

図5. WST-1法の測定手順と原理

As (同じく A_{sample}) として、通常は阻害率I (%)を

$$I = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100$$

で計算できる。50%阻害を与える試料の希釈倍率を正確に求め、その希釈倍率における試料溶液が IC_{50} 値を示すSOD標品の濃度と等価であると考えて、試料原液または試料固体重量当たりのSOSAを算出する。なお、算出に用いるSOD酵素単位に関して、従来はシトクロムc法により決定されたSOD酵素単位を用いていた。しかしながら、後に述べるように本酵素単位の定義が測定値の室間再現精度に影響を及ぼすことが判明したことから、我々は新たに「WST還元50%阻害を示すサンプル溶液20 μL に含まれるSOD量を1単位(U)とする」との定義を導入した。現在、SOD Assay Kit-WSTの測定マニュアルにも、この新たな定義が記載されている。本総説には、新定義の導入前・後の結果が示されていることを予めご了承ください。

通常の生化学試料では、この式に基づいて、SODの活性測定が可能であるが、食品試料の場合には、試料成分による直接的なWST-1の還元がどの程度起こっているかを常に知っておく必要がある。その評価は、XOD溶液の代わりに緩衝液(キットではDilution bufferに相当)を添加した系について吸光度変化(A_b : マニュアルでは A_{blank2})を測定し、 A_c と比較することで可能である。

本法は簡便な分光学的検出でSOSAを評価できる大変簡易なスクリーニング法である。一般に本法は水溶性の試料への適用が前提となっているため、脂溶性の試料への適用は限られる。また $\text{O}_2^{\cdot-}$ の発生に使用している酵素XODに直接阻害を示す物質が共存する場合には、見かけ上、活性を示すことに

なる。その懸念がある場合には、キットの中のWST-1濃度を変化させて IC_{50} を測定してみる。もしXODを直接阻害している場合には、WST-1の濃度が増加してもその値が変化しないはずである($\text{O}_2^{\cdot-}$ と競合すれば、WST-1濃度が増加すると IC_{50} は大きくなる)。また試料の色に基づく妨害が問題になることもある。このような場合には、WST-1をスピントラップ剤DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide) に代えて、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ のスピンアダクトを電子スピン共鳴(ESR)装置にて検出する方法がある¹⁹⁾。

3. 各種試料に対する方法の比較

我々は、上述の厚生労働科学研究費補助金プロジェクトにおいて、抗酸化能評価法の公定法候補を選定し、その妥当性評価を行った¹⁹⁾。選定条件は、(1)過去の研究において使用されてきた実績があること、(2)短時間での測定が可能であること、(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ことの3項目とし、結果としてラジカル消去活性測定法であるDPPH法とABTS法、活性酸素消去活性測定法であるWST-1法を候補として選定した。本プロジェクトでは上記3法を用いて、既存添加物のうち単一化合物からなる酸化防止剤及び複数成分からなる天然由来酸化防止剤の測定を行い、得られた結果を比較した。

3-1. 単一化合物からなる酸化防止剤

既存添加物のうち単一化合物からなる酸化防止剤9種類(カテキン、ケルセチン、*trans*-フェルラ酸、没食子酸、モリン、セサモール、D- α -トコフェロール、D- δ -トコフェロール、

表2. 単一化合物からなる酸化防止剤の抗酸化能測定における共同試験結果

酸化防止剤	DPPH法			ABTS法			WST-1法		
	RSD _d (%)	RSD _r (%)	HorRat値	RSD _d (%)	RSD _r (%)	HorRat値	RSD _d (%)	RSD _r (%)	HorRat値
カテキン	3.29	18.10	1.32	3.16	52.06	3.72	14.34	29.91	3.01
ケルセチン	8.63	13.45	0.95	3.34	27.74	1.88	16.25	45.16	5.31
セサモール	3.13	12.29	0.94	2.01	7.10	0.44	13.81	44.32	10.39
フェルラ酸	1.80	9.89	0.83	8.90	82.68	6.19	11.68	16.86	2.40
没食子酸	3.69	12.62	0.85	4.12	7.44	0.46	15.87	57.32	3.59
モリン	5.12	12.60	1.05	3.44	3.40	0.26	27.43	33.03	4.61
エラグ酸	4.74	9.16	0.63	7.53	15.99	1.04	18.59	54.93	4.71
D- α -トコフェロール	3.81	42.85	3.72	2.84	9.96	0.81	—	—	—
D- δ -トコフェロール	5.08	12.48	1.11	2.84	10.13	0.80	—	—	—

エラグ酸)の抗酸化能評価に関する3試験機関での共同試験を行った。共同試験では、酸化防止剤試薬のロット、試薬秤取量、溶媒容量、溶液調製操作に用いる器具の種類、希釈手順、データ解析方法を全て指定し、同一プロトコルにて測定を行った。DPPH法とABTS法では各種酸化防止剤の抗酸化能をTrolox等価活性として示し、WST-1法ではSOD等価活性として示した。各手法で求められた抗酸化能の繰り返し精度RSD_d(%)、室間再現精度RSD_r(%)、及び室間再現精度の予測値との比(HorRat値)を求めた(表2)。

なお、HorRat値はその値が2以下であれば、室間再現精度が許容範囲内であるとみなされる。検証の結果、DPPH法では8種類、ABTS法では7種類の酸化防止剤の測定においてHorRat値が2以下となったことから、これらの方法は高い測定精度を有していると考えられた。一方、WST-1法では、D- α -トコフェロールとD- δ -トコフェロールの測定が不能であっただけでなく、残り全ての測定結果においてHorRat値が2以上となり、室間再現精度が若干劣ることが判明した。

