

飼料研究報告

第51号

令和8年

Research Report of Animal Feed

Vol. 51
2026



**Food and Agricultural
Materials Inspection Center**

WOAH Collaborating Centre
for Animal Feed Safety and Analysis

Reference Centre



World Organisation
for Animal Health
Founded as OIE

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。これらの研究成果の多くは、飼料分析基準検討会で審議の上、公定分析法である「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 8 年 10 月

理事長 木内 岳志

謝 辞

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

令和7年度飼料分析基準検討会委員
(敬称略。五十音順。役職は令和8年3月現在。)

永西 修	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門 研究推進部 研究推進室
久城 真代	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 食品流通・安全研究領域 食品安全・信頼グループ長補佐
小池 良治	農林水産省動物医薬品検査所 検査第二部 総括上席研究官
後藤 哲久	AOAC インターナショナルフェロー
坂 真智子	株式会社エスコ 代表取締役社長
永山 敏廣	元明治薬科大学 教授
堀江 正一	大妻女子大学 名誉教授
松井 徹	国立大学法人京都大学 名誉教授
松井 利郎	国立大学法人九州大学 農学研究院 教授
安井 明美	元国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 アドバイザー

目 次

1 牛用配合飼料中の 3-ニトロオキシプロパノールの液体クロマトグラフによる分析法の開発	
菊田 千乃, 長久保 眞平, 若宮 洋市……………	1
2 配合飼料中のフラボフォスフォリポールの微生物学的定量法の検討	
野村 昌代, 大島 慎司, 鈴木 時也, 時田 佳奈, 梁川 璃胡, 山多 晴子, 野崎 友春……………	7
3 愛玩動物用飼料のジャーキー, 菓子類及び粉ミルク中のオクラトキシン A の液体クロマトグラフによる分析法の検討	
船木 紀夫, 野村 哲也, 仲谷 琢実 ……………	16
4 そうこう類及び植物性油かす類中のアフラトキシン, ステリグマトシスチン及びゼアラレノンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の検討	
山上 陽平, 井上 直, 齊木 雅一, 中村 信仁, 小塚 健志, 青山 幸二 ……………	28
5 穀類及び牧草中の 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の改正基準値相当の濃度における妥当性確認	
高橋 雄一, 山下 奈々……………	41
精度管理	
1 令和 7 年度飼料等の共通試料による分析鑑定について	
倉島 ちなみ, 有田 桜子, 林 駿太, 山下 奈々, 安藤 千咲, 菊田 千乃 ……………	49
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 7 年度)	
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課 ……	73
2 飼料中の腸球菌の薬剤耐性モニタリング調査 (令和 5~6 年度)	
新井 詠子, 青木 華歩, 奥山 紀子, 久保田 恵理, 山多 晴子, 橋本 仁康 ……………	90
3 特定添加物検定結果等について (令和7年度)	
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課 ……………	105

他誌掲載論文（抄録）

- 1 Trial for *cyp51A* gene variants to discriminate Japanese *Aspergillus oryzae* from *A. flavus*
KANAZASHI Yuhei, YAMAGAMI Yohei,
FURUKAWA Tomohiro, YABE Kimiko and KUSHIRO Masayo
(JSM Mycotoxins, 75(2), 55-57 (2025).) 114
- 2 LC-MS/MSによる飼料作物サイレージ中のゼアラレノンおよびデオキシニバレノール分析法の室間共同試験
鈴木 知華, 會田 紀雄
(食品衛生学雑誌, 66(6), 165-171 (2025).) 114
- 3 Quantitative Real-Time PCR for *Fusarium graminearum* sensu stricto and *F. asiaticum* Infection in Wheat Kernels
YAMAGAMI Yohei, KANAZASHI Yuhei, INOUE Hiroyoshi,
NAKAGAWA Hiroyuki, KUSHIRO Masayo and
FURUKAWA Tomohiro
(JSM Mycotoxins, 76(1), 3-8 (2026).) 114
- 4 Survey of trichothecene contamination in imported and domestically produced feed in Japan
YAMAGAMI Yohei, NOMURA Masayo and AOYAMA Koji
(Mycotoxin Research, 42(33), (2026).) 114

CONTENTS

1	Development of 3-Nitrooxypropanol Determination Method in Formula Feed for Cattle by LC KIKUTA Yukino, NAGAKUBO Shinpei and WAKAMIYA Yoichi	1
2	Study of Flavophospholipol Determination Method in Formula Feed by Microbiological Assay NOMURA Masayo, OSHIMA Shinji, SUZUKI Tokiya, TOKITA Kana, YANAGAWA Riko, YAMATA Seiko and NOZAKI Tomoharu	7
3	Study of Ochratoxin A Determination Method in Jerky, Confectionery and Milk Powder for Pet Food by LC FUNAKI Norio, NOMURA Tetsuya and NAKATANI Takumi ..	16
4	Study of Determination Method of Aflatoxin, Sterigmatocystin and Zearalenone in Brans and Food Processing By-products, and Oil Seed Meals for Feed by LC-MS/MS YAMAGAMI Yohei, INOUE Tadashi, SAIKI Masakazu, NAKAMURA Nobuhito, KOZUKA Kenji and AOYAMA Koji ..	28
5	Validation Study of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Determination Method in Grains and Grass Hay for Feed by LC-MS/MS at Concentration Equivalent to the Revised Regulation Values TAKAHASHI Yuichi and YAMASHITA Nana	41
§ Proficiency test		
1	Proficiency Test (Fiscal Year 2025) KURASHIMA Chinami, ARITA sakurako, HAYASHI Shunta, YAMASHITA Nana, ANDOU Chisaki and KIKUTA Yukino ...	49
§ Investigative report		
1	Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (Fiscal Year 2025) Feed Analysis 1st Division and 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	73
2	Monitoring Results of Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Feed Ingredients and Formula Feed (Fiscal Years 2023-2024) ARAI Eiko, AOKI Kaho, OKUYAMA Noriko, KUBOTA Eri, YAMATA Seiko and HASHIMOTO Yoshiyasu	90

3 Results of Official Testing of Specified Feed Additives (Fiscal Year 2025)

Feed Analysis 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection
Department 105

§ Papers accepted in other journals (abstract)

1 Trial for *cyp51A* gene variants to discriminate Japanese *Aspergillus oryzae* from *A. flavus*

KANAZASHI Yuhei, YAMAGAMI Yohei,
FURUKAWA Tomohiro, YABE Kimiko and KUSHIRO Masayo
(JSM Mycotoxins, 75(2), 55-57 (2025).) 114

2 Collaborative Study of Determination Method of Zearalenone and Deoxynivalenol in Silage by LC-MS/MS

SUZUKI Chika and AITA Norio
(Food Hygiene and Safety Science, 66(6), 165-171 (2025).) 114

3 Quantitative Real-Time PCR for *Fusarium graminearum* sensu stricto and *F. asiaticum* Infection in Wheat Kernels

YAMAGAMI Yohei, KANAZASHI Yuhei, INOUE Hiroyoshi,
NAKAGAWA Hiroyuki, KUSHIRO Masayo and
FURUKAWA Tomohiro
(JSM Mycotoxins, 76(1), 3-8 (2026).) 114

4 Survey of trichothecene contamination in imported and domestically produced feed in Japan

YAMAGAMI Yohei, NOMURA Masayo and AOYAMA Koji
(Mycotoxin Research, 42(33), (2026).) 114

1 牛用配合飼料中の 3-ニトロオキシプロパノールの液体クロマトグラフによる分析法の開発

菊田 千乃^{*1}, 長久保 眞平^{*2}, 若宮 洋市^{*3}

Development of 3-Nitrooxypropanol Determination Method in Formula Feed for Cattle by LC

KIKUTA Yukino^{*1}, NAGAKUBO Shinpei^{*2} and WAKAMIYA Yoichi^{*3}

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

(Current affiliation: Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan),

^{*2} Fukuoka Regional Center, FAMIC,

^{*3} Fukuoka Regional Center, FAMIC (Current affiliation: Nagoya Regional Center, FAMIC))

A quantitative determination method using a liquid chromatograph with an ultraviolet detector (LC-UV) was developed to determine the concentration of 3-nitrooxypropanol (3-NOP) in formula feed for cattle.

3-NOP in a sample was extracted with acetonitrile-water-formic acid (180:20:1). The extracted solution was centrifuged, and its supernatant was injected into an LC with a UV detector at 210 nm to determine the 3-NOP concentration. LC separation was carried out using an ODS column (InertSustain C18, 3 mm i.d. × 150 mm, 3 μm, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) with a gradient of 0.1 % (v/v) methanesulfonic acid aqueous solution and 0.1 % (v/v) methanesulfonic acid methanol solution as a mobile phase.

A limit of quantification (LOQ) and a limit of detection (LOD) of 3-NOP in the present method were 30 mg/kg and 9 mg/kg, respectively.

Key words: 3-nitrooxypropanol; feed additives; liquid chromatograph with ultraviolet detector (LC-UV); formula feed for cattle

キーワード：3-ニトロオキシプロパノール；飼料添加物；液体クロマトグラフ；牛用配合飼料

1 緒 言

温室効果ガスである二酸化炭素やメタンの排出削減が各国で求められている。飼料についても、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」¹⁾において、温室効果ガスの排出を削減する飼料の開発に取り組むこととしており、普及が期待されている。

3-ニトロオキシプロパノール（以下「3-NOP」という。）は、牛の曖気により排出されるメタンを削減することを目的として開発された。メタン生成経路の最終段階において、メチル補酵素 M は、メチル補酵素 M 還元酵素を触媒として補酵素 B と反応し、メタンを放出する。3-NOP は、メチル補酵素 M に構造が類似していることから、メチル補酵素 M 還元酵素に結合し、その活性を阻害することによりメタンの生成を削減する²⁾。

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター，現 農林水産省消費・安全局

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター，現 名古屋センター

3-NOP は、我が国において令和 6 年に「飼料の栄養成分その他の有効成分の補給」用途の飼料添加物に指定された³⁾。牛を対象とする飼料に 3-NOP として 0.015 % (150 mg/kg) 以下の添加が認められており⁴⁾、3-NOP の代謝物である 3-ニトロオキシプロピオン酸を規制対象物質として畜産物中の基準値も設定されている。しかしながら、飼料分析基準⁵⁾に 3-NOP の分析法は収載されていないことから、畜産物中の基準値を超過した際の原因究明等のため、牛用配合飼料中の 3-NOP の分析法の確立が急務となっている。

そこで、令和 6 年度に横田ら⁶⁾は、飼料添加物の指定のために申請業者である DSM 株式会社から提出された資料に掲載されている液体クロマトグラフ（以下「LC」という。）による分析法⁷⁾（以下「DSM 法」という。）について、飼料分析基準への収載の可否を検討した。検討において、DSM 法を一部改良し、改良した分析法を用いて添加回収試験を実施したところ、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。）に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす結果が得られた。令和 7 年度は、当該分析法の定量下限及び検出下限並びに測定波長について検討したので、その概要を報告する。

参考に 3-NOP の構造式等を Fig. 1 に示した。

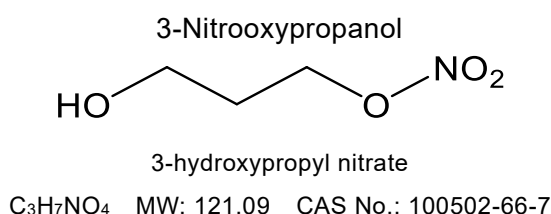


Fig. 1 Chemical structure of 3-nitrooxypropanol (3-NOP)

2 実験方法

2.1 試 料

1) 牛用配合飼料

3-NOP を含まない牛用配合飼料をそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。

なお、検討に用いた牛用配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

2) 分析用試料

3-NOP 製剤（dsm-firmenich 製、3-NOP を 10 %含有）を、1)で調製した各牛用配合飼料と 10 倍希釈を目処に V 型混合機を用いて段階的に混合（30 rpm, 30 分間）し、3-NOP として 30 mg/kg（基準値上限の 1/5）を含有する分析用試料をそれぞれ調製した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For suckling calves	Grains	68	Corn, heat-treated corn, wheat, roasted soybean flour
	Oil seed meal	28	Soybean meal
	Others	4	Molasses, calcium carbonate, salt, calcium phosphate, medium-chain fatty acid calcium, licorice extract, stevia, feed additives
For growing and fattening beef cattle	Grains	57	Corn, heat-treated corn, heat-treated soybean
	Oil seed meal	26	Rapeseed meal, soybean meal
	Brans	16	Corn gluten feed
	Others	1	Calcium carbonate, molasses, salt, feed additives

2.2 試 薬

- 1) メタノール及びアセトニトリルは液体クロマトグラフ用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。ギ酸は試薬特級（質量分率 98 %）を用いた。メタンスルホン酸は和光特級（富士フイルム和光純薬製）を用いた。水は純水製造装置ピュアライン WL220（ヤマト科学製）により精製した水（JIS K 0557 に定義された A3 相当）を用いた。

- 2) アセトニトリル－水－ギ酸（180+20+1）

900 mL のアセトニトリルに、100 mL の水と 5 mL のギ酸を加えた。

- 3) 3-NOP 標準液

3-NOP 標準品（dsm-firmenich 製、純度 98.3 %）50 mg を量って 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリル－水－ギ酸（180+20+1）を加えて溶かし、更に標線までアセトニトリル－水－ギ酸（180+20+1）を加えて 3-NOP 標準原液を調製した（この液 1 mL は、3-NOP として 0.5 mg を含有）。

使用に際して、3-NOP 標準原液の一部をアセトニトリル－水－ギ酸（180+20+1）で正確に希釈し、1 mL 中に 3-NOP として 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 及び 50 µg を含有する標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉砕機：ZM 200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン、使用時回転数 14000 rpm）
- 2) V 型混合機：III 形 筒井理化学器械製（缶体容量 2 L、使用時回転数 30 rpm）
- 3) マグネチックスターラー：RS-4AN アズワン製
- 4) LC：Prominence 島津製作所製
- 5) 紫外・可視分光光度計：UVmini-1240 島津製作所製

2.4 定量方法

- 1) 抽 出

分析試料 10 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル－水－ギ酸（180+20+1）100 mL を加え、30 分間スターラーでかき混ぜて抽出した。抽出した液をプラスチック製遠心沈殿管に入れ、16000×g で 3 分間遠心分離し、上澄み液を LC による測定に供する試料溶液とした。

2) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び 3-NOP 標準液各 5 μ L を LC に注入しクロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 に示した。

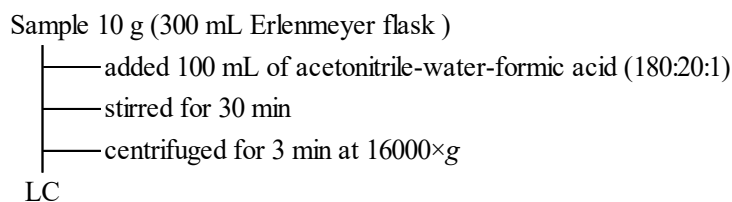
Table 2 Operating condition of LC

Detector	UV detector (Wavelength: 210 nm)
Column	InertSustain C18 (3 mm i.d. $\times$ 150 mm, 3 μ m), GL Sciences
Mobile phase	0.1 % (v/v) methanesulfonic acid aqueous solution – 0.1 % (v/v) methanesulfonic acid methanol solution (23:2) (hold for 9 min) $\rightarrow$ 0.1 min $\rightarrow$ (1:4) (hold for 6 min) $\rightarrow$ 0.1 min $\rightarrow$ (23:2) (hold for 5 min)
Flow rate	0.4 mL/min
Column temperature	40 $^{\circ}$ C

3) 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 3-NOP 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 3-NOP

3 結果及び考察

3.1 定量下限及び検出下限

3-NOP 検量線が直線性を示した範囲, 2~50 μ g/mL の下端付近となる濃度 (最終試料溶液中濃度 3 μ g/mL 相当量) の添加回収試験の結果は Table 3 のとおり良好であり, 得られたピークの SN 比が 10 以上であったため, 3-NOP の定量下限は 30 mg/kg とした。この濃度は, 3-NOP の基準値 (150 mg/kg 以下) に対して 1/5 であり, 妥当性確認ガイドラインに定められた目標値 (基準値 0.1 mg/kg 以上 : 基準値に対して 1/5 以下) を満たしていた。

本法の検出下限を確認するため, 添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた。その結果, 検出下限は 9 mg/kg であり, 同様に妥当性確認ガイドラインに定められた目標値 (基準値 0.1 mg/kg 以上 : 基準値に対して 1/10 以下) を満たしていた。なお, 得られたクロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

Table 3 Recoveries for 3-NOP

Spiked level (mg/kg)	For suckling calves		For growing and fattening beef cattle	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
30	103	0.8	99.2	2.0

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

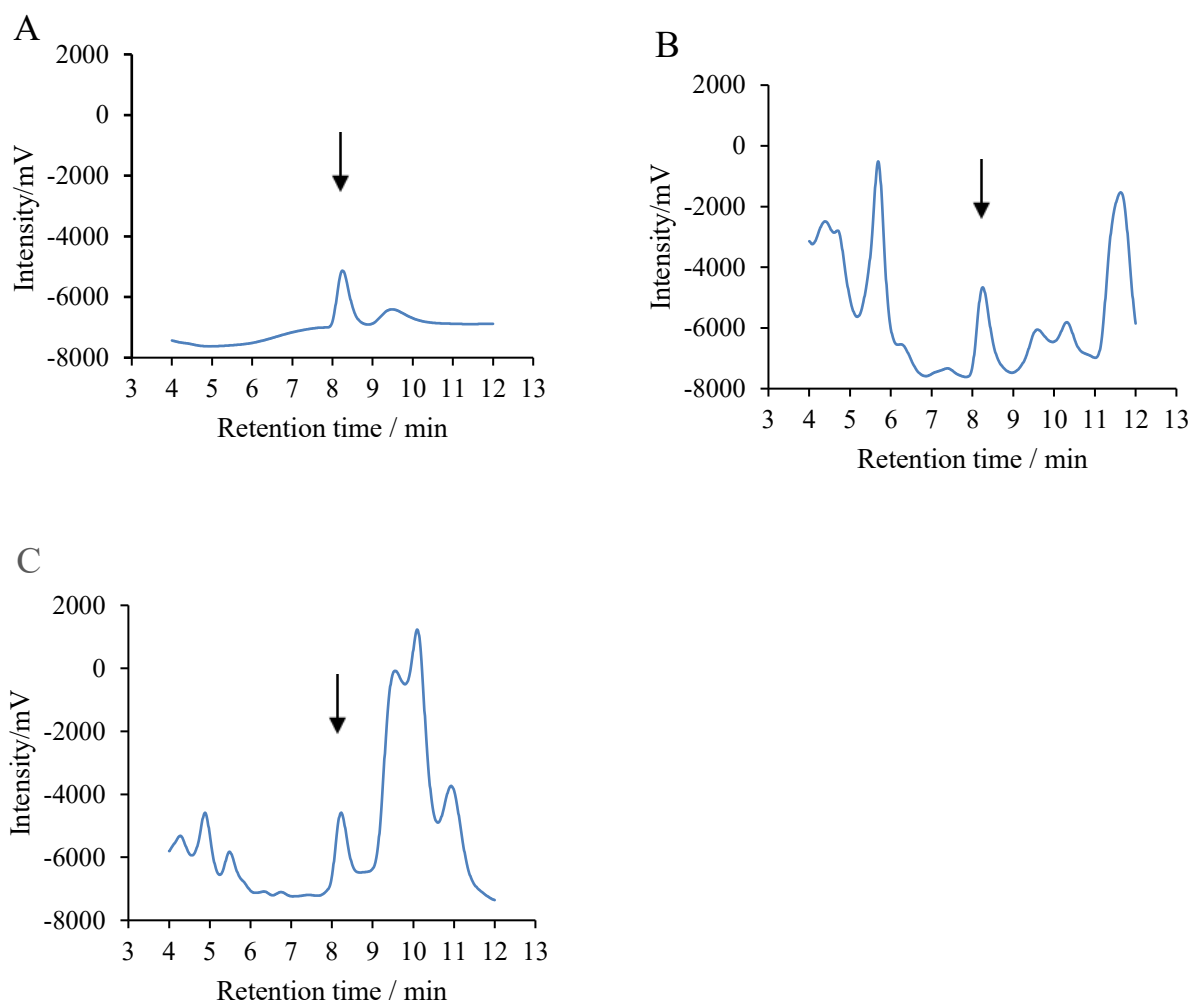


Fig. 2 Chromatograms on recovery test

(Arrows indicate the retention times of 3-NOP.)

A: Standard solution (2 µg/mL of 3-NOP; 10 ng as injection amount)

B, C: Spiked sample solution (B: formula feed for suckling calves, C: formula feed for growing and fattening beef cattle, each spiked at 30 mg/kg of 3-NOP (15 ng as injection amount))

3.2 測定波長の検討

測定波長の 210 nm 付近は多くの有機物が吸収を持ち、夾雑物による妨害が大きい波長とされているため、他に適した波長領域がないか検討を行った。LC による 3-NOP 測定時の移動相組成

と条件を一致させるため、水-メタノール (92+8) に 3-NOP 標準品を 1 mmol/L の濃度で溶解して試料溶液を調製し、紫外・可視分光光度計で UV スペクトルを測定した。UV 検出器の検出範囲である 190 nm~380 nm を測定範囲として、水-メタノール (92+8) でブランク補正をして得られた結果は Fig. 3 のとおりであり、210 nm 付近以外で測定に適した吸収ピークは確認できなかったため測定波長は 210 nm を採用した。

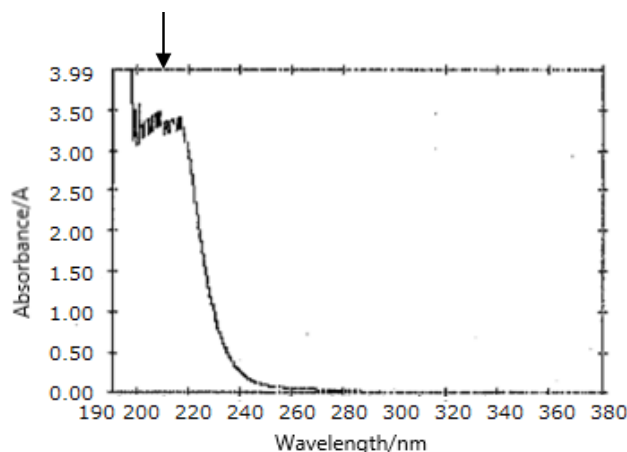


Fig. 3 UV spectrum of 3-NOP
(The arrow indicates a wavelength of 210 nm.)

4 まとめ

牛用配合飼料中の 3-NOP について、DSM 法を基に、LC を用いた分析法の飼料分析基準への収載の可否について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 本法の 3-NOP の定量下限は 30 mg/kg、検出下限は 9 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認ガイドラインに定められた目標を満たしていた。

文 献

- 1) 農林水産省：みどりの食料システム戦略，令和 3 年 5 月 12 日 (2021).
- 2) 農林水産省農業資材審議会（第 63 回）：飼料添加物の新規指定等（案）（3-ニトロオキシプロパノール），令和 6 年 3 月 12 日 (2024).
- 3) 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く飼料添加物を定める件，昭和 51 年 7 月 24 日，告示第 750 号 (1976).
- 4) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，省令第 35 号 (1976).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，令和 5 年 12 月 1 日，5 消安第 4714 号 (2023).
- 6) 横田 典明，長久保 眞平，山下 奈々，菊田 千乃，若宮 洋市：牛用配合飼料中の 3-ニトロオキシプロパノールの液体クロマトグラフによる分析法の開発，飼料研究報告，50，11-20 (2025).
- 7) DSM 株式会社：DSM 社社内資料（非公表）：飼料中の 3-ニトロオキシプロパノール定量法，令和 5 年 11 月 9 日 (2023).

2 配合飼料中のフラボフォスホリポールの微生物学的定量法の検討

野村 昌代^{*1}, 大島 慎司^{*1,2}, 鈴木 時也^{*1}, 時田 佳奈^{*3},
梁川 璃胡^{*1}, 山多 晴子^{*1}, 野崎 友春^{*1}

Study of Flavophospholipol Determination Method in Formula Feed by Microbiological Assay

NOMURA Masayo^{*1}, OSHIMA Shinji^{*1,2}, SUZUKI Tokiya^{*1}, TOKITA Kana^{*3}, YANAGAWA Riko^{*1},
YAMATA Seiko^{*1} and NOZAKI Tomoharu^{*1}

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

^{*2} Institute of Food Research, National Agriculture and Food Research Organization, ^{*3} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Current affiliation: Sendai Regional Center, FAMIC))

A quantitative determination method using microbiological assays was studied to determine the concentration of flavophospholipol (FV) in formula feed.

After mixing a sample with hexane, FV was extracted by adding 0.01 mol/L sodium hydroxide solution-acetone (1:1). The extract was diluted with buffer No. 7, and the pH was adjusted to 6.9-7.1. The FV in the diluted solution was purified by a phospholipid removal column and determined by the standard curve method using *Bacillus cereus* ATCC 19637 in F-19 medium.

Results of the recovery test (adding standard solution) of two types of formula feed for growing period broiler and one type for finishing period broiler showed a recovery rate of over 90 %. Results of the other recovery test (adding the preparation) tended to be different from the recovery test in which the standard solution was added. Moreover, the recovery rate with the preparation greatly differed by the difference of the spiked level. Therefore, it was considered that further examination of the analytical method was necessary.

Key words: flavophospholipol; microbiological assay; plate method; formula feed

キーワード：フラボフォスホリポール；微生物学的定量法；平板法；配合飼料

1 緒 言

フラボフォスホリポール（以下「FV」という。）は、*Streptomyces* 属の 4 種の細菌（*Streptomyces bambergiensis*, *Streptomyces ghanaensis*, *Streptomyces geysiriensis* 及び *Streptomyces ederenis*）により産生される含リン多糖類系の抗生物質で¹⁾、化学式は $C_{65-75}H_{124-135}N_{6-7}O_{40-42}P$ の分子式を有する複数の成分の複合体であり、構造が未確定の成分を含む²⁾。主要な成分はモエノマイシン A で、他にモエノマイシン A₁₂, C₁, C₃, C₄ 等を含むが²⁾、これらの構成比は不明である。FV の製造用原体の理化学的性状は、褐色～暗褐色の粉末で、特異なおいを有し、メタノールにわずかに溶けるほかは、ほとんどの溶媒に溶けない。また、酸性又は塩基性溶液中では不安定で、pH 7~9 の場合に安定である。FV は、主としてグラム陽性菌に対して強い抗菌作用を有し、鶏（ブロイラーを含む）及び豚に対して成長促進効果がある。作用機序は、細菌の細胞壁の生合成阻害と考えられている¹⁾。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

^{*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

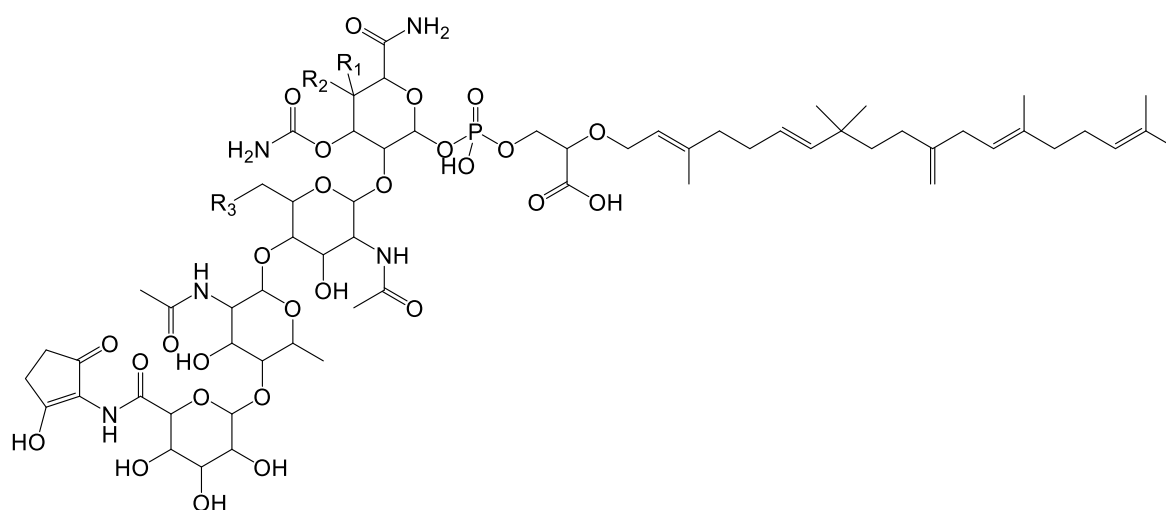
^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 仙台センター

51 年に飼料添加物として指定された³⁾。FV を含むことができる飼料の種類及び量は、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令⁴⁾（以下「省令」という。）により、ブロイラーを除く鶏用（幼すう用及び中すう用）及びブロイラー用（前期用及び後期用）で 1~5 g(力価)/t、豚用（ほ乳期用）で 2~10 g(力価)/t、豚用（子豚期用）で 2.5~5 g(力価)/t と規定されている。

近年、国内において FV を添加した配合飼料は流通しており、配合飼料の原材料として使用するプレミックスについては FV 定量法が飼料分析基準⁵⁾に定められている。しかし、配合飼料中の分析方法については、検討は試みられたものの、未だ確立されていない。抗菌性飼料添加物を含む配合飼料の適切な製造管理には、定量可能な分析方法の確立が不可欠である。

そこで、一般財団法人生物科学安全研究所が令和 5 年に生産資材安全確保対策委託事業において開発した配合飼料中の FV の分析法（以下「RIAS 法」という。）⁶⁾等を基に、ブロイラー前期用及び後期用配合飼料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 FV の構造式等を Fig. 1 に示した。



	R ₁	R ₂	R ₃
Moenomycin A	CH ₃	OH	Glucosyl
Moenomycin A ₁₂	OH	H	Glucosyl
Moenomycin C ₁	OH	H	H
Moenomycin C ₃	CH ₃	OH	H
Moenomycin C ₄	CH ₃	OH	OH

Flavophospholipol (FV)

C₆₅₋₇₅H₁₂₄₋₁₃₅N₆₋₇O₄₀₋₄₂P

Fig. 1 Chemical structures of FV

2 実験方法

2.1 試料

1) 配合飼料

抗菌性飼料添加物を含まないブロイラー前期用 2 種類及びブロイラー後期用 1 種類を、それぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し、添加回収試験用（標準液添加）等

の分析用試料とした。なお、検討に用いた配合飼料を Table 1 に示した。

- 2) FV 製剤：Huvepharma 製（含有量 80 g(力価)/kg，賦形物質等：炭酸カルシウム，ケイ酸マグネシウム，ケイソウ土，クエン酸，ジブチルヒドロキシトルエン，食塩，リン酸二水素カルシウム，没食子酸プロピル，コーンコブミール，エトキシキン及び二酸化ケイ素）

- 3) 希釈剤

添加回収試験用試料調製の希釈剤として米ぬか油かすを用いた。

- 4) 添加回収試験用（製剤添加）の分析用試料

乳鉢を用いて 2) の FV 製剤を 3) の希釈剤と混合して，FV として 8 mg(力価)/g の希釈試料を調製し，これを用いて，さらに 0.8 mg(力価)/g の希釈試料を調製した。V 型混合機（筒井理化学器械製）で希釈試料と 1) のブロイラー前期用 1 を混合し，FV としてそれぞれ 1.5 g(力価)/t 及び 7.5 g(力価)/t 含有する試料を調製した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For growing period broiler 1	Grains	61	Corn, milo
	Oil seed meal	29	Soybean meal, corn gluten meal
	Animal by-products	4	Fish meal
	Others	6	Animal fat, calcium phosphate, calcium carbonate, salt, feed additives
For growing period broiler 2	Grains	57	Corn, brown rice
	Oil seed meal	31	Soybean meal, corn gluten meal, rapeseed meal
	Animal by-products	4	Fish meal
	Brans	1	Defatted rice bran
	Others	7	Plant fat, calcium phosphate, calcium carbonate, salt, feed additives
For finishing period broiler	Grains	65	Corn, milo, brown rice
	Oil seed meal	24	Soybean meal, corn gluten meal
	Animal by-products	4	Fish meal
	Others	7	Animal fat, calcium phosphate, calcium carbonate, salt, feed additives

