

201234003A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 恭子

平成25（2013）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
食品添加物の規格の向上及び使用実態の把握に関する研究 佐藤恭子	1
II. 分担研究報告	
1. 食品添加物の規格の向上と使用実態に関する研究 佐藤恭子 （資料） 食品添加物の生産量統計調査を基にした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	13
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 北村陽二	31
3. NMRを用いた食品添加物定量法の開発 大槻 崇	45
4. 香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究 山田雅巳	57
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 久保田浩樹	63
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	79
IV. 研究成果の刊行物・別刷	80

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 24 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 食の国際化により、食品の安全性確保のために重要性を増した、食品添加物の規格の向上及び使用実態の把握を目的として研究を行った。

食品添加物の規格の向上及び使用実態に関する研究－アルギン酸塩類の定量法に関する研究では、蒸留法、比色法及び HPLC 法について検討した結果、蒸留法により精度良い定量値が得られた。食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関わる研究では、指定添加物の第 10 回調査の第 2 年度として、集計化工場と精密化のため、再調査を行った。また、既存添加物の第 4 回調査の初年度として、企業アンケート調査を実施し、結果を集計化した。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では、日米欧三極の使用量実態調査結果及び使用量から計算される推定摂取量結果を比較し考察した。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、香料の表示等に関する調査・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－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、測定中の液体試料の揮発や、固体試料の場合、すりつぶしの有無によってスペクトルが変化する可能性があることを明らかにした。

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 法を用いたアゾキシストロピン等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、本法がアゾキシストロピン等の定量分析に適用でき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－我が国独自の食品香料の中から、SAR のソフト 3 種類による予測がいずれかで陽性になったもの 43 品目について簡易遺伝毒性試験を実施したところ、陽性になったものは 14%であった。個々の SAR による遺伝毒性の予測の正確度は 4～11%であったことから、一つのソフトに絞って香料を対象にカスタマイズすることが効率よい安全性評価につながることを示唆された。

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及び次亜塩素酸水により殺菌処理したときに生成するハロ酢酸類の推定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ハロ酢酸残存量を ECD 検出器付ガスクロマトグラフ分析装置により分析した。また、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酢酸及びトリクロロ酢酸の経口暴露量を推計し、いずれもリスク評価値を下回っていることが確かめられた。

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。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

第8版食品添加物公定書における、アルギン酸塩類の定量法は、水銀バルブを使用した複雑なガラス器具による装置を使用した蒸留法が設定されている。本研究は、水銀バルブを使用しない定量法を検討することを目的とし、米国薬局方（USP）で使用されている水銀バルブを用いない簡単な装置による蒸留法、比色法及びHPLC法による定量法の検討を試みた。

2) 食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関わる研究

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推定を行う。

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

国際的な香料化合物の使用動向を把握すると同時に、香料化合物の安全使用、世界における日本の使用実態を客観的に確認するため、日米欧が同時期に同調査リストを使用して実施した各国・地域における香料化合物使用実態調査結果について、日欧米間の比較を行った。

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。本年度は香料の表示に関する規制について調査・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。一方、減衰全反射法（ATR法）は、現在では公定書には規定されていないが、その測定の簡便さと再現性の良さから、近年急速に普及しつつある。そこで、本研究では、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、食品添加物分析への qHNMR（¹H NMR を利用した qNMR）法の有効性、汎用性を明らかにするため、アゾキシストロピン等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、構造活性相関手法が遺伝毒性予測に適用できるかどうかを検討した。SAR の陽性結果を FAT で確認するとともに、新しいソフトウェア TiMeS での予測も検討した。

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、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、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酢酸に着目し、電子捕獲検出器付ガスクロマトグラフを用いて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ハロ酢酸暴露量の推計を行った。さらに、次亜塩素酸水でカット野菜を殺菌処理する際のハロ酢酸の生成能についても調査を行った。

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

USP General Tests and Assays <311> Alginate Assayを準用し（ただし、蒸留時間は3時間とした）、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

ナフトレゾルシノール法により定量を行い、

得られた値をアルギン酸ナトリウム量として算出後、それらを各アルギン酸塩の分子量に換算し、各アルギン酸塩量を求めた。

(3) HPLC法

①アルギン酸塩類の酸分解

試料を2.5mol/Lに溶解し、100℃で6時間加熱した後、3～5 mLのメタノールを加え、40℃で減圧乾固及び窒素パーズを行い、TFAを取り除いた。残留物を1%トリエチルアミン水溶液で溶解しHPLC用試料液とした。

②酵素による酵素分解

①の方法で酸分解した試料にアルギン酸リアーゼ水溶液（5 unit/mL）反応させ、凍結乾燥を行い、1%トリエチルアミン水溶液4mLに溶解し、フィルターろ過後酵素反応HPLC用試料液とした。

③HPLCによる定量

マンヌロノラクトンを1%トリエチルアミンで溶解し、マンヌロン酸標準液(0.5～5 mg/mL)を調製し、検量線を作成した。グルロン酸については試薬が購入できなかったため、単離精製した試料溶液中のグルロン酸含量をマンヌロン酸を用いてナフトレゾルシノール比色法により定量し、同様に標準液（0.01～0.05 mg/mL）を調製し、検量線を作成した。アルギン酸塩類をトリフルオロ酢酸（TFA）溶液で加水分解して得られたHPLC用試料液及びさらにアルギン酸リアーゼにより分解して得られた酵素反応HPLC用試料液につき、検量線を用いてマンヌロン酸及びグルロン酸の定量を行なった。

2) 食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関する研究

指定添加物については事業者へ出荷実需の調査表を送り、平成 22 年度の数値の記入を依頼し、回収した調査表を集計し、さらに未報告者、数値確認等について再調査、再集計処理を行った上で、日本人の平均一日食品添加物の摂取量を推定する。既存添加物については、事業者へ調査票を送り、平成 23 年度の数値の記入を依頼し、回収した調査票を集計し、検討を加

え、再調査を行い、生産・輸入された総量を推定する。

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

平成 23 年度の使用量調査結果を基に、IOFI から提供を受けた欧米で同時期に実施した調査結果（平成 22 年 1 月～12 月）と比較、検討・考察した。

4) 諸外国の香料規制に関わる調査研究

香料に関する表示については、香料製品に対する表示及び香料を使用した食品への表示の二つがある。今回の調査は両方とも可能な範囲で調査を行った。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

