

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）

令和 2 年度総括研究報告書

食品添加物の安全性確保に資する研究

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

食品添加物の摂取量推計及び香料規格に関する研究

生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関わる研究：食品添加物を実際にどの程度摂取しているかを把握することは、食品添加物の安全性を確保する上で重要であることから、指定添加物についてその製造または輸入の営業の申請を行っている業者を対象に、令和元年度の取扱量について調査を行った。

香料使用量に関わる調査研究：国際食品香料工業協会（IOFI）の香料化合物及び天然香料のグローバル使用量調査において、我が国の使用量を精度よく、効率的に得るため、香料化合物及び天然香料の使用量の調査方法を検討し、調査票を作成した。

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/世界保健機関共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の検証を行っている。これまでの研究により 921 品目の JECFA 規格の検証を終了したが、平成 27 年度使用量調査での使用実績があるにもかかわらず JECFA 規格の検証を終了していない品目が 243 品目残されていた。本年度は、これら検証の終了していない品目について、これまで収集したデータを詳細に検討し、今後の作業方針を立案した。

マーケットバスケット（MB）方式による低揮発性香料の摂取量調査

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、MB 方式による低揮発性香料の一日摂取量調査について検討を行った。アルデヒド系香料を対象に MB 混合試料に含まれる各種香料の含有量を QuEChERS 法により抽出・精製後、ガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）により分析し、20 歳以上の喫食量をもとに推定一日摂取量を算出した。

食品添加物公定書一般試験法の改良に関する調査研究

液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS）を用いる試験法の妥当性を検討するため、ステビオール配糖体の LC/MS 及び LC/UV のアイソクラティック条件での検討を行った。その結果、LC/MS は選択性が高く S/N 比も良好であり、 σ 値を基にして求めた検出限界や定量下限値も、LC/MS の方が LC/UV より 4~6 倍検出感度が高い結果となった。また、グラジエント条件での定量結果と比較したと

ころ、LC/UV では、精度及び定量値が低く、LC/MS では、精度は同程度か少し良好であったが、定量値はグラジェント条件より低い傾向が見られ、特定のイオンを用いた場合のみ同程度の定量値となった。アイソクラティック条件での分析は、多検体の迅速分析に有用であるが、高い真度や精度を求める場合は、適切なイオンや適切な濃度範囲の検量線等を用い、ピーク分離、精度及び定量値をグラジェント条件の場合と比較し、より良好な条件を選択すべきであることが示唆された。

赤外スペクトル測定法に関する研究

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法について、普及著しい減衰全反射法（ATR 法）も含め、規格設定に関わる調査、検討を行った。その結果、異性体が存在するものに関して、異性体混合物として規定する場合には、各異性体の含有率なども規定することが必要であると考えられた。また、確認試験に ATR 法を取り入れる場合は、同一条件での測定を前提とした標準品との比較を行う必要があると考えられた。

残留溶媒試験法に関する研究

ヘッドスペース（HS）-GC/MS を用いて、ショ糖脂肪酸エステル中の残留溶媒試験法の検討を行った。規格値相当のジメチルスルホキシド（DMSO）及びジメチルホルムアミド（DMF）を添加したショ糖脂肪酸エステル 1 g に溶解溶媒として 1-メチル-2-ピロリジオン（NMP）1 mL を加え、バイアル平衡化温度 110°C、バイアル平衡化時間 30 分で HS-GC/MS による標準添加法により添加回収試験を行った結果、いずれも 90%以上の回収率が得られ、DMSO や DMF のような高沸点の有機化合物の残留溶媒試験法として、HS-GC/MS による標準添加法は有用な方法であ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

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

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、一日摂取量の推計や品質を担保するための試験法の整備や成分規格の設定が重要であることから、以下の研究を行った。

1. 食品添加物の摂取量推計及び香料規格に関する研究

1) 生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関わる研究

食品添加物を実際にどの程度摂取しているかを把握することは、食品添加物の安全性を確保する上で重要なことであり、生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定を継続した。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、日常生活にお

ける品目毎の摂取量の把握及び許容一日摂取量（ADI）との比較を目的として、指定添加物の取扱量について生産・輸入業者にアンケート調査を行い、集計化を行った。

2) 香料使用量に関わる調査研究(天然香料使用量の国際比較)

香料化合物の安全性評価の重要な要素の一つである摂取量を Maximised 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。国際食品香料工業協会 (IOFI) では、来年度、3 回目となる、日米欧等による香料化合物及び天然香料のグローバル使用量調査を実施する。グローバル使用量調査において、我が国の使用量を精度よく、効率的に得るため、香料化合物及び天然香料の使用量の調査方法を検討し、調査票を作成することを目的とした。

3) 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な要素である。国際機関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) では香料化合物の規格を設定しており、最近規格を設定した多くの国で参照されている。一方、第 9 版食品添加物公定書の改正作業等においては、国内に流通している香料化合物の規格値が実測され、いくつかの JECFA 規格は香料化合物の実態を反映していないことが確認された。そのため、JECFA 規格の検証を行って

る。本年度は昨年度の厚生労働科学研究で検証作業が終了していない品目について、追加の調査の方法等の見直しを行った。

2. マーケットバスケット (MB) 方式による低揮発性香料の摂取量調査の検討

流通する食品中からの香料の摂取量を明らかとするため、昨年度は QuEChERS-GC/MS を用いて MB 方式における低揮発性エステル系香料の一日摂取量推計を調査した。本年度は、同様の方法により低揮発性アルデヒド系香料の一日摂取量推計を検討した。

