

表 7 機関別ダイオキシン類1日摂取量の経年推移(平成10~24年度)¹⁾

地区	PCDDs+PCDFs+Co-PCBs (pgTEQ/kgbw/day) ND=0															
	H10年度	H11年度	H12年度	H13年度	H14年度	H15年度	H16年度	H17年度	H18年度	H19年度	H20年度	H21年度	H22年度	H23年度	H24年度	
北海道地区	A	2.43	1.10	0.72	0.57	0.74	0.71	0.41	0.59	0.33	0.92	1.05	0.37	0.43	0.39	0.64
	B					0.80	0.92	0.85	1.54	0.39	1.28	1.22	0.92	0.52	0.55	0.67
東北地区	A	1.10	1.27	0.95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B		1.40	1.63	1.68	0.97	0.60	0.41	0.53	0.46	0.40	0.13	0.57	0.54	0.59	0.42
	C					1.27	0.75	0.70	0.99	0.90	0.60	0.75	0.92	0.60	0.74	0.50
	D					1.75	1.13	2.46	1.38	1.57	0.68	0.85	1.33	0.94	0.98	0.56
関東地区	A	1.84	3.33	1.10	0.88	1.26	0.67	1.42	0.47	0.51	0.68	0.48	0.28	0.90	0.39	0.62
	B					1.66	1.63	1.49	0.76	0.81	0.89	1.24	0.48	1.21	0.70	0.67
	C					2.30	2.55	1.64	1.11	1.28	1.12	1.70	0.69	1.61	0.95	1.14
	D	1.84	1.43	1.51	1.70	1.17	0.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E					2.02	0.86	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F					2.99	2.31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
中部地区	A	1.76	1.46	1.28	1.21	0.76	0.86	0.88	0.59	0.68	0.70	0.61	0.68	0.63	0.53	0.30
	B					0.95	0.92	1.46	1.11	0.87	0.85	0.78	1.06	1.04	0.60	0.75
	C					1.26	1.74	2.04	1.74	1.22	2.51	1.10	1.39	1.46	0.85	1.00
	D	-	1.35	1.23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E	1.70	1.37	1.24	1.44	1.18	1.15	0.61	0.59	0.58	0.68	0.60	0.70	-	-	-
	F					1.43	1.30	0.76	0.68	0.76	0.76	0.96	0.77	-	-	-
関西地区	A	1.75	2.08	1.50	1.32	0.52	0.49	0.52	0.40	0.40	0.35	0.63	0.36	0.47	0.52	0.36
	B					0.57	0.96	0.58	0.50	0.62	0.45	0.69	0.44	0.55	0.52	0.52
	C					1.11	1.26	1.73	1.37	1.01	1.48	1.69	0.96	0.78	0.59	1.22
	D	-	5.93	1.73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E	2.29	1.55	1.22	1.12	0.83	0.67	1.14	0.58	0.86	0.64	0.57	0.63	0.48	0.44	0.76
	F					1.18	0.98	1.62	0.70	1.32	0.82	0.61	0.97	0.56	0.71	0.83
中国四国地区	A	-	1.60	1.74	1.72	1.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B					2.36	1.38	1.95	1.23	1.54	1.08	1.16	1.14	0.74	1.54	1.00
	C					1.53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	D					1.72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	E	-	3.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	F			0.85	0.76	0.69	0.53	-	-	-	-	-	-	-	-	
九州地区	A	1.07	1.26	1.23	1.36	0.63	0.90	1.06	1.01	0.82	0.67	0.61	0.59	0.48	0.50	0.69
	B					1.03	1.35	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C					1.32	1.31	1.20	1.34	0.92	0.90	0.64	0.81	0.69	0.67	0.84
	D					1.81	1.76	1.48	1.47	1.64	1.17	1.11	1.49	0.73	0.94	0.92
	E	1.75	1.57	1.31	2.89	0.47	0.73	0.52	0.56	0.54	0.37	0.54	0.57	0.70	0.36	0.22
	F					1.00	0.90	0.84	0.91	0.56	1.03	0.60	1.08	0.90	0.40	0.44
平均	1.75	1.92	1.25	1.39	1.27	1.13	1.21	1.02	0.90	0.93	0.92	0.84	0.81	0.68	0.69	

1) 平成10~12年度の摂取量は、平成12年度厚生科学研究費補助金研究事業「ダイオキシン類の食品経由総摂取量調査研究報告書」から、平成13~15年度の摂取量は、平成15年度厚生労働科学研究費補助金研究事業「ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究報告書」から、平成16~18年度の摂取量は、平成18年度厚生労働科学研究費補助金研究事業「ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究報告書」から引用した。平成19~21年度の摂取量は、平成21年度厚生労働科学研究費補助金研究事業「ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究」から引用した。平成22及び23年度の摂取量は、平成22及び23年度厚生労働科学研究費補助金研究事業「食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価とその手法開発に関する研究」から引用した。全て2005 TEFを使用して算出した摂取量である。

食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価と
その手法開発に関する研究

分担研究報告書

食品からの塩素化ダイオキシン類の摂取量調査研究
塩素化ダイオキシン類の個別食品汚染調査

研究代表者 松田りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部
研究分担者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所食品部

研究要旨

畜肉類(28 試料)、魚介類(8 試料)、畜肉及び魚介類を含む冷凍・レトルト食品(30 試料)について、ダイオキシン類濃度を調査した。畜肉類 28 試料(牛肉、豚肉、鶏肉、鴨肉、牛肝臓、豚肝臓、鶏肝臓について各 4 試料)を調査した結果、ダイオキシン類濃度は 0.000030~0.41 pg TEQ/g(中央値 0.0067 pg TEQ/g)の範囲内であった。魚介類 8 試料(ハマチ、ホタテについて各 4 試料)を調査した結果、ダイオキシン類濃度は 0.000090~2.4 pg TEQ/g(中央値 0.86 pg TEQ/g)の範囲内であった。畜肉類を含む冷凍・レトルト食品 24 試料(カレー、ミートソース、牛丼の具、ハンバーグ、ミートボール、唐揚げ、餃子について各 3 試料)を調査した結果、ダイオキシン類濃度は 0.000020~0.042 pg TEQ/g(中央値 0.00045 pg TEQ/g)の範囲内であった。魚介類を含む冷凍・レトルト食品 6 試料(サケ塩焼き、サバの煮付けについて各 3 試料)を調査した結果、ダイオキシン類濃度は 0.098~0.52 pg TEQ/g(中央値 0.21 pg TEQ/g)の範囲内であった。また、平成 23 年度の調査結果により、ダイオキシン類が比較的高濃度に含まれていることが判明したタラ肝臓(燻製)及び鮫肝油加工食品の 2 製品について、フォローアップ調査を実施した。平成 24 年度は該当製品について各 2 試料を購入し、ダイオキシン類濃度を調査した。タラ肝臓(燻製)のダイオキシン類濃度は 7.0 pg TEQ/g 及び 19 pg TEQ/g であり、平成 23 年度の調査結果と比較すると顕著に低い濃度であった。一方、鮫肝油加工食品のダイオキシン類濃度は 67 pg TEQ/g 及び 73 pg TEQ/g であり、平成 23 年度の調査結果とほぼ同じ濃度であった。

研究協力者

(財)日本食品分析センター

中村宗知、柳俊彦、飯塚誠一郎

国立医薬品食品衛生研究所

松田りえ子、高附 巧

量の約 99%が魚介類、肉・卵類、乳製品類に由来している。そこで、これら摂取への寄与が大きい食品のダイオキシン類汚染実態を把握し、個人別暴露量を正確に評価するためのデータ蓄積を目的に、今年度は畜肉類及び魚介類のダイオキシン類汚染調査を実施した。また、今までに調査が不足している、畜肉及び魚介類を含む冷凍・レトルト食品についてダ

