

博士学位論文

Regulatory science study on a food
ingredient intake survey and
development of new analytical methods
for food additives

食品成分摂取量調査と食品添加物の
新規測定法の開発に関する
レギュラトリーサイエンス研究

2017 年 7 月

鈴木 一平

目次

Abstract.....	1
第1章 緒論.....	4
1.1. 研究目的.....	4
1.2. 本論文の研究概要と構成.....	7
1.3. 図表.....	10
1.4. 参考文献.....	12
第2章 食品中のアルミニウム含有量の定量と食品からのアルミニウム摂取量推計	13
2.1. 序論.....	13
2.2. 方法.....	15
2.3. 結果および考察.....	18
2.4. 要約.....	23
2.5. 図表.....	24
2.6. 参考文献.....	40
第3章 加工食品中の銅クロフィル (CuCh) および銅クロフィリンナトリウム (CuCh-Na) 分析法の開発.....	42
3.1. 序論.....	42
3.2. 方法.....	45
3.3. 結果および考察.....	47
3.4. 要約.....	52
3.5. 図表.....	53
3.6. 参考文献.....	61
第4章 過酢酸製剤成分 1-ヒドロキシエチリデン-1,1-ジホスホン酸およびオクタン 酸の生鮮食品中分析法の開発.....	63
4.1. 序論.....	63
4.2. IC-MS/MS を用いた生鮮食品中 HEDP 分析法の開発.....	65

4.3. オクタン酸の生鮮食品中分析法の開発と輸入生鮮食品中のオクタン酸量の調査.....	75
4.3. 考察.....	83
4.4. 要約.....	84
4.5. 図表.....	85
4.6. 参考文献.....	100
第5章 総括.....	102
5.1. 総合考察.....	102
5.2. 図表.....	106
5.3. 参考文献.....	107
略語表.....	108
謝辞.....	109

Abstract

In recent years, new scientific concepts that connect science and technology with the real world, e.g., regulatory science, green sustainable chemistry, and science communication, are rapidly evolving to establish harmony with the real world. Of these, regulatory science is a scientific field that was proposed in 1987 by Uchiyama with the following principal objective: “regulatory science is the science that reconciles the fruits of science and technology with the most desirable form for harmony between people and society.” Regulatory science is an interdisciplinary scientific field with a vast targeted research area. Within this area, one can find basic research grounding regulations related to things such as pharmaceuticals, food, and food additives, which play an important role in the prediction and evaluation of characteristics and impact when, once distributed in the market, these products are directly ingested into the human body. In particular, utmost attention should be paid to the basic research that ensures the safety standards of food and food additives that are ingested through meals every day. I herein used regulatory science to examine the results of an intake survey of aluminum present in foods and developed analytical methods for food additives on the basis of the following three studies.

1) Estimation of daily aluminum intake in Japan based on food consumption inspection results

Dietary aluminum (Al) intake by young children, children, youths, and adults in Japan was estimated using the market basket method. The Al content of food category (I–VII) samples for each age group was determined by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. The Al content in processed foods and unprocessed foods ranged from 0.40 to 21.7 mg/kg and from 0.32 to 0.54 mg/kg, respectively. In the case of processed foods for all age groups, the Al content in sugar and confections/savories was the highest. The daily dietary Al intake from processed foods was much higher than that from unprocessed foods. The mean weekly percentages of the provisional tolerable weekly intake (PTWI; established by the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives in 2011) from processed foods for young children, children, youths, and adults are 43.1%, 22.4%, 17.6%, and 15.1%, respectively. Only the highest consumer Al exposure value (>P95) of the young children group exceeded the PTWI.

2) Development of an analytical method for copper chlorophyll and sodium copper chlorophyllin in processed foods

The food colorants copper chlorophyll (CuCh) and sodium copper chlorophyllin (CuCh-Na) are

used worldwide in a wide range of processed foods. I developed an analytical method for the determination of CuCh and CuCh-Na levels in processed foods to effectively monitor the appropriate use of these colorants. The proposed analytical method involves simultaneous extraction and parallel analysis of hydrophobic CuCh and hydrophilic CuCh-Na without potentially harmful solvents. CuCh and CuCh-Na were extracted from processed foods with 1-butanol and ethyl acetate. CuCh-Na was extracted from the initial extraction solvent with 0.15 mol/L NaOH, and then, the residual extraction solvent and alkaline water layers were dried. Finally, the samples were carbonized with H₂SO₄. The carbonized samples were ashed in a muffle furnace at 480°C. The residue was dissolved in 0.1 mol/L HNO₃, and the level of copper in the samples was determined using atomic absorption spectrophotometry to indirectly quantify the levels of CuCh and CuCh-Na. The performance of the developed method was validated by a recovery test and application for commercial foods. The results indicated that the developed method has reliable precision and applicability for the determination of CuCh and CuCh-Na in commercial foods.

3) Development of analytical methods for residual materials of peracetic-acid-based sanitizers on uncooked foods

Peracetic-acid-based sanitizers (PAS) are antimicrobial agents that are widely used to treat uncooked foods because they are effective against a wide range of microorganisms. However, PAS had not been permitted to be used for food sanitation in Japan. Therefore, the residual materials of PAS on imported uncooked foods had to be monitored for the regulation. The residual materials of PAS components are 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid (HEDP) and octanoic acid (OA). Therefore, the analytical methods of residual HEDP and OA on PAS-treated uncooked foods are developed in this study. The developed analytical method of residual HEDP on uncooked foods involves an ultrasonic extraction, a simple sample preparation, and an ion chromatograph with tandem mass spectrometry. The developed analytical method of residual OA on uncooked foods involves straightforward solvent extraction, derivatization with sulfuric acid/methanol, and gas chromatography coupled with mass spectrometry. These developed methods were validated via a recovery test and application to the PAS-treated various uncooked foods. The obtained result shows that these methods can be applied and are appropriate for determining residual HEDP and OA on PAS-treated uncooked foods for the regulation. Moreover, the developed determination method of OA was applied to imported uncooked foods (56 beef samples, 34 vegetable samples, and 89 fruit

samples), and we found that OA levels ranged from 0.34 to 0.53 mg/kg, from the limit of quantification (LOQ, 0.02 mg/kg) to 0.48 mg/kg, and from LOQ to 1.12 mg/kg, respectively.

第 1 章 緒論

1.1. 研究目的

近代における科学技術の発展とその成果は人類の繁栄を支える原動力である。19 世紀半ばに始まったとされる科学と産業の結びつきは、工業生産性を加速させるだけでなく、抗生物質の開発などの医療技術、窒素固定法などの農業技術、保存料による食品保存技術といった新たな技術をもたらした¹⁾。これらの科学技術の成果により人類の健康状態、栄養状態は劇的に改善され世界人口は過去 200 年で推定 10 億人から 74 億人に飛躍的に増大した²⁾。このように科学技術の恩恵により人間の活動が拡大したことが、現代社会の発展の基礎となったことに疑いはない。しかし科学技術とその成果に支えられた現代社会は、製品の大量生産大量廃棄による地球資源の枯渇、温室効果ガスの排出による地球温暖化、天然に存在しない難分解性化合物による環境汚染など様々な問題を生み出した。加えて、生命科学の急速な発展は、遺伝子操作技術によりゲノムという生命の根源に人間が関わることまで可能にするなど、ワトソンの提言したいわゆる「倫理的・法的・社会的問題」をもたらし、これまでの社会通念を超える課題を突き付けている³⁾。このように、科学技術の発展は実社会に多くの解決すべき課題をもたらしたことは否定できないが、反面その解決のためには、科学技術の適切な活用が欠かせないものであることもまた事実である。

そのような中で近年、科学技術と実社会とを結びつける科学領域としてレギュラトリーサイエンス、グリーンサステイナブルケミストリー、サイエンスコミュニケーションといった新たな概念が急速に発展している。このうち、レギュラトリーサイエンスは、内山によって 1987 年に提唱された科学的概念であり⁴⁾、その目的は「科学・技術の進歩を、真に人と社会に役立つ最も望ましい姿に調整 (regulate) するための科学」とされ、さらに 4 半世紀を経て、多岐にわたって広がりを見せたレギュラトリーサイエンスは⁵⁾、2013 年の科学技術基本計画において「科学技術の成果を人と社会に役立てることを目的に、根拠に基づいた確かな予測、評価、判断を行い、科学技術の成果を人と社会との調和の上で最も望ましい姿に調整するための科学」と定義されている^{6,7)}。このようにレギュラトリーサイエンスは“regulate”によって科学的成果を実際的な形で社会に還元するための科学領域と考えられているが、これは“regulate”の持つ「規制、抑制」という強制的な意味だけではなく、「秩序のとれた状態にする、正常な状態にする、加減する」といった

意味を含んでおり⁸⁾、科学的成果と実際の社会規範との整合性をとる事が重視されている。

現在、科学の加速的な発展に伴ってレギュラトリーサイエンスの充実が急務となっており、2013年の科学技術基本計画では、ライフイノベーション推進を目的としたシステム改革の一環として、医薬品及び医療機器の承認審査を迅速かつ効率的に行うために、審査機関におけるレギュラトリーサイエンス研究機能の充実を図ることが決定されている⁶⁾。これによって、審査機関が新規に開発された薬剤などについての有効性や安全性に関するレギュラトリーサイエンス研究を充実させることで、行政による適切な規制の設定をサポートし、革新的な科学的成果を円滑に社会に還元することが期待されている。

また、レギュラトリーサイエンス研究は食品安全分野においても重要視されている。病気を治療するという有効性を重要視し、有効性と安全性のバランスの視点から社会への受入の可否を判断する医薬品と違い、食品の社会への受入の可否の判断は栄養摂取やエネルギー補給という有用性の面よりも、そもそも食べて安全であることが極めて重要視される。そのため、食品の安全性を確保するためには、食品の安全を脅かす可能性のある危害要因（ハザード）、すなわち食中毒の原因となる病原菌やウイルス、あるいは自然毒、残留農薬、残留動物医薬品、食品添加物、その他の環境中の化学物質、さらには放射性物質や食品中のアレルゲン等を特定するとともに、ヒトの健康や環境衛生に与える危険性（リスク）の程度を評価し（リスク評価）、次にこのリスク評価結果等を基にこれらリスクを低減するための措置をとること（リスク管理）が行われる。またリスク管理した結果については、それが有効に機能しているかどうかをモニターし、もし有効でない場合には、必要に応じてリスク評価とリスク管理の見直しが行われる。さらに、このすべての過程においては、リスクについて利害関係者（生産者、消費者、行政等）間での情報・意見交換（リスクコミュニケーション）が重要である。このようなリスク評価、リスク管理、リスクコミュニケーションの3つの要素からなる食品の安全性の確保の方策は、現在リスクアナリシスと称されている（Fig.1.1）⁹⁾。

食品分野におけるレギュラトリーサイエンス研究はこれら一連のリスクアナリシスを支えるための科学領域として認識されており、食品の毒性学研究や統計学による摂取量の推計などの研究活動はリスク評価を支え、分析化学などによる流通食品の成分分析はリスク管理を支え、消費者・生産者・行政間のリスク認識の調整などの社会心理学的研究などはリスクコミュニケーションを支えており、幅広い領域の科学分野がレギュラトリ

ーサイエンス研究として食の安全に関わっている (Fig.1.1).

食品において特にリスクアナリシスが重要視されるのは食品添加物についてである。現代社会にとって食品の安全性を高め、健康の増進に寄与する食品添加物はなくてはならないものであるが、日々の生活の一部であるがゆえにハザードが発生した場合の社会に対する影響は大きいことから、消費者の求める安全性もとりわけ厳しく、科学的な安全性の確保が強く求められている。日本において食品添加物とは、食品衛生法第4条により、医薬品を除いて“添加物とは、食品の製造の過程において又は食品の加工若しくは保存の目的で、食品に添加、混和、浸潤その他の方法によって使用する物をいう。”と定義されており、1992年に、「人の健康を損なうおそれがなく、かつその使用が消費者に何らかの利点を与えるものでなければならない」と厚生省(当時)から通知されている。そのため国内において流通する食品添加物は安全でかつ有用であることが前提とされ、食品安全委員会によってリスク評価が行われたのち、行政によって設定された規格基準に基づいてリスク管理がされている。さらに、基準や規制は設定しただけで終わるものではなく、たえず見直しと検討が必要であり、予測の妥当性と評価法の見直し、最新の科学に応じた分析法の研究に取り組む必要がある。また、リスク評価の基準となる摂取量の調査は広範囲で継続的な情報収集が評価の正確性に直結し、適切な基準の設定といったリスク管理に影響することから、日本各地の地方衛生研究所で行われる地域に流通する食品のモニタリングによってもたらされるデータは非常に重要である。しかし、地方行政における行政リソースはひっ迫しており、レギュラトリーサイエンス研究を十分に行う余力は無くなってきている¹⁰⁾。そのため、行政リソースの効率化が必須と考えられその一環として、地方衛生研究所などで日常的に行われる食品添加物の分析法の効率化と、使用試薬の削減などによるコスト削減が有効と考えられた。

そこで本論文では、レギュラトリーサイエンス研究の枠組みの中で、食品成分の摂取量調査および、3種の食品添加物について効率的な新規の食品中分析法開発に関する研究を行った。

1.2. 本論文の研究概要と構成

第 2 章 食品中のアルミニウム含有量の定量と食品からのアルミニウム摂取量推計

現代において食品流通はグローバル化を加速しており, Hazard analysis and critical control point (HACCP) 等の世界的に統一されたハザード管理システムが整備されつつあり, 安全性の確保や流通の効率化によってさらなる食品流通網の発展が見込まれる. その反面, グローバルな食品流通では, 食品成分や食品添加物に対する規格基準や規制が各国において異なることが問題になる場合が多く, 近年ではイタリアの万国博覧会において, 鰹節の含有するベンゾピレンが EU の基準値を超えていたため禁輸措置が取られるなど社会的に大きな話題となった¹¹⁾. このように, 各国における基準が異なることによる不利益も多いことから, 世界的に食品の規格基準統一に向けた運動が存在する.

そのような背景の中で, 国際機関である Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) では, 食品添加物の毒性や耐容摂取量などの安全性評価が行われており, この評価は各国国内においても規格基準設定の参考とされることから, 食品添加物の統一的な規格基準を作る上で重要な役割を果たしている.

一方で, このような規格基準は設定されるだけでは不十分であり, 実際の添加量や摂取量を調査し, リスク評価を行う必要がある. しかし, 実際の食品から摂取する成分は食品の生産された地域, 生産方法, 食文化, 時代によって容易に変化する. そのため, 食品中の食品添加物のリスク評価を行うためには, その根拠となる摂取量の調査を継続的に行う必要がある (Fig.1.2). また, このようなリスク評価は必ずしも普遍的なものではなく, 有効性や毒性について新しい科学的知見がもたらされる度に再評価を行い, 必要であれば更新されるべきものである. アルミニウム (Al) はミョウバンやベーキングパウダーといった形で食品添加物に含まれる金属であり, 1989 年に JECFA によって設定された食品から摂取する Al の暫定耐容一週間摂取量 (provisional tolerable weekly intake (PTWI)) は, 体重あたり 7.0 mg (7.0 mg/kg bw/week) に設定されていたが¹²⁾, 新たな科学的知見がもたらされる度に更新されており, 二度の更新を経て現在の PTWI は 2.0 mg/kg bw/dweek とされている^{13,14)}.

そこで本章では, 国内における一般的な食事での Al 含有量を測定し, 摂取する Al 量を推計した. また, 推計摂取量と更新された PTWI との比較検討を行った.

第 3 章 加工食品中の銅クロロフィル (CuCh) および銅クロロフィリンナトリウム

(CuCh-Na) 分析法の開発

近年、グリーンケミストリーの推進が世界的な潮流となっている。Anastase らによって提唱されたグリーンケミストリーは本来、「物質を設計し、合成し応用するときには有害物となるべく使わない、出さない化学」として、化学合成における安全性の向上と環境負荷の低減を目的にしていた¹⁵⁾。現在、この概念はさらに拡張され化学合成研究の場だけではなく他の科学分野や、産業生産の場まで含めた化学物質によるリスクの低減と、リサイクルによる環境負荷の最小化を目的とした概念として捉えられており、グリーンサステイナブルケミストリーともよばれる^{16,17)}。

このように世界的な化学物質使用量削減の動きの中、食品分析などの分析化学分野においても有機溶媒などの化学物質の使用削減は重要な課題となっている。日本における食品中の食品添加物分析は、「食品中の食品添加物分析法」として厚生労働省が示した、いわゆる公定法が広く使用されている。しかし収載されている試験法の中には、開発されてから数十年経過している方法で、現在では有害性の疑いがあると考えられている有機溶媒を必要とする、安全性に問題があり環境負荷の大きい分析法を採用しているものが一部存在する。また、有害試薬の使用は試薬の管理や廃棄に多大な人的・金銭的成本として研究機関にのしかかる。そのため日常的に大量の試験を必要とし、多くの化学物質が使用される食品添加物のモニタリング分析においては、有害試薬はもとより、試薬の使用量を可能な限り減らし、また安全性の高い分析手法を開発し更新していく必要がある (Fig.1.2)。

そこで本章ではリスク管理効率化のため、公定法に収載されている食品中の銅クロロフィル (CuCh) および銅クロロフィリンナトリウム (CuCh-Na) 分析法の改良を目的とした研究を行った。公定法による CuCh/CuCh-Na の分析法では、発がん性の疑いがあるクロロホルムを溶媒として必要としており、環境への影響と安全性への懸念から改善する必要があり、また、CuCh と CuCh-Na の分離効率が悪いとの指摘もあった。そこで、本章ではクロロホルムを使わずに食品中の CuCh/CuCh-Na を精製し、CuCh/CuCh-Na を効率よく分離定量可能な分析法について検討を行った。

第 4 章 生鮮食品中の過酢酸製剤成分 1-ヒドロキシエチリデン-1,1-ジホスホン酸 (HEDP) およびオクタン酸分析法の開発

日本はカロリーベースで食料自給率が 40%程度とされており、食品の半分以上を輸入食品に頼っている。また、世界各国の食品が輸入されることは、日々の生活を豊かなものにしており、そういった面でも輸入食品は日本において欠かせないものとなっている。日本では食品添加物の使用はポジティブリスト制を取っており、リストに含まれない食品添加物を含む食品は違反品とされ輸入・流通ができない。そのため、日本で使用できない添加物を含んでいる輸入食品が問題になる場合がある。実際に、平成 27 年度の輸入食品監視統計では日本で未指定の食品添加物を使用していたため違反となった件数は 44 件、添加物などの規格違反、基準値の超過などの違反は 569 件に上っており、これらは、輸出国側では問題ないものの、日本の基準に適合していないというケースが多く含まれている。実際に違反品が流通した事例として、輸入食塩に添加されていたフェロシアン化物の問題があげられる¹⁸⁾。フェロシアン化物は食塩の凝固防止剤としてヨーロッパ諸国では古くから使用されており、食経験が長い物質であった。加えて、JECFA などの評価がなされていたが¹⁹⁾、国内では食品添加物として未指定であった。しかし、フェロシアン化物の添加された塩と塩を含む輸入食品が国内流通していることが明らかとなり、問題になった。また、このような食経験が豊富な食品だけではなく、国外において近年になって使用され始めた食品添加物が含まれた食品が、国内における規格基準が設定される前に輸入される可能性もある。このような場合には対象となる食品添加物の分析法そのものが存在せず、当該食品添加物の食品中含有量の実態把握が困難なことがあり、リスク管理の観点から速やかに分析法を確立する必要が生じる (Fig.1.2)。

そのような背景の中で実際に、2013 年に過酢酸製剤についての問題が指摘された。過酢酸製剤は 2000 年代初頭からアメリカを中心に生鮮食品の殺菌に使用され始めた殺菌料である。しかし、日本では過酢酸製剤は食品添加物として 2013 年時点では未指定であり、過酢酸製剤処理された輸入生鮮食品の流通が認められていなかった。そのためリスク管理の観点から、過酢酸製剤中の不揮発成分である 1-ヒドロキシエチリデン-1,1-ジホスホン酸 (HEDP) およびオクタン酸の輸入食品中の残留量を分析する必要があった^{20,21)}。そこで、本章では新たに生鮮食品中の HEDP およびオクタン酸分析法の開発を行った。

1.3. 図表

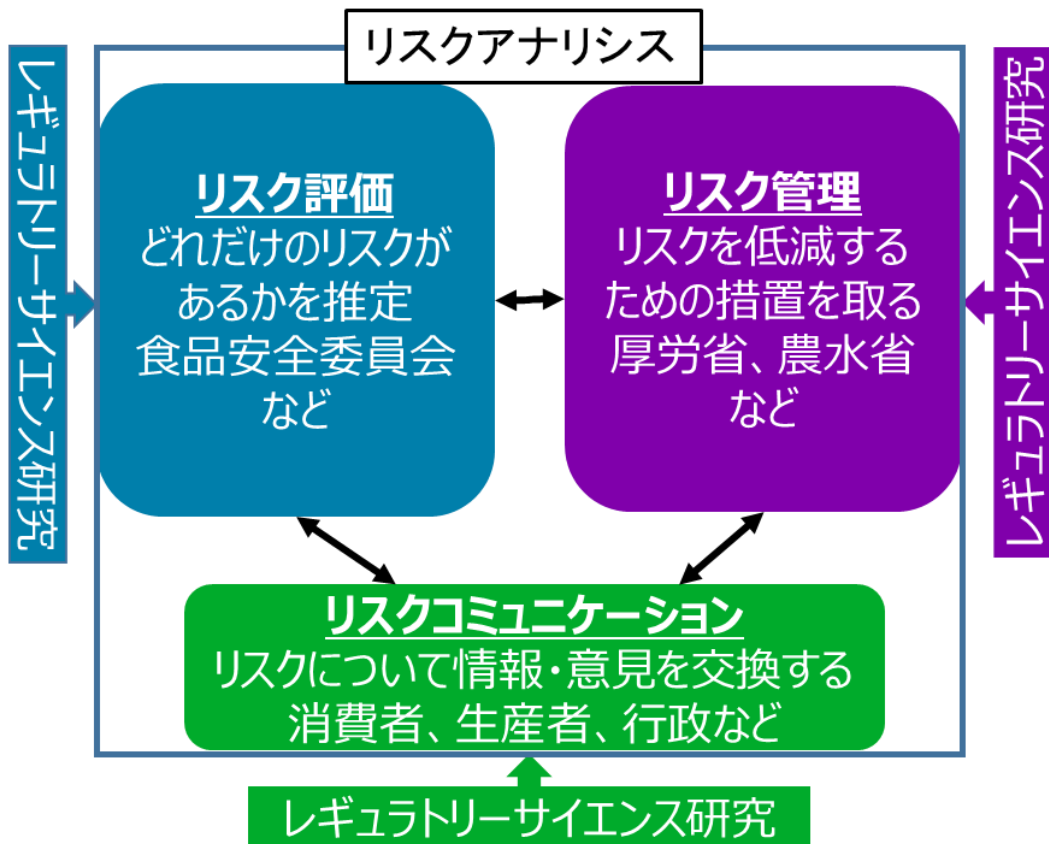


Figure 1.1. 食品安全におけるリスクアナリシスとレギュラトリーサイエンス研究

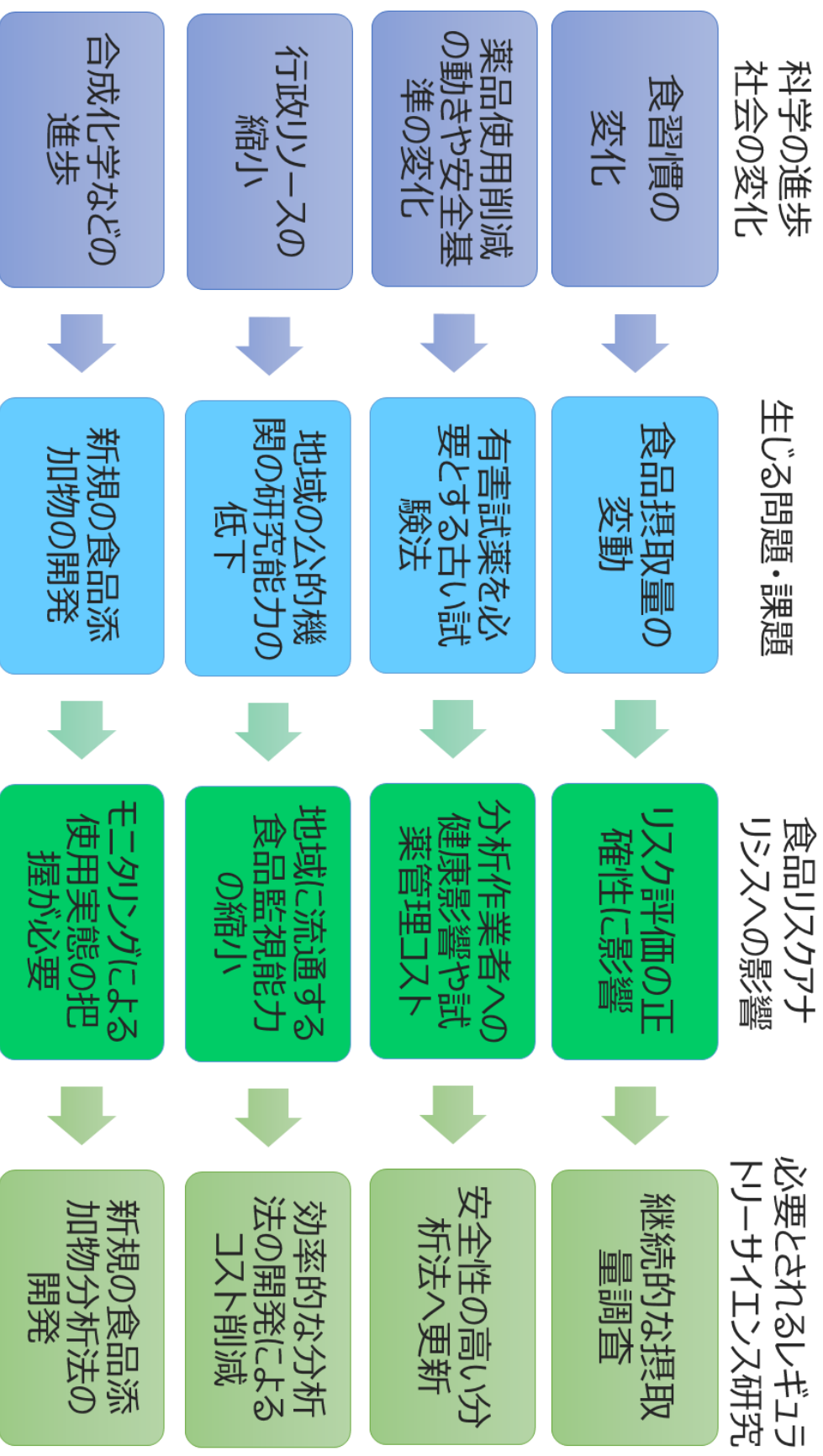


Figure 1.2. 食品安全におけるレギュラトリーサイエンス研究テーマ

1.4. 参考文献

- 1) 古川安, “科学の社会史：ルネサンスから20世紀まで” 南窓社, 東京, 2001.
- 2) United Nations, *World Population Prospects The 2015 Revision*, New York, 2015.
- 3) “The Ethical, Legal, and Social Implications Program of the National Center for Human Genome Research: A Missed Opportunity?,” ed. by Ruth, Ellen Bulger, Meyer, Bobby Elizabeth, Fineberg, Harvey V., National Academies Press (US), Washington (DC), 1995.
- 4) Uchiyama M., *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **49**, 185–7 (1995).
- 5) Kojima H., Kasamatsu T., *Genes Environ.*, **37**, 12 (2015).
- 6) Report on The 4th Science and Technology Basic Plan, 2013.
- 7) Report on The 5th Science and Technology Basic Plan, 2016.
- 8) 細谷憲政, “人間栄養とレギュラトリーサイエンス” 第一出版, 東京, 2010
- 9) Akiyama H., *YAKUGAKU ZASSHI*, **137**, 447–452 (2017).
- 10) 小澤 邦寿, *公衆衛生*, **77**, 48–53 (2013)
- 11) Ministry of agriculture forestry and fisheries, “ミラノ国際博覧会への日本産食品の持込みにおける特例措置について.”:
<<http://www.maff.go.jp/j/press/shokusan/gaisyoku/150213.html>>.
- 12) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *Evaluation of certain food additives and contaminants*, 1989.
- 13) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, 7–17 (2011).
- 14) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, **940**, 33–44 (2007).
- 15) Bender D. A., “A dictionary of food and nutrition,” Oxford University Press, 2009.
- 16) Melchert W. R., Reis B. F., Rocha F. R. P., *Anal. Chim. Acta*, **714**, 8–19 (2012).
- 17) de la Guardia M., Garrigues S., “Handbook of Green Analytical Chemistry,” John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2012.
- 18) Kümmerer K., Clark J., “Sustainability Science,” Springer Netherlands, Dordrecht, 2016, pp.43–59.
- 19) “指定外添加物（フェロシアン化物）を使用する食塩及びその食塩を使用し製造した食品への対応.”: <<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2002/07/h0712-4.html>>.
- 20) JECFA, *WHO Food Addit. Ser.*, **54**, (2006).
- 21) FSANZ, *Application A513 Octanoic Acid as a Processing Aid Initial: Assessment Report*, 2004.

