

200837046A (1/2)

厚生労働科学研究費補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業

既存添加物の有効性と品質を確保するための
規格試験法の開発

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

分冊 その 1

研究代表者	山崎 壮	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	受田 浩之	高知大学
	松本 清	九州大学大学院
	松藤 寛	日本大学
	杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所
	堀江 正一	埼玉県衛生研究所
	多田 敦子	国立医薬品食品衛生研究所
	秋山 卓美	国立医薬品食品衛生研究所

平成 21 年 (2009 年) 4 月

目次

分冊 その1

I. 総括研究報告書

- 既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発……………1
研究代表者：山崎 壮

II. 分担研究報告書

A. 既存添加物の品質評価試験法の開発

1. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究
- 1.1. 酸化防止剤の抗酸化活性評価に対する ORAC 法の適用性について……………9
研究分担者：受田 浩之
研究協力者：松本 清
研究協力者：島村 智子
- 1.2. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究……………17
研究分担者：松本 清
研究協力者：受田 浩之
2. 天然酸化防止剤の品質劣化及び過剰使用の有害影響に関する研究
- 2.1. 天然酸化防止剤の品質劣化及び過剰使用の有害影響に関する研究……………25
研究分担者：松藤 寛
3. NMR を用いた既存添加物の新規分析法の開発に関する研究
- 3.1. NMR を用いた既存添加物の新規分析法の開発に関する研究
—qNMR を用いたコチニール色素（カルミン酸）の絶対定量—……………33
研究分担者：杉本 直樹
4. 保存料・日持ち向上剤の抗菌活性と活性成分に関する研究
- 4.1. 保存料・日持ち向上剤の抗菌活性と活性成分に関する研究
—既存添加物検討対象候補品目の選定—……………47
研究分担者：山崎 壮
研究協力者：伊藤 裕才
- 4.2. 保存料・日持ち向上剤の抗菌活性と活性成分に関する研究
—抗菌・抗かび活性の測定—……………55
研究分担者：堀江 正一
研究協力者：小林 晴美
5. 既存添加物の規格作成に向けての検討
- 5.1. 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究（概要）……………65
研究協力者：日本食品添加物協会

B. 既存添加物の基原確認試験法の開発	
6. 既存添加物の成分と基原に関する研究	
6.1. 既存添加物苦味料イソアルファー苦味酸の成分分析	73
研究分担者：多田 敦子	
研究協力者：石附 京子	
6.2. 既存添加物ドクダミ抽出物の成分分析	83
研究分担者：多田 敦子	
研究協力者：石附 京子	
7. 食品用酵素の基原と確認試験法の開発に関する研究	
7.1. 食品用酵素の基原と確認試験法の開発に関する研究	91
研究分担者：秋山 卓美	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	97
IV. 研究成果の刊行物・別刷	99

分冊 その2 (別冊)

既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究
日本食品添加物協会

1. 報告書	i
2. 別紙資料	
I. 別紙資料1	1
1.新規規格作成検討品目	2
1-1.増粘安定剤(レバン)	2
1-2.酸化防止剤(8品目)	6
(1)酵素分解リンゴ抽出物	7
(2)コメヌカ酵素分解物	8
(3)セサモリン	10
(4)セージ抽出物	11
(5)単糖・アミノ酸複合	12
(6)ヘゴ・イチョウ抽出物	14
(7)ペパー抽出物	15
(8)メラロイカ精油	16
1-3.ガムベース・光沢剤(ミルラ)	17
1-4.製造用剤・ミネラル(8品目)	23
(1)酸素	24
(2)水素	25
(3)ゼイン	27
(4)鉄	29
(5)ナフサ	31
(6)ニストース	32
(7)木材チップ	33
(8)木炭	34
2. 既策定規格の見直し品目	35
2-1.着色料(8品目)	35
(1)カロブ色素	35
(2)金	36
(3)クーロー色素	39
(4)タマネギ色素	41
(5)赤ダイコン色素	44
(6)エルダーベリー色素	51

(7) ブドウ果汁色素	57
(8) 褐色系色素（9品目）色素	62
2-2. 増粘安定剤（グァーガム酵素分解物）	74
2-3. 酵素（フルクトシルトランスフェラーゼ）	79
2-4. 乳化剤（動物性ステロール）	85
II. 別紙資料2	91
1. 第1部会（甘味料）	92
2. 第2部会（着色料）	111
3. 第3部会（保存料・日持向上剤）	247
4. 第4部会（増粘安定剤）	269
5. 第5部会（酸化防止剤・ビタミン）	284
6. 第6部会（ガムベース・光沢剤）	296
7. 第7部会（酵素）	311
8. 第8部会（酸味料）	319
9. 第9部会（乳化剤）	322
10. 第10部会（乳化剤）	325
11. 第13部会（製造用剤・ミネラル類）	336

既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発

研究代表者 山崎 壮 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部第二室長

研究要旨

既存添加物の成分規格の整備が大幅に遅れている。また、これまでの既存添加物成分規格では添加物としての有効性評価が軽視されてきた。そこで我々は、平成 17～19 年度厚生労働科学研究において、酸化防止剤、苦味料、増粘安定剤、ガムベースに重点を置き、有効性（活性）を測定する手法も導入して品質評価の指標となる成分を明らかにしてきた。有効性を担保できる規格を作成するという考えをさらに進めるために、本研究では、これまで我々が取り上げなかった保存料・日持ち向上剤の成分解析と、基原の確認試験法の開発を重点事項とした。さらに、分析法の開発に当たっては、混合物の確認能力にすぐれた GC/MS、LC/MS、NMR を利用した規格試験法の開発を進めた。

