資料３－１

亜硫酸水素アンモニウム水の
食品添加物新規指定のための概要書

令和２年２月３日

独立行政法人酒類総合研究所

目次

用語の定義 p.4
序　亜硫酸水素アンモニウム水の食品添加物指定の必要性 p.6
Ⅰ．添加物の概要
1. 名称及び用途 p.7
２．起源または発見の経緯 p.7
３．諸外国における使用状況
（１）CODEX p.8
（２）OIV p.8
（３）EU p.8
（４）アメリカ p.9
（５）オーストラリア・ニュージーランド p.10
（６）日本 p.10
４．国際機関等における安全性評価
（１）国際機関における評価 p.12
（２）欧州連合における評価 p.13
（３）米国における評価 p.15
（４）オーストラリア・ニュージーランドにおける評価 p.15
（５）食品安全委員会における評価 p.16
５．物理化学的性質
（１）構造式等 p.17
（２）製造方法 p.17
（３）成分規格案 p.17
（４）成分規格案と既存の規格の対照表 p.19
（５）成分規格案の設定根拠 p.22
（６）試験法の検証データ及び試験成績 p.24
（７）食品添加物の安定性 p.24
（８）食品中の食品添加物の分析法 p.24
６．使用基準案 p.24
Ⅱ．有効性に関する知見
１．食品添加物としての有効性及び同種の添加物との効果の比較 p.26
２．食品中での安定性 p.28
３．食品中の栄養成分に及ぼす影響 p.29
Ⅲ．安全性に係る知見
１．体内動態試験 p.30
２．毒性試験 p.57
３．ヒトにおける知見 p.117

４．亜硫酸の相互作用 p.120
５．一日摂取量の推計等 p.129
Ⅳ．海外添加物取り扱い社 p.135
Ⅴ．引用文献一覧 p.136

用語の定義

この概要書で用いる用語の定義は、次による。

用　　語	定　　義
酒税法	昭和 28 年法律第 6 号
ワイン	酒税法第 3 条第 13 号に掲げる果実酒及び同条第 14 号に掲げる甘味果実酒
ぶどう酒	酒税法第 3 条第 13 号に掲げる果実酒及び同条第 14 号に掲げる甘味果実酒のうちぶどうを原料としたもの
果汁	果実を絞って得られる汁でアルコール発酵が終了していないもの。アルコール分の有無は問わない。本概要書では専らぶどう果汁を指す。
マスト	ブドウを除梗・破砕してできた、果汁に果皮、種子等の固形物が混合したものでアルコール発酵が終了していないものを指す。アルコール分の有無は問わない。
常在成分	食品中に一般に存在する成分
亜硫酸	本概要書では二酸化硫黄 SO_2 が水と反応した結果生じる SO_2 由来の化学種をまとめたものを指す。
ADI	Acceptable Daily Intake：一日摂取許容量
CAS	Chemical Abstracts Service
CHL	チャイニーズハムスター線維芽細胞
EC	European Commission：欧州委員会
EFSA	European Food Safety Authority：欧州食品安全機関
EU	European Union：欧州連合
FAO	Food and Agriculture Organization：国際連合食糧農業機関
FAS	WHO Food Additives Series
FAN	Free Amino Nitrogen：遊離アミノ態窒素
FDA	Food and Drug Administration.：米国食品医薬品局
FSANZ	Food Standards Australia New Zealand ：オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関
GMP	Good Manufacturing Practice：適正製造規範
GRAS	Generally Recognized As Safe
INS	International Numbering System：食品添加物国際番号システム
JECFA	FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
LD50	Lethal Dose 50：半数致死量
LOEL	No Observed Adverse Effect Level：最小影響量
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level：無毒性量
NOEL	No Observed Effect Level：無影響量
Oenological Practices	醸造規則　ワイン製造に関して許されるすべての操作、使用する物品（原料、添加物、加工助剤）の種類、使用制限等を定めたもの
OIV	Organisation international de la vigne et du vin：国際ブドウ・ワイン機構
SCF	Scientific Committee for Food：欧州食品科学委員会
TRS	World Health Organization Technical Report Series

V79	チャイニーズハムスター肺線維芽細胞
WHO	World Health Organization：世界保健機関

序　亜硫酸水素アンモニウム水の食品添加物指定の必要性

この概要書により指定要請する亜硫酸水素アンモニウム水は、その使用対象をぶどう酒及びぶどう酒の製造に用いる果汁とし、酵母の発酵を助成するための発酵助成剤及び保存料、酸化防止剤として使用する。

1．亜硫酸水素アンモニウム

亜硫酸水素アンモニウムは水に可溶な無色の結晶として存在するが、ワイン製造に用いる果汁に対しては水溶液として添加する(OIV oenological codex)。果汁の発酵前あるいは発酵中に添加された亜硫酸水素アンモニウム水は果汁の酸性条件下で分解して、アンモニウムイオン（NH_4^+）と二酸化硫黄（SO_2）が生成する [1]。アンモニウムイオンは FAN[1]の一種として酵母が直接資化できる栄養源となり、円滑な果汁の発酵を促進する。一方、二酸化硫黄は果汁の酸化を防ぐ役割を果たす。さらに、果汁中では水と反応し、一部 SO_2、HSO_3^-の形をとる [2]が、主に SO_2 が果汁の発酵に好ましくない有害微生物の発生及び増殖を抑制する効果を持つ [1]。ここで保存料、酸化防止剤としての二酸化硫黄が不足している場合、必要に応じて食品衛生法および酒税法において果実酒への使用が認められているピロ亜硫酸カリウム（メタ重亜硫酸カリウム）やそのまま二酸化硫黄（無水亜硫酸）等を添加することができる。なお、このとき添加できる量を、後述の使用基準案において示す使用上限である「二酸化硫黄としての残存量が 0.35g/kg 以上残存しない」ようにすることで現行と変わらない二酸化硫黄濃度を確保することができる。

2．ワイン製造におけるアンモニア

ワインは果汁にワイン酵母を添加することで果汁を発酵させて製造する。果汁には極めて多様な種類の窒素化合物、アンモニウムイオンの形で多く含まれているアンモニアのほか、硝酸や各種アミノ酸、アミン、ペプチド、タンパク質などが常在成分として含まれており [2]、これらの窒素化合物はワインの品質に重要な役割を果たしている。その中でも、アンモニア及び一部のアミノ酸は、酵母が代謝に利用できる窒素（資化性窒素と呼ぶ）を含み、発酵の初期に酵母が増殖するために必須の因子となっている。そのため、資化性窒素の欠乏によって健全な発酵に必要な酵母の数を確保できずに発酵遅延や不完全発酵が生じるほか、酵母が好ましくない成分である硫化水素を生成することにつながり、ワインの品質を著しく低下させるおそれがある。したがって、これらの懸念を解消するためにワイン製造においては資化性窒素の欠乏した果汁にアンモニウム塩や窒素を含む発酵助成剤の添加が一般的に行われている。

---

[1]Free Amino Nitrogen の略。酵母が直接代謝に利用することができる窒素化合物のことを指しており、アミノ酸や 3 単位以内の小さなペプチドの他、アンモニアも含まれる。

[2] 酸性条件下であるため、亜硫酸イオン（SO_3^{2-}）はほぼ生じない。

３．ワイン製造における亜硫酸

ワイン中の亜硫酸は２種類に分かれ、果汁中のアセトアルデヒドをはじめとするカルボニル化合物や糖などと結合した結合型亜硫酸とそれ以外の遊離型亜硫酸が存在する。また、亜硫酸はワイン製造において、主に大きく分けて２点①有害微生物の増殖防止（保存料）、②酸化防止剤の役割を果たす。これらは遊離型亜硫酸の効果によるものであるが詳細については有効性の項において記述する。

