

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4年度～令和6年度 総合研究報告書

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 食品添加物の安全性確保には、品質を担保するための成分規格の設定や一日摂取量の推計が重要であることから、品質の担保に重要な規格試験法の向上、摂取量等の把握のため、以下の研究を行った。

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1品目毎の摂取量を把握して摂取量を推定し、許容一日摂取量（ADI）との比較を行うため、指定添加物及び既存添加物の生産量調査を行った。まず、令和元年度を対象とした第13回指定添加物生産量調査及び令和2年度を対象とした第8回既存添加物生産量調査の結果をとりまとめ、指定添加物は一人一日摂取量を推定し、ADIと比較した結果もまとめた。また、令和4年度を対象とした第14回指定添加物生産量調査、令和5年度を対象とした第9回既存添加物生産量調査を行い、摂取量推計に資する近年の生産量情報を得た。

香料使用量に関わる調査研究：香料（香料化合物及び天然香料物質）の使用量に関わる調査研究では、これまでに国際食品香料工業協会（IOFI）のグローバル調査に呼応して実施した令和2年を対象とした調査結果について、香料の使用実態や摂取量の把握のため、得られた情報の解析を行った。まず、結果の再確認を行った後、過去の国内調査結果との比較を行った。また、グローバル調査結果に基づき、我が国における食品用香料化合物及び天然香料の使用量について国際的な結果との比較を行うことで、日本の国内調査結果の傾向を解析により把握した。

香料化合物の SPET 法による摂取量調査研究：香料化合物について、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）で近年、安全性評価のための摂取量推定方法として検討、導入されている、Single Portion Exposure Technique（SPET）法による摂取量推定方法を検討するため、まず基礎情報の収集や品目の選定、調査票案の作成を行い、予備調査を実施した。さらに、年度ごとに前年度調査の検討結果に基づいて調査方法の一部を改訂しつつ、計20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、得られた推計値について他の推計法の場合と比較を行った。

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

MB 試料中に含まれる香料を分析し摂取量推定を行うため、年度ごとに対象香料の種類を変えて、MB 試料中に含まれるラクトン系、イソチオシアネート系及びチオエーテル系の各代表的な香料を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等を用いて分析した。得られた結果を基に、20 歳以上の成人の喫食量データに基づき一日摂取量の推計を行った。また、香料化合物の使用量に基づいた Maximized Survey-Derived Intake (MSDI) 法による推定摂取量や ADI との比較を行った。

ICP を用いた規格試験法に関する研究

国際的な動向を踏まえて国内規格試験法への ICP 法導入について検討するため、海外規格で誘導結合プラズマ (ICP) 発光分光分析法や ICP 質量分析法（合わせて ICP 法と略す）が用いられているが国内では採用されていない添加物品目を調査して ICP 法の適用候補品目を検討し、ICP 法を適用する場合の試験条件や課題の検討を行った。また、日本産業規格 (JIS 規格) で溶解のみの前処理で ICP による元素分析を適用している品目のうち、JIS 規格の方法で鉛やヒ素の回収率が低かった品目について、前処理法等を検討した。さらに検討結果を踏まえ、無機塩 4 品目について、キレート固相カートリッジを用いる前処理と ICP 発光分光分析法を適用した鉛及びヒ素の定量分析法を、絶対検量線法、内標準法、標準添加法（ヒ素のみ）により測定し、結果を基に、公定書の規格試験へ導入可能性について考察した。絶対検量線法と標準添加法では良好な結果が得られたが、内標準法はさらに検討すべき課題が認められた。また、結果を基に、公定書の規格試験への導入可能性について考察した。

卓上 NMR を用いた規格試験の開発に関する研究

国際的に汎用性の高まりつつある核磁気共鳴スペクトル測定法 (NMR 法) について、新たな規格試験法導入に向けた検討をするため、まず、公定書の定量用試薬 8 化学物質を対象に卓上 NMR での ^1H 核による定量 NMR 法 (^1H -qNMR) の検討を行い、別に実施した 600MHz の高分解能装置での結果と比較し、真度、精度を確認した。また、2 種の立体異性体の NMR 信号が重なるナリンジンを用い、ピーク高さ法 (PH 法) での分離分析精度を調べ、さらにジアステレオマー混合物であるジフェノコナゾールをモデル化合物として用い、80 MHz 卓上 NMR における PH 法及びピークフィッティング法 (PF 法) による異性体比算出の精度を評価した。卓上 NMR においても一定の精度で、重なり合うピークの分離解析が可能な手法であることが確認された。ただし、さらに検討が必要な点も認められ、規格試験として運用する上での課題について考察した。

食品添加物の規格試験法の改良に関する調査研究

アスパルテーム規格試験におけるアスパルテーム及びその異性体を対象とした定量法のさらなる精度等の向上を目指し、 ^1H -qNMR に基づく相対モル感度

(Relative Molar Sensitivity: RMS)を用いた HPLC 分析法の確立について検討した。まず、HPLC による測定条件について、米国食品規格集 (Food Chemicals Codex) の方法 (FCC 法) も参照して検討し、アスパルテームと不純物 2 種とを分離分析可能な条件を検討した。さらに、基準物質 (アスパルテーム) に対する、不純物 L- α -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) 及び 5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸 (DKP) の各 RMS を明らかにし、これら RMS の正確性を、モデル溶液を用いた実験により実証した。以上より、RMS 及び基準物質を用いることでアスパルテーム中の L, D-APM 及び DKP の正確な定量が可能となり、アスパルテームを含むこれら計 3 種の測定対象物質の効率的かつ信頼性の高い新規 HPLC 分析法を確立することができた。

食品添加物の生産量や香料の使用量調査、各種摂取量推計法での検討により、食品添加物の摂取量の把握に資するデータが、また、国際的な試験法や新たな試験法導入のための研究により、食品添加物の品質の担保に資するデータが得られ、食品添加物の安全性確保のための基礎資料となる有益な結果が得られた。

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
西崎 雄三 東洋大学 食環境科学部
(令和 4~5 年度は、
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

A. 研究目的

食品添加物の安全性確保には、品質を担保するための成分規格の設定や一日摂取量の推計が重要であることから、本研究では、品質の担保に重要な規格試験法の向上、摂取量等の把握のための研究を行うことを目的とした。

食品がグローバルに流通し、海外で認められている食品添加物の指定要請が増加し、指定においては、国際整合性を考慮しつつ、化学的根拠に基づくリスク評価及びリスク管理が求められている。リスク管理の一環として食品添加物の品質

を担保するため、成分規格が設定され、一般試験法とともに食品添加物公定書 (公定書) として公表されているが、分析技術の進歩や国際整合性を考慮した試験法 (一般試験法及び規格試験法) の検討が必要と考えられる。また、国際的な試験法の導入は、国内で使用が認められている食品添加物を含有する食品の輸出の円滑化等においても重要である。これまで、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議により作成された規格 (JECFA 規格) 等との比較を行い、今後検討すべき試験法として、誘導結合プラズマ (ICP) 発光分光分析法や ICP 質量分析法 (合わせて ICP 法と略す) 及び核磁気共鳴スペクトル測定法 (NMR 法) を用いる試験法が挙げられた。これら分析手法は、国際的にも規格試験法への導入が進められつつあり、本研究では、これら分析手法を用いた規格試験法の確立を目指し、規格試験法に応用する際の課題について検討を行った。

また、食品添加物の安全性確保のため、リスク評価及びリスク管理に摂取量推定も欠かせないことから、摂取量推計に資する食品添加物の生産量等調査や香料（香料化合物及び天然香料物質）の使用量調査を行うとともに、JECFA で近年香料の評価に導入されている、Single Portion Exposure Technique (SPET) 法による摂取量推計法の国内香料への応用に関する検討や、香料のマーケットバスケット (MB) 方式摂取量調査を行った。

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

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、食品添加物摂取量の推定に資するデータを得るため、生産量調査を行った。

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昭和 57 年度より開始され、3 年を 1 クールとする調査研究を行っている。本研究では、令和元年度の実産量指定添加物の製造・輸入事業者を中心に、自社における食品添加物グレード品の取り扱いについてアンケート調査を行った第 13 回調査の結果に精査、検討を加え、国民 1 人あたり一日品目別摂取量を求め、報告書としてまとめた。さらに本研究では、令和 4 年度の実産・輸入・販売・使

用を対象にした第 14 回調査を行った。

一方、既存添加物については、出荷量の実態を把握することを目的とし、平成 12 年度に調査研究が開始され、3 年を 1 クールとする調査研究を行っている。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、製造・輸入の調査を行った。本研究では、令和 2 年度の実存添加物の生産・輸入・販売・使用を対象とした第 8 回既存添加物生産量調査の結果を解析、整理して報告書としてまとめた。さらに本研究では、令和 5 年度の実産・輸入・販売・使用を対象にした第 9 回調査を行った。

2) 香料使用量に関わる調査研究

香料（香料化合物及び天然香料物質）の使用量調査研究は、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実施し、国内外の規制への順応状況や時代を反映した香料の使われ方の変化の様子を知る上で、また科学的な安全性評価のための最新の暴露量データを提供するという意味でも定期的の実施することが望ましいと言える。また、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。このような中、国際食品香料工業協会（International Organization of the Flavor Industry :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について呼びかけ、日本においてもこれに呼応し、平成 22 年、平成 27 年に引続き、令和 2 年（2020 年）を対象とした使用量調査が行われた。

本研究では、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 2 年対象調査）結果を基に、まず、香料化合物に関しては過去 4 回の使用量調査結果、天然香料に関しては前回の使用量調査結果と比較検討を行い、日本の香料の使用実態を明らかにすることを目的とし解析を行った。また、令和 2 年対象調査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、天然香料物質及び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。