3-2. 天然物由来酸化防止剤

複数成分からなる天然物由来酸化防止剤(26種類):チャ抽出物(4種類)、緑茶エキス、ミックストコフェロール、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、トコトリエノール、カンゾウ油性抽出物、ブドウ種子

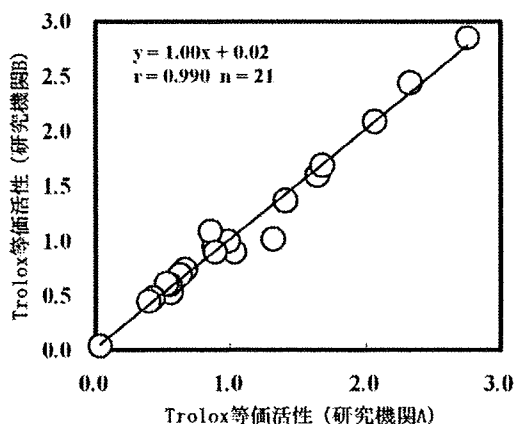


図6. 2ヶ所の研究機関で求めたTrolox等価活性の相関(DPPH法)

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、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、酵素処理ルチンの抗酸化能評価を行った。本実験は、2ヶ所の試験機関で行い、得られた結果を回帰分析により評価した。DPPH法での回帰分析結果を図6に示した。

2試験機関の測定結果に有意な直線性が認められ($r=0.990$)、回帰式の傾きが1.00であったことから、両試験機関で得られた値が極めて高い一致性を示すことが確認された。ABTS法においても同様の結果が得られている(傾き1.11、 $r=0.990$)。この結果より、DPPH法並びにABTS法では、天然物由来酸化防止剤の評価に対しても十分対応可能であることが示された。一方、WST-1法は脂溶性の高い酸化防止剤に対しては対応不能であり、その適用範囲が限定されることが判明した。さらに、測定可能であった酸化防止剤(17種)の回帰分析結果では、直線の傾きが1.25となり、両研究機関の測定値に25%の差が認められた。この原因を検証した結果、測定法自体に問題があるわけではなく、シクロクロムc法により決定されたSOD酵素単位をSOD等価活性の算出に用いたことが原因と判明した。そこで、我々は「WST還元率の50%阻害を示すサンプル溶液20 μ Lに含まれるSOD量を1単位(U)とする」と新たに定義し、測定結果の再解析を試みた。その結果、回帰分析の結果が大幅に改善され、WST-1法においても良好な室間再現性が確認された(傾き1.03、 $r=0.992$)。

上記の結果、DPPH法及びABTS法については、今後本格的な分析法の妥当性確認を行うことにより、公定法として採用出来る可能性が高いと考えられた。分析法の公定化に向けた妥当性確認方法のガイドラインはいくつか存在するが、AOAC、ISO、IUPACの三者が合意したHarmonized protocolが代表的である。この場合、定量法では8ヶ所以上、定性法では10ヶ所以上の共同試験参加機関による共同試験の有効なデータがなければならぬとされている¹⁰⁾。一方、WST-1法では、単一化合物からなる酸化防止剤の測定において十分な室間再現精度が得られなかったものの、天然物由来酸化防止剤の測定結果では、SOD酵素単位の定義を変更することによ

り、良好な結果が得られている。単一化合物からなる酸化防止剤の結果についても再検証の必要はあるが、同様に室間再現精度の改善が見込まれることから、引き続きWST-1法も公定法候補として検討する予定である。

4. 抗酸化物質の相乗・相殺効果

食品や天然物抽出物中で、抗酸化物質が単独で存在することは希であり、多くは複合系として存在する。これら抗酸化物質の活性は、相加的に働くだけでなく、何らかの化合物との共存によって強められたり、弱められたりすることがある。実際、抽出液などの複合系では、しばしば抗酸化物質の濃度と活性との間に相関が無いことが報告されている。その詳細は不明であるが、成分間の何らかの相互作用、すなわち相乗効果あるいは相殺効果によるものと推察されている。

混合系における抗酸化物質間の相互作用は、予測された値（予測値）よりも実測値が大きければ相乗効果（synergistic effect）、小さければ相殺効果（antagonistic effect）、同等であれば相加効果（additive effect）と判定されるが、判定基準となる予測値の見積もりは極めて難しい。混合系における抗酸化物質の活性予測値について、その算出方法、算出根拠を明確に論じた報告例は見当たらない。

本稿では、薬剤での併用効果の判定（活性予測値の算出）に利用されている2つの評価法を紹介するとともに、酸化防止剤併用効果の解析への応用例（当研究グループの取り組み）について述べる。

4-1. Fractional product methodによる予測・評価¹⁸⁾

Webbら（1963年）が考案した方法であり、2つ以上の酵素阻害治療薬の併用効果を評価するための古典的な方法である。薬剤1と薬剤2の併用効果は以下の式で表される。

$$(f_{12}) = (f_{1}) \times (f_{2}) \quad (1)$$

ここで、 (f_{12}) は薬剤1と2併用時に薬剤の影響を受けていない割合を、 (f_{1}) は薬剤1単独使用時に影響を受けていない割合を、 (f_{2}) は薬剤2単独使用時に影響を受けていない割合を示す。

