

201033032A

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

食品添加物の規格の向上と使用実態の把握等に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 恭子

平成23（2011）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
食品添加物の規格の向上と使用実態の把握等に関する研究	-----	1
佐藤恭子		
II. 分担研究報告		
1. 食品添加物の規格の向上及び使用実態に関する研究	-----	15
佐藤恭子		
2. NMRを用いた食品添加物定量法の開発	-----	27
大槻 崇		
3. 食品添加物の規格基準向上のための赤外スペクトルに関する調査研究	-----	41
北村陽二		
4. 香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究	-----	65
山田雅巳		
5. 食品添加物と食品成分との複合作用による副生成物の解明	-----	73
久保田浩樹		
(資料) 食品添加物規格基準の向上と使用実態に関する調査研究		
その1 指定添加物品目		
その2 既存添加物品目		
食品香料化合物の使用量調査及び摂取量に関わる調査研究		
諸外国の香料規制に関わる調査研究		

食品添加物の規格の向上と使用実態の把握等に関する研究

研究代表者 佐藤 恭子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

研究要旨

食品添加物の国際調和の要請に適切に対応しつつ、我が国の食品の安全性を確保するためには、食品添加物の規格に関する国際的視野での再整備が必要であり、また、食品添加物の使用実態の把握が重要となることから、以下の研究を行った。

アルギン酸の定量法に関する研究：アルギン酸の定量法には、現在、水銀を使用した装置が規定されている。そこで、より簡便で精度の高い安全な定量法の開発を目指し、本年度は、定量法の標準品として必要なマンヌロン酸及びグルロン酸の分離精製を行った。

定量 NMR 法の適用に関する検討：定量 NMR 法は、国際単位系へのトレーサビリティが確保された絶対定量法であることから、食品添加物の定量法への適用性、有効性について検討した。

赤外スペクトル（IR）に関する調査研究：近年普及しつつある減衰全反射法（ATR 法）を調査の対象に含め、測定法により IR に差が生じる原因の解明を試み、確認試験への ATR 法の利用の可能性を検討した。

香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究：我が国独自の香料化合物について、国際的ハーモナイゼーションを目指した規格向上のために、40 検体を選んで簡易遺伝毒性試験を行い、構造活性相関手法を用いた類似構造解析との相関を調べ、考察した。

食品添加物と食品成分との複合作用による副生成物の解明：各種生鮮食品を次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理したときに生成するトリハロメタン類（THM）の生成暴露量を明らかとするため、ダイナミックヘッドスペースーガスクロマトグラフ質量分析装置を用いて生鮮食品に残存する THM 等の揮発性化合物の分析を行った。

生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定：生産量統計を基にした指定添加物の摂取量の推定は、第 9 回調査として、平成 19 年度の実産量調査に精査、検討を加え、それぞれの物質について、国民 1 人が 1 日に摂取する食品添加物量を推定し、既存添加物に関しては第 4 回の調査として、平成 20 年度の実産量統計調査をまとめた。

香料化合物の使用量調査及び摂取量に関わる調査研究：日米欧で行う使用実態調査に向けて、本年度は、集計作業の効率化を図るため、香料化合物データベースを高度化し、回答表を作成した。

諸外国の香料規制に関わる調査研究：国際統合化に向けたわが国における香料規制のあり方の検討のための基礎資料として、諸外国の香料規制についての調査に着手した。

研究分担者

北村 陽二	国立大学法人金沢大学学際 科学実験センター准教授
山田 雅巳	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第二室長
久保田浩樹	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官
大槻 崇	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

アルギン酸及びその塩類は増粘安定剤、増粘剤、乳化安定剤、ゲル化剤として利用される食品添加物である。アルギン酸は β -D-マンヌロン酸（マンヌロン酸）と α -L-グルロン酸（グルロン酸）が β 1,4結合で直鎖状結合した高分子であることから、定量法としてウロン酸に由来するカルボン酸から生成する二酸化炭素を定量する方法が採用されている。しかし、この方法は煩雑で、装置に水銀バルブが用いられていることから、安全かつ簡便で精度の良い定量法が求められている。そこで、新たな定量法の検討に必要な標準物質（マンヌロン酸及びグルロン酸）の分離精製を行った。

A. 研究目的

食品の安心・安全の確保には、食品添加物の品質と適正な使用を欠かすことはできない。食品添加物の品質を担保するために重要なのが食品添加物の規格である。近年、国際的に食品添加物としての必要性が高くかつ安全性が確認されている物質について指定に向けた検討を国主導で行っており、新規指定品目の成分規格については、国際統合性が重視されている。食品添加物の国際調和の要請に適切に対応しつつ、我が国の食品の安全性を確保するためには、食品添加物の規格に関する国際的視野での再整備が必要である。また、食品添加物の適正な使用のためには、使用実態の把握や摂取量の推定等が重要となる。そこで、本研究では以下の研究を行った。

食品添加物の規格の向上に関する研究

1) アルギン酸の定量法に関する研究

2) 定量 NMR 法の適用に関する検討

食品添加物の定量法等では標準物質を必要とする場合があるが、分析値の信頼性確保には標準物質の純度が大きく影響する。食品添加物の安全性を確保する上で精度や信頼性の高い分析法の確立は非常に重要であるため、国際単位系（SI）へのトレーサビリティが確保された絶対定量法である定量 NMR（quantitative NMR；qNMR）法の応用は有用であると考えられる。そこで本研究では、qNMR法の食品添加物分析への有効性、汎用性を更に明らかにするため、アスコルビン酸及びフルジオキソニルを対象に検討を行った。

3) 赤外スペクトル（IR）に関する調査研究

IR法は、その簡便性と確実性から、世界的にも各種化合物の確認に広く活用されている。IR法は、ほとんど試薬を必要としないため、有機溶媒等を多用する化学的な確認試験法に比べ、有機溶媒等の廃棄量も少なく、自然環境に影響を与えない優れた確認試験法であると考えられる。そこで、本研究では、食品添加物等の国内規格の向上等を目的にして、種々の測定法で得られるIRを比較検討するとともに、公定書には規定されていないが、近年普及しつつある減衰全反射法（Attenuated Total Reflection；ATR法）も調査の対象に含め、それぞれの測定法のIRに差が生じる原因の解明を試みるとともに、ATR法によるIRの、確認試験への利用の可能性を検討することとした。

4) 香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究

欧米を中心として流通している香料化合物のポジティブリスト化は、JECFAにおける安全性評価を軸として進行しており、国内における規格も、国際ハーモナイゼーションを踏まえた規格向上を検討することが望まれている。本研究では、遺伝毒性に基づいた安全性規格の向上を効率的に進めるために、構造活性相関手法（SAR）の遺伝毒性予測への適用を検討する。本年度は、遺伝毒性試験としてフラクチュエーションAmes試験（FAT）法の導入を検討し、その結果に基づきSARによる遺伝毒性予測の妥当性を調べた。

