

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 21 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
	堀江 正一	大妻女子大学
	杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所
	水上 元	名古屋市立大学大学院
	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 22 年 (2010 年) 5 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. 有効性を担保できる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脂質過酸化抑制能評価法の
適用性について…………… 11

研究分担者：受田 浩之

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

- 1.3 抗酸化活性測定法の既存添加物の有効性評価への応用に関する研究
－既存添加物ドクダミ抽出物の有効性の評価－…………… 23

研究分担者：多田 敦子

研究協力者：石附 京子

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…………… 31

研究分担者：松藤 寛

3. 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…………… 41

研究分担者：堀江 正一

研究協力者：小林 晴美

B. 定量 NMR 法を利用した既存添加物分析法の開発

4. NMR を用いた既存添加物の新規分析法の開発と応用に関する研究

4.1. 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 を用いたダッタンソバ乾麺中のクエルセチンの迅速絶対定量－…………… 51

研究分担者：杉本 直樹

4.2. 定量 NMR 法による既存添加物の定量に関する研究

- －定量 NMR によるクエルセチンおよびクエルセチン配糖体の絶対定量－…………… 65

研究分担者：多田 敦子

研究協力者：杉本 直樹

研究協力者：高橋 加奈

4.3. 定量 NMR 法の既存添加物と天然抽出物への適用に関する研究…………… 75

研究分担者：水上 元

研究協力者：永津 明人

<u>C. 既存添加物の基原確認試験法の開発</u>	
5. 既存添加物の成分と基原に関する研究 －既存添加物クワ抽出物の基原の解析－	83
研究分担者：多田 敦子 研究協力者：石附 京子	
6. 食品用酵素の基原と確認試験法の開発に関する研究	89
研究分担者：秋山 卓美	
<u>D. 既存添加物の規格作成に向けての検討</u>	
7. 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究（概要）	105
研究協力者：日本食品添加物協会 高橋 仁一	
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	109
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷	111

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

研究報告書

既存添加物の規格化に関する調査研究

別紙資料

I. 別紙資料 1 新規規格作成及び既策定規格の見直し結果詳細目	1
1. 新規規格作成検討品目	
1-1. 増粘安定剤 (エレミ樹脂)	2
1-2. 酸化防止剤 (ドクダミ抽出物)	7
1-3. 酸化防止剤・着色料 (ソバ全草抽出物)	9
1-4. 酵素 (イソマルトデキストラナーゼ)	12
1-5. 苦味料等 (ゲンチアナ抽出物)	19
1-6. 製造用剤・ミネラル (海藻灰抽出物)	24
2. 既策定規格の見直し品目	
2-1. 着色料 (褐色系色素 4 品目 (タマネギ色素、タマリンド色素、 クロー色素、カキ色素))	27
2-2. 乳化剤 (植物性ステロール)	37
2-3. 製造用剤・ミネラル (くん液)	47
II. 別紙資料 2 EU の新しい食品酵素規制に関する調査研究報告詳細	53
1. EU の新しい食品酵素規制に関する調査研究報告	54
2. 各規則ガイドラインの概要	55
3. 和訳 EC1331	58
4. 和訳 EC1332	73
5. 和訳 EFSA Guideline	92
6. EC1331 establishing a common authorisation procedure for food additives, food enzymes and food flavourings	121
7. EC1332 on food enzymes and amending	127
8. EFSA Guideline 090723	136

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。しかも成分規格未設定品目には、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。本研究では、これまでの既存添加物成分規格では対応が不十分であった有効性評価と基原の確認に対応するために、(1)有効性を担保できる品質評価試験法の作成、(2)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、(3)基原の確認試験法の開発、をめざしている。3年計画の2年目は、以下の研究を行った。

有効性を担保できる品質評価試験法の開発としては、成分規格試験法に利用できる抗酸化活性試験標準操作法を確立するために、 β -カロテン退色法、TBA 法の評価を行い、その適用性を検討した。さらには、 β -カロテン退色法、TBA 法の各測定値と DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法、ORAC 法の各測定値との関連性を評価した。酸化防止剤の併用効果の解析を行った。ORAC 法の疎水性酸化防止剤への適合性を検証した。DPPH 法を用いて、ドクダミ抽出物中の含有成分である各種フラボノイドおよびクロロゲン酸の抗酸化活性寄与率を算出した。また、天然抗酸化剤の酸化による品質劣化の評価指標成分を探索するために、ローズマリー抽出物およびチャ抽出物を強制的に酸化劣化させた際に生成した遺伝毒性物質について、生成条件と生成物による遺伝毒性発現メカニズムを解析した。また、保存料・日持ち向上剤の有効性評価試験法の開発としては、まず既存添加物の有効性（抗菌活性）を評価するために、製品の抗菌・抗かび活性を液体培地法を用いてスクリーニングした。抗菌活性評価の指標成分を明らかにするために、抗菌活性成分の分画を試みた。

新技術を導入した規格試験法の開発としては、定量 NMR 法を用いた既存添加物の新規分析法の開発と応用を検討した。ソバ乾麺中のクエルセチンの含量、およびクエルセチン配糖体を成分とする食品添加物と市販試薬、セスキテルペンとアルカロイドを成分とする植物抽出物と市販試薬の純度を測定した。

基原の確認試験法の開発としては、既存添加物クワ抽出物製品と生薬ソウハクヒ製品（ともにクワの根皮を基原とする。）の基原植物種を考察した。また、8品目の酵素について、国内で流通しているほぼすべてにあたる 103 試料を入手し、SDS-PAGE によりタンパク質分離パターンを分析し、基原種と電気泳動パターンとの関連を解析した。

