

資料

養殖魚及び天然魚における ヒドロコルチゾン含有状況について

清 川 由 樹 吉 田 純 一

1 はじめに

ヒドロコルチゾン（以下「HC」という。）は抗炎症作用を有する動物用医薬品であり、現在は乳のみに残留基準値（0.01ppm）が定められている。一方、HCは副腎皮質ホルモンの一種で、生体内物質であることから、「食品添加物等の規格基準」（昭和34年厚生省告示340号）の第1のA食品一般の成分規格第8項（基準値が個別に定められていない場合、農薬等の成分である物質が自然に食品に含まれる物質と同一であるときは、対象となる食品に通常含まれる量を超えてはならない）が適用される。

当センターでは、食品中に残留する動物用医薬品の試験を厚生労働省から示された多成分試験法である「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）」¹⁾（以下「一斉法Ⅰ」という。）に準じて実施しており、2013～2015年度にかけて、複数の養殖魚から定量下限値（0.01ppm）を超えてHCが検出された。

そこで、2014～2015年度の養殖魚におけるHC含有状況とあわせて、HCが魚類に通常どの程度含有されているのか把握する目的で、天然魚におけるHC含有量についても調査を実施したので報告する。

2 調査方法

2. 1 試料

養殖魚7魚種（ウナギ、クロマグロ、ニジマス、ヒラメ、マダイ、ブリ、カンパチ）計82検体、天然魚9魚種（サゴシ、ヤマトカマス、サヨリ、マダイ、アラカブ、イサキ、オオモンハタ、ネイゴ、ハマチ）計65検体

2. 2 対象化合物

ヒドロコルチゾン（HC）

2. 3 試薬及び試液

2. 3. 1 試薬

標準品：ヒドロコルチゾン（和光純薬工業(株)）

有機溶媒：*n*-ヘキサン（残留農薬・PCB試験用）、抽出用のアセトニトリル（HPLC用）、メタノール（HPLC用）、テトラヒドロフラン（HPLC用）及び1-プロパノール（HPLC用）は和光純薬工業(株)製を、LC-MS/MSの移動相用のアセトニトリル（LC/MS用）は関東化学(株)製を用いた。

その他の試薬：無水硫酸ナトリウム（残留農薬試験用）は和光純薬工業(株)製、ギ酸（HPLC用）、ジメチルホルムアミド（特級）は関東化学(株)製を用いた。

2. 3. 2 標準原液及び標準液の調製

標準品10mgを量り取り、メタノールに溶解後、メスフラスコで100mLとしたものを標準原液とした。またアセトニトリル：水（4：6）混液で適宜希釈したものを標準液とした。

2. 3. 3 試液

0.05%ギ酸水溶液は、ギ酸0.5mLを超純水で1Lにメスアップしたものをを用いた。アセトニトリル飽和ヘキサンは、アセトニトリルと*n*-ヘキサンを等倍量混合して30分間振とう後、1時間ほど静置したヘキサン層を用いた。

2. 4 装置

高速液体クロマトグラフは(株)島津製作所製 Prominenceシリーズを使用した。送液ポンプはLC-20AD、オートサンプラーはSIL-20ACHT、カラムオーブンはCTO-20ACを用いた。

質量分析装置はエービーサイエックス社製4000QTRAPを使用し、イオンソースはTurb Ion Sprayを用いた。

2. 5 LC-MS/MS測定条件

測定条件は、表1のとおり。

表1 LC-MS/MSの測定条件

LC条件	
分析カラム	: ジーエルサイエンス (株) 製 Inertsil ODS-SP (内径2.1mm, 長さ100mm, 粒径3μm)
流速	: 0.2mL/min
注入量	: 5μL
カラム温度	: 40℃
移動相	: A: アセトニトリル B: 0.05% 酢酸水溶液
グラジェント条件	: 0min (A : B = 5 : 95) → 3min (5 : 95) → 15min (95 : 5) → 22min (95 : 5)
MS/MS条件	
イオン化法	: エレクトロスプレーイオン化 (ESI)
イオンスプレー電圧	: 5.5kV
イオンソース温度	: 500℃
RT	: 11.6min
DP	: 81V
CE	: 33V
測定イオン	: Q1 : 363.1 Q3 : 121.2
測定モード	: MRM (Multiple Reaction Monitoring)

