

食品添加物の安全性確保のための研究

研究代表者 佐藤 恭子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長

研究要旨 食品添加物の安全性確保には、品質を担保するための成分規格の設定及び摂取量の推定が重要であることから、以下の研究を行った。

香料規格及び食品添加物の摂取量推計に関する研究

香料化合物規格の国際整合化に関わる調査研究：食糧農業機関 / 世界保健機関合同食品添加物専門家会議（JECFA）規格の検証が必要と考え、調査研究を行っている。本年度は、昨年度までの調査で、更なる検討が必要と判断した 111 品目について再度詳細に調査するとともに、調査未実施品目のうち 209 品目に対して試験成績表・受け入れ検査の実測値調査を行った。

香料使用量に関わる調査研究：香料化合物の安全性評価は、主として代謝、毒性、摂取量の 3 つの情報に基づいている。それらの重要な要素の一つである摂取量を MSDI (Maximised Survey-derived Daily Intake) 法で算出するには使用量データが必要になる。本年度は、昨年度実施した平成 27 年の我が国における香料化合物使用量の調査結果を過去 3 回の結果と比較検討した。また天然香料については、昨年調査漏れの品目についての追加調査と国際食品香料工業協会のグローバル調査リストにない主要な 7 基原物質について調査を実施した。

食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関わる研究：第 12 回調査として、我が国における指定添加物についてその製造・輸入事業者を対象に平成 28 年度の取扱量についてアンケート調査を行い集計化した。

マーケットバスケット方式による香料の摂取量調査の検討

我が国の流通食品における香料摂取量の実態を明らかにするため、マーケットバスケット（MB）方式による香料の一日摂取量調査について検討を行った。エーテル系及びアルコール系香料を対象に、MB 混合試料に含まれる各種香料の含有量をダイナミックヘッドスペース（DHS）-ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC-MS）を用いて分析し、20 歳以上の喫食量をもとに推定一日摂取量を算出した。

食品香料についての遺伝毒性評価予測システムの研究

食品香料化合物 3942 物質について、Lhasa Limited (UK) の DEREK Nexus と MultiCASE Inc. (USA) の CASE Ultra を用いて、エームス試験結果の定量的構造活性相関（QSAR）予測計算を行った。このうち 58 化合物は両者の QSAR モデルで陽性と判断され、変異原性が疑われた。

食品添加物公定書一般試験法の改良に関する調査研究

質量分析計を用いる試験法の妥当性を検討するため、具体的な試験法としてローズマリー抽出物の JECFA 成分規格案に記載されている GC-MS を用いた揮発性成分定量法の検証を実施した。その結果、GC-MS を用いる試験法の分析精度は、食品添加物成分規格の一般試験法として妥当と考えられたが、定量に用いるイオンの選定が正確な定量を行う上で特に重要であることが示された。

赤外スペクトル測定法に関する調査研究

赤外スペクトル (IR) 法の減衰全反射法 (ATR 法) の確認試験への利用の可能性を検討した。その結果、確認試験に ATR 法を取り入れる場合は、標準品との比較を行うか、プリズムの種類や反射回数などの条件を規定した上で、測定試料毎に参照スペクトルとの比較、或いは波数規定を定めていく必要があると考えられた。

鉛及びヒ素の同時分析法に関する研究

食品添加物中のヒ素及び鉛の同時分析法のための前処理法として鉄共沈法を確立し、ICP-AES 法により同時分析を行った。塩化カリウムを用い、確立した方法の妥当性評価を行った結果、鉄共沈法は真度、精度共に良好な分析法であることが明らかとなった。また、食品添加物 5 試料を用いた添加回収試験の結果より、塩化カリウム以外の食品添加物にも応用が可能であると考えられた。

研究分担者

久保田浩樹 国立医薬品食品衛生研究所
本間 正充 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
北村 陽二 国立大学法人金沢大学
学際科学実験センター
建部 千絵 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

食品添加物の安全性確保には、その品質の確保と適正な使用が欠かせない。品質を担保するためには、成分規格やその試験法の設定が重要であり、食のグローバル化に伴い、これらの国際整合性への考慮が必要となっている。また、食品添加物の適正な使用のためには、摂取量推計等使用実態の把握が重要となることか

ら、以下の研究を行った。

1. 香料規格及び食品添加物の摂取量推計に関する研究

1) 香料化合物規格の国際整合化に関する調査研究

香料化合物の規格は、製品中の不純物の基準というだけでなく、製品の同一性を確認する上でも重要な要素である。平成 22 年度の厚生労働科学研究での調査によると我が国では 2045 品目の香料化合物が使用されているが、公式な規格が定められているものは 134 品目のみである。それ以外の類又は誘導体として指定されている 18 項目の香料化合物については、規格の実態調査と集約を行い(平成 16~21 年度厚生労働科学研究)自主的な規格として日本香料工業会ホームペ

ージに公開されている(以下、自主規格)。一方、これら香料化合物には食糧農業機関/世界保健機関合同食品添加物専門家会議(JECFA)等も規格を設定している。

我が国で行われた国際汎用香料化合物の規格設定、及び平成30年2月に公表された第9版食品添加物公定書改正作業においては、国内に流通している香料化合物の規格値が実測され、いくつかのJECFA規格は香料化合物の実態を反映していないことが確認されている。そのため、香料化合物の規格値に関する実態調査を行い、JECFA規格の検証及び修正案の作成を行うこととした。

本年度は昨年度実施した試験成績表・受け入れ検査の調査結果から、より詳細な検討が必要と判断した品目と今までに更なる調査でも結論が得られなかった111品目の更なる追加調査を行った。また、実測値調査を行っていない279品目中、平成27年の使用量調査結果で使用が確認されなかった69品目と個別指定された1品目(オクタン酸)を除いた209品目の試験成績表・受け入れ検査の実測値調査を行った。

2) 香料使用量に関わる調査研究

これまでに、我が国で流通している香料化合物の使用量調査を、3回(平成13年、平成17年、平成22年)実施し、我が国の香料化合物の使用実態を明らかにしてきた。香料化合物の使用量実態調査は、国内外の規制への順応状況や時代を反映した香料の使われ方の変化の様子を知る上で、また科学的安全性評価のための最新の暴露量データを提供するという

意味でも定期的実施することが望ましいと言える。このような中、国際食品香料工業協会(IOFI)により安全性評価の基礎資料としてJECFAへ最新の暴露量データを継続的に提供するという目的でグローバルな使用量調査が計画された。そこで、2010年に引き続き、2015年の使用量調査を行い、得られたデータをIOFIに提供することにした。

本研究では、2015年1月から12月までの国内における香料化合物の使用量調査の結果を過去3回の調査結果(平成13年、平成17年及び平成22年における使用量調査)と比較、検討した結果について報告する。また、天然香料については、追加調査の結果を報告する。

3) 食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関わる研究

指定添加物にあっては品目ごとに原則としてその許容一日摂取量(ADI)が検討評価されており、行政上各指定添加物の日本人1人1日実摂取量の把握が求められている。指定添加物の摂取量を推定するため、今年度は、食品添加物の生産・輸入業者にアンケート調査を行い、集計化を行った。

2. マーケットバスケット方式による香料の摂取量調査の検討

流通する食品中からの香料の摂取量を明らかとするため、マーケットバスケット(MB)方式による香料の一日摂取量の推計を検討した。本研究の1年目であった昨年度は、エステル系香料に着目し、MB方式によるエステル系香料の一日摂

取量の実態調査を行った。今年度はエーテル系香料並びに脂肪族及び芳香族アルコール系香料を対象に、DHS-GC-MSを用いてMB 1群混合試料中の香料含量の分析を行い、20歳以上の食品の喫食量から各種香料の一日摂取量の推計を行った。

3. 食品香料についての遺伝毒性評価予測システムの研究

本研究では、現在世界中で使用されている食品香料について、定量的構造活性相関(QSAR)を用いてそのエームス変異原性を予測し、既存の試験データと比較することによりQSARの予測精度を検証すると共に、実際の試験データがなく、QSARによって変異原性が強く疑われる香料に関しては、我が国での使用量等の重要性を考慮し、実際のエームス試験の実施を提案し、その安全性を担保することを目的とする。