第2章 食品中のアルミニウム含有量の定量と食品からのアルミニウム摂取量推計

2.1. 序論

アルミニウム (Al) は地殻を構成する元素のうち酸素、ケイ素に次いで 3 番目に多く含まれている人類にとって非常に身近な金属である。そのため Al は飲料水や土埃といった天然成分として人体に接触する機会は多く、また、制酸剤などの医薬品、ミョウバンやベーキングパウダーなどの食品添加物として利用されているため、意識的・無意識的を問わず摂取する機会は多い。摂取した Al は大半がそのまま排泄され、微量に吸収された Al (0.01~0.3%) は血中から腎臓を経て尿中へと排泄されることが明らかとなっているが^{1,2)}、人体において何らかの役割を担っているかはよくわかっていない。しかしながら、Al の有害性を指摘する報告もあり、未だ議論の余地はあるものの、脳、骨、心臓などに蓄積し、多量に摂取した場合に中枢神経系、骨格系、造血系に影響を与え、病気を発症する一因となる可能性が指摘されている¹⁻⁴⁾。

このような健康への懸念から、1989 年に Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) は、Al の暫定耐容週間摂取量 (PTWI: provisional tolerable weekly intake) を、体重あたり 7.0 mg に設定した (7.0 mg/kg bw/week)。さらに、Al の神経毒性、生殖発生毒性について動物実験の知見が蓄積されてきたことを受け 2007 年には PTWI の再評価が行われている。この再評価では、Al と毒性に関する明確な容量相関性が認められないなど Al 摂取がどの程度健康に影響を与えるかは不明と評価されたが、動物実験で報告されている最も低い無毒性量 (NOAEL) を根拠として最大限保守的に見積もった結果、PTWI は 1.0 mg/kg bw/week に再設定された⁶⁾。その後、Al の新規の毒性学上の報告を受けて⁷⁾、JECFA は 2011 年に改めて PTWI の評価を行っている。その結果、PTWI は 2.0 mg/kg bw/week に再設定されており⁸⁾、現在では食品から摂取する Al 量がこの PTWI 以下になるような食習慣が望ましいと考えられている。

食品に含まれる Al は、野菜、穀類、魚介類などに水や土壌などから食品に移行した天然由来の Al、また、Al 製の調理器具や食器などから溶出し混入した Al などが食品に含まれることがあるが、これらは Al の総摂取量に対して微量であり、Al 摂取の大部分は加工食品に添加されたミョウバンやベーキングパウダーといった食品添加物に由来すると考えられている^{1,9,10)}。実際の食習慣における食品からの Al 摂取量推計についての研究は米国¹¹⁾、ドイツ¹²⁾、ベルギー¹³⁾、中国南部¹⁴⁾、EU 域内¹⁵⁾などの国や地域からの報告

がすでになされている。しかしながら、その摂取量推計は国や地域によって大きく値が異なっており、これは調査方法の違いによる影響に加え、食習慣の違いが原因と考えられている。さらに、食品中のAl含有量はAlを含む食品添加物の添加によって大きく変動するため、日本国内におけるAl摂取量を食品添加物規制の異なる他の国、地域のデータから推計するのは適切ではないと考えられた。国内の研究として、陰膳方式^aによる研究や、マーケットバスケット (MB) 法^b によって調製したトータルダイエツトスタディ試料を用いたAl摂取量推計が行われている^{15,16}。1996~1998年にかけて行われたMB法を用いた研究では、食事から摂取するAl量は成人で1日に3.5 mg (週間摂取量として0.42 mg/kg bw/week)^c と推計しており、更新されたPTWIを越えることはないと推察された。しかしながら、当該研究から10年以上が経過しており、現在の食習慣に十分対応可能であるとは言い難い。したがって、現在のAl摂取による健康影響評価には、改めて国内における食品中のAl含有量を測定し、国内における食品からのAl摂取量を推計した上で、更新されたPTWIに対する比率の検討を行う必要があった。本研究では、MB法を用いて穀類や砂糖・菓子類といった食品群ごとの混合試料を調製し、誘導結合プラズマ原子発光分析 (ICP-AES) を用いて混合試料中のAl含有量を測定した。測定された食品中のAl濃度に基づいて、年齢層別 (小児, 学童, 青年, 成人) の各食品群かのAl摂取量の推計を行い、更新されたPTWIとの比較検討を行った。

a ボランティアに1日間に摂取したすべての飲食物と同じ種類を同じ量だけタンクに採取してもらい、それを分析試料とする方法。¹⁹⁾

b 国民の食品の消費量に応じて市場から購入した食品を採取し、混合・破碎したものを分析試料とする方法。(Fig.2.1)

c 筆者による再計算、成人体重を 58.6kg とした。

2.2. 方法

2.2.1. 試薬および試液

塩酸 (HCl) (有害金属測定用, 35.0~37.0%), 硝酸 (HNO₃) (精密分析用, 60~62%), 0.1 mol/L HNO₃ (定量分析用), Al標準液 (JCSS, 100 µg/mL) および超純水は和光純薬工業 (株) から購入した. 検量線用標準品 (0.012, 0.06, 0.3, 1.5, 7.5 µg/mL) はAl標準液を 0.1 mol/L HNO₃ で希釈して調製した. また, 本研究で使用した水はMerck Millipore社製 Milli-Q Gradient A10 system を用いて精製 (18 MΩ·cm) したものを使用した.

2.2.2. 試料調製

アルミニウム摂取量推計はMB法を用いて行った. 加工食品については食品喫食量調査 (平成22年度委託事業「食品摂取頻度・摂取量調査の特別集計業務報告書」(独立行政法人国立健康・栄養研究所)) に基づいて, 喫食量調査の対象となっている7群189品目の食品の年齢層別の喫食量 (g, mL/day) を算出し, 加工食品喫食量リストを作成した. 年齢層は1~6 才 (小児), 7~14 才 (学童), 15~19 (青年), 20 才以上 (成人) と分類した. また, 189種の加工食品は以下の7群に分類した; I群: 調味料および飲料, II群: 穀物, III群: 芋および豆類, IV群: 魚介, 肉および卵類, V群: 油脂および乳製品, VI群: 砂糖および菓子類, VII群: 果実, 野菜および海藻類. 次に, 189品目286製品を都内スーパーで購入した (Table 2.1.). 喫食量が多く, 製品の偏りがデータに与える影響が多いと考えられる品目については, 2もしくは3メーカーの製品を購入した. 次に, 加工食品摂取量リストに基づいて加工食品を採取した. 複数製品を購入した品目については, 製品数に応じて摂取量を案分して採取した. 採取した食品は群ごとに混合し, 計28のマーケットバスケット試料 (MB 試料) を調製した (4年齢層×7群). 食品の混合にはブレンダー (Knife Mill GRINDOMIX GM 300; Retsch) を使用し, 混合時には試料重量と同重量の水を加えた. ただし, I群 (調味料および飲料) については水を加えなかった. 結果および考察で示したAl検出量は水による希釈を補正した値である. 調製後試料は100 mLのポリエチレンボトルに分注し, 分析までの間-20°Cで保存した.

未加工食品は33品目を4群 (II, III, IVおよびVII群) に分類した. また, マーケットバスケット方式による年齢層別食品添加物の一日摂取量の調査 [<http://www.ffcr.or.jp/Zaidan/mhwinfo.nsf/98a5d7b766af9bfb492565a10020c601/1100115ac3d23fd7492569d800171034?OpenDocument>] に基づいて加工食品と同様に年齢層別の未加工

食品摂取量リストを作成した。次に、33品目40製品の未加工食品を都内スーパーとインターネットを通じて購入した (Table 2.2.)。これらの未加工食品を加工食品と同様に未加工食品摂取量リストに基づき混合し、13のMB試料を調製した (4年齢層×3群 (II, IVおよびVII群) + III群)。III群は年齢層間の摂取量に大きな差が無かったため共通の試料とした。調製後MB試料は125 mLのポリエチレンボトルに分注し、分析までの間-20°Cで保存した。

2.2.3. 試験溶液の調製

2.0 gのMB試料を石英ビーカーに採取し、250°Cのホットプレートで乾燥、炭化した。さらに、電気炉で100°C/hの昇温条件で485°Cまで加熱し、485°Cを一晩維持した。冷却後、5.0 mLのHNO₃/H₂O (1:1)を加え溶解し、ホットプレートで乾燥した後、電気炉で灰化した。灰化試料を少量の超純水で湿らせ、5.0 mLのHClを加え再度ホットプレートで乾燥した。灰化試料を0.1 mol/L HNO₃で溶解しDigi TUBE (SCP SCIENCE Co., Baie-D'Urfé, Canada)に回収し、0.1 mol/L HNO₃で50.0 mLに定容した。

2.3.4. アルミニウムの定量

各群のAl濃度の定量にはOptima 5300DV ICP-AES (Perkin-Elmer) を用いた。ICP-AES の各設定は以下の通り、吸引速度, 1.0 mL/min; プラズマガス (Ar) 流量, 15.0 L/min; 補助ガス流量, 0.2 mL/min; キャリヤーガス流量, 0.7 mL/min; RFパワー, 1300 W; 測定波長, 395.153 nm.

2.3.5. 加工食品及び未加工食品由来のアルミニウム摂取量の推計

年齢層ごとの群別Al一日摂取量は、ICP-AES分析で測定したの各食品群中のAl含有量と、年齢層ごとの喫食量に応じて、以下の式を用いて求めた。

$$D_i \text{ (mg/person/day)} = C_i \text{ (mg/kg)} \times X_i \text{ (g/person/day) for each age group /1000}$$

D_i (mg/person/day): 各年齢層の群別Al一日摂取量

C_i (mg/kg): 各MB試料から検出されたAl含有量

X_i (g/person/day): 各年齢層における各食品群の一日摂取量

また、各年齢層のAI一日摂取総量 (Y) は以下の式で求めた.

$$Y \text{ (mg/person/day)} = \sum (D_{N(I-VII)}) + \sum (D_{N(II, III, IV \text{ and } VII)})$$

また、各年齢層のAI週間摂取量 (W) は以下の式で求めた.

$$W \text{ (mg/kg bw/week)} = Y \text{ (mg/person/day)} \times 7 \text{ (days)} / BW \text{ (kg)}$$

BW: 各年齢層の平均体重 (小児; 16.0 kg, 学童; 36.5 kg, 青年; 56.5 kg, 成人; 58.6 kg)

2.3.6. 加工食品による AI 高摂取者推計

各年齢層における加工食品からのAI摂取量の分布をパーセンタイル分析により求め、年齢層別に週間摂取量の50, 90, 95, 99.5パーセンタイルを算出した。まず、食品喫食量調査の個別データ (小児: 1619件, 学童: 3419件, 青年: 2539件, 成人: 32787件) をもとに、各食品群 (I~VII群) の一人あたりの喫食量の多い加工食品順に品目の順位付けを行い、総喫食量の50%以上をカバーする様に上位数品目を選択した。さらに、選択された品目の組み合わせによって、その食品群の総喫食量をカバーするための割合 (%) および重量を計算した。次いで、年齢層ごとの群別AI一日摂取量 (mg/person/day) を乗じ、算出されたAI摂取量を合計しAI一日摂取総量とし、年齢層別にパーセンタイル値を求めた。さらに、AI一日摂取総量を各年齢層平均体重 (2.3.5.参照) で除し、7 (日) を乗じ週間摂取量 (mg/kg bw/week) を算出し、対PTWI (2 mg/kg bw/week) 比を求めた。

2.3. 結果および考察

2.4.1. 試験法の評価

本分析法では加工食品のMB試料 (IV群:学童) を7回分析した測定値の標準偏差 (σ) に3.143を乗じた値を検出限界 (LOD) とし, さらにLODに3を乗じた値を定量限界 (LOQ) とした. また, 未加工食品も同様に, MB試料 (II群:小児)を分析し, LOD, LOQを算出した. その結果, LODおよびLOQは 加工・未加工食品共に0.1 mg/kg, 0.3 mg/kgであった.

本法の真度および精度は添加回収試験 (n=3) で検討した. 成人の加工食品群および未加工食品群のMB試料にAlを添加し, 回収試験を行った.

Al添加量は, 各群のMB試料中のAl含有量と同程度とした. 加工食品での添加回収試験の結果, 回収率は83~113%, 相対標準偏差 (RSD) は 7.8%以下だった (Table 2.3). また, 未加工食品の回収率は81~106%, RSD は18.5%以下だった. この結果と, 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインを比較したところ^d, 回収率は良好であり本分析法はMB試料中のAlの定量分析に使用可能であると考えられた.

2.4.2. MB法による加工・未加工食品中 Al の定量

加工食品中のAl含有量を推定するため, 調製した各食品群・年齢層のMB試料を分析した. Table 2.4に示したように, 加工食品から検出されたAlは0.40~21.7 mg/kgであった. Alの検出量が多かった順に砂糖・菓子類, 穀類, 野菜および海藻類, 芋・豆類 (VI > II > VII > III) であり, 世代間の違いは観察されなかった. また, このデータから主なAlの摂取源はVI群であり, これは膨張剤などAlを含む食品添加物の寄与が大きいと考えられた. 実際, VI群の試料とした55製品のうち22製品にベーキングパウダーなどの膨張剤の使用が表示されていた (ただし全ての膨張剤がAlを含むとは限らない). またII群でも40製品中4

^d食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの回収試験目標値¹⁷⁾

添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)	RSD _r ^{*1}	RSD _R ^{*2}
≤ 0.001	70 ~ 120	30 >	35 >
0.001 < $\sim \leq 0.01$	70 ~ 120	25 >	30 >
0.01 < $\sim \leq 0.1$	70 ~ 120	15 >	20 >
0.1 <	70 ~ 120	10 >	15 >

^{*1}RSD_r, 併行精度, ^{*2}RSD_R, 室内精度

製品に膨張剤の表示があった。VII群から検出されたAlは主に土壌や海水などの天然に由来するものと考えられた。過去の研究でも、環境由来のAlが果実・野菜類に含まれるAlを増加させるとの報告があり^{14,18)}、また、色止剤として使用される硫酸アルミニウムなどの影響も考えられた。III群で検出されたAlはVII群と同様に主に栽培された土壌などの周辺環境に由来するものと考えられた、III群には膨張剤の表記がある食品は無かった。ただし、過去の研究でレンズマメや小豆などの豆類はAl含有量の多い食品として報告されている^{12,19-21)}。IV群からもAlが検出されたが過去の国内での研究では、3.7~10.9 mg/kgのAlが検出されており¹⁶⁾、これと比較して検出量が大幅に低かった。この過去の研究では、硫酸アルミニウムアンモニウムおよび硫酸アルミニウムカリウムなどが安定剤として添加された製品を多く含んでいたためではないかと推察された。

次に、未加工食品MB試料中のAl分析を行った。Table 2.5に示したように、未加工食品のMB試料からのAl検出量は0.32~0.54 mg/kgだった。このように、Alは加工・未加工食品に広く含まれているが、加工食品の方が未加工食品より多くのAlを含む傾向があると考えられ、この傾向は過去の研究とも一致している¹⁴⁾。今回の結果ではII群のAl含有量は0.32~0.43 mg/kgであった。この結果をドイツでの報告と比較すると、穀類のAl含有量は8.5 mg/kgと今回の結果よりはるかに高い値を示している¹⁸⁾。ドイツの報告では穀類にイモを含んでいる点で今回の群分類と異なるが、ギリシャからの報告ではイモのAl含有量は0.64 mg/kgと、今回のIII群の結果と同様の値が示されている¹²⁾。この違いは日本における穀類摂取の大半が米、西欧では小麦類に偏っていることが一因として考えられ、また穀物の栽培された土壌の違いなどの環境の違いも考えられた。また、本研究において未加工食品IV群のAl含有量は0.50 mg/kg以下だった。過去の研究では魚介類のAl含有量は過去の研究でも1.0 mg/kg以下である場合がほとんどで、同様に肉類では0.40 mg/kg、卵や卵製品では0.74 mg/kg以下であるとの報告があり^{9,12-14,18,20)}、今回の結果とよく一致していた。果実、野菜及び海藻を含むVII群が0.37~0.54 mg/kgと最もAl含有量が多かった。この値はギリシャの研究で報告されている0.80 mg/kg以下と一致しており¹²⁾、また、ベルギーで報告されている果実類の平均2.41 mg/kg、野菜類の平均1.96 mg/kg¹³⁾より低い。しかし、現在報告のある果実、野菜のAl含有量はその栽培種によって0.07~41.1 mg/kg^{12-14,18)}と非常に幅が広く、単純な比較は困難であると考えられた。

2.4.3. 食品からのアルミニウム摂取量推計

AIの摂取量は食品のAI含有量と食品の喫食量に依存する。本研究では、AI摂取量はMB法によって定量した各食品群のAI含有量 (2.4.2.) と、年齢層別の食品喫食量リストに基づいて算出した。加工・未加工食品からのAI一日摂取量の推計結果をTables 2.6., 2.7. にそれぞれ示した。一人あたりのAI一日摂取量が最も多い加工食品群は、成人はI群 (0.70 mg/person/day), 青年および学童ではII群 (1.00, 0.74 mg/person/day), 小児ではVI群 (0.83 mg/person/day) であった (Table 2.6.). 未加工食品では全ての年齢層においてVII群から摂取するAIが最も多かった (Table 2.7.).

加工・未加工食品から摂取するAI推計値の合計をFig. 2.2に示した。この結果から、食品からのAI摂取は全ての世代で加工食品の寄与が大きく、未加工食品の影響は限定的であると推察された。また、AIの総摂取量が最も多かった年齢層は青年 (2.84 mg/person/day) であった。これは食品の摂取量そのものが他の年齢層に比べて多いためと考えられたが、体重あたりの摂取量では、小児、学童、青年、成人でそれぞれ0.12, 0.06, 0.05, 0.04 mg/kg bw/dayとなり、小児が最も摂取量が多く、これはVI群の摂取量が相対的に多いためと推察された。本研究の結果では加工食品のI, IIおよびVI群の3群から摂取するAI量が特に多く、I, II, VI群の合計で総摂取量の90%近くを占めていた。また、未加工食品のIV, VII群では、摂取するAIの77~79%, 67~88%が未加工食品からの摂取と考えられたが、摂取量全体に占める未加工食品のIV, VII群の比率は2.1~3.2%および4.1~8.7%であった。これらの結果から、AI摂取量についてのおおまかな推計は加工食品を対象にすることで算出可能と考えられた。

また、今回推計したAI摂取量推計と他の国・地域から報告されているAI摂取量推計と比較した。ベルギーの成人ではAI摂取全体に対して、非アルコール飲料の寄与が最も大きく¹³⁾、これは今回の結果と同様であった (Fig. 2.2)。また、ギリシャのAI摂取量に関する報告では、主なAI摂取源は穀類と野菜で、それぞれ寄与率は46.7, 25.7%とされており¹²⁾、本研究の結果では、II群の穀類が全年代でAI摂取に大きく寄与している点は類似しているが、野菜の比率は低い。その反面ギリシャの報告では菓子類のAI摂取における寄与率は5.3%と低い¹²⁾、本研究ではVI群の寄与率が高い。この理由として本研究では、ケーキドーナツ、バターケーキなどは菓子類としてVI群に分類したが、ギリシャの研究ではこれらの食品を穀類に分類しているためと推察される。そのため、この差は群分類の差と、食品摂取量、食品添加物量それぞれの影響を複合的に受けた結果と考えられる。また、蒸しパンのようなアジア圏を中心とした食品のように食習慣の地域差による

Al摂取源の違いも推定された。実際、中国南部の研究では蒸しパンがAl摂取に対する寄与率が高いことが報告されており、食感を向上させるために膨張剤としてAlが多く添加されているためと考えられる¹⁴⁾。また、本研究で推計したAlの群別摂取量は国内における2001年の調査結果と比較して全体的に低い値を示していたが、Al摂取における各食品群の寄与率は良く一致していた¹⁶⁾。

2.4.4. Al含有量の高い食品群の個別試料中 Al含有量の測定

Al総摂取量に高い寄与率を示した食品群については詳細を調査するため、MB試料 (I, IIおよびVI群) の調製に用いた各製品についてAl含有量を個別に測定した。結果はTable 2.8, 9および10に示した。Al含有量はI群の中ではカレールーが10.7 mg/kgと最も高く、次いでミルクココアの9.69 mg/kg, インスタントコーヒーの6.12 mg/kgだった。II群では、天ぷら粉の222 mg/kgが最も高く、次いで菓子パンの156 mg/kg, あんまんの59.2 mg/kg, 肉まんの57.5 mg/kgだった。VI群では、ケーキドーナツの258 mg/kg, 次いで蒸しパンの172 mg/kg, バターケーキの116 mg/kgだった。Al含有量は同じ品目であっても製品によって大きな差があり、蒸しパンでは0.95~172 mg/kg, ケーキドーナツでは1.53~258 mg/kg, バターケーキでは<LOQ~116 mg/kgと大きな差があった。この傾向は過去の研究と大きく変わらないと考えられた^{13,16)}。また、今回の研究では、あんまんなどはイーストを使っていることからII群に分類し、蒸しパンはイーストを使用していないことからIV群に分類したが、共にAl含有量が高い製品があることから、これらの膨張剤が添加されることの多い食品についての分類が結果に大きく影響を与えるものと推察された。

EUや米国などでは、酸性リン酸アルミニウムナトリウム、アルミノケイ酸ナトリウムは食品添加物としての使用が認可されており^{12,22-25)}、酸性リン酸アルミニウムナトリウムはシリアルなどの製品に膨張剤として使用され、またアルミノケイ酸ナトリウムはケーキミックスや乾燥製品の固結防止剤として使用されている。これらは食パン、ケーキ、クッキー、菓子などの形で摂取され、EUや米国のAl摂取量のうちで高い寄与率を占めている。しかし、日本においては酸性リン酸アルミニウムナトリウム、アルミノケイ酸ナトリウムは、食品添加物として認められていない。代わりに、硫酸アルミニウムアンモニウムおよび硫酸アルミニウムカリウムが使用されており、これらの食品添加物の使用量に制限はない。そのため、今回の結果で高いAl濃度を示したIIおよびVI群の試料は膨張剤として添加された硫酸アルミニウムアンモニウムおよび硫酸アルミニウムカリ

ウムののに起因する可能性が高いと推察される。

さらに、I群で最もAI総摂取量に対する寄与が大きいのは、小児では野菜ジュースの0.02 mg/person/day、学童ではカレーの0.04 mg/person/day、青年、成人では緑茶の0.07mg/person/dayおよび0.16 mg/person/dayだった。II, VI群では、全ての世代において菓子パン、ケーキドーナッツが最も高い寄与率を示した。

2.4.5. 加工食品による AI 高摂取者推計

MB試料のAI含有量測定結果 (2.3.2.) をもとに加工食品から摂取する平均週間AI摂取量の推計を行った。この結果、小児、学童、青年、成人でそれぞれ0.86, 0.45, 0.35および0.30 mg/kg bw/weekと推計された。各年齢層のAIの平均週間摂取量に対するPTWI (2.0 mg/kg bw/week) との比は、それぞれ43.1, 22.4, 17.6, 15.1%だった。

AI週間摂取量のパーセンタイル分析上位の結果 (P_{50} , P_{95} , $P_{97.5}$, P_{99}) をFig.2.3に示した。 P_{95} に位置したのは小児で2.0 mg/kg bw/week、学童では1.0 mg/kg bw/week、青年で0.8 mg/kg bw/week、成人では0.6 mg/kg bw/weekだった。このように、 P_{95} ではPTWIに対して小児で100%、学童では49%、青年では40%、成人では31%となった。このように、小児のAI高摂取者 ($> P_{95}$) ではPTWIを越える可能性が示唆された。小児以外では99パーセンタイルでもPTWI未満であった。

PTWIは保守的な値であり、PTWI比が100%を越えたとしても過度に注意する必要はないが、バランスの良い食習慣を意識することが重要と考えられた。また、AI摂取量の低減には、膨張剤を含むパン類や菓子類などに偏った食習慣を避けること、パン類や菓子類の製造段階で、AIを含む膨張剤の添加量を削減することも有効であると考えられた。

また、食品からの摂取に加えて、調理器具や包装からのAI摂取もあると考えられるが、食品からの摂取に比べて量は微量であると考えられている。¹³⁾ しかし具体的な研究例は少ないため、調理器具などからのAI摂取についてはさらに詳細な研究が必要だと思われる。

2.4. 要約

本章ではMB法を用いて調製した食品試料中のAl含有量を測定し、試料中Al含有量を基にAl摂取量の推計を行った。まず、食品を穀類、魚介類、砂糖・菓子類など7群に分類し、購入した食品を喫食量に応じて混合し、MB試料とした。各群のMB試料のAl含有量を分析した結果、加工食品には0.40~21.73 mg/kgのAlが含まれていた。もっともAl含有量の高かった食品群は砂糖・菓子類だった。また、未加工食品も同様に分析した結果、0.32~0.54 mg/kgのAlを含有していた。また、最も多くAlが検出されたのは野菜などを含む群だった。未加工食品では加工食品に比べてAlの含有量は少ない傾向にあった。さらにこれらの結果を用いて年齢層別（小児（1-6才）、児童（7-14才）、青年（15-19才）、成人（<20才））に、食品から摂取するAl量を推計した。この結果、一週間に加工食品から摂取する平均的なアルミニウムの摂取量は、小児、児童、青年、成人でそれぞれ、0.86, 0.45, 0.35, 0.30 mg/kg bw/weekであった。加工食品から摂取すると推計されたAlは、すべての世代において調味料・嗜好飲料、穀類、砂糖・菓子類の3群が総摂取量の約90%を占めていた。Alの総摂取量が最も多かった年齢層は青年であった、これは食品の摂取量そのものが他の年齢層に比べて多いためと考えられたが、体重あたりの摂取量では、Al含有量の多い砂糖・菓子類の摂取頻度の高い小児で最も摂取量が多い結果となった。しかし、どの年齢層であっても平均的な食習慣において加工食品から摂取すると推計されたAl量はJECFAによって設定されたPTWI (2.0 mg/kg bw/week) を超えることはなかった。また、パーセンタイル分析によってAl高摂取者の分布について検討を行った結果、小児において95パーセンタイル値でPTWIを越えた。このことから、偏った食習慣をする小児のAl摂取量はPTWIを超える可能性が示唆された。他の年齢層では99パーセンタイルにおいてもPTWI未満だった。

