

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）

平成30年度総括研究報告書

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 食品添加物の安全確保には、その品質の担保と適正な使用が欠かせない。品質の担保に重要な成分規格及びその試験法の向上、摂取量等の把握のため、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の研究

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）により定められた香料化合物の化合物同定用の規格に明らかな間違いや流通実態に即していないものがあつたことから、JECFAの規格の検証を行っている。本年度は検証の判断基準の見直しを行い、今までに結論の得られていなかった179品目を再度詳細に調査し、平成25年度からの6年間に検討した計1088品目を再検証した。

香料使用量に関わる調査研究：香料化合物及び天然香料物質の世界同時使用量調査（平成27年の日米欧及び中南米の各国・地域での使用量の調査）に基づき、香料化合物について、日米欧及び中南米における使用量実態調査結果及び使用量から計算される推定摂取量を比較するとともに、天然香料物質の国内調査結果の集計及び考察を行った。

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：食品添加物一品目毎の生産・流通量の調査結果より国民1人あたり一日の食品添加物摂取量を推定する。指定添加物については、日本国内の食品添加物製造所を対象に、平成28年度の生産・輸入・販売・使用について追調査を行った。既存添加物等については、製造・輸入業者を対象に、平成29年度の製造・輸入量についてアンケート調査を実施した。

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。アルデヒド系及びケトン系香料を対象にMB混合試料に含まれる各種香料をQuEChERS法により抽出・精製後、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

DEREK NexusとCASE Ultraの2つの定量的構造活性相関（QSAR）を用い

た細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames試験）の予測において、陽性と予測された6化合物について実際のAmes試験を実施したところ、全て陽性を示した。また、適正なアルゴリズムと記述子を選択し、香料の特性を考慮したローカルQSARモデル（香料Star Drop QSARモデル）の開発に成功した。さらに、既存の香料のAmes試験データベースの見直しを行い、堅牢化を図った。新規データベースに対して新たに開発した香料Star Drop QSARモデルで予測精度を検証したところ、97%との正確性でAmes変異原性を予測できた。

食品添加物公定書一般試験法の改良に関する調査研究

GC-MSを用いる試験法の妥当性を検討するため、ヒドロキシプロピルメチルセルロースのJECFA成分規格に記載されているGC-MSを用いた純度試験であるプロピレンクロロヒドリン量分析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。

赤外スペクトル測定法に関する調査研究

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、測定試料の物性も考慮し、品目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

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。本研究ではこれまで鉛及びヒ素の同時分析を目的として、より簡便な前処理法として、鉄共沈法による鉛及びヒ素の前処理法について検討を行い、ナトリウム塩及びカリウム塩中の鉛及びヒ素の高周波誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-AES）による同時分析法を確立した。本年度は、炭酸塩について検討し、更に、食用赤色3号を試料とし、鉛及びヒ素以外の金属についても鉄共沈法による前処理法やICP-AESによる同時分析法が適用可能か検討した。

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の研究

1) 香料化合物規格の国際整合化に関わる調査研究

現在、我が国で公式な規格が定められている香料化合物は134品目のみであり、それ以外の国内で流通している香料化合物については、規格の実態調査と集約を行い、自主的な規格として公開している（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。

上記規格実態調査研究や第9版食品添加物公定書の改正作業等において、いくつかのJECFAの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た。そこで、平成25年度より、流通している香料化合物1088品目の規格値に関する実態調査を行い、JECFAの規格の検証を行っている。本年度は、平成29年度までに行った調査で、さらなる検討が必要と判断した239品目のうち、平成27年の使用量調査で使用が確認された179品目の詳細な実測値調査を行った。並行して、判断基準を見直し、それに基づいて平成25～29年度のデータの再検証を行った。

2) 香料使用量に関わる調査研究

JECFAによる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算出するには使用量データが必要になる。国際食品香料工業協会（IOFI）は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日米欧によるグローバルな使用量調査を計画した。そこで、平成22年に引き続き、平成27年の使用量調査を行った。なお、今回から新たに中南米地域も調査に加えられ、更に調査対象に天然香料物質が加えられた。

本研究では、平成27年（2015年）の国内における香料化合物使用量調査の結果を、同時期に実施した欧米及び中南米の使用量調査の結果と比較・検討した。また、天然香料物質については、IOFIのグローバル使用量調査リストに掲載された物質に、昨年追加実施した7品目を加え、日本で使用されている天然香料物質の調査結果を集計・考察した。

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

指定添加物（食品衛生法施行規則別表第1に掲げられている添加物）については品目ごとに原則としてその一日摂取許容量（ADI）が検討評価されており、行政上各添加物の日本人1人1日実摂取量の把握が求められている。本年度は、昨年度に行った平成28年度の実産流通を対象とした初年度調査の未回答事業者等に再度調査を行い、既存添加物については、流通実態を把握するため、平成29年度の実産流通を対象に生産・輸入業者へのアンケート調査を行った。