また、薬剤1と2併用時の阻害割合を (f_{12}) 、単独使用時の阻害割合を (f_{1}) 、 (f_{2}) とすると、式 (1) は以下のように表される。

$$[1 - (f_{12})] = [1 - (f_{1})] [1 - (f_{2})] \quad (2)$$

または

$$(f_{12}) = [(f_{1}) + (f_{2})] - [(f_{1}) \times (f_{2})] \quad (3)$$

Shi¹⁹⁾ は、引用先は不明であるが、恐らくこの概念に基づく以下の式を、抗酸化物質の併用効果に利用している。

$$I_E = (I_A + I_B) - (I_A \times I_B / 100) \quad (4)$$

ここで、 I_E は試料AとB併用時の予測される消去率を、 I_A は試料Aの消去率を、 I_B は試料Bの消去率を示す。実測値 I_M と予測値 I_E を比較することにより併用効果を判定する ($I_M/I_E > 1$ 相乗効果、 $I_M/I_E = 1$ 相殺効果、 $I_M/I_E < 1$ 相殺効果)。これらの式を利用して、例えば終濃度が IC_{50} を示す濃度の試料を混合した場合、予測値は75%となり、 IC_{25} の試料を混合すると予測値は43.8%となる。

実際、我々の実験で11種類の単一成分からなる酸化防止剤（食品添加物）での2成分での組み合わせ（55通り）及び安息香酸類、桂皮酸類、フラボノイド類、ビタミン類、ジテルペン類の24種類の抗酸化物質を用い、その全組み合わせ（276通り）での併用効果を検討した結果、酸化防止剤55通りの組み合わせでは、36通りにおいて相乗効果、1通りで相殺効果であること、24種の抗酸化物質の組み合わせでは、74通りにおいて相乗

表3. 酸化防止剤の2成分混合時のDPPHラジカル消去率と予測値との比

	BHA	BHT	CT	QC	SM	FA	GA	MO	EA	aTOC	dTOC
	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E
BHA	—	1.049*	1.010	1.069**	1.036	1.077**	1.050	1.063*	1.070*	1.074**	1.059*
BHT	—	—	0.996	1.031	1.058**	1.038*	1.025*	1.029	1.024	1.087**	1.076*
カテキン(CT)	—	—	—	1.039*	0.980	0.969	0.971	0.998	1.067	1.008	1.035
ケルセチン(QC)	—	—	—	—	1.129**	1.081	1.094	1.093*	1.082*	1.208**	1.151**
セサモール(SM)	—	—	—	—	—	1.195**	1.058**	1.128**	1.170*	1.162**	1.174**
フェルラ酸(FA)	—	—	—	—	—	—	1.105*	1.177*	0.903*	1.108*	1.107**
没食子酸(GA)	—	—	—	—	—	—	—	1.019	1.055**	1.140*	1.058
モリン(MO)	—	—	—	—	—	—	—	—	1.117**	1.201*	1.111**
エラグ酸(EA)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.117**	1.135*
D- α -トコフェロール(aTOC)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.155**
D- δ -トコフェロール(dTOC)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

I_M/I_E の比が1以上で有意差ありは相乗効果、1以下で有意差ありは相殺効果。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

効果、61通りで相殺効果となった。表3に一例を示す。しかし、これらの多くの組み合わせによる効果は弱く、相加効果をわずかに上回る、あるいは下回る程度であり、1.2以上の活性増強の組み合わせは14通り、0.8以下の活性低下の組み合わせは33通りであった²⁰⁾。

4-2. Median effect analysisによる予測・評価²¹⁾

Chou and Talalay (1984年)により提案された方法であり、薬剤の併用効果の解析法として現在のところ最も利用されている。現在までに1600以上の文献で引用されており、本法の解析ソフトも市販されている (BIOSOFT社 CalcuSyn)。本法は、上記Fractional product methodが、個々の薬剤が独立して作用している場合で、か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ず、薬剤の阻害様式を考慮していない点 (反応が双曲線型かシグモイド型か) 及び個々の薬剤の相互的な役割を考慮していない点 (個々の薬剤が独立して作用しているのか、排他的に作用しているのか) を指摘している。また、本法は他に古くから利用されているIsobologram method (Isobolとも呼ばれる) の問題点 (個々の薬剤が排他的に作用しているときのみしか評価できない) も指摘し、これらを含めた評価法を提案している。

本式は以下のように表され、

$$f_b/f_u = (D/D_m)^m \quad (5)$$

ここで、Dはdose (濃度)、D_mはMedian effect (IC₅₀)、mはHill型の係数を示す。式 (5) を変形すると、

$$\log(f_b/f_u) = m \log(D/D_m) \quad (6)$$

となり、 $\log(D/D_m)$ あるいは $\log D$ を横軸に、 $\log(f_b/f_u)$ を縦軸にプロットすることにより、個々の薬剤のmを求めることができる。m=1のとき、反応は双曲線型、すなわち一次反応型あるいはMichaelis-Menten型となり、m>1のとき高次反応型となる。本法は、m値を基に、実測値からCI (combination index) 値を算出し、併用効果を判定する (CI<1相乗効果、CI=1相加効果、CI>1相殺効果) ことができる。

本法は実験結果を基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とされている。しかし、Berenbaum²²⁾は指数関数的な濃度依存性を示す阻害剤は、この方法に適用できないことを指摘している。