2. 6 試験溶液の調製

一斉法 I の一部を変更し、以下のとおり実施した。なお、試験フローを図1に示した。

試料5.0gを量り取り、アセトニトリル30mL、アセトニトリル飽和ヘキサン20mL及び無水硫酸ナトリウム10gを加え、ホモジナイズした後、毎分3000回転、4℃で5分間遠心分離し、有機層を採った。得られた有機層からアセトニトリル層を分取し、残ったヘキサン層を遠心分離した残留物に加え、さらにアセトニトリル20mLを加えて激しく振り混ぜた後、毎分3000回転、4℃で5分間遠心分離した。ヘキサン層を捨て、得られたアセトニトリル層を合わせ、1-プロパノール10mLを加えて、40℃以下で乾固直前まで濃縮し、窒素ガス (純度: 99.999%) で還流させ、プロパノール臭がなくなるまで完全に乾固し、溶媒を除去した。得られた残留物にアセトニトリル: 水 (4: 6) 混液5.0mLを加え、超音波照射処理により溶解し、アセトニトリル飽和ヘキサン2.5mLを積層して、毎分3000回転、4℃で5分間遠心分離し、アセトニトリル層を試験溶液とした。

2. 7 装置検出下限 (IDL)

装置検出下限 (以下「IDL」という。) の測定及び算出は、「化学物質環境実態調査実施の手引き (平成20年度

版)」²⁾に従った。IDLは、検量線に用いる最低濃度の標準液 (0.002ppm) を7回繰り返して測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて次式によって算出した。

$$IDL = (t_{n-1, 0.05}) \times \sigma_{n-1, 1} \times 2$$

$t_{n-1, 0.05}$: 危険率5%, 自由度n-1 のt値 (片側)

$\sigma_{n-1, 1}$: IDL 算出のための測定値の標本標準偏差

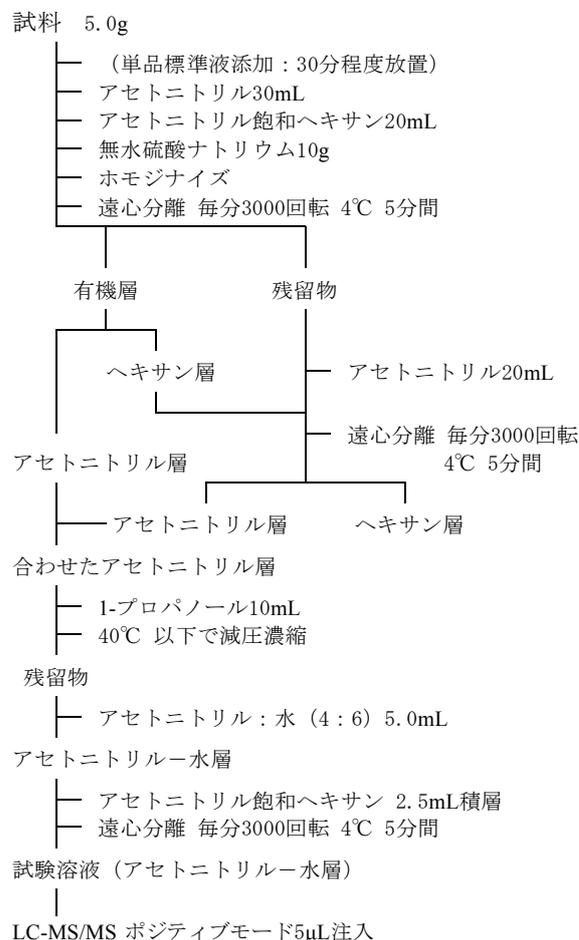


図1 試験フロー

3 結果及び考察

3. 1 装置検出下限 (IDL)

IDLを表2に示す。IDLは0.00101ppmであったことから、0.001ppm以上の値を示したものを検出ありとした。

表2 装置の検出下限

物質名	平均値 (ppm)	標準偏差 (ppm)	IDL (ppm)	CV (%)	真度 (%)
HC	0.00191	0.00026	0.00101	13.3	96.3

