

I. 総括研究報告

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

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 総括研究報告書

研究代表者	渡邊敬浩	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
研究分担者	片岡洋平	国立医薬品食品衛生研究所食品部
研究分担者	松田りえ子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究分担者	天倉吉章	松山大学薬学部
研究分担者	畝山智香子	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

研究概要

有害物質の摂取量推定値は、ヒトの健康危害リスク管理のための基礎データであり、高い信頼性と精密さが要求される。リスク管理の施策策定には、懸念される有害物質の摂取量推定値が適時に必要となる。同時に、リスクへの寄与が大きい有害物質の摂取量推定値を継続的に監視し、施策効果を検証する必要がある。本研究では、様々な有害物質の信頼できる摂取量を適時にまた必要に応じて継続的に推定する事を目的に、有害物質の摂取量推定、摂取量の信頼性向上と精密化、摂取量を推定すべき新規有害物質の選定の3つに大別できる研究を実施した。

有害物質の摂取量推定研究では、マーケットバスケット方式により全国10地域においてトータルダイエツト試料を調製し、その分析を通じて各種有害物質の摂取量を推定した。摂取量を推定した有害物質は、耐用摂取量(TDI)が設定されているホウ素、アルミニウム、ニッケル、セレン、カドミウム、アンチモン、バリウム、鉛、ウランに加え、一斉に分析可能としたヒ素、総水銀、スズ、クロム、コバルト、モリブデンの元素類、メチル水銀、PCBs、ダイオキシン類(PCDD/PCDFs及びCo-PCBs)である。研究の成果として、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。ダイオキシン類の全国平均摂取量は0.58(範囲：0.18～0.97)pg TEQ/kg bw/dayと推定された。

さらにダイオキシン類の摂取量については、精密化の一環として、ハイリスク集団と考えられる幼児におけるダイオキシン類の1日摂取量を推定するため、幼児用のTD試料を調製しダイオキシン類を分析した。その結果、幼児によるダイオキシンの摂取量は、0.46 pg TEQ/kg bw/dayと推定された。

TDIが設定されている元素類のうち、ニッケル、メチル水銀、ホウ素、アルミニウム、セレン、カドミウム、バリウム、ウランのそれぞれの摂取量が耐用摂取量に占める割合(対TDI比)は、ニッケルの78.4%を筆頭に、メチル水銀が50%以上、ホウ素、アルミニウム、セレン、カドミウム、バリウムが30%以上、ウランが10%以上となった。ダイオキシン類の全国平均摂取量は、平成24年度の調査結果よりやや低い値で推定された。摂取量の推定値の最大は0.97 pg TEQ/kg bw/dayであり平均値の約1.7倍であったが、日本におけるTDI(4 pg TEQ/kg bw/day)の24%程度であった。

その他、摂取量推定が必要かを判断するため、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(ヘキサプロモシクロドデカン：HBCD)、塩素系難燃剤(デクロランプラス：DP)を対象に食品濃度の実態等を調査した。PAHsの含有実態調査では、燻製魚、なまり節、焼き魚、燻製肉、燻製卵、鰹削り節、及び鰹節等を風味原料に使用したダシパック及びつゆの計43試料を分析した。その結果、鰹削り節やダシパックのPAHs濃度が高い傾向が認められた。PAHs16種の中でも分子量の小さいBenzo[a]anthracene、Cyclopenta[c,d]pyrene等はほぼ100%の割合で検出され、濃度も高かった。燻製魚介類の調査結果を用いてBAP摂取量を試算した結果、多めに見積もっても11.3 ng/kg体重/日程度と推定された。暴露マージンを計算すると約8,800であったことから、人の健康への懸念は大きいとは言えなかった。HBCDの含有実態調査では、魚介類20試料すべてから検出され、その湿重量当たりの濃度範囲は0.12 ng/g～22 ng/g(平均3.1 ng/g)であった。異性体別の濃度は α 体が0.12～16 ng/g、 β 体がND～0.11 ng/g、 γ 体がND～6.2 ng/gであった。濃度が高い試料について光学異性体分析を行った結果、光学異性体構成比は α 体で0.49～0.56、 γ 体で0.50～0.55であり、光学異性体による明確な差異は見られなかった。DPの含有実態調査では、魚介類20試料中17試料からDPが検出された。得られた濃度値(湿重量あたり)は syn 体がND～7.0 pg/g(平均2.2 pg/g)、 $anti$ 体はND～13 pg/g(平均3.7 pg/g)であり、DPの syn 体と $anti$ 体の濃度合計値(Total DP)の範囲はND～20 pg/g(平均5.9 pg/g)であった。

摂取量の信頼性向上と精密化研究では、1)摂取量推定を目的とした分析法の性能評価手法の開発、2)リスクを考慮した精密摂取量推定手法開発、3)メチル水銀分析法及びヒ素形態別分析法の開発について検討した。摂取量推定を目的とした分析法の性能評価手

法の開発の成果として、マーケットバスケット方式によるTD試料を模した性能評価用試料(SEMP)が開発された。摂取量推定を目的とする分析法の一例として多元素一斉分析法を取りあげ、本法を用いてSEMPを分析した結果から、食品に本来含まれている元素が元素ごとに異なる濃度で含まれていたものの、その均質性は非常に高いことが示された。さらに、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。

年代別の食品摂取量パターンの比較のため、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)の年齢区分ごとに求めた。その結果、年齢区分に応じた食品摂取重量のパターン等、有害物質の摂取量を推定する上で不可欠な情報が得られた。得られた情報を踏まえ、1-3歳の幼児の平均的食事を模したTD試料が作製された。

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を基礎とし、主にGC-MS/MSを測定機器に採用することにより、摂取量推定を目的とした分析に使用可能な方法を開発した。本分析法の妥当性は、メチル水銀の主たる摂取源と考えられる10群(魚介)及び11群(肉・卵)を模したSEMP試料に、それぞれ0.05 mg/kg、0.005 mg/kgになるよう標準品を添加した試料を5併行分析した結果から推定された真度と併行精度によって確認した。本法により10群試料を分析した結果から推定された真度及び精度(RSD%)はそれぞれ84%と4.9%、11群試料を試料を分析した結果から推定された真度及び精度はそれぞれ97%と3.3%であった。ヒ素の形態別分析法として、2種の無機ヒ素(亜ヒ酸、ヒ酸)と6種の有機ヒ素(モノメチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸、トリメチルアルシンオキサイド、アルセノベタイン、アルセノコリン、テトラメチルアルソニウム)の選択的な定量分析法の開発を検討した。高速液体クロマトグラフィー-誘導結合プラズマ質量分析計(HPLC-ICP-MS)による形態別分析法に着目し、無機ヒ素と有機ヒ素を合わせた計8つのヒ素化合物を分離し測定するための測定法を検討した。特に毒性が高いとされる無機ヒ素を高分解能で分析可能なODSカラムの選定、及び逆相イオンペアクロマトグラフィーによる分離のための移動相条件の最適化を行った。

摂取量を推定すべき新規有害物質の選定研究では、ダイオキシン類バイオアッセイの鍵となるアリル炭化水素レセプター(AhR)と76種の有害物質の相互作用を評価した他、暴露マージン(MOE)の大きさで分類した化合物のリストを作成した。AhRとの相互作用

を評価したPAHs及びその誘導体、残留農薬、アミノ酸及びその代謝物のうち、PAHsの多くは、顕著なAhR活性を濃度依存的に示した。PAHsの誘導体については、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った。ニトロ化及びアミノ化体では、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。一方、農薬では、インドール骨格を有するcarbendazim、thiabendazoleの2種の化合物に強い活性が認められた。アミノ酸及びその代謝物についても同様、インドール化合物tryptamineに活性が認められた。MOEを指標作成した化合物リストからは、MOEが一桁と評価されている化合物、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摂取量推定の優先順位の高い化合物である可能性が示された。

1. 有害物質の摂取量推定研究

1-1. 各種有害物質の適時及び継続的な摂取量推定

A. 研究目的

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ット (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。

B. 研究方法

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。

TD 試料は、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 $> 18.2\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 、TOC $< 3 \text{ ppb}$)

・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)。

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)-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：ジーエルサイエンス
- ・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 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 を水に溶解して 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 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 (1 min) \rightarrow 10 /min \rightarrow 160 (0 min) \rightarrow 20 /min \rightarrow 280 (5 min)
- ・注入口温度: 250
- ・トランスファライン温度: 280
- ・イオン源温度: 280
- ・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)

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 μ L 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はほぼ完全に留去後、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
- ・注入量：2.0 μ L
- ・昇温条件：100 (1 分保持)-20 /分-180 -2 /分-260 -5 /分- 300 (4 分保持)
- ・MS 導入部温度：280
- ・イオン源温度：280
- ・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：~ 10.0 kV
- ・分解能：10,000 以上

