

201131018A

---

---

---

201131018A

厚生労働科学研究費補助金  
食品の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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 恭子

平成24（2012）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	-----	11
佐藤恭子		
2. 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	-----	21
北村陽二		
3. NMRを用いた食品添加物定量法の開発	-----	79
大槻 崇		
4. 香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究	-----	87
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	-----	93
久保田浩樹		
(資料) 生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関わる研究		
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		

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
平成 23 年度総括研究報告書

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第一室長

研究要旨

食品の安全性確保の一助とするため、食品添加物の国際化を踏まえ、食品添加物規格の向上に関する研究及び食品添加物の使用実態の把握に関する研究を行った。

食品添加物の規格の向上及び使用実態に関する研究—アルギン酸及びその塩類の定量法に関する研究では、公定法であるアルギン酸定量法からの有害物質排除のため、蒸留法、比色法及び HPLC 法を検討した。生産量統計を基にした指定添加物の摂取量の推定では、第 10 回調査として指定添加物の平成 22 年度取扱量のアンケート調査及び集計を行った。香料化合物の使用量調査及び摂取量に関わる調査研究では、日米欧同時の使用量実態調査として、平成 22 年の食品香料化合物の使用量調査を実施し、国内での使用量及び推定摂取量を明らかにした。諸外国の香料規制に関わる調査研究では、諸外国の香料規制のうち、副剤に関する定義及び規制の調査・研究を行い、22 の国及び地域の情報を得た。

赤外スペクトルに関する研究：香料化合物 45 品目の標準 IR 及びその測定法を定め、さらに、ATR 法の確認試験への利用の可能性を検討した。

NMR を用いた食品添加物定量法の開発：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定量 NMR 法を用いたチアベンダゾール（防かび剤）の定量分析に関する検討を行った。その結果、本法は良好な真度、併行精度、直線性を有することが明らかとなり、本法がチアベンダゾールの定量分析に適用可能であることが明らかとなった。

香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究：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、我が国独自の食品香料のうち、JECFA での遺伝毒性試験結果のない化合物から、SAR 陰性で使用量の多い 200 検体のうち、43 検体を選んで簡易遺伝毒性試験を行い、93%が陰性だった。

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ハロアセトニトリル及び抱水クロラールの暴露量を調査するため、殺菌洗浄処理モデルにおける生鮮食品中の消毒副生成物残存量をガスクロマトグラフ質量分析装置により分析を行った。

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

## 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、国際整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、国際的視野での食品添加物の規格の向上が重要である。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。

### A-1 食品添加物の規格の向上及び使用実態に関する研究

#### 1) アルギン酸の定量法に関する研究

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 $\beta$ -D-マンヌロン酸（マンヌロン酸）と $\alpha$ -L-グルロン酸（グルロン酸）が $\beta$  1,4 結合で直鎖状結合した高分子であり、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、米国

薬局方（USP）の装置による蒸留法の適用性を調べるために、公定法との比較検討を行い、更に比色及び HPLC による定量法についても検討を行った。

#### 2) 生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関わる研究

指定添加物にあつては品目ごとに原則としてその許容一日摂取量（ADI）が検討評価されており、行政上各添加物の日本人1人1日実摂取量の把握が求められている。食品添加物の摂取量を推定するため、今年度は、食品添加物の生産・輸入業者にアンケート調査を行い、集計化を行った。

#### 3) 食品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年中の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。そこで、食品香料化合物について使用量実態調査を実施し、国内での使用量を把握するとともに、推定摂取量を明らかにした。

#### 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、各国の香料規制を調査する必要がある。本年度は解決すべき課題のうち、副剤に関する定義及び規制について調査・研究を行った。

### A-2 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

赤外スペクトル（IR）法は、その簡便性と確実性から、国際的にも各種化合物の確認試験に汎用されている。さらに、IR法はほとんど試薬を必要としないため、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。このような背景

のもと、IR法が各種食品添加物の確認試験にも多用され、食の安全に寄与している。そこで、本研究では、食品添加物公定書で確認試験としてIRが設定されていない香料化合物45品目について、測定法や測定条件に検討を加えた。また、本研究では、近年普及しつつある減衰全反射法（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した。

#### A-3 NMR を用いた食品添加物定量法の開発

近年、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として定量 NMR（qNMR）法が注目を集めている。食品添加物の規格試験法の精度向上を目指した研究の一環として、品添加物分析への qHNMR 法の有効性、汎用性を更に明らかにするため、チアベンダゾール（TBZ）を対象に検討を行った。

#### A-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。

#### A-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（次亜 Na）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。また、近年、新たな殺菌料として希塩酸や食塩を電気分解することで次亜塩素酸を主成分した殺菌液を生成する装置が次亜塩素酸水

として食品添加物に認可され、徐々に普及し始めている。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、消毒副生成物のハロアセトニトリル（HAN）及び抱水クロラール（CH）に着目し、GC/MS を用いての食品中の残存量の調査を行い、殺菌処理された食品由来の HAN 及び CH 暴露量の推計を行った。

#### B. 研究方法

##### B-1 食品添加物の規格の向上及び使用実態に関する研究

###### 1) アルギン酸の定量法に関する研究

###### (1) 蒸留法

第8版食品添加物公定書 成分規格・保存基準各条 アルギン酸の定量法及びUSP General Tests and Assays <311> Alginates Assayに従い、アルギン酸、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸カルシウム及びアルギン酸ナトリウムの定量を行った。

###### (2) 比色法

カルバゾール硫酸法、オルシンFe<sup>3+</sup>塩酸法及びナフトレゾルシノール法による比色定量を行った。

###### (3) アルギン酸塩類の加水分解

アルギン酸塩類100 mgを0.05 mol/L炭酸水素ナトリウム溶液50 mLに溶解し、水を加え100 mLとした。この液10 mLに2.5 mol/Lトリフルオロ酢酸溶液20 mLを加え、100°Cで6時間加熱した。

###### 2) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

調査法 アンケート方式

調査対象年度 平成22年(2010年)度(平成22年4月～平成23年3月)

調査対象 指定添加物413品目

調査内容 製造及び輸入した品目名、製造量、輸入量、食品向け出荷量、輸出货量、食品以外の用途向け出荷量、総出荷量

調査対象業者 食品添加物製造（輸入）業者

###### 3) 香料化合物の使用量調査及び摂取量に関わる調査研究

昨年度に作成した使用量調査票を使い、平成22年(2010年)1月～12月に国内で食品香料製造に使用した食品香料化合物の量について、食品香料製造会社145社を対象に調査を行い、内容・数量等を精査した後、使用量を集計し摂取量を算出した。また、本調査結果と前回及び前々回の調査結果を比較、検討した。

#### 4) 諸外国の香料規制に関わる調査研究

香料製品の製造化に使用される副剤及び天然香料の製造における抽出溶媒に関する規制について、調査を行った。法令資料は当該国・地域の政府及び関係機関、FAOの法規データベース、独立行政法人日本貿易振興機構のWeb siteを参照した。

