

図3 各シグナルの縦緩和時間 (単位: 秒)

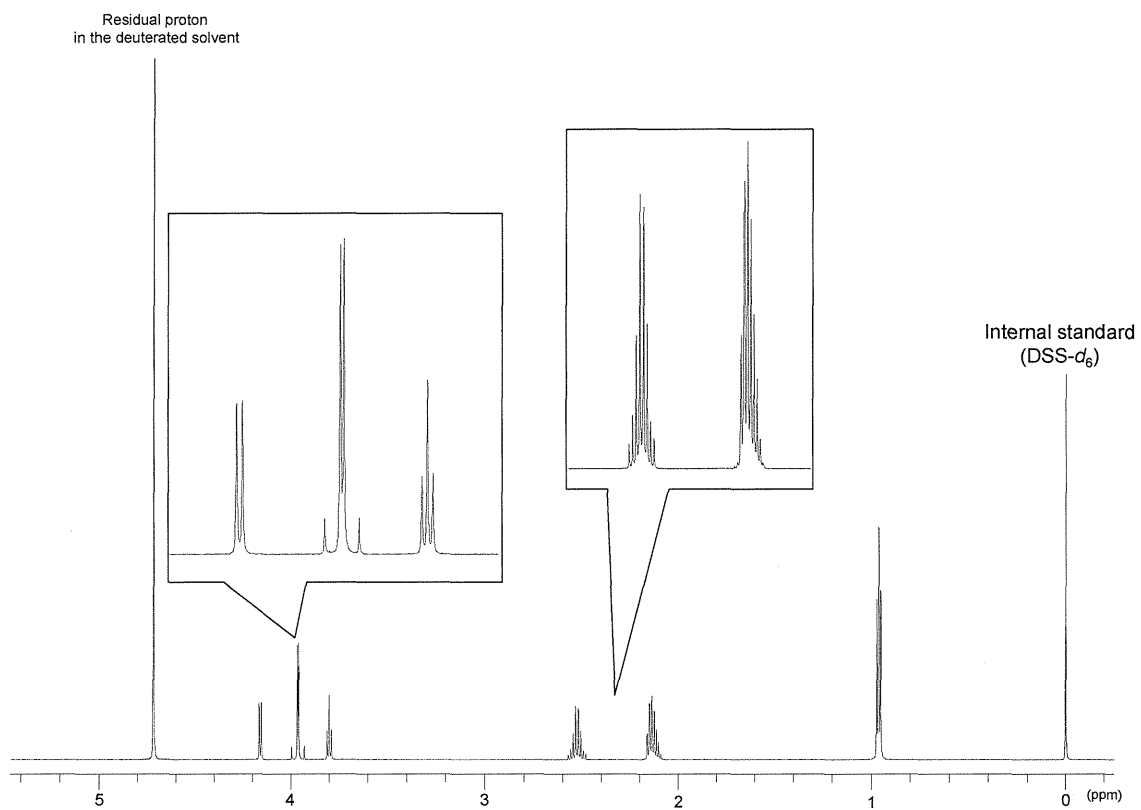


図4 グルタミルバリルグリシンの¹H NMR スペクトル (qHNMR 測定条件, 測定溶媒: D₂O)

ICP-MS 等を用いた食品添加物中の鉛分析法に関する研究

研究分担者 建部 千絵 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 食品添加物用無機塩類（1価の陽イオンを含む）について、親水性メタクリレートを母体としたイミノ二酢酸基を導入した固相カートリッジ（Inert Sep ME-1）を用いた鉛の抽出法の検討を行なった。塩化カリウム、塩化アンモニウム、酢酸ナトリウムまたは硝酸ナトリウムに 2 µg/g 相当の鉛を添加し、固相カートリッジによる鉛の抽出操作を行なったところ、いずれの試料においても、89.8～102.8%の良好な回収率が得られた。硫酸ナトリウムでは回収率が低かったが、塩酸(1→4)溶液を加えて加熱し、半分程度に濃縮した後、蒸発した水を補い、固相カートリッジにより鉛の抽出操作を行なうことで、92.6%の回収率が得られた。以上の結果から、1価の陽イオンを含む食品添加物用無機塩類については、Inert Sep ME-1 を用いた鉛の抽出が可能であり、1 価の陽イオンを含む無機塩類に設定されている溶媒抽出法の代替法として有用な方法であると考えられた。

A. 研究目的

塩類を多量に含む食品添加物においては、ナトリウム、カリウム、バリウム、カルシウム等イオン化エネルギーが低い陽イオンが多量に含まれると、原子吸光光度計による分析でイオン化干渉が起り、鉛の分析が困難となるため、これらの陽イオンを取り除くことが必要とされる。多量の陽イオンが含まれる試料からの鉛の抽出方法としては、ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム（APDC）溶媒抽出法や、イオン交換樹脂法などの前処理を行い、共存元素との分離や目的元素の濃縮を行う方法が採用されている。しかし、溶媒抽出法は操作が煩雑で、多検体を迅速に処理することは難しい。また、試験溶液が酢酸ブチル溶液であるため、原子吸光光度計で分析する際、溶

媒の揮散等、分析環境への配慮が必要である。一方、イオン交換樹脂を用いる方法は選択性に乏しいため、目的元素以外の元素が濃縮され、それらが干渉する可能性がある。以上の理由からより簡便な方法で、良好な分析環境で試験でき、目的元素への選択性が高い方法が望まれている。

近年、イオン交換樹脂と比較して、選択性が優れているキレート樹脂が利用されており、親水性メタクリレートを母体としたイミノ二酢酸基を導入した固相カートリッジ（Inert Sep ME-1（GLサイエンス(株)）¹⁾NOBIAS Chlate PA-1（日立ハイテクノロジ）²⁾やキレートディスク（エムポア TM キレートディスク（住友スリーエム社）³⁾を用いた方法が報告されている。しかし、これらの報告は食品、河川、海水及び尿中

