

15種の化合物に、濃度依存的に顕著な活性が認められ、fluorene に弱い活性が認められた。

PAHs の誘導体(ニトロ化、ハロゲン化、アミノ化 PAHs)(20 種)について、AhR 活性を評価した結果、強い活性が認められたのは、7-nitrobenzo[*a*]anthracene、6-nitrobenzo[*a*]pyrene、2-chloronaphthalene、1,4-dichloronaphthalene、1-aminonaphthalene で、次いで2-nitroanthracene、2-aminoanthracene が若干の活性を示した。このように、供試した PAHs の大半は顕著な AhR 活性を示した。一方、一部化合物(dibenzo[*a,l*]pyrene, benzo[*g,h,i*]perylene)に活性が認められなかった。PAHs の毒性に関する科学的知見の“発がん性”をみると、活性を示さなかった dibenzo[*a,l*]pyrene はグループ 2A に、一方の benzo[*g,h,i*]perylene はグループ 3 にリスト化されており、今回の結果だけでは本活性の有無と対応しなかった。AhR 活性と PAHs の毒性の度合いとの関連については、さらなる検討が必要である。

近年、PAHs の誘導体(ニトロ化体、ハロゲン化体、アミノ化体)の食品への含有も懸念されている。そこでそれら化合物について AhR 活性を検

討した結果、全体として環の数が多くなれば活性が強くなる傾向が認められた。ハロゲン化体(塩素化物)をみると、塩素の数が多い化合物は活性が弱まる傾向が認められた。ニトロ化体では、ニトロ基の数や位置で活性の強弱は考察できなかったが、環の数が 4 以上になると活性が認められた。アミノ化体では、1-aminonaphthalene で活性が認められたのみで、構造活性相関的考察はできなかった。

PAHs のケイラックスアッセイとの感度は、TCDD と比較すると約 1000 倍弱い傾向であったが、最大となる RLU は約 2 倍の値が観察された。ケイラックスアッセイでは評価する上で TCDD を基準に比較を行っているが、細胞への暴露 24 時間後の代謝物を検出しており、TCDD より代謝物量の多い PAHs が多く認められた。DXNs と PAHs では代謝速度や関与する遺伝子が若干異なること等に起因する可能性がある。一方で、本結果は本アッセイの食品中 PAHs 分析への応用を示唆するデータでもあり、今後の発展が期待できる。

2. 残留農薬

食品の残留農薬 23 種について検討した結果、carbendazim、thiabendazole の 2 種の化合物に強い

活性が認められた。活性を示した化合物はいずれもインドール骨格を有する化合物であった。これまでの報告から、インドール骨格を有する化合物は AhR 活性を示す傾向があるという構造活性相関的考察が示唆されており、本結果も同様の結果であった。

3. アミノ酸及びその代謝

14 種について検討した結果、tryptamine のみ活性を認め。Tryptamine もインドール骨格を有する化合物であり、同様の結果であった。

4. 食品分析

PAHs の簡易分析への応用が示唆されたため、PAHs を検出した報告のある食品について抽出物を調製し、AhR 活性を評価した。その結果、ウイスキー、かつお節、紅茶のいずれの抽出物においても濃度依存的に

AhR 活性が認められた。特にかつお節は活性が強く、この結果は市販食品の PAHs 分析した結果と対応した。

D. 結論

DXNs 様活性を有する新規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ため、PAHs(ニトロ化体、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、さらに食品中のアミノ酸およびそれら代謝物約 14 種について、AhR 活性をバイオアッセイにより評価した。その結果、供試した PAHs の大半は、顕著な AhR 活性を示した。PAHs の誘導体については、全体として環の数が多くなれば活性が強くなる傾向が認められた。ハロゲン化体は塩素の数が多くなるほど、活性が弱まる傾向が認められた。ニトロ化およびアミノ化体では、本検討だけでは置換基の数や位置で活性の強弱は考察できなかった。

3-2. 国際動向を踏まえた摂取量推定すべき有害化学物質の探索に関する研究

A. 研究目的

国民の健康保護ための施策策定には、懸念される有害物質のリスク情報が必要となる。食品には意図的・

非意図的に無数の化合物が含まれ、そのリスクの程度も多様なので、リスク管理の優先順位づけのために目安となる情報が必要になる。食品は

世界的に取引されているので国際動向も考慮しながら、限られたリソースを効果的に使ったリスク管理が求められている。そこで食品からの有害化学物質の摂取量を推定して詳細リスク評価を実施する必要性を判断するための材料となる、世界的に問題になっている、関心の高い化合物についての情報収集を行った。国際会議等で具体的な検討が始まるより学術情報が先行することが多いので、まず学術論文をベースに、近年非意図的汚染物質のリスク評価に使われることが増えてきた暴露マージン(MOE)についての情報を収集した。

B. 研究方法

2013年8月時点でPubMedをMargin of Exposure (MOE)で検索し、140文献をリストアップした。それらのうち要約部分から化合物の

MOEを評価したと考えられる文献124報を集め、記載されている数値データを抽出した。結果的に75報の論文から877組のデータを収集した。それらを数値の小さい順に並べおおまかにグループ分けした。

C. 結果及び考察

MOEが一桁と評価されているもの、すなわち、アクリルアミド、テトラクロロエタン、アフラトキシンB1、鉛、エタノール、ダイオキシン、フラン、無機ヒ素、アクロレイン、テトラクロロエタン、テトラプロモビスフェノールA、カルバミン酸エチル、Sudan I、酸化カドミウム、ホルムアルデヒド、メチルオイゲノール、ゲニステインが比較的優先順位の高い化合物である可能性がある。