既存添加物の品質評価試験法の開発としては、

- (1) 成分規格試験法に利用できる抗酸化活性標準操作法を確立するために、初年度は、ORAC 法による測定を行い、昨年度までに得られた DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法による抗酸化活性値との関連性を考察した。また、DPPH 法のプロトコールを再検証し、改良した。酸化防止剤の併用効果を検討するために、薬剤の併用効果判定に汎用されている Median effect analysis と昨年度用いた Fractional product method とで解析結果を比較した。
- (2) 天然抗酸化剤の品質劣化と過剰使用による食品中での有害物質生成の可能性を調べるため、初年度は、ローズマリー抽出物の照射分解物と熱分解物の遺伝毒性を調べた。
- (3) 定量 NMR 分析法は、測定原理から考えて、測定対象成分の標準物質がなくても混合試料のままでも混合試料中の個別成分を定量可能であるという特徴をもつ。そこで、定量 NMR 分析法を既存添加物の分析に応用することをめざし、初年度は定量 NMR 法を用いてコチニール色素の主色素成分であるカルミン酸を絶対定量した。
- (4) 保存料・日持ち向上剤では、有効性の評価と抗菌活性評価の指標成分を明らかにすることをめざし、初年度は、抗菌もしくは静菌作用があるとされている国内で流通実績のある既存添加物を収集し、抗菌・抗かび活性をスクリーニングした。
- (5) 既存添加物の自主規格作成と改良を業界に依頼した。業界自主規格の新規作成と見直し、および第 4 版既存添加物自主規格試験法の検証を行った。

既存添加物の基原確認試験法の開発としては、

- (1) 植物由来添加物の成分と原料植物中の成分とを比較することで市販製品の基原の妥当性を考察することをめざし、初年度は、イソアルファー苦味酸、ホップ抽出物、およびドクダミ抽出物の成分分析法を検討し、基原の確かさを確認した。
- (2) 酵素製品中の酵素タンパク質を確認する方法を検討するために、3 品目（ α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ）のそれぞれ複数の基原に由来する複数の酵素製品を対象にして、SDS-PAGE によって予備的検討を行った。

分担研究者

- 受田 浩之 高知大学教育研究部自然科学系農学部門 教授
- 松本 清 九州大学大学院農学研究院教授
- 松藤 寛 日本大学生物資源科学部准教授
- 堀江正一 埼玉県衛生研究所水・食品担当部長
- 秋山 卓美 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官
- 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部 第三室長
- 多田 教子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官

協力研究者

- 島村 智子 高知大学農学部 准教授
- 伊藤 裕才 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官
- 小林 晴美 埼玉県衛生研究所水・食品担当部
- 石附 京子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部
- 高橋 仁一 日本食品添加物協会常務理事

A. 研究目的

既存添加物は、指定添加物と異なり、事前の安全性・有効性の評価、成分規格設定がないまま使用が認められたものである。厚生労働省はその後既存添加物の安全性確認と成分規格作成に向けて積極的に取り組んできたが、既存添加物 418 品目のうち、国の成分規格設定済（＝食品添加物公定書に収載済）は 130 品目にとどまっている。国の成分規格の整備が大幅に遅れている。成分規格設定済の品目は、成分組成が比較的単純であり、主な有効成分が既知であるものが主体であるのに対して、残された品目では、有効成分が多く類似化合物の混合物であると考えられている品目や、有効性と有効成分自体が明確でない品目が多い。また、成分の有効性と安全性の確保には正しい基原と部位の原材料を常に使用することが重要であり、国の成分規格の中にはそれを担保する規定も整備する必要がある。今後の成分規格案作成には従来よりも一層の困難が予想されるので、業界自力での自主規格作成に頼るだけでは進展しない。

従来、既存添加物の品質確保を図るための研究は、厚生労働省による既存添加物の成分規格整備研究事業及び安全性確認研究事業として、または厚生労働科学研究事業として、国立医薬品食品衛生研究所を中心とした研究班で行われているに過ぎない。

これまでの既存添加物成分規格では添加物としての有効性評価が軽視されてきた。そこで我々は、平成 17～19 年度厚生労働科学研究において、酸化防止剤、苦味料、増粘安定剤、ガムベースに重点を置き、有効性（活性）を測定する手法も導入して品質評価の指標となる成分を明らかにしてきた。有効性を担保できる規格を作成するという考えをさらに進めるために、本研究では既存添加物の品質評価試験法と基原確認試験法の開発を行う。分析法の開発に当た

っては、食品添加物公定書の次期改正が予定される 5～6 年後の分析技術レベルを考慮して、混合物の確認能力にすぐれた GC/MS、LC/MS、NMR を利用した規格試験法の開発を行う。

既存添加物の品質評価試験法の開発としては、平成 17～19 年度厚生労働科学研究の成果を踏まえて天然酸化防止剤の品質規格試験法に利用できる具体的な抗酸化活性標準操作法を確立する。また、NMR を既存添加物含有成分の定量分析法に応用する研究を行うが、測定対象成分の標準物質がなくても混合試料のままでも混合試料中の個別成分を絶対定量するという新しい概念である。保存料・日持ち向上剤では、抗菌力と抗菌活性を担う成分が不明確である品目・製品が多いので、有効性の評価と抗菌活性評価の指標成分を明らかにする。