Ⅰ．添加物の概要

１．名称及び用途

名称　：（和名）　亜硫酸水素アンモニウム水 [3] [4]

（英名）　Ammonium Hydrogen Sulfite Water [4] [5]

（参考）なお、英名については引用文献に以下のような同義語の記載がある。

Ammonium Bisulphite：[1][6][11][16][39]

Ammonium Bisulfite：[5][40][237]

Ammonium Hydrogen Sulphite：[8][40]

CAS 登録番号：10192-30-0 [1]

INS 番号：－

E 番号：－

用途　：発酵助成剤、保存料、酸化防止剤

２．起源または発見の経緯

亜硫酸水素アンモニウム水はワインの原料となる発酵前あるいは発酵中の果汁やマストに加えることで、液中で二酸化硫黄とアンモニウムイオンに解離する。これにより亜硫酸による効果と、アンモニアによる効果を同時に得ることができる食品添加物として OIV 加盟国間で使用されてきた [5]が、2017 年にオーストラリアでもワインの製造に使用できる加工助剤に認可され、使用できるようになった [6]。

３．諸外国における使用状況

ワインに関する国際機関である国際ブドウ・ワイン機構 （OIV：Organisation international de la vigne et du vin、我が国は未加盟。）や EU をはじめ多くの国では、ワイン（ブドウ生産物）についてはその製造に関し、全ての操作や使用物品等をポジティブリストとしてまとめている。これは Oenological Practices （仏 Pratique œnologique：以下醸造規則）と呼ばれ、一般的には添加物および加工助剤（Processing aid）両者を含んだリストとして定めている。

当該添加物の使用を醸造規則に明記している例は、OIV の規則にみられ、presevatives（保存料）の目的で使用すると記載されている。

（1）CODEX

CODEX の GSFA（General Standard for Food Additives）では、亜硫酸水素アンモニウムに関する記載は見当たらない。関連する物質では Table 1 に、亜硫酸グループとして、二酸化硫黄(INS:220)亜硫酸ナトリウム(同 221)、亜硫酸水素ナトリウム(同 222)、ピロ亜硫酸ナトリウム(同 223)、ピロ亜硫酸カリウム(同 224)、亜硫酸カリウム(同 225)、チオ硫酸ナトリウム(同 539)が登録され、当該申請に関係する対象として、①果汁類のほか、②サイダー及びペリー、③ブドウを原料としたワイン、④ブドウ以外を原料としたワインに使用が認められている。

なお、それぞれに使用上限が定められており、①50mg/kg②200mg/kg③350mg/kg④200mg/kg までとしている [7]。

（2）OIV

日本は未加盟ではあるが、OIV の定めるワインに関する各種の定義やルール、特に製造方法に関する醸造規則は世界的な標準として扱われ始めた。この醸造規則の中では、保存料、酸化防止剤として作用する亜硫酸を添加する目的で、気体や水溶液としての二酸化硫黄、ピロ亜硫酸カリウム、亜硫酸水素カリウムのほか、亜硫酸水素アンモニウムの記載があり、保存料(Preservative)に分類されている [8]。これらは製品ワインの種類により、総亜硫酸（Sulphur dioxide (total)）の残存量が細かく定められており、表 1 のとおりとなっている。

表 1. OIV における亜硫酸の総残存量規定 [8]

製品ワインの種類	亜硫酸の残存量
①赤ワイン(③を除く)	150mg/L 以下
②白ワイン(③、④を除く)	200mg/L 以下
③残糖分 4g/L 超のワイン（④を除く）	300mg/L 以下
④特定の甘口白ワイン	400mg/L 以下

なお、OIV ではこれらはいずれも添加物(Additive)に分類されている [8]。

そのほか発酵助成剤として、硫酸アンモニウム(INS:517)、リン酸水素二アンモニウム(同 342)の記載があり、上限 0.3g/L 以下まで使用できる加工助剤（Processing aid）に分類されている。

（3）EU

EU 域内で使用が認められている食品添加物は、欧州議会・閣僚理事会規則 1333/2008 [9] と欧州委員会規則 1129/2011 [10]で定められており、この中の Annex II 及びIIIで認可された食品添加物名と使用条件が記載されている。なお、これらの規則(Annex II、III)は加工助剤には対応していない（欧州議会・閣僚理事会規則 1333/2008 article 2 ）。

これらの資料に亜硫酸水素アンモニウムの記載はないことから食品添加物としては指定さ

れていないこととなっているが、類縁物質の亜硫酸水素ナトリウム(E222)、亜硫酸水素カリウム(E228)が添加物として記載され、いずれも Annex II (Union list of food additives approved for use in foods and conditions of use)、Part C(Definition of Groups of additives)では、二酸化硫黄—亜硫酸グループとして規制されるその他の添加物に分類され、使用上限は対象となる食品ごとに細かく規定されている。

EU 域内で適用される醸造規則は、別の欧州委員会規則 2019/934 [11]の Annex I PART A に記載され、この中で TABLE 2 の 4 番目にアルコール発酵及びマロラクティック発酵[3]活性化剤（発酵助成剤）に発酵助成剤の項目がある。ここには 9 品目の記載があり、そのうちリン酸水素二アンモニウム、硫酸アンモニウム、亜硫酸水素アンモニウム、塩酸チアミン、不活性化酵母（グルタチオン濃度保証有）の 5 品目が加工助剤としてアルコール発酵の目的だけに使用できると記載されている。なお、この項において亜硫酸水素アンモニウムはブドウや発酵中の果汁及びマストにのみ(すなわち発酵が終了したワインに使用してはならない) [12]、亜硫酸水素アンモニウム塩として 0.2g/L 以下の量で使用できると記載されている。

ワインに使用できる物品について、欧州委員会規則 2019/934 [11]の Article 9 で「欧州委員会規則 231/2012 に記載があるものについては同規則でその純度及び仕様を定めるが、記載がないもの(E 番号がないものと同義)については欧州委員会規則 2019/934 に記載の OIV Codex file に従う」とある。亜硫酸水素アンモニウムは欧州委員会規則 231/2012[239]に記載のない物品であるため、EU 各国は亜硫酸水素アンモニウムの使用について、EU の醸造規則と OIV 規格の双方を遵守する必要があるということになる。

（4）アメリカ

アメリカで食品、食品加工に使用できる物質については、CFR（連邦規則集）Title 21 の中に纏められている [13]。具体的な物質名は複数の Part から構成され、Part172（直接食品添加物)、Part173（二次的直接食品添加物)、Part175～178（間接食品添加物)、Part180（条件付き食品添加物)、Part182（GRAS 物質)、Part184（直接食品利用 GRAS 物質)、Part186（間接食品利用 GRAS 物質）となっている。ここには、亜硫酸水素アンモニウムの記載はない。なお、硫酸アンモニウムが GRAS として記載されているが、類縁物質の亜硫酸水素ナトリウムや亜硫酸水素カリウムの記載はない。しかし、2005 年より自国の醸造規則を満たしたワインの流通を相手国が認めるとする 2 国間協定が EU とアメリカで結ばれている。そのため、EU 域内からの輸入ワインについては亜硫酸水素アンモニウムを EU の醸造規則を遵守して使用したワインもアメリカ国内で流通できることとなっている [14]。

一方、ワインなど TTB（Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau）によって管轄される分野は CFR Title 27 に纏められている。ワイン及びその原料となる果汁は、この中の Part 24

