

ニウム

流速：0.1 mL/min (isocratic)

カラム温度：40°C

オートサンプラー温度：4°C

注入量：1 µL

測定時間：30 min

MS/MS 条件

イオン化法：ESI

イオン化モード：ポジティブモード

測定溶液の調製

各有機ヒ素化合物の標準品を水で希釈し、1 mg/L とした標準溶液を測定溶液とした。

C.D. 研究結果及び考察

検討 1) 摂取量推定に使用可能なヒ素の化学形態別分析法の開発

C.D. 1-1 分析法の開発時に観察された現象

摂取量推定が目的の場合、人が摂取する多様な食品を分析する必要がある。本研究の目的は、TD 試料を分析することであるが、TD 試料の分析が可能か SEMP を用いて検証する過程において、食品群に応じて特異な以下の現象が観察された。

現象 1) 無機ヒ素の価数の変換

SEMP 中の As(V)が As(III)へ、または As(III)が As(V)へと変換された。

現象 2) 未知の有機ヒ素化合物に由来すると考えられるピークの検出

SEMP の 10 群、11 群中の MMA 及

び DMA からは未知のピークが検出された。多原子干渉が起こらない条件で測定している ICP-MS の選択性を考慮すれば、これらのピークは未知の有機ヒ素化合物に由来すると推測される。しかし、標準品がないため同定することはできなかった。

現象 3) 未知のヒ素化合物に由来すると考えられるピークの検出

SEMP の 8 群からは、8 種の標準品以外のヒ素化合物に由来すると考えられる多数のピークが検出された。これらも標準品がないため同定することはできなかった。

以上の現象 1)~3)を踏まえ、以下のように判断し結果を取り扱うことにした。

1) As(III)と As(V)を区別せずそれらの和の量として定量することにした。

2) 有機ヒ素化合物については、現時点では全てのピークを同定することができず、また定量値の品質も十分に保証できないと判断し、今年度の検討としては無機ヒ素のみを分析対象とし、有機ヒ素化合物を分析対象としないことにした。

上記の判断に基づき、これより先には、無機ヒ素の As(III)と As(V)の検討結果についてのみ述べる。

C.D. 1-2 分析法の真度と併行精度の推定

SEMP の 1~14 群試料を 5 点併行で

分析した結果から分析法の真度と併行精度を推定した。その結果、全群の As(III)並びに As(V)の組み合わせを通じて、併行精度は 0.4~18%(RSD%)、As(III)分析時の真度は 42~186%、As(V)分析時の真度は 14~163%と推定された。また全群を通じ、添加した As(III)と As(V)の量の和を真値とし、これと As(III)と As(V)分析値の和との比較から推定した真度は 91~108%であった。以上の結果から、開発した分析法の性能は、As(III)と As(V)別の定量を目的とすると TD 試料の全群を通じて十分でないと評価した。しかし、As(III)と As(V)の量の和を無機ヒ素量として定量することが可能な分析法であると判断した。

検討 2) LC-MS/MS を用いた有機ヒ素化合物の化学形態別分析法の開発

C.D. 2-1 MS/MS 条件の検討

各有機ヒ素化合物の標準溶液を直接 MS/MS に注入し、測定条件を検討した。イオン化法は ESI、測定モードはポジティブモードを選択した。SCAN 測定(m/z 50-500)により得られたマススペクトルに基づきプレカーサーイオンを選択し、測定機器の感度が最大になるように、オリフィスプレートの電圧(DP)を最適化した。また、MRM モードの測定でのモニターイオンは、コリジョンエネルギー

の電圧(CE)を変化させ高い感度が得られたプロダクトイオンのうち最も高い S/N が得られたプロダクトイオンから 2 つ選択し、それぞれ定量イオンと定性イオンとした。

