

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
（H26-食品-一般-001）
平成27年度研究分担報告書

研究分担課題：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

研究代表者 穂山 浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

要旨 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。

研究協力者

西崎雄三 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
多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所
小出知己 株式会社テクノスルガ・ラボ
卯津羅健作 ナガセケムテックス株式会社

A. 研究目的

既存添加物の酵素品目は、その添加物の酵素活性に基づいた名前が付けられており、基原に関しては、ひとつの生物種に指定されていない。既存添加物の酵素品目には、細菌・酵母・カビなどの微生物を基原とするものが殆どであるが、種の同定に至っていないものが数多く存在する。また、公的な種の同定法については規定されていない。

近年、全生物に共通して存在するリボソーム遺伝子の DNA 塩基配列 (rDNA) を指標にした分子生物学的手法による種の同定解析が幅広く受け入れられており、公定法のひとつである日本薬局方にも収載されている¹⁾。細菌では、16S rDNA、酵母やカビでは 26S/28S rDNA や 5.8S rDNA 遺伝子を含むスペーサー領域 (ITS 領域) が用いられる。現在では、従来の形態学および生化学に基づいて分類されていた微生物に対して、rDNA を指標にした種の再分類が活

発に行なわれており、それに伴い rDNA データが蓄積され、データベースの充実度は年々増している。rDNA を指標にした種の同定は、従来の形態学・生化学に基づいた同定に対して、データベースに登録された既知の rDNA 塩基配列との相同値から判断するため、実験者の主観が入らず、再現性の高い同定結果が得られる点で非常に優れているため、公的な微生物の種の同定法として期待される。

平成8年に作成した既存添加物名簿に記載されている微生物由来の酵素品目の基原については、各酵素製剤メーカーが形態学・生化学に基づいて同定したと考えられ、上述の rDNA を指標にした種の再同定を行なうことが、既存添加物の品質と安全を確保する上で重要であると考えられる。

そこで本研究では、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株をモデルとして16S rDNAを指標にした種の同定解析を行うこととした。

B. 研究方法

B-1. 試料

アルギン酸リアーゼ生産菌 71/58 株は、ナガ

セケムテックス (株) より供与された。

B-2. 16S rDNA 塩基配列解析

PCR 増幅からサイクルシーケンスまでの操作は、各プロトコールに従った。

- DNA 抽出
アクロモペプチダーゼ (和光純薬 (株))
- PCR 増幅
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ (株))
- サイクルシーケンス
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technology 社)
- 使用プライマー (Table 1)
9F, 1510R (PCR 増幅)
9F, 785F, 802R, 1510R (サイクルシーケンス)
- 塩基配列決定
ChromasPro 1.5 (Technelysium 社)
- ソフトウェア
テクノスルガ・ラボ微生物同定システム (株)
テクノスルガ・ラボ)
- データベース
DB-BA11.0 (株)テクノスルガ・ラボ
国際塩基配列データベース

C. 結果および考察

C-1. 16S rDNA 塩基配列決定

71/58 株から抽出した DNA を鋳型として、ユニバーサルプライマー 9F と 1510R を用いて PCR を行なった。得られた PCR 増幅産物をシーケンスした。なおシーケンサーからの生データ (エレクトロフェログラム) を、目視により確認した後に、1439 bp の 71/58 株由来 16S rDNA 塩基配列を決定した。

C-2. 16S rDNA を指標にした相同性検索

現在、細菌の種は DNA-DNA 分子交雑試験による相同値が 70%以上を示す菌株同士を 1 つの菌種と定義している²⁾。16S rDNA の全長塩基配列 (約 1,500 塩基) の相同値が 98.7%以上の場合には、DNA-DNA 分子交雑試験の相同値が 70%以上を示す可能性、つまり同種の可能性がある

とされている³⁾。すなわち、相同値が 98.7%未満の場合は、明確に別種と判断できる。本研究では、Fig. 1 に示したスキームに沿って、71/58 株の種の同定を行なうことにした。

細菌の同定においては「国際原核生物命名規約に基づき承認された種」の「基準株 (Type Strain)」との比較が重要とされる。これらの条件を満たすデータとの比較を行うため、今回はテクノスルガ・ラボ微生物同定システムをもちいて塩基配列解析を行った。併せて、日々新しい遺伝子データが追加更新される、国際塩基配列データベースに対しても検索を行った。

71/58 株由来の 16S rDNA 塩基配列 1439 bp を用いて blastn による相同性検索を行なった結果を Table 2 および Table 3 に示す。どちらの結果においても、上位は *Flavobacterium* 属由来の塩基配列が占めた。基準株との比較結果 (Table 2) における最上位は相同値 97.3% で *F. pectinovorum* および *F. banpakuense*、次いで相同値 97.2% で *F. compostarboris* が続いた。これらは Fig. 1 に示したスキームに沿うと、相同値が 98.5%未満のため、別種と判断された。国際塩基配列データベースに対する検索結果 (Table 3) では、上位 20 配列中に基準株由来の配列は 1 配列しか検索されなかった。また、その配列は基準株との比較 (Table 2) で最上位に検索された *F. pectinovorum* と同配列であった。

これらのことから、71/58 株と 98.7%以上の相同性を示す、細菌既知種の基準株に由来する 16S rDNA 塩基配列は存在しないと考えられた。

なお、参考までに 71/58 株と *S. multivorum* との相同値を調べたところ、79.9%しかなかった。現在、*Sphingobacterium* 属は *Sphingobacteraceae* 科、*Flavobacterium* 属は *Flavobacteraceae* 科に分類され、別の菌群であることが知られている。

C-3. 16S rDNA を指標にした分子系統解析

次に、基準株との比較 (Table 2) で検索された *Flavobacterium* 属各種の 16S rDNA 塩基配列と 71/58 株の 16S rDNA 塩基配列を用いて分子系統解析を行った (Fig. 2)。その結果、71/58 株は *Flavobacterium* 属の種で形成されるクラスター内に含まれたが、いずれの既知種とも異なる分

子系統学的位置を示した。

相同性検索および分子系統解析の結果から、71/58株は *Flavobacterium* 属の新種を構成する可能性が高いと考えられた。本研究では、71/58株を *Flavobacterium* sp.と同定した。

D. 結論

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。

E. 参考文献

- 1) 第十六改正日本薬局方，厚生労働省：参考情報 G4. 微生物関連 (2011)
- 2) Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, L., Moore, L.H., Moore, W.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., and Trüper, H.G: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37, 463-464 (1987)
- 3) Stackebrandt, E. and Ebers, J.: Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards.

