

図3 DKP の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル ( $^1\text{H}$ -qNMR 測定条件, 測定溶媒 :  $\text{DMSO}-d_6$ )

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(2 価の陽イオンを含む)について、親水性メタクリレートをも母体としたイミノ二酢酸基を導入したキレート樹脂固相カートリッジ(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 µg/g 相当(炭酸カルシウムは 3 µg/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 2 価のカルシウム及びマグネシウム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、pH の調整により多量の沈殿が生成するため Inert Sep ME-1 を用いた鉛の抽出は困難であったが、高選択性分子認識ゲル固相カートリッジ(MetaSEP AnaLig)やリン酸イットリウム共沈法を用いることで簡便な操作で多量に含む鉄マトリックスから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。

#### A. 研究目的

第 9 版食品添加物公定書においては、海外規格との整合性をはかる目的から、一部の食品添加物を除き、鉛規格が設定されることとなった。ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム等イオン化エネルギーが低い陽イオン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。第 9 版食品添加物公定書においても、陽イオンを多量に含む食品添加物に対しては、鉛試験法に APDC 溶媒抽出法が設定されている。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り、環境管理の面からも有機溶媒使用量の削減が求められている。

APDC 溶媒抽出法の代替法として、昨年は一価の陽イオン(ナトリウム及びカリウム)を含む無機塩類を対象とし、キレート樹脂固相カートリッジ(Inert Sep ME-1)を用いた鉛抽出法の検

討を行い、良好な結果が得られた。今年度は二価の陽イオン(カルシウム及びマグネシウム)を含む無機塩類を対象とし、Inert Sep ME-1 を用いた鉛抽出法の検討を行ったので報告する。更に、カルシウム及びマグネシウム以外の二価の陽イオンとして、鉄イオンを含む試料を用いて、高選択性分子認識ゲル固相カートリッジ (MetaSEP AnaLig)及びリン酸イットリウム共沈法を用いた方法による鉛の抽出を検討したので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 試料

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、炭酸マグネシウムは食品添加物用を用いた。

### 2. 試薬・試液

炭酸カルシウム、硫酸第一鉄(硫酸鉄(II)七水和物)、リン酸及びアスコルビン酸は試薬特級、酸化イットリウム(99.99%)、クエン酸水素二アンモニウム(原子吸光分析用)、硝酸(有害金属測定用)、塩酸(有害金属測定用)並びに鉛標準液(1000 µg/mL)はいずれも和光純薬工業(株)製を用いた。酢酸アンモニウム溶液(500 g/L、鉄試験用)、25%アンモニア水(有害金属測定用)は関東化学(株)製、1,10-フェナントロリン-水和物は試薬特級、シグマアルドリッチジャパン(株)製を用いた。

0.1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム溶液(500 g/L、鉄試験用)4 mL を水で 250 mL とした。

0.5 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム溶液(500 g/L、鉄試験用)80 mL を水で 1000 mL とした。

塩酸(1→4)：塩酸 250 mL を水で 1000 mL とした。

硝酸(1→100)：硝酸 10 mL を水で 1000 mL とした。

鉛標準原液(硝酸)：鉛標準液(1000 µg/mL)5 mL を硝酸(1→100)で 50 mL とし、鉛標準原液(硝酸)とした(濃度 100 g/mL)。

鉛標準溶液(硝酸)：鉛標準原液(硝酸)5 mL、2.5 mL、1 mL 及び 0.5 mL をそれぞれ正確に取り、硝酸(1→100)で 50 mL とし、10、5、2 及び 1 µg/mL 標準溶液(硝酸)とした。10 µg/mL 標準溶液(硝酸) 2.5、1 及び 0.5 mL をそれぞれ正確に取り、硝酸(1→100)で 50 mL とし、0.5、0.2 及び 0.1 µg/mL 標準溶液(硝酸)とした。リン酸イットリウム共沈法で用いる標準溶液は、硝酸(1→100)の代わりに、0.8 mol/L 硝酸を用いて各標準溶液を調製した。

1 mol/L 硝酸：硝酸 74 mL を水で 1 L とした。

0.03 mol/L EDTA・NH<sub>4</sub> 溶液：EDTA 4.38 g を水 100 mL で溶かし、25%アンモニア水 2.2 mL を加え、5%アンモニア水で pH9.2 となるように調整し、水で 500 mL とした。

鉛標準原液(EDTA)：鉛標準液(1000 µg/mL)5 mL を 0.03 mol/L EDTA・NH<sub>4</sub> 溶液で 50 mL とし、鉛標準原液(EDTA)とした(100 µg/mL)。

鉛標準溶液(EDTA)：鉛標準原液(EDTA) 5 mL、2.5 mL、1 mL 及び 0.5 mL をそれぞれ正確に取り、0.03 mol/L EDTA・NH<sub>4</sub> 溶液で 50 mL とし、10、5、2 及び 1 µg/mL 標準溶液(EDTA)とした。10 µg/mL 標準溶液(EDTA)2.5、1 及び 0.5 mL をそれぞれ正確に取り、0.03 mol/L EDTA・NH<sub>4</sub> 溶液で 50 mL とし、0.5、0.2 及び 0.1 µg/mL 標準溶液(EDTA)とした。

イットリウム溶液：酸化イットリウム 100 mg を塩酸 0.5 mL に溶かし、水で 10 mL とし

た。

0.5 mol/L リン酸：リン酸 1.7 mL を水で 50 mL 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), MetaSEP AnaLig (150 mg), 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。Omnipore メンブランフィルター(1.0  $\mu\text{m}$ )はミリポア株製を用いた。フィルターホルダー(ファンネル 300 mL, ガラスベース及びクランプはいずれも  $\phi$  47 mm 用, 吸引ろ過びん 1L)は柴田科学株製を用いた。