3. 2 養殖魚のHC含有量

表3に養殖魚のHC含有状況を示す。養殖魚82検体中33検体からHCが検出された。このうち11検体においては

定量下限（0.01ppm）以上のHCが検出され、特にマダイやカンパチから0.030ppmと高い含有量が確認された。一方、ウナギやクロマグロ、ニジマスにおいては定量下限以上のHCは検出されなかった。

HCが定量下限を超えて検出された検体については投薬履歴等の確認を行ったが、HC使用の実態はなかった。そのため検出されたHCは生体内物質である可能性が高いと考えられる。

表3 養殖魚のHC含有量及び検出率

魚種	検体数	検出 検体数*	最大含有量 (ppm)	平均含有量 (ppm)	検出率 (%)
ウナギ	19	3	0.003	0.0004	15.8
クロマグロ	2	0	—	—	0.0
ニジマス	5	1	0.003	0.0006	20.0
ヒラメ	22	9	0.024	0.0045	40.9
マダイ	9	6	0.030	0.0085	66.7
ブリ	12	5	0.013	0.0021	41.7
カンパチ	13	9	0.030	0.0080	69.2
平均				0.0025	40.2

* IDL以上の検出数

3. 3 天然魚のHC含有量

表4に天然魚のHC含有状況を示す。天然魚65検体中57検体からHCが検出され、このうち14検体においては定量下限以上のHCが検出された。特にサヨリについては全検体から定量下限以上のHCが検出され、最も含有量が高かったものは0.045ppmであった。一方でサゴシやアラカブ、イサキ、オオモンハタ、ネイゴなど定量下限を超過しない魚種も多くあった。

天然魚については動物用医薬品であるHCが使用されている可能性は無く、天然に存在する状態でも生体内物質としてのHCが定量下限を超過する可能性があることが明らかになった。

表4 天然魚のHC含有量及び検出率

魚種	検体数	検出 検体数*	最大含有量 (ppm)	平均含有量 (ppm)	検出率 (%)
サゴシ	7	2	0.002	0.0004	28.6
ヤマトカマス	30	28	0.016	0.0039	93.3
サヨリ	6	6	0.045	0.0336	100.0
マダイ	8	8	0.012	0.0091	100.0
アラカブ	4	4	0.003	0.0028	100.0
イサキ	2	2	0.004	0.0041	100.0
オオモンハタ	2	2	0.006	0.0055	100.0
ネイゴ	3	2	0.002	0.0012	66.7
ハマチ	3	3	0.020	0.0138	100.0
平均				0.0072	87.7

* IDL以上の検出数

3. 4 他機関のデータとの比較

静岡市環境保健研究所が魚類を対象に実施した調査によると、タイから0.065ppm、カンパチから0.023ppmと高値のHCが検出されている³⁾。今回の調査でも、マダイ及びカンパチのHC含有量が高かったことから、同様の傾向を示していると言える。

また、国立医薬品食品衛生研究所が魚介類を対象に実施した調査では、魚類のうちクロマグロを除く全ての種類で0.0001ppm以上の検出があったと報告がある⁴⁾。今回の調査においても、クロマグロからのHC検出がなかったことから、クロマグロはHCが検出されにくい魚種であることが推察される。

以上のことより、魚種によってHC含有量には大きな違いがあることが示唆された。

3. 5 重量とHC含有量

養殖及び天然マダイについて、HCが検出された検体の重量とHC含有量を図2、図3に示した。同じ重量であってもHC含有量に違いがあることや最大HC含有量を示した検体の重量が最大でも最小でもないことから、重量とHC含有量に相関性はなく、個体によって含有量は大きく異なることが分かった。

