

201426014A

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

食品添加物の規格試験法の向上及び摂取量推定等に関する研究  
平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 恭子

平成27(2015)年 5月

## 目 次

I. 総括研究報告	
食品添加物の規格試験法の向上及び摂取量推定等に関する研究	1
佐藤恭子	
II. 分担研究報告	
1. 食品添加物規格試験法の向上と使用実態の把握等	19
佐藤 恭子	
2. 食品添加物の規格試験法向上のための赤外スペクトルに関する調査研究	31
北村 陽二	
3. 定量NMR法による定量用標準物質の純度分析法の確立	55
大槻 崇	
4. ICP-MS等を用いた食品添加物中の鉛分析法に関する研究	63
建部 千絵	
5. 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	75
山田 雅巳	
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	83
久保田浩樹	
(資料) 香料化合物規格の国際整合化に係わる調査研究	
我が国で使用している天然香料の使用量調査研究	
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	

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 26 年度総括研究報告書

食品添加物の規格試験法の向上及び摂取量推定等に関する研究

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 食品添加物の安全確保には、その品質の担保のための成分規格試験法の向上及び摂取量等使用実態の把握が欠かせないことから、以下の研究を行った。

#### 食品添加物規格試験法の向上と使用実態の把握等

香料化合物規格の国際整合化に係わる調査研究：香料化合物の規格を国際間で整合化することは安全性のために重要である。食糧農業機関/世界保健機関合同食品添加物専門家会議（JECFA）規格の検証のため、日本香料工業会自主規格を作成した香料化合物のうちJECFA規格の存在するものについて両規格を比較検討し、違いが見られたものについて実測値調査及び一部について再調査を行った。

我が国で使用している天然香料の使用量調査研究：昨年度の予備的な使用量調査及び調査方法の検討を踏まえ、初めての天然香料の使用量調査を実施した。調査方法は、全ての基原物質を対象とし、天然香料使用量の全体像を把握する方法とした。今回の調査から、平成 25 年の 1 年間に使用された天然香料基原物質は 281 品目であり、その単純合計使用数量は約 2,730t であることが明らかになり、概略ではあるが天然香料の使用量を把握することができた。欧米に先駆けた本研究により複雑な天然香料の使用量調査に着手できたことは、食品香料の安全性を考える上でその意義は大きい。

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 11 回調査として指定添加物の平成 25 年度取扱量のアンケート調査及び集計を行った。

#### 食品添加物の規格試験法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、近年普及著しい ATR 法の確認試験への利用の可能性を検討した。その結果、吸湿性が極めて高く、試料調製時の取り扱いの難しい化合物には、ATR 法が非常に有効であることを示し、ATR 法を添加物への確認試験に利用するためには、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。

#### 定量 NMR 法による定量用標準物質の純度分析法の確立

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、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 を用いた 5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸の定量分析に関する検討を行った。その結果、定量 NMR 法は本化合物の分析において良好な分析精度を有することが明らかとなった。

## ICP-MS 等を用いた食品添加物中の鉛分析法に関する研究

2 価の陽イオンを含む無機塩類の食品添加物の鉛試験法で規定されている溶媒抽出法について代替法の検討を行った。カルシウム塩及びマグネシウム塩には、親水性メタクリレートを母体にしたイミノ二酢酸基を導入したキレート樹脂による固相抽出法が有用であり、硫酸第一鉄には、高選択性分子認識ゲルによる固相抽出法やリン酸イットリウム共沈法が有用であると考えられた。

## 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

126 の香料について、構造活性相関 (SAR) の予測と簡易 Ames 試験 (FAT) の結果を精査したところ、12 物質は SAR の陰性予測に対して、FAT が陽性であった。これらはいずれも類縁物質には遺伝毒性を含む安全性に懸念がない報告があるものだった。さらに、その 12 物質のうち 9 物質について標準的な Ames 試験を実施した結果はすべて陰性であった。これらのことから、香料の評価に SAR モデルの予測や、類縁物質の評価を参考にすることが有用であると結論した。

## 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

小麦粉改良剤の過酸化ベンゾイルを添加した食品より生成する副生成物の実態解明のため、過酸化ベンゾイルを添加した小麦粉を用いてバターケーキ及びクッキーを調製し、菓子中の揮発性化合物を分析した結果、微量のベンゼンが検出されたが、過酸化ベンゾイルを添加した菓子類からのベンゼンの経口暴露量を推計されたところ、20 歳以上における一人当たりの耐容一日摂取量を大きく下回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 変異遺伝部第一室長
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
建部 千絵	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

添加物の規格とその試験法である。また、食品添加物の適正な使用のためには、摂取量推計等使用実態の把握が重要となる。そこで、本研究では以下の研究を行った。

### A-1 食品添加物規格試験法の向上と使用実態の把握等

#### 1) 香料化合物規格の国際整合化に係わる調査研究

香料化合物の規格は、製品中の不純物の基準というだけでなく、製品の同一性を確認する上でも重要な要素である。日本国内で流通している食品香料化合物は、平成 18 年度の厚生労働科学研究での調査によると 2,164 品目であるが、そのほとんどは 18 項目の類または誘導體として指定されており、食品添加物としての成分規格が定められているも

## A. 研究目的

食品添加物の安全確保には、そ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

のは 130 品目(平成 27 年 2 月)のみである。それ以外の香料化合物については、規格の実態調査と集約を行い(平成 16~21 年度厚生労働科学研究)、自主的な規格として日本香料工業会ホームページに公開されている(以下自主規格)。国際汎用香料化合物の規格設定及び第 9 版食品添加物公定書改正作業においては、JECFA 規格を参考にし、香料化合物の規格値が実測された結果、いくつかの JECFA 規格は香料化合物の実態を反映していないことが確認された。それらを踏まえ、流通している香料化合物の規格値に関する実態調査を行い、JECFA 規格の検証を行うこととした。本年度は①昨年度、国際的に使用量の多い品目について実測値(I)の調査を行い、さらなる調査が必要となった品目の追加の実測値(II)の調査、②自主規格と JECFA 規格との比較により、規格に問題を持つ可能性のある品目の中で日本での使用量が多い約 200 品目の実測値(I)の調査を行い、問題の特定を行った。

