

B. 研究方法

1) 試薬

チアベンダゾール標準物質は、和光純薬製（食品添加物試験用，Code No.202-07761）を用いた．2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸- d_6 ナトリウム塩（DSS- d_6 ）認証標準物質は、和光純薬製（Code No.044-31671，Lot.No.DCP5376：純度 92.2%± 0.7%）を用いた．重ジメチルスルホキシド（DMSO- d_6 ）は Acros 製を用いた．その他の試薬はすべて市販の試薬特級品を用いた．

2) 装置

核磁気共鳴装置（NMR）：オートサンプラー付き JNM-ECA600（600 MHz）（日本電子（株）製）．

3) チアベンダゾールの NMR スペクトル分析（シグナルの帰属）

チアベンダゾール標準物質約 10 mg を量りとり，DMSO- d_6 約 1.0 g に溶解した．この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ，密閉し，各種 NMR 測定（ ^1H NMR， ^{13}C NMR， ^1H - ^1H COSY，HMQC，HMBC）を行った．

4) qHNMR 法によるチアベンダゾールの定量

4-1) qHNMR 標準溶液の調製

DSS- d_6 21.85 mg を精密に量り，DMSO- d_6 100 g を加え qHNMR 標準溶液とした（DSS- d_6 濃度：0.201 mg/g）．

4-2) チアベンダゾール含量の測定

チアベンダゾール標準物質約 13 mg を精密に量りとり，qHNMR 標準溶液約 1.0 g に溶解した．この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ，密閉し，qHNMR 測定を行った．DSS- d_6 のシグナル面積強度を 9.000 としたときのチアベンダゾール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，チアベンダゾール含量（ C_{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_{TBZ} ， I_{DSS} =チアベンダゾール及び DSS- d_6 のシグナル面積強度（DSS- d_6 ：9.000）， H_{TBZ} ， H_{DSS} =チアベンダゾール及び DSS- d_6 の特定基の水素数（DSS- d_6 : $\text{CH}_3 \times 3=9$ ）， M_{TBZ} ， M_{DSS} =チアベンダゾール及び DSS- d_6 の分子量（チアベンダゾール：201.25，DSS- d_6 ：224.36）， W_{TBZ} =チアベンダゾールの秤量濃度（mg/g）， C_{DSS} =DSS- d_6 濃度（0.201 mg/g）．

4-3) 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．なお，qHNMR の化学シフト値は，DSS- d_6 の水素シグナルを基準シグナル（ $\delta 0$ ）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．DSS- d_6 及び定量シグナルの積分範囲を設定した後，DSS- d_6 のシグナル面積強度を 9.000 としたときのチアベンダゾールに由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度等を上記 4-2) で示した計算式に代入し，チアベンダゾール含量を算出した．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 Alice 2 for qNMR（日本電子（株）製）を用いた．

C. 結果及び考察

1) チアベンダゾールの各水素シグナルの帰属
qHNMR 法による精密な定量には，試料に由来する NMR シグナルを帰属するとともに，各シグナルの S/N 比，各シグナル間または重溶媒中の水や残留プロトンのシグナルとの分離度合いなどを確認しなければならない．そこで，チアベンダゾールについて ^1H NMR 測定を行い，スペクトルパターン情報を収集した．その結果，図 1 に示した ^1H NMR スペクトルが得られた．また，本結果及び ^{13}C NMR，各種 2 次元 NMR（ ^1H - ^1H COSY，HMQC，HMBC）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（図 2）．

得られたスペクトルパターン情報を基に、次の検討を行った。

2) qHNMR 法によるチアベンダゾール含量の測定

qHNMR 法は、スペクトル上に観察される標準物質と測定対象物質のシグナル面積強度（積分値）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 にトレーサブルな標準物質を用いることにより、得られる定量値の信頼性が大幅に向上した方法と言える。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、チアベンダゾールについて qHNMR 測定を行った。なお、本法により得られた定量値の SI トレーサビリティーを確保するため、認証標準物質である DSS-d₆ を用いてチアベンダゾール標準物質中のチアベンダゾール含量を算出した。その結果、図 3 に示したように、 $\delta_{\text{H}} 7.24$ （水素数 2）、 $\delta_{\text{H}} 7.55-7.68$ （水素数 2）、 $\delta_{\text{H}} 8.48$ （水素数 1）及び $\delta_{\text{H}} 9.37$ （水素数 1）にチアベンダゾールに由来するシグナルがそれぞれ観察された。また表 2 に示したように、これらのシグナルより算出されたチアベンダゾール含量は 99.3~99.6%、相対標準偏差（RSD）は 0.1~0.3%であった。従って、各シグナルより得られるチアベンダゾールの含量値及び併行精度はほぼ同等であることが明らかとなった。しかし、これらのうち $\delta_{\text{H}} 7.24$ のシグナルは若干ブロードな形状を示し、また、 $\delta_{\text{H}} 7.55$ 及び 7.68 のシグナルは、シグナル間の分離が不十分であった。qHNMR では、形状がシャープで多重度が小さいシグナルを定量に用いることがより精確な定量に繋がると考えられている。また、このようなシグナルは、夾雑物のシグナルの影響も受けにくい。さらに、S/N が大きいシグナルを定量用シグナルとして選択することによって、より低い濃度（低い含量）での定量も可能となる。これらの点を鑑みると、 $\delta_{\text{H}} 7.24$ 、 $\delta_{\text{H}} 7.55$ 及び $\delta_{\text{H}} 7.68$ のシグナルは、夾雑物が多く含まれる試料の場合、定

量精度に疑義が生じる可能性が推測された。一方、 $\delta_{\text{H}} 8.48$ 及び $\delta_{\text{H}} 9.37$ のシグナルは、 $\delta_{\text{H}} 7.24$ 、 $\delta_{\text{H}} 7.55$ 及び $\delta_{\text{H}} 7.68$ のシグナルと比べ、シグナルの多重度は小さく、シグナル形状も良好であった。また、これらのシグナルは $\delta_{\text{H}} 7.24$ 、 $\delta_{\text{H}} 7.55$ 及び $\delta_{\text{H}} 7.68$ のシグナルと比べ S/N が大きいことから、より低濃度での定量も可能と考えられた。チアベンダゾールの定量可能な濃度範囲の及び定量分析の精確さを考慮すると、定量用シグナルとしては、 $\delta_{\text{H}} 8.48$ 及び $\delta_{\text{H}} 9.37$ を用いることが適切と考えられた。