3) 香料化合物の SPET 法による摂取量調査研究

食品添加物の摂取量推定方法には様々な方法がある。香料化合物に関しては、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、MSDI 法を補完する目的で、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、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した。初年度は、小規模での予備調査を行い、調査から集計、考察までの一連の作業を通じて調査方法の課題を検討し、その後検討結果を踏まえて調査方法について必要な改訂を検討し、さらに香料化合物品目数を増やして SPET 法による摂取量調査を実施した。

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、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、食品中からの低揮発性の香料や極微量の揮発性香料の分析は難しく、分析法の見直しが必要になっていた。

近年、分析技術発展に伴い、農薬の分析等において分散型固相抽出法の1種である QuEChERS 法を GC/MS と組み合わせることで、食品に含まれる化合物を迅速・簡便かつ効果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、本研究では、低揮発性の香料としてラクトン系香料に着目し、QuEChERS-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。

また、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。そこで本研究では、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、イソチオシアネート系香料及びチオエーテル系香料に着目し、MB 方式における香料の一日摂取量推計を検討した。

3. ICP を用いた規格試験法に関する研究

鉛やヒ素、その他元素の同時分析試験法設定に向け、公定書の成分規格試験に誘導結合プラズマ (ICP) 法 (ICP 発光分光分析 (ICP-OES) 又は ICP 質量分析 (ICP-MS)) を導入するにあたり必要な分析手法の課題を検討するために、本研究ではま

ず、海外規格 (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives (JFAO/WHO 合同食品添加物専門家会議: JECFA) や Food Chemicals Codex (米国食品化学物質規格集: FCC)) や、国内規格 (日本薬局方 (局方) や日本産業規格 (JIS)) において示されている、一般試験法における ICP 法や、各条の成分規格試験に用いられている ICP 法について調査を行った。

次に、JIS で ICP-OES 装置を用いた規格試験が設定されている試薬品目のうち、第 10 版食品添加物公定書で成分規格が設定されている添加物品目を対象とし、第 10 版食品添加物公定書の各条で規格が設けられている鉛 (Pb) 及びヒ素 (As) について、内標準法 (内標準物質としてイットリウム (Y) 使用) を用いて、適切な測定波長の検討や、内標準法を用いる場合の適切な検液中の試料濃度や内標準濃度の検討を行った。

さらに、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 の添加回収試験を行い、分析条件の最適化を実施した。As は内標準 Y 濃度 0.01 µg/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、最終年度はキレート固相カートリッジ組み合わせて As と Pb を同時に分析する方法の検討を行った。

4. 卓上 NMR を用いた規格試験の開発

に関する研究

一般に、市販試薬（標準品）に表示された純度は、クロマトグラフィーによる面積百分率法で値付けされた相対純度である場合が多く、クロマトグラム上で検出できない水分や不純物等の含量は無視される。したがって、食品や医薬品等の規格試験では、試薬会社、購入後の保管状態、不純物組成の違いにより、分析結果や規格値に対する適否判定が、試験機関によって異なることが懸念される。

食品添加物公定書及び日本薬局方の中で、定量用標準品の規格試験として qNMR が採用され、 ^1H 共鳴周波数 400 MHz 以上の高磁場 NMR の利用が規定されているが、装置の大きさ、導入費、ヘリウム充填による維持費が負担となる。近年、国内外で卓上 NMR の開発が進み、LC/MS や GC/MS と同程度の価格で導入可能であり、さらにヘリウム充填が必要ないため、今後の普及が予想される。

そこで本研究では、卓上 NMR を用いた規格試験の開発に関する研究の一環として、まず、第 9 版食品添加物公定書に収載されているアゾキシストロビン、カフェイン、ジフェニルアミン、ジフェノコナゾール、*p*-ヒドロキシ安息香酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸メチル、ピリメタニル、フルジオキシソニル、プロピコナゾール及びロスマリン酸の計 10 種の定量用標準品について、卓上 NMR を用いた qNMR の真度及び精度を評価した。

また、定量 NMR (quantitative NMR : qNMR) は、スペクトル上のプロトン間

の積分比を用いて、これらの存在比から試料の純度を算出することができる。積分法によるスペクトル解析は公定法に採用されているが、複数のプロトンが重なると個々を解析できないという欠点を持つ。一方、ピーク高さ法は、プロトンのピークの高さを基準とするため、ピークの頂点さえ離れていれば、それぞれの定量に利用できると考えられる。そこで本研究では、スペクトル上でプロトンが重なり合うことの多い卓上 NMR の解析手法として、2*S* 体と 2*R* 体の光学異性体を持つナリンジンをモデルにして、ピーク高さ法による異性比と純度の算出について評価した。

さらに本研究では、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。

5. 食品添加物の規格試験法の改良に関する調査研究

定量用標品の含量（純度）の正確性を担保するための分析法の確立は、食品添加物の安全性、製品の品質の保証の観点から重要であり、信頼性の高い規格試験法の確立につながることが期待される。

近年、国際単位系 (SI) へのトレーサ

ビリィが確保された絶対定量法として qNMR が注目を集めている。qNMR のうち、 ^1H NMR を利用した qNMR (^1H -qNMR) は、定量性が確保された測定条件を用いる事で、2 つの化合物間のシグナル面積強度比が「各化合物のモル濃度×各置換基上の水素数」に比例する原理を利用した定量法である。

本研究では ^1H -qNMR の有用性を明らかにするために、アスパルテームの規格試験法で使用するアスパルテーム (L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル) 及びその異性体である L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルを対象に検討を行った。

また、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。

そこで本研究では、アスパルテームの成分規格の更なる向上に向けた検討の一環として、FCC12などを参考に、現在の電位差滴定法から HPLC 法への定量法の改良に向けた検討を行い、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) 及び 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。さらに本研究では、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。

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 指定添加物の生産量調査

本研究における食品添加物の生産量調査は、日本国内の食品添加物製造事業者・輸入販売事業者に調査票を送付し、食品添加物原体 (食品添加物の文字が表示されていて出荷されるもの及び自家消費されたもの：食品添加物グレード) の種類・生産・販売・使用についての調査である。

まず本研究では、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、令和元年度の生産・販売・使用を対象とした調査の結果に基づき、解析を行い、第 13 回指定添加物の調査結果をまとめた。なお、最終的なアンケート回収率は 89.0%であった。

次に本研究では、令和 4 年度を対象とした指定添加物の生産量調査を令和 5 年度に行い、さらに令和 6 年度にその追加調査を実施した。調査の主な内容を以下に示す。

調査内容

- (1) 調査法 アンケート方式
- (2) 調査対象年度 令和 4 年
- (3) 調査対象 指定添加物 474 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

指定添加物の製造又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 468 事業者であった。

令和 6 年度の追調査では、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、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 既存添加物の生産量調査

まず本研究では、令和 2 年度の生産・販売・使用を対象に、「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 357 品目について第 8 回既存添加物生産量調査を行った。本調査では、既存添加物の製造・輸入の可能性のある事業者に調査票を送付し、製造・輸入を行っているものの品名、製造・輸入の区分、数量について行った。最終的な調査票の回収率は 89.4%となり、製造又は輸入していると回答した事業者は 251 社であった。

さらに本研究では、令和 5 年度の既存添加物流通実態を対象とし、第 9 回既存添加物生産量調査を令和 6 年度に実施した。主な調査内容を以下に示す。

(1) 調査方法：アンケート方式

(2) 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

(3) 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。

(4) 調査対象添加物：「既存添加物名簿」に収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）

(5) 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つてはその純度
- 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

2)-1 香料化合物使用量の過去の調査結果との比較及び天然香料使用量の調査

2)-1-1 香料化合物使用量の過去の調査結果の比較

令和 2 年（2020 年）1 月～12 月に国内

で香料製造に使用した香料化合物の量について、香料を製造している会社から回答を得た結果を元に、過去4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

摂取量 (μg/人/日)

$$= (\text{年間使用量(kg)} \times 10^9 (\mu\text{g/kg})) \\ \div (\text{消費者人口} \times \text{報告率} \times 365 \text{ 日}) \\ \dots (\text{式 1})$$

消費者人口:日本の総人口(1億2000万人) × 0.1 = 1200 万人

報告率:本調査で有効回答した香料会社51社の年間販売量(41,479 t)を日本香料工業会会員124社の年間販売量(45,123 t)で除した値(0.919)。安全性を厳しく評価するためには推定摂取量をより多く見積もる必要があるため、計算された報告率の値0.919を、0.9とした。

2)-1-2 天然香料使用量の調査

IOFIより提供されたIOFIのグローバル調査リスト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、米国食品香料製造者協会(Flavor and Extract Manufacturers Association of the United States:FEMA)の「一般に安全とみなされる物質(Generally Recognized as Safe:GRAS)」(FEMA GRAS)リスト収載品と、FEMA番号がなくIOFIグローバル調査リストにないが過去の調査で日本の使用量が多い天然香料14基原物質を追加した調査票で調査を行った。令和2年を対象とした調査結果と平成27年を対象とした調査結果を比較し、検討を行った。

2)-2 天然香料使用量の国際比較

天然香料の令和2年(2020年)1月~12月を対象とした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(μg/人/日)

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

消費者人口:

日本 1億2,000万人 × 0.1 = 1,200 万人

米国 3億3,000万人 × 0.1 = 3,300 万人

欧州 4億 × 0.1 = 4,000 万人

中南米 6億5,000万人 × 0.1

= 6,500 万人

インドネシア 2億7,600万人 × 0.1

= 2,760 万人

中国 14億 × 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%

2)-3 香料化合物使用量の国際比較

食品香料化合物の令和2年(2020年)1月~12月を対象とした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 ($\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$)

