

201426031A

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

既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者	穠山 浩	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	天倉 吉章	松山大学
	多田 敦子	国立医薬品食品衛生研究所
	杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所
	受田 浩之	高知大学
	井之上 浩一	静岡県立大学
	永津 明人	金城学院大学

平成 27 (2015) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究

代表研究者 : 穂山浩	1
-------------------	---

II. 分担研究報告書

1. 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究

1.1. 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究	13
----------------------------------	----

協力研究者 : 日本食品添加物協会

2. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

2.1. 既存添加物生コーヒー豆抽出物の成分研究	21
--------------------------------	----

分担研究者 : 天倉吉章

協力研究者 : 好村守生

協力研究者 : 杉脇秀美

2.2. 既存添加物ゲンチアナ抽出物の品質評価法の検討	25
-----------------------------------	----

分担研究者 : 天倉吉章

協力研究者 : 好村守生

協力研究者 : 杉脇秀美

2.3. 既存添加物モウソウチク抽出物の成分研究	31
--------------------------------	----

分担研究者 : 天倉吉章

協力研究者 : 好村守生

3. 既存添加物の有効成分に関する研究

3.1. 既存添加物ジャマイカカссия抽出物と天然香料クワツャ中におけるクアシン、

ネオクアシンの新規定量分析法の検討	43
-------------------------	----

分担研究者 : 多田敦子

協力研究者：西崎雄三

協力研究者：石附京子

3.2. 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の分離 59

分担研究者：多田敦子

協力研究者：受田浩之

協力研究者：島村智子

協力研究者：石附京子

協力研究者：杉本直樹

3.3. 粘度測定法に関する検討 65

分担研究者：多田敦子

協力研究者：杉本直樹

協力研究者：田邊思帆里

協力研究者：佐藤恭子

協力研究者：建部千絵

3.4. 既存添加物クエルセチンの定量法確立のための qNMR を応用した検討 71

分担研究者：多田敦子

協力研究者：松田諭

協力研究者：河崎裕美

協力研究者：石附京子

協力研究者：西崎雄三

協力研究者：杉本直樹

4. 既存添加物の成分規格試験法の検討

4.1. 一般飲食物添加物「チコリ色素」の指標成分の探索 77

分担研究者：杉本直樹

協力研究者：多田敦子

協力研究者：西崎雄三

4.2. INADEQUATE によるカルミン酸，耐酸性カルミン（4-アミノカルミン酸）の

¹³C-NMR スペクトルの完全帰属 89

分担研究者：杉本直樹

協力研究者：多田敦子

協力研究者：大槻崇

協力研究者：西崎雄三

協力研究者：石附京子

5. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

5.1. 酸化防止剤の力価評価－DPPH 法と ORAC 法の比較－ 111

分担研究者：受田浩之

協力研究者：島村智子

6. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

6.1. 既存添加物ムラサキイモ色素の成分規格の検討 117

分担研究者：井之上浩一

協力研究者：細谷孝博

6.2. 既存添加物クチナン黄色素の成分規格の検討 135

分担研究者：井之上浩一

7. NMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

7.1. NMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究 149

分担研究者：永津明人

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 159

既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究

研究代表者 樺山浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部長

研究要旨

(1) 既存添加物の成分規格作成の技術的実現性に関する調査

第 9 版食品添加物公定書に未収載の既存添加物の中から、第 10 版公定書の作成に備え検証規格の作成を実施した。収集した情報に基づき検証試験を実施するための検証用の規格を作成すると共に、今までに作成した規格案も含め一部の品目については裏付け試験を実施した。また、残された品目の中から情報の整ったものについて第 5 版自主規格案として成分規格案を作成した。更に、既存添加物名簿収載品目リストの基原・製法・本質に記載されている基原種について、削除、変更又は拡大の必要性の有無を調査した。

(2) 含有成分解析と成分規格試験法の検討

1) 既存添加物名簿収載のゲンチアナ抽出物の品質規格作成のための化学的検討として、HPLC 及び TLC による定性試験、HPLC による定量分析について検討した。その結果、*gentiopicroside* 及び *amarogentin* を指標成分として確認、定量する方法を作成した。

2) 既存添加物名簿に収載されている「クチナシ黄色素」および「サフラン色素」の成分規格を行うため、それぞれの比較検討を実施した。アルカリ分解後のクロセチン含有量は、クチナシ黄色素では 67.6%および 45.5%であり、サフラン色素では 42.3%となった。しかしながら、お互いの色素を明確に識別することは不可能であった。一方、ゲニポシドにおいては、クチナシ黄色素から僅かであるが検出することができた。その一方で、アルカリ加水分解すると、ゲニポシドのピークは減少し、新たにゲニピンのピークが検出された。

3) 「ムラサキイモ色素」と「ムラサキヤマイモ色素」の品質規格作成のため検討を行った。LC-MS による成分分析を行った結果、ムラサキイモ色素成分は、その殆どで同定することが達成できた。しかし、ムラサキヤマイモ色素では、各成分の同定までには至らなかった。8 版にはムラサキヤマイモ色素については記載がなく、公定試験法設定が望まれる。

4) チコリ色素はキク科キクニガナ (*Cichorium intybus* L.) の根をばい煎したものより、水で抽出して得られたものである。チコリ色素の規格試験法を作成するための基礎的な検討として、指標成分の有無の調査、試験法案を作成した。

5) 天然由来の酸化防止剤である既存添加物クエルセチン成分規格案の作成のために、¹H-NMR による定量 NMR(quantitative NMR: qNMR)を適用し、試薬や添加物の正確な *quercetin* 含量を求めることにより、既存添加物クエルセチンの定量法確立のための基礎的検討を行った。標準試薬(qNMR 純度適用)を用いた LC/UV による *quercetin* の定量が最も適切であることが示唆された。

