

た。

$$MOE = \text{毒性の参照値} / \text{摂取量}$$

C. 結果及び考察

表 1 は計算に用いた摂取量である。この値は 11 機関の参加したマーケットバスケット方式による推定値である。調査方法は、各機関により地域の食品摂取量にあわせて軽度の調理を施した食品を 14 群に分けて混合し混合した試料を国立衛研に集めて分析した。2013-2015 年度の 3 ヶ年分で 2013 年度のみ参加機関は 10 である。地域ごとの有害元素の摂取量の推定値にほとんど地域特性が観察されなかったため、地域別の検討は行わず全ての値の平均値と最大値を用いた。検出限界以下は 0 とみなした。単位は体重を 50kg と仮定しての $\mu\text{g/kg bw/day}$ である。

表 2 に毒性の参照値とその出典を示した。

各種元素の MOE 試算値

ホウ素

平均摂取群 (28.1)	最大摂取群 (37.1)	POD
14	11	ヒトの耐容上限摂取量 (400)
341	259	ラット胎仔の体重減少の NOAEL (9600)

動物を用いた毒性試験で胎児の体重減少については NOAEL 9.6 mg/kg/d と BMDL₀₅ : 10.3 mg/kg/d の二つの近い値があったため、小さい方を採用した。MOE は平均でも最大でも 100 以上なので安全上の懸念とはならない。

耐容上限摂取量は栄養素としてのミネラルを考えた場合の指標であり、この値を超えなければ問題は無いというもので特に MOE を計算する必要は無いが参考までに加えた。

アルミニウム

これらの値から MOE を試算した。以下個別の元素毎に記載する。摂取量、毒性影響の指標となる値 (Point of Departure: POD) の単位は全て $\mu\text{g/kg bw/day}$ である。

略語

NOAEL : No Observed. Adverse Effect Level. 無毒性量.

LOAEL. : Lowest Observed. Adverse Effect Level. 最小毒性量

BMDL : ベンチマーク用量の 95%信頼下限値

TWI : tolerable weekly intake 耐容週間摂取量

EFSA : European Food Safety Authority
欧州食品安全機関

EPA : US Environmental Protection Agency
米環境保護庁

平均摂取群 (70.8)	最大摂取群 (463.2)	POD
706	108	マウス LOAEL (50000)

POD はマウスの握力低下や体重減などで、最大摂取群でも MOE は 100 を超えている。

ニッケル

平均摂取群 (2.9)	最大摂取群 (4.5)	POD
97	62	ラット移植胎児消失の BMDL ₁₀ (280)
0.38	0.24	ヒト経口暴露後の接触性皮膚炎の BMDL ₁₀ (1.1)

一般的な毒性に関する MOE は平均摂取群では約 100 で最大摂取群でも 62 と 100 より小さい値であるが POD の指標が移植胎児の消失なので妊娠初期でなければ懸念とはならない。アレルギー性の接触性皮膚炎を指標とした場合には MOE は普通の食事で 1 より小さくなる。アレルゲンとなる食品に関しては大抵 MOE は 1 より小さくなるのでこれだけでニッケルをリスクが高いとみなすことはない。食品安全上の懸念というよりもアレルギーを誘発するようなニッケル製アクセサリなどを身につけるのは、特にアレルギーの既往症や家族歴があるような人では避けた方が良いという注意喚起である。

セレン

平均摂取群 (1.8)	最大摂取群 (2.0)	POD
8	8	セレン中毒の NOAEL (15)
0.56	0.50	成人の適切摂取量 (1)

セレンはヒトの必須微量元素で欠乏症もあるが中毒の報告もあり、安全域が比較的狭い。しかし平均摂取群と最大摂取群に摂取量の差はほとんどないことから、通常の食生活で著しい摂りすぎになることはないと考えられる。必要量は摂れているようなので特に欠乏する心配は無いようである。むしろセレンサプリメントなどは必要ないと明確に言える。

カドミウム

平均摂取群 (0.37)	最大摂取群 (0.65)	POD
27	15	尿タンパク、EPA の NOAEL (10)

3.8	2.1	尿タンパク、EFSA の TWI のもとになった値 (1.40)
5.4	3.1	尿タンパク、食品安全委員会のヒト健康に悪影響を及ぼさない量 (2)

ヒトでの腎機能障害（尿中タンパク質量が一定以上になる）をエンドポイントとしていくつかの機関により若干異なる毒性学的参照値が提案されている。どの値を用いても比較的数字は小さく、リスク管理の優先順位としては高いほうである。ヒトのデータがもとになっているため、動物実験で得られた毒性学的参照値よりは不確実性が小さくなるため数値が小さくても許容できるという判断も可能ではある。

アンチモン

平均摂取群 (0.03)	最大摂取群 (0.20)	POD
11667	1750	寿命、血糖、コレステロールの LOAEL (350)