4. 食品添加物公定書一般試験法の改良に関する調査研究

食品添加物公定書の一般試験法の改良は、規格試験の質の向上ならびに規格基準の精度向上に貢献するものである。また、近年、欧米で認められている食品添加物等の指定要請が増加しており、成分規格設定の迅速化のためには一般試験法の国際統合化を図ることが必須であると考えられる。前年度、国際的な食品添加物規格の一般試験法と日本の食品添加物公定書における一般試験法とを比較し、今後公定書に今後優先的に追加すべき試験法として質量分析計(MS)を用いる試験法が挙げられた。そこで今年度は、

MSを用いる試験法を導入する場合を想定し、その妥当性について検討を行ったので報告する。

5. 赤外スペクトル測定法に関する調査研究

食品添加物等の国内規格の向上などを目的にして、ATR法によるIRの確認試験への利用の可能性を検討した。固体の測定試料として、波数や強度の指標となるポリスチレンを用いて基礎的な検討を行った。次に、液体試料として、異なる屈折率を持つ4種類の低い試料を取り上げ、それぞれについて1回反射と5回反射ATR法によるIR測定法を比較検討した。

6. 鉛及びヒ素の同時分析法に関する研究

第9版食品添加物公定書では多くの食品添加物において鉛及びヒ素の規格が設定されている。本研究では昨年度、鉛試験法において第5法(APDC溶媒抽出法)が設定されている食品添加物(無機塩類)について、ヒ素及び鉛の同時分析を目的とし、食品添加物として汎用されるナトリウム塩やカリウム塩中のヒ素及び鉛を鉄と共沈させることにより、沈殿させたヒ素と鉛を導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-AES法)により同時分析する方法を確立した。

今年度は、カリウム塩を用い、確立した方法の妥当性評価を行い、更に食品添加物試料を用いて確立した方法が適用可能であるか検討を行った。

B. 研究方法

1. 香料規格及び食品添加物の摂取量推

計に関する研究

1) 香料化合物規格の国際整合化に関する調査研究

以下の方法で規格に問題を持つ可能性のある品目を抽出し、問題点を整理した。

(1) 実測値()とJECFA 規格との比較

平成28年度に行った実測値(I)¹の調査で、より詳細な検討が必要となった品目の実測値()²調査とJECFA 規格との比較、加えて今までの更なる調査でも結論が得られなかった品目の更なる実測値()調査とJECFA規格との比較

実測値()の調査品目の選定

実測値()収集のための調査票の検討及び調査の実施

調査結果の集計と各規格項目の比較

(2) JECFA規格と実測値(I)の比較

実測値(I)調査品目の選定

実測値(I)の調査のための調査票の検討及び実施

各規格項目とJECFA規格との比較

次年度、実測値()の調査を行う必要があると思われる品目の抽出

2) 香料使用量に関わる調査研究

(1) 香料化合物使用量調査

昨年度、香料化合物については、日本香料工業会の「食品香料化合物データベース2015」に基づき作成した使用量調査票を用い、平成27年(2015年)1月～

¹ 試験成績表・受け入れ検査値

² 実測値(I)では規格の設定条件が異なる等で妥当性を判断できなかったため、測定項目及び測定条件を限定して得られた値

12月に国内で香料製造に使用した香料化合物の量について、香料を製造している会社から回答を得た。本年度はその結果を元に、過去3回の我が国における使用量調査結果と比較検討を行った。

・推定摂取量の算出

摂取量(μg/人/日)

= (年間使用量(kg) × 10⁹(μg/kg))

/ (消費者人口 × 報告率 × 365日)

消費者人口：日本の総人口(1億2000万人) × 0.1 = 1200万人

報告率：本調査で有効回答した香料会社44社の年間販売量(43438t)を日本香料工業会会員136社の年間販売量(46580t)で除した値(0.93)。

(2) 天然香料使用量調査

昨年度行った使用量調査で調査漏れの品目について追加調査を行った。調査結果については、IOFIのグローバル調査リスト(CDS又はNFC Poundage Survey List)に転記しIOFIへ報告した。また昨年度未調査の品目で過去の天然香料の使用実態調査(平成26年度厚生労働科学研究)で使用量の多かった7基原物質について形態ごとの使用量調査を実施した。

3) 食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関わる研究

調査内容

(1) 調査法 アンケート方式

(2) 調査対象年度 平成28年

(3) 調査対象 指定添加物454品目

(4) 調査内容

調査票：製造及び輸入した品目名

調査票：(調査事項)製造量及び輸

入量、(調査事項)食品向け出荷量、輸出量及び食品以外の用途向け出荷量、総出荷量

(5) 調査対象製造所

指定添加物の製造または輸入の営業の申請を行っている業者の全製造所。なお、該当品を取り扱わないことが確実である事業者は調査対象から除外し、今回の送付先は593事業者(今回は653事業者)であった。

2. マーケットバスケット方式による香料の摂取量調査の検討

ダイナミックヘッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析装置を用いて、マーケットバスケット方式調査用加工食品1群試料(MB1群試料)中に含まれるエーテル系及びアルコール系香料を分析し、20歳以上の成人の喫食量データを基に、摂取量推計を行った。

1) DHS-GC-MS 測定条件

DHS 側条件

サンプルカップ温度 80、サンプルニードル温度 80、バルブオープン温度 125、トランスファーライン温度 150、パージ時間 20 min、パージ流量 40 mL/min、ドライパージ時間 5 min、デソープ時間 6 min、デソープ温度 220、ベーク時間 30 min、ベーク温度 230、スターラー攪拌 弱回転、クライオフォーカス なし

GC-MS 側条件

カラム Stabilwax (60 m × 0.32 mm I.D. 膜厚 0.5 μm)、カラム温度 40 (1 min)→3 /min→130 →5 /min →230、注入口温度 200、インターフ

ェース温度 230、イオン化法 EI、イオン化電圧 70 eV、測定モード SIM
測定質量数

アセタール m/z 103、イソブタノール m/z 74、ブタノール m/z 56、1,8-シネオール m/z 154、イソアミルアルコール m/z 70、1-ヘキサノール m/z 69、*cis*-3-ヘキセン-1-オール m/z 82、2-ヘキセン-1-オール m/z 82、リナロール m/z 154、*dl*-メントール m/z 138、ベンジルアルコール m/z 107、フェネチルアルコール m/z 122、酢酸- d_3 エチル m/z 91、イソアミルアルコール-1,1- d_2 m/z 72。

2) DHS-GC-MS 用試験溶液の調製

MB 1 群試料約 1.0 g を VOA バイアルに採り、攪拌子、塩化ナトリウム 5 g 及び水 15 mL を加え、次いでマイクロシリンジを使用して内部標準溶液を 5 μL 注入し、直ちにキャップで密封した後、攪拌子でバイアル中の試料を良く攪拌し、DHS-GC-MS 用試験溶液とした。

3. 食品香料についての遺伝毒性評価予測システムの研究

1) 対象物質

日本香料工業会から食品香料化合物データベース2015年版の提供を受けた。これには4549物質の食品香料の、名称、構造式、Cas登録番号、スマイルズ、分子量が掲載されている。

2) QSARモデル

(1) DEREK Nexus

化合物の部分構造と毒性学的作用との間の既知の関係に基づく知識ルールを適用して、毒性作用を予測する。

(2) CASE Ultra statistical model

アラートはマシンラーニング技術を使用してトレーニングデータから自動的にマイニングされる。化学構造と、その毒性結果のみがトレーニングデータに必要なインプットである。今回利用したエームス変異原性のためのCASE Ultraの主なモデルは、GT1_AT_ECOLI、GT1_A7B、PHARM_ECOLI及びPHARM_SALMの4つのモジュールで構成されている。

4. 食品添加物公定書一般試験法の改良に関する調査研究

GC-MS を用いる分析法の妥当性検証試験は、第 82 回 JECFA 会議にて審議されたローズマリー抽出物 (Rosemary Extract) の成分規格案 (Tentative 規格) 1) の純度試験に記載されている GC-MS を用いた揮発性成分定量法に基づいて行った。

1) GC-MS 測定条件

測定は、標準液及び試料溶液それぞれ調製 n=1 につき 2 回ずつ行った。また、試料溶液中の化合物は、スキャンモード測定時に標準液から得られる標品のピークと、保持時間及びマススペクトルを比較することにより同定した。