食品添加物の実態の把握

5) 食品添加物と食品成分との複合作用による副生成物の解明

次亜塩素酸ナトリウムは、野菜や魚介類加工品及び食品製造工程に用いられる装置や器具などの殺菌料として広く利用されている食品添加物であり、食品衛生における微生物学

的危害防止ため重要な役割を果たしているが、塩素処理により様々な塩素系化合物が生成することが確認されている。そこで、本研究では、食品由来の消毒副生成物の経口暴露量の推計に必要な基礎データを収集するため、本年度は、特に主要な消毒副生成物としてTHMに着目し、ダイナミックヘッドスペースガスクロマトグラフ質量分析装置（DHS-GC/MS）を用い、生鮮食品の塩素殺菌処理後及び流水洗浄等後に食品に残存する揮発性化合物を分析した。

6) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

日常生活における食品添加物1品目毎の摂取量の把握及び許容一日摂取量（ADI）との比較を目的として、生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定を継続した。

7) 香料化合物の使用量調査及び摂取量に関わる調査研究

加工食品の流通が国際化する中、食品香料を国際間で安全に使用するための国際整合化が急務であり、香料化合物の安全性評価が進められる必要がある。このような状況の下、国際食品香料工業協会（IOFI）により、安全性評価の基礎データとしてJECFAへ提供する最新の暴露量を得る目的で日本、米国、EUにおける香料化合物使用量同時調査が提唱された。一方、国内の香料化合物の使用量調査は前回調査から4年が経ち、その間に、国際汎用香料化合物が新規に指定されており、香料化合物の使用実態は変化していると考えられることから、我が国で使用している香料化合物について調査することとし、本年度は、調査で使用する調査回答表の完成を目的とした。

8) 諸外国の香料規制に関わる調査研究

国際統合化に向けてのわが国における香料規制のあり方の検討のための基礎資料として、各国の香料規制、具体的には香料の定義、主剤として使用できる原料、香料製造に関する規制（抽出溶媒、副剤等）、香料表示に関する規制（天然、アレルギー、GMO等）、及び新規物質を使用する場合の手順、宗教による制約などを調査する必要がある。本年度は解決すべき課題のうち、各国の香料の定義、主剤として使用できる原料の調査・研究を行なうこととした。

B. 研究方法

1) アルギン酸の定量法に関する研究

アルギン酸ナトリウムを80%硫酸で加水分解した後、2mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH8に調整し、アルギン酸ナトリウム加水分解物中に残存するラクトン体をウロン酸に変換させ、陰イオン交換カラムで、0.5~2mol/L酢酸の直線濃度勾配で溶出を行い、分画した。各画分についてカルバゾール硫酸法による比色を行い、ウロン酸が検出された画分を合わせて、減圧濃縮、凍結乾燥を行った。

陰イオン交換カラムによる分離で得られたウロン酸は、それぞれ2mg/mLとなるように水に溶解し、下記の条件でHPLCにより分析した。

<HPLC条件>

カラム: Zorbax SAX, 5 μ m, 4.6mm \times 250mm
(アジレントテクノロジー(株)製)

装置: LC-10ADvp, SIL-10ADvp, RID-10A, CTO-10Avp, SCL-10Avp (株島津製作所製)
移動相: 0.7mol/L酢酸、流速: 1.4 mL/min、
カラム温度: 40 $^{\circ}$ C、検出器: RI検出器

2) qNMR法の適用に関する検討

アスコルビン酸（標準品及び特級品）、アスコルビン酸含有製品は、試料約10mgを精密に量り、qNMR標準溶液約1.0gに溶解した。この溶液を外径5mmのNMR試料管に入れ、密閉し、qNMRに付した。また、フルジオキソニルは、試料約20mg及びDSS- d_6 標準物質約4mgをそれぞれ精密に量り、重水素化ジメチルスルホキシド2mLを加えてこれらを溶解した。この液を外径5mmのNMR試料管に入れ、密閉し、qNMRに付した。

qNMRの化学シフト値は、DSS- d_6 のプロトンシグナルを基準シグナル(δ 0 ppm)とし、 δ 値をppm単位で表した。得られたFIDデータは、フーリエ変換(Windows関数: exponential function BF=0.12 Hz、zero filling=1、trapezoidal function T1=T2=0、T3=90、T4=100)及び位相補正を行った。

アスコルビン酸については、DSS- d_6 のシグナル面積強度を9.000としたときのアスコルビン酸に由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度等を式(1)に代入し、含量(%)を算出した。なお、データの解析は、フーリエ変換から含量の算出までを自動処理できる定量解析ソフトウェア(日本電子(株)開発中)を用いた。

$$C_{ASA} = \left(\frac{I_{ASA}/H_{ASA}}{I_{DSS}/H_{DSS}} \times \frac{M_{ASA}/W_{ASA}}{M_{DSS}/C_{DSS}} \right) \times 100 \quad (1)$$

ただし、 I_{ASA} 及び I_{DSS} =アスコルビン酸及びDSS- d_6 のシグナル面積強度(DSS- d_6 : 9.000)、 H_{ASA} 及び H_{DSS} =アスコルビン酸及びDSS- d_6 の特定基のプロトン数(DSS- d_6 : $\text{CH}_3 \times 3 = 9$)、 M_{ASA} 及び M_{DSS} =アスコルビン酸及びDSS- d_6 の分子量(MW:176.12及び224.36)、 W_{ASA} =アスコルビン酸の秤量濃度(mg/g)、 C_{DSS} =DSS- d_6 濃度(1.05 mg/g)。

フルジオキソニルについては、DSS- d_6 のシグナル面積強度を9.000としたときのフルジオキソニルに由来する δ_H 7.31~7.40、7.56及び7.85 ppmのシグナル面積強度等を式(2)に代入し、含量(%)を算出した。

$$C_{FL} = \frac{W_{DSS} \times I \times P}{W_{FL} \times N} \times 1.106 \quad (2)$$

ただし、 C_{FL} =フルジオキソニル含量(%), W_{FL} 及び W_{DSS} =フルジオキソニル及びDSS- d_6 標準物質の秤取量(mg)、 $I=3$ 種のシグナル(δ_H 7.31~7.40、7.56及び7.85 ppm)の面積強度の和、 $N=3$ 種のシグナルの水素数の和、 P =DSS- d_6 標準物質の純度(92.2%)

3) IRに関する調査研究

ネオテームについて、ペースト法やKBr法により得られたIRと、減衰全反射法(ATR法)により得られたIRとを比較検討した。

赤外分光光度計は、JASCO FT/IR-4100(日本分光社製)を用い、測定は、分解能 4 cm^{-1} (32回繰り返す)、測定領域 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ で行なった。ペースト法の測定には、原則として、大きさ $30\sim 35\text{ mm}\times 30\sim 35\text{ mm}$ 、厚さ 5 mm のKBr板を窓板として使用し、対照にはKBr板1枚を使用した。また、流動パラフィン、メルク社製の赤外用Nujol®を使用した。KBr法については、原則として現行第8版食品添加物公定書の記載に従って、KBr錠剤(直径 10 mm)を作成し、対照にはKBrのみの錠剤を使用した。