ピロリジン、バニリン及びケイ皮酸について、ATR法、液膜法によりIRを測定した。本研究で測定に用いた装置は、JASCO FT/IR-4100（日本分光社製）である。液膜法、の測定は、分解能 4 cm^{-1} （32回繰り返し）、測定領域 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ で行なった。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 2 cm^{-1} （積算回数96回）、測定領域 $4000\sim 500\text{ cm}^{-1}$ で測定を行なった。

B-3 NMR を用いた食品添加物定量法の開発

1) NMR 分析（シグナルの帰属）

10 mg/g のアゾキシストロビン/MeCN- d_3 溶液及びピリメタニル/MeOH- d_4 溶液につき、各種 NMR 測定を行った。

2) qHNMR 法による定量

(1) 含量の測定

アゾキシストロビン約 20 mg に 4-BTMSB- d_4 約 4 mg 、及び MeCN- d_3 2 mL を加えて溶解し、qHNMR 測定を行った。1,4-BTMSB- d_4 のシグナル面積強度を 18.00 としたときのアゾキシストロビン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、アゾキシストロビン含量 (C_{AZ} , %) を算出した。

$$C_{AZ} = \frac{I_{AZ}/H_{AZ}}{I_{BTMSB}/H_{BTMSB}} \times \frac{M_{AZ}/W_{AZ}}{M_{BTMSB}/W_{BTMSB}} \times 100$$

ただし、 I_{AZ} 、 I_{BTMSB} はアゾキシストロビン及び 1,4-BTMSB- d_4 のシグナル面積強度（1,4-BTMSB- d_4 : 18.00）、 H_{AZ} 、 H_{BTMSB} はアゾキシストロビン及び 1,4-BTMSB- d_4 の特定基の水素数（1,4-BTMSB- d_4 : $\text{CH}_3\times 6=18$ ）、 M_{AZ} 、 M_{BTMSB} はアゾキシストロビン及び 1,4-BTMSB- d_4 の分子量（アゾキシストロビン : 403.39 、1,4-BTMSB- d_4 : 226.50 ）、 W_{AZ} 、 W_{BTMSB} はアゾキシストロビン及び 1,4-BTMSB- d_4 の秤取量 (mg) である。ピリメタニルについても同様に含量の測定を行った。

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

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 ピュアリティ ((株) JEOL RESONANCE 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)

被検物質を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 2 g を 50 mL のスクリーキャップバイアルに採り、濃度を調整した次亜塩素酸ナトリウム (次亜 Na) 溶液浸して 10 分間殺菌処理を行った。反応停止後、塩化ナトリウムを加えて溶かし、内部標準液を含む *tert*-ブチルメチルエーテル(MTBE)で抽出し、10%硫酸メタノール溶液によりメチルエステル化処理を行った後、飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加えて中和し、GC/ECD 用試験液とし、ハロ酢酸の分析を行った。

(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

USP法で、蒸留時間を3時間とした結果、いずれの試料についても良好な結果が得られた。

(2) 比色法

アルギン酸カルシウムでは含量が38%程度と低い値であった。これはアルギン酸カルシウムが不溶性であることが原因と考えられた。そ

他の試料については、91.1~108.9%となったが、アルギン酸アンモニウム及びアルギン酸において規格外の含量値が得られた。

(3) HPLC法

グルロン酸及びマンヌロン酸の含量の合計は、酵素処理しなかったものより、酵素処理 (0.5 時間) したもののほうが若干合計値が高くなったが、いずれの試料についてもグルロン酸及びマンヌロン酸含量の合計は3.3~24%となり、低い値となった。

HPLC法でグルロン酸及びマンヌロン酸含量の合計が低かった原因は、酸分解が不十分であったことが原因と考えられ、アルギン酸カルシウムで非常に低かったことは、酸分解が不十分であったことに加え、比色法と同様、アルギン酸カルシウムが不溶性であることが原因と考えられた。

2) 食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関わる研究

指定添加物については、第 10 回調査の第 2 年度にあたり、平成 22 年度を調査対象に再・追加調査を実施した。発送した調査票は初年度分と本年度の再・追加調査分を合わせて全国 688 箇所の会社・事業所となった。回収数は 562 (回収率 81.7%) で、回収率は過去の調査の平均回収率よりやや低い回収率となった。

既存添加物については、本年度は第 5 回調査の初年度にあたり、平成 23 年度を調査対象として、全国 453 箇所の事業所に調査票を送付した。調査票の回収率は 80.4%となり、前回調査を下げた。また、製造または輸入していると回答した企業は 243 社 (回収数に対する比率は 66.8%) となり、前回調査の追加調査を含めた数に及ばないので、追加調査を行って精度を高める必要がある。

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

1) 日米欧三極で使用されているコアリスト中の食品香料化合物の品目数と年間使用量

日本における①個別指定品目、②類指定品目、

③日本では使用できない香料化合物に分類して欧米の各使用品目数、数量について整理した。日米欧が共通して使用した2187化合物を収載した調査リスト（コアリスト）のうち、調査期間中に日本では1456化合物（使用量約1249t）、米国では1085化合物（使用量約6697t）、欧州では1204化合物（使用量約5249t）が使用されていた。3極の中では、日本で使用されている品目数が最も多く、総使用量に関しては、日米欧の人口比率（約1：3：3）を考慮しても、日本が一番少ないことが明らかとなった。また、日本では個別指定品目とされている香料化合物は欧米でも使用量占有率が60%以上と高いことから、比較的大量に使用される化合物の傾向は三極とも類似していることがうかがえた。

日米欧三極同時の食品香料化合物使用量調査を集計整理した結果、世界の香料使用のほとんどを占める三極の2010年1年間に使用した香料化合物の総数量は約13202tであることが分かった。この結果は三極の消費人口7億5千万人を考えれば世界において香料は安全に使用されているといえる。

また、総使用量に対応する総使用化合物の数は約2100程度であり、近年は減少傾向にある。これは製剤技術の進歩や一部国際統合が進んだ結果でもありと考えられるが、一方安全性に配慮してより慎重に香料化合物を選択している結果も影響しているものとも考えられる。