3. 食品添加物公定書一般試験法の改良に関する調査研究—ステビオール配糖体の LC/MS による分析法の検討 (2) —

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、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として、質量分析計 (MS) を用いる試験法を導入する場合を想定し、液体クロマトグラフィ—質量分析 (LC/MS) を用いる定量法の精度について調べるため、昨年度、具体的な試験法として、ステビオール配糖体の溶媒グラジエント LC/MS 条件による分析精度について調べた。今年度は、同様にしてステビオール配糖体のアイソクラティック LC/MS 条件による分析精度について調べた。

4. 赤外スペクトル測定法に関する研究

赤外スペクトル (IR) 法は、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。また、減衰全反射法 (Attenuated Total Reflection; ATR 法) は、現在では公定書には規定されていないが、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る。そこで、本研究では、我が国での食品添加物等の規格基準の向上を目的として、ATR 法も含め、規格設定に関わる調査、検討を行った。

5. 残留溶媒試験に関する調査研究

ショ糖脂肪酸エステルは、ショ糖を親水基、脂肪酸を親油基とした非イオン界面活性剤であり、古くから食品添加物として認められている食品添加物である。ショ糖脂肪酸エステルは純度試験にジメチルスルホキシド (DMSO) 2 µg/g 以下、ジメチルホルムアミド (DMF) 1 µg/g 以下と規定されており、いずれも、パックドカラムを用いた分析法が設定されており、キャピラリーカラムへの変更が期待される。そこで、本研究では、ショ糖脂肪酸エステル中の DMSO 及び DMF の分析法として、ヘッドスペース (HS) - GC/MS を用いた方法について検討を行った。

B. 研究方法

1. 食品添加物の摂取量推計及び香料規格に関する研究

1) 生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関わる研究

調査内容

- (1) 調査法 アンケート方式
- (2) 調査対象年度 令和元年
- (3) 調査対象 指定添加物 465 品目

(4) 調査内容

製造及び輸入した品目名、製造量及び輸入量、国内食品向け出荷量、国内食品以外の用途向け出荷量、輸出量及び総出荷量

(5) 調査対象製造所

指定添加物の製造または輸入の営業の申請を行っている業者の全製造所。なお、該当品を取り扱わないことが確実である事業者は調査対象から除外し、今回の送付先は 505 事業者であった。

2) 香料使用量に関わる調査研究

IOFI から入手した使用量調査のための香料化合物リスト、天然香料リスト及び Regional Review 品目リストについて検討を行った。香料化合物については、厚生労働省 令和元年 10 月 21 日通知「類又は誘導体として指定されている 18 項目の香料に関するリストについて」(薬生食基発第 1021 第 1 号・薬生食監発第 1021 第 1 号) の香料リストの情報等を追加し、香料化合物データベースの更新を行った。更新した香料化合物データベースと IOFI の香料化合物リストとの比較を行い、調査票の検討を行った。天然香料については、IOFI より提供された天然香料リストの収載品目を検討し、さらに追加で調査する品目を検討した。

3) 香料化合物規格の国際整合化に関わる調査研究

JECFA 規格の検証ができていない品目について、以下の手順で抽出、整理し、検証のための分析計画を立案した。

- (1) これまでの研究結果の整理

- ① 平成 25-30 年度研究の検証結果のまとめ
- ② 平成 31 年度研究の検証結果のまとめ
- ③ 検証が終了していない品目の分類
- ④ 本年度以降の研究方針立案
- (2) 品目毎の JECFA 規格の問題点の抽出と検証計画立案
 - ① これまでの検証作業のまとめ
 - ② 考察に用いる実測値の確認
 - ③ JECFA 規格と実測値の違いについての考察
 - ④ JECFA 規格を検証するための分析方法の提案

2. MB 方式による低揮発性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 → 250°C、注入口温度: 240°C、インターフェース温度: 250°C、イオン源温度: 200°C、イオン化法: EI、イオン化電圧: 70 eV、測定モード: SIM、測定質量数: エチルバニリン m/z 137、シンナムアルデヒド m/z 131、バニリン m/z 151、フルフラール m/z 96、ヘキサナール m/z 82、ペリルアルデヒド m/z 107、ベンズアルデヒド m/z 106、5-メチルフルフラール m/z 110、バニリン- d_3 (メトキシ- d_3) m/z 154、フルフラール-3,4,5- d_5 m/z 99、ヘキサナール- d_{12} m/z 80、ベンズアルデヒド-2,3,4,5,6- d_5 m/z 111。

2) 試験溶液の調製

QuEChERS 法 (AOAC 2007.01) を用い、以下の方法により試料調製を行った。

MB 1~5,7 群試料は約 5.0 g、MB 6 群試料は約 1.0 g を 50 mL 遠心チューブに採り、水 5 mL、内部標準原液 100 μL 及び 1%酢酸アセトニトリル溶液 10 mL を添加し、よく攪拌した。無水硫酸ナトリウム 6 g、無水酢酸ナトリウム 1.5 g を加え、直ちにキャップで密封後、1 分間振とうした後、遠心 (1 分間、1500×g) した。この上清の一部を硫酸マグネシウム 150 mg、PSA 50 mg、C18 充填剤 50 mg を含んだ 2 mL 遠心チューブに採取し、タッチミキサーで 30 秒間攪拌した後、遠心 (1 分間、1,500 回転/分) した。上清をバイアルに採取し試験溶液とした。

3. 食品添加物公定書一般試験法の改良に関する調査研究—ステビオール配糖体の LC/MS による分析法の検討 (2) —

本研究では、ステビア抽出物のアイソクラティック LC/MS 定量条件により得られたピーク面積から、絶対検量線法及び内標準法で定量計算を行い、液体クロマトグラフィー紫外吸光度検出 (LC/UV) によるピーク面積を用いた場合と比較した。また、令和元年度に実施した溶媒グラジェントによる LC/MS 条件での検討結果と比較した。