3) 本法の直線性の評価

次に、チアベンダゾールの定量における qHNMR 法の直線性について検討を行った。チアベンダゾール標準物質を qHNMR 標準溶液に溶解し各濃度（0.31, 0.63, 1.2, 2.4, 4.8, 10 及び 20 mg/g、各濃度 3 検体ずつ）に調製した。これらを qHNMR 測定し、 $\delta_{\text{H}} 8.48$ 及び $\delta_{\text{H}} 9.37$ のシグナルより得られたデータを用いてそれぞれ検量線を作成した。X 軸にチアベンダゾール濃度、Y 軸にチアベンダゾールと内部標準（DSS-d₆）のシグナル面積強度比をとり、検量線の決定係数（R²）より直線性を評価した。その結果、図 4 に示したように、両シグナルともに 0.31-20 mg/g の範囲で R²=1 の良好な直線性が得られた。

4) 本法の真度及び精度の評価

次に、本法の真度及び精度について検討を行った。前項で示した方法と同様に各濃度（0.16, 0.31, 0.63, 1.2, 2.4, 4.8, 10 及び 20 mg/g）3 検体ずつチアベンダゾール標準溶液を調製し qHNMR 測定を行った。真度は、秤量濃度と qHNMR による実測値との相対誤差より評価した。また、精度（併行精度）は、各濃度 3 検体の実測値の RSD より評価した。表 3 に示したように、 $\delta_{\text{H}} 8.48$ のシグナルでは、0.31 mg/g 以上の秤量濃度において、実測値との相対誤差は 1%以下であった。また、この濃度範囲における各試料の RSD は 0.1

-0.6%であり、併行精度も良好であった。同様に、 $\delta_{\text{H}} 9.37$ のシグナルでは、0.31 mg/g 以上の秤量濃度において実測値との相対誤差は1%を下まわるとともに、この濃度範囲における併行精度も良好であった (RSD : 0.03-0.3%)。一方、秤量濃度が 0.16 mg/g の場合、秤量濃度と実測値の相対誤差及び RSD が、 $\delta_{\text{H}} 8.48$ のシグナルでは -3.8% (RSD : 4.4%)、 $\delta_{\text{H}} 9.37$ のシグナルでは -5.5% (RSD : 4.0%) となり、定量値の精確さが低下した。

以上の結果より、 $\delta_{\text{H}} 8.48$ 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。

5) 本法の定量下限について

qHNMR 測定におけるチアベンダゾールの定量下限は、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た。表3に示したように、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。

D. 結論

本研究では、食品添加物の規格試験法の精度向上を目指して、qHNMR 法によるチアベンダゾール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、チアベンダゾール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、チアベンダゾールの定量

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。

E. 研究発表

学会発表

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)

F. 知的所有権の取得状況

なし

参考文献

- 1) Saito, T. *et al.*: *Accred. Qual. Assur.* 14, 79-86 (2009)
- 2) 田原麻衣子ら: 日本食品化学学会誌, 16, 28-33 (2009)
- 3) 多田敦子ら: 食品衛生学雑誌, 51, 205-212 (2010)
- 4) 細江潤子ら: 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 41, 960-970 (2010)
- 5) Hasada, K. *et al.*: *J. Nat. Med.* 64, 161-166 (2010)
- 6) 杉本 直樹ら: 食品衛生学雑誌, 51, 19-27 (2010)
- 7) Hasada, K. *et al.*: *J. Nat. Med.* 65, 262-267 (2011)