我々は、Median effect analysisを用いて、単一化合物からなる酸化防止剤の併用効果の判定を試みている。一例として、D- α -トコフェロールとケルセチンのMedian effectプロットを示した (図7)。なお、抗酸化能の測定にはDPPH法を用いている。D- α -トコフェロール単独、ケルセチン単独、両者併用

時の直線の傾きm値は、それぞれ1.83、1.74、1.93と算出され、この値をもとにCI値が見積もられる。CIプロットの代表例を図8に示す。

D- α -トコフェロールとケルセチンの組み合わせでは、いずれの阻害割合においてもCI<1となり両者の併用効果は、相乗効果と判定された。また、フェルラ酸とエラグ酸ではいずれの阻害割合においてもCI>1となり両者の併用は相殺効果を示すことが判明した。D- α -トコフェロールとモリンではCIプロットの結果から、両者の効果はほぼ相加性であると判断したが、その効果は阻害割合 (混合時の濃度レベル) によって異なっていた。すなわち両者の効果は、 $f_b < 0.5$ では相殺性を示したものの、 $f_b > 0.5$ では逆に相乗性を示すことが判明した。この結果は、混合時の濃度レベルが低い場合、両者は相殺的に作用し、高濃度では相乗的に作用することを示している。Median effect analysisでは、併用時の濃度レベルに応じた併用効果の判定が可能であったことから、本法の有用性が確認された²³⁾。表4にFractional product methodとMedian effect analysisで得られた判定結果の一部を示す。D- α -トコフェロールとケルセチン、フェルラ酸とエラグ酸の組み合わせは両法で同様の判定結果を得たが、Fractional product methodで相乗効果と判定された2組 (D- α -トコフェロールとモリン、セサモールとエラグ酸) では異なる結果となった。特に、セサモールとエラグ酸の組み合わせでは、両法の判定結果が全く逆となり、Median effect analysisで相殺効果と判定された。Fractional product methodは、限定された条件下での解析法であることを考慮すると、Median effect analysisでの判定結果の信頼性が高いと考えられたが、この点に関しては今後詳しく検討する必要がある。

以上、薬剤の併用効果の解析法を紹介するとともに、我々のデータの一部を示した。これらの解析法によると、予測値は単一系の単なる足し算ではなく、また個々の薬剤の反応様式等を把握しなければ見誤った予測値を見積もることになる。さらに、解析法の選択によって判定結果が全く異なる場

