

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

乳幼児食品中の有害物質及び病原微生物の
暴露調査に関する基礎的研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

(課題番号：H17-食品-003)

主任研究者 五十君 静信

国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

乳幼児食品中の有害物質及び病原微生物の暴露調査に関する基礎的研究研究班

平成17年度 研究組織

主任研究者

五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

分担研究者

米谷 民雄 国立医薬品食品衛生研究所 食品部

吉池 信男 国立健康・栄養研究所 健康・栄養調査研究部

豊福 肇 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

協力研究者

長岡 恵 国立医薬品食品衛生研究所 食品部

岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

窪田 邦宏 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

三好 美紀 国立健康・栄養研究所 国際栄養協力室

天野富美夫 大阪薬科大学 薬学部

森崎 奈緒 財団法人 日本冷凍食品検査協会

久保ゆかり 財団法人 日本食品衛生協会

事務および経理担当者

仲島 昌司 国立医薬品食品衛生研究所 総務部

吉岡 宏美 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

目 次

I. 総括研究報告書

乳幼児食品中の有害物質及び病原微生物の 暴露調査に関する基礎的研究	1
五十君 静信	
総括研究報告書概要版	11

II. 分担研究報告書

1. 乳幼児食品中の有害化学物質の分析に関する研究	13
米谷 民雄、長岡 恵	
2. 乳幼児食品中の病原微生物に関する研究	29
五十君 静信、岡田 由美子、朝倉 宏、久保 ゆかり、天野 富美夫	
(1)食品より分離された <i>Enterobacter sakazakii</i> の性状と 細菌学的分類に関する検討	45
朝倉 宏、五十君 静信	
(2) <i>Enterobacter sakazakii</i> の免疫学的検出法の開発に関する研究	49
天野 富美夫	
(3)粉ミルク及び市販離乳食由来のリストERIA症に関する文献調査	57
岡田 由美子	
3. 乳幼児における有害微生物の汚染および健康被害情報に関する研究	63
豊福 肇、窪田 邦宏	
4. 乳幼児の食品摂取量調査のための基礎研究 ～乳幼児の人工乳・離乳食等の摂取に関するデータ分析～	79
吉池 信男、三好 美紀	

平成17年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

乳幼児食品中の有害物質及び病原微生物の暴露調査に関する基礎的研究

総括研究報告書

主任研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨：

一般に乳幼児は化学物質や病原微生物に対する感受性が高く、また、成人とは食品摂取内容が異なることから、乳幼児の化学物質や病原微生物への暴露量評価は、成人とは別途行う必要がある。そこで、乳幼児における暴露量評価手法を検討し、分析が必要と考えられるいくつかの有機化合物、無機化合物および病原微生物に着目し、その分析法や検査法を確立し、さらに暴露量評価手法に基づいて、測定や検出を試みた。無機化合物として JECFA が PTWI を設定している無機ヒ素を、有機化合物として FDA が一昨年から健康影響の調査を開始しているフランを対象として、その分析法を文献調査し、また実際に分析法の検討を開始し、さらにフランについては一部の市販乳幼児食につき予備分析を実施した。微生物は、エンテロバクター・サカザキ、リステリアを主な対象とし、乳児用調製粉乳に関する国際的な会議に参加し議論に加わると共に、国内外の文献調査等により情報収集を行った。エンテロバクター・サカザキについては、菌株の解析、汚染実態調査、調製粉乳の製造工程の現地調査を行った。暴露評価を目的として、乳幼児のベビーフード等の摂取実態に関して、既発表の調査データ、関連データベース並びにウェブサイト等を活用し検討した。

分担研究者：

米谷 民雄：国立医薬品食品衛生研究所
食品部

吉池 信男：国立健康・栄養研究所
健康・栄養調査研究部

豊福 肇：国立医薬品食品衛生研究所
安全情報部

A. 研究目的

食品からの有害化学物質等の成人の摂取量調査は実施されてきたが、異なる食品摂取をする乳幼児に対して系統的な摂取量調査は行われていない。乳幼児は、一般に化学物質や有害微生物に対する感受性が高く、成人の調査結果を外挿する

ことは適当でない場合が想定される。本研究では、乳幼児における食品からの有害化学物質や有害微生物等の摂取量を把握し、乳幼児が摂取する食品の安全対策を進めるための基礎的データの収集を目的とする。

B. 研究方法

食品中のヒ素のうち、無機ヒ素を分別定量する方法について文献調査した。また、実際の食品試料につき、抽出率を上げかつ有機ヒ素が無機ヒ素にまで分解されないような酸部分分解法について検討しさらに、分別定量法として水素化物変換－コールドトラップ－原子吸光法の応用を試みた。一方、フランの分析法の調査では、フランの捕集にはヘッドスペース法と SPME (solid phase micro-extraction) 法が両方使用されていた。今年度はヘッドスペース GC/MS 法を用いて、一部の市販ベビーフードについて、フランの予備分析を実施した。ベビーフードの使用頻度、ベビーフードを含む食品成分表のデータ等の情報を整理し、化学分析データと合わせて暴露量試算を行う準備を進めた。