A. 研究目的

トータルダイエツト試料によるダイオキシン類の摂取量推定結果では、ダイオキシン類摂取

イオキシソ類を分析し、それらからのダイオキシソ類摂取量を推定した。さらに、平成 23 年度の調査結果により、ダイオキシソ類が比較的高濃度に含まれていることが判明したタラ肝臓(燻製)及び鮫肝油加工食品の 2 製品について、フォローアップ調査を実施した。

B. 研究方法

1. 試料

試料は東京都内及び神奈川県のスーパーマーケット、及びインターネットを介して購入した。畜肉及び魚介類を含む冷凍・レトルト食品の概要については表 1 に示した。

2. 分析項目及び検出限界

ダイオキシソ類

WHO が毒性等価係数(TEF)を定めた下記の PCDDs 7 種、PCDFs 10 種及び Co-PCBs 12 種の計 29 種を分析対象とした。

()内の数字は検出限界(pg/g)を示す。但し、健康食品(鮫肝油加工食品)は分析に使用する試料量を少なくしたため検出下限が異なる(4,5 塩素化 PCDD/Fs: 0.05、6,7 塩素化 PCDD/Fs:0.1、8 塩素化 PCDD/Fs:0.2、ノンオルト PCBs: 0.5、モノオルト PCBs:5)。

PCDDs

- 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD (0.01)
- 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 1,2,3,7,8,9-HxCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (0.02)
- 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD (0.05)

PCDFs

- 2,3,7,8-TCDF, 1,2,3,7,8-PeCDF, 2,3,4,7,8-PeCDF (0.01)
- 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF, 1,2,3,7,8,9-HxCDF, 2,3,4,6,7,8-HxCDF, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF, 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF (0.02)
- 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDF (0.05)

Co-PCBs

- 3,3',4,4'-TCB(#77), 3,4,4',5-TCB(#81), 3,3',4,4',5-PeCB(#126), 3,3',4,4',5,5'-HxCB(#169) (0.1)
- 2,3,3',4,4'-PeCB(#105), 2,3,4,4',5-PeCB(#114), 2,3',4,4',5-PeCB(#118), 2',3,4,4',5-PeCB(#123), 2,3,3',4,4',5-HxCB(#156), 2,3,3',4,4',5'-HxCB (#157), 2,3',4,4',5,5'-HxCB(#167), 2,3,3',4,4',5,5'-HpCB(#189) (1)

3. 分析方法

ダイオキシソ類の分析は、「食品中のダイオキシソ類の測定方法暫定ガイドライン」(厚生労働省、平成 20 年 2 月)に従った。

4. 分析結果の表記

測定結果は湿重量あたりの毒性等量(pg TEQ/g)で示した。ダイオキシソ類の毒性等量の計算には、TEF (WHO 2005)を用いた。検出限界以下の異性体濃度はゼロとして計算した。

C. 研究結果及び考察

1. 個別食品のダイオキシソ類実態調査結果

畜肉類(7 種、28 試料)及び魚介類(2 種、8 試料)のダイオキシソ類分析結果を表 2 に示した。また、食品毎のダイオキシソ類濃度の概要を表 3 に示した。畜肉類中のダイオキシソ類濃度は牛肉が 0.000090~0.26 pg TEQ/g (中央値 0.017 pg TEQ/g)、豚肉が 0.000030~0.00072 pg TEQ/g (中央値 0.00022 pg TEQ/g)、鶏肉が 0.000084~0.28 pg TEQ/g (中央値 0.0057 pg TEQ/g)、鴨肉が 0.0011~0.41 pg TEQ/g (中央値 0.12 pg TEQ/g)、牛肝臓が 0.00059~0.22 pg TEQ/g (中央値 0.16 pg TEQ/g)、豚肝臓が 0.011~0.26 pg TEQ/g (中央値 0.029 pg TEQ/g)、及び鶏肝臓が 0.00030~0.29 pg TEQ/g (中央値 0.00078 pg

TEQ/g)であった。

魚介類中のダイオキシン類濃度は、ハマチが1.7~2.4 pg TEQ/g(中央値1.9 pg TEQ/g)、及びホタテが0.000090~0.023 pg TEQ/g(中央値0.016 pg TEQ/g)であった。最もダイオキシン類濃度が高かった個別食品はハマチであった。ハマチ4試料は固体及び産地が異なるにもかかわらず、いずれの試料でも2 pg TEQ/g前後のダイオキシン類を含んでいた。平成19年度の厚生労働科学研究の調査結果¹⁾でも、ハマチの成魚であるブリで1.0~6.9 pg TEQ/g($n = 6$)のダイオキシン類が検出されている。

2. 冷凍及びレトルト食品のダイオキシン類実態調査結果

畜肉類及び魚介類を含む冷凍・レトルト食品30試料のダイオキシン類分析結果、及びダイオキシン類摂取量の推定値を表4に示した。畜肉類(牛肉、豚肉、鶏肉)を使用した冷凍・レトルト食品のダイオキシン類濃度は、0.000020~0.042 pg TEQ/g(中央値0.00045 pg TEQ/g)であった。魚介類を使用した冷凍・レトルト食品のダイオキシン類濃度は、0.098~0.52 pg TEQ/g(中央値0.21 pg TEQ/g)であった。魚介類を使用した冷凍・レトルト食品のダイオキシン類濃度は、畜肉類を使用した食品よりも高かった。最もダイオキシン類濃度が高かったのはサバの煮付(試料番号28)であり、ダイオキシン類濃度は0.52 pg TEQ/gであった。今回調査した魚介類を含む冷凍・レトルト食品では、原材料の殆どを魚が占めていることから、魚のダイオキシン類濃度が大きく反映されていると考えられる。

冷凍・レトルト食品からの1食あたりのダイオキシン類摂取量を推定した。摂取量を推定するにあたり、試料番号12までの試料については1人前等の記載があるため、この食品重量に基づいて1食あたりのダイオキシン類摂取量を推定した。それ以外の試料については食

品摂取量に関する明確な記載がないため、1食あたり100gを摂取すると仮定して、1食あたりのダイオキシン類摂取量を求めた。畜肉類を使用した冷凍・レトルト食品からの摂取量は0.0016~5.6 pgTEQ/食であった。牛井の具(試料番号8)で最も高い値が推定されたが、耐容1日摂取量(TDI)に占める割合は3%程度であった。魚介類を使用した冷凍・レトルト食品からの摂取量は9.8~52 pgTEQ/食であった。サバの煮付(試料番号28)で最も高い値が推定され、TDIの約26%に相当した。なお、仮に当該食品を1日3回食しても、TDIを超過することはなかった。

3. ダイオキシン類濃度が高かった食品のフォローアップ調査

平成23年度の個別食品調査の結果、タラ肝臓(燻製)及び鮫肝油加工食品の2製品のダイオキシン類濃度が高いことが判明した²⁾。そこで、該当する製品のダイオキシン類濃度についてフォローアップ調査を実施した。平成24年度は該当の2製品について、賞味期限が異なる各2試料を追加購入し、ダイオキシン類分析を実施した。表5にダイオキシン類分析結果を、平成23年度の調査結果とあわせて示した。平成24年度に購入した製品(#2及び#3)のダイオキシン類濃度は、タラ肝臓(燻製)が19及び7.0 pg TEQ/g、鮫肝油加工食品が67及び73 pg TEQ/gであった。タラ肝臓(燻製)のダイオキシン類濃度は、平成23年度の結果と比較すると顕著に低かった。一方、鮫肝油加工食品のダイオキシン類濃度は平成23年度の調査結果と殆ど変わらなかった。

