

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

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 —

研究分担者 堀江正一（埼玉県衛生研究所）

研究協力者 小林晴美（埼玉県衛生研究所）

研究要旨

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ことを目的とした。初年度は、保存料・日持ち向上剤の抗菌・抗かび活性のスクリーニングを目的とした。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、茶抽出物、カンゾウ油性抽出物等に抗菌活性があることが明らかとなった。

A. 研究目的

既存添加物の多くは天然物からの抽出物であり、原材料の種類や産地の違い、製法の違いなどから製品の成分組成や含量は必ずしも一定ではない。加えて、有効成分も明確でない品目もある。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ことを目的とする。初年度は、保存料・日持ち向上剤の抗菌・抗かび活性のスクリーニングを目的とした。

B. 研究方法

1. 試料

保存料に区分されている既存添加物および既存添加物名簿収載品目リスト注解書（1999年、日本食品添加物協会）に抗菌作用があると記載されている品目のうちから、表1に示した既存添加物の市場流通製品を日本食品添加物協会から提供していただき、研究試料として用いた。

2. 試薬・器材

供試試験菌：グラム陽性菌、グラム陰性菌、芽胞形成菌、酵母及びかびから代表的菌種として一種ずつ選び、使用した。

グラム陽性菌：*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (NBRC 13276, ATCC

6538)

グラム陰性菌：*Escherichia coli*
(NBRC 3972, ATCC 8739)

芽胞形成菌：*Bacillus subtilis* (NBRC 3134, ATCC 6633)

酵母：*Candida albicans* (NBRC 1594, ATCC 2091, ATCC 10231)

かび：*Aspergillus niger* (NBRC 9455, ATCC 16404)

ペトリ皿（シャーレ）：合成樹脂製で、内径 90 mm の滅菌したものを用いた。

斜面培地 A：精製水 1L に対してペリプトン 10g, 酵母エキス 2g, 硫酸マグネシウム 1g 及び寒天 15g を採り、内容物を十分溶解した後、pH7.0±0.2 に調整する。これを 25mL 試験管に約 10mL 分注してから 121℃, 15 分間高圧滅菌処理する。滅菌後試験管を水平面に対して 15 度傾けて置き、内容物を凝固させて斜面培地 A を調製する。

斜面培地 B：精製水 1L に対してペプトン 5g, 酵母エキス 3g, 麦芽エキス 3g, グルコース 10g 及び寒天 15g を採り、内容物を十分溶解した後、pH7.0±0.2 に調整する。これを 25mL 試験管に約 10mL 分注してから 121℃, 15 分間高圧滅菌処理する。滅菌後試験管を水平面に対して 15 度傾けて置き、内容物を凝固させて斜面培地 B を調製する。

斜面培地 C：精製水 1L に対して市販の調製済み培地ポテト・デキストロース寒天培地 39g を採り、内容物を十分溶解する。これを 25mL 試験管に約 10mL 分注してから 121℃, 15 分間高圧滅菌処理する。滅菌後試験管を水平面に対して 15 度傾けて置き、内容物を

凝固させて斜面培地 C を調製する。

ブイオン培地：精製水 1L に対してペプトン 10g, 肉エキス 5g 及び塩化ナトリウム 5g を採り、内容物を十分溶解した後、pH 7.0±0.2 に調整する。これを 50mL 三角フラスコに約 25mL 分注してから 121℃, 15 分間高圧滅菌処理する。

パルプディスク：アドバンテック東洋（株）製の直径 10mm, 厚さ 1.2mm（吸水量 0.08mL±0.01mL）の厚手のパルプディスクを 121℃, 15 分間高圧滅菌後、十分乾燥させてから用いた。

その他の試薬は、いずれも特級品を用いた。

3. 試験菌液及び検査用培地の作製

試験菌液及び培地の調製は、「繊維製品の抗菌性試験方法及び抗菌効果：JIS L 1902」に準拠し、概ね次のとおり調製した。

細菌類 NBRC 3134, 3972, 13276 の試験菌液：斜面培地 A に各試験菌を移植後 18～24 時間培養する。斜面培地上の菌をブイオン培地 25mL に白金耳移植し、30℃で 18～24 時間培養する。ブイオン培地中の菌濃度は $10^6 \sim 10^7$ 個/mL 程度とする。

酵母 NBRC 1594 の試験菌液：斜面培地 B に酵母を移植後 3 日間培養する。斜面培地上の酵母をブイオン培地 25mL に白金耳移植し、25℃で 3 日間培養する。ブイオン培地中の菌濃度は $10^6 \sim 10^7$ 個/mL 程度とする。

かび NBRC 9455 の試験菌液：斜面培地 C にかびを移植後 5～7 日間培養する。斜面培地上のかびを 0.05% Tween 80 生理食塩水 25mL に白金耳移植し、

