水、試薬等並びに器具類は必要に応じ、滅菌したものを用いる。

培地等で pH の調整を要する場合は、塩酸（1 mol/L）又は水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）を用いる。なお、培地の組成は標準処方である。

## 1　サルモネラ

### 1.1　培養法

#### A　　試薬等の調製

1) 界面活性剤溶液　　界面活性剤[注1]溶液（10 v/v%）を 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。

2) ヨウ素・ヨウ化カリウム溶液　　ヨウ化カリウム 20.0 g（19.95~20.04 g）を水 50 mL に溶かし、更にヨウ素 12.5 g（12.45~12.54 g）を加えて溶かした後、水を加えて 100 mL とする。

3) 生理食塩液　　塩化ナトリウム溶液（0.9 w/v%）を 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。

4) 緩衝ペプトン水　　ペプトン 10.0 g（9.95~10.04 g）、塩化ナトリウム 5.0 g（4.95~5.04 g）、リン酸水素二ナトリウム・12 水 9.0 g（8.95~9.04 g）及びリン酸二水素カリウム 1.5 g（1.45~1.54 g）を水 1,000 mL に溶かし、pH を 6.9~7.1 に調整する。

これを 500 mL の培養瓶に 250 mL 分注し、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後、45 °C 以下に冷却し、界面活性剤溶液 15 mL を加えて振り混ぜる。

5) ハーナ・テトラチオン酸塩培地[注2]　　ペプトン 18.0 g、酵母エキス 2.0 g、ブドウ糖 0.5 g、D(−)-マンニトール 2.5 g、塩化ナトリウム 5.0 g、チオ硫酸ナトリウム（無水）26.0 g、デオキシコール酸ナトリウム 0.5 g、炭酸カルシウム 25.0 g 及びブリリアントグリーン 10 mg を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 7.3~7.5 に調整する。

これを 45 °C 以下に冷却した後、ヨウ素・ヨウ化カリウム溶液 40 mL を加え、かき混ぜながら 25 mL の培養瓶に 10 mL 分注する。

6) ラパポート・バシリアディス培地[注3]　　パパイン消化大豆 5.0 g、塩化ナトリウム 8.0 g、リン酸二水素カリウム 1.6 g、塩化マグネシウム六水和物 40.0 g 及びマラカイトグリーンしゅう酸塩 40 mg を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 5.1~5.3 に調整する。これを 25 mL の培養瓶に 10 mL 分注する。

7) DHL 寒天培地[注4]　　ペプトン 20.0 g、肉エキス 3.0 g、スクロース 10.0 g、ラクトース一水和物 10.0 g、クエン酸三ナトリウム二水和物 1.0 g、クエン酸鉄（III）アンモニウム 1.0 g、チオ硫酸ナトリウム（無水）2.2 g、デオキシコール酸ナトリウム 1.0 g、ニュートラルレッド 30 mg 及びカンテン 15.0 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 7.2~7.4 に調整する。

なお、必要に応じてノボビオシンナトリウムを培地 1,000 mL に対して 20 mg 加える。

これをペトリ皿（内径 90 mm、高さ 15 mm のもの）に一様に広がるように 20 mL 分注し、水平に静置して凝固させた後、倒置してふたをわずかにずらし、35~37 °C で 1 時間静置して培地表面を乾燥させる。

8) ブリリアントグリーン寒天培地[注5]　ペプトン 10.0 g、酵母エキス 3.0 g、スクロース 10.0 g、ラクトース一水和物 10.0 g、塩化ナトリウム 5.0 g、フェノールレッド 80 mg、ブリリアントグリーン 12.5 mg 及びカンテン 20.0 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 6.8~7.0 に調整する。

なお、必要に応じてノボビオシンナトリウムを培地 1,000 mL に対して 20 mg 加える。

以下、7)による。

9) クロモアガーサルモネラ寒天培地[注6]　ペプトン・酵母エキス混合物 7.0 g、選択剤・発色酵素基質混合物[注7] 12.9 g 及びカンテン 15.0 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 7.5~7.7 に調整する。

以下、7)による。

10) TSI 寒天培地[注8]　ペプトン 20.0 g、酵母エキス 3.0 g、肉エキス 3.0 g、スクロース 10.0 g、ラクトース一水和物 10.0 g、ブドウ糖 1.0 g、塩化ナトリウム 5.0 g、チオ硫酸ナトリウム 0.3 g、クエン酸鉄（III）アンモニウム 0.3 g、フェノールレッド 24 mg 及びカンテン 9~18 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 7.3~7.5 に調整する。

これを試験管（内径 10 mm、全長 120 mm）に 4 mL 程度分注し、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後、半斜面（上部 1/3 が斜面、下部 2/3 が高層）に凝固させる。

11) SIM 寒天培地[注8]　ペプトン 30.0 g、肉エキス 3.0 g、クエン酸鉄アンモニウム 0.5 g、チオ硫酸ナトリウム 50 mg 及びカンテン 5.0 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 7.2~7.4 に調整する。

これを試験管（内径 10 mm、全長 120 mm）に 4 mL 程度分注し、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後、高層に凝固させる。

12) リジン脱炭酸試験用培地[注8]　酵母エキス 3.0 g、ブドウ糖 1.0 g、L-リジン一塩酸塩 5.0 g 及びブロモクレゾールパープル 15 mg を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 6.7~6.9 に調整する。

これを試験管（内径 10 mm、全長 120 mm）に 4 mL 程度分注し、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。

## B　培　　養

前増菌培養　分析試料 25 g（25.0～25.4 g）を量って緩衝ペプトン水に入れ、振り混ぜた後、35~37 °C で 18~24 時間培養する。

選択増菌培養　前増菌培養液 1 mL 及び 0.1 mL をそれぞれハーナ・テトラチオン酸塩培地及びラパポート・バシリアディス培地に加え、振り混ぜた後、41~43 °C で 18~24 時間培養する。

選択分離培養　上記 2 種類の選択増菌培養液の 1 白金耳ずつを DHL 寒天培地及びブリリアントグリーン寒天培地にそれぞれ画線塗抹し、倒置して 35~37 °C で 18~24 時間培養する。

なお、必要に応じてクロモアガーサルモネラ寒天培地についても同様に操作する。

純粋分離培養　　上記 DHL 寒天培地、ブリリアントグリーン寒天培地又はクロモアガーサルモネラ寒天培地表面のサルモネラと疑われる集落をそれぞれから 3 個程度釣菌し、それぞれ生理食塩液 0.3 mL 程度で希釈する。各希釈液の 1 白金耳を DHL 寒天培地、ブリリアントグリーン寒天培地又はクロモアガーサルモネラ寒天培地に画線塗抹し、倒置して 35~37 °C で 18~24 時間培養する。

確認培養　　上記 DHL 寒天培地、ブリリアントグリーン寒天培地又はクロモアガーサルモネラ寒天培地表面のサルモネラと疑われる集落を 1 個釣菌し、TSI 寒天培地の高層部に穿刺した後、そのまま斜面部に塗抹する。更に、SIM 寒天培地の高層部に穿刺した後、リジン脱炭酸試験用培地に接種する。これらを 35~37 °C で 18~24 時間培養する。

## C　同　　定

確認同定　　上記 3 種類の確認培地における下記の生化学的性状により、サルモネラを確認する。

サルモネラの多くは、乳糖・白糖発酵（−）、ブドウ糖発酵（ガス産生）（+）、硫化水素（+）、運動性（+）、IPA（−）、インドール（−）、リジン脱炭酸（+）の性状を示す。

血清型別[注 9、10]　　スライドグラス上に生理食塩液及びサルモネラ O 群多価血清をそれぞれ 1 滴滴下し、サルモネラの性状を示した菌を TSI 寒天培地斜面上から少量かき取り、生理食塩液と混和した後、続いて O 群多価血清と混和し、スライドグラスを前後に傾けながら凝集の有無を確認する。

O 群多価血清で凝集した菌について、同様に各 O 群血清との凝集の有無を確認し、O 群を決定する。

O 群の決定した菌について、試験管法により H 血清との凝集の有無を確認し、H 抗原を決定する。

O 群及び H 抗原が決定した菌について、Kauffmann-White の抗原表に照合し、サルモネラの血清型を確認する。

注 1　Tween 80（関東化学製）又はこれと同等のもの

2　ハーナ・テトラチオン酸塩培地（栄研化学製）又はこれと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地を用いてもよい。

3　Rappaport-Vassiliadis (RV) Enrichment Broth（Thermo Fisher Scientific 製）又はこれと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地を用いてもよい。

4　DHL 寒天培地（栄研化学製）又はこれと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地を用いてもよい。

5　Brilliant Green Agar（Becton, Dickinson and Company 製）又はこれと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地を用いてもよい。

6　CHROMagar Salmonella（CHROMagar 製）又はこれと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地を用いてもよい。

7　サルモネラに特有の酵素活性により分解され、紫色を呈する発色基質を混合したもの

8　培地は、これらと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地を用いてもよい。

9　*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 及び *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis の各血清型については、サルモネラの性状を示した菌又は前増菌培養後の培養液を試料とし、1.2 に規定する方法により、迅速な同定が可能である。

10　O 群多価血清又は各 O 群血清との凝集は、1 分以内に強く凝集したものを陽性とする。

1.2　マルチプレックス PCR 法による特定血清型[注1]の迅速同定法

本項において、bp（base pair）とあるのは、DNA の塩基対数を表す。

水、試薬及び器具類は、必要に応じて滅菌したものを用いる。また、超純水とは、水を更に電気伝導率 5.6 μS/m 以下（比抵抗 18 MΩ·cm 以上）に精製したものとする。なお、滅菌する場合は高圧蒸気滅菌（121 °C、15 min 以上）又は同等と認められる方法で処理する。

**A　　試薬等の調製**

1)　25 mmol/L 水酸化ナトリウム溶液　　水酸化ナトリウム 0.10 g（0.095~0.104 g）に超純水 100 mL を加えて溶かし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。

2)　1 mol/L トリス塩酸緩衝液　　トリスヒドロキシメチルアミノメタン 12.1 g（12.05~12.14 g）に超純水 60 mL を加え、更に塩酸 4.2 mL を加えて溶かし、塩酸で pH を 7.9~8.1 に調整した後、更に超純水を加えて 100 mL とし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。

3)　0.5 mol/L EDTA 溶液　　エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 18.6 g（18.55~18.64 g）及び水酸化ナトリウム 2.0 g（1.95~2.04 g）を超純水 60 mL に溶かし、水酸化ナトリウム溶液（5 mol/L）で pH を 7.9~8.1 に調整した後、更に超純水を加えて 100 mL とし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。

4)　Tris-acetate, EDTA (TAE) 緩衝液[注2]　　トリスヒドロキシメチルアミノメタン 4.84 g、酢酸 1.14 mL 及び 0.5 mol/L EDTA 溶液 2 mL を水に溶かして 1,000 mL とする。