2.5. 図表

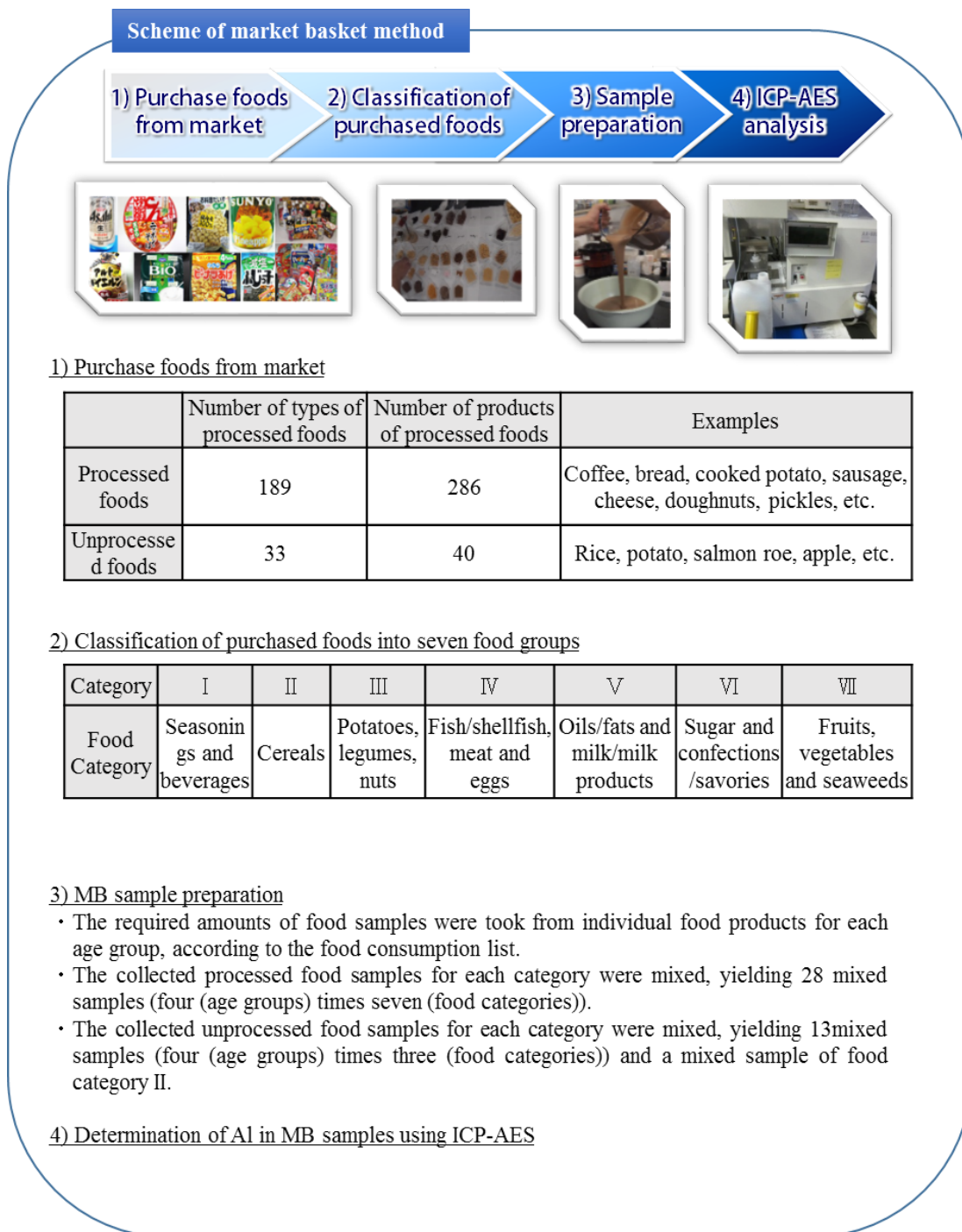


Figure 2.1. Scheme of market basket method for determination of Al concentration in foods

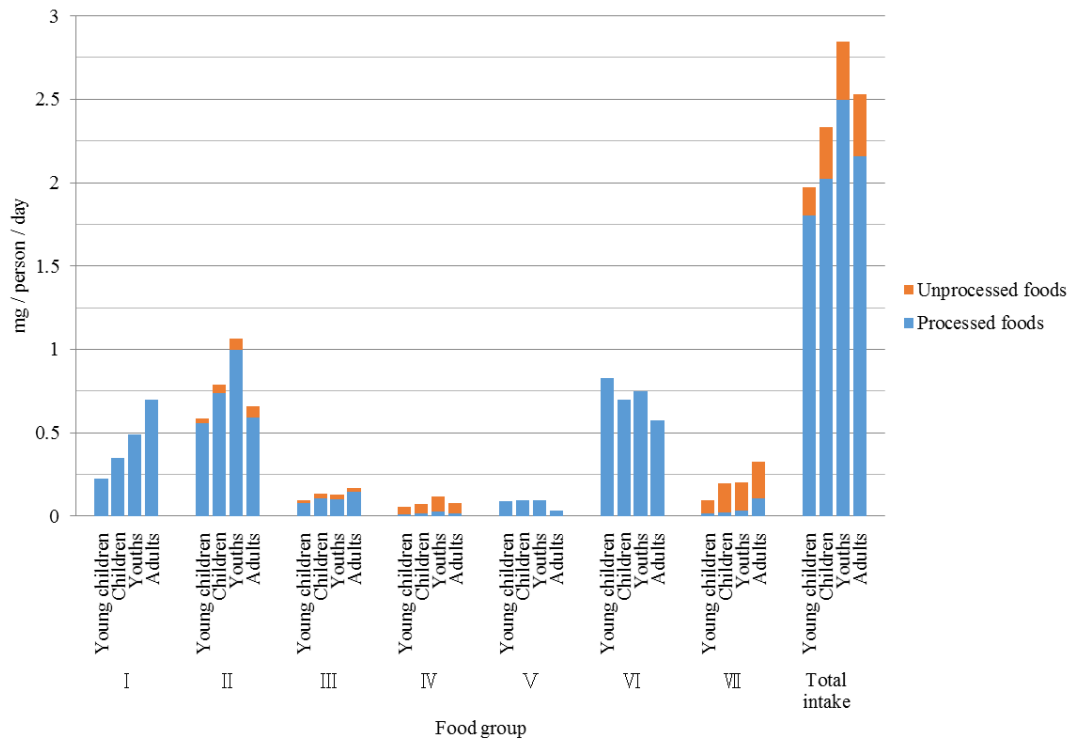


Figure 2.2. Total daily AI intake

The graph indicates the estimated daily intake of AI of a person from each food category (mg/person/day). AI intake from processed foods is indicated in blue, and AI intake from unprocessed foods is indicated in orange. The mean body weight of each age group is 16.0 kg for young children, 36.5 kg for children, 56.5 kg for youths, and 58.6 kg for adults.

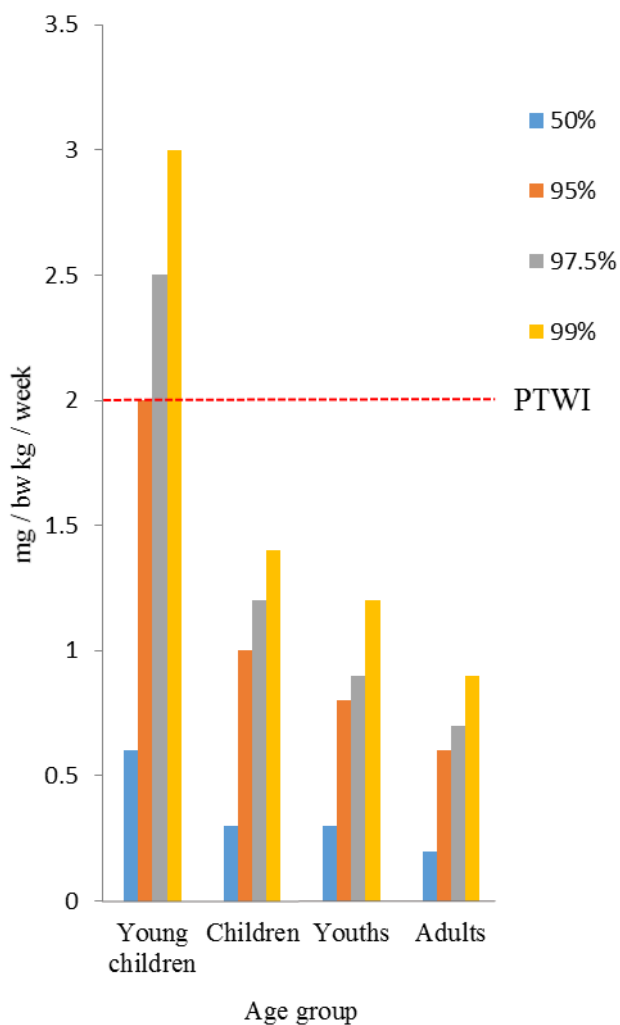


Figure 2.3. Percentile analysis of Al intake from processed foods

Each column indicates the estimated weekly Al intake for each percentile value. The dashed line indicates Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI; 2.0 mg/kg bw/week), established by JECFA in 2011.

Table 2.1. Categories of processed food samples and the usual intakes

Category	Food category	Number of types of processed food	Number of products of processed food	Intakes of each category of processed food (g)			
				Young children	Children	Youth	Adults
I	Seasonings and beverages	41	63	338	461	573	706
II	Cereals	27	40	85	134	130	120
III	Potatoes, legumes, nuts	28	36	67	98	98	127
IV	Fish/shellfish, meat and hens' eggs	17	29	26	36	41	43
V	Oils/fats and milk/milk products	23	37	74	89	77	62
VI	Sugar and confections /savories	27	55	38	41	36	30
VII	Fruits, vegetables and seaweeds	26	26	8	14	13	24
	Total	189	286	636	874	969	1113

The 189 types of processed food (e.g. coffee, rice cake, bacon and biscuit) were classified into seven food categories (purchased 286 processed food products). The intakes of categories of processed foods were based on the usual daily diet in Japan from the Special Survey Study of the Frequency and Level of Food Consumption.

Young children (1-6 year olds), children (7-14), youths (15-19), and adults (older than 20 years).

Table 2.2. Categories of unprocessed food samples and the usual intakes

Category	Food category	Number of types of unprocessed food	Number of products of unprocessed food	Intakes of each category of unprocessed food (g)			
				Young children	Children	Youth	Adults
I	Seasonings and beverages						
II	Cereals	2	4	83	127	178	173
III	Potatoes, legumes, nuts	1	3	43	73	55	52
IV	Fish/shellfish, meat and hens' eggs	14	17	101	163	202	173
V	Oils/fats and milk/milk products						
VI	Sugar and confections /savories						
VII	Fruits, vegetables and seaweeds	16	16	223	342	341	406
	Total	33	40	449	704	776	804

The 33 types of unprocessed foods were classified into four categories (purchased 40 unprocessed food products). The intakes of categories of processed foods were based on All Investigation Report of Daily Intake of Food Additives in 2000.

Young children (1-6 year olds), children (7-14), youths (15-19), and adults (older than 20 years).

Table 2.3. Results of spike and recovery tests for each food group.

Food category ^{*1}	Spiked aluminium amount (mg/kg) ^{*2}	Recovered ^{*3} (%)	Relative standard deviation (%)
I	2	113.2	1.8
II	3	83.0	1.6
III	0.5	101.8	2.9
IV	0.5	106.9	6.6
V	0.5	84.5	7.8
VI	10	101.1	3.5
VII	3	92.8	3.7

*1 All food category samples for the adults age group in the processed foods

*2 The spiked levels of Al were decided as the native levels of Al in each category of processed foods.

*3 $(\text{Determined levels of Al from spiked sample} - \text{determined levels of Al from blank sample}) / \text{spiked levels of Al} \times 100$. Mean (n=3)

Table 2.4. Al concentrations in processed foods (mg/kg).

Age group	Food category						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
	Seasonings and beverages	Cereals	Potatoes, legumes, nuts	Fish/shellfish, meat and eggs	Oils/fats and milk/milk products	Sugar and confections/ savories	Fruits, vegetables and seaweeds
Young children	0.67	6.57	1.13	0.46	1.21	21.73	1.56
Children	0.76	5.49	1.07	0.41	1.09	17.03	1.68
Youths	0.86	7.68	1.05	0.66	1.24	20.57	2.35
Adults	0.99	4.93	1.13	0.40	0.49	19.12	4.45

*Young children: 1-6 year olds, Children: 7-14 year olds, Youths: 15-19 year olds, Adults: larger than 20 year olds.

Table 2.5. Al concentrations in unprocessed foods (mg/kg).

Age group	Food category			
	II Cereals	III Potatoes, legumes, nuts	IV Fish/shellfis h, meat and eggs	VII Fruits, vegetables and seaweeds
Young children	0.32	0.43	0.40	0.37
Children	0.43	0.43	0.33	0.50
Youths	0.36	0.43	0.44	0.50
Adults	0.39	0.43	0.33	0.54

*Young children: 1-6 year olds, Children: 7-14 year olds, Youths: 15-19 year olds, Adults: larger than 20 year olds.

Table 2.6. Daily AI intake from processed foods (mg/person/day).

Age group	Food category						
	I Seasonings and beverages	II Cereals	III Potatoes, legumes, nuts	IV Fish/shellfish, meat and eggs	V Oils/fats and milk/milk products	VI Sugar and confections/ savories	VII Fruits, vegetables and seaweeds
Young children	0.23	0.56	0.08	0.01	0.09	0.83	0.01
Children	0.35	0.74	0.11	0.02	0.10	0.70	0.02
Youths	0.49	1.00	0.10	0.03	0.10	0.75	0.03
Adults	0.70	0.59	0.14	0.02	0.03	0.57	0.11

*Young children: 1-6 year olds, Children: 7-14 year olds, Youths: 15-19 year olds, Adults: larger than 20 year olds.

Table 2.7. Daily AI intake from unprocessed foods (mg /person/day).

Age group	Food category			
	II Cereals	III Potatoes, legumes, nuts	IV Fish/shellfis h, meat and eggs	VII Fruits, vegetables and seaweeds
Young children	0.03	0.02	0.04	0.08
Children	0.05	0.03	0.06	0.17
Youths	0.07	0.02	0.09	0.17
Adults	0.07	0.02	0.06	0.22

*Young children: 1-6 year olds, Children: 7-14 year olds, Youths: 15-19 year olds, Adults: larger than 20 year olds.

Table 2.8. The levels of Al in the high Al content food category I and the daily dietary Al intake for all age groups

	Foods	Quantitative value (mg/kg)	Intake (mg/person/day)			
			Young children	Children	Youths	Adults
1	Vegetable juice-1	3.180 ± 0.180	0.024	0.017	0.021	0.014
2	Vegetable Juice-2	2.000 ± 0.109	0.001	0.001	0.001	0.002
3	Tomato juice	1.560 ± 0.083	0.001	0.000	0.002	0.002
4	Carrot juice	-	-	-	-	-
5	Orange juice	-	-	-	-	-
6	Apple juice	-	-	-	-	-
7	Reconstituted concentrated orange juice	0.568 ± 0.010	0.003	0.003	0.004	0.001
8	Reconstituted concentrated apple juice	0.633 ± 0.030	0.004	0.002	0.002	0.001
9	Orange juice (30%)	0.381 ± 0.054	0.002	0.002	0.001	0.000
10	Ordinary milk-solids, nonfat lactic acid bacteria beverages	-	-	-	-	-
11	Pasteurized after fermentation lactic acid bacteria beverages	-	-	-	-	-
12	Low milk-solids, nonfat lactic acid bacteria beverages	-	-	-	-	-
13	Sake	-	-	-	-	-
14	Pale beer-1	-	-	-	-	-
15	Pale beer-2	-	-	-	-	-
16	Pale beer-3	-	-	-	-	-
17	Low-malt beer-1	-	-	-	-	-
18	Low-malt beer-2	-	-	-	-	-
19	Low-malt beer-3	-	-	-	-	-
20	Shochu-1 (Japanese distilled beverage)	-	-	-	-	-
21	Shochu-2 (Japanese distilled beverage)	-	-	-	-	-
22	Shochu-3 (Japanese distilled beverage)	-	-	-	-	-
23	Red wine	-	-	-	-	-
24	White wine	0.697 ± 0.056	0.000	0.000	0.000	0.001
25	Whisky	-	-	-	-	-
26	Green tea infusion-1	0.886 ± 0.074	0.009	0.015	0.034	0.080
27	Green tea infusion-2	1.74 ± 0.046	0.017	0.030	0.067	0.158
28	Green tea infusion-3	0.857 ± 0.075	0.009	0.015	0.033	0.078

29	Oolong tea infusion-1	3.34 ± 0.037	0.013	0.025	0.061	0.047
30	Oolong tea infusion-2	1.90 ± 0.180	0.008	0.014	0.035	0.027
31	Oolong tea infusion-3	2.16 ± 0.023	0.009	0.016	0.039	0.030
32	Black tea infusion-1	2.19 ± 0.121	0.004	0.013	0.022	0.017
33	Black tea infusion-2	1.87 ± 0.084	0.003	0.011	0.019	0.014
34	Black tea infusion-3	1.63 ± 0.015	0.003	0.009	0.016	0.012
35	Coffee infusion-1	0.37 ± 0.039	0.000	0.000	0.001	0.002
36	Coffee infusion-2	0.367 ± 0.043	0.000	0.000	0.001	0.002
37	Coffee infusion-3	-	-	-	-	-
38	Soluble coffee powder	6.12 ± 0.128	-	0.000	0.001	0.003
39	Milk cocoa	9.69 ± 0.215	0.006	0.007	0.004	0.002
40	Roasted barley tea infusion-1	-	-	-	-	-
41	Roasted barley tea infusion-2	-	-	-	-	-
42	Roasted barley tea infusion-3	-	-	-	-	-
43	Sports drink-1	0.336 ± 0.033	0.002	0.006	0.005	0.001
44	Sports drink-2	-	-	-	-	-
45	Sports drink-3	-	-	-	-	-
46	Soda	-	-	-	-	-
47	Cola drink	0.663 ± 0.033	0.001	0.005	0.007	0.002
48	Fruit flavored and colored drink	-	-	-	-	-
49	Worcestershire sauce	1.15 ± 0.109	0.001	0.003	0.003	0.002
50	Soy sauce-1	0.862 ± 0.051	0.002	0.003	0.004	0.005
51	Soy sauce-2	0.626 ± 0.020	0.001	0.002	0.003	0.004
52	Soy sauce-3	2.90 ± 0.028	0.007	0.010	0.012	0.017
53	Soup stock-1	0.610 ± 0.013	0.007	0.007	0.009	0.010
54	Soup stock-2	-	-	-	-	-
55	Soup stock-3	1.50 ± 0.010	0.016	0.016	0.023	0.026
56	Straight mentsuyu (seasoning soy sauce)	-	-	-	-	-
57	Grain vinegar	-	-	-	-	-
58	Hon-mirin (sweet rice wine)	-	-	-	-	-
59	Curry roux	10.7 ± 0.306	0.021	0.040	0.029	0.023
60	Ketchup	4.08 ± 0.313	0.010	0.014	0.014	0.007
61	Triple strong mentsuyu (seasoning soy sauce)	-	-	-	-	-
62	Ponzu (citrus based sauce)	0.488 ± 0.016	0.000	0.001	0.001	0.001
63	Oil free Japanese style dressing	-	-	-	-	-

Table 2.9. The levels of Al in the high Al content food category II and the daily dietary Al intake for all age groups

	Foods	Quantitative value (mg/kg)	Intake (mg/person/day)			
			Young children	Children	Youths	Adults
1	Rice cake	-	-	-	-	-
2	Sekihan (sticky rice steamed with azuki red beans)	-	-	-	-	-
3	Rice ball	-	-	-	-	-
4	Rice vermicelli	1.81 ± 0.111	0.000	0.001	0.000	0.000
5	Roasted rice ball	-	-	-	-	-
6	Premixed flour for hot cake	0.99 ± 0.096	0.002	0.001	0.000	0.000
7	Tempura flour	222 ± 2.344	0.042	0.033	0.080	0.083
8	White table bread-1	0.670 ± 0.019	0.003	0.005	0.006	0.005
9	White table bread-2	0.628 ± 0.053	0.003	0.005	0.005	0.005
10	White table bread-3	0.779 ± 0.023	0.004	0.006	0.006	0.006
11	Other bread-1	0.84 ± 0.045	0.002	0.004	0.003	0.001
12	Other bread-2	-	-	-	-	-
13	Other bread-3	1.02 ± 0.100	0.003	0.005	0.004	0.002
14	Sweetened -1	27.2 ± 0.329	0.061	0.073	0.109	0.053
15	Sweetened -2	156 ± 2.325	0.352	0.419	0.624	0.302
16	Udon-1 (Japanese wheat flour noodle)	-	-	-	-	-
17	Udon-2 (Japanese wheat flour noodle)	-	-	-	-	-
18	Udon-3 (Japanese wheat flour noodle)	-	-	-	-	-
19	Chinese noodles-1	1.12 ± 0.034	0.005	0.009	0.008	0.007
20	Chinese noodles-2	-	-	-	-	-
21	Chinese noodles-3	0.988 ± 0.130	0.004	0.008	0.007	0.007
22	Instant noodle	1.84 ± 0.160	0.002	0.004	0.005	0.004
23	Chinese syle instant cup noodle	1.50 ± 0.049	0.001	0.001	0.002	0.001
24	Japanese style instant cup noodle	39.7 ± 2.651	0.008	0.013	0.022	0.014
25	Chow mein type instant noodle	2.20 ± 0.159	0.000	0.002	0.002	0.001
26	Instant macaroni and spaghetti-1	0.493 ± 0.050	0.002	0.002	0.003	0.002
27	Instant macaroni and spaghetti-2	-	-	-	-	-
28	Instant macaroni and spaghetti-3	-	-	-	-	-
29	Jiaozi	1.44 ± 0.097	0.003	0.007	0.005	0.004
30	Bread crumbs	0.421 ± 0.048	0.000	0.001	0.001	0.000

31	Pork dumpling	-	-	-	-	-
32	Pizza	0.568 ± 0.011	0.000	0.001	0.000	0.000
33	Kanze-fu, Komachi-fu (wheat gluten)	2.07 ± 0.024	0.000	0.000	0.000	0.001
34	Buckwheat-1	4.26 ± 0.057	0.006	0.006	0.007	0.014
35	Buckwheat-2	1.02 ± 0.027	0.001	0.001	0.002	0.003
36	Buckwheat-3	0.749 ± 0.062	0.001	0.001	0.001	0.002
37	Cornflakes	-	-	-	-	-
38	Millets and beans	3.08 ± 0.082	0.002	0.006	0.001	0.005
39	Chinese steamed bun with meat filling	57.5 ± 1.01	0.054	0.110	0.077	0.038
40	Chinese steamed bun with a bean-jam filling	59.2 ± 0.380	0.015	0.008	0.015	0.007

Table 2.10. The levels of Al in the high Al content food category VI and the daily dietary Al intake for all age groups

	Foods	Quantitative value (mg/kg)	Intake (mg/person/day)			
			Young children	Children	Youths	Adults
1	Honey	0.385 ± 0.017	0.000	0.000	0.000	0.000
2	Strawberry jam	0.394 ± 0.050	0.000	0.000	0.000	0.000
3	Blueberry jam	0.641 ± 0.015	0.000	0.000	0.000	0.000
4	Orange marmalade	-	-	-	-	-
5	Japanese steamed bun-1	0.947 ± 0.072	0.000	0.000	0.000	0.001
6	Japanese steamed bun-2	172 ± 5.30	0.016	0.048	0.038	0.151
7	Japanese steamed bun-3	69.2 ± 0.467	0.007	0.019	0.015	0.061
8	Rice cracker-1	-	-	-	-	-
9	Rice cracker-2	6.51 ± 0.177	0.006	0.005	0.003	0.005
10	Rice cracker-3	-	-	-	-	-
11	Castella (Japanese sponge cake)	-	-	-	-	-
12	Daifuku-1 (sweet rice cake)	0.821 ± 0.034	0.000	0.000	0.000	0.000
13	Daifuku-2 (sweet rice cake)	0.462 ± 0.017	0.000	0.000	0.000	0.000
14	Daifuku-3 (sweet rice cake)	0.410 ± 0.023	0.000	0.000	0.000	0.000
15	Dango (sweet dumplings)	-	-	-	-	-
16	Dorayaki-1 (pancake sandwich with bean paste)	0.828 ± 0.084	0.000	0.001	0.000	0.001
17	Dorayaki-2 (pancake sandwich with bean paste)	0.952 ± 0.057	0.001	0.001	0.000	0.001
18	Dorayaki-3 (pancake sandwich with bean paste)	1.25 ± 0.028	0.001	0.001	0.001	0.001
19	Arare-1 (bite-sized rice cracker)	-	-	-	-	-
20	Arare-2 (bite-sized rice cracker)	-	-	-	-	-
21	Arare-3 (bite-sized rice cracker)	1.97 ± 0.215	0.000	0.001	0.000	0.001
22	Neri-yokan (bean paste jelly)	1.88 ± 0.014	0.000	0.000	0.000	0.002
23	Short cake-1	59.2 ± 0.684	0.040	0.051	0.058	0.054
24	Short cake-2	-	-	-	-	-
25	Short cake-3	-	-	-	-	-
26	Custard cream puffs-1	-	-	-	-	-
27	Custard cream puffs-2	-	-	-	-	-
28	Custard cream puffs-3	-	-	-	-	-

29	Cake doughnuts-1	66.1 ± 0.519	0.077	0.056	0.059	0.028
30	Cake doughnuts-2	258 ± 4.788	0.301	0.219	0.232	0.111
31	Cake doughnuts-3	1.53 ± 0.132	0.002	0.001	0.001	0.001
32	Butter cake-1	2.70 ± 0.176	0.001	0.001	0.001	0.001
33	Butter cake-2	116 ± 0.351	0.044	0.059	0.058	0.051
34	Butter cake-3	-	-	-	-	-
35	Biscuits-1	-	-	-	-	-
36	Biscuits-2	0.382 ± 0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
37	Biscuits-3	0.850 ± 0.041	0.001	0.001	0.001	0.000
38	Puff pie	-	-	-	-	-
39	Oil-sprayed cracker	-	-	-	-	-
40	Pretzels	-	-	-	-	-
41	Candy-1	-	-	-	-	-
42	Candy-2	-	-	-	-	-
43	Candy-3	0.489 ± 0.020	0.000	0.000	0.000	0.000
44	Custard pudding-1	-	-	-	-	-
45	Custard pudding-2	-	-	-	-	-
46	Custard pudding-3	-	-	-	-	-
47	Orange jelly-1	-	-	-	-	-
48	Orange jelly-2	-	-	-	-	-
49	Orange jelly-3	-	-	-	-	-
50	Milk chocolate-1	6.13 ± 0.187	0.003	0.005	0.005	0.028
51	Milk chocolate-2	4.36 ± 0.251	0.002	0.004	0.003	0.020
52	Milk chocolate-3	18.2 ± 0.191	0.010	0.016	0.014	0.082
53	Potato chips	-	-	-	-	-
54	Chocolate biscuits	8.52 ± 0.640	0.007	0.014	0.012	0.003
55	Coffee jelly	-	-	-	-	-

2.6. 参考文献

- 1) EFSA, *Eur. Food Saf. Auth. J.*, **754**, 1–34 (2008).
- 2) Peto M. V, *Rejuvenation Res.*, **13**, 589–98 (2010).
- 3) She Y., Wang N., Chen C., Zhu Y., Xia S., Hu C., Li Y., *Biol. Trace Elem. Res.*, **147**, 246–50 (2012).
- 4) Nordberg G. F., Fowler B. A., Nordberg M., Friberg L. T., “Handbook on the Toxicology of Metals,” 3rd ed., Academic Pres, 2007.
- 5) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Evaluation of certain food additives and contaminants, 1989.
- 6) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, **940**, 33–44 (2007).
- 7) Poirier J., Semple H., Davies J., Lapointe R., Dziwenka M., Hiltz M., Mujibi D., *Neuroscience*, **193**, 338–362 (2011).
- 8) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, 7–17 (2011)
- 9) Pennington J., *Food Addit. Contam.*, **5(2)**, 161–232 (1988).
- 10) Greger J. L., “Dietary and Other Sources of Aluminium Intake,” 1st ed., ed. by Chadwick, Derek J., Whelan, Julie, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 1992.
- 11) Pennington J. A., Schoen S. A., *Food Addit. Contam.*, **12**, 119–28 (1995).
- 12) Bratakos S. M., Lazou A. E., Bratakos M. S., Lazos E. S., *Food Addit. Contam. Part B*, **5**, 33–44 (2012).
- 13) Fekete V., Vandevijvere S., *Food Chem.*, **55**, 602–608 (2013).
- 14) Jiang Q., Wang J., Li M., Liang X., Dai G., Hu Z., Wen J., Huang Q., Zhang Y., *Food Addit. Contam.*, **PartA**, 37–41 (2013).
- 15) Ishiwata H., Yamada T., Yoshiike N., Nishijima M., Kawamoto A., Uyama Y., *Eur. Food Res. Technol.*, **215**, 367–374 (2002).
- 16) Matsuda R., Sasaki K., Oshiro Z., Toyoda M., *Food Hyg. Saf. Sci. (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, **42**, 18–23 (2001).
- 17) Matsuda, R., *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **130**, 21–30 (2012)
- 18) Müller M., Anke M., Illing-Günther H., *Food Chem.*, **61**, 419–428 (1998).

