

外因性内分泌かく乱物質と一般微生物の分析

後藤 邦康

Analysis of Endocrine Disrupting Chemicals and Microbes in Alcoholic Beverages and Sake Cake

Kuniyasu GOTO

緒 言

外因性内分泌かく乱物質（一般には「環境ホルモン」と呼ばれる）については、平成12年11月（改訂）に「内分泌攪乱化学物質問題へ環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画 SPEED '98—」¹⁾として国としての対応方法が策定された。さらに、平成17年3月には環境省より「化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について—ExTEND2005—」²⁾が示されSPEED '98の改定作業が続けられている。一方、これらの物質がヒトへ影響を与える主要な経路は食品（飲料を含む）からの摂取と考えられる。食品中の個々の物質についてのリスク評価および容器等からの溶出規制等については食品安全委員会や厚生労働省等で行われている³⁾。

当所では平成16年5～6月に買上げた市販酒類等（清酒、焼酎、ビール、ワイン、ウイスキー、酒粕）について、分析を行いその結果検出された物質の濃度については危害を与えるものではないと考えられた⁴⁾。しかし、当時は平成14年8月の厚生労働省の食品衛生法の一部改正（告示267号）により、容器等への規制が本格的に始まった時期であった。平成16年に買上げを行った清酒や焼酎等は平成15年以前に製造されたものが多いと考えられ、外因性内分泌かく乱物質の主な混入源と推定されるホースなどの機材の更新が酒類製造メーカーでも始まって浅い時期と考えられる。前回調査⁴⁾以降、外因性内分泌かく乱物質対応の機材の

導入が進んだと考えられ、規制以後の実態を反映していない可能性がある。そこで、前回調査で他の成分と比べ比較的高い数値の見られた、ノニルフェノール（以下NP）、ビスフェノールA（以下BPA）、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル（以下DEHP）およびアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル（以下DEHA）について、再度調査を実施することとした。なお、各物質に関する前回調査から現在までの国内におけるリスク評価の見直しによる無毒性量から推定される耐容一日摂取量（TDI）に対する大きな見直しはなされていないが、BPAについては欧州食品安全局における評価の見直しによりTDIを0.01 mg/kg 体重/日（2002年暫定）から0.05 mg/kg 体重/日（2007年正式）とされている⁵⁾。

なお、NPおよびBPAについては簡易分析法を検討し、良好な結果を得たため、平成18年度以降の買上げ試料については本簡易法を用いて分析を行った。また、昨年度に続き微生物検査も実施した。

材料と実験方法

1. 供試試料および試薬

市販されている酒類および酒粕を、平成18年3月（平成17年度）、平成18年12月～平成19年2月（平成18年度）、平成20年1～3月（平成19年度）に買上げ、外因性内分泌かく乱物質の分析を実施した。また、前回調査⁴⁾において高い値を示した市販酒類については同一銘柄の製品を追跡して買

上げた。

使用試薬はHPLC用もしくは環境ホルモン分析用のものを使用した。また、使用器具についても予備試験により、NPおよびBPA等を溶出しないことを確認したものを用いた。NP分析の標準物質はAldrich社製(29, 085-8)、サロゲート物質および内部標準には4-*n*-ノニルフェノール-2,3,5,6-*d*₄(以下dNP, 関東化学社製28641-96)、BPA分析の標準物質は環境分析用標準品(和光純薬工業社製025-13541)、サロゲート物質および内部標準にはビスフェノールB(以下BPB, 東京化学工業社製B1050)を用いた。

2. GC/MSによる分析

平成17年度までの酒類・酒粕の分析は前報⁴⁾に基づき行った。平成18年度以降のDEHPおよびDEHAについては第1図の方法で前処理を行った。GC-MSの分析条件は前報⁴⁾に基づき行った。

3. 固相抽出および高速液体クロマトグラム(HPLC) - 蛍光検出による簡易分析

平成18年度以降のNPおよびBPAの分析については固相抽出法を用いた前処理とHPLC-蛍光法により測定を行った。

3-1. 試料の調整

発泡性のある酒類は超音波洗浄機(柴田科学社製SU-9TH)で室温10分間処理で、脱気し、容量をHPLC用蒸留水で元に復して以下を使用した。エタノール濃度が20%を超える酒類についてはHPLC用蒸留水で20%以下になるように希釈して使用した。酒粕については試料1gにメタノール10mlを加え、10分間超音波処理(柴田科学社製SU-9TH)により均一化を行った。3,000rpmで10分間遠心した上清を回収し、HPLC用蒸留水22.5ml, 1M NaOH 2.5mlおよびジクロロメタン2mlを加え、5分間激しく振とうし、3,000rpmで5分間遠心した下層(ジクロロメタン層)を回収した。上層部分にジクロロメタン2mlを加え、再度抽出操作を繰り返し、ジクロロメタン層を回収、前に回収したものと合わせ、室温N₂

気流中で乾固した。この試料をメタノール1mlに溶解した。内部標準を加えNP測定用として、HPLC-蛍光分析用試料とした。

3-2. 固相カラムの準備

固相カラムはC18およびPSAカラムを使用した。C18カラムは固相量500mg・カートリッジ型(Varian社製Bond Elut C18 500mg)を使用、使用前にジクロロメタン10ml, メタノール10ml, 20%メタノール10mlで、洗浄したものを使用した。PSAカラムは固相量50mg(Varian社製Bond Elut PSA 50mg)を使用、使用前にジクロロメタン5ml, ジクロロメタン・アセトン(1:1)5mlで、洗浄し、N₂ガスで乾燥したものを使用した。