既存添加物の基原確認試験法の開発としては、正しい基原と部位の原材料が使用されていることを確認するために有効な指標成分を明らかにし、その成分の分析手法を開発する。

B. 研究方法（3 年間の全体計画）

I. 既存添加物の品質評価試験法の開発

1. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

平成 17～19 年度厚労科研の成果を踏まえ、成分規格試験法に利用できる室間再現性のある抗酸化活性標準操作法を確立する。そのために、以下の項目を年度別に順次検討する。

- ・ラジカル消去活性測定法（DPPH 法、ABTS 法）で評価すべき酸化防止剤と活性酸素消去活性測定法（WST-1 法）で評価すべき酸化防止剤の区別を行う。
- ・酸化防止剤併用効果と併用が活性測定値に与える影響を検討する。
- ・ORAC 法による抗酸化活性との比較評価

や、脂質過酸化抑制効果の測定に有効な方法を検討する。

2. 天然酸化防止剤の品質劣化及び過剰使用の有害影響に関する研究

天然抗酸化剤の過剰摂取（主に健康食品素材として）による生体内有害作用が報告され、抗酸化剤がプロオキシダント作用を示す可能性が指摘されている。食品中でも天然抗酸化剤の劣化や過剰使用により抗酸化剤のプロオキシダント作用による有害物質生成の可能性があり得る。そこで、天然抗酸化剤の食品中での有害物質生成の可能性を調べ、抗酸化剤の不適切な使用による有害物質生成を防ぐための成分規格、使用基準、適正使用に資する基礎的情報を得ることを目的とする。そのために、*in vitro* 遺伝毒性を指標にして、酸化防止剤及び酸化劣化した酸化防止剤の低濃度から高濃度の範囲にわたって有害影響を検討する。また遺伝毒性が認められた成分の化学構造を明らかにする。

3. NMR を用いた既存添加物の新規分析法の開発に関する研究

NMR は測定原理から考えて、測定対象成分の標準物質がなくても混合物試料から成分を分離・精製することなく混合物中の個別成分を定量可能である。そこで、NMR を絶対定量分析法として利用し（以下、定量 NMR 法と呼ぶ）、既存添加物の分析に応用することをめざす。年度ごとに対象品目を替えて検討する。

4. 保存料・日持ち向上剤の抗菌活性と活性成分に関する研究

既存添加物の保存料・日持ち向上剤は、抗菌もしくは静菌作用があるとされているが、市販製品の抗菌力と抗菌活性成分が不明確である上、有効性を担保する成分規格も設定されていない。そこで、有効性を担保するための成分試験法を開発することを目的に、活性成分を解析し、抗菌活性評価の指

標成分を明らかにする。

初年度は保存料・日持向上剤の抗菌・抗かび活性スクリーニングを行い、2～3年目に抗菌・抗かび活性成分の分画と構造決定（成分分画と抗菌・抗かび活性測定との連携）を行う。

5. 既存添加物の規格作成に向けての検討
既存添加物の自主規格作成と改良を業界に依頼する。

II. 既存添加物の基原確認試験法の開発

1. 既存添加物の成分と基原に関する研究

国の成分規格が設定されていない品目を中心に、正しい基原と部位の原材料が使用されていることを確認するために有効な指標成分を明らかにし、その成分の分析手法を開発する。甘味料、酸化防止剤、天然着色料、苦味料などから年度ごとに品目を替えて検討する。

一部の既存添加物品目では基原記載に疑義が生じている。そこで、原料生物の和名及び学名の妥当性の文献調査を行う。原料植物が入手できる場合には、植物のDNA分析による種の同定と植物の含有成分の分析を行い、既存添加物製品の基原記載の妥当性を評価する。

2. 食品用酵素の基原と確認試験法の開発に関する研究

日本では食品用酵素(すべて既存添加物)は、酵素機能を表し、酵素タンパク質(物質)を特定できる名称ではない。法的には酵素基原が指定されていないため、酵素基原が異なると酵素タンパク質は異なり、酵素特性も酵素活性測定法も異なる。そこで、食品酵素の品質確保の観点から、最終製品の化学分析により品目の識別、期限の識別ができる手段を確保しておくために、基原酵素タンパク質を確認する方法を開発する。タンパク質電気泳動、ペプチド分析などを検討する。年度ごとに品目を替えて検討する。

III. 倫理面への配慮

本研究においては、実験動物、ヒトを対象とした研究およびヒトから採取した臓器・組織などの試料を用いる研究は実施しなかった。分担研究課題の一つでヒト由来細胞株としてヒトリンパ芽球培養細胞株TK6を使用した。ATCCからの分譲ではbiosafety level 1とされており、研究倫理および安全性上の国の指針の対象に該当しない。その取り扱いに関しても、研究分担者の所属機関での培養細胞の取り扱い規程に従った。

C. 研究結果および考察

I. 既存添加物の品質評価試験法の開発

1. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

近年、食品の抗酸化活性評価法の一種であるORAC法の使用頻度が高まっている。そこで、ORAC法による測定を行い、昨年度までに得られたDPPH法、ABTS法、WST-1法による抗酸化活性値との関連性を考察した。ORAC法とDPPH法、あるいはABTS法の間には有意な相関が認められたものの、WST-1法との相関関係に有意性は認められなかった。ORAC法による酸化防止剤の力価評価は可能であるものの、脂溶性酸化防止剤への適用性の低さ、測定時間の長さ、再現性の低さなどの特徴を理解した上で慎重に取り扱う必要があるものと考えられた。

DPPH法のプロトコールを再検証し、改良した。酸化防止剤の併用効果を検討するために、薬剤の併用効果判定に汎用されているMedian effect analysisと昨年度用いたFractional product methodとで解析結果を比較した。「既存添加物名簿収載品目リスト」に記載されている天然物酸化防止剤の中で単一の成分からなる7種類の添加物を用い、10通りの組み合わせで併用効果を検討した結果、相乗