十分混合したものを試験菌液とする。生理食塩水中の菌濃度は $10^6 \sim 10^7$ 個/mL 程度とする。

検査用平板は、Difco 社製のポテト・デキストロース寒天培地及び日本製薬製のソイビーン・カゼインダイジェスト(SCD)寒天培地を使用した。これらの培地を 121°C 、15 分間高压滅菌後、 $55^\circ\text{C} \pm 1$ に保持する。細菌類 NBRC 3134, 3972 及び 13276 にあつては、SCD 寒天培地に、かび NBRC 9455 及び酵母 NBRC 1594 にあつてはポテト・デキストロース寒天培地に、各試験菌液を培地の①1/15 量及び②1/150 量加え、十分に混合した後、その 15 mL をペトリ皿に注入し、水平に静置して凝固させ、菌濃度の異なる 2 種の検査用平板培地を作製した。

4. 微生物発育阻止試験

バルブディスクを試験溶液に浸漬し、風乾せずに検査用平板培地上に置いた。それらの平板培地は、約 5°C で 30 分間放置した後、細菌類は 30°C で 18~24 時間、酵母及びかびは 25°C で 5 日間培養した。

バルブディスク周辺に出現した阻止円の直径をノギスで測定して、直径 12mm 以上のものを陽性とした。10mm 超~12mm 未満を疑陽性(±)とした。

5. 試験溶液の調製

試料 0.5 g を 50 mL ポリプロピレン製遠心チューブに採り、精製水あるいは 80%メタノール 50 mL を加えて混合後、その上清を試験溶液とした。

C. 結果及び考察

1. 微生物発育阻止試験

1.1 精製水調製溶液

保存効果があると既存添加物名簿収

載品目リスト注解書に記載されている既存添加物(表 1)を精製水で調製した 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(表 2-3)。ポリリシンは、試験に供した 5 種の微生物に対して抗菌力を示した。茶抽出物、カンゾウ抽出物等は一部の試験菌に抗菌力を示した。試験した既存添加物に対して *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* NBRC 13276 は 5 種類の試験菌の中で最も高い感受性を示した。

1.2 80%メタノール調製溶液

精製水の変わりに 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(表 4-5)。得られた結果は、精製水で調製した場合とほぼ同様であった。

D 結論

保存効果があると記載されている既存添加物 13 品目、21 抽出物を精製水及び 80%メタノール溶液で調製した 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。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。

今年度は保存効果があると記載されている既存添加物の抗菌・抗かび活性のスクリーニングを目的として試験したが、活性を認めた品目について今後さらに活性を担う成分の解析を進める予定である。

なお、今回の結果は特定の条件下で

の試験菌に対する抗菌活性を試験したものであり、さまざまな食品中で至適濃度で使用した場合の抗菌活性を反映するものではない。また、微弱な抗菌活性や静菌活性を検出することを目的にはしていない。したがって、今回試験対象とした品目の中には抗菌活性を報告した文献がある品目もあるが、今回とは異なる抗菌活性試験法を採用しているため、結果を単純に比較することはできないと考えている。

E. 研究業績

該当なし。

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

G. 健康危険情報

該当なし。

表1 試験に供した既存添加物

No.	品目	備考
1	チャ抽出物	
2	チャ抽出物	
3	チャ抽出物	
4	モウソウチク抽出物	
5	モウソウチク抽出物	アルコール95%
6	モウソウチク抽出物	アルコール95%
7	モウソウチク抽出物	アルコール95%
8	カワラヨモギ抽出物	
9	ポリリシン	50%粉末
10	ポリリシン	25%溶液
11	しらこたん白抽出物	さけ由来
12	しらこたん白抽出物	ニンシ由来
13	ブドウ種子抽出物	
14	ホコッシ抽出物	
15	トウガラシ水性抽出物	
16	ペクチン分解物	
17	ユッカフォーム抽出物	
18	カンゾウ油性抽出物	エタノール溶液
19	カンゾウ油性抽出物	水溶性製剤製品
20	クワ抽出物	
21	ブドウ果皮抽出物	

(注) 同一品目が複数ある場合、製品No.5~7以外は、同一品目の別製品である。製品No.5~7は同一製品の別ロット品である。

表2 1%試料溶液(精製水)の試験菌に対する阻止円形成の有無(試験菌液:培地=1:15)

No.	試料	NBRC3972 (<i>Escherichia coli</i>)	NBRC13276 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> (BGA)	NBRC1594 (<i>Candida albicans</i>)	NBRC9455 (<i>Aspergillus niger</i>)
1	チャ抽出物	—	17.6	±	—	—
2	チャ抽出物	—	14.4	—	—	—
3	チャ抽出物	—	15.8	—	—	—
4	モウソウチク抽出物	—	—	—*1	—	—
5	モウソウチク抽出物	—	—	—	—	—
6	モウソウチク抽出物	—	—	—	—	—
7	モウソウチク抽出物	—	—	—	—	—
8	カワラヨモギ抽出物	—	—	—	—	14.4
9	ポリリシン	±	±	15.5	12.6	—
10	ポリリシン	±	±	13.6	—	—
11	しらこたん白抽出物	—	—	—	—*1	—
12	しらこたん白抽出物	—	—	—*1	—	—
13	ブドウ種子抽出物	—	±	—	—	—
14	ホコッシ抽出物	—	—	—*1	—	—
15	トウガラシ水性抽出物	—	—	—	—	—
16	ペクチン分解物	—	—	—	—	—
17	ユッカフォーム抽出物	—	—	—	—	—
18	カンゾウ油性抽出物	—	—	—	—	—
19	カンゾウ油性抽出物	—	—	12.1	—	—
20	クワ抽出物	—	—	—	—	—
21	ブドウ果皮抽出物	—	—	—	—	—
Control	2.5g/kg安息香酸*2	—	—	—	—	—
	25g/kg安息香酸	±	12.2	17.9	19.1	19.4
	3.0g/kgソルビン酸*2	—	—	—	—	—
	30g/kgソルビン酸	—	±	16.0	21.0	22.6
Blank H ₂ O	—	—	—	—	—	

