

食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）

令和 6 年度総括研究報告書

食品添加物の試験法の検討及び摂取量に基づく安全性確保に向けた研究

研究代表者 多田 敦子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部室長

研究要旨

食品添加物生産量調査・香料使用量及び SPET 法による調査に基づく摂取量推計に関する研究

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：食品添加物の安全性を確保する上で、摂取量推定は重要であることから、指定添加物について令和 4 年度の生産・輸入・販売・使用を対象に追調査を行った。また、既存添加物については、令和 5 年度の出荷量について調査を行った。

香料使用量に関わる調査研究：香料化合物及び天然香料物質の安全性評価に必要な情報の一つに摂取量があり、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である。今年度は、日本の食品用の香料化合物及び天然香料物質の使用量調査（令和 2 年対象）と、同時期に実施された海外（欧米、中南米、中国等）の使用量調査結果に基づき、食品用香料化合物について日本と海外における使用量実態調査結果等を比較するとともに、日本の調査結果の考察を行った。

香料化合物の SPET 法による摂取量推定研究：FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会（JECFA）においては、MSDI 法を補完する方法として特定の食品分類における平均添加率に基づく摂取量推定方法(Single Portion Exposure Technique (SPET) 法)も併用されるようになってきており、日本における適用に向けた基礎的検討を目的として本研究を行った。今年度は、昨年度の検討を踏まえて方法を一部改訂し、昨年度とは異なる調査対象香料化合物計 10 品目について SPET 法による摂取量推定研究を実施した。

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、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。チオエーテル系香料を対象に MB 混合試料に含まれる各種香料の含有量をダイナミックヘッドスペース (DHS)ー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。

ICP を用いた規格試験法に関する研究

無機塩 4 品目（亜硫酸ナトリウム、塩化カルシウム、炭酸カリウム、硫酸マグ

ネシウム) について、誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-OES) を用いてヒ素 (As) および鉛 (Pb) の定量分析を行った。As は水溶液をキレート固相カートリッジに通液して検液を調製し、Pb は同カートリッジでマトリックス除去を行った。定量法は絶対検量線法、内標準法 (内標準: イットリウム (Y))、As のみ標準添加法を用いた。添加回収試験の結果、As は全品目で、絶対検量線法で 82%以上、標準添加法で 92%以上の回収率を示し、標準添加法は定量法として有効と判断された。Pb もカートリッジ処理により、亜硫酸ナトリウムを除き全品目で 80%以上の回収率を示し、前処理法として有用であることが確認された。一方、内標準法では As の回収率がすべて 110%以上となり、内標準元素 (Y) の適用には再検討が必要と考えられた。

食品添加物の規格試験法の改良に関する調査研究

アスパルテームの規格試験法の改良および精度向上を目指した研究の一環として、昨年度確立した提案法を基に ^1H 核による定量 NMR (^1H -qNMR) に基づく相対モル感度 (Relative Molar Sensitivity: RMS) を用いた L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル (L, D-APM) および 5-ベンジル-3, 6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸 (DKP) 分析法の確立について検討を行った。その結果、基準物質 (アスパルテーム) に対する L, D-APM および DKP の各 RMS が明らかとなり、これらの RMS の正確性はモデル溶液を用いた実験により実証された。以上の結果より、今回明らかとなった RMS 及び基準物質を用いることでアスパルテームから、L, D-APM 及び DKP の定量が可能となり、アスパルテームを含め計 3 種の測定対象物質の効率的かつ信頼性の高い分析法が確立された。

卓上 NMR を用いた規格試験の開発に関する研究

高磁場 NMR に比べて分解能が低い卓上 NMR では、適切なスペクトル解析手法の選択が重要となる。本研究ではジアステレオマー混合物であるジフェノコナゾール (DFZ) をモデルとし、卓上 NMR (80 MHz) におけるピーク高さ法 (PH 法) 及びピークフィッティング法 (PF 法) の定量精度を検証した。高磁場 NMR では両手法とも誤差 $\pm 2\%$ 以内、卓上 NMR では $\pm 10\%$ 以内で異性体比の算出が可能であった。卓上 NMR で精度が低下した要因として、不純物由来のピークが解析対象と重なり、識別が困難であったことが挙げられる。また、PF 法においては、解析対象ピークの半値幅を把握し、必要に応じて半値幅の値を固定してフィッティングを行うことが、定量精度確保のために重要であった。

研究分担者

久保田浩樹 国立医薬品食品衛生研究所
建部 千絵 国立医薬品食品衛生研究所
大槻 崇 日本大学 生物資源科学部
西崎 雄三 東洋大学 食環境科学部

研究協力者

西島 基弘 実践女子大学名誉教授
松村 雅彦 日本食品添加物協会専務理事
桝村 聡 日本香料工業会会長

寺見 祥子 国立医薬品食品衛生研究所
太田重紀子 国立医薬品食品衛生研究所
藤原由美子 国立医薬品食品衛生研究所
高田 翔平 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. 食品添加物生産量調査・香料使用量及び SPET 法による調査に基づく摂取量推計に関する研究

