

令和元年度

山梨県衛生環境研究所  
研究成果発表会

要 旨 集

令和2年3月19日（木）

新型コロナウイルス感染症患者の国内発生による、令和2年3月12日(木)開催予定の成果発表会中止に伴い、当所の研究発表及び参加校が発表予定でありました研究発表のうち、当所ホームページにおいて掲載可能な演題につきまして要旨集を作成いたしました。

御協力頂きました、参加高等学校及び参加大学、並びに関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

## 令和元年度 山梨県衛生環境研究所研究成果発表会 発表要旨

- 1 山梨県大月市岩殿山礫岩層の礫の起源について  
県立都留高等学校 自然科学部 村岡宏晃・小林大翔・阿竹花菜女
- 2 味覚センサーによる本県産ミネラルウォーターの特徴  
衛生環境研究所生活科学部 山本敬男
- 3 インフルエンザウイルスにおける薬剤耐性遺伝子の検索  
衛生環境研究所微生物部 大沼正行
- 4 液体中の固体のライデンフロスト現象について  
県立甲府南高等学校 物理宇宙部 横尾颯人・小宮山拓海
- 5 糖の比率による蜂蜜の結晶化の傾向  
北杜市立甲陵高等学校 佐藤麦太・服部広平
- 6 遺伝的な交流に与える砂防ダムの影響評価と改良  
山梨大学 郡司優太・加藤大地・宮崎淳一
- 7 果汁飲料等のパツリン試験法の検討  
衛生環境研究所生活科学部 濟藤友季子
- 8 動物に由来する自然毒試験法に関する取り組み  
衛生環境研究所生活科学部 小泉美樹
- 9 植物に由来する自然毒試験法に関する取り組み  
衛生環境研究所生活科学部 小泉美樹
- 10 HS-SPME-GC/MS による食品中低沸点有機化合物の測定  
衛生環境研究所生活科学部 山本敬男
- 11 収去食品からの第三セフェム系及びカルバペネム系薬剤耐性大腸菌群の検出状況  
衛生環境研究所微生物部 植松香星
- 12 本栖湖の水色（水の色）が一時的に悪化した要因  
衛生環境研究所環境科学部 長谷川裕弥
- 13 県内河川における外来珪藻調査  
衛生環境研究所環境科学部 堀内雅人

### 【特許紹介】

- マルチプレックスシヤトル PCR による食中毒菌の一括検出法  
衛生環境研究所微生物部 柳本恵太



# 山梨県大月市岩殿山礫岩層の礫の起源について

○村岡 宏晃, 小林 大翔, 阿竹花菜女(山梨県立都留高等学校 自然科学部)

## 1. はじめに

岩殿山は山梨県東部のJR中央線の大月駅の北東約1kmのところある標高634mの山である。花崗岩地形のように切り立った岩肌が特徴であるが、実際は礫岩層である。この岩殿山を構成する礫岩層が岩殿山礫岩層である。本校では、10年間にわたって周辺の地層や礫の調査・研究を行ってきた。

## 2. 調査の動機

岩殿山礫岩層の北側には、砂岩や粘板岩から構成される四万十層が分布しているが、山梨県北都留郡丹波山村の北方では、青岩鍾乳洞があったり、山梨県と東京都、埼玉県の県境にある雲取山の付近には石灰岩層も分布している。しかし、岩殿山礫岩層を構成する礫には石灰岩は含まれない。礫の起源はどこにあるのか疑問を持ち調査を行った。

## 3. 調査方法と調査内容

調査・試料採取は、国道139号線沿いを中心に大月市の岩殿山から北側の丹波山村まで、調査を行った。岩殿山の北には松姫峠(標高1,250m)・大丹波峠(標高920m)と、丹波川や小菅川の谷がある。四万十層からは、その地層を構成する砂岩を、岩殿山礫岩層からは砂岩礫を採取した。採集したものを、肉眼および薄片を偏光顕微鏡下で観察した。



図.1 岩殿山の砂岩礫の偏光顕微鏡写真

## 4. 結果

### (1) 肉眼での岩石の観察結果

採取した岩石を観察したところ、長さ7~10mmほどの泥岩片と思われる粒子を含んだ特徴のよく似た砂岩が、松姫峠南側四万十層と、岩殿山礫岩層中の砂岩から見つかった。

### (2) 偏光顕微鏡による観察結果

各地点の砂岩に含まれる石英粒子の最大粒径と円磨度の関係をまとめたものが図. 1である。岩殿山の礫と松姫峠よりも南側の礫は同じような相関がみられたが、松姫峠よりも北側の礫は異なる傾向があることが分かった。これらのことから、岩殿山を構成する礫は、現在の松姫峠よりも近い場所から供給されたと考えられる。

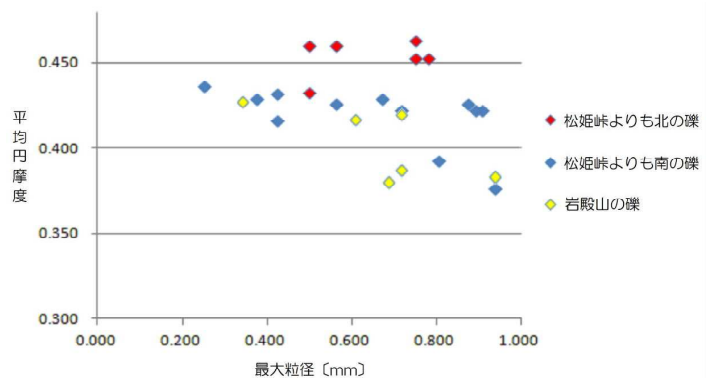


図.2 採集した礫の平均円磨度と最大粒径の相関

## 5. 考察

岩殿山礫岩層の礫と北側に分布する四万十層を構成する砂岩を比較した結果、岩殿山礫岩層を構成する礫は現在の松姫峠よりも南側の四万十層から供給され、それよりも北側の四万十層から礫は供給されなかったことになる。以上のことから、岩殿山礫岩層が堆積した時期に既に松姫峠を含む尾根が形成され、松姫峠の北側には小菅川・丹波川などの谷が存在し、松姫峠よりも北側の岩石は南側に流れ込めない環境にあったと考える。

# 味覚センサーによる本県産ミネラルウォーターの特徴

○山本敬男, 小泉美樹, 小林 浩 (山梨県衛生環境研究所)

## 【 背景と目的 】

本県はミネラルウォーターの生産量が全国1位を誇り、その水質は非常に良好で多くが軟水に分類される。この良質な水のさらなるイメージアップを図るため、本県では、「やまなし水ブランド戦略」を策定した。そのため、「やまなし水ブランド」の向上に寄与する研究が必要とされた。

そこで、やまなしの水ブランド力の向上に寄与することを目標とし、県内産ミネラルウォーターのミネラル含有量と香り・味覚を化学的に分析して各製品を特長ごとに分類し、本県のも多様で良質なミネラルウォーターの特性を「見える化」することとした。

今回は、県内産ミネラルウォーターの味覚について、味覚センサーを用いて化学的に分析して各製品の特徴を評価したので報告する。

## 【 方法 】

県内産のミネラルウォーター24銘柄と、県外産2銘柄、外国産4銘柄の計30銘柄について、味覚センサーによる味覚分析を行った。味覚センサーは、(株)インテリジェントセンサーテクノロジー社製味覚認識装置 SA402B を使用した。この装置は、酸味、塩味、旨味、苦味、渋味のそれぞれの提味物質に反応するセンサーにより、味の種類の分別、並びに味の強度を数値として測定することが出来る。味覚センサーのデータに加え、専門家による官能試験のデ

