

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成31年度(令和元年度)研究分担報告書

既存添加物の基原同定手法に関する研究

～ペプチドを指標とした既存添加物酵素の基原同定法の検討～

研究分担者 増本直子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 研究員

**研究要旨** 既存添加物酵素の本質であるタンパク質からペプチドを生成し、この質量スペクトルにマッチするペプチドをMascot searchで検索し、同定したペプチドが帰属するタンパク質の基原情報を得る方法を検討した。本研究ではヘミセルラーゼをモデルにして、製品に付帯する基原情報とMascot searchで同定した基原情報を比較・評価した。

研究協力者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 室長

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 研究員

## A. 研究目的

既存添加物の成分規格中の定義には、想定外の原料が使用されるのを防ぐ目的で基原が規定される。既存添加物酵素の基原は、ひとつの生物種に規定されていない。例えば、異なる生物種に由来する製品でも、酵素活性が同じであれば、同一の品目と見なされる。既存添加物酵素は、細菌、放線菌、酵母、糸状菌、担子菌などの微生物を基原とするものが殆どである。微生物の中には、有害物質を生産するものもある。したがって、既存添加物酵素製品から基原のトレーサビリティ体系を構築することは、既存添加物酵素の安全性を確保する上で重要な検討項目といえる。本研究では、既存添加物酵素製品から基原を確認する方法として、酵素の本質であるタンパク質から得たペプチドを指標成分とした基原の同定法を検討する。既存添加物酵素「ヘミセルラーゼ」7製品を対象に、取得した基原情報と製品付帯情報に矛盾がないか、また基原同定法としての可能性について検討する。

## B. 研究方法

### B-1. 試料

基原の情報とともに日本食品添加物協会を通じて入手したヘミセルラーゼ7製品の既存添加物酵素を試料として用いた。付帯する基原情報は、Tableに記載した。

### B-2. 試薬

グアニジン塩酸塩 (Cat No. 17353-25) およびトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Cat No. 35434-05) は、ナカライテスク (株) より購入した。ヨード酢酸ナトリウム (Cat No. I2512-25G) および重炭酸アンモニウム (Cat No. A6141-500G) は、Sigma-Aldrich 社より購入した。エチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸二ナトリウム塩二水和物 (Cat No. 343-01861), HPLC用アセトニトリル (ACN) (Cat No. 015-08633), トリフルオロ酢酸 (Cat No. 208-02746) およびギ酸 (Cat No. 063-05895) は、和光純薬工業 (株) より購入した。ジチオトレイトール (DTT) (Cat No. 20291) は、Thermo Scientific 社より購入した。消化酵素 Trypsin (Cat No. V5280) および rLys-C (Cat No. V1671) は、Promega 社より購入した。

### B-3. 試料調製

試料は、総タンパク質濃度が約 1 g/L となるように TEG (0.5 M Tris-HCl, 5 mM EDTA, 7M グアニジン (pH 8.0)) に溶解させた。この液 100  $\mu$ L に対し、0.5 M DTT 1  $\mu$ L 添加し、

37°Cで90分反応させた後、1Mヨード酢酸1.2 μL添加し、37°Cで30分間反応させ、タンパク質を還元、アルキル化した。続いて水を400 μL添加し、あらかじめ水で平衡化させたPD Mini Trap G-25 (Cat No. 28918007, GE Healthcare社製)に全量(502.2 μL)を付加した後、目的のタンパク質を水1 mLで溶出させ、凍結乾燥処理した。得られた乾燥物は、50 mM重炭酸アンモニウム40 μLに溶解し、0.5 mLチューブに20 μLずつ分注した。それぞれのチューブに1 μg/μLのTrypsin 0.5 μLと0.2 μg/μLのrLys-C 1 μLを添加し、37°Cで16時間消化させた。消化後、1%TFA含有2%ACN 20 μLを添加して反応を止めた後、水60 μLを加えてLC/MS/MS用試料液とした。

#### B-4. 分析方法

**装置** 超高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/TOF-MS) : Waters社製 ACQUITY UPLC H-CLASS/Xevo G2 QToF

**LC条件** カラム : ACQUITY UPLC Peptide BEH300 C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm, 300Å), 流速 : 0.2 mL/min, カラム温度 : 40°C, 移動相 : 0.1%ギ酸/0.1%ギ酸含有 ACN = 99 : 1 (0 min) → 65 : 35 (60 min) → 50 : 50 (70 min) → 10 : 90 (70~75 min) → 99 : 1 (75~90 min), 注入量 : 2 μL.

**MS/MS条件** イオン化モード : ESI+, キャピラリー電圧 : 3.0kV, コーン電圧 : 30V, 取り込みモード : MS<sup>E</sup>, コリジョンエネルギー : 20-40V, ソース温度 : 120°C, 脱溶媒温度 : 450°C, コーンガス : 50L/h, 脱溶媒ガス : 800L/h.