2.2 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用いた。

- 2) 7 号緩衝液

飼料分析基準第 9 章第 1 節 1 の A の 1) の vii) に従って調製した。

- 3) 希釈溶媒

7 号緩衝液－アセトン（3+1）を調製した後，リン酸（5 mol/L 及び 1 mol/L）で pH を 6.9~7.1 に調整した。

4) FV 標準液

常用標準 FV 40 mg 以上を正確に量り，メタノール-水（1+1）を正確に加えて溶かし，1 mg(力価)/mL の FV 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，0.8, 0.4, 0.2, 0.1 及び 0.05 µg(力価)/mL（1 g(力価)/t 以外の添加回収試験の際に使用）又は 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 及び 0.025 µg(力価)/mL（1 g(力価)/t の添加回収試験の際に使用）の組み合わせの各標準液を調製した．なお，参照標準液は，用いた標準液 5 濃度の中央の濃度とした．

5) F-19 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．

6) 孢子液

試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 19637 を用い， 1×10^6 個/mL の孢子液を調製した．

7) 寒天平板

高圧蒸気滅菌した後，49~51 °C に保温した F-19 号培地に，孢子液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加えて十分にかき混ぜ，その 20 mL をプラスチック製滅菌シャーレ（内径 90 mm，高さ 20 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．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，せん孔機を用いて 4 個のせん孔（内径 8 mm）を設けた．

8) 抽出溶媒

0.01 mol/L 水酸化ナトリウム溶液-アセトン（1+1）

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM 200 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) リン脂質除去ミニカラム：InertSep Phospholipid Remover（100 mg/3 mL）ジーエルサイエンス製
- 3) 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
- 4) 恒温器：LTI-1001ED 東京理化器械製又は ILE800 ヤマト科学製
- 5) 阻止円測定装置：ProtoCOL3HD Synoptics 製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 5 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ，ヘキサン 15 mL を加え，2~3 分間かき混ぜた．更に抽出溶媒 50 mL を加えて混和し，試料溶液の pH が 7~9 の範囲外であった場合，少量の水酸化ナトリウム溶液（5 mol/L 及び 1 mol/L）で pH 7~9 の範囲に調整した後，20 分間かき混ぜて抽出した．抽出液の全量を 100 mL のガラス製共栓遠心沈殿管に入れ，1500×g で 5 分間遠心分離した．遠心分離後，下層 25 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ，全量フラスコの標線を超えない範囲で 7 号緩衝液を加えて，リン酸（5 mol/L 及び 1 mol/L）で pH を 6.9~7.1 に調整した後，更に標線まで 7 号緩衝液を加えた．試料溶液をろ紙（5 種 A）でろ過した後，参照標準液の濃度である 0.2 µg(力価)/mL を超える場合は，希釈溶媒で 0.2

μg(力価)/mL となるように希釈し、カラム処理に供する試料溶液とした（本検討においては、FV として 7.5 g(力価)/t 含有する試料の試料溶液のみ希釈を行った。）。

2) カラム処理

試料溶液 10 mL をリン脂質除去ミニカラムに入れ、3 mL/min 程度の流速になるよう吸引した。10 mL の試験管をカラムの下に置き、初めの流出液 2 mL を捨て、別の 10 mL の試験管をカラムの下に置き、その後の流出液 4 mL を受けた。流出液をメンブランフィルターでろ過し、試料溶液を調製した。

3) 分注及び培養

2.2 の 7) で調製した寒天平板を用い、飼料分析基準の標準曲線法に準じ、標準液及び試料溶液をそれぞれ 100 μL ずつ、各せん孔に分注し、9~11 °C で 2 時間静置した後、27~29 °C で 16~24 時間培養した。

4) 阻止円直径の測定及び計算

阻止円測定装置又はノギスを用い、培養を終えた寒天平板上の阻止円の直径をそれぞれ 0.25 mm まで正確に測定し、飼料分析基準の標準曲線法に準じ、試料中の FV 濃度を求めた。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Sample 5 g (200 mL Erlenmeyer flask)

- added 15 mL of hexane
- stirred for 2~3 min
- added 50 mL of 0.01 mol/L sodium hydroxide solution-acetone (1:1)
- adjusted pH 7~9
- stirred for 20 min

Extract (100 mL centrifuge tube)

- centrifuged at 1500×g for 5 min

Lower layer 25 mL (50 mL volumetric flask)

- adjusted pH 6.9~7.1
- filled up 50 mL with buffer No. 7
- filtered through filter paper (No. 5A of JIS P 3801)
- diluted to 0.2 μg(potency)/mL with buffer No. 7-acetone (3:1) (pH 6.9~7.1) (If more than 0.2 μg(potency)/mL)

InertSep Phospholipid Remover (100 mg/3 mL)

- applied sample solution
- discarded the first 2 mL of the eluate
- collected the following 4 mL of the eluate
- filtered through membrane filter (PTFE 0.45 μm)

Filtrate and standard solutions (prepared each standard solution by diluting with dilution solvent)

- prepared agar plate by adding *Bacillus cereus* ATCC 19637 to the agar medium F-19 (agar well method)
- dispensed 100 μL of each solution into each agar well
- kept the agar plate at 9~11 °C for 2 hours
- incubated at 27~29 °C for 16~24 hours
- measured diameter of each inhibition zone by zone analyzer

Calculation (by standard response line method)

Scheme 1 Analytical procedure for FV in feed

2.5 添加回収試験（標準液添加）

2.2 の 4) の FV 標準原液の一定量をメタノール-水（1+1）で正確に希釈し、100 µg(力価)/mL の標準液を調製して添加に用いた。各分析試料に FV として 1 g(力価)/t（最終試料溶液中で 0.05 µg(力価)/mL）又は 2 g(力価)/t（同 0.1 µg(力価)/mL）相当量を添加し、よく混合した後、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。

2.6 予備添加回収試験（標準液添加）（RIAS 法（ブロイラー後期用の方法））

RIAS 法において、試料量は FV として 20 µg(力価)相当量を量りとりとされていることから、2.1 の 1) のブロイラー後期用 20 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、20 µg(力価)相当量（分析試料中 1 g(力価)/t 相当量）の FV 標準液を 2.5 に従って添加後、0.0075 mol/L 水酸化ナトリウム溶液-アセトン（1+1）を 50 mL 加え、10 分間振り混ぜ、更に 10 分間超音波処理を行って抽出した。抽出液を 50 mL のポリプロピレン製共栓遠心沈殿管に移し、8000×g で 10 分間遠心分離した。遠心分離後の上澄み液を脱脂綿を詰めた漏斗でろ過して、ろ液を 100 mL のビーカーに入れた。遠心分離後の残さを先の 300 mL の共栓三角フラスコに戻し、同様の操作で 2 回目の抽出を行い、得られたろ液を先のビーカーに合わせた。ろ液全量を 300 mL の分液漏斗に入れ、酢酸エチル 60 mL を加えて 5 分間振り混ぜ、静置した。下層を 100 mL の全量フラスコに入れ、標線まで 7 号緩衝液を加え、0.2 µg(力価)/mL の試料溶液を調製し、以降は 2.4 の 3) に従って定量した。なお、FV 標準液については、2.2 の 4) の 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 及び 0.05 µg(力価)/mL の組み合わせの各標準液を用いた。

2.7 メンブランフィルターによるろ過の影響の比較（添加回収試験（標準液添加））

ブロイラー後期用 5 g を量って、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、FV 標準液を 2.5 に従って添加後、2.4 の 1) に従い操作した。遠心分離後の下層 25 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ、全量フラスコの標線を超えない範囲で 7 号緩衝液を加え、リン酸（5 mol/L 及び 1 mol/L）で pH を 6.9~7.1 に調整した後、更に標線まで 7 号緩衝液を加えた。その後、試料溶液をろ紙（5 種 A）でろ過したもの（メンブランフィルター無）と、更にメンブランフィルターでろ過したもの（メンブランフィルター有）を調製し、以降は 2.4 の 3) に従って定量した。

2.8 添加回収試験（製剤添加）（溶媒変更）

2.2 の 3) の希釈溶媒を 7 号緩衝液-メタノール（3+1）（pH 6.9~7.1 に調整）に、2.2 の 8) の抽出溶媒をメタノール-水（1+1）に変更し、2.1 の 4) に従って製剤を添加したブロイラー前期用 1 を用いて 2.4 に従って定量した。

3 結果及び考察

3.1 予備添加回収試験（標準液添加）（RIAS 法（ブロイラー後期用の方法））

RIAS 法は、配合飼料の種類により分析法が分かれているが、そのうち、ブロイラー後期用の方法を用いて、2.6 により予備添加回収試験を実施した。その結果、回収率が 60 %を下回った。その理由として、遠心分離後の沈殿物に流動性が認められたことから、抽出液と沈殿物の分離が不十分であり、沈殿物に FV が残存しているために回収率が低い可能性が考えられた。そこで、改善のため、抽出後の操作について、遠心分離を行う方法から、5 種 A のろ紙を敷いたブフナー漏斗にて吸引ろ過する方法に変更するとともに、試料量を 10 g 及び 5 g に変更して再度予備添加回収試験を実施した。その結果、試料量を 10 g に変更した場合では回収率が 80 %台、5 g に変更

した場合では回収率が 90 % 台になった。

試料量を減らすことによりマトリックスの影響が小さくなり、回収率が改善したと考えられたが、試料量を 5 g 未満に減らすと、分析試料中に含まれる FV の量も減少するため、阻止円が小さくなり定量不可となる可能性が考えられた。また、脱脂のため酢酸エチルを加えて振り混ぜる操作により、試料溶液の一部が酢酸エチル層へ移行し試料溶液が濃縮されること、試料量を FV として 20 μg (力価)相当量とすると 2~20 g と幅があるために、試料が抽出液を吸収する量にも差が生じ、最終試料溶液の溶媒組成が標準液の組成 (7 号緩衝液-アセトン (3+1)) と異なることへの懸念も生じた。

そのため、FV と同じ含リン多糖類系の抗生物質であるマカルボマイシンの飼料分析基準収載の飼料中の定量方法等を参考に、抽出溶媒を 0.0075 mol/L 水酸化ナトリウム溶液-アセトン (1+1) から 0.01 mol/L 水酸化ナトリウム溶液-アセトン (1+1) へ変更し、酢酸エチルでの液液分配による脱脂から、抽出時にヘキサンを用いる脱脂方法に変更した。加えて、試料量を固定とし、かき混ぜて抽出し、遠心分離を行った後、下層をろ紙でろ過する方法に変更して検討を行うこととした。また、最終試料溶液の pH を標準液の pH と揃えるため、抽出後の試料溶液を 50 mL に定容する際に、pH 6.9~7.1 に調整する操作を追加した。

以上の操作により試料溶液を調製したところ、ろ紙によるろ過後の試料溶液が白濁した。その改善のため、2.7 に従ってメンブランフィルターによるろ過の影響を確認した結果、試料溶液の白濁は解消し、Table 2 のとおり回収率が向上したことから、メンブランフィルターによるろ過を追加することとした。

Table 2 Results comparing with and without filtration by membrane filter

Spiked level (g(potency)/t)	Membrane filter	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
1	Without membrane filter	88.6	7.6
	With membrane filter	98.0	0.26

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.2 添加回収試験 (標準液添加)

2.4 の 1) にて得られた試料溶液をメンブランフィルターでろ過し、2.4 の 3) に従い、添加回収試験を 3 点併行にて実施した。試料は 2.5 に従って FV として 1 g(力価)/t 相当量 (最終試料溶液中 0.05 μg (力価)/mL) を添加したブロイラー前期用 1, 2 及び後期用を用いた。その結果は、Table 3 のとおり、平均回収率はブロイラー前期用 1 が 102 %, ブロイラー前期用 2 が 116 %, ブロイラー後期用が 98.0 % であった。

ブロイラー前期用 2 が 110 % を超える高い回収率であったことから、改善のため、リン脂質除去ミニカラムの使用を検討した。ブロイラー前期用 2 に 2.5 に従って FV として 2 g(力価)/t 相当量 (同 0.1 μg (力価)/mL) を添加した後、2.4 の 1) に従って抽出した試料溶液 10 mL をリン脂質除去ミニカラムに入れ、流出液を 2 mL ずつ採取して、各流出液をメンブランフィルターでろ過し、各画分の FV 回収率を確認した。その結果は Table 4 のとおり、流出液 0~2 mL の画分における回収率は 123 % と高く、2 mL 以降の画分における回収率は 92.7~97.5 % と良好な結果であった。ミ

ニカラムに供する試料液量が増えるほど、ミニカラムにおいて夾雑物を除去しきれなくなる懸念があったため、試験に用いるのに必要十分な量のみを採取することとし、初めの流出液 2 mL を捨て、その後の 4 mL を用いることとした。

ブロイラー前期用 1, 2 及び後期用を用い、2.5 に従って FV として 2 g(力価)/t 相当量 (同 0.1 µg(力価)/mL) を添加し、2.4 に従い、添加回収試験を 3 点併行にて実施した。その結果は、Table 5 のとおり、回収率の改善が認められたため、リン脂質除去ミニカラムによる精製を追加することとした。

Table 3 Recoveries for FV without phospholipid removal columns
(addition of FV standard solution)

Spiked level (g(potency)/t)	Phospholipid removal column	For growing period broiler 1		For growing period broiler 2		For finishing period broiler	
		Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	Without column	102	5.1	116	3.9	98.0	0.26

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 4 Elution pattern of FV from phospholipid removal columns

Target	Recovery (%)				
	0~2 mL	2~4 mL	4~6 mL	6~8 mL	8~10 mL
FV	123	92.7	93.5	96.0	97.5

$n = 1$

Table 5 Recoveries for FV with phospholipid removal columns (addition of FV standard solution)

Spiked level (g(potency)/t)	Phospholipid removal column	For growing period broiler 1		For growing period broiler 2		For finishing period broiler	
		Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
2	With column	91.2	4.5	94.5	1.5	98.2	4.1

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.3 添加回収試験 (製剤添加)

2.1 の 4) に従って製剤を添加した分析用試料を用いて添加回収試験を実施した。

FV として 7.5 g(力価)/t (最終試料溶液中で 0.2 µg(力価)/mL) 含有するブロイラー前期用 1 を 2.4 に従って定量したところ、回収率が 70 % 台と低い回収率であった。改善のため、省令で規定されている FV の製剤の力価試験を参考に、2.8 のとおり、抽出溶媒及び希釈溶媒をアセトン含有からメタノール含有へ変更し、FV として 1.5 g(力価)/t (同 0.075 µg(力価)/mL) 及び 7.5 g(力価)/t 含有するブロイラー前期用 1 を定量した。その結果、7.5 g(力価)/t の回収率は 90 % 台へ改善したが、1.5 g(力価)/t の回収率が 150 % 台となった。標準液添加による添加回収試験と異なる傾

向となり、更に、添加濃度の違いにより回収率が大きく異なる結果となったことから、分析法の更なる検討が必要であると考えられた。

4 まとめ

配合飼料中の FV の定量法について、RIAS 法を基に飼料分析基準への収載の可否について検討したところ、以下の結果が得られ、分析法の更なる検討が必要であると考えられた。

- 1) RIAS 法にて、予備的に添加回収試験（標準液添加）を行ったところ、マトリックスの影響を受け、回収率が低くなる可能性等が示唆された。
- 2) 飼料分析基準収載の飼料中のマカルボマイシンの定量法等を参考に、RIAS 法の改良を試みたところ、ろ紙によるろ過後の試料溶液が白濁した。メンブランフィルターによるろ過を追加することで、白濁は解消し、添加回収試験（標準液添加）の回収率が向上したが、一部の試料において、110 %を超える高い回収率となった。更に、リン脂質除去ミニカラムによる精製を追加することで、回収率が改善した。
- 3) マカルボマイシンの定量法を参考に改良した方法（本法）にて、7.5 g(力価)/t での添加回収試験（製剤添加）を行った結果は、70 %台と低い回収率となった。改善のため、省令で規定されている FV の製剤の力価試験を参考に、抽出溶媒及び希釈溶媒をアセトン含有からメタノール含有へ変更した。その添加回収試験（製剤添加）の結果、回収率は 90 %台へ改善したが、1.5 g(力価)/t の回収率が 150 %台となった。製剤添加の添加回収試験の結果は、標準液添加による添加回収試験結果と異なる傾向となり、更に、添加濃度の違いにより回収率が大きく異なる結果となった。

文 献

- 1) Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F.: Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria, Clin. Microbiol. Rev. 16, 175–188 (2003).
- 2) Zehl M, Pittenauer E, Rizzi A, Allmaier G.: Characterization of moenomycin antibiotic complex by multistage MALDI-IT/RTOF-MS and ESI-IT-MS. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 17, 1081–1090 (2006).
- 3) 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).
- 4) 飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料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).
- 6) 一般財団法人生物科学安全研究所：令和 5 年度生産資材安全確保対策委託事業 飼料中のフラボフォスフォリポールの分析法の開発 (2024).

3 愛玩動物用飼料のジャーキー、菓子類及び粉ミルク中のオクラトキシン A の液体クロマトグラフによる分析法の検討

船木 紀夫*, 野村 哲也*, 仲谷 琢実*

Study of Ochratoxin A Determination Method in Jerky, Confectionery and Milk Powder for Pet Food by LC

FUNAKI Norio*, NOMURA Tetsuya* and NAKATANI Takumi*

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

A quantitative determination method using a liquid chromatograph with a fluorescence detector (LC-FD) was studied to determine the concentration of ochratoxin A in pet food products such as molded and dried jerky (hard and soft types), confectionery, and milk powder.

Initial analytical methods examined did not yield satisfactory results for jerky made from pork liver and milk powder. Therefore, appropriate analytical methods were found for each of the samples by changing the sample volume, extraction solvent, and extraction methods.

Key words: ochratoxin A; jerky; confectionery; milk powder; pet food; liquid chromatograph with fluorescence detector (LC-FD)

キーワード: オクラトキシン A ; ジャーキー ; 菓子類 ; 粉ミルク ; ペットフード ; 液体クロマトグラフ

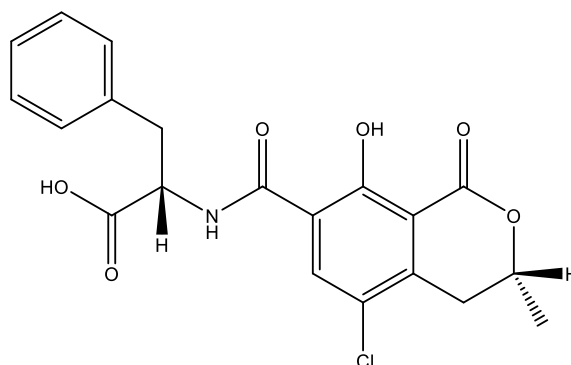
1 緒 言

オクラトキシン A は *Aspergillus* 属及び *Penicillium* 属の一部のかびが産生するかび毒で、穀類等から検出される。また、オクラトキシン A に汚染された飼料の摂取により、畜産物からも検出される。オクラトキシンの関連物質は 10 種類以上が知られているが、オクラトキシン A の汚染報告が最も多い¹⁾。動物試験ではオクラトキシン A に腎毒性及び発がん性が認められており、EU では基準値として、犬及び猫用のペットフードで 0.01 mg/kg が設定されている²⁾。我が国ではペットフードの基準値は設定されていないが、食品において基準値の設定が検討されている。

愛玩動物用飼料等の検査法に収載されているオクラトキシン A の分析法³⁾は、適用対象をドライ製品、セミドライ製品及びウェット製品に限定しており、スナック類への適用拡大に係る妥当性確認では、回収率の低下等が認められている⁴⁾。このため、平成 27 年の農林水産省の委託事業において、一般財団法人日本冷凍食品検査協会（現：日本食品検査）が開発した分析法⁵⁾（以下「冷食検法」という。）を基に、愛玩動物用飼料のジャーキー、菓子類及び粉ミルク中のオクラトキシン A の液体クロマトグラフ（以下「LC」という。）による分析法について、愛玩動物用飼料等の検査法への収載の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考におクラトキシン A の構造式等を Fig. 1 に示した。

* 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



Ochratoxin A

N-[[*(3R)*-5-Chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1*H*-2-benzopyran-7-yl]carbonyl]-L-phenylalanine

C₂₀H₁₈ClNO₆ MW: 403.82 CAS No.: 303-47-9

Fig. 1 Chemical structure of ochratoxin A

2 実験方法

2.1 試料

成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）並びに菓子類はそれぞれ回転刃による粉砕機で粉砕し、目開き 1 mm のふるいを通し、分析用試料とした。粉ミルクは直接目開き 1 mm のふるいを通し、分析用試料とした。なお、検討に用いた愛玩動物用飼料を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the pet food

Pet food types	Ingredients
Formed jerky for dogs	Meat (beef, chicken), cornstarch, defatted soybeans, D-sorbitol, glycerin, fragrance, sodium lactate, pH adjuster, seasoning, phosphate (Na, K), antioxidants (extracted vitamin E, sodium vitamin C), coloring agent (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs (hard type) 1	Ezo deer thigh meat
Dried jerky for dogs (hard type) 2	Pork liver
Dried jerky for dogs (soft type)	Chicken breast, salt, moisturizer (glycerin), antioxidant (propylene glycol), color former (sodium nitrite)
Confectionery (biscuit) for dogs	Flour, sugar, vegetable oil, tapioca starch, milk (milk powder, high fructose condensed milk), chicory extract (contains dietary fiber and oligosaccharides), lactic acid bacteria, minerals (Ca, Na), leavening agent, flavor, emulsifier, yucca extract, antioxidant (vitamin E)
Milk powder for cats	Milk (casein, skim milk powder, whey protein), fats and oils (animal oils, vegetable oils), lactose, egg yolk powder, docosahexaenoic acid powder, dry yeast, milk oligosaccharides, minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Mg, Fe, Cu and Zn), emulsifier, vitamins (A, D, E, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, niacin, pantothenic acid, folic acid, β-carotene), amino acids (L-arginine, L-cystine, taurine), flavorings, nucleotides

2.2 試 薬

- 1) トルエン、酢酸エチル、ヘキサン及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬・PCB 試験用を用いた。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）を用いた。アセトニトリルは残留農薬・PCB 試験用（前処理に使用）又は液体クロマトグラフ用（溶離液に使用）（ともに富士フイルム和光純薬製）を用いた。リン酸緩衝生理食塩水（以下「PBS」という。）はタブレット（シグマアルドリッチ製）を用いて調製した。無水炭酸ナトリウムは試薬特級（質量分率 99.8 %），塩化ナトリウムは試薬特級（質量分率 99.5 %），酢酸は試薬特級（質量分率 98 %），リン酸は試薬特級（質量分率 85 %），塩酸は試薬特級（質量分率 35~37 %）を用いた。酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用 1 mol/L 水溶液（富士フイルム和光純薬製）を用いた。水は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

- 2) オクラトキシン A 標準液

オクラトキシン A 標準品（富士フイルム和光純薬製，純度 99.9 %）5 mg を量って 25 mL の全量フラスコに入れ，トルエン-酢酸（99+1）を加えて溶かし，更に標線までトルエン-酢酸（99+1）を加えてオクラトキシン A 標準原液を調製した（この液 1 mL は，オクラトキシン A として 0.2 mg を含有）。

使用に際して，オクラトキシン A 標準原液 1 mL を 20 mL の全量フラスコに正確に入れ，窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル-水（1+1）を加えて残留物を溶かし，更に標線までアセトニトリル-水（1+1）を加えて，1 mL 中にオクラトキシン A として 10 µg を含有する液を調製した。この液の一部を，アセトニトリル-水（1+1）で正確に希釈し，1 mL 中にオクラトキシン A として 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 及び 20 ng を含有する検量線作成用オクラトキシン A 標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉砕機：LM-2 岩谷産業製（使用時回転数 20000 rpm）
- 2) 振り混ぜ機：小型シェーカー MW-DRV 宮本理研工業製（使用時振動数 300 rpm）
- 3) ホモジナイザー：AM-7 日本精機製（使用時回転数 8000 又は 10000 rpm）
- 4) メンブランフィルター：HLC-DISK25（孔径 0.45 µm，直径 25 mm，親水性 PTFE） 関東化学製
- 5) ガラス製ろ紙：GF/A（孔径 1.6 µm，直径 90 mm） Whatman 製
- 6) イムノアフィニティークラム（以下「IAC」という。）：OCHRAKING 堀場製作所製
- 7) LC：Nexera X2 島津製作所製

2.4 定量方法

2.4.1 ジャーキー（豚レバーを原材料としたものを除く）及び菓子類（冷食検法）

- 1) 抽 出

分析試料 25 g を量って 500 mL の広口プラスチック容器（以下「PP 製容器」という。）に入れ，アセトニトリル-水（3+2）200 mL を加え，5 分間静置後，30 分間振り混ぜて抽出した。抽出した液を 15 mL のプラスチック製遠心沈殿管（以下「PP 製チューブ」という。）に入れ，2000×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（孔径 0.45 µm）でろ過した。ろ液 4 mL を 50 mL の PP 製チューブに正確に入れ，PBS で約 10 mL に希釈し，カラム処理に

供する試料溶液とした。希釈時に濁りが見られた場合は、更に PBS を約 50 mL まで加えた後、ガラス製ろ紙でろ過し、ろ紙を少量の PBS で洗浄した洗液を合わせて、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

IAC にストップコックを取り付け、保存液を液面が充てん剤の上端に達するまで自然流下させて保存液を流出させた。PBS 3 mL を IAC に入れて流出させ、更に PBS 3 mL を IAC に入れて 1~2 mL 流出させた。リザーバーを取り付け、試料溶液全量を IAC に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下（自然流下させ、必要に応じて流速が 1 mL/min 程度になるよう吸引または圧注した。以下同様。）させた。試料溶液の入っていた PP 製チューブを PBS 3 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次 IAC に加え、同様に流出させた。更に、試料溶液の入っていた PP 製チューブを 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 3 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次 IAC に加え、同様に流出させた後リザーバーを外し、圧注して全量流出除去させた。15 mL の PP 製チューブをカラムの下に置き、メタノール-酢酸 (49+1) 1 mL を加えて液面が充てん剤の上端に達するまで流下してオクラトキシン A を溶出させた。5 分間静置し、更にメタノール-酢酸 (49+1) 1 mL ずつで 2 回溶出させた後、圧注して全量溶出させた。溶出液を 45 °C 以下の水浴上で窒素ガスを送って乾固し、アセトニトリル-水 (1+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を不活性処理済みバイアルに移し、LC による測定に供する試料溶液とした。

3) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各オクラトキシン A 標準液各 50 µL を LC に注入しクロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 に示した。

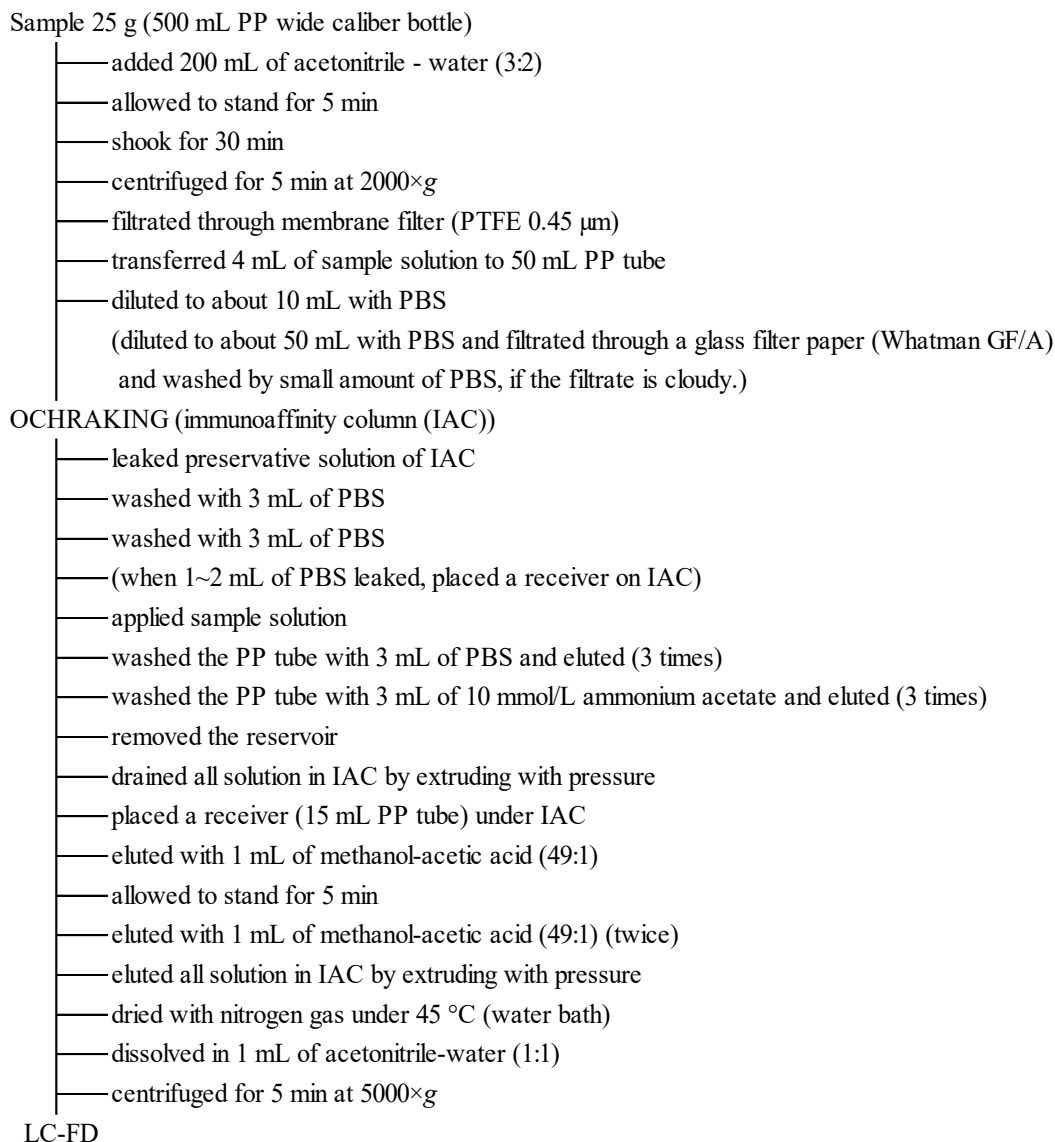
Table 2 Operating condition of LC

Detector	Fluorescence detector (excitation wavelength: 335 nm, fluorescence wavelength: 480 nm)
Column	Mightysil RB-18 (4.6 mm i.d, 250 mm, 5 µm), Kanto chemical
Mobile phase	Acetonitrile-water-1 % (v/v) phosphoric acid (230:230:1)
Flow rate	1.0 mL/min
Column temperature	40 °C

4) 計 算

得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中のオクラトキシン A 量を算出した。以下、3.1, 3.2 及び 3.3 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 ochratoxin A in jerky and confectionery for pet food except for ones made from pork liver

2.4.2 豚レバーを原材料としたジャーキー（以下「豚レバー分析法」という。）

1) 抽出

分析試料 5 g（又は 25 g）を量って 500 mL のステンレス製ホモジナイザー専用カップに入れ、0.5 mol/L リン酸-2 mol/L 塩化ナトリウム（4+1）100 mL を加え、5 分間静置後、更に酢酸エチル 100 mL を加え、10000 rpm で 5 分間ホモジナイズして抽出した。抽出した液を 50 mL の PP 製チューブに入れ、2000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液の酢酸エチル層を液液分配 I に供する試料溶液とした。