カラム HP-5MS (30 m×0.25 mm、膜厚 0.25 µm、Agilent 製) カラム温度 70 (1 min) 5 /min 130 10 /min 240 (1 min)、注入口温度 250、キャリアーガス He、流量 1 mL/min、スプリット比 100 : 1、注入量 1.0 µL、四重極 150、イオン源 230、インターフェース 250、イオン化法 EI、イオン化エネルギー 70 eV、測定モード スキャン (確認時) 及び SIM (定量時)

2) 各揮発性成分含量の算出

JECFA の成分規格案に記載の含量算出式は誤りがあると思われた。試料溶液には内標準物質を添加していることから、内標準法にて各揮発性成分含量を算出することとした。すなわち、5 種の揮発性成分 (-)-borneol、(-)-bornyl acetate、(-)-camphor、eucalyptol 及び verbenone) それぞれについて、縦軸に IS のピーク面積に対する被検成分のピーク面積の比を、横軸に IS の濃度に対する被検成分濃度の比をとった検量線を作成した。JECFA の規格案には、定量イオンについて指定がなかったため、あらゆるイオンの組み合わせで検量線を作成した。試料に含まれる各成分の含量 (mg/kg) は以下の式で算出した。

$$\text{成分含量 (mg/kg)} = \frac{A_S/A_{IS}-b}{a} \times C_{IS} \times \frac{V}{W}$$

ただし、 A_S は試料溶液中の成分のピーク面積、 A_{IS} は試料溶液中の内標物質のピーク面積、 a 、 b はそれぞれ検量線の傾きと切片、 C_{IS} は試料溶液における内標物質の濃度 ($\mu\text{g/mL}$)、 V は試料溶液量 (mL)、 W は用いた試料の質量 (g) である。

3) 試験法の妥当性評価

目的成分の定量法として GC-MS を用いた方法が妥当かどうかを参考文献 2)、3) に従い評価した。

5. 赤外スペクトル測定法に関する調査研究

固体試料のポリスチレンは、波数校正用の市販品 (日立製作所製) を用いた。液体試料のプロピオン酸エチル、ヘキサ

ン酸エチル、酢酸フェネチル、N-メチルアントラニル酸メチルは食品添加物試料（香料）を用いた。これらの試料について、ATR法によりIRを測定した。反射回数による違いを検討するため、1回反射、または5回反射ATRモジュールを装着した装置で測定し、また、1回反射ATRにおいては、プリズムの違いを検討する目的で、ダイヤモンドプリズム、ZnSeプリズムでの測定を行った。5回反射ATRではダイヤモンドプリズムは製造が非常に困難であり、販売されていないため、ZnSeプリズムのみでの測定を行った。

本研究でのATR法の測定には、一回反射ATR装置（入射角45°）または5回反射ATR装置（中央での入射角45°）を装着したJASCO FT/IR-4100（日本分光社製）を用い、分解能4 cm⁻¹（96回繰り返し）測定領域は4000～600 cm⁻¹で測定を行なった。

6. 鉛及びヒ素の同時分析法に関する研究

1) 試料

塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナトリウムは食品添加物用を用いた。

2) 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の抽出法

(1) 試料液の調製

試料2 gにAs・Pb混合標準原液0.8 mLを添加(Asとして3 µg/g、Pbとして2 µg/g相当添加)し、室温で30分間放置した後、硝酸(1→100)溶液20 mLを加え溶かし、アンモニア水でpH9となるように調整し、試料液とした。

(2) 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の精製

試料液に次亜塩素酸水0.2 mLを加えた後、鉄溶液0.5 mLを加えた後、1 M酢酸アンモニウム溶液5 mLを加え、アンモニア水でpH9に調整した後、10分静置した。必要に応じて遠心分離（3000 rpm、5分間）し、得られた沈殿を水10 mLで洗浄し、沈殿を硝酸（1→10）溶液1 mLに溶かし水で10 mLとし試験溶液とした。なお、試料を用いず、試料と同様に操作したものを空試験溶液とした。

3) ICP-AES法によるヒ素及び鉛の定量

試験溶液、標準溶液及び空試験溶液につき、ICP-AES法により次の波長における発光スペクトル線の発光強度を測定した。標準溶液の発光強度より検量線を作成し、試験溶液強度から空試験溶液吸光度を差し引いた値から、検量線を用いて試験溶液中のヒ素及び鉛の濃度を求め、試料中の各元素量を算出した。

元素	測定波長
As (III)	193.76
Pb	220.353

4) 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の抽出法の妥当性評価

(1) 検量線の直線性の確認

As・Pb混合標準液を用いて検量線(n=3)を作成しそのばらつきを求めた。

(2) 装置検出下限 (ILOD)

日本工業規格（JIS）発光分光分析通則（JIS K 0116）の4.8.4 管理のための測定に従い、装置検出下限（検量線用ブランク溶液を連続10回測定したときに得られる信号の標準偏差の3倍の信号を与える濃度。装置検出限界ともいう。）を

求めた。

(3) 方法定量下限 (MLOQ)

JIS発光分光分析通則 (JIS K 0116) の4.8.4 管理のための測定に従い、方法定量下限 (空試験溶液を連続 10 回測定したときに得られる信号の標準偏差の 14.1 倍の信号を与える濃度。)を求めた。

(4) 併行精度及び室内再現精度

塩化カリウム 2 g に As・Pb 混合標準原液を下記の濃度となるように添加し (n=5)、30分室温で放置した後、硝酸 (1→100) 溶液 20 mL を加え溶かし、アンモニア水で pH9 となるように調整し、試料液 (n=5) とし、得られた試験溶液について、ヒ素及び鉛を測定し、添加回収率を求め、併行精度 (RSD_r) を算出した。同様の操作を異なる 3 日間繰り返し、それぞれの回収率を求め、室内再現精度 (RSD_{ip}) を求めた。

元素	濃度 (µg/g)		
As	1.5	3	6
Pb	1	2	4
As・Pb混合標準原液 (As 7.5、Pb 6 µg/mL) 添加量 (mL)	0.4	0.8	1.6

5) 食品添加物試料を用いた添加回収試験

食品添加物試料 (塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム及び硫酸ナトリウム) 2 g に As・Pb 混合標準原液 0.8 mL を添加 (As として 3 µg/g、Pb として 2 µg/g 相当添加) し、室温で 30 分放置した後、添加試料とし、試験溶液を調製した。得られた試験溶液について、ヒ素及び鉛を測定し、回収率を求めた。なお、硫酸ナトリウムに

ついては試料液の調製の際、硝酸 (1→100) 溶液 20 mL を加えた後 5 分間加熱し、冷後アンモニア水で pH9 に調整し、試料液とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理面にかかわる事項はない。

C. 研究結果及び考察

1. 香料規格及び食品添加物の摂取量推計に関する研究

1) 香料化合物規格の国際統合化に関する調査研究

(1) 実測値 () と JECFA 規格との比較

実測値 () の調査品目の選定

平成 28 年度の実測値 () 調査について、規格項目毎に再度整理、検討した判断記号に従い、再検証を行った。その結果 16 品目の判断を変更し、その中の 8 品目は更なる調査が必要と判断した。また、今までの実測値調査で、追加の調査が必要と思われたものを加えた 111 品目を実測値 () の調査品目とした。

実測値 () の収集のための調査票の検討及び調査の実施

調査対象とする規格項目は、JECFA 規格にある項目を必須とし JECFA 条件で実測してもらうこととした。加えて、自主規格での設定項目である含量、含量の範囲 (異性体含むかどうか)、定量法、屈折率、比重、酸価、融点・凝固点、(比) 旋光度で実測データがある場合はその値も報告してもらうこととした。また、測定条件毎の記入欄を設け誤記を防止するようにした。加えて、過去の調査で、ガ

スクロマトグラフィー(GC)による定量の際、異性体、不純物量の確認が必要と思われる品目に対して、GC チャート及びその帰属データの提出も依頼した。本年度は平成 27 年に使用報告があった会社すべてを対象として調査を行った(平成 29 年 5~8 月)。