特に明確な毒性影響が知られていないため、漠然としたエンドポイントであるが暴露マージンは大きく、懸念とはならない。

バリウム

平均摂取群 (9.2)	最大摂取群 (15.1)	POD
6848	4172	腎症の BMDL ₁₀ (63000)

MOE は最大摂取群でも 4172 と大きく、健康上の懸念とはならない。

鉛

平均摂取群 (0.20)	最大摂取群 (0.71)	POD
2.5	0.7	発達神経毒性の BMDL ₀₁ (0.5)
7.5	2.1	血圧の BMDL ₀₁ (1.5)
3.2	0.9	慢性腎疾患の BMDL ₁₀ (0.63)

鉛の健康影響のうち、発達神経毒性については特に子どもの知能への不可逆的影響であるため、遺伝毒性発がん物質と同様に安全とみなせる量は存在しないと考えられている。ただしあてはまるのは発育中の子どものみである。この摂取量は特に子どもを対象に評価

したものではないが、そのままの値を使用した。一般論として子どもは体重あたりのエネルギー必要量が大人より多いため、食品由来の有害物質暴露量は成人より多くなることが多い。MOE は平均摂取群で 2.5、最大摂取群では 0.7 と 1 より小さく、これは鉛による有害影響が出ている可能性を否定できないため、リスク管理の優先順位は高い。血圧上昇と慢性腎疾患をエンドポイントとした場合の MOE についても一桁未満であり、成人においてもリスク管理の優先順位は高い。なお鉛の暴露源は食品以外に大気と土壌（埃など）と水（鉛の水道管）があり、特に子どもでは土壌由来が無視できない場合がある。

ウラン

平均摂取群 (0.02)	最大摂取群 (0.05)	POD
3000	1200	ラット腎毒性の LOAEL (60)

ウランの食事からの摂取による MOE は最大摂取群でも 1000 以上あり、安全上の懸念とはならない。ただしウランは地域により水に含まれるため飲料水からの暴露のほうが多い。

ヒ素

総ヒ素としての毒性の参照値はない

無機ヒ素

平均摂取群 (0.35)	最大摂取群 (0.51)	POD
8.6	5.9	がん、JECFA の BMDL ₀₅ (3)
0.9	0.6	がん、EFSA の BMDL ₀₁ 下限 (0.3)
22.9	15.7	がん、EFSA の BMDL ₀₁ 上限 (8)

無機ヒ素は遺伝毒性発がん物質とみなされ、毒性のエンドポイントはヒトでのがんの発症率の増加である。地域により飲料水の濃度が高く疫学データの多くは水由来の暴露であるが食品由来の暴露でも同じ影響があるとみなされる。MOE は平均摂取群でも一桁未満と小さく、リスク管理の優先順位は高い。日本の場合飲料水由来のヒ素暴露はあまりないと考えられるが、コメに含まれる有機ヒ素のうちメチルアルシン酸は無機ヒ素と同様の発がん性が指摘されていることに注意が必要である。つまりコメを多く食べている場合、発がん性のヒ素の暴露量は無機ヒ素だけで計算すると過小推定になる可能性がある。なお FDA が 2016 年に発表した評価では無機ヒ素の有害影響として妊娠中の胎児への影響と小さな子

子どもの知能への影響を確度が高いとしているが用量反応関係についてのデータが不十分で POD や参照用量は導出できないと発表している。しかしながらアメリカ人のヒ素摂取量が子どもで成人より多いため、妊婦と乳幼児にコメ由来の無機ヒ素暴露量を減らすよう助言している。

無機水銀

平均摂取群 (0.17)	最大摂取群 (0.34)	POD
353	176	ラット腎毒性の BMDL ₁₀ (60)

無機水銀の暴露マージンは最大摂取群でも 100 を超える。

スズ

平均摂取群 (2.9)	最大摂取群 (22.6)	POD
11034	1416	ヒト食欲不振 (32000)

スズの明確な毒性影響は確認されていないが、報告されている中では食事中の濃度が 150mg/kg 以上で食欲不振という有害影響があったためそれを体重当たりの摂取量に換算して POD とした。MOE は 1000 を上回り安全上の懸念とはならない。

クロム

平均摂取群 (0.53)	最大摂取群 (0.94)	POD
539623	30426	Cr(III)のラット慢性毒性試験の NOAEL (286000)
377	213	Cr(VI)のラット血液病変の BMDL ₀₅ (200)
1887	1064	Cr(VI)のマウス腫瘍性病変の BMDL ₁₀ (1000)
208	117	Cr(VI)のマウス非腫瘍性病変の BMDL ₁₀ (110)