Microbiol Today, 33, 152-155 (2006)

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 西崎雄三，多田敦子，石附京子，伊藤裕才，小野田絢，杉本直樹，穂山浩，モル吸光係数比を利用したジャマイカカシヤ抽出物中のクアシンおよ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)

2. 学会発表

- 1) 西崎雄三，多田敦子，石附京子，加藤智久，秋山卓美，穂山浩，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)

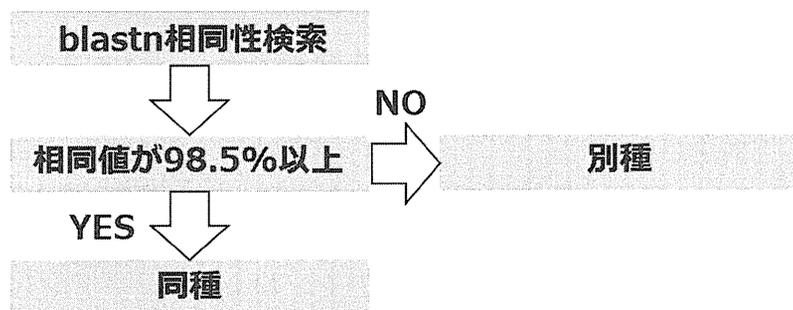


Fig. 1 本研究での 16S rDNA を指標にした 71/58 株の同定スキーム
(図中の相同率は 98.7%に変更願います)

Table 1. 本研究で使したプライマー

Primer	Sequence (5'-3')
9F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG
785F	GGATTAGATACCCTGGTAGTC
802R	TACCAGGGTATCTAATCC
1510R	GGCTACCTTGTTACGA

Table 2. DB-BA11.0 に対する BLAST 検索結果: 上位 20 塩基配列との相対率

種名	基準株名	Accession No.	相対率	BSL
<i>Flavobacterium pectinovorum</i>	DSM6368	AM230490	1430/1470 (97.3%)	
<i>Flavobacterium banpakuense</i>	15F3	GQ281770	1417/1456 (97.3%)	
<i>Flavobacterium palustre</i>	S44	KJ150599	1426/1474 (96.7%)	
<i>Flavobacterium reichenbachii</i>	WB3.2-61	AM177616	1423/1470 (96.8%)	
<i>Flavobacterium chungbukense</i>	CS100	HM627539	1418/1463 (96.9%)	
<i>Flavobacterium compostarboris</i>	15C3	GQ281769	1412/1453 (97.2%)	
<i>Flavobacterium plurextorum</i>	1126-1H-08	HE612094	1414/1457 (97.0%)	
<i>Flavobacterium piscis</i>	412R-09	HE612101	1417/1462 (96.9%)	
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	DSM2064	AM230489	1420/1471 (96.5%)	1*
<i>Flavobacterium limicola</i>	ST-82	AB075230	1421/1474 (96.4%)	
<i>Flavobacterium hercynium</i>	WB_4.2-33	AM265623	1419/1470 (96.5%)	
<i>Flavobacterium succinicans</i>	DSM4002	AM230492	1418/1470 (96.5%)	
<i>Flavobacterium resistens</i>	BD-b365	EF575563	1427/1480 (96.4%)	
<i>Flavobacterium tractae</i>	435-08	HE612100	1414/1460 (96.8%)	
<i>Flavobacterium aquidureense</i>	WB_1.1-56	AM177392	1417/1465 (96.7%)	
<i>Flavobacterium saccharophilum</i>	NBRC15944	AB473208	1397/1439 (97.1%)	
<i>Flavobacterium phragmitis</i>	BLN2	GU564236	1417/1474 (96.1%)	
<i>Flavobacterium arsenitoxidans</i>	S2-3H	JX001187	1410/1457 (96.8%)	
<i>Flavobacterium flevense</i>	NBRC14960	AB680723	1394/1439 (96.9%)	
<i>Flavobacterium defluvii</i>	EMB117	DQ372986	1394/1437 (97.0%)	

注 1) BSL は日本細菌学会が定めるバイオセーフティレベルを意味する (BSL1* (日和見病原体) 以上を表記)。

参考: *Sphingobacterium multivorum* との相対値

種名	基準株名	Accession No.	相対率	BSL
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	IAM14316	AB100738	1148/1437 (79.9%)	1*

Table 3. 国際塩基配列データベースに対する BLAST 検索結果: 上位 20 塩基配列との相対率 (検索日 2016 年 3 月 7 日)

登録名	株名	Accession No.	相対率
uncultured bacterium	-	HQ119549	1441/1474 (97.8%)
bacterium	YTM085720	KR029805	1441/1475 (97.7%)
<i>Flavobacterium</i> sp.	PR6-5	FJ889628	1438/1474 (97.6%)
uncultured <i>Flavobacterium</i> sp.	-	JN873207	1436/1472 (97.6%)
uncultured <i>Flavobacterium</i> sp.	-	JN873206	1438/1475 (97.5%)
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	JLY	KR094122	1434/1474 (97.3%)
<i>Flavobacterium</i> sp.	W1.09-205	JX458427	1434/1474 (97.3%)
<i>Flavobacterium arsenitoxidans</i> *	R-51041	LN995689	1422/1455 (97.7%)
<i>Flavobacterium</i> sp.	WB2.3-9	AM934644	1428/1466 (97.4%)
uncultured bacterium	-	HM049710	1433/1474 (97.2%)
<i>Flavobacterium pectinovorum</i> **	DSM 6368	NR_114994	1430/1470 (97.3%)
<i>Flavobacterium</i> sp.	PR4-11	FJ889627	1432/1474 (97.2%)
<i>Flavobacterium</i> sp.	WB2.1-16	AM934631	1426/1465 (97.3%)
<i>Flavobacterium pectinovorum</i> *	PhyCEm-99	AM921624	1431/1471 (97.3%)
<i>Flavobacterium</i> sp.	WB 3.3.45	AM177620	1428/1468 (97.3%)
<i>Flavobacterium</i> sp.	HC3-8	JF312978	1434/1477 (97.1%)
uncultured bacterium	-	FJ801173	1431/1474 (97.1%)
<i>Flavobacterium</i> sp.	WB 4.4-73	AM177638	1428/1469 (97.2%)
uncultured soil bacterium	-	DQ297959	1431/1474 (97.1%)
<i>Flavobacterium</i> sp.	WB 2.1-87	AM167561	1424/1463 (97.3%)

