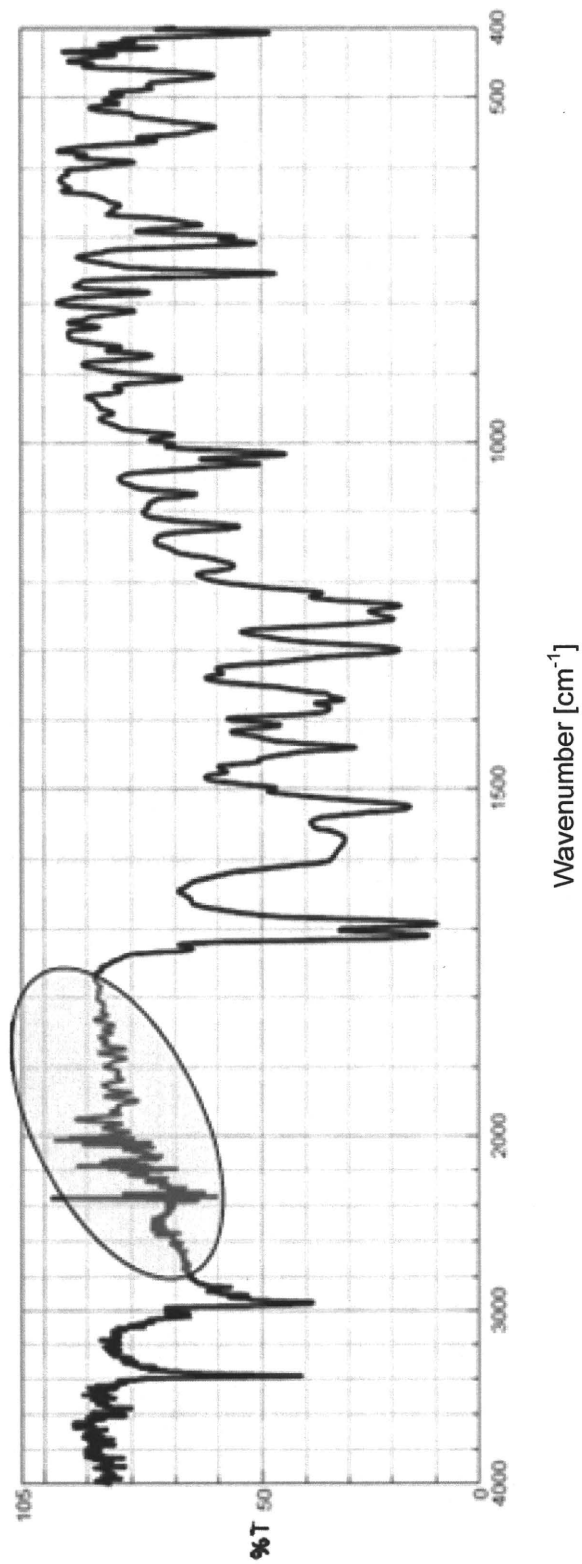


() はダイヤモンドの吸収により信頼できない領域)

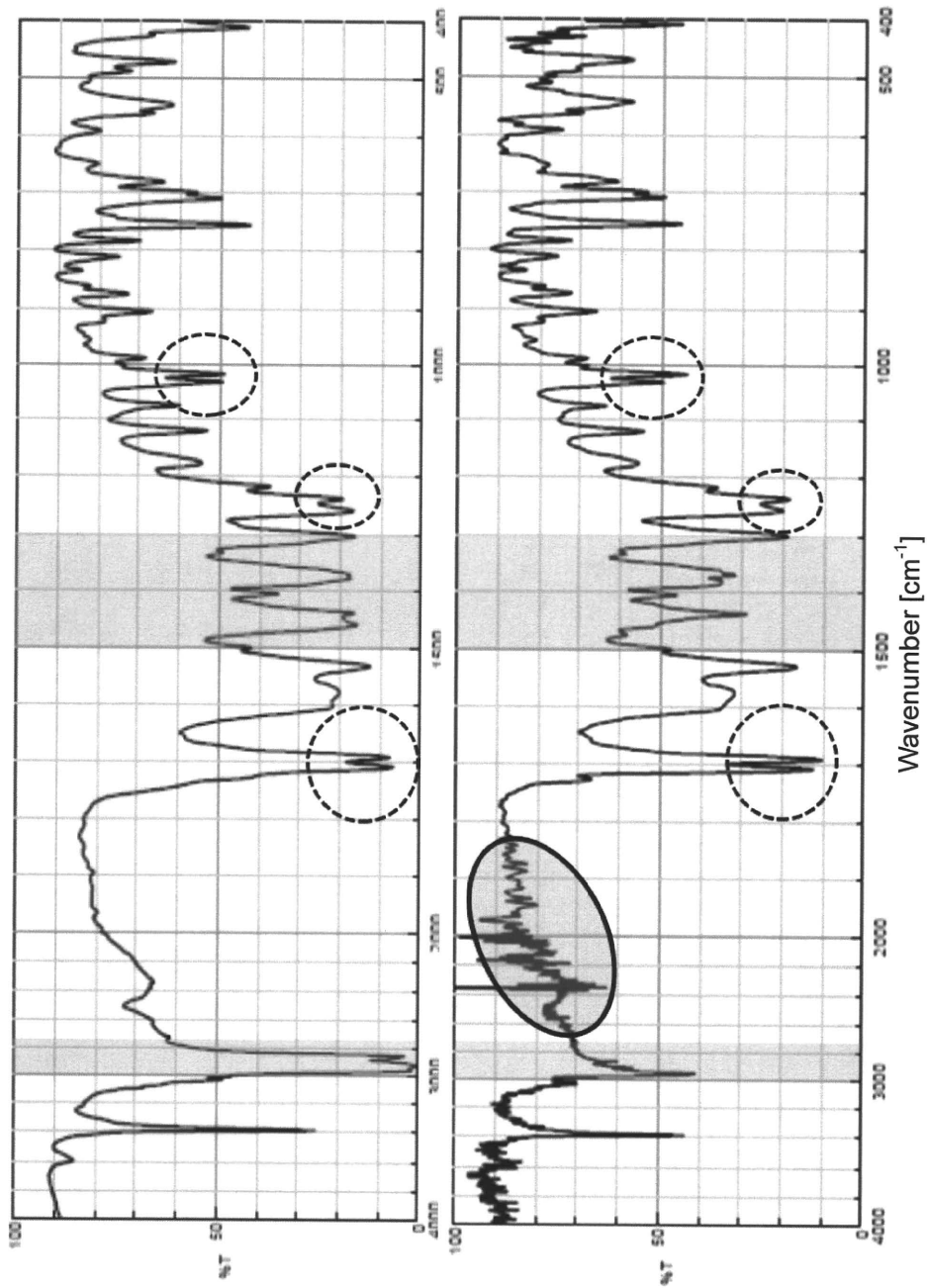
図 15. 乾燥ネオテームの ATR 法による IR スペクトル
(ATR 補正、縦軸 Abs に変換、5.5 倍に演算、縦軸 %T に再変換)



() はダイヤモンドの吸収により信頼できない領域

図 16. 乾燥ネオテームの ATR 法による IR スペクトル

(ATR 補正、縦軸 Abs に変換、5.5 倍に演算、縦軸 %T に再変換、ベースライン補正)



はNujolの吸収により
比較に用いない領域

はダイヤモンドの吸収
により信頼できない領域

図 17. 乾燥ネオテームのペースト法（上段）と ATR 法（下段）による IR スペクトル

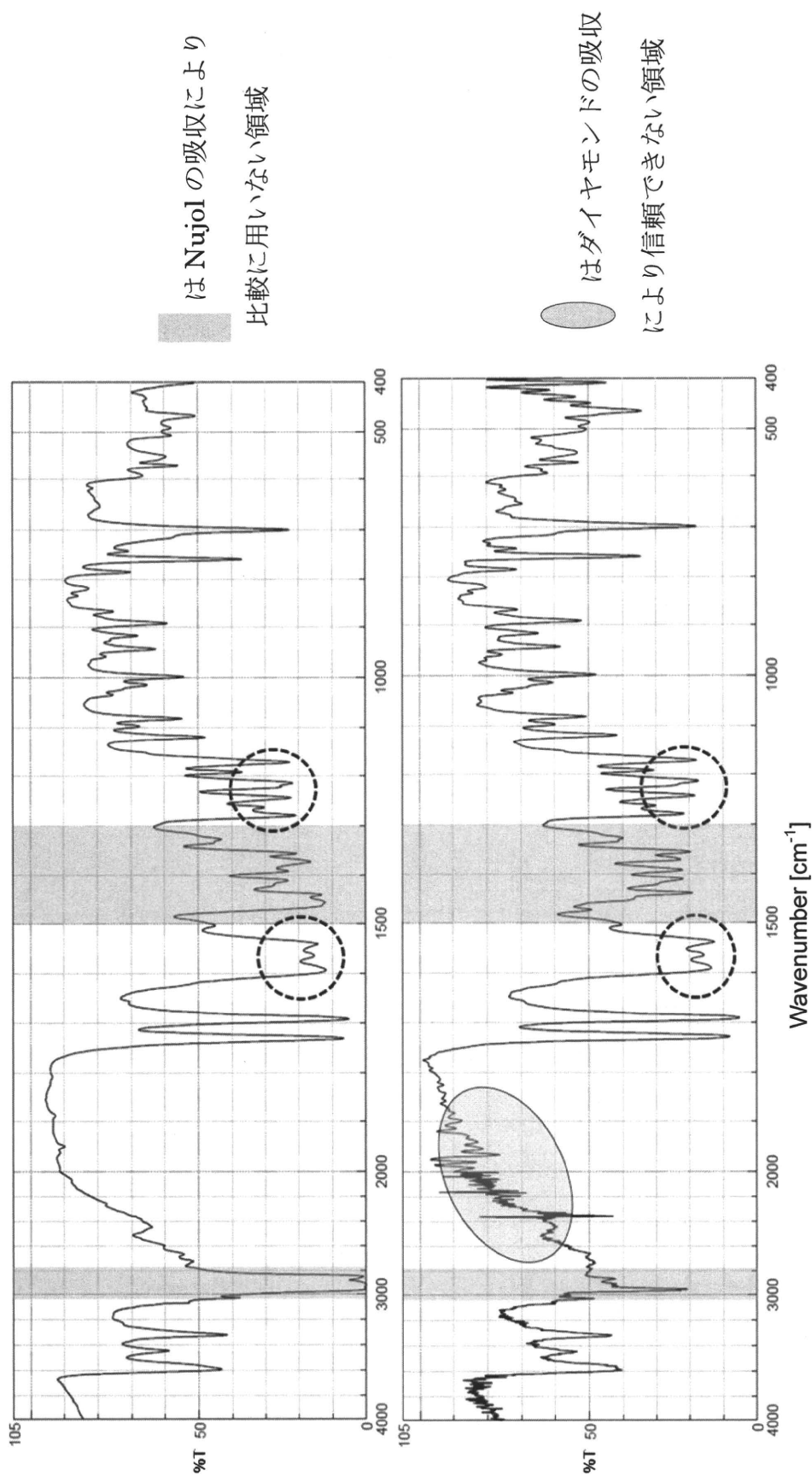
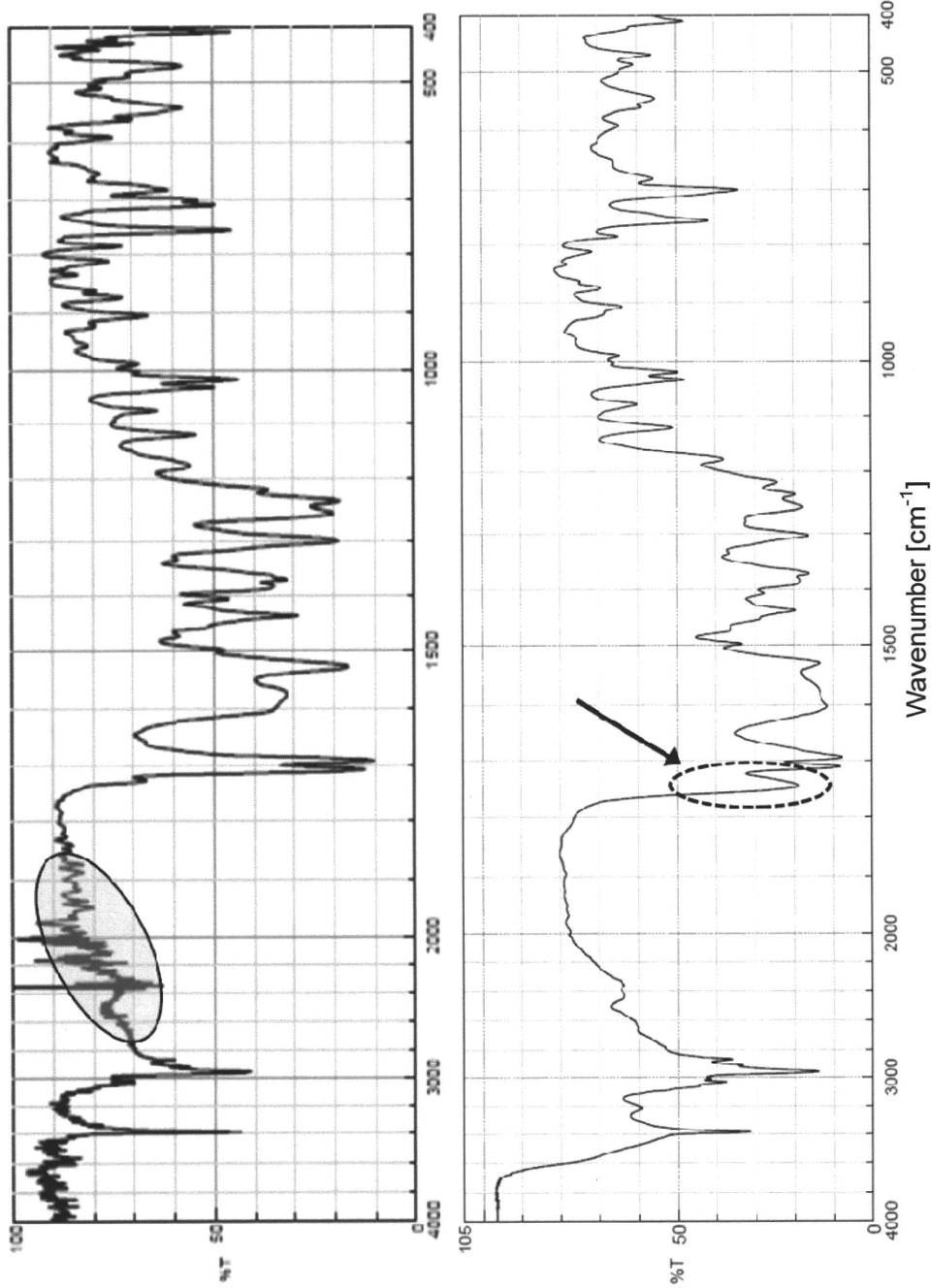