表中の数値は阻止円の直径(単位 mm)を示す。

*1 菌の生育に抑制されている部分が認められた。

*2 食品衛生法(第22年法律第233号)に基づく食品添加物一般の使用基準における最大量。

表3 1%試料溶液(精製水)の試験菌に対する阻止円形成の有無(試験菌液:培地=1:150)

No.	試料	NBRC3972 (<i>Escherichia coli</i>)	NBRC13276 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> (BGA)	NBRC1594 (<i>Candida albicans</i>)	NBRC9455 (<i>Aspergillus niger</i>)
1	チャ抽出物	—	22.3	—	—	—
2	チャ抽出物	—	17.0	—	—	—
3	チャ抽出物	—	20.6	—	—	—
4	モウソウチク抽出物	—	—	—	—	—
5	モウソウチク抽出物	—	—	—	—	—
6	モウソウチク抽出物	—	—	—	—	—
7	モウソウチク抽出物	—	—	—	—	—
8	カワラヨモギ抽出物	—	17.4	—	—	— ^{*1}
9	ポリリシン	±	±	—	13.2	— ^{*1}
10	ポリリシン	—	—	—	—	—
11	しらこたん白抽出物	±	—	—	—	—
12	しらこたん白抽出物	—	—	—	—	—
13	ブドウ種子抽出物	—	14.8	—	—	—
14	ホコッソ抽出物	—	±	—	—	—
15	トウガラシ水性抽出物	—	—	—	—	—
16	ペクチン分解物	—	—	—	—	—
17	ユッカフォーム抽出物	—	—	—	—	—
18	カンゾウ油性抽出物	—	±	—	—	—
19	カンゾウ油性抽出物	—	17.2	—	—	—
20	クワ抽出物	—	12.6	—	—	—
21	ブドウ果皮抽出物	—	14.3	—	—	—
	2.5g/kg安息香酸 ^{*2}	13.1	24.9	—	—	—
	25g/kg安息香酸	26.2	37.9	—	20.6	26.8
Control	3.0g/kgソルビン酸 ^{*2}	14.6	25.9	—	—	—
	30g/kgソルビン酸	21.6	36.9	—	19.6	20.9
	Blank H ₂ O	—	—	—	—	—

表中の数値は阻止円の直径(単位 mm)を示す。

*1 菌の生育に抑制されている部分が認められた。

*2 食品衛生法(第22年法律第233号)に基づく食品添加物一般の使用基準における最大量。

表4 1%試料溶液(80%メタノール)の試験菌に対する阻止円形成の有無(試験菌液:培地=1:15)

No.	試料	NBRC3972 (<i>Escherichia coli</i>)	NBRC13276 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> (BGA)	NBRC1594 (<i>Candida albicans</i>)	NBRC9455 (<i>Aspergillus niger</i>)
1	チャ抽出物	—	19.7	±	—	—
2	チャ抽出物	—	15.6	—	—	—
3	チャ抽出物	—	18.2	—	—	—
4	モウソウチク抽出物	—	—	— ^{*1}	—	—
5	モウソウチク抽出物	—	—	—	—	—
6	モウソウチク抽出物	—	—	—	—	—
7	モウソウチク抽出物	—	—	—	—	—
8	カワラヨモギ抽出物	—	—	—	—	14.4
9	ポリリシン	— ^{*1}	12.9	15.5	— ^{*1}	—
10	ポリリシン	— ^{*1}	12.0	13.6	—	—
11	しらこたん白抽出物	—	—	—	—	—
12	しらこたん白抽出物	—	—	— ^{*1}	—	—
13	ブドウ種子抽出物	—	— ^{*1}	—	—	—
14	ホコッシ抽出物	—	14.0	— ^{*1}	—	—
15	トウガラシ水性抽出物	—	—	—	—	—
16	ペクチン分解物	—	—	—	—	—
17	ユッカフォーム抽出物	—	—	—	—	—
18	カンゾウ油性抽出物	—	13.2	—	—	—
19	カンゾウ油性抽出物	—	14.8	12.1	—	—
20	クワ抽出物	—	±	—	—	—
21	ブドウ果皮抽出物	—	—	—	—	—
	2.5g/kg安息香酸 ^{*2}	—	—	—	—	—
Control	25g/kg安息香酸	14.9	17.1	17.9	19.1	19.4
	3.0g/kgソルビン酸 ^{*2}	—	—	—	—	—
	30g/kgソルビン酸	— ^{*1}	12.9	16.0	21.0	22.6
	Blank 80%メタノール	—	—	—	—	—