6) ヤマモモ抽出物の主成分であるミリシトリンの定量に関して、qNMR を用いた定量法の確立を目指した。グルコサミンでは 1 位または 2 位の水素を用いた定量に目処が立っていた。ミリシトリンでも芳香族水素を用いた定量に目処が立ち、原料生薬の楊梅皮中のミリシトリン定量も含めて測定法の確立を行った。

7) 既存添加物名簿収載のモウソウチク抽出物の品質規格作成のための化学的検討として、本製品

中の含有成分について検討を行った。PH-1 と仮称する 1 種の新規化合物を単離し、その構造を明らかにした。さらに、単離した化合物を標準品として HPLC 分析を行った結果、本製品中には *p*-coumaric acid、3,4'-dihydroxypropiofenone 3-*O*-glucoside、lyoniresinol 9'-*O*-glucoside が主要成分として含まれることが明らかとなった。

8) 既存添加物名簿収載の酸化防止剤生コーヒー豆抽出物の品質規格作成のための化学的検討として、製品中の含有成分について検討を行った。その結果、10 種の化合物が同定された。現在、DPPH ラジカル活性を指標に酸化防止能を検討するとともに、その他の成分について、網羅的に解析を進めている。

(3) 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

1) 複数試験機関での評価研究が行われプロトコルの妥当性確認が終了している DPPH 法と ORAC 法を用い、既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価を行った。その結果、両方法による評価結果の相関は、酸化防止剤に含まれる主要抗酸化成分の種類に影響を受け、大きく異なることが判明した。今後、酸化防止剤の主要抗酸化成分の各種抗酸化測定法への応答を考慮に入れ、適切な力価評価法を選択する必要があると考えられた。

2) カンゾウ油性抽出物製品には、これまでの分離により抗酸化活性が認められた *Glycyrrhiza inflata* 由来製品の 7 画分及び *Glycyrrhiza glabra* 由来製品の 8 画分につき、ODS とは異なる分離特性を有するカラムを用いてさらに HPLC による分離・分画を行い、抗酸化活性測定を行った。各カンゾウ油性抽出物製品の活性ピークを分離・特定することができた。

(4) 増粘剤等の規格試験法の検討

物質の粘度を測定する手法として、食品添加物公定書において粘度測定法は、毛細管粘度計法（第 1 法）と回転粘度計法（第 2 法）が規定されている。一方、日本工業規格（JIS）における粘度測定法としては、細管粘度計、落球粘度計、共軸二重円筒形回転粘度計、単一円筒形回転粘度計、円すいー平板形回転粘度計の他、近年、振動粘度計が追加されている。本報告では、食品添加物公定書、日本薬局方、JECFA、EU、FCC、JIS、JCSS 等における粘度測定法を調査し比較整理した。

(5) 酵素の基原の解析法の確立

第 9 版公定書に収載予定の酵素の基原において、種の同定に至っていない菌種の提供が困難な状況にある。酵素パパイン由来のパパイヤ植物種から簡易に DNA を抽出する方法を確立した。

研究分担者

天倉 吉章	松山大学薬学部 教授
多田 敦子	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官
杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所 室長
受田 浩之	高知大学教育研究部自然科学系生命環境医学部門 教授
井之上 浩一	静岡県立大学薬学部 講師
永津 明人	金城学院大学薬学部 教授

研究協力者

上田 要一	日本食品添加物協会 専務理事
森 将人	日本食品添加物協会 常務理事
佐藤 恭子	国立医薬品食品衛生研究所 室長
建部 千絵	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
田邊 思帆里	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官
西崎 雄三	国立医薬品食品衛生研究所 研究員
石附 京子	国立医薬品食品衛生研究所
河崎 裕美	国立医薬品食品衛生研究所
松田 諭	国立医薬品食品衛生研究所
大月 典子	国立医薬品食品衛生研究所
好村 守生	松山大学薬学部 講師
杉脇 秀美	松山大学薬学部 嘱託職員
島村 智子	高知大学教育研究部総合科学系生命環境医学部門 准教授
細谷 孝博	静岡県立大学食品栄養科学部 助教

A. 研究目的

既存添加物 365 品目のうち、国の成分規格設定済は約 130 品目にとどまっている。現在検討中の第 9 版公定書には酵素 62 品目を含む 87 品目が新規既存添加物として収載される予定である。しかし依然として約 140 品目の成分規格が未設定である。また自主規格が定められている品目に関しても規格の内容が不十分で信頼性が低いと考えられ、さらに添加物としての有効性と有効成分自体が明確でない品目や流通実態が不明確な品目がある。これは成分分析や基原等の解析において高度な科学的解析手法が必要な場合がある故に規格設定が困難であると考えられる。

本研究では、国の成分規格が設定されていない既存添加物約 140 品目について、流通実態や今後の成分規格作成の技術的実現性を調査研究し、今後の成分規格作成の優先順序を判断する。また今後の規格設定が可能と考えられる品目については、含有成分の解析と基原確認及び成分規格試験法の検討を進める。また規格試験として、酸化防止剤には抗酸化活性測定法の導入を検討し、酸化防止剤の規格試験法素案を作成する。また苦味料や増粘剤等、複雑な混合物の品目に関しても特性値を指標とした規格試験法の開発を模索する。また第 9 版公定書に収載予定の酵素の基原に関しては、種の同定に至っていない菌種があることから、種の同定を解析する方法を確立する。

B. 研究方法

- 1.成分規格未設定の既存添加物の現状整理：既存添加物の流通状況、安全性試験実施状況、成分規格の整備状況を調査した。
- 2.含有成分解析と成分規格試験法の検討：成分規格未設定の品目（ゲンチアナ抽出物、ク

チナシ黄色素、ムラサキイモ色素、チコリ色素、クエルセチン、グルコサミン、ヤマモモ抽出物、生コーヒー豆抽出物、モウソウチク抽出物)について含有成分を解析した。有効成分(指標成分)の標準品設定のため、定量NMRを利用した純度検定等を行った。