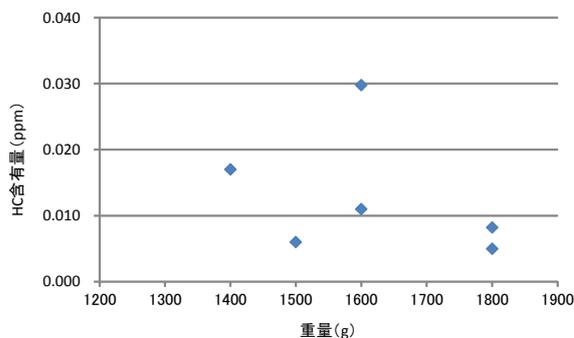


図2 養殖マダイ重量とHC含有量

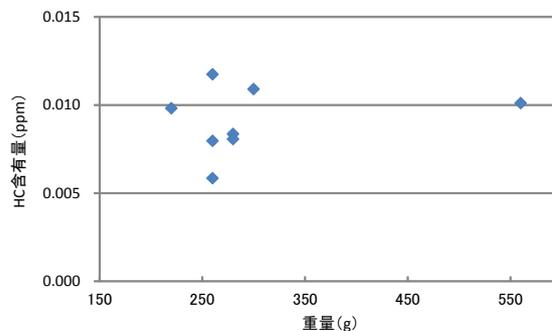


図3 天然マダイ重量とHC含有量

3. 6 HC含有量とストレスの関係

HCはストレス応答に素早く反応するホルモンとして知られており、魚類でも同様の作用を示すことが知られている。また、一般に高密度飼育は血中コルチゾールが高くなる⁹⁾という報告がある他、揚網行為が血中コルチゾール濃度に影響を及ぼす⁹⁾という報告もあることから、魚類は様々なストレス要因にさらされており、ストレスがHC含有量に影響を与えていることが分かる。

今回、HCが0.024ppm検出された養殖ヒラメの写真を図4に、また同施設において養殖されたHC不検出検体を図5に示す。HCが検出された検体については、魚体が大きく反り、致死時に強いストレス負荷があったことが推測される。同じような飼育環境でもHC含有量に違いが生じていることから、致死時のストレス要因の影響は大きいと思われる。

以上のことより、HC含有量が個体によって大きく異なるのは、ストレスが関係している可能性が高い。



図4 HCが検出された養殖ヒラメ



図5 HC不検出検体

3. 7 養殖魚及び天然魚のHC含有状況の比較

養殖魚のHC検出率は40.2%、平均含有量は0.0025ppmであった(表3)。一方、天然魚は検出率87.7%、平均含有量0.0072ppmであり(表4)、検出率及び含有量は天然魚の方が高い値を示した。

天然魚については、漁獲方法によっては、漁獲網による圧迫と拘束に加えて、ウロコの脱離等がストレス要因となり、HC含有量及び検出率が高くなった可能性がある。一方で、養殖魚については比較的魚体の損傷が少ない漁獲方法が用いられている可能性が高く、さらには活

き締め処理が行われる等、致死時のストレスが比較的少なかったことから検出率が低くなったのではないかと考える。

4 まとめ

- 1) 養殖魚については4割の検体からHCが検出されたが、この検出は生体内物質である可能性が高いと考えられる。また天然魚については9割弱の検体からHCが検出され、天然に存在する状態でもHCが定量下限を超過することが明らかになった。
- 2) HC含有量は魚種によって大きく異なる一方で、同魚種間でも個体差があることが確認された。HCはストレス刺激によって分泌されることから、ストレスを多く受けた検体は高値を示す傾向にあることが示唆され、個体差が生じる要因と考えられる。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知；食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法（食安発1129002号），平成17年11月29日
- 2) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課；化学物質環境実態調査実施の手引き（平成20年度版），平成21年3月
- 3) 静岡市環境保健研究所；魚類からのヒドロコルチゾン検出事例について，静岡市環境保健研究所年報，26，45～47（2010）
- 4) 坂井隆敏，坂井英里，他；魚介類中の天然ヒドロコルチゾン含有量実態調査，全国衛生化学技術協議会年会講演集，49，74～75（2012）
- 5) 赤崎正人；ストレス作用因子と魚類のストレス，日本水産増殖，38（3），298～299（1990）
- 6) 角田篤弘，Ari Purbayanto，他；漕ぎ刺網で漁獲されたシロギスの血中コルチゾール濃度を指標としたストレス測定，日本水産学会誌，65（3），457～463（1999）