効果1組、相殺効果3組、相加効果6組という判定結果が得られた。この結果は、19年度厚生科学研究で用いた Fractional product method の結果と一部異なるものであった。

2. 天然酸化防止剤の品質劣化及び過剰使用の有害影響に関する研究

天然酸化防止剤の品質劣化と過剰使用による食品中での有害物質生成の可能性を調べる目的で、ローズマリー抽出物をモデル試料とし、強い条件で酸化劣化させたときの成分変化と有害物質生成の可能性を調べた。ローズマリー抽出物に光照射すると数多くの分解物が生成したが、未処理のときと同様に、遺伝毒性を示さなかった。一方、加熱分解させたところ、分解物は遺伝毒性を示した。

3. NMR を用いた既存添加物の新規分析法の開発に関する研究

定量 NMR 法の応用例として、コチニール色素の主色素成分であるカルミン酸を絶対定量した。複数試料で得られた含量値を HPLC 分析の結果と比較したところ、定量 NMR 法で求めた含量値 (%) と carminic acid の HPLC ピーク面積の間に良好な正の相関が得られた。今回行った定量 NMR 測定が幅広い純度(含量)範囲で絶対定量法として機能し、計量学的に信頼性の高い分析値を導いていることが確認された。定量 NMR 法は測定時間が約 10 分以内であり、測定対象の標準品を必要としない点が優れており、品質評価法として有望であることを示した。

4. 保存料・日持ち向上剤の抗菌活性と活性成分に関する研究

既存添加物名簿掲載品目リスト注解書(日本食品添加物協会)に抗菌作用もしくは静菌作用があると記載されている既存添加物のうちで国内で流通実績のあるものを収集し、抗菌・抗かび活性をスクリー

ニングした。精製水及び 80%メタノールで調製した 1%溶液のグラム陽性菌、グラム陰性菌、芽胞形成菌、酵母及びかびに対する抗菌活性を調べた結果、ポリリシンは試験に供した 5 種類の試験菌に対して抗菌力を示した。茶抽出物、カンゾウ油性抽出物、カワラヨモギ抽出物、ホコッシ抽出物が一部の試験菌に抗菌力を示した。

5. 既存添加物の規格作成に向けての検討

既存添加物の自主規格作成と改良を業界(日本食品添加物協会)に依頼した。新たに 18 品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、11 品目について「第 4 版既存添加物自主規格」の見直し改定を行った。また、「第 4 版既存添加物自主規格」の試験法について妥当性を確認するため、検証作業を実施した。

II. 既存添加物の基原確認試験法の開発

1. 既存添加物の成分と基原に関する研究

植物由来添加物製品の含有成分と原料植物からの抽出成分とを比較しながら、市販製品の基原の妥当性を考察することを目的として、各種イソアルファー酸異性体の LC/MS 分析法を新たに確立し、既存添加物イソアルファー苦味酸製品、一般飲食物添加物ホップ抽出物製品および市販のホップ関連製品を分析し、基原の確かさを確認した。

既存添加物ドクダミ抽出物中のフラボノイドの成分組成を明らかにし、基原を確認することを目的とし、LC/MS を用いた分析法を検討した。ドクダミ抽出物の LC/MS 分析法を確立した。生薬ジュウヤクの基原はドクダミ *Houttuynia cordata* THUNB. の花期の地上部と定義されているので、生薬ジュウヤク製品の葉由来部の 30%エタノール抽出物を作製して、既存添加物製品と成分

組成を比較した。両者の成分組成はほぼ合致し、既存添加物製品の基原はドクダミ *H. cordata* であると示唆された。

2. 食品用酵素の基原と確認試験法の開発に関する研究

酵素製品中の酵素タンパク質を確認する方法を検討する目的で、それぞれ複数の基原に由来する α -アミラーゼ、 β -アミラーゼおよびグルコアミラーゼの製品を収集し、SDS-PAGEによって分析した。 α -アミラーゼはメインバンドの泳動度によって基原の判別ができる場合が多かった。 β -アミラーゼとグルコアミラーゼは基原が異なる製品は異なるパターンを示した。基原によって特徴的な泳動パターンを示した製品が多かったので、SDS-PAGEは簡便な基原推定法として有用な場合が多いことが示された。

D. 結論

今年度はほぼ計画通り研究が進んだ。次年度は、いずれの課題も、初年度の成果を基にさらに研究を進展させる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 松藤寛、佐々怜一郎、本間友輝、宮島拓臣、山崎壮、受田浩之、島村智子、松井利郎、松本清、山形一雄：抗酸化物質の2成分混合系におけるDPPHラジカル消去活性、日本食品科学工学会誌、56(3)：129-136(2009)。

