6%）であった。

令和元年度の製造数量は、サリノマイシンナトリウム、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、ノシヘプタイド、エンラマイシンの順に多かった。また、実量力価換算量は、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、エンラマイシン、ノシヘプタイドの順に多かった。

表 5 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等
（平成 30・令和元年度）

類別	特定添加物の種類	平成30年度		令和元年度	
		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	75,340	6,027	50,400	4,032
	ノシヘプタイド	—	—	59,540	2,382
	小計	75,340	6,027	109,940	6,414
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	396,260	39,626	320,600	32,060
	モネンシンナトリウム	336,800	67,360	315,980	63,196
	ラサロシドナトリウム	98,160	14,724	161,720	24,258
	小計	831,220	121,710	798,300	119,514
総計		906,560	127,737	908,240	125,928
対前年度比 (%)		106.4	104.2	100.2	98.6

※ 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

令和元年度の特定添加物の検定合格数量（製造及び輸入）と登録特定飼料等製造業者による製造数量の総計（以下「総数量」という。）及びその実量力価換算量を表 6 に示した。

令和元年度に製造及び輸入された特定添加物は 8 種類あり、総数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム（38.9%）、モネンシンナトリウム（23.2%）、ナラシン（12.5%）の順に多く、類別ではポリエーテル系が最も多く、1,304 トン（検定：506 トン、登録：798 トン）と全体の 85.2%を占めた。また、実量力価換算量を種類別にみると、モネンシンナトリウム（35.5%）、サリノマイシンナトリウム（29.7%）、ラサロシドナトリウム（12.1%）の順に多く、類別でもポリエーテル系が最も多く、174 トン(力価)（検定：55 トン(力価)、登録：119 トン

(力価)) と全体の 86.8 % を占めた。

次に、平成 22 年度から令和元年度までの過去 10 年間における特定添加物の総数量及び実量力価換算量の類別の推移をそれぞれ図 3 及び図 4 に示した。

登録特定飼料等製造業者による製造は平成 19 年度から開始されており、平成 21 年度には、登録銘柄の大幅な追加があった影響で、登録特定飼料等製造業者による製造の割合が増加した。その後も年々増加し、平成 29 年度以降では検定合格数量を上回るようになった。令和元年度は、特定添加物の総数量全体の 59.3 % (前年度 60.6 %)、実量力価換算量全体の 62.8 % (前年度 65.0 %) を登録特定飼料等製造業者による製造が占めた。

表 6 特定添加物の総数量等
(令和元年度)

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	亜鉛バシトリン	—	—	—	—
	エンラマイシン	50,400	3.3	4,032	2.0
	ノシヘプチド	59,540	3.9	2,382	1.2
	小計	109,940	7.2	6,414	3.2
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	—	—	—	—
マクロライド系	リン酸タイロシン	—	—	—	—
	小計	—	—	—	—
ホスホグリコリピッド系	フラボフォスフォリポール	29,250	1.9	2,340	1.2
	小計	29,250	1.9	2,340	1.2
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	595,226	38.9	59,523	29.7
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—
	ナラシン	191,000	12.5	19,100	9.5
	モネンシンナトリウム	355,940	23.2	71,188	35.5
	ラサロシドナトリウム	161,720	10.6	24,258	12.1
	小計	1,303,886	85.2	174,069	86.8
その他	アビラマイシン	88,175	5.8	17,635	8.8
	ビコザマイシン	—	—	—	—
	小計	88,175	5.8	17,635	8.8
総計		1,531,251	100.0	200,458	100.0

