

平成 22 年度生産資材安全性確保調査・試験事業
「有害物質等の家畜等への移行調査事業」
(2) エトキシキンの牛への移行調査 報告書

社団法人 日本科学飼料協会
財団法人 畜産生物科学安全研究所

1. 目的

飼料の使用が原因となって、家畜の健康に被害が生じたり、残留基準を超える物質を含む畜産物が生産されたりすることを防止するため、飼料及び飼料添加物の基準及び規格等を設定し、検査等を通じて監視が行われているが、飼料及び飼料添加物の基準及び規格等の設定には、これらの物質の畜産物等への移行に関する科学的情報が必要となる。

このため、飼料中に残留した有害物質等が家畜を通じて畜産物等に移行する量を把握するための試験（飼養試験）を実施する。

2. 飼養試験

(1) 試験実施場所

社団法人日本科学飼料協会 科学飼料研究センター（千葉県成田市吉倉 821）

(2) 試験担当者

(3) 調査対象有害物質

エトキシキン（1, 2 - dihydro - 2, 2, 4 - trimethylquinolin - 6 - yl ethyl ether、純度 25 %、コーキン化学）を用いた。

(4) 試験方法

1) 供試動物

導入前の搾乳量が 25.0～35.0 kg/日以上ホルスタイン種泌乳牛（36～105 月齢）を 9 頭用いた。なお、供試牛は導入後 14～27 日間の予備飼育を行って健康状態及び産乳状況に異常がないことを確認したのち試験に用いた。

2) 試験区の設定

全給与飼料の重量比で 50、150 及び 500 ppm に相当するエトキシキンを添

加するエトキシキン添加区 3 区を設定した。

各試験区の濃度については、以下 2 点を踏まえて設定した。

- ① 通常、牛用飼料に含まれるエトキシキン濃度は 100 ppm 未満と推測されること
- ② 飼料安全法で規定されているエトキシキンの使用基準の妥当性を確認するためには 150 ppm での試験を行う必要があること

(参考) 牛用飼料に含まれるエトキシキンの濃度の推定

- ・ 牛用飼料に直接エトキシキンを添加することはなく、牛用飼料に含まれるエトキシキンはビタミン A 等由来がほとんど
- ・ ビタミン A 等を製造する際に添加されるエトキシキンの濃度は最大 10 %
- ・ 牛用飼料に添加されるビタミン A 等の割合は一般的に 0.1 %

以上から、牛用飼料に含まれるエトキシキンの濃度は最大で 10 % × 0.1 % = 100 ppm であるが、製造過程でエトキシキン自身が酸化されることを考慮すると、通常、牛用飼料に含まれるエトキシキンの濃度は 100 ppm 未満と推測される。

供試牛を予備飼育期間中の搾乳量の分布がほぼ均等となるように各区に 3 頭ずつ割り付けて、28 日間飼育した。各供試牛へのエトキシキンの給与量は、全給与飼料重量から個体毎に算出し、毎回の飼料給与時に、少量の配合飼料と混合して給与した。

配合飼料及び乾草は、市販の乳用牛飼育用配合飼料（雪印配合飼料マルチフィット 16、雪印種苗、表 1）及び米国産のチモシーを用い、原物比で 10 : 8 の割合で給与した。飼料給与量は、日本飼養標準による可消化養分総量（TDN）要求量（農業・食品産業技術総合研究機構、2007）を充足する量を個体毎に算出し、朝及び夕方に半量ずつ定量給与した。

表 1 配合飼料の表示

原材料の区分	配合割合	原材料名
穀類	42 %	とうもろこし、末粉、加熱大豆、大麦、(マイロ)、(小麦粉)
そうこう類	35 %	コーングルテンフィード、米ぬか、ふすま、とうもろこしジスチラージグレインソリュブル
植物性油かす類	13 %	ナタネ油かす、大豆油かす
その他	10 %	糖蜜、アルファルファミール、炭酸カルシウム、アルファルファ、とうふかす、食塩、リン酸カルシウム