該当の鮫肝油加工食品について、製品に記載されている最大の食品摂取量に基づいて、ダイオキシン類摂取量を推定した。その結果、#1~#3のダイオキシン類摂取量は、129~140 pg TEQ/日と推定され、これはTDIの64~70%に相当した。本年度のトータルダイエット調査による国民平均のダイオキシン類摂取量は

34.6 pg TEQ/日であることから³⁾、他の一般的な食品からのダイオキシン類摂取量を加味しても TDI を超えることはない。しかし、健康食品は同じ製品を比較的長期に渡り摂取する傾向があり、本製品の摂取はダイオキシン類摂取量を長期にわたり大幅に上昇させる危険性が懸念された。

D. 結論

1. 畜肉類(7種、28試料)及び魚介類(2種、8試料)を調査した。畜肉類は 0.000030~0.41 pg TEQ/g(中央値 0.0067 pg TEQ/g)、魚介類は 0.000090~2.4 pg TEQ/g(中央値 0.86 pg TEQ/g)であった。最もダイオキシン類濃度が高かった食品はハマチであり、ダイオキシン類濃度は 1.7~2.4 pg TEQ/g(中央値 1.9 pg TEQ/g)であった。
2. 冷凍及びレトルト食品(10種、30試料)を調査した結果、サバの煮付のダイオキシン類濃度が最も高かった(0.52 pg TEQ/g)。本食品を1食摂取したときのダイオキシン類摂取量は 52 pg TEQ/日と推定され、TDI の約 26%に相当した。
3. 平成 23 年度のフォローアップ調査として、ダイオキシン類濃度が高かったタラ肝臓(燻製)及び鮫肝油加工食品を追加購入し、ダイオキシン類分析を実施した。その結果、鮫肝油加工食品は平成 23 年度の調査結果と同様に、ダイオキシン類を高濃度に含むことが明らかになった。

E. 参考文献

- 1) 平成 19 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書「ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 塩素化ダイオキシン類の個別食品汚染調査)
- 2) 平成 23 年度厚生労働科学研究補助金研

究報告書「食品を介したダイオキシン類等有害化学物質摂取量の評価とその手法開発に関する研究」(分担報告書 塩素化ダイオキシンの個別食品汚染調査)

- 3) 平成 24 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書「食品を介したダイオキシン類等有害化学物質摂取量の評価とその手法開発に関する研究」(分担報告書 塩素化ダイオキシン類のトータルダイエツト調査)

F. 研究業績

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) Tsutsumi T , Takatsuki S , Matsuda R: Dioxin concentrations in dietary supplements containing animal oil on the Japanese market, The 32nd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants(2012.8).
 - 2) 堤 智昭, 高附 巧, 石井 利華, 松田 りえ子: 畜肉類を使用した弁当からの塩素化ダイオキシン類摂取量, 第 49 回全国衛生化学技術協議会年会 (2012.11).

表1 畜肉及び魚介類を含む冷凍・レトルト食品試料の概要

試料番号	種類	形態	主要食材	他の動物・魚介類性食材等
1	カレー	レトルト	牛肉	ラード、ポークエキス、脱脂粉乳等
2	カレー	レトルト	牛肉	鶏皮、、脱脂粉乳調製品、牛肉だし等
3	カレー	レトルト	牛肉	牛脂豚脂混合油、チキンブイヨン等
4	ミートソース	レトルト	牛肉	豚肉、ラード等
5	ミートソース	レトルト	牛肉	ラード、ナチュラルチーズ等
6	ミートソース	レトルト	牛肉	豚脂、牛肉だし等
7	牛丼の具	冷凍	牛肉	ビーフエキス等
8	牛丼の具	レトルト	牛肉	ビーフコンソメ、乳たん白、卵白末、脱脂粉乳等
9	牛丼の具	レトルト	牛肉	食用油脂(牛脂、豚脂)等
10	シチュー	レトルト	牛肉	ビーフエキス、牛脂、バター、チキンエキス、全粉乳、ゼラチン等
11	シチュー	レトルト	牛肉	牛脂豚脂混合油、全粉乳、ビーフエキス、豚ゼラチン等
12	シチュー	レトルト	牛肉	ラード、牛脂、ビーフエキス等
13	ハンバーグ	冷凍	鶏肉	牛肉、豚肉等
14	ハンバーグ	冷凍	豚肉	牛肉、卵白粉等
15	ハンバーグ	冷凍	牛肉	豚肉、豚脂、、鶏卵、ビーフオイル等
16	ミートボール	冷凍	鶏肉	豚脂等
17	ミートボール	冷凍	鶏肉	豚肉、豚脂等
18	ミートボール	冷凍	鶏肉	豚脂等
19	唐揚げ	冷凍	鶏肉	卵白、鶏卵等
20	唐揚げ	冷凍	鶏肉	鶏卵、卵白粉、チキンエキス等
21	唐揚げ	冷凍	鶏肉	鶏卵等
22	餃子	冷凍	豚肉	鶏肉、豚脂(国産)、チキンスープ等
23	餃子	冷凍	豚肉	鶏肉、豚脂、ゼラチン(豚)等
24	餃子	冷凍	豚肉	鶏肉、豚脂、ゼラチン、ポークエキス等
25	サケ塩焼き	冷凍	サケ	ゼラチン等
26	サケ塩焼き	レトルト	サケ	-
27	サケ塩焼き	レトルト	サケ	-
28	サバの煮付	レトルト	サバ	かつお節エキス等
29	サバの煮付	レトルト	サバ	ゼラチン等
30	サバの煮付	冷凍	サバ	-

表2 個別食品中のダイオキシン類濃度測定結果

食 品			ダイオキシン類濃度 (pg TEQ/g) ¹⁾		
			PCDD/Fs	Co-PCBs	Total
畜肉類	牛肉 1	国産	0.24	0.021	0.26
	牛肉 2	国産	0.0034	0.00036	0.0037
	牛肉 3	輸入	0.020	0.011	0.031
	牛肉 4	輸入	0	0.000090	0.000090
	豚肉 1	国産	0	0.000060	0.000060
	豚肉 2	国産	0.00036	0.00036	0.00072
	豚肉 3	輸入	0	0.000030	0.000030
	豚肉 4	輸入	0.00026	0.00012	0.00038
	鶏肉 1	国産	0.26	0.022	0.28
	鶏肉 2	国産	0.00030	0.0015	0.0018
	鶏肉 3	輸入	0.000024	0.000060	0.000084
	鶏肉 4	輸入	0.0096	0	0.0096
	鴨肉 1	国産	0.065	0.18	0.25
	鴨肉 2	国産	0.13	0.28	0.41
	鴨肉 3	輸入	0.0010	0.00011	0.0011
	鴨肉 4	輸入	0.0010	0.00019	0.0012
	牛肝臓 1	国産	0.19	0.010	0.20
	牛肝臓 2	国産	0.22	0.00012	0.22
	牛肝臓 3	輸入	0.12	0.000060	0.12
	牛肝臓 4	輸入	0.00059	0	0.00059
	豚肝臓 1	国産	0.016	0.000030	0.016
	豚肝臓 2	国産	0.24	0.020	0.26
	豚肝臓 3	国産	0.011	0	0.011
	豚肝臓 4	国産	0.041	0.000060	0.041
	鶏肝臓 1	国産	0.29	0.00024	0.29
	鶏肝臓 2	国産	0.00055	0.000060	0.00061
	鶏肝臓 3	国産	0.00095	0	0.00095
	鶏肝臓 4	国産	0.00030	0	0.00030
魚介類	ハマチ 1	国産 養殖	0.37	1.3	1.7
	ハマチ 2	国産 養殖	0.38	1.4	1.8
	ハマチ 3	国産 養殖	0.56	1.9	2.4
	ハマチ 4	国産 養殖	0.53	1.6	2.1
	ホタテ 1	国産 養殖	0	0.000090	0.000090
	ホタテ 2	国産 養殖	0.011	0.00012	0.011
	ホタテ 3	国産 養殖	0.013	0.010	0.023
	ホタテ 4	国産 養殖	0.011	0.010	0.021

