

該事業者が保有する食品製造用のプラントを用いて、SEMP は調製した。調製した SEMP は、約 100 g ずつ不活性容器に分取し小分け試料とした。

SEMP を用いた分析法の性能評価手法の開発

各種有害物質の適時及び継続的な摂取量推定で実施した 14 種の(有害)元素の摂取量推定のために用いる分析法の性能評価をモデルとして、その手法を検討した。

規定濃度の標準品を添加した SEMP の計画的な分析により得られた分析値の解析から、分析法の真度及び精度の推定を試みた。

C.D. 結果及び考察

TD研究では、MB方式あるいは陰膳方式によって調製された試料(TD試料)を分析する。この分析に用いる方法については、1985年にWHOが公表したガイドライン「Guidelines for the study of dietary intakes of chemical contaminants」や2011年にEFSA、WHO、FAOが共同で公表したガイドライン「Towards a harmonised Total Diet Study approach: a guidance document」において、摂取量推定の目的に合致した方法を選択すると同時に、その妥当性を確認することが指示されている。前述のとおり、摂取量推定を

目的として使用する分析法の妥当性確認への国際的な要求が示されているが、その具体的な方法(摂取量推定に使用する分析法の性能評価手法)は未発達である。

本研究ではMB方式によるTD試料を模した分析法性能評価用試料(SEMP)の開発を検討した。また開発した SEMPを用い、本年度の摂取量推定にも使用した元素の一斉分析法を一つのモデルとして、性能評価手法の開発を検討した。

SEMPは、MB方式によるTD試料の区分に従い、1~13の群(これに試料調製機関で採水した水道水を加えた14の群)別の試料として開発した。各群に含める個々の食品は、1)候補となる食品の内、摂取重量が基本的に上位5位に入ること、2)食品成分表や販売時に付帯している商品表示に情報がある場合にはそれを参照し、可能な限り分析対象となる元素濃度が低いと考えられることを規準に選別した。摂食に必要な最低限の調理を施した後、食品の種類と重量によって各群試料を構成し、合一した。分析法の性能評価用試料であるため、SEMPが分析対象となる元素濃度の分布をもつこと(その分布の幅が広いこと)は望ましくない。つまり、SEMPにはより高い均質性が要求される。このより高い均質性を達成するために、合一した食品の混合は、

食品製造用のプラントを用い、食品製造事業者の経験を踏まえて実施した。混合後の試料は、100 gを単位として不活性容器に小分けした。

約 30 個に小分けした試料から無作為に 5 個の試料を抜き出し、元素一斉分析法により分析した。その結果、分析対象の一部は、本来的に食品に含まれている元素であるため、SEMP から検出され、その濃度がある程度の分布をもつことが明らかとなった。たとえば SEMP1 群の B 濃度の平均値は 0.2 mg/kg であり、そのバラツキは RSD%として約 4%である。この分析値のバラツキには、分析によるバラツキが寄与していることを考えると、SEMP1 群の B 濃度の分布は極めて小さい。一方、分布の観点から結果をみれば、SEMP8 群の As 濃度等のバラツキが RSD%として 200%超え、一見大きい様に感じられる。しかし、濃度の平均値は 0.000004 mg/kg であり、総摂取量への寄与の点からは無視できるほど小さい。分析による分析値のバラツキの寄与も大きいと推察される。

SEMP を用いた分析法の性能評価手法として、適切な濃度を添加し、添加した試料を一定の計画に従って分析し得られた分析値から、分析法の真度と精度を推定する手順について検討した。添加濃度決定の基本的

な考え方としては、1)分析による分析値のバラツキの SEMP 濃度分布への寄与が無視できるほど高い濃度がそもそも SEMP に含まれていた場合には、その濃度の 2 倍量を添加する、2)分析による分析値のバラツキが SEMP 濃度分布への寄与に対し支配的であることが疑われる低い濃度が SEMP に含まれていた場合には、SEMP から得られた分析値の平均+2標準偏差に相当する濃度を求め、継続して摂取量推定している有害元素に関しては過去の推定時に検出された濃度に比べ低いことを確認した後に添加することとした。添加した SEMP を 5 併行で分析して得られた分析値から推定した、元素一斉分析法の性能として、全 14 群と分析対象全 14 元素の組合せ(組合せ総数 194)を通じ、真度は 80~128%、精度は RSD%として 0.3~17.9%の範囲で推定された。ある特定の元素の SEMP 全群を通じた真度、精度が低い、あるいは SEMP の特定の群での全元素の真度、精度が低いといった傾向も認められない。以上の結果から、摂取量推定のための分析法が有すべき性能として、妥当な性能であることが確認できたと判断した。

E. 結論

摂取量推定ではその推定のための算術に LOD の値を用いる。この LOD の値は、本研究でも実施したように、分析対象となる試料を含まないブランクを操作する実験の結果等から推定される、いわば分析系の性能を表す値である。しかし実際には、試料に含まれているある濃度が、どのくらいの性能で分析され、どのよ

うな値を取り得るのかを検証し保証することが必要である。この検証に使用するのに適した試料として SEMP は開発され、実際に元素の一斉分析法をモデルに、添加濃度の決定も含めた信頼性保証手順が構築された。今後、異なる分析対象への適用検討が期待される。