(1) LC 条件

カラム: Inertsil ODS-3 (150 mm × 2.1 mm I.D. 粒子径 3 μm)、カラム温度: 40°C、流速: 0.3 mL/分、注入量: 1 μL、移動相 0.1 vol% ぎ酸水溶液 / 0.1 vol% ぎ酸含有アセトニトリル溶液 (7 : 3)

(2) 検出条件

MS イオン化法: ESI(-)、測定モード: スキャン (確認時、 m/z 500~1050) 及び

SIM (定量時)

UV 210 nm

4. 赤外スペクトル測定法に関する研究

測定試料は、市販品を用いた。本研究で測定に用いた装置は、JASCO FT/IR-4100 である。測定は、分解能 4 cm^{-1} (32 回繰り返し)、測定領域 $4000\sim 600\text{ cm}^{-1}$ で行った。液膜法、ペースト法の測定には、原則として、大きさ $30\sim 35\text{ mm}\times 30\sim 35\text{ mm}$ 、厚さ 5 mm の KBr 板を窓板として使用した。なお、対照にはこの KBr 板を使用した。ATR 法の測定には、前述の赤外分光光度計に、ダイヤモンドプリズム一回反射 ATR 装置を装着した装置を用い、分解能 4 cm^{-1} (積算回数 96 回)、測定領域 $4000\sim 600\text{ cm}^{-1}$ で測定を行った。

5. 残留溶媒試験に関する調査研究

1) HS-GC/MS 条件

(1) GC/MS 条件

カラム : DB-624 UI ($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm}$ I.D. 膜厚 $1.4\text{ }\mu\text{m}$)、カラム温度 : 40°C (5 min) $\rightarrow 40^\circ\text{C}/\text{min}\rightarrow 240^\circ\text{C}$ (3min)、注入口温度 : 200°C 、キャリアーガス : ヘリウム、キャリアーガス流量 : $1\text{ mL}/\text{min}$ 、スプリット比 : 30 : 1、スプリット流量 : $30\text{ mL}/\text{min}$ 、トータルフロー : $34\text{ mL}/\text{min}$ 、セプタムパージフロー : $3\text{ mL}/\text{min}$ 、カラム流量 : $1\text{ mL}/\text{min}$ 、イオン源 : EI、イオン源温度 : 230°C 、四重極温度 : 150°C 、電子エネルギー : 70.0 eV 、測定モード : TIC 及び SIM、スキャン範囲 (m/z) : 40 \sim 400、測定質量数 : DMSO m/z 63 及び 78、DMF m/z 44 及び 73。

(2) HS サンプラー条件

バイアル平衡化温度 : 110°C 、バイアル平衡化時間 : 30 分、トランスファーライン温度 : 150°C 、注入時間 : 0.5 min、バイアルサイズ : 20 mL、バイアル攪拌 : レベル 5、充填圧力 : 15 psi

2) HS 条件の最適化

(1) 平衡化温度の検討

バイアルにシヨ糖脂肪酸エステル 1 g を量り、添加用混合標準液/NMP $50\text{ }\mu\text{L}$ (DMSO $2\text{ }\mu\text{g}$ 及び DMF $1\text{ }\mu\text{g}$ 相当) を添加し、NMP 1 mL を加え、攪拌子を入れ、PTFE セプタム付きアルミシールで密閉し、SMP/NMP 試料液 1 \sim 7 を調製した (各 $n=3$)。試料液 1 \sim 7 は室温にて 5 分間マグネチックスターラーで攪拌した後、1) HS-GC/MS 条件において、バイアル平衡化温度 80 、 90 、 100 、 110 、 120 、 130 及び 140°C 、平衡化時間 40 分でそれぞれ加熱し、GC/MS で DMSO 及び DMF のピーク面積値を測定した。

(2) 平衡化時間の検討

(1) 平衡化温度の検討と同様に、SMP/NMP 試料液 1 \sim 6 を調製し (各 $n=3$)、試料液 1 \sim 6 は室温にて 5 分間マグネチックスターラーで攪拌した後、1) HS-GC/MS 条件において、平衡化時間 10、20、30、40、50 及び 60 分でそれぞれ加熱し、GC/MS で分析を行い、DMSO 及び DMF のピーク面積値を測定した。

3) 添加回収試験

5 つのバイアルにシヨ糖脂肪酸エステル 1 g を量り、添加用混合標準液/NMP $50\text{ }\mu\text{L}$ を添加し、30 分室温で放置した。NMP または混合標準液 0.5、1.0、2、5 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{NMP}$ 1 mL を加え、攪拌子を入

れ、PTFE セプタム付きアルミシールで密閉し、添加試料液/NMP 1～5 を調製した (n=3)。別に添加用混合標準液の代わりに NMP 50 μ L を添加し、同様に調製したものを空白試料液/NMP とした (n=3)。添加試料液/NMP 1～5 及び空白試料液/NMP はそれぞれ室温にて 5 分間マグネチックスターラーで攪拌した後、1) HS-GC/MS 条件で分析し、DMSO 及び DMF のピーク面積値を測定した。横軸に DMSO 及び DMF の濃度、縦軸に DMSO 及び DMF のピーク面積をとり、グラフにそれぞれの値をプロットし、関係線を作成し、関係線の横軸との交点と原点との距離から DMSO 及び DMF の濃度 (μ g/g) を求めた。得られた濃度から添加回収率 (%) 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. 食品添加物の摂取量推計及び香料規格に関する研究