#### B-5. 解析方法

**データ抽出条件** ソフトウェア : BiopharmaLynx, 抽出範囲 : 全イオン電流クロマトグラム 5~70 minにおける信号強度の高い上位300件のマススペクトル.

**検索条件** サーバー : Mascot Server, 検索モード : MS/MS Ions Search, データベース : Swiss-Prot, 消化酵素 : Trypsin または rLys-C, 修飾 : Carboxymethyl (C), 価数 : 1 価, データ

フォーマット : PKL.

#### B-6. SDS-PAGE

Bladford法で、試料中の総タンパク量を測定し、1レーンあたり5 μg相当量をロードした。分子量マーカー : Precision Plus Protein Standard-Unstained (Cat No. 1610363, Bio-Rad社製), ゲル : Bullet Page One Precast Gel (Cat No. 13077-04, ナカライテスク(株)製), 染色液 : Bullet CBB Stain One (Cat No. 13542-81, ナカライテスク(株)製), 泳動条件 : 定電圧400V (10 min).

#### C. 結果および考察

試料中タンパク質からのペプチド断片の生成には、多くの論文で使用された実績があり、比較的安価に購入できる、Promega社の消化酵素 Trypsin および rLys-Cを使用することにした。質量分析計には、ペプチド断片の正確な質量情報を取得するために、TOF-MSを使用することにした。検索には Mascot Server を使用し、タンパク質アミノ酸配列データベースには、専門のキュレーターによるアノテーションを経た配列のみがまとめられた Swiss-Prot を使用した。

Trypsinを使用した際の Mascot search の結果と rLys-Cを使用した際のそれから、重複でヒットしたタンパク質について、基原, Entry name, EC No, タンパク質名, 分子量およびアミノ酸配列カバー率の情報とともに Table にまとめた。Table には試料に付帯する基原情報と、SDS-PAGE で検出されたバンドの泳動度から推定した分子量情報を併記し (Fig. 1), Mascot search の結果と比較し考察した。

ヘミセルラーゼの EC 番号については、3.2.1.8, 3.2.1.32, 3.2.1.78, 3.2.1.89, および 3.2.1.99 に相当すると考えるのが妥当と思われる。なお、セルラーゼは 3.2.1.4 および 3.2.1.91 に相当する。

【試料 1, 2】 *A. niger* 由来ヘミセルラーゼ [MANA\_ASPNC] が第一位でヒットし、製品に付帯する基原情報 *A. niger* と一致した。次いで、セルラーゼに分類される酵素 (EC 3.2.1.4

および3.2.1.91) もヒットしていた。

【試料3】上位でヒットしたわけではないが、*A. niger* 由来ヘミセルラーゼ[XYNC\_ASPNC]および[XYNC\_ASPNG]の2件がヒットし、製品に付帯する基原情報 *A. niger* と一致した。本製品には、別基原である *A. shirousami* 由来グルコアミラーゼや *A. awamori*, *A. oryzae* 由来  $\alpha$ -アミラーゼもヒットしており、複数の酵素品目を配合した酵素製品である可能性も考えられた。

【試料4】データベース Swiss-Prot および TrEMBL には、*P. coccineus* 由来ヘミセルラーゼ関連タンパク質は登録されていなかった。*P. coccineus* 由来ヘミセルラーゼ関連遺伝子を単離・同定した後、これをデータベースに登録して、Mascot search の同定精度が向上するのか興味もたれる。

【試料5,6】データベース Swiss-Prot および TrEMBL には、*T. longibrachiatum* 由来ヘミセルラーゼの登録が確認されなかった。代わりに、*T. harzianum* や *T. reesei* 由来ヘミセルラーゼがヒットした。

【試料7】データベース Swiss-Prot および TrEMBL には、*T. viride* 由来ヘミセルラーゼの登録が確認されなかった。代わりに、まったく基原が異なるパンコムギ *T. aestivum* 由来タンパク質が9件ヒットしたが、これらのタンパク質は、付帯情報にあった製品中に添加された小麦粉に由来するものだと推察された。

#### D. 結論

既存添加物酵素ヘミセルラーゼ7製品を対象にして、酵素製品から生成したペプチドのマススペクトルを Mascot search に付し、帰属される基原と製品付帯情報を比較した。

Mascot Search の結果を十分吟味することが必須だが、本法は販売業者の情報提供に依存することなく、科学的に基原を判断することが可能で、データベースの充実化とともに、より精巧な解析が期待できる。