このほかに、食品添加物業界に依頼し、業界自主規格の新規作成と見直し、および EU における新たな食品酵素規制に関する調査研究を行った。

研究分担者	
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
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
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
受田 浩之	高知大学教育研究部自然科学 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	大妻女子大学家政学部 教授
水上 元	名古屋市立大学大学院薬学 研究科 教授
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
高橋 加奈	国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部
島村 智子	高知大学教育研究部自然科学 学系農学部門 准教授
小林 晴美	埼玉県衛生研究所 水・食品担当
永津 明人	金城学院大学薬学部 教授
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使用することが重要であり、成分規格の中にはそれを担保する規定が必要であるが、技術的困難さからこれまでの既存添加物成分規格では対応が不十分であった。こうした状況を踏まえると、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、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作成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、(1)有効性を担保できる品質評価試験法の作成、(2)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、(3)基原の確認試験法の開発、をめざす。

有効性を担保できる既存添加物の品質評価試験法の開発としては、室間再現性のある標準操作法が確立していないために異なる研究室での抗酸化活性測定値を比較できないという問題に対して、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抗酸化活性試験標準操作法の確立をめざす。

既存添加物の保存料・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ことをめざす。

天然物由来である既存添加物の規格試験を考えると、正確な純度が明らかになっている定量用標準品がほとんど供給されていないという実態がある。天然化合物の高純度品を試薬製品として安価に市販することが困難であるという技術的問題に由来している。一方、NMRは測定対象成分自体の標準品がなくても試料中の個別成分含量を絶対定量可能であるという特長をもつことから、定量用標準品自体の供給が困難な場合やSI単位系にトレーサブルではない定量用標準品（GCやHPLCのピーク面積百分率法で純度を算出した試薬など）しか供給されていない場合に、定量NMR法は含量の絶対定量測定に威力を発揮すると期待できる。そこで、既存添加物の定量分析法に定量NMR法を応用する研究を行う。さらには、SI単位系にトレーサブルではない定量用標準品を定量NMR法で正確に純度測定し、GC/MSとLC/MSの定量用標準品に利用する手法の有効性を実証することもめざす。

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。その際には、GC/MSとLC/MSも成分分析に積極的に利用していく。

B. 研究方法（3年間の全体計画）

A. 有効性を担保できる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年度厚生労働研の成果を踏まえ、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3年間かけて検討する。

- ・酸化防止剤の併用が活性測定値に与える影響
- ・異なる抗酸化活性測定法（DPPH法、ABTS法、WST-1法、ORAC法、β-カロテン退色法など）の測定値間の関連性評価
- ・室間再現性のある抗酸化活性測定標準操作法の作成

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、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に、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と生成メ

カニズムを調べる。そのために、酸化防止剤を高濃度で強制的に酸化劣化させた際の有害物質生成の可能性を *in vitro* 遺伝毒性を指標にして調べ、有害物質の生成条件および遺伝毒性発現メカニズムを解析する。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. 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（抗菌活性）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。

まず、保存料・日持ち向上剤製品の抗菌・抗かび活性スクリーニングを行い、活性が認められた品目について抗菌・抗かび活性成分の分画と構造決定を行う。

B. 定量 NMR 法を利用した既存添加物分析法の開発

4. NMR を用いた既存添加物の新規分析法の開発と応用に関する研究

NMR は、原理上、混合試料中の個別成分含量を測定対象成分自体の標準品なしで絶対定量可能である。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）、既存添加物の定量分析に応用することをめざす。年度ごとに対象品目、対象化合物を替えて検討する。既存添加物の定量用試薬の純度測定も行う。

C. 既存添加物の基原確認試験法の開発

5. 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。そのために、植物由来添加物の含有成分と原料植物の含有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。甘味料、酸化防止剤、苦味料などから年度ごとに品目を替えて検討する。

6. 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。

D. 既存添加物の規格作成に向けての検討

7. 既存添加物の規格作成に向けての検討

既存添加物の業界自主規格の作成と改良を業界に依頼する。

E. 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 を使用したが、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

A. 有効性を担保できる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) 抗酸化活性測定法として、今年度はβ-カロテン退色法とTBA法を評価した。

一部の酸化防止剤を除いては活性を測定することができた。β-カロテン退色法は着色している試料には適用が困難であることが判明した。さらに、β-カロテン退色法、TBA法の各測定値とORAC法、DPPH法、ABTS法、WST-1法の各測定値との関連性を考察した。抗酸化活性値の高低に関連性が認められなかったことから、脂質過酸化抑制能評価法であるβ-カロテン退色法、ならびにTBA法と、活性酸素・ラジカル消去活性測定法であるORAC法、DPPH法、ABTS法、WST-1法とは異なる挙動を示す傾向にあることが判明した。

2) 酸化防止剤の併用が活性測定値に与える影響を検討するために、天然酸化防止剤の併用効果をDPPH法とWST-1法で測定し、データを2つの解析手法(Median effect analysisとFractional product method)で解析し、結果を比較した。2つの解析方法による判定結果は大きく異なるものではなかった。しかし、Median effect analysisによる解析から、今回併用した酸化防止剤は2つが互いに排他的(拮抗的)に反応していることが判明した。このことから、本酸化防止剤の反応型がFractional product methodの適用条件である「両者が独立して作用する場合」に適合しないことが明らかになった。併用効果の解析に使用実績のあるFractional product methodが適用困難であることが判明した。Median effect analysisでは濃度レベルに応じた判定も可能であ