2. 学会発表

- 1) 島村智子、平山大剛、杉本直樹、山崎 壮、松井利郎、松本 清、受田浩之：酸化防止剤の力価評価に対する各種抗酸化活

性評価法の適用性—天然物由来酸化防止剤について—、日本食品科学工学会第55回大会、2008年9月、京都。

- 2) 井邊早春、石川洋哉、受田浩之、山崎 壮、松井利郎、松本清：酸化防止剤混合系におけるDPPHラジカル消去活性測定とMedian effect analysisによる併用効果の判定。第46回化学関連支部合同九州大会、2009年7月、北九州 [発表予定]
- 3) 杉本直樹、古庄紀子、建部千絵、末松孝子、内海博明、多田敦子、佐藤恭子、山崎 壮、棚元憲一：核磁気共鳴に基づく食品添加物の新規定量法の開発。日本食品化学学会第14回学術大会、2008年5月、西宮。
- 4) 杉本直樹、佐藤恭子、山崎 壮、棚元憲一、末松孝子、内海博明、齋藤 剛、井原俊英、小島 豊、伊藤澄夫：qNMRを用いた天然色素カルミン酸の絶対定量。日本生薬学会第55回年会、2008年9月、長崎。
- 5) 建部千絵、杉本直樹、齋藤 剛、井原俊英、末松孝子、有福和紀、内海博明、吉田雄一、多田敦子、佐藤恭子、山崎 壮、棚元憲一、西村哲治：qNMRに基づく食用合成色素の新規定量法。日本薬学会第129年会、2009年3月、京都。
- 6) 石附京子、多田敦子、杉本直樹、山崎 壮、棚元憲一：LC/MS/MSを用いたイソアルファー苦味酸およびホップ関連製品の分析。日本食品衛生学会第96回学術講演会、2008年9月、神戸。
- 7) 多田敦子、石附京子、濱田ひかり、小林義一、山崎 壮、棚元憲一：味認識装置による食品添加物イソアルファー苦味酸および含有苦味成分の測定。日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月、福岡。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

1. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発
平成 20 年度分担研究報告書
酸化防止剤の抗酸化活性評価に対する ORAC 法の適用性について

研究分担者 受田 浩之 高知大学教育研究部自然科学系農学部門 教授
研究協力者 松本 清 九州大学大学院農学研究院 教授
研究協力者 島村 智子 高知大学教育研究部自然科学系農学部門 准教授

研究要旨 近年、食品の抗酸化活性評価法の一つである ORAC 法の使用頻度が高まっている。しかし、食品添加物の酸化防止剤に対する ORAC 法の適用例はこれまでのところ存在しない。そこで本研究では、酸化防止剤の力価評価に対する ORAC 法の適用性について検討を行った。33 種類の酸化防止剤を試料として ORAC 法による抗酸化力価評価を行ったところ、水溶性酸化防止剤では 11 種類全て、脂溶性酸化防止剤では 22 種類中 17 種類において ORAC 値を求めることができた。過去の本事業において酸化防止剤の力価評価法として適用可と判断した 3 法（DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法）と ORAC 法の再現性（CV）を比較した結果、ORAC 法の再現性は他の 3 方法より低い傾向にあった。また、上記 3 方法と ORAC 法で得られた抗酸化力価の間の回帰分析を行ったところ、ORAC 法と DPPH 法、あるいは ABTS 法の間には有意な相関が認められたものの、WST-1 法との相関関係に有意性は認められなかった。以上のことから、ORAC 法による酸化防止剤の力価評価は可能であるものの、脂溶性酸化防止剤への適用性の低さ、測定時間の長さ、再現性の低さなどの特徴を理解した上で慎重に取り扱う必要があるものと考えられた。

A. 研究目的

現在、日本国内で使用されている酸化防止剤は、指定添加物と既存添加物の 2 種類に大別される。指定添加物は安全性と有効性が確認された上で、成分規格が設定されている。一方、既存添加物は、平成 7 年の食品衛生法の改正に伴い、経過措置的にその使用が認められているものである。これらは天然由来の複雑な混合物である場合が多く、有効成分含量、あるいは成分組成を指標とした規格基準の設定が遅れている。既存添加物については規格基準の設定を目的として、成分組成の確認、有効成分の同定、及び定量法の開発が行われているが、現状の機器分析では不可能である場合も多い。従って、

成分組成に基づいた規格が未だ設定できていない既存添加物に対しては一定の品質確保のため、抗酸化力価に基づいた新たな評価法を規格基準法として適用する必要があると考えられる。そこで本事業では、下記の 3 つの条件：(1) 過去の研究において使用された実績がある、(2) 短時間での測定が可能である、(3) 特殊な測定機器を必要としない汎用性の高い分光学的測定法である、を満たす DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法を酸化防止剤の力価評価法の候補として提案し、共同試験を行った結果、これらの 3 つの方法が酸化防止剤の品質評価法として適用可能であることを報告した¹⁾。

その一方、近年、米国、および日本国内で Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) 法を食品の抗酸化力価評価法として統一しようとする動きが見られるようになった。米国では DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法と同様、ORAC 法が食品の抗酸化力価評価に対する一般的な方法として扱われるようになり、ORAC 法による食品の抗酸化活性評価結果が多数報告されている。日本国内においても ORAC 法を用いた食品の抗酸化活性評価結果報告が増加傾向にあるものの、DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法と比べると、その報告数は極めて少ない。

ORAC 法では、ラジカル発生剤 (AAPH) から生じた活性酸素が蛍光試薬 (フルオレセイン) と反応し、蛍光強度が減少する。抗酸化物質はこの減少を防ぎ得るため、抗酸化力価の評価が可能となる。具体的には、試料添加時の蛍光強度の崩壊曲線 (Area Under Curve : AUC) と、ブランクの AUC との間の面積 (net AUC) を使用して試験に用いた抗酸化物質の抗酸化力価を評価する。また、ORAC 法は、抗酸化物質の抗酸化力価だけでなく、抗酸化能の持続時間も測定できるとされている。その一方、ORAC 法は水系の反応系で行われるため、脂溶性の抗酸化物質の測定が困難である場合が多い。また、温度の影響を受けやすい、測定手順の標準化が行われていないなどの問題点を抱えている。