5)　Tris-borate, EDTA (TBE) 緩衝液　　トリスヒドロキシメチルアミノメタン 10.8 g（10.75~10.84 g）、ホウ酸 5.5 g（5.45~5.54 g）及び 0.5 mol/L EDTA 溶液 4 mL を水に溶かして 1,000 mL とする。

6)　アガロースゲル　　電気泳動用アガロース 2.5 g（2.45~2.54 g）に TAE 緩衝液又は TBE 緩衝液 100 mL を加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、50~60 °C に冷却した後、ゲルの厚さが 3~4 mm になるようゲル形成型に流し込み、コームを差し込み、水平に静置する。十分にゲルが固化した後コームを抜く。

7)　電気泳動用色素溶液　　DNA 分子量マーカー[注3]に添付されているもの又は以下により調製したものを用いる。

ブロモフェノールブルー25 mg、キシレンシアノール FF 25 mg 及びグリセリン 3 g を水に溶かして 10 mL とし、121 °C で 15 分高圧蒸気滅菌する。

8)　ゲル染色液　　臭化エチジウム約 10 mg を滅菌した水 1,000 μL に溶かして臭化エ

チジウム原液を調製し、使用時にこの原液 50 μL に TAE 緩衝液又は TBE 緩衝液 1,000 mL を加えてゲル染色液とする。

9) 陽性対照　*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 及び *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis の標準菌株から DNA を抽出[注4]し、滅菌した超純水を加えて、1 mL 中に DNA としてそれぞれ 10 μg 以上を含有する各血清型の陽性対照を調製する。

10) プライマー混合溶液　各血清型につき、対応する 4 組のプライマー対[注5]を滅菌した超純水に加えて、それぞれ 10 μmol/L の各プライマー混合溶液を調製する。

11) PCR 反応液　各血清型につき、滅菌した超純水 1 μL、PCR 緩衝液[注6] 25 μL、2 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液[注7] 10 μL、10 μmol/L プライマー混合溶液 12 μL 及び DNA ポリメラーゼ液[注8] 1 μL（1 単位相当量）を PCR チューブ 1 本あたりの必要量とする。これらの試薬について、必要本数分の量をそれぞれマイクロチューブ（容量 1.5 mL）に加えて PCR 反応液を調製する。更に、滅菌した超純水 1 μL の代わりに陽性対照 1 μL を添加した PCR 反応液（阻害確認用）を調製する。

## B　同　　定

1) 前増菌培養液を用いた同定方法

DNA の抽出　1.1 の B の前増菌培養液 200 μL をマイクロチューブ（容量 1.5 mL）に入れ、13,000×*g* で 1 分間遠心分離した後、上澄み液を除去する。更に、生理食塩液 1 mL を加えて懸濁させ、13,000×*g* で 1 分間遠心分離した後、上澄み液を除去する。この残留物から得られた DNA 抽出液[注9]100 μL を新しいマイクロチューブ（容量 1.5 mL）に入れ、抽出した DNA を精製[注10]し、減圧乾燥する。滅菌した超純水 20 μL を加えて残留物を溶かし、試料溶液等の調製に供する DNA 試料液とする。

試料溶液等の調製　各血清型につき、PCR 反応液 49 μL を PCR チューブ（容量 200 μL）に入れ、DNA 試料液 1.0 μL を加えて振り混ぜ、PCR 反応に供する試料溶液とする。また、PCR 反応液（阻害確認用）49 μL を別の PCR チューブに入れ、DNA 試料液 1.0 μL を加えて同様に操作し、阻害確認用試料溶液を調製する。

同時に、陽性対照 1.0 μL 及び滅菌した超純水 1.0 μL をあらかじめ PCR 反応液 49 μL を入れたそれぞれ別の PCR チューブに加えて同様に操作し、陽性対照液及び陰性対照液を調製する。

PCR 反応　各試料溶液、阻害確認用試料溶液、陽性対照液及び陰性対照液の入った PCR チューブを DNA 増幅装置に入れ、PCR 反応を行う。

PCR 反応条件　例

DNA 増幅装置：Gene Amp System 9700（Applied Biosystems 製）

プライマー：血清型検出用プライマー対[注5]

反応温度条件：94°C（2 min 保持）→［98°C（10 s 保持）→60°C（30 s 保持）→68°C（30 s 保持）］（35 サイクル）

温度制御条件：9600 モード

電気泳動　　TAE 緩衝液又は TBE 緩衝液を入れた泳動槽にアガロースゲルを入れ、100 V の定電圧で 10 分間予備泳動を行う。PCR 反応の終了した試料溶液、阻害確認用試料溶液、陽性対照液及び陰性対照液及び DNA 分子量マーカー[注3]各 5 µL に電気泳動用色素溶液 1 µL をそれぞれ加えて混合し、各液の全量を先のアガロースゲルのそれぞれ別のウェルに注入し、100 V の定電圧でブロモフェノールブルーがウェルから 4~5 cm 移動するまで電気泳動を行う。

電気泳動の終了したアガロースゲルをゲル染色液に入れ、約 30 分間浸した後、UV トランスイルミネーターに載せ、365 nm 又は 312 nm の紫外線を照射し、PCR 増幅産物の有無を確認する。

判　　定　　陽性対照液において各血清型検出用プライマーセット[注5]に対応する 4 つの検出サイズの PCR 増幅産物がすべて検出され、陰性対照液において PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において各血清型検出用プライマーセットに対応する 4 つの検出サイズの PCR 増幅産物がすべて検出された場合に、当該血清型検出用プライマーに対応するサルモネラに陽性の疑い有りと判定する[注11]。ただし、阻害確認用試料溶液で PCR 増幅産物が検出されない場合は、PCR 反応を阻害する成分が含まれている疑いがあることから、当該試料溶液についての判定は行わない。

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

2)　純粋分離培養で得られたサルモネラと疑われる集落を用いた同定方法

DNA の抽出　　1.1 の B の純粋分離培養で得られたサルモネラと疑われる集落を 1 個釣菌し、あらかじめ 25 mmol/L 水酸化ナトリウム溶液 50 µL を入れたマイクロチューブ（容量 1.5 mL）中で懸濁させる。この懸濁液を 95 °C で 5 分間加熱した後放冷し、1 mol/L トリス塩酸緩衝液 4 µL を加え、10,000×$g$ で 5 分間遠心分離し、得られた上澄み液を DNA 試料液とする。

以下、1)による。

注 1　家畜伝染病予防法（昭和 26 年法律第 166 号）における監視伝染病として、家畜伝染病に定められた家きんサルモネラ感染症の原因菌である *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum 及び biovar Pullorum 並びに届出伝染病に定められた家畜のサルモネラ症の原因菌である *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis 、 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 及び *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis をいう。

2　これと同等の組成を有する市販品（50×TAE（ニッポンジーン製）を水で 50 倍希釈する）を用いてもよい。

3　市販の 100 bp ラダーマーカーを用いるとよい。

4　ブレインハートインフュージョン寒天培地に培養した各陽性対照菌の集落を 1 個釣菌し、あらかじめ 25 mmol/L 水酸化ナトリウム溶液 50 µL を入れたマ

イクロチューブ（容量 1.5 mL）中で懸濁させる。この懸濁液を 95 ℃ で 5 分間加熱した後放冷し、1 mol/L トリス塩酸緩衝液 4 µL を加え、10,000×*g* で 5 分間遠心分離し、得られた上澄み液を DNA 抽出液とする。

ブレインハートインフュージョン寒天培地　　ペプトン 10.0 g、牛心臓浸出液 250 mL、子牛脳浸出液 200 mL、ブドウ糖 2.0 g、塩化ナトリウム 5.0 g、リン酸二水素ナトリウム・12 水 2.5 g 及びカンテン 15.0 g を水に加えて 1,000 mL とし、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 7.3~7.5 に調整する。以下 1.1 の A の 7)による。

Brain Heart Infusion Agar（Thermo Fisher Scientific 製）又はこれと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地を用いてもよい。

5　次の文献に記載された塩基配列となるよう合成したもの。

Masato Akiba, Masahiro Kusumoto and Taketoshi Iwata: Rapid identification of Salmonella enterica serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR, *Journal of Microbiological Methods*, 85, 9-15 (2011)

各血清型検出用プライマーセットに対応する検出サイズは次のとおり。なお、すべてのセットに共通の 605 bp の増幅産物は、サルモネラが共通して保有する遺伝子（*invA*）に由来するものである。

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum 検出用
増幅産物サイズ：97 bp, 206 bp, 301 bp, 605 bp

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin 検出用
増幅産物サイズ：105 bp, 203 bp, 296 bp, 605 bp

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis 検出用
増幅産物サイズ：101 bp, 203 bp, 299 bp, 605 bp

*Salmonella enterica* subsp. *enterica serovar* Typhimurium 検出用
増幅産物サイズ：94 bp, 196 bp, 303 bp, 605 bp

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis 検出用
増幅産物サイズ：100 bp, 198 bp, 305 bp, 605 bp

6　2×PCR Buffer for KOD FX（東洋紡製）又はこれと同等のもの

7　2 mmol/L dNTPs（東洋紡製）又はこれと同等のもの

8　KOD FX（1.0 U/µL.）（東洋紡製）又はこれと同等のもの

9　InstaGene Matrix（Bio-Rad Laboratories 製）による方法又はこれと同等の結果が得られる方法

10　Ethachinmate（ニッポンジーン製）による方法又はこれと同等の結果が得られる方法

11　血清型の確定は 1.1 の C の血清型別による。

2　大腸菌

2.1　腸管出血性大腸菌 O157

## A　試薬等の調製

1)　界面活性剤溶液　　1 の A の 1)による。

2)　生理食塩液　　1 の A の 3)による。

3)　リン酸緩衝生理食塩液（以下「PBS」という。）　　リン酸水素二ナトリウム・12 水 1.15 g（1.145~1.154 g）、リン酸二水素カリウム 1.20 g（1.195~1.204 g）、塩化ナトリウム 8.0 g（7.95~8.04 g）、塩化カリウム 0.20 g（0.195~0.204 g）及び界面活性剤[注1] 0.50 g（0.495~0.504 g）を量って水 750 mL に溶かし、pH を 7.3~7.5 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。

4)　緩衝ペプトン水　　1 の A の 4)による。

5)　mEC 培地[注2]　　ペプトン 20.0 g、デオキシコール酸ナトリウム 1.12 g、ラクトース一水和物 5.0 g、リン酸水素二カリウム 4.0 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g 及び塩化ナトリウム 5.0 g を水 1,000 mL に加え、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後、pH を 6.8~7.0 に調整し、200 mL の培養瓶に 100 mL 分注する。