## 2) 我が国で使用している天然香料の使用量調査研究

天然香料は食品の着香の目的に用いられる重要な素材である。平成 19~21 年度の厚生労働科学研究として使用品目に関する実態調査を行い、調査年度中に我が国で使用された天然香料基原物質が 487 品目であることを報告した。この調査では定性的な結果が得られたのみであり、定量的調査の必要性もあると考えられたため、使用量調査の実施を検討することとした。本研究は、どのような基原物質の天然香料がどのくらい使用されているのかを調査することで、摂取量の把握を行うための基礎資料となると思われる。

本年度は、平成 25 年度の予備調査を踏まえた方法により、すべての基原物質について使用量調査を実施することを目的とした。

## 3) 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。指定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-2 食品添加物の規格試験法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、有機・無機化合物を問わず、国際的にも各種化合物の確認試験に汎用されている。IR法はほとんど試薬を必要としないため、化学的な確認試験法に比べ、有機溶媒などの廃棄量も少なく、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法は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。一方、減衰全反射法(Attenuated Total Reflection; 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 of 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、食品添加物等の国内規格の向上などを目的にして、測定試料として塩化コリンを取り上げ、ATR法によるIR測定法を検討した。

## A-3 定量 NMR 法による定量用標準物質の純度分析法の確立

食品添加物の成分規格には、原則として含量とその分析法が定められている。同分析法で HPLC 等が使用される場合には、純度が正確な定量用標品が必要となり、食品添加物の品質確保の観点から、信頼性の高い純度分析法の確立が急務である。

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 (quantitative NMR ; qNMR) が注目を集めている。NMR は原子核を対象に測定を行っているため、計量学的に正確な純度が付与された SI にトレーサブルな標品すなわち認証標準物質を内標準物質として用いることにより、様々な測定対象化合物の含量や純度を求めることが可能である。また、簡便性、迅速性、環境負荷の低減の面でも優れている。そこで本研究では、食品添加物の規格試験法の精度向上を目指した研究の一環として、高甘味度甘味料の 1 つであるアスパルテムの成分規格において、アスパルテム中の残存量に関する規定が設けられている 5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸 (DKP) の定量分析における  $^1\text{H}$ -qNMR の有効性に関する検討を行った。

#### A-4 ICP-MS 等を用いた食品添加物中の鉛分析法に関する研究

塩類を多量に含む食品添加物においては、原子吸光光度計による分析でイオン化干渉が起これ、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、ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム (APDC) 溶媒抽出法等が採用されているが、より簡便で、分析環境に配慮した、目的元素への選択性が高い方法

が望まれている。

昨年度、APDC 溶媒抽出法の代替法として、1 価の陽イオンを含む無機塩類を対象とし、キレート樹脂を用いた鉛抽出法の検討を行い、良好な結果が得られたことから、今年度は 2 価の陽イオンを含む無機塩類を対象に検討を行ったので報告する。

#### A-5 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

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、構造活性相関手法に基づく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。昨年度、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た。今年度は、SAR モデルの予測が簡易 Ames 試験と一致しなかった物質のうち、SAR モデルが陰性、簡易 Ames 試験が陽性だった 12 化合物に着目し、うち 9 化合物について標準的な Ames 試験を実施した。

#### A-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

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。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、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。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、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) を用いて分析を行う。昨年度は、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、BPO の添加量に応じてベンゼンが増加し、主にパンの耳の部分に残存していることが明らかとした。2 年目である本年度は、小麦粉菓子について同様に調査を行った。さらに、この調査結果を用いて小麦粉菓子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。

## B. 研究方法

### B-1 食品添加物規格試験法の向上と使用実態の把握等

#### 1) 香料化合物規格の国際整合化に係わる調査研究

以下の方法で規格に問題を持つ可能性のある品目を抽出し、問題点を整理した。

(1) 平成 25 年度に、より詳細な検討が必要となった品目の実測値 (II) と JECFA 規格との比較

- ① 実測値 (II) の調査品目、測定項目、測定条件の設定
- ② 実測値 (II) の収集のための調査票の検討及び調査の実施
- ③ 調査結果の集計と各規格項目の比較

(2) JECFA 規格と実測値 (I) の比較

- ① 昨年度行った自主規格と JECFA 規格との比較により規格に問題を持つ可能性のある品目の中で、日本で使用量の多い約 200 品目の抽出
- ② 実測値 (I) の調査の実施
- ③ 各規格項目と JECFA 規格との比較
- ④ 次年度、実測値 (II) の調査を行う必要があると思われる品目の抽出

#### 2) 天然香料の使用量調査研究

(1) 調査の概要

① 調査対象会社

日本香料工業会全会員 140 社

② 調査対象使用量

平成 25 年 1~12 月の使用量

③ 調査対象品目

消食表第 377 号通知別添 2 記載の天然香料基原物質及び追加品目

④ 調査対象範囲

日本で飲食に供する加工食品に使用されている天然香料のみを対象とし、医薬品類、タバコ製品、口腔衛生用品 (歯磨き等)、洗剤、ペットフード及び香粧品等の用途は除く。

⑤ 調査方法

作成した調査票及び入力説明書を E-mail で配信し、返信にて回答を得た。

⑥ 回答期間

平成 26 年 7 月 1 日から 10 月 31 日まで

(2) 調査票の作成

① 基本回答票

平成 20 年度の天然香料基原物質使用実態調査で作成した「天然香料基原物質データベース」の物質名、参考事項にある情報に加え、具体的原料名、基原物質毎の合計使用量及び追加情報や疑問点等の記入欄を追加した。

## ② 追加品目回答票

基本回答票に見あたらない品目、及びどの基原物質に該当するか不明な品目を使用の場合に、原料名、英名、学名（わかれば）、使用量の記載を求めた。

### (3) 入力説明書の作成

回答会社が調査票に適切に入力するための説明書を作成した。

### (4) 回答の点検・精査

平成 26 年 12 月～平成 27 年 1 月

得られた回答に、疑問が認められた場合、当該回答会社に問い合わせを行い修正した。

### (5) 一部天然香料の集計及び考察

使用量合計が 100t を超える天然香料について集計を実施し、各種の考察を行った。

## 3) 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

### (2) 調査対象年度 平成25年

### (3) 調査対象 指定添加物438品目

### (4) 調査内容

調査票Ⅰ：製造及び輸入した品目名

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) 調査対象製造所 指定添加物の製造または輸入の営業の申請を行っている業者の全製造所