2) 液液分配 I

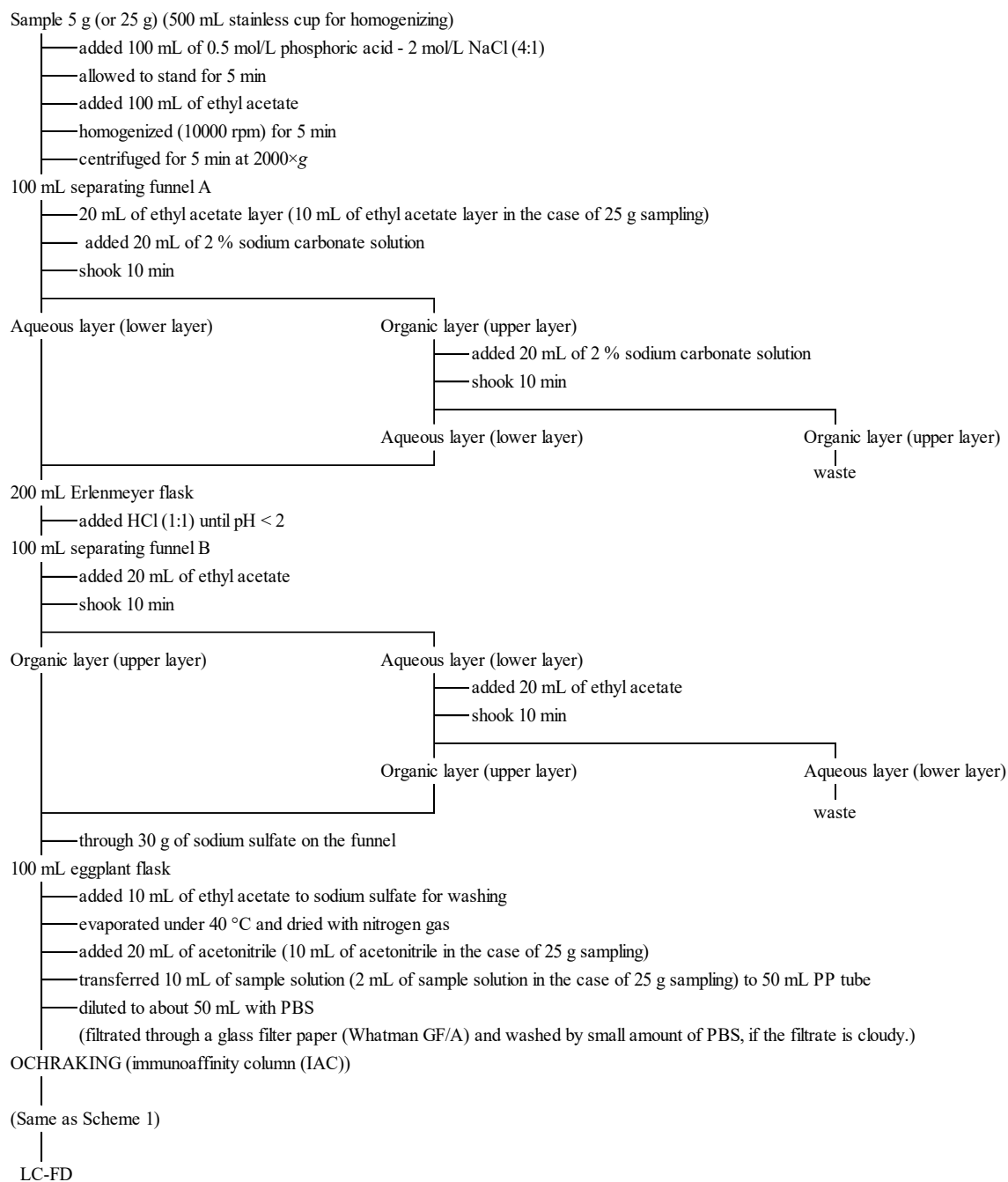
試料溶液 20 mL（25 g 採取時は 10 mL）をあらかじめ 2 %炭酸ナトリウム溶液 20 mL を入れた 100 mL の分液漏斗に正確に加え、10 分間振り混ぜた後静置し、水層（下層）を 200 mL の三角フラスコに移した。分液漏斗に 2 %炭酸ナトリウム溶液 20 mL を加えて 10 分間振り混ぜた後静置し、先の三角フラスコに水層（下層）を合わせ、酢酸エチル層（上層）は廃棄した。

水層に pH < 2 になるまで塩酸 (1+1) を加え、液液分配 II に供する試料溶液とした。

3) 液液分配 II

試料溶液を元の分液漏斗に戻し、試料溶液の入っていた三角フラスコを酢酸エチル 20 mL で洗浄して分液漏斗に加え、10 分間振り混ぜた後静置し、水層（下層）を元の三角フラスコに入れ、酢酸エチル層（上層）を無水硫酸ナトリウム 30 g を入れた漏斗に通して脱水させながら 100 mL なす型フラスコに移した。水層を分液漏斗に戻し、試料溶液の入っていた三角フラスコを酢酸エチル 20 mL で洗浄し、分液漏斗に加えて 10 分間振り混ぜた後静置し、同様の操作を行った。漏斗上の硫酸ナトリウムを酢酸エチル 10 mL で洗浄して洗液を先のなす型フラスコに移し、40 °C 以下の水浴で減圧濃縮し、窒素乾固後、アセトニトリル 20 mL (25 g 採取時は 10 mL) を正確に加えて残留物を溶かし、10 mL (同 2 mL) を正確にとって 50 mL の PP 製チューブに入れ、PBS で約 50 mL に希釈し、カラム処理に供する試料溶液とした。PBS での希釈時に濁りが見られた場合は、ガラス製ろ紙にてろ過した後、ろ紙を少量の PBS で洗浄し、洗液を合わせて、カラム処理に供する試料溶液とした。

以下、2.4.1 の 2) から 4) に従って定量を行った。なお、定量法の概要を Scheme 2 に示した。



Scheme 2 Analytical procedure for ochratoxin A in jerky for pet food made from pork liver

2.4.3 粉ミルク（以下「粉ミルク分析法」という．）

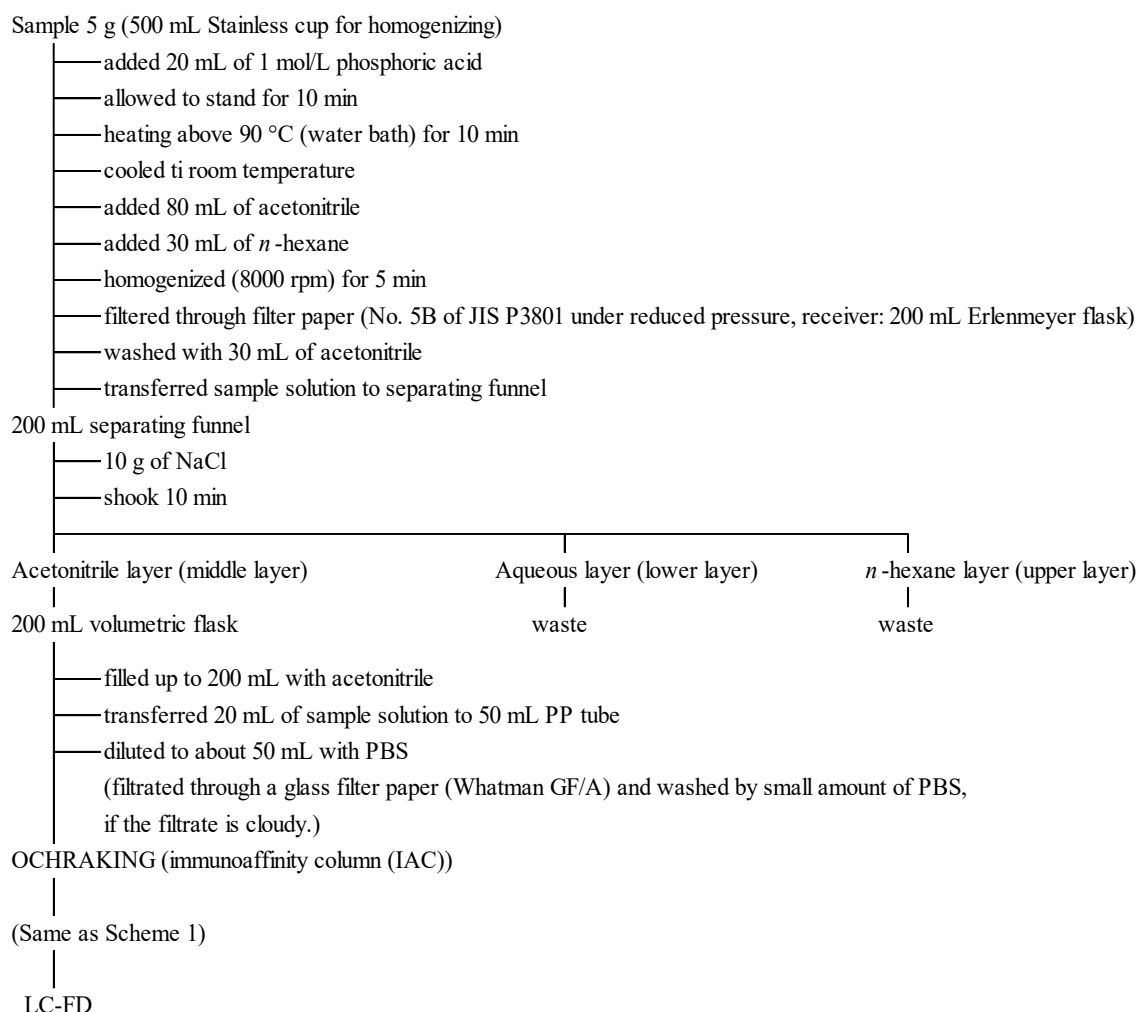
1) 抽出

分析試料 5 g を量って 500 mL のステンレス製ホモジナイザー専用カップに入れ、1 mol/L リン酸 20 mL を加え、10 分間静置後、90 °C 以上の水浴上で 10 分間加熱後、放冷した．アセトニトリル 80 mL 及びヘキサン 30 mL を加え、8000 rpm で 5 分間ホモジナイズして抽出した．200 mL の三角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、残さをアセトニトリル 30 mL で洗浄し、洗液を合わせて、液液分配に供する試料溶液とした．

2) 液液分配

試料溶液をあらかじめ塩化ナトリウム 10 g を入れた 200 mL の分液漏斗に加え，試料溶液の入っていた三角フラスコをアセトニトリル 5 mL で洗浄し，洗液を試料溶液に合わせた．10 分間振り混ぜた後静置し，塩化ナトリウムを含む水層（下層）を抜いてからアセトニトリル層（中層）を 200 mL の全量フラスコに入れ，更にアセトニトリルで定容した．この液 20 mL を正確にとって 50 mL の PP 製チューブに入れ，PBS で約 50 mL に希釈し，カラム処理に供する試料溶液とした．PBS での希釈時に濁りが見られた場合は，ガラス製ろ紙でろ過し，ろ紙を少量の PBS で洗浄した洗液を合わせて，カラム処理に供する試料溶液とした．

以下，2.4.1 の 2) から 4) に従って定量を行った．なお，定量法の概要を Scheme 3 に示した．



Scheme 3 Analytical procedure for ochratoxin A in milk powder for pet food

2.5 添加回収試験

2.2 の 2) で調製した，1 mL 中にオクラトキシン A として 10 μ g を含有する液の一部を，アセトニトリル-水（1+1）で正確に希釈し添加に用いた．

愛玩動物用飼料のジャーキー，菓子類及び粉ミルクについて，オクラトキシン A としてそれぞれ 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 ng/mL）になるように添加してよく混合し，一夜静置した後本法に従って定量し，回収率を求めた．

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 2)により調製した各検量線作成用オクラトキシン A 標準液 50 μL を LC に注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した。

得られた検量線の一例は Fig. 2 のとおりであり、各 0.25~20 ng/mL （注入量として 0.0125~1 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線の濃度範囲は、オクラトキシン A を 0.0005~0.04 mg/kg 含有する分析用試料を本法（冷蔵検法、豚レバー分析法及び粉ミルク分析法）に従い調製した最終試料溶液中のオクラトキシン A 濃度範囲に相当する。

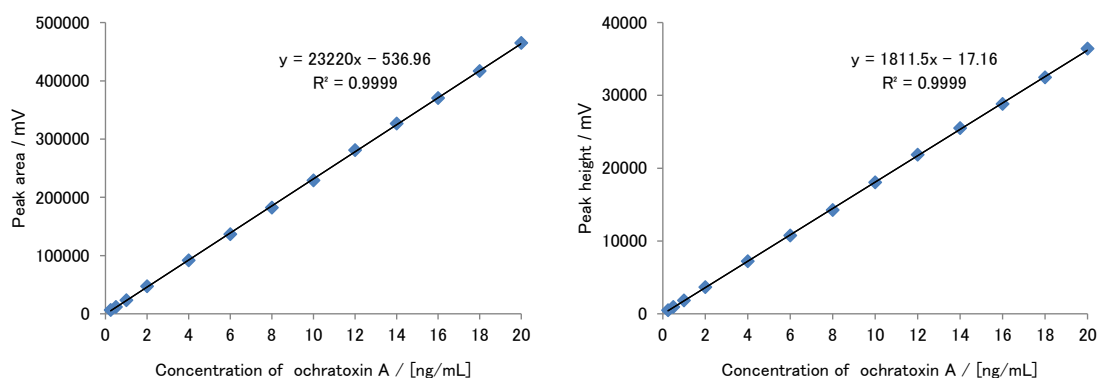


Fig. 2 Calibration curves of ochratoxin A by peak area (left) and peak height (right)

3.2 冷蔵検法による予備検討

成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）1 及び 2、素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルクについて、2.5 に従いオクラトキシン A 標準液を添加し、2.4.1 の冷蔵検法により添加回収試験を行った。その結果は Table 3 のとおりであり、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）2 及び粉ミルクを除いた各試料について、愛玩動物用飼料等の試験法³⁾第 11 章試験法の妥当性確認法（以下「試験法の妥当性確認法」という。）に定められた真度の目標値（0.01 mg/kg では 60 %以上 115 %以下）を満たす良好な結果であった。良好な結果が得られなかった 2 試料について、オクラトキシン A 標準液を添加せずに IAC 工程前までの前処理を行い、その後にオクラトキシン A 標準液を添加したところ、回収率は Table 4 のとおり良好であったことから、IAC 工程までの抽出工程に問題があると考えられた。

Table 3 Recoveries for ochratoxin A (method for jerky for pet food except for ones made from pork liver)

Samples	Spiked level (mg/kg)	Recovery (%)
Formed jerky for dogs	0.01	82.7
Dried jerky for dogs (hard type) 1	0.01	83.0
Dried jerky for dogs (hard type) 2	0.01	38.2
Dried jerky for dogs (soft type)	0.01	81.8
Confectionery for dogs	0.01	76.5
Milk powder for cats	0.01	34.0

n = 1

Table 4 Recoveries for ochratoxin A spiked after the extraction step (method for jerky for pet food except for ones made from pork liver)

Samples	Spiked level (mg/kg)	Recovery (%)
Dried jerky for dogs (hard type) 2	0.01	85.5
Milk powder for cats	0.01	94.5

n = 1

3.3 抽出方法の検討 1：豚レバー分析法

豚のレバーにはオクラトキシン A の蓄積が認められることから⁶⁾、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）2 のように、それを主原材料とするジャーキーについては、特に分析法の開発が求められているが、3.2 の結果で低回収率だったことから、冷食検法とは異なる分析法を検討することとした。Table 3 及び 4 の結果から、IAC 工程までの抽出工程に問題があると考えられたため、オクラトキシン A に係る他の抽出方法を調査したところ、オクラトキシン A を酸性条件下で有機溶媒により抽出し、一旦アルカリで逆抽出後、液性を酸性に戻してから再び有機溶媒で抽出する方法が報告されており^{1), 7)~9)}、抽出に用いる有機溶媒については、クロロホルム⁷⁾、酢酸エチル¹⁾又はクロロホルムと酢酸エチルの併用^{8), 9)}を用いた例があった。

そこで、鰹節を対象とした内山らの報告⁷⁾を基に、振り混ぜ抽出をホモジナイズ抽出に、有害性の高いクロロホルムを酢酸エチルにそれぞれ変更した。素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）2 について、2.5 に従いオクラトキシン A 標準液を添加し、2.4.2 の豚レバー分析法により添加回収試験を行った。なお、試料採取量を 25 g とした場合及び振り混ぜ抽出の場合も検討した。その結果、Table 5 のとおり、試料採取量 5 g 及びホモジナイズ抽出の場合が最も良好な結果となった。

Table 5 Recoveries for ochratoxin A (method for jerky for pet food made from pork liver)

Extraction method	Spiked level (mg/kg)	Amount of sampling (g)	Recovery (%)
Shaking	0.01	5	43.4
Homogenizing	0.01	5	91.8
		25	77.6

n = 1

3.4 抽出方法の検討 2：粉ミルク分析法

粉ミルクにも豚レバー分析法を適用できるか試したところ、低回収率となった。その原因として、粉ミルクには水溶性成分が多く含まれ、脂溶性成分が多い豚レバーとは異なる物性を示したためと考えられた。そこで、乳汁中のオクラトキシン A 分析法¹⁰⁾を基に、抽出溶媒の変更及び加熱工程の追加（試料を固化させ、吸引ろ過工程を容易にするため）等を行った。粉ミルクについて、2.5 に従いオクラトキシン A 標準液を添加し、2.4.3 の粉ミルク分析法により添加回収試験を行った。その際、リン酸添加量及び加熱時間についても検討した。その結果、Table 6 のとおり、すべての条件で試験法の妥当性確認法に定められた真度の目標値（0.01 mg/kg では 60 %以上 115 %以下）を満たす結果であったが、最も回収率の高かったリン酸 20 mL 添加、10 分加熱を採用することとした。

Table 6 Recoveries for ochratoxin A (method for milk powder for pet food)

Samples	Spiked level (mg/kg)	Addition amount of 1 mol/L phosphoric acid (mL)	Heating time (min)	Recovery (%)
Milk powder for cats	0.01	20	10	84.4
		20	15	70.5
		40	10	76.2
		40	15	69.2

n = 1

4 まとめ

愛玩動物用飼料のジャーキー、菓子類及び粉ミルク中のオクラトキシン A について、冷食検法を基に、LC を用いた定量法の愛玩動物用飼料等の検査法への収載の可否について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) ジャーキー、菓子類及び粉ミルクについて冷食検法による添加回収試験を行った結果、豚レバーを原材料に使用したものを除くジャーキー及び菓子類については、良好な回収率が得られたが、豚レバーを原材料に使用したジャーキー及び粉ミルクについては、低回収率であった。
- 2) 豚レバーを原材料に使用したジャーキーについては試料採取量の変更、抽出溶媒等の変更、振り混ぜ抽出からホモジナイズ抽出への変更及び液液分配の実施等、粉ミルクについては試料採取量の変更、抽出溶媒等の変更、振り混ぜ抽出からホモジナイズ抽出への変更及び加熱工程の追加等により、良好な回収率が得られた。

- 3) 検量線は 0.25~20 ng/mL 相当量（注入量として 0.0125~1 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線の濃度範囲は、オクラトキシン A を 0.0005~0.04 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濃度範囲に相当する。

文 献

- 1) 田端 節子, 飯田 憲司, 木村 圭介, 岩崎 由美子, 中里 光男, 鎌田 国広, 広門 雅子 : HPLC-FL および LC/MS/MS による食品中のオクラトキシン A, B およびシトリニンの同時分析法, 食品衛生学雑誌, 49(2), 100-105 (2008).
- 2) THE EUROPEAN COMMISSION : COMMISSION RECOMMENDATION (EU) 2016/1319 of 29 July 2016 amending Recommendation 2006/576/EC as regards deoxynivalenol, zearalenone and ochratoxin A in pet food, Official Journal of the European Union, L 208/58-60 (2016).
- 3) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター : 「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).
- 4) 一般財団法人日本海事検定協会 : 平成 26 年度愛玩動物用飼料の分析法検討委託事業報告書, 2. オクラトキシン A (2015).
- 5) 一般財団法人日本冷凍食品検査協会 : 平成 27 年度愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業報告書 ー分析法開発の部ー, オクラトキシン A の分析法の開発 (2016).
- 6) Schrenk D, Bignami M, Bodin L, Chipman J, Mazo J, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, Hoogenboom L, Leblanc J, Nebbia C, Nielsen E, Ntzani E, Sand S, Schwerdtle T, Vleminckx C, Wallace H, Gropp J, Antonissen G, Rychen G, Ruiz J, Innocenti M, Rovesti E and Petersen A : Risks for animal health related to the presence of ochratoxin A (OTA) in feed, *EFSA Journal*, 21(11), 8375 (2023)
- 7) UCHIYAMA S, SAITO Y and UCHIYAMA M : Protein-bonding of Ochratoxin A and Its Extractability from Proteinous Food, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 26(6), 651-657 (1985).
- 8) 矢崎 廣久, 高橋 治男, 七山 悠三 : マイコトキシンに関する研究 オクラトキシンの抽出と分析について, 千葉衛研報告, 2, 1-6 (1978).
- 9) 矢崎 廣久, 高橋 治男 : オクラトキシンーオクラトキシンの性状と分析方法ー, 千葉衛研報告, 9, 6-15 (1985).
- 10) 一般社団法人日本科学飼料協会 : 平成 19 年度飼料等の適正製造指針の検討事業報告書 オクラトキシン A の乳中等への移行残留調査 (2007). (未公表)

4 そうこう類及び植物性油かす類中のアフラトキシン, ステリグマトシスチン及びゼアラレノ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検討

山上 陽平^{*1}, 井上 直^{*2}, 齊木 雅一^{*2}, 中村 信仁^{*3}, 小塚 健志^{*1}, 青山 幸二^{*1}

Study of Determination Method of Aflatoxin, Sterigmatocystin and Zearalenone
in Brans and Food Processing By-products, and Oil Seed Meals for Feed by LC-MS/MS

YAMAGAMI Yohei^{*1}, INOUE Tadashi^{*2}, SAIKI Masakazu^{*2}, NAKAMURA Nobuhito^{*3},
KOZUKA Kenji^{*1} and AOYAMA Koji^{*1}

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

^{*2} Sapporo Regional Center, (FAMIC),

^{*3}Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Current affiliation: Agricultural Chemicals Inspection
Department, FAMIC))

A quantitative determination method using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS) was studied to determine the concentrations of aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂), sterigmatocystin (STC), and zearalenone (ZEN) in brans and food processing by-products, and oil seed meal.

An extraction solvent in the method, compiled in the Feed Analysis Standard of Japan, was modified to reduce matrix effects. The matrix effects tended to decrease as the proportion of water in the extraction solvent decreased. However, extraction efficiency of mycotoxins also decreased.

At the same time, matrix effects and recovery rates of each mycotoxin in the effluent fraction were also confirmed using a purification column (Captiva EMR Mycotoxins, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) and an LC column (Inertsil Ph, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), which are different from the method compiled in the Feed Analysis Standard of Japan. Among aflatoxins and ZEN, ion suppression of AFB₁, AFG₂ and ZEN was observed due to the sample matrix in some of the sample fractions, while AFB₁ and AFB₂ showed low recovery in some of the sample fractions. However, these matrix effects and recovery rates were within the acceptable range. On the other hand, ion enhancement of STC due to the sample matrix was observed in many of the samples. For future studies, the recovery rate of STC in each sample will be evaluated using a stable isotope-labeled STC.

Key words: aflatoxin; sterigmatocystin; zearalenone; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); brans and food processing byproduct; oil seed meal; corn dried distillers grains with solubles

キーワード：アフラトキシン；ステリグマトシスチン；ゼアラレノン；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；そうこう類；植物油かす類；とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 農薬検査部

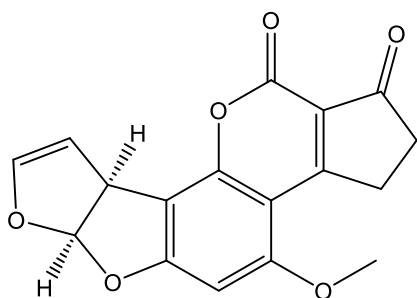
1 緒 言

現在，独立行政法人農林水産消費安全技術センターでは，かび毒のうちアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンの分析は，飼料分析基準¹⁾第5章第3節1の「かび毒の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による一斉分析法」（以下「かび毒一斉法」という．）を中心に実施している．しかし，そうこう類及び植物性油かす類の一部はかび毒一斉法において，飼料分析基準別紙2「試験法の妥当性確認ガイドライン」による真度等の目標値を満たさないものがあることから²⁾，他の分析法により分析を実施している，もしくは分析を実施していない成分がある．アフラトキシン及びゼアラレノンは配合飼料等で基準値³⁾が設定されており，ステリグマトシスチンは農林水産省の「サーベイランス・モニタリング中期計画」で調査対象として取り上げられている．従って，そうこう類及び植物性油かす類中のアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンについて，効率的な分析の実施及び分析を実施していない成分への対応のため，新規分析法を確立する必要がある．

令和4年度に渡辺ら⁴⁾は，とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル（以下「DDGS」という．）を対象として塩析を用いた新規分析法を検討した際に，アフラトキシン G₁ 等においてマトリックス効果が認められたため，マトリックス効果低減の検討を行ったが，改善には至らなかった．

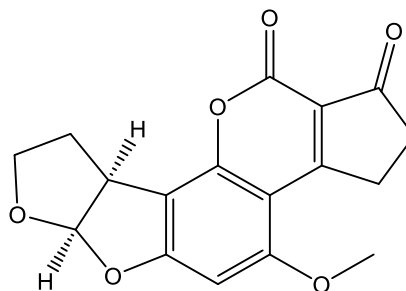
そこで，今回，そうこう類及び植物性油かす類中のアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンを液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という．）により定量する方法について，抽出溶媒及び精製カラムを検討した結果を報告する．

参考にあフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンの構造式等を Fig. 1 に示した．

Aflatoxin B₁

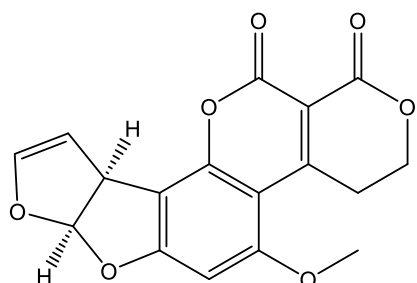
(6a*R*,9a*S*)-2,3,6a,9a-tetrahydro-4-methoxycyclopenta[*c*]furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*][1]benzopyran-1,11-dione

C₁₇H₁₂O₆ MW: 312.06 CAS No.: 1162-65-8

Aflatoxin B₂

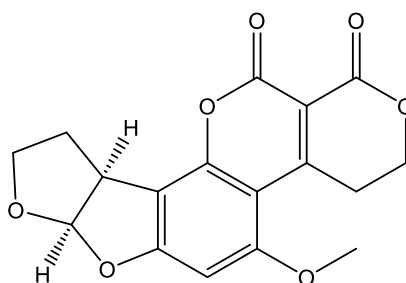
(6a*R*,9a*S*)-2,3,6a,8,9,9a-hexahydro-4-methoxy-cyclopenta[*c*]furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*][1]benzopyran-1,11-dione

C₁₇H₁₄O₆ MW: 314.08 CAS No.: 7220-81-7

Aflatoxin G₁

(7a*R*,10a*S*)-3,4,7a,10a-tetrahydro-5-methoxy-1*H*,12*H*-furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*]pyrano[3,4-*c*][1]benzopyran-1,12-dione

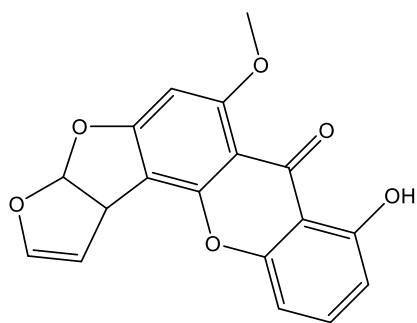
C₁₇H₁₂O₇ MW: 328.06 CAS No.: 1165-39-5

Aflatoxin G₂

(7a*R*,10a*S*)-3,4,7a,9,10,10a-hexahydro-5-methoxy-1*H*,12*H*-furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*]pyrano[3,4-*c*][1]benzopyran-1,12-dione

C₁₇H₁₄O₇ MW: 330.07 CAS No.: 7241-98-7

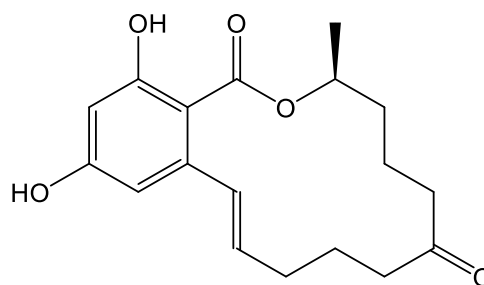
Sterigmatocystin



(3a*R*-*cis*)3a,12c-dihydro-8-hydroxy-6-methoxy-7*H*-furo[3',2':4,5]furo[2,3-*c*]xanthen-7-one

C₁₈H₁₂O₆ MW: 324.28 CAS No.: 10048-13-2

Zearalenone



(4*S*,12*E*)-15,17-dihydroxy-4-methyl-3-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-12,15,17,19-tetraene-2,8-dione

C₁₈H₂₂O₅ MW: 318.36 CAS No.: 17924-92-4

Fig. 1 Chemical structures of aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone

2 実験方法

2.1 試料

米ぬか油かす，コーングルテンフィード，DDGS，ふすま，麦ぬか，コーングルテンミール，大豆油かす及びなたね油かすはそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し，分析用試料とした。

2.2 試薬

2.2.1 2.4.1 及び 2.4.2 には以下の 1)~6)の試薬を用いた。

1) アセトニトリルは LC/MS 用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。酢酸アンモニウムは HPLC 用 1 mol/L 水溶液（富士フイルム和光純薬製）を用いた。水は LC/MS 用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。

2) アフラトキシン標準原液

市販のアフラトキシン（B₁，B₂，G₁，G₂）混合標準液（各アフラトキシン 25 µg/mL，富士フイルム和光純薬製）をアフラトキシン標準原液とした。

3) ステリグマトシスチン標準原液

ステリグマトシスチン標準品（富士フイルム和光純薬製，純度 98.2 %）5 mg を量って 20 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリルを加えて溶かし，更に標線までアセトニトリルを加えてステリグマトシスチン標準原液を調製した（この液 1 mL は，ステリグマトシスチンとして 0.25 mg を含有）。

4) ゼアラレノン標準原液

ゼアラレノン標準品（富士フイルム和光純薬製，純度 99.7 %）5 mg を量って 100 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリルを加えて溶かし，更に標線までアセトニトリルを加えてゼアラレノン標準原液を調製した（この液 1 mL は，ゼアラレノンとして 0.05 mg を含有）。

5) 添加用アフラトキシン標準液

アフラトキシン標準原液の一部を，アセトニトリルで正確に希釈し，保管用標準液を調製した。使用に際して，保管用標準液の一部をアセトニトリルで正確に希釈し，1 mL あたりアフラトキシン B₁，B₂，G₁ 及び G₂ としてそれぞれ 25 ng を含む添加用アフラトキシン標準液を調製した。

6) 検量線作成用ステリグマトシスチン及びゼアラレノン混合標準液

ステリグマトシスチン標準原液及びゼアラレノン標準原液の一部を混合し，アセトニトリルで正確に希釈し，検量線作成用ステリグマトシスチン及びゼアラレノン混合標準原液を調製した。

使用に際して，検量線作成用ステリグマトシスチン及びゼアラレノン混合標準原液の一部を，アセトニトリル-水（84+16）で正確に希釈し，1 mL 中にステリグマトシスチン及びゼアラレノンとしてそれぞれ 0.1，0.125，0.25，0.5，0.75，1，2，3 及び 4 ng を含有する検量線作成用ステリグマトシスチン及びゼアラレノン混合標準液を調製した。

2.2.2 2.4.3 には以下の 1)~6)の試薬を用いた。

1) アセトニトリル，ギ酸，酢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。酢酸アンモニウムは遺伝子工学研究用 10 mol/L 水溶液（ニッポンジーン製）を用いた。水は Milli-Q IQ 7005（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) アフラトキシシン標準原液

市販のアフラトキシシン (B₁, B₂, G₁, G₂) 混合標準液 (各アフラトキシシン 25 µg/mL, 富士フイルム和光純薬製) をアフラトキシシン標準原液とした。

3) ステリグマトシスチン標準原液

ステリグマトシスチン標準品 (富士フイルム和光純薬製, 純度 99.5 %) 5.0 mg を量って 10 mL の全量フラスコに入れ, アセトニトリルを加えて溶かし, 更に標線までアセトニトリルを加えてステリグマトシスチン標準原液を調製した (この液 1 mL は, ステリグマトシスチンとして 500 µg を含有)。

4) ゼアラレノン標準原液

ゼアラレノン標準品 (富士フイルム和光純薬製, 純度 99.7 %) 2.5 mg を量って 50 mL の全量フラスコに入れ, アセトニトリルを加えて溶かし, 更に標線までアセトニトリルを加えてゼアラレノン標準原液を調製した (この液 1 mL は, ゼアラレノンとして 50 µg を含有)。