ータも併せて解析した。

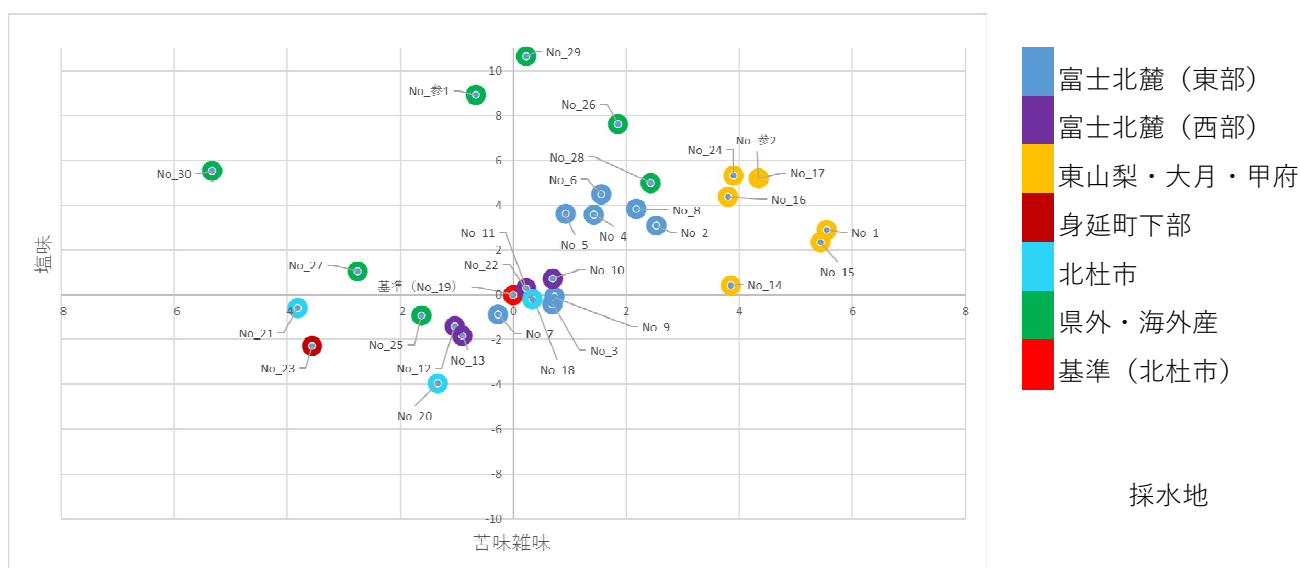
## 【 結果と考察 】

今回使用した味覚認識装置は、先味(舌に触れた瞬間に感じる味)として、酸味、苦味雑味、渋味刺激、旨味、塩味を、後味(舌に残る味)として苦味、渋味、旨味コクを数値化することが可能である。

今回分析したミネラルウォーターはどんな味を有するのかを解析したところ、苦味雑味、渋味刺激、塩味、旨味の先味4種類であった。後味については確認できなかった。

次に北杜市採水の製品 No19 を基準として各製品の味の比較を行った。下図は、横軸に苦味雑味を、縦軸に塩味の強度を取り、各製品の味の強度をプロットしたものである。採水地ごとに色分けを行った。官能検査では、苦味雑味は飲んだ際のキレ感に、塩味はコクや塩味など重厚感として表現できる。味覚センサーの結果と専門家による官能試験の結果を合わせて解析したところ、基準品に対する両者の評価は概ね一致していた。

また下図からは、採水地ごとに大まかな味の違いが見て取れる。ミネラルウォーターの味の違いは含有するミネラル成分によるので、今後は、各ミネラルウォーターのミネラル成分と味の関係を解析していく予定である。



# インフルエンザウイルスにおける薬剤耐性遺伝子の検索

○大沼正行, 西潟 剛 (山梨県衛生環境研究所)

## I はじめに

インフルエンザウイルス (inf) は、強力な感染力と頻繁な抗原変異により毎年冬季に流行する急性呼吸器感染症である。主な症状は、上気道炎や発熱、頭痛、関節炎などであるが、免疫力・体力の低い高齢者や乳幼児はしばしば重篤な症状を引き起こすこともあり、ワクチン接種による予防対策やノイラミニダーゼ (NA) 阻害薬による治療が欠かせないものとなっている。

NA 阻害薬は、季節性 inf (A/B 型) による重篤な諸症状を緩和するため、治療や予防目的で使われているが、ウイルスは遺伝子変異を起こしやすいため、NA 阻害薬耐性 inf の出現は常に危惧されている。

現在、NA 阻害薬耐性 inf の検出は、「抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス」(以下「サーベイランス」) に基づき、国立感染症研究所が季節性 inf (A/B 型) の薬剤感受性試験を、各地衛研が AH1pdm の H275Y 遺伝子変異の検出を全国規模で実施している。当所は、サーベイランスにより、これまで AH1pdm の遺伝子変異の検出を行ってきた。今回は、さらに AH3 型及び B 型の遺伝子変異の検出を行い NA 阻害薬耐性 inf の調査を実施したので報告する。

## II 方法

感染症発生動向調査事業として患者由来の咽頭拭液等を検査対象とした。2017/2018 シーズン (2017 年 9 月～2018 年 8 月) に 249 検体、2018/2019 シーズン (2018 年 9 月～2019 年 8 月) に 266 検体が当所に搬入され、インフルエンザ診断マニュアル (第 3 版) に基づいて、亜型の同定試験を実施した。

NA 阻害薬耐性検査は同マニュアルに従い、AH1pdm はウイルス培養液を検体としてリアルタイム RT-PCR 法を行い、AH1pdm の NA 阻害薬耐性の原因となる H275Y 遺伝子変異の検出を行った。AH3 型及び B 型は咽頭拭液等を検体として、ダイレクトシーケンス法を用いて遺伝子変異の検出を行った。

## III 結果

### 1. ウイルス検出状況

当所に搬入された 515 検体を検査したところ、486 検体から inf が検出された。内訳は、AH1pdm が 135 株 (27.8%)、AH3 型が 231 株 (47.5%)、B 型が 120 株 (24.7%) であった。

図 1 にシーズン別の型別検出状況を示した。

2017/2018 シーズンは、AH1pdm が 63 検体 (26.3%)、AH3 型が 73 検体 (30.4%)、B 型はビクトリア系統が 1 検体 (0.4%)、山形系統が 103 検体 (42.9%) それぞれ検出された。

2018/2019 シーズンは、AH1pdm が 72 検体 (29.3%)、AH3 型が 158 検体 (64.2%)、B 型はビクトリア系統が 11 検体 (4.5%)、山形系統が 5 検体 (2.0%) それぞれ検出された。

県内のウイルス検出状況は、2 シーズンともに全国の検出状況と同様であった<sup>1,2)</sup>。

### 2. NA 阻害薬耐性調査

AH1pdm は、2017/2018 シーズンに 63 株中 62 株を、2018/2019 シーズンに 72 株中 63 株を解析し、H275Y の遺伝子変異および H275H と H275Y が混合した遺伝子変異ともに検出されなかった。

AH3 型について、3 カ所の遺伝子変異の検出を行った結果、2017/2018 シーズンに解析した 73 株及び 2018/2019 シーズンに解析した 157 株では耐性に関与する変異は認められなかった。