- 19) Wang Y., Lu C., Xiao Z., Wang G., Kuan S. S., Rigsby E. J., *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 724–726 (1991).
- 20) Soliman K., Zikovsky L., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **242**, 807–809 (1999).
- 21) Cabrera C., Lloris F., Giménez R., Olalla M., López M. C., *Sci. Total Environ.*, **308**, 1–14 (2003).
- 22) Jorhem L., Haegglund G., *Zeitschrift für Leb. und Forsch.*, **194**, 38–42 (1992).
- 23) Yang Q., Penninckx W., Smeyers-Verbeke J., *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1948–1953 (1994).
- 24) Leblanc J., Guérin T., Noël L., Calamassi-Tran G., Volatier J., Verger P., *Food Addit. Contam.*, **22(7)**, 624–641 (2005).
- 25) Saiyed S. M., Yokel R. a, *Food Addit. Contam.*, **22**, 234–44 (2005).

第3章 加工食品中の銅クロロフィル (CuCh) および銅クロロフィリンナトリウム (CuCh-Na) 分析法の開発

3.1. 序論

銅クロロフィル (CuCh) 及び銅クロロフィリンナトリウム (CuCh-Na) は、植物に存在する天然のクロロフィルから誘導される緑色の着色料である。CuCh はクロロフィルの配位するマグネシウムイオンを化学処理により銅イオンに置換することで得られ、CuCh-Na は CuCh の疎水性のフィトール鎖を加水分解し、水溶性のナトリウム塩 (もしくはカリウム塩) とすることで、着色料としての利便性を向上させている。CuCh/CuCh-Na は天然のクロロフィルに比べて光や熱に対する安定性が高いという特徴から、長期保存や加工による退色が少なく鮮やかな緑色を保つため、世界的に食品添加物として加工食品の着色に利用されている。

CuCh/CuCh-Na の食品添加物としての安全性は JECFA によって評価されており、一日摂取許容量 (ADI: acceptable daily intake) が CuCh (0~15 mg/kg bw/day) および CuCh-Na (0~15 mg/kg bw/day) にそれぞれ設定されている^{1,2)}。この評価に基づいて、Codex Alimentarius Commission は最大使用量 (maximum use levels (MULs)) をチーズやマスタード、菓子など 57 の加工食品について設定しており、この MULs は加工食品によって CuCh/CuCh-Na 含量として 15~700 mg/kg、もしくは銅として 6~100 mg/kg と、幅広い濃度で設定されている³⁾。しかしながら、国や地域単位での規制はそれぞれ異なっており、EU ではチーズや酢、ジャムなどの限られた食品にのみ必要最低限の使用 (*quantum satis* use) を認めている。また、日本において MULs は添加する CuCh/CuCh-Na の銅含量として設定されており、EU と同様に限られた食品にのみ添加が認められている。Table 3.1. に示したように、日本では CuCh は 7 種、CuCh-Na は 9 種の食品に対して MULs が設定されているが、加工食品ごとに銅として 0.4~150 mg/kg と大きく幅のある値となっている。このように CuCh/CuCh-Na はそれぞれ異なる加工食品に対して異なる MULs が設定されているため、ともにクロロフィル様の緑色着色料であるものの、適正使用の監視には加工食品中の CuCh/CuCh-Na を個別に定量する必要がある。そのため、CuCh/CuCh-Na を効率よく分離定量可能な、加工食品中分析法が必要とされている。

CuCh/CuCh-Na 分析法についてはすでいくつかの報告があり、主に以下の 2 つのア

プローチに大別される⁵⁻⁷⁾. 1つ目は CuCh/CuCh-Na の吸光を指標に、高速液体クロマトグラフ-フォトダイオードアレイ検出器 (HPLC-PDA) などの光学的分析により定量する方法、2つめは CuCh/CuCh-Na の配位する銅を定量指標として原子吸光光度計 (AAS) によって銅含有量を測定し、間接的に定量する方法である。このうち、光学的分析法は高感度であり定性に優れるが、CuCh/CuCh-Na は copper chlorin e6, copper rhodin g7, copper chlorin e4 (Fig. 3.1) などの異性体の混合物として存在しており、光学的分析法による厳密な定量を行うためにはすべての異性体に対して純度の高い標準品が必要となる。しかし、すべての異性体について標準品が市販されているわけではなく、その都度精製により入手する必要がある。さらに、光学的分析法ではこれらの異性体および天然のクロロフィルを十分にクロマトグラフィーによって分離する必要があるが、分子的な性状の似通った異性体を完全に分離するのは容易ではない^{8,10)}。

対照的に、AAS による銅を定量指標とした分析法で必要な標準物質は銅標準品のみであり、高純度の標準品の入手が容易である。また、異性体や天然のクロロフィルによる分析上の妨害が無いことから、精度よく様々な加工食品に応用可能であると考えられる。銅を定量指標とした分析法の報告として、Ushiyama et al.¹¹⁾は疎水性の CuCh と親水性の CuCh-Na を加工食品中から溶媒抽出によって一括抽出を行い、液・液分配によって分離した後それぞれ精製し、定量を行っている。この分析法は食品中の食品添加物分析法(いわゆる公定法)に採用されており、加工食品中の CuCh/CuCh-Na 分析法として一般に使用されている。しかし、この分析法では精製過程で有害溶媒であるクロロホルムを用いていることから、現在の安全基準の観点から考えると日常業務として使用する分析法としては望ましくない。また、試料調製法も煩雑である。すでに、Tsunoda et al. はこの手法を改良し、分析法の簡素化と、クロロホルムを使用しない分析法を報告している⁵⁾。しかし、この分析法は天然の銅を排除する工程が存在せず、また、わらび加工品に対する分析法の性能評価しか行われていないことから、他の加工食品に含まれる CuCh/CuCh-Na 分析に応用可能か不明である。また、CuCh と CuCh-Na を酢酸エチル層と水酸化ナトリウム水溶液層にそれぞれ液・液分配する際の分離が不十分な場合があることが報告されている¹²⁾。

そこで本章では、信頼性が高く有害性の疑いのある溶媒を使用しない加工食品中の CuCh/CuCh-Na 分析方法の開発を目的として研究を行った。今回開発した分析法は、疎水性の CuCh と親水性の CuCh-Na を有害性の低い溶媒で一括抽出し、改良した液・液分配

によって分離した後にそれぞれ精製し、AASによって銅含有量を指標とした CuCh/CuCh-Na の定量を行った。次いで、日本の規制において CuCh/CuCh-Na の添加が認められている加工食品を用い、試験法の性能評価を行った。さらに、市販食品に本分析法を適用し、実際の加工食品に適用可能であることを確認した。

3.2. 方法

3.2.1. 試薬および試液

分析化学用の CuCh は 日本葉緑素 (株) から入手した. 2 種の食品添加の CuCh-Na は タマ化学工業 (株) および 日本葉緑素 (株) から入手した. 6 種の分析化学用 CuCh-Na は 関東化学 (株), 東京化成工業 (株), ナカライテスク (株), 和光純薬 (株), 岸田化学 (株), Sigma-Aldrich 社から購入した. また, これらの CuCh/CuCh-Na は日本の食品添加物としての製品規格を満たしていた. 銅標準品 (1,000 µg/mL) は SCP science 社から購入した. 他の溶媒などは全て関東化学の特級品を使用した. また, 試薬の調製には Millipore 社製の Milli-Q Gradient system によって製造された超純水を用いた.

3.2.2. HPLC 条件

HPLC は (株) 島津製作所製の LC10A HPLC システムに SPD-10AV UV/VIS 検出器を接続して用いた. 分析用カラムは GL サイエンス社製の Inertsil ODS-3V (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 µm) を用いた. 移動相には 1.0 mmol/L 酢酸アンモニウム/メタノールを用いた (A 液 80:20, B 液 20:80). グラジエント分析条件は (A:B) : 0 min (10:0) → 15 min (0:10) → 30 min (0:10) で行った. その他の条件として, 流速は 1 mL, 注入量は 10 µL, カラムオープン温度は 40°C, 測定波長は 405 nm に設定した.

3.2.3. 試料

全ての試料は東京都内のスーパーで購入した. 購入した食品は, こんぶ, 野沢菜漬け, ワサビ漬け, シロップ, チューインガム, さつま揚げ, キャンディー, ホホワイトチョコレート, ヨモギ大福の 9 食品. この中で野沢菜漬けを CuCh/CuCh-Na 分析法検討のモデル食品とし, CuCh/CuCh-Na それぞれ 10 mg/kg を添加した試料を調製し, 抽出法の検討などに用いた. また, 添加回収試験に試料として用いた食品は銅葉緑素の使成分表示が無いもの^a, 市場食品からの分析では表示のあるものを購入し使用した.

^a 日本における食品成分表示では「銅葉緑素」の表記は CuCh および CuCh-Na いずれにも使用される.

3.2.4. 原子吸光光度計測定条件

AAS は (株) 島津製作所製 AA-6800 原子吸光光度計を用いた。AAS 条件は、フレーム方式 (空気/アセチレン混合ガス, 流量 1.8 L/min), 注入時間 5 sec, 銅中空陰極ランプ, 分析線波長 324.8 nm で行った。

3.2.5. CuCh/CuCh-Na 製品中の銅含量の定量

CuCh/CuCh-Na は 60% HNO₃ と HCl による湿式灰化を行い, 灰化試料は 50 mL の 0.1 mol/L HNO₃ に溶解し, AAS によって銅含量を測定した。

3.2.6. 試料調製

試料 5~20 g を 100 mL バイアルに量り採り, 1 mol/L HCl 5 mL 及び 1-ブタノール 20 mL を加えて 5 分間ホモジナイザー (Ultra turrax T25, IKA 社製) を用いてホモジナイズした。さらに酢酸エチル 30 mL を加えて 5 分間ホモジナイズ後, 遠心分離機 (H80-R, (株) コクサン社製) を用いて 3,000 g で 5 分間遠心分離し, 酢酸エチル・1-ブタノール層を分液ロート (分液ロート A とする) に採取した。残渣に対して同様の操作を 2 回繰り返す, 分液ロート A にあわせた。分液ロート A に石油エーテル 100 mL を加えて穏やかに混和し, さらに水 30 mL を加えて振とう機 (SR-2w, タイテック社製) を用いて振とうし, 下層の水を廃棄した。続いて分液ロート A に水 50 mL を加え, さらに 1.7 mol/L 水酸化ナトリウムを 5 mL 加え 5 分間激しく振とう抽出し, 静置分離後, 下層のアルカリ水層を別の分液ロート (分液ロート B とする) に回収した。さらに同様の操作を 2 回繰り返す, アルカリ水層を分液ロート B にあわせた。分液ロート B に 1 mol/L HCl 15 mL 及び 1-ブタノール 100 mL を加えて軽く振とうし, 下層のアルカリ水層を廃棄して有機溶媒層を得た。有機溶媒層をなす型フラスコに移し, 1~2 mL になる程度まで減圧濃縮した。残渣はメタノールで洗い込みビーカーに移して蒸発乾固し, H₂SO₄ 5 mL を加えて炭化した後, 電気マッフル炉へ入れて 480°C で灰が得られるまで灰化した。灰化後, これに HCl 5 mL を加え蒸発乾固するまでホットプレート上で加熱した後, 0.1 mol/L HNO₃ で洗い込み全量を 50 mL とし CuCh-Na 試験液とした。また, 分液ロート A に残った抽出溶媒に無水硫酸ナトリウムを加え脱水した後, 減圧濃縮し, メタノール添加以降の操作をロート B の試料と同様に行い, CuCh 試験液とした。

3.3. 結果および考察

3.3.1. 分析化学用および食品添加物グレードの CuCh/CuCh-Na 銅含有量の測定

国内の規制では CuCh/CuCh-Na の MULs は食品に添加する銅の重量として規制されており、そのため食品添加物規格には CuCh/CuCh-Na の銅含有量も規定されている。そこで添加回収試験に用いる試薬を選定するため、分析化学用および食品添加物の CuCh/CuCh-Na の銅含量を AAS によって分析した。この結果、Table 3.2.に示したように、分析化学用 CuCh から 6.3 mg/g の銅を検出した。また、2種の食品添加物グレードの CuCh-Na からそれぞれ 38.3, 44.3 mg/g の銅を検出した。さらに、6種の分析化学用 CuCh-Na からは 38.8~45.8 mg/g の銅を検出した。この結果、今回の分析に使用した CuCh/CuCh-Na の銅含有量はすべて日本における食品添加物の規格に適合していること示された。

CuCh/CuCh-Na に配位する銅は、理論値では分子量の 6.7%および 9.2%を占める¹³⁾。しかし、今回の結果では CuCh から検出された銅は分子量比の 0.6%、CuCh-Na から検出された銅は分子量比の平均が約 4%であった。同様の報告はすでになされており、Hidaka et al.は CuCh/CuCh-Na から分子量比 0.3~0.8% および 3.4~4.5%の銅を検出したと報告しており、この値は今回の結果とよく一致していた¹³⁾。これは、銅イオンを配位していない分解産物などが多く混入しているためと考えられた。

次に、CuCh-Na の純度を検討するため、2種の食品添加物グレードの CuCh-Na (A, B)、6種の分析化学用 CuCh-Na (C~H) について、HPLC-UV/Vis による分析を行った (Fig.3.2)。この結果、クロマトグラム上に 3つの主なピークが確認され、過去の文献⁷⁾との比較からそれぞれ、Cu (II) isochlorin e4, Cu (I) isochlorin p6, Cu (II) isochlorin e6 であると推定された。また、C の分析化学用 CuCh-Na (和光純薬) が最も夾雑ピークが少なく銅含量も多かったことから、C を本研究における基準品として用いた。また、以降の研究では CuCh/CuCh-Na の重量は全て銅重量として示している。

3.3.2. 試料調製法の開発

初めに、加工食品中の CuCh/CuCh-Na 抽出に用いる溶媒の検討を行った。塩酸酸性下で 1-ブタノールと酢酸エチルを用いて、疎水性の CuCh と親水性の CuCh-Na の一括抽出法の検討を行った。この結果、食品試料からの脱色を確認した。また、この抽出溶媒は天然のクロロフィルも抽出されるため、脱色が目視で確認できることから、抽出が十分で

あるか簡便に確認が可能であった。

次に、CuCh/CuCh-Naを一括抽出した溶媒から、CuCh-Naをアルカリ水層に転溶し、精製する方法について検討を行った。過去の研究では類似の操作において、抽出溶液に1%アンモニア水を加え使用していたが^{5,6)}、ストック溶液の安定性と取り扱いの簡易さから水酸化ナトリウムに変更した。分液ロートにCuCh-Naを含有する抽出溶媒と水酸化ナトリウム水溶液を加え攪拌し、静置して液・液分配を行った。次いで、アルカリ水層と有機溶媒層をそれぞれ分析し、銅含量を測定した。この結果、Fig.3.3に示したようにアルカリ水層からは57.0%のCuCh-Naしか観察されず、26.5%は有機溶媒層に含まれたままだった。このように、公定法と同様の液・液分配を行った際に、分離が不完全になる場合があることはすでに報告がある。Kunii et al.は公定法の液・液分配効率についてを検討した結果、水溶性のCuCh-Naが有機溶媒層に40%、脂溶性のCuChにいたっては70%近くがアルカリ水層に移行したと報告しており¹²⁾、今回の結果と同様の問題が生じたものと考えられた。Kunii et al.は、CuCh/CuCh-Naが界面活性作用を有するため、本来的に液・液分配による分離の難易度が高いこと、水やアルコールの混入による溶媒組成の変化による影響を指摘している。また、有機溶媒相に含まれる酢酸エチルは3%程度(v/v)の水を溶解することが知られており、有機溶媒層に含まれる水にCuCh-Naが溶解することが不完全な分配の一因と考えられた。そこで、有機溶媒層の疎水性を上げることで混入した水を除去し、分配効率の改善を図った。疎水性を上げるため、CuCh-Naを含む抽出溶媒に石油エーテルを加え、分離した水層を除去した後に、水酸化ナトリウム水溶液を加えて混合し、液・液分配を行った。その結果Fig.3.3に示したように84.2%のCuCh-Naがアルカリ水層から検出された。このように、石油エーテルの添加による抽出溶媒からの水の除去は、CuCh-Naのアルカリ水層への転溶に効果的な手法であることが示された。

次に、試料の灰化条件について検討を行った。CuCh-Na(10 mg)をマッフル炉で500, 480 および 450°Cで灰化し、灰化試料中の銅含量を測定した。この結果、各温度での検出量はそれぞれ77.4, 87.3 および 67.9%であった。この結果から、灰化温度は480°Cとした。上述の検討結果を総合して、加工食品中のCuCh/CuCh-Naを一括抽出し、平行分析を行う分析法を開発した。全体のスキームをFig.3.4に示した。

3.3.3. 検出下限、定量下限および検量線の直線性の検討

分析法の感度および直線性についての検討を行った。LODは0.5 mg/Lの銅標準品を20

回併行分析した結果の標準偏差に 3.3 を乗じた値とし、LOQ は LOD に 3 を乗じた値とした。検討の結果 LOQ は 0.075 mg/L と考えられ、また、5 g の試料を用いた場合、試料中濃度として LOQ は 0.75 mg/kg であった。ただし、今回の研究において 10 g の試料を用いたヨモギ大福、ホワイトチョコレートに関しては、LOQ は 0.375 mg/kg であった。

銅標準品による検量線は 0.075~3 mg/L の範囲の 6 点で作成した。この検量線の直線性は、決定係数 (R^2)=0.9997 と良好であった。

3.3.4. 添加回収試験

分析法の真度および精度を検討するため、漬物やガムなどの加工食品に対する CuCh/CuCh-Na の添加回収試験を行った。添加濃度は CuCh/CuCh-Na とともに 10 mg/kg で行った。この濃度は LOQ の約 10 倍相当として設定したが、この濃度が MULs を超えるヨモギ大福 (6.4 mg/kg)、ホワイトチョコレート (1 mg/kg) に関しては 2 mg/kg の添加とした。

添加回収試験の結果は Table 3.3. に示した。各食品からの CuCh の回収率は 70.7~80.8%、標準偏差 (SD) は 1.7~5.0% であった。また CuCh-Na の回収率は 55.6~72.3%、SD は 1.5~7.8% だった (ホワイトチョコレート 50.0% を除く)。これらの結果から、本分析法は加工食品中の CuCh/CuCh-Na の分析に適用可能な真度および精度を有していると考えられた。また、CuCh/CuCh-Na 非添加の試料から銅が検出されなかったことから、精製によって天然由来の銅の影響は排除されていると考えられた。

過去の文献と比較すると、Ushiyama et al. は 5 種類の加工食品の添加回収試験結果として CuCh で 91.2~97.4%、CuCh-Na で 80.4~97.4% の回収率を報告している¹¹⁾。Tsunoda et al は同様に CuCh で 85.3~94.1%、CuCh-Na で 86.0~93.7%⁵⁾、Scotter et al. は 8 種の加工食品において、CuCh で 50~107%、CuCh-Na で 49~110% とそれぞれ報告している⁷⁾。Amakawa et al. は CuCh-Na のみの検討であるが、10 種の加工食品を用いた検討で 90.7~102% の回収率を報告している⁶⁾。今回の分析法の回収率はこれらの研究に対して若干低かった。この理由として、以前の研究に比べて添加量が微量だったためと考えられる (過去文献の添加量は 100 mg/kg)。

また、最も回収率の低かったのはホワイトチョコレートだった。過去の研究においてもチョコレートコーティングされたビスケットのように脂肪分の多い食品では CuCh/CuCh-Na の分析が困難だったとの報告があり⁷⁾、この原因を CuCh/CuCh-Na の界面

活性作用と乳化剤の影響と推定している。実際に、今回使用したホワイトチョコレートは40%の脂肪分と、脂肪分の分離を抑えるための乳化剤を含んでおり、今回の研究でCuCh-Naの回収率が低かったのは過去の研究と同様に脂肪分と乳化剤の影響であると推察され、この問題は試料の脱脂処理や、溶媒pHやイオン強度の調整などによって解決できる可能性があると考えられた。

3.3.5. 市販食品中のCuCh/CuCh-Na分析

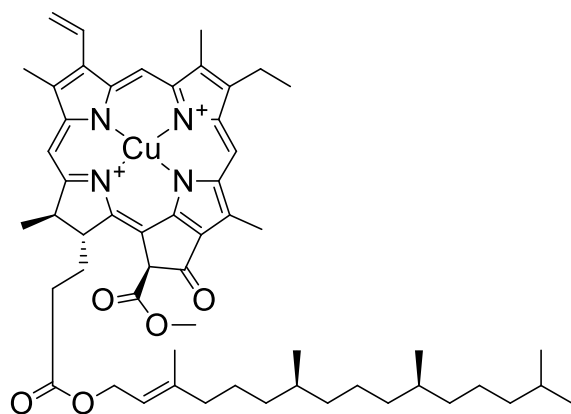
本分析法を市販の銅葉緑素 (CuCh/CuCh-Na) の成分表示がある加工食品に適用し、CuCh/CuCh-Na 含有量を測定した。Table 3.4. に示したように、分析したすべての加工食品からCuChおよびCuCh-Naを検出した。CuCh/CuCh-Naそれぞれの検出量はそれぞれ<LOD~3.7 mg/kg, <LOD~8.0 mg/kgであった。日本において設定されている検出量とMULsの比は、0.85~32.5%であり、検出量がMULsを越えるものはなかった。個別にみると、まず、チューンガムからCuChを0.9 mg/kg, CuCh-Naを2.2, 8.0 mg/kgを検出している。過去のチューンガムのCuCh/CuCh-Naを分析した結果では、Tsunoda et al. が5種のチューンガムからCuChを0.55~1.13 mg/kgを検出したことを報告しており⁵⁾, Amakawa et al. は2種のチューンガムからCuCh-Naを2.3, 7.5 mg/kgを検出したことを報告している⁶⁾。このように、市販のチューンガムから検出されたCuCh/CuCh-Na含有量は、過去の報告と同様であると考えられた。また、本研究においてキャンディーからはCuCh-Naを6.5 mg/kg検出し、この結果はMULsに対して32.5%と今回の研究で最大だった。過去のキャンディー中CuCh-Naの分析結果として、Amakawa et al.は2種のキャンディーから0.3, 0.9 mg/kgを検出したことを報告している⁶⁾。このように、今回キャンディーから検出されたCuCh-Naは過去の研究より多かったが、MULと比較すると十分低かった。また、漬物からはCuCh/CuCh-Naをそれぞれ3.7, 1.3 mg/kg検出した。Tsunoda et al.は6種(36検体)のワラビ水煮など山菜加工品の分析しており⁵⁾, CuCh/CuCh-Naをそれぞれ0.02~4.91 mg/kg, 0.02~5.22 mg/kg検出したことを報告している。今回の分析結果はこの結果とよく一致していると考えられた。また、わさび漬けからCuChがCuCh-Naより多く検出され、わさび漬けの着色には主にCuChが使用されているように見える。このようにCuChが野菜などの加工品から検出されるという結果はAmakawa et al.も報告している⁶⁾。しかし、Amakawa et al.は、CuChは疎水性であり、野菜のつけ汁などに使われるとすれば親水性のCuCh-Naが適切であると考えられることから、検出されたCuChは加工工程におい

て野菜の有する天然のクロロフィルから誘導されたのではないかと考察している。実際、野菜を銅釜で煮ると緑色が鮮やかになり、退色しにくいことは生活の知恵として知られている。これはクロロフィルがフェオフィチン化することで本来配位しているマグネシウムイオンが脱落し、pheophorbide a などの分子が生じ、これらのマグネシウムを含まない分子に銅釜から溶出した銅イオンが配位することで CuCh が誘導されるためと考えられている^{9,14)}。このため、今回わさび漬から検出された CuCh も添加されたものではなく、同様のメカニズムで天然のクロロフィルから誘導されたものと推察された。

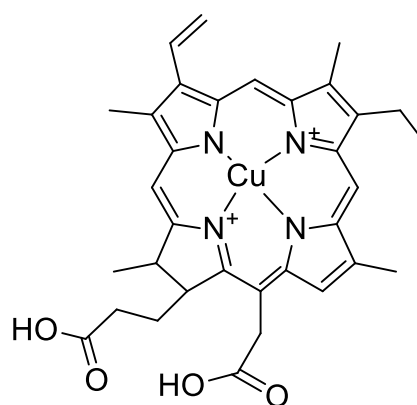
3.4. 要約

本章では新規の食品中銅葉緑素分析方法の開発を行った。本分析法は疎水性の銅クロロフィリン (CuCh) と親水性の銅クロロフィリンナトリウム (CuCh-Na) を加工食品中から酢酸エチルおよび 1-ブタノールを抽出溶媒として一括抽出を行い、試料調製の効率化を行った。さらに、有機溶媒層とアルカリ水層による液・液分配を改良することで、効率よく疎水性の CuCh と親水性の CuCh-Na を分離し、かつ、有害なクロロホルムを使用せずに並行分析を可能とした。また、本分析法は原子吸光光度計を用いた分析を採用し、CuCh/CuCh-Na の配位している銅イオンを指標として間接的に定量することで、精度の高い定量を可能にした。添加回収試験を用いて本分析法の真度・精度を評価した結果、CuCh/CuCh-Na の回収率はそれぞれ 70.7~80.8%, 55.6~72.3%であり、また、回収率の標準偏差はそれぞれ 1.7~5.0%, 1.5~7.8%であり、良好な分析精度を示した。また、実際に成分表示に銅葉緑素の表示がある市販の加工食品について本分析法を適用した結果、CuCh/CuCh-Na をそれぞれ銅として <LOD~3.7 mg/kg および <LOD~8.0 mg/kg を検出した。検出した CuCh/CuCh-Na は、すべて使用基準以内だった。このように本法は、実際に CuCh/CuCh-Na をの添加された加工食品の分析に活用できることが確認された。