1) 生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関する研究

(1) 調査票回収結果

今回は初年度の第 1 次調査で 79.6% の回収率を挙げ、前回の初年度の水準(77.0%)を上回った。

(2) 調査票の課題への対応

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

(3) 調査結果

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

集計 1 食品添加物用途別 品目名と全出荷量、純食品向け出荷量、輸出量調べ

集計 2 食品添加物品目名別 製造会社数、全出荷量、純食品向け出荷量、輸出量調べ

回収した調査票を 1 次集計したうえで、研究グループ会議を開催し、第 12 回までの調査結果その他の情報から、再調査、精密調査をすべき対象の企業の抽出を行い、次年度は、これらが、単なる回答忘れなのか、OEM、製造の国外化、あるいは、事業終了が原因なのかについて、電話の聞き取り調査等で、明らかにしてゆく。加えて、既存添加物についての第 8 回目の摂取量推定のためのアンケート調査を実施する。

2) 香料使用量に関わる調査研究

IOFI から入手したグローバル使用量調査リストには、香料化合物 (CDS) リスト、天然香料 (NCS) リスト、及びどちらのリストに含めるか地域ごとに決めて調査する Regional Review 品目リストが含まれている。それぞれの内容について、わが国の規制、及び、これまでの使用量調査等の知見に基づき検討を行い、日本で使用する調査票を作成することとした。

なお、使用量調査リストに加えて、調査を行う際のよくある質問と回答 (FAQs)、及び天然香料 (NCS) の製法に基づく形態と使用部位に関する説明文

書が配布されているので、これらも参考にして検討を行った。

(1) 香料化合物

① 香料化合物データベースの更新

「食品香料化合物データベース 2015」をベースに、新規に追加された GRAS28, GRAS29 の FEMA GRAS 物質、EU Union List に関する削除品目や令和元年 10 月 21 日発出の「類又は誘導体として指定されている 18 項目の香料に関するリストについて」（以下、通知リスト）の情報を加え、香料化合物データベースの情報を更新した。新たに追加された FEMA GRAS 品目で、通知リストに記載のない品目については、該当する 18 類の仮判定を行った。

② 香料化合物 (CDS) リストの確認

IOFI の香料化合物(CDS)リストは、FEMA GRAS を基準にした 2447 品の FEMA 番号、化合物名 (Primary Name) 等を記載したリストで、日本の香料に該当しない物質も記載されている。

●日本の香料に該当しない品目について

日本では香料化合物に該当しないが IOFI の調査リストに記載されている物質は 215 品目であった。これらは、日本では類別香料に該当しない未認可の香料物質の他、乳化剤や製造用剤など他の食品添加物の用途で使用されている品目もあった。IOFI の調査リストの基になる FEMA GRAS リストには香料製剤の副剤などに用いられる物質も含まれていることならびに調味料などの日本独自の食品添加物分類が海外では香料に包括されるなど、香料化合物の対象範囲の差異などが要因と考えられる。

●異性体の区別の違う品目

香料化合物 (CDS) リストの分類と比較して、日本では香料化合物について異性体を区別し分類している品目がある。

FEMA 番号と香料化合物データベースの品目を比較した場合、137 品目について一つの FEMA 番号に対して複数の品目の存在が見られた。これは調査時に区別して回答してもらうための参考資料とする。

流通している香料化合物の中には、異性体などを分画しない形態で販売されているものが存在している。香料化合物の製造の歴史は長く、製造方法から複数の化合物が生産されたとしても過去の製造技術や分析技術では異性体などを細かく分けることが困難であった可能性があることと、使用するにあたり、混合物でも安定した香調であるものについては分画の必要性が求められていなかったと推測される。また、安全性評価の観点からは、構造相関のある物質に関しては個別に評価を行う必要性が要求されていないため混合物である流通品については細分化を必要としていなかったとも考えられる。

一方、化学の進歩とともに近年一部の化合物に関して生産技術が向上し、単一物質で高純度の化合物が合成可能となり流通している。日本での使用量調査に基づく香料化合物データベースに記載の物質は、単一物質での流通または分離して検出された物質の使用実態を反映したものと言える。

●IOFI 調査リストで 2 つのリストに記載の香料化合物について

BISABOLENE 、 NOOTKATONE 、

VALENCENE は、IOFI の調査リストでは、香料化合物 (CDS) リスト及び天然香料 (NCS) リストの 2 種に登録されている。

IOFI の天然香料 (NCS) リストに掲載の上記 3 品目は天然香料の基原が明確でないため、日本の調査においては香料化合物リストで調査を実施する。

③ Regional Review 品目リストについて

前回の IOFI のグローバル使用量調査において、香料化合物 (CDS) として調査するか天然香料 (NCS) で調査するかの判断が日本香料工業会と IOFI で異なり、結果として日本香料工業会で追加調査を行った品目がいくつか存在した。これらの取り扱いについてはその後 IOFI 側でも議題となり、今回、5 品目が Regional Review という形で回覧された。内容を検討した結果、RUM ETHER はエステル類に属する香料化合物、その他は日本の調査では天然香料に該当するとした。

④ 香料化合物調査票の作成

更新したデータベースから個別指定品目及び 18 類に該当する品目を抽出し、さらに IOFI では天然香料 (NCS) リストに掲載の物質だが天然香料の基原が明確でないため、日本の調査においては香料化合物として調査する 3 品目を加えたものを来年度の使用量調査基本回答票とした。基本回答票にない品目については品目名 (英名)、CAS 番号、使用量、希釈率または含量を記入できる追加回答票を作成した。

(2) 天然香料

IOFI より提供された天然香料 (NCS) リストを基に以下の作業を経て日本独自の調査票を作成した。

① 天然香料 (NCS) リストの内容確認

今回は IOFI の調査リストが Spice の原体なども取り入れた幅広い対象であったが、今回は FEMA GRAS 収載品目で香料の形態 (オイル、エキス等) に特化したリストが提供された。今回から品目毎に抽出部位、製法を表す NCS Processing Code が付与されている点も特徴的である。

② 天然香料 (NCS) リストに記載の NCS Processing Code について

NCS Processing Code の記号を天然香料の形態、使用部位の情報に変換した説明書を作成した。その情報を日本で実施する天然香料調査票の製法と部位の情報として反映させた。

