

飼料研究報告

第49号

令和6年

Research Report of Animal Feed

Vol. 49
2024



**Food and Agricultural
Materials Inspection Center**

WOAH Collaborating Centre
for Animal Feed Safety and Analysis



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)

WOAH 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、食品等の品質や表示の適正化等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（WOAH）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」（令和 5 年 12 月 1 日付け 5 消安第 4714 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）に記載されています。

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 6 年 9 月

理事長 木内 岳志

目 次

1	とうもろこしサイレージ及び稲発酵粗飼料中のフモニ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分析法の開発 長久保 眞平, 山上 陽平	1
2	豚用配合飼料中のシスチン, リジン, メチオニン及びトレオニンの液体クロマト グラフによる同時分析法の開発 土井 雄悟, 山上 陽平, 塩津 萌々子	14
3	愛玩動物用飼料中の糞便系大腸菌群の検出法の検討 近藤 勝, 齊木 雅一, 平田 絵理香, 大島 慎司, 野崎 友春, 久保田 恵里	28
4	アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法の妥当性確認 ～稲発酵粗飼料及びイアコーンサイレージへの適用～ 山多 晴子, 佐藤 琢実, 安藤 千咲, 千原 哲夫	38
5	愛玩動物用飼料のウェット製品の水分測定に使用可能なフィルムの規格の検討 佐藤 憲大, 佐藤 梢, 相原 久美子, 池澤 昭人	49
6	ハイ及びストローキューブ配合の牛用配合飼料中のモネンシナトリウムに係る 飼料分析基準の妥当性確認 坂井田 里子, 野村 昌代, 橋本 仁康	56
7	ヘリウムを使用しない代替法の検討 (1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による農薬一斉分析法の検討 船木 紀夫, 小堀 拓也	65
	(2) 愛玩動物用飼料中の無機砒素のヘリウムを使用しない代替法の検討 門屋 日菜, 橋本 良美	80
精度管理		
1	令和5年度飼料等の共通試料による分析鑑定について 山上 陽平, 平田 絵理香, 吉村 哲史, 小堀 拓也, 佐藤 琢実, 山下 奈々	91

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5年度）
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課，飼料鑑定第二課 …… 115
- 2 飼料中の腸球菌の薬剤耐性モニタリング調査（令和5年度）
新井 詠子，奥山 紀子，久保田 恵理，井上 華歩，
橋本 仁康 …………… 134
- 3 特定添加物検定結果等について（令和5年度）
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課 …………… 150

他誌掲載論文（抄録）

- 1 Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from animal feed in Japan

YAMAGAMI Yohei, ASAO Miyuki, TAKAHASHI Akiko,
HASHIMOTO Yoshiyasu, OKUYAMA Noriko, ARAI Eiko,
ARIHARA Wakana, MASUI Ryota and SHIMAZAKI Yoko
(Frontiers in Veterinary Science, 10 (2023).) …………… 159
- 2 Occurrence Evaluation of Aflatoxigenic *Aspergilli* in Thai Corn Using Dichlorvos-ammonia and Whole-agar Extraction Methods

POUNGPONG Kanokporn, MANEEBOON Thanapoom,
ARAI Wichitra, AOYAMA Koji, FURUKAWA Tomohiro,
TODORIKI Setsuko, YABE Kimiko,
BUNCHASAK Chaiyapoom and KUSHIRO Masayo
(Japan Agricultural Research Quarterly, 58(2), 83-91 (2024).) … 159

CONTENTS

1	Development of Fumonisin Determination Method in Corn Silage and Whole-Crop Rice Silage by LC-MS/MS	NAGAKUBO Shinpei and YAMAGAMI Yohei	1
2	Development of Simultaneous Determination Method of Cystine, Lysine, Methionine and Threonine in Formula Feed for Pigs by Automatic Amino Acid Analyzer	DOI Yugo, YAMAGAMI Yohei and SHIOTU Momoko	14
3	Study of Fecal Coliform Detection Method for Pet Food	KONDO Masaru, SAIKI Masakazu, HIRATA Erika, OSHIMA Shinji, NOZAKI Tomoharu and KUBOTA Eri	28
4	Validation Study of Simultaneous Determination Method of Aflatoxins by LC ~Application to Whole-Crop Rice Silage and Ear Corn Silage~	YAMATA Seiko, SATO Takumi, ANDOU Chisaki and CHIHARA Tetsuo	38
5	Study of Plastic Film Bags for Moisture Content Determination in Wet Pet Food	SATO Norihiro, SATO Kozue, AIHARA Kumiko and IKEZAWA Akito	49
6	Validation Study on Monensin Sodium Determination Method for Formula Feed for Cattle Containing Hay and Straw Cube	SAKAIDA Satoko, NOMURA Masayo and HASHIMOTO Yoshiyasu	56
7	Study of Alternative Determination Method without Helium		
(1)	Simultaneous Determination Method of Pesticides by LC-MS/MS	FUNAKI Norio and KOBORI Takuya	65
(2)	Alternative Determination Method of Inorganic Arsenic in Pet Food	KADOYA Hina and HASHIMOTO Yoshimi	80
§ Proficiency test			
1	Proficiency Test (in the Fiscal Year 2023)	YAMAGAMI Yohei, HIRATA Erika, YOSHIMURA Satoshi, KOBORI Takuya, SATO Takumi and YAMASHITA Nana	91

§ Investigative report

- 1 Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2023)
Feed Analysis 1st Division and 2nd Division, Fertilizer and Feed
Inspection Department 115

- 2 Monitoring Results of Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Animal Feed (in the Fiscal
Year 2023)
ARAI Eiko, OKUYAMA Noriko, KUBOTA Eri, INOUE Kaho
and HASHIMOTO Yoshiyasu 134

- 3 Results of Official Testing of Specified Feed Additives (in the Fiscal Year 2023)
Feed Analysis 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection
Department 150

§ Papers accepted in other journals (abstract)

- 1 Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from animal feed in Japan
YAMAGAMI Yohei, ASAO Miyuki, TAKAHASHI Akiko,
HASHIMOTO Yoshiyasu, OKUYAMA Noriko, ARAI Eiko,
ARIHARA Wakana, MASUI Ryota and SHIMAZAKI Yoko
(Frontiers in Veterinary Science, 10 (2023).) 159

- 2 Occurrence Evaluation of Aflatoxigenic *Aspergilli* in Thai Corn Using Dichlorvos-ammonia and Whole-
agar Extraction Methods
POUNGPONG Kanokporn, MANEEBOON Thanapoom,
ARAI Wichitra, AOYAMA Koji, FURUKAWA Tomohiro,
TODORIKI Setsuko, YABE Kimiko,
BUNCHASAK Chaiyapoom and KUSHIRO Masayo
(Japan Agricultural Research Quarterly, 58(2), 83-91 (2024).) 159

1 とうもろこしサイレージ及び稲発酵粗飼料中のフモニシンの液体クロマトグラフトンデム型質量分析計による分析法の開発

長久保 眞平^{*1}, 山上 陽平^{*2,3}

Development of Fumonisin Determination Method in Corn Silage and Whole-Crop Rice Silage by LC-MS/MS

NAGAKUBO Shinpei^{*1} and YAMAGAMI Yohei^{*2,3}

(*¹ Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) (Now Fukuoka Regional Center, FAMIC),

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

^{*3} Institute of Food Research, National Agriculture and Food Research Organization)

We have developed a quantitative determination method of fumonisin concentration in corn silage and whole-crop rice silage (WCRS) using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Fumonisin was extracted with methanol-water (3:1), and the extracted solution was filtered. The filtrate was then purified with a solid phase extraction column (Oasis MAX, Waters Co.; Milford, MA, USA), and injected into an LC-MS/MS to determine the fumonisin concentration. LC separation was then carried out on an ODS metal-free PEEK column (InertSustain C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 µm, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) with a gradient of 0.1 % formic acid aqueous solution and 0.1 % formic acid acetonitrile solution as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on corn silage and WCRS. Corn silage and WCRS was added with 3.111 mg/kg of fumonisin B₁, 1.111 mg/kg of fumonisin B₂ and 0.267 mg/kg of fumonisin B₃ respectively. The resulting mean recoveries ranged from 64.7 % to 66.2 % for fumonisin B₁, 58.0 % to 65.8 % for fumonisin B₂ and 61.8 % to 67.0 % for fumonisin B₃. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 4.5 % for fumonisin B₁, less than 2.5 % for fumonisin B₂ and less than 2.2 % for fumonisin B₃. This method was considered in need of improvement, because the mean recoveries were out of target.

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

キーワード：フモニシン；液体クロマトグラフトンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；とうもろこしサイレージ；稲発酵粗飼料

1 緒 言

フモニシンは *Fusarium* 属の菌から産生されるかび毒である。フモニシンはウマの白質脳症、ブタの肺水腫、ヒトの新生児神経管障害の原因物質とされており、ヒトの食道癌との関係も示唆されている¹⁾。今までにフモニシンは、A群、B群、C群及びP群の構造が決定されているが、その中

^{*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 福岡センター

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*3} 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

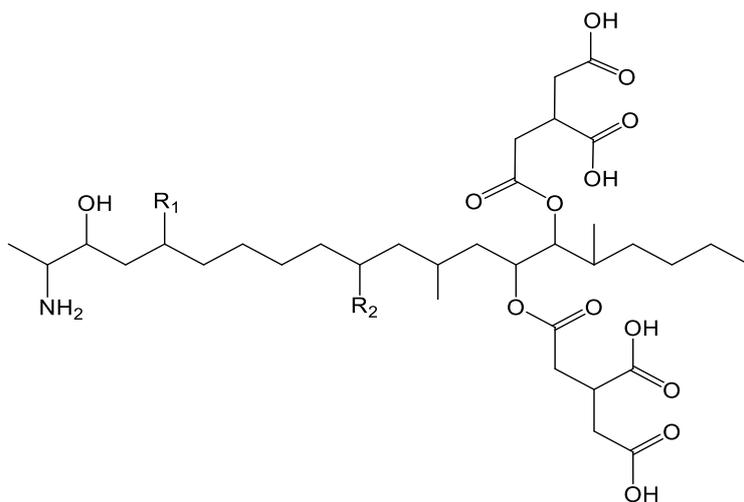
でも、フモニシン B₁, B₂ 及び B₃ は自然汚染の報告事例が多い¹⁾。

飼料自給率の向上は食料自給率向上の重点的な施策として位置づけられ、サイレージを含む粗飼料の増産対策が積極的に行われている²⁾。これら国産のサイレージからはフモニシンを含むかび毒が検出される事例³⁾があり、サイレージ等のかび毒のリスク管理を進める上で、サイレージ等中のかび毒の分析法の整備が急務となっている。

飼料中のフモニシン B₁, B₂ 及び B₃ の分析法は、飼料分析基準⁴⁾において液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法が収載されているが、サイレージは対象としておらず、サイレージ中のかび毒の汚染実態が確認できない状況である。

そこで、今回、一般財団法人日本食品分析センターが「平成 25 年度飼料中の有害物質等の含有実態調査事業（重金属，かび毒）報告書」において使用したサイレージ中のフモニシンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）による同時定量法⁵⁾（以下「JFRL 法」という。）について、とうもろこしサイレージ及び稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）を対象に飼料分析基準への収載の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考にフモニシンの構造式等を Fig. 1 に示した。



	Chemical formula	R ₁	R ₂	Molecular formula	MW	CAS
Fumonisin B ₁	(2 <i>S</i> ,2' <i>S</i>)-2,2'-{[(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,11 <i>S</i> ,16 <i>R</i> ,18 <i>S</i> ,19 <i>S</i>)-19-amino-11,16,18-trihydroxy-5,9-dimethylicosane-6,7-diyl]bis[oxy(2-oxoethane-2,1-diyl)]}disuccinic acid	OH	OH	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721.83	1136355-83-0
Fumonisin B ₂	(2 <i>R</i> ,2' <i>R</i>)-2,2'-{[(5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,16 <i>R</i> ,18 <i>S</i> ,19 <i>S</i>)-19-amino-16,18-dihydroxy-5,9-dimethylicosane-6,7-diyl]bis[oxy(2-oxoethane-2,1-diyl)]}disuccinic acid	OH	H	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705.83	116355-84-1
Fumonisin B ₃	2- [[(5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,11 <i>R</i> ,18 <i>R</i> ,19 <i>S</i>)-19-amino-6- (3,4-dicarboxybutanoyloxy)-11,18-dihydroxy-5,9-dimethyl-icosan-7-yl]oxycarbonylmethyl]butanedioic acid	H	OH	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705.83	116379-59-4

Fig. 1 Chemical structures of fumonisins

2 実験方法

2.1 試料

とうもろこしサイレージ及び WCRS は 60 °C で 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，分析用試料とした。

2.2 試薬

1) アセトニトリル，ギ酸及びメタノールは LC-MS 用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。アンモニア水は試薬特級（質量分率 28 %）を用いた。水は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

2) フモニシン B₁ 標準原液

フモニシン B₁ 標準品（Sigma-Aldrich 製，純度 98.00 %）5 mg を量って 25 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリル-水（1+1）を加えて溶かし，更に標線までアセトニトリル-水（1+1）を加えてフモニシン B₁ 標準原液を調製した（この液 1 mL は，フモニシン B₁ として 200 µg を含有）。

3) フモニシン B₂ 標準原液

フモニシン B₂ 標準品 (Sigma-Aldrich 製, 純度 96 %) 1 mg を量って 10 mL の全量フラスコに入れ, アセトニトリル-水 (1+1) を加えて溶かし, 更に標線までアセトニトリル-水 (1+1) を加えてフモニシン B₂ 標準原液を調製した (この液 1 mL は, フモニシン B₂ として 100 µg を含有) .

4) フモニシン B₃ 標準原液

フモニシン B₃ 標準品 (Trilogy 製, 純度 98.0 %) のドライアップ製品に, 指定された量のアセトニトリル-水 (1+1) を加えて溶かし, フモニシン B₃ 標準原液を調製した (この液 1 mL は, フモニシン B₃ として 100 µg を含有) .

5) 混合標準液

フモニシン B₁ 標準原液 50 µL, フモニシン B₂ 標準原液及びフモニシン B₃ 標準原液各 100 µL を 20 mL の全量フラスコに入れて混合し, 更に標線までアセトニトリル-水 (1+1) を加えて混合標準原液を調製した (この液 1 mL は, 各フモニシンとして各 500 ng を含有) .

使用に際して, 混合標準原液の一部をアセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に各フモニシンとして 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100 ng を含有する混合標準液を調製した.

2.3 装置及び器具

- 1) 粉砕機 : ZM 200 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)
- 2) 振り混ぜ機 : レシプロシェーカー SR-2DW タイテック製 (使用時振動数 300 rpm)
- 3) 4 級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (以下「ミニカラム」という.) : Oasis MAX (充てん剤量 500 mg, リザーバー容量 6 mL) Waters 製
- 4) メンブランフィルター : 13HP045AN (孔径 0.45 µm, 直径 13 mm, 親水性 PTFE) 東洋濾紙製
- 5) LC-MS/MS :
LC 部 : Nexera XS 島津製作所製
MS/MS 部 : LCMS-8050 島津製作所製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 20 g を量って 500 mL の共栓三角フラスコに入れ, メタノール-水 (3+1) 200 mL を加え, 30 分間振り混ぜて抽出し, 抽出液をろ紙 (5 種 A) を用いてろ過し, カラム処理に供する試料溶液とした.

2) カラム処理

ミニカラムをメタノール 5 mL 及び水 5 mL で洗浄した. 試料溶液 1 mL をあらかじめアンモニア水 (1+19) 3 mL を入れたミニカラムに正確に加えて混和し, 液面が充てん剤の上端に達するまで流下 (必要に応じて流速が 1 mL/min 程度になるよう吸引した. 以下同様.) した. ミニカラムをメタノール 5 mL ずつで 2 回洗浄し, 50 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き, ギ酸-メタノール (1+49) 5 mL をミニカラムに加えて各フモニシンを溶出させた.

溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固

した。アセトニトリル-水 (1+1) 8 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

試料溶液及び混合標準液各 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 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	InertSustain C18 metal-free PEEK column (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 3 μ m), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% formic acid aqueous solution – 0.1 v/v% formic acid acetonitrile solution (7:3) → 15 min → (1:9) (hold for 5 min) → 2 min → (7:3) (hold for 3 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI) (Positive ion mode)
Nebulizer gas	Air (2.5 L/min)
Drying gas	N ₂ (5 L/min)
Interface temperature	250 °C
Heat block temperature	500 °C
Desolvation line temperature	150 °C
Collision gas	Ar (270 kPa)

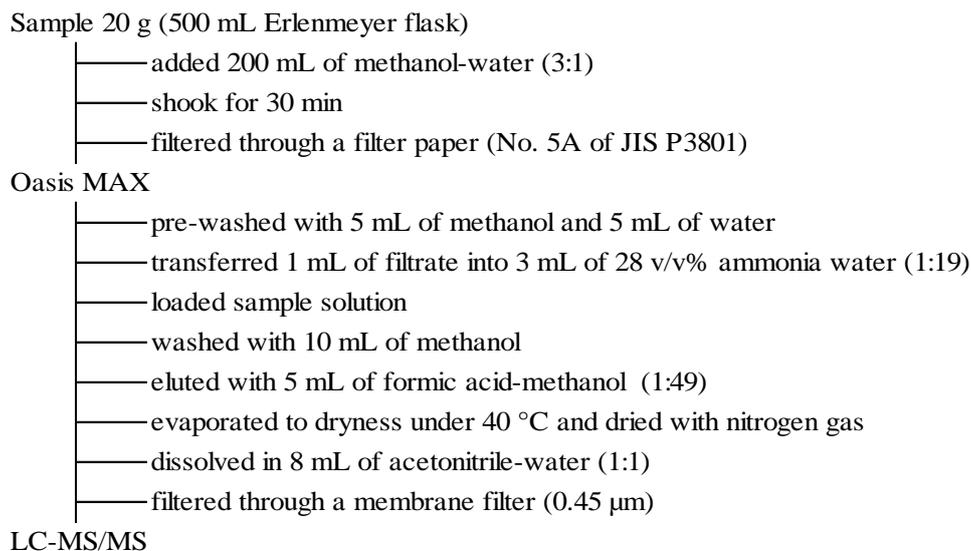
Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
Fumonisin B ₁	723	352	—	36
		—	334	42
Fumonisin B ₂	707	336	—	37
		—	318	40
Fumonisin B ₃	707	336	—	39
		—	318	39

4) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中の各フモニシン量を算出した。なお、3.7 はピーク面積での結果を記載した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for fumonisins in corn silage and whole-crop rice silage (WCRS)

2.5 標準添加法による汚染試料の定量方法

自然汚染が認められた試料については、必要に応じて標準添加法により定量値を求めた。各フモニシン標準液を添加した試料及び無添加試料について、2.4に従って得られたSRMクロマトグラムからピーク面積を求め、ピーク面積及び添加濃度（無添加試料については0 mg/kg）を用いて検量線を作成し、検量線を外挿した添加濃度の軸の負の切片から定量値を算出した。

2.6 添加回収試験

2.2の2)~4)の各標準原液をアセトニトリル-水（1+1）で正確に希釈し添加に用いた。

とうもろこしサイレージ及びWCRSについて、原物換算して、フモニシンB₁として3.111 mg/kg相当量（最終試料溶液中で87.5 ng/mL）、フモニシンB₂として1.111 mg/kg相当量（同31.25 ng/mL）、フモニシンB₃として0.267 mg/kg相当量（同7.5 ng/mL）を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。回収率は各試料のブランク値を差し引いて算出した。

なお、添加濃度は風乾物試料に対して、フモニシンB₁として7 mg/kg相当量、フモニシンB₂として2.5 mg/kg相当量、フモニシンB₃として0.6 mg/kg相当量であり、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 抽出溶媒量の検討

JFRL法と同様に、分析試料20 gにメタノール-水（3+1）100 mLを加えたところ、抽出溶媒を吸収し十分に振り混ぜられない試料があった。そのため、抽出溶媒量は200 mLとし、抽出容器は500 mLの三角フラスコを用いることとした。

なお、3.5以降の検討は試料採取量及び抽出溶媒量を半量にし、抽出容器を200 mL三角フラスコに変更して実施した。

3.2 精製方法の検討

JFRL 法と同様に抽出液を 1650×g で遠心分離したところ、試料が十分に沈殿せず、上澄み液の採取が困難な試料があったため、ろ紙を用いてろ過することとした。また、最終溶液をメンブランフィルターに通過させることとした。

3.3 ピーク形状の確認

2.2 の 5)により調製した混合標準液各 5 μL を LC-MS/MS に注入し、InertSustain C18 を用いて得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、全成分にテーリングが見られ、流路及びカラムの洗浄を行ったが、ピーク形状は改善されなかった。そこで、InertSustain C18 メタルフリー PEEK カラムに変更したところピーク形状が改善されたため、以後の検討はこのカラムを使用することとした。

参考として、得られたクロマトグラム例を Fig. 2-1 及び Fig. 2-2 に示した。

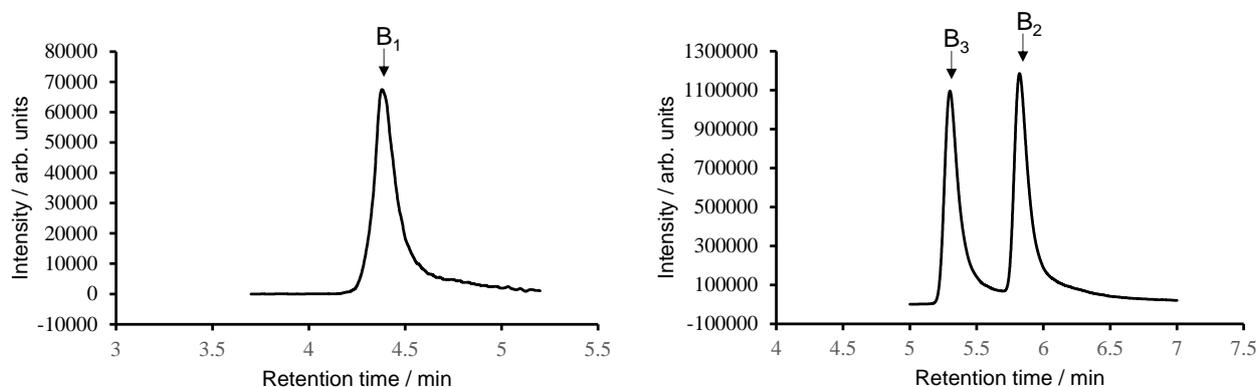


Fig. 2-1 Selected reaction monitoring (SRM) chromatogram using InertSustain C18 column

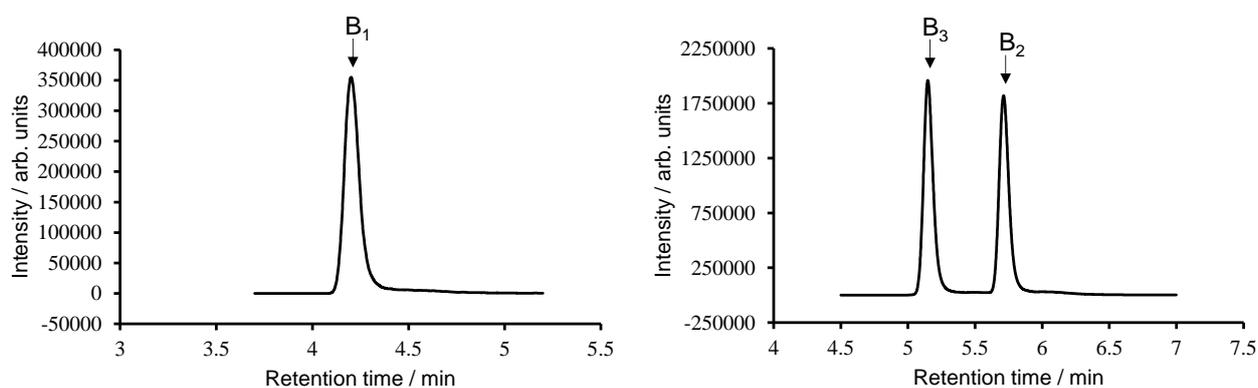


Fig. 2-2 SRM chromatogram using InertSustain C18 metal-free PEEK column

3.4 検量線

2.2 の 5)により調製した混合標準液各 5 μL を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した。

得られた検量線の一例は Fig. 3-1, Fig. 3-2 及び Fig. 3-3 のとおりであり、各 1~100 ng/mL (注入量として 0.005~0.5 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線の濃度範囲は、各フモニシンを 0.08~8 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フモニ

シン濃度範囲に相当する。

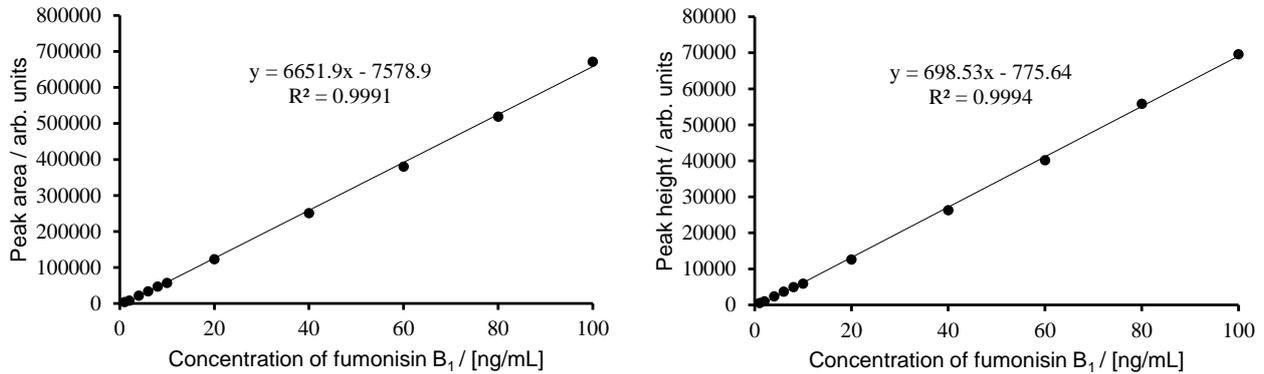


Fig. 3-1 Calibration curves of fumonisin B₁ by peak area (left) and peak height (right)

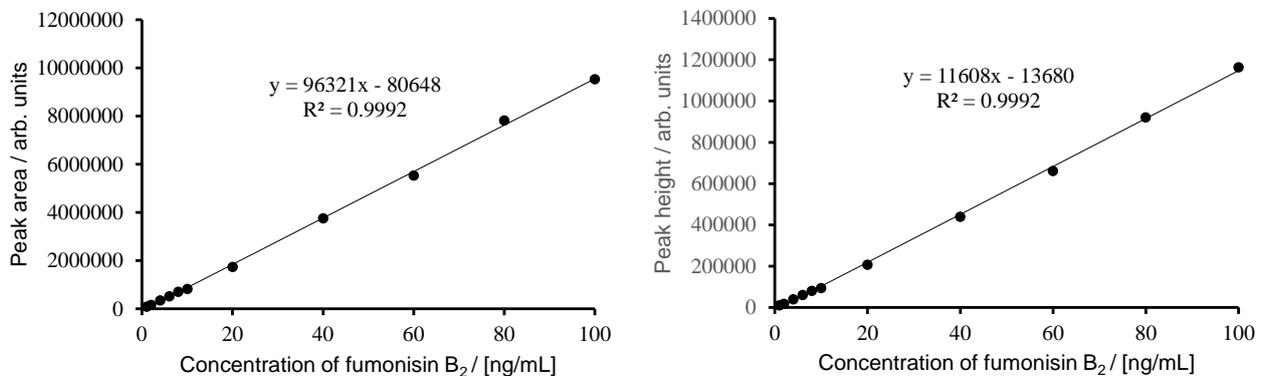


Fig. 3-2 Calibration curves of fumonisin B₂ by peak area (left) and peak height (right)

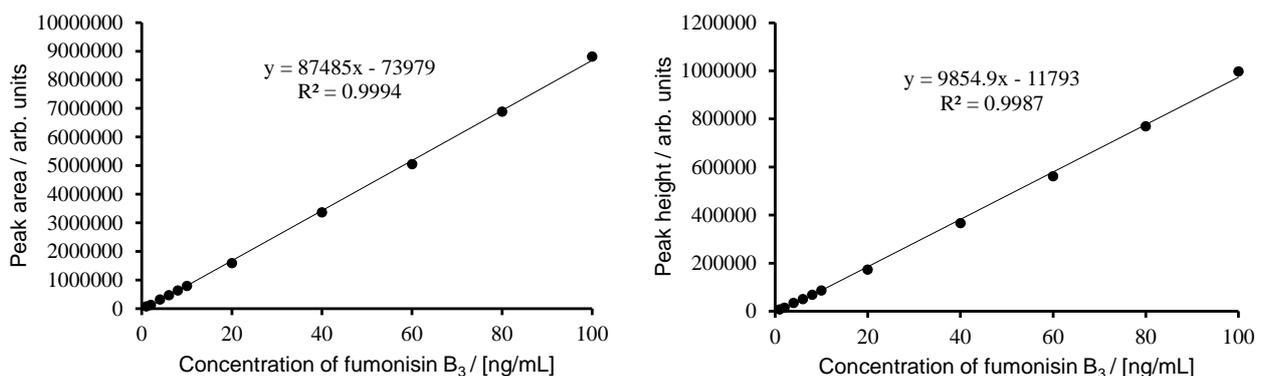


Fig. 3-3 Calibration curves of fumonisin B₃ by peak area (left) and peak height (right)

3.5 妨害物質の検討

とうもろこしサイレージ 2 検体及び WCRS 2 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認した結果、定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、とうもろこしサイレージは各フモニシンと同じ保持時間に、WCRS はフモニシン B₂ 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フモニシンであると判断した。

本検討により得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

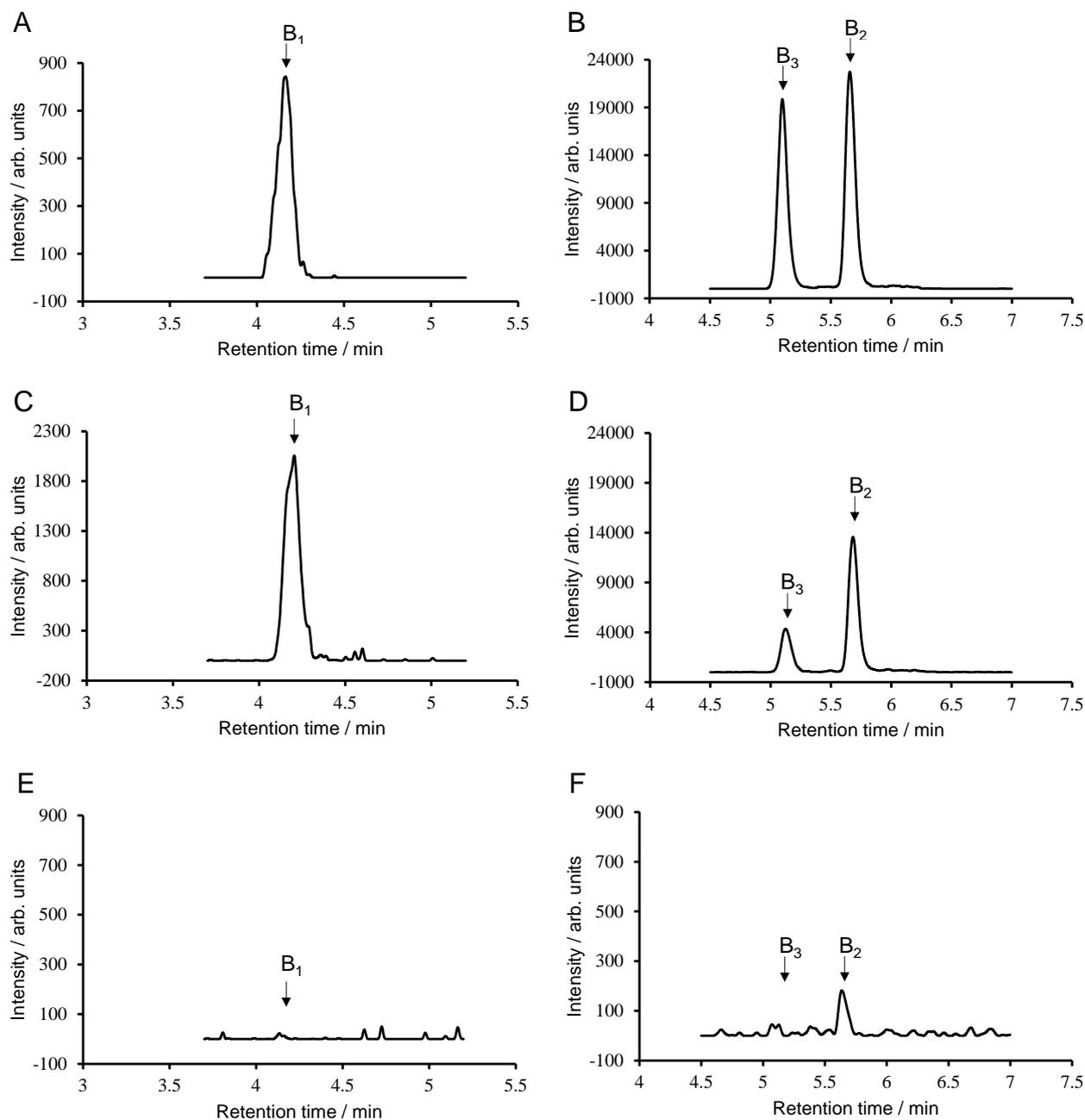


Fig. 4 Typical SRM chromatograms of fumonisins in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the peaks of

B₁: fumonisin B₁, B₂: fumonisin B₂ and B₃: fumonisin B₃.)

A, B: Standard solution (1 ng/mL: 5 pg as fumonisins)

C, D: Sample solution of corn silage

E, F: Sample solution of WCRS

3.6 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)~2)により調製したとうもろこしサイレージ及び WCRS のブランク試料溶液に各フモニシンとして 6.4 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 3 のとおり、試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。なお、各マトリックス標準液のピーク面積は各試料ブランクの平均ピーク面積を差し引いて算出した。

Table 3 Matrix effect study

Mycotoxin	Samples	Concentration of mycotoxins		Matrix effect ^{b)} (%)
		Matrix standard solution (ng/mL)	Sample ^{a)} (mg/kg air-dry matter)	
Fumonisin B ₁	Corn silage	80	6.4	112
	WCRS	80	6.4	116
Fumonisin B ₂	Corn silage	80	6.4	107
	WCRS	80	6.4	103
Fumonisin B ₃	Corn silage	80	6.4	102
	WCRS	80	6.4	100

$n = 3$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

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

3.7 添加回収試験

2.6 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 4 のとおり、フモニシン B₁ については平均回収率は 64.7 及び 66.2 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD_r）として 4.2 %以下，フモニシン B₂ については平均回収率は 58.0 及び 65.8 %，RSD_rは 2.5 %以下，フモニシン B₃ については平均回収率は 61.8 及び 67.0 %，RSD_rは 2.2 %以下の成績が得られ，飼料分析基準別紙 2 の試験法の妥当性確認ガイドライン⁵⁾（以下「妥当性確認ガイドライン」という。）に定められた目標値（真度：70 %以上 120 %以下，精度：3.111 及び 1.111 mg/kg では 16 %以下，0.267 mg/kg では 22 %以下）のうち真度の目標値を満たせず，分析法の改良が必要であると考えられた。なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

Table 4 Recoveries for fumonisins

Mycotoxin	Spiked level (mg/kg original matter) ^{a)}	Corn silage			WCRS		
		Natural contamination ^{b)} (mg/kg)	Recovery ^{c)} (%)	RSD _r ^{d)} (%)	Natural contamination ^{b)} (mg/kg)	Recovery ^{c)} (%)	RSD _r ^{d)} (%)
Fumonisin B ₁	3.111	0.438	64.7	1.2	ND	66.2	4.2
Fumonisin B ₂	1.111	0.0671	65.8	2.5	0.141	58.0	0.68
Fumonisin B ₃	0.267	0.0215	67.0	2.2	ND	61.8	1.4

a) The mycotoxins were spiked to air-dried samples one night prior to extraction. The spiked levels were 7 mg/kg as air-dry basis for fumonisin B₁, 2.5 mg/kg as air-dry basis for fumonisin B₂ and 0.6 mg/kg as air-dry basis for fumonisin B₃, respectively. The levels of mycotoxins as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of samples was 60 % for fed basis and 10 % for 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) Natural contamination was measured in standard addition method when it was higher than one tenth of spiked level. Natural contamination was measured in mean of the five samples, when it was lower than one tenth of spiked level.

c) (mean of the five samples – natural contamination) / spiked level × 100

d) Relative standard deviation of repeatability

ND: Not detected

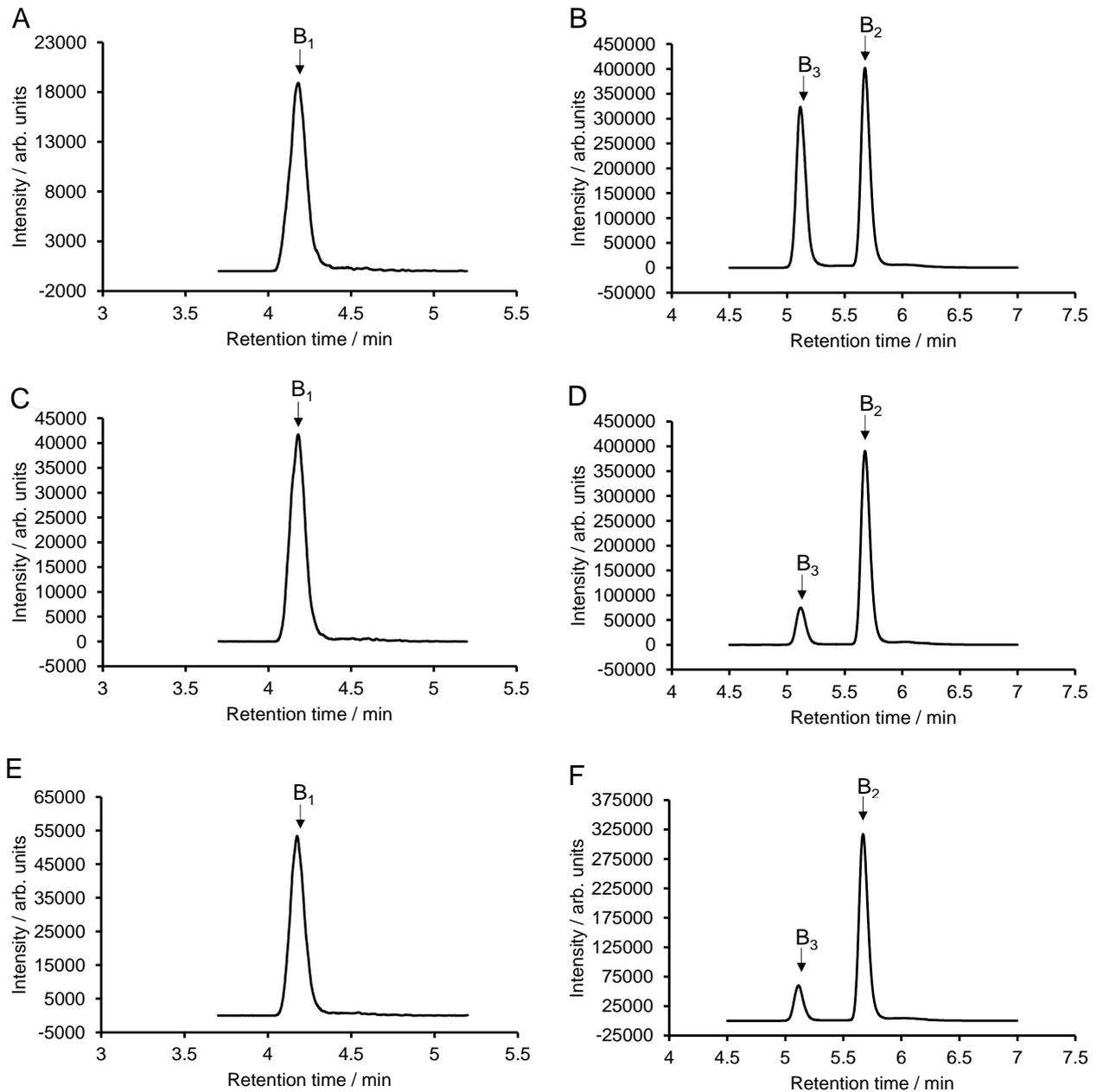


Fig. 5 Typical SRM chromatograms of fumonisins in standard and spiked sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the peaks of B₁:

fumonisin B₁, B₂: fumonisin B₂ and B₃: fumonisin B₃.)

A, B: Standard solution (25 ng/mL: 125 pg as fumonisins)

C, D: Sample solution of corn silage (spiked at 3.111 mg/kg as fed basis of fumonisin B₁ (as 87.5 ng/mL in sample solution), 1.111 mg/kg as fed basis of fumonisin B₂ (as 31.25 ng/mL in sample solution) and 0.267 mg/kg as fed basis of fumonisin B₃ (as 7.5 ng/mL in sample solution))

E, F: Sample solution of WCRS (spiked at 3.111 mg/kg as fed basis of fumonisin B₁ (as 87.5 ng/mL in sample solution), 1.111 mg/kg as fed basis of fumonisin B₂ (as 31.25 ng/mL in sample solution) and 0.267 mg/kg as fed basis of fumonisin B₃ (as 7.5 ng/mL in sample solution))

4 まとめ

とうもろこしサイレージ及び WCRS 中のフモニシンについて、JFRL 法を基に、LC-MS/MS を用いた同時定量法について、飼料分析基準への収載の可否を検討したところ、抽出溶媒量及び精製方法を変更することで、以下の結果が得られた。

- 1) 検量線はそれぞれ 1~100 ng/mL 相当量（注入量として 0.005~0.5 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線の濃度範囲は、各フモニシンを 0.08~8 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フモニシン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。
- 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、試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。
- 4) 原物中に換算して、フモニシン B₁ として 3.111 mg/kg 相当量、フモニシン B₂ として 1.111 mg/kg 相当量、フモニシン B₃ として 0.267 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、妥当性確認ガイドラインに定められた真度の目標値を満たせず、分析法の改良が必要であると考えられた。

文 献

- 1) JECFA: Safety evaluation of certain mycotoxins in food, WHO food additives series 47 (2001). <https://inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm>, cited 27 Dec. 2023.
- 2) 農林水産省畜産局飼料課：飼料をめぐる情勢，https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/1_siryo/attach/pdf/index-1046.pdf，令和 6 年 3 月。
- 3) 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)。
- 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，令和 5 年 12 月 1 日，5 消安第 4714 号 (2023)。
- 5) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 25 年度飼料中の有害物質等の含有量実態調査事業（重金属，かび毒）報告書，平成 26 年 3 月 (2014)。

2 豚用配合飼料中のシスチン, リジン, メチオニン及びトレオニンの液体クロマトグラフによる同時分析法の開発

土井 雄悟^{*1}, 山上 陽平^{*2,3}, 塩津 萌々子^{*2}

Development of Simultaneous Determination Method of Cystine, Lysine, Methionine and Threonine in Formula Feed for Pigs by Automatic Amino Acid Analyzer

DOI Yugo^{*1}, YAMAGAMI Yohei^{*2,3} and SHIOTU Momoko^{*2}

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

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

^{*3} Institute of Food Research, National Agriculture and Food Research Organization)

We have developed a simultaneous quantitative determination method of the concentration of amino acids (cystine, lysine, methionine and threonine) in formula feed for pig using an automatic amino acid analyzer.

Amino acids in a sample were oxidized with a performic acid solution, and the sample solution was hydrolyzed with hydrochloric acid. The sample solution was then concentrated under the reduced pressure, and diluted with sodium citrate buffer. Then, amino acids in the sample solution was determined using an automatic amino acid analyzer. Amino acids separation was carried out on an AApak Na-LG separation column (6.0 mm i.d. × 50 mm, 4 μm, JASCO Co. Inc.; Tokyo, Japan) and an AECpak Na-LG ammonia removal column (4.6 mm i.d. × 35 mm, JASCO Co. Inc.) with a gradient of Amino Buffer Na-LG 1st, 2nd, 3rd and 4th. The amino acids were then colored by post-column reaction with Amino Reagent Na-LG (Hypo Reagent and OPA Reagent) (JASCO Co. Inc.).

Recovery tests were conducted on formula feed for piglets and fattening pigs. Formula feed for piglets was added with 0.448 % of cystine, 1.57 % of lysine, 0.448 % of methionine and 1.12 % of threonine. The resulting mean recoveries were 90.2 % for cystine, 105 % for lysine, 83.7 % for methionine and 102 % for threonine. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 1.2 % for cystine, less than 1.4 % for lysine, less than 1.0 % for methionine and less than 1.7 % for threonine. Formula feed for fattening pigs was added with 0.336 % of cystine, 1.12 % of lysine, 0.336 % of methionine and 0.672 % of threonine. The resulting mean recoveries were 98.9 % for cystine, 78.8 % for lysine, 105 % for methionine and 92.1 % for threonine. RSD_r was less than 1.7 % for cystine, less than 1.9 % for lysine, less than 2.1 % for methionine and less than 1.5 % for threonine.