ATR法の測定には、前述の赤外分光光度計に、ダイヤモンドプリズム一回反射ATR装置(日本分光社製)を装着した装置を用い、分解能 4 cm^{-1} (積算回数96回)、測定領域 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ で測定を行なった。ATR法で得られたスペクトルは、必要に応じて、スペクトルマネージャーVer.2(日本分光社製)

のATR補正機能、演算機能、ベースライン補正機能を用いて補正を行った。

4) 香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究

SARのソフトウェアとして、遺伝毒性評価を目的とするDEREK(Lhasa Ltd.)、MULTICASE(MCase; Multicase Inc.)及びADMEWORKS(AWorks; 富士通九州システムエンジニアリング)の3種類を用いた。

また、わが国独自の香料化合物40検体をそのまま、もしくはジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、DMSOで所定の濃度に希釈して被験物質溶液とし、*Salmonella typhimurium* TA100及びTA98を検定菌とし、簡易遺伝毒性試験であるFAT法を行った。

5) 食品添加物と食品成分との複合作用による副生成物の解明

野菜類及び鶏肉、豆腐は小さく切り分け、試料 2 g を 50 mL のスクリーキャップバイアルに採り、野菜及び鶏肉の場合は有効塩素濃度として $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、豆腐は $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ となるように調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液 20 mL に浸し、室温で10分間放置し殺菌処理を行った。殺菌処理後、アスコルビン酸ナトリウム(4→10) $200\text{ }\mu\text{L}$ を加えて反応を止めた後、バイアル瓶に試料を採取し、攪拌子、塩化ナトリウム 3 g 、測定用精製水 10 mL 及び内部標準液を $2\text{ }\mu\text{L}$ を加え、直ちに密封しDHS-GC/MS用試験液とし、揮発性有機化合物(VOC)23種の分析を行った。鮮魚は約 20 g の一尾をそのまま 250 mL のガラス瓶に採り、有効塩素濃度として $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ の次亜塩素酸ナトリウム 200 mL で同様に処理した後、皮を残したまま3枚におろし、約 2 g をバイアル瓶に採取し、野菜類等と同様に操作し、GC/MS用試験液を調製した。

6) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

指定添加物については、平成19年度の製造・輸入分を対象に行った第9回アンケート調査及び再調査より生産流通量をまとめ、食品添加物別1人1日摂取量を求めるための作業を行った。既存添加物については、平成20年度に「既存添加物名簿」に記載されていた443品目及び「一般に食品として飲食に供されているものであって添加物として使用される品目リスト」の53品目の合計、496品目を対象品目とし、平成20年度の製造・輸入分を対象に第4回アンケート調査及び追加の調査を加え、製造・輸入出荷量を集計した。本調査及び追加調査を行い、各品目の生産流通量をまとめた。

7) 香料化合物の使用量調査及び摂取量に関わる調査研究

まず、平成16年度から21年度にかけて構築した香料化合物データベースを高度化した。このための資料として、米国、EU、中国、韓国等各国・地域の最新情報を調査した。これらの情報を利用し、同データベースに品目の追加、情報の追加または修正、CAS番号の精査等を行った。高度化したデータベースを基にSEQ番号、品目名、CAS番号、FEMA GRAS番号の表を作成してIOFIの使用量調査用リストと比較し修正を行ったものを使用量調査用の基本回答表とした。また、基本回答表にない香料化合物を調査するための追加品目回答表も併せて作成した。

8) 諸外国の香料規制に関わる調査研究

本年度は、各国・地域の香料の定義・分類、主剤として使用できる原料の調査を行った。

関連法令の調査は、当該国政府・省庁のWeb site、米国農務省等の貿易相手国政府・

省庁及び各種団体・調査機関の調査報告書等を参考にした。法令資料は当該国・地域の政府・省庁、FAOの法規データベース及び独立行政法人日本貿易振興機構のWeb siteから入手した。当該国・地域の政府機関のWeb siteの法令の英訳、解説、またはQ&A等も法令に準じるものとして利用した。また当局へ問い合わせを行なった結果が得られた場合はこれも資料に加えた。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理面にかかわる事項はない。

C. 研究結果

1) アルギン酸の定量法に関する研究

1-1) アルギン酸ナトリウムからのウロン酸の分離

硫酸により加水分解された、アルギン酸ナトリウム加水分解物について、陰イオン交換樹脂により分離を行った。約1000mLの溶出液を溶出させ、約200本のフラクションが得られた。各フラクション中のウロン酸の有無をカルバズール硫酸法により発色させ確認したところ、Fig.2に示すようにフラクションNo.100~140及びフラクションNo.140~180にピークが確認された。それぞれをピーク1及び2として回収し、減圧濃縮により濃縮後、2mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH6~8に調整後、凍結乾燥を行い、ピーク1及び2でそれぞれ0.3g及び0.5gのウロン酸が得られた。

1-2) アルギン酸ナトリウム加水分解物のHPLCによる分析

得られたウロン酸について、さまざまなカラムを用いて、アルギン酸ナトリウム加水分解物及び陰イオン交換樹脂による分離後のピーク1及びピーク2のHPLCによる分析を行った。その結果、Fig.3に示すように、アルギン酸ナトリウム加水分解物からは12.5分及び

15分に二つのピークが確認され、ピーク1は12.5分、ピーク2は15分にそれぞれ溶出し、アルギン酸ナトリウム加水分解物に含まれるピークの溶出時間と一致した。また、ピーク1及びピーク2のクロマトグラムからはその他の不純物は見られなかった。また、マンヌロン酸及びグルロン酸を同様にHPLCで分析した報告例²⁾と比較したところ、それぞれの溶出時間から、ピーク1はグルロン酸、ピーク2はマンヌロン酸と推測された。

2) qNMR法の適用に関する検討

2-1) アスコルビン酸

qNMR法は、スペクトル上に観察される基準物質と測定対象化合物のシグナル強度とモル濃度の関係から、測定対象化合物の濃度を絶対定量することが可能である。また、SIにトレーサブルな基準物質を用いることにより、得られる定量値の信頼性が向上することが期待される。そこで、本法の食品添加物分析への適用性を明らかにするため、酸化防止剤であるアスコルビン酸についてqNMR測定を行った結果、いずれも定量再現性は良好であった。また、別に滴定法により含量を求めたところ、qNMR法の結果とほぼ一致し、qNMR法により算出された定量値が正確であることが確認された。

次に、qNMR法の特徴の一つとして、混合物に含まれる測定対象成分を、誘導体化等の処理を行わず非分離で短時間に絶対定量ができることが挙げられることから、ビタミン製剤等のアスコルビン酸含量をqNMR法及びHPLC法により求めて比較したところ、すべての試料において、qNMR法により得られたアスコルビン酸含量はHPLC法により得られた結果とほぼ同等であった。したがって、qNMR法は定量用アスコルビン酸標準品を用いず、別の基準物質を用いることによりSI