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

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 法による摂取量調査研究

3)-1 予備調査

初年度はまず、国内でこれまでに実施された香料化合物の SPET 法による摂取量推計の試みに関する研究報告の内容を検討し、予備調査において対象とする物質の条件について検討した。この条件に当てはまる香料化合物として 2 物質を選択して調査票を作成し、香料化合物事業者 8 社に配布し、予備調査を行った。調査から集計、考察までの一連の作業を通じて調査方法の課題を検出すると共に、得られた摂取量推計値を、他の摂取量推計方法での値と比較した。

3)-2 試行調査

本研究 2 年目は、実施した予備調査の結果を踏まえて回答欄の書式を一部見直し、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. エチルバニリン
2. エチルマルトール
3. 酢酸イソアミル
4. マルトール
5. アントラニル酸メチル
6. ベンズアルデヒド
7. エチルラクテート
8. シンナムアルデヒド
9. アセト酢酸エチル
10. サリチル酸メチル

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、MB 法により得られた値等と比較を行った。

調査対象は、日本香料工業会の全会員企業 124 社とし、調査に当たっては各社の機密情報を取り扱うため、回答した会社名を記号化したほか、情報の漏洩管理には最大限の注意を払った。また、調査対象企業より送付されたファイルは会社名を記号化した上で各社のデータを統合し、1 つの集計ファイルとした。

得られた回答データに基づき、SPET 法及び modified Theoretical Added Maximum Daily Intake (mTAMDI) 法による摂取量推計を行い、既に報告されている MB 法及び MSDI 法での推計値や ADI と比較した。

本研究の 3 年目は、2 年目に実施した

調査の結果を踏まえて回答書式をさらに一部見直し、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、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

1) ラクトン系香料

GC/MS 測定条件

カラム：DB-1HT (15 m × 0.25 mm I.D. 膜厚 0.1 μm)、カラム温度：40℃ (3 min)→4℃/min→170℃→20℃/min→300℃、注入口温度：300℃、インターフェース温度：310℃、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：γ-ラクトン系香料 m/z 85、δ-ラクトン系香料 m/z 99

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。試料は約 5.0 g を 50 mL 遠心チューブに採り、水 5 mL、内部標準原液 200 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、1,500×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 GC/MS バイアルに採取し試験溶液とした。

2) イソチオシアネート系香料

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 280℃、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 10 分、ストリッピング時間 10 分、ドライステップ時間 4 分

GC/MS 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℃ (3 min)→4℃/min→170℃→20℃/min→300℃、注入口温度 300℃、インターフェース温度 240℃、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 アリルイソチオシアネート m/z 99、3-ブテニルイソチオシアネート m/z 113、4-ペンテニルイ

ソチオシアネート m/z 127

試験溶液の調製

MB 試料 (1~4 及び 6~7 群 1.0 g、5 群 0.5 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、次いでマイクロシリンジを使用して内部標準溶液を 5 μ L 注入し、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) チオエーテル系香料

DHS-GC/MS 測定条件

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

GC/MS 条件: カラム Stabilwax (30 m $\times$ 0.32 mm I.D. 膜厚 0.5 μ m)、カラム温度 40°C (8 分) $\rightarrow$ 10°C/分 $\rightarrow$ 250°C (6 分)、注入口温度 220°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 ジメチルスルフィド m/z 62、ジアルルジスルフィド 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

1) 対象品目及び ICP 法分析条件の調査

海外規格 (JECFA 規格及び FCC13 の規格) や、国内規格 (局方 18 や JIS) において、一般試験法で ICP 法が用いられている試験法や、各条の成分規格で ICP 法による元素分析が採用されている品目を調査した。また、一般試験法や各条での記載状況や示されている条件等についてまとめた。さらに、海外規格と公定書の記載内容を比較した。

2) ICP 法分析条件の検討

測定波長は、As で 189.042 nm、Pb で 220.353 nm、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 μ g/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、異なる試料濃度の検液を用いて、As 及び Pb の添加回収試験を行ったところ、試料濃度、検量線 (内標準法又は絶対検量線法)、含まれるマトリックスの違いにより、測定値に与える影響が異なることが明らかとなった。検液中の試料濃度が低くなると、マトリックスの影響は小さくなるが、測定対象元素の濃度も低くなり強度も低くなることから、測定対象元素とマトリックスの種類や濃度の組み合わせによって良好な回収率が得られる場合と得られない場合があった。

3) 無機塩試料を用いた ICP 法の検討

測定波長は、As で 189.042 nm、Pb で 220.353 nm、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、昨年の試験結果から、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. 卓上 NMR を用いた規格試験の開発に関する研究

1) 各種定量用試薬についての卓上 NMR を用いた定量 NMR 適用の検討

定量用試薬として食品添加物公定書に収載されている 10 種の定量用標準品(アゾキシストロビン、カフェイン、ジフェニルアミン、ジフェノコナゾール、*p*-ヒドロキシ安息香酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸メチル、ピリメタニル、フルジオキシニル、プロピコナゾール及びロスマリン酸)を対象に、卓上 NMR を用いた ^1H -qNMR の検討を行った。得られた測定結果を、別に高分解能装置である 600MHz を用いた ^1H -qNMR の結果と比較し、卓上 NMR を用いた ^1H -qNMR の真度・精度について考察した。

2) ナリンジンを対象としたピーク高さ法による解析の検討

試料は食品添加物として流通するナリンジン 3 社 4 製品を用いた。キラル HPLC と積分法による内部標準 qNMR を用いて、ナリンジンの異性体比と絶対純度を算出し、参照値とした(異性体比 (2*S*/2*R* 比) 0.859~0.935、絶対純度 80.2~94.2%)。

ピーク高さ法は、スペクトル上でナリンジンの 2*S* 体と 2*R* 体を識別可能であったラムノース 1 位 (Rha-H1) とグルコース 1 位 (Glc-H1) を用いて解析した。

3) ジフェノコナゾールを対象としたピーク高さ法及びピークフィッティング法による解析の検討

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) 及び 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。

5. 食品添加物の規格試験法の改良に関する調査研究

1) 定量 NMR による純度確認方法の検討

アスパルテーム及びその光学異性体である L- α -アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル等を対象に、定量法や純度試験法の改良に向けた検討を行った。定量値の正確性の担保には、定量用試薬純度の正確な評価が必要で

あるため、まず ^1H -qNMR を応用し、測定条件の最適化及び定量シグナルの選定を行い、精確な純度が算出可能な方法を確立した。また、国際規格等における定量法や純度試験法の精査を行った。

2) HPLC による分離分析法の検討

FCC12 で示されている分析法(FCC 法)について、アスパルテーム及び 5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸(DKP)並びに L- α -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)分析の適用性を分析時間や分離度の点から評価した。また、提案法を基に、これら 3 種の測定対象並びに L,D-APM を一定量添加したアスパルテーム試料の分析を行った。

3) RMS を用いた HPLC 定量法の検討

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 又は 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。

(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 指定添加物の生産量調査

令和元年度を対象とした第 13 回の調査の解析研究を行ったところ、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・輸入事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。

1)-1-1 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品(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その輸入量及び輸出量を対象とした。さらに、製造又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、食品用として前年販売した量を「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ている。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については、事業者からの申告値のみでなく、報告の有無、数値ミスを勘案し、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必要である。

1)-1-2 使用查定量

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。指定添加物がどのような食品にどれくらい使われているかについては、食品市場の動向からある程度変化が予測できる。そのため、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などを考察し、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、査定を進めている。

1)-1-3 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による様々な廃棄が発生する。本調査では人の口に入らない食品添加物量を、第1回10%、第2回15%、第3回以降20%と見積り、第6回報告書以降、毎回考察を加えたうえで、廃棄（損失）率20%を継続してきた。

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13回調査では、令和元年人口12600万人で除し、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）で表示した。

1)-1-4 出荷量、使用查定量、摂取量の例

示と査定の必要性

表1-1に出荷量の上位ランキング10品目の出荷量、使用查定量、摂取量を示す。

集計表における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。「使用查定量」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。統計法によるわが国統計出版物の集計方法に準拠した手法を用いながらも、食品添加物市場の多様性、及び一人一日摂取量の把握という最終目的上、査定を行っている。

また、本研究では、令和4年度の生産量を対象とした指定添加物の第14回目の摂取量推定のためのアンケート調査も実施した。

調査票回収結果

第14回調査の初年度である令和5年度の第1次調査で78.2%の回収率を挙げ、前回第13回調査の初年度の水準（79.6%）と同程度であった。

調査票の課題への対応

第14回調査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。

調査結果

回収された調査票をもとにデータをコンピュータ入力し集計を行い、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

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13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、令和6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、明らかにするため、第14回調査の第2次調査として追調査を行った。その結果、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。

回収された調査票を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 既存添加物の生産量調査

本研究ではまず、令和2年度を対象とした第8回の調査の解析研究を行った。結果を以下に示す。

製造量、輸入量

製造量とは、国内で最終商品たる食品添加物が生産され、令和2年度に出荷された量を意味する。輸入量とは、当該食品添加物が輸入され、そのまま令和2年度に販売された量を意味する。既存添加物の原料起原が国産であるか輸入品であるかは問わない。ただし、実際には、食品添加物として明確に製造された、あるいは輸入されたと区別し切れないケースがある。製造量、輸入量の区分については、申告値を参考として、査定した品目がある。

出荷報告のない品目

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というケースがあり、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。

第8回の調査結果の一部を表1-2（甘味料）に示す。また、表1-2には、参考までに、製造量と輸入量の合計値を食品への使用量とみなし、人が摂取する量を計算して記載した。「摂取量」、「一人当たり一日摂取量」とは、それぞれ廃棄量（食品ロス）を20%とした場合の1年間に国民が摂取した総量、人口12600万人と1年365日として割ったものである。