B 型について、5 カ所の遺伝子変異の検出を行った結果、2017/2018 シーズンに解析した 97 株及び 2018/2019 シーズンに解析した 16 株では耐性に関与する変異は認められなかった。

## IV 考察・まとめ

今回調査を実施した 2017/2018、2018/2019 の 2 シーズンにおいて、NA 阻害薬耐性に関与する遺伝子変異を持つ inf は検出されなかったが、サーベイランスによる全国調査の結果<sup>3)</sup>では、耐性株が検出されていることから、県内でも NA 阻害薬耐性 inf が検出される可能性があるため、調査を継続する必要がある。

また本調査では耐性調査を実施していないが、2018 年 3 月から販売開始されたバロキサビルマルボキシル (ゾフルーザ) のサーベイランスの耐性調査の結果、NA 阻害薬よりも耐性率が高いことが明らかとなった<sup>2)</sup>。このことから、今後はゾフルーザを含めた薬剤耐性 inf の全国的な調査の動向を注視していく必要がある。

## V 引用文献

- 1) 国立感染症研究所：インフルエンザ 2017/2018 シーズン.病原微生物検出情報, 39, 181-183(2018)
- 2) 国立感染症研究所：インフルエンザ 2018/2019 シーズン.病原微生物検出情報, 40, 177-179(2019)
- 3) 国立感染症研究所：抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス,(<http://www.niid.go.jp/niid/ja/influ-resist.html>)(2020 年 1 月 7 日アクセス可能)

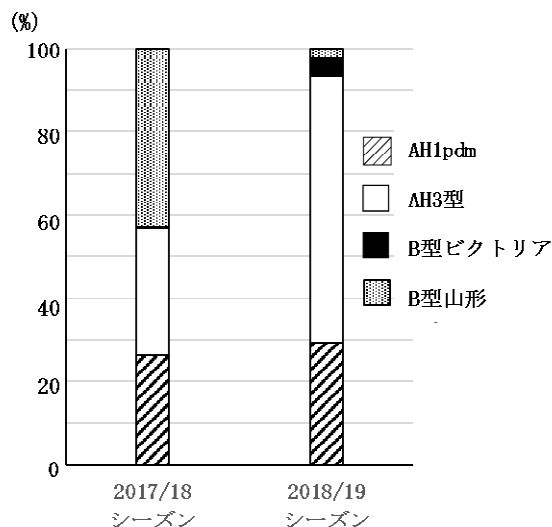


図1 シーズン別の型別検出状況

# 液体中の固体のライデンフロスト現象について

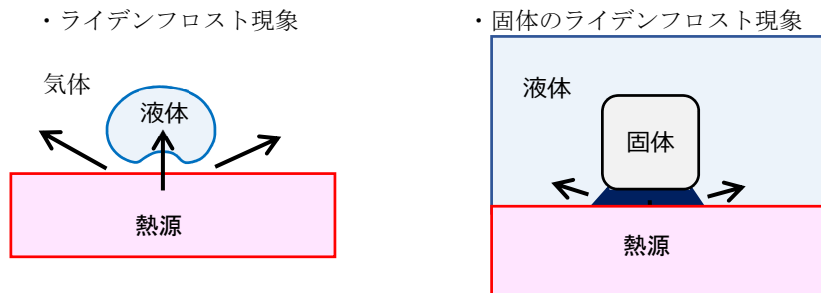
○横尾颯人（甲府南高校 物理宇宙部）、小宮山拓海（甲府南高校 物理宇宙部）

## 1. 研究動機・目的

液体を、その沸点に比べて高温に熱した金属板などの固体表面に滴らしたとき、液体が瞬時に全て蒸発せずしばらく存在し続ける現象をライデンフロスト現象という。我々は、液体中で固体を下から熱し、熱源と固体との間に液体を存在させることでも、同様の現象が起こるかに興味を持った。

## 2. 定義

この研究では、液体中において固体が融点を超えた温度で熱されたとき、固体の一部が融解して生じた液体の影響ですぐに融解されず、ある温度の範囲において、固体の融解時間が長くなることを「固体のライデンフロスト現象」と呼ぶことにする。



## 3. 研究内容

本実験では固体に氷、液体に油とエタノールを用いた。

- ① 熱する温度と氷の融解時間の関係調べる。

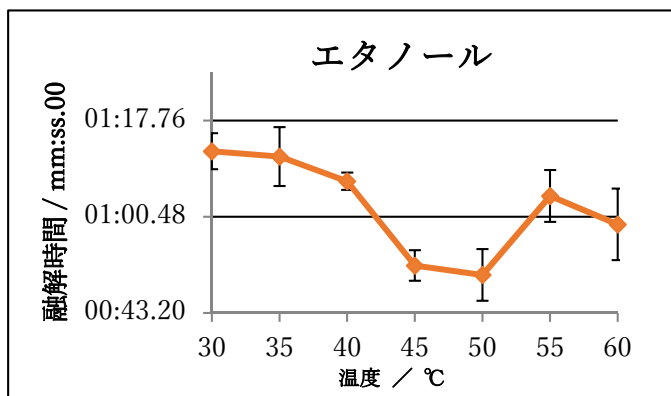
熱する温度と氷の融解時間の関係をグラフで表し、固体のライデンフロスト現象が起きているのか調べる。また、性質の異なる2種類の液体で実験を行い、周りの液体が固体のライデンフロスト現象に及ぼす影響を調べる。

- ② 氷の熱し方を変える。

氷を下方からのみ熱した場合と周りの液体全体から熱した場合で固体のライデンフロスト現象にどのような変化があるか調べる。



## 4. 結果



熱源の温度が55°C、60°Cになったとき融解時間は長くなった。

このことより、固体のライデンフロスト現象が起きたと考えられる。



# 糖の比率による蜂蜜の結晶化の傾向

甲陵高等学校 佐藤麦太 服部広平

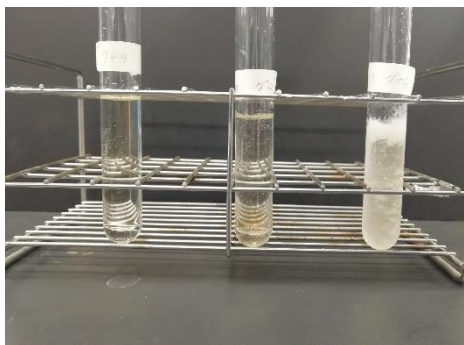
## 目的

蜂蜜には結晶化しやすいものとしにくいものがある。蜂蜜の主成分である糖の比率の違いに注目し、糖の割合と結晶化には相関関係があるのではないかと考えた。

## 方法

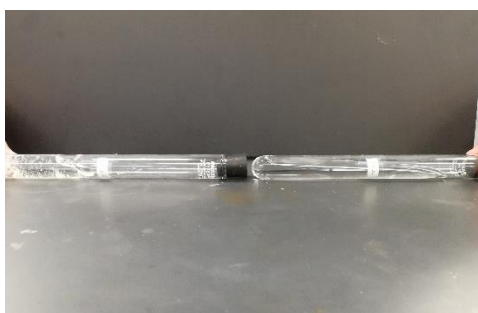
蜂蜜の主成分である三種類の糖のうち、蜂蜜に最も近いグルコース6g、フルクトース8g、スクロース1g、水5mlを基準とし、蜂蜜によって含有率の差が大きいフルクトースとグルコースを5%ずつ変化させた溶液を作成、変化の様子を観察した。