### B-2 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

香料化合物45品目について、液膜法、薄膜法、または、ペースト法によりIRを測定した。

JASCO FT/IR-4100 (日本分光社製) を用い、分解能 $4\text{ cm}^{-1}$  (32回繰り返し)、測定領域 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ で行なった。液膜法、薄膜法及び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 $5\text{ mm}$ のKBr板を窓板として使用した。なお、対照にはこのKBr板を使用した。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 $4\text{ cm}^{-1}$  (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。

### B-3 NMR を用いた食品添加物定量法の開発

#### 1) TBZ の NMR スペクトル分析

$10\text{ mg/g}$  TBZ/DMSO- $d_6$ 溶液につき、各種NMR測定を行った。

#### 2) qHNMR 法による TBZ の定量

##### (1) TBZ 含量の測定

TBZ 標準物質約  $13\text{ mg}$  を精密に量りとり、

qHNMR 標準溶液 ( $0.201\text{ mg/g}$  DSS- $d_6$ /DMSO- $d_6$ 溶液)約  $1.0\text{ g}$  に溶解し、qHNMR 測定を行った。DSS- $d_6$  のシグナル面積強度を  $9.000$  としたときの TBZ に由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度、分子量、濃度等を下記の式に代入し、TBZ 含量 ( $C_{\text{TBZ}}$ , %) を算出した。

$$C_{\text{TBZ}} = \frac{I_{\text{TBZ}}/H_{\text{TBZ}}}{I_{\text{DSS}}/H_{\text{DSS}}} \times \frac{M_{\text{TBZ}}/W_{\text{TBZ}}}{M_{\text{DSS}}/C_{\text{DSS}}} \times 100$$

ただし、 $I_{\text{TBZ}}$ 、 $I_{\text{DSS}}=\text{TBZ}$  及び DSS- $d_6$  のシグナル面積強度 ( $\text{DSS-}d_6 : 9.000$ )、 $H_{\text{TBZ}}$ 、 $H_{\text{DSS}}=\text{TBZ}$  及び DSS- $d_6$  の特定基の水素数 ( $\text{DSS-}d_6:\text{CH}_3\times 3=9$ )、 $M_{\text{TBZ}}$ 、 $M_{\text{DSS}}=\text{TBZ}$  及び DSS- $d_6$  の分子量 ( $\text{TBZ} : 201.25$ 、 $\text{DSS-}d_6 : 224.36$ )、 $W_{\text{TBZ}}=\text{TBZ}$  濃度 ( $\text{mg/g}$ )、 $C_{\text{DSS}}=\text{DSS-}d_6$  濃度 ( $0.201\text{ mg/g}$ )。

#### (2) qHNMR 測定条件及びデータの解析

qHNMR 測定の基本条件を表1に示した。

表1 qHNMR 測定条件

Spectrometer	JEOL JNM-ECA600
Probe	5 mm broadband autotune probe
Spectral width	20 ppm (-5-15 ppm)
Auto filter	on (eight times)
Acquisition time	4 s
Flip angle	$90^\circ$
Pulse delay	$60\text{ s} (>5\times T_1)$
Scan times	8
Spining	off
$^{13}\text{C}$ decoupling	multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)
Probe temperature	$28^\circ\text{C}$

データの解析には、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 Alice 2 for qNMR (日本電子(株)製)を用いた。

### B-4 香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究

#### 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 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。

#### 2) フラクチュエーションAmes試験(FAT)

わが国独自の香料化合物 43 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 で段階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 を行った。

## B-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

試料 (細切した野菜類、鶏肉及び豆腐) 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 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 (次亜 Na) 溶液 20 mL に浸し、室温で 10 分間殺菌処理を行った。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た後、バイアル瓶に試料を採取し、塩化ナトリウム 8g を加えて溶かし、0.1µg/mL 内部標準液を含む MTBE 5 mL を加え、5 分間激しく振りまぜ 3,000rpm で 5 分間遠心分離した後、MTBE 層を分取し硫酸ナトリウムで脱水した後、GC/MS 用試験液とし、ハロアセトニリル (HAN) 及び抱水クロラル (CH) 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 µg/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。

(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. 研究結果及び考察

### C-1 食品添加物の規格の向上及び使用実態に関する研究

#### 1) アルギン酸の定量法に関する研究

##### (1) 蒸留法

公定法及び USP 法でアルギン酸類の定量を行ったところ、USP 法の結果は公定法での結果より若干低かった。USP 法で、蒸留時間を公定法と同じ 3 時間としたところ、いずれのアルギン酸塩類

についても、2 時間煮沸した時よりも 0.8~4.6% 高くなり、蒸留時間が含量に影響することが明らかとなった。

##### (2) 比色法

ナフトレゾルシノール法では、他の 2 法に比べ、ウロン酸間の発色の差が小さかったことから、ガラクトン酸を標準品としてナフトレゾルシノール法により各アルギン酸類の定量を行ったが蒸留法による定量値よりも低かった。比色法を定量法とするためには、アルギン酸塩類の加水分解条件の検討等が必要であると考えられた。

##### (3) HPLC 法

HPLC による定量法については、アルギン酸塩類の酸等による加水分解において、加水分解生成物が不溶化し、完全な加水分解に到らなかった。マンヌロン酸及びグルロン酸を標準品として定量が可能と推測されたが、多量のアルギン酸塩類を単糖であるグルロン酸及びマンヌロン酸まで加水分解する条件の設定には、加水分解時間や温度、酸の濃度の条件等、より詳細な検討が必要であると考えられた。

#### 2) 生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関する研究

第 10 回調査の初年度にあたり、平成 22 年度を調査対象に全国 701 カ所の会社・事業所に調査票を発送した。調査票の見直しを図った結果、前回 (63.4%) の水準を大きく上回る回収数 (502, 回収率 71.6%) が得られた。回収された調査票をもとにデータをコンピュータ入力し集計を行った。

#### 3) 食品香料化合物の使用量調査及び摂取量に関する調査研究

本調査では日本の食品香料製造会社全体の食品香料年間販売数量 (平成 22 年 1 月~12 月) の 98.8% を占める 86 社から有効回答が得られたことから、本調査結果は国内における食品香料化合物の使用実態を十分に反映していると考えられる。平成 22 年中に我が国で使用された食品香料化合物の総数は 2045 品目で、前回 (平成 17 年) の 2155 品目より、110 品目減少したが、年間総使用量は約 1264t (前回: 1216t) であった。また、個別指定、類

指定品目，上位2品目，25品目の総使用量に対する占有率は前回の調査ときわめて近い結果となり，大局的にみればこれらの品目別にみた使用量の内訳には大きな変化はなかったとすることができる。