1) WHO 2005 TEFにより計算

表3 個別食品中のダイオキシン類濃度の概要

食品	試料数	ダイオキシン類濃度 (pg TEQ/g) ¹⁾			
		平均値	中央値	最大値	最小値
牛肉	4	0.074	0.017	0.26	0.000090
豚肉	4	0.00030	0.00022	0.00072	0.000030
鶏肉	4	0.072	0.0057	0.28	0.000084
鴨肉	4	0.17	0.12	0.41	0.0011
牛肝臓	4	0.14	0.16	0.22	0.00059
豚肝臓	4	0.082	0.029	0.26	0.011
鶏肝臓	4	0.073	0.00078	0.29	0.00030
ハマチ	4	2.0	1.9	2.4	1.7
ホタテ	4	0.014	0.016	0.023	0.000090

1) WHO 2005 TEFにより計算

表4 畜肉及び魚介類を含む冷凍・レトルト食品試料のダイオキシン類濃度と摂取量

試料番号	種類	主な畜肉及び魚介類の種類	ダイオキシン類濃度 ¹⁾ (pg TEQ/g)			1食当たりのダイオキシン類 摂取量 ²⁾ (pg TEQ/食)	TDIに対する割合 ³⁾ (%)
			PCDD/Fs	Co-PCBs	Total		
1	カレー	牛肉	0.00036	0	0.00036	0.067	0.03
2	カレー	牛肉	0.000024	0.000011	0.000036	0.0078	0.004
3	カレー	牛肉	0.000027	0	0.000027	0.0054	0.003
4	ミートソース	牛肉	0.000031	0	0.000031	0.0038	0.002
5	ミートソース	牛肉	0.00041	0	0.00041	0.061	0.03
6	ミートソース	牛肉	0.000022	0	0.000022	0.0035	0.002
7	牛丼の具	牛肉	0.000020	0	0.000020	0.0016	0.0008
8	牛丼の具	牛肉	0.027	0.016	0.042	5.6	3
9	牛丼の具	牛肉	0.00052	0.000062	0.00059	0.070	0.04
10	シチュー	牛肉	0.020	0.00013	0.020	4.0	2
11	シチュー	牛肉	0.000023	0.00022	0.00025	0.050	0.02
12	シチュー	牛肉	0.00027	0	0.00027	0.057	0.03
13	ハンバーグ	鶏肉	0.0011	0.017	0.018	1.8	0.9
14	ハンバーグ	豚肉	0.00051	0	0.00051	0.051	0.03
15	ハンバーグ	牛肉	0.00031	0.000074	0.00039	0.039	0.019
16	ミートボール	鶏肉	0.0012	0.013	0.014	1.4	0.7
17	ミートボール	鶏肉	0.00032	0.00026	0.00058	0.058	0.029
18	ミートボール	鶏肉	0.000071	0.00012	0.00020	0.020	0.010
19	唐揚げ	鶏肉	0.00061	0.000078	0.00069	0.069	0.03
20	唐揚げ	鶏肉	0.0012	0.000019	0.0012	0.12	0.06
21	唐揚げ	鶏肉	0.027	0.011	0.038	3.8	1.9
22	餃子	豚肉	0.00040	0.000094	0.00049	0.049	0.02
23	餃子	豚肉	0.00027	0.000065	0.00033	0.033	0.017
24	餃子	豚肉	0.0060	0.00011	0.0061	0.61	0.3
25	サケ塩焼き	サケ	0.037	0.083	0.12	12	6
26	サケ塩焼き	サケ	0.018	0.11	0.12	12	6
27	サケ塩焼き	サケ	0.0080	0.090	0.098	9.8	5
28	サバの煮付け	サバ	0.13	0.39	0.52	52	26
29	サバの煮付け	サバ	0.12	0.32	0.44	44	22
30	サバの煮付け	サバ	0.066	0.23	0.29	29	15

1) WHO 2005 TEFにより計算

2) 各試料の1食あたりの食品摂取量については、試料番号1～12は商品に記載の情報に基づいた。試料番号13以降は1食あたり100gを摂取すると仮定した。

3) 体重50kgとした場合の一日摂取量(200 pg TEQ/日)と比較

表5 平成23年度にダイオキシン類濃度が高かった食品のフォローアップ調査

食 品				ダイオキシン類濃度 (pg TEQ/g) ¹⁾		
				PCDD/Fs	Co-PCBs	Total
魚肝臓加工品	タラ肝臓(燻製)	#1	平成23年度購入 ²⁾	12	41	54
		#2	平成24年度購入	1.8	17	19
		#3	平成24年度購入	1.5	5.5	7.0
健康食品	鮫肝油加工食品	#1	平成23年度購入 ²⁾	14	53	67
		#2	平成24年度購入	14	54	67
		#3	平成24年度購入	15	58	73

1) WHO 2005 TEFにより計算

2) 平成23年度 厚生労働科学研究補助金研究報告書「食品を介したダイオキシン類等有害化学物質摂取量の評価とその手法開発に関する研究」より引用した。

分 担 研 究 報 告

有害物質摂取量推定法の精密化研究

渡邊 敬浩

食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価とその手法開発に関する研究

有害物質摂取量推定法の精密化研究

研究代表者 松田りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部部長
研究分担者 渡邊 敬浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部第三室長

研究要旨

メチル水銀を中心とした有機水銀の摂取量推定に不可欠な、下記 2 つ研究を実施した。

研究 1:魚介類中の有機水銀(メチル水銀、エチル水銀、フェニル水銀)の実態調査

魚介類には広くメチル水銀が含まれていることが知られているが、その他の有機水銀の含有について得られている知見は少ない。そこで本研究では、昨年度開発したフェニル誘導体化 GC-MS/MS 法に改良を加えた後、その方法を用いて、複数種類の魚、タコ、エビ・カニ、貝類など、市場から購入可能であった多種類の魚介類の分析を行い、メチル水銀、エチル水銀、フェニル水銀の含有実態を調査した。その結果、メチル水銀は最大で 0.19 mg/kg の濃度で検出されたが、エチル水銀とフェニル水銀が 0.01 mg/kg を超える濃度で検出されることはなかった。

研究 2:摂取量推定に使用可能なメチル水銀分析法の開発

摂取量推定に使用可能なメチル水銀分析法について引き続き検討した。本年度の研究では、これまでに開発したフェニル誘導体化 GC-MS 法に含まれるフェニル誘導体化反応、GC-MS による測定、また抽出の条件を見直し、さらに試料の前処理手順を追加することにより、より頑健で操作性に優れた改良法を開発した。改良法の性能を、タラ、マグロ、メカジキを基材とする 4 種の認証標準試料、及びメチル水銀標準溶液を用いて調製した添加試料(タラ並びにキハダマグロ)を計画的に分析することで評価した。得られた分析値から推定された真度は、4 種の認証標準試料に対し 84～89%、2 種の添加試料に対し 93%あるいは 96%であった。また室内精度は、4 種の認証標準試料に対し 2.5～3.7%、両添加試料に対し約 3.5%と推定された。

研究協力者 菊地博之、松田りえ子
研究協力者 赤木浩一

国立医薬品食品衛生研究所食品部
福岡市保健環境研究所

A. 研究目的

生体物質と結合することや、官能基により修飾されることで、複数の化学形態を生じ、それに伴い毒性が変化する化学物質が知られる。水銀はそのような化学物質の一つである。食品を介した汚染化学物質の摂取量推定の目的の一つには、その摂取による健康危害リスクへの影響を評価するた