6)　CT-SMAC 寒天培地[注2]　　ペプトン 20.0 g、デオキシコール酸ナトリウム 1.5 g、ソルビトール 10.0 g、塩化ナトリウム 5.0 g、ニュートラルレッド 30 mg、クリスタルバイオレット 1 mg 及びカンテン 15.0 g を水 1,000 mL に加え、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後、pH を 7.1~7.3 に調整し、45 °C 以下に冷却した後、セフィキシム 50 μg 及び亜テルル酸カリウム 2.5 mg を加える。

これをペトリ皿（内径 90 mm、高さ 15 mm のもの）に一様に広がるように 20 mL 分注し、水平に静置して凝固させた後、倒置してふたをわずかにずらし、35~37 °C で 1 時間静置して培地表面を乾燥させる。

7)　クロモアガーO157 寒天培地[注2]　　ペプトン 5.0 g、酵母エキス 3.0 g、塩化ナトリウム 5.0 g、選択剤・発色基質混合物[注3] 1.0 g 及びカンテン 15.0 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 6.7~6.9 に調整する。

以下 6)による。

8)　CLIG 寒天培地[注2]　　カゼインペプトン 7.5 g、肉ペプトン 2.5 g、ラクトース一水和物 1.0 g、D-セロビオース 10.0 g、L-トリプトファン 0.1 g、塩化ナトリウム 5.0 g、フェノールレッド 25 mg、4-メチルウンベリフェリル-*β*-D-グルクロニド 20 mg 及びカンテン 14.9 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 7.3~7.5 に調整する。

これを試験管（内径 10 mm、全長 120 mm）に 4 mL 程度分注し、115 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後、半斜面（上部 1/3 が斜面、下部 2/3 が高層）に凝固させる。

9)　SIM 寒天培地　　1 の A の 12)による。

## B　培　　養

前増菌培養　　1 の B の前増菌培養の項による。

選択増菌培養[注4]　　前増菌培養液 10 mL を mEC 培地に加え、振り混ぜた後、41~43 °C で 18~24 時間培養する。

免疫磁気ビーズ[注5]による集菌　　選択増菌培養液 1 mL をプラスチック製遠心沈殿管

（容量 1.5 mL）に入れ、腸管出血性大腸菌 O157 の抗体を結合させた免疫磁気ビーズ 20 µL を加え、15 分間穏やかに振り混ぜる[注6]。これを磁石板に装着し、ときどき穏やかに振り混ぜながら 3 分間静置した後、液を除去する。磁石板をとりはずし、PBS 1 mL を残留物に加えて 5 分間穏やかに振り混ぜた後[注6]、磁石板を装着し、ときどき穏やかに振り混ぜながら 3 分間静置した後、液を除去する。

磁石板をとりはずし、PBS 1 mL を残留物に加え同様に 2 回操作した後、PBS 100 µL を加えて免疫磁気ビーズを懸濁させる。

選択分離培養　免疫磁気ビーズ懸濁液 50 µL ずつを CT-SMAC 寒天培地及びクロモアガーO157 寒天培地にそれぞれ加えて綿棒で塗抹した後、白金耳で画線塗抹し、倒置して 35~37 °C で 18~24 時間培養する。

純粋分離培養　CT-SMAC 寒天培地及びクロモアガーO157 寒天培地表面の腸管出血性大腸菌 O157 と疑われる集落をそれぞれから 5 個程度釣菌し、それぞれ生理食塩液 0.3 mL 程度で希釈する。各希釈液の 1 白金耳をクロモアガーO157 寒天培地に画線塗抹し、倒置して 35~37 °C で 18~24 時間培養する。

確認培養　純粋分離培養のクロモアガーO157 寒天培地表面の腸管出血性大腸菌 O157 と疑われる集落を 1 個釣菌し、CLIG 寒天培地の高層部に穿刺した後、そのまま斜面部に塗抹する。更に、SIM 寒天培地の高層部に穿刺する。これらを 35~37 °C で 18~24 時間培養する。

## C　同　　定

確認同定　CLIG 寒天培地及び SIM 寒天培地における下記の生化学的性状により、腸管出血性大腸菌 O157 を確認する。

腸管出血性大腸菌 O157 の多くは、乳糖発酵（+）、オキシダーゼ（−）、*β*-グルクロニダーゼ活性（−）、セロビオース利用能（−）、硫化水素（−）、運動性（+）、IPA（−）、インドール（+）の性状を示す。

血清型別[注7]　腸管出血性大腸菌 O157 の性状を示した菌を少量かき取り、スライドグラス上に 1 滴滴下した O157 血清と混和し、スライドグラスを前後に傾けながら凝集の有無を確認する。更に、100 °C、30 分間の加熱処理菌についても同様に凝集の有無を確認する。

O157 血清で凝集した菌について、試験管法により H 血清との凝集の有無を確認し、H 抗原を決定する。

ベロ毒素遺伝子の検出　腸管出血性大腸菌 O157 の性状を示した菌を少量かき取り、あらかじめ生理食塩液 200 µL を入れたプラスチック製遠心沈殿管（容量 1.5 mL）に加えて振り混ぜ、7,000×*g* で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を除去する。水 100 µL を残留物に加えて振り混ぜ、98 °C で 5 分間加熱した後、急冷する。

この加熱処理菌液を 7,000×*g* で 10 分間遠心分離し、上澄み液を PCR[注8] に供し、ベロ毒素遺伝子の有無を確認する。

ベロ毒素産生性試験　腸管出血性大腸菌 O157 の性状を示した菌を少量かき取り、プレート内でベロ毒素を感作させたラテックス粒子[注9]と混和し、凝集の有無を確認する。

注 1　Tween 20（関東化学製）又はこれと同等のもの

2　培地は、これらと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地を用いてもよい。

3　O157 に特有の酵素活性により分解され、藤色を呈する（*β*-グルコシド及び*β*-グルクロニド構造を有するもの）発色基質で、CHROMagar O157（CHROMagar 製）に含まれるもの又はこれと同等のもの

4　以下に示す PCR 法によって、選択増菌培養液中に大腸菌ベロ毒素産生遺伝子が存在しないことを確認した場合には、腸管出血性大腸菌 O157 陰性と判定し、免疫磁気ビーズによる集菌の項以降の操作を省略する。

（PCR 法）

選択増菌培養液 1 mL をプラスチック製遠心沈殿管（容量 1.5 mL）に入れ、7,000×*g* で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を除去する。残留物に生理食塩液 500 µL を加えて振り混ぜ、7,000×*g* で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を除去する。残留物に水 100 µL を加えて振り混ぜ、98 °C で 5 分間加熱した後、急冷する。

この加熱処理菌液について、以下、ベロ毒素遺伝子の検出の項に従って操作し、ベロ毒素遺伝子の有無を確認する。

5　Dynabeads anti-E.coli O157（Thermo Fisher Scientific 製）又はこれと同等のもの

6　回転数又は振動数が毎分 60 回程度の振り混ぜ機を用いる。

7　O157 血清との凝集は、1 分以内に強く凝集したものを陽性とする。

8　O157（ベロ毒素遺伝子）One Shot PCR Screening Kit（タカラバイオ製）又はこれと同等のもの

9　VTEC-RPLA「生研」（デンカ生研製）又はこれと同等のもの

2.2　ベロ毒素産生性大腸菌

**A　　試薬等の調製**

1)　界面活性剤溶液　　1 の A の 1)による。

2)　生理食塩液　　1 の A の 3)による。

3)　緩衝ペプトン水　　1 の A の 4)による。

4)　mEC 培地　　2.1 の A の 5)による。

5)　CT-SMAC 寒天培地　　2.1 の A の 6)による。

6)　レインボーアガーO157 寒天培地[注1]　　ペプトン 6.0 g、糖類 35.63 g、発色基質[注2] 0.4 g、3-indoxyl-β-D-galactoside 0.25 g、3-indoxyl-β-D-glucuronide 0.12 g 及びカンテン 14.0 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 6.7~6.9 に調整する。

これをペトリ皿（内径 90 mm、高さ 15 mm のもの）に一様に広がるように 20 mL 分注し、水平に静置して凝固させた後、倒置してふたをわずかにずらし、35~37 °C で 1 時間静置して培地表面を乾燥させる。

7)　CLIG 寒天培地　　2.1 の A の 8)による。

8)　SIM 寒天培地　　1 の A の 11)による。

## B　培　　養

前増菌培養　　1 の B の前増菌培養の項による。

選択増菌培養[注3]　　2.1 の B の選択増菌培養の項による。

選択分離培養　　選択増菌培養液の 1 白金耳ずつを CT-SMAC 寒天培地及びレインボーアガーO157 寒天培地にそれぞれ画線塗抹し、倒置して 35~37 °C で 18~24 時間培養する。

純粋分離培養　　CT-SMAC 寒天培地及びレインボーアガーO157 寒天培地表面のベロ毒素産生性大腸菌と疑われる集落をそれぞれから 5 個程度釣菌し、それぞれ生理食塩液 0.3 mL 程度で希釈する。各希釈液の 1 白金耳をレインボーアガーO157 寒天培地に画線塗抹し、倒置して 35~37 °C で 18~24 時間培養する。

確認培養　　純粋分離培養のレインボーアガーO157 寒天培地表面のベロ毒素産生性大腸菌と疑われる集落を 1 個釣菌し、CLIG 寒天培地の高層部に穿刺した後、そのまま斜面部に塗抹する。更に、SIM 寒天培地の高層部に穿刺する。これらを 35~37 °C で 18~24 時間培養する。

## C　同　　定

確認同定　　CLIG 寒天培地及び SIM 寒天培地における下記の生化学的性状により、ベロ毒素産生性大腸菌を確認する。

ベロ毒素産生性大腸菌の多くは、乳糖発酵（+）、オキシダーゼ（−）、*β*-グルクロニダーゼ活性（+/−）、セロビオース利用能（−）、硫化水素（−）、運動性（+）、IPA（−）、インドール（+/−）の性状を示す。

血清型別[注4]　　ベロ毒素産生性大腸菌の性状を示した菌を少量かき取り、スライドグラス上に 1 滴滴下した病原性大腸菌 O 群混合血清と混和し、スライドグラスを前後に傾けながら凝集の有無を確認する。更に 100 °C、30 分間の加熱処理菌についても同様に凝集の有無を確認する。

O 群混合血清で凝集した菌について同様に各 O 群血清との凝集の有無を確認し、O 群を決定する。

O 群の決定した菌について、試験管法により H 血清との凝集の有無を確認し、H 抗原を決定する。

ベロ毒素遺伝子の検出　　ベロ毒素産生性大腸菌の性状を示した菌を少量かき取り、以下 2.1 の C のベロ毒素遺伝子の検出の項による。

ベロ毒素産生性試験　　ベロ毒素産生性大腸菌の性状を示した菌を少量かき取り、以下 2.1 の C のベロ毒素生産性試験の項による。

注 1　培地は、これらと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地を用いてもよい。

2　ベロ毒性産生性大腸菌に特有の酵素活性により分解され、黒～暗灰色又は青～赤紫色を呈する発色基質で、Rainbow agar O157（Biolog 製）に含まれるもの又はこれと同等のもの