含有する飼料添加物の名称；ビタミン A、ビタミン D₃、ビタミン E、ニコチン酸、コリン、炭酸マンガン、硫酸銅、硫酸コバルト、炭酸亜鉛、ヨウ素酸カルシウム
 成分量；粗たん白質 16.0 %以上、粗脂肪 3.0 %以上、粗繊維 10.0 %以上、粗灰分 10.0 %以上、カルシウム 0.50 %以上、リン 0.30 %以上、可消化養分総量 72.0 %以上
 注) () 内の原材料は原料事情等により使用しないことがある。

3) 飼養管理

供試牛は、開放型牛舎内に設置したゴム製床マット (1.4×2.2 m) 上でタイストールにより個体毎につき飼いした。敷料にはオガクズを用いた。

搾乳はバケットミルクカーを用いて、1日2回(概ね午前8時30分及び午後4時30分)実施した。飲水は井水を自由飲水させた。また、固形塩(鉍塩 E100TZ、日本全薬工業)を自由舐食させた。試験期間中にワクチネーションは実施しなかった。

4) 調査項目

① 飼養試験成績

導入日、試験開始日及び飼育終了日に個体別体重を測定するとともに、各回の飼料給与時に前回給与分の残飼の有無を確認した。搾乳量は、各回の搾乳時に個体毎に測定し、前日夕方と当日朝の搾乳量を合計して1日泌乳量を算出した。また、毎日の健康状態を個体別に各回の搾乳時に観察した。

② 分析用検体の採材

ア) 供試飼料

配合飼料及び乾草を試験開始時に採材して分析用検体とし、分析実施

施設に送付した。

イ) 乳汁

給与開始前、給与開始後 1、3、7、14、21 及び 28 日の乳汁を個体別に採材して分析用検体とした。なお、乳汁の採材にあたっては、当該日の夕方及び翌朝の搾乳時にバケットミルカー内の乳汁を攪拌したのち約 1/10 量を採取して冷蔵（5 °C 以下）保存し、1 日分を混合したのち 50 mL×2 検体調製した。

これらの検体は、調製後冷凍保存（約 -25 °C）し、冷凍条件で分析実施施設に送付した。

ウ) 臓器・組織

全供試牛を、飼育終了日にソムノペンチル（共立製薬）の静脈内投与により全身麻酔を施したのち放血屠殺し、主要臓器について剖検したのち、個体別に筋肉（背最長筋）、脂肪（腎臓周囲脂肪）、肝臓及び腎臓を採材して分析用検体を調製した。

これらの検体は、採材後直ちにドライアイス・アセトンにより急速凍結したのち冷凍庫（-25 °C 以下）内で保存し、凍結条件で分析実施施設に送付した。

5) 試験実施日

供用牛の馴致開始日、給与開始日、最終給与日、屠殺・採材日は表 2 に示したとおりである。

表 2 試験実施期間

区	個体番号	馴致開始日	給与開始日	最終給与日	屠殺・採材日
50 ppm 添加区	164	1月12日	2月1日	2月28日	3月1日
	165	1月12日	2月1日	2月28日	3月1日
	167	1月13日	2月1日	2月28日	3月1日
150 ppm 添加区	162	1月7日	2月2日	3月1日	3月2日
	191	1月19日	2月2日	3月1日	3月2日
	166	1月12日	2月2日	3月1日	3月2日
500 ppm 添加区	163	1月7日	2月3日	3月2日	3月3日
	161	1月7日	2月3日	3月2日	3月3日
	160	1月7日	2月3日	3月2日	3月3日

3. 分析法の検討・開発、妥当性の確認等

(1) 試験実施場所

財団法人 畜産生物科学安全研究所 (神奈川県相模原市緑区橋本台 3-7-11)

(2) 試験担当者

[Redacted]