3.天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究：公的な規格試験法に利用できる抗酸化活性標準操作法の確立を検討した。DPPH法による酸化防止剤評価方法を確立し、含有成分が多種のため分離分析が困難な酸化防止剤(生コーヒー豆抽出物、カンゾウ油性抽出物、ローズマリー抽出物等)の抗酸化活性評価を実施し、活性成分含有量(成分分析が可能な場合)との比較を行った。

4.日持ち向上剤や増粘剤等の規格試験法の検討：カワラヨモギ抽出物に関して物理的特性値等を指標とした規格試験法の開発を検討した。食品添加物公定書、日本薬局方、JECFA、EU、FCC、JIS、JCSS等における粘度測定法を調査し比較整理した。

5.酵素の基原の解析法の確立：第9版公定書に収載予定の酵素の基原に関しては、種の同定に至っていない菌種があることから、種の同定を解析する方法を検討した。

倫理面への配慮

特になし

C・D 研究結果及び考察

1.成分規格未設定の既存添加物の現状整理

- 1) 既存添加物の成分規格の整備状況、安全性試験実施状況、国内外規格の有無等の調査：第9版食品添加物公定書未収載品について次の事項について調査を行った。
- 2) 10版公定書に向けた検証用成分規格の作成：第10版公定書に向けて新たに成分規格検証用の29規格案を作成した。また、昨年度検証用規格案を作成した金、トウガラシ水性抽出物、グァーガム酵素

分解物、グルコサミン、イソマルトデキストラナーゼ、酵素処理レシチン、高級脂肪酸(ステアリン酸)、高級脂肪酸(パルミチン酸)、高級脂肪酸(ベヘニン酸)については裏付け試験を実施した。

- 3) 第5版自主規格案の作成：第9版食品添加物公定書後に規格未設定の品目として残ると考えられる既存添加物から、更に検証用規格を作成したものを除き、第5版自主規格の作成を検討した。本年度は成分規格案を作成するために必要な情報がある程度集まった25規格を作成した。また、第4版自主規格にあったもののの中で、今回見直しが出来なかった5規格は暫定規格とした。
- 4) 既存添加物の品目ごとの基原生物の調査：既存添加物名簿収載品目リストの基原・製法・本質に記載されている基原種と流通実態との齟齬や改正要望についてアンケート調査を実施した。回答があった55社の内7社からグルコサミン、キチン、キトサン、スフィンゴ脂質、ファフィア色素、トウガラシ水性抽出物、トウガラシ色素、生コーヒー豆抽出物、アグロバクテリウムスクシノグリカンの計9品目について、改正要望が寄せられた。

2.含有成分解析と成分規格試験法の検討

- 1) 「ゲンチアナ抽出物」：本添加物の確認試験を提案する目的で、HPLC及びTLCによる定性試験、HPLCによる定量分析について検討した結果、gentiopicroside及びamarogentinを指標成分として確認、定量する方法を作成した。gentiopicrosideを標品とした定量法とTLC法による確認試験を提案することができた。
- 2) 「クチナシ黄色素」：既存添加物名簿および日本食品添加物協会「既存添加物自主規格」に収載されている「クチナシ黄色素」および「サフラン色素」の成分規格を行うため、それぞれの比較検討を実施した。初めに、8版公定法を基盤に国内で流通するクチナシ黄色素2製品およびサフラン色素1製品の評価を行った。その結果、本評

価では、サフラン色素とクチナシ黄色素を区別することが不可能であった。そこで、HPLCによる色素成分クロシン、クロセチンおよび不純物であるゲニポシドの一斉分析法を開発し、アルカリ加水分解前後の評価を行った。アルカリ分解後の製品を測定した結果、ほぼ同様のクロマトグラムを得ることができ、*trans* 型クロセチンが最も有効に検出することができ、本化合物を指標とすることができた。その結果、アルカリ分解後のクロセチン含有量は、クチナシ黄色素では 67.6% および 45.5% であり、サフラン色素では 42.3% となった。しかしながら、お互いの色素を明確に識別することは不可能であった。一方、ゲニポシドにおいては、クチナシ黄色素から僅かであるが検出することができた。その一方で、アルカリ加水分解すると、ゲニポシドのピークは減少し、新たにゲニピンのピークが検出された。しかし、現在の 8 版公定法では、その点について、判断することはできない。今後、ゲニピンを含めた不純物質試験が要求されるものと思われる。

- 3) 「ムラサキイモ色素」：既存添加物名簿および日本食品添加物協会「既存添加物自主規格」に記載されている「ムラサキイモ色素」と「ムラサキヤマイモ色素」の品質規格作成のため、それぞれの比較検討を実施した。初めに、8 版公定法を基盤に国内で流通するムラサキイモ色素の評価を行った。また、4 版自主規格によるムラサキヤマイモ抽出試料の評価も行った。その結果、本評価では、ムラサキイモ色素とムラサキヤマイモ抽出試料は規格基準内であったが、お互いを区別することが不可能であった。そこで、HPLC による吸収極大波長に基づき分離分析法を開発し、各色素成分のピークパターンを評価した。その結果、両色素では、その成分が大幅に異なり、各ピークの同定が求められた。そこで、LC-MS による成分分析を行った結果、ムラサキイモ色素成分は、その殆どで同定することが達成できた。しかしながら、ムラ

サキヤマイモでは、各成分の同定までには至らなかった。本研究より、現在の規格基準では、ムラサキイモおよびムラサキヤマイモでは区別できないが、色素成分が大幅に異なり、いずれの成分を明確にし、含有物質による評価基準を行えば、両色素の判別が可能ということが分かった。