3　以下に示す PCR 法によって、選択増菌培養液中に大腸菌ベロ毒素産生遺伝子が存在しないことを確認した場合には、ベロ毒素産生性大腸菌陰性と判定し、選択分離培養の項以降の操作を省略する。

（PCR 法）

選択増菌培養液 1 mL をプラスチック製遠心沈殿管（容量 1.5 mL）に入れ、7,000×$g$ で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を除去する。残留物に生理食塩液 500 µL を加えて振り混ぜ、7,000×$g$ で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を除去する。残留物に水 100 µL を加えて振り混ぜ、98 °C で 5 分間加熱した後、急冷する。

この加熱処理菌液について、以下、ベロ毒素遺伝子の検出の項に従って操作し、ベロ毒素遺伝子の有無を確認する。

4　O 群混合血清又は各 O 群血清との凝集は、1 分以内に強く凝集したものを陽性とする。

2.3　その他の大腸菌

**A　　試薬等の調製**

1)　界面活性剤溶液　　1 の A の 1)による。

2)　生理食塩液　　1 の A の 3)による。

3)　緩衝ペプトン水　　1 の A の 4)による。

4)　mEC 培地　　2.1 の A の 5)による。

5)　EMB 寒天培地[注1]　　ペプトン 10.0 g、ラクトース一水和物 10.0 g、リン酸水素二カリウム 2.0 g、エオシン Y 0.4 g、メチレンブルー65 mg 及びカンテン 15.0 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 6.7~6.9 に調整した後、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。

これをペトリ皿（内径 90 mm、高さ 15 mm のもの）に一様に広がるように 20 mL 分注し、水平に静置して凝固させた後、倒置してふたをわずかにずらし、35~37 °C で 1 時間静置して培地表面を乾燥させる。

6)　レインボーアガーO157 寒天培地　　2.2 の A の 7)による。

7)　TSI 寒天培地　　1 の A の 10)による。

8)　SIM 寒天培地　　1 の A の 11)による。

9)　シモンズ・クエン酸塩寒天培地[注1]　　塩化ナトリウム 5.0 g、クエン酸ナトリウム 2.0 g、リン酸水素二カリウム 1.0 g、リン酸二水素アンモニウム 1.0 g、硫酸マグネシウム七水和物 0.2 g、ブロモチモールブルー24 mg 及びカンテン 15.0 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 6.6~6.8 に調整する。

これを小試験管（内径約 10 mm のもの）に 4 mL 程度分注し、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後、半斜面（上部 1/3 が斜面、下部 2/3 が高層）に凝固させる。

10)　VP 半流動培地[注1]　　ペプトン 5.0 g、膵消化カゼイン 7.0 g、酵母エキス 1.0 g、ブドウ糖 10.0 g、塩化ナトリウム 5.0 g 及びカンテン 3.0 g を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 6.9~7.1 に調整する。これを小試験管（内径約 10 mm のもの）に 4 mL 程度分注し、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後、高層に凝固させる。

**B　　培　　養**

前増菌培養　　1 の B の前増菌培養の項による。

選択増菌培養　　2.1 の B の選択増菌培養の項による。

選択分離培養　　選択増菌培養液の 1 白金耳ずつを EMB 寒天培地及びレインボーアガーO157 寒天培地にそれぞれ画線塗抹し、倒置して 35~37 °C で 18~24 時間培養する。

純粋分離培養　　EMB 寒天培地及びレインボーアガーO157 寒天培地表面の大腸菌と疑われる集落をそれぞれから 5 個程度釣菌し、それぞれ生理食塩液 0.3 mL 程度で希釈する。各希釈液の 1 白金耳を EMB 寒天培地に画線塗抹し、倒置して 35~37 °C で 18~24 時間培養する。

確認培養　　純粋分離培養の EMB 寒天培地表面の大腸菌と疑われる集落を 1 個釣菌し、TSI 寒天培地の高層部に穿刺した後、そのまま斜面部に塗抹する。更に、SIM 寒天培地の高層部に穿刺する。再度同一の集落を釣菌し、シモンズ・クエン酸塩寒天培地の高層部に穿刺した後、そのまま斜面部に塗抹する。更に、VP 半流動培地の高層部に穿刺する。これらを 35~37 °C で 18~24 時間培養する。

## C　同　　定

確認同定　　TSI 寒天培地、SIM 寒天培地、シモンズ・クエン酸塩寒天培地及び VP 半流動培地における下記の生化学的性状により、大腸菌を確認する。

大腸菌の多くは、乳糖・白糖発酵（+）、ブドウ糖発酵（ガス産生）（+）、硫化水素（−）、運動性（+）、IPA（−）、インドール（+/−）、クエン酸利用能（−）、VP 反応（−）、オキシダーゼ（−）の性状を示す。

なお、必要に応じて病原性大腸菌 O 群混合血清により血清型別を行う。

注 1　培地は、これらと同等の組成を有する市販の乾燥粉末培地を用いてもよい。

# 第 19 章　鑑　定

## 1　物理的方法

### 1.1　比重選別

適当な比重液を使用して比重の差により物質を選別する方法である。

一般に使用される比重液（15 °C の場合）の比重は次のとおりである。

| 品　　名 | 比重 | 備　　考 |
|---|---|---|
| ベンゼン | 0.88 | |
| クロロホルム | 1.50 | |
| 四塩化炭素 | 1.59 | |
| ブロモホルム | 2.90 | 安定剤としてエタノール4 %を添加した市販品の比重は2.6程度である。 |

なお、上記の比重液を混合して所要の比重液を調製する場合は、次式による。

$$B = A \times \frac{a-c}{c-b}$$

$A$ ：$a$ 液の量（mL）

$B$ ：混合すべき $b$ 液の量（mL）

$a$ ：$a$ 液の比重

$b$ ：$b$ 液の比重

$c$ ：求める液の比重（$a > c > b$）

飼料等の比重は、おおむね次のとおりである。

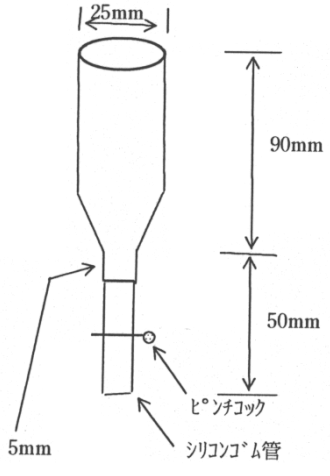
| 品　　名 | 比重 |
|---|---|
| 穀類、そうこう類、その他の植物質 | 1.5以下 |
| しお虫、えびがら、かにがら | 1.4~2.0 |
| かきがら、貝がら粉末等 | 1.9~2.6 |
| 炭酸カルシウム、大理石 | 2.6~2.9 |
| 魚骨 | 1.3~2.0 |
| 獣骨 | 1.9~2.2 |
| けいそう土 | 1.8~2.5 |

比重選別には、図の比重分離用漏斗を用い、次の方法により行う。

分析試料の一部を量ってあらかじめ 1/3~1/2 の高さまで比重液を入れた比重分離用漏斗に入れてかき混ぜ、漏斗の壁についた試料を比重液で洗い落す。

15~20 分間静置し試料が分離した後、ゴム管の両端を指ではさみ、上部の液をろ紙でろ過し、ろ紙上の残さを顕微鏡検査に供する。

下部の沈下物を、あらかじめ乾燥して質量を量っておいたろ紙上に少量のエタノールで洗い落し、水で洗浄した後、乾燥し、質量を量ってその量を求める。



1.2　顕微鏡検査

(1)　光学顕微鏡による方法

i)　植物質試料　　分析試料約 2 g を量って 500 mL のコニカルビーカーに入れ、少量のエタノールを加えて試料を潤した後、水酸化ナトリウム溶液（5 w/v%）150 mL を加えて 30 分間煮沸する。

ビーカーの上部まで水を加えて静置し、上澄み液を吸引除去し、水層が澄明になるまで洗浄操作を繰り返す。

沈殿物の一部をとり、倍率 50~100 倍で試料の組織、細胞の形状、色調等を鏡検する。

ii)　動物質試料　　分析試料約 2 g を量って 500 mL のコニカルビーカーに入れ、硫酸（1+34）150 mL を加えて 15 分間煮沸する。

ビーカーの上部まで水を加えて静置し、上澄み液を吸引除去し、水層が澄明になるまで洗浄操作を繰り返す。

沈殿物の一部をとり、倍率 50~100 倍で試料の組織、細胞の形状、色調等を鏡検する。

(2)　実体顕微鏡による方法

分析試料約 10 g を組立てふるいで粒度別に分け、それぞれについて実体顕微鏡により鏡検する。

1.3　流水淘汰選別

（適用範囲：ふすま、米ぬか中のもみがら粉末、落花生さや粉末及びのこくず）

分析試料約 1 g を量って 500 mL のトールビーカーに入れ、水酸化ナトリウム溶液（5 w/v%）100 mL を加える。トールビーカーを時計皿又は冷却器で覆い、蒸発する水分を補いながら 30 分間煮沸し、更に水を加えて再び煮沸した後静置する。上澄み液を捨て、沈殿物を 1 L のビーカーに移す。ガラス製 L 字管を用い、ビーカーの壁面に沿って流水を送って渦流を起こさせながら、ビーカーの壁面近くの白色部分（ふすま又は米ぬかの残さ）を別のガラス製 L 字管を用いて吸引除去する。

ビーカー中央部の残留物をろ紙（あらかじめ乾燥し質量を量っておいたもの）でろ過し、乾燥した後、質量を量り、これに係数（もみがら粉末の場合は 2.5、落花生さや粉末及びのこくずの場合は 1.7）を乗じて当該混入物の量とする。

2　化学的方法

2.1　デンプン

分析試料 1~2 g をビーカーに入れ、水 50~100 mL を加えて 5 分間煮沸した後、ろ紙でろ過し、ろ液にヨウ素ヨウ化カリウム溶液 1~2 滴を滴下する。

デンプンが存在する場合には、溶液が青～紫色を呈する。

ヨウ素ヨウ化カリウム溶液　　ヨウ化カリウム 6 g（5.5~6.4 g）を水に溶かして 100 mL とし、更にヨウ素約 2 g を加えて溶かし、褐色瓶に入れて保存する。

2.2　リグニン

分析試料に適量のフロログルシン溶液を加えて潤し、5 分間静置した後、塩酸 1~2 滴を加える。

リグニンが存在する場合には、試料が濃赤色を呈する。

フロログルシン溶液　　フロログルシン二水和物約 2 g をエタノールに溶かして 100 mL とする。

2.3　炭酸カルシウム

(1)　分析試料 1~2 g を試験管に入れ、塩酸（1+7）を少量加える。

炭酸カルシウムが存在する場合には、二酸化炭素の泡が発生する。

(2)　分析試料の一部を量って比重分離用漏斗に入れ、四塩化炭素を用いて比重選別を行い、沈下物をエタノールでろ紙（あらかじめ乾燥し質量を量っておいたもの）上に洗い落し、更に水で洗浄した後乾燥し、質量を量る。