分析対象

PCBs 全 209 異性体を分析対象とした。

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。

C.D. 結果及び考察

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。

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)の摂取量は、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つの方式で推定したが、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た。

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推定した。全国平均は以下の通り推定された。B:1523.8 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Al:4687 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Ni:156.8 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Se:90.2 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Cd:17.6 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Sb: 2.2 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Ba:468.4 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Pb:10.4 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、U: 1.0 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、As:213.9 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Sn:228.9 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Cr:30.2 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Co:9.0 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Mo:225.3 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 。

総摂取量推定値に対する各群摂取

量推定値の寄与率算出した結果、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った。しかし、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、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、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。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。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 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ の範囲にあり、全国平均は6.7 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ と推定された。

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群からの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。

PCBs摂取量は $\text{ND}=0$ と $\text{ND}=\text{LOD}/2$ 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

$\text{ND}=\text{LOD}/2$ 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、 $2/\text{LOD}$ の値を以後の集計と考察に用いた。

全10地域を通じ、10群からの総PCBs摂取量は223～558 $\text{ng}/\text{man}/\text{day}$ の範囲、11群から総PCBs摂取量は13.3～88.1 $\text{ng}/\text{man}/\text{day}$ の範囲で推定された。

総PCBs摂取量に占める各同族体摂取量の割合を算出した結果、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た変化はなかった。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、推定した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となった。

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のうち、耐用摂取量(TDI)の設定されている有害元素(B、Al、Ni、Se、Cd、Sb、Ba、Pb、U)、メチル水銀、PCBs摂取量の対TDI比を求めた。ヒ素の有害性を疑う余地はないが、JECFAによって撤回されたのち、新たな耐用摂取量の設定はされていないため、対TDI比の算出は控えた。今回の推定結果に基づけば、Ni摂取量の対TDI比が78.4%と計算され最も高い。この値に準じてメチル水銀摂取量の対TDI比も50%を超えている。そのほか、B、Al、Se、Cd、Ba摂取量の対TDI比が30%を超えており、年次推移を監視すべきと考える。U摂取量とPb摂取量の対TDI比はそれぞれ約10%と6%であり、上記の有害元素に比べれば低値であるが、Uにつ

いては初めて摂取量を推定した有害元素であるため複数年にわたる監視が必要と考える。

これまで30年以上にわたり推定してきたPb、Cd、As、Hg、PCBsについて、今年度の結果も加えた摂取量推定値の経年変化を解析したところ、As、Hg、Cdの摂取量は30年間にわたりわずかに減少が認められるもののほぼ一定の値で推移していることが確認された。PbとPCBs摂取量は1990年代までに大きく減少して以降ほぼ下げ止まり、安定して推移していた。

対TDI比を指標としてPbとPCBsの摂取量を他の有害元素等の摂取量と比較すると、十分に低下しているとも評価できる。しかし、規制等の場面においてALARAの原則等の適用が図られることに鑑みると、少ないながらも摂取量が推定される間は、検出頻度を踏まえて分析するTD試料の群を限定することや、隔年で摂取量を推定するなどの効率化を図りつつ、継続して監視する必要があると考える。

昨年度までは、TD試料を調製する各協力機関でそれぞれ分析された結果に基づき摂取量を推定してきた。本年度からは、協力機関が調製したすべてのTD試料を国立医薬品食品衛生研究所に集め、同所一機関で分析することに大きく方向転換を図った。分析には、事前に性能評価した分析法を用いた

が、これは分析法の性能に関する客観的な証拠を準備し第三者に開示可能とすることで、摂取量推定値の信頼性を確保することが目的である。年次推移をみる限り、本年度推定された摂取量は、これまでに推定されてきた摂取量と矛盾なく一致している。この一致によって、昨年度までに推定されてきた摂取量の信頼性も、より増したと考える。

E. 結論

本研究により、元素類の全国平均摂取量は B:1523.8 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Al:4687 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Ni:156.8 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Se:90.2 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Cd:17.6 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Sb: 2.2 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Ba:468.4 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Pb:10.4 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、U: 1.0 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、As:213.9 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Sn:228.9 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Cr:30.2 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Co:9.0 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Mo:225.3

$\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 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6.7 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、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。これら有害物質の摂取量推定は、積極的に継続して実施すべきと考える。またPbとPCBsの対TDI比はそれぞれ5.8%と0.2%であり、上記の有害物質の対TDI比に比べ小さな値ではあるが、規制等の場面においてALARAの原則等の適用が図られることに鑑みると、少ないながらも摂取量が推定される間は、推定方法の効率化を図りつつ、継続して監視する必要があると考える。

1-2. 塩素化ダイオキシン類のトータルダイエット調査

A. 研究目的

TD 試料を用いたダイオキシン類の摂取量推定は、平成9年から厚生科学研究(現在は厚生労働科学研究)費補助金により、ごと年実施されており、国民のダイオキシン類暴露量

とその経年推移に関する知見が得られている。国民平均のダイオキシン類摂取量を推定するため、本年度は全国7地区8機関において日本人の平均的な食品摂取に従ったTD試料を調製し、試料中のダイオキシン類

を分析し、1日摂取量を推定した。また、今年度は新たにハイリスク集団と考えられる幼児におけるダイオキシン類摂取量を推定するため、幼児の食品摂取に従ったTD試料を作製し、試料中のダイオキシン類を分析し、1日摂取量を推定した。

B. 研究方法

1. 試料

1-1. 日本人の平均的なTD試料

国民平均のダイオキシン類摂取量を推定するためのTD試料は、全国7地区の8機関で調製した。厚生労働省が実施した平成20～22年度の国民健康・栄養調査の地域別食品摂取量(1歳以上)を項目ごとに平均し、各食品の地域別摂取量とした。TD試料は、有害物質の摂取量推定研究と同様、14群に分けて調製した。

1～9群、及び12～14群の試料は、各機関で1セット調製した。10及び11群はダイオキシン類の主要な摂取源であるため、8機関が各群3セットずつ調製した。これら3セットの試料は、魚種、産地、メーカー等が異なる食品を合一し調製した。昨年度までの研究では、12群についても各機関で3セットの試料調製を実施したが、12群のダイオキシン類摂取量に占める割合が低下しており、平成19年度以降の割合は2.1%以下であった。

そのため、12群からのダイオキシン類摂取量は全体に占める割合が高いとは言えないため、今年度より各機関で1セットの試料作製とした。

各機関で3セットずつ調製した10及び11群の試料はそれぞれの試料を分析に供した。一方、1～9群及び12～14群は、各機関の食品摂取量に応じた割合で混合した共通試料とし、分析に供した。

1-2. 幼児のTD試料

国民健康栄養調査データ(平成20～22年度)を集計し、幼児(1-3歳)の食事摂取に従ったTD試料を作製した。なお、14群として分類される飲料水については、ダイオキシン類摂取量に対する寄与が極めて少ないことが現在までの研究により明らかとなっているため、分析対象より除いた。

2. 分析対象項目及び検出限界

分析対象項目は、WHOが毒性係数(TEF)を定めたPCDDs 7種、PCDFs 10種及びCo-PCBs 12種の計29種とした。

3. 分析方法

ダイオキシン類の分析法は、「食品中のダイオキシン類測定方法ガイドライン」(厚生労働省、平成20年2

月)に従った。

4. 推定結果の表記

推定結果は、1日摂取量を体重あたりの毒性等量(pgTEQ/kg bw/day)で示した。TEQの算出には2005年に定められたTEFを使用し、分析値が検出限界値未満の異性体濃度をゼロとして計算した値(以下、ND=0と略す)と、個々の異性体の検出限界値濃度の1/2として計算した値(以下、ND=LOD/2と略す)を示した。

C. 研究結果及び考察

1. 国民平均のダイオキシン類摂取量推定

7地区の8機関において調製した平均的な食品摂取を模したTD試料を分析し、ダイオキシン類摂取量及び各群からの摂取割合を算出した。

1-1. PCDD/PCDFs 摂取量

PCDD/PCDFsの1日摂取量は、ND=0として推定した場合、平均9.15(範囲:1.48~22.23)pgTEQ/dayであった。これを、日本人の平均体重を50kgとして、体重(kg)あたりの1日摂取量に換算すると、平均0.18(範囲:0.03~0.44)pgTEQ/kg bw/dayとなった。平成24年度は平均0.21(範囲:0.07~0.43)pgTEQ/kg bw/dayであり、今年度の平均値はほぼ同等で

あった。

ND=LOD/2として推定した場合のPCDD/PCDFsの1日摂取量は、平均48.11(範囲:41.38~59.72)pgTEQ/dayであり、体重あたり平均0.96(範囲:0.83~1.19)pgTEQ/kg bw/dayであった。