調査結果の集計と各規格項目の比較
含量情報がないデータは不採用とした。調査対象の 111 品目中 80 品目で 2 製品以上の測定値が得られた。各測定値が JECFA 規格を満たしているか、満たしていない場合はどのような違いがあるかを規格項目毎に判断記号を付け、昨年度までの実測値()及び実測値()のデータも含めて整理した。明らかな異常値が報告されている製品は外れ値として集計には用いなかった。以下各規格項目に関しては 2 製品以上の測定値が得られた 80 品目について述べる。

- a 含量：JECFA 規格を満たしているものは 54 品目(O、)、JECFA 規格に問題があるが実測データより規格案が設定できたものは 11 品目(XO)、更なる調査が必要なものは 15 品目(X、P)であった。
- b 融点・凝固点：JECFA 規格で設定があった 19 品目のうち、JECFA 規格を満たしているものは 9 品目(O、OK、OW、OY、 、 Y)、JECFA 規格に問題があるが実測データより規格案が設定できたものは 7 品目(XO、SO、NO)、更なる調査が必要なものは 3 品目(X、ND)であった。
- c 屈折率：JECFA 規格で設定があった 67 品目のうち、JECFA 規格を満たし

ているものは 48 品目(O、OK、OY、)、JECFA 規格に問題があるが、実測データより規格案が設定できたものは 10 品目(XO、X、S、F)、更なる調査が必要なものは 9 品目(X、P)であった。

- d 比重：JECFA 規格で設定があった 67 品目のうち、JECFA 規格を満たしているものは 32 品目(O、OY、)、JECFA 規格に問題があるが、実測データより規格案が設定できたものは 24 品目(XO、X、S、F)、更なる調査が必要なものは 11 品目(X、P)であった。
- e 酸価：JECFA 規格で設定があった 45 品目のうち、JECFA 規格を満たしているものは 29 品目(O、)、JECFA 規格に問題があるが、実測データより規格案が設定できたものは 10 品目(XO、F)、更なる調査が必要なものは 6 品目(X、P)であった。
- f (比)旋光度：2 品目に JECFA 規格で設定があった。JECFA 規格の上限値もしくは下限値ぎりぎりのため変更した方が良いものが 1 品目(OY)、測定温度を 25 から 20 に変更し規格設定できたものが 1 品目(XO)あった。

総合判定

2 製品以上の測定値が得られた 80 品目について(3)の各規格項目の検証結果を総合的に検討した。JECFA 規格を満たしているものは 25 品目(総合判定：O、OK、OW、OY、 、 Y)、JECFA 規格に問題があるが、実測データより規格案が設定できたものは 36 品目(XO、X)、更なる調査が必要なものは 19 品目(X)

であった。

JECFA 規格に問題があり、かつ現時点では規格案の設定ができないものは 19 品目（総合判定：X）あったが、それに加え 1 製品もしくは全く測定値が得られなかったものが 31 品目（総合判定：ND）あり、これら計 50 品目は次年度以降に更なる調査を行う予定である。

(2) JECFA規格と実測値()の比較

実測値()調査品目の選定

調査対象品 1088 品目中、平成 28 年度までに実測値調査を行っていない 279 品目から、平成 27 年に使用されなかった 69 品目と個別指定された 1 品目を除いた 209 品目を実測値()の調査品目とした。

実測値()の調査のための調査票の検討及び実施

調査対象とする規格項目はこれまでの自主規格での設定項目である含量、含量の範囲（異性体含むかどうか）、定量法、屈折率、比重、酸価、融点・凝固点、（比）旋光度とした。また、測定条件毎の記入欄を設け誤記を防止するようにした。本年度は平成 27 年に使用報告があった会社すべてを対象として調査を行った（平成 29 年 5～7 月）。

各規格項目と JECFA 規格との比較

含量情報がないデータは不採用とした。調査対象の 209 品目のうち、85 品目で 2 製品以上の測定値が得られた。検討に必要なデータを 2 個以上得られなかった 124 品目（ND）については、次年度実測値()の調査対象品目とし、本年度は検討しなかった。検討に必要なデータを得ら

れた品目については、JECFA 規格を満たしているか、満たしていない場合はどのような違いがあるかを規格項目毎に判断記号を付け、整理した。明らかな異常値が報告されている製品は外れ値として集計には用いなかった。以下各規格項目に関しては 2 製品以上の測定値が得られた 85 品目について述べる。

a 含量：JECFA 規格を満たしているものは 78 品目（O、OK、OY、 ） JECFA 規格に問題があるが、実測データより規格案が設定できたものは 4 品目（XO） 更なる調査が必要なものは 3 品目（X）であった。

b 融点・凝固点：JECFA 規格で設定があった 6 品目のうち、JECFA 規格を満たしているものは 4 品目（O、OK） JECFA 規格に問題があるが実測データより規格案が設定できたものは 2 品目（XO） 更なる調査が必要なものはなかった。

c 屈折率：JECFA 規格で設定があった 79 品目のうち、JECFA 規格を満たしているものは 67 品目（O、OW、OY、 、 W） JECFA 規格に問題があるが、実測データより規格案が設定できたものは 9 品目（XO、SO、S ） 更なる調査が必要なものは 3 品目（X）であった。

d 比重：JECFA 規格で設定があった 80 品目のうち、JECFA 規格を満たしているものは 63 品目（O、OK、OW、OY、 ） JECFA 規格に問題があるが、実測データより規格案が設定できたものは 12 品目（XO、SO、S 、 F） 更なる調査が必要なものは 5 品目（X）

であった。

e 酸価：JECFA 規格で設定があった 37 品目のうち、JECFA 規格を満たしているものは 31 品目（O、OK、 ）
JECFA 規格に問題があるが、実測データより規格案が設定できたものは 5 品目（XO、F）、更なる調査が必要なものは 1 品目（X）であった。

次年度、実測値（ ）の調査を行う必要があると思われる品目の抽出

2 製品以上の測定値が得られた 85 品目について(3)の各規格項目の検証結果を総合的に検討した。JECFA 規格を満たしているものは 60 品目（総合判定：O、OK、OW、OY、 、 W）、JECFA 規格に問題があるが、実測データより規格案が設定できたものは 22 品目（XO）、更なる調査が必要なものは 3 品目（X）であった。

更なる調査が必要なもの 3 品目（X）及び検討に必要なデータを 2 個以上得られなかった 124 品目（ND）の計 127 品目は次年度、実測値（ ）の調査を行う必要があると思われるが、今回のデータを精査し、JECFA 規格との整合性確認の可能性を考慮する必要もあると考える。

2) 香料使用量に関わる調査研究

- 香料化合物使用量調査 -

有効回答会社44社から回収された回答データの整理、精査、検討を行った。基本回答票で回答がなく追加回答票で回答があった品目は50品目弱あった。名称を精査した結果、基本回答票にない新規化合物は2品目だけであった。過去に使用報告がなく、今回新規に使用が報告さ

れた品目は77品目あった。そのうち17品目が新規指定された香料化合物であった。

(1) 本調査の報告率

2015年1月～12月の有効回答会社44社の香料化合物年間販売量から日本香料工業会会員136社の年間販売量に基づき算出した報告率は、93%であった。本調査においても過去と同様に高い報告率が得られたことから、本調査結果は国内における香料化合物の使用実態を十分に反映していると言える。

(2) 日本で使用されている香料化合物の品目数と年間使用量

調査結果から国内において2015年中に使用された香料化合物の概要を過去の調査結果（H22：2010年の使用実態、H17：2005年の使用実態、H13：平成13年直近1年間の使用実態）と比較した。

総使用品目数は1937品目で平成22年の2045品目より、108品目減少した。個別指定品目は平成27年12月までに54品目が新規指定されているが、そのうち使用の報告があった品目は48品目であった。類指定品目数は平成22年の1936品目から127品目減少し、平成13年の調査から減少傾向にある。

総使用量は1249tで平成22年の1264tとほぼ同じ数量であった。平成27年の個別指定品目の使用量と類指定品目の使用割合は、新規指定品目の使用量が増えた分、個別指定品目の使用量が増えた。そのため個別指定品目の使用割合が若干高くなっている。