乳幼児が摂取する食品、特にベビーフード・調製粉乳等の特徴・種類や摂取状況を把握するため、既発表の調査データ、関連データベース並びにウェブサイト等を活用し検討した。また、乳幼児の食生活に関す

る全国実態調査のデータを用いた二次解析を行い、乳児用ミルクとフォローアップミルクの摂取量について、栄養法別および月齢別の分布を明らかにした。

乳幼児用調製粉乳 (PIF) を介するエンテロバクター・サカザキによる健康被害の発生が諸外国で報告されており、特に NICU における本菌の感染による髄膜炎の発症は重要な問題となっている。文献調査により、米、英、オランダ、デンマーク、仏、ニュージーランド等で発生した事例について、検討した。一方、わが国における本菌の乳幼児への暴露や感染の実態に関する情報は文献的には皆無であった。今年度の厚労省の調査において、微量ではあるものの、PIF 及び類似食品で本菌が確認された。研究班では、この結果を受け、さらに広く本菌の汚染実態調査を行うと共に、製造工場の協力の下、調製粉乳の製造工程における本菌汚染の可能性につき検討を行った。わが国における本菌によるヒトへの感染事例が存在するかについても情報収集を開始した。一般の食品検査において、大腸菌群検査を行った約 4,000 検体から、エンテロバクター・サカザキが検出されているか調べた。得られた 19 株の本菌分離株については細菌学的な解析を進めた。新生児の髄膜炎起因菌として知られているリステリアについては、乳幼児の感染事例につき文献調査を行い、乳児用調製粉乳からの感染について

考察した。

2004年及び2006年のFAO/WHOの専門家会合の報告書、Codexの文書、英文の科学論文から、最近の*E. sakazakii*による健康被害の実態を調査した。

ベビーフードの特徴や種類については、関連文献および日本ベビーフード協会や各メーカーがウェブサイト等を通して提供している情報を整理した。ベビーフードの摂取状況に関しては、既発表の調査データ（厚生労働省調査、その他）を活用し、乳汁栄養法の分布とベビーフードの使用頻度に焦点をあてて検討を行った。更に、中絶らが行った乳幼児の食生活に関する全国実態調査のデータおよび、ベビーフードを含む食品成分表を活用し、調製粉乳の摂取量分布の解析を行った。

尚、詳しい研究方法については、各分担報告書を参考にさせていただきたい。

C. 研究結果

有害化学物質の検討

①無機ヒ素

食品中のヒ素のうち、無機ヒ素を分別定量する方法について文献調査した。近年では、HPLC-ICP/MSがヒ素の化学形分析で最も有効で広く使用されている方法であった。また、最近HG-AAS法による”形態別ヒ素分析システム”が市販されており、前処理法が確立できれば、無機ヒ素を分別定量する

方法として使用できる可能性があると考えられた。本研究においては、乳幼児食中の無機ヒ素の分析に、市販のHG-AAS法による装置を用いることにした。方法論を確立し、分析した結果と、他の方法による形態別分析結果を比較したところ、総ヒ素の値は認証値の範囲内であり、また、各化学形のヒ素濃度は他の方法による文献値とよく一致していた。乳幼児食には栄養成分としてヒジキや魚介類などが添加されることが多いため、マトリックスの影響について検討した。無機ヒ素の分析値には影響は見られず、今回の分析条件は、乳幼児食中に魚類が存在していても、無機ヒ素の定量には影響しない分析条件であることがわかった。

②フラン

条件検討を行った後、検量線の作成を行った。得られた検量線は、相関係数が0.999で良好な直線性を示した。粉ミルクに関しては、MDLを0.4 ppb、MQLを1 ppbと設定した。市販の粉ミルク20製品について、フランの定量を行った。一般的には低い含有量であったが、缶入りの牛乳アレルギー疾患用食品において、36 ppbが検出された。なお、同時に行った添加回収試験での添加回収率は、全ての検体について90%以上であった。

市販のベビーフード21製品について、フランの定量を行ったところ、すべての製品でフランが検出された。最高は、いわし団

子のおんかけ（レトルトパウチ）における 90 ppb であった。なお、同時に行った添加回収試験での添加回収率は、全ての検体について 90 %以上であった。

有害微生物の検討

有害微生物については、本年度エンテロバクター・サカザキとリステリアを対象に研究を行った。

今年度の厚労省の調査において、微量ではあるものの、PIF 及び類似食品で本菌が確認された。この調査結果を受け、研究班では国内の PIF 製造工場に協力をお願いし、PIF 製造工程の現地調査を行い、本菌がどのような経路から汚染する可能性があるのか、どのような対策が取りうるかについて検討を開始した。