* 基準株由来の配列ではないことから、比較対象外と判断。

** DB-BA11.0 収録の配列と同じと判断。

0.01

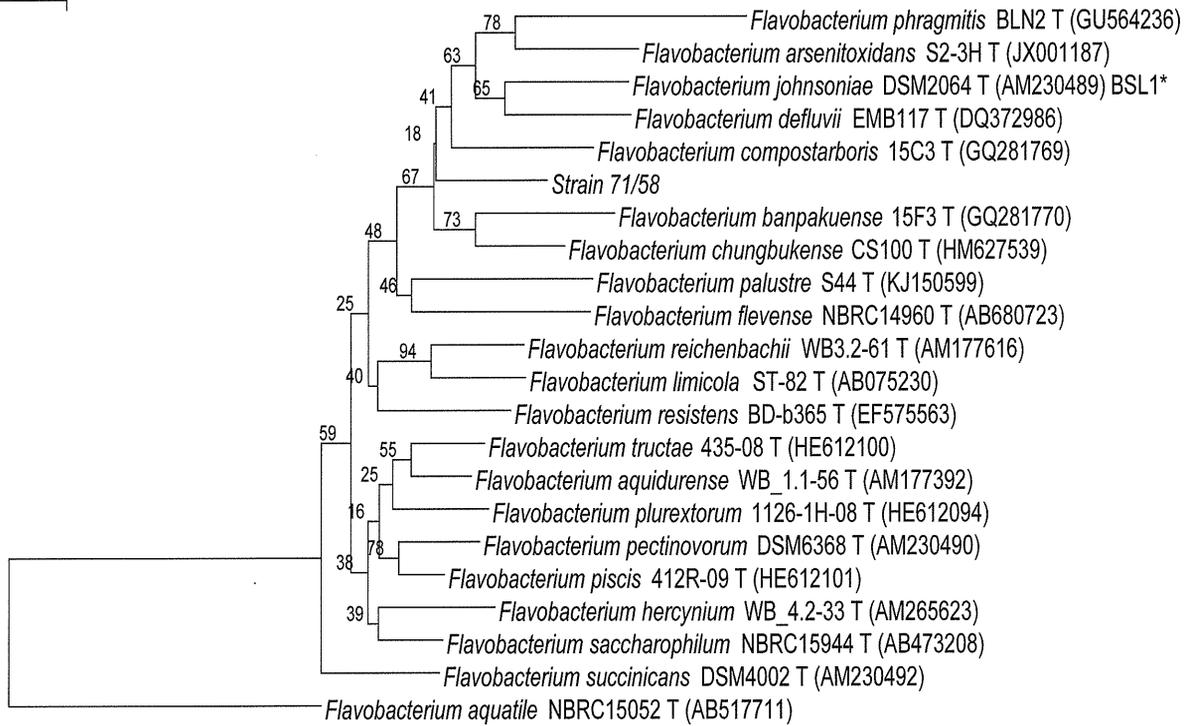


Fig. 2 BLAST 検索により近縁と考えられた *Flavobacterium* 属の既知種上位 20 種と 71/58 株の 16S rDNA に基づく分子系統樹。
左上の線はスケールバー、系統枝の分岐に位置する数字はブートストラップ値、株名の末尾の T はその種の基準株 (Type strain)、BSL はバイオセーフティレベル (BSL1*(日和見病原体)以上を表記) を示す。

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
（H26-食品-一般-001）
平成27年度研究分担報告書

研究分担課題：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

研究分担者 受田浩之 高知大学教育研究部総合科学系 教授

要旨 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、トコトリエロール、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。今後は、個別品目の試験法案作成に取り組む予定である。

研究協力者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長
島村智子 高知大学教育研究部総合科学系 准教授

A. 研究目的

現在、日本で使用されている酸化防止剤は、指定添加物と既存添加物の2種類に大別される。指定添加物は安全性と有効性が確認された上で成分規格が設定されている。一方、既存添加物は経過措置的にその使用が認められているものである。これらは天然由来の複雑な混合物である場合が多く、有効成分含量や成分組成を指標とした規格基準の設定が必要である。既存添加物については規格基準の設定を目的として、成分組成の確認、有効成分の同定、及び定量法の開発が行われている。しかし、既存添加物に分類される酸化防止剤中に存在する全ての抗酸化物質の同定を行うことが困難な場合もある。従って、成分組成に基づく規格が設定できていない既存添加物の抗酸化力価に関し

ては、一定の品質確保のため有効成分の分析を必要としない標準法の確立が必要と考えられた。このような状況のもと、これまでに各種抗酸化活性測定法の既存添加物の抗酸化力価評価への適用性を検討し、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法に関する複数機関での評価研究を行い、最終的に DPPH 法を標準法の候補として選出した¹⁾。

今年度は、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。

B. 一般試験法案

抗酸化活性測定法は酸化防止剤の抗酸化活性を測定する方法である。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）等価活性で表す。

操作法

(1) トロロックスの DPPH ラジカル消去率の測定

トロロックス 100 mg を精密に量りとり、エタノール (99.5) を加えて 100 mL とする。この液 50 mL を正確に量りとり、エタノール (99.5) を加えて 500 mL とし、トロロックス標準原液とする。標準原液をエタノール (99.5) を加えて希釈し、60 µg/mL と 80 µg/mL のトロロックス標準液を調製する^{*1}。試験管にトロロックス標準液 200 µL を量りとり、抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加えて混合する。この液に DPPH 試液 (0.2 mmol/L) 1000 µL を加え、直ちに 10 秒間攪拌後、室温暗所で 30 分間静置し、検液とする。別に標準液の代わりにエタノール (99.5) を用いて検液の調製と同様に操作し、比較液とする。エタノール (99.5) 1200 µL に抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加え、混合したものを対照液とし、波長 517 nm における検液の吸光度 A_R 及び比較液 A_C を測定し、次式により DPPH ラジカルの消去率 (%) を求める。

$$\text{トロロックスの DPPH の消去率 (\%)} = \frac{(A_C - A_R)}{A_C} \times 100$$

^{*1} トロロックス試薬の純度は 97% であるため、実際の試験に用いるトロロックス標準液の濃度については純度を考慮した補正を行う。

(2) トロロックスの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) の算出

横軸にトロロックス標準液の濃度 (60 µg/mL と 80 µg/mL)、縦軸に DPPH の消去率 (%) をとり、グラフにそれぞれの値をプロットする^{*2}。この 2 点を通る回帰線から、トロロックスの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を求める。ただし、3 回の繰り返し測定を行い、その平均値をトロロックスの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) とする。

^{*2} この 2 点の間に消去率 50% があることを確認する。値が外れている場合は標準液の調製からやり直す。

(3) 試料の DPPH ラジカル消去率の測定

別に規定する量の試料を試験管に量りとり、

別に規定する量の希釈溶媒を加えて希釈し、5 種以上の異なる濃度の試料液を調製する。試験管に試料液 200 µL を量りとり、抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加えて混合する。この液に DPPH 試液 (0.2 mmol/L) 1000 µL を加え、直ちに 10 秒間攪拌後、室温暗所で 30 分間静置し、検液とする。別に試験液の代わりに希釈溶媒を用いて検液の調製と同様に操作し、比較液とする。エタノール (99.5) 1200 µL に抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加え、混合したものを対照液とし、波長 517 nm における検液の吸光度 A_S 及び比較液 A_C を測定し、次式により DPPH ラジカルの消去率 (%) を求める。

$$\text{DPPH の消去率 (\%)} = \frac{(A_C - A_S)}{A_C} \times 100$$

(4) 酸化防止剤試料の 50% 阻害濃度 (IC_{50}) の算出

横軸に酸化防止剤試料液の濃度、縦軸に DPPH の消去率 (%) をとり、グラフにそれぞれの値をプロットする。DPPH の消去率 50% を挟む酸化防止剤試料液の濃度 2 点を通る回帰線から、トロロックスの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を求める。ただし、3 回の繰り返し測定を行い、その平均値をトロロックスの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) とする。