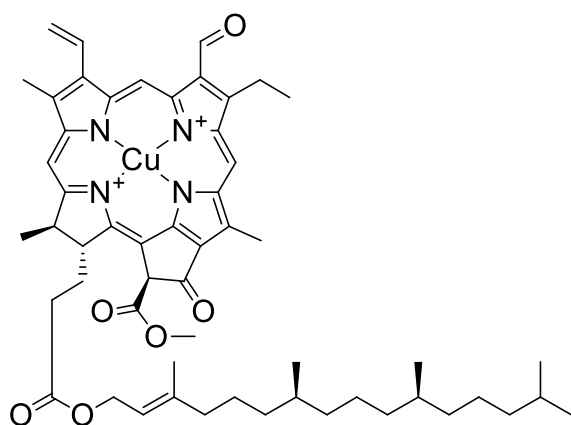
3.5. 图表



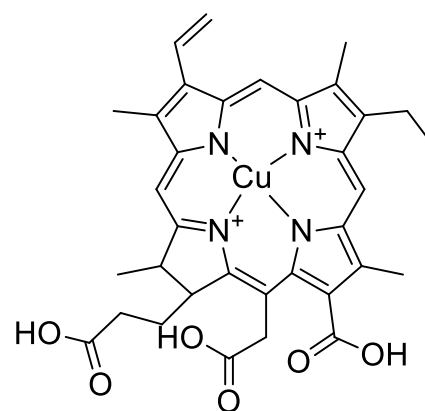
Copper (II) chlorophyll a



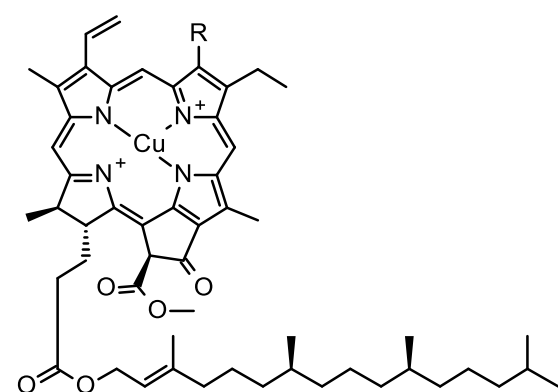
Copper (II) isochlorin e4



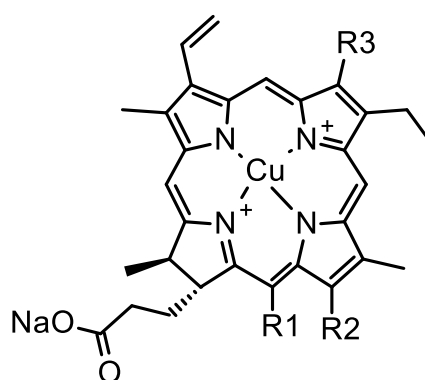
Copper (II) chlorophyll b



Copper (II) isochlorin e6



Basic structure of copper (II) chlorophylls (CuCh)



Basic structure of sodium copper (II) chlorophyllins (CuCh-Na)

Figure 3.1. Representative analogues of CuCh/CuCh-Na

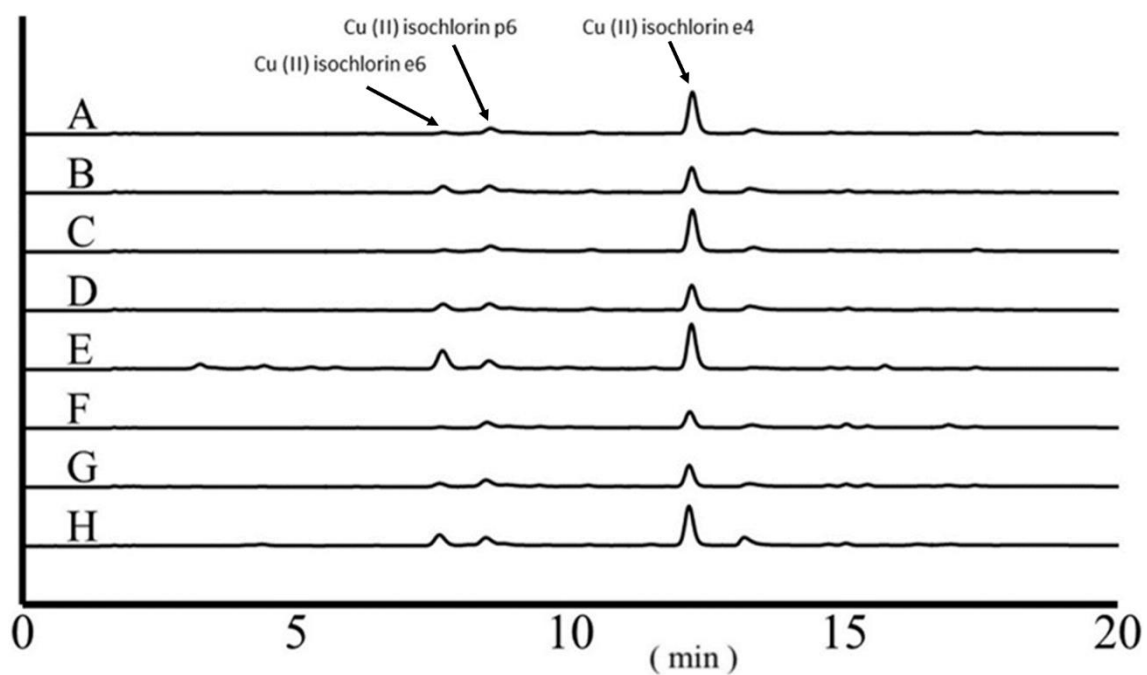


Figure 3.2. HPLC-VIS chromatogram of CuCh-Na.

Food additive-grade CuCh-Na (A, B) and analytical-grade CuCh-Na (C-H) were analysed using HPLC. Arrows indicate peaks identified as Cu(II) iso-chlorin e4, Cu(II) iso-chlorin p6, and Cu(II) iso-chlorin e6.

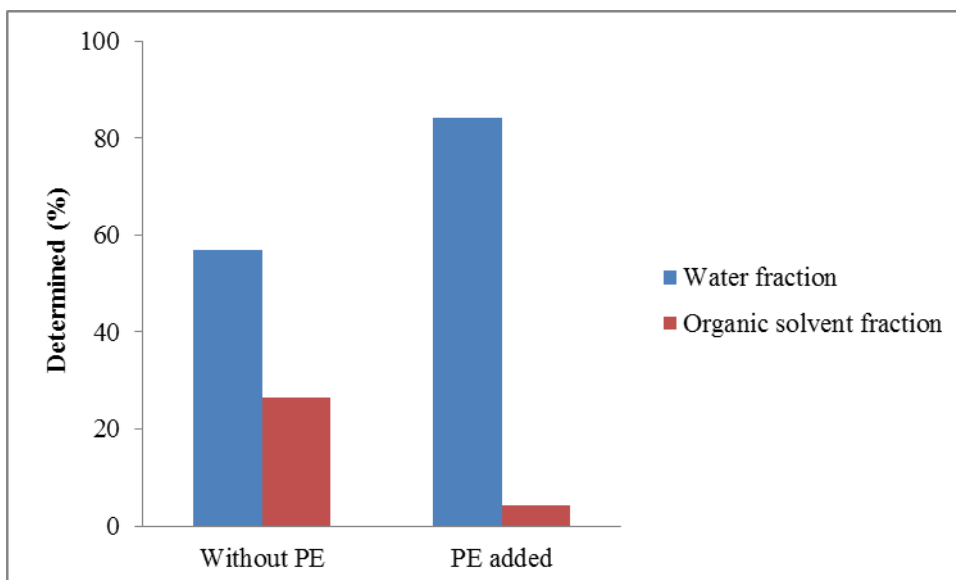


Figure 3.3. Effect of petroleum ether (PE) on CuCh-Na separation from extraction solvent.

The recovery ratio of CuCh-Na in the water layer and organic solvent layer are indicated as black and gray columns, respectively.

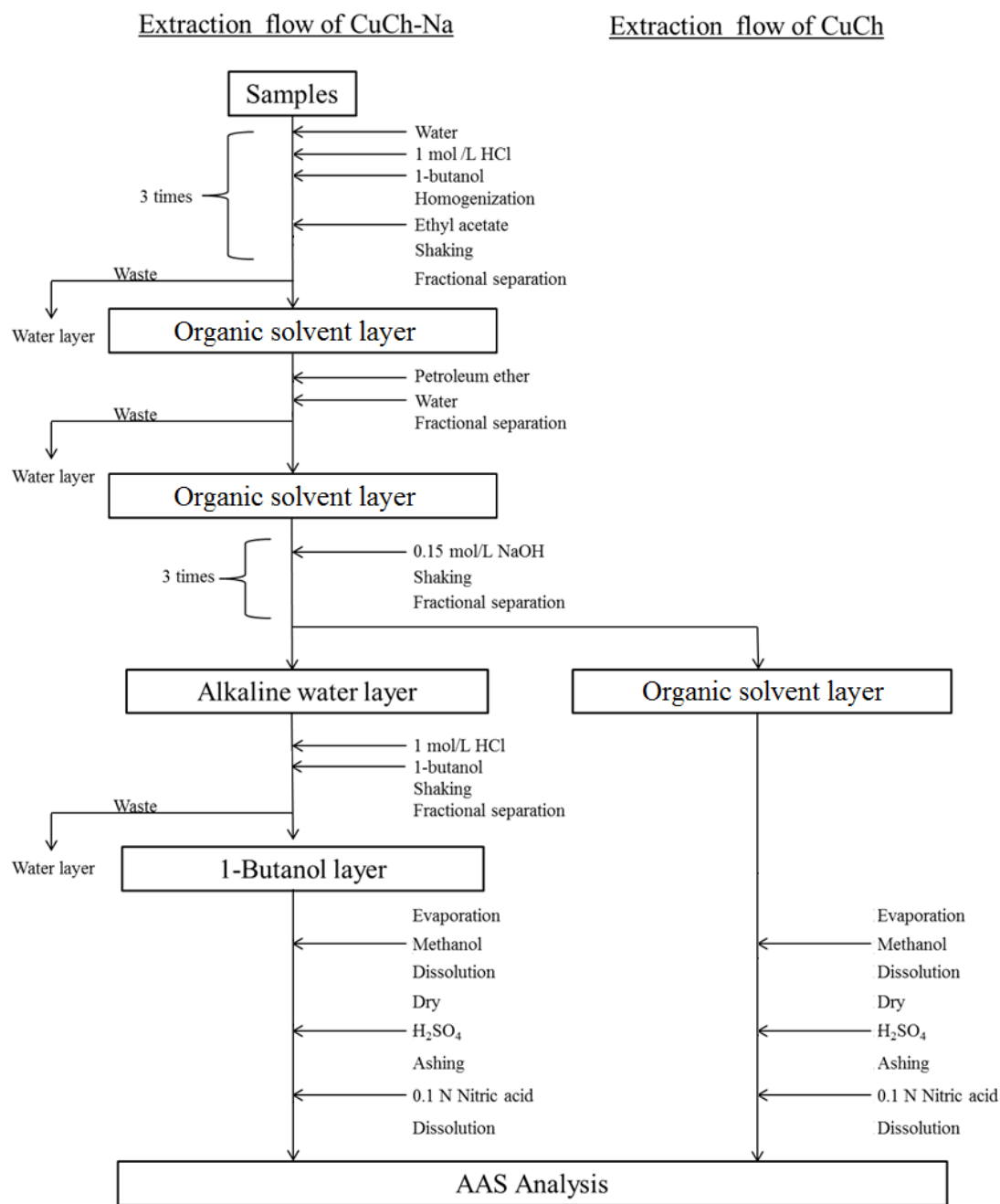


Figure 3.4. Flow chart for determination of CuCh-Na and CuCh in food samples.

Table 3.1. Standards for use of CuCh/CuCh-Na in Japan¹⁵⁾

	Target foods	Maximum use levels*
Copper Chlorophyll (CuCh)	Agar jelly in MITSUMAME (prepared by mixing agar jelly, cut fruits, greebeans, etc. with sugar syrup) packed into cans or plastic containers	0.0004 g/kg
	Chewing gum	0.050 g/kg
	Chocolate	0.0010 g/kg
	Fish-paste products (excluding SURIMI)	0.030 g/kg
	Fruits and vegetables for preservation	0.10 g/kg
	KONBU (kelp)	0.15 g/kg of dry kelp
	Moist cakes (excluding bread with sweet fillings or toppings)	0.0064 g/kg
	Target foods	Maximum use levels*
Sodium Copper Chlorophyllin (CuCh- Na)	Agar jelly in MITSUMAME (prepared by mixing agar jelly, cut fruits, greebeans, etc. with sugar syrup) packed into cans or plastic containers	0.0004 g/kg
	Candies	0.020 g/kg
	Chewing gum	0.050 g/kg
	Chocolate	0.0010 g/kg
	Fish-paste products (excluding SURIMI)	0.030 g/kg
	Fruits and vegetables for preservation	0.10 g/kg
	KONBU (kelp)	0.15 g/kg of dry kelp
	Moist cakes (excluding bread with sweet fillings or toppings)	0.0064 g/kg
	Syrup	0.0064 g/kg

*As copper

Table 3.2. Level of Cu in products containing CuCh-Na and CuCh.

	Product	Cu content (mg/g)
Food additive-grade CuCh-Na	A	38.3
	B	44.3
Analytical-grade CuCh-Na	C	43.1
	D	38.8
	E	39.3
	F	39.3
	G	40.3
	H	45.8
Analytical-grade CuCh	I	6.3

All CuCh/CuCh-Na-containing products were ashed and diluted with 0.1 N HNO₃. The concentration of copper in the products were determined using AAS. Products A and B: food additive-grade CuCh-Na; products C-H: analytical-grade CuCh-Na; product I: analytical-grade CuCh.

Table 3 .3. CuCh/CuCh-Na recovery from processed foods.

Sample	Spiked CuCh or CuCh-Na (mg/kg)* ¹	Sample (g)	Blank				Spiked			
			CuCh-Na fraction		CuCh fraction		CuCh fraction		CuCh-Na fraction	
			Mean* ²	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
CuCh	Seaweed (Kombu)	10.0	5	ND* ³	-	ND	-	75.2 ± 2.1	14.3 ± 0.2	
	Pickled leaf vegetable (Nozawana zuke)	10.0	5	ND	-	ND	-	80.8 ± 2.3	7.9 ± 1.3	
	Chewing gum	10.0	5	ND	-	ND	-	76.3 ± 2.6	Trace* ⁴	
	Fried fish cake (Satsuma age)	10.0	5	ND	-	ND	-	71.1 ± 1.7	Trace	
	White chocolate	2.0	10	ND	-	ND	-	73.1 ± 5.0	Trace	
	Mugwort-flavoured rice cake (Yomogi daifuku)	10.0	5	ND	-	ND	-	70.7 ± 1.9	9.5 ± 2.7	
CuCh-Na	Seaweed (Kombu)	10.0	5	ND	-	ND	-	Trace	69.4 ± 4.8	
	Pickled leaf vegetable (Nozawana zuke)	10.0	5	ND	-	ND	-	11.1 ± 1.4	68.8 ± 2.2	
	Syrup	10.0	5	ND	-	ND	-	Trace	65.5 ± 2.1	
	Chewing gum	10.0	5	ND	-	ND	-	Trace	55.6 ± 4.8	
	Fried fish cake (Satsuma age)	10.0	5	ND	-	ND	-	Trace	63.8 ± 7.8	
	Candy (Green tea flavored)	10.0	5	ND	-	ND	-	Trace	72.3 ± 5.4	
	White chocolate	2.0	10	ND	-	ND	-	Trace	50.0 ± 10.7	
	Mugwort-flavoured rice cake (Yomogi daifuku)	2.0	10	ND	-	ND	-	Trace	65.0 ± 1.5	

*¹ As copper

*² n=3

*³ Not detected

*⁴ Trace indicates a value higher than the LOD and lower than the LOQ.

Table 3.4. Determined levels of CuCh/CuCh-Na in commercial processed foods.

Sample	CuCh ^{*1} (mg/kg)		CuCh-Na (mg/kg)		CuCh determined level/MUL ^{*3} (%)	CuCh-Na determined level/MUL ^{*3} (%)
Pickled vegetable (Wasabi zuke)	3.7	± 1.9	1.3	± 0.7	3.7	1.3
Chewing gum A	0.9	± 0.0	ND ^{*2}		1.7	-
Chewing gum B	0.9	± 0.1	ND		1.7	-
Chewing gum C	0.9	± 0.1	2.2	± 0.4	1.8	4.5
Chewing gum D	1.8	± 0.1	8.0	± 0.3	3.7	16.0
Fried fish cake (Satsuma age)	ND		0.9	± 0.2	-	2.2
Candy	0.9	± 0.1	6.5	± 0.2	-	32.5

*¹ Mean ± SD (n=3)

*² Not determined

*³ Determined level of CuCh or level of CuCh-Na/maximum use level (MUL) × 100.

3.6. 参考文献

- 1) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives 13th Session ed., “Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some food colours, emulsifiers, stabilizers, anticaking agents, and certain other substances”, Rome, FAO, 1970, p. 32-34. (ISBN 92-5-101836-7)
- 2) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives 20th Session ed., “Evaluation of certain food additives and contaminants”, Rome, FAO, 1978, p. 18-25. (ISBN 92-4-120631-4)
- 3) Codex: General standard for food additives CODEX STAN 192-1995. Chlorophylls and chlorophyllins, copper complexes. INS 141 (i), INS 141 (ii); Codex Alimentarius Commission (2015).
- 4) European Communities, Official Journal of the European Communities, European Parliament and Council Directive 94/36/EC of 30 June 1994 (1994).
- 5) Tsunoda, K., Inoue, N., Tachibana, M., Aoyama, M., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci)*, **34**, 25-31 (1993).
- 6) Amakawa, E., Ogiwara, T., Takeuchi, M., Ohnishi, K., Kano, I., *Tokyo Toritsu Eisei Kenkyusho Kenkyu Nempo (Annual Report of The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)*, **44**, 131-137 (1993).
- 7) Scotter, M., Castle, L., Roberts, D., *Food Addit. Contam.*, **22**, 1163-1175 (2005).
- 8) Inoue, H., Yamashita, H., Furuya, K., Nonomura, Y., Yoshioka, N., Li, S., *J. Chromatogr. A*, **679**, 99-104 (1994).
- 9) Yasuda, K., Tadano, K., Ushiyama, H., Ogawa, H., Kawai, Y., Nishima, T., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **36**, 710-716 (1995).
- 10) Mortensen, A., Geppel, A., *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **8**, 419-425 (2007).
- 11) Ushiyama, H., Nishijima, M., Yasuda, K., Kamimura, H., Tabata, S., Nishima, T., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **27**, 417-420 (1986).
- 12) Kunii, S., Kamio, N., Ito, I., *Fukushima Eiseikenkyusho Nenho (Annual Report of Fukushima Institute of Public Health)*, **26**, (2008)
- 13) Hidaka, C., Esaki, Y., Fujimoto, T., *Fukuokashi Eiseikenkyusho Ho (Annual Report of Fukuokashi Institute of Public Health)*, **20**, 108-112 (1995).

- 14) Insel, P., Ross, D., McMahon, K., Bernstein, M., “Nutrition”, Jones & Bartlett Publishers, 2010, p. 507-550. (ISBN 0-7637-9376-0)
- 15) The Japan Food Chemical Research Foundation, “Standards for Use of Food Additives”, <<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/stanrd.use>>, cited 23 September, 2016.

第4章 過酢酸製剤成分 1-ヒドロキシエチリデン-1,1-ジホスホン酸およびオクタン酸の生鮮食品中分析法の開発

4.1. 序論

過酢酸製剤は過酢酸を主成分とする殺菌料であり、過酢酸より生じるヒドロキシラジカルによって微生物のタンパク質や DNA を変性させることで殺菌効果を示すと考えられている。過酢酸製剤は、その特徴として広い抗菌スペクトルを有しており、グラム陰性細菌 (e.g., *Escherichia coli*), グラム陽性細菌 (e.g., *Staphylococcus aureus*), 酵母, さらに芽胞形成細菌 (e.g., *Clostridium sp.*) に対して殺菌作用を示す¹⁻³⁾。過酢酸製剤は医療器具の殺菌や工場配管の殺菌などに幅広く用いられるほか、米国, カナダ, オーストラリア, ニュージーランドなどで生鮮食品の表面殺菌料として使用されている。過酢酸製剤は JECFA によって生鮮食品殺菌に用いるうえでの安全性評価がなされており⁴⁾, さらに European Food Safety Authority, Food Standards Australia New Zealand (FSANZ) など各国の食品安全にかかわる機関においても評価されている^{5,6)}。その反面, 日本においては食品添加物として指定されておらず^{*a}, 国内では過酢酸製剤殺菌された食品の流通は認められていなかった。

しかし, 国内に輸入食品として過酢酸製剤処理された生鮮食品が流通している可能性が指摘されたことを受け, 2013 年 4 月に行われた薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会において, 過酢酸製剤成分の食品添加物指定を速やかに行うこと, また, 過酢酸製剤成分が食品添加物として指定されるまでの間, 輸入生鮮食品中の過酢酸製剤残留成分の残留量調査を行うことが決定された。

生鮮食品の表面殺菌に用いられる過酢酸製剤の成分は, 過酢酸, 酢酸, 過酸化水素, HEDP, オクタン酸, 過オクタン酸, 水であり (Table 4.1.), これら成分のうち, 主成分である過酢酸, 過酸化水素は反応性が高く, 生鮮食品表面で速やかに酢酸, 酸素, 水へと分解するため, 過酢酸製剤は相対的に残留物の少ない殺菌料と考えられている⁷⁾。しかし, 過酢酸製剤成分のうち HEDP およびオクタン酸は常温で安定な物質として知られ, 揮発性も乏しい。さらに, 過酢酸製剤は, 牛や豚などのと体, 果実, カット野菜などの生鮮食

*a 2016 年 10 月に食品添加物として指定された。

品に直接噴霧・浸漬などの方法で表面殺菌に用いられ、通常、殺菌後の水洗処理などは行われぬ。これらの理由から一般的な流通過程において生鮮食品表面に HEDP およびオクタン酸は残留する可能性があると考えられている⁴⁻⁶⁾。そのため、過酢酸製剤残留成分として HEDP とオクタン酸について輸入生鮮食品中の残留量調査を行う必要があった。

HEDP は、第一世代のビスホスホネート系薬剤としてパジェット病など骨の病気の治療に使用されることで良く知られている医薬品としての側面を持つ。しかし、本来 HEDP は 19 世紀に水中の金属を除去するキレーターとして開発され、水軟化剤として利用されていた化合物でもある。HEDP は過酢酸製剤においても同様にキレーターとして配合されており、過酢酸製剤中の金属をキレートすることでフェントン反応などを抑制し、過酢酸や過酸化水素の分解を防ぎ、過酢酸製剤の殺菌作用を安定化している。

また、オクタン酸は炭素数 8 の脂肪酸であり、天然では牛乳やココナッツミルクに豊富に含まれることが知られている。過酢酸製剤に添加されたオクタン酸は界面活性剤として働くことで過酢酸製剤の表面張力を低下させ、殺菌対象との接触効率を亢進することで殺菌作用を向上していると考えられている^{1,9)}。

このように、HEDP は過酢酸製剤の安定化に、オクタン酸は殺菌効果の向上にそれぞれ有用であり、生鮮食品殺菌用の過酢酸製剤には広く配合されている。過酢酸製剤に含まれる HEDP およびオクタン酸の健康影響評価は前述の JECFA, FSANZ, 食品安全委員会などによって評価されており、生鮮食品表面に残留するレベルでの健康影響はないと考えられている。また食品安全委員会は過酢酸製剤の健康影響評価において、HEDP については 0.013 mg/bw kg/day の ADI を設定しているが⁸⁾、オクタン酸は動物実験と摂取量推計を鑑みて、オクタン酸が添加物として適切に使用される場合安全性に懸念はなく ADI を特定する必要は無いと判断している⁸⁾。しかし、これらの評価の根拠となった HEDP およびオクタン酸の残留量推計は殺菌処理前後の重量差を基に算出しているなど、間接的なデータを根拠としており、実際の残留量と十分に近似しているか不明であった。しかし、現在までに過酢酸製剤処理された生鮮食品に残留した HEDP およびオクタン酸について、直接的な定量分析を試みた研究報告は調査した限りでは見つからなかった。そこで、本章では生鮮食品に残留した HEDP およびオクタン酸の分析法について検討を行った。

4.2. IC-MS/MS を用いた生鮮食品中 HEDP 分析法の開発

HEDP 分析法は生鮮食品以外の試料での研究報告が数例あり、HPLC-UV 検出器を用いたポストカラム法による間接的蛍光分析法^{10,11)}、イオンクロマトグラフ (IC) - 誘導結合型プラズマ質量分析計を用いた分析法¹²⁾、蒸発光散乱検出器を用いた分析法¹³⁾、イオンペア試薬を用いた LC-MS 分析法¹⁴⁾、誘導体化処理を行いガスクロマトグラフ - 質量分析計 (GC-MS) による分析を行う方法などが報告されている¹⁵⁾。しかし、HEDP の生鮮食品中の残留量は 0.004~0.2 mg/kg 程度とごく微量であると推定されており⁴⁾、これらの分析法の感度では測定に不十分と考えられた。また、これらの分析法は医薬品としての HEDP 製剤や、血漿中の HEDP などを主な分析対象としており、食品のように多様なマトリクスが存在する試料に対しては分析法の性能評価を行っておらず、生鮮食品中の HEDP 分析に対応できるか不明だった。そこで本研究では、生鮮食品に残留した HEDP 分析法を新たに開発し、各種生鮮食品を用いて分析法の性能評価を行った。

4.2.1. 方法

4.2.1.1. 試薬および試液

HEDP (60%水溶液)、パミドロン酸二ナトリウム水和物 (PAM)、アレンドロン酸ナトリウム三水和物 (ALD)、リセドロン酸一ナトリウム 2.5 水和物 (RIS) は東京化成工業 (株) より購入した。ゾレドロン酸一水和物 (ZOL)、ニトリロトリス (メチレンホスホン酸) (NTMP)、メチルホスホン酸 (MPA) は Sigma-Aldrich 社より購入した。その他の溶媒などは関東化学工業 (株) の試薬特級品を使用した。過酢酸製剤製品は製造業者から入手した。また、本研究で使用した水は Merck Millipore 社製 Milli-Q Gradient A10 system 用いて精製 (18 M Ω ·cm) したものを使用した。

HEDP 保存溶液は HEDP 水溶液を水で希釈して調製した (1 mg/mL)。HEDP 標準溶液 (0.05~1 μ g/mL) は保存溶液を適宜希釈して調製した。RIS は水で溶解し 1 μ g/mL 溶液とし、分析試料添加用の内標準溶液として用いた。調製した溶液は Nalgen 社製のポリエチレン (PE) ボトルに入れ、4°C で保存した。

4.2.1.2. IC 条件

液体クロマトグラフィーは Thermo Fisher Scientific 社製 IC 装置 (Dionex ICS-2100) を用いた。装置の構成は、電気伝導度検出器 (DS-6)、オートサンプラー (AS-AP)、サプレ

ッサー (AERS 500, 2 mm i.d.), 溶媒調整装置 (EGC III KOH) から成る. 溶離液は溶離液調整装置によって生成した 30 mM 水酸化カリウム/10%メタノール溶液を用いた. 分析用のカラムは Thermo Fisher Scientific 社製の陰イオン交換カラム (IonPac AS-11, 250 × 2.0 mm i.d.) にガードカラム (IonPac AG 11, 50 × 2.0 mm i.d.) を接続して用いた. また, 分析条件は以下の通り, 流速は 0.25 mL/min, カラムオーブンの温度は 35°C, サプレッサー電流は 19 mA, 試料注入量は 25 µL. 装置のコントロールは Dionex 社製ソフトウェア Chromeleon 7.1 を用いた. また, IC に検出器としてタンデム型質量分析計 (MS/MS) を接続し, 分析を行った. 全ての定量値は各標準溶液および試験液を 2 回分析し, 分析結果を平均した値を定量値として算出した.