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（食品衛生法施行規則別表第1に掲げられている添加物）については品目ごとに原則としてその許容一日摂取量（ADI）が検討評価されており、行政上各添加物の日本人一人一日摂取量の把握が求められている。本調査では、指定添加物の1日平均摂取量の把握を目的として、令和4年度の生産・輸入・販売・使用を対象に調査を行った。一方、既存添加物については、一定純度とする規格がないものもあることから、「既存添加物収載品目リスト」収載品目（既存添加物）及び「一般に食品として飲食に供されているものであって添加物として使用される品目リスト」収載品目（一般飲食物添加物）のうち、食品添加物公定書で成分規格が定められている品目等の出荷量の実態を把握することを目的とし、令和5年度の製造・輸入の調査を行った。

2) 香料使用量に関わる調査研究

—食品香料化合物使用量の国際比較—

JECFA による香料化合物の安全性評価は、主として代謝、毒性、摂取量の3つの情報に基づいている。それらの重要な要素の一つである摂取量を算出するには使用量データが必要になる。国際食品香料工業協会（IOFI）は安全性評価の基礎資料として JECFA へ最新の暴露量データを継続的に提供するという目的でグローバルな使用量調査が計画された。そこで、平成22年、平成27年に引続き、令和2年の使用量調査計画があり、日本における調査を実施し対応した。

今年度は、令和2年（2020年）1月から12月に日本で使用された香料化合物及び天然香料の使用量調査（令和3年実施）結果と、同時期に実施された海外（米国、欧州、中南米、インドネシア、中国）の使用量調査結果に基づき、食品用香料化合物（食品香料化合物と略す）について日本と海外における使用量実態調査結果等を比較するとともに、日本の調査結果の考察を行うことを目的とした。

3) 香料化合物の SPET 法による摂取量推定研究

食品添加物の摂取される量を推定・把握することは、その添加物の安全性の担保において非常に重要であり、その推定方法には様々な方法がある。香料化合物に関しては従来、年間使用量に基づく Maximized Survey-derived Daily Intake (MSDI) 法が用いられてきた。MSDI 法は、年間使用量に基づく推定摂取量の算出方法であり、その香料がごく限られた用途に少量しか用いられないような場合、この方法では過小推定になる可能性が指摘されてきた。この問題を解消する

ため、FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives : JECFA) では近年、Single Portion Exposure Technique (SPET) 法という新しい方法も採用し、MSDI 法と併用してデータを求めるようになってきている。SPET 法は、食品に使用された香料の添加率とその食品の摂取量との積から香料の摂取量を推定する方法であり、MSDI 法の評価結果を補完することが期待される。

本研究では、香料化合物の SPET 法による摂取量推定研究を行なうため、JECFA において香料化合物の摂取量の推定方法として従来から採用されている MSDI 法を補完する目的で新たに採用された SPET 法について検討し、推定方法としての妥当性を考察するとともに、香料化合物の摂取量推定に関して新たな知見を得ることを目的とする。

今年度は、昨年度の検討を踏まえて調査方法の一部を改訂し、昨年度の対象とは異なる香料化合物の SPET 法による摂取量推定を実施することを目的とした。

2. 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

実際に流通している食品中の香料の含有量から平均的な一日摂取量を推計するため、我々はガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) を用いて食品中の香料の含有量を分析し、一日摂取量の推計を試みてきた。この分析法は、香料の分析調査には有効な調査法であるが、極微量の揮発性香料の食品中からの分析は難しく、分析法の見直しが必要になって

いた。

近年、ダイナミックヘッドスペース (DHS) を GC/MS と組み合わせることで、食品に含まれる極微量の化合物を高感度・簡便かつ選択的に分析する方法が開発され、各種食品からの分析に応用されている。この分析法は、食品に含まれる一部香料の分析にも有効と考えられる。そこで、流通する食品中からの香料の摂取量を明らかにするため、DHS-GC/MS 分析法を用いて MB 方式における香料の一日摂取量推計を検討した。本調査研究の 3 年目である本年度はチオエーテル系香料に着目し調査を行った。

3. ICP を用いた規格試験法に関する研究

第 10 版食品添加物公定書に記載の無機塩 4 品目 (亜硫酸ナトリウム、塩化カルシウム、炭酸カリウム、硫酸マグネシウム) を対象に、ヒ素 (As) および鉛 (Pb) の添加回収試験を行い、分析条件の最適化を実施した。As は内標準イットリウム (Y) 濃度 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 、試料濃度 0.02 mg/mL で絶対検量線法を用いると 90%以上の回収率が得られた。一方、Pb はどの条件でも回収率が低かった (37~71%)。この結果を踏まえ、今年度はキレート固相カートリッジと組み合わせる As と Pb を同時に分析する方法の検討を行った。