り、本法の有用性があらためて示された。

3) ORAC法の疎水性酸化防止剤への適合性を検証した。ORAC法による疎水性酸化防止剤の測定では、溶解助剤としてランダムメチル化シクロデキストリン、反応溶媒としてAWA溶液(アセトン:超純水:酢酸=700:295:5)を使う組合せが最適であることが示された。

4) DPPH法を既存添加物ドクダミ抽出物製品の抗酸化活性評価に適用し、含有成分である各種フラボノイドおよびクロロゲン酸の抗酸化活性寄与率を算出した。ドクダミ抽出物製品には抗酸化活性が認められたが、添加物製品の活性の約20%が各種フラボノイドおよびクロロゲン酸の抗酸化活性により説明できることが明らかとなった。

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

ローズマリー抽出物およびチャ抽出物を強制的に酸化劣化させた際に生成した遺伝毒性物質について、生成条件と生成物による遺伝毒性発現メカニズムを解析した。ローズマリー抽出物にアスコルビン酸を添加すると、濃度依存的に遺伝毒性物質の生成が抑制された。

また、ローズマリー抽出物を加熱した際に生じる小核誘発を示す遺伝毒性物質の分画を行った。今後活性成分を単離して構造決定を行う予定である。

チャ抽出物は*in vitro*で遺伝毒性を示すが、カタラーゼを加えることで顕著に低下した。チャ抽出物の熱分解物にも*in vitro*で遺伝毒性が認められたが、カタラーゼを加えることで顕著に低下した。チャ抽出物に含まれるカテキン類は*in vitro*で過酸化水素を発生させることが知られているが、チャ抽出物の熱分解物からも過酸化水素が発生することが示唆された。

3. 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

抗菌活性測定法として液体培地法を用いて既存添加物の抗菌・抗かび活性をスクリーニングした。昨年度行った寒天培地法(ペーパーディスク法)に比べて、操作が煩雑で手間がかかるが、抗菌活性をより感度よく検出できた。

また、昨年度行った寒天培地法で活性が認められた品目のうち4品目(ポリリシン、チャ抽出物、カンゾウ油性抽出物、ブドウ種子抽出物)について、ミニカートリッジカラム(Oasis HLB)を用いて抗菌活性成分の分画を試みた。チャ抽出物はカラム保持分画に抗菌活性が見られた。ポリリシンカンゾウ油性抽出物、およびブドウ種子抽出物はカラム流出分画と保持分画の両方に抗菌活性が認められた。

B. 定量 NMR 法を利用した既存添加物分析法の開発

4. NMR を用いた既存添加物の新規分析法の開発と応用に関する研究

定量 NMR 法により以下の測定を行った。

- 1)ソバ乾麺中のクエルセチン含量測定
- 2)クエルセチン配糖体を成分とする食品添加物と市販試薬の純度測定
- 3)セスキテルペンとアルカロイドを成分とする植物抽出物と市販試薬の純度測定

定量 NMR 測定では、(1) 定量測定に適したプロトンシグナルを選択すること、(2) 純度が保証された SI 単位系にトレーサブルな定量 NMR 基準物質を確保すること、(3) 測定対象化合物量に対してプロトンシグナル面積が精確な定量性をもつ NMR 測定条件と NMR 観測データから精確なピーク面積を算出できる解析条件を設定すること、が重要ポイントである。事項(2)と(3)は定量 NMR 法の基本技術に関わる問題で

あり、測定対象有機化合物の種類に関わらない共通事項であるが、別の研究プロジェクトの中で検討した。この研究班では定量 NMR の応用研究にターゲットを絞り、事項(1)について検討した。測定対象成分のシグナルの中に測定試料のマトリクスや共存成分からのプロトンシグナルと明確に分離するシグナルが存在するかは、実際に分析を試みて初めてわかることなので、今回様々な試料と化合物を分析対象として検証したが、いずれも試料も定量測定に適したプロトンシグナルを選択することができた。また、事項(3)に関わることであるが、定量 NMR 分析値の繰り返し再現性の精度がきわめて高いことが実証された。さらに、定量 NMR で精確な含量を求めた HPLC 用標準品を使って HPLC 法による通常の定量分析も行ったが、定量 NMR 法による含量値と HPLC 法による含量値とはきわめて高い相関性を示した。

定量 NMR 法では、試料の溶媒抽出以外の前処理を必要としないこと、1 測定あたりの分析時間が 10 分程度と短いこと、測定対象の化合物と同一の標準品を必要としないことなど、きわめてすぐれた特性を持つ定量分析法であり、天然物成分の含量を高い精度で絶対定量できることを実証できた。

C. 既存添加物の基原確認試験法の開発

5. 既存添加物の成分と基原に関する研究

数種の国内クワ栽培品種の標準植物の根皮乾燥物から抽出物を調製して成分組成を調べ、既存添加物クワ抽出物製品および生薬ソウハクヒ製品の成分組成と比較することにより、製品の基原植物種を考察した。

国内クワ品種標準植物由来の根皮抽出物を調製して HPLC で比較したところ、マガワ *Morus bombycis* (2 栽培品種)、ヤマグワ *Morus alba* (2 栽培品種) では品種

ごとに成分組成の特徴が認められた。含有成分のLC/MS分析の16種の主要ピークを用いて主成分分析を行った結果、既存添加物クワ抽出物製品の基原は、国内でマグワ *M. alba* とされている栽培品種またはその交雑種と推定された。一方、中国産クワを原料とする生薬ソウハクヒ製品とは成分組成が異なった。