表中の数値は阻止円の直径(単位 mm)を示す。

*1 菌の生育に抑制されている部分が認められた。

*2 食品衛生法(第22年法律第233号)に基づく食品添加物一般の使用基準における最大量。

表5 1%試料溶液(80%メタノール)の試験菌に対する阻止円形成の有無(試験菌液:培地=1:150)

No.	試料	NBRC3972 (<i>Escherichia coli</i>)	NBRC13276 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> (BGA)	NBRC1594 (<i>Candida albicans</i>)	NBRC9455 (<i>Aspergillus niger</i>)
1	チャ抽出物	—	21.6	—	—	—
2	チャ抽出物	—	17.4	—	—	—
3	チャ抽出物	—	20.6	—	—	—
4	モウソウチク抽出物	—	—	—	—	—
5	モウソウチク抽出物	—	—	—	—	—
6	モウソウチク抽出物	—	—	—	—	—
7	モウソウチク抽出物	—	—	—	—	—
8	カワラヨモギ抽出物	—	16.0	—	—	18.1
9	ポリリシン	±	—	—	12.9	—
10	ポリリシン	—	—	—	—	—
11	しらこたん白抽出物	—	—	—	— ^{*1}	—
12	しらこたん白抽出物	—	—	—	—	—
13	ブドウ種子抽出物	—	14.8	—	—	—
14	ホコッシ抽出物	—	18.6	—	—	—
15	トウガラシ水性抽出物	—	— ^{*1}	—	— ^{*1}	—
16	ペクチン分解物	—	±	—	—	—
17	ユッカフォーム抽出物	—	— ^{*1}	—	— ^{*1}	—
18	カンゾウ油性抽出物	—	16.2	—	—	—
19	カンゾウ油性抽出物	—	18.6	—	—	—
20	クワ抽出物	—	15.8	—	—	—
21	ブドウ果皮抽出物	—	15.1	—	—	—
	2.5g/kg安息香酸 ^{*2}	17.6	23.8	—	—	—
	25g/kg安息香酸	28.4	49.4	—	26.7	18.1
Control	3.0g/kgソルビン酸 ^{*2}	16.9	24.4	—	—	±
	30g/kgソルビン酸	26.4	45.4	—	29.3	19.7
	Blank 80%メタノール	—	—	—	—	—

表中の数値は阻止円の直径(単位 mm)を示す。

*1 菌の生育に抑制されている部分が認められた。

*2 食品衛生法(第22年法律第233号)に基づく食品添加物一般の使用基準における最大量。

5. 既存添加物の規格作成に向けての検討

—既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究—

研究報告書（概要）

研究協力者 高橋 仁一 日本食品添加物協会 常務理事

研究要旨

当協会は、これまでも既存添加物の成分規格設定を目標に、行政並びに学識経験者のご指導のもと、当協会としての自主規格の策定を進めてきた。

平成20年度には、第8版食品添加物公定書の公表を機に、既存添加物等の自主規格案の策定・蓄積結果の集大成及び既収載規格の見直しを実施し、「第4版既存添加物自主規格」を刊行し、既収載の142品目（既存添加物123品目及び一般飲食物添加物19品目）に加えて78品目を新規収載した。また、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。なお、自主規格未策定品目には、製造業者の特定が困難である場合や、当該製造業者の協力が得られない場合等も多いことから、平成19年度に導入した「参考規格」の概念を継続適用することにより策定品目の拡大を推進した。

これらの作業は、これまでと同様に当協会技術委員会の自主規格専門委員会が中心となって推進した。具体的には、既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。なお、必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進め、自主規格（案）を改定するとともに、その妥当性評価を行った。

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。

はじめに

当協会は、これまでも既存添加物の成分規格設定を目標に、行政並びに学識経験者のご指導のもと、当協会としての自主規格の策定を進めてきた。

平成14年11月には、これまで蓄積してきた189品目の自主規格を収載した「第三版既存添加物自主規格」を刊行した。しかしながら、既存添加物418品目のうち、公定規格及び自主規格の策定済み品目は凡そ半数に留まっていたため、新規規格策定を継続し、平成15年度に19品目の自主規格の策定を行ってきた。

平成16年度には、第8版食品添加物公定書への収載候補品目を中心に、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部との間でその規格・試験法の妥当性を検討し、38品目について見直し改定を行った。平成17年度には、新たに9品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、1品目について見直し改定を行った。平成18年度には、新たに4品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、30品目について見直

し改定を行った。平成19年度には、新たに22品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、26品目について見直し改定を行った。