- 4) 「チコリ色素」：一般飲食物添加物「チコリ色素」の成分規格を設定するための基礎情報を得るために、製品中に指標成分となる特有の成分が含有されているかどうか検討した。チコリ色素製品をHPLCに付し、観察された化合物1及び2を単離精製し、NMRによりその化学構造を決定した。その結果、化合物1が 5-(hydroxymethyl)furfural (HMF)、化合物2が 4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methylfuran-3(2H)-one であり、いずれもチコリ色素製品を製造する際、焙煎の過程において糖類が変性した生じた化合物であり、チコリ色素の指標成分としては不適当と考えられた。また、チコリ色素に特有な成分であるチコリ酸、加水分解後のカフェ酸を定量分析した結果、加水分解後のカフェ酸の有無がチコリ色素の確認に応用可能と考えられた。
- 5) 「クエルセチン」：天然由来の酸化防止剤である既存添加物クエルセチンは、食品添加物公定書未収載であり、成分規格案の作成を行う上で定量法の確立が必要である。そこで本研究では、¹H-NMR による定量 NMR(quantitative NMR: qNMR)を適用し、試薬や添加物の正確な quercetin 含量を求めることにより、既存添加物クエルセチンの定量法確立のための基礎的検討を行った。本研究により、既存添加物クエルセチンの成分規格作成に有用な基礎データを得ることができた。また、これらの結果より、標準試薬(qNMR 純度適用)を用い

た LC/UV による quercetin の定量が最も適切であることが示唆された。

- 6) 「グルコサミン」・「ヤマモモ抽出物」：近年確立された ^1H qNMR 法(定量 NMR 法)を既存添加物の規格試験法に適用の可能であるか明らかにする目的で研究を行った。すなわち、適用の可能性のあるものがあるか、可能性があるものに関しては実際に適用する場合の測定条件の確立を目的とした。本年度は「ヤマモモ抽出物」と「グルコサミン」に関する適用条件を探索した。すなわち、「ヤマモモ抽出物」ではこれに含有される myricitrin の、「グルコサミン」では glucosamine そのものの、それぞれ定量条件の確立を行った。「ヤマモモ抽出物」中の myricitrin の純度は、認証標準物質として PHP、仲介物質として HMD を用い、methanol- d_4 中で測定したスペクトルの 6 位または 8 位の水素シグナル面積から測定可能であることを示した。「グルコサミン」中の glucosamine の純度は、PHP を直接内部標準として用い、 D_2O 中で測定したスペクトルの 2 つのアノマーの 2 位の水素シグナル面積の和から測定可能であることを示した。

- 7) 「モウソウチク抽出物」：既存添加物名簿収載のモウソウチク抽出物は「イネ科モウソウチク (*Phyllostachys heterocycla* MITF.) の茎の表皮を、粉碎したものより、微温時エタノールで抽出して得られたもの」であり、2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノンを主成分とするものとされる。本研究では、モウソウチク抽出物の品質規格作成のための化学的検討として、本製品中の含有成分について検討を行った。その結果、現在までに 11 種の既知化合物

[5-hydroxymethyl-2-furfural、4-hydroxybenzoic acid、*p*-coumaric acid、*trans*-ferulic acid、*N,N'*-diferuloylputrescine、arbutin、tachioside、isotachioside、4'-dihydroxypropiofenone 3-*O*-glucoside、aburaside、yoniresinol 9'-*O*-glucoside] とともに、PH-1 と仮称す

る 1 種の新規化合物を単離し、その構造を明らかにした。さらに、単離した化合物を標準品として HPLC 分析を行った結果、本製品中には *p*-coumaric acid、

3,4'-dihydroxypropiofenone 3-*O*-glucoside、yoniresinol 9'-*O*-glucoside が主要成分として含まれることが明らかとなった。また、本製品中の主要成分として知られている 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone は、今回の分析結果ではマイナー成分として観察されるのみであった。

- 8) 「生コーヒー豆抽出物」：既存添加物名簿収載の酸化防止剤生コーヒー豆抽出物は、「アカネ科コーヒー (*Coffea arabica* LINNE) の種子より、温時アスコルビン酸又はクエン酸酸性水溶液で抽出して得られたものである。有効成分は、クロロゲン酸及びポリフェノールである」と記載されている。本研究では、生コーヒー豆抽出物の品質規格作成のための化学的検討として、製品中の含有成分について検討を行った。その結果、10 種の化合物

[5-*O*-caffeoylquinic acid、3-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid)、4-*O*-caffeoylquinic acid、5-*O*-feruloylquinic acid、4-*O*-feruloylquinic acid、3-*O*-feruloylquinic acid、caffeine、4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid、3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid、*trans-p*-coumaroyl-L-tryptophan] が同定された。現在、DPPH ラジカル活性を指標に酸化防止能を検討するとともに、その他の成分について、網羅的に解析を進めている。

3. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

- 1) 各種酸化防止剤の DPPH ラジカル消去活性、及び ORAC 値：今回測定に用いた酸化防止剤 22 種類のうち、DPPH 法では 20 種類、ORAC 法では 22 種類全てにおいて抗酸化力価を求めることができた。このことから、両方法とも比較的広い適用範囲を有することが判明した。

2) 各種酸化防止剤の DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値の比較：各種酸化防止剤の DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値の比較を行うために、両者の相関を調べた。その結果、相関係数は 0.460 ($n=20$) となった。両者の間の相関は有意であったが ($p<0.05$)、直線性は高いものではなかった。また、酸化防止剤の種類によって、DPPH 法と ORAC 法において異なる挙動を示すことが判明した。具体的には、カテキン類が主要抗酸化成分であるチャ抽出物では、DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値共に大きな変化を示し、両者の間に高い直線性が認められた ($r=0.775$, $n=5$)。それに対して、ケルセチン配糖体、及びその類縁化合物が主要抗酸化成分であるヤマモモ抽出物、エンジュ抽出物、ルチン類の場合、DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値の間に相関は認められなかった ($r=-0.239$, $n=7$)。このことから、主要抗酸化成分の基本構造がフラバノールであるかフラボンであるか、或いは配糖体であるか否かにより、DPPH 法、及び ORAC 法に対する挙動が異なる可能性が示唆された。