図 18. ネオテームのペースト法（上段）と ATR 法（下段）による IR スペクトル



はダイヤモンドの吸収
により信頼できない領域

図 19. 乾燥ネオテームの ATR 法 (上段) と KBr 法 (下段) による IR スペクトル

香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究

研究分担者 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

研究要旨

我が国独自の食品香料について、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。

A. 研究目的

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。特に、我が国では独自の香料化合物が多く使用されており、それらについてはもちろん、JECFA による安全性評価がなされていない。これらは種類が多いため、すべてについて遺伝毒性試験を実施することは、期間、費用の面で問題がある。構造活性相関手法（SAR）を導入することが効率化の面で有用であるとする。

また、多くの香料化合物は暴露量が微量であるため、年間使用量を上回る検体量を要する毒性試験の実施には疑問が残る。最も簡便なスクリーニング遺伝毒性試験である Ames 試験を実施するにしても、数百 mg の検体を必要とすることから、簡易スクリーニング法、フラクチュエーション Ames 試験（FAT）法が導入できれば、毒性試験の負担が多くの点で軽減されると予想される。

以上を踏まえ、本研究では、遺伝毒性に基

づいた安全性評価を軸とした規格の向上を効率的に進めるために、構造活性相関手法が遺伝毒性予測に適用できるかどうかを検討する。初年度は、遺伝毒性試験として FAT 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る。

B. 研究方法

1) 構造活性相関手法（SAR）

SAR のソフトウェアとして、遺伝毒性評価を目的とする次の 3 種類、DEREK (Lhasa Ltd.)、MULTICASE (MCase ; Multicase Inc.)、ADMEWORKS (AWorks ; 富士通九州システムエンジニアリング) を用いた。DEREK は、知識ベースのエキスパートシステムで、既知データから陽性をもたらす特徴的な部分構造を定義し、ルール化された経験則に基づき、定性的に Ames 試験結果の予測を行うものである。一方、AWorks は、人工知能型アプローチのシステムで、化学物質の構造をフラグメントに分解後、パラメータ(数値データ)に変換し、Ames 試験陽性と相関性の高いパラメータに基づき、多変量解析及びパターン認識により試験結果を予測する。

数値データから定量的な毒性の予測が可能である。したがってこれは定量的構造活性相関 (QSAR) を調べることができる。MCASE は中間型で、化学物質の構造と特徴を表す構造記述子と、多数の部分的構造を機械的に検出し、統計理論から Ames 試験陽性と相関する構造記述子を選別し、予測を行うシステムである。

2) 被験物質

わが国独自の食品香料のうち、入手できた 40 検体を表 1 に示した。このうち、No.1-11 は SAR の 3 種類のソフトの少なくとも一つで陽性判定が得られたものである。

3) 被験物質溶液の調製

被験物質が液体の場合には、被験物質そのまま、もしくはジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業) で所定の濃度に希釈して速やかに用いた。被験物質が粉末の場合には、所定量秤量し DMSO に溶解して最高用量の溶液を調製し、以下 DMSO で段階希釈した。いずれの場合も被験物質溶液は用時に調製した。

4) 陽性対照物質

試験実施施設で蓄積データが得られている物質を使用した。反応液中 (プレインキュベーション時) での濃度は次のとおり: S9 mix 非存在下では、TA100 及び TA98 について、それぞれナトリウムアジド水溶液 1 µg/mL と、4-ニトロキノリン-1-オキシド DMSO 溶液 1 µg/mL を用いた。S9 mix 存在下では、TA100 及び TA98 について、いずれも 2-アミノアントラセン DMSO 溶液 0.4 µg/mL を用いた。

5) 試験材料

最小グルコース寒天平板培地と代謝活性化を調べるためのラット S9 はそれぞれ、極東製薬工業製、キッコーマン製を用いた。

6) 検定菌

検定菌として *Salmonella typhimurium* TA100 及び TA98 を用いた。いずれの菌株も、アミノ酸の一つであるヒスチジンの合成酵素の一つをコードする遺伝子に、点突然変異を持ち、その復帰突然変異により最小培地上でコロニーを形成する能力を獲得する。この原理に基づき、形成された復帰変異コロニーの数が変異原性の指標となる。そのほかに、化学物質の透過性を高めるための膜変異、突然変異に結びつく DNA 付加体が除去されずに残るよう、除去修復系の遺伝子の欠失、突然変異の誘発に関係するプラスミド pKM101 が菌株に導入されており、それらによって遺伝毒性の検出感度が高められている。

7) FAT 法

ニュートリエントブロス No. 2 (Oxoid 製) を 12 mL 入れた L 字型試験管 (容積: 29 mL) に、解凍した凍結保存菌 24 µL をすみやかに接種し、37°C で 10 時間、往復振とう培養して前培養菌液とした。増殖の確認は分光光度計により 660 nm の吸光度の測定により行った。段階希釈法 (10⁶ 倍希釈) によって、前培養菌液中の生菌数を求めた。

24 ウェルマイクロプレートの所定のウェルに、S9 mix 非存在下では被験物質調製液 (10 µL/ウェル) 及び試験菌液 (490 µL/ウェル)、S9 mix 存在下では被験物質調製液 (10 µL/ウェル)、S9 mix (75 µL/ウェル) 及び試験菌液 (415 µL/ウェル) を分注する。ウェル数は、3 ウェル/用量/条件/菌を使用する。

分注操作終了後、24 ウェルマイクロプレートに蓋をし、回転振とう (37°C、90 分間、回

転数：170 rpm) する (プレインキュベーション)。プレインキュベーション後、24 ウェルマイクロプレートの各ウェル中の被験物質に由来する沈殿の有無を目視により観察する。全ての群について、24 ウェルマイクロプレートにインジケータ培地 (2.5 mL/ウェル) を加え、混合液を調製して、再度沈殿の有無を目視により観察する。

マルチチャンネルマイクロピペットを用い、混合液を 24 ウェルマイクロプレート (1 ウェル) 1 枚から 384 ウェルマイクロプレート (48 ウェル) 3 枚へ分注する。分注量は 60 μ L/ウェル (384 ウェルマイクロプレート) とする。

すべての分注操作終了後、384 ウェルマイクロプレート (蓋付き) をチャック付きビニール袋に入れ (プレート数：4 枚以下/袋)、チャックを閉めた後、静置培養 (37°C、72 時間) する。