Key words: amino acid; cystine; lysine; methionine; cysteic acid; methionine sulfone; threonine; automatic amino acid analyzer; formula feed for pigs

キーワード：アミノ酸；シスチン；リジン；メチオニン；システイン酸；メチオニンスルホン；トレオニン；アミノ酸自動分析装置；豚用配合飼料

^{*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 仙台センター

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*3} 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

1 緒 言

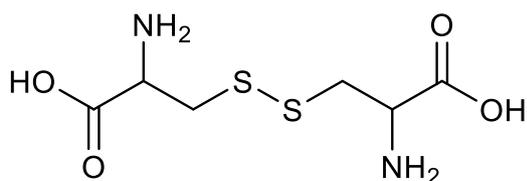
家畜排せつ物に含まれる窒素及びリンは，地球温暖化ガスや悪臭の発生，湖沼等の富栄養化などの畜産環境問題の原因として問題となっている．このうち排せつ物中の窒素については，アミノ酸バランスの適正化により低減できることが報告されている¹⁾．これらの知見に基づき，飼料の公定規格²⁾には環境負荷低減型配合飼料（豚用）の規格が設けられ，アミノ酸（シスチン，リジン，メチオニン及びトレオニン）の最小量が規定されている．また，農林水産省が令和 3 年に策定した「みどりの食料システム戦略」³⁾に掲げている畜産分野における温室効果ガス排出量の削減に向けても，環境負荷低減型配合飼料の普及が期待されている．

現在，飼料中のメチオニンの分析法について飼料分析基準⁴⁾ではアミノ酸分析計による同時分析法（以下「同時分析法」という．）が記載されているが，低回収の問題がある．また，シスチン，リジン及びトレオニンについても豚用配合飼料において妥当性を確認する必要がある．

令和 4 年度，筆者ら⁵⁾はメチオニンを過ギ酸処理によりメチオニンスルホンに酸化した後，塩酸加水分解を行い，アミノ酸自動分析装置で測定する方法について予備検討を行ったところ，同時分析法と比較しメチオニン測定量が増加する傾向が確認された．

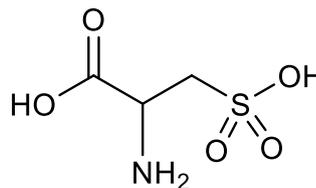
そこで今回，豚用配合飼料中のメチオニンについて，アミノ酸自動分析装置による定量法を開発し，更にシスチン（メチオニンと同様に過ギ酸処理によりシステイン酸として定量），リジン及びトレオニンの同時定量についても検討したので，その概要を報告する．

参考にシスチン，システイン酸，リジン，メチオニン，メチオニンスルホン及びトレオニンの構造式を Fig. 1 に示した．



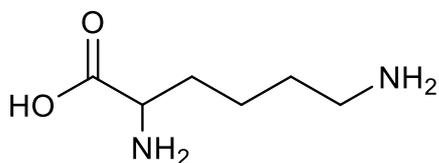
DL - Cystine

2,2-Diamino-3,3-dithiodipropionic acid

C₆H₁₂N₂O₄S₂ MW: 240.30 CAS No.: 923-32-0

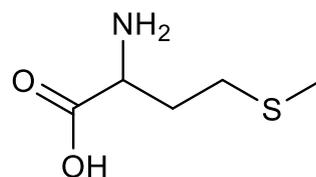
DL - Cysteic acid

2-amino-3-sulfo-propanoic acid

C₃H₇NO₅S MW: 169.16 CAS No.: 498-40-8

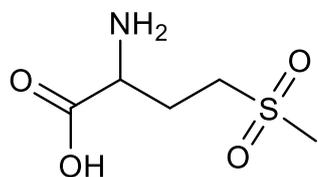
DL-Lysine

2,6-Diaminohexanoic acid

C₆H₁₄N₂O₂ MW: 146.19 CAS No.: 70-54-2

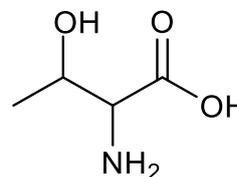
DL - Methionine

2-Amino-4-(methylthio)butyric acid

C₅H₁₁NO₂S MW: 149.21 CAS No.: 59-51-8

DL - Methionine sulfone

2-Amino-4-(methanesulfonyl)butanoic acid

C₅H₁₁NO₄S MW: 181.21 CAS No.: 820-10-0

DL-Threonine

2-Amino-3-hydroxybutyric acid

C₄H₉NO₃ MW: 119.12 CAS No.: 80-68-2

Fig. 1 Chemical structures of cystine, cysteic acid, lysine, methionine, methionine sulfone and threonine

2 実験方法

2.1 試料

配合飼料はそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し、分析用試料とした。なお、検討に用いた配合飼料を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For suckling pigs	Grains	58	Corn, heat-treated corn, heat-treated soybean
	Oil seed meal	18	Soybean meal, linseed meal
	Animal by-products	6	Dried whey, fish meal, skim milk, swine and poultry by-product meal
	Others	18	Confection, calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, fructooligosaccharide, silic acid, cultured <i>paenibacillus</i> , yeast for feed, citric acid, tartaric acid, lactic acid, malic acid, sepiolite, feed additives
For piglets 1	Grains	74	Corn, rice
	Oil seed meal	20	Rapeseed meal, soybean meal, corn germ meal
	Others	6	Confection, calcium carbonate, animal fat, salt, calcium phosphate, vegetable oil
For piglets 2	Grains	75	Corn, wheat, rice, milo
	Oil seed meal	21	Soybean meal, rapeseed meal
	Brans	1	Wheat bran, distiller's dried grains with solubles
	Others	3	Animal fat, calcium carbonate, calcium phosphate, salt, licorice root extract, stevia, feed additives
For fattening pigs 1	Grains	73	Milo, wheat, rice, cassava, barley, heat-treated milo
	Brans	7	Rice bran, corn gluten feed, wheat bran
	Oil seed meal	6	Soybean meal, rapeseed meal, corn germ meal
	Others	14	Confection, calcium carbonate, molasses, calcium phosphate, salt, bakery yeast, feed additives
For fattening pigs 2	Grains	80	Corn, rice, wheat, milo, barley
	Oil seed meal	15	Rapeseed meal, soybean meal
	Brans	2	Rice bran, corn gluten feed
	Others	3	Calcium carbonate, calcium phosphate, animal fat, salt, betaine, vegetable oil, yucca extract, quillaja extract, silicic acid anhydride, vermiculite
For fattening pigs 3	Grains	72	Corn, milo, wheat
	Oil seed meal	21	Rapeseed meal, soybean meal, corn germ meal
	Brans	4	Corn gluten feed, distiller's dried grains with solubles,
	Others	3	Animal fat, calcium carbonate, salt, confection, vegetable oil, silicic acid, calcium phosphate, molasses
For boar pigs	Grains	64	Corn, rice, wheat, milo
	Oil seed meal	19	Rapeseed meal, soybean meal
	Brans	12	Wheat bran, corn gluten feed, distiller's dried grains with solubles, rice bran
	Animal by-products	1	fish meal
	Others	4	Molasses, calcium carbonate, calcium phosphate, salt, lignocellulose, alfalfa meal, feed yeast, lactobacillus, dry yeast cell wall, bentonite, saccharomyces cerevisiae yeast, ascophyllumnodsum, diatomaceous earth, milk thistle extract, chicory extract, animal fat

2.2 試薬

- 1) 水酸化ナトリウム及び過酸化水素水は試薬特級を用いた。ギ酸は試薬特級（質量分率 98%）を用いた。二亜硫酸ナトリウムは和光特級（富士フィルム和光純薬製）を用いた。20%塩酸は精密分析用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。フェノールはアミノ酸自動分析用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液は試料希釈用（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 K 0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。

2) 各アミノ酸標準品

L-シスチン, L-システイン酸, L-リシンー塩酸塩, L-メチオニン, L-メチオニンスルホン及び L-トレオニンの標準品は, Table 2 に示した供給業者, 純度のものを用いた。

Table 2 Amino acid standards used in the present study

Amino acids	Manufacturer	Purity (%)
L-Cystine	FUJIFILM Wako Pure Chemical	99.4
L-Cysteic acid	FUJIFILM Wako Pure Chemical	99.8
L-Lysine monohydrochloride	National Institute of Advanced Industrial Science and Technology	99.8
L-Methionine	FUJIFILM Wako Pure Chemical	100.0
L-Methionine sulfone	Thermo Fisher Scientific	99.0
L-Threonine	FUJIFILM Wako Pure Chemical	99.9

3) アミノ酸標準原液

L-システイン酸, L-メチオニン, L-メチオニンスルホン及び L-トレオニン標準品各 200 mg, L-リシンー塩酸塩標準品 250 mg を量ってそれぞれ 10 mL の全量フラスコに入れ, pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液を加えて溶かし, 更に標線まで pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液を加えて各アミノ酸標準原液を調製した (この液 1 mL は, 各アミノ酸として 20 mg を含有)。

L-シスチン標準品 100 mg を量って 5 mL の全量フラスコに入れ, 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて溶かし, 更に標線まで 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えてシスチン標準原液を調製した (この液 1 mL は, シスチンとして 20 mg を含有)。

4) アミノ酸混合標準液

L-システイン酸, L-リシン, L-メチオニンスルホン及び L-トレオニン標準原液各 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し, 更に標線まで pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液を加えてアミノ酸混合標準原液を調製した (この液 1 mL は, 各アミノ酸として 200 µg を含有)。

使用に際して, アミノ酸混合標準原液の一部を pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液で正確に希釈し, 1 mL 中に各アミノ酸としてそれぞれ 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 及び 20 µg を含有するアミノ酸混合標準液を調製した。

5) 過酸化水素水ーギ酸溶液

過酸化水素水 10 mL にギ酸 90 mL を加え, 密栓して 30 分間静置した後, 30 分間冷所 (0~4 °C) に静置して調製した。

6) フェノール添加 6 mol/L 塩酸

20 %塩酸 350 mL にあらかじめ 60 °C の水浴で溶解したフェノール 350 µL を加え, よく混合して調製した。

7) 0.1 mol/L 塩酸

水 1180 mL に 20 %塩酸 20 mL を加え, よく混合して調製した。

8) 溶離液

Amino Buffer Na-LG 1st, 2nd, 3rd 及び 4th (日本分光製, 以下「1st」, 「2nd」, 「3rd」及び「4th」という。)を使用した。溶離液の組成については Table 3 に示した。

Table 3 Compositions of the mobile phase

Mobile phase names	Substance names	Proportion (%)
Amino Buffer Na-LG 1st	Ultrapure water	< 80
	Ethanol	15
	Citric acid monohydrate	< 5
	Trisodium citrate dihydrate	< 1
	Sodium perchlorate dihydrate	< 1
Amino Buffer Na-LG 2nd	Ultrapure water	< 90
	Citric acid monohydrate	< 5
	Trisodium citrate dihydrate	< 1
	Sodium perchlorate dihydrate	< 1
Amino Buffer Na-LG 3rd	Ultrapure water	< 95
	Citric acid monohydrate	< 1
	Trisodium citrate dihydrate	< 1
	Sodium perchlorate dihydrate	< 1
Amino Buffer Na-LG 4th	Ultrapure water	> 98
	Sodium hydroxide	< 1

9) 反応液

反応液 A として、Amino Reagent Na-LG (Hypo Reagent) (日本分光製) を、反応液 B として、Amino Reagent Na-LG (OPA Reagent) (日本分光製) 1000 mL に、エタノール (日本分光製、純度 99.5 %) 10 mL で溶かしたオルトフタルアルデヒド (日本分光製、純度 99.0 %) 500 mg を全量加えて調製したものを使用した。反応液に使用した試薬の組成については Table 4 に示した。

Table 4 Compositions of the reagent used in reaction solution

Reagent names	Substance names	Proportion (%)
Amino Reagent Na-LG (HYPO Reagent)	Ultrapure water	> 95
	Boric acid	< 2
	Sodium hydroxide	< 1
	Sodium hypochlorite	< 0.1
Amino Reagent Na-LG (OPA Reagent)	Ultrapure water	> 95
	Boric acid	< 2
	Sodium hydroxide	< 1
	Brij-35, 30 % Solution	< 0.5
	3-Mercaptopropionic acid	< 0.5

2.3 装置及び器具

- 1) 粉砕機 : ZM 200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)
- 2) 超音波洗浄機 : US-02 エスエヌディ製

3) メンブランフィルター：Millex-LH（孔径 0.45 μm ，直径 25mm，親水性 PTFE）Merck Millipore 製

4) アミノ酸自動分析装置：EXTREMA 日本分光製

2.4 定量方法

1) 過ギ酸酸化

分析試料の一定量（窒素として 10 mg 相当量）を量って 200 mL のなす形フラスコに入れ、過酸化水素水ーギ酸溶液 10 mL を加えて密栓し、超音波処理してよく混合後、冷所（0~4 $^{\circ}\text{C}$ ）に一夜静置した。これに二亜硫酸ナトリウムを 0.84 g 加え、5 分間手で振り混ぜた。

2) 加水分解

先のなす形フラスコにフェノール添加 6 mol/L 塩酸 50 mL を加え、冷却管を付け、115 $^{\circ}\text{C}$ のシリコン油浴中で 24 時間加熱して分解した後放冷した。分解液を 250 mL の全量フラスコに入れ、試料溶液が入っていた 200 mL のなす形フラスコを 0.1 mol/L 塩酸 30 mL で洗浄し、洗液を先の全量フラスコに入れ、更に標線まで 0.1 mol/L 塩酸を加え、ろ紙（5 種 A）でろ過した。これを正確に 2 mL 取って 50 mL のなす形フラスコに入れ、40 $^{\circ}\text{C}$ 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。pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液 2 mL を正確に加え、超音波処理して残留物を溶かした後、メンブランフィルターでろ過し、アミノ酸自動分析装置に供する試料溶液とした。

3) アミノ酸自動分析装置による測定

試料溶液及び各アミノ酸混合標準液各 10 μL をアミノ酸自動分析装置に注入し、クロマトグラムを得た。測定条件を Table 5 に示した。

Table 5 Operating conditions of automatic amino acid analyzer

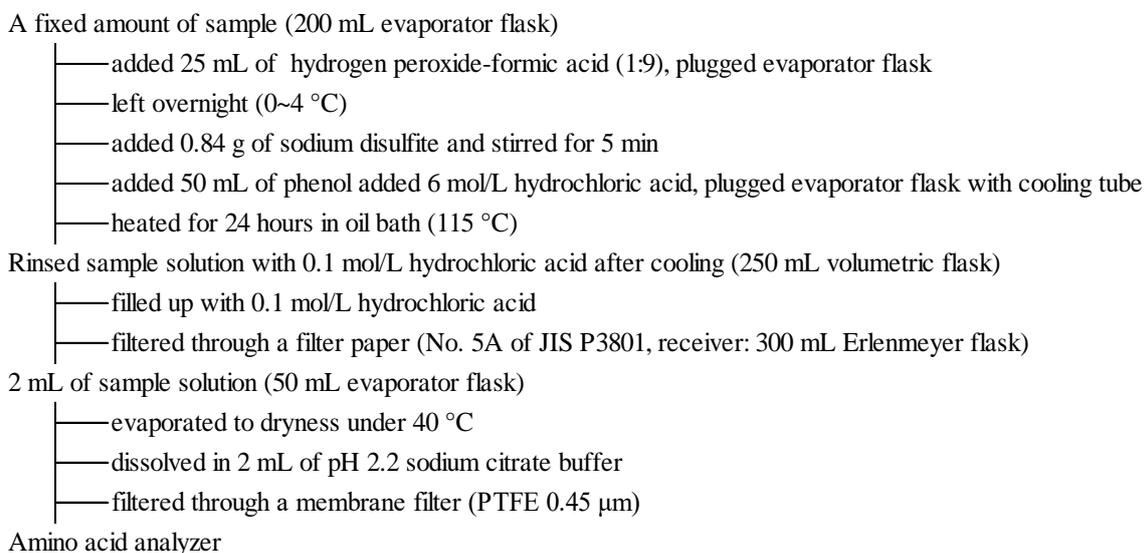
Detector	Fluorescent detector (excitation wavelength: 345 nm, fluorescent wavelength: 455 nm)
Separation column	AApak Na-LG (6.0 mm i.d. \times 50 mm, 4 μm), JASCO
Ammonia removal column	AECpak Na-LG (4.6 mm i.d. \times 35 mm), JASCO
Mobile phase	1st (hold for 1.5 min) \rightarrow 0.5 min \rightarrow 1st-2nd-3rd (44:5:1) \rightarrow 1 min \rightarrow 2nd-3rd (24:1) \rightarrow 11 min \rightarrow 2nd-3rd (41:9) (hold for 8 min) \rightarrow 10 min \rightarrow 2nd-3rd (1:1) \rightarrow 5 min \rightarrow 2nd-3rd (1:4) \rightarrow 5 min \rightarrow 3rd (hold for 5 min) \rightarrow 0.1 min \rightarrow 4th (hold for 0.9 min) \rightarrow 0.05 min \rightarrow 1st (hold for 21.95 min)
Reaction solution	Solution A-solution B (1:1) Solution A: Hypo Reagent Solution B was prepared by adding 500 mg of ortho-phthalaldehyde dissolved in 10 mL of ethanol to 1000 mL of OPA Reagent.
Flow rate	Mobile phase: 0.5 mL/min, Reaction solution: 0.5 mL
Column temperature	60 $^{\circ}\text{C}$

4) 計算

得られたクロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の各アミノ酸量を算出した。なお、本法では、シスチン及びメチオニンはそれぞれ操作中にシステイン酸及びメチオニンスルホンに変換されるためシステイン酸及びメチオニンスルホンとして定量し、システイン酸及びメチオニンスルホン量にそれぞれ 0.7103, 0.8234 を乗じてシスチン及びメチオ

ニン量に換算した。

なお，定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for methionine assay in feed (non-spiked sample)

2.5 添加回収試験

2.2 の 3)の L-シスチン，L-リジン，L-メチオニン及び L-トレオニン標準原液を添加に用いた。添加濃度は，子豚育成用及び肉豚肥育用配合飼料について，飼料の公定規格に定められた環境負荷低減型配合飼料の最小量の 2 倍程度の量とした。

子豚育成用配合飼料 1 にシスチン，リジン，メチオニン及びトレオニンとしてそれぞれ 0.448, 1.57, 0.448 及び 1.12 %相当量（最終試料溶液中で 2.4, 8.4, 2.4 及び 6.0 µg/mL），肉豚肥育用配合飼料 3 にシスチン，リジン，メチオニン及びトレオニンとしてそれぞれ 0.336, 1.12, 0.336 及び 0.672 %相当量（同 1.8, 6.0, 1.8 及び 3.6 µg/mL）を添加後よく混合し，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。また，回収率は試料ブランク値を差し引いて算出した。

なお，標準原液添加試料については試薬量の節約及び試料溶液の濃度を検量線の範囲内とするため，2.4 の 2)の操作の一部について以下の下線部のとおり全量フラスコの容量を変更し，波線部の操作を追加して実施した。

先のなす形フラスコにフェノール添加 6 mol/L 塩酸 50 mL を加え，冷却管を付け，115 °C のシリコン油浴中で 24 時間加熱して分解した後放冷した。分解液を 100 mL の全量フラスコに入れ，試料溶液が入っていた 200 mL のなす形フラスコを 0.1 mol/L 塩酸 30 mL で洗浄し，洗液を先の全量フラスコに入れ，更に標線まで 0.1 mol/L 塩酸を加え，ろ紙（5 種 A）でろ過した。これを正確に 3 mL 取って 25 mL の全量フラスコに入れ，更に標線まで 0.1 mol/L 塩酸を加えた。これを正確に 2 mL 取って 50 mL のなす形フラスコに入れ，40 °C 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。pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液 2 mL を正確に加え超音波処理して残留物を溶かした後，メンブランフィルターでろ過し，アミノ酸自動分析装置に供する試料溶液とした。

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 4)により調製した各アミノ酸混合標準液各 10 μL をアミノ酸自動分析装置に注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積を用いて検量線を作成した。

得られた検量線は Fig. 2 のとおりであり、1~20 $\mu\text{g/mL}$ (注入量として 0.01~0.2 μg 相当量) の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線の濃度範囲は、シスチン、リジン、メチオニン及びトレオニンをそれぞれ 0.0398~0.796, 0.0560~1.120, 0.0461~0.922 及び 0.0560~1.120 %含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各アミノ酸濃度範囲に相当する。

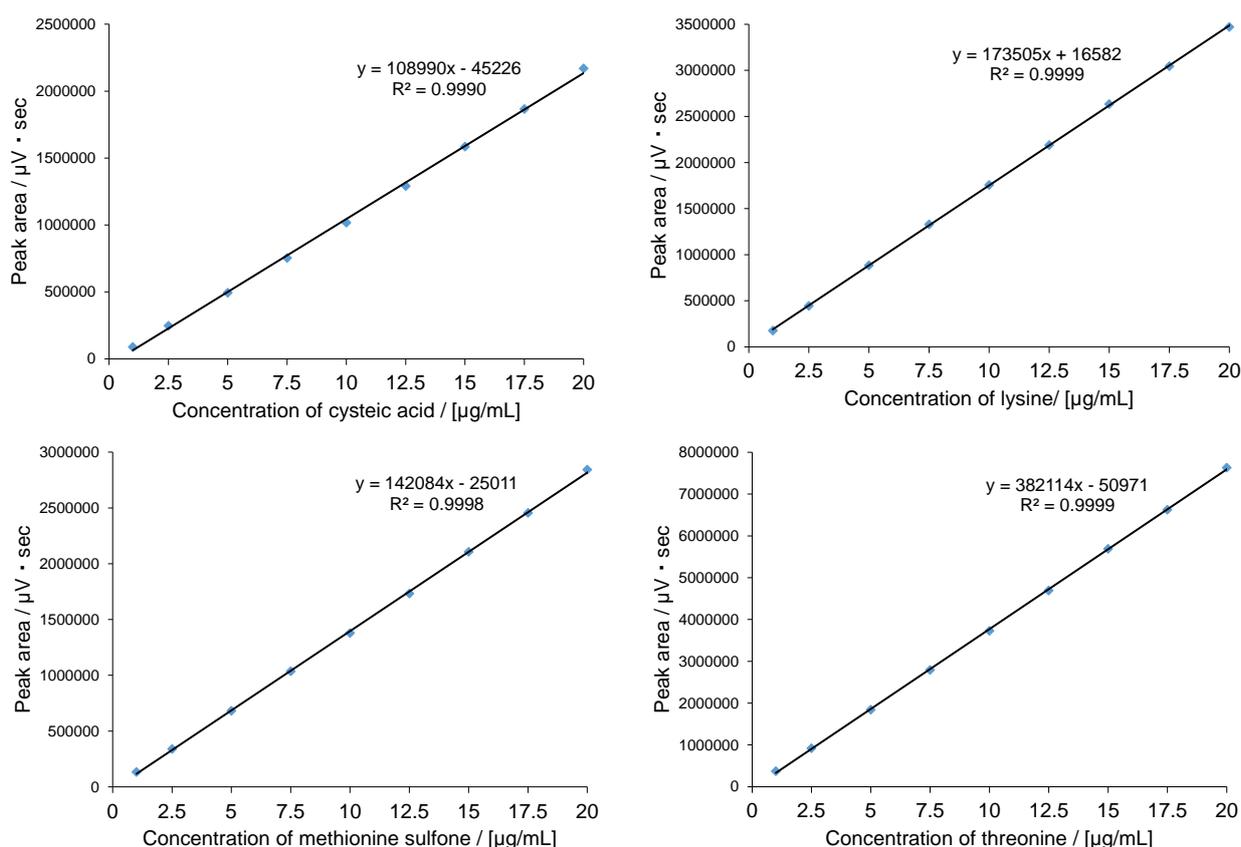


Fig. 2 Calibration curves of cysteic acid, lysine, methionine sulfone and threonine

3.2 妨害物質の検討

豚用配合飼料 7 検体を用い、本法により調製した試料溶液をアミノ酸自動分析装置に注入し、得られたクロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においてもメチオニンスルホンと重なるピークが確認されたため、ピークを垂直に分割し面積で定量することとした。システイン酸、リジン及びトレオニンについては定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られたクロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

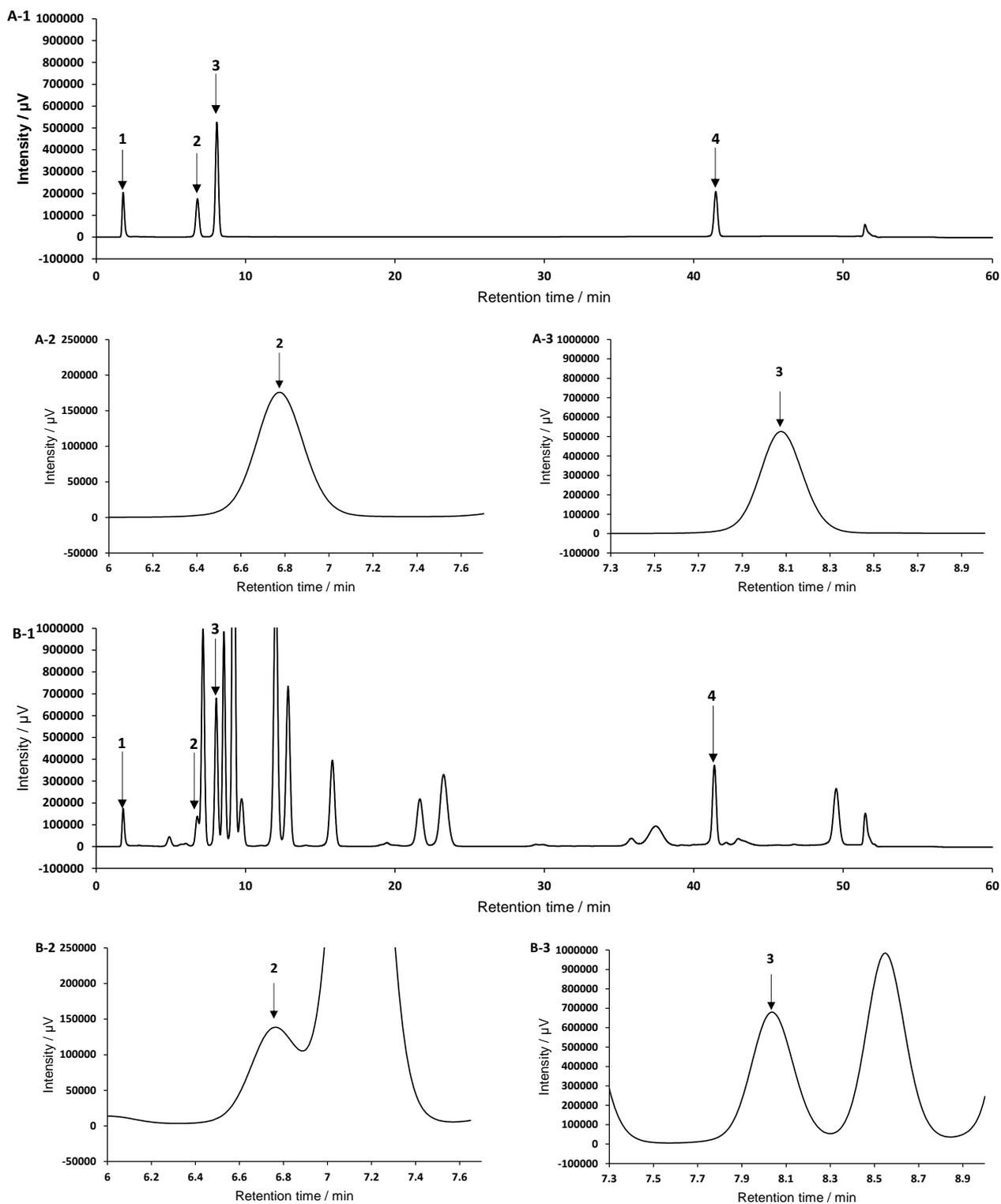


Fig. 3 Typical chromatograms of standard and sample solution

(Operating conditions of automatic amino acid analyzer are shown in Table 5. Arrows indicate the peaks of 1: cysteic acid, 2: methionine sulfone, 3: threonine and 4: lysine.)

A: Standard solution (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, A-2 and A-3 are enlarged views of portions of A-1.)

B: Sample solution of formula feed for piglets (B-2 and B-3 are enlarged views of portions of B-1.)

3.3 併行精度確認試験

子豚育成用配合飼料 1 及び肉豚肥育用配合飼料 3 を 2.4 に従って定量し、繰返し精度を求めた。その結果は Table 6 のとおり、子豚育成用配合飼料 1 では、シスチンについて繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 3.1 %、リジンについて RSD_r は 2.2 %、メチオニンについて RSD_r は 3.2 %、トレオニンについて RSD_r は 2.4 %、肉豚肥育用配合飼料 3 では、シスチンについて RSD_r は 2.7 %、リジンについて RSD_r は 2.8 %、メチオニンについて RSD_r は 2.9 %、トレオニンについて RSD_r は 3.1 % の成績が得られた。これらは飼料分析基準別紙 2 の試験法の妥当性確認ガイドライン（以下「妥当性確認ガイドライン」という。）に定められた 1) 及び 2) の併行精度の目標値を満たす結果であった。

- 1) 精度（子豚育成用配合飼料 1）：シスチン 4.8 % 以下、リジン 4.0 % 以下、メチオニン 4.9 % 以下、トレオニン 4.4 % 以下
- 2) 精度（肉豚肥育用配合飼料 3）：シスチン 4.8 % 以下、リジン 4.3 % 以下、メチオニン 4.7 % 以下、トレオニン 4.4 % 以下

Table 6 Repeatability of cystine, lysine, methionine and threonine

Amino acids	For piglets 1		For fattening pigs 3	
	Content ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Content ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
Cystine	0.278	3.1	0.305	2.7
Lysine	0.937	2.2	0.637	2.8
Methionine	0.255	3.2	0.344	2.9
Threonine	0.569	2.4	0.504	3.1

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.4 添加回収試験

2.5 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 7 のとおり、子豚育成用配合飼料 1 では平均回収率及び RSD_r はそれぞれ、シスチンが 90.2 % 及び 1.2 %、リジンが 105 % 及び 1.4 %、メチオニンが 83.7 % 及び 1.0 %、トレオニンが 102 % 及び 1.7 %、肉豚肥育用配合飼料 3 では平均回収率及び RSD_r はそれぞれ、シスチンが 98.9 % 及び 1.7 %、リジンが 78.8 % 及び 1.9 %、メチオニンが 105 % 及び 2.1 %、トレオニンが 92.1 % 及び 1.5 % の成績が得られた。これらは妥当性確認ガイドラインに定められた 1)~3) の真度及び併行精度の目標値を満たす結果であった。

- 1) 真度：70 % 以上 120 % 以下
- 2) 精度（子豚育成用配合飼料 1）：シスチン 4.2 % 以下（定量値 0.681 %）、リジン 3.5 % 以下（同 2.57 %）、メチオニン 4.3 % 以下（同 0.646 %）、トレオニン 3.7 % 以下（同 1.72 %）
- 3) 精度（肉豚肥育用配合飼料 3）：シスチン 4.3 % 以下（定量値 0.646 %）、リジン 3.7 % 以下（同 1.57 %）、メチオニン 4.2 % 以下（同 0.714 %）、トレオニン 3.9 % 以下（同 1.15 %）

なお、得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 7 Recoveries for cystine, lysine, methionine and threonine

Amino acids	For piglets 1				For fattening pigs 3			
	Spiked level (%)	Blank level ^{a)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Spiked level (%)	Blank level ^{a)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)
Cystine	0.448	0.279	90.2	1.2	0.336	0.317	98.9	1.7
Lysine	1.57	0.914	105	1.4	1.12	0.680	78.8	1.9
Methionine	0.448	0.272	83.7	1.0	0.336	0.364	105	2.1
Threonine	1.12	0.583	102	1.7	0.672	0.528	92.1	1.5

a) $n = 1$ b) $(\text{mean of five samples} - \text{blank level}) / \text{spiked level} \times 100$

c) Relative standard deviation of repeatability

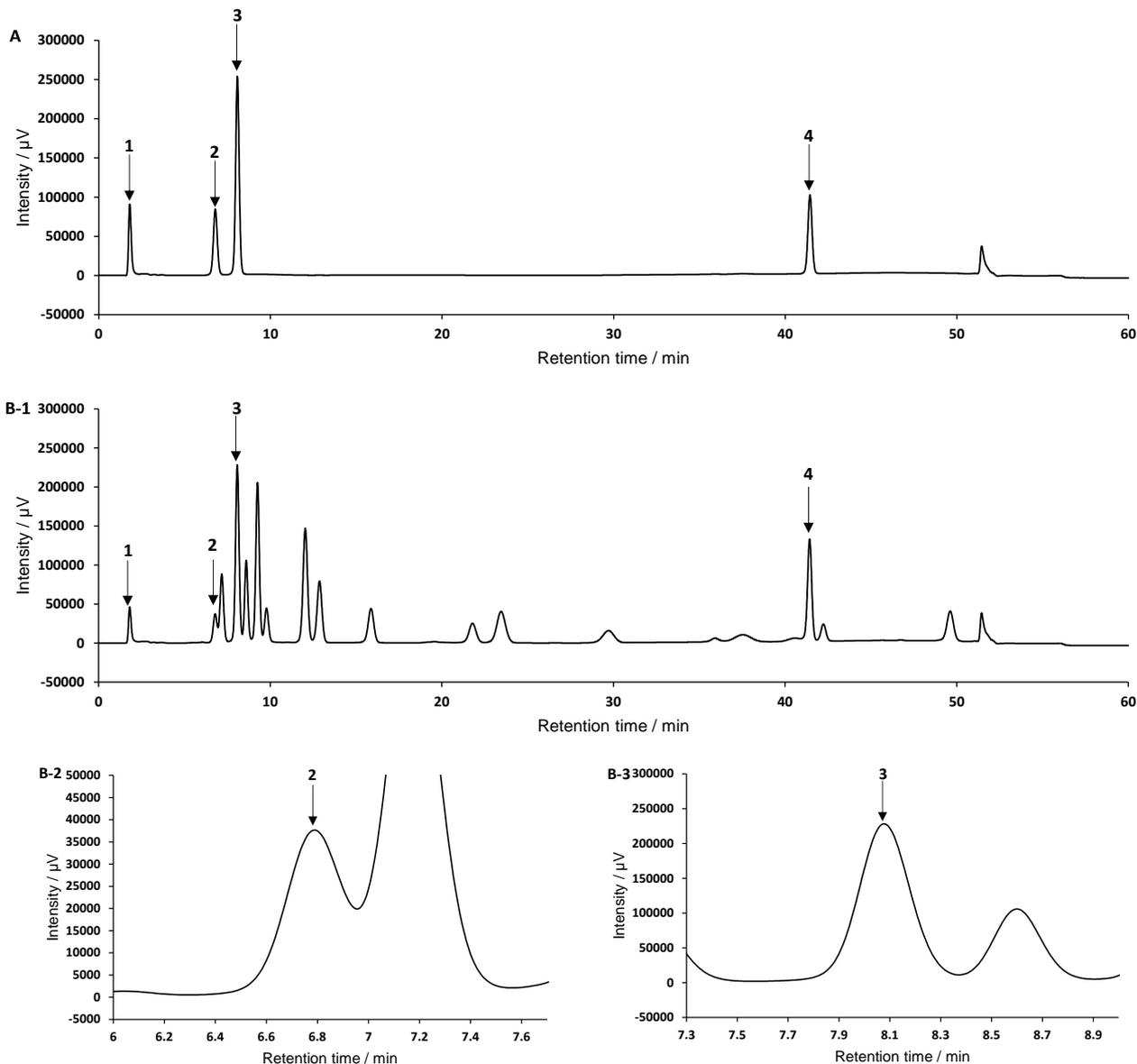


Fig. 4 Typical chromatograms of standard and spiked sample solution
 (Operating conditions of automatic amino acid analyzer are shown in Table 5. Arrows indicate the peaks of 1: cysteic acid, 2: methionine sulfone, 3: threonine and 4: lysine.)
 A: Standard solution (10 $\mu\text{g/mL}$)
 B: Sample solution of formula feed for piglets (spiked at 0.44 % cystin and methionine (as 2.4 $\mu\text{g/mL}$ in sample solution), 1.44 % lysine (as 8.4 $\mu\text{g/mL}$ in sample solution), and 0.94 % threonine (as 6.0 $\mu\text{g/mL}$ in sample solution). B-2 and B-3 are enlarged views of portions of B-1.)

4 まとめ

豚用配合飼料中のメチオニンについて、過ギ酸処理によりメチオニンスルホンに酸化した後、塩酸加水分解を行う分析法の飼料分析基準への収載の可否について検討するとともに、シスチン、リジン及びトレオニンとの同時定量法としての適用を併行して検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 検量線はシステイン酸，リジン，メチオニンスルホン及びトレオニンとしてそれぞれ 1~20 $\mu\text{g/mL}$ 相当量（注入量として 0.01~0.2 μg 相当量）の範囲で直線性を示した。
なお，当該検量線の濃度範囲は，シスチンを 0.0398~0.796 %，リジンを 0.0560~1.120 %，メチオニンを 0.0461~0.922 %，トレオニンを 0.0560~1.120 % 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各アミノ酸濃度範囲に相当する。
- 2) 豚用配合飼料について，本法に従って得られたクロマトグラムにはメチオニンスルホンと重なるピークが確認されたため，ピークを垂直に分割し面積で定量することとした。システイン酸，リジン及びトレオニンについては選択性を妨げるピークは認められなかった。
- 3) 子豚育成用配合飼料及び肉豚肥育用配合飼料を本法に従って 5 点併行分析し，繰返し精度を求めたところ，妥当性確認ガイドラインに定められた併行精度の目標値を満たす結果が得られた。
- 4) 子豚育成用及び肉豚肥育用配合飼料について，飼料の公定規格に定められた環境負荷低減型配合飼料の最小量の 2 倍程度のシスチン，リジン，メチオニン及びトレオニンを添加し，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結果が得られた。

文 献

- 1) 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構：日本飼養標準 豚 (2013).
- 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：みどりの食料システム戦略，<https://www.maff.go.jp/j/kanbo/kankyoseisaku/midori/attach/pdf/index-10.pdf>，令和 3 年 5 月 12 日 (2021).
- 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，令和 5 年 12 月 1 日，5 消安第 4714 号 (2023).
- 5) 土井 雄悟，山上 陽平：豚用配合飼料中のシスチン，リジン，メチオニン及びトレオニンのアミノ酸自動分析装置による分析法の検討，飼料研究報告，48，40-49 (2023).

3 愛玩動物用飼料中の糞便系大腸菌群の検出法の検討

近藤 勝^{*1}, 齊木 雅一^{*1}, 平田 絵理香^{*2}, 大島 慎司^{*3}, 野崎 友春^{*3}, 久保田 恵理^{*4}

Study of Fecal Coliform Detection Method for Pet Food

KONDO Masaru^{*1}, SAIKI Masakazu^{*1}, HIRATA Erika^{*2}, OSHIMA Shinji^{*3},
NOZAKI Tomoharu^{*3} and KUBOTA Eri^{*4}

(*¹ Sapporo Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),

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

^{*3} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC, ^{*4} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC
(Now Yokohama Office, FAMIC))

We have studied a detection method of fecal coliforms in pet food.

Having added 0.1 w/v% peptone salt solution to a sample and left at rest for 30 minutes, it was blended by a stomacher for 5 minutes. The diluted solution (1 mL) after stomacher treatment was inoculated into five EC fermentation tubes respectively and cultured at 44.5 °C for 24 hours. One loop of the EC fermentation tube that produced gas was inoculated into an EMB agar plate and cultured at 35 °C for 24 hours. One typical colony on the EMB agar plate was inoculated into a lactose fermentation tube and cultured at 35 °C for 24 to 48 hours. Similarly, it was also inoculated into a standard agar slant and cultured at 35 °C for 24 hours. If the lactose fermentation tube exhibited yellowing and gas production, and the colonies on the standard agar slant were identified as gram-negative and non-spore-forming bacilli through gram staining, fecal coliforms were determined to be positive.

A bacterial inoculation test was conducted using *Escherichia coli* NCTC 9001. The *E. coli* was added at levels of 2, 6 and 18 CFU/g (1, 3 and 9 CFU/test portion) to six types of pet food. As the result of the bacterial inoculation test, the estimated LOD₅₀ (level of detection at 50 % probability of detection), was calculated to be 0.5 to 1.0 CFU/test portion based on ISO16140-3:2021. No needs of improvement were identified for this method.

Key words: fecal coliform; pet food; estimated LOD₅₀; ISO16140-3:2021

キーワード：糞便系大腸菌群；愛玩動物用飼料；eLOD₅₀；ISO16140-3:2021

1 緒 言

近年、愛玩動物用飼料の不十分な加熱乾燥や衛生管理に起因すると考えられるサルモネラ汚染事例が報告されており、病原微生物による汚染防止のため愛玩動物用飼料の製造及び取扱いにおける衛生管理の徹底が求められている¹⁾。現在、微生物に関して愛玩動物用飼料等の検査法²⁾に記載されているのは、生菌数及び病原微生物のサルモネラの検出法のみであり、日常の衛生管理の指標に用いることができるような衛生指標菌の検出法の確立が求められている。

^{*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 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肥飼料安全検査部

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

日本国内の食品分野では、食品衛生法に基づく「食品、添加物等の規格基準」³⁾において、食肉製品、冷凍食品等に糞便系大腸菌群の成分規格が定められている。食品衛生法上の糞便系大腸菌群は、グラム陰性の無芽胞桿菌で 48 時間以内に乳糖を分解して酸とガスを産生する好気性又は通性嫌気性の一類（大腸菌群）のうち、44.5 °C で発育する菌群とされている⁴⁾。大腸菌の多くが 44.5 °C で発育して乳糖を分解することから、煩雑な試験を行わずに大腸菌の存在を推定しようとする意図で考えられた菌群であり⁴⁾、環境衛生管理に有用な衛生指標菌として食品分野で広く用いられている。今回、食品衛生法に基づく加熱食肉製品及び乾燥食肉製品の糞便系大腸菌群の試験法⁵⁾（以下「糞便系大腸菌群試験法」という。）及び一般財団法人東京顕微鏡院が実施した令和 4 年度生産資材安全確保対策委託事業（愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業）（以下「事業」という。）において報告⁶⁾された内容を基に、糞便系大腸菌群試験法の愛玩動物用飼料への適用の可否について検討を行ったので、その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

市販の愛玩動物用飼料（ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、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）を各 2 検体）を用いた。成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキーについては、滅菌済みのはさみを用いて無菌的に切断し、長さを 20 mm 以下としたものを分析用試料とした。その他の試料については、そのまま分析用試料として用いた。なお、検討に用いた愛玩動物用飼料を Table 1 に示した。

Table 1 Ingredients list of pet foods used in the present study (1)

Pet food types	Ingredients
Dry food for dogs	Lamb meal, wheat flour, sweet sorghum, chicken meal, chicken oil, corn, chicken extract, sugar beet pulp, poultry meat, sunflower oil, peas, carrot, pumpkin, tomato, vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D ₃ , E, choline, niacin, pantothenic acid, folic acid), minerals (Zn, K, Cl, Se, Fe, Cu, Na, I), methionine, antioxidants (rosemary extract, tocopherol mixture, citric acid, BHA, BHT)
Dry food for cats	Meat meal, soybean meal, soy pulp, animal fat, cellulose, chicken meal, fish meal, fish powder, mature tuna, meat (chicken), oligosaccharide, modified starch, minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, zinc amino acid complex, Zn, I, Co), vitamins (A, D, E, K, B ₁ , B ₂ , pantothenic acid, niacin, B ₆ , folic acid, biotin, choline), amino acids (methionine, taurine), antioxidants (rosemary extract, tocopherol mixture)
Semi dry food for dogs 1	Grains (wheat flour, etc.), meats (chicken meal, chicken extract, beef meal, etc.), sugars, potatoes (sweet potato, etc.), vegetables (carrot, pumpkin, spinach, propylene glycol, minerals (calcium phosphate, calcium carbonate, potassium chloride, magnesium sulfate, sodium chloride, iron sulfate, zinc carbonate, manganese carbonate, calcium iodate), thickening stabilizer (glycerine), preservative (potassium sorbate), vitamins (choline, C, E, nicotinic acid, pantothenic acid, A, B ₆ , B ₁ , B ₂ , folic acid, B ₁₂ , D), pH adjuster, amino acids (L-lysine hydrochloride), antioxidants (sodium erythorbate, tocopherol mixture, rosemary extract), food colors (titanium dioxide, food yellow no.5, food red no.106, food yellow no.4, food blue no.1)
Semi dry food for dogs 2	Grains (bread crumb, wheat flour, corn, etc.), meats (chicken meal, chicken extract, chicken breast powder, beef meal, pork meal), sugars (isomerized sugar, oligosaccharide), beans (defatted soybean, soy pulp powder), animal fat, beer yeast, herb, vegetables (carrot powder, pumpkin powder, spinach powder), seafood (dried small fish), propylene glycol, minerals (Ca, Cl, Cu, Fe, I, Na, P, Zn), emulsifier, preservative (potassium sorbate), pH adjuster, seasoning, food colors (titanium dioxide, food red no.106, food yellow no.4, food yellow no.5, food blue no.1), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, K, choline, pantothenic acid), antioxidants (tocopherol mixture, herb extract)
Wet food for dogs	Meats (chicken, beef, poultry, lamb, pork, etc.), vegetables (carrot, spinach), vegetable protein, dietary fiber, vitamins (B ₁ , B ₆ , B ₁₂ , D ₃ , E, choline, pantothenic acid, folic acid), minerals (Ca, Cl, I, K, Mg, Mn, P, Se, Zn), polysaccharide thickener, EDTA-Ca • Na, color former (sodium nitrite)
Wet food for cats	Fishes (skipjack tuna, white fish, tuna extract, etc.), vegetable oil, vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , E, K, choline, niacin, pantothenic acid, biotin, folic acid), minerals (Ca, Cu, Fe, I, Mg, Mn, Zn), taurine, polysaccharide thickener, seasoning, EDTA-Ca • Na, EDTA-Na

Table 1 Ingredients list of pet foods used in the present study (2)

Pet food types	Ingredients
Formed jerky for dogs 1	Meats (chicken, chicken breast), wheat flour, processed soybean products, bread crumbs, vegetable oil, sugars, defatted soybean, beer yeast, carrot, spinach, sorbitol, minerals (Ca, Na, Zn, Fe, Cu, I), propylene glycol, preservatives (sorbic acid, sodium dehydroacetate), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , niacin, pantothenic acid), sodium polyphosphate, smoked liquid, baking powder, color former (sodium nitrite), food colors (titanium dioxide, food red no.106, food yellow no.4, food blue no.1), pH adjuster
Formed jerky for dogs 2	Meats (chicken, beef), modified starch, soybean protein, wheat flour, glycerin, sucrose, spinach, carrot, propylene glycol, sorbitol, salt, glucono delta lactone, sodium polyphosphate, preservatives (potassium sorbate, sodium dehydroacetate), antioxidant (sodium erythorbate), color former (sodium nitrite), food color (food red no.106)
Dried jerky for dogs (hard type)	Deer meat
Dried jerky for dogs and cats (hard type)	Cod, preservative (sodium dehydroacetate)
Dried jerky for dogs (soft type) 1	Chicken breast meat, glycerin, sorbitol, corn starch, mineral (NaCl), sodium phosphate, color former (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs (soft type) 2	Meat (pork heart), salt, glucosamine, chondroitin, α -linolenic acid (derived from perilla oil), collagen, oligosaccharide, dextrin, glycerin, propylene glycol, antioxidant (vitamin C), color former (sodium nitrite)

2.2 試薬

- 1) 水は Milli-Q IX 7005 (メルク製) により精製した精製水を用い、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。
- 2) 0.1 w/v%ペプトン加生理食塩水 (以下「希釈液」という。) ペプトン 1 g 及び塩化ナトリウム 8.5 g を量って水 1000 mL に溶かし、塩酸 (1 mol/L) 又は水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) で pH を 6.9~7.1 に調整した後、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。
- 3) EC 発酵管 EC 培地 (パールコア EC 培地 “栄研”, 栄研化学製) 37 g を水 1000 mL に加え、加温しながら溶かし、ダーラム管を入れた中試験管に 10 mL ずつ分注した後、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。滅菌後、流水で急冷し、ダーラム管に気泡が入っていないことを確認した。
- 4) EMB 寒天培地 EMB 培地 (パールコア EMB 培地 “栄研”, 栄研化学製) 40 g を水 1000 mL に加え、加温しながら溶かし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。これをプラスチック製滅菌シャーレに様に広がるように 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。
- 5) 乳糖ブイヨン発酵管 乳糖ブイヨン培地 (パールコア乳糖ブイヨン培地 “栄研”, 栄研化学製) 18 g を水 1000 mL に加え、加温しながら溶かし、ダーラム管を入れた中試験管に 10 mL ずつ分注した後、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。滅菌後、流水で急冷し、ダーラム管に

気泡が入っていないことを確認した。

- 6) リン酸緩衝生理食塩水（以下「PBS」という。）　　PBS 粉末（アキュディアTM D-PBS（一）粉末，島津ダイアグノスティクス製）9.6 g を水 1000 mL に溶かし，121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。
- 7) 標準寒天斜面培地　　標準寒天培地（パールコア標準寒天培地“栄研”，栄研化学製）23.5 g を水 1000 mL に加え，加温しながら溶かした。これを中試験管に 10 mL ずつ分注した後，121 °C で 20 分間高圧蒸気滅菌し，斜面に凝固させた。
- 8) グラム染色液　　フェイバー-G「ニッスイ」（島津ダイアグノスティクス製）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）。
- 9) 大腸菌添加液　　BIOBALL HIGHDOSE 10K *Escherichia coli* NCTC 9001 株（ロット番号 8020, 10298.0 CFU，バイオメリュウ製）1 個を PBS 7.6 mL で溶解し，大腸菌添加原液とした。大腸菌添加原液を PBS で 3 倍，9 倍及び 27 倍に希釈し，菌濃度が 450 CFU/mL，150 CFU/mL 及び 50 CFU/mL 程度となるよう大腸菌添加液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) ストマッカー：EXNIZER400　オルガノ製
- 2) 恒温水槽：NTT-2200　東京理化学器械製
- 3) インキュベーター：LTI-700E　東京理化学器械製
- 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

1) 試料液の調製

分析試料 25 g を量ってストマッカー袋に入れ，希釈液 225 mL を加えた後 30 分間静置した。これをストマッカー処理（200 rpm，5 分間）し，試料液とした。

2) EC 発酵管による培養

試料液 1 mL を滅菌済みのメスピペットで 5 本の EC 発酵管にそれぞれ加え，恒温水槽中で 44.5 °C (± 0.2 °C) で 22~26 時間培養した。培養後，5 本ともダーラム管にガス産生による気泡が認められないものは糞便系大腸菌群陰性とした。

3) EMB 寒天培地による培養

EC 発酵管による培養後，ダーラム管にガス産生により気泡が認められた EC 発酵管から 1 白金耳量とり，EMB 寒天培地に画線塗抹し，倒置して 35 °C で 22~26 時間培養した。

4) 乳糖ブイヨン発酵管及び標準寒天斜面培地による培養

EMB 寒天培地で培養後，糞便系大腸菌群の定型的集落（黒色の金属光沢または紫赤色）を釣菌し，乳糖ブイヨン発酵管及び標準寒天斜面培地でそれぞれ 35 °C で 24~48 時間及び 35 °C で 22~26 時間培養した。

5) 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。その上に滅菌水 10 μ L を添加し，4)の標準寒天斜面培地上で発育した菌を釣菌し，滅菌水中で塗抹した。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。

6) 糞便系大腸菌群の判定

乳糖ブイヨン発酵管による培養後、ダーラム管にガス産生により気泡が認められ、酸産生により黄変したもの、かつ標準寒天斜面培地上の菌がグラム陰性の無芽胞桿菌であった場合、糞便系大腸菌群陽性とし、その他の場合は陰性と判定した。

なお、試験方法の概要を Scheme 1 に示した。

Sample solution preparation

- weighed 25 g sample in bag for stomacher
- added 225 mL 0.1 w/v% peptone salt solution and left at rest for 30 min
- shook for 5 min using stomacher (200 rpm)

EC fermentation tube

- inoculated each 1 mL of sample solution for 5 tubes of EC medium containing a Durham tube
- incubated for 22~26 h at 44.5 °C

EMB agar

- inoculated with a loop to a plate of EMB agar from EC fermentation tubes observed gas production
- incubated for 22~26 h at 35 °C

Standard agar slant

- inoculated a typical colonies with a wire to a plate of standard agar slant
- incubated for 22~26 h at 35 °C

Lactose fermentation tube

- inoculated a typical colonies with a wire to lactose fermentation tube
- incubated for 24~48 h at 35 °C

Gram staining

- performed gram staining and observed under a microscope

Gas production

Detection of fecal coliforms

Scheme 1 Analytical procedure of fecal coliforms in pet food inspection method

2.5 大腸菌添加試験

1) 試料液の調製

2.1 の分析試料 25 g を量って滅菌済みストマッカー袋に入れ、試料中の菌濃度が 2, 6 及び 18 CFU/g (以下、低濃度、中濃度及び高濃度とする。) となるように 2.2 の 9) で調製した 27 倍希釈、9 倍希釈及び 3 倍希釈の大腸菌添加液をそれぞれ 1 mL 添加し、希釈液 225 mL を加えた後、30 分間静置した。これをストマッカー処理 (200 rpm, 5 分間) し、EC 発酵管に接種する大腸菌添加試料液とした。併せて、大腸菌を添加しないブランク試料液も調製した。

なお、試料を 10 倍希釈した試料液 1 mL を 5 本の EC 発酵管に接種することから、培地に接種される試料 (以下「試験部位」という。) 中の菌濃度に換算 (試料中菌濃度 ÷ 10 × 5) すると、低濃度、中濃度及び高濃度はそれぞれ 1, 3 及び 9 CFU/試験部位となる。

2) EC 発酵管による培養から糞便系大腸菌群の判定

大腸菌添加試料液は低濃度 $n=4$ 、中濃度 $n=4$ 及び高濃度 $n=1$ 、ブランク試料液は $n=1$ で試験を実施した。

なお、ブランク試料液を用いた EC 発酵管による培養において、ガスが産生しないことを確認できたため、大腸菌添加試料液は 2.4 の 2)まで実施し、EC 発酵管でのガス産生の有無により陰性及び陽性を判定した。また、念のため EC 発酵管でガスの産生が認められたものから各濃度 1 本を無作為に選び、2.4 の 3)~5)を実施し、糞便系大腸菌群の性状を示すことを確認した。

3) estimated LOD₅₀ (eLOD₅₀) の算出

2)で陽性と判定された試料数に応じて、ISO16140-3:2021⁷⁾から抜粋した Table 2 を基に eLOD₅₀ を算出した。

Table 2 Determination of estimated LOD₅₀ (eLOD₅₀) based on the number of positive results per level of contamination (excerpt from ISO16140-3:2021)

High inoculation level (9×LOD ₅₀ / test portion)	Intermediate inoculation level (3×LOD ₅₀ / test portion)	Low inoculation level (1×LOD ₅₀ / test portion)	Blank level	eLOD ₅₀ (CFU/test portion)
1/1 ^{a)}	4/4	4/4	0/1	<1.0×LIL ^{b)}
1/1	4/4	3/4	0/1	=0.5×LIL
1/1	4/4	2/4	0/1	=0.7×LIL
1/1	4/4	1/4	0/1	=1.0×LIL
1/1	4/4	0/4	0/1	=1.5×LIL
1/1	3/4	4/4	0/1	=0.7×LIL
1/1	3/4	3/4	0/1	=1.0×LIL
1/1	3/4	2/4	0/1	=1.3×LIL
1/1	3/4	1/4	0/1	=1.7×LIL
1/1	3/4	0/4	0/1	=2.3×LIL
1/1	2/4	4/4	0/1	=1.1×LIL
1/1	2/4	3/4	0/1	=1.5×LIL
1/1	2/4	2/4	0/1	=1.9×LIL
1/1	2/4	1/4	0/1	=2.6×LIL
1/1	2/4	0/4	0/1	=3.7×LIL
1/1	1/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result
1/1	1/4	3/4	0/1	=2.1×LIL
1/1	1/4	2/4	0/1	=2.8×LIL
1/1	1/4	1/4	0/1	=4.0×LIL
1/1	1/4	0/4	0/1	=6.3×LIL
1/1	0/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result
1/1	0/4	3/4	0/1	=3.0×LIL
1/1	0/4	2/4	0/1	=4.3×LIL
1/1	0/4	1/4	0/1	=6.7×LIL
1/1	0/4	0/4	0/1	=14.0×LIL

a) Number of positive results/number of measurement at level

b) LIL: Low inoculation level

3 結果及び考察

3.1 試料液の調製方法

糞便系大腸菌群試験法を規定している通知において、試料液の調製方法は、試料 25 g に滅菌ペプトン加生理食塩水 225 mL を加えて細砕すると規定されており、一般的には、ブレンダー又はストマッカーを用いて均質化している⁸⁾。

本法の試料液の調製方法は、愛玩動物用飼料等の検査法収載の生菌数及びサルモネラの試験法と同様の方法を採用した。具体的には、ストマッカー処理の前に膨潤のため 30 分静置する時間を取り、ストマッカー処理の時間は 5 分間とした。また、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）のうち、切断できない試料は対象外とした。

3.2 試験法の評価方法

一般に、定性試験の性能評価には検出下限値が使われるが、微生物試験においては試料中の微生物分布が均一でなく、採取部位に対象菌が含まれる確率が検出の可否を決めるため、確実に検出可能な下限値を求めるのは難しいとされている⁹⁾。ISO16140-2:2016¹⁰⁾及び ISO16140-3:2021 では、微生物定性試験法の性能評価の 1 つの指標として、実施試験の 50 %が陽性となる菌量である LOD₅₀ (Level of detection) が示されており、東京顕微鏡院はこれを参考に、事業において LOD₅₀ を試験法の評価に用いている。以上を踏まえ、本検討においても、LOD₅₀ を試験法の評価に用いることとした。

3.3 単一試験室における検証（大腸菌添加試験）

ISO16140-3:2021 は、単一試験室における公定法、標準試験法等を導入する際の検証手順を定めたガイドラインであり、菌添加試験の結果から estimated LOD₅₀ (eLOD₅₀) を算出して評価する手法が示されている。なお、LOD₅₀ の算出法と比べ、試料数が少ないことから eLOD₅₀ (推定された LOD₅₀) と定義されている。

糞便系大腸菌群試験法の愛玩動物用飼料への適用に関する予備検討として、ISO16140-3:2021 に基づき 2.5 により大腸菌添加試験を実施した。なお、菌添加濃度は、低濃度で LOD₅₀ と同程度、中濃度で LOD₅₀ の 3 倍及び高濃度で LOD₅₀ の 9 倍となるように設定した。本検討に用いる糞便系大腸菌群試験法の LOD₅₀ は公表されていないことから、このときの LOD₅₀ は 1 CFU/試験部位とみなした。

結果は Table 3 のとおりであり、得られた eLOD₅₀ は 0.5~1.0 CFU/試験部位であった。

ISO16140-3:2021 では、算出された eLOD₅₀ が、LOD₅₀ の 4 倍以内であることを許容限界として規定している。本検討では LOD₅₀ を 1 CFU/試験部位とみなしていることから、eLOD₅₀ が 4 CFU/試験部位以下の場合に許容限界を満たしていることとなる。以上より、本試験により算出された eLOD₅₀ はこの許容限界を満たしていた。

Table 3 Number of positive results and eLOD₅₀ for the detection of fecal coliforms in pet foods

Pet food types	Inoculation level of test portion ^{a)}			Blank level	eLOD ₅₀ (CFU/test portion)
	High inoculation level	Intermediate inoculation level	Low inoculation level		
Dry food for dogs	1/1 ^{b)}	4/4	3/4	0/1	0.5
Dry food for cats	1/1	4/4	2/4	0/1	0.7
Semi dry food for dogs 1	1/1	4/4	2/4	0/1	0.7
Semi dry food for dogs 2	1/1	4/4	2/4	0/1	0.7
Wet food for dogs	1/1	4/4	1/4	0/1	1.0
Wet food for cats	1/1	4/4	1/4	0/1	1.0
Formed jerky for dogs 1	1/1	4/4	3/4	0/1	0.5
Formed jerky for dogs 2	1/1	3/4	3/4	0/1	1.0
Dried jerky for dogs (hard type)	1/1	4/4	2/4	0/1	0.7
Dried jerky for dogs and cats (hard type)	1/1	4/4	2/4	0/1	0.7
Dried jerky for dogs (soft type) 1	1/1	4/4	3/4	0/1	0.5
Dried jerky for dogs (soft type) 2	1/1	4/4	3/4	0/1	0.5

a) High inoculation level: 9 CFU/test portion, Intermediate inoculation level: 3 CFU/test portion,
Low inoculation level: 1 CFU/test portion

b) Number of positive results/number of measurement at level

4 まとめ

糞便系大腸菌群試験法の愛玩動物用飼料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、検出法の改良が必要な点は認められなかった。

- 1) 試料液の調製方法は、愛玩動物用飼料等の検査法に記載されている生菌数及びサルモネラの試験法と同様の方法を採用した。また、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）のうち、切断できない試料は対象外とした。
- 2) 愛玩動物用飼料に、大腸菌を 2, 6 及び 18 CFU/g (1, 3 及び 9 CFU/試験部位) となるように添加し試験した結果、eLOD₅₀ は 0.5~1.0 CFU/試験部位であり、ISO16140-3:2021 で規定する許容限界を満たしていた。

文 献

- 1) 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防止対策の徹底について、令和元年年 7 月 12 日、元消安第 1178 号 (2019).
- 2) 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).
- 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) 公益社団法人日本食品衛生協会：食品衛生検査指針 微生物編 改訂第 2 版 2018, 174-175 (2018) (ISBN 978-4-889250-98-5).
- 5) 厚生省生活衛生局長通知：食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について、平成 5 年 3 月 17 日、衛乳第 54 号 (1993).