4. 増粘剤等の規格試験法の検討

1) 物質の粘度を測定する手法として、様々な粘度計が存在する。食品添加物公定書において粘度測定法は、毛細管粘度計法（第1法）と回転粘度計法（第2法）が規定されている。一方、日本工業規格（JIS）における粘度測定法としては、細管粘度計、落球粘度計、共軸二重円筒形回転粘度計、単一円筒形回転粘度計、円すいー平板形回転粘度計の他、近年、振動粘度計が追加されている。本報告では、食品添加物公定書、日本薬局方、JECFA、EU、FCC、JIS、JCSS等における粘度測定法を調査し、比較整理した。また、JISにおける振動粘度

計の原理と各測定計との相違について調べた。

5. 酵素の基原の解析法の確立

第9版公定書に収載予定の酵素の基原において、種の同定に至っていない菌種の提供が困難の状況にある。今年度は、酵素パパイン由来のパパイヤ植物種から簡易に DNA を抽出する方法を確立した。

E. 結論

1. 既存添加物の成分規格作成の技術的実現性に関する調査

第9版食品添加物公定書に未収載の既存添加物の中から、第10版公定書の作成に備え検証規格の作成を実施した。

2. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

既存添加物名簿収載のゲンチアナ抽出物の品質規格作成のための化学的検討を行い、gentiopicroside 及び amarogentin を指標成分として確認、定量する方法を作成した。既存添加物名簿に収載されている「クチナシ黄色素」および「サフラン色素」の成分規格を行うため、それぞれの比較検討を実施し、ゲンポシドにおいては、クチナシ黄色素から僅かであるが検出することができた。「ムラサキイモ色素」と「ムラサキヤマイモ色素」の品質規格作成のため検討を行い、LC-MS による成分分析を行った結果、ムラサキイモ色素成分は、ほぼ同定した。チコリ色素の規格試験法を作成するための基礎的な検討として、指標成分の有無の調査、試験法案を作成した。既存添加物名簿収載のモウソウチク抽出物の品質規格作成のための化学的検討を行ったところ、1種の新規化合物を単離し、その構造を明らかにした。生コーヒー豆抽出物の品質規格作成のための化学的検討を行ったところ、主検出成分は caffeine、カフェー酸及びフェルラ酸誘導体であった。既存添加物

クエルセチンの定量法確立のための基礎的検討を行い、標準試薬(qNMR 純度適用)を用いた LC/UV による quercetin の定量が最も適切であることが示唆した。

3. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

複数試験機関での評価研究が行われプロトコルの妥当性確認が終了しているDPPH法とORAC法を用い、既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価を行い、両方法による評価結果の相関は、酸化防止剤に含まれる主要抗酸化成分の種類に影響を受け、大きく異なることが判明した。

4. 増粘剤等の規格試験法の検討

食品添加物公定書、日本薬局方、JECFA、EU、FCC、JIS、JCSS 等における粘度測定法を調査し比較整理した。

5. 酵素の基原の解析法の確立

パパイヤ植物種から簡単に DNA を抽出する方法を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山崎太一, 大槻崇, 三浦亨, 末松孝子, 堀之内嵩暁, 村上雅代, 齋藤剛, 井原俊英, 多田敦子, 田原麻衣子, 合田幸広, 穂山浩, 中尾慎治, 山田裕子, 小池亮, 杉本直樹: 1HNMR による精確な定量分析のための内標準液を用いる試料調製法の検討. 分析化学, 63, 323-329 (2014).
- 2) 田原麻衣子, 杉本直樹, 大槻崇, 多田敦子, 穂山浩, 合田幸広, 五十嵐良明: 定量 NMR による多環芳香族炭化水素市販試薬の純度決定. 環境科学会誌, 27, 142-150 (2014).
- 3) 原田晋, 小川有子, 杉本直樹, 穂山浩: フランス製菓子赤色マカロン摂取後に生じた, コチニール色素によるアナフィラキシーの 2 症例. 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌, 8, 180-186 (2014).
- 4) 大月典子, 杉本理恵, 佐藤恭子, 杉本直樹, 秋山卓美, 豊田正武, 穂山浩: 化粧品・医薬部外品中の乳アレルギータンパク質の分析. 日食化誌, 21, 155-162 (2014).
- 5) 山川有子, 山野朋子, 穂山浩, 池澤善郎: フランス製赤色マカロンに含まれるコチニール色素が原因と思われるアナフィラキシーの 1 例—最近のコチニールアレルギーについて. 皮膚臨床, 56, 1241-1245 (2014).
- 6) 原田晋, 山川有子, 杉本直樹, 穂山浩: フランス製菓子赤色マカロン摂取後に生じた, コチニール色素によるアナフィラキシーの 2 症例. J Environ Dermatol Cutan Allergol, 8, 180-186 (2014).
- 7) 原田晋, 穂山浩, 杉本直樹, 山川有子: ドイツ製ブラッドオレンジジュースに含まれていたコチニール色素によるアナフィラキシーの 1 例. 皮膚臨床, 56, 1247-1251 (2014).
- 8) 北川麻美子, 中村公亮, 近藤一成, 生形省次, 穂山浩: 野菜加工食品中の遺伝子組換えトマトに汎用される組換え DNA 配列の検出について. 食品衛生学雑誌, 55, 247-253 (2014).
- 9) 田中秀典, 北崎康生, 中村公亮, 穂山浩, 明石良: 遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の簡易検出法の確立. 育種学研究, 16, 158-161 (2014).
- 10) 多田敦子, 杉本直樹, 小林義和, 濱田ひかり, 石附京子, 秋山卓美, 伊藤裕才, 山崎 壮, 穂山浩: 味認識装置による既存添加物苦味料及び関連苦味化合物の品質評価. Jpn. J. Food Chem. Safety, in press