2-2. リスクを考慮した精密摂取量推定手法開発

A. 研究目的

有害物質の摂取量推定は、基準値や規格値、規制値等、行政による管理の指標となる数値の設定や、それら行政施策の効果検証に不可欠である。推定された摂取量を科学的根拠として、人の健康危害に対する実際的な影響が評価され、管理のための数値は決定される。化学物質のヒトへの暴露量の 90%以上は、食事を介していると考えられていることから、本研究の他の分担課題において、マーケットバスケット方式により調製した TD 試料を分析することにより、重金属類、PCBs のような有害物質の摂取量推定を、継続して実施している。

マーケットバスケット方式による

TD 試料の調製は、国民健康・栄養調査で得られた、それぞれの食品小分類の 1 日摂取重量の平均値に基づいている。従って、この方法で得られる有害物質の摂取量は、国民全体を平均した食事からの値となる。しかし、国民全体の食品摂取は一様ではない。特に、幼児、高齢者のように有害化学物質の影響を受けやすいと考えられるグループは、その食品摂取の状況も全体の平均とは異なっているため、国民全体の有害物質摂取量推定値のみで、これらのグループのリスクを評価することはできず、個々のグループごとに摂取量を推定する必要がある。

本分担課題では、上記の議論を踏まえ、年代別の食品摂取量パターン

の比較を行うとともに、幼児における TD 試料の作成を試みた。

B. 研究方法

年代別食品摂取量の算出

平成 20-22 年に行われた国民健康・栄養調査結果の、食品小分類ごとの 1 日の摂取量の平均値を求めた。全データの他に、1-3 歳(幼児 1)、4-6 歳(幼児 2)、7-12 歳(学童)、13-18 歳(中学・高校生)、19-64 歳(成人)、65 歳以上(高齢者)の年齢区分ごとの平均値を求めた。

各年齢区分の平均体重は、国民健康・栄養調査の身体・生活習慣データ中の体重を年齢区分ごとに平均した値とした。

幼児(1-3 歳)の TD 試料作製

年代別食品摂取量の算出で求めた、食品小分類ごとの 1-3 歳の 1 日量平均値を用いて、TD 試料を作製した。

食材は東京都世田谷区のスーパーマーケット及び小売店で購入し、13 の群に分別し、必要に応じて茹でる・焼く等の調理を行った後に、上記の 1 日摂取量に従って混合し、13 群の試料を作製した。各群の内容は、米(1 群)、雑穀・芋(2 群)、砂糖・菓子(3 群)、油脂(4 群)、豆(5 群)、果実(6 群)、有色野菜(7 群)、その他の野菜・漬物・きのこ・海藻(8 群)、嗜好飲料(9 群)、魚介(10 群)、肉・卵(11 群)、

乳(12 群)、調味料(13 群)とした。

C.D. 研究結果及び考察

年代ごとの食品摂取パターン

全食品の摂取量は、幼児 1 から成人まで年代と共に増加し、高齢者においてやや減少した。成人の 1 日の食品摂取量は 1-3 歳の幼児の 1.8 倍となった。食品群別では、1 群(米)の摂取量は幼児から中学・高校生まで増加するが、成人以降は減少した。2 群(雑穀・芋)、3 群(砂糖・菓子)も 1 群と同じ傾向であるが、増加量はわずかであった。一方、4 群(油脂)の摂取量は 12 g 以下と少ないが、幼児から中学・高校生までの増加とそれ以降の減少の変化の割合は大きく、1 群(米)と同程度であった。5 群(豆)の摂取量は年齢と共に増加が見られ、高齢者の摂取量が最大であった。6 群(果実)の摂取量は大きな変化ではないが、幼児から成人になるにつれて減少し、高齢者でやや増加していた。7 群(有色野菜)と 8 群(その他の野菜・海藻)の摂取量は、5 群(豆)と同じく、年齢と共に増加がみられた。9 群(嗜好飲料)の摂取量は年齢の増加と共に大きく増加した。この増加傾向は幼児から成人まで継続し、高齢者ではやや減少する。変化の割合は大きく、成人の摂取量は 1-3 歳幼児の 3.3 倍に達している。10 群(魚介)

の摂取量は年齢と共に増加する一方、11群(肉・卵)の摂取量は中学・高校生まで上昇し、その後減少した。高齢者の11群摂取量は、学童と同程度になっている。12群(乳)の摂取量は、幼児から学童までは増加し、その後急激に減少した。中学・高校生の12群(乳)の摂取量は幼児と同程度、成人及び高齢者の摂取量は幼児の1/2となった。13群(調味料)の摂取量は、幼児から成人までで2倍程度増加し、高齢者でやや減少した。

各食品群の全食品に対する割合を算出した結果、主食である1群(米)の割合は中学・高校性まで増加するが、成人になると減少した。2群(雑穀・芋)、3群(砂糖・菓子)の割合は、幼児から高齢者まで単調に減少が見られた。4群(油脂)も中学・高校性まで増加が見られるが、全体に占める割合は非常に小さかった。5群(豆)は年代の上昇と共に摂取割合が増加しているが、6群(果実)は年代と共に割合が減少した。7群(有色野菜)と8群(その他の野菜・海藻)は年代間での大きな変化は見られなかった。9群(嗜好飲料)は年代と共に割合が最も顕著に増加した。動物性食品である10群(魚介)と11群(肉・卵)の割合は、幼児から中学・高校生まで共に増加するが、その後、10群は増加、11群は減少した結果、高齢者におけ

る量群の摂取割合は同程度となった。12群(乳)の割合は、幼児～学童では15%以上となり、主食である1群と同程度であるが、中学・高校生から激減し、成人では4%まで低下した。13群(調味料)の割合は、年代間で大きな差は認められなかった。