(5) トロロックス等価活性 (TEAC) の算出

酸化防止剤試料液とのトロロックス標準液の IC_{50} が同一の活性を有しているとみなし、酸化防止剤の抗酸化活性をトロロックス等価活性 (TEAC) で表す。酸化防止剤のトロロックス等価活性は次式により求める。

$$\text{酸化防止剤のトロロックス等価活性 (TEAC)}^{*3} = \frac{\text{トロロックスの } IC_{50}}{\text{酸化防止剤試料液の } IC_{50}}$$

^{*3} 同一日に測定した酸化防止剤試験溶液の IC_{50} とトロロックスの IC_{50} の値を用いて TEAC を求めることが望ましい。

試薬・試液・標準品

(1) トロロックス標準溶液

(±)-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, Aldrich 製, 233813, 純度 97%

(2) トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4), 抗酸化活性測定法用

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール^{※4} 12.1 g を量り, 水を加えて溶かし, 塩酸試液 (1 mol/L) で pH 7.4 に調整し, 水を加えて 1000 mL とする。

※4 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 和光純薬 特級 207-06275 純度 99.0%

(3) DPPH 試液 (0.2 mmol/L)

DPPH^{※5} 17 mg を精密に量りとり, エタノール (99.5) を加えて溶かし, 200 mL とし, 遮光して吸光度が定常状態に達するまで 2 時間放置する^{※6}。この液 1000 μ L を試験管に正確に量りとり, エタノール (99.5) 200 μ L と抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 μ L を正確に加えて混合し検液とする。エタノール (99.5) 1200 μ L に抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 μ L を加え, 混合したものを対照液とする。検液につき 517 nm における吸光度を測定し, 検液の吸光度が 1.00 ± 0.05 の範囲内であることを確認する。検液の吸光度が 1.05 を超える場合はエタノール (99.5) を加えて希釈し, 検液の吸光度が 1.00 ± 0.05 の範囲内に入るように調整する。用事調製する。

※5 DPPH Aldrich 製 D9132

※6 DPPH 溶液は, 調製直後から 1 時間程度まで時間と共に吸光度が低下する。2 時間放置することで吸光度が定常状態に達する。

C. 研究結果と考察

(1) トロロックスの IC₅₀ について

過去に実施した DPPH 法に関する複数機関で

の評価研究¹⁾では, 標準プロトコルとしてトロロックスの IC₅₀ の算出にあたり, トロロックス濃度 0, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/mL での測定を実施した。その結果, IC₅₀ を求める際に最終的に利用する (プロットする) 2 点は常に 60 μ g/mL と 80 μ g/mL の値であった。このことから, 今回作成した一般試験法案では, 60 μ g/mL と 80 μ g/mL の 2 点での測定を実施することとした。

また, 複数機関での評価研究¹⁾の際のデータを参考にした場合, 一般試験法案を適用した際のトロロックスの IC₅₀ は 61.6~64.6 mg/mL の範囲の値となると考えられた。

(2) チャ抽出物への適用の検討

過去に DPPH 法による 14 製品の測定例がある既存添加物のチャ抽出物について, 一般試験法案を適用した際に予測される各種項目の数値について検討した。その結果を表 1 に示した。紅茶抽出物である M, 烏龍茶抽出物 N を除いた場合, チャ抽出物の IC₅₀ を求める際に使用する (プロットする) 2 点の濃度範囲は, 20~80 μ g/mL となると考えられた。紅茶抽出物については 100~200 μ g/mL の濃度範囲となると予測されるため, 別途濃度の指定が必要であると考えられた。また, 烏龍茶抽出物は, 本試験法案では適用外であると判断された。

一方, チャ抽出物の TEAC は最大で 3.01, 最小で 0.44 (紅茶抽出物を除く場合は 0.95) であった。同じチャ抽出物であっても抗酸化力価 (TEAC) には約 6.8 倍の差があり, 基準値の設定について考慮が必要である。

(3) カンゾウ油性抽出物への適用の検討

過去に DPPH 法による 5 製品の測定例があるカンゾウ油性抽出物 (粉末製品) について, 一般試験法案を適用した際に予測される各種項目の数値について検討した。その結果を表 2 に示した。カンゾウ油性抽出物 (粉末) の IC₅₀ を求める際に使用する (プロットする) 2 点の濃度範囲は 125~500 μ g/mL となると考えられた。また, TEAC に関しては, 最大で 0.32, 最小で 0.20 と比較的, 同程度の値を示した。カンゾウ

油性抽出物では適用外となる製品は存在しなかった。今後は液体製品を含めた、基準値の設定についてより詳細な検討が必要であると考えられた。

(3) その他の酸化防止剤についての検討

DPPH 法により求めたその他の酸化防止剤の TEAC を図 1 に示した。図 1 から明らかなように、品目によりその抗酸化力価は大きく異なるため、各品目ごとに個別試験法、ならびに基準値を設定することが現実的な方策である。また、ここに示した品目については、1 製品のみ測定例しかないため、今後は複数製品の試験を実施し、個別の試験法案を作成する。なお、単糖・アミノ酸複合物、コメヌカ酵素分解物の抗酸化力価評価については、本試験法案では適用外と判断された。

E. 結論

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。

参考文献

1) T. Shimamura, Y. Sumikura, T. Yamazaki, A. Tada, T. Kashiwagi, H. Ishikawa, T. Matsui, N. Sugimoto, H. Akiyama, H. Ukeda, *Anal. Sci.*, **30**, 717-721 (2014).

