

ピラジンの概要

1. はじめに

ピラジンは、麦芽等の食品中に存在し、また、コーヒー、ココナッツ等の焙煎及びえび、豚肉、牛肉等の加熱調理により生成する成分である¹⁾。欧米では、焼菓子、ハード・キャンデー類、ソフト・キャンデー類、アルコール飲料、冷凍乳製品類、製菓材料などの様々な加工食品において香りを再現し、風味を向上させるために添加されている²⁾。

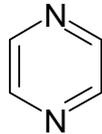
2. 名称等

名称：ピラジン

英名：Pyrazine

英文別名：1,4-Diazine

構造式：



化学式：C₄H₄N₂

分子量：80.09

CAS 番号：290-37-9

3. 安全性に係る知見の概要

厚生労働省が行った安全性試験の結果ⁱ⁾、National Library of Medicine (NLM: PubMed, TOXLINE)、米国香料工業会のデータベース (RIFM-FEMA database)、製品評価技術基盤機構 (NITE) データベースの検索結果、JECFA モノグラフの内容等に基づき、遺伝毒性試験、反復投与毒性試験等の成績をとりまとめた。なお、動物を用いた試験成績については経口投与のものに限定した。

(1) 反復投与毒性

5 週齢の SD 系ラット (各群雌雄各 10 匹) への強制経口投与による 90 日間反復投与毒性試験 (0、0.03、0.3、3mg/kg 体重/日ⁱⁱ⁾) では、いずれの投与群で

ⁱ⁾反復投与毒性試験 (引用文献 3-1)) および小核試験 (引用文献 9-1)) が厚生労働省の委託により行われている。各試験に使用された被験物質については、試験機関において保存されていた被験物質の一部を譲り受けて分析を行い、(独)産業技術総合研究所により公開されているスペクトルと比較したところ両者のパターンが一致したこと等から、ピラジンであることが国立医薬品食品衛生研究所の専門家により確認されている^{3-2) 3-3) 9-2)}。なお本被験物質は、添加物として指定する際に予定されている規格に合致しているものである。

ⁱⁱ⁾ 投与量は、通常、安全マージンを確保するため、欧米における使用量調査を基に算定した推定摂取量に対して 1,000、10,000、100,000 倍に相当する 3 用量群で実施するが、¹⁾

も一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、器官重量、剖検及び病理組織学的検査において、被験物質投与に関連した毒性影響は認められなかった^{3-1) 3-2) 3-3)}。

この結果から、本試験条件下における無毒性量 (NOAEL) は 3mg/kg 体重/日ⁱⁱⁱと考えられる。

(2) 発がん性

発がん性試験は行われておらず、国際機関 (International Agency for Research on Cancer (IARC)、European Chemicals Bureau (ECB)、U. S. Environmental Protection Agency (EPA)、National Toxicology Program (NTP)) でも、発がん性の評価はされていない。

(3) 遺伝毒性

細菌 (サルモネラ菌TA98^{4) 5) 6) 7) 8)}、TA100^{4) 5) 6) 7) 8)}、TA102⁶⁾、TA1535⁷⁾、TA1537^{7) 8)}、TA1538⁷⁾) を用いた復帰突然変異試験では、代謝活性化系の有無に関わらず陰性であった。

マウスリンパ腫由来の細胞株 (*L5178Y tk⁺*) を用いたマウスリンフォーマTK試験 (最高用量10.0 mg/mL) では、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であった⁷⁾。

酵母を用いた突然変異試験 (最高用量 60.0 mg/mL) で、最高用量で変異コロニー数の増加はみられたが、有糸分裂組換え数の増加は検出されなかった⁸⁾。

チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHO細胞) を用いた染色体異常試験 (最高用量25mg/mL) では、最高用量で代謝活性化系の有無にかかわらず陽性が認められた⁸⁾が、現行ガイドラインで設定されている限界用量より高い用量のみでの反応であり、毒性学的に意義のあるものとは考えられなかった。

7 週齢の ICR 系マウス (各群雄 5 匹) を用いた骨髄小核試験 (最高用量 1,000mg/kg 体重/日×2、強制経口投与) では陰性であった^{9-1) 9-2) 3-3)}。

以上の結果から、酵母突然変異試験および CHO 細胞を用いた染色体異常試験で陽性の結果が認められたが、それらは高用量域のみであり、十分に高用量まで試験された復帰突然変異試験及び動物を用いた小核試験では陰性の結果が得られていることを考慮して総合的に判断すると、本物質は、香料として用いられるような低用量域では、生体にとって問題となるような遺伝毒性はないものと考えられる。

表 遺伝毒性試験概要

√JECFA モノグラフ¹⁰⁾に記載された欧米の推定摂取量が非常に小さい(0.2 µg/人/日)ことから、本物質に関しては JECFA で香料としての使用に安全性の懸念がないとする摂取量の閾値 1.5 µg/人/日(0.03 µg/kg 体重/日)を基本の値として採用し、これに対して 1,000、10,000、100,000 倍に相当する 3 用量群を設定して試験を実施した。

iii いずれの用量においても毒性影響が認められなかったことから、ここでは試験を実施した最高用量を NOAEL とした。

	試験	対象	処理濃度・投与量	結果	参照
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験 [1994年]	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98、TA100)	[+/-S9*1] 用量の詳細不明*2	陰性	4
	復帰突然変異試験 [1993年]	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100)	[+/-S9*1] 用量の詳細不明	陰性	5
	復帰突然変異試験 [1989年]	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA102)	[+/-S9*1] 0、0.641µg/plate~64.1mg/plate*3	陰性*4	6
	復帰突然変異試験 [1988年]	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538)	[-S9*1] 0、0.333、1、3.333、6.666、10 mg/plate	陰性	7
			[+S9*1：ラット肝] 0、0.333、1、3.333、6.666、10 mg/plate	陰性	
			[+S9*1：ハムスター肝] 0、0.333、1、3.333、6.666、10 mg/plate	陰性	
	復帰突然変異試験 [1980年]	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1537)	[+/-S9*1] 0、6.3、12.5、25、50、100mg/plate	陰性	8
	マウスリンフォーマTK試験 [1988年]	マウスリンパ腫由来の細胞株 (<i>L5178Y tk⁺</i>)	[-S9*1] 0、4.857、6.143、7.429、8.714、10.0 mg/mL	陰性	7
[+S9*1] 0、2.286、3.571、6.143、7.429、8.714、10.0 mg/mL			陰性		
酵母突然変異試験 [1980年]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (D5)	0、7.5、15、30、60mg/mL	陽性*5	8	
染色体異常試験 [1980年]	チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHO細胞)	[3時間処理、+/-S9*1] 2.5、5、10、20、25mg/mL	陽性*6	8	
<i>in vivo</i>	骨髄小核試験 [2007年、GLP]	7週齢のICR系マウス (各群雄5匹) [Crlj:CD1(ICR)]	0、250、500、1000mg/kg 体重/日、2日間、水溶液、強制経口投与	陰性	9-1

注) 下線：陽性と判定された用量。

*1：+/-S9：代謝活性化系存在及び非存在下。 -S9：代謝活性化系非存在下。

+S9：代謝活性化系存在下。

*2：本物質は試験結果が陰性であったため文献では詳細について記載されていないが、同時に試験された物質の用量設定がすべて0.8、4、20、100 µmole/ plateであることから、本物質についても同じ用量設定で試験が行われたと推測される。0.064、0.32、1.6、8 mg/ plateに相当

*3：0.641µg/plate~64.1mg/ plateは8nmol~0.8mmol/plateに相当

*4：TA102では代謝活性化系存在下、変異コロニーが僅かに(1.2~1.3倍)増加。

*5：変異コロニー数の割合が60mg/mL(最高用量)で有意に増加(生存率37%)、有糸分裂組換えは有意に増加しなかった。

*6：代謝活性化系の有無にかかわらず、染色体異常を有する細胞の割合が増加。試験は40mg/mLの用量まで行われたが、最高用量では分裂阻害及び細胞毒性が認めら

れ、染色体異常の観察が出来なかった。

(4) その他

内分泌かく乱性及び生殖発生毒性に関する試験は行われていない。

なお、本物質をゴールデンハムスターの輸卵管に投与した試験で、卵母細胞ピックアップ率、輸卵管の絨毛運動周波数及び、卵管漏斗部の平滑筋収縮にピコモル又はナノモルの濃度で影響が認められたという文献がある¹⁴⁾。また、本物質を鶏胚の絨毛尿膜上に投与した試験で、鶏胚体外膜の成長及び絨毛尿膜の脈管形成にピコモルの濃度で影響が認められ、DNA合成や毛細血管叢形成、中胚葉血管の遊走を阻害したという報告がある¹⁵⁾。

いずれも経口投与による試験成績ではないことから参考扱いとし、NOAELの設定根拠には用いなかった。

4. 摂取量の推定

本物質の香料としての年間使用量の全量を人口の10%が消費していると仮定するJECFAのPCTT (Per Capita intake Times Ten) 法^{iv)}により計算された一人一日あたりの推定摂取量^{v)}は、米国についてはJECFA評価時に申請された推定年間使用量、欧州については1995年の年間使用量調査における報告量に基づき、双方とも0.2 μg ¹⁰⁾となる。正確には認可後の追跡調査による確認が必要と考えられるが、既に許可されている香料物質について、我が国と欧米の推定摂取量が同程度との情報¹¹⁾があることから、本物質に関しても、認可後の我が国での推定摂取量が、おおよそ0.2 μg /人/日になると推定される。

iv [年間使用量(kg)]/[人口(億人)]/[365(日)]/[報告率]/[人口の1割で消費] $\times 10$ で求めた。

	米国	欧州
年間使用量(kg)	1.2	1.2
人口(億人)	2.6	3.2
報告率	0.8	0.6
推定摂取量(μg /人/日)	(計算値) 0.158 \cdots	(計算値) 0.171 \cdots

v JECFA モノグラフ¹⁰⁾では、年間使用量は1995年の使用量調査に基づくとされているが、本物質は2001年にGRAS20として香料としての使用における安全性の確認結果が公表されており、95年当時の使用実績は無い。JECFAへ提出するデータのとりまとめを行っている米国香料工業会に確認したところ、本物質の米国での使用量については、食品用香料としての使用が申告され、GRAS評価を受けた当時に見積もられた年間最大使用量がJECFAに提出されているとのことであり、そのことを説明する脚注が欠落しているとのことであった。なお、2008年に公開されたEFSAの評価書¹⁷⁾では、本物質のEUでの推定摂取量は0.024 μg /人/日と記載されており、JECFAモノグラフの推定摂取量(0.2 μg /人/日)とは大きな差異が生じている。本評価書はJECFAで評価済みの品目の再評価という位置づけであるが、EUの推定摂取量は人口を3.75億人とし、再計算されている。EFSA評価書によれば、JECFAモノグラフにおける算出方法との違いは人口のみであると考えられるが、このような差異が生じた理由は不明である。しかしながらJECFAモノグラフの推定摂取量(0.2 μg /人/日)は、EFSAの推定摂取量を上回るため、本概要書における安全マージンの算出には影響しないと考えられる。

なお、食品中にもともと存在する成分としての本物質の摂取量は、欧州では意図的に添加された本物質の 36,000 倍であるとの報告¹⁰⁾がある。

5. 安全マージンの算出

90 日間反復投与毒性試験成績の NOAEL 3mg/kg 体重/日と、想定される推定摂取量 (0.2µg/人/日) を日本人平均体重 (50kg) で割ることで算出される推定摂取量 (0.000004mg/kg 体重/日) と比較し、安全マージン 750,000 が得られる。