培養後、チャック付きビニール袋から 384 ウェルマイクロプレートを取り出し、全ての群について、混合液が黄色に変化したウェル数 (黄変ウェル数) を目視によって計測する。

同一用量における 3 区画の黄変ウェル数が全て 0 となる用量が連続して 2 用量以上認められる場合、それらの用量は生育阻害が認められるものと判断する。

数式を用いて、同一処理内容の 3 区画における平均黄変ウェル数及び黄変ウェル出現頻度 (%) を算出する。なお、陰性対照群及び陽性対照群の黄変ウェル出現頻度 (%) は、それぞれ陰性対照値及び陽性対照値とする。

(倫理面への配慮)

In silico とバクテリアを用いた研究なので、該当しない。

C. 研究結果

1) SAR の結果

日本独自で使用している香料 1,405 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、MCCase 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 MCCase 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。MCCase 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 番号が同一のもの重複を除くと、99 化合物であった。

2) FAT の結果

SAR で一つでも陽性に出た 99 化合物 (表 2) のうち、必要量が入手できた 11 化合物についての FAT の結果は表 3 の識別番号 1-11 に示す。総合判定が陰性で、SAR の DEREK と MCCase 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 (表 3)。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。

D. 考察

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。

健康影響を評価する場合、個々のハザードとともに曝露量を考慮することが重要であるが、香料は使用が特定されるため、残留農薬などのように生産量からの割り出しでは曝露評価が困難である。したがって、今回は曝露量を考慮しないものとした。

FAT では4条件(2菌株、±S9)のうちひと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%ということになる。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。

ヨーロッパでは約2,600種類の香料が使用されている。EFSA の評価の過程で、 α, β 不飽和カルボニル構造をもつものは構造上遺伝毒性の懸念があるとされ、データが無いと評価しないとして、試験実施を要求されている。360余、全部についての実施は無理であるため、EFSA と専門家の間でグループ化したのち代表的な化合物の選定を協議し、一部は既に実施しているという状況である。

以上を踏まえ、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。TIMES は、既存の文献データから得られた薬物代謝に関する変換率の情報から、特定の基準条件に対して変換確率を校正することができ、また、データがない場合は組合せアルゴリズムを用いて、既知の代謝マップを適合性が最も高い変換確率に書き換えることができるソフトである。

E. 結論

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。

F. 研究発表

学会発表

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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 検体一覧表

No.	名 称	CAS番号	性 状
1	Acetaldehyde ethyl linalyl acetal	40910-49-4	液体
2	Ocimene oxide	69103-20-4	液体
3	2,4,6-Trimethyl-4-phenyl-1,3-dioxane	5182-36-5	液体
4	Acetaldehyde benzyl ethyl acetal	66222-24-0	液体
5	Acetaldehyde benzyl hexyl acetal	—	液体
6	2-Ethoxyethyl acetate	111-15-9	液体
7	2,6-Nonadienal	557-48-2	液体
8	2,4-Hexadienal	80466-34-8	液体
9	Acetaldehyde 2,3-butanediol acetal	3299-32-9	液体
10	2-Butoxyethyl acetate	112-07-2	液体
11	Isobutyl methyl disulfide	67421-83-4	液体
12	cis-3-Heptenol	1708-81-2	液体
13	Diisoamyl ether	544-01-4	液体
14	tert-Butyl acetoacetate	1694-31-1	液体
15	4-tert-Butylcyclohexanone	98-53-3	粉末
16	2,4-Dimethyl-3-pentanone	565-80-0	液体
17	Ethyl pivalate	3938-95-2	液体
18	Ethyl mercaptoacetate	623-51-8	液体
19	5-Hexenyl acetate	5048-26-0	液体
20	3-Hydroxyhexanoic acid	10191-24-9	液体
21	Isopropyl lactate	617-51-6	液体
22	Maltol butyrate	67860-01-9	液体
23	2-Methoxy-2-methylpropane	1634-04-4	液体
24	Methyl acrylate	96-33-3	液体
25	2,8-p-Menthadien-1-ol	22771-44-4	液体
26	2-Propionylfuran	3194-15-8	粉末
27	cis-3-Hexenyl cis-3-hexenoate	61444-38-0	液体
28	3,4-Dimethoxyacetophenone	1131-62-0	粉末
29	Dinonyl sulfide	929-98-6	液体
30	2-Hydroxy-3,4-dimethyl-2-cyclopentenon	21835-00-7	粉末
31	4-Methylphenylmethanethiol	4498-99-1	液体
32	3-Oxobutane-2,2-diyl dibutyrate	71808-61-2	液体
33	Cyclohexanethiol	1569-69-3	液体
34	2-Hydroxyethyl salicylate	87-28-5	液体
35	1-Methoxy-2-propanol	107-98-2	液体
36	1-(5-Methyl-2-furyl)-1,2-propanedione	1197-20-2	液体
37	8-Methylnonanoic acid	5963-14-4	液体
38	2-Methyl-3-pentanone	565-69-5	液体
39	8-p-Menthen-7-ol	18479-64-6	液体
40	2-Acetyl-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene naphthalene	—	粉末

表 2 SAR で少なくとも一つ陽性判定が出た物質一覧 (: 本研究に用いた 11 物質)

Mol ID	JID	Data base name	CAS	DEREK	MCase	Aworks
46	2466	3-thienylcarboxylic acid	88-13-1	-	+	-
63	2554	diethenyl sulfide		-	-	+
85	2711	methyl 3-(2-furyl)-2-propenoate	623-18-7	-	+	-
123	2884	acetaldehyde amyl butyl acetal		-	+	-
124	2886	acetaldehyde amyl hexyl acetal		-	+	-
125	2887	acetaldehyde amyl methyl acetal	73142-32-2	-	+	-
126	2888	acetaldehyde amyl propyl acetal		-	+	-
127	2889	acetaldehyde benzyl ethyl acetal	66222-24-0	-	+	-
128	2890	acetaldehyde benzyl hexyl acetal		-	+	-
129	2891	acetaldehyde bis(1-carboxyethyl) acetal		-	+	-
130	2892	acetaldehyde 2,3-butanediol acetal	3299-32-9	-	+	-
131	2894	acetaldehyde butyl hexyl acetal		-	+	-
132	2895	acetaldehyde butyl methyl acetal	75677-94-0	-	+	-
133	2896	acetaldehyde citronellyl ethyl acetal	68928-61-0	-	+	-
134	2898	acetaldehyde dibenzyl acetal	23556-90-3	-	+	-
136	2903	acetaldehyde diisopropyl acetal	4285-59-0	-	+	-
137	2907	acetaldehyde ethyl eugenyl acetal		+	+	-
138	2908	acetaldehyde ethyl trans-2-hexenyl acetal		-	+	-
139	2911	acetaldehyde ethyl linalyl acetal	40910-49-4	-	+	-
140	2912	acetaldehyde ethyl l-menthyl acetal		-	+	-
141	2913	acetaldehyde ethyl isoeugenyl acetal		-	+	-
143	2915	acetaldehyde ethyl 1-octen-3-yl acetal		-	+	-
144	2917	acetaldehyde ethyl vanillin acetal		-	+	-
145	2918	acetaldehyde glyceryl acetal	3674-21-3	-	+	-
147	2919	acetaldehyde hexyl isobutyl acetal		-	+	-
156	2929	4-acetoxy-3-methoxybenzyl acetate		-	-	+
161	2940	acetaldehyde ethyl ethylvanillin acetal		-	+	-
183	2982	benzyl eugenyl ether	57371-42-3	+	-	-
197	3008	3-buten-2-one	78-94-4	+	-	-
199	3012	2-butoxyethyl acetate	112-07-2	-	+	-
221	3052	carvone oxide		+	-	-
223	3055	carvyl acetate oxide		+	-	-
331	3200	3,5-dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one	28564-83-2	-	+	-
332	3201	dihydroedulan		-	+	-
342	3217	dimethyl maleate	624-48-6	-	+	-
370	3254	3,7-dimethyl-2,6-nonadienal	41448-29-7	+	-	-
420	3323	ocimene oxide	69103-20-4	+	+	-
425	3329	2-ethoxyethyl acetate	111-15-9	-	+	-
426	3335	ethyl eugenyl ether	1755-54-0	+	-	-
467	3401	ethyl beta-(4-methylphenyl)glycidate	52788-71-3	+	-	+
483	3422	allyl ethyl sulfide		-	-	+
491	3430	2-ethyl-2-butenal	19780-25-7	+	+	-
492	3430	2-ethyl-2-butenal	19780-25-7	+	+	-
493	3431	alpha-ethylcinnamaldehyde	28467-92-7	+	-	-
494	3431	alpha-ethylcinnamaldehyde	28467-92-7	+	-	-
516	3468	furan	110-00-9	+	-	-
520	3476	furfuryl heptanoate	39481-28-2	+	-	-
528	3488	guaia-1(10),11-dien-15-al		+	+	-
550	3518	2-pentyl-2-nonenal		+	+	-
553	3526	2,4-hexadienal	80466-34-8	+	-	-