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

我が国では食品添加物の摂取量を把握するため、市販食品を7つの食品群に分けて混合し、この混合試料中に含まれる食品添加物を定量し、その結果に国民の平均的な各食品群の食品喫食量を乗じて摂取量を求める、マーケットバスケット(MB)方式による一日摂取量調査が実施されている。

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、MB方式による香料の一日摂取量の推計を検討した。本年度はアルデヒド系及びケトン系香料を対象に、QuEChERS法により試料調製した後、GC-MSを用いてMB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。

また、MB方式による香料の摂取量調査手法について、従来の香料の使用量に基づいた摂取量推定結果と比較し、MB方式の有用性及び問題点について検証を行った。

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

食品香料の安全性評価のためには適切な変異原性試験の実施が重要である。細菌を用いる復帰突然変異試験(Ames試験)は重要な変異原性試験であるが、試験の実施には約2g程度のサンプルが必要である。一方、香料の生産量は極めて少なく、試験が不可能である場合や香料独特の香気(臭気)から実験室内での試験が困難である場合もある。このため、

Ames変異原性をインシリコ手法である定量的構造活性相関(QSAR)により評価する方法が注目されている。

DEREK NexusとCASE Ultraの2つのQSARモデルを用いたAmes試験結果予測の検証のため、両者のQSARモデルで陽性と判断され、試験データのない6化合物についてAmes試験を行った。また、香料に特化した新たなQSARモデルを開発し、その予測性を評価した。

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

食品添加物規格設定時に用いる試験法の国際整合性を確保するために、国際的な食品添加物規格の一般試験法には設定されているものの食品添加物公定書の一般試験法には設定されていない試験法を新たに導入することを目標とし、平成28年度に、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た。その結果、公定書に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。そこで本年度は、MSを用いる試験法を導入する場合を想定し、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)の規格の純度試験に記載されているGC-MSを用いたプロピレンクロロヒドリン(PCH)分析法の検証を実施し、妥当性について検討した。

5. 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)法は、その簡便性と確実性から、各種食品添加物の確認

試験にも多用され、食の安全に寄与している。減衰全反射法（ATR法）は、その測定の簡便さと再現性の良さから、近年急速に普及しつつあり、第17改正日本薬局方でも規定されている。そこで、本研究では、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。

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においては、海外規格との整合性をはかる目的から、一部の食品添加物を除き、鉛規格が設定された。また、ヒ素規格についても、多くの食品添加物に設定されている。

本研究では、食品添加物（無機塩類）であるナトリウム塩やカリウム塩試料を用いて、鉄共沈法による前処理後、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-AES）による同時分析が可能であることを明らかとしてきたが、本年度は、これまで検討しなかった炭酸塩について鉄共沈法の適用を検討した。更に、第9版食品添加物公定書において、鉛及びヒ素以外に重金属規格が設定され、鉛試験法の前処理法として乾式灰化法が設定されている食用色素を用いて検討を行った。

B. 研究方法

1. 香料規格及び食品添加物の摂取量推計の研究

1) 香料化合物規格の国際整合化に関わる調査研究

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) 判断基準の見直し
- (2) 平成29年度に行った実測値（Ⅰ）*の調査結果で実測値（Ⅱ）**調査が必要となった品目、及び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（Ⅱ）調査とJECFA規格との比較

- ① 実測値（Ⅱ）の調査品目の選定
- ② 実測値（Ⅱ）収集のための調査票の検討及び調査の実施
- ③ 調査結果の集計と各規格項目の比較
- ④ 総合判定

- (3) 平成25～29年度のデータの見直し

*実測値（Ⅰ） 試験成績表・受け入れ検査値

**実測値（Ⅱ） 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、測定項目および測定条件を限定して得られた値

2) 香料使用量に関わる調査研究

a. 香料化合物

(1) 調査方法

日米欧の各香料工業会及び中南米6地域（ブラジル、チリ、コロンビア、メキシコ、アルゼンチン、ペルー）の6協会により実施された調査結果を整理し、日米欧及び中南米の比較を行った。また、日米欧及び中南米の調査結果を使用してMaximized Survey-Derived Intake (MSDI)法により摂取量を算出した。

JECFA “Working paper (monograph) format for flavouring agents” (12/2000) 記載の摂取量推定法による計算式を適用

$$\begin{aligned} & \text{摂取量}(\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}) \\ &= \frac{\text{年間使用量}(\text{kg}) \times 10^9 (\mu\text{g}/\text{kg})}{\text{消費者人口} \times \text{報告率} \times 365 \text{ 日}} \end{aligned}$$