平成20年度には、第8版食品添加物公定書の公表を機に、既存添加物等の自主規格案の策定・蓄積結果の集大成及び既収載規格の見直しを実施し、「第4版既存添加物自主規格」を刊行し、既収載の142品目（既存添加物123品目及び一般飲食物添加物19品目）に加えて78品目を新規収載した。また、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。なお、自主規格未策定品目には、製造業者の特定が困難である場合や、当該製造業者の協力が得られない場合等も多いことから、平成19年度に導入した「参考規格」の概念を継続適用することにより策定品目の拡大を推進した。

これらの作業は、これまでと同様に当協会

技術委員会の自主規格専門委員会が中心となって推進した。具体的には、既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。なお、必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進め、自主規格(案)を改定するとともに、その妥当性評価を行った。

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。

1. 研究方法

1-1. 自主規格の策定及び見直し

本研究は、当協会技術委員会の自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当が中心となって推進した。これまでと同様に既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進め、適切な安全性確保が図れるよう、自主規格(案)を策定し、その妥当性を評価した。

新規規格策定に当たっては、主成分の確認、定量法の開発検討等を中心に行い、規格・試験法の設定並びにその妥当性等に関して評価・検討を行った。

1-2. 「第4版既存添加物自主規格」試験法の検証

「第4版既存添加物自主規格」について、次の方法により試験法の検証調査を行った。

- (1) 検証調査対象品目
「第4版既存添加物自主規格」収載全品目
- (2) 検証調査方法
資料1の検証依頼書及び検証結果報告書様式により実施
- (3) 調査期間
平成20年10月～平成21年2月
- (4) 調査対象者
当協会の関連部会加入会社

2. 調査研究者

これら評価・検討を行った自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当のメンバーは別紙に記したとおりである。

3. 研究結果の概要

3-1. 自主規格の策定及び見直し

本年度は以下の品目について、「新規規格設定のための調査研究と規格案の策定」及び「当協会第三版既存添加物自主規格として定められている規格・試験法及びこれまでに策定した自主規格案の内容についての見直し」を行った。なお、必要に応じ新たな試験方法の導入を検討し、それらの妥当性に関しても評価・検討した。

(1) 平成20年度 新規規格作成検討18品目)

本年度新規作成検討品目は次のとおりである。

用途分類(検討品目数)	自主規格作成検討品目
増粘安定剤(1品目)	レバン
酸化防止剤(8品目)	酵素分解リング抽出物(参考規格)、コメヌカ酵素分解物(参考規格)、セサモリン(参考規格)、セージ抽出物(参考規格)、単糖・アミノ酸複合物(参考規格)、ヘゴ・イチョウ抽出物(参考規格)、ペパー抽出物(参考規格)、メラロイカ精油(参考規格)
ガムベース・光沢剤(1品目)	ミルラ
製造用剤・ミネラル(8品目)	酸素(参考規格)、水素(参考規格)、ゼイン、鉄(参考規格)、ナフサ(参考規格)、ニストース(参考規格)、木材チップ(参考規格)、木炭

(2) 既設定規格の見直し(11品目)
本年度は、「第4版 既存添加物 自主規格」

(平成20年10月刊行)収載品目及び自主規格案策定済品目について見直しを行った。

見直しの結果、改定が必要とされた品目について、その妥当性を評価・検討した。

本年度見直しを行った品目及び見直しの概要は次表のとおりである。

用途分類(品目数)	検討項目	見直しの概要
着色料 (8品目)	カロブ色素、金、クローロ色素、タマネギ色素、赤ダイコン色素、エルダーベリー色素、ブドウ果汁色素、褐色系色素(カカオ色素、カキ色素、クローロ色素、コウリヤン色素、シアナット色素、タマネギ色素、タマリンド色素、チコリ色素、ペカンナッツ色素)	・カロブ色素の確認試験及び色価試験法の改訂検討を行った。 ・金の純度試験(2)銅の改訂検討を行った。 ・クローロ色素、赤ダイコン色素及びブドウ果汁色素の確認試験の改訂検討を行った。 ・タマネギ色素の色価試験法の改訂検討を行った。 ・エルダーベリー色素の色価規格及び確認試験の改訂検討を行った。 ・褐色系色素9品目の差別化のための確認試験の改訂検討を行った。
増粘安定剤 (1品目)	グァーガム酵素分解物	・確認試験について見直しを行った。
酵素(1品目)	フルクトシルトランスフェラーゼ	・フルクトシルトランスフェラーゼ活性測定法に、第2法を追加・挿入した。
乳化剤(1品目)	動物性ステロール	・含量の規格及び定量法を追加した。

3-2. 「第4版既存添加物自主規格」試験法の検証

検証結果の回収結果は、次のとおりであった。

	有効回答数	延品目数	問題無品目数	問題有品目数	問題有品目の分類							備考
					色価	性状	確認試験	純度試験	乾燥減量	強熱残分	定量法	
第1部会(甘味料)	6	6	5	1		1			1			
第2部会(着色料)	22	78	60	18	2		6	10				
第3部会(保存料・日持向上剤)	8	8	8	0								
第4部会(増粘安定剤)	4	4	4	0								
第5部会(酸化防止剤・ビタミン)	2	2	0	2			2				2	
第6部会(ガムベース・光沢剤)	1	13	13	0								部会で一括報告
第7部会(酵素)	1	62	62	0								部会で一括報告
第8部会(酸味料)	1	1	1	0								
第9部会(調味料・苦味料)	2	2	1	1		1						
第10部会(乳化剤)	2	2	2	0								
第13部会(製造用剤・ミネラル類)	5	7	6	1						1		
小計	72	185	162	23	2	2	8	10	1	1	2	