5) 検量線作成用かび毒混合標準液

各かび毒標準原液の一部を混合し, アセトニトリルで正確に希釈し, 検量線作成用かび毒混合標準原液を調製した。

使用に際して, 検量線作成用かび毒混合標準原液の一部を, アセトニトリル-水-酢酸 (23+76+1) で正確に希釈し, 1 mL 中にアフラトキシシン B₁, B₂, G₁, G₂ 及びステリグマトシスチンとしてそれぞれ 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 及び 20 ng, ゼアラレノンとして 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30 及び 40 ng を含有する検量線作成用かび毒混合標準液を調製した。

6) 添加用かび毒混合標準液

各かび毒標準原液の一部を混合し, アセトニトリルで正確に希釈し, 添加用かび毒混合標準原液を調製した。

添加用かび毒混合標準原液の一部を, アセトニトリルで正確に希釈し, 1 mL 中にアフラトキシシン B₁, B₂, G₁, G₂ 及びステリグマトシスチンとしてそれぞれ 2000 ng 及びゼアラレノンとして 40000 ng を含む添加用混合標準液①, 並びに 1 mL 中にアフラトキシシン B₁, B₂, G₁, G₂ 及びステリグマトシスチンとしてそれぞれ 200 ng 及びゼアラレノンとして 4000 ng を含む添加用混合標準液②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-2W タイテック製 (使用時振動数 300 rpm)

3) 多機能カラム :

多機能カラム 1 (2.4.1 及び 2.4.2 に使用) : MultiSep 226 AflaZon+ Romer Labs 製

多機能カラム 2 (2.4.3 に使用) : Captiva EMR Mycotoxins (600 mg) Agilent Technologies 製

4) メンブランフィルター : DISMIC-13HP (孔径 0.45 µm, 直径 13 mm, 親水性 PTFE) 東洋濾紙製

5) LC-MS/MS :

LC-MS/MS 1 (2.4.1 及び 2.4.2 に使用)

LC 部 : Nexera X2 島津製作所製

MS 部 : LCMS-8050 島津製作所製

LC-MS/MS 2 (2.4.3 に使用)

LC 部 : Nexera X2 島津製作所製

MS 部 : QTrap 4500 AB Sciex 製

2.4 定量方法

2.4.1 抽出溶媒の変更によるマトリックス効果の確認

かび毒一斉法を用い，分析試料としてコーングルテンフィードの採取量は 25 g とし，抽出溶媒はアセトニトリル-水 (100+0, 84+16, 70+30 又は 60+40) 4 種類を検討した．各抽出溶媒によるコーングルテンフィードの抽出液を多機能カラム 1 に負荷し，流出液を 2 mL ずつ分取した．分取した流出液のうち 475 µL をそれぞれ正確にとり，添加用アフラトキシン標準液 25 µL を添加 (各アフラトキシンとして 0.001 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 1.25 ng/mL 相当量)) し，LC-MS/MS に供する試料溶液とした．同時に 2.2.1 の 6) に従って調製した試料マトリックスを含まない同濃度の液を調製し，LC-MS/MS に供する標準液とした．試料溶液及び標準液各 10 µL を LC-MS/MS 1 に注入し，選択反応検出 (以下「SRM」という．) クロマトグラムを得て，試料溶液及び標準液のピーク面積比を確認した．測定条件は Table 1 及び 2 のとおり．

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS 1

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 µm), Agilent Technologies
Mobile phase	10 mmol/L ammonium acetate aqueous solution – acetonitrile (9:1) (hold for 1 min) → 19 min → (1:4) (hold for 15 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Nebulizer gas	N ₂ (2.5 L/min)
Drying gas	N ₂ (5 L/min)
Interface temperature	300 °C
Heat block temperature	200 °C
Desolvation line temperature	200 °C
Collision gas	Ar (270 kPa)

Table 2 MS/MS parameters of LC-MS/MS 1

Target	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
			Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
Aflatoxin B ₁	+	313	241	-	39
			-	285	24
Aflatoxin B ₂	+	315	243	-	42
			-	259	27
Aflatoxin G ₁	+	329	214	-	38
			-	200	41
Aflatoxin G ₂	+	331	217	-	37
			-	245	31
Sterigmatocystin	+	325	281	-	37
			-	310	25
Zearalenone	-	317	175	-	23
			-	131	30

2.4.2 抽出溶媒の変更による抽出効率の確認

かび毒一斉法を用い、分析試料としてとうもろこし（自然汚染試料）の採取量は 25 g とし、抽出溶媒はアセトニトリル-水（100+0, 90+10 又は 84+16）3 種類を検討した。各抽出溶媒により得られた抽出液 2.5 mL に、それぞれアセトニトリル-水（59+16, 82+18 又は 84+16）7.5 mL を加え、多機能カラム 1 に負荷する液の抽出溶媒の組成がアセトニトリル-水（84+16）となるよう希釈した。以降はかび毒一斉法に従い、得られた試料溶液を LC-MS/MS による測定に供した。試料溶液並びに検量線作成用ステリグマトシスチン及びゼアラレノン混合標準液各 10 µL を LC-MS/MS 1 に注入し、SRM クロマトグラムを得た。測定条件は Table 1 及び 2 のとおり。

2.4.3 多機能カラム 2 を用いた場合の回収率の確認

分析試料 25 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水（84+16）100 mL（ふすま及び麦ぬかは 150 mL）を加え、60 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1700×g で 5 分間遠心分離した。上澄み液 5 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れ、添加用混合標準液①25 µL を添加した（ふすま及び麦ぬかは各アフラトキシシン及びステリグマトシスチンとして 0.06 mg/kg 相当量、ゼアラレノンとして 1.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中に各アフラトキシシン及びステリグマトシスチンとして 1.875 ng/mL 相当量、ゼアラレノンとして 37.5 ng/mL 相当量）、その他の試料は各アフラトキシシン及びステリグマトシスチンとして 0.04 mg/kg 相当量、ゼアラレノンとして 0.8 mg/kg 相当量（同各アフラトキシシン及びステリグマトシスチンとして 1.25 ng/mL 相当量、ゼアラレノンとして 25 ng/mL 相当量））後、アセトニトリルで 10 mL に定容した。試料溶液を多機能カラム 2 に入れ、流出液をガラス試験管に 2 mL ずつ分取した。流出液のうち 200 µL（ふすま及び麦ぬかは 300 µL）をそれぞれ正確にとり、これらに 1 %酢酸 600 µL（ふすま及び麦ぬかは 500 µL）を正確に加え、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。標準液を添加しない試料についても同様に操作した。試料溶液及び各検量線作成用かび毒混合標準液各 5 µL を LC-MS/MS 2 に注入し、SRM クロマトグラムを得た。測定条件を Table 3 及び 4 に示した。

また，マトリックス効果確認のため，標準液を添加しない試料の各画分の流出液 195 μL （ふすま及び麦ぬかは 295 μL ）をそれぞれ正確にとり，添加用混合標準液②5 μL を添加した（各アフラトキシン及びステリグマトシスチンとして 0.04 mg/kg 相当量，ゼアラレノンとして 0.8 mg/kg 相当量（同各アフラトキシン及びステリグマトシスチンとして 1.25 ng/mL 相当量，ゼアラレノンとして 25 ng/mL 相当量））後，1 %酢酸 600 μL （ふすま及び麦ぬかは 500 μL ）を正確に加え，メンブランフィルターでろ過し，LC-MS/MS 2 による測定を行った。

Table 3 Operating conditions of LC-MS/MS 2

Column	Inertsil Ph (2.1 mm i.d. $\times$ 150 mm, 5 μm), GL Sciences
Mobile phase	0.5 mmol/L ammonium acetate 0.1 % (v/v) formic acid aqueous solution- 0.5 mmol/L ammonium acetate 0.1 % (v/v) formic acid methanol solution (4:1) $\rightarrow$ 14 min $\rightarrow$ (0:10) $\rightarrow$ (4:1) (hold for 5 min)
Flow rate	0.3 mL/min
Column temperature	40 $^{\circ}\text{C}$
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Ion source temperature	650 $^{\circ}\text{C}$
Curtain gas	N_2 (40 psi)
Nebulizer gas	Air (70 psi)
Turbo gas	Air (70 psi)
Collision gas	N_2 (8)
Capillary voltage	Positive: 5500 V, Negative: 4500 V

Table 4 MS/MS parameters of LC-MS/MS 2

Target	Mode	Precursor ion (m/z)	Product ion		Collision energy (eV)
			Quantifier (m/z)	Qualifier (m/z)	
Aflatoxin B ₁	+	313	241	-	47
			-	285	31
Aflatoxin B ₂	+	315	259	-	39
			-	287	33
Aflatoxin G ₁	+	329	311	-	29
			-	200	51
Aflatoxin G ₂	+	331	313	-	31
			-	245	39
Sterigmatocystin	+	325	310	-	33
			-	281	49
Zearalenone	-	317	175	-	30
			-	131	36

3 結果及び考察

3.1 抽出溶媒の変更によるマトリックス効果の確認

かび毒一斉法では抽出溶媒をアセトニトリル-水（84+16）としている．この抽出溶媒の組成

を変更することによりマトリックス効果の低減が可能であるか、各アフラトキシンを対象に 2.4.1 により確認した。その結果は Fig. 2 のとおりであり、抽出溶媒における水の割合が低くなるほど試料マトリックスの測定値への影響が低減される傾向にあった。また、アセトニトリル-水 (100+0) においては、いずれの画分においても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。

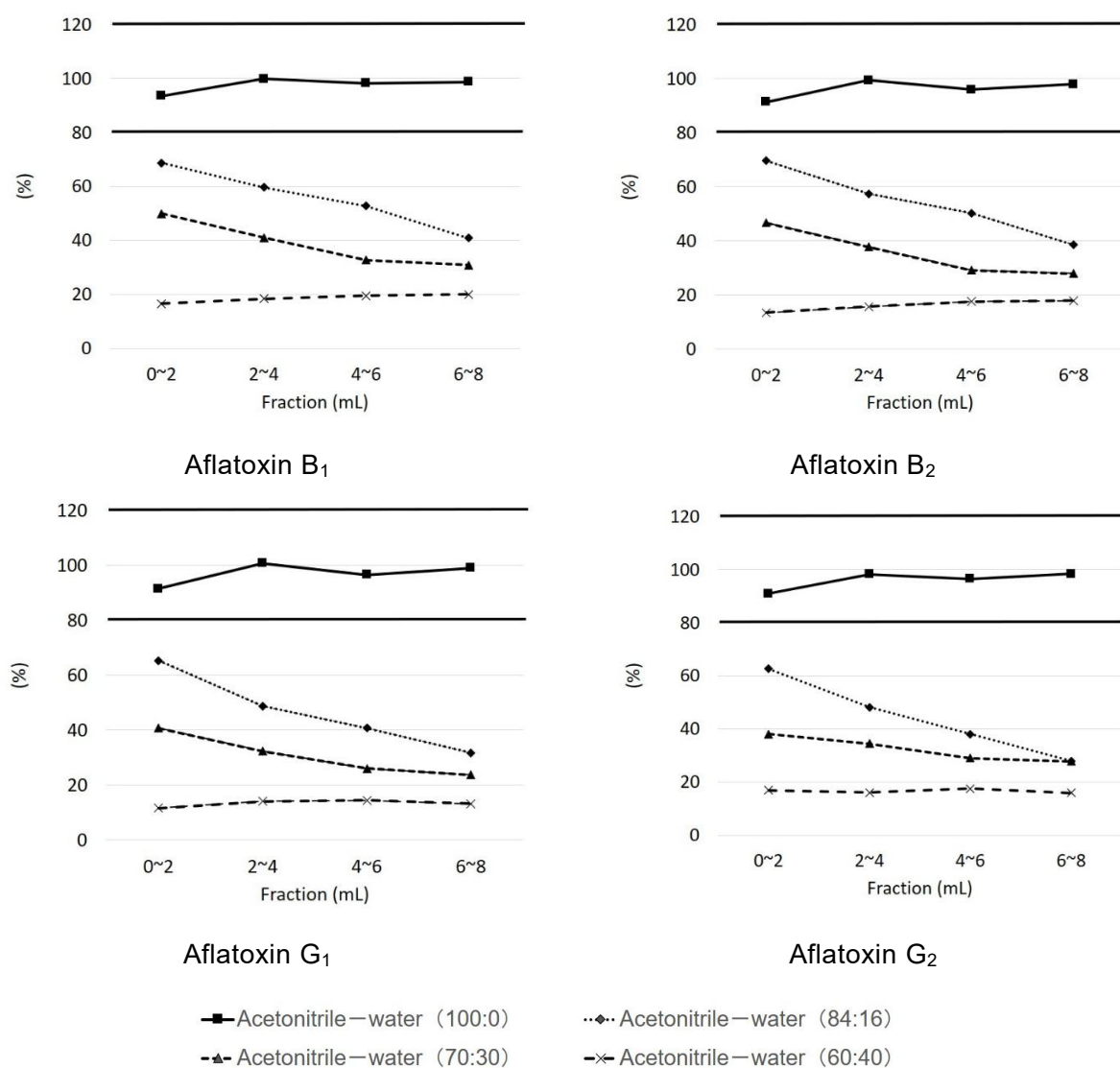


Fig. 2 Matrix effects (%) for different extraction solvent composition

$n = 1$

Ratio of peak area of aflatoxins in the presence of matrix to that in the absence of matrix.

The bold lines indicate the range in which quantification is possible without substantial matrix effects (80~120 %).

3.2 抽出溶媒の変更による抽出効率の確認

3.1 の結果を受け、かび毒一斉法の適用範囲であるとうもろこしの自然汚染試料を用いて、ステリグマトシスチン及びゼアラレノンを対象に 2.4.2 により抽出効率を確認した。その結果は Table 5 のとおりであり、かび毒一斉法の抽出溶媒であるアセトニトリル-水 (84+16) の抽出効率に対して、ステリグマトシスチン、ゼアラレノンともに、抽出溶媒における水の割合が低くなるほど抽出効率が減少した。そのため、抽出溶媒の組成は変更せず検討を進めることとした。

Table 5 Comparison of extraction recoveries using naturally contaminated corn samples

Mycotoxin	Extraction solvent composition	Concentration of mycotoxin (µg/kg)	Relative extraction recovery ^{a)} (%)
Sterigmatocystin	Acetonitrile-water (100:0)	0.74	45
	Acetonitrile-water (90:10)	1.25	76
	Acetonitrile-water (84:16)	1.64	100
Zearalenone	Acetonitrile-water (100:0)	11.8	31
	Acetonitrile-water (90:10)	18.7	49
	Acetonitrile-water (84:16)	38.4	100

n = 3

a) Relative extraction recovery (%) was calculated as: recovery with acetonitrile-water (100:0 or 90:10) / recovery with acetonitrile-water (84:16) × 100.

3.3 多機能カラム 2 を用いた場合の回収率の確認

多機能カラム 2 (Captiva EMR Mycotoxins) は、メーカーのアプリケーションノートにおいてとうもろこし子実及び大豆中のかび毒の分析において良好な結果が得られている。また、LC カラムの Inertsil Ph はシリカゲルにアルキルフェニル基を結合させたフェニルカラムの一種であり、アルキル鎖による疎水性相互作用及びフェニル基の π 電子相互作用が働く。アフラトキシン、ステリグマトシスチン及びゼアラレノンはいずれも芳香環を有することから、Inertsil Ph はかび毒一斉法で用いられている C18 カラムとは異なる挙動を示すことが期待された。そこで、2.4.3 により各試料溶液における Captiva EMR Mycotoxins からの流出画分を Inertsil Ph を用いて測定した。得られた結果のうち、代表的な結果である DDGS、ふすま及び麦ぬかのマトリックス効果及び回収率を Fig. 3 に示した。

マトリックス効果は、各アフラトキシン及びゼアラレノンでは、一部の試料の画分においてアフラトキシン B₁、G₂ 及びゼアラレノンが 80 %より低かったが、それ以外の画分は良好であり、全体的に全試料において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。一方、ステリグマトシスチンでは、コーングルテンフィード及び DDGS は良好であったが、ふすま及

び麦ぬかは全画分において 120 %より高く、測定値への顕著な影響が認められた。米ぬか油かす、コーングルテンミール、大豆油かす及びなたね油かすは、一部の画分において 120 %に近い又は 120 %より高く、測定値への影響が認められた。

回収率は、各アフラトキシン及びゼアラレノンでは、一部の試料の 0~2 mL 画分においてアフラトキシン B₁ 及び B₂ が 70 %より低かったが、それ以外の全試料の画分は良好であった。一方、ステリグマトシスチンでは、DDGS は良好であったが、ふすま及び麦ぬかは全画分において、米ぬか油かす、コーングルテンフィード、コーングルテンミール、大豆油かす及びなたね油かすは一部の画分において、70 %より低い (0~2 mL 画分のみ) 又は 120 %より高かった。

試料マトリックス由来の夾雑物の影響により、特にステリグマトシスチンにおいて顕著な影響を受けたことから、今後は、安定同位体標識ステリグマトシスチンを内標準として用いて検討を進める予定である。

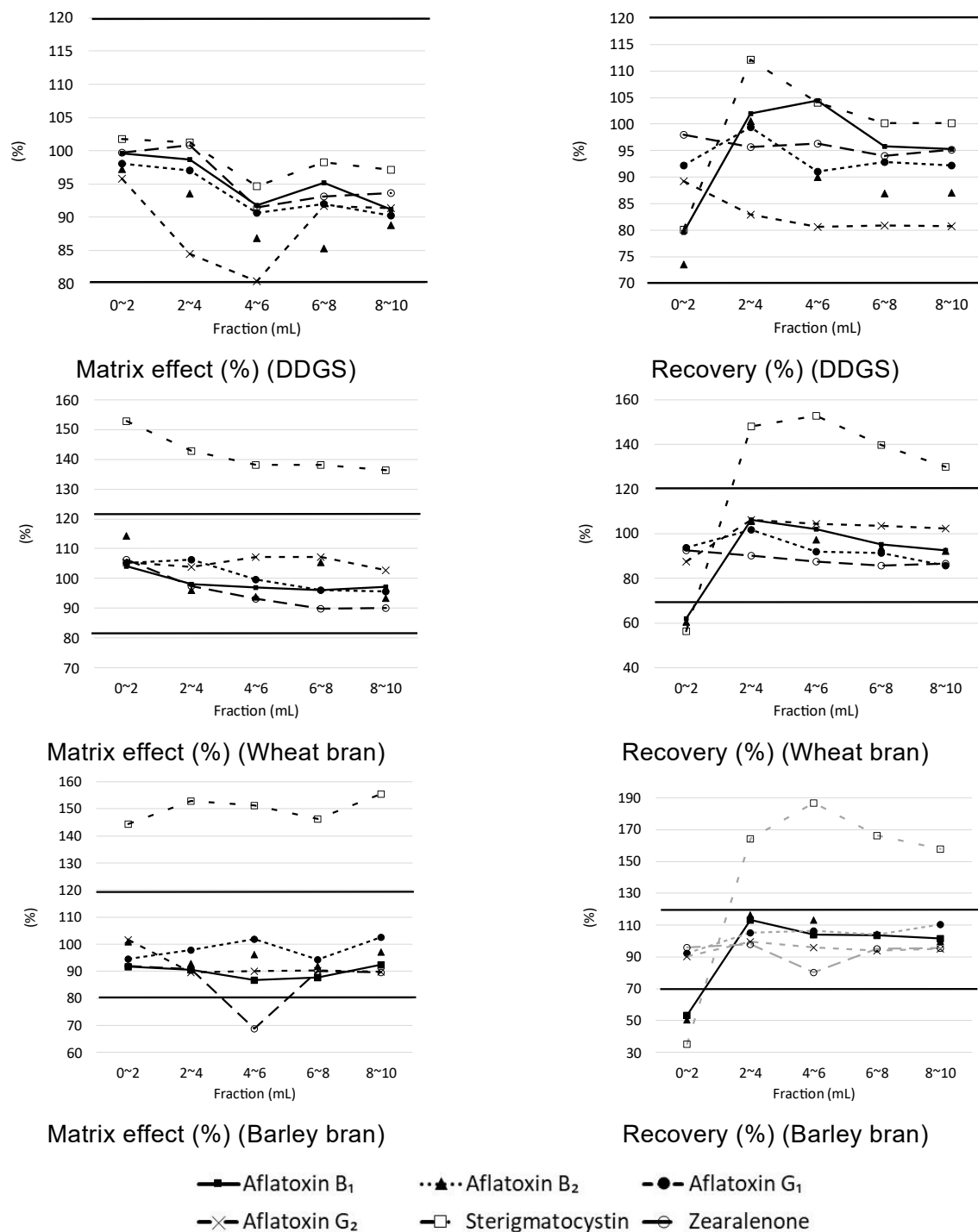


Fig. 3 Elution pattern of aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone using a multifunctional column and a phenyl column

$n = 1$

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

The bold lines indicate the range in which quantification is possible without substantial matrix effects (80~120 %) for matrix effects, and the target trueness range (70~120 %) for recovery rates specified in the validation guideline for test methods in Appendix 2 of the Feed Analysis Standards of Japan.

4 まとめ

そうこう類及び植物性油かす類中のアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンについて，LC-MS/MSにより定量する方法を検討したところ，以下の結果が得られた．

- 1) かび毒一斉法を基に抽出溶媒の組成を変更したところ，抽出溶媒における水の割合が低くなるほど試料マトリックスの測定値への影響が低減される傾向にあったが，抽出効率は減少した．
- 2) かび毒一斉法とは異なる精製カラム（Captiva EMR Mycotoxins）及び LC カラム（Inertsil Ph）を用いて，流出画分における各かび毒のマトリックス効果及び回収率を確認したところ，アフラトキシン及びゼアラレノンは，一部の試料の画分においてアフラトキシン B₁，G₂ 及びゼアラレノンのマトリックス効果並びにアフラトキシン B₁ 及び B₂ の低回収が認められたものの，全体的に全試料において顕著なマトリックス効果は認められず，回収率も良好であった．一方，ステリグマトシスチンは，多くの試料において試料マトリックスによるイオン化促進が認められた．

今後，安定同位体標識ステリグマトシスチンを使用し，各試料におけるステリグマトシスチンの回収率を評価する予定である．

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) 鈴木 知華，名塚 英一，加藤 耕一，青山 幸二：かび毒の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による一斉分析法の植物性油かす類に対する妥当性確認，飼料研究報告，41，118-121 (2016)．
- 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) 渡辺 ちとせ，林 菜月：とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル中のアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の検討，飼料研究報告，48，50-64 (2023)．

5 穀類及び牧草中の 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の改正基準値相当の濃度における妥当性確認

高橋 雄一^{*1}, 山下 奈々^{*2}

Validation Study of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Determination Method in Grains and Grass Hay for Feed by LC-MS/MS at Concentration Equivalent to the Revised Regulation Values

TAKAHASHI Yuichi^{*1} and YAMASHITA Nana^{*2}

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

(Current affiliation: Fukuoka Regional Center, FAMIC)

^{*2} Nagoya Regional Center, FAMIC)

A validation study was conducted on a method for determining 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in grains and grass hay at concentration equivalent to the revised regulation values and the limits of quantification. The method, which uses a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS), is compiled in the Feed Analysis Standard of Japan.

Briefly, 2,4-D and related compounds were first added with water, and then extracted with acetone under acidic condition. The extracted solution was purified by liquid-liquid partition with a 10 % (w/v) sodium chloride solution and hexane-ethyl acetate (1:1). 2,4-D related compounds, such as 2,4-D ethyl, in the sample solutions were hydrolyzed to 2,4-D under alkaline condition. The hydrolyzed sample solution was purified with a solid phase extraction (SPE) column (Mega Bond Elut C18, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA). It was then purified by liquid-liquid partition with a 10 % (w/v) sodium chloride solution and diethyl ether, followed by further purification with an SPE column (InertSep GC/PSA, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan). The purified sample solution was injected into LC-MS/MS to determine the concentration of 2,4-D. LC separation was then carried out using an ODS column (Atlantis T3, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 µm, Waters Co.; Milford, MA, USA) with a gradient of 5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution and 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution as a mobile phase. In MS/MS analysis, a negative mode electrospray ionization (ESI-) was used.

Recovery tests were conducted on five types of grains and grass hay. 2,4-D and 2,4-D ethyl were added at following levels: 2 mg/kg for oats, wheat, milo and rye; 0.01 and 2 mg/kg for barley; and 5 and 400 mg/kg for wheat straw. The results showed that mean recoveries ranged from 87.1 % to 100 % for 2,4-D, and 81.2 % to 93.0 % for 2,4-D ethyl. The relative standard deviation of repeatability (RSD_r) was 7.3 % or less for 2,4-D and 8.4 % or less for 2,4-D ethyl.

Key words: 2,4-D and related compounds; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); grass hay; grain; validation study

キーワード：2,4-D 及び関連化合物；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；乾牧草；穀物；妥当性確認

^{*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 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名古屋センター

1 緒 言

2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（以下「2,4-D」という．）は 1950 年に国内登録されたフェノキシ系の除草剤であり，オーキシシン作用により植物の分裂組織を異常に活性化させ，茎葉の奇形を生じさせることで除草効果を示すと考えられている¹⁾．

我が国では，農林水産省令において穀類及び牧草中の基準値が設定されているが，令和 6 年 8 月 26 日付けで飼料中の 2,4-D（2,4-D ナトリウム塩，2,4-D ジメチルアミン塩，2,4-D エチル，2,4-D イソプロピル，2,4-D ブトキシエチル及び 2,4-D アルカノールアミン塩（以下「2,4-D 関連物質」という．）を含む．）の残留基準値²⁾が改正され，えん麦，大麦，小麦，マイロ及びライ麦は 0.5 mg/kg から 2 mg/kg に，牧草は 260 mg/kg から 400 mg/kg に基準値が引き上げられた．しかし，これらの飼料における基準値相当濃度の妥当性が確認されていないことから，妥当性確認が急務となっている．

そこで，今回，えん麦，大麦，小麦，マイロ及びライ麦については飼料分析基準³⁾に収載されている液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という．）法（その 1）により，牧草については，同法（その 2）により 2,4-D の改正後の基準値濃度における妥当性確認を行ったので，その概要を報告する．また，大麦及び牧草中の 2,4-D の定量下限濃度における妥当性確認も行ったので併せて報告する．なお，2,4-D 関連物質には，加水分解により 2,4-D に変換してから定量する化合物が含まれていることから，本検討は 2,4-D 及び 2,4-D 関連物質から加水分解が必要な 2,4-D エチルを選定して実施することにした．

参考に 2,4-D 及び 2,4-D エチルの構造式等を Fig. 1 に示した．

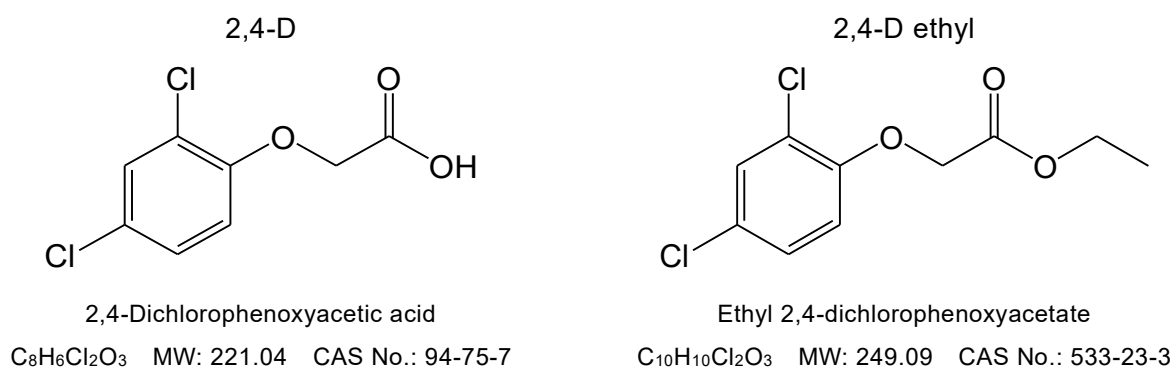


Fig. 1 Chemical structures of 2,4-D and 2,4-D ethyl

2 実験方法

2.1 試 料

えん麦，大麦，小麦，マイロ，ライ麦及びウィートストローはそれぞれ目開き 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．

2.2 試 薬

- 1) アセトニトリル，アセトン，酢酸エチル，ジエチルエーテル，トルエン，ヘキサン，塩化ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬・PCB 試験用を用いた．メタノールは抽出操作には残留農薬・PCB 試験用を，溶離液には LC/MS 用を用いた．酢酸アンモニウム溶液は 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液（LC 用，富士フイルム和光純薬工業製）を用いた．水は Milli-Q

Advantage (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。その他の試薬は特級を用いた。

2) 2,4-D 標準原液

2,4-D 標準品 (関東化学製, 純度 98.0 %) 25 mg を量って 50 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線までアセトンを加えて 2,4-D 標準原液を調製した (この液 1 mL は, 2,4-D として 0.5 mg を含有)。

使用に際して, 2,4-D 標準原液の一部を, メタノールーギ酸 (1000+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に 2,4-D として 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 及び 0.4 µg を含有する各 2,4-D 標準液を調製した。

3) えん麦, 大麦, 小麦, マイロ及びライ麦添加用 2,4-D 標準液

2,4-D 標準原液の一部をアセトンで正確に希釈し, 1 mL 中に 2,4-D として 20 µg を含有するえん麦, 大麦, 小麦, マイロ及びライ麦基準値濃度添加用 2,4-D 標準液及び 1 mL 中に 2,4-D として 0.1 µg を含有する大麦定量下限濃度添加用 2,4-D 標準液を調製した。

4) ウィートストロー添加用 2,4-D 標準液

2,4-D 標準品 80 mg を量って 20 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線までアセトンを加えてウィートストロー基準値濃度添加用 2,4-D 標準液 (この液 1 mL は, 2,4-D として 4 mg を含有) 及び 1 mL 中に 2,4-D として 50 µg を含有するウィートストロー定量下限濃度添加用 2,4-D 標準液を調製した。

5) 2,4-D エチル標準原液

2,4-D エチル標準品 (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 97.0 %) 25 mg を量って 50 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線までアセトンを加えて 2,4-D エチル標準原液を調製した (この液 1 mL は, 2,4-D エチルとして 0.5 mg を含有)。

6) えん麦, 大麦, 小麦, マイロ及びライ麦添加用 2,4-D エチル標準液

2,4-D エチル標準原液の一部をアセトンで正確に希釈し, 1 mL 中に 2,4-D エチルとして 20 µg を含有するえん麦, 大麦, 小麦, マイロ及びライ麦基準値濃度添加用 2,4-D エチル標準液及び 1 mL 中に 2,4-D エチルとして 0.1 µg を含有する大麦定量下限濃度添加用 2,4-D エチル標準液を調製した。

7) ウィートストロー添加用 2,4-D エチル標準液

2,4-D エチル標準品 80 mg を量って 20 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線までアセトンを加えてウィートストロー基準値濃度添加用 2,4-D エチル標準液 (この液 1 mL は, 2,4-D エチルとして 4 mg を含有) 及び 1 mL 中に 2,4-D エチルとして 50 µg を含有するウィートストロー定量下限濃度添加用 2,4-D エチル標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機: ZM-200 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)
- 2) 振り混ぜ機: レシプロシューカー SR-SDW タイテック製 (使用時振動数 300 rpm)
- 3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム: Mega Bond Elut C18 カートリッジ (充てん剤量 1 g) Agilent Technologies 製
- 4) グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム: InertSep GC/PSA カートリッジ (充てん剤量 500 mg/500 mg) ジーエルサイエンス製

5) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部 : ACQUITY TQD Waters 製

2.4 定量方法

えん麦, 大麦, 小麦, マイロ及びライ麦は飼料分析基準第 6 章第 1 節 2.1 に従い操作した. ただし, 基準値濃度における試験において, 最終溶液中の 2,4-D 濃度が検量線の範囲外になることが予想されたため, 最終溶液の一定量をメタノールーギ酸 (1000+1) で 5 倍希釈してから測定した. ウィートストローは飼料分析基準第 6 章第 1 節 2.2 に従い操作した.

定量法の概要を Scheme 1 に, LC-MS/MS の測定条件を Table 1 及び 2 に示した.