[3] マロラクティック発酵：ワインに乳酸菌の一種を添加して起こすリンゴ酸を乳酸へ変換させる発酵のこと。ワインの過剰な酸味を和らげるために行われることがある。

(wine)に製造方法等の詳細が規定されている。製造に使用できる主な物質はこの中の Subpart L に纏められている。ここにも亜硫酸水素アンモニウムの記載はない [15]。

以上、CFR Title 21 及び Title 27 に記載がないことから、亜硫酸水素アンモニウムはアメリカにおいて、酒類を含む食品、食品加工に使用できる物質には含まれていないこととなる。

（5）オーストラリア・ニュージーランド

オーストラリア・ニュージーランドにおいては、食品添加物や加工助剤はポジティブリスト制となっており、食品添加物と加工助剤は別の法律にまとめられている。ここで加工助剤については、Australia New Zealand Food Standards Code の schedule 18 [16]にまとめられている。こちらのリストに亜硫酸水素アンモニウムが記載されており、ワインの製造において、酵母の栄養とする目的で GMP のもとでの使用が認められている。また、ワイン製造に使用可能な資材は一般食品に関する規則とは別に、ワイン製造についての規則（Oenological Practices）に記載されている［6］。こちらの規則はオーストラリアにのみ適用されているものであり、この中で亜硫酸水素アンモニウムは、2017 年 10 月に Table to clause 4 の Processing aid に追加された。

また、アメリカと同様に 2009 年よりワインの流通に関する 2 国間協定が EU とオーストラリアとの間で結ばれている。その中の ANNEX I PARTA、B において、相手国へ輸出するワインに対し使用が認める醸造規則及び物品が定められており、そこに亜硫酸水素アンモニウムが含まれていることから、双方の国において、自国で定められた範囲で亜硫酸水素アンモニウムを使用して製造したワインを相手国内で流通できることとなっている[240]。

（6）日本

我が国においては、亜硫酸水素アンモニウムは食品添加物として指定されていない。OIV、EU などで定める類縁物質のうち、食品衛生法施行規則別表第 1 [17]には亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウムの記載がある。

また、上記（1）～（6）のまとめとして、亜硫酸塩類の類縁物質を以下の表 2 に記載する。

表 2. 諸外国における類縁物質使用状況一覧表

和名 (○=公定書記載、 △＝別名、×＝未認可)	英名	認可国（機関）
○二酸化硫黄 △無水亜硫酸	①Sulfur Dioxide ①'Sulphur Dioxide	CODEX①(INS220) OIV① EU①(E220) 豪州①'
○亜硫酸 Na	①Sodium Sulfite ①'Sodium Sulphite	CODEX①(INS221) EU(E221) ①'、日本①
○ピロ亜硫酸 Na △メタ重亜硫酸 Na △酸性亜硫酸ソーダ (ピロ亜硫酸 Na として)	①Sodium Metabisulfite ①'Sodium Metabisulphite ②Sodium Pyrosulfite	CODEX①(INS223) EU①'E223) 日本①②
×亜硫酸 K	Potassium Sulfite	CODEX①(INS225) 豪州(亜硫酸 K 塩類、Additive)
○ピロ亜硫酸 K △メタ重亜硫酸 K	①Potassium Metabisulfite ①'Potassium Metabisulphite ②Potassium Pyrosulfite ③Potassium Disulphite ④Potassium Anhydrous Sulfite	CODEX①(INS224) OIV①②③④ (醸造規則にのみ記載) EU(E224) ①' 米国(GMP)① 豪州(亜硫酸 K 塩類、Additive) 日本②
×亜硫酸水素 NH_4 液	①Ammonium Hydrogen Sulfite ①'Ammonium Hydrogen Sulphite ②Ammonium Bisulfite ②' Ammonium Bisulphite (③Ammonium Hydrogen Sulfite Solution)	OIV ①' (Additive) ※2 EU②'(醸造規則にのみ記載) 豪州②'(Processing aid) (日本=当該概要書案③)

4．国際機関等における安全性評価

（1）国際機関における評価

1） 亜硫酸水素アンモニウムについて、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議(JECFA)における評価は確認できない。

2） ワインの製造過程で用いられる亜硫酸水素アンモニウムは、発酵過程中に酵母の栄養のための窒素源となるとともに二酸化硫黄を生成する [1]。

食品添加物としての二酸化硫黄及び亜硫酸塩類については、JECFA は複数回評価を実施し、概要は次のとおり。

①1973 年の第 17 回会合で、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（ピロ亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウム、亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム）の評価を実施した。ラットでのピロ亜硫酸ナトリウム混餌の 2 年間慢性毒性／3 世代生殖毒性併合試験結果から、無毒性量（Level causing no toxicological effect）をピロ亜硫酸ナトリウムとして 0.215%混餌したものとし、換算を行い二酸化硫黄として 70 mg/kg 体重/日と評価し、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類グループとしての一日摂取許容量（ADI）を、二酸化硫黄として 0-0.7 mg/kg 体重/日と設定した [18] [19]。

②1986 年の第 30 回会合で、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（ピロ亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウム、亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸水素カルシウム、チオ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素カリウム）の評価を実施した。これまでの評価以降に収集した新たな安全性に係る情報も併せて評価を行い、第 17 回会合と同じ毒性試験結果を基とした二酸化硫黄及び亜硫酸塩類グループとしての ADI（二酸化硫黄として 0-0.7 mg/kg 体重/日）が維持された。特異的な副作用の頻度と二酸化硫黄単体及び結合体の関連する毒性影響について引続きレビューを続けるべきと勧告し、また、食品中での二酸化硫黄の化学形態の情報が必要とされた。なお、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類に不耐性の人を保護するための適切な表示について言及している [20] [21]。

③1998 年の第 51 回会合で、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（亜硫酸水素カルシウム、ピロ亜硫酸カルシウム、亜硫酸カルシウム、亜硫酸水素カリウム、ピロ亜硫酸カリウム、亜硫酸カリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、チオ亜硫酸ナトリウム）の評価を実施した。これまでの評価以降に収集した新たな安全性に係る情報も併せて評価を行った。二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の安全性の再評価が完結する前に、報告されている水酸化スルホン酸アセトアルデヒドの肝臓への影響におけるアセトアルデヒドの役割の解明がなされるべきとの留保条件の下、以前に設定した二酸化硫黄及び亜硫酸塩類グループとしての ADI（二酸化硫黄として 0-0.7 mg/kg 体重/日）を維持した。なお、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類に不耐性の人を保護するための適切な表示について言及している。

また、日本を含む 10 ヶ国の摂取量に関するデータを基に、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（亜硫酸水素カルシウム、ピロ亜硫酸カルシウム、亜硫酸カルシウム、亜硫酸水素カリウム、ピロ亜硫酸カリウム、亜硫酸カリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、チオ亜硫酸ナトリウム）の摂取量推計を実施した。各国ごとの使用基準の最

高量を用いる摂取量推計では、ADI を下回った。提案されたコーデックス添加物一般基準（GSFA）の最高使用量や食品群の範囲を用いる摂取量推計では、ADI を上回った。これは、GSFA 案に収載された食品群の範囲が各国より多く、また、特定の食品群の使用量が一般的に各国の最高使用量より高いためである。提案された GSFA での使用量を適正なものにすべきとされた [22] [23] [24]。

④2008 年の第 69 回会合で、7 ヶ国の摂取量に関するデータを基に、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウム、亜硫酸カリウム、亜硫酸水素カルシウム、亜硫酸水素カリウム、チオ亜硫酸ナトリウム）のばく露評価を実施したところ、全世代において平均では ADI の範囲内であるが、高摂取者では ADI を超過していた。いくつかの国の子供や青少年では、1 日摂取量が ADI の 2 倍となった。なお、いくつかの推計は一日のみの摂取量調査結果を基としているが、まれに摂取する食品について過大推計となることが知られている。ADI を超過しないよう食事からのばく露量の減少のため、それぞれの国や企業は、国内基準をコーデックス基準（最高使用量）により見直すこと、国内基準（最高使用量）の遵守、代替の方法の研究、あるいは食品への使用量の減少などを考慮すべきとされた [25]。

（２）欧州連合における評価

１） 亜硫酸水素アンモニウムについて、欧州食品安全機関(EFSA)における評価は確認できない。

２） 関連物質である食品添加物の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類についての評価の概要は次のとおり。

①欧州食品科学委員会（SCF）における評価

SCF は、1994 年に二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウム、亜硫酸カルシウム、亜硫酸水素カルシウム）について評価を行い、意見書を纏め、1996 年に公表した。利用可能な毒性試験結果からこれらは発がん性、変異原性又は生殖毒性物質ではなかった。ラットと豚の混餌での長期毒性試験における胃での炎症を指標として、無作用量（NOEL）を二酸化硫黄換算して 70 mg/kg 体重/日と評価し、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類のグループとしての ADI を、二酸化硫黄として 0-0.7 mg/kg 体重/日とした。また、大部分の人には健康へのハザード（有害性影響）はないが、喘息に苦しむ人にとっては深刻な有害性影響となる可能性がある。二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の飲食物への添加について、技術的に必要な範囲に留めるべきである。また、過敏症の人は、食品と非アルコール飲料についてラベル表示により二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の使用を識別できるが、アルコール飲料は除外されており、アルコール飲料においてもラベル表示すべきと勧告した [26]。

②EFSA における再評価

欧州委員会（EC）から EFSA への要請を受けて、EFSA 専門家パネルは二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウム、亜硫酸カルシウム、亜硫酸水素カルシウム、亜硫酸水素カリウム）の再評価を実施し、2016 年に科学意見書を公表した。

専門家パネルは、二酸化硫黄、亜硫酸水素イオン及び亜硫酸イオンが一連の平衡状態で存在すること、これらが胃の pH においては亜硫酸水素イオンに傾き、また、生理的 pH 域においては亜硫酸イオンに傾くことを記述した。このため、摂取後においては、亜硫酸イオンを形成する能力に基づき、様々な亜硫酸源において read across を用いることが可能である。一方、専門家パネルは、様々な食品における亜硫酸塩類の反応性、及び得られる反応生成物に関する不確実性を記述した。

全体的に限られたデータベースからは、遺伝毒性について懸念は示されず、また、利用可能な混餌投与、強制経口投与又は飲水投与による経口ばく露による、慢性毒性試験、発がん性試験及び生殖毒性試験での悪影響も報告されなかった。ラットを用いた長期投与毒性試験から、無毒性量(NOAEL)が二酸化硫黄(SO_2)当量で 70 mg/kg 体重/日と特定された。しかし、専門家パネルは、データベースにおけるいくつかの不確実性及び限界を記述し、現行の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類としてのグループ ADI の 0.7 mg SO_2 当量/kg 体重/日(デフォルトの不確実係数を用いて算定)を適当なものとして維持するが、データベースが改善されるまでの暫定的なものとみなすことが望ましいと結論づけた。専門家パネルは、当該データベース及びこの暫定グループ ADI を再評価することを勧告し、推奨する複数の研究（体内動態試験、作用機序（mode of action）分析、過敏症の研究等）が完了までに 5 年を要することを記述した。

さらに専門家パネルは、すべての人口集団において二酸化硫黄及び亜硫酸塩類への推定ばく露量は、現行のグループ ADI の 0.7 mg SO_2 当量/kg 体重/日を上回ると結論づけた[27]。

③参考　EC における EFSA 再評価後のデータ募集

EC は、EFSA による二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウム、亜硫酸カルシウム、亜硫酸水素カルシウム、亜硫酸水素カリウム）についての再評価結果及び勧告を受けて、2016 年に EC 自ら関係企業に対して、全ての二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の体内動態（飲料や固形食品の処理に使用された際の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の化学形態や反応物の特定を含む)、作用機序（mode of action）等についての科学、技術データの募集を実施した。体内動態の評価後及び作用機序のデータ受領後、EFSA が添加物評価のためのガイドラインに沿った新規の毒性試験を要求するかどうか検討する予定である。追加データが必要な場合、新たなデータ募集を行う予定である [28]。

その後、EC は関係企業と協議を行い、今後の予定を公表した。現在企業において体内動態試験についての検討中であり、データの提出期限は 2019 年 12 月である [29]。

（3）米国における評価

1） 亜硫酸水素アンモニウムについて、米国食品医薬品庁（FDA）における評価は確認できない。

2） 1976 年、FDA からの委託により米国生物実験科学連合（FASEB）は、食品添加物の亜硫酸水素カリウム、ピロ亜硫酸カリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム及び二酸化硫黄について、得られている知見を基に評価を行った。その中の消費者ばく露データの項でコーデックス委員会がヒトの潜在的一日摂取量(PDI)を 2.1mg/kg 体重/日と設定し、JECFA が ADI を 0.7 mg/kg 体重/日と設定したことが記述されている。

また、同項に FASEB は、米国内では成人において亜硫酸が添加された食品を通じて 1 日に摂取される亜硫酸は SO_2 として 2mg/kg 体重/日を超えず、成人人口の大部分はおよそ 0.2mg/kg 体重/日程度であると結論付けるのは合理的であり、幼児や子供の SO_2 摂取量が 0.2mg/kg 体重/日であると推計するデータを疑う理由はないとしている。さらに、その他生物学的研究の結果を勘案し、最終的には現在の使用量や使用方法で、公衆への有害影響を示す合理的根拠はないとしている。ただし、消費量の大きな増加による食事の有害影響については、追加データなしには判断することはできないとしている [30]。

（4）オーストラリア・ニュージーランドにおける評価

1） オーストラリアと欧州連合とのワインについての合意に基づくオーストラリア側の義務に関係して、オーストラリアワイン製造協会から、ワイン製造に関する新規の加工助剤として亜硫酸水素アンモニウムの使用許可申請があり、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）は評価を実施し 2017 年に結果を公表した。亜硫酸水素アンモニウムについて、ワイン製造における適正使用規範（GMP）に基づく加工助剤としての使用を認めている。なお、市販のワインに亜硫酸イオンが 10 mg/kg （二酸化硫黄として）以上の濃度で残存する場合は、表示が必要である。

安全性評価の概要は次のとおり。

ワインの製造過程で用いられる亜硫酸水素アンモニウムは、発酵過程中に分解により二酸化硫黄とアンモニウムイオンが生成し、アンモニウムイオンは酵母の栄養のための窒素源となる。

FSANZ は、最近、提案書 P298 を公表し、その中で二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の広域なレビューの一環として安全性評価を報告した（注：2）参照)。

しかし、今回 FSANZ は、現行の保守的な JECFA の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類グループとしての ADI を適切と判断している [1]。