#### 4) 諸外国の香料規制に関わる調査研究

香料製造に関する規制の根拠法令等，副剤の定義，香料製剤に使用できる副剤，食品香料製造に使用できる抽出溶媒について，22の国と地域の情報を得ることができた。香料の副剤の定義として，Codexの定義を取り入れたと思われる国や地域がある一方，副剤が抽出溶媒を指している国や食品や食品添加物がその機能を発揮しない範囲で使用できると考えられる国，溶剤等香料製剤に使用可能な品目，使用禁止品目が示されている国や地域があった。食品香料製造に使用できる抽出溶媒及び残留規制については，国によって使用できる抽出溶媒が異なり，規制の方法が異なるため，注意が必要である。

### C-2 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

#### 1) 食品添加物の測定法，測定条件及び標準 IR の確立に関する検討

食品添加物公定書で確認試験として IR が設定されていない香料化合物 45 品目について，IR の測定法などを検討した結果，いずれの品目に関しても，再現性の良い IR を得る測定法を確立することができた。アントラニル酸メチル，ケイ皮酸メチル，シンナミルアルコール，ピペロナル，*d*lメントール，*l*メントールは，いずれも融点が常温に近く，測定環境温度によって固体と液体の状態を取り得るため，ペースト法，液膜法及び薄膜法を検討した。その結果，加温融解させた状態で液膜法で測定すれば，環境温度の影響を受けず，簡便に再現性のある IR を得られることを明らかにした。

#### 2) ATR法の確認試験への利用の可能性の検討

近年普及しつつある ATR 法の確認試験への利用の可能性についても検討した結果，ATR 法でも，液体状と固体状の相状態の違いを区別できるもの

の，ATR 法で得られる IR と従来法で測定した IR は一致せず，既存の参照 IR との比較では試料の確認は困難であり，ATR 同士での比較が必要であることを明らかにした。また，ATR 法は，原理的に光路長が短いため，試料厚さの影響を受けず，その特性はプリズムと隙間の生じない液体試料において，最大限に発揮されるため，液体試料での再現性は非常に優れていた。さらに，コルチゾン酢酸エステルを用いた検討から，ATR 法は，結晶多形を区別することも可能な有用な測定法であることを明らかにした。よって，このような有用性を持つ ATR 法は確認試験に活用すべきであると考えられる。そのためには，ATR 同士での比較が必須であり，ATR 法を食品添加物への確認試験に利用するためには，その測定条件や試料の状態を規定するなど，ATR 法での標準 IR の確立に向け，準備を始める必要があると考えられる。

### C-3 NMR を用いた食品添加物定量法の開発

TBZ について  $^1\text{H}$  NMR， $^{13}\text{C}$  NMR 及び各種 2 次元 NMR スペクトルの詳細な解析により，各水素シグナルを帰属した。得られたスペクトルパターン情報を基に，qHNMR 法による TBZ 含量の測定を行った。定量用シグナルとして， $\delta_{\text{H}}$  8.48 及び  $\delta_{\text{H}}$  9.37 を用い，qHNMR 法の直線性について検討した結果，両シグナルともに 0.31～20 mg/g の範囲で  $R^2=1$  の良好な直線性が得られた。さらに，真度及び精度の評価を行い， $\delta_{\text{H}}$  8.48 及び  $\delta_{\text{H}}$  9.37 のシグナルを定量に用いた場合，0.31～20 mg/g の範囲において精確な定量分析が可能であることが判明した。TBZ の定量下限は，測定濃度と実測値の相対誤差及び併行精度がともに 1%以下を示す最小濃度とし，この条件を満たす最小濃度は 0.31 mg/g であったことから，本法の定量下限を 0.31 mg/g とした。

### C-4 香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究

#### 1) SAR

わが国独自の食品香料について，JECFA の構造グループ番号のあるものを 1774 物質，抽出した。

その中から、JECFA評価で遺伝毒性データのないものを抽出し、前出の3つのソフトウェアでSARを実施した。SARの結果がいずれも陰性で年間（平成18年）使用量 1 g以上のものは約200物質であり、そられについて、LUMO（Lowest Unoccupied Molecular Orbital；最低空軌道）を計算した。

OECD\_QSAR\_ToolBox に変異原性データがあった物質を除外し、JECFA の構造グループを基準に、1 グループの中に 1-2 物質しかないグループを選定した。1 グループの中に 3 物質以上ある場合、LUMO 値の小さい方から 2 物質を選定し、合計 39 物質が選ばれた。

## 2) FAT

SAR の予測結果が陰性だった 43 物質についての FAT の結果は、40 物質が総合判定陰性で、陽性になったのは 3 物質であった。今回は SAR 陰性判定の物質のみを FAT の対象としたため、一致率（精度）のみ算出され、93%であった。一般的な化学物質についての DEREK 及び MCase の精度が 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同等であったことになる。

以上を踏まえ、最終年度はこれまでに得られた変異原性試験の結果に基づき、予測結果を検証し、試験化合物の予測性向上のための部分構造アラートの構築を検討する。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。

## C-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

### 1) 生鮮食品類の次亜 Na 殺菌処理及び水洗浄処理後の HAN 及び CH 残存量の調査

生鮮野菜（葉菜類、根菜類及び豆類等、計 8 種類の野菜）、魚介類（豆アジ、エビ、カキ）、鶏肉を 100 µg/L 次亜 Na 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の食品中の HAN 及び CH 残存量を調べた。モノクロロアセトニトリル、トリクロロアセトニ

トリル、モノプロモアセトニトリル、ブロモクロロアセトニトリル、ジプロモアセトニトリルは全ての対象試料において殺菌処理による生成はみられなかった。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ジクロロアセトニトリル（DCAN）及び CH が検出され（DCAN：nd～136.7ng/g、CH：nd～16.2ng/g）、流水洗浄により減少した（DCAN：nd～20.6ng/g、CH：nd～13.8ng/g）。

魚介類の豆アジは殺菌処理後 18.3ng/g の DCAN 及び 19.2ng/g の CH が検出され、水洗浄後それぞれ、検出下限値以下及び 10.6ng/g に減少した。エビ及びカキは殺菌及び水洗浄後、DCAN 及び CH は検出されなかった。次亜 Na による殺菌処理では残留塩素の除去のため水洗浄が一般に行われており、残存する DCAN の除去にも水洗浄が有効であることが確認できた。

鶏肉は殺菌処理及びオープン加熱処理後、DCAN 及び CH は検出されなかった。

豆腐については 10 µg/mL の次亜 Na を用い、生鮮野菜等と同様に処理し、HAN 及び CH 量を調べたが、いずれも定量下限値以下であった。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、HAN 及び CH は検出されなかった。

### 2) カット野菜の次亜塩素酸水殺菌処理による HAN 及び CH 生成能の検討

次亜塩素酸水（強酸性次亜塩素酸水及び微酸性次亜塩素酸水）によりカット野菜を殺菌処理したときの HAN 及び CH の生成能を調査した。次亜塩素酸水で殺菌及び水洗浄処理した場合は HAN 及び CH は生成せず、食品への残存は見られなかった。次亜塩素酸水は、塩素濃度が低いため、試料との塩素化反応の進行が低く抑えられていると考えられる。