めに必要な科学的知見の取得が挙げられる。この目的を達成するためには、毒性の異なる複数の化学形態が存在する場合には、当該化学物質を形態別に分析しなければならない。

本課題では、これまでも、摂取量推定の目的に使用可能なメチル水銀分析法について検討してきた。その成果として、魚あるいは魚介類を分析

対象とする、フェニル誘導体化を介したメチル水銀分析法(GC-MS 法)並びに有機水銀分析法(GC-MS/MS 法)が開発されている。今年度は、1) 摂取量推定の必要性を判断するために、GC-MS/MS 法を用いて魚介類中に含まれるメチル水銀、エチル水銀、フェニル水銀濃度の実態を調査した研究、2) 摂取量推定に使用されるマーケットバスケット試料の分析を念頭に、頑健性や操作性の向上を目的とした GC-MS 法の改良に関する研究を実施したのであわせて報告する。

B. 研究方法

研究 1: 魚介類中の有機水銀(メチル水銀、エチル水銀、フェニル水銀)の実態調査

試料

2012 年 4 月～6 月にかけて、福岡県内のスーパーマーケット等において計 38 種の魚介類を購入し、可食部を分別の上、混合・均質化することにより、分析用試料を調製した。購入した魚介類の詳細は、結果表 1 を参照のこと。

分析機器

遠心分離機: 久保田商事(株)製高速冷却遠心機 model 6200 を用いた。

GC-MS/MS: Thermo Scientific 社製 TRACE GC ULTRA 及び TSQ Quantum GC を用いた。

GC-MS/MS 測定条件

カラム: ジーエルサイエンス(株)製 InertCap5MS/NP PROG 10M+TL(内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m)

オーブン温度: 50°C(1 min)→10°C/min→260°C(0 min)

ポストラン: 280°C(5 min)

注入口温度: 250°C

トランスファライン温度: 280°C

イオン源温度: 280°C

注入量: 2 μ L(スプリットレス時間 0.5 min)

キャリアガス流量: 1.0 mL/min (He)

イオン化法: EI

イオン化エネルギー: 70 eV

分析モード: SIM

メチル水銀定量イオン: m/z 294

メチル水銀定性イオン: m/z 277、279、292

エチル水銀定量イオン: m/z 308

エチル水銀定性イオン: m/z 277、279、306

フェニル水銀定量イオン: m/z 354

フェニル水銀定性イオン: m/z 277、279、356

分析モード: SRM

メチル水銀定性イオン: m/z 292→77、292→277、294→77、294→279

エチル水銀定性イオン: m/z 306→77、306→277、308→77、308→279

フェニル水銀定性イオン: m/z 354→77、354→277、356→77、356→279

有機水銀一斉分析法

昨年度報告した分析法に若干の改良を加え、実態調査に使用した。使用した有機水銀分析法を以下に示す。

抽出

試料約 10 g を 225 mL 容ポリプロピレン製チューブに正確に量り取り、0.1 mol/L 臭化カリウム溶液 30 mL を加えホモジナイズした後、硫酸銅(II)飽和 2 mol/L 硫酸 30 mL 及びトルエン 50 mL を加え 15 分間振とう後、遠心分離し(3,500 rpm, 15 分間)、トルエン層を分取した。残さにトルエン 45 mL を加え同様に操作後、100 mL に定容し抽出液とした。

フェニル誘導体化

抽出液または各濃度の混合標準溶液 5 mL に 2% テトラフェニルホウ酸ナトリウム溶液 1 mL を

加え混合し、15分間フェニル誘導体化した。遠心分離した(3,500 rpm, 5分間)トルエン層をPSAに3 mL負荷し、初流1 mLを廃棄して流出液を採取し、測定溶液とした。

測定及び有機水銀濃度の定量

測定溶液をGC-MS/MSに注入し測定することにより得られたクロマトグラムのパーク面積から、絶対検量線法により測定溶液中のメチル水銀の濃度を求め、さらに下記の算術式に従って試料の含有量を算出した。検量線の濃度範囲を超過した場合には、測定溶液をトルエンで適宜希釈し再測定した。

有機水銀含有量(mg/kg)=検量線より求めた測定溶液中濃度(ng/mL)×抽出液量(100 mL)×希釈倍率/試料採取量(10.0 g)/1,000

研究 2: 摂取量推定に使用可能なメチル水銀分析法の開発

試料

認証標準試料

認証標準試料(CRM 7402-a: タラ魚肉粉末、BCR-463: マグロ魚肉粉末、ERM-CE464: マグロ魚肉粉末、CRM 7403-a: メカジキ魚肉粉末)は、西進商事(株)を通じ入手した。また、分析時には、2 gを量りとり、一般的な魚肉の水分含量を勘案して水8 gを加え混合した後、試料とした。

ブランク及び添加試料

ブランク試料及び添加試料の調製には、東京都内のスーパーマーケットで購入したマダラ及びキハダマグロの切り身を用いた。

購入した切り身をGM200(レッチェ社製)により十分に混合することでブランク試料を調製した。ブランク試料10.0 gをアセトンとトルエンにより前処理した後、添加用メチル水銀標準溶液を試料中濃度として0.3 mg/kgになるよう加え、添加試料

を調製した。

試薬等

塩化メチル水銀は、ジーエルサイエンス社製のものを用いた。臭化カリウム、無水硫酸銅(II)、硫酸、システイン塩酸塩一水和物、酢酸ナトリウム三水和物、りん酸二水素ナトリウム二水和物、りん酸水素二ナトリウム十二水和物、テトラフェニルホウ酸ナトリウム、ポリエチレングリコール300(PEG 300)は、和光純薬工業社製のものを使用した。その他の試薬類は残留農薬分析用または試薬特級に準じたものを使用した。

水: ミリポア社製装置(Element A10)により製造した超純水(比抵抗 > 18.2 MΩ・cm、TOC < 3 ppb)を用いた。

メチル水銀標準原液: 塩化メチル水銀標準品58.2 mgを正確に量りとり、トルエンで溶解し50 mLに定容した。本標準原液のメチル水銀濃度は1000 µg/mLである。

添加用メチル水銀標準溶液: メチル水銀標準原液3 mLを量りとり、トルエンで100 mLに定容後、定容した溶液10 mLを量りとり、トルエンで100 mLで定容した。

100 ng/mLメチル水銀溶液: 塩化メチル水銀標準品11.6 mgを正確に量りとり、水で溶解し100 mLに定容した。

1 mol/L臭化カリウム溶液: 臭化カリウム 119 gを水で溶解し1 Lに定容した。

硫酸銅(II)飽和4 mol/L硫酸: 水600 mLに濃硫酸200 mLを加え、放冷後、水で900 mLに定容した後、無水硫酸銅(II)を飽和するまで溶解した。

1%システイン溶液: L-システイン塩酸塩一水和物(10 g)、酢酸ナトリウム三水和物(8 g)、無水硫酸ナトリウム(125 g)を水で溶解し、1 Lに定容した。

メチル水銀-システイン溶液：メチル水銀標準原液 1 mLを量りとり、これに1%システイン溶液 90 mLを加え15分間振とうした後、水層が清澄になるまで静置した。水層を分取し、1%システイン溶液で100 mLに定容した。

0.2 mol/Lリン酸緩衝液(pH 7.0)：リン酸二水素ナトリウム二水和物31.2 gを水で溶解して1 Lとし、これを第一液とした。リン酸水素二ナトリウム十二水和物71.6 gを水で溶解して1 Lとし第二液とした。第一液380mLと第二液610mLを混合し、必要に応じ、第一液を用いてpHを7.0に調整した。