#### E. 研究発表

該当なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

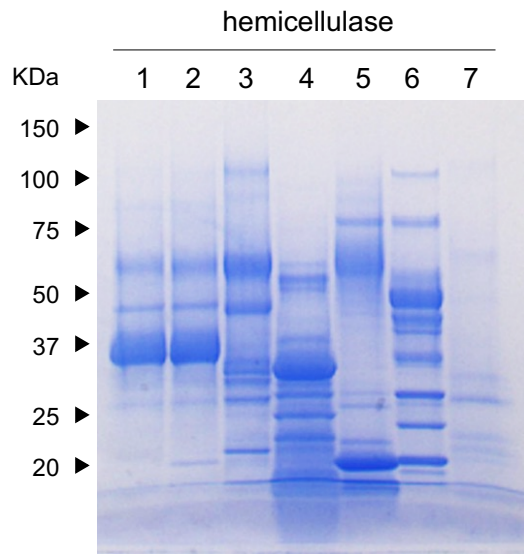


Fig. 1 酵素製品の SDS-PAGE の結果

Table 1 セルラーゼの Mascot search の結果 (1/2)

Sample No	Provided information		Results of Mascot search									
	Organism	Mass of major protein (kDa)	Ranking	Organism	Entry name	ECNo	Protein	Mass	Coverage	Ranking	rLys-C Coverage	
1	<i>Aspergillus niger</i>	65, 50, 36	1	<i>A. niger</i>	MANA_ASPNC	EC=3.2.1.78	Probable mannan endo-1,4-beta-mannosidase A	41627	37%	1	20%	
			2	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49260	23%	2	16%	
			2	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49272	23%	2	16%	
2	<i>Aspergillus niger</i>	65, 50, 36	3	<i>A. awamori</i>	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	7%	4	14%	
			3	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	7%	4	14%	
			3	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNG	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41321	7%	3	14%	
			3	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	7%	3	14%	
			1	<i>A. niger</i>	MANA_ASPNC	EC=3.2.1.78	Probable mannan endo-1,4-beta-mannosidase A	41627	37%	1	20%	
			2	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49260	23%	4	7%	
			2	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49272	23%	4	7%	
3	<i>Aspergillus niger</i>	63, 48, 33, 29, 26, 19	3	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	17%	3	24%	
			3	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	17%	3	24%	
			3	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	17%	2	24%	
			1	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNG	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41321	25%	1	25%	
			1	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	25%	1	25%	
			2	<i>A. shirousami</i>	AMYG_ASPSH	EC=3.2.1.3	Glucosylase	68669	23%	4	15%	
			3	<i>A. awamori</i>	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	25%	2	34%	
			3	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	25%	2	34%	
			4	<i>A. awamori</i>	AMYA_ASPAW	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A	55367	9%	3	27%	
			4	<i>A. awamori</i>	AMYB_ASPAW	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase B	55408	9%	3	27%	
			4	<i>A. oryzae</i>	AMYA1_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	55297	9%	3	27%	
			4	<i>A. oryzae</i>	AMYA3_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-3	55291	9%	3	27%	
			5	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49260	4%	6	3%	
			5	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49272	4%	6	3%	
6	<i>A. niger</i>	65, 50, 36	6	<i>E. nidulans</i>	CBHA_EMENI	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	48651	4%	6	3%	
			6	<i>A. kawachii</i>	XYNA_ASPKW	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase A	35574	10%	8	7%	
			6	<i>A. niger</i>	XYNC_ASPNC	EC=3.2.1.8	Probable endo-1,4-beta-xylanase C	35580	10%	8	7%	
			6	<i>A. niger</i>	XYNC_ASPNG	EC=3.2.1.8	Probable endo-1,4-beta-xylanase C	35570	10%	8	7%	
			7	<i>A. kawachii</i>	GUNA_ASPKW	EC=3.2.1.4	Endoglucanase A	25913	12%	9	7%	

Table 1 セルラーゼの Mascot search の結果 (2/2)