PCDD/PCDFs摂取量に対する寄与率が高い食品群は、ND=0の場合、10群(魚介類)80.1%、11群(肉・卵類)17.4%であり、これら2群で全体の97.6%を占めた。

ND=LOD/2の場合は、高い順に9群(酒類、嗜好飲料)22.8%、10群16.7%、1群(米、米加工品)15.8%であった。ND=0の場合には、9群及び1群の寄与はほとんどゼロであるが、これらの食品群は摂取量が多いため、全てのダイオキシン類分析値がNDであっても、それをLOD/2の濃度として計算に含め推定値を算出すると、その結果として摂取量が高く推定され、寄与率も高くなっている。

1-2. Co-PCBs 摂取量

Co-PCBsの1日摂取量は、ND=0の場合、平均19.71(範囲:7.74~32.9)pgTEQ/dayであり、体重あたり平均0.39(範囲:0.15~0.66)pgTEQ/kg bw/dayであった。平成24年度は平均0.48(範囲:0.15~0.85)pgTEQ/kg bw/dayであり、今年度の平均値はや

や低い値であった。

ND=LOD/2 の場合の摂取量は、平均 32.69(範囲 : 20.91 ~ 45.58)pgTEQ/day であり、体重あたりとすれば、平均 0.65(範囲 : 0.42 ~ 0.91)pgTEQ/kg bw/day であった。

Co-PCBs 摂取量に対する寄与率が高い食品群は、ND=0 の場合、10 群(魚介類)96.2%、11 群(肉・卵類)3.5%であり、これら 2 群で全体の 99.7%を占めた。

ND=LOD/2 の場合は、高い順に 10 群 58.0%、9 群 11.4%、1 群 7.9%であった。PCDD/PCDFs の場合と同様に、9 群及び 1 群からの寄与率が高くなった。

1-3 . ダイオキシン類摂取量

PCDD/PCDFs と Co-PCBs を合わせたダイオキシン類の 1 日摂取量は、ND=0 の場合、平均 28.86(範囲 : 9.22 ~ 48.37)pgTEQ/day であり、体重あたり摂取量は平均 0.58(範囲 : 0.18 ~ 0.97)pgTEQ/kg bw/day であった。日本における TDI(4 pgTEQ/kg bw/day) の 15%程度であり、最大値の 0.97 pgTEQ/kg bw/day も TDI の 25%程度であった。平成 24 年度は平均 0.69 (範囲 : 0.22 ~ 1.22)pgTEQ/kg bw/day であり、今年度の平均値はやや低い値であった。

ND=LOD/2 の場合の 1 日摂取量は、

平均 80.79(範囲 : 62.29 ~ 98.96)pgTEQ/day であり、体重あたり摂取量は平均 1.62(範囲 : 1.25 ~ 1.98) pgTEQ /kg bw/day であった。

ダイオキシン類摂取量に対する寄与率が高い食品群は、ND=0 の場合、10 群(魚介類)91.1%、11 群(肉・卵類)7.9%であり、これら 2 群で全体の 99.0%を占めた。ND=LOD/2 の場合は、高い順に 10 群 33.4%、9 群(酒類、嗜好飲料)18.2%、1 群(米、米加工品)12.6%であり、PCDD/PCDFs 及び Co-PCBs の場合と同じく 1 群及び 9 群の寄与率が高かった。

ダイオキシン類摂取量に占める Co-PCBs の割合は、ND=0 の場合、68%であった。Co-PCBs からの摂取率は平成 23 ~ 24 年度が 70%であり、ほぼ 7 割を推移している。

本調査研究では、ダイオキシン類摂取への寄与が大きい 10 群、及び 12 群の試料を各機関で各 3 セット調製し、ダイオキシン類摂取量の最小値、中央値及び最大値を求めている。これまでの調査結果と同様に、同一機関であっても、推定されるダイオキシン類摂取量の最小値と最大値には 1.2 ~ 3.5 倍の開きがあった(平成 25 年度)。3 セットの試料は同一地域で市販食品を購入し調製されているが、各試料に合一した魚種、個体等の差が影響しているものと考えられる。

特に10群からの摂取量推定値の差は大きく、魚介類中のダイオキシン類濃度の分布が広いことが推察された。1セットのTD試料に合一することが可能な食品の数は限られているため、本研究のように10群として調製する試料数を多くして、全試料を通じて広範な魚介類が試料に含まれるようにすることが、国民平均のダイオキシン類摂取量の精密な推定に有用であると考えられる。

1-4. ダイオキシン類摂取量の経年推移

平成10～18年度の推定値は、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路総摂取量調査研究報告書」、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」、及び平成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、平成19～21年度の推定値は、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報告書」から、平成22～24年度の摂取量は、平成24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、ダイオキシン類摂取量の経年推移を解析した(平成19～21年度の推定値は2005年のTEFを用いて再計算した)。

平成25年度のダイオキシン類摂取量(平均値)は0.58 pgTEQ/kg bw/dayであり、平成10年度以降の調査結果の中で最も低い値であった。また、調査研究が開始された平成10年度及び11年度のダイオキシン類摂取量は1.75及び1.92 pgTEQ/kg bw/dayであり、これらの値と比較すると、最近の摂取量は40%以下まで低下している。低下率は平成10年度から18年度までが大きく、18年度以降は小さくなっている。また、各年度で推定されたダイオキシン類摂取量の最大値として、平成11年の関西地区AにおいてTDIである4 pgTEQ/kg bw/dayを超えたことがあった。しかし、それ以降は最大値でTDIを超える摂取量は推定されておらず、平成20年度以降は継続して2 pgTEQ/kg bw/dayを下回っており、特に本年度の最大値は1 pgTEQ/kg bw/day以下となった。

ダイオキシン類摂取量が減少している要因の一つとして、平成11年7月に成立、平成12年1月に施行されたDXNs対策特別措置法が考えられ

る。これに基づき環境基準が設定されたことにより、焼却施設等からのダイオキシン類の排出が大幅に抑制されたことが、摂取量の低下に大きく寄与していると考えられる。また、その他の要因としては、魚介類の摂取量が過去に比べ減少していることが挙げられる。平成 10 年度のダイオキシン類摂取量の推定に用いた魚介類の 1 日摂取量は 97.0 g/day であったが、平成 25 年度の調査では 70.7 g/day であり、27%程度減少している。

2. 幼児のダイオキシン類摂取量推定

幼児用の TD 試料の分析結果に基づき推定されたダイオキシン類 1 日摂取量は、ND=0 の場合は PCDD/PCDFs が 2.08 pgTEQ/day、Co-PCBs が 3.66 pgTEQ/day、及びその和であるダイオキシン類が 5.74 pgTEQ/day であった。幼児の平均体重を 12.6 kg と仮定した場合、体重(kg)あたりの 1 日摂取量に換算すると、PCDD/PCDFs が 0.17 pgTEQ /kg bw/day、Co-PCBs が 0.29 pgTEQ /kg bw/day、及びダイオキシン類が 0.46 pgTEQ /kg bw/day であった。ダイオキシン類摂取量推定値の対 TDI 比は、約 12%であった。また、幼児によるダイオキシン類の摂取量推定値は本年度の国民平均の摂取量推定値(0.58 pg TEQ/kg be/day)と大差はなかった。

幼児の体重は、当然のことながら国民平均と比較して小さいが、ダイオキシン類の主要な暴露経路である魚介類の摂取量もまた国民平均と比較して少ないため、両者のダイオキシン類摂取量に顕著な差が生じなかったと考えられる。

また、ND=LOD/2 の場合の 1 日摂取量は PCDD/PCDFs が 16.78 pgTEQ/day、Co-PCBs が 8.67 pgTEQ/day、及びその和であるダイオキシン類が 25.45 pgTEQ/day であり、体重あたりの摂取量はそれぞれ、1.33、0.69、2.02 pgTEQ /kg bw/day と推定された。

ダイオキシン類摂取量に対する寄与率が高い食品群は、ND=0 の場合、10 群(魚介類)91.0%、次いで 7 群(緑黄色野菜)6.6%であり、これら 2 つの群で全体の 97.5%を占めた。通常は 7 群からの総ダイオキシン類摂取量への寄与は小さいが、今回調製した 7 群試料からは、TEF が大きい 1,2,3,7,8-PeCDD が検出下限値近い低濃度ではあるが検出されたため、摂取量推定値が大きくなった。

ND=LOD/2 の場合は、寄与率が高い順に 10 群 21.4%、9 群(酒類、嗜好飲料)13.5%、12 群(乳・乳製品)13.0%、1 群(米、米加工品)11.5%であり、ND=0 の場合と比較すると、1 群、9 群、及び 12 群の寄与率が高かった。