## B-2 食品添加物の規格試験法向上のための赤外スペクトルに関する調査研究

測定試料の塩化コリンは、国立医薬品食品衛生研究所より提供を受けた食品添加物試料及び市販品（ナカライテスク社製EPグ

レード)を用いた。これらの試料について、錠剤法、ペースト法及びATR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、ペースト法の測定は、分解能 $4\text{ cm}^{-1}$ （32回繰り返し）、測定領域 $4000\sim 600\text{ cm}^{-1}$ 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 $5\text{ mm}$ のKBr板またはNaCl板を窓板として使用した。なお、対照にはこの同じ材質の窓板を使用した。また、流動パラフィン、メルク社製の赤外用Nujolを使用した。錠剤法については、原則として第9版食品添加物公定書の記載に従って、KBr(またはNaCl, KCl)錠剤(直径 $10\text{ mm}$ )を作成し、測定時の対照には対応するハロゲン化アルカリのみの錠剤を使用した。なお、ハロゲン化アルカリには、日本分光社製の赤外用KBr, NaCl, KClブロックを用いた。ATR法の測定には、前述の赤外分光光度計に、ダイヤモンドブリズム一回反射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 $4000\sim 600\text{ cm}^{-1}$ で測定を行った。

## B-3 定量 NMR 法による定量用標準物質の純度分析法の確立

### 1) DKP の NMR 分析 (シグナルの帰属)

DKP 約  $10\text{ mg}$  を量りとり、 $\text{DMSO}-d_6$  約  $0.75\text{ mL}$  に溶解し、各種NMR測定( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY, HMQC, HMBC)を行った。

### 2) $^1\text{H}$ -qNMR による DKP の定量

DKP 約  $10\text{ mg}$  及び  $\text{DSS}-d_6$  約  $4\text{ mg}$  をそれぞれ精密に量り、 $\text{DMSO}-d_6$   $2\text{ mL}$  を加え



て溶解し、<sup>1</sup>H-NMR 測定を行った。DSS-*d*<sub>6</sub> のシグナル面積強度を 9.00 としたときの DKP 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、DKP 含量 (C<sub>GL</sub>, %) を算出した。

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

ただし、I<sub>DKP</sub>、I<sub>DSS</sub> は DKP 及び DSS-*d*<sub>6</sub> のシグナル面積強度 (DSS-*d*<sub>6</sub>:9.00)、H<sub>DKP</sub>、H<sub>DSS</sub> は DKP 及び DSS-*d*<sub>6</sub> の特定基の水素数 (DSS-*d*<sub>6</sub>:CH<sub>3</sub>×3=9)、M<sub>DKP</sub>、M<sub>DSS</sub> は DKP 及び DSS-*d*<sub>6</sub> の分子量 (DKP : 262.26, DSS-*d*<sub>6</sub> : 224.36)、W<sub>DKP</sub>、W<sub>DSS</sub> は DKP 及び DSS-*d*<sub>6</sub> の秤取量 (mg) である。

### 3) <sup>1</sup>H-<sup>q</sup>NMR 測定条件及びデータの解析

<sup>1</sup>H-<sup>q</sup>NMR 測定の基本条件を表 1 に示した。

表1 <sup>q</sup>H-NMR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
Scan times	8
Spining	off
<sup>13</sup> C decoupling	multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)
Probe temperature	30°C

得られた FID データは、フーリエ変換 (zero filling=1) 及び位相補正を行った。なお、データの解析は、Alice 2 ver.5 (JEOL RESONANCE 製) を用いた。

## B-4 ICP-MS 等を用いた食品添加物中の鉛分析法に関する研究

### 1) Inert Sep ME-1 を用いた試験溶液の調製

#### (1) 試料溶液の調製

各試料 2 g を量り、塩酸 (1→4) 20 mL を加え、5 分間穏やかに沸騰させ、冷後、アンモニア水で、pH5~6 となるように調整し、試料溶液とした。

#### (2) Inert Sep ME-1 による鉛の抽出

Inert Sep ME-1 を硝酸 (1→100) 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 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 5 mL を流出させ、試料溶液を流速 5 mL/min でカートリッジへ負荷した。0.5 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 10 mL 及び水 10 mL で洗浄後、硝酸 (1→100) 約 7 mL で流速 1 mL/min でゆっくりと溶出させ、その液を回収し、硝酸 (1→100) で 10 mL とし、試験溶液とした。別に、試料を用いずに試料溶液と同様に操作し、得られた液を空試験溶液とした。

### 2) MetaSEP AnaLig を用いた鉛試験の検討

#### (1) 試料溶液の調製

試料 2 g を量り、1 mol/L 硝酸 20 mL を加え、5 分間穏やかに沸騰させ、冷後、試料溶液とした。別に、試料を用いずに調製した液を試料溶液と同様に操作し、得られた液を空試験溶液とした。

#### (2) MetaSEP AnaLig による鉛の溶出

MetaSep AnaLig を水 50 mL で洗浄し、樹脂が水を含んだ状態でコックを閉じた。0.03 mol/L EDTA・NH<sub>4</sub> 溶液 10 mL を通液し (流速 1~2 mL/min)、洗浄した。水 10 mL 及び 1 mol/L 硝酸 10 mL で交互に通液し (流速 10 mL/min)、3 回繰り返した。試料

溶液を通液し（流速 2~3 mL/min, 素通り画分), 1 mol/L 硝酸 20 mL 通液し（流速 10 mL/min, 洗浄画分 1), 次に, 水 50 mL を通液し（流速 10 mL/min, 洗浄画分 2), 流液の pH が 5 付近であることを pH 試験紙で確認した。さらに, 0.03 mol/L EDTA・NH<sub>4</sub> 溶液 2 mL を MetaSep AnaLig へ馴染ませ, 2 分放置した後, 溶出し（流速 2~3 mL/min, 溶出画分 1), 同様に EDTA・NH<sub>4</sub> 溶液 2 mL を MetaSep AnaLig へ負荷し, 溶出画分 2~5 を回収した。別に, 試料を用いずに調製した液を, 試料溶液と同様に操作し, 得られた液を空試験溶液とした。