1%テトラフェニルホウ酸ナトリウム溶液：テトラフェニルホウ酸ナトリウム0.5 gを0.2 mol/Lリン酸緩衝液(pH 7.0)で溶解し、50 mLに定容した。本溶液は、用事調製した。

エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム(PSAミニカラム)：ジーエルサイエンス(株)製InertSep PSA(200 mg/3mL)をトルエンでコンディショニングして使用した。

分析機器

遠心分離機：久保田商事(株)製高速冷却遠心機 model 6200 を用いた。

GC-MS：Agilent 社製 6890N GC 及び 5975 MSD を用いた。

GC-MS 測定条件

カラム：InertCap 5MS/NP (内径0.25 mm、長さ30 m、膜厚 0.25 μm)

オープン温度：70°C(1 min)→20°C/min→ 31°C (5 min)

注入口温度：250°C

トランスファライン温度：280°C

イオン源温度：230°C

注入量：2.5 μL

キャリアガス流量：1.0 mL/min (He)

イオン化法：EI

分析モード：SIM

定量イオン： m/z 292

メチル水銀分析法

本研究で検討したメチル水銀分析法(改良メチル水銀分析法)を以下に示す。

試料の前処理

試料10.0 gにアセトン100 mLを加え30秒間振とうした後、1,880 gで5分間遠心分離し、溶媒を除去した。次にトルエン100mLを加え、同様に操作した。

抽出

前処理した試料に1 mol/L臭化カリウム溶液40 mL、硫酸銅(II)飽和4 mol/L硫酸40 mL及びトルエン80 mLを加え、30分間振とうし、1,880 gで20分間遠心分離した後、トルエン層を採取した。再度、水層にトルエン50 mLを加え10分間振とう後、同様に遠心分離し、トルエン層を採取した。得られたトルエン溶液を統合後、1%システイン溶液50 mLを加え、5分間振とうした。静置後、採取したシステイン層に6 mol/L塩酸30 mL及びトルエン30 mLを加え、10分間振とうすることで転溶した。転溶操作を2回繰り返し、得られたトルエン溶液を統合後100 mLに定容した。

メチル水銀のフェニル誘導体化

定容後のトルエン溶液3 mLに対し、0.2 mol/Lリン酸緩衝液(pH 7.0) 5 mL、1%テトラフェニルホウ酸ナトリウム溶液1 mLを加え室温で10分間振とうした。

測定溶液の調製

誘導体化反応後の溶液を速やかに840 gで10分間遠心分離し得たトルエン層を、予めトルエン3 mLでコンディショニングしたPSAミニカ

ラム(200 mg/3 mL)に負荷した。初流1 mLを除く溶出液を採取し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。脱水したトルエン溶液1 mLに600 µg/mL

PEG 300 0.5 mLを加え、測定溶液とした。

検量線

メチル水銀標準原液を適宜量りとり、トルエンを用いて100 mLあるいは200 mLに定容することにより、検量線作成用の標準溶液(検量線用溶液)を調製した。検量線用溶液の濃度は、0、2.5、5、10、25、50、75及び100 ng/mLとした。試料と同様に、これらの検量線用溶液も誘導体化以降の操作を行った後、GC-MSにより測定した。各検量線用溶液に含まれるメチル水銀の誘導体であるメチルフェニル水銀測定値(ピーク面積値)のメチル水銀濃度に対する一次回帰式を最小二乗法により求め、検量線を作成した。

測定及びメチル水銀濃度の算出

測定溶液をGC-MSに注入し、測定値を得た。次いで、作成した検量線の各パラメーターを用い、下式に従い、測定溶液中のメチル水銀濃度を逆推定した。

測定溶液中のメチル水銀濃度(mg/kg)

$$= (\text{Signal}_{\text{analyte}} - \text{intercept}) / \text{slope}$$

Signal_{analyte}:メチルフェニル水銀の測定値

Intercept:検量線の切片

Slope:検量線の傾き

その後、測定溶液中濃度に分析操作による希釈の倍率を乗じ、試料中メチル水銀濃度を算出し、定量値とした。

分析法の妥当性確認

分析法の性能を評価するために、4種の認証標準試料及び2種の添加試料を計画的に分析して得

られた定量値の解析結果から、真度と精度を推定した。具体的な分析計画を以下に示す。

認証標準試料：1日に4種の試料をそれぞれ2併行で分析し、この分析を5日間実施した。

添加試料：1日に2種の添加試料をそれぞれ2併行で分析し、この分析を5日間実施した。添加試料の分析時には、対応するブランク試料も2併行で分析した。なお、各添加試料から得られた分析値から対応する全ブランク試料から得られた分析値の平均値を差し引いた後、真度と精度を推定した。

性能評価の結果(真度と精度の推定値)を食安発第0926001号「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に示された性能基準値と比較し、分析法の妥当性を確認した。

C.D. 研究結果及び考察

研究1: 魚介類中の有機水銀(メチル水銀、エチル水銀、フェニル水銀)の実態調査

C.D.1 有機水銀類の実態調査結果

流通量の多いサバ、タイ、マグロ、イカ、タコ、エビなど、38種の魚介類を福岡県内の市場から買い上げ、それら食品中の有機水銀(メチル水銀、エチル水銀、フェニル水銀)濃度の実態を調査した。試料とした38種の魚介類のうち、30試料から、0.01~0.19 mg/kgの範囲でメチル水銀を検出した。スケソウタラの卵巣を除き、定量値の得られなかった残り7試料からも、痕跡程度のメチル水銀由来のピークが確認されている。

エチル水銀及びフェニル水銀はすべての試料から検出されなかった。

全ての試料について、有機水銀混合溶液を0.10 mg/kg相当添加した添加試料を調製し、試料と併行して分析することによって、回収率を確認した。その結果、試料により回収率は異なり、メチル水銀では65.8~102.7%、エチル水銀では65.7~

93.3%、フェニル水銀では 63.1~99.2%であった。

今回の実態調査の結果からも、メチル水銀が多様な魚介類に含まれていることが明らかとなり、摂取量推定の必要性が改めて確認された。一方、メチル水銀が検出された試料であってもエチル水銀、フェニル水銀は検出されていない。この結果は、魚介類中に含まれる有機水銀の種類は、メチル水銀が主であることを示す有用な知見である。しかし、試料によって回収率が大きく変動していること並びに、現在の GC-MS/MS 法の定量限界が、エチル水銀とフェニル水銀共に 0.01 mg/kg に設定されており、実態調査の目的に用いる分析法の定量限界としては若干高めであることの 2 点を考慮すれば、さらに分析法の性能を高め、より信頼できる分析値によって実態を追調査することも必要であろう。

研究 2: 摂取量推定に使用可能なメチル水銀分析法の開発

C.D.2 メチル水銀分析法の改良

C.D.2-1 フェニル誘導体化法の改良

昨年度の検討結果として、誘導体化反応は、メチル水銀を含むシステイン溶液 1 mL に対し、0.1 mol/L 塩酸 5 mL、2%テトラフェニルホウ酸ナトリウム 1 mL 及び n-ヘプタン 2.5 mL を加えた後、40°C で 30 分間振とうすることを条件として行う事を手順とした。しかし、その後、この手順に従い誘導体化反応を行い、精製を経て調製した測定溶液を繰り返し注入することで、GC-MS の感度が著しく低下することが明らかになった。昨年度の検討でも、誘導体化反応時に誘導体化試薬(テトラフェニルホウ酸)が分解することにより、ビフェニル等の多種のフェニル化合物が多量に生じることを報告した。今回明らかとなった、GC-MS の著しい感度低下は、これら分解物のライナー等への吸着が原因ではないかと考察した。そこで、メチル水銀