4.2.1.3. MS/MS 条件

検出器として Waters 社製四重極型 MS/MS (Quattro Premier/XE) を用いた. イオン化モードはエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) のネガティブモードで行った. 装置のコントロールは Waters 社製ソフトウェア MassLynx V4.1 を用いた. キャピラリー電圧, コーン電圧, 衝突エネルギーはそれぞれ, 2 kV, 20 V, 20 eV に設定した. イオンソース温度, 脱溶媒化温度はそれぞれ 120, 400°C に設定した. 脱溶媒, コーンの窒素ガス流量はそれぞれ, 800, 50 L/h に設定した. HEDP と RIS の検出は選択反応モニタリング (SRM: selected reaction monitoring) を用い, HEDP は m/z 205 [M-H]⁻ から生じる m/z 123, 169 のプロダクトイオンを, RIS は m/z 282 [M-H]⁻ から生じる m/z 200 のプロダクトイオンをそれぞれモニタリングした. スキャン間隔は 0.5 秒. 合計分析時間は 11 分, 注入後 6 分間は MS/MS に導入せずに廃液とした.

4.2.1.4. 試料調製

果実類, 野菜類, 食肉試料は都内のスーパーマーケットで購入した (Table 4.2.). 果実類, 野菜類試料は試料全体を PE 製の袋 (Ziploc, 旭化成 (株) 製) もしくは 50 mL の PE チューブに入れ, 試料重量と等量の水を加え封入した. ただし, 重量当たりの表面積が大きい試料 (チェリー, ブロッコリー) に関しては 3 倍量の水を加えた. 次に, 超音波洗浄槽 (SV-18TH, 柴田科学 (株)) に封入した試料を入れ, 30 分間超音波抽出を行った. 上清を抽出液とし, 後述の精製法で精製した. 肉類試料は 1 検体につき 5 g の肉片を試料として採取し, 50 mL の PE チューブに入れ, 20 mL の水を加え封入した. 15 分間の超音波

抽出を行い、上清を 50 mL の PE チューブに回収した。抽出残渣に 20 mL の水を加え再度超音波抽出を行い、同様に上清を回収した。回収した 40 mL の上清を水で 50 mL に定容し、抽出液とした。

次に、以下の方法で抽出液の精製を行った。5 mL の抽出液を 0.45 μm の PTFE フィルター (Millex, Merck Millipore 社製) によってろ過し、さらにフィルターに接続した強陽イオン交換カートリッジ (Bond Elut SCX, 500 mg, Agilent Technologies 社製) に通液した。カートリッジはあらかじめ 5 mL のメタノールと 5 mL の水によってウェッティングを行った。通液した抽出液は、始めの 2 mL を廃棄し 3 mL を回収した。回収した溶液 1 mL あたり 5 μL の内標準溶液を添加し、IC-MS/MS 分析用試験液とした。

4.2.1.5. 検量線

各生鮮食品の精製後の抽出溶液に規定量の HEDP 標準溶液と内標準溶液を添加し、マトリックス含有標準溶液とした。マトリックス含有標準溶液は、5 点の濃度で調整した (果実・野菜類: 0.005~0.06 mg/L, 肉類: 0.02~0.1 mg/L)。検量線は HEDP と内標準物質のピーク面積比を濃度に応じてプロットし作成した。また、検量線の $R^2 > 0.99$ を良好な直線性とみなし、定量に用いた。

4.2.1.6. 分析法の評価

HEDP の分析装置上の定量下限値 (instrumental limit of quantification: ILOQ) および検出下限値 (instrumental limit of detection: ILOD) は、HEDP のシグナル高と peak-to-peak ノイズの比 (S/N 比) として 10:1 および 3:1 を与える濃度とした。ILOQ は HEDP を含まないことを確認した食品の精製後抽出液に、S/N=10 を僅かに超える程度の HEDP 溶液を添加した試料を 6 回連続測定し、得られた S/N 比の平均値から算出した。方法定量下限値 (method limit of quantification: MLOQ) は以下の式から求めた。

$$\text{MLOQ (mg/kg)} = \text{ILOQ (mg/L)} \times \text{抽出液量 (L)/試料重量 (kg)}.$$

また、添加回収試験における HEDP の試料への添加量は MLOQ の 2 倍程度とした (果実類および野菜類 0.01 mg/kg (チェリー, ブロッコリー: 0.03 mg/kg), 肉類: 0.4 mg/kg)。

HEDP 分析法の真度および精度は 1 日 2 併行 5 日間の添加回収試験によって評価を行

った。また、ブロッコリーおよび牛肉を野菜および肉類の代表として選択し、HEDP 添加濃度はMLOQの2倍および20倍濃度の2点(牛肉:0.2 mg/kg, ブロッコリー:0.02 mg/kg)で行った。HEDP 分析法の真度は、添加回収試験の回収率の平均値として算出した。また併行精度および室内精度は添加回収試験の回収率を一元配置分散分析(one-way ANOVA)によって分析し、それぞれ相対標準偏差 RSD_r および RSD_R として評価した。

4.2.1.7. 過酢酸製剤処理された生鮮食品での検討

過酢酸製剤製品(過酢酸量含有量 12.0%)を取扱説明書に基づいて使用時最大濃度に希釈した(過酢酸濃度として 80 mg/L)。果実類、野菜類試料を希釈した過酢酸製剤に10秒間浸漬し、引き上げたのち5秒間自然滴下により余剰を除いた。次に40°Cの乾燥機(WFO-400, 東京理科機器(株))で生鮮食品表面に付着した過酢酸製剤を完全に乾燥させた。4.2.1.4. に則って、過酢酸製剤処理した試料を処理し、試験溶液を調製した。

4.2.2. 結果

4.2.2.1. MS/MS および IC 条件の最適化

HEDP は UV や蛍光領域の吸収をほとんど持たないため、一般的な UV 検出器やフォトダイオードアレイ検出器のような光学検出器では検出できない。電気伝導度検出器による検出は可能だが $\mu\text{g}/\text{kg}$ レベルの HEDP の検出には感度が不十分と考えられた。そこで、高感度かつ特異性の高い検出器である MS/MS による HEDP 検出法の検討を行った。

MS/MS 条件の最適化のために、10%メタノール溶液に溶解した $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の HEDP 溶液を MS/MS に直接注入し、条件検討を行った。まず HEDP の MS スペクトル (m/z 50~300) の検討を行った。この結果、HEDP は m/z 205 に分子イオン $[\text{M}-\text{H}]^-$ を示すことが明らかとなった (Fig. 4.1.a)。次に、プロダクトイオンスキャン分析により m/z 205 から生じるプロダクトイオンスペクトルの検討を行った。この結果 (Fig. 4.1.b), m/z 123 および 169 に主なプロダクトイオンが生じることが明らかとなった。そこで MS/MS による HEDP の定量には、 m/z 205 から生じる m/z 123 および 169 を定量イオンとして SRM 測定することとした。また、今回得られたプロダクトイオンスペクトルはオンラインデータベースに登録されている ESI Q-TOF MS で得られた HEDP のスペクトルとよく一致していた²²⁾。ポジティブモードの ESI によるイオン化では、 m/z 207 に分子イオン $[\text{M}+\text{H}]^+$ が観察されたが、ネガティブモードで観察された m/z 205 のシグナルの強度の方が強かったため、ネガティブモードを採用した。さらに、 m/z 123 および 169 のシグナル強度が最大になるようにコーン電圧などの他の MS/MS 条件を最適化した (4.2.1.3. MS/MS 条件を参照)。

次に、HEDP 分析に適した IC 条件の検討を行った。検討にはリン酸化合物分析に一般的に使用されている陰イオン交換カラムを使用した^{11,23)}。リン酸化合物分析には親水性相互作用クロマトグラフィー (hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)) を使用した研究例があったため²⁴⁾、HILIC カラムを用いた予備検討を行ったが、ピークに極端なテーリングやスプリットが生じたため採用しなかった。

次に IC の溶離液の最適化を行った。初期の検討では 30 mM の水酸化カリウム水溶液を溶離液として使用していたが、HEDP ピークのテーリング (peak asymmetry factor $b/a > 4$) が生じるという問題があった。既報の IC を用いた HEDP 分析法の報告でも、同様に陰イオン交換カラムを使用した分析で HEDP のピークにテーリングが生じることが示されて

おり、報告では適切な溶離液を用いることでテーリングが改善する可能性を指摘している¹²⁾。そこで、HEDP ピークのテーリングを解消する適切な溶離液の検討を行った。過去の研究では、有機溶媒を溶離液に添加することによってカラム担体と分析対象の相互作用が変化し、ピーク形状が改善することが報告されていた¹⁵⁾。そこで、30 mM 水酸化カリウムに 10% のメタノールを添加した溶離液を用いて HEDP ピークの形状について検討を行った。この検討の結果、メタノールの添加によりピーク形状が改善する (peak asymmetry factor $b/a < 2$) ことが示された。さらに、メタノールの添加により非添加の溶離液を用いた場合のピーク面積と比較して HEDP のピーク面積は約 1.6 倍に向上した。これは、テーリングの解消による影響だけではなく、有機溶媒の添加によって ESI によるイオン化において脱溶媒化効率が向上したことも影響していると推察された。

4.2.2.2. 内標準物質の選択

一般的に MS/MS を用いた分析では、ILOQ レベルの微量な分析対象の定量性は MS/MS の安定性に強く影響を受ける。これに対し、適切な内標準物質の使用は MS/MS の感度変化による誤差を低減させ、ILOQ レベルでの測定における定量性を向上させる有効な手段である。そこで、6 種のリン酸化合物 (Fig. 4.2. b) を内標準物質候補として、IC-MS/MS を用いた選択イオンモニタリング (SIM) 分析による検討を行った。検討の結果 (Fig. 4.2.a), 全ての内標準物質候補 (0.05 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液) が S/N 比 10 以上のピークを示した。しかし、NTMP は溶出時間が遅く (36.13 min), 分析時間の観点から採用しなかった。反対に、MPA, PAM および ALD は溶出時間が早く (MPA: 2.64, PAM: 3.84, ALD: 4.47 min), 野菜や果実類などの生鮮食品に一般的に含まれる硝酸や酢酸といった無機酸や有機酸と溶出時間が近く、分析の安定性に影響を与える恐れがあったことから採用しなかった。また、ZOL の溶出時間 (9.21 min) は HEDP の溶出時間 (9.16 min) とほぼ一致していたため、HEDP の定量に予期しない相互作用が生じる恐れがあった。RIS の溶出時間 (8.26 min) は HEDP の溶出時間と近く、ピークはほぼ完全に分離していた。このことから、HEDP の IC-MS/MS 分析における内標準物質として RIS を選択した。

Fig. 4.3.a に RIS 水溶液のイオンスペクトラムを示した。HEDP 分析に最適化した条件において RIS は m/z 283 に分子イオン $[\text{M-H}]^-$ を生じることが明らかとなった。また、Fig. 4.3.b に示したプロダクトイオンスペクトルでは、 m/z 283 から m/z 200 を主なプロダクトイオンとして生じることが明らかとなった。そこで、RIS のモニタリングは m/z 283 から

生じる m/z 200 のイオンを SRM 測定し、得られたピーク面積を HEDP に対する内標準として用いることとした。

Fig. 4.4.に HEDP と RIS (ともに 0.05 mg/L 水溶液) の電気伝導度計で測定した IC クロマトグラムと MS/MS による SRM クロマトグラムを示した。この結果、電気伝導度検出器では HEDP, RIS 共にピークが観察できなかったが (Fig. 4.5.a), SRM クロマトグラムでは定量可能な強度のピークが得られることが確認された (Fig.4.5.b)。

4.2.2.3. 生鮮食品からの HEDP 抽出法の検討

果実類、野菜類からの HEDP 抽出には、試料重量と等量の水を用いた。しかし、表面積/重量比が大きいブロッコリーなどでは等量の水では表面を覆うには不十分だったため、面積/重量比の大きい果実類、野菜類については試料重量の 3 倍量の水を用い、完全に浸漬した。肉類の抽出では、IC-MS/MS 分析において生じるサプレッションなど、マトリックスの影響を抑えるため試料重量の 10 倍の水を抽出に用いた。抽出には超音波処理による抽出法を用い、超音波処理後の上清を分析用の抽出液とした。

次に、抽出液をろ過するためのメンブレンフィルターについて検討を行った。HEDP 水溶液 (0.2 $\mu\text{g/mL}$) を各種材質のディスク型メンブレンフィルター (polyvinylidene difluoride (PVDF), cellulose acetate (CLA), polytetrafluoroethylene (PTFE)) に通液し、ろ液中の HEDP を分析することでメンブレンフィルターへの吸着率を検討した (n=3)。この結果、PVDF と CLA を材質とするメンブレンフィルターではそれぞれ 27.5 および 15.5% の HEDP 吸着が観察された。一方、PTFE を材質とするメンブレンフィルターでは吸着が見られなかった。この結果から、もっとも吸着率が低かった PTFE 製メンブレンフィルターを抽出液のろ過に採用した。

また、試料溶液中の金属イオンが IC 分析のカラムに深刻なダメージを与えることや、リン酸化合物のピーク形状の不良につながるということが報告されている^{11,12,25)}。そこで、本研究では SCX カートリッジにフィルターろ過された抽出液を通液し、抽出液中の金属イオンの除去を行った。フィルター処理と SCX カートリッジによる金属イオンの除去処理を行った抽出液に、内標準溶液を 5 μL 添加し、IC-MS/MS 分析用の試料溶液とした。この試料溶液の調製法は、過去に報告されている誘導体化法などの HEDP 分析法と比較して^{23,26)}、簡便かつ迅速な手法であると考えられた。

4.2.2.4. 検量線の作成と直線性の検討

ESIによるイオン化は高感度で選択性の高い分析対象の検出を可能にする優れた方法だが、一方で試料溶液中に存在する食品成分などのマトリックスの影響により、イオン化のエンハンスメントもしくはサプレッションなどによる妨害を受ける。この妨害はマトリックス組成によって大きく変動するため、食品によってその影響は様々であり、MLOQ や定量値に与える影響も食品によって異なると考えられる。そこで、本分析法では内標準物質に加えてマトリックスマッチングによる補正を行った検量線を作成し、生鮮食品中の HEDP を正確に測定する方法を検討した。検量線作成用の標準溶液は、HEDP を含まないことを確認した各食品の精製後抽出液に、規定量の HEDP 標準溶液と内標準溶液を添加して調製した。検量線の範囲は、果実類、野菜類では 0.005~0.06 mg/L、肉類では 0.02~0.1 mg/L とした。各生鮮食品群の代表的な試料について結果を示すと、各検量線の R^2 はパパイア、セロリ、牛肉でそれぞれ 0.994, 0.994 および 0.993 であり、本分析法で用いた検量線の直線性は良好と考えられた。

4.2.2.5. ILOQ および MLOQ の検討

本分析法における HEDP の ILOQ は 0.005 mg/L だった。この感度は既報のビスホスホネート化合物分析法のうち最も高感度な分析法 (ILOQ = 0.003 mg/L) と比較しても、同等の感度と考えられた^{24,27)}。また生鮮食品中の HEDP 分析における MLOQ は果実類、野菜類では 0.007 mg/kg (ブロッコリーとチェリーは 0.02 mg/kg)、また、牛肉では 0.1 mg/kg、鶏肉、豚肉では 0.2 mg/kg だった。これらの MLOQ は過酢酸製剤処理された食品に残留した HEDP を分析するのに十分な感度であると考えられた。

4.2.2.6. 添加回収試験

マトリックスを多く含む試料の代表として、添加回収試験における牛肉試料のクロマトグラムを示した (Fig. 4.5.)。Fig. 4.5.a に示したように、0.4 mg/kg の HEDP を添加した試料から調製された試験溶液の分析では、IC クロマトグラムでは妨害が大きく、HEDP のピークは全く観察できないが、Fig. 4.5.b に示した SRM クロマトグラム上では定量なピークが観察できることが解る。このように、IC-MS/MS 分析により肉類のような多量にマトリックスを含む生鮮食品に残留した HEDP であっても分析可能であることが示された。

添加回収試験の結果を Table 4.2. に示した. 果実類からの回収率は 73.9~103.8%, RSD は 1.9~12.6%, 2 種の野菜類で回収率は 89.9 および 95.9%, RSD は 4.1 および 8.9%, 肉類では 80.3~90.1%, RSD: 4.4~10.8%だった. このように, 本分析法は様々な生鮮食品に含まれる HEDP に対して良好な回収率と精度を示したことから, 実際に多様な生鮮食品に残留した HEDP の分析に対応可能であると考えられた.

4.2.2.7. 分析法の真度および精度の検討

本分析法の真度および精度を評価するため, 1 日 2 併行で 5 日間, 2 濃度 (MLOQ の 2 倍および 20 倍) での添加回収試験をブロッコリー, 牛肉の 2 種の試料に対して行った. この結果を Table 4.3. に示した. 回収率は 93.6~101.2%であった. また RSD_f および RSD_R は 6.9 および 11.5%以下だった. 回収率は MLOQ の 2 倍程度の微量の添加でも良好であり, またその併行精度および室内精度も良好だったことから, 本分析法は微量な生鮮食品中の HEDP を正確かつ高精度に測定可能と考えられた.

4.2.2.8. 過酢酸製剤処理された生鮮食品への適用

本分析法を模擬的に過酢酸製剤処理した果実類および野菜類に適用した. 過酢酸製剤は果実類, 野菜類の殺菌に用いる最大濃度 (過酢酸として 80 mg/L) に水で希釈したものを使用した. 希釈した過酢酸製剤に含有する HEDP 濃度を分析した結果, 検出された HEDP は 2.03 mg/L, RSD は 5.7% (n=3)だった.

過酢酸製剤処理された果実類および野菜類から検出された HEDP 量を Table 4.4. に示した. 果実類, 野菜類から検出された平均 HEDP 量はそれぞれ 0.009~0.047 mg/kg および 0.008~0.317 mg/kg だった. 今回の分析で検出された HEDP 量は JECFA が過酢酸製剤処理によって果実類, 野菜類に残留すると推定した量 (0.0042~0.135 mg/kg) と同等と考えられた⁴⁾. しかし, チェリーおよびブロッコリーに関しては若干 JECFA の推定した残留量を越えておいた. また, 今回の試験での他の果実類, 野菜類からの検出量と比較してチェリーとブロッコリーは最も高い HEDP 検出量を示した. これは, 他の生鮮食品に比べて大きな表面積/重量比であることと, 滑らかな表面を持つ生鮮食品と比較して複雑な表面構造を有するために過酢酸製剤残留量が多くなったためと考えられた. 特に, JECFA の残留量推定はブロッコリーの茎のみを使用しているため, 房も使用した今回の結果との差はこの表面積と構造の違いによって生じたものと考えられる.

生鮮食品に残留した HEDP の安全性評価は食品安全委員会で行われており、この中で、毒性学上の根拠を踏まえ、食品安全委員会は HEDP の ADI を 0.013 mg/kg bw/day と設定している。また、保守的な見積もりとして日本における食品からの HEDP 摂取量を 0.0014 mg/kg bw/day と推計している^{8,28)}。この推計は野菜の HEDP 残留量を 0.202 mg/kg として推計している。そこで、野菜の HEDP 残留量を今回の最大検出量 (ブロッコリーの 0.351 mg/kg) に置き換え、食品安全委員会の推計と同様に計算しなおした結果、推計された摂取量は 0.0021 mg/kg bw/day であった。この結果から、今回の結果に基づく過酢酸製剤処理された生鮮食品から摂取すると推定される HEDP の摂取量は、設定された ADI を十分下回っていた。

4.3. オクタン酸の生鮮食品中分析法の開発と輸入生鮮食品中のオクタン酸量の調査

報告のある食品中のオクタン酸分析に関する研究は、主にワインやチーズといった食品中の香気性成分の 1 つとして分析された例が多く、これらの研究では香気成分のパターン分析が主であり、オクタン酸を定量的に調査した例は少ない¹⁶⁻²¹⁾。また、過酢酸製剤は食肉、野菜類、果実類など性状の異なる幅広い生鮮食品の表面殺菌に使用されるため、オクタン酸残留量を測定するためには汎用的な手法が必要である。しかし、報告のあるオクタン酸分析法は性能評価において単一もしくは類似の食品試料に対しての検討しか行っておらず、汎用的な分析に対応できるか不明だった。そこで本研究では、生鮮食品に残留したオクタン酸の分析方法を新たに開発し、各種生鮮食品を用いて分析法の性能評価を行った。また、実際に輸入された生鮮食品中のオクタン酸含有量を測定した。

4.3.1. 方法

4.3.1.1. 試料

分析条件の検討用および添加回収試験用試料の牛肉 (部位:サーロイン, オーストラリア産), 豚肉 (部位 モモ, 国産), 鶏肉 (部位:ムネ, 国産), キャベツ (国産)、ブロッコリー (国産), ニンジン (国産), リンゴ (国産) およびオレンジ (米国産) ならびに国産生鮮食品試料の牛肉, リンゴおよびオレンジは 2013 年 5 月から 2015 年 12 月の間に都内のスーパーマーケットで購入して用いた。また、過酢酸製剤によるオクタン酸残留試験用試料の牛肉 (部位:ヒレ, オーストラリア産), アスパラガス (オーストラリア産), パプリカ (オランダ産), オレンジ (オーストラリア産), レモン (ニュージーランド産) は、2016 年 10 月に都内のスーパーマーケットで購入して用いた。輸入生鮮食品中のオクタン酸量の調査用試料の牛肉は輸入関連団体から購入し、また、野菜類および果実類は輸入関連団体を通じて入手した。これらの試料の購入および入手は 2014 年 6 月から 2015 年 2 月と、2015 年 6 月から 2016 年 1 月の間に行った。

4.3.1.2. 試薬, 試液等

試薬: オクタン酸およびオクタン酸メチルは関東化学工業 (株) の特級品, ノナン酸メチルは東京化成工業 (株) の一級品を用いた。その他は関東化学工業 (株) の特級品を用いた。食肉殺菌用過酢酸製剤 (過酢酸 12.3%, オクタン酸 8.8% 含有) および野菜・果実殺

菌用過酢酸製剤 (過酢酸 12.0%, オクタン酸 10.0% 含有) は製造業者から入手した。

内標準物質含有ヘキサン: ノナン酸メチル 0.1 g をヘキサンに溶解して正確に 200 mL とした。この溶液 5 mL を正確にとり、ヘキサンを加えて 500 mL に定容した (5 µg/mL)。

検量線用標準溶液: オクタン酸メチル 0.02 g を精密に量り、内標準物質含有ヘキサンに溶解して正確に 100 mL に定容し、これを標準原液 (200 µg/mL) とした。標準原液を内標準物質含有ヘキサンで適宜希釈し、検量線用標準溶液 (0.1~20 µg/mL) を調製し、4°C で保存した。

内標準物質含有メタノール: ノナン酸メチル 0.1 g をヘキサンに溶解して正確に 100 mL とした。この溶液 5 mL を正確にとり、メタノールを加えて 500 mL とした (5 µg/mL)。

オクタン酸残留試験用過酢酸製剤: 各過酢酸製剤の取り扱い説明書に基づき、食肉用、野菜・果実用それぞれの使用時における過酢酸の最大濃度 (食肉用: 220 mg/L, 野菜・果実用: 80 mg/L) となるように水で希釈して調製した。

4.3.1.3. 装置

GC-MS は Agilent Technologies 社製の GC (Agilent7890A) および同社 MS (Agilent 5975C), もしくは (株) 島津製作所製 GC (Shimadzu GC-2010) および MS (Shimadzu QP2010 plus) を用いた。また、ホモジナイザーは IKA 社製の ULTRA-TURRAX T25, 遠心分離機は (株) コクサン製の H-80R を用いた。

4.3.1.4. GC-MS 測定条件

カラム: DB-225ms (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 µm) (Agilent Technologies 社製), カラム温度: 60°C (1 分), 60→220°C (7°C/分, 昇温), 220°C (10 分); 注入口温度: 250°C; ランスファーライン (インターフェース) 温度: 280°C; 注入方式: スプリット (スプリット比 1:10); キャリヤーガス: ヘリウム (1 mL/min); イオン化モード: EI (70 eV); イオン源温度: 230°C; 検出モード: SIM; 定量イオン (m/z): 74 (オクタン酸メチルおよび内標準物質); 注入量: 1 µL

4.3.1.5. オクタン酸残留試験試料の調製

過酢酸製剤の取り扱い説明書に記載された推奨使用方法を参考に、オクタン酸残留試験用過酢酸製剤を 1 L ビーカーに試料全体が沈む程度 (500 mL 程度) 注ぎ、試料を 30 秒

間浸漬し、引き上げたのち 30 秒間ビーカー上に滞空させ、自然滴下により水滴を切った。過酢酸製剤処理した牛肉、野菜および果実からそれぞれ 3 検体の試料 (各 10 g) を採取した。各食品は過酢酸製剤処理前に一部を採取し、ブランク試料とした。

4.3.1.6. 試験溶液の調製

細切またはすりつぶした試料約 10 g を精密に量り、ジエチルエーテル 20 mL を加え、5 分間振とう抽出した。必要に応じて遠心 (2 分, 3,000 g) した後、ジエチルエーテル層をナス型フラスコに移した。残さに対して同様の操作を繰り返し、抽出液をナス型フラスコに集め減圧濃縮した。濃縮物に対し硫酸・メタノール溶液 10% (v/v) 2 mL を加え混合した後、45°C で 30 分間加熱した。放冷後、水 3 mL、内標準物質含有メタノール 1 mL およびヘキサン 2 mL を加え、タッチミキサーでかくはんし、ヘキサン層をとり試験溶液とした。

4.3.1.7. 検量線

検量線用標準溶液を GC-MS に注入し、オクタン酸メチルと内標準物質のピークの面積比から 0.1~2.0 µg/mL, 0.2~5 µg/mL および 1~20 µg/mL の範囲の検量線を作成した。

4.3.1.8. 試料中のオクタン酸の定量

試験溶液を GC-MS に注入し、得られたオクタン酸メチルと内標準物質のピークの面積比と検量線とから試験溶液中のオクタン酸メチル濃度 (µg/mL) を求め、次式によって試料中のオクタン酸含量 (mg/kg) を計算した。

$$\text{オクタン酸 (mg/kg)} = C \times V \times k / W$$

C: 試験溶液中のオクタン酸メチル濃度 (µg/mL)