国内の PIF 製造工場では、それぞれの製造工場により多少異なるが、海外で本菌の混入の原因となると指摘されている、粉と粉を混ぜ合わせ最終製品を作り上げる工程がある製造フローは、そのまま使われていなかった。多くの国内製造会社においては、粉と粉を混ぜ合わせ最終製品を作る工程をほぼ無くしており、PIF 各成分を溶解混和後、加熱乾燥を行っていた。製造工場によっては、一部の原材料を粉として加える工程が残っているが、この場合においても、それぞれの原材料に対する製品管理が徹底されていた。本

菌の重要性から、製造工程を見直し改善している工場も見られた。

一般の食品検査において、大腸菌群検査を行った約 4,000 検体から、エンテロバクター・サカザキが検出されているか調べ 19 株が分離された。細菌学的な解析により、分離株はその特徴からいくつかのクラスターに分けることが出来た。本菌の感染事例に関する情報収集は、国立感染症研究所感染症情報センター及び地方衛生研究所等を通じ調査を開始した。これまでの報告では、髄膜炎の原因細菌として、リステリアは確認されたが、エンテロバクター・サカザキに関する情報は皆無であった。

リステリアは、文献調査により、新生児における母子間の垂直感染が重要であると思われた。

健康被害情報

近年、乳幼児用調製粉乳（PIF）を介するエンテロバクター・サカザキ（*Enterobacter sakazaki*）による健康被害の発生が諸外国で報告されている。文献調査により、米、英、オランダ、デンマーク、仏、ニュージーランド等で 73 例の患者及び 9 例の腸管定着が報告され、うち 27 名が死亡していた。2004 年の FAO/WHO 専門家会合以降も、2 件のアウトブレイクが発生し、2 名の新生児がなくな

っている。また、疫学的な情報から、乳児がハイリスクであることは言うまでもないが、従来考えられていたよりも広い年齢層、またすべての免疫状態の乳児を対象とした予防対策が必要であることが明らかになった。

摂取量に関する調査

乳幼児が摂取する食品、特にベビーフード・調製粉乳の特徴・種類や摂取状況を把握するため、日本ベビーフード協議会や各メーカーのウェブサイトの情報、ならびに既発表の調査データなどを整理の上、検討を行った。また、乳幼児の食生活に関する全国実態調査のデータを用いた二次解析の結果、乳児用ミルクとフォローアップミルクの摂取量について、栄養法別および月齢別の分布の特徴が明らかになった。

D. 考察

有害物質の検討

①ヒ素

乳幼児食には、不飽和脂肪酸や鉄などの有用成分を含有させる目的で魚介類やヒジキなどを加えることが多いが、これらは総ヒ素量が非常に高い。今回用いた分析条件は、魚類が存在していても無機ヒ素の定量には影響しない分析条件であることが示された。次年度には、米、魚介類、ヒジキを含む乳幼児食を中心として、無機ヒ素量の

実態調査を行えると考えられた。

②フラン

ヘッドスペースサンプラーのオープン温度設定を 80℃にして 30 分間加熱すると、粉ミルクにおいてフランの二次生成が考えられた。そこで、温度を 60℃に下げて分析を実施した。

分析の結果、粉ミルクでは特殊な 1 製品を除き低いレベルであった。一方、ベビーフードからは、すべての製品からフランが検出された。しかし、同じ食品の形態でも含有量に大きな差があり、食材と加工方法の組み合わせにより、生成量に大きな差が出ると考えられた。今後は、食材中の特定の成分に着目した研究が必要と考えられた。

有害微生物の検討

本年度は、主にエンテロバクター・サカザキとリステリアについて研究を行ったが、文献調査の結果から、乳幼児用食品を介した感染について、両者の傾向は異なっていた。エンテロバクター・サカザキが、PIF からの感染が多数確認されているのに対し、リステリアではこのような感染に関する報告は確認できず、むしろ新生児における母子間の垂直感染が重要であると思われた。

国内では、エンテロバクター・サカザキの乳幼児への暴露や感染の実態はこれまで調べられておらず、その実態は不明

であった。本年度の研究により、一般の食品から本菌が分離され、PIF からの分離も確認されたことから、国内に於いても本菌が感染する可能性はあると考えられる。一方、エンテロバクター・サカザキによる感染事例は、確認されていない。引き続き情報収集を続ける予定である。

PIF を製造している 5 社に協力をお願いし、製造工程を確認したところ、いずれの工場においても、海外で本菌の汚染の危険性が高いと指摘されている原材料の粉同士を混ぜ合わせ最終製品とするような工程に対する本菌の汚染の可能性の認識を持っており、このような工程に対する対策が徹底されつつある。既にこの工程自体を無くしている工場も見られた。以前は本菌の感染に関する認識がない工場もあったようであるが、調査時点では改善されていた。工場によっては、一部の材料を加熱乾燥の最終工程に加えていたが、加える原料の汚染に関しては、十分な注意が払われていた。厚労省の調査後、エンテロバクター・サカザキに関する重要性は徹底され、これに伴い製造工程の改善や対策が進んでいることが確認できた。