食品群中で摂取割合の変化が最も大きいのは、12群(乳)と9群(嗜好飲料)であった。幼児ではこの2つの群の摂取割合は17%程度でほぼ等しいが、成年の9群(嗜好飲料)の摂取割合32%に増加する一方、12群(乳)の摂取割合は4%に減少した。これらの群は、幼児と成年の食品摂取パターンを特徴づけていると考えられる。

幼児から成人に成長し、体格が大きくなることから、食品の摂取量が増えるのは当然である。しかし、有害物質の摂取量は体重当たりで評価されることから、年代区分ごとの食品1日摂取量を平均体重で除した値が、摂取量よりも重要と考えられる。そこで年代区分ごとの食品1日摂取量を平均体重で除した値を求めた。その結果、食品摂取量とは逆に、体重当たりの食品摂取量は、1-3歳の幼児で最も大きく、成長と共に小さくなり、高齢者でやや増加した。食品群別では、5群(豆)、9群(嗜好飲料)、10群(魚介)以外の群は、幼児か

ら成人にかけて体重当たりの摂取量が減少した。5 群(豆)、9 群(嗜好飲料)、10 群(魚介)の体重当たり摂取量は中学・高校生で最少となり、成人及び高齢者でやや増加した。中でも9 群(嗜好飲料)の増加率は大きかった。

有害物質の濃度が、幼児と成人の食品で大きく変わらないとすれば、体重当たりの有害物質摂取量は幼児で最も大きくなる可能性が高い。また、幼児期において摂取割合の高い、乳に含まれる有害物質の影響は、特に幼児において大きいと考えられる。国民全体平均の摂取量推定の結果は、ダイオキシン・PCB のような POPs、水銀は 10 群(魚介)から大部分を摂取していることを示している。幼児期は 10 群の摂取割合は小さいが、体重当たりの摂取量は他の年代区分よりも大きく、影響も大きいと考えられる。また、高齢者においても、10 群の体重当たり摂取量は、全体平均を上回っている。

以上の考察の結果から、本年度は 1-3 歳の幼児の平均的食事を模した TD 試料を作製することとした。

幼児(1-3 歳)の TD 試料作製

幼児用 TD 試料に含める食品は、基本的に全体平均の TD 試料に含めた食品と統一したが、一般に幼児が食べないと考えられる、刺激の強い食品等は、別の食品でおきかえた。

TD 試料作製の基礎としている、国民健康・栄養調査結果は、調査対象者が調査日に喫食した食品重量を、小分類ごとにまとめて提供される。それぞれの小分類には、多数の食品が含まれており、実際に TD 試料に含める食品の選択は試料作製者に委ねられている。本研究のように、年代別の TD 試料を調製する際には、小分類の重量だけではなく、その年代で多く摂取される食品を含めることも、重要と考えられるため、小分類だけでなく実際に摂取した食品の情報が得られれば、より精密な評価が可能となると思われる。

今後は、本分担課題で作成した、幼児の TD 試料中の、重金属、ダイオキシンを分析して摂取量を推定し、全体平均の試料から推定した摂取量と比較する予定である。

2-3. 有害化学物質摂取量推定に不可欠な分析法開発

A. 研究目的

水銀やヒ素は、官能基により修飾されることで、複数の化学形態を生じ、その化学形態により生体内動態や毒性が異なることが知られている。水銀の化学形態の一つであるメチル水銀は、難分解性のため環境中に蓄積しやすく、また脂溶性が高いため生物凝縮もされやすい。そのため、食物連鎖の上位に位置する鯨・イルカ・マグロなどの水産物の摂食により健康危害リスクの高い物質とされる。ヒ素もまた環境中に広く存在し生物濃縮の恐れもあることから、ヒ素を高濃度で含有する食品の摂食による健康危害リスクへの関心は国際的にも高い。これまでの報告から、食事を通じたヒ素の摂取源は、主に海産物であることが示されている。海水産物など、多くの食品に含有されるヒ素の化学形態は、毒性の低い有機ヒ素化合物あることが明らかとなっているが、毒性の高い無機ヒ素化合物である亜ヒ酸やヒ酸もまた、食品に少量ではあるが含有されていることが知られる。しかし分析の困難さから、これら化学形態別のヒ素摂取量は十分に推定されていない、そこで本研究では、摂取量推定の目的に叶った感度や

選択性に優れたメチル水銀及び化学形態別ヒ素の分析法構築を目的に下記の3つの研究を実施した。

研究1) 暫定的規制値への適合判定を目的としたメチル水銀分析法の開発

現在、環乳第99号により、一部の魚介類を除きメチル水銀には、暫定的規制値として0.3 ppmが設定されている。この暫定規制値への適合を判定するための分析法として検討してきたメチル水銀分析法(以下、GC-MS法)の検討を更に進め、改良した分析法の性能を評価した。

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

本研究では、上記GC-MS法を基礎とし、分解能と選択性に優れ、より高感度な測定が可能であるGC-MS/MSを測定機器に採用することで、摂取量推定に使用可能なメチル水銀分析法の開発を検討した。

研究3) 摂取量推定に使用可能な化学形態別ヒ素分析法の開発

現在、Codex委員会食品汚染物質部会(CCCF)では、コメの国際食品規格として、無機ヒ素を項目とすることが検討されている。規格の設定

に当たっては、その根拠となる摂取量推定値が不可欠である。特に、コメを主食とする我が国にとって、米飯の摂食を通じた無機ヒ素の摂取量は、健康危害リスクの有無あるいはその大きさを知るために不可欠な科学的根拠でもある。また、総無機ヒ素摂取量に対するコメ由来の無機ヒ素摂取量の寄与を知ることもしリスク管理上重要である。