- 6) 一般財団法人東京顕微鏡院：令和4年度生産資材安全確保対策委託事業（愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業）調査報告書（2022）.
- 7) International Organization for Standardization：ISO 16140-3. Microbiology of the food chain - Method validation - Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. Geneva, Switzerland (2021).
- 8) 栄研化学株式会社：食品微生物検査マニュアル 改訂第2版，128-129 (2009) (ISBN 978-4-990017-52-1).
- 9) 千葉 雄介，金井 美樹，藤原 茜，高瀬 冴子，荒島 麻実，土井 りえ，島田 真一，石井 里枝：E. coli および黄色ブドウ球菌定性試験法における検出下限値の推定，日本食品微生物学会雑誌，39(4)，132-140 (2022).
- 10) International Organization for Standardization：ISO 16140-2. Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Geneva, Switzerland (2016).

4 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法の妥当性確認 ～稲発酵粗飼料及びイアコーンサイレージへの適用～

山多 晴子^{*1}, 佐藤 琢実^{*2}, 安藤 千咲^{*2}, 千原 哲夫^{*2}

Validation Study of Simultaneous Determination Method of Aflatoxins by LC ～Application to Whole-Crop Rice Silage and Ear Corn Silage～

YAMATA Seiko^{*1}, SATO Takumi^{*2}, ANDOU Chisaki^{*2} and CHIHARA Tetsuo^{*2}

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

(Now Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC),

^{*2} Kobe Regional Center, FAMIC)

We have made a validation study on the application of the simultaneous determination method of four aflatoxins (B₁, B₂, G₁ and G₂) to whole-crop rice silage (WCRS) and ear corn silage (ECS). This method uses a liquid chromatograph with fluorescence (LC-FD) for formula feed, corn and corn silage, and has been listed in the Feed Analysis Standard of Japan.

Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ (AFs) were extracted with acetonitrile-water (9:1), and then the solution was centrifuged. The supernatant was purified with a solid phase extraction column (Mycosep 226 AflaZon+, Romer Labs Division Holding GmbH, Getzersdorf, Austria), and the eluted solution was concentrated to dryness. For derivatization, trifluoroacetic acid was added to the residue, and the sample solution was injected into the LC-FD to determine the concentration of AFs. LC-FD separation was then carried out on an ODS column (Shodex C18M 4E, 4.6 mm i.d. × 250 mm, 5μm, Resonac Holdings Co.; Tokyo, Japan) with water-methanol (3:2) as a mobile phase.

Recovery tests were conducted on WCRS and ECS. AFB₁, G₁ and G₂ were added at the levels of 0.0013, 0.011, 0.022 and 0.044 mg/kg, and AFB₂ was added at the levels of 0.00022, 0.011, 0.022 and 0.044 mg/kg for WCRS respectively. The resulting mean recoveries ranged from 79.8 % to 91.0 % for AFB₁, 86.9 % to 98.2 % for AFB₂, 87.2 % to 112 % for AFG₁ and 93.8 % to 107 % for AFG₂. The repeatability in the form of relative standard deviations (RSD_r) was less than 2.8 % for AFB₁, less than 8.7 % for AFB₂, less than 6.7 % for AFG₁ and less than 2.5 % for AFG₂. AFB₁ and G₁ were added at the levels of 0.0026, 0.011, 0.022 and 0.044 mg/kg, AFB₂ was added at the levels of 0.00044, 0.011, 0.022 and 0.044 mg/kg, and AFG₂ was added at the levels of 0.0052, 0.011, 0.022 and 0.044 mg/kg for ECS respectively. The resulting mean recoveries ranged from 78.6 % to 100 % for AFB₁, 78.1 % to 100 % for AFB₂, 76.3 % to 108 % for AFG₁ and 82.3 % to 108 % for AFG₂. RSD_r was less than 7.6 % for AFB₁, less than 4.2 % for AFB₂, less than 6.5 % for AFG₁ and less than 5.1 % for AFG₂.

This AFs analysis method was thus verified to be applicable to WCRS and ECS.

Key words: aflatoxin; liquid chromatograph (LC); whole-crop rice silage; ear corn silage

キーワード : アフラトキシンの液体クロマトグラフ ; 稲発酵粗飼料 ; イアコーンサイレージ

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

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

1 緒 言

我が国の食料自給率向上のための重点的な施策として、サイレージを含む粗飼料等の国産飼料の増産対策が積極的に行われている¹⁾。これら国産のサイレージからはかび毒が検出される事例²⁾があり、サイレージ等のかび毒のリスク管理を進める上で、サイレージ等中のかび毒の分析法の整備が急務となっている。現行の飼料分析基準³⁾には、白井ら⁴⁾が検討した配合飼料及びとうもろこし、並びに、高橋ら⁵⁾が検討したとうもろこしサイレージを適用範囲としたアフラトキシンの液体クロマトグラフ（以下「LC」という。）による同時分析法（以下「収載法」という。）が収載されているが、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）及びイアコンサイレージ（以下「ECS」という。）は対象としていない。

そこで、今回、WCRS及びECSの収載法への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。参考にアフラトキシン B₁、B₂、G₁及びG₂の構造式等を Fig. 1 に示した。

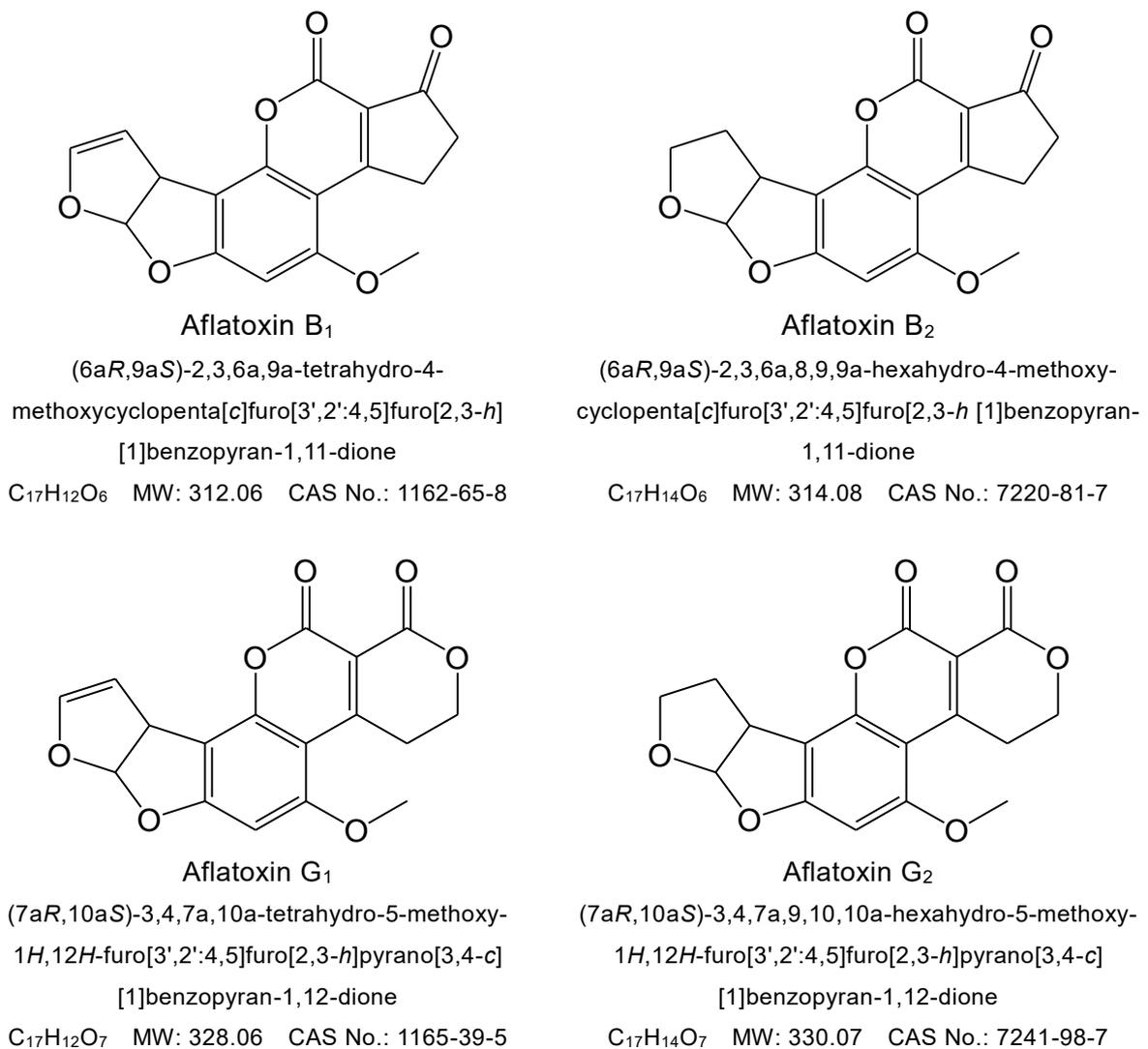


Fig. 1 Chemical structures of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂

2 実験方法

2.1 試料

WCRS 及び ECS は 60 °C で 6 時間乾燥後、更に室内に静置して風乾した。これを目開き 1 mm のスクリーンを装着したカッティングミルで粉碎し、分析用試料とした。

2.2 試薬

1) メタノールは LC 用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。トリフルオロ酢酸は Reagent Plus（Sigma-Aldrich 製）を用いた。その他の試薬は試薬特級を用いた。水は Milli-Q Integral 5（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

2) アフラトキシン混合標準液

アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ 混合標準原液（各 25 µg/mL, Supelco 製）1 mL を 50 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加えて、アフラトキシン混合標準液 1 を調製した（この液 1 mL は、アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ として各 0.5 µg を含有）。

さらに、アフラトキシン混合標準液 1 の 1 mL を 25 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加えて、アフラトキシン混合標準液 2 を調製した（この液 1 mL は、アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ として各 20 ng を含有）。

2.3 装置及び器具

- 1) カッティングミル：SM 2000 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，使用時回転数 835 rpm）
- 2) 振り混ぜ機：MW-DRV 宮本理研工業製（使用時振動数 300 rpm）
- 3) 多機能カラム：MycoSep 226 AflaZon+ Romer Labs Division Holding GmbH 製
- 4) 試験管濃縮装置：EB-303 アズワン製
- 5) LC：Prominence 島津製作所製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 25g を量って 500 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (9+1) 200 mL (ECS は 150 mL) を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、650×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

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

3) 誘導体化反応

試料溶液 1 mL を 10 mL の試験管に正確に入れ、40 °C 以下に設定した試験管濃縮装置で窒素ガスを送って濃縮乾固した。残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加え、試験管に栓を施し、試験管ミキサーで 10 秒程度振り混ぜた後、15 分間静置した。更に水-アセトン (9+1) 0.9 mL を試験管に正確に加え、試験管ミキサーで 10 秒程度振り混ぜた。この液をプラスチック製遠心沈殿管（容量 1.5 mL）に入れ、5000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

同時にアフラトキシン混合標準液 1 (0.5 µg/mL) を用い、2~60 µL の間の数点並びにアフラ

トキシシン混合標準液 2 (20 ng/mL) を用い, 2.5~25 μ L の間の数点をそれぞれ 10 mL の試験管に正確に入れ, 40 °C 以下に設定した試験管濃縮装置で窒素ガスを送って濃縮乾固した. 残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加え, 以下は試料溶液と同様に操作し, 1 mL 中にアフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ としてそれぞれ 0.05~30 ng 相当量を含む各検量線作成用混合標準液を調製した.

4) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各検量線作成用混合標準液各 20 μ L を LC に注入し, クロマトグラムを得た. 測定条件を Table 1 に示した.

Table 1 Operating conditions of LC

Detector	FL detector (Ex: 365 nm, Em: 450 nm)
Column	Shodex C18M 4E (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μ m), Resonac
Mobile phase	Water-methanol (3:2)
Flow rate	0.8 mL/min
Column temperature	40 °C

5) 計 算

得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し, 試料中のアフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ 量を算出した. なお, 3.2 以降はピーク面積での結果を記載した. なお, 定量法の概要を Scheme 1 に示した.

Under the light-shielding conditions

Sample 25.0 g (500 mL amber Erlenmeyer flask)

- added acetonitrile-water (9:1)
(WCRS: 200 mL, ECS: 150 mL)
- shook for 30 min
- centrifuged for 5 min at 650×g
- transferred 4.5 mL of supernatant into test tube

MycoSep 226 AflaZon+

- pushed MycoSep 226 AflaZon+ column into test tube
- transferred 1 mL of effluent solution through MycoSep 226 AflaZon+ column to another test tube

10 mL test tube

- evaporated under 40 °C and dried with N₂ gas

Derivatization (standard solution at the same time)

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

LC-fluorescence detector

Scheme 1 Analytical procedure for aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in whole-crop rice silage (WCRS) and ear corn silage (ECS)

2.5 添加回収試験

2.2 の 2) のアフラトキシン混合標準原液をアセトニトリルで正確に希釈し、添加に用いた。

WCRS について、原物換算してアフラトキシン B₁、G₁ 及び G₂ として 0.0013, 0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.38, 3.1, 6.3 及び 12.5 ng/mL）、アフラトキシン B₂ として 0.00022, 0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量（同 0.063, 3.1, 6.3 及び 12.5 ng/mL）、ECS について、原物換算してアフラトキシン B₁、G₁ 及び G₂ として、0.0026, 0.0052 (G₂ のみ)、0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量（同 0.5, 1.0 (G₂ のみ)、2.2, 4.2 及び 8.3 ng/mL）、アフラトキシン B₂ として 0.00044, 0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量（同 0.083, 2.2, 4.2 及び 8.3 ng/mL）を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、WCRS の風乾物試料に対して、アフラトキシン B₁、G₁ 及び G₂ として 0.003, 0.025, 0.05 及び 0.1 mg/kg 相当量、アフラトキシン B₂ として 0.0005, 0.025, 0.05 及び 0.1 mg/kg 相当量になるように添加し、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。また、ECS の風乾物試料に対して、アフラトキシン B₁、G₁ 及び G₂ として 0.003, 0.006 (G₂ のみ)、0.013, 0.025 及び 0.05 mg/kg 相当量、アフラトキシン B₂ として 0.0005, 0.013, 0.025 及び 0.05 mg/kg 相当量になるように添加し、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 30 % 及び 20 % と想定⁹⁾して、原物（水分含有量 30 %）中濃度 = 風乾物（水分含有量 20 %）中濃度 / 1.14 の式により行った。

3 結果及び考察

3.1 抽出溶媒量の検討

飼料分析基準第 5 章第 3 節 2 に従い、抽出操作を確認した。なお、WCRS 及び ECS は収載法の注 2 に記載されている振り混ぜることが困難な試料と判断し、試料採取量を 25 g に減量した。

抽出溶媒量をとうもろこしサイレージと同じ 150 mL とした場合、WCRS では試料が抽出溶媒により膨潤し、振り混ぜることが困難であったため、抽出溶媒量を 200 mL に増量した。また、抽出効率を高めるため、WCRS、ECS とともに褐色三角フラスコの容量を 300 mL から 500 mL に変更した。

3.2 妨害物質の検討

WCRS 及び ECS 各 2 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC に注入し、得られたクロマトグラムを確認したところ、全ての検体でアフラトキシン B₁、G₁ 及び G₂ のピーク前後に妨害ピーク（風乾物試料に対して最大 0.0008 mg/kg 相当量）が認められた。しかし、妨害ピークの面積は当検討の定量下限（0.003 mg/kg）と想定したピーク面積の 1/3 未満であり、飼料分析基準別紙 2 の試験法の妥当性確認ガイドライン（以下「妥当性確認ガイドライン」という。）に定める選択性の許容範囲内であることから、以後の検討に支障はないものと判断した。

なお、得られたクロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

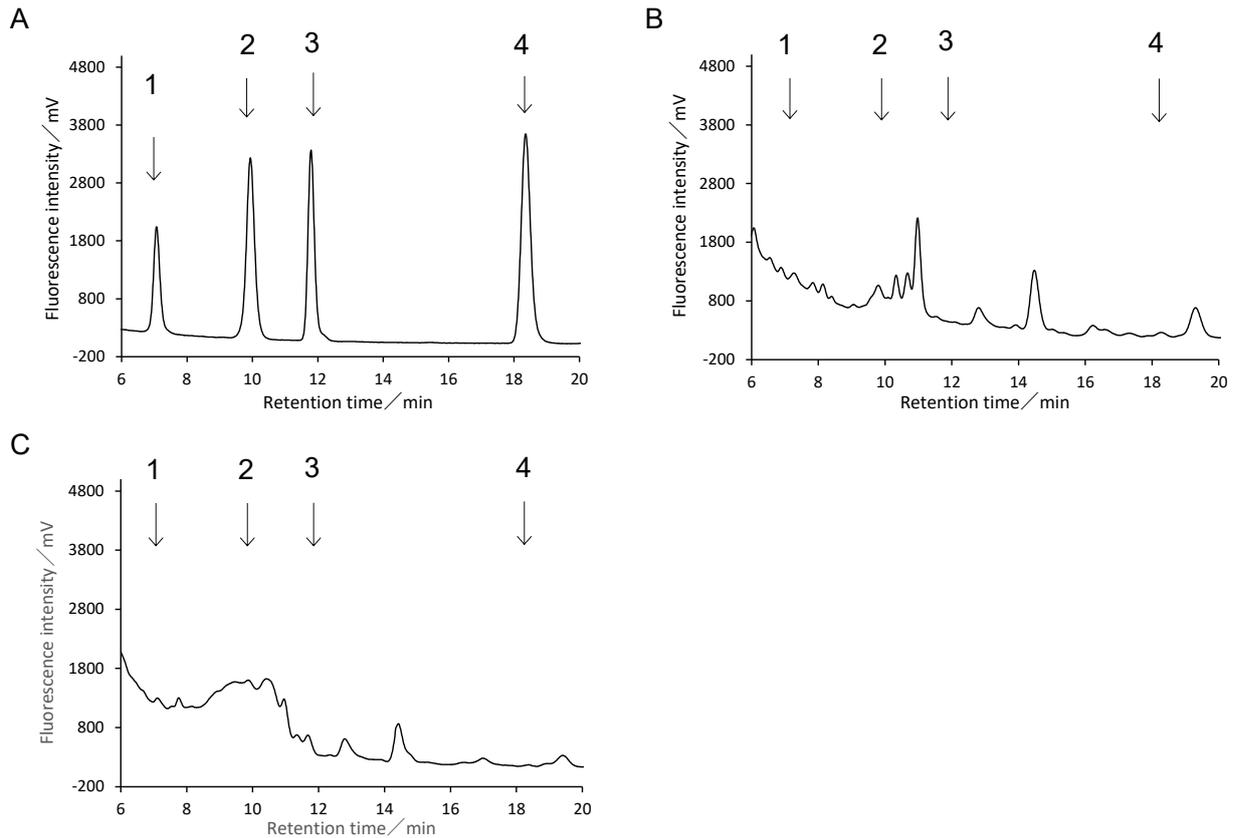


Fig. 2 Typical chromatograms of standard solution and blank sample solutions (LC conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the retention times of 1: aflatoxin G₁ derivative, 2: aflatoxin B₁ derivative, 3: aflatoxin G₂ and 4: aflatoxin B₂)

A: Standard solution (The concentrations of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ are 0.4 ng/mL respectively)

B: Sample solution of WCRS

C: Sample solution of ECS

3.3 添加回収試験

2.5により添加回収試験を実施し、その結果をTable 2に示した。なお、添加回収試験の添加濃度は、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準⁷⁾で示す配合飼料における最も低いアフラトキシンB₁の基準値0.01 mg/kg並びにとうもろこしの同値0.02 mg/kg及びその2倍相当量となるように設定した。定量下限の確認は、妨害ピークの影響及びとうもろこしサイレージの定量下限をふまえ、WCRSにおいて原物中でアフラトキシンB₁, G₁及びG₂は0.0013 mg/kg, アフラトキシンB₂は0.00022 mg/kgとなるように、ECSにおいて原物中でアフラトキシンB₁, G₁及びG₂は0.0026 mg/kg, アフラトキシンB₂は0.00044 mg/kgとなるように設定した。ECSのアフラトキシンG₂は試料により妨害ピークのパターンに違いが認められたことから、原物中0.0052 mg/kgを追加で設定した。

WCRSにおけるアフラトキシンB₁の平均回収率は79.8~91.0%, その繰返し精度は相対標準偏差(RSD_r)として2.8%以下, アフラトキシンB₂の平均回収率は86.9~98.2%, RSD_rは8.7%以下, アフラトキシンG₁の平均回収率は87.2~112%, RSD_rは6.7%以下, アフラトキシンG₂の平均回収率は93.8~107%, RSD_rは2.5%以下であった。

ECS におけるアフラトキシン B₁ の平均回収率は 78.6~100 %，RSD_r は 7.6 %以下，アフラトキシン B₂ の平均回収率は 78.1~100 %，RSD_r は 4.2 %以下，アフラトキシン G₁ の平均回収率は 76.3~108 %，RSD_r は 6.5 %以下であった。また，ECS1 に 0.0026 mg/kg 原物相当量を添加したアフラトキシン G₂ の平均回収率が 129 %となり，妥当性確認ガイドラインに定められた真度の目標値（70 %以上 120 %以下）を外れたが，その他の平均回収率は 82.3~108 %，RSD_r は 5.1 %以下であり，妥当性確認ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値（22 %以下）を満たした。

なお，得られたクロマトグラムの一例を Fig. 3 及び Fig. 4 に示した。

Table 2 Recoveries for aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in WCRS and ECS

Aflatoxin	Spiked level (mg/kg original matter) ^{a) b)}	WCRS1		WCRS2		ECS1		ECS2	
		Recovery ^{c)} (%)	RSD _r ^{d)} (%)						
B ₁	0.0013	79.8	0.8	84.8	2.5	—	—	—	—
	0.0026	—	—	—	—	91.6	1.6	92.2	1.4
	0.011	—	—	85.0	2.8	—	—	100	7.6
	0.022	86.7	2.3	—	—	78.6	1.7	—	—
	0.044	91.0	1.0	—	—	81.7	1.0	—	—
B ₂	0.00022	91.3	8.7	98.2	7.4	—	—	—	—
	0.00044	—	—	—	—	100	4.2	86.4	2.2
	0.011	—	—	86.9	1.3	—	—	93.0	3.7
	0.022	86.9	2.2	—	—	78.1	1.4	—	—
	0.044	87.6	0.7	—	—	79.4	1.1	—	—
G ₁	0.0013	93.6	1.0	112	6.7	—	—	—	—
	0.0026	—	—	—	—	97.8	1.4	101	0.5
	0.011	—	—	88.1	3.6	—	—	108	6.5
	0.022	87.2	3.5	—	—	76.3	1.8	—	—
	0.044	99.7	1.9	—	—	86.1	1.3	—	—
G ₂	0.0013	95.8	1.5	107	2.5	—	—	—	—
	0.0026	—	—	—	—	129	1.2	101	1.4
	0.0052	—	—	—	—	95.0	0.4	—	—
	0.011	—	—	94.9	2.3	—	—	108	5.1
	0.022	93.8	2.0	—	—	82.3	1.2	—	—
	0.044	96.5	1.5	—	—	86.3	1.4	—	—

— : not tested

In dark cell, mean recovery is more than 120 % (exceed the upper limit of the target value).

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

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

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

b) The aflatoxins were spiked to air-dried ECS samples one night prior to extraction. The spiked level were 0.003, 0.006 (G₂ only), 0.013, 0.025 and 0.05 mg/kg air-dry matter for aflatoxins B₁, G₁ and G₂, and 0.0005, 0.013, 0.025 and 0.05 mg/kg air-dry matter for aflatoxin B₂ respectively. The levels of aflatoxins in original matter were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of ECS samples was 30 % for original matter and 20 % for air-dry matter.

The levels of aflatoxins in original matter (moisture 30 %)

= the levels of aflatoxins in air-dry matter (moisture 20 %) / 1.14

c) Mean ($n = 5$)

d) Relative standard deviation of repeatability

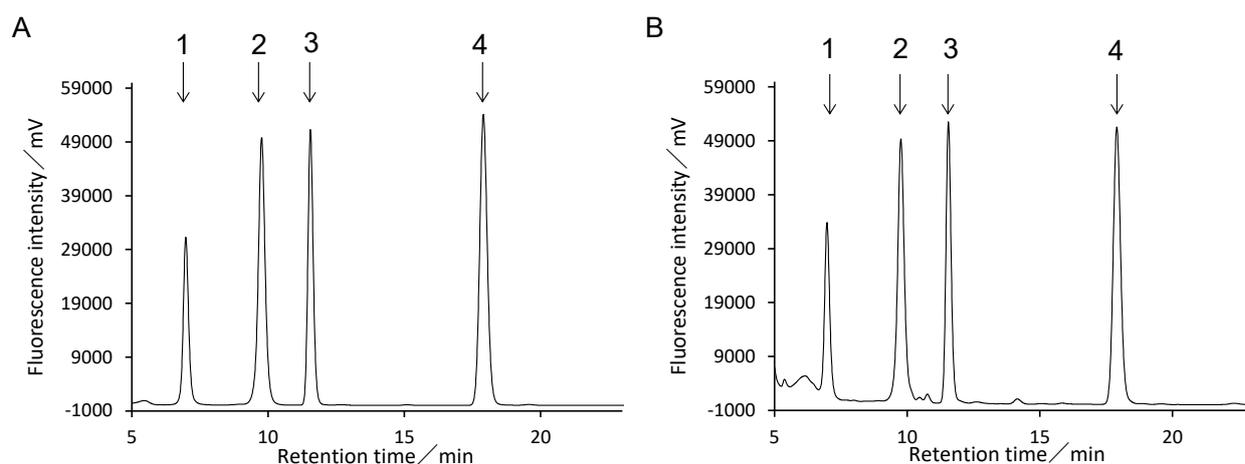


Fig. 3 Typical chromatograms of standard solution and spiked sample (WCRS) (LC conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the peaks of 1: aflatoxin G₁ derivative, 2: aflatoxin B₁ derivative, 3: aflatoxin G₂ and 4: aflatoxin B₂)
A: Standard solution (The concentrations of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ are 6.0 ng/mL respectively)
B: Sample solution of WCRS (spiked at 0.022 mg/kg original matter of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ (corresponding to 6.3 ng/mL))

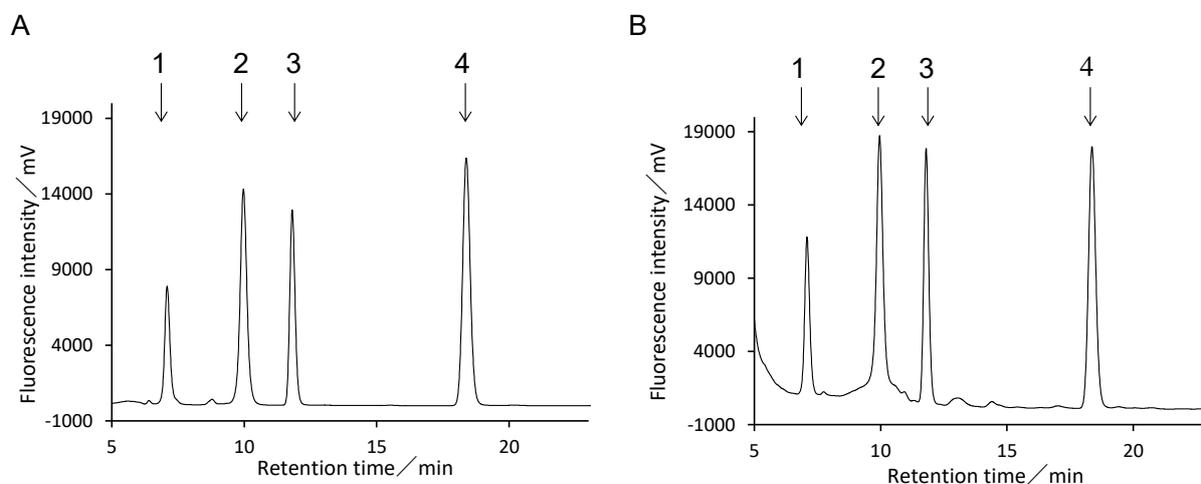


Fig. 4 Typical chromatograms of standard solution and spiked sample (ECS) (LC conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the peaks of 1: aflatoxin G₁ derivative, 2: aflatoxin B₁ derivative, 3: aflatoxin G₂ and 4: aflatoxin B₂)
A: Standard solution (The concentrations of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ are 2.0 ng/mL, respectively)
B: Sample solution of ECS (spiked at 0.011 mg/kg original matter of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ (corresponding to 2.2 ng/mL))

3.4 定量下限及び検出下限

アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の検量線の直線性が確認されている範囲の下端付近となる

濃度（WCRS の風乾物中では、アフラトキシン B₁、G₁ 及び G₂ については 0.003 mg/kg 相当量（最終試料液中濃度 0.38 ng/mL）、アフラトキシン B₂ については 0.0005 mg/kg 相当量（同 0.063 ng/mL）、ECS 中では、アフラトキシン B₁ 及び G₁ については 0.003 mg/kg 相当量（同 0.5 ng/mL）アフラトキシン B₂ については 0.0005 mg/kg 相当量（同 0.083 ng/mL）、アフラトキシン G₂ については 0.006 mg/kg 相当量（同 1.0 ng/mL））の添加回収試験の結果から、本法の定量下限及び検出下限を求めた。Fig. 2 のとおり、各アフラトキシンのピークの前後において妨害物質のピークが多数存在していることから、定量値の標準偏差の 10 倍及び 4.26 倍（Student の *t*-値（片側、有意水準 0.05、自由度 4）の 2 倍）から定量下限及び検出下限を推定したところ、WCRS の風乾物中のアフラトキシン B₁、G₁ 及び G₂ の定量下限は 0.003 mg/kg、検出下限は 0.001 mg/kg、アフラトキシン B₂ の定量下限は 0.0005 mg/kg、検出下限は 0.0002 mg/kg と考えられた。

また、同様に、ECS の風乾物中のアフラトキシン B₁ 及び G₁ の定量下限は 0.003 mg/kg、検出下限は 0.001 mg/kg、アフラトキシン B₂ の定量下限は 0.0005 mg/kg、検出下限は 0.0002 mg/kg、アフラトキシン G₂ の定量下限は 0.006 mg/kg、検出下限は 0.001 mg/kg と考えられた。

なお、Table 2 に示したとおり、当該定量下限における添加回収試験結果は良好であった。

4 まとめ

WCRS 及び ECS 中のアフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ について、収載法のアフラトキシンの LC による同時定量法の適用の可否について検討したところ、WCRS の抽出溶媒量等を変更することで、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) WCRS 及び ECS 中のアフラトキシン B₁、G₁ 及び G₂ は、本法に従って得られたクロマトグラムに定量を妨げるピークが認められたが、妥当性確認ガイドラインに定める選択性の許容範囲内であった。また、アフラトキシン B₂ は、本法に従って得られたクロマトグラムに定量を妨げるピークは認められなかった。
- 2) WCRS に対し、原物中に換算してアフラトキシン B₁、G₁ 及び G₂ として 0.0013, 0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量、アフラトキシン B₂ として 0.00022, 0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量を、ECS に対し、原物中に換算してアフラトキシン B₁、G₁ 及び G₂ として 0.0026, 0.0052 (G₂ のみ)、0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量、アフラトキシン B₂ として 0.00044, 0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施して回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認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結果が得られた。
- 3) 本法の WCRS 中のアフラトキシン B₁、G₁ 及び G₂ の定量下限は風乾物中で 0.003 mg/kg、検出下限は 0.001 mg/kg、アフラトキシン B₂ の定量下限は風乾物中で 0.0005 mg/kg、検出下限は 0.0002 mg/kg と推定された。ECS 中のアフラトキシン B₁ 及び G₁ の定量下限は風乾物中で 0.003 mg/kg、検出下限は 0.001 mg/kg、アフラトキシン B₂ の定量下限は風乾物中で 0.0005 mg/kg、検出下限は 0.0002 mg/kg、アフラトキシン G₂ の定量下限は風乾物中で 0.006 mg/kg、検出下限は 0.001 mg/kg と推定された。

文 献

- 1) 農林水産省畜産局飼料課：飼料をめぐる情勢, https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/attach/pdf/index-1046.pdf, 令和 6 年 3 月.
- 2) 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).
- 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, 令和 5 年 12 月 1 日, 5 消安第 4714 号 (2023).
- 4) 白井 裕治, 関口 好浩, 下村 正之, 早川 俊明：多機能クリーンナップカラム法／高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の同時定量, 飼料研究報告, **24**, 10-25 (1999).
- 5) 高橋 雄一, 嶋村 知紗：アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法の適用範囲をとうもろこしサイレージに拡大するための妥当性確認, 飼料研究報告, **44**, 121-135 (2019).
- 6) 加藤 耕一, 嘉手苺 舞, 桑原 正良：カルタップの液体クロマトグラフ質量分析計による分析法の妥当性確認～イアコーンサイレージへの適用～, 飼料研究報告, **47**, 89-97 (2022).
- 7) 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 愛玩動物用飼料のウェット製品の水分測定に使用可能なフィルムの規格の検討

佐藤 憲大*, 佐藤 梢*, 相原 久美子*, 池澤 昭人*

Study of Plastic Film Bags for Moisture Content Determination in Wet Pet Food

SATO Norihiro*, SATO Kozue*, AIHARA Kumiko* and IKEZAWA Akito*

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

We have studied properties of plastic film bags to be used for moisture content determination of wet pet food. We used four types of plastic film bags: normal type (currently listed in the Feed Analysis Standard of Japan), high density polyethylene (HDPE) type, low density polyethylene (LDPE) type, and nylon film type.

After weighing out diatomite to the plastic film bags, they were dried at 105 °C for 2 hours. Ground pet food was then added, and mixed with dried diatomaceous earth in the bags. The mixtures were thinly spread in the bags and dried at 105 °C for 3 hours. The moisture content was calculated from the weight differences of the pet food before and after drying.

LDPE film bags and nylon film bags were found unsuitable for the method because of the lack of heat resistance function in the former and the susceptibility to static electricity in the latter.

Based on the moisture content measured with normal film bags and HDPE film bags, the result was statistically evaluated. HDPE film bags were found suitable for the method, because no significant differences were identified between HDPE film bags and normal film bags when using metal shelves to prevent bags from twisting or closing during drying for the former.

Key words: moisture content; diatomite; plastic film bag; high density polyethylene (HDPE); pet food; wet type pet food

キーワード：水分；ケイソウ土；プラスチックフィルム袋；高密度ポリエチレン；愛玩動物用飼料；ウェット製品

1 緒 言

愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令¹⁾別表の1の(4)において、「規定する物質の販売用愛玩動物用飼料中の含有量を算出するに当たっては、当該販売用愛玩動物用飼料中の水分の含有量が10%を超えるときは、その超える量を当該販売用愛玩動物用飼料の量から除外するものとし、当該販売用愛玩動物用飼料中の水分の含有量が10%に満たないときは、その不足する量を当該販売用愛玩動物用飼料の量に加算するものとする。」とあるように、愛玩動物用飼料の成分規格を判断するに当たっては、水分量の補正が重要となっている。

愛玩動物用飼料の水分の測定方法は、愛玩動物用飼料等の検査法²⁾で定められている。愛玩動物用飼料のうち、水分量が70~90%程度のウェット製品の水分は、平成22年度に石橋ら³⁾が開発したケイソウ土添加フィルム法が適用される。ケイソウ土添加フィルム法ではポリエチレンフィルム製袋を使用することとされているが、分析法の開発に用いられた袋（以下「既存袋」とい

* 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

う.) は現在市販されておらず、容易に入手できない問題点がある。このため、本検討では食品表示基準⁴⁾も参考に、市販されているプラスチックフィルム製袋のうち、適切な大きさの高密度ポリエチレン製袋(以下「HDPE 袋」という。)、低密度ポリエチレン製袋(以下「LDPE 袋」という。)及びナイロンを含有する袋(以下「ナイロン袋」という。)を用いて、既存袋との同等性を評価したので、その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

既報³⁾と同様に、市販されている犬用又は猫用のウェット製品を主体となる動物質性原料別に区分し、各区分から製品を選定して分析に供した。製品毎に総量が 300 g 以上となるよう開封・混合し、フードプロセッサーで試料がペースト状になるまで均質化して分析用試料とした。なお、調製後の分析用試料は、チャック付きアルミ袋に入れて冷蔵保管した。

なお、検討に用いたウェット製品を Table 1 に示した。

Table 1 Ingredients list of wet pet foods

Sample No.	Main ingredient	Sample type	Ingredients
1	Beef	Wet food for dogs	Meats (chicken, beef, chicken extract, etc.), starch (corn starch, etc.), animal fat, grains (wheat flour, etc.), thickener (carrageenan), minerals (Cl, Cu, Fe, K, Mn, Na, Zn), food colors (titanium dioxide), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, choline, niacin, pantothenic acid), color former (sodium nitrite)
2	Beef and vegetables	Wet food for dogs	Meats (chicken, chicken liver, beef, chicken extract), wheat flour, vegetables (carrot, green pea, potato), animal fat, soy protein, xylose, minerals (Ca, Cl, Cu, Fe, I, K, Mn, Na, Zn), glycerin, thickener, food colors (caramel, iron oxide), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, choline, niacin, pantothenic acid), color former (sodium nitrite)
3	Chicken	Wet food for dogs	Meats (chicken breast, chicken tender, chicken extract, etc.), grains (rice, foxtail millet, wheat berry, japanese millet, amaranthus), fish cartilage extract containing chondroitin, thickener, mineral (K), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D, E, niacin, pantothenic acid, folic acid), glucosamine
4	Chicken (high-fat)	Wet food for dogs	Chicken, chicken by-product meal, soybean oil, whey protein concentrate, medium chain triglyceride, sodium chloride, thickener
5	Fish	Wet food for cats	Bonito, tuna extract, oligosaccharide, thickener, vitamin E, green tea extract

2.2 試薬

ケイソウ土は、ハイフロスーパースセル(富士フィルム和光純薬製)を用いた。

2.3 装置及び器具

- 1) 袋: Table 2 のとおり。
- 2) フードプロセッサー: 松下電器産業製 MK-K80
- 3) 除電器: 島津製作所製 イオナイザ STABLO-AP

Table 2 Compositions and specifications of plastic film bags

Classification of features	Bag types	Manufacturer or wholesaler	Material	Size ^{a)} (mm)	Thickness (mm)
High density polyethylene (HDPE)	Current film bag	Custom order	HDPE (Hi-Zex)	80 × 130	0.05
	Hi-Zex film bag	ASANUMA	HDPE (Hi-Zex)	100 × 150	0.03
	Shoulex film bag	HAKUBA PHOTO INDUSTRY	HDPE (Shoulex)	110 × 150	0.028
Low density polyethylene (LDPE)	LDPE film bag-1	Sansyo	LDPE	80 × 150	0.03
	LDPE film bag-2	SEISANNIPPONSHA	LDPE	85 × 120	0.04
	LDPE film bag-3	ORDIY	Linear LDPE (L-LDPE)	80 × 150	0.08
Biaxially oriented nylon (Nylon)	Nylon film bag (type R)	Fukusuke Kogyo	Nylon for retort and L-LDPE	130 × 180	0.075
	Nylon film bag (type S)	Fukusuke Kogyo	Barrier nylon and L-LDPE with heat resistant	120 × 170	0.075

a) Width × length

2.4 定量方法

愛玩動物用飼料等の検査法第3章の1の1.2に従った。

1) 前処理

ケイソウ土約3gを秤量して袋に入れ、電気定温乾燥機（以下「乾燥機」という。）内で立てかけ、105℃で2時間乾燥させた。なお、以降の乾燥機での乾燥においては、袋を試験管立てに斜めに置いた試験管の合間に立てかけた状態で乾燥した。ただし、乾燥が不十分と認められた際の再分析及びナイロン袋との比較検討を行った際の全ての分析では、袋を市販のスタンドに立てかけた状態で乾燥を行った。乾燥後、袋の口を5mm程度ずつ3回折りたたみ、ゼムクリップで袋の口を止めて、デシケーター内で15分間放冷した。放冷後に、ゼムクリップを外して、ケイソウ土と袋の重量を正確に測定した。なお、重量を正確に測定する際は、除電器を用いて静電気を除去して測定した。

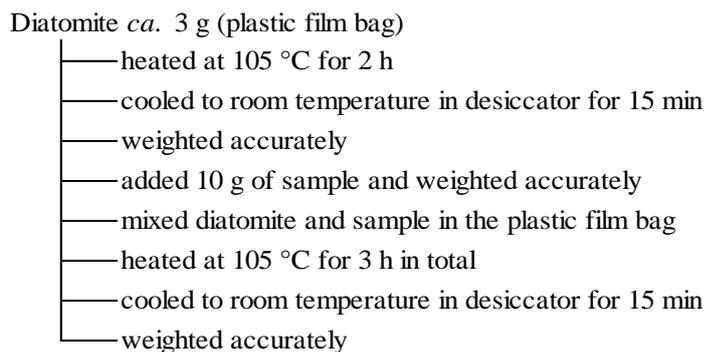
2) 水分測定

分析試料10g前後を1)で用意した袋内に直接秤量し、重量を正確に測定した。袋の口を閉じ、袋の外側から揉んで試料とケイソウ土が均一になるまで混和させた後、袋の外側からガラス棒を押し当て、袋内部の混和物を均一に薄く広げた。袋の口を開いて乾燥機に入れ、105℃で合計3時間乾燥した。なお、乾燥中は1時間毎に袋を取り出して乾燥状態を確認し、乾燥が進んで塊状になった混和物を袋の外から押しつぶして粉末状にし、乾燥を続けた。乾燥終了後は、袋の口を5mm程度ずつ3回折りたたみ、ゼムクリップで袋の口を止めて、デシケーター内で15分間放冷した。放冷後にゼムクリップを外して、混和物と袋の重量を正確に測定した。

3) 計算

試料の秤量値と乾燥減量の値から、試料中の水分量を算出した。

なお、定量法の概要をScheme 1に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for moisture content in wet pet foods

3 結果及び考察

3.1 袋の耐熱性の確認

本法では 105 °C での加熱乾燥を伴うため、使用する袋には耐熱性が求められる。このため、Table 1 の試料番号 1 を用いて 2.4 の操作を行い、Table 2 に示した市販の袋の耐熱性を確認した。

その結果、LDPE 袋は加熱処理中に袋の変形や癒着が認められた。HDPE 袋及びナイロン袋では、袋の変形等は認められなかったため、この後の検討では HDPE 袋及びナイロン袋を用いることとした。

3.2 HDPE 袋の検討

既存袋及び市販の HDPE 袋を用いて、分析用試料の水分を 2.4 に従って測定し、試料毎に既存袋と HDPE 袋間で得られた水分の測定値を用いて Welch の *t*-検定を行った。既存袋とハイゼックス袋の結果は Table 3、既存袋とショーレックス袋の結果は Table 4 のとおりであり、一部の試料において有意差が認められた。既存袋及び各 HDPE 袋間の測定値に大きな差は見られず、相対標準偏差 (RSD_r) が小さいために、有意差が出たと考えられた。また、有意差が認められた HDPE 袋の水分の測定値は、既存袋よりも低くなる傾向があった。乾燥途中で HDPE 袋の状態を確認すると、袋の口が自然に狭まっていた例や、袋の内部でごくわずかに水滴の凝集が見られた例があったことから、混和物中の水分が十分に蒸発しなかった可能性が考えられた。この要因として、用いた HDPE 袋は既存袋よりもサイズが一回り大きく素材も薄いことから、捻れを生じやすいためと考えた。このため、有意差が認められた試料について、袋の口を外側に折り返して、市販のバッグスタンドに立てかけた状態で再分析を行い、改めて Welch の *t*-検定を行った結果、有意差は認められなかった。

これらの結果から、HDPE 袋はウェット製品の水分測定に使用可能であると考えられた。

Table 3 Comparison of moisture content (current film bags and Hi-Zex film bags) and the results of Welch's *t*-test

Sample No.	Current film bag			Hi-Zex film bag			<i>p</i> value ^{c)}	Significant difference
	Experiment No.	Measured value ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Experiment No.	Measured value ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)		
1	1	78.30	0.02	1	78.28	0.05	0.292	No
2	1	82.21	0.07	1	82.16	0.2	0.577	No
3	1	86.22	0.05	1	86.14	0.06	<u>0.040</u>	Yes
				2	86.23	0.2	0.894	No
4	1	76.36	0.07	1	76.29	0.04	<u>0.047</u>	Yes
				2	76.41	0.1	0.381	No
5	1	84.34	0.1	1	84.18	0.3	0.197	No

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Calculated by Welch's *t*-test (The underlined value is less than 0.05.)Table 4 Comparison of moisture content (current film bags and Shoulex film bags) and the results of Welch's *t*-test

Sample No.	Current film bag			Shoulex film bag			<i>p</i> value ^{c)}	Significant difference
	Experiment No.	Measured value ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Experiment No.	Measured value ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)		
1	1	78.30	0.02	1	78.39	0.07	<u>0.022</u>	Yes
				2	78.37	0.1	0.269	No
2	1	82.21	0.07	1	82.14	0.07	0.099	No
3	1	86.22	0.05	1	86.21	0.06	0.872	No
4	1	76.36	0.07	1	76.46	0.1	0.112	No
5	1	84.34	0.1	1	83.86	0.2	<u>0.002</u>	Yes
				2	84.31	0.1	0.523	No

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Calculated by Welch's *t*-test (The underlined value is less than 0.05.)