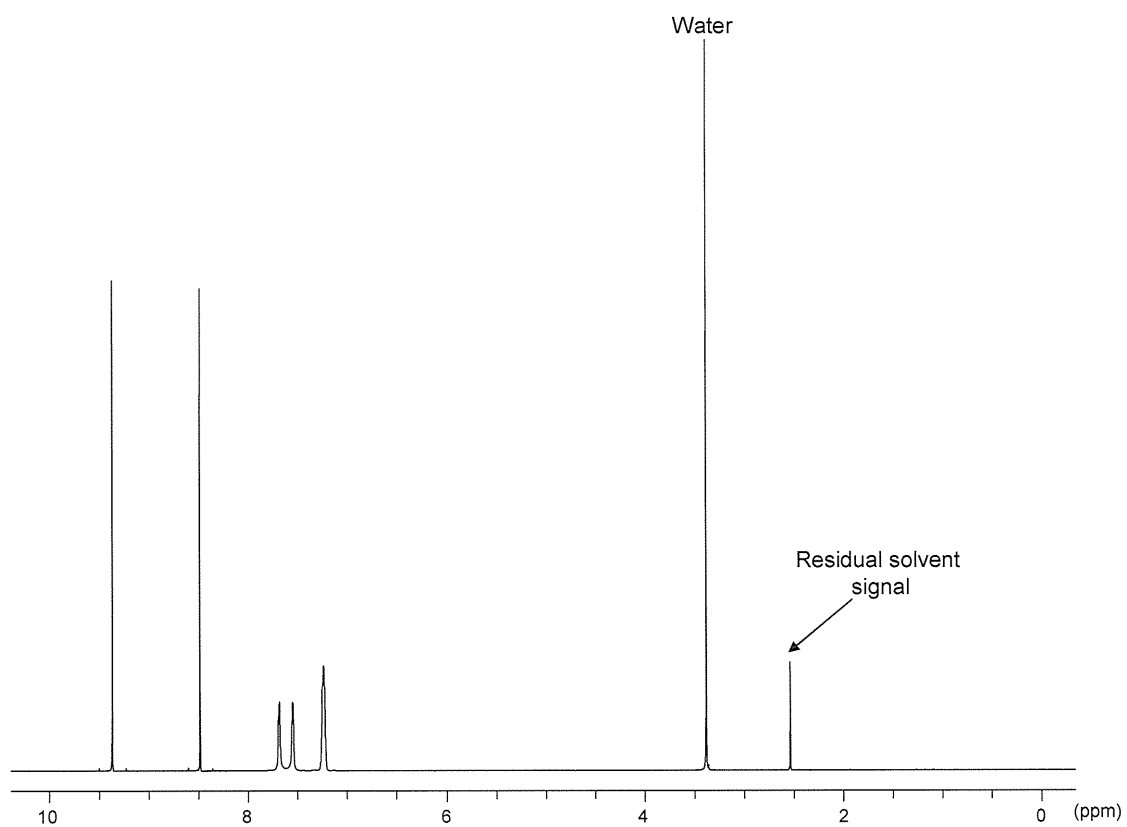


図1 チアベンダゾールの¹H NMR スペクトル

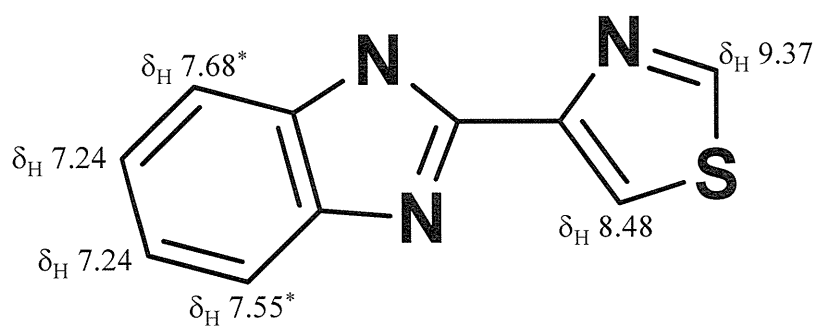


図2 チアベンダゾールの化学構造及び¹H NMR 化学シフト

*Assignments are interchangeable

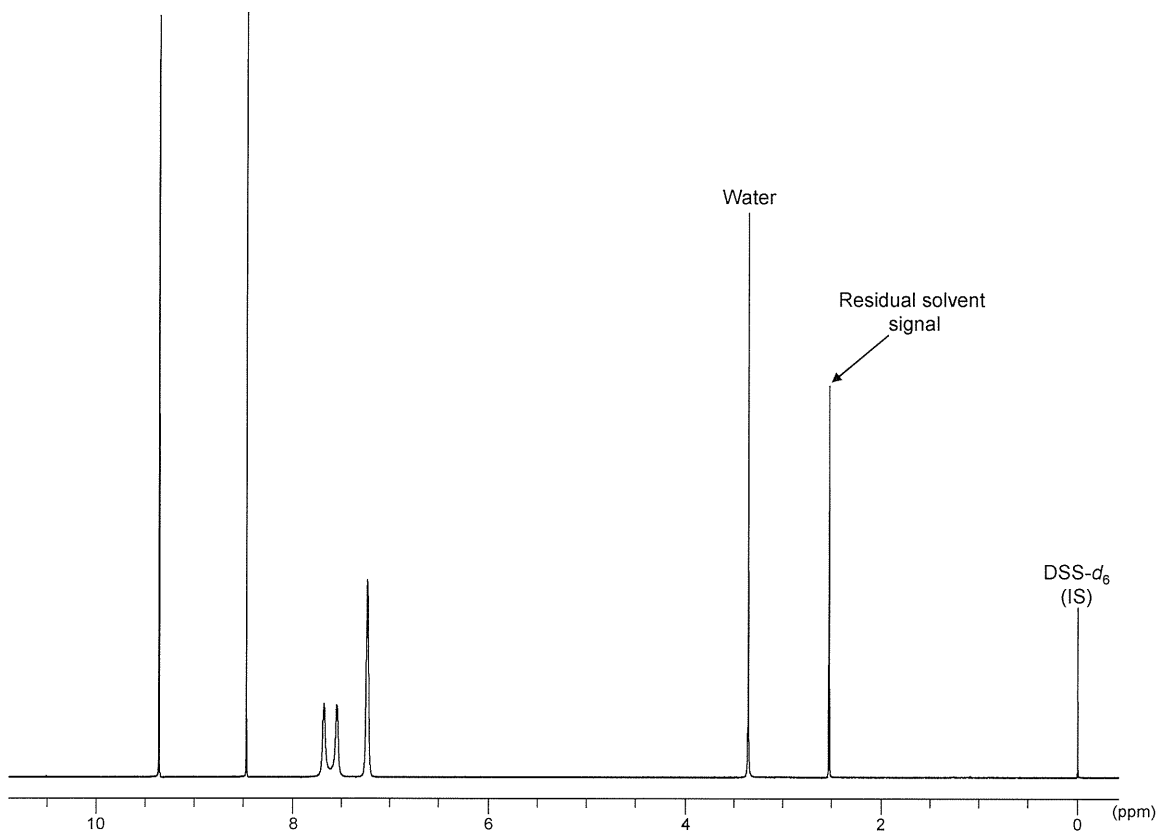


図3 チアベンダゾールの¹H NMR スペクトル (qHNMR 測定条件)