### 3) 食品由来の DCAN 及び CH 暴露量の推定

次亜 Na で殺菌処理したときに、殺菌処理洗浄後にカット野菜に残存した DCAN 及び CH の経口暴露量の推計を行った結果、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は、

DCANは3.9 µg/日/人、CHは4.5 µg/日/人となった。水道水質基準ではDCANのTDIを8 µg/kg/日としており、TDIに対する生鮮食品由来の経口暴露量の寄与率は1.0%であった。一方、CHのTDIは5.3 µg/kg 体重/日であり、CHのTDIに対する生鮮食品由来の経口暴露量の寄与率は1.7%となった。いずれも、水道水水質基準の算定目安となるTDIへの寄与率20%に比べて十分に低い値であった。

#### D. 結論

##### D-1 食品添加物の規格の向上及び使用実態に関する研究

アルギン酸塩類の蒸留法による定量法については、USP法を準用することで公定法と同程度の定量結果が得られ、現在の公定法よりも簡便な定量法として有用な方法であると考えられた。

生産量統計を基にした指定添加物の摂取量の推定では、第10回調査の初年度として、基礎的な情報を得た。

食品香料化合物の使用量調査及び摂取量に関する調査研究では、平成13年、17年の調査に続き、日米欧3極同時の使用量調査という目的を伴った第3回の使用量実態調査を実施した。この使用量を基に各食品香料化合物の摂取量を推定することによって我が国において食品香料化合物が安全に使用されている実態を把握できた。

諸外国の香料規制に関わる調査研究では、諸外国の副剤に関する定義及び規制について調査・研究を行い、22の国及び地域について情報を収集することができた。副剤を明確に定義しているのはインドネシア、中国、メルコスールの3つの国及び地域であった。また、天然香料の抽出溶媒は特に規定されていない国が多いが、規定されている場合、国によって使用可能な溶媒、残留規制方法が異なることもあるため、注意が必要である。

##### D-2 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

食品添加物公定書で確認試験にIRが設定されていない香料化合物45品目について、測定法や測

定条件に検討を加え、標準IR及びその測定法を定めることができ、規格基準の向上に寄与できたと考えられる。さらに、近年普及しつつあるATR法の確認試験への利用の可能性を検討した。その結果、ATR法で得られるIRと既存の参照IRとの比較での試料の確認は、困難であったが、その一方で、ATR法は、再現性に優れ、結晶多形の区別も可能であるといった点で有用であった。従って、これらの利点を持つATR法を活用するためには、ATR同士での比較が必須であり、ATR法を添加物への確認試験に利用するためには、その測定条件を確立し、ATR法での標準IRの確立が必要であると結論した。

##### D-3 NMRを用いた食品添加物定量法の開発

食品添加物の規格試験法の精度向上を目指して、qHNMR法によるTBZの絶対定量に関する検討を行った。本法は良好な真度、併行精度、直線性を有し、TBZの絶対定量に有効な分析法であることが判明した。本結果は、TBZの定量分析の精確さ及び信頼性を更に向上させる知見であり、将来的な定量用標準物質や食品添加物製品の規格試験法への本法の適用へ向けた基礎的データが得られたものとする。

##### D-4 香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究

我が国独自の食品香料の中から、JECFAでの遺伝毒性試験結果のない化合物を中心に43検体を選んで簡易遺伝毒性試験を行い、SARを用いた類似構造解析との相関を調べた。一致率が93%だったことから、SARで一時スクリーニングをかけ、陽性になったものについてAmes試験を実施するという手順が、効率が良いと推察された。

##### D-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

各種生鮮食品を次亜Naにより殺菌処理したとき、DCAN又はCHが生成し、野菜の種類によって、これら化合物生成能に違いがみられたが、殺菌処理後の流水洗浄処理で残存量は減少し、水洗浄が消毒副生成物の除去に有効であることが確かめられた。

また、次亜Naの代替として、次亜塩素酸水で殺

菌処理したところ、何れの消毒副生成物も検出されず、次亜Naとは異なる挙動を示すことが明らかとなった。

さらに、今回の調査結果により得られた残存量を基に、生鮮食品由来のDCAN及びCHの経口暴露量を推計したところ、DCAN及びCHのTDIに対する寄与率は、それぞれ1.0%及び1.7%であり、次亜Na殺菌処理された食品由来の経口暴露量は低いことが確かめられた。

次亜Na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行うことが必要と考えられる。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 久保田浩樹, 佐藤恭子, 佐々木伸大, 河村葉子, 小関良宏, 穂山浩: 日本食品化学学会誌 (2012) In press

##### 2. 学会発表

- 1) 建部千絵, 鐘熙寧, 大槻崇, 久保田浩樹, 佐藤恭子, 穂山浩「アルギン酸塩類の定量」第25回キチン・キトサンシンポジウム, 奈良 (2011.8)

- 2) 北村陽二, 佐藤恭子, 小阪孝史, 小川数馬, 鶴野いずみ, 道関美祐希, 三輪大輔, 斎藤寛, 柴和弘: 食品添加物の赤外スペクトル測定におけるATR法の適用に関する検討, 日本薬学会 第132年会, 札幌 (2012.3)
- 3) 古庄紀子, 大槻崇, 建部千絵, 佐藤恭子, 穂山浩, 河村葉子: チアベンダゾールの定量法の検討, 第102回日本食品衛生学会学術講演会, 秋田(2011.9)
- 4) 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦: 次世代シーケンサーを用いた大腸菌ミューテーター株ゲノムに蓄積する突然変異の解析, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜 (2011.12)
- 5) 堀妃佐子, 下吉里実, 藤居互, 増村健一, 山田雅巳: F344系統 *gpt*delta ラットを用いた突然変異試験と末梢血小核試験の統合法の検討, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 6) 高木久宜, 野崎祐次, 河田昭彦, 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦: F344系 *gpt*delta ラットの6ヶ月飼育試験による背景データの取得, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 7) 須井哉, 川上久美子, 奥富弘子, 山田雅巳, 能美健彦: ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討7, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)

#### G. 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（食品の安全確保推進研究事業）

平成23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

第8版食品添加物公定書のアルギン酸塩類の定量法には、水銀バルブを用いた装置による蒸留法が設定されていることから、有害物質を排除した定量法が求められている。そこで、蒸留法、比色法及びHPLC法の3種類の定量法について検討した。蒸留法を用いた定量法については、United States Pharmacopeia（米国薬局方，USP）のアルギン酸の定量の採用されている水銀バルブ不使用の装置を用いることにより、公定法とほぼ同程度の定量結果を得ることができた。また、比色法による定量法については、ウロン酸間の発色の差が小さいレゾルシノール法が有用な方法と考えられたが、単糖であるウロン酸と高分子のアルギン酸塩類では発色が異なる傾向が見られ、標準品の設定が定量値に影響を及ぼすことが示唆された。HPLC法による定量法については、アルギン酸塩類の完全加水分解の条件検討が必要であると考えられた。