③ 天然香料 (NCS) リストの品目の確認

天然香料 (NCS) リスト (FEMA GRAS リスト収載品目) に、日本の天然香料基原物質名を割り振った。食品や他の添加物用途になるなど、我が国では天然香料とみなされないものを除外した。さらに香料化合物として調査を実施するものは天然香料調査票から除外した。

④ Regional Review 品目リストの品目の追加

Regional Review 品目リスト収載品目のなかで日本において天然香料に該当するものを天然香料調査票に追加した。

⑤ IOFI の天然香料 (NCS) リストにない品目の追加調査

IOFI のグローバル調査では、食品由来の天然香料は調査の対象になっていない

が、日本においては主要な天然香料の原料として使用されているものがある。天然香料は基原物質の種類も多く、製法も多岐にわたることから非常に多くの品目が使用されている。すべての天然香料基原物質について調査を実施することは回答する企業の負担が大きいため、過去の調査で使用量の多かった品目に絞り実施することにした。平成 27 年度の厚生労働科学研究の調査結果で 10t 以上使用されていた主要な天然香料基原物質について、予め形態を表す品名で調査リストに加えた。追加調査に加えた天然香料基原物質は 14 種であった。このうち、ミカンについては NATSUMIKAN OIL (Citrus natsudaidai ; FEMA No.4860)、MIKAN OIL (Citrus unshiu ; FEMA No.4861)が IOFI の天然香料 (NCS) リストに掲載されていたので、他の柑橘類と同様に製法の違う品目をリストに加えた。

⑥ 天然香料調査票の作成

調査 No.、FEMA No.、品名、製法、部位、基原物質名を記載したリストに使用量(kg)と備考欄を加え整理したものを「天然香料調査票」とした。

3) 香料化合物規格の国際統合化に関わる調査研究

(1) これまでの研究結果の整理

① 平成 25-30 年度研究の検証結果のまとめ

自主規格と JECFA 規格の両方が存在した 1068 品目と、国際的に使用量の多い 20 品目の計 1088 品目について、JECFA 規格を再検証した。検討品目の分類を表 1 に示す。

256 品目の JECFA 規格には問題がないことが確認された。587 品目の JECFA 規格では流通規格とのずれ等の問題があった。これらは JECFA 規格の問題点が特定できたとして実測値を基に修正案を策定した。34 品目の JECFA 規格については、実測値との乖離の原因の特定ができなかった。139 品目では検討に必要なデータを 2 個以上得られなかった。また、7 品目は天然香料との差がはっきりしないとして検討を保留した。

なお、研究期間中に個別指定された 2 品目、JECFA 番号の削除された 1 品目、平成 27 年の使用量調査で使用量報告のなかった 62 品目は検討対象から除外した。

② 平成 31 年度研究の検証結果のまとめ ●平成 30 年度までに検証の終わらなかった品目の再検討

平成 30 年度までに JECFA 規格と実測値の乖離の原因が判明してない 34 品目と、検証に必要な数の実測値が得られていない 139 品目から、平成 27 年度使用量調査で、3 社以上の使用のあった 45 品目を再度詳細に調査した。

検証の結果、2 品目の JECFA 規格は問題なし、30 品目は JECFA 規格の問題が特定できたため、実測値を基に修正案を策定した。8 品目は規格と実測値の乖離の原因を特定できなかった。5 品目は検討に必要なデータ 3 個以上が得られなかった。

●平成 27 年度使用量調査で新たに使用が確認された品目の追加調査

平成 27 年度使用量調査の結果をもとに、269 品目を検証対象に追加した。追

加の調査の結果、13品目はJECFA規格に問題なし、33品目はJECFA規格の問題点が特定できたため、実測値を基に修正案を策定した。13品目はJECFA規格と実測値に乖離がみられたが、原因の特定ができなかった。210品目は検証に必要な3つ以上のデータが得られなかった。

③ 検証が終了していない品目の分類

平成25-30年度研究と平成31年度研究をまとめると、JECFA規格の検証が終了していないのは243品目であった。7品目は天然香料との差が明確でなく検討を保留中、21品目については、実測値はあるもののJECFA規格の検証が終了していない。また215品目は平成27年度に3社以上の使用があったが、検証に必要な実測値が得られていない。

④ 本年度以降の研究方針立案

天然香料との差が明確でなく、検討を保留中の7品目と実測値が得られているが検証結果の出していない21品の計28品目について、検証に用いた製品や分析方法等の問題点を精査することとした。

平成31年度研究で3つ以上の実測値の得られなかった215品目は、これらの多くが過去の複数回の調査で回答が得られておらず、再度調査しても回答が得られる可能性は低いことから、以降の調査はしないこととした。なおこれらは、使用会社数も少ないため、仮にJECFA規格に問題があっても公衆衛生上の問題は少ないと考えられる。

(2) 品目毎の問題点の抽出と分析計画の立案

これまで収集した実測値データを用いて、検証に用いた製品や分析方法等の問

題点を洗い出し、検証に必要な分析方法を検討した。

その結果、2-Methyl-3-furanthiol、Terpinolene、Ethyl 5-hydroxydecanoateについては、問題ないことが判明し、3-Methyl-1-pentanol、Diallyl trisulfide、Isoamyl acetoacetate等8品目は、データ数が少ないため判断できなかった。*cis*-3-Hexenal、Dipropyl trisulfide、Cinnamyl cinnamate等15品目は、複数の組成の異なる製品群が流通している可能性があると考えられた。2,5-Dihydroxy-2,5-dimethyl-1,4-dithiane、2-Thienylmercaptanは物質の同定、測定条件等に問題あった。