—：実績なし

※1 検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造数量の総計

※2 検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造の実量力価換算量の総計

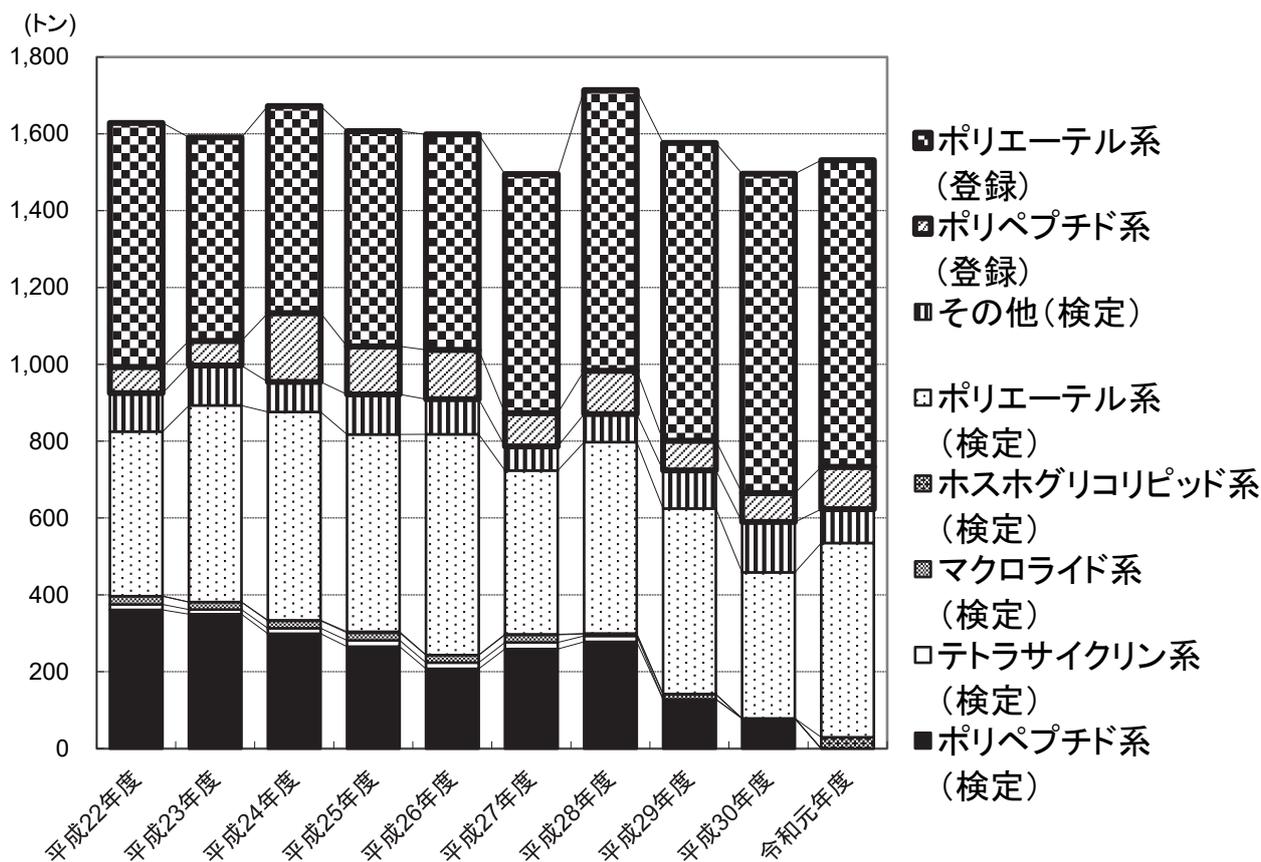


図3 特定添加物の総数量の推移（類別）

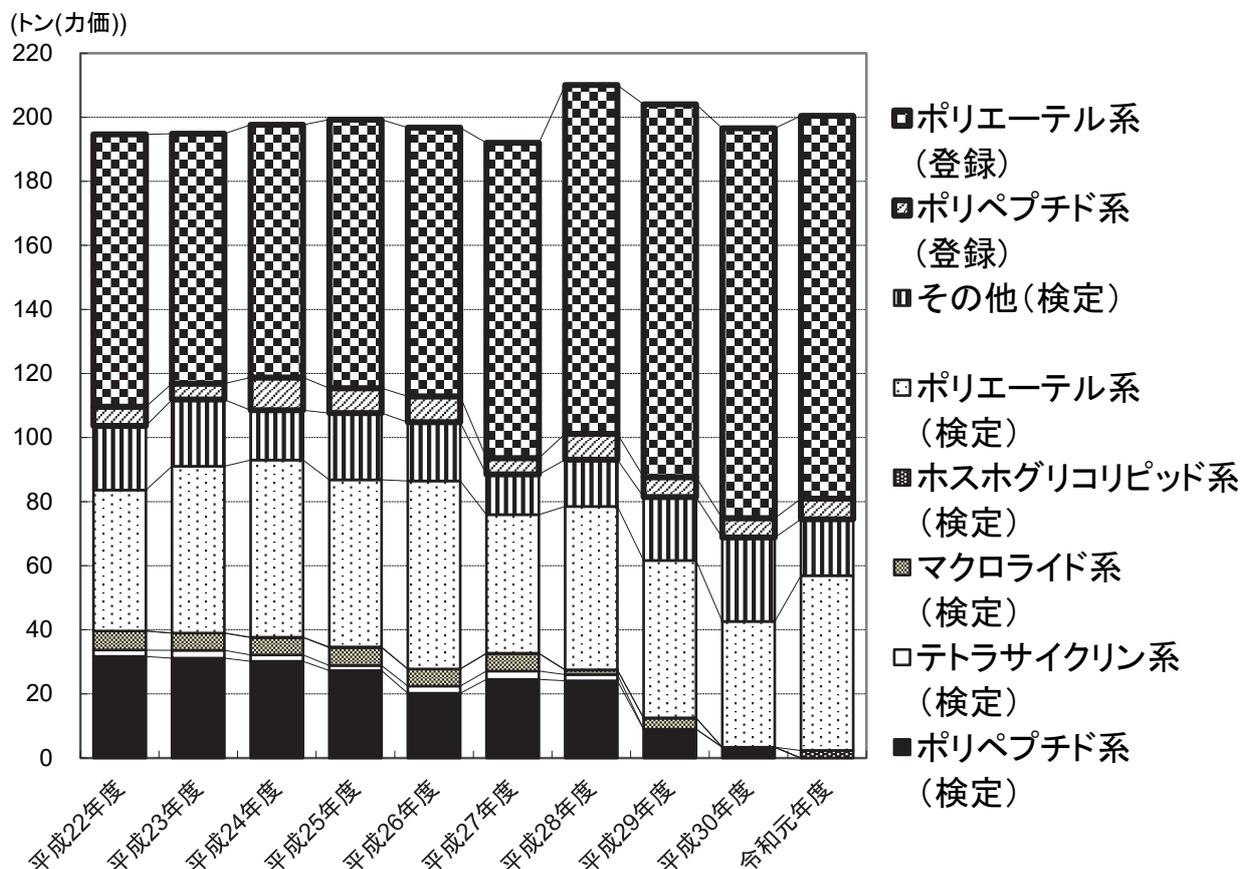


図4 特定添加物の総数の実量カ価換算量の推移（類別）

7 要 約

- 1) 令和元年度の特定添加物の検定の結果は、以下のとおりである。
 - i 検定に合格した特定添加物は、6 業者から申請された、5 種類、8 銘柄であった。
 - ii 検定合格件数は 122 件、合格数量は 623 トン、実量力価換算量は 75 トン(力価)で、前年度に比べて件数は減少したが、数量及び実量力価換算量は増加した。
 - iii 検定合格数量の精製級と飼料級の割合を比較すると、飼料級が全体の 93.6 %を占めた。また、実量力価換算量では、飼料級が 89.3 %を占めた。
 - iv 検定合格数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム、ナラシン、アピラマイシンの順に多かった。また、実量力価換算量も同様の結果であった。
 - v 検定合格数量を類別にみると、ポリエーテル系、その他、ホスホグリコリピッド系の順に多かった。また、実量力価換算量も同様の結果であった。
- 2) 令和元年度の登録特定飼料等製造業者による製造の結果は、以下のとおりである。
 - i 登録特定飼料等製造業者に登録されているのは 2 業者 2 工場であった。
 - ii 製造実績は 1 業者 1 工場、5 種類、製造数量は 908 トン、実量力価換算量は 126 トン(力価)で、前年度に比べて、種類及び製造数量は増加したが、実量力価換算量は減少した。