出荷量の多い品目

第8回調査において、出荷量が多かった添加物上位5位に入ったのはケイソウ

土、トレハロース、活性白土、活性炭の製造用剤であり、次いで着色料のカaramel I であった。このうち、ケイソウ土、活性白土、活性炭は、食品添加物として出荷されたが、加工助剤として用いられて最終食品に残留しない（ろ過助剤等）ことなどから、国民全体の年間摂取量の推定値は 0 (t) であった。

さらに、本研究では、令和 5 年度の生産量を対象とした既存添加物の第 9 回目調査のためのアンケート調査を実施した。

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、さらに追調査を行っており、本研究の分担報告で示す値は暫定値である。

2) 香料使用量に関わる調査研究

2)-1 香料化合物使用量の過去の調査結果との比較及び天然香料使用量の調査

2)-1-1 香料化合物使用量の過去の調査結果の比較

日本の食品香料製造会社全体（日本香料工業会会員 124 社）の食品香料年間販売数量（2020 年 1 月～12 月）の 91.9%を占める 51 社から有効回答が得られた。天然香料においても 92.0%を占める 53 社からの回答が得られた。高い報告率が得られ、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。

①国内で使用されている香料化合物の品目数と年間使用量

我が国において使用されている香料化合物の総数は 1,843 品目、年間総使用量は約 1,272 t であった。このうち食品衛生法施行規則別表第一収載個別指定品目

129 品目の年間総使用量は約 777 t、18 類品目の総数は 1,714 品目、年間総使用量は約 495 t になることが明らかとなった。

使用されている香料化合物の内訳を見ると、我が国の香料化合物総使用量の 61.1%を個別指定品目 129 品目が占め、品目数の多い 18 類品目は 38.9%であった。全香料化合物中では vanillin、l-menthol の使用量が多く、この 2 品目で全体の約 22%を占めた。さらにこれらを含めた上位 25 品目の使用量は総使用量の約 65%を占めた。前回の調査ときわめて近い結果となり、これらの品目別にみた使用量の内訳には大きな変化はなかったと言える。

類別の使用量では、エステル類が 32.5%、ケトン類 11.8%、エーテル類 7.1%で全体の約半分を占め、次いで脂肪族高級アルコール類 7.8%となっている。占有率の高いエステル類、エーテル類が減少傾向にある一方で、脂肪族高級アルデヒド類、チオール類、ラクトン類が増加傾向となっている。個別指定香料は指定作業が進むに従って品目数が増える一方で、全体の使用品目数が減少傾向にあるので使用量品目数での占有率が 7.0%と高まってきている。

個別指定香料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、使用量での占有率は 61.1%と高い占有率となっている。

使用量別の品目数の結果から使用量の多い香料化合物の品目数は少なく、少量使用品目が極めて多数あることが明らかとなった。一般に「食品香料の特徴は微

量で多成分であること」とされているが、我が国の使用実態においても実証された。

②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 10,000 μg /人/日以上は 6 品目、1,000~10,000 μg /人/日は 53 品目、100~1,000 μg /人/日は 129 品目であることから、摂取量が 100 μg /人/日を超える品目は 188 品目(全品目中の 10%)であった。使用量から算出した推定摂取量からみると、1,843 品目の推定総摂取量は 322,775 μg /人/日、平均推定摂取量は 175 μg /人/日であった。また、使用量調査結果を見ると上位 25 品目が約 65%を占めていたことから、上位 25 品目を除いた平均推定摂取量を計算すると 61 μg /人/日であった。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摂取量 1.5 μg /人/日以下の品目数は、1,029 品目で、全品目中の 55.8%であった。JECFA の安全性評価の観点からみたこれらの結果は、今後の香料化合物の安全性評価にも活かされるものと思われる。

2)-1-2 天然香料使用量の調査

①国内で使用されている天然香料の品目数と年間使用量

令和 2 年(2020 年)に我が国で食品香料として使用された香料化合物、IOFI のグローバル調査リスト収載の天然香料及び日本で主要な天然香料 14 基原物質について国内での使用量実態を把握した。

昨年度の天然香料調査によって、我が国において使用されている FEMA GRAS 収載の天然香料は濃縮度(fold)により細分化された項目まで含めると 282 品目であ

り、総使用量は約 1,431 t、FEMA GRAS には収載がないが日本で主要な天然香料 14 基原物質の使用量は約 1,109 t になることが明らかとなった。

使用量別品目数では、10~100 kg のものが 69 品目(品目数として全体の 26.7%)、100~1,000 kg のものが 59 品目(22.9%)と全体に占める割合は多く、前回調査と同様の傾向であり、1,000 kg 以上のものは平成 27 年で 49 品目(19.7%)、令和 2 年で 54 品目(20.9%)であった。

②使用量の多い天然香料基原物質

日本で使用されている天然香料基原物質の上位 20 物質(IOFI グローバル調査リスト品目中)について前回調査との使用量の比較を行った結果、使用量が 1 位から 8 位までは変わらなかったものの、バニラとレモンは増加した。一方でオレンジとグレープフルーツは減少し、チコリとホップは前回調査ではランク外であったが使用量が大幅に増加してランクインし、他にも使用量の差が大きい基原物質も確認された。天然香料は基原となる植物などの栽培量や収穫量に影響を受け易く、バニラは平成 31 年から令和元年にかけてバニラビーンズの高騰が激しくバニラ代替品としてバニラ香料の需要が高まった。また、コロナ禍での巣ごもり需要や中食・冷食需要の増加が起因したと考えられ使用量が増加したものもあった。一方、人が外出したりスポーツをしたりする機会が減ったことによると考えられるものもあり、果汁飲料やスポーツドリンク市場の縮小や生産者の他の作物への転作、ハリケーン等の天候不順等の香料原料としての物量確保が困難といった要

因が考えられるオレンジやグレープフルーツのようなものの使用量の減少もあった。

FEMA GRAS には収載がないが日本で主要な天然香料 14 基原物質としては、前回調査で調査対象としたカカオ、クリーム、コウチャ、コーヒー、バター、ミルク、リンゴに、新たにミカン、チーズ、カツオブシ、プラム、ハチミツ、トウモロコシ、ウーロンチャを追加した。前回調査対象の 7 基原物質で比較した場合で、総使用量は約 1,024 t と前回調査の約 431 t から 大幅に増加し、新たに追加した 7 基原物質の総使用量は約 85 t であった。その中でも、ミルク、コーヒー、コウチャが前回調査と比較して使用量、増幅共に変化が大きい基原物質となっていた。また、使用量が多い品目が多く、同じ基原物質でも製法により物性や香調が異なるため使用量に大きな差があった。

2)-2 天然香料使用量の国際比較

日本と海外（米国、欧州、中南米、インドネシア、中国）の IOFI のグローバル使用量調査リスト中の天然香料の使用量は、日本が 273 品目/1,427t、米国が 300 品目/6,387t、欧州が 318 品目/5,340t、中南米が 274 品目/2,527t、インドネシアが 202 品目/510t、中国が 214 品目/2,246t という結果になった。日本が使用品目数では日本が欧米及び中南米に比べ少なく、インドネシア及び中国より多い結果になった。これは IOFI のグローバル使用量調査リストが FEMA GRAS 物質 (Flavor and Extract Manufacturers Association of the United States 米国食品香料工業協会において Generally Recognized as

Safe “一般に安全とみなされる物質”) で構成されているため、日本、インドネシア、中国では馴染みの少ない品目が多く含まれていることが理由としてあげられる。加えてインドネシア、中国では独自の天然香料リストを運用しているため、日本より品目数が制限されている。また日本では調査対象としなかった品目が、米国では 13 品目、欧州では 12 品目、中南米では 12 品目、インドネシアでは 4 品目、中国では 2 品目使用されていた。これらは主にステビア抽出物で、日本では甘味料に該当するため天然香料として調査対象としなかった。香料の定義が異なる海外（米国、欧州、中南米、インドネシア、中国）では甘味料としての使用のみではなく、フレーバーの機能として使用されている実態も明らかになった。

また、日本では天然香料として取り扱われるが、欧米では Chemically Defined Substances など天然香料以外の分類になっている品目が 4 品目あった。国際整合を考える上では、分類についての検討が今後必要であると考えられる。

各国で使用量が上位にある品目はオレンジ、グレープフルーツやレモンなどの柑橘精油、バニラエクスやハッカ、ペパーミント精油など共通していた。これらは主要な天然香料であるため、各地域で多く使用されていることが明らかとなった。

日本が他地域に比べ特徴的であった品目は、グレープフルーツとシソがあげられる。グレープフルーツは日本ではスポーツドリンクの市場規模が大きく、そのカテゴリでグレープフルーツ香料が多

く使用されている。シソ（PERILLA OIL）は摂取量も他地域の1,000倍以上で、他の基原植物と比較し日本の摂取量が多く、日本人に嗜好性の高いハーブであることがあげられる。

GINGER OLEORESIN、CAPSICUM OLEORESINなどは海外の使用量が多く、日本は使用量が少ない。この理由の一つとして考えられるのは、分類の違いから、海外ではフレーバーとして使用されているものが、日本においては香辛料抽出物として使用されているという可能性がある。

日本は使用量100kg以下の累積占有率が約54%なのに対し、米国では35%、欧州では約31%、中南米・中国では約48%、インドネシアでは約63%となっている。このことから分かるように、日本は欧米に比べ使用量の少ない天然香料が品目全体の多くを占めていることが分かった（表1-3）。これは、日本市場に多種多様の加工食品が流通しているが、一品目の流通量が他の国・地域と比べ少量であり、少量多品種の製品開発が行われていることが要因であると推測される。