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Atlantis T3 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 µm), Waters
Mobile phase	5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution – 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution (70:30) → 10 min → (0:100) (hold for 10 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Injection amount	5 µL
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI) (Negative ion mode)
Source temperature	150 °C
Desolvation gas	N ₂ (800 L/h, 400 °C)
Capillary voltage	Negative ion 0.6 kV
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.2 mL/min)

Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)		
Pymetrozine	218	105	-	35	20
		-	78	35	40

なお, 加水分解により 2,4-D エチルは 2,4-D になることから, 2,4-D エチルを添加して添加回収試験を行った際の回収率の計算は, 検量線から求めた試料中の 2,4-D 量を次式により 2,4-D エチル量に換算し, 添加した 2,4-D エチルの試料中濃度で除してその割合を求めることにより行った.

試料中の 2,4-D エチル量 = $A \times 249.1 / 221.0$

A : 検量線から求めた試料中の 2,4-D 量

Sample 10 g (300 mL of Erlenmeyer flask)

- added 20 mL of water (grass hay: 30 mL) and allowed to stand for 30 min
- added 5 mL of HCl (4 mol/L) and 100 mL of acetone (grass hay: 120 mL) and shaken for 30 min
- filtrated with suction filter (No. 5B of JIS P 3801) under reduced pressure
- washed with 50 mL of acetone
- filled up 200 mL with acetone
- diluted sample solution of grass hay 500-fold with acetone

8 mL of sample solution

Liquid-liquid partition I (300 mL of separatory funnel)

- added 100 mL of sodium chloride solution (10 % (w/v))
- added hexan-ethyl acetate (1:1) and shaken for 5 min (two times: 100 mL and 50 mL)
- put hexan-ethyl acetate layer into 300 mL of Erlenmeyer flask
- added sodium sulfate
- filtered through filter paper (No. 5A of JIS P 3801)
- evaporated to dryness under 40 °C
- dissolved in 2 mL of methanol

Hydrolysis reaction

- added 1 mL of NaOH (1.5 mol/L)
- refluxed in water bath (80 °C) for 30 min
- adjusted pH to 7.5~8.0 with HCl (1.5 mol/L)
- added 16 mL of sodium bicarbonate solution (0.1 % (w/v))

Mega Bond Elut C18 cartridge

- washed with 10 mL of methanol and 10 mL of water
- applied sample solution
- eluted with 20 mL of sodium bicarbonate solution (0.1 % (w/v))-methanol (1:1)

Liquid-liquid partition II (300 mL of separatory funnel)

- added 5 mL of HCl (4 mol/L) and 100 mL of sodium chloride solution (10 % (w/v))
- applied sample solution
- added diethyl ether and shaken for 5 min (two times: 50 mL)
- put diethyl ether layer into 200 mL of Erlenmeyer flask
- added sodium sulfate
- filtered through filter paper (No. 5A of JIS P 3801)
- evaporated to dryness under 40 °C
- dissolved in 5 mL of acetonitrile-toluene (3:1)

InertSep GC/PSA cartridge

- washed with 10 mL of acetonitrile-toluene (3:1)
- applied sample solution
- washed with 5 mL of acetonitrile-toluene (3:1)
- eluted with 30 mL of acetonitrile-toluene-formic acid (75:25:1)
- evaporated to dryness under 40 °C
- dissolved in 1.0 mL of methanol-formic acid (1000:1)
- diluted sample solutions of orts, barley, wheat, milo and rye, to which the reference concentration has been spiked, 5-fold with methanol-formic acid (1000:1)

LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for 2,4-D in grains and grass hay

2.5 添加回収試験

2.2 の 3), 4), 6) 及び 7) の添加用 2,4-D 標準液又は添加用 2,4-D エチル標準液を添加に用いた。試料への標準液の添加は、試料 1 点につき添加用 2,4-D 標準液又は添加用 2,4-D エチル標準液のいずれか一方のみを添加することで行った。

2,4-D として、えん麦、小麦、マイロ及びライ麦に 2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2,4-D として 160 ng/mL）、大麦に 0.01 及び 2 mg/kg 相当量（同 4 及び 160 ng/mL）、ウィートストローに 5 及び 400 mg/kg 相当量（同 4 及び 320 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に 2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

また、2,4-D エチルとして、えん麦、小麦、マイロ及びライ麦に 2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2,4-D として 142 ng/mL）、大麦に 0.01 及び 2 mg/kg 相当量（同 3.55 及び 142 ng/mL）、ウィートストローに 5 及び 400 mg/kg 相当量（同 3.55 及び 284 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に 2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

3 結果及び考察

3.1 添加回収試験

2.5 により、改正後の基準値濃度及び定量下限濃度での添加回収試験を実施した。その結果は Table 3 及び 4 のとおり、2,4-D については平均回収率は 87.1~100 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 7.3 % 以下、2,4-D エチルについては平均回収率は 81.2~93.0 %、 RSD_r は 8.4 % 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。）に定められた目標値（真度：70 % 以上 120 % 以下、精度：0.01 mg/kg では 22 % 以下、2 mg/kg では 14 % 以下、5 mg/kg では 12 % 以下、400 mg/kg では 6.4 % 以下）を満たす結果であった。なお、得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

Table 3 Recoveries for 2,4-D

Spiked level (mg/kg)	Oats		Barley		Wheat		Milo	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.01	—	—	100	7.2	—	—	—	—
2	89.4	1.4	87.1	1.3	89.0	6.3	91.8	2.8
5	—	—	—	—	—	—	—	—
400	—	—	—	—	—	—	—	—

Spiked level (mg/kg)	Rye		Wheat straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.01	—	—	—	—
2	91.1	2.2	—	—
5	—	—	96.8	7.3
400	—	—	93.6	2.5

— : Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 4 Recoveries for 2,4-D ethyl

Spiked level (mg/kg)	Oats		Barley		Wheat		Milo	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.01	—	—	89.2	8.4	—	—	—	—
2	84.2	3.0	93.0	3.2	82.5	2.3	81.2	2.1
5	—	—	—	—	—	—	—	—
400	—	—	—	—	—	—	—	—

Spiked level (mg/kg)	Rye		Wheat straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.01	—	—	—	—
2	85.1	3.2	—	—
5	—	—	81.5	8.3
400	—	—	81.4	2.7

— : Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

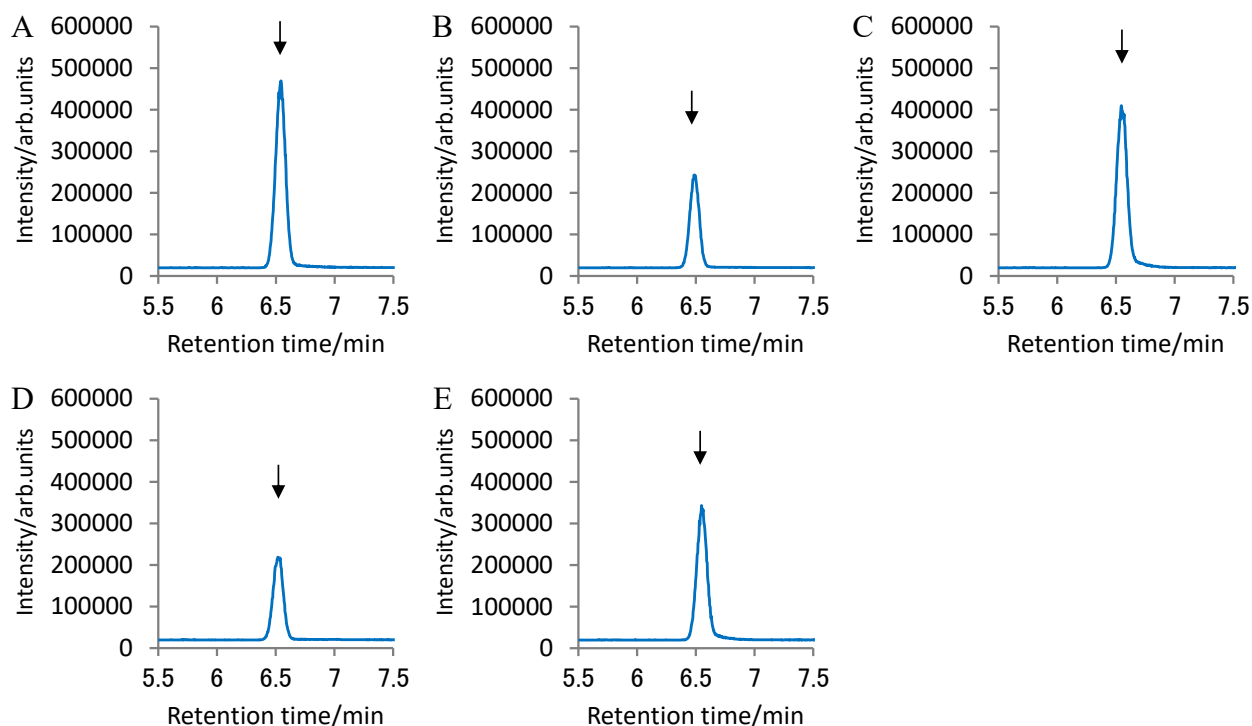


Fig. 2 Typical selected reaction monitoring chromatograms of 2,4-D in standard and spiked sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the peak of 2,4-D)

A: Standard solution (300 ng/mL of 2,4-D (1.5 ng as injection amount))

B: Sample solution of barley (spiked at 2 mg/kg of 2,4-D (0.8 ng as injection amount))

C: Sample solution of wheat straw (spiked at 400 mg/kg of 2,4-D (1.6 ng as injection amount))

D: Sample solution of barley (spiked at 2 mg/kg of 2,4-D ethyl (0.8 ng as injection amount))

E: Sample solution of wheat straw (spiked at 400 mg/kg of 2,4-D ethyl (1.6 ng as injection amount))

4 まとめ

穀類及び牧草中に残留する 2,4-D 及び 2,4-D エチルについて、添加回収試験を実施したところ、以下の結果が得られ、飼料分析基準に収載されている分析法の基準値濃度及び定量下限濃度における妥当性が確認された。

- 1) 2,4-D 及び 2,4-D エチルとして、えん麦、小麦、マイロ及びライ麦に 2 mg/kg 相当量、大麦に 0.01 及び 2 mg/kg 相当量、ウィートストローに 5 及び 400 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及び併行精度の目標値を満たす結果が得られた。

文 献

- 1) 食品安全委員会農薬専門調査会：2,4-D 農薬評価書，平成 29 年 12 月 (2017)。
- 2) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976)。
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，令和 5 年 12 月 1 日，5 消安第 4714 号 (2023)。

精度管理**1 令和 7 年度飼料等の共通試料による分析鑑定について****Proficiency Test (Fiscal Year 2025)**

倉島 ちなみ^{*1}, 有田 桜子^{*2}, 林 駿太^{*3},
山下 奈々^{*4}, 安藤 千咲^{*5}, 菊田 千乃^{*6}

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・・・中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・・・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 7 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 7 年 6 月 19 日及び 6 月 20 日

3.2 調製場所

独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

3.3 調製方法**1) A 試料**

目開き 1 mm の網スクリーンを装着した粉砕機で粉砕した中すう育成用配合飼料約 80 kg を用い, 以下の手順により試料を調製した。

試料をよく混合した後, 9 等分した。その中の 4 区画を一つに合わせてよく混合した後, 4 等分して元に戻した。この操作を表 1 の混合区画表により 7 回繰り返した後, 各区画より一定量（約 20 g）とり別の袋に入れ, 1 袋当たり約 180 g 入りの試料 310 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, 現 農薬検査部

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター, 現 農林水産省消費・安全局

^{*4} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

^{*5} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター, 現 肥飼料安全検査部

^{*6} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター, 現 農林水産省消費・安全局

表 1 混合区画表

回 数	I	II	III	IV	V	VI	VII
	5	6	7	7	2	8	2
区画番号	2	3	8	6	4	6	5
	9	1	1	9	3	1	4
	4	8	5	3	9	7	3

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（総量約 70 kg）を同表の混合割合で混ぜ合わせた試料を用い、A 試料と同様に 1 袋当たり約 180 g 入りの試料 310 個を調製した。

表 2 C 試料の原料及びその混合割合

原 料 名	混合割合 (%)	原 料 名	混合割合 (%)
とうもろこし	30	ビートパルプ	8
小麦	20	玄米	3
大豆油かす	10	肉骨粉	3
なたね油かす	10	食塩	3
DDGS	10	炭酸カルシウム	3

3) D 試料

子豚育成用プレミックス 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 310 個を調製した（混合については表 1 の混合区画表 IV~VII の 4 回繰り返した.）。

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（SL）

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 7 年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領」（68 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	17.42	17.46	5.04	5.25	28.67	29.19	34.82	35.09
2	17.19	17.38	5.13	5.32	29.03	28.67	34.11	35.93
3	17.38	17.39	5.06	5.12	29.10	28.98	34.65	34.65
4	17.07	17.19	5.14	5.14	28.87	28.26	35.36	36.09
5	17.10	17.51	5.12	5.37	28.44	29.25	37.16	35.02
6	17.08	17.39	5.12	5.35	28.51	28.06	37.16	36.31
7	17.29	17.53	5.04	5.03	28.85	28.69	35.17	35.79
8	17.38	17.59	5.09	5.26	29.10	29.34	36.26	36.32
9	17.26	17.23	5.04	5.11	28.47	28.21	36.94	35.88
10	17.49	17.41	5.08	5.22	28.86	29.06	35.64	35.26

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 $V=S/\varphi$	分散比 $F_0=V_A/V_E$	F境界値 $F(\alpha=0.05)$
A試料	試料間 A	0.2374	9	0.0264	1.25	3.02
	粗たん白質 分析誤差 E	0.2110	10	0.0211		
	総計 T	0.4483	19			
	A	0.0901	9	0.0100	0.79	3.02
	粗灰分 E	0.1264	10	0.0126		
	T	0.2165	19			
D試料	A	1.6209	9	0.1801	1.95	3.02
	銅 E	0.9216	10	0.0922		
	T	2.5425	19			
	A	8.5928	9	0.9548	1.76	3.02
	亜鉛 E	5.4306	10	0.5431		
	T	14.0234	19			

6 参加試験室

6.1 参加試験室総数及びその内訳

総数 204

うち 飼料製造業者関係…135

飼料添加物製造業者関係…12

民間分析機関等…17

飼料検査指導機関…40

6.2 試料別参加試験室数

A 試料…203

C 試料…104

D 試料…81

7 分析成績及び解析結果並びに鑑定成績

以下，A 試料の試料番号を試験室番号とした．

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，その分布を図 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)

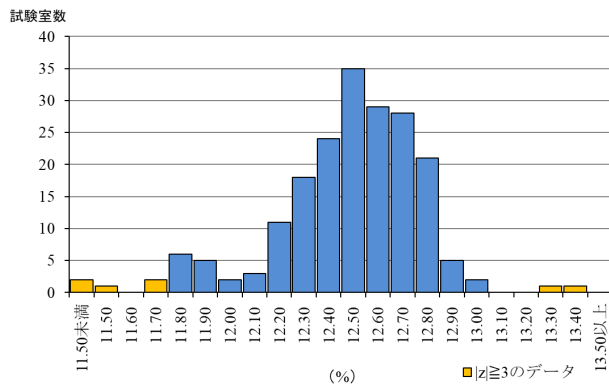
試験 室番 号	A試料			粗たん白質			粗脂肪			粗繊維			粗灰分			カルシウム			リン			SL(管理分析法)			SL(飼料分析基準)			銅			重鉛			クエン酸モランテル		
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/力価) / t	No. z-score	分析値 (g/力価) / t	No. z-score	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	12.55	1 -0.04	4.02	1 -0.06	3.16	3 -0.38	4.98	1 -3.86	1.048	2 -0.45	0.584	1 -1.01	44.8	3 -0.22	28.18	1 -0.24	35.28	1 -0.45	21.0	1 1.07																
4	12.61	1 0.20	4.00	1 -0.20	3.66	3 1.22	5.51	1 0.89	1.111	2 0.84	0.570	1 -2.19	5.38	1 -0.26	1.111	2 0.84	1.111	2 0.84	0.570	1 -2.19																
5	12.81	1 1.02	4.20	1 1.16	4.21	1 1.22	4.21	1 1.22	3.42	2 0.44	5.02	1 -3.50	5.44	1 0.26	3.42	2 0.44	5.02	1 -3.50	5.44	1 0.26																
6	11.95	1 -2.49	4.21	1 1.22	4.08	1 0.34	4.08	1 0.34	3.13	2 -0.48	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26	3.13	2 -0.48	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26																
7	12.42	1 -0.57	4.08	1 0.34	4.02	1 -0.06	4.02	1 -0.06	3.32	3 0.12	5.45	1 0.35	5.45	1 0.35	3.32	3 0.12	5.45	1 0.35	5.45	1 0.35																
10	12.70	1 0.57	4.02	1 -0.06	4.10	1 0.47	4.10	1 0.47	3.18	4 -0.32	5.34	1 -0.62	5.34	1 -0.62	3.18	4 -0.32	5.34	1 -0.62	5.34	1 -0.62																
11	12.76	1 0.81	4.18	1 1.02	4.00	1 -0.20	4.00	1 -0.20	3.64	3 1.15	5.40	1 -0.08	5.40	1 -0.08	3.64	3 1.15	5.40	1 -0.08	5.40	1 -0.08																
12	12.35	1 -0.85	4.18	1 1.02	3.84	2 -1.29	3.84	2 -1.29	3.39	3 0.35	5.58	1 1.52	5.58	1 1.52	3.39	3 0.35	5.58	1 1.52	5.58	1 1.52																
15	12.62	1 0.24	4.00	1 -0.20	4.16	1 0.88	4.16	1 0.88	3.42	3 0.44	5.39	1 -0.17	5.39	1 -0.17	3.42	3 0.44	5.39	1 -0.17	5.39	1 -0.17																
16	12.49	1 -0.28	3.84	2 -1.29	4.00	1 -0.20	4.00	1 -0.20	3.42	3 0.44	5.39	1 -0.17	5.39	1 -0.17	3.42	3 0.44	5.39	1 -0.17	5.39	1 -0.17																
18	11.55	1 -4.12	4.16	1 0.88	4.00	1 -0.20	4.00	1 -0.20	3.89	3 1.95	5.46	1 0.44	5.46	1 0.44	3.89	3 1.95	5.46	1 0.44	5.46	1 0.44																
19	12.47	1 -0.36	4.17	1 0.95	3.89	3 1.95	5.46	1 0.44	3.09	2 -0.61	5.30	1 -0.98	5.30	1 -0.98	3.09	2 -0.61	5.30	1 -0.98	5.30	1 -0.98																
20	12.57	1 0.04	4.17	1 0.95	4.04	1 0.44	4.04	1 0.44	4.01	3 2.34	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26	4.01	3 2.34	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26																
22	12.59	1 0.12	3.89	2 -0.95	4.17	1 0.95	4.17	1 0.95	3.85	2 -1.22	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26	3.85	2 -1.22	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26																
23	12.67	1 0.44	4.17	1 0.95	3.85	2 -1.22	3.85	2 -1.22	3.96	2 -0.47	6.08	1 6.02	6.08	1 6.02	3.96	2 -0.47	6.08	1 6.02	6.08	1 6.02																
24	12.67	1 0.44	4.10	1 0.47	4.10	1 0.47	4.10	1 0.47	4.01	3 2.34	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26	4.10	1 0.47	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26																
25	12.60	1 0.16	4.04	1 0.06	4.04	1 0.06	4.04	1 0.06	2.79	1 -1.57	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26	4.04	1 0.06	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26																
27	12.31	1 -1.02	4.30	1 1.84	4.30	1 1.84	4.30	1 1.84	3.51	3 0.73	5.27	1 -1.25	5.27	1 -1.25	4.30	1 1.84	5.27	1 -1.25	5.27	1 -1.25																
28	12.66	1 0.40	4.10	1 0.47	3.51	3 0.73	3.51	3 0.73	4.01	3 2.34	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26	3.51	3 0.73	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26																
29	12.79	1 0.94	4.04	1 0.06	17.27	4 -0.93	17.27	4 -0.93	4.01	1 -0.13	5.47	1 0.53	5.47	1 0.53	4.01	1 -0.13	5.47	1 0.53	5.47	1 0.53																
29			4.30	1 1.84	17.34	4 -0.58	17.34	4 -0.58	4.01	1 -0.13	5.47	1 0.53	5.47	1 0.53	4.01	1 -0.13	5.47	1 0.53	5.47	1 0.53																
30	12.94	1 1.55	4.30	1 1.84	17.54	3 0.39	17.54	3 0.39	4.01	1 -0.13	5.47	1 0.53	5.47	1 0.53	4.01	1 -0.13	5.47	1 0.53	5.47	1 0.53																
31	12.53	1 -0.12	4.01	1 -0.13	17.47	3 0.04	17.47	3 0.04	4.01	1 -0.13	5.47	1 0.53	5.47	1 0.53	4.01	1 -0.13	5.47	1 0.53	5.47	1 0.53																
32	12.87	1 1.26	4.01	1 -0.13	17.28	3 -0.88	17.28	3 -0.88	4.01	1 -0.20	5.40	1 -0.08	5.40	1 -0.08	4.01	1 -0.20	5.40	1 -0.08	5.40	1 -0.08																
33	12.34	1 -0.89	4.00	1 -0.20	17.57	3 0.53	17.57	3 0.53	4.02	2 -0.06	5.40	1 -0.08	5.40	1 -0.08	4.00	1 -0.20	5.40	1 -0.08	5.40	1 -0.08																
34	12.85	1 1.18	4.80	1 5.25	17.63	3 0.83	17.63	3 0.83	2.70	2 -1.86	5.32	1 -0.80	5.32	1 -0.80	4.80	1 5.25	5.32	1 -0.80	5.32	1 -0.80																
36	12.00	1 -2.28	3.75	2 -1.91	3.75	2 -1.91	3.75	2 -1.91	3.25	3 -0.09	5.77	1 3.23	5.77	1 3.23	3.75	2 -1.91	5.77	1 3.23	5.77	1 3.23																
38	12.72	1 0.65	3.91	1 -0.81	16.81	2 -3.18	16.81	2 -3.18	3.25	3 -0.09	5.77	1 3.23	5.77	1 3.23	3.91	1 -0.81	5.77	1 3.23	5.77	1 3.23																
39	12.91	1 1.43	3.93	2 -0.68	17.17	3 -1.42	17.17	3 -1.42	2.72	2 -1.79	5.46	1 0.44	5.46	1 0.44	3.93	2 -0.68	5.46	1 0.44	5.46	1 0.44																
40	12.80	1 0.98	4.08	1 0.34	17.44	3 -0.09	17.44	3 -0.09	2.72	2 -1.79	5.46	1 0.44	5.46	1 0.44	4.08	1 0.34	5.46	1 0.44	5.46	1 0.44																
41	12.46	1 -0.40	4.08	1 0.34	17.98	3 2.55	17.98	3 2.55	3.34	3 0.19	5.37	1 -0.35	5.37	1 -0.35	4.08	1 0.34	5.37	1 -0.35	5.37	1 -0.35																
42	11.90	1 -2.69	4.25	2 1.50	17.10	3 -1.76	17.10	3 -1.76	3.17	2 -0.35	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26	4.25	2 1.50	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26																
43	12.45	1 -0.44	4.00	2 -0.20	17.17	4 -1.42	17.17	4 -1.42	3.34	3 0.19	5.37	1 -0.35	5.37	1 -0.35	4.00	2 -0.20	5.37	1 -0.35	5.37	1 -0.35																
44	11.75	1 -3.31	3.86	1 -1.16	17.41	3 -0.24	17.41	3 -0.24	3.17	2 -0.35	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26	3.86	1 -1.16	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26																
45	12.69	1 0.53	3.45	1 -3.96	17.41	3 -0.24	17.41	3 -0.24	2.81	2 -1.50	5.38	1 -0.26	5.38	1 -0.26	3.45	1 -3.96	5.38	1 -0.26	5.38	1 -0.26																
46	12.72	1 0.65	4.09	2 0.40	17.41	3 -0.24	17.41	3 -0.24	3.23	3 -0.16	5.48	1 0.62	5.48	1 0.62	4.09	2 0.40	5.48	1 0.62	5.48	1 0.62																
48	13.00	1 1.79	4.44	1 2.80	17.79	1 1.61	17.79	1 1.61	3.16	2 -0.38	5.38	1 -0.26	5.38	1 -0.26	4.44	1 2.80	5.38	1 -0.26	5.38	1 -0.26																
50			3.92	2 -0.75	17.70	2 1.17	17.70	2 1.17	3.16	2 -0.38	5.38	1 -0.26	5.38	1 -0.26																						
51	12.55	1 -0.04	17.37	3 -0.44	17.37	3 -0.44	17.37	3 -0.44	3.16	2 -0.38	5.38	1 -0.26	5.38	1 -0.26	17.37	3 -0.44	5.38	1 -0.26	5.38	1 -0.26																
			3.92	2 -0.75	17.37	3 -0.44	17.37	3 -0.44	3.16	2 -0.38	5.38	1 -0.26	5.38																							

表5 A及びD試料の分析成績 (3)

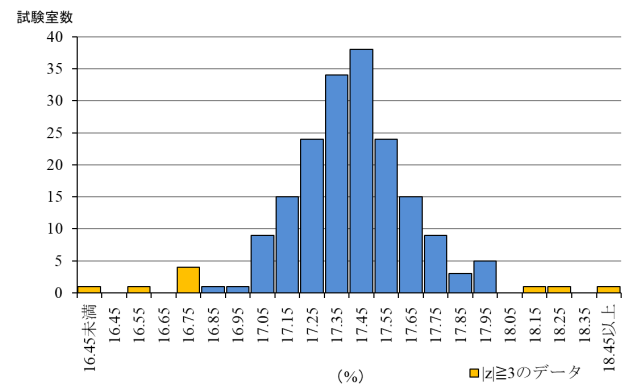
試験 番号	A試料			D試料												
	水分 分析値 (%)	No. z-score	粗たん白質 分析値 (%)	粗脂肪 分析値 (%)	粗繊維 分析値 (%)	粗灰分 分析値 (%)	カルシウム 分析値 (%)	リン 分析値 (%)	SL(管理分析法) 分析値 (g(力価)/t)	SL(飼料分析基準) 分析値 (g(力価)/t)	銅 分析値 (g/kg)	No. z-score	亜鉛 分析値 (g/kg)	No. z-score	クエン酸モナシ 分析値 (g/kg)	No. z-score
128	12.78	1 0.89	17.32	3 -0.68	4.10	2 0.47	3.48	3 0.64	5.39	1 -0.17	0.964	2 -2.19	0.534	1 -5.22		
130	12.30	1 -1.06	17.24	2 -1.07	4.13	1 0.68										
132	12.46	1 -0.40	17.95	3 2.40	4.12	1 0.61	2.86	2 -1.34	5.25	1 -1.43						
133	12.48	2 -0.32	17.42	3 -0.19					5.27	2 -1.25						
134	12.53	1 -0.12	17.48	3 0.09	3.87	1 -1.09	3.31	2 0.09	5.43	1 0.17						
138	12.85	1 1.18	17.29	3 -0.83	3.97	2 -0.40			5.44	1 0.26					43.8	3 -0.96
140	12.73	1 0.69	17.55	3 0.44	4.06	1 0.20			5.45	1 0.35	1.134	2 1.32	0.572	1 -2.02		
141	11.83	1 -2.98							4.87	1 -4.85						
142	12.63	1 0.28	17.46	3 0.00	4.06	2 0.20	3.28	3 0.00	5.44	1 0.26	1.047	1 -0.47	0.604	1 0.67	27.30	1 -1.28
145	12.51	1 -0.20							5.39	1 -0.17						
146	12.38	1 -0.73	17.39	3 -0.34					5.27	1 -1.25	0.535	3 -11.06	0.304	2 -24.61		
148	12.79	1 0.94	17.42	3 -0.19	3.92	1 -0.75	5.46	1 0.44	5.46	1 0.44						
150	12.56	1 0.00	17.46	3 0.00	4.06	2 0.20	3.37	2 0.28	5.41	1 0.00	0.948	2 -2.52	0.572	1 -2.02		
151	12.83	1 1.10	17.20	2 -1.27	3.63	2 -2.73	2.50	3 -2.50	5.70	1 2.60	1.110	2 0.82	0.590	1 -0.50	27.88	1 -0.60
152	12.73	1 0.69	17.50	3 0.19	3.85	2 -1.22			5.19	1 -1.97	1.064	2 -0.12	0.575	1 -1.77		
153	12.50	1 -0.24	17.34	3 -0.58	4.13	1 0.68	3.20	1 -0.25	5.56	1 1.34	1.046	3 -0.49	0.597	2 0.08	30.05	2 1.96
156	12.24	1 -1.30	17.49	3 0.14	3.99	2 -0.27	3.73	2 1.44	5.49	1 0.71	1.029	2 -0.84	0.586	1 -0.84	28.16	1 -0.27
157	12.90	1 1.38	17.37	2 -0.44	4.14	1 0.75	3.09	2 -0.61	5.32	1 -0.80	1.018	1 -1.07	0.572	1 -2.02	34.14	1 -1.20
158	12.39	1 -0.69	17.34	3 -0.58	3.94	2 -0.61			5.62	1 1.88	1.073	2 0.06	0.604	1 0.67	29.32	1 1.10
159	12.20	1 -1.47	17.53	3 0.34			3.76	2 1.54	5.51	1 0.89					33.69	1 -1.50
163	12.59	1 0.12	17.40	3 -0.29					5.19	1 -1.97	48.9	2 0.37				
164	12.32	1 -0.98	17.54	3 0.39	3.97	2 -0.40			5.51	1 0.89	1.043	2 -0.55	0.593	1 -0.25	35.35	1 -0.40
167	12.62	1 0.24			4.30	1 1.84	2.99	1 -0.93	5.45	1 0.35	1.106	2 0.74	0.609	1 1.09		
168	12.78	1 0.89	17.80	3 1.66												
169									5.36	1 -0.44	1.053	2 -0.35	0.610	1 1.18		
170	12.72	1 0.65			2.75	2 -1.70			5.40	1 -0.08					32.88	1 -2.04
171	12.73	1 0.69	17.37	3 -0.44					5.21	1 -1.79					36.15	1 0.12
173	12.38	1 -0.73	17.23	4 -1.12	3.90	1 -0.88	2.98	4 -0.96	5.24	1 -1.52					27.92	1 -0.55
174	12.54	1 -0.08	17.48	3 0.09	3.83	2 -1.36	4.50	2 3.91	5.45	1 0.35	1.060	2 -0.20	0.570	1 -2.19	29.31	1 1.08
175	12.28	1 -1.14	17.38	3 -0.39					5.35	1 -0.53						
176	12.76	1 0.81	17.62	3 0.78	3.86	2 -1.16			5.35	1 -0.53	1.055	1 -0.31	0.603	1 0.59	32.23	1 -2.47
177	12.80	1 0.98	17.24	3 -1.07	3.98	2 -0.34			5.20	1 -1.88	1.078	2 0.16	0.586	1 -0.84	21.7	1 2.02
178																
179	12.56	1 0.00	17.10	3 -1.76	4.09	1 0.40	3.10	2 -0.57	5.39	1 -0.17	1.105	2 0.72	0.592	1 -0.33	28.50	1 0.13
181	12.70	1 0.57	17.65	3 0.93	4.16	1 0.88			5.29	1 -1.07	1.090	2 0.41	0.618	1 1.85	28.89	1 0.59
182	12.88	1 1.30	17.44	3 -0.09	4.09	2 0.40	3.91	3 2.02	5.31	1 -0.89						
183	12.66	1 0.40	17.61	3 0.73	3.81	2 -1.50	3.28	2 0.00	5.44	1 0.26	1.106	1 0.74	0.598	1 0.16		
185	12.78	1 0.89	17.19	1 -1.32	4.12	1 0.61			5.53	1 1.07			0.613	1 1.43	45.2	3 0.07
187	12.53	1 -0.12	17.58	3 0.58	3.67	2 -2.45			5.38	1 -0.26						
188	12.59	1 0.12	17.42	3 -0.19	3.89	2 -0.95	3.77	3 1.57	5.26	1 -1.34	1.140	2 1.44	0.610	1 1.18	29.06	1 0.79
															36.40	1 0.29

表5 A及びD試料の分析成績 (5)