## 結果



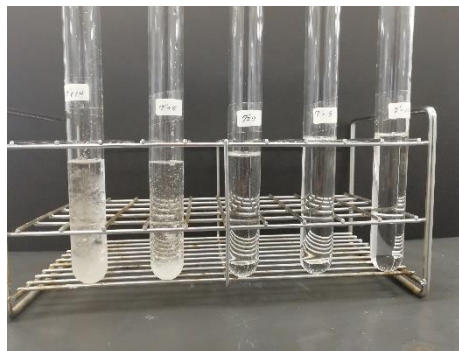
### 結晶化の様子

(右からグルコース+10%、基準液、フルクトース+10%)



### 粘性の違いの様子

(右からグルコース+10%、フルクトース+10%)



### 体積の変化の様子

(左からグルコースが多い溶液)

## 結論

グルコースが多く含まれる方が結晶化しやすいと考えられる。溶液の粘性も、グルコースが多い方が強かった。全ての実験で溶液に体積変化が見られたが、糖の含有率と体積に相関があるのかは分からなかった。

## 考察

グルコースの含有率が高い方が結晶化しやすかった理由として、フルクトースはグルコースに比べ水和力が高く、より多くの水分子と水素結合するため結晶化しにくかったと思われる。

## 課題

体積の変化が本当に糖の比率に相関を示すのかが突き止められなかった。

相関関係など存在せず、偶然一部の実験で糖の比率に相関を示しただけなのか、自分達の実験の精度が不十分で本当は完全な相関を示すのかが最後まで分からなかった。

# 遺伝的な交流に与える砂防ダムの影響評価と改良

○郡司優太（山梨大学）、加藤大地（山梨大学）、宮崎淳一（山梨大学）

## 目的

愛知県設楽ダムの建設予定地周辺のホトケドジョウ類を保護するために、移植候補地の探索や遺伝学的解析を行ってきた。その中で、調査地域のほとんどの小河川に数カ所の砂防ダムや堰堤が設置されており、魚類などの生物はそれらを乗り越えて上流には移動できず、遺伝的な交流が阻害されていると思われた。一方、スリット型の砂防ダムが設置されている小河川も存在し、防災と生物の遺伝的交流を維持しようという点で理想的と思われた。そこで本研究では、砂防ダムや堰堤の遊泳力の小さいホトケドジョウ類の遺伝的な交流に与える影響を調査するとともに、スリット型ダムの有効性を明らかにし、さらにスリット型ダムをより効果的に活用するための改善法を提案することを目的とする。

## 方法

2016年から毎年6月に荒尾川と宇連川の砂防ダム（前者は非スリット型、後者はスリット型）の上流、下流のそれぞれでタモ網とトラップを用いてトウカイナガレホトケドジョウを採集した。3cm以上の個体の体側3カ所に、標識としてイラストマーを注射することによって個体識別を行った。採集した翌日に標識した個体を採集した地点に放流した。2016年6月から2ヶ月毎に再捕獲を行い、ダム上下間での移動を調査した。

## 結果

2016年からの約4年間の調査で、荒尾川（非スリット型、高さ約2m）において標識個体の上流側から下流側への移動(1個体)を確認することはできたが、下流側から上流側への移動を確認することはできなかった。宇連川（スリット型）において、標識個体の上流側から下流側への移動(3個体)だけでなく、下流側から上流側への移動(5個体)を確認することができた。

## 考察

本研究において、スリット型ダムが遊泳力の小さいホトケドジョウ類のような小型の魚類に対しても移動の大きな障壁とならず、ダム上流と下流間の交流を維持させることが明らかとなった。調査を行った宇連川の調査地では、スリットダム下流にプール（時期により大きさは変動）が存在し、そこに堆積物も存在しており、ホトケドジョウ類のように遊泳力の小さい魚類がスリットダムを下流側から上流側に乗り越えるために準備する場所として利用できると考えられる。一方、スリットダムより約20m下流側からは底面がコンクリートで固められ、ホトケドジョウ類は棲息できず、スリットダムにアクセスするための障害となっている。このようなことから、スリットダムの改良策として、スリットダム直下流にプールを作ること、スリットダムの上下流側はできるだけ自然状態を残すことを提案する。

# 果汁飲料等のパツリン試験法の検討

○濟藤友季子，神宮司聡美，小泉美樹，小澤美紀，山本敬男，小林浩（山梨県衛生環境研究所）

## 1. はじめに

パツリンはペニシリウム属やアスペルギルス属等の真菌によって産生されるカビ毒であり、真菌が付着した果実の果汁等から検出事例が報告されている。パツリンの毒性については、動物実験において消化管の充血、出血、潰瘍等の症状が認められている。

わが国では、平成 15 年 11 月 26 日の食品衛生法改正により、リンゴの搾汁及び搾汁された果汁のみを原料とするものについては、パツリン含有量が 0.050ppm を超えるものであってはならないとの規格基準が設定された。

本県ではリンゴ果汁が生産されているが、パツリンの実態調査は実施されていない。そこで本検討では、平成 15 年 11 月 26 日付け食安発第 1126001 号（以下、通知）に記載された方法で試料の調製を行い、液体クロマトグラフタンデム質量分析法（以下、LC/MS/MS 法）又はガスクロマトグラフ質量分析法（以下、GC/MS 法）で分析し、両分析法の結果を比較した。

## 2. 試験方法及び試料

### (1) 試験法

試料にはパツリン検出限界未満のリンゴジュースを使用した。試料の調製は、通知に記載された方法で行い、測定は LC/MS/MS 法又は GC/MS 法により行った。GC/MS 法で測定する試料にあっては、トリメチル化剤により誘導体化を行ったものを試験溶液とした。

### (2) 妥当性評価方法

試料 5.0 g に、パツリン標準液を 0.010ppm 及び 0.050ppm となるように添加し、添加回収試験 (n=5) を行った。

## 3. 結果及び考察

### (1) LC/MS/MS 法における妥当性評価

LC/MS/MS 法における添加回収試験の回収率、回収率範囲及び相対標準偏差（以下、RSD）を表 1 に示した。食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン（平成 19 年 11 月 15 日食安発 1115001 号）（以下、ガイドライン）では、平均回収率及び RSD の目標値を添加濃度ごとに定めている。今回 LC/MS/MS 法で得られた平均回収率及び RSD はこの目標値を満たす値となった。しかし、0.050mg/kg 添加群において試行回数 5 回のうち 1 回でガイドラインにおける平均回収率の目標値の上限を超過し、本試験法では実際の含有量よりも定量値が高くなる可能性が示唆された。

パツリン標準液（0.150mg/L）及びパツリン未添加のリンゴジュース試料の LC/MS/MS 分析におけるクロマトグラムを比較した。パツリン未添加の試料

において、パツリンは検出されなかったが、標準液のパツリン保持時間である 9.61min 付近に、原料由来と思われるピーク（9.69min 及び 10.39min）が確認された。このことから、LC/MS/MS 法の添加回収試験において回収率が一部高くなった要因として、パツリンと原料由来物質のピークが重なることでパツリンの定量値に影響した可能性が考えられる。

### (2) GC/MS 法における妥当性評価

GC/MS 法における添加回収試験の回収率、回収率範囲及び RSD を表 2 に示した。平均回収率及び RSD はガイドラインの目標値を満たしていた。また、パツリンの保持時間付近に原料由来物質と思われるピークは認められなかった。