F. 研究発表

1. 論文発表
なし。

2. 学会発表

1) 島村智子, 吉田鉄平, 柏木丈弘, 受田浩之, 多田敦子, 杉本直樹, 穂山浩, 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。

G. 知的財産権の出願, 登録状況
なし。

H. 健康危機情報
なし。

表1 チャ抽出物への適用例

酸化防止剤	50%阻害を挟む濃度2点 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	TEAC
A	20, 40	3.01
B	20, 40	2.51
C	20, 40	2.63
D	40, 60	1.30
E	20, 40	2.39
F	60, 80	0.97
G	40, 60	1.77
H	20, 40	2.54
I	60, 80	0.95
J	40, 60	1.38
K	20, 40	2.74
L	50, 60	1.21
M	100, 200	0.44
N	—	—

表2 カンゾウ油性抽出物（粉末）への適用例

酸化防止剤	50%阻害を挟む濃度2点 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	TEAC
A	200, 500	0.25
B	200, 500	0.32
C	125, 250	0.30
D	250, 500	0.23
E	250, 500	0.20

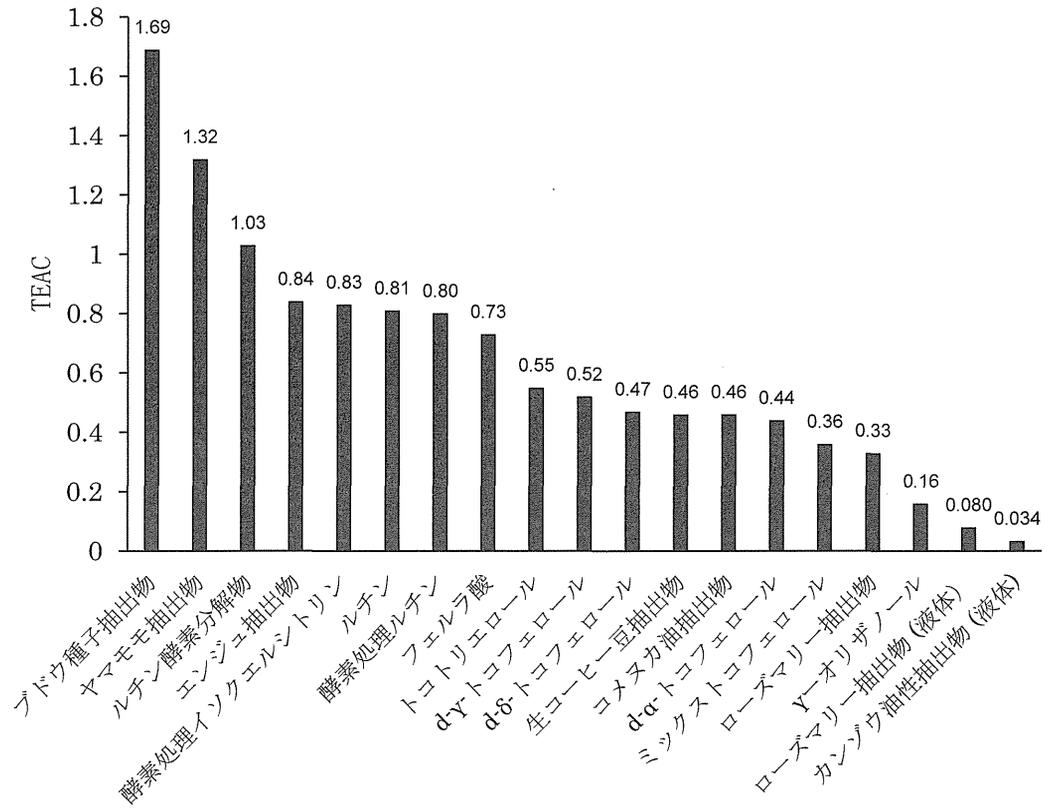


図1 各種酸化防止剤のTEAC

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
（H26-食品-一般-001）
平成27年度研究分担報告書

研究分担課題：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

研究分担者 井之上 浩一 立命館大学薬学部 准教授

要旨 日本食品添加物協会「既存添加物自主規格（第4版）」に記載されているムラサキヤマイモ色素の成分規格作成のため、主成分解析および確認試験の検討を実施した。ムラサキヤマイモ色素は、流通品および独自に調製したものをを用いることとした。自主規格案であるクエン酸緩衝液（pH 3.0）による色彩および極大吸収部、水酸化ナトリウム溶液による液の色変化に関しては、規格基準として適合していた。本確認試験は、第8版食品添加物公定書のムラサキイモ色素とほぼ同等の試験であり、両者の識別判断は不可能であった（昨年度報告）。そこで、ムラサキヤマイモおよびムラサキイモ色素の成分解析を液体クロマトグラフィーにより実施した。その結果、最大吸収波長（ムラサキイモ色素：515～535 nm，ムラサキヤマイモ色素：525～545 nm）によるピークが全く異なっており、それぞれの成分を同定する必要がある。成分同定には、質量分析法を用いて、ムラサキイモ由来成分は、Cyanidin, Penidin, Peonidinなどの配糖体であり、ムラサキヤマイモ由来成分は、Alatanin類の異性体混合と同定できた。ムラサキヤマイモ色素の成分規格試験としては自主規格案で問題はないが、ムラサキイモ色素とムラサキヤマイモ色素では、主成分が異なることを留意することと結論付けられた。

研究協力者 細谷孝博 静岡県立大学食品
栄養科学部 助教

A. 研究目的

日本食品添加物協会「第4版 既存添加物自主規格」（以下、4版自主規格）に規格されているムラサキヤマイモ色素（Purple Yam Color）は、ヤマノイモ科ヤマノイモ（*Dioscorea alata* Linné）の塊根より水もしくは含水エタノールで抽出して得られたものであると定義され、主色素はシアニジンアシルグリコシド等を主成分とするものとされている¹⁾。

一方、学術的にはムラサキヤマイモは、ヤマノイモ科ヤマノイモ属の植物で英名では、Purple yamと言われている。李らは、ムラサキヤマイモの成分特性として、抗酸化作用や各主成分の解析を報告している²⁾。また、津久井ら

は、フィリピンで市販されている Purple yam 粉末から、アントシアニン解析の結果、主に3種類：シアニジン-3-ゲンチオビオシド+p-クマール酸（含有率：42%）、マルビジン-3-ゲンチオビオシド-5-ラムノシド+p-クマール酸（35%）およびマルビジン-3-ゲンチオビオシド-5-グルコシド+p-クマール酸（22%）と示している³⁾。また、近年の報告では、Purple yam 遺伝子解析から chalcone isomerase, flavanone 3-hydroxylase, flavonoid 3'-monooxygenase, dihydroflavonol 4-reductase, leucoanthocyanidin dioxygenase および flavonol 3-O-glucosyltransferase 発現を確認し、アントシアニン類の新たな含有の可能性を示唆している⁴⁾。その一方で、既存添加物として色素の詳細な成分分析に関する報告は殆どない。

本研究では、国内において、色素製剤の入手が容易でなかったため、ムラサキヤマイモ塊根(2種類)から抽出したものを対象試料とした。また、国内流通品についても1品目について検討を行った。さらに、ムラサキイモ色素は、既に第8版食品添加物公定書(以下、8版公定法)に規格化されており、その比較検討も実施した。

B. 研究方法

ムラサキヤマイモ塊根は沖縄県産①および自家栽培[静岡県立大学薬草園]②を用いた。また、国内での入手品は、③ムラサキヤマイモ色素原液(Lot. 160114-3:三栄源 FFI)を用いた。一方、ムラサキイモ色素は、4種類(①株式会社パイオニア企画:アヤ紫さつま芋, ②三笠産業株式会社:ムラサキイモファインパウダー, ③藤元商店:紫芋パウダー, ④サンレッド YM粉末ムラサキイモ色素)を試料とした。