分担研究報告書に、文献調査から海外のデータを基に、現段階でのエンテロバクター・サカザキのリスクプロファイルの作成を試みた。このプロファイルには、

国内の実態がまだ加味されていない。研究班の研究データを加え、最終年度には国内の実態を加えたリスクプロファイルに仕上げる予定である。

健康被害情報

2004 年の専門家会合以降に世界中で明らかになった情報を検討した結果、*E. sakazakii* 感染予防対策は、生後 1 年未満に限らず、またすべての免疫状態の乳幼児を対象に実施すべきである。

最近の 2 つの *E. sakazakii* に汚染された PIF の摂取によるアウトブレイクの調査結果を検討したところ、連携のとれた、迅速な対応ができるサーベイランスシステムが機能していることの重要性が再認識された。ヒトの感染症サーベイランスサイト担当者と食品衛生担当者の連携、協力関係が PIF 中のサルモネラ及び *E. sakazakii* に起因するリスクを管理する上で重要であることが示唆された。

摂取量に関する調査

乳幼児における乳汁や離乳食の摂取実態を定量的に把握することは技術的に難しく、国内外においても発表されている調査データは限られている。わが国を代表する栄養調査である国民健康・栄養調査においても、摂取量把握が困難であることなどから 1 歳未満の乳幼児は調査対

象とはしていない。

そのため、多くの国において、離乳期を中心とした各月齢におけるエネルギーや栄養素摂取量の情報が不足しており、食事摂取基準の策定に際しての大きな課題の一つとなっている。その理由としては、食べる量が少なく定量的な評価に誤差が生じやすいこと、ベビーフード等のいわゆる“市販食品”に関して、食材構成等が開示されておらず、それに由来する栄養素や食品群別摂取量の算出が困難であることがあげられる。また、母乳の摂取量を把握することも、技術的にかなりの労を要することであり、わが国において利用可能なデータは極めて少ない。

このような状況を踏まえ、初年度は既存資料の収集及び整理と、既に調査が行われたデータの二次解析により、本研究班として必要とされるデータベースの一部を作成した。今回、国内の文献資料について、医学中央雑誌を中心に幅広く検索をかけて、関連文献の収集を図ったが、利用可能な発表論文は極めて少ないことが改めて確認された。しかし、すでに発表されている大規模調査のデータについて、本研究課題の目的に沿った形での再解析を行うことにより、貴重な基本データを得ることができたと考えている。

E. 結論

有害化学物質の分析では、米、魚介類を含む乳幼児食に適用できる、無機ヒ素定量法を設定することができた。フランはFDA法を改良して、乳幼児食品中の含有量を分析した。粉ミルクでは一般に低いレベルであったが、ベビーフードではフランが全製品から検出された。食材と加工方法によりフランの生成量に大きな差があると考えられたため、特定の成分に着目した研究が必要と考えられた。

乳幼児が摂取する食品、特にベビーフード・調製粉乳の特徴・種類や摂取状況を把握するため、情報、既発表の調査データなどを整理、乳幼児の食生活に関する全国実態調査のデータを用いた二次解析の結果、乳児用ミルクとフォローアップミルクの摂取量について、栄養法別および月齢別の分布の特徴が明らかになった。

乳幼児食品中の有害微生物としてエンテロバクター・サカザキとリステリアを対象として、これらの病原微生物の乳幼児への感染の可能性について文献調査を行い、その結果から、それぞれの菌の重要性について考察した。特に、PIFを介するエンテロバクター・サカザキによる健康被害の発生が諸外国で報告されており、エンテロバクター・サカザキに関しては、文献調査により、その重要性は極めて高いと判断した。そこで、国内事例の情報収集、食品からの分離、分離株の疫学的解析、乳幼児用調製

粉乳の製造工程における本菌の挙動について検討を開始した。リステリアでは、文献調査から周産期リステリア症では母親の感染による母子の垂直感染と思われる事例が多く見られたが、PIF および市販離乳食が原因と見られる感染例は国内外共に報告されていなかった。従って乳幼児食品を介したリステリアによる感染のリスクはあまり高くないと結論した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nagaoka M. H. and Maitani T. : Binding affinity of aluminium to human serum transferrin and effects of carbohydrate chain modification as studied by HPLC/high-resolution ICP-MS -Speciation of aluminium in human serum-. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 1887-1894 (2005).
- (2) 豊福 肇: *Codex Information* 第 37 回食品衛生部会、食品衛生研究, 55, 25-32. (2005)
- (3) 五十君静信、岡田由美子: 食品を介したリステリア症。化学療法の領域。21, No. 4, 475-481. (2005)
- (4) 五十君静信: リステリアの食品汚染とリ

スク管理。食品衛生学雑誌。46(4), J237-239 (2005)