2)-3 香料化合物使用量の国際比較

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（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 μ g/人/日を超える香料化合物の占有率を比較したところ（表1-4）、日本では12.7%（100 μ g/人/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 (2*H*)-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 法による摂取量調査研究

3)-1 予備調査

予備調査結果は、回答のまとめを行い、得られた情報を基に SPET 法による推定を行った。また、予備調査について回答者の意見をフィードバックとして収集した。SPET 法による推定値を MSDI 法、MB 法及び mTAMDI 法による推定値と比較し、また、ADI との比較を行った。

3)-1-1 調査方法について

①バリデーションの要不要

香料の使用量の調査等では、過去の調査結果との比較において明らかにかけ離れた数値が報告された場合に確認を行うなどのバリデーションを行っている。一方で今回の調査には、過去の報告データは存在せず、海外での調査結果も存在していない。また SPET 法のための調査は用途と添加率であって、各社のノウハウや製品・用途によってかなり左右されるものと考えられる。バリデーションの比較対象として、欧米で安全性評価時に報告されている用途と添加率を用いることも

考えられたが、過去の使用量調査の結果を見ると、日本と欧米ではその嗜好や使用量にかなりの違いがあることがわかる。よってバリデーションの要不要と比較対象となりうる数値については引き続きの課題とし、今回は調査回答をそのまま受け入れ、検討した。

②回答者から収集したフィードバックの内容

「概ね問題なく回答できた」、「不要な食品分類も多いのではないか、あるいは、分類が細かすぎる」などがあった。ただし現段階で分類を整理してしまうことで必要な分類が抜け落ちてしまう懸念もあったため、変更はある程度調査を積み重ねたうえで行う方が良いと考えられた。ただし、回答者の利便性を上げ、より正確な回答を得るために、今後は調査票を改訂し、注意書きを追記したり、日本食品成分表（分類）における具体的な食品名から容易に回答票の該当小分類にリンクできる形式にしたり、調査期間に余裕を持たせたりして、改善するのがよいと考えられた。

その他、今後継続的に見ていく必要がある課題として、以下が挙げられた。

- ・添加率の最大値を持つとして選ばれた食品による該当食品分類のポーションサイズ

- ・新製品、期間限定品などで、添加率を通常より上げるなどの可能性があると思われる点を踏まえた、添加率についての定期的な見直し

3)-1-2 調査結果について

SPET 法以外の推定方法との比較

SPET 法で得られた値を、他の MSDI 法、

MB 法及び mTAMDI 法による推定値と比較した。SPET 法による結果は MSDI 法や MB 法による結果を上回ってはいたが、MSDI 法の値とは同程度であり、mTAMDI 法で求めた値よりは低かった。なお過大推定の傾向があるとされる mTAMDI の値でも今回の調査結果では ADI をかなり下回っていた。MB 法は喫食量を踏まえて市販食品を混合し、その混合試料の分析値から摂取量を推計する方法であるため、他の方法と比較して、より実態を反映している値とされている。MSDI 法は香料として使用された化合物の量から推計するため、MB 法以外の方法の中では比較の実態を反映しているとされ汎用されてきた。しかしながらいずれの方法も、食品摂取の偏りは考慮されていないという課題がある。

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、初年度の調査では MSDI 法と MB 法より大きな推定値となったが、ADI よりは低かった。ただしこれは対象範囲を限定した予備調査での結果であり、今後、回答対象を増やした調査が必要であると考ええる。なお香料化合物の安全性評価法の特徴から、全ての香料化合物について ADI が設定されているわけではないため、今後同様の検討を行う場合、品目によっては、例えば構造クラスに基づく毒性学的懸念の閾値（Threshold of Toxicological Concern：TTC）との比較なども必要になってくると考えられる。

予備調査ではあるものの、対象とした 2 物質の安全性は SPET 法でも示された。また得られた値を他の推定法による値と

比較した結果、4 種の方法での推定値は一般的な傾向を反映しており、初年度の調査方法の妥当性は一定程度示されたものと考えられる。各推定方法にはそれぞれ限界はあるため、今後も複数の方法を併用していくことが望ましいと考えられる。

3)-2 試行調査

2 年目に対象とした 10 品目の調査結果をまとめ、考察を行った。

調査方法について

今後、継続的に見ていく必要があると考えられる課題として、以下の点が挙げられた。

新製品、期間限定品などでは他との差別化のため、添加率を通常よりも上げた製品も出てくる可能性がある。調査のタイミングによっては、このことで標準添加率の値が大きく変わり SPET の算出値に影響する可能性も考えられる。よって、一度調査をした品目についてもある程度定期的に添加率の見直しをしていく必要があると考えられた。また、調査結果のバリデーションの必要性の有無についても、検討を要すると考えられた。

調査結果について

個々の品目の SPET 法、MSDI 法、MB 法、mTAMDI 法による推定値、及び ADI 等と比較を行ったところ、シンナムアルデヒドにおける SPET 法の値は、MSDI 法や MB 法より高く、mTAMDI 法の値より 2 割ほど高く、NOEL より低かった。残り 9 品目の SPET 法の値は、MSDI 法や MB 法の値より高い一方、mTAMDI 法の値、ADI（又は NOEL）より低かった。MB 法は食事の実態に合わせて市場から食品を集めて分析して求め

る値であるため、他の間接的な方法と比較して、より実態を反映している値とされている。MSDI 法は香料として使用された化合物の量から推算するため、間接的な方法の中では比較の実態を反映しているとされ汎用されてきた。しかしながら双方とも、食品摂取の偏りは考慮されていないという問題がある。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・MB 法双方より大きな推定値となった。ただし、現段階では調査対象となった香料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ず、引き続き確認が必要である。今回の調査により得られた値を他の推定法による値と比較した結果は、4 種の推定法について一般的に言われている傾向を反映していた。各推計法の特徴があるため、今後も複数の方法を併用して検討していくことが望ましいと考えられる。また、食品分類項目に関しては、今後更なる留意が必要であると考えられた。食品分類をさらに細分化することは回答者の労力を増やすことにもなるが、日本での調査には日本特有の食品に合わせたカテゴリ設定が必要であることも推測できる。一方で、分類を変更すると過去のデータとの比較が難しくなることも想定されるので、変更による課題もあり、今後検討が必要と考えられた。

さらに、3 年目に対象とした 10 品目について調査結果をまとめ、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。

最終年度に調査した 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、前年度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

1) ラクトン系香料

(図 2-1～図 2-2、表 2-1～表 2-5)

本研究で MB 方式により調査したラクトン系香料のうち、最も一日摂取量が多かったのは δ -ドデカラクトン(δ -C12)の 2.4 mg/人/日であり、 δ -デカラクトン(δ -C10)及び δ -ウンデカラクトン(δ -C11)が 0.4 mg/人/日、 γ -ドデカラクトン(γ -C12)が 0.3 mg/人/日、 γ -ウンデカラクトン(γ -C11)が 0.2 mg/人/日、その他のラクトン系香料は定量限界未満であった。

JECFA で ADI が設定さ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。ADI が設定されている γ -ノナラクトン(γ -C9) (0-1.25 mg/kg 体重/日)、 γ -ウンデカラクトン(γ -C11) (0-1.25 mg/kg 体重/日) について対 ADI 比を求めたところ、 γ -C9 が 0%、 γ -C11 が 0.3% であった。このため、今回調査した香料化合物の対 ADI 比は最大でも 0.3% 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。

2) イソチオシアネート系香料

(図 2-3～図 2-4、表 2-6～表 2-9)

本研究で MB 方式により調査したイソチオシアネート系香料のうち、最も一日摂取量が多かったのはアリルイソチオシアネート (AITC) の 0.08 mg/人/日であり、3-ブテニルイソチオシアネート (3-BITC) が 0.02 mg/人/日、4-ペンテニルイソチオシアネート (PITC) が 0.01 mg/人/日であった。

JECFA では、これら化合物を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として ADI が設定されていない。参考として欧州食品安全機関 (EFSA) における AITC の ADI をもとに ADI (mg/kg 体重/日) に対する 1 kg 体重当たりの推定一日摂取量 (mg/kg 体重/日) の割合 (対 ADI 比) を求めたところ 6.7% であった。このため、AITC の対 ADI 比は、ADI に比べ十分に低いと考えられた。

3) チオエーテル系香料

(図 2-5～図 2-6、表 2-10～表 2-13)

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

1) 対象品目及び ICP 法分析条件の調査

(表 3-1～表 3-9)

1)-1 国際規格における ICP 法を用いた元素分析法

JECFA 規格の一般試験法のいくつかの項目において ICP-OES (表記としては

Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrophotometry (ICP-AES)) の記述がされていた。しかし、一般試験法の中に内標準法に関わる記述はなく、また、ICP-MS に関する記述はなかった。JECFA 各条においては、ICP-OES が多くの鉛規格の試験として示されている(約 60 品目)。いずれも ICP-OES のみでなく原子吸光光度法も選択できる記載となっており、適切な試料量、方法、前処理を分析者自身で選択するようになっている。なお、ICP-MS に関する記述はなく、各条で ICP-MS が採用されている品目もなかった。ヒ素の分析法としては 4 品目に、亜鉛の分析法として 5 品目に、セレンの分析法で 2 品目に ICP-OES が設定されているが、詳細な条件は示されていない。