### 3) リン酸イットリウム共沈法を用いた鉛試験法の検討

#### (1) 試料溶液の調製

試料 2 g を量り, 1 mol/L 硝酸 100 mL を加え, 5 分間穏やかに沸騰させ, 冷後, 試料溶液とした。

#### (2) リン酸イットリウム共沈法による鉛の抽出

試料溶液にアスコルビン酸 3 g を加え, 溶解させ, イットリウム溶液 1 mL, 0.5 mol/L リン酸 3 mL を加えた後, アンモニア水で約 pH3 に調整した。約 30 分間室温で放置し, 生成した沈殿を沈降させた後, メンブランフィルターを用いて, 吸引ろ過により沈殿を分離した。沈殿が付着したメンブランフィルターを 50 mL 遠沈管に取り, 4 mol/L 硝酸 2 mL でメンブランフィルターに付着した沈殿を溶解し, その液を 10 mL メスフラスコに回収した。更に, 水でメンブランフィルターを洗いこみ, その洗浄液を先の 10 mL メスフラスコに合わせ, 水で 10 mL とし, 試験溶液とした。別に, 試料を用いずに調製した液を, 試料溶液と同様に操作し, 得られた液

を空試験溶液とした。

#### 4) 原子吸光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, 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

### B-5 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

#### 1) 構造活性相関手法 (SAR)

SAR のソフトウェアとして用いたのは, 遺伝毒性評価を目的とする次の3種類である。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.)。

#### 2) Ames 試験

(1) 試験の概略 検定菌として, *Salmonella typhimurium* TA100及び TA98を用い, プレインキューベーション法により, S9mix 存在下及び非存在下で実施した。初めに, 15, 50, 150, 500, 1500及び5000 µg/plate の6用量で用量設定試験を行い, 生育阻害が認められた場合は, その用量を最高用量として本試験を実施した。陰性対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められた場合を陽性と判定した。

(2) 被験物質 試験に供した化合物は表 1 の

9種で、いずれも東京化成工業㈱より購入した。

また、陽性対照物質は、S9mix存在下では2-aminoanthracene, S9mix非存在下では2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamideを用いた。陰性対照物質（溶媒）にはdimethylsulfoxide (DMSO)を用いた。これらは和光純薬工業㈱より購入した。

## B-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

### 1) 試薬

過酸化ベンゾイル（約25%水湿潤品）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%の希釈過酸化ベンゾイルを調製した。

### 2) 装置

ダイナミックヘッドスペースシステムとしてTeledyne Tekmar製のページ&トラップ装置AQUA PT5000J Plus及びオートサンプラーSOLATek72を用いた。GC-MSは島津製作所製のGCMS-QP2010を用いた。

### 3) DHS-GC/MS測定条件

DHS側条件 サンプルカップ温度：60℃、サンプルニードル温度：60℃、バルブオープン及びトランスファーライン温度：150℃、ページ時間：6 min、ページ流量：40 mL/min、ドライページ時間：5 min、デソープ時間：6 min、デソープ温度：220℃、ベーク時間：15 min、ベーク温度：230℃、スターラー攪拌：弱回転、クライオフォーカス：なし

GC-MS側条件 カラム：AQUATIC-2 60 m × 0.25 mm I.D. 膜厚 1.4 μm、カラム温度：40℃ (2 min) → 4℃/min → 100℃ → 20℃/min → 200℃ (3 min)、注入口温度：160℃、インターフェース温度：200℃、イオン化法：

EI, イオン化電圧：70 eV, 測定モード：スキャン, 測定質量数：ベンゼン  $m/z$  78, フルオロベンゼン  $m/z$  96

### 4) 試料調製方法（バターケーキ及びクッキーの調製法）

薄力粉に希釈過酸化ベンゾイルを添加し、BPOを添加した小麦粉を調製し、バターケーキ及びクッキーを調製した。

### 5) DHS-GC/MS用試験溶液の調製

バターケーキ及びクッキーは、ブレンダーで粉砕し、試料とした。試料2.0 gを40 mLのVOAバイアルに採り、攪拌子、塩化ナトリウム3 g及び水13 mLを加え、次いでマイクロシリンジを使用して内部標準溶液を2 μL注入し、直ちにキャップで密封した後、マグネチックスターラーでバイアル中の試料を良く攪拌し、DHS-GC/MS用試験溶液とした。

（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 食品添加物規格試験法の向上と使用実態の把握等

#### 1) 香料化合物規格の国際整合化に係わる調査研究

##### (1) 実測値（Ⅱ）とJECFA規格との比較

##### ① 実測値（Ⅱ）の調査品目の特定

昨年度、次年度より詳細な調査を行う必要があると思われた110品目に対し、再度規格の検討を行った結果、より詳細な検討が必要な品目は56品目となった。

##### ② 実測値（Ⅱ）の収集のための調査票の検討及び調査の実施

調査対象とする規格項目はこれまでの自主規格での設定項目である含量、含量の範囲、

定量法，屈折率，比重，酸価，融点・凝固点，  
（比）旋光度とした。また，比重等に関しては，測定条件 20℃のもの と 25℃のものがあるため，測定条件毎の記入欄を設け誤記を防止するようにした。

### ③ 調査結果の集計と各規格項目の比較

調査対象の 56 品目中 12 品目については実測データ数が少ない等の理由により規格設定を見送り，残りの 44 品目について，各測定値が JECFA 規格と合致しているか，していない場合はどのような違いがあるかを規格項目毎に判断記号を付け，整理した。明らかな異常値が報告されている製品は外れ値として集計には用いなかった。また JECFA に規格設定が無いが規格が必要と考えられた場合（例えばエステル類の酸価）は，規格設定をした。

その結果，8 品目は JECFA 規格で問題なし，32 品目は JECFA 規格の修正が望ましい，18 品目は再追加調査が必要となった。

## (2) JECFA 規格と実測値（I）の比較

### ① 本年度調査品目の選定

昨年度の調査で，平成 16～19 年度の厚生労働科学研究において自主規格を作成した香料化合物のうち JECFA 規格の存在した 1,068 品目について両規格を比較検討したところ，979 品目で違いが見られ，258 品目の実測値（I）を調査した。本年度は，残りの品目のうち使用量の多い 199 品目を JECFA 規格と比較検討し，実測値（I）の調査品目を選定した。