次に、ろ紙上の残留物をビーカーに入れ、塩酸（1+7）10 mL を加え、10~20 分間静置した後、ろ紙（5 種 A）でろ過し、熱水で洗浄してるつぼ（あらかじめ乾燥し質量を量っておいたもの）に入れ、550~600 °C で 2 時間加熱して灰化した後放冷し、質量を量り、試料中の炭酸カルシウム量を算出する。

2.4　血粉

(1)　ヘモクロモーゲン結晶法（高山法）

微粉砕した分析試料をスライドグラスにとり、高山試液 1 滴を加えて混和し、カバーグラスで覆い、遠火で加熱し、5~6 分間静置した後、100 倍程度の顕微鏡により鏡検する。

獣血粉が存在する場合には、橙色～紅色の柱状、針状、菊花状又は束状のヘモクロモーゲン結晶が認められる。

高山試液　　ピリジン 3 mL、ブドウ糖溶液（30 w/v%）10 mL 及び水酸化ナトリウム溶液（10 w/v%）3 mL を混合し、褐色瓶に保存する。

(2)　ルミノール蛍光法

微粉砕した分析試料約 0.1 g を時計皿にとり、エタノールで潤した後、ルミノール溶液 5 mL を加えて暗所で観察する。

獣血粉が存在する場合には、蛍光を発し、その蛍光は 1~2 分間持続する。

ルミノール溶液　　ルミノール約 0.1 g を過酸化ナトリウム溶液（0.5 w/v%）に溶かして 100 mL とする（使用時に調製する。)。

2.5　尿素

分析試料約 2 g を共栓三角フラスコに入れ、水 50 mL を加えて 15 分間かき混ぜた後、ろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液 5 mL をビーカーに入れ、酢酸 15 mL を加えてかき混ぜ、更にキサントヒドロール溶液 1 mL を 5 分間おきに 2 回加えた後 15 分間静置し、更に水 10 mL をかき混ぜながら加える。

尿素が存在する場合には、徐々に白雲状の沈殿を生成する（キサントヒドロール反応）。

キサントヒドロール溶液　　キサントヒドロール 10 g（9.5~10.4 g）をメタノールに溶かして 100 mL とする。

2.6　尿酸

分析試料 0.5~1 g を磁製皿に入れ、硝酸 1~2 滴を加え、沸騰水浴上で蒸発乾固する。

尿酸が存在する場合には、試料の周縁が赤褐色となり、アンモニア水を滴下すると紫色を呈する（ムレキシド反応）。

2.7　アンモニア

分析試料約 2 g を 100 mL の三角フラスコに入れ、水 50 mL を加えてかき混ぜた後、ろ紙（5 種 A）でろ過し、ろ液 2 mL を磁製皿に入れ、ネスラー試液 1~2 滴を加える。

アンモニアが存在する場合には、黄色又は赤褐色を呈する。

ネスラー試液　　ヨウ化カリウム 5 g（4.5~5.4 g）を水 5 mL に溶かし、これに塩化水銀溶液（塩化水銀（II）2.5 g（2.45~2.54 g）を熱水 10 mL に溶かす。）を生じた赤色の沈殿がわずかに残る程度まで振り混ぜながら徐々に加えた後放冷する。水酸化カリウム 15 g（14.5~15.4 g）を水 130 mL に溶かした溶液を先の溶液に加え、更に塩化水銀溶液 0.5 mL を加えて振り混ぜ、上澄み液を褐色瓶に保存する。

2.8　クロム（なめし皮革中のクロム）

粉砕しない分析試料約 2 g を灰化した後、硫酸（1+9）10 mL を加え、更に 1,5-ジフェニルカルボノヒドラジド液数滴を加える。

クロムが存在する場合には、紫色を呈する。

ジフェニルカルバジド溶液　　1,5-ジフェニルカルボノヒドラジド約 0.2 g をエタノールに溶かして 100 mL とする。

2.9　ホルムアルデヒド

分析試料 1~2 g を試験管に入れ、硫酸（3+1）2 mL 及びクロモトロープ酸二ナトリウム二水和物約 0.2 g を加え、60~70 °C の水浴上で 10 分間加熱する。

試料中にホルムアルデヒド（縮合物を含む。）が存在する場合には、鮮やかな紫色を呈する。

なお、魚類特にタラには微量のホルムアルデヒドが存在する。

2.10　シアン化水素

分析試料約 1 g を 20 mL の広口びんに入れ、水 5 mL を加えた後、ピクリン酸試験紙でびんの口を覆い、時計皿で押さえて 25~30 °C で静置する。

シアン化水素が 50 mg/kg 以上存在する場合には、試験紙が 2 時間以内に赤褐色に変色する。

変色の判定は、瓶の外側の部分の色を対照として行う。

ピクリン酸試験紙　　4 cm 角のろ紙を 2,4,6-トリニトロフェノール溶液（1 w/v%）に浸して風乾し、使用に際して、炭酸ナトリウム溶液（10 w/v%）で潤す。

2.11　魚骨、獣骨等の判別

分析試料約 1 g を蒸発皿に入れ、マラカイトグリーン試液 3 mL を加え、沸騰水浴上で蒸発乾固し、エタノール及び水で数回ずつ洗浄した後、着色状態を実体顕微鏡又はルーペを用いて観察する。

| | |
|---|---|
| 獣骨 | ほとんど着色しない。 |
| 蒸製骨粉 | 鮮やかな青色を呈する。 |
| 魚骨（助宗） | 青緑色を呈する。 |
| 魚骨（鮪） | 黒緑色を呈する。 |

マラカイトグリーン試液　　マラカイトグリーンしゅう酸塩約 0.2 g をエタノールに溶かして 100 mL とする。

3　機器による鑑定

飼料、原料又は飼料添加物中の特殊な成分又は物質の鑑定に当たっては、分光光度計、赤外分光光度計、蛍光光度計、X 線回折装置、質量分析装置、核種分析装置等、鑑定する成分又は物質に応じた機械、器具を用いて行う。

# 第 20 章　その他

## 第 1 節　成分規格の定められた飼料及び飼料添加物

### 1　尿素

（適用範囲：配合飼料）

#### A　　試薬の調製

第 3 章 2.1 の A による。

#### B　　試料溶液の調製

分析試料 20 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の全量フラスコに入れ、塩酸（0.1 mol/L）200 mL を加え、毎分 30~40 回転の振り混ぜ機で 30 分間振り混ぜた後、標線まで塩酸（0.1 mol/L）を加え、ろ紙（5 種 A）でろ過して試料溶液とする。

#### C　　定　　量

試料溶液 25 mL をケルダールフラスコに正確に入れ、水を加えて 50 mL とし、メチルレッド試液数滴を加え、水酸化ナトリウム溶液（0.5 w/v%）で pH を 5.6~5.8 に調整した後、尿素を分解するのに十分な量のウレアーゼ[注 1] を加える。この容器を密栓して 40~50 °C の水浴中で 1 時間加温して尿素を分解した後冷却する。

分解液に酸化マグネシウム 2~3 g 及び消泡剤としてシリコン油 2~3 滴を加え、以下第 3 章 2.1 の C の 1)に準じて蒸留及び滴定を行う。

同時に、試料溶液 25 mL 及びウレアーゼについて空試験を行い、滴定値を補正した後窒素〔N〕量を求め、これに 2.14 を乗じて試料中の尿素〔$CH_4N_2O$〕量を算出する。

注 1　ウレアーゼは、その 0.1 g 以下で尿素 0.04 g を完全に分解するものを用いる。

### 2　ジウレイドイソブタン

（適用範囲：配合飼料）

#### A　　試薬の調製

1)　ジウレイドイソブタン　　ジウレイドイソブタン〔$C_6H_{14}N_4O_2$〕を 90 °C の熱水で 2 回再結晶し、結晶の倍量のメタノールで洗浄した後、デシケーター中で乾燥する。

2)　酢酸エチル　　酢酸エチルを適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水した後蒸留し、主留分を使用する。

3)　緩衝液　　水 400 mL、酢酸ナトリウム（無水）溶液（1 mol/L）200 mL 及び塩酸（1 mol/L）400 mL を混合し、pH を 0.65 に調整する。

#### B　　定　　量

加水分解及び抽出　　分析試料の一部（ジウレイドイソブタンとして 0.2 g 相当量）を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の耐圧共栓フラスコに入れ、緩衝液 100 mL を加え、更にトルエン 20 mL を正確に加える。これを 40 °C の水浴中で 40 分間かき混ぜながら加温した後、氷水中で 5 分間かき混ぜながら冷却して抽出液とする。

直ちに、抽出液に内部標準物質として酢酸エチル 250 µL を加えて振り混ぜる。トルエン層 12~13 mL を共栓遠心分離管に入れ、適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、150×$g$ で 3 分間遠心分離し、上澄み液をガスクロマトグラフィーに供する

試料溶液とする。

同時に、ジウレイドイソブタン 0.15~0.25 g の間の数点を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、量って 250 mL の耐圧共栓フラスコに入れ、以下試料の場合と同様に操作し、標準液とする。

ガスクロマトグラフィー　試料溶液及び各標準液の各一部をガスクロマトグラフに注入しクロマトグラムを得る。

測定条件　例

検　出　器：水素炎イオン化検出器
カラム用管：ガラス製（内径 3 mm、長さ 3 m）
カラム充てん剤：フタル酸ジオクチル（25 %）/ガスクロマトグラフィー用ケイソウ土（粒径 177~250 μm（80~60 メッシュ））[注 1]
キャリヤーガス：$N_2$（40 mL/min）
燃料ガス：$H_2$（70 mL/min）
助燃ガス：乾燥空気（1.0 kg/cm$^{2)}$
カラム槽温度：90 °C
試料導入部温度：120 °C
検出器温度：120 °C

計　算　各標準液より得られたクロマトグラムから、イソブチルアルデヒドと酢酸エチルとのピーク高さ比を求め、ジウレイドイソブタンと酢酸エチルとの質量比に対する検量線を作成する。

試料溶液より得られたクロマトグラムからイソブチルアルデヒドと酢酸エチルとのピーク高さ比を求め、試料中のジウレイドイソブタン量を算出する。

注 1　Celite 545（Celite Corporation 製）又はこれと同等のもの

3　プロピレングリコール

（適用範囲：配合飼料）

**A　試薬の調製**

1)　プロピレングリコール標準液　プロピレングリコール〔$C_3H_8O_2$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてプロピレングリコール標準原液を調製する（この液 1 mL は、プロピレングリコールとして 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にプロピレングリコールとして 0.1~0.6 mg を含有する数点のプロピレングリコール標準液を調製する。