W: 試料の採取量 (g)

V: 試験溶液量 (mL)

k: 0.911 (オクタン酸分子量 (144.21) / オクタン酸メチル分子量 (158.24))

なお、輸入生鮮食品中のオクタン酸量の調査用試料のうち、牛肉については 1 検体につき 3 片の切片を採取・分析し、平均値を算出した。一方、野菜類・果実類については同

一ロットから2個体を採取し、それぞれ分析を行い平均値を算出した。

4.3.2. 結果

4.3.2.1. 試験溶液の調製法

試験溶液の調製にあたり、はじめに抽出操作の予備検討を行った。食品中のオクタン酸を分析するためには、まず、有機溶媒を用いて食品中からオクタン酸を抽出する必要がある。そこで、オクタン酸の極性を考慮して、ジエチルエーテルおよびヘキサン/アセトン (2:1) 混合溶液を用いて抽出溶媒の最適化に関する検討を行った。オクタン酸 10 mg/kg を添加した鶏肉を試料として添加回収試験を行ったところ、両者の回収率の値の差は0.8ポイントと大きな違いは認められなかった。そこで本研究では、溶媒の調製が不要なジエチルエーテルを抽出溶媒として用いることとした。

また、ジエチルエーテルを用いた抽出方法を最適化するため、浸漬操作、振とう操作および超音波操作における抽出効率を比較した。オクタン酸を添加した鶏肉を試料としたとき、振とう操作と浸漬操作では、その回収率の値の差は3.1ポイントとほぼ同等であったが、超音波操作では振とう操作と浸漬操作より 11.9 ポイント低い回収率を示した。また、試料としてキャベツを用いて振とう操作と浸漬操作により同様の検討を行ったところ、振とう操作での回収率は浸漬操作より 6.8 ポイント良好な値を示した。以上の結果より、振とう操作を抽出方法として採用した。

さらに、抽出操作時の抽出回数について検討を行った。試料としてオクタン酸 1.0 mg/kg および 10 mg/kg を添加した鶏肉およびキャベツを用いて、抽出回数が2回の場合と3回の場合でそれぞれ添加回収試験を行ったところ、各試料、各添加濃度での回収率の値の差は 0.2~3.0 ポイント以内と大きな違いは認められなかった。従って、これらの結果および実験操作の迅速性、簡便性も考慮し、抽出操作は2回と設定した。

抽出後から試験溶液を調製する間の操作については、Ichihara らの方法を一部変更して行った²⁹⁾。遊離脂肪酸のGC-MS分析では、分子内のカルボキシ基によりカラム固定相への吸着が生じテーリングを起こすことや、水素結合により沸点上昇を起こし分析が困難となることが指摘されている。そのため一般的に脂肪酸の分析では、前処理として脂肪酸とメタノールを酸または塩基を触媒として反応させ、カルボキシ基のメチルエステル化を行う³⁰⁾。そこで本研究では、10% (v/v) 硫酸含有メタノールを用いてオクタン酸をメチルエステル化し、分析した (Fig. 4.6)。また、ヘキサン分配時のオクタン酸メチルの損失や、測定時の注入誤差などを補正するため、ノナン酸メチルを内標準物質としてメチルエステル化反応後の液に添加し、試験溶液の調製を行った。

4.3.2.2. GC-MS 条件および直線性

食肉 3 種 (牛肉, 豚肉, 鶏肉), 野菜類 3 種 (キャベツ, ブロッコリー, ニンジン) および果実類 2 種 (リンゴ, オレンジ) より調製した試験溶液 (オクタン酸無添加, 内標準物質添加) および標準溶液についてそれぞれ分析し, 各ピークの分離挙動を確認した (Fig. 4.7). その結果, 標準溶液のクロマトグラムでは 8.8 分付近にオクタン酸メチルに由来するピーク, 10.7 分に内標準物質であるノナン酸メチルのピークがそれぞれ観察された (Fig. 4.7. D). また, 両者のピークは十分に分離されるとともに, そのピーク形状も良好であった. 次に, 標準溶液 (Fig. 4.7. D) と各試験溶液 (Fig. 4.7. A, B, C, Blank) のクロマトグラムを比較したところ, オクタン酸メチルのピークは夾雑成分などのピークと良好なベースライン分離を示した. さらに, 各試料についてオクタン酸メチルおよびノナン酸メチル無添加の条件で分析したところ, すべての試料からノナン酸メチルは検出されなかった. 以上の結果より, 今回設定した条件を用いることにより, これらの試料については試料由来の夾雑成分等の妨害を受けずにオクタン酸メチルの分析が可能と確認された.

なお, 検量線は 0.1~2.0 $\mu\text{g/mL}$, 1.0~2.0 $\mu\text{g/mL}$ および 10~200 $\mu\text{g/mL}$ の範囲においてそれぞれ R^2 が 0.997 以上と良好な直線性を示した. また, 直線性の範囲内で S/N 比 10 以上となる濃度を本分析法の LOQ とした. その結果, LOQ は試験溶液として 0.1 mg/L, 試料中濃度として 0.02 mg/kg であった.

4.3.2.3. 添加回収試験

食肉 3 種 (牛肉, 豚肉および鶏肉), 野菜類 3 種 (キャベツ, ブロッコリー, ニンジン) および果実類 2 種 (リンゴおよびオレンジ) について添加回収試験を行った. オクタン酸の添加濃度は, 1.0 mg/kg および 10 mg/kg とした. 各試料 5 併行で測定し, 無添加試料 2 検体から検出されたオクタン酸量の平均値を減じて, 平均回収率および相対標準偏差 (RSD %) を算出した. 各試料の代表的なクロマトグラムを Fig. 4.7. (A, B, C, spiked) に示した. 各試料のオクタン酸の回収率は, 1.0 mg/kg で 74.2~96.6%, 10 mg/kg で 80.5~98.5% であった (Table 4.5.). また, RSD は 1.0 mg/kg で 3.4~9.6%, 10 mg/kg で 2.6~8.2% であり, 両濃度における本法の真度, 併行精度はともに良好であった.

4.3.2.4. 過酢酸製剤処理により残留するオクタン酸量

過酢酸製剤処理によるオクタン酸残留量の検討を行った。使用時の最大濃度に調製した過酢酸製剤によって模擬的に殺菌処理を行った生鮮食品と、未処理の生鮮食品についてオクタン酸を分析し、得られた値の差を残留量とした。結果を Table 4.6. に示す。過酢酸製剤の使用によるオクタン酸の残留量は牛肉で 0.14 mg/kg, パプリカで 0.13 mg/kg, アスパラガスで 0.30 mg/kg, レモンで 0.10 mg/kg, オレンジで 0.08 mg/kg であった。なお, FSANZ による報告では, 過酢酸製剤処理された生鮮食品中のオクタン酸量は保守的に見積もって, 肉類で 1.3~4.0 mg/kg, ブロッコリーで 1.7 mg/kg と推定している⁵⁾。これらの推定値と比較すると今回検出されたオクタン酸の残留量は総じて低かった。

4.3.2.5. 輸入生鮮食品および国産生鮮食品中のオクタン酸量

過酢酸製剤の使用が認められているアメリカ, カナダなどを含む 8 ヶ国から輸入された生鮮食品 (牛肉 56 検体, 野菜類 34 検体, 果実類 89 検体) について, これらに含まれるオクタン酸量を測定した。

この結果 (Table 4.7.), 輸入牛肉から 0.05~1.70 mg/kg (平均±標準偏差 : 0.40±0.31 mg/kg) のオクタン酸が検出され, また, 野菜類では LOQ~1.5 mg/kg (平均±標準偏差 : 0.15±0.32 mg/kg), 果実類では LOQ~4.00 mg/kg (平均±標準偏差 : 0.46±0.75 mg/kg) のオクタン酸が検出された。このように, いずれの食品群でも検出量のばらつきは非常に大きかった。

輸入生鮮食品から検出されたオクタン酸の平均値に比べて, 模擬的に行った最大濃度の過酢酸製剤処理によるオクタン酸の残留量は (Table 4.6.) アスパラガスを除くいずれの食品群においても低かった。

過酢酸製剤を使用していないと考えられる国産の生鮮食品を分析した結果, 牛肉 4 検体からは 0.05, 0.11, 0.24, 0.40 mg/kg のオクタン酸が検出された。またリンゴ 2 検体からは 0.40 および 0.60 mg/kg, オレンジ 2 検体からは 0.64 および 0.71 mg/kg のオクタン酸が検出された。オクタン酸は哺乳類の乳脂肪, ココナッツ油の含有成分など天然の飽和脂肪酸として動植物を問わず自然界に広く存在している³¹⁻³³⁾。食品中のオクタン酸含有量に関して, 主に食品中の香気成分分析を目的とした研究が報告されており, 牛肉では牛脂から 2.0 mg/kg²⁰⁾, 野菜類ではフリーズドライ処理されたブロッコリーの葉から 10~20 mg/kg³³⁾, フリーズドライ処理されたタマネギの芽から 0.27 mg/kg³⁴⁾, 果実類由来では, オレンジの皮から 1.2 mg/kg²¹⁾, オレンジジュースから 0.2 mg/kg²¹⁾, リンゴジュースから

1.7 mg/kg 検出した¹⁹⁾などの報告がある。

本研究で得られた輸入食品および国産食品の定量値、過酢酸製剤処理によるオクタン酸残留量、ならびに文献値を総合的に考察すると、輸入食品から検出されたオクタン酸は過酢酸製剤の使用によると明確に判断できず、検出されたオクタン酸の大部分はいずれも天然由来であることが示唆された。

4.3. 考察

本章では過酢酸製剤による殺菌処理によって生鮮食品に残留する可能性がある, HEDP およびオクタン酸の分析法について検討を行った. この結果, HEDP については, IC-MS/MS による生鮮食品中の HEDP 分析法を確立した. また, 生鮮食品中のオクタン酸量を簡便に分析するため, 誘導体化処理と GC-MS を組み合わせた分析法を確立した. 分析法の性能評価の結果, HEDP 分析法, オクタン酸分析法は真度, 精度ともに良好であり, 生鮮食品中の残留量を検出可能な感度を有することが示された. また, 輸入生鮮食品を対象にオクタン酸含有量の実態調査を行った結果, オクタン酸がほとんどの食品から検出された. これらのオクタン酸の大部分は天然由来であり, そのため過酢酸製剤処理によって増加するオクタン酸は天然のオクタン酸のばらつきに打ち消され, 観察できないと考えられ, 過酢酸製剤処理の指標として用いる場合 HEDP が適当と考えられた.

4.4. 要約

本章では、生鮮食品に残留する可能性のある過酢酸製剤成分、HEDP およびオクタン酸の食品中分析法の確立についての以下の研究を行った。

① IC-MS/MS を分析装置として使用した、高感度でかつ迅速な生鮮食品中の HEDP 分析法を確立した。本分析法における生鮮食品中の HEDP の定量下限値は 0.007~0.2 mg/kg であり、また、検量線の直線性は良好だった。添加回収試験の結果、回収率は 73.9~103.8%，RSD は 1.9~12.6 %だった。本分析法の真度、精度は 1 日 2 併行、5 日間にわたる添加回収試験の変動として評価した。その結果、添加回収試験全体の回収率は 93.6~101.2%，併行精度、室内精度は RSD として 6.9%、11.5%以下だった。さらに、模擬的に過酢酸製剤処理を行った野菜類、果実に本分析法を適用した結果、0.007~0.317 mg/kg の HEDP を検出した。これにより、実際に過酢酸製剤処理された生鮮食品から HEDP が分析可能であることが示された。

② 生鮮食品中のオクタン酸量を簡便に分析するためメチル化による誘導体化と GC-MS による定量法の検討を行った。この結果、ジエチルエーテルを用いた簡易な溶媒抽出法を行った後、10% (v/v) 硫酸・メタノールによって誘導体化し、GC-MS を用いて分析する方法を確立した。確立した分析法による生鮮食品からのオクタン酸の回収率は 74.2~96.6%，相対標準偏差は 2.6~9.6%だった。食品試料中の LOQ は 0.02 mg/kg であった。輸入食品 (牛肉 56 検体、野菜類 34 検体、果実類 89 検体) を対象にオクタン酸の分析を行った結果、牛肉からは 0.34~0.53 mg/kg、野菜類は LOQ~0.48 mg/kg、果実類からは LOQ~1.12 mg/kg のオクタン酸を検出した。また、検出されたオクタン酸の大部分は天然由来であることが示唆された。

4.5. 图表

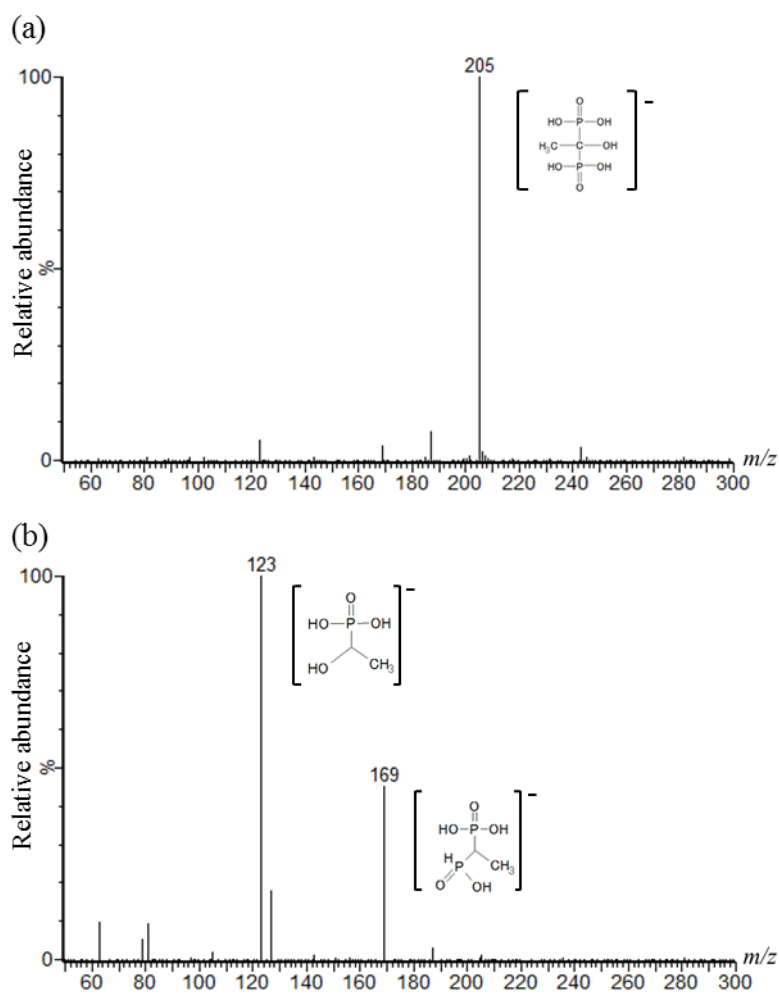


Figure 4.1. Mass spectra of HEDP

(a) MS spectrum of 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid (HEDP) (m/z 50-300). The molecular structure of HEDP ion is shown in the figure.

(b) Result of a product ion scan of m/z 205. The molecular structures in the figure are the estimated structures of the product ions (m/z 123 and 169).

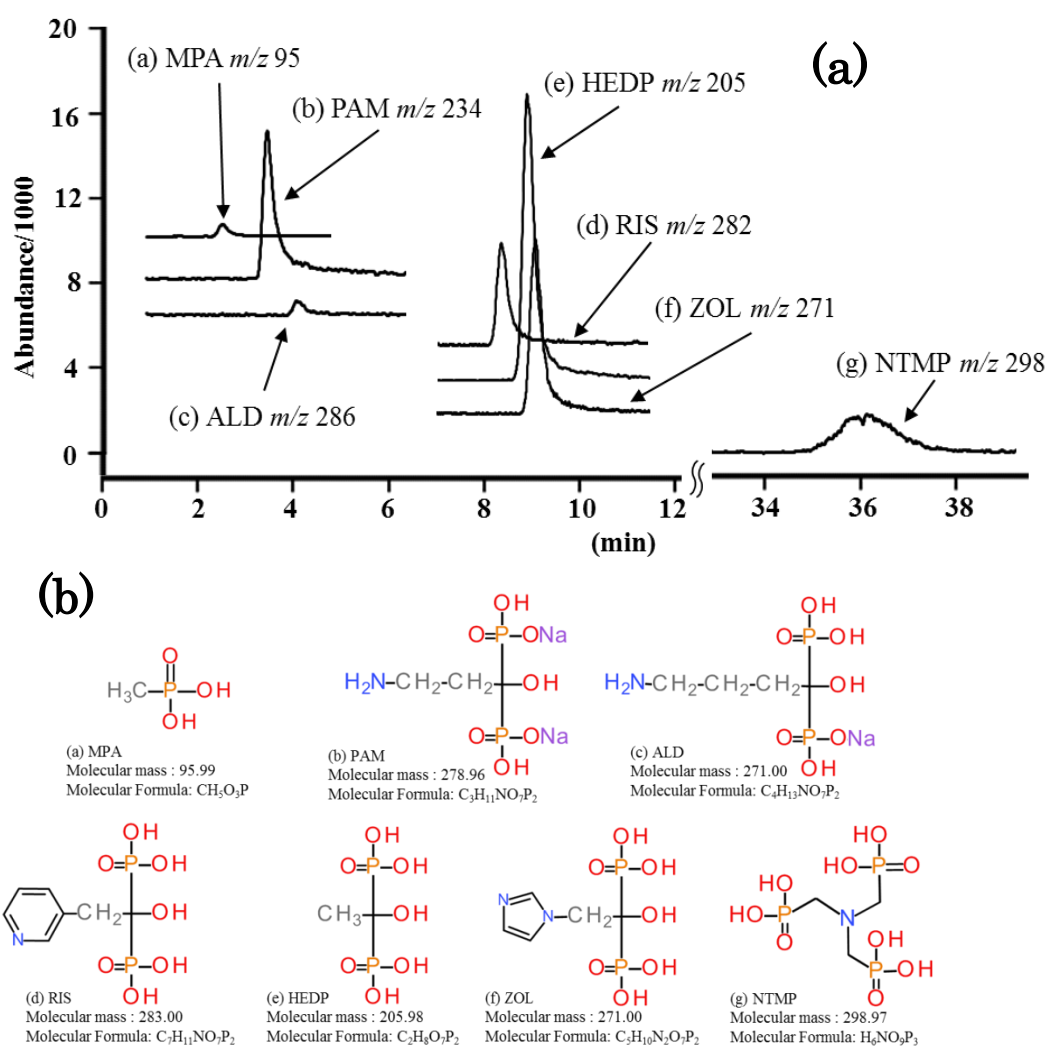


Figure 4.2. SIR chromatogram of HEDP and candidate internal standard compounds

(a) SIR chromatogram: MPA: methylphosphonic acid, (b) PAM: disodium pamidronate hydrate, (c) ALD: alendronate sodium trihydrate, (d) RIS: monosodium risedronate hemipentahydrate, (e) HEDP, (f) ZOL: zoledronic acid monohydrate, (g) NTMP: nitrilotris (methylene) triphosphonic acid.

All chromatograms were obtained from analysis of a 0.05 mg/L solution of each compound.

The inlet flow for MS/MS was introduced only while the peaks of each compound were observed.

(b) Molecular structure of HEDP and candidates of internal standard

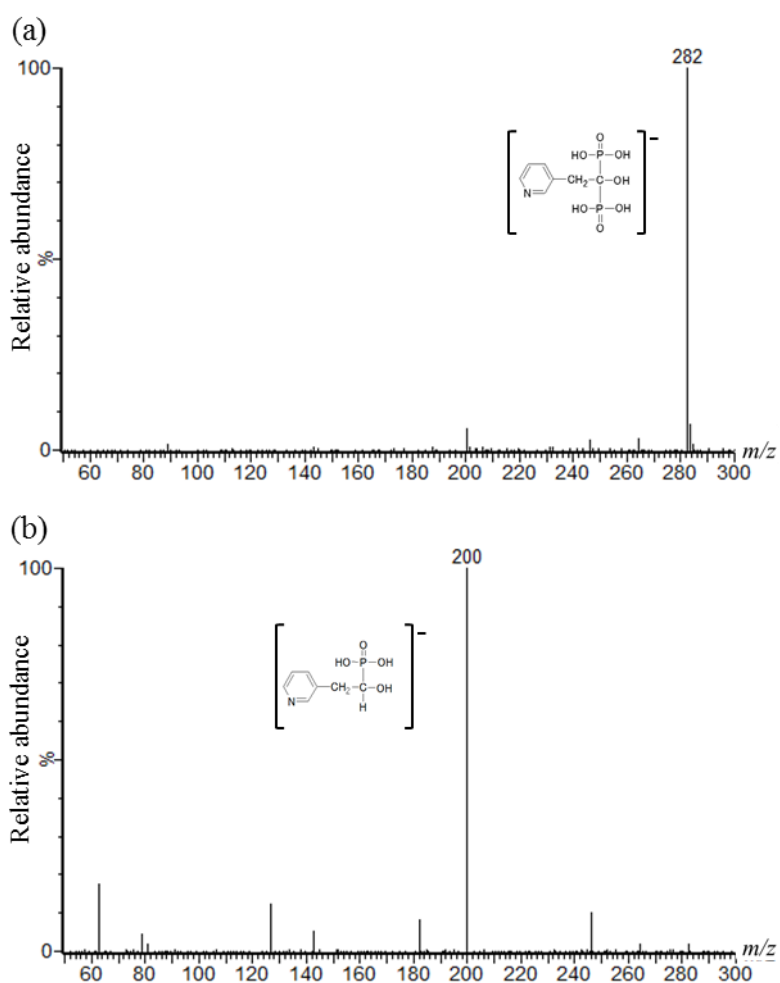


Figure 4.3. Mass spectra of RIS

(a) MS spectrum of monosodium risedronate hemipentahydrate (RIS) (m/z 50-300). The molecular structure of RIS ion is shown in the figure.

(b) Result of a product ion scan of m/z 282. The molecular structure in the figure is an estimated structure of the product ion (m/z 200).

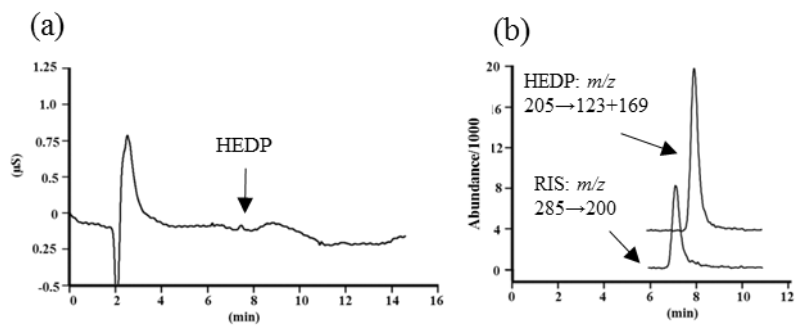


Figure 4.4. IC and SRM chromatograms of HEDP

(a) IC chromatogram of 0.05 mg/L HEDP with RIS

(b) SRM chromatogram of 0.05 mg/L HEDP with RIS

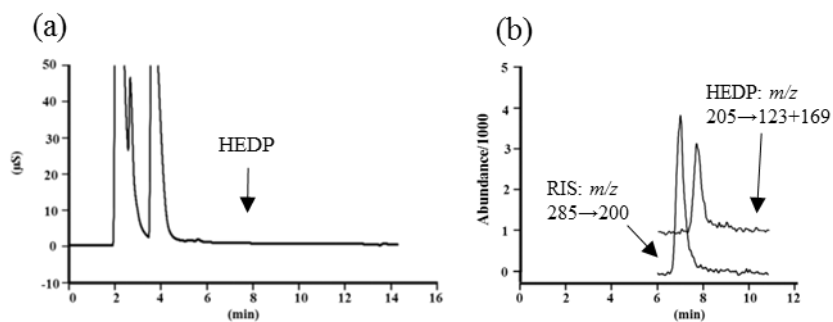


Figure 4.5. IC and SRM chromatograms of HEDP in the recovery test

(a) IC chromatogram of beef sample solution spiked with 0.4 mg/kg of HEDP.

(b) SRM chromatogram of beef sample solution spiked with 0.4 mg/kg of HEDP.

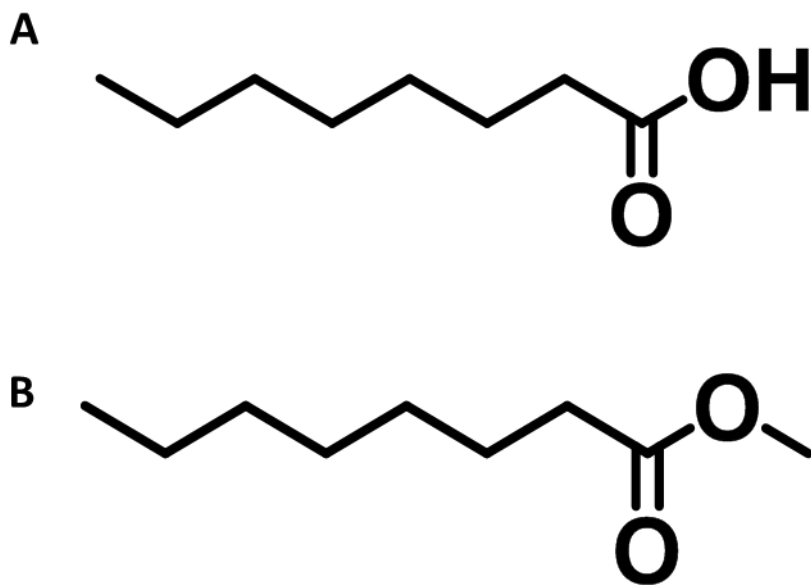


Figure 4.6. Chemical structures of octanoic acid (A) and methyl octanoate (B)

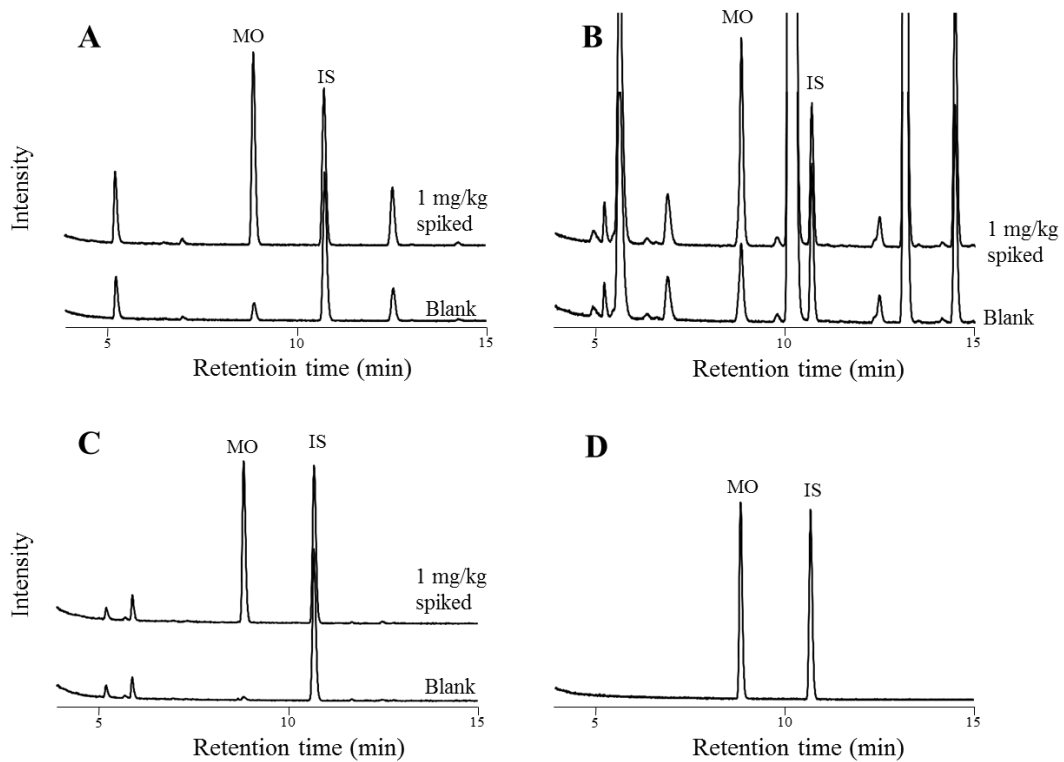


Figure 4.7. MS chromatograms of food samples

A. Beef, B. Orange, C. Broccoli, D. Standard solution of methyl octanoate (5 mg/L),

These extracted chromatograms were generated for m/z 74.