ワインの加工助剤としての亜硫酸水素アンモニウムの使用による亜硫酸イオンの残留によるばく露量の変化は無視できるので、ばく露評価は行わなかった。

この申請における、ワイン製造での加工助剤としての亜硫酸水素アンモニウムの使用については、公衆衛生や安全性についての懸念はない [31]。

2） FSANZ は、2016 年に関連物質である二酸化硫黄及び亜硫酸塩類について、安息香酸類とともに、それらの食品基準の見直しに関する調査に対応して、提案書 P298 を準備し、公表している。この提案書における二酸化硫黄及び亜硫酸塩類についての記述の概要は次のとおり。

2005 年のオーストラリアにおける摂取量調査を行った。対象は年齢と性別で区分した 10 グループで、95 パーセンタイルの推定食事ばく露量を評価した結果、13～18 歳の 10 代の少女からなるグループ以外の 9 つのグループで二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の 1 日摂取量が、潜在的に関係する Health based guidance value（HBGV）を超過していることが示された [32]。この HBGV は JECFA が設定した ADI と同一である。また、ニュージーランドにおける摂取量調査の結果においても支持された。リスク評価については、FSANZ は、現在利用可能な科学データから現状の JECFA の ADI は低すぎるとの意見である。また、EFSA の 2016 年の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類についての科学意見書でも、新しいデータによる ADI の見直しを勧告している。新しいデータがでれば、新しい ADI の設定が可能である。その時には、JECFA による ADI の見直しが求められる。リスク評価の点から、今回食品基準の見直しは考慮していない。現在のリスク管理手法は適切である。上記の ADI の見直しや他の国際的評価により、食品基準は見直しが可能である [33] [34]。

（5）食品安全委員会における評価

1） 食品安全委員会において、亜硫酸水素アンモニウムは未評価である。

2） 平成 15 年 7 月に厚生労働省から、関連物質である亜硫酸塩類（亜硫酸ナトリウム、次亜硫酸ナトリウム、二酸化硫黄、ピロ亜硫酸ナトリウム及びピロ亜硫酸カリウム）の使用基準改正にかかる意見聴取要請に対して、同年 9 月に食品安全委員会は、

『(引用開始）亜硫酸塩類について薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会毒性・添加物合同部会において行われた「その安全性について現段階で新たな対応をとる必要はないと考えられる」との評価の結果は、当委員会として妥当と考える（引用終わり)』

と、厚生労働省に通知している [35]。

3） 関連物質であるアンモニウムイオンについて、

食品安全委員会は、「添加物評価書アンモニウムイソバレレート（第 2 版）(2014 年 12 月）において、次のようにまとめている [36]。

『(引用開始）アンモニアは、ヒトが食品を摂取することにより、消化管内において 1 日当たり十二指腸で 10 mg、結腸で約 3 g 産生されるとされている。産生されたアンモニアはほとんどが吸収された後、門脈循環に入るとされている。健常なヒトではアンモニウムイオンは肝臓で速やかに尿素に変換され、尿中に排泄されるとされている。(参照 7) 添加物 (香料)「アンモニウムイソバレレート」を摂取することで体内に取り込まれるアンモニアの量は、ヒトにおいて食事から産生されるアンモニアの量の変動の範囲内と考えられ、また、ヒト体内で産生されたアンモニアと同様に代謝されると考えられることから、ここではアンモニアに係る知見は参照しなかった。(引用終わり)』

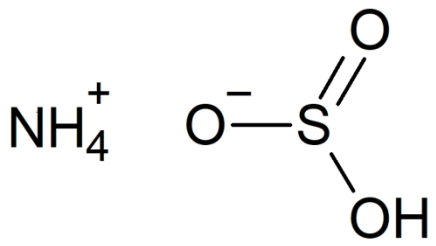
注：同評価書において、以下の文献を引用している。
参照 7：EFSA J 2009;ON-955:1,5,14,15,23 and 24 [37]

また、食品安全委員会は、「添加物評価書　硫酸アルミニウムアンモニウム、硫酸アルミニウムカリウム」（2017 年 12 月）において、次のようにまとめている [38]。
『(引用開始）アンモニウムイオンについては、添加物「アンモニウムイソバレレート（第 2 版)」の評価書 (2014) において、ヒトが食品を摂取することにより、消化管内において、1 日当たり十二指腸で 10 mg、結腸で約 3 g のアンモニアが産生されるとされている。産生されたアンモニアはほとんどが吸収された後、門脈循環に入るとされている。健常なヒトではアンモニウムイオンは肝臓で速やかに尿素に変換され、尿中に排泄されるとされている。
「硫酸アルミニウムアンモニウム」を摂取することで体内に取り込まれるアンモニアの量は、ヒトにおいて食事から産生されるアンモニアの量の変動の範囲内と考えられること、また、ヒト体内で産生されたアンモニアと同様に代謝されると考えられることから、本評価書では体内動態及び毒性の検討は行わないこととした。(引用終わり)』

5．物理化学的性質

（1）構造式等（亜硫酸水素アンモニウム）

構造式： [1]



分子量：99.11 [1] [3]

（2）製造方法

アンモニア水溶液に気体の二酸化硫黄を吹き込んで製造する [1]。

（3）成分規格案

項目	成分規格案	参照規格
① 名称	亜硫酸水素アンモニウム水	1
② 英名	Ammonium Hydrogen Sulfite Water	1，2
③ CAS 登録番号※	10192-30-0	4

④ 定義	亜硫酸水素アンモニウムを主成分とする水溶液である。	
⑤ 含量	本品は、二酸化硫黄（SO_2=64.06）8.0%以上及びアンモニア（NH_3=17.03）2.1%以上を含む。	5
⑥ 性状	本品は、淡黄色の液体である。	3，4
⑦ 確認試験	本品は、アンモニウム塩の反応及び亜硫酸水素塩の反応を呈する。	3
⑧ 純度試験	(1) 鉛　Pb として 5 μg／g 以下　(0.8 g、第 5 法、比較液　鉛標準液 4.0mL、フレーム方式) 本品に塩酸（1 → 4）20mL を加え、時計皿等で覆い、穏やかに 5 分間沸騰させる。冷後、試料液とする。なお、試料が溶けない場合には、蒸発乾固した後、残留物に塩酸（1 → 4）20mL を加え、穏やかに 5 分間沸騰させる。冷後、試料液とする。	3
	(2) ヒ素　As として　3 μg／g 以下（5.0 g、第 1 法、標準色 ヒ素標準液 3.0mL、装置 B） 本品に水を加えて 25mL とする。この液 5mL を量り、硫酸 2mL を加え、二酸化硫黄の発生が止むまで水浴上で加熱する。約 2mL になるまで蒸発濃縮した後、水を加えて 10mL とし、この液 5mL を量り、検液とする。	3
⑨ 定量法	① 亜硫酸塩定量法 本品約 0.3g を精密に量り、亜硫酸塩定量法により定量する。 0.05mol／L ヨウ素溶液 1 mL=3.203mg SO_2	3
	② アンモニア定量法 亜硫酸水素アンモニウム濃度が 1 %となるように水で正確に希釈した液 10mL に 30%水酸化ナトリウムを 10mL 加え、水蒸気蒸留を行い、留液 100mL を 0.1mol／L 塩酸で定量する。	2

参考規格

1 ：化合物の辞典 [4]

2 ：OIV INTERNATIONAL ŒNOLOGICAL CODEX COEI-1-AMMHYD [5]

3 ：厚生労働省　第 9 版食品添加物公定書 [3]

4 ：FSANZ　Supporting document 1Risk and technical assessment – application A1127 Processing Aids in Wine, 26 April 2017 [11–17] [1]

5 ：Laffort　BISULFITE NH4 400,100 TECHNICAL DETA SHEET [39]

（４）成分規格案と既存の規格の対照表

次表（表 3）に類似添加物の国際機関、及び指定添加物に係る食品添加物公定書の規格を示す。

国際機関の規格においては、OIV の International Oenological Codex [5]を、我が国においては類似物質である亜硫酸水素カリウム液及び亜硫酸水素ナトリウム液の第 9 版食品添加物公定書 [3]で定める規格を参考として記載した。

表 3. 成分規格案と既存の規格の対照表

	亜硫酸水素アンモニウム水（本規格案）	亜硫酸水素アンモニウム（OIV 規格）[5]	亜硫酸水素カリウム液 [3]	亜硫酸水素ナトリウム液 [3]
含量	二酸化硫黄 8.0%以上 アンモニア 2.1%以上	二酸化硫黄 62.0%以上 アンモニア 16.5%超	25.0%以上	34.0%以上
性状	淡黄色の液体である。	液体で二酸化硫黄のにおいがある	淡黄色の液体で、二酸化硫黄のにおいがある。	淡黄色の液体で、二酸化硫黄のにおいがある。
確認試験				
	水溶液は、アンモニウム塩の反応及び亜硫酸水素塩の反応を呈する	水溶液はアンモニウム塩の反応及び二酸化硫黄の反応を呈する	水溶液(1→5)は、カリウム塩の反応及び亜硫酸水素塩の反応を呈する	水溶液(1→5)は、ナトリウム塩の反応及び亜硫酸水素塩の反応を呈する
純度試験				
溶状	—	—	わずかに微濁（3.0g、水 20mL）	わずかに微濁（3.0g、水 20mL）
鉄	—	50mg/kg 未満	—	—
鉛	5μg/g 以下（Pb として）	(5mg/kg 未満)	2μg/g 以下（Pb として）	2μg/g 以下（Pb として）
水銀	—	1mg/kg 未満	—	—
ヒ素	3μg/g 以下（As として）	3mg/kg 未満	1.5μg/g 以下（As として）	1.5μg/g 以下（As として）
強熱残分	—	0.2%以下	—	—
定量法				
亜硫酸水素塩	約 0.3g を精密に量り、亜硫酸塩定量法により定量する。	5mL に冷水 50mL を加え、デンプンの存在下、0.05M のヨウ素で滴定する。	約 0.5g を精密に量り、亜硫酸塩定量法により定量する。	約 0.5g を精密に量り、亜硫酸塩定量法により定量する。
アンモニア	亜硫酸水素アンモニウム濃度が 1 %となるように水で正確に希釈した液 10mL に 30%水酸化ナトリウムを 10mL 加	100 倍希釈液 10mL に 30%水酸化ナトリウムを 10mL 加え、蒸留水で 100mL として蒸留し、0.1M 塩酸で定量する。	—	—

		え、水蒸気蒸留を行い、留液 100mL を 0.1mol/L 塩酸で定量する。			
保存基準		—	冷気や熱を避け、密閉容器に保管する	—	—

（５）成分規格案の設定根拠

本指定要請の背景において、EU 域内において製造・流通している物品の利用を想定していることから、基本的には EU の成分規格を参考に設定することとした。EU での亜硫酸水素アンモニウムの規格は OIV の成分規格に準ずるため、OIV の成分規格 [5]を参考とする。一方では、確認試験及び純度試験については、食品添加物公定書に定めのある分析法を利用することが望ましいことや、安全性に影響を与えうることを考慮し、特に安全性に係る項目について、すでに我が国において食品添加物として溶液として指定されており、利用実績がある類似の亜硫酸塩溶液として、亜硫酸水素カリウム液及び亜硫酸水素ナトリウム液における規格 [3]を採用することとした。

イ　含量及び性状

(ｲ)　含量

OIV における亜硫酸水素アンモニウム規格では「アンモニア 16.5%超、二酸化硫黄 62.0%以上」とされている。本指定要請物品は亜硫酸塩及びアンモニウム塩それぞれが別の効果を有することから、OIV 規格に倣い、二酸化硫黄及びアンモニアそれぞれについて、規格を設けることとした。具体的な規格値については現在特定できている EU 流通品の中で一番含量の低い Bisulfite NH_4 100(Laffort 社、10%亜硫酸水素アンモニウム水) [39]の二酸化硫黄発生量（102g±3g/L）及び密度（1.095±0.02g）を鑑み、最小量を試算した上でリスクを考慮し「二酸化硫黄 8.0%以上、アンモニア 2.1%以上」とした。なお、算出根拠は以下のとおりである。

(1) 最小量の算出

二酸化硫黄：102/1095×100=9.32%

アンモニア：9.3×17(NH_3)/64(SO_2)=2.48%

(2) (1) からの提案規格の算出

二酸化硫黄：酸化等による減少リスクを考慮して 8.0%

アンモニア：8.0×17/64=2.1%

(ﾛ)　性状

OIV における亜硫酸水素アンモニウム規格では“Ammonium hydrogen sulfite always takes an aqueous solution forms. This solution emits a piquant sulfur dioxide odor”と記載がある。

一方、我が国における類似の亜硫酸塩溶液である亜硫酸水素カリウム液及び亜硫酸水素ナトリウム液においては「淡黄色の液体で、二酸化硫黄のにおいがある」との規格が採用されている。ここで、OIV 規格の「piquant=ピリッとした」の表現は二酸化硫黄の特徴に含まれると考えられるが、この特徴が最も低濃度の亜硫酸水素アンモニウム水に当てはまるかが確かでないため、「淡黄色の液体である」とした。

ロ　確認試験

OIV の亜硫酸水素アンモニウム規格においては、アンモニウム塩及び亜硫酸塩であることの確認試験についてのみ規定されており、これらについて試験方法も括弧書きで定められているが、前述のとおり食品添加物公定書に定める分析法を利用することが望ましいこと、これらが定性反応試験であり、試験結果に大きな影響を及ぼすことはないと考えられることから、我が国における類似の添加物の記載方法にならい、「水溶液は、アンモニウム塩の反応及び亜硫酸水素塩の反応を呈する」とした。

ハ　純度試験

次のとおり成分規格及び試験法を採用する。

(イ)　溶状

OIV で規格が定められていないことから定めないこととする。

(ロ)　灰分

我が国では類似の亜硫酸塩溶液にいずれも設定されていないことから、定めないこととする。

(ハ)　鉄

2020 年の日本人の食事摂取基準で考えられる鉄の耐容上限量は摂取状況をはるかに下回り、サプリメントや鉄強化食品の不適切な利用がない限り過剰摂取が生じる可能性はない[241]ことから、規格を設定しないこととした。なお、我が国では類似の亜硫酸塩溶液にいずれも設定されていない。

(ニ)　鉛

OIV における亜硫酸水素アンモニウム規格では試験項目の記載があるものの、具体的な数値は記載されていない。そこで EU 流通品の情報 [39] [40]を参照すると、いずれも 5mg/kg 未満となっていることから、事実上 5mg/kg 未満が EU 域内における規格となっていると考えられる。一方、我が国では類似の亜硫酸塩溶液である亜硫酸水素カリウム液及び亜硫酸水素ナトリウムにおいて 2 μg/g 以下に設定されている。前述のとおり、EU 域内において製造・流通している物品の利用を想定していることから、事実上の EU 域内の成分規格を参考にして、5 μg/g 以下とする。

また、試験法については食品添加物公定書に定める方法によることとする。

(ホ)　水銀

2004 年の食品安全委員会の評価書では[242]、食品からの水銀摂取量は耐容摂取量の 5 割程度であり、食品からの摂取が健康に悪影響を及ぼす可能性は低いことから、規格を設定しないこととした。なお、我が国では類似の亜硫酸塩溶液にいずれも設定されていない。