本研究では、有害物質摂取量推定の目的に合致した形態別ヒ素摂取量推定を目的とし、それに必要となる形態別ヒ素定量分析法の開発を検討した。

B. 研究方法

研究 1) 暫定的規制値への適合判定を目的とした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、1.0 gを量りとり、水 9.0 gを加え混合したものを試料とした。

魚試料

東京都内のスーパーマーケット

で購入したタラ、キハダマグロ、メバチマグロ、サバ、カツオの切り身を用いた。

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 200(PEG 200)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:メルク社製装置(Element A10)により製造した超純水(比抵抗 > 18.2M Ω ・cm、TOC < 3 ppb)を用いた。

メチル水銀標準原液 (1000 $\mu\text{g/mL}$):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 50 mLに定容した。

添加用メチル水銀標準溶液 (3 $\mu\text{g/mL}$):塩化メチル水銀 58.2 mgを正確に量りとり、水に溶解し正確に 500 mLとした。本溶液 3 mLを正確

に取り、水で 100 mL に定容した。

1 mol/L 臭化カリウム溶液：臭化カリウム 119.0 g を量りとり水で 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% L-システイン溶液：L-システイン塩酸塩一水和物 10.0 g、酢酸ナトリウム三水和物 8.0 g、無水硫酸ナトリウム 125.0 g を量りとり、水で 1 L に定容した。

0.2 mol/L リン酸緩衝液(pH 7.0)：第一液として、リン酸二水素ナトリウム二水和物 31.2 g を量りとり、水で 1 L とした。第二液として、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 71.6 g を量りとり、水で 1 L とした。第一液 380 mL と第二液 610 mL を混合し、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 0.2 g を量りとり、0.2 mol/L リン酸緩衝液(pH 7.0)で 20 mL に定容した。本溶液は、用事調製した。

1.5 mg/mL ポリエチレングリコール 200(PEG200)溶液：PEG200 150 mg を量りとり、トルエンで 100 mL とした。

分析機器

遠心分離機：久保田商事社製高速冷却遠心機 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 μ m)

オープン温度：70 $^{\circ}$ C (1 min) \rightarrow 20 $^{\circ}$ C /min \rightarrow 280 $^{\circ}$ C (5 min)

注入口温度：250 $^{\circ}$ C

トランスファライン温度：280 $^{\circ}$ C

イオン源温度：230 $^{\circ}$ C

注入量：1 μ L

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

モニターイオン： m/z 292*、294、277

*定量イオン

メチル水銀分析法(GC-MS 法)

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、デカンテーションによりアセトンを除去した。残渣にトルエン 100 mL 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 を加えて、振とう機で 30 分間振とうした。1,880 g で 20 分間遠心分離した後、上層のトルエン層を 200 mL の分液漏斗に移した。再度、水層にトルエン 50 mL を加え、振とう機で 10 分間振とうした。同様に遠心分離後、トルエン層を上記の分液漏斗に合わせた。

転溶

トルエン層に 1% L-システイン溶液 50 mL を加え 5 分間振とうした。静置後、水層を 200 mL の分液漏斗に移した。これに 6 mol/L 塩酸 30 mL、トルエン 30 mL を加え 5 分間振とうし、トルエン層を 100 mL メスフラスコに移した。上記と同様の操作をあと 2 回繰り返し、トルエンで 100 mL に定容した。

メチル水銀のフェニル誘導体化

試験管に定容後のトルエン溶液 4 mL を正確に量りとり、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 を加えた。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 840 g で 10 分遠心分離し、トルエン層をガラスチューブに移し、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 を正確にバイアルに量りとり、1.5 mg/mL PEG200 0.5

mL を正確に加え測定溶液とした。

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。

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

摂取量推定を目的とした分析に使用する分析法の性能を評価するためのモデル試料 Sample for Evaluation of Methods Performance(以下、SEMP)を用いた。また、水銀はこれまでの本研究課題の成果として、ほぼ魚介類(10 群)と肉類(11 群)からしか検出されないことが明らかとなっていることから、10 群と 11 群を試料とした。

試薬等

研究 1 と同じ試薬を用いた。

分析機器

GC-MS/MS: サーモフィッシャーサイエンティフィック社製 TRACEGC ULTRA 及び TSQ Quantum を用いた。

GC-MS/MS 測定条件

カラム: InertCap 5MS/NP (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m)
オープン温度: 70 $^{\circ}$ C(1 min)→10 $^{\circ}$ C

/min → 160 °C(0 min) → 20 °C/min
→ 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：1 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：SRM

モニターイオン： m/z 294 → 279(定量イオン)、 m/z 292 → 277(確認イオン)

メチル水銀分析法(GC-MS/MS 法)

試料の前処理～測定溶液の調製

GC-MS 法に同じ。

研究 3) 摂取量推定に使用可能な化学形態別ヒ素分析法の開発

試薬等

硝酸 1.42(超微量分析用)、25% テトラメチルアンモニウムヒドロキシド(以下、TMAH)(精密分析用)、1-ブタンスルホン酸ナトリウム、マロン酸(特級)、メタノール(液体クロマトグラフィー用)、メチルオレンジ(特級)、25%アンモニア水(有害金属測定用) は和光純薬社製のものをを用いた。

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

標準品：下記の 8 種類を使用した。

As(III)：ヒ素標準液(As 100) (和光純薬社製)