6. 食品用酵素の基原と確認試験法の開発に関する研究

8品目の酵素（ α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、ヘミセルラーゼ）について、国内で流通しているほぼすべてにあたる103試料を入手し、SDS-PAGEによりタンパク質分離パターンを分析した。多くの製品に関して基原によって特徴的な電気泳動パターンを示した。植物由来酵素では種の確認が可能であった。細菌・真菌由来酵素では、菌種の確認が可能な例が多かったが、*Bacillus* 属のように属の確認しかできない例もあった。

基原生物種と酵素製品中の含有タンパク質の電気泳動パターンの関連に関する有用な情報が得られた。酵素の簡便な基原確認試験法として利用が期待できる。

D. 既存添加物の規格作成に向けての検討

7. 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究

既存添加物の成分規格の整備に向けて、業界（日本食品添加物協会）に依頼して、既存添加物の業界自主規格の新規作成と見直し、およびEUにおける新たな食品酵素規制に関する調査研究を行った。

既存添加物の業界自主規格の新規作成品目は、エレミ樹脂（増粘安定剤）、ソバ全草抽出物（酸化防止剤）、イソマルトデキスト

ラナーゼ（酵素）、海藻灰抽出物（製造用剤・ミネラル）の4品目と参考規格（品質管理の参考とするものであり、品質管理のための適否判定に使用する業界自主規格ではない。）として、ドクダミ抽出物（酸化防止剤）、ゲンチアナ抽出物（苦味料等）の2品目である。なお、ドクダミ抽出物とゲンチアナ抽出物は、食品添加物としての使用実態が確認できないことから、現在、厚生労働省において消除予定添加物として3回目の消除手続きが進められている。

既設定規格の見直しとしては、以下の6品目を対象とした。褐色系着色料は類似の性質を示すために確認試験における品目間の判別が困難であるので、昨年度から4品目（タマネギ色素、タマリンド色素、クロー色素、カキ色素）の判別方法の検討を行っているが、今年度は可視スペクトルの比較、硫酸第一鉄による沈殿反応の比較を行った。植物ステロールについて、定量法のフィトステロールの計算式の係数を見直した。くん液について、ヘプタナールの含量規定とその試験法を新たに追加した。また重金属規格を鉛規格に変更した。

2009年1月にEUの食品改良剤一括法に係る共通規則が施行され、7月には食品酵素に関する登録評価のためのEFSAガイドラインが公表された。従来はEU共通の食品酵素の規制対象は2品目のみであり、これ以外の酵素はEU加盟各国の国内法によって規制されていた。EUでは、この新たな食品酵素規制によって、すべての食品酵素を対象にして共通認可手続に基づいた承認を受けていない食品酵素および当該酵素を使用して製造された食品はEU域内で流通させることはできなくなる。つまり、ポジティブリスト制の導入である。EFSAガイドラインの内容は、従来から食品酵素のポジティブリスト制を採用してきたフランスとデンマークの申請におけるガイドラ

インを踏襲しており、JECFA の酵素一般規格とも共通している。そこで、日本の今後の食品酵素の規制を検討するうえで参考にするために、EU における新たな食品酵素規制を調査した。

D. 結論

ほぼ予定通り研究が進んだ。いずれの課題も研究を継続する。

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) 杉本直樹、多田敦子、末松孝子、有福和紀、齋藤剛、井原俊英、吉田雄一、久保田領志、田原麻衣子、清水久美子、伊藤澄夫、山崎壮、河村葉子、西村哲治. 定量NMRを用いたコチニール色素中のカルミン酸の絶対定量. 食品衛生学雑誌 51(1)、19-27(2010).
 - 3) Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H. Quantitative determination of atractylon in *Atractylodis Rhizoma* and *Atractylodis Lanceae Rhizoma* by $^1\text{H-NMR}$ spectrometry. *Journal of Natural Medicines*, 64(2), 161-166(2010).
 - 4) 石川洋哉、松本清、受田浩之、島村智子、松藤寛、山崎壮. 食品の抗酸化能評価法. *FFIジャーナル*、215(1)、5-16(2010).
 - 5) 秋山卓美、佐々木亮、山崎壮、棚元憲一、山形一雄、河村葉子. SDS-PAGEによる既存タンパク質酵素のタンパク質分離パターン. *日本食品化学学会誌* (2010) 印刷中.
2. 学会発表
 - 1) Saito, T., Yamada, Y., Yoshida, Y., Arifuku, K., Miura, T., Ihara, T., Suematsu, T., Tada, A., Sugimoto, N. Development of infrastructure for quantitative NMR. The 2nd International Meeting on NMR and Quantitative Analysis (2009.4).
 - 2) 多田敦子、杉本直樹、石附京子、末松孝子、有福和紀、齋藤剛、井原俊英、吉田雄一、山崎壮、西村哲治、棚元憲一、河村葉子. NMRによる既存添加物中のquercetin配糖体の定量. 食品化学学会第15回総会・学術大会(2009.5).
 - 3) Sugimoto, N., Tada, A., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Yamazaki, T., Sato, K., Nishimura, T. Development of SI traceable quality control method for natural products based on qNMR. 50th ASP meeting (2009.6).
 - 4) 齋藤剛、三浦亨、井原俊英、前田恒昭、杉本直樹、多田敦子、西村哲治、有福和紀、末松孝子、山田裕子、吉田雄一. NMRを利用した有機化合物の定量における精確な秤量の重要性. 76回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会シンポジウム(2009.6).
 - 5) 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(2009.7、北九州).