2. 学会発表

- (1) 長岡(浜野) 恵、種池康仁、米谷民雄: 水素化物変換-コールドトラップ-原子吸光法によるヒ素の分別定量法の応用。第 66 回分析化学討論会 講演要旨集 p. 185 (北見) (2005. 5)
- (2) 長岡(浜野) 恵、種池康仁、米谷民雄: 食品中の無機ヒ素の分別定量法に関する研究-水素化物変換-コールドトラップ-原子吸光法の応用-。第 15 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 講演要旨集 p. 63-64 (大阪) (2005. 6)
- (3) Nagaoka M. H., Taneike Y., Akiyama H. and Maitani T. : Speciation analysis of arsenic in foods using hydride-generation-cold trap-atomic absorption spectrophotometry. 11th IUPAC International Symposium on Macromolecule-Metal Complex. Proceeding p. 42 (Pisa) (2005. 9)
- (4) 窪田邦宏、豊福肇、酒井真由美、鈴木穂高、春日文子、森川馨: 「食品安全情報」- 海外における食品微生物情報の動向。第 140 回日本獣医学会学術集会、(鹿児島) (2005. 9)
- (5) 豊福 肇: CODEX における食品安全規

- 格と国際的動向。第 24 回 日本食品微生物学会学術セミナー、(広島) (2005. 9)
- (6) 五十君静信。国内のリステリア症の現状とその制御に向けて。第 26 回日本食品微生物学会学術総会シンポジウム “*Listeria monocytogenes* の研究動向” (金沢) (2005. 11)
- (7) Igimi S, Morisaki N, Asai M, Kubo Y, Asakura H and Yamamoto S. *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula: Hazard analysis in Japan. 40th Toxic Microorganisms Joint Panel, UJNR Scientific Session. (Matsushima) (2005. 11)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

総括研究報告書概要版（webにて公開）

研究年度：平成 17(2005)年度

研究課題名：乳幼児食品中の有害物質及び病原微生物の暴露調査に関する基礎的研究

文献番号：200501373A

研究分野名：健康安全確保総合研究分野

研究事業名：食品の安心・安全確保推進研究

主任研究者氏名：五十君 静信

所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究目的：

食品からの有害化学物質等の成人の摂取量調査は実施されてきたが、異なる食品摂取をする乳幼児に対して系統的な摂取量調査は行われていない。乳幼児は、一般に化学物質や有害微生物に対する感受性が高く、成人の調査結果を外挿することは適当でない場合が想定される。本研究では、乳幼児における食品からの有害化学物質や有害微生物等の摂取量を把握し、乳幼児が摂取する食品の安全対策を進めるための基礎的データの収集を目的とする。

研究方法：

化学物質は、有機化合物のフラン、無機物質として無機ヒ素について文献調査等による情報収集と分離分析法の検討を行った。

微生物は、エンテロバクター・サカザキ、サルモネラ、リステリアを対象とし、乳児用調製粉乳に関する国際的な会議に参加し議論に加わりと共に、国内外の文献調査等により情報収集を行った。サカザキ菌については、菌株の解析、汚染実態調査、調製粉乳の製造工程の現地調査を行った。

暴露評価を目的として、乳幼児のベビーフード等の摂取実態に関して、既発表の調査データ、関連データベース並びにウェブサイト等を活用し検討した。

結果と考察：

乳幼児は化学物質への感受性が高く、成人とは食品摂取の内容も大きく異なることから、

乳幼児に対しては別途暴露量を把握しておく必要がある。本年は無機ヒ素を分別定量する方法を検討し、酸部分分解法、分別定量法として水素化物変換－コールドトラップ－原子吸光法の応用を試みた。フランは、ヘッドスペース GC/MS 法によるベビーフードの分析を行った。ベビーフードの使用頻度、ベビーフードを含む食品成分表のデータ等の情報を整理し、暴露量試算を行う準備を進めた。

乳幼児用調製粉乳(PIF)を介するエンテロバクター・サカザキによる健康被害の発生が諸外国で報告されており、Codex 委員会では PIF の規格の議論が進められている。一方、わが国における本菌の乳幼児への暴露や感染の実態は不明であった。今年度の厚労省の調査において、微量ではあるものの、PIF 及び類似食品で本菌が確認されたことを受け、汚染実態および感染事例に関する調査を開始し、調製粉乳の製造工程における有害微生物汚染の可能性につき検討を行った。リステリアは、文献調査により、母子間の垂直感染が重要であると思われた。

結論：

乳幼児における食品からの有害化学物質や有害微生物等の摂取量を推定するための基礎的データの取得を開始した。

研究主分野	0706	社会基盤	有害危険・危惧物質等安全対策
研究副分野	0103	ライフサイエンス	食料科学・技術
”	2	0605	製造技術
			品質管理・製造現場安全確保