クロムは三価 Cr(III)と六価 Cr(VI)で毒性が大きく異なり、食品中に存在するのは主に Cr(III)である。ただし Cr(VI)と区別して測定してはいないので全てが Cr(III)であった場合と全てが Cr(VI)であった場合とを計算した。Cr(III)のみでは MOE は非常に大きな値となり安全上の懸念とはならない。仮に Cr(VI)が若干含まれていたとしても MOE はがん以外のエンドポイントでは最大摂取群でも 100 を超える。がんについても最大摂取群で全ての

クロムが Cr(VI)であるという現実的ではない仮定をした場合でも MOE は 1000 以上あり、リスクとなる可能性は低い。

コバルト

毒性参照値無し

モリブデン

平均摂取群 (4.3)	最大摂取群 (6.3)	POD
33	22	尿酸値増加の LOAEL (140)
0.2	0.2	適切摂取量 (1)

データがあまりなく、日本人の摂取量は欧州(成人1日あたり 58 µg/day から 157 µg/day)より多いようである。MOE は最大摂取群でもヒトでの有害影響の指標について二桁以上はある。

メチル水銀

平均摂取群 (0.13)	最大摂取群 (0.32)	POD
10.8	4.4	神経発達、EPA のハイエンド (1.4)
6.2	2.5	神経発達、EPA のローエンド (0.8)
9.2	3.8	神経発達、EFSA と食品安全委員会 (1.2)

メチル水銀に関しては妊娠中の母親の摂取による胎児の神経発達への影響が主なエンドポイントであるため、対象となるのは妊婦である(米国では幼児も対象になっているが日本では子どもは含まないとしている)。今回の摂取量推定は特に妊婦を対象にしたものではないが、計算された暴露マージンは 1 桁であった。従ってリスク管理の必要性があるが、妊婦に対してはメチル水銀の多い魚の摂取に関する助言というリスク管理対策が既にとられている。

以上の結果から、一般的な毒性については MOE 100 以下、遺伝毒性発がん物質あるいはその他の閾値のない毒性影響については MOE 10000 以下をリスク管理の優先順位が高いという判断基準を用いると、日本人にとってリスク管理の優先順位が高いのは、無機ヒ素、鉛、カドミウム、メチル水銀ということになる。このうちメチル水

銀に関しては既に対象集団への食事助言というリスク管理対策がとられている。カドミウムについても一定濃度以上のカドミウムを含むコメのリスク管理は行われてきた。これらの対策の有効性については継続的にモニタリングする必要がある。鉛とヒ素についてはカドミウムやメチル水銀よりリスク管理の優先順位は高いと考えられるがリスク管理対策についてはまだ不十分である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 畝山智香子、登田美桜：世界各国のトランス脂肪酸のリスク評価について，食品衛生研究, 65(11), 15-25, (2015)

2. 学会発表

なし

3. その他

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 日本人の有害元素の推定摂取量 (μ g/kg bw/day)

元素	平均値	最大値	データ数 n
ホウ素 (B)	28.1	37.1	32
アルミニウム (Al)	70.8	463.2	32
ニッケル (Ni)	2.9	4.5	32
セレン (Se)	1.8	2.0	32
カドミウム (Cd)	0.4	0.6	32
アンチモン (Sb)	0.03	0.2	32
バリウム (Ba)	9.2	15.1	32
鉛 (Pb)	0.2	0.7	32
ウラン (U)	0.02	0.05	32
ヒ素 (As)	4.3	8.1	32
無機ヒ素 (iAs)	0.3	0.5	22
水銀 (Hg)	0.2	0.3	32
スズ (Sn)	2.9	22.6	32
クロム (Cr)	0.5	0.9	32
コバルト (Co)	0.2	0.3	32
モリブデン (Mo)	4.2	6.3	32
メチル水銀 (MeHg)	0.1	0.3	32

表 2

POD (point of departure) MOE の計算に使用したもの

B
<p>・ NOAEL 9.6 mg boron/kg bw/d POD (μ g/kg bw/day) 9600 エンドポイント ラット生殖毒性試験での胎仔の体重低下、LOAEL 13 mg boron/kg bw/d 出典 EHC204 http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc204.htm EFSA 2004 EFSA http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/80</p> <p>・ UL 0.4 mg/kg bw/d POD (μ g/kg bw/day) 400 エンドポイント ヒトの耐容摂取量 出典 1998 EHC204 http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc204.htm</p> <p>・ BMDL05 : 10.3 mg/kg-day POD (μ g/kg bw/day) 10300 エンドポイント 胎仔の体重減少 出典 EPA IRIS http://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=410 Boron and Compounds CASRN 7440-42-8</p>
Al
<p>・ LOAEL 50 mg Al/kg bw per day 、 POD (μ g/kg bw/day) 50000 エンドポイント マウスの握力低下や体重減、不確実係数 100 で PTWI は 2 mg Al/kg bw 出典 JECFA 2011 "Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Seventy-fourth meeting, Geneva, 14-23 June 2011." http://www.fao.org/3/a-at873e.pdf</p>
Ni
<p>・ BMDL10 of 0.28 mg/kg b.w, POD (μ g/kg bw/day) 280 エンドポイント ラットの移植後の胎児ロス、TDI は 2.8 μg Ni/kg b.w. per day 出典 EFSA 2015 http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4002</p> <p>・ BMDL10 of 1.1 μg Ni/kg b.w POD (μ g/kg bw/day) 1.1 エンドポイント ヒトでの経口暴露後の接触性皮膚炎 出典 EFSA 2015 http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4002</p> <p>・ 吸入では発がん性があるが飲料水基準はない 1991 EHC 108 http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc108.htm</p>
Se
<p>・ NOAEL : 1.5 x10⁻² mg/kg-day POD (μ g/kg bw/day) 15 エンドポイント セレン中毒 (神経系、皮膚、血液学的)</p>