水酸化ナトリウム, エタノール, クエン酸, ギ酸, 酢酸は和光純薬社製(特級)を用いた。精製水およびアセトニトリルはミリポア社製を利用した。

クエン酸緩衝液(pH 3.0):クエン酸 2.1 gを量り, 精製水を加えて, 100 mLとする。また, リン酸 2 ナトリウム 7.16 gを量り, 精製水を加えて, 100 mLとする。両溶液を比率 159:41で混合する。

水酸化ナトリウム溶液: 水酸化ナトリウム 1.0 gを量り, 精製水 25 mLで定容した。

塊根からの色素成分の抽出: 対象試料を水/エタノールによるミキサーで粉碎し, 超音波抽出を行う。その後, 遠心分離を行い, 上清を1 mL採取し, 精製水で10倍希釈する。本試料を固相抽出 Sep-Pak で精製したものを試料とした。

電子天秤: メトラー製 METTLER AE 100

遠心分離: クボタ製 KUBOTA 2410 および日立製作所社製 HITACHI CF16RX2

恒温振盪水槽: NTS-400A, HU-M, 東京理化工機(株)製

紫外可視分光光度計: 日立製作所社製 U-2010
LC装置: Waters社製 Waters Acquity H Class

LCによる分離分析: 対象色素および塊根から抽出物は水/アセトニトリル混液(50/50, V/V)により調製した。移動相には, 1.0% ギ酸水溶液/アセトニトリルを使用し, 0分から30分かけて組成比 90/10 から 75/25 まで, グラジュエントを行い, その後, 10/90 で5分間送液した。カラム: TSKgel ODS-100V column (2.0×150 mm, 3 μm, 東ソー社製)
カラム温度: 40°C
移動相: 1.0%ギ酸水溶液/1.0%ギ酸アセトニトリル (B:10% (0-1 min) →60% (40 min))
流速: 0.2 mL/min
検出波長: 210-600 nm
注入量: 5 μL

MS装置: Thermo Fisher Scientific社製 Accela/Q-Exactiveを用いた。測定条件は, エレクトロスプレーイオン化法(ESI: ポジティブモード)で行った。その他の条件は下記に示す。

MS条件

Scan range: m/z 200-2000
Resolution: 70,000
Polarity: Positive
Sheath gas flow rate: 40
Aux gas flow rate: 10
Spray voltage 3.80 kV
Capillary temperature: 350°C
Heater temperature: 300°C

MS/MS条件

Scan range: m/z 150-150
Resolution: 70,000
Polarity: Positive
Sheath gas flow rate: 40
Aux gas flow rate: 10
Spray voltage 3.80 kV
Capillary temperature: 350°C
Heater temperature: 300°C
NCE: 15 eV

4 版自主規格（ムラサキヤマイモ色素）

(1) 対象試料の色価 20 に換算して 1 g に相当する量を電子天秤で量り、クエン酸緩衝液（pH 3.0）100 mL に溶解する。その際、液の色は赤～暗赤紫色を呈する。

(2) (1)の溶液 15 mL に水酸化ナトリウム溶液（1→25）5 mL を加えるとき、液の色は暗緑色に変化する。

(3) (1)の溶液の吸収極大波長を測定する。波長 525～545 nm に吸収極大部を有する。

C. 研究結果

4 版自主規格に従い、各検液を調製し、各試験を実施した。また、塊根からの色素成分に関しては、濃縮乾固した粉末試料を同様色素製剤として扱い、本試験に利用した。試験結果に関して、ムラサキイモ色素の 8 版公定法およびムラサキヤマイモ色素の 4 版自主規格は、いずれも確認判定が同じであるため、以下の記載は同列とする。

(1) いずれも赤～暗紫赤色の色彩を示し、色価などの判別は可能であった。

(2) いずれも暗緑色の色彩を示し、アルカリによる色彩変化の判別は可能であった。

(3) 紫外可視分光光度計により、吸光度を測定した。ムラサキヤマイモ色素では、4 版自主規格の 525～545 nm 付近での吸収極大波長を示した。8 版公定法に従い、ムラサキイモ色素は、515～535 nm において吸収極大波長が観察された。ムラサキヤマイモ色素^③ についてのみ、色彩結果を図 1 に示す。本結果より、国内で入手したムラサキヤマイモ色素、ムラサキイモ色素および塊根抽出試料は、4 版自主規格および 8 版公定法の規格基準に適合するものと判断できる。そのため、色彩と色素成分の判断については、両規格案に関しては問題ないと考えられる。しかしながら、両規格試験では、ムラサキイモ色素やムラサキヤマイモ色素の判別は不可能である。そのため、ムラサキイモ色素およびムラサキヤマイモ色素の色素成分を比較しながら、同定する必要があると考えられた。

LC/MS による分析条件については、昨年度検討した結果を用いることとした。ムラサキヤマイモ色素およびムラサキイモ色素の代表的な吸収極大波長（ムラサキヤマイモ色素：525～545 nm、ムラサキイモ色素：515～535 nm）および ESI-MS（ポジティブモード： m/z 200～2000）クロマトグラムを図 2 に示す。いずれも、主成分のピークパターンが異なることが判明した。そこで、各成分の同定を実施することとした。

ムラサキヤマイモ色素については、525～545 nm の波長により、検出されたピーク 1～8 について、MS スペクトルとの関連性から同定を試みた。また、既報の MS スペクトルデータおよび NMR 解析を参考とすることとした⁵⁾。

それぞれのピークについて、可視・紫外吸収スペクトルは、いずれもアントシアニン特有の吸収スペクトルを示した。高分解能 ESI-MS のポジティブモード(m/z 200～2000)および MS/MS のマススペクトルにより、ムラサキヤマイモに含まれるアントシアニン成分の同定を行った。各ピークの MS/MS パターンより、フラグメントイオンに m/z 287 を示したピーク 1-7 には、シアニジン骨格であることが示唆された。ピーク 7 は、 m/z 271 よりペラルゴニジン骨格を、ピーク 8 は、 m/z 301 よりペオニジン骨格を有することが示唆された。ムラサキヤマイモ (*Discorea alata*) からは、既に吉田らおよび守屋らにより Alatanin A-G のアシル化アントシアニンが報告されている⁶⁾。それぞれの精密質量数からの分子式、ピークパターンおよびフラグメントイオンより、検出されたアントシアニン成分同定を試みた。ピーク 1 に関しては、既報⁵⁾中に報告がなく、unknown とした。また、ピーク 2 および 3 に関しては、Alatanin E の構造であるが、精密質量数、フラグメントパターン、可視・紫外吸収スペクトルが一致しているため、帰属ができなかった。ピーク 5 に関しては、 m/z 1347 および 817 の 2 成分のアントシアニンが含有しており、Alatanin B (質量数 1347) および Alatanin C (質量数 817) が重なって検出していると判断した。なお、ムラサキヤマイモの主成分は、Alatanin C であることから、ピーク 5 の主要アントシアニンは、Alatanin C と