FCC13 規格では一般試験法の中に、「icp」、「icp-oes」及び「icp-ms」の項目があり、詳細な説明が示されている。しかし、特定の元素の測定波長や測定質量や検量線について詳細は示されていない。また、内標準元素についての記述がされている。FCC13 各条では多くの試験で ICP 法が採用されており、ヒ素、鉛、カドミウム及び水銀の試験に用いられている例が多い。ICP-OES、ICP-MS が採用されているものは、ヒ素でそれぞれ 19 品目、24 品目、鉛ではそれぞれ 24 品目、31 品目となっており、ICP-MS が使用できる品目は多い。ICP-OES の記載のあるいくつかの各条においては、各条内に詳細な操作法が示されている。ICP-MS が使用できる品目は多いものの、詳細な条件が記載されている各条は少なく、内標準法が採用されている Rebaudioside A では

ヒ素に対してはイットリウム、鉛に対してはタリウムを内標準元素としていた。

1)-2 国内規格における ICP 法を用いた元素分析法

第 9 版食品添加物公定書では一般試験法において、「誘導結合プラズマ発光分光分析法」が一般試験法として設定されている。「装置」「操作法」から成り、測定波長については、「操作法」について、「別に規定する方法で調製した検液、標準液又は比較液を導入し、適当な発光スペクトル線の発光強度を測定する。」と示されるのみで、内標準法については「操作法、(3)内標準法」に操作については示されているが、内標準元素については言及されていない。公定書 9 の各条では亜セレン酸ナトリウムの鉛、鉄、ヒ素、酸化カルシウムのバリウム、二酸化チタンの鉄、アルミニウム及びケイ素規格において ICP-OES が採用されている。1-ヒドロキシエチリデン-1,1-ジホスホン酸(HEDP)の鉄規格においては ICP-OES の内標準法が唯一採用されている。また、タール色素レーキのバリウム規格で ICP-OES が採用されている。

局方 18 では一般試験法において、「誘導結合プラズマ発光分光分析法及び誘導結合プラズマ質量分析法」として、原理、装置構成、試料の前処理、ICP 発光分光分析計の操作、分光器の性能評価、操作条件の最適化、干渉とその抑制又は抑制、定性及び定量分析等が詳しく示されている。測定元素の測定波長や測定質量等について詳細は示されていない。また、「6. 定性及び定量分析」の項では「検量線法、(ii) 内標準法」において、内標準元素

を選択する上で留意すべき点が示されている。局方 18 各条において、ICP-OES が使用されているのは、各条成分規格バラスクロビル塩酸塩のパラジウム規格のみであり、パラジウム規格において、各条に測定波長、標準溶液の調製法などが記載されており、ICP-OES で規格値相当の標準溶液と発光強度を比較し判定する方法が採用されている。

JIS では、K 0116 発光分光分析通則において、「4. ICP 発光分光分析」で装置の構成、付属装置(オートサンプラー等)、水、試薬及びガス、サンプリング及び試料溶液の調製、検量線作成用溶液等の調製、測定条件の設定、定量分析、データの質の管理等詳細が示されている。「12. 定量分析」では検量線法、内標準法、標準添加法、同位体希釈分析法について説明が示されており、内標準元素としては、「測定対象元素と質量数が近く、質量スペクトルの重なりがなく、プラズマ中で同様な挙動を示し、試料溶液中に含まれていないことが望ましい。また、内標準元素は必要に応じて、単一又は複数で使用する。」と記述がある。JIS 試薬各条では、試薬規格に金属等の規格があり、それらの試験方法として、ICP-OES が多数採用されている。ICP-OES が採用されている試薬は、亜硫酸水素ナトリウム、塩化カルシウム等 30 品目以上あり、各測定元素の測定波長も各条にて規定されている。多くは内標準法による測定条件が採用されており、いずれも一定量のイットリウム標準溶液を検液及び標準溶液にそれぞれ添加して ICP-OES で分析することとなっている。

2) ICP 法分析条件の検討

(表 3-10～表 3-26、図 3-1～図 3-9)

JIS 試薬規格において、前処理なく調製した検液について ICP-OES を用いた元素分析が設定されている異なる無機塩で、添加物でもある 4 品目(亜硫酸ナトリウム、塩化カルシウム、炭酸カリウム及び硫酸マグネシウム)について、ICP-OES を用いた内標準法及び絶対検量線法による As 及び Pb の定量法について検討した。内標準法において As、Pb 及び Y の最適な測定波長及び内標準(Y)濃度を検討したところ、As は 189.042 nm、Pb は 220.353 nm、Y は 370.030 nm での感度が良好であった。内標準法では亜硫酸ナトリウムではいずれの検液でも回収率 70%未満又は 130%以上の結果が得られ、マトリックスの影響が大きかった。塩化カルシウムの検液 1 及び 2 (0.02 g/mL) 炭酸カリウムの検液 2 (0.04 g/mL)、硫酸マグネシウムの検液 1～3 (0.02～0.08 g/mL) で 70～120%の良好な回収率が得られた。なお、いずれの無添加試料からも As 及び Pb は検出されなかった。また絶対検量線法では、亜硫酸ナトリウムの検液 1 及び 2 (0.02 及び 0.04 g/mL) 及び炭酸カリウムの検液 1～3 (0.02～0.08 g/mL) において As で内標準法より良好な回収率が得られたものの、Pb では硫酸マグネシウムの検液 1 (0.02 g/mL) での 71.8%以外、いずれの品目、検液でも回収率は 65.3%以下と低かった。

3) 無機塩試料を用いた ICP 法の検討

(表 3-27～表 3-39、図 3-10～図 3-12)

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、試料調製法及び分析条件の最適化を行った。前年度の結果から、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、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。

3)-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) 及び 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 ($R^2 > 0.99$)。

3)-2 試料液の調製法の検討

酸性条件下では Pb がキレート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)-3 添加回収試験の結果

3)-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)-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)-3-3 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)-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、新たに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キレート固相カートリッジを用いた場合の結果でも 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. 卓上 NMR を用いた規格試験の開発に関する研究

1) 各種定量用試薬についての卓上 NMR を用いた定量 NMR 適用の検討

(表 4-1、図 4-1~図 4-10)

高磁場 NMR と卓上 NMR から得られたスペクトルを比較し、両スペクトルで積分範囲を統一した。試料毎に qNMR 測定の結果を考察した。

対象とした 10 種品目の試薬について絶対純度を qNMR で算出したところ、600 MHz と 60 MHz の差は次の通りであった。アゾキシストロビンで 0.8%、カフェインで 0.6%、ジフェニルアミンで 0.5%、ジフェノコナゾールで 1.2%、*p*-ヒドロキシ安息香酸で 1.8%、*p*-ヒドロキシ安息香酸メチルで 0.4%、ピリメタニルで 0.8%、フルジオキシニルで 1.4%、プロピコナゾールで 0.4%、ロスマリン酸で 1.4%であった。

今回用いた試薬のうち、ロスマリン酸のみは 60 MHz の結果で食品添加物公定書に収載されている規格値 (95%以上) を下回っており、本研究で用いたロスマリン酸が定量用ではなく、細胞生物学用であったことが理由として挙げられた。他の試薬は、600 MHz 及び 60 MHz のいずれの結果も、食品添加物公定書に収載されている規格値を満たしていた。

2) ナリンジンを対象としたピーク高さ法による解析の検討

(表 4-2～表 4-3、図 4-11～図 4-17)

ピーク高さ法から算出した異性体比は、参照値との相対誤差が 0.3～3.7%であり、参照値と大きく乖離することはなかった。他方、絶対純度においては、全ての試料において参照値に対して 50%程度低い純度値であった。この原因として、比較するプロトンピークの半値幅の違いが考えられた。異性体比算出においては、異性体間で同一のプロトンピーク、すなわち半値幅の近いプロトンピークを比

較したため、参照値と同等の結果が得られた。しかし、純度算出においては、qNMR 用内標準のプロトンピークに対して、ナリンジンのプロトンピークが幅広であったため、純度が過小評価されたと考察した。NMR ピーク高さ法は、プロトンが重なりあうことの多い卓上 NMR の解析手法として有用と考えられるが、異性体比や純度の計算に用いるプロトンピークの半値幅について考慮する必要がある。

3) ジフェノコナゾールを対象としたピーク高さ法及びピークフィッティング法による解析の検討

(表 4-4～表 4-5、図 4-18～図 4-21)

解析には DFZ の H5' 及び 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± 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± 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。

5. 食品添加物の規格試験法の改良に関する調査研究

1) 定量 NMR による純度確認方法の検討

(表 5-1、図 5-1～図 5-5)

^1H -qNMR 法の食品添加物分析への適用性を明らかにするため、アスパルテーム及び L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルについて ^1H -qNMR 測定を行った。定量値の SI トレーサビリティを確保するため、認証標準物質である 1, 4-BTMSB- d_4 を用いて試薬中のアスパルテーム及び L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル含量を算出した。

食品添加物公定書では、L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルの純度試験が規定されていることを考慮すると、 ^1H -qNMR を用いて含量を算出する場合、L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルと完全に重複しないシグナルを用いなければ、定量値に大きな誤差を生じる可能性が高いと推測された。そこで、アスパルテームと L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルの ^1H -qNMR スペクトルを比較すると、アスパルテームにおいて δH 2.48 (水素数 1) に観察されたシグナルは、L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルに由来するシグナルとは重複せず、形状もシャープで、近傍に他のシグナルは観察されなかったため、アスパルテーム定量用シグナルとして適切と考えられた。

同様に、L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルから考えた場合、アスパルテームと完全に重複しないシグナルを用いることにより、良好

な精度で当該化合物の正確な定量が可能になると考えられた。両化合物を比較すると、 δH 2.06 (水素数 1) に観察されたシグナルは、アスパルテームに由来するシグナルとは重複せず、定量用シグナルとして適切と考えられた。

選択した各定量用シグナルより算出されたアスパルテーム含量は、 $93.9 \pm 0.8\%$ (Mean $\pm$ SD, $n=3$)、L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル 2 製品の含量は、 83.9% ($n=1$) 及び 86.1% ($n=1$) であることが判明した。