出典 EPA IRIS

http://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=472

・成人 Adequate Intake (AI) 70 µg/day POD (µ g/kg bw/day) 1

出典 EFSA 2014 <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3846>

欠乏症と毒性の両方があり実験により多様 1986 EHC58

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc58.htm>

Cd

・NOAEL : 1 x10⁻² mg/kg-day POD (µ g/kg bw/day) 10

エンドポイント ヒト尿タンパク

出典 EPA IRIS

http://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=141

・NOAEL 1.40 µg Cd/kg b.w POD (µ g/kg bw/day) 1.40

エンドポイント ヒト尿タンパク

出典 EFSA 2009 <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/980>

(TWI が 2.5 µg/kg b.w(0.36 µg Cd/kg b.w.,)調整係数 3.9 なので 0.36x3.9)

・14.4 µg/kg 体重/週 POD (µ g/kg bw/day) 2

エンドポイント ヒト尿タンパク

出典 食品安全委員会 2008

<https://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-gaiyou-cadmium.pdf>

・PTMI 25 µg/kg bw JECFA 2011

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v64je01.pdf>

Sb

・LOAEL : 3.5 x10⁻¹ mg/kg-day POD (µ g/kg bw/day) 350

エンドポイント 寿命、血糖、コレステロール

出典 EPA IRIS

https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=6

・ <http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid40.htm>

Ba

・BMDL05 : 63 mg/kg-day POD (µ g/kg bw/day) 63000

エンドポイント 腎症

出典 EPA IRIS

http://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=10

<p>・ 毒性の閾値 0.2-0.5 g、炭酸バリウムの最小毒性量 = 29 mg/kg、影響は筋虚弱など EHC107 http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc107.htm</p>
Pb
<p>・ BMDL01 0.50µg/kg b.w. per day POD (µ g/kg bw/day) 0.5 エンドポイント 発達神経毒性、血中鉛濃度 12µg/L (相当する食事からの摂取量 0.50µg/kg b.w. per day)); 出典 EFSA 2010 http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1570</p> <p>・ BMDL01 1.50µg/kg b.w. per day POD (µ g/kg bw/day) 1.5 エンドポイント 収縮期血圧, 血中鉛濃度 36 (相当する食事からの摂取量 1.50µg/kg b.w. per day); 出典 EFSA 2010 http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1570</p> <p>・ BMDL100.63µg/kg b.w. per day POD (µ g/kg bw/day) 0.63 エンドポイント 慢性腎疾患 BMDL10, 血中鉛濃度 15µg/L (相当する食事からの摂取量 0.63µg/kg b.w. per day). 出典 EFSA 2010 http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1570</p> <p>・ JECFA は PTWI 25 µg/kg bw だったものを取り下げ、閾値はないとした。 エンドポイント 0.3 µ g/kg bw /day で IQ 0.5 ポイント低下、0.02 µ g/kg bw /day で血圧 1 mmHg 上昇 出典 JECFA 2011 WHO Food Additives Series 64 http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v64je01.pdf</p>
U
<p>・ LOAEL 0.06 mg/kg b.w. per day POD (µ g/kg bw/day) 60 エンドポイント ラット腎毒性 出典 EFSA 2009 (WHO を継承) http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1018 (TDI 0.6 µg/k kg bw/day) 食品安全委員会 2011 (TDI 0.2 µg/kg b.w. per day, 安全係数 300)</p>
iAs
<p>・ BMDL0.5 (3.0 µg/kg bw per day) POD (µ g/kg bw/day) 3 エンドポイント 皮膚がん 出典 JECFA 2011 WHO Food Additives Series 63 http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v63je01.pdf</p> <p>・ BMDL01 0.3 から 8 µg/kg b.w. per day の間 POD (µ g/kg bw/day) 0.3-8</p>