研究キーワード 1	0 1 4	微生物
”	2	0 2 4 食品
”	3	0 3 3 感染症
”	4	0 8 2 有害化学物質

応用研究

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

乳幼児食品中の有害化学物質の分析に関する研究

分担研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

研究要旨：乳幼児は化学物質への感受性が高く、また、成人とは食品摂取の内容も大きく異なることから、乳幼児に対しては成人とは別に暴露量を把握しておくことが望ましい。そこで、無機化合物として無機ヒ素を、有機化合物としてフランを取り上げ、それらの分析法を文献調査し、さらに実際に分析法の検討や予備分析を行った。無機ヒ素の分別定量には水素化物変換-コールドトラップ-原子吸光法を採用し、米、魚介類を含む乳幼児食に適用できる、前処理方法を設定した。フランについては、米国 FDA が公表しているヘッドスペース-ガスクロマトグラフ-質量分析計による方法を改良し、それを用いて、市販の粉ミルク 20 製品及びベビーフード 21 製品について分析した。その結果、粉ミルクでは特殊な 1 製品を除きすべて低いレベルであったが、ベビーフードからはすべての製品からフランが検出され、しかも同じ食品の形態の食品でも含有量に大きな差があり、食材と加工方法の組み合わせにより、生成量に大きな差が出ると考えられた。

研究協力者

長岡 恵 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官

化学物質のいくつかについて、実際に暴露量の評価を行うことにした。対象としては、無機化合物として JECFA が PTWI を設定しており、最近ヒジキで問題となった無機ヒ素、有機化合物として米国 FDA が健康影響を調査すると発表¹⁾したフランを取り上げた。それらの分析法を文献調査し、さらに実際に分析法の検討を開始した。

A. 研究目的

化学物質の人への暴露は 90%以上が食事を介するものと考えられている。そのため、これまで継続してトータルダイエツト調査により有害化学物質の摂取量調査が実施されてきたところである。しかし、乳幼児は化学物質への感受性が高く、また、成人とは食品摂取の内容も大きく異なることから、乳幼児に対しては別途暴露量を把握しておくことが望ましい。そこで、乳幼児における食品からの化学物質暴露量評価法を検討し、さらに、従来から問題となっている化学物質や最近問題になった

B. 研究方法

文献調査は主として PubMed を用いて実施した。実験方法を、以下に記述する。

①無機ヒ素

1) 装置

形態別ヒ素分離システム：島津 ASA-2sp、
原子吸光分光光度計：サーモエレメンタル
SOLAAR M5

2) 分析方法

米からの無機ヒ素抽出の際、食品中の有機ヒ素が無機ヒ素にまで分解されないよう、以下の通り行った。

米試料0.2 gを100 ml トールビーカーに採り、高純度濃硝酸 (TAMAPURE AA-100、68%) 5 ml を添加し、時計皿で覆い、3時間あるいは6時間加熱した。溶液の色は透明あるいは薄黄色を確認し、液量が約1 ml になるまで時計皿を外して加熱を続けた (目安として約10 min)。ついで過塩素酸を1 ml 添加して加熱を続け、液量が1 ml になるまで加熱し (目安として約30 min)、十分に過塩素酸の白煙を確認し、再び過塩素酸を1 ml 添加して、硝酸が完全に残存しなくなるまで加熱し、液量が約1 ml になるまで加熱した。milliQ 水で10 ml に定容として分析用溶液とした。なお、硝酸のみで加熱する際に加熱装置の温度は150°C に設定した (実際のビーカー中の溶液の温度は110–120°Cであった (硝酸の沸点は122°C))。過塩素酸 (沸点は203°C) 添加時の加熱装置の温度は130°C に設定 (実際のビーカー中温度は約110°C) し、加熱中の溶液の温度は110°C を超えないように加熱した。

② フラン

文献調査の結果、分析のためにフランを採集する方法として、ヘッドスペース法とSPME (solid phase micro extraction) 法が多く使用されていた。本研究では、米国FDAが採用しているヘッドスペース法を用いることにした。FDAは、内標準としてフラン-d₄を用い、標準添加法によるヘッドスペース-GC/MS法によりフランを分析

する方法を公表している²⁾。しかし、検量線法でも分析できることが明らかになったため、本研究では検量線法を用い、また、フランの二次生成を防ぐために、ヘッドスペースサンプラーのオープン設定温度を60°Cに下げ、以下の方法により分析を実施した。なお、実際の分析は、(財)日本食品分析センターに委託して行った。

試料：市販の国産乳幼児食品 (粉ミルク20製品及びベビーフード21製品) を検体とした。

分析方法

1) 試薬

フラン標準品 (ALDRICH)、フラン-d₄ (C/D/N ISOTOPES)、メタノール (残留農薬・PCB試験用) (和光純薬 (株))

2) 装置及び器具

ヘッドスペースサンプラー：7694 (Agilent)、ガスクロマトグラフ・質量分析計：6890N/5973N (Agilent)

3) 標準溶液の調製

ヘッドスペース用バイアルにメタノールを20.0 ml採取してセプタムで密栓した後、秤量した。次いで、マイクロシリンジを用いてセプタムからフラン標準品を50 µl注入し秤量した。これらの秤量値の差を全液量20.05 mlで除した値を求め、得られた濃度を2.5 mg/ml標準原液の正確なフラン濃度とした。ヘッドスペース用バイアルに精製水20.0 mlを採取して密栓した後、フラン標準原液をセプタムから40 µl注入し、5 µg/mlのフラン標準溶液を調製した。標準溶液の正確な濃度は標準原液からのフラン採取量 (µg) を全液量20.04 mlで除した値より求めた。5 µg/mlのフラン標準溶液