- (2015).
- 11) Inoue K, Tanada C, Nishikawa H, Matsuda S, Tada A, Ito Y, Min JZ, Todoroki K, Sugimoto N, Toyo'oka T, Akiyama H "Evaluation of Gardenia Yellow using crocetin from alkaline hydrolysis based on ultra high-performance liquid chromatography and high-speed countercurrent chromatography." *J. Sep Sci*, 37, 3619-3624 (2014).
 - 12) Shimamura T, Sumikura Y, Yamazaki T, Tada A, Kashiwagi T, Ishikawa H, Matsui T, Sugimoto N, Akiyama H, Ukeda H "Applicability of DPPH Assay for Evaluation of Antioxidant Capacity of Food Additives -Inter-laboratory Evaluation Study-" *Analytical Sciences*, 30, 717-721 (2014).
 - 13) Tada A, Ishizuki K, Yamazaki T, Sugimoto N, Akiyama H "Method for the Determination of Natural Ester-Type Gum Bases Used as Food Additives via Direct Analysis of their Constituent Wax Esters Using High-Temperature GC/MS." *Food Science & Nutrition*, 2, 417-425 (2014).
 - 14) Ohtsuki T, Sato K, Abe Y, Sugimoto N, Akiyama H "Quantification of acesulfame potassium in processed foods by quantitative ^1H NMR." *Talanta*, 131, 712-718 (2015).
 - 15) Noguchi A, Akiyama H, Nakamura K, Sakata K, Minegishi Y, Mano J, Takabatake R, Futo S, Kitta K, Teshima R, Kondo K, Nishimaki-Mogami T "A novel trait-specific real-time PCR method enable quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize." *Eur Food Res Technol*, in press (2015).
 - 16) Hashimoto H, Hongo T, Hayashi C, Nakamura K, Nakanishi K, Ikeda M, Adachi R, Akiyama H, Teshima R "A method for the detection of shrimp/prawn and crab DNAs to identify allergens in dried seaweed products." *Jpn. J. Food Chem. Safety*, in press (2015).
 - 17) Inoue K, Tanada C, Sakamoto T, Tsutsui H, Akiba T, Min JZ, Todoroki K, Yamano Y, Toyo'oka T "Metabolomics approach of infant formula for the evaluation of contamination and degradation using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with mass spectrometry." *Food Chemistry*, 15, 318-324 (2015).
 - 18) Ito Y, Ishizuki K, Sugimoto N, Tada A, Akiyama T, Sato K, Akiyama H, Goda Y "Confirmation of the configuration of two glucuronic acid units in glycyrrhizic acid." *Jpn. J. Food Chem. Safety*, in press (2015).
 - 19) Wakita K, Kuwabara H, Furusho N, Tatebe C, Sato K, Akiyama H "A Comparative Study of the Hydroxyl and Saponification Values of Polysorbate 60 in International Food Additive Specifications." *American Journal of Analytical Chemistry*, 5, 199-204 (2014).
 - 20) Koizumi D, Shirota K, Akita R, Oda H, Akiyama H "Development and validation of a lateral flow assay for the detection of crustacean protein in processed foods." *Food Chemistry*, 150, 348-352 (2014).

- 21) Nakamura K, Kondo K, Kobayashi T, Noguchi A, Ohmori K, Takabatake R, Kitta K, Akiyama H, Teshima R, Nishimaki-Mogami T “Identification and detection of genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand.” *Biol Pharm Bull*, 37, 1-5 (2014).
 - 22) Abe Y, Yamaguchi M, Mutsuga M, Kawamura Y, Akiyama H “Survey of volatile substances in kitchen utensils made from acrylonitrile–butadiene–styrene and acrylonitrile–styrene resin in Japan.” *Food Sci. Nutr.*, 2, 236-243 (2014).
 - 23) Sato K, Suzuki I, Kubota H, Furusho N, Inoue T, Yasukouchi Y, Akiyama H “Estimation of Daily Aluminum Intake in Japan Based on Food Consumption Inspection Results: Impact of Food Additives.” *Food Sci. Nutr.*, 2, 389-397 (2014).
 - 24) Tatebe C, Xiong Z, Takashi O, Kubota H, Sato K, Akiyama H “A simple and rapid chromatographic method to determine unauthorized basic colorants (rhodamine B, auramine O, and pararosaniline) in processed foods.” *Food Sci. Nutr.*, 2, 547-556 (2014).
 - 25) Ponghong K, Shimamura T, Higuchi K, Kashiwagi T, Grudpan K, Motomizu S, Ukeda H, “Spectrophotometric Sequential Injection Analysis System for Estimating the Concentration of Lipid Hydroperoxides in Edible Oils”, *Journal of Flow Injection Analysis*, 31, 33-37 (2014).
 - 26) Akiyama T, Yamazaki T, Tada A, Ito Y, Otsuki N, Akiyama H “Classification of microbial α -amylases for food manufacturing using proteinase digestion.” *Food Sci. Nutr.*, in press (2015).
- ## 2. 学会発表
- 1) 大月典子, 杉本理恵, 佐藤恭子, 杉本直樹, 秋山卓美, 豊田正武, 穂山浩: 化粧品・医薬部外品中の乳アレルギータンパク質の分析について. 日本食品化学学会第20回総会・学術大会(2014.5).
 - 2) 天倉吉章, 好村守生, 森本沙羅, 吉田隆志, 多田敦子, 伊藤裕才, 杉本直樹, 山崎壮, 穂山浩: 既存添加物ゲンチアナ抽出物の成分研究. 日本食品化学学会第20回総会・学術大会(2014.5).
 - 3) Shimamura T, Ponghong K, Higuchi K, Kashiwagi T, Grudpan K, Ukeda H “Development of sequential injection analysis system for evaluating lipid peroxidation inhibitory activity of antioxidants.” 19th International Conference on Flow Injection Analysis, Fukuoka (2014.11.30-12.5).
 - 4) 松田諭, 多田敦子, 大槻崇, 石附京子, 河崎裕美, 田原麻衣子, 杉本直樹, 穂山浩: 既存添加物クエルセチンの定量法確立のための qNMR を用いた基礎的検討. 第108回日本食品衛生学会学術講演会 (2014.12).
 - 5) 西崎雄三, 多田敦子, 伊藤裕才, 大槻崇, 杉本直樹, 穂山浩: qNMR と HPLC を併用した天然苦味料ジャマイカカシア抽出物中のクアシン及びネオクアシンの新規定量法の開発. 日本薬学会第135年会 (2015.3).
 - 6) Miura T, Suematsu T, Sugimoto N,

Nakao S, Takaoka S, Yamada Y

“Development of quantity analytical standard by using qNMR.3rd Annual Practical Applications of NMR in Industry Conference.” PANIC, (2015.2).