しかし、GC/MS 法では 2 つの課題が見受けられた。一つ目は GC/MS 法ではパツリンの誘導体化に時間と技術を要する点である。二つ目は、パツリン誘導体化物の経時的な安定性が好ましくない点である。GC/MS 法によりパツリン標準液（0.100ppm）を経時的に測定したところ、誘導体化後約 2 時間の測定値と比較し、約 8 時間後及び約 18 時間後の測定値は各々 80% 及び 61% まで減少した。

## 4. まとめ

LC/MS/MS 法及び GC/MS 法によるパツリン試験法の課題を比較した。その結果、LC/MS/MS 法では原料由来物質がパツリンの定量値に影響を与える可能性が示唆され、GC/MS 法では誘導体化に時間と技術を要することや、誘導体化物の経時的な安定性が好ましくないことが確認された。以上の課題を踏まえ、今後は LC/MS/MS 法における LC の分析条件の見直しを行い、原料由来物質の影響を排除することにより、迅速かつ正確な検査法を目指したい。

（なお、本検討の一部は令和元年度山梨県公衆衛生研究発表会で報告した。）

表 1 LC/MS/MS 法における添加回収試験結果 (n=5)

添加 (mg/kg)	回収率 (%)	回収率 範囲 (%)	RSD (%)
0.010	102.9	98.6-108.1	3.3
0.050	111.4	104.6-121.0	6.5

表 2 GC/MS 法における添加回収試験結果 (n=5)

添加 (mg/kg)	回収率 (%)	回収率 範囲 (%)	RSD (%)
0.010	108.9	102.0-116.0	5.1
0.050	91.2	81.7-108.3	9.7

# 動物に由来する自然毒試験法に関する取り組み

○小泉美樹，山本敬男，小林 浩（山梨県衛生環境研究所）

## 【 背景と目的 】

自然毒は、動植物が体内で生成または生物濃縮により蓄積する毒素である。自然毒による食中毒発生数は微生物由来のものより少ないが、毒性が強く発生数に対して重症例や死亡例が多い。

動物を喫食することで中毒を起こす自然毒を動物性自然毒と呼ぶ。動物性自然毒を有する動物は、その大半が海洋性魚介類である。当県は海洋を有していないため通常業務で魚介類中自然毒の検査を行っていないが、冷蔵機器の発達により多くの魚介類が流通している。特に、マグロの消費量は全国的に見ても上位であり、マグロ中のヒスタミンによる食中毒も発生した。

ヒスタミンによる食中毒は厚生労働省のまとめ<sup>1)</sup>によると年間 10～20 件程度発生しているが、食品衛生法の基準値が設定されていないため、通常業務で検査をしている自治体は少ないものと思われる。

今回は、ヒスタミン食中毒に対応するため試験方法の検討、評価を行ったので報告する。

## 【 自然毒の特徴と試験方法 】

ヒスタミンは、アミノ酸であるヒスチジンにヒスタミン産生菌が作用することによる微生物的腐敗で生成される。熱に安定で加熱では分解・除去することはできない。

発症時期：食後 30 分～数時間

症状：アレルギー様症状(顔面紅潮、嘔吐、腹痛等)

試験方法：不揮発性腐敗アミン高速液体クロマトグラフィーによる定量法<sup>2)</sup>を参照し、ダンシルクロリド試薬による蛍光誘導体化処理後、蛍光検出器付き液体クロマトグラフを用いて測定した。内部標準物質には 1,8-オクタジアミンを使用した。食中毒誘発を助長する一因<sup>3)</sup>と考えられる腐敗アミンであるカダベリン、スペルジミン、チラミン、プトレシンについて同時測定が可能であることを確認した。

## 【 結果と考察 】

平成 29 年度と令和元年に、地方衛生研究所等が実施した外部精度管理事業による試験精度の評価を受けた。結果

は良好であり、検討した試験方法は通常業務、食中毒の原因物質調査業務に使用できると思われた。

食中毒発生時には、原因物質特定のために迅速な試験実施が重要と考えられる。平成 29 年の外部精度管理事業では、前処理として固相カラムを使用した場合、定量値が添加量よりも低くなり、前処理から結果確認までの期間(以下、検査期間)が長くなる傾向が認められた。精製を実施しない場合は、定量値が添加量よりも若干高くなることが報告されたが、検査期間は短縮されることから、高濃度汚染による食中毒が疑われる場合、カラム精製を省略し、試料を希釈し測定することも速やかな結果報告のために有効であることが示唆された<sup>4)</sup>。また、試験の際には使用するガラス器具への吸着も考えられるため、試験期間の短縮は有用である。

外部精度管理では、試料の採取量を減らし、高速液体グラフ質量分析器(LC/MS/MS)を用いた機関もあったが、ヒスタミン類は試料中に偏在することが指摘されており、試料採取の減量は食中毒原因物質調査では実用的ではないと考えられた。しかし、LC/MS/MSを用いた場合、誘導体化を必要としないため、試験期間の短縮が可能であり、分析法として有用性は非常に高い。そのため、この方法による試験精度の検討は重要であると思われる。

今後は、LC/MS/MSによるヒスタミン分析法だけでなく、他の海洋動物性自然毒(マリントキシン)についての試験方法を検討する予定である。

## 【 引用文献 】

- 1) [mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000130677.html](http://mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000130677.html)
- 2) 日本薬学会編 衛生試験法・注解、205-207 (2015)
- 3) 寺田安一：腐敗中毒、健帛社、80(1971)
- 4) 平成 29 年度関東甲信静支部ブロックにおける精度管理事業報告書

# 植物に由来する自然毒試験法に関する取り組み

○小泉美樹, 山本敬男, 小林 浩 (山梨県衛生環境研究所)

## 【背景と目的】

自然毒は、動植物が体内で生成または生物濃縮により蓄積する毒素である。食中毒を起こす自然毒は毒性が強く重症例や死亡例が多い。

植物を喫食することで中毒を起こす自然毒を植物性自然毒と呼ぶ。植物性自然毒の食中毒発生数は近年増加傾向にあり、本県でもスイセンの誤食による植物性自然毒食中毒が発生した。

食中毒の再発を防ぐためには原因物質を特定するとともに食品中濃度の把握が重要である。この食中毒原因物質調査のために植物性自然毒の試験方法確立が必要である。

本報告では、集団食中毒の原因になることが多いジャガイモの芽や皮、緑変部分に多く含まれるとされる $\alpha$ -ソラニン、 $\alpha$ -チャコニンや、食中毒事例が頻発しているスイセン中のリコリン、ガランタミン、重症・死亡例の多いイヌサフラン、グロリオサに含まれるコルヒチンについて試験方法を検討し、食中毒事例への適応性を確認した。

## 【自然毒の特徴と試験方法】

### (1) $\alpha$ -ソラニン、 $\alpha$ -チャコニン

発症時期：食後 30 分～半日

症状：嘔吐、下痢、腹痛、目眩、動悸等

試料：ジャガイモを日光にあて緑変させたもの

前処理方法は、衛生試験法・注解 2010 を参考にした<sup>1)</sup>。分析には高速液体クロマトグラフィーを用いた。

### (2) リコリン、ガランタミン

発症時期：食後 30 分以内

症状：嘔吐、下痢、発汗、悪心、頭痛等

試料：県内で栽培されているスイセンの葉及び茎部分

調理後の濃度把握のため、試料の一部は調理した<sup>2)</sup>。試料の前処理は、植物性自然毒の一斉分析法<sup>3)</sup>を参考とし、高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS/MS)を用いて分析した。