JECFA規格に問題があることを踏まえ、平成25～31年度でJECFA規格の検証を行ってきたが、規格の正当性が確認できずかつ新たな規格設定ができなかったものが多々あった。今回それらの香料化合物に対して今後の検討方針を決めた。次年度以降これらの方針で検証作業を行い、結果をJECFA、IOFIに提案したいと考えている。

日本をはじめ中国、韓国、ベトナム等、香料化合物の規格を規制にしている国ではJECFA規格を参考にして国内規格を設定している。食の安全上からも、今後も香料化合物の規格を設定する国が増えてくると思われる。その際にJECFA規格が間違っているとその香料化合物が流通できないという問題となる。この点からもJECFA規格の見直しが早急に必要と考えられる。

2. MB方式による低揮発性香料の摂取

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3.66 mg/人/日であり、エチルバニリン0.23 mg/人/日、フルフラール0.07 mg/人/日、ヘキサナール0.16 mg/人/日、ベンズアルデヒドは0.09 mg/人/日、5-メチルフルフラール0.07 mg/人/日であった。ペリルアルデヒドの摂取量は0 mg/人/日であった。

2) 一日摂取量のADIとの比較

JECFAでADIが定められている食品添加物について、一人当たりのADI (mg/人/日) に対する一人当たりの一日摂取量 (mg/人/日) の割合 (対ADI比) を求めた。なお、シンナムアルデヒド、ヘキサナール、ペリルアルデヒド及び5-メチルフルフラールに関しては、JECFAにおいて「acceptable¹」と評価しているため算定から除外した。

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)、フルフラール (0-0.5 mg/kg 体重/日)、ベンズアルデヒド (0-5 mg/kg 体重/日) について対ADI比を求めたところ、バニリンが0.63%で最も高く、その他の香料は、エチルバニリン 0.13%、フルフラール 0.23%、ベンズアルデヒド 0.03%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 0.63%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. 食品添加物公定書一般試験法の改良

に関する調査研究—ステビオール配糖体のLC/MSによる分析法の検討 (2) —

1) 標準液の分析におけるピーク形状、ピークの選択性及び検出感度

LC/MSの絶対検量線法、内標準法、LC/UVの絶対検量線法、内標準法で標準液を分析し、各方法でのレバウジオシドA及びステビオシドの検出結果から、ピーク形状、ピークの選択性、検出感度について調べた。

ピーク形状及びピークの選択性は、レバウジオシドA及びステビオシド共に、LC/UVよりLC/MSの方が良好であった。今回の分析法で、LC/MSはLC/UVよりS/N比が250倍以上と非常に良好であったが、精度を考慮した検出限界、定量下限の差はLC/MSとLC/UVで4~6倍であった。

2) 試料中のレバウジオシドAの定量

LC/MSでの検量線 (m/z 965) 及び関係線 (m/z 965/ m/z 641) はレバウジオシドA標品の濃度3点 (1~10 $\mu\text{g/mL}$ 及び5~20 $\mu\text{g/mL}$) により、LC/UVでの検量線及び関係線はレバウジオシドA標品の濃度3点 (5~20 $\mu\text{g/mL}$) により直線性が得られ、それぞれ R^2 は 0.9985 及び 0.9994 と 0.9705 であり、これら範囲の検量線及び関係線を定量計算に用いた。 R^2 は、グラジエント条件での結果と比較し、LC/MSではより高値となったが、LC/UVでは低値となった。定量の結果、LC/MSでの絶対検量線法 (m/z 965)、内標準法 (m/z 965/ m/z 641) から算出したレバウジオシドAの含量 (%) は、1~10

¹ acceptable : 現在の使用を認める

$\mu\text{g/mL}$ の検量線及び関係線を用いた場合はそれぞれ 85.6 及び 90.5%、5~20 $\mu\text{g/mL}$ の検量線及び関係線を用いた場合はそれぞれ 86.7 及び 94.2%であった。LC/UV での絶対検量線法、内標準法から算出したレバウジオシド A の含量 (%) は、5~20 $\mu\text{g/mL}$ の検量線及び関係線を用いて算出し、それぞれ 77.5 及び 63.8% と LC/MS より低い値となった。

本研究のアイソクラティック条件での定量結果を、グラジェント条件での定量結果と比較した。その結果、LC/MS の場合は、グラジェント条件の場合より絶対検量線法と内標準法との値の差が大きく、絶対検量線法ではグラジェント条件の場合より低かった。内標準法の場合はグラジェント条件の場合とおおよそ同程度であったが、検量線等の濃度範囲により 4% 程度値が異なり、適切な濃度範囲の検量線等を用いることが重要であることが示された。今回のアイソクラティック条件の LC/UV の場合は、絶対検量線法、内標準法での定量値はそれぞれグラジェント条件の場合の 82% 及び 67% と低値となった。

3) 定量精度

LC/MS での絶対検量線法、内標準法、LC/UV での絶対検量線法、内標準法での 6 回繰り返し測定時の定量精度として、各方法での相対標準偏差 (RSD) (%) を求めた。その結果、LC/MS の絶対検量線法、内標準法での RSD は、1~10 $\mu\text{g/mL}$ の検量線 (m/z 965) 及び関係線 (m/z 965/ m/z 641) を用いた場合はそれぞれ 1.1 及び 1.8%、5~20 $\mu\text{g/mL}$ の検量線 (m/z 965) 及び関係線 (m/z 965/ m/z 641) を用い

た場合はそれぞれ 1.1 及び 2.0% であった。LC/MS の m/z 1011 を用いた場合の精度は、絶対検量線法では m/z 965 を用いた場合とほぼ同じであったが、内標準法 (m/z 1011/ m/z 849) では数倍良い精度が得られた。LC/UV での絶対検量線法、内標準法の RSD は、それぞれ 5.9 及び 11.0% であった。