類別に見た品目数及び使用量

香料化合物の類別の年間使用品目数を過去の調査結果と比較した。

エステル類が34.3% (H22 : 36.1%、H17 : 38.8%、H13 : 44.9%)、ケトン類10.9% (H22 : 11.1%、H17 : 11.1%、H13 : 9.5%)、エーテル類8.0% (H22 : 8.3%、H17 : 8.9%、H13 : 9.9%)で全体の約半分を占め、次いで脂肪族高級アルコール類7.7% (H22 : 7.7%、H17 : 7.8%、H13 : 7.1%)となっている。個別指定香料化合物は指定作業が進むに従って品目数が増え、全体の使用品目数が減少傾向にあるので占有率が6.6% (H22 : 5.4%、H17 : 4.1%、H13 : 2.8%)と高まってきている。

香料化合物の類別の年間使用量を過去の調査結果と比較した。

個別指定香料化合物の使用品目数はそれほど多くないものの、重要な香料化合物が多く含まれ、64.2% (H22 : 62.8%、H17 : 66.3%、H13 : 66.5%)と高い占有率となっている。ついでエステル類10.7% (H22 : 11.8%、H17 : 9.2%、H13 : 8.4%)、ケトン類6.6% (H22 : 6.5%、H17 : 5.6%、H13 : 6.7%)、脂肪酸類5.3% (H22 : 6.0%、H17 : 5.1%、H13 : 3.4%)となっている。

使用量別の品目数

我が国で使用されている香料化合物について、使用量ごとの品目数及び占有率を過去の調査結果と比較した。

今までの調査と同様、今回の調査でも我が国で使用されている香料化合物について、少量で使用されている品目が極めて多数あることが明らかとなった。すなわち0.01 kg (10 g) 以下のものが190品目(数として全体の9.8%)、0.01~0.1 kgが239品目(12.3%)、0.1~1 kgが386品目(19.9%)と、1 kg以下が全体の品目

数の42.1%を占め、100 kg以下のものが83.2%を占めていた。一方、比較的使用量の多い化合物については、それほど品目数が多くはなく、1000 kgを超えて使用されているものは114品目(5.9%)に過ぎない。そのうちの46品目は、食品衛生法施行規則別表第1に個別名で収載されている品目に該当するものであった。

平成27年と平成22年の調査結果を比較すると使用量が1 kg以下の化合物に関しては品目数が72減少した。

これを平成13年から平成17年、平成17年から平成22年の変化と比べると、1 kg以下で使用されている品目数の減少が大幅に少なくなった。これは日本で独自に少量使用されていた品目の合理化が進み、また国際的に使用可能な品目への集約が進んだ結果と考えられる。

国内で使用されている香料化合物の推定摂取量

推定摂取量が10000 µg/人/日以上は7品目、1000~10000 µg/人/日は51品目、100~1000 µg/人/日は117品目であることから、摂取量が100 µg/人/日を超える品目は175品目(全品目中の9.0%)に過ぎない。

1937品目の推定総摂取量は317032 µg/人/日、平均推定摂取量は164 µg/人/日であった。また上位25品目が2/3を占めていたことから、それらを除いた平均推定摂取量を計算すると53 µg/人/日であった。

更にJECFAの香料評価法判断樹において安全性に懸念なしと判断される1.5 µg/人/日以下の品目数は、1167品目(全品目中の60.2%)であった。

この様に国内で使用されている香料化合物の大半の推定摂取量は過去の調査と同様に極めて少量であった。

新規指定香料化合物の使用実態

平成16年12月より平成27年9月までに新規指定された香料化合物54品目の本調査により得られた使用量より推定摂取量を求めた。

食品安全委員会評価時に使用した欧米の推定摂取量と比較した結果、プロパノール、イソアミルアルコール、2-メチルブタノール、2,5-ジメチルピラジン、2,6-ジメチルピラジン、2-メチルブタナール、2-メチルピラジン、2,6-ジメチルピリジン、2-エチル6-メチルピラジンの9品目が評価時に使用した推定摂取量の値を越えていた。しかし各香料化合物の構造クラス閾値と比較した結果、イソアミルアルコール以外は構造クラス閾値を下回っていた。また、イソアミルアルコールに関しても、食品安全委員会の評価時に使用した90日間反復投与試験のNOAEL 295 mg/kg 体重/日と今回調査した推定摂取量(2346 µg/人/日)を日本人平均体重(55.1 kg)で割ることで算出される体重1kg当たりの推定摂取量(0.0426 mg/kg 体重/日)とを比較し、安全マージン6925が得られた。この値は国際汎用香料化合物の評価時に90日間反復投与試験の適切な安全マージンとされた1000を上回っていることから、安全性に懸念はないと考えられる。

したがって新規指定香料化合物は現時点での使用量において安全性に懸念が無いことが本調査により実証された。

- 天然香料使用量調査 -

21品目について、追加調査を行った。

(1) 追加調査

日本では天然香料に該当するが IOFI の調査では化合物リスト「CDS Poundage Survey List」に記載されていたため昨年度調査対象とならなかった品目及び FEMA GRAS 26 以降に記載された天然香料など調査漏れがあった 21 品目について、追加調査票を作成し、調査を実施した。

(2) 詳細調査

IOFIの調査リストには含まれていないが、過去の天然香料の使用実態調査(平成26年度厚生労働科学研究)で使用量の多かった7基原物質について調査した。

3) 食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関わる研究

(1) 調査票回収結果

今回は初年度の第1次調査で77.0%の回収率を挙げていて、前回の初年度の水準(74.1%)を上回った。

(2) 調査票の課題への対応

今回も従来の調査票を見直して、調査票回答者にとっての「分かり易さ」と「回答作業の効率化が」図れるように留意した。結果として第1次調査での高回答率維持に反映されたものと見ている。

(3) 調査結果

回収された調査票もとにデータをコンピュータ入力し集計を行い下記の集計資料を作成した。

指定添加物 用途別 全出荷量、食品向け出荷量、輸出货量

指定添加物 添加物番号順 全出荷量、食品向け出荷量、輸出货量

2. マーケットバスケット方式による香料の摂取量調査の検討

1) 分析条件の検討

国内において使用量が多い13種のエーテル系及びアルコール系香料を対象に、DHS-GC/MSを用いた分析法の検討を行った。今回の分析条件では検出できなかったフルフリルアルコールを除き、最終的に12種の香料を対象とした。

2) MB方式による一日摂取量の推計

MB方式による摂取量は各食品群の喫食量に大きく依存することから、全喫食量の63.4%を占める1群MB試料に着目し対象香料の含有量を調べた。その後、20歳以上の喫食量をもとに推定一日摂取量を算出した。

今回MB方式により調査した香料のうち、最も一日摂取量が多かったのはイソアミルアルコール 9.7 mg/人/日であり、イソブタノール 2.6 mg/人/日、フェネチルアルコール 4.1 mg/人/日であった。その他の香料は定量限界未満であったため、摂取量は0 mg/人/日となった。

イソアミルアルコールは食品成分として果実、野菜、乳製品、酒類等に含まれるとの報告があり⁴⁾、また、イソブタノール及びフェネチルアルコールも同様に天然由来の成分として含まれることから、今回算定されたMB方式による推定一日摂取量は天然由来の食品成分と添加香料の合計量と考えられた。

平成24年度厚生労働科学研究における香料化合物の使用量に基づいたMSDI法による摂取量の推定⁵⁾では、イソブタ

ノール0.184 mg/人/日、イソアミルアルコール0.623 mg/人/日、フェネチルアルコール1.039 mg/人/日と推計されており、今回の調査結果は、使用量による摂取量推定の結果より高い値となった。

一般に生産量や使用量に基づく推計では生産・流通や食品廃棄によるロス分も含まれるため摂取量が多く推計される傾向があり、MB方式による一日摂取量の方が低いことが多いが、Stofbergらによる報告⁶⁾によると、食品中にもともと存在する成分としてのイソアミルアルコール摂取量は、意図的に添加されたものの95倍とされており、今回のMB方式によるイソアミルアルコールの推定摂取量の大半は食品由来と考えられた。イソブタノールとフェネチルアルコールも食品由来の成分として含まれることから、同様にMB方式の結果が高くなったと推察された。