6. 構造クラスに基づく評価

本物質はピラジン環に置換基を持たないとして、構造クラスⅢに分類される^{10) 12)}。ピラジン誘導体に分類される食品成分である本物質は、尿中に未変化体のまま排泄されるか、環の水酸化とそれに伴う抱合を受け排泄される¹⁰⁾。

なお、6 週齢の雄の SD ラットに本物質を腹腔内投与 (80.1mg/kg 体重/日×3) したところ、肝臓において主に CYP2E を誘導したとの報告がある¹⁶⁾。

7. JECFA における評価

本物質は、2001 年第 57 回 JECFA 会議で、ピラジン誘導体の一つとして評価され、想定される推定摂取量 (0.2µg/人/日) が、構造クラスⅢの摂取許容値 (90µg/人/日) を下回ることなどから、香料としての使用において安全性の懸念はないとされた¹⁰⁾。

8. 「国際的に汎用されている香料の我が国における安全性評価法」¹³⁾に基づく評価

本物質は香料としての使用において生体にとって特段問題となる毒性はないと考えられる。また、構造クラスⅢに分類され、安全マージン (750,000) は 90 日間反復投与毒性試験の適切な安全マージンとされる 1,000 を上回り、かつ想定される推定摂取量 (0.2µg/人/日) が構造クラスⅢの摂取許容値 (90µg/人/日) を下回る。

引用文献

- 1) VCF Volatile Compounds in Food : database / Nijssen, L.M.; Ingen-Visscher, C.A. van; Donders, J.J.H. [eds]. - Version 12.2 - The Netherlands : TNO Quality of Life (website accessed in Aug. 2010)(未公表)
- 2) RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc.)-FEMA (Flavor and Extract Manufacturers' Association) database, Material Information on Pyrazine (website accessed in Aug. 2010) (未公表)
- 3-1) ピラジンのラットによる 90 日間反復経口投与毒性試験 (2007) (株)三菱化学安全科学研究所 (厚生労働省委託試験)

- 3-2) SIGMA-ALDRICH Certificate of Analysis (PRODUCT NUMBER W401501-SPEC, LOT NUMBER 01523HD, PRODUCT NAME PYRAZINE, 99+ %)
- 3-3) ピラジンの確認結果
- 4) Lee H., Bian S.S. and Chen Y.L. (1994) Genotoxicity of 1,3-dithiane and 1,4-dithiane in the CHO/SCE assay and the Salmonella/microsomal test. *Mutation Research*, **321**, 213-218.
 - 5) Takahashi A. and Ono H. (1993) Mutagenicity assessment in 44 epoxy resin hardeners in Salmonella typhimurium tester strains. *Chemistry Express*, **8(5)**, 785-788.
 - 6) Aeschbacher H.U., Wolleb U., Loliger J., Spadone J.C. and Liardon R. (1989) Contribution of coffee aroma constituents to the mutagenicity of coffee. *Food and Chemical Toxicology*, **27(4)**, 227-232.
 - 7) Fung V.A., Cameron T.P., Hughes T.J., Kirby P.E. and Dunkel V.C. (1988) Mutagenic activity of some coffee flavor ingredients. *Mutation Research*, **204**, 219-228.
 - 8) Stich H.F., Stich W., Rosin M.P. and Powrie W.D. (1980) Mutagenic activity of pyrazine derivatives: A comparative study with Salmonella typhimurium, Saccharomyces cerevisiae and Chinese hamster ovary cells. *Food and Cosmetics Toxicology*, **18(6)**, 581-584.
- 9-1) ピラジンのマウスを用いる小核試験 (2007) (財)残留農薬研究所 (厚生労働省委託試験)
- 9-2) 試験成績書 (関東化学株式会社、品名:ピラジン、規格:鹿特級、ロット番号:804W2150)
- 10) WHO Food Additives Series 48.Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, Pyrazine Derivatives (Report of 57th JECFA meeting)
参考 : <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48je12.htm>
- 11) 平成 14 年度厚生労働科学研究報告書「日本における食品香料化合物の使用量実態調査」日本香料工業会
- 12) ピラジンの構造クラス (要請者作成資料)
- 13) 香料安全性評価法検討会. 国際的に汎用されている香料の安全性評価の方法について (最終報告・再訂正版) . 平成15年11月4日
- 14) Riveles K., Roza R., Arey J., and Talbot P. (2004) Pyrazine derivatives in cigarette smoke inhibit hamster oviductal functioning, *Reproductive Biology and Endocrinology*, **2**: 23-36
- 15) Melkonian G., Eckelhoefer H., Wu M., Tong C., Riveles K., and Talbot P.