の微量金属の分析法に対する報告であり、食品添加物の無機塩類に対しての報告はない。

そこで、本研究では、食品添加物の内、1価の陽イオンの無機塩類、特に1価の陽イオンを多量に含む食品添加物を対象とし、食品添加物の鉛試験法の前処理として固相カートリッジの利用が可能かどうか検討したので報告する。

B. 研究方法

1) 試料

塩化カリウム（試薬特級）は和光純薬工業（株）製を用いた。塩化カリウム（食品添加物用）、塩化アンモニウム（食品添加物用）、硫酸ナトリウム（食品添加物用）、酢酸ナトリウム（食品添加物用）、硝酸ナトリウム（食品添加物用）は一般財団法人日本食品添加物協会を通じて入手した。

2) 試薬・試液

硝酸（有害金属測定用）は和光純薬工業（株）製、酢酸アンモニウム溶液（500 g/L、鉄試験用）は関東化学（株）製、塩酸（有害金属測定用）は和光純薬工業（株）製、鉛標準液（1000 µg/mL）は和光純薬工業（株）製を用いた。

0.1 M 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム溶液 4 mL を水で 250 mL とした。

0.5 M 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム溶液 80 mL を水で 1000 mL とした。

塩酸(1→4)溶液：塩酸 250 mL を水で 1000 mL とした。

硝酸(1→100)溶液：硝酸 10 mL を水で 1000 mL とした。

鉛標準原液：鉛標準液(1000 µg/mL)5 mL

を水で 50 mL とし、鉛標準原液とした(100 µg/mL)。

鉛標準溶液：鉛標準原液(100 g/mL)5 mL, 2.5 mL, 1 mL 及び 0.5 mL をそれぞれ正確に取り、硝酸溶液で 50 mL とし、10, 5, 2 及び 1 µg/mL 標準溶液とした。10 µg/mL 標準溶液 2.5, 1 及び 0.5 mL をそれぞれ正確に取り、硝酸溶液で 50 mL とし、0.5, 0.2 及び 0.1 µg/mL 標準溶液とした。

3) 器具・装置

ダイヤフラム真空ポンプ、SPE バキュームマニホールド、無機分析用吸引マニホールド DigiTUBE 用ラック、PTFE デリバリャーチップ、1, 3, 6 mL アダプター付き 25 mL リザーバー、Inert Sep ME-1 (250 mg/6 mL)、DigiTube は GL サイエンス（株）製を用いた。原子吸光光度計は（株）島津製作所製 AA-6800 を用いた。

4) 操作法

(1) 固相カートリッジによる前処理法の検討

① 試料液の調製

各試料 2 g を量り、塩酸溶液 20 mL に溶解し、アンモニア水を加え、pH5~6 となるように調整し、試料液とした。

② 固相カートリッジによる鉛の抽出

Inert Sep ME-1 を硝酸(1→100)溶液 5 mL(流速 20 mL/min)で洗浄し、水 20 mL 以上(流速 20 mL/min)でカートリッジ内に残る硝酸を洗浄した。0.1 M 酢酸アンモニウム溶液 5 mL を流出させ、試料液を流速 5 mL/min でカートリッジへ負荷した。0.5 M 酢酸アンモニウム 10 mL 及び水 10 mL で洗浄後、硝酸(1→100)溶液約 7 mL で流速 1

mL/min でゆっくりと溶出させ、溶出液に硝酸(1→100)溶液を加え 10 mL に定容し、試験溶液とした。ただし、試料を用いずに試料液と同様に操作し、得られた液を空試験溶液とした。

(2) 固相カートリッジに対する鉛吸着量の検討

鉛濃度 0.2 µg/mL の塩酸(1→4)溶液 20 mL, 50 mL, 100 mL 及び 200mL (鉛として 4, 10, 20 及び 40µg) をアンモニア水で pH5~6 に調整した液を試料液とし、(1)② 固相カートリッジによる鉛の抽出に準じて、試験溶液を調製した。(5)原子吸光度法による鉛の定量に従い、検量線より、試験溶液中の鉛濃度を算出し、鉛の添加回収率を求め、固相カートリッジに吸着した鉛吸着量を算出した。

(3)塩化カリウムを用いたカートリッジを使用した鉛試験検討 (鉛添加回収試験)

試薬特級の塩化カリウムに 2 µg/g 相当の鉛を添加し、(1)② 固相カートリッジによる鉛の抽出に準じて試験溶液を調製し、鉛の添加回収率を求めた。ただし、溶出液は 2 M 硝酸及び硝酸(1→100)溶液の 2 種類で検討した。2 M 硝酸を用いた場合は 2 mL で溶出させ、水で 10 mL に定容し試験溶液とした。硝酸(1→100)溶液を用いた場合は、約 7 mL で溶出させ、硝酸(1→100)溶液で 10 mL に定容し試験溶液とした。(5)原子吸光度法による鉛の定量に従い、検量線より、試験溶液中の鉛濃度を算出し、鉛の添加回収率を求めた。

(4)食品添加物試料を用いた鉛の添加回収試

験の検討

食品添加物用の試料を用いて、各食品添加物の鉛規格値相当量の鉛を添加し、その後、(1)②固相カートリッジによる鉛の抽出に準じて、試験溶液を調製し、(5)原子吸光度法による鉛の定量に従い、検量線より、試験溶液中の鉛濃度を算出し、鉛の添加回収率を求めた。

(5)原子吸光度法による鉛の定量

試験溶液、標準溶液及び空試験溶液につき、原子吸光度法により次の操作条件で吸光度を測定した。標準溶液の吸光度より検量線を作成し、試験溶液吸光度から空試験溶液吸光度を差し引いた値から、検量線を用いて (Fig.1), 試験溶液中の鉛濃度を求め、試料中の鉛量を算出した。