### 4. 操作法

#### (1) Inert Sep ME-1 を用いた前処理による鉛添加回収試験

##### ① 試料溶液の調製

試薬特級の炭酸カルシウム, 硫酸第一鉄にそれぞれ 3  $\mu\text{g/g}$ , 2  $\mu\text{g/g}$  相当の鉛を添加し, 塩酸(1 $\rightarrow$ 4) 20 mL を加え, 5 分間加熱し, 穏やかに沸騰させ, 冷後, アンモニア水を加え, pH5 $\sim$ 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 $\rightarrow$ 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 $\rightarrow$ 100)約 7 mL で流速 1 mL/min でゆっくりと溶出し, その液を回収し, 硝酸(1 $\rightarrow$ 100)で 10 mL とし, 試験溶液とした。ただし, 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) 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) ①試料溶液の調製及び②Inert Sep ME-1 による鉛の抽出に準じて, 試験溶液を調製し, (6) 原子吸光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。なお, ①の試料溶液の調製の際の加熱時間は第 9 版食品添加物公定書における各試料の各条鉛規格の方法に従い加熱, または必要に応じて蒸発乾固後, 更に塩酸(1 $\rightarrow$ 4)溶液に溶解し, 試料溶液とした。

#### (3) MetaSEP AnaLig を用いた鉛試験の検討

##### ① 試料溶液の調製

硫酸第一鉄 2 g を量り, 鉛規格値相当量(2  $\mu\text{g/g}$ )の鉛を添加し, 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。ただし, 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 による鉛の抽出

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 $\cdot$ NH<sub>4</sub> 溶液 10 mL を通液し(流速 1 $\sim$ 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(流速 2 $\sim$ 3 mL/min)し, 流液を素通り画分として回収した。1 mol/L 硝酸 20 mL 通液し(流速 10 mL/min), 流液を回収し, 洗浄画分 1 として回収した。その後, 水 50 mL を通液(流速 10 mL/min)し, 流液の pH が 5 付近であることを pH 試験紙で確認し, 流液を回収し, 洗浄画分 2

とした。その後、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)、回収し、溶出画分1とした。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。更に、MetaSep AnaLigに残存する鉛を洗浄除去するために0.03 mol/L EDTA・NH<sub>4</sub>溶液及び水10 mLでそれぞれ洗浄し、洗浄画分3~4を回収した。それぞれ(6)原子吸光光度法による鉛の定量に従い、0.05~5 µg/mL標準溶液(硝酸またはEDTA)から作成した検量線より、素通り画分、洗浄画分1~4、溶出画分1~5を試験溶液とし、試験溶液中の鉛濃度を算出し、鉛の添加回収率(n=5)を求め、各画分における鉛の溶出パターンを得た。

#### (4) MetaSEP AnaLigを用いた硫酸第一鉄の鉛試験の検討 (鉛添加回収試験)

食品添加物用硫酸第一鉄が入手できなかったため、試薬の硫酸第一鉄2gを量り、鉛規格値相当量(2 µg/g)の鉛を添加し、(3) MetaSEP AnaLigを用いた鉛試験の検討に従い添加回収試験(n=5)を行った。ただし、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。

#### (5) 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

硫酸鉄第一鉄2gを量り、鉛規格値相当量(2 µg/g)の鉛を添加し、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3gを加え、溶解させ、イットリウム溶液1 mL、0.5 mol/Lリン酸溶液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。ただし、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。

(6)原子吸光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。

#### (6) 原子吸光光度法による鉛の定量

試験溶液、標準溶液(硝酸またはEDTA)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(Fig.1及び2)、試験溶液中の鉛濃度を求め、試料中の鉛量を算出した。なお、検量線に用いた標準溶液は試験溶液と同じ溶液により調製した。

#### 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

(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

### (1) 試薬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)

2価の陽イオンを含む化合物として、試薬の

炭酸カルシウム及び硫酸第一鉄を用い、Inert Sep ME-1 を用いた規格値相当の鉛を添加し、添加回収試験を行ったところ、炭酸カルシウムでは 97.5%の回収率が得られた。一方、硫酸第一鉄では、試料溶液の調製段階で、褐色の沈殿が析出し、試験が不可能であった。

### (2) 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 µg/g(炭酸カルシウムは 3 µg/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。その結果、Table 1~8 に示すように、鉛無添加の炭酸カルシウム及び炭酸マグネシウムからは 0.26 µg/mL(1.3 µg/g)及び 0.078 µg/mL(0.39 µg/g)の鉛が検出されたが、いずれも規格値(3 µg/g 及び 2 µg/g)以下であり、炭酸カルシウム及び炭酸マグネシウム以外の試料からは鉛が検出されなかった。

また、鉛の n=5 での鉛の平均添加回収率は、水酸化カルシウムで 103.3±5.0%、炭酸カルシウム 103.2±3.5%、塩化カルシウム 94.6±3.7%、サンゴ未焼成カルシウム 98.9±3.8%、グルコン酸カルシウム 97.1±4.9%、酸化マグネシウム 88.0±5.2%、塩化マグネシウム 89.6±3.6%、炭酸マグネシウム 94.0±3.6%であった。

### (3) 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 µg/g となるように鉛を添加し、MetaSEP AnaLig に負荷し素通り画分、洗浄画分 1~4、溶出画分 1~5 を試験溶液とし、試験溶液中の鉛濃度を算出し、鉛の

添加回収率を求めた。その結果 Fig. 3 に示すように、素通り画分ならびに洗浄画分 1~4 では鉛は検出されず、負荷した試料溶液中の鉛のうち平均 99.9%(n=5)の鉛が 0.03 mol/L EDTA・NH<sub>4</sub> 溶出画分 1 で溶出していた。

### (4) MetaSEP AnaLig を用いた硫酸第一鉄の鉛試験の検討 (鉛添加回収試験)

(3) MetaSEP AnaLig を用いた鉛試験の検討の結果を踏まえ、硫酸第一鉄に 2 µg/g となるように鉛を添加し、n=5 での鉛の平均添加回収率を求めたところ、Table 9 に示すように 99.9±9.2%となった。

### (5) 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 µg/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、n=5 での鉛の平均添加回収率を求めた。その結果、Table 10 に示すように n=5 の平均回収率は 82.4±4.1%となり、良好な結果が得られた。

## D. 考察

### (1) 試薬を用いた Inert Sep ME-1 を使用した鉛試験検討 (鉛添加回収試験)

硫酸第一鉄では試料溶液を調整する際、pH2 以上にすると沈殿が生成した。これは、試料溶液中の鉄イオン(Fe<sup>2+</sup>)がアンモニア水を加えることにより、水酸化鉄(Fe(OH)<sub>2</sub>)が沈殿し、空気中の酸素により参加が進み褐色の水酸化第二鉄(Fe(OH)<sub>3</sub>)の沈殿となるためと考えられた<sup>1)</sup>。キレート樹脂は鉛イオン(Pb<sup>2+</sup>)と同様 Fe<sup>2+</sup>も吸着してしまうため、Fe<sup>2+</sup>をあらかじめ取り除くか、固相中のイミノ二酢酸とキレートを形成しないようマスキング剤を添加する必要がある。そこで、Fe<sup>2+</sup>が 1,10-フェナントロリンー水和物で水溶性の錯イオンを生成することから、2 g の硫