にトレーサブルなアスコルビン酸含量を算出できることが裏付けられた。

2-2) フルジオキソニル

フルジオキソニルの定量法としてのqNMR法の適用性を明らかにするため、同一のフルジオキソニルから別々に秤量し調製した4サンプルについてそれぞれ非連続で6回測定した。4サンプルのフルジオキソニル含量は98.9~99.3%とほぼ同等であり、4サンプル間の定量値のRSD及び同一サンプルの6回繰り返し測定のRSDはともに0.1%と良好であったことから、qNMR法はフルジオキソニルの定量に十分適用可能であることが確認された。

3) IRに関する調査研究

3-1) ポリスチレンフィルムの吸光度での透過IRとATRの比較検討

まず、透過法でのIRと、ATR(反射)法について基礎的に検討するために、波数校正用のポリスチレンフィルムを用いて、吸光度を比較検討した。透過IRスペクトルとATRスペクトル(ATR補正後)では、相対強度比は、透過IRスペクトルと大きく異なっていた。これは、ATRの原理通り、短波長(長波数)側ほどもぐり込み深さ(セル長に相当)が短く、長波長(短波数)側に比べ吸光度は小さく観測されることを示す結果であった。

3-2) ネオテームを用いたペースト法とATR法の比較検討

次に、ネオテームを取り上げ、従来のペースト法やKBr法と、ATR法を比較検討した。乾燥前のネオテーム(ネオテーム-水和物)及び乾燥したネオテーム(45℃、五酸化ニリン存在下、減圧乾燥)のIRスペクトルを、ATR法で測定し、補正を行い、得られたATR

法での IR スペクトルを、乾燥前のネオテーム及び乾燥したネオテームのペースト法での IR スペクトルと、それぞれ比較すると、ATR 法とペースト法での IR スペクトルは比較的類似していたが、一部のピークの相対強度は異なっていた。従って、乾燥のありなしに関わらず、ネオテームの ATR 法での IR スペクトルは、ペースト法の IR スペクトルとは異なるスペクトルであることが分かった。

一方、ATR 法で得られた乾燥ネオテームと、ネオテーム-水和物の IR スペクトルは異なっていた。

3-3) ネオテームを用いた KBr 法と ATR 法の比較検討

さらに、ATR 法による乾燥ネオテームの IR スペクトルと、KBr 法で測定した乾燥ネオテームの IR スペクトルとの比較を行ったところ、KBr 法での異常スペクトルは、ATR 法では認められなかった。この原因としては、ATR 法は、試料と KBr との混合、加圧を必要としないためと考えられる。従って、ATR との比較により、KBr 法の異常スペクトルを検出できる可能性があると考えられる。

4) 香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究

4-1) SAR の結果

日本独自で使用している香料 1405 化合物について、前出の 3 つのソフトウェアで解析した結果、DEREK で陽性になったものが 62、MCASE で陽性になったものが 62、AWorks で陽性になったものが 18 あった。3 つのソフトウェアすべてで陽性の判定になった化合物は一つもなく、いずれか二つで陽性になった化合物は 18 あった。そのうち 16 化合物は DEREK と MCASE で陽性になったもので、残りの 2 化合物は DEREK と AWorks で陽性になったものであった。MCASE と AWorks

で同時に陽性になった化合物はなかった。少なくとも一つで陽性になったものは 119 化合物で、そのうち CAS 番号が同一のものの重複を除くと、99 化合物であった。

4-2) FAT の結果

SAR で一つでも陽性に出た 99 化合物のうち、必要量が入手できた 11 化合物について FAT を行った。SAR の DEREK と MCASE の両方で陽性になった ocimene oxide は FAT では 4 条件で陰性の結果であり、一致しなかった。FAT の 4 条件のうち、1 条件でのみ陽性だったのは 4 化合物で、TA100 の結果が陽性になる傾向にあった。一方 FAT の 2 条件、3 条件で陽性になった化合物が一つずつあった。これらはともに TA98 の \pm S9mix で陽性になっていた。

SAR の 3 種類のソフトでいずれも陰性だった化合物 1,286 のうち、必要量が入手できた 29 化合物について FAT を実施した。20 化合物は総合判定が陰性だった。残りの 9 化合物については、4 条件もしくは 3 条件で陽性になった化合物が 1 つずつ、1 条件のみで陽性になったものが 7 化合物あった。

5) 食品添加物と食品成分との複合作用による副生成物の解明

5-1) 生鮮食品類の塩素殺菌処理及び水洗浄処理によるクロロホルム (CF) 残存量の変化
生鮮野菜 (葉菜類、根菜類及び豆類等、計 8 種類の野菜)、魚 (豆鮭)、甲殻類 (エビ) あるいは貝類 (カキ) を 100 μ g/L 次亜塩素酸ナトリウムにより 10 分間殺菌し、さらに、水道水で 1 分間流水洗浄し、殺菌及び流水洗浄後に残存する THM 量を調べた。生鮮野菜の場合、殺菌処理により、野菜の種類により異なる量の CF が検出され (3.8~70.1ng/g)、流水洗浄により減少した (3.2~39.0ng/g)。

豆鮭は殺菌処理後に定量下限値以下であり、エビ及びカキの CF 量は 5.3、3.1 ng/g と少なく、流水洗浄後もほとんど変動しなかった。

5-2) 鶏肉の塩素殺菌処理及び加熱処理による CF 残存量の変化

鶏肉を生鮮野菜等と同様に処理し、THM 生成量を調べた。殺菌処理により 13.8 ng/g の CF が検出された。肉類は通例、加熱調理が行われるため、オーブンで 5 分間加熱調理を行い、鶏肉に残存する CF 量を調べたところ、定量下限値以下まで減少した。

5-3) 豆腐の塩素殺菌処理及び水洗浄処理による CF 残存量の変化

豆腐については 10 µg/mL 次亜塩素酸ナトリウムを用い、生鮮野菜等と同様に処理し、THM 生成量を調べた。殺菌処理後も CF は定量下限値以下であり、塩素殺菌による CF 生成量の増加は認められなかった。

6) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

指定添加物に関しては、平成19年度において、一日摂取量の多かった品目は、L-グルタミン酸ナトリウム (2540mg/人/日)、D-ソルビトール (1450mg/人/日)、クエン酸 (無水物換算、376 mg/人/日)、二酸化炭素 (218 mg/人/日)、グリセリン脂肪酸エステル (212 mg/人/日) 等であった。

既存添加物に関しては、平成 20 年度の生産量統計を調査した。出荷量の多かったものは、製造用剤ケイソウ土(45,390 トン)、製造用剤活性白土 (36,746 トン)、製造用剤窒素 (31,333)、製造用剤パーライト (15,720 トン)、着色料カラメル I (13,107 トン) 等であった。

7) 香料化合物の使用量調査及び摂取量に関わる調査研究

香料化合物データベースの高度化を行い、データベースから品目名、SEQ 番号、CAS 番号及び FEMA GRAS 番号の項目を抽出し、使用量及び含量の項目を加えた「基本回答表」を作成した。さらに、基本回答表に無い品目を調査するための「追加品目回答表」を作成した。

8) 諸外国の香料規制に関わる調査研究

調査 (平成 23 年 2 月末) の結果、以下の国と地域について、各国の香料の定義、主剤として使用できる原料の情報を収集することができた。

アジア・オセアニア: インド、インドネシア、韓国、シンガポール、タイ王国、台湾、中国、バングラデシュ、フィリピン、ベトナム、香港、マレーシア、モンゴル、オーストラリア・ニュージーランド

北米: アメリカ合衆国、カナダ

中南米: メキシコ、メルコスール

ヨーロッパ: EU、ロシア

中東・アフリカ: 湾岸協力会議加盟国(GCC)、南アフリカ

D. 考察

1) アルギン酸の定量法に関する研究

アルギン酸ナトリウムを硫酸で加水分解し、陰イオン交換樹脂で分離精製し、二つのウロン酸を得ることができた。それぞれのウロン酸はこれまでの報告例より、グルロン酸及びマンヌロン酸と推測されるが、今後、NMR等による、より詳細な同定が必要である。また、これらのウロン酸を用いて、Zorbax SAXカラムによるHPLC分析が可能であったが、RI検出器を用いたため感度が非常に悪かった。今後、LC/MSやその他の検出器を用いる方法等

の検討が必要である。

一方、比色法については、今回、ウロン酸の検出法として最も一般的なカルバズール硫酸法を用いたが、カルバズール硫酸法はマンヌロン酸及びグルロン酸に対しては感度が低いという報告もあり、その他の比色法についても検討する必要がある。

2) qNMR 法の適用に関する検討

アスコルビン酸の qNMR 測定において、各シグナルから得られる含量値に着目すると、標準品では3種のシグナル間の含量値に大きな違いは認められなかったが、特級品では、 δ_{H} 4.96 ppm より得られた含量値は 0.6~0.8%高めに算出された。標準品の各シグナル及び特級品の他のシグナルの含量値がほぼ同等であることを考慮すると、特級品の δ_{H} 4.96 ppm の定量値が高めに算出されたことは、このシグナルと重なる不純物による影響と推定された。また、アスコルビン酸含有ビタミン製剤等の qNMR 法によるアスコルビン酸の含量測定では、試料によっては、アスコルビン酸に由来するシグナル (δ_{H} 3.75 ppm 及び δ_{H} 4.07 ppm) と夾雑物に由来すると考えられるシグナルとの分離が不十分であったため、これらのシグナルからアスコルビン酸含量を正確に定量することは困難と考えられた。一方、 δ_{H} 4.96 ppm のシグナルは、すべての試料において夾雑物由来のシグナルと十分に分離していることが確認されたことから定量に用いた。今回確立した qNMR によるアスコルビン酸の定量分析法は、従来の HPLC 法に比べ簡便性、迅速性の面で優位性があり、定量値の信頼性も向上した新たな方法である。今後、食品等に含まれるアスコルビン酸の定量分析等への応用が期待される。

3) IR に関する調査研究

IR 法は、その簡便性、確実性から、確認試験として世界的に用いられている。本研究では、食品添加物の規格基準の向上を目的として、種々の測定法で得られる IR を比較検討した。まず、ネオテームについて、従来の測定法(透過法)であるペースト法と KBr 法により、乾燥前後のネオテームの IR を測定し、得られた IR を比較検討した。さらに、乾燥条件についても検討を加えた。その結果、ネオテームは、40~50°C程度で、五酸化二リン存在下で減圧乾燥し、ペースト法で測定するのが適当であると考えられた。

さらに、近年普及しつつある ATR 測定法について、ATR 法による IR の確認試験への利用の可能性を検討した。まず、ポリスチレンフィルムを用いて、透過 IR スペクトルと、ATR 法による IR スペクトルを比較検討した。さらに、実際の食品添加物として、ネオテームを用い、従来のペースト法や KBr 法と、ATR 法を比較検討した。その結果、以下に示すような問題点があることが分かった。試料としてネオテームを用いた場合、従来の測定(透過)法であるペースト法と ATR 法とを比較すると、ATR 法で得られた IR は、ペースト法による IR とは異なるため、両者を併用した確認試験には問題がある。また、ATR 法において、ATR 補正を行うと、機器メーカーによって ATR 補正機能(補正法)が異なる可能性がある。

一方で、ネオテームを用いた検討において、ATR 法によるスペクトルでも、ネオテームの水和物と無水物の区別が可能であったことや、ATR 法との比較で、KBr 法での異常スペクトルを検出可能であったことから、ATR 法は簡便な操作で定性的な分析が可能であるという利点を有していると考えられる。従って、この利点を活用できる利用法を、ATR 装置が普及する前に、十分に検討や模索をすべきで

あると考えられる。

4) 香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究

FATは新しい手法で、従来の方法で実施されたAmes試験の結果との一致率は80%であると報告されている。したがって、今回のFATの結果をAmes試験の結果とすることで、大きな誤りはないとする。

FATでは4条件(2菌株、±S9)のうち一つでも陽性になった場合、SARでは少なくとも一つのソフトウェアで陽性になった場合をそれぞれ「陽性」とし、陰性は陽性でない場合とする。この基準に照合するとSARの陽性判定のFATとの一致率(感度)は55%、陰性判定のFATとの一致率(精度)は69%となる。一般的な化学物質についてのDEREK及びMCASEの感度は70%程度、精度は90%程度であることを勘案すると、今回の香料についての結果はその8割程度であったことになる。このことから、SARを香料について実施する場合、一般的な化学物質とは違う判断基準を必要とすることが推察された。

次年度は日本の香料18類に含まれ、かつ、JECFAのグループ評価が行われたものの中から、Ames試験データのないものについて、入手可能なものを選んでSARを実施する。その結果に基づき、18類からいくつかのカテゴリーの物質を選んで、簡易Ames試験を実施する。SARと簡易Ames試験の判定が一致しない化合物については代謝も含めた解析ができる別のソフトウェア(TIMES)での計算を検討する。

5) 食品添加物と食品成分との複合作用による副生成物の解明

5-1) 生鮮食品類の塩素殺菌処理によるTHMの生成と水洗浄による除去効果

各種生鮮野菜を塩素殺菌処理したところ、

野菜の種類によりTHM(CF)生成量に違いが見られた。水道水ではTHMの前駆物質としてフミン質等のフェノール系化合物の関与が指摘されており、野菜に含まれるポリフェノール系化合物等が関与しているものと考えられた。一方、豆鮭、エビ及びカキのTHM生成量は総じて低く、魚介類由来のTHM暴露影響は小さいと結論付けた。