これらの食品群についてはダイオキシン類がほとんど検出されていないが、摂取量が多いため $ND=LOD/2$ で計算した場合の摂取量推定値が高くなった。

日本において幼児のダイオキシン類の摂取量を推定した事例としては、2002年に東京都が実施した調査がある。この調査では、国民健康・栄養調査の2歳～6歳の食品摂取量に基づき調製したTD試料を分析している。得られた分析結果に基づき、ダイオキシン類摂取量は 30.4 pg TEQ/日 ($2.03 \text{ pg TEQ/kg/day}$)と推定されている。本研究が対象とした年齢層や、推定の実施時期(試料の調製時期)等が異なるため、推定された摂取量を直接比較することは困難であるが、二つの摂取量推定値には約4倍の違

いがある。

D. 結論

1. 全国7地区8機関で調製したTD試料の分析を通じ、ダイオキシン類の摂取量を推定した結果、平均1日摂取量は $0.69 \text{ pgTEQ/kg bw/day}$ であり、日本におけるTDIの約17%であった。ダイオキシン摂取量は経年的に減少傾向にあるが、食品の安全を確保するため、今後もダイオキシン類摂取に対する寄与が大きい魚介類に重点を置いた調査を継続し、動向を見守る必要がある。

2. 幼児(1歳～3歳)を対象にしたTD試料を用いてダイオキシン類の摂取量調査を実施した結果、1日摂取量は $0.46 \text{ pg TEQ/kg w/day}$ と推定された。

1-3. ハロゲン化難燃剤の実態調査

A. 研究目的

難燃剤には、ハロゲン系やリン系などの有機系難燃剤及び金属酸化物やアンチモン系などの無機系難燃剤があり、このうちハロゲン系難燃剤はその効率の良さからプラスチック製品の難燃剤として幅広く使用されている。

ハロゲン系難燃剤のうち、臭素系

難燃剤は、人体への影響や、より毒性が高い臭素系ダイオキシン類の発生等への懸念がある。高臭素化難燃剤であるヘキサブロモシクロドデカン(HBCD)は、分子量641.7の臭素系化合物で、16の立体異性体があり、主な異性体は 体、 体及び 体である。HBCDは難燃剤として優れた性質を持つ一方、環境中での残留性

や生物蓄積性を有することから、平成 25 年にストックホルム条約(POPs 条約)の締結国会議において同条約付属書 A(廃絶)に追加されることが決定され、日本においても化学物質審査規制法の第一種特定化学物質への指定が決定した。しかし、HBCD を使用した製品の廃棄が今後増加していくことから、環境や食品における汚染実態調査を継続的に行っていく必要がある。HBCD についてはこれまでの研究において、マーケットバスケット方式により調製された 10 群(魚介類)試料からのみから検出されている。そのため、魚介類の個別試料を分析することで、食品汚染の実態を把握することができると考えられる。

一方、デクロランプラス(Dechlorane Plus、以下 DP)は、分子量 653.7 の塩素系化合物である。化学名(IUPAC 名)は 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 13, 13, 14, 14-dodecachloro-, 4, 4a, 5, 6, 6a, 7, 10, 10a, 11, 12, 12a-dodecahydro-1,4:7,10-dimethanodi benzo [a, e] cyclooctene であり、*syn* 体と *anti* 体の二つの異性体が存在する。DP は POPs 条約で指定された塩素系難燃剤・マイレックス(Mirex)の代替製品として需要が増大傾向にあり、近年環境汚染物質として注目されている物質である。食品中の DP

については、国内で魚介類から検出した事例が報告されているが、食品汚染実態に関する十分なデータが得られていないのが現状である。

上記の現状に鑑み、本研究では臭素系難燃剤である HBCD 及び塩素系難燃剤である DP について、魚介類試料中の汚染実態調査を行った。

B. 研究方法

1 試料・試薬等

1.1 試料

平成 25 年度に福岡県内の食料品店で購入した生鮮魚介類 20 試料(主に九州地区を産地とする)を調査対象とした。各々の可食部を採取し、細切・均一化したものを分析に用いた。

1.2 標準物質

-、 -、 -HBCD 標準品、及び -、 -、 $^{-13}\text{C}_{12}$ ラベル化 HBCD は Cambridge Isotope Laboratories 社製を用いた。各異性体をメタノールで適宜希釈・混合して分析に用いた。

DP の標準溶液は、Wellington Laboratories 社製を使用した。DP の *syn* 体と *anti* 体の各々についてネイティブ体標準液と ^{13}C -ラベル体標準液を購入し、これらをノナンで適宜希釈・混合して分析に用いた。シリジスパイクには、 ^{13}C -2,3,3',55'-pentaCB(^{13}C -PCB111)を使用した。

1.3 試薬及び器材

アセトン、ヘキサン、ジクロロメタン、ノナン、メタノール、蒸留水(ヘキサン洗浄品)、無水硫酸ナトリウム及び塩化ナトリウムは関東化学社製のダイオキシン類分析用又は残留農薬・PCB 試験用を用いた。硫酸は和光純薬工業社製の有害金属測定用を使用した。44%硫酸シリカゲルは和光純薬工業社製ダイオキシン類分析用を用いた。珪藻土は International Sorbent Technology 社製の BULK ISOLUTE SORBENT HM-Nを用いた。フロリジルカートリッジカラムは Waters 社製の Sep-pak Vac RC (500 mg)を使用した。スルホキシドカラムは Supelco 社製の Supelclean Sulfoxide(3 g)を用いた。

2 機器及び使用条件

2.1 液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)

HBCD 分析には LC-MS/MS(Waters 社製 2695 / Quattro Ultima Pt)を用いた。

2.2 高分解能ガスクロマトグラフ・質量分析計(HRGC-HRMS)

HRGC-HRMS は下記の 2 つのシステムを使用した。

システム 1 :

HRGC : Agilent 6890N(スプリット

レス注入)-HRMS : Micromass AutoSpec Premier

システム 2 :

HRGC : Agilent 7890N(大量注入装置アイスティサイエンス社製 LVI-S200 付き)-HRMS : Micromass AutoSpec Premier

2.3 GPC 装置

GPC として、ポンプはジーエルサイエンス社製の PU 714、カラムオーブンはジーエルサイエンス社製の CO 705、検出器はジーエルサイエンス社製の GL-7452、分画装置は東京理化学器械社製の DC-1500 を使用した。プレカラム及び分離カラムは昭和電工社製 Shodex CLNpak EV-G AC 及び EV-2000 AC を用い、移動相はアセトン/シクロヘキサン(3:7, v/v)、流速 5 mL/min とした。

2.4 高速溶媒抽出装置

高速溶媒抽出(ASE)には DIONEX 社製の大容量型装置 ASE-350 を使用した。抽出条件は下記の通りであった。

セル温度:100、セル圧力:1500psi、加熱時間:5分、静置時間:10分、抽出サイクル数:2、抽出溶媒:ヘキサン

3 実験操作

3.1 HBCD の分析操作

試料約 5 g を秤取して精製水 5 mL を加え、 $^{13}\text{C}_{12}$ -、 $^{13}\text{C}_{12}$ -及び $^{13}\text{C}_{12}$ -HBCD 各 1 ng を内部標準として添加した。これに抽出溶媒としてメタノール 20 mL を加え 2 分間高速ホモジナイザーにより攪拌抽出した。これをろ過し、ろ液は 300 mL 分液ポートに移した。残渣は、メタノール 10 mL と 10%ジクロロロメタン/ヘキサンの混液(以下 DCM/Hex)10 mL で再度ホモジナイズ抽出を行い、さらに 10% DCM/Hex 20mL で抽出を行った。ろ紙をメタノール及び 10% DCM/Hex 各 10 mL で洗い、ろ液及び洗液を 300 mL 分液ポートに合わせ、あらかじめジクロロメタンで洗浄した 5% NaCl 水溶液 120 mL を加えて 5 分間振とうした後、静置した。分離した有機層は綿栓した三角ポート上の無水硫酸ナトリウムを通過させ、ナス型フラスコに採った。その後、10% DCM/Hex 40 mL で同様の液-液抽出及び脱水を 2 回行った。得られた有機層はエバポレーターで減圧濃縮し、アセトン/シクロヘキサン (3 : 7)に置換し 10 mL に定容した。そのうちの 2 mL を GPC 装置に注入し、粗脂肪溶出直後の HBCD 溶出画分(溶出時間 12.5 分~18.5 分)を採取して濃縮乾固した。残渣を少量のヘキサンに溶解し、パスツールピペッ

トに 44%硫酸シリカゲルを 1 g 充填したミニカラムに負荷した。20% DCM/Hex 8mL で溶出し、窒素ガス吹付け乾燥した。少量のジクロロメタンに溶解させインサートバイアルに移し、自然乾燥後にメタノール 50 μ L を加えて溶解させ、LC-MS/MS で測定した。