さらに、これら使用化合物の数は多いもののJECFAが採用している限界閾値1.5µg/人/日の摂取量以下で使用している化合物が世界においても4割以上が占められていることから見ても香料は世界の中において安全に使用していることが裏付けられた。

2) 日米欧の使用量の多い上位50品目についての比較

米国の使用量上位50品目を基準にした日本・EUとの比較及びEUの使用量上位50品目を基準にした日本・米国との比較を行った。

日米欧共通し、使用量1位はVanillin、2位は

Mentholであった。その他か、日本ではAllyl isothiocyanate（ワサビ様の香気成分）、4-Methyl-5-thiazoleethanol及びそのエステル（ミート系、ナッツ系やミルク系）、また50位以内ではないもののp-Menta-1,8-dien-7-al（perillaldehyde）（シソ様の香気成分）の使用順位が高かった。

米国ではMethyl salicylate（冬緑油（ツツジ科ヒメコウジ精油）の香気成分）、Benzaldehyde（チェリー系）、Cinnamaldehyde（肉桂様）、Stearic acid（油脂の風味）や、近年、清涼感を与える物質として開発された*N*-Ethyl-2-isopropyl-5-methylcyclohexancarboxamideの使用順位が高い。

また、砂糖様の甘い香気を持つ4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanoneがEUで13位とよく使用されていた。この化合物は、砂糖様の甘い香気を持つところからVanillinやMaltolと同様欧州人にはよく好まれるものと思われ、EUでは甘い風味への嗜好が高いことが浮き彫りになった。

3) 日米欧三極で使用されている食品香料化合物の推定摂取量比較について

推定摂取量が100µg/人/日を超える品目は、日本では167品目（全品目中の11.5%）、米国では250品目（同23%）、欧州では197品目（同16.4%）であった。一方、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推定摂取量1.5µg/人/日以下の品目数は、日本では768品目（全品目中の52.7%）、米国では492品目（同45.3%）、欧州では521品目（同43.3%）であった。この様に各地域で使用されている多くの食品香料化合物が少量で使用されており、特に日本でその傾向が顕著である実態が明らかになった。

4) 新規指定食品香料化合物の使用実態について

平成22年12月末までに新規指定された34品目について、三極における使用量及び推定摂取量の比較を行い、また食品安全委員会の評価で

使用した推定摂取量とNOAELとの比較を行った。欧米において食品安全委員会評価時の推定摂取量を超えている品目はあるものの、NOAELと比較すると安全マージンが1000を下回るものはなく、また日本では推定摂取量を超えたものはなかった。

5) 日本で使用している香料化合物のFEMA GRAS物質（FEMA物質）の割合について

平成 23 年度報告書において、我が国で使用している香料化合物の品目数を 2045 品目と報告したが、そのうち FEMA 物質に該当する品目数は全体の 75.6%であり、使用量は総使用量（1256t）の 99.4%を占めていた。FEMA 以外の物質は 500 品目(24.4%)で、その使用量は 0.6%に過ぎない実態が明らかになった。また、500 品目中、EU FLAVIS 物質は 253 品目、6.3t であり、日本独自で使用していると思われる香料化合物は 247 品目、0.8t であった。このことは、海外での適合性も考慮に入れた香料開発が進められた結果であると推定される。

なお、日本の総使用量については昨年度報告したピペロナルの使用量に誤りがあったため、1264tから1256tに修正している。

4) 諸外国の香料規制に関わる調査研究

調査（平成25年2月末）の結果、以下の国・地域について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)、南アフリカ共和国

1) 香料製品の表示

今回調査した約半数の国・地域で香料もしくは香料を含む食品添加物の表示基準を持ち、その内の約半数は Codex、日本とほぼ同じく、食

品添加物であること、賞味期限、使用基準・使用方法、製造者名・住所等の表示項目を要求していた。

2) 香料を最終商品へ使用した場合の表示

最終食品での香料の表示を規定している国・地域がほとんどであり、調査対象国（地域）で規定していないのはモンゴル、バングラデシュのみであった。

最終食品への香料の表示は、基本的に一括表示であった。

香料を天然、合成を区別できるように表示する国・地域もあった。分類の方法は天然、合成の2分類の場合もあれば、さらにNIを加えた3分類の場合もあった。さらに米国ではWONFなど天然香料を分類する規則があり、EUにおいても同様の規則が定められている。一方で日本など香料成分の表示で「天然」或いは"Natural"等の表示が禁止されている国・地域や表示の規則がない国・地域もあった。最終食品における香料表示の目的は、消費者の選択に資する、或いは誤認を与えないことであり、クラス分類することが安全性のためとは考え難い。

3) アレルギー表示

日本では法的に表示義務品目と表示推奨品目に分かれているが、他国は中国を除いてすべて表示義務品目である。中国は推奨表示となっている。

各国・地域におけるアレルギー表示の調査では、日本及び調査した22の国・地域の中で14の国・地域にはアレルギー表示義務があり、対象品目が示されていた(インドは乳幼児用代替ミルクのみのため、対象としなかった)が、品目の詳細に関しては、国・地域で異なっていた。日本でアレルギー対象品目になっていない海外のアレルギー対象品目としては、トマト、ゴマ、セロリ、マスタード、ハウチワマメ、小麦以外の麦類、クルミ以外のナッツ類、イガイ・イシガイ類、貝類、軟体動物、蜂花粉、プロポリス、ローヤルゼリー等があった。

アレルギー表示に関しては、約6割の国・地

域で規制されていたが、各国・地域における食生活の差が表示義務対象品目にも表れていた。また、規制している各国・地域の中でも我が国は最も規制が進んでいることが明らかとなった。

加工食品の交易量が増す中、世界各国で安全に食することができるように、少なくとも重篤な症状を起こすアレルギー物質については現在 Codex で規定している以上の内容で国際的に統一して表示品目を設定するなどのルール作成が必要と考えられる。