3.3 ナイロン袋の検討

既存袋及び市販のナイロン袋を用いて、分析用試料の水分を 2.4 に従って測定し、試料毎に既存袋とナイロン袋間で得られた水分の測定値を用いて Welch の *t*-検定を行った。既存袋とナイロン R 袋の結果は Table 5、既存袋とナイロン S 袋の結果は Table 6 のとおりであり、一部の試料において有意差が認められ、再分析を行っても有意差が認められたものがあった。既存袋及び各ナイロン袋間の測定値に大きな差は見られず、RSD_r が小さいために、有意差が出たと考えられた。

また、ナイロン袋の秤量操作において、除電器を用いた場合でも天秤の表示値が安定しづらい現象が見られたが、その要因の一つとして静電気の影響が疑われた。今回検討に用いたナイロン

袋は、ナイロンとポリエチレンの2素材から構成されるものである。静電気の帯電列⁵⁾によると、ナイロンは正電荷を帯びる性質が強く、一方でポリエチレンは負電荷を帯びる性質が強いとされている。正反対の性質を持つ2素材から構成される点からも、静電気が影響したものと推測された。

静電気の影響を大きく受ける操作性の観点から、今回の検討に用いたナイロン袋は本法において適用することは困難と考えられた。

Table 5 Comparison of moisture content (current film bags and nylon film bags (type R)) and the results of Welch's *t*-test

Sample No.	Current film bag			Nylon film bag (type R)			<i>p</i> value ^{c)}	Significant difference
	Experiment No.	Measured value ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Experiment No.	Measured value ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)		
1	1	78.37	0.08	1	78.43	0.1	0.244	No
2	1	82.26	0.02	1	82.30	0.1	0.397	No
3	1 ^{d)}	86.07	0.03	1 ^{d)}	86.11	0.03	<u>0.024</u>	Yes
	2 ^{d)}	84.59	0.02	2 ^{d)}	84.59	0.04	0.653	No
4	1	76.35	0.05	1	76.38	0.1	0.529	No
5	1	84.42	0.04	1	84.54	0.1	0.070	No

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Calculated by Welch's *t*-test (The underlined value is less than 0.05.)

d) Different lots were analyzed for each experiment number.

Table 6 Comparison of moisture content (current film bags and nylon film bags (type S)) and the results of Welch's *t*-test

Sample No.	Current film bag			Nylon film bag (type S)			<i>p</i> value ^{c)}	Significant difference
	Experiment No.	Measured value ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Experiment No.	Measured value ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)		
1	1	78.37	0.08	1	78.54	0.2	0.100	No
2	1	82.26	0.02	1	82.32	0.05	<u>0.033</u>	Yes
	2	82.34	0.05	2	82.25	0.08	<u>0.032</u>	Yes
3	1 ^{d)}	86.07	0.03	1 ^{d)}	86.17	0.05	<u>0.002</u>	Yes
	2 ^{d)}	84.59	0.02	2 ^{d)}	84.60	0.1	0.923	No
4	1	76.35	0.05	1	76.84	0.7	0.097	No
5	1	84.42	0.04	1	84.51	0.1	0.138	No

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Calculated by Welch's *t*-test (The underlined value is less than 0.05.)

d) Different lots were analyzed for each experiment number.

4 まとめ

愛玩動物用飼料のウェット製品の水分測定法で用いることができるプラスチックフィルム袋の規格を検討したところ、以下の結果が得られ、市販の HDPE 袋は本法で使用可能であると考えられた。

- 1) LDPE 袋は 105 °C での加熱操作により変形や癒着が認められ、耐熱性がなかった。HDPE 袋及びナイロン袋は、加熱操作を経ても変形等が確認されず、耐熱性があった。
- 2) 乾燥中に HDPE 袋の口が狭まらないように留意して分析を行い、既存袋及び HDPE 袋を用いて測定した水分値について Welch の *t*-検定を行った結果、有意差は認められなかった。
- 3) ナイロン袋は静電気の影響を大きく受ける操作性の観点から、本法において適用することは困難と考えられた。

文 献

- 1) 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，省令第 1 号 (2009).
- 2) 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).
- 3) 石橋 隆幸，石田 亜希子，田端 麻里：愛がん動物用飼料（ウェット製品）中の水分の測定法，飼料研究報告，36，41-53 (2011).
- 4) 消費者庁次長通知：「食品表示基準について」の一部改正について，令和 4 年 3 月 30 日，消費表第 128 号 (2022).
- 5) 独立行政法人労働安全衛生総合研究所：静電気安全指針 (2007).

6 ヘイ及びストローキューブ配合の牛用配合飼料中のモネンシンナトリウムに係る飼料分析基準の妥当性確認

坂井田 里子*, 野村 昌代*, 橋本 仁康*

Validation Study on Monensin Sodium Determination Method for Formula Feed for Cattle Containing Hay and Straw Cube

SAKAIDA Satoko*, NOMURA Masayo* and HASHIMOTO Yoshiyasu*

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

We have made a validation study to determine monensin sodium (MN) in formula feed for cattle, containing hay and straw cubes, using the plate and liquid-chromatograph (LC). These methods have been listed in the Feed Analysis Standard of Japan.

In the plate method, MN was quantified as following: MN in formula feed was extracted with methanol-water (9:1), and the solution was filtered. The filtrate was purified with basic alumina. Then MN concentration was determined by the 2-2 dose method using *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 in F-22 medium.

In the LC method, MN was extracted with methanol-water (9:1), and the solution was filtered. The filtrate was injected into a post-column derivatization LC equipped with a UV-Vis detector (520 nm) to determine the concentration of MN. LC separation was then carried out on ODS column (Mightysil RP-18 GP, 4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Kanto Chemical Co., Inc.; Tokyo, Japan) with methanol-water-acetic acid (94:6:0.1) as a mobile phase, and MN was derivatized by post-column reaction with methanol-sulfuric acid-vanillin (95:2:3, v/v/w).

Recovery tests were conducted using four types of formula feed for cattle, containing hay and straw cubes. Those materials were added with MN according to the following specifications: 15, 22.5, 30 and 45 g(potency)/t for the plate method; 15, 30 and 45 g(potency)/t for the LC method. The resulting mean recoveries ranged as following: 102 % to 118 % for the plate method; 98.6 % to 106 % for the LC method. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was as following; less than 4.5 % for the plate method; less than 3.0 % for the LC method. In the plate method, if the sample collection amount was larger than normal, some samples showed the sign that they were not adequately stirred with the extraction solvent.

Key words: monensin sodium; antibiotic; plate method; liquid-chromatography (LC); formula feed for cattle; hay cube; straw cube

キーワード：モネンシンナトリウム；抗生物質；平板法；液体クロマトグラフィー；牛用配合飼料；ヘイキューブ；ストローキューブ

1 緒 言

モネンシンは、*Streptomyces cinnamonensis* の培養により得られるポリエーテル系の抗生物質であり、我が国では、飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進を目的に、昭和 53 年に飼料添加物としてモネンシンナトリウム（以下「MN」という。）が指定された¹⁾。

MN は、省令²⁾でブロイラーを除く鶏用（幼すう用・中すう用）及びブロイラー用（前期及び後

* 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

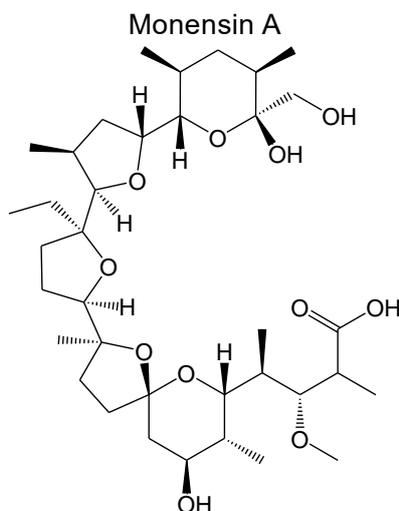
期用) 飼料に 80 g(力価)/t, 牛用 (ほ乳期用, 幼令期用及び肥育期用) 飼料に 30 g(力価)/t 添加することが認められている. なお, 粗砕したヘイキューブを原料とする牛肥育期用飼料については, 均質に混ざりにくいという懸念から MN を含んではならないとされていた³⁾が, 飼料製造事業場からは混合技術や工程管理の向上を踏まえ見直しが要望されていた.

そこで農林水産省からの要請により, 粗砕したヘイ又はストローキューブ (以下「ヘイキューブ等」という.) 配合の牛用配合飼料における MN の定量法として, 農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知⁴⁾が定める迅速定量法 (吸光光度法) について妥当性確認を実施した結果, 適用可能であると確認された. これにより MN が飼料中に均質に混合されることを工程管理及び品質管理において確認できる事業場においては, ヘイキューブ等を原料とする牛肥育期用飼料に MN を添加することが認められることとなった⁵⁾.

牛用配合飼料中の MN の定量法としては, 迅速定量法の他に飼料分析基準⁶⁾に定められた平板法及び液体クロマトグラフ法がある. しかし, 飼料分析基準に記載のこれらの分析法については, 開発時にヘイキューブ等が配合された牛用配合飼料に対する妥当性確認は行われていない^{7), 8)}.

そこで, ヘイキューブ等が配合された牛用配合飼料中の MN に係る平板法及び液体クロマトグラフ法の妥当性を確認したので, その概要を報告する.

なお, MN は MN-A, MN-B, MN-C 及び MN-D の混合物であり, 主成分は MN-A である. 参考に MN-A の構造式等を Fig. 1 に示した.



(2S,3R,4S)-4-[(2S,5R,7S,8R,9S)-2-[(2R,5S)-5-ethyl-5-[(2R,3S,5R)-5-[(2S,3S,5R,6R)-6-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-3,5-dimethyloxan-2-yl]-3-methyloxolan-2-yl]oxolan-2-yl]-7-hydroxy-2,8-dimethyl-1,10-dioxaspiro[4.5]decan-9-yl]-3-methoxy-2-methylpentanoic acid

C₃₆H₆₂O₁₁ MW: 670.87 CAS No.: 17090-79-8 (monensin A), 22373-78-0 (monensin Na)

Fig. 1 Chemical structure of MN-A

2 実験方法

2.1 試料

ヘイキューブ等が配合された, 抗菌性飼料添加物を含まない牛用配合飼料 4 種類について, 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されたものを入手し, 分析用試料とし

た. また, 牛用配合飼料 4 に使用されたアルファルファヘイキューブを入手し, 目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機を用いて粉碎し, 検討に用いた.

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 ^{a)}
For cattle 1 (Wheat straw cube: 12 %)	Grains	54	Barley (flake), corn (flake), corn, toasted soybean flour
	Brans	27	Wheat bran, hominy feed, corn gluten feed
	Oil seed meal	4	Soybean meal
	Others	15	Wheat straw (cube), bagasse (chip), alfalfa (pellet), calcium carbonate, salt, feed additives
For cattle 2 (Mixed cube (timothy hay and alfalfa hay): 18 %)	Grains	36	Corn (flake), corn, off-grade wheat flour, barley, wheat
	Oil seed meal	16	Soybean meal, non-enzymatically soybean meal, rapaseed meal
	Brans	13	Corn gluten feed, wheat bran
	Others	35	Timothy hay and alfalfa hay (mixed cube), bagasse (chip), beet pulp, corn cob (pellet), molasses, calcium carbonate, salt, feed additives
For cattle 3 (Alfalfa hay cube: 4 %)	Grains	47	Corn, barley, off-glade wheat flour
	Oil seed meal	20	Soybean meal, rapaseed meal, corn gluten meal
	Brans	19	Wheat bran, soybean hulls
	Others	14	Beat pulp, alfalfa hay (cube), molasses, calcium carbonate, salt, feed additives
For cattle 4 (Alfalfa hay cube: 14 %)	Grains	37	Corn (flake), corn, barley (flake)
	Brans	21	Wheat bran, corn gluten feed, mixed barley bran
	Oil seed meal	8	Soybean meal, rapaseed meal, non-enzymatically soybean meal,
	Others	34	Alfalfa hay (cube), beet pulp, alfalfa (pellet), pineapple bagasse, calcium carbonate, molasses, salt, alfalfa concentrate, feed additives

a) Coarse crushed raw materials and heat-processed raw materials are indicated in brackets after their names.

2.2 平板法

2.2.1 試薬

1) 試薬は試薬特級を用いた. 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, 必要に応じて 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌したものをを用いた.

2) 希釈溶媒

水-メタノール (7+3)

3) MN 標準液

常用標準モネンシン 40 mg 以上を正確に量り, メタノールを正確に加えて溶かし, 1 mg(力価)/mL の MN 標準原液を調製した. 使用に際して, 標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し, 2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製した.

4) F-22 号培地

酵母エキスは Bacto Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company 製), カンテンは Bacto Agar (Becton, Dickinson and Company 製) を用い, 飼料分析基準第 9 章第 1 節 1 の A の 3)に従って

調製した。

5) 孢子液

試験菌として *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 を用い、 1×10^8 個/mL の孢子液を調製した。

6) 寒天平板

高圧蒸気滅菌した後、49~51 °C に保温した F-22 号培地に、孢子液を培地 100 mL に対して 0.05 mL 程度加えて十分にかき混ぜ、その 10 mL をペトリ皿（内径 90 mm，高さ 15 mm）に一様に広がる様に分注した後、水平に静置して凝固させ、平板とした。円筒投下機を用い、平板上の半径 25 mm の円周上の相隣する各々が中心に対して 90°の間隔となる位置に、4 個の円筒（外径 8 mm，内径 6 mm，高さ 10 mm，ステンレス製）を置いた。

7) 抽出溶媒

水-メタノール（1+9）

8) 塩基性アルミナ

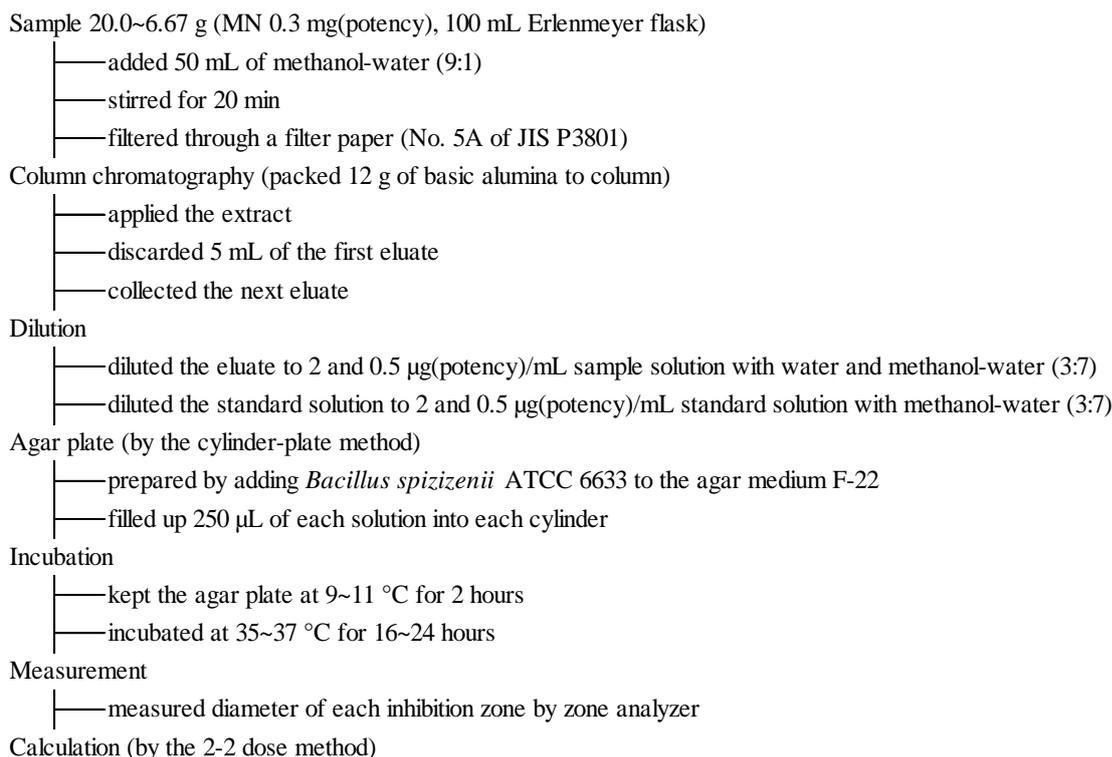
榎本ら⁹⁾の検討に基づき、カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ（Aluminium oxide 90 active basic Art.1076, Merck 製）を乾燥器にて 130 °C で 2 時間乾燥し、気密容器に入れ、塩基性アルミナ 94 g に対して水 6 mL を加えてよく混和した後、一夜静置し、Brockmann スケール¹⁰⁾の活性度 III（水分 6 v/w %）に調整したものを使用した。

2.2.2 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) 恒温器：ILE800 ヤマト科学製又は LTI-1001ED 東京理化学器械製
- 3) 阻止円測定装置：ZONE ANALYZER ZA-F システムサイエンス製

2.2.3 定量方法

飼料分析基準第 9 章第 2 節 27.2.2 に従った。なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for MN in formula feed (Plate method)

2.2.4 添加回収試験

2.2.1 の 3)の MN 標準原液を添加に用いた。2.2.3 に従った場合の試料量は、MN として 0.3 mg(力価)相当量とされていることから、各分析試料を 20.0, 13.3, 10.0 及び 6.67 g 量り、それぞれに MN として 0.3 mg(力価)相当量 (各分析試料中 15, 22.5, 30 及び 45 g(力価)/t 相当量) を添加後よく混合し、2.2.3 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

2.2.5 添加回収試験 (ヘイキューブの影響確認)

2.2.1 の 3)の MN 標準原液を添加に用いた。試料として 2.1 により調製したアルファルファヘイキューブを使用した。牛用配合飼料 4 を 20.0 g 採取した場合のヘイキューブ含有量である 2.8 g を量り、MN として 0.3 mg(力価)相当量 (牛用配合飼料 4 を 20.0 g 採取した場合の添加濃度 15 g(力価)/t 相当量) を添加後よく混合し、2.2.3 に従って 2 点併行分析を実施し、平均回収率を求めた。

2.3 液体クロマトグラフ法

2.3.1 試薬

1) 硫酸は試薬特級、メタノールは液体クロマトグラフ用 (富士フイルム和光純薬製)、酢酸は高速液体クロマトグラフィー用 (関東化学製)、バニリンは鹿特級 (関東化学製) を用いた。水は Direct-Q UV3 (Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。

2) MN 標準液

2.2.1 の 3)で調製した MN 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 MN として 0.2 mg(力価) 相当量を含む液体クロマトグラフ法用の MN 標準液を調製した。使用

に際して、液体クロマトグラフ法用の MN 標準液の一定量をメタノール-水 (9+1) で正確に希釈し、1 mL 中に MN として 0.5, 1, 2.5, 5, 10 及び 15 μg (力価)相当量を含む各 MN 標準液を調製した。

3) 反応液

硫酸 10 mL をメタノール 475 mL にかき混ぜながら徐々に加えた後、バニリン 15 g を加えて溶かしたものを用時調製した。

2.3.2 装置及び器具

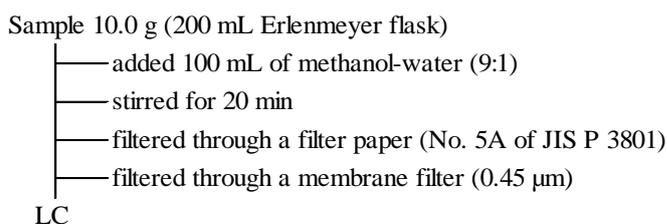
- 1) メンブランフィルター：13HP045AN (孔径 0.45 μm , 直径 13 mm, PTFE) 東洋濾紙製
- 2) 液体クロマトグラフ：Prominence 島津製作所製

2.3.3 定量方法

飼料分析基準第 9 章第 3 節 1.2 に従った。なお、本報告はピーク面積での結果を記載した。液体クロマトグラフの測定条件を Table 2 に、定量法の概要を Scheme 2 に示した。MN-A, MN-B, MN-C 及び MN-D のうち、飼料添加物として指定されているものは MN-A を主成分とするものであり、早川ら⁸⁾による液体クロマトグラフ法における MN 定量法の検討と同様、本検討では、MN-A を定量物質とした。

Table 2 Operating conditions of LC

Detector	UV detector (wavelength: 520 nm)
Column	Mightysil RP-18GP (4.6 mm i.d. \times 150 mm, 5 μm), Kanto Chemical
Mobile phase	Methanol-water-acetic acid (94:6:0.1)
Reaction solution	Methanol-sulfuric acid-vanillin (95:2:3, v/v/w)
Flow rate	Mobile phase 0.6 mL/min, Reaction solution 0.6 mL/min
Temperature	Column 40 $^{\circ}\text{C}$, Reactor 95 $^{\circ}\text{C}$
Reaction coil	0.5 mm i.d. \times 5 m



Scheme 2 Analytical procedure for MN in formula feed (LC method)

2.3.4 添加回収試験

2.2.1 の 3) の MN 標準原液を添加に用いた。各分析試料に、MN として 15, 30 及び 45 g(力価)/t 相当量 (最終試料溶液中で 1.5, 3.0 及び 4.5 μg (力価)/mL) をそれぞれ添加後よく混合し、2.3.3 に従って定量し、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 平板法

2.2.4 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 2 のとおり、省令²⁾で牛用飼料に添加

することが認められている濃度（以下「成分規格濃度」という。）である 30 g(力価)/t について、平均回収率は 104~108 %，繰返し精度は相対標準偏差（以下「RSD_r」という。）として 4.5 %以下の成績が得られた。

また、関口らによる検討¹¹⁾と同様に添加濃度 15 及び 45 g(力価)/t についても検討を行った結果、平均回収率は 102~118 %，RSD_rは 3.1 %以下の成績が得られた。なお、添加濃度 15 g(力価)/t のうち牛用配合飼料 1 については、分析試料に抽出液を加えた際に吸水及び膨張が著しく、かき混ぜが正常に行われなかった。また、添加濃度 15 g(力価)/t のうち、牛用配合飼料 3 及び 4 の回収率が高くなる傾向が認められたことから、ヘイキューブの影響を確認するため、2.2.5 により添加回収試験を実施した。その結果、平均回収率は 106 %であったことから、ヘイキューブによる影響ではないことが確認できた。

なお、農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知⁶⁾において、管理限界は成分規格濃度の 100 ±25 %としていることから、成分規格濃度の 75 %相当である 22.5 g(力価)/t（試料量 13.3 g）についても添加回収試験を実施した。その結果は、Table 3 のとおり、平均回収率は 103~109 %，RSD_rは 3.0 %以下の成績が得られた。

Table 3 Recoveries for MN (plate method)

Spiked level (g(potency)/t)	Amount of sample (g)	For cattle 1		For cattle 2		For cattle 3		For cattle 4	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)						
15	20.0	Not extractable		102	2.9	114	3.1	118	2.1
22.5	13.3	109	3.0	109	1.1	108	2.4	103	2.4
30	10.0	107	1.7	104	4.5	107	1.8	108	3.7
45	6.67	104	2.9	105	1.1	107	1.9	104	0.7

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.2 液体クロマトグラフ法

2.3.4 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 4 のとおり、平均回収率は 98.6~106 %，RSD_rは 3.0 %以下の成績が得られ、飼料分析基準別紙 2 の試験法の妥当性確認ガイドライン（以下「妥当性確認ガイドライン」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結果であった。なお、得られたクロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

1) 真度：90 %以上 110 %以下

2) 精度：添加濃度 15 g(力価)/ t : 9.6 %以下，同 30 g(力価)/ t : 9.0 %以下，同 45 g(力価)/ t : 11 %以下

Table 4 Recoveries for MN (LC method)

Spiked level (g(potency)/t)	For cattle 1		For cattle 2		For cattle 3		For cattle 4	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)						
15	103	3.0	106	2.1	105	0.8	98.6	2.1
30	102	2.0	101	1.0	103	0.7	99.1	2.1
45	105	1.2	106	2.0	103	2.0	102	1.4

a) Mean (n = 5)

b) Relative standard deviation of repeatability

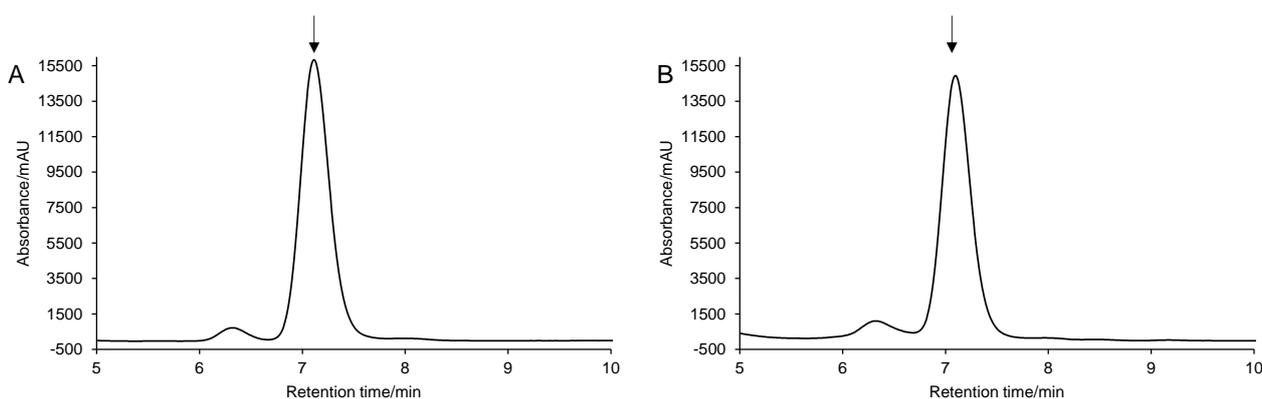


Fig. 2 Typical chromatograms of MN-A derivative in standard and sample solution (LC operating conditions are shown in Table 2. Arrows indicate the retention times of MN-A derivative.)

A: Standard solution (5 µg(potency)/mL of MN: 0.1 µg(potency) as injection amount)

B: Sample solution of formula feeds for cattle 2 (spiked at 45 g(potency)/t of MN: 0.09 µg(potency) as injection amount)

4 まとめ

ヘイキューブ等が配合された牛用配合飼料中の MN について、飼料分析基準に記載されている平板法及び液体クロマトグラフ法の妥当性を確認したところ、平板法については分析試料の採取量が多くなることにより、抽出溶媒を加えた際に膨潤等によりかき混ぜ抽出が困難な場合を除き、適用が可能と考えられた。液体クロマトグラフ法については従来の方のままで適用が可能と考えられた。

- 1) 平板法を用いて、MN として牛用配合飼料に 15, 22.5, 30 及び 45 g(力価)/t 相当量を添加し、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、平均回収率は 102~118 %, RSD_r は 4.5 % 以下であった。また、15 g(力価)/t 相当量を添加した場合、抽出溶媒によるかき混ぜが正常に行われない試料が認められた。
- 2) 液体クロマトグラフ法を用いて、MN として牛用配合飼料に 15, 30 及び 45 g(力価)/t 相当量を添加し、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結果が得られた。

文 献

- 1) 農林省告示：飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律の規定に基づき飼料添加物を定める件，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省告示第 750 号 (1976).
- 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) 農林水産省畜産局流通飼料課長通知：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肥育期用飼料の取扱いについて，昭和 61 年 2 月 20 日，61-1 (1986).
- 4) 農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について，昭和 60 年 10 月 15 日，60 畜 B 第 2928 号 (1985).
- 5) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知：抗生物質を含む牛肥育期用配合飼料の製造管理に関する指導について，令和 5 年 6 月 6 日，5 消安第 1415 号 (2023).
- 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，令和 5 年 12 月 1 日，5 消安第 4714 号 (2023).
- 7) 草間 豊子：牛用配合飼料中のモネンシンナトリウムの定量法の検討，飼料研究報告，11，107-123 (1986).
- 8) 早川 俊明，牧野 大作：高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のモネンシンナトリウムの定量，飼料研究報告，26，60-68 (2001).
- 9) 榎本 舞弓，橋本 仁康，山多 利秋：ポリエーテル系抗生物質の微生物学的定量法に用いる塩基性アルミナについて，飼料研究報告，40，150-157 (2015).
- 10) Brockmann, H. Schodder, H.: Aluminiumoxyd mit abgestuftem Adsorptionsvermögen zur chromatographischen Adsorption, Chem. Ber. 74, 73 (1941).
- 11) 関口 好浩，嶋村 知紗，大島 舞弓，橋本 仁康，奥村 寿章，加藤 まどか，三枝 尚子，千原 哲夫：モネンシンナトリウムの微生物学的試験法，液体クロマトグラフ法及び吸光光度法による定量法のほ乳期子牛育成用配合飼料に対する妥当性確認，飼料研究報告，41，134-148 (2016).

7 ヘリウムを使用しない代替法の検討

(1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による農薬一斉分析法の検討

船木 紀夫*¹, 小堀 拓也*²

Study of Alternative Determination Method without Helium (1) Simultaneous Determination Method of Pesticides by LC-MS/MS

FUNAKI Norio*¹ and KOBORI Takuya*²

(*¹ Nagoya Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

(Now Kobe Regional Center, FAMIC),

(*² Nagoya Regional Center, FAMIC)

We have examined a simultaneous determination method of the concentration of 64 pesticides in feed using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS), instead of gas-chromatograph mass spectrometer (GC-MS).

Having added water to a sample, pesticides were extracted with acetonitrile, and the solution was filtered. The filtrate was purified with GPC and three types of solid phase extraction columns (Chem Elut CE 1020, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan, ENVI-Carb/NH₂, Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA and Sep-Pak Plus Florisil cartridge, Waters Co.; Milford, MA, USA), and injected into an LC-MS/MS to determine the concentration of each pesticides. LC separation was then carried out on an ODS column (Wakopak Ultra C18-2, 2.1 mm i.d. × 100 mm, 2 μm, Fuji Film Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; Osaka, Japan) with a gradient of 5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution and 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Suitable measurement ion conditions were found for 48 out of 64 pesticides. Linearity of calibration curve was confirmed in the range of 20 to 400 ng/mL for 47 out of 48 pesticides mentioned above. Peaks that interfered with the quantification of each pesticide were not observed in the chromatogram of formula feed, corn and alfalfa hay, obtained according to this method. Under the measurement conditions that the peak intensity of each pesticide was the highest, 23 out of 47 had a matrix effect range of 80 to 120 % in all samples. And no pesticides had a matrix effect of less than 50 % in all samples.

Key words: pesticide; simultaneous determination method; gas-chromatograph mass spectrometer (GC-MS); liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); feed

キーワード：農薬；一斉分析法；ガスクロマトグラフ質量分析計；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料

1 緒 言

独立行政法人農林水産消費安全技術センターでは、飼料製造事業場等に対して行った立入検査に

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

*² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

て収去した飼料について、飼料分析基準¹⁾に記載された試験法により試験を実施し、製造及び使用方法等の基準並びに成分の規格²⁾への適合状況を確認している。飼料分析基準収載法のうち、農薬については主にガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法（以下「GC-MS 法」という。）により試験を実施しているが、この方法ではヘリウムを使用する必要がある。

近年、我が国ではヘリウムの入手が困難な状況が長期化しており、今後も安定供給の見通しが立っていない状況である。そこで今回、GC-MS 法の対象農薬について、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測定条件を検討したので、その概要を報告する。

なお、今回検討した農薬を Table 1 に示した。

Table 1 Target compounds in this study

Compounds (Group A)		Compounds (Group B)	
Alachlor	Deltamethrin	Atrazine	Fipronil
Aldrin	Diazinon	Cadusafos	Flutolanil
alpha-BHC	Dieldrin	Chlorobenzilate	Iprobenfos
beta-BHC	Edifenphos	Clorpyrifos	Isofenphos
gamma-BHC, Lindane	Endrin	Clorpyrifos-methyl	Isofenphos-oxon
delta-BHC	Fenpropathrin	Cyhalothrin	Isoprothiolane
Bifenthrin	Flucythrinate	Difenoconazole	Malathion
Bromobutide	Heptachlor	Dimethoate	Pendimethalin
deBr-Bromobutide	Heptachlor epoxide	EPN	Phenothrin
Chlordane	Methidathion	Ethion	Phenthoate
(<i>cis</i> -, <i>trans</i> -)	(<i>E</i>)-Methominostrobin	Ethofenprox	Phorate
Chlorfenvinphos	permethrin	Fenbuconazole	Phosmet
(<i>Z</i> -, <i>E</i> -)	(<i>cis</i> -, <i>trans</i> -)	Fenitrothion	Procymidone
Chlorpropham	Pirimiphos-methyl	Fenthion	Tebuconazole
Chlorthal-dimethyl	Propanil	Fenvalerate	Terbufos
DDD	Propargite	(+Esfenvalerate)	
(<i>o</i> , <i>p'</i> -, <i>p</i> , <i>p'</i> -)	Propiconazole		
DDE	Silafluofen		
(<i>o</i> , <i>p'</i> -, <i>p</i> , <i>p'</i> -)	Trifluralin		
DDT			
(<i>o</i> , <i>p'</i> -, <i>p</i> , <i>p'</i> -)			

2 実験方法

2.1 試料

配合飼料（肉豚肥育用及び種牛飼育用），とうもろこし及び乾牧草（アルファルファヘイ）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、分析用試料とした。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 2 に示した。

Table 2 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion	
		(%)	Ingredients
For piglets	Grains	70	Corn, wheat flour, roasted soybean flour, rice
	Brans	22	Bran
	Oil seed meal	3	Soybean meal, corn germ meal
	Others	5	Calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, garlic powder, molasses, corn steep liquor, feed additives
For dairy cattle	Oil seed meal	58	Corn gluten feed, potato gluten feed, rapeseed meal, soybean meal
	Grains	36	Corn, barley, rice, wheat flour
	Brans	2	Rice bran, bran
	Others	4	Molasses, calcium carbonate, feed additives

2.2 試薬

- 1) アセトニトリルは残留農薬・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。1%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。酢酸アンモニウム及び炭酸カリウムは試薬特級を用いた。水は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。
- 2) A グループ追加農薬標準品
アルドリン, α -BHC, β -BHC, γ -BHC, クロルデン (*cis* 体), クロルデン (*trans* 体), *p*, *p'*-DDT, ディルドリン, エンドリン及びヘプタクロル（以下「A グループ追加農薬」という。）の各標準品は, Table 3 に示した供給業者, 純度のものを用いた。
- 3) A グループ追加農薬標準原液
A グループ追加農薬標準品各 25 mg を量ってそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線までアセトンを加えて各 A グループ追加農薬標準原液を調製した（これらの液各 1 mL は, 各農薬として 0.5 mg を含有）。
- 4) 農薬混合標準液
A グループ追加農薬標準原液各 4 mL を 200 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し, 更に標線までアセトンを加えて A グループ追加農薬混合標準原液を調製した（この液 1 mL は, 各農薬として 10 μ g を含有）。

Table 1 の A グループの農薬（A グループ追加農薬は除く。）を含む 10 μ g/mL の A グループ農薬混合標準原液（林純薬工業製。アセトン溶液。）及び 10 μ g/mL の A グループ追加農薬混合標準原液各 2 mL を 20 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し, 更に標線までアセトニトリルを加えて A グループ農薬混合標準液を調製した（この液 1 mL は, 各農薬として 1 μ g を含有）。Table 1 の B グループの農薬を含む B グループ農薬混合標準原液（林純薬工業製。アセトン溶液。）についても同様に操作し, B グループ農薬混合標準液を調製した。

使用に際して, 各農薬混合標準液の一定量を, アセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300 及び 400 ng を含有する農薬

混合標準液を調製した。

Table 3 Additional group A pesticide standards used in the present study

Pesticides	Manufacturer	Purity (%)
Aldrin	Accu standard	100
alpha-BHC	Dr. Ehrenstorfer GmbH	98.6
beta-BHC	Dr. Ehrenstorfer GmbH	97.5
gamma-BHC, Lindane	Dr. Ehrenstorfer GmbH	99.5
cis-Chlordane	Accu standard	100
trans-Chlordane	Dr. Ehrenstorfer GmbH	99.1
p,p'-DDT	Accu standard	99.5
Dieldrin	Accu standard	100
Endrin	Dr. Ehrenstorfer GmbH	96.5
Heptachlor	Dr. Ehrenstorfer GmbH	99.0

2.3 装置及び器具

1) 粉砕機：

粉砕機 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 14000 rpm)

粉砕機 2 (乾牧草用)：

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

2) 振り混ぜ機：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) ケイソウ土カラム：Chem Elut CE 1020 (20 mL) Agilent Technologies 製

4) グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：ENVI-Carb/NH₂ (500 mg/500 mg) Supelco 製

5) フロリジルカラム：Sep-Pak Plus Florisil Waters 製にリザーバーを連結したもの

6) ゲル浸透クロマトグラフ：GPC システム 島津製作所製

7) メンブレンフィルター：DISMIC-25HP (孔径 0.45 μm, 直径 25 mm, 親水性 PTFE) 東洋濾紙製

8) LC-MS/MS：

LC 部：ACQUITY UPLC System Waters 製

MS/MS 部：ACQUITY TQ Detector Waters 製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10 g (乾牧草は 5 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. 300 mL のなす形フラスコをブフナー漏斗の下に置き, 抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後, 先の三角フラスコ及び残さを順次アセトニトリル 50 mL で洗浄し, 同様に吸引ろ過した. ろ液を 40 °C 以下の水浴で 15 mL 以下まで減圧濃縮した後, カラム処理に供する試料溶液とした.

2) カラム処理 I

試料溶液をケイソウ土カラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 5 mL で洗浄し、洗液をケイソウ土カラムに加え、5 分静置後、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-ヘキサン (1+1) 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た後、更に酢酸エチル-ヘキサン (1+1) 40 mL をカラムに加え、同様に溶出させた。

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。シクロヘキサン-アセトン (4+1) 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、10 mL の遠心沈殿管に入れて、1000×g で遠心分離した後、上澄み液をメンブランフィルター (孔径 0.45 μm) でろ過し、GPC に供する試料溶液とした。

3) GPC

試料溶液 5 mL を GPC に注入し、定量する各農薬が溶出する画分を 200 mL のなす形フラスコに分取し、キーパーとしてジエチレングリコール-アセトン (1+49) 1 滴を加え、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。酢酸エチル 2 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

4) カラム処理 II

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムを酢酸エチル 10 mL で洗浄した。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流出させた。50 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下した後、更に酢酸エチル 4 mL をカラムに加え、同様に溶出させた。

溶出液にキーパーとしてジエチレングリコール-アセトン (1+49) 1 滴を加え、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-アセトン (7+3) 10 mL (乾牧草は 5 mL) を加えて残留物を溶かし、カラム処理 III に供する試料溶液とした。

5) カラム処理 III

フロリジルミニカラムにリザーバーを取り付け、アセトン 5 mL 及びヘキサン 5 mL で順次洗浄した。試料溶液 4 mL を正確に取ってミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。50 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-アセトン (7+3) 6 mL を加えて各農薬を溶出させた。

溶出液にキーパーとしてジエチレングリコール-アセトン (1+49) 1 滴を加え、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル-水 (1+1) 2 mL を加えて残留物を溶かし、メンブランフィルター (孔径 0.45 μm) でろ過し、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

6) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各農薬標準液各 2 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 4 に示した。

Table 4 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	WAKO pak C18-2 (2.1 mm i.d. × 100 mm, 2 μm), Fujifilm wako pure chemicals
Mobile phase	5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution- 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution (85:15) (hold for 0.25 min) → 0.25 min → (40:60) → 8.5 min → (20:80) → 9 min → (1:9) (hold for 15 min) → 3 min → (1:99) → (hold for 5 min) → 0.1 min (85:15) → (hold for 3.9 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI) (Positive ion mode)
Ion source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ (600 L/h, 350 °C)
Capillary voltage	3.5 kV
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.4 Pa)
Collision energy	10 eV, 20 eV, 30 eV, 40 eV or 50 eV

7) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

- Sample 10.0 g (5.0 g for grass hay) (300 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 a filter paper (No. 5B of JIS P3801) under reduced pressure
 - washed with 50 mL of acetonitrile
 - evaporated to the volume of 15 mL under 40 °C
- Chem Elut CE 1020 (applicable sample volume 20 mL)
- placed a receiver (300 mL evaporator flask)
 - applied sample solution
 - washed the evaporator flask with 5 mL of water and applied the solvent
 - allowed to stand for 5 min
 - washed the evaporator flask with 20 mL of hexane-ethyl acetate (1:1) and applied the solvent (3 times)
 - eluted with 40 mL of hexane-ethyl acetate (1:1)
 - evaporated under 40 °C and dried with nitrogen gas
 - dissolved in 10.0 mL of cyclohexane-acetone (4:1)
 - centrifuge for 5 min at 1000×g
 - filtrated through a membrane filter (0.45 µm)
 - applied 5.0 mL of sample solution
- GPC
- evaporated under 40 °C and dried with nitrogen gas
 - added 2 mL of ethyl acetate
- ENVI-Carb/NH₂ (500 mg/500 mg)
- washed with 10 mL of ethyl acetate
 - placed a receiver (50 mL evaporator flask)
 - applied sample solution
 - washed the evaporator flask with 5 mL of ethyl acetate and eluted (twice)
 - eluted with 4 mL of ethyl acetate
 - evaporated under 40 °C and dried with nitrogen gas
 - dissolved in hexane-acetone (7:3) (grass hay 5.0 mL, others 10.0 mL)
- Sep-Pak Plus Florisil (6 mg)
- washed with 5 mL of acetone and 5 mL of hexane
 - placed a receiver (50 mL evaporator flask)
 - applied 4.0 mL of sample solution
 - eluted with 6 mL of hexane-acetone (7:3)
 - evaporated under 40 °C and dried with nitrogen gas
 - added 2 mL of acetonitrile-water (1:1)
 - filtrated through a membrane filter (0.45 µm)
- LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for pesticides in feed

2.5 MS/MS 測定条件の検討方法

最初に予備測定として、コリジョンエネルギーを 30 eV に固定し、コロン電圧を 10, 20, 30, 40 又は 50 V と変化させながら SRM 測定を行うことで、各プリカーサーイオン及びプロダクトイオンの組み合わせ毎に、ピークの保持時間、形状及び信号強度を比較した。なお、プリカーサーイオン及びプロダクトイオンの組み合わせについては、LC-MS/MS 法の各文献³⁾⁻¹²⁾等を参考に

設定した。予備測定の結果から、成分毎にモニターイオンを 2~11 種類選別し、コーン電圧を 10, 20, 30 又は 40 V, コリジョンエネルギーを 10, 20, 30, 40 又は 50 eV とそれぞれ変化させて測定した。なお、コーン電圧 50 V については、予備測定時にピークを検出しなかった成分が多かったため除外した。

3 結果及び考察

3.1 測定溶媒の検討

アセトニトリル又はアセトニトリル-水 (1+1) で希釈して調製した 100 ng/mL 農薬混合標準液の各成分について、ピーク形状及び信号強度を比較したところ、全成分においてアセトニトリル-水 (1+1) の方が良好であったことから、この後の検討ではアセトニトリル-水 (1+1) を用いることとした。クロマトグラムの一例を Fig. 1 に示した。

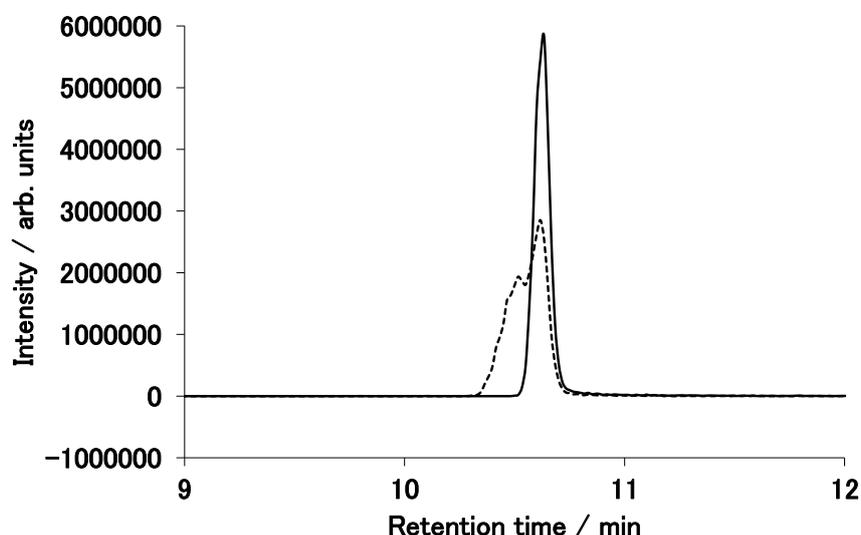


Fig. 1 Typical selected reaction monitoring (SRM) chromatogram of pirimiphos-methyl (100 ng/mL) by different solvents
(Precursor ion > Product ion (m/z): 306 > 108, Cone voltage: 30 V, Collision energy: 30 eV, Solid line: acetonitrile-water (1:1), Dotted line: acetonitrile)

3.2 測定条件の検討

2.5 の予備測定において塩素系農薬等、定量に十分な感度のイオンが見いだせなかった成分 (A グループ: アルドリル, BHC, クロルタルジメチル, クロルデン, DDD, DDE, ディルドリル, エンドリン, ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド, B グループ: クロルベンジレート及びプロシミドン) を除いた各成分について、プリカーサーイオン及びプロダクトイオンの組み合わせを選別し、100 ng/mL 農薬混合標準液についてコーン電圧及びコリジョンエネルギーを 10 刻みに調整して測定し、概ね 10^3 以上の信号強度が得られた測定条件を Table 5 及び 6 に示した。なお、DDT については十分な信号強度が得られたものの、合算として基準値が設定されている DDD 及び DDE の測定条件が見いだせなかったため、今回の検討からは除外した。

今回測定した A グループの 34 成分のうち 18 成分及び B グループの 30 成分のうち 27 成分に

ついて、それぞれプリカーサーイオン及びプロダクトイオンの組み合わせ 2 組以上で十分な信号強度が得られ、定量イオン及び確認イオンとして設定できる可能性が示唆された。なお、A グループのアラクロール及びトリフルラリン並びに B グループのホレートについては、1 組のイオンで十分な感度が得られた。

Table 5 Confirmation result of MS/MS conditions (compound group A)

Compounds	Cone voltage (V)	Precursor ion >Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Retention time (min)	Compounds	Cone voltage (V)	Precursor ion >Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Retention time (min)
Alachlor	20	<u>270 > 162</u>	20	8.2			350 > 97	30	
		440 > 165	50		Fenpropathrin	20	<u>350 > 125</u>	10	15.2
Bifenthrin	10	440 > 166	40	20.4			367 > 125	20	
		<u>440 > 181</u>	10				469 > 107	50	
		312 > 119	20		Flucythrinate-1, 2 (Not seprated)	20	469 > 157	40	14.4
Bromobutide	10	<u>312 > 194</u>	10	7.9			<u>469 > 199</u>	20	
		314 > 119	20				285 > 191	30	
		314 > 196	10		(E)-Methominostrobin	20	<u>285 > 196</u>	10	5.2
deBr-Bromobutide	10	<u>234 > 116</u>	10	6.9			285 > 238	10	
		234 > 119	20				303 > 58	30	
Chlorfenvinphos-1 (Z or E)	20	<u>359 > 155</u>	10	9.5	Methidathion	20	<u>303 > 85</u>	20	5.5
		359 > 170	40				320 > 85	30	
		361 > 172	40				408 > 168	40	
Chlorfenvinphos-2 (Z or E)	20	<u>359 > 155</u>	10	10.1	Permethrin-1 (cis or trans)	10	<u>408 > 183</u>	20	18.3
		359 > 170	40				410 > 183	20	
		361 > 172	40		Permethrin-2 (cis or trans)	10	<u>408 > 183</u>	20	19.5
Chlorpropham	20	<u>214 > 154</u>	20	5.0			410 > 183	20	
		214 > 172	10				<u>306 > 108</u>	30	
		504 > 172	30		Pirimiphos-methyl	30	306 > 125	30	10.5
		506 > 93	50				306 > 164	20	
		506 > 172	30				218 > 127	20	
Deltamethrin (Metabolite of tralomethrin)	20	521 > 172	30	16.5	Propanil	30	<u>218 > 162</u>	10	6.3
		521 > 181	50				220 > 127	20	
		521 > 279	20				<u>368 > 57</u>	20	
		523 > 172	30		Propargite	20	368 > 107	30	14.6
		523 > 181	40				368 > 175	20	
		<u>523 > 281</u>	20				<u>342 > 69</u>	20	
		305 > 93	40		Propiconazole-1, 2 (Not seprated)	30	342 > 159	30	9.4
		305 > 97	30				344 > 161	30	
Diazinon	30	305 > 125	20	9.7			426 > 59	40	
		305 > 153	20		Silafluofen	10	426 > 168	40	22.5
		<u>305 > 169</u>	20				<u>426 > 287</u>	10	
Edifenphos	20	<u>311 > 109</u>	30	9.2	Trifluralin	30	<u>353 > 236</u>	20	10.9
		311 > 111	20						
		311 > 173	20						

Double line: The ions that achieved the highest sensitivity under the conditions for measurement for each component

Table 6 Confirmation result of MS/MS conditions (compound group B)

Compounds	Cone voltage (V)	Precursor ion >Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Retention time (min)	Compounds	Cone voltage (V)	Precursor ion >Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Retention time (min)
Atrazine	30	<u>216 > 104</u>	30	5.0	Flutolanil	30	324 > 65	50	6.6
		216 > 174	20				<u>324 > 93</u>	30	
Cadusafos	20	271 > 97	30	10.7	Iprobenfos	10	324 > 173	30	8.8
		<u>271 > 159</u>	10				324 > 242	20	
Clorpyrifos	20	<u>350 > 97</u>	30	14.0	Isofenphos	10	<u>289 > 91</u>	20	10.3
		350 > 198	20				306 > 91	30	
		352 > 97	30		346 > 121	40			
Clorpyrifos-methyl	10	352 > 200	20	11.1	Isofenphos-oxon (Contains in isofenphos)	10	<u>346 > 217</u>	20	7.2
		322 > 125	20				330 > 121	40	
		<u>324 > 125</u>	20				330 > 201	20	
Cyhalothrin-1	30	450 > 141	40	15.7	Isoprothiolane	10	<u>330 > 229</u>	10	6.9
		<u>450 > 225</u>	10				291 > 189	20	
		467 > 225	20				<u>291 > 231</u>	10	
Cyhalothrin-2	30	450 > 141	40	16.1	Malathion	20	331 > 99	20	6.9
		<u>450 > 225</u>	10				331 > 125	30	
		467 > 225	20				<u>331 > 127</u>	10	
Difenoconazole-1, 2 (Not separated)	30	<u>406 > 251</u>	20	10.6	Pendimethalin	10	348 > 99	30	14.3
		406 > 265	40				282 > 43	30	
		408 > 253	30				282 > 194	20	
Dimethoate	20	408 > 267	30	2.6	Phenothrin-1	20	<u>282 > 212</u>	10	18.9
		230 > 47	40				351 > 153	40	
		230 > 79	30				351 > 168	40	
EPN	20	<u>230 > 125</u>	20	11.2	Phenothrin-2	20	<u>351 > 183</u>	20	19.4
		324 > 77	50				351 > 153	40	
		324 > 110	50				351 > 168	40	
Ethion	20	<u>324 > 157</u>	20	13.5	Phenthoate	20	<u>351 > 183</u>	20	9.0
		385 > 129	40				321 > 79	40	
		<u>385 > 171</u>	20				321 > 107	30	
Ethofenprox	20	385 > 175	30	20.1	Phosmet	20	321 > 125	20	5.8
		385 > 199	20				321 > 135	20	
		394 > 107	40				<u>321 > 163</u>	10	
Fenbuconazole	30	<u>394 > 177</u>	10	8.0	Phorate	10	338 > 79	50	10.4
		394 > 183	30				338 > 107	30	
		<u>337 > 70</u>	20				338 > 135	20	
Fipronil	30	337 > 125	30	8.3	Tebuconazole	30	318 > 133	40	9.1
		337 > 129	30				<u>318 > 160</u>	10	
		437 > 367	20				335 > 160	20	
Fenitrothion	20	<u>437 > 368</u>	20	9.6	Terbufos	10	<u>261 > 75</u>	10	12.7
		454 > 367	20				<u>308 > 70</u>	20	
		454 > 368	20				308 > 125	30	
Fenthion	20	<u>278 > 109</u>	20	9.6	Fenvalerate-1, 2 (Not separated)	20	310 > 70	20	17.0
		278 > 125	20				310 > 127	30	
		279 > 125	20				289 > 57	20	
Fenvalerate-1, 2 (Not separated)	20	<u>279 > 169</u>	20	9.6	Terbufos	10	<u>289 > 103</u>	10	12.7
		420 > 125	40						
		420 > 167	10						
Fenvalerate-1, 2 (Not separated)	20	437 > 125	40	17.0	Terbufos	10	<u>437 > 167</u>	20	12.7
		437 > 125	40						
		<u>437 > 167</u>	20						