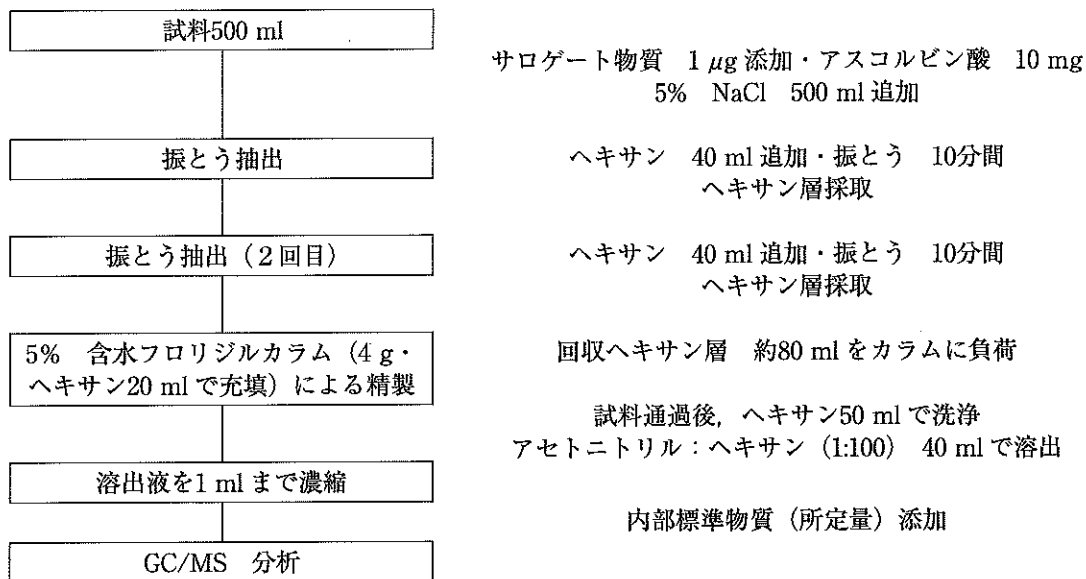
3-3. 試料の前処理

試料100mlにサロゲート物質兼内部標準を0.1μg添加し、C18カラムに負荷し、目的物質を吸着させ、20%メタノール20mlで洗浄した後、N₂ガスで乾燥した。乾燥したC18カラムにPSAカラムを連結し、ジクロロメタン5mlでNPおよびdNPを含む画分を溶出させ回収した。BPAおよびBPBはPSAカラムに吸着しているため、連結しているC18カラムを除きPSAカラムをジクロロメタン・アセトン(1:1)1.5mlで、BPAおよびBPBを含む画分を溶出させ回収した。両画分はN₂気流中で乾固させ、1mlメタノールに溶解し、HPLC分析に供した。

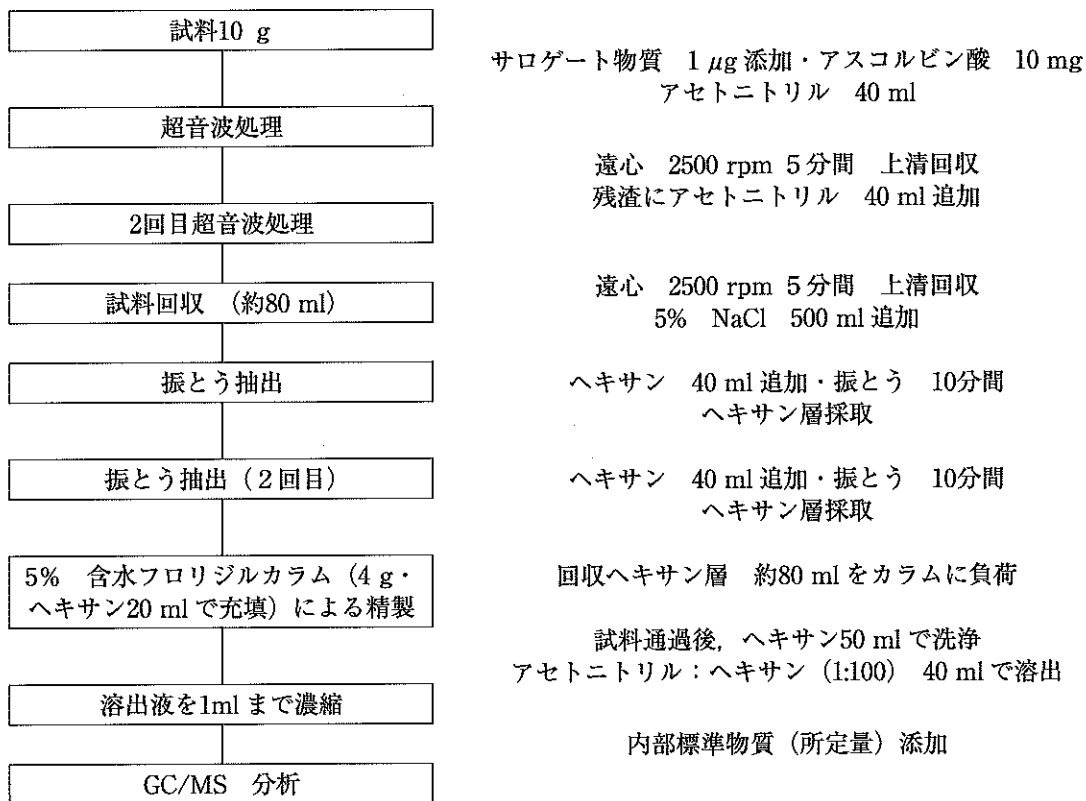
なお、赤ワイン等の色素を多く含む酒類については、色素がBPAおよびBPB画分に混入し、以下の測定に障害が生じるため、回収したメタノール溶液0.5mlに0.1N NaOH 0.5mlを加え、さらにジクロロメタン0.5mlを加え、3分間激しく振とうし、5分間遠心した上清を回収した。回収試料に1N HCl 0.05mlを加え中和した後、HPLC用試料とした。

3-4. HPLC- 蛍光検出

HPLC- 蛍光検出には島津製作所社製LC-10Aシステムで行った。使用カラムは関東化学社製Mightysil RP-18GP250-4.6(5μm)、蛍光測定装置には島津製作所社製RF-10AXL(Sensitivity:



第1図A GC-MS分析用酒類の前処理フロー



第1図B GC-MS分析用酒粕の前処理フロー

HIGH, Gain: x1, Attenuation: 125) を使用した。
NP 測定には移動相0.03%トリフロロ酢酸を含む
75%メタノール水を用い, 流量1 ml/min, 励起
光波長230 nm, 測定波長300 nmで測定を行った。
BPA 測定には移動相0.05%トリフロロ酢酸を含
む, 60%メタノール水を用い, 流量1 ml/min,
励起光波長235 nm, 測定波長335 nmで測定を

行った。

4 微生物分析

平成19年度買上げた酒類46点について, 前報⁶⁾
に基づき, 一般微生物および大腸菌群の測定を
行った。

結果と考察

1. 市販酒購入実績と年度による重複状況

各年度の買上げ状況を第1表Aに示した。平成16年度買上げ調査で酒類中のNP, BPA, DEHP濃度の高かった3製品については継続して買上げを行った。なお、前報⁴⁾と平成18, 19年度で買上げた製品で同一製造場のものは18点あり(第1表B), 買上げに際しては同一銘柄または価格帯の近い容器形態(ガラス瓶・紙パック等)が同じものを選択した。平成19年度買上げ酒粕(12点)については同一銘柄・同一ロットを複数含む5社6銘柄を買上げ調査した。