<p>エンドポイント 肺、膀胱、皮膚がん</p> <p>出典 EFSA 2009 http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1351</p> <p>・NOAEL: 8×10^{-4} mg/kg-day POD (μg/kg bw/day) 0.8</p> <p>エンドポイント 心血管系、皮膚 (色素沈着、角化)</p> <p>出典 EPA IRIS</p> <p>http://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=278</p> <p>・Oral Slope Factor: 1.5 per mg/kg-day、Drinking Water Unit Risk: 5×10^{-5} per μg/L</p> <p>エンドポイント がん</p> <p>出典 EPA IRIS</p> <p>http://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=278</p>
Hg
<p>・BMDL10 0.06 mg/kg bw per day POD (μg/kg bw/day) 60</p> <p>エンドポイント 雄ラットの相対腎重量の増加</p> <p>出典 JECFA 2011 WHO Food Additives Series 63</p> <p>http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v63je01.pdf 不確実係数 100 で無機水銀の PTWI は 4μg/kg bw</p> <p>EFSA 2012 http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2985</p>
Sn
<p>・150 mg tin/kg 食事 (1日 1500g 食べると仮定して 2250mg、体重 70kg で 32mg/kg)</p> <p>POD (μg/kg bw/day) 32000</p> <p>エンドポイント 食欲不振</p> <p>出典 EFSA 2005 http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/254</p> <p>・PTWI 14mg/kg bw JECFA (PTWI の導出根拠は明確ではなく急性影響の出る摂取量から導出されたと考えられる)</p> <p>http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=515</p> <p>・67 mg of tin (267 mg/kg food) で影響なし</p> <p>出典 CICAD 2005 Tin and Inorganic Tin Compounds (Cicads 65, 2005)</p> <p>http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad65.htm</p>
Cr

<p>・ NOAEL 286 mg Cr(III)/kg b.w. per day POD (μ g/kg bw/day) 286000 エンドポイント NTP のラット経口での慢性毒性試験の最大投与量 (TDI は追加の安全係数 10 を加えて 0.3 mg/kg b.w. per day,) 出典 EFSA 2014 http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3595</p> <p>・ BMDL05 0.2 mg Cr(VI)/kg b.w. per day POD (μ g/kg bw/day) 200 エンドポイント 血液病変、雄ラットのヘマトクリット減少 出典 EFSA 2014 http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3595</p> <p>・ BMDL10 1.0 mg Cr(VI)/kg b.w. per day POD (μ g/kg bw/day) 1000 エンドポイント 腫瘍性病変、腺腫とがんの合計 出典 EFSA 2014 http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3595</p> <p>・ BMDL10 0.11 mg Cr(VI)/kg b.w. per day POD (μ g/kg bw/day) 110 エンドポイント 非腫瘍性病変、雌マウス十二指腸上皮過形成 出典 EFSA 2014 http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3595</p> <p>・ 三価は必須微量栄養素、6 価は遺伝毒性 1988 EHC61 http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc61.htm</p>
<p>Co</p> <p>・ Cobalt(III)は細菌で遺伝毒性陽性 CICAD 2006 COBALT AND INORGANIC COBALT COMPOUNDS http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad69.htm</p>
<p>Mo</p> <p>・ LOAEL : 1.4 x10⁻¹ mg/kg-day POD (μ g/kg bw/day) 140 エンドポイント 尿酸値増加 出典 EPA IRIS http://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=425</p> <p>・ Adequate Intake (AI) 65 μg/day 成人 POD (μ g/kg bw/day) 1 出典 EFSA 2013 http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3333</p>
<p>MeHg</p>

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果に関する刊行物一覧表

整理番号	発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1	Watanabe T, Kikuchi H, Matsuda R, Tomoko Hayashi T, Akaki K and Teshima R.	Performance evaluation of an improved GC-MS method to quantify methylmercury in fish	J. Hood Hyg. Soc. Japan	56	69-76	2015
2	渡邊敬浩, 堤 智昭	食品に含まれる有害物質トランス脂肪酸と多環芳香族炭化水素類	公衆衛生	79	777-782	2015
3	Takahashi K, Yasutake D, Kajiwara J, Watanabe T.	Dietary intake of hexabromocyclododecane in Japan.	Organohalogen Compounds	77	416-418	2015
4	Yasutake D, Hori T, Takahashi K, Kajiwara J and Watanabe T	Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) and hydroxylated PCBs in seafood samples collected in Kyusyu district, Japan.	Organohalogen Compounds	77	386-389	2015
5	Amakura, Y., Tsutsumi, T., Yoshimura, M., Nakamura, M., Handa, H., Matsuda, R., Teshima, R., Watanabe, T.	Detection of aryl hydrocarbon receptor activation by some chemicals related in food hygiene by using a reporter gene assay	Foods	5	doi:10.3390/foods5010015	2016
6	畝山智香子, 登田美桜	世界各国のトランス脂肪酸のリスク評価について	食品衛生研究	65	15-25	2015