Double line: The ions that achieved the highest sensitivity under the conditions for measurement for each component

3.3 検量線

2.2 の 4) に従って調製した各農薬混合標準液各 2 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を用いて検量線を作成した。Table 5 及び 6 に記載の農薬のうち、B グループの EPN 以外の農薬について、各 20~400 ng/mL (注入量として 0.04~0.8 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。参考までに、得られた EPN の検量線を Fig. 2 に示した。EPN は、どの測定イオンについても直線性を示さなかったため本法の対象外とした。ピーク高さを用いて検量線を作成した場合は、ほとんどの成分で直線性を示さなかった。

なお、当該検量線の濃度範囲は、各農薬を 0.02~0.4 mg/kg 含有する分析用試料を GC-MS 法に従い調製した最終試料溶液中の各農薬濃度範囲に相当する。

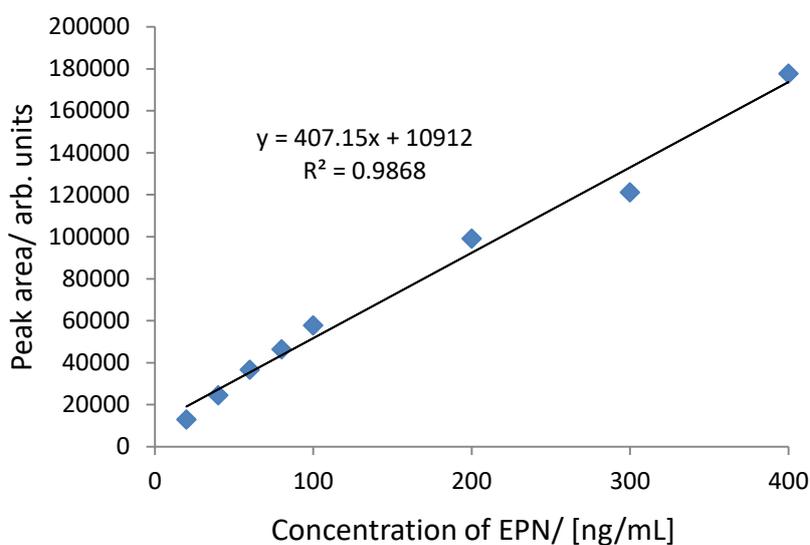


Fig. 2 Calibration curve of EPN by peak area
(Precursor ion > Product ion (m/z): 324 > 157)

3.4 妨害物質の検討

GC-MS 法による試験にて全ての対象農薬が不検出であった肉豚肥育用配合飼料、種牛飼育用配合飼料、とうもろこし及びアルファルファヘイ各 1 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、いずれの農薬の保持時間においても定量を妨げるピークは認められなかった。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 のとおり、種牛飼育用配合飼料はピリミホスメチルと同じ保持時間にピークが認められたが、プリカーサーイオン>プロダクトイオン: 306 > 108 (m/z) 以外のモニターイオン (306 > 125 及び 306 > 164 (m/z)) においても同様のピークが確認されたことからピリミホスメチルであると判断した。

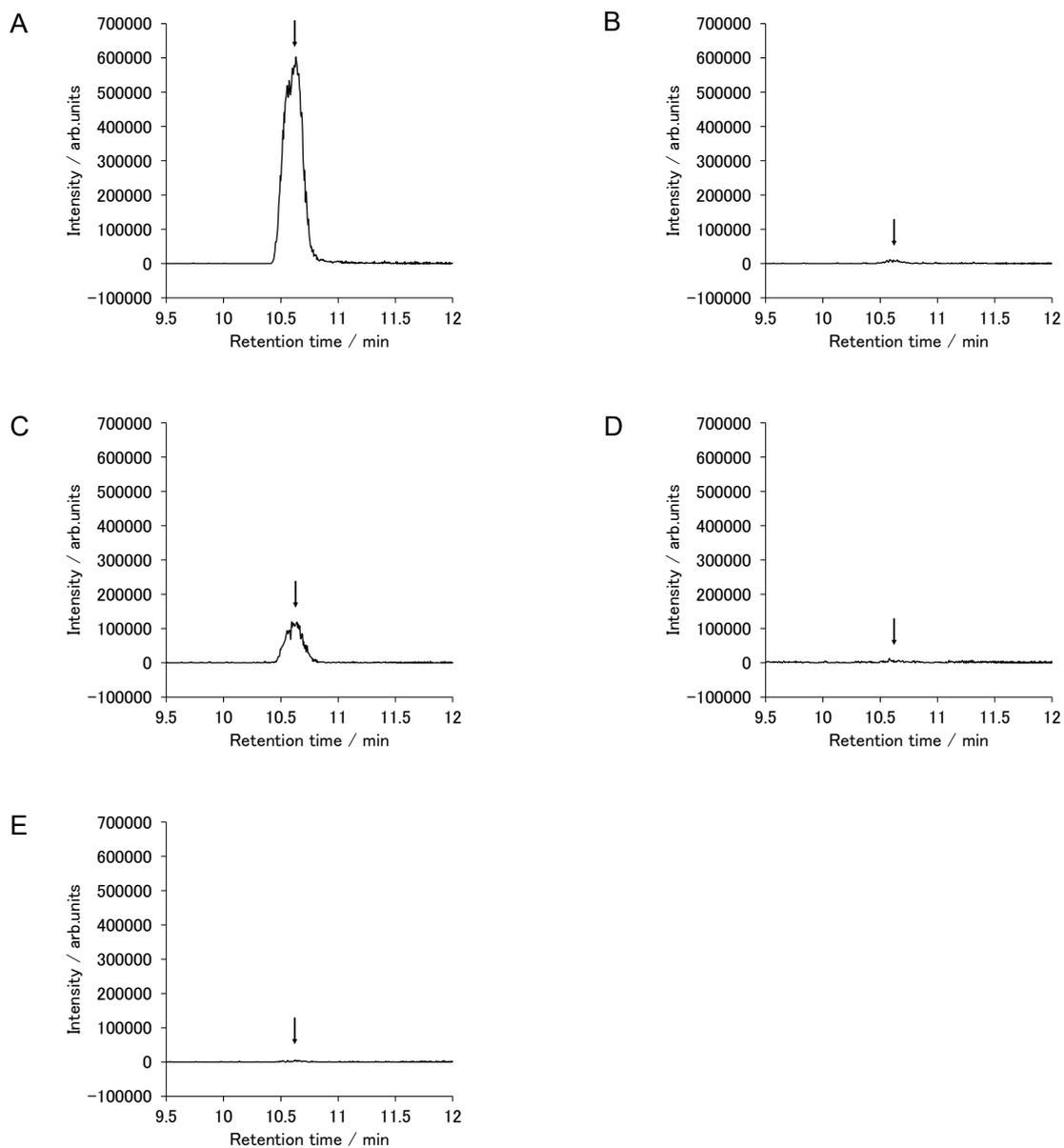


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of pirimiphos-methyl in standard and blank sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Table 4. Precursor ion > Product ion (m/z): 306 > 108, Cone voltage: 30 V, Collision energy: 30 eV. Arrows indicate the retention time of pirimiphos-methyl.)
 A: Standard solution (20 ng/mL),
 B~E: Blank sample solution (B: formula feed for growing pigs, C: formula feed for dairy cattle, D: corn and E: alfalfa hay)

3.5 マトリックス効果の確認

検量線の直線性を確認できた 47 成分 (A グループ 20 成分, B グループ 27 成分) について, 2.4 の 1)~5)により調製した肉豚肥育用配合飼料, 種牛飼育用配合飼料, とうもろこし及びアルファルファヘイのブランク試料溶液に各農薬として 0.1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 100 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 4)に従って調製した同濃度の標準液に

対するピーク面積比を確認した。

成分ごとに最もピーク強度が大きかった測定条件におけるマトリックス効果は Table 7 及び 8 のとおりであり、全ての試料についてマトリックス効果が 80~120 %となった農薬は A グループで 9 成分、B グループで 14 成分であった。一方、A グループの 2 成分（ペルメトリン及びプロパニル）及び B グループの 3 成分（シハロトリン、ジメトエート及びフィプロニル）では、全ての試料についてマトリックス効果が 80 %を下回った。

なお、GC-MS 法では、添加回収試験における回収率の目安を 50~200 %の範囲としていた。全ての試料についてマトリックス効果がこの範囲内であった農薬は A グループで 18 成分、B グループで 25 成分であり、全ての試料についてマトリックス効果が 50 %を下回った成分はなかった。

Table 7 Matrix effect study (group A)

Compounds	Precursor ion >Product ion (m/z)	Matrix effect ^{a)} (%)			
		Formula feed for growing pig	Formula feed for dairy cattle	Corn	Alfalfa hay
Alachlor	270 > 162	94.3	95.8	99.2	83.7
Bifenthrin	440 > 181	68.3	77.4	86.1	56.6
Bromobutide	312 > 194	98.9	95.4	100	89.4
deBr-Bromobutide	234 > 116	99.4	97.9	102	91.1
Chlorfenvinphos (Total amount) ^{b)}	359 > 155	98.2	93.4	98.3	86.6
Chlorpropham	214 > 172	95.1	93.6	101	72.4
Diazinon	305 > 169	103	103	104	105
Deltamethrin	523 > 281	83.7	81.4	83.3	70.9
Edifenphos	311 > 109	96.5	94.8	99.0	86.9
Fenpropathrin	350 > 125	91.2	88.4	92.9	78.7
Flucythrinate-1, 2 (Not separated)	469 > 199	96.8	88.7	95.4	71.1
Methidathion	303 > 85	92.5	89.7	96.3	57.9
(E)-Methomino-strobin	285 > 196	96.0	90.5	98.6	61.9
Permethrin (Total amount) ^{b)}	408 > 183	56.5	57.4	61.7	46.5
Pirimiphos-methyl	306 > 108	101	104	101	102
Propanil	218 > 162	63.0	58.8	66.3	49.3
Propargite	368 > 57	99.0	94.9	100	80.6
Propiconazole-1, 2 (Not separated)	342 > 69	82.7	79.0	84.6	69.8
Silafluofen	426 > 287	74.4	62.5	83.1	56.6
Trifluralin	353 > 236	101	98.9	96.6	90.4

$n = 3$

Light gray: 50 % or more but less than 80 %, Dark gray: less than 50 %

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

b) Components with isomers detected as two peaks is calculated as a total amount.

Table 8 Matrix effect study (group B)

Compounds	Precursor ion >Product ion (m/z)	Matrix effect ^{a)} (%)			
		Formula feed for growing pig	Formula feed for dairy cattle	Corn	Alfalfa hay
Atrazine	216 > 104	79.0	73.8	88.5	48.1
Cadusafos	271 > 159	96.3	92.5	96.8	88.2
Clorpyrifos	350 > 97	102	96.2	99.5	89.8
Clorpyrifos-methyl	324 > 125	100	97.3	100	98.8
Cyhalothrin (Total amount) ^{b)}	450 > 225	71.6	71.2	76.4	59.6
Difenoconazole-1, 2 (Not separated)	406 > 251	82.1	74.9	83.9	63.7
Dimethoate	230 > 125	72.2	56.3	77.8	29.0
Ethion	385 > 171	96.7	91.1	96.0	84.2
Ethofenprox	394 > 177	60.8	79.2	86.3	57.7
Fenbuconazole	337 > 70	82.1	77.6	83.1	65.6
Fenitrothion	278 > 109	96.8	97.2	95.3	104
Fenthion	279 > 169	92.2	87.7	92.9	86.7
Fenvalerate-1, 2 (Not separated)	437 > 167	82.1	79.7	78.7	74.0
Fipronil	437 > 368	75.9	72.5	78.7	64.7
Flutolanil	324 > 93	96.3	88.0	97.1	72.0
Isofenphos	346 > 217	86.2	74.0	78.0	75.6
Isofenphos-oxon	330 > 229	99.0	96.1	97.9	96.7
Isoprothiolane	291 > 231	97.3	92.7	97.8	82.4
Iprobenfos	289 > 91	97.6	94.0	97.7	91.0
Malathion	331 > 127	101	97.7	100	89.1
Pendimethalin	282 > 212	97.8	93.1	95.4	87.4
Phenothrin (Total amount) ^{b)}	351 > 183	74.9	75.7	80.3	59.1
Phenthoate	321 > 163	94.3	91.5	98.4	85.9
Phorate	261 > 75	99.3	102	99.3	97.7
Phosmet	318 > 160	85.1	77.1	86.7	51.8
Tebuconazole	308 > 70	80.7	77.4	82.4	71.0
Terbufos	289 > 103	101	96.6	100	98.7

$n = 3$

Light gray: 50 % or more but less than 80 %, Dark gray: less than 50 %

a)~b) Refer to the footnote of Table 7

4 まとめ

農薬一斉法の対象農薬 64 成分について、LC-MS/MS を用いた同時定量法の測定条件を検討したところ、以下の結果が得られ、一部の成分について測定が可能であると考えられた。

- 1) 標準液の希釈溶媒をアセトニトリル又はアセトニトリル-水 (1+1) とした場合のクロマトグラムを比較したところ、ピーク形状及び信号強度ともに後者の方が良好であった。
- 2) 各種報告を参考にモニターイオンを設定し、コーン電圧を 10~40 V の範囲、コリジョンエネルギーを 10~50 eV の範囲でそれぞれ変化させて測定したところ、64 成分のうち 48 成分についての測定イオン条件を見出した。

- 3) 検量線は、2)で測定イオン条件を見出した 48 成分のうち、EPN を除く 47 成分についてそれぞれ 20~400 ng/mL 相当量（注入量として 0.04~0.8 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、各農薬を 0.02~0.4 mg/kg 含有する分析用試料を GC-MS 法に従い調製した最終試料溶液中の濃度範囲に相当する。
- 4) 肉豚肥育用配合飼料，種牛飼育用配合飼料，とうもろこし及びアルファルファヘイについて，本法に従って得られたクロマトグラムには各農薬の定量を妨げるピークは認められなかった。
- 5) 本法に従って得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果，マトリックス効果が 80~120 % となった農薬は A グループで 9 成分，B グループで 14 成分であった。また，全ての試料についてマトリックス効果が 50~100 % であった農薬は A グループで 18 成分，B グループで 25 成分であり，全ての試料についてマトリックス効果が 50 % を下回った成分はなかった。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，令和 5 年 12 月 1 日，5 消安第 4714 号 (2023).
- 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) 山本 謙吾，友成 真菜，金丸 正：残留農薬分析業務における分析法の検討（希釈の効果を用いた LC-MS/MS による茶中の残留農薬一斉試験法），農薬調査研究報告，14，14-30 (2021).
- 4) 佐々木 秀幸，代市 守，鈴木 徹也，岸田 繁二，臼井 裕一，野村 哲也：残留農薬分析業務における分析法の検討（LC/MS/MS を用いた大豆中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価），農薬調査研究報告，11，23-31 (2018).
- 5) 佐々木 秀幸，守山 智章，山田 篤司，鈴木 徹也，臼井 裕一，野村 哲也：残留農薬分析業務における分析法の検討（LC-MS/MS を用いた野菜・果実類中の残留農薬一斉試験法の同時分析法の開発），農薬調査研究報告，10，30-39 (2017).
- 6) 佐々木 秀幸，守山 智章，山田 篤司，鈴木 徹也，青山 吉一，臼井 裕一：残留農薬分析業務における分析法の検討（LC-MS/MS による一斉試験法（野菜・果実類）対象農薬追加の妥当性検証），農薬調査研究報告，9，46-59 (2016).
- 7) 小澤 祐子，細川 明香，山森 泰大，竹田 正美：LC-MS/MS による農産物中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価，石川保環研報，56，26-30 (2019).
- 8) 水口 竜人，小澤 祐子，由田 洋一，新家 薫子，砺波 和子：LC-MS/MS を用いた農産物中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価について（第 2 報），石川保環研報第，54，1-11 (2017).
- 9) 菅谷 京子，齋藤 仁美，小篠 智江，徳田 侑子，市本 範子：LC-MS/MS による農産物中残留農薬測定項目拡大の検討，栃木県保健環境センター年報，27，26-30 (2021).
- 10) 中野 裕太，長澤 英子，内田 丈晴，坂牧 寛：アンモニア溶液を溶離液とする LC-MS/MS による残留農薬の高感度検出，分析化学，69 (3)，141-150 (2020).
- 11) 上野 英二，渡邊 美奈恵，梅村 優子，井上 知美，猪飼 誉友：LC-MS/MS による農産物中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価，日本食品衛生学会誌，55 (6)，290-296 (2014).
- 12) 大垣 有紀，林 克弘，川合 啓之，志村 恭子：農産物残留農薬一斉分析法の検討，三重保環研年報，13，44-59 (2011).

7 ヘリウムを使用しない代替法の検討

(2) 愛玩動物用飼料中の無機砒素のヘリウムを使用しない代替法の検討

門屋 日菜*, 橋本 良美*

Study of Alternative Determination Method without Helium (2) Alternative Determination Method of Inorganic Arsenic in Pet Food

KADOYA Hina* and HASHIMOTO Yoshimi*

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

For a determination method of inorganic arsenic, which is listed in the Inspection Method for Pet Food of Japan, we have studied an alternative method that does not use helium (collision gas) of a liquid-chromatograph inductively-coupled-plasma mass spectrometer (LC-ICP-MS).

Having added 2 w/v% tetramethyl ammonium hydroxide (TMAH) solution to a sample, inorganic arsenic was extracted by heating. The extract was diluted with water and adjusted to about pH 3 with 0.3 mol/L nitric acid, and then injected into a LC-ICP-MS to determine the concentration of inorganic arsenic. LC separation was then carried out on an ODS column (CAPCELL PAK C18 MG, 4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm, Osaka Soda Co. Ltd.; Osaka, Japan) with 10 mmol/L sodium 1-butanefulfonate, 4 mmol/L malonic acid, 4 mmol/L TMAH and 0.05% methanol solution as a mobile phase. Besides, LC-ICP-MS measurement was conducted by a method that did not use helium as the collision gas.

A study of interfering substances in LC-ICP-MS measurement was conducted on pet food samples. As a result, no peaks that interfere with the selectivity of inorganic arsenic were observed in any of the samples. Furthermore, a matrix effect study of inorganic arsenic was conducted. The peak area ratio of a matrix standard solution, prepared by adding standard solution to blank sample solution, and that of the standard solution of the same concentration, was calculated. As a result, a dried jerky sample was diluted two-fold to reduce the matrix effect, allowing for unaffected determination. For other pet foods, the matrix had no significant effect on the measurement values.

Key words: inorganic arsenic; liquid-chromatograph inductively-coupled-plasma mass spectrometer (LC-ICP-MS); helium; pet food

キーワード：無機砒素；液体クロマトグラフ誘導結合プラズマ質量分析計；ヘリウム；愛玩動物用飼料

1 緒 言

愛玩動物用飼料中の無機砒素は、愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令¹⁾において無機砒素(III) (以下「As(III)」という。)及び無機砒素(V) (以下「As(V)」という。)の総和として2 μg/gの基準値が定められている。この分析法として、愛玩動物用飼料等の検査法²⁾に液体クロマトグラフ誘導結合プラズマ質量分析計(以下「LC-ICP-MS」という。)による分析法が収載されており(以下「収載法」という。), コリジョンガスとしてヘリウムを使用し、測定を行って

* 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

いる。

我が国では近年、ヘリウムの入手が困難である状況が長期化しており、今後も安定供給の見通しが立っていない。そこで、愛玩動物用飼料の無機砒素の LC-ICP-MS による分析法について、ヘリウム（コリジョンガス）を用いない代替法を検討したので、その概要を報告する。

参考に、分析対象とした無機砒素の構造式等を Fig. 1 に示した。

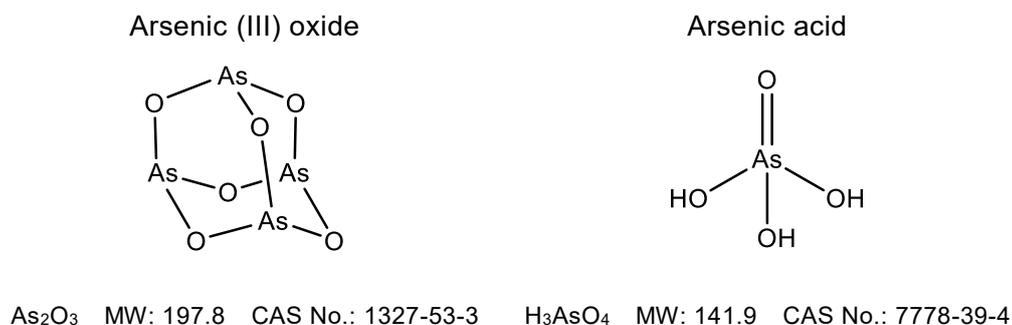


Fig. 1 Chemical structures of arsenic compounds

2 実験方法

2.1 試料

ドライ製品（犬用及び猫用），セミドライ製品（犬用），ウェット製品（犬用），成型ジャーキー（犬用），素材乾燥ジャーキーのハードタイプ及びソフトタイプ（犬用及び猫用），菓子類（犬用）並びに粉ミルク（猫用）を検討に用いた。有姿のままでは粉砕が困難なジャーキーは、はさみ等を用いて細断したのち、回転刃による粉砕機で粉砕し、粉砕が不十分と思われるものについては 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し、分析用試料とした。ウェット製品はフードプロセッサで粉砕し、分析用試料とした。粉ミルクは粉砕を行わなかった。その他の試料はそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し、分析用試料とした。

検討に用いた愛玩動物用飼料を Table 1 に示した。なお、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

Pet food types	Ingredients
Dry food for dogs	Chicken, barley, corn, wheat, pea bran, corn gluten, milo, cellulose, chicken extract, vegetable oil, beet pulp, flaxseed, pork extract, wheat bran, oat fiber, apple, broccoli, carrot, cranberry, pea beans, minerals (calcium, sodium, potassium, chloride, copper, iron, manganese, selenium, zinc, iodine), lactic acid, amino acids (taurine, lysine), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, beta carotene, niacin, pantothenic acid, folic acid, biotin, choline), antioxidants (mixed tocopherols, rosemary extract, green tea extract), carnitine
Dry food for cats	Raw beef, raw beef liver, fish meal, peas, tapioca starch, whole flaxseed, chicken fat, natural flavors, dried beef, vinegar, canola, minerals (potassium chloride, sodium chloride, calcium carbonate, zinc sulfate, iron sulfate, manganese sulfate, sodium selenite, cobalt sulfate, calcium iodate), vitamins (choline chloride, niacin, vitamin E supplement, calcium pantothenate, riboflavin supplement, thiamine nitrate, pyridoxine hydrochloride, vitamin A supplement, biotin, vitamin B ₁₂ supplement, folic acid, vitamin K ₁ supplement, vitamin B ₃ supplement), taurine, antioxidants (natural mixed tocopherols, citric acid, rosemary extract, green tea extract, spearmint extract)
Semi-dry food for dogs	Grains (corn, wheat flour, defatted rice bran, corn gluten feed, wheat protein), meats (chicken meal, chicken, beef flour, pork flour, chicken liver powder, chicken fillet, beef), defatted soybeans, fats and oils (animal fat, vegetable oil (including omega-6 fatty acids)), beer yeast, salt, sugars (sucrose, oligosaccharides), selenium yeast, vegetables (cabbage, barley grass, pumpkin, tomato, carrot, broccoli, spinach, molokheiya), small fish powder, casein phosphopeptide, propylene glycol, minerals (calcium, phosphorus, sodium, chloride, iron, copper, manganese, zinc, iodine, cobalt), pH adjuster, preservatives (potassium sorbate, sodium dehydroacetate), glycerin, sorbitol, vitamins (A, B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, pantothenic acid, choline), swelling agent, antioxidants (sodium erythorbate, mixed tocopherol, rosemary extract), food colors (titanium dioxide, food red no.102, food red no.106, food yellow no.4, food yellow no.5, food blue no.1), glucosamine, amino acids (arginine, methionine), chondroitin
Wet food for dogs 1	Pork, rice, tomato, radish, komatsuna, corn, wood ear mushroom, olive oil
Wet food for dogs 2	Meats (chicken, lamb, chicken breast, etc.), vitamins, minerals, polysaccharide, phosphate (Na), food color (titanium dioxide), EDTA-Ca/Na
Formed jerky for dogs 1	Cereals, meats [beef, cartilage (including collagen), etc.], vegetables (carrots, pumpkin, etc.), dietary fiber, lactic acid bacteria, thickening stabilizer (glycerin), preservative (potassium sorbate), food colors (red 40, yellow 4)
Formed jerky for dogs 2	Beef liver, beef tongue
Formed jerky for dogs 3	Meats (chicken, beef), rice bran, modified starch, wheat flour, sucrose, salt, propylene glycol, stabilizer (sorbitol), antioxidant (sodium erythorbate), preservatives (sodium dehydroacetate, potassium sorbate), color former (sodium nitrite), pH adjuster, food colors (titanium dioxide, red 106)
Formed jerky for dogs 4	Meats (chicken, beef), defatted soybeans, wheat flour, wheat protein, D-sorbitol, glycerin, sodium lactate, minerals (Ca, P), salt, phosphates (Na, K), seasonings, preservative (sorbic acid), antioxidants (extracted vitamin E, sodium vitamin C), fragrance, color former (sodium nitrite), food color (red 40)

Table 1 Ingredients list of pet foods (continued)

Pet food types	Ingredients
Dried jerky for dogs (hard type) 1	Chicken fillet, starch, powdered egg white, trehalose, minerals (sodium, calcium), phosphate (Na)
Dried jerky for dogs (hard type) 2	Chicken breast
Dried jerky for dogs (hard type) 3	Horse lung
Dried jerky for dogs (hard type) 4	Venison
Dried jerky for dogs and cats (hard type) 1	Sika deer
Dried jerky for dogs and cats (hard type) 2	Chicken fillet
Dried jerky for dogs and cats (hard type) 3	Beef tongue skin
Dried jerky for dogs and cats (hard type) 4	Venison
Dried jerky for dogs (soft type) 1	Chicken fillet, glycerin, quality preservation agent (propylene glycol), sodium hexametaphosphate, preservatives (potassium sorbate, sodium tehydroacetate), salt, antioxidant (sodium erythorbate), sodium polyphosphate, color former (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs (soft type) 2	Chicken fillet, thickening stabilizers (glycerin, sorbitol), sodium lactate, pH adjuster, minerals (sodium chloride), preservative (potassium sorbate), antioxidant (sodium pyrosulfite), oligosaccharide, fish cartilage extract substance (containing chondroitin), glucosamine
Dried jerky for dogs (soft type) 3	Chicken, salt, glycerin (humectant), propylene glycol (quality preservation agent), color former (sodium nitrite)
Confectionery for dogs	Flour, sugar, starch, vegetable oil, skim milk powder, oligosaccharide, calcium carbonate, cheese
Milk powder for cats	Dried whey protein concentrate, dried whey powder, animal and vegetable oils, glucose, lecithin, taurine, starch, lactoferrin, probiotics (<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>), fragrance, silicon, vitamins (A, B ₁ hydrochloride, B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , calcium pantothenate, C, D ₃ , E, choline chloride, niacin, biotin, folic acid), minerals (dicalcium phosphate, calcium carbonate, ferrous glycine, ferrous sulfate, copper sulfate, manganese sulfate, sodium selenite, zinc oxide, cobalt sulfate)

2.2 試薬

- メタノールは LC-MS 用 (富士フイルム和光純薬製), 硝酸は Ultrapur-100 (関東化学製), 25 w/v%水酸化テトラメチルアンモニウム (以下「TMAH」という.) は超高純度分析用 (多摩化学工業製), 0.1 w/v%メチルオレンジ溶液は中和滴定用 (富士フイルム和光純薬製), 1-ブタンスルホン酸ナトリウムは東京化成工業製, マロン酸は特級 (富士フイルム和光純薬製) を用いた. 水は Milli-Q Integral 5 (Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた.
- 2 w/v% TMAH
25 w/v% TMAH 8 mL に水を加えて 100 mL とした.

3) 0.3 mol/L 硝酸

硝酸 1.92 mL に水を加えて 100 mL とした。

4) 溶離液 (10 mmol/L 1-ブタンスルホン酸ナトリウム・4 mmol/L マロン酸・4 mmol/L TMAH・0.05 %メタノール溶液)

1-ブタンスルホン酸ナトリウム 1.602 g, マロン酸 0.416 g, 25 w/v% THAH 1.458 g を水に溶かし, メタノール 0.5 mL を加えて, 硝酸で pH 3.0 (2.95~3.04) に調整した後, 更に水を加えて 1 L とした。

5) As (III) 標準液

砒素 (III) 標準液 (富士フィルム和光純薬製, 保証値 1001 mg/L) 1 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れ, 標線まで水を加えて As (III) 標準液を調製した (この液 1 mL は, As (III) として 100 µg 含有)。

6) As (V) 標準液

砒素 (V) 標準液 (メルク製, 保証値 1002 mg/L) 1 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れ, 標線まで水を加えて As (V) 標準液を調製した (この液 1 mL は, As (V) として 100 µg 含有)。

7) 砒素混合標準原液

As (III) 標準液及び As (V) 標準液各 0.5 mL を正確に 50 mL の全量フラスコに入れ, 標線まで水を加えて砒素混合標準原液を調製した (この液 1 mL は, As (III) 及び As (V) をそれぞれ As として 1 µg 含有)。

8) 砒素混合標準液

溶離液 25 mL を入れた 50 mL の全量フラスコに, 砒素混合標準液 50, 125, 250, 375 又は 500 µL をそれぞれ正確に入れ, 0.1 w/v%メチルオレンジ水溶液数滴及び 2 w/v% TMAH 5 mL を加えて 0.3 mol/L 硝酸で pH を約 3 (オレンジ色) に調整した後, 更に標線まで水を加え, 1 mL 中に As としてそれぞれ 1, 2.5, 5, 7.5 及び 10 ng を含有する砒素混合標準液を調製した。

同時に砒素混合標準液を加えずに同様に操作し, 濃度 0 ng/mL の標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

1) 粉砕機 :

粉砕機 1 (ドライ製品, セミドライ製品, 菓子類及び一部のジャーキー用) :

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

粉砕機 2 (ジャーキー用) :

GM 200 Retsch 製 (使用時回転数 10000 rpm)

2) フードプロセッサー : MK-K58 パナソニック製

3) 遠心沈殿管 : 15 mL Metal free centrifuge Labcon 製

4) スポイト : エコノスポイト 3 mL サンプラテック製

5) メンブランフィルター : Millex-HP Merck Millipore 製 (孔径 0.45 µm, 直径 33 mm, PES)

6) バイアル瓶 : 2 mL Target DP vial, PP Thermo Fisher Scientific 製

7) LC-ICP-MS :

液体クロマトグラフ部 : UltiMate 3000 Thermo Fisher Scientific 製

誘導結合プラズマ質量分析計部 : iCAP Qc Thermo Fisher Scientific 製

2.4 定量方法

コリジョンガス未使用時の誘導結合プラズマ質量分析計部の測定条件以外は、愛玩動物用飼料等の検査法第4章4.1に従った。

1) 抽出

分析試料 0.5 g を量って 15 mL の遠心沈殿管に入れ、2 w/v% TMAH 5 mL を加えて振り混ぜた。これをドライブロックバスを用いて 100 °C で 2 時間加熱して抽出した後放冷した。

抽出液に水 5 mL を加えて振り混ぜた後、2100×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を 50 mL の全量フラスコに入れた。遠心沈殿管の残さに水 12.5 mL を加えて振り混ぜた後、2100×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を先の全量フラスコに加える操作を 2 回繰り返した。先の全量フラスコに 0.1 w/v%メチルオレンジ溶液数滴を加え、0.3 mol/L 硝酸で pH を約 3 (オレンジ色) に調整した後、標線まで水を加えた。この液の一定量を 7380×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をメンブランフィルターでろ過し、LC-ICP-MS による測定に供する試料溶液とした。

同時に試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製した。

2) LC-ICP-MS による測定

試料溶液、空試験溶液及び各砒素混合標準液各 20 µL を LC-ICP-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。測定条件は Table 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operating conditions of LC

Column	CAPCELL PAK C18 MG (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 µm), Osaka Soda
Mobile phase	10 mmol/L sodium 1-butanefulfonate / 4 mmol/L malonic acid / 4 mmol/L TMAH / 0.05% methanol solution (pH 3.0)
Flow rate	0.75 mL/min
Column temperature	30 °C

Table 3-1 Operating conditions of ICP-MS with collision gas (Gas conditions are an example.)

Nebulizer gas	Ar (1.10 L/min)
Plasma gas	Ar (14.0 L/min)
Auxiliary gas	Ar (0.80 L/min)
Collision gas	He (4.3 L/min)
High-frequency output	1550 W
Monitor ion	<i>m/z</i> 75

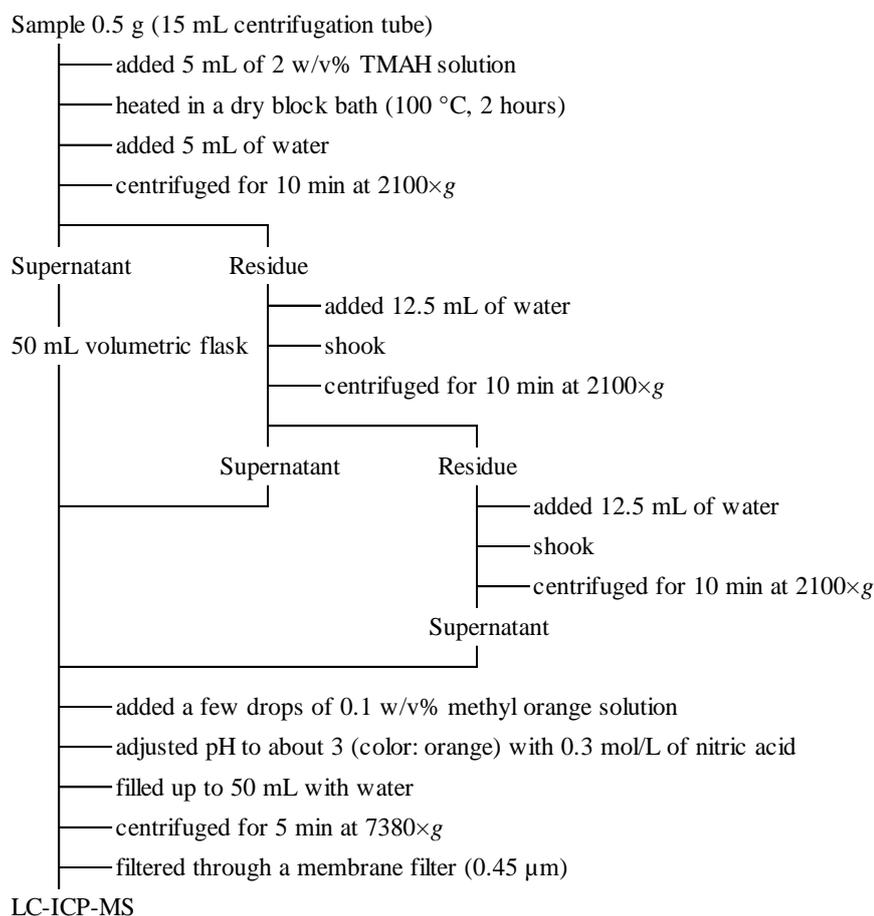
Table 3-2 Operating conditions of ICP-MS without collision gas (Gas conditions are an example.)

Nebulizer gas	Ar (1.10 L/min)
Plasma gas	Ar (14.0 L/min)
Auxiliary gas	Ar (0.80 L/min)
High-frequency output	1550 W
Monitor ion	<i>m/z</i> 75

3) 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 As (III) 及び As (V) を算出した。なお、空試験溶液について、ピークが認められた場合は結果を差し引いた。

定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for inorganic arsenic in pet food

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 8)により調製した各標準液 20 µL をコリジョンガス未使用で LC-ICP-MS に注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した。得られた検量線は Fig. 2-1 及び Fig. 2-2 のとおりであり、1~10 ng/mL (注入量として 0.02~0.2 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、As (III) 及び As (V) として 0.1~1 mg/kg を含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の濃度範囲に相当する。

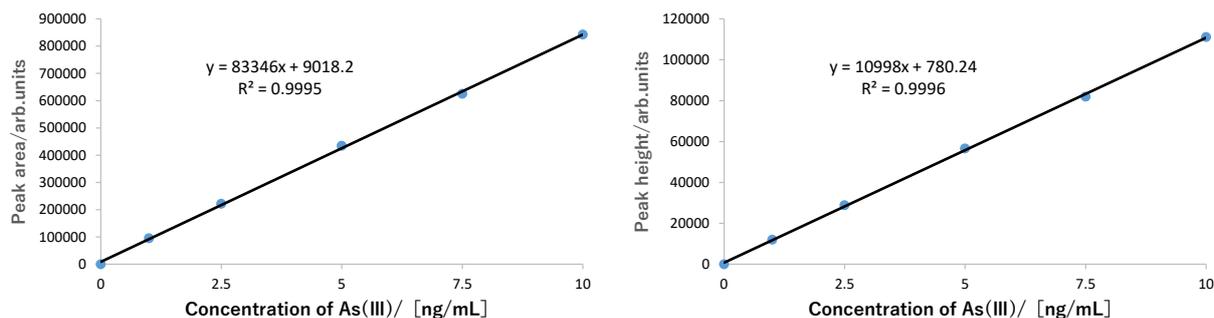


Fig. 2-1 Calibration curves of arsenic (III) oxide (As(III)) by peak area (left) and peak height (right)

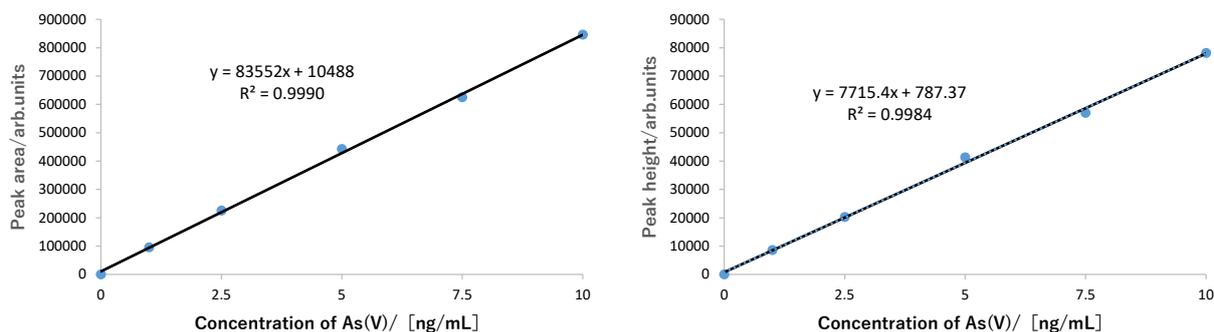


Fig. 2-2 Calibration curves of arsenic acid (As(V)) by peak area (left) and peak height (right)

3.2 妨害物質の検討

Table 1 の愛玩動物用飼料を用い、2.4 の 1)により調製した試料溶液をコリジョンガス未使用で LC-ICP-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、セミドライ製品（犬用）、ウェット製品（犬用）2 及び成型ジャーキー（犬用）3 について As (V) と同じ保持時間に検出下限以上のピークが認められた（含有量としてそれぞれ 0.057 mg/kg, 0.097 mg/kg 及び 0.18 mg/kg）。

そこで、検出された試料について、収載法に従いコリジョンガスを使用して As (V) の測定を行った。その結果、同様にピークが認められ、それぞれの含有量はセミドライ製品（犬用）で 0.056 mg/kg, ウェット製品（犬用）2 で 0.10 mg/kg, 成型ジャーキー（犬用）3 で 0.19 mg/kg であった。コリジョンガス未使用時と使用時で結果に大きな差が認められなかったことから、同じ保持時間に認められたピークは自然汚染の As (V) のピークと考えられ、いずれの試料においても各砒素の定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

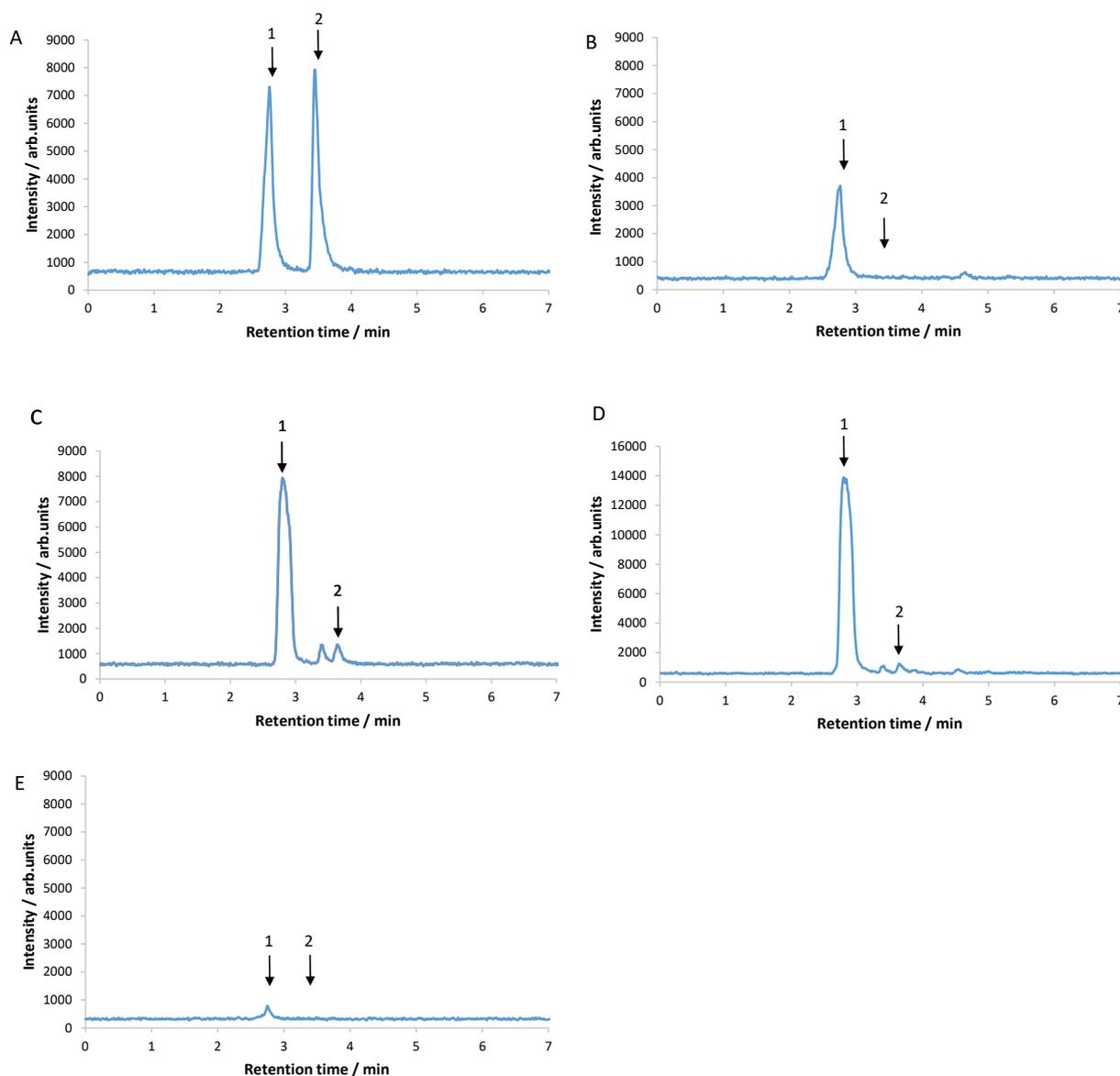


Fig. 3 Typical selected ion monitoring chromatograms of standard and blank sample solutions (Arrows indicate the retention times of 1: As(V), 2: As(III))

A: Standard solution (1 ng/mL as each As)

B~I: Blank or naturally contaminated sample solutions (B: semi-dry food for dogs, C: wet food for dogs, D: formed jerky for dogs, E: confectionery for dogs)

3.3 マトリックス効果の確認

2.4の1)により調製したTable 1のドライ製品(犬用), セミドライ製品(犬用), ウェット製品(犬用) 1, 成型ジャーキー(犬用) 1, 素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用) 1, 素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用) 1, 菓子類(犬用)及び粉ミルク(猫用)のブランク試料溶液にAs(III)及びAs(V)をそれぞれ2 mg/kg相当量(最終試料溶液中で20 ng/mL相当量)を添加した各マトリックス標準液について, 2.2の8)に従って調製した同濃度の各砒素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, 素材乾燥ジャーキーのAs(III)以外については試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。

素材乾燥ジャーキーの As (III) についてイオン化を抑制するマトリックス効果が認められたため、これを低減するため試料溶液を超純水で 2 倍希釈して測定した。併せて、イオン化抑制がコリジョンガスの有無によるものであるかを確認するため、コリジョンガスを使用し測定を行った。その結果、コリジョンガスを使用した場合においてもイオン化を抑制するマトリックス効果が認められたが、コリジョンガスの使用の有無にかかわらず、試料溶液を希釈することによりマトリックス効果による影響を受けずに測定が可能であった。

なお、各マトリックス標準液のピーク面積は各試料ブランクの平均ピーク面積を差し引いて算出した。

Table 4 Matrix effect study

Pet food types	Matrix effect ^{a)} (%)			
	Helium (collision gas) not used		Helium (collision gas) used	
	As (III)	As (V)	As (III)	As (V)
Dry food for dogs	99.2	103	—	—
Semi-dry food for dogs	102	104	—	—
Wet food for dogs 1	89.7	88.4	—	—
Formed jerky for dogs 1	99.0	101	—	—
Dried jerky for dogs (hard type) 1	78.7	89.5	89.1	85.3
	95.0 ^{b)}	91.3 ^{b)}	99.1 ^{b)}	92.9 ^{b)}
Dried jerky for dogs (soft type) 1	73.8	88.7	79.7	82.2
	93.0 ^{b)}	94.4 ^{b)}	95.2 ^{b)}	91.6 ^{b)}
Confectionery for dogs	102	107	—	—
Milk powder for cats	97.0	107	—	—

—: Not tested

$n = 3$

a) Ratio of peak area of arsenic in the presence of matrix (as 20 ng/mL: 2 mg/kg in sample) to that in the absence of matrix

b) Double dilution

4 まとめ

愛玩動物用飼料中の無機砒素の LC-ICP-MS による分析法について、コリジョンガスを用いない方法を検討したところ、以下の結果が得られ、測定が可能であると考えられた。なお、素材乾燥ジャーキー中の As (III) については、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 2 倍希釈することで測定が可能であった。

- 1) 検量線はそれぞれ 1~10 ng/mL (注入量として 0.02~0.2 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、As (III) 及び As (V) として 0.1~1 mg/kg を含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の濃度範囲に相当する。
- 2) 愛玩動物用飼料について、コリジョンガス未使用時に得られた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。

- 3) コリジョンガス未使用時に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、試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。

文 献

- 1) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，農林水産省令・環境省令第 2 号（2021）
- 2) 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).