殺菌処理後の鶏肉よりCFが検出されたが、オープンによる加熱調理により定量下限値まで低下した。CFは揮発性が高く、殺菌処理後に鶏肉に吸着したCFは、加熱過程で揮散したと考えられる。

5-2) 生鮮食品由来のTHM暴露量の推定

次亜塩素酸ナトリウムで殺菌処理したときに、殺菌処理及び流水洗浄後に生鮮食品に残存するCFの経口暴露量の推計を行った。各食品群の摂取量は平成20年国民健康・栄養調査報告書掲載の食品群別摂取量平均値(総数)を参考とし、緑黄色野菜は93.4g/人/日、その他の野菜は166.4g/人/日、魚介類は75.5g/人/日とした。各食品群の代表値として残存量の高かったニンジン(緑黄色野菜)、モヤシ(その他の野菜)、エビ(魚介類)の水洗後の残存量の数値を用い、体重50kgのヒトの生鮮食品由来の一日当たりの経口暴露量を計算したところ0.14µg/kg体重/日と算出された。

CFの毒性はWHO(1994)の評価において遺伝毒性に基づくものではないと考えられておりTDIを12.9µg/kg体重/日としている。TDIに対する生鮮食品由来の暴露量の寄与率は約1%であり、水道水水質基準の算定根拠であるCF寄与率の20%に比べて低い値となった。なお、野菜及び魚介類の多くは加熱調理されるため、調理過程においてCFが揮散していくと考えられ、実際の経口暴露量はさらに低い数値になると予想される。以上より、

生鮮食品の塩素殺菌処理により生成される CF の経口暴露量は、水道水水質基準に比べて十分に低い値であり、健康に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

6) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

指定添加物については、過去の調査結果と大きく外れるものではなかった。一日摂取量の多かった品目は、L-グルタミン酸ナトリウム (2540mg/人/日)、D-ソルビトール (1450mg/人/日)、クエン酸 (無水物換算、376 mg/人/日)、二酸化炭素 (218 mg/人/日)、グリセリン脂肪酸エステル (212 mg/人/日) 等であった。また、ADIとの比較からも問題がなかった。

既存添加物に関しては平成20年度において、出荷量の多かったもののうち、ケイソウ土、活性白土及びパーライトは、ろ過助剤や精製剤として使用されるものであり、直接食品とともに摂取されるものではない。また、窒素は、気体であるため、他の食品添加物とは異なる。この調査からは食品とともに摂取される既存添加物としては、カラメル類が最も多いものと推察された。

7) 香料化合物の使用量調査及び摂取量に関する調査研究

データベースの高度化にあたり、参照するリスト間で、CAS 番号や、異性体表記が異なる等の問題が生じた。また、IOFI の使用量調査用リストには、日本で使用できない品目が記載されており、一方、日本独自香料化合物が記載されていないことから、香料化合物データベースを基に独自の基本回答表を作成した。その結果、基本回答表にあげた品目は計 4104 品目となった。これらの品目を「使用品目」とし、参考 CAS 番号、SEQ 番号、

FEMA GRAS 番号、使用量、含量、備考の欄を加え、各使用品目に調査 No.を付与して基本回答表を完成した。また、追加品目回答表は、各香料会社が基本回答表に無い品目を使用している場合に使用品目名、CAS 番号、使用量、含量その他を自由に記載できる表とした。

8) 諸外国の香料規制に関わる調査研究

8-1) 香料の定義の比較

香料の定義に味の付与を含めない日本型の規制を持つ国は韓国のみであり、ほとんどの国では香料の定義に味を含めていることが判明した。一方、諸外国においてもアミノ酸類など日本では調味料に区分される成分を flavour に含める場合と flavour enhancer に含める場合があり、flavour enhancer、調味料、苦味料など関連するカテゴリーについては改めて調査・整理が必要と考えられた。

4-2) 香料の分類

Codex では、天然香料と化学的に定義される香料化合物に区別され、化学的に定義される香料化合物はさらに製法により単離香料化合物と合成香料化合物に分類されている。香料の分類に関してはいくつかのパターンに分かれ、規制を設定した時期が影響していると考えられた。いくつかの国では、欧州の古い規制様式に似た分類様式を採用しているが、やがてそういった国々でも新しい分類が採用されるものと考えられた。

4-3) 食品香料に使用可能な原料と使用制限のある原料

天然香料に関しては多くの国でネガティブリスト制を採用していたが、香料化合物に関してはまちまちであった。ポジティブリストを採用している国ではリストに新規化合物を

追加するための評価基準の違い、FEMA-GRAS 等参考にしているリストの更新に法規の改正が追いついていない等で不整合が起きていることが判明した。今後は政治的に中立であるという点からも Codex 及び JECFA リストも重要性を増すとと思われる。

E. 結論

アルギン酸の定量法に関する研究では、アルギン酸ナトリウムを硫酸で加水分解後、陰イオン交換樹脂で分離精製を行った。その結果、HPLC 分析でそれぞれマンヌロン酸 (0.3g) 及びグルロン酸 (0.5g) と推測された二つのウロン酸画分を得ることができた。

定量 NMR 法の適用に関する検討では、qNMR 法は良好な定量精度を示すとともに試料調製、分析操作等を簡便化し迅速な定量分析が可能となる等、アスコルビン酸及びフルジオキソニルの絶対定量に有効な分析法であることが判明した。本検討結果は、これらの食品添加物分析の精度並びに信頼性を更に向上させる知見であり、将来的な公定法における純度試験法または定量法への適用へ向けた基礎的データが得られたものと考えられる。

赤外スペクトル (IR) に関する調査研究では、食品添加物の規格基準の向上を目的として、近年普及しつつある ATR 法について IR の確認試験への利用の可能性を検討した。その結果、試料としてネオテームを用いた場合、従来の測定 (透過) 法と ATR (反射) 法とを比較すると、ATR 法で得られた IR は、従来の透過法による IR とは異なることが分かった。一方で、ATR 法は簡便な操作で定性的な分析が可能であるという利点を有しているため、この利点を活用できる利用法を、ATR 装置が普及する前に、十分に検討や模索をすべきであると結論した。

香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究で

は、我が国独自の食品香料について、40検体を選んで簡易遺伝毒性試験を行い、構造活性相関手法 (SAR) を用いた類似構造解析との相関を調べた。SARの予測との一致率は陽性予測で半数、陰性予測で3分の2程度であった。この数字は高いとは言えず、遺伝毒性試験データがない香料について、試験をせずにin silicoによる予測で判断するためには、SARの条件を修正する必要があると考えられる。