As(V)：ヒ酸[As(V)] 水溶液 (NMIJ CRM 7912-a)

アルセノベタイン水溶液(NMIJ CRM 7901-a)

ジメチルアルシン酸水溶液(NMIJ CRM 7913-a)

メチルアルソン酸、アルセノコリンブロマイド、トリメチルアルシンオキシド、ヨウ化テトラメチルアルソニウム (トリケミカル研究所製)

標準原液：メチルアルソン酸、アルセノコリン、トリメチルアルシンオキシド、テトラメチルアルソン酸については各 1000 mg/L になるように、それぞれ下記のとおり標準原液を調製した。

・メチルアルソン酸標準品 50 mg を正確に量りとり、水で 50 mL に定容した。

・アルセノコリンブロマイド標準品 74.2 mg を正確に量りとり、水で 50 mL に定容した。

・トリメチルアルシンオキシド標準品 50.0 mg を正確に量りとり、水で 50 mL に定容した。

・ヨウ化テトラメチルアルソニウム標準品 97.0 mg を正確に量りとり、水で 50 mL に定容した。

上記以外のヒ素化合物については、

購入した水溶液を標準原液として用いた。

0.15 mol/L 硝酸溶液：硝酸 4.8 mL を量りとり、水で 500 mL に定容した。

メチルオレンジ溶液：メチルオレンジ 0.1 g を量りとり、水で 100 mL に定容後、孔径 0.45 μm のディスミックスフィルター(アドバンテック東洋社製)でろ過した。

2.5% アンモニア水：25%アンモニア水 5 mL を水で 50 mL に定容した。

HPLC 用移動相：25% TMAH 0.3645 g、1-ブタンスルホン酸ナトリウム 1.922 g、マロン酸 0.416 g、メタノール 0.5 mL を量りとり、水を加え、25%アンモニア水で pH3.0 に調整した後、1 L に定容した。なお、この溶液は用事調製した。

分析機器

HPLC：島津製作所社製 Prominence を用いた。

ICP-MS：サーモフィッシャーサイエンティフィック社製 X-Series2 を用いた。

HPLC 測定条件

カラム：L-column2(内径 4.6 mm 長さ 25 cm 粒子径 3 μm) (化学物質研究評価機構社製)

移動相：0.05%(v/v) メタノール、12 mM 1-ブタンスルホン酸ナトリウム、4 mM マロン酸、1 mM TMAH

溶液(pH3.0)

流速：0.75 mL/min

カラム温度：25 $^{\circ}\text{C}$

オートサンプラー温度：4 $^{\circ}\text{C}$

注入量：20 μL

測定時間：15 min

ICP-MS 測定条件

測定モード：CCT モード

(コリジョンモード)

コリジョンガス：He

測定ポイント時間：50 ms

測定質量数：75

その他の条件は、機器の自動チューニングプログラムによって設定した。

測定溶液の調製

検討に用いた測定溶液の調製方法を以下に示した。なお、測定溶液は各ヒ素化合物の濃度が 10 ng/mL となる混合溶液とした。

各標準原液を適量量りとり、0.15 mol/L 硝酸溶液を 10 mL 加えた。これにメチルオレンジ溶液をパスツールピペットで一滴(約 10 μL)加え、2.5%アンモニア水で約 pH3 に調整し水で 50 mL に定容した。

C.D. 研究結果及び考察

研究 1) 暫定的規制値への適合判定を目的としたメチル水銀分析法の開発

C.D. 1-1 メチル水銀分析法(GC-MS

法)の改良

C.D. 1-1-1 測定溶液の調製に用いるポリエチレングリコール(PEG)と注入量の検討

改良前の GC-MS 法では、測定時に機器への吸着を疑い、ポリエチレングリコール 300(PEG300)を混合して測定溶液を調製することを手順としていた。

本検討では、メチルフェニル水銀の損失を抑えることにより適した PEG を選定するための検討をした。この時、メチルフェニル水銀の分子量を考慮し、PEG200 と PEG300 について検討した。

メチルフェニル水銀標準溶液に PEG200 と PEG300 が 250、500、750 ng 共注入されるように測定溶液をそれぞれ調製し、1 μ L を GC-MS 測定した。その結果、PEG200 と PEG300 ではピーク面積値に差がなかったことから、より沸点が低く、GC カラムの昇温条件での最終到達温度を下げるのが可能な PEG200 を選択した。また、PEG200 の共注入量は必要最小量の 500 ng とした。

さらに、GC-MS への注入量を 1 μ L とした場合にも、検量線の最下点濃度として設定した 2.5 ng/mL メチルフェニル水銀溶液から SN 比が 40 以上のピークが得られた。この濃度は暫定規制値に相当する濃度(メチル

フェニル水銀として 30 ng/mL)の 1/10 以下の濃度であり、GC-MS への注入量を減少させても問題ないと判断した。

C.D. 1-1-2 試料マトリクスが測定溶液におよぼす影響の検討

本検討では試料由来のマトリクス存在下における PEG200 の効果を検討した。検討では、試料由来のマトリクスの有無と PEG200 共注入の有無とでのメチルフェニル水銀のピーク面積を比較した。魚試料(タラ、メバチマグロ、カツオ、サバ)から調製したメチルフェニル水銀溶液に PEG200 の添加した測定溶液と添加しない測定溶液の 2 種類を調製し、GC-MS で測定した。また、メチル水銀標準溶液も同様に操作した。測定の結果、マトリクスの有無に関わらず全ての測定溶液で PEG200 を添加した場合に、ピーク面積が 1.51～1.62 倍に高くなった。これらの測定結果に基づき、PEG200 の効果は、試料由来のマトリクスの有無に因らないと判断した。逆に、試料由来マトリクスによるメチルフェニル水銀の損失抑制効果は、PEG200 による抑制効果よりも小さいことが示唆された。