IV. 研究成果の刊行物別刷

Performance Evaluation of an Improved GC-MS Method to Quantify Methylmercury in Fish

Takahiro WATANABE^{*1}, Hiroyuki KIKUCHI¹, Rieko MATSUDA¹,
Tomoko HAYASHI¹, Koichi AKAKI² and Reiko TESHIMA¹

¹ National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

² Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment:

2-1-34 Jigyohama, Chuo-ku, Fukuoka 810-0065, Japan;

*Corresponding author

Here, we set out to improve our previously developed methylmercury analytical method, involving phenyl derivatization and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). In the improved method, phenylation of methylmercury with sodium tetraphenylborate was carried out in a toluene/water two-phase system, instead of in water alone. The modification enabled derivatization at optimum pH, and the formation of by-products was dramatically reduced. In addition, adsorption of methyl phenyl mercury in the GC system was suppressed by co-injection of PEG200, enabling continuous analysis without loss of sensitivity. The performance of the improved analytical method was independently evaluated by three analysts using certified reference materials and methylmercury-spiked fresh fish samples. The present analytical method was validated as suitable for determination of compliance with the provisional regulation value for methylmercury in fish, set in the Food Sanitation law.

(Received November 7, 2014)

Key words: methylmercury; phenyl derivatization; GC-MS; fresh fish

Introduction

Methylmercury, an organomercury compound, has adverse health effects, such as marked distal sensory disturbances, constriction of visual field, ataxia, dysarthria, auditory disturbances, and tremors, due to its action on the central nervous system^{1, 2}. The central nervous system of the developing fetus, in which the blood-brain barrier function is not fully developed, is reported to be particularly vulnerable^{*1, *2}. Due to concerns over adverse health effects, international organizations and governments have issued warnings regarding the consumption of methylmercury-contaminated foods, particularly fish and shellfish. In March of 2004, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) lowered the provisional tolerable weekly intake of methylmercury from 3.3 to 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/week. Also in 2004, the U.S. Food and Drug Administration revised its advice and recommended that pregnant women limit their consumption of specific kinds of fish and

shellfish^{*3}. On June 3, 2003, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (MHLW) issued its "Advice on Fish Consumption and Mercury". In 2005, MHLW also issued a modified proposal, "Advice for Pregnant Women on Fish Consumption and Mercury"^{*4}.

In 1973, MHLW set the provisional regulation value for mercury in fish and shellfish (excepting some fish species) at 0.4 ppm as total mercury and 0.3 ppm as methylmercury. In the appendix to the notification in which the regulation values were published, the analytical method for methylmercury (hereinafter referred to as the "official method") is presented^{*5}. In the official method, methylmercury is extracted with benzene under hydrochloric acid and then transferred to a cysteine-con-

* E-mail: tawata@nihs.go.jp

*1 "Food Safety Risk Assessment Related to Methylmercury in Seafood", Food Safety Commission of Japan, Tokyo. (2005). https://www.fsc.go.jp/english/topics/methylmercury_risk_assessment.pdf

*2 "Methylmercury; Environmental Health Criteria 101", WHO, Geneva (1990). <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc101.htm>

*3 "FDA and EPA Announce the Revised Consumer Advisory on Methylmercury in Fish", U.S. Food and Drug Administration and Environment Protection Agency (2004). <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2004/ucm108267.htm>

*4 "Advice for Pregnant Women on Fish Consumption and Mercury", Subcommittee on Animal Origin Foods, Food Sanitation Committee, Pharmaceutical Affairs and Food Sanitation Council, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, Tokyo (2005). <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/suigin/dl/051102-1en.pdf>

*5 "Provisional regulation value for mercury in fish and shellfish", The Ministry of Health and Welfare of Japan, Tokyo. Notification No. 99 (1973).

taining aqueous solution. The methylmercury is then once again transferred to benzene by acidifying the aqueous cysteine-containing layer, and is then measured using a GC-ECD equipped with a packed column. Because benzene (a carcinogenic solvent) is used for extraction and ECD (which requires special control for its β -ray source) is used for the measurement, the official method is not versatile. In addition, it has been reported that, depending upon the species examined, the recovery of methylmercury in analyses of fish samples using the official method may be low³⁾.

In order to overcome the above-mentioned drawbacks associated with the official method, method providing more efficient extraction of methylmercury was developed by employing alkaline degradation of proteins, hexane washing to remove fats, and dithizone as the complexing agent. This method was also adopted by the Japanese Ministry of the Environment⁶⁾. The method uses toluene instead of benzene; but, as in the official method, ECD is used for detection. Although a method employing inductively coupled plasma mass spectrometry for measurement of methylmercury has been reported⁴⁾, the detector is not sufficiently versatile for food analysis.