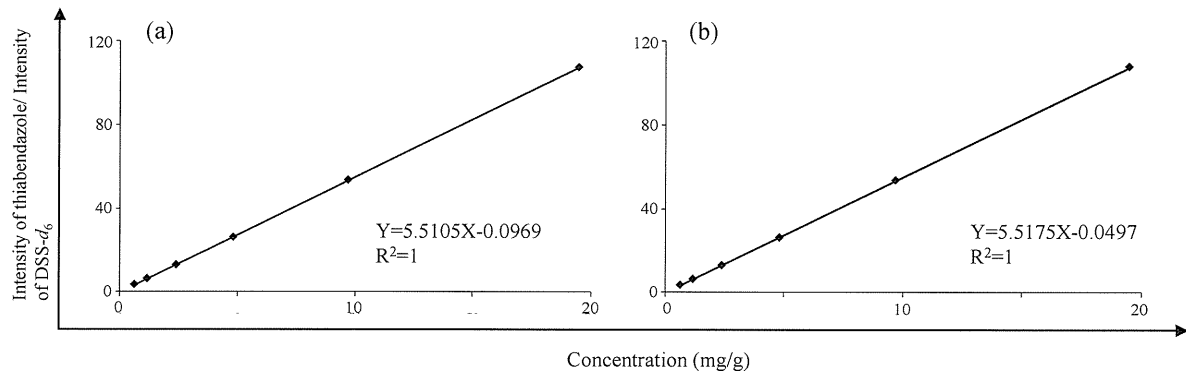


図4 秤量濃度とチアベンダゾール及び DSS- d_6 のシグナル面積強度比の相関性
(a) δ_H 8.48 (b) δ_H 9.37

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°
Pulse delay	60 s ($>5 \times T_1$)
Scan times	8
Spining	off
^{13}C decoupling	multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)
Probe temperature	28°C

表 2 各シグナルより算出されたチアベンダゾール含量の比較 (n=3)

Signal (δ_{H} , ppm)	Content (%)	RSD (%)
7.24	99.6	0.2
7.55 and 7.68	99.4	0.1
8.48	99.3	0.2
9.37	99.5	0.2

表 3 各濃度における秤量濃度と実測値の比較 (n=3)

Prepared concentration (mg/g)	δ_H 8.48			δ_H 9.37		
	Obtained concentration (mg/g)	RSD (%)	Relative error (%)	Obtained concentration (mg/g)	RSD (%)	Relative error (%)
0.16	0.15	4.4	-3.8	0.15	4.0	-5.5
0.31	0.31	0.6	-0.8	0.31	0.2	-0.3
0.63	0.62	0.5	-0.5	0.63	0.5	-0.03
1.2	1.2	0.1	-0.7	1.2	0.4	-0.1
2.4	2.4	0.1	-0.5	2.4	0.2	-0.3
4.8	4.8	0.2	-0.5	4.8	0.2	-0.2
10	9.7	0.2	-0.3	9.7	0.2	0.1
20	20	0.2	0.2	20	0.1	0.2

The relative error between the prepared concentration and obtained concentration calculated with the equation below

$$\text{Relative error} = (\text{obtained concentration} - \text{prepared concentration}) / \text{prepared concentration} \times 100$$

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、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った。93%が陰性だった。

A. 研究目的

欧米を中心として流通している食品香料のポジティブリスト化は、JECFAによ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、我が国では独自に使用されている食品香料が多く、それらについては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）の導入が効率化の面で有用であると考える。

加えて、多くの食品香料は暴露量が微量であるため、毒性試験の実施にはこれらの年間使用量を上回る検体量を要することになる。最も簡便なin vitro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。一方、簡易スクリーニング法、フラクチュエーションAmes試験（FAT）は数mgの検体量で判定結果を出すことができる。

以上を踏まえ、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。初年度で、遺伝毒性試験としてFAT

の導入を検討し、有用であるという結論を得た。

2年目は、JECFAでは、遺伝毒性試験の結果がない香料を入手し、FATを実施した。

B. 研究方法

B-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.)、ADMEWORKS (AWorks ; 富士通九州システムエンジニアリング)、MULTICASE (MCase ; Multicase Inc.)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、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はこれらの中間型で、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。

B-2 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。

B-3 被験物質

結果C-1に示す順序で39物質を選択し、それに昨年度評価できなかった4検体を加えた43検体(表1)を対象とした。

B-4 被験物質溶液の調製

被験物質が液体の場合には、被験物質を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調製とし、速やかに試験に供した。

B-5 陽性対照物質

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(1 µg/mL)を用いた。

B-6 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。

B-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ー培地 (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 µL/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)、チャックを閉めたのち、37°C で静置培養する。TA100 の場合 48 時間、TA98 の場合 72 時間。

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

C-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使用量1g以上(ただし平成18年のデータ)のものを抽出し、JECFAの構造グループ番号順、使用量順にソートしたものが約200物質あった。それについて、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た。JECFAの構造グループを基準に、まず、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。

C-2 FATの結果

43物質すべてSARの予測結果が陰性だった物質についての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(表2)。Methyl-N,N-dimethylantranilate(図1(a))は代謝活性化がある条件で、Neryl acetate(図1(b))とVerbenone(図1(c))は代謝活性化がない条件下で、いずれもTA100で変異原性を示した。

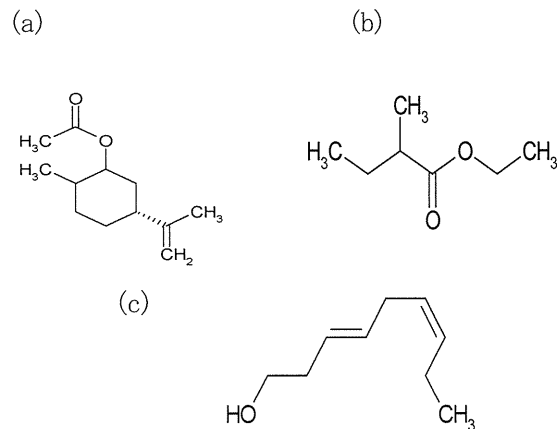


図1 FATで変異原性陽性を示した化合物の構造

D. 考察

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、今回も曝露量は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、それが93%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。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

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。

F. 研究発表

学会発表

- 1) 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）

- 2) 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）
- 3) 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）
- 4) 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。