(3) 方法

試料分析は、飼料分析基準の分析方法を応用し、メタノールで抽出し、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC-FL) によりエトキシキン进行分析した (農林水産消費安全技術センター 飼料分析基準研究会、2009)。

乳汁、筋肉、肝臓、腎臓及び脂肪の 2 濃度 (定量限界 0.01 $\mu\text{g/g}$ 相当及び定量限界の 10 倍 0.1 $\mu\text{g/g}$ 相当) の添加試料における真度 (添加回収率) は平均 (試行 3 回、3 日間) で、日内では腎臓の 77 % ~ 乳汁の 109 %、日間では筋肉の 78 % ~ 乳汁の 104 % であった。精度 (変動係数) は、日内では筋肉の 2.7 % ~ 乳汁の 11 %、日間では筋肉の 2.7 % ~ 腎臓の 8.4 % であった (表 3-1)。

また、配合飼料及び乾牧草の 2 濃度 (定量限界 1 $\mu\text{g/g}$ 相当及び定量限界の 10 倍 10 $\mu\text{g/g}$ 相当) の添加試料における真度 (添加回収率) は平均 (試行 3 回、1 日間) で、乾牧草の 76 % ~ 配合飼料の 107 %、精度 (変動係数) は、配合飼料の 0.54 % ~ 乾牧草の 2.0 % であった (表 3-2)。

定量限界は、乳汁、筋肉、肝臓、腎臓及び脂肪で 0.01 $\mu\text{g/g}$ (ppm)、配合飼料及び乾牧草で 1 $\mu\text{g/g}$ (ppm) とし、いずれも S/N=10 以上であることを確認した。

定量限界相当濃度を含む 5 濃度段階による検量線は、0.05 ng ~ 2 ng の測定範囲で良好な直線性 ($r \geq 0.999$) を示した。

また、各試料に関してエトキシキンの保持時間付近には、定量を妨害するピークがないこと (エトキシキンの定量限界相当の 1/3 未満) を確認した。

表 3-1 添加回収試験結果（乳および臓器・組織）

試料	添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	試行日	回収率 (%)			日内変動 (%)		日間変動 (%)	
			試行①	試行②	試行③	平均	変動係数	平均	変動係数
乳	0.01	1	92	90	98	93	4.5	97	5.1
		2	97	98	96	97	1.0		
		3	96	107	101	101	5.4		
	0.1	1	108	107	112	109	2.4	104	7.4
		2	110	96	98	101	7.5		
		3	92	103	114	103	11		
筋肉	0.01	1	83	87	86	85	2.5	86	4.4
		2	83	82	92	86	6.4		
		3	93	86	86	88	4.5		
	0.1	1	81	75	77	78	4.0	78	2.7
		2	79	79	79	79	0		
		3	81	77	76	78	3.3		
肝臓	0.01	1	88	78	78	81	7.2	83	7.7
		2	78	76	81	78	3.2		
		3	88	93	90	90	2.8		
	0.1	1	82	75	79	79	4.4	81	4.7
		2	80	77	79	79	1.9		
		3	83	88	83	85	3.4		
腎臓	0.01	1	84	90	77	84	7.7	88	8.4
		2	90	81	83	85	5.5		
		3	88	98	99	95	6.4		
	0.1	1	94	94	80	89	9.1	83	8.4
		2	82	74	76	77	5.5		
		3	81	83	81	82	1.5		
脂肪	0.01	1	91	80	80	84	7.6	86	5.2
		2	89	91	88	89	1.7		
		3	84	82	88	85	3.6		
	0.1	1	83	76	80	80	4.4	82	5.9
		2	88	87	87	87	0.67		
		3	77	84	77	79	5.1		

表 3-2 添加回収試験結果（配合飼料および乾草）

試料	添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	試行	回収率 (%)			日内変動 (%)	
			試行①	試行②	試行③	平均	変動係数
配合飼料	0.01	1	106	109	107	107	1.4
	0.1	2	106	107	107	107	0.54
乾草	1	1	76	75	78	76	2.0
	10	2	81	82	79	81	1.9