生産量統計を基にした指定添加物の摂取量の推定：第10回調査として、我が国における指定添加物についてその製造・輸入事業者を対象に平成22（2010）年度（平成22年4月～平成23年3月）の取扱量についてアンケート調査を行い集計化した。

香料化合物の使用量調査及び摂取量に関わる調査研究：日米欧同時の使用量実態調査として、平成22（2010）年（平成22年1月～12月）の食品香料化合物の使用量調査を実施し、国内での使用量を把握するとともに、推定摂取量を明らかにした。

諸外国の香料規制に関わる調査研究：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、諸外国の香料規制を調査する必要がある。本年度はこのうち、副剤に関する定義及び規制について調査・研究を行い、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

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

### A-1 アルギン酸の定量法に関する研究

日本では食品添加物の品質を保持するために、食品添加物公定書において様々な規格が設定されている。それらの規格試験法には科学技術の進歩に伴った精度の高い試験法の採用や国際的な整合化が望まれている。食品添加物公定書<sup>1)</sup>では、アルギン酸類の定量法として、構成糖であるウロン酸のカルボン酸から遊離させた二酸化炭素を水酸化ナトリウム溶液に吸収させ、残った水酸化ナトリウムを塩酸で逆滴定する方法が採用されている(公定法)。しかし、その公定法に採用される装置は水銀バルブが使用された非常に煩雑な構造を有した装置であり (Fig. 1 a)), より安全に試験を実施するために、水銀バルブの除去が望まれている。一方、United States Pharmacopeia (米国薬局方, USP) におけるアルギン酸類の定量法では同様の原理で定量を行うが、水銀バルブを用いない装置で定量している (Fig. 1 b))。そこで本研究では、USPで使用されている装置による蒸留法の適用性を調べるために、公定法との比較検討を行い、更に比色及びHPLCによる定量法についても検討を行った。

### A-2 生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関する研究

指定添加物にあつては品目ごとに原則としてその許容一日摂取量 (ADI) が検討評価されており、行政上各添加物の日本人1人1日実摂取量の把握が求められている。食品添加物の摂取量を推定するため、今年度は、食品添加物の生産・輸入業者にアンケート調査を行い、集計化を行った。

### A-3 食品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年中の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、食品香料化合物について使用量実態調査を実施し、国内での使用量を把握するとともに、推定摂取量を明らかにした。

### A-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、各国の香料規制を調査する必要がある。本年度は解決すべき課題のうち、副剤に関する定義及び規制について調査・研究を行った。

なお、生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関わる研究(日本食品添加物協会)、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及び諸外国の香料規制に関わる調査研究(日本香料工業会)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

### B-1 アルギン酸の定量法に関する研究

#### 1) 試料

アルギン酸、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸カルシウム、アルギン酸ナトリウムは食品添加物規格のものを用いた。

#### 2) 試薬・試液

##### (1) 試薬

0.1 mol/L塩酸、0.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液は和光純薬工業(株)製容量分析用を、塩酸は和光純薬工業(株)製ヒ素分析用、塩化バリウム二水和物、フタル酸水素カリウム及びフェノールフタレインは和光純薬工業(株)製特級を、亜鉛は小宗化学薬品

株製ヒ素分析用を、グラスウールは日本石英ガラス株製を、D-Galacturonic acid sodium salt及びD-(+)-Galacturonic acid monohydrateはFluka社製を、D-Glucuronic acid monohydrate及びD-(+)-Glucuronic acid- $\gamma$ -LactoneはAldrich社製を、D-Glucuronic acid Lactoneは東京化成株製を、その他は試薬特級を用いた。

なお、蒸留法には新たに煮沸し冷却した水又は窒素で15分以上パージした水を用いた。

### (2) 試液等

- ①フェノールフタレイン試液：フェノールフタレイン1 gを量り、エタノール100 mLを加えて溶かした。
- ②0.25 mol/L水酸化ナトリウム溶液：0.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液 500 mLを新たに煮沸し冷却した水で1 Lとし、使用時に標定して用いた。標定：フタル酸水素カリウムを粉末とし、100°Cで3 時間乾燥し、その約1 gを精密に量り、水40 mLを加えて溶かし、水酸化ナトリウム溶液で滴定した(指示薬フェノールフタレイン試液2 滴)。
- ③0.025 mol/L四ホウ酸水素ナトリウム硫酸溶液：四ホウ酸水素ナトリウム0.95 gを濃硫酸100 mLに溶解した。
- ④カルバゾール液：カルバゾール125 mgをメタノール100 mLに溶解した。
- ⑤鉄試薬：塩化第二鉄(FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O)78mgを濃塩酸100 mLに溶解した。
- ⑥オルシン試液：オルシン1.0 gをエタノール(95) 100 mLに溶解した。要時調製した。
- ⑦銅-塩酸試液：濃塩酸40 mLに2.5%硫酸銅溶液 1 mL及び水9 mLを加えた。
- ⑧ナフトレゾルシノール試液：1,3-ジヒドロキシナフタレン100 mgを使用直前に水25 mLに溶解し水を加えて100 mLとした。

### 3) 器具・装置

第8版食品添加物公定書アルギン酸定量用蒸留装置は特注品を、USPアルギン酸定量用蒸留装置は6546,ACE GLASS社製を用いた。

### 4) 操作法

#### (1) 蒸留法によるアルギン酸の定量 (公定法)

Fig.1 a)に示す装置を用いて、以下の通り試験した。試料を105°Cで4時間乾燥し、放冷後、その約0.25 gを精密に量り、反応フラスコDに入れ、0.1 mol/L塩酸25 mLと数個の沸石を入れて還流冷却器Fに接続した。接続部をリン酸でぬらし、ストップコックMから空気を圧送して水銀バルブBの水銀を管内に約5 cm上昇させてストップコックMを閉じ、1~2分間水銀面が下がらないことを確かめた。二酸化炭素を除いた空気を1時間に3~6Lの流量で吸引しながら装置内に流し、マントルヒーターEで加熱し、試料を穏やかに3分間煮沸した。その後、試料を15分間放冷し、滴下管Gに塩酸23 mLを入れ、吸接管Jを外して速やかに0.25 mol/L水酸化ナトリウム溶液25 mLを正確に加え、1-ブタノール5滴を加え、吸接管Jを再び接続した。二酸化炭素を除いた空気を1時間に約2 Lの流量で吸引しながら装置内に流し、塩酸を滴下管Gから反応フラスコDに加え、マントルヒーターEで加熱し、試料を3時間煮沸した。次に、加熱と吸引を止め、吸接管J内の0.25 mol/L水酸化ナトリウム溶液をストップコックMから空気圧でゆっくりフラスコKに入れ、吸接管J内は水15 mLずつで3回洗い、それぞれの洗液を空気圧でフラスコKに入れた。フラスコKを外し、10w/v%塩化バリウム溶液10 mLを加えて、栓をして約2分間ゆるやかに振り混ぜ、フェノールフタレイン試液2滴を加え、0.1mol/L塩酸で滴定し、別に空試験を行った。