Sample No	Provided information				Results of Mascot search				rLys-C		
	Organism	Mass of major protein (kDa)	Ranking	Organism	Entry name	ECNo	Protein	Mass	Coverage	Ranking	Coverage
4	<i>Pyrenopeziza coccineus</i>	56, 33, 27, 24, 20									
5	<i>Tricoderma longibrachiatum</i>	83, 63, 17	1	<i>T. harzianum</i>	XVN_TRIHA	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase	20691	20%	5	3%
			1	<i>T. reesei</i>	XYN2_HYPIQ	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	24055	17%	5	3%
			1	<i>T. reesei</i>	XYN2_HYPJR	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	24055	17%	5	3%
			1	<i>T. harzianum</i>	XYN2_TRIHA	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	23809	17%	5	3%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	8%	2	2%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55469	8%	2	2%
			2	<i>T. viride</i>	GUX1_HYPRU	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55360	8%	2	2%
			2	<i>T. koningii</i>	GUX1_TRIKO	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	8%	2	2%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	2%	1	2%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	2%	1	2%
			4	<i>T. reesei</i>	GUN4_HYPJE	EC=3.2.1.91	Endoglucanase-4	35953	2%	4	2%
6	<i>Tricoderma longibrachiatum</i>	115, 83, 51, 45, 35, 28, 22, 18	1	<i>T. reesei</i>	XYN3_HYPIQ	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 3	38227	26%	2	18%
			1	<i>T. reesei</i>	XYN3_HYPJR	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 3	38227	26%	2	18%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	12%	3	9%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55469	12%	3	9%
			2	<i>T. koningii</i>	GUX1_TRIKO	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	12%	3	9%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	13%	1	14%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	13%	1	14%
			6	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJE	EC=3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49453	3%	6	5%
			6	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJR	EC=3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49453	3%	6	5%
			8	<i>T. reesei</i>	GUN4_HYPJE	EC=3.2.1.4	Endoglucanase-4	35953	3%	7	2%
7	<i>Trichoderma viride</i>	26	1	<i>Triticum aestivum</i>	IAA1_WHEAT	-	Alpha-amylase inhibitor 0.19	13908	63%	1	21%
			2	<i>Triticum aestivum</i>	IAA5_WHEAT	-	Alpha-amylase inhibitor 0.53	13698	52%	1	21%
			3	<i>Triticum aestivum</i>	IAA2_WHEAT	-	Alpha-amylase inhibitor 0.28	17368	44%	6	7%
			6	<i>Triticum aestivum</i>	IAC16_WHEAT	-	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMI6	16410	30%	5	18%
			9	<i>Triticum aestivum</i>	GLT4_WHEAT	-	Glutenn, high molecular weight subunit PW212	89352	1%	2	6%
			9	<i>Triticum aestivum</i>	GLT5_WHEAT	-	Glutenn, high molecular weight subunit DX5	90529	1%	2	6%
			13	<i>Triticum aestivum</i>	THN5_WHEAT	-	Purothionin A-1	15485	5%	3	6%
			13	<i>Triticum aestivum</i>	THN2_WHEAT	-	Alpha-2-purothionin	15418	5%	3	6%
			14	<i>Triticum aestivum</i>	IAAC2_WHEAT	-	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM2	16030	16%	4	16%

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成31年度(令和元年度)研究分担報告書

既存添加物の基原同定手法に関する研究

～香辛料抽出物の規格作成のための基原生物の選定～

研究分担者 増本直子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 研究員

**研究要旨** 既存添加物名簿収載品目のひとつである「香辛料抽出物」について、今後の規格作成に当たり、これまでに収集した情報をもとに定義案を作成した。香辛料抽出物の73種の基原を、食品添加物の成分規格作成の解説に従い、基原種として相応しいと思われる和名や学名を整備した。また、必要に応じて、類似する品目であると予想される天然香料や海外規格と比較しながら基原種の取舍選択を行った。本研究により、「香辛料抽出物」成分規格のうちの定義原案が整備された。

研究協力者

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 研究員  
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 室長

#### A. 研究目的

「香辛料抽出物」は、平成8年に作成された既存添加物名簿に収載されている品目の一つであり、74種の基原生物を原料とする抽出物である(基原生物74種のうち1種については、第四次消除名簿に収載されている)。これまで多くの既存添加物名簿収載品目の規格を整備し、食品添加物公定書(以下、公定書)への収載を行ってきたが、香辛料抽出物に関しては原料とする基原種が多く、このため実際に流通している製品の製法や成分組成が大きく異なることが予想されることから、成分規格の整備が遅れており、公定書に成分規格が収載されているものはない。しかし、香辛料抽出物は流通量も比較的多いため、規格整備は大きな課題となっている。

既に流通しており、有効性と安全性が確認されているとみなされる既存添加物の規格整備において、規格の設定根拠となる情報収集は特に重要であり、由来(基原の学名・和名)と

成分(含量)が正しく設定されているかという情報は規格整備時に不可欠である。このうち、基原の学名の設定は、その添加物に想定外の原料が使用されることを防ぐ目的がある。和名のみでは基原生物が一義的に特定されないことが少なくなく、この曖昧さが悪用されて原料の不正使用などが起こる恐れがある。また、既存添加物は国内で自生も栽培もされていない植物や海外で生産される微生物に由来するものも多く、適切な和名が存在しない基原もある。既存添加物の基原種を正しい学名で設定するという事は、その添加物の品質と安全性を確保するために必須である。しかし、1999年に編纂された既存添加物名簿収載品目リスト注解書に記載されている学名・和名には、現在の流通実態や正しいとされる学名・和名と異なるもののほか、誤記も含まれていると思われる。