操作条件

光源ランプ 鉛中空陰極ランプ

分析線波長 283.3 nm

支燃性ガス 空気

可燃性ガス アセチレン

C. 研究結果

1. カートリッジへの鉛の吸着量の検討

Inert Sep ME-1 (250 mg/6 mL) への鉛吸着量を検討するために、鉛濃度 0.2 µg/mL の塩酸(1→4)溶液 20 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL を採取し、アンモニア水で pH5~6 に調整した液を試料液とし、鉛の抽出操作を行なったところ、Table 1 に示すように 87.3~96.2%の鉛が回収された。

2. 塩化カリウムを用いたカートリッジを使用した鉛試験検討 (鉛添加回収試験)

試薬特級の塩化カリウムに 2 µg/mL 相当の

鉛を添加し、2 M 硝酸 2 mL で溶出し、水で 10 mL としたものと硝酸(1→100)溶液 約 7 mL で溶出し硝酸(1→100)溶液で 10 mL としたもので、鉛の添加回収試験を行なったところ、Table 2-1 及び 2-2 に示すように、n=3 での平均添加回収率は 2 M 硝酸で溶出したものは 104.3±5.5%，硝酸(1→100)溶液では 96.9±9.8% となり、いずれも良好な回収率が得られた。

3. 食品添加物試料を用いた鉛の添加回収試験の検討

食品添加物用の塩化カリウム、塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナトリウムを試料とし、各試料に 2 µg/g となるように鉛を添加し、固相カートリッジによる鉛の添加回収試験(試行回数 n=3)を行なった。

いずれも空試験溶液からは鉛が検出されず、塩化カリウムで 105.2±3.0%，塩化アンモニウムで 102.6±5.8%，酢酸ナトリウムで 98.4±3.1%，硝酸ナトリウムで 89.8±3.9% の良好な回収率が得られた。しかし、硫酸ナトリウムでは 4.46±3.3% となり、添加回収率が低かった(Table 3~7)。

D. 考察

1. カートリッジへの鉛の吸着量の検討

Inert Sep ME-1 (250 mg/6 mL) へは鉛として、4~40 µg 相当が吸着可能であることが明らかとなった。これらの鉛量は鉛規格値 2 µg/g として、試料採取量 2~20 g に相当するが、原子吸光光度計で分析した場合でも、試料 2 g を採取し、固相カートリッジで鉛を抽出後、試験溶液 10 mL として、鉛濃度 0.4 µg/mL でも分析が十分可能であ

った。ただし、装置の感度が異なる場合も考慮すれば、必要に応じて試料採取量を増やすことも可能であることが明らかとなった。

また、試料液 200 mL の場合、pH を調整するために多量のアンモニア水を要したため、試験溶液中に多量の塩が生じたことが推測されたが、固相カートリッジにより鉛が選択的に抽出されたことにより、多くの塩が取り除かれ、原子吸光光度計でも分析が可能となり、良好な鉛の回収率が得られることが明らかとなった。

2. 塩化カリウムを用いたカートリッジを使用した鉛試験検討(鉛添加回収試験)

今回検討した結果からは、2 M 硝酸 2 mL で溶出し、水で 10 mL としたものと硝酸(1→100)溶液 7 mL で溶出し硝酸(1→100)溶液で 10 mL に定容したのものでも良好な回収率が得られた。また、ICP や ICP/MS への応用を考慮した場合、酸由来の干渉を避ける必要があることや、現在食品添加物公定書における鉛試験における検液及び比較液は硝酸(1→100)溶液で調製されていることから、溶出液は硝酸(1→100)溶液を用いることが望ましいと考えられた。

3. 食品添加物用硫酸ナトリウムを用いた前処理法の検討

食品添加物用硫酸ナトリウムについて鉛の添加回収試験を行なった結果、鉛の回収率が悪かった。これは、硫酸イオンと鉛が塩酸溶液中で硫酸鉛となり不溶化し、固相カートリッジを通過できなかったと考えられる。硫酸鉛は塩酸溶液中で加熱することでアニオン交換され塩化鉛となり可溶化す

る。よって、鉛を 2 µg/g となるように添加した硫酸ナトリウムを塩酸(1→4)溶液で溶解する際、加熱することとした。加熱方法は、ホットプレートを 300℃に設定し、試料液が半分程度に濃縮されるまで加熱する方法と、蒸発乾固させる方法の 2 通りを行なった。それぞれ、加熱した後、冷後、蒸発した水を補い、20 mL とし、試料液として固相カートリッジによる鉛の抽出を行なった。その結果 Table 8 に示すように、回収率は 85.2%及び 83.0%となりいずれも良好な回収率が得られた。蒸発乾固させた場合、乾固させたあとに、試料が飛び散ることや、試料が部分的に高温で加熱される可能性があるため、鉛の回収率にばらつきが生じたり、悪くなることがあるため、2 倍程度に濃縮することが望ましいと考えられた。そこで、鉛を 2 µg/g となるように鉛を添加した硫酸ナトリウムを試料とし、塩酸(1→4)溶液に溶解し、300℃で加熱し、液量が半分程度になるまで濃縮後、蒸発した水を補った後、固相カートリッジで鉛を抽出したところ、Table 9 に示すように、n=3 での平均回収率は 92.7±3.3%となり、良好な結果が得られた。

4. その他の無機塩への応用

今回の検討結果から、硫酸ナトリウムのように、鉛を不溶化させる無機塩も存在するため、試料に応じた前処理が必要であると考えられた。今回用いた InertSep ME-1 は 1 価の陽イオンを吸着しないため、無機塩中の鉛のみを保持し、脱塩することが可能であったことから、1 価の無機塩中の鉛を抽出する方法としては有用であると考えられた。今回は 1 価の陽イオンを含む無機

塩類について良好な結果が得られたことから、今後、2 価の陽イオン（マグネシウム、カルシウム等）を含む無機塩類、有機酸塩及びリン酸塩類などについて検討を行う予定である。

E. 結論

食品添加物用無機塩類（1 価の陽イオンを含む）について、Inert Sep ME-1 を用いた鉛の抽出法の検討を行なった。塩化カリウム、塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、硝酸ナトリウムに 2 µg/g 相当の鉛を添加し、固相カートリッジによる鉛の抽出操作を行なったところ、いずれの試料においても、89.8～102.8%の良好な回収率が得られた。硫酸ナトリウムでは回収率が低かったが、硫酸ナトリウムに塩酸(1→4)溶液を加えた後、加熱して液量が半分程度になるまで濃縮し、冷後、蒸発した水を補い、固相カートリッジにより鉛の抽出操作を行なったところ、92.6%の回収率が得られた。

以上の結果から、1 価の塩を含む食品添加物用無機塩類の鉛試験法については、Inert Sep ME-1 を用いた鉛の抽出が可能であり、溶媒抽出法の代替法として有用な方法であると考えられた。今後、2 価の陽イオンを含む食品添加物用無機塩類などについて検討を行う予定である。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

- 1) Akamatsu S. et al., *Food Add. & Contam.: Part A*, **29**, 11, 1696-1700 (2012)
- 2) 竹内ら, *日本職業・災害医学学会会誌*, **55**, 1, 15-19 (2007)
- 3) 新野ら, *Bull. Soc. Sea. Water Sci. Jpn*, **58**, 85-92 (2004)

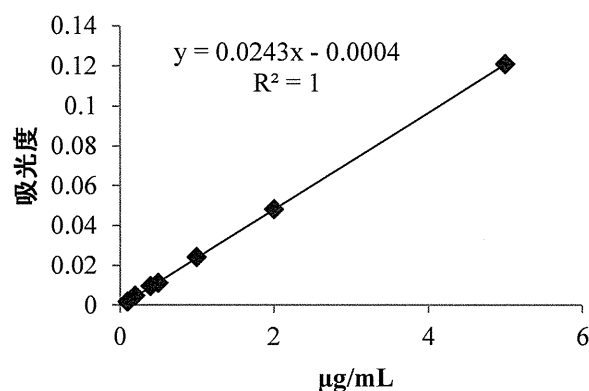


Fig.1 原子吸光光度計による鉛の検量線 (例)

Table 1 Inert Sep ME-1 の鉛吸着量の検証

試料液量 (mL)	試料液中 鉛濃度 (µg/mL)	想定試料 採取量 (g)	カートリッジ へ負荷される 鉛量 (µg)	空試験溶液 吸光度 濃度 (µg/mL)	試験溶液 吸光度 濃度 (µg/mL)	Recovery (%)
20 mL	0.2	2	4	N.D.	0.0048 0.23	95.7
50 mL	0.2	5	10	N.D.	0.0116 0.51	96.2
100 mL	0.2	10	20	N.D.	0.0222 0.97	93.2
200 mL	0.2	20	40	N.D.	0.0405 1.74	85.5

N.D. 検出下限以下 (0.1 µg/mL 以下)

Table 2-1 Inert Sep ME-1 からの溶出液
2 M 硝酸 2 mL で溶出後、水で 10 mL にメスアップ

	空試験溶液 吸光度	試験溶液 吸光度 濃度(µg/mL)	Recovery (%)
KCl-1	N.D.	0.009 0.404	101.1
KCl-2	N.D.	0.0099 0.443	110.6
KCl-3	N.D.	0.009 0.404	101.1
		平均	104.3
		RSD	5.5

N.D. 検出下限以下 (0.1 µg/mL 以下)

Table 2-2 Inert Sep ME-1 からの溶出液の検証
 硝酸(1→100)溶液で溶出後，硝酸(1→100)溶液で 10 mL にメスアップ

	空試験溶液 吸光度	試験溶液 吸光度 濃度(μg/mL)	Recovery (%)
KCl-1	N.D.	0.009 0.380	95.0
KCl-2	N.D.	0.010 0.430	107.5
KCl-3	N.D.	0.008 0.353	88.2
		平均	96.9
		RSD	9.8

N.D. 検出下限以下 (0.1 μg/mL 以下)

Table 3 固相カートリッジ前処理による食品添加物用塩化カリウムに
 対する鉛の添加回収試験

	空試験溶液 吸光度	試験溶液 吸光度 濃度(μg/mL)	Recovery (%)
KCl-1	N.D.	0.0097 0.412	102.9
KCl-2	N.D.	0.010 0.434	108.6
KCl-3	N.D.	0.010 0.416	104.1
		平均	105.2
		RSD	3.0

N.D. 検出下限以下 (0.1 μg/mL 以下)

Table 4 固相カートリッジ前処理による食品添加物用塩化アンモニウムに
 対する鉛の添加回収試験

	空試験溶液 吸光度	試験溶液 吸光度 濃度(μg/mL)	Recovery (%)
NH ₄ Cl-1	N.D.	0.0091 0.385	96.2
NH ₄ Cl-2	N.D.	0.010 0.430	107.5
NH ₄ Cl-3	N.D.	0.010 0.416	104.1
		平均	102.6
		RSD	5.8

N.D. 検出下限以下 (0.1 μg/mL 以下)

Table 5 固相カートリッジ前処理による食品添加物用酢酸ナトリウムに対する鉛の添加回収試験

	空試験溶液 吸光度	試験溶液 吸光度 濃度($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
CH ₃ COONa-1	N.D.	0.0089 0.383	95.7
CH ₃ COONa-2	N.D.	0.010 0.407	101.9
CH ₃ COONa-3	N.D.	0.009 0.391	97.7
		平均	98.4
		RSD	3.1

N.D. 検出下限以下 (0.1 $\mu\text{g/mL}$ 以下)

Table 6 固相カートリッジ前処理による食品添加物用硝酸ナトリウムに対する鉛の添加回収試験

	空試験溶液 吸光度	試験溶液 吸光度 濃度($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
NO ₃ Na-1	N.D.	0.0092 0.359	89.8
NO ₃ Na-2	N.D.	0.010 0.377	94.2
NO ₃ Na-3	N.D.	0.009 0.342	85.5
		平均	89.8
		RSD	3.9

N.D. 検出下限以下 (0.1 $\mu\text{g/mL}$ 以下)

Table 7 固相カートリッジ前処理による食品添加物用硫酸ナトリウムに対する鉛の添加回収試験

	空試験溶液 吸光度	試験溶液 吸光度 濃度($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
Na ₂ SO ₄ -1	N.D.	N.D.	0.00
Na ₂ SO ₄ -2	N.D.	0.002 0.082	7.20
Na ₂ SO ₄ -3	N.D.	0.002 0.078	6.17
		平均	4.46
		RSD	3.9

N.D. 検出下限以下 (0.1 $\mu\text{g/mL}$ 以下)

Table 8 異なる溶解方法での固相カートリッジ前処理による食品添加物用硫酸ナトリウムに対する鉛の添加回収試験

	空試験溶液 吸光度	試験溶液 吸光度 濃度($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
無添加	N.D.	- -	-
添加 (1/2 濃縮)	N.D.	0.009 0.371	85.2
添加 (蒸発乾固)	N.D.	0.009 0.362	83.0

N.D. 検出下限以下 (0.1 $\mu\text{g/mL}$ 以下)

Table 9 固相カートリッジ前処理による食品添加物用硫酸ナトリウムに対する鉛の添加回収試験

	空試験溶液 吸光度	試験溶液 吸光度 濃度($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
Na_2SO_4 -1	N.D.	0.0092 0.359	89.8
Na_2SO_4 -2	N.D.	0.0090 0.368	92.0
Na_2SO_4 -3	N.D.	0.010 0.385	96.3
		平均	92.7
		RSD	3.3

N.D. 検出下限以下 (0.1 $\mu\text{g/mL}$ 以下)

日本独自の香料化合物についての遺伝毒性評価予測システムの研究

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一室長

研究要旨 126 の香料について、構造活性相関の予測と簡易 Ames 試験の結果を精査したところ、72 物質は試験結果どおりに予測していたが、12 物質は FAT の陽性結果を陰性と予測していた。今後、香料評価に対して SAR が効率よく働くようにするためには、香料に特化したカスタマイズが有効と思われる。

A. 研究目的

食品添加物の安全性確保の一環として、わが国独自香料の規格の向上が重要と考え、そのための適切な安全性評価を目指す。本研究では、構造活性相関手法を基にした遺伝毒性予測システムの研究を通して効率的かつ有効なアプローチを検討する。

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ふ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。

今年度は、SAR モデルによる予測と簡易 Ames 試験を実施した 126 化合物の結果について、SAR モデルの予測性、予測結果の組合せの検討などを実施し、SAR モデルに

よる予測が香料評価により有効に使われるための方法を考察した。

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 Ames 試験で陽性判定になる特徴的な部分構造（アラート）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。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 試験の陽性判定と相関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

ことができるソフトである。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試験の陽性判定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 SARモデルの予測性のパラメータ

SARモデルの予測性を比較するため次のような計算式でそれぞれのパラメータを算出し、予測性を比較した。(表2)

$$\text{感度}(\%) = N_+ / N_{F+} \times 100$$

$$\text{精度}(\%) = N_- / N_{F-} \times 100$$

$$\text{一致率}(\%) = (N_+ + N_-) / N_{\text{total}} \times 100$$

$$\text{偽陽性率}(\%) = (N_{F-} \cdot N_+) / N_{S+} \times 100$$

$$\text{偽陰性率}(\%) = (N_{A+} \cdot N_-) / N_{S-} \times 100$$

B-3 SARモデルの予測結果の組合せの検討

SARモデルは現時点では万能ではなく、アラートのデータを増やす、既知のAmes試験結果のデータを増やすなどで予測性を上げている状況である。医薬品等、特徴的な構造の予測に特化するため個別にカスタマイズすることにより予測性を上げて利用する場合も多い。一般的には、複数のSARモデルの予測の組合せで、パフォーマンスは上がると言われている。そこで、3つのSARモデルの判定について組合せ1, 2, 3を次のように定義し、それぞれの組合せでのパフォーマンスを上述のパラメータで比較した(表3)。

組合せ1: 3つのSARモデルの予測結果が一致した場合のみSARの判定を陽性(もしくは陰性)とする。一致しない場合は保留とする。

組合せ2: 3つのSARモデルの予測結果のうち、2つ以上一致した場合をSARの判定として採用する。

組合せ3: 3つのSARモデルの予測結果のうち1つでも陽性ならばSARの判定を陽性とし、陰性は3つともが陰性と予測した場合のみ。

C. 研究結果

C-1 SARの各モデルのパフォーマンス

SARでAmes試験結果を予測した物質126化合物を3回に分けて簡易Ames試験(FAT)を実施した結果と、SARの各モデルの予測との相関を表にした(表1)。SARの予測結果が陽性でFATが陽性であった物質は12化合物で、表1からわかるように(2+8+2=12)、複数のモデルで予測されたものではなく、一つのモデルだけが陽性を予測したものであった。一方、陰性予測で陰性であったもののほとんどが、3つのモデルともに陰性の予測をしたものであった。