- 7) 河崎裕美, 関口若菜, 多田敦子, 秋山卓美, 杉本直樹, 穂山浩: HILIC カラムを用いた LC/MS によるカラメル III 中の 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール (THI) の直接定量. 日本食品衛生学会第 108 回学術講演会(2014.12).
- 8) 井之上浩一: LC/MS を基盤とする天然添加物および含有成分の食品分析技術に関する研究. 日本食品化学学会第 20 回総会・学術大会(2014.5).
- 9) 西川弘晃, 井之上浩一, 棚田千尋, 杉本直樹, 関俊哲, 轟木堅一郎, 穂山浩, 豊岡利正: 高速向流クロマトグラフィーによる加水分解クチナシ黄色素クロセチンの単離精製. 日本食品化学学会第 20 回総会・学術大会(2014.5).
- 10) Nishikawa H, Harada S, Tanada C, Jun Z Min, Todoroki K, Inoue K, Toyooka T “Application of High-Speed Countercurrent Chromatography for the Purification of Various Natural Chemicals from Raw Materials.” PITTCON 2015 Conference & Expo, New Orleans, LA USA (2015.3).

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成26年度「既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究」

— 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究—

一般社団法人日本食品添加物協会

研究報告書

平成26年度「既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究」

—既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究—

業務受託者	上田 要一	所属	一般社団法人日本食品添加物協会	役職	専務理事
研究者	森 将人	所属	一般社団法人日本食品添加物協会	役職	常務理事

[はじめに]

既存添加物365品目中、成分規格の定められているものは、128品目(130規格)にすぎず、約240品目(約250規格)については、未設定の状況にある。第9版食品添加物公定書は87品目(87規格)が収載される予定であるが、なお、約150品目(約160規格)が未設定の状況で残る。

当協会は、これまでも既存添加物の食品添加物公定書への新規収載を目標に、自主規格の策定を進めてきた。

平成20年度は、第8版食品添加物公定書の公表を機に、既存添加物等の自主規格案の策定・蓄積結果の集大成及び既収載規格の見直しを実施し、「第4版既存添加物自主規格」を刊行し、既収載の142品目(既存添加物123品目及び一般飲食物添加物19品目)に加えて78品目を新規収載した。

また、既存添加物について自主規格案の策定検討及び見直し検討を推進してきた。

しかしながら、国の成分規格が設定されていない既存添加物については、

- ・業界自主規格がない、またはあっても質が不十分
- ・添加物としての有効性と有効成分自体が不明確
- ・食品添加物としての流通実態が不明確
- ・正しい基原の原材料が使用されていることの確認が不十分

といった品目が多いことが指摘されている。これまでは、国が業界自主規格を技術的に検証した上で国の成分規格として整備してきた。上述の約150品目については規格設定が困難な品目が残ったと言えるが、今後も着実な成分規格の作成が必要である。

本年度は、昨年度に引き続きこれまでに収集した情報に基づき検証試験を実施するための検証用の規格を作成するとともに、昨年度作成した規格案も含め一部の品目については裏付け試験を実施した。また、残された品目の中から情報の集まり、環境の整ったものについて第5版自主規格案として成分規格案を作成した。更に、既存添加物名簿収載品目リストの基原・製法・本質に記載されている基原種について、削除、変更又は拡大の必要性の有無を調査した。

研究結果の概要と考察

1. 研究方法

(1) 既存添加物の成分規格の整備状況、安全性試験実施状況、国内外規格の有無等の調査

第9版食品添加物公定書未収載品について、本年度作成する検証用規格および自主規格を含め成分規格の整備状況、安全性試験実施状況、国内外規格の有無等を調査した。

(2) 10版公定書に向けた検証用規格の作成

既存添加物365品目中、第8版食品添加物公定書に収載されている128品目、第9版食品添加物公定書に収載される予定の87品目および昨年度作成した検証用26規格を除いた残りの品目について第10版公定書に向けた2次検証用成分規格案の作成検討を行うとともに、昨年度報告した1次検証用成分規格も含め一部の品目について裏付け試験を実施した。

また、規格作成とは別に、褐色フラボノイド系着色料における類似色素間での差別化(区別試験

法)に関する検討も実施した。

(3) 既存添加物の第5版自主規格に向けた成分規格の検討

前項の検証用とできなかった品目について、成分規格が設定可能なものから自主規格案を作成するとともに、規格設定の根拠となる関連情報(海外規格を含む各種規格との対比)を調査する。

(4) 既存添加物の品目ごとの基原生物の調査

既存添加物名簿収載品目リストの基原・製法・本質に記載されている基原種について、削除、変更又は拡大の必要性の有無を調査した。

2. 調査研究者

これら評価・検討を行った自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当のメンバーは別紙に記したとおりである。

3. 研究結果の概要

(1) 既存添加物の成分規格の整備状況、安全性試験実施状況、国内外規格の有無等の調査

第9版食品添加物公定書未収載品目について次の事項について調査を行い、品目別および部会別にまとめ、別紙資料1および2に収載した。なお、安全性試験実施状況の詳細については、別紙資料6に収載した。

- ・ 第10版食品添加物公定書収載成分規格(案)及び第5版既存添加物自主規格成分規格(案)の整備状況
- ・ 安全性試験実施状況
- ・ 国内外の規格の有無。

(2) 10版公定書に向けた検証用成分規格の作成

① 成分規格検証用規格案作成品目

第10版公定書に向けて新たに成分規格検証用の28規格案を作成した。作成した規格の部会別規格数を表1にまとめた。

表1 部会別検証用規格数

部会	分野	規格数
第2部会	着色料	1
第4部会	増粘安定剤	10
第5部会	酸化防止剤・ビタミン	5
第6部会	ガムベース・光沢剤	1
第9部会	調味料・苦味料	2
第10部会	乳化剤	1
第13部会	製造用剤・ミネラル	8

② 成分規格案(部会別)

作成した規格品目名は表2のとおりである。各品目の成分規格案は第9版食品添加物公定書に準ずる形で作成し、関連資料や裏付けデータとともに部会別に整理して別紙資料3に収載した。

表2 第10版食品添加物公定書2次検証品目

部会	既存 No※	用途	既存添加物名簿名称
2	258	着色料	ファフィア色素
4	4	増粘安定剤	アグロバクテリウムスクシノグリカン
4	13	増粘安定剤	アマシードガム
4	19	増粘安定剤	アラビノガラクトン
4	40	増粘安定剤/ガムベース	エレミ樹脂
4	82	増粘安定剤	キチン
4	84	増粘安定剤/製造用剤	キトサン
4	145	増粘安定剤/製造用剤	サバクヨモギシードガム
4	229	増粘安定剤	トロロアオイ
4	257	増粘安定剤	ファーセララン
4	336	増粘安定剤	モモ樹脂
5	58	酸化防止剤	カテキン
5	76	酸化防止剤	カンゾウ油性抽出物
5	255	酸化防止剤	ヒマワリ種子抽出物
5	306	酸化防止剤	没食子酸
5	365	酸化防止剤	ローズマリー抽出物
6	321	ガムベース	ミルラ
9	27	苦味料	イソアルファー 苦味酸
9	120	苦味料	ゲンチアナ抽出物
10	172	乳化剤	スフィンゴ脂質
13	121	製造用剤	高級脂肪酸(カプリル酸)
13	121	製造用剤	高級脂肪酸(カプリン酸)
13	121	製造用剤	高級脂肪酸(ミリスチン酸)
13	121	製造用剤	高級脂肪酸(ラウリン酸)
13	239	製造用剤	ばい煎コメヌカ抽出物
13	240	製造用剤	ばい煎ダイズ抽出物
13	262	製造用剤	フィチン(抽出物)
13	327	製造用剤	メバロン酸

※:既添 No: 数字は既存添加物番号

なお、25年度に規格案を提出した1次検証品目のうち表3にあげた品目について裏付け試験を実施するとともに、その一部については規格案も見直した。裏付けデータ、見直した規格案についても部会別に整理して別紙資料3に収載した。

表3 裏付け試験を実施した第10版食品添加物公定書1次検証品目

部会	既存 No※	用途	既存添加物名簿名称
2	89	着色料	金
3	216	製造用剤	トウガラシ水性抽出物
4	92	増粘安定剤	グァーガム酵素分解物
4	104	増粘安定剤/製造用剤	グルコサミン
5	202	酸化防止剤/製造用剤	チャ抽出物
7	28	酵素	イソマルトデキストラナーゼ
10	127	乳化剤	酵素処理レシチン
13	121	製造用剤	高級脂肪酸(ステアリン酸)
13	121	製造用剤	高級脂肪酸(パルミチン酸)
13	121	製造用剤	高級脂肪酸(ベヘニン酸)

※:既添 No: 数字は既存添加物番号

(3) 第5版自主規格案の作成

第9版食品添加物公定書後に残ると考えられる既存添加物から、更に検証用規格を作成したものを除き、第5版自主規格の作成を検討した。

本年度は成分規格案を作成するために必要な情報がある程度集まった24規格を作成した。また、第4版自主規格にあったものの中で、今回見直しが出来なかった5規格は暫定規格とした。作成した自主規格及び暫定規格名は表4のとおりである。なお、第14部会においては、基原別の香辛料抽出物について、自主規格設定のために必要な使用実態や関連規格などの調査を開始した。作成した自主規格案および関連資料については、部会別に整理して別紙資料4に収載した。

表4 第5版既存添加物自主規格案新規作成品目

部会	既存 No※	用途	既存添加物名簿名称
5	95	酸化防止剤	クエルセチン
5	115	酸化防止剤	クローブ抽出物※※
5	136	酸化防止剤	ゴマ油不けん化物※※
5	232	酸化防止剤	生コーヒー豆抽出物
6	100	ガムベース	グッタペルカ
6	138	ガムベース	ゴム
6	152	ガムベース/光沢剤	シェラックロウ
9	124	苦味料	酵素処理ナリンジン※※
9	236	苦味料	ニガヨモギ抽出物※※
9	357	苦味料	レイシ抽出物(子実体)
10	187	乳化剤	ダイズサポニン
10	195	乳化剤	胆汁末※※
13	9	製造用剤	アスペルギルステレウス糖たん白質
13	48	製造用剤	海藻灰抽出物
13	148	製造用剤	酸素
13	155	製造用剤	分岐シクロデキストリン
13	158	製造用剤	シソ抽出物
13	198	製造用剤	柿タンニン
13	198	製造用剤	ミモザタンニン
13	200	製造用剤	窒素
13	201	製造用剤	チャ乾留物
13	212	製造用剤/強化剤	鉄
13	237	製造用剤	ニッケル
13	302	製造用剤	ヘリウム
13	318	強化剤	貝殻未焼成カルシウム
13	318	強化剤	卵殻未焼成カルシウム
13	331	製造用剤	木材チップ
13	332	製造用剤	木炭
13	356	製造用剤	ルテニウム

※:既添 No: 数字は既存添加物番号

※※: 暫定規格