酸第一鉄に過量の 1,10-フェナントロリン-水合物を加え、pH を調整したところ、濃赤色の鉄フェナントロリン錯体が生成し、 $\text{Fe}(\text{OH})_3$  の沈殿の生成は抑制されたが、一部沈殿が生成し、Inert Sep ME-1 に保持されてしまい、完全に  $\text{Fe}^{2+}$  を除去することは困難であった。

#### (2) 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。

#### (3) MetaSEP AnaLig を用いた鉛試験の検討

硫酸第一鉄に  $2 \mu\text{g/g}$  となるように鉛を添加し、MetaSEP AnaLig を用いて検討を行った。その結果、最初の  $0.03 \text{ mol/L EDTA} \cdot \text{NH}_4$  溶出  $2 \text{ mL}$  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。

#### (4) MetaSEP AnaLig を用いた硫酸第一鉄の鉛試験の検討 (鉛添加回収試験)

硫酸第一鉄に  $2 \mu\text{g/g}$  となるように鉛を添加し、 $n=5$  での鉛の平均添加回収率を求めたところ、Table 10 に示すように  $99.9 \pm 9.2\%$  となったが、一つの試料で回収率が 114.5% と高かったため、標準偏差が高くなった。これは MetaSEP AnaLig を繰り返し洗浄し使用したため、カートリッジに残存してしまった鉛を完全に洗浄し

きれなかったことが原因の一つと考えられた。

その他の平均回収率は  $96.3 \pm 5.0\%$  と良好な結果が得られた。MetaSEP AnaLig はコストの面からも繰り返し使用できることが望ましいが、繰り返し使用していると、目詰まりが起きやすくなり、洗浄が不十分となることもあるため注意が必要であると考えられた。繰り返し使用する場合は、負荷する試料溶液中の不溶物を取り除くことや、 $0.03 \text{ mol/L EDTA} \cdot \text{NH}_4$  溶液による洗浄と水による洗浄操作を繰り返し、残存する鉛を完全に除去し、鉛の溶出の有無を確認するなど、今後洗浄操作について検討が必要であろう。

#### (5) 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<sup>2)</sup>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。すでに報告されている方法は、電気加熱原子吸光分析法での方法であったが、今回の検討で、原子吸光度法でも共沈剤であるリン酸イットリウムの影響がほとんどなく、良好な鉛回収率が得られた。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。

#### E. 結論

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 µg/g 相当 (炭酸カルシウムは 3 µg/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 価のカルシウム及びマグネシウム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, pH を 4 以上にすることにより多量の沈殿が生成するため 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簡便な操作で鉄を多量に含むマトリックスから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.

今回は主に無機塩類を中心に検討を行ったが, 第 9 版食品添加物公定書では有機物を含む塩類 (アミノ酸塩, 有機酸塩等) についても溶媒抽出法による鉛試験が設定されていることから, 今後, 有機物を含む塩類 (アミノ酸塩, 有機酸塩等) についても, 灰化法や固相カートリッジを含めた前処理法の検討を含めより簡便な鉛試験法の検討が必要と考えられた.

#### 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) 高木誠司, 新訂定性分析化学(第 40 版), pp174-178, 南江堂 (1990)
- 2) 加賀谷ら, 鉄と鋼, 93, 2, 80-85 (2007)



Table 1 Inert Sep ME-1 を用いた前処理による食品添加物用水酸化カルシウムに対する鉛の添加回収試験

	Pb ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)
Ca(OH) <sub>2</sub> BLK	N.D.	-
Ca(OH) <sub>2</sub> -1	0.393	98.1
Ca(OH) <sub>2</sub> -2	0.393	98.1
Ca(OH) <sub>2</sub> -3	0.434	108.5
Ca(OH) <sub>2</sub> -4	0.417	104.3
Ca(OH) <sub>2</sub> -5	0.430	107.4
	Average	103.3
	S.D.	5.0

N.D. 検出下限以下 (0.05 $\mu\text{g/mL}$  以下)

Table 2 Inert Sep ME-1 を用いた前処理による食品添加物用炭酸カルシウムに対する鉛の添加回収試験

	Pb ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)
CaCO <sub>3</sub> BLK	0.260	-
CaCO <sub>3</sub> -1	0.868	101.2
CaCO <sub>3</sub> -2	0.893	105.4
CaCO <sub>3</sub> -3	0.851	98.5
CaCO <sub>3</sub> -4	0.905	107.4
CaCO <sub>3</sub> -5	0.880	103.3
	Average	103.2
	S.D.	3.5

N.D. 検出下限以下 (0.05  $\mu\text{g/mL}$  以下)

Table 3 Inert Sep ME-1 を用いた前処理による食品添加物用塩化カルシウムに対する鉛の添加回収試験

	Pb ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)
CaCl <sub>2</sub> BLK	N.D.	-
CaCl <sub>2</sub> -1	0.393	98.1
CaCl <sub>2</sub> -2	0.380	95.0
CaCl <sub>2</sub> -3	0.368	91.9
CaCl <sub>2</sub> -4	0.360	89.9
CaCl <sub>2</sub> -5	0.393	98.1
	Average	94.6
	S.D.	3.7

N.D. 検出下限以下 (0.05  $\mu\text{g/mL}$  以下)

Table 4 Inert Sep ME-1 を用いた前処理による食品添加物用サンゴ未焼成カルシウムに対する鉛の添加回収試験

	Pb ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)
Non-calcinated Coral Calcium BLK	N.D.	-
Non-calcinated Coral Calcium-1	0.512	103.3
Non-calcinated Coral Calcium-2	0.498	99.8
Non-calcinated Coral Calcium-3	0.498	99.8
Non-calcinated Coral Calcium-4	0.467	92.9
Non-calcinated Coral Calcium-5	0.490	98.8
Average		98.9
S.D.		3.8

N.D. 検出下限以下 (0.05  $\mu\text{g/mL}$  以下)