既に本事業では、前述の通り、酸化防止剤の品質評価法として DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法を提案してきたが、米国、および日本国内で食品の抗酸化力価評価法として統一の動きのある ORAC 法が酸化防止剤の力価評価にも適用可能であるか否かの基礎データを収集することも重要であると判断した。そこで本研究では、33 種類の既存添加物に分類される酸化防止剤 : チャ抽出物 (4 種類)、緑茶エキス、トコ

トリエノール、d- α -トコフェロール、d- γ -トコフェロール、d- δ -トコフェロール、ミックストコフェロール、カンゾウ油性抽出物、ブドウ種子抽出物、単糖・アミノ酸複合物、生コーヒー豆抽出物、ローズマリー抽出物 (2 種類)、コメヌカ酵素分解物、コメヌカ油抽出物、 γ -オリザノール、フェルラ酸 (2 種類)、ヤマモモ抽出物、エンジュ抽出物、酵素処理イソクエルシトリン、ルチン酵素分解物、ルチン、酵素処理ルチン、カテキン、ケルセチン、モリン、エラグ酸、セサモール、没食子酸の抗酸化力価評価を ORAC 法で行うこととした。また、DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法により求めた各種酸化防止剤の抗酸化力価と ORAC 法による測定結果の比較を行い、ORAC 法の酸化防止剤力価評価に対する適用性を検討した。

B. 研究方法

(1) ORAC 法²⁾

蛍光測定用 96 穴マイクロプレートに試料溶液 20 μ l とフルオレセイン (終濃度 70 nM) 120 μ l を順次添加し、マイクロプレート用インキュベーターを用いて、37°C で正確に 15 分間ブレインキュベーションした。その後、マルチチャンネルピペットを用いて AAPH (終濃度 12 mM) 60 μ l を添加し、ただちにマイクロプレートリーダーにセットし、1 分間隔で 80 分間、測定温度 37°C、励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm で蛍光強度を測定した。なお、各測定前には攪拌を行った (179.3 rpm、1 秒間)。ブランクには試料溶液の代わりに試料溶媒の 75 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、あるいは 50% アセトン水溶液を添加した。測定終了後、各試料の AUC を算出した。ただし、AUC の算出前に、ブランクの 0 分の蛍光強度を試料の 0 分の蛍光強度で割った後、得られた値を試料の蛍光強度

に乗じることで補正を行った。補正後の蛍光強度の値から、以下の式を用いて各試料の AUC とブランクの AUC を求めた。

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i / f_0$$

測定は3回繰り返し、各回の試料、およびブランクの AUC を求めた。試料の AUC からブランクの AUC を差し引くことで、試料の net AUC を求めた。同様の手順で、標準物質トロロックスの net AUC を求めた。トロロックスの net AUC (X) に対しトロロックスの濃度 (Y) をプロットし、回帰直線を引いた。その結果、以下の回帰式を得た。

$$Y = 0.2548X - 0.2949$$

上記の式により、各酸化防止剤の抗酸化力価 (ORAC 値) をトロロックス等量 (TE/g) に換算した。

C. 研究結果と考察

(1) ORAC 法による酸化防止剤の力価評価

33 種類の酸化防止剤を ORAC 法に供し、ORAC 値の算出の可否を調べた。その結果を表 1 に示した。表 1 の左端の列には水溶性酸化防止剤を、その他 2 列には脂溶性酸化防止剤を示した。その結果、今回測定に用いた水溶性酸化防止剤 11 種類の全てについて ORAC 値を求めることができた。また、反応が水系で行われる ORAC 法では測定が困難であるとされる脂溶性酸化防止剤については、Ou ら³⁾ の提案した 50%アセトン水溶液を溶媒に用いることで、22 種類中 17 種類で ORAC 値を求めることができた。しかし、カンゾウ油性抽出物、コメヌカ油抽出物、セサモール、 γ -オリザノール、ミックストコフェロールの 5 種類の脂溶性酸化防止剤は 50%アセトン水溶液への溶解性が低く、溶解操作の際に白濁が生じた。このため、測定自体を続行す

ることができず、結果として ORAC 値を求めることができなかった。今回は脂溶性酸化防止剤用の溶媒として 50%アセトン溶液を使用した。他に β -シクロデキストリンを含むアセトン溶液、アセトン-酢酸溶液などの溶媒も提案されている。今回 ORAC 値を求めることができなかった 5 種類については、他の溶媒を用いることで ORAC 値を求めることができるようになる可能性が残されていたが、その他 17 種類の脂溶性酸化防止剤の溶媒として 50%アセトン溶液が適用可能であったため、今回はその他の溶媒の検討は行わなかった。

水溶性酸化防止剤の ORAC 値を図 1 に示した。この場合、ORAC 値が高いほど抗酸化活性が高いことを意味している。その結果、カテキンが最も高い抗酸化活性を示し、以下、チャ抽出物 C、没食子酸、チャ抽出物 D、ブドウ種子抽出物、チャ抽出物 B、チャ抽出物 A、生コーヒー豆抽出物、緑茶エキス、コメヌカ酵素分解物、単糖・アミノ酸複合物の順であった。

脂溶性酸化防止剤の ORAC 値を図 2 に示した。その結果、ケルセチンが最も高い抗酸化活性を示し、以下、フェルラ酸 B、モリン、ルチン酵素分解物、ルチン、エラグ酸、ヤマモモ抽出物、エンジュ抽出物、酵素処理ルチン、酵素処理イソクエルシトリン、フェルラ酸 A、ローズマリー抽出物 A、ローズマリー抽出物 B、d- α -トコフェロール、d- δ -トコフェロール、d- γ -トコフェロール、トコトリエノールの順であった。