- 6) 井邊早春、石川洋哉、受田浩之、山崎壯、松井利郎、松本清。Median effect analysisによる酸化防止剤混合系における併用効果の判定 日本食品科学工学会第56回大会 (2009.9、名古屋)。
- 7) Tada, A., Sugimoto, N., Takahashi, K., Ishizuki, K., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Yamazaki, T., Nishimura, T., Kawamura, Y. Determination of the contents of quercetin glucosides in natural food additives by quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy. 123rd AOAC Annual Meeting (2009.9).
- 8) Akiyama, T., Sasaki, R., Yamagata, K., Tanamoto, K., Yamazaki, T., Kawamura, Y. Identification of origins of food manufacturing enzymes. The 123rd AOAC Annual Meetings (2009.9).
- 9) 石附京子、多田敦子、高橋加奈、杉本直樹、松本清、受田浩之、松藤寛、山崎壯、河村葉子。LC/MSによる既存添加物ドクダミ抽出物中の成分の定量と抗酸化活性測定。第98回日本食品衛生学会学術講演会 (2009.10、函館)。
- 10) 多田敦子、石附京子、小山朗夫、深井俊夫、秋山卓美、山崎 壯、河村葉子、既存添加物クワ抽出物中の成分と基原の検討。第98回日本食品衛生学会学術講演会 (2009.10、函館)。
- 11) 羽佐田桂子、永津明人、吉田貴光、水上元、山崎壯、杉本直樹、西村哲治。qNMRを利用した朮類生薬に含まれるatractylonの非分離定量。日本生薬学会第56回年会 (2009.10)。
- 12) 杉本直樹、多田敦子、末松孝子、有福和紀、齋藤剛、井原俊英、吉田雄一、久保田領志、山崎壯、河村葉子、西村哲治。定量NMRを用いた天然有機化合物の絶対定量法の開発。第51回天然有機化合物討論会 (2009.10)。
- 13) 杉本直樹、多田敦子、田原麻衣子、久保田領志、清水久美子、佐藤恭子、山崎壯、河村葉子、西村哲治。qNMRに基づく有機標準品の品質管理法の開発。第46回全国衛生化学技術協議会年会 (2009.11)。
- 14) 三浦 亨、齋藤 剛、井原俊英、小池昌義、前田恒昭、杉本直樹、多田敦子、西村哲治、有福和紀、末松孝子、山田裕子、吉田雄一。NMRを利用して有機化合物を定量する場合の解析条件が定量値に与える影響に関する研究。第48回NMR討論会 (2009.11)。
- 15) 吉田貴光、羽佐田桂子、水上元、永津明人、山崎 壯、杉本直樹、西村哲治。qNMRによるオウレン中のベルベリンアルカロイド類の定量。第38回生薬分析シンポジウム (2009.12)。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

A. 有効性を担保できる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評価に対する脂質過酸化抑制能評価法の適用性について
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
3. 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

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）

既存添加物の成分と品質評価に関する研究

平成 21 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脂質過酸化抑制能評価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 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 食品科学分野で長年用いられてきた抗酸化活性評価法には、活性酸素やラジカル種の消去活性を評価する手法の他、リノール酸などを反応系に使用する手法（脂質過酸化抑制能評価法）が存在する。今年度は、代表的な脂質過酸化抑制能評価法であるβ-カロテン退色法とTBA法による酸化防止剤の抗酸化活性評価を行い、その適用性について検討した。その結果、β-カロテン退色法では12種類の酸化防止剤のうち10種類について活性を求めることが可能であった。しかし、試料自体が強く色を呈しているものには適用性が低い可能性が示された。TBA法では測定に供した8種類全ての酸化防止剤について活性を求めることが可能であった。β-カロテン退色法、ならびにTBA法による測定結果と活性酸素・ラジカル消去活性測定法であるDPPH法、ABTS法、WST-1法、ORAC法による測定結果の比較を行ったところ、β-カロテン退色法-DPPH法の組み合わせ以外では有意な相関が認められなかった。このことから、脂質過酸化抑制能評価法であるβ-カロテン退色法、ならびにTBA法と活性酸素・ラジカル消去活性測定法とは異なる挙動を示す傾向にあることが判明した。

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、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⁾。また、近年、米国や日本国内で使用頻度が高まっているORAC法の酸化防止剤力価評価に対する適用性についても検討を行ってきた。

これまで検討を行ってきたDPPH法、ABTS法、WST-1法、ORAC法は、いずれも活性酸素やラジカル種の消去活性を評価する手法であり、その

反応系に脂質は用いられない。一方で、食品科学分野で長年用いられてきた抗酸化活性評価法には、上記の活性酸素やラジカル種の消去活性を評価する手法の他、リノール酸などを反応系に使用する手法（脂質過酸化抑制能評価法）が存在する。そこで、今年度は、β-カロテン退色法、TBA法といった脂質過酸化抑制能評価法の酸化防止剤力価評価に対する適用性について検討を行った。

B. 研究方法

(1) β-カロテン退色法

β-カロテン退色法は津志田らの方法²⁾を一部改変して行った。β-カロテン・リノール酸溶液 2.9 mL に試料溶液 50 μL を混合した。その後、470 nm における吸光度 (A_{S_0}) を測定し、60 °C で 20 分間インキュベーションした。その後、470 nm における吸光度 ($A_{S_{20}}$) を再度測定した。試料溶液の代わりに、試料溶媒を添加したものをコントロール (A_{C_0} 、 $A_{C_{20}}$) として、試料の阻害率 (%) を下記の式で算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{ (A_{C_0} - A_{C_{20}}) - (A_{S_0} - A_{S_{20}}) \} / (A_{C_0} - A_{C_{20}}) \times 100$$