4) GMO 表示

日本では、香料に対する表示の義務はない。食品については、5%以上且つ上位 3 品目の原材料について表示義務が課せられている。

海外を見てみると GMO 表示に関する規制がある国・地域は、調査した 22 の国・地域のうち 11 の国・地域であった。規制内容は、日本と同様に食品に対する表示規制と思われる国・地域が 8 の国・地域であり、明確に添加物に対してまで表示を求めている国・地域は、中国及びオーストラリア・ニュージーランド、EU の 3 の国・地域のみであった。

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. ピロリジンの測定に関する検討

ATR法は、液体試料の場合、プリズム上に試料をのせるだけで簡便に測定が出来るが、液膜法のように、窓板に挟まれておらず、外気にさらされた状態で測定することになるため、測定中に吸湿や揮発などを生じる可能性がある。そこで、吸湿しやすく、揮発性も高いピロリジンの測定法を種々検討した。その結果、ATR法でピロリジンを測定する際には、揮発を防止することが必須であり、揮発防止のための器具の材質にも注意する必要があることが明らかとなった。

2. 固体試料の測定に関する検討

ATR法では、プリズムと試料が接している面で反射する際に赤外光のもぐり込みが生じ、そ

のときの試料の赤外光の吸収を測定することで、スペクトルが得られる。従って、ATR法においては、プリズムと試料が接している面積も重要となってくる。固体試料の場合、粒子径によって、接する面積が異なってくる可能性がある。そこで、固体粉末試料として、バニリン、ケイ皮酸を取り上げ、すりつぶしによって細かい粉末にした場合の変化について検討を行った。すりつぶすことにより、一部のピーク強度に逆転がみられた。この変化はすりつぶしの際の吸湿ではないと考えられ、原因について詳細に検討していく必要がある。

C-3 NMR を用いた食品添加物定量法の開発

アゾキシストロビン及びピリメタニルについて ^1H NMR, ^{13}C NMR 及び各種 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。得られたスペクトルパターン情報を基に、qHNMR 法による含量の測定を行った。

その結果、アゾキシストロビンについては、 δ_{H} 3.53 (水素数 3), δ_{H} 3.70 (水素数 3), δ_{H} 6.43 (水素数 1), δ_{H} 7.22 (水素数 1), δ_{H} 7.26-7.36 (水素数 3), δ_{H} 7.38-7.48 (水素数 3), δ_{H} 7.73 (水素数 1), δ_{H} 7.80 (水素数 1) 及び δ_{H} 8.28 (水素数 1) にアゾキシストロビンに由来するシグナルがそれぞれ観察された。これらのうち、 δ_{H} 3.53, δ_{H} 3.70, δ_{H} 6.43 及び δ_{H} 8.28 に観察されたシグナルは、形状がシャープで多重度も小さく、近傍に他のシグナルも観察されなかった。qHNMR では、このようなシグナルを定量に用いることにより、より精確な定量が可能と考えられている。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)における定量も可能となる。これらの点を考慮し、定量用シグナルとしては、 δ_{H} 3.53, δ_{H} 3.70, δ_{H} 6.43 及び δ_{H} 8.28 を用いることが適切と考えられた。

ピリメタニルについては、観察された全ての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。さらに、各シグナル間の分離も精確な定量には十分であった。以上より、ピリメタニルの定量には、全てのシグナルが適用可能と考えられた。また、真度、精度、直線性を評価した結果、いずれも良好であり、アゾキシストロピン及びピリメタニルの絶対定量に有効な分析法であることが判明した。

C-4 香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究

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、前出の3つのソフトウェアでSARを実施した。3つのソフトでともに陽性だった物質は1品目、いずれか2つのソフトで陽性になった物質は25品目、いずれか1つのソフトで陽性になった物質は147品目あった。その中で流通量の多いもの、純度が95%以上のもので、試験可能な量が入手できた43品目を選んだ。

SARの予測結果が一つもしくは二つ陽性だった43品目についてのFATの結果は、37品目が総合判定陰性で、陽性になったのは6品目であった。SARの予測結果で一つのソフトのみが陽性とした品目は8個でそのうち6個がFATで陽性だった。SARの予測結果で二つのソフトが陽性と判定した33品目はFATでは1品目も陽性ならなかった。

SARの陽性判定のFATとの一致率(感度)は、DEREK, MCase, AWORKSの順に11%, 10%, 4%, 陰性判定のFATとの一致率(精度)は同じく、81%, 77%, 70%と算出された。MCaseはFAT陽性品目6個中、3個を陽性と判定していたが、43品目中30品目を陽性としていたことから、ヒット率が高くなったのは、多く陽性判定を出していたためと考えられ、精度は必ずしも高いとは言えない。

今回の43品目についてTiMeSモデルでAmes試験結果を予測したところ14個が陽性と予測されたが、その中にFAT陽性判定の6

個は含まれていなかった。現時点でTiMeSには香料の遺伝毒性予測のための基本データが不足していることが考えられる。また、予測モデルを複数使用することが必ずしも予測性を上げることにつながらないことが分かった。

本研究課題で対象にしているのは香料で、一般的な化学物質とは異なる構造のものが多く含まれていると考えられる。したがって、予測性を上げるためにはSARのモデルのアラートについてカスタマイズの必要があるだろう。今回の判定率の差は決して大きくはないが、DEREKには「判定はできない(E, equivocal)」という判定基準があるなど、より細かい予測をしているので、香料の予測については今後DEREKを中心に予測性を上げていくのがよいかもしれない。

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

次亜Naで殺菌処理が想定される生鮮野菜について、殺菌及び水洗浄処理後のDCAA及びTCAA残存量の推移を調べた。モデル試料として殺菌処理が想定される葉菜類、根菜類及び豆類等、計8種類の野菜を選び検討を行った。次亜Na殺菌処理により、全ての野菜より32.8~295.8 ng/gのDCAAが検出された。DCAAは野菜の種類により生成量に違いがみられ、葉菜類ではキャベツ(249.2 ng/g)、根菜類ではニンジン(295.8 ng/g)が高い残存量を示したのに対し、キュウリ(32.8 ng/g)やタマネギ(42.3 ng/g)は低い残存量であった。一方、TCAAは、キャベツ、キュウリ、タマネギ、モヤシ、カイワレダイコンの殺菌処理で、それぞれ13.1, 17.4, 130.9, 39.1, 41.3 ng/g検出された。いずれも、水洗浄処理により減少がみられた。殺菌処理後のDCAAとTCAA生成量を比較した場合、総じてDCAA量がTCAA量に比べて高い値を示したが、タマネギは例外的にTCAA生成量が高く