3.2 DP 分析の分析操作

均一化した魚介類試料の約 10 g を 250 mL 容テフロン製遠沈管に秤量し、珪藻土約 20g を加えて混合した。混合物を ASE-350 用のステンレス製抽出セル(99mL 容)に充填し、クリーンアップスパイク (^{13}C -syn-DP 及び ^{13}C -anti-DP の 2 成分を各 250 pg 相当) を添加し、2.3 項に示した条件で抽出を行った。抽出液は 250 mL 容の捕集ボトルに回収し、2%塩化ナトリウム水溶液 50 mL を加えて緩やかに振り混ぜて抽出液を洗浄した。抽出液を 300 mL 容ナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターで約 10 mL になるまで濃縮した。

この濃縮液を、風袋を量った 100 mL 容ビーカーに移し、室温下で一夜静置して大部分の有機溶媒を揮散させた。その後、105 に設定したアルミブロック上で 3 時間加熱し乾燥させた。放冷後重量を測定し、得られた抽出物(脂肪成分)の重量を求めた。

抽出物を少量のヘキサンで再溶解し、試験管内で硫酸と反応させ、脂肪成分や色素等の有機物を除去した(硫酸処理)。脂肪含量が10%以上の試料では、50 mL 容共栓遠沈管を用いて抽出液約30 mL に対して硫酸10 mL を添加し、一夜静置した。脂肪含量が10%に満たない試料においては、10 mL 容共栓スピッツ管を用い、抽出液約6 mL に対して硫酸2 mL で処理を行った。硫酸処理は有機層の着色が無くなるまで繰り返して行った。

硫酸処理後のヘキサン層に対して減圧濃縮や窒素ガス気流による濃縮を行い、最終的に10 mL 容先細型スピッツ管内で全量約1 mL に調製した。ここに蒸留水(ヘキサン洗浄品)をパスツールピペットで数滴加え、試験管ミキサーで緩やかに混和してヘキサン層を洗浄した。次に2,500 rpm で10分間遠心分離を行い、得られた上清(ヘキサン層)をフロリジルカラムによる精製操作に供した。

フロリジル精製は先山らの方法⁸⁾を参考に行った。あらかじめヘキサン10 mL でコンディショニングしたカラムに上記のヘキサン層を負荷し、5%ジクロロメタン/ヘキサン7 mL で溶出した。得られた溶出液を窒素ガス気流で穏やかに濃縮し、濃縮液を測定バイアルに移し、シリンジスパイク(¹³C-PCB111を125 pg相当)を

添加した。ノナンで全量を約50 µLとしたものを最終検液とし、このうち2 µL をHRGC-HRMS(2.2項に記載したシステム1)に注入して測定した。定量下限値は、*syn* 体及び *anti* 体ともに湿重量あたり1 pg/gであった。

C. 研究結果及び考察

1 市販魚介類試料中の HBCD 濃度

HBCD は20試料すべてから検出され、その湿重量当たりの濃度範囲は0.12 ng/g ~ 22 ng/g(平均3.1 ng/g)であった。異性体別では、*syn* 体は20試料全てから検出されたが、*anti* 体は20試料中6試料、*syn* 体は20試料中11試料から検出され、濃度範囲は *syn* 体が0.12 ~ 16 ng/g(平均2.4 ng/g)、*anti* 体がND ~ 0.11 ng/g(ND=0としたときの平均0.01 ng/g)、*syn* 体が0.02 ~ 6.2 ng/g(ND=0としたときの平均0.65 ng/g)であった。魚介中のHBCD異性体の濃度割合は、*syn* 体 > *anti* 体 > *syn* 体であった。

魚種別に見ると、HBCD濃度はマグロ及びブリで高い傾向が見られ、サバは2検体中1検体が高い濃度であった。また、異性体については、マグロの *syn* 体の割合が他の魚種に比べて高い傾向を示していた。今回の分析では魚種あたりの検体数が1~4検体と少ないため、魚種ごとの異性体別濃度の傾向を詳細に把握するた

めにはさらに検体数を増やして分析する必要がある。

全 20 試料の湿重量あたりの Total HBCD 濃度に対する各試料の脂肪含量 (%) との間には相関が見られた ($r^2=0.529$)。

2 市販魚介類試料中の DP 濃度

DP は 20 試料中 17 試料から検出され、これら 17 試料のうち 2 試料では *syn* 体は定量限界値未満(ND)であり、*anti* 体のみが定量下限値(1.0 pg/g)以上の濃度で検出された。

全 20 試料の検出濃度範囲は *syn* 体が ND ~ 7.0 pg/g(平均 2.2 pg/g)、*anti* 体は ND ~ 13 pg/g(平均 3.7 pg/g)であった。DP の *syn* 体と *anti* 体の濃度合計値 (Total DP) の範囲は ND ~ 20 pg/g(平均 5.9 pg/g)であった。

我が国における DP 濃度の過去の実態調査事例としては、食用魚介類 20 種類の分析を行い、ND(< 0.2 pg/g) ~ 14.2 pg/g の結果が得られている。魚種や試料採取地が異なるが、本研究で得られた結果はこの過去の実態調査事例で報告された結果と近似した値であった。

全 20 試料の湿重量あたりの Total DP 濃度に対する各試料の脂肪含量 (%) との間には、弱い相関が認められた ($r^2=0.212$)。

水質や土壌等の環境媒体から DP

を検出したこれまでの報告では、環境動態の観点から、異性体の *syn* 体と *anti* 体の濃度比を求め、両者の残留傾向が比較されている。今回分析を行った魚介類 20 試料のうち、*syn* 体と *anti* 体の双方が検出された 15 試料について Total DP 濃度に対する *anti* 体濃度の比率(f_{anti})を算出したところ、 f_{anti} 値の範囲は 0.58 ~ 0.65(平均 : 0.62)であった。米国で工業生産されている DP 製品の f_{anti} 値は 0.64 ~ 0.85、中国で生産される製品の分析事例では 0.59 ~ 0.60 と報告されている。本研究の魚介類 15 試料の f_{anti} 値は、中国製品に近い値を示し、柿本らによる魚介類 12 試料における報告(範囲 : 0.56 ~ 0.72、平均 : 0.62)と近い値であった。一方、国内における屋外沈着物(0.81 ~ 0.85)、土壌(0.81)、底質(0.77 ~ 0.84)等)と比較して低い傾向が認められた。

D. 結論

魚介類中の HBCD 濃度の実態調査では、測定した 20 試料すべてから HBCD が検出された。その湿重量あたりの濃度範囲は 0.12 ng/g ~ 22 ng/g(平均 3.1 ng/g)であった。魚種別ではマグロやブリで濃度が高い傾向があり、脂肪含量との相関が見られた。HBCD の生産量は今後減少すると考えられるが、環境への放出は長

期間続くと予想される。本研究で得られた実態調査結果からは、現時点でも魚介類の汚染頻度が高いことが示唆されており、従って、今後も魚介類を中心とした調査を継続して行う必要がある。

魚介類 20 試料のうち 17 試料から DP が検出され、Total DP の濃度範囲

は ND ~ 20 pg/g(平均：5.9 pg/g)であった。今後も、魚介類を中心に調査データの蓄積・拡充を図り、汚染実態を把握するとともに、トータルダイエツト試料等の分析等を通じ、喫食に由来する摂取量の把握が必要と考えられる。

1-4. 多環芳香族炭化水素類の実態調査

A. 研究目的

多環芳香族炭化水素類(PAHs)は芳香環を二つ以上持つ炭化水素化合物の総称であり、Benzo[a]pyrene(BAP)をはじめ、発ガン性の疑いがある物質が多く含まれている。PAHs は、食品の燻製や乾燥、加熱(直火調理)などの製造過程で生成されることが知られており、これらの加工処理をした食品からの PAHs 摂取が懸念されている。食品中には種々の PAHs が存在するが、欧州食品科学委員会(SCF)や食品添加物専門家会議(JECFA)を中心に PAHs のリスク評価が行われ、モニタリングすべき 16 種の PAHs(以下、PAHs16 種と表記)が提案されている。また、日本では食品衛生法に基づく PAHs の基準値は設定されていないが、現在、EU、カナダ、中国及び韓国等で食品中の BAP に基準値

が設定されている。さらに、EU では BAP と共に、Benzo[a]anthracene(BAA)、Chrysene(CHR)、Benzo[b]fluoranthene(BBF)を含めた PAHs4 種の合計値について 2012 年 9 月より基準値が施行されている。