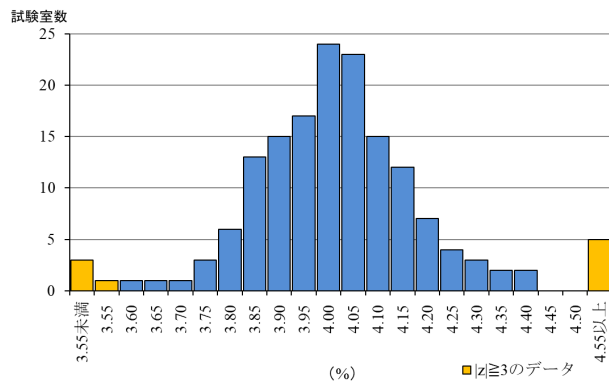
試験 番号	A試料			D試料																			
	水分 分析値 (%)	No. z-score	粗たん白質 分析値 (%)	No. z-score	粗脂肪 分析値 (%)	No. z-score	粗繊維 分析値 (%)	No. z-score	粗灰分 分析値 (%)	No. z-score	カルシウム 分析値 (%)	No. z-score	リン 分析値 (%)	No. z-score	SL(管理分析法) 分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	SL(飼料分析基準) 分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	銅 分析値 (g/kg)	No. z-score	亜鉛 分析値 (g/kg)	No. z-score	クエン酸モナテル 分析値 (g/kg)
250	12.50	1 -0.24	17.35	2 -0.53	4.14	1 0.75	3.31	3 0.09	5.49	1 0.71	1.025	2 -0.93	0.301	1 -24.87	45.9	3 0.59	27.40	1 -1.17	33.70	1 -1.50	21.2	1 1.34	
251	12.65	1 0.36	17.82	3 1.76	3.97	2 -0.40	3.31	3 0.09	5.42	1 0.08	1.035	2 -0.72	0.609	1 1.09	41.5	3 -2.66	22.32	1 -7.18	37.63	1 1.10			
252	12.89	1 1.34	17.20	3 -1.27	4.01	2 -0.13	3.53	3 0.80	5.29	1 -1.07	1.035	2 -0.72	0.609	1 1.09									
253	12.36	1 -0.81	17.20	3 -1.27	4.01	2 -0.13	3.53	3 0.80	4.83	1 -5.21	1.035	2 -0.72	0.609	1 1.09									
254	12.71	1 0.61	17.73	3 1.32	3.89	1 -0.95	5.42	1 0.08	5.42	1 0.08	1.123	2 1.09	0.590	1 -0.50	44.8	3 -0.22							
255	12.55	1 -0.04	17.31	3 -0.73	3.89	1 -0.95	5.38	1 -0.26	5.38	1 -0.26	1.123	2 1.09	0.590	1 -0.50									
256			17.58	4 0.58	3.53	2 -3.41																	
257	12.59	1 0.12	17.61	3 0.73	3.97	1 -0.40	3.53	3 0.80	5.38	1 -0.26	1.071	2 0.02	0.585	1 -0.92	49.4	3 3.17	27.39	1 -1.18	34.79	1 -0.77	22.8	1 3.50	
258	12.77	1 0.85	17.65	3 0.93	3.97	2 -0.40	3.51	2 0.73	5.37	1 -0.35	1.148	2 1.61	0.579	1 -1.43	28.56	1 0.20	27.87	1 -0.61	34.07	1 -1.25			
259	12.99	1 1.75	17.52	3 0.29	3.76	2 -1.84	3.00	2 -0.89	5.53	1 1.07	1.100	2 0.62	0.600	1 0.33					33.00	1 -1.96			
260	12.40	1 -0.65	17.42	3 -0.19	4.02	1 -0.06	5.01	1 -3.59	5.01	1 -3.59	1.100	2 0.62	0.600	1 0.33									
263	12.35	1 -0.85	17.80	3 1.66	3.15	2 -0.41	3.15	2 -0.41	5.43	1 0.17	1.018	2 -1.07	0.580	1 -1.34									
264	12.56	1 0.00	17.66	3 0.98	3.85	2 -1.22	3.35	3 0.22	5.39	1 -0.17	1.018	2 -1.07	0.580	1 -1.34									
265	12.53	2 -0.12	17.29	4 -0.83	3.94	1 -0.61	4.46	1 3.79	5.34	1 -0.62	1.018	2 -1.07	0.580	1 -1.34					37.37	1 0.93	19.5	1 -0.94	
266	11.89	1 -2.73	17.47	3 0.04	3.94	1 -0.61																	
267	12.64	1 0.32	16.98	2 -2.35	3.97	1 -0.40	3.85	3 1.83	5.63	1 1.97	0.787	2 -5.85	0.594	1 -0.16					39.14	1 2.11			
270	12.88	1 1.30	2.74	3 -72.20	4.40	1 2.52			5.05	1 -3.23													
271	12.63	1 0.28	17.47	3 0.04	4.16	2 0.88	5.44	1 0.26	5.44	1 0.26	1.091	2 0.43	0.607	1 0.92									
272	12.63	1 0.28	17.35	4 -0.53	3.97	1 -0.40	3.24	2 -0.12	5.58	1 1.52	1.091	2 0.43	0.607	1 0.92					28.13	1 -0.30	37.60	1 1.08	
273	11.42	1 -4.66	17.31	3 -0.73	4.13	1 0.68																	
274	12.60	1 0.16	17.39	3 -0.34	4.03	2 0.00	5.47	1 0.53	5.47	1 0.53	0.958	2 -2.31	0.617	1 1.77	47.6	3 1.84	26.91	1 -1.75					
276	12.74	1 0.73	17.37	3 -0.44	4.07	1 0.27	5.5	1 0.80	5.5	1 0.80	0.958	2 -2.31	0.617	1 1.77									
278	12.50	1 -0.24	17.81	3 1.71	3.94	2 -0.61	3.23	3 -0.16	5.34	1 -0.62	1.017	2 -1.09	0.587	1 -0.75	44.2	3 -0.66	28.48	1 0.10	36.86	1 0.59	20.3	1 0.13	
279	12.72	1 0.65	17.41	3 -0.24	3.94	2 -0.61	5.52	1 0.98	5.52	1 0.98	1.017	2 -1.09	0.587	1 -0.75	45.3	3 0.14	28.48	1 0.10	36.86	1 0.59	19.2	1 -1.34	
280	12.17	1 -1.59	17.31	2 -0.73	4.37	1 2.32	4.79	1 -5.57	5.21	1 -1.79	1.034	2 -0.74	0.608	1 1.01									
282	12.72	1 0.65	17.34	3 -0.58	4.09	1 0.40	3.46	2 0.57	5.21	1 -1.79	1.034	2 -0.74	0.608	1 1.01	49.1	1 0.46	29.17	1 0.92	35.96	1 0.00	19.8	1 -0.53	
283	12.44	1 -0.49	17.18	2 -1.37	4.34	1 2.11	2.52	2 -2.44	5.01	1 -3.59	1.197	1 2.62	0.588	1 -0.67									
284	12.66	1 0.40	17.74	3 1.37	4.05	2 0.13	5.47	1 0.53	5.47	1 0.53	1.083	1 0.26	0.597	1 0.08									
285	12.47	1 -0.36	17.38	3 -0.39	4.11	2 0.54	2.65	3 -2.02	5.35	1 -0.53	1.080	3 0.20	0.590	1 -0.50									
286	12.38	1 -0.73	17.42	2 -0.19	4.95	1 -4.13			4.95	1 -4.13													
287	12.70	1 0.57	17.40	3 -0.29	4.04	3 0.06	5.24	1 -1.52	5.24	1 -1.52	0.693	2 8.17											
288	12.16	1 -1.63	17.90	3 2.15	3.86	3 -1.16	7.73	1 14.29	5.19	1 -1.97	1.260	2 3.92	0.600	1 0.33	45.6	3 0.36	29.00	1 0.72	34.33	1 -1.08	20.7	1 0.67	
290	12.82	1 1.06	17.49	3 0.14	4.01	2 -0.13	3.71	3 1.38	5.47	1 0.53	1.260	2 3.92	0.600	1 0.33									
291	12.75	1 0.77	17.62	4 0.78	4.03	2 0.00	5.42	1 0.08	5.42	1 0.08	1.023	2 -0.97	0.598	1 0.16									
292	12.48	1 -0.32	17.71	3 1.22	3.96	2 -0.47	2.88	4 -1.28	5.52	1 0.98	1.023	2 -0.97	0.588	1 -0.67	44.4	3 -0.51	28.50	1 0.13	35.75	1 -0.13	19.8	1 -0.53	
293	12.48	1 -0.32	17.66	3 0.98	3.96	2 -0.47			5.49	1 0.71	1.086	2 0.33	0.597	1 0.08									
294	12.68	1 0.49	17.86	3 1.96	3.96	2 -0.47	5.40	1 -0.08	5.40	1 -0.08	1.086	2 0.33	0.597	1 0.08									
296	12.55	1 -0.04	17.08	1 -1.86	3.94	2 -0.61			5.49	1 0.71													
299	12.29	1 -1.10	17.92	3 2.25	3.94	2 -0.61	2.55	1 2.34	5.53	1 1.07	0.938	2 -2.72	0.594	1 -0.16					29.14	1 0.88	33.69	1 -1.50	



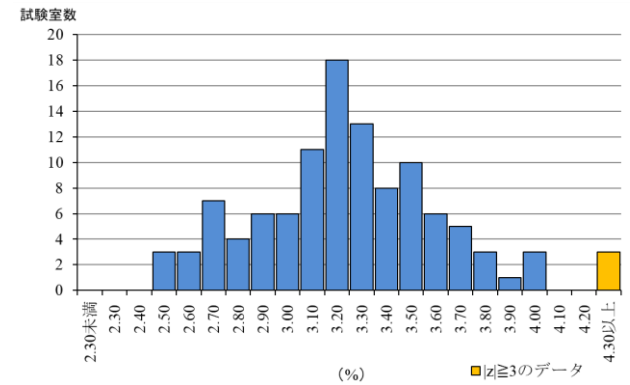
水分 (A 試料)



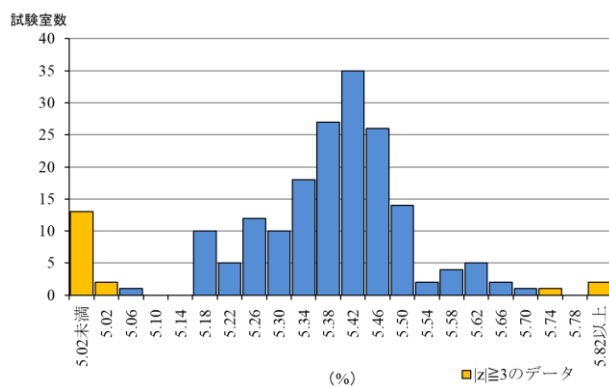
粗たん白質 (A 試料)



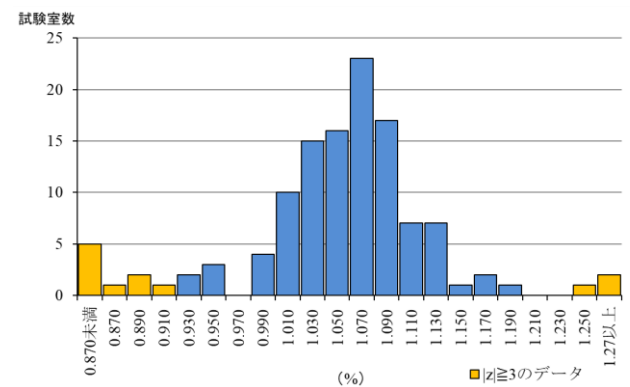
粗脂肪 (A 試料)



粗繊維 (A 試料)

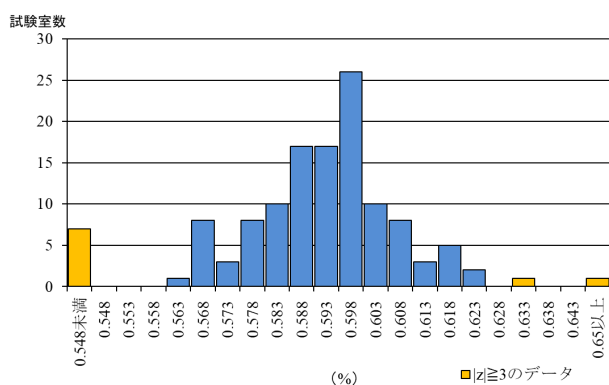


粗灰分 (A 試料)

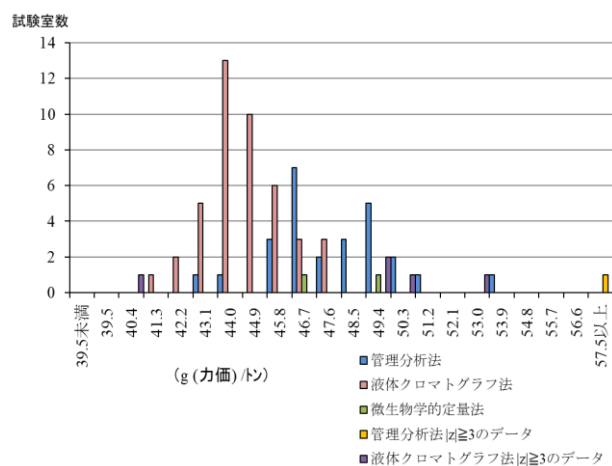


カルシウム (A 試料)

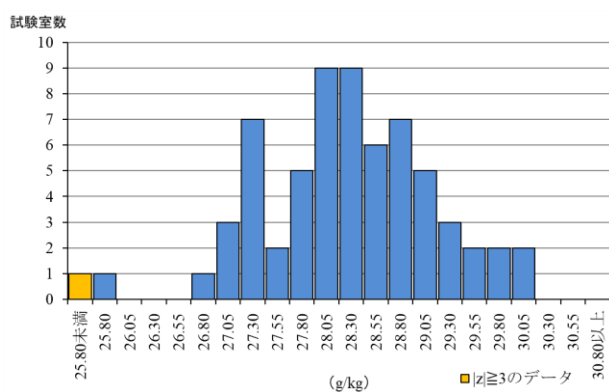
図1 分析成績の分布(1)



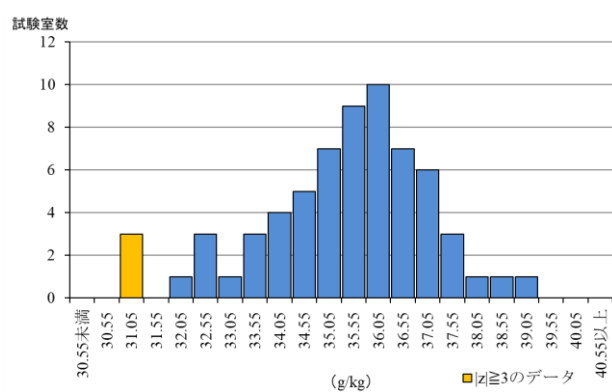
リン (A 試料)



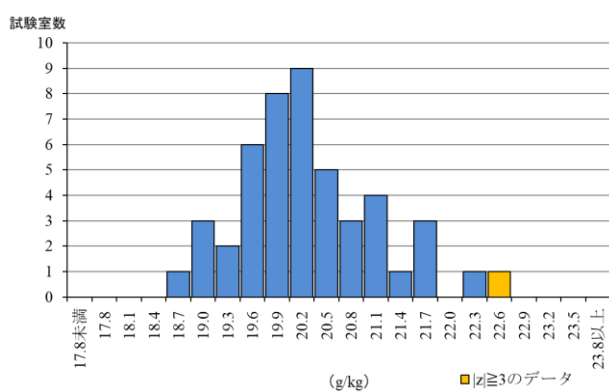
サリノマイシンナトリウム (A 試料)



銅 (D 試料)



亜鉛 (D 試料)



クエン酸モランテル (D 試料)

図 1 分析成績の分布 (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	196	187	158	110	190
1 中央値	12.56	17.46	4.03	3.28	5.41
下限境界値 ^{注2}	11.83	16.85	3.59	2.35	5.08
上限境界値	13.29	18.07	4.47	4.21	5.74
2 平均値	12.54	17.46	4.03	3.27	5.41
標準偏差	0.25	0.21	0.14	0.35	0.11
変動係数 (%)	2.0	1.2	3.6	10.6	2.0
95 %信頼区間	12.50~12.58	17.43~17.49	4.01~4.05	3.20~3.34	5.39~5.42

区 分	カルシウム (%)	リン (%)	SL (管理分析法) ^{注3} (g(力価)/トン)	SL (飼料分析基準) ^{注4} (g(力価)/トン)
データ数	120	127	27	48
1 中央値	1.070	0.596	48.1	45.1
下限境界値 ^{注2}	0.925	0.560	41.7	41.0
上限境界値	1.215	0.632	54.5	49.2
2 平均値	1.070	0.595	48.3	45.0
標準偏差	0.048	0.013	2.3	1.4
変動係数 (%)	4.5	2.2	4.8	3.1
95 %信頼区間	1.061~1.080	0.593~0.597	47.4~49.2	44.6~45.5

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

2 z -スコアの絶対値が3の境界値である。

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	65	65	47
1 中央値	28.39	35.96	20.2
下限境界値 ^{注2}	25.85	31.45	18.0
上限境界値	30.93	40.47	22.4
平均値	28.40	35.79	20.3
2 標準偏差	0.85	1.48	0.8
変動係数 (%)	3.0	4.1	3.9
95 %信頼区間	28.19~28.61	35.42~36.16	20.1~20.6

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

2 z -スコアの絶対値が 3 の境界値である。

表 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	
		多量 ^{注1}	中量 ^{注2}	少量 ^{注3}	計		
とうもろこし	30	104	0	0	104	0	100
小麦	20	43	35	13	91	13	88
大豆油かす	10	17	78	5	100	4	96
なたね油かす	10	7	82	9	98	6	94
DDGS	10	2	50	16	68	36	65
ビートパルプ	8	9	58	15	82	22	79
玄米	3	3	18	19	40	64	38
肉骨粉	3	0	9	66	75	29	72
食塩	3	0	2	100	102	2	98
炭酸カルシウム	3	0	2	77	79	25	76

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
精白米	1	23	29	53
りん酸カルシウム	0	0	20	20
コーングルテンミール	0	15	2	17
魚粉	0	0	16	16
大麦	6	5	2	13
米ぬか油かす	0	8	5	13
ふすま	1	9	3	13
マイロ	1	5	2	8
アルファルファミール	0	4	2	6
コーングルテンフィード	0	5	0	5
ごま油かす	0	3	2	5
あまに油かす	0	2	2	4
綿実油かす	0	0	4	4
キャッサバ	0	0	3	3
麦ぬか	0	1	2	3
ライ麦	1	0	2	3
小麦粉	0	1	1	2
サフラワー油かす	0	0	2	2
やし油かす	0	1	1	2
スクリーニングペレット	1	0	0	1
パイナップルかす	0	0	1	1
ビールかす	0	1	0	1
ホミニーフード	1	0	0	1

注 1 検出した原料の推定される混合割合が 15 %以上と報告されたもの。

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

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

8 各試料の解析結果及び鑑定成績

以下、分析法別の解析結果では、分析法別に分けたデータでロバスト法に基づく z -スコアを求め、その絶対値が 3 以上の分析値を異常値として棄却し、平均値、標準偏差及び変動係数を求めた。なお、分析法ごとに示している z -スコアの絶対値が 3 以上の数については、各分析項目の全データの解析から算出した数である。

8.1 A 試料（中すう育成用配合飼料）の解析結果

1) 水 分

分析値は 196 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 7 件であった。これらを除いた平均値は 12.54 %で、この 95 %信頼区間は 12.50~12.58 %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、193 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、標準偏差及び変動係数はそれぞれ 12.54 %、0.26 %及び 2.0 %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。

2) 粗たん白質

分析値は 187 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 17.46 %で、この 95 %信頼区間は 17.43~17.49 %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、8 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、標準偏差及び変動係数はそれぞれ 17.42 %、0.38 %及び 2.2 %であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法では、17 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び変動係数はそれぞれ 17.27 %、0.24 %及び 1.4 %であった。

飼料分析基準・燃焼法では、132 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、標準偏差及び変動係数はそれぞれ 17.50 %、0.19 %及び 1.1 %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 3 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び変動係数はそれぞれ 17.34 %、0.20 %及び 1.2 %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 158 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 9 件であった。これらを除いた平均値は 4.03 %で、この 95 %信頼区間は 4.01~4.05 %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、86 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び変動係数はそれぞれ 4.09 %、0.13 %及び 3.3 %であった。

自動分析機による方法では、69 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、標準偏差及び変動係数はそれぞれ 3.96 %、0.12 %及び 3.1 %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。

4) 粗繊維

分析値は 110 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件であった。これらを除いた平均値は 3.27 %で、この 95 %信頼区間は 3.20~3.34 %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、11 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、標準偏差及び変動係数はそれぞれ 3.21 %、0.56 %及び 17.6 %であった。

飼料分析基準・ろ過法では、56 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、標準偏差及び変動係数はそれぞれ 3.16 %、0.30 %及び 9.4 %であった。

自動分析機による方法では、39 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び変動係数はそれぞれ 3.47 %、0.26 %及び 7.5 %であった。

その他の方法では 4 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 18 件であった。これらを除いた平均値は 5.41 %で、この 95 %信頼区間は 5.39~5.42 %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18件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び変動係数はそれぞれ5.41%、0.11%及び2.0%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。

6) カルシウム

分析値は120件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が3以上のものは12件であった。これらを除いた平均値は1.070%で、この95%信頼区間は1.061~1.080%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、17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、標準偏差及び変動係数はそれぞれ1.098%、0.054%及び4.9%であった。

飼料分析基準・原子吸光光度法では、99件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは10件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び変動係数はそれぞれ1.064%、0.048%及び4.5%であった。

その他の方法では4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。

7) リン

分析値は127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0.595%で、この95%信頼区間は0.593~0.597%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、122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、標準偏差及び変動係数はそれぞれ0.595%、0.013%及び2.2%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2件）の報告があった。

8) サリノマイシンナトリウム

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

管理分析法（迅速定量法及びフローインジェクション法）では、分析値は27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48.3 g(力価)/トンで、この95%信頼区間が47.4~49.2 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48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。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

管理分析法・迅速定量法では、22件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは1件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び変動係数はそれぞれ47.9 g(力価)/トン、2.2 g(力価)/トン及び4.5%であった。

管理分析法・フローインジェクション法では、5件の報告があり（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは0件）、その平均値、標準偏差及び変動係数はそれぞれ48.9 g(力価)/トン、1.0 g(力価)/トン及び2.1%であった。

飼料分析基準・液体クロマトグラフ法では、48件の報告があり（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは5件）、その平均値、標準偏差及び変動係数はそれぞれ45.0 g(力価)/トン、1.4

g(力価)/トン及び 3.1 %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、48.5 g(力価)/トンであった。

8.2 D 試料（子豚育成用プレミックス）の解析結果

1) 銅

分析値は 65 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件であった。これらを除いた平均値は 28.40 g/kg で、この 95 %信頼区間は 28.19~28.61 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、62 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、標準偏差及び変動係数はそれぞれ 28.43 g/kg, 0.76 g/kg 及び 2.7 %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。

2) 亜鉛

分析値は 65 件の報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件であった。これらを除いた平均値は 35.79 g/kg で、この 95 %信頼区間は 35.42~36.16 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、63 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、標準偏差及び変動係数はそれぞれ 35.82 g/kg, 1.50 g/kg 及び 4.2 %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 47 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、標準偏差及び変動係数はそれぞれ 20.3 g/kg, 0.8 g/kg 及び 3.9 %であった。この 95 %信頼区間は 20.1~20.6 g/kg であった。

8.3 C 試料（鑑定用飼料原料混合試料）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。

104 件の報告があり、混合した原料以外に検出と報告があった原料は 23 種類であった。

混合した原料について、とうもろこし（混合割合 30 %）は、104 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 104 件、中量が 0 件、少量が 0 件であった。

小麦（混合割合 20 %）は、91 件（検出率 88 %）の報告があり、その内訳は多量が 43 件、中量が 35 件、少量が 13 件であった。

大豆油かす（混合割合 10 %）は、100 件（検出率 96 %）の報告があり、その内訳は多量が 17 件、中量が 78 件、少量が 5 件であった。

なたね油かす（混合割合 10 %）は、98 件（検出率 94 %）の報告があり、その内訳は多量が 7 件、中量が 82 件、少量が 9 件であった。

DDGS（混合割合 10 %）は、68 件（検出率 65 %）の報告があり、その内訳は多量が 2 件、中量が 50 件、少量が 16 件であった。

ビートパルプ（混合割合 8 %）は、82 件（検出率 79 %）の報告があり、その内訳は多量が 9 件、中量が 58 件、少量が 15 件であった。

玄米（混合割合 3 %）は、40 件（検出率 38 %）の報告があり、その内訳は多量が 3 件、中量が 18 件、少量が 19 件であった。

肉骨粉（混合割合 3 %）は、75 件（検出率 72 %）の報告があり、その内訳は多量が 0 件、中量が 9 件、少量が 66 件であった。

食塩（混合割合 3 %）は、102 件（検出 98 %）の報告があり、その内訳は多量が 0 件、中量が 2 件、少量が 100 件であった。

炭酸カルシウム（混合割合 3 %）は、79 件（検出率 76 %）の報告があり、その内訳は多量が 0 件、中量が 2 件、少量が 77 件であった。

誤って検出された原料としては、精白米が最も多く、53 件の報告があった。次いで、りん酸カルシウムが 20 件、コーングルテンミールが 17 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，令和 5 年 12 月 1 日，5 消安第 4714 号 (2023).

(参考)

令和 7 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…中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…子豚育成用プレミックス

※ 令和 7 年度以降、B 試料（魚粉）の分析は実施しません。

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」（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）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) 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 7 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。

報告書（様式）をダウンロードする際、FAMIC ホームページが暗号化に対応していないことにより、エラーが出ることがあります。エラーが出た際は、別添「FAMIC ホームページのファイル保存方法」を参照して保存してください。

- (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。チキンミールを検出した場合は肉骨粉を選択してください。

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7年9月30日（火）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わ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7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1日（水）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

TEL

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 ℃ 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)/トン	分析法	1 迅速定量法 2 フローインジェクション法 3 飼料分析基準（液体クロマトグラフ法） L C 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	g/kg	分析法	1 飼料分析基準 2 その他の方法
亜鉛	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	g/kg	分析法	1 飼料分析基準 測定条件 L C 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) 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ト
ホミニーフード	コーングルテンミール	あまに油かす	サフラワー油かす
なたね油かす	綿実油かす	やし油かす	ごま油かす
大豆油かす	DDGS	肉骨粉(牛, 豚, 鶏混合)	フェザーミール※
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

※チキンミールを検出した場合は肉骨粉を選択してください。

(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 7 年度）****Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (Fiscal Year 2025)**

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って、有害畜産物（家畜等の肉、乳、その他の食用に供される生産物で人の健康をそこなうおそれがあるもの）が生産され、又は家畜等に被害が生じることにより畜産物の生産が阻害されることを防止する見地から、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7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 7 年 4 月から令和 8 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収去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 59 成分のうちの 31 成分を対象とした。

イ ア以外の農薬

飼料分析基準に方法が規定されている農薬のうちの 26 成分を対象とした。

2) BSE 発生防止に係る成分

i 動物由来たん白質

成分規格等省令別表第 1 の 2 に規定された牛等を対象とする飼料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			不溶性不純物	サルモネラ	
顕微鏡鑑定	ELISA試験				PCR試験					
配合飼料	成鶏飼育用配合飼料	21	21	8	9					5
	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	2	2	1	1					1
	種鶏飼育用配合飼料	1	1							
	鶏数種用飼料(幼すう用、ブロイラー前期用を含まないもの)	1	1	1						1
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	2	1	2					
	子豚育成用配合飼料	3	2							1
	肉豚肥育用配合飼料	7	7	1	1					1
	種豚育成用配合飼料	3	3							
	種豚飼育用配合飼料	2	2	1	1					1
	豚数種用飼料(ほ乳期子豚用を含まないもの)	2	2							
	ほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料	1				1				
	若令牛育成用配合飼料	5	4	3	3	4	4	4		3
	乳用牛飼育用配合飼料	8	5	1	2	5	5	5		3
	幼令肉用牛育成用配合飼料	1	1							
	肉用牛肥育用配合飼料	15	9	3	4	10	10	10		2
	肉牛繁殖用配合飼料	5	1	2	2	5	5	5		2
	牛数種用飼料(ほ乳期子牛用及び乳用牛用を含むもの)	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)	4	2			2	2	2		
	牛数種用飼料(ほ乳期子牛用、乳用牛用を含まないもの)	2	2							
穀類	圧ぺんとうもろこし・アルファルファ二種混合飼料	1	1	1	1	1	1	1		1
	動物性たん白質混合飼料	1								1
	糖蜜吸着飼料	1				1	1	1		1
	上記以外の混合飼料等	17	2	2	2	17	17	17		7
	小計	108	72	25	28	46	45	45		30
	とうもろこし	41	41		41					
	グレインソルガム(マイロ)	1	1		1					
	大麦	11	11							
	小麦	7	7							
	末粉	1	1							
そうこう類	小計	61	61		42					
	米ぬか(米ぬか油かす)	6	6							
	コーングルテンフィード	23	23							
	とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル(DDGS)	6	6							
	ビールかす	3	3							
	ふすま	50	50							
	麦ぬか	4	4							
	小計	92	92							
植物性油かす類	コーングルテンミール	23	23							
	大豆油かす	18	18							
	なたね油かす	7	6							1
	小計	48	47							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	
						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	かび毒	重金属	農薬					
動物 質 性 飼 料	チキンミール	15		2						15
	豚鶏混合肉骨粉	9		1						9
	豚肉骨粉	1								1
	肉骨粉	6								6
	魚粉	12		4						12
小 計		43		7						43
乾 牧 草	アルファルファ	20	19	1	1					
	稲わら	1		1	1					
	オーチャードグラス	1		1	1					
	スーダングラス	1		1	1					
	チモシー	4		4	4					
	ライグラス	1		1	1					
小 計		28	19	9	9					
そ の 他	動物性油脂	49							49	
	特定動物性油脂	1							1	
	綿実	6	6							
	小 計	56	6						50	
合 計		436	297	41	79	46	45	45	50	74

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収載されている。

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。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。

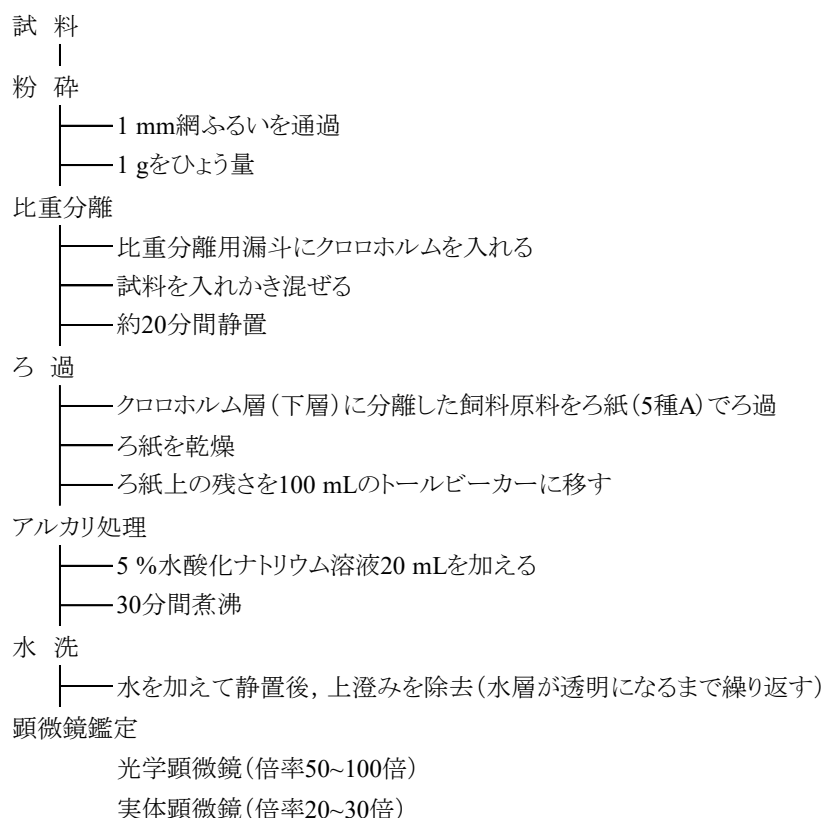


図 1 試料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

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 72 点，単体飼料 225 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 53 点からは検出されなかった。

とうもろこし 41 点中 4 点から検出され（検出率 10 %），最大値は 0.002 mg/kg，平均値は 0.001 mg/kg であり，管理基準値（0.02 mg/kg）を超えるものはなかった。

ii ゼアラレノン

配混合飼料 53 点全てから検出され，最大値は 0.090 mg/kg，平均値は 0.034 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 41 点中 40 点から検出され