表1 FATを実施した香料 検体一覧

識別番号	名称	CAS番号	性状
1	3-Methyl-2-(cis-2-pentenyl)-2-cyclopentanol	488-10-8	液体*1
2	Cyclotene butyrate	68227-51-0	液体
3	2-Methyl-1-phenyl-2-propanol	100-86-7	液体
4	p-Cymen-8-ol	1197-01-9	液体
5	Terpinolene	586-62-9	液体
6	cis-3-Hexenyl anthranilate	65405-76-7	液体
7	Methyl N,N-dimethylantranilate	10072-05-6	液体
8	1-Isopropenyl-4-methylbenzene	1195-32-0	液体
9	L-carvone	6485-40-1	液体
10	D-carvone	2244-16-8	液体
11	Neryl acetate	141-12-8	液体
12	Neryl formate	2142-94-1	液体
13	Methyl isovalerate	556-24-1	液体
14	cis-3-Hexenyl isovalerate	35154-45-1	液体
15	Ethyl formate	109-94-4	液体
16	Ethyl myristate	124-06-1	液体*2
17	beta-Damascone	35044-68-9	液体
18	alpha-Damascone	43052-87-5	液体
19	alpha-Irone	79-69-6	液体
20	Isoamyl propionate	105-68-0	液体
21	Isoamyl hexanoate	2198-61-0	液体
22	cis-3-Hexenal	6789-80-6	液体
23	trans-3-Hexenoic acid	1577-18-0	液体*2
24	trans-4-Decenoic acid	57602-94-5	液体
25	cis-3-Hexenyl propionate	33467-74-2	液体
26	cis-3-Hexenyl isobutyrate	41519-23-7	液体
27	Maltol isobutyrate	65416-14-0	液体
28	4-Oxoisophorone	1125-21-9	液体
29	L-piperitone	4573-50-6	液体
30	3-Methyl-4-octanolide	39212-23-2	粉末
31	Nootkatone	91416-23-8	液体
32	Dehydronootkatone	5090-63-1	液体
33	Verbenone	80-57-9	液体
34	Isopulegol	89-79-2	液体
35	Acetylpyrazine	22047-25-2	粉末
36	2-Acetyl-3-ethylpyrazine	32974-92-8	液体
37	2-Acetyl-3-methylpyrazine	23787-80-6	液体
38	1-Furfurylpyrrole	1438-94-4	液体
39	2-Ethylbutanal	97-96-1	液体
40	Palmitic acid	57-10-3	固体
41	Nonanoic acid	112-05-0	液体
42	Nonanol	143-08-8	液体
43	Methyl 2-octenoate	2396-85-2	液体

*1: 純度87%

*2: 保管条件下(冷蔵)では固体

表2 香料(計43種類)のFATの判定

識別番号	物質名	検定菌				総合判定	JECFA
		TA100		TA98			
		-S9	+S9	-S9	+S9		
1	3-Methyl-2-(cis-2-pentenyl)-2-cyclopentenone	-	-	-	-	-	2
2	Cyclotene butyrate	-	-	-	-	-	2
3	2-Methyl-1-phenyl-2-propanol	-	-	-	-	-	7
4	p-Cymen-8-ol	-	-	-	-	-	7
5	Terpinolene	-	-	-	-	-	9
6	cis-3-Hexenyl anthranilate	-	-	-	-	-	19
7	Methyl N,N-dimethylantranilate	-	+	-	-	+	19
8	1-Isopropenyl-4-methylbenzene	-	-	-	-	-	20
9	L-carvone	-	-	-	-	-	23
10	D-carvone	-	-	-	-	-	23
11	Neryl acetate	+	-	-	-	+	26
12	Neryl formate	-	-	-	-	-	26
13	Methyl isovalerate	-	-	-	-	-	28
14	cis-3-Hexenyl isovalerate	-	-	-	-	-	28
15	Ethyl formate	-	-	-	-	-	30
16	Ethyl myristate	-	-	-	-	-	30
17	beta-Damascone	-	-	-	-	-	36
18	alpha-Damascone	-	-	-	-	-	36
19	alpha-Irone	-	-	-	-	-	36
20	Isoamyl propionate	-	-	-	-	-	37
21	Isoamyl hexanoate	-	-	-	-	-	37
22	cis-3-Hexenal	-	-	-	-	-	38
23	trans-3-Hexenoic acid	-	-	-	-	-	38
24	trans-4-Decenoic acid	-	-	-	-	-	39
25	cis-3-Hexenyl propionate	-	-	-	-	-	39
26	cis-3-Hexenyl isobutyrate	-	-	-	-	-	39
27	Maltol isobutyrate	-	-	-	-	-	40
28	4-Oxoisophorone	-	-	-	-	-	41
29	L-piperitone	-	-	-	-	-	41
30	3-Methyl-4-octanolide	-	-	-	-	-	43
31	Nootkatone	-	-	-	-	-	45
32	Dehydronootkatone	-	-	-	-	-	
33	Verbenone	+	-	-	-	+	45
34	Isopulegol	-	-	-	-	-	49
35	Acetylpyrazine	-	-	-	-	-	50
36	2-Acetyl-3-ethylpyrazine	-	-	-	-	-	50
37	2-Acetyl-3-methylpyrazine	-	-	-	-	-	50
38	1-Furfurylpyrrole	-	-	-	-	-	51
39	2-Ethylbutanal	-	-	-	-	-	52
40	Palmitic acid	-	-	-	-	-	53
41	Nonanoic acid	-	-	-	-	-	53
42	Nonanol	-	-	-	-	-	53
43	Methyl 2-octenoate	-	-	-	-	-	

黄色は総合判定陽性 (+) を示す。JECFA のカラムの数字は JECFA の構造グループ。

食品添加物と食品成分の複合作用による副生成物の解明

分担研究者 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。

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、ジクロロアセトニトリル及び抱水クロラールが生成し、食品の種類により生成量に違いがみられた。また、殺菌処理した試料を水道水で流水洗浄し、洗浄工程の前後における副生成物の残存量を調べたところ、流水洗浄後には副生成物の残存量が減少することが確かめられた。さらに、殺菌料として次亜塩素酸ナトリウムの代わりに次亜塩素酸水でカット野菜を殺菌処理した場合、消毒副生成物はいずれも生成せず、次亜塩素酸ナトリウムとは異なる挙動を示すことが明らかとなった。今回の調査結果をもとに、次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理後の生鮮食品からのジクロロアセトニトリル及び抱水クロラールの経口暴露量を推計したところ、耐容一日摂取量（TDI）に対する寄与率は、それぞれ 1.0%及び 1.7%であり、水道水の水質基準値の算定目安となっている寄与率 20%に比べて低い値となった。