本研究のアイソクラティック条件での結果を、令和元年度のグラジェント条件での結果と比較した結果、LC/MS の場合は、精度は同程度か少し良好になった。LC/UV の場合は、精度は許容範囲ではあるもののグラジェント条件より低下した。

4. 赤外スペクトル測定法に関する研究

参考となる規格基準を調査した結果、透過法である既存の測定法と、反射法である ATR 法を特に区別せずに規定しているものがある一方で、欧州薬局方では、両者を明確に区別していた。ATR 法は、原理的に波長依存性があり、基本的に透過法によるスペクトルとは異なるため、透過法によるスペクトルとの比較による確認は問題がある。実際に、試料としてバニリン、ケイ皮酸を用いて検討したところ、従来 of 測定法 (透過法) であるペースト法と ATR 法とを比較 (流動パラフィンに由来するピーク領域を除いて比較) すると、ATR 法で得られたスペクトルは、ペースト法によるスペクトルと相対強度が異なる箇所が認められるなど、両者のスペクトルは異なっていた。また、酢酸テルピニルについて、液膜法と ATR 法とを比較すると、ATR 法で得られたスペクトルは、液膜法によるスペクトルと

相対強度が異なる箇所が認められるなど、両者のスペクトルは異なっていた。従って、確認試験において ATR 法で得られたスペクトルと、透過法で得られたスペクトルの比較による確認は問題があると考えられた。

一方で、食品添加物（香料）には、異性体混合物が規定される場合がある。異性体混合物の場合には、異性体の混合比率によって、スペクトルが異なることが考えられる。そこで、異性体を有する酢酸テルピニルを取り上げ、複数のメーカー品に関して比較検討を行った。A 社は α 、 β 、 γ の異性体を含む、とされ、純度 97%（以上）であり、B 社は異性体混合物とされ、純度 85%（以上）であり、C 社は α 体含有とされ、純度 98%（以上）である。液膜法で測定した結果、A、B 社はほぼ一致したが、異性体の混合率の異なる C 社では、A、B 社では認められなかった 2836 cm^{-1} のピークが認められるが、A、B 社では認められた 833 cm^{-1} のピークが認められないなど、A、B 社と C 社の間では、スペクトルに差が認められた。ATR 法で測定した場合でも、同様の傾向を示した。従って、異性体混合物として規定する場合には、各異性体の含有率の限度なども規定することが必要であると考えられた。

5. 残留溶媒試験に関する調査研究

1) HS 条件の最適化

(1) 平衡化温度の検討

バイアル平衡化温度を 80、90、100、110、120、130 及び 140°C で変化させ、DMSO 及び DMF のシグナル面積を測定

した。その結果、平衡化温度 90°C では DMSO のピークが非常に小さく、いずれも加熱温度が高くなるにつれて DMSO 及び DMF の各シグナル面積値が大きくなる傾向が見られたが、120°C 以上で各シグナルの面積値のばらつきが大きかった。以上の結果から、面積値のばらつきも小さく、ある程度の感度が得られる温度として、平衡化温度は 110°C とすることとした。

(2) 平衡化時間の検討

バイアル平衡化温度 110°C で、バイアル平衡化時間を 10、20、30、40、50 及び 60 分間とし、DMSO 及び DMF のシグナル面積を測定した。その結果、平衡化時間で面積値に大きな差は見られなかったが、10 分、40~60 分ではばらつきが大きい傾向が見られた。以上の結果から、面積値のばらつきも小さく、ある程度の感度が得られる加熱時間として、平衡化時間を 30 分とした。

2) 添加回収試験

規格値相当の DMSO 及び DMF をショ糖脂肪酸エステルに添加し、標準添加法により、DMSO 及び DMF の含量を求め、回収率を求めた。その結果、DMSO では m/z 63 で 96.3%、 m/z 78 で 92.4%、DMF では m/z 44 で 96.3%、 m/z 73 で 97.4% となり、良好な結果が得られた。

D. 結論

1. 食品添加物の摂取量推計及び香料規格に関する研究

1) 生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関わる研究

指定添加物の第 13 回調査の初年度と

して、基礎的な情報を得た。今後、追加調査及び査定並びに摂取量推定へと段階的にまとめていく。

2) 香料使用量に関わる調査研究

我が国における香料化合物及び天然香料の使用量調査のための調査票を作成した。この研究は、我が国における香料化合物及び天然香料の使用実態について継続的な調査を最新の情報を基に効率的に実施し、IOFI から要請されたグローバル使用量調査にもデータを提供するために必要な準備である。IOFI から提供された最新版のグローバル使用量調査リストを参考に、我が国の使用量を精度よく、効率的に得るための調査票を作成した。3～5年おきの調査では調査対象品について動きがあるため、調査に先立ち最新の情報に基づいてリストを更新することが重要である。また、常に改善を図ることで、調査漏れなどを防ぐことができ、回答者にとっての回答のしやすさも増して、より忠実に実態を反映した調査が実現できるものと期待される。

3) 香料化合物規格の国際整合化に関わる調査研究

これまでの研究により 921 品目の JECFA 規格の検証を終了したが、平成 27 年度使用量調査での使用実績があるにもかかわらず JECFA 規格の検証を終了していない品目が 243 品目残されていた。今年度はその 243 品目について、次年度以降の分析計画を立てた。215 品目については、使用会社数が少ないことなどから、以降の調査はしないこととした。28 品目のうち、3 品目は既存の実測値を用いて JECFA 規格の検証が可能とし、

8 品目については、実測値の収集を継続することとした。15 品目は含量や組成の異なる複数のグレードの製品が同一の化合物名で集計されている可能性があり、含量、副成分の情報を集め、製品群を分類することで規格の検証を検討することとした。残る 2 品目については、物質の同定のやり直しが必要、物性値が通常の測定装置の測定範囲を超える等の原因が指摘され、これらについては個別に対応方法を検討する必要がある。