(ヘ)　ヒ素

OIV における亜硫酸水素アンモニウム規格では 3 mg/kg 未満に設定されていることから、OIV の規格を参考にして、3 μg/g 以下とする。また、試験法については食品添加物公定書に定める方法によることとする。

ニ　定量法

それぞれ下記の方法により定量する。

(ｲ)　亜硫酸水素塩

食品添加物公定書に定めのある分析法の利用が望ましいことから、我が国の亜硫酸塩定量法を採用することとする。

(ﾛ)　アンモニア

OIV により分析法が定められているため、これを採用することとする。。

ホ　保存基準

我が国の類似の亜硫酸塩には定められていないことから、定めないこととする。

（6）試験法の検証データ及び試験成績

本指定要請の背景において、EU 域内において製造・流通している物品の利用を想定しており、したがってこれら物品の試験成績を提出することとしたい。試験を実施した上で、その結果をおって提出する。

（7）食品添加物の安定性

EU 流通品の情報 [39]を参照すると、未開封の状態で製造から 2 年間が使用期限とある。本品を酸性である果汁やマストに添加すると二酸化硫黄とアンモニウムイオンに解離する [1]。

（8）食品中の食品添加物の分析法

本品は、ワインの原料となる発酵前あるいは発酵中の果汁やマストに対して使用されることを想定している。添加後、本品は二酸化硫黄及びアンモニウムイオンに解離し、前者は水と反応して亜硫酸を発生し、主に有害微生物の増殖防止及び酸化防止の効果を発揮しつつ大気中に揮散、あるいは酸化により徐々に消失する。また、後者は栄養源として酵母に吸収されて、発酵助成剤としての役割を果たし消失する。少量が使用食品中に残存した場合は、亜硫酸及びアンモニウムイオンとして解離した状態で存在する [1]。ここで亜硫酸は我が国において、食品衛生法により二酸化硫黄としての残存量が 0.35g/kg 未満とされている [41]これを確認するためには「食品中の食品添加物分析法」を用いる。一方、アンモニウムイオンは果汁、マストやワインの主要な常在成分であるため、添加された成分と峻別して分析することは困難であると考えられる。

6．使用基準案

（1）　使用基準案

亜硫酸水素アンモニウム水は、ぶどう酒の製造に用いる果汁及びぶどう酒（発酵が終了したものを除く。）以外に使用してはならない。

亜硫酸水素アンモニウム水の使用量は、亜硫酸水素アンモニウム塩としてぶどう酒の製造に用いる果汁及びぶどう酒（発酵が終了したものを除く。）にあってはその１Ｌにつき0.2ｇ以下でなければならない。

また、亜硫酸水素アンモニウム水は、二酸化硫黄として、ぶどう酒（ぶどう酒の製造に用いる酒精分１容量％以上を含有するぶどう搾汁及びこれを濃縮したものを除く。）１kgにつき0.35ｇ以上残存しないように使用しなければならない。

（亜硫酸水素アンモニウム水を使用したぶどう酒の製造に用いる果汁を、ぶどう酒（発酵が終了したものを除く。）の製造に用いる場合、亜硫酸水素アンモニウム水をぶどう酒（発酵が終了したものを除く。）に使用するものとみなす。）

（２）使用基準案の設定根拠

本概要書では、果汁やマストの酵母による発酵を助成するほか、腐造、酸化を防止するために亜硫酸水素アンモニウム水を使用することを前提としている。

OIV や EU、オーストラリアでの記載では、いずれも発酵前あるいは発酵中の果汁やマスト（注：1 容量%以上のアルコール分を含むと我が国では酒類に該当する）に使用を認めるもので、したがってアルコール発酵が終了した製品ワインにはできないこととなっている。一方でその使用量については、EU では亜硫酸水素アンモニウム塩として 0.2g/L 以下としているが、オーストラリアでは GMP のもとで使用することとしており、具体量としての制限を定めていない。

ここで、EU 域内において製造・流通している物品の利用を想定していることから、EU の使用基準を参考に対象食品をぶどう酒の製造に用いる果汁及びぶどう酒（発酵が終了したものを除く。）に限定した上で、使用上限量を亜硫酸水素アンモニウム塩として 0.2g/L とする。

また、我が国において、食品衛生法により二酸化硫黄としての残存量が 0.35g/kg 未満とされていることから [41]、製品ワインへの二酸化硫黄としての残存量 0.35g/kg 未満を追加した。

Ⅱ．有効性に関する知見

１．食品添加物としての有効性及び他の同種の添加物との効果の比較

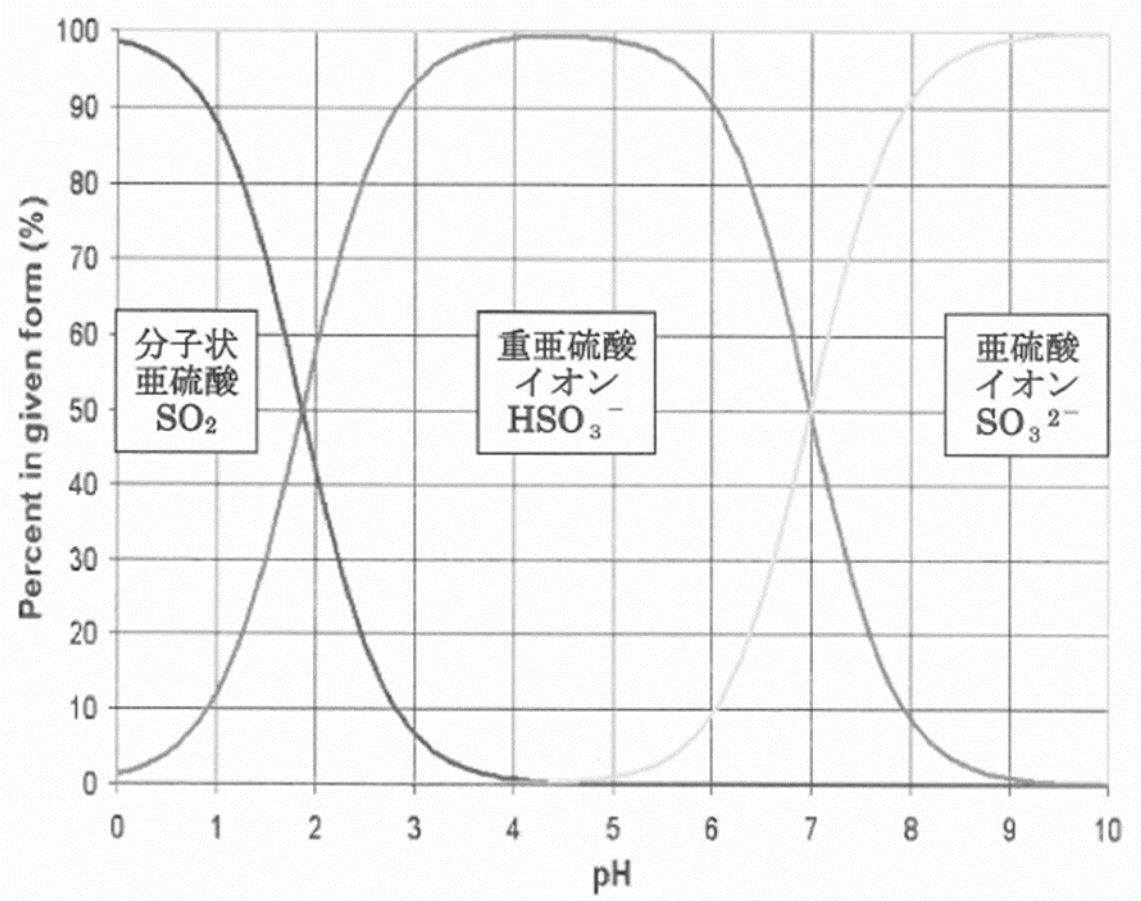
(ア)亜硫酸塩

序において言及した遊離型亜硫酸は SO_2、HSO_3^-、SO_3^{2-}の 3 種類存在し、pH に依存して化学種の存在比が変化する。なお、化学平衡は式 1、図 1 のとおりとなっており、通常の果汁及びワインの pH(3.0～4.0) [2] においては、HSO_3^-と SO_2が支配的であることが分かる。