（検出率 98 %），最大値は 0.25 mg/kg，平均値は 0.051 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 0.26 mg/kg（最大値 1.1 mg/kg），DDGS の平均値は 0.13 mg/kg（最大値 0.21 mg/kg）及びコーングルテンミールの平均値は 1.3 mg/kg（最大値 4.1 mg/kg）であった．

iii デオキシニバレノール

配混合飼料 53 点中 52 点から検出され（検出率 98 %），最大値は 1.1 mg/kg，平均値は 0.31 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 41 点中 40 点から検出され（検出率 98 %），最大値は 1.2 mg/kg と高く，平均値は 0.35 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 3.0 mg/kg（最大値 12 mg/kg），DDGS の平均値は 1.9 mg/kg（最大値 3.9 mg/kg）及びコーングルテンミールの平均値は 0.23 mg/kg（最大値 1.1 mg/kg）であった．

iv フモニシン

配混合飼料 53 点全てから検出され，最大値は 1.5 mg/kg，平均値は 0.37 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 41 点全てから検出され，最大値は 1.6 mg/kg と高く，平均値は 0.35 mg/kg であった．とうもろこしの加工副産物の定量値は，コーングルテンフィードの平均値は 0.29 mg/kg（最大値 0.81 mg/kg）及びコーングルテンミールの平均値は 1.8 mg/kg（最大値 6.3 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	7	0	0								
配混合飼料 (表外 ¹⁾ に示す飼料)	管 0.01	2	0	0			0.5	53	53	100	0.090	0.034
配混合飼料 (上記以外の配合飼料)	管 0.02	44	0	0								
全配混合飼料		53	0	0				53	53	100	0.090	0.034
とうもろこし	管 0.02	41	4	10	0.002	0.001	—	41	40	98	0.25	0.051
グレインソルガム (マイロ)	—	1	0	0			—	1	1	100	0.0007	0.0007
大麦	—	5	0	0			—	5	4	80	0.003	0.001
小麦	—	5	0	0			—	5	4	80	0.003	0.001
米ぬか (米ぬか油かす)	—	6	0	0			—	6	5	83	0.056	0.017
コーングルテンフィード	—	23	23	100			—	23	23	100	1.1	0.26
とうもろこしジスチラーズグレインソルベブル (DDGS)	—	6	0	0			—	6	6	100	0.21	0.13
ビールかす	—						—					
ふすま	—	8	0	0			—	8	7	88	0.01	0.003
麦ぬか	—						—					
コーングルテンミール	—	23	23	100			—	23	23	100	4.1	1.3
大豆油かす	—	9	1	11	0.001	0.001	—	9	9	100	0.018	0.006
なたね油かす	—						—					
綿実	—						—					
計		134	5	4				180	175	97		

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	23	23	100	1.1	0.37	4	53	53	100	1.5	0.37
配混合飼料 (上記以外の配合飼料)	1	30	29	97	0.9	0.27						
全配混合飼料		53	52	98	1.1	0.31		53	53	100	1.5	0.37
とうもろこし	—	41	40	98	1.2	0.35	—	41	41	100	1.6	0.35
グレインソルガム (マイロ)	—	1	1	100	0.035	0.035	—					
大麦	—	5	4	80	0.091	0.059	—					
小麦	—	5	2	40	0.043	0.030	—					
米ぬか (米ぬか油かす)	—	6	1	17	0.043	0.043	—					
コーングルテンフィード	—	23	23	100	12	3.0	—	23	22	96	0.81	0.29
とうもろこしジスチラーズグレインソルベブル (DDGS)	—	6	6	100	3.9	1.9	—					
ビールかす	—	3	0	0			—					
ふすま	—	8	6	75	0.15	0.11	—					
麦ぬか	—	4	4	100	0.27	0.17	—					
コーングルテンミール	—	23	22	96	1.1	0.23	—	23	23	100	6.3	1.8
大豆油かす	—	9	0	0			—					
なたね油かす	—	6	1	17	0.017	0.017	—					
綿実	—	6	1	17	0.024	0.024	—					
計		199	163	82				140	139	99		

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	134	0	0		
アフラトキシンG ₁	0.0003	134	0	0		
アフラトキシンG ₂	0.0003	134	0	0		
ステリグマトシスチン	0.0003	145	35	24	0.009	0.001
HT-2トキシン	0.002	185	60	32	0.044	0.015
T-2トキシン	0.003	185	67	36	0.065	0.010
ネオソラニオール	0.002	185	6	3	0.005	0.003
フザレノン-X	0.003	185	1	1	0.041	0.041
3-アセチルデオキシニバレノール	0.006	185	19	10	0.18	0.046
15-アセチルデオキシニバレノール	0.006	185	94	51	1.1	0.16
ニバレノール	0.002	185	98	53	0.19	0.025
ジアセトキシシルペノール	0.002	185	6	3	0.008	0.004
デオキシニバレノール-3-グルコシド	0.002	185	140	76	0.95	0.077
オクラトキシンA	0.0003	291	119	41	0.013	0.002
シトリニン	0.002	272	43	16	0.23	0.012
α -ゼアララノール	0.002	151	0	0		
β -ゼアララノール	0.002	151	2	1	0.003	0.003
ゼアララノン	0.002	151	25	17	0.028	0.009
α -ゼアラレノール	0.003	151	21	14	0.010	0.005
β -ゼアラレノール	0.003	151	33	22	0.023	0.009

*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）25 点、乾牧草等 9 点及び魚粉等（魚粉及び肉骨粉）7 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

配混合飼料 25 点中 8 点から検出され（検出率 32 %）、最大値は 0.10 mg/kg、平均値は 0.07 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 9 点中 3 点から検出され（検出率 33 %）、最大値は 0.08 mg/kg、平均値は 0.07 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 4 点全てから検出され、最大値は 2.1 mg/kg、平均値は 1.2 mg/kg であった。肉骨粉等 3 点からは検出されなかった。いずれも管理基準値（3 mg/kg）を超えるものはなかった。

ii 水銀

配混合飼料 25 点中 13 点から検出され（検出率 52 %）、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 9 点中 5 点から検出され（検出率 56 %）、最大値は 0.09 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 4 点全てから検出され，最大値は 0.67 mg/kg，平均値は 0.48 mg/kg であった。肉骨粉等 3 点全てから検出され，最大値は 0.25 mg/kg，平均値は 0.12 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。

iii 鉛

配混合飼料 25 点中 5 点から検出され（検出率 20 %），最大値は 0.5 mg/kg，平均値は 0.3 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 9 点中 1 点から検出され（検出率 11 %），その測定値は 0.4 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 4 点中 2 点から検出され（検出率 50 %），最大値は 0.5 mg/kg，平均値は 0.4 mg/kg であった。肉骨粉等中 3 点中 1 点から検出され（検出率 33 %），その測定値は 1.0 mg/kg であった。いずれも管理基準値（7 mg/kg）を超えるものはなかった。

iv ひ素

配混合飼料 25 点中 11 点から検出され（検出率 44 %），最大値は 0.41 mg/kg，平均値は 0.18 mg/kg であった。稲わらを除く乾牧草等 8 点中 2 点から検出され（検出率 25 %），最大値は 0.26 mg/kg，平均値は 0.24 mg/kg であった。いずれも管理基準値（2 mg/kg）を超えるものはなかった。また，稲わら 1 点の測定値は 2.4 mg/kg であり，管理基準値（7 mg/kg）を超えるものはなかった。

動物質性飼料では，魚粉 4 点全てから検出され，最大値は 7.8 mg/kg，平均値は 6.2 mg/kg であり，管理基準値（15 mg/kg）を超えるものはなかった。肉骨粉等 3 点からは検出されなかった。

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）	25	8	32	0.10	0.07	0.03
	1	乾牧草等	9	3	33	0.08	0.07	
	3	魚粉	4	4	100	2.1	1.2	
		肉骨粉等	3	0	0			
	総 計		41	15	37	2.1	0.36	
水銀	0.2	配混合飼料（養殖水産動物用を除く）	25	13	52	0.05	0.03	0.01
	0.4	乾牧草等	9	5	56	0.09	0.05	
	1	魚粉	4	4	100	0.67	0.48	
		肉骨粉等	3	3	100	0.25	0.12	
	総 計		41	25	61	0.67	0.12	
鉛	2	配混合飼料（養殖水産動物用を除く）	25	5	20	0.5	0.3	0.2
	3	乾牧草等	9	1	11	0.4	0.4	
	7	魚粉	4	2	50	0.5	0.4	
		肉骨粉等	3	1	33	1.0	1.0	
	総 計		41	9	22	1.0	0.4	
ひ素	2	配混合飼料（養殖水産動物用を除く）	25	11	44	0.41	0.18	0.05
		乾牧草等（稲わらを除く）	8	2	25	0.26	0.24	
	7	稲わら	1	1	100	2.4	2.4	
	15	魚粉	4	4	100	7.8	6.2	
	7	肉骨粉等	3	0	0			
総 計			41	18	44	7.8	1.7	

3) 農 薬

配混合飼料 28 点，穀類（とうもろこし及びマイロ）42 点及び乾牧草 9 点について，省令基準値が定められている農薬 31 成分及び省令基準値が定められていない農薬 26 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 31 成分の結果を表 4 に，省令基準値が定められていない 26 成分の結果を表 5 に示した．なお，省令基準値を超過したものはなかった．

i アセフェート

省令基準値（0.5 mg/kg）が定められているとうもろこし 11 点中 1 点から検出され（検出率 9 %），その測定値は 0.018 mg/kg であった．

ii その他の検出された農薬

ピレスロイド系農薬であるデルタメトリン及びトラロメトリンが，省令基準値が定められていない配混合飼料 28 点中 1 点から検出され（検出率 4 %），その測定値は 0.029 mg/kg であった．また，省令基準値が定められていない農薬について，牧草 9 点中の 1 点からジフェノコナゾール及びテブコナゾールが，牧草 2 点からビフェントリンが並びに牧草 1 点からプロピコナゾールが検出された．

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	14	0	0			0.005
	配混合飼料（牛等用）	0.4	14	0	0			
	牧草	0.4	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	31	0	0			
	計	—	68	0	0			
BHC	配混合飼料	0.005	28	0	0			0.005
	牧草	0.02	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	31	0	0			
	計	—	68	0	0			
DDT	配混合飼料	0.1	28	0	0			0.02
	牧草	0.1	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	31	0	0			
	計	—	68	0	0			
アセフェート	とうもろこし	0.5	11	1	9	0.018	0.018	0.003
アトラジン	とうもろこし	0.2	30	0	0			0.02
	グレインソルガム（マイロ）	0.02	1	0	0			
	牧草	15	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	28	0	0			
	計	—	68	0	0			
アラクロール	とうもろこし	0.02	30	0	0			0.02
	グレインソルガム（マイロ）	0.05	1	0	0			
	牧草	0.05	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	28	0	0			
	計	—	68	0	0			
アルドリン及び ディルドリン	配混合飼料	0.02	28	0	0			0.02
	牧草	0.02	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	31	0	0			
	計	—	68	0	0			
イソフェンホス	とうもろこし	0.02	30	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	38	0	0			
	計	—	68	0	0			
エチオン	牧草	20	9	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	59	0	0			
	計	—	68	0	0			
エンドリン	配混合飼料	0.01	28	0	0			0.01
	牧草	0.01	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	31	0	0			
	計	—	68	0	0			
クロルピリホス	とうもろこし	0.1	30	0	0			0.01
	グレインソルガム（マイロ）	0.75	1	0	0			
	牧草	13	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	28	0	0			
	計	—	68	0	0			
クロルピリホスメチル	とうもろこし	7	30	0	0			0.02
	グレインソルガム（マイロ）	10	1	0	0			
	基準値のない飼料	—	37	0	0			
	計	—	68	0	0			

表4 農薬のモニタリング及びサーベイランスの結果（省令基準値が定められている成分，続き）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの				検出 下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
クロルフェンビンホス	とうもろこし	0.05	30	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	38	0	0			
	計	—	68	0	0			
クロルプロファム	とうもろこし	0.05	30	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	38	0	0			
	計	—	68	0	0			
ジメトエート	とうもろこし	1	30	0	0			0.02
	グレインソルガム（マイロ）	0.2	1	0	0			
	牧草	2	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	28	0	0			
	計	—	68	0	0			
ダイアジノン	とうもろこし	0.02	30	0	0			0.02
	グレインソルガム（マイロ）	0.1	1	0	0			
	牧草	10	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	28	0	0			
	計	—	68	0	0			
デルタメトリン及び トラロメトリン	とうもろこし	2	30	0	0			0.03
	グレインソルガム（マイロ）	2	1	0	0			0.03
	牧草	5	9	0	0			0.045
	基準値のない飼料	—	28	1	4	0.029*	0.029*	0.03
	計	—	68	1	1	0.029*	0.029*	
テルブホス	とうもろこし	0.01	30	0	0			0.005
	グレインソルガム（マイロ）	0.05	1	0	0			
	牧草	1	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	28	0	0			
	計	—	68	0	0			
ピリミホスメチル	とうもろこし	1	30	0	0			0.02
	グレインソルガム（マイロ）	1	1	0	0			
	基準値のない飼料	—	37	0	0			
	計	—	68	0	0			
フィプロニル	とうもろこし	0.02	30	0	0			0.003
	グレインソルガム（マイロ）	0.01	1	0	0			
	基準値のない飼料	—	37	0	0			
	計	—	68	0	0			
フェニトロチオン	とうもろこし	1	30	0	0			0.02
	グレインソルガム（マイロ）	6	1	0	0			
	牧草	10	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	28	0	0			
	計	—	68	0	0			
フェントエート	とうもろこし	0.4	30	0	0			0.02
	グレインソルガム（マイロ）	0.4	1	0	0			
	基準値のない飼料	—	37	0	0			
	計	—	68	0	0			
フェンバレレート	配混合飼料（鶏・うずら用）	0.5	10	0	0			0.02
	配混合飼料（豚用）	4	4	0	0			
	配混合飼料（牛等用）	8	14	0	0			
	牧草	13	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	31	0	0			
	計	—	68	0	0			

表4 農薬のモニタリング及びサーベイランスの結果（省令基準値が定められている成分，続き）

モニタリング等の 対象成分	モニタリング等の 対象試料	省令 基準値 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			検出 下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	
フェンプロパトリン	牧草	20	9	0	0		0.02
	基準値のない飼料	—	59	0	0		
	計	—	68	0	0		
ヘプタクロル	配混合飼料	0.02	28	0	0		0.02
	牧草	0.02	9	0	0		
	基準値のない飼料	—	31	0	0		
	計	—	68	0	0		
ペルメトリン	とうもろこし	2	30	0	0		0.02
	グレインソルガム（マイロ）	2	1	0	0		
	牧草	55	9	0	0		
	基準値のない飼料	—	28	0	0		
	計	—	68	0	0		
ペンディメタリン	とうもろこし	0.2	30	0	0		0.02
	グレインソルガム（マイロ）	0.1	1	0	0		
	牧草（アルファルファに限る）	150	1	0	0		
	牧草（アルファルファを除く）	2000	8	0	0		
	基準値のない飼料	—	28	0	0		
	計	—	68	0	0		
ホスメット	とうもろこし	0.05	30	0	0		0.02
	グレインソルガム（マイロ）	0.05	1	0	0		
	牧草	40	9	0	0		
	基準値のない飼料	—	28	0	0		
	計	—	68	0	0		
ホレート	とうもろこし	0.05	30	0	0		0.02
	グレインソルガム（マイロ）	0.05	1	0	0		
	牧草	1.5	9	0	0		
	基準値のない飼料	—	28	0	0		
	計	—	68	0	0		
マラチオン	とうもろこし	2	30	0	0		0.02
	グレインソルガム（マイロ）	6	1	0	0		
	牧草	135	9	0	0		
	基準値のない飼料	—	28	0	0		
	計	—	68	0	0		
メチダチオン	とうもろこし	0.1	30	0	0		0.02
	グレインソルガム（マイロ）	0.2	1	0	0		
	牧草	12	9	0	0		
	基準値のない飼料	—	28	0	0		
	計	—	68	0	0		

*試料が湿潤であったことから風乾物で試験を実施し，検出下限以上であった値を水分補正して現物換算したため検出下限未満の値となっている。

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)	平均値 (mg/kg)	
EPN	68	0	0			0.02
イソプロチオラン	68	0	0			0.02
イプロベンホス	68	0	0			0.02
エディフェンホス	68	0	0			0.02
エトフェンプロックス	68	0	0			0.02
カズサホス	68	0	0			0.02
クロルタールジメチル	68	0	0			0.02
クロルデン	68	0	0			0.02
クロルベンジレート	68	0	0			0.02
ジフェノコナゾール	68	1	1	0.034	0.034	0.02
シラフルオフェン	68	0	0			0.02
テブコナゾール	68	1	1	0.70	0.70	0.02
トリフルラリン	68	0	0			0.02
ビフェントリン	68	2	3	2.0	1.0	0.02
フェノトリン	68	0	0			0.02
フェンチオン	68	0	0			0.02
フェンブコナゾール	68	0	0			0.02
フルシトリネート	68	0	0			0.02
フルトラニル	68	0	0			0.02
プロシミドン	68	0	0			0.02
プロパニル	68	0	0			0.02
プロパルギッド	68	0	0			0.02
プロピコナゾール	68	1	1	0.63	0.63	0.02
ブロモブチド	68	0	0			0.02
メタミドホス	11	0	0			0.003
メトミノストロビン	68	0	0			0.02

3.2 飼料への動物由来たん白質等の混入確認

国内で製造されたは乳期子牛育成用代用乳用配合飼料 1 点，若令牛育成用配合飼料 4 点，乳用牛飼育用配合飼料 5 点，肉用牛肥育用配合飼料 10 点，肉牛繁殖用配合飼料 5 点，牛複数ステージ用配合飼料 2 点，その他の牛用混合飼料等 11 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 7 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 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（国内製造牛用飼料等）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			ほ乳動物由来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 (%)	
牛用飼料等										
ほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料	1	0	0							0
若令牛育成用配合飼料	4	0	0	4	0	0	4	0	0	0
乳用牛飼育用配合飼料	5	0	0	5	0	0	5	0	0	0
肉用牛肥育用配合飼料	10	0	0	10	0	0	10	0	0	0
肉牛繁殖用配合飼料	5	0	0	5	0	0	5	0	0	0
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)	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0
圧ぺんとうもちし・アルファルファ二種混合飼料	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等	9	0	0	9	0	0	9	0	0	0
合計	38	0	0	37	0	0	37	0	0	0

表 8 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
	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	4	0	0	4	0	0	4	0	0	0
フランス	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0
英国	2	0	0	2	0	0	2	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）

49 点及び特定動物性油脂 1 点について，不溶性不純物の含有量を測定した結果，不溶性不純物の成分規格を超えるものはなかった．その結果を表 9 に示した．

表 9 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	49	0.064	0.020
特定動物性油脂	0.02 %以下	1		

3.4 サルモネラ

国内で製造された単体飼料 44 点及び配混合飼料 30 点についてモニタリングを実施した結果，サルモネラが検出されたものはなかった．なお，単体飼料では，前年度及び前々年度ともに検出率は 2 % であった．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．

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).

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 5～6 年度）

新井 詠子^{*1}, 青木 華歩^{*2}, 奥山 紀子^{*1}, 久保田 恵理^{*3}, 山多 晴子^{*1}, 橋本 仁康^{*1}

Monitoring Results of Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Feed Ingredients and Formula Feed (Fiscal Years 2023-2024)

ARAI Eiko^{*1}, AOKI Kaho^{*2}, OKUYAMA Noriko^{*1},

KUBOTA Eri^{*3}, YAMATA Seiko^{*1} and HASHIMOTO Yoshiyasu^{*1}

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

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

^{*3} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Current affiliation: Yokohama Office, FAMIC))

An antimicrobial susceptibility test was conducted on enterococci, which is isolated from soybean meal, fish meal, poultry by-product meal, swine and poultry by-product meal, and formula feed.

Enterococci were isolated from samples through the following process: selective enrichment culture in AC broth; selective culture on Enterococcosel Agar; and two-successive pure isolations on Brain Heart Infusion Agar. The isolated gram-positive cocci were detected by the cultivation in Heart Infusion broth supplemented with 6.0 % NaCl. After confirming their 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).

A total of 182 enterococci were isolated from feed ingredients and formula feed, including 46 *Enterococcus faecalis*, 41 *E. faecium* and 95 other species. The resistance rates to each antimicrobial were obtained from 124 isolates, with values ranging from 0.0 % to 38.7 %. No isolates were resistant to vancomycin.

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；豚鶏混合肉骨粉；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、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⁾。現在は、「薬剤耐性（AMR）

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

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

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 横浜事務所

対策アクションプラン（2023-2027）」に基づき取組が進められている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* の多剤薬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。このことから、2018 年度から 2020 年度にかけて、国内流通の飼料原料及び配合飼料から腸球菌を分離し、薬剤耐性の実態を把握することを目的とした調査を行った^{15)~19)}。

同調査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、チキンミール及び豚鶏混合肉骨粉を、配合飼料として牛用、豚用及び鶏用を対象とし、2023 年度に引き続き 2024 年度も同様の調査を実施した。分離した菌株について菌種同定の上、薬剤感受性試験を行った。このたび、2023、2024 年の調査で得られたデータをとりまとめたので報告する。

2 実験方法

2.1 試 料

試料は 2023 年 4~12 月及び 2024 年 4~11 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。内訳を Table 1 に示した。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。

Table 1 Samples

Samples	No. of samples
Soybean meal	2
Fish meal	40
Poultry by-product meal	25
Swine and poultry by-product meal	28
Poultry feed	11
Swine feed	10
Cattle feed	27
Total	143

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）により精製した蒸留水（JIS K 0211 の 5218 に定義された蒸留水）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（富士フイルム和光純薬製）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。

3) エンテロコッカセル寒天培地（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 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。これを 60 °C まで冷却した後、プラスチック製滅菌シャーレに様に広がるように 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 °C 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 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。これを 60 °C まで冷却した後、プラスチック製滅菌シャーレに様に広がるように 15~20 mL 分注し凝固させた。その後、37 °C で 17 時間以上保温し、培地のコンタミネーションがないことを確認した。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（富士フイルム和光純薬製）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 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（バイオメリュウ製）（以下「API」という。）

10) InstaGene Matrix（Bio-Rad Laboratories 製）

11) PCR プライマー（菌種同定用）

菌種判定に用いた PCR プライマーを Table 2 に示した。腸球菌属の検出には 16S ribosomal RNA（以下「rRNA」という。）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 2 Primers (genus and species)

	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（菌種同定用） 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（菌種同定用） 2.5 mmol/L dNTPs（Thermo Fisher Scientific 製）
- 14) 25 mmol/L 塩化マグネシウム溶液（菌種同定用） 25 mmol/L MgCl₂（Thermo Fisher Scientific 製）
- 15) DNA ポリメラーゼ液（菌種同定用） AmpliTaq Gold DNA polymerase（5 unit/μL）（Thermo Fisher Scientific 製）
- 16) PCR 反応液（菌種同定用）

i *E. faecalis*, *E. faecium* 及び *E. durans* を同時に検出する反応系

ア DNA ポリメラーゼ液量を 0.7 μL とした反応液の調製

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、必要本数分の量をマイクロチューブ（容量 1.5 mL）で混合して調製した。

イ DNA ポリメラーゼ液量を 0.3 μL とした反応液の調製

アの調製に用いた試薬等のうち、DNA ポリメラーゼ液（菌種同定用）0.3 μL, 超純水 14.6 μL に組成を変えて同様に調製した。

ii *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* 又は *E. hirae* を個別に検出する反応系

ア DNA ポリメラーゼ液量を 0.7 μL とした反応液の調製

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 15.8 μ L を混合した PCR 反応液 22.5 μ L 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、必要本数分の量をマイクロチューブ (容量 1.5 mL) で混合して調製した。

イ DNA ポリメラーゼ液量を 0.3 μ L とした反応液の調製

アの調製に用いた試薬等のうち、DNA ポリメラーゼ液 (菌種同定用) 0.3 μ L, 超純水 15.4 μ L に組成を変えて同様に調製した。

17) PCR 陽性対照 (菌種同定用)

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×Loadind Buffer (タカラバイオ製)

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 μ L 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) ハートインフュージョン寒天培地 (以下「HI 寒天培地」という。)

Heart Infusion Agar (Becton, Dickinson and Company 製) 40 g を蒸留水 1000 mL に溶かした。以下、2.2 の 4)と同様に操作した。

26) 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 3 に示した。フローズンプレートは 2 倍系列で 9~12 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 3 Antimicrobial agents

Group	Antimicrobial agent	Abbreviation	Concentration range (μg/mL)	Breakpoint (μg/mL)
Aminoglycosides	Gentamicin	GM	0.25 — 512	500 ^{b)}
	Kanamycin	KM	0.5 — 1024	512 ^{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	256 ^{a)}
Macrolides	Azithromycin	AZM	0.25 — 64	—
	Erythromycin	EM	0.12 — 128	8 ^{b)}
	Tylosin	TS	0.12 — 256	16 ^{a)}
Penicillins	Ampicillin	ABPC	0.12 — 128	16 ^{b)}
Phenicol	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 the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System (JVARM) from epidemiological cut-off values calculated based on MIC distribution.²³⁾

b) Criteria published by CLSI²⁴⁾

27) PCR プライマー（薬剤耐性遺伝子検出用）

薬剤耐性遺伝子の検出に用いた PCR プライマーを Table 4 に示した。マクロライド耐性遺伝子について、マクロライドが結合する 50S サブユニットの 23S rRNA をメチル化し結合を減少させる酵素をコードする *ermA* 及び *ermB* 並びにマクロライドを細胞外に排出するたん白質をコードする *mefA/E* に特異的なプライマーセットを用いた²⁵⁾。プライマーは北海道システム・サイエンスで委託合成し、超純水で 100 μmol/L になるよう溶解した。

Table 4 Primers (resistance gene)

gene	Direction	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Positive control	Reference
resistance gene					
Multiplex PCR					
<i>ermA</i>	F	TAA CAT CAG TAC GGA TAT TG	200	Staphylococcus	25)
	R	AGT CTA CAC TTG GCT TAG G			
<i>ermB</i>	F	CCG AAC ACT AGG GTT GCT C	139	Campylobacter	25)
	R	ATC TGG AAC ATC TGT GGT ATG			
<i>mefA/E</i>	F	AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC	348	Cloned into pMA vector (Genebank accession No.U70055)	25)
	R	TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG			

28) 10×PCR 緩衝液（薬剤耐性遺伝子検出用） 10×Ex Taq Buffer (Mg²⁺ free)（タカラバイオ製）

29) 2.5 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液 (薬剤耐性遺伝子検出用) dNTP Mixture (タカラバイオ製)

30) 25 mmol/L 塩化マグネシウム溶液 (薬剤耐性遺伝子検出用) MgCl_2 (タカラバイオ製)

31) DNA ポリメラーゼ液 (薬剤耐性遺伝子検出用) Takara Ex Taq (5 unit/ μL) (タカラバイオ製)

32) PCR 反応液 (薬剤耐性遺伝子検出用)

10×PCR 緩衝液 (薬剤耐性遺伝子検出用) 2.5 μL , 2.5 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液 (薬剤耐性遺伝子検出用) 1.5 μL , 25 mmol/L 塩化マグネシウム溶液 (薬剤耐性遺伝子検出用) 1.5 μL , DNA ポリメラーゼ液 (薬剤耐性遺伝子検出用) 0.125 μL , 各プライマー 0.125 μL (*ermA*, *ermB* 及び *mefA/E*) 及び超純水 17.6 μL を混合した PCR 反応液 24.0 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、必要本数分の量をマイクロチューブ (容量 1.5 mL) で混合して調製した。

33) PCR 陽性対照 (薬剤耐性遺伝子検出用)

ermA 及び *ermB* の PCR 陽性対照は農林水産省動物医薬品検査所から分与された DNA 抽出液を用いた。DNA は、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 製) を用いて、*ermA* にあつては豚由来黄色ブドウ球菌から、*ermB* にあつては豚由来カンピロバクターからそれぞれ抽出されたものである。*mefA/E* の PCR 陽性対照は Thermo Fisher Scientific が提供している GeneArt 遺伝子合成サービスを利用して委託合成した。合成された 5 μg の乾燥凍結プラスミド DNA を超純水で溶解し、0.01 ng/ μL に調製したものを試験に用いた。

2.3 装置及び器具

- 1) インキュベーター: 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: 内径 90 mm, 高さ 15 mm ニプロ製
- 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 アドバンス製
- 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) 純粋分離培養

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℃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 性状確認

1) 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。HI 寒天培地から 1 集落を釣菌し、生理食塩水 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。

2) 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℃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。

2.6 PCR 法を用いた菌種判定

2.5 の 1)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 2)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。

1) 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 の生理食塩水が入った 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。

2) 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 22.5 μL 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。

3) 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℃ (4 分間保持) → [95℃ (30 秒間保持) → 55℃ (1 分間保持) → 72℃ (1 分間保持)] (30 サイクル) → 72℃ (7 分間保持) の条件で PCR 反応を行った。*E. casseliflavus* は② : 95℃ (10 分間保持) → [92℃ (30 秒間保持) → 45℃ (1 分間保持) → 72℃ (1 分間保持)] (30 サイクル) → 72℃ (7 分間保持) の条件で PCR 反応を行った。

4) 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 μ L に電気泳動用色素溶液 1 μ L 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．

5) 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各プライマーセットに対応する腸球菌種と判定した．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．

2.7 API を用いた菌種判定

2.6 において菌種が判定されず，腸球菌属とのみ判定された分離株について，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．

2.8 菌種同定

PCR 又は API の判定結果を菌種同定の結果とし，腸球菌と判定された分離株のうち，菌種の同定に至らなかったもの，及び色素産生性が PCR 又は API で判定された菌種の性状と不一致であったものは *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 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．

2.9 分離株の保存

分離株を HI 液体培地 2 mL と 20 %スキムミルク 2 mL を混合した溶液に懸濁し，-80 $^{\circ}$ C で冷凍保存した．

2.10 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 HI 寒天培地で 35 $^{\circ}$ 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 ピンプレートフローズプレートを接種した．接種後，フローズプレートにふたをして，35 $^{\circ}$ C で 16~24 時間培養した．

3) 判定

培養したフローズ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，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．フローゼンプレートに薬剤を含まない 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²⁵⁾及び JVARM で得られた値（二峰性を示す MIC 分布の中間点）²⁴⁾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．

2.11 薬剤耐性遺伝子の検出

1) DNA 抽出

菌種判定の際に抽出した液を DNA 試料液として用いた．

2) 試料溶液等の調製

PCR 反応液 24.0 μL を PCR チューブに入れ，DNA 試料液を 1.0 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 1.0 μL 加えて，陽性対照液及び陰性対照液を調製した．

3) 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，94 $^{\circ}\text{C}$ （5 分間保持）→ [94 $^{\circ}\text{C}$ （1 分間保持）→55 $^{\circ}\text{C}$ （1 分間保持）→72 $^{\circ}\text{C}$ （1.5 分間保持）]（35 サイクル）→72 $^{\circ}\text{C}$ （7 分間保持）の条件で PCR 反応を行った．