Table 5 Inert Sep ME-1 を用いた前処理による食品添加物用グルコン酸カルシウムに対する鉛の添加回収試験

	Pb ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)
Calcium Gluconate BLK	N.D.	-
Calcium Gluconate-1	0.364	91.0
Calcium Gluconate-2	0.392	98.0
Calcium Gluconate-3	0.401	100.4
Calcium Gluconate-4	0.373	93.3
Calcium Gluconate-5	0.411	102.7
Average		97.1
S.D.		4.9

N.D. 検出下限以下 (0.05  $\mu\text{g/mL}$  以下)

Table 6 Inert Sep ME-1 を用いた前処理による食品添加物用酸化マグネシウムに対する鉛の添加回収試験

	Pb ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)
MgO BLK	N.D.	-
MgO-1	0.360	89.9
MgO-2	0.368	91.9
MgO-3	0.318	79.5
MgO-4	0.368	91.9
MgO-5	0.347	86.8
Average		88.0
S.D.		5.2

N.D. 検出下限以下 (0.05  $\mu\text{g/mL}$  以下)

Table 7 Inert Sep ME-1 を用いた前処理による食品添加物用塩化マグネシウムに対する鉛の添加回収試験

	Pb ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)
MgCl <sub>2</sub> BLK	N.D.	-
MgCl <sub>2</sub> -1	0.336	84.1
MgCl <sub>2</sub> -2	0.355	88.7
MgCl <sub>2</sub> -3	0.373	93.3
MgCl <sub>2</sub> -4	0.359	89.9
MgCl <sub>2</sub> -5	0.369	92.2
Average		89.6
S.D.		3.6

N.D. 検出下限以下 (0.05  $\mu\text{g/mL}$  以下)

Table 8 Inert Sep ME-1 を用いた前処理による食品添加物用炭酸マグネシウムに対する鉛の添加回収試験

	Pb ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)
MgCO <sub>3</sub> BLK	0.078	-
MgCO <sub>3</sub> -1	0.369	92.2
MgCO <sub>3</sub> -2	0.516	100.2
MgCO <sub>3</sub> -3	0.479	91.0
MgCO <sub>3</sub> -4	0.442	93.3
MgCO <sub>3</sub> -5	0.452	93.3
Average		94.0
S.D.		3.6

Table 9 MetaSep AnaLig®を用いた前処理による硫酸第一鉄に対する鉛の添加回収試験

	Pb ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)
FeSO <sub>4</sub> BLK	N.D.	-
FeSO <sub>4</sub> -1	0.373	93.1
FeSO <sub>4</sub> -2	0.410	102.6
FeSO <sub>4</sub> -3	0.391	97.9
FeSO <sub>4</sub> -4	0.458	114.5
FeSO <sub>4</sub> -5	0.367	91.7
Average		99.9
S.D.		9.2

N.D. 検出下限以下 (0.05  $\mu\text{g/mL}$  以下)

Table 10 リン酸イットリウム共沈殿法による硫酸第一鉄に対する鉛の添加回収試験

	Pb ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)
FeSO <sub>4</sub> BLK	0.131	-
FeSO <sub>4</sub> -1	0.437	76.6
FeSO <sub>4</sub> -2	0.467	84.2
FeSO <sub>4</sub> -3	0.482	87.9
FeSO <sub>4</sub> -4	0.457	81.7
FeSO <sub>4</sub> -5	0.457	81.7
Average		82.4
S.D.		4.1

N.D. 検出下限以下 (0.05  $\mu\text{g/mL}$  以下)

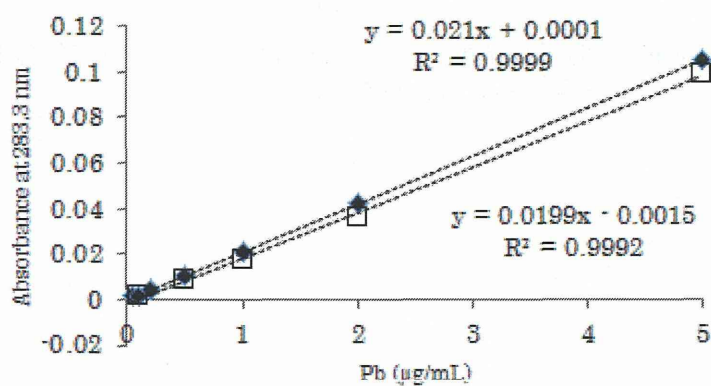


Fig.1 原子吸光光度計による鉛標準溶液 (硝酸) の検量線 (例)  
 ◆硝酸(1→100), □0.8 mol/LN 硝酸

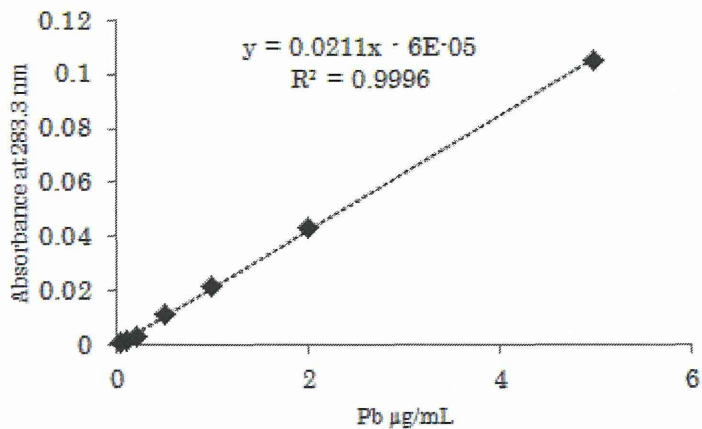


Fig.2 原子吸光光度計による鉛標準溶液 (EDTA 溶液) の検量線 (例)