法的な拘束力がある公的な規格を作成する際には、最新の知見も重要ではあるが、定義中の基原種の学名及び和名は、最新情報よりも設定根拠のトレーサビリティ、すなわち、堅牢性を重視して設定することされている。実際に、第9版食品添加物公定書を作成するにあたっては、一般的に認知されたデータベースや書籍を参照し、これらに示された学名と和

名が既存添加物の定義に採用されており、設定根拠のトレーサビリティが確保されている。成分規格作成にあたり、基原生物種の学名記載をどのような根拠のもと行うかについては、現在、食品添加物の成分規格作成の解説<sup>1)</sup>に明記してある。

本研究では、過去2年にわたり、先述の成分規格作成の解説記載のルール(以下、解説ルールと呼ぶ)に則って、「香辛料抽出物」に含まれる74種の基原の学名・和名について再調査を行ってきた。ここでは、学名の誤記やシノニムの多用が散見され、整理の必要が示された。さらに、74基原と同じあるいは類縁種を基原として用いていると思われる、天然香料や海外規格(中国、米国)との比較も行った。その結果、天然香料については、示された和名及び学名の妥当性をYList及びTropicosをもとに検討したところ、半数程度が全く同じ植物種を基原としていることが明らかとなった。その一方で、同じ名称であっても香辛料抽出物と天然香料とで異なる基原を用いているものもあった。さらに、海外規格との比較では、学名まで精査したところ、日本独自の基原のものや、日本では2つの基原として区別して扱われているものが他国ではひとつの基原として示されているものもあった。

今年度の研究では、「香辛料抽出物」の規格案作成に向けて、第四次消除名簿に記載された1基原を除く73基原について、過去2年間の調査で得られた情報を整理し、課題も踏まえながら、第10版公定書に提案するに相応しいと思われる基原生物を提案したので報告する。

## B. 研究方法

過去2年の研究で行った調査は以下の通りである。

- 1) 香辛料抽出物の74基原とされる基原生物の学名および和名について、解説ルールに則って修正案を提案した。
- 2) 天然香料および海外規格(中国、米国)の基原生物の学名について、解説ルールに沿った場合の変更点を調査した。

今年度は、1), 2)の結果を比較し、以下の方針に従って73基原の基原生物の学名および和名を提案した。

- ① 原則、
  - ・和名はYlist (<http://ylist.info/index.html>),
  - ・学名はTropicos (<https://www.tropicos.org>)のものを採用した。どの規格でも全く同じ種を基原としているものについては、その種を基原生物として提案した。
- ② 天然香料や海外規格で基原として挙げられていても、データベースなどの情報から現在の香辛料抽出物の基原種と別種と考えられる場合は、基原種の範囲を広げず、既存添加物名簿収載品目リスト注解書の基原生物を提案した(ただし、学名・和名は解説ルールに則って修正した)。
- ③ 学名について、YlistとTropicosが異なっている場合は、各国の規格も比較しつつ、原則Tropicosのものを採用した。一方、和名については、Ylistに記載のない基原生物の和名は基原に記載しない案を提案した。

## C. 結果および考察

これまでの調査結果から得られた内容を精査し、「香辛料抽出物」の基原としてふさわしいと判断し提案した73基原生物案を表1に示す。提案した基原生物種の学名および和名は、研究方法の項に示すとおり、これまでの調査結果に従い、和名はYlist、学名はTropicosで標準とされているものを採用した。

香辛料抽出物の基原生物となっている種には日本に自生していないものも多く、そもそも和名が存在しない種が多く存在した。このような場合、第9版公定書作成時には、和名の代わりに学名のラテン語読みをカタカナ表記で記載していた。しかし、今回の香辛料抽出物には、1品目中の基原種が多くそのほぼすべてに和名が存在しないといったケースがあり、学名のラテン語読みをカタカナ表記しては要領を得ないものが複数あった。学名がある時点で基原種は一義的であること、カタカナ表記にすることで余計な混乱が生じることやそれを上回るメリットが感じられないこと



から、今回の基原種名の提案では、和名のないものは学名のみを記載することも併せて提案した。

基原種を提案するにあたり特筆すべきものについて、以下に詳細を示す。

#### ○5. アンゼリカ

既存添加物名簿収載品目リスト注解書には、「セリ科のアンゼリカ (*Peucedanum praeruptorum* DUMN., *Angelica sylvestris* L. var. *archangelica* L.) またはその他の *Angelica* 属の根、種子、葉茎」と定義されている。Ylist によりアンゼリカ (標準和名) の学名は *Angelica archangelica* L. であり、リストに記載の2つの学名は Ylist に収載されていなかった。Tropicos では前者の *Peucedanum praeruptorum* Dunn. がヒットしたが、後者については何の情報も得られなかった。