(2) ORAC 法の再現性について

本研究において ORAC 値を求めることができた水溶性酸化防止剤と脂溶性酸化防止剤の計 27 種類の測定における変動係数の平均は、7.8%であった。Ou ら⁴⁾ は野菜の抗酸化活性を ORAC 法で測定し、その平均値と標準偏差を報

告している。その値をもとに変動係数を求めたところ、15-44%となった。このことから、本研究における ORAC 法の再現性は妥当なものであると判断した。また、過去に本事業で行った DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法における酸化防止剤の力価評価における各測定の変動係数は、それぞれ、1.7% (n = 28)、2.4% (n = 28)、7.1% (n = 24) であったことから、ORAC 法の再現性は過去に酸化防止剤の品質評価法として適用可と判断した 3 法と比較して低いことが判明した。

(3)ORAC 法と他法との比較

続いて、ORAC 法で求めた各酸化防止剤の ORAC 値と DPPH 法、ABTS 法により求めたトロロックス等価活性 (TEAC)、あるいは WST-1 法により求めた SOD 等価活性との相関について調べた。その結果を表 2 に示した。

①DPPH 法との比較

ORAC 法と DPPH 法との間の相関係数は 0.587 となり、両者の間に有意な相関が認められた (n = 26、 $p < 0.05$)。しかし、その値は低いものであった。両方法間の回帰分析結果は、サツマイモの ORAC 値を測定した Teow ら⁵⁾によっても報告されている。それによると、両方法間の相関係数は 0.859 (n = 17) と高い値を示していた。Teow ら⁵⁾の測定試料は水溶性の抗酸化物質であったことから、水溶性と脂溶性の違いが相関係数の大小に影響を与える可能性があるものと考えられた。そこで本研究でも、水溶性酸化防止剤と脂溶性酸化防止剤に分け、再度相関を調べた。その結果、水溶性酸化防止剤では相関係数が 0.759 (n = 9) となった。その一方、脂溶性酸化防止剤では 0.570 (n = 17) となった。このことから、水溶性酸化防止剤の

抗酸化活性評価では ORAC 法と DPPH 法で同じ挙動を示す傾向にあるものの、脂溶性酸化防止剤では必ずしも挙動は一致しないことが判明した。

②ABTS 法との比較

ORAC 法と ABTS 法との間の相関係数は 0.463 となり、両者の間に有意な相関が認められた (n = 26、 $p < 0.05$)。しかし、DPPH 法と同様、その値は低いものであった。前述の Teow ら⁵⁾は、ORAC 法と ABTS 法との間の回帰分析の結果についても報告している。それによると、両方法間の相関係数は 0.761 (n = 20) と高い値であった。しかし、この場合の測定試料は水溶性の抗酸化物質であったことから、ABTS 法についても水溶性酸化防止剤と脂溶性酸化防止剤に分け、再度相関を調べた。その結果、水溶性酸化防止剤の相関係数は 0.669 (n = 10) となった。一方で、脂溶性酸化防止剤の相関係数は 0.396 (n = 16) であった。このことから、ABTS 法についても水溶性抗酸化物質の抗酸化活性評価は ORAC 法と ABTS 法で同じ挙動を示す傾向にあるが、脂溶性抗酸化物質の抗酸化活性評価の挙動は一致しないことが判明した。

③WST-1 法との比較

ORAC 法と WST-1 法との間の相関係数は 0.171 (n = 22) となり、両者の間に有意な相関は認められなかった。また、水溶性酸化防止剤と脂溶性酸化防止剤に分けた場合でも、その相関係数はそれぞれ 0.432 (n = 10)、0.075 (n = 12) となり、両者の間に有意な相関は認められなかった。このことから、ORAC 法と WST-1 法による力価評価結果は異なる挙動を示すことが判明した。

D. 結論

既存添加物に分類される 33 種類の酸化防止剤を試料とし、ORAC 法による抗酸化力価評価を行った。その結果、水溶性酸化防止剤では 11 種類全て、脂溶性酸化防止剤では 22 種類中 17 種類において ORAC 値を求めることができた。また、ORAC 法の再現性 (CV) は過去に本事業において酸化防止剤の力価評価法として適用可と判断した 3 法と比較して低いことが判明した。加えて、ORAC 法で得られた抗酸化力価と DPPH 法、あるいは ABTS 法で求めた抗酸化力価の間には有意な相関が認められた。特に、水溶性酸化防止剤のみに限った場合の ORAC 法と上記 2 法の相関は高かったが、逆に、脂溶性酸化防止剤に限った場合は相関が低くなる傾向にあった。その一方で、ORAC 法と WST-1 法の力価評価結果の間には有意な相関は認められなかった。以上の結果より、ORAC 法による酸化防止剤の力価評価は可能であるものの、脂溶性酸化防止剤への適用性の低さ、測定時間の長さ、再現性の低さなどの特徴を理解した上で慎重に取り扱う必要があるものと考えられた。

E. 参考文献

- 1) 島村智子、松浦理太郎、徳田貴志、杉本直樹、山崎壮、松藤寛、松井利郎、松本清、受田浩之、酸化防止剤力価評価のための各種抗酸化活性測定法の共同試験、食科工、54、482-487 (2007)。
- 2) Dávalos A., Gómez-Cordovés C., and Bartolomé B., Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 48-54 (2004).
- 3) Ou B., Hampsch-Woodill M., and Prior R. L., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4619-4626 (2001).
- 4) Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., and Deemer E. K., Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3122-3128 (2002).
- 5) Teow C. C., Truong V. D., McFeeters R. F., Thompson R. L., Pecota K. V., and Yencho G. C., Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chem.*, 103, 829-838 (2007).