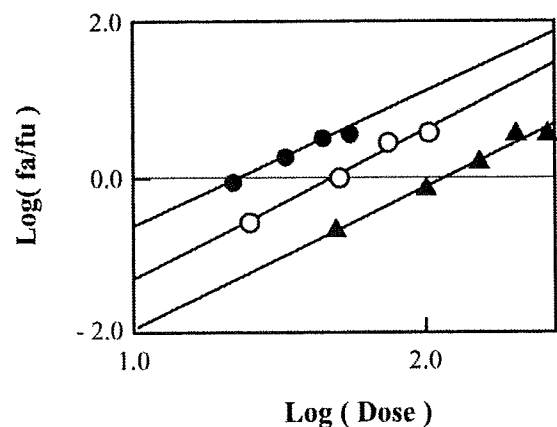


図7. 酸化防止剤の組み合わせによるMedian effectプロット
○; 併用、▲; D- α -トコフェロール、●; ケルセチン

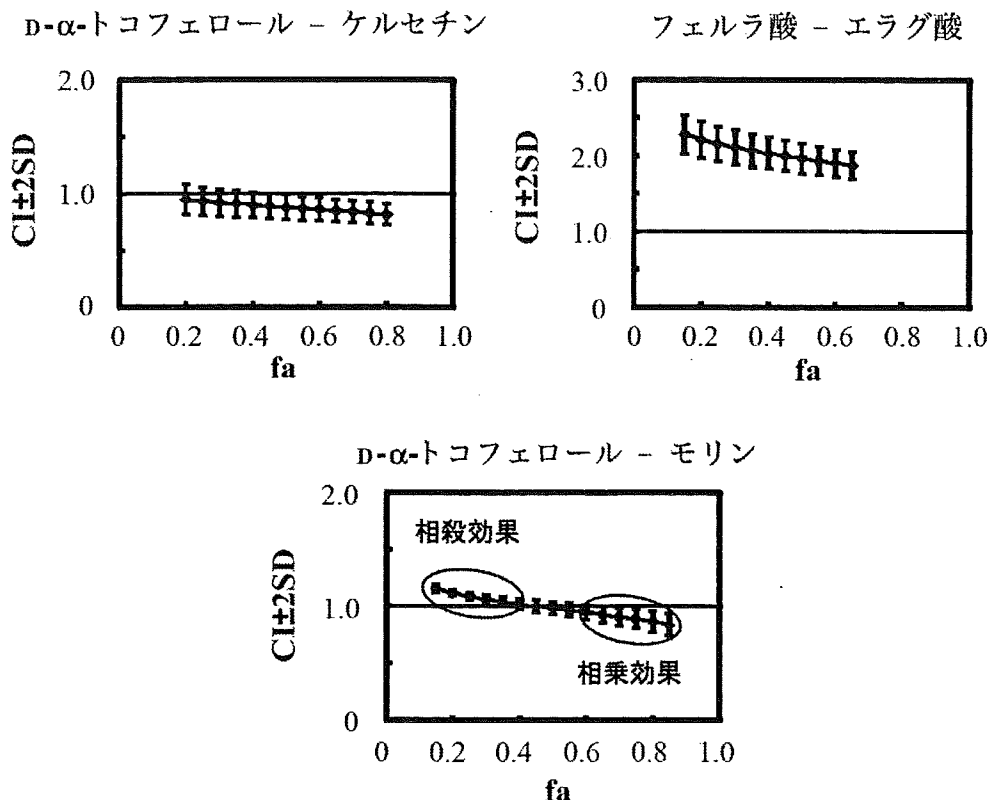


図8. 酸化防止剤の組み合わせによるCIプロット

表4. Fraction product methodとMedian effect analysisによる酸化防止剤併用効果の比較

化合物の組み合わせ	Fractional product method	Median effect analysis
D-α-トコフェロール-ケルセチン	相乗	相乗
フェルラ酸-エラグ酸	相殺	相殺
D-α-トコフェロール-モリン	相乗	相加
セサモール-エラグ酸	相乗	相殺

合があるため、解析法の妥当性を慎重に評価すべきである。現在、我々はMedian effect analysisを中心に酸化防止剤の併用効果の解析を試み、その有効性を評価している。今回示した結果はその一部であり、解析のもととなるデータは、DPPH法による測定値のみである。しかし、上述のように抗酸化能評価法は様々であり、測定法により抗酸化物質の作用様式は異なる。抗酸化能評価法に応じた併用効果の評価系を確立することも、相乗効果、相殺効果を議論するためには必要となるであろう。

5. おわりに

本総説では代表的な抗酸化能評価法を紹介したが、抗酸化能評価法は多種多様であるばかりでなく、その測定メカニズムも異なる。従って、同一の試料でも測定法が違くと得られ

る抗酸化能が異なる上、各測定法で得られた値が相関しない場合が多い。個々の測定法におけるプロトコルが統一されていない点がこの状況をさらに複雑にしている。抗酸化能評価を行う場合、実験者は評価対象試料に応じて試験法を選ぶ必要があるが、実際にはその選択が極めて難しい。結果として、複数の評価法を併用せざるを得ないのが現状である。また、生体内での食品の抗酸化能を評価するための試験法と、食品保存に使用する抗酸化剤の抗酸化能を評価するための試験法を区別する必要もあろう。

抗酸化能評価法を統一化し、標準的な測定法を提示しようとする試みが国内外で行われている²⁴⁾。その第一候補となっているのが上述のORAC法である。しかしながら、上記の理由により評価法を統一することは極めて困難である。今回我々は、DPPH法、ABTS法、WST-1法の3法に関して公定法化の可能性を検討してきた。その結果、現時点では、いずれの方法も酸化防止剤の抗酸化能評価における公定法の候補と

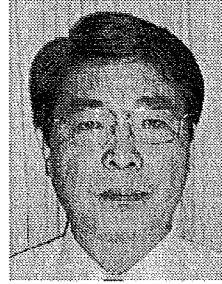
なり得るという結論に至っている。DPPH法及びABTS法に関しては、高い精度を有し、かつ広い適用性を有することから公定法の最有力候補としているが、脂溶性物質の測定と測定精度に課題が残るWST-1法についても公定法化への可能性を十分残していると考えている。その理由としては、植物系試料中に多く含まれる抗酸化酵素の活性測定には、DPPH法及びABTS法は適さず、WST-1法が極めて有力と考えられるからである。このことは、測定対象物に対して最適な抗酸化評価法を選択する必要があると言うことを意味している。今後、上記3法にORAC法も含めて分析法の妥当性確認を行い、各種試料に対して適切な抗酸化評価法を提示することが必要であろう。

本総説では抗酸化成分の相乗・相殺効果についても述べた。抗酸化能を指標とした酸化防止剤の品質規格基準を設定する上では、抗酸化物質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。本稿では、2種類の併用効果の解析法（Fractional product method及びMedian effect analysis）を例に挙げ、その解析方法、特徴及び応用例について解説した。特に、Median effect analysisでは、反応メカニズムに応じた解析が可能でなく、抗酸化物質の濃度レベルに応じて併用効果（相加・相乗・相殺）を判定できる点で有用性は高い。濃度レベルに応じた判定結果は、実際に酸化防止剤を用いる場合に非常に有益な情報となるであろう。

抗酸化能評価法の標準化に向けて、残されている課題は多い。多数の研究機関がこの難題に取り組んでいる。現時点では、我々の取り組みもその一部にすぎないが、今後本研究の成果が食品の抗酸化機能研究の進展や食品添加物の品質確保の一助となることを期待したい。