今回、アンゼリカの定義としては、「アンゼリカ (*Angelica archangelica* L.) またはその他の *Angelica* 属の根、種子、葉茎」としている。*P. praeruptorum* Dunn. は、*Angelica* 属の種とシノニムであるという情報は得られていないため、今回の提案ではもともとリストに基原として定められていたにもかかわらず定義から外れる可能性が高い。しかし、1) これまでの調査から、天然香料でも海外規格でも基原として用いられていないこと、2) *P. praeruptorum* Dunn. の根は生薬「ゼンコ」の基原であり、食薬区分で「専ら医」に分類されること、の2点から、とくに申し出のない限り定義に含める必要はないと判断し定義案から外した。

#### ○11. カシヨウ

既存添加物名簿収載品目リスト注解書には、「ミカン科の (*Xanthoxylum piperitum* L.) の果実 (乾燥果)」と定義されている。*Xanthoxylum* 属というものは存在しないので、これは *Zanthoxylum* の誤字であると思われた。その場合、基原生物は *Zanthoxylum piperitum* L. となる。これはサンショウ (標準和名) の学名であり、32.サンショウとの区別は部位 (11.カシヨウは果実、32.サンショウは種子、葉) のみとなる。

この可能性も全くないわけではないが、同じ植物の部位を分けて違う名称として扱うことは、よほどのことがない限り現実的ではない。

一方、日本薬局方外生薬規格に収載されている生薬に「シヨクシヨウ (蜀椒)」がある。これは別名をカシヨウ (花椒) といい、局方生薬「サンショウ」とは別品目である。複数の *Zanthoxylum* 属種の果皮 (種子はできるだけ除いたもの) が基原として挙げられている<sup>2)</sup>。既存添加物名簿収載品目リスト注解書に記載の基原となる部位も、カシヨウでは果皮と定められており、これがシヨクシヨウの使用部位とほぼ同じである。実際、香辛料抽出物のカシヨウとして流通している食品添加物サンプルについて日本添加物協会を通じて収集したところ、シヨクシヨウの基原種のひとつであるカホクザンシヨウ (*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.) を使用しているという資料が添付された添加物原体が存在した。以上のことから、カシヨウの基原生物としては、「カホクザンシヨウ (*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.) の果実 (乾燥果)」と提案した。なお、シヨクシヨウではもうひとつ同じ *Zanthoxylum* 属のフユザンシヨウが基原として挙げられているが、こちらは流通の確認がとれていないため、定義案には含めていない。また、基原生物の変更に伴い、カホクザンシヨウの英名が Sichuan pepper であることから、基原の英語表記としてこれを提案した。

#### ○12. カシヤ

既存添加物名簿収載品目リスト注解書には、「クスノキ科のケイ (*Cinnamomum cassia* NEES ex. BLUME) の樹皮、根茎、葉」と定義されている。この定義は、B. 研究方法の項に記載の解説ルールに則って「トンキンニッケイ (*Cinnamomum cassia* Nees ex Blume) の樹皮、根茎、葉」と修正すべきであると提案している。このカシヤの別名に『カシヤフィスチュラ』というものがあり、*Cinnamomum cassia* とどのような関係があるのか不明であった。しかし、昨年度の日本香料工業会からの回答で、天然香料の基原である *Cassia fistula* L. のカタ

カナ表記と同じであることが判明した。もし、カシヤフィスチュラが *Cassia fistula* L. のことであれば、リストの定義に含まれていないものであり不適切である。また、*Cassia fistula* L. 由来でなくとも、天然香料にこのような基原のものが存在するのであれば、カシヤフィスチュラという別名を残すことは混乱のもとになる可能性が高い。そこで、今回は、『カシヤフィスチュラ』という別名を削除することを提案した。

#### ○15. カルダモン

既存添加物名簿収載品目リスト注解書には、「ショウガ科カルダモン (*Elettaria cardamomum* MATON var. major THAWAIFES-セイロンタイプ, *E. cardamomum* MATON var. *miniscula* BURKHILL-マラバルおよびマイソールタイプ) の種子 (果実)」と定義されている。Tropicos にて調査したところ、*Elettaria cardamomum* (L.) Maton var. *major* (Sm.) Thwaites や *E. cardamomum* (L.) Maton var. *minuscula* Burkill という種は存在することが明らかとなった。しかし、天然香料や海外の規格では、カルダモンに相当する基原は *E. cardamomum* Maton. となっている。変種を同種と扱うか別種と扱うかにより、規格への適合不適合が変わってくるが、仮に別種と扱うことにすると海外で流通しているカルダモンが日本では使用できないことになる。そこで今回は、海外規格との整合性を考慮し、15.カルダモンの基原種として *E. cardamomum* Maton. を提案した。なお、Ylist では『カルダモン』という名称や *E. cardamomum* Maton. の標準和名は収載されていなかったため、和名の記載は規格案からは削除した。