### (3) コルヒチン

発症時期：食後数時間以降

症状：口腔・咽頭灼熱感、嘔吐、下痢、発熱、背部疼痛等

試料：グロリオサの根茎およびスープにコルヒチンを添加したもの

前処理は、植物性自然毒の一斉分析法<sup>3)</sup>を参考し、LC/MS/MSを用いて分析した。

## 【結果と考察】

### (1) $\alpha$ -ソラニン、 $\alpha$ -チャコニン

ジャガイモに含まれる $\alpha$ -ソラニン及び $\alpha$ -チャコニンは、芽や皮等に偏在し、水溶性が高く、除芽や剥皮、調理によって減少するとされる。当所で天日暴露により発芽を促した試料をホモジナイズし、関東甲信静ブロック各機関に配布し、試料中濃度を測定した。検出濃度は39～145  $\mu\text{g/g}$ (平均90  $\mu\text{g/g}$ )と濃度範囲がやや大きかった<sup>4)</sup>。

### (2) リコリン、ガランタミン

リコリン及びガランタミンは、ゆでこぼし後も3割程度植物中に残留し、調理後も有毒成分を除去できないことがわかった。また、スイセンの種類や個体によって含有するリコリン、ガランタミン濃度に差があることが示唆された<sup>2)</sup>。

### (3) コルヒチン

コルヒチンは令和元年に関東甲信静ブロックに所属する機関で同一試料を用いた外部精度管理を実施した。前処理に固相カラム精製を用いると試験期間の長期化、結果のばらつきが認められた<sup>5)</sup>。コルヒチンは工場加工で加熱分解するといわれている<sup>6)</sup>が、家庭における加熱では不十分な可能性があり、毒性が高く、調理後も喫食は危険である。

## 【まとめ】

これら物質の繰り返し測定精度は良好であり、食中毒発生時に原因物質特定のための試験方法として使用可能であると考えられた。また、LC/MS/MS分析ではリコリン、ガランタミン及びコルヒチンは同条件で測定でき、一斉試験を行うことが可能であることも確認できた。

今後は、本検討結果を活用し、県民への周知、注意喚起に活用するとともに、他の植物性自然毒の試験方法についてさらに検討を行う予定である。

## 【引用文献】

- 1) 衛生試験法・注解 2010 p272
- 2) 山本敬男ら：植物とその調理品に含まれるリコリン・ガランタミン測定法の検討(2018年度山梨衛環研成果発表会)
- 3) 山口奈穂ら：LC/MS/MSによる植物性自然毒の迅速一斉分析法の開発、第55回全国衛生科学技術協議会年会講演集、152-153 (2018)
- 4) 平成26年度関東甲信静ブロック精度管理事業報告書
- 5) 令和元年度関東甲信静ブロック精度管理事業報告書
- 6) fgc.go.jp/fsciis/foodSafetyMaterial/show/syu04310970482

# HS-SPME-GC/MS による食品中低沸点有機化合物の測定

○山本敬男, 小泉美樹, 小林 浩 (山梨県衛生環境研究所)

## 【 目的 】

食品の容器包装には様々な有機化合物(化合物)が使用され、代表的な包装資材として PET や PE などがある。これらの容器包装資材には可塑剤や原材料が残存する可能性があり、これら化合物の食品への移行の有無を知る必要がある。

僅かな食品中化合物の定量には、分離、精製した後、GC 法や HPLC 法などにより定量されることが多い。しかし、食品には糖やたんぱく質などが多量に存在し、測定精度に影響するため、目的とする化合物を選択的に装置に導くことが必要となる。

そこで、食品中の糖質やたんぱく質を選択的に取り除く方法のひとつとしてヘッドスペース(HS)法を利用した。HS バイアル内の気相内化合物を効率的に GC に導入するため固相マイクロカラム抽出(SPME: Solid Phase Micro Extraction)法を用いた。本報告では、ペースト状果実食品(ペースト食品)内の低沸点有機化合物の測定を試みたのでその概要を報告する。

## 【 試験方法 】

測定対象とした化合物は、アクリル樹脂などに用いられるアクリル酸メチル(AM)、アクリル酸エチル(AE)、アクリル酸 n-ブチル(AB)、アクリル酸 2-エチルヘキシル(AH)である。標準原液濃度は、AM 9.57、AE 9.23、AB 9.00、AH 8.87 mg/mL の MeOH 溶液とした。標準液は、これら原液を用い 4 種混合液とし、低濃度混合液は AM 0.000957、AE 0.000923、AB 0.00090、AH 0.000887mg/mL とし、10 倍高い濃度との範囲で検量線を作成し直線性を確認した。

100mL 用の HS バイアルに精製水 40mL、NaCl 15g を加え、ペースト食品約 18g をバイアル内に加えた。テフロンシールを敷いたゴムセプタムにて封印し、HS バイアルを 40°C 水浴に 20 分間静置し、気相に SPME を 1 分間暴露し GC/MS に導入した。なお、標準系列は、ペースト食品添加の有無の 2 系統を作成し、回収率を検討した。HS バイアル内の MeOH 濃度は標準系列に合わせ 1mL 添加した。

## 【 結果と考察 】

作成した検量線範囲ではいずれも  $r=0.99$  以上の直線性が得られた。しかし、それぞれの物質の応答値を比較すると、食品無添加の検量線は、いずれの物質とも濃度が高くなると応答値の低下が認められた。一方、食品を添加した検量線では AH を除き応答値の低下傾向に改善が認められた。この結果から、検量線の作成には測定対象とする食品の添加が必要と考えられた。

低濃度での添加回収試験を実施し、概要を表に示した。ペースト食品無添加の検量線による結果では、回収率が高くなり(上段)、添加を行った検量線では概ね 100% 付近の回収率が得られた(下段)。回収率が高くなる原因は、ペースト食品添加の応答値が無添加検量線に対して高くなったためと思われる。食品に含まれる成分が化合物を液相から気相に追い出したことによると思われる。しかし、AH は添加、無添加共に高く、いずれの場合でも回収率が 120% を超えた。この原因を今後も検討する予定である。

以上の結果から、この化合物の測定には測定対象とする食品を添加した標準系列の作成が必要であり、回収試験による精度確認が必要と考えられた。

表 試験結果概要 (n=3)

	回収率 (%)	CV (%)
AM	140.9	6.81
	103.3	3.21
AE	118.6	7.11
	93.9	4.22
AB	120.7	0.88
	113.8	3.89
AH	131.9	4.20
	147.9	10.04

(上段：食品添加なしの検量線による測定)

(下段：食品添加ありの検量線による測定)

# 収去食品からの第三世代セフェム系及びカルバペネム系

## 薬剤耐性大腸菌群の検出状況

○植松香星， 柳本恵太， 中田陽子， 山上隆也（山梨県衛生環境研究所）

### 【目的】

近年、抗菌薬の普及に伴って病原体が抗菌薬に対する耐性を獲得し、まん延することが世界的に懸念されている。国はヒト・動物・食品及び環境から検出される薬剤耐性菌に関して総合的に動向調査と監視を行う「薬剤耐性ワンヘルス動向調査」を実施している。

国内ではこれまでに、食品の薬剤耐性菌汚染調査として食肉等を中心に食中毒起因菌の薬剤耐性状況が報告されているが、一般食品を対象とした調査は少ない。そこで今回、県内で流通する一般食品における薬剤耐性菌の汚染状況を把握するため、収去食品から検出された大腸菌群について AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ（AmpC）産生菌、基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ（ESBL）産生菌及びカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）の検索を行った。