引用文献

- 1) 今田伊助, 佐藤英介, 井上正康, 化学と生物, **37**, 411-419 (1999).
- 2) 澤智裕, 赤池孝章, 前田浩, 化学と生物, **40**, 15-21 (2002).
- 3) 二本悦雄, 化学と生物, **37**, 554-561 (1999).
- 4) G. Cao, H. M. Alessio and R. G. Cutler, *Free Radical Biol. Med.*, **14**, 303-311 (1993).
- 5) B. Ou, M. Hampsch-Woodill and R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4619-4926 (2001).
- 6) D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. Flanagan and E. Deemer, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1815-1821 (2002).
- 7) R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannale, M. Yang and C. Rice-Evans, *Free Radical Biol. Med.*, **26**, 1231-1237 (1999).
- 8) M. S. Blois, *Nature*, **181**, 1199-1200 (1958).
- 9) T. Yamaguchi, H. Takamura, T. Matoba and J. Terao, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1201-1204 (1998).
- 10) 大柳善彦, "活性酸素と病気", 化学同人, 1989.
- 11) 井上正康, "活性酸素と医食同源", 共立出版, 1996.
- 12) H. Ukeda, Y. Hasegawa, T. Ishii and M. Sawamura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 2039-2042 (1997).
- 13) H. Ukeda, D. Kawana, S. Maeda and M. Sawamura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 485-488 (1999).
- 14) H. Ukeda, A. K. Sarker, D. Kawana and M. Sawamura, *Anal. Sci.*, **15**, 353-357 (1999).
- 15) Y. Noda, K. Anzai, A. Mori, M. Kohno, M. Shinmei and L. Packer, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **42**, 35-44 (1997).
- 16) 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, 日食科工誌, **54**, 482-487 (2007).
- 17) 後藤哲久, "食品分析法の妥当性の確認ハンドブック 第1版", 永田忠博編, サイエンスフォーラム, 2007, pp. 32-38.
- 18) J. L. Webb, "Enzyme and metabolic Inhibitors," Vol. 1, Academic press, New York, 1963, pp. 66-79, 488-512.
- 19) J. Shi, Q. Qu, Y. Kakuda, S. J. Xue, Y. Jiang, S. Koide and Y. Shim, *J. Food Comp. Anal.*, **20**, 603-608 (2007).
- 20) 松藤寛, 佐々裕一郎, 本間友輝, 宮島拓臣, 千野誠, 山崎壮, 島村智子, 受田浩之, 松井利郎, 松本清, 山形一雄, 日食科工誌, **56**, 129-136 (2009).
- 21) T. C. Chou and P. Talalay, *Adv. Enzyme Regul.*, **22**, 27-55 (1984).
- 22) M. C. Berenbaum, *J. Theor. Biol.*, **114**, 413-431 (1985).
- 23) 井邊早春, 石川洋哉, 受田浩之, 山崎壮, 松井利郎, 松本清, 日本食品科学工学会第56回大会講演要旨集, 101 (2009).
- 24) 渡辺純, 沖智之, 竹林純, 山崎光司, 津志田藤二郎, 生物と化学, **47**, 237-243 (2009).



松本 清

九州大学大学院農学研究院
教授
農学博士

1974年九州大学農学部助手、1978年同大学農学部助教授、1989年同大学農学部教授、2000年同大学大学院農学研究院教授。



受田 浩之

高知大学
教授
農学博士

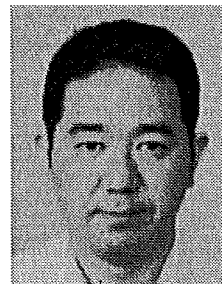
1982年九州大学農学部食糧化学工学科卒業、1984年同大学大学院農学研究科修士課程修了、1986年同大学大学院農学研究科博士課程中途退学、同年同大学農学部助手、1991年高知大学農学部助教授、2004年同教授、2005年地域連携推進本部長、国際・地域連携センター長兼務、2006年高知大学副学長兼務、1990年農学博士（九州大学）、1991年ドイツ国立バイオテクノロジー研究所（GBF）、～92年客員研究員。



島村 智子

高知大学農学部
准教授
博士（農学）

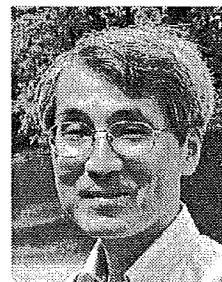
2002年愛媛大学大学院連合農学研究科博士課程修了、同年～2005年日本獣医畜産大学（現日本獣医生命科学大学）助手、2005年～高知大学農学部准教授。



松藤 寛

日本大学生物資源科学部食品生命学科
准教授
博士（農学）

1996年九州大学大学院農学研究科博士後期課程修了、同年日本大学生物資源科学部助手、1999年同専任講師、2002年～2003年米国カリフォルニア大学デービス校環境毒性部客員研究員、2008年日本大学生物資源科学部准教授、現在に至る。

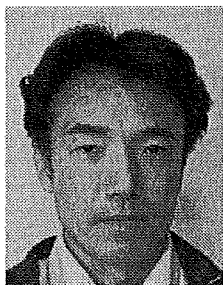


山崎 壮

国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部
第二室長
薬学博士

1983年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了、同年国立衛生試験所（現国立医薬品食品衛生研究所）勤務、食品添加物部研究員、機能生化学部第一室長を経て、2000年～食品添加物部第二室長。

PROFILE



石川 洋哉

福岡女子大学人間環境学部栄養健康科学科
准教授
博士（農学）

1997年九州大学大学院農学研究科博士後期課程修了、同年同大学ベンチャービジネスラボラトリー講師（中核の研究機関研究員）、2000年日本学術振興会特別研究員、同年九州大学大学院農学研究科助手、2007年同助教、2009年福岡女子大学人間環境学部栄養健康科学科准教授、現在に至る。



200939027A (2/2)

平成21年度 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

総括・分担研究報告書 分冊その2

— 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

平成21年度 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

—既存添加物の規格化に関する調査研究—

研究者 高橋 仁一

所属 日本食品添加物協会

役職 常務理事

〔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月は、これまで蓄積してきた189品目の自主規格を収録した「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年度は、第8版食品添加物公定書への収録候補品目を中心に、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録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、既収録の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品目を新規収録した。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。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。

本年度は、新たに6品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、6品目について第4版既存添加物自主規格の見直しを行った。