4. 食品添加物の規格試験法の改良に関する調査研究

食品添加物公定書におけるアスパルテームの定量法では、電位差滴定法が規定されているが、定量値の正確性の向上、

国際調和等の観点から、HPLC 法への変更が期待されている。昨年度は、米国食品規格集(FCC)12 で示されている方法を参考に、HPLC によるアスパルテーム、L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル(L, D-APM)および5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸(DKP)の同時定量が可能な分析法(提案法)を確立した。今年度は、提案法のさらなる改良並びに分析法全体の効率化や精度向上を目的に、¹H 核による定量 NMR (¹H-qNMR)に基づく相対モル感度(Relative Molar Sensitivity : RMS)を用いた分析法の確立に関する検討を行った。

5. 卓上 NMR を用いた規格試験の開発に関する研究

NMR は高い定量精度と定性能力を持つ分析法であり、食品添加物公定書の規格試験にも採用されている。しかし、高磁場 NMR 装置は高価であり、液体ヘリウムの補充など維持費もかかるため、導入可能な機関は限られている。すなわち、NMR による試験を実施できる施設は限定的である。一方、近年では低コストで液体ヘリウムを必要としない卓上 NMR 装置の開発が進んでおり、将来的な規格試験への応用が期待される。本研究では、ジフェノコナゾール(DFZ)をモデル化合物として用い、卓上 NMR (80 MHz)におけるピーク高さ法(PH 法)及びピークフィッティング法(PF 法)の定量精度を検証した。DFZ はジアステレオマーを2種含み、ピークが近接して重なりやすいため、従来の積分法によるスペクトル解析では異性

体の分離が困難である。そこで、PH 法及び PF 法により異性体比を算出し、高磁場 NMR との比較により精度を評価した。

B. 研究方法

1. 食品添加物生産量調査・香料使用量及び SPET 法による調査に基づく摂取量推計に関する研究

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

1)-1 指定添加物

本調査は、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)について令和4年度の生産・輸入・販売・使用を対象に調査を行った。この指定添加物を対象とした調査は昭和59年度の第1回報告以来、3年毎に行われ、今回は第14回の調査となる。令和5年度の追調査として、アンケート個票並びに、その集計表を点検して、記入不備・記入値等に疑問のある業者を抽出して、電話・メール照会等を行い、集計化向上と精密化を期した。さらに、本年度新たに追加した21社への調査に加え、初年度未回答企業への電話・メールでの再調査を97件、合計118件の調査を行った。

1)-2 既存添加物

既存添加物を対象とした調査は平成13年度の第1回報告以来、3年毎に行われ、今回は第9回の調査となる。

調査方法：アンケート方式

調査対象期間：令和5年4月から令和6年3月までの1年間あるいは令和5年を過半日数含む1年間

調査対象企業：令和3年度に実施された調査の回答状況を基に、既存添加物等

の製造・輸入の可能性のある企業を広く対象とした。

調査対象添加物：「既存添加物名簿」に記載されている全品目 357 品目並びに「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（一般飲食物添加物）リスト」のうち、第 9 版食品添加物公定書で成分規格が定められている品目、品名に色素とうたわれている品目及びその他の 53 品目（合計 410 品目）

記載要求事項：

- a) 製造・輸入を行っているものの品名
 - b) 製造・輸入の区別
 - c) 製造・輸入の数量（換算単位が記載してあるものについては換算した数値）
 - d) 換算単位が明示されていない品目にあってはその純度
 - e) 用途（食品/非食品）別出荷量、輸出量
- 調査の留意点：今回の調査では既存添加物収載品目リスト及び一般飲食物添加物品目リストを中心に既存添加物等の出荷量の実態を把握することを目的とした。リストが公表されて 29 年が経過し、成分規格が定められているものが増加したが、未設定のものも依然多い。これらについて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。

2) 香料使用量に関わる調査研究

ー食品香料化合物使用量の国際比較ー

食品香料化合物の令和2年(2020年)1月～12月の使用量調査の結果に加え、IOFI が実施した同時期の米国、欧州、中南米、インドネシア、中国の使用量調査結果を整理し、日本と海外各国・地域との比較を行った。また、調査結果を使用して

Maximized Survey-Derived Intake (MSDI)法により摂取量を算出した。(JECFA “Working paper (monograph) format for flavouring agents” (12/2000) 記載の摂取量推定法による計算式を適用) 摂取量(μ g/人/日)

$$= \{ \text{年間使用量(kg)} \times 10^9 (\mu \text{ g/kg}) \} / \{ \text{消費者人口} \times \text{報告率} \times 365 \text{ 日} \}$$

消費者人口：

日本 1 億 2,000 万人 $\times 0.1 = 1,200$ 万人

米国 3 億 3,000 万人 $\times 0.1 = 3,300$ 万人

欧州 4 億 $\times 0.1 = 4,000$ 万人

中南米 6 億 5,000 万人 $\times 0.1$

$= 6,500$ 万人

インドネシア 2 億 7,600 万人 $\times 0.1$

$= 2,760$ 万人

中国 14 億 $\times 0.1 = 1$ 億 4,000 万人

(The World Bank Group, 2020)