2) HPLC による分離分析法の検討

(表 5-2、図 5-6～図 5-23)

まず FCC 法におけるアスパルテーム及び 5-ベンジル-3, 6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸 (DKP) 並びに L- α -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) の適用性を検証した。その結果、カラム圧やアスパルテームと L, D-APM の分離度並びに分析時間の点で FCC 法に問題があることが判明した。そこで種々の検討を繰り返した結果、流速を 0.8 mL/min, 移動相を 2 種の溶液 (移動相 A: 0.05 mol/L リン酸二水素ナトリウム: 0.05 mol/L リン酸水素二ナトリウム=1: 1, 移動相 B: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム: 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリウム: アセトニトリル=4: 4: 2) のグラジエント分析を用いる提案法により、FCC 法における問題点を解決できることが判明し、アスパルテーム、L, D-APM、DKP の 3 種の成分が良好に分析可能であることが明らかとなった。なお、この提案法は、2024 年 2 月 9 日に公表された第 10 版食品添加物公定書における L, D-APM

の純度試験に採用されている。本検討において、提案法はアスパルテームの定量も可能であり、現在の電位差滴定法の代替法としても有用と考えられた。また、DKP を含めたアスパルテーム、L, D-APM、DKP の同時定量も可能であることから、各化合物の定量法、確認試験法における分析法の統一など、本法は規格試験法の効率性や実用性の向上にも資するものと思われる。

3) RMS を用いた HPLC 定量法の検討

(表 5-3～表 5-5、図 5-24～図 5-30)

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。

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

食品添加物の安全性確保には、品質を担保するための成分規格の設定や一日摂取量の推計が重要であることから、本研究では、品質の担保に重要な規格試験法の向上、摂取量等の把握のための研究を行った。

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 指定添加物の生産量調査

指定添加物について、第 13 回の調査として、令和元年度の生産・流通量を対象とした調査結果をとりまとめた。結果として、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。

また、令和 4 年度の生産・流通量を対象とした指定添加物の第 14 回調査のアンケート調査、及びその追加調査を実施し、指定添加物の摂取量推定に資する生産量の基礎的な情報を得た。

1)-2 既存添加物の生産量調査

既存添加物に関しては、第8回の調査として令和2年度の生産・流通量を対象とした調査結果をとりまとめた。

また、令和5年度の生産・流通量を対象とした既存添加物の第9回アンケート調査を実施し、摂取量推定に資する生産量の基礎的な情報を得た。

2) 香料使用量に関わる調査研究

令和2年(2020年)1月から12月に日本国内で食品香料として使用された香料化合物及び天然香料を対象とした使用量調査結果に基づき、本研究ではその解析を行った。

まず、日本における香料の使用実態について、過去の国内調査結果を確認し、比較した。有効回答会社は香料化合物で51社、天然香料で53社であった。報告率は香料化合物で91.9%、天然香料で92.0%であった。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食品香料の使用実態を十分に反映していると考えられた。令和2年(2020年)に使用された香料化合物の総数は1,843品目、年間総使用量は約1,272 tであった。このうち食品衛生法施行規則別表第一収載個別指定品目129品目の総使用量は約777 t、その他の18類品目の総数は1,714品目、年間総使用量は約495 tになることが明らかとなった。香料化合物の使用品目数は平成13年(2001年)の使用量調査から減少傾向にある。この理由は、香料規制のグローバル化への適応や消費者の嗜好の変化に対応して使用される食品香料化合物の選択が入念に検討され、食品香料の処方簡素化・合理化が進め

られたと考えられた。また過去の調査結果と同様、使用量の多い食品香料化合物の品目数は少なく、少量使用品目が極めて多数あることが明らかとなった。

天然香料については、我が国におけるFEMA GRAS 収載の天然香料は濃縮度(fold)により細分化された項目まで含めると282品目が使用されており、総使用量は約1,431 t、FEMA GRAS には収載がないが日本で主要な天然香料14基原物質の使用量は約1,109 tであった。オレンジやレモンなどの柑橘類、バニラ、ハッカ、ペパーミントを基原とする天然香料や一般的な食品やハーブ、香辛料から得られた天然香料の使用量が多かった。また、使用量は少ないもののバラやジャスミンなど食品にアクセントをつける天然香料も数多く使用されていることが分かった。令和2年はコロナ禍で、人が外に出る機会が減ったためか、レジャー用途や外食用の需要が減少し、中食用が増えた。そのためそれらに使用される香料化合物や天然香料も消費動向の変化の影響を受けたと考えられる。

次に本研究では、令和2年を対象とした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の結果と、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、天然香料物質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、使用品目数及び使用量は欧米より低い値であった。

さらに本研究では、日本の食品用香料化合物についても、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、海外における使用量実態調査結果と比較し、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で、一定以上の推定摂取量となる香料化合物の占有率は、日本が最も低い値であった。

これらの結果は、今後の香料化合物及び天然香料の安全性評価にも活かされるものと思われる。

3) 香料化合物の SPET 法による摂取量調査研究

国際的な添加物の評価機関である JECFA において、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を用いる SPET 法が併用されるようになってきていることから、この方法に関する理解を深め、日本における運用を検討することを目的として研究を行った。

まず本研究では、予備調査を行った。MB 法による推定値や ADI との比較を行えるように、これらデータが存在し、かつ食品に元々存在する量を考慮しなくてよいエチルバニリン、エチルマルトールの 2 物質を選択し、SPET 法での調査方法を検討した後、予備調査を行った。その結果、予備調査方法が概ね妥当であったことが示唆された。

さらに本研究では、予備調査結果や食品分類の検討を踏まえて一部調査方法を改訂し、調査品目数と調査回答社数を拡大して、計 20 品目について SPET 法による摂取量調査を実施した。SPET 法により得られた推定摂取量の値を、年間使用量を元にして求める MSDI 法による推定値

と比較したところ、対象品目により、同レベルの値となるものと、MSDI 法で得られた値より高いものが見られた。

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。

まず本研究では、ラクトン系香料について、QuEChERS 法により抽出・精製後、GC/MS を用いて分析した。MB 方式によるラクトン系香料の一日摂取量は、 δ -C12 の 2.4 mg/人/日と最も高く、 δ -C10 及び δ -C11 が 0.4 mg/人/日、 γ -C12 が 0.3 mg/人/日、 γ -C11 が 0.2 mg/人/日、その他のラクトン系香料は定量限界未満であった。JECFA で ADI が設定されている γ -C9、 γ -C11 について対 ADI 比を求めたところ、 γ -C9 が 0%、 γ -C11 が 0.3%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。

さらに本研究では、イソチオシアネート系香料及びチオエーテル系香料について、DHS-GC/MS を用いて分析し、MB 方式による摂取量推計を行った

MB方式によるイソチオシアネート系香料の一日摂取量は、AITCが0.08 mg/人/日と最も高く、3-BITCが0.02 mg/人/日、PITCが0.01mg/人/日であった。AITCについてEFSAのADIとの対ADI比を求めたところ、6.7%であり、ADIに比べ十分に低いと考えられた。

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

本研究ではまず、ICP 法 (ICP-OES 及び ICP-MS) について、海外規格 (JECFA や FCC13) や、国内規格 (局方 18 や JIS) において、一般試験法での記載状況や、各条の成分規格試験に用いられている記載例について調査を行った。その結果、JECFA では一般試験法の ICP-OES の項で測定波長が指定されているが、FCC13、JIS (JIS K1106 発光分光分析通則) や局方 18 (2.63 誘導結合プラズマ発光分光分析法及び誘導結合プラズマ質量分析法) では一般試験法の中で測定波長は指定されておらず、いずれも各条で測定波長が設定されていた。また、ICP-MS については FCC13、局方 18 及び JIS (K 0133 高周波プラズマ質量分析通則) にのみ記述があった。調査結果から、今後、公定書で ICP 法を採用する場合は、測定対象元素の規格値や、添加物に含まれる可能性の高いマトリックス (ナトリウム、カリウム、カルシウム等) を考慮し、多くの食品添加物の各条の成分規格に設定されている鉛やヒ素について、適切な測定波長の検討や、内標準元素としてイットリウムを用い、内標準法を用いる場合の適切な内標準元素濃度を検討することが必要であ

ると考えられた。

次に本研究では、検液中の試料濃度、検量線 (内標準法又は絶対検量線法)、含まれるマトリックスの違いの影響について検討し、これらにより測定値に与える影響が異なることを明らかにした。試料濃度が低くなると、マトリックスの影響は小さくなるが、測定対象元素の濃度も低くなり強度も低くなることから、測定対象元素とマトリックスの種類や濃度の組み合わせによって良好な回収率が得られる場合と得られない場合があることが明らかとなり、硫酸マグネシウムについては内標準法であれば、いずれの試料濃度の検液でも 70~114%回収率が得られ、試料を硝酸(1→100)で溶解するのみで、ICP-OES の内標準法で As 及び Pb の分析が可能であると考えられた。

さらに本研究では、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) 及び鉛 (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。それまでの検討結果を踏まえ、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)、及び標準添加法、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 及び 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及び標準添加法で 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及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. 卓上 NMR を用いた規格試験の開発に関する研究

本研究では計 10 種の定量用標準品に対して、卓上 NMR を用いた qNMR を検討した。卓上 NMR では磁場の大きさが小さくなるため、単純な化学構造をとるカフェイン、*p*-ヒドロキシ安息香酸及び *p*-ヒドロキシ安息香酸メチルでは問題にならないが、その他の物質については共鳴信号の分離が悪かった。そのため、不純物に由来する共鳴信号を避けるように積分範囲を設定したところ、卓上 NMR と高磁場 NMR から得られる qNMR 純度の結果は、差異 2%以内で良好に一致した。