3) 一日摂取量のADIとの比較

JECFAでADIが定められている食品添加物について、ADI (mg/kg 体重/日) に対する体重あたりの一日摂取量 (mg/kg 体重/日) の割合 (対ADI比) を求めた。体重あたりの一日摂取量 (mg/kg 体重/日) は、一人あたりの一日摂取量 (mg/人/日) を20歳以上の平均体重 (58.6kg) で割って求めた (表9)。なお、アセタール、イソブタノール、ブタノール、1,8-シネオール、1-ヘキサノール、cis-3-ヘキセノール、2-ヘキセン-1-オール、フェネチルアルコールに関しては、JECFAにおいて「Acceptable」と評価しているため、算定から除外した。

ADI が設定されている香料のうち、一日摂取量が得られたのはイソアミルアルコールのみであり、イソアミルアルコールについて対 ADI 比を求めたところ、5.5%であり、ADI に比べて摂取量は十分に低いことが示された。

3. 食品香料についての遺伝毒性評価予測システムの研究

食品香料化合物データベース 2015 年版掲載物質 4549 物質から、混合物、構造式が記載されていない物質を除き、3942 物質を電子データ化した。この 3942 物質について、DEREK Nexus と CASE Ultra を用いてエームス試験結果 QSAR 予測計算を行ったところ、367 物質はいずれかにおいて陽性の予測結果を示した。また、そのうち 58 化合物は両 QSAR モデルにおいて陽性の予測結果を示した。このうち 17 化合物に関しては既存のエームス試験データが存在しており、11 化合物で陽性、4 化合物で擬陽性、2 化合物で陰性の結果であった。従って、QSAR に陽性予測率は $15/17=88\%$ と計算できる。試験データのいない 41 化合物に関してはエームス変異原性が強く疑われるため、実際に試験を行い、確認する必要がある。

陽性と判定された物質の以下に構造別に分類した。ケトン類、アルデヒド類が多く認められ、一方、インドール及びその誘導体、脂肪酸類、脂肪族高級アルコール類、テルペン系炭化水素類、チオエーテル類、フェノールエーテル類、フェノール類、芳香族アルコール類、ラクトン類は存在しなかった。この結果は香

料のローカル QSAR モデルの開発に重要な知見を与える。

一方、3942 物質のうち、QSAR 予測ができなかったものは、DEREK で 55 物質、CASE Ultra では 103 物質であった。興味深いことに DEREK Nexus と CASE Ultra で対象物質の重複が無かった。

DEREK で予測できなかった化合物の全ては芳香族アルデヒド類、脂肪族高級アルデヒド類であり、分子量は 220 以下であった。14 物質については実際のエームス試験データがあり、全て陰性であった。

上記で述べた様にアルデヒド類には QSAR で陽性予測のものも有り、実試験によりケミカルスペースを拡大することが重要である。

CASE Ultra で予測できなかった 103 化合物にはアルデヒド類はなく、種類は多岐に及んでいた。特にチオエーテル、チオール等の硫黄を含む化合物が多かった。エームス試験が実施されている化合物が 7 化合物あったが、全て陰性であった。DEREK とは対照的に、陽性の可能性の少ない、チオエーテル類、チオール類、脂肪酸類、脂肪族高級アルコール類が含まれる。CASE Ultra ではスルフィド (sulfide) 構造を持つ物質や、炭素の三重鎖構造や、二重鎖構造が連続する構造を持つ物質の予測計算が難しいと考えられているが、今回の解析でもそのことが指摘される。また、オキサゾールやピロール構造を持つ化合物も CASE Ultra では予測計算が難しいと思われる。しかしながら CASE Ultra で予測できない化合物の多くは陰性である可能性が高く、

この情報は両 QSAR 結果からの専門判断の際に重要であり、DEREK のような知識ベース QSAR モデルで陰性であれば、CASE Ultra の結果不要かもしれない。

4. 食品添加物公定書一般試験法の改良に関する調査研究

1) GC-MS による揮発性成分の確認

JECFA 成分規格案において、Rosemary Extract は *Rosmarinus officinalis* L. の乾燥葉をアセトンまたはエタノールにより抽出したものと定義されている。一方、日本で入手可能である、本研究で用いたローズマリー抽出物3製品のうち、2製品 (A1及びA2) の抽出溶媒には含水アルコール、1製品 (B1) にはヘキサンがそれぞれ使用されており、JECFA成分規格案で想定されるものとは異なる。そこで、GC-MSによる揮発性成分の定量を行う前に、測定対象としている5種の揮発性成分((-)-borneol、(-)-bornyl acetate、(-)-camphor、eucalyptol 及びverbenone) が、これら製品に含まれているかを確認した。その結果、試料溶液25 mg/mLを用いて分析したところ、B1及びA2からはこれら5種が検出されたが、A1ではいずれの化合物も検出されなかった (検出限界0.118 ~ 1.97 µg/mL)。

2) GC-MS による揮発性成分定量法の妥当性評価

a) ピークの形状

標準液 (濃度 20 µg/mL) を分析し、検出イオンごとにクロマトグラムを抽出した。4-heptanone と eucalyptol の検出

イオンである m/z 43 で抽出したクロマトグラムでは、他のイオンの場合と比較してベースラインが乱れていた。さらに、 m/z 95 で抽出したクロマトグラムでは、標準液の濃度が濃くなると bornyl acetate のピークの直後に別のピークが検出され、このピーク分離は不良であった。それ以外のピークは、対称度 (シンメトリー係数) は 1.5 以下であり、また良好に分離していた。

b) 検量線の直線性

JECFA の規格案には、定量イオンについての指定がなかったため、あらゆるイオンの組み合わせで検量線を作成したところ、どのイオンの組み合わせで検量線を作成するかで R^2 値に多少の変動があった。

c) 検出限界と定量下限

各化合物の検出限界及び定量下限は、JIS 通則 K0114:2012 に従って求めた S/N 比が 3 及び S10 となることとした。検出限界又は定量下限付近の濃度で 6 回繰り返し測定を行い、検出限界と定量下限を推定したところ、どのイオンを定量用に選択するかによって、検出限界や定量下限値に最大で 10 倍程度の違いがあった。

d) 精度

妥当性評価は、分析者 2 名が 1 日につき 2 回分析試料を調製・分析し、これを 3 日間繰り返して得たデータに対し行った。先述の検量線を用いて試料中の各揮発性成分含量を算出し、得られた値に対し一元配置分散分析を行い、精度を算出した。いずれの化合物のいずれのイオンの組み合わせにおいても試験法としては

適と判定された。

3) 定量に用いるイオンの違いによる定量値の違いの検証

JECFA規格案では、揮発性成分の定量に用いるイオンの m/z 値が設定されていなかったため、本研究ではあらゆるイオンの組み合わせについて定量値を算出した。そこで、用いるイオンによって得られる定量値に違いがあるかどうかを調べるため、1つのイオンの組み合わせを1つの群とみなし(eucalyptolと(-)-bornyl acetateは、それぞれ9群ずつ、(-)-borneol、(-)-camphor及びverbenoneはそれぞれ6群ずつ、各群12個のデータ(1日2データ×3日間×分析者2名))、群間で定量値に差があるかどうかを一元配置分散分析により検定した。その結果、eucalyptol、borneol、(-)-camphor及びverbenoneについては危険率5%のとき F 値は棄却域になく、本検定においては定量イオンの違いによる定量値に差があるとはいえないと考えられた。しかし、bornyl acetateでは危険率を1%としても F 値が棄却域にあり、定量イオンの違いによる定量値の差があると考えられた。Bornyl acetate由来の m/z 95のイオンを使用して定量した群を除くと、その F 値は危険率を5%にしても棄却域から外れた。ピーク形状の項でも述べたとおり、 m/z 95では、標準液の濃度が濃くなるとbornyl acetateのピークの直後に別のピークが検出され、かつ、そのピーク分離が不良であった。これが、 m/z 95のイオンを用いたbornyl acetateの定量値に影響し、他のイオンで定量した値と比べてずれが大きくなった可能性が考えられた。以上

のことから、GC-MS分析法においては定量イオンの選択が定量値に大きな影響を与えるため、その吟味の重要性がGC-MS分析法を試験法として導入する際の課題として挙げられた。