### 【調査対象と方法】

2017年4月から2018年3月までの調査期間において、県内の食品製造業者及び食品販売店から衛生業務課広域衛生監視指導担当及び各保健所が収去した食品1,652検体を対象とした（表）。

大腸菌群の検出方法はEC培地による増菌培養又はデソキシコレイト培地による混釈法である。EMB培地で再分離後、生じたコロニーについてグラム陰性菌及び乳糖発酵を確認した。大腸菌群と判定した菌株は、市販品の同定キットを用いて同定した。

薬剤耐性菌の検査は、AmpC陽性菌、ESBL陽性菌について、それぞれの市販PCRキットにより行った。PCR陽性株は、薬剤感受性ディスクを用いてポロン酸又はクラブラン酸により、阻止円の拡張を確認した。CREは、IPM、MEPM、CAZのディスクを用いてスクリーニングを行った。

### 【結果】

調査対象検体1,652検体から *Klebsiella* 属及び *Enterobacter* 属等48株の大腸菌群を検出し、全ての株について耐性菌の検索を実施した。

AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌は5検体から5株検出し、菌種は *E. cloacae* 4株、*E. asburiae* が1株であった。*E. cloacae* 4株の内訳は、ソフトクリーム由来株が2株、シュークリーム由来株1株、焼き団子由来株が1株であった。*E. asburiae* の1株はソフトクリーム由来株であった。

ESBLはPCRで11株が陽性であったが、全ての株がCTX、CAZ感受性であったため、陰性と判定した。また、IPM、MEPM、CAZが感受性であり、CREは検出されなかった。

### 【考察】

今回の調査において、加熱による制御が困難であるアイスクリーム類、シュークリーム及び焼き団子から AmpC 陽性の *Enterobacter* 属が検出され、県内に流通する一般食品において AmpC 陽性の耐性菌が存在することが明らかになった。本調査では薬剤耐性菌が検出された食品の種類に偏りがみられているが、その理由は、検出方法が異なることも考えられたが、不明である。他の報告によると、そうざいや和生菓子からも検出されていることから、食品中に広く存在することが示唆された。

今後も食品における薬剤耐性状況を注視しながら、本調査を新たな食品中の耐性菌調査等に活用していきたいと考える。

表 調査対象食品

品 目	検体数
そうざい（加熱処理）	381
弁当類	179
生めん類	132
清涼飲料水	121
ミネラルウォーター	111
和生菓子	110
そうざい（非加熱処理）	103
アイスクリーム類	83
洋生菓子	80
食肉製品	38
その他	314
合 計	1,652



# 本栖湖の水色（水の色）が一時的に悪化した要因

○長谷川裕弥(山梨衛生環境研究所)

## 1. はじめに

当所では、富士五湖の水質をモニタリングするために、毎月1回、富士五湖水質補足調査（以下、補足調査）を実施している。補足調査では、窒素やリンなどの水質測定とあわせて、現場で水色や透明度を測定している。水色や透明度は、湖内の植物プランクトン量などとの関係が深いので、湖内の水質を推測する一助となる。

富士五湖の1つである本栖湖（最大水深約120m）は、植物プランクトンが少ないため透明度が高く（過去10年間の平均透明度：15.3m）、湖水は通常青色をしている。しかし、2019年12月に水色が青緑色となり、植物プランクトンの影響が考えられた。そこで、本発表では2019年12月の本栖湖の植物プランクトンを調査し、水色が悪化した要因を考察したので報告する。

## 2. 方法

2019年12月の本栖湖表層水を分取し、光学顕微鏡で植物プランクトンを観察した。さらに、その後の経過を見るために、2020年1月及び2月においても12月と同様に植物プランクトンを観察した。また、併せて2019年度の補足調査で得られた水色（フォーレル水色計\*で測定）と表層水温の結果を使用した（速報値）。

\*青色から緑色を11段階に分類した水色の色見本となる標準液。

## 3. 結果と考察

2019年4月～2020年2月までの本栖湖の水色と表層水温の経月変化を図1に示す。4月～11月の水色は青色（フォーレル4～5）であった。12月の水色は青緑色（フォーレル7）に変化し、1月以降は通常の青色に戻った。水色は、湖に生息する植物プランクトンの種類やその量の影響を受けるため、12月以降、表層水の植物プランクトンを光学顕微鏡で観察した。その結果、12月は淡水赤潮の原因となる黄色鞭毛藻綱のウログレナ属が観察された（図2）。ウログレナ属は細胞内に黄緑色～黄褐色の葉緑体を持つため、湖水の水色が青緑色に変化した（水色が悪化した）と考えられた。1月以降、水色が青色（フォーレル5）に戻り、ウログレナ属が観察されないことから、ウログレナ属の増殖は一時的な現象であった。ウログレナ属の増殖要因は、水温や栄養塩類、気象条件などの複合的な影響が考えられる。水温に着目してみると、2019年12月の表層水温（12.6℃）は、過去10年間の12月の平均表層水温（11.8±0.9℃）と大差なかった。今回、水温データだけではウログレナ属の増殖要因を明らかにできなかったが、今後も同様な事象が発生する可能性があるため、継続した監視が必要と考えられる。

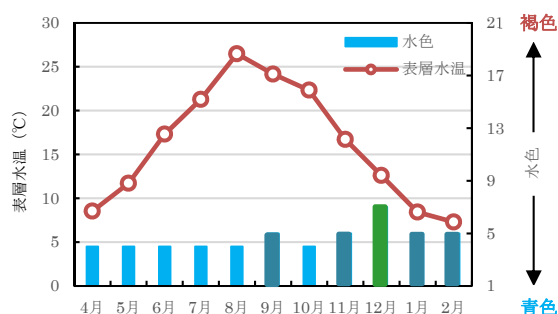


図1 水色と表層水温の経月変化（2019年度）

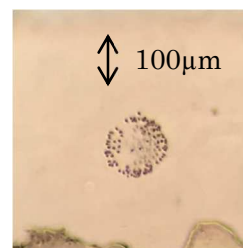


図2 ウログレナ属



# 県内河川における外来珪藻調査

○堀内雅人（山梨県衛生環境研究所）

## 【背景と目的】

近年、国内の河川において外来珪藻 *Cymbella janischii*（以下Cj）の生息が確認されている。この珪藻は県内河川においても生息が確認されており、河川中の礫などにミズワタ状の群体を生じ、増殖が進むと川底を覆うほどになることもある。このため、他の水生生物や付着藻類の生息を妨害する可能性があり、山梨県水産技術センター（以下水産技術センター）の調査によると、礫の付着藻類を餌としているアユの定着に悪影響を及ぼすことが明らかになっている。

当研究所では、水産技術センターからの要望を受け、県内河川におけるCjの分布状況を知るために調査を行っている。今回はこれまで行った調査のうち4河川のCj群体調査状況について報告する。

## 【方法】

水産技術センターより寄せられた生息情報及び当所で把握した生息情報を基に、2018年5月より2020年1月まで断続的に概ね季節ごとに荒川（1地点）、笛吹川（2地点）、須玉川（1地点）について調査を行った。また、釜無川（1地点）については1回現地調査を行った。現地において目視によるCjと見られる群体の有無を観察し、Cjと見られる群体が確認された場合はその採取を行った。採取した群体についてプレパラートを作成し、顕微鏡観察による同定を行った。

