

201522016A

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 27 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	立命館大学
	永津 明人	金城学院大学

平成 28 (2016) 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

研究代表者 : 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

研究協力者 : 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 19

研究分担者 : 天倉吉章

研究協力者 : 好村守生

研究協力者 : 杉脇秀美

2.2. 既存添加物モウソウチク抽出物の成分研究 27

研究分担者 : 天倉吉章

研究協力者 : 好村守生

2.3. 既存添加物カキ色素の成分研究 33

研究分担者 : 天倉吉章

研究協力者 : 好村守生

3. 既存添加物の有効成分に関する研究

3.1. 既存添加物カワラヨモギ抽出物の乾燥減量試験法とqNMRを応用した

定量法の開発 37

研究分担者 : 多田敦子

研究協力者 : 加藤智久

研究協力者	： 西崎雄三	
研究協力者	： 石附京子	
研究協力者	： 杉本直樹	
3.2. 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の LC/TOF-MS による解析	55
研究分担者	： 多田敦子	
研究協力者	： 石附京子	
研究協力者	： 受田浩之	
研究協力者	： 島村智子	
研究協力者	： 杉本直樹	
4. 既存添加物の成分規格試験法の検討		
4.1. 既存添加物クチナシ青色素の色素生成メカニズムの解明:中間体構造の解明	67
研究分担者	： 杉本直樹	
研究分担者	： 多田敦子	
研究協力者	： 西崎雄三	
研究協力者	： 石附京子	
4.2. 16S rDNA を指標にしたアルギン酸リアーゼ生産菌の種の同定	81
研究協力者	： 西崎雄三	
研究協力者	： 杉本直樹	
研究協力者	： 多田敦子	
研究協力者	： 小出知己	
研究協力者	： 卯津羅健作	
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. 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	87
研究分担者	： 受田浩之	
研究協力者	： 杉本直樹	
研究協力者	： 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ヤマイモ色素の成分規格および解析 93

研究分担者 : 井之上浩一

研究協力者 : 細谷孝博

6.2. 既存添加物ゴマ油不けん化物の成分規格の検討 103

研究分担者 : 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 115

研究分担者 : 永津明人

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 129

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 穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

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。既存添加物の中から第 10 版食品添加物公定書収載をめざし、いままでに作成した検証用規格のうち 4 品目について規格案、関連資料を見直し、改正した。また、検証用規格案の妥当性検討の為、5 品目について裏付け試験を実施した。残された既存添加物については第 5 版自主規格の作成を目指して検討を行った。2 品目について成分規格案の作成及び裏付け試験を実施した。

(2) 含有成分解析と成分規格試験法の検討

1) 「生コーヒー豆抽出物」：生コーヒー豆抽出物の製品中から 10 種の化合物が単離・同定された。DPPH ラジカル消去活性を指標に酸化防止効果を検討した結果、活性の強かった画分から、5-*O*-caffeoylquinic acid、4-*O*-caffeoylquinic acid、3-*O*-caffeoylquinic acid が検出され、これらカフェー酸誘導体が添加物活性への寄与に大きく影響していることが示唆された。

2) 「モウソウチク抽出物」：本製品中から昨年度に引き続き成分精査を行った結果、新たに 1 種の既知化合物[4'-hydroxypropiophenone] を単離した。また、単離した化合物を標準品として HPLC による化合物のプロファイリングを行った。

3) 「カキ色素」：カキ色素の品質規格作成のための化学的検討として、本製品の含有成分の分離・精製を行った。

4) 「クチナシ青色素」：青色素の前駆体と考えられる黄色素 Y1 及び Y2 を単離し、その構造を決定した。また青色素本体がゲニピンと一級アミンがモル比 1:1 で反応したユニットの繰り返し構造であることが示唆された。

5) 「ゴマ油不けん化物」：汎用性のある逆相系 LC を用いて、主成分とするセサモリンに加えて、セサミン及びセサモールの一斉分析法を構築した。検出限界は 0.02~0.04 ppm 及び定量限界は 0.08~0.15 ppm となった。本手法を用いて、ゴマ油不けん化物の定量を行ったところ、セサモリン：9.4 mg/g、セサミン：12.8 mg/g 及びセサモールは不検出であった。

6) 「グルコサミン」・「クローブ抽出物」：Glucosamine 定量では昨年度確立した PHP を直接内部標準とする方法で、PHP をそのまま DSS-d₆ に置き換えることで対応可能であることを確認した。「クローブ抽出物」中の eugenol の定量では、「クローブ抽出物」の acetone-d₆ 懸濁液上清に認証標準物質である 1,4-BTMSB-d₄ の DMSO-d₆ 溶液を加えて測定し、1,4-BTMSB-d₄ のトリメチルシリル基のシグナルと eugenol の 2 位の H シグナルのシグナル面積を比較することで定量可能であることを確認した。

7) 「ムラサキヤマイモ色素」：「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行った。現在の規格基準では、ムラサキイモ及びムラサキ

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。

8)「カンゾウ油性抽出物」: *Glycyrrhiza inflata* 由来製品及び *Glycyrrhiza glabra* 由来製品より単離した活性成分につき、LC/TOF-MS(/MS)を用いて分析し、精密質量による組成解析から含有成分の推定を行い、市販試薬及び供与された単離標品との解析結果と比較した。カンゾウ油性抽出物製品中の6種の抗酸化活性成分及び2種の非活性成分を同定した。

(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

既存添加物に分類される酸化防止剤の抗酸化力価評価に関する一般試験法案を作成した。過去のデータを参考に適用性について検討したところ、大部分の酸化防止剤については、適用可と判断されたが、チャ抽出物のうち烏龍茶抽出物、単糖・アミノ酸複合物、コメヌカ酵素分解物については適用外と判断された。

(4) 増粘剤等の規格試験法の検討 溶液状態のカワラヨモギ抽出物製品に適した乾燥減量試験法を確立した。また、LC/UV 及び LC/MS によるカピリン定量条件を最適化し、qNMR を応用してカピリン標品の正確な純度値を付けて定量に用いることで、信頼性の高い LC 定量法を開発した。カピリン標品を必要としない qNMR での直接定量法が、比較的カピリン含量の高いカワラヨモギ抽出物製品では、有用な定量法の1つとして選択可能であることを示した。

(5) 酵素の基原の解析法の確立 16S rDNA を指標にしたアルギン酸リアーゼ生産菌 71/58 株の種の同定解析を行なった。本菌株は形態学・生態学に基づいて *S. multivorum* (*F. multivorum* のシノニム) と同定されていたが、16S rDNA を指標にして解析を行なった結果、*Flavobacterium* sp. と同定された。

研究分担者

天倉 吉章	松山大学薬学部 教授	建部 千絵	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官
多田 敦子	国立医薬品食品衛生研究所 室長	大槻 崇	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	西崎 雄三	国立医薬品食品衛生研究所 研究員
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	石附 京子	国立医薬品食品衛生研究所
井之上 浩一	立命館大学薬学部 准教授	加藤 智久	国立医薬品食品衛生研究所
永津 明人	金城学院大学薬学部 教授	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

研究協力者

上田 要一	日本食品添加物協会 専務理事	細谷 孝博	静岡県立大学食品栄養科学部 助教
森 将人	日本食品添加物協会 常務理事	小出 知己	株式会社テクノスルガ・ラボ
佐藤 恭子	国立医薬品食品衛生研究所 部長	卯津羅健作	ナガセケムテックス株式会社

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記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 版公定書に記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：

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及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見直し及び裏付け試験

既存添加物 365 品目中、第 8 版食品添加物公定書に記載されている 128 品目、第 9 版食品添加物公定書に記載される予定の 87 品目を除く残りの品目について、昨年度までに作成した成分規格検証用の 51 規格案について、一部見直しあるいは裏付け試験を実施した。

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：

成分規格未設定の品目（生コーヒー豆抽出物、モウソウチク抽出物、クチナシ青色色素、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）について機器分析を用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 (quantitative NMR: qNMR) 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：

DPPH 法に基づく一般試験法案を作成し、試験法案を適用した場合に予測される各種既存添加物の基準値をまとめた。抗酸化活性測定法は DPPH 法を用いた。DPPH ラジカル消去率を求め、(±)-6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸 (トロロックス) 等価活性で表した。DPPH 法による酸化防止剤評価方法を確立し、含有成分が多量のため分離分析が困難な酸化防止剤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：

既存添加物カワラヨモギ抽出物流通製品 5 種類を用い、乾燥減量試験法の開発、LC/UV 及び LC/MS による定量法の開発を行った。qNMR を応用し、カピリン単離標品の正確な純度を求め、また添加物製品についても、カピリン標品を使用しない qNMR による直接定量を行った。

5.酵素の基原の解析法の確立：

既存添加物アルギン酸リアーゼの生産菌である細菌 *Sphingobacterium multivorum* の 71/58 株から抽出した DNA を鋳型として、16S rDNA 塩基配列解析を行った。DB-BA11.0 (㈱テクノスルガ・ラボ) や国際塩基配列データベースを用いて相同性解析を行った。

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

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 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見直しと裏付け試験

第 10 版公定書に向けて昨年度までに作成した成分規格検証用の規格案のうち、4 品目について規格案、関連資料を見直し、改正した。また、検証用規格案の妥当性検討の為、セイヨウワサビ抽出物、カンゾウ油性抽出物等の 5 品目について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残ると考えられる既存添加物から、第 10 版公定書に向けた検証用規格を作成したものを除き、使用実態の再調査及び第 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揃ったムラサキヤマイモ色素と乳清焼成カルシウムの 2 品目について規格を作成し、裏付け試験を実施した。

4) 既存添加物の品目ごとの基原生物等の調査

第 9 版食品添加物公定書未収載品目の基原植物、微生物等で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等について、削除、変更又は拡大の必要性の有無について昨年度に引き続きアンケート調査を実施した結果、ローズマリー抽出物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) 「生コーヒー豆抽出物」：生コーヒー豆抽出物の製品中から 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] が単離・同定された。DPPH ラジカル消去活性を指標に酸化防止効果を検討した結果、活性の強かった画分から、5-*O*-caffeoylquinic acid、-*O*-caffeoylquinic acid、3-*O*-caffeoylquinic acid が検出され、これらカフェー酸誘導体が添加物活性への寄与に大きく影響していることが示唆された。

2) 「モウソウテク抽出物」：本製品中の含有成分について検討を行った結果、現在までに11種の既知化合物を単離し、構造を明らかにしている。単離した化合物を標準品としてHPLC分析を行った結果、主要成分として*p*-coumaric acid、3,4'- dihydroxy-propiophenone 3-*O*-glucoside、lyoniresinol-9'-*O*-glucosideを認めた一方、本製品中の主要成分として知られている

2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinoneはマイナー成分として観察されるのみであったことを昨年度報告した。本年度も引き続き成分精査を行った結果、新たに1種の既知化合物 [4'-hydroxypropiophenone] を単離した。また、単離した化合物を標準品としてHPLCによる化合物のプロファイリングを行った。

3) 「カキ色素」：本研究では、カキ色素の品質規格作成のための化学的検討として、本製品の含有成分の分離・精製を行った。現時点では化合物の単離に至っていないが、HPLC分析において複数のピークを認める画分を得た。

4) 「クチナシ青色素」：既存添加物クチナシ青色素は、ゲニピンと一級アミンの反応生成物が主色素成分とされるがその構造は未だ不明である。この主色素成分の生成過程お

よび構造についての知見を得るため、ゲニピンとベンジルアミンを用いたモデル実験をおこなった。ゲニピンとベンジルアミンの混合液は、無色→黄色→赤色→緑色→青色へ経時的に変化した。この内、青色素の前駆体と考えられる黄色素Y1及びY2を単離し、その構造を決定した。また、ゲニピンとベンジルアミンを異なる比に調製した混合液の反応実験から、青色素本体がゲニピンと一級アミンがモル比1：1で反応したユニットの繰り返し構造であることが示唆された。

5) 「ゴマ油不けん化物」：汎用性のある逆相系LCを用いて、主成分とするセサモリンに加えて、セサミン及びセサモールの一斉分析法を構築した。検出波長には、紫外可視スペクトルから判断して、290 nmに設定した。各種移動相を検討した結果、15分以内に分析することができた。検出限界は0.02～0.04 ppm及び定量限界は0.08～0.15 ppmとなった。本手法を用いて、ゴマ油不けん化物の定量を行ったところ、セサモリン：9.4 mg/g、セサミン：12.8 mg/g及びセサモールは不検出であった。更に、質量分析への直接導入も可能であり、マススペクトルから同定解析にも応用することができた。

6) 「グルコサミン」・「クローブ抽出物」：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。本年度は「グルコサミン」に関する測定条件の改良と、「クローブ抽出物」の適用条件を探索した。「グルコサミン」ではglucosamine定量の際の認証標準物質をDSS-d₆に変更しての条件確立を、「クローブ抽出物」ではeugenolの定量条件の確立を行った。Glucosamine定量では昨年度確立したPHPを直接内部標準とする方法で、PHPをそのままDSS-d₆に置き換えることで対応可能であることを確認した。「クロー

ブ抽出物」中のeugenolの定量では、「クローブ抽出物」のacetone-d₆懸濁液上清に認証標準物質である1,4-BTMSB-d₄のDMSO-d₆溶液を加えて測定し、1,4-BTMSB-d₄のトリメチルシリル基のシグナルとeugenolの2位のHシグナルのシグナル面積を比較することで定量可能であることを確認した。

7) 「ムラサキヤマイモ色素」：既存添加物名簿及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、ムラサキモ色素成分は、大部分は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、ムラサキモ及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。

8) 「カンゾウ油性抽出物」：今までの研究からカンゾウ油性抽出物製品の主要成分による全体の抗酸化力価への寄与率は高くはないことが明らかとなり、HPLCによる分離・分画後、各画分の活性測定を行い、他の抗酸化成分を分離・特定した。今年度は、*Glycyrrhiza inflata* 由来製品及び *Glycyrrhiza glabra* 由来製品より単離した活性成分につき、LC/TOF-MS(/MS)を用いて分析し、精密質量

による組成解析から含有成分の推定を行い、市販試薬及び供与された単離標品との解析結果と比較した。その結果、カンゾウ油性抽出物製品中の6種の抗酸化活性成分及び2種の非活性成分を同定した。

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

既存添加物に分類される酸化防止剤の抗酸化力価に基づく基準値の設定を目的とし、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法による一般試験法案を作成した。過去の測定例を参考に適用性について検討したところ、大部分の酸化防止剤(チャ抽出物、カンゾウ油性抽出物、ブドウ抽出物、ヤマモモ抽出物、ルチン酵素分解物、エンジュ抽出物、酵素処理イソクエルシトリン、ルチン、酵素処理ルチン、フェルラ酸、トコリエロール、d- γ -トコフェロール、d- δ -トコフェロール、d- α -トコフェロール、ミックストコフェロール、生コーヒー豆抽出物、コメヌカ油抽出物、ローズマリー抽出物、 γ -オリザノール)について、適用可と判断された。一方、烏龍茶抽出物、単糖・アミノ酸複合物、コメヌカ酵素分解物については、本試験法案では適用外と判断された。

4.増粘剤等の規格試験法の検討

溶液状態のカワラヨモギ抽出物製品に適した乾燥減量試験法を確立した。また、LC/UV及びLC/MSによるカピリン定量条件を最適化し、qNMRを応用してカピリン標品の正確な純度値を付けて定量に用いることで、信頼性の高いLC定量法を開発した。さらに、カピリン標品を必要としないqNMRでの直接定量法が、比較的カピリン含量の高いカワラヨモギ抽出物製品では、有用な定量法の1つとして選択可能であることを示した。

5.酵素の基原の解析法の確立

平成8年の既存添加物名簿作成時において、形態学・生化学に基づいて種が同定された既

存添加物アルギン酸リアーゼの生産菌である細菌*Sphingobacterium multivorum* (*Flavobacterium multivorum* のシノニム) の71/58株について、近年、細菌の同定法として主流となっている16S rDNAを指標にした種の同定解析を行なった。71/58株由来16S rDNA全長配列を明らかにし、相同性検索および分子系統解析を行なった結果、*Flavobacterium*属の新種の可能性が高い*Flavobacterium* sp.と推定された。

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

本年度は、既存添加物の中から第10版食品添加物公定書収載をめざし、いままでに作成した検証用規格のうち4品目について規格案、関連資料を見直し、改正した。また、検証用規格案の妥当性検討の為、5品目について裏付け試験を実施した。今後、裏付け試験の結果を踏まえ、更に規格の完成に向けて検討を進める。また更に検証を実施する品目を増やすための検討を進める。

また残された既存添加物については第5版自主規格の作成を目指して検討を行った。このうち2品目について成分規格案の作成及び裏付け試験を実施した。今後必要な情報を得るためにさらなる工夫が必要であると共に、流通実態の有無についても見極め、規格作成の優先順位を明確にする必要がある。

2. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

「生コーヒー豆抽出物」：生コーヒー豆抽出物の製品中から10種の化合物が単離・同定された。DPPHラジカル消去活性を指標に酸化防止効果を検討した結果、活性の強かった画分から、5-*O*-caffeoylquinic acid、4-*O*-caffeoylquinic acid、3-*O*-caffeoylquinic acidが検出され、これらカフェー酸誘導体が添加

物活性への寄与に大きく影響していることが示唆された。「モウソウチク抽出物」：本製品中から昨年度に引き続き成分精査を行った結果、新たに1種の既知化合物[4'-hydroxypropiophenone]を単離した。また、単離した化合物を標準品としてHPLCによる化合物のプロファイリングを行った。「カキ色素」：本研究では、カキ色素の品質規格作成のための化学的検討として、本製品の含有成分の分離・精製を行った。現時点では化合物の単離に至っていないが、HPLC分析において複数のピークを認める画分を得ており、今後の精査でそれら成分の詳細を明らかにする予定である。また、HPLC分析から本製品には構造不特定の縮合型タンニン類が豊富に含まれることが示唆されたことから、その詳細についても検討を行う予定である。

「クチナシ黄色素」：既存添加物クチナシ青色素の主色素成分の生成過程及び構造についての知見を得るため、ゲニピンとベンジルアミンを用いたモデル実験をおこなった。青色素の前駆体と考えられる黄色素Y1及びY2を単離し、その構造を決定した。また青色素本体がゲニピンと一級アミンがモル比1:1で反応したユニットの繰り返し構造であることが示唆された。「ゴマ油不けん化物」：汎用性のある逆相系LCを用いて、主成分とするセサモリンに加えて、セサミン及びセサモールの一斉分析法を構築した。本手法を用いて、ゴマ油不けん化物の定量を行ったところ、セサモリン：9.4 mg/g、セサミン：12.8 mg/g及びセサモールは不検出であった。「グルコサミン」・「クローブ抽出物」：「グルコサミン」に関する測定条件の改良と、「クローブ抽出物」の適用条件を探索した。「ムラサキヤマイモ色素」：「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行った。現在の規格基

準では、ムラサキイモ及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。「カンゾウ油性抽出物」： *Glycyrrhiza inflata*由来製品及び *Glycyrrhiza glabra*由来製品より単離した活性成分につき、LC/TOF-MS(/MS)を用いて分析し、精密質量による組成解析から含有成分の推定を行い、市販試薬及び供与された単離標品との解析結果と比較した。カンゾウ油性抽出物製品中の6種の抗酸化活性成分及び2種の非活性成分を同定した。

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

既存添加物に分類される酸化防止剤の抗酸化力価評価に関する一般試験法案を作成した。過去のデータを参考に適用性について検討したところ、大部分の酸化防止剤については、適用可と判断されたが、チャ抽出物のうち烏龍茶抽出物、単糖・アミノ酸複合物、コメヌカ酵素分解物については適用外と判断された。今後は、個々の酸化防止剤に関する詳しい試験法の作成に取り組む予定である。

4. 増粘剤等の規格試験法の検討

既存添加物カララヨモギ抽出物の公的成分規格作成のため、乾燥減量試験法を検討し、さらに定量 NMR を応用した LC 定量法の開発を行った。その結果、溶液状態のカララヨモギ抽出物製品に適した乾燥減量試験法を確立することができた。また、LC/UV 及び LC/MS によるカピリン定量条件を最適化し、qNMR を応用してカピリン標品の正確な純度値を付けて定量に用いることで、信頼性の高い LC 定量法を開発できた。さらに、カピリン標品を必要としない qNMR での直接定量法が、比較的カピリン含量の高いカララ

ヨモギ抽出物製品では、有用な定量法の1つとして選択可能であることを示した。

5. 酵素の基原の解析法の確立

16S rDNA を指標にしたアルギン酸リアーゼ生産菌 71/58 株の種の同定解析を行なった。本菌株は形態学・生態学に基づいて *S. multivorum* (*F. multivorum* のシノニム) と同定されていたが、16S rDNA を指標にして解析を行なった結果、*Flavobacterium* sp. と同定された。第9版食品添加物公定書案に記載されているアルギン酸リアーゼの基原には、「細菌 (*Alteromonas macleodii*, *Flavobacterium multivorum*, *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* 属, *Xanthomonas* 属に限る。)」と記載されているため、71/58 株はアルギン酸リアーゼの生産菌として使用することが可能である。rDNA を指標にして種の再同定が活発に行なわれている状況下、既存添加物の酵素生産菌についても、酵素製剤メーカーの協力のもと、rDNA を指標にした種の再同定を行い、公的な成分規格に明確な基原を規定する必要がある。一方で、上述のように当時、形態学・生化学に基づいた同定結果と齟齬が生じることも懸念されたが、これについては酵素製剤メーカーと行政との間で積極的な意見交換が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Amakura Y, Yoshimura M, Morimoto S, Yoshida T, Tada A, Ito Y, Yamazaki T, Sugimoto N, Akiyama H. : Chromatographic evaluation and characterization of components of gentian root extract used as food additives. *Chem Pharm Bull.* 64, 78-82, (2016).

- 2) Amakura Y, Yoshimura M, Yoshida T, Tada A, Ito Y, Yamazaki T, Sugimoto N, Akiyama H. : Chromatographic evaluation of the components of grape skin extract used as food additives. *Jpn. J. Food Chem. Safety*. 22, 108-114, (2015).
- 3) Kawasaki, H., Akiyama, T., Tada, A., Sekiguchi, W., Nishizaki, Y., Ito, Y., Sugimoto, N., Akiyama, H.: Development of HILIC-LC/MS method for direct quantitation of 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole in caramel III with the qNMR certified standard. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 22(2), 115-122 (2015).
- 4) Yusai Ito, Kyoko Ishizuki, Naoki Sugimoto, Atsuko Tada, Takumi Akiyama, Kyoko Sato, Hiroshi Akiyama, Yukihiro Goda. : Confirmation of the configuration of two glucuronic acid units in glycyrrhizic acid. *Jpn. J. Food Chem. Safety*. 22(1), 32-37, (2015).
- 5) 西崎雄三, 多田敦子, 石附京子, 伊藤裕才, 小野田絢, 杉本直樹, 穉山浩, モル吸光係数比を利用したジャマイカカシニ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. *食品衛生学雑誌*, 56, 185-193 (2015).
- 6) Todoroki K, Nakano T, Ishii Y, Goto K, Tomita R, Fujioka T, Min JZ, Inoue K, Toyo'oka T. : Automatic analyzer for highly polar carboxylic acids based on fluorescence derivatization-liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*. 29, 445-451, (2015).
- 7) Takayama T, Kuwabara T, Maeda T, Noge I, Kitagawa Y, Inoue K, Todoroki K, Min JZ, Toyo'oka T. : Profiling of chiral and achiral carboxylic acid metabolomics: synthesis and evaluation of triazine-type chiral derivatization reagents for carboxylic acids by LC-ESI-MS/MS and the application to saliva of healthy volunteers and diabetic patients. *Anal Bioanal Chem*. 407, 1003-1014, (2015).
- 8) Inoue K, Tsuchiya H, Takayama T, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto T, Matsukawa N, Toyo'oka T. : Blood-based diagnosis of Alzheimer's disease using fingerprinting metabolomics based on hydrophilic interaction liquid chromatography with mass spectrometry and multivariate statistical analysis. *J Chromatogr B*. 974, 24-34, (2015).
- 9) Min JZ, Tomiyasu Y, Morotomi T, Jiang YZ, Li G, Shi Q, Yu HF, Inoue K, Todoroki K, Toyo'oka T. : First observation of N-acetyl leucine and N-acetyl isoleucine in diabetic patient hair and quantitative analysis by UPLC-ESI-MS/MS. *Clin Chim Acta*. 444, 143-148, (2015).
- 10) Mochizuki T, Takayama T, Todoroki K, Inoue K, Min JZ, Toyo'oka T. : Towards the chiral metabolomics: Liquid chromatography-mass spectrometry based DL-amino acid analysis after labeling with a new chiral reagent, (S)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-1-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)pyrrolidine-2-carboxylate, and the application to saliva of healthy volunteers. *Anal Chim Acta*. 22, 73-82, (2015).
- 11) 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 Chem.* 181, 318-324, (2015).
- 12) Min JZ, Morota Y, Jiang YZ, Li G, Kang D, Yu HF, Inoue K, Todoroki K, Toyooka T. : Rapid and sensitive determination of diacetylpolyamines in human fingernail by ultraperformance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom.* 20, 477-486, (2015).
- 13) Todoroki K, Ishii Y, Ide T, Min JZ, Inoue K, Huang X, Zhang W, Hamashima Y, Toyooka T. : Advanced dress-up chiral columns: New removable chiral stationary phases for enantioseparation of chiral carboxylic acids. *Anal Chim Acta.* 882, 101-111, (2015).
- 14) Nakano T, Todoroki K, Ishii Y, Miyauchi C, Palee A, Min JZ, Inoue K, Suzuki K, Toyooka T. : An easy-to-use excimer fluorescence derivatization reagent, 2-chloro-4-methoxy-6-(4-(pyren-4-yl)butoxy)-1,3,5-triazine, for use in the highly sensitive and selective liquid chromatography analysis of histamine in Japanese soy sauces. *Anal Chim Acta.* 880, 145-151, (2015).
- 15) Li XL, Li G, Jiang YZ, Kang D, Jin CH, Shi Q, Jin T, Inoue K, Todoroki K, Toyooka T, Min JZ. : Human nails metabolite analysis: A rapid and simple method for quantification of uric acid in human fingernail by high-performance liquid chromatography with UV-detection. *J Chromatogr B.* 1002, 394-398, (2015).
- 16) Takayama T, Mochizuki T, Todoroki K, Min JZ, Mizuno H, Inoue K, Akatsu H, Noge I, Toyooka T. : A novel approach for LC-MS/MS-based chiral metabolomics fingerprinting and chiral metabolomics extraction using a pair of enantiomers of chiral derivatization reagents. *Anal Chim Acta.* 898, 73-84, (2015).
- 17) Inoue K, Ozawa Y, Toyooka T. : Application of liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of sedative medicine in clinical stage. *Chromatography.* 36, 81-92, (2015).
- 18) Uno K, Takayama T, Todoroki K, Inoue K, Min JZ, Mizuno H, Toyooka T. : Evaluation of a Novel Positively-charged Pyrrolidine-based Chiral Derivatization Reagent for the Enantioseparation of Carboxylic Acids by LC-ESI-MS/MS. *Chromatography.* 36, 57-60, (2015).

2. 学会発表

- 1) 吉田晴菜, 杉脇秀美, 好村守生, 島村智子, 受田浩之, 多田敦子, 西崎雄三, 杉本直樹, 穂山 浩, 佐藤恭子, 天倉吉章, 既存添加物「生コーヒー豆抽出物」活性画分の成分解析, 第 54 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2015 年 10 月 31 日 (高知)
- 2) 好村 守生, 越智 啓介, 多田 敦子, 杉本 直樹, 穂山 浩, 天倉 吉章, 既存添加物「モウソウチク抽出物」の成分研究, 日本生薬学会第 62 回年会, 2015 年 9 月 11 日 (岐阜)
- 3) 田邊思帆里, 多田敦子, 古庄紀子, 建部千絵, 西川真寿美, 荒井なぎさ, 西崎雄三,

佐藤恭子, 杉本直樹, 穠山浩 : 食品添加物
公定書における一般試験法の国際整合性
に関する研究 : 粘度測定法. 日本食品化学
学会第 21 回総会・学術大会(2014.5)(東京).

- 4) Sugimoto, N., Takada, M., Ishizuki, K.,
Ohtsuki, T., Tada, A., Nishizaki, Y., Suematsu,
T., Miura, T., Yamada, Y., Horinouchi, T.,
Koike, R., Kato, T., Togawa, T. Akiyama,
H.:“AQARI” vs. “PULCON”, a comparison of
qNMR: internal and external reference
methods. Pacifichem2015 (2015.12)(Hawaii).
- 5) 西崎雄三, 多田敦子, 石附京子, 加藤智久,
秋山卓美, 穠山浩, 杉本直樹, 佐藤恭子,
メチルパラベンを内標準物質とする既存
添加物「酵素処理ルチン (抽出物)」HPLC
定量分析法の確立, 第 1 回 次世代を担う
若手のためのレギュラトリーサイエンス
フォーラム (2015 年 9 月, 千葉)
- 6) 島村智子, 吉田鉄平, 柏木丈弘, 受田浩
之, 多田敦子, 杉本直樹, 穠山浩, ロダン
鉄法による酸化防止剤の抗酸化力価評価,
第 27 回ビタミン研究会, 香川, 2016 年 1
月.
- 7) 高橋未来, 井之上浩一, 西崎雄三, 多田敦
子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 穠山 浩 ; 逆相
系 HPLC による既存添加物・ゴマ油不け
ん化物の成分規格の検討. 日本薬学会第
136 年会 (横浜) 2016 年 3 月 26 日~29 日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を 含む)

なし

平成27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27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、平成25年度及び平成26年度に作成した規格案の一部の品目について、見直し及び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目について、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見直し及び裏付け試験

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品目を除く残りの品目について、昨年度までに作成した成分規格検証用の51規格案について、一部見直しあるいは裏付け試験を実施した。

(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に記載した。

- 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見直しと裏付け試験

第10版公定書に向けて昨年度までに作成した成分規格検証用の規格案のうち、4品目について規格案、関連資料を見直し、改正した。また、検証用規格案の妥当性検討の為、5品目について裏付け試験を実施した。見直し等を実施した品目は表1にまとめた通りである。

それぞれ実施した項目について、規格案及び関連資料、裏付けデータを部会別に整理して別紙資料3に記載した。

表1 第10版食品添加物公定書 検証用規格見直し品目

部会	規格等 見直し	裏付け 試験	既存 No [※]	用途	既存添加物名簿名称
3	—	○	175	日持ち向上/製造用剤	セイヨウワサビ抽出物
5	—	○	76	酸化防止剤/日持ち向上	カンゾウ油性抽出物
5	○		365	酸化防止剤	ローズマリー抽出物
6	○	○	154	ガムベース	ジェルトン
6	○	○	199	ガムベース	チクル
7	○	○	28	酵素	イソマルトデキストラナーゼ

※: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、前述の第10版公定書に向けた検証用規格を作成したものを除き、使用実態の再調査及び第5版自主規格の作成を検討している。

本年度は成分規格案を作成するために必要な情報が揃った2品目(表2)について規格を作成し、裏付け試験を実施した。なお、第14部会においては、昨年度より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2 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
2	322	着色料	ムラサキヤマイモ色素
13	163	製造用剤/強化剤	乳清焼成カルシウム

※:既添No:数字は既存添加物番号

(4) 既存添加物の品目ごとの基原生物等の調査

第9版食品添加物公定書未収載品目の基原植物、微生物等で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等について、削除、変更又は拡大の必要性の有無について昨年度に引き続きアンケート調査を実施した結果、ローズマリー抽出物について改正要望が寄せられた。詳細は、別紙資料5に収載した。

4. 考察

本年度は、既存添加物の中から第10版食品添加物公定書収載をめざし昨年度までに作成した検証用規格のうち4品目について規格案、関連資料を見直し、改正した。また、検証用規格案の妥当性検討の為、5品目について裏付け試験を実施した。今後、裏付け試験の結果を踏まえ、更に規格の完成に向けて検討を進める。また、更に検証を実施する品目を増やすための検討を進める。

残された既存添加物については第5版自主規格の作成を目指して検討を行った。このうち2品目について成分規格案の作成及び裏付け試験を実施した。今後必要な情報を得るためにさらなる工夫が必要であると共に、流通実態の有無についても見極め、規格作成の優先順位を明確にする必要がある。

平成28年度では、第10版食品添加物公定書収載を目指して更に検証用の規格を作成し、試料の収集、裏付け試験を進めると共に、既存添加物の自主規格の整備と改良に関する検討を継続する。

本年度の調査研究に際しては、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の穂山先生をはじめとする諸先生方には多大なるご指導をいただいた。この場をお借りし心より感謝申しあげる次第である。

以上

別紙

調査研究者名簿

	氏名	企業名
技術委員長	森將人	日本食品添加物協会
自主規格専門委員長、部会長・部会担当	西宮隆	株式会社タイショーテクノス
規格専門委員長	斎藤知明	MCフードスペシヤリティーズ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	山本正次	丸善製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	中島光一	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	大本俊郎	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	橋本成久	太陽化学株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	松岡賢一	DSP五協フード&ケミカル株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	植田実木生	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	増田哲也	エーザイフード・ケミカル株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	尾崎史浩	株式会社ロッテ
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	卯津羅健作	ナガセケムテックス株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	小川知成	天野エンザイム株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	岩間保憲	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	香村正徳	味の素株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	小野茂一	大宮糧食工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	坂井昭浩	オルガノフードテック株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	村上和也	富田製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	深尾正	日本新薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	関谷史子	高砂香料工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	稲井隆之	長谷川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	阿部貴宏	三菱化学株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	酒井正典	ダイワ化成株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	中島敏貴	上野製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	北川剛司	理研ビタミン株式会社
技術顧問	山田隆	一般社団法人日本食品添加物協会
技術顧問	高橋仁一	一般社団法人日本食品添加物協会