A. 研究目的

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。

次亜Na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ホルム(CF)を検出し、また、河川水の塩素処理によってCF、ブロモジクロロメタン(BDCM)、ジブロモクロロメタン(DBCM)、ブロ

モホルム(BF)から構成されるトリハロメタン(THM)が生成することが知られている²⁾。また、これまでにTHMの他にも、ハロアセトニトリル(HAN)や、抱水クロラール(CH)、ハロ酢酸などの様々な消毒副生成物の存在が確認されている。

このため、世界中で消毒副生成物の健康影響について評価を行い、飲料水の水質基準値を設定している。WHOの飲料水ガイドライン第4版³⁾では、CFは0.3 mg/L、BDCMは0.06 mg/L、DBCMは0.1 mg/L、BFは0.1 mg/L、ジブロアセトニ

リル(DBAN)は0.07 mg/L, ジクロロアセトニトリル(DCAN)は0.02 mg/L(暫定)をガイドライン値としている。米国EPAでは、総THMの最大許容濃度が年間平均として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は0.06 mg/L、BDCMは0.03 mg/L、DBCMは0.1 mg/L、BFは0.09mg/L以下に設定されている⁶⁾。また、水質目標設定項目としてDCANが0.01 mg/L、CHが0.02 mg/Lに暫定的に設定され、TCAN、BAN、DBANは要検討項目になっている。

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)がトータルダイエツ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⁾、油脂類や乳製品、野菜類など様々な食品よりTHMが検出されている⁸⁻¹¹⁾。また、これまでに食品の次亜Na処理にともなうTHM生成影響についても調査が行われ、鶏肉や野菜類の塩素殺菌処理によりCFが生成¹²⁻¹⁵⁾し、また、牛乳製造プラントにおいて次亜Naと界面活性剤を併用して殺菌洗浄した時のCFの生成挙動について報告されている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、また、THM以外の消毒副生成物の調査はほとんど行われておらず、生鮮食品における消毒副生成物の暴露影響について十分に解明されていない。

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(いわゆる電解水製造装置)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¹⁹⁾。次亜塩素酸水は、有効塩素濃度及びpHにより分類され、現在のところ強酸性次亜塩素酸水と微酸性次亜塩素酸水の2種類がある。これまで、次亜塩素酸水については、野菜の殺菌処理によるTHM生成能について調査されているが、HANやCHの生成能については未解明であり調査が必要である。

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を推計するため、生鮮食品の殺菌処理により生成する消毒副生成物の残存量について調査を行っており、昨年度は、主要な消毒副生成物のうち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(GC/MS)を用いて分析を行い、生鮮食品の種類によりCF生成量に変化し、水道水による水洗浄により食品中のCF残存量が水道水中の残存レベルまで減少することを明らかとした。

本年度は、消毒副生成物のHAN及び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。さらに、強酸性次亜塩素酸水及び微酸性次亜塩素酸水でカット野菜を殺菌処理したときのHAN及びCH生成能について次亜Na処理と比較したので報告する。

B. 研究方法

1) 試料 都内スーパーで購入したキャベツ、レタス、キュウリ、ニンジン、タマネギ、ダイコン、モヤシ、カイワレ大根、豆アジ、エビ、カキ、鶏もも肉及び絹ごし豆腐を用いた。各試料は超純水で濯いだ後、小さく切り分け実験に用いた。

2) 試薬 ハロアセトニトリル(HAN)混合標準原液(トリクロロアセトニトリル[TCAN]、モノクロロアセトニトリル[MCAN]、ジクロロアセトニトリル[DCAN]、モノブromoアセトニトリル[MBAN]、ブromoクロアセトニトリル[BCAN]、ジブromoアセトニトリル[DBAN])、抱水クロラール(CH)標準原液、及び内部標準原液として、関東化学社製の水質試験用ハロアセトニトリル混合標準原液II、抱水クロラール標準原液、及び1,2,3-トリクロロプロパン標準原液を用いた。希釈溶媒には関東化学社製の残留農薬・PCB試験用tert-ブチルメチルエーテル(MTBE)を用い、塩化ナトリウムには和光純薬工業社製の水質試験用を、

硫酸ナトリウムには和光純薬工業社製の残留農薬試験用いた。その他の試薬は特級を用いた。次亜塩素酸ナトリウムは第8版食品添加物公定書¹⁹⁾に従いあらかじめ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殺菌液とした。

3) 器具及び装置 GC/MSは島津製作所製のGCMS-QP2010を用いた。全てのガラス器具は105°Cで3時間加熱後、放冷して用いた。

4) GC/MS測定条件

GC/MS 条件 カラム：DB-1 (Agilent Technologies) 30m×0.25mm ID, 膜厚1.0µm, カラム温度：40°C(10 min)→(20°C/min)→300°C(2 min), スプリットレス, 注入口温度：250°C, インターフェース温度：250°C, イオン化法：EI, イオン化電圧：70ev, 線速度：43 cm/min

5) 殺菌処理方法

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、魚介類及び鶏肉の場合は有効塩素濃度として100 µg/mL, 豆腐には10 µg/mLとなるように調製した次亜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) 200 µLを加えて反応を止め、よく攪拌した後、試料を採取した。

6) GC/MS用試験液の調製

試料を50 mLのスクリーキャップバイアルに採り、塩化ナトリウム8 gを加え、軽く振って溶かした後、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用試験液とした。なお、遠心分離後、MTBE層がゲル化した場合は、ゲル化したMTBE層を10mLのスクリーキャップ試験管に採取し、硫酸ナトリウム2gを加えて振り混ぜた後、3,000rpmで5分間遠心分離して液状となったMTBE層を分取し、硫酸ナトリウムで脱水した後、GC/MS用試験液とした。

7) 検量線用標準液の調製

HAN混合標準原液及びCH標準原液の各1 mLを10 mLのメスフラスコに正確に採り、MTBEを加えて正確に10 mLとし、HAN及びCH混合標準液とした。HAN及びCH混合標準液を段階的にメスフラスコに採り、MTBEで正確にメスアップし、検量線用標準液とした。各検量線用標準液をそれぞれ正確に採り、以下、GC/MS用試験液と同様に操作を行った。