その他

知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

健康危害情報

なし

II. 分担研究報告 1

各種有害物質の適時及び継続的な摂取量推定研究

渡邊敬浩

平成 25 年度厚生労働科学研究補助金 食品の安全確保推進研究事業

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
研究分担報告書

各種有害物質の適時及び継続的な摂取量推定研究

研究代表者及び研究分担者

渡邊敬浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部

研究要旨

有害物質の摂取量推定値は、健康危害リスクの管理を目的に行政が規格値等を設定し、その後の経過を継続的に監視することで施策効果を検証するための科学的根拠である。また、自らがどのような有害物質のどのくらいの量を摂取しているかという、素直な国民の関心への答えとなる。従って、健康危害リスクの大きさを踏まえ、懸念が生じる蓋然性の高い有害物質の摂取量を適時かつ継続的に、より高い信頼性をもって推定することが必要である。

本研究では、1)各種有害物質の適時及び継続的な摂取量推定、2) 摂取量推定値の信頼性保証スキームの構築、3) 摂取量推定の実施の判断に必要な有害物質濃度の実態調査、の大きく3つに区分される研究を実施した。

1)各種有害物質の適時及び継続的な摂取量推定：健康危害リスクが生じる蓋然性の高い有害物質として、鉛、カドミウム、ヒ素、メチル水銀を含む有害元素及びPCBsを取り上げマーケットバスケット方式によるトータルダイエツト研究の一環として、摂取量を推定した。

2)摂取量推定値の信頼性保証スキームの構築:分析値の信頼性が担保されていなければ、摂取量推定値を信頼することはできない。そこで、摂取量推定を目的とした分析に使用する方法の性能を評価するための試料(SEMP)を開発し、実際に摂取量推定のための分析に用いる多元素一斉分析法をモデルとし、性能評価手法を検討した。

3)摂取量推定の実施の判断に必要な有害物質濃度の実態調査：毒性や国際的な規制等の動向から優先度が高いと判断した多環芳香族炭化水素類(PAHs)、臭素系難燃剤(ヘキサブロモシクロドデカン)、塩素系難燃剤(デクロランプラス)を対象に食品濃度の実態等を調査した。

・有害物質摂取量調査研究協力者
国立医薬品食品衛生研究所食品部

片岡洋平、林智子、堤 智昭、植草義徳、高附巧、五十嵐敦子、手島玲子

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 松田りえ子

北海道立衛生研究所 平間祐志、高橋哲夫

新潟県保健環境科学研究所 吉崎麻友子

横浜市衛生研究所 石井敬子

福井県衛生環境センター 中村雅子

名古屋市衛生研究所 寺田久屋、加藤陽康、加藤友香里

滋賀県衛生科学センター 小林博美

香川県環境保健研究センター 石川順子、安永恵

宮崎県衛生環境研究所 野崎祐司

沖縄県衛生環境研究所 古謝あゆ子

・有害物質実態調査研究協力者

福岡県保健環境研究所 高橋浩司、堀 就英、宮脇 崇

公益財団法人北九州生活科学センター 山本貴光

国立医薬品食品衛生研究所食品部 堤 智昭、足立利華

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 松田りえ子

有害物質の摂取量推定値は、健康危害リスクの管理を目的に行政が規格値等を設定し、その後の経過を継続的に監視することで施策効果を検証するための科学的根拠である。また、自らがどのような有害物質のどのくらいの量を摂取しているかという、素直な国民の関心への答えとなる。従って、健康危害リスクを踏まえ、懸念が生じる蓋然性の高い有害物質の摂取量を適時かつ継続的に、より高い信頼性をもって推定することが必要である。

本研究では、1)各種有害物質の適時及

び継続的な摂取量推定、2)摂取量推定値の信頼性保証スキームの構築、3)摂取量推定の蓋然性の判断に必要な有害物質濃度の実態調査を目的に、大きく3つに区分される研究を実施した。

本分担課題で実施した研究内容は上記の通り多岐にわたるため、研究1)と研究2)とをまとめ、有害物質摂取量推定の部としてまず報告する。次いで、研究3)について、有害物質濃度実態調査の部として報告する。有害物質濃度の実態調査研究はハロゲン系難燃剤の部とPAHsの部とに分けて報告する。

各種有害物質の適時及び継続的な摂取量推定研究・研究報告書
有害物質摂取量推定の部

各種有害物質の適時及び継続的な摂取量推定研究・研究報告書

有害物質摂取量推定の部

研究要旨

1)各種有害物質の適時及び継続的な摂取量推定：本研究では、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分析を通じ、鉛、カドミウム、ヒ素を含む14種の元素類、メチル水銀及びPCBsの摂取量を推定した。その結果、元素類の全国平均摂取量は B:1523.8 µg/man/day、Al:4687 µg/man/day、Ni:156.8 µg/man/day、Se:90.2 µg/man/day、Cd:17.6 µg/man/day、Sb: 2.2 µg/man/day、Ba:468.4 µg/man/day、Pb:10.4 µg/man/day、U: 1.0 µg/man/day、As:213.9 µg/man/day、Sn:228.9 µg/man/day、Cr:30.2 µg/man/day、Co:9.0 µg/man/day、Mo:225.3 µg/man/day と推定された。またメチル水銀とPCBsの全国平均摂取量は、それぞれ 6.7µg/man/day、436 ng/man/day と推定された。耐用摂取量(TDI)が設定されている有害物質については、推定された摂取量推定値が占める割合(対 TDI 比)を求めた。その結果、Ni の 78.4%を筆頭に、メチル水銀が 50%以上、B、Al、Se、Cd、Ba が 30%以上、U が 10%以上となった。