4. 研究結果の概要

4-1. 自主規格の策定及び見直し

(1) 新規規格作成検討

① 増粘安定剤（1品目）

本年度は、レバンについて検討した。定義、含量、性状、確認試験、純度試験、乾燥減量、灰分及び微生物限度について調査研究を行い、その結果に基づいて規格案を策定し、その妥当性について検討した。

② 酸化防止剤（8品目）

酵素分解リンゴ抽出物、コメヌカ酵素分解物、セサモリン、セージ抽出物、単糖・アミノ酸複合物、ヘゴ・イチョウ抽出物、ペパー抽出物及びメラロイカ精油について自主規格案を作成すべく種々検討を行った。輸入品が多く自主規格設定のための検討作業が難しいこと及び国内販売品目については製造量が少ないこと等により、今回はいずれの品目についても参考規格（メーカー規格又は医薬部外品原料規格）となった。

なお、「参考規格」の既存添加物自主規格における扱いは、次の通りである。

参考規格の扱い：参考規格とは、製造会社等が自社規格を設定し品質管理を行う際の参考に資するための規格であり、関連する公定規格等を基に作成した規格である。参考規格については、適否判定及び試験実施対象とするものではない。

また、「ペパー抽出物」の定量法のピペリン含量については、吸光係数等を使用した計算式への改訂検討が必要であり、「メラロイカ精油」については、定量法の追加検討が必要と考えられる。

③ ガムベース・光沢剤（1品目）

ミルラについて、自主規格案を作成し、項目及び試験法について確認を行い、妥当性を検証した。

④ 製造用剤・ミネラル（8品目）

製造用剤等8品目につき、規格及び試験方法を策定した。

ゼインについては、医薬品添加物規格に記載のゼインを参考として規格化した。

木炭については、「活性炭」の規格及び試験方法に準拠して作成した。ただし、その製法的特性に基づき、確認試験における吸着試験並びに純度試験における亜鉛の項目を削除した。

酸素、水素、鉄、ナフサ、ニストース及び木材チップについては、公定規格に基づく参考規格を作成した。

(2) 既策定規格の見直し

① 着色料（8品目）

第4版既存添加物自主規格の検証結果に基づき、規格改訂検討を行い、改訂案を作成した。

- ・カロブ色素については、確認試験及び色価試験法の改訂検討を行った。
- ・金については、純度試験(2)銅の改訂検討を行った。
- ・クローリー色素、赤ダイコン色素及びブドウ果汁色素については、確認試験の改訂検討を行った。
- ・エルダーベリー色素については、色価規格及び確認試験の改訂検討を行った。

また、褐色系色素9品目については差別化のための確認試験の改訂検討を行った。カカオ色素において他の色素との差別化試験が確認できたことから、改訂案を作成した。

② 増粘安定剤（1品目）

グァーガム酵素分解物の確認試験見直しを行い、改訂案を作成した。

③ 酵素（1品目）

フルクトシルトランスフェラーゼ活性測定法に、第2法を追加・挿入した。

④ 乳化剤（1品目）

「動物性ステロール」に「含量」の規格を追加するため、定量法の検討を行った。

4-2. 「第4版既存添加物自主規格」試験法の検証

(1) 全般的問題点

提出された検証試験成績書から、第4版既

存添加物自主規格どおり100%忠実に試験を実施しているかどうか疑わしい点が散見された。例をあげると次のとおりである。

- ・第4版既存添加物自主規格に設定されていない項目についての試験結果記載があり、適判定の記載もされていた。
- ・限度試験項目について、実測値の記載がされていた。
- ・実測値の記載桁数が規格値と合致しないものが認められた。
- ・明らかに規格不適と思われる項目について試験省略がなされていた。
- ・実測値の得られるはずの規格項目に対して規格限度値のみの記載がされていた。
- ・第4版既存添加物自主規格以外の公定試験法及び社内試験法で試験が行われていた。
- ・濁度の定義の解釈ミスにより、澄明の結果が不適判定とされていた。

(2) 検証結果の概要

①第1部会（甘味料）

カンゾウ油性抽出物の液体品について性状及び乾燥減量規格不適合を示唆する報告があったが、問題点の有無を確認の必要があるものと考えられる。

②第2部会（着色料）

金については、純度試験(2)銅について試験法上の問題が確認された。アナトー色素（ノルピキシン粉末品）については、純度試験(4)アセトン等の試験において溶け残りが認められた。また、アナトー色素（ノルピキシン粉末品）の確認試験の引用ミスが確認された。更にクロー色素、アカダイコン色素、エルダベリー色素及びブドウ果汁色素の確認試験に不具合が認められた。エルダベリー色素については色価規格が実態と合わないことが確認された。酵素処理ルチンにおいては、確認試験及び定量法に問題が確認された。