以下に示す、0.25 mol/L水酸化ナトリウム溶液1 mL当たりの当量用いて、計算し、含量を算出した。

アルギン酸：25.00 mg

アルギン酸アンモニウム：27.12 mg

アルギン酸カリウム：29.75 mg

アルギン酸カルシウム：27.38 mg

アルギン酸ナトリウム：27.75 mg

#### (2) 蒸留法によるアルギン酸の定量 (USP法)

Fig.1 b)に示す装置を用いて、以下の通り試験した。試料約0.25 gを精密に量り、反応フラスコDに入れ、0.1 mol/L塩酸50 mLと沸石を入れて還流

冷却器Fに接続し、反応フラスコDに窒素を接続し、マントルヒーターEで加熱し、試料を2分間煮沸する。試料を10分間放冷後、吸収管Jを接続し、窒素流量を90～100 mL/分で5分間流し吸収管J内をパージ後、窒素流量を60～65 mL/分にして、吸収管Jに1-ブタノールを10滴及び0.25 mol/L水酸化ナトリウム溶液25 mLを加え、水50 mLで洗いこみ、蓋をした。反応フラスコDに塩酸46 mLを加え窒素を接続し、マントルヒーターEで加熱し、試料を2時間煮沸した後、加熱を止め、窒素流量を90～100 mL/分にして、10分間放冷した。吸収管Jを取り外し、吸収管へ10%塩化バリウム溶液10 mL及び攪拌子を直ちに加えて、栓をして攪拌子でゆっくりと1分間攪拌後、フェノールフタレイン試液3滴を加え、0.1 mol/L塩酸で滴定し、別に空試験を行った。

なお、試料はあらかじめ乾燥減量を測定し（乾燥条件：105℃、4時間）、その値を用いて試料量を乾燥物換算し、以下に示す、0.25 mol/L水酸化ナトリウム溶液1 mL当たりの当量用いて、含量を算出した。

アルギン酸：25.00 mg

アルギン酸アンモニウム：27.12 mg

アルギン酸カリウム：29.75 mg

アルギン酸カルシウム：27.38 mg

アルギン酸ナトリウム：27.75 mg

### (3) 比色法によるアルギン酸の定量

#### ①試料液の調製

ウロン酸をそれぞれ100 mg精密に量り、水で100 mLとし、1 mL中にウロン酸が10～40 µg含むように正確に水で希釈し、試料液とした。

#### ②カルバゾール硫酸法<sup>2)</sup>

氷冷した0.025 mol/L四ホウ酸水素ナトリウム2.5 mLを試験管にとり、試料液0.5 mLをその上に静かに加えた。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。ガラス玉をして沸騰湯浴中に10分間保ち、水冷して室温とし、カルバゾール液0.1 mLを加えて混和後、沸騰湯浴中に15分間保ち発色させた。室温まで水冷して、530 nmで比色定量した。

#### ③オルシンFe<sup>3+</sup>塩酸法<sup>\*2</sup>

試料液1.0 mLに鉄試液約1.0 mL及びオルシン試液1.0 mLを加え、ガラス玉を蓋として、沸騰水浴中に20分間保ち、水冷して、エタノール(95)を加えて一定容として、660 nmで比色定量した。

#### ④ナフトレゾルシノール法<sup>3)</sup>

試料液1 mLに銅-塩酸試液2 mL及びナフトレゾルシノール試液1 mLを加え、沸騰水浴中で65分間加熱した。氷水中で冷却後、酢酸ブチル4 mLを加え、よく振とうし、遠心分離し、酢酸ブチル層をメンブランフィルター（孔径0.45 µm）でろ過し、566 nmで比色定量した。

#### (4) アルギン酸塩類の加水分解<sup>4)</sup>

アルギン酸塩類100 mgを0.05 mol/L炭酸水素ナトリウム溶液50 mLに溶解し、水を加え100 mLとした。この液10 mLに2.5 mol/Lトリフルオロ酢酸溶液20 mLを加え、100℃で6時間加熱した。

## B-2 生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関わる研究

- 1) 調査法 アンケート方式（資料Ⅰ：送付調査資料一式）
- 2) 調査対象年度 平成22年(2010年)度（平成22年4月～平成23年3月）
- 3) 調査対象 指定添加物413品目
- 4) 調査内容 調査票Ⅰ：製造及び輸入した品目調査票Ⅱ：（調査事項Ⅰ）製造量及び輸入量、（調査事項Ⅱ）食品向け出荷量、輸出量及び食品以外の用途向け出荷量、総出荷量
- 5) 調査対象業者 食品添加物製造（輸入）業者

## B-3 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

昨年度に作成した使用量調査票を使い、平成22年(2010年)1月～12月に国内で食品香料製造に使用した食品香料化合物の量について、食品香料製造会社145社を対象に調査を行い、内容・数量等を精査した後、使用量を集計し摂取量を算出した。また、本調査結果と前回及び前々回の調査結果を比較、検討した。

## B-4 諸外国の香料規制に関わる調査研究

香料製品の製造化に使用される副剤及び天然香料の製造における抽出溶媒に関する規制について、調査を行った。法令資料は当該国・地域の政府及び関係機関、FAOの法規データベース、独立行政法人日本貿易振興機構のWeb siteを参照した。

## C. 研究結果

### C-1 アルギン酸の定量法に関する研究

#### 1) 蒸留法

公定法及びUSP法でアルギン酸類の定量を行ったところ(Table 1)、いずれの値も含量規格値内に収まる値であったが、USP法では91.2~97.3%となり公定法での結果より若干低かった。これらの原因として、USP法は公定法よりも蒸留時間が短いことが関係していると思われる。そこで、USP法で、蒸留時間を公定法と同じ3時間とし、アルギン酸塩類を定量したところ (USP改変法(3時間蒸留))、含量は92.0~98.2% となり、いずれのアルギン酸塩類についても、2時間煮沸した時よりも0.8~4.6%高くなった。

#### 2) 比色法

アルギン酸類の構成糖であるグルロン酸及びマンヌロン酸は試薬として入手困難であるため、他のウロン酸類を用いて比色法を検討した結果、ナフトレゾルシノール法では、他の2法に比べ、ウロン酸間の発色の差が小さかった(Fig. 2)。そこで、ガラクチュロン酸を標準品としてナフトレゾルシノール法によりアルギン酸類の定量を行ったところ、各アルギン酸塩類の含量は36~59%となり、公定法及びUSP法の含量値と一致しなかった。

#### 3) HPLC法

HPLCによる定量法については、昨年度単離精製したグルロン酸及びマンヌロン酸を標準品として定量するため、アルギン酸塩類の酸等による加水分解を試みたが、加水分解生成物が不溶物として残ってしまい、完全な加水分解に到らなかった。

### C-2 生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関わる研究

第10回調査の初年度にあたり、平成22年度を調査対象に全国701カ所の会社・事業所に調査票を発送した。回収数は502(回収率71.6%)で、前回(63.4%)の水準を大きく上回った。回収された調査票をもとにデータをコンピュータ入力し集計を行い下記の集計票を作成した。