報告率：

日本 90%、米国 90%、欧州 90%、中南米 70%、インドネシア 80%、中国 60%

3) 香料化合物の SPET 法による摂取量推定研究

昨年度実施した調査の結果を踏まえて今回の調査用に回答書式を一部見直し、各食品分類に想定される香料化合物の標準添加率について新たに調査を行った。

調査対象物質：

1. 2-メトキシ-4-プロピルフェノール
2. イソアンブレットリド
3. チオゲラニオール
4. 4,5-ジメチルチアゾール
5. 2-sec-ブチル-3-メトキシピラジン
6. エチル 2-メルカプトプロピオネート
7. 5-メチル-2-ヘプテン-4-オン
8. trans, trans-2,4-オクタジエナール

9. 5, 6, 7, 8-テトラヒドロキノキサリン
10. 1-ペンテン-3-オール

得られたデータから SPET 法により推定摂取量を計算し、その値を MSDI 法により得られた値等と比較を行った。

また、前回同様にかかなりの過大推定となることが知られる modified Theoretical Added Maximum Daily Intake (mTAMDI) 法による推定も行い比較した。

2. MB 方式による香料の摂取量調査の検討

DHS-GC/MS 測定条件

DHS 条件: カラム温度 60℃、ドライステップ トラップ温度 10℃、インジェクションステップ トラップ温度 250℃、バルブ及びトランスファーライン温度 260℃、インキュベーション時間 30 分、ストリップング時間 20 分、ドライステップ時間 10 分

GC/MS 条件: カラム Stabilwax (30 m × 0.32 mm I.D. 膜厚 0.5 μm)、カラム温度 40℃ (8 分) → 10℃/分 → 250℃ (6 分)、注入口温度 220℃、インターフェース温度 250℃、イオン源温度 200℃、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 ジメチルスルフィド m/z 62、ジアリルジスルフィド m/z 146

試験溶液の調製

MB 試料 (1 群 1.0 g、2~7 群 0.2 g) を 20 mL のヘッドスペースバイアルに量り採り、塩化ナトリウム 1 g 及び水 2 mL を加え直ちにキャップで密封した後、ボルテックスミキサーでバイアル中の試料を良く攪拌し、DHS-GC/MS 用試験溶液と

した。

3. ICP を用いた規格試験法に関する研究

測定波長は、ヒ素 (As) で 189.042 nm、鉛 (Pb) で 220.353 nm、イットリウム (Y) で 371.030 nm が最も感度が良く、測定対象元素の強度に合わせ内標準濃度は 0.01 μg/mL とした。亜硫酸ナトリウム、塩化カリウム、炭酸カルシウム、硫酸マグネシウムを対象とし、去年の試験結果から、As は試料濃度 0.02 mg/mL であれば希釈のみで良好に定量可能であることが分かった。一方、Pb はマトリックスの影響が大きく回収率が低かったため、キレート固相カートリッジを用いた前処理によるマトリックス除去を実施した。As の分析には、試料を水に溶解しカートリッジに通過させた素通り液を使用し、Pb の分析にはカートリッジに保持された成分を硝酸で溶出して試料液とした。As についてはマトリックスの影響を補正するため、同一マトリックスを用いた標準添加法による定量も併用した。

4. 食品添加物の規格試験法の改良に関する調査研究

RMS の算出にあたっては、¹H-qNMR による含量に基づいて調製された各測定対象物質及び基準物質の標準溶液について HPLC で分析した。その後、得られたデータに基づき原点を通る各検量線を作成し、その検量線式の傾きの比 (測定対象/基準物質) から基準物質に対する測定対象の RMS を算出した。得られた RMS の正確性については、L, D-APM または DKP

を含む既知濃度のモデル溶液を調製し、RMS を用いた分析法と従来の測定対象物質の定量用標品を用いる絶対検量線法により得られる定量値を比較することにより評価した。

5. 卓上 NMR を用いた規格試験の開発に関する研究

試料には、食品添加物として流通する DFZ (FA255～257) と市販標準品を用いた。DFZ 約 40 mg を重アセトン 1.0 mL に溶解し、NMR 測定を実施した。600 MHz (高磁場) および 80 MHz (卓上) の NMR 装置を用い、測定条件は統一した (25° C、AQ 4.5 s、D1 60 s)。得られたスペクトルは MestReNova で処理し、PH 法ではピークトップの高さを、PF 法では Lorentzian-Gaussian 型の波形分離によって異性体比を算出した。参照値としては、既報のキラル HPLC で得られた異性体比を用いた。

(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. 食品添加物生産量調査・香料使用量及び SPET 法による調査に基づく摂取量推計に関する研究

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

1)-1 指定添加物

昨年度の追調査を行った結果、69 社から回答を得た。令和 5 年度と令和 6 年度の合計調査数は 489 件、回収数は 435 件、回収率は 89.0% であった。