632	3629	1-hydroxy-2-heptanone	17046-01-4	+	-	-
636	3638	1-hydroxy-5-methyl-2-hexanone		+	-	-
647	3649	isobutanal dimethyl acetal		-	-	+
706	3759	eugenyl isoamyl ether		+	-	-
707	3760	eugenyl phenylacetate	10402-33-2	+	-	-
715	3774	methyl 2-(butyrylthio)propionate		-	-	+
716	3778	methyl trans-2-decenoate	7367-85-3	-	+	-
731	3804	methyl beta-(4-methylphenyl)glycidate	99334-18-6	+	-	+
732	3805	methyl beta-methyl-beta-phenylglycidate		-	-	+
733	3807	methyl 2-(isobutyrylthio)propionate		-	-	+
758	3846	isovaleraldehyde dimethyl acetal		-	-	+
783	3890	5-methyl-2-furfuryl acetate	18091-24-2	+	-	-
824	3951	2-methylpiperonylideneacetaldehyde		+	-	-
854	4000	2,6-nonadienal	557-48-2	+	-	-
885	4042	2,6-octadienal	56767-18-1	+	-	-
886	4042	2,6-octadienal	56767-18-1	+	-	-
887	4042	2,6-octadienal	56767-18-1	+	-	-
888	4042	2,6-octadienal	56767-18-1	+	-	-
889	4043	trans,cis-2,6-octadienal	76917-23-2	+	-	-
978	4196	eugenyl butyrate		+	-	-
979	4197	eugenyl propionate	7504-66-7	+	-	-
1009	4249	sinensal		+	+	-
1010	4249	sinensal		+	+	-
1018	4267	3-thienylcarbaldehyde	498-62-4	-	+	-
1026	4280	triethyleneglycol diacetate		-	+	-
1044	4305	2,4,6-trimethyl-4-phenyl-1,3-dioxane	5182-36-5	-	+	-
1060	4334	2-acetyl-4-methylpyrimidine	71850-85-6	-	+	-
1071	4347	ethyl 2-butyrylcinnamate		-	+	-
1072	4347	ethyl 2-butyrylcinnamate		-	+	-
1094	4366	4-methoxydiphenyl		-	+	-
1097	4369	methyl 2-undecenoate		-	+	-
1098	4369	methyl 2-undecenoate		-	+	-
1114	4401	butanal dimethyl acetal		-	-	+
1132	4425	cis,cis-2,6-decadienal		+	-	-
1142	4441	dihydroperillaldehyde		+	+	-
1149	4449	2,7-dimethyl-10-(1-methylethyl)-1-oxaspiro[4,5]deca-3,6-diene	89079-92-5	-	+	-
1205	4535	5-(2-furyl)-2,4-pentadienal	5916-94-9	+	-	-
1210	4540	1-hepten-3-one		+	-	-
1218	4546	(2S,4aR,8aS)-2,5,5,8a-tetramethyl-3,4,4a,5,6,8a-hexahydro-2H-1-benzopyran	41678-32-4	-	+	-
1246	4584	isobutyl methyl disulfide	67421-83-4	-	-	+
1250	4591	3-(2-furyl)-2-isopropyl-2-propenal		+	+	-
1259	4597	linalyl acetate epoxide		+	+	-
1275	4633	methyl 2-oxopropyl disulfide	122861-78-3	-	-	+
1290	4658	trans-2-methyl-6-methylene-2,7-octadienal	17015-30-4	+	+	-
1384	4973	methyl 2-octenoate	2396-85-2	-	+	-
1389	4975	methyl linoleate oxide	90459-45-3	+	-	-
1392	4979	methyl beta-(4-methylphenethyl)glycidate		+	-	-
1401	4994	3-(2-furyl)-2-[(methylthio)methyl]-2-propenal	81381-99-9	+	+	-

表 3 香料（計 40 種類）の FAT の判定

識別 番号	物質名	検定菌				総合判定
		TA100		TA98		
		-S9	+S9	-S9	+S9	
1	Acetaldehyde ethyl linalyl acetal	-	-	-	-	-
2	Ocimene oxide	-	-	-	-	-
3	2,4,6-Trimethyl-4-phenyl-1,3-dioxane	-	-	-	-	-
4	Acetaldehyde benzyl ethyl acetal	-	-	+	-	+
5	Acetaldehyde benzyl hexyl acetal	-	-	+	+	++
6	2-Ethoxyethyl acetate	-	+	+	+	+++
7	2,6-Nonadienal	-	-	-	-	-
8	2,4-Hexadienal	-	-	-	-	-
9	Acetaldehyde 2,3-butanediol acetal	+	-	-	-	+
10	2-Butoxyethyl acetate	-	+	-	-	+
11	Isobutyl methyl disulfide	+	-	-	-	+
12	cis-3-Heptenol	-	-	-	-	-
13	Diisoamyl ether	-	-	-	+	+
14	tert-Butyl acetoacetate	-	-	+	-	+
15	4-tert-Butylcyclohexanone	-	-	-	-	-
16	2,4-Dimethyl-3-pentanone	+	+	+	+	++++
17	Ethyl pivalate	-	-	-	-	-
18	Ethyl mercaptoacetate	-	-	-	-	-
19	5-Hexenyl acetate	-	-	-	-	-
20	3-Hydroxyhexanoic acid	-	-	-	-	-
21	Isopropyl lactate	+	+	-	+	+++
22	Maltol butyrate	-	-	-	-	-
23	2-Methoxy-2-methylpropane	-	-	-	-	-
24	Methyl acrylate	-	-	-	-	-
25	2,8-p-Menthadien-1-ol	+	-	-	-	+
26	2-Propionylfuran	-	-	-	-	-
27	cis-3-Hexenyl cis-3-hexenoate	-	-	-	-	-
28	3,4-Dimethoxyacetophenone	+	-	-	-	+
29	Dinonyl sulfide	+	-	-	-	+
30	2-Hydroxy-3,4-dimethyl-2-cyclopentenone	-	-	-	-	-
31	4-Methylphenylmethanethiol	-	-	-	-	-
32	3-Oxobutane-2,2-diyl dibutyrate	-	-	-	-	-
33	Cyclohexanethiol	-	-	-	-	-
34	2-Hydroxyethyl salicylate	-	-	+	-	+
35	1-Methoxy-2-propanol	-	-	-	-	-
36	1-(5-Methyl-2-furyl)-1,2-propanedione	-	-	-	-	-
37	8-Methylnonanoic acid	-	-	-	-	-
38	2-Methyl-3-pentanone	-	-	+	-	+
39	8-p-Menthen-7-ol	-	-	-	-	-
40	2-Acetyl-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene naphthalene	-	-	-	-	-