#### ○19. クチナシ

既存添加物名簿収載品目リスト注解書には、「アカネ科のクチナシ (*Gardenia jasminoides* ELLIS または *G. augusta* MERR. var. *glandiflora* HORT.) の花, 果実」と定義されている。Tropicos によると *Gardenia jasminoides* J. Ellis と *G. augusta* Merr. var. *grandiflora* (Lour.) Sasaki

とはとくにシノニムであるという記載はない。しかし、天然香料ではこれらはシノニムとして取り扱われており、中国の規格でも基原として記載されているのは *Gardenia jasminoides* J. Ellis のみである。当初の既存添加物名簿収載品目リスト注解書でもクチナシのみを基原として想定しているように読み取れることから、今回はクチナシ (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) のみを基原として提案した。

#### ○24. ケーパー

既存添加物名簿収載品目リスト注解書には、「フウチョウソウ科のフウチョウボク (*Capparis spinosa* L.) の花 (花蕾) または根皮, 果実, 葉茎」と定義されている。しかし、Ylist によると、*Capparis spinosa* L. の標準和名はトゲフウチョウボク (フウチョウボク科) であり、フウチョウボクの学名は *C. micracantha* DC. var. *henryi* (Matsum.) Jacobs であるとされていた。Ylist に従うと、既存添加物名簿収載品目リスト注解書の定義には 2 種の基原種が含まれていることになる。一方、海外や天然香料の規格では、ケーパーに相当する基原は *C. spinosa* L. のみである。このことから、既存添加物名簿収載品目リスト注解書では和名を誤って記載していたと判断し、今回はトゲフウチョウボク (*Capparis spinosa* L.) のみを基原として提案した。

#### ○25. コショウ

既存添加物名簿収載品目リスト注解書には、「コショウ科のコショウ (*Piper nigrum* L., *P. longum* L., *P. officinarum* D. C.) の種子 (果実)」と定義されている。学名として 3 つ挙げられているが、コショウの標準和名をもつものは *Piper nigrum* L. のみであり、*P. longum* L. の和名はインドナガコショウである。また、*P. officinarum* D. C. に該当する和名はなく、Tropicos にて調査したところ、*P. officinarum* (Miq.) C. DC. という学名は存在するが、Accepted name とされているのは *P. retrofractum* Vahl であった。種についての情報が少ない *P. officinarum* D. C. (*P. retrofractum*

Vahl) については、天然香料や海外の規格でも基原として用いられていないため、今回は他規格と合わせてコショウ (*Piper nigrum* L.) とインドナガコショウ (*P. longum* L.) のみを基原として提案した。

#### ○31. サルビア

サルビアの英語表記は「Salvia」とされている。しかし、アメリカや中国ではサルビアの別名セージを英語表記した「Sage」が品目名として採用されている。国際整合性の観点から、基原の英語表記として Sage を提案した。

#### ○36. ジュニパーベリー

既存添加物名簿収載品目リスト注解書には、「ヒノキ科のセイヨウネズ (*Juniperus communis* L.) の果実」と定義されている。Ylist によると、セイヨウネズを標準和名とする学名は *Juniperus communis* L. var. *communis* である。しかし、Tropicos ではこの学名が *Juniperus communis* L. とシノニムの関係にあるかどうかについては言及されておらず、同種であると断定できなかった。天然香料や海外の規格では *Juniperus communis* L. のみが基原とされている。和名のよりどころとしている Ylist と完全に一致しているわけではないが、他規格との整合性の観点から、今回はセイヨウネズ (*Juniperus communis* L.) を基原として提案した。

#### ○40. セイヨウワサビ

既存添加物名簿収載品目リスト注解書には、「アブラナ科のセイヨウワサビ (*Armoracia rusticana* GAERTN., *Cochlearia armoracia* L.) 等の根茎」と、基原植物名の後に「等」がついたものが定義されている。しかし、天然香料や海外の規格ではセイヨウワサビ (*Armoracia rusticana* P. Gaertn., B. Mey. et Scherb.) のみが基原として用いられている。「等」がどの範囲を示すのか明確でなく、他規格と比較しても「等」を除くことによる不利益がないと判断し、「等」を除きセイヨウワサビのみを基原として提案した。