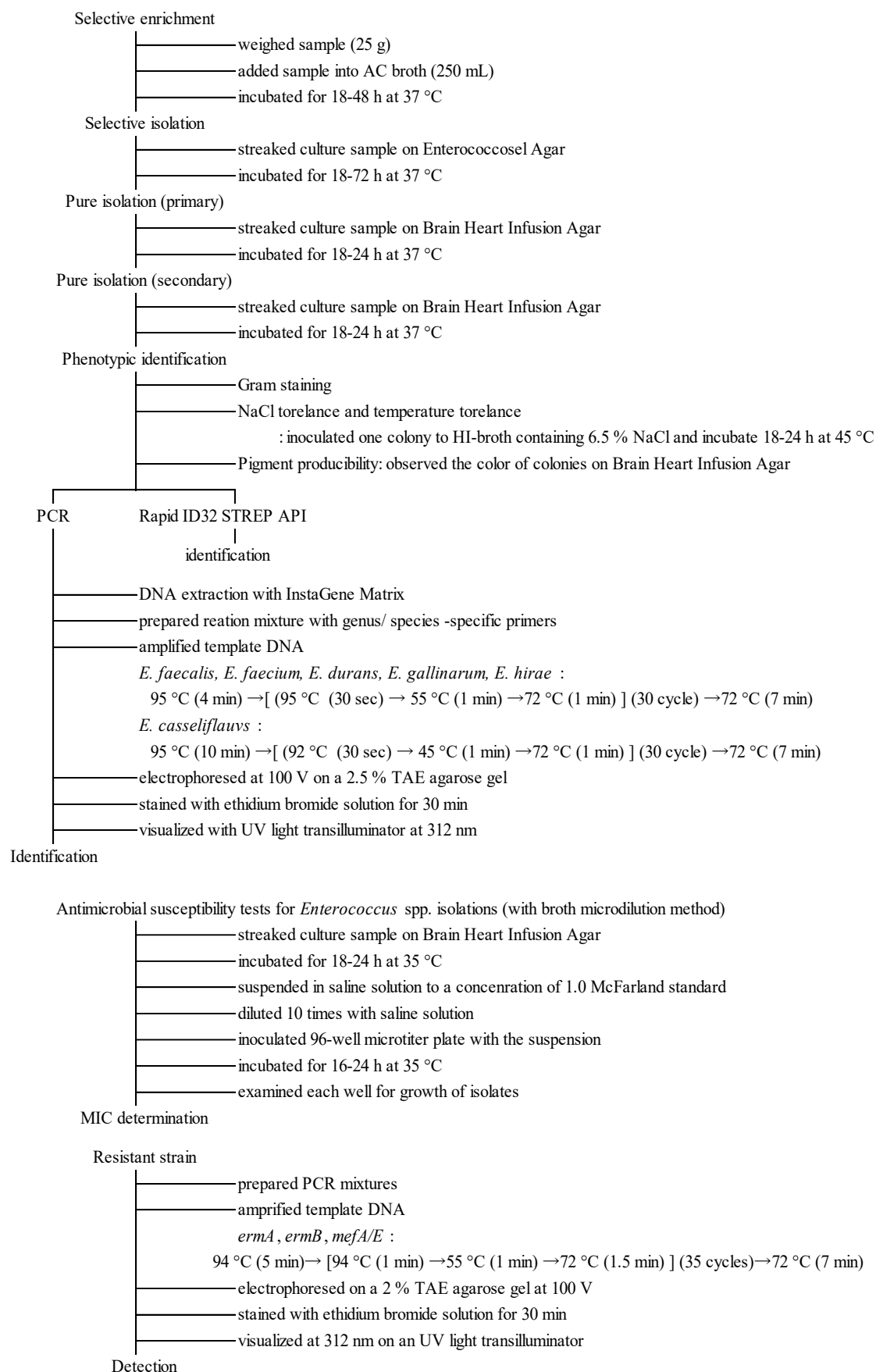
4) 電気泳動

2.6 の 4)と同様に実施した．

5) 判定

陽性対照液において各薬剤耐性遺伝子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，陰性対照液において PCR 増幅産物が不検出の場合，かつ，試料溶液において各薬剤耐性遺伝子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対応する薬剤耐性遺伝子が陽性と判定した．

なお，分析の概要を 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菌種別分離頻度を Table 5 に示した（菌種を特定できなかった腸球菌については *Enterococcus* sp.として記載した）。検体とした 143 試料のうち 98 試料から腸球菌が分離された。腸球菌として分離された 182 株のうち 116 株について菌種が同定された。*E. faecalis* が最も多く分離され（46 株）、次いで *E. faecium*（41 株）、*E. hirae*（14 株）、*E. durans*（12 株）、*E. casseliflavus*（3 株）の順に分離頻度が高かった。飼料原料及び配合飼料において、主要な腸球菌はいずれも *E. faecalis* 及び *E. faecium* であった。

Table 5 Isolates from feed samples

Samples	No. of 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.	
feed ingredients	95	57	32	20	3	7	7	38	107
formula feed	48	41	14	21	0	5	7	28	75
Total	143	98	46	41	3	12	14	66	182

3.2 薬剤感受性

菌種同定により腸球菌と判定された 182 株のうち、同じ試料から分離され、同一菌株である可能性のあるものを除いた 134 株を薬剤感受性試験に供した。うち 10 株についてはフローゼンプレート上で正常な菌の発育が認められず、試験結果を得ることができなかった。試験結果を得ることができた 124 株の薬剤感受性を Table 6 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、GM、CP 及び ABPC に対しても耐性は認められなかった。また LCM に対する耐性率は 5 %以下、TC 及び CPFEX に対する耐性率は 10 %以下といずれも低かった。いずれかの薬剤に耐性を示した菌株は 80 株あり、EM に耐性を示すものの割合が 38.7 %と多かった。

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。全体で高い耐性率が認められた EM について、耐性を持つ菌株は *E. faecium* に多く見られた。

2023~2024 年に分離された EM 耐性腸球菌を対象に、マクロライド系、リンコマイシン系及びストレプトグラミン系間で交差耐性（MLS_B 耐性：Macrolides-licosamides streptogramin B 耐性）が認められている²⁶⁾*ermA*、*ermB* 及びこれらと耐性機構の異なる *mefA/E* の 3 種のマクロライド系薬剤耐性遺伝子の保有状況について調査したところ、EM、TS 及び LCM に対して高い MIC を示した 3 株について *ermB* の保有が認められ、*ermB* による MLS_B 耐性が生じているものと考えられた。その他の 1 菌株について *mefA/E* の保有が認められたが、*ermA* を保有する菌株は見られず、EM 耐性を示す 48 株のうち 44 株についてはいずれの耐性遺伝子の保有も認められなかった。

EM の属するマクロライド系薬剤はヒト及び畜水産において多く使用されており、JVARM における 2022 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。本調査において EM に耐性を示した菌株のうち、ヒトや家畜由来のマクロライド耐性腸球菌で主に検出される *ermB* 遺伝子を保有するものは 3 株とわずかであった。また *mefA/E* 遺伝子は 1 株のみから検出され、*ermA* 遺伝子は検出されなかった。このことから、本調査においてはこれらの耐性遺伝

子の伝播により EM 耐性率が高くなったものではないと考えられた。

Table 6 Antibiotic susceptibility of *Enterococcus* spp. from feed samples

	2023-2024 (124 isolates)						BP ($\mu\text{g/mL}$)
	Range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Resistance <i>n</i>	Resistance (%)		
KM	1 - >1024	128	512	24	19.4		512 ^{a)}
GM	0.3 - 32	8	16	0	0.0		500 ^{b)}
SM	4 - >512	32	128	-	-		-
VCM	≤ 0.12 - 8	1	2	0	0.0		32 ^{b)}
TC	≤ 0.12 - >64	0.5	2	12	9.7		16 ^{b)}
CP	2 - 16	8	8	0	0.0		32 ^{b)}
CPFX	≤ 0.12 - 16	1	2	11	8.9		4 ^{b)}
ABPC	≤ 0.12 - 2	1	2	0	0.0		16 ^{b)}
SNM	≤ 0.12 - 8	2	2	-	-		-
BC	0.3 - >512	256	512	-	-		-
AZM	0.3 - >64	8	32	-	-		-
EM	≤ 0.12 - >128	2	16	48	38.7		8 ^{b)}
TS	0.3 - >256	4	16	20	16.1		16 ^{a)}
LCM	1 - >512	32	64	3	2.4		256 ^{a)}

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

	<i>E. faecalis</i> (<i>n</i> = 28)				<i>E. faecium</i> (<i>n</i> = 29)				Others (<i>n</i> = 67)			
	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Resistance <i>n</i>	Resistance (%)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Resistance <i>n</i>	Resistance (%)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Resistance <i>n</i>	Resistance (%)
KM	64	128	1	3.6	256	512	8	27.6	128	1024	15	22.4
GM	16	16	0	0.0	8	16	0	0.0	8	16	0	0.0
TC	0.5	64	4	14.3	0.5	16	4	13.8	0.5	2	4	6.0
CPFX	1	2	0	0.0	1	2	2	6.9	1	4	9	13.4
ABPC	1	1	0	0.0	1	2	0	0.0	1	2	0	0.0
EM	2	4	2	7.1	8	32	24	82.8	0.5	16	22	32.8
TS	2	4	2	7.1	8	8	1	3.4	8	16	1	1.5
LCM	32	64	2	7.1	16	32	0	0.0	32	64	1	1.5
CP	8	8	0	0.0	8	16	0	0.0	8	8	0	0.0
VCM	2	2	0	0.0	1	4	0	0.0	0.5	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。2023~2024 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 143 点の試料を収集し、うち 98 点から腸球菌が分離された。

- 2) 182 株の腸球菌が分離され、うち 116 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) 感受性試験の結果が得られた 124 株のうち 80 株において薬剤耐性が認められた。EM について高い耐性率（38.7 %）が見られたが、ヒトや家畜由来のマクロライド耐性腸球菌で主に検出されるマクロライド系薬剤耐性遺伝子を保有するものはわずかであり、本調査においてはこれらの耐性遺伝子の伝播により EM 耐性率が高くなったものではないと考えられた。また、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 9 Apr. 2026.
- 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 9 Apr. 2026.)
- 4) The government of Japan: National action plan on antimicrobial resistance (AMR) 2023-2027. <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001096228.pdf>, cited 9 Apr. 2026.
- 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 9 Apr. 2026.
- 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 9 Apr. 2026.
- 9) The AMR One Health Surveillance Committee: Nippon AMR One Health Report (NAOR) 2019. <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000714628.pdf>, cited 9 Apr. 2026.
- 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**, 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., et al.: 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., Bodeis Jones S., Yang Q., et al.: Prevalence and antimicrobial susceptibility of indicator organisms *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. animal food, 2005-2011. *microorganisms*, 8, 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 2025, <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001675600.pdf>, cited 22 Apr. 2026.
- 24) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 36th Edition., CLSI document M100-Ed36 (2026).
- 25) Di Cesare, A., Luna G. M., Vignaroli C., Pasquaroli S., Tota S., Paroncini, P., et al.: Aquaculture can promote the presence and spread of antibiotic-resistant enterococci in marine sediments, *PLOS ONE*, 8(4), e62838, doi: 10.1371/journal.pone.0062838 (2013).
- 26) Roberts, M. C.: Environmental macrolide-lincosamide-streptogramin and tetracycline resistant bacteria, *Front. Microbiol.*, 2, 40, doi: 10.3389/fmicb.2011.00040 (2011).

調査資料**3 特定添加物検定結果等について（令和 7 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 (Fiscal Year 2025)

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 7 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 7 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 7 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 7 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 7 年度に検定に合格した特定添加物は 5 種類、7 銘柄（前年度 5 種類、7 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 7 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	○	モンテバン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
		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		7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 7 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 5 年度及び令和 6 年度の結果とともに表 2 に示した。

令和 7 年度の検定合格件数は 87 件，合格数量は 611 トンで実量力価換算量は 77 トン(力価)であった。件数，数量及び実量力価換算量の対前年度比は，それぞれ 96.7 %，121.5 %，122.7 %となり，件数は微減したものの，数量及び実量力価換算量は大きく増加した。これはナラシンの件数，数量及び実量力価換算量が大きく増加していることが要因の一つと考えられる。

令和 7 年度の検定合格数量を種類別にみると，ナラシンが全体の 46.0 %（前年度 26.3 %）で最も多く，次いでサリノマイシンナトリウム 40.4 %（前年度 50.3 %），アピラマイシン 7.3 %（前年度 13.1 %），フラボフォスフォリポール 5.9 %（前年度 9.5 %），エンラマイシン 0.4 %（前年度 0.8 %）となった。また，実量力価換算量については，令和 7 年度はサリノマイシンナトリウムが全体の 48.2 %（前年度 51.5 %）で最も多く，次いでナラシン 36.3 %（前年度 21.0 %），アピラマイシン 11.5 %（前年度 20.9 %），フラボフォスフォリポール 3.7 %（前年度 6.1 %），エンラマイシン 0.3 %（前年度実績 0.5 %）となった。

検定合格数量を類別にみると，令和 7 年度は，ポリエーテル系が 86.4 %（前年度 76.6 %），オルトソマイシン系が 7.3 %（前年度 13.1 %），ホスホグリコリピッド系が 5.9 %（前年度 9.5 %），ポリペプチド系が 0.4 %（前年度 0.8 %）であった。

令和 7 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，ナラシンは倍増し，サリノマイシンナトリウムは前年度並み，エンラマイシン，フラボフォスフォリポール及びアピラマイシンは減少した。

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ポリエーテル系は増加したものの，ポリペプチド系，ホスホグリコリピッド系及びオルトソマイシン系は減少した。

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，センデュラマイシンナトリウムは平成 19 年度から，モネンシンナトリウムは令和 5 年度から，ラサロシドナトリウムは平成 22 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 7 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5年度～令和7年度）

類 別	特定添加物の種類	令和5年度				令和6年度				令和7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))	
				構成比 (%)	構成比 (%)			構成比 (%)	構成比 (%)			構成比 (%)	構成比 (%)
ポリペプチド系	亜鉛バシトラシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	エンラマイシン	3	3,960	0.6	317	3	3,920	0.8	314	2	2,460	0.4	197
	ノシヘブタイド	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ホスホグリコ リピッド系	小 計	3	3,960	0.6	317	3	3,920	0.8	314	2	2,460	0.4	197
	フラボフオスフォリポール	6	36,000	5.7	2,880	8	48,000	9.5	3,840	6	36,000	5.9	2,880
	小 計	6	36,000	5.7	2,880	8	48,000	9.5	3,840	6	36,000	5.9	2,880
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	45	259,020	40.8	36,702	49	252,900	50.3	32,490	41	246,960	40.4	37,296
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ナラシン	23	250,425	39.5	25,043	12	132,275	26.3	13,228	26	281,025	46.0	28,103
	モネンシンナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ラクロシドナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	小 計	68	509,445	80.3	61,745	61	385,175	76.6	45,718	67	527,985	86.4	65,399
オルトソマイシ ン系	アピラマイシン	24	84,925	13.4	16,985	18	65,900	13.1	13,180	12	44,475	7.3	8,895
	小 計	24	84,925	13.4	16,985	18	65,900	13.1	13,180	12	44,475	7.3	8,895
	ピコザマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
その他	小 計	0	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	0
	総 計	101	634,330	100.0	81,926	90	502,995	100.0	63,052	87	610,920	100.0	77,370
	対 前 年 度 比 (%)	104.1	100.5	—	98.3	89.1	79.3	—	77.0	96.7	121.5	—	122.7

ー：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7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7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7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	亜鉛バシトランシ	—	—	—	—	—	—
	エンラマイシン	—	—	—	2	2,460	197
	ノシヘプタイド	—	—	—	—	—	—
ホスホグリコリピッド系	フラボフォスフォリボール	—	—	—	6	36,000	2,880
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	—	—	—	41	246,960	37,296
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—	—	—
	ナラシン	—	—	—	26	281,025	28,103
	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	—	—	—	12	44,475	8,895
その他	ビコザマイシン	—	—	—	—	—	—
合 計		0	0	0	87	610,920	77,370
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7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7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、モネンシンナトリウム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7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904トン（対前年度比110.3%）、実量力価換算量は137トン（力価）（対前年度比105.4%）であった。

令和7年度の製造数量は、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、ノシヘプタイド、エンラマイシンの順に、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，エンラマシシ，ノシヘプタイトの順に多かった。

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 6・7 年度）

類 別	特定添加物の種類	令和6年度		令和7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	20,400	1,632	42,940	3,435
	ノシヘプタイト	40,740	1,630	61,620	2,465
	小 計	61,140	3,262	104,560	5,900
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	184,720	18,472	202,880	20,288
	モネンシンナトリウム	432,260	86,452	415,740	83,148
	ラサロシドナトリウム	141,920	21,288	181,140	27,171
	小 計	758,900	126,212	799,760	130,607
総 計		820,040	129,474	904,320	136,507
対 前 年 度 比 (%)		108.7	113.6	110.3	105.4

※：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 7 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 7 年度に製造及び輸入された特定添加物は 8 種類あり，総数量を種類別にみると，サリノマイシンナトリウム（29.7 %），モネンシンナトリウム（27.4 %），ナラシン（18.5 %）の順に多く，類別ではポリエーテル系が最も多く，1,328 トン（検定：528 トン，登録：800 トン）と全体の 87.6 %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（38.9 %），サリノマイシンナトリウム（26.9 %），ナラシン（13.1 %）の順に多く，類別でもポリエーテル系が最も多く，196 トン(力価)（検定：65 トン(力価)，登録：131 トン(力価)）と全体の 91.6 %を占めた。

次に，平成 28 年度から令和 7 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 7 年度は，特定添加物の総数量全体の 59.7 %（前年度 62.0 %），実量力価換算量全体の 63.8 %（前年度 67.3 %）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 7 年度)

類 別	特定添加物の種類	総数量※1 (kg)	構成比 (%)	実量力価 換算量※2 (kg(力価))	構成比 (%)
ポリペプチド系	亜鉛バシトラシン	—	—	—	—
	エンラマイシン	45,400	3.0	3,632	1.7
	ノシヘブタイド	61,620	4.1	2,465	1.2
	小 計	107,020	7.1	6,097	2.9
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	2.4	2,880	1.3
	小 計	36,000	2.4	2,880	1.3
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	449,840	29.7	57,584	26.9
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—
	ナラシン	281,025	18.5	28,103	13.1
	モネンシンナトリウム	415,740	27.4	83,148	38.9
	ラサロシドナトリウム	181,140	12.0	27,171	12.7
	小 計	1,327,745	87.6	196,006	91.6
オルトソマイシン系	アビラマイシン	44,475	2.9	8,895	4.2
	小 計	44,475	2.9	8,895	4.2
その他	ビコザマイシン	—	—	—	—
	小 計	0	0.0	0	0.0
総 計		1,515,240	100.0	213,878	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

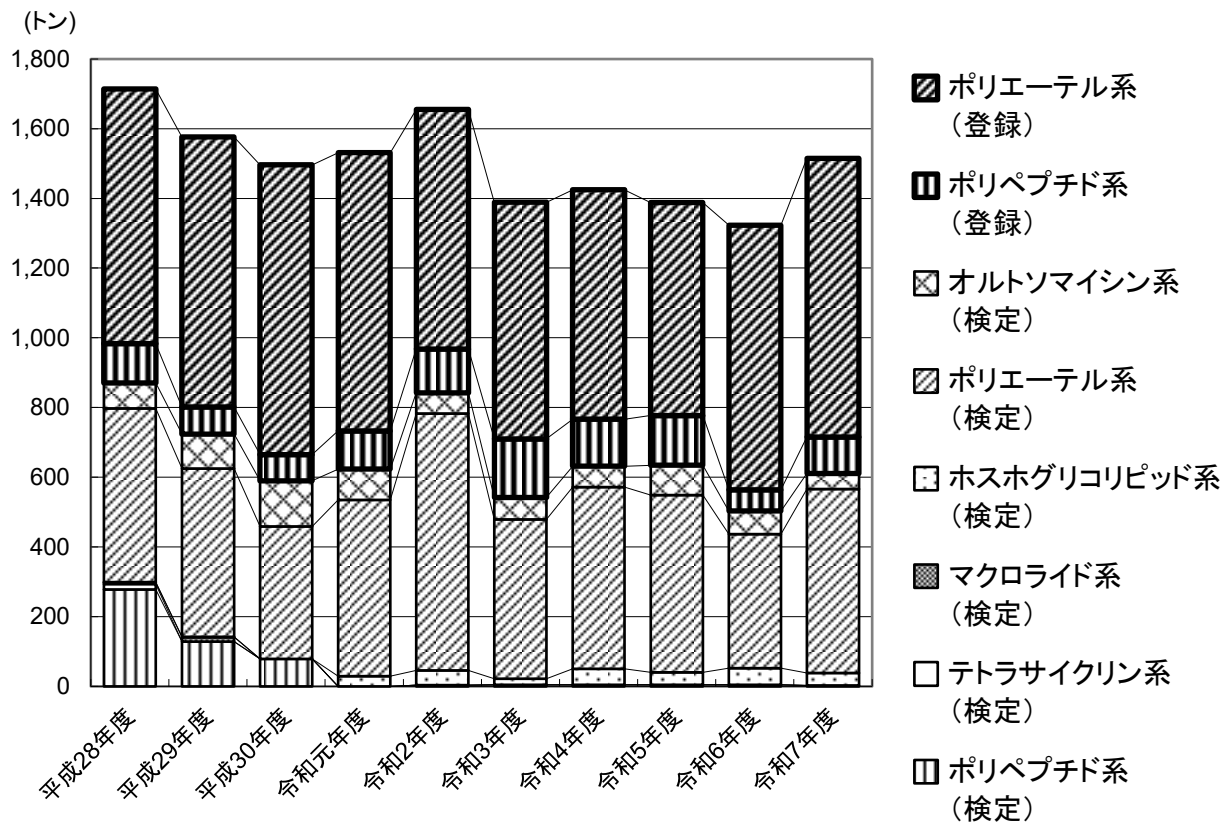


図1 特定添加物の総数量の推移（類別）

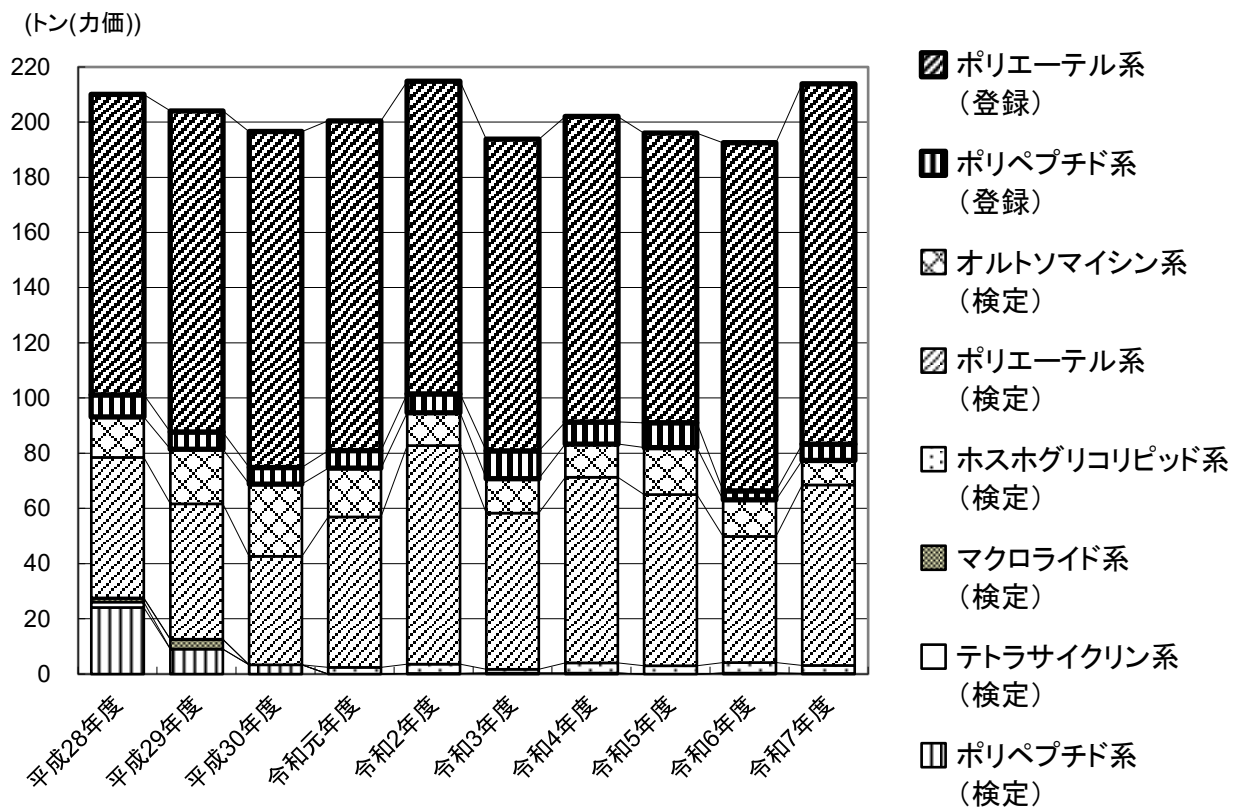


図2 特定添加物の総数の実量カ価換算量の推移（類別）

6 要 約

1) 令和 7 年度の特定添加物の検定の結果は、以下のとおりである。

- i 検定に合格した特定添加物は、4 業者から申請された、5 種類、7 銘柄であった。
- ii 検定合格件数は 87 件、合格数量は 611 トン、実量力価換算量は 77 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、ナラシン、サリノマイシンナトリウム、アビラマイシンの順に多かった。また、実量力価換算量はサリノマイシンナトリウム、ナラシン、アビラマイシンの順に多かった。
- v 検定合格数量を類別にみると、ポリエーテル系は前年度に比べて増加したが、ポリペプチド系、ホスホグリコリピッド系及びオルトソマイシンは減少した。また、実量力価換算量も同様の結果であった。

2) 令和 7 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 904 トン、実量力価換算量は 137 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増加した。
- ii 種類別にみると、製造数量はモネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウムの順に多かった。また、実量力価換算量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。

3) 令和 7 年度の特定添加物の総数量等の結果は、以下のとおりである。

特定添加物の検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造数量とを合計した総数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム、モネンシンナトリウム、ナラシンの順に多かった。また、実量力価換算量においては、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ナラシンの順に多かった。

他誌掲載論文

(抄録)

- 1 Trial for *cyp51A* gene variants to discriminate Japanese *Aspergillus oryzae* from *A. flavus*

KANAZASHI Yuhei, YAMAGAMI Yohei,
FURUKAWA Tomohiro, YABE Kimiko and
KUSHIRO Masayo

JSM Mycotoxins, 75(2), 55-57 (2025).

DOI: 10.2520/myco.75-2-1

- 2 LC-MS/MS による飼料作物サイレーシ中のゼアラレノンおよびデオキシニバレノール分析法の室間共同試験

鈴木 知華, 會田 紀雄

食品衛生学雑誌, 66(6), 165-171 (2025).

DOI: 10.3358/shokueishi.66.165

- 3 Quantitative Real-Time PCR for *Fusarium graminearum* sensu stricto and *F. asiaticum* Infection in Wheat Kernels

YAMAGAMI Yohei, KANAZASHI Yuhei,
INOUE Hiroyoshi, NAKAGAWA Hiroyuki,
KUSHIRO Masayo and FURUKAWA Tomohiro

JSM Mycotoxins, 76(1), 3-8 (2026).

DOI: 10.2520/myco.76-1-2

- 4 Survey of trichothecene contamination in imported and domestically produced feed in Japan

YAMAGAMI Yohei, NOMURA Masayo and
AOYAMA Koji

Mycotoxin Research, 42(33), (2026).

DOI: 10.1007/s12550-026-00637-1

1 Trial for *cyp51A* gene variants to discriminate Japanese *Aspergillus oryzae* from *A. flavus*

KANAZASHI Yuhei, YAMAGAMI Yohei,
FURUKAWA Tomohiro, YABE Kimiko and
KUSHIRO Masayo

Aspergillus section *Flavi* contains *Aspergillus oryzae*, an important species in Japanese traditional brewing, and also *A. flavus*, an aflatoxigenic species. Genetic discrimination of *A. oryzae* from *A. flavus* is very tough since they share over 99% sequence identity of their genome. Recently, *cyp51A* gene variants were reported to be a promising indicator to discriminate strains of *A. oryzae* from those of *A. flavus*. In this study, we applied the indicator for Japanese *A. oryzae* strains. Consequently, contradictory results were obtained for more than one Japanese *A. oryzae* strain.

JSM Mycotoxins, 75(2), 55-57 (2025).

DOI: 10.2520/myco.75-2-1

2 LC-MS/MS による飼料作物サイレージ中のゼアラレノンおよびデオキシニバレノール分析法の室間共同試験

鈴木 知華, 會田 紀雄

A collaborative study was conducted by eight laboratories to validate a method for the determination of zearalenone (ZEN) and deoxynivalenol (DON) in silage using LC-MS/MS. Corn silage and whole-crop rice silage were spiked with ZEN and DON at the following levels: 0.2–2.2 mg/kg of ZEN and 1.2–14 mg/kg of DON for corn silage, and 0.48–2.6 mg/kg of ZEN and 0.8–10 mg/kg of DON for whole-crop rice silage. The resulting mean recoveries ranged from 104% to 111% for ZEN and from 97.9% to 107% for DON. The repeatability and reproducibility, expressed as relative standard deviations (RSD_r and RSD_R), were less than 6.1% and 8.8% for ZEN, and less than 8.3% and 19% for DON, respectively. The HorRat values were less than 0.53 for ZEN and less than 1.2 for DON. These results demonstrated that the method is suitable for the inspection of ZEN and DON in silage.

食品衛生学雑誌, 66(6), 165-171 (2025).

DOI: 10.3358/shokueishi.66.165

3 Quantitative Real-Time PCR for *Fusarium graminearum* sensu stricto and *F. asiaticum* Infection in Wheat Kernels

YAMAGAMI Yohei, KANAZASHI Yuhei,
INOUE Hiroyoshi, NAKAGAWA Hiroyuki,
KUSHIRO Masayo and FURUKAWA Tomohiro

To develop effective measures for controlling *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination in wheat, accurate quantification of *Fusarium* infection is essential. We developed a species-specific real-time PCR assay as a reliable quantification method for *Fusarium graminearum* sensu stricto (s. str.) and *F. asiaticum* infection in wheat. Two types of assays were evaluated: SYBR Green and TaqMan assays. Total DNA was extracted from wheat kernels harvested from a field where *F. graminearum* s. str. and *F. asiaticum* infection in wheat was artificially promoted, and *EF1a* gene copy numbers were quantified using both assays. Strong correlations were observed between the copy numbers obtained from the two assays ($r = 0.97$ for bulk samples), as well as between the *EF1a* gene copy number (SYBR Green assay) and ergosterol content ($r = 0.88$). These results indicate that real-time PCR provides a reliable method for quantifying *F. graminearum* s. str. and *F. asiaticum* infection. In particular, the primer and probe sequences prepared in this study were specific to *F. graminearum* s. str. and *F. asiaticum*, making the TaqMan assay suitable for quantifying infections by these species.

JSM Mycotoxins, 76(1), 3-8 (2026).

DOI: 10.2520/myco.76-1-2

4 Survey of trichothecene contamination in imported and domestically produced feed in Japan

YAMAGAMI Yohei, NOMURA Masayo and
AOYAMA Koji

As part of the Surveillance/Monitoring Programme

by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, we investigated trichothecenes in 301 feed ingredient and 176 complete feed samples collected from across Japan between 2016 and 2022. Ten trichothecenes, including six type B trichothecenes—deoxynivalenol (DON), 3-acetyldeoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol (15-AcDON), deoxynivalenol-3-glucoside (D3G), nivalenol (NIV), and fusarenon-X—and four type A trichothecenes—T-2 toxin, HT-2 toxin, diacetoxyscirpenol, and neosolaniol—were quantified using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Type B trichothecenes were frequently detected, whereas type A trichothecenes were less common. Maize contained the greatest diversity of trichothecenes, with higher concentrations of DON in samples from the United States and of NIV in samples from Brazil. Contamination in maize varied depending on its origin. As a primary component of complete feed, maize contributed to overall trichothecene contamination, as indicated by similar yearly variations in total (type A and B) trichothecene concentrations; positive correlations among DON, 15-AcDON, and D3G; and the same most frequent combination, DON + 15-AcDON + D3G + NIV detected in both matrices. Although DON concentrations in complete feed samples remained below the guidance values in Japan, multiple trichothecenes were frequently detected. These data provide a baseline for regulatory monitoring for both imported and domestically produced feeds in Japan. Furthermore, feed diversification, attributable to increased feed costs and climate variability necessitates continued monitoring of susceptible ingredients, as trichothecene occurrence and concentrations can vary by feed type, origin, and year.

Mycotoxin Research, 42(33), (2026).

DOI: 10.1007/s12550-026-00637-1

飼料研究報告編集委員

委員長 橋本 陽子

副委員長 古川 明

青山 幸二

西村 真由美

浅尾 美由起

橋本 仁康

大島 慎司

日比野 洋

小塚 健志

山上 陽平

小森谷 敏一

山多 晴子

鈴木 知華

山多 利秋

高橋 亜紀子

吉永 晋

永原 貴子

飼料研究報告 第51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 050-3797-1858

FAX 048-601-1179

<https://www.famic.go.jp/>

令和8年10月

編集 飼料研究報告編集委員会