精度管理**1 令和5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 2023)**

山上 陽平^{*1,2}, 平田 絵理香^{*3}, 吉村 哲史^{*4},
小堀 拓也^{*5}, 佐藤 琢実^{*6}, 山下 奈々^{*7}

1 目 的

飼料・飼料添加物製造等業者，飼料検査指導機関，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・・・幼すう育成用配合飼料

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

※ B 試料（魚粉）の分析については，令和5年度は実施していない。

3 共通試料の調製**3.1 調製年月日**

令和5年6月15日及び6月16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1mmのスクリーンを装着した粉砕器で粉砕した幼すう育成用配合飼料約100kg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20g）を袋に入れ，1袋当たり約180g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 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

*3 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 農林水産省消費・安全局

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

*5 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

*6 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

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

2) 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（総量約 100 kg）を用い、A 試料と同様に 1 袋当たり約 180 g 入りの試料 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	25	コーングルテンフィード	10
小麦	20	ビートパルプ	7
マイロ	10	チキンミール	3
大豆油かす	10	玄米	3
ごま油かす	10	炭酸カルシウム	2

3) D 試料

ほ乳期子豚育成用プレミックス約 80 kg を用い、A 試料と同様に 1 袋当たり約 180 g 入りの試料 340 個を調製した。

4 分析鑑定項目及び実施要領

4.1 分析鑑定項目

A 試料・・・水分，粗たん白質，粗脂肪，粗繊維，粗灰分，カルシウム，リン及びサリノマイシンナトリウム

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 5 年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領」（110 ページ）による。

5 共通試料の均質性確認

A 試料では粗たん白質及び粗灰分，D 試料では銅及び亜鉛を分析し，Thompson らの harmonized protocol¹⁾に基づき，各試料の均質性を確認した。

ランダムに抜き取った 10 袋で各 2 点併行分析した結果を表 3 に，また，その結果に基づく一元配置の分散分析結果を表 4 に示した。

いずれの試料においても，分散比 F_0 は F 境界値を下回り，有意水準 5 %において試料間に有意な差は認められず，試料の均質性に問題はないと判断した。

表3 A及びD試料の分析結果

試料 No.	A試料				D試料			
	粗たん白質 (%)		粗灰分 (%)		銅 (g/kg)		亜鉛 (g/kg)	
	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2
1	19.89	19.91	4.84	4.87	25.08	24.85	22.45	22.13
2	20.13	20.42	4.90	4.85	24.98	24.93	22.44	22.61
3	20.28	20.48	4.78	4.80	24.65	25.38	21.22	22.92
4	19.81	20.54	4.88	4.86	24.75	24.49	20.63	20.95
5	20.53	20.04	4.83	4.87	24.75	24.60	21.23	20.80
6	20.24	20.06	4.83	4.88	24.68	24.50	20.40	22.02
7	20.32	20.31	4.87	4.84	24.53	24.42	21.49	21.19
8	20.01	20.20	4.83	4.82	24.75	24.86	22.14	21.66
9	19.79	20.16	4.85	4.90	24.71	25.02	22.27	22.64
10	20.54	20.48	4.83	4.87	24.75	24.75	22.21	22.27

表4 A及びD試料の分散分析結果

成分名	要因	偏差平方和 S	自由度 ϕ	不偏分散 $V=S/\phi$	分散比 $F_0=V_A/V_E$	F境界値 $F(\alpha=0.05)$
A試料	試料間 A	0.6078	9	0.0675	1.23	3.02
	粗たん白質 分析誤差 E	0.5485	10	0.0548		
	総計 T	1.1562	19			
	粗灰分 A	0.0119	9	0.0013	1.97	3.02
	粗灰分 E	0.0067	10	0.0007		
	粗灰分 T	0.0186	19			
D試料	銅 A	0.5922	9	0.0658	1.56	3.02
	銅 E	0.4207	10	0.0421		
	銅 T	1.0129	19			
	亜鉛 A	7.3139	9	0.8127	2.54	3.02
	亜鉛 E	3.2020	10	0.3202		
	亜鉛 T	10.5159	19			

6 参加試験室

6.1 総数 204

- うち 飼料製造業者関係…133
- 飼料添加物製造業者関係…13
- 民間分析機関等…17
- 飼料検査指導機関…41

6.2 試料別参加試験室数

- A 試料…202
- C 試料…107
- D 試料…81

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 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 及び 7 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 8 及び 9 に示した。

表5 A及びD試料の分析成績(1)

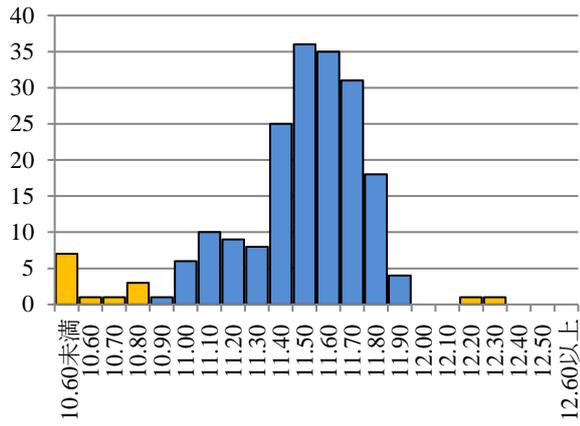
試験 番号	A試料		水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		SL(管理分析法)		SL(飼料分析基準)		銅		重鉛		クエン酸セランテル	
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/100g)	No. z-score	分析値 (g/100g)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score														
1	11.82	1 1.16	19.96	4 -1.83	4.52	1 1.85	3.53	2 2.36	5.23	1 1.88	0.863	2 0.07	0.596	1 -0.12	0.863	2 0.07	47.7	3 -0.54	47.7	3 -0.54	25.09	1 0.15	21.37	1 -0.81	4.3	1 -1.98
5	11.36	1 -0.89	20.33	3 -0.04	4.20	2 -0.57	3.23	3 1.41	5.14	1 1.11	0.853	2 -0.14	0.588	1 -0.63	0.853	2 -0.14	48.4	3 0.00	48.4	3 0.00	25.53	1 0.86	22.26	1 0.19	5.1	1 0.28
6			20.48	3 0.67	4.10	2 -1.33	2.94	3 0.49			0.864	1 0.09	0.586	1 -0.76	0.864	1 0.09										
8	11.43	1 -0.58	20.17	3 -0.81	4.03	2 -1.87	2.46	2 -1.03	5.03	1 0.17	0.939	2 1.77	0.572	1 -1.65	0.939	2 1.77					25.09	1 0.15	21.37	1 -0.81		
11	11.08	1 -2.15	20.55	3 1.01	4.03	2 -1.87	4.93	1 -0.68	4.93	1 -0.68	0.844	2 -0.34	0.598	1 0.00	0.844	2 -0.34					25.53	1 0.86	22.26	1 0.19		
12	11.55	1 -0.04	20.28	3 -0.28	4.27	1 -0.04	4.99	1 -0.17	4.99	1 -0.17	0.850	2 -0.21	0.610	1 0.76	0.850	2 -0.21					25.14	1 0.22	20.80	1 -1.45	4.7	1 -0.85
13	11.57	1 0.04									0.844	2 -0.34	0.598	1 0.00	0.844	2 -0.34										
14	11.74	1 0.80	20.43	3 0.43	4.34	1 0.48	3.05	2 0.84	5.07	1 0.51	0.850	2 -0.21	0.610	1 0.76	0.850	2 -0.21										
15	11.42	1 -0.62	20.48	3 0.67					5.03	1 0.17	0.830	2 -0.66	0.601	1 0.19	0.830	2 -0.66										
18	11.28	1 -1.25	20.73	3 1.87					5.32	1 2.65	0.849	2 -0.23	0.602	1 0.25	0.849	2 -0.23										
19	11.89	1 1.48	20.69	3 1.68	4.17	2 -0.80	2.77	3 -0.04	4.97	1 -0.34	0.836	2 -0.52	0.614	1 1.01	0.836	2 -0.52	47.1	3 -1.01	47.1	3 -1.01	25.53	1 0.86	22.53	2 0.49		
20	10.88	1 -3.05			4.23	1 -0.35	2.40	2 -1.22	5.38	1 3.16	0.964	2 2.33	0.600	2 0.12	0.964	2 2.33										
21			20.50	1 0.77	4.22	1 -0.42	2.67	1 -0.36	5.07	1 0.51	0.877	1 0.39	0.583	1 -0.95	0.877	1 0.39										
23	11.28	1 -1.25	20.39	3 0.24	4.47	1 1.47	2.59	3 -0.61	5.30	1 2.48	0.883	2 0.52	0.621	1 1.46	0.883	2 0.52	48.9	1 -1.08	48.9	1 -1.08	23.09	1 -3.12	20.00	1 -2.35		
25	10.28	2 -5.25	20.89	2 2.64					4.91	1 -0.83	1.005	2 3.25	1.718	1 7.11	1.005	2 3.25										
27	11.63	1 0.31	20.38	3 0.19	4.04	1 -1.79	3.05	3 0.84	4.82	1 -1.62	0.873	2 0.30	0.594	1 -0.25	0.873	2 0.30	50.0	1 -0.62	50.0	1 -0.62	24.76	1 -0.39	21.61	1 -0.53		
30	11.63	1 0.31	20.38	3 0.19	4.23	1 -0.35	2.77	3 -0.04	4.92	1 -0.77	0.873	2 0.30	0.594	1 -0.25	0.873	2 0.30										
33	11.80	1 1.07	20.45	3 0.52	4.26	1 -0.12	2.74	2 -0.14	4.98	1 -0.25	0.750	2 -2.45	0.600	1 0.12	0.750	2 -2.45										
35	11.56	2 0.00	20.48	3 0.67					4.92	2 -0.77	0.750	2 -2.45	0.600	1 0.12	0.750	2 -2.45										
37	11.53	1 -0.13	20.75	3 1.97	4.14	2 -1.03	3.70	2 2.90	5.02	1 0.08	0.750	2 -2.45	0.600	1 0.12	0.750	2 -2.45										
38	11.62	1 0.26			4.50	2 1.70	2.27	2 -1.63	5.03	1 0.17	0.821	2 -0.86	0.571	1 -1.71	0.821	2 -0.86										
39	11.12	1 -1.97			4.10	2 -1.33	2.75	4 -0.11	5.05	1 0.34	1.214	1 7.93	0.573	1 -1.58	1.214	1 7.93										
40	10.48	1 -4.85	20.42	3 0.38	4.09	2 -1.41	2.75	4 -0.11	4.84	1 -1.45	0.869	2 0.21	0.614	1 1.01	0.869	2 0.21										
41	11.52	1 -0.17	20.41	3 0.33	4.30	2 0.18	2.75	4 -0.11	4.90	1 -0.94	0.804	2 -1.24	0.597	1 -0.06	0.804	2 -1.24										
43	11.56	1 0.00	20.49	3 0.72	4.30	2 0.18	2.75	4 -0.11	5.05	1 0.34	0.804	2 -1.24	0.597	1 -0.06	0.804	2 -1.24										
43					4.23	2 -0.35	2.92	2 0.42	4.79	1 -1.88	0.800	2 -1.33	0.590	1 -0.50	0.800	2 -1.33										
45	11.44	1 -0.53	20.48	3 0.67	4.31	2 0.25			4.85	1 -1.37																
46			20.25	4 -0.43	4.31	2 0.25																				
46			20.37	5 0.14	4.43	3 1.16																				
49	11.66	1 0.46	20.34	3 0.01	4.24	2 -0.30	2.84	2 0.18	5.03	1 0.14	0.821	2 -0.86	0.571	1 -1.71	0.821	2 -0.86										
50	11.70	1 0.62	20.27	4 -0.33	4.50	2 1.70																				
51	11.74	1 0.80	20.69	3 1.68					5.03	1 0.17	0.852	2 -0.16	0.605	1 0.44	0.852	2 -0.16										
53	11.37	1 -0.85	20.34	3 0.00	4.03	2 -1.87			4.90	1 -0.94	0.852	2 -0.16	0.627	1 1.84	0.852	2 -0.16										
56	11.89	1 1.48							4.87	1 -1.19																
57	11.60	1 0.17	20.49	3 0.72					4.81	1 -1.71																
60	11.54	1 -0.08	20.24	3 -0.48	4.35	2 0.56			5.17	1 1.37																
62	11.87	1 1.39	20.43	3 0.44					5.01	1 0.00	0.897	2 0.82	0.623	1 1.58	0.897	2 0.82										
63	11.88	1 1.43	20.13	1 -1.01	4.30	1 0.18	2.18	2 -1.92	4.92	1 -0.77	0.782	2 -1.73	0.581	1 -1.07	0.782	2 -1.73										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										
63																										

表5 A及びD試料の分析成績 (4)

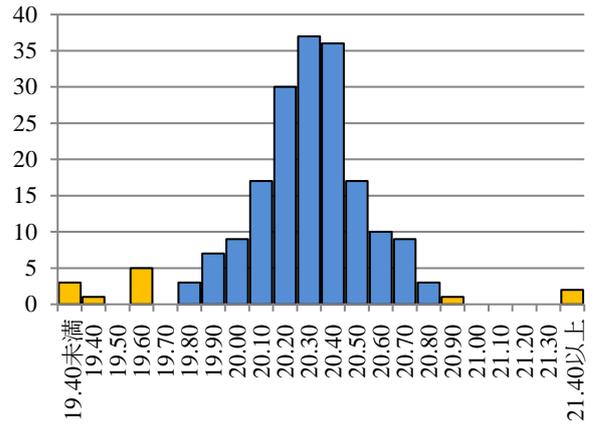
試験 番号	A試料		水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		SL(管理分析法)		SL(飼料分析基準)		銅		重鉛		クエン酸セランテル	
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score																						
184	11.19	-1.66	20.32	3 -0.09	4.13	2 -1.11	4.86	1 -1.28	4.61	3 5.79	4.87	1 -1.19	0.825	2 -0.78	0.593	1 -0.31	49.4	1 -0.86	21.87	1 -5.12	24.21	1 2.38	5.1	1 0.28		
186	11.48	-0.35	20.56	3 1.05	4.30	2 0.18	5.09	1 0.68	4.79	1 -1.88	4.79	1 -1.88	0.825	3 -0.77	0.629	2 1.96	53.0	1 0.59	21.87	1 -5.12	24.21	1 2.38	5.1	1 0.28		
187	11.07	-2.20	20.46	3 0.57	4.30	2 0.18	4.61	3 5.79	4.79	1 -1.88	4.79	1 -1.88	0.825	2 -0.78	0.629	2 1.96	53.0	1 0.59	21.87	1 -5.12	24.21	1 2.38	5.1	1 0.28		
188	11.50	-0.26	20.76	3 2.02	4.48	1 1.54	4.48	1 1.54	2.94	1 0.49	4.94	1 -0.59	0.825	3 -0.77	0.629	2 1.96	53.0	1 0.59	21.87	1 -5.12	24.21	1 2.38	5.1	1 0.28		
192	11.54	-0.08	20.98	4 3.08	4.44	1 1.24	4.44	1 1.24	2.27	-1.63	5.05	1 0.34	0.827	2 -0.72	0.583	1 -0.95	52.8	4	24.87	1 -0.21	20.63	1 -1.64	5.1	1 0.28		
195	11.50	-0.26	20.06	2 -1.34	4.28	1 0.02	3.00	2 0.68	5.07	1 0.51	4.93	1 -0.68	0.864	1 0.09	0.572	1 -1.65	52.8	4	24.87	1 -0.21	20.63	1 -1.64	5.1	1 0.28		
196	11.75	1 0.85	20.30	3 -0.19	4.28	1 0.02	3.00	2 0.68	2.51	2 -0.87	4.93	1 -0.68	0.864	1 0.09	0.572	1 -1.65	52.8	4	24.87	1 -0.21	20.63	1 -1.64	5.1	1 0.28		
198	11.87	1 1.39	20.21	2 -0.62	4.22	1 0.42	3.79	2 -3.69	3.02	3 0.74	5.18	1 1.41	0.700	2 -3.57	0.570	1 -1.77	52.8	4	24.87	1 -0.21	20.63	1 -1.64	5.1	1 0.28		
199	11.60	1 0.17	20.12	2 -1.05	4.22	1 0.42	3.79	2 -3.69	3.02	3 0.74	5.00	1 -0.08	0.859	2 -0.01	0.570	1 -1.77	52.8	4	24.87	1 -0.21	20.63	1 -1.64	5.1	1 0.28		
201	10.85	-3.19	20.22	2 -0.57	3.79	2 -3.69	3.02	3 0.74	5.00	1 -0.08	5.00	1 -0.08	0.859	2 -0.01	0.570	1 -1.77	52.8	4	24.87	1 -0.21	20.63	1 -1.64	5.1	1 0.28		
202			20.62	2 1.34	4.60	2 2.46	5.07	1 0.51	5.07	1 0.51	5.07	1 0.51	0.740	2 -2.67	0.562	1 -2.30	53.5	1 0.79	24.80	1 -0.32	21.90	1 -0.21	4.4	1 -1.84		
203	11.76	1 0.89	20.10	3 -1.15	4.16	2 -0.88	4.85	1 -1.37	4.85	1 -1.37	4.85	1 -1.37	0.901	2 0.93	0.562	1 -2.30	53.5	1 0.79	24.80	1 -0.32	21.90	1 -0.21	4.4	1 -1.84		
204	10.84	-3.23	19.98	3 -1.73	4.16	2 -0.88	4.85	1 -1.37	5.00	1 -0.07	5.00	1 -0.07	0.901	2 0.93	0.562	1 -2.30	53.5	1 0.79	24.80	1 -0.32	21.90	1 -0.21	4.4	1 -1.84		
205	11.77	1 0.94	20.88	3 2.60	4.44	1 1.24	4.44	1 1.24	2.70	2 -0.26	4.44	1 1.24	0.866	2 0.14	0.604	1 0.38	57.7	1 2.50	25.29	1 0.47	22.67	1 0.65	5.5	1 1.42		
207	11.76	1 0.89	20.71	3 1.78	4.10	2 -1.33	5.18	1 1.45	5.02	1 0.08	5.02	1 0.08	0.866	2 0.14	0.604	1 0.38	57.7	1 2.50	25.29	1 0.47	22.67	1 0.65	5.5	1 1.42		
208	10.26	-5.84	20.04	1 -1.44	3.83	1 -3.39	4.86	1 -1.28	4.81	1 -1.71	4.81	1 -1.71	0.855	2 -0.10	0.588	1 -0.63	57.7	1 2.50	24.86	1 -0.22	20.69	1 -1.57	5.4	1 1.09		
209	11.64	1 0.35	20.18	3 -0.77	4.31	2 0.25	4.87	1 -1.19	4.94	1 -0.59	4.94	1 -0.59	0.855	2 -0.10	0.588	1 -0.63	57.7	1 2.50	24.86	1 -0.22	20.69	1 -1.57	5.4	1 1.09		
211	11.82	1 1.16	20.26	1 -0.38	4.34	1 0.48	4.34	1 0.48	2.08	2 -2.23	4.90	1 -0.94	0.867	2 0.16	0.584	1 -0.88	57.7	1 2.50	24.96	1 -0.06	21.84	1 -0.28	5.4	1 1.09		
212	11.72	1 0.69	20.32	3 -0.09	4.04	3 -1.78	5.10	1 0.75	2.80	3 0.04	5.10	1 0.75	0.846	2 -0.31	0.599	1 0.03	57.7	1 2.50	23.95	1 -1.71	21.24	1 -0.96	5.4	1 1.09		
213	11.69	1 0.58	20.37	3 0.14	4.18	2 -0.73	5.09	1 0.68	2.75	2 -0.11	5.09	1 0.68	0.904	2 0.99	0.575	1 -1.46	48.4	3 -0.03	23.95	1 -1.71	21.24	1 -0.96	5.4	1 1.09		
215	11.24	-1.45	20.21	3 -0.62	4.27	1 -0.02	3.33	2 -1.43	2.33	2 -1.43	5.14	1 1.08	0.837	2 -0.50	0.574	1 -1.50	48.4	3 -0.03	24.80	1 -0.32	21.90	1 -0.21	4.4	1 -1.84		
216	12.25	1 3.10	20.23	3 -0.52	4.16	2 -0.88	4.85	1 -1.37	4.85	1 -1.37	4.85	1 -1.37	0.901	2 0.93	0.562	1 -2.30	53.5	1 0.79	24.80	1 -0.32	21.90	1 -0.21	4.4	1 -1.84		
218	11.58	1 0.08	20.22	3 -0.58	4.48	2 1.54	5.00	1 -0.07	2.70	2 -0.26	5.00	1 -0.07	0.901	2 0.93	0.562	1 -2.30	53.5	1 0.79	24.80	1 -0.32	21.90	1 -0.21	4.4	1 -1.84		
222	11.80	1 0.07	20.75	3 1.97	4.25	2 -0.19	2.63	3 -0.49	5.02	1 0.08	5.02	1 0.08	0.866	2 0.14	0.604	1 0.38	57.7	1 2.50	25.29	1 0.47	22.67	1 0.65	5.5	1 1.42		
225	11.41	-0.67	20.44	3 0.48	4.17	1 -0.80	4.81	1 -1.71	4.81	1 -1.71	4.81	1 -1.71	0.855	2 -0.10	0.588	1 -0.63	57.7	1 2.50	24.86	1 -0.22	20.69	1 -1.57	5.4	1 1.09		
226	11.70	1 0.62	20.37	3 0.14	4.29	1 0.10	4.94	1 -0.59	2.79	4 0.01	4.94	1 -0.59	0.855	2 -0.10	0.588	1 -0.63	57.7	1 2.50	24.86	1 -0.22	20.69	1 -1.57	5.4	1 1.09		
227	11.51	-0.22	20.46	4 0.57	4.29	1 0.10	4.94	1 -0.59	2.32	4 -1.47	5.01	1 0.00	0.817	2 -0.95	0.610	1 0.76	57.7	1 2.50	24.86	1 -0.22	20.69	1 -1.57	5.4	1 1.09		
229	11.67	1 0.49	20.15	3 -0.91	4.58	2 2.30	3.12	3 1.06	3.12	3 1.06	5.16	1 1.28	0.830	2 -0.66	0.584	1 -0.88	57.7	1 2.50	25.02	1 0.03	20.69	1 -1.57	5.4	1 1.09		
230	11.78	1 0.98	20.28	3 -0.28	4.28	1 0.02	2.85	1 0.19	2.85	1 0.19	5.06	1 0.42	0.802	1 -1.28	0.591	1 -0.44	57.7	1 2.50	25.02	1 0.03	20.69	1 -1.57	5.4	1 1.09		
233	11.80	1 1.07	20.57	3 1.10	4.11	2 -1.26	3.01	3 0.71	3.01	3 0.71	4.97	1 -0.34	0.820	2 -0.88	0.586	1 -0.76	47.2	3 -0.94	25.36	1 0.58	20.28	1 -2.03	5.0	1 -0.05		
234	11.03	-2.38	20.08	4 -1.25	4.20	1 -0.57	5.10	1 0.77	5.10	1 0.77	5.10	1 0.77	0.820	2 -0.88	0.586	1 -0.76	47.2	3 -0.94	25.36	1 0.58	20.28	1 -2.03	5.0	1 -0.05		
236	11.45	-1.49	20.47	3 0.62	4.37	1 0.71	5.13	1 1.02	5.13	1 1.02	5.13	1 1.02	0.995	2 3.03	0.607	1 0.57	54.3	2 1.12	27.07	1 3.38	23.58	1 1.67	4.7	1 -0.85		
237	11.48	-1.35	20.26	2 -0.38	4.55	1 2.08	5.06	1 0.42	5.06	1 0.42	5.06	1 0.42	0.823	2 -0.81	0.604	1 0.38	54.3	2 1.12	27.07	1 3.38	23.58	1 1.67	4.7	1 -0.85		
238	11.67	1 0.49	20.07	3 -1.30	4.41	1 1.01	4.86	1 -1.28	4.86	1 -1.28	4.86	1 -1.28	0.823	2 -0.81	0.604	1 0.38	54.3	2 1.12	27.07	1 3.38	23.58	1 1.67	4.7	1 -0.85		
239	11.40	-0.71	20.56	4 1.05	4.41	1 1.01	5.03	1 0.17	5.03	1 0.17	5.03	1 0.17	0.865	2 0.11	0.602	1 0.25	48.5	1 -1.24	24.93	1 -0.11	21.37	1 -0.80	4.7	1 -0.85		
240	11.54	-1.08	20.62	3 1.34	4.30	2 0.14	5.01	0.04	3.06	3 0.87	5.01	0.04	0.865	2 0.11	0.602	1 0.25	48.5	1 -1.24	24.93	1 -0.11	21.37	1 -0.80	4.7	1 -0.85		
241	11.53	-1.13	20.42	3 0.38	4.16	1 -0.88	2.89	3 0.33	2.89	3 0.33	5.02	1 0.08	0.845	2 -0.32	0.588	1 -0.63	48.5	1 -1.24	24.93	1 -0.11	21.37	1 -0.80	4.7	1 -0.85		
242	10.95	-2.74	20.20	2 -0.67	4.20	1 -0.57	3.20	2 1.31	3.20	2 1.31	7.60	1 22.18	0.860	2 0.01	0.650	1 3.30	48.5	1 -1.24	24.93	1 -0.11	21.37	1 -0.80	4.7	1 -0.85		
246	11.99	1 1.93	20.15	2 -0.91	4.49	1 1.62	4.74	1 -2.31	4.74	1 -2.31	4.74	1 -2.31	0.894	2 0.77	0.601	1 0.19	48.5	1 -1.24	24.93	1 -0.11	21.37	1 -0.80	4.7	1 -0.85		
247	10.07	-6.70	19.88	2 -2.21	3.72	2 -4.22	2.96	3 0.55	2.96	3 0.55	5.17	1 1.37	0.894	2 0.77	0.601	1 0.19	48.5	1 -1.24	24.93	1 -0.11	21.37	1 -0.80	4.7	1 -0.85		

表5 A及JD試料の分析成績(5)

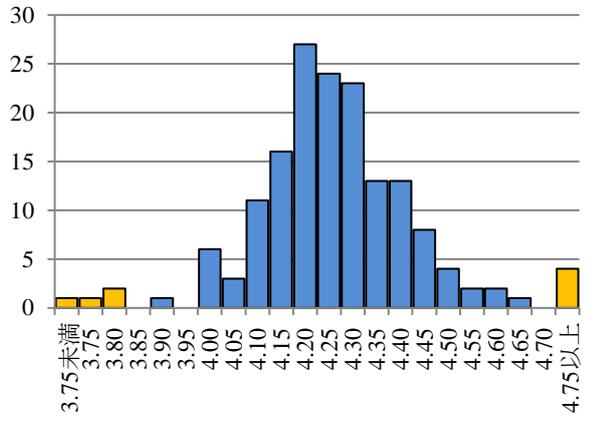
試験 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		SL(管理分析法)		SL(飼料分析基準)		銅		重鉛		クエン酸モリブデン	
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score																				
250	11.60	1 0.17	20.50	4 0.77	7.03	2 20.92	2.66	3 -0.39	4.94	1 -0.59	0.898	2 0.86	0.574	1 -1.52	24.59	1 -0.67	20.53	1 -1.75	24.59	1 -0.67	20.53	1 -1.75	4.9	1 -0.28
251	11.55	1 -0.04	20.53	3 0.91	3.91	2 -2.78	4.96	1 -0.42	4.96	1 -0.42	0.839	2 0.46	0.595	1 -0.19	24.69	1 -0.50	21.51	1 -0.65	24.69	1 -0.50	21.51	1 -0.65	4.9	1 -0.28
254	11.63	1 0.31	20.48	3 0.67	4.17	1 -0.80	3.02	4 0.74	5.05	1 0.34	0.839	2 0.46	0.595	1 -0.19	27.44	1 3.99	22.11	1 0.02	27.44	1 3.99	22.11	1 0.02	4.9	1 -0.28
255	11.70	1 0.62	20.16	3 -0.86	4.33	1 0.40	2.74	3 -0.14	5.07	1 0.51	0.839	2 -0.48	0.597	1 -0.06	25.26	1 0.42	21.76	1 -0.37	25.26	1 0.42	21.76	1 -0.37	4.9	1 -0.28
256	11.77	1 0.94	20.64	3 1.44	4.22	2 -0.42	2.49	2 -0.93	5.08	1 0.59	0.819	2 -0.90	0.572	1 -1.65	25.77	1 1.26	21.32	1 -0.86	25.77	1 1.26	21.32	1 -0.86	5.0	1 0.08
258	11.51	1 -0.22	20.64	3 1.44	4.22	2 -0.42	2.49	2 -0.93	5.08	1 0.59	0.819	2 -0.90	0.572	1 -1.65	25.77	1 1.26	21.32	1 -0.86	25.77	1 1.26	21.32	1 -0.86	5.0	1 0.08
259	10.58	1 -4.40	19.69	4 -3.13	4.52	2 1.85	2.76	2 -0.07	4.75	1 -2.22	0.824	1 -0.79	0.586	1 -0.76	20.50	1 -1.78	20.50	1 -1.78	20.50	1 -1.78	20.50	1 -1.78	5.0	1 0.08
261	11.57	1 0.04	20.32	3 -0.09	4.38	2 0.78	5.03	1 0.17	5.03	1 0.17	0.876	2 0.36	0.588	1 -0.63	20.50	1 -1.78	20.50	1 -1.78	20.50	1 -1.78	20.50	1 -1.78	5.0	1 0.08
262	11.48	1 -0.35	20.32	3 -0.09	4.38	2 0.78	5.03	1 0.17	5.03	1 0.17	0.876	2 0.36	0.588	1 -0.63	20.50	1 -1.78	20.50	1 -1.78	20.50	1 -1.78	20.50	1 -1.78	5.0	1 0.08
263	11.72	1 0.71	19.60	4 -3.56	4.40	1 0.94	4.40	1 0.94	4.40	1 0.94	0.876	2 0.36	0.588	1 -0.63	20.50	1 -1.78	20.50	1 -1.78	20.50	1 -1.78	20.50	1 -1.78	5.0	1 0.08
264	11.52	1 -0.17	20.27	3 -0.33	4.17	1 -0.80	3.17	2 1.22	5.02	1 0.08	0.810	1 -1.10	0.612	1 0.88	25.00	1 0.00	23.19	1 1.23	25.00	1 0.00	23.19	1 1.23	5.5	1 1.42
265	11.70	1 0.62	20.34	2 0.00	4.31	1 0.25	3.62	2 2.65	4.94	1 -0.59	0.780	2 -1.78	0.600	1 0.12	47.6	3 -0.61	5.2	1 0.65	47.6	3 -0.61	5.2	1 0.65	5.2	1 0.65
266	11.19	1 -1.66	20.34	2 0.00	4.31	1 0.25	3.62	2 2.65	4.94	1 -0.59	0.780	2 -1.78	0.600	1 0.12	47.6	3 -0.61	5.2	1 0.65	47.6	3 -0.61	5.2	1 0.65	5.2	1 0.65
267	11.85	1 1.30	20.57	3 1.10	4.20	1 -0.57	2.78	2 -0.01	5.07	1 0.51	0.813	1 -1.04	0.603	1 0.31	45.9	3 -1.96	21.95	1 -0.15	45.9	3 -1.96	21.95	1 -0.15	5.3	1 0.85
272	11.47	1 -0.40	20.31	3 -0.14	4.20	1 -0.57	2.40	2 -1.22	4.95	1 -0.51	0.849	1 -0.23	0.592	1 -0.38	49.1	3 0.54	21.95	1 -0.15	49.1	3 0.54	21.95	1 -0.15	4.8	1 -0.56
274	11.87	1 1.39	20.31	3 -0.14	4.20	1 -0.57	2.40	2 -1.22	4.95	1 -0.51	0.849	1 -0.23	0.592	1 -0.38	49.1	3 0.54	21.95	1 -0.15	49.1	3 0.54	21.95	1 -0.15	4.8	1 -0.56
277	10.76	1 -3.59	20.76	3 2.02	4.16	2 -0.88	3.68	2 2.84	5.74	1 0.25	0.843	2 -0.37	0.444	1 9.77	23.83	1 -1.91	21.95	1 -0.15	23.83	1 -1.91	21.95	1 -0.15	5.3	1 0.85
278	11.62	1 0.26	19.94	4 -1.92	4.40	1 0.94	3.68	2 2.84	5.74	1 0.25	0.843	2 -0.37	0.444	1 9.77	23.83	1 -1.91	21.95	1 -0.15	23.83	1 -1.91	21.95	1 -0.15	5.3	1 0.85
279	11.44	1 -0.53	19.84	2 -2.43	4.40	1 0.94	3.68	2 2.84	5.74	1 0.25	0.843	2 -0.37	0.444	1 9.77	23.83	1 -1.91	21.95	1 -0.15	23.83	1 -1.91	21.95	1 -0.15	5.3	1 0.85
281	11.36	1 -0.89	20.87	3 2.55	4.32	1 0.31	2.74	1 -0.14	4.87	1 -1.23	0.723	2 -3.06	0.588	1 -0.66	46.6	3 -1.41	24.36	1 -1.04	46.6	3 -1.41	24.36	1 -1.04	4.9	1 -0.22
282	11.23	1 -1.48	20.87	3 2.55	4.32	1 0.31	2.74	1 -0.14	4.87	1 -1.23	0.723	2 -3.06	0.588	1 -0.66	46.6	3 -1.41	24.36	1 -1.04	46.6	3 -1.41	24.36	1 -1.04	4.9	1 -0.22
283	12.30	1 3.32	19.91	2 -2.07	4.49	1 1.62	2.86	2 0.22	5.01	1 0.00	0.911	2 1.15	0.616	1 1.14	24.36	1 -1.04	22.31	1 0.24	24.36	1 -1.04	22.31	1 0.24	4.9	1 -0.22
284	11.12	1 -1.97	20.19	2 -0.72	4.38	1 0.78	2.86	2 0.22	5.01	1 0.00	0.911	2 1.15	0.616	1 1.14	24.36	1 -1.04	22.31	1 0.24	24.36	1 -1.04	22.31	1 0.24	4.9	1 -0.22
286	11.46	1 -0.44	20.78	3 2.11	4.16	2 -0.88	2.68	3 -0.33	5.01	1 0.00	0.834	2 -0.57	0.575	1 -1.46	25.59	1 0.96	21.12	1 -1.09	25.59	1 0.96	21.12	1 -1.09	5.0	1 0.00
290	11.73	1 0.76	20.47	3 0.62	4.40	2 0.94	2.68	3 -0.33	5.05	1 0.34	0.834	2 -0.57	0.575	1 -1.46	25.59	1 0.96	21.12	1 -1.09	25.59	1 0.96	21.12	1 -1.09	5.0	1 0.00
291	11.50	1 -0.26	20.23	3 -0.52	4.25	1 -0.19	4.78	1 -1.96	5.05	1 0.34	0.834	2 -0.57	0.575	1 -1.46	25.59	1 0.96	21.12	1 -1.09	25.59	1 0.96	21.12	1 -1.09	5.0	1 0.00
293	9.40	1 -9.72	18.18	2 -10.40	4.45	1 1.31	3.47	3 2.17	4.85	1 -1.34	0.813	1 -1.04	0.603	1 0.31	45.9	3 -1.96	21.95	1 -0.15	45.9	3 -1.96	21.95	1 -0.15	4.8	1 -0.56
294	11.53	1 -0.13	20.48	3 0.67	4.89	1 -1.02	4.89	1 -1.02	4.89	1 -1.02	0.813	1 -1.04	0.603	1 0.31	45.9	3 -1.96	21.95	1 -0.15	45.9	3 -1.96	21.95	1 -0.15	4.8	1 -0.56
302	11.86	1 1.34	26.13	4 27.89	4.20	1 -0.57	1.73	3 -3.34	5.23	1 1.88	0.966	2 2.38	0.597	1 -0.06	24.79	1 -0.34	21.29	1 -0.89	24.79	1 -0.34	21.29	1 -0.89	5.0	1 0.00
304	11.59	1 0.13	20.42	3 0.38	4.12	2 -1.18	3.04	2 0.80	4.80	1 -1.79	0.860	2 0.01	0.600	1 0.12	21.84	1 -5.17	25.10	1 3.38	21.84	1 -5.17	25.10	1 3.38	5.0	1 0.00
306	11.66	1 0.44	19.67	4 -3.22	4.32	2 0.33	3.39	3 1.92	5.03	1 0.17	0.860	2 0.01	0.600	1 0.12	21.84	1 -5.17	25.10	1 3.38	21.84	1 -5.17	25.10	1 3.38	5.0	1 0.00
307	11.53	1 -0.13	20.42	3 0.38	4.48	3 1.54	2.74	3 -0.14	5.11	1 0.85	0.770	1 -2.00	0.620	1 1.39	24.79	1 -0.34	21.29	1 -0.89	24.79	1 -0.34	21.29	1 -0.89	5.0	1 0.00
309	11.53	1 -0.13	20.42	3 0.38	4.48	3 1.54	2.74	3 -0.14	5.11	1 0.85	0.770	1 -2.00	0.620	1 1.39	24.79	1 -0.34	21.29	1 -0.89	24.79	1 -0.34	21.29	1 -0.89	5.0	1 0.00
310	11.71	1 0.67	20.55	3 1.01	4.27	2 -0.04	3.35	3 1.79	5.00	1 -0.08	0.866	2 0.14	0.590	1 -0.50	26.11	1 1.81	24.27	1 2.45	26.11	1 1.81	24.27	1 2.45	5.0	1 0.00
312	11.67	1 0.49	20.32	2 -0.09	4.20	1 -0.57	2.55	2 -0.74	5.05	1 0.34	0.861	2 0.03	0.602	1 0.25	24.97	1 -0.04	21.48	1 -0.68	24.97	1 -0.04	21.48	1 -0.68	5.0	1 0.00
314	11.13	1 -1.95	20.32	2 -0.09	4.20	1 -0.57	2.55	2 -0.74	5.05	1 0.34	0.861	2 0.03	0.602	1 0.25	24.97	1 -0.04	21.48	1 -0.68	24.97	1 -0.04	21.48	1 -0.68	5.0	1 0.00
315	11.77	1 0.94	20.43	3 0.43	4.13	2 -1.11	4.96	1 -0.42	4.96	1 -0.42	0.866	2 0.14	0.590	1 -0.50	26.11	1 1.81	24.27	1 2.45	26.11	1 1.81	24.27	1 2.45	5.0	1 0.00
316	11.83	1 1.21	20.44	3 0.48	4.13	2 -1.11	4.96	1 -0.42	4.96	1 -0.42	0.866	2 0.14	0.590	1 -0.50	26.11	1 1.81	24.27	1 2.45	26.11	1 1.81	24.27	1 2.45	5.0	1 0.00
317	11.48	1 -0.35	20.26	3 -0.38	4.31	1 0.25	3.35	3 1.79	5.00	1 -0.08	0.866	2 0.14	0.590	1 -0.50	26.11	1 1.81	24.27	1 2.45	26.11	1 1.81	24.27	1 2.45	5.0	1 0.00
318	11.56	1 0.00	20.64	3 1.44	4.31	1 0.25	3.35	3 1.79	5.00	1 -0.08	0.866	2 0.14	0.590	1 -0.50	26.11	1 1.81	24.27	1 2.45	26.11	1 1.81	24.27	1 2.45	5.0	1 0.00



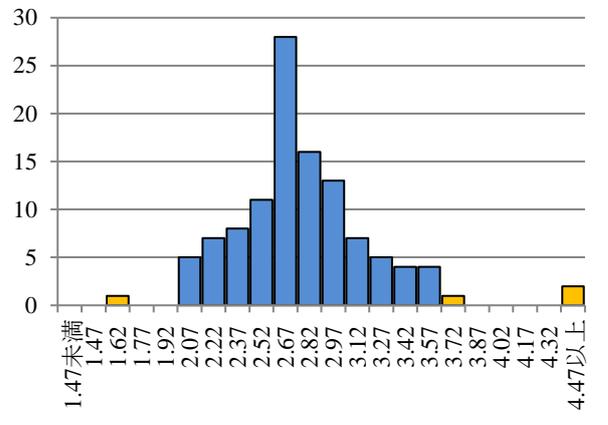
水分 (A 試料)



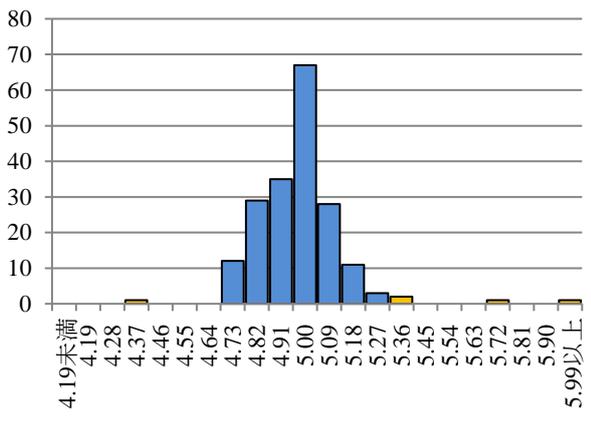
粗たん白質 (A 試料)



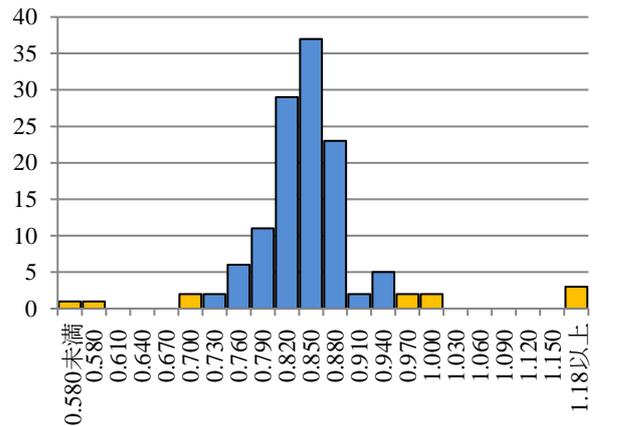
粗脂肪 (A 試料)



粗繊維 (A 試料)

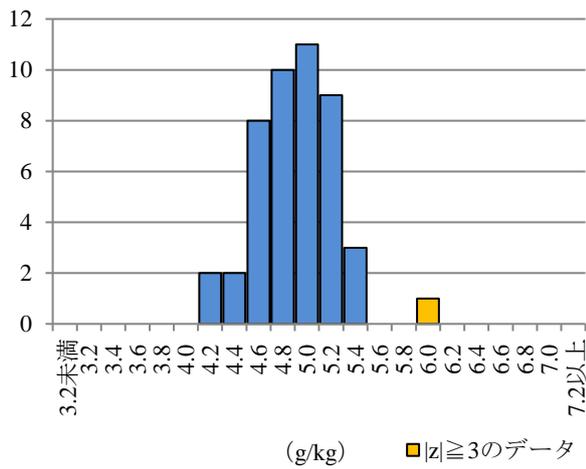
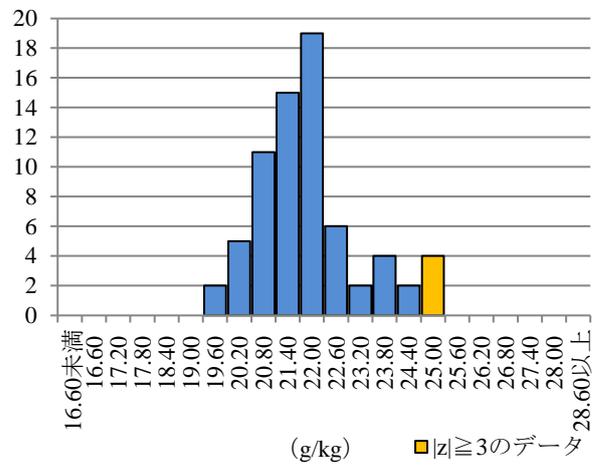
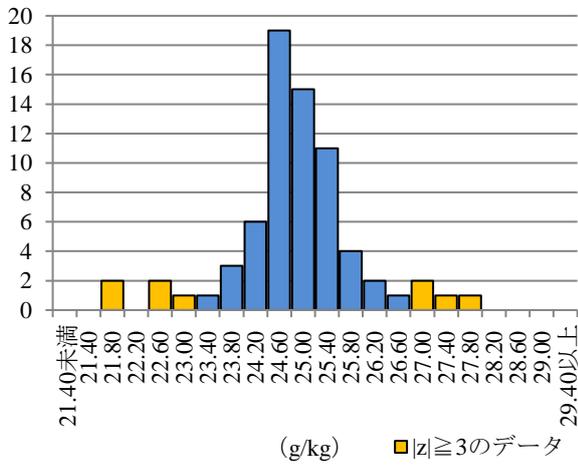
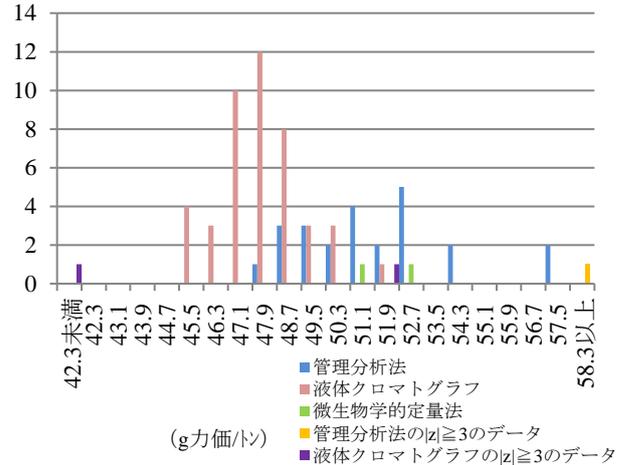
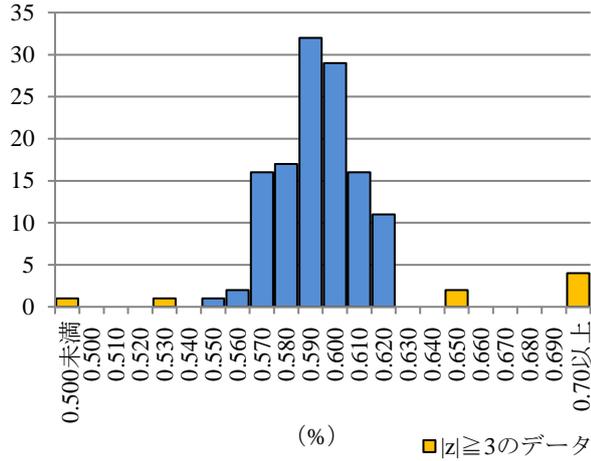


粗灰分 (A 試料)



カルシウム (A 試料)

図1 分析成績のヒストグラム (1)



クエン酸モランテル (D 試料)

図1 分析成績のヒストグラム (2)

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	197	190	162	112	190
1 中央値	11.56	20.34	4.28	2.79	5.01
1 下限境界値 ^{注2}	10.89	19.72	3.88	1.84	4.66
1 上限境界値	12.23	20.96	4.67	3.73	5.36
2 平均値	11.56	20.35	4.28	2.83	5.00
2 標準偏差	0.22	0.21	0.13	0.35	0.12
2 変動係数 (%)	1.9	1.0	3.1	12.6	2.4
2 95%信頼区間	11.53~11.59	20.32~20.39	4.26~4.30	2.76~2.89	4.99~5.02

区分	カルシウム (%)	リン (%)	SL (管理分析法) ^{注3} (g(カ価)/トン)	SL (飼料分析基準) ^{注4} (g(カ価)/トン)
データ数	126	132	25	46
1 中央値	0.860	0.598	51.5	48.4
1 下限境界値 ^{注2}	0.726	0.551	44.1	44.6
1 上限境界値	0.994	0.645	58.9	52.2
2 平均値	0.855	0.597	52.0	48.3
2 標準偏差	0.043	0.015	2.5	1.4
2 変動係数 (%)	5.0	2.6	4.8	2.9
2 95%信頼区間	0.847~0.863	0.594~0.599	51.0~53.0	47.9~48.7

注1 区分1の数値は報告された分析値から算出した結果であり、区分2は区分1で算出したzスコアの絶対値が3以上の異常値を除外して算出した結果である。

2 zスコアの絶対値が3の境界値である。

3 SL (管理分析法)は、サリノマイシンナトリウムの迅速定量法及びフローインジェクション法を集計した結果である。

4 SL (飼料分析基準)は、サリノマイシンナトリウムの液体クロマトグラフ法を集計した結果である。

表7 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	71	70	46
1 中央値	25.00	22.09	5.0
1 下限境界値 ^{注2}	23.17	19.42	3.9
1 上限境界値	26.83	24.76	6.1
2 平均値	25.09	22.04	5.0
2 標準偏差	0.60	1.05	0.3
2 変動係数 (%)	2.4	4.8	5.9
95%信頼区間	24.94~25.24	21.79~22.30	4.9~5.1

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 混合した原料の鑑定成績

原 料 名	混合割合 (%)	試 験 室 数				検出率 (%)	
		検 出		不 検 出	計		
		多量 ^{注1}	中量 ^{注2}				少量 ^{注3}
とうもろこし	25	107	0	0	107	0	100
小麦	20	40	46	7	93	14	87
マ イ ロ	10	13	51	38	102	5	95
大豆油かす	10	20	79	6	105	2	98
コーングルテンフィード	10	0	10	10	20	87	19
ごま油かす	10	2	26	23	51	56	48
ビートパルプ	7	5	39	18	62	45	58
チキンミール	3	1	3	31	35	72	33
玄米	3	5	42	12	59	48	55
炭酸カルシウム	2	0	0	69	69	38	64

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9 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
なたね油かす	6	53	19	78
りん酸カルシウム	0	1	42	43
精白米	3	23	16	42
魚粉	0	1	39	40
米ぬか油かす	0	15	15	30
食塩	0	0	31	31
ふすま	1	7	8	16
大麦	6	4	3	13
DDGS	0	2	9	11
あまに油かす	2	2	5	9
やし油かす	0	4	4	8
アルファルファミール	0	1	6	7
コーングルテンミール	0	1	6	7
肉骨粉	0	1	6	7
ライ麦	1	1	3	5
小麦粉	0	2	2	4
えん麦	0	0	2	2
サフラワー油かす	0	1	1	2
スクリーニングペレット	0	1	1	2
パイナップルかす	0	1	1	2
ビールかす	0	0	2	2
麦ぬか	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（幼すう育成用配合飼料）の解析結果

1) 水分

分析値は197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14件であった。これらを除いた平均値は11.56%で、この95%信頼区間は11.53~11.59%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²⁾では、194件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは13件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ11.56%、0.22%及び1.9%であった。

その他の方法では3件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは1件）の報告があった。

2) 粗たん白質

分析値は190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20.35%で、この95%信頼区間は20.32~20.39%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、9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20.14%、0.08%及び0.4%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20.23%、0.27%及び1.3%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20.40%、0.18%及び0.9%であった。

自動分析機による方法では、29件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは7件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ20.19%、0.34%及び1.7%であった。

その他の方法では1件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは0件）の報告があった。

3) 粗脂肪

分析値は162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4.28%で、この95%信頼区間は4.26~4.30%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、88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4.32%、0.11%及び2.7%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4.22%、0.14%及び3.4%であった。

その他の方法では3件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは0件）の報告があった。

4) 粗繊維

分析値は112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2.83%で、この95%信頼区間は2.76~2.89%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・静置法では、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2.73%、0.17%及び6.1%であった。

飼料分析基準・ろ過法では、57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2.80%、0.44%及び15.8%であった。

自動分析機による方法では、38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2.95%、0.25%及び8.4%であった。

その他の方法では7件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは0件）の報告があった。

5) 粗灰分

分析値は190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5.00%で、この95%信頼区間は4.99~5.02%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、188件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは5件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ5.01%、0.12%及び2.4%であった。

その他の方法では2件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは0件）の報告があった。

6) カルシウム

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11件であった。これらを除いた平均値は0.855%で、この95%信頼区間は0.847~0.863%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、18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0.841%、0.041%及び4.8%であった。

飼料分析基準・原子吸光光度法では、106件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは8件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ0.858%、0.043%及び5.0%であった。

その他の方法では2件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは0件）の報告があった。

7) リン

分析値は132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0.597%で、この95%信頼区間は0.594~0.599%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、127件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは7件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ0.596%、0.015%及び2.5%であった。

その他の方法では5件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは1件）の報告があった。

8) サリノマイシンナトリウム

管理分析法では、分析値はサリノマイシンナトリウム無添加試料（未配布）のブランク値による補正が必要であるが、今回は補正されない分析値の報告であるため、飼料分析基準による分析値との間に差が生じる可能性があったことから、これらを分離して集計した。

また本年度は、飼料分析基準の微生物学的定量法による定量値と、飼料分析基準の液体クロマトグラフ法による定量値との差が大きかったことから、これらを別々に集計した。

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25件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が3以上のものは1件であった。その平均値は52.0 g(力価)/トンで、この95%信頼区間が51.0~53.0 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46件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が3以上のものは2件であった。

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、21件の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ52.0 g(力価)/トン、2.6 g(力価)/トン及び5.0%であった。

管理分析法・フローインジェクション法では、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50.9 g(力価)/トン、0.9 g(力価)/トン及び1.8%であった。

飼料分析基準・液体クロマトグラフ法では、46件の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ48.3 g(力価)/トン、1.4 g(力価)/トン及び2.9%であった。

飼料分析基準・微生物学的定量法では、2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、52.2 g(力価)/トンであった。

8.2 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 71 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 9 件であった。これらを除いた平均値は 25.09 g/kg で、この 95 %信頼区間は 24.94~25.24 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、70 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 25.10 g/kg, 0.60 g/kg 及び 2.4 %であった。

その他の方法では 1 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があった。

2) 亜鉛

分析値は 70 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 22.04 g/kg で、この 95 %信頼区間は 21.79~22.30 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 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 22.03 g/kg, 1.06 g/kg 及び 4.8 %であった。

その他の方法では 2 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があった。

3) クエン酸モランテル

分析値は 46 件の報告（いずれも飼料分析基準による分析法）があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件であった。これらを除いた平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 5.0 g/kg, 0.3 g/kg 及び 5.9 %であった。この 95 %信頼区間は 4.9~5.1 g/kg 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。

107 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 22 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 25 %）は、107 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 107 件、中量が 0 件、少量が 0 件であった。

小麦（混合割合 20 %）は、93 件（検出率 87 %）の報告があり、その内訳は多量が 40 件、中量が 46 件、少量が 7 件であった。

マイロ（混合割合 10 %）は、102 件（検出率 95 %）の報告があり、その内訳は多量が 13 件、中量が 51 件、少量が 38 件であった。

大豆油かす（混合割合 10 %）は、105 件（検出率 98 %）の報告があり、その内訳は多量が 20 件、中量が 79 件、少量が 6 件であった。

コーングルテンフィード（混合割合 10 %）は、20 件（検出率 19 %）の報告があり、その内訳は多量が 0 件、中量が 10 件、少量が 10 件であった。

ごま油かす（混合割合 10 %）は、51 件（検出率 48 %）の報告があり、その内訳は多量が 2 件、中量が 26 件、少量が 23 件であった。

ビートパルプ（混合割合 7 %）は、62 件（検出率 58 %）の報告があり、その内訳は多量が 5

件、中量が39件、少量が18件であった。

チキンミール（混合割合3%）は、35件（検出率33%）の報告があり、その内訳は多量が1件、中量が3件、少量が31件であった。

玄米（混合割合3%）は、59件（検出率55%）の報告があり、その内訳は多量が5件、中量が42件、少量が12件であった。

炭酸カルシウム（混合割合2%）は、69件（検出率64%）の報告があり、その内訳は多量が0件、中量が0件、少量が69件であった。

誤って検出された原料としては、なたね油かすが最も多く、78件の報告があった。次いで、りん酸カルシウムが43件、精白米が42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).
- 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).