4. 試験結果

(1) 飼育成績

搾乳量、飼料摂取量及び体重は表 4-1~4-3 に示したとおりであり、いずれの項目においてもエトキシキン給与量に対応した用量依存的な傾向は認められなかった。

なお、500 ppm 添加区では 1 頭（160 号牛）が給与開始後 9 日に乳房炎を発症したことから乳房炎軟膏投与による治療を給与開始後 12 日から 2 日間連続して実施した結果、正常に復した。

この個体以外には、健康状態に異常は観察されなかった。

表 4-1 体重 (kg)

区	導入日 (kg)	給与開始日 (kg)	飼育終了日 (kg)
50 ppm 添加区	596 \pm 80	612 \pm 49	597 \pm 41
150 ppm 添加区	640 \pm 81	659 \pm 56	631 \pm 70
500 ppm 添加区	584 \pm 42	622 \pm 34	602 \pm 29

注) 平均値 \pm 標準偏差 (n=3)

表 4-2 飼料摂取量 (kg)

区	配合飼料	乾草
50 ppm 添加区	11.2 \pm 0.6	8.9 \pm 0.5
150 ppm 添加区	10.7 \pm 0.9	8.5 \pm 0.8
500 ppm 添加区	11.5 \pm 1.1	9.2 \pm 0.9

注) 平均値 \pm 標準偏差 (添加区 ; n=3)

表 4-3 搾乳量 (kg/日)

区	1 週	2 週	3 週	4 週	平均
50 ppm 添加区	20.2±1.5	20.7±1.0	20.3±1.1	20.7±0.5	20.6±0.9
150 ppm 添加区	18.7±3.0	18.8±2.0	18.5±2.0	18.3±1.7	18.6±2.2
500 ppm 添加区	19.0±1.7	19.0±0.3	19.2±0.9	19.1±0.3	19.1±0.8

注) 平均値±標準偏差 (n=3)

2) 分析結果

① 配合飼料および乾草中のエトキシキン含有量

本試験で供試した配合飼料および乾草からはエトキシキンは検出されなかった (定量限界 ; 1 ppm)。

② 乳中のエトキシキン含有量

エトキシキン給与期間中における乳中のエトキシキン含有量は表 5-1 及び 5-2 に示したとおりであり、50 ppm 添加区および 150 ppm 添加区ではいずれの時点においてもエトキシキンは検出されなかった (定量限界 ; 0.01 ppm)。

一方、500 ppm 添加区では、給与開始前にはエトキシキンは検出されなかったが、給与開始後 1 日において 3 例中 1 例で、給与開始後 7 日において 3 例中 2 例で 0.01~0.02 ppm のエトキシキンが検出され、給与開始後 14 日以降ではすべての個体で 0.02~0.03 ppm のエトキシキンが検出された。

表 5-1 乳中のエトキシキン含有量 (開始前~給与開始後 3 日、ppm)

区	給与開始前	給与開始後 1 日	給与開始後 3 日
50 ppm 添加区	< 0.01	< 0.01	< 0.01
150 ppm 添加区	< 0.01	< 0.01	< 0.01
500 ppm 添加区	< 0.01	< 0.01~0.02	< 0.01

注) 平均値±標準偏差 (n=3)、定量限界 0.01 ppm

表 5-2 乳中のエトキシキン含有量 (給与開始後 7~28 日、ppm)

区	給与開始後 7 日	給与開始後 14 日	給与開始後 21 日	給与開始後 28 日
50 ppm 添加区	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
150 ppm 添加区	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
500 ppm 添加区	< 0.01~0.02	0.03±0.01	0.02±0.00	0.03±0.01

注) 平均値±標準偏差 (n=3)、定量限界 0.01 ppm

③ 臓器・組織中のエトキシキン含有量

臓器・組織中のエトキシキン含有量は表 6 に示したとおりであって、50 ppm 添加区の筋肉、脂肪、肝臓および肝臓からはエトキシキンは検出されなかった（定量限界；0.01 ppm）。