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 食品添加物名と全出荷量、食品向け出荷量、輸出量調べ

集計 2 食品添加物名別 製造会社数、全出荷量、食品向け出荷量、輸出量調べ
1)-2 既存添加物

調査票発送数は 341 件、回収数は 262 件 (回収率 76.8%)、そのうち、製造・輸入ありは 212 件 (回収に対する比率 62.2%) であった。なお、追調査を行っており、本報告は暫定値である。

2) 香料使用量に関わる調査研究

ー食品香料化合物使用量の国際比較ー

令和 2 年 (2020 年) を対象とした使用量調査結果において、日本では 1,429 品目 (使用量約 1,267t)、米国は使用化合物 1,002 品目 (香料: 918 品目、香料以外: 84 品目) で総使用量約 22,664t (香料: 6,836t、香料以外: 15,828t)、欧州は使用化合物 1,206 品目 (香料: 1,168 品目、香料以外: 38 品目) で総使用量は約 8,210t (香料: 7,066t、香料以外: 1,144t)、中南米は使用化合物 1,215 品目 (香料: 1,125 品目、香料以外: 90 品目) で総使用量は約 20,203t (香料: 4,755t、香料以外: 15,448t)、インドネシアは使用化合物 972 品目 (香料: 923 品目、香料以外: 49 品目) で総使用量は約 5,298t (香料: 1,440t、香料以外: 3,858t)、中国は使用化合物 1,148 品目 (香料: 1,115 品目、香料以外: 33 品目) で総使用量は約 21,085t (香料: 5,400t、香料以外: 15,685t) であった。この結果からすると食品香料

化合物数（分類①～③：国内での香料定義内の化合物）では日本が最も多かったが、使用量から計算される推定摂取量が $100 \mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ を超える香料化合物の占有率を比較したところ、日本では 12.7%（ $100 \mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ 以下の累積占有率 87.26%より算出）と最も低く米国の約半分の数値となった。

また、欧米及び中南米では香料として使用されているもので日本では個別指定品目又は 18 類香料に該当するとみなされない食品香料化合物が 77 品目あった。

また、海外では、日本では香料にはない概念（Flavo(u)rings with Modifying Properties（以下 FMPs と記載）、サーマルプロセスフレーバー）に使用される香料化合物が存在し、今後、国内で扱われる場合には検討が必要だと考えられた。

実態調査から見た各国・地域の使用食品香料化合物に関する差は、やはりそれぞれの国・地域が持つ食文化によるところが大きいと思われる。例として欧米に比べ日本ではわさびの香気成分である ALLYL ISOTHIOCYANATE の使用量が多かった。また日本ではいわゆる貼布剤の香気の影響が強く食品香料としての嗜好性が低い METHYL SALICYLATE やチェリー様の BENZALDEHYDE は、米国では嗜好性が高く使用量が多かった。欧州では日本、米国に比べ甘い砂糖様の香気を持つ 4-HYDROXY-2,5-DIMETHYL-3(2H)-FURANONE、MALTOL、ETHYL VANILLIN の使用量が多かった。またコーヒーやココア等に使用される CAFFEINE の使用量順位が高かった。中南米も CAFFEINE の使用量順位が高く、乳を原料とした菓子が好まれていること

から乳系の香料に使用される GAMMA-NONALACTONE、DIACETYL の使用量順位が高かった。

3) 香料化合物の SPET 法による摂取量推定研究

調査結果をまとめ、考察を行った。

SPET 法、MSDI 法、mTAMDI 法による個々の品目の推定摂取量を算出した。これらの推定摂取量を NOAEL (NOEL)・TTC と比較を行ったところ、総じて SPET 法で得られた推定摂取量は MSDI 法で得られた値よりは高かった。一般的に mTAMDI 法の値より SPET 法の値は低い傾向にあると言われているが、今回得られた値はそのような傾向はみられず高いものもあれば低いものもあった。

今回調査した 10 物質の中に、ADI が公に設定されている物質はなかったため、各物質についての NOAEL を検索した。NOAEL が見つからなかった物質については JECFA の評価書を参照し、類縁化合物の NOEL、あるいは TTC を比較対象とした。

SPET 法で得られた推定摂取量の値は、NOAEL (NOEL) の値の $1/200$ から $1/100,000$ 程度であった。また、NOAEL が見つからなかった物質の値は TTC の値より十分に低かった。

SPET 法は食品摂取の偏りを考慮するために導入された方法であり、今回の調査では MSDI 法より大きな推定値となった。ただし、まだ調査対象となった香料化合物の数が限られていることから、今後調査を継続していく中で必ずしもこれと同じ結果になるとは限らないため、引き続き確認が必要であると考えられた。

また、昨年の研究結果を鑑みて、回答

項目を食品名とフレーバータイプに分け、さらに小分類の記載を改訂したことにより、食品カテゴリーが分かりやすくなったことで、精度の高い回答が得られたものと考えられた。

2. MB 方式による香料の摂取量調査の検討

MB 方式によるチオエーテル系香料の推定一日摂取量は、ジメチルスルフィドが 0.02 mg/人/日であり、ジアリルジスルフィドはいずれの試料でも定量限界未満であり 0 mg/人/日と推定された。