(2003) Growth and angiogenesis are inhibited in vivo in developing tissues by pyrazine and its derivatives. *TOXICOLOGICAL SCIENCES*, **74**, 393-401

16) Japenga A.C., Davies S., Price R.J. & Lake B.G. (1993) Effect of treatment with pyrazine and some derivatives on cytochrome P450 and some enzyme activities in rat liver. *Xenobiotica*, **23**, 169-179

17) EFSA (2008) Flavouring Group Evaluation 50 (FGE.50): Consideration of pyrazine derivatives evaluated by JECFA (57th meeting) structurally related to pyrazine derivatives evaluated by EFSA in FGE.17 (2005). *The EFSA journal*, **636**, 1-35.

No.	項目	内容
(1)	名称	ピラジン
	一般的名称	Pyrazine
	化学名	1,4-Diazine
	CAS番号	290-37-9
(2)	JECFA等の国際的評価機関の結果	FEXPANにより評価され2001年のGRAS 20 に公表された ¹⁾ 。本物質は、2001年第57回JECFA会議で、ピラジン誘導体のグループとして評価され、想定される推定摂取量が、構造クラスⅢの摂取許容値(90 μ g/人/日)を下回るなど、香料としての使用において安全性の懸念はないと評価された ²⁾ 。
	JECFA番号	951
(3)	外国の認可状況・使用状況	欧米をはじめ各国で認可され広く使用されている。
	FEMA GRAS番号	4015
	CoE番号	11363
	CFR21掲載	なし
	EULレジスター	FL No. 14.144
	使用量データ	1.2kg(米国、JECFA評価時報告の推定値)、1.2kg(EU、1995年) ²⁾
(4)	我が国での添加物としての必要性	本物質は食品に存在する成分であり、様々な加工食品において香りを再現し、風味を向上する際に必要不可欠な物質である。本物質は現在日本では未認可であるが、その添加量は微量ながら効果は非常に大きく、様々な加工食品に対してすでに国際的には着香の目的で広く使用されている。したがって国際的整合性の面からみても、これらの物質を日本で使用できるようにすることが不可欠と考えられる。
	天然での存在	麦芽等の食品中に存在し、また、コーヒー、ココナッツ等の焙煎及びえび、豚肉、牛肉等の加熱調理により生成する成分である ³⁾ 。
	米国での食品への使用例(平均添加率)	焼菓子 1ppm、ハード・キャンデー類 1ppm、ソフト・キャンデー類 1ppm、アルコール飲料 0.6ppm、冷凍乳製品類 0.6ppm、製菓材料 0.6ppm ⁴⁾
(5)	参考資料	1) Food Technology.(2001) Vol. 55, No. 12, pp34-55. 2) WHO Food Additives Series 48.Safety Evaluation of Certain Food Additives(2001) (Report of 57th JECFA meeting) http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48je12.htm 3) VCF Volatile Compounds in Food : database / Nijssen, L.M.; Ingen-Visscher, C.A. van; Donders, J.J.H. [eds]. - Version 12.2 - The Netherlands : TNO Quality of Life (website accessed in Aug. 2010)(未公表) 4) RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc.)-FEMA (Flavor and Extract Manufacturers' Association) database, Material Information on Pyrazine (website accessed in Aug. 2010) (未公表)