なった。MCAA, MBAA, BCAA, DBAA, BDCAA, CDBAA, TBAA については、次亜 Na 殺菌処理による明確な生成は確認できなかった。

2) 魚介類の次亜 Na 殺菌処理及び水洗浄処理後の DCAA 及び TCAA 残存量の調査

魚介類として魚(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 DCAA 及び TCAA 残存量の推移を調べた。次亜 Na 殺菌処理後にカキより痕跡程度の DCAA が検出されたが、水道水による流水洗浄後には取り除かれ、全ての食品において不検出となった。また、TCAA も、殺菌及び水洗浄処理後のすべての試料において不検出となった。

3) 鶏肉の次亜 Na 殺菌処理及び水洗浄処理後の DCAA 及び TCAA 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 DCAA 及び TCAA 生成量の推移を調べた。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、オープンで 5 分間加熱調理後の DCAA 及び TCAA 残存量を調べたが、同様に不検出であった。

4) 豆腐の次亜 Na 殺菌処理及び水洗浄処理後の DCAA 及び TCAA 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 DCAA 及び TCAA 残存量の推移を調べた。殺菌処理及び水洗浄処理後の試料からも DCAA 及び TCAA は検出されなかった。

タンパク性食品の場合は、次亜 Na による殺菌処理により、ハロ酢酸がほとんど生成しておらず残存が低く抑えられたと考えられる。このため、殺菌処理された食品由来の DCAA 及び TCAA 暴露影響は主に生鮮野菜に限定されることが明らかとなった。

5) カット野菜の次亜塩素酸水殺菌処理による

DCAA 及び TCAA 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 DCAA 及び TCAA の生成能について調査した。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場合には、DCAA 及び TCAA は生成せず食品への残存は見られなかった。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 であり、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たと考えられる。このため、消毒副生成物による暴露影響の観点から比較した場合、次亜塩素酸水は次亜 Na に比べて優れていると考えられた。

6) 殺菌処理された食品由来の DCAA 及び TCAA 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 DCAA 及び TCAA の暴露量の推計を行った。独立行政法人国立健康・栄養研究所の平成 22 年度食品摂取頻度・摂取量調査の特別集計業務報告書の農産物・畜水産物の平均摂取量データから殺菌が想定される生野菜や浅漬け原材料野菜など計 46 品目を抽出し、食品群毎の喫食量を求めた。また、食品中の DCAA 及び TCAA 残存量は、食品群において水洗浄後に最も残存量が高かった食品をその食品群の代表値として選んだ。体重 55.1 kg のヒトの生鮮食品由来の一日当たりの経口暴露量は、DCAA は 0.74 µg/kg 体重/日、TCAA は 0.11 µg/kg 体重/日となった。

食品安全委員会の化学物質・汚染物質専門調査会清涼飲料水部会では、DCAA の評価結果を、発がんユニットリスク(VSD)を 7.8×10^{-3} mg/kg 体重/日としているが、VSD に対する生鮮食品由来の暴露量の割合は 9.5%であった。一方、TCAA は TDI を 6 µg/kg 体重/日に設定しており、TCAA の TDI に対する生鮮食品由来の経口

暴露量の割合は1.9%であった。いずれも安全性の評価値の10%以下であった。

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（USP法を改変）による定量については、良好な精度が得られる方法であることが分かった。比色法による定量法については、アルギン酸ナトリウムと、マンヌロン酸で感度が大きく異なり、単糖での発色が良いことが分かった。このことから、比色で定量する場合は、マンヌロン酸等の単糖ではなくアルギン酸ナトリウム等ポリマーの状態のものを標準品として、試料と同様に塩酸で加水分解を行った後定量することが望ましいと思われた。また、アルギン酸カルシウムのように水に溶解できない試料については比色法は採用できないことが明らかとなった。一方、HPLC法では、グルロン酸及びマンヌロン酸を用いた定量法は、試料を完全に単糖まで、酸分解することは困難であるため、その含量は非常に低いものとなった。また、マンヌロン酸は試薬として入手可能であるが、グルロン酸が入手不可能であるため単離精製が必要であり、時間と労力が必要である。以上の結果から、アルギン酸塩類の含量規格値を求める方法として適用は難しいと考えられた。

食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関わる研究では、指定添加物について再・追加調査を実施して、ほぼ調査活動を完了し、既存添加物につい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わる調査研究では、日本で使用された香料化合物の数は多いものの、その使用量は三極の中では一番少ないことが明らかとなった。また、各国・地域で使用が確認された化合物の推定摂取量からは、1.5 μ g/人/日（JECFA 限界閾値）以下で使用している化合物の割合が日本では約53%、米国約45%、欧州約43%であり、日本ば

かりでなく世界的に見ても少量で使用されている化合物の多いことが確認された。

諸外国の香料規制に関わる調査研究では、今回調査できた22の国・地域を見ると、香料の製品自体については約7割の国・地域が、加工食品の原材料としての香料表示については約9割の国・地域が何らかの法律により表示を規定していた。加工食品への表示については個別香料原料による表示を義務付けている国・地域は無く、規制している全ての国・地域は我が国と同様に一括名表示することを認めていることが分かった。このことから国際的にみても加工食品への香料表示については一括名表示が最も適した表示であるといえる。

アレルギー表示に関しては、約6割の国・地域で規制されていた。

GMO表示に関しては、規制している国・地域でも食品添加物にまで表示を求めているところは少なかった。

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

食品添加物の規格基準の向上を目的として、食品添加物の確認試験に国際的に多用されている赤外スペクトル（IR）法について、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、測定中の液体試料の揮発や、固体試料の場合、すりつぶしの有無によってスペクトルが変化する可能性があるといった問題点があることを明らかにした。従って、再現性に優れたATR法といえども、ATR法を添加物への確認試験に利用するためには、品目毎に測定条件を調査し、ATR法での測定条件と標準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

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法によるアゾキシストロピン及びピリメタニルの定量に関する検討を行った。本法は良好な真度、精度、直線性を

有し、アゾキシストロビン及びピリメタニルの絶対定量に有効な分析法であることが判明した。本結果は、アゾキシストロビン及びピリメタニ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考えられる。

D-4 香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究

昨年の結果を踏まえ、我が国独自の食品香料の中から、SARによる予測が陽性になったものについて簡易遺伝毒性試験を実施するという手順を取った。簡易遺伝毒性試験で陽性になったものは約10%であった。SARによる遺伝毒性の予測は、横に広げるよりも、一つのソフトに絞って香料を対象にカスタマイズすることが効率よい安全性評価につながることを示唆された。

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、DCAA又はTCAA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減少す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水洗浄後の残存量をもとに、生鮮食品由来のDCAA及びTCAAの暴露量を推計したところ、DCAA及びTCAAのVSD又はTDIに対する割合は、それぞれ9.5%及び1.9%であり、次亜Na殺菌

処理された食品由来の経口暴露量は評価値に比べ低いことが確かめられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kubota, H., Sato, K., Sasaki, N., Kawamura, Y., Ozeki, Y., Akiyama, H., "Formation of volatile halogenated compounds in fresh-cut cabbage treated with sodium hypochlorite" Jpn. J. Food Chem. Safety, 19, 94-103 (2012)

2. 学会発表

- 1) 北村陽二, 佐藤恭子, 小川数馬, 小阪孝史, Mohammad A. AZIM, 鶴野いずみ, 三輪大輔, 西村成美, 畠中香奈芽, 斎藤 寛, 柴 和弘: 確認試験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133年会, 横浜 (2013.3)
- 2) 須井哉, 川上久美子, 根岸沙記, 山田雅巳: ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討 8. 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡(2012.11)
- 3) Ohtsuki, T., Sato, K., Sugimoto, N., Akiyama, H. : Absolute quantification for ascorbic acid and benzoic acid in foods using quantitative ¹H NMR, 2012 ISNFF Conference and Exhibition, 米国 (2012.12)

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24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 アルギン酸の定量法に関する研究：アルギン酸塩類の定量法として、蒸留法（USP 法を改変）、比色法及び HPLC 法による検討を行なった。蒸留法では、いずれのアルギン酸塩類についても精度良く定量値が得られ、流通品についても適用が可能であった。比色法では、アルギン酸ナトリウム及びアルギン酸カリウムには適用可能であったが、アルギン酸及びアルギン酸アンモニウムでは蒸留法より高い値となり、規格値を超えてしまい、アルギン酸カルシウムは水に不溶であるため低い値しか得られなかった。HPLC 法についてはいずれのアルギン酸塩類についてもグルロン酸及びマンヌロン酸含量の合計が 3.3~24%と低い値しか得られず、酸分解が不十分であるため、規格試験としては適用が困難であることが分かった。

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：行政による食品添加物管理状況の妥当性の確認及び経年による食品添加物摂取の変化の把握のために、食品添加物一品目毎の生産・流通量の調査結果より国民1人あたり一日の食品添加物摂取量を推定する。指定添加物については、日本国内の食品添加物製造所を対象に平成22年度の生産・輸入・販売・使用について調査を行った。既存添加物等については、その製造・輸入業者を対象に、平成23年度の製造・輸入量についてアンケート調査を実施、回答内容を集計した。

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：香料化合物の国際的な使用動向を把握すると共に、香料化合物の安全使用や世界における日本の使用実態の客観的な確認等を目的として、日米欧三極の使用量実態調査結果及び使用量から計算される推定摂取量結果を比較し考察した。日本で使用された香料化合物の数は多いものの、その使用量は三極の中では一番少ないことが明らかとなった。また、各国・地域で使用が確認された化合物の推定摂取量から1.5 μ g/人/日（JECFA限界閾値）以下で使用している化合物の割合を求めたところ、日本では約53%、米国約45%、欧州約43%であり、日本ばかりでなく世界的に見ても少量で使用されている化合物の多いことが確認された。

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我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、香料の表示等に関する調査・研究を行った。香料製品の表示に関しては、22の国・地域の内15の国・地域で香料、添加物もしくは一般工業製品としての表示規定を持っていた。また、加工食品の原材料表示としての香料の表示に関する規定については20の国・地域で規定されていた。香料の表示については、香料製品、食品への表示のいずれも個別での香料原料表示を義務付けている国・地域は無く、全ての国・地域で一括名表示を認めていた。

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

井垣 理太郎 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。食品添加物公定書では、食品添加物として使用されるアルギン酸類の定量法として、ウロン酸に由来するカルボン酸から遊離し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定量法が公定法として採用されている。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複雑な構造を有した装置であり、より安全に試験を実施するためには水銀バルブを使用しない装置の利用が望まれている。一方、United States Pharmacopeia (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、Fig.1に示す水銀バルブを用いない装置で定量している。昨年度、USPで使用されている装置による蒸留法が適用可能であるか、公定法との比較検討を行い、蒸留時間の延長により公定法と同様の結果が得られる可能性が示唆された。今年度はその方法の妥当性評価及び流通品に対して適用可能であるか実態調査を行なった。また、蒸留法(USP法を改変)で含量を求めたアルギン酸ナトリウムを標準品として、比色による定量を行い、更にグルロン酸及びマンヌロン酸を標準品とした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わる研究

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推定を行う。

A-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

国際的な香料化合物の使用動向を把握すると同時に、香料化合物の安全使用、世界における日本の使用実態を客観的に確認するため、日米欧が同時期に同調査リストを使用して実施した各国・地域における香料化合物使用実態調査結果について、日欧米間の比較を行った。

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、我が国における香料規制のあり方検討の基礎資料とするため、各国・地域の香料規制を調査する必要がある。本年度は各国・地域の規制状況を把握するという解決すべき課題のうち、香料の表示に関する規制等について調査・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

アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸、アルギン酸カルシウム(株キミカ製)