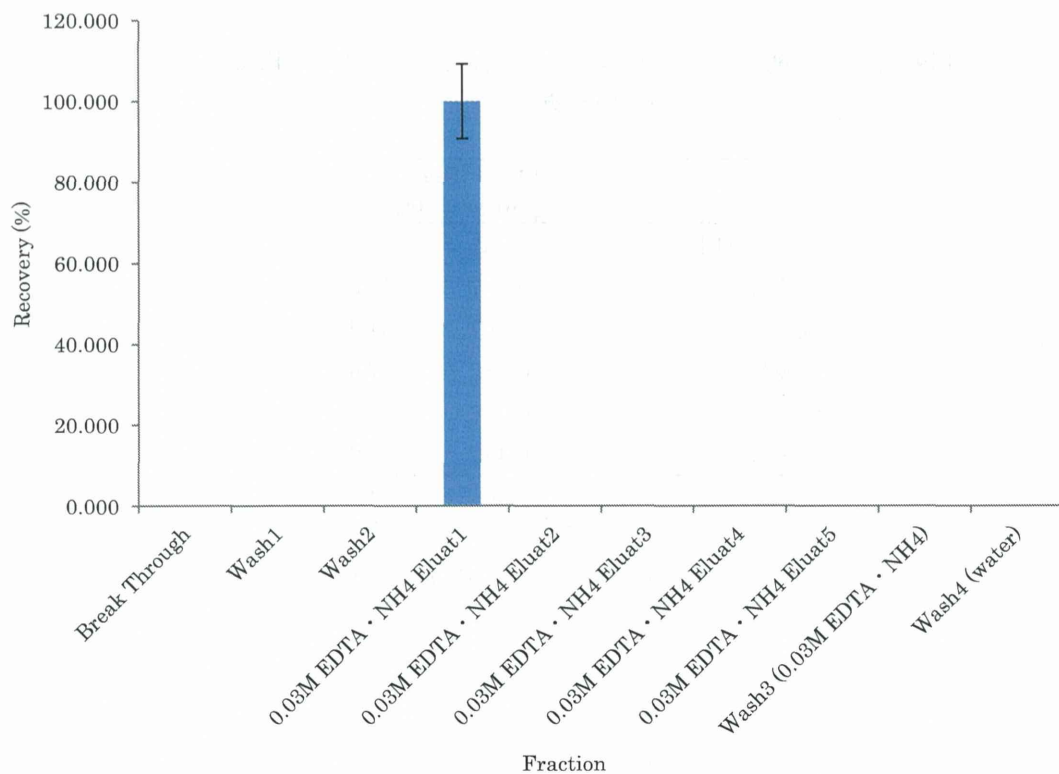


Fig.3 鉛添加硫酸第一鉄を固相カートリッジで処理したときの鉛の溶出パターン

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 (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。

#### A. 研究目的

食品添加物の安全性確保の一環として、わが国独自の香料規格の向上が重要と考え、中でも適切な安全性評価の整備を目指す。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。

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。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ため、日本で評価を実施する必要がある。しかし、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。そこで、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た。

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。

#### 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.)。

##### B-2 Ames 試験

【試験の概略】検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100 及び TA98 を用い、プレートインキュ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。

【被験物質】試験に供した化合物は以下の9種類（表1）で、いずれも東京化成工業㈱より購入した。

diisoamyl ether  
*tert*-butyl acetoacetate  
2-hydroxyethyl salicylate  
methyl *N,N*-dimethylantranilate  
neryl acetate  
2,4-dimethyl-3-pentanone  
2-methyl-3-pentanone  
3,4-dimethoxyacetophenone  
dinonyl sulfide

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。

【試験操作】ニュートリエントブロスNo. 2 (Oxoid) を12 mL入れたL字型試験管に解凍した凍結保存菌24 µLをすみやかに接種し、4℃で保冷後、タイマーの設定により37℃で10時間、往復振とう培養して試験菌液とした。Amesらの標準法(Maron & Ames, Mutation Research 113, 173-215, 1983)に従い、プレインキュベーション法により、用量設定試験と本試験を各1回実施した。いずれの試験も代謝活性化系の関与を調べるため、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素が含まれるラット肝ホモジネート画分に補酵素を加えたS9mixの存在下と非存在下の2条件で行

った。具体的には、小試験管中に、①被験物質調製液0.1 mL、②S9 mix存在下ではS9 mix 0.5 mL、S9 mix非存在下では0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4) 0.5 mL、③試験菌液0.1 mLを混合し、37℃で20分間インキュベーションしたのち、2.0 mLのトップアガーを加えて混和し、最小グルコース寒天平板培地上に流して固める。また、被験物質調製液のかわりに使用溶媒 (DMSO) 0.1 mLまたは陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照及び陽性対照とした。平板の培養は37℃で48時間とした。出現した変異コロニー数を、コロニーアナライザー (CA-11, システムサイエンス, 面積補正有り) または目視により計測した。被験物質に由来する沈殿の有無は、目視により観察した。また、生育阻害の有無については、目視あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。平板は各用量、陰性及び陽性対照につき2枚ずつ使用し、変異コロニー数について平板2枚の平均値を求めた。陰性及び陽性対照の変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値及び陽性対照値とした。

(倫理面への配慮)

*in silico* と *in vitro* の研究であるので、該当しない。

## C. 研究結果

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。この中で下線を引いていない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 (表2-10)。

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 (表11)。したがって、SARの陰性予測率は95.8%と計算される。

#### D. 考察

上述のように、香料に対する3種類のSARを用いたAmes試験結果の陰性予測率は95.8%と計算されるため、SARによる陰性予測は信頼できると考える。SARで陽性が予測されたものについて、標準的なAmes試験、その他の遺伝毒性試験を実施することで、評価が効率的に行えると考えてよいだろう。

昨年度の報告書では、3種類のSAR予測は陰性でFATの結果が陽性だった12化合物についての、類縁化合物評価を調べている。表1にあるように、類縁化合物についてはAmes試験で陰性の結果があるものがほとんどで、いずれも安全性に懸念がないと評価されていた。今回の結果より、9化合物についてのSARによるAmes試験結果予測と類縁化合物の情報が、実際のAmes試験の結果と一致していたことが明らかになった。したがって、SARによる予測に加えて、類縁化合物の情報も香料評価には十分参考になることがわかる。

最後に、簡易Ames試験と標準的なAmes試験の結果の齟齬について考察する。簡易Ames試験のバリデーション研究の報告

(Sui et al., Genes & Environment, 31, 47-55, 2009) によれば、NTPによるAmes試験結果がある40化合物を対象に簡易Ames試験を実施した結果、陽性一致率は100% (20/20) であった (陰性一致率は60% (12/20))。これは、今回の9化合物に対して簡易Ames試験すべて陽性、Ames試験すべて陰性、陽性一致率0%とは、全く逆の結果である。バリデーション研究に用いた化合物については、SARの予測をしていないことに加えて、典型的な遺伝毒性物質を選んでいるところも香料とは違う。つまり集められた化合物の性質には、それぞれバイアスがかかっているため、単純に一致率だけで比較することはできないと考えられる。