### ② 実測値（I）の調査の実施（試験成績表及び受け入れ検査値）

調査対象とする規格項目はこれまでの自主規格での設定項目である含量，含量の範囲，定量法，屈折率，比重，酸価，融点・凝固点，

（比）旋光度とした。また，比重等に関しては，測定条件 20℃のもの と 25℃のものがあるため，測定条件毎の記入欄を設け誤記を防止するようにした。

### ③ 各規格項目と JECFA 規格との比較

調査対象の 199 品目のすべてでデータが得られた。各測定値について，JECFA 規格と合致しているか，していない場合はどのような違いがあるかを規格項目毎に判断記号を付け，整理した。明らかな異常値が報告されている製品は外れ値として集計には用いなかった。8 割以上の測定値が JECFA 規格を満たしている場合は，その JECFA 規格項目に問題はないと判定した。また，JECFA 規格を満たす測定値が 3 つ以上報告されており，満たさない測定値が無かったものも同様に問題ないと判定した。一方，JECFA 規格を満たす測定値が 2 つ以下であり，JECFA 規格を満たさないデータも報告されていない規格項目については「暫定問題なし」とした。また JECFA に規格設定が無く，測定値がある場合は，測定値にかかわらず JECFA 規格適合とした。

92 品目は緊急に詳細な調査を行う必要はないと考えられ，107 品目は次年度検討の上，さらなる調査が必要と考えられた。

### (3) 問題点の整理

実測によって JECFA 規格に問題が見つかった例の中には，JECFA の規格設定の根拠に問題があるものが多数みられた。異性体混合物の GC 法の場合，その多くはどのピークを合算するのか明確にされていない。また含量の定量法には化学法と GC 法があるが JECFA 規格と自主規格で異なるものがあつた。また例えば融点が 25℃以上のものに比重，屈折率を設定しているもの，融点が 25℃

未満のものに融点が設定されているものが見られた。前者は過冷却での測定で測定法として問題があり、後者は屈折率、比重で代用可能で、単に物理的性質が記載されているだけでも考えられる。このような規格項目自体の妥当性に由来する不一致は、他にも酸価、旋光度、沸点等において多数見られた。規格の幅に関しても、屈折率等通常ある程度の幅が必要な項目に対して、1点の規格が設定されているもの、著しく狭いものも存在した。屈折率、比重、旋光度の測定温度が統一されていない点も問題であった。

上記の問題については必ずしも JECFA 規格が誤っているわけではないが、測定条件が統一されていない場合は、測定者の負担増となることから修正が望ましい。JECFA においてガイドライン作成を提案する必要があると考えられる。

今回は検討保留としたが、天然物から分離精製した香料化合物、またはそれらを原料として合成反応を行った香料化合物についても対策が必要である。これらは含量も様々であり、安全性評価に必要とされる 95%までの成分が同定されていない場合もあった。他の規格値も様々であり、組成が異なる製品を測定した可能性も考えられた。

## 2) 天然香料の使用量調査研究

日本香料工業会全会員会社 140 社に調査を依頼し、その結果、使用無しの回答を含めて 51 社から有効回答を得た。回答を精査し疑問があった点について当該回答会社に問い合わせをした上で修正を施した。この修正の結果、2,336 件の回答となった。平成 25 年における業界での全食品香料生産量 (55,337t) に占める回答会社 51 社の生産量

(50,609t) は 91%であったことから本調査での実際の回答率も同程度であると判断した。このことから本調査は業界の実態を十分反映し、目的に沿った結果を得ることができたと思われる。

### ① 回答の精査

今回得られた 51 社からの回答を精査し、疑問点につき当該回答会社に問い合わせを行い修正した。

この結果、寄せられた回答数は 2,336 件で、使用されている基原物質は 281 品目、合計数量は約 2,730t であった。平成 22 年の合成香料化合物の合計使用量が約 1,256 t であったことを考えると、非常に大量の天然香料が我が国で流通している食品中に使用されていることがわかった。

### ② 調査結果の概要

前回の調査においては、消食表第 377 号通知別添 2 記載の天然香料基原物質と新たに報告された基原物質の合計使用品目数は 487 品目であったが、今回調査では 281 品目であった。

消食表第 377 号通知別添 2 に記載されていない基原物質については、平成 19~21 年度厚生労働科学研究でも使用実態の報告があったカブルーパとキャンディアについてそれぞれ使用量が報告され、恒常的な使用のあることが明らかになった。さらにカラメル及びアルピニア マラッケンシスといった全く新たな基原物質が報告されたのは興味深い。カラメルは砂糖を煮詰めたカラメルソースから香気を得て着香目的で使用しており、またアルピニア マラッケンシスはショウガ属ハナミョウガ科のインドや東南アジアで食経験のある植物であるが、特徴香気成分としてケイ皮酸メチルがあり、この香気を利

用しているものと考えられる。

### ③ 包括名称でリスト化された基原物質について

総称的な名称（包括名称）を有する基原物質については、具体的な品目名を把握する目的で記載を依頼した。具体的な品目名が回答された基原物質名とその品目名を表 1 に挙げる。

### ④ 使用量の多い基原物質の集計と考察

今回の調査における全体及び基原物質毎の集計及び詳細な考察については次年度行うが、使用量が比較的多い 100t を超える基原物質について集計を行った。その結果、一般的な嗜好にあった天然香料が主に使用されていることが明らかになった。

このうちオレンジ、リンゴ、バニラ及びコーヒーについては、前年度、予備調査を行っている。今年度は全会員会社（140社）を対象にした調査であったにもかかわらず、前年と比較してオレンジとコーヒーについては著しく数量が減少していた。この理由として、オレンジは精油の輸入量が前年の 16,000t に対して 9,000t に減少したことが関係しているものと思われる。またコーヒーについては水あるいは水-アルコール抽出によって得られるいわゆるエキストラクトやチンキの扱いについて、予備調査当時は食品か香料かの判断が困難であったことが推測される。

今回は部位・形態に関係なく基原物質ごとの使用量全体のための調査であったが、詳細な実態把握が求められる天然香料については、別途さらなる調査を行うことも必要と考えられる。

### 3) 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) 調査回収結果

第 11 回調査の初年度にあたり、平成 25 年度を調査対象に全国 653 事業者に調査票を送付した。回収率は 73.7% で、前回の初年度の水準と同程度であった。

#### (2) 調査結果

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 食品添加物用途別 品目名と全出荷量、純食品向け出荷量、輸出量調べ  
集計 2 食品添加物品目名別 製造会社数、全出荷量、純食品向け出荷量、輸出量調べ