同定した。以上の同定した結果と構造を表1および図3に示す。これら、構造式から明らかのように昨年報告したムラサキイモ色素の主成分(表2)と比較しても全く異なることが判明した。そのため、規格基準は色彩などを評価する上で確認試験として利用できるが、その主成分は異なることを留意しなければならない。

D. 考察

本研究では、4版自主規格を基盤に国内で入手可能なムラサキヤマイモおよび色素の規格基準評価を実施した。その結果、いずれも規格基準内と判断できた。しかしながら、8版公定法のムラサキイモ色素およびムラサキヤマイモの区別は不可能であった。そこで、LCによるクロマトグラムパターンを比較した結果、最大吸収波長(ムラサキイモ: 515~535 nm, ムラサキヤマイモ: 525~545 nm)によるピークが全く異なっていた。つまり、各規格基準に準じるが、その由来成分は全く異なることが分かった。そのため、各ピークの成分を同定し、新たな規格基準指標を担保する必要がある。そのため、LC/MSによって、各ピークの同定を実施することとした。表1には、ムラサキヤマイモ由来成分、表2にはムラサキイモ由来成分の吸収極大波長、同定に用いたLC/MS情報(保持時間, MSイオン, MS/MSイオン)および分子量をまとめた。いずれの殆どが既知物質であるが、両成分は全く異なることが判明した。今後、ムラサキイモおよびムラサキヤマイモの両方の色素成分を判別できる試験法の確立が望まれる。

E. 結論

本結果より、ムラサキヤマイモ色素の自主規格案は、妥当なものと評価できた。そのうえで、ムラサキイモ色素と比較した結果、最大吸収波長(ムラサキイモ色素: 515~535 nm, ムラサキヤマイモ色素: 525~545 nm)によるピークが全く異なっており、それぞれの成分を同定する必要があった。成分同定の結果、ムラサキイモ由来成分は、cyanidin, penidin, peonidinなどの配糖体であり、ムラサキヤマイモ由来成

分は、Alatanin 類の異性体混合と同定できた。ムラサキヤマイモ色素の成分規格試験としては自主規格案で問題はないが、ムラサキイモ色素とムラサキヤマイモ色素では、主成分が異なることを留意することと結論付けられた。つまり、下記自主規格案に伴う確認試験は食品添加物公定書として妥当と思われる。

定義:本品は、ヤマイモ (*Dioscorea alata* Linné) の塊根より水、弱酸性水又は含水エタノールで抽出して得られたものである。主色素は、アニジンアシルグリコシド等を主成分とするものである。

確認試験: (1) 本品の表示量から、色価20に概算して1gに相当する量を取り、クエン酸緩衝液(pH 3.0) 100 mLに溶かした液は、赤~暗赤紫色を呈する。

(2) (1)の液15 mLに水酸化ナトリウム溶液(1→25) 5 mLを加えるとき、液の色は暗緑色に変わる。

(3) 本品をクエン酸緩衝液(pH 3.0)に溶かした液は、波長525~545 nmに極大吸収部がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

平成27年度は特になし。

2. 学会発表

平成27年度は特になし。

G. 知的財産権の出願、登録状況

特になし

H. 健康危機情報

特になし

I. 参考文献

- 1) 日本食品添加物協会; 第4版 既存添加物自主規格 平成20年10月13日発行
- 2) 李 佩璇, 志和地 弘信, 入江 憲治, Ye Tint Tun, 石田 裕, 豊原 秀和; 熱帯農業

研究 3, 62-69 (2010).

3) 津久井 亜紀夫, 桑野 和民, 三田村 敏男, 谷村 和八郎 ; 日本農芸化学会誌 51, 471-476 (1977).

4) Wu ZG, Jiang W, Mantri N, Bao XQ, Chen SL, Tao ZM; BMC Genomics 30, 346. (2015).

5) Moriya C, Hosoya T, Agawa S, Sugiyama Y, Kozone I, Shin-Ya K, Terahara N, Kumazawa S; Biosci. Biotechnol. Biochem. 79: 1484-1492. (2015).

6) Yohida K, Kondo T, Kameda K, Kawakishi S, Lubag AJM, Mendoza, EMT, Goto T; Tetrahedron Lett. 32, 5575-5578. (1991).

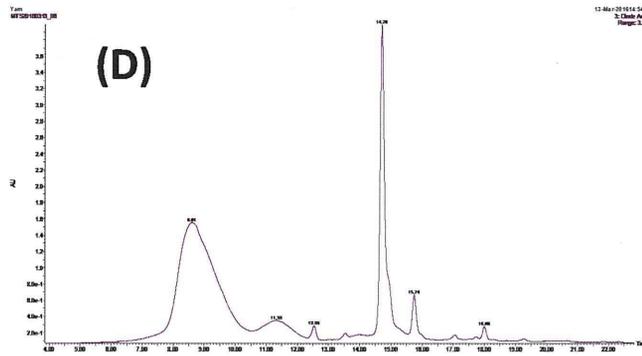
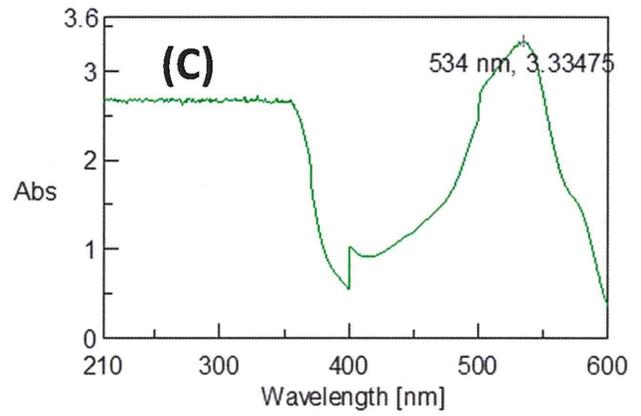
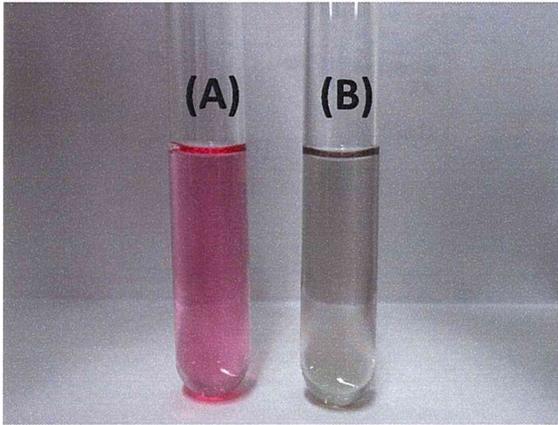