2)　内標準液　1,3-プロパンジオール 0.50 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えて内標準液を調製する（この液 1 mL は、1,3-プロパンジオールとして 5 mg を含有する。）。

## B　定　　量

抽　　出　分析試料 5.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、500 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、20 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 10 分間遠心分離し、上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過する。

ろ液 5 mL を試験管に正確に入れ、内標準液 0.5 mL を正確に加え、ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

同時に、各プロピレングリコール標準液 5 mL ずつをそれぞれ試験管に正確に入れ、内標準液 0.5 mL ずつをそれぞれ正確に加え、ガスクロマトグラフィーに供する標準液とする。

ガスクロマトグラフィー　　試料溶液及び各標準液各 5 μL をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件　例

検　　出　　器：水素炎イオン化検出器

カ ラ ム 用 管：ガラス製（内径 3 mm、長さ 1 m）

カラム充てん剤：ポリエチレングリコール（平均分子量 1,000）（5 %）/三フッ化樹脂（粒径 240~400 μm（60~30 メッシュ））[注1]

キャリヤーガス：$N_2$（0.6 kg/cm$^2$）

燃 料 ガ ス　：$H_2$（1.2 kg/cm$^2$）

助 燃 ガ ス　：乾燥空気（1.0 kg/cm$^2$）

カ ラ ム 槽 温 度：115 °C

試料導入部温度：200 °C

検 出 器 温 度：250 °C

計　　算　　得られたクロマトグラムからプロピレングリコール及び 1,3-プロパンジオールのピーク高さ又は面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のプロピレングリコール量を算出する。

注 1　Flusin T（ジーエルサイエンス製（販売終了））又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

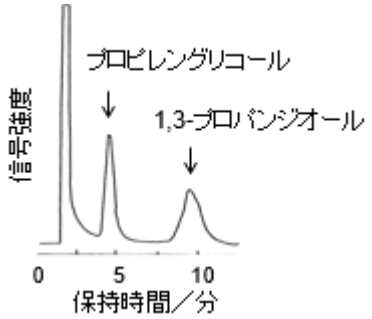
・添加回収率及び繰返し精度

| 試料の種類 | 添加濃度（%） | 繰返し | 添加回収率（%） | 繰返し精度 $RSD_r$（%） |
|---|---|---|---|---|
| ほ乳期子豚育成用配合飼料1 | 1 | 3 | 95.3 | 2.2 |
| | 3 | 3 | 97.1 | 1.7 |
| | 5 | 3 | 97.3 | 1.9 |
| ほ乳期子豚育成用配合飼料2 | 1 | 3 | 99.8 | 2.3 |
| | 3 | 3 | 99.1 | 3.4 |
| | 5 | 3 | 97.1 | 2.1 |
| ほ乳期子牛育成用配合飼料 | 1 | 3 | 95.7 | 0.7 |
| | 3 | 3 | 95.2 | 1.8 |
| | 5 | 3 | 97.7 | 3.2 |

・共同試験

| 試料の種類 | 有効試験室数 | 棄却試験室数 | 添加濃度（%） | 添加回収率（%） | 室内繰返し精度 $RSD_r$（%） | 室間再現精度 $RSD_R$（%） | HorRat |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ほ乳期子豚用配合飼料 | 6 | 0 | 1.5 | 96.0 | 3.0 | 3.9 | 1.0 |

（参考）クロマトグラム例




**試料（ほ乳期子豚育成用配合飼料中）のクロマトグラム**

第 2 節　油脂の品質規格成分

1　過酸化物価

**A　　試薬の調製**

1)　ヨウ化カリウム飽和溶液　　ヨウ化カリウムを煮沸冷却した水に飽和させ、暗所に保存する。

2)　0.0167 mol/L 二クロム酸カリウム標準液　　二クロム酸カリウム（標準試薬）（メノウ乳ばちを用いて粉末とし、100~110 °C で 3~4 時間乾燥したもの）4.903 g（4.9025~4.9034 g）を量って 1,000 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて 0.0167 mol/L 二クロム酸カリウム標準液を調製する。

3)　デンプン試液　　デンプン（溶性）1.0 g（0.95~1.04 g）を少量の水で均質なペースト状にしたものを、熱水 100 mL 中にかき混ぜながら加え、更に穏やかに煮沸しながら透明になるまでかき混ぜた後放冷し、上澄み液を使用する。

4)　0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液　　チオ硫酸ナトリウム五水和物 25.0 g（24.95~25.04 g）を量って 1,000 mL の全量フラスコに入れ、煮沸冷却した水を加えて溶かし、更に標線まで煮沸冷却した水を加えて 0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準原液を調製し、この容器を密栓して 5~6 日間静置した後、次により濃度を標定する。

ヨウ化カリウム溶液（10 w/v%）10 mL を 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、塩酸 5 mL を加えて軽く振り混ぜ、更に 0.0167 mol/L 二クロム酸カリウム標準液 25 mL を正確に加えて激しく振り混ぜた後 5 分間静置する。

煮沸冷却した水 100 mL で先の三角フラスコの器壁を洗浄し、軽く振り混ぜ、0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準原液で滴定する（溶液の黄色がほとんど消失するまで滴定し、デンプン試液数滴を加えて徐々に滴定を続け、デンプンの青色が消えて溶液が緑色となったときを終点とする。）。

同時に、0.0167 mol/L 二クロム酸カリウム標準液を加えない液について空試験を行い、0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準原液の係数を算出する。

使用に際して、標準原液の一部を煮沸冷却した水で正確に 10 倍に希釈し、0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液を調製する。

**B　　試料溶液の調製**

分析試料 50~100 g を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、円筒ろ紙[注 1]（直

径 45 mm、高さ 150 mm）に入れ、この円筒ろ紙を大型ソックスレー抽出器に入れ、クロロホルムで 2~3 時間抽出した後、抽出液を 70 °C 以下の水浴で 50 mL まで減圧濃縮して試料溶液とする。

### C　定　　量

試料溶液の一部を共栓三角フラスコに正確に入れ、試料溶液の 1.5 倍量の酢酸を加えて軽く振り混ぜた後、窒素ガスを送って三角フラスコ内の空気を十分に置換する。更にこの三角フラスコに窒素ガスを送りながらヨウ化カリウム飽和溶液 1 mL を正確に加え、直ちに栓をして激しく振り混ぜた後暗所に 5 分間静置する。

次に、先の三角フラスコに水 75 mL を加え、再び栓をして激しく振り混ぜた後、デンプン試液数滴を加え、窒素ガスを送りながら 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準液で滴定する（デンプンによる青色が消失したときを終点とする。）。同時に、空試験を行い、デンプン試液で発色しないことを確認する。

別に、試料溶液の一部を脂肪ひょう量瓶に正確に入れ、第 3 章 3.1 に準じて粗脂肪量を求め、過酸化物価を算出する。

注 1　No. 84（東洋濾紙製）又はこれと同等のもの

## 2　酸　価

### A　試薬の調製

1)　0.05 mol/L 硫酸標準液　　第 3 章 2.1 の A の 2)による。

2)　0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液　　水酸化カリウム 7 g（6.5~7.4 g）を量って 1,000 mL の全量フラスコに入れ、適量の水を加えて溶かし、更に標線までエタノールを加え、この容器を密栓して 5~6 日間静置する。この液の上澄み液をろ紙（5 種 A）でろ過して 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液を調製し、次により濃度を標定する。

0.05 mol/L 硫酸標準液 25 mL を 200 mL の三角フラスコに正確に入れ、フェノールフタレイン試液数滴を加え、0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液で滴定して係数を算出する。

### B　試料溶液の調製

1 の B による。

### C　定　　量

試料溶液の一部を 200 mL の三角フラスコに正確に入れ、フェノールフタレイン試液数滴を加え、0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液で滴定する（溶液が微紅色となったとき（着色して 30 秒以内に消失するものであってはならない。）を終点とする。）。

同時に、空試験を行い、先の滴定結果を補正する。

別に、試料溶液の一部を脂肪ひょう量瓶に正確に入れ、3.3.1 に準じて粗脂肪量を求め、次式により酸価を算出する。

$$\text{酸価} = \frac{5.611 \times V \times f}{W}$$

$V$ ：滴定に要した 0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液の量（mL）

$f$ ：0.1 mol/L 水酸化カリウム標準液の係数

$W$：酸価の測定に用いた試料溶液中の粗脂肪の質量（g）

3　たん白質

（適用範囲：動物性油脂）

### A　試薬の調製

1)　抽出溶媒　　水酸化ナトリウム 20.0 g（19.95~20.04 g）を水に溶かして 500 mL とする。

2)　たん白質標準液　　たん白質（IgG）溶液[注1]（10 mg/mL）500 µL をマイクロシリンジで 50 mL の全量フラスコに入れ、標線まで抽出溶媒を加えてたん白質標準原液を調製する（この液 1 mL は、たん白質として 100 µg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を抽出溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にたん白質として 0~80 µg を含有する数点のたん白質標準液を調製する。

3)　1 %酒石酸ナトリウムカリウム溶液　　酒石酸ナトリウムカリウム四水和物 1.34 g（1.335~1.344 g）を水で溶かして 100 mL とする。

4)　発色試薬　　硫酸銅五水和物 0.78 g（0.775~0.784 g）を 1 %酒石酸ナトリウムカリウム溶液に加えて溶かし、直ちにその 2 mL を炭酸ナトリウム溶液（2 w/v%）100 mL に加え、発色試薬を調製する（使用する直前に調製する）。

5)　フェノール試液　　フェノール試薬[注2]を水で 2 倍量に希釈する。

### B　試料溶液の調製

試料の調製　　動物性油脂 20 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、300 mL のトールビーカーに量り、石油エーテル 100 mL を加えて溶かす。この液をあらかじめブフナー漏斗[注3]に入れたろ紙[注4]（5 種 B）で穏やかに吸引ろ過する。更に先のトールビーカー、ろ紙及び漏斗の内壁を石油エーテル 100 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。

ろ紙上の不溶性不純物をろ紙とともにシャーレに入れ、石油エーテル臭がなくなるまで静置し、105±1 °C で 1 時間乾燥した後、デシケーター（シリカゲル）中で 30 分間放冷し、抽出に供する試料とする。

抽　　出　　シャーレ内の試料をろ紙とともに 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、抽出溶媒 20 mL を正確に加え、栓をして、ろ紙が崩れるまで振り混ぜて抽出した後 10 分間静置する。この液が均質になるように振り混ぜ、以下同様に 2 回操作する。共栓遠心沈殿管内の抽出液をろ紙（5 種 B）でろ過し、初めのろ液 5~8 mL を捨て、その後のろ液 5 mL を試料溶液[注5]とする。

同時に、別のろ紙（5 種 B）を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、以下同様に操作し、ろ液を空試験溶液とする。