#### E. 結論

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。

#### F. 研究発表

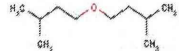
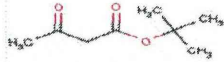
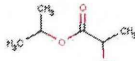
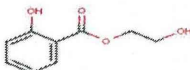
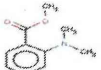
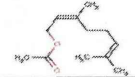
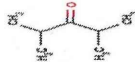


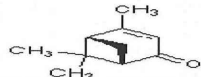


なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



表1 3つのSARモデルで陰性になった化合物とその類縁化合物の安全性評価結果

化合物名	CAS No.	構造	類縁化合物情報		
			グループ*1	名称・構造	安全性評価結果
diisoamyl ether	544-01-4		FGE.59 (aliphatic ethers)	2-butyl ethyl ether	問題なし
<u>tert</u> butyl acetoacetate	1694-31-1		FGE. 92	ethyl acetoacetate	Ames 試験陰性
<u>isopropyl</u> lactate	617-51-6		FGE.64	ethyl lactate と lactic acid	Ames 試験陰性
2-hydroxyethyl salicylate	87-28-5		FGE.52	methyl salicylate	Ames 試験 (複数) 陰性
methyl <u>N,N</u> dimethylantranilate	10072-05-6		FGE.84	methyl <i>N</i> methylantranilate	Ames 試験 (複数) 陰性
neryl acetate	141-12-8		FGE. 62 Rev1	geranyl acetate	Ames 試験 (複数) 陰性
2,4-dimethyl-3-pentanone	565-80-0		FGE. 7 Rev3	4-methyl-2-pentanone	Ames 試験 (複数) 陰性
2-methyl-3-pentanone	565-69-5				
3,4-dimethoxyacetophenone	1131-62-0		FGE. 22 Rev1	4-hydroxy-3,5-dimethoxy acetophenone	Ames 試験 (複数) 陰性*2
<u>verbenone</u>	80-57-9		FGE. 47 Rev1	bicyclic ketones を含む化合物	遺伝毒性の懸念なし
<u>2,8-p</u> menthadien-1-ol	22771-44-4		FGE. 18 Rev2	beta-terpineol (環の二重結合がない)	Ames 試験陰性
dinonyl sulfide	929-98-6		simple aliphatic & aromatic sulfides & thiols	allyl sulfide	安全性の懸念なし

下線は今年度、Ames 試験を実施しなかった化合物

\*1 表1の別添参照

\*2 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。

表 1 の別添 EFSA の評価プログラムにおける香料のグループ分け

1. Flavouring groups in the evaluation programme of EFSA (situation 1 September 2012)	
FGE.07 rev4	二級アルコール及び飽和直鎖又は分岐鎖カルボン酸の飽和及び不飽和脂肪族二級アルコール、ケトン及びエステル
FGE.18 rev2	脂肪族、脂環及び芳香族飽和及び不飽和三級アルコール、芳香族三級アルコール及びそのエステル
FGE.22 rev1	環置換フェノール物質
FGE 47 rev1	3環二級アルコール、ケトン及び関連エステル類
2. Flavouring groups evaluated by JECFA and considered by EFSA	
FGE.52	EFSA が FGE.20 で評価したベンジルアルコール・ベンズアルデヒド・関連アセタール・安息香酸・関連エステルと構造的に関連する JECFA 第 57 回会合で評価されたヒドロキシ及びアルコキシ置換ベンジル誘導体の検討
FGE.59 rev1	EFSA が FGE.23Rev2 で評価したアニソール誘導体を含む脂肪族・脂環族・芳香族エーテルと構造的に関連する JECFA 第 61 と 63 回会合で評価した脂肪族及び芳香族エーテルの検討
FGE.62 rev1	EFSA が FGE .05Rev2(2010 年)及び FGE .06Rev1(2008 年)で評価した物質と構造的に関連する JECFA 第 61/68 回会合で評価された直鎖及び分岐鎖脂肪族不飽和、非共役アルコール、アルデヒド、酸及び関連エステルの検討
FGE.64	EFSA が FGE.10Rev1 で評価した化学グループ 9・13・30 の脂肪族一級及び二級飽和及び不飽和アルコール・アルデヒド・アセタール・カルボン酸・エステルと構造的に関連する、JECFA (57 回会合)で評価された脂肪族非環式ジオール・トリオール及び関連物質の検討
FGE.84	アントラニル酸エステル類
FGE.92	EFSA が FGE.10Rev1 で評価した追加の酸素含有官能基とラク톤を含む脂肪族一級及び二級飽和及び不飽和アルコール・アルデヒド・アセタール・カルボン酸・エステルと構造的に関連する、JECFA (68 回会合)で評価された脂肪族非環式ジオール・トリオール及び関連物質の検討

表2 diisoamyl ether の Ames 試験結果

代謝活性化 系の有無	試験物質用量 (µg/plate)	試験実施期間: 2015年1月26日より2015年1月29日			
		復帰変異数		コロニー数/plate(平均)	
		塩基付置換型		フレームシフト型	
		TA100	TA98		
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	88 ( 91 )	93 ( 21 )	21 ( 21 )	20 ( 21 )
	1.56	84 ( 95 )	105 ( 21 )	23 ( 21 )	18 ( 21 )
	3.13	108 ( 106 )	103 ( 22 )	22 ( 22 )	22 ( 22 )
	6.25	122 ( 119 )	115 ( 25 )	29 ( 25 )	20 ( 25 )
	12.5	129 ( 120 )	110 ( 23 )	28 ( 23 )	17 ( 23 )
	25	116 ( 122 )	127 ( 16 )	12 ( 16 )	20 ( 16 )
	50	114 * ( 111 )	107 * ( 14 )	11 * ( 14 )	17 * ( 14 )
	59 mix (+)	0 (陰性対照)	121 ( 121 )	121 ( 30 )	34 ( 30 )
1.56	134 ( 118 )	102 ( 39 )	39 ( 39 )	38 ( 39 )	
3.13	127 ( 128 )	128 ( 30 )	32 ( 30 )	26 ( 30 )	
6.25	145 ( 154 )	163 ( 31 )	26 ( 31 )	35 ( 31 )	
12.5	162 ( 146 )	130 ( 29 )	30 ( 29 )	27 ( 29 )	
25	137 ( 133 )	129 ( 33 )	33 ( 33 )	32 ( 33 )	
50	125 * ( 122 )	118 * ( 35 )	37 * ( 35 )	33 * ( 35 )	
陽性対照	S9 mixを 必要とし ないもの	名称 AF-2	AF-2		
	用量(µg/plate)	0.01	0.1		
対照	S9 mixを 必要とす るもの	名称 2AA	2AA		
	用量(µg/plate)	1	0.5		
	コロニー数/plate	462 ( 434 )	405 ( 481 )	509 ( 481 )	453 ( 464 )