2)摂取量推定値の信頼性保証スキームの構築:分析値の信頼性が担保されていなければ、摂取量推定値を信頼することはできない。そこで、摂取量推定を目的に使用する分析法の性能を評価するための試料(SEMP)を開発し、実際に摂取量推定のための分析に用いる多元素一斉分析法をモデルとし、性能評価手法を検討した。SEMP は通常の商品を選択の上合一、均質化した試料である。このため、SEMP には多元素一斉分析法の対象となる14元素が元素ごとに異なる濃度で含まれていた。しかし、分析値のバラツキは小さく、均質な試料であることが示された。SEMP の分析結果及び、推定すべき摂取量の大きさを踏まえ濃度を決め調製した添加試料の計画的な分析の結果から、多元素一斉分析法の真度と精度を推定した。その結果、一部の元素と試料の組合せを除き、真度は 90~110%、併行精度は 15%未満と推定された。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所食品部

片岡洋平、林智子、堤 智昭、植草義徳、高附巧、五十嵐敦子、手島玲子

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

松田りえ子

北海道立衛生研究所

平間祐志、高橋哲夫

新潟県保健環境科学研究所

吉崎麻友子

横浜市衛生研究所	石井敬子
福井県衛生環境センター	中村雅子
名古屋市衛生研究所	寺田久屋、加藤陽康、加藤友香里
滋賀県衛生科学センター	小林博美
香川県環境保健研究センター	石川順子、安永恵
宮崎県衛生環境研究所	野崎祐司
沖縄県衛生環境研究所	古謝あゆ子

A. 研究目的

研究 1) 各種有害物質の適時及び継続的な摂取量推定

本研究では、有害物質の適時及び継続的な摂取量推定を目的に、過去の研究成果や耐用摂取量が設定されていることを基準に、各種有害元素、メチル水銀及び PCBs を対象とした。各種有害元素、メチル水銀及び PCBs の摂取量は、マーケットバスケット(MB)方式によるトータルダイエツト(TD)研究の一環として推定した。なお、これら摂取量推定のための分析は、新たに開発した元素一斉分析法、メチル水銀分析法及び異性体別 PCBs 分析法の性能を確認した後、国立医薬品食品衛生研究所で実施した。

研究 2) 摂取量推定値の信頼性保証スキームの構築

TD 研究の一環として実施される摂取量推定では、人の食事を模したモデル試料の分析値と、食事の量(摂取食品重量)が根拠となる。従って、モデル試料が摂取量推定の目的に沿って適切に分析され、一定品質の分析値が得られているこ

とが、摂取量推定値の信頼性確保には不可欠な要件となる。そこで本研究では、摂取量推定値の信頼性保証スキームの構築を目的とし、摂取量推定に用いる分析法の性能評価手法の開発を検討した。

B. 研究方法

研究 1) 各種有害物質の適時及び継続的な摂取量推定

1)-1. TD 試料の調製

日本人が日常的に飲食する食事(日常食)からの有害物質摂取量を推定するため、日常食のモデルとなる TD 試料を MB 方式により調製した。TD 試料の調製は、試料に含める食品数を多くすることと、地域による食品摂取パターンの違いを考慮し、全国 10 カ所の衛生研究所等で行った。該当する各地域における個々の食品の摂取量には、平成 20 年度~22 年度の 3 カ年に行われた国民健康・栄養調査の結果を入手し、地域別に集計した結果(3 年間の平均値)を用いた。各地の小売店から食品を購入し、茹でる、焼く等の一般的な調理加工を行ってから、1 日当たりの摂取量に従って秤量し、混

合・均質化することで試料を調製した。

TD 試料は、混合・均質化の際に組み合わせる食品の種類に応じて、下記 14 群に分割して調製した。1 群:米及びその加工品、2 群:雑穀・芋、3 群:砂糖・菓子類、4 群:油脂類、5 群:豆・豆加工品、6:果実類、7 群:有色野菜、8 群:その他の野菜・海草類、9 群:嗜好飲料、10 群:魚介類、11 群:肉・卵、12 群:乳・乳製品、13 群:調味料、14 群:飲料水。

調製された TD 試料は変質等による分析結果への影響に配慮し、不活性容器に入れ冷凍状態を保ちつつ、国立医薬品食品衛生研究所に収集した。全ての分析は、国立医薬品食品衛生研究所で実施した。

1)-2. 元素の一斉分析

1)-2-1. 試薬・試液

分析に使用した主たる試薬を以下に示す。

- ・水：メルク社製装置(Milli Q Element A10)により製造した超純水。(比抵抗 > 18.2MΩ・cm、TOC < 3 ppb)
- ・硝酸：硝酸 1.42 Ultrapur-100 (関東化学株式会社)
- ・過酸化水素水：Ultrapure (関東化学株式会社)
- ・各種元素標準原液 (ウランを除く)：Trace CERT ICP 用 (シグマアルドリッチ社製)
- ・ウラン標準原液：XSTC-289 (西進商事)
- ・混合内部標準溶液：ベリリウム(Be)、ガリウム(Ga)、イットリウム(Y)、インジ

ウム(In)、タリウム(Tl)の濃度がそれぞれ 50 mg/L、20 mg/L、2 mg/L、10 mg/L、0.5 mg/L になるように各元素の標準原液から適量を分取し、硝酸 14 mL を加えた後、水で 100 mL に定容した。

1)-2-2. 機器

- ・マイクロ波分解装置：ETHOS-One 及び ETHOS-TC (マイルストーンゼネラル社製)
- ・ICP-MS：ICP-MS iCAP Q (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)

1)-2-3. 分析法

測定溶液の調製

各分析用試料から 0.5 g をマイクロ波分解装置用容器に量りとった。硝酸 7 mL 及び過酸化水素水 1 mL を加え、分解した。分解後の溶液に、混合内部標準溶液 0.5 mL を添加後、水で 50 mL に定容した。定容後の溶液を測定溶液として ICP-MS により測定した。

試料の分解条件

マイクロ波分解装置による分解は、以下の条件で行った。

70℃;2 分間 → 50℃;3 分間 → 200℃;18 分間(50℃から 200℃までの温度変化に要する時間)。200℃に到達した後、同温度でさらに 10 分間分解させた。

測定条件

ICP-MS による測定は、以下の条

件で行った。なお、各測定パラメーターは、標準試薬を用いた機器のキャリブレーション結果に基づき設定した。

- ・スプレーチャンバー:(ペルチェ冷却ジャケット付)サイクロン型
- ・コリジョンガス:ヘリウム(99.9999%)
- ・測定モード:KED(Kinetic Energy Discrimination:運動エネルギー弁別)モード
- ・元素あたりの測定時間:1秒
(積分時間(s):0.1、チャンネル数:1、スペース(u):0.1、掃引数(回):10)
- ・繰り返し測定回数:3

分析対象元素の測定質量数

分析対象とした14種の元素と測定質量数は以下の通りである。(括弧内の数字が測定質量数)

ホウ素:B(11)、アルミニウム:Al(27)、クロム:Cr(52)、コバルト:Co(59)、ニッケル:Ni(60)、ヒ素:As(75)、セレン:Se(78)、モリブデン:Mo(95)、カドミウム:Cd(111)、スズ:Sn(118)、アンチモン:Sb(121)、バリウム:Ba(137)、鉛:Pb(208)、ウラン:U(238)。

内部標準元素の測定質量数

内部標準とした元素と測定質量数は以下の通りである。(括弧内の数字が測定質量数)

Be(9)、Ga(71)、Y(89)、In(115)、Tl(205)。

測定値の補正における内部標準元素と分析対象元素の組み合わせ

各分析対象元素に由来する測定値を、以下の組み合わせで内部標準

元素に由来する測定値により除し、補正した。

- ・Be : B、Al
- ・Ga : Cr、Co、Ni
- ・Y : As、Se
- ・In : Mo、Cd、Sn、Sb、Ba
- ・Tl : Pb、U

検量線の設計

分析対象とした各種元素標準原液を量り取り、混合内部標準溶液0.5 mLを加えた後、適宜硝酸を加え水で50 mLに定容することにより、検量線作成用の混合標準溶液(検量線用溶液)を調製した。検量線は、分析対象とした元素ごとにブランクを含む16点(STD 0~15)の検量点を設定することを基本に設計した。ただし、ウランは混合標準溶液には含めず、別途、検量線用溶液を調製した。(ウラン分析用にはSTD0~11の12点を設定した)。設計した検量線の各検量点の濃度を表1及び表2に示した。

検量線用溶液をICP-MSに注入し、分析対象元素の測定値と内部標準元素の測定値の比(内標補正值)を算出し、内標補正值の対象元素濃度に対する一次回帰式を求め検量線を作成した。

定量に使用した検量線の範囲は、下式に示す戻し値バイアスが、検量点に設定した全濃度について15%未満(ただし、検量線の最下点

は 20%未満)になる範囲とした。

戻し値バイアス(%)=(戻し値-規定濃度)/規定濃度 × 100

戻し値：検量線の作成に使用した測定値を作成した検量線により検量して得られる値

各対象元素濃度の算出

測定溶液から得られた測定値から内標補正値を算出した。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対象元素濃度を逆推定した。

測定溶液中の対象元素濃度 (mg/kg) = (Signal_{analyte} / Signal_{IS} - intercept) / slope

Signal_{analyte}:対象元素由来の信号強度
Signal_{IS}:内部標準元素由来の信号強度

Intercept:検量線の切片

Slope:検量線の傾き

測定溶液中濃度に、溶液調製時の試料の希釈倍率を乗じ、試料中濃度 (mg/kg)を算出し分析値とした。

1)-2-4. 検出下限及び定量下限

試料を含めず全分析操作を実施する操作ブランク実験を、試料の分解に使用するすべての容器(計 54)を用いて行い、得られた定量値から標準偏差(σ)を推定し、その 3 倍の値(3σ)を

検出下限(LOD)、10 倍の値(10σ)を定量下限(LOQ)として推定した(表 3)。LOD を下回った値は ND とした。

1)-2-5. 分析計画

1 つの TD 試料から 3 つの分析試料を採取し、3 併行分析を実施した。個々の分析試料の対象元素の濃度を求め、その平均値を分析値とし、摂取量推定に用いた。

1)-3. メチル水銀分析

1)-3-1. 試薬・試液

メチル水銀の分析に使用した主たる試薬を以下に示す。

- ・塩化メチル水銀：ジールサイエンス
- ・アセトン及びトルエン：残留農薬・PCB 分析用(関東化学株式会社製)
- ・臭化カリウム：特級(和光純薬工業株式会社)
- ・硫酸銅(II)：鹿特級(関東化学株式会社)
- ・L-システイン塩酸塩一水和物：特級(和光純薬工業株式会社)
- ・テトラフェニルホウ酸ナトリウム：和光純薬工業株式会社
- ・ポリエチレングリコール 200：一級(和光純薬工業株式会社)
- ・1 mol/L 臭化カリウム溶液：臭化カリウム 119.0 g を水に溶解し、1 L とした。
- ・硫酸銅(II)飽和 4 mol/L 硫酸：水 600 mL に硫酸 200 mL を加え、放冷後、水を加えて 900 mL にした後、無水硫酸銅(II)を飽和するまで溶解させた。

・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 を水に溶解し、1 L とした。

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

1)-3-2. 機器

・GC-MS/MS：TSQ Quantum XLS (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)

1)-3-3. 分析法

測定溶液の調製

各分析用試料から 10.0 g を量りとり、アセトン 100 mL を加え 30 秒間振とうした。アセトンを除去後、トルエン 100 mL を加え 30 秒間振とうした。遠心後、トルエンを除去し、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 分間激しく振とうした。遠心後、トルエン層を採取した。水層にトルエン 50 mL を加え 10 分間振とう後、同様に操作して得られたトルエン層を合わせた。1% L-システイン溶液 50 mL を加え 5 分間振とうし、静置後、水

層を採取した。6 mol/L 塩酸 30 mL、トルエン 30 mL を加え 5 分間振とう後、トルエン層を採取した。水層にトルエン 30 mL を加え 5 分間振とうし、トルエン層を合わせ、正確に 100 mL とした。トルエン溶液 4mL に 0.2 mol/L りん酸緩衝液(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、室温に 10 分間静置後、遠心した。トルエン層を脱水後、1 mL を採取し、1.5 mg/mL PEG200 0.5 mL を正確に加え混合したものを測定溶液とした。

測定条件

GC-MS/MS による測定は、以下の条件で行った。

- ・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 10 $^{\circ}$ C /min \rightarrow 160 $^{\circ}$ C (0 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: 280 $^{\circ}$ C
- ・溶媒待ち時間: 6 分
- ・注入量: 1 μ L
- ・キャリアガス(He)流量: 1.0 mL/min
- ・イオン化法: EI
- ・分析モード: SRM
- ・モニターイオン: m/z 294 \rightarrow m/z 279 (コリジョンエネルギー: 5 V)

検量線の設計

0、0.5、1.0、2.5、5.0 ng/mL の 5 点を検量点とする検量線を設計した。各濃度の塩化メチル水銀標準溶液を誘導体化

後、測定溶液の調製と同様に操作して、その 1 µL を GC-MS/MS に注入し、得られた測定値のメチル水銀濃度に対する一次回帰式を求め検量線を作成した。

1)-4. 異性体別 PCBs 分析

1)-4-1. 試薬・試液

異性体別 PCBs の分析に使用した主たる試薬を以下に示す。

- ・検量線用 PCB 標準液：TPCB-CSL-A、CS1-A、CS2-A、CS3-A、CS4-A、CS5-A (関東化学株式会社)
- ・クリーンアップスパイク標準液：TPCB-CL-A100 (関東化学株式会社)
- ・シリンジスパイク標準液：TPCB-SY-A100 (関東化学株式会社)
- ・209 異性体確認用標準液：M-1668A-1-0.01X、2-0.01X、3-0.01X、4-0.01X、5-0.01X (和光純薬工業株式会社)等容量混合したもの
- ・高分解能質量数補正用試薬：パーフルオロケロセン(PFK:L16596)(日本電子株式会社)
- ・アセトン、エタノール、ジクロロメタン、ヘキサン、ノナン：ダイオキシン類分析用(関東化学株式会社製)
- ・ヘキサン洗浄水：残留農薬試験用(関東化学株式会社製)
- ・塩化ナトリウム：残留農薬試験・PCB 試験用(関東化学株式会社製)
- ・無水硫酸ナトリウム：PCB 試験用(関東化学株式会社製)

・水酸化カリウム：特級(関東化学株式会社製)

・アルミナ(関東化学株式会社製)：ダイオキシン類分析用(関東化学株式会社製)

・多層シリカゲルカラム：内径 15 mm、長さ 30 cm のカラムに無水硫酸ナトリウム 2 g、シリカゲル 0.9 g、44%硫酸シリカゲル 3 g、シリカゲル 0.9 g、及び無水硫酸ナトリウム 2 g が順次充填されたもの(ジーエルサイエンス株式会社製)

・アルミナカラム：内径 15 mm、長さ 30 mm のカラムに無水硫酸ナトリウム 2 g、アルミナ 15 g、無水硫酸ナトリウム 2 g を順次充填し作製した。

・GC キャピラリーカラム：HT8-PCB(内径 0.25 mm x 60 m)(関東化学株式会社製)

1)-4-2. 機器

・GC：HP 6890 Series GC System Plus (Hewlett Packard 社製)

・MS：JMS-700 (日本電子株式会社製)

1)-4-3. 分析法

測定溶液の調製

均一化した試料 20.0 g をビーカーに量りとり、クリーンアップスパイク 100 µL を加えた後、1 mol/L 水酸化カリウム・エタノール溶液を 100 mL 加え室温で 16 時間、スターラーで攪拌した。このアルカリ分解液を分液ロートに移した後、水 100 mL、ヘキサン 100 mL

を加え 10 分間振とう抽出した。静置後、ヘキサン層を分取し、水層にヘキサン 70 mL を加え同様の操作を 2 回行った。ヘキサン抽出液を合わせ、2%塩化ナトリウム溶液 100 mL を加えて緩やかに揺り動かし、静置後、水層を除き同様の操作を繰り返した。ヘキサン層の入った分液ロートに濃硫酸を適量加え、緩やかに振とうし、静置後、硫酸層を除去した。この操作を硫酸層の着色が薄くなるまで繰り返した。ヘキサン層をヘキサン洗浄水 10 mL で 2 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し約 2 mL のヘキサンに溶解した。この溶液を、ヘキサン 120 mL で洗浄した後の多層シリカゲルカラムに負荷し、ヘキサン 50 mL で溶出した。溶出液は溶媒を減圧留去し、約 2 mL のヘキサンに溶解した。この溶液を、ヘキサンで湿式充填したアルミナカラム負荷し、ヘキサン 100 mL で洗浄後、20%(v/v)ジクロロメタン含有ヘキサン 100 mL で溶出した。溶媒を窒素気流下でほぼ完全に留去後、シリンジスパイク 100 μ L を加え、GC-MS 測定溶液とした。

測定条件

GC-MS による測定は、以下の条件で行った。

- ・注入方式: スプリットレス
- ・注入口温度: 280 $^{\circ}$ C
- ・注入量: 2.0 μ L
- ・昇温条件: 100 $^{\circ}$ C (1 分保持)-20 $^{\circ}$ C/分

-180 $^{\circ}$ C-2 $^{\circ}$ C/分-260 $^{\circ}$ C-5 $^{\circ}$ C/分- 300 $^{\circ}$ C(4 分保持)

- ・MS 導入部温度: 280 $^{\circ}$ C
- ・イオン源温度: 280 $^{\circ}$ C
- ・イオン化法: EI ポジティブ
- ・イオン化電圧: 38 eV
- ・イオン化電流: 600 μ A
- ・加速電圧: \sim 10.0 kV
- ・分解能: 10,000 以上

分析対象

表 4 に挙げる PCBs 全 209 異性体を分析対象とした。

設定質量数

各 PCBs 同族体の測定用設定質量数並びに、質量校正用に使用したパーフルオロケロセン(PFK)の設定質量数を表 5 に示す。

検量線の設計

化学物質環境実態調査実施の手引き-平成 20 年度版-(環境省、平成 21 年 3 月)及び、排ガス中の POPs 測定方法マニュアル(環境省、平成 23 年 3 月)(以下、マニュアル)を参考にして、相対感度係数(RRF)法により検量線を作成した。

表 6 に示した検量線作成用標準液(TPCB-CSL-A、CS1-A、CS2-A、CS3-A、CS4-A、CS5-A の 6 点)をそれぞれ 3 回測定し、それら標準液に含まれる分析対象異性体について計 18 点の測定値を得た。またクリーンアップスパイク標準液及びシリンジスパイク標準液を測定し、それら溶液に含まれる標識された異性

体の測定値を得た。これら測定値のうち、検量線作成用標準液とクリーンアップスパイク標準液中の対応する異性体の測定値から RRF を、クリーンアップスパイク標準液とシリンジスパイク標準液中の対応する異性体の測定値から相対感度係数(RRFss)を算出した。検量線作成用標準液に含まれる分析対象異性体のうち、同一の化学構造をもつ標識された異性体がない場合には、クリーンアップスパイク標準液に含まれる全異性体から得られた測定値の平均値を使用して RRF を算出した。これら RRF 及び RRFss の変動は、10%(RSD%)以内になることを目標とした。

1)-4-4. 検出下限及び定量下限

最低濃度の検量線作成用標準液(TPCB-CSL-A)をノナンで 5 倍に希釈した溶液を GC-MS により測定し、その結果から、S/N=3 に相当する濃度を LOD、S/N=10 に相当する濃度を LOQ とした。標準液に含まれていない異性体については、同族体の標準品から得られた S/N の平均値に基づき LOD 及び LOQ を算出した。また、操作ブランク試験を 5 回行い、検出された異性体については、その測定値の標準偏差の 3 倍及び 10 倍の値を算出し、S/N から算出した値と比較後、より大きな値を LOD、又は LOQ とした。本分析法の異性体ごとの

LOD と LOQ を表 7 に示した。

1)-4-5. 測定溶液の測定

測定溶液の測定開始時には、正しく測定できることを確認するために、3 濃度の標準液を測定し、RRF 及び RRFss を求めた。これら測定開始時に得られた値が、検量線作成時の RRF 及び RRFss と比較し、±15%以内にあることをもって、正しく測定できることの確認とした。

検量線作成時の RRF を用いて、測定溶液に含まれる各異性体を定量した。測定溶液から得られた異性体の信号が検量線の濃度範囲外となった場合は、外挿した。操作ブランク値が認められた異性体の定量では、操作ブランク値を差し引いた。なお、検量線作成用標準液に含まれない異性体の溶出位置は、209 全異性体を含む標準液を使用して決定した。

また、RRFs 値を用いクリーンアップスパイク標準液中の各異性体濃度を定量することで、定量精度が異常なく維持されていることを常に確認した。

研究 2) 摂取量推定値の信頼性保証スキームの構築

2)-1. 摂取量推定を目的とした分析法の性能評価用試料 (Samples for evaluation of methods performance;

SEMP)の開発

SEMP 開発のコンセプト

SEMP の開発は、以下を基本的な考え方として検討した。

- ・摂取する食品の種類及びそれらの重量が大きく変化する影膳方式による試料ではなく、国民が平均的に摂取する食品の種類とその重量を反映した MB 方式による TD 試料のモデルとなること。

- ・MB 方式による試料のモデルとなる試料を開発することから、全ての食品をその類似性から 13 の群に分割し、群ごとに SEMP を開発すること。また、MB 方式による試料のモデルとすることから、必要に応じ各食品に基本的な調理加工を施すこと。

- ・各群を構成する食品は、摂取量の多さ(より大きいこと)を考慮して選択すると同時に、分析法の性能評価の対象となる有害物質等の持ち込みの可能性を極力低下させるために、食品の種類を制限すること。さらに、実際に SEMP の調製に使用する食品は、その商品情報(たとえば有機栽培といった)を十分に考慮の上、選択すること。

- ・十分な均質性が担保できる混合方法を採用すること。

SEMP のレシピ

開発コンセプトに従い、各群 SEMP の調製に用いた各食品種名、それらの重量(混合量並びに混合割合)、調理加工の有無等、必要な情報をまとめたレシピを表 7 に示す。

表 7 に示した通り、各群の SEMP を 3000～5000 g 程度調製することを計画した。このように多量の食品をその均質性を担保しつつ混合することは、通常の試験室では難しい。そこで、食品製造事業者との共同研究体制を組織し、当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

研究 1 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

研究 1)各種有害物質の適時及び継続的な摂取量推定

MB 方式により全国 10 地域で TD 試料を調製し、その分析により得られた値、すなわち各種(有害)物質の TD 試料濃度と、各地域の食品摂取重量に基づき、各種(有害)物質の摂取量を推定した。

これらの摂取量を考察するに当たり、地域間比較は慎重に行わなければならない。TD 試料の群として比較すれば、食品

摂取重量の地域差は最大でも2倍程度である。従って、摂取量推定値の地域差が2倍以上であった場合には、地域ごとに調製されたTD試料の濃度に差があることになる。しかしTD試料は、その地域にある時点で流通する食品を買い上げ、それらを組み合わせて調製される日常食のモデルであり、調製を一つの地域に限ったとしても、食品を買い上げる時期や、買い上げる食品の種類に応じて多様である。あるときに買い上げた一組みの食品から調製されたTD試料の濃度が仮に高かったからといって、常にその地域において摂取量が高めになるとは言えない。ある地域における摂取量を考察するのであれば、その地域における摂取量を複数の機会にわたって推定する必要がある。

本研究により得られた結果として、各種(有害)物質の地域別摂取量推定値を示すが、記述するにとどめ比較等は行わない。全国平均値についてのみ考察する。

1)-1. 各種元素の摂取量推定

TD試料の分析を通じ、各種元素の摂取量を推定した。一斉分析法の対象となる14元素(B、Al、Ni、Se、Cd、Sb、Ba、Pb、U、As、Sn、Cr、Co、Mo)の地域・食品群別摂取量推定値を表9-1～表9-14に示す。LOD未満の分析結果が含まれる場合にのみ、試料濃度を0あるいはLOD/2 (ND=0あるいはND=LOD/2)とする2つの方式で摂取量を推定した。この場合には、Cd、Sb、Ba、Sn、Cr、Coの6元素が該当

した。上記元素の摂取量推定値を示した、表9-5、表9-6、表9-7、表9-11、表9-12、表9-13に明らかなおり、2つの方式で推定した摂取量はほぼ一致した。この結果は、十分に感度の高い分析法を採用することで、分析結果がNDとなる機会を極力減らし、LODがより低濃度に設定された効果といえる。ほぼ一致する推定値ではあるが、より安全側に立脚した推定に配慮し、2方式により摂取量を推定した場合には、2/LODの値を以後の集計と考察に用いる。

今回推定した総摂取量の値(食品群別摂取量推定値の総和)は全10地域を通じ、元素ごとに以下の範囲にあった。B:1294～1854 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Al:1632～23160 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Ni:103～214 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Se:78.2～98.8 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Cd:11.9～32.4 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Sb: 0.9～8.8 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Ba:270～754 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Pb:3.8～30.9 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、U: 0.5～1.9 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、As:159.3～285.7 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Sn:2.4～1127.8 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Cr:18.3～46.6 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Co:5.3～16.3 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Mo:158.5～314.6 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 。

地域・食品群別摂取量推定値を集計し、食品群別摂取量と総摂取量の全国平均を表10に示した。ND=0とND=LOD/2として推定した2つの摂取量を示しているが、前述のとおりほぼ一致していることから、ND=LOD/2として推定した摂取量について以下述べる。また表は、耐用摂取量が設定されている元素(有害元素：B、Al、

Ni、Se、Cd、Sb、Ba、Pb、U)とそれ以外の元素(Sn、Cr、Co、Mo)に2分割して示した。Asの耐用摂取量は撤回されているが、有害元素の表に含めた。表に0.0の数値が含まれているが、これは小数点以下1桁で摂取量推定値を表記しているためであって、0ではない。各元素摂取量の全国平均は以下の通り推定された。B:1523.8 µg/man/day、Al:4687 µg/man/day、Ni:156.8 µg/man/day、Se:90.2 µg/man/day、Cd:17.6 µg/man/day、Sb: 2.2 µg/man/day、Ba:468.4 µg/man/day、Pb:10.4 µg/man/day、U: 1.0 µg/man/day、As:213.9 µg/man/day、Sn:228.9 µg/man/day、Cr:30.2 µg/man/day、Co:9.0 µg/man/day、Mo:225.3 µg/man/day。

総摂取量推定値に対する各群摂取量推定値の寄与率を図1に示した。図1を俯瞰することで、食品群別摂取量の総摂取量への寄与率のパターンは元素によって大きく異なることがわかる。本年度の研究によってはじめて摂取量を推定した元素については、図1に示した寄与率が一般的といえるか判断できない。つまり、ある特定の元素の摂取量を考察するうえで、総摂取量に対する寄与率が特定の食品群において高くあるいは低くなることは、現時点では判断できない。今後の継続研究の結果を待たなければならない。しかし、過去の研究の結果とも一致することから、Pb、As、Cdについては、図1に示した摂取寄与率が一般的であることが確認できる。つまり、1)Pbは特定の食品によらず様々な食品から摂取される、2)Asは主に

魚介類から摂取され、それに準じてその他野菜・海藻類からの摂取量が多い、3)Cdは米から最も多く摂取されるといえる。

元素としての特徴から一斉分析には向かない総水銀(Hg)は、別途ICP-MS法により分析した。また、これまでの研究の成果として、Hgはほぼ魚介類(10群)と肉類(11群)からしか検出されず、かつ10群摂取量が支配的であることが明らかとなっていた。このことを踏まえ、効率的に摂取量を推定するために、10群と11群のTD試料のみを分析した。全国10地域で調製された10群と11群のTD試料のHg分析結果に基づく摂取量推定値を表11に示す。

地域Jで調製された11群からは唯一Hgが検出されなかった。そのためHg摂取量はND=0とND=LOD/2の2つの方式で推定したが、結果はほぼ一致した。また、10群と11群それぞれからの摂取量の和をHg摂取量とし各群の寄与率を計算すると、10群の寄与率が最も低い地域であっても95.9%となり、支配的であることが確認された(表12)。このHg摂取量の推定結果を踏まえ、メチル水銀の分析は10群のみを対象とし実施した。10群のTD試料の分析を通じてメチル水銀摂取量を推定した結果、メチル水銀摂取量は、全10地域を通じ2.11~15.92 µg/man/dayの範囲にあり、全国平均は6.7µg/man/dayと推定された(表13)。

1)-2. PCB類の摂取量推定

TD試料の分析を通じ、PCBs類の摂取

量を推定した。今年度の研究から、高分解能GC-MS法を用いることで、209あるPCBsの異性体別測定を可能とし、同じ塩素化数の異性体をまとめた同族体別摂取量、また同族体別摂取量の総和として総PCBs摂取量を推定した。またメチル水銀摂取量推定の場合と同様に、これまでの研究からPCBsはほぼ10群と11群からしか検出されず、かつ10群摂取量が支配的であることが明らかになっていることを踏まえ、10群と11群のTD試料のみを分析した。

10群の分析結果に基づくPCBs摂取量推定値を表14に、11群の分析結果に基づくPCBs摂取量推定値を表15に示した。一部異性体の分析結果がLOD未満であったため、摂取量は $ND=0$ と $ND=LOD/2$ の2つの方式により推定した。2つの方式により推定された摂取量を比較すると、10群ではほぼ一致している。11群からの摂取量推定値は、推定方式を $ND=LOD/2$ とした場合にやや高めとなっているが、大きく乖離してはいない。この結果は、十分に感度の高い分析法を採用することで、分析結果がNDとなる機会を極力減らし、LODをより低濃度に設定した効果といえる。ほぼ一致する推定値ではあるが、より安全側に立脚した推定に配慮し、2方式により摂取量を推定した場合には、 $2/LOD$ の値を以後の集計と考察に用いる。

全10地域を通じ、10群からの総PCBs摂取量は223～558 ng/man/dayの範囲、11群から総PCBs摂取量は13.3～88.1

ng/man/dayの範囲で推定された。

図2には、総PCBs摂取量に占める各同族体摂取量の割合を示した。10群からの総PCBs摂取量は主に3～7塩素化同族体摂取量によって占められており、TD試料の調製地域に依存していない。このことから、魚介類からの総PCBs摂取量は主に3～7塩素化同族体摂取量によって占められるのが一般的といえるかもしれない。一方の11群には、この特徴が認められず、総PCBs摂取量に各同族体摂取量が占める割合は地域(試料)ごとに大きく変わっている。11群に分類される畜肉等に含まれるPCBsは、魚介類が海洋環境に含まれるPCBsを食物連鎖も経て蓄積するのに対し、主に餌となる牧草等の摂取によって蓄積されたものと考えられる。PCBsを蓄積する経路の違いや、生体内での代謝の異なりが、今回得られた同族体摂取量割合の違いの原因であり、10群と11群から摂取するPCBs同族体の特徴といえるのかもしれない。継続研究によって確認すべき課題である。

10群と11群試料の分析からそれぞれ推定したPCBs摂取量の和を求め、PCBs総摂取量として表16に示した。PCBs総摂取量は10地域を通じて239～629 ng/man/dayの範囲にあり、全国平均は436 ng/man/dayと推定された。

1)-3. 有害元素及びPCBs摂取量の対TDI比と経年変化

今年度本研究で摂取量を推定した元素