2. MB 方式による低揮発性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。低揮発性エステル系香料について、QuEChERS 法により抽出・精製後、GC/MS を用いて分析したところ、一部の食品群においてエチルバニリンの回収率が 70%以下となったが、その他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。

MB 方式によるアルデヒド系香料の一日摂取量は、バニリンが最も高く 3.66 mg/人/日であった。次いで、エチルバニリン 0.23 mg/人/日、フルフラール 0.07 mg/人/日、ヘキサナール 0.16 mg/人/日、ベンズアルデヒドは 0.09 mg/人/日、5-メチルフルフラール 0.07 mg/人/日であった。また、対 ADI 比は、バニリンが 0.63%で最も高く、その他の香料は、エチルバニリン 0.13%、フルフラール 0.23%、ベンズアルデヒド 0.03%であった。MB 方式により推定されるアル

デヒド系香料の摂取量の ADI に対する割合は最大でも 0.63% であり、ADI に比べ十分に低く、現状において、安全性上の特段の問題はないと考えられた。

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

3. 食品添加物公定書一般試験法の改良に関する調査研究—ステビオール配糖体の LC/MS による分析法の検討(2)—

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 LC/MS を導入することを想定し、分析精度について調べた。今年度は、令和元年度のグラジェント条件での検討と同様にして、ステビオール配糖体のアイソクラティック LC/MS 条件での分析法について、絶対検量線法及び内標準法により検討を行った。その結果、LC/MS では選択性が高く S/N 比も良好であり、 σ 値を基にして求めた検出限界や定量下限値も、LC/MS の方が LC/UV より 4~6 倍検出感度が高い結果となった。また、グラジェント条件での定量結果と比較したところ、LC/UV では、

精度は許容範囲ではあるものの低く、定量値も低かった。LC/MS の場合は、精度は同程度か少し良好であったが、定量値はグラジェント条件より低い傾向が見られ、特定のイオンを用いた場合のみ同程度の定量値となった。アイソクラティック条件での分析は、多検体の迅速分析に有用であるが、高い真度や精度を求める場合は、適切なイオンや適切な濃度範囲の検量線等を用い、ピーク分離、精度及び定量値をグラジェント条件の場合と比較し、より良好な条件を選択すべきであることが示唆された。

4. 赤外スペクトル測定法に関する研究

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 IR 法について、普及著しい ATR 法も含め、規格設定に関わる調査、検討を行った。参考となる規格基準を調査した結果、透過法である既存の測定法と、反射法である ATR 法を特に区別せずに規定してもものと、両者を明確に区別しているものがあつた。ATR 法は、原理的に波長依存性があり、基本的に透過法によるスペクトルとは異なるため、透過法によるスペクトルとの比較による確認は問題がある。実際に、試料としてバニリン、ケイ皮酸、酢酸テルピニルを用いた場合、従来の測定（透過）法であるペースト法、液膜法と ATR 法では得られたスペクトルは異なっていたことから、確認試験において ATR 法で得られたスペクトルと、透過法で得られたスペクトルの比較による確認は問題があると考えられた。また、酢酸テルピニルを用

いて異性体混合物に関して検討した結果、液膜法、ATR 法いずれで測定した場合でも、異性体の混合比率の異なる試料間では、スペクトルに差が認められた。従って、異性体が存在するものに関して、異性体混合物として規定する場合には、各異性体の含有率なども規定することが必要であると考えられた。確認試験に ATR 法を取り入れる場合、同一条件での測定を前提とした標準品との比較を行う必要があると考えられた。

5. 残留溶媒試験に関する調査研究

ショ糖脂肪酸エステル中の DMSO 及び DMF の HS-GC/MS による分析法の検討を行った。HS-GC/MS の SIM モードで DMF m/z 44 及び m/z 73、DMSO m/z 63 及び m/z 78 で定量が可能であった。規格値相当の DMSO 及び DMF を添加したショ糖脂肪酸エステル 1 g に溶解溶媒として NMP 1 mL を加え、バイアル平衡化温度 110°C、バイアル平衡化時間 30 分で HS-GC/MS による標準添加

法により添加回収試験を行ったところ、いずれも 90%以上の回収率が得られた。以上の結果から、DMF や DMSO のような高沸点の有機化合物の残留溶媒試験として、HS-GC/MS による標準添加法は有用な方法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

なし

2. 学会発表

- 1) 寺見祥子、多田敦子、増本直子、中島馨、建部千絵、久保田浩樹、佐藤 恭子、食品添加物公定書一般試験法に関する研究—ステビオール配糖体の LC-MS による分析法の検討—、第 57 回全国衛生化学技術協議会年会（誌上発表）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 検討品目の分類

研究年度(報告書年度)	平成 25-30	平成 31①	平成 31②	合計	
検討対象	JFFMA 自主規格のある品目及び国際的に使用量の多い品目	平成 25-30 の検討で結論が出なかった品目(保留 7 品目を除く)。	平成 27 年調査で新規の使用が確認された品目		
検討品目数(開始時)	1088	173	269	-	
検討結果	問題なし	256	2	13	271
	問題あり (問題点が明確で、修正案提案可能)	587	30	33	650
	実測値はあるが問題点が不明	34	8	13	21
	十分なデータが得られなかった	139	5	210	215*
	最終的な検討数	1016	45	269	1285
保留(天然)	7	-	-	7	
除外	個別指定	2			2
	JECFA 番号削除	1			1
	平成 27 年使用量調査	62(使用なし)	128(2 社以下)		190

* 平成 27 年使用量調査の結果で、使用会社数が 2 以下の品目は調査対象から除いているため平成 31 年度研究での数値のみ集計。