試料濃度 (x) に対して阻害率 (y) をプロットし、回帰直線を引いた。その回帰直線から 50% 阻害を挟む 2 点を選びだし、その 2 点に対する回帰直線を引いた。このようにして得られた回帰式の y に 50 を代入し、 x (50% 阻害を示す濃度: IC_{50}) を求めた。この操作を 3 回行い、各回で求められた IC_{50} の値の平均値を試料の IC_{50} とした。同様の手順で、標準物質であるブチルヒドロキシアニソール (BHA) の IC_{50} を求めた。BHA の IC_{50} と試料の IC_{50} が等価であるとみなして、各試料のリノール酸酸化抑制能を BHA 等価活性として評価した。

本測定では、チャ抽出物 (4 種類)、緑茶エキス、カテキン、ケルセチン、酵素処理ルチン、

単糖・アミノ酸複合物、エンジュ抽出物、d-α-トコフェロール、ローズマリー抽出物の 12 種類の酸化防止剤を試料として用いた。

(2) TBA 法³⁾

界面活性剤 Tween 40 を用いてリノール酸を超純水と混合し、10 分間の超音波処理を施して 5% リノール酸溶液を調製した。

リノール酸の酸化は以下の手順で行った。試験管に 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 500 μL、5% リノール酸混合溶液 1 mL、200 mM AAPH 200 μL、試料 800 μL を順次添加し、37°C で 24 時間のインキュベーションを行った。インキュベーション後の溶液をリノール酸酸化溶液とし、TBA と反応させた。TBA との反応は以下の手順で行った。試験管にリノール酸酸化溶液 500 μL、0.4% BHA 溶液 5 μL、20% トリクロロ酢酸 250 μL、0.67% TBA 溶液 250 μL を順次添加し、80°C で 10 分間加熱した。加熱後、氷冷し、遠心分離 (4500 rpm、15 分間) を行った。その後、上清の 535 nm における吸光度 (A_S) を測定した。試料溶液の代わりに試料溶媒を添加した際の吸光度をコントロール (A_C) として、下記の式にて試料の阻害率 (%) を算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = (A_C - A_S) / A_C \times 100$$

試料濃度 (x) に対して阻害率 (y) をプロットし、回帰直線を引いた。その回帰直線から 50% 阻害を挟む 2 点を選びだし、その 2 点に対する回帰直線を引いた。このようにして得られた回帰式の y に 50 を代入し、 x (50% 阻害を示す濃度: IC_{50}) を求めた。この操作を 3 回行い、各回で求められた IC_{50} の値の平均値を試料の IC_{50} とした。同様の手順で、標準物質である BHA の IC_{50} を求めた。BHA の IC_{50} と試料の IC_{50} が等価であるとみなして、各試料のリノール酸酸化抑制能を BHA 等価活性として評価した。

本測定では、チャ抽出物（4種類）、緑茶エキス、ケルセチン、エンジュ抽出物、 $d-\alpha$ -トコフェロールの8種類の酸化防止剤を試料として用いた。

C. 研究結果と考察

(1) β -カロテン退色法

β -カロテン退色法では、脂質であるリノール酸の自動酸化に伴い生じた過酸化物が β -カロテンの二重結合と反応し、 β -カロテンの色が消失する。抗酸化物質はこの色の消失を防ぎ得るため、抗酸化力価の評価が可能となる。

この β -カロテン退色法による測定結果を図1に示した。縦軸に試料の脂質過酸化抑制能をBHA等価活性（BHAeq.）として示し、横軸に試料名を示した。BHA等価活性の値が大きいほど脂質過酸化抑制能が高いことを意味している。

その結果、測定に用いた12種類の酸化防止剤のうち10種類で IC_{50} 値を求めることができた。しかしながら、ケルセチンとローズマリーでは IC_{50} 値を算出することができなかった。その理由は下記の通りであった。ローズマリー抽出物は、飽和濃度においても阻害率が50%に達せず、 IC_{50} 値を算出することができなかった。ケルセチンの場合、反応溶液の吸光度値が安定せず、正確な IC_{50} の値を求めることが困難であった。ケルセチン溶液はそれ自体が黄色を呈していることから、その色が測定の再現性を低下させたと考えられた。先の研究において適用性を検討したDPPH法、ABTS法、WST-1法は分光学的手法であるが、今回のケルセチンのように試料自体の着色による妨害は認められなかった。これは、先の3種類の方法では50%阻害が低濃度の試料、すなわち希釈倍率の高い試料で認められていたため、色の影響を受けなかったものと考えられた。この結果より、 β -カロテ

ン退色法では、試料自体が強く色づいているものには適用が困難である可能性が高いことが判明した。

β -カロテン退色法で測定した抗酸化活性は、チャ抽出物Bが最も高く、以下、チャ抽出物A、チャ抽出物C、チャ抽出物D、エンジュ抽出物、酵素処理ルチン、緑茶エキス、カテキン、 $d-\alpha$ -トコフェロール、単糖・アミノ酸複合物の順であった。以上の10種類の酸化防止については、先の研究において、DPPH法、ABTS法、WST-1法、ORAC法でも測定済である。そこで、活性の高低を比較してみたが、いずれの方法の評価結果とも活性の高低は一致しなかった。

また、他法との比較として、先の4方法の測定結果との回帰分析を行った。その結果、DPPH法との間の相関係数は0.672、ABTS法では0.558、WST-1法では0.559、ORAC法では0.464（いずれも $n=9$ ）となった。DPPH法との間でのみ有意な相関が認められたが（ $p < 0.05$ ）、その値は低いものであった。また、その他の3方法との間には有意な相関関係は認められなかった。このことから、脂質過酸化抑制能評価法である β -カロテン退色法による測定結果は、活性酸素・ラジカル消去活性測定の測定結果とは異なる挙動を示す傾向にあることが判明した。