2. 簡易分析法

2-1. 固相抽出

従来の分析法ではジクロロメタンによる液液抽出を行い、濃縮、誘導体化(GC分析のため)、再度ヘキサンによる抽出と濃縮を行い、GC-MS分析を行う必要があった。液液抽出およびその後の濃縮には一工程に1時間から数時間を要する(2回行うので2時間以上)。一方、固相抽出法では使用する有機溶剤の量も数~10 ml前後と使用量も少なく、比較的安価な装置で自動化も可能であり、水質の分析等では前処理法として実用化されている^{7,8)}。また、複数の試料を同時に処理することも可能であり、検出にかかる前処理試料とするまでの所要時間も1~2時間程度とすることができる。しかし、酒類に対する応用例はなく、また、酒類は種類によりそのアルコール度数や内容物の組成が異なり、個々の前処理法を検討する必要があった。予備試験の結果、初期のアルコール濃度を蒸留水で20%以下に希釈することにより、酒類の種類にかかわらず、C18カラムにNPおよびBPAを吸着することができた。また、PSAカラ

ムを用いることにより、NPおよびBPAを分割して取得することが可能であることがわかった。

2-2. HPLC- 蛍光検出

HPLC- 蛍光検出については、HPLCでよく使用される紫外吸収の測定装置に比べると、蛍光検出器はやや高価ではあるが、MS分析機に比べれば安価な装置であり、GC-MS分離のために必要な誘導体化の操作も不要であり、経常的な分析には有効であった。

2-2-1. NP分析の検討

NPおよびdNPを各100 $\mu\text{g/l}$ を含むメタノールを50 μl 注入したHPLCクロマトグラムを第2図に示した。NPおよびdNPの保持時間は6.6~6.8分および8.7~8.9分であった。酒類についてはサロゲート物質としてdNPを前処理操作前に1 $\mu\text{g/l}$ になるように添加した後、固相カラムによる前処理で100倍濃縮した試料(約0.5 $\mu\text{g/l}$ のNPを含む清酒と焼酎を使用)のクロマトグラムを第2図に示した。サロゲート物質として使用したdNPのシグナル強度はNPおよびd-NPを既知濃度含むメタノールと比べ、酒類の前処理操作後の試料でも90~95%、変動率5%前後と種類間による差も少なかった(第2図)。そこで、HPLC試料注入前に新たな内部標準を加える必要はないと考え、以後dNPをサロゲート物質兼内部標準として使用することとした。

清酒、ワインおよびビールでは保持時間4分までに大きなピークが現れたが、焼酎およびウィスキーでは全体的に蛍光を発する成分は少なかった。全種類についてNP, dNPの保持時間付近に影響を与えるピークはなかった。

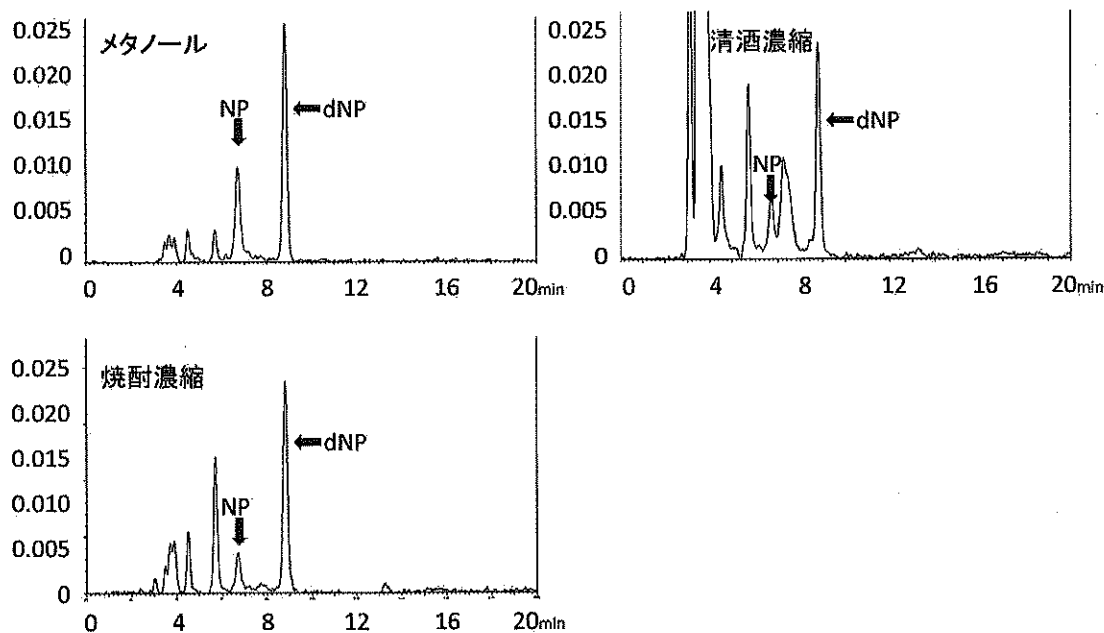
酒粕についてはメタノール抽出後、蒸留水で希釈し、酒類と同様に直接固相抽出する方法についても検討したが、十分に夾雑物を除去できなかった。そこで、メタノール抽出後、抽出液を蒸留水

第1表A 買上げ年度と買上げ点数

	H16	H17	H18	H19
酒類	41	2	50	46
酒粕	6	4	2	12

第1表B 平成16, 18, 19年度で重複する銘柄数

清酒	焼酎	ビール	ワイン(白)	ワイン(赤)	酒粕
7	3	3	1	2	2



第2図 ノニルフェノールのHPLCクロマトグラム

縦軸は蛍光強度、横軸は保持時間を示す。NP: ノニルフェノール dNP: 4-*n*-ノニルフェノール-2,3,5,6- d_4
メタノールにはNPおよびdNPを各100 $\mu\text{g/l}$ (終濃度)になるよう添加。清酒濃縮、焼酎濃縮 (100倍)では濃縮前試料にNPを約0.5 $\mu\text{g/l}$, d-NPを1 $\mu\text{g/l}$ (終濃度)になるよう添加し、前処理を行った。HPLCへの注入量は50 μl 。

で希釈した後、ジクロロメタンによる液液抽出の工程を加えた。その結果、保持時間4分までの初期の大きなピークは残るものの、NPの測定に影響を与える夾雑ピークを除去することができ、クロマトグラムは示さないが、固相抽出を行った清酒濃縮試料と類似したものとなった。

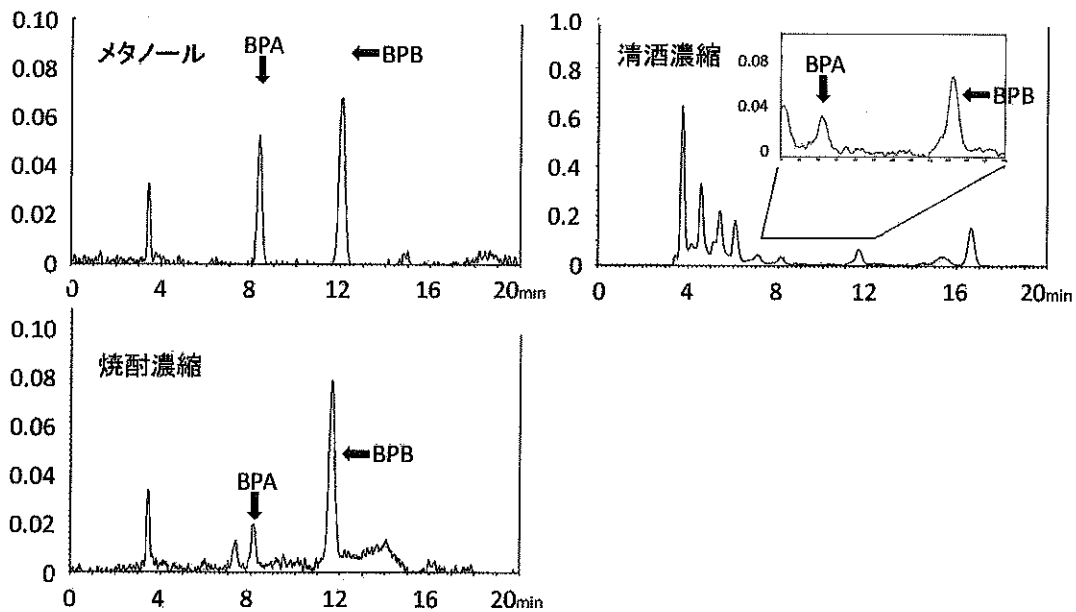
2-2-2. BPA分析の検討

BPAおよびBPBを各100 $\mu\text{g/l}$ になるよう添加したメタノールを50 μl 注入したHPLCクロマトグラムを第3図に示した。BPAおよびBPBの保持時間は8.3~8.4分および12.0分前後であった。酒類についてはサロゲート物質としてBPBを前処理操作前に1 $\mu\text{g/l}$ になるよう添加した後、固相カラムによる前処理で100倍濃縮した試料 (約0.5 $\mu\text{g/l}$ BPAを含む清酒と焼酎を使用)のクロマトグラムを第3図に示した。サロゲート物質として使用したBPBのシグナル強度はBPAおよびBPBを既知濃度含むメタノールと比べ、酒類の前処理操作後でも87.5~92.5%, 変動率7%前後と酒類間による差も少なかった (第3図)。そこで、HPLC試料注入前に新たな内部標準を加える必要はないと考え、以後BPBをサロゲート物質兼内

部標準として使用することとした。

クロマトグラムはNPと異なり、銘柄により種々のパターンを示したが、清酒、焼酎、白ワインやウィスキーについてはBPA, BPBのシグナルに影響を与えるものはなかった。しかし、ビールや赤ワインについては保持時間4分までの初期ピークが大きく、BPAのシグナルが初期ピークの上に重なる場合もあったが、特に色調の濃厚なものを除いて定量は可能であった。ただし、一部の赤ワインや黒ビール等については初期ピーク以外にもBPBの保持時間以降にも溶出成分が出現し、連続して測定する場合、次の測定に影響を与える場合もあった。これらの影響を除くため、PSA処理後、アルカリ条件下でのジクロロメタン抽出を行うことで、測定に影響する夾雑物を除く操作を加えることにより、連続して測定することも可能となった。

酒粕については酒類と同じ固相抽出による前処理の方法では初期の溶出ピークが大きくBPAピークに影響し測定できなかった。NPと同様にジクロロメタンによる液液抽出を組み合わせた処理を行ったが、BPAの保持時間 (約8.2分) 付近



第3図 ビスフェノールAのHPLCクロマトグラム

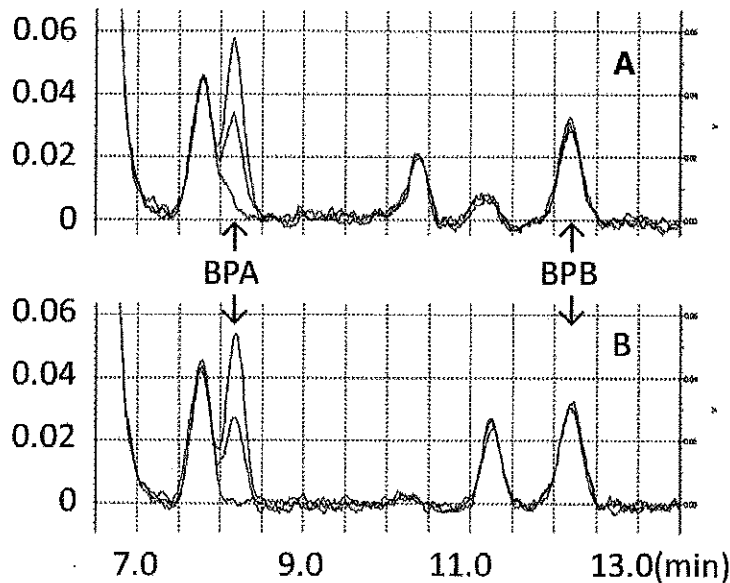
縦軸は蛍光強度、横軸は保持時間を示す。BPA:ビスフェノールA BPB:ビスフェノールB
 メタノールにはBPAおよびBPBを各100 $\mu\text{g/l}$ (終濃度)になるよう添加。清酒濃縮、焼酎濃縮(100倍)では濃縮前試料にBPAを約0.5 $\mu\text{g/l}$, BPBを1 $\mu\text{g/l}$ (終濃度)になるよう添加し、前処理を行った。HPLCへの注入量は50 μl 。

に夾雑ピーク(保持時間約7.7分)が現れ、定量性に影響を与えた。そこで、平成19年度買上げ試料については夾雑ピークの影響を除くために、標準添加法(前処理した試料にBPAを終濃度1~

10 $\mu\text{g/kg}$ になるように添加)による測定を行い、定量化を行った(第4図)。

2-3. 簡易測定法による回収率と定量性

メタノールにNPおよびBPA所定量とdNPま



第4図 酒粕中のビスフェノールAの標準添加法による定量

BPA:ビスフェノールA(BPA) BPB:内部標準ビスフェノールB(BPB)。サロゲート物質兼内部標準としてBPBを10 $\mu\text{g/kg}$ 添加し、前処理を行った各試料(A, Bは異なる酒粕)にBPAを0, 5, 10 $\mu\text{g/l}$ (終濃度)になるよう添加した。HPLCへの注入量は50 μl 。

たはBPBを内部標準として2 $\mu\text{g/l}$ になるよう添加した時の面積比を示した結果を第5図に示した。それぞれの相関係数は0.9999, 0.9994と高い値を示し, NP, BPBとも0.1~5 $\mu\text{g/l}$ 間で直線性を保っていた。前処理処理により酒類では100倍, 酒粕では等倍に濃縮されるため, GC/MS法と同等程度の測定能力があるものと考えられた。

今回の簡易測定法による添加回収試験結果を第6図に示す。各種酒類(予備試験でNP, BPAの濃度は検出限界以下もの)にNPについては2または4 $\mu\text{g/l}$, BPAについては1または4 $\mu\text{g/l}$ 添加した時の回収試験を行った。酒類により変動はあるが, NPについては回収率が平均105.9%(変動率10.7%), BPAについては回収率が平均

92.2%(変動率16.2%)であった。なお, 前回の調査結果とあわせるため, NPについては酒類で0.1 $\mu\text{g/l}$, 酒粕で10 $\mu\text{g/kg}$, BPAについては酒類で0.01 $\mu\text{g/l}$, 酒粕で1 $\mu\text{g/kg}$ 以上のものについて定量化することとした。

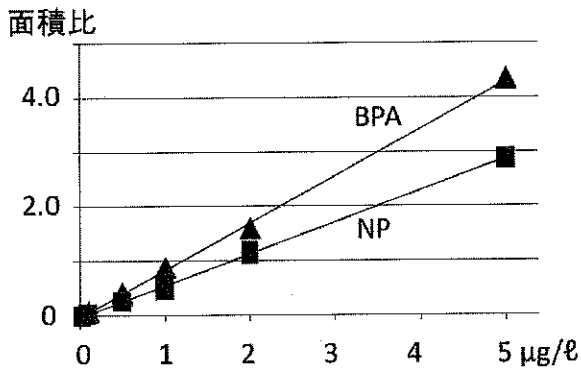
以上の検討により, 本分析法は酒類または酒粕中のNPおよび酒類中のBPAの測定について, これまでの分析法と比較して, 簡易に精度よく測定できることがわかった。よって, 平成18年度以降の買上げ試料について, この分析法で測定を行うこととした。

3. 調査結果と前報⁴⁾との比較

3-1. 酒類と酒粕

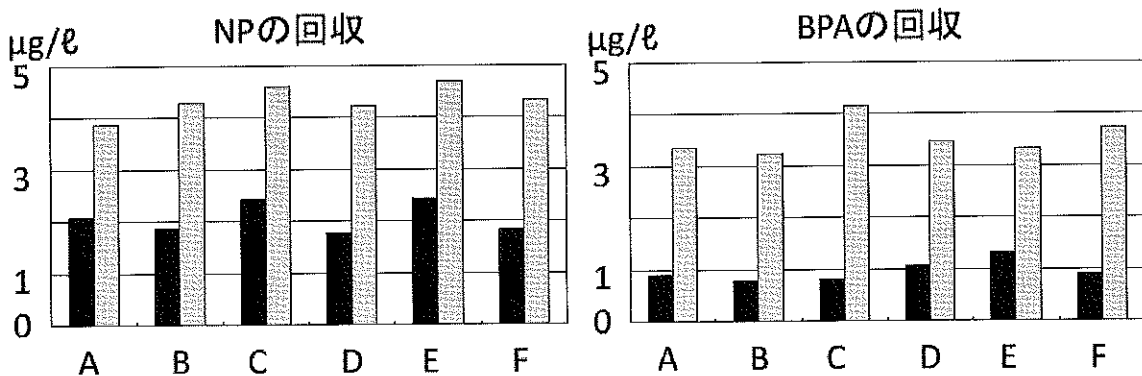
前回の調査結果以降の買上げ点数, 分析値について第1表から第5表までに分析結果をまとめた。なお, 平均値等の算出には平成16年度買上げ分析の定量下限以下の試料については定量下限値の1/2を測定値として計算を行った。

購入した酒類全体の分析値のNP濃度の平均値は1.9→1.4→1.3 $\mu\text{g/l}$ (平成16年度→平成18年度→平成19年度, 第2表A)減少し, BPA濃度の平均値は0.55→0.16→0.12 $\mu\text{g/l}$ (第3表A)と減少傾向にあった。DEHPおよびDEHAについては試料数が少なく全体的な傾向についてはわからない(第4表A, 第5表A)。しかし, 平成16年度買上げ分に比べ, 平成19年度のDEHA濃度の平



第5図 ノニルフェノール(NP)およびビスフェノールA (BPA)のHPLC-蛍光検出法による検量線

縦軸は内部標準(dNP, BPB各2 $\mu\text{g/l}$)に対する面積比を示す。横軸はNPまたはBPAの濃度を示す。HPLCへの注入量は50 μl 。



第6図 固相抽出法による回収

ノニルフェノール(NP)については2(黒)または4(灰色) $\mu\text{g/l}$, ビスフェノールA(BPA)については1(黒)または4(灰色) $\mu\text{g/l}$ を添加し, 固相抽出後HPLC-蛍光法により測定した。

A: 蒸留水 B: 20%エタノール C: 清酒 D: 焼酎 E: 赤ワイン F: 白ワイン

第2表A ノニルフェノールの経年変化 (μg/l)