-S9 : S9mix 非存在下、+S9 : S9mix 存在下、- : 陰性、+ : 陽性

数字は被験物質が粉末であることを示す。

++は SAR も FAT も陽性判定の 6 物質

-は SAR も FAT も陰性判定の 20 物質

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

研究分担者 久保田浩樹 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官

研究要旨

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トリハロメタンをはじめとした揮発性化合物の分析を行った。

生鮮野菜（葉菜類及び根菜類）及び魚介類（鮮魚、貝類）、鶏肉等、計 13 品目を次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理を行ったとき、対象食品よりクロロホルムの生成が確認されたが、クロロホルム生成量は食品の種類により差がみられた。また、殺菌処理により生成したクロロホルムは、水道水により流水洗浄処理を行うことで食品より取り除かれ残存量の減少が確認された。また、殺菌処理後の鶏肉をオープンにより加熱調理したとき、鶏肉に付着していたクロロホルムは定量下限値以下となり、加熱調理により殆ど取り除くことができた。さらに、生鮮食品中のクロロホルム残存量の調査結果をもとに、塩素殺菌由来で食品に残存するクロロホルムの推定暴露量を計算したとき、耐容一日摂取量量(TDI)に対する寄与率は約 1%であり、水道水の水質基準値に比べて低い値であった。

A. 研究目的

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。

次亜塩素酸ナトリウムは古くから水道の消毒薬としても利用されてきたが、1972 年に Rook らが河川水からクロロホルム (CF) を検出し¹⁾、また、河川水の塩素処理によって CF を始めとした様々なトリハロメタン (THM) が生成されることを明らかとしている²⁾。その後も、塩素処理により生成する消

毒副生成物について広く研究が行われ、これまでにハロアセトニトリルや、抱水クロラール、ハロ酢酸などの様々な塩素系化合物が確認されている。

このため、各国では消毒副生成物による健康影響について評価を行い、飲料水の水質基準値が設けられている。WHO の飲料水ガイドライン第 3 版³⁾では、CF が 0.2 mg/L、ブロモジクロロメタン (BDCM) が 0.06 mg/L、ジブロモクロロメタン (DBCM) が 0.1 mg/L、ブロモホルム (BF) が 0.1 mg/L に設定されている。米国 EPA では総 THM の最大許容濃度 (MCL) が年間平均として 0.08 mg/L で

あり⁴⁾、また、EUでは、総 THM として 0.1 mg/L に設定している⁵⁾。

現在、わが国では水道水の水質基準において、THM 類は総 THM として 0.1mg/L、CF が 0.06 mg/L、BDCM が 0.03 mg/L、DBCM が 0.1 mg/L、BF が 0.09mg/L 以下に設定されている⁶⁾。

食品中の THM 残存量の調査については、米国食品医薬品局 (FDA) がトータルダイエットスタディの一環として継続的にモニタリングを行っており⁷⁾、日本においても豊田らにより食品中の THM 残存量の調査が行われている。これらの調査によると、油脂類や乳製品、野菜類等を中心に様々な食品より THM が検出されている⁸⁻¹¹⁾。また、食品の次亜塩素酸ナトリウム処理に伴う THM 生成能についても研究が行われ、鶏肉や野菜類の塩素殺菌処理において CF が生成¹²⁻¹⁵⁾し、牛乳製造プラントにおける次亜塩素酸の界面活性剤との併用洗浄による CF 生成挙動の解明などの報告がある¹⁶⁻¹⁸⁾。しかし、これら研究の多くは一部の食品に限られており、食品全般における THM 生成挙動の実態を解明するには至っていない。

これまでに、カットキャベツを塩素系殺菌料で殺菌処理したときに生成する消毒副生成物について調査を行い、殺菌処理により生成する主要な副生成物として、THM、ハロアセトニトリル及びハロ酢酸の存在を明らかとしてきた。

本研究では、食品の安全確保推進の研究調査の一環として、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、野菜、鮮魚及び肉類等の生鮮食品を殺菌処理したときに生成する消毒副生成物の生成量について検討を行った。今年度は、特に主要な消毒副生成物として THM に着目し、食品に残存する揮発性化合物についてダ

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)を用いて分析を行い、生鮮食品を塩素殺菌処理したときの THM 残存量の調査を行った。さらに、塩素殺菌処理を行った場合、食品に殺菌料が残存することから、十分な流水ですすぎ洗いが通常行われている。そこで食品に残存する THM の流水洗浄が THM 残存量に及ぼす影響についてあわせて調査を行ったので報告する。

B. 研究方法

1) 試薬

揮発性有機化合物標準原液として関東化学製の揮発性化合物混合標準液を用いた。内部標準原液として関東化学社製のフルオロベンゼン標準原液、4-ブロモフルオロベンゼン標準原液を用いた。希釈溶媒には和光純薬工業社製の THM 用メタノールを用いた。少量のメタノールを入れた 10 mL のメスフラスコに、フルオロベンゼン標準原液及び4-ブロモフルオロベンゼン標準原液 1 mL をそれぞれ正確に採り、メタノールを加えて正確に 10 mL とし内部標準原液とした。この液 1 mL を正確に採り、メタノールを加えて正確に 10 mL とし内部標準液とした。塩化ナトリウムは和光純薬工業社製の水質試験用を用いた。次亜塩素酸ナトリウムには和光純薬工業社製の食品添加物用を用いた。測定用精製水には、妨害成分が含まれていないことをあらかじめ確認した、EDS ポリッシャーを通過させた超純水を用いた。その他の試薬は特級を用いた。次亜塩素酸ナトリウム溶液は次亜塩素酸ナトリウムを第 8 版食品添加物公定書¹⁹⁾に従い、ヨウ素滴定法で定量した後、有効塩素濃度が 10 または 100 µg/mL となるように適宜希釈し、調製した。