### C　定　　量

試料溶液 1 mL を正確に量り、10 mL の共栓付試験管に入れ、発色試薬 5 mL を加え、栓をして振り混ぜた後 10 分間静置する。フェノール試液 1 mL を加え、速やかに栓をして振り混ぜた後 30 分間静置し、この液について、波長 750 nm の吸光度を測定する。

同時に、同様に操作した各たん白質標準液の吸光度から、空試験溶液を対照として、

以下の示差法による計算により、試料中のたん白質含有量を算出する。

計算

試料中のたん白質量（mg/kg）$=(Q_S - Q_B)\times V \times f$

$V$ ：試料溶液の希釈倍率（mL/g）

$f$ ：たん白質標準液の係数

$Q_S$ ：試料溶液中のたん白質含有量（μg/mL）

$$Q_S = Q_L + \frac{(S_A - S_L)}{(S_H - S_L)} \times (Q_H - Q_L)$$

$Q_L$ ：試料溶液の吸光度より低濃度のたん白質標準液の濃度

$Q_H$ ：試料溶液の吸光度より高濃度のたん白質標準液の濃度

$S_A$ ：試料溶液の吸光度

$S_L$ ：試料溶液より少ない含有量（$Q_L$）の標準液の吸光度

$S_H$ ：試料溶液より多い含有量（$Q_H$）の標準液の吸光度

$Q_B$ ：空試験溶液中のたん白質含有量（μg/mL）（求め方は $Q_S$ と同様）

注 1　たん白質定量用たん白質標準品、IgG 溶液（和光純薬工業製（販売終了））又はこれと同等のもの

2　蛋白質測定用フェノール試薬（関東化学製）又はこれと同等のもの

3　セパロート（日本理化学器械製）又はこれと同等のもの

4　褐色に変色したろ紙は定量に影響を及ぼすので使用しない。

5　試料溶液が着色又は懸濁していると定量に影響を及ぼすので注意する。

（参考）分析法バリデーション

・繰返し精度

| 添加成分 | 添加濃度（%）（不溶性不純物として） | 繰返し | 測定値（mg/kg） | 繰返し精度 $RSD_r$（%） |
|---|---|---|---|---|
| 牛由来獣脂かす | 0.15 | 3 | 381 | 4.6 |
| 豚由来獣脂かす | 0.15 | 3 | 430 | 3.6 |

・共同試験

| 試料の種類 | 有効試験室数 | 棄却試験室数 | 添加濃度（%）不溶性不純物として | 測定値（mg/kg） | 室内繰返し精度 $RSD_r$（%） | 室間再現精度 $RSD_R$（%） | HorRat |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 豚由来獣脂かす | 7 | 0 | 0.15 | 347 | 9.4 | 18 | 2.7 |

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　不溶性不純物として 0.015 %

第 3 節　その他

1　塩酸不溶解物（土砂）

**定　　量**

分析試料 2.0 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の硬質トールビーカーに入れ、550~600 °C で灰化した後放冷する。残留物を少量の水で潤し、塩酸 25 mL 及び水をトールビーカーに加えて 100 mL とし、時計皿で覆って 30 分間煮沸する。この液をろ紙（5 種 A）でろ過し、先のトールビーカー及び残さを熱水で洗浄し、同様にろ過する。

ろ紙上の残留物（塩酸不溶解物）をろ紙とともに乾燥し、るつぼ（あらかじめ

550 °C で 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録したもの）に入れる。これを 550~600 °C で 2 時間加熱して灰化し、放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、試料中の塩酸不溶解物（土砂）量を算出する。

2　揮発性塩基性窒素

**A　　試薬の調製**

第 3 章 2.1 の A による。

**B　　試料溶液の調製**

分析試料 5~10 g を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の全量フラスコに入れ、水 200 mL を加え、毎分 30~40 回転の振り混ぜ機で 30 分間振り混ぜる。この全量フラスコの標線まで水を加え、この液をろ紙（5 種 A）でろ過し、試料溶液とする。

**C　　定　　量**

試料溶液 25~50 mL をケルダールフラスコに正確に入れ、酸化マグネシウム約 2 g 及び消泡剤としてシリコン油 1~2 滴又はパラフィン 0.2~0.5 g を加え、第 3 章 2.1 の C に準じて蒸留、滴定を行い、試料中の揮発性塩基性窒素〔N〕量を求める。

3　糊化（α 化）度

（適用範囲：圧ぺんとうもろこし）

**A　　試薬の調製**

1)　デンプン溶液　　デンプン（溶性）約 0.2 g を水に溶かして 100 mL とする。

2)　ブドウ糖標準液　　ブドウ糖〔$C_6H_{12}O_6$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてブドウ糖標準原液を調製する（この液 1 mL はブドウ糖として 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中にブドウ糖として 20~80 μg を含有する数点のブドウ糖標準液を調製する。

3)　酢酸溶液　　酢酸 60.0 g（59.95~60.04 g）に水を加えて 500 mL とする。

4)　酢酸緩衝液　　酢酸ナトリウム三水和物 136 g（135.5~136.4 g）を水に溶かして 500 mL とし、酢酸溶液で pH を 4.8 に調整する。

5)　1 mol/L 酢酸緩衝液　　酢酸緩衝液を水で 2 倍量に希釈する。

6)　発色試薬　　試料溶液中のブドウ糖に対して、ムタローゼ、グルコースオキシダーゼ及びペルオキシダーゼの作用により、定量的にフェノール及び 4-アミノアンチピリンの酸化縮合体を生成する試薬[注 1]

7)　水酸化ナトリウム溶液　　水酸化ナトリウム 40.0 g（39.95~40.04 g）を水に溶かして 100 mL とする。

8)　グルコアミラーゼ溶液（酵素力価 2.63 U[注 2]/mL）　　以下の手順により、酵素力価が 1 mL あたり 2.63 U となるようにグルコアミラーゼ溶液を調製する。

i)　酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液の調製　　グルコアミラーゼ[注 3] 約 0.1 g を 100 mL の全量フラスコに入れ、1 mol/L 酢酸緩衝液を加えて溶かし、更に標線

まで 1 mol/L 酢酸緩衝液を加えて、酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液を調製する（使用時に調製する。）。

ii) ブドウ糖生成量の測定　デンプン溶液 4 mL を正確に 25 mL の試験管に入れ、37 °C の恒温槽中で 10 分間保温した後、酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液 1 mL を正確に加え、37 °C で正確に 10 分間反応させる[注4]。次に、試験管を沸騰水浴中で 8 分間煮沸して酵素を失活させた後放冷する。この液を水で 100 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加えて酵素力価測定用溶液を調製する。

同時に、あらかじめ失活させておいた[注5]酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液を用いて同様に操作し、空試験溶液とする。

次に、酵素力価測定用溶液 1 mL を 25 mL の試験管に正確に入れ、発色試薬 3 mL を正確に加えて振り混ぜた後、37 °C の恒温槽中で 5 分間静置する。この液について、水を対照液として波長 505 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に各ブドウ糖標準液について、酵素力価測定用溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して酵素力価測定用溶液中のブドウ糖濃度 *G*（μg/mL）を求める。

iii) グルコアミラーゼの酵素力価の計算　次式により酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液 1 mL あたりの酵素力価 *E*（U/mL）を求める。

$$E = \frac{100 \times G}{180.16 \times 10}$$

iv) グルコアミラーゼ採取量の算出　次式により 2.63 U/mL のグルコアミラーゼ溶液の調製に必要なグルコアミラーゼ採取量 *A*（g）を算出する。

$$A = \frac{B \times 2.63}{E}$$

*B* ：酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液調製時のグルコアミラーゼ採取量（g）

v) グルコアミラーゼ溶液の調製　グルコアミラーゼ[注3] *A*（g）を有効数字 4 桁まで量って 100 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加える（使用時に調製する。）。

### B　試料溶液の調製

分析試料[注6] 0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、25 mL の試験管に入れ、水 8 mL を正確に加え、ボルテックスミキサーで均質な懸濁液を調製する。懸濁液 2 mL ずつを 25 mL の試験管 3 本に正確に入れ[注7]、それぞれ（S）、（R）及び（$R_0$）とする。酢酸緩衝液 1.60 mL 及び水 0.40 mL を（S）に加える（全量は 4 mL となる。）。（R）及び（$R_0$）に水酸化ナトリウム溶液 0.20 mL ずつを振り混ぜながら加え[注8]、65 °C の水浴上で 5 分間加熱し完全に糊化させた後水冷する。酢酸溶液 1.60 mL ずつを（R）及び（$R_0$）に加えて中和し、更に水 0.20 mL ずつを加えて 4 mL とする。

（S）、（R）及び（$R_0$）を、37 °C の恒温槽で 10 分間予備保温した後、（S）及び（R）にグルコアミラーゼ溶液 1 mL ずつを正確に加え、（$R_0$）にあらかじめ失活させておいた[注9]グルコアミラーゼ溶液 1 mL を正確に加える。これらの試験管をときど

き振り混ぜながら 37 °C の恒温槽で正確に 60 分間反応[注4]させ、沸騰水浴中で 8 分間煮沸して[注10]酵素を失活させた後放冷する。

（S）、（R）及び（$R_0$）を水で 200 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加え、ろ紙（5 種 B）でろ過してそれぞれ試料溶液（S）、（R）及び（$R_0$）とする。

### C　測　　定

試料溶液（S）、（R）及び（$R_0$）各 1 mL をそれぞれ 25 mL の試験管に正確に入れ、発色試薬 3 mL ずつを正確に加えて振り混ぜた後、37 °C の恒温槽中で 5 分間静置する[注11]。これらの液について、水を対照液として波長 505 nm の吸光度を測定し[注12]、得られた吸光度から次式により糊化度を算出する。

$$\text{試料中の糊化度（\%）} = \frac{A_S - B_R}{A_R - B_R}$$

$A_S$ ：試料溶液（S）の吸光度

$A_R$ ：試料溶液（R）の吸光度

$B_R$ ：試料溶液（$R_0$）の吸光度

注 1　グルコース C-II テストワコー（和光純薬工業製（販売終了））の発色試薬又はこれと同等のもの

2　グルコアミラーゼがデンプン（溶性）に 37 °C で作用するとき、1 分間に 1 μmol のブドウ糖を生成する量を 1 単位（U）とする。

3　Amyloglucosidase（*A. niger*）（*Aspergillus niger* 起源、Megazyme 製）又はこれと同等のもの

4　このときの溶液は、反応に最適な条件である pH 4.8 の 0.2 mol/L 酢酸緩衝液となっている。

5　酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液 10 mL を 25 mL 試験管に入れ、栓をして、沸騰水浴中で 8 分間煮沸して失活させる。

6　熱がかからないように液体窒素等による冷却を行いながら粒度 0.15 mm 以下になるまで粉砕し、試料に対して十分量のエタノール及びアセトンを加えて脱脂し、一晩風乾させたもの。