表 6 給与開始後 28 日における臓器・組織中のエトキシキン含有量（ppm）

区	筋肉	脂肪	肝臓	腎臓
50 ppm 添加区	<0.01	0.04±0.01	<0.01	<0.01
150 ppm 添加区	<0.01~0.01	0.14±0.04	<0.01~0.01	<0.01~0.01
500 ppm 添加区	<0.01~0.03	0.68±0.12	0.05±0.01	0.01±0.01

注) 平均値±標準偏差 (n=3)、定量限界 0.01 ppm

150 ppm 添加区の筋肉、肝臓および腎臓ではそれぞれ 3 例中 1 例でエトキシキンは 0.01 ppm 検出され、脂肪では 3 例全てからエトキシキンは 0.11~0.18 ppm（平均 0.14 ppm）検出された。

500 ppm 添加区の筋肉では 3 例中 2 例で 0.01 および 0.03 ppm のエトキシキンは検出され、脂肪、肝臓および腎臓では 3 例全てから 0.60~0.82 ppm（平均 0.68 ppm）、0.04~0.06 ppm（平均 0.05 ppm）および 0.01~0.02 ppm（平均 0.01 ppm）検出された。

5. 考 察

エトキシキンは飼料安全法により飼料の品質の低下の防止（酸化防止剤）を目的とする飼料添加物に指定されており、飼料中での濃度は BHT（ジブチルヒドロキシトルエン）および BHA（ブチルヒドロキシアニソール）との合計量で飼料 1 トンあたり 150 g 以下と規定されている（農林省、1976）。また、牛の筋肉、肝臓および腎臓では 0.5 ppm、牛の脂肪では 5 ppm の残留基準値が設定されている（厚生労働省、2005）。なお、乳については残留基準値が設定されていないことから一律基準値（0.01 ppm）が適用されることになる。

本試験では、乳牛に対して全給与飼料中の濃度で 50~500 ppm に相当するエトキシキンを 28 日間継続給与し、給与期間中の乳を経時的に採材するとともに、給与終了時に筋肉、脂肪、肝臓および腎臓を採材して、定量限界 0.01 ppm の HPLC-FL 法によりエトキシキンの畜産物への移行量を調査した。

その結果、乳については、500 ppm 添加区では 0.01 ppm 以上のエトキシキンは検出されたが、飼料安全法に規定されている使用基準の最大濃度（150 ppm）

のエトキシキンを含む飼料を給与した場合には、いずれの採材時点においても定量限界（0.01 ppm）未満であって、飼料安全法を順守していれば、乳中のエトキシキン濃度が一律基準値を超えるおそれはないと推察される。

また、筋肉、肝臓および腎臓についても、飼料安全法に規定されている使用基準の最大濃度（150 ppm）のエトキシキンを含む飼料を給与した場合に 3 例中 1 例でエトキシキンが 0.01 ppm 検出されたが、その他の 2 例ではいずれも定量限界未満であった。脂肪では 3 例全てからエトキシキンが 0.11～0.18 ppm 検出されたが、いずれも厚生労働省が定めている残留基準値を大きく下回っており、乳と同様に、飼料安全法を順守していれば、筋肉、肝臓、腎臓及び脂肪中のエトキシキン濃度が残留基準値を超えるおそれはないと推察される。

8. 参考文献

- 農業・食品産業技術総合研究機構（2007）．日本飼養標準・乳牛（2006年版），中央畜産会，東京．
- 農林省（1976）．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 日付，農林省令第 35 号．
- 農林水産消費安全技術センター 飼料分析基準研究会（2009）．飼料分析法・解説（2009），社団法人 日本科学飼料協会，東京
- 厚生労働省（2005）．食品、添加物等の規格基準の一部改正の件，平成 17 年 11 月 29 日付，厚生労働省告示第 499 号．