をヘッドスペース用バイアル内で精製水を用いて希釈し、密栓して0.5 µg/mlのフラン標準溶液を調製した。また、内標準物質のフラン-d₄を用いて同様に操作し、2.5 mg/mlの内標準原液及び5 µg/mlの内標準溶液を調製した。

4) 検量線の作成

ヘッドスペース用バイアルに塩化ナトリウム4 gを入れ、110°Cで30分以上加熱後、汚染のない場所で冷却した。このバイアルに精製水10 mlを加え、セプタムで密栓した後、5 µg/mlの内標準溶液を10 µlずつセプタムからマイクロシリンジで注入した。次いで、0.5及び5 µg/mlのフラン標準溶液の2~100 µlを注入し、1~500 ngの標準溶液を調製した。

各標準溶液についてその気相部分をヘッドスペース-ガスクロマトグラフ-質量分析計(HS-GC/MS)に注入した。得られたフラン及びフラン-d₄のピーク高比と標準溶液中のフラン重量の関係から検量線を作成した。

5) 分析操作

試料はあらかじめ4時間以上冷蔵庫で冷却したものを使用した。ヘッドスペース用バイアルに塩化ナトリウム4 gを入れ、110°Cで30分以上加熱後、氷中で冷却した。このバイアルに冷却した試料(液体試料においては3~10 g、それ以外の試料においては1~3 g)を秤量して入れ、精製水を加えて10 mlとして、素早くセプタムで密栓した。試料秤量後から密栓するまでは、バイアルを氷中に置いて操作した。次いで、5 µg/mlの内標準溶液を10 µlずつセプタムからマイクロ

シリンジで注入し試験溶液とした。各試験溶液についてその気相部分をHS-GC/MSに注入した。得られたフラン及びフラン-d₄のピーク高比と4)で得られた検量線から試料中のフランを定量した。

6) HS-GC/MS操作条件

ヘッドスペースサンプラー操作条件

機種：7694(Agilent)、オープン温度：60°C、バイアル加熱時間：30 min、ループ温度：100°C、トランスファーライン温度：130°C、加圧時間：0.3 min

ガスクロマトグラフ-質量分析計操作条件

機種：6890N/5973N(Agilent)、カラム：TC-WAX(ジーエルサイエンス)、φ 0.25 mm×60 m、膜厚 0.25 µm、導入系：スプリット(1:40)、温度：試料注入口 200°C、カラム 40°C、ガス流量：ヘリウム(キャリアーガス) 1 ml/min、イオン源温度：230°C、イオン化電圧：70 eV、イオン化法：EI、設定質量数： m/z 68、39、 m/z 72(内標準物質)

C. 研究結果

①無機ヒ素

食品中のヒ素のうち、無機ヒ素を分別定量する方法について文献調査した。以前には、クロマトグラフィーを使用せずに、塩酸酸性下に無機ヒ素をAsCl₃の状態にし、蒸留法や有機溶媒を用いた液-液分配法で無機ヒ素を分離する方法が用いられた。この方法の欠点は、有機ヒ素の一部が無機ヒ素に変わったり、無機ヒ素画分に有機ヒ素が若干混じってくることである。一方、各ヒ素を水素化物に変換し、液体窒素温度で

捕集し、沸点の順に気化させて原子吸光で測定する水素化物変換—コールドトラップ—原子吸光法 (HG-AAS 法) も、自作装置などを用いて使用されていた。

しかし近年では、HPLC-ICP/MS がヒ素の化学形分析で最も有効で広く使用されている方法であった。また、最近 HG-AAS 法による”形態別ヒ素分析システム”が市販されており、前処理法が確立できれば、無機ヒ素を分別定量する方法として使用できる可能性があると考えられた。

離乳食などを含む乳幼児食には米を使用しているものが多いが、米には無機ヒ素が含まれている。ヒ素の形態別分析では上述のように HPLC/ICP-MS が主に用いられているが、塩分が含まれる食品では AsCl の干渉が起こり、精密な As の定量が困難になる。また、離乳食の実態調査を行う上で、(HG-AAS 法) はランニングコスト的にも HPLC/ICP-MS 法よりも有効である。そこで、本研究においては、乳幼児食中の無機ヒ素の分析に、市販の HG-AAS 法による装置を用いることにした。

HG-AAS 法の装置の概略を図 1-1 に示す。水素化物に変換可能な化学形にした各種ヒ素を NaBH_4 により水素化物に還元し、液体窒素温度の U 字間に捕集し、ついで沸点順に気化させて、原子吸光でヒ素濃度を分析するものである。図 1-2 に 4 種ヒ素化合物の標準混合溶液から得られた典型的なチャートを示す。

総ヒ素濃度の認証値がある Rice flour 1568a (NIST) を、研究方法に記載した実験条件で前処理して分析した結果を、他の方法による形態別分析結果とともに表 1-1 に示す。総ヒ素の値は認証値の範囲内であ