集計1 用途別 食添名と全出荷量、純食品向け出荷量、輸出量調べ

集計2 食添名別 製造会社数、全出荷量、純食品向け出荷量、輸出量調べ

### C-3 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

本調査では日本の食品香料製造会社全体の食品香料年間販売数量(平成22年1月~12月)の98.8%を占める86社から有効回答が得られた。平成22年中に我が国で使用された食品香料化合物の総数は2045品目で、前回(平成17年)の2155品目より、110品目減少したが、年間総使用量は約1264t(前回:1216t)であった。このうち食品衛生法施行規則別表第1収載個別指定品目109品目の総使用量は約779t(総使用量の61.6%)、その他の18類品目の総数は1936品目、年間総使用量は約485t(38.4%)になることが明らかとなった。また、全食品香料化合物中ではバニリン、*l*-メントールの使用量が多く、この2品目で全体の24%を占めた。さらにこれらを含めた上位25品目の使用量は総使用量の約68%を占めた。

使用量から算出した推定摂取量からみると、2045品目の推定総摂取量は320,701 $\mu$ g/人/日、推定平均摂取量は157 $\mu$ g/人/日であったが、摂取量が100 $\mu$ g/人/日を超えるものは2045品目中175品目(8.6%)であり、JECFAの香料評価法判断樹において安全性に懸念なしと判断される摂取量1.5 $\mu$ g/人/日以下の品目数は1257品目(全品目数の61.5%)であった。

### C-4 諸外国の香料規制に関わる調査研究

香料製造に関する規制の根拠法令等、副剤の定義、香料製剤に使用できる副剤、食品香料製造に

使用できる抽出溶媒について、以下の国と地域の情報を得ることができた。

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、バングラディシュ、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）、南アフリカ共和国

## D. 考察

### D-1 アルギン酸の定量法に関する研究

アルギン酸塩類の蒸留法による定量については、蒸留時間が含量に影響することが明らかとなった。

比色法による定量法の検討では、他のウロン酸による定量の可能を検討したが、ナフトレゾルシノール法でウロン酸類での発色に差がみられなかったものの、ガラクトuron酸を標準品としてアルギン酸塩類を定量した値はアルギン酸塩類の蒸留法による定量値よりも低かった。この結果は、ガラクトuron酸が単糖であるのに対し、高分子のアルギン酸塩類は単糖にまで加水分解されず、オリゴ糖が含まれるため、発色が異なることが原因の一つと考えられた。また、構成糖と異なるウロン酸で定量したために発色が異なった可能性も原因と考えられ、比色法においては、標準品の設定が定量値に影響を及ぼすことが示唆された。より正確な比色法を行うためには、アルギン酸塩類を単糖となるまで加水分解できる条件の検討や、標準品として多糖類を用いる等、更なる検討が必要である。

また、HPLCによる定量法の検討では、マンヌロン酸及びグルロン酸を標準品として定量が可能と推測されたが、多量のアルギン酸塩類を単糖であるグルロン酸及びマンヌロン酸となるまで加水分解する条件の設定には、加水分解時間や温度、酸の濃度の条件等、より詳細な検討が必要である

と考えられた。

### D-2 生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関わる研究

今回の回収率は71.6%で、前回(63.4%)の水準を大きく上回った。今回は従来の調査票を抜本的に見直して、調査票回答者にとっての「分かり易さ」と「業務の効率化」が進展できるようにしたことにより、結果として第1次調査の高回答率に反映されたものと思われる。来年度実施する追調査により、最終的には90%の回収率を目指すとともに、データの精密化を目指す。

### D-3 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

本調査では日本の食品香料製造会社全体（日本香料工業会会員145社）の食品香料年間販売数量（平成22年1月～12月）の98.8%を占める86社（不使用回答9社を含む）から有効回答が得られた。前回同様、高い回答率が得られたことから、本調査結果は国内における食品香料化合物の使用実態を十分に反映していると考えられる。また、個別指定、類指定品目、上位2品目、25品目の総使用量に対する占有率は前回の調査ときわめて近い結果となり、大局的にみればこれらの品目別にみた使用量の内訳には大きな変化はなかったとすることができる。

### D-4 諸外国の香料規制に関わる調査研究

副剤を明確に定義しているのはインドネシア、中国、メルコスールであった。これらの国・地域での定義は基本的にCodexの定義と同じで、それぞれ自国の関係法令に取り入れたものと思われる。メキシコの副剤（Coaduyante）は、抽出溶媒を指すと考えられ、韓国では、香料の副剤に関する規定はなかったが、食品添加物製剤の規定があり、日本と同様に添加物及び食品がその機能を発揮しない範囲で使用できると考えられる。その他では、インド、シンガポール、タイ、台湾、カナダ、米合衆国、EUにおいては、溶剤等香料製剤に使

用可能な品目，使用禁止品目が示されていた。

食品香料製造に使用できる抽出溶媒及び残留規制については，国によって使用できる抽出溶媒が異なり，規制の方法が異なるため，注意が必要である。

## E. 結論

### E-1 アルギン酸の定量法に関する研究

アルギン酸塩類の蒸留法による定量法については，USP法を準用することで公定法と同程度の定量結果が得られ，現在の公定法よりも簡便な定量法として有用な方法であると考えられた。一方，比色法ではナフトレゾルシノール法がアルギン酸塩類の定量法として有用な比色法であると考えられたが，単糖であるウロン酸と高分子のアルギン酸塩類で発色が異なる傾向が見られたことから，標準品の設定が定量値に影響を及ぼす可能性が考えられた。また，HPLC法による定量法については，今回検討した条件では，アルギン酸塩類を完全な単糖（マンヌロン酸及びグルロン酸）となるまで，加水分解することが困難であったことから，更なる条件の検討が必要であると考えられた。

### E-2 生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関わる研究

生産量統計を基にした指定添加物の摂取量の推定では，第10回調査の初年度として，基礎的な情報を得た。今後は前回調査までと同様に，追加調査，及び査定ならびに摂取量推定へと段階的にまとめていく。

### E-3 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

平成13年，17年の調査に続き，日米欧3極同時の使用量調査という目的を伴った第3回の使用量実態調査を実施した。本研究では，過去の調査と

同様にその調査結果から食品衛生法施行規則別表第1収載の食品香料化合物について国内での使用実態を把握した。この使用量を基に各食品香料化合物の摂取量を推定することによって我が国において食品香料化合物が安全に使用されている実態を把握できた。

### E-4 諸外国の香料規制に関わる調査研究

諸外国の副剤に関する定義及び規制について調査・研究を行い，22の国及び地域について情報を収集することができた。副剤を明確に定義しているのはインドネシア，中国，メルコスールの3つの国及び地域であった。また，天然香料の抽出溶媒は特に規定されていない国が多いが，規定されている場合，国によって使用可能な溶媒，残留規制方法が異なることもあるため，注意が必要である。