不純物由来の共鳴信号がスペクトル上の広範囲で観察される場合、卓上 NMR による定量は困難が予想される。本研究で用いた定量用標準品のように、高純度な試薬や添加物製品の品質管理においては、卓上 NMR も十分に活用できると考えられた。また、積分による定量法を検討したが、不純物由来の信号を分離可能 (理論上) なピークフィッティング や CRAFT (complete reduction to amplitude frequency table) による手法、またピーク高さ法なども積極的に検討していく必要があると考えられた。

次に本研究では、NMR スペクトル上で、2 種の立体異性体に由来するプロトンが重なり合うナリンジンモデルにして、NMR ピーク高さ法による異性体の分離分析を検討した。

ピーク高さ法は、解析に用いるプロトンの半値幅の影響を強く受けることは明

らかであった。ピーク高さ法による純度算出では、半値幅の異なるピーク同士 (qNMR 用内標準 vs. ナリンジンの Rha-H1 又は Glc-H1) を計算に用いたため、参照値と大きく乖離した結果が導かれた。

一方、ピーク高さ法で求めた異性体比は、参照値と大きく乖離することはなかった。これは、異性体間で半値幅がほぼ同じプロトンピーク同士を比較していたためである。

ピーク高さ法は卓上 NMR 等の低磁場 NMR スペクトルの解析の一つとして有用と考えられるが、正確な結果を得るためには、半値幅が同程度のプロトン同士を比較する必要がある。この点を考慮すれば、ピーク高さ法を用いた NMR 試験を、特に異性体比の確認に応用することが可能と考えられた。

さらに本研究では、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。

5. 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、食品添加物の規格試験法の改良、精度の向上を目指して、 ^1H -qNMR によるアスパルテーム及び L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルの定量に関する検討を行った。

その結果、適切な定量用シグナルが見出され、本法のアスパルテーム及び L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルの含量分析への適用性が明らかとなった。本結果は、 ^1H -qNMR の特徴を考慮すると、アスパルテーム及び L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル試薬の含量分析の信頼性を更に向上させる知見であり、将来的な定量用試薬の分析法への本法の適用へ向けた基礎データが得られた。

次に本研究では、食品添加物の規格試験法の改良や精度向上を目指した研究の一環として、定量値の正確性の向上、国際調和等の観点より、FCC12などを参考に、現在の電位差滴定法から HPLC 法への定量法の改良に向けた検討を行った。その結果、アスパルテームの正確な定量における FCC 法の問題点が明確となるとともに、アスパルテーム定量法に対する提案法を見いだした。また、この提案法は、アスパルテーム製品中の不純物である

L, D-APM 及び DKP の同時分析が可能であることを明らかにした。

さらに本研究では、アスパルテームの規格試験法の改良及び精度向上を目指し、確立した提案法を基に ^1H -qNMR に基づく RMS を用いた L, D-APM 及び 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。

以上、本研究では、食品添加物の生産量や香料の使用量調査、各種摂取量推計法での検討により、食品添加物の摂取量の把握に資するデータが、また、国際的な試験法や新たな試験法導入のための研究により、食品添加物の品質の担保に資するデータが得られ、食品添加物の安全性確保のための基礎資料となる有益な結果が得られた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表等

1) 建部千絵、藤原由美子、鐘熙寧、久保

田浩樹、多田敦子、佐藤恭子、UV-Vis 法を用いた食品添加物公定書塩化物試験法に関する検討、*日本食品化学学会誌*、**29**、61-68 (2022)

2) 西崎雄三、qNMR に基づく相対モル感度を利用したクロマトグラフィーによる定量分析、*日本食品衛生学雑誌*、**63**、J51-J53 (2022)

3) 西崎雄三、外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) のすすめ、*ぶんせき*、**12**、498-503 (2022)

4) Terami S, Kubota H, Koganesawa N, Murakoshi S, Satou M, Sekine Y, Watanabe S, Tsuruoka N, Sugiki M, Tahara S, Yasunaga M, Kamimoto K, Nakashima A, Ihara S, Takeshita T, Kawahara R, Takamine T, Koja A, Ebisu N, Yanagimoto T, Tatebe C, Tada A, Sato K, Estimation of daily intake of food additives by Japanese young children using the market basket method in 2018, *Food Additives & Contaminants: Part A*, **40**, 328-345 (2023)

5) Hirose S, Watanabe M, Tada A, Sugimoto N, Sato K, Hara-Kudo Y, Suitability of culture broth and conditions for *Escherichia coli* and gas production as a test for food additives in EC broth, *Food Hyg. Saf. Sci.*, **64**, 69-77 (2023)

6) 稲井隆之、浮田英生、大橋篤志、樺沢正志、児高由以子、澤野友信、関谷史子、土屋一行、寺川将樹、長屋有紀子、松井敏晃、久保田浩樹、建部千絵、佐藤恭子、多田敦子、日本における食品香料

化合物の使用量調査結果（2020 年）、
日本食品化学学会誌、**30**、158-164
（2023）

7) Fuji Y, Uchida K, Akashi T, Ohtsuki T, Matsufuji H, Hirai Y M, Molecular Identification of UDP-sugar-dependent glycosyltransferase and acyltransferase involved in the phenylethanoid glycoside biosynthesis induced by methyl jasmonate in *Sesamum indicum* L. *Plant and Cell Physiology*, **64**, 716-728 (2023)

8) 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) 加藤菜帆、西崎雄三、増本直子、石附京子、中島馨、大槻崇、松藤寛、杉本直樹、佐藤恭子、天然苦味料ニガヨモギ抽出物の成分規格作成を目的とした基礎的検討、日本食品化学会 第 28 回総会・学術大会（2022. 5）（東京）

2) 西崎雄三、建部千絵、石附京子、増本直子、吉田久美、杉本直樹、佐藤恭子、外部標準法定量 NMR（EC-qNMR）によるアントシアニンの純度測定、日本食品化学会 第 28 回総会・学術大会（2022. 5）（東京）

3) 加藤菜帆、大槻崇、松藤寛、定量 NMR に基づいた相対モル感度を用いた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニンの定量について、

日本食品科学工学会第 69 回大会（2022. 8）（オンライン開催）

4) 西崎雄三、鳥海栄輔、中西資、石附京子、増本直子、杉本直樹、既存添加物：乾留抽出物製品の PAHs 定量分析法の開発と実態調査、第 59 回全国衛生化学技術協議会年会（2022. 10）（川崎）

5) 建部千絵、藤原由美子、久保田浩樹、多田敦子、佐藤恭子、杉本直樹、HS-GC/MS を用いたシヨ糖脂肪酸エステル中の残留溶媒分析法の検討、日本食品衛生学会第 118 回学術講演会（2022. 11）（長崎）

6) 西崎雄三、石附京子、吉村弘伸、松熊伸也、朝倉克夫、末松孝子、杉本直樹、Q 値を指標にした外部標準法定量 NMR（EC-qNMR）の測定自動化とその定量精度について、第 61 回 NMR 討論会（2022. 11）（高知）

7) 石附京子、西崎雄三、増本直子、杉本直樹、佐藤恭子、乾留抽出により得られる既存添加物の成分比較（木酢液・チャ乾留物・モウソウチク乾留物）、日本食品衛生学会 第 118 回学術講演会（2022. 11）（長崎）

8) 都築明日香、西崎雄三、増本直子、鈴木俊宏、兎川忠晴、杉本直樹、外部標準法定量 NMR（EC-qNMR）、試料間でレシーバーゲインが異なるときの補正について、第 4 回日本定量 NMR 研究会年会（2022. 12）（東京）

9) 岡庭寛昂、池上美音、宮下采佳、大槻崇、松藤寛、長田和実、中西祐輔、高橋恭子、酪酸が腸管上皮バリアへ与える影響、日本農芸化学会 2023 年度大会（2023. 3）（オンライン開催）

10) 吉成知也、関根葵、小林直樹、西崎

雄三、杉本直樹、工藤由起子、渡辺麻衣子、MALDI-ToF MS を用いた既存添加物酵素の基原生物の同定手法に関する研究、日本農芸化学会 2023 年度大会 (2023. 3) (オンライン開催)

11) 加藤菜帆、大槻崇、松藤寛、健康食品中のアントシアニン定量における相対モル感度 (RMS) を用いた Single-reference HPLC 法の適用について、日本食品化学学会 第 29 回学術大会 (2023. 6) (富山)

12) 建部千絵、藤原由美子、久保田浩樹、多田敦子、杉本直樹：アルギン酸の硫酸塩試験法に関する検討、日本食品化学学会 第 29 回学術大会 (2023. 6) (富山)

13) 加藤菜帆、大槻崇、松藤寛、相対モル感度 (RMS) を用いた Single-reference HPLC による健康食品中のアントシアニン定量法の開発、AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回年次大会 (2023. 7) (東京)

14) 久保田浩樹、寺見祥子、建部千絵、多田敦子、佐藤恭子、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マルトール及びエチルマルトールの一日摂取量調査、第 60 回全国衛生化学技術協議会年会 (2023. 11) (福島)

15) 建部千絵、藤原由美子、久保田浩樹、多田敦子、杉本直樹、qNMR を用いた食用タール色素成分規格で使用される不純物定量用試薬の純度測定、第 5 回日本定量 NMR 研究会年会 (2023. 12) (川崎)

16) 加藤千穂、西崎雄三、大槻崇、松藤寛、阿部裕、多田敦子、杉本直樹、qNMR におけるピーク高さ法の検討：naringin の場合、第 5 回日本定量 NMR 研究会年会

(2023. 12) (川崎)

17) 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)

18) 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)

19) 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)

20) 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)

21) 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