### C-2 食品添加物の規格試験法向上のための赤外スペクトルに関する調査研究

#### 1) 塩化コリンに関する検討

##### (1) KBr, KCl, NaCl錠剤法を用いた検討

塩化コリンは、1価のカチオン化合物と、塩化物イオンの塩化合物である。したがって、錠剤法を用いる場合は、塩交換の生じない NaCl, KCl を選択すべきであるが、比較のため、KBr についても検討を行った。

その結果、NaCl, KCl を用いた場合、錠剤表面が潮解しており、その錠剤を測定しても、全体に透過率の低い異常スペクトルを示し、スペクトルとしての体を成さなかった。また、NaCl, KCl, KBr のいずれの場合でも水由来と思われる  $3400\text{ cm}^{-1}$  及び  $1650\text{ cm}^{-1}$  付近に大きなピークが観察された。従って、錠剤法は不適であると判断した。

##### (2) ペースト法を用いた検討

次に、吸湿の生じにくい、ペースト法での測定を行った。ペースト法での試料調製は、試料に流動パラフィンを加え、表面を

覆った後にすり混ぜることで、吸湿を抑えるようにして行ったが、結果としては $3400\text{ cm}^{-1}$ 及び $1650\text{ cm}^{-1}$ 付近に水分由来と思われるピークが観察された。従って、ペースト法を用いても試料調製時に吸湿が生じていると考え、塩化コリンの測定には適さないと判断した。

### (3) ATR法を用いた検討

まず、塩化コリン結晶を粉末化するため極短時間すりつぶし、測定した結果、 $3400\text{ cm}^{-1}$ 及び $1650\text{ cm}^{-1}$ 付近のピークは観察されなかった。また、塩化コリンを粉末化するすりつぶし時間を長くすると、 $3400\text{ cm}^{-1}$ 付近のショルダー及び $1650\text{ cm}^{-1}$ 付近にブロードなピークが観察された。従って、ATR法を用いる場合でも、結晶を粉末化するためのすりつぶし時間は短時間に抑える必要があると考えられる。

なお、塩交換の影響を調べるため、NaCl粉末、KCl粉末、KBr粉末を加えてすり混ぜた後、ATR法で測定した結果、いずれの場合でも、 $3400\text{ cm}^{-1}$ 付近のショルダー及び $1650\text{ cm}^{-1}$ 付近のピークが、塩化コリン単独ですりつぶした場合よりも顕著に表れた。また、KBr粉末を加えた場合のみ、 $3005\text{ cm}^{-1}$ と $3025\text{ cm}^{-1}$ の2つのピークが $3016\text{ cm}^{-1}$ の単一ピークになり、 $1412\text{ cm}^{-1}$ のピークが $1404\text{ cm}^{-1}$ にシフトするなど、他と異なるスペクトルを与えた。錠剤法でKBrを用いた場合にも同様の傾向が認められたことから、塩化コリンとKBrのすり混ぜを行うと、塩交換が生じていると考えられる。

従って、塩化コリンの様に吸湿性が極めて高く、ペースト法でも吸湿の生じるような取り扱いの難しい化合物には、ATR法による測定が最も適していると考えた。また、

ATR法を塩化コリンの確認試験に用いる場合には、結晶を粉末化するすり混ぜ時間は可能な限り短くする必要があると考えられる。

### 2) オクタン酸に関する検討

オクタン酸は融点が $16.5^{\circ}\text{C}$ 、沸点が $237^{\circ}\text{C}$ であり、常温では液状（油性液体）であることから、KBr板を窓板として液膜法でIRの測定を行った。その結果、得られたスペクトルの縦軸をAbs表示したスペクトルは、JECFAのスペクトルと一致した。さらに、オクタン酸をATR法で測定した結果、得られたスペクトルは、SIGMA ALDRICHのSpectral ViewerのATRスペクトルと一致したが、液膜法でのスペクトルとは一致しなかった。

ATR法で測定したスペクトルは、従来法で測定したスペクトルとは一致せず、ATR法同士の比較で確認することが必要と考えられる。

以上より、食品添加物の測定法をATR法で規定する場合は、ATR補正を行わない、生スペクトルの測定結果と、ATR法による標準IRとの比較、あるいは、ATRで測定したスペクトルについての波数規定が妥当であると考えられる。

### C-3 定量 NMR 法による定量用標準物質の純度分析法の確立

DKPについて $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR及び各種2次元NMR( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  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、 $\delta_{\text{H}}$  1.59,  $\delta_{\text{H}}$  2.07,  $\delta_{\text{H}}$  4.06,  $\delta_{\text{H}}$  4.23及び $\delta_{\text{H}}$  7.1-7.4

のシグナルより算出された DKP 含量は、96.0～96.5%であった。一方、 $\delta_H$  2.96,  $\delta_H$  3.12,  $\delta_H$  7.88 及び  $\delta_H$  8.14 より算出された DKP 含量はそれぞれ、97.3%, 100.2%, 94.0%及び 94.7%であり、他のシグナルから得られた DKP 含量と比べ1～4%程度差が認められた。これは、 $\delta_H$  2.96 については、シグナルの左裾が  $\delta_H$  3.12 のシグナルの裾と隣接していること、 $\delta_H$  3.12 については、 $\delta_H$  3.3 付近に観察される DMSO- $d_6$  中の水に由来するシグナルの裾が  $\delta_H$  3.12 のシグナルと重なり、適切な積分範囲を設定できていないため、定量値が高くなったと考えられた。また、 $\delta_H$  7.88 及び  $\delta_H$  8.14 については、それぞれ分子内の窒素に結合した水素が交換性の性質を有しているため、定量値は低く観察され、正確な定量は困難と考えられた。

なお、 $\delta_H$  7.1-7.4 のシグナル群より算出された DKP の定量値は、他のシグナルとほぼ同等であったが、これらを定量用シグナルとして用いる場合、製品の純度によっては、これらのシグナルの範囲内に夾雑物由来のシグナルが重なる可能性も懸念される。以上の点を考慮すると、DKP の定量には、 $\delta_H$  1.59,  $\delta_H$  2.07,  $\delta_H$  4.06,  $\delta_H$  4.23 を用いることが適切と考えられた (DKP 平均含量 : 96.1%)。また、これら 4 種のシグナルから算出された相対標準偏差 (RSD) は 0.1～0.3 %と良好であった。