C.D. 1-1-3 PSA カラムによる精製操作の検討

改良前の GC-MS 法では、フェニル誘導体化反応後の溶液に含まれる試料由来のマトリクスや誘導体化試薬などの除去を目的に、導体化反応後の溶液を PSA カラムにより精製していた。本検討では、精製の効果を検証した。魚試料(タラ、メバチマグロ、カツオ、サバ)から抽出、誘導体化したメチルフェニル水銀溶液を PSA カラム精製した測定溶液と精製しない測定溶液の 2 種類を調製し、GC-MS 測定した。また、メチル水銀標準溶液も同様に操作した。その結果、カラム精製の有無によるクロマトグラムの変化は認められず、PSA カラム精製の効果は少ないと評価し、PSA カラム精製の操作は分析手順から除くこととした。

C.D. 1-2 メチル水銀法(GC-MS法)の妥当性確認

改良した GC-MS 法の妥当性を確認した。国立医薬品食品衛生研究所並びに福岡市保健環境研究所で計 3 名による認証標準試料と添加試料の分析を実施し、得られた分析値から真度と精度を推定した。その結果、全ての試料と人を通じて真度は 85~100%の範囲、室内精度(RSD%)は 1.6~7.3%の範囲で推定された。いずれの推定値もガイドラインの目標値を満たしていたことから、暫定的規制

値への適合判定に使用する分析法としての妥当性が確認された。

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

C.D. 2-1 GC-MS/MS 測定条件の検討

メチルフェニル水銀のフラグメントパターンを確認するため、 m/z 50~500 の範囲でスキャン測定した結果、それぞれ、 $\text{Me}^{202}\text{HgPh}^+$ 、 $\text{Me}^{200}\text{HgPh}^+$ に由来すると考えられる分子イオンピーク m/z 294、292 が観察された。コリジョンエネルギーの条件を 5、10、15、20 V と変化させた測定の結果、いずれのコリジョンエネルギーの条件でも、 m/z 294 をプリカーサーイオンとした場合は、プロダクトイオン m/z 279 が、 m/z 292 をプリカーサーイオンとした場合は、 m/z 277 のみが主なプロダクトイオンとして検出された。また、コリジョンエネルギーが 5V のときにプロダクトイオンの強度は最大となった。以上の結果より、最適なコリジョンエネルギーは 5 V と判断し、プリカーサーイオン m/z 294 と 292 のプロダクトイオンとしてそれぞれ m/z 279 と 277 を選択した。また、 m/z 279の方が m/z 277 と比較して強度が高かったため、 m/z 279 を定量イオン、 m/z 277 を確認イオンと設定した。

C.D. 2-2 GC-MS/MS法の真度と併行精度の推定

SEMPの10群と11群試料及び、それぞれの試料に0.05mg/kgあるいは0.005 mg/kgになるようメチル水銀を添加した試料を4併行で分析した結果から分析法の真度と併行精度を推定した。

添加試料の分析結果から推定した真度と併行精度を表6に示した。4併行分析結果の平均値と添加量との比率として推定した真度は、10群試料で84%、11群試料で97%であった。併行精度(RSD%)は10群試料で4.9%、11群試料で3.3%であった。

研究 3) 摂取量推定に使用可能な化学形態別ヒ素分析法の開発

今年度は、化学形態別ヒ素の測定法を検討した。既報を参考に、HPLCを用いてODSカラムにより分離し、ICP-MSで検出するHPLC-ICP-MS法を選択した。この方法におけるHPLCの分離モードは、ブタンスルホン酸を主なイオンペア試薬とした、逆相イオンペアクロマトグラフィーである。検討では、既報と同じHPLCの測定条件を初期条件に設定し、よりよいピーク分離のために測定条件を改良した。

C.D. 3-1 分析対象化合物の選定

標準品が入手可能な①亜ヒ酸：As(III)、②ヒ酸：As(V)、③(モノ)メチルアルソン酸：MMA、④ジメチルアルシン酸(別名：カコジル酸)：DMA、⑤トリメチルアルシンオキシド：TMAO、⑥アルセノベタイン：AsB、⑦アルセノコリン：AsC、⑧テトラメチルアルソニウム：TeMAを分析対象化合物とした。

C.D. 3-2 HPLCカラムの検討

最初にHPLCによる測定法の初期条件で①～⑧の混合標準溶液の測定をした。その結果、As(III)とMMAのピークの分離がよくないことが判明した。ヒ素の形態別分析法では、無機ヒ素と有機ヒ素とを分別して定量する能力が重要であり、これらの化学形態に由来するピークが十分に分離していることが必要である。そこで、As(III)とMMAの分離がよいHPLCカラムの検討を行った。国内メーカーのHPLCカラムでエンドキャップがよいとされる製品を中心に選択した。また、理論段数が高まることによるピークの分離度の向上及び分析時間の短縮を目的に、充填剤の粒子径が3 µmの製品を検討した。その結果、同じODSカラムでも製品の違いにより、無機ヒ素と有機ヒ素の分離が異なることが判明した。しかし、As(III)とMMAのピークを完

全に分離できる HPLC カラムはなかったため、検討した中で最良の分離が得られた L-column2 を選択した。

C.D. 3-3 HPLC 移動相条件の検討

他のカラムに比べると、L-column2 での TMAO と TeMA の分離が良いとは言えない。分析法の本来の目的からすると、これら 2 つの有機ヒ素の分離は問題とはならないが、検討としては有益と考え、これら 2 種の有機ヒ素も完全に分離可能な移動相組成を検討した。まず、1-ブタンスルホン酸ナトリウム濃度のみを初期条件から変更して検討を行った。このときの 1-ブタンスルホン酸ナトリウムの濃度範囲は、8 mM~14 mM とした。その結果、1-ブタンスルホン酸ナトリウムの濃度が初期条件から高くても、また逆に低くても TMAO と TeMA のピークが重なることが判明した。そこで、1-ブタンスルホン酸ナトリウムの濃度として、10 mM と 12 mM を候補とした。次に、TMAH の濃度のみを初期条件から変更して検討を行った。このときの TMAH の濃度範囲は、1 mM~8 mM とした。その結果、TMAH の濃度が低いほど TMAO と TeMA のピークの見分け度が高くなる傾向が認められた。そこで、TMAH の濃度として、1 mM と 2 mM を候補とした。最後に、1-ブタンス

ルホン酸ナトリウムと TMAH について、候補とした濃度を組み合わせて TMAO と TeMA のピークの見分け度を検討した。その結果、1-ブタンスルホン酸ナトリウムの濃度が 10mM、TMAH の濃度が 1 mM の組み合わせが最も TMAO と TeMA のピークの見分け度が高かったが、逆に As(III) と MMA のピークの見分け度は検討した組み合わせの中では低くなった。そのため、TMAO と TeMA のピークの見分け度以外に、As(III) と MMA 及び DMA と AsB のピークの見分けなども考慮して、1-ブタンスルホン酸ナトリウムの濃度は 12mM、TMAH の濃度は 1 mM とした。以上の結果より、HPLC の移動相を 0.05 % メタノール、12 mM 1-ブタンスルホン酸ナトリウム、1 mM TMAH、4mM マロン酸の溶液(pH3)とした。

E. 結論

研究 1) 暫定的規制値への適合判定を目的としたメチル水銀分析法の開発

これまでに検討したフェニル誘導体化 GC-MS 法の改良を検討し、その頑健性や操作性が向上した。また、複数の魚試料を用いて構築した分析法の性能を評価し、暫定的規制値への適合判定を行う分析法として、妥当な分析結果を得ら

れる方法であると判断した。

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

研究 1 で改良した GC-MS 法を GC-MS/MS を測定機器に用いることで、選択性と感度のより優れた分析法に改良した。これにより、試料に含まれるより微量のメチル水銀の定量が可能となった。今後は、必要に応じてさらなる改良の検討を行い、TD 試料や様々な食品を用いたメチル水銀の摂取量推定をしていく予定である。

研究 3: 摂取量推定に使用可能な化学形態別ヒ素分析法の開発

無機ヒ素(2 種類)と有機ヒ素化合物(6 種類)を、汎用的な分析機器である HPLC を用いた ODS カラムによる逆相イオンペアクロマトグラフィーにより分離し、ICP-MS で検出するための測定条件を設定した。今後は、ヒ素含有量の高い食品や摂取量推定に使用する分析用試料(主に、トータルダイエット試料)からの各種ヒ素化合物の抽出法を検討し、本検討で構築した測定法と併せて、ヒ素の化学形態別分析法を開発する。また、これら試料からのヒ素の化学形態別摂取量推定も検討する予定である。

3. 摂取量を推定すべき新規有害物質の選定研究

3-1. ダイオキシン様活性を有する新規有害物質に関する研究

A. 研究目的

食品中には多様な有害物質が存在しており、これら摂取による健康リスクを評価・管理することが課題の一つとしてあげられている。対象となる有害物質には、通常の食品に極微量しか含まれてないものもある。それらの健康へのリスクは非常に低く、残留上限の基準値を設定することがリスク管理施策となる。食品中の残留有害物質であるダイオキシン類(DXNs)や多環芳香族炭化水素(PAHs)といった環境汚染物質はその一例としてあげられる。

DXNs や PAHs は化合物群の種類が多く、現在の分析法においては、標準品を指標に、GC/MS 分析による定量結果の総和を評価値として用いる等としている。一方で、分析法が煩雑で費用が高価であることから、簡易分析法が提案されてもいる。例えば DXNs においては、バイオアッセイによる簡易分析法が環境分野における公定法として採用されている。そのバイオアッセイで鍵となっているアрил炭化水素レセプター(AhR)は、DXNs 等の環境汚染物質をリガンドとするため別名ダイオキシンレ

セプターとも呼ばれ、それらの生体毒性発現に関与していることが指摘されている。DXNs の簡易分析法は、このメカニズムを利用したバイオアッセイであり、スクリーニングとして用いることが可能となっている。一方で、AhR は一部 PAHs をリガンドとし活性化されることが報告されている。

バイオアッセイは迅速で低廉であるため、スクリーニングとして有用である。上述したような有害物質を簡便に、総合的にスクリーニングできるようなシステムがあり、それを用いて総合的なリスク管理値のようなものが算出できれば、食品の安全性における新たなリスク評価・管理の施策実施に有意義である。そこで本研究では、DXNs の簡便測定法として採用されている AhR を用いた技術開発を進める。AhR については、DXNs 及び一部 PAHs 以外の有害物質との相互作用に関する情報が少ない。研究の初段階として、基礎データの構築を目的に、DXNs 様活性を有する有害物質の探索及び活性と物質の構造相関の解明を試みる。本年度はまだデータの乏しい PAHs(ニト