日本国内において食品に含まれる PAHs に対して、何らかの行政施策を講じる必要があるか判断するため、PAHs 汚染が懸念される食品の含有実態調査が望まれるが、報告は少ない。そのため、昨年度の厚生労働科学研究費では、PAHs 含有実態調査への利用を目的として、PAHs16 種を対象とする GC-MS/MS 法を検討した。本法の性能評価を燻製食品について実施した結果、発ガン性が最も強い BAP を含む殆どの PAHs16 種を良好に測定することが可能であった。

本年度は、昨年度に検討した分析法を用いて、燻製食品や加熱調理食品を対象に PAHs 含有実態調査を実施した。さらに、鰹削り節や鰹節等を使用したダシパックについては、ダシ(うま味を抽出した液体)を作製するために使用されることが多いことから、これらの食品からダシへの PAHs の移行率についてもあわせて検討した。

B. 研究方法

1. 試薬

PAHs として、Benzo[c]fluorine (BCL)、BAA、Cyclopenta[c,d]pyrene (CPP)、CHR、5-methylchrysene (5MC)、BBF、Benzo[k]fluorathene (BKF)、Benzo[j]fluoranthene (BJF)、BAP、Indeno[1,2,3-c,d]pyrene (ICP)、Dibenzo[a,h]anthracene (DHA)、Benzo[g,h,i]perylene (BGP)、Dibenzo[a,l]pyrene (DLP)、Dibenzo[a,e]pyrene (DEP)、Dibenzo[a,i]pyrene (DIP)、Dibenzo[a,h]pyrene (DHP)を、PAHs の安定同位体として重水素(D)標識した D₁₂-BAA、D₁₂-CHR、D₁₂-BBF、D₁₂-BKF、D₁₂-BAP、D₁₂-ICP、D₁₄-DHA、D₁₂-BGP、D₁₄-DIP、D₁₂-Perylene(PYL)を AccuStandard 社、Cambridge Isotope Laboratories 社及び Chiron 社より購入した。

シリカゲルミニカラムは、GL Sciences 社製の InertSep SI FF(担体量 1 g)を使用した。PSA ミニカラムは、GL Sciences 社製の InertSep PSA(担体量 1 g)を使用した。

ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)カラムは、昭和電工社製の Shodex CLNpak EV-2000 AC(300×20 mm i.d.)、またプレカラムとして Shodex CLNpak EV-G AC(100×20 mm i.d.)を使用した。

GC キャピラリーカラムは、Varian 社製の VF-17ms を使用した。

アセトニトリル 5000(PCB 試験用)、アセトン 5000(PCB 試験用及び高速液体クロマトグラフィー用)、エタノール 5000(PCB 試験用)、水酸化カリウム(特級)、シクロヘキサン(高速液体クロマトグラフィー用)、トルエン 5000(PCB 試験用)、ヘキサン 5000(PCB 試験用)、ポリエチレングリコール(PEG)300、無水硫酸ナトリウム(PCB 試験用)は関東化学(株)より購入した。

2. 試料

食品試料は東京都内の小売店及びインターネットを介して購入した。購入した食品は、ホモジナイザーで均一化し分析に供した。

3. 装置

ホモジナイザー：レッチェ社製
GM200

ポリトロン：Kinematica社製 Polytron
PT 10-35 GT

GPC：GL Sciencences社製 G-Prep
GPC8100 plus

GC-MS/MS：Agilent(Hewlett-Packard)
社製 7890A/7000B

4. PAHs 分析

4-1. 抽出

均一化した試料 20.0 g(鰹削り節及びダシパックについては 2.0 g)を量りとった。これにサロゲート溶液(D標識 PAHs9種)を加え、室温で30分放置した。その後、鰹削り節及びダシパックについては、水 8 mL を加えて1時間膨潤させた。水 20 mL とアセトン-ヘキサン(1:2)100 mL を加えてポリトロンによりホモジナイズ(15,000 rpm、約 90s)した後、1,000 rpm で3分間遠心分離し、有機層を分取した。残渣を含む水層にヘキサン 50 mL を加えて同様にホモジナイズした後、遠心分離し、有機層を合わせた。さらに、つゆについては、残った水層にヘキサン 100 mL を加え、振とう抽出を2回行い得られた有機層を合わせた。有機層に適量の無水硫酸ナトリウムを加えて15分放置後、無水硫酸ナトリウムをろ別した。予め重量を測定しておいたナスフラス

コにろ液を受け、40℃以下で溶媒を留去した後、残留物の重量を測定し、これを粗脂肪重量とした

4-2. 精製

抽出操作により得られた粗脂肪をヘキサン 30 mL に溶解し、ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で3回振とう抽出した。アセトニトリル層を合わせ、40℃以下で溶媒を留去した後、残留物をアセトン-シクロヘキサン(4:6)6 mL に溶解した。この溶液を、2,500 rpm で5分間遠心分離し、上澄み液 5 mL を GPC に導入した。GPC 精製条件を下記に示した。

【GPC 精製条件】

GPC 精製装置：G-Prep GPC8100 plus
カラム：CLNpak EV-2000 AC(300 × 20 mm I.D.)

ガードカラム：CLNpak EV-G AC(100 × 20 mm I.D.)

カラムオープン：40

溶離液：アセトン-シクロヘキサン
(4:6)

流速：5 mL/min

検出器：UV 254 nm

アセトン-シクロヘキサン(4:6)を移動相として用い、トリシクラゾールの溶出終了から25分間の画分を分取し、40℃以下で溶媒を留去した。残留物をアセトン-ヘキサン(1:1)3 mL に溶解し、この溶液を、予めアセ

トン-ヘキサン(1:1)15 mL で洗浄した PSA ミニカラムに負荷し、さらにアセトン-ヘキサン(1:1)7 mL を注入した。負荷液を含む全溶出液の溶媒を 40 以下で留去し、残留物に D₁₂-PYL(0.5 µg/mL トルエン溶液)200 µL を添加し試験溶液とした。

鰹削り節及びダシパックについては PSA ミニカラム後にシリカゲルミニカラムによる追加精製を行った。PSA ミニカラムからの溶出液の溶媒を留去後、アセトン - ヘキサン(1:99)3 mL に溶解した。この溶液を、予めアセトン-ヘキサン(1:99)15 mL で洗浄したシリカゲルミニカラムに負荷し、さらにアセトン-ヘキサン(1:99)9 mL を注入した。負荷液を含む全溶出液の溶媒を 40 以下で留去し、残留物に D₁₂-PYL(0.5 µg/mL トルエン溶液)200 µL を添加し試験溶液とした。

4-3. GC-MS/MS 測定

下記に最終的に選択した GC-MS/MS 条件を示す。

【GC 条件】

カラム:VF-17ms(長さ 30 m×内径 0.25 µm、膜厚 0.15 µm)

昇温条件 : 140 (1 min)→30 /min→210 →2.5 /min→245 →2 /min→260 (3 min)→8 /min→350 (1.5 min),

total=40.5 min

流速 : 1.1 mL/min(ヘリウム)

インサート : シングルテーパライナー

注入量 : 2.5 µL(スプリットレス注入、PEG300 共注入(500 ng/injection))

注入口温度 : 350

【MS/MS 条件】

イオン化法 : EI ; イオン化電圧 : 70 eV ; トランスファーライン温度 : 350 ; イオン源温度 : 320 ; 四重極温度 : 150 ; 測定モード : MRM

内部標準法により PAHs16 種を定量した。サロゲートには D 標識した PAHs を使用した。PAHs16 種全ての D 標識体を入手することは不可能であったため、測定対象物の化学構造が直接対応する D 標識体がない場合は、リテンションタイムが近い D 標識体をサロゲートとして使用した。シリンジスパイクには D 標識したペリレンを使用した。

5. 鰹削り節及びダシパックからのダシの調製

ダシへの PAHs の移行率を検討するため、鰹削り節 2 種(薄削り、厚削り)とダシパック 1 種からダシを調製した。鰹削り節については一般的な方法、ダシパックについては該当製品に記載の方法によりダシを調製し

た(各3試行)。

薄削りの鰹削り節については、水 500 mL をビーカーで沸騰させた後、20.0 g の鰹削り節を加え、弱火で 1 分間煮出した。篩(目開き 500 μ m)で濾してダシ殻を除いた液体をダシとした。

厚削りの鰹削り節については、水 500 mL をビーカーで沸騰させた後、15.0 g の鰹削り節を加え、弱火で 20 分間煮出した。篩(目開き 500 μ m)で濾してダシ殻を除いた液体をダシとした。

ダシパックについては、水 400 mL をビーカーで沸騰させた後、1 袋(内容量 8 g 程度)を入れ中火で 5 分間煮出した。その後、出し殻となるダシパックを取り除いた液体をダシとした。

ダシは全量を使用して、前述したつゆの分析方法に従い PAHs 分析を行った。また、浸出前の鰹削り節、ダシパック、及びそれらの出し殻についても、前述した鰹削り節及びダシパックの分析方法に従い PAHs 分析を行った。

C. 研究結果及び考察

1. PAHs 分析法の性能評価

実態調査の主な対象とした食品について、本法の真度及び併行精度を評価した。各試料の PAHs の添加濃

度は、ブランク試料に含まれる PAHs に影響されず定量可能と考えられる最も低い濃度を選択した。燻製サケ及び燻製ソーセージでは 0.5 μ g/kg、燻製卵及びつゆでは 1.0 μ g/kg、鰹削り節では 10 μ g/kg の濃度となる様に各 PAHs を添加した。これらの添加試料について 1 日 5 併行で分析し、得られた分析値より真度及び併行精度を推定した。実態調査を実施するにあたり、真度は 80~120%、併行精度は 10%以内を目標値として本法の適用性を評価した。その結果、燻製サケ、燻製ソーセージ及びつゆでは、全ての PAHs について真度は 92~113%、97~120%、及び 82~115%、併行精度は 0.3~3.2%、0.3~4.6%、及び 0.2~5.6%と推定され、真度と併行精度は目標値の範囲内であった。燻製卵では、DHP の真度が 80%を僅かに下回り目標値を外れたが、それ以外の PAHs については真度が 91~109%、併行精度は 0.3~5.5%と目標値の範囲内であった。また、鰹削り節については、DLP、DEP 及び DHP の真度が 20%以上乖離し目標値を外れたが、それらを除いた PAHs の真度は 102~119%、併行精度は 0.2%~3.1%と目標値の範囲内であった。燻製サケ、燻製ソーセージ、燻製卵、及び鰹削り節で推定された真度及び併行精度は、昨年度の報告とほぼ同

様の結果であった。

なお、本法の BCL 及び CHR に対する選択性については、PAHs 類縁化合物(分析対象以外の PAHs など)が共存する場合は、これら化合物と分離が不十分となる可能性を昨年度に報告している。実態調査で対象となる食品試料の中には、物理化学的な性質が PAHs16 種と類似する PAHs 類縁化合物が含まれることが考えられるため、これら化合物の影響についても十分に注意を払う必要がある。鰹削り節、ダシパック以外の食品では、BCL、CHR、及び DHP の分析値の信頼性は十分でないと判断し参考値とした。鰹削り節及びマトリックスが類似すると考えられるダシパックについては、それらに加え、DLP 及び DEP の分析値についても参考値とした。DHP については、複数の食品種で真度が 80%を下回るか、それに近い値が得られたため、現段階では対象とする全ての食品について参考値とした。また、定量下限値については、性能評価時の PAHs 添加濃度とした。

2. 食品中の PAHs 含有実態調査

燻製又は焼く等の加工がされている可能性のある食品、及び鰹節等の燻製食品を風味原料に使用しているダシパック及びつゆを対象に、PAHs

の含有実態を調査した。調査した試料の詳細は、燻製サバ 1 試料、サバのなまり節 5 試料、カツオのなまり節 6 試料、焼サケ 4 試料、焼サバ 4 試料、燻製鶏 3 試料、燻製鴨 3 試料、燻製卵 5 試料、鰹削り節 2 試料、鰹節等を風味原料に含むダシパック 5 試料とつゆ 5 試料の計 43 試料である。鰹削り節とダシパックでは多くの PAHs が定量下限値以上となり、その割合は低分子量の PAHs(BAA 及び CPP、並びに参考値ではあるが BCL 及び CHR)で 100%に近かった。燻製魚及びなまり節でも定量下限値以上となった PAHs は比較的多く、最高で 80%程度であった。燻製肉では定量下限値以上となった PAHs は最高で 30%程度であった。一方、焼き魚と燻製卵、及びつゆでは定量下限値以上となった PAHs はゼロに近かった。

燻製魚、なまり節、燻製肉、鰹削り節、ダシパックについては、複数の試料で定量下限値以上であった PAHs が認められたため、それらの PAHs 濃度を比較した。鰹削り節やダシパックの PAHs 濃度は高く、特に低分子量の PAHs の濃度は 100 µg/kg を超える場合も多かった。鰹削り節等が高い濃度の PAHs を含有することは、農林水産省の有害化学物質含有実態調査でも明らかにされている。

また、燻製魚、なまり節、燻製肉について、EU で設定されている BAP の基準値(5 µg/kg)を適用すると、これを超過した試料は 47 試料中 5 試料であった。また、鰹削り節については 10 試料中 9 試料で 12-39 µg/kg の BAP が、ダシパックについては 10 試料中 8 試料で 20-52 µg/kg の BAP が検出された。しかし、これらの食品は加工により水分含量が大幅に低下しているため、EU の基準値を適用する際は加工係数等を考慮する必要があると考えられる。さらに、ダシパックについては、直接消費するよりは、その浸出液をダシとして利用することが殆どと考えられるため、ダシへの PAHs 移行率についての情報が重要と考えられる。

次に PAHs 含有濃度が高かった燻製魚、なまり節や鰹削り節からの BAP 摂取量の試算しリスク評価を試みた。これらの食品の個々の詳細な食品摂取量は入手できなかったが、平成 24 年国民健康・栄養調査結果を集計した結果、これらの食品が含まれる魚介(塩蔵、生干し、乾物)の摂取量の国民平均は 14.5 g となった。そこで、調査した燻製食品、なまり節、及び鰹削り節において BAP の最高濃度であった 39 µg/kg を用いて BAP 摂取量を推定した。その結果、BAP の 1 日摂取量は 566 ng と推定され、体

重を 50 kg と仮定すると、11.3 ng/kg 体重/日であった。JECFA より提案されている BAP のベンチマーク用信頼下限値(BMDL)である 100,000 ng/kg 体重/日を用いて、暴露マージンである MOE(BMDL/BAP 摂取量)を算出すると、約 8,800 であった。EFSA では MOE が 10,000 以上であれば、‘国民の健康への懸念が低くリスク管理の優先度が低い’としている。今回の BAP 摂取量の試算においては、BAP 濃度として鰹削り節の最大値を使用しており、また食品摂取量についても魚の干物等も含んでいることから、BAP 摂取量は過大に見積もられている可能性が高い。このような試算方法でも、10,000 に近い MOE が得られたことから、今回の調査結果からは燻製魚介類からの BAP 摂取による人の健康への懸念は大きいとは言えなかった。

3. 鰹削り節及びダシパックからのダシへの PAHs 移行率

鰹削り節及び鰹節等を風味原料としたダシパックの PAHs 濃度が高いことが実態調査で明らかとなった。これらの食品については、その浸出液がダシとして広く用いられている。そのため、浸出操作により、これらの食品に含まれる PAHs がダシに移行する割合を調査しておくことが実

際の PAHs 摂取量を把握するために重要である。そこで、鰹削り節 2 種(薄削り、厚削り)とダシパック 1 種を使用し、一般的な浸出操作を行った場合のダシへの PAHs 移行率について調べた。鰹削り節についてはそれぞれ一般的な方法、ダシパックについては商品に記載の方法によりダシを作製した(各 3 試行)。

ダシの PAHs 濃度は低く、定量可能であった PAHs について移行率を求めると、薄削りの鰹削り節で 1.7 ~ 2.1%、厚削りの鰹削り節で 2.5 ~ 3.0%、ダシパックで 0.4 ~ 1.6%であった。いずれの試料でもダシへの PAHs の移行率は非常に低かったが、厚削りの鰹削り節の PAHs 移行率が若干高い傾向がうかがえた。厚削りの鰹削り節では煮出す時間が他の試料よりも大幅に長かったため、PAHs の移行率がやや高くなったことが考えられる。一方で、ダシ殻における PAHs の残存率はいずれの試料でも高く、91%以上であった。PAHs の Log Pow は 5.8 ~ 7.7 である。移行率が低かった要因の一つとして、PAHs は脂溶性が高いため、水溶性の浸出液に移行しにくいことが推察された。

このように鰹削り節やダシパック

は PAHs 濃度が高かったが、ダシとしての使用に限れば、PAHs 摂取量は大幅に減少すると考えられる。一方で、ダシ殻には殆どの PAHs が残存するため、食用とした場合は PAHs 摂取量を増加させるため留意が必要である。

D. 結論

- 1) PAHs 含有実態調査への使用を目的に本法の性能を評価した。鰹削り節及びダシパック以外の食品では BCL、CHL、及び DHP の分析値の信頼性は十分でないと判断し参考値とした。鰹削り節とダシパックについては、それらに加え、DLP 及び DEP の分析値についても参考値とした。
- 2) 実態調査の結果、鰹削り節とダシパックの PAHs 含有濃度が高いことが明らかとなった。特に低分子量の PAHs の含有濃度が高い傾向があった。今回の調査結果を用いて BAP 摂取量を試算した結果、燻製魚介類からの BAP 摂取による人の健康への懸念は大きいとは言えなかった。
- 3) 鰹削り節やダシパックからのダシへの PAHs 移行率は非常に低く、殆どの PAHs はダシ殻に残存した。