消費者人口：

日本 1億2000万人×0.1=1200万人

米国 3億3000万人×0.1=3300万人

欧州 4億5000万人×0.1=4500万人

中南米6億2100万人×0.1=6210万人

報告率：

日本、米国、中南米 90%、欧州 80%

b. 天然香料物質

(1) 調査方法

平成28年度に実施した天然香料使用量調査（平成27年分）の結果と平成29年度に実施した追加調査21品目のデータを天然香料基原物質毎に集計し、平成26年度の調査結果（平成25年分）と比較した。

(2) データ再確認アンケート及び再集計

平成26年度の調査結果から大きく使用量が増えた品目について、データ再確認のアンケートを実施し、平成28年度と平成29年度の集計結果に再確認アンケートの結果を反映させた。

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

a. 指定添加物

(1) 調査法 アンケート方式

(2) 調査対象年度 平成28年度

(3) 調査対象 指定添加物454品目

(4) 調査内容

調査票Ⅰ：製造及び輸入した品目名

調査票Ⅱ：（調査事項Ⅰ）製造量及び輸

入量、（調査事項Ⅱ）食品向け出荷量、輸出货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

昨年度の追調査として、アンケート個票ならびに、その集計表を点検し、記入不備・記入値等に疑問のある2業者を抽出して照会等を行い、集計化向上と精密化を期した。さらに、本年度新たに追加した5社への調査に加え、初年度未回答企業への再調査を108件、合計113件の調査を行った。

b. 既存添加物

(1) 調査方法

アンケート方式

(2) 調査対象期間

平成29年4月から30年3月までの1年間あるいは平成29年を過半日数含む1年間

(3) 調査対象企業

平成27年の第6回目調査の回答状況を基に、既存添加物等の製造・輸入の可能性のあった企業（363社）

(4) 調査項目

①調査対象添加物

既存添加物365品目及び一般に食品として飲食に供されているものであって添加物として使用される品目53品目（合計418品目）

②記載要求事項

a) 製造・輸入を行っているものの品名

b) 製造・輸入の区別

c) 製造・輸入の数量（換算単位が記載してあるものについては換算した

数值)

- d) 換算単位が明示されていない品目
にあってはその純度
- e) 用途 (食品/非食品) 別出荷量、輸
出量

2. MB 方式による香料の摂取量調査の 検討

1) GC-MS 測定条件

カラム : InertCap Pure-WAX (30 m
× 0.25 mm I.D.、膜厚 0.25 μm)、カ
ラム温度 : 40°C (5 min)→5°C/min→240°C、
注入口温度 : 240°C、インターフェース温
度 : 240°C、イオン源温度 : 240°C、イ
オン化法 : EI、イオン化電圧 : 70 eV、測定
モード : SIM

2) 試験液の調製

AOAC 2007.01 に準拠した Q-sep
QuEChERS 抽出塩キット Q150 及び Q-
sep QuEChERS 精製キット Q251(島津
ジーエルシー) を用い、MB 1~7 群試料
より試験液を調製した。

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) Ames 試験

2つのQSARモデルで陽性を示した58
化合物のうち、6化合物を対象物質とし
てOECD試験ガイドラインTG471 に準
拠し、細菌を用いる復帰突然変異試験を
実施した。

2) Star Drop QSAR モデルの開発

英国オプティブリアム (日本代理店は
ヒューリンクス) が開発する統計ベース
の QSAR モデルである。ヒューリンクス
社との共同研究により、Star Drop

AmesQSAR モデルの開発を行った。
我々が保持する Ames 試験データベース
を活用し、適切なアルゴリズムと記述子
の選択を行い、予測率の高い QSAR モデ
ルを選択した。

3) 香料の Ames 試験データベース

小野らの報告 (Food and Chemical
Toxicology, 50, 1538-1546, 2012)の香料
化合物の Ames 試験データのうち、
Equivocal と評価されている 14 化合物
の Ames 試験結果について専門家判断に
より見直しを行った。

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 74 回 JECFA 会議にて審議
された HPMC の成分規格の純度試験に
記載されている PCH 分析法に基づき行
った。

1) GC-MS

GC-MSによる測定は、以下の条件で行
った。標準添加試料液及び試料溶液はそ
れぞれ1日につきn=3で調製し、測定した。
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。

(1) GC-MS測定条件

カラム : DB-624 (30 m×0.25 mm I.D.、
膜厚 1.4μm)、カラム温度 : 40°C (5 min)
→10°C/min→80°C(3 min)→25°C/min→
230°C(5 min)、四重極温度 : 150°C、イ
オン源温度 : 230°C、トランスファーライン
温度 : 260°C、イオン化法 : EI、イオン化
電圧 : 70 eV、測定モード : スキャン (確

認時、 m/z 30~200) 及び SIM (定量時)