JECFA では、香料として使用する限りにおいて安全性に懸念がないと考えられることからジメチルスルフィド、ジアリルジスルフィドに許容一日摂取量 (ADI) は設定されていない。従来から実施されている国内の香料化合物の使用量に基づいた MSDI 法とは別に、流通食品から調査する MB 方式による調査からも、ジメチルスルフィドの推定一日摂取量は低いことが示された。

3. ICP を用いた規格試験法に関する研究

本研究では、第 10 版食品添加物公定書に記載の無機塩 4 品目 (亜硫酸ナトリウム、塩化カルシウム、炭酸カリウム、硫酸マグネシウム) を対象に、As 及び Pb の添加回収試験を通じて、試料調製法および分析条件の最適化を行った。昨年度の結果から、As は検液中の試料濃度が 0.02 mg/mL であれば、内標準を用いず絶対検量線法で 90%以上の良好な回収率が得られたため、本年度は As については水によ

る希釈のみで対応可能と判断した。一方、Pb はマトリックスの影響を強く受け、内標準法を用いても回収率が低かったことから、マトリックス除去のためキレート固相カートリッジを用いることとした。

1) 測定波長の選定と検量線の作成

ICP-OES による測定では、As (189.042 nm、193.759 nm) および Pb (220.353 nm、261.418 nm) の各波長で、標準溶液濃度 0.02~1 µg/mL の範囲で良好な直線性 ($R^2 > 0.999$) を確認。内標準 (Y: 371.030 nm) との発光強度比からも良好な検量線が得られた ($R^2 > 0.99$)。

2) 試料液の調製法の検討

酸性条件下では Pb がキレート固相カートリッジに保持されにくいため、本年度はすべての試料を水で溶解し、試料液とした。添加回収試験用の標準溶液も希釈に水を用い、硝酸の影響を最小限に抑えた。特に塩化カルシウムでは標準溶液を添加することによって pH が低下するため、アンモニア水により pH を 6 程度に調整し、試料液とした。

3) 添加回収試験の結果

3)-1 亜硫酸ナトリウム

As の回収率は絶対検量線法で約 80~83%、標準添加法で 96~100%と良好であった。一方、Pb は全ての手法で 60%台であり、Pb の一部がキレート固相カートリッジを通過した可能性が示唆された。

3)-2 塩化カルシウム

As、Pb ともにすべての分析法で良好な回収率 (As: 約 92~116%、Pb: 約 83~94%) を得た。特に Pb は昨年の回収率 (約 64%) に比べて著しく改善された。

3)-3 炭酸カリウム

As はすべての波長・手法で 90%以上の回収率を示し、Pb も 80%以上の回収率を示した。ただし、検液間でばらつきが見られ、再現性にやや課題が残った。

3)-4 硫酸マグネシウム

As は約 87～89%、Pb は約 94～101%の回収率を示し、いずれも高い精度が確認された。昨年度の結果 (Pb 回収率約 72～84%) と比較して大きく改善した。

As は標準添加法や絶対検量線法を用いることで、各無機塩中でも安定して 90%以上の回収率を得ることが可能であった。一方 Pb については、昨年度は低回収率が課題であったが、今年度はキレート固相カートリッジを導入したことで、塩化カルシウム、炭酸カリウム、硫酸マグネシウムでは明確な回収率の改善が確認された。ただし、亜硫酸ナトリウムでは今回の結果でも Pb の回収率が低く、キレート固相カートリッジへの保持に課題が残ると考えられた。

4. 食品添加物の規格試験法の改良に関する調査研究

基準物質 (アスパルテーム) に対する L, D-APM 及び DKP の RMS を算出するため、 ^1H -qNMR による含量に基づいて調製された各測定対象物質及び基準物質の標準溶液について、紫外可視分光検出器が接続された HPLC で分析した。その後、得られたデータに基づき原点を通る各検量線を作成し、その検量線式の傾きの比 (測定対象/基準物質) から基準物質に対する測定対象の RMS を算出した。まず、各検量線の直線性を評価したところ、L, D-APM, DKP 及びアスパルテームの検量線の決定係数

は 0.996～0.9999 と良好であることが確認された。測定対象物質及び基準物質ごとに 3 併行の検量線の傾きの平均値を算出したところ、L, D-APM は 1319、DKP は 1555、アスパルテームは 1583 であることが判明した。そこで、得られたこれらのデータより、基準物質 (アスパルテーム) に対する測定対象物質の RMS を算出したところ、L, D-APM は 0.83、DKP は 0.98 であることが明らかとなった。次に、得られた RMS の正確性を評価するため、L, D-APM を含むモデル溶液 A 及び DKP を含むモデル溶液 B を各 3 セットずつ調製し、HPLC に供し、RMS 法及び従来法の 1 つである測定対象物質を定量用標品として用いる絶対検量線法により得られる定量値を比較した。その結果、RMS 法と絶対検量線法により得られた定量値はほぼ同等であり、RSD は最大で 4.3%と精度も良好であった。以上の結果より、基準物質及びそれに対応する RMS は正確であり、RMS 法によりアスパルテームから L, D-APM 及び DKP の精確な定量が可能であることが明らかとなった。