次に、表1をもとにパラメータを算出した(表2)。いずれのモデルも精度、一致率に大きな差はなかったが、偽陽性率、偽陰性率についてはMultiCASEが他より15%程度小さい値であり、より良い結果を示した。

C-2 複数のSARモデルの予測結果を用いる場合の判定の組合せの検討

今回用いた126化合物については、3つのモデルで陽性と判定したものがなかったため、組合せ1の感度は計算するまでもなく0である。また、二つ以上のモデルで陽性の判定を示した物質も126化合物中34化合物と少なく、それに加えてFAT陽性になる物

質が24しかなかったことから、組合せ2の感度も0という結果になった(表3)。

表1 SARモデルの予測結果とFATの結果の相関

	FAT	SAR			合計
		陽性	保留*	陰性	
<i>Derek for Windows</i>	陽性	2	0	22	24
	陰性	19	4	79	102
	小計	21	4	101	126
<i>MultiCASE</i>	陽性	8	—	16	24
	陰性	30	—	72	102
	小計	38	—	88	126
<i>ADMEWorks</i>	陽性	2	—	22	24
	陰性	25	—	77	102
	小計	27	—	99	126

*Derekのシステムには陽性陰性の判定ができない、Equivocal (保留) というカテゴリがある。

表2 SARモデルのパフォーマンス

	<i>Derek</i>	<i>MultiCASE</i>	<i>ADMEWorks</i>
感度(%)	8.3	33.3	8.3
精度(%)	77.5	70.6	75.5
一致率(%)	64.3	63.5	62.7
偽陽性率(%)	109.5	78.9	92.6
偽陰性率(%)	21.8	18.2	22.2

表3 SARモデルの予測結果の組合せのパフォーマンス

	組合せ1	組合せ2	組合せ3
感度(%)	0	0	50
精度(%)	58.8	65.7	58.8
一致率(%)	47.6	53.2	57.1
偽陽性率(%)	N/C	102.9	79.2
偽陰性率(%)	33.3	26.4	16.7

N/C: 分母が0で計算できない。

C-3 SARが陽性を予測し、FATの結果も陽性だった化合物について

FATの陽性結果をSARが陽性と予測した化合物は、Derek、ADMEWorksともに2化合物、MultiCASEは8化合物であった。それらの名称を表4にまとめた(表4)。それぞれの構造は別添の図1に示した。

表4 SARとFATともに陽性の物質

MultiCASE	Derek
2-metyltetrahydrofuran-3-one	4-methoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone
linalool oxide	1-octen-3-one
acetaldehyde 2,3-butanediol acetal	
acetaldehyde benzyl ethyl acetal	
acetaldehyde benzyl hexyl acetal	
2-butoxyethyl acetate	ADMEWorks
2-ethoxyethyl acetate	α -angelicalactone
acetaldehyde diethyl acetal	isobutyl methyl disulfide

C-4 SARモデルがいずれも陰性を予測し、FATの結果が陽性だった化合物について

いわゆる偽陰性だった化合物について、別添の表5にまとめた。香料における18項目の中の3, 4, 5類がほとんどである程度構造の共通性が見られた。

D. 考察

まず、SARモデルが陽性と判定する場合について考える。FATの陽性を正しく予測できた化合物が、SARモデルごとに異なっていたことから(表1, 4)、複数のSAR

モデルが陽性と判断すれば陽性の可能性が高いとは言えないことがわかる。図1にそれぞれの SAR モデルが陽性を正しく判定できた化合物の構造を示した。例として数は多くないが、それぞれのモデルに分類されている化合物に、ほかのモデルには見られない特徴がある。例えば、MultiCASE の場合、8 個いずれの化合物にもエーテル・環状エーテルとメチル基が含まれる。すなわち Acetal および Acetate が多くを占めている。

次に、SAR モデルが陰性と判定する場合について考える。表1でそれぞれの SAR モデルが陰性と判定し、実際に陰性だった化合物にはほとんど重なりがあり、表3では組合せ3の偽陽性率が低いことが示された。このことは、『複数の SAR モデルが陰性と判定した場合、実際の化合物に変異原性がないと考える』ことが妥当であることを示していると言える。126 化合物のうち、ある 43 化合物については、SAR モデルがいずれも陰性と判定したものばかりを集めて FAT を実施している。その結果、3 化合物のみが FAT 陽性であったことも（精度 93%）、この考え方を支持していると言えるだろう。

最後に、SAR で陽性と判定されなかったにもかかわらず、FAT で陽性になった 12 化合物について（表5）、文献検索等から得られた情報を含め考察する。

diisoamyl ether : EFSA が香料グループ評価 (FGE.59) で *aliphatic ethers* の評価をしており、問題なしという結論である。

diisoamyl ether の類縁物質としては *2-butyl ethyl ether* を評価している。

tert-butyl acetoacetate : FGE.92 で類縁物質の *ethyl acetoacetate* の評価をしており、Ames 試験は陰性の結果を得ている。

isopropyl lactae : FGE.64 で類縁物質の *ethyl lactate* と *lactic acid* が評価されており、いずれも Ames 試験は陰性である。

2-hydroxyethyl salicylate : FGE.52 で類縁物質の *methyl salicylate* が評価されており、Ames 試験は複数実施されていずれも陰性、安全性には懸念がないとされている。

methyl N,N-dimethylantranilate : FGE.84 で類縁物質（メチル基が1つ少ない）の *methyl N-methylantranilate* が評価されており Ames 試験は複数実施されていずれも陰性、安全性には懸念がないとされている。

neryl acetate : FGE.62Rev1 で類縁物質の *geranyl acetate* が評価されており Ames 試験は複数実施されていずれも陰性、安全性には懸念がないとされている。

2,4-dimethyl-3-pentanone 及び、**2-methyl-3-pentanone** : FGE.7 Rev3 で類縁物質の *4-methyl-2-pentanone* が評価されており Ames 試験は2件の実施がありいずれも陰性、安全性には懸念がないとされている。