食品添加物と食品成分との複合作用による副生成物の解明では、各種生鮮食品を次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理したとき、CFが生成し、野菜の種類により THM 生成能に差がみられたが、殺菌処理後に水道水で流水洗浄を行うことで、食品の種類によらず、CF残存量が減少することが明らかとなった。また、加熱調理により鶏肉に残存した CF が減少することも明らかとなり、CF の除去に殺菌処理後の水道水流水洗浄や加熱調理が有効であることが確かめられた。さらに、調査結果により得られた残存量より、生鮮食品由来の CF の経口暴露量を推計したところ、CF の TDI の約 1%であり、暴露影響は低いことが明らかとなった。

生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定では、第 9 回の生産量統計を基にした指定添加物の摂取量の推定をまとめた。国民 1 人が 1 日に摂取する指定添加物量は、過去の調査結果と大きく外れるものではなく、また ADI との比較からも問題がなかった。既存添加物に関しては第 4 回の調査として、平成 20 年度の実産量調査をまとめた。

香料化合物の使用量調査及び摂取量に関わる調査研究の本年度の研究では、平成 16 年度から平成 21 年度にかけて構築した香料化合物データベースの高度化を行い、データベースを基に、使用量調査用の基本回答表及び追加品目回答表を作成した。

諸外国の香料規制に関わる調査研究では、香料に関する法規制を調査し、22 の国及び地域について情報を得ることができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

- 1) 北村 陽二, 佐藤 恭子, 小阪 孝史, 小川 数馬, 鶴野 いずみ, 太田 朱音, 小川 結加, 柴 和弘: 食品添加

物ネオテームの赤外スペクトルの測定法に関する検討, 日本薬学会 第131年会, 静岡 (2011.3).

2) M. Yamada, M. Takamune, A.

Katafuchi, T. Nohmi, Novel

Salmonella strains for Ames test that can detect pyrimidine damage in DNA, 2nd ACEM, Pattaya (2010.12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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）
平成22年度分担研究報告書

食品添加物の規格の向上及び使用実態に関する研究

研究分担者 佐藤 恭子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部第一室長

研究要旨

アルギン酸は直鎖状のポリウロン酸であり、 β -D-マンヌロン酸（マンヌロン酸）及び α -L-グルロン酸（グルロン酸）が β 1,4結合で連なった高分子である。アルギン酸及びその塩類4品目の定量法として、ウロン酸に由来するカルボキシル基から発生する二酸化炭素を滴定により定量する方法が採用されているが、操作が煩雑で、水銀を使用した装置を使用しなければならない。そこで、より簡便で精度の高い安全な定量法の開発を目指し、本年度は、定量法の標準品として必要なマンヌロン酸及びグルロン酸を得ることを試みた。アルギン酸ナトリウムを酸分解し、陰イオン交換樹脂で分離精製することで、HPLCにより、それぞれマンヌロン酸及びグルロン酸と推測される二つのウロン酸画分を得ることができた。

生産量統計を基にした指定添加物の摂取量の推定は、第9回調査として、平成19年度の生産量調査及び追調査（アンケート調査）に精査、検討を加え、それぞれの物質について、国民1人が1日に摂取する食品添加物量を推定した。結果は、過去の調査結果と大きく外れるものではなく、またADIとの比較からも問題がなかった。既存添加物に関しては第4回の調査として、平成20年度の実産量統計調査をまとめた。

香料化合物の使用量調査及び摂取量に関わる調査研究は、日米欧が2010年中に使用したフレーバリング物質の使用量調査を共通の使用量調査用リストを用いて同時期に調査するという国際食品香料工業協会（IOFI）の計画を受け、使用実態調査を行うこととし、今年度は、集計作業の効率化を図るため、香料化合物データベースを高度化し、回答表を作成した。

諸外国の香料規制に関わる調査研究では、国際整合化に向けたわが国における香料規制のあり方の検討のための基礎資料として、諸外国の香料規制、具体的には香料の定義、主剤として使用できる原料、香料製造に関する規制（抽出溶媒、副剤等）、香料表示に関する規制（天然、アレルギー、GMO等）、及び新規物質を使用する場合の手順、宗教による制約などを調査する必要がある。本年度はこれら課題のうち、各国の香料の定義、主剤として使用できる原料の調査・研究を行ない、22の国及び地域について情報を得ることができた。

研究協力者

建部 千絵 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部

西島 基弘 実践女子大学生生活科学部

西川 秀美 日本食品添加物協会
長谷川徳二郎 日本香料工業会

A. 研究目的

1) アルギン酸の定量法に関する研究

アルギン酸は、 β -D-マンヌロン酸（マンヌロン酸）と α -L-グルロン酸（グルロン酸）が β 1,4 結合で直鎖状結合した高分子である（Fig.1）。主に海藻の構造主成分、土壤微生物の被膜多糖としても知られており、自然界に広く存在している。工業的には年間約 30000 トン生産されており、食品、医薬品、化粧品、工業製品等様々な用途で用いられている。

日本においては、昭和 32 年にアルギン酸ナトリウムが食品添加物として指定され、既存添加物としてアルギン酸の使用が認められていたが、その他のアルギン酸塩については国際的な整合性から、平成 18 年にアルギン酸カリウム、アルギン酸カルシウム、アルギン酸アンモニウムが食品添加物として指定され、増粘安定剤、増粘剤、乳化安定剤、ゲル化剤として利用されている。

第 8 版食品添加物公定書では、アルギン酸及びアルギン酸塩類の定量法としてウロン酸に由来するカルボン酸から生成する二酸化炭素を定量する方法が採用されている。しかし、この方法は非常に煩雑で、装置に水銀バルブが用いられており、専用の機器の入手も困難である。以上のことから、安全かつ簡便で精度の良い定量法が求められている。そこで、構成成分のウロン酸に着目した高速液体クロマトグラフィー、比色法等を用いた定量法の検討を行うこととした。しかし、アルギン酸類を構成するマンヌロン酸及びグルロン酸は試薬として市販されておらず、標準品として定量法に用いることができない。そこで、今年度はアルギン酸ナトリウムを酸でマンヌロン酸及びグルロン酸に加水分解し、陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離精製を行った。

2) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

食の安全性確保のため、日常生活における食品添加物 1 品目毎の摂取量の把握及び許容一日摂取量（ADI）との比較を目的として、生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定を継続した。指定添加物の摂取量の推定は、昭和 60 年を第 1 回とする調査研究であり、本年度は第 9 回調査の最終年度に当たる。また、既存添加物の生産量統計調査は、平成 6 年に予備調査を行い、平成 12 年度を第 1 回とし、本年度は第 4 回調査の最終年度に当たる。

3) 香料化合物の使用量調査及び摂取量に関する調査研究

加工食品の流通が国際化する中、食品香料を国際間で安全に使用するための国際整合化が急務であり、香料化合物の安全性評価が進められる必要がある。このような状況の下、国際食品香料工業協会（IOFI）により、安全性評価の基礎データとして JECFA へ提供する最新の暴露量を得る目的で日本、米国、EU それぞれの国・地域において 2010 年中に使用した香料化合物の使用量について 2011 年に同時調査することが提唱された。一方、これまでに、平成 12~14 年度及び平成 16~18 年度の 2 回にわたり、国内で流通している食品香料に使用されている香料化合物の使用量調査を実施したが、前回調査から 4 年が経ち、その間に、国際汎用香料化合物が新規に指定されており、香料化合物の使用実態は変化していると考えられた。そこで、前 2 回の調査に続く定期調査という位置づけで我が国で使用している香料化合物について調査することとし、本年度は、来年度の調査で使用する調査回答表の完成を目的とした。

4) 諸外国の香料規制に関わる調査研究

国際整合化に向けてのわが国における香料規制のあり方の検討のための基礎資料として、各国の香料規制、具体的には香料の定義、主剤として使用できる原料、香料製造に関する規制（抽出溶媒、副剤等）、香料表示に関する規制（天然、アレルギー、GMO等）、及び新規物質を使用する場合の手順、宗教による制約などを調査する必要がある。本年度は解決すべき課題のうち、各国の香料の定義、主剤として使用できる原料の調査・研究を行なうこととした。

なお、生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定(日本食品添加物協会)、香料化合物の使用量調査及び摂取量に関わる調査研究(日本香料工業会)及び、諸外国の香料規制に関わる調査研究の詳細に関しては本報告書の資料を参照されたい。

B. 研究方法

1) アルギン酸の定量法に関する研究

1-1) 試薬

アルギン酸ナトリウム（500 cps、ナカライテスク(株)製）、Dowex1×8 陰イオン交換樹脂、Cl-型、200-400 メッシュ（和光純薬工業(株)製）、硫酸、水酸化ナトリウム、酢酸、カルバゾール、四ホウ酸ナトリウム十水和物（すべて特級、和光純薬工業(株)製）を用いた。

1-2) 試液

0.025mol/L 硫酸・ホウ酸溶液：4 ホウ酸ナトリウム・10 水和物 0.95 g を濃硫酸 100mL に溶かした。

カルバゾール液：カルバゾール 125mg をメタノールに溶かし 100mL とした。

1-3) 陰イオン交換カラムの作製

Dowex1×8 陰イオン交換樹脂（200-400 メッシュ）は 2mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて活性化し、2mol/L 酢酸で洗い樹脂を酢酸型に変換させ、0.5mol/L 酢酸で洗浄した。テフロン製活栓付ガラス製クロマト管（φ 2.1cm×45cm）の底に綿を詰め、0.5mol/L 酢酸で満たした後、樹脂を湿式充てんし（約 20cm の高さ）、カラムの3倍容量の 0.5mol/L 酢酸で平衡化させた。

1-4) 硫酸によるアルギン酸ナトリウムの加水分解

Haug らの方法¹⁾に基づき、以下の通りにアルギン酸ナトリウムの加水分解を行った。まず、アルギン酸ナトリウム 500mg に 80%硫酸 5mL を加え、氷冷しながら混ぜ、18 時間室温で放置した。その後、氷冷しながら、硫酸が 2mol/L となるように水 65mL を加え、その液は密閉した瓶へ入れ、5 時間沸騰水浴中で加熱した。冷後、2mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え中和した。沈殿物はフィルターろ過し、2 倍量の水で洗いこんだ後、アルギン酸ナトリウム加水分解物とした。

1-5) 陰イオン交換クロマトグラフィーによるアルギン酸ナトリウムからのウロン酸の分離

アルギン酸ナトリウム加水分解物中に残存するラクトン体をウロン酸に変換させるために、2mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH8 に調整し、1 時間半放置した。アルギン酸ナトリウム加水分解物を 0.5mol/L 酢酸で平衡化した陰イオン交換カラムに負荷し、0.5mol/L 酢酸から 2mol/L 酢酸の直線濃度勾配で溶出を行った。溶出液は約 7 mL ずつ試験管に採

取した。

各試験管に採取した溶出液はカルバゾール硫酸法による比色を行い、ウロン酸の有無を確認した。ウロン酸が検出された画分を合わせて、減圧濃縮した後、残存する酢酸を取り除くために水を加えさらに減圧濃縮した。得られた残留物は2mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH6~8に調整後、凍結乾燥した。以上の操作を繰り返し、ピーク1及びピーク2をそれぞれ得た。

1-6) カルバゾール硫酸法

氷冷した0.025mol/L硫酸・ホウ酸溶液1mLを試験管に採り、試料液0.2mLを加え、室温以上の温度にならないように氷冷しながら混和した。ガラス玉をキャップとして、沸騰水浴中で10分間加熱し、氷冷後、カルバゾール液0.04mLを加え混和し、更に沸騰水浴中で15分間加熱し、発色させた。冷後、530nmでの吸光度を測定した。

1-7) HPLCによるウロン酸の分析

陰イオン交換カラムによる分離で得られたウロン酸は、それぞれ2mg/mLとなるように水に溶解し、フィルター（前処理ディスクW-25-2、東ソー(株)製）を通した後、下記の条件でHPLCにより分析した。

<HPLC条件>

カラム: Zorbax SAX, 5 μ m, 4.6mm \times 250mm
(アジレントテクノロジー(株)製)

装置: LC-10ADvp, SIL-10ADvp, RID-10A, CTO-10Avp, SCL-10Avp (株式会社島津製作所製)
移動相: 0.7mol/L酢酸、流速: 1.4 mL/min、
カラム温度: 40 $^{\circ}$ C、検出器: RI検出器

2) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

指定添加物については、わが国における食品添加物の製造・輸出入事業者を主対象に、自社における平成19年度の食品添加物グレードの取り扱いについて、調査及び追加調査を行い、貿易統計などにより明らかになる添加物の荷動き、業界誌見積り出荷数値、食品産業関係の加工食品生産統計値など各種統計上の照合と共に、純食品用に出荷された量ながら、流通上、医薬品、化粧品添加物として、またはプラスチック添加物に使用される例がきわめて多いことから、あるいは食品添加物グレード品が新たに食品添加物合成原料となる場合もあり、これらを調査考察しながら、実質的に食用に供された添加物量を査定した。既存添加物については、平成8年4月16日告示された「既存添加物名簿」に記載されている443品目（平成19年3月の告示で削除された38品目は除く）及び「一般に食品として飲食に供されているものであつて添加物として使用される品目リスト」の53品目の合計、496品目を対象品目とし、本調査及び追加調査を行い、各品目の生産流通量をまとめた。

3) 香料化合物の使用量調査及び摂取量に関する調査研究

3-1) 香料化合物データベースの高度化

平成16年度から21年度にかけて構築した香料化合物データベースを高度化した。このための資料として、米国、EU、中国、韓国等各国・地域の最新情報を調査した。これらの情報を利用し同データベースに品目の追加、情報の追加または修正、CAS番号の精査などを行った。なお、国際食品香料工業協会の使用量調査用リストの作成においても今年度高度化したデータベースから情報を提供し、リストの充実に協力した。