2) 各 PCH 量の算出

標品として用いた PCH は成績書より 1C2P を 75.3 %含有しており、残りの 24.7%を 2C1P 含有値として算出した。PCH 量算出のためのピーク面積の測定は、JECFA の成分規格に準拠し、1C2P、2C1P 及び内標 σ -xylene- d_{10} (IS) それぞれ m/z 79、58 及び 116 を用い、 m/z 81、31、98 は定性のための確認に用いた。

3) 試験法の妥当性評価

実施者 1 名が 1 日につき 3 回分析試料を調製し、5 日間行った。この時、検量線作成のための標準液作成も 1 日 1 回調製した。得られた定量値 15 個について、一元配置分散分析を行い、試験法の評価に必要な精度を算出した。

5. 赤外スペクトル測定法に関する調査研究

液体試料 (屈折率の異なるイソ吉草酸エチル、酪酸、ベンジルアルコール、ケイ皮酸エチル) 及び固体試料 (バニリン) 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た。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。

6. 鉛及びヒ素の同時分析法に関する研究

1) 炭酸塩類を用いた鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法の検討

(1) 試料液の調製法

炭酸塩試料液調製法 1: 試料 2 g に Pb・As 混合標準原液 0.8 mL を添加 (Pb として 2 $\mu\text{g/g}$ 、As として 3 $\mu\text{g/g}$ 相当添加) し、30 分室温で放置した後、硝酸 (1→100) 溶液 20 mL を加え溶かし、試料液とした。炭酸塩試料液調製法 2 (改良法): 試料 2 g に Pb・As 混合標準原液 0.8 mL を添加し、30 分室温で放置した後、塩酸 (1→4) 溶液 20 mL を少量ずつ加え、泡立たなくなったら、ホットスターラー上で攪拌しながら加熱し、蒸発乾固させた。得られた残留物に硝酸 (1→100) 又は水 20 mL を加え、加熱して溶かし、試料液とした。

(2) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出

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 pH 9 に調整した後、30 分静置した。沈殿を水で洗浄後、硝酸 (1→10) 溶液 1 mL に溶解し、水で 10 mL とし、試験液とした。ICP-AES により鉛、ヒ素、亜鉛を測定し、添加回収率を求めた。

2) 食用赤色 3 号を用いた、鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法の検討

(1) 試料液の調製法

色素試料液調製法 1: 試料に鉛、ヒ素及び亜鉛の標準原液を添加 (Pb として 2 $\mu\text{g/g}$ 、As として 3 $\mu\text{g/g}$ 、Zn として 200 $\mu\text{g/g}$ 相当添加) し、第 9 版食品添加物公定書一般試験法 タール色素試験法の鉛試験法第 2 法を準用し、試料液を調製した。

色素試料液調製法 2: 試料に鉛、ヒ素及び亜鉛の標準原液を添加 (Pb として 2 $\mu\text{g/g}$ 、As として 3 $\mu\text{g/g}$ 、Zn として 200 $\mu\text{g/g}$ 相当添加) し、タール色素試験法のヒ素試験法を準用し、試料液とした。

(2) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出方法

1) (2) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出に従い実施した。

(3) キレート固相カートリッジによる抽出方法

試料液をコンディショニングしたInertSep ME-1へ負荷し、0.5 M 酢酸アンモニウム及び水で洗浄後、硝酸(1→100)溶液約7 mL流速1 mL/minで溶出し、硝酸(1→100)溶液で10 mLとし、試験液とした。

(4) 鉄共沈法及びキレート固相カートリッジによる鉛、ヒ素及び亜鉛の抽出法の検討

試料液に次亜塩素酸水0.2 mLを加え、次いで鉄溶液0.5 mLを加え、更に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、30分静置した。必要に応じて遠心分離(3000 rpm、5分間)し、上澄液及び沈殿をInertSEP ME-1を接続したフリット付きエンブテリザーバー内へ負荷し、沈殿をエンブテリザーバーに保持させた。得られた沈殿を水10 mLで洗浄し、洗浄液は捨てた。

InertSEP ME-1を取り外し、エンブテリザーバーをストップコックにつなぎ、硝酸(1→10)溶液1 mLを加え、5分間静置した後、フリット上の硝酸(1→10)溶液を回収し、水で10 mLとし試験液1とした。InertSEP ME-1は0.5 M 酢酸アンモニウム溶液及び水で洗浄した後、硝酸(1→100)で溶出し、10 mLとし、試験液2とした。なお、(1) 試料液の調製法の色素試料液調製法2で調製した試料

液を用いた場合は、溶出液は半分の容量で溶出し、試験液1は、硝酸(1→10) 0.5 mLを加えて5 mLとし、試験液2は、硝酸(1→100) 3.5 mLで溶出して5 mLとした。

ICP-AESにより測定し、検量線より、各試験液中の鉛、ヒ素及び亜鉛の濃度を算出し、回収率を求めた。

(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の研究

1) 香料化合物規格の国際整合化に関する調査研究

(1) 判断基準の見直し

これまでに実測値とJECFA規格との比較を行っていく過程で、規格値に合致していても、区別し、問題点を抽出、整理する必要があることが判明し、判断基準の整理を行ってきた。本年度は、規格項目の判断で各規格項目にOY、OK、OWと判定された場合の総合判定の優先順位を決め、X△の定義の変更を行った。

(2) 平成29年度に行った実測値(I)の調査結果で実測値(II)調査が必要となった品目、及び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(II)調査とJECFA規格との比較

① 実測値(II)の調査品目の選定

平成29年度の実測値(I)調査で更なる調査が必要と判断した127品目と今までの実測値調査で、追加の調査が必要と思われた112品目の計239品目から平成

27年の使用量調査で使用量報告がなかった60品目を除いた179品目に対して実測値（Ⅱ）の調査を行った。

② 実測値（Ⅱ）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、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。

③ 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179品目中76品目で2製品以上の測定値が得られた。

④ 総合判定

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37品目、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17品目であった。

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22品目あったが、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103品目あり、これら計125品目は来年度以降に更なる調査を行う予定である。

(3) 平成25～29年度のデータの見直し

JECFA規格に問題があることを踏まえ、平成25～30年度で1088品目について検討を行い、個別指定された2品目及び平成27年の使用量調査で報告がなかった70品目（JECFAから削除された1品目を含む）を除く1016品目の規格を精査した。

317品目はJECFA規格で問題がないと判断し、161品目はJECFA規格に合致しているがJECFA規格が広すぎるもしくは狭すぎるまたは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と考えられた。365品目はJECFA規格に問題があり実測値を基に修正案を策定した。JECFA規格の妥当性の判断ができなかった37品目と検討に必要なデータを2個以上得られなかった136品目の計173品目は来年度以降の更なる調査が必要と判断した。

2) 香料使用量に関わる調査研究

a. 香料化合物

(1) 日米欧及び中南米の四極で使用されているIOFIのグローバル使用量調査リスト中の香料化合物の品目数と年間使用量

各国・地域の香料化合物の使用品目及び使用量について、先ず全体像を把握するため、日本における①個別指定品目、②類指定品目、③日本で個別指定品目・18類に該当しない香料化合物、④日本で香料に該当しない化合物に分類して各国・地域の各使用品目数、数量及び使用量占有率について整理した。使用量占有率に関しては、香料化合物の実態を把握するため、日本で香料に該当しない化合物を除いて、計算した。

IOFIのグローバル使用量調査リスト収載品について、日本は使用化合物1444品目で総使用量は1242 tであった。米国は使用化合物1184品目（香料：1107品目、香料以外：77品目）で総使用量14738 t（香料：7333 t、香料以外：7405 t）、欧

州は使用化合物1231品目（香料：1194品目、香料以外：37品目）で総使用量は6262 t（香料：5488 t、香料以外：774t）、中南米は使用化合物1241品目（香料：1155品目、香料以外：86品目）で総使用量は19850 t（香料：4925 t、香料以外：14925 t）であった。日本は、品目数としては最も多く、日本で香料に該当しない化合物を除いた総使用量に関しては、中南米に次いで少ないことが分かった。

また、日本では個別指定品目とされている香料化合物は欧米及び中南米でも使用量占有率が優に50%を超え高いことから、比較的大量に使用される化合物の傾向は四極とも類似していることがうかがえた。

(2) 使用量の多い品目の比較

各国・地域間にどのような特徴があるのか検討するために日米欧及び中南米の使用量の多い上位50品目について整理して比較した。その結果、現在世界中で多く使われている化合物については各国・地域間で大きな差は認められなかったが、一部の香料化合物はそれぞれの食文化の特徴を反映した使用がされていることも確認できた。

(3) 日米欧及び中南米四極で使用されている香料化合物の推定摂取量

摂取量は香料が安全に使用されていることを確認する上で極めて重要な情報である。そこで日米欧及び中南米四極で使用している香料化合物（日本で香料に該当しない化合物を除く）について摂取量別に整理し比較検討した。

推定摂取量が100 µg/人/日を超える品目は、日本では167品目（全品目中の

11.6%）、米国では192品目（同17.3%）、欧州では179品目（同15.0%）、中南米では163品目（同14.1%）であった。更に以前の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た推定摂取量1.5µg/人/日以下の品目数は、日本では762品目（全品目中の52.8%）、米国では548品目（同49.5%）、欧州では493品目（同41.3%）、中南米では589品目（同51.0%）であった。

この様に各地域で使用されている多くの香料化合物が少量で使用されており、特に日本と中南米でその傾向が顕著である実態が明らかになった。

(4) 新規指定香料化合物の使用実態

平成27年9月末までに新規指定された54品目の四極における推定摂取量について食品安全委員会の評価で使用した推定摂取量及びNOAELとの比較を行った。その結果、欧米及び中南米においては食品安全委員会評価時の推定摂取量を超えて使用している品目はあるものの、NOAELと比較すると欧州でacetaldehydeの安全マージンが975であり1000を若干下回っていたが、その他全て1000を下回るものはなかった。現状において日本で新規に指定された54品目は四極で安全に使用されていることが確認できた。

(5) 日本で香料として使用できない化合物の使用状況

具体的な不整合化合物を知るために、欧米及び中南米ではフレーバーとして使用されているが③日本で個別指定品目・18類に該当しない香料化合物、④日本で香料に該当しない化合物（③：84品目、④：122品目、計206品目）の使用状況につ

いてまとめた。その中には現在指定作業中のアミン類7品目も含まれている。欧米及び中南米で使用量の報告がなかった品目が63品目あった。欧米及び中南米で使用報告があり日本では個別指定品目・18類に該当しないため使用できない香料化合物が43品目あった。

国際整合性の観点からこれらの物質も我が国で使用できるようになることが望ましく今後とも国際整合化のための取り組みが必要である。

b. 天然香料物質

(1) 天然香料基原物毎の集計

日本の天然香料基原物毎に使用量データを集計した。今回調査した基原物質数は、190品目で使用量の報告のあった品目は154品目、使用量の報告がなかった品目は36品目であり、天然香料物質の平成27年の使用量は、1755 t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

a. 指定添加物

昨年度の追調査を行った結果、75社から回答を得た。平成29年度と30年度の合計調査数は595件、回収数は531件、回収率は89.2%であった。

回収された調査票をもとにデータをコンピュータ入力し集計を行った。

b. 既存添加物

(1) 調査の留意点

今回の調査では既存添加物収載品目リスト及び一般飲食物添加物品目リストを中心に既存添加物等の出荷量の実態を把

握することを目的とした。

(2) コンピュータへのインプット、集計
指定添加物の調査と同様に、調査票の回答をコンピュータ入力し、集計した。

(3) 調査票の回収結果

調査票発送数は363件、回収数は286件（回収率78.8%）、製造または輸入していると回答した企業は214社（回収に対する比率74.8%）であった。

2. MB方式による香料の摂取量調査の検討

1) MB方式による一日摂取量の推計

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バニリン 1.22 mg/人/日であり、エチルバニリン 0.13 mg/人/日、ヘキサナール 0.54 mg/人/日、ベンズアルデヒドは 0.32 mg/人/日であった。ペリルアルデヒド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。

2) 一日摂取量のADIとの比較

ADIが設定されているエチルバニリン (0-3 mg/kg 体重/日)、バニリン (0-10 mg/kg 体重/日)、ベンズアルデヒド (0-5 mg/kg 体重/日) について、ADIに対する体重あたりの一日摂取量の割合（対ADI比）を求めたところ、バニリンが0.21%で最も高く、その他の香料は、エチルバニリン0.07%、ベンズアルデヒド0.11%であった。このため、今回調査した香料化合物は、何れも対ADI比0.21%以下であり、いずれの香料も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

1) Ames 試験結果

QSAR により変異原性が予測された 6 化合物の全てが実際の Ames 試験で陽性と判定され、陽性予測率は 100%であった。また、その陽性結果は化学構造から説明可能であった。このことは QSAR が変異原性予測に有効であり、かつその変異原性メカニズムを提示してくれることを示している。これらの試験結果をトレーニングデータとして QSAR に組みこむことによりさらに精度の高いモデルの構築が期待できる。

2) 香料用 Star Drop QSAR モデルの開発

ヒューリンクス社との共同研究により統計ベースの QSAR モデルである Star Drop による Ames 試験予測モデルの開発を行った。予測アルゴリズムとしては Random Forest、記述子としては量子化学計算結果(MO)を記述子に含めないプロトタイプの QSAR モデル (Perfume_case10_noMO.aim) を開発した。また、香料化合物は低分子量であること、限られた元素しか含まれないという物性から香料に特化したローカル QSAR モデル (香料 Star Drop QSAR モデル) を開発した。

3) 香料 Ames 試験データの見直しと、Star Drop QSAR モデルへの反映

小野らの報告の香料化合物の Ames 試験データベースの見直しを行い、データベースの堅牢化を図った。この新規データベースに対して新たに開発した香料 Star Drop QSAR モデルで予測精度を検証したところ、97%の正確性で Ames 変

異原性を予測できた。この結果は香料 Star Drop QSAR モデルは実用性に耐えることを示すものである。

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

1) GC-MS によるプロピレンクロロヒドリン定量法の妥当性評価

(1) 検量線の直線性

JECFA 規格の定量用イオンの組み合わせで検量線を作成したところ、各検量線の直線性は 1C2P 及び 2C1P においていずれも 0.9997 以上と良好な結果が得られた。

(2) 検出限界と定量下限

検量線用 PCH 標準液の最低濃度 (25 ng/mL) の液を用いて、6 回繰り返し測定を行い、各化合物の検出限界と定量下限を推定した。いずれの定量下限値も、検量線用 PCH 標準溶液の最低濃度として設定されている 25 ng/mL 未満であり、検量線の最低濃度として 25 ng/mL が十分妥当であることが確認された。

(3) 添加回収率

標準添加試料液を調製し (n=6)、添加回収率を調べた結果、1C2P 及び 2C1P の添加回収率の平均はそれぞれ 84.0% 及び 85.8% と良好であり、いずれも今回の基準 (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) を満たしていた。

(4) 精度

妥当性評価は、分析者 1 名が 1 日につき 3 回標準添加試料液を調製・分析し、これを 5 日間繰り返し得たデータに対し行った。1C2P 及び 2C1P 両化合物において併行精度及び室内精度は良好で

あり、試験法としては適と判定された。

5. 赤外スペクトル測定法に関する調査研究

1 回反射 ATR でのダイヤモンドプリズムと ZnSe 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。

液体試料は、いずれの化合物も、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。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。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、ベンジルアルコールを除き、明確な波長依存性を示さなかった。この結果は、5 回反射の場合、ピーク強度が全体に大きくなり、透過率を縦軸に取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。

固体試料としてのバニリ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、スペクトルに僅かな違いが認められた。また、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 回反射よりも小さくなり、バニリンをめのう製の乳鉢ですりつぶすことにより、結晶粒子を小さくして 5 回反射 ATR で測定を行った場合でも、すりつぶし前よりはピーク強度が

強くなったものの、1 回反射よりも弱かった。これらの結果は、結晶が粗い試料においては、プリズムとの密着が悪く、プリズム面積が広く試料との密着が難しい 5 回反射 ATR では、密着性の悪さが増幅されたためと考えられ、試料の結晶の状態によっては、5 回反射の方が 1 回反射よりもピーク強度が弱くなる場合があることを示している。

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、測定試料の物性も考慮し、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。

6. 鉛及びヒ素の同時分析法に関する研究

1) 炭酸塩の鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法の検討

炭酸水素ナトリウムを試料とし、炭酸塩試料液調製法 1 により試料液を調製し、鉄共沈法を行ったところ、pH9 に調整しても、鉄の沈澱が析出せず、いずれの元素も回収率はほとんど得られなかった。炭酸イオンが鉄の共沈に影響を及ぼしている可能性が示唆されたことから、試料に塩酸 (1→4) 溶液を加え、蒸発乾固した後、水で試料液を調製し (改良法)、鉄共沈法を行うこととした。

炭酸塩試料 (3 品目：炭酸カリウム、炭酸水素アンモニウム、炭酸ナトリウム)

を試料とし、改良法により試料液を調製し、添加回収試験を行った結果、いずれも良好な回収率が得られた。

2) 食用赤色 3 号を用いた、鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法の検討

(1) 試料液調製法の検討

食用赤色 3 号を用い、色素試料液調製法 1 により試料液を調製し、鉄共沈法による抽出を行ったところ、鉛とヒ素は 70%以上の回収率が得られたが、亜鉛では回収率が得られなかった。一方、キレート固相カートリッジによる抽出を行ったところ、ヒ素は回収できなかった。そこで、鉄共沈法及びキレート固相カートリッジによる抽出を行ったところ、いずれも 78%以上の良好な回収率が得られた。また、色素試料液調製法 2 により試料液を調製した場合には、灰化操作は簡便ではあったが、鉛及び亜鉛の回収率が低い傾向がみられた。

食用赤色 3 号では、鉛、ヒ素及び亜鉛を測定するために、それぞれ前処理方法や測定方法が異なっている。今回の検討により、鉄共沈法及びキレート固相カートリッジを用い、ICP-AESを用いることで鉛、ヒ素及び亜鉛を一度の前処理で同時分析できることが明らかとなった。

D. 結論

1. 香料規格及び食品添加物の摂取量推計の研究

香料化合物規格の国際整合化に関わる調査研究では、179 品目の実測値(Ⅱ)調査を行い、さらに、本年度取りまとめた判断基準に従い、使用量報告のあった平成 25～29 年度の調査品目から本年度

実測値(Ⅱ)調査品目を除いた 837 品目のデータの見直しを行った。JECFA 規格に問題があることを踏まえ、平成 25～30 年度で 1088 品目について検討を行い、個別指定された 2 品目及び平成 27 年の使用量調査で報告がなかった 70 品目を除く 1016 品目の規格を精査した。317 品目は JECFA 規格で問題がないと判断し、161 品目は JECFA 規格に合致しているが JECFA 規格が広すぎる等のため変更した方が良いと考えられた。365 品目は JECFA 規格に問題があり実測値を基に修正案を策定した。JECFA 規格の妥当性の判断ができなかった 37 品目と検討に必要なデータを 2 個以上得られなかった 136 品目の計 173 品目は更なる調査が必要と判断した。

香料使用量に関わる調査研究では、香料化合物について、世界における使用実態の動向を把握するとともに香料が安全に使用されていることの確認を目的として、IOFIを通じて欧米及び中南米の使用量調査結果の提供を受け、日米欧及び中南米四極における香料化合物の使用量実態調査結果及びその結果から算出する推定摂取量の比較を行った。天然香料物質については、平成28年度、平成29年度のデータを集計し考察した。

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では、追加調査を実施し、既存添加物については基礎的な情報を得た。

2. MB 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。アルデヒド系及びケトン系香料について、QuEChERS法により抽出・精製後、GC-MSを用いて分析した。マルトール及びエチルマルトールのケトン系香料において定量不能となり、試験法のさらなる検討が必要と考えられたが、バニリン等のアルデヒド系香料については概ね良い分析精度が得られ、アルデヒド系香料の摂取量調査に本試験法は有用と考えられた。

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

2つのQSARによるAmes変異原性の予測により陽性と予測された58化合物のうち6化合物について実際のAmes試験を実施したところ、全てにおいて陽性を示した。また、香料に特化した新たなQSARモデル(Star Drop)の開発を行った。適正なアルゴリズムと記述子を選択し、また香料の特性(低分子量、限られた元素)を考慮したローカルQSARモデル(香料Star Drop QSARモデル)の開発に成功した。さらに、既存の香料のAmes試験データベースの見直しを行い、データベースの堅牢化を図った。新規データベースに対して新たに開発した香料Star Drop QSARモデルで予測精度を検証したところ、97%との正確性でAmes変異原性を予測できた。この結果は香料Star Drop QSARモデルは実用性に耐えうることを示すものである。

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。今年度は具体的な試験法としてHPMCのJECFA成分規格に記載されているGC-MSを用いた純度試験であるPCH量分析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。検量線用標準溶液の最低濃度が定量下限濃度に比べて十分高く、また、検量線用標準液の濃度範囲が広すぎない点などが、有効であったのではないかと推察された。

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、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、試料の物性など、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

食品添加物中のヒ素、鉛及びその他の重金属のICP-AESによる同時分析のための前処理法を検討した。炭酸塩試料は塩酸(1→4)溶液を加え、炭酸を二酸化

炭素に分解した後、鉄共沈法を行うことにより、食用赤色 3 号については、タール色素試験法鉛試験法に従い試料液を調製した後、鉄共沈法及びキレート固相カートリッジを用いて抽出することにより、鉛、ヒ素等を抽出することができ、ICP-AES による同時分析が可能であることが明らかとなった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 彌勒地義治、齊藤憲二、岸本一宏、高木成典、土屋一行、鈴木紀生、満月眞寿、和田善行、渡邊武俊、阿部国広、佐野恵右、笠原陽子、東仲隆治、久能靖、佐藤恭子. JECFA 規格と我が国における食品香料化合物実測値の調査研究(第1報). 日本食品化学学会誌、26(1)、1-10 (2019)

2. 学会発表

1) 本間正充、Improvement of quantitative structure-activity relationship (QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity 口演、QSAR2018、ブレッド・スロベニア (2018.6)

2) A. Tada, N. Masumoto, K. Nakajima, C. Tatebe, Y. Nishizaki, H. Kubota, N. Sugimoto, K. Sato, Validation of a quantification method using gas chromatography-mass spectrometry,

AOAC 2018, Tronto (2018.8)

3) 本間正充、Mutagens and carcinogens in Japanese food: evolution of prioritized risk 口演、第49回米国環境変異ゲノミクス学会、サンアントニオ・米国 (2018.9)

4) 本間正充、(QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity 口演、KNect365 Life Sciences Annual Meeting of Genotoxic Impurities、ベルリン・ドイツ (2018.10)

5) 本間正充、(QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity and its application to risk assessment 口演、2018 Joint International Workshop "Progress of Genotoxicity Methods and Regulatory Acceptance、広州・中国 (2018.11)

6) 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用いた鉛及びヒ素の同時分析法の妥当性評価及び食品添加物への適用、日本食品衛生学会第114回学術講演会、広島 (2018.11)

7) 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、高橋茉衣夏、上出茉歩、濱本萌風、吉田楓、池田朝海、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へのATR法の適用に関する検討、日本薬学会第139年会、千葉 (2019.3)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