2) 器具及び装置

バイアル瓶 (50 mL) 及びテフロンライナー付シリコンセプタムは、I-CHEM 製の EPA 規格に準拠した 40mL VOA バイアルを用いた。バイアル瓶は 100°C で 3 時間加熱後、放冷し、バイアル瓶内部及びセプタムを窒素パーズ処理した後、分析に使用した。ダイナミックヘッドスペースシステムとして Teledyne Tekmar 製のパーズ&トラップ装置 AQUA PT5000J Plus 及びオートサンプラー SOLAtek72 を用いた。SOLAtek72 のサンプルニードルには、ダイナミックヘッドスペース分析用に成型された長さ 4.8cm のニードル (ジーエルサイエンス製) を使用した。GC/MS は島津製作所製の GCMS-QP2010 を用いた。

3) ダイナミックヘッドスペース GC/MS 測定条件

ダイナミックヘッドスペース条件 サンプルカップ温度: 60°C、サンプルニードル温度: 60°C、バルブオープン及びトランスファーライン温度: 150°C、パーズ時間: 8 min、パーズ流量: 40 mL/min、ドライパーズ時間: 5 min、ドライパーズ温度: 150°C、デソープ時間: 6 min、デソープ温度: 220°C、ベーク時間: 35 min、ベーク温度: 230°C、スターラー攪拌: 弱回転、クライオフォーカス: なし
GC/MS 条件 カラム: AQUATIC-2 60m×0.25mm I.D. 膜厚 1.4 µm、カラム温度: 40°C(3min)→(4°C/min)→200°C(7min)、注入口温度: 160°C、インターフェース温度: 200°C、イオン化法: EI、イオン化電圧: 70eV

4) 殺菌処理方法

野菜類及び鶏肉、豆腐は小さく切り分け、試料 2 g を 50 mL のスクリュウキャップバイ

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 µg/mL、豆腐は 10 µg/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) 200µL を加えて反応を止め、よく攪拌した後、冷所に保管後、バイアル瓶に試料を採取し試験に供した。

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 µg/mL の次亜塩素酸ナトリウム 200 mL に室温で 10 分間浸漬して殺菌処理後、アスコルビン酸ナトリウム(4→10) 2 mL を加えて反応を止め、試料を取り出し、速やかに皮を残したまま 3 枚におろし、この試料約 2 g をバイアル瓶に移し試験に供した。

5) DHS-GC/MS 用試験液の調製

試料の入ったバイアル瓶に、攪拌子、塩化ナトリウム 3 g 及び測定用精製水 10 mL を加え、次いでマイクロシリンジを使用して内部標準液を 2 µL 注入し、直ちにテフロンシート付きセプタムを装着したキャップで密封し GC/MS 用試験液とした。

6) 検量線用標準液の調製

内部標準原液 1 mL を正確に少量のメタノールを入れたメスフラスコ 20 mL に採り、次いで、揮発性有機化合物混合標準原液 1mL を正確に採り、メタノールを加えて正確に 20 mL とし、揮発性有機化合物標準液とした。この液 0、0.1、0.2、0.5、1、2 mL をそれぞれ正確に採り、メタノールを加えてそれぞれ正確に 10 mL とし、6 種類の検量線用標準源液とした。6 本のバイアル瓶にそれぞれ攪拌子、塩化ナトリウム 3g 及び測定用精製水 10 mL を採り、次いでマイクロシリンジを使用して検量線用標準源液を 2 µL 注入し、直ち

にテフロンシート付きセプタムをのせ、アルミキャップで密封し、検量線用標準液とした。

C. 研究結果

1) DHS-GC/MS による生鮮野菜中の揮発性化合物の分析

測定対象とした揮発性有機化合物 (VOC) 23種のトータルイオンクロマトグラムを Fig. 1に示した。30分までに全てのピークを検出することができた。このうち *m*-キシレン及び *p*-キシレンはピークが分離せず検出された。これら化合物は異性体のためマススペクトルも類似しており分別が困難であった。このため *m*-キシレン及び *p*-キシレンは *m,p*-キシレンの合計量として算出した。また、スクリーン分析によるトータルイオンの測定では 9.5分に溶出の 1,1-ジクロロエチレン、10.6分のジクロロメタン、13.2分のシス-1,2-ジクロロエチレン、18.3分の BDCM、24.0分の *m,p*-キシレンのピークはカラム由来と推定される夾雑ピークと分離が不十分であったが、ターゲットイオンの選択により各化合物を特異的に選択することができた。その他の化合物は良い分離を示した。

2) 添加回収試験

各試料に VOC を 5 ng/g 又は 50 ng/g となるように添加し、添加回収試験を行った。代表例としてキャベツからの揮発性化合物の添加回収試験結果を Table 1 に示した。各化合物の定量下限値は 1 ng/g であった。未処理試料よりジクロロメタン、CF、及びベンゼンが微量検出されたが、定量下限値以下であり添加回収試験の結果に影響はなかった。*cis*-1,3-ジクロロプロペン及び *o,m,p*-キシレンの回収率が 60%以下となったが、その他の化合物は 70%以上の概ね良い回収率を示し、変動係数も 7%以内であった。また、タマネギ及びモ

ヤシ、カキの未処理試料から微量のトルエンが検出された。このため、これら試料ではトルエンは分析対象から除外した。

Table 2 に各試料からの CF の添加回収試験の結果を示した。50 ng/g 添加では 43.7~55.2 ng/g と良い回収率であった。5 ng/g 添加において、アジ及びエビからの回収率が 140%以上となったが、その他の添加試料については、5 ng/g 添加において 4.9~5.6 ng/g と概ね良い回収率が得られた。また、アジからの回収結果にバラツキがみられたが、変動係数は 10%以内であり、Horwitz の式²⁰より算出される予測変動係数よりも小さく分析精度は良好であった。

3) 生鮮野菜の塩素殺菌処理及び水洗浄処理による CF 残存量の変化

サラダ等として生のまま食される生鮮野菜類について、100 µg/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 分間流水洗浄したときに、殺菌及び流水洗浄後に残存する CF 量を調べた (Table 3)。モデル試料として葉菜類、根菜類及び豆類等、計 8 種類の野菜を選び検討を行った。各試料の塩素殺菌処理により CF が生成し、タマネギ、モヤシ及びカイワレ大根において、それぞれ 42.2、70.1、39.0 ng/g の CF が検出されたが、その後の水道水による流水洗浄により、25.0、39.0、21.9 ng/g まで減少した。その他の野菜類の流水洗浄後の残存量は、3.2~6.3 ng/g であった。

4) 魚介類の塩素殺菌処理及び水洗浄処理による CF 残存量の変化

魚介類として魚 (豆鯨)、甲殻類 (エビ) 及び貝類 (カキ) を 100 µg/mL 次亜塩素酸ナトリウムで 10 分間殺菌処理し、さらに、水道水で 1 分間流水洗浄したときの CF 残存の推

移を調べた (Table 4)。エビ及びカキの次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理後の 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。鮮魚は皮つき試料を分析したが、殺菌処理直後の試料は定量下限値以下であった。また、流水洗浄後に微量の CF が含まれていた。