しかしながら、今回は試料数が12種類と少なかったため、今後、測定試料数をさらに増やし、より詳細な検討を行う必要があると考えている。

(2) TBA法

TBA法は、過酸化脂質の分解により生成するマロンジアルデヒドが2分子のTBAと結合して生成する赤色物質を測定することで脂質過酸化度を評価する方法である。

このTBA法による測定結果を図2に示した。縦軸に試料の脂質過酸化抑制能をBHA等価活性(BHAeq.)として示し、横軸に試料名を示した。BHA等価活性の値が大きいほど脂質過酸化抑制能が高いことを意味している。

その結果、今回分析に供した8種類の酸化防止剤全てでIC₅₀値を求めることができた。上記のβ-カロテン退色法ではIC₅₀値を求めることができなかったケルセチンの評価も可能であったことから、同じ脂質過酸化抑制能評価法ではあるが、TBA法の方が適用範囲が広い可能性があるかと推察された。

TBA法で測定した抗酸化活性は、緑茶エキスが最も高く、以下、チャ抽出物D、エンジュ抽出物、d-α-トコフェロール、チャ抽出物B、チャ抽出物A、チャ抽出物C、ケルセチンの順であった。以上の8種類の酸化防止については、先の研究において、DPPH法、ABTS法、WST-1法、ORAC法でも測定済である。そこで、活性の高低を比較してみたが、いずれの方法の評価結果とも活性の高低は一致しなかった。

また、他法との比較として、先の研究で適用性について検討した4方法の測定結果との回帰分析を行った。その結果、DPPH法との間の相関係数は0.598 (n = 8)、ABTS法では0.344 (n = 8)、WST-1法では0.049 (n = 7)、ORAC法では0.475 (n = 7)となった。いずれの場合にも有意な相関関係は認められなかった (p < 0.05)。このことから、脂質過酸化抑制能評価法であるTBA法による測定結果は、活性酸素・ラジカル消去活性測定の測定結果とは異なる挙動を示す傾向にあることが判明した。

しかしながら、今回は試料数が8種類と少なかったため、今後、測定試料数をさらに増やし、より詳細な検討を行う必要があると考えている。

D. 結論

代表的な脂質過酸化抑制能評価法であるβ-カロテン退色法とTBA法による酸化防止剤の抗酸化活性評価を行い、その適用性について検討した。その結果、β-カロテン退色法では12種類の酸化防止剤のうち10種類について活性を求めることが可能であった。しかし、試料自体が強く色を呈しているものには適用性が低い可能性が示された。TBA法では測定に供した8種類全ての酸化防止剤について活性を求めることが可能であった。β-カロテン退色法、ならびにTBA法による測定結果と活性酸素・ラジカル消去活性測定法であるDPPH法、ABTS法、WST-1法、ORAC法による測定結果の比較を行ったところ、β-カロテン退色法-DPPH法の組み合わせ以外では有意な相関が認められなかった。このことから、脂質過酸化抑制能評価法であるβ-カロテン退色法、ならびにTBA法と活性酸素・ラジカル消去活性測定法とは異なる挙動を示す傾向にあることが判明した。

E. 参考文献

- 1) 島村他、食科工、54、482 (2007).
- 2) 津志田他、日食工誌、41、611 (1994).
- 3) 食品中の生体機能調節物質研究法、川岸舜朗編著、学会出版センター、東京、p. 14 (1996).