図1 ムラサキヤマイモ色素の確認試験

- (A) 4版自主規格（ムラサキヤマイモ色素）確認試験(1)
- (B) 4版自主規格（ムラサキヤマイモ色素）確認試験(2)
- (C) 4版自主規格（ムラサキヤマイモ色素）確認試験(3)
- (D) LCによるムラサキヤマイモ色素のクロマトグラム

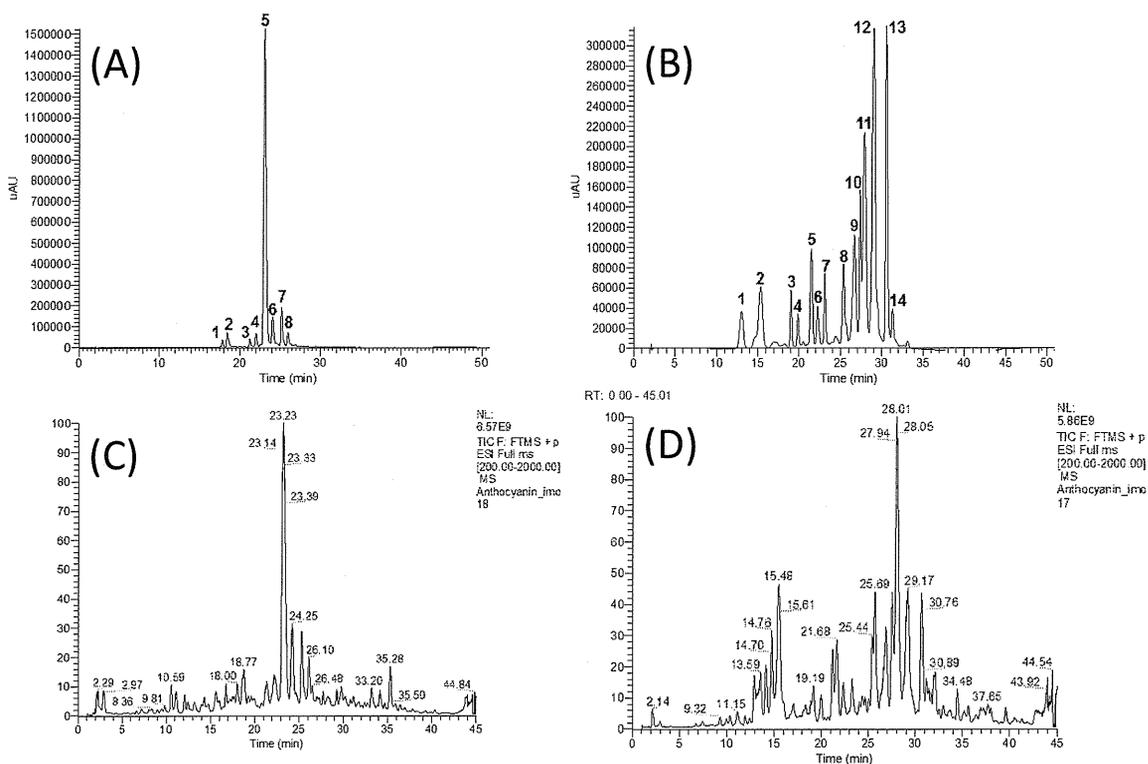


図2 ムラサキヤマイモおよびムラサキイモ成分のLC/MSクロマトグラム
 (A) ムラサキヤマイモ色彩成分の525~545 nm吸収ピーク
 (B) ムラサキイモ色彩成分の515~535 nm吸収ピーク
 (C) ムラサキヤマイモのESI-MS (m/z 200~2000 : ポジティブモード)ピーク
 (D) ムラサキイモのESI-MS (m/z 200~2000 : ポジティブモード)ピーク

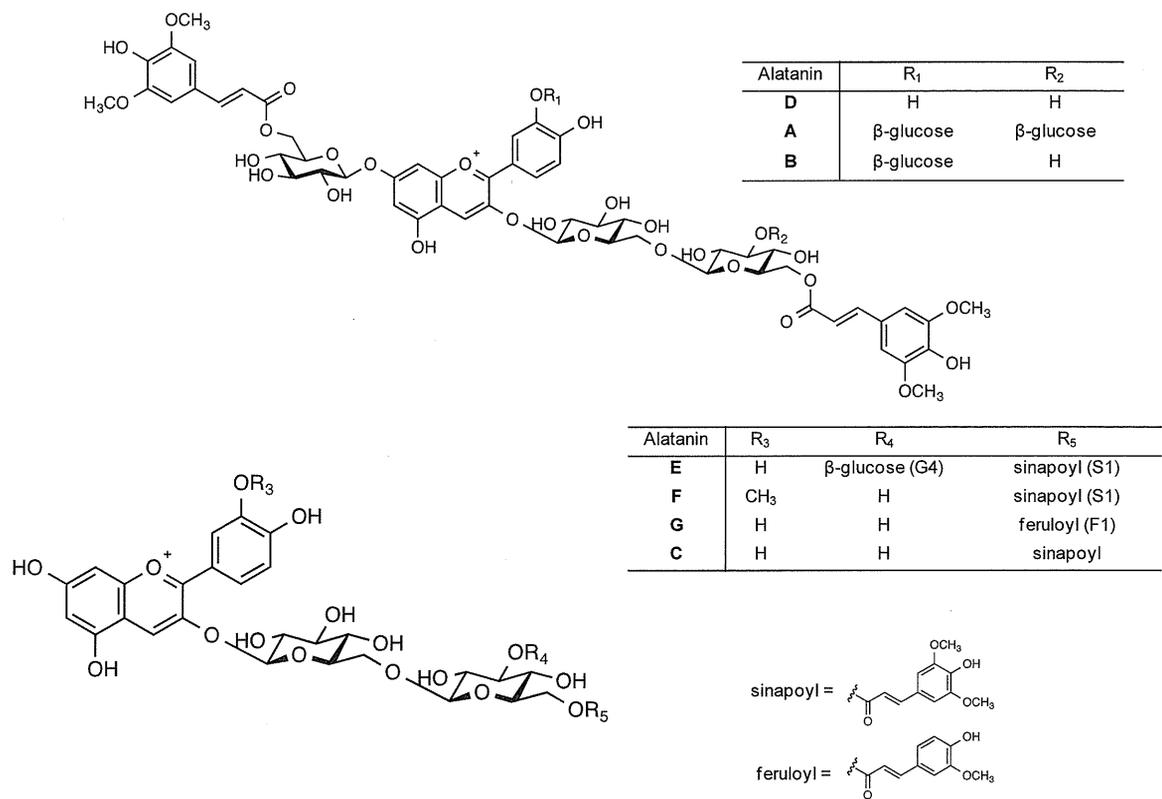


図3 ムラサキヤマイモ成分の構造推定