2) 試薬・試液

0.1 mol/L塩酸、0.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液（容量分析用、和光純薬工業(株)製）、塩酸（ヒ素分析用、和光純薬工業(株)製）、塩化バリウム二水和物、フタル酸水素カリウム、フェノールフタレイン（特級、和光純薬工業(株)製）、亜鉛（ヒ素分析用、小宗化学薬品(株)製）、グラスウール（日本石英ガラス(株)製）、アルギン酸リアーゼ（From *Flabobacterium* sp.シグマ社製）、D-mannuronolactone（Carbosynth社製）、その他は試薬特級を用いた。なお、蒸留法には超純水製造装置から採取した新鮮な水を使用した。

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を中水で1 Lとし0.25 mol/L 水酸化ナトリウム溶液とした。この溶液は、フタル酸水素カリウムを粉末とし、100℃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、たびたび、滴定した（指示薬フェノールフタレイン試液2 滴）。

③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。

④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100 mLとした。

3) 器具・装置

USPアルギン酸定量用蒸留装置（6546、ACE GLASS社製）

シリンジフィルター（W-25-2、H-25-5、東ソー(株)製）

4) 操作法

(1)蒸留法（USP法を改変）

Fig.1 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50mL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3時間（USP法は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。

以下に示す、0.25 mol/L水酸化ナトリウム溶液1 mL当たりの当量を用いて計算し、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)比色法

①試料液の調製

アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウム約500mgを水30 mLに溶解し、その液をナスフラスコに移し、凍結乾燥を行なったものを試料とし、アルギン酸は0.05mol/L炭酸ナトリウム溶液に溶解し、アルギン酸カルシウムは水に溶解しないため、粉末を採取し、1mg/mL水溶液を調製し、各アルギン酸塩類水溶液を50 µg/mL相当となるように正確に希釈し試料液とした。

②ナフトレゾルシノール法¹⁾

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、酢酸ブチル層をフィルターろ過し、566 nmで比色定量した。アルギン酸ナトリウム溶液を希釈したものの標準品として、試料液と同様に操作し、得られた値をア

ルギン酸ナトリウム量として算出後、それらを各アルギン酸塩の分子量に換算し、各アルギン酸塩量を求めた。

(3)HPLC法

①アルギン酸塩類の酸分解

Matsumoto²⁾らの方法に従い、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸アンモニウム約500mgを水30 mLに溶解し、その液をナスフラスコに移し、凍結乾燥を行なった。凍結乾燥で得られた試料100~150 mg採取し、アルギン酸及びアルギン酸カルシウムは水に溶解しないため、粉末を100~150 mg採取し、そこへ2.5mol/Lトリフルオロ酢酸 (TFA) 溶液20mLに溶解し、100℃で6時間加熱した。その後、試料液をナスフラスコに移し、3~5 mLのメタノールを加え、エバポレーターを用いて40℃で減圧乾固した。その後、40℃に加温しながら、窒素パージを行い、TFAを取り除いた。残留物を1%トリエチルアミン水溶液で20 mLとし、そのうち4 mLを採取し、フィルターろ過後HPLC用試料液とした。

②酵素による酵素分解

①の方法で酸分解した試料約20mgを採取し、少量の水で溶解した後、1%アンモニア水を加えpH6となるように調整し、4mLとした。その液をヒートブロックで37℃で5分間予備加熱し、アルギン酸リアーゼ水溶液 (5 unit/mL) を200 µLを加え、37℃で反応させた。30分後、1時間後にヒートブロックから取り出し、沸騰水浴で5分間加熱し、反応を停止させ、凍結乾燥を行い、1%トリエチルアミン水溶液4mLに溶解し、フィルターろ過後酵素反応HPLC用試料液とした。

③HPLCによる定量

アルギン酸塩類を酸等で加水分解し、精製し得られた、グルロン酸及びマンヌロン酸で定量することを試みたが、含量が非常に少なかったため、マンヌロノラクトンについては試薬で購入可能であったため、マンヌロノラクトンを1%トリエチルアミンで溶解し、マンヌロン酸標準液(0.5~5 mg/mL)を調製し、検量線を作成した。グルロン酸については試薬が購入できなかったため、単離

精製した試料溶液中のグルロン酸含量をマンヌロン酸を用いてナフトレゾール比色法により定量し、同様に標準液 (0.01~0.05 mg/mL)を調製し、検量線を作成した。アルギン酸塩類についてはHPLC用試料液及び酵素反応HPLC用試料液を20µL注入し、検量線を用いてマンヌロン酸及びグルロン酸の定量を行なった。ただし、グルロン酸の検量線範囲は低濃度であったため、各試料液を10倍希釈したHPLC用試料液及び酵素反応HPLC用試料液ものについて、グルロン酸を定量した。

④HPLC条件

カラム : Zorbax SAX、5µm、4.6mm×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 : 0.7N酢酸、流速 : 1.4 mL/min、カラム温度 : 40℃、検出器 : RI検出器

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

指定添加物については厚生省が作成した「平成12年1月末現在・食品添加物製造・輸入業者名簿」に基に、その後の情報を付け加えて、これら事業者へ出荷実需の調査表を送り、平成22年度の数値の記入を依頼した。回収した調査表を集計し、研究班で未報告者、数値確認など精密調査事項を抽出し、2年目アンケートを行い、再度集計処理した報告書に基づき、3年目、研究班が内容を検討且つ評価、解析、考察を行い、日本人の平均一日食品添加物の摂取量を推定する。既存添加物については前回実施した調査で、当該品目の生産・輸入の実績があると回答のあったものに、その後の情報を付け加えて、これら事業者へ調査票を送り、平成23年度の数値の記入を依頼した。回収した調査票を集計し、研究班で検討を加え、2年目再調査、追加調査を行い、研究班が内容の評価、解析、考察を行い生産・輸入された総量を推定する。