(参考)

令和5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・飼料添加物製造等業者，飼料検査指導機関，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…幼すう育成用配合飼料

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

※ B試料（魚粉）の分析は，今年度は実施しません。

3. 分析鑑定項目

A試料・・・水分，粗たん白質，粗脂肪，粗繊維，粗灰分，カルシウム，リン及びサリノマイシンナトリウム

C試料・・・飼料原料の検出及び混合割合の推定

D試料・・・銅，亜鉛及びクエン酸モランテル

4. 分析鑑定要領

(1) 試料の分析鑑定方法は，「飼料分析基準」（平成20年4月1日付け19消安第14729号農林水産省消費・安全局長通知）に定める方法及び「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」（昭和53年9月5日付け53畜B第2173号、53水振第464号農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知）の別記にあるサリノマイシンナトリウム又はモネンシンナトリウムを含む飼料の管理方法に準拠してください。

なお，参考までにこれらの分析法の抜粋（飼料分析基準等（抜粋））を添付します。

また，各分析法の末尾に，試料採取量等の一例を記載しましたので，参考として下さい。

(2) 上記3に示した分析鑑定項目のうち，各試験室において実施可能な項目（全項目でなくても可）について分析及び鑑定を行い，必ず今年度の報告書様式（Microsoft Excel形式．入手方法は5（1）参照．）にて，報告してください。

(3) 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。

(4) 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，該当部分のみ記入した報告書を別途作成していただき，ご報告ください。

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，独立行政法人農林水産消費安全技術センターホームページ（http://www.famic.go.jp/ffis/feed/sub2_teawase.html）より「令和5年度飼料等の共通

試料による分析鑑定結果報告書」をダウンロードしてMicrosoft Excel上で記入し、報告してください。

- (2) 試料番号はA, C及びD試料でそれぞれ異なりますので、分析結果を報告する試料についてそれぞれ記入してください。(結果とりまとめ時はA試料の試料番号を試験室番号としますので、A試料の試料番号については分析を行わない場合も必ず記入してください。)

分析値は、水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム及びリンについては%で、サリノマイシンナトリウムについてはg(力価)/トンで、銅、亜鉛及びクエン酸モランテルについてはg/kg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、銅及び亜鉛の分析値は、小数点以下第3位を四捨五入して同第2位まで、カルシウム及びリンの分析値は小数点以下第4位を四捨五入して同第3位まで、サリノマイシンナトリウム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、備考欄に該当番号を記入し、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、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、灰化温度を記入してください。

- (3) 鑑定結果は、検出した原料名を報告書(3)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)から選択してください。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、該当する番号を選択してください。(複数回答される場合やその他を選択された場合、番号欄右枠(補足欄)に記入してください。)

- (4) 分析の一部を別の試験室等で実施した場合は、実施した試験室名と分析項目を報告書の(4)の欄もしくは報告時のメール本文に記載してください。

- (5) 令和5年9月29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メールアドレスに送付してください。報告書のファイル名は「試験室番号(A試料の番号)_試験室名」としてください。(例:試験室番号1番FAMIC本部の場合:「1_FAMIC本部」)

複数の報告書を提出される場合は、ファイル名の末尾に全体数がかかるように番号を付けてください。(例:計2つの報告書を提出する場合、1-2と2-2など)

報告メールの件名は「令和5年度手合わせ分析結果報告_試験室名」としてください。

提出済みの報告書に訂正等がある場合は件名に【再提出】と入れたメールもしくは電話で確実に担当者へご連絡ください。

正しく受信できた場合、10月2日までに受信確認メールを返信いたします。（締切日直前に提出された場合、多少返信が遅れる可能性もございますがご了承ください。）

提出した報告書ファイルは受信確認メールが届くまで破棄しないでください。

メールでの報告書提出が難しい場合は担当者までご連絡ください。

表省略

令和5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 []
 MAIL []
 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	[] %	分析法	1 飼料分析基準 2 その他の方法
粗たん白質	[] %	分析法	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	[] %	分析法	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	[] %	分析法	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	[] %	分析法	1 飼料分析基準 灰化温度 [] °C 2 その他の方法
カルシウム	[] %	分析法	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 (原子吸光度法) 3 その他の方法
リン	[] %	分析法	1 飼料分析基準 2 その他の方法
サリノマイシンナトリウム	[] g(力価)/ト	分析法	1 迅速定量法 2 迅速定量法 (フローインジェクション装置使用) 3 飼料分析基準 (液体クロマトグラフ法) LC メーカー/型式 検出器 メーカー/型式 カラム メーカー/型式 内径(mm) [] 長さ(mm) [] 粒径(μm) [] 4 飼料分析基準 (微生物学的定量法)

(2) D試料 分析結果 試料番号

分析成分名	分析値	備考	
銅	<input type="text"/> g/kg	分析法	1 飼料分析基準 2 その他の方法
亜鉛	<input type="text"/> g/kg	分析法	1 飼料分析基準 2 その他の方法
クエン酸モ ランテル	<input type="text"/> g/kg	分析法	1 飼料分析基準 測定条件 LC メーカー/型式 検出器 メーカー/型式 カラム メーカー/型式 内径(mm) <input type="text"/> 長さ(mm) <input type="text"/> 粒径(μm) <input type="text"/> 2 その他の方法

(3) C試料 鑑定結果 試料番号

検出原料名	混合割合	検出方法	補足

混合割合

下から選択

多量 (15%以上)

中量 (5%以上15%未満)

少量 (1%以上5%未満)

検出方法

下から番号を選択

その他の場合補足を記入

1 肉眼

2 酸処理

3 アルカリ処理

4 その他

注) 10種類の原料を混合しています。各セルの検出原料名のリストから選択してください。

検出原料名			
下表から選択			
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
ホミニーフード	コーングルテンミール	あまに油かす	サフラワー油かす
なたね油かす	綿実油かす	やし油かす	ごま油かす
大豆油かす	DDGS	肉骨粉	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	食塩	炭酸カルシウム	りん酸カルシウム

(4) 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。(メール本文でも可)

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5年度）****Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2023)**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**

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、飼料等の使用が原因となつて、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、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、法令等で定められている基準値等の適合状況のモニタリング及び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5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**

令和5年4月から令和6年3月までの間に、農林水産省（地方農政局等）が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

飼料安全法第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。）が定められている。また、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準³⁾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。各試料に対するモニタリング等実施成分は、これらの基準値の他、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て以下のとおり選定した。

1) 有害物質**i かび毒（24成分）****ア 指導基準値等が定められているもの（4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、デオキシニバレノール及びフモニシン（B₁、B₂及びB₃の総和）

以下同じ。)を対象とした。

イ ア以外のかび毒等 (20 成分)

飼料分析基準⁴⁾に方法が規定されている以下のかび毒 20 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, オクラトキシン A, シトリニン, 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

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 (57 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 60 成分のうちの 33 成分を対象とした。

イ ア以外農薬

飼料分析基準に方法が規定されている農薬のうちの 24 成分を対象とした。なお, サーベイランスを効率的に進めるため, 令和 5 年度から対象成分を見直した。

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				
顕微鏡鑑定	ELISA試験				PCR試験	不溶性不純物	サルモネラ		
種類	試料点数								
	大すう育成用配合飼料	1	1						
	成鶏飼育用配合飼料	26	24	6	4			7	
	ブロイラー肥育前期用配合飼料	1	1						
	ブロイラー肥育後期用配合飼料	5	5	1	1			1	
	肉用種鶏飼育用配合飼料	2	1		1			1	
	種鶏飼育用配合飼料	1	1						
	大雛飼育用配合飼料	1	1	1	1			1	
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1		2			1	
	子豚育成用配合飼料	6	5	1	1				
	肉豚肥育用配合飼料	14	13	2	2			1	
	種豚育成用配合飼料	4	4						
	種豚飼育用配合飼料	4	4	1					
	豚数種用飼料（ほ乳期子豚用を含まないもの）	2	2						
配合飼料	ほ乳期子牛育成用配合飼料	2	1	1		1	1	1	
	若令牛育成用配合飼料	4	4	1	2	2	2	2	2
	乳用牛飼育用配合飼料	5	2	2	2	5	5	5	2
	幼令肉用牛育成用配合飼料	4	3			1	1	1	
	肉用牛肥育用配合飼料	22	18	3	5	9	9	9	2
	肉牛繁殖用配合飼料	3	2			1	1	1	1
	種牛飼育用配合飼料	1	1	1	1	1	1	1	1
	牛数種用飼料（ほ乳期子牛用を含み、乳用牛用を含まないもの）	1	1						
	牛数種用飼料（乳用牛用を含み、ほ乳期子牛用を含まないもの）	1	1						
	牛数種用飼料（ほ乳期子牛用、乳用牛用を含まないもの）	4	3	1	1	2	2	2	1
	養殖水産動物用配合飼料	31		31					
	とうもろこし、ふすま二種混合飼料	1	1	1	1	1	1	1	1
	動物性たん白質混合飼料	1				1	1	1	
	糖蜜吸着飼料	1				1	1	1	
	上記以外の混合飼料	16	1	1	1	16	16	16	5
	小計	167	101	54	25	41	41	41	27
穀類	大麦	3	3						
	グレインソルガム（マイロ）	3	3		3				
	小麦	3	3						
	とうもろこし	47	47		47				
	小計	56	56		50				
そうこう類	米ぬか	6	6						
	コーングルテンフィード	36	36						
	とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル（DDGS）	6	6						
	ふすま	6	5						1
	麦ぬか	1	1						
	小計	55	54						1

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			不溶性 不純物
顕微鏡 鑑定	ELISA 試験						PCR 試験			
植物 性油 かす 類	コーングルテンミール	36	36							
	大豆油かす	7	7							
	なたね油かす	7	6							1
	小 計	50	49							1
動物 質性 飼 料	チキンミール	20				20	20	20		14
	フェザーミール	10				10	10	10		3
	原料混合肉骨粉	23		1			23	23		14
	肉骨粉（ボークミール）	6					6	6		1
	魚粉	58		33		29	29	29		23
	魚介類すり身	1				1	1	1		1
	乾燥ほや殻	1				1	1	1		1
	イカ内臓溶解液	1				1	1	1		
小 計	120		34		62	91	91		57	
乾 牧 草	アルファルファ	4		4	4					
	稲わら	1		1	1					
	ウィートヘイ	1		1	1					
	オーツヘイ	2		2	2					
	スーダングラス	1		1	1					
	チモシー	4		4	4					
	バミューダグラス	1		1	1					
小 計	14		14	14						
そ の 他	乾燥酵母細胞壁	1				1	1	1		
	酵母菌培養物	1				1	1	1		
	動物性油脂	44							44	
	綿実	6	6							
小 計	52	6			2	2	2	44		
合 計		514	266	102	89	105	134	134	44	86

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、グレインソルガム（マイロ）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。

i~iii の試験方法の定量下限，検出下限及び回収率は飼料分析基準に記載されている。

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

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。魚粉等，チキンミール等，肉骨粉等及び輸入飼料は，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。

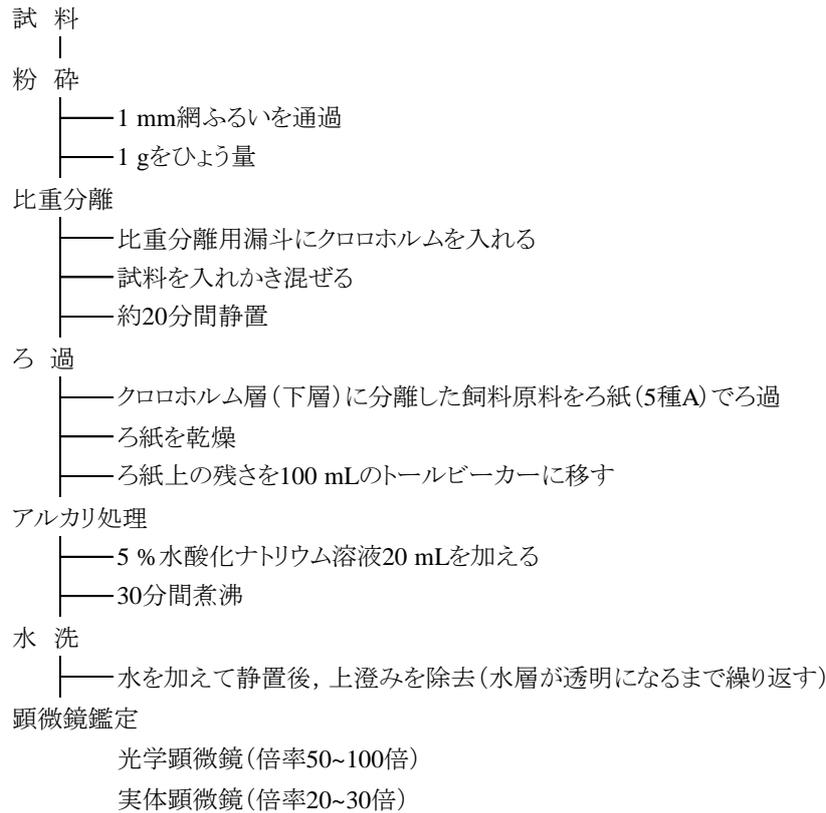


図1 試料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

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。

1) かび毒

配混合飼料 101 点, 単体飼料 165 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, デオキシニバレノール及びフモニシンの 4 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 20 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 4 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 20 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 101 点中 16 点から検出され (検出率 16%), 最大値は 0.003 mg/kg, 検出されたものの平均値 (以下同様) は 0.001 mg/kg であり, 指導基準値 (乳用牛用 0.01 mg/kg) 及び管理基準値 (幼すう用, ブロイラー前期用, ほ乳期子豚用及びほ乳期子牛用は 0.01 mg/kg, それ以外の配混合飼料は 0.02 mg/kg.) を超えるものはなかった。

とうもろこし 47 点中 11 点から検出され (検出率 23%), 最大値は 0.011 mg/kg, 平均値は 0.002 mg/kg であり, 管理基準値 (0.02 mg/kg) を超えるものはなかった。

ii ゼアラレノン

配混合飼料 101 点中 97 点から検出され（検出率 96 %），最大値は 0.18 mg/kg，平均値は 0.042 mg/kg であり，管理基準値（家畜及び家きんに給与される配合飼料で 0.5 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 47 点中 45 点から検出され（検出率 96 %），最大値は 0.22 mg/kg，平均値は 0.037 mg/kg であった。とうもろこしの加工副産物の定量値が高く，コーングルテンフィードの平均値は 0.27 mg/kg（最大値 1.0 mg/kg），DDGS の平均値は 0.33 mg/kg（最大値 0.51 mg/kg）及びコーングルテンミールの平均値は 0.55 mg/kg（最大値 2.1 mg/kg）であった。

iii デオキシニバレノール

配混合飼料 101 点中 85 点から検出され（検出率 84 %），最大値は 1.6 mg/kg，平均値は 0.36 mg/kg であり，管理基準値（反すう動物（ほ乳期のものを除く。）に給与される配合飼料は 3 mg/kg，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は 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 47 点中 41 点から検出され（検出率 87 %），最大値は 3.3 mg/kg と高く，平均値は 0.44 mg/kg であった。とうもろこしの加工副産物の定量値が高く，コーングルテンフィードの平均値は 2.9 mg/kg（最大値 8.9 mg/kg），DDGS の平均値は 3.0 mg/kg（最大値 4.1 mg/kg）及びコーングルテンミールの平均値は 0.22 mg/kg（最大値 1.3 mg/kg）であった。

iv フモニシン

配混合飼料 101 点全てから検出され，最大値は 3.2 mg/kg，平均値は 0.67 mg/kg であり，管理基準値（家畜及び家きんに給与される配合飼料は 4 mg/kg）を超えるものはなかった。

単体飼料の指導基準値等は定められていないが，とうもろこしは 47 点全てから検出され，最大値は 6.3 mg/kg と高く，平均値は 1.0 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が高いものがあり，コーングルテンミールの平均値は 1.6 mg/kg（最大値 9.9 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 対象試料	アフラトキシンB ₁ (検出下限 ²⁾ 0.0003 mg/kg)						ゼアラレノン (検出下限 ²⁾ 0.0003 mg/kg)					
	指導/管理 基準値 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			管理 基準値 (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)	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	0	0								
配混合飼料 (表外 ¹⁾ に示す飼料)	管 0.01	4	0	0		0.5	101	97	96	0.18	0.042	
配混合飼料 (上記以外の配合飼料)	管 0.02	93	16	17	0.003	0.001						
全配混合飼料		101	16	16	0.003	0.001	101	97	96	0.18	0.042	
大麦	—	3	0	0			—	3	2	67	0.002	0.001
グレイソルガム (マイロ)	—	3	0	0			—	3	1	33	0.002	0.002
小麦	—	3	0	0			—	3	1	33	0.004	0.004
とうもろこし	管 0.02	47	11	23	0.011	0.002	—	47	45	96	0.22	0.037
米ぬか	—	6	0	0			—	6	4	67	0.020	0.008
コーングルテンフィード	—						—	35	35	100	1.0	0.27
とうもろこしジスチラスグレイソルガム (DDGS)	—	6	3	50	0.002	0.0008	—	6	6	100	0.51	0.33
ふすま	—	5	0	0			—	5	4	80	0.013	0.005
麦ぬか	—						—					
コーングルテンミール	—						—	36	36	100	2.1	0.55
大豆油かす	—	7	0	0			—	7	6	86	0.008	0.003
なたね油かす	—						—					
綿実	—						—					
計		181	30	17			252	237	94			

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 (続き)

モニタリング等の 対象試料	デオキシニバレノール (検出下限 ²⁾ 0.003 mg/kg)						フモニシン (B ₁ +B ₂ +B ₃) (検出下限 0.0006 mg/kg)					
	管理 基準値 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			管理 基準値 (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)	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)												
配混合飼料 (表外 ¹⁾ に示す飼料)	3	36	31	86	1.6	0.40	4	101	101	100	3.2	0.67
配混合飼料 (上記以外の配合飼料)	1	65	54	83	1.0	0.33						
全配混合飼料		101	85	84	1.6	0.36	101	101	100	3.2	0.67	
大麦	—	3	0	0			—					
グレイソルガム (マイロ)	—	3	0	0			—					
小麦	—	3	1	33	0.14	0.14	—					
とうもろこし	—	47	41	87	3.3	0.44	—	47	47	100	6.3	1.0
米ぬか	—	6	2	33	0.016	0.016	—					
コーングルテンフィード	—	36	35	97	8.9	2.9	—	36	36	100	1.0	0.26
とうもろこしジスチラスグレイソルガム (DDGS)	—	6	6	100	4.1	3.0	—					
ふすま	—	5	5	100	0.32	0.20	—					
麦ぬか	—	1	1	100	1.0	1.0	—					
コーングルテンミール	—	36	34	94	1.3	0.22	—	36	36	100	9.9	1.6
大豆油かす	—	7	0	0			—					
なたね油かす	—	6	0	0			—					
綿実	—	6	4	67	0.066	0.031	—					
計		266	214	80			220	220	100			

1) 該当する配混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, ブロイラー肥育前期用, ほ乳期子豚用及びほ乳期子牛用
- ゼアラレノン : 家畜及び家きん用
- デオキシニバレノール : 反すう動物 (ほ乳期のものを除く.) 用
- フモニシン : 家畜及び家きん用

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	181	4	2	0.001	0.0006
アフラトキシンG ₁	0.0003	181	6	3	0.002	0.001
アフラトキシンG ₂	0.0003	181	1	1	0.002	0.002
ステリグマトシスチン	0.0003	205	43	21	0.003	0.001
HT-2トキシン	0.002	266	63	24	0.090	0.023
T-2トキシン	0.003	266	114	43	0.14	0.013
ネオソラニオール	0.002	266	23	9	0.012	0.004
フザレノン-X	0.003	266	7	3	0.049	0.019
3-アセチルデオキシニバレノール	0.006	266	14	5	0.25	0.054
15-アセチルデオキシニバレノール	0.006	266	134	50	1.3	0.16
ニバレノール	0.002	266	173	65	1.8	0.044
ジアセトキシシルペノール	0.002	266	17	6	0.005	0.003
デオキシニバレノール-3-グルコシド	0.002	266	207	78	1.3	0.11
オクラトキシンA	0.0003	260	39	15	0.039	0.002
シトリニン	0.002	260	36	14	0.027	0.008
α -ゼアララノール	0.002	211	0	0		
β -ゼアララノール	0.002	211	0	0		
ゼアララノン	0.002	211	27	13	0.043	0.012
α -ゼアラレノール	0.003	211	24	11	0.013	0.006
β -ゼアラレノール	0.003	211	48	23	0.045	0.011

*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）23点、乾牧草等14点、魚粉等（魚粉及び肉骨粉）34点及び養殖水産動物用配合飼料31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23点中6点から検出され（検出率26%）、最大値は0.19 mg/kg、平均値は0.10 mg/kgであり、管理基準値（0.8 mg/kg）を超えるものはなかった。

乾牧草等14点中3点から検出され（検出率21%）、最大値は0.20 mg/kg、平均値は0.11 mg/kgであり、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33点中30点から検出され（検出率91%）、最大値は4.3 mg/kg、平均値は0.90 mg/kgであった。肉骨粉1点からは検出されなかった。魚粉1点が4.3 mg/kgで管理基準値（3 mg/kg）を超えるものであった。

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31点全てから検出され、最大値は2.8 mg/kg、平均値は0.54 mg/kgであった。

ii 水銀

養殖水産動物用を除く配混合飼料 23 点中 7 点から検出され（検出率 30 %），最大値は 0.05 mg/kg，平均値は 0.03 mg/kg であり，管理基準値（0.2 mg/kg）を超えるものはなかった。

乾牧草等 14 点中 9 点から検出され（検出率 64 %），最大値は 0.10 mg/kg，平均値は 0.05 mg/kg であり，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 33 点全てから検出され，最大値は 0.61 mg/kg，平均値は 0.22 mg/kg であった。肉骨粉 1 点の測定値は 0.01 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。

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 31 点全てから検出され，最大値は 0.33 mg/kg，平均値は 0.13 mg/kg であった。

iii 鉛

養殖水産動物用を除く配混合飼料 23 点中 4 点から検出され（検出率 17 %），最大値は 1.3 mg/kg，平均値は 0.6 mg/kg であり，管理基準値（2 mg/kg）を超えるものはなかった。

乾牧草等 14 点中 2 点から検出され（検出率 14 %），最大値は 0.4 mg/kg，平均値は 0.3 mg/kg であり，管理基準（3 mg/kg）を超えるものはなかった。

動物質性飼料では，魚粉 33 点中 13 点から検出され（検出率 39 %），最大値は 1.5 mg/kg，平均値は 0.7 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 31 点中 11 点から検出され（検出率 35 %），最大値は 1.5 mg/kg，平均値は 0.5 mg/kg であった。

iv ひ素

養殖水産動物用を除く配混合飼料 23 点中 10 点から検出され（検出率 43 %），最大値は 0.35 mg/kg，平均値は 0.16 mg/kg であった。稲わらを除く乾牧草等 13 点中 7 点から検出され（検出率 54 %），最大値は 0.24 mg/kg，平均値は 0.18 mg/kg であった。いずれも管理基準値（2 mg/kg）を超えるものはなかった。稲わら 1 点の測定値は 2.9 mg/kg であり，管理基準値（7 mg/kg）を超えていなかった。

動物質性飼料では，魚粉では 33 点全てから検出され，最大値は 9.0 mg/kg，平均値は 4.0 mg/kg であり，管理基準値（15 mg/kg）を超えるものはなかった。肉骨粉 1 点からは検出されなかった。

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 31 点全てから検出され，最大値は 3.8 mg/kg，平均値は 2.3 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	0.8	配混合飼料（養殖水産動物用を除く）	23	6	26	0.19	0.10	0.03
	1	乾牧草等	14	3	21	0.20	0.11	
	3	魚粉	33	30	91	4.3	0.90	
		肉骨粉	1	0	0			
	—	養殖水産動物用配合飼料	31	31	100	2.8	0.54	
		総計	102	70	69	4.3	0.64	
水銀	0.2	配混合飼料（養殖水産動物用を除く）	23	7	30	0.05	0.03	0.01
	0.4	乾牧草等	14	9	64	0.10	0.05	
	1	魚粉	33	33	100	0.61	0.22	
		肉骨粉	1	1	100	0.01	0.01	
	—	養殖水産動物用配合飼料	31	31	100	0.33	0.13	
		総計	102	81	79	0.61	0.15	
鉛	2	配混合飼料（養殖水産動物用を除く）	23	4	17	1.3	0.6	0.2
	3	乾牧草等	14	2	14	0.4	0.3	
	7	魚粉	33	13	39	1.5	0.7	
		肉骨粉	1	0	0			
	—	養殖水産動物用配合飼料	31	11	35	1.5	0.5	
		総計	102	30	29	1.5	0.6	
ひ素	2	配混合飼料（養殖水産動物用を除く）	23	10	43	0.35	0.16	0.05
		乾牧草等（稲わらを除く）	13	7	54	0.24	0.18	
	7	稲わら	1	1	100	2.9	2.9	
	15	魚粉	33	33	100	9.0	4.0	
	7	肉骨粉	1	0	0			
	—	養殖水産動物用配合飼料	31	31	100	3.8	2.3	
	総計	102	82	80	9.0	2.5		

3) 農薬

配混合飼料 25 点，穀類（とうもろこし及びマイロ） 50 点及び乾牧草等 14 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 24 成分の計 57 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 24 成分の結果を表 5 に示した。

牧草 1 点がシハロトリンの省令基準値を超過した。

その他に省令基準値以内で検出されたものとして，有機リン系農薬及びピレスロイド系農薬が散見され，グリホサート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 有機リン系農薬

省令基準値が定められているクロルピリホス，クロルピリホスメチル，ピリミホスメチル及びマラチオンが検出された。検出率が最も高かったのはピリミホスメチルで 27 %であった。

ii ピレスロイド系農薬

省令基準値が定められているシハロトリン，デルタメトリン及びトラロメトリン並びにペ

ルメトリンが検出された。牧草 1 点が 1.4 mg/kg でシハロトリンの省令基準値 (0.6 mg/kg) を超えるものであった。

iii グリホサート

省令基準値が定められているとうもろこし 12 点中 10 点から検出され (検出率 83 %) , 最大値は 0.06 mg/kg, 平均値は 0.03 mg/k であった。

iv その他の検出された農薬

省令基準値が定められていない農薬について、プロシミドンが牧草 1 点から検出された。

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	12	0	0			
	配混合飼料 (牛等用)	0.4	13	0	0			
	牧草	0.4	14	0	0		0.005	
	基準値のない飼料	—	38	0	0			
	計	—	77	0	0			
BHC	配混合飼料	0.005	25	0	0			
	牧草	0.02	14	0	0		0.005	
	基準値のない飼料	—	38	0	0			
	計	—	77	0	0			
DDT	配混合飼料	0.1	25	0	0			
	牧草	0.1	14	0	0		0.02	
	基準値のない飼料	—	38	0	0			
	計	—	77	0	0			
アトラジン	とうもろこし	0.2	35	0	0			
	マイロ	0.02	3	0	0			
	牧草	15	14	0	0		0.02	
	基準値のない飼料	—	25	0	0			
	計	—	77	0	0			
アラクロール	とうもろこし	0.02	35	0	0			
	マイロ	0.05	3	0	0			
	牧草	0.05	14	0	0		0.02	
	基準値のない飼料	—	25	0	0			
	計	—	77	0	0			
アルドリソ及び ディルドリン	配混合飼料	0.02	25	0	0			
	牧草	0.02	14	0	0		0.02	
	基準値のない飼料	—	38	0	0			
	計	—	77	0	0			
イソフェンホス	とうもろこし	0.02	35	0	0			
	基準値のない飼料	—	42	0	0		0.02	
	計	—	77	0	0			
エチオン	牧草	20	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	63	0	0		0.02	
	計	—	77	0	0			
エンドリン	配混合飼料	0.01	25	0	0			
	牧草	0.01	14	0	0		0.01	
	基準値のない飼料	—	38	0	0			
	計	—	77	0	0			
グリホサート	とうもろこし	5	12	10	83	0.06	0.03	0.01

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)	
クロルピリホス	とうもろこし	0.1	35	2	6	0.02	0.02	0.01
	マイロ	0.75	3	0	0			
	牧草	13	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	25	0	0			
	計	—	77	2	3	0.02	0.02	
クロルピリホスメチル	とうもろこし	7	35	0	0			0.02
	マイロ	10	3	0	0			
	基準値のない飼料	—	39	2	5	0.03	0.03	
	計	—	77	2	3	0.03	0.03	
クロルフェンピホス	とうもろこし	0.05	35	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	42	0	0			
	計	—	77	0	0			
クロルプロファム	とうもろこし	0.05	35	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	42	0	0			
	計	—	77	0	0			
クロルベンジレート	とうもろこし	0.02	35	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	42	0	0			
	計	—	77	0	0			
シハロトリン	とうもろこし	0.04	35	0	0			0.02
	マイロ	0.2	3	0	0			
	牧草	0.6	14	2	14	1.4	0.83	
	基準値のない飼料	—	25	0	0			
	計	—	77	2	3	1.4	0.83	
ジメトエート	とうもろこし	1	35	0	0			0.02
	マイロ	0.2	3	0	0			
	牧草	2	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	25	0	0			
	計	—	77	0	0			
ダイアジノン	とうもろこし	0.02	35	0	0			0.02
	マイロ	0.1	3	0	0			
	牧草	10	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	25	0	0			
	計	—	77	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	35	0	0			0.03
	マイロ	1	3	0	0			0.03
	牧草	5	14	0	0			0.045
	基準値のない飼料	—	25	2	8	0.11	0.10	0.03
	計	—	77	2	3	0.11	0.10	
テルブホス	とうもろこし	0.01	35	0	0			0.005
	マイロ	0.05	3	0	0			
	牧草	1	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	25	0	0			
	計	—	77	0	0			
ピリミホスメチル	とうもろこし	1	35	10	29	0.39	0.16	0.02
	マイロ	1	3	0	0			
	基準値のない飼料	—	39	11	28	0.58	0.13	
	計	—	77	21	27	0.58	0.14	
フィプロニル	とうもろこし	0.02	35	0	0			0.003
	マイロ	0.01	3	0	0			
	基準値のない飼料	—	39	0	0			
	計	—	77	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)
フェニトロチオン	とうもろこし	1	35	0	0		0.02	
	マイロ	1	3	0	0			
	牧草	10	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	25	0	0			
	計	—	77	0	0			
フェントエート	とうもろこし	0.4	35	0	0		0.02	
	マイロ	0.4	3	0	0			
	基準値のない飼料	—	39	0	0			
	計	—	77	0	0			
フェンバレレート	配混合飼料（鶏・うずら用）	0.5	7	0	0		0.02	
	配混合飼料（豚用）	4	5	0	0			
	配混合飼料（牛等用）	8	13	0	0			
	牧草	13	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	38	0	0			
	計	—	77	0	0			
フェンプロパトリン	牧草	20	14	0	0		0.02	
	基準値のない飼料	—	63	0	0			
	計	—	77	0	0			
ヘプタクロル	配混合飼料	0.02	25	0	0		0.02	
	牧草	0.02	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	38	0	0			
	計	—	77	0	0			
ペルメトリン	とうもろこし	2	35	2	6	0.08	0.05	0.02
	マイロ	2	3	0	0			
	牧草	55	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	25	0	0			
	計	—	77	2	3	0.08	0.05	
ペンディメタリン	とうもろこし	0.2	35	0	0		0.02	
	マイロ	0.1	3	0	0			
	牧草（アルファルファに限る）	150	4	0	0			
	牧草（アルファルファを除く）	2000	10	0	0			
	基準値のない飼料	—	25	0	0			
	計	—	77	0	0			
ホスメット	とうもろこし	0.05	35	0	0		0.02	
	マイロ	0.05	3	0	0			
	牧草	40	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	25	0	0			
	計	—	77	0	0			
ホレート	とうもろこし	0.05	35	0	0		0.02	
	マイロ	0.05	3	0	0			
	牧草	1.5	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	25	0	0			
	計	—	77	0	0			
マラチオン	とうもろこし	2	35	2	6	0.15	0.12	0.02
	マイロ	6	3	0	0			
	牧草	135	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	25	2	8	0.21	0.21	
	計	—	77	4	5	0.21	0.16	
メチダチオン	とうもろこし	0.1	35	0	0		0.02	
	マイロ	0.2	3	0	0			
	牧草	12	14	0	0			
	基準値のない飼料	—	25	0	0			
	計	—	77	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	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)	
EPN	77	0	0		0.02
イソプロチオラン	77	0	0		0.02
イプロベンホス	77	0	0		0.02
エディフェンホス	77	0	0		0.02
エトフェンプロックス	77	0	0		0.02
カズサホス	77	0	0		0.02
クロルタルジメチル	77	0	0		0.02
クロルデン	77	0	0		0.02
ジフェノコナゾール	77	0	0		0.02
シラフルオフェン	77	0	0		0.02
テブコナゾール	77	0	0		0.02
トリフルラリン	77	0	0		0.02
ビフェントリン	77	0	0		0.02
フェノトリン	77	0	0		0.02
フェンチオン	77	0	0		0.02
フェンブコナゾール	77	0	0		0.02
フルシトリネート	77	0	0		0.02
フルトラニル	77	0	0		0.02
プロシミドン	77	1	1.3	0.11	0.11
プロパニル	77	0	0		0.02
プロパルギッド	77	0	0		0.02
プロピコナゾール	77	0	0		0.02
ブロモブチド	77	0	0		0.02
メトミノストロビン	77	0	0		0.02

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 29 点，その他の魚介類由来たん白質 3 点，チキンミール 20 点及びフェザーミール 10 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 点及び魚介類すり身 1 点から反すう動物由来 DNA が検出されたが，ELISA 試験において同一試料から牛由来たん白質が検出されなかったことから，混入確認判定手順に基づき牛由来たん白質の混入は認められないと総合的に判断した．肉骨粉（ポークミール）6 点及び原料混合肉骨粉 23 点について，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，肉骨粉（ポークミール）1 点から牛由来たん白質の混入が認められた．なお，原料混合肉骨粉 1 点から反すう動物由来 DNA が検出されたが，ELISA 試験において同一試料から牛由来たん白質が検出されなかったことから，混入確認判定手順に基づき牛由来たん白質の混入は認められないと総合的に判断した．これらの結果を表 7 及び表 8 に示した．

表7 動物由来たん白質のモニタリングの結果（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	29	0	0	29	0	0	29	2	7	0
魚介類すり身	1	0	0	1	0	0	1	1	100	0
乾燥ほや殻	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
イカ内臓溶解液	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
計	32	0	0	32	0	0	32	3	9	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	20	0	0	20	0	0	20	0	0	0
フェザーミール	10	0	0	10	0	0	10	0	0	0
原料混合肉骨粉				23	0	0	23	1	4	0
肉骨粉(ポークミール)				6	1	17	6	1	17	1
計	30	0	0	59	1	2	59	2	3	1

国内で製造されたほ乳期子牛育成用配合飼料 1 点, 若令牛育成用配合飼料 2 点, 乳用牛飼育用配合飼料 5 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 9 点, 肉牛繁殖用配合飼料 1 点, 種牛飼育用配合飼料 1 点, 牛複数ステージ用配合飼料 2 点, 糖蜜吸着飼料 1 点, その他の牛用混合飼料 11 点及びその他の畜種向けの混合飼料（動物質原料を含むもの）1 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. これらの結果を表 9 に示した.

輸入された牛用混合飼料等 8 点について, 顕微鏡鑑定, ELISA 試験及び PCR 試験による牛由来たん白質の混入確認を実施した結果, いずれの飼料からも混入は認められなかった. これらの結果を表 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													
ほ乳期子牛育成用配合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
若令牛育成用配合飼料	2	0	0	2	0	0	2	0	0				0
乳用牛飼育用配合飼料	5	0	0	5	0	0	5	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	9	0	0	9	0	0	9	0	0				0
肉牛繁殖用配合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
種牛飼育用配合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
牛数種用飼料(ほ乳期子牛用，乳用牛用を含まないもの)	2	0	0	2	0	0	2	0	0				0
とうもろこし，ふすま二種混合飼料	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
上記以外の混合飼料	10	0	0	10	0	0	10	0	0				0
小計	34	0	0	34	0	0	34	0	0				0
その他の畜種向け飼料 (動物質原料を含むもの)													
動物性たん白質混合飼料	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
小計	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
合計	35	0	0	35	0	0	34	0	0	1	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	5	0	0	5	0	0	5	0	0	0
ベルギー	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ブルガリア	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ブラジル	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
合計	8	0	0	8	0	0	8	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）44点について，不溶性不純物の含有量を測定した結果，1点が不溶性不純物の成分規格を超えるものであった。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	44	0.339	0.035

3.4 サルモネラ

国内で製造された単体飼料59点及び配混合飼料27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（魚粉）からサルモネラが検出された（検出率2%）。なお，単体飼料では，前年度の検出率は3%，前々年度は検出されなかった。また，配混合飼料ではサルモネラは検出

されなかった。なお、配混合飼料では、前年度及び前々年度ともにサルモネラは検出されていない。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 *S.Tennessee* 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¹⁾によると、*S.Tennessee* は国内で発生したサルモネラ食中毒の原因菌として過去にヒトからも分離されているが、ここ数年の上位 10 血清型には含まれていなかった。

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）

モニタリング等の対象試料	試験点数	検出点数	検出率 (%)
動物質性飼料			
乾燥ほや殻	1	0	0
魚介類すり身	1	0	0
魚粉	23	1	4
チキンミール	14	0	0
フェザーミール	3	0	0
原料混合肉骨粉	14	0	0
肉骨粉（ポークミール）	1	0	0
そうこう類			
ふすま	1	0	0
植物性油かす類			
なたね油かす	1	0	0
計	59	1	2

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）

モニタリング等の対象試料	試験点数	検出点数	検出率 (%)
牛用配合飼料	9	0	0
鶏用配合飼料	10	0	0
豚用配合飼料	2	0	0
その他の混合飼料	6	0	0
計	27	0	0

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，令和 5 年 12 月 1 日，5 消安第 4714 号 (2023).
- 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) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-table/1525-iasrb.html>，cited 28 Jul. 2023.

調査資料

2 飼料中の腸球菌の薬剤耐性モニタリング調査（令和5年度）

新井 詠子*¹, 奥山 紀子*¹, 久保田 恵理*², 井上 華歩*¹, 橋本 仁康*¹

Monitoring Results of Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Animal Feed
(in the Fiscal Year 2023)

ARAI Eiko*¹, OKUYAMA Noriko*¹, KUBOTA Eri*², INOUE Kaho*¹ and HASHIMOTO Yoshiyasu*¹

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

*²Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Yokohama Office, FAMIC))

We have made an antimicrobial susceptibility test on enterococci isolated from soybean meal, fish meal, poultry by-product meal, swine and poultry by-product meal, and formula feed.

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 physiological characteristics, enterococci were identified with PCR and Rapid ID 32 STREP API. The minimum inhibitory concentration (MIC) was subsequently measured using the broth micro-dilution method according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Enterococci isolated from feed ingredients and formula feed were 28 *Enterococcus faecalis*, 20 *E. faecium*, and 45 other species. The antimicrobial resistance rates were 0.0 % to 22.2 % for *E. faecalis*, 0.0 % to 84.6 % for *E. faecium*, and 0.0 % to 53.1 % for other species.

Key words: antimicrobial resistance; soybean meal; fish meal; poultry by-product meal; swine and poultry by-product meal; formula feed; *Enterococcus faecalis*; *Enterococcus faecium*; minimum inhibitory concentration (MIC)

キーワード：薬剤耐性；大豆油かす；魚粉；チキンミール；原料混合肉骨粉；配合飼料；*Enterococcus faecalis*；*Enterococcus faecium*；最小発育阻止濃度（MIC）

1 緒 言

近年、薬剤耐性菌による感染症の増加が世界的に懸念されている¹⁾。2015年5月に開催された世界保健機関（WHO）の総会では、「薬剤耐性（Antimicrobial Resistance, AMR）に関するグローバル・アクション・プラン」が採択された²⁾。これを受けて2016年4月に日本政府は「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン」を公表し、ヒト、動物、食品、環境に関する薬剤耐性問題について、2016年から2020年までを計画期間として分野横断的に取組（ワンヘルスアプローチ）を進めてきた³⁾。当該計画は新型コロナウイルス感染症まん延の影響による延長を経て2022年に期間を終え、新たなアクションプランへの取組が2023年からの5年間を期間として進められている⁴⁾。

腸球菌（*Enterococcus*）は、ヒトの医療現場では従来から病原性が低く日和見感染菌として考え

*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，現横浜事務所

られてきた。しかし、1980年代以降に日本を含む各国で *E. faecalis* 及び *E. faecium* の多剤耐性菌が病院内感染症の主要な起因菌となった⁵⁾。国内の農場では1999年から実施されている動物由来薬剤耐性菌モニタリング (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System, JVARM) の調査で、牛、豚及び鶏 (以下「食用動物」という。) の腸内容物から薬剤耐性腸球菌が高い頻度で検出されている^{6)~9)}。食用動物に分布する薬剤耐性腸球菌は畜産物を介して食品媒介性感染症を引き起こす可能性があり、畜産物と食用動物との薬剤耐性の関連について調査が進められている¹⁰⁾。一方、飼料では海外における飼料中の薬剤耐性腸球菌の分布^{11)~14)}及び食用動物との薬剤耐性の関連¹⁴⁾についての報告はあるが、国内の状況に関する情報は充分でない。

本調査では、国内流通の飼料原料及び配合飼料から腸球菌を分離し、現在の薬剤耐性の実態を把握することを目的とした。2018年度から2020年度の調査^{15)~19)}において腸球菌の分離率が比較的高かったもの及び重要性の高い腸球菌の分離源となったものを中心に、飼料原料として大豆油かす、魚粉、チキンミール及び原料混合肉骨粉を、配合飼料として牛用、豚用及び鶏用を対象とし、腸球菌の分離を試みた。分離した菌株についてグラム染色、生化学的性状及び生物学的性状により菌種同定の上、薬剤感受性試験を行ったので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

試料は2023年4~12月に国内の飼料製造事業場において、飼料等検査実施要領²⁰⁾に規定された微生物試験用の試料の採取方法で採取した。試料は試験開始まで4℃で保存し、採取後5週間以内に試験に供した。なお、配合飼料においては、原材料に生菌剤が使用されていないものを採取した。

2.2 試薬

1) 試薬は等級があるものは特級を用いた。水は RFD230RA (東洋製作所製) により精製した蒸留水 (JIS K 0211 の 5213 に定義された蒸留水) 又は Direct-QUV3 (Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。

2) AC 液体培地

AC ブイヨン基礎培地 (日水製薬製) 50.5 g 及びアジ化ナトリウム (富士フィルム和光純薬製) 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。

3) エンテロココセル寒天培地 (以下「ECS 寒天培地」という。)

Enterococcosel Agar (Becton, Dickinson and Company 製) 56 g 又は Enterococcosel Agar (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、シャーレに一様に広がるように15~20 mL 分注し凝固させた。その後、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。

4) ブレインハートインフュージョン培地 (以下「BHI 寒天培地」という。)

Brain Heart Infusion 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。これを60℃まで冷却した後、シャーレに一様に広がるように15~20 mL 分注し凝固させた。その後、37℃で17時間以上培養し、培地のコンタミネーションを確認した。培地表面に水滴があった場合は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。

5) 生理食塩水

塩化ナトリウム濃度が 0.9 w/v% となるように蒸留水に加えて溶かし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

6) グラム染色液, 脱色液

前染色液はビクトリアブルー液, 脱色液はピクリン酸エタノール溶液, 後染色液はサフラニン液 (全て日水製薬製) を用いた。

7) 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 (和光純薬工業製) 0.8 g をエタノール 47.5 mL に溶かし、蒸留水 2.5 mL に加えて調製した。

8) 6.5 w/v% 塩化ナトリウム加ハートインフュージョン液体培地 (以下「6.5 % NaCl 加 HI 液体培地」という。)

Heart Infusion Broth (Becton, Dickinson and Company 製) 25 g, 塩化ナトリウム 60~65 g, ブドウ糖 1 g 及び指示薬として 1.6 w/v% ブ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 (内径 10 mm) に 3 mL 分注し、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

9) Rapid ID32 STREP API (ビオメリュー製) (以下「API」という。)

10) InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories 製)

11) PCR プライマー

菌種判定に用いた PCR プライマーを Table 1 に示した。腸球菌属の検出には 16S ribosomal RNA 領域を増幅するプライマーセットを用いた²¹⁾。腸球菌種の検出には *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* 及び *E. hirae* に特異的な superoxide dismutase (*sodA*) 領域を増幅するプライマーセットを用いた²²⁾。各プライマーは北海道システム・サイエンスに委託し合成した。合成されたプライマーは超純水で 100 µmol/L に溶解した。

Table 1 Primers

Species and gene	Primer	Direction	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Positive control	Reference
Genus detection						
16S rRNA gene	E1	F	TCA ACC GGG GAG GGT	733		21)
	E2	R	ATT ACT AGC GAT TCC GG			
Species identification						
Multiplex PCR						
<i>E. faecalis</i>	FL1	F	ACT TAT GTG ACT AAC TTA ACC	360	ATCC 29212	22)
	FL2	R	TAA TGG TGA ATC TTG GTT TGG			
<i>E. faecium</i>	FM1	F	GAA AAA ACA ATA GAA GAA TTA T	215	ATCC 6057	22)
	FM2	R	TGC TTT TTT GAA TTC TTC TTT A			
<i>E. durans</i>	DU1	F	CCT ACT GAT ATT AAG ACA GCG	295	ATCC 6056	22)
	DU2	R	TAA TCC TAA GAT AGG TGT TTG			
Duplex PCR						
<i>E. casseliflavus</i>	CA1	F	TCC TGA ATT AGG TGA AAA AAC	288	ATCC 700327	22)
	CA2	R	GCT AGT TTA CCG TCT TTA ACG			
<i>E. gallinarum</i>	GA1	F	TTA CTT GCT GAT TTT GAT TCG	173	ATCC 49753	22)
	GA2	R	TGA ATT CTT TGA AAT CAG			
<i>E. hirae</i>	HI1	F	CTT TCT GAT ATG GAT GCT GTC	187	ATCC 8043	22)
	HI2	R	TAA ATT CTT CCT TAA ATG TTG			

- 12) 10×PCR 緩衝液 10×PCR Gold Buffer (Thermo Fisher Scientific 製)
- 13) 2.5 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液 2.5 mmol/L dNTPs (Thermo Fisher Scientific 製)
- 14) 25 mmol/L 塩化マグネシウム溶液 25 mmol/L MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific 製)
- 15) DNA ポリメラーゼ液 AmpliTaq Gold DNA polymerase (5 unit/μL) (Thermo Fisher Scientific 製)
- 16) PCR 反応液
- i) *E. faecalis*, *E. faecium* 及び *E. durans* を同時に検出する反応系
 10×PCR 緩衝液 2.5 μL, 2.5 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液 2.0 μL, 25 mmol/L 塩化マグネシウム溶液 1.5 μL, DNA ポリメラーゼ液 0.7 μL, 各プライマー0.2 μL (E1, E2, FL1, FL2, FM1, FM2, DU1 及び DU2) 及び超純水 14.2 μL を混合した PCR 反応液 22.5 μL を PCR チューブ 1 本あたりの必要量とした。これらの試薬について、必要本数分の量をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) で混合して調製した。
- ii) *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* 又は *E. hirae* を個別に検出する反応系
 10×PCR 緩衝液 2.5 μL, 2.5 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液 2.0 μL, 25 mmol/L 塩化マグネシウム溶液 1.5 μL, DNA ポリメラーゼ液 0.7 μL, 各プライマー0.2 μL (E1, E2, CA1 及び CA2), (E1, E2, GA1 及び GA2) 又は (E1, E2, HI1 及び HI2) 及び超純水 15.0 μL を混合した PCR 反応液 22.5 μL を PCR チューブ 1 本あたりの必要量とした。これらの試薬について、必要本数分の量をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) で混合して調製した。
- 17) PCR 陽性対照
 標準株の *E. faecalis* (ATCC 29212), *E. faecium* (ATCC 6057), *E. casseliflavus* (ATCC 700327), *E. durans* (ATCC 6056), *E. gallinarum* (ATCC 49753) 及び *E. hirae* (ATCC 8043) を供して、2.6 の 1)の方法で菌体から DNA を抽出した。

- 18) Tris-acetate, EDTA 緩衝液 (以下「TAE 緩衝液」という.)
50×TAE 緩衝液 (ニッポンジーン製) 20 mL を超純水で希釈して 1000 mL とした.
- 19) 2.5 %アガロースゲル
Agarose L03 「TaKaRa」 (タカラバイオ製) 2.5 g を TAE 緩衝液 100 mL に加え, 電子レンジで加熱して溶かし, ゲルの厚さが 3~4 mm になるようにコームを差し込んだゲルメーカーに流し込み, 室温で静置し固化させた.
- 20) 電気泳動用色素溶液 6×Loagind Buffer (タカラバイオ製)
AC ブイヨン基礎培地 (日水製薬製) 50.5 g 及びアジ化ナトリウム (富士フィルム和光純薬製) 0.25 g を蒸留水 1000 mL に溶かし 500 mL 培養瓶に 250 mL 分注して, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.
- 21) DNA 分子量マーカー 100 bp DNA Ladder (タカラバイオ製)
- 22) ゲル染色液
0.625 mg/mL 臭化エチジウム溶液 (フナコシ製) 40 µL を TAE 緩衝液 50 mL に加えて染色液とした.
- 23) 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 を蒸留水 1000 mL に溶かした. これを試験管に 2 mL 分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.
- 24) 20 w/v%スキムミルク液 (以下「20 %スキムミルク」という.)
Skim Milk (Becton, Dickinson and Company 製) 200 g を蒸留水 1000 mL に溶かした. これを試験管に 2 mL 分注し, 110 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.
- 25) 薬剤感受性試験用プレート ‘栄研’ (オーダープレート) 栄研化学製 (以下「フローズンプレート」という.)
供試薬剤及び各薬剤の濃度範囲を Table 2 に示した. フローズンプレートは 2 倍系列で 10~12 段階に希釈した各薬剤及び Ca^{2+} , Mg^{2+} を MH 液体培地に添加し, それらを 96 穴マイクロプレートに充填したものをを用いた. フローズンプレートは -80 °C で冷凍保存し, 使用時は室温で解凍し試験に用いた.