陰性対照, アセトン  
AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; 2AA, 2-Aminoanthracene  
\*, 生育阻害が認められた。

表3 tert-butyl acetoacetate の Ames 試験結果

代謝活性化 系の有無	試験物質用量 (µg/plate)	試験実施期間: 2014年12月15日より2014年12月18日			
		復帰変異数		コロニー数/plate(平均)	
		塩基付置換型		フレームシフト型	
		TA100	TA98		
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	101 ( 96 )	90 ( 17 )	25 ( 17 )	11 ( 17 )
	156	84 ( 86 )	87 ( 17 )	13 ( 17 )	21 ( 17 )
	313	103 ( 97 )	91 ( 17 )	20 ( 17 )	14 ( 17 )
	625	82 ( 99 )	116 ( 20 )	20 ( 20 )	19 ( 20 )
	1250	101 ( 104 )	106 ( 25 )	28 ( 25 )	21 ( 25 )
	2500	91 ( 94 )	97 ( 19 )	13 ( 19 )	24 ( 19 )
	5000	90 * ( 83 )	75 * ( 16 )	12 * ( 16 )	19 * ( 16 )
	59 mix (+)	0 (陰性対照)	100 ( 99 )	97 ( 27 )	21 ( 27 )
156	93 ( 96 )	98 ( 27 )	25 ( 27 )	29 ( 27 )	
313	96 ( 100 )	103 ( 29 )	30 ( 29 )	28 ( 29 )	
625	106 ( 105 )	103 ( 27 )	32 ( 27 )	22 ( 27 )	
1250	102 ( 99 )	96 ( 29 )	29 ( 29 )	29 ( 29 )	
2500	99 ( 106 )	112 ( 25 )	22 ( 25 )	28 ( 25 )	
5000	70 * ( 76 )	82 * ( 25 )	21 * ( 25 )	25 * ( 25 )	
陽性対照	S9 mixを 必要とし ないもの	名称 AF-2	AF-2		
	用量(µg/plate)	0.01	0.1		
対照	S9 mixを 必要とす るもの	名称 2AA	2AA		
	用量(µg/plate)	1	0.5		
	コロニー数/plate	414 ( 434 )	454 ( 507 )	500 ( 507 )	513 ( 384 )

陰性対照, ジメチルホルムサキンド  
AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; 2AA, 2-Aminoanthracene  
\*, 生育阻害が認められた。

表4 2-hydroxyethyl salicylate の Ames 試験結果

代謝活性化 系の有無	試験物質用量 (µg/plate)	試験実施期間: 2014年12月15日より2014年12月18日			
		復帰変異数		コロニー数/plate(平均)	
		塩基付置換型		フレームシフト型	
		TA100	TA98		
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	101 ( 96 )	90 ( 17 )	25 ( 17 )	11 ( 17 )
	156	85 ( 83 )	81 ( 19 )	13 ( 19 )	24 ( 19 )
	313	89 ( 87 )	84 ( 21 )	22 ( 21 )	20 ( 21 )
	625	95 ( 95 )	94 ( 19 )	18 ( 19 )	20 ( 19 )
	1250	89 ( 89 )	89 ( 24 )	27 ( 24 )	20 ( 24 )
	2500	86 ( 89 )	91 ( 22 )	17 ( 22 )	26 ( 22 )
	5000	44 * ( 54 )	63 * ( 13 )	16 * ( 13 )	10 * ( 13 )
	59 mix (+)	0 (陰性対照)	100 ( 99 )	97 ( 27 )	21 ( 27 )
8.77	96 ( 96 )	96 ( 27 )	NT	NT	
19.5	100 ( 91 )	82 ( 21 )	NT	NT	
39.1	96 ( 97 )	97 ( 29 )	NT	NT	
78.1	121 ( 112 )	113 ( 22 )	NT	NT	
156	97 ( 102 )	106 ( 21 )	20 ( 21 )	22 ( 21 )	
313	74 ( 68 )	61 ( 29 )	27 ( 29 )	30 ( 29 )	
625	6 * ( 5 )	4 * ( 26 )	19 ( 26 )	33 ( 26 )	
1250	NT	NT	22 ( 22 )	21 ( 22 )	
2500	NT	NT	16 ( 16 )	15 ( 16 )	
5000	NT	NT	0 * ( 1 )	1 * ( 1 )	
陽性対照	S9 mixを 必要とし ないもの	名称 AF-2	AF-2		
	用量(µg/plate)	0.01	0.1		
対照	S9 mixを 必要とす るもの	名称 2AA	2AA		
	用量(µg/plate)	1	0.5		
	コロニー数/plate	414 ( 434 )	454 ( 507 )	500 ( 507 )	513 ( 384 )

陰性対照, ジメチルホルムサキンド  
AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; 2AA, 2-Aminoanthracene  
\*, 生育阻害が認められた。  
NT, 実施せず。