5) 鶏肉の塩素殺菌処理及び水洗浄処理による CF 残存量の変化

肉類として鶏肉を 100 µg/mL 次亜塩素酸ナトリウムで 10 分間殺菌液に浸漬処理したときの THM 生成量を調べた (Table 5)。殺菌処理により 13.8 ng/g の CF が検出された。鶏肉は殺菌処理後に、流水洗浄処理が行われるのか不明のため、流水処理は実施しなかった。しかし、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することが明らかとなった。

6) 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

豆腐の製造工程において約 10 µg/L の次亜塩素酸ナトリウムが使用する場合があるため、次亜塩素酸ナトリウム浸漬処理後の CF 量の推移を調べた (Table 6)。次亜塩素酸ナトリウム濃度は豆腐の製造工程において一般的と考えられる 10 µg/mL とした。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。また、調理前に水洗いすることを想定し、水道水に 10 分間浸漬したところ、微量の CF が豆腐より検出された。

D. 考察

1) 食品中の THM 分析法の検討

食品に含まれる CF の分析を DHS-GC/MS 法により検討を行った。従来、食品中の揮発性化合物の分析法として、スタティックヘッドスペース (SHS) -GC 法が広く用いられてきたが、タンパク質や脂質を多く含む食品では、試料に CF が吸着するため、豆腐からの CF 回収率が 5.2% と著しく低下することが報告されており、食品全般への適用には問題があった。これに対し、DHS-GC/MS 法を用いた場合、豆腐からの回収率は、5 ng/g 添加において 112% であった。この回収率は精度管理ガイドラインの範囲内であり、従来の SHS-GC 法に比べ大幅に改善された。また、本試験法は試料調製が簡便であり、かつ、食品成分由来の妨害を極力抑えながら高感度の分析ができることから、微量の THM 分析において有用な試験法と考えられた。ただし、アジ及びエビからの添加回収率が 120% を超える結果となり、一部の食品の適用に注意が必要であった。これら試料では内部標準液ピークの保持時間に夾雑ピークが一緒に重なって検出された。ターゲットマスでは夾雑ピークの影響を受けることなく目的成分を特異的に検出することができたが、マトリクス効果により内部標準ピークの強度に影響を及ぼし、定量値が高めになったと考えられた。このため本試験法をアジ及びエビに適用するには、今後さらなる分析条件の見直しが必要であり、今回は参考値として、半定量的な THM 残存量の推移を観察するにとどめた。

また、*cis*-1,3-ジクロロプロペン及び *o,m,p*-キシレンの食品からの回収率が低くなった。しかし、これら化合物は水道水の塩素処理においても副生成物として検出される事例は殆どないことから、本研究において実質的に大きな影響はなかったと思われる。また、その他の揮発性化合物の添加回収率は概ね良好な結果を示した。

2) 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、野菜の種類により生成量に変化が見られた。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、食品においては野菜に含まれるポリフェノール系化合物等の成分の存在量により THM 生成能に違いが生じたと考えられた。モヤシの次亜塩素酸ナトリウム処理により 70.1 ng/g の CF が検出された。日高らはモデル実験としてモヤシ 20 g を 200 µg/L 次亜塩素酸ナトリウム 1.2L に 10 分間浸漬させたとき、114 ng/g の CF を検出しており、他の野菜に比べ THM 生成能が高いことを報告しており¹³⁾、本研究でも同様の結果が得られた。また、水道水により 1 分間流水洗浄することで、食品に残留していた CF は取り除かれ、特にモヤシでは 39.0 ng/g まで減少し、THM の除去に流水洗浄の有効性が確認できた。モヤシやタマネギは、一般に加熱調理される場合が多く、食品に残存した CF は調理過程で揮散し大幅に減少することが予想され、実際の暴露量はさらに低くなると考えられる。また、スプラウトは、細菌が増殖しやすい食品であることから、他の食品に比べ微生物学的リスクに十分に配慮することが必要である。

鮮魚（豆アジ）を殺菌処理したとき THM は検出されず、流水洗浄後に 1.8 ng/g 残存していた。この実験の流水洗浄に使用した水道水には 4 ng/mL の CF が含まれており、水道水由来の THM が鮮魚表面に付着したと考えられた。また、エビやカキの THM 生成能は総じて低く、魚介類由来の THM 暴露影響は小さいと結論付けた。

鶏肉の殺菌処理により 13.8 ng/g の 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。Axtell らは、ブロイラー鶏肉を、水道水またはクロラミン溶液に 6 時間浸漬した試料をローストしたとき、2 試料間の CF 残存量に有意な差がないことを明らかとしており²²⁾、本研究結果と一致した結果を示している。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。

3) 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した 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 93.4 g/人/日、その他の野菜は 166.4 g/人/日、魚介類は 75.5 g/人/日とした。各食品群の代表値として残存量の高かった野菜を選び、緑黄色野菜はニンジン、その他の野菜はモヤシ、魚介類はエビの水洗後の残存量の数値を用いた。また、豆腐より 2.0 ng/g の CF が検出されているが、殺菌処理試料から検出されていないことから、水道水由来と考えられた。加工調理工に用いる水道水は、水道水の水質基準に組み込まれているため、豆腐はデータから除外した。以上の結果をもとに、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 0.14 µg/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 12.9 µg/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、算出した生鮮食品由来の暴露量は、今回測定した試料の最大値を各食品群に代入しており、さらに、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。

E. 結論

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、加熱調理によっても鶏肉に残存した 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。

次亜塩素酸ナトリウムは、野菜や魚介類など生鮮食品を直接摂取する場合、微生物学的危害を防止する上で欠かすことのできない重要な役割を果たしており、今後とも微生物学的リスクを十分に考慮した上での化学的リスク評価の調査を継続的に行っていくことが必要と考えられる。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考論文

- 1) Rook, J.J.: *Water Treatment and Examination*, 21(3), p259 (1972)
- 2) Rook, J.J.: *Water Treatment and Examination*, 23(2), p234-243 (1974)
- 3) WHO: *Guidelines for Drinking-water Quality* 3rd Ed. (2004)
- 4) Susan D. Richardson: *Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), p666-684 (2003)
- 5) *Official Journal of the European Communities Council Directive* 98/83/EC (1998)
- 6) 厚生労働省令第百一号: 水質基準に関する省令 (2003)
- 7) Heikes et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 43(11), p2869-2875 (1995)
- 8) Toyoda, M., Ishizaka, T., Saito, Y.: *食品衛生学雑誌*, 27(3), p245-241 (1986)
- 9) Tamakawa, K. et al.: *食品衛生学雑誌*, 29(2), p156-160 (1988)
- 10) Miyahara, M. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 43(2), p320-326 (1995)
- 11) René Imhof et al.: *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 85, p681-703 (1994)
- 12) Vizzier-Thaxton, V. et al.: *J. Poultry Sci. Soc.*, 19, p169-173 (2010)
- 13) Hidaka, T. et al.: *食品衛生学雑誌*, 32(4), p308-314 (1991)
- 14) Hidaka, T. et al.: *食品衛生学雑誌*, 33(3), p267-273 (1992)
- 15) Hidaka, T. et al.: *食品衛生学雑誌*, 35(4), p357-364 (1994)
- 16) Tiefel, P., Guthy, K.: *Milchwissenschaft*, 52(12), p686-691 (1997)
- 17) Resch, P., Guthy, K.: *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 95, p418-523 (1999)