ロ化、ハロゲン化体、アミノ化体を含む)39 種及び食品に残留する農薬 23 種、さらに食品成分としてあげられるアミノ酸及びその代謝物 14 種等について、AhR 活性をバイオアッセイにより評価した。

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

PAHs(ニトロ化、ハロゲン化、アミノ化を含む)(39 種) :
benzo[*c*]fluorene, 1,2-benzanthracene (benzo[*a*]anthracene),
cyclopenta[*c,d*]pyrene, chrysene,
5-methylchrysene,
benzo[*b*]fluoranthene,
benzo[*k*]fluoranthene,
benzo[*j*]fluoranthene, benzo[*a*]pyrene,
indeno[1,2,3-*c,d*]pyrene,
dibenzo[*a,h*]anthracene,
benzo[*g,h,i*]perylene,
dibenzo[*a,l*]pyrene,
dibenzo[*a,e*]pyrene,
dibenzo[*a,i*]pyrene,
dibenzo[*a,h*]pyrene,
1-amino-4-nitronaphthalene,
9,10-dinitroanthracene,
1,3-dinitronaphthalene,
1,5-dinitronaphthalene,
1,8-dinitronaphthalene,
2-nitroanthracene, 9-nitroanthracene,
7-nitrobenzo[*a*]anthracene,

6-nitrobenzo[*a*]pyrene,
1-nitronaphthalene, 2-nitronaphthalene,
1-chloronaphthalene,
2-chloronaphthalene,
1,4-dichloronaphthalene,
octachloronaphthalene,
1,2,3,4-tetrachloronaphthalene,
1-aminoanthracene,
2-aminoanthracene,
1-aminonaphthalene,
1,8-diaminonaphthalene, naphthalene,
anthracene, fluorene(いずれも関東化学社製)を用いた。

農薬(23 種): malathion, chlorpyrifos, diazinon, prothiofos, pirimiphos methyl, fenitrothion, ethyl-*p*-nitrophenyl phenylthiophosphonothiate (EPN), tolclofos methyl, parathion methyl, phenthoate, chlorpyrifos methyl, methidathion, imazalil, carbendazim, leucomalachite green, imadacloprid, acetamiprid, thiabendazole, azoxystrobin, tribenuron methyl, flufenoxuron, pyraclostrobin, kresoxim methyl(いずれも関東化学社製)を用いた。

アミノ酸及びその代謝物(14 種) :
tryptamine, L-tryptophan,
4-aminobutanoic acid, L-glutamic acid,
tyramine, L-tyrosine, putrescine,
cadaverine, L-lysine, L-arginine,

histamine, histidine(和光純薬工業社製), L-ornithine, agmatine(東京化成工業社製)を用いた。

ウイスキー、かつお節、紅茶は、市販のものを用いた。抽出(かつお節、紅茶)は 80%エタノールでホモジナイズ後、吸引ろ過し、ろ液を減圧濃縮して行った。ウイスキーは原液を減圧濃縮した。

ジメチルスルホキシド(DMSO)(生化学用)は和光純薬工業社製を用いた。RPMI1640 培地、ペニシリン/ストレプトマイシン溶液、リン酸緩衝生理食塩水、0.25%トリプシン溶液はナカライテスク社製を用いた。牛胎児血清(FBS)は Invitrogen 社製を、Lysis 試薬、ルシフェラーゼアッセイシステムは Promega 社製を用いた。マイクロプレートリーダーは Perkin Elmer 社製の Enspire を使用した。

2. 評価方法

評価はレポータージーンアッセイ [ルシフェラーゼ遺伝子を導入した培養細胞を利用したレポータージーンアッセイ(ケイラックスアッセイ)] により行った。ケイラックスアッセイは、DXNs 応答性組換え細胞 H1L6.1c2 を用いたレポータージーンアッセイを利用して DXNs の毒性等量を測定する方法である。具体的な評価方法を以下に記す。

ケイラックスアッセイ：化合物及び抽出物を DMSO に溶解し、試料溶液とした(コントロールは DMSO)。試料溶液は 4~6 段階の濃度(0.1~100,000 nM の範囲で 4~6 段階)に DMSO で希釈して調製した。試料 4 μ L を試験管に入れ、RPMI1640 培地(+8% FBS +1%ペニシリン/ストレプトマイシン)400 μ L を加えて攪拌後、そのうち 200 μ L を一晩前培養した 96 穴マイクロプレート中の DXNs 応答性組換え細胞 H1L6.1c2(約 1.5×10^5 cell/well)に 1 ウェルずつ暴露し、CO₂ インキュベーター(37°C, 5%CO₂ 濃度)で 20~24 時間培養した。培養後、培地を取り除き、ウェルを洗浄後、顕微鏡下で細胞の生存を確認した。Lysis 試薬 300 μ L で細胞壁を溶解後、プレートミキサーで 10 分間振とうした。振とう後、10 分間放置し、基質としてルシフェリン 50 μ L を加え、ルミノメーターにより発光度(RLU)を測定した。

C. 研究結果及び考察

1. PAHs

PAHs(19 種)の AhR 活性について、ケイラックスアッセイによる評価した結果、cyclopenta[*c,d*]pyrene、benzo[*g,h,i*]perylene、dibenzo[*a,l*]pyrene、anthracene を除く