		平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度
	清酒	2.4(11)	NT	1.6(22)	3.1(16)
	焼酎	0.4(8)	<0.1(1)	0.6(10)	0.3(13)
	ビール	1.8(5)	NT	0.1(6)	0.3(12)
	ワイン (白)	2.5(7)	NT	0.2(7)	0.7(1)
	ワイン (赤)	2.8(6)	0.2(1)	5.5(5)	0.7(1)
	ウイスキー	0.7(4)	NT	NT	1.4(2)
	リキュール	NT	NT	NT	<0.1(1)
全 体	平均値	1.9	0.13	1.4	1.3
	標準偏差	3.7	—	5.3	5.7
	中央値	0.6	0.2	<0.1	<0.1
	最大値	23.0	0.2	29.4	39.3
	最小値	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	試料数	41	2	50	46
	定量下限	0.1	0.1	0.1	0.1

各種類別は平均値を示す。()内の数字は分析点数を示す。NTは調査せずを示す。平均値は定量下限以下の試料の値を平成16年度の定量下限値の1/2として算出した。

第2表B 市販酒粕中のノニルフェノール濃度の経年変化 (μg/kg)

	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度
平均値	136	31.3	154	94.8
標準偏差	125	52.5	—	46.8
中央値	134	5	154	91.5
最大値	310	110	303	172
最小値	<10	<10	<10	25
試料数	6	4	2	12
定量下限	10	10	10	10

平均値は定量下限以下の試料の値を平成16年度の定量下限値の1/2として算出した。

均値が上昇している結果は、含有量の多い焼酎を中心に買上げた影響(9点中8点)によるものであると考えられた。なお、平成16年度買上げ酒類を含めた最大値はNPで39.3 μg/l(平成19年度買上げ)、BPAで13.0 μg/l(平成16年度)、DEHPで340 μg/l(平成16年度)、DEHAで7.4 μg/l(平成19年度)であった。

酒粕については試料数がどの年度も少なく、全体的な傾向はわかりにくいだが、比較的試料数の多い平成16年度と19年度の比較からはNP濃度の平均値で136→94.8 μg/kg、BPA濃度の平均値で2.0→1.2 μg/kg、DEHP濃度の平均値で555→431

μg/kgと減少した(第2表Bから第4表B)。DEHAについては装置の都合で、平成19年度の定量下限が50 μg/kg以下となったため、比較できなかった(第5表B)。DEHPについては平成16年度と平成19年度買上げ試料各1点(同一銘柄)で1,000 μg/kg前後の製品が存在した。なお、平成16年度買上げ含めた最大値はNPで310 μg/kg(平成16年度買上げ)、BPAで6.3 μg/kg(平成17年度)、DEHPで1,100 μg/kg(平成16年度)、DEHAで47 μg/kg(平成16年度)であった。

NP、BPA、DEHPのTDIは0.1、0.05、0.04~0.14 mg/kg体重/日⁹⁾とされ、平成15年改正「水質に

第3表A ビスフェノールAの経年変化 (μg/l)

	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	
清酒	0.29(11)	NT	0.02(22)	0.04(16)	
焼酎	0.03(8)	<0.01(1)	0.02(10)	0.06(13)	
ビール	0.03(5)	NT	0.03(6)	0.13(12)	
ワイン(白)	0.31(7)	NT	0.52(7)	0.71(1)	
ワイン(赤)	2.75(6)	0.98(1)	0.46(5)	0.53(1)	
ウイスキー	0.03(4)	NT	NT	<0.01(2)	
リキュール	NT	NT	NT	<0.1(1)	
全 体	平均値	0.55	0.49	0.13	0.09
	標準偏差	2.06	—	0.33	0.16
	中央値	0.04	0.49	<0.01	<0.01
	最大値	13.0	0.98	1.25	1.18
	最小値	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
	試料数	41	2	50	46
	定量下限	0.01	0.01	0.01	0.01

各種類別は平均値を示す。()内の数字は分析点数を示す。NTは調査せずを示す。平均値は定量下限以下の試料の値を平成16年度の定量下限値の1/2として算出した。

第3表B 市販酒粕中のビスフェノールA濃度の経年変化 (μg/kg)

	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度
平均値	2.0	3.6	—	1.2
標準偏差	1.4	2.0	—	0.7
中央値	2	3.3	—	1.3
最大値	4	6.3	—	2.4
最小値	<1	1.5	—	<1
試料数	6	4	0	12
定量下限	1	1	—	1

平均値は定量下限以下の試料の値を平成16年度の定量下限値の1/2として算出した。

関する省令(平成15年5月30日厚生労働省令第101号)では0.3 mg/l(要検討項目・暫定), 0.1 mg/l(要検討項目・暫定), 0.1 mg/l(要監視項目)と設定されている。平成18, 19年度調査におけるNP濃度の最大値は酒類で39.3 μg/l(平成19年度), 酒粕で310 μg/kg(平成16年度)で, BPA濃度の最大値は酒類で13.0 μg/l(平成16年度), 酒粕で340 μg/l(平成16年度)で, DEHP濃度の最大値は酒類で6.3 μg/kg(平成17年度), 酒粕で1,100 μg/kg(平成16年度)であった。平成16年度調査試料については前報⁴⁾で安全性の評価を行ったとおりである。平成17年度以降最大値の出現したも

のは, 酒類NPで39.3 μg/l(平成19年度)と酒粕BPで6.3 μg/kg(平成17年度)である。それぞれ物質のTDIを体重50 kgのヒトについて算出すると1日耐容量はNPで5 mg, BPAで25 mgとなる。この一日耐容量を超えるためにはNPで最大値の酒類を飲用した場合で127 l, BPAで最大値の酒粕を摂食した場合で396 kg必要となり, 前回調査と同様これらによる影響は少ないものと考えられた。

3-2. 酒類の種類別

清酒の平均値については他の種類に比べてNP濃度が2.4→1.6→3.1 μg/l(平成16→18→19年度)

第4表A フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの経年変化 (μg/l)

	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	
清酒	0.5(11)	NT	NT	<0.5(1)	
焼酎	45.7(8)	64(1)	44(2)	10(8)	
ビール	1.2(5)	NT	NT	NT	
ワイン(白)	0.9(7)	NT	NT	NT	
ワイン(赤)	0.3(6)	0.25(1)	1(1)	NT	
ウィスキー	3.6(4)	NT	NT	NT	
全 体	平均値	9.8	32.1	29.7	8.7
	標準偏差	53.0	—	—	20.9
	中央値	0.25	32.1	44	0.6
	最大値	340	64	44	64
	最小値	<0.5	<0.5	1	<0.5
	試料数	41	2	3	9
	定量下限	0.5	0.5	0.5	0.5