## F. 研究発表

### 学会発表

建部千絵，鐘熙寧，大槻崇，久保田浩樹，佐藤恭子，穂山浩「アルギン酸塩類の定量」第25回キチン・キトサンシンポジウム，奈良(2011.8)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 参考文献

- 1) 厚生労働省：第8版食品添加物公定書(2007)
- 2) 福井作蔵：“還元糖の定量法 第2版”(1990) 学会出版センター
- 3) 川崎洋子ら：食品衛生学雑誌，39(5)，297-302 (1998)
- 4) Buranaosot et al. : *Carbohydrate Research*, 345, 1205-1210 (2010)

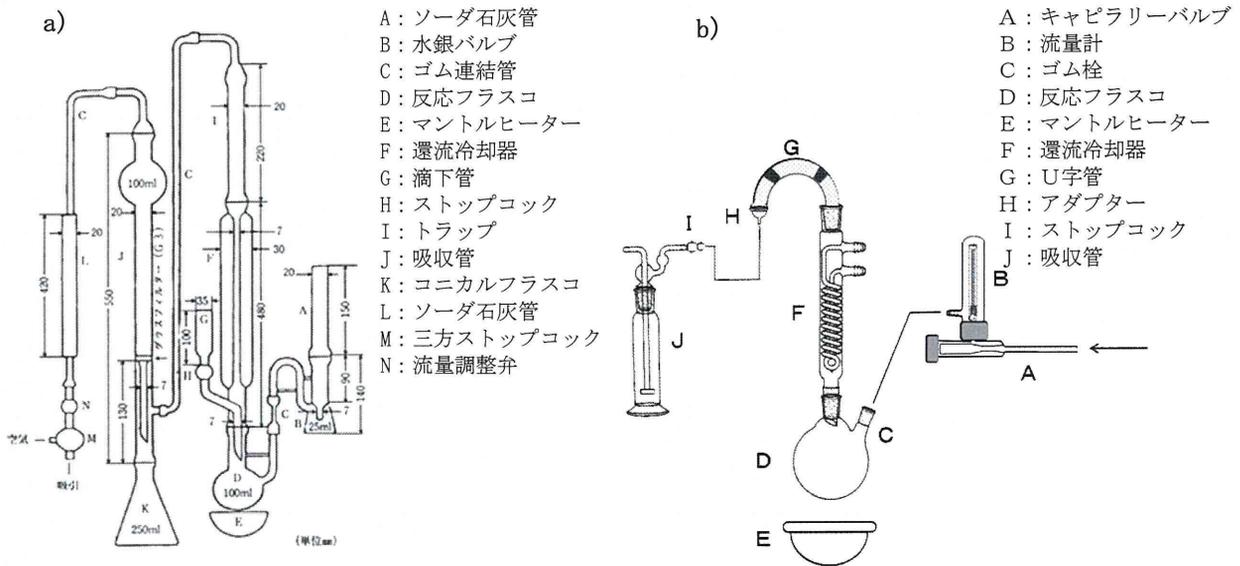


Fig. 1 アルギン酸類定量に用いられる蒸留装置  
 a) 公定法<sup>3)</sup>, b) USP法

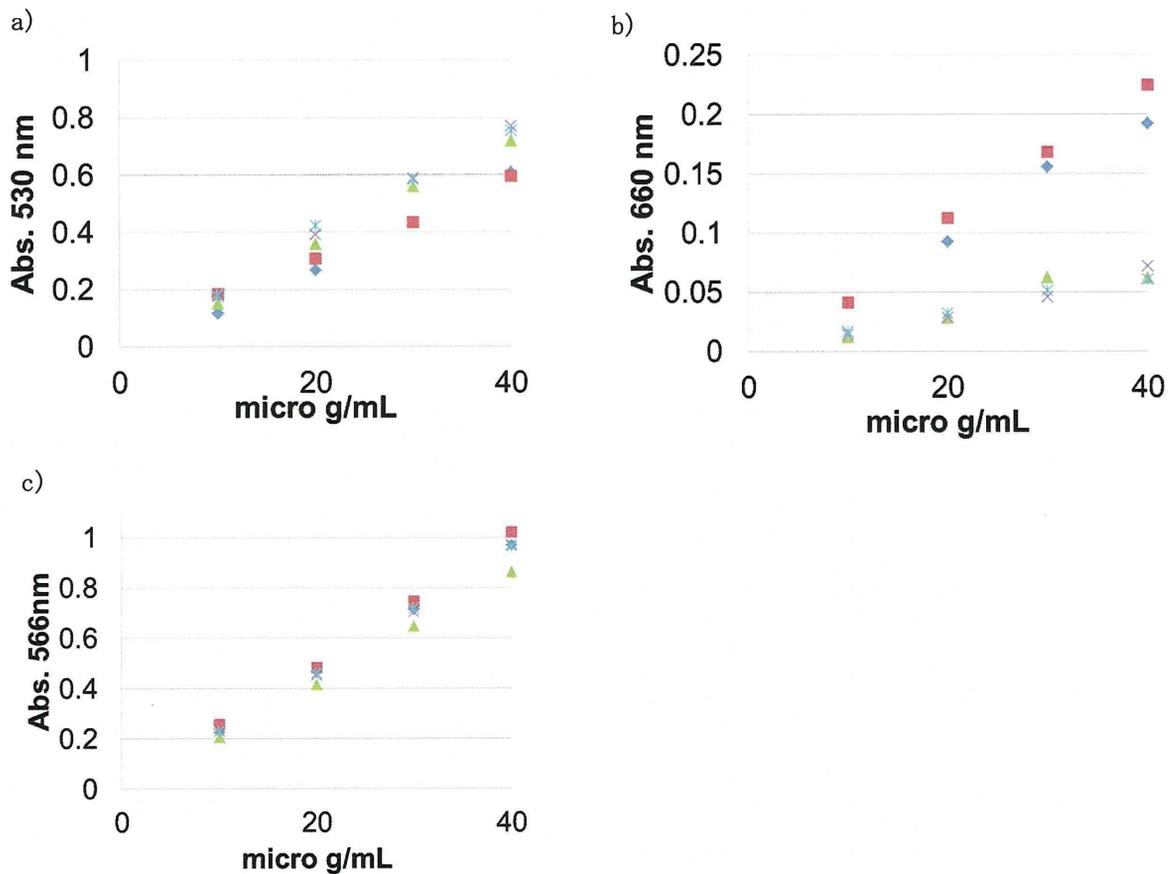


Fig. 2 様々な比色法によるウロン酸の検量線

a) カルバゾール硫酸法, b) オルシン鉄<sup>3+</sup>塩酸法, c) ナフトレゾルシノール法

◆: D-Galacturonic acid sodium salt, ▲: D-Glucuronic acid monohydrate,

\*: D-Glucuronic acid lactone, ■: D-(+)-Galacturonic acid monohydrate,

×: D-(+)-Glucuronic acid-γ-lactone