F. 研究発表

(1) 論文発表

松藤寛、佐々怜一郎、本間友輝、宮島拓臣、山崎壮、受田浩之、島村智子、松井利郎、松本清、山形一雄：抗酸化物質の 2 成分混合系における DPPH ラジカル消去活性、日本食品科学工学会誌、56 (3): 129-136 (2009)。

(2) 学会発表

島村智子、平山大剛、杉本直樹、山崎 壮、松井利郎、松本 清、受田浩之：酸化防止剤の力価評価に対する各種抗酸化活性評価法の適用性—天然物由来酸化防止剤について—、日本食品科学工学会第 55 回大会、2008 年 9 月 (京都)

表1 酸化防止剤のORAC値算出の可否

試料名	可否	試料名	可否	試料名	可否
チャ抽出物A	○	ヤマモモ抽出物	○	フェルラ酸A	○
チャ抽出物B	○	エンジュ抽出物	○	フェルラ酸B	○
チャ抽出物C	○	d- α -トコフェロール	○	酵素処理 イソクエルシトリン	○
チャ抽出物D	○	d- γ -トコフェロール	○	エラグ酸	○
緑茶エキス	○	d- δ -トコフェロール	○	ケルセチン	○
生コーヒー豆 抽出物	○	モリン	○	酵素処理ルチン	○
ブドウ種子 抽出物	○	トコトリエノール	○	カンゾウ油性 抽出物	×
単糖アミノ酸 複合物	○	ローズマリー 抽出物A	○	コメヌカ油 抽出物	×
コメヌカ 酵素分解物	○	ローズマリー 抽出物B	○	セサモール	×
カテキン	○	ルチン	○	γ -オリザノール	×
没食子酸	○	ルチン酵素分解物	○	ミックス トコフェロール	×

表2 ORAC法と他法の相関

	全体	水溶性酸化防止剤	脂溶性酸化防止剤
DPPH法	0.587 * (n = 26)	0.759 * (n = 9)	0.570 * (n = 17)
ABTS法	0.463 * (n = 26)	0.669 * (n = 10)	0.396 (n = 16)
WST-1法	0.171 (n = 22)	0.432 (n = 10)	0.075 (n = 12)

*: significant (p < 0.05)

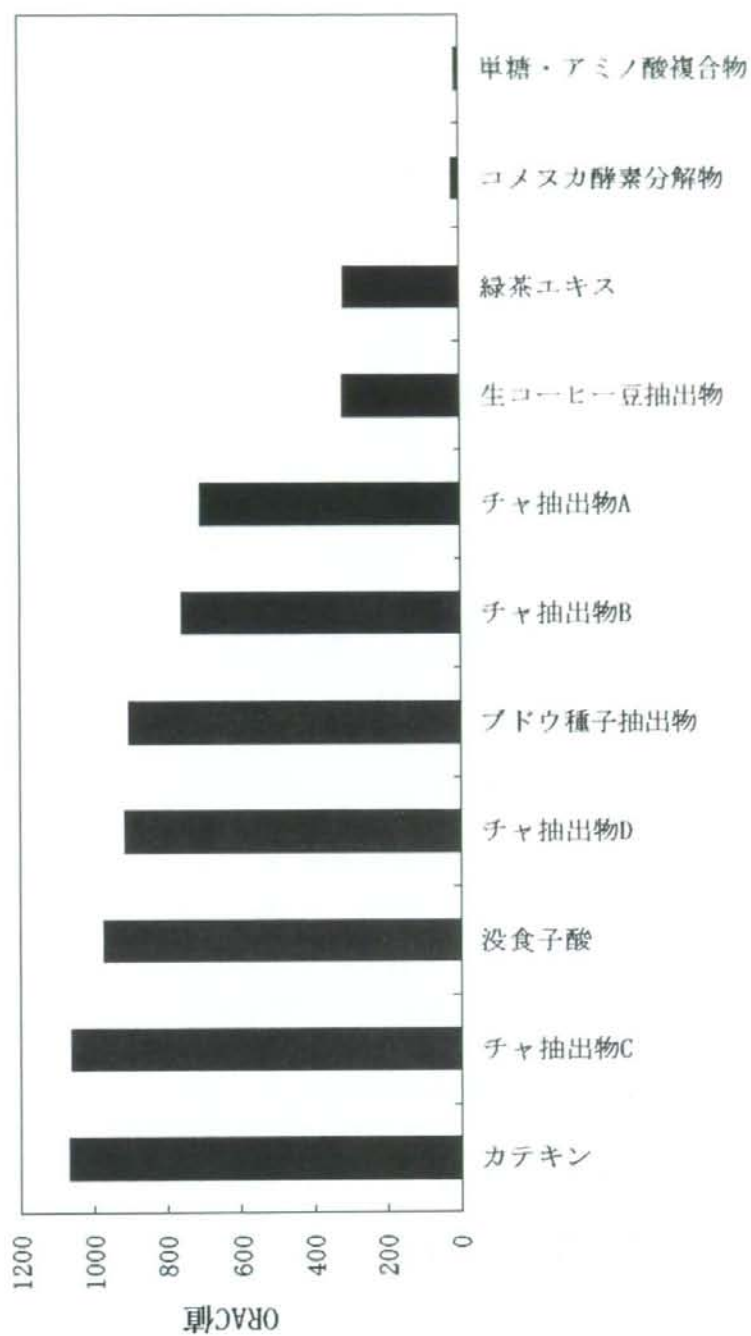


図1 水溶性酸化防止剤のORAC値