各種類別は平均値を示す。()内の数字は分析点数を示す。NTは調査せずを示す。平均値は定量下限以下の試料の値を平成16年度の定量下限値の1/2として算出した。

第4表B 市販酒粕中のフタル酸ジ-2-エチルヘキシル濃度の経年変化 (μg/kg)

	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度
平均値	555	383	44	431
標準偏差	286	157	—	490
中央値	445	385	44	230
最大値	1100	570	75	990
最小値	360	190	<25	74
試料数	6	4	2	3
定量下限	25	25	25	25

平均値は定量下限以下の試料の値を平成16年度の定量下限値の1/2として算出した。

となった(第2表A)。これは高い値として継続して買上げた製品(第6表の清酒)による影響が大きいと考えられ、この製品を除いた場合、0.5→0.2→0.6 μg/l(平成16→18→19年度)となり、他種類と同程度の値となった。

焼酎の平均値についてはDEHPおよびDEHA濃度が45.7、1.6 μg/lと他種類に比べ高かった(第4、5表Aの平成16年度)。DEHPについては平成16年度買上げ時の分析で高い値を示した製品(第6表の焼酎)の値が低下した結果、平成19年度では10 μg/lと1/4以下に低下した。この高い製品を除いたDEHPの平均値は3.7→2.1 μg/l(平成16→19年度)となり、平成16年度のウィスキー(4

点の平均値3.6 μg/l)と同様、他の種類と比べて高く、蒸留酒特有の現象かどうか今後検討する必要がある。

3-3. 前調査で特定の成分値が高く継続して買上げた製品

前報⁴⁾で調査成分値が高く継続して買上げた清酒(NP)、焼酎(DEHP)、赤ワイン(NPおよびBPA)各1点について、分析した結果を第6表に示した。清酒のNPについては上昇し、焼酎のDEHPについては平成17年度以降平成16年度の値の1/5以下となったが、赤ワインのNP、BPAについては変動していた。

清酒については香りが高く、「新酒」の表示が

第5表A アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルの経年変化 (μg/l)

	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	
清酒	0.10(11)	NT	NT	<0.01(1)	
焼酎	1.63(8)	<0.01(1)	0.08(2)	1.42(8)	
ビール	0.005(5)	NT	NT	NT	
ワイン(白)	0.024(7)	NT	NT	NT	
ワイン(赤)	0.005(6)	<0.01(1)	0.08(1)	NT	
ウイスキー	0.36(4)	NT	NT	NT	
全 体	平均値	0.38	0.05	0.24	1.26
	標準偏差	1.23	—	—	2.39
	中央値	0.005	0.05	0.08	0.25
	最大値	6.6	<0.01	0.11	7.4
	最小値	<0.01	<0.01	0.05	<0.01
	試料数	41	2	3	9
	定量下限	0.01	0.01	0.01	0.01

各種類別は平均値を示す。()内の数字は分析点数を示す。NTは調査せずを示す。平均値は定量下限以下の試料の値を平成16年度の定量下限値の1/2として算出した。

第5表B 市販酒粕中のアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル濃度の経年変化 (μg/kg)

	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度
平均値	37	<10	<10	<50
標準偏差	8.2	—	—	—
中央値	36.5	<10	<10	<50
最大値	47	<10	<10	<50
最小値	24	<10	<10	<50
試料数	6	4	2	3
定量下限	10	10	10	50

平均値は定量下限以下の試料の値を平成16年度の定量下限値の1/2として算出した。

あり醸造後、日が経っていないと考えられたにもかかわらずやや着色もあった。これらの特徴から当製品は活性炭量の使用を控えた濾過精製工程を経ていると考えられた。一方、データは示さないが、酒類中のNPやBPAについては濾過精製工程で少量の活性炭処理により、濃度が低下することが分かっている。この銘柄については機材からの溶出と濾過精製工程での低下がないため高い値となっている可能性も考えられる。しかし、増加している原因については今後検討を加える必要がある。

赤ワインのNPとBPAの変動については、商品表示において「海外産の果汁を国内で醸造し、

輸入ワインとブレンドしている」旨が記載され、原材料レベルでの影響が反映されている可能性がある。

3-4. 酒 粕

平成19年度の調査では同日に同一銘柄Aを4点(内2点は同一ロット・購入店舗は2か所)および異なる日に購入した同一銘柄Bを5点(内3点は同一ロット購入店舗は2か所)で購入した。同一銘柄でも、平成19年度買上げ銘柄AのNP濃度で、25~160 μg/kg, BPA濃度で1以下~1.6 μg/kg, 銘柄BのNP濃度で50~118 μg/kg, BPA濃度で1以下~2.3 μg/kgと個々の変動が大きかった。しかし、例えばNPについてみた場合、

第6表 継続買上げ製品の濃度変化（単位は $\mu\text{g/l}$ ）

		H16	H17	H18	H19
清酒	ノニルフェノール	23	NT	29.4	39.3
焼酎	フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	340	64	44	64
ワイン (赤)	ノニルフェノール	2.9	0.2	24	0.65
	ビスフェノール A	1.5	0.98	0.36	0.71

NT は調査せずを示す。

平成19年度に銘柄Aについては $85.6 \pm 29.9 \mu\text{g/kg}$ （平均 \pm 標準偏差）、銘柄Bについては $94.0 \pm 66.0 \mu\text{g/kg}$ となり、平成16年度と比べると $310 \rightarrow 85.6 \mu\text{g/kg}$ （銘柄A）、 $230 \rightarrow 94.0 \mu\text{g/kg}$ （銘柄B）と低下していた。

銘柄Aについては平成16、19年度ともにDEHPの値が1,100、990 $\mu\text{g/kg}$ と高い値になった。平成12年前後に市販弁当中のDEHP濃度が異常の高く社会問題になったが、その際の調査値は803~8,930 ng/g （1999年調査）であり、主な原因が調理用ポリ塩化ビニル（PVC）製手袋であることが判明し、その規制が平成12年6月より実施¹⁰されている（DEHPの許容一日摂取量は40~140 $\mu\text{g/kg}$ 体重/日）。その結果、この規制以後、市販弁当10検体の再調査（平成12年8月）では最高値でも517 ng/g 、平均値では平成11年の値の約1/22である198 ng/g となっている¹¹。