り、また、各化学形のヒ素濃度は他の方法による文献値とよく一致していた。

今回採用した方法では As 化合物が無機ヒ素にまで分解されないようにするため 110°C 以下で試料調製を行っている。この場合、必然的に未分解の炭素が多く残り、ヒ素の分析を妨害する可能性が考えられる。特に乳幼児食には栄養成分としてヒジキや魚介類などが添加されることが多いため、マトリックスの影響について検討した。魚類の標準物質である CRM627 に無機ヒ素を添加して検量線を作成し、マトリックス効果を検討したところ、図 1-3 に示すように、無機ヒ素の分析値には影響は見られなかった。すなわち、今回の分析条件は、乳幼児食中に魚類が存在していても、無機ヒ素の定量には影響しない分析条件であることがわかった。

②フラン

1) 検量線の作成

FDA 法ではフラン分析時のヘッドスペースサンプラーのオープン温度設定が 80°C で加温時間は 30 分である。しかしながら、粉ミルクにおいては、 80°C で 30 分間加温することにより新たにフランが生成する可能性が考えられた。そこで、本分析ではヘッドスペースサンプラーのオープン温度設定を 60°C に下げて試験した。フラン標準溶液 (1~500 ng) 中のフラン及び内標準物質とのピーク高比により検量線を作成し、図 2-1 に示した。得られた検量線は、 60°C 加温においても相関係数が 0.999 で良好な直線性を示した。

2) 粉ミルクにおける検出下限及び定量

下限の算出

あらかじめ分析を行いフラン濃度が目標とする定量下限値付近であることが判明している試料を用いて、分析を7回繰り返して標準偏差(以下SD)を求め、危険率5%、自由度n-1のt値{片側t(n-1, 0.05)}から、検出下限(以下MDL)及び定量下限(以下MQL)を以下の式より求めた。

$$MDL=2 \times t(n-1, 0.05) \times SD$$

$$t(n-1, 0.05)=1.943 \quad n=7$$

$$MQL=3 \times MDL$$

結果を表2-1に示した。この結果から粉ミルクに関しては、MDLを0.4 ppb、MQLを1 ppbと設定した。

3) 粉ミルク中のフランの定量

市販の粉ミルク20製品について、フランの定量を行った。結果を表2-2に示す。一般的には低い含有量であったが、缶入りの牛乳アレルギー疾患用食品において、36 ppb検出された。

なお、同時に行った添加回収試験での添加回収率は、全ての検体について90%以上であった。

4) ベビーフード中のフランの定量

市販のベビーフード21製品について、フランの定量を行った。結果を表2-3に示す。すべての製品でフランが検出された。最高は、いわし団子のあんかけ(レトルトパウチ)における90 ppbであった。

なお、同時に行った添加回収試験での添加回収率は、全ての検体について90%以上であった。

D. 考察

① ヒ素

乳幼児食には、不飽和脂肪酸や鉄などの

有用成分を含有させる目的で魚介類やヒジキなどを加えることが多いが、これらは総ヒ素量が非常に高い。今回用いた分析条件は、魚類が存在していても無機ヒ素の定量には影響しない分析条件であることが示された。次年度には、米、魚介類、ヒジキを含む乳幼児食を中心として、無機ヒ素量の実態調査を行えると考えられた。

② フラン

ヘッドスペースサンプラーのオープン温度設定を80℃にして30分間加熱すると、粉ミルクにおいてフランの二次生成が考えられた。そこで、温度を60℃に下げた分析を実施した。

分析の結果、粉ミルクでは特殊な1製品を除き低いレベルであった。一方、ベビーフードからは、すべての製品からフランが検出された。しかし、同じ食品の形態でも含有量に大きな差があり、食材と加工方法の組み合わせにより、生成量に大きな差が出ると考えられた。今後は、食材中の特定の成分に着目した研究が必要と考えられた。

E. 結論

① ヒ素

米、魚介類を含む乳幼児食に適用できる、無機ヒ素定量法を設定することができた。

② フラン

FDA法を改良して、乳幼児食品中のフランの含有量を分析した。粉ミルクでは一般に低いレベルであったが、ベビーフードでは全製品から検出された。食材と加工方法によりフランの生成量に大きな差がある

と考えられたため、特定の成分に着目した研究が必要と考えられた。

F. 参考文献

- 1) FDA: <http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2004/NEW01065.html>
- 2) FDA: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/furan.html>

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 長岡(浜野) 恵, 種池康仁, 米谷民雄: 水素化物変換-コールドトラップ-原子吸光法によるヒ素の分別定量法の応用 第 66 回分析化学討論会 p.185 (2005.5)
- 2) M. H. Nagaoka, Y. Taneike, H. Akiyama, T. Maitani : Speciation analysis of arsenic in foods using hydride-generation-cold trap-atomic absorption spectrophotometry. 11th IUPAC International Symposium on Macromolecule-Metal Complex. Proceeding p.42 (Pisa)(2005.9)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。