MO: methyl octanoate, IS: internal standard

Table 4.1. Components of a typically peracetic acid–based sanitizer for fruits and vegetables⁴⁾

Component	%
Peracetic acid	14
Acetic acid	48
Hydrogen peroxide	4.5
Octanoic acid	8.8
Peroxyoctanoic acid	1.4
HEDP	0.6
Water	22.7

Table 4.2. Recovery of HEDP on uncooked foods at levels near the limit of quantification

Sample	Spiked level (mg/kg)	Recovery (%)	RSD ^{*1} (%)
Fruits			
Cherry	0.030	76.6	2.9
Grapefruit	0.010	87.3	1.9
Kiwi	0.010	73.9	11.0
Lemon	0.010	82.6	4.7
Lime	0.010	103.8	8.8
Orange	0.010	89.0	3.1
Papaya	0.010	102.0	12.6
Vegetables			
Broccoli	0.030	89.9	4.1
Celery	0.010	95.9	8.9
Meats			
Beef	0.40	80.3	10.8
Chicken	0.40	84.0	4.4
Pork	0.40	90.1	10.0

n=3

*1RSD, relative standard deviation of recoveries

Table 4.3. Inter-day recovery, repeatability, and reproducibility of determinations of HEDP on broccoli and beef

Spiked level (mg/kg)	Broccoli		Beef	
	0.06	0.6	0.4	4.0
Recovery ^{*1} (%)	93.6	94.0	96.0	101.2
RSD _r ^{*2} (%)	2.9	5.9	6.9	5.7
RSD _R ^{*3} (%)	5.4	5.9	11.5	6.9

^{*1}Each recovery value represents the mean of results on five different days (two trials per day).

^{*2}RSD_r, relative standard deviation for repeatability.

^{*3}RSD_R, relative standard deviation for reproducibility.

^{*4}RSD_r and RSD_R were calculated by one-way analysis of variance of the recovery values obtained on five different days.

Table 4.4. Application of the developed method for the determination of residual HEDP on PAS-treated foods

Sample	Determined HEDP ^{*1} (mg/kg)	Average ^{*3} (mg/kg)
Fruits		
Cherry	0.045-0.049	0.047
Grapefruit	(0.005) ^{*2} -0.011	0.009
Kiwi	0.019-0.027	0.022
Papaya	0.008-0.011	0.009
Vegetables		
Broccoli	0.284-0.351	0.317
Celery	0.141-0.217	0.170
Red bell pepper	(0.006) ^{*2} -0.010	0.008

n=3

The uncooked food samples were treated by imitating the process of actual sanitization using a product of peracetic acid-based sanitizer (PAS).

^{*1}Determined levels of 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid (HEDP).

^{*2}Reference value (<Method limit of quantification (MLOQ)).

^{*3}Average of three tests.

Table 4.5. Recoveries of octanoic acid from each sample

	1 mg/kg ^{*1}		10 mg/kg ^{*1}	
	Recovery (%)	RSD (%) ^{*2}	Recovery (%)	RSD (%) ^{*2}
Beef	96.6	6.9	92.6	3.6
Pork	87.2	4.8	83.3	8.2
Chicken	77.9	3.4	82.0	3.1
Cabbage	96.1	3.4	91.7	5.0
Broccoli	87.8	8.5	95.0	6.4
Carrot	85.1	4.7	94.9	2.6
Apple	95.5	4.2	98.5	5.5
Orange	74.2	9.6	80.5	8.1

*1 Spiked level

*2 Relative standard deviation (n=5)

Table 4.6. Residual levels of octanoic acid in uncooked foods by peracetic acid-based sanitizer (PAS) treatments

	Blank		PAS treated ^{*1}		Increased level
	mg/kg	RSD (%) ^{*2}	mg/kg	RSD (%) ^{*2}	mg/kg
Meats					
Beef	0.12	3.1	0.26	5.8	0.14
Vegetables					
Paprika	0.03	7.8	0.16	9.2	0.13
Asparagus	0.02	7.1	0.33	15.8	0.30
Fruits					
Lemon	0.07	6.0	0.17	9.2	0.10
Orange	0.26	4.0	0.34	5.9	0.08

*1 These samples were treated by PAS for carcass sanitization or for vegetables/fruits sanitization.

*2 Relative standard deviation (n=3)

Table 4.7. Determination levels of octanoic acid in imported uncooked foods

Sample (Exporting Country)	Number of samples	Max. (mg/kg) ^{*1}	Min. (mg/kg) ^{*2}	Content (mg/kg) ^{*3}		
Meats						
Beef (USA) ^{*4}	17	1.70	0.08	0.34	±	0.37
Beef (Canada)	14	1.41	0.09	0.53	±	0.38
Beef (AUS) ^{*4}	16	0.71	0.06	0.34	±	0.22
Beef (NZL) ^{*4}	9	0.77	0.05	0.40	±	0.21
Meats Sum	56	1.70	0.05	0.40	±	0.31
Vegetables						
Asparagus (USA) ^{*4}	2	0.88	0.12	0.48	±	0.41
Broccoli (USA) ^{*4}	7	0.47	0.05	0.23	±	0.17
Celery (USA) ^{*4}	6	1.50	< 0.02 ^{*5}	0.25	±	0.44
Chili pepper (NZL) ^{*4}	2	0.28	0.08	0.15	±	0.09
Kale (USA) ^{*4}	5	0.09	0.03	0.07	±	0.04
Paprica (NZL) ^{*4}	2	0.24	< 0.02 ^{*5}	0.11	±	0.11
Paprica (Netherlands)	2	0.05	0.04	0.05	±	0.03
Paprica (Republic of Korea)	4	0.05	< 0.02 ^{*5}	0.02	±	0.02
Treviso (USA) ^{*4}	4	0.03	< 0.02 ^{*5}	< 0.02		
Vegetables Sum	34	1.50	< 0.02	0.15	±	0.32
Fruits						
Avocado (NZL) ^{*4}	1	0.02	< 0.02 ^{*5}	< 0.02 ^{*5}		
Cherry (USA) ^{*4}	2	0.09	0.02	0.05	±	0.03
Grapefruits (USA) ^{*4}	7	1.50	0.33	0.78	±	0.31
Grapefruits (South Africa)	2	0.95	0.43	0.76	±	0.23
Kiwi (NZL) ^{*4}	9	0.23	0.03	0.06	±	0.06
Lemon (NZL) ^{*4}	2	0.09	0.07	0.04	±	0.05
Lemon (USA) ^{*4}	13	1.10	0.04	0.19	±	0.22
Lemon (Chile)	6	0.42	0.06	0.14	±	0.11
Lemon (South Africa)	1	0.24	0.05	0.15		
Lime (Mexico)	13	0.27	0.05	0.10	±	0.06
Melogold (USA) ^{*4}	3	0.75	0.39	0.60	±	0.13
Orange (AUS) ^{*4}	7	1.70	0.27	0.83	±	0.42
Orange (USA) ^{*4}	9	2.50	0.36	1.12	±	0.78
Orange (South Africa)	1	1.00	0.60	0.80		
Papaya (USA) ^{*4}	13	4.00	0.03	0.93	±	1.14
Fruits Sum	89	4.00	< 0.02	0.46	±	0.75

*1 These values indicate the maximum level of determination

*2 These values indicate the minimum level of determination

*3 These values indicate mean±standard deviation.

*4 USA: United States of America, AUS: Australia, NZL: New Zealand

*5 The determination levels smaller than LOQ (< 0.02 mg/kg) were taken as zero for all calculation.

4.6. 参考文献

- 1) Oakes T. R., Stanley P. M., Keller J. D., 5,200,189A, 6, Apr. 1993.
- 2) Broda D. M., *Lett. Appl. Microbiol.*, **45**, 336–41 (2007).
- 3) 岩沢篤郎, 中村良子, 検査と技術, **31**, 1417–1419 (2003).
- 4) JECFA, *WHO Food Addit. Ser.*, **54**, (2006).
- 5) FSANZ, Application A513 Octanoic Acid as a Processing Aid Initial: Assessment Report, 2004.
- 6) EFSA, *Eur. Food Saf. Auth. J.*, **306**, 1–10 (2005).
- 7) Block S. S., “Disinfection, sterilization, and preservation,” 4th ed., Lea & Febiger, 1991.
- 8) 食品安全委員会, 食品安全委員会通知 “食品健康影響評価の結果の通知について,” 2015.
- 9) Hilgren J. D., Salverda J. A., *J. Food Sci.*, **65**, 1376–1379 (2000).
- 10) Lovdahl M. J., Pietrzyk D. J., *J. Chromatogr. A*, **850**, 143–152 (1999).
- 11) Fernandes C., Leite R. S., Lancas F. M., *J. Chromatogr. Sci.*, **45**, 236–241 (2007).
- 12) Kovačević M., Gartner A., Novič M., *J. Chromatogr. A*, **1039**, 77–82 (2004).
- 13) Xie Z., Jiang Y., Zhang D., *J. Chromatogr. A*, **1104**, 173–178 (2006).
- 14) Warnke M. M., Breitbach Z. S., Dodbiba E., Crank J. A., Payagala T., Sharma P., Wanigasekara E., Zhang X., Armstrong D. W., *Anal. Chim. Acta*, **633**, 232–7 (2009).
- 15) Yuzawa T., Watanabe C., Tsuge S., Freeman R. R., Matherly R., *J. Chromatogr. A*, **1216**, 5292–5 (2009).
- 16) Antalick G., Perello M. C., de Revel G., *Food Chem.*, **121**, 1236–1245 (2010).
- 17) Carunchia Whetstine M. E., Karagul-Yuceer Y., Avsar Y. K., Drake, *J. Food Sci.*, **68**, 2441–2447 (2003).
- 18) Pinho O., Ferreira I. M. P. L. V. O., Ferreira M. A., *Anal. Chem.*, **74**, 5199–5204 (2002).
- 19) Jurado-Sánchez B., Ballesteros E., Gallego M., *Talanta*, **84**, 924–930 (2011).
- 20) LARICK D. K., HEDRICK H. B., BAILEY M. E., WILLIAMS J. E., HANCOCK D. L., GARNER G. B., MORROW R. E., *J. Food Sci.*, **52**, 245–251 (1987).
- 21) Brat P., Rega B., Alter P., Reynes M., Brillouet J. M., *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3442–3447 (2003).
- 22) “Scripps Center For Metabolomics and Mass Spectrometry - METLIN.”:

- <https://metlin.scripps.edu/metabo_info.php?molid=2629>, cited 23 June, 2016.
- 23) Peng S. X., Dansereau S. M., *J. Chromatogr. A*, **914**, 105–110 (2001).
 - 24) Bertolini T., Vicentini L., Boschetti S., Andreatta P., Gatti R., *J. Chromatogr. A*, **1365**, 131–9 (2014).
 - 25) Huikko K., Kotiaho T., Yli-Kauhaluoma J., Kostianen R., *J. Mass Spectrom.*, **37**, 197–208 (2002).
 - 26) Ismail Z., Aldous S., Triggs E. J., Smithurst B. A., Barry H. D., *J. Chromatogr.*, **404**, 372–7 (1987).
 - 27) Sparidans R. W., den Hartigh J., Beijnen J. H., Vermeij P., *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **696**, 137–144 (1997).
 - 28) RYOICHI N., TAKAHISA N., TOSHIO O., KAORU T., MIZUO O., TSUGUO N., *Clin. Rep.*, **23**, 1257–1288 (1989).
 - 29) Ichihara K., Fukubayashi Y., *J. Lipid Res.*, **51**, 635–40 (2010).
 - 30) 中村洋, “分析試料前処理ハンドブック,” 丸善, Tokyo, 2003.
 - 31) Schreiber D., Knight R., Hoagland T., Venkitanarayanan K., *J. Food Prot.*, **67**, 884–888 (2004).
 - 32) Sun J., Yu B., Curran P., Liu S. Q., *Food Chem.*, **129**, 1882–1888 (2011).
 - 33) Arnáiz E., Bernal J., Martín M. T., García-Viguera C., Bernal J. L., Toribio L., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **113**, 479–486 (2011).
 - 34) Takahashi M., Shibamoto T., *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 10462–10467 (2008).

第5章 総括

5.1. 総合考察

食品添加物は現代の食習慣になくってはならない存在ではあるが、実際に人体に摂取するという特性上、その適切な使用には特に安全・安心が求められており、リスク評価を支える摂取量調査、リスク管理を支えるモニタリング調査といったリスクアセスメントを支える食品分野におけるレギュラトリーサイエンス研究は食品の安全に直結している。また国際的流通網の整備に伴い、規格基準の根拠となる正確な科学的データが求められている。加えて、地方行政における行政リソースはひっ迫しており、流通する食品を十分に調査するため、分析法の効率化とコスト削減が必要であった。そこで本論文ではレギュラトリーサイエンスの枠組みの中で、AIの摂取量調査と3種の新規食品添加物分析法の開発に関する研究を行った。

第2章の研究では、MB法を用いて食品中のAI含有量を測定し、食品由来のAI摂取量の推計を行った。各食品群中のAI含有量を定量した結果、食品群ごとにAIの含有量は大きく異なり、特に砂糖・菓子類、穀類から多く検出された。国内の平均的な食習慣における加工食品からのAI摂取量は、JECFAの設定したPTWI (2 mg/kg bw/week) を十分に下回っていた¹⁾。しかし、偏った食習慣の小児ではPTWIを超えるAI暴露の可能性があり、バランスの良い食事に注意する必要があると考えられた。加えて、今回の研究はどのような食事をすればAIの摂取量を低減させることが可能であるかを考える上で有用な知見といえる。また、今回の食品試料は関東近郊で流通している食品限定されており、今後、関西など他の地域におけるAI摂取量についての研究を行うことで、地域の食習慣を反映させることができれば、さらに高い信頼性をもつAIのリスク評価が可能となり、地域の食の安全・安心を担保する一助となるだろう。

第3章の研究では、安全性に懸念のある従来の試験法を改善し、安全性と効率を向上させた新たな食品添加物の分析法の開発を行うことで、リスク管理の効率化を図った。食品中の食品添加物分析法(いわゆる公定法)で示されたCuCh/CuCh-Naの分析法は、現在では安全性への懸念により使用が推奨されないクロロホルムを分析に必要としていた²⁾。また、CuChおよびCuCh-Naはそれぞれ個別に定量する必要があるが、分離精製が公定法では不十分でとの指摘があり、改善する必要があった。そこで、有害性の高い溶媒を使用せずにCuCh/CuCh-Naを分離定量可能な分析法を開発した。実際にCuCh/CuCh-Naが添加されている市販食品に本分析法を適用した結果、市販食品からCuCh/CuCh-Naを

定量可能であることが示された。このように本章では、食品中の CuCh/CuCh-Na 分析法に新たな選択肢を加えた。また、有害性の高い溶媒を使用しないことから、食品添加物のモニタリング試験従事者の安全性を向上させ、分析コストの削減も期待された。

第 4 章の研究では、過酢酸製剤残留成分の分析法の開発を行った。過酢酸製剤は食品添加物として未指定だったため、日本では過酢酸製剤処理された食品の流通が認められていなかった。しかし、過酢酸製剤に安定剤として含まれる HEDP と界面活性剤として含まれるオクタン酸は、輸入生鮮食品に残留する可能性が指摘されていた。そのためリスクアナリシスの観点から、輸入生鮮食品中の残留 HEDP およびオクタン酸の残留実態調査を行う必要があり、早急に分析手法の開発が必要とされていた。そこで、まず HEDP について検討を行った。その結果、簡易な試料調製法に加え IC-MS/MS による高感度な定量法を組み合わせることで、真度、精度ともに良好な生鮮食品中の HEDP 分析法を確立した。

次に、オクタン酸についても生鮮食品中の分析法の開発を行った。この結果、誘導体化による試料調製と、GC-MS を組み合わせることで簡便かつ真度、精度ともに良好な生鮮食品中オクタン酸分析法を確立した。また、HEDP、オクタン酸分析法はともに過酢酸製剤処理を行った生鮮食品に適用し、性能評価を行った結果、生鮮食品に残留した微量の HEDP、オクタン酸を分析できる感度を有していることが示された。

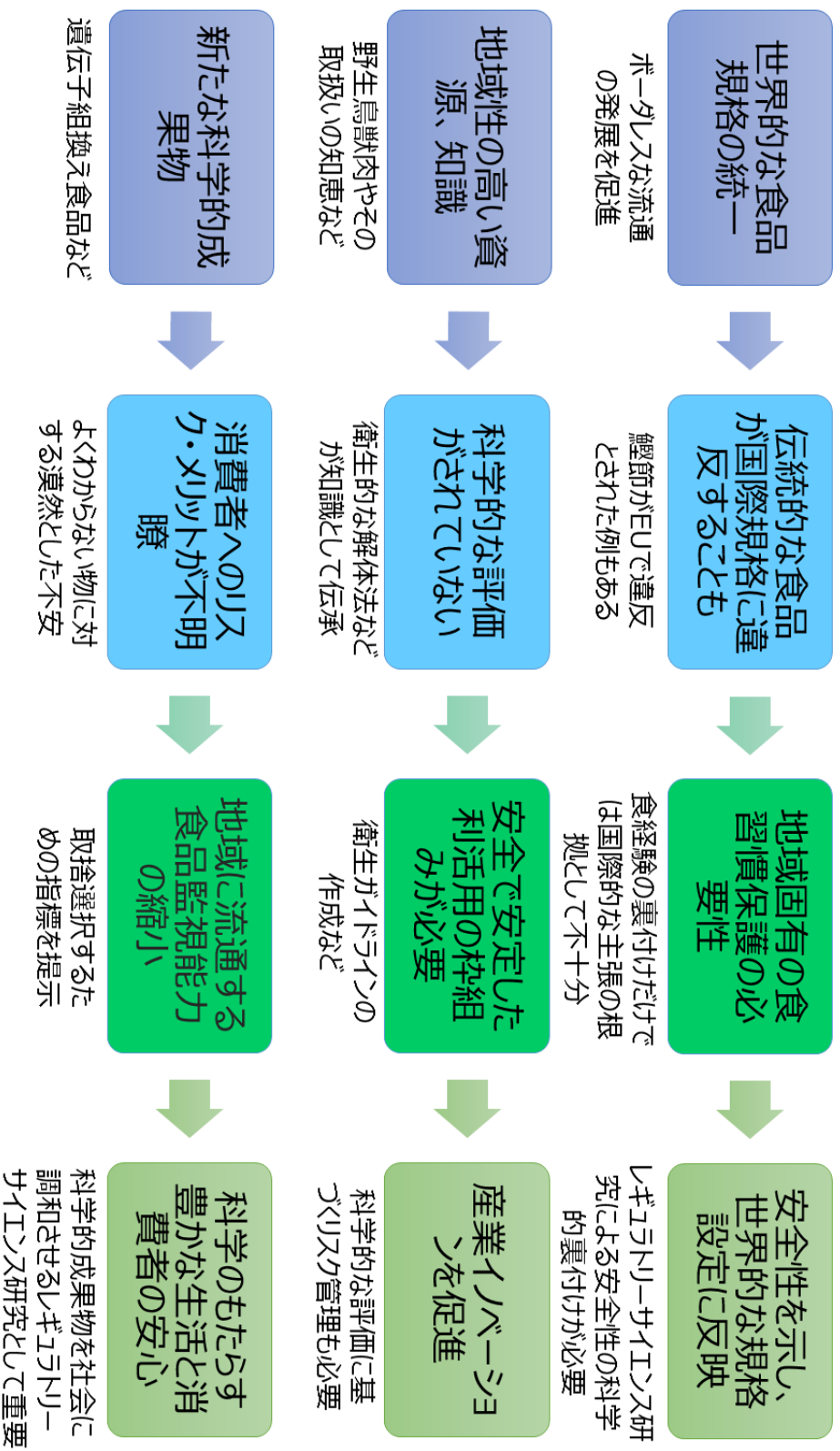
また、過酢酸製剤処理された生鮮食品の実態調査を行う場合、過酢酸製剤処理によって増加するオクタン酸は天然のオクタン酸のばらつきに打ち消され、観察が困難であるが、HEDP は測定可能と考えられた。このため、過酢酸製剤処理の指標として HEDP の測定が妥当と考えられた。この結果は、HEDP がリスク管理上の新たな評価基準の 1 つとして有用であることを示唆していた。

以上のように本論文では、レギュラトリーサイエンス研究において一定の成果を示した。しかし、レギュラトリーサイエンス研究は継続的な再調査、再評価が必須とされている。実際に、AI 摂取は砂糖・菓子類に含まれるベーキングパウダーに由来する AI の占める割合が大きいことが周知されつつあり、その結果、ホットケーキミックスなどのベーキングパウダーを含む製品は、AI 不使用であることを謳ったものが多くを占めるようになってきている。そのため、現在の AI 摂取量は調査時点に比べて減少していると考えられ、レギュラトリーサイエンス研究として継続的な調査が必要である。また、科学的知見の蓄積とともに新たなリスクが判明した場合には再評価および規制の再検討が求められる

だろう。さらに、レギュラトリーサイエンス研究の調査精度や合理性の向上は、進歩する科学技術水準に合わせて要求されていくものであり、今回開発した食品添加物分析法も、当該食品添加物が使用される限り最新の科学的知見を積極的に取り込み、更新していく必要がある。また、HEDP やオクタン酸のように国内で使用が許可されていない添加物に対する規制は、輸入食品に対する非関税障壁となる可能性がある。現在、環太平洋戦略的経済連携協定 (TPP) のような物流の障壁となる規制を取り払おうとする世界的な運動が存在し、国内独自の規制は科学的に合理的な根拠を示さなければ WTO に撤廃を求められる可能性が高い。しかし、自国内への無秩序な輸入品の流入は地域産業を破壊する恐れもあり、慎重な対応を要する。また、序論でもふれたが、鯉節が EU で違反品とされた問題のように、地域に伝統的に伝わる食経験が豊富な食品であっても、国際規格に照らし合わせた場合違反品とされる場合がある。そのような中で、科学的根拠に基づく食品の有害性や安全性について根拠を示し、国際規格に反映させることが必要であり、その根拠となる食品成分の含有量調査などのレギュラトリーサイエンス研究は、間接的に地域の産業を保護し、また活性化する意味でも重要と言えるだろう (Fig. 5.1)。

また、レギュラトリーサイエンス研究は食品分野のリスクアナリシスを支えるだけではない。レギュラトリーサイエンスは、古くから民間の間で伝承された知恵や暮らし向きなどを、適切に整理・判断し、国民の健康への影響の良し悪しを評価する評価科学の側面を持つ³⁾。例えば、限定されたコミュニティにのみ伝わる有用な知識や資源を科学的に評価した上で一般化を行い、利活用への道を開き、科学的な安全性を根拠とした産業イノベーションの発展をサポートすることもレギュラトリーサイエンス研究として重要である。例えば、農林水産省ではレギュラトリーサイエンス研究推進計画を策定しており、この計画では山菜中有害成分の分析法の開発とリスク評価に関する研究、野生鳥獣肉についてのリスク評価の研究および衛生ガイドラインの作成などがレギュラトリーサイエンス研究として行われている⁴⁾。このように、地域で限定的にしか活用されていなかった資源を科学的に評価し、規格基準などの整備を行うことで産業イノベーションの育成を促している (Fig. 5.1)。さらに、レギュラトリーサイエンス研究によって、科学的に妥当性が担保された評価を示すことは、例えば遺伝子組換え食品などの科学的成果物を消費者が自律的に取捨選択するための指標となり、時として消費者には不可解に見える科学的成果を正しくとらえ、科学的成果物の享受による豊かな生活と消費者の安心につながると考えられる (Fig. 5.1)。

科学の進歩が加速度を増し、科学的成果物が社会に与える影響がさらに大きくなる中で、今後のレギュラトリーサイエンスは比例して重要性が増大すると考えられ、レギュラトリーサイエンス研究のさらなる発展が望まれる。



5.2. 図表

Figure 5.1. 発展的なレギュトリーサイエンス研究

5.3. 参考文献

- 1) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, 7-17 (2011).
- 2) Ushiyama H., Nishijima M., Tabata S., Yasuda K., Kamimura H., Nishima T., *Food Hyg. Saf. Sci. (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, **27**, 417-420 (1986).
- 3) 細谷憲政, “人間栄養とレギュラトリーサイエンス” 第一出版, 東京, 2010
- 4) “レギュラトリーサイエンスに属する研究：農林水産省.”:
<http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/regulatory_science/#rsplan>, cited 26
December, 2016.

略語表

AAS	Atomic absorption spectrophotometry
ADI	Acceptable daily intake
CuCh	Copper chlorophyll
CuCh-Na	Sodium copper chlorophyllin
FSANZ	Food Standards Australia New Zealand
GC-MS	Gas chromatograph–mass spectrometer
HACCP	Hazard analysis and critical control point
HEDP	1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid
HPLC	High-performance liquid chromatography
IC-MS/MS	Ion chromatograph with tandem mass spectrometry
ICP-AES	Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MB 試料	マーケットバスケット試料
MB 法	マーケットバスケット法
mg/kg bw/day	体重あたりの一日摂取量
mg/kg bw/week	体重あたりの週間摂取量
mg/person/day	一人あたりの一日摂取量
MULs	Maximum use levels
OA	Octanoic acid
PAS	Peracetic acid-based sanitizers
PTWI	Provisional tolerable weekly intake
RSD	Relative standard deviation
RSD _r	Relative standard deviation for repeatability
RSD _R	Relative standard deviation for reproducibility
R ²	決定係数
SIM	Selected ion monitoring
SRM	Single reaction monitoring

謝辞

本博士論文は、筆者が国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部において行った研究をとりまとめたものです。本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を賜りました国立医薬品食品衛生研究所食品部 穂山 浩先生に心より感謝申し上げます。また、本論文をとりまとめるにあたり、ご指導ならびにご校閲を賜りました三重大学大学院 地域イノベーション学研究科 矢野 竹男教授に心より感謝申し上げます。

また、本研究の遂行に当たり多大なご協力、ご助言を頂戴しました国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の佐藤 恭子先生ならびに、食品添加物部の諸先生に深謝申し上げます。また、研究活動において多大なご助力を頂きました食品添加物部の職員の皆様に深謝申し上げます。また、本研究に対し直接的なご指導を頂きました久保田 浩樹先生、大槻 崇先生に特別の感謝を申しあげます。

また、研究の基礎をご指導頂きました東京農業大学資源生物工学研究室の川崎 信治教授に心より感謝申し上げます。また、研究のみならず様々な面でお気遣いを頂きました東京農業大学資源生物工学研究室の新村 洋一教授に心より感謝申し上げます。

最後に、惜しみなく支え続けてくれた家族に改めて感謝いたします。