C. 研究結果

1) GC/MS分析条件の検討

測定対象とした7種の消毒副生成物のGC/MSによるトータルイオンクロマトグラムをFig. 1に示した。16分までに全てのピークが検出された。このうち スキャン分析によるトータルイオン測定ではDCANが試薬由来の夾雑ピークと一部重なって妨害を受けたが、ターゲットマスを m/z 74に選択することでDCANを特異的に検出することができた。その他の化合物は良い分離を示した。各化合物の定量下限値は、DCAN及びCHの定量下限値が5 ng/g, その他の化合物が10 ng/gであった。

2) 添加回収試験

測定対象とした6種のHAN及びCHを各種生鮮食品に10 ng/g又は50 ng/gとなるように添加し添加回収試験を実施した(Table 1-7)。TCANの回収率が、レタスとモヤシを除いて70%以下となり、特に魚介類及び鶏肉などのタンパク性食品において回収率が著しく低下した。また、エビに添加したDCAN, MBAN, BCAN, DBANの回収率も70%以下となった。このため、これら化合物については、定量性に問題があるため、原則として半定量的な生成挙動のみを調べた。その他の食品の各化合物の添加回収率は概ね良好であり、MCAN, DCAN, CH, MBCN, BCAN, DBANの回収率範囲はそれぞれ84.0~117%, 74.0~104.2%, 90.5~117.1%, 78.9~116.4%, 73.7~105.8%, 70.4~116.6%であり、相対標準偏差も10%以内の良好な結果を示した。そこで、

この試験法を用いて生鮮食品の殺菌及び水洗浄処理後のHAN及びCH残存量を調べた。

3) 生鮮野菜の次亜Na殺菌処理及び水洗浄処理後のHAN及びCH残存量の調査

生鮮野菜類を100 µg/L次亜Naにより10分間殺菌し、さらに、水道水で1分間流水洗浄したときの殺菌及び水洗浄後の食品中のHAN及びCH残存量を調べた(Table 8, 9)。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。殺菌処理後にタマネギ、ダイコンは、それぞれ135.7, 95.9 ng/gのDCANが検出されたが、その後の水道水による流水洗浄により、13.7, 20.6 ng/gまで減少した。また、キャベツ、キュウリ、モヤシ、カイワレ大根は、殺菌処理後には、6.2~11.4 ng/gのDCANが検出されたが、水洗浄後の残存量は定量下限値以下となった。さらに、レタス及びニンジン、殺菌処理によりDCANは生成しなかった。

一方、CHは、キャベツ、ニンジン及びダイコンの殺菌処理で、CHがそれぞれ15.1, 16.2, 12.5 ng/gが検出され、水洗浄処理により、5.0, 13.8, 5.4 ng/gまで減少した。また、キュウリは、殺菌処理後にCHが8.2 ng/g残存していたが、水洗浄後には定量下限値以下となった。レタス、タマネギ、モヤシ及びカイワレ大根は、殺菌処理によるCH生成はなかった。なお、MCAN, TCAN, MBAN, BCAN, DBAN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。

4) 魚介類の次亜Na殺菌処理及び水洗浄処理後のHAN及びCH残存量の調査

魚介類として魚(豆アジ)、甲殻類(エビ)及び貝類(カキ)を100 µg/mL次亜Na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HAN及びCH残存量の推移を調べた(Table 4)。エビ及びカキは、殺菌及び水洗浄後の試料より、HAN及びCHは検出されなかった。豆アジは、殺菌処理により18.3 ng/gのDCANが生成し、その後の水洗浄処理で検出下限値以下となった。また、殺菌前の未処理豆アジより29.6 ng/g

のCHが検出され、その後の殺菌処理で19.2ng/g、水洗浄処理で10.6 ng/gに減少した。

5) 鶏肉の次亜Na殺菌処理及び水洗浄処理後のHAN及びCH残存量の調査

鶏肉を100 µg/mL次亜Naで10分間殺菌液に浸漬処理したときのHAN及びCH生成量を調べた(Table 5)。殺菌処理後の試料より消毒副生成物は検出されなかった。また、鶏肉は、通例加熱調理が行われるため、オーブンで5分間加熱調理後にHAN及びCH残存量を調べたが、同様に不検出であった。

6) 豆腐の次亜Na殺菌処理及び水洗浄処理後のHAN及びCH残存量の調査

豆腐は、製造時に約10 µg/mLの次亜Naを容器内に満たしてパック詰めされる場合があるため、10 µg/mL次亜Na浸漬処理後のHAN及びCH量を調べた(Table 6)。殺菌処理後もHAN及びCHは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分間浸漬したが、HAN及びCHは不検出であった。

7) 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Naの代替として、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(Fig. 2)。次亜塩素酸水として、強酸性次亜塩素酸水及び微酸性次亜塩素酸水の2タイプの殺菌料を用い、100 µg/mL次亜Na殺菌処理と結果の比較を行った。次亜Naで殺菌処理した場合、DCAN及びCHが生成するが、強酸性次亜塩素酸水及び微酸性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。

D. 考察

1) 食品中のHAN及びCH分析法の検討

生鮮食品に含まれるHAN及びCH残存量を明らかとするため、水質基準試験法に準じて溶媒抽出-GC/MS法により分析を行った。本試験法ではTCAN, DCAN及びBCANを除いて概ね良好

な回収率を示し、相対標準偏差も10%以内の良い精度を示した。Raymerら²⁰⁾はEPAの試験法をもとにMTBE溶媒抽出-GC/ECDを用いて各種食品及び飲料からのHAN, CH及びハロ酢酸分析法を開発し、一部の食品においてTCAN, DBCN, BCANの回収率が低くなることを明らかとしており、今回の結果と一致している。TCAN, DCAN及びBCANはマトリクスへの吸着や分解などが原因で回収率が低下したと考えられ、これら化合物を対象とする場合には試料調製法の改良が必要と考えられた。ただし、TCAN, BCAN及びDBCNは水道水の塩素処理においても、一般に生成量は低く、本研究においても殺菌処理後の食品及び浸漬液ともに、定量下限値以下であり、回収率による補正を加えて最大暴露量を推定しても十分に小さな値となるため、実質的に大きな影響はなかったと考えられる。