5. 卓上 NMR を用いた規格試験の開発に関する研究

解析には DFZ の $\text{H5}'$ 及び $\text{H3}'$ ピークを用いた。高磁場 NMR (600 MHz) では、PH 法・PF 法ともに誤差 $\pm 2\%$ 以内で異性体比の算出が可能であった。一方、卓上 NMR (80 MHz) ではピークの重なりが顕著で、積分法 (INT 法) は適用できなかったが、PH 法では誤差 $\pm 5.9\%$ 、PF 法では最大 18.1%の誤差が生じた。PF 法では、波形分離後の異性体間のピーク半値幅に大

きな差が生じており、本来は両者が同程度の半値幅に収束すべきところ、値が一致しなかったことが定量誤差 18.1%の一因と考えられた。そこで、半値幅を固定して再解析を行った結果、PF 法の定量誤差は PH 法と同程度の±10%以内に改善された。以上より、PF 法を卓上 NMR に適用する際には、対象ピークの半値幅を適切に設定することが重要であると示唆された。

D. 結論

1. 食品添加物生産量調査・香料使用量及び SPET 法による調査に基づく摂取量推計に関する研究

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

食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関わる研究では、昨年度実施した第 14 回指定添加物アンケート調査の追加調査を実施し、また、既存添加物については第 9 回既存添加物アンケート調査を実施し、基礎的な情報を得た。

2) 香料使用量に関わる調査研究

ー食品香料化合物使用量の国際比較ー

香料化合物及び天然香料物質の安全性評価に必要な情報の一つに摂取量があり、摂取量を MSDI 法で算出するには使用量データが必要である。今年度は、令和 3 年に実施した日本の食品香料化合物及び天然香料物質の使用量調査（令和 2 年対象）と、同時期に実施された海外（欧米、中南米、中国等）の使用量調査結果に基づき、食品香料化合物について日本と海外における使用量実態調査結果等を比較

するとともに、日本の調査結果の考察を行った。その結果、使用量から計算される推定摂取量は日本が最も低い値であった。

3) 香料化合物の SPET 法による摂取量調査研究

JECFA においては、MSDI 法を補完する方法として特定の食品分類における平均添加率に基づく摂取量推定方法（SPET 法）も併用されるようになってきており、日本における適用に向けた基礎的検討を目的として本研究を行った。今年度は、昨年度実施した調査結果を踏まえて方法を一部改訂し、昨年度とは異なる計 10 品目の香料化合物について SPET 法による摂取量推定を実施した。今回の結果では、総じて SPET 法で得られた推定摂取量は MSDI 法で得られた値より高かった。一般的に mTAMDI 法の値より SPET 法の値は低い傾向にあると言われているが、今回得られた値はそのような傾向はみられず高いものもあれば低いものもあった。

2. MB 方式による香料の摂取量調査の検討

流通食品における香料の摂取量の実態を明らかにするため、MB方式による香料の一日摂取量調査について検討を行った。チオエーテル系香料について、DHS-GC/MS を用いて分析した。

MB方式によるチオエーテル系香料の一日摂取量は、ジメチルスルフィドが0.02 mg/人/日であり、ジアリルジスルフィドはいずれの試料でも定量限界未満であり 0 mg/人/日と推定された。今回調査対象としたMB方式によるチオエーテル系香料

の推定摂取量は、香料化合物の使用量に基づいたMSDI法による推定摂取量よりも低い結果であった。

3. ICP を用いた規格試験法に関する研究

本研究では、JIS 試薬規格に基づき、前処理を行わずに調製される検液について ICP-OES によるヒ素(As)および鉛(Pb)の定量分析法の妥当性を、異なる無機塩 4 品目(亜硫酸ナトリウム、塩化カルシウム、炭酸カリウム、硫酸マグネシウム)を対象に検討した。これらは食品添加物としても使用される品目である。前年度の知見を踏まえ、As 分析用検液は水希釈後、キレート固相カートリッジを通した素通り液を用い、Pb についてはマトリックス除去のため、キレート固相カートリッジで処理した上で検液を調製した。定量法として、As は絶対検量線法、内標準法(内標準元素:Y, 測定波長 371.030 nm)、および標準添加法、Pb は絶対検量線法及び内標準法を用いた。各試料には規格値相当の As および Pb を添加し、添加回収試験により平均回収率 (n=3) を求めた。

試験の結果、亜硫酸ナトリウムでは、As の回収率は絶対検量線法で 82.6%、標準添加法で 96.5%と良好であったが、Pb についてはカートリッジの通過により検液中に 0.01~0.02 µg/mL 相当の Pb が残存しており、カートリッジへの吸着条件の最適化が課題であることが明らかとなった。塩化カルシウムでは、As については絶対検量線法および標準添加法で 90%以上の回収率が得られ、Pb では絶対検量線法及び内標準法で 80%以上の回収率を