The authors previously developed a versatile analytical method involving phenyl derivatization of methylmercury and subsequent measurement by GC-MS, which is widely used in food analysis⁵⁾. In the present paper, this previously reported method (hereinafter referred to as the "original method") was improved to achieve the level of performance necessary for use in determining compliance with the provisional regulation value for methylmercury. The improved method was validated.

Materials and Methods

Samples

Certified reference materials (CRM) for validation (CRM 7402-a: cod fish powder; BCR-463: tuna fish powder; ERM-CE464: tuna fish powder; and CRM 7403-a: swordfish powder) were purchased from Seishin Trading Co., Ltd. Fresh fish samples (cod, tuna, mackerel, and bonito) were purchased at a supermarket in Tokyo.

Reagents

Methylmercury chloride was obtained from GL Sciences Inc. (Tokyo, Japan). Potassium bromide, anhydrous copper(II) sulfate, sulfuric acid, cysteine hydrochloride monohydrate, sodium acetate trihydrate, sodium dihydrogen phosphate dihydrate, disodium hydrogen phosphate dodecahydrate, sodium tetraphenylborate, and polyethylene glycol (PEG) 200 were obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan). Other reagents were of pesticide residue analysis grade or special grade. Ultrapure water was produced using a Milli-Q purification system (Element 10) (Merck Millipore,

Billerica, MA, USA).

A methylmercury standard stock solution (1,000 $\mu\text{g/mL}$) was prepared by accurately weighing 58.2 mg of methylmercury chloride, dissolving it in toluene and adjusting the final volume to 50 mL with toluene. A methylmercury standard solution for spiking (3 $\mu\text{g/mL}$) was prepared by accurately weighing 58.2 mg of methylmercury chloride, dissolving it in water and accurately adjusting the volume to 500 mL, and then diluting 3 mL of this solution to a final volume of 100 mL with water. A 1 mol/L potassium bromide solution was prepared by dissolving potassium bromide in water. Copper(II) sulfate-saturated 4 mol/L sulfuric acid was prepared by adding 200 mL of concentrated sulfuric acid to 600 mL of water, allowing it to cool, adjusting the volume to 900 mL with water, and dissolving anhydrous copper(II) sulfate until the solution was saturated. A 1% L-cysteine solution was prepared by dissolving 10.0 g of L-cysteine hydrochloride monohydrate, 8.0 g of sodium acetate trihydrate, and 125.0 g of anhydrous sodium sulfate in water and adjusting the final volume to 1 L. Sodium phosphate buffer (0.2 mol/L; pH 7.0) was prepared by mixing 0.2 mol/L sodium dihydrogen phosphate (acidic solution) and 0.2 mol/L disodium hydrogen phosphate (basic solution) to give pH 7.0.

A 1% sodium tetraphenylborate solution was prepared by dissolving 0.2 g of sodium tetraphenylborate in phosphate buffer (0.2 mol/L; pH 7.0). The 1% sodium tetraphenylborate solution was prepared immediately before use. A 1.5 mg/mL solution of PEG200 was prepared by dissolving PEG200 in toluene.

Equipment

The centrifuge used was a Model 6200 from Kubota Corporation (Tokyo, Japan). The homogenizer used was GM200 from Verder Scientific Co., Ltd. (Tokyo, Japan). The GC-MS used was a 6890N GC & 5975 MSD from Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA, USA).

The following conditions were used for GC-MS measurement: InertCap 5MS/NP (0.25 mm i.d. \times 30 m long, 0.25 μm film thickness) column (GL Sciences Inc.); oven temperature, 70°C(1 min) \rightarrow 20°C/min \rightarrow 280°C(5 min); injection port temperature, 250°C; transfer line temperature, 280°C; ion source temperature, 230°C; injection volume, 1 μL ; carrier gas flow rate, 1.0 mL/min (He); ionization method, EI; analysis mode, SIM; ions monitored, m/z 292 (quantitation ion), 294, and 277.

Analytical procedure

A sample of fresh fish was homogenized and 10.0 g of the homogenized sample was weighed and used for further analyses. A portion of CRM (1.0 g) was weighed and mixed with 9.0 g of water. Each sample was shaken with 100 mL acetone for 30 sec, and centrifuged. The supernatant was removed. 100 mL of toluene was added to the residue and the mixture was shaken for 30 sec, then centrifuged, and the supernatant was removed. The acetone- and toluene-washed residue was shaken with 40 mL of 1 mol/L potassium bromide solution, 40 mL of

⁶⁾ "Mercury Analysis Manual", 2004, Ministry of the Environment of Japan, Tokyo (2004). http://www.nimd.go.jp/kenkyu/docs/march_mercury_analysis_manual%28e%29.pdf

copper(II) sulfate-saturated 4 mol/L sulfuric acid, and 80 mL of toluene, and centrifuged. The toluene layer was collected. To the remaining water layer, 50 mL of toluene was added. The mixture was shaken for 10 min, and the toluene layer was collected after centrifugation and combined with the previous toluene layer. To the combined toluene layers, 50 mL of 1% L-cysteine solution was added and the mixture was shaken for 5 min. After being allowed to stand, the water layer was collected, and 30 mL of 6 mol/L hydrochloric acid and 30 mL of toluene were added. The sample was shaken for 5 min, and the toluene layer was collected. This procedure was repeated three times, and the volume of the combined toluene layers was adjusted to 100 mL with toluene. A 4-mL aliquot was removed from this solution, 5 mL of 0.2 mol/L phosphate buffer (pH 7.0) and 1 mL of 1% sodium tetrphenylborate solution were added to it, and phenyl derivatization was carried out by shaking for 10 min at room temperature. The reaction solution was centrifuged, the toluene layer was dehydrated with anhydrous sodium sulfate, 1 mL of the solution was accurately removed, and 0.5 mL of 1.5 mg/mL PEG200 was accurately added to obtain a GC-MS measurement solution.

Preparation of standard solutions for calibration curve

Aliquots of methylmercury standard stock solution were diluted with toluene to prepare standard solutions of 0, 5, 10, 25, 50, 75, and 100 ng/mL for use in constructing a calibration curve. The standard solutions were then subjected to phenyl derivatization and subsequent processing identical to that of analytical samples.

Preparation of blank and spiked samples

A blank sample was prepared by sufficiently homogenizing cod or tuna muscle that was confirmed beforehand to contain less than 0.15 mg/kg of methylmercury. A spiked sample was prepared by accurately adding 1 mL of a 3 µg/mL aqueous methylmercury solution to 10.0 g of the blank sample homogenate, mixing well, and allowing the sample to stand for 30 min prior to analysis.

Method validation

Four different CRMs and two different spiked samples were analyzed, and the trueness and precision (repeatability and intralaboratory reproducibility) were estimated. For the CRMs and spiked samples, two parallel analyses per day were carried out for 5 days. Simultaneously, two parallel analyses per day of the blank sample were carried out for 5 days. The analytical result for each spiked sample was obtained by subtracting the mean of the results obtained from analysis of the blank sample from the result for each individual spiked sample. One-way analysis of variance was performed for the 10 analytical results. The validation was independently carried out by three analysts (A, B, and C). Analysts A and B carried out the validation using CRMs and spiked samples in the same laboratory (laboratory I), whereas

analyst C carried out the validation using CRMs in a different laboratory (laboratory II). The validity of the analytical method was confirmed by comparing the estimates of trueness and precision with the performance criterion shown in Notification No. 0926001, "Guidelines for the validation of analytical methods for testing metals in food"^{*7}.

Results

Improvement of pretreatment and extraction procedure

In the original method, 1 mol/L potassium bromide solution and copper(II) sulfate-saturated 4 mol/L sulfuric acid were added to samples and methylmercury was extracted with toluene. Depending on the fish species analyzed, this sometimes resulted in substantial emulsion generation during extraction, greatly compromising the efficiency of the extraction procedure. Therefore, sample pretreatment using acetone and toluene, as employed in a collaborative study to validate a quantitative method for methylmercury⁶⁾, was investigated for its potential to prevent emulsion generation. For pretreatment, 100 mL of acetone was added to a sample and then removed after shaking for 30 sec, followed by similar addition and removal of 100 mL of toluene. This resulted in a dramatic reduction in the frequency of emulsion generation in samples prepared from cod, tuna, mackerel, and bonito.

Optimization of phenyl derivatization conditions

In the original method, phenyl derivatization was carried out by transferring methylmercury to a 1% L-cysteine solution after toluene extraction, adding and mixing Walpole buffer (pH 1.0), adding *n*-heptane and 2% sodium tetrphenylborate solution, and then allowing the mixture to stand for 1 hr in a 30°C water bath with mixing every 10 min. However, repeated injection of measurement solutions prepared according to this procedure ultimately resulted in a significant reduction in GC-MS sensitivity, which was thought to be due to adsorption of various phenyl compounds generated by the decomposition of tetrphenylborate (*e.g.*, biphenyl) on parts of the instrument, such as liners. In order to avoid this decrease in sensitivity, reaction conditions that would reduce the amount of degradation products formed without impacting on the phenylation efficiency were investigated (sodium tetrphenylborate concentration, pH, reaction temperature, and reaction time). The generation of biphenyl, the degradation product formed in the highest amount, was used as an indicator to assess the effect of modifying the reaction conditions. We found that when the concentration of sodium tetrphenylborate was reduced from 2 to 1%, the efficiency of phenyl derivatization did not change. Therefore, the sodium tetrphenylborate concentration was set at 1% to decrease the amount of by-products formed.

The effect of pH on phenyl derivatization efficiency

^{*7} "Guidelines for the validation of analytical methods for testing metals in food", The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, Tokyo. Notification No. 0926001 (2012).