のフェニル化の効率は低下させず、分解物ができるだけ生成しない誘導体化条件を検討した。検討では、メチル水銀のフェニル化及び分解物の生成に影響を与える要因として、pH、温度、及び時間に着目し、これら要因を変化させた実験を行った。なお、テトラフェニルホウ酸の分解により生じる化合物には、ベンゼン環の数や分子構造が異なる、ビフェニル、テルフェニル、クワテルフェニルなどが含まれる。本検討では、事前の分析結果から生成量が最も多い事が明らかとなった、ビフェニルを分解物の指標とした。

検討では、100 ng/mL メチル水銀溶液、また、pH 2~12 の範囲にある各種緩衝液(0.2 mol/L リン酸緩衝液 : pH 2、3、4、6、7、8、11、12、0.2 mol/L 酢酸緩衝液 : pH 4、5、6、0.2 mol/L トリス緩衝液 : pH 7、8、9)を用いた。

まず、pH と時間の影響について検討するため、100 ng/mL メチル水銀溶液 1 mL に対し、各種緩衝液 5 mL、1%テトラフェニルホウ酸ナトリウム溶液 1 mL、n-ヘプタン 2.5 mL を加え、30°C で誘導体化反応を行った。反応時間は 0、10、20、30 分間とした。各条件で誘導体化し得られたメチルフェニル水銀及びビフェニルのピーク面積値を図 1 に示した。pH が 2~8 までの条件では、メチルフェニル水銀のピーク面積値に大きな違いは無い。しかし、用いる緩衝液の pH が 9 を超えると、メチルフェニル水銀のピーク面積値は低下した。一方で、ビフェニルのピーク面積値は、検討した条件の中で最も酸性の強い pH 2 で最も高く、pH 5 までの範囲では、漸次的に低下した。

次に、温度の影響について検討した。検討では、酢酸緩衝液(pH 5)を用い、25、30、40°C で反応させた。また反応時間は 0、10、20、30 分間とした。図 2 に示すように、検討した 3 つの温度条件下では、メチルフェニル水銀のピーク面積値に違いは認められなかった。一方、反応温度を 40°C とする

と、ビフェニルのピーク面積値は、反応時間に依存し増加した。

以上の結果を踏まえ、誘導体化反応は、メチル水銀を含む溶液 1 mL に 0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7) 5 mL、1%テトラフェニルホウ酸ナトリウム 1 mL、及び n-ヘプタン 2.5 mL を加え、室温で、10 分間振とうし、行うこととした。

C.D. 2-2 転溶条件の検討

メチル水銀のフェニル誘導体化は、反応溶液にリン酸緩衝液を加えることにより、中性条件下で行う事とした。しかし、中性のシステイン溶液中でメチル水銀は、システインとの複合体を形成しており、この複合体を直接に誘導体化することはできない。改良した条件によりメチル水銀をフェニル化するためには、まず、メチル水銀をこの複合体から解離させなければならない。そこで、塩酸を加え酸性とすることで複合体からメチル水銀を解離させ、続いてトルエンに転溶したのち、誘導体化させる方法を検討した。

検討では、60 ng/mL のメチル水銀-システイン溶液を用いた。この溶液 50mL に対し、6 mol/L 塩酸 30 mL を加えた後、液量と回数を変えてトルエンにより転溶した。転溶後のトルエン溶液を合わせ、100 mL に定容し、先に示した条件で誘導体化後、測定し定量値を得た。得られた定量値のシステイン溶液中濃度に対する比を転溶率として求め、表 2 に示した。

転溶操作を 1 回とすると、用いるトルエン量に依存して、転溶率が増加していることが分かる。しかしその値は最大でも 83% であり、操作回数を増やすことによりさらに転溶率が上昇することが期待された。そこで転溶操作を 2 回及び 3 回行う事について検討した。転溶操作を 2 回行った場合には、用いたトルエンの量の違いによらず、2 回の操作を通じて得られる転溶率は 90% 程度であっ

た。さらに転溶操作を 3 回行った場合には、用いるトルエン量の違いによらず 95% 以上の転溶率が得られた。これらの結果から、操作の簡便性も踏まえ、30 mL のトルエンで 3 回転溶することとした。また、転溶時の振とう時間については別途検討し、5 分間と 10 分間とに違いが認められなかったことから(結果は示していない)、操作の迅速性を考慮し 5 分間とした。

上記のとおり、メチル水銀をシステインとの複合体から解離させ、トルエンに転溶する操作を追加することに合わせ、誘導体化条件も変更した。変更後の誘導体化条件は以下の通りである。なお、検量線用メチル水銀標準液もトルエンにより調製することに変更した。

メチル水銀を含むトルエン溶液 3 mL に 0.2 mol/L リン酸緩衝液(pH 7) 5 mL、1%テトラフェニルホウ酸ナトリウム 1 mL を加え、室温で、10 分間振とうする。

C.D. 2-3 PEG 共注入の検討

検量線は 0~100 ng/mL の比較的狭い範囲に設計した。しかしこの濃度範囲であっても、作成される検量線の切片は常に負となり、GC-MS 測定時にメチルフェニル水銀の一部がライナー等に吸着し、損失していることが疑われた。そこで、この損失の抑制効果を期待し、ポリエチレングリコール 300 (PEG300) の共注入を検討した。

0~100 ng/mL の濃度の検量線用溶液(0、2.5、5、10、25、50、75、100 ng/mL)を調製し、誘導体化した。カラム精製後、測定溶液を 2 つに分割し、一方はそのまま、他方には測定溶液 1 mL に対し 600 µg/mL の PEG300 0.5 mL を加え混合後、GC-MS に注入した。この手順を 3 日間実施して得られた測定値を結果として、図 3 に示した。3 日間に得られた測定値の平均値に基づき、検量線は作成している。PEG300 を用いず測定した場合の検量線は、

$y = 202.8x - 73.9$ 、PEG300を共注入した場合の検量線は $y = 222.0x + 5.1$ となった。

PEG300との混合により、測定溶液中のメチルフェニル水銀濃度は低下し、その結果、ピーク面積値は低下すると予想していた。しかし、図3に示したとおり、得られたピーク面積値は増加している。この結果からは、PEG300によりメチル水銀のライナー等への吸着が抑制されていることが示唆される。あるいは、吸着を抑制しているのではなく、ライナー内での滞留を減らし、実質的にカラムに負荷される量を増加させているのかもしれない。

図4に示したとおり、PEG300を共注入することにより、重合度の異なるPEGに由来する複数のピークが観察されたが、メチルフェニル水銀(保持時間6.3分)由来のピークと重なることはなく、測定を妨害しないと判断した。

以上の結果と考察に基づき、PSAカラムの溶出液1 mLに対し600 µg/mL PEG300 0.5 mLを添加し、測定溶液を調製することとした。

C.D.2.4 前処理法及び抽出法の検討

昨年度の報告書中でも、分析する魚種によっては、抽出操作時に強固なエマルジョンが生じ、操作性が大きく損なわれることが問題であると指摘している。今年度の研究では、エマルジョンが発生しなくなることを期待し、AOAC Official Method 988.11 (Mercury (Methyl) in Fish and Shellfish)に記載の方法を参考に、アセトン及びトルエンによる試料の前処理法を検討した。その結果、試料にアセトン100 mLを加え30秒間振とう後、アセトンを除去し、次いでアセトンの代わりにトルエンを用いて同じく操作することを前処理とすることで、種々の魚試料においてエマルジョンの発生頻度は大きく低下した。

また、この前処理を行う事で、1 mol/L 臭化カリウム溶液を加えた後の試料の流動性も高くなった。

そのため、昨年度の報告書では、酸による試料の分解とトルエンによるメチル水銀の抽出とを段階を分けて行うことを手順としていたが、これらをまとめて一つの手順とすることに変更した。