3,4-dimethoxyacetophenone : FGE.22Rev1 で類縁物質の *4-hydroxy-3,5-dimethoxy acetophenone* が評価されており Ames 試験は多少不十分ながら2件の実施がありいずれも陰性、安全性には懸念がないとされている。

verbenone : FGE.47 Rev1 において

bicyclic ketones を含む化合物の評価がされており、類縁物質の評価から、verbenone についても遺伝毒性の懸念は無いとされている。

2,8-p-menthadien-1-ol : FGE.18Rev2 で類縁物質の beta-terpineol(環の二重結合がない)が評価されており Ames 試験は陰性、安全性には懸念がないとされている。

dinonyl sulfide (C₁₈H₃₈S) : 類縁物質というには炭素数が少ないが、allyl sulfide (C₆H₁₀S) についての評価が、simple aliphatic and aromatic sulfides and thiols というカテゴリーで、JECFA により実施されて WHO Technical Report series 896 に掲載されている。安全性の懸念はないとされている。

以上より、いずれの化合物についても構造類似物質の安全性には懸念がないとされていることから、SAR モデルの Ames 試験結果の予測が誤りであったと結論付けることは正しくないことかもしれない。FAT についてのこれまでのデータは、陽性結果は標準的な Ames 試験結果と同等であると考えるという結論ではあるが (Genes & Environ., 31, 47-55, 2009), まだ 40 物質程度の結果から導かれたものである。したがって、これら 12 物質の結果については、標準的な Ames 試験を実施して、FAT の結果を確認することが必要であると考える。

E. 結論

SAR モデルの予測は、モデルごとにアラートの違いが多少あるため、いずれの予測も陰性になった場合は、実際の Ames 試験も陰性である確率が高いが、陽性結果の予測にはばらつきがあった。今後、香料評価に対して SAR が効率よく働くようにするためには、香料に特化したカスタマイズが有効と思われる。

F. 研究発表 学会発表

- 1) 山田雅巳, 高宗万希子, 松田知成, 次世代DNAシーケンサーを用いた, 表現型によらない変異原性試験の開発, 日本環境変異原学会第42回大会, 岡山 (2013.11)
- 2) M. Yamada, M. Takamune, Y. Matsuda, T. Matsuda, A pilot study for the new mutation assay using a high-throughput DNA sequencer, 11th International Conference on Environmental Mutagens, Brazil (2013.11)

G. 知的財産権の出願・登録状況

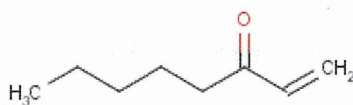
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

A) Derekが陽性と予測した化合物

a) 4-methoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone
4077-47-8

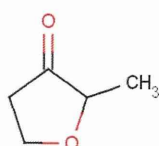


b) 1-octen-3-one
4312-99-6

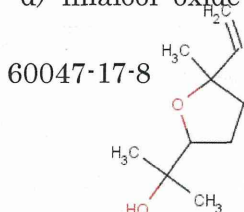


B) MultiCASEが陽性と予測した化合物

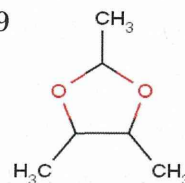
c) 2-methyltetrahydrofuran-3-one acetal
3188-00-9



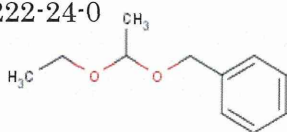
d) linalool oxide
60047-17-8



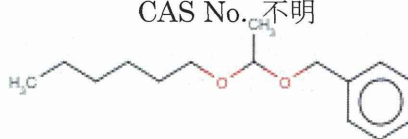
e) acetaldehyde 2,3-butanediol
3299-32-9



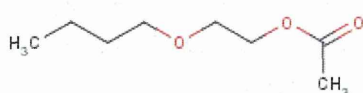
f) acetaldehyde benzyl ethyl acetal
66222-24-0



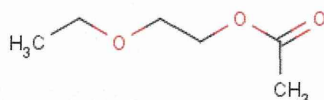
g) acetaldehyde benzyl hexyl acetal
CAS No. 不明



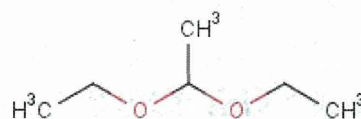
h) 2-butoxyethyl acetate
112-07-2



i) 2-ethoxyethyl acetate
111-15-9

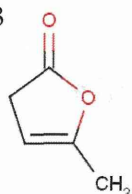


i) acetaldehyde diethyl acetal
105-57-7



C) ADMEWorksが陽性と予測した化合物

k) α -angelicalactone
591-12-8



l) isobutyl methyl disulfide
67421-83-4

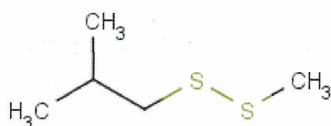


図1 SARが陽性を予測し、FATの結果も陽性だった化合物とその構造

表 5 3つのSARモデルすべてで偽陰性になった化合物

JECFA No.	化合物名	CAS No.	構造
N/A	diisoamyl ether	544-01-4	
N/A	<i>tert</i> -butyl acetoacetate	1694-31-1	
N/A	isopropyl lactate	617-51-6	
N/A	2-hydroxyethyl salicylate	87-28-5	
1551	methyl <i>N, N</i> -dimethylantranilate	10072-05-6	
59	neryl acetate	141-12-8	
N/A	2,4-dimethyl-3-pentanone	565-80-0	
N/A	2-methyl-3-pentanone	565-69-5	
N/A	3,4-dimethoxyacetophenone	1131-62-0	
1870	verbenone	80-57-9	
N/A	2,8- <i>p</i> -menthadien-1-ol	22771-44-4	
N/A	dinonyl sulfide	929-98-6	