F. 研究発表

- (1) 論文発表
なし。
- (2) 学会発表
なし。

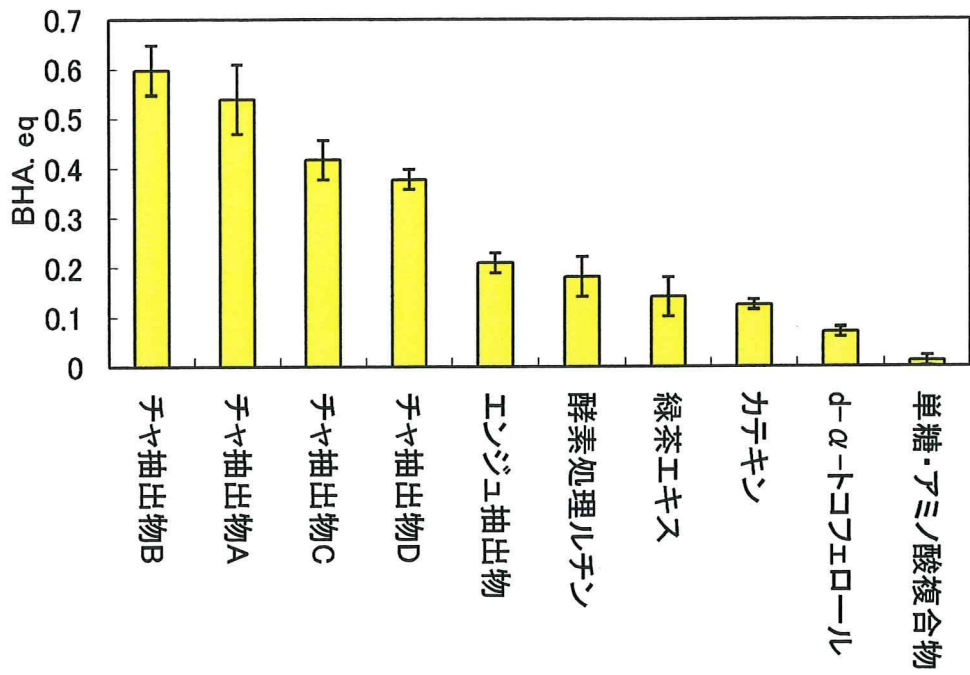


図1 β-カロテン退色法で評価した各種酸化防止剤の抗酸化活性

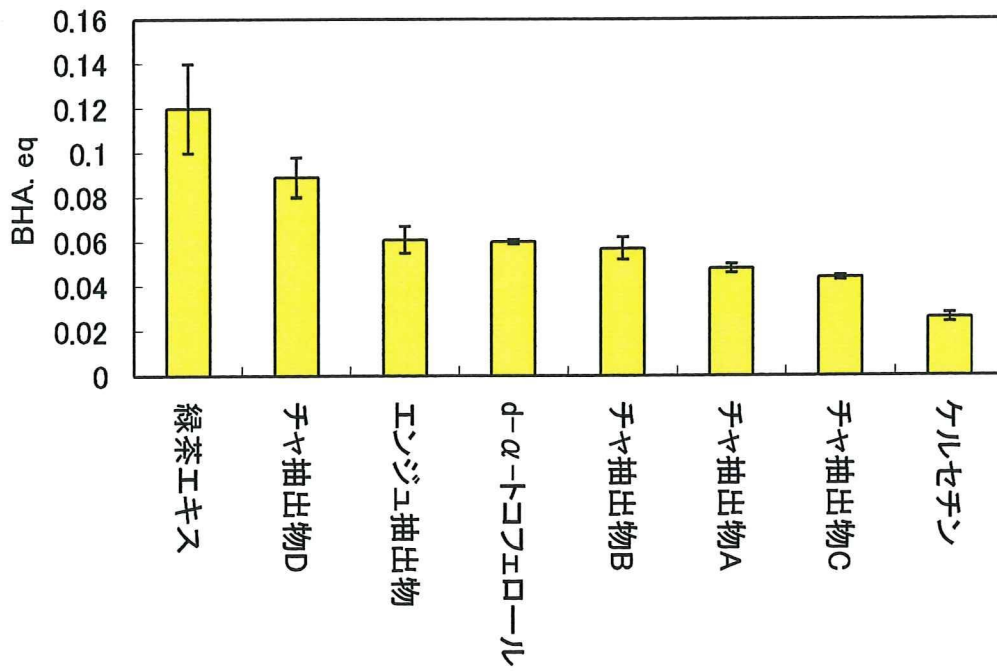


図2 TBA法で評価した各種酸化防止剤の抗酸化活性

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 21 年度分担研究報告書

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

研究分担者 松本 清 九州大学農学研究院 教授

研究協力者 受田 浩之 高知大学農学部 教授

研究要旨

酸化防止剤の併用効果を判定するために、薬剤の併用効果判定に汎用されている Median effect analysis の適用性を昨年度に引き続き検討した。本年度は、「既存添加物名簿収載品目リスト」に収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 8 種類の添加物を用い、DPPH 法により 4 通り、WST-1 法で 8 通りの組み合わせで併用効果を検討した。その結果、DPPH 法と WST-1 法で概ね一致した判定結果が得られた。また、今回併用した酸化防止剤の反応型は、本解析法の I 型あるいは III 型であり、両者が排他的（拮抗的）に反応していることが判明した。このことから、本酸化防止剤の反応型が Fractional product method（19 年度厚生科学研究で使用）の条件である「両者が独立して作用する場合」に適合しないことが明らかになった。続いて、国内外で注目されている ORAC 法を用いて疎水性酸化防止剤であるトコフェロール類の抗酸化能評価を試みた。その結果、反応溶媒としてリン酸塩緩衝液、50%アセトン水溶液、AWA 溶液（アセトン：超純水：酢酸＝700：295：5）を単独で用いた場合にはいずれも測定が困難であり、AWA 溶液にランダムメチル化シクロデキストリンを添加した場合のみ測定可能であることが明らかになった。

A. 研究目的

食品への用途が認められている酸化防止剤の品質規格を設定する上では、酸化防止剤の相互作用を評価することは極めて重要である。特に、酸化防止剤使用時に相殺効果が生じた場合、期待される抗酸化効果が得られなくなるため重大な問題となる。しかしながら、併用効果の解析方法は確立されておらず、その対応が急務となっている。我々は、平成 17～19 年度厚生科学研究「天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価に関する研究」において、抗酸化成分の併用効果の検討に使用された実績を有する Fractional product method¹⁾を用いて酸化防止剤の併用効果の判定を試みた。すなわち、試料 A と B の混合試料の阻害率の予測値 (I_E) は以下の式で計算できると報告されている^{2,3)}ことから、予測値 I_E と実測値とを比較することにより、2 成分混合系における酸化防止剤の効果（相乗効果、

相加効果、相殺効果）を検討してきた。

$$I_E = (I_A + I_B) - (I_A \times I_B / 100)$$

しかしながら、Fractional product method では、個々の化合物が独立して作用し、且つその反応が双曲線型に当てはまる場合にしか適用できないという制限がある。そこで昨年度、さらに有効な併用効果の解析法を模索し、薬剤の併用効果解析法として用いられてきた『Median effect analysis』を抗酸化食品成分併用効果の新規解析法として新たに提案した。

本法は、Chou ら⁴⁾が考案した方法であり、実験結果をもとに薬剤の反応型を推定し、反応型に応じた併用効果の解析を行うため、汎用性が極めて高い。さらに、本法により阻害割合に応じた CI（Combination Index）値を算出することにより、併用効果を詳細に検討することが可能となる。昨