7　懸濁液は試料と水が分離しやすいので、ボルテックスミキサーで均質分散化させた直後に行う。

8　振り混ぜ、均質分散化させた直後に水酸化ナトリウム溶液を添加する。

9　グルコアミラーゼ溶液 10 mL を 25 mL 試験管に入れ、栓をして、沸騰水浴中で 8 分間煮沸して失活させる。

10　反応後直ちに沸騰水浴中に試験管を入れる。

11　室温（15 °C 以上）で 15 分間静置でも可

12　発色後 1 時間以内に測定する。

## 4　コレステロール

### A　試薬の調製

1)　コレステロール標準液　　コレステロール〔$C_{27}H_{46}O$〕20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、20 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、

更に標線までアセトンを加えてコレステロール標準液を調製する（この液 1 mL はコレステロールとして 1 mg を含有する。）。

2) 内標準液　5*a*-コレスタン〔$C_{27}H_{48}$〕20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、20 mL の全量フラスコに入れ、ヘキサンを加えて溶かし、更に標線までヘキサンを加えて内標準液を調製する（この液 1 mL は 5*a*-コレスタンとして 1 mg を含有する。）。

3) 1 mol/L 水酸化カリウム・エタノール溶液　水酸化カリウム 14.0 g（13.95~14.04 g）を少量の水に溶かし、エタノールを加えて 200 mL とする。

## B　定　　量

ソックスレー抽出　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、円筒ろ紙[注1]（直径 22 mm、高さ 90 mm）に入れ、その上に脱脂綿を軽く押さえるようにして入れる。

これをソックスレー抽出器に入れ、脂肪ひょう量瓶に連結し、クロロホルムーメタノール（2+1）で 16 時間抽出する。

次に、円筒ろ紙をとり去り、クロロホルムーメタノール（2+1）を回収し、けん化に供する粗脂質を得る。

けん化　脂肪ひょう量瓶中の粗脂質に内標準液 100 μL 及び 1 mol/L 水酸化カリウム・エタノール溶液 50 mL を加え、還流冷却器を接続し、1 時間加熱してけん化した後室温まで冷却し、精製に供する試料溶液とする。

同時に、コレステロール標準液 100 μL を別の脂肪ひょう量瓶に正確に入れ、内標準液 100 μL 及び 1 mol/L 水酸化カリウム・エタノール溶液 50 mL を加え、以下粗脂質と同様に操作し、精製に供する標準液とする。

精　製　試料溶液を 300 mL の分液漏斗 A に入れ、試料溶液の入っていた脂肪ひょう量瓶を水 50 mL 及び石油エーテル 50 mL で洗浄し、洗液を順次分液漏斗 A に加える。分液漏斗 A を 1 分間振り混ぜた後静置し、水層（下層）を 300 mL の分液漏斗 B に入れる。分液漏斗 B に石油エーテル 50 mL を加え、同様に振り混ぜた後静置し、水層を 300 mL の分液漏斗 C に入れ、石油エーテル層（上層）を分液漏斗 A に合わせる。分液漏斗 C に石油エーテル 50 mL を加えて同様に操作し、石油エーテル層を分液漏斗 A に合わせる。

水 40 mL を分液漏斗 A に加え、同様に振り混ぜた後静置し、水層を捨てる。分液漏斗 A に水 40 mL を加え、同様に 3 回操作した後、石油エーテル層を三角フラスコに入れ、適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、300 mL のなす形フラスコにろ紙（5 種 A）でろ過する。ろ液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固し、残留物をトリメチルシリル化に供する試料とする。

同時に、けん化した標準液について、試料溶液と同様に操作し、残留物をトリメチルシリル化に供する標準試料とする。

トリメチルシリル化　試料に *N,O*-ビス（トリメチルシリル）アセトアミド[注2] 0.6 mL 及びトリメチルクロロシラン[注2] 0.2 mL を加え、栓をして軽く振り混ぜた後、60 °C の水浴中で 1 分間加温した後室温まで冷却する。ヘキサン 2 mL をこの液に加

え、激しく振り混ぜてガスクロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

同時に、*N,O*-ビス（トリメチルシリル）アセトアミド[注2] 0.6 mL 及びトリメチルクロロシラン[注2] 0.2 mL を標準試料に加え、以下試料と同様に操作し、ガスクロマトグラフィーに供する標準液とする。

ガスクロマトグラフィー　試料溶液及び標準液各 1 μL をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件　例

検　出　器：水素炎イオン化検出器

カ　ラ　ム：溶融石英製キャピラリーカラム（14 %シアノプロピルフェニル－86 %ジメチルポリシロキサンコーティング（内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm））[注3]

キャリヤーガス　：He（1.3 mL/min）

メイクアップガス：He+$N_2$（10 mL/min）

燃 料 ガ ス　：$H_2$（40 mL/min）

助 燃 ガ ス　：空気（250 mL/min）

試 料 導 入 法：スプリットレス

試料導入部温度：280 °C

カ ラ ム 槽 温 度：50 °C（2 min 保持）→昇温 20 °C/min→250 °C→昇温 2 °C/min→280 °C（10 min 保持）

検 出 器 温 度：300 °C

計　算　得られた標準液のクロマトグラムから、以下の式により感度補正係数（*K*）を求める。

$$K = A_{is} / A_s$$

$A_{is}$ ：標準液のクロマトグラムにおける内標準（5*a*-コレスタン）のピーク面積

$A_s$ ：標準液のクロマトグラムにおけるトリメチルシリル化したコレステロールのピーク面積

得られた感度補正係数及び試料溶液のクロマトグラムから、以下の式により試料中のコレステロール量を算出する。

$$\text{コレステロール量（mg/kg）} = \frac{P \times K \times S_{is} \times 1{,}000}{P_{is} \times W}$$

$P$ ：試料溶液のクロマトグラムにおけるトリメチルシリル化したコレステロールのピーク面積

$P_{is}$ ：試料溶液のクロマトグラムにおける内標準（5*a*-コレスタン）のピーク面積

$S_{is}$ ：添加した内標準（5*a*-コレスタン）の質量（mg）

$W$ ：試料質量（g）

注 1　No. 84（東洋濾紙製）又はこれと同等のもの

2　ガスクロマトグラフ用試薬又はこれと同等のもの

3　DB-1701（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

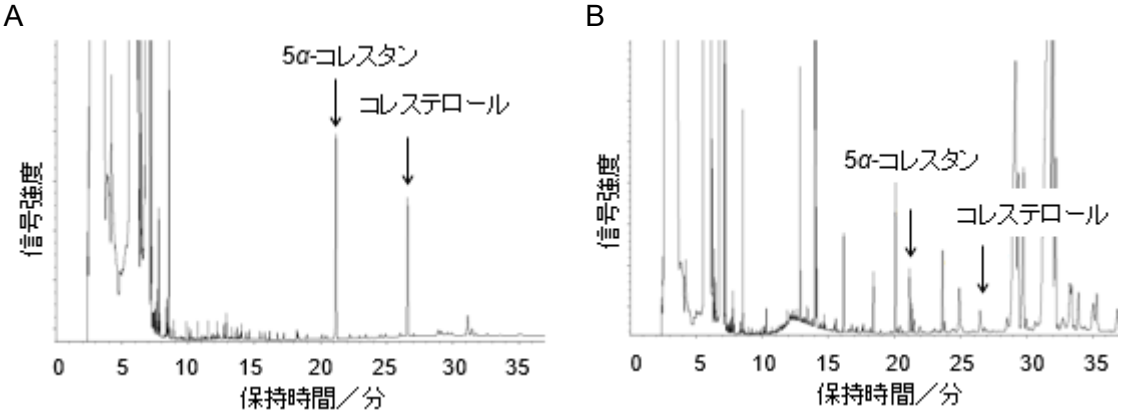
| 試料の種類 | 添加濃度 (mg/kg) | 繰返し | 添加回収率 (%) | 繰返し精度 $RSD_r$ (%) |
|---|---|---|---|---|
| 乳用牛飼育用配合飼料 | 40 | 3 | 95.2 | 1.5 |
| | 200 | 3 | 92.5 | 2.0 |
| 若令牛育成用配合飼料 | 40 | 3 | 91.8 | 3.9 |
| | 200 | 3 | 94.5 | 1.1 |
| とうもろこし | 40 | 3 | 84.5 | 3.1 |
| | 200 | 3 | 94.6 | 5.6 |

・共同試験

| 試料の種類 | 有効試験室数 | 棄却試験室数 | 測定値 (mg/kg) | 室内繰返し精度 $RSD_r$ (%) | 室間再現精度 $RSD_R$ (%) | HorRat |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 牛用配合飼料 | 7 | 2 | 9.3 | 7.9 | 14 | 1.3 |
| とうもろこし | 10 | 1 | 10.5 | 11 | 25 | 2.7 |

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　1 mg/kg

（参考）クロマトグラム例




**標準液及び添加試料のクロマトグラム**

A：標準液

B：添加試料（とうもろこし）

5　水溶性窒素

（適用範囲：フィッシュソリュブル吸着飼料及びフィッシュソリュブル）

### A　　試薬の調製

第 3 章 2.1 の A による。

### B　　試料溶液の調製

分析試料 20 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL のフラスコに入れ、水 200 mL を加え、毎分 30~40 回転の振り混ぜ機で 30 分間振り混ぜた後、1,500×*g* で 10 分間遠心分離し、上澄み液をろ紙（5 種 A）でろ過し、試料溶液とする。

### C　　定　　量

試料溶液 25 mL をケルダールフラスコに正確に入れ、硫酸カリウム 1.8 g（1.75~1.84 g）及び硫酸銅（II）五水和物約 0.2 g を加え、更に硫酸 10 mL を加え、以下第 3 章 2.1 の B 及び C に準じて分解蒸留、滴定を行い、試料中の水溶性窒素〔N〕量を求める。

6　ペプシン消化率

### A　　試薬の調製

1)　0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液　　第 3 章 2.1 の A の 1)による。

2)　0.05 mol/L 硫酸標準液　　第 3 章 2.1 の A の 2)による。

3)　ペプシン塩酸液　　ペプシン（力価 1:10,000）2.0 g（1.95~2.04 g）を 1,000 mL の全量フラスコに入れ、塩酸（1+150）を加えて溶かし、更に標線まで同液を加える（使用直前に調製する。）。

### B　　定　　量

分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、脱脂した後、200 mL の三角フラスコに入れ、あらかじめ 42~45 °C に加温したペプシン塩酸液 150 mL を加えてこの容器を密栓し、45 °C で 16 時間振り混ぜた後放冷する。

この液をろ紙（5 種 A）でろ過し、先の三角フラスコ及び残さを順次温水で洗浄し、ろ紙上の残留物（不消化物）をろ紙とともにケルダールフラスコに入れ、以下第 3 章 2.1 の B 及び C に準じて分解、蒸留、滴定を行い、不消化物の粗たん白質量を求める。

同時に、分析試料について第 3 章 2.1 により粗たん白質量を求め、ペプシン消化率を算出する。