③第5部会（酸化防止剤・ビタミン）

酵素処理ナリンジンの定量法に問題が確認された。

④第9部会（調味料・苦味料）

カフェイン（抽出物）の性状（規格値）に問題が確認された。

⑤第13部会（製造用剤・ミネラル類）

チャ乾留物の強熱残分（規格値）に問題が確認された。

5. 研究結果の詳細

(1) 自主規格の策定及び見直し

研究結果の詳細は、別冊報告書別紙資料1のとおりである。

(2) 「第4版既存添加物自主規格」試験法の検証

検証結果の詳細は、別冊報告書別紙資料2のとおりである。

6. 考察

本年度は17品目の新規自主規格策定検討及び11品目の既設定規格・規格案の見直しを行った。

規格検討内容の概要は既に述べてきた通りであるが、本年度も、規格案を作成した段階で当協会顧問の山田隆先生に規格案の全面的レビューと問題点の抽出をしていただき、必要に応じて修正するという一連の作業を繰り返し行った。これにより、本年度新規策定及び改定した規格内容は、よりの確なものになったと考えている。また、第4版既存添加物自主規格発行に伴い収載品目の試験法について検証調査を実施し、結果に基づく規格見直し検討及び正誤表の作成検討を行った。

今後は、新規規格策定を継続するとともに、規格策定の可否についても早急に結論を出していく所存である。

また、第9版食品添加物公定書への新規収載を目指した第4版既存添加物自主規格の改訂作業を進めて行く所存である。

本年度自主規格策定あるいは見直し作業に関しては、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の山崎壮先生をはじめとする諸先生方並びに当協会顧問である山田隆先生には多大なるご指導をいただいた。この場をお借りし

心より感謝申しあげる次第である。

調査研究者名簿

	氏名	企業名
技術委員長	高橋 仁一	日本食品添加物協会
自主規格・規格専門委員長	大倉 裕二	キリンフードテック株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	相田 忠	長谷川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	浅田 敏	天野エンザイム株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	伊藤 秀行	理研ビタミン株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	植田 実木生	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	長田 裕次	三菱商事フードテック株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	小野 茂一	大宮糧食工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	皆藤 光雅	三菱化学フーズ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	中島 敏貴	上野製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	唐澤 昌彦	味の素株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	北村 智	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	香田 隆俊	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	坂井 昭浩	オルガノ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	滝口 俊男	株式会社ロッテ
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	武智 壽夫	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	田中正剛	ダイワ化成株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	関谷 史子	高砂香料工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	深尾 正	日本新薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	宮野 信雄	株式会社タイショーテクノス
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	村上 和也	富田製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	村椿 康隆	第一工業製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	大和谷 和彦	大日本住友製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	山本 隆志	小川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	吉武 繁廣	エーザイフード・ケミカル株式会社
技術顧問	山田 隆	日本食品添加物協会

6. 既存添加物の成分と基原に関する研究

既存添加物苦味料イソアルファー苦味酸の成分分析

研究分担者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官

研究協力者 石附京子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

研究要旨 既存添加物イソアルファー苦味酸中の詳細な苦味成分組成を明らかにし、基原の確かさを確認することを目的とし、LC/MS/MS を用いて、各種イソ α 酸および関連する種々のホップ由来成分を詳細に分析する方法を検討した。その結果、各種イソ α 酸関連化合物を良好に分離でき、かつ個別に測定できる分析方法を明らかにした。この方法を用い、既存添加物製品として提供されたイソアルファー苦味酸 2 種 4 製品を分析したところ、ロット間および製品間で多少の違いは見られたものの、ほぼ同じ成分組成であった。また、一般飲食物添加物であるホップ抽出物 3 種 5 製品の分析では、製品の種類により成分内容は様々であることが分かった。今回得られた方法は、各種イソ α 酸関連化合物を各成分ごとに分析できる有用な方法であり、イソ α 酸類含有試料の詳細な成分組成の解明および基原の確認に役立つと考えられる。本研究により、既存添加物イソアルファー苦味酸の規格法を検討する上で、有用な基礎的データが得られた。

A. 研究目的

イソアルファー苦味酸（別名：イソアルファ一酸，英名：iso- α -bitter acid）は、既存添加物名簿¹⁾に記載されている天然由来の苦味料の一つで、その定義は、「ホップの花から得られた、イソフムロン類を主成分とするものをいう。」と記載されている。また、既存添加物名簿収載品目リスト²⁾の基原・製法・本質には、「クワ科ホップ (*Humulus lupulus* LINNE) の雌花より、水、二酸化炭素又は有機溶剤で抽出し、熱処理して得られたものである。主成分はイソフムロン類である。」と記載されている。イソアルファー苦味酸は、ほどよい苦みを与えることにより、味にアクセントをつけ、嗜好性を高める効果があるとされる³⁾。