C.D. 2-2 HPLC カラムの検討

LC-MS/MS では、質量数による選択が可能であるため、各ヒ素化合物を完全に分離させる必然性は小さくなる。しかし、機器の汚染等を避けるために検出器への導入を避けたい試料に由来する塩などの共存物質と分離する程度には、分析対象とする有機ヒ素化合物がカラムに保持される必要がある。そこで、数種類の HPLC カラムを検討し、有機ヒ素化合物の HPLC カラムへの保持や分離の程度を検討した。当初、HPLC カラムには ODS 系カラムやポリマー系逆相カラムを、移動相にはこれらカラムを用いた HPLC に一般的に使用される酢酸アンモニウム、ギ酸・メタノール(もしくはアセトニトリル)混液を用いて検討した。しかし ODS 系カラムへの保持は確認されず、ポリマー系逆相カラムでは弱い保持が確認されただけであった。その他、p-HILIC カラムを用いた検討も行ったが、全ての有機ヒ素化合物を保持させることはできなかった。そこで、4種の有機ヒ素化合物を保持することが報告されているポリマー系のイオン交換カラムである HAMILTON 社製

PRP-200 並びに SHODEX 社製の NN-414 を選択し、硝酸系の移動相を用いて検討した結果、各有機ヒ素化合物が各カラムに適切に保持されることを確認した。

以上の結果から、入手のし易さなども考慮し、NN-414 を HPLC 用カラムとして用いることにした。

C.D. 2-3 HPLC 条件の最適化

選択した HPLC カラムでの有機ヒ素化合物の分離を最適化するため、移動相の塩濃度(硝酸アンモニウム濃度)を検討した。移動相に 5 mM 硝酸、0~20mM 硝酸アンモニウムを用いた場合の、各有機ヒ素化合物の HPLC カラムへの保持時間を調べた。その結果、硝酸アンモニウム濃度を高くすると有機ヒ素化合物の保持が弱くなる傾向が認められ、この傾向は有機ヒ素化合物の種類に依存しないことが明らかとなった。一方、硝酸アンモニウム濃度によらず TMAO、TeMA、AsC を完全に分離することはできなかった。これらの結果に基づき、移動相の組成を有機ヒ素化合物の分離効率が最大であると考えられた 5 mM 硝酸、6 mM 硝酸アンモニウムに設定した。

E. 結論

研究 1: 摂取量推定に使用可能なヒ素の化学形態別分析法の開発

昨年度に検討したヒ素の化学形態別の測定法に、各種ヒ素化合物の試料からの抽出法を組み合わせ、ヒ素の化学形態別分析法を構築した。また、その性能を添加試料の分析結果から評価した。その際、未知の有機ヒ素化合物が検出されたこと等により、現在の分析法では、有機ヒ素化合物の正確な定量は困難であることが判明した。無機ヒ素の分析については、価数の変換が生じたことを原因とし、3 価と 5 価のヒ素を独立して定量するには十分な性能を確認できなかったが、3 価と 5 価のヒ素の量の和を無機ヒ素量とすれば、十分な性能で分析できることを確認した。今後は未知の有機ヒ素化合物の同定と分別定量に焦点を合わせ、摂取量推定を目的としたより精密な化学形態別ヒ素化合物の分析法の開発検討を継続する。

検討 2) LC-MS/MS を用いた有機ヒ素化合物の化学形態別分析法の開発

6 種の有機ヒ素化合物を分析するための LC-MS/MS 条件を検討した。その結果、HPLC 条件と MS 条件が最適化され、各有機ヒ素化合物が適切に測定できることを確認した。今後、MS/MS だけでなく TOF-MS を用いた測定条件の検討、標準品がない有機ヒ素化合物の同定等を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、これらの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が、分析法が煩雑で費用が高価であることから、簡易分析法の提案もなされている。例えば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シル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し、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る。一方で、AhR は一部 PAHs やその他の植物性食品成分をリガンドとし活性化されることが報告されているがその詳細についてはごく一部が明らかにされているのみである。

バイオアッセイは迅速で低廉であり、仮に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開発されそれを用いて総合的なリスク管理値のような指標が設定できれば、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。またバイオアッセイを食品分析に適用するならば、目的とする有害物質以外の化学物質による結果への影響も把握する必要がある。

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。また一部の食品成分との相互作用について報告があるが、まだ未解明な部分も多い。本研究ではその初期段階として、DXNs 様活性を有する物質の探索及び活性と物質の構造関連の

解明を試みる。

H25年度はデータの乏しい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(ケイラックスアッセイ)により評価した。今年度は、H25年度の結果から明らかになった AhR 活性物質を中心に、評価の信頼度を確保することを目的とし、複数の評価系を使って比較検討を行った。また H25年度に実施した研究を継続させ、PAHs 検出の報告がある食品(かつお節、紅茶)の抽出物について、カラムクロマトグラフィーを用いた分画を行い、各分画物の AhR 活性を測定した。さらに、野菜や果物を中心とした食品試料(39種類)について抽出物を調製し、未検討である酵母を用いたアッセイにより AhR 活性を評価した。

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)

: benzo[*c*]fluorene,
1,2-benzanthracene
(benzo[*a*]anthracene),
chrysene,
benzo[*b*]fluoranthene,

benzo[*k*]fluoranthene,
benzo[*j*]fluoranthene,
benzo[*a*]pyrene,
indeno[1,2,3-*c,d*]pyrene,
dibenzo[*a,i*]pyrene, dibenzo[*a,h*]pyrene,
7-nitrobenzo[*a*]anthracene,
6-nitrobenzo[*a*]pyrene,
2-chloronaphthalene,
1,4-dichloronaphthalene,
1-aminonaphthalene, naphthalene(いずれも関東化学製)を用いた。

農薬、アミノ酸、天然由来成分：
carbendazim, thiabendazole(いずれも関東化学製)、tryptamine, evodiamine(いずれも和光純薬工業製)、imperatorin, daidzein, tectochrysin(いずれもフナコシ製)を用いた。

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。その他の試薬は特級又は高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

食品試料(アーモンド、あずき、アスパラガス、えのきたけ、オクラ、カキ、カボチャ、キウイ、キャベツ、くるみ、グレープフルーツ、ゴボウ、ゴマ、こまつな、さつまいも、ししとうがらし、ブナシメジ、ショウガ、セロリ、ダイズ、大葉、タケノコ、トマト、ナス、ニラ、ニンニク、ネギ、ハクサイ、パセリ、ピーマン、ブロッコリー、ミカン、みつば、もやし、ユズ、ラッカセイ、リンゴ、レタス、レモン)について

はいずれも市販のものを用いた(26年10月に入手)。かつお節、紅茶については、H25年度に抽出したのものを用いた。各分画物の調製は以下の通りで、得られた画分を試料として用いた。

かつお節：かつお節(10.1 g)を80%エタノール(50 mL)でホモジナイズ後、ろ過し、ろ液を濃縮して抽出物(1.6 g)を得た。抽出物を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し、エタノールに不溶な沈殿部を含めて6画分(Fr. 1~6)を得た。

紅茶：紅茶(11.0 g)を80%エタノール(50 mL)でホモジナイズ後、ろ過し、ろ液を濃縮して抽出物(787.8 mg)を得た。抽出物を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し、エタノールに不溶な沈殿部を含めて8画分(Fr. 1~8)を得た。

活性評価には、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、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。酵母によるアッセイは、CROMIS AhR(長瀬産業)を使用した。

2. 使用機器及び分析条件

マイクロプレートリーダーは Enspire(Perkin Elmer 社製)又は Infinite F200(TECAN 社)を使用した。

逆相 HPLC は、Shimadzu Prominence システム(島津製作所)を使用した。測定条件は下記のとおり。カラム：L-column ODS(2.1 I.D. × 150 mm)(化学物質評価研究機構)、カラム温度：40°C、流速：0.3 mL/min、測定波長：200-400 nm、移動相：(A)5%酢酸及び(B)アセトニトリル〔濃度勾配条件(B in A)：0→30 min(0→50%)、30→35 min(50→85%)、35→40 min(85%)、40→50 min(85→90%)、50→55 min(90→100%)、55→60 min(100%)〕。

3. 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、ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2 を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2 は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流域に4個のダイオキシン応答配列 DRE を含むシトクロム P450(CYP1A1) プロモーターを持つプラスミド pGudLuc6.1 をマウス肝ガン細胞 Hepa1c1c7 に導入した細胞)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ダイオキシン類応答性組換え細胞 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。

ヒト由来組換え細胞によるアッセイ:ダイオキシン類応答性組換え細胞 101L は、3 個の生体異物応答配列 XRE を含むヒト CYP1A1 プロモーターにホタルのルシフェラーゼ遺伝子と融合したプラスミドをヒト肝がん細胞由来 HepG2 に導入した細胞で、本細胞をアッセイに使用した。主な方法はケイラックスアッセイに準じた。

酵母によるアッセイ:キットのプロトコールに準じて行い、吸光度を活性値とした。

すべて測定は 2~3 回行い、その平均値をデータとして求めた。

C. 研究結果及び考察

1. 評価法の比較

PAHs 等、19 種の化合物及び食品抽出物(ウイスキー、紅茶、かつお節)について、ケイラックスアッセイとヒト由来組換え細胞(101L 細胞)による方法を比較した。その結果、ケイラックスアッセイのマウス由来細胞とヒト由来 101L 細胞では、感度に差があるものの、ケイラックスの細胞で活性が認められるものは 101L 細胞でも活性があり、ほぼ同じ挙動を示す傾向が確認された。環境汚染物質に対してはマウスの方がヒトより感受性が高い傾向が認められ、一方、食品抽出物ではほぼ同等であった。これは環境汚染物質の場合、単に化合物を取り込み代謝する一方、食品抽出物は複合物であるため、それ以外の要因も考えられ、その影響と考察されるが、今後の検討が必要とされる。

benzo[b]fluoranthene、dibenzo[a,e]pyrene、7-nitrobenzo[a]anthracen に加え、これまでケイラックスアッセイで活性が認められている天然由来成分 evodiamine、imperatorin、daidzein、tecto-chrysin について、酵母による評価系を用いて評価した。供試した化合物のうち、dibenzo[a,e]pyrene はケイラッ

クスアッセイにおいて活性が弱かったもので、比較のため試験に供した。その他のものはケイラックスアッセイで活性が認められたものである。

Dibenzo[*a,e*]pyrene の結果は、高濃度領域で活性はわずかであり、ケイラックスアッセイでの結果と同じ傾向であることが示された。一方、その他大半の化合物については本アッセイにおいても活性が認められた。これまでの検討で、daidzein についてはケイラックスアッセイでは顕著な活性が認められるが、本アッセイでは活性が認められなかった。Daidzein は大豆イソフラボン的一种で、植物エストロゲンとして知られている化合物である。酵母と細胞を使用した方法での違いの影響と考察されるが、単一化合物による評価で細胞のみに活性が認められることは、AhR 以外の要因により活性を示すことが示唆される。さらに、食品試料(ウイスキー、紅茶、かつお節)についても検討した。その結果、いずれも濃度依存的に活性が認められ、ケイラックスアッセイと同じ傾向の結果が得られ、いずれの評価法においても同じ傾向の結果が得られることが確認できた。

以上の結果から、活性の強弱や感度には違いはあるが、いずれのアッセイにおいても活性の有無についてはほぼ同じ傾向を示しており、現在のところ、

本評価においては感度や既存データが多いケイラックスアッセイにより測定することで対応できることが示された。

2. 食品試料分画物の評価

H25 年度の結果、活性を示した食品試料(かつお節、紅茶)について、活性成分を解明する目的で、カラムクロマトグラフィーによる分画を行った。各抽出物を Sephadex LH-20 に付し、かつお節抽出物については 6 画分、紅茶抽出物については 8 画分に分けた。得られた画分をケイラックスアッセイ及び酵母によるアッセイにより評価した。その結果、両食品試料ともいずれの画分においても活性が認められた。かつお節をみると、ケイラックスアッセイにおいては Fr. 2~5、酵母によるアッセイにおいては Fr. 2~6 に顕著な活性が認められた。一方、Fr. 1 はいずれも活性が弱く、ほぼパラレルな結果が得られた。今後、活性成分について検討する予定である。

紅茶では、ケイラックスアッセイにおいては Fr. 3、6、7 が活性を示し、特に Fr. 3 の活性が強かった。酵母によるアッセイにおいては Fr. 1~3 に活性がみとめられ、特に Fr. 2 の活性が強く、両者の活性に違いが認められた。これは、酵母と細胞による違いから、紅茶に共存する成分との相互作用が両者で異なること等が考えられる。

3. 食品試料における測定

その他の食品について、酵母によるアッセイでの評価は未検討であったため、39種の食品試料について AhR 活性を測定した。その結果、いずれの食品試料も弱いながら AhR 活性を示すものが多く、特に大葉、ブロッコリー、パセリ、もやし、次いでアズキ、ゴマ、コマツナ、タケノコ等に活性が認められた。ブロッコリーやパセリ等はケイラックスアッセイでも活性を示しており、ほぼ同様の傾向が確認された。

D. 結論

食品中の AhR 相互作用(DXNs 様活性)物質について、H25 年度に実施したケイラックスアッセイによる方法とは別のアッセイ(ヒト由来組換え細胞によるレポータージーンアッセイ及び酵母を用いたアッセイ)による評価を行い、データを比較した。その結果、一部の化合物で活性の有無に違いが認められたが、その他については検出感度の違いが認められるものの、活性の有無についてはほぼ同じ傾向が示された。また食品(かつお節、紅茶)の抽出物について、カラムクロマトグラフィーを用いた分画を行い、各分画

物の AhR 活性を測定した。かつお節抽出物については 6 画分に分け、そのうち、4~5 画分が活性を示し、その 2 画分は特に顕著な活性を示した。紅茶抽出物については 8 画分に分け、そのうち 3 画分が活性を示し、特に 1 画分の活性は顕著であった。それらに寄与する化合物については引き続き精査中する予定である。また、食品については酵母によるアッセイでの評価は未検討であったため、39種の食品試料について、AhR 活性を測定した。その結果、いずれの試料も弱いながら AhR 活性を示すものが多く、特に大葉、ブロッコリー、パセリ、もやし、次いでアズキ、ゴマ、コマツナ、タケノコ等に活性が認められ、ケイラックスアッセイによる結果とほぼ同様の傾向であることを確認した。

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学物質や化合物が含まれ、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。意図的に使用されるもの(食品添加物や残留農薬)についてはほとんどの国で許認可制をとっており、安全性に関する情報を吟味してリスクが管理されている一方、非意図的に食品に含まれる汚染物質については情報が少なくリスクの高いものもある。これまで安全性に関する情報が比較的多くあり安全であるとみなせる量が設定できるものについては TDI を設定してそれ以下であることを確保することが定法として行われてきたが、ここ 10 年ほどは遺伝毒性発がん物質のように安全と見なせる量が設定できないものや TDI を設定するには安全性に関するデータが不足しているもの場合には暴露マージン(MOE)を用いて評価するようになってきた。つまり MOE を用いて評価せざるを得ないものの中にはリスク管理の優先順位の高いものがある可能性がある。そこで

各国の食品安全機関による MOE 評価の結果を収集した。

B. 研究方法

世界各国の食品安全担当機関によるリスク評価の結果から MOE で評価されているものを抽出した。

C. 結果及び考察

遺伝毒性発がん物質については MOE の値 10000 を一つの目安としてそれより小さい値のものから優先的に対策を講じる必要があるとみなされる。遺伝毒性発がん性以外の毒性についてはデフォルトの安全係数 100 をひとつの目安とするがケースバイケースで判断する。

遺伝毒性発がん物質については多くの国でヒ素(無機ヒ素)とアクリルアミドが優先的に対策すべきものと評価されている。2015 年にスペインのカタルーニャ州が食品からの暴露量を以前(2012 年)より詳細に評価した結果、推定暴露量が減り MOE の値がやや大きくなったと報告しているがそれでも一桁から最大でも 200 未満であり優先順位の高いままである。

近年関心が高くなってきているものとしてはピロリジジナルカロイ

ドがある。もともとピロリジジナルカロイドがある種のハーブサプリメントやハチミツ等に含まれていることは知られていたが、最近の関心はハーブティーであり、その場合摂取量が多い集団がある可能性がある。欧州ではお茶として販売されているものからの検出が報告されていることもあり、実態調査が求められている。カルバミン酸エチルについては欧米で実態調査が進み、酒類中濃度の規制値設定などの削減対策がとられてきたが近年は香港や韓国などで関心が高く対策がとられるようになってきた。

遺伝毒性以外の毒性については鉛が優先的に対策すべきものと評価されている。ニッケルのアレルギー誘発性については MOE 10 以下を目安としたうえで一部のヒトにとってリスクとなる可能性があるとして評価されている。ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) については MOE 2.5 を目安としたうえで、同様に欧州の一部のヒトにとってリスクとなる可能性があるとして評価されている。

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

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とする行政施策における規格値等の設定及び、設定後の経過を継続的に監視することを通じた施策効果検証の科学的根拠となる。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、国民の関心への答えでもある。従って、健康危害リスクの大きさを踏まえ、懸念の蓋然性が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)摂取量推定の実施の判断に必要な有害物質濃度の実態等の調査に区分し、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：健康危害リスクが懸念される蓋然性の高い有害物質として、鉛、カドミウム、ヒ素(総ヒ素並びに無機ヒ素)、水銀(総水銀並びにメチル水銀)を含む元素類及び 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全国平均摂取量を推定した。また、一部有害物質については、全国平均摂取量の他に、一地域に限定して幼児(1~3 歳児)における摂取量を推定し、当該地域における全年齢層平均摂取量との比較を初めて実施した。さらに、低濃度ながらも含有実態が明らかとなった臭素系難燃剤(ヘキサブロモシクロドデカン)及び塩素系難燃剤(デクロランプラス)の摂取量推定を試行した。2)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：EU 等の一部の国においては既に規制がされている多環芳香族炭化水素類(PAHs)、生物の代謝により生じ毒性が懸念されている水酸化 PCBs を対象に食品の濃度実態等を調査した。

・有害物質摂取量推定研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所食品部

片岡洋平、林 智子、林 恭子、堤 智昭、植草義徳、高附 巧、五十嵐敦子、松田りえ子、

手島玲子

北海道立衛生研究所

平間祐志、高橋哲夫、林 玲子

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

村木沙織

福井県衛生環境研究センター

五十嵐麻衣

名古屋市衛生研究所

中島正博、加藤陽康、高木恭子、谷口 賢

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

上田淳司、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

福岡県保健環境研究所

高橋浩司、安武大輔、宮脇 崇

・有害物質実態調査研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所食品部 堤 智昭、足立利華、松田りえ子

福岡県保健環境研究所 安武大輔、堀 就英、高橋浩司

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とする行政施策における規格値等の設定及び、設定後の経過を継続的に監視することを通じた施策効果検証の科学的根拠となる。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、国民の関心への答えでもある。従って、健康危害リスクを踏まえ、懸念の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第一に必要である。

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)摂取量推定の実施の判断に必要な有害物質濃度の実態等の調査に大きく区分し、研究を実施した。信頼性の高い摂取量推定値を得るために不可欠であることから、昨年度検討した分析法の妥当性確認を含む分析結果の品質保証スキームは、本年度研究の実施に当たっても同じ水準を維持した。本分担課題報告書では、研究 1)について、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 2)について、有害物質濃度実態調査の部として報告する。

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-元素類及び PCBs 摂取量の推定-

研究要旨

1)各種有害物質の全国平均摂取量の推定：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(TD)試料の分析を通じ、健康危害リスクが懸念される蓋然性の高い有害物質として、鉛、カドミウム、ヒ素(総ヒ素並びに無機ヒ素)、水銀(総水銀並びにメチル水銀)を含む元素類及び PCBs の全国平均摂取量を推定した。その結果、元素類の全国平均摂取量は B:1292 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Al:2453 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Ni:140 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Se:91.6 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Cd:19.3 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Sb:1.38 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Ba:442 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Pb:7.82 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、U:1.16 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Sn:133 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Cr:20.9 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Co:7.67 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、Mo:216 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ と推定された。総ヒ素と無機ヒ素の全国平均摂取量は、それぞれ 215 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、19.3 $\text{ng}/\text{man}/\text{day}$ と推定された。総水銀とメチル水銀の全国平均摂取量は、それぞれ 8.53 $\mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 、6.52 $\text{ng}/\text{man}/\text{day}$ と推定された。PCBs の全国平均摂取量は、488 $\text{ng}/\text{man}/\text{day}$ 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 70%を筆頭に、メチル水銀が 57%、Se、Cd、Ba が 30%以上、B、Al が 15%以上、U が 10%以上となった。

2)特定地域における全年齢層平均摂取量と幼児摂取量との比較：2013 年度と 2014 年度に特定 1 地域で調製した TD 試料の分析を通じ、一部元素及び PCBs の全年齢層平均摂取量と幼児(1~3 歳児)における摂取量とを推定し比較した。その結果、体重当たりの摂取量としてみた場合には、総じて幼児摂取量が全年齢層平均摂取量を上回った。

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、松田りえ子、手島玲子
北海道立衛生研究所	平間祐志、高橋哲夫、林 玲子
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	村木沙織
福井県衛生環境研究センター	五十嵐麻衣
名古屋市衛生研究所	中島正博、加藤陽康、高木恭子、谷口 賢
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	上田淳司、安永 恵

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とした。有害物質には、過去の研究成果や耐用摂取量(TDI)が設定されていることを指標に、鉛、カドミウム、ヒ素(総ヒ素並びに無機ヒ素)、水銀(総水銀並びにメチル水銀)を含む元素類及び PCBs を選定した。なお、無機ヒ素摂取量は、本研究班片岡分担課題の成果として分析法が開発されたことを受け、当研究班においては初めて推定した。鉛、カドミウム、ヒ素、水銀を含む元素類及び 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。本 TD 研究では、全国 11 カ所の地域で TD 試料を調製し、その分析を通じて各種元素類及び PCBs の全国・全年齢層平均摂取量を推定した。また、本研究班松田分担課題の成果として調製された幼児用 TD 試料の分析を通じ、幼児における一部元素類及び PCBs 摂取量を推定した。

B. 研究方法

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。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、TD 試料の調製は、全国 11 カ所の衛生研究所等で行った。試料は 2014 年 4 月から 10 月までの間に調製された。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。この集計では、年齢を要素としていない。そのため、該当する地域における各食品の全年齢層平均摂取量が集計結果となる。各地域の担当者は、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、該当する地域における 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された。全ての分析は、国立医薬品食品衛生研究所で実施した。

その他、本研究班松田分担課題の成果として、幼児(1~3歳児)における食品の摂取量を集計した結果に基づき、国立医薬品食品衛生研究所において上記と同様の手法を用いて幼児用 TD 試料が調製された。2013年並びに2014年の2カ年にわたり調製された幼児用 TD 試料の分析を通じ、幼児における一部元素類及び PCBs の摂取量を推定した。

2. 分析

元素類の一斉分析、メチル水銀の分析また異性体別 PCBs の分析には、昨年度報告した方法を用いた。元素類一斉分析法の対象元素は、以下の14元素である。ホウ素(B)、アルミニウム(Al)、クロム(Cr)、コバルト(Co)、ニッケル(Ni)、総ヒ素(total As)、セレン(Se)、モリブデン(Mo)、カドミウム(Cd)、スズ(Sn)、アンチモン(Sb)、バリウム(Ba)、鉛(Pb)、ウラン(U)。

元素類の一斉分析法では、環境からの元素類の持ち込み量を減らし分析結果の品質を向上させること及び、容器の洗浄等をより迅速に行うことで分析効率を向上させることを目的として、試料の分解に石英セルを用いる手順を新たに導入した。また、異性体別 PCBs 分析法では、GC による分離に使用するカラムが劣化したため交換

した。これらの新たな手順の導入やカラム交換により変化する可能性があったことから、検出下限(LOD)や定量下限(LOQ)を再推定した。元素類一斉分析法及び異性体別 PCBs 分析法の LOD と LOQ を表 1 並びに表 2 に示す。表 1 には、下記する総水銀分析法とメチル水銀分析法及び、無機ヒ素分析法の LOD と LOQ の値を含めた。

本年度から、新たに水銀計を用いた方法による総水銀分析と HPLC-ICP-MS 法による無機ヒ素分析を実施した。HPLC-ICP-MS 法の詳細及びその性能評価結果は、当年片岡分担課題の研究報告書により報告されている。新たに開発し導入した分析法のうち、総水銀分析法の概要のみを下記する。

総水銀分析法

2-1. 試薬・試液

分析に使用した主たる試薬を以下に示す。

- ・L-システイン塩酸塩一水和物：L-システイン塩酸塩一水和物(特級)(和光純薬社)
- ・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)
- ・添加剤 B:活性アルミナ(日本インストルメンツ社)

・添加剤 M: 炭酸ナトリウムと水酸化ナトリウムを体積比 1:1 で混合したもの(日本インスツルメンツ社)

・標準原液: ICP-MS 用 1000 mg/L 水銀標準原液(シグマアルドリッチ社)

・0.001% L-システイン溶液: L-システイン塩酸塩一水和物 14.5 mg を量りとり、水 900 mL、硝酸 2 mL を加え溶解後、水で 1000 mL に定容した。

・添加用標準溶液: 標準原液を 0.001% L-システイン溶液で希釈し、100 ng/mL 並びに 2 ng/mL の溶液を調製した。

2-2. 機器及び器具

・総水銀計: マーキュリー/MA-2000 (日本インスツルメンツ社)

・セラミック製サンプルポート(日本インスツルメンツ社)

2-3. 測定条件

加熱モード: 装置にあらかじめプログラムされている加熱モードのうち、標準溶液及び 14 群試料の測定には MODE 1、14 群以外の試料の測定には MODE 3 を選択した。

測定モード: 装置にあらかじめプログラムされている測定モードのうち、標準溶液及び水銀濃度が 0.01 mg/kg 未満の試料の測定には LOW モード、水銀濃度が 0.01 mg/kg 以上の試料の測定には HIGH モードを用いた。

2-4. 分析前の準備

・添加剤 B 及び添加剤 M: 使用する直前に 750°C で 5 時間加熱した。

・サンプルポート: 5M 硝酸溶液に 12 時間以上浸け置きした後、水でよくすすぎ、使用する直前に 750°C で 5 時間加熱した。冷却後、総水銀計により 800°C で 4 分間再加熱した。

2-5. 分析法

測定試料の調製

標準溶液は、100 µL をサンプルポートに直接量り取り、測定試料とした。

食品試料は、100 mg をサンプルポートの底面に配した添加剤 M の上に配し、さらに添加剤 M、添加剤 B、添加剤 M の順に重層して測定試料とした。サンプルポートの底面から添加剤 M、添加剤 B、添加剤 M の順に重層して空試料とした。

検量線の作成

標準原液を適宜量りとり、0.001% L-システイン溶液で希釈し、検量線用標準溶液とした。各検量線用標準溶液を総水銀計で測定し、得られた吸光度の水銀量に対する一次回帰式を最小二乗法により求め、検量線とした。各検量線用標準溶液中の水銀量は 0.1、0.25、0.5、0.75、1 ng (LOW モード時)、または 1、5、10、15、20 ng (HIGH モード時)とした。

測定及び総水銀濃度の算出

各測定試料を総水銀計にセットし、

測定値(吸光度)を得た。次いで、作成した検量線の各パラメーターを用いて下式に従い、試料の総水銀濃度を逆推定した。

$$\text{測定試料の総水銀濃度 (mg/kg)} \\ = \{(\text{Signal}_{\text{analyte}} - \text{intercept}) / \text{slope}\} / 100$$

Signal_{analyte}: 測定値

Intercept: 検量線の切片

Slope: 検量線の傾き

$$\text{試料の総水銀濃度 (mg/kg)} \\ = (\text{測定試料の総水銀濃度}) - (\text{空試料の総水銀濃度})$$

なお、空試料の総水銀濃度は、空試料を5併行分析し得た濃度の平均値として1日ごとに求めた。

2-6. 総水銀分析法の LOD 及び LOQ

空試料の分析を32回実施し、得られた総水銀濃度の標準偏差(σ)を推定し、その3倍の値(3σ)をLOD、10倍の値(10σ)をLOQとして推定した(表1)。

2-7. SEMP を用いた性能評価

実際に食品試料に含まれている総水銀を分析する際の分析法の性能を評価するために、昨年度本研究班において開発したSEMP(Sample for evaluation of methods performance)を利用し総水銀を添

加した試料を調製の上、5併行分析した結果から併行精度と真度を推定した。

事前の分析結果から、SEMP 10群(魚試料)には比較的高い濃度で総水銀が含まれていることが明らかであったため、当該SEMPへの添加濃度は0.1 mg/kgとした。SEMP 10群を除くその他のSEMP(1~9群及び、11~14群)への添加濃度は0.002 mg/kgとした。

SEMPを用いた総水銀分析法の性能評価結果を表3に示す。

C. D. 結果及び考察

各種有害物質の全国平均摂取量の推定

MB方式により全国11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TD試料の各種(有害)物質濃度と、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。本年度から新たに推定を始めた、幼児(1~3歳児)における各種有害物質の摂取量(幼児摂取量)との区別を明確にするため、全国各地で調製した全年齢層を対象とするTD試料の分析結果に基づき推定された地域別摂取量の平均値を、全国平均摂取量とする。

昨年度報告書で言及したとおり、TD試料は、その地域に流通している多数の食品をある時点で買い上げ組み合わせて調製される日常食のモデルであるため、一地域だけに調製を限定しても、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になる。つまり、ある特定地域で調製された一組のTD試料が、その