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

平成23年度の使用量調査結果を基に、IOFIから提供を受けた欧米で同時期に実施した調査結果（平成22年1月～12月）と比較、検討・考察した。

日米欧の香料化合物使用量実態調査結果を比較するに当たり各国・地域の調査結果を以下の通り整理した。

1)分類

コアリストのフレーバー物質を日本の18類、個別指定品目、日本で未認可の香料化合物及び日本では香料ではない化合物に分類した。

2)日本では香料ではない化合物の削除

欧米ではフレーバー物質とされコアリストに記載されているが、日本では香料とみなされない化合物をリストから除外した。

3)推定摂取量の算出

食品香料化合物の使用量データを基に推定摂取量を算出し、日本のデータとの比較表を作成した。

なお、摂取量の推定はPCTT法にて行ったが基準となる消費人口、報告率については下記の数値を使用した。

日本 1億2000万人 \times 0.1=1200万人、報告率90%

米国 3億1000万人 \times 0.1=3100万人、報告率80%

欧州 3億2000万人 \times 0.1=3200万人、報告率80%

B-4 諸外国の香料規制に関わる調査研究

1.調査範囲

香料に関する表示については、香料製品に対する表示及び香料を使用した食品への表示の二つがある。今回の調査は両方とも可能な範囲で調査を行った。

また、国・地域によっては香料の製造においては、法規制だけではなく、宗教による制約も考慮が必要でありその情報が必要である。宗教に関しては、その解釈がまちまちであるため、入手できた資料による根拠及び基本的な制約についてのみにとどめた。

2.調査方法

法令資料は当該国・地域の政府および関係機関、FAOの法規データベース、独立行政法人日本貿易振興機構（ジェトロ）のWeb siteを参照した。当該国・地域の政府機関のWeb siteに法令の英訳、解説、またはQ&A等が掲載されている場合は、それらも法令に準じるものとして利用した。また会員企業が直接当局へ問い合わせを行い結果が得られた場合や香料会社の海外支店などを通じて得られた情報も利用した。更に、宗教に関しては関連する書籍等を参照した。

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

昨年度の公定法及びUSP法でアルギン酸類の定量を行った結果、第8版食品添加物公定書における公定法よりUSP法での定量結果が低く、その結果が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た。そこで、USP法で、蒸留時間を公定法と同じ3時間とし、各試料n=3での分析を行った。その結果、Table 1に示すように、いずれの試料についても平均含量92.8～99.6%、相対標準偏差は0.9～3.0%となり、ばらつきも小さかった。さらにUSP法で3時間蒸留する方法を用いて、流通品について定量を行なったところ、Table 2に示すように、いずれも含量規格値内に収まる結果となった。

2)比色法

蒸留法で定量したアルギン酸ナトリウムを標準品として、ナフトレゾルシノール比色法によるアルギン酸塩類の定量を行った。その結果、検量線については、Fig.2及び3に示すように、アルギン酸ナトリウム及びマンヌロン酸により良好な検量線が得られたが、傾きに大きな違いが見られた。マンヌロン酸は単糖であることから、今回の検量線はアルギン酸ナトリウムの検量線を用いることとした。アルギン酸ナトリウムの検量線により、各試料を定量したところ、Table 3に示すように、アルギン酸カルシウムが水に不溶であったためか、

含量が38%程度と低い値であった。その他の試料については、91.1~108.9%となり、アルギン酸ナトリウム及びアルギン酸カリウムでは規格値内に収まる結果が得られたが、アルギン酸アンモニウム及びアルギン酸において規格外の含量値が得られた。また、これらの結果を蒸留法で得られた結果と比較すると、Table 4に示すように、アルギン酸ナトリウムでは蒸留法での結果が高めに出ており、アルギン酸カリウムはほぼ同じ結果が得られ、アルギン酸アンモニウムとアルギン酸は蒸留法が低い結果が得られた。

3)HPLC法

グルロン酸及びマンヌロン酸を用いたHPLCによる定量法については、2.5mol/L TFAによる酸分解のみが不十分である可能性があることを考慮し、酸分解した試料について、さらに、酵素による加水分解を行なった。酸分解したもの、酸分解及び酵素処理したもの、いずれも、グルロン酸及びマンヌロン酸のピークが検出され、良好に分離した(Fig.4)。グルロン酸及びマンヌロン酸それぞれの標準液についてHPLCにより分析し(Fig.5、6)、検量線を作成し(Fig.7、8)、各アルギン酸塩類のHPLC用試料液及び酵素反応HPLC用試料液中のグルロン酸及びマンヌロン酸含量を定量した結果、Table 5に示すようにグルロン酸及びマンヌロン酸の含量の合計は、酵素処理しなかったものより、酵素処理(0.5時間)したものの方が若干合計値が高くなったが、著しく高くなるものはなかった。また、酵素処理時間を1時間としても、それ以上高くなるものはなく、若干減少するものもあった。また、いずれの試料についてもグルロン酸及びマンヌロン酸含量の合計は3.3~24%となり、低い値となった。特にアルギン酸カルシウムでは3.3~5.0%と低い値であった。

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

指定添加物については、第10回調査の第2年度にあたり、平成22年度を調査対象に再・追加調査を実施した。発送した調査票は初年度分と本

年度の再・追加調査分を合わせて全国688箇所の会社・事業所となった。回収数は562(回収率81.7%)であった。既存添加物については、本年度は第5回調査の初年度にあたり、平成23年度を調査対象として、全国453箇所の事業所に調査票を送付した。調査票の回収率は80.4%、製造または輸入していると回答した企業は243社(回収数に対する比率は66.8%)であった。

回収された調査票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 名称と全出荷量、純食品向け出荷量、輸出量調べ

集計2 食添番号順 製造会社数、全出荷量、純食品向け出荷量、輸出量調べ

集計3 食品添加物名別 食添以外の用途調べ

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

1) 日米欧三極で使用されているコアリスト中の食品香料化合物の品目数と年間使用量

日本における①個別指定品目、②類指定品目、③日本では使用できない香料化合物に分類して欧米の各使用品目数、数量について整理した。日米欧が共通して使用した2187化合物を収載した調査リスト(コアリスト)のうち、調査期間中に日本では1456化合物(使用量約1249t)、米国では1085化合物(使用量約6697t)、欧州では1204化合物(使用量約5249t)が使用されていた。3極の中では、日本で使用されている品目数が最も多く、総使用量に関しては、日米欧の人口比率(約1:3:3)を考慮しても、日本が一番少ないことが明らかとなった。また、日本では個別指定品目とされている香料化合物は欧米でも使用量占有率が60%以上と高いことから、比較的大量に使用される化合物の傾向は三極とも類似していることがうかがえた。

2) 日米欧の使用量の多い上位50品目についての比較

米国の使用量上位50品目を基準にした日本・EUとの比較及びEUの使用量上位50品目を基準