 - iii 製造数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウムの順に多かった。また、実量力価換算量は、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウムの順に多かった。
- 3) 令和元年度の特定添加物の総数量等の結果は、以下のとおりである。
 - i 平成 31 年 4 月 1 日から令和 2 年 4 月 1 日の間に 3 種類の特定添加物が指定を取り消された。
 - ii 特定添加物の検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造数量とを合計した総数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム、モネンシンナトリウム、ナラシンの順に多かった。また、実量力価換算量では、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウムの順に多かった。

飼料研究報告編集委員

委員長	功刀 豊	副委員長	荻窪 恭明
	青山 幸二		高橋 雄一
	石田 有希恵		野村 昌代
	石橋 隆幸		橋本 亮
	大島 慎司		橋本 仁康
	風間 鈴子		原 秀樹
	設楽 賢治		日比野 洋
	須永 善行		

飼料研究報告 第45号

発行 独立行政法人農林水産消費安全技術センター
埼玉県さいたま市中央区新都心2番地1
さいたま新都心合同庁舎検査棟
TEL 050-3797-1857
FAX 048-601-1179
<http://www.famic.go.jp/>

令和2年10月

編集 飼料研究報告編集委員会

印刷 名取印刷工業有限会社
東京都新宿区新小川町7番11号 名取第2ビル
TEL 03-3260-4767

リサイクル適性 

この印刷物は、印刷用の紙へ
リサイクルできます。