示した。炭酸カリウムでは、As・Pb ともに絶対検量線法および標準添加法において 90%以上の回収率を示したが、Pb に関して一部検液において低い定量値が見られ、再現性の面でばらつきが認められた。硫酸マグネシウムでは、As・Pb の全ての定量法で 90%以上 (As は一部 88%以上) の回収率が得られ、良好な結果であった。これらの結果から、前年度において回収率が低かった Pb に関しては、キレート固相カートリッジによる前処理が有効であり、特に亜硫酸ナトリウムを除く 3 品目においては 80%以上の回収率が得られた。As に関しては、絶対検量線法で 82%以上の回収率が得られたほか、標準添加法では 92%以上とより高い回収率を示し、定量法として適用可能であることが確認された。一方、内標準法では As の回収率がいずれの品目でも 110%以上となる傾向があり、使用した Y を内標準物質とする場合、定量値が高くなる可能性が示唆された。このため、As の分析においてはより適切な内標準物質の選定が今後の課題と考えられた。

4. 食品添加物の規格試験法の改良に関する調査研究

本研究では、アスパルテームの規格試験法の改良および精度向上を目指した研究の一環として、昨年度確立した提案法を基に ¹H-qNMR に基づく RMS を用いた L, D-APM および DKP 分析法の確立について検討した。その結果、正確な標準溶液の濃度に基づいて作成した各検量線式の傾きの比(測定対象物質の傾き/基準物質の傾き)より、基準物質(アスパルテーム)に

対する測定対象物質 2 種の各 RMS を明らかにした。これらの RMS の正確性はモデル溶液を用いた検証により実証され、アスパルテームから測定対象物質 2 種の効率的かつ高精度な定量を可能とすることが明らかとなった。本研究で確立した分析法は、アスパルテームの規格試験における実用的な手法としての活用が期待される。

5. 卓上 NMR を用いた規格試験の開発に関する研究

本研究では、DFZ をモデル化合物として、卓上 NMR (80 MHz) における PH 法及び PF 法の定量精度を検証した。高磁場 NMR (600 MHz) では、PH 法・PF 法ともに、従来法である INT 法と同等の精度 (誤差 $\pm 2\%$ 以内) で異性体比を算出することができた。一方、卓上 NMR においても PH 法・PF 法の両手法による解析は可能であったが、精度は 600 MHz と比較して劣る結果となり、誤差は $\pm 10\%$ 以内であった。この精度低下の要因として、600 MHz スペクトルでは分離していた不純物由来のピークが、80 MHz においては対象ピークと完全に重なっていたことが挙げられる。また、PF 法においては、解析対象ピークの半値幅を固定しない場合、定量誤差が 10% を超えるなど、参照値とはかけ離れた結果となる可能性が示唆された。この点は、PF 法を規格試験に導入する際に、解析条件として十分な検討を要する事項である。

以上の結果より、PH 法及び PF 法は、卓上 NMR においても一定の定量精度を確保できる解析手法であることが確認され

た。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表等

1) Kurohara T, Tatebe C, Fujiwara Y, Hioki F, Takada S, Tada A, Sugimoto N: Ruhemann's purple monitoring by UHPLC/MS/MS for ninhydrin test. Food Hyg. Saf. Sci., 66, 12-18 (2025)

2. 学会発表

1) 多田敦子, 太田亜紀子, 日置冬子, 建部千絵, 久保田浩樹, 窪崎敦隆, 杉本直樹: 食品添加物フィチン酸カルシウムの規格試験法の検討. 日本食品化学学会第 30 回総会・学術大会 (2024.5) (東京)

2) 建部千絵, 柳本登紀子, 日置冬子, 小田島知未, 吉田美佳, 久保田浩樹, 佐藤恭子, 多田敦子, 杉本直樹: 食品添加物ポリビニルアルコール中の残留溶媒試験法の検討. 日本食品化学学会第 30 回総会・学術大会 (2024.5) (東京)

3) 藤原由美子, 建部千絵, 黒原崇, 柳本登紀子, 日置冬子, 久保田浩樹, 多田敦子, 杉本直樹: 食品添加物公定書のニンヒドリン反応による確認試験の基礎的検討. 日本食品化学学会第 30 回総会学術大会, (2024.5) (東京)

4) 建部千絵, 藤原由美子, 高田翔平, 久保田浩樹, 多田敦子, 杉本直樹: SR-HPLC 法を用いた食用青色 1 号中の 2-, 3-及び 4-ホルミルベンゼンスルホン酸の定量法に関する検討. 日本食品衛生学会第

120 回学術講演会，（2024. 11）（春日井）
5) 久保田浩樹、寺見祥子、太田亜紀子、
建部千絵、多田敦子、杉本直樹、マーケ
ットバスケット方式による加工食品中の
ラクトン系香料の一日摂取量調査、第 61

回全国衛生化学技術協議会年会（2024. 11）
（堺）

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