4) JECFA 成分規格案の規格値との比較

JECFA の成分規格案において、ローズマリー抽出物に含まれる5種の揮発性成分量は、ローズマリー抽出物中のカルノシン酸及びカルノソール含量との比により規定されている。すなわち、カルノシン酸とカルノソールの総量(w/w%)を5種の揮発性成分の総量(w/w%)で除した値が15より大きいこと、とされている。A2についてカルノシン酸とカルノソールの総量(w/w%)をJECFA成分規格案に準じてHPLCにて求めたところ、13.7%であった。一方、A2の揮発性成分は、eucalyptolが0.0124%(全イオンの組み合わせから算出した定量値の平均値。以下同じ。ただし、bornyl acetateは m/z 95由来のイオンで測定した定量値を除いた平均値)、camphorが0.1476%、borneolが0.2857%、verbenoneが0.0812%、bornyl acetateが0.0357%であり、5種の総量(w/w%)は0.563%であった。従って、カルノシン酸とカルノソールの総量(w/w%)を5種の揮発性成分の総量(w/w%)で除した値は24.4であり、これはJECFAの成分規格値(15より大きいこと)を満たしていた。

5. 赤外スペクトル測定法に関する調査研究

プリズムの種類による差、反射回数の影響、測定試料の屈折率の影響について検討した。

1) 固体試料を用いた検討

測定に用いるATR装置のプリズム及び反射回数による違いを検討するため、固体試料としてポリスチレンを用い、1回反射ATRではダイヤモンドプリズム及びZnSeプリズム、また、5回反射ATR装置でZnSeプリズムを用いて測定した。

固体試料としてのポリスチレンでの検討において、1回反射ATRで、ダイヤモンドプリズムとZnSeプリズム間で顕著な違いは見られなかった。この結果は、ダイヤモンド、ZnSeプリズムの屈折率がいずれも約2.4とほぼ同じ値であることから、ATRの原理を反映した妥当な結果であると考えた。しかしながら、低波数側で差が生じたのは、ダイヤモンドとZnSeプリズムの屈折率が完全に同一ではないためである可能性が考えられる。また、1回反射と5回反射の比較では、5回反射のピーク強度は1回反射よりも大きく、ピーク強度の増加は基本的に低波数側が大きく、波長依存性を示した。この結果も、ATR法の原理を反映した妥当な結果であると考えた。一方、5回反射の場合、ピーク強度が測定毎に変動する傾向が認められた。この結果は、5回反射の場合、プリズムと試料の接地面積が大きいため、特に固体試料では、押さえつけの強度の違いがピーク強度に影響を与え、変動の要因となった可能性があると考えた。固体試料での変動に関しては、今後、測定数を増やし、検討する必要があると考えられる。

2) 液体試料を用いた検討

次に、試料の屈折率の違いと反射回数との関連を検討するため、屈折率の異なる、プロピオン酸エチル、ヘキサン酸エチル、酢酸フェネチル、N-メチルアントラニル酸メチルを取り上げ、1回反射ATRでのプリズム間の差、及び、プリズムをZnSeプリズムに固定し、1回反射と5回反射での反射回数によるスペクトルを比較した。

1回反射ATRでの、ダイヤモンドプリズムとZnSeプリズムで違いはほぼ見られなかった。一方、同じZnSeプリズムを用いた場合、5回反射のピーク強度は1回反射よりも大きかったが、ピーク強度の増加の程度は、明確な波長依存性を示さなかった。この結果は、今回検討した化合物では、5回反射の場合、ピーク強度が全体に大きくなり、吸光度が高い、すなわち、透過率が低く、透過率を縦軸にとるとピークがつぶれた状態になり、定量性が低下しているピークの割合が多くなったためと考えた。

本研究で得られた結果より、食品添加物の測定法をATR法で規定する際においては、確認法として参照スペクトルとの比較、或いは波数規定を行う場合は、プリズムの種類や反射回数などの条件を規定する必要があると考えられた。条件の規定を行わない場合は、同一条件で測定することを前提として標準品との比較が妥当であると考えられた。今後も引き続き条件検討を行い例数を重ねるとともに、入射角可変型の装置も市販されているため、今後、これらの装置の可否も含め、規定の具体的な内容を検討する必要

があると考えられた

6. 鉛及びヒ素の同時分析法に関する研究

1) 鉄共沈法によるヒ素及び鉛の抽出法の妥当性評価

(1) 検量線

ヒ素では0.038~1.5 µg/mL の範囲で $R^2=0.9999$ 、鉛では0.025 ~ 1.0 µg/mL $R^2=0.9992$ となり良好な直線性が得られた。

(2) ILOD

ヒ素では0.0114 µg/mL、鉛では0.0122 µg/mLとなった。

(3) MLOQ

ヒ素では0.1084 µg/mL、鉛では0.0259 µg/mLとなった。

(4) 併行精度及び室内再現性

ヒ素については、添加濃度1.5、3及び6 µg/gで平均回収率は76.0%、87.2%及び86.5%、 RSD_r はそれぞれ3.2%、1.5%及び2.1%、 RSD_{ip} はそれぞれ6.7%、4.3%及び4.3%となり、添加濃度3 µg/gでは平均回収率が70%代と低めではあったが、概ね良好な回収率、併行精度及び室内再現精度が得られた。また鉛については、添加濃度1、2及び4 µg/gで平均回収率は92.3%、94.3%及び90.9%、 RSD_r はそれぞれ3.2%、3.1%及び2.1%、 RSD_{ip} はそれぞれ6.4%、6.5%及び2.1%となり、いずれの添加濃度でも、90%以上の平均回収率が得られ、併行精度及び室内再現精度も良好な結果が得られ、本法は真度、精度共に良好な分析法であると考えられた。

2) 食品添加物試料を用いた添加回収試験

確立した鉄共沈法を用いて、食品添加物試料5品目からのヒ素及び鉛の添加回収試験を行った。その結果、いずれの試料からもヒ素では平均回収率が79.9 ~ 83.2% RSD は2.2 ~ 4.2%、鉛では平均回収率が88.1 ~ 91.7%、 RSD は1.6 ~ 3.6%となり、今回用いた食品添加物試料からは良好な回収率が得られ、カリウム塩、ナトリウム塩以外にアンモニウム塩にも応用が可能であることが明らかとなった。また、硫酸ナトリウムについては硫酸鉛が沈殿することを考慮し、硝酸溶液を加えた後に5分間加熱した試料液を用いた場合、加熱しない場合と比較して、ヒ素及び鉛の回収率が20%程度良くなったことから、硫酸塩を試料とする場合は加熱した方が良いと考えられた。

D. 結論

1. 香料規格及び食品添加物の摂取量推計に関する研究

1) 香料化合物規格の国際統合化に関する調査研究

本年度も、2つの調査を行った。1つ目は、平成28年度の実測値(I)の調査で更なる調査が必要と判断された品目と今までの更なる調査でも結論が得られなかった品目の更なる実測値()調査である。

2つ目は、平成28年度までに実測値調査を行っていない279品目中、平成27年に使用されなかった69品目と個別指定された1品目(オクタン酸)を除いた209品目の実測値()の調査である。

平成25~29年度で、1088品目(個別指定されたオクタン酸を含む)の検討・調査を行い、413品目はJECFA規格で

問題ないが、その内 60 品目は JECFA 規格では上限値もしくは下限値のため、広すぎるもしくは狭すぎるために修正が必要なものであった。409 品目は JECFA 規格の修正が必要、189 品目は更なる調査が必要な品目であった。また 76 品目は平成 27 年に使用されていないため、調査が難しいと考えた。

2) 香料使用量に関わる調査研究

日本で使用された香料化合物の品目及びその使用量について、日米欧三極同時の使用量調査という目的を伴った第 4 回の使用量実態調査を実施した。本研究では、過去の調査と同様に、その調査結果から食品衛生法施行規則別表第 1 収載の香料化合物について国内での使用量実態を把握した。

本調査によって、我が国において使用されている香料化合物の総数は 1937 品目、年間総使用量は約 1250t であった。このうち食品衛生法施行規則別表第 1 収載個別指定品目 128 品目の年間総使用量は約 800t、18 類品目の総数は 1809 品目、年間総使用量は約 450t になることが明らかとなった。

使用されている香料化合物の内訳を見ると、我が国の香料化合物総使用量の 64.2 %を個別指定品目 128 品目が占め、品目数の多い 18 類品目は 35.8 %に過ぎなかった。