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、酵素については、EUの新しい食品酵素規制に関する調査研究を行った。

研究結果の概要と考察

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. EUの新しい食品酵素規制に関する調査研究

2009年1月に施行されたEUの食品改良剤一括法に係る共通規則、及び食品酵素規則並びに登録・評価ガイドラインの調査研究を行った。

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4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21年度 新規規格作成検討(6品目)

本年度の新規規格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)	エレミ樹脂
酸化防止剤(2品目)	ドクダミ抽出物(参考規格)、ソバ全草抽出物
酵素(1品目)	イソマルトデキストラナーゼ
苦味料等(1品目)	ゲンチアナ抽出物(参考規格)
製造用剤・ミネラル(1品目)	海藻灰抽出物

(2)既設定規格の見直し(6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。

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)	検討品目	見直しの概要
着色料(4品目)	褐色系色素4品目	褐色系色素4品目(タマネギ色素、タマリンド色素、クーロー色素、カキ色素)の確認試験における差別化の検討を行った。
乳化剤(1品目)	植物性ステロール	精製植物ステロールの定量法中のフィトステロールの計算式(係数)等について見直し検討を行った。
製造用剤・ミネラル(1品目)	くん液	新たにヘプタナールの含量規格及び試験方法を追加すると共に、純度試験の重金属試験を鉛試験に変更した。

3-2. EUの新しい食品酵素規制に関する調査研究

2009年1月に施行されたEUの食品改良剤一括法に係る共通規則、及び食品酵素規則並びに登録・評価ガイドラインの調査研究を行った。規則 No. 1331/2008 共通認可手続、規則 No. 1332/2008 食品酵素、及び EFSA ガイドラインの翻訳を行うと共に各規則、ガイドラインの概要についてまとめ上げた。

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、別紙資料1のとおりである。

(2) EUの新しい食品酵素規制に関する調査研究

調査研究結果の詳細は、別紙資料2のとおりである。

6. 考察

本年度は6品目の新規自主規格策定検討及び6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、2009年1月に施行されたEUの食品改良剤一括法に係る共通規則、及び食品酵素規則並びに登録・評価ガイドラインの調査研究を行った。

既存添加物の自主規格及び自主規格案の新規策定に関しては、第3次既存添加物消除予備調査における復活品目のうち自主規格及び自主規格案未作成品目(14品目)を中心に策定作業を進めると共に第9版食品添加物公定書への対応検討等に基づく策定規格及び規格案の内容充実のための規格見直しについても検討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。

以上

別紙

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	キリン協和フーズ株式会社
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	西山 浩司	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	尾崎 史浩	株式会社ロッテ
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	岩間 保憲	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	佐藤 祐一	太陽化学株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	橋本 成久	太陽化学株式会社
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

— 別紙資料目次 —

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、クローリー色素、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

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

平成22年2月

第四部会（糊料・増粘安定剤）既存添加物自主規格案検討結果報告書

日本食品添加物協会 第四部会

研究者所属：太陽化学株式会社

三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

1. 目的

既存添加物の自主規格の制定にあたり、第8版食品添加物公定書規格および第4版自主規格の検討過程で様々な見直しを行っている。

ここでは、これまで自主規格が制定されていなかったエレミ樹脂について新規格を設定するための調査検討を行い、自主規格案を策定するとともに、その妥当性を確認した。

試験内容、試験方法等は第8版食品添加物公定書の収載品目等を参考にして設定した。

2. 検討結果並びに考察

本品は、カンラン科エレミ (Canarium luzonium A GRAY.) の分泌液を乾燥して得られたβ-アミリンを主成分とする樹脂であることから、他の植物性樹脂と同様に参照スペクトルを利用した確認試験を含む規格を策定した。

3. 規格（案）及び試験結果

別紙の通り。

以上

エレミ樹脂

平成22年2月

研究者 所属 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

1. 緒言

本報告は、既存添加物「エレミ樹脂」について、高砂香料工業株式会社で実施した結果をもとにまとめたものである。

2. 目的

自主規格作成のため、確認試験等について調査研究を行い、この結果を踏まえて規格（案）を作成した。

3. 試験法

食品添加物公定書に準じた。

確認試験については、本品が植物性の樹脂であることから、赤外吸収スペクトルを参照スペクトルと比較する方法とした。

4. 結果

試験結果は、以下の通りである。

規格項目	規格値	ロット		
		911001	911002	912001
性状	—	適	適	適
確認試験	—	適	適	適
酸 価	26~34	28	29	28
重金属	Pbとして 10 μ g/g以下	10 μ g/g以下	10 μ g/g以下	10 μ g/g以下
ヒ 素	As ₂ O ₃ として 1.0 μ g/g以下	1.0 μ g/g以下	1.0 μ g/g以下	1.0 μ g/g以下
乾燥減量	0.5%以下	0.1%	0.1%	0.1%
灰 分	0.1%以下	0.0%	0.0%	0.0%

5. 考察

以上の結果から、規格（案）の試験が確認試験を含め、問題なく実施できることを確認した。

6. 結び

自主規格（案）を次に示す。

以上

自主規格案

エレミ樹脂

Elemi resin

定義 本品は、カンラン科エレミ (Canarium luzonicum A Gray.) の分泌液を、乾燥して得られたものである。主成分は、 β -アミリンである。