#### C-4 ICP-MS 等を用いた食品添加物中の鉛分析法に関する研究

##### 1) Inert Sep ME-1 を用いた鉛の添加回収試験

食品添加物用の水酸化カルシウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、サンゴ未焼成カ

ルシウム、グルコン酸カルシウム、酸化マグネシウム、塩化マグネシウム、炭酸マグネシウム、各試料に 2  $\mu\text{g/g}$  (炭酸カルシウムは 3  $\mu\text{g/g}$ ) となるように鉛を添加し、Inert Sep ME-1 による鉛の添加回収試験を行った結果、いずれも 79.5～108.5%と良好な結果が得られ、カルシウムやマグネシウムを多量に含む試料の場合でも Inert Sep ME-1 による鉛の抽出は可能であることが明らかとなった。

##### 2) MetaSEP AnaLig を用いた鉛試験の検討

硫酸第一鉄は Inert Sep ME-1 による前処理で鉛の回収率が得られなかったことから、鉛を特異的に捕集する MetaSEP AnaLig を用いて検討を行った。硫酸第一鉄に 2  $\mu\text{g/g}$  となるように鉛を添加し、MetaSEP AnaLig による鉛の添加回収試験を行った。その結果、最初の 0.03 mol/L EDTA・ $\text{NH}_4$  溶出 2 mL で平均 99.9% (n=5) の鉛を回収することができた。鉄マトリックスを含む試料中の鉛の抽出にも MetaSEP AnaLig が有用であることが明らかとなった。

##### 3) リン酸イットリウム共沈法を用いた鉛試験法の検討

硫酸第一鉄に 2  $\mu\text{g/g}$  となるように鉛を添加し、鉛の抽出方法として、リン酸イットリウム共沈法を用いたところ、良好な回収率が得られた。本法は鉄鋼中の微量鉛の定量を参考にした方法であり、リン酸イットリウムが鉛及び鉄と広い範囲の pH で定量的に共沈するのに対し、 $\text{Fe}^{2+}$ とは pH3 以下で沈殿を生成しないことによる。本法は定量可能元素が鉛のみであることや、操作が簡便であることから鉄マトリックス中の鉛試験法として有用な方法の一つであると考えられた。

#### C-5 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

SARによる予測が陰性で、簡易Ames試験が陽性だった化合物を、表1にまとめた。この中で下線のない9化合物について、簡易Ames試験と同じTA100及びTA98の2菌株で標準的な方法でAmes試験を実施した。結果は9化合物ともS9 mixの有無にかかわらず、陰性対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められず、陰性と判定された。

H22~24 年度に実施した香料に関する研究課題では 126 化合物について簡易 Ames 試験を実施し、それらの SAR 予測結果と照合している。今回の Ames 試験の結果により簡易 Ames 試験の結果が補正され、SAR 陰性予測 72 化合物のうち、簡易 Ames 試験もしくは Ames 試験で陰性になったものが、69 化合物になった。したがって、SAR の陰性予測率は 95.8%と計算される。

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、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。一方、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、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てよいだろう。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 化合物について文献検索等から得られた情報では、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。したがって、これら 12 化合物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。

## C-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

1) BPO を添加した小麦粉より作成したバターケーキ及びクッキー中のベンゼン残存量の調査

BPO 添加量を、現在の食品添加物製剤の希釈過酸化ベンゾイル (BPO 含量 22%) を使用して使用基準値の半分 (0.15g/kg) を添加した場合及び使用基準値 (0.30g/kg) を添加した場合にあわせて 33 mg/kg, 66 mg/kg に設定し、BPO 添加バターケーキ及びクッキーを焼成した。

BPO 無添加バターケーキのベンゼン含量は 0.7 ng/g であったが、33 mg/kg, 66 mg/kg の BPO 添加バターケーキから、それぞれ 3.9 ng/g, 9.4 ng/g のベンゼンが検出された。また、BPO 無添加クッキーのベンゼン含量は 0.6 ng/g であったが、33 mg/kg, 66 mg/kg の BPO 添加クッキーから、それぞれ 1.3 ng/g, 2.5 ng/g のベンゼンが検出され、バターケーキ及びクッキー中のベンゼン残存量は BPO 添加量に対応して増加した。米国食品医薬品局 (FDA) ではトータルダイエツトスタディの一環として食品中の揮発性化合物の残存量を継続的にモニタリングしており、様々な食品に 1~190 ng/g のベンゼンが含まれていることを報告している。今回の BPO 添加バターケーキ及びクッキー中のベンゼン残留量は、これら食品中のベンゼン残留量の範囲内に含まれる結果であった。

なお、BPO 添加した小麦粉中のベンゼン含量は 0.4 ng/g であり、この小麦粉を用いて作成したバターケーキ中のベンゼン含量より低い値を示した。

2) BPO 添加バターケーキ中のベンゼン分布状況の分析

BPO 添加バターケーキ中のベンゼンの分布状態を調べたところ、バターケーキの外側から深さ 1 cm 以上内側の部分には 5.6 ng/g、には 11.1 ng/g のベンゼンが残存した。BPO の加熱分解によりベンゼンが生成していると考えられ、バターケーキ生地をオーブンで焼成する時に、高温にさらされる生地の表面部分が、内部よりも BPO の分解反応が進み、結果としてバターケーキ外側のベンゼン残存量が高くなったと考えられる。

### 3) BPO 添加バターケーキ及びクッキーの焼成温度によるベンゼン残存量の比較

BPO 添加バターケーキ及びクッキーの生地を焼成するときの焼成温度によるベンゼン残存量の変化について調べた。66 mg/kg の BPO 添加バターケーキ及びクッキー生地を作成し、焼成温度をバターケーキやクッキーの焼成温度として一般的とされる 170°C より 10°C 低い 160°C で焼成した。なお、焼成時間は同じ時間とした。バターケーキ及びクッキーともに、焼成温度 160°C では 15.4 ng/g 及び 2.5 ng/g であった。BPO は加熱により分解反応が進むが、160°C と 170°C では BPO 分解反応に大きな影響を及ぼす温度差ではなく、むしろ、焼成温度を高めることにより試料中に残存するベンゼンが大気中に揮散しやすくなり、170°C ではベンゼン残存量が減少したと考えられた。