1-5. 塩素化ダイオキシン類の個別食品汚染調査

A. 研究目的

TD 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量の約 99%が魚介類、肉・卵類に由来している。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、今年度は魚介類及びそれらの加工品のダイオキシン類濃度の実態を調査した。また、ヨーロッパなどではケージ飼いよりも平飼いの鶏卵に含まれるダイオキシン類が高い傾向にあることが報告されている。そこで、国内の平飼いの鶏卵を対象にダイオキシン類濃度の実態を調査した。さらに、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鮫肝油加工食品の 1 製品について、平成 24 年度に引き続き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。

2. 分析項目

WHO が毒性等価係数(TEF)を定めた

PCDDs 7 種、PCDFs 10 種及び Co-PCBs 12 種の計 29 種を分析対象とした。

3. 分析方法

ダイオキシン類の分析は、「食品中のダイオキシン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

分析結果は湿重量あたりの毒性等量 (pg TEQ/g)で示した。ダイオキシン類の毒性等量の計算には、TEF(WHO 2005)を用いた。目標とした検出限界値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. 魚介類及びそれらの加工品のダイオキシン類実態調査結果

魚介類及びそれらの加工品(8 種、50 試料)のダイオキシン類を分析した。その結果、ダイオキシン類濃度はカツオでは 0.21 ~ 0.50 pg TEQ/g(中央値 0.29 pg TEQ/g)、サバでは 0.71 ~ 1.4 pg TEQ/g(中央値 0.91 pg TEQ/g)であった。魚介類の加工品中のダイオキシン類濃度は、カツオのなまり節では 0.036 ~ 0.34 pg TEQ/g(中央値 0.065 pg

TEQ/g)、サバのなまり節では 0.70 ~ 2.3 pg TEQ/g(中央値 1.3 pg TEQ/g)、カニ味噌では 1.3 ~ 14 pg TEQ/g(中央値 8.9 pg TEQ/g)、キャビアでは 0.47 ~ 1.4 pg TEQ/g(中央値 0.83 pg TEQ/g)、鰹節では 0.11 ~ 0.91 pg TEQ/g(中央値 0.14 pg TEQ/g)、及び鰹節を含むふりかけでは 0.037 ~ 0.29 pg TEQ/g(中央値 0.069 pg TEQ/g)であった。平成 10 年よりダイオキシン類の個別食品汚染調査は継続して実施しているが、カニ味噌の分析は初めてであり、比較的高い濃度のダイオキシン類を含んでいることが明らかとなった。

2. 平飼いの鶏卵のダイオキシン類実態調査結果

平飼い表示の鶏卵 33 試料と、対照として平飼い表示の無い鶏卵 9 試料のダイオキシン類を分析した。その結果、ダイオキシン類濃度は平飼いの鶏卵では、0.0056 ~ 1.4 pg TEQ/g(中央値 0.12 pg TEQ/g)、平飼い表示のない卵では 0.0016 ~ 0.15 pg TEQ/g(中央値 0.034 pg TEQ/g)であった。平飼い表示の無い鶏卵の調査数が少ないため比較には注意が必要であるが、平飼いの鶏卵のダイオキシン類濃度は表示の無い鶏卵と比較すると、やや高い傾向があった。

ヨーロッパにおける平飼い鶏卵中のダイオキシン類濃度について、PCDD/Fs 濃度の中央値は 0.85 pg TEQ/g fat、95

パーセンタイル値は 3.36 pg TEQ/g fat、Co-PCBs 濃度の中央値は 0.34 pg TEQ/g fat、95 パーセンタイル値は 3.97 pg TEQ/g fat と報告されている。これらの鶏卵中のダイオキシン類濃度は一見すると高いように見えるが、脂肪重量当りに換算されている。文部科学省の食品成分データベース (<http://fooddb.mext.go.jp/>)によると鶏卵中の脂肪量は、全卵 100 g 中で 10.3 g、すなわち 10.3% である。今回の調査結果を約 9.7 倍すれば、大凡の脂肪重量当たりのダイオキシン類濃度に換算できると考えられる。これに従うと、今回調査した平飼い鶏卵の脂肪重量当たりのダイオキシン類濃度は、PCDD/Fs の中央値は 0.61 pg TEQ/g fat、95 パーセンタイル値は 4.3 pg TEQ/g fat、Co-PCBs の中央値は 0.53 pg TEQ/g fat、95 パーセンタイル値は 1.8 pg TEQ/g fat 程度であると推察される。今回の調査では試料の脂肪重量を実測していないため比較には注意を要するが、これらのダイオキシン類濃度はヨーロッパで報告されている平飼い鶏卵のダイオキシン類濃度と大差が無かった。

3. 健康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、鮫肝油加工食品の 1 製品のダイオキシン類濃度が高いことが判明した。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平成 24 年度に引き続き実施した。平成 25 年度に同一製品を新たに 2 試料購入し、ダイオキシン類を分析したが、ダイオキシン類濃度は 69 及び 61 pg TEQ/g と、よく似た値であった。平成 23 から 24 年度の調査における同一製品のダイオキシン類濃度は 67 ~ 73 pg TEQ/g であり、当該製品のダイオキシン類濃度に大きな変化は認められず、依然として高濃度のダイオキシン類が含まれていた。

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。今年度に調査した製品(#4 及び #5)のダイオキシン類摂取量は、120 ~ 130 pg TEQ/日と推定され、これは TDI の 58 ~ 66%に相当した。本年度のトータルダイエツト調査による国民平均のダイオキシン類摂取量は 28.9 pg TEQ/日であることから、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、本製品の摂取には注意を払う必要がある。

D. 結論

1. 魚介類及びそれらの加工品(8 種、

50 試料)のダイオキシン類濃度を調査した。魚(カツオ、サバについて各 5 試料)のダイオキシン類濃度は、0.021 ~ 1.4 pg TEQ/g(中央値 0.61 pg TEQ/g)の範囲であった。なまり節(カツオ、サバについて各 5 試料)のダイオキシン類濃度は、0.036 ~ 2.3 pg TEQ/g(中央値 0.52 pg TEQ/g)の範囲であった。カニ味噌(5 試料)のダイオキシン類濃度は、1.3 ~ 14 pg TEQ/g(中央値 8.9 pg TEQ/g)の範囲であった。キャビア(5 試料)のダイオキシン類濃度は、0.47 ~ 1.4 pg TEQ/g(中央値 0.83 pg TEQ/g)の範囲であった。鯉節及び鯉節を含むふりかけ(20 試料)のダイオキシン類濃度は、0.037 ~ 0.91 pg TEQ/g(中央値 0.12 pg TEQ/g)の範囲であった。

2. 平飼表示されている鶏卵(33 試料)を調査した結果、ダイオキシン類濃度は 0.0056 ~ 1.4 pg TEQ/g(中央値 0.12 pg TEQ/g)であった。

2. 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、平成 23 及び 24 年度の調査結果と同様に、ダイオキシン類を高濃度を含むことが明らかになった。

2. 摂取量の信頼性向上と精密化研究

2-1. 摂取量推定を目的とした分析法の性能評価手法の開発

A. 研究目的

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

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

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 SEMPI 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、SEMPI 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 SEMPI 濃度分布への寄与が無視できるほどに高い濃度がそもそも SEMPI 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 SEMPI 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 SEMPI 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 SEMPI 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 SEMPI 全群を通じた真度、精度が低い、あるいは SEMPI 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とも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 \cdot cm、TOC < 3 ppb)を用いた。

メチル水銀標準原液 (1000 μ 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 μ 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 (1 min) 20 /min 280 (5 min)

注入口温度：250

トランスファライン温度：280

イオン源温度：230

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 回繰り返す、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 を正確に加えて測定溶液とした。

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 (1 min) 10

/min 160 (0 min) 20 /min
280 (5 min)

注入口温度：250

トランスファライン温度：280

イオン源温度：280

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 > 18.2M \cdot cm、TOC < 3 ppb)を用いた。

標準品：下記の 8 種類を使用した。

As()：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

オートサンプラー温度：4

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事が可能な 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 亜ヒ酸：
As(III)、ヒ酸：As(V)、(モノ)メチルアルソン酸：MMA、ジメチルアルシン酸(別名：カコジル酸)：DMA、
トリメチルアルシンオキサイド：
TMAO、アルセノベタイン：AsB、
アルセノコリン：AsC、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 As(III) 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() 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() 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

口化、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

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増えるほど、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