#### ○42. ソーレル

既存添加物名簿収載品目リスト注解書には、「タデ科のスイバ (*Rumex acetosa* L.)」と定義されている。他品目の基原では基原種とともに部位名も記載されているが、42. ソーレルには部位名がない。葉などが用いられると想像されるが、他の規格の情報がなく実態がどのようであるか不明なため、全草として提案し実態に合わせて修正することとした。

#### ○46. タラゴン

既存添加物名簿収載品目リスト注解書には、「キク科のタラゴン (*Artemisia dracunculus* L.—フランス種, *A. dracunculoides* PURSH—ロシア種) の全草」と定義されている。Ylist によると、タラゴンを標準和名とする学名は *Artemisia dracunculus* L. のみであり、Tropicos でも *A. dracunculoides* PURSH についての情報は得られなかった。インターネット上では、*A. dracunculoides* はロシアンタラゴンとして知られているようであったが、引用しても差し支えないような正式な文献は見つからなかった。天然香料や海外の規格では *A. dracunculus* L. のみが基原とされており、今回はこれらに合わせて *A. dracunculoides* PURSH を基原から除いて提案した。

#### ○50. トウガラシ

既存添加物名簿収載品目リスト注解書では、「ナス科のトウガラシ (*Capsicum frutescens* L., または *C. annum* L.) の果実 (実莢)」と定義されている。Tropicos では *Capsicum frutescens* L. と *C. annum* L. はシノニムとされているが、Ylist では両者は別種としてそれぞれトウガラシ、キダチトウガラシという和名が当てられている。アメリカでは両者が基原として併記されていたが、中国では *Capsicum* spp. と広い範囲であり、国によって異なっていた。原則として学名は Tropicos の記載に従うこととしていたが、Ylist と Tropicos の見解が異なりその詳細が不明であったため、どちらの判断でもカバーできるよう、トウガラシ (*Capsicum*

*annuum* L.) またはキダチトウガラシ (*C. frutescens* L.) を基原として提案した。

#### ○60. パプリカ

既存添加物名簿収載品目リスト注解書には、「ナス科のパプリカ (*Capsicum annum* L.) の果実 (実莢)」と定義されている。これは、50. トウガラシの基原の一部と全く同じである。種としてはパプリカとトウガラシは同一であり、トウガラシの栽培品種のひとつがパプリカである。そのため、単に基原種を記載しただけでは規格上トウガラシとの区別ができない。なお、海外の規格では、パプリカという品目はない。今回は、50. トウガラシとの区別という観点から、パプリカは標準和名ではないが、もとの規格に沿ってパプリカ (*Capsicum annum* L.) と提案した。

#### ○68. リンデン

既存添加物名簿収載品目リスト注解書には、「シナノキ科のボダイジュ (*Tilia cordata* MILL. または *Tilia vulgaris* L. var. *miqueliana* MAXIM.) の花、葉」と定義されている。Ylist と Tropicicos によると、ボダイジュを標準和名とする *Tilia miqueliana* Maxim. と、フユボダイジュを標準和名とする *T. cordata* Mill. の存在が確認された。しかし、*T. vulgaris* L. var. *miqueliana* MAXIM. という学名は確認できなかった。アメリカの規格では、68. リンデンに相当する品目の基原は *Tilia* spp. と幅広く、詳細は不明であった。今回は、データベースで確認できたボダイジュ (*T. miqueliana* Maxim.) とフユボダイジュ (*T. cordata* Mill.) のみを基原として提案した。

#### D. 結論

既存添加物名簿収載品目のひとつである香辛料抽出物について、これまでに収集した情報をもとに、規格案作成を見据えて基原の提案を行った。第四次削除により削除された 48. チャービルを除く 73 種の基原について、食品添加物の成分規格作成の解説<sup>1)</sup>に従いながら、基原種として相応しいと思われる和名や学名

を整備した。必要に応じて、類似する品目であると予想される天然香料や海外規格と比較しながら基原種の取捨選択を行った。

本研究で提案した基原種原案は、主に名称の不整合を修正し、記載の名称が一義的に決まるよう整備したものである。本基原種原案は、香辛料抽出物の規格案作成のためのいわゆるたたき台であり、今後流通実態などをもとに加筆修正していくこととなる。しかし、一定の規則のもと基原を整備したことは、香辛料抽出物の規格案作成に大きく寄与したといえる。

#### E. 参考文献

- 1) 食品添加物の成分規格作成の解説 <[http://www.nihs.go.jp/dfa/\\_src/624/sakuseiforweb\\_191018.pdf](http://www.nihs.go.jp/dfa/_src/624/sakuseiforweb_191018.pdf)> (accessed 2019-11-22).
- 2) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課課長通知 ”日本薬局方外生薬規格 2018” 平成 30 年 12 月 14 日。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
該当無し
2. 学会発表  
該当無し

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し