Table 2 Antimicrobial agents

Group	Antimicrobial agent	Abbreviation	Concentration range (µg/mL)		Breakpoint (µg/mL)
Aminoglycosides	Gentamicin	GM	0.25	— 512	32 ^{a)}
	Kanamycin	KM	0.5	— 1024	128 ^{a)}
	Streptomycin	SM	0.5	— 512	—
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	CPFX	0.12	— 128	4 ^{b)}
Glycopeptides	Vancomycin	VCM	0.12	— 128	32 ^{b)}
Lincomycins	Lincomycin	LCM	0.25	— 512	128 ^{a)}
Macrolides	Azithromycin	AZM	0.25	— 64	—
	Erythromycin	EM	0.12	— 128	8 ^{b)}
	Tylosin	TS	0.12	— 256	64 ^{a)}
Penicillins	Ampicillin	ABPC	0.12	— 128	16 ^{b)}
Phenicols	Chloramphenicol	CP	0.25	— 512	32 ^{b)}
Polyethers	Salinomycin Sodium	SNM	0.12	— 32	—
Polypeptides	Bacitracin	BC	0.25	— 512	—
Tetracyclines	Tetracycline	TC	0.12	— 64	16 ^{b)}

a) Defined microbiologically in JVARM. Intermediate values of the two peaks were defined as breakpoints when MICs were bimodally distributed²³⁾.

b) Criteria published by CLSI²⁴⁾

2.3 装置及び器具

- 1) インキュベーター：176-4S 佐竹化学機械工業製，FMU-1301 福島工業製，IS802 ヤマト科学製
- 2) 光学顕微鏡：BX41 オリンパス製
- 3) プラスチック製滅菌シャーレ（以下「シャーレ」という．）：ニプロ製（内径 90 mm，高さ 15 mm）
- 4) アルミブロック恒温槽：Dry Thermo Unit DTU-2C タイテック製
- 5) 遠心分離機：MX-300 トミー精工製
- 6) DNA 増幅装置：GeneAmp PCR system 9700 Applied Biosystems 製
- 7) 電気泳動装置：Mupid-exU
- 8) 電気泳動パターン撮影システム：AE-6932GXES-U アトー製
- 9) トランスファーセット：ステム製
- 10) マイクロプレートリーディングミラー：極東製薬工業製

2.4 分離

- 1) 選択増菌培養
無菌操作で採取した試料 25 g を AC 液体培地に入れ，振り混ぜた後，37 °C で 18~48 時間培養した．
- 2) 選択分離培養
選択増菌培養液の 1 白金耳を ECS 寒天培地に画線塗布し，37 °C で 18~72 時間培養した．

3) 純粹分離培養

ECS 寒天培地上より、腸球菌の典型性状である周囲が黒褐色又は黒色帯で中心が半透明の集落を 1~2 個釣菌し、それぞれ生理食塩液 10~15 μL で懸濁した。各懸濁液の 1 白金耳を BHI 寒天培地に画線塗布し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 18~24 時間培養した。BHI 寒天培地上に形成された 1 集落を釣菌し、再度 BHI 寒天培地で培養した。

2.5 同定

1) 性状試験

i 形態学的性状

分離株の形態学的性状を確認するため、グラム染色を実施した。BHI 寒天培地から 1 集落を釣菌し、生理食塩液 10~15 μL に懸濁した。懸濁液をスライドガラス上に薄く広げて自然乾燥し、バーナーで塗抹面を火炎固定した。塗抹面に前染色液を十分滴下し、1 分間静置した後、水洗した。前染色液が溶け出さなくなるまで脱色液を滴下し水洗した。その後、後染色液を十分滴下し、1 分間静置した後、水洗した。スライドガラス上の水分をろ紙でふき取った。性状を光学顕微鏡で観察し、グラム陽性球菌であるかを鑑別した。同時にコンタミネーションを確認した。

ii 生理学的性状

分離株の生理学的性状を確認するため、高塩化ナトリウム耐性、高温耐性の試験を実施した。BHI 寒天培地から白金線で 1 集落を釣菌し、6.5 % NaCl 加 HI 液体培地に接種して、45 $^{\circ}\text{C}$ で 18~24 時間培養し性状を観察した。6.5 % NaCl 加 HI 液体培地が紫色から黄色や灰色に変化又は混濁があった分離株は高塩化ナトリウム耐性及び高温耐性が陽性とした。また、色素産生性は集落を観察し、鮮やかな黄色であった分離株は陽性とし、白色又はクリーム色であった分離株は陰性とした。

iii 生化学的性状

2.5 の 1) の i) においてグラム陽性球菌であることが確認され、かつ 2.5 の 1) の ii) において高塩化ナトリウム耐性及び高温耐性が陽性であった分離株について、API を用いてキットの説明書に従い試験を実施した。測定結果の判定は同定ソフトである APIWEB[®]を用いた。判定結果が「acceptable」、 「good」、 「very good」又は「excellent」の場合は判定された菌種を採用した。

2) PCR 法を用いた菌種同定

2.5 の 1) の i) においてグラム陽性球菌であることが確認され、かつ 2.5 の 1) の ii) において高塩化ナトリウム耐性及び高温耐性が陽性であった分離株を PCR に供した。

i DNA 抽出

標準株又は分離株を BHI 寒天培地で培養後、形成された集落を 1~2 個釣菌し 100 μL の生理食塩液が入った 1.5 mL チューブに懸濁した。懸濁した菌液を 12000 rpm で 1 分間遠心分離し上澄み液を除去した。その後、InstaGene Matrix を用いてキットの説明書に従って DNA の抽出操作を行い、陽性対照液及び DNA 試料液を調製した。

ii 試料溶液等の調製

PCR 反応液 22.5 μL を PCR チューブに入れ、DNA 試料液を 2.5 μL 加えて PCR 反応に供する試料溶液とした。同時に、PCR 反応液に陽性対照又は超純水を 2.5 μL 加えて、陽性対照

液及び陰性対照液を調製した。

iii PCR 反応

各試料溶液、陽性対照液及び陰性対照液の入った PCR チューブを DNA 増幅装置に入れ、*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. gallinarum* 及び *E. hirae* は、①：95 °C（4 分間保持）→ [95 °C（30 秒間保持）→55 °C（1 分間保持）→72 °C（1 分間保持）]（30 サイクル）→72 °C（7 分間保持）の条件で PCR 反応を行った。*E. casseliflavus* は②：95 °C（10 分間保持）→ [92 °C（30 秒間保持）→45 °C（1 分間保持）→72 °C（1 分間保持）]（30 サイクル）→72 °C（7 分間保持）の条件で PCR 反応を行った。

iv 電気泳動

TAE 緩衝液を入れた電気泳動装置に 2.5 %アガロースゲルを入れた。PCR 反応が終了した試料溶液、陽性対照液、陰性対照液及び DNA 分子量マーカー各 5 µL に電気泳動用色素溶液 1 µL をそれぞれ加えて混合した。各混合液の全量を先のアガロースゲルのウェルに注入し、100 V の定電圧でブロモフェノールブルーがウェルから 4~5 cm 移動するまで電気泳動を行った。電気泳動が終了したアガロースゲルをゲル染色液に入れ、約 30 分間浸して染色し、電気泳動パターン撮影システムで 312 nm の紫外線を照射し、PCR 増幅産物を確認した。

v 判定

陽性対照液において腸球菌属及び各腸球菌種の特異的なプライマーセットに対応する PCR 増幅産物がすべて検出され、陰性対照液において PCR 増幅産物が不検出の場合、かつ、試料溶液において腸球菌属及び各腸球菌種の特異的なプライマーセットに対応する PCR 増幅産物が検出された場合は *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* 又は *E. hirae* と菌種を判定した。また、試料溶液において腸球菌属の特異的なプライマーセットに対応する PCR 増幅産物のみが検出された場合は腸球菌属として判定した。

3) 菌種判定

PCR 法で判定された菌種を判定結果とし、PCR 法で菌種を判定できなかったが API で判定できた場合は API の結果を判定結果とした。ただし、色素産生性が PCR 又は API で判定された菌種の性状と不一致であった場合の分離株は判定結果を *Enterococcus sp.* とした。PCR 法又は API により菌種が判定できず、腸球菌属とのみ判定された場合の分離株は *Enterococcus sp.* とした。なお、高塩化ナトリウム耐性が陰性であった場合、高温耐性が陰性であった場合、グラム陽性球菌であることが確認できなかった場合又は PCR 法で腸球菌属と判定されなかった場合は、腸球菌の分離がなかったと判断した。

分離した菌株は HI 液体培地 2 mL と 20 %スキムミルク 2 mL を混合した溶液に入れ、-80 °C で冷凍保存した。

2.6 薬剤感受性試験

菌種同定された株を試験に供した。なお、同一検体から分離された 2 株の菌種同定の結果が一致した場合はいずれか 1 株を試験に供し、異なる結果であった場合はいずれの株も試験に供した。

1) 接種菌液の調製

分離株を BHI 寒天培地で 35 °C で 18~24 時間培養した。形成された集落を釣菌し McFarland No. 1 となるよう生理食塩水に懸濁した。更に、調製した菌液 1 mL を生理食塩水 9 mL で希釈し、接種菌液とした。

2) 菌液の接種及び培養

トランスファーセットを用いて専用トレイに接種菌液を入れ、そこに浸した 96 ピンプレートをフローズンプレートに接種した。接種後、フローズンプレートにふたをして、35 °Cで 16~24 時間培養した。

3) 判定

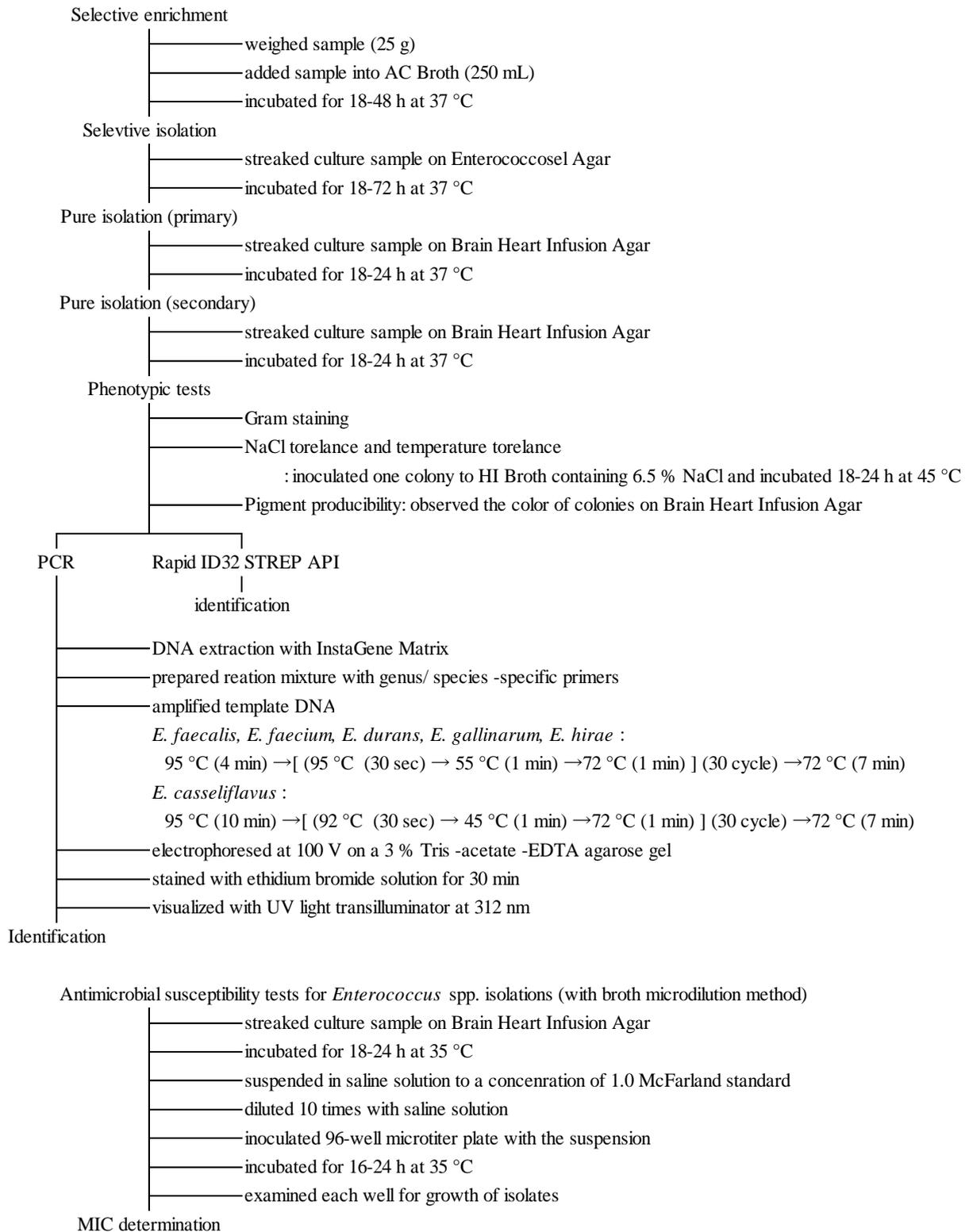
培養したフローズンプレートをマイクロプレートリーディングミラーの上に置き、肉眼で混濁又は沈殿が認められない場合及び沈殿物があっても直径が 1 mm 未満で 1 個の場合は発育阻止とみなした。それ以外の場合は発育とみなした。接種菌の発育が阻止された薬剤の最低濃度をもって最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration) (以下「MIC」という。) とした。フローズンプレートの薬剤を含まない Ca^{2+} , Mg^{2+} 添加 MH 液体培地が充填されたウェルに発育が認められない場合及び薬剤希釈系列中に不連続な発育が認められた場合 (スキップ現象) は再試験を行うこととし、再試験においても前述の事象が認められた場合は試験不成立とした。

各薬剤の耐性限界値 (以下「ブレイクポイント」という。) は、Clinical and Laboratory Standards Institute (以下「CLSI」という。) が規定するブレイクポイント²⁴⁾及び JVARM で得られた値 (二峰性を示す MIC 分布の中間点)²³⁾を用いた。供試株の MIC 値がブレイクポイント以上であった場合は耐性株とした。耐性率は供試株数 (試験不成立となったものを除く) における耐性株数の割合 (耐性株数/供試株数×100) で算出した。なお判定は、バンコマイシンについてのみ 24 時間培養後、その他の薬剤については 16~20 時間培養後に行った。

4) 試験の精度管理

精度管理株の *E. faecalis* (ATCC 29212) の MIC 値が CLSI の定める精度管理限界値²⁴⁾以内であることを試験成立条件とした。

なお、分離から薬剤感受性試験までの概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Antimicrobial susceptibility test of *Enterococcus* spp. isolated from feed ingredients and formula feed

3 結果及び考察

3.1 飼料原料及び配合飼料中の腸球菌の検出状況

調査の対象とした飼料原料及び配合飼料における腸球菌の分離頻度を Table 3 に示した。検体

とした 79 試料のうち 52 試料から腸球菌が分離された。動物質性原料においては魚粉の陽性率が 65 % と最も高く、次いでチキンミール、原料混合肉骨粉がそれぞれ 53 %、47 % であった。植物質性原料として大豆油かすを対象としたが、検体数が少なく引き続き調査が必要と考えられた。配合飼料の陽性率は鶏用及び牛用がいずれも 88 % と高かった。豚用配合飼料は検体数が少なく、引き続き調査が必要と考えられた。

Table 3 Isolates from feed samples

	No. of samples	No. of samples contain <i>Enterococci</i>	Rate of samples with <i>Enterococci</i> (%)	No. of isolates
Soybean meal	2	1	50	2
Fish meal	20	13	65	21
Poultry by-product meal	15	8	53	16
Swine and poultry by-product meal	15	7	47	12
Poultry feed	8	7	88	12
Swine feed	3	2	67	4
Cattle feed	16	14	88	26
Total	79	52	66	93

3.2 菌種別分離頻度

本調査で分離された腸球菌の菌種別分離頻度を Table 4 に示した。腸球菌として分離された 93 株のうち 59 株について菌種が同定された。*E. faecalis* が最も多く分離され (28 株)、次いで *E. faecium* (20 株)、*E. hirae* (10 株)、*E. durans* (4 株)、*E. casseliflavus* (1 株) の順に分離頻度が高かった。飼料の種類別に見ると、魚粉及びチキンミールでは *E. faecalis* がそれぞれ 48 % (10/21 株) 及び 44 % (7/16 株) の割合で分離され、これらの飼料中に存在する主要な腸球菌種であった。また牛用配合飼料では *E. faecalis* 及び *E. faecium* がそれぞれ 23 % (6/26 株) 及び 27 % (7/26 株) の頻度で分離され、この 2 菌種が主要な腸球菌種となっていた。菌種別では、*E. faecalis* は飼料原料からの分離頻度が高い傾向にあった (20/28 株) のに対して、*E. hirae* は配合飼料からの分離頻度が高い傾向にあった (7/10 株)。

Table 4 Isolation rate of *Enterococcus*

Samples	No. of <i>Enterococcus</i> -positive samples	No. of isolates						Total
		<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. hirae</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	
Soybean meal	1	0	2	0	0	0	0	2
Fish meal	13	10	3	0	3	2	3	21
Poultry by-product meal	8	7	2	1	0	1	5	16
Swine and poultry by-product meal	7	3	2	0	0	0	7	12
Poultry feed	7	2	4	0	1	2	3	12
Swine feed	2	0	0	0	0	1	3	4
Cattle feed	14	6	7	0	0	4	9	26
Total	52	28	20	1	4	10	30	93

3.3 薬剤感受性

菌種同定により腸球菌と判定された 93 株のうち、同じ試料から分離され、同一菌株の可能性のあるものを除いた 70 株を薬剤感受性試験に供した。うち 7 株はフローズンプレート上で正常な菌の発育が認められず試験不成立となった。試験成立となった 63 株の耐性率を Table 5 に示した。ヒト医療の観点から重要とされている VCM に対して、耐性を示す菌株はなかった。その他、CP 及び ABPC に対しても耐性は認められなかった。一方でいずれかの薬剤に耐性を示した菌株は 40 株あり、そのうち 23 株は複数の薬剤に耐性を示した。KM に耐性を示す菌株が最も高い頻度で分離されたが (50.8%)、KM はアミノグリコシド系薬剤であり、腸球菌はアミノグリコシド系薬剤に対して内因性耐性を持っている²⁵⁾ことが理由のひとつと考えられた。次いで EM 及び TC に耐性を示す菌株が多く見られた (それぞれ 34.9 % 及び 12.7 %)。EM の属するマクロライド系薬剤はヒト及び畜水産分野において、TC の属するテトラサイクリン系薬剤は特に畜産分野において多く使用されており²³⁾、JVARM における 2020 年のと畜場等由来の腸球菌に関する調査でも高い耐性率が示されている²³⁾。本調査の結果から、飼料中にも EM 及び TC に対する耐性をもつ腸球菌が存在していることから、引き続き動向を調査する必要があると考えられた。

いずれかの薬剤に耐性を示した菌株の各耐性パターンを Table 6 に示した。多剤耐性菌 (内因性耐性を持つ KM を除く複数の薬剤に耐性を認めた菌株) は 10 株あった。

分離株数の多かった *E. faecalis*, *E. faecium* 及びその他の腸球菌について、各薬剤に対する耐性率を Table 7 に示した。いずれも KM に対して最も高い耐性率を示したが、耐性率及び MIC は *E. faecium* においてより高かった。

Table 5 Antibiotic susceptibility of *Enterococcus* spp. from each feed samples

	Fish meal (<i>n</i> = 12)				Poultry by-product meal (<i>n</i> = 8)				Swine and poultry by-product meal (<i>n</i> = 6)				Break point (µg/mL)
	MIC ₅₀		Resistance		MIC ₅₀		Resistance		MIC ₅₀		Resistance		
	(µg/mL)	(µg/mL)	<i>n</i>	(%)	(µg/mL)	(µg/mL)	<i>n</i>	(%)	(µg/mL)	(µg/mL)	<i>n</i>	(%)	
KM	64	256	4	33.3	64	>1024	3	37.5	128	512	3	50.0	128 ^{a)}
GM	8	16	0	0.0	8	16	0	0.0	8	16	0	0.0	32 ^{a)}
SM	32	128	-	-	64	>512	-	-	64	128	-	-	-
VCM	1	2	0	0.0	1	4	0	0.0	1	4	0	0.0	32 ^{b)}
TC	0.25	64	2	16.7	0.5	64	1	12.5	1	16	1	16.7	16 ^{b)}
CP	8	8	0	0.0	8	8	0	0.0	8	8	0	0.0	32 ^{b)}
CPFX	1	2	1	8.3	1	4	1	12.5	1	8	1	16.7	4 ^{b)}
ABPC	1	2	0	0.0	1	2	0	0.0	1	1	0	0.0	16 ^{b)}
SNM	1	2	-	-	2	2	-	-	1	2	-	-	-
BC	128	256	-	-	256	512	-	-	256	>512	-	-	-
AZM	16	32	-	-	2	>64	-	-	8	32	-	-	-
EM	4	16	4	33.3	1	>128	2	25.0	4	16	2	33.3	8 ^{b)}
TS	4	8	1	8.3	2	>256	1	12.5	4	16	0	0.0	64 ^{a)}
LCM	32	64	1	8.3	64	>512	1	12.5	16	64	0	0.0	128 ^{a)}

	Poultry feed (<i>n</i> = 8)				Cattle feed (<i>n</i> = 23)				Total (<i>n</i> = 63)				Break point (µg/mL)	Reference ²¹⁾ Resistance of isolates from slaughterhouses in 2020 (%) ^{c)}
	MIC ₅₀		Resistance		MIC ₅₀		Resistance		MIC ₅₀		Resistance			
	(µg/mL)	(µg/mL)	<i>n</i>	(%)	(µg/mL)	(µg/mL)	<i>n</i>	(%)	(µg/mL)	(µg/mL)	<i>n</i>	(%)		
KM	128	1024	4	50.0	128	1024	14	60.9	128	1024	32	50.8	128 ^{a)}	13.9 - 48.2
GM	8	32	1	12.5	8	16	1	4.3	8	16	2	3.2	32 ^{a)}	6.2 - 7.5
SM	64	64	-	-	64	128	-	-	64	128	-	-	-	-
VCM	1	2	0	0.0	1	2	0	0.0	1	2	0	0.0	32 ^{b)}	0.0 -
TC	0.5	>64	2	25.0	0.5	0.5	1	4.3	0.5	16	8	12.7	16 ^{b)}	28.5 - 66.9
CP	8	8	0	0.0	8	8	0	0.0	8	8	0	0.0	32 ^{b)}	0.4 - 16.1
CPFX	1	16	1	12.5	1	2	1	4.3	1	2	6	9.5	4 ^{b)}	0.0 - 7.3
ABPC	1	2	0	0.0	1	2	0	0.0	1	2	0	0.0	16 ^{b)}	0.0 - 0.5
SNM	2	2	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-	-	-
BC	256	>512	-	-	256	512	-	-	256	512	-	-	-	-
AZM	1	16	-	-	8	32	-	-	8	32	-	-	-	-
EM	0.25	16	2	25.0	4	16	8	34.8	2	16	22	34.9	8 ^{b)}	4.9 - 36.8
TS	4	8	0	0.0	4	16	0	0.0	4	16	2	3.2	64 ^{a)}	3.4 - 30.6
LCM	32	64	0	0.0	32	64	0	0.0	32	64	2	3.2	128 ^{a)}	3.4 - 40.9

- a) Defined microbiologically in JVARM. Intermediate values of the two peaks were defined as breakpoints when MICs were bimodally distributed²³⁾.
- b) Criteria as published by CLSI²⁴⁾.
- c) Maximum and minimum of resistance with poultry, swine and cattle.

Table 6 Pattern of antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp.

Feed ingredient	Species	Pattern of resistance	Compound feed	Species	Pattern of resistance
Soybean meal	<i>E. faecium</i>	KM, EM	Poultry feed	<i>E. faecium</i>	KM, EM
Soybean meal	<i>E. faecium</i>	TC	Poultry feed	<i>E. faecium</i>	GM, KM, EM
Fish meal	<i>E. faecalis</i>	TC	Poultry feed	<i>E. durans</i>	TC
Fish meal	<i>E. faecalis</i>	KM	Poultry feed	<i>E. hirae</i>	TC, CPFX
Fish meal	<i>E. faecalis</i>	EM, TS, LCM	Poultry feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM
Fish meal	<i>E. faecium</i>	KM, EM, TC	Poultry feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM
Fish meal	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, EM	Swine feed	<i>E. hirae</i>	KM, EM, CPFX
Fish meal	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, EM, CPFX	Swine feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, EM
Poultry by-product meal	<i>E. faecalis</i>	KM, EM, TS, LCM, TC	Swine feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, EM
Poultry by-product meal	<i>E. hirae</i>	KM, EM	Cattle feed	<i>E. faecalis</i>	KM
Poultry by-product meal	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, CPFX	Cattle feed	<i>E. faecium</i>	KM
Swine and poultry by-product meal	<i>E. faecalis</i>	TC	Cattle feed	<i>E. faecium</i>	KM, EM
Swine and poultry by-product meal	<i>E. faecalis</i>	KM	Cattle feed	<i>E. faecium</i>	KM, EM
Swine and poultry by-product meal	<i>E. faecium</i>	KM, EM, CPFX	Cattle feed	<i>E. faecium</i>	KM, EM
Swine and poultry by-product meal	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, EM	Cattle feed	<i>E. faecium</i>	EM
			Cattle feed	<i>E. faecium</i>	KM, EM, TC
			Cattle feed	<i>E. faecium</i>	GM, KM, EM
			Cattle feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM
			Cattle feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM
			Cattle feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM
			Cattle feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM
			Cattle feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM
			Cattle feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, EM
			Cattle feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, EM
			Cattle feed	<i>Enterococcus</i> sp.	CPFX

Table 7 Antibiotic susceptibility of *E. faecalis*, *E. faecium* and other *Enterococci*

	<i>E. faecalis</i> (n = 18)				<i>E. faecium</i> (n = 13)				Others (n = 32)			
	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	Resistance n (%)		MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	Resistance n (%)		MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	Resistance n (%)	
KM	64	128	4 22.2		256	1024	11 84.6		128	1024	17 53.1	
GM	16	16	0 0.0		8	32	2 15.4		8	16	0 0.0	
TC	0.5	64	3 16.7		0.5	64	3 23.1		0.5	1	2 6.3	
CPFX	1	2	0 0.0		0.5	1	1 7.7		1	4	5 15.6	
ABPC	1	1	0 0.0		1	2	0 0.0		1	2	0 0.0	
EM	4	>128	2 11.1		8	16	11 84.6		0.25	16	9 28.1	
TS	2	>256	2 11.1		4	8	0 0.0		8	16	0 0.0	
LCM	32	512	2 11.1		16	32	0 0.0		32	64	0 0.0	
CP	8	8	0 0.0		8	16	0 0.0		8	8	0 0.0	
VCM	2	2	0 0.0		1	2	0 0.0		1	1	0 0.0	

4 まとめ

国内流通の飼料原料及び配合飼料から腸球菌を分離し、薬剤耐性の状況を調べた。2023年度の調査において得られた知見を以下に示した。

- 1) 調査対象として79点の試料を収集し、うち52点から腸球菌が分離された。
- 2) 93株の腸球菌が分離され、うち59株について菌種が判定された。菌種別分離頻度は *E. faecalis* が最も高く、*E. faecium*、*E. hirae*、*E. durans*、*E. casseliflavus* の順に高かった。

- 3) 各飼料等における腸球菌の陽性率は、鶏用配合飼料及び牛用配合飼料（88 %）、魚粉（65 %）、チキンミール（53 %）、原料混合肉骨粉（47 %）の順に高かった。大豆油かす及び豚用配合飼料については検体数が少なく、さらなる調査が必要と考えられた。
- 4) 感受性試験を行った 63 株のうち 40 株において薬剤耐性が認められ、23 株については複数の薬剤に対して耐性があった。EM 及び TC においても耐性率が高く（34.9 %及び 12.7 %）、引き続き調査が必要と考えられた。ヒト医療の観点から重要視される VCM についてはいずれの菌株においても耐性を認めなかった。

文 献

- 1) Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi, A K M, Wertheim H F L, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara G L, Gould I M, Goossens H, Greko C, So A D, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta A Q, Qamar F N, Mir F, Kariuki S, Bhutta Z A, Coates A, Bergstrom R, Wright G D, Brown E D, Cars O: Antibiotic resistance—the need for global solutions, *Lancet Infect. Dis.*, **13**(12), 1057-1098 (2013).
- 2) WHO: Global action plan on antimicrobial resistance. <https://www.emro.who.int/health-topics/drug-resistance/global-action-plan.html>, cited 2 Feb. 2024.
- 3) The government of Japan: National action plan on antimicrobial resistance (AMR) 2016-2020. <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000138942.pdf>, cited 2 Feb. 2024.
- 4) The government of Japan: National action plan on antimicrobial resistance (AMR) 2023-2027. <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001096228.pdf>, cited 10 Apr. 2024.
- 5) George R C, Uttley A H C: Susceptibility of enterococci and epidemiology of enterococcal infection in the 1980s, *Epidem. Inf.*, **103**, 403-413 (1989).
- 6) Kojima A, Morioka A, Kijima M, Ishihara K, Asai T, Fujisawa T, Tamura Y, Takahashi T: Classification and antimicrobial susceptibilities of *Enterococcus* species isolated from apparently healthy food-producing animals in Japan, *Zoonoses and Public Health*, **57**, 137-141 (2010).
- 7) National Veterinary Assay Laboratory Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries: A report on the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring system 2000 to 2007, (2009). https://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/pdf/jvarm2000_2007_final_201005.pdf, cited 2 Feb. 2024.
- 8) National Veterinary Assay Laboratory Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries: A report on the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring system 2008 to 2011, (2013). https://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/pdf/jvarm2008_2011.pdf, cited 2 Feb. 2024.
- 9) The AMR One Health Surveillance Committee: Nippon AMR One Health Report (NAOR) 2019. <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000714628.pdf>, cited 2 Feb. 2024.
- 10) Bortolaia V, Espinosa-Gongora C, Guardabassi L: Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat, *Clin. Microbiol. Infect.*, **22**(2), 130-140 (2016).
- 11) da Costa P M, Oliveira M, Bica A, Vaz-Pires P, Bernardo F: Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from poultry feed and feed ingredients, *Vet. Microbiol.*, **120**, 122-131 (2007).

- 12) Ge B, LaFon P C, Carter P J, McDermott S D, Abbott J, Glenn A, Ayers S L, Friedman S L, Parige J C, Wagner D D, Zhao S, McDermott P F, Rasmussen M A: Retrospective analysis of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* in animal feed ingredients, *Foodborne Pathog.*, **10**(8), 684-691 (2013).
- 13) Channaiah L H, Subramanyam B, Zurek L: Molecular characterization of antibiotic resistant and potentially virulent enterococci isolated from swine farms and feed mills, *J. Stored Prod. Res.*, **77**, 189-196 (2018).
- 14) Ge B, Domesle K, Gaines S, Lam C, Jones S M B, Yang Q, Ayers S L, McDermott P E: Prevalence and antimicrobial susceptibility of indicator organisms *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. animal food, 2005-2011. *Microorganisms*, **8**(7), 1048, doi: 10.3390/microorganisms8071048 (2020).
- 15) 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).
- 16) 浅尾 美由起, 奥山 紀子, 山上 陽平: 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), 飼料研究報告, **45**, 164-178 (2020).
- 17) 山上 陽平, 有原 若奈, 増井 亮太, 高橋 亜紀子, 橋本 仁康: 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 2 年度), 令和 2 年度飼料分析基準検討会 (2021).
- 18) 山上 陽平, 浅尾 美由起, 高橋 亜紀子, 橋本 仁康, 奥山 紀子, 新井 詠子, 有原 若奈, 増井 亮太: 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 3 年度), 令和 3 年度飼料分析基準検討会 (2022).
- 19) Yamagami Y, Asao M, Takahashi A, Hashimoto Y, Okuyama N, Arai E, Arihara W, Masui R, Shimazaki Y: Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from animal feed in Japan, *Front. Vet. Sci.*, Volume 10 - 2023, doi.org/10.3389/fvets.2023.1328552 (2024).
- 20) 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).
- 21) Deasy B M, Rea M C, Fitzgerald G F, Cogan T M, Beresford T P: A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*, *System. Appl. Microbiol.*, **23**, 510-522 (2000).
- 22) Jackson C R, Fedorka-Cray P J, Barrett J B: Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci, *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 3558-3565 (2004).
- 23) 厚生労働省: 薬剤耐性 (AMR) ワンヘルス動向調査年次報告書 2022, <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001182435.pdf>, cited 2 Feb. 2024.
- 24) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 33rd Edition., CLSI document M-100-ED33 (2023).
- 25) 日本臨床微生物学会: 抗菌薬感受性検査のための標準法 第 24 版 2014 年 1 月 (2014) (ISBN: 1-56238-000-0).

調査資料

3 特定添加物検定結果等について（令和 5 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 2023)

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 5 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 5 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 5 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 5 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 4 業者からあり、前年度からの増減はなかった．申請のあった 4 業者のそれぞれの製造形態等は、①製剤の製造のみを行っているのが 2 業者、②製剤の輸入のみを行っているのが 2 業者であった．なお、国内製造の製剤に用いられている製造用原体は輸入品であった．

令和 5 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、9 銘柄）であった．

また、輸入先国について、製剤の輸入先国は、アピラマイシンが英国、ナラシンが米国、フラボフォスフォリポール及びサリノマイシンナトリウムがブルガリア、製造用原体の輸入先国は、サリノマイシンナトリウム及びエンラマイシンが中国で、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 5 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	エランコジャパン株式会社※2		アピラマイシン	○	サーマックス200	200
			ナラシン	○	モンデバン100	100
	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	○	サリノマイシン 10%製剤 K-J	100
	ロック化学製品株式会社	御殿場工場	エンラマイシン	○	エンラマイシン8%R	80
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
				○	サコックス200	200
			フラボフォスフォリポール	○	フラボマイシン80	80
計	4業者	2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 5 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令和 3 年度及び令和 4 年度の結果とともに表 2 に示した。

令和 5 年度の検定合格件数は 101 件，合格数量は 634 トンで実量力価換算量は 82 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 104.1 %，100.5 %，98.3 %となり，前年度と比較して大きな変動は見られなかった。

令和 5 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 40.8 %（前年度 48.3 %）で最も多く，次いでナラシン 39.5 %（前年度 33.0 %），アピラマイシン 13.4 %（前年度 9.5 %），フラボフォスフォリポール 5.7 %（前年度 7.3 %），エンラマイシン 0.6 %（前年度 0.7 %）となった。また，実量力価換算量については，令和 5 年度はサリノマイシンナトリウムが全体の 44.8 %（前年度 53.8 %）で最も多く，次いでナラシン 30.6 %（前年度 25.0 %），アピラマイシン 20.7 %（前年度 14.4 %），フラボフォスフォリポール 3.5 %（前年度 4.4 %），エンラマイシン 0.4 %（前年度実績 0.4 %）となった。

検定合格数量を類別にみると，令和 5 年度は，ポリエーテル系が 80.3 %（前年度 82.6 %），オルトソマイシン系が 13.4 %（前年度 9.5 %），ホスホグリコリピッド系が 5.7 %（前年度 7.3 %），ポリペプチド系が 0.6 %（前年度 0.7 %）であった。

令和 5 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，ナラシン及びアピラマイシンは増加したが，エンラマイシン，フラボフォスフォリポール，サリノマイシンナトリウム及びモネンシンナトリウムは減少した。前年度検定実績があったモネンシンナトリウムについては申請がなかった。

同様に類別に前年度と比較すると，検定合格数量及び実量力価換算量ともにオルトソマイシン系は増加したものの，ホスホグリコリピッド系及びポリエーテル系は減少した。ポリペプチド系は前年並みであった。

亜鉛バシトラシンは平成 28 年度から，ノシヘプタイドは令和元年度から，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，ピコザマイシンは平成 11 年度から検定の申請がなく，これらは令和 5 年度も申請がなかった。なお，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は，後述の表 4 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）
（令和3年度～令和5年度）

種類別	特定添加物の種類	令和3年度			令和4年度			令和5年度		
		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))	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	3	3,720	297.6	2	4,120	330	3	3,960	317
	ノシヘブタイド	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ホスホグリコ リピッド系	小計	3	3,720	297.6	2	4,120	330	3	3,960	317
	フラボフオスフォリポール	2	18,000	1,440.0	8	46,000	3,680	6	36,000	2,880
	小計	2	18,000	1,440.0	8	46,000	3,680	6	36,000	2,880
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	33	315,220	42,322.0	48	304,685	44,841	45	259,020	36,702
	センデューラマイシンナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ナラシン	13	142,300	14,230.0	20	208,625	20,863	23	250,425	25,043
	モネンシンナトリウム	—	—	—	2	8,000	1,600	—	—	—
	ラサロシドナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—
オルトソマイシ ン系	小計	46	457,520	56,552.0	70	521,310	67,304	68	509,445	61,745
	アピラマイシン	17	62,550	12,510.0	17	59,950	11,990	24	84,925	16,985
	小計	17	62,550	12,510.0	17	59,950	11,990	24	84,925	16,985
その他	ピコザマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	小計	0	0	0	0	0	0	0	0	0
総計	68	541,790	70,800	97	631,380	83,303	101	634,330	81,926	
対前年度比 (%)	51.1	64.3	74.8	142.6	116.5	117.7	104.1	100.5	98.3	

—：実績なし

3 特定添加物の精製級及び飼料級別の検定合格件数等

特定添加物は、培養後の製造方法の違いにより、精製級と飼料級に区分される。前者は、抗生物質の有効成分のみを培養液から抽出及び精製した高純度の製造用原体に由来するもので、後者は、抗生物質の有効成分、製造に用いた培地成分及び菌体成分を含む培養液を乾燥した製造用原体に由来するものである。

令和5年度の特定添加物の精製級及び飼料級別の検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量を表3に示した。

精製級の実績はなく、すべて飼料級のみであった。

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5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3 検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量（精製級・飼料級別）
（令和5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	/	/	/	3	3,960	317
	ノシヘプタイド	—	—	—	—	—	—
ホスホグリコリビッド系	フラボフォスフォリポール	/	/	/	6	36,000	2,880
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	—	—	—	45	259,020	36,702
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	/	/	/
	ナラシン	/	/	/	23	250,425	25,043
	モネンシンナトリウム	—	—	—	/	/	/
ラサロシドナトリウム	—	—	—	/	/	/	
オルトソマイシン系	アピラマイシン	/	/	/	24	84,925	16,985
その他	ピコザマイシン	—	—	—	/	/	/
合計		0	0	0	101	634,330	81,926
割合	割合 (%)	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0

—：実績なし

※斜線は、当該区分の規格がないことを示す。

4 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等

令和5年度初めの時点で、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。

令和5年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量及び実量力価換算量を表4に示した。なお、ノシヘプタイド及び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5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754トン（対前年度比95.1%）、実量力価換算量は114トン（力価）（対前年度比96.1%）であった。

令和5年度の製造数量及び実量力価換算量は、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、サリノマイシンナトリウム、エンラマイシン、ノシヘプタイドの順に多かった。

表 4 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等
(令和4・5年度)

類 別	特定添加物の種類	令和4年度		令和5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	64,340	5,147	81,840	6,547
	ノシヘプタイド	70,800	2,832	61,620	2,465
	小 計	135,140	7,979	143,460	9,012
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	140,840	14,084	110,500	11,050
	モネンシンナトリウム	380,560	76,112	378,360	75,672
	ラサロシドナトリウム	136,780	20,517	121,840	18,276
	小 計	658,180	110,713	610,700	104,998
総 計		793,320	118,692	754,160	114,010
対 前 年 度 比 (%)		93.6	96.3	95.1	96.1

※各登録特定飼料等製造業者より聞き取り

5 特定添加物の総数量等

令和5年度の特定添加物の検定合格数量（製造及び輸入）と登録特定飼料等製造業者による製造数量の総計（以下「総数量」という。）及びその実量力価換算量を表5に示した。

令和5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、モネンシンナトリウム（27.2%）、サリノマイシンナトリウム（26.6%）、ナラシン（18.0%）の順に多く、類別ではポリエーテル系が最も多く、1,120トン（検定：509トン、登録：611トン）と全体の80.7%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（38.6%）、サリノマイシンナトリウム（24.4%）、ナラシン（12.8%）の順に多く、類別でもポリエーテル系が最も多く、167トン(力価)（検定：62トン(力価)、登録：105トン(力価)）と全体の85.1%を占めた。

次に、平成26年度から令和5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1及び図2に示した。

総数量は増減があるものの、減少傾向で推移した。また、その実量力価換算量はおおよそ変わらず推移した。

検定合格数量については増減があるものの、減少傾向で推移した。また、実量力価換算量も同様に減少傾向で推移した。

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29年度から令和元年度までの3年間及び令和3年度以降、検定合格数量を上回っている。令和5年度は、特定添加物の総数量全体の54.3%（前年度55.7%）、実量力価換算量全体の58.2%（前年度58.8%）を登録特定飼料等製造業者による製造が占めた。

表5 特定添加物の総数量等
（令和5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	85,800	6.2	6,864	3.5
	ノシヘプタイド	61,620	4.4	2,465	1.3
	小計	147,420	10.6	9,329	4.8
ホスホグリコリピッド系	フラボフォスフォリポール	36,000	2.6	2,880	1.5
	小計	36,000	2.6	2,880	1.5
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	369,520	26.6	47,752	24.4
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—
	ナラシン	250,425	18.0	25,043	12.8
	モネンシンナトリウム	378,360	27.2	75,672	38.6
	ラサロシドナトリウム	121,840	8.8	18,276	9.3
	小計	1,120,145	80.7	166,743	85.1
オルトソマイシン系	アピラマイシン	84,925	6.1	16,985	8.7
	小計	84,925	6.1	16,985	8.7
その他	ビコザマイシン	—	—	—	—
	小計	0	0.0	0	0.0
総計		1,388,490	100.0	195,936	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

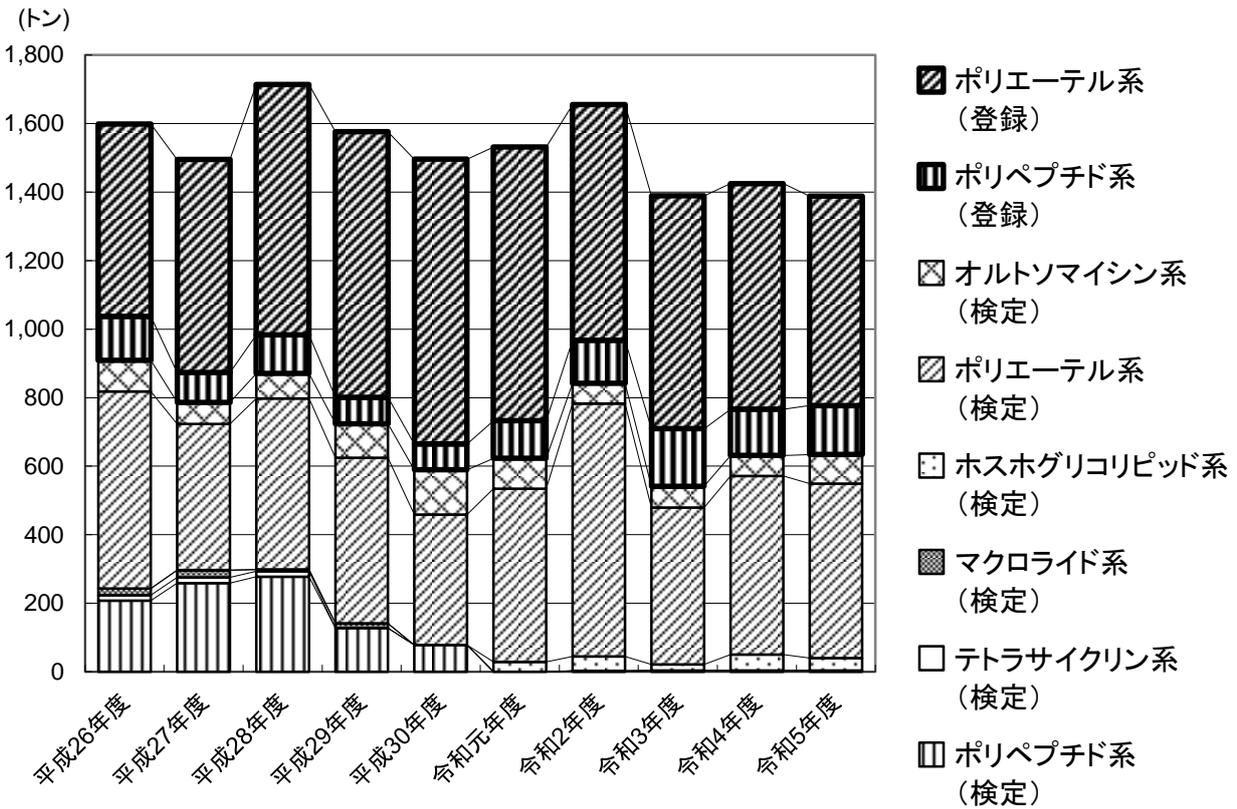


図1 特定添加物の総数量の推移 (類別)

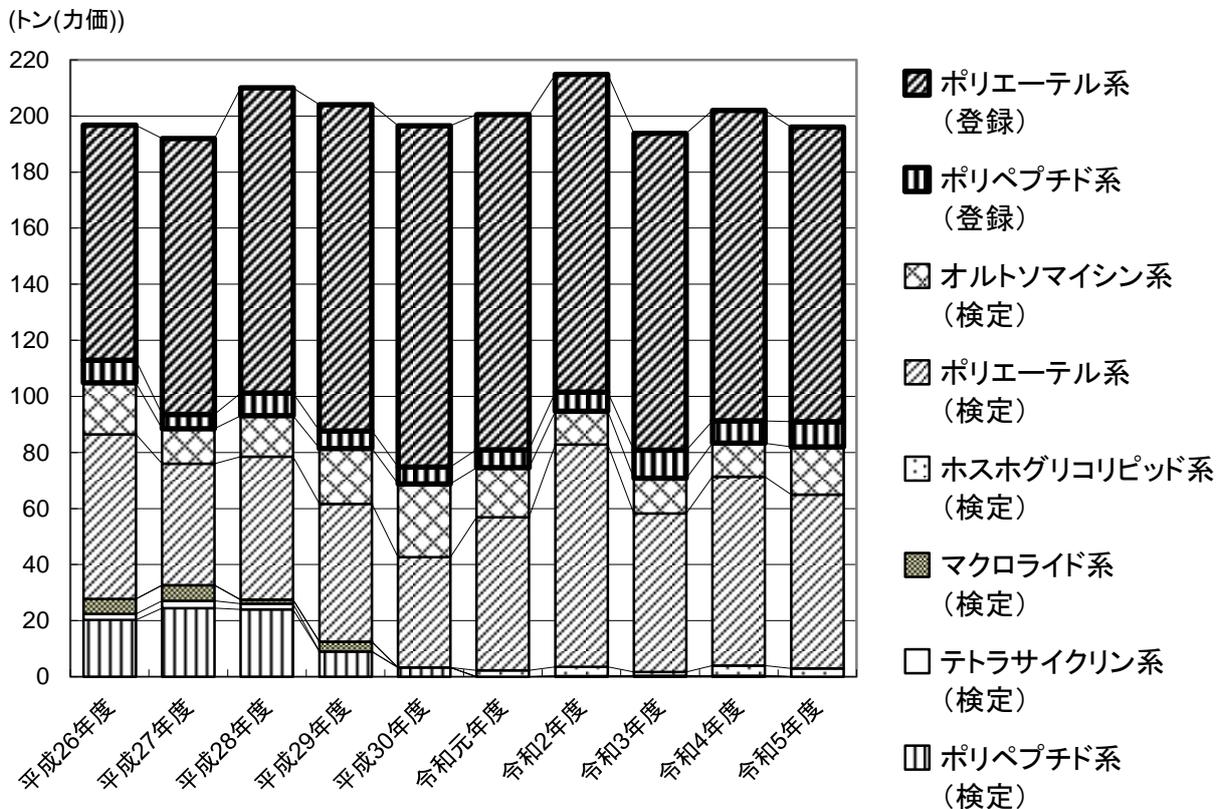


図2 特定添加物の総数の実量カ価換算量の推移 (類別)

7 要 約

- 1) 令和5年度の特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、4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101件、合格数量は634トン、実量力価換算量は82トン(力価)で、前年度に比べて件数、数量及び実量力価換算量ともに増加した。
 - iii 検定に合格した特定添加物はすべて飼料級であり、精製級の実績はなかった。
 - 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、ポリペプチド系及びホスホグリコリピッド系は前年度に比べて減少したが、オルトソマイシン系は増加した。また、実量力価換算量も同様の結果であった。
- 2) 令和5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1業者1工場であり、5種類製造し、製造数量は754トン、実量力価換算量は114トン(力価)で、前年度に比べて、製造数量及び実量力価換算量ともに減少した。
 - ii 種類別にみると、製造数量はモネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、サリノマイシンナトリウムの順に多かった。また、実量力価換算量も同様の結果であった。
- 3) 令和5年度の特特定添加物の総数量等の結果は、以下のとおりである。

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、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ナラシンの順に多かった。また、実量力価換算量においても、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ナラシンの順に多かった。

他誌掲載論文

(抄録)

1 Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from animal feed in Japan

YAMAGAMI Yohei, ASAO Miyuki, TAKAHASHI Akiko,
HASHIMOTO Yoshiyasu, OKUYAMA Noriko, ARAI Eiko,
ARIHARA Wakana, MASUI Ryota and SHIMAZAKI Yoko
Frontiers in Veterinary Science, 10 (2023).

DOI: 10.3389/fvets.2023.1328552

2 Occurrence Evaluation of Aflatoxigenic *Aspergilli* in Thai Corn Using Dichlorvos-ammonia and Whole-agar Extraction Methods

POUNGPONG Kanokporn, MANEEBOON Thanapoom,
ARAI Wichitra, AOYAMA Koji, FURUKAWA Tomohiro,
TODORIKI Setsuko, YABE Kimiko,
BUNCHASAK Chaiyapoom and KUSHIRO Masayo

Japan Agricultural Research Quarterly, 58(2), 83-91 (2024).

DOI: 10.6090/jarq.58.83

飼料研究報告編集委員

委員長	功刀 豊	副委員長	嶋崎 洋子
	青山 幸二		橋本 仁康
	石橋 隆幸		原 秀樹
	大島 慎司		保田 伊世
	小塚 健志		山多 晴子
	高橋 亜紀子		山多 利秋
	西村 真由美		吉永 晋
	野崎 友春		

飼料研究報告 第49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6年9月

編集 飼料研究報告編集委員会