例えば、DEHPを1,000 $\mu\text{g/kg}$ 含む酒粕を粕汁に使用した場合（50 g使用）、1食当り50 μg の摂取となる。この値は最も厳しいTDIとして40 $\mu\text{g/kg}$ 体重/日を採用し、体重50 kgのヒトが摂取したとして、許容量（2,000 μg ）の1/40であり、直接的に人体に危害を与えるものではないと考えられる。しかし、一般食品のDEHPの含量が低減している中では、酒粕についてもその含量を減らす必要があると考えられ、混入原因の追及と使用器具・機材等まで配慮した製造・流通工程の見直しを行う必要がある。

今回調査した物質については、原料や醸造工程で生成するものではなく、主に機材・器具等から混入するものと考えられている。これら器具・容器等については平成18年3月31日の厚生労働省告

示第201号（食品衛生法）により、器具及び容器包装の規格が全面改訂され、JIS・ISO規格の改正や関連業界の自主規格等も設定されていて今後、今回検査物質の機材等からの混入は少なくなるものと考えられる。しかし、これらの規格に定められた、溶出試験法や素材レベルでの規制値は一般的な酒類・食品等での使用を想定したものである。酒類製造工程中に想定外の使用条件で使用する場合は、機材に使用されている素材レベルでの確認または個別の状況にあった使用条件での溶出試験による安全性確認が必要である。例えば、多層構造になっているホース等を直接醗等へ投入する場合は、ホースの外装構造についても考慮する必要がある。また、溶出試験（食品衛生法では20%エタノールと想定）では高濃度のエタノールを含む醸造用アルコールや焼酎原酒を取り扱い、火入れや蒸留操作等での高温条件、長期貯蔵等を行う場合には、それぞれ想定される条件での溶出状況について考慮する必要がある。さらに、DEHPのように揮発性の強い物質を含む塩ビ製手袋では消毒アルコールや高温の揚げ油との併用によりDEHPの食品等への移行が進みやすくなり、主な混入原因となっていることが知られている。一方、アルコールを含む製品は親油性の成分を溶かしこむ性質があり、製造工程の状況によっては油性食品を取り扱う場合と同様に注意をする必要があると考えられる。

4. 微生物検査結果

平成19年度買上げ酒類について微生物検査（一般微生物および大腸菌群）を行ったところ、買上げ酒類46点中4点（清酒4点、焼酎1点）で一般

微生物が平均2.25 cfu/ml (1~3 cfu/ml:コロニー形成個数/ml)の生菌濃度で見出された。大腸菌群については前報⁶⁾同様、全点不検出であった。検出された4銘柄のうち1銘柄(3 cfu/ml検出)は前年度8 cfu/ml検出されたものであった。また、清酒で検出された2銘柄については前年度検出されていないものであった。買上げ点数に対する一般微生物の出現頻度はやや増加したが、生菌体濃度は前回同様1~3 cfu/mlと、水道水水質基準の一般細菌基準値(100 cfu/ml以下)より十分低い値であった。

ま と め

平成17, 18, 19年度に市販酒類(清酒, 焼酎, ビール, ワイン, ウイスキー, リキュール)を2, 50, 46点, および酒粕4, 2, 12点を買上げ, 平成16年度に市販酒類および酒粕を買上げ分析, 比較的高い含量を示した物質としてノニルフェノール(NP), ビスフェノールA(BPA), フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)およびアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)について分析を行った。その結果, 酒類について, NP濃度の平均値は1.9→1.4→1.3 µg/l, BPA濃度の平均値は0.55→0.13→0.09 µg/l(平成16→18→19年度)となった。平成16年度買上げ酒類を含めた最大値はNPで39.3 µg/l(平成19年度買上げ), BPAで13.0 µg/l(平成16年度), DEHPで340 µg/l(平成16年度), DEHAで7.4 µg/l(平成19年度)であった。酒粕については平成16年度買上げ含めた最大値はNPで310 µg/kg(平成16年度買上げ), BPAで6.3 µg/kg(平成17年度), DEHPで1,100 µg/kg(平成16年度), DEHAで47 µg/kg(平成16年度)であった。平成17年度以降最大となった製品中の分析値と各物質の耐容一日許容量(TDI)から, 酒類および酒粕による影響は今のところ大きくはないと考えられるが, 外因性内分泌かく乱物質の酒類等への混入に対しては今後とも配慮していく必要があるものと思われる。酒類中の微生物については平成18年度調査に比べ検出率が若干増加したが, 検出率は9%以下で, 検出される濃度も平

均で2.25 cfu/ml, 最大でも3 cfu/mlと低いものであった。なお, 全酒類製品で大腸菌群は検出されなかった。以上より, 水道水水質基準の一般細菌の基準値(100 cfu/ml)より, 十分低く問題のないレベルであった。

参 考 文 献

- 1) 内分泌攪乱化学物質問題へ環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計SPEED'98—:
<http://www.env.go.jp/chemi/end/endindex.html>
- 2) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について—ExTEND2005—:
<http://www.env.go.jp/chemi/end/extend2005/index.html>
- 3) 厚生労働省ホームページ:
<http://www.nihs.go.jp/edc/edc.html>
- 4) 向井 伸彦, 木曾 邦明: 酒類の安全性に関する調査(第3報)—外因性内分泌かく乱物質の分析—, 酒類総合研究所報告, 177, 43(2005)
- 5) 欧州食品安全局(Bisphenol Aの耐容一日摂取量について)
http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620835386.htm
- 6) 後藤 邦康: 酒類および清酒粕中のアスベストと一般微生物の分析, 酒類総合研究所報告, 179, 44(2007)
- 7) 中西 成子, 日野 隆信: 固相抽出-GC/MSによる水中のフェノール類の分析方法の検討, 千葉衛研報告, 24, 16-21(2000)
- 8) 矢口 久美子ら: ディスク型固相を用いた環境水中のアルキルフェノール及びビスフェノールAの分析法, 東京衛研年報, 53, 229-233(2002)
- 9) 厚生労働省「水質基準の見直しにおける検討概況」:
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/konkyo0303.html>
- 10) 厚生省生活衛生局食品化学課長通知: 塩化ビ

ニル製手袋の食品への使用について，平成12
年6月14日，衛化第31号（2000）

11) 津村 ゆかりら：調理用 PVC 製手袋使用規

制後における市販品中のフタル酸エステル
類及びアジピン酸ジ（2-エチルヘキシル）濃
度，食衛誌，42，128-132（2001）