## 【結果と考察】

Cj群体の調査結果を表1に示す（顕微鏡観察において、Cjと同定されたものを記した）。

表1 各河川調査地点におけるCj群体の確認状況

	2018年5月	2018年6月	2018年7月	2018年11月	2019年1月	2019年2月	2019年5月	2019年6月	2019年7月	2019年9月	2019年11月	2020年1月
荒川（上流）	×	△	－	×	×	△	△	－	－	○	○	○
笛吹川（上流）	－	－	－	－	－	－	○	－	○	○	△	－
笛吹川（中流）	×	○	－	×	×	△	△	－	○	×	×	－
須玉川（上流）	○	－	×	×	－	－	△	－	×	×	○	△
釜無川（上流）	－	－	－	－	－	－	－	×	－	－	－	－

○：群体多い（目立つ） △：群体少ない（目立たない） ×：群体確認されず －：未調査

荒川、笛吹川、須玉川の調査地点では群体の生息が経年で確認された。また、各河川とも年ごと、季節ごとに群体が増減する傾向が見られた。一方、釜無川については、Cj群体の発見情報の提供を受けた後、現地調査に赴く間に少なからぬ降雨があり、その影響で河川流量が増えたことにより河床が攪乱され、群体が剥離流失し、調査時にはCj群体が見られなかった可能性が考えられた。

河川におけるCj群体の増殖は水温と流量増加などによる河床の攪乱状況に大きな影響を受けると考えられる。Cjは比較的低い水温を好む傾向があると考えられ、春先から初夏及び秋から初冬にかけて河川上・中流域での増殖が見られることが多い。しかし、この調査では水温が高くなるとされる夏季でも少なからぬCj群体が観察される地点もあった。これは気象状況により、水温がCjの増殖を妨げるほど上昇しなかったことが原因の一つと考えられる。Cjが年間を通じて河川に生息し好条件時に増殖を繰り返すのか、あるいはその都度外部から侵入して増殖するのかは今のところ不明である。Cj群体が確認されない時期における付着・流下藻類等の調査を行い、河川中における年間通じてのCj存在状況と増殖メカニズムを調査する必要がある。

## 【特許紹介】

# マルチプレックスシャトルPCRによる食中毒菌の一括検出法

○柳本恵太, 植松香星

山梨県衛生環境研究所

### 【目的】

食中毒原因菌の検出のためには、検体中の細菌を培養し、その性状等を確認する方法が一般的に広く用いられているが、煩雑な手法が必要となり、検出までには多くの時間がかかるため、迅速性、操作性に優れた検出法が望まれている。

細菌のDNAを検出する遺伝子検査法は、短時間での結果判定、非典型的な性状を持った細菌への対応が可能で、比較的簡便であるという特徴がある。今回我々は、年間に発生する食中毒の原因菌の大部分に対応でき、1検体当たり1反応液で、かつ2時間以内で結果判定が可能であるmultiplex shuttle PCRによる食中毒原因菌の検出法を検討したので報告する。

### 【方法】

対象とした細菌は、カンピロバクター・ジエジュニ及びコリ、ウエルシュ菌、赤痢菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、腸管出血性大腸菌、腸管毒素原性大腸菌、腸管侵入性大腸菌、腸管病原性大腸菌、腸管凝集付着性大腸菌とした。標的遺伝子は、病原性に関わる遺伝子とし、1菌種に複数存在する場合は、保有率が高いものを選択した。菌株（計399株）及び消化器症状事例（9事例、74検体）における患者便から、アルカリ熱抽出法で遺伝子を抽出し、サンプルとした。結果は、菌株については既存のプライマー、患者便については、培養との比較を行った。また、菌株の段階希釈により、 $10^0\sim 10^3$  cfu / tube の範囲で検出感

度を検討した。

### 【結果】

PCRは65分間で完了し、遅くとも2時間以内に結果を確認することができた。菌株を用いた検討では、感度は99.1%、非特異反応はなく、特異度は100%であった。糞便からの検出では、培養結果との比較で、感度は83.3%、特異度は96.4%であった。検出感度は全ての遺伝子が $10^0\sim 10^2$  cfu / tube の範囲であった。

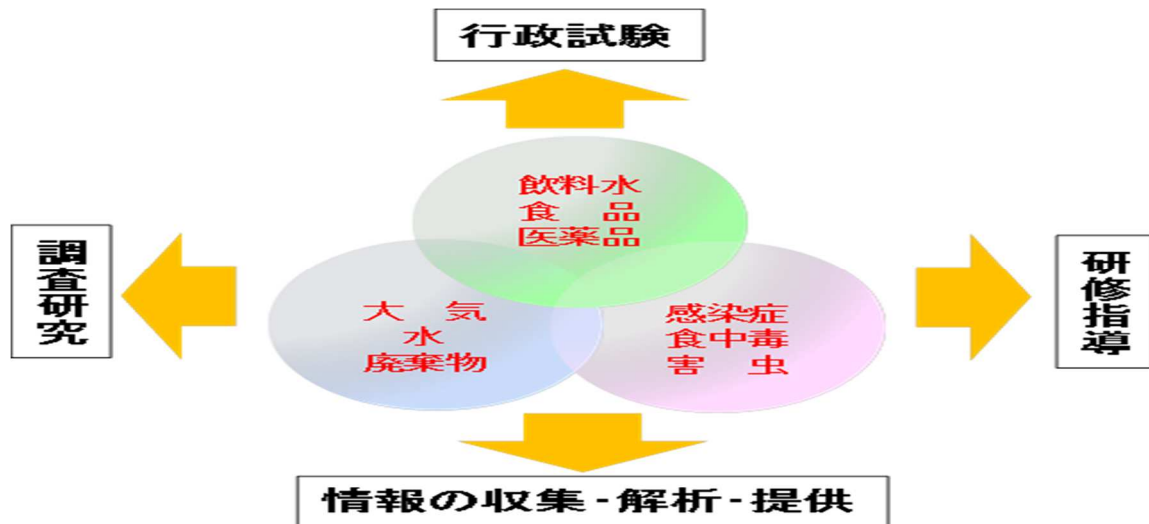
### 【考察】

菌株における比較では概ね良好な結果となった。その中で検出できなかったカンピロバクター・コリは、健康保菌者由来であり、対象とした病原遺伝子を保有していなかった可能性も考えられた。また、消化器症状事例での検討では、簡便な遺伝子抽出法でありながら食中毒原因菌を検出できた。このことから本法の検出感度は、急性期の患者糞便であれば、検出に十分であることが考えられた。この検討では一部の検体で培養結果との不一致があったが、原因としては、検体を不適切な条件で保存中に対象菌が死滅してしまったことや、抗菌薬投与後の培養不能菌を検出したことが考えられた。本法は1検体1反応液で2ステップにより、11種の食中毒原因菌の一括検出が可能であることから、迅速・安価・簡便に大量の検体を処理することができると考えられる。今後は、検体数をさらに増やしながら、信頼性の高いスクリーニング法として確立していきたい。

## 山梨県衛生環境研究所のご案内

山梨県衛生環境研究所は、県民の健康を守り、生活環境をよりよくすることを旨とす、衛生行政・環境行政に係る科学的・技術的中核機関です。

山梨県福祉保健部の出先機関として、各関係部局や保健所、林務環境事務所と協力しながら、行政試験、調査研究、研修指導、情報の収集・解析・提供を行っています。



〒400-0027

山梨県甲府市富士見 1-7-31 電話 055-253-6721

FAX 055-253-5637

<https://www.pref.yamanashi.jp/eikanken/index.html>