使用量別品目数では、0.01kg (10g) 以下のものが 190 品目 (数として全体の 9.8%)、0.01 ~ 0.1 kg が 239 品目 (12.3%)、0.1 ~ 1 kg が 386 品目 (19.9%) と、1kg 以下が全体の品目数の 42.1%を占め、

100kg 以下のものが約 84%を占める。一方、1t を超えて使用されているものは 114 品目 (5.9%) に過ぎなかった。この結果から使用量の多い香料化合物の品目数は少なく、少量使用品目が極めて多数あることが明らかとなった。

また、この結果は過去の調査結果とも極めて近かった。一般に「食品香料の特徴は微量で多成分であること」とされているが、我が国の使用実態においてもこのことが 4 度の使用量調査において実証された。

使用量から算出した推定摂取量からみると、1937 品目の推定総摂取量は 317032 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ 、平均推定摂取量は 164 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ であった。

3) 食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関わる研究

指定添加物の第 11 回調査の初年度として、基礎的な情報を得た。今後、追加調査及び査定並びに摂取量推定へと段階的にまとめていく。

2. マーケットバスケット方式による香料の摂取量調査の検討

流通食品における香料の摂取量の実態を明らかにするため、MB 方式による香料の一日摂取量調査について検討を行った。エーテル系及びアルコール系香料を対象に DHS-GC/MS を用いて分析したところ、一部の揮発性の低い香料において測定不能となり、別途試験法の検討が必要と考えられた。一方、揮発性の高いアルコール系香料については概ね良い分析精度が得られ、DHS-GC/MS 法の有用

性が確かめられた。

MB 方式によるアルコール系香料の一日摂取量は、イソアミルアルコールが最も高く、9.7 mg/人/日であり、イソブタノール 2.6 mg/人/日、フェネチルアルコール 4.1 mg/人/日であった。

イソアミルアルコールは、天然由来の食品成分として様々な食品に含まれており、従来の香料化合物の使用量に基づいたMSDI法による摂取量の推定の結果に比べて推計摂取量が高い結果となった。ただし、MB 方式によるイソアミルアルコールの推計摂取量の算定は、今回が初めての試みであり、購入地域や購入食品により変動する可能性がある。このため、MB 方式による調査結果については、他の研究報告も含め総合的に判断することが必要である。なお、MB 方式により算定されたイソアミルアルコール推計摂取量の ADI に対する割合は 5.5% であり、ADI に比べ十分に低いことから、現状において、安全性上の特段の問題はないと考えられた。

MB 方式による一日摂取量推計では、流通する食品を食品喫食量リストに基づき購入し、分析する必要があるため、分析調査可能な香料の種類や数に制約があり、現在流通する様々な香料をまとめて調査するのは難しい。しかしながら、天然由来の食品成分にも含まれる香料化合物については、天然由来の食品成分と添加香料の合計量としての一日摂取量調査結果が得られ、従来の摂取量推計法では新しい知見を得ることができた。このため、従来の香料の一日摂取量評価手法を補完する役割を果し、今後の食品衛生の

向上することが期待される。

3. 食品香料についての遺伝毒性評価予測システムの研究

食品香料化合物データベース 2015 年版掲載物質 4549 物質から、混合物、構造式が記載されていない物質を除き、3942 物質を電子データ化した。この 3942 物質について、Lhasa Limited (UK) の DEREK Nexus と MultiCASE Inc. (USA) の CASE Ultra を用いてエームス試験結果の QSAR 予測計算を行った。このうち 58 化合物は両者の QSAR モデルで陽性と判断され、変異原性が疑われた。このうち、試験データのない 41 化合物に関しては実際にエームス試験を行い、変異原性の有無を確認する必要がある。

4. 食品添加物公定書一般試験法の改良に関する調査研究

食品添加物公定書の一般試験法の 1 つとして、濃度測定を目的とした GC-MS 分析法を導入することを想定し、その妥当性の評価を行った。具体的な試験法としてローズマリー抽出物の JECFA 成分規格案に記載されている GC-MS を用いた揮発性成分定量法を選択し、国内で入手したローズマリー抽出物を用いて試験法の検証を実施した。その結果、分析精度は試験法として妥当と考えられる範囲内であった。しかし、定量用イオンとして選択する m/z によって定量下限や検出限界が大きく変わり、また、内標準物質と測定化合物の定量に用いるイオンの組み合わせによって定量値が異なる例も認

められたため、質量分析計による定量法においてはイオンの選択が重要であることが示された。本研究により得られた知見は、今後 GC-MS を用いる試験法を食品添加物公定書の一般試験法に導入し、添加物各条規格で設定する際の有用な基礎情報となると考えられる。

5. 赤外スペクトル測定法に関する調査研究

食品添加物の規格基準の向上を目的として、食品添加物の確認試験に国際的に多用されている赤外スペクトル(IR)法について、近年普及しつつあるATR法の確認試験への利用の可能性を検討した。その結果、プリズムの種類、反射回数、試料の種類や、着目するピークの波数など、種々の要因が、ピーク強度、すなわちスペクトル形状に影響を与える可能性があることを示した。以上より、食品添加物の確認試験に、ATR法を積極的に取り入れていくべきではあるが、確認試験にATR法を取り入れる場合は、測定試料毎に、同一条件での測定を前提とした標準品との比較を行うか、プリズムの種類や反射回数などの条件を規定した上で、参照スペクトルとの比較、或いは波数規定を定めていく必要があると考えられた。

6. 鉛及びヒ素の同時分析法に関する研究

塩化カリウムを試料とし、鉄共沈法によるヒ素及び鉛の抽出法の妥当性評価を行った。また、食品添加物 5試料(塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム及び硫酸ナトリウム)を用いた規格値相当のヒ素及び鉛

の添加回収試験を行ったところ、ほぼ良好な結果が得られ、塩化カリウム以外の食品添加物にも十分応用が可能であると考えられた。以上の結果から、食品添加物公定書における一部の食品添加物を対象とした場合、ヒ素及び鉛規格試験において、簡便で精度の高いヒ素及び鉛の同時分析法として有用な方法であると考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

学会発表

- 1) 本間正充, Ames/QSAR International Collaborative Study, 口頭, 第7回国際遺伝毒性試験国際ワークショップ, 東京都, 2107年11月8日
- 2) 本間正充, In Silico Approaches in Genetic Toxicology -Progress and Future-, 口頭, 第12回国際環境変異原学会, 韓国, 2017/11/15
- 3) 本間正充, AOP-based Evaluation of Chemical Mutagenicity and Development of New Endpoints and Models, 口頭, 第12回国際環境変異原学会, 韓国, 2017年11月14日
- 4) 本間正充, In Silico Approaches in Genetic Toxicology -Progress and Future-, 口頭, 第17回中国環境変異原学会年次大会, 中国, 2017年12月7日
- 5) 本間正充, QSARの最近の進歩について, 第2回ICH M7関連ワークショップ, 東京, 2017年5月23日

- 6) 北村 陽二, 佐藤 恭子, 多田 敦子, 小川 数馬, 小阪 孝史, 中島 美由紀, 茂野 泰貴, 高橋 茉衣夏, 小澤 梓, 上出 茉歩, 瀨本 萌凧, 吉田 楓, 斎藤 寛, 柴 和弘, 食品添加物確認試験の赤外スペクトル測定におけるATR法の適用に関する検討, 日本薬学会 第138年会, 石川県, 2018年3月26日
- 7) 建部千絵, 鐘熙寧, 久保田浩樹, 多田敦子, 佐藤恭子, 鉄共沈法を利用した食品添加物中の鉛及びヒ素の同時分析法の検討, 日本食品衛生学会第113回学術講演会, 東京都, 2017年11月
- JECFA Monographs 19.
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知(食安発 1224 第 1 号) “食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン” 平成 22 年 12 月 24 日
- 3) 医薬食品局食品安全部長(食安発第 0926003 号) “食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン” 平成 20 年 9 月 26 日
- 4) Nijssen LM et. al: Volatile compounds in food : qualitative and quantitative data (1996)
- 5) 平成 24 年度厚生労働科学研究報告書 「食品添加物の規格の向上及び摂取量推定等に関する研究」
- 6) Stofberg J, Grundschober F: Perf. Flav., 12, 27-56 (1987)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

- 1) Rosemary Extract (Tentative). Compendium of Food Additive Specifications. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 82nd meeting 2016. FAO