表5 methyl N,N-dimethylantranilate の Ames 試験結果

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (ug/plate)	試験実施期間: 2015年1月22日より2015年1月26日			
		復帰変異数 コロニー数/plate (平均)			
		塩基対置換型		フレームシフト型	
		TA100	TA98		
(-)	0 (陰性対照)	120	120	21	18
		( 120 )	( 120 )	( 20 )	( 18 )
	156	128	141	20	14
		( 135 )	( 135 )	( 17 )	( 14 )
	313	147	155	25	17
		( 151 )	( 151 )	( 21 )	( 17 )
	625	120	126	10	16
		( 125 )	( 125 )	( 13 )	( 16 )
	1250	114	113	20	11
		( 114 )	( 114 )	( 16 )	( 11 )
	2500	50*	81*	13*	11*
		( 70 )	( 70 )	( 12 )	( 11 )
	5000	0*	0*	0*	0*
		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )
(+) S9 mix	0 (陰性対照)	136	111	27	17
		( 124 )	( 124 )	( 22 )	( 17 )
	977	168	169	NT	
		( 168 )	( 168 )		
	195	142	157	NT	
		( 150 )	( 150 )		
	391	156	133	NT	
		( 145 )	( 145 )		
	781	170	146	NT	
		( 158 )	( 158 )		
	156	152	167	30	32
		( 160 )	( 160 )	( 31 )	( 32 )
	313	147	173	33	31
	( 160 )	( 160 )	( 32 )	( 31 )	
625	147	146	30	29	
	( 146 )	( 146 )	( 30 )	( 29 )	
1250	132	156	25	30	
	( 144 )	( 144 )	( 28 )	( 30 )	
2500	80*	87*	17*	12*	
	( 84 )	( 84 )	( 15 )	( 12 )	
5000	0*	0*	0*	0*	
	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	
陽性	S9 mixを必要とし ないもの	名称 AF-2	AF-2		
		用量(ug/plate) 0.01	0.1		
対照	S9 mixを必要とするもの	名称 2AA	2AA		
		用量(ug/plate) 1	0.5		
		コロニー数/plate 564	533	508	609
		( 540 )	( 540 )	( 604 )	( 609 )
		名称 2AA	2AA		
		用量(ug/plate) 1	0.5		
		コロニー数/plate 1258	1262	521	525
		( 1260 )	( 1260 )	( 523 )	( 525 )

陰性対照 シメチルスルホキシド  
AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2AA, 2-Aminoanthracene  
\*, 生育阻害が認められた。  
NT, 実施せず。

表6 neryl acetate の Ames 試験結果

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (ug/plate)	試験実施期間: 2014年12月15日より2014年12月18日			
		復帰変異数 コロニー数/plate (平均)			
		塩基対置換型		フレームシフト型	
		TA100	TA98		
(-)	0 (陰性対照)	101	99	23	11
		( 96 )	( 96 )	( 17 )	( 11 )
	122	76	80	19	16
		( 79 )	( 79 )	( 18 )	( 16 )
	244	80	94	17	11
		( 87 )	( 87 )	( 14 )	( 11 )
	488	92	85	21	21
		( 89 )	( 89 )	( 21 )	( 21 )
(+)	977	83	109	18	19
		( 96 )	( 96 )	( 19 )	( 19 )
	195	86	100	18	21
		( 93 )	( 93 )	( 20 )	( 21 )
	391	97*	84*	20*	12*
		( 91 )	( 91 )	( 16 )	( 12 )
	781	43*	36*	0*	0*
		( 40 )	( 40 )	( 0 )	( 0 )
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	100	97	21	33
		( 99 )	( 99 )	( 21 )	( 33 )
	977	101	100	35	28
		( 101 )	( 101 )	( 32 )	( 28 )
	195	104	121	27	24
		( 113 )	( 113 )	( 26 )	( 24 )
	391	102	113	21	22
		( 108 )	( 108 )	( 22 )	( 22 )
	781	102	101	30	20
		( 102 )	( 102 )	( 28 )	( 20 )
	156	106	99	23	24
		( 103 )	( 103 )	( 24 )	( 24 )
	113	84*	66*	16*	19*
	( 75 )	( 75 )	( 18 )	( 19 )	
625	0*	0*	0*	0*	
	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	
陽性	S9 mixを必要とし ないもの	名称 AF-2	AF-2		
		用量(ug/plate) 0.01	0.1		
対照	S9 mixを必要とするもの	名称 2AA	2AA		
		用量(ug/plate) 1	0.5		
		コロニー数/plate 414	454	500	513
		( 434 )	( 434 )	( 507 )	( 513 )
		名称 2AA	2AA		
		用量(ug/plate) 1	0.5		
		コロニー数/plate 1011	1041	351	417
		( 1026 )	( 1026 )	( 384 )	( 417 )

陰性対照 シメチルスルホキシド  
AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2AA, 2-Aminoanthracene  
\*, 生育阻害が認められた。

表7 2,4-dimethyl-3-pentanone の Ames 試験結果

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (ug/plate)	試験実施期間: 2015年1月26日より2015年1月29日				
		復帰変異数 コロニー数/plate (平均)				
		塩基対置換型		フレームシフト型		
		TA100	TA98			
(-)	0 (陰性対照)	105	106	20	21	
		( 105 )	( 105 )	( 21 )	( 21 )	
	156	119	130	20	14	
		( 125 )	( 125 )	( 17 )	( 14 )	
	313	104	103	33	26	
		( 104 )	( 104 )	( 27 )	( 26 )	
	625	134	113	22	25	
		( 124 )	( 124 )	( 24 )	( 25 )	
(+)	1250	104	122	26	35	
		( 113 )	( 113 )	( 31 )	( 35 )	
	2500	86*	79*	16*	13*	
		( 83 )	( 83 )	( 15 )	( 13 )	
	5000	0*	0*	0*	0*	
		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	
	S9 mix (+)	0 (陰性対照)	119	133	27	28
			( 126 )	( 126 )	( 28 )	( 28 )
156		103	142	33	38	
		( 123 )	( 123 )	( 36 )	( 38 )	
313		114	113	24	24	
		( 114 )	( 114 )	( 24 )	( 24 )	
625		115	119	29	31	
		( 117 )	( 117 )	( 30 )	( 31 )	
1250		114	137	30	30	
		( 126 )	( 126 )	( 30 )	( 30 )	
2500	89*	95*	16*	19*		
	( 92 )	( 92 )	( 13 )	( 19 )		
5000	0*	0*	0*	0*		
	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )		
陽性	S9 mixを必要とし ないもの	名称 AF-2	AF-2			
		用量(ug/plate) 0.01	0.1			
対照	S9 mixを必要とするもの	名称 2AA	2AA			
		用量(ug/plate) 1	0.5			
		コロニー数/plate 462	405	509	453	
		( 454 )	( 454 )	( 481 )	( 453 )	
		名称 2AA	2AA			
		用量(ug/plate) 1	0.5			
		コロニー数/plate 1162	1156	430	498	
		( 1159 )	( 1159 )	( 464 )	( 498 )	

陰性対照 シメチルスルホキシド  
AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2AA, 2-Aminoanthracene  
\*, 生育阻害が認められた。