性状 本品は、淡黄色の粉末状もしくは塊状の物質であり、特有の芳香がある。

確認試験 本品を赤外吸収スペクトル測定法中のペースト法により測定し、本品のスペクトルを参照スペクトルと比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収を認める。

純度試験 (1)酸価 26～34

本品1gを精密に量り、中和エタノール(エタノールに指示薬としてフェノールフタレイン試液を2～3滴加え、0.1mol/L水酸化カリウム(エタノール溶液)で滴定し、淡紅色になるまで調整したもの)50mLを加えて溶かし、検液とする。以下食品添加物公定書油脂類試験法中の酸価の試験を行なう。

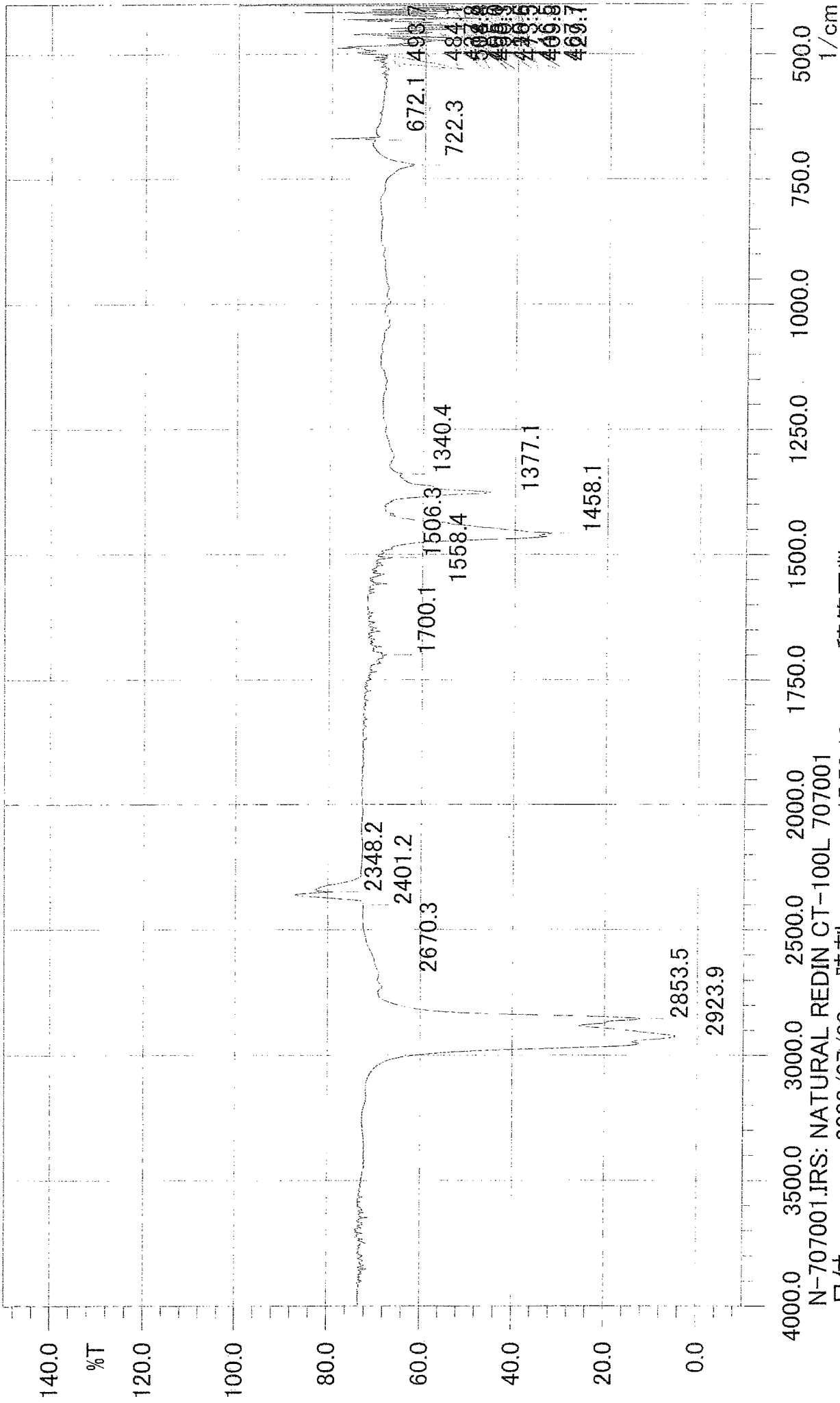
(2)重金属 Pbとして $10\mu\text{g/g}$ 以下(2.0g, 第4法, 比較液 鉛標準液2.0mL)

(3)ヒ素 As_2O_3 として $1.0\mu\text{g/g}$ 以下(2.0g, 第4法, 装置B)

乾燥減量 0.5%以下

灰分 0.1%以下

以上



4000.0 3500.0 3000.0 2500.0 2000.0 1750.0 1500.0 1250.0 1000.0 750.0 500.0
 1/cm

N-707001.IRS: NATURAL REDIN CT-100L 707001
 日付: 2008/07/30 時刻: 15:59:19 品質保証室
 データ種別: HYPER IR ユーサー: %T
 横座標: 1/cm 縦座標: 最大波数: 3999.12
 最小波数: 400.20 データ間隔: 0.96434
 データ点数: 3733 データ間隔: auto
 ゲイン: auto

積算回数: 45
 検出器: standard
 アトマイズ関数: Happ
 波数範囲: 1/cm
 分解能: 2.0
 ミラー速度: 2.8(low)