食品添加物の食品中における消長と副生成物に関する研究

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 希釈過酸化ベンゾイルを添加した小麦粉を用いてパンを焼成したときに副次的に生成するベンゼンの暴露影響を調査するため、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計を用いて分析を行った。

33～105 mg/kg の過酸化ベンゾイル（BPO）を添加した小麦粉を用いてパン生地を作り、パンを焼成したところ、微量のベンゼンが検出された。パン中のベンゼン量は BPO の添加量に応じて増加し、主にパンの耳の部分に残存していることが明らかとなった。また、BPO を添加した食パンとバターロールを作成し、ベンゼン量を比較したところ、ベンゼン残存量に大きな違いはなかった。

今回の調査結果をもとに、BPO を添加したパン及び菓子パンからのベンゼンの経口暴露量を推計したところ、20 歳以上における一人当たりの耐容一日摂取量（TDI）に対する一日摂取量の割合は 0.02% であり、BPO を添加したパンからのベンゼン暴露量は、TDI を大きく下回ることが確かめられた。

A. 研究目的

希釈過酸化ベンゾイルは、小麦粉改良剤として用いられる過酸化ベンゾイル(BPO)を含む食品添加物製剤であり、小麦粉に含まれるカロテノイドの漂白分解に利用される¹⁾。本品の主成分である BPO は、加熱、衝撃、摩擦などによって爆発を起こしやすいため、25%の水を添加したものが試薬として販売されている。食品添加物製剤として用いられる希釈過酸化ベンゾイルは、BPO をミョウバン、リン酸のカルシウム塩類、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム及びデンプンのうち 1 種以上のもので希釈した製剤であり、BPO 19.0～22.0%を含むと規定されている²⁾。

わが国では、希釈過酸化ベンゾイルに使用基準が設定されており、小麦粉以外の食

品に使用してはならず、小麦粉 1kg につき 0.30g 以下に使用が制限されている。2004 年に食品中の BPO の改正分析法が通知され、市販食品の検査が行われている³⁾。

2010 年に輸入食品検査の過程で、海外では BPO 32%を含む製剤が流通している実態が明らかとなった。このため、小麦粉及びその加工品より、使用基準相当量を超える BPO が検出された場合には、食品衛生法 11 条違反として取り扱うように通知⁴⁾されるとともに、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会において、希釈過酸化ベンゾイル中の BPO 含有量を 19.0～22.0%から 19.0～35.0%に変更し、使用基準を希釈過酸化ベンゾイルとしての限度値設定から、BPO としての使用限度値への改正が検討されている。

BPO は工業的には加熱により、開裂して 2 つのベンゼンカルボキシルラジカルとなり、さらに二酸化炭素が脱離して、フェニルラジカルを生成するため⁵⁾、ポリマーの重合開始剤として合成に利用されている。しかし、BPO とフタル酸からなる硬化剤を加熱するとベンゼンが生成するとの報告がある⁶⁾。

International Agency for Research on Cancer (IARC) ではベンゼンを Group 1 に分類している (IARC, 1995)⁷⁾。わが国では、水道法水質基準において、Integrated Risk Information System (IRIS, 2000) における 10^{-5} 発がんリスクに関する評価などを参考に 0.01 mg/L に設定しており⁹⁾、また、WHO 水道水水質ガイドライン第 4 版においても、ガイドライン値を 0.01 mg/L としている¹⁰⁾。食品安全委員会は、清涼飲料水の規格基準の改正に係る食品健康影響評価において、ベンゼンのリスク評価において、非発がん毒性を指標とした場合の TDI を 18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日、発がん性を指標とした場合の発がんユニットリスクを $2.5 \times 10^{-2}/(\text{mg}/\text{kg}$ 体重/日) と設定している。

これまでに、食品添加物製剤として小麦粉に添加された BPO は、時間経過とともに安息香酸に分解することが知られているが¹¹⁾、ベンゼン生成について調査した研究報告はない。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、BPO を含む小麦粉を用いて小麦粉加工食品を作成したときに、食品中に副次的に生成するベンゼンの暴露影響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計 (DHS-GC/MS) を用いて分析を行った。本研究の初年度として、小麦粉

加工食品の中で喫食量が多いパンに着目し、BPO 添加小麦粉を用いて作成したパン中のベンゼン残留量を調べた。さらに、この調査結果を用いてパン及び菓子パンからのベンゼン暴露量を推計し、評価値との比較を行ったので報告する。

B. 研究方法

1) 試料 パンの材料として、強力粉、バター、砂糖、塩、卵及びドライイーストを用いた。これら食材は都内スーパーで購入し、ホームベーカリーとオーブンレンジを用いてパンを作成した。

2) 試薬 BPO は東京化成工業(株)製の過酸化ベンゾイル (約 25%水湿潤品) を用いた。ベンゼン標準原液及びフルオロベンゼン標準原液は、関東化学(株)製の水質試験用を用いた。塩化ナトリウムは和光純薬工業(株)製の水質試験用、メタノールは和光純薬工業(株)製のトリハロメタン測定用を用いた。その他は、試薬特級を用いた。

過酸化ベンゾイル (約 25%水湿潤品) は第 8 版食品添加物公定書の希釈過酸化ベンゾイルの定量法²⁾に従い、BPO 含量を求めた。その後、過酸化ベンゾイル (約 25%水湿潤品) に、BPO 含量が食品添加物含量規定の最大量 (22%) または海外製品の最大量 (35%) となるように、トウモロコシ製デンプンを加えて乳鉢中で良く混和し、BPO 含量が 22% 及び 35% の 2 つの希釈過酸化ベンゾイルを調製した。

3) 内部標準溶液の調製

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 1 mL を正確に採り、メタノールを加えて正確に 10 mL とし、内部標準原液とした。内