C.D.3 改良メチル水銀法の妥当性確認

C.D.2-1~2-4に示した検討の結果、最終的に規定した分析法を改良メチル水銀分析法として、その妥当性を確認した。

妥当性確認には、4種の認証標準試料及び2種の切り身魚から調製したブランク試料及び添加試料を用いた。試料を試験対象として、分析方法の妥当性を確認した。

図5~図7に、検量線用標準液、認証標準試料、そしてブランク試料及び添加試料から得られたSIMクロマトグラム(m/z 292)を示した。いずれのクロマトグラム上でも、メチルフェニル水銀のピークに影響するピークは認められない。このことから、選択性には問題が無いと判断した。

各試料から得られた定量値の解析結果に基づき推定された真度、併行精度並びに室内精度を表3-1及び表3-2に示す。認証標準試料を対象とした場合の真度は84~89%、併行精度は1.2~3.5%、室内精度は2.5~3.7%と推定された。また、タラ、キハダマグロの切り身から調製した添加試料(0.3 mg/kgのメチル水銀を含む)を対象とした場合の真度は93、96%、併行精度は3.4、2.1%、室内精度は3.4、3.6%とそれぞれ推定された。

認証標準試料と添加試料のいずれが分析対象であるかによらず、精度は5%未満で推定されている。一方、真度は、認証標準試料を対象とした場合に、添加試料を対象とした場合に比べてより低い値で推定されている。認証標準試料は、凍結乾燥された粒子の細かな粉体であり、試料の前処理時に十分沈殿せず、一部を損失している。また、本研究では、メチル水銀とタンパク質との結合など、天然での汚染

を十分に模した添加試料の調製方法を検討していない。そのため、単純に添加した塩化メチル水銀が、前処理時に使用するトルエンに溶解し試料から除かれてしまうことを恐れ、前処理後にメチル水銀標準溶液を添加し、添加試料を調製している。つまり、本研究で用いた添加試料の分析からは、前処理操作が定量値に与える影響を評価できない。認証標準試料を用いて推定された真度が添加試料を用いて推定された真度に比べて低い値である結果からは、上述した試料の損失以外にも、前処理時にメチル水銀が損失している可能性も考えられる。今後、この可能性を検証するためにも、添加方法や添加後の膨潤、溶媒の除去等について検討し、天然の汚染を模した添加試料の調製方法を確立し、改めて性能評価する必要がある。

真度及び精度の推定値が、食安発第 0926001 号「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に示されたそれぞれの目標値を下回ったことをもって、本改良メチル水銀分析法の妥当性が確認されたと判断した。

E. 結論

研究 1: 魚介類中の有機水銀(メチル水銀、エチル水銀、フェニル水銀)の実態調査

若干の改良を加えた GC-MS/MS 法を用い、38 種の魚介類中のメチル水銀、エチル水銀、並びにフェニル水銀濃度の実態を調査した。その結果、30 試料から 0.01~0.19 mg/kg の範囲でメチル水銀が検出された。この結果からも、改めてメチル水銀摂取量を推定する必要性が支持される。一方、今回の調査では、エチル水銀やフェニル水銀は検出されなかったが、用いた分析法の性能が十分に実態調査の目的に適しているとは言えないため、今後、さらに改良を行い、より性能の高い信頼できる分析法により追調査することが必要と考えられる。

研究 2: 摂取量推定に使用可能なメチル水銀分析法の開発

本年度の検討により、昨年度までに報告したメチル水銀分析法の頑健性や操作性が向上した。今後、1)マーケットバスケット方式により調製したトータルダイエット試料のうちどの様な食品群に適用するか、2)定量下限とすべき濃度に対する改良法の感度の不足などを考慮し、本課題において別に実施している GC-MS/MS を用いた有機水銀分析法の開発から得られた知見も活用しつつ、必要に応じてさらなる改良を加え、メチル水銀摂取量を推定する。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

赤木浩一、渡邊敬浩、菊地博之、松田りえ子

「魚介類中の有機水銀のフェニル誘導体化・GC-MS 法による分析」

第 104 回日本食品衛生学会学術講演会(2012.9)

表 1 GC-MS/MS 法を用いた魚介類中の有機水銀濃度実態調査結果

試料	含有量 (mg/kg)			回収率(%)		
	メチル水銀	エチル水銀	フェニル水銀	メチル水銀	エチル水銀	フェニル水銀
まぐろ(赤身)	0.1949	<0.010	<0.010	80.9%	79.2%	82.8%
はまち	0.1674	<0.010	<0.010	87.0%	77.5%	72.7%
きはだまぐろ	0.1520	<0.010	<0.010	85.0%	84.3%	99.1%
ぶり	0.1383	<0.010	<0.010	65.8%	76.4%	63.1%
かつお	0.1159	<0.010	<0.010	91.7%	84.0%	72.2%
うなぎ(白焼き)	0.0834	<0.010	<0.010	90.9%	79.3%	73.5%
ずわいがに	0.0764	<0.010	<0.010	95.9%	82.5%	71.0%
たら	0.0755	<0.010	<0.010	80.9%	65.7%	88.3%
たい	0.0734	<0.010	<0.010	75.5%	78.2%	65.0%
あゆ	0.0711	<0.010	<0.010	84.0%	77.9%	86.2%
くじら	0.0548	<0.010	<0.010	85.6%	83.6%	80.5%
かます	0.0518	<0.010	<0.010	102.7%	86.7%	79.7%
さば	0.0463	<0.010	<0.010	79.2%	73.4%	70.8%
さんま	0.0456	<0.010	<0.010	83.0%	72.1%	68.9%
きす	0.0435	<0.010	<0.010	81.2%	79.3%	66.2%
あまだい	0.0431	<0.010	<0.010	77.1%	80.2%	72.1%
たこ	0.0356	<0.010	<0.010	79.9%	71.4%	63.1%
あじ	0.0311	<0.010	<0.010	75.8%	76.4%	72.8%
いか	0.0279	<0.010	<0.010	83.2%	76.4%	64.9%
きびなご	0.0276	<0.010	<0.010	98.6%	93.3%	98.7%
たちうお	0.0273	<0.010	<0.010	83.0%	76.2%	63.6%
とびうお	0.0266	<0.010	<0.010	85.7%	82.5%	84.3%
かれい	0.0249	<0.010	<0.010	78.3%	76.1%	68.0%
いわし(まいわし生)	0.0225	<0.010	<0.010	81.5%	71.0%	76.2%
うまづらはぎ	0.0221	<0.010	<0.010	90.5%	85.9%	81.4%
ふぐ	0.0204	<0.010	<0.010	89.9%	79.4%	64.7%
あまえび	0.0181	<0.010	<0.010	95.3%	91.1%	74.6%
したびらめ	0.0163	<0.010	<0.010	81.6%	77.4%	65.2%
ほたて貝柱	0.0131	<0.010	<0.010	97.3%	90.3%	99.2%
えび(しばえび)	0.0114	<0.010	<0.010	82.8%	78.0%	78.2%
えび(くるまえび生)	(0.0095)	<0.010	<0.010	82.5%	81.7%	78.0%
えび(ブラックタイガー)	(0.0089)	<0.010	<0.010	87.7%	87.8%	77.4%
さわら	(0.0084)	<0.010	<0.010	86.9%	85.7%	78.8%
さけ	(0.0082)	<0.010	<0.010	78.1%	73.9%	72.4%
ししゃも	(0.0065)	<0.010	<0.010	85.0%	82.8%	76.5%
あさり	(0.0063)	<0.010	<0.010	95.5%	88.5%	93.1%
かき	(0.0035)	<0.010	<0.010	74.0%	71.5%	68.8%
スケトウダラ卵(生)	(0.)	<0.010	<0.010	92.0%	72.6%	97.7%