### 4) BPO 添加小麦粉菓子からのベンゼン暴露量の推計

BPO 添加小麦粉菓子を喫食したことによるベンゼンの暴露量の推計を行った。小麦粉菓子の喫食量は平成 22 年度食品摂取頻度・摂取量調査 特別集計業務報告書の食品添加物のマーケットバスケット調査データの 6 群砂糖類・菓子類に分類されるケーキ・ペ

ストリー類及びビスケット類の喫食量を参考にした。小麦粉菓子中のベンゼン残存量代表値として、今回の調査において使用基準の中で最も残存量が高かった 66 mg/kg BPO 添加時のバターケーキ (9.4 ng/g) 及びクッキー (2.5 ng/g) のベンゼン残存量の結果を用い、それぞれをケーキ・ペストリー類及びビスケット類に当てはめた。これらのデータをもとに 20 歳以上のヒト一人当たりの小麦粉菓子からのベンゼン推定暴露量を計算した。

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、ベンゼンの評価結果を、発がん性を指標とした場合の発がんユニットリスク (VSD) を  $2.5 \times 10^{-2}$  (mg/kg 体重/日)、非発がん毒性を指標とした場合の耐容一日摂取量 (TDI) を 18  $\mu$ g/kg 体重/日としている。今回の調査結果を評価値の厳しい TDI と比較した場合、TDI に対する小麦粉菓子からの暴露量の割合は 0.01% であった。また、1-6 歳、7-14 歳、15-19 歳の各年齢層の TDI に対する割合は、それぞれ 0.03%、0.01%、0.01% であり、最大でも評価値の 0.03% 以下であった。なお、算定された小麦粉菓子の推定暴露量は、本調査結果の使用基準最大限度における残存量を代表値として計算した結果であり、実際の暴露量はもっと低い数値になると予想される。このため、BPO 添加した小麦粉菓子からのベンゼン経口暴露量は、評価値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。

## D. 結論

### D-1 食品添加物規格試験法の向上と使用実態の把握等

香料化合物規格の国際統合化に係わる調査研究では、今年度は二つの調査を行った。一つ目は、昨年度の実測値（I）調査の追加調査であり、対象とした56品目のうち8品目はJECFA規格で問題なし、32品目はJECFA規格の修正が望ましい、18品目は再追加調査が必要となった。二つ目は、JECFA規格に問題を持つ可能性のある品目のうち、日本で使用量の多い199品目の実測値（I）の調査であった。107品目は次年度検討の上、さらなる調査が必要と考えられたが、約5割にあたる92品目は暫定的ながら、緊急に詳細な調査を行う必要はないと考えられた。

我が国で使用している天然香料の使用量調査研究では、平成25～27年度の2年目として我が国の香料業界で使用されている全ての天然香料の使用量を把握するため昨年度実施した予備調査によって検討した調査方法を基に調査を実施した。その結果600品目を超える基原物質について使用数量の概要を把握することができた。

生産量統計を基にした食品添加物摂取量の推定では、指定添加物の第11回調査の初年度として、基礎的な情報を得た。今後、追加調査及び査定並びに摂取量推定へと段階的にまとめていく。

## D-2 食品添加物の規格試験法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、塩化コリンのような極めて吸湿性の高い化合物の場合、従来汎用されていたKBr法や

ペースト法では試料調製中に吸湿が生じるのに対し、ATR法は試料調製がほとんど不要のため、吸湿のない本来のスペクトルが得られることが分かった。また、ATRで測定する場合でも、結晶を粉末化するすり混ぜ時間は可能な限り短くすべきであることを示した。以上より、食品添加物の確認試験に、ATR法を積極的に取り入れていくべきであり、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 定量 NMR 法による定量用標準物質の純度分析法の確立

本研究では、食品添加物の規格試験法の精度の向上を目指して、 $^1\text{H}$ -qNMRによるDKPの定量に関する検討を行った。本法は良好な分析精度を有し、DKP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、DKP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、将来的な定量用試薬の分析法への本法の適用へ向けた基礎データが得られたものとする。

## D-4 ICP-MS 等を用いた食品添加物中の鉛分析法に関する研究

食品添加物用無機塩類（2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った。水酸化カルシウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、サンゴ未焼成カルシウム、グルコン酸カルシウム、酸化マグネシウム、塩化マグネシウム、炭酸マグネシウムに2  $\mu\text{g/g}$  相当（炭酸カルシウムは3  $\mu\text{g/g}$  相当）の鉛を添加し、Inert Sep ME-1による鉛の抽出操作を行ったところ、いずれの試料においても、79.5～108.5%の

良好な回収率が得られた。以上の結果から、2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、多くの無機塩類で 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。また、硫酸第一鉄は、Inert Sep ME-1 を用いた鉛の抽出は困難であったが、MetaSEP AnaLig やリン酸イットリウム共沈法を用いることで鉛の抽出が可能となり、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。

#### D-5 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

複数のSARモデルの予測で陰性になったが簡易Ames試験で陽性になった12物質について、それらの類縁化合物はいずれも安全性に懸念がないといされていた(昨年度)。そのうち9物質について標準的なAmes試験を実施し、いずれも陰性であることが確認できた。SARモデルにはアラートの違いが多少あるため、複数のモデルで陰性が予測された場合は、実際のAmes試験も陰性である確率が高いと考えられる結果となった。香料評価には、複数のSARによるAmes試験結果の予測と、類縁化合物の評価結果が十分参考になるものと考えられる。

#### D-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

BPO を添加した小麦粉を用いてバターケーキ及びクッキーを作成したところ、これら菓子より微量のベンゼンが検出された。バターケーキ中のベンゼン量はBPO添加量に応じて増加し、内側より外側に残存し、バターケーキ及びクッキー中のベンゼン残留量は、焼成温度の上昇により減少した。

さらに、今回の調査結果により得られたベンゼン残存量をもとに、小麦粉菓子からのベンゼン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TDIに対する一日摂取量の割合は0.01%であり、BPO添加小麦粉菓子の摂取によるベンゼン暴露量は評価値に比べ十分に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

学会発表

1. Ohtsuki, T., Sato, K., Sugimoto, N., Akiyama, H. "Quantification of acesulfame potassium in processed foods by quantitative  $^1\text{H}$  NMR ", 12th International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science (2014.5) (イタリア).

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし