

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 28 年度～30 年度 総合研究報告書

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：香料化合物の規格を国際間で整合化することは安全性のために重要である。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）の香料化合物の規格の検証が必要と考え、1088品目について検討を行い、個別指定された2品目及び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：JECFAによる香料化合物の安全性評価に重要な摂取量をMaximized Survey-derived Daily Intake（MSDI）法で算出するには使用量データが必要になる。我が国における香料化合物使用量の定期調査を行い、調査結果を過去3回の結果と比較検討するとともに、国際食品香料工業協会（IOFI）の香料化合物のグローバル使用量調査へのデータ提供を行い、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した。また天然香料物質については、IOFIの初のグローバル調査に対応するとともに、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、天然香料物質の日本の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：行政による食品添加物管理状況の妥当性の確認及び経年による食品添加物摂取の変化の把握のために、指定添加物に関しては、第11回調査として、平成25年度の製造数量等のアンケート調査を元に、各食品添加物について国民1人が1日に摂取

する量を推定し、一日摂取許容量（ADI）との比較を行った。また、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・使用について第11回アンケート調査及び追調査を行った。既存添加物等に関しては、第6回の調査として、平成26年度の製造・輸入量のアンケート調査を実施し、生産量統計を取りまとめ、さらに、製造・輸入業者を対象に、平成29年度の製造・輸入量について第7回のアンケート調査を実施した。

マーケットバスケット（MB）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）方式による香料の推定一日摂取量調査について検討を行った。MB方式による主な香料の一日摂取量は、エステル系香料は酢酸エチル（1.90 mg/人/日）、アルコール系香料はイソアミルアルコール（1.90 mg/人/日）、アルデヒド系香料はバニリン（1.22 mg/人/日）であった。いずれの香料もADIに比べて摂取量は十分に低いことが示された。

食品香料についての遺伝毒性評価予測システムの研究

流通する香料化合物について2つのQSARを用いて細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames試験）の予測を行い、変異原性が強く疑われた11物質について、簡易Ames試験（FAT）、もしくはGLPでの標準的Ames試験を実施した。このうち7物質で陽性を示した。また、香料に特化した新たなQSARモデル（StarDrop）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。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。

食品添加物公定書一般試験法の改良に関する調査研究

食品添加物公定書一般試験法の改良に向けた検討を行うため、JECFAの規格や米国のFood Chemicals Codex等に記載があり公定書の一般試験法では採用されていない試験法について調査した。今後公定書への追加を検討すべきと考えられる試験法について、汎用性及び国際整合の観点から検討したところ、質量分析計を用いる試験法や残留溶媒試験法等が挙げられた。そこで、質量分析計を用いる試験法としてガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）を用いる試験法の妥当性を検討するため、ローズマリー抽出物のJECFA成分規格案の揮発性成分量のGC-MSを用いる分析法と、ヒドロキシプロピルメチルセルロースのJECFA成分規格のプロピレンクロロヒドリン量のGC-MSを用いる分析法とを、具体的試験法として取り上げ、検証を実施した。その結果、GC-MSを用いる試

験法を食品添加物成分規格の一般試験法として取り入れる場合、いくつかの点に留意が必要と考えられた。GC-MSを用いて正確な定量を行う上で、定量に用いるイオンの選定や検量線の濃度範囲の設定が特に重要であることが示された。検量線の最低濃度が定量下限濃度に比べて十分高いことや、検量線の濃度範囲を広く設定しすぎない点等が、重要だと推察された。

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、近年普及著しい減衰全反射法（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、補正を行わないATRスペクトル同士での比較とし、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、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が、その前処理法及び分析法は試料の性質により異なっている。本研究では、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、カリウム塩、炭酸塩等の中の鉛及びヒ素のICP-AES法による同時分析法を確立した。また、鉛、ヒ素及び亜鉛の規格が設定されている食用赤色3号を試料とし、鉄共沈法及びキレート固相カートリッジを用いることで良好な回収率を得られた。以上の結果から、鉄共沈法は一部の食品添加物の鉛及びヒ素の同時分析法として有用な方法であり、鉄共沈法及びキレート固相カートリッジを用いることで、鉛、ヒ素及び亜鉛が同時に分析できることが明らかとなった。

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
山田 雅巳**	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

* 平成29～30年、** 平成28年

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切な使用が欠かせない。食品添加物の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、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。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。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わる調査研究

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である。日本国内で流通している香料化合物は、平成22年度の厚生労働科学研究での調査によると2045品目であるが、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）、米国食品化学物質規格集（FCC）、欧州連合（EU）、中国、韓国等も規格を設定し、特に国際機関であるJECFAの規格は最近規格を設定した多くの国で参照されている。

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は、JECFA規格を参考にしたが、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た。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。

2) 香料使用量に関わる調査研究

JECFAによる食品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1つである摂取量をMSDI法で算出するには使用量データが必要になる。我が国では、平成12～14年度厚生労働科学研究、平成16～18年度厚生労働科学研究の2回にわたって、それぞれ2002年、2005年に国内で流通している食品香料に使用されている香料化合物の使用量調査を実施してきた。さらに、国際食品香料工業協会（IOFI）が提唱した、日米欧のそれぞれの国・地域で2010年中に使用したフレーバーリング物質の使用量調査に呼応して、平成22～24年度厚生労働科学研究で香料化合物の使用量調査を行った。2016年1月、IOFIにより、第2回目の香料化合物のグローバル使用量調査が提唱されるとともに、天然複合物質（天然香料物質）についても安全性評価の基礎データとするための使用量調査を依頼されたことから、我が国における香料化合物の使用量実態を把握するとともに、IOFIの第2回目のグローバル使用量調査に対してもデータを提供するため、前3回の使用量調査に引き続く定期調査として、香料使用量に関わる調査研究を行った。また、天然香料物質については、平成25～27年度の厚生労働科学研究において我が国の天然香料基原物質リストに掲載されている品目の使用量を調査した経験を踏まえて、今回はIOFIの調査リストと天然香料基原物質リストを比較照合して我が国独自の調査リストを作成することで、天然香料物質としては初のグローバル使用量調査に対応した。

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

食の国際化が進み、食生活が変化しており、食品添加物の国際的整合化が図られているなか、食品添加物毎の摂取量をADIと比較し、食品添加物に係わる行政の管理の妥当性を確認するとともに、日常生活における食品添加物の摂取の動向を把握して食品衛生行政の推進に役立てることを目的とし、生産量統計調査を基にした指定添加物の摂取量の推定を継続した。また、食品添加物の摂取量調査を実施する上で、輸入食品からの摂取量は重要と考えられることから、使用基準のある保存料10品目を対象に、輸入食品に含まれる食品添加物の量を推定するための調査を行った。一方、既存添加物等については、出荷量の実態を把握することを目的とし、製造・輸入量調査を行った。

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

香料の摂取量の推計は、国際的にMSDI法等により香料の生産段階における使用量又は添加率と食品の喫食量から求める推計法が一般的であり、流通している食品中の香料含有量から一日摂取量を推計した報告はほとんどない。一方、食品添加物では摂取量を把握するため、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化合物の摂取量を明らかとするため、高感度かつ選択的な分析が可能なダイナミックヘッドスペースーガスクロマトグラフ質量分析

装置(DHS-GC-MS)を用いてMB方式による各種食品群の分析を行い、20歳以上の食品の喫食量から主な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

食品添加物の安全性確保の一環として、わが国独自の香料規格の向上が重要と考え、本研究では、適切な安全性評価の整備を目指す。安全性評価において最初のステップである細菌を用いる復帰突然変異試験(Ames試験)の変異原性評価に焦点を絞り、構造活性相関手法(QSAR)に基づく遺伝毒性予測システムの研究について効率的かつ有効なアプローチを検討する。

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

食品添加物は、原則として、人の健康を損なうおそれのない場合として厚生労働大臣が定める場合に限り、その使用が認められ(指定)、その品質を担保するために純度や成分について遵守すべき項目(成分規格)が設定されている。成分規格に記載される各試験に用いられる試験法は、食品添加物公定書の一般試験法の項にまとめられている。そのため、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、その手続きの迅速化が求められているが、成分規格設定の迅速化のためには分析法の進歩に対応して一般試験法を改良する

だけでなく、国際整合化を図ることが必須であると考えられる。

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、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。さらに、比較結果から、今後公定書に優先的に追加すべき試験法の一つとして質量分析計を用いる試験法が挙げられたことから、特にガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）を用いる分析法について検討すべく、JECFAの各条規格あるいは成分規格案を具体例として取り上げて妥当性検証を行い、GC-MSを用いる分析法を食品添加物公定書の一般試験法として取り入れる場合の課題について検討した。

5. 赤外スペクトル測定法に関する調査研究

国際規格において食品添加物の確認試験に多用されている赤外スペクトル（IR）について、我が国での規格基準向上を目的とし、国内外の最新のIRの試験法との比較調査を行う。調査内容には、既存の測定法に加え、普及著しい減衰全反射法（ATR法）も含め、国内外の規格基準との整合性に配慮しつつ、必要に応じて規格試験法の改善を目指す。

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

れることとなり、一般試験法の鉛試験法において、前処理法の違いにより、第1法～第5法が検液の調製法として設定される。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。一般試験法のヒ素試験法において、前処理法の違いにより、検液の調製法に第1法～第5法が設定され、測定は装置Bまたは装置C（水素化物発生装置）を使用して行うこととなっており、食品添加物毎にこれらの前処理法及び測定方法が規定されている。

高マトリックス中の鉛やヒ素の分析の前処理法としては、鉛ではピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム（APDC）溶媒抽出法や、イオン交換樹脂法などの、共存元素との分離や目的元素の濃縮を行う方法が一般的に採用されており、第9版食品添加物公定書においても、ナトリウム塩等の高マトリックスを含む食品添加物中の鉛の前処理においてはAPDC溶媒抽出法が第5法として設定される。ヒ素においてはヒ素が金属イオンと沈殿しやすい性質を利用し、廃水中や土壌からヒ素を除去する方法や、キレート樹脂に金属塩を結合させヒ素を精製する方法が多く報告されている。

本研究では、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）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、誘導プラズマ発光分析装置（ICP-AES）による同時分析が可能であるか検討した。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ている品目について、ICP-AES法により同時分析が可能である

か、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に関する研究

1) 香料化合物規格の国際整合化に関わる調査研究

本研究では、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27年度以前に行った実測値 (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

- a 実測値 (II) の調査品目の選定
- b 実測値 (II) 収集のための調査票の検討及び調査の実施
- c 調査結果の集計と各規格項目の比較
- d 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、測定項目及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) 使用量調査

「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～12 月に国内

で食品香料製造に使用した香料化合物の量について、食品香料を製造している会社 136 社から回答を得た。

(2) 過去の調査との比較

(1)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

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

消費者人口：

$$\begin{aligned} & \text{日本の総人口(1億2000万人)} \times 0.1 \\ & = 1200 \text{ 万人} \end{aligned}$$

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(43438 t)を日本香料工業会会員 136 社の年間販売量(46580 t)で除した値(0.93)。

(3) 米欧及び中南米の調査との比較

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(2)と同様に摂取量を算出した。

消費者人口：

日本	$1 \text{ 億} 2000 \text{ 万人} \times 0.1 = 1200 \text{ 万人}$
米国	$3 \text{ 億} 3000 \text{ 万人} \times 0.1 = 3300 \text{ 万人}$
欧州	$4 \text{ 億} 5000 \text{ 万人} \times 0.1 = 4500 \text{ 万人}$
中南米	$6 \text{ 億} 2100 \text{ 万人} \times 0.1 = 6210 \text{ 万人}$

報告率：

日本、米国、中南米は90%、欧州は80%

b. 天然香料物質

(1) 使用量調査

IOFIより提供された「NFCs Poundage Survey List」から日本における天然香料基原物質に該当する品目のうち米国食品香料工業協会がフレーバーとしての使用において安全と見なされる物質として公開したもの（FEMA GRAS）リスト収載品を選択して独自に作成した調査票を用いて香料化合物と同様に調査を行った。

得られた回答については内容・数量等を精査した後、使用量を集計し、香料化合物についてはIOFIの「CDS Poundage Survey List（CDS：Chemical Defined Substance）」に転記した。また天然香料物質については「NFCs Poundage Survey List（NFC：Natural Flavoring Complex 天然フレーバー複合物質）」に記入し、ともにIOFIへの報告を行った。

(2) 過去の調査との比較

(1)の調査の対象外で平成25～27年度の天然香料物質の使用実態調査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、(1)の結果とともに天然香料基原物質毎に集計し、過去の調査結果（2013年分）と比較した。

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

a. 指定添加物

国民一人が一日に摂取する食品添加物量を、それぞれの物質の製造・輸入量の統計データから推定する。

食品添加物を国内で製造している、あるいは、輸入している事業者に対し、アンケート形式で、食品添加物1品目毎に(1)製造・輸入量、(2)差し引くべき輸出量、食品以外の用途向けの使用量・出荷量、(3)

食品向けの使用量・出荷量の回答を求め、これを集計した上で、添加後の食品加工工程での消長、食品の廃棄率等の考察を加え、人口・年間日数で除して、一日の推定摂取量とする調査を3年1サイクルで行う。

(1) 第11回摂取量調査

調査法：アンケート方式

調査対象年度：平成25年4月から26年3月までの1年間

調査対象：指定添加物438品目

調査内容：製造及び輸入した品目名

- ①総供給量 製造量及び輸入量
- ②総出荷量 食品向け、輸出、食品以外の用途

調査対象製造所：日本国内の食品添加物製造事業者・輸入販売事業者（657事業者）（前回は689事業者）。

1年目調査では74.1%、2年目、3年目に実施された追調査により、最終的には86.9%となった。

(2) 第12回摂取量調査

調査対象年度：平成28年4月から29年3月までの1年間

調査対象：指定添加物454品目

(3) 輸入食品中の食品添加物

① 使用したデータ

含有量推定の調査対象食品添加物：保存料の安息香酸、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸カルシウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、ナイシン、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸ブチル、パラオキシ安息香酸プロピルを含有量推定の10種類

食品添加物及び対象食品添加物を含有す

る食品の輸入量データ：厚生労働省統計資料（平成 25 年 4 月 1 日から平成 26 年 3 月 31 日）

輸入食品データ：輸入食品監視統計（平成 25 年 4 月 1 日から平成 26 年 3 月 31 日）

② 輸入加工食品中の食品添加物含有量の推定

上記 10 種類の食品添加物を使用しているとして検疫所に届出られた加工食品を抽出し、その中から各々の添加物の使用基準を基に、使用基準のある加工食品を抽出し、それらの食品での含有量を推定した。それ以外の食品は、その加工食品の原料の一部に今回の調査対象食品添加物が使用されており、含有量を推定することは困難と判断し、調査対象からはずすこととした。なお、届出時には食品添加物の含有量の記載が無いため、含有量は基準値の 50%量として計算を行った。

b. 既存添加物

(1) 第 6 回製造・輸入量調査

調査方法：アンケート方式

調査対象期間：平成 26 年 4 月から 27 年 3 月までの 1 年間あるいは平成 26 年を過半日数含む 1 年間

調査対象企業：既存添加物等の製造・輸入の可能性のあった企業 395 社

調査項目：

・調査対象添加物

- ① 「既存添加物名簿収載品目リスト」に収載されている全品目 365 品目
- ② 「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リスト」のうち、第 8 版食品添

加物公定書で成分規格が定められている品目、品名に「色素」を含む品目、その他（一般飲食物添加物名番号一覧表記載品目）、合わせて 53 品目（a、b 合計 418 品目）

・記載要求事項

- ① 製造・輸入を行っているものの品名
 - ② 製造・輸入の区別
 - ③ 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値）
 - ④ 換算単位が明示されていない品目にあってはその純度
 - ⑤ 用途（食品/非食品）別出荷量、輸出量
- 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に掲載された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。リストが公表されて 20 年が経過し、成分規格が定められているものは増加したが、未設定のものも依然多い。これらについては純度など量的基準を明確に記入してもらうよう留意した。

調査票の回収結果：最終的な調査票の回収率は 87.6%となり、製造または輸入していると回答した事業者は 244 社であった。

(2) 第 7 回製造・輸入量調査

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

調査対象企業：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）
その他は第 6 回に同じ。

2. MB方式による香料の摂取量調査の検討

1) 試料

加工食品群別年齢階級別の食品喫食量リストを作成し、7食品群189食品を購入した。これら食品を7つの食品群に分類し、20歳以上の一日喫食量をもとに試料を採取、均質磨砕して1~7群からなるMB方式調査用の加工食品群試料(MB試料)を調製した。

2) 分析

ページ&トラップ装置AQUA PT5000J Plus及びオートサンプラーSOLATek72 (Teledyne Tekmar) をGCMS-QP2010 (島津製作所) と連携させたDHS-GC-MSを用い、MB試料中のエステル系及びアルコール系香料の分析を行った。アルデヒド系香料については、分散型固相抽出法のQuEChERS法により抽出・精製後、GC-MSによりMB試料の分析を行った。

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

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#、スマイルズ、分子量が掲載されている。

2) QSARモデル

(1) DEREK Nexus

英国ラーサ社が開発・販売する商用のSARシステムである。DEREKは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

米国MultiCase Inc.が開発した統計的方法に基づく毒性予測ソフトウェアである。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。

(3) Star Drop

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。

3) Ames試験

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(Ames試験)を実施した。本試験はアミノ酸要求性のサルモネラ菌と大腸菌の株を用いて点変異を検出し、被験物質がDNAに影響を与えるか否かの判定する試験である。尚、簡易型Ames試験(FAT)はTA100、TA98による96-wellプレートを用いたFluctuation法によるAmes試験である。

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) 食品添加物公定書一般試験法と国外規格の試験法との比較

(1) 調査対象

- ・第9版食品添加物公定書案(公定書9版案)
- ・米国薬局方の米国食品化学物質規格集 第10版(FCC10: Food Chemicals Codex, 10th Edition)
- ・FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議(JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)の食品添加物規格総合概論 第4巻(JECFA vol4: Combined Compendium of Food Additive

Specifications volume 4)

(2) 調査方法

①一般試験法の項目による比較

公定書9版案一般試験法項目とFCC10及びJECFA vol4における試験法との比較を行い、FCC10及びJECFA vol4における試験法には記載があるが公定書9版案には記載のない一般試験法項目について比較した。

②個別一般試験法の内容についての比較

近年使用頻度が高まっているMSを検出器として用いる試験法や、現在は各条規格に個別に設定されているが、一般試験法としての規格設定の検討を要すると考えられる残留溶媒試験法 (Residual Solvents) について、試験の内容の比較を行い、公定書では設定がされていない事項等を確認した。

2) GC-MSを用いる分析法の検証1：ローズマリー抽出物中の揮発性成分分析法の検証

1)の結果から、今後公定書に優先的に追加すべき試験法の一つとしてMSを用いる試験法が挙げられたことから、特にGC-MSを用いる分析法について検討すべく、JECFAの各条規格あるいは各条規格案でMSを用いている試験を調べた (Table 4-1)。この内、具体例として、まず、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) の純度試験に記載されている揮発性成分分析法を取り上げて妥当性検証を行い、GC-MSを用いる試験法を食品添加物公定書の一般試験法として取り入れる場合の課題について検討した。

(1)試料及び試薬

ローズマリー抽出物は、3社計2製品を用いた。揮発性成分標品として、市販の(-)-

borneol、(-)-bornyl acetate、(-)-campho、eucalyptol及びverbenone試薬を、内標準物質 (IS) として、市販の4-heptanon試薬を用いた。抽出溶媒として、高速液体クロマトグラフィー用Tetrahydrofuran (THF) を用いた。

(2)標準液及び試料溶液の調製

- ・内部標準液 (ISS) : 4-heptanon 0.4 mg/mL
- ・標準液: 各標品の標準原液 (0.4 mg/mL) を調製し、それぞれ約0~200 µg/mLになるようTHFで希釈し、濃度6点の標準液 (IS 20 µg/mL含有) を作製した。
- ・試料溶液: 2.5 g又は250 mgの試料を精密に量り、ISS 500 µLを加え、THFで10mLに定容し、超音波処理後、遠心上清を用いた。

(3)GC-MSによる分析条件

GC-MSによる測定は、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。

(4)各揮発性成分量の算出

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量を算出した。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 (Table 4-2) の組み合わせで検量線を作成し、各成分の量 (mg/kg) を算出した。

(5)試験法の妥当性評価

分析者2名が1日につき2回分析試料を調製し、3日間行った。検量線作成のための標準液になるようにジエチルエーテルで正確に希釈し、濃度5点の検量線用標準液を調製

した(1日1回調製)。得られた定量値12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。得られた精度を「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」(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、平成22年12月24日)及び「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」(医薬食品局食品安全部長、食安発第0926003号、平成20年9月26日)の基準と比較することにより、目的成分量の分析法として妥当であるかを評価した。

3) GC-MSを用いる分析法の検証2：ヒドロキシプロピルメチルセルロース中のプロピレンクロロヒドリン量分析法の検証

別の具体例として、第74回JECFA会議にて審議されたヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)の成分規格の純度試験に記載されているプロピレンクロロヒドリン(PCH)量分析法を取り上げ、妥当性検証試験を行った。

(1)試料及び試薬

HPMC試料として、市販試薬3社3製品を用いた。PCH標品として、市販の1-chloro-2-propanol(1C2P)試薬(純度75.3%、2-chloro-1-propanol(2C1P)含有)を、ISとして市販の σ -xylene- d_{10} 試薬を用いた。抽出溶媒として、ジエチルエーテルを、内部標準原液調製にメタノールを用いた。

(2)内部標準液、標準液及び試料溶液の調製

- ・内部標準原液： σ -xylene- d_{10} 16 ng/mL
- ・内部標準液： σ -xylene- d_{10} 8 ng/mL
- ・標準原液：PCH標品 10 μ g/mL
- ・標準液：PCH標品 500 ng/mL
- ・検量線用標準液：標準液を正確に希釈し、標品濃度25、50、100、200及び250 ng/mL

の検量線用標準液(IS各8 ng/mL含有)を調製した。

- ・標準添加試料液：試料1種及び標準原液を用いて正確に希釈し、超音波処理後、遠心上清を標準添加試料液(IS 8 ng/mL含有)とした。
- ・試料溶液：試料1 gを精密に量り、内部標準液5.0 mLを正確に加えた。超音波処理後、上清を試料溶液とした。

(3)GC-MS分析条件

GC-MSによる測定は、JECFA成分規格の条件(Table 4-3)により行った。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。

(4)各PCH量の算出

標品として用いたPCHは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。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を用いた。

(5)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。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。得られた精度を「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」及び「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」の基準と比較することにより、目的成分量の分析法として妥当であるかを評価した。

5. 赤外スペクトル測定法に関する調査研究

1) 測定に用いる装置による違いの検討

2社 (A社、B社) の機器メーカーのATR装置でモンテルカストナトリウム (ナカライテスク社製) を測定した。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、Geプリズムでの測定を行った。さらに、ATR補正機能の違いについても検討を行った。この検討でのATR法の測定には、A、B社ともに、一回反射ATR装置 (入射角 45°) 用い、分解能は 4 cm^{-1} 、測定領域は $4000\sim 600\text{ cm}^{-1}$ (Geプリズムのみ $4000\sim 700\text{ cm}^{-1}$) で測定を行なった。それぞれについて、解析ソフトでATR補正を行った。

2) 反射回数及びプリズムの違いに関する検討

1回反射 (入射角 45°)、または5回反射ATRモジュール (中央での入射角 45°) 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。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。

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。測定試料は、国立医薬品食品衛生研究所より提供を受けた食品添加物試料 (香料) を用いた。

6. 鉛及びヒ素の同時分析法に関する研究

1) 試薬・試液

硝酸 (超高純度試薬、Ultrapur-100)、塩酸 (超高純度試薬、Ultrapur-100) 酢酸アンモニウム溶液 (500 g/L 、鉄試験用)、25%アンモニア水 (有害金属測定用) 鉛標準液 ($1000\text{ }\mu\text{g/mL}$) 炭酸水素ナトリウム (特級)、炭酸ナトリウム (特級) は関東化学 (株) 製を用いた。ヒ素 (III) 標準液 ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$)、塩化ナトリウム (特級)、塩化鉄 (III) 六水和物 (特級)、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (食品添加物用)、エタノール (95)、硝酸マグネシウム六水和物 (特級) 炭酸カリウム (特級) は和光純薬工業 (株) 製を用いた。ヒ酸 [As(V)] 水溶液 (NMIJ CRM、 99.53 mg/kg) は国立研究開発法人産業技術総合研究所製を用いた。塩化カリウム (特級) は片山化学製を用いた。炭酸水素アンモニウム (特級) はシグマアルドリッチ製を用いた。食用赤色3号は食品添加物製品を用いた。

1 M 酢酸アンモニウム溶液: 酢酸アンモニウム溶液 78 mL を水で 500 mL とした。

0.1 M 酢酸アンモニウム溶液: 酢酸アンモニウム溶液 4 mL を水で 250 mL とした。

0.5 M 酢酸アンモニウム溶液: 酢酸アンモニウム溶液 80 mL を水で 1000 mL とした。

鉄溶液: 塩化鉄 (III) 六水和物 2.4 g を水に溶かし、 50 mL とし、その液 5 mL を水で 50 mL とした。

硝酸マグネシウム六水和物・エタノール (95) 溶液 (1→10): 硝酸マグネシウム六水和物 50 g をエタノール (95) で 500 mL とした。

硝酸マグネシウム六水和物・エタノール (95) 溶液 (1→50): 硝酸マグネシウム六水和物 10 g をエタノール (95) で 500

mLとした。

硝酸(1→10)溶液：硝酸10 mLを水で100 mLとした。

硝酸(1→100)溶液：硝酸10 mLを水で1000 mLとした。

鉛標準原液(100 µg/mL)：鉛標準液(1000 µg/mL) 5 mLを硝酸(1→100)溶液で50 mLとし、鉛標準原液(100 µg/mL)とした。

Pb・As混合標準原液：鉛標準原液(100 µg/mL) 5 mL、ヒ素(III)標準液(1000 µg/mL) 7.5 mLを硝酸(1→100)溶液で100 mLとし、Pb・As混合標準原液とした(Pbとして5 µg/mL、Asとして7.5 µg/mL)。

Pb・As混合標準液：Pb・As混合標準原液を適宜硝酸(1→100)溶液で希釈し、以下の表に示す濃度となるように、Pb・As混合標準液1～7を調製した。

Pb・As混合標準液No.	濃度(µg/mL)	
	Pb	As
1	1.0	1.5
2	0.8	1.2
3	0.5	0.75
4	0.4	0.6
5	0.2	0.3
6	0.1	0.15
7	0.05	0.075

As(V)標準原液：ひ酸[As(V)]水溶液約3.8 gを精密に量り、硝酸(1→100)溶液で50 mLとし、As(V)標準原液(7.5 µg/mL)とした。

As(V)標準液：As(V)標準原液(7.5 µg/mL)を適宜希釈し、As(V)標準液(As(V)として0.0325～1.5 µg/mL)を調製した。

Pb・As混合溶液(Pb 0.2 mg/L、As 0.3

mg/L)：Pb・As混合標準原液2 mLを硝酸(1→100)溶液で50 mLとした。

Pb・As混合溶液(Pb 0.2 mg/L、As 0.075 mg/L)：ヒ素(III)標準液(100 µg/mL)を硝酸(1→100)溶液で0.75 mL及び鉛標準原液(100 µg/mL) 2 mLを硝酸(1→100)溶液で100 mLとした液5 mLを、硝酸(1→100)溶液で50 mLとした。

Zn標準原液：Zn標準液(1000 µg/mL) 10を硝酸(1→100)溶液で20 mLとし、Zn標準原液(500 µg/mL)とした。

Pb・As・Zn混合標準液：Pb・As混合標準原液及び、Zn標準原液を適宜硝酸(1→100)溶液で希釈し、以下の表に示す濃度となるように、Pb・As・Zn混合標準液1～7を調製した。

Pb・As・Zn混合標準液No.	濃度(µg/mL)		
	Pb	As	Zn
1	1.0	1.5	50
2	0.8	1.2	40
3	0.5	0.75	30
4	0.4	0.6	20
5	0.2	0.3	10
6	0.1	0.15	5
7	0.05	0.075	2.5

2) 試料

塩化アンモニウム、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、食用赤色3号は食品添加物製品を用いた。

3) 器具・装置

ダイヤフラム真空ポンプ、SPEバキュームマニホールド、無機分析用吸引マニホールドDigiTUBE用ラック、PTFEデリバリーチップ、1、3、6 mLアダプター付き25 mLリザーバー、キレート固相カートリッジ(Inert Sep ME-1、250 mg/6 mL)、

エンプレティリザーバー (20 mL、フリット付) 及びDigiTubeはGLサイエンス(株)製を用いた。ホットプレート (CHP-250DN、CHP-250DR) 及びホットスターラー (DP-1M) はアズワン製を用いた。電気マッフル炉 (KDF S100) はデンケン・ハイデンタル製を用いた。

高周波誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES)、SPS-3520) 日立ハイテクサイエンス(株)製を用いた。

4) ICP-AES法による定量

試験液、標準液及び空試験液につき、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。標準液の発光強度より検量線を作成し、試験液強度から空試験液吸光度を差し引いた値から、検量線を用いて試験液中の鉛及びヒ素の濃度を求め、試料中の各元素量を算出した。

元素	測定波長
Pb	220.35
As (III)、As (V)	193.76
Zn	213.86

5) キレート固相カートリッジによる鉛及びヒ素の抽出法の検討

(1) 試料液の調製

塩化ナトリウム2 gを量り、Pb・As混合標準原液0.8 mLを添加 (Pbとして2 µg/g、Asとして3 µg/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、アンモニア水でpH1~9となるように調整し試料液とした。

(2) キレート固相カートリッジによる鉛及びヒ素の抽出

キレート固相カートリッジを硝酸 (1→100) 溶液5 mL (流速20 mL/min) で洗浄

し、水 20 mL以上 (流速20 mL/min) でカートリッジ内に残る硝酸を洗浄した。

0.1 M酢酸アンモニウム溶液5 mLを流出させ、試料液全量を流速5 mL/minでカートリッジへ負荷した。0.5 M酢酸アンモニウム10 mL及び水10 mLで洗浄後、硝酸 (1→100) 溶液約8 mL (流速1 mL/min) でゆっくりと溶出し、その溶出液を回収し、硝酸 (1→100) 溶液で10 mLとし、試験液とした。また、試料を用いずに試験液の調製と同様に操作し、得られた液を空試験液とした。

(3) 鉛及びヒ素の添加回収率の算出

4) ICP-AES法による定量に従い、鉛及びヒ素を測定し、検量線より、試験液中の鉛及びヒ素の濃度を算出し、鉛及びヒ素の添加回収率を求めた。

6) 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

塩化ナトリウムまたは塩化カリウム2 gにPb・As混合標準原液0.8 mLを添加 (Pbとして2 µg/g、Asとして3 µg/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、アンモニア水でpH9となるように調整し試料液とした。

(2) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法

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、上澄液及び沈殿をストップコックを付けたフリット付エンプレティリザーバーに負荷し (Fig. 6-1)、沈殿のみを回収した。得られた沈殿を水10 mLで洗浄し、洗

浄液は捨てた。ストップコックを閉じ、硝酸(1→10)溶液1 mLでフリット上を満たし、5分間静置した。硝酸(1→10)溶液に沈殿が溶けたら、フリット上の硝酸(1→10)溶液を通液し、回収した。更に、少量の水でエンピテリザーバー及びフリットを洗浄し、得られた洗浄液を先の回収液と合わせ、水で10 mLとし試験液とした。

4) ICP-AES法による定量に従い鉛及びヒ素を測定し、検量線より、試験液中の鉛及びヒ素の濃度を算出し、鉛及びヒ素の添加回収率を求めた。

(3) pHの検討

(1) 試料液の調製に従い、pHは1、3、5、7及び9に調整し、試料液をそれぞれ調製した。

(4) 次亜塩素酸ナトリウム溶液添加量の検討

(1) 試料液の調製に従い試料液を調製した後、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。以下(2) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法を行い、試験液を調製し、4) ICP-AES法による定量に従い鉛及びヒ素を測定し、検量線より、試験液中の鉛及びヒ素の濃度を算出し、鉛及びヒ素の添加回収率を求めた。

(5) 鉄添加量の検討

(1) 試料液の調製に従い調製した試料液に次亜塩素酸水0.2 mLを加え、鉄溶液0.05~2 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。以下(2) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法に従

い精製を行い、試験液を調製し、4) ICP-AES法による定量に従い鉛及びヒ素を測定し、検量線より、試験液中の鉛及びヒ素の濃度を算出し、鉛及びヒ素の添加回収率を求めた。

7) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法の妥当性評価

(1) 検量線の直線性の確認

Pb・As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*1 (Instrument Limit of Detection: 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、ブランク溶液及びPb・As混合溶液(Pb 0.2 mg/L, As 0.3 mg/L)を発光強度が安定した後それぞれ10回連続測定を行い、ブランク溶液の測定強度の平均値(Xb)及び標準偏差(Sb)並びにPb・As混合溶液の測定強度の平均値(X1)を算出し、以下の式によりILODを求めた。

$$I = 3 \times S_b / k$$

I: ILOD

k: 検量線の傾き $(X_1 - X_b) / C_1$

C₁: Pb・As混合溶液の濃度 (mg/L)

*1 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。

(3) 方法定量下限*2 (Method Limit of Quantification: 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、空試験液及びPb・As混合溶液(Pb 0.2 mg/L, As 0.075 mg/L)を発光強度が安定した後それぞれ10回連続測定を行い、空試験液

の測定強度の平均値 (X1b) 及び標準偏差 (Sd)並びにPb・As混合溶液の測定強度の平均値 (X11) を算出し、MLOQを求めた。

$$M = \sqrt{2 \times 10 \times S_d / k}$$

M: MLOQ

k: 検量線の傾き (X11 - X1b) / C2

C2: Pb・As混合溶液の濃度 (mg/L)

*2 方法定量下限 = 空試験液を連続 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。

(4) 併行精度

塩化カリウム2gにPb・As混合標準原液を以下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20mL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(n=5)。6) (2) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法により得られた試験液について、4) ICP-AES法による定量に従い鉛及びヒ素を測定し、検量線より、試験液中の鉛及びヒ素の濃度を算出し、鉛及びヒ素の添加回収率を求め、併行精度(Repeatability: RSDr)を算出した。

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

(5) 室内再現精度

塩化カリウム2gにPb・As混合標準原液を鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法の妥当性評価 (4) 併行精度の表の濃度となるようにそれぞれ添加し、室温で30分間放置した後、硝酸(1→100)溶液20mL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(n=5)。6) (2) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法により得られた試験液について、4) ICP-AES法による定量に従い、鉛及びヒ素を測定し、検量線より、試験液中の鉛及びヒ素の濃度を算出し、鉛及びヒ素の添加回収率を求めた。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(Intermediate Precision: RSDip)を求めた。

8) 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)2gにPb・As混合標準原液0.8mLを添加(Pbとして2µg/g、Asとして3µg/g相当添加)し、室温で30分放置した後、添加試料とし、6) (2) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法により試験液を調製した。得られた試験液について、4) ICP-AES法による定量に従い鉛及びヒ素を測定し、検量線より、試験液中の鉛及びヒ素の濃度を算出し、鉛及びヒ素の回収率を求めた。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20mL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。

9) 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

試料2gにPb・As混合標準原液0.8mLを添加(Pbとして2µg/g、Asとして3µg/g相当添加)し、30分室温で放置した後、硝酸(1→100)溶液20mLを加え溶かし、試料液とした。

(2) 試料液の調製法 (改良法)

試料2 gにPb・As混合標準原液0.8 mLを添加 (Pbとして2 µg/g、Asとして3 µg/g相当添加) 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。

(3) 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pH9に調整した後、30分静置した。上澄液及び沈殿をストップコックを付けたフリット付エンプティリザーバーに負荷し (1滴/秒程度)、沈殿のみを回収した。得られた沈殿を水10 mLで洗浄し、洗浄液は捨てた。ストップコックを閉じ、硝酸 (1→10) 溶液1 mLでフリット上を満たし、5分間静置した。硝酸 (1→10) 溶液に沈殿が溶けたら、フリット上の硝酸 (1→10) 溶液を通液し、回収した。更に、少量の水でエンプティリザーバー及びフリットを洗浄し、得られた洗浄液を先の回収液と合わせ、水で10 mLとし試験液とした。

4) ICP-AES法による定量に従いヒ素、鉛及び亜鉛の定量に従い測定し、検量線より、試験液中の鉛及びヒ素の濃度を算出し、鉛及びヒ素の添加回収率を求めた。ただし、試料を用いずに調製した液を、試料液と同様に操作し、得られた液を空試験液とした。

10) 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 (タール色素試験法鉛試験法第2法)

試料1.0 gを磁製のるつぼに量り、Pb・As混合標準原液0.4 mL及び亜鉛標準原液0.4 mLを添加 (Pbとして2 µg/g、Asとして3 µg/g、Znとして200 µg/g相当添加) し、30分放置した。硝酸マグネシウム六水和物・エタノール (95) 溶液 (1→10) 10mLを加えて混和し、エタノールに点火して燃焼させた。燃焼終了近くになると内容物が飛び散ることがあるため、蓋を用いた。冷後、硫酸を2 mLで試料全体を潤し、ホットプレート上で100°C～500°Cで徐々に温度を上げ内容物は石英棒で時々かき混ぜながら加熱した。ほとんど炭化し、硫酸の白煙が発生しなくなるまで加熱した。その後、るつぼを電気炉に入れ、徐々に加熱して500°Cで強熱して灰化した。炭化物が残ったときは、硝酸マグネシウム六水和物・エタノール (95) 溶液 (1→10) 5 mLを加えて混和し、同様の操作を繰り返した。

冷後、残留物に塩酸 (1→4) 30 mLを加え、加熱して蒸発乾固させ、得られた残留物に水10 mLを加え加熱して溶かし試料液1とした。

(2) 試料液の調製法 (タール色素試験法ヒ素試験法)

試料0.50 gを量り、磁製のるつぼに入れ、Pb・As混合標準原液0.2 mL及び亜鉛標準原液0.2 mLを添加 (Pbとして2 µg/g、Asとして3 µg/g、Znとして200 µg/g相当添加) し、30分放置した。これに硝酸マグネシウム六水和物・エタノール (95) 溶液 (1→50) 20mLを加え、エタノールに点火して燃焼させた。燃焼終了近くになる

と内容物が飛び散るため蓋を用いた。その後、ホットプレート上で150°C~500°Cで徐々に温度を上げ加熱し、時々石英棒で内容物を砕きながら、ほとんど炭化するまで加熱した。その後、電気炉に入れ、徐々に加熱して500°Cで強熱して灰化した。炭化物が残ったときは、少量の硝酸で潤し、白煙が発生しなくなるまで加熱した後、再び電気炉に入れて500°Cで灰化した。冷後、残留物に塩酸(1→4) 15 mLを加え、蒸発乾固し、水20 mLを加え加熱して溶かし試料液2とした。

(3) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出方法

9) (3) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出に従い実施した。

(4) キレート固相カートリッジによる抽出方法

キレート固相カートリッジを硝酸(1→100) 溶液5 mL(流速20 mL/min)で洗浄し、水20 mL以上(流速20 mL/min)でカートリッジ内に残る硝酸を洗浄した。0.1 M酢酸アンモニウム溶液5 mLを流出させ、試料液を流速5 mL/minでカートリッジへ負荷した。0.5 M酢酸アンモニウム10 mL及び水10 mLで洗浄後、硝酸(1→100) 溶液約7 mLで流速1 mL/minでゆっくりと溶出し、その液を回収し、硝酸(1→100) 溶液で10 mLとし、試験液とした。ただし、試料を用いずに調製した液を、試料液と同様に操作し、得られた液を空試験液とした。

(5) 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

あらかじめ、フリット付エンプティリ

ザーバーの下部にキレート固相カートリッジをアダプターで連結し、キレート固相カートリッジ下部にストップコックを連結し、マニホールドに接続したものを用意した(Fig.6-2)。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、30分静置した。必要に応じて遠心分離(3000 rpm、5分間)し、上澄液及び沈殿をエンプティリザーバー内へ負荷した。ストップコックを開け、毎秒1滴程度の早さで流れるように調整し、沈殿をエンプティ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、エンプティ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でフリット上を満たし、5分間静置した。硝酸(1→10) 溶液に沈殿が溶けたら、フリット上の硝酸(1→10) 溶液を通液し、回収した。更に、少量の水でエンプティリザーバー及びフリットを洗浄し、得られた洗浄液を先の回収液と合わせ、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5 mLで洗浄し、洗液は捨て、水20 mLで洗浄した後、硝酸(1→100) 7 mLで溶出し(1 mL/min)、硝酸(1→100) で10 mLとし試験液2とした。なお、2) 試料液の調製法(タール色素試験法ヒ素試験法)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、最終試験液は5 mLとした。ただし、試料を用いずに調製した液を、試料液と同様に操作し、得られた液を空試験液とした。

4) ICP-AES法による定量に従い鉛、ヒ

素及び亜鉛を測定し、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

(1) 実測値 (I) 及び実測値 (II) 調査

平成 28~30 年度に 511 品目の調査を行った。

① 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 511 品目中 384 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平成 29 年度までのデータも含めて、規格項目毎に判断基準 (Table 1-1) に基づき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。なお、判定しやすくするためにグラフ化を行った。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 384 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 328 品目 (O、OK、OY、OW、△)、 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)、更なる調査が必要なものは 20 品目 (X) であった。詳細に見ると JECFA 規格を満たす製品が 3 つ以上報告されかつ 7 割以上の製品が JECFA

規格を満たしているものは 280 品目 (O)、 JECFA 規格に合致しているが厳しすぎる (狭すぎる) ため変更した方が良いものは 9 品目 (OK)、 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は 3 品目 (OY)、 JECFA 規格に合致しているが JECFA 規格が広すぎるため変更した方が良いものは 1 品目 (OW)、 JECFA 規格を満たす製品の数が 2 つであったが規格を満たさない製品の報告がなかったものは 35 品目 (△) であった。なお、データのバラツキが大きいため、あるいは第 2 成分等の情報がないため規格設定できなかつた 20 品目 (X) は以降の検討から外した。

b) 融点・凝固点： JECFA 規格で「minimum」と表記があるもの、ないものがあつたが、すべて「minimum」とみなした。 JECFA 規格で設定があつた 56 品目のうち、 JECFA 規格を満たしているものは 28 品目 (O、OK、OY、OW、△)、 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 25 品目 (XO、F)、更なる調査が必要なものは 3 品目 (X、ND) であった。詳細に見ると JECFA 規格を満たす製品が 3 つ以上報告されかつ 8 割以上の製品が JECFA 規格を満たしているものは 13 品目 (O)、 JECFA 規格に合致しているが厳しすぎる (狭すぎる) ため変更した方が良いものは 4 品目 (OK)、 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は 6 品目 (OY)、 JECFA 規格に合致しているが JECFA 規格が広

すぎるため変更した方が良いものは 1 品目 (OW)、JECFA 規格を満たす製品の数が 2 つであったが規格を満たさない製品の報告がなかったものは 4 品目 (△) であった。JECFA 規格に問題があるが 3 つ以上の実測データより規格案が設定できたものが 19 品目 (XO)、融点・凝固点が 20°C未満のため規格設定は不要と考えられるものが 6 品目 (F) であった。

- c) 屈折率: JECFA 規格で設定があった 323 品目のうち、JECFA 規格を満たしているものは 276 品目 (O、OK、OY、OW、△)、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 47 品目 (XO、SO、F) であった。詳細に見ると JECFA 規格を満たす製品が 3 つ以上報告されかつ 8 割以上の製品が JECFA 規格を満たしているものは 208 品目 (O)、JECFA 規格に合致しているが厳しすぎる (狭すぎる) ため変更した方が良いものは 13 品目 (OK)、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は 8 品目 (OY)、JECFA 規格に合致しているが JECFA 規格が広すぎるため変更した方が良いものは 9 品目 (OW)、JECFA 規格を満たす製品の数が 2 つであったが規格を満たさない製品の報告がなかったものは 38 品目 (△) であった。JECFA 規格に問題があるが 3 つ以上の実測データより規格案が設定できたものが 32 品目 (XO)、JECFA 規格は 1 点規格だが 3 つ以上の実測データより規格案が設定できたものが 7 品目 (SO)、標準の測定温度

では固体のため、規格設定は不要と考えられるものが 8 品目 (F) であった。

- d) 比重: JECFA 規格で設定があった 321 品目のうち、JECFA 規格を満たしているものは 215 品目 (O、OK、OY、OW、△)、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 104 品目 (XO、SO、F)、更なる調査が必要なものは 2 品目 (X) であった。詳細に見ると JECFA 規格を満たす製品が 3 つ以上報告されかつ 8 割以上の製品が JECFA 規格を満たしているものは 115 品目 (O)、JECFA 規格に合致しているが厳しすぎる (狭すぎる) ため変更した方が良いものは 8 品目 (OK)、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は 24 品目 (OY)、JECFA 規格に合致しているが広すぎるため変更した方が良いものは 18 品目 (OW)、JECFA 規格を満たす製品の数が 2 つであったが規格を満たさない製品の報告がなかったものは 50 品目 (△) であった。JECFA 規格に問題があるが 3 つ以上の実測データより規格案が設定できたものが 85 品目 (XO)、JECFA 規格は 1 点規格だが 3 つ以上の実測データより規格案が設定できたものが 12 品目 (SO)、標準の測定温度では固体のため、規格設定は不要と考えられるものが 7 品目 (F) であった。
- e) 酸価: JECFA 規格で設定があった 173 品目のうち、JECFA 規格を満たしているものは 127 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 46 品目 (XO、

F) であった。詳細に見ると JECFA 規格を満たす製品が 3 つ以上報告されかつ 8 割以上の製品が JECFA 規格を満たしているものは 106 品目 (O)、JECFA 規格に合致しているが厳しすぎる(狭すぎる)ため変更した方が良いものは 1 品目 (OK)、1 つもしくは 2 つしか実測データが得られなかったが規格を満たさない製品の報告がなかったものは 20 品目 (△) であった。JECFA 規格に問題があるが 3 つ以上の実測データより規格案が設定できたものが 3 品目 (XO)、アルデヒド類、エステル類ではないため規格設定は不要と考えられるものが 43 品目 (F) あった。

- f) (比) 旋光度: JECFA 規格で設定があった 4 品目のうち、JECFA 規格を満たしているものは 1 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 4 品目 (XO、F) であった。詳細に見ると JECFA 規格に問題があるが 3 つ以上の実測データより規格案が設定できたものが 1 品目 (XO)、物質名すべてが光学活性体ではないため規格設定は不要と考えられるものが 2 品目 (F) あった。なお、物質名が光学活性体なのに規格設定されていないものが 1 品目あった。

② 総合判定

2 製品以上の測定値が得られた 384 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 188 品目 (総合判定: O、OK、OY、OW、△)、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 167 品目 (XO、SO、X△)

であった。

詳細に見ると JECFA 規格を満たしている 188 品目中、JECFA 規格に全く問題ないと判断されたものは 83 品目 (総合判定: O)、JECFA 規格に合致しているが厳しすぎる(狭すぎる)ため変更した方が良いものは 18 品目 (総合判定: OK)、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は 25 品目 (総合判定: OY)、JECFA 規格に合致しているが JECFA 規格が広すぎるため変更した方が良いものは 14 品目 (総合判定: OW)、データ数が 2 つだが JECFA 規格に問題がないと判断されたものは 48 品目 (総合判定: △) であった。

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 167 品目中、3 つ以上の実測データより規格案が設定できたものは 153 品目 (総合判定: XO)、いずれかの JECFA 規格項目が 1 点規格だが 3 つ以上の実測データより規格案が設定できたものが 7 品目 (総合判定: SO)、1 つもしくは 2 つしか実測データが得られなかったが酸価不要以外に規格を満たさない製品の報告がなかったものは 7 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 29 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 127 品目 (総合判定: ND) あり、これら計 156 品目は来年度以降に更なる調査を行う予定である。

(2) 平成 25～29 年度のデータの見直し

① 平成 25～29 年度のデータの見直し

上述で見直した本年度の判断基準 (資

料1)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。

② 結果

838品目中、240品目の総合判定が変更となった(資料3)。その内39品目はデータ数が足りない、データのバラツキが大きい、第2成分等の情報が無い等の理由により、来年度以降再調査が必要となった。

(3) 問題点の整理

① JECFA規格の問題点

a) 異性体混合物のGC法による含量測定

流通品では異性体混合物のデータが得られたが、JECFA規格では、異性体に関する情報が無いため、その含量に関しての判断が困難だった(例：(E)-Geranyl tiglate (JECFA No.1822))。

b) 常温で固体の物質に屈折率、比重を設定しているもの、常温で液体の物質に融点・凝固点

常温で固体の物質に屈折率、比重を設定しているもの、常温で液体の物質に融点・凝固点を設定しているものが見られた。前者は過冷却での測定となるため測定法として問題があり、後者は規格として屈折率、比重が代用可能で、単に物理的性質が記載されているだけとも考えられる。

c) 不要と思われる規格の設定(酸価、旋光度)

規格項目自体の妥当性に疑問を持たれる品目があった。香料の酸価に関しては、第9版食品添加物公定書で純度試験と位置づけられている。従って、経時変化等で

酸性物質が生成する可能性のある、アルデヒド類、エステル類のみで十分であると考えられ、テルペン類や脂肪酸類に該当するl-Monomenthyl glutarate (JECFA No.1414)、mono-Menthyl succinate (JECFA No.447)に酸価を設定する意味はない。旋光度に関しては、品目名で光学異性体を示していないにも関わらず、旋光度規格が設定されているものがあった(例：delta-Hexalactone (JECFA No.224))。これについては、単に分析値が収載されたものと推測され、規格値としては設定不要と考えられる。

d) 規格の幅

屈折率等通常ある程度の幅が必要な項目に対して、1点の規格が設定されているもの、幅が著しく狭いもの、逆に著しく広いものも存在した。また実測値の多くがJECFA規格の上限値もしくは下限値のものがあった。そのような場合、JECFA規格に合致はしているが、変更した方が良いという判断を行った(OY、OK、OW)。

e) 測定条件

屈折率、比重の測定温度が統一されていない点(例：Heptyl butyrate (JECFA No.154)の比重の測定温度30℃)も問題と考えられた。これは、必ずしもJECFA規格が誤っているわけではないが、測定者の負担増となることから香料の原則測定温度である屈折率20℃、比重25℃への統一が望ましい。JFFMAでは自主規格作成指針をつくり測定条件、規格幅等の統一を進めた。今後の各国での調査結果も踏まえ、JECFAにガイドライン作成を提案する必要があると考えられる。

② データ不足

今回十分なデータが得られなかった品目が136品目あった。これらの多くは使用会社が少なく、かつ使用量も少ないため規格の全項目の判定が困難であった。今後も長期に渡り、調査を行い続け、データ数を増やしていく必要があると考える。

③ 複数グレードが流通している品目

香料化合物の中には天然物をそのままもしくは化学反応させたものを分画、濃縮、精製したものがある（例：Myrcene（JECFA No.1327））。これらは、天然原料に由来する複数の化合物を含み、その成分や比率が一定ではないため、結果的に複数のグレードのものが流通しており、これらに一律の規格を設定することは困難であった。これらはEUのOther Flavouring Substanceのようなステータスに分離し、別な観点からの規格設定、例えば原料、製法を規格とするのも一案かと考えるが、海外との協議も必要と思われるので、今後Codex、JECFA、IOFIでの取り纏めを期待したい。

2) 香料使用量に関わる調査研究

a. 香料化合物

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。

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。

① 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。

② 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 に個別名で記載されて

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。

③ 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。

(3) 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。総使用量の集計に際しては、使用量が0.1kg未満の場合は、0.05kgとみなし集計した。

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14、738 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：774 t）、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：4、925 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使用しており、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、日米欧及び中南米の人口比率を考慮しても尚且つ日本は少ないことも分かった。

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。

(4) 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。

- ・香料化合物で比較すると、vanillinは全ての地域で1位であった。
- ・日本ではallyl isothiocyanate、4-methyl-5-thiazoleethanol及びそのエステルの使用順位が高い。
- ・米国では上位50位以内に日本で香料に該当しない化合物10品目が含まれている。これらは日本では調味料に分類されるが、米国においてはフレーバーとして使用されている。また米国ではmethyl salicylate、benzaldehyde、cinnamaldehyde、stearic acidといった化合物が日本と比較して摂取量順位が高い。
- ・欧州の摂取量上位の物質は順位の上下はあるものの日本と傾向が似ているが、trans-anethole、4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanoneの使用量順位が高い。
- ・中南米は上位50位以内に日本で香料に該当しない化合物14品目が含まれており、特に香料の副剤である溶剤等が多く含まれている。香料化合物で見ると、乳系のフレーバーによく使われる化合物であるbutyric acidやラクトン類が上位に含まれていた。

以上の結果、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。

一方、日本で使用されていない香料化

化合物が数多く欧米で使われている事実から推測すると、食文化から来る各国・地域での香気嗜好性はこの辺の香料化合物にあるものと思われ、微量で使用されている香料化合物の重要性を今回改めて認識できた。

(5) 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。

(6) 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。

(7) 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

有効回答会社 49 社から回収された回答データの整理、精査、検討を行った。さらに、日本では天然香料物質に該当するが 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

た天然香料物質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、調査するとともに、IOFI の調査リストには含まれていないが、過去の天然香料物質の使用実態調査（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。

(1) 日本で使用されている FEMA GRAS 収載の天然香料物質の品目数と年間使用量

我が国における FEMA GRAS 収載の天然香料物質は濃縮度(fold)により細分化された項目まで含めると 254 品目が使用されており、総使用量は 1403 t であった。過去我が国では数次にわたる香料化合物使用量調査、及び平成 27 年度厚生労働科学研究で天然香料基原物質リスト収載の全天然香料物質について総使用量の調査を実施しており、天然香料物質の使用量は香料化合物よりはるかに多かったことが明らかになっているが、今回の FEMA GRAS 収載物質に限った調査においても、香料化合物より天然香料物質の使用量が多いことが分かった。

(2) 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品目であった。また、今回の調査した天然香料物質の2015年の使用量は、1755 t であった。

(3) 過去の天然香料使用量調査結果との比較

平成26年度に2013年に日本国内で使用された天然香料の使用量調査を実施して

いる。このときは今回と違って、基原物質で使用量の調査を実施した。今回の調査は基原物質での調査ではなく、IOFIが分類したFEMA番号による調査で調査対象の内容が異なるが、過去との比較を実施するため、天然香料基原物質でまとめ、2013年の使用量調査結果と比較した。

今回調査した天然香料基原物質の使用量は、2013年が2369 t となっている。2013年は基原物質での調査のため、天然香料の製法に限定はないが、2015年の調査では、天然香料の抽出部位や抽出方法が限定されている。2013年の調査では612基原品目の調査を実施したが、2015年の調査では190基原品目と調査品目自体にも大きな差がある。そのため、2015年の使用量が少ないことは妥当な結果と言える。

使用量の多い天然香料はオレンジ、バニラ、レモン、グレープフルーツと同じ傾向であり、ほとんどの基原物質は同じような使用量であった。一方で一部の天然香料基原物質では、使用量に大きな差異が出た。これは今回調査した以外の製法等で得られた天然香料が調査の対象から外れたためと考えられる。

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

a. 指定添加物の摂取量調査

(1) 調査結果のまとめ方、査定

前回までと同様に、ADI との比較において、一人一日摂取量で問題となる品目は無かった。これらは指定添加物につき、その製造・輸入業者名簿によりアンケートを発送し、膨大な項目数の数値につき、集計、点検、再度のアンケート等を行い、

生産流通量を整理した後、約 1 年かけて食品添加物別に一日摂取量を求めるための作業を進めた結果である。最終作業の内容は、統計法による各種指定統計で行われる工業統計と異なる。

(2) アンケート申告数値の取扱い

アンケートは食品添加物グレード（出荷時、食品衛生法の規程による食品添加物〇〇の表示をした製品）として生産し、あるいは輸入して出荷した量と輸出量を対象とした。さらに製造または輸入した量のうち医薬用、化粧品用等食品用以外に販売した数量を除き、食品用として販売した量を「純食品向け出荷量」としてアンケートの中に記すよう依頼した。本調査研究では、食添グレード品の出荷量あるいは食品向け出荷量の積算値の根拠を、アンケート集計結果に基づいて行っているのであるが、一方で事業者からの申告値に拘束されてしまいがちでもある。報告の有無、数値ミスなどがまず勘案されなければならないが、さらに、整理された積算値に大きな間違いがないかどうかを確認するため、業界誌あるいは研究員の市場見積り値との整合性を検証することがどうしても必要である。作業に3年間を要する理由でもある。

(3) 使用査定量

最終集計値の見積りの際には最新の食品産業統計等による加工食品の生産変動等を考察し、アンケートにおける申告集計を基に、年間国内供給量を討議し、査定を行った。

全般的に食品添加物は食品添加物用以外の用途をもっているのが通例である。医薬品、医薬品添加剤、化粧品、飼料添加

物はもとより、プラスチック添加物、家庭用衛生用品成分、農薬等に使用されている。

このアンケート集計でもっとも注意する必要があるのが、生産され、出荷された食品添加物グレード品を純度の高い原材料として用い、新たに別の添加物が製造されるケースであり、調査しないと二重積算となる。リン酸が良い例で、リン製造所から食添グレードのリン酸が販売され、リン酸化合物メーカーが購入して各種リン酸塩を合成している。

(4) 摂取量と一人一日平均摂取量

食品添加物は一般の加工食品及び郊外レストランチェーンで一括調理される半調理食品などへ使用される。製造中の損失、流通時の廃棄、飲食店と家庭での期限切れ廃棄及び食べ残し等が発生する。本調査では、人の口に入らない食品添加物量を原則として 20%と見積り、単純な摂取量は使用査定量の 80%を基本として算出されているが、本報告書では輸入食品を勘案しなければならない対象添加物がある。的確な食品別統計が乏しいので正確性は期しがたいが、見積り計算により加えられ、その結果、80%と一致しないものがある。

摂取量までの数値は、原則として有効数字 3 桁としている。年間の国民全体の摂取量から一人一日平均摂取量を求める計算は、第 11 回であれば、平成 25 年人口 12700 万人で除し、さらに 365 (日) で除している。一人一日摂取量は mg 数となる。総供給量の査定にあたっては随所で四捨五入によって桁数を丸めている。一人一日摂取量計算については、計算上算出され

たものは、原則、有効数字 3 桁（摂取量が 0.1mg 未満のものは 2 桁、0.01mg 未満のものは 1 桁）で表示してある。

(5) 第11回調査における出荷量、使用査定量、摂取量の例示と査定の必要性

Table 1-2 に出荷量の上位ランキング 10 品目を例示し、標記の 3 数値を示す。

食品向け出荷量は企業の添加物毎の申告値の積算量である。アンケート回答からみると、食品グレード品の出荷量のうち、実際に食品に使用されている量が正確に把握できていないケースもあると考えられる。「使用査定量」及び「摂取量」はアンケートで申告された食品向け出荷量をもとに（この数値には使用対象不明の医薬品向け、再合成原材料向けも含まれると考えて）、実際に製造に使用された量、実際に人の口に入る量を査定した数値である。一般の指定統計ではこのような査定をするシステムにはなっていない。

(6) 第 12 回調査票回収結果

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。

b. 輸入食品中の食品添加物

平成25年度にはわが国は約3100万tの食品を輸入している、その中には多くの加工食品が含まれていることから、輸入される加工食品中に含まれている食品添加物の含有量を推定することとした。

前回調査では、消費者や食品関係業界の関心の高い亜硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、硝酸ナトリウムの 3 種類の発色剤、エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸

二ナトリウムの 2 種類の酸化防止剤を対象とした。

今回の調査では、保存料の安息香酸、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸カルシウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、ナイシン、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸ブチル、パラオキシ安息香酸プロピルの 10 種類を対象品目とした。

保存料10品目の輸入食品中の含有量推定値を国内における出荷量調査と比べると、輸入食品中に含まれる割合は安息香酸570%、安息香酸ナトリウム3.8%、ソルビン酸が11.3%、ソルビン酸カリウムが3.1%、ソルビン酸カルシウムが0%、デヒドロ酢酸ナトリウムが0%、ナイシンが0%、パラオキシ安息香酸エチルが0%、パラオキシ安息香酸ブチルが0%、パラオキシ安息香酸プロピルが0%であった。安息香酸は食品向け出荷量が無く、輸入食品中に約5.7 tと推定したが、安息香酸ナトリウムと合算してみると12.6 t (6.9%) であった。また、ソルビン酸及びソルビン酸カリウムが多かったが、摂取量としては影響がない量になると考えられる。

c. 既存添加物の製造・輸入量調査

(1) 第 6 回調査

出荷量の多かったものは、製造用剤ケイソウ土 (57054 t)、製造用剤生石灰 (48600 t) 製造用剤活性白土 (31837 t)、着色料マリーゴールド色素 (28028 t)、製造用剤トレハロース (26004 t)、製造用剤パーライト (16300 t)、着色料カラメル I (13757 t)、製造用剤活性炭 (9903 t)、着色料トウガラシ色素 (9827 t) 製造

用剤へキサン（8402 t）等であった。

既存添加物の場合、少量需給品の場合が多いため、自社の製品リストにはあるが、注文があったときだけ製造するため、調査年次には発注がなかったというケースがある。また、ある年に製造し数年間は販売のみ行っているような場合、調査年次に出荷がなければゼロとして報告されるケースもある。いずれも少量生産品目と推定されるが、出荷がないからといって市販流通がないとは一概に言えない。

(2) 第7回調査票の回収結果

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. 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) MB 試料中の香料分析法の検討

DHS-GC-MSを用いることで、高感度かつ選択的にMB試料中の香料を分析でき、摂取量推計に有効な分析手段と考えられた。しかし、低揮発性香料は本法による分析は難しく、別途試験法の検討が必要と考えられた。

2) MB 方式による一日摂取量の推計

エステル系香料のうち最も一日摂取量が多かったのは酢酸エチル 1.896 mg/人/日であり、次いで酢酸イソアミル 0.150 mg/人/日であった。アルコール系香料はイソアミルアルコール 9.7 mg/人/日で最も高く、次いでフェネチルアルコール 4.1 mg/人/日であった。アルデヒド系香料はバニリン 1.22 mg/人/日であり、次いでヘキサナール 0.54 mg/人/日であった。

酢酸エチルなどは食品成分として含まれており、天然由来の食品成分と添加香料の合計量と考えられた。

3) 一日摂取量の ADI との比較

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) を求めたところ、エステル系香料は酢酸エチル0.13%、酢酸イソアミル0.05%、であった。アルコール系香料は、イソアミルアルコールは5.5%であった。アルデヒド系香料は、バニリンが0.21%で最も高かった。今回調査した香料化合物は、いずれの香料も摂取量はADIに比べて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Ames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。この内5化合物については簡易型Ames試験を、6化合物についてはGLPによる標準的Ames試験を実施した。結果、簡易型Ames試験では1化合物、標準的Ames試験では全てで陽性を示した。簡易型Ames試験の結果はQSAR予測との解離が大きく、検証には標準的Ames試験が必要であると認識された。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。

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

1) 食品添加物公定書一般試験法と国外規格の試験法との比較

(1) 一般試験法の項目による比較

FCC10及びJECFA vol4における試験法と公定書9版案における一般試験法との比較を行った。FCC10及びJECFA vol4には記載があるが公定書9版案には記載のない一般試験法項目について調べた結果、試験法の大項目は公定書9版案にもFCC10やJECFA vol4と同様の設定があるものの、その中の細かい試験項目の一部は設定されていない場合が見受け

られた。公定書9版案に収載される添加物品目では設定の必要のない項目であっても、今後国外から指定要請される添加物品目によっては、試験項目の設定が必要となる可能性も考えられた。

(2) 個別一般試験法の内容についての比較

(1)の調査の結果、特にFCC10やJECFA vol4では、近年質量分析計を検出器として用いる試験法項目の記載が追加されていることが分かった。また、残留溶媒試験法は、FCC9やJECFA vol 4では一般試験法に項目があるが、公定書9版案の一般試験法では項目が設定されていない。そこで、質量分析計を検出器として用いる試験法と残留溶媒試験法について、より詳しい比較検討を行った。その結果、公定書9版案では、質量分析計の使用については、液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーの項目で検出器として挙げられているものの、質量分析計を用いる試験法についての留意点等の詳細については未だ記載がされていないことや、残留溶媒試験については、公定書のいくつかの添加物品目の各条規格では、検討を行った上で設定された試験法もあるが、公定書の一般試験法の項目は無く、さらに再検討を行った上で、一般試験法の設定を検討するのがよいと考えられた。

2) GC-MSを用いる分析法の検証1:ローズマリー抽出物中の揮発性成分量分析法の検証

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のとして定義されている。

一方、日本で入手可能な本研究で用いたローズマリー抽出物3製品のうち、JECFAの定義の抽出溶媒に近い含水アルコールを用いており、かつ測定対象としている揮発性成分が含まれている製品A2を用い、試験法検証用試料として用いることとした (Fig. 4-1)。

(1) GC-MSによる揮発性成分分析法の妥当性評価

①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、定量に用いるピークを切り取ったものを Fig. 4-2に示す。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、いずれもわずかなテーリングが認められたものの対称度 (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。

②検量線の直線性

JECFAの成分規格案に記載の揮発性成分含量算出式は誤りがあると思われたため、内標準法により定量値を算出することとした。また、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 (ISである4-heptanoneでは3つのイオンが設定されているため、同じく3つのイオンを検出するよう設定されているeucalyptolと(-)-bornyl acetateは、それぞれ9組ずつ、

2つのイオンを検出するよう設定されている(-)-borneol、(-)-camphor及びverbenoneはそれぞれ6組ずつ) で定量することを想定した。そこで、上記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eucalyptol では $R^2=0.9994\sim 0.9999$ 、(-)-camphor では $R^2=0.9980\sim 0.9991$ 、(-)-borneol では $R^2=0.9956\sim 0.9979$ 、verbenone では $R^2=0.9939\sim 0.9958$ 、(-)-bornyl acetateでは $R^2=0.9959\sim 0.9984$ であり、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。

③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、それぞれ $S/N=3$ 及び $S/N=10$ となることとした。検出限界また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。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。

④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日間繰り返し得たデータに対し行った。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。各成分の量はすべて100 ppm (mg/kg) を超えていたため、「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」に従い試験法の適否を判定したところ、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。

(2) 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分析値を算出した。そこで、用いるイオンによって得られる分析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を用いる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を用いる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。

(3) 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。製品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0.01236%（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0.1473%、borneolが0.2849%、verbenoneが0.08038%、bornyl acetateが0.03555%であり、5種の総量（w/w%）は0.560%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24.5であり、これはJECFAの成分規格値を満たしていた。

3) GC-MSを用いる分析法の検証2：ヒドロキシプロピルメチルセルロース中のプロピレンクロロヒドリン量分析法の検証
(1) GC-MSによるプロピレンクロロヒドリンの確認

JECFAのHPMC成分規格の純度試験では、PCH量について、1 mg/kg 以下

(Not more than 1 mg/kg) と規定されており、GC-MSによるPCH分析法が記載されている。本研究では、この分析法に準拠して実施した。スキャンモードにより m/z 30~200のトータルイオンクロマトグラム (TIC) 及び分析対象ピークのMSスペクトルを確認した。Fig. 4-3-1)にはISを含む検量線用PCH標準液 (200 ng/mL) のTICを示す。保持時間9.1分、10.0分及び14.1分にピーク1、2及び3が認められ、ピーク3はISのピーク、sは溶媒由来のピークを示す。ピーク1及び2のMSスペクトルより、それぞれ1C2P及び2C1Pであると確認された。また、各MSスペクトルから、1C2P及び2C1Pの各分子量関連イオンとしてそれぞれ m/z 79、81及び m/z 31、58が認められ、JECFA規格で定量用イオンにそれぞれ m/z 79及び m/z 58、定性イオンに m/z 81及び m/z 31を設定していることは妥当と考えられた。ISについてもMSスペクトルにJECFA規格で定量用イオンに m/z 116、定性イオンに m/z 98を設定していることは妥当と考えられた。本研究でもこれらイオンを検出イオンとし、同様に定量及び定性に用いることとした。SIMモード測定条件でジエチルエーテル、検量線用PCH標準液 (25 ng/mL及び200 ng/mL) を測定した結果を、Fig.4-3-2)、3)及び4)に示す。ジエチルエーテルではピークは検出されず、検量線用標準液では明確なピークとして検出できた。

(2) GC-MSによるプロピレンクロロヒドリン量分析法の妥当性評価

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では $R^2=0.99994\sim 0.99996$ 、2C1Pでは $R^2=0.99970\sim 0.99997$ であった。ローズマリー抽出物の規格案の検証時は、化合物により、 R^2 が0.9990未満の場合も認められ、検量線用に用いる濃度範囲を狭くすることで値が改善されたが、今回はいずれも0.9997以上と良好な結果が得られた。測定対象化合物や分析条件の性質にもよると思われるが、検量線の濃度範囲が元々10倍以内であることも直線性が良好な理由の一つと推測された。

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。6回繰り返し測定時の標準偏差 (σ) の3倍及び10倍として推定した検出限界と定量下限、 $S/N=3$ 及び $S/N=10$ に相当する濃度として推定した検出限界と定量下限を算出したところ、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

添加回収率試験に用いる試料としては、測定対象化合物を含まない試料を用いて標準添加試料液を調製することが望ましい。そのため、まず、試料選択のため、HPMC試料3社3製品中の1C2P及び2C1PをGC-MSのSIMモード測定により確認した。その結果、試料Aでは2C1Pが検出されず、1C2Pも定量下限未満 (0.03

mg/kg)であったため、標準添加試料液の作製には試料Aを用いることとした。

標準添加試料液を調製し (n=6)、試料Aに含まれる1C2Pを差し引いて添加回収率を調べた結果をTable 4-4に示す。その結果、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「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」の真度(回収率)70~120%の範囲を満たし、適と判断された。

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日間繰り返して得たデータに対し行った。各分析日用に調製した検量線用PCH標準液の分析結果から作成した検量線を用い、試料中の各PCH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、併行精度及び室内精度を算出した (Table 4-5)。2成分の含量はすべて0.1ppm (mg/kg) 以上であるため、「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」に従い試験法の適否を判定したところ、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

食品添加物の赤外スペクトルに関して、特に近年普及著しい減衰全反射 (ATR) 法について調査した結果、具体的な測定条件の規定や品目ごとの留意点の注釈などがなされていなかったため、ATR法に関する以下の検討を行った。

1) 測定に用いる装置による違いに関する検討

測定に用いる装置による違いを検討するため、2社 (A社、B社) の機器メーカーの装置で比較検討を行った。測定試料として、第17改正日本薬局方においてATR法が採用されているモンテルカストナトリウムを用いた。

(1) 測定装置による違いについての検討

A社、B社ともに1回反射ダイヤモンドプリズムを用いて測定した。その結果、A社のスペクトル (Fig. 5-1) とB社のスペクトル (Fig. 5-2) は、全体の強度は異なるものの、ピークの相対強度や波数はほぼ一致し、同じプリズムを用いたATR測定においては、機器メーカー間での差はほぼ無いものと考えられた。

(2) プリズムの違いについての検討

次に、プリズムによる違いを検討するため、A社の装置において、ZnSeプリズム、Geプリズムでも測定を行った。その結果、ZnSeプリズム (Fig. 5-3) では、ダイヤモンドプリズムでのスペクトルとほぼ一致したが、Geプリズム (Fig. 5-4) では、全体にピーク強度が弱く (Fig. 4の縦軸は102.5~90%Tであることに注意)、特に高波数側では、他のプリズムでは観察されたピーク (2920 cm^{-1} 、2970 cm^{-1} 付近) が、ピークとして認識できないほど小さかった。従って、ATR測定においては、プリズムによって違いが有ると考えた。ATR法は、プリズムと試料の境界面で入射光が全反射する際に、試料への光のもぐり込みが生じ、その時の光の吸収を測定している。もぐり込み深さはプリズム、試料の屈折率に依存するため、

プリズムによってもぐり込み深さが異なり、スペクトルが異なる可能性が考えられる。

(3) ATR補正機能の違いについての検討

ATR法は原理的に、ピーク強度が波数に依存し、低波数側ほどピーク強度が大きくなるため、一般に、機器メーカーの解析ソフトには、ATR補正機能が備わっている。そこで、機器メーカー間でのATR補正機能の違いについて比較検討を行った。今回は、ダイヤモンドプリズムでのスペクトルについてATR補正を行った。その結果、A社のATR補正後のスペクトル (Fig. 5-5) に比べ、B社のATR補正後のスペクトル (Fig. 5-6) では高波数側 (3000 cm^{-1} 以上) が低くなるなど、両者は一致しなかった。従って、ATR補正機能は機器メーカーにより違いがあるものと考えた。

第17改正日本薬局方において、ATR法の測定法としては「ATR(減衰全反射)プリズム面に試料を密着させ、その反射スペクトルを測定する。」とあり、今回扱ったモンテルカストナトリウムのATR法での確認法は、標準品との比較となっている。ここでの結果より、食品添加物の測定法をATR法で規定する場合は、ATR補正を行わない、生スペクトルの測定結果を用いる必要があり、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、プリズムの種類や補正の有無などの条件を規定する必要があると考えられた。

2) ATR装置のプリズムと反射回数、及び測定試料の物性に関する検討

(1) ポリスチレンを用いた検討

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。その結果、1回反射ATRでは、ダイヤモンドプリズムとZnSeプリズム間で、顕著な差はないものの、低波数側では違いが認められた (Fig. 5-7)。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。

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 (Fig. 5-8)。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。

さらに、5回反射では、測定毎にピーク強度が異なる傾向を示した (Fig. 5-9)。以上より、同じ1回反射で、ほぼ同じ屈折率を持つダイヤモンドプリズムとZnSeプリズムでは顕著な差は認められなかったが、低波数側では違いが認められた。また、プリズムをZnSeに統一し、反射回数の異なるATR装置を用いた場合、ピーク強度は反射回数を反映し、反射回数が多い方が測定毎の変動が認められた。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。

(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、1回反射ATRではダイヤモンドプリズム及びZnSeプリズム、5回反射ATRではZnSeプリズムで液体試料の測定を行った。

① プロピオン酸エチルでの検討

屈折率の低い試料として、屈折率が1.38であるプロピオン酸エチルを取り上げ、1回反射、及び5回反射ATR法による測定を行った。その結果、1回反射ATRでは、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 (Fig. 5-10)。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 (Fig. 5-11)。

② ヘキサン酸エチルでの検討

次に屈折率の低い試料として、屈折率が1.41であるヘキサン酸エチルを取り上げ、1回反射、及び5回反射ATR法による測定を行った。その結果、1回反射ATRでは、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 (Fig. 5-12)。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 (Fig. 5-13)。

③ 酢酸フェネチルでの検討

次に屈折率の比較的高い試料として、屈折率が1.50である酢酸フェネチルを取り上げ、1回反射、及び5回反射ATR法による測定を行った。その結果、1回反射ATRでは、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 (Fig. 5-14)。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 (Fig. 5-15)。

④ N-メチルアントラニル酸メチルでの検討

次に屈折率の高い試料として、屈折率が1.58であるN-メチルアントラニル酸メチルを取り上げ、1回反射、及び5回反射ATR法による測定を行った。その結果、1回反射ATRでは、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 (Fig. 5-16)。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 (Fig. 5-17)。

⑤ ベンジルアルコールでの検討

次に屈折率の比較的高い試料として、屈折率が1.54であるベンジルアルコールを取り上げ、1回反射、及び5回反射ATR法による測定を行った。その結果、1回反射ATRでは、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 (Fig. 5-18)。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回反射よりも大きく、ピーク強度の増加の程度は、波長依存性の傾向を示した (Fig. 5-19)。

液体試料としての香料化合物での検討においては、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、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 (Fig. 5-20)、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。ベンジルアルコールは、他の化合物に比べ、弱い吸収のピークが多いため、波長依存性の傾向を示したと考えられる。

(3) バニリンを用いた検討

測定試料の物性と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、固体試料としてバニリンを用い、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。その結果、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 (Fig. 5-21)。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 (Fig. 5-22)、バニリンをメノウ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 (Fig. 5-23)。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。

6. 鉛及びヒ素の同時分析法に関する研究

1) ICP-AESによる鉛及びヒ素の同時測定

Pb・As混合標準液を用いて、ICP-AES法により測定し検量線を作成したところ、Fig. 6-3に示すようにヒ素は0.075~1.5 µg/mL、鉛は0.025~1 µg/mLの範囲で $R^2 > 0.999$ の良好な直線性が得られた。本研究では第9版食品添加物公定書において、多くの食品添加物の規格に設定される、鉛及びヒ素規格値 (Pbとして2 µg/g以下、Asとして3 µg/g以下) を測定対象濃度 (最終試験液としてPb 0.4 µg/mL、As 0.6 µg/mL) とした場合でも、十分に測定が可能な範囲で直線性が得られることが明らかとなった。しかし、ヒ素の測定波長は紫外領域 (193.76 nm) であるため、ブランク (硝酸 (1→100) 溶液) 強度のばらつきも大きいことから、低濃度 (最終試験液濃度として0.075 µg/mL) 以下のヒ素を測定することは困難であると考えられた。

また、本研究ではヒ素(III)をヒ素(V)に酸化させることで鉄との共沈を行うこととしたため、鉄共沈法において最終試験液で測定する対象はヒ素(V)となる。そこで、ヒ素(III)とヒ素(V)をICP-

AES法で測定した場合、感度に差がみられるか、ヒ素 (V) 標準液及びヒ素 (III) を用いたPb・As混合標準液を用いてn=3で同様に検量線を作成し比較した。その結果、Fig. 6-4に示すようにヒ素 (V) 標準液で作成した検量線は、ヒ素 (III) を用いたPb・As混合標準液で作成した検量線とほぼ同じ傾きの検量線が得られた。以上の結果から、ICP-AESによる分析においては、ヒ素 (III) とヒ素 (V) はほぼ同じ感度を示すことが明らかとなった。本研究では、ヒ素 (III) を用いたPb・As混合標準液を添加し検討を行ったことから、Pb・As混合標準液用いて検量線を作成し、ヒ素を定量することとした。

2) キレート固相カートリッジによる鉛及びヒ素の抽出法の検討

イミノジ酢酸基を持つキレート固相カートリッジは2価の重金属を捕捉し、それ以外の陽イオンは捕捉されない。Ca²⁺やMg²⁺はバッファーで洗浄することが可能である。鉛については、キレート固相カートリッジを用いて抽出が可能であり、多量の陽イオン（ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム等）を含む塩類中の重金属の抽出に有用と考えられている⁵⁾。そこで、塩化ナトリウムを用いて、キレート固相カートリッジを用いた鉛及びヒ素の抽出法の検討を行ったところ、Fig. 6-5に示すように、試料液のpH 5以上で、90%以上の鉛が回収され、鉛の抽出が可能であったが、ヒ素についてはいずれのpHにおいても抽出されなかった。以上の結果から、ヒ素の抽出にはキレート固相カートリッジは適さないことが明らかとなったため、塩化カリウ

ムでの検討は行わなかった。

3) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法の検討

(1) pHの検討

はじめに、塩化ナトリウム2 gに鉛及びヒ素を添加（Pbとして2 µg/g、Asとして3 µg/g相当添加）し、pHを1～9に調整した試料液を用いて望月らの方法に従い⁶⁾、鉛及びヒ素の回収率を求めたところ、いずれのpHにおいても回収率が得られなかった。鉄共沈に関する梶原らの文献⁷⁾によれば、ヒ素 (III) とヒ素 (V) では、形態により鉄との共沈しやすさが異なることから、文献7)を参考に、次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えることで、ヒ素 (III) をヒ素 (V) にした後、望月らの方法に従いpHを9に調整後、鉄共沈を行った。その結果、Fig. 6-6に示すように、次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えることで鉛及びヒ素で90%以上の回収率が得られた。そこで、試料に塩化カリウムを用い、同様に次亜塩素酸ナトリウム溶液を加え、pH1～11に調整した後、鉄共沈法を行ったところ、Fig. 6-7に示すように、pH9で鉛及びヒ素で90%以上の回収率が得られた。以上の結果から、試料液はpH9に調整し鉄共沈法を行うこととした。

(2) 次亜塩素酸ナトリウム溶液添加量の検討

鉄共沈法における次亜塩素酸ナトリウム溶液量の最適化を行うため、塩化ナトリウム及び塩化カリウムに2 gに鉛及びヒ素を添加（Asとして3 µg/g、Pbとして2 µg/g相当添加）し、異なる次亜塩素酸ナトリウム溶液量（0～2000 µL）を加え、鉄共沈法を行ったところ、Fig. 6-8に示す

ように、次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えないものでは鉄の沈殿が生成せず、次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えたもの(200~800 µL)では沈殿が生成した。1000、1500及び2000 µL加えたものも同様に沈殿が見られた。得られた沈殿を精製し、鉛及びヒ素の回収率を求めたところ、Fig. 6-9に示すように、無添加の場合は鉛及びヒ素の回収率が10%以下であったが、200 µL以上ではいずれも80%以上の回収率が得られた。以上の結果から、次亜塩素酸ナトリウム溶液は、ヒ素(III)をヒ素(V)とし、鉄と共沈させるために添加する必要があるが、添加する量は回収率に大きな影響を与えないと考え、次亜塩素酸ナトリウム溶液の添加量は200 µLとした。

(3) 鉄添加量の検討

鉄共沈法における次亜塩素酸ナトリウム溶液量の最適化を行うため、塩化ナトリウム及び塩化カリウム2 gに鉛及びヒ素を添加(Asとして3 µg/g、Pbとして2 µg/g相当添加)し、次亜塩素酸ナトリウム溶液(200 µL)を加え、鉄溶液(鉄として50~2000 µg)を加え、鉄共沈法を行ったところ、Fig. 6-10に示すようにいずれの試料においてもヒ素では400 µg以上で80%以上、鉛では200 µg以上の鉄を添加することで90%以上の回収率が得られた。鉄の添加量を1000 µg以上に増やした場合、ICP-AES法による測定の際、鉄マトリックスの干渉を受けやすく、測定値のばらつきが見られたことから、1000 µg以下が望ましいと考えた。そこで、塩化カリウムを試料とし、鉄溶液を鉄として50~1000 µgの範囲で添加し、鉛及び

ヒ素の回収率(n=3)を求めたところ、Fig. 6-11に示すように、ヒ素は鉄200 µg以上で90%以上、鉛は鉄100 µg以上で90%以上の回収率が得られ、500 µg以上では回収率のばらつきが小さかった(標準偏差 < 3%)。以上の結果から、鉄添加量は500 µgとした。

4) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法の妥当性評価

(1) 検量線

Pb・As混合標準液(Pb 0.025~1.0 µg/mL、As 0.038~1.5 µg/mL)を用いて検量線を作成(n=3)したところ(Fig. 6-12)、ヒ素では0.075~1.5 µg/mLの範囲で $R^2=0.9999$ となり良好な直線性が得られた。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。また、いずれの濃度においてもばらつきは小さかった。

(2) ILOD

B. 7) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法の妥当性評価 (2) ILODに従い、ILODを求めた。その結果、ヒ素では0.0114 µg/mL、鉛では0.0122 µg/mLとなった。

(3) MLOQ

B. 6. 7) (3) MLOQに従い、MLOQを求めた。その結果、ヒ素では0.1084 µg/mL、鉛では0.0259 µg/mLとなった。

(4) 併行精度及び室間再現性

B. 6. 7) (4) 併行精度及び7) (5) 室内再現精度に従い、回収率、併行精度(RSD_r)及び室内再現精度(RSD_{ip})をそれぞれ求めたところ、鉛については、Table 6-1に示すように添加濃度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、ヒ素については、Table 6-2に示すように添加濃度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、本法は真度、精度共に良好な分析法であると考えられた。

5) 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(4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、Table 6-3に示すように、いずれの試料からもヒ素では平均回収率が79.9~83.2%、相対標準偏差(RSD)は2.2~4.2%、鉛では平均回収率が88.1~91.7%、RSDは1.6~3.1%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、鉛及びヒ素の回収率が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。

6) ICP-AESによる鉛及びヒ素、鉛、ヒ素

及び亜鉛の同時測定

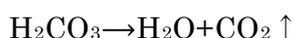
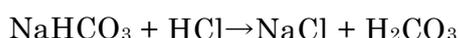
Pb・As・Zn混合標準液を用いて、B. 4) ICP-AESによる定量に従い各元素を測定し検量線を作成したところ、Fig. 6-13に示すように鉛は0.05~1 µg/mL、ヒ素は0.075~1.5 µg/mL、亜鉛は2.5~50µg/mLの範囲でR²>0.999の良好な直線性が得られた。第9版食品添加物公定書において、多くの食品添加物の規格に設定される、鉛及びヒ素の規格値(Pbとして2 µg/g以下、Asとして3 µg/g以下)を想定し最終試験液を調製した場合の各元素濃度(最終試験液としてPb 0.4 µg/mL、As 0.6 µg/mL)を十分に測定が可能な範囲で直線性が得られることが明らかとなった。また、食用赤色3号を対象とした場合も、鉛、ヒ素及び亜鉛の規格値(Pbとして2 µg/g以下、Asとして3 µg/g以下、Znとして200 µg/g以下)から想定し、最終試験液を調製した場合の各元素濃度(最終試験液としてPb 0.2 µg/mL、As 0.3 µg/mL、Zn 20 µg/mL)を十分測定可能であることが明らかとなった。

7) 炭酸塩の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

これまでの検討結果を踏まえて、炭酸水素ナトリウムを試料とし、鉛及びヒ素を添加(Pbとして2 µg/g、Asとして3 µg/g相当添加)し、硝酸(1→100)溶液20 mLに溶解し、試料液とし4.3)鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出に従い、鉄共沈法を行ったところ、pHを調整する際、これまでの試料ではpH4~6程度のものが多かったが、炭酸水素ナトリウムではpH7.5であり、アンモニア水でpH9に調

整しても、鉄の沈澱が析出しなかった。その結果、いずれの元素も回収率はほとんど得られなかった。更に、炭酸カリウムを試料とし同様に試験したところ、鉛の回収率は70%程度、ヒ素の回収率は50%程度であった。炭酸カリウムの場合も pHを9に調整した際に鉄の沈澱の析出が少なかったことから、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。試料液中の炭酸イオンを取り除くため、炭酸塩が塩酸により二酸化炭素と水に分解することを利用し（以下反応式）、



炭酸水素ナトリウムを試料とし、塩酸（1→4）溶液を加えて溶かすこととした。その結果、試料に塩酸（1→4）溶液を加えると、硝酸（1→100）溶液を加えた時よりも多量の泡が発生し、多くの二酸化炭素が発生している様子がみられた。その溶液を加熱し、蒸発乾固した後、硝酸（1→100）または水で試料液を調製した後鉄共沈法を行った。その結果、硝酸（1→100）で試料液を調製した場合 Table 6-4に示すように、鉛及びヒ素の回収率（n=5）は91.7±5.6%及び75.9±2.9%となり、水で試料液を調製した場合は104.8±7.2%、80.7±5.6%であり、水で溶解した方が良好な回収率が得られ、鉄共沈法でのpH調整も容易であったため、以後、試料液は水で溶解することとした。

(2) 添加回収試験

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）を用いて、規格値相当の鉛及びヒ素を添

加し（Pbとして2 µg/g、Asとして3 µg/g）、塩酸（1→4）溶液に溶解した後、加熱し蒸発乾固させたものを水に溶解した後、B. 6. 9) (3) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出に従い操作し、鉛及びヒ素の添加回収試験を行った。その結果、Table 6-5に示すように、鉛及びヒ素の回収率（n=5）は、炭酸カリウムでは100.3±5.8%、78.8±5.4%、炭酸水素アンモニウムでは98.7±7.4%、76.8±4.7%、炭酸ナトリウムでは94.0±3.7%、75.6±3.0%となり、いずれも良好な回収率が得られた。

今回使用した、炭酸塩は炭酸水素ナトリウム（分子量：89.91）を例とすると、試料2 g中の炭酸水素ナトリウムのモル濃度は0.02 molであり、加えた塩酸（1→4）溶液20 mL中の塩酸のモル濃度はおよそ0.06 molであるため、炭酸水素ナトリウムが二酸化炭素に分解されるには十分な量の塩酸を加えていることとなる。塩酸（1→4）溶液を加えることによって、すべての炭酸が二酸化炭素に分解することにより、炭酸イオンの影響がなくなったと考えられた。また、蒸発乾固させることにより、加えた塩酸が塩化物塩となり析出し、水を加えた時の試料液のpHが酸性～弱酸性となり、鉄共沈法でのpH調整が容易にでき、操作も簡便であった。

8) 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号に規格値相当の鉛、ヒ素及び亜鉛を添加し（Pbとして2 µg/g、Asとして3 µg/g、Znとして200 µg/g相当添加）、Fig. 6-14に示すようにタール色素試験法鉛試験法に従い灰化を行い、B. 6.

9) (3) 鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出に従い操作した。その結果、回収率 (n=1) は、鉛で90.3%、ヒ素で70.6%、亜鉛で11.5%となり、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、B. 6. 10) (4) キレート固相カートリッジによる抽出方法を行ったところ、回収率 (n=1) は鉛で102.7%、ヒ素で8.1%、亜鉛で105%であり、キレート固相カートリッジではヒ素は回収できなかった。そこで、B. 6. 10) (5) 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 (Fig.6-2) に従い操作し、鉛、ヒ素及び亜鉛を抽出することを試みた。その結果、鉄共沈法及びキレート固相カートリッジによる回収率 (n=1) は鉛で89.3%、ヒ素で78.2%、亜鉛で101.1%であった。

一方、タール色素試験法ヒ素試験法の灰化方法で灰化した場合、試料が少ない分操作は簡便であり、硝酸マグネシウム・エタノール (95) 溶液を加えた際も飛び散ることが少なく操作しやすく、灰化操作で得られた残渣も少なかった (Fig. 6-15)。残渣に水を加え、調製した試料液を用い鉄共沈法及びキレート固相カートリッジによる回収率 (n=1) を求めたところ、鉛で74.6%、ヒ素で78.6%、亜鉛で81.1%となり、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。

以上の結果から、タール色素試験法鉛試験法で灰化を行った場合、鉛及びヒ素は鉄共沈法で75%以上回収され、亜鉛は鉄共沈法では20%程度しか回収されなかったが、キレート固相カートリッジで

80%程度の回収率が得られ、それらを合わせてほぼ100%の良好な回収率が得られることが明らかとなり、食用赤色3号はタール色素試験法鉛試験法に従い灰化を行い鉄共沈法及びキレート固相カートリッジで鉛、ヒ素及び亜鉛を抽出することとした。

(2) 添加回収試験

食用赤色3号に規格値相当の鉛、ヒ素及び亜鉛を添加し (Pbとして2 µg/g、Asとして3 µg/g、Znとして200 µg/g相当添加)、食用赤色3号はタール色素試験法鉛試験法に従い灰化を行い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、Table 6-6に示すように、回収率 (n=3) は鉛で89.8±2.7%、ヒ素で72.3±9.0%、亜鉛で100.4±1.2%であり、いずれも70%以上の良好な回収率が得られた。

タール色素試験法ヒ素試験法の灰化方法で試験液2を調製する際は、試料採取量が0.5 gと少ないこともあり、予備灰化と乾式灰化の2回の繰り返しで灰化が終了した。しかし、タール色素試験法ヒ素試験法の灰化方法では鉛や亜鉛の回収率がタール色素試験法鉛試験法の灰化方法で得られた回収率と比べて10%程度低い結果となった。これは、灰化操作において硫酸を加えないことにより一部の元素の揮散が考えられた。

一方、試験液1の調製法は、タール色素試験法鉛試験法において、硫酸を添加し、灰化する一般的な灰化方法では完全に灰化することが難しい色素を対象とし、灰化補助剤として硝酸マグネシウム溶液を添加した後、硫酸を加え灰化する方法

であり、硝酸マグネシウム（1→10）溶液を加えることから、鉛の分析の際は溶媒抽出法による前処理が必要とされている。今回の検討では、タール色素試験法鉛試験法に従い、ヒ素の揮散を懸念し500℃で強熱したため、試験液1を調製する際は、完全に白色の灰となるまで、予備灰化と乾式灰化を3回繰り返した。試験液1では硫酸を加えているため鉛や亜鉛などが揮散しづらいため、鉛や亜鉛で良い回収率が得られたと考えられた。また、食用赤色3号のタール色素試験法鉛試験法の灰化方法では、タール色素試験法ヒ素試験法の灰化方法と同様前処理で硝酸マグネシウム溶液を加えるため、ヒ素も揮散しづらい条件となっていることや、強熱温度を500℃としたため、ヒ素もある程度回収できたと考えられた。

食用赤色3号では、鉛、ヒ素及び亜鉛を測定するために、タール色素試験法鉛試験法（灰化＋溶媒抽出法＋原子吸光光度法）、ヒ素試験法（灰化＋原子吸光光度法（水素化物発生装置））、亜鉛及び鉄試験法（灰化＋原子吸光光度法）が設定されており、それぞれ前処理方法や測定方法が異なっている。今回の検討において、鉄共沈法及びキレート固相カートリッジを用い、ICP-AES法を用いることで鉛、ヒ素及び亜鉛を一度の前処理で簡便に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に関する研究

1) 香料化合物規格の国際統合化に関わる調査研究

JECFA規に問題があることを踏まえ、平成28～30年度で新たな品目と平成25～27年度で結論の出なかった品目を併せ511品目の調査を行った。

188品目はJECFA規格で問題がないと判断したが、その内37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ものであった。167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規格妥当性の判断ができなかった29品目と検討に必要なデータを2個以上得られなかった127品目の計156品目は来年度以降の更なる調査が必要と判断した。平成25～30年度に対象とした1088品目以外にも使用実態がある品目が確認されている。来年度以降、本年度に再調査が必要となった品目に加え、それらの品目の調査を行う予定である。

2) 香料使用量に関わる調査研究

日米欧及び中南米の四極での調査結果を比較考察することにより世界における食品香料化合物の使用実態を明らかにするとともに、我が国での食品香料化合物の使われ方の実態を明確にすることができた。また、今回の使用量調査を基に計算した各地域の推定摂取量の結果も、安全性評価をする上できわめて重要な資料となり今後の食品香料化合物の評価に際し有効に利用されることが期待される。

天然香料物質においてもFEMA番号による使用量調査を初めて実施した。リンゴやコーヒーなどFEMA番号のない主要な天然香料7基原物質については、

別途調査を実施した。

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

第11回の指定添加物の摂取量の推定では、国民1人が1日に摂取する指定添加物量は、過去の調査結果と大きく外れるものではなく、またADIとの比較からも問題がなかった。

輸入食品中の食品添加物含有量推定では、保存料の安息香酸、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸カルシウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、ナイシン、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸ブチル、パラオキシ安息香酸プロピルの量を推計し、国内における出荷量調査と比べた結果、いずれも摂取量としては影響がない量になると考えられた。

既存添加物に関しては第6回の調査として、平成26年度の生産量統計調査をまとめた。

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

マーケットバスケット方式による香料の推計一日摂取量調査を行うことで、流通食品からの香料摂取量に関する新しい知見を得ることができた。本調査結果は従来の香料の一日摂取量評価手法を補完する役割を果たし、今後の食品衛生の向上に寄与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

流通する食品香料化合物について2つのQSARを用いてAmes試験の予測を行い、変異原性が強く疑われた11物質について、簡易Ames試験（FAT）、もしくは

GLPでの標準的Ames試験を実施した。

このうち7物質で陽性を示した。また、香料に特化した新たなQSARモデル（StarDrop）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。新規データベースに対して新たに開発した香料Star Drop QSARモデルでその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。

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

食品添加物公定書一般試験法の改良に向けた検討を行うため、JECFA規格やFCC等に記載があり公定書の一般試験法では採用されていない試験法について調査した。今後公定書への追加を検討すべきと考えられる試験法について、汎用性及び国際整合の観点から検討したところ、質量分析計を用いる試験法や残留溶媒試験法等が挙げられた。そこで、質量分析計を用いる試験法としてGC-MSを用いる試験法の妥当性を検討するため、ローズマリー抽出物のJECFA成分規格案の揮発性成分量のGC-MSを用いる分析法と、ヒドロキシプロピルメチルセルロースのJECFA成分規格のプロピレンクロロヒドリン量のGC-MSを用いる分析法とを、具体的試験法として取り上げ、検証を実施した。その結果、GC-MSを用いる試験法を食品添加物成分規格の一般試験法として取り入れる場合、いくつかの点に留意が必要と考えられた。GC-MSを用いて正確な定量を行う上で、定量に

用いるイオンの選定や検量線の濃度範囲の設定が特に重要であることが示された。検量線の最低濃度が定量下限濃度に比べて十分高いことや、検量線の濃度範囲を広く設定しすぎない点等が、重要だと推察された。

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、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明らかにした。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、補正を行わないATRスペクトル同士での比較とし、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、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。

6. 鉛及びヒ素の同時分析法に関する研究

本研究により、ナトリウム塩はカリウム塩の試料に対し、鉄共沈法では、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (0.2 mL) を加えてヒ素 (III) をヒ素 (V) にし、鉄溶液 (鉄として500 µg) を添加した後、酢酸ナトリウム溶液を加え、pH9にすること

で、ナトリウムやカリウムのような高マトリックス存在下で鉛及びヒ素が鉄と共に共沈し、90%以上の回収率が得られることが明らかとなった。鉄共沈法は非常に簡便で、操作も容易であることから、食品添加物の規格試験の簡便化につながるであろう。

本研究では鉄共沈法による鉛及びヒ素の抽出法の妥当性評価を行い、塩化カリウムを試料とし、鉛 (添加濃度1、2及び4 µg/g) 及びヒ素 (添加濃度1.5、3及び6 µg/g) の添加回収試験を行い、回収率、併行精度 (RSD_r) 及び室内再現精度 (RSD_{ip}) を求めたところ、鉛では平均回収率が90.9~94.3%、RSD_r 2.1~3.2%、RSD_{ip} 2.1~6.5%、ヒ素では平均回収率が76.0~87.2%、RSD_r 1.5~3.2%、RSD_{ip} 4.3~6.7%となり、いずれの濃度でも良好な回収率が得られ、併行精度及び室内再現精度も良好であり、確立した鉄共沈法は真度、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4試料 (塩化アンモニウム、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム及び硫酸ナトリウム) を用いて規格値相当の鉛及びヒ素を添加し添加回収試験を行ったところ、鉛では平均回収率が1~91.7%、RSDは1.6~3.6%、ヒ素では平均回収率が79.9~83.2% RSDは2.2~4.2%となり、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。

更に、炭酸塩4試料に規格値相当の鉛及びヒ素を添加し (Pbとして2 µg/g、Asとして3 µg/g相当添加)、塩酸 (1→4) 溶液を加え、炭酸を二酸化炭素に分解した後、鉄共沈法を行ったところ、鉛及び

ヒ素の回収率が75%、95%以上の良好な回収率が得られることが明らかとなった。また、食用赤色3号に規格値相当の鉛、ヒ素及び亜鉛を添加し（Pbとして2 µg/g、Asとして3 µg/g、Znとして200 µg/g相当添加）、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抽出したところ、鉛で89.8±2.7%、ヒ素で72.3±9.0%、亜鉛で99.4±1.6%となり、いずれも70%以上の良好な回収率（n=3）が得られた。以上の結果から、鉄共沈法を用いることで炭酸塩中の鉛及びヒ素、鉄共沈法及びキレート固相カートリッジを用いることで、食用赤色3号中の鉛、ヒ素及び亜鉛を抽出することができ、ICP-AES法により同時分析が可能であることが明らかとなった。

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、鉛及びヒ素規格試験において、鉄共沈法は簡便で精度の高い鉛及びヒ素の前処理法及び同時分析法として有用な方法であると考えられた。また、鉄共沈法及びキレート固相カートリッジを用いることで鉛及びヒ素以外の亜鉛についても抽出することが可能であることが明らかとなり、それぞれの前処理法及び測定法を行う第9版食品添加物公定書での煩雑な操作と比較して、非常に簡便で短時間で操作が可能であることから、代替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

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) 北村陽二、佐藤恭子、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、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137年会、仙台（2017.3）

2) 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（2017.5）

3) 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（2017.11）

4) 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（2017.11）

5) 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（2017.11）

6) 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 (2017.12)
- 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、茂野泰貴、高橋茉衣夏、小澤梓、上出茉歩、濱本萌凧、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、金沢 (2018.3)
- 8) 本間正充、Improvement of quantitative structure-activity relationship (QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity 口演、QSAR2018、ブレット・スロベニア (2018.6)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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、濱本萌凧、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
- H.** 参考文献
- 1) 日本食品化学工学会、新・食品分析法、光琳、pp232 (1996)
- 2) 柏木ら、分析化学、vol.50、 No.3、 p187-192 (2991)
- 3) 五来ら、分析化学、vol.51、 No.9、 p729-734 (2002)
- 4) Balaji et al., Chemosphere、 59、 p1169-1174 (2005)
- 5) 建部ら、食品化学学会第22回総会・学術大会講演要旨集、p80 (2016)
- 6) 望月ら、第98回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集、p118 (2009)
- 7) 梶原ら、分析化学、 vol.60、 No.8、 p629-634 (2011)