2) 生鮮食品類の塩素殺菌処理によるHAN及びCHの生成挙動と水洗浄効果

各種生鮮野菜を次亜Naにより殺菌処理したところDCAN及びCHが生成し、野菜の種別により、各化合物の生成量に違いがみられた。DCANとCHは構造が異なっており、それぞれ異なる前駆体化合物から生成すると考えられ、食品成分の違いによりDCANやCHの生成量が変化したと考えられる。

DCANは、タマネギ及びダイコンの殺菌処理で比較的高い濃度のDCANを生成するが、水洗浄により大幅に残留量が減少しており、その他の食品でも、水洗浄後には定量下限値以下まで減少した。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、残留するDCANの除去にも水洗浄が有効であることが確認できた。また、殺菌処理によりダイコン、ニンジン等においてCHも生成したが、CHの生成量はDCANと比べて低い値であり、水洗浄後のCH残留量も総じて低く抑えられていた。

鮮魚（豆アジ）を殺菌処理したときDCANが18.3 ng/g検出されたが、水洗浄処理により

DCANを除去することができた。また、殺菌前の未処理試料よりCHが検出された。この詳しい原因は不明であるが、食品由来のCH暴露量の推計において、経口暴露影響を最大限に見積もる必要があるため、未処理豆アジのCH含量を魚介類由来の暴露量として算定を行った。また、エビやカキに次亜Na殺菌処理後のHAN及びCHの残存は見られなかった。

鶏肉を殺菌処理したところ試料中よりHAN及びCHは検出されなかった。DCANはタンパク質の塩素化により生成すると考えられており²¹⁾、タンパク性食品である魚介類及び鶏肉はDCAN生成能を有していると考えられるが、試料からは検出されず、殺菌処理後の浸漬液のみからDCANが検出された。このため、次亜Na殺菌処理でDCANは生成するが、速やかに浸漬液中に移行しているため、試料には残存せず暴露影響はなかったと考えられる。

3) 生鮮食品類の次亜塩素酸水処理によるHAN及びCHの生成能の次亜Naとの比較

次亜Naの代替として強酸性次亜塩素酸水及び微酸性次亜塩素酸水で殺菌処理したところ、食品中にHAN及びCHの残存はみられなかった。次亜Naは通常、塩素換算で100~200 µg/gの殺菌液が用いられるが、次亜塩素酸水は次亜Naに比べて低い塩素濃度で、次亜Naと同等の強い殺菌効果を示すことが知られており、今回使用した強酸性次亜塩素酸水及び微酸性次亜塩素酸水の塩素濃度も約20 µg/mLであった。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。このように生鮮野菜の殺菌処理による消毒副生成物の生成挙動において、次亜塩素酸水は次亜Naとは異なる挙動を示すことが明らかとなった。

4) 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。各食品群の摂取量は平成21年国民健康・栄養調査報告書²²⁾収載の食品群

別摂取量平均値（総数）を参考とし、緑黄色野菜は93.4 g/日/人、その他の野菜は187.5 g/日/人、魚介類は74.2 g/日/人とした。食品中のDCAN及びCH残存量は、食品群毎の水洗浄後において最も残存量が高かった食品を代表値として選んだ。具体的には、DCANでは、その他の野菜としてダイコンを代表値として選び、緑黄色野菜及び魚介類は、定量下限値以下であったことから残存量をゼロとした。一方、CHは、緑黄色野菜としてニンジン、その他の野菜としてダイコンの結果を用いた。なお、魚介類については、殺菌前の豆アジのCH含量を用いた。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。

なお、算定された生鮮食品由来の推定暴露量は、各食品群の最大値を用いて計算した結果であり、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DCAN及びCHは分解すると考えられ、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。このため、生鮮食品の次亜Na殺菌処理により生成されるDCAN及びCHの経口暴露量は、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。

F. 研究発表

論文発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考論文

- 1) Rook, J.J.: Water Treatment and Examination, 21(3), 259 (1972)
- 2) Rook, J.J.: Water Treatment and Examination, 23(2), 234-243 (1974)
- 3) WHO: Guidelines for Drinking-water Quality 4th Ed. (2011)
- 4) Susan D. Richardson: Trends in Analytical Chemistry, 22(10), 666-684 (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., *et al.*: 食品衛生学雑誌, 27(3), 245-241 (1986)
 - 9) Tamakawa, K. *et al.*: 食品衛生学雑誌, 29(2), 156-160 (1988)
 - 10) Miyahara, M. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, 43(2), 320-326 (1995)
 - 11) René Imhof *et al.*: *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 85, 681-703 (1994)
 - 12) Vizzier-Thaxton, V. *et al.*: *J. Poultry Sci. Soc.*, 19, 169-173 (2010)
 - 13) Hidaka, T. *et al.*: 食品衛生学雑誌, 32(4), 308-314 (1991)
 - 14) Hidaka, T. *et al.*: 食品衛生学雑誌, 33(3), 267-273 (1992)
 - 15) Hidaka, T. *et al.*: 食品衛生学雑誌, 35(4), 357-364 (1994)
 - 16) Tiefel, P., Guthy, K.: *Milchwissenschaft*, 52(12), 686-691 (1997)
 - 17) Resch, P., Guthy, K.: *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 95, 418-523 (1999)
 - 18) Resch, P., Guthy, K.: *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 96, 9-16 (2000)
 - 19) 厚生省: 第8版食品添加物公定書, p269 (2007)
 - 20) Raymer J. H. *et al.*: *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 10, 808-815 (2000)
 - 21) Trehy M. L. *Et al.*: *Environ. Sci. Technol.*, 20 (11), 1117-1122 (1986)
 - 22) 厚生労働省: 平成21年度国民栄養調査報告, 173 (2011.10)