ホップから得られる苦味成分は、 α 酸、 β 酸 (Fig. 1) に由来する。苦味は本来人間にとつ

て拒否される感覚であるが、 α 酸が加熱等により異性化して生じるイソ α 酸は、芳醇でさわやかな苦味を与える。一方、 α 酸、 β 酸の酸化物は好ましくない鈍い苦味を与える。

Fig. 1に示すように、 α 酸、 β 酸は、それぞれ同族化合物の総称であり、アシル基の違いにより、種々の同族体が存在する。このうち主なものは、co-、normal-(n-)、ad-体であり、イソ α 酸ではさらにそれぞれについてcis/trans異性体が存在する。したがって、各種イソ α 酸類の組成の違いにより、製品の苦味の強さ、質が異なる可能性があるが、既存添加物イソアルファー苦味酸の詳細な成分組成についてはこれまで報告が無い。また、既存添加物イソアルファー苦味酸としての国の公的規格は未だ定められておらず、基原の確かさを確認し得る規格設定の上でも、含有成分に関する詳細な情報が

必要とされる。

ビールおよびその原料に含有される α 酸、 β 酸およびイソ α 酸については、EBC (European Brewery Convention)、BCOJ (Brewery Convention of Japan) 等で、分析方法を設定している^{4),5)}。EBCの分析方法⁴⁾では、「7.8 Iso α , α' and β -acids in Hop and Isomerized Hop Extracts by HPLC」に、使用カラムとして「250 x 4 mm, filled with 5 micron ODS RP18, e.g. Nucleosil 5 C18, "Hop Analysis"」または「125 x 4 mm, e.g. "Grom Bitter Bier", 7 micron RP18」と記載されており、溶離液としてリン酸緩衝液を使用、検出波長としては、イソ α 酸の保持時間では270 nm、 α 酸および β 酸の保持時間では314 nmと記載されている。BCOJの分析方法⁵⁾では、「6.2.2ホップ： α 酸、 β 酸」、「6.2.3 ホップ：異性化ホップエキス中のイソ α 酸」、「6.2.4ホップ：異性化ホップペレット中のイソ α 酸」等に、使用カラムとして「Shim-pack CLC-ODS/H (P/N 228-00808-92, 島津製作所製 25 cm x 4.6 mm i.d.)または同等品」と記載されており、検出波長としては、イソ α 酸の保持時間では270 nm (または280 nm)、 α 酸および β 酸の保持時間では302 nmと記載されている。いずれの方法も用いるカラムによっては、イソ α 酸類相互のピークが重なってしまう場合があり、したがって種々のイソ α 酸同族体のピーク面積を合わせ、イソ α 酸総量を算出している。また、検出はUV吸収で行っているが、イソ α 酸同族化合物および α 酸、 β 酸のピーク同定の点で、より選択性の高い方法が望まれる。

そこで本研究では、既存添加物製品として日本添加物協会より提供されたイソアルファ苦味酸の成分実態を把握し、基原の確かさを確認するため、LC/MS/MSを用い、詳細な成分組成を調べる分析法を検討した。イソ α 酸主要6成分に加え、 α 酸、 β 酸、還元型イソ α 酸が分離・同定できる分析条件について調べ、規格作成のための基礎的データの蓄積を目的とし

て研究を行った。また、一般飲食物添加物であるホップ抽出物製品の成分分析にも応用した。

B. 研究方法

1. 試料

分析用標品として、次に示す国際標準エキスをLabor Veritas (Zurich, Switzerland)より購入した。イソ α 酸：DCHA-Iso, ICS-I2 (dicyclohexylamine誘導体化 iso- α -acids, 含有量64.3%)、還元イソ α 酸：DCHA-Rho, ICS-R2 (dicyclohexylamine誘導体化 rho-iso- α -acids standard, 65.3%)、Tetra, ICS-T2 (tetrahydroiso- α -acids standard, 99.4%)、DCHA-Hexa, ICS-H1 (dicyclohexylamine誘導体化 hexahydroiso- α -acids standard, 65.7%)およびICE2 (α 酸含有量 49.39%, β 酸含有量 24.94%)。また、ホップに含有される成分であるキサントフモール (xanthohumol)、およびイソキサントフモール (isoxanthohumol) (Alexis社製、和光純薬工業(株)販売)も標品として用い、同じ分析条件での保持時間を確認した。日本食品添加物協会を通じて提供された既存添加物イソアルファ苦味酸2種4製品 (内1種3製品はロットのみが異なる。)および一般飲食物添加物ホップ抽出物2種4製品 (内1種3製品はロットのみが異なる。)に加え、国内で市販されているホップ抽出物製品1種1製品を使用した。上記以外の試薬・溶媒はすべて市販特級品あるいはHPLC用を使用した。

2. 装置

高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置(LC/MS/MS)：Waters LC/MS/MS system (Waters社製) (LC: Alliance 2695 separations module, PDA: 2996 Photodiode array detector, MS: Quattro micro™)

3. 試料の調製

0.02%ギ酸メタノールを用い、各種イソ α 酸標品は0.8~12 μ g/mLの濃度範囲で5段階、添加物製品は10および50 μ g/mLの2段階の