式 1. 液体中における亜硫酸の化学平衡［42］

$$SO_2 + H_2O \rightleftarrows HSO_3^- + H^+ \qquad pKa_1 = 1.81$$
$$HSO_3^- \rightleftarrows SO_3^{2-} + H^+ \qquad pKa_2 = 7.2$$

図 1.亜硫酸化学種の分布［1］



このうち、SO_2の方が強い抗菌性を示すが、白のテーブルワインに対して、0.8mg/L の SO_2が存在することで汚染酵母 *Brettanomyces sp.*、ある種の乳酸菌やその他汚染微生物に対し、24 時間後には 10,000 倍減少させるとの報告がある［43]。

また、SO_2 は pH により遊離型亜硫酸における存在比が大きく変化することから、ワインの pH が抗菌作用を発揮するために必要な遊離型亜硫酸量に大きく関与する。例として、白ワイン

を有害微生物から守るために必要な SO_2 の量は 0.8ppm(mg/L)とされているが、この濃度を保つために必要な遊離型亜硫酸は pH2.9 では 11ppm(mg/L)であるのに対し、pH が 4.0 になると 125ppm(mg/L)と 10 倍以上にもなる [44]。したがって、亜硫酸を添加する際に有害微生物を抑制する効果を得るためには、事前に果汁またはワインの pH を確認し、適切な低い値を保って十分な SO_2 を確保することが重要である。

果汁やワインにはポリフェノールなどの容易に酸化される化合物が豊富に含まれているが、亜硫酸は還元剤として酸素分子と反応し、果汁またはワインの酸化を阻害する。なお、赤ワインには亜硫酸と同じように還元剤として働くフラボノイドフェノールが豊富に含まれることから、白ワインの場合に亜硫酸の抗酸化剤としての役割がより重要になる [43]。

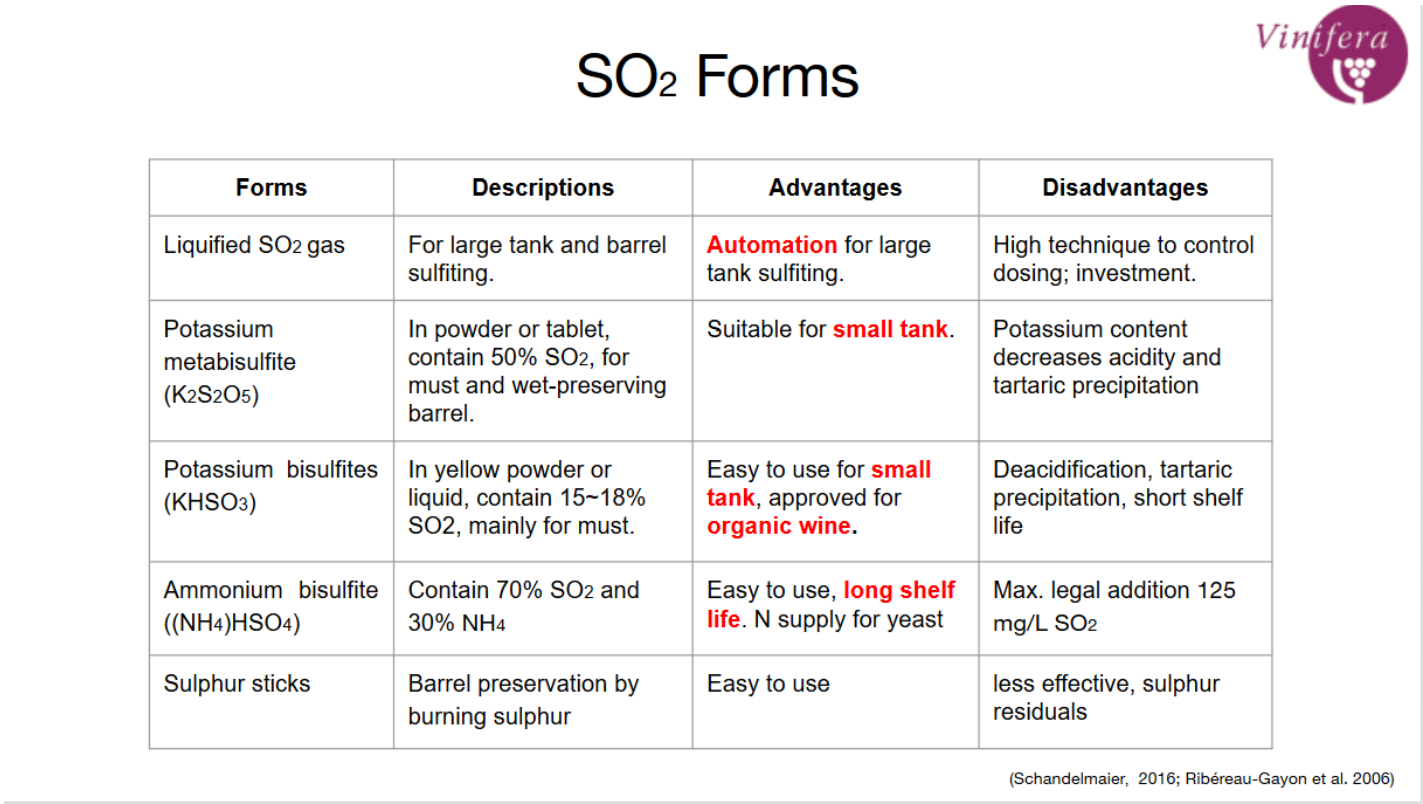
また、ブドウを含む植物はチロシナーゼ酵素群を産生する。この酵素群が働くことで無色である非フラボノイドの o-ジヒドロキシフェノールを褐色のキノンに酸化される。未だ詳細な機序は完全には明らかになっていないが、亜硫酸はこのチロシナーゼ酵素群の働きを阻害することで白ワインの褐変を防ぐ効果もある。果汁に 35mg/L の亜硫酸を添加することで、チロシナーゼによる酸素の取り込みが完全に阻害されたとの報告がある [43]。

果汁に対する亜硫酸添加は p H、対象となるブドウの品質や品種、熟度のほか、どのようなワインに仕上げるかによって変動し、ときには一切行わないこともある。しかし、亜硫酸はワイン製造において望ましい性質を複数持ち合わせる有効性の高い添加物である。

上記のとおり亜硫酸塩は果汁やマストに添加して亜硫酸を発生させ、主に有害な微生物の発生を抑制すると同時に酸化を防ぐ効果を持つ。一般的に添加物として用いられているものについては表 4 のとおりにまとめることができる。

この中で亜硫酸水素アンモニウムは添加量に上限が定められているものの、液体であることから使用が容易であるほか、未開封状態で使用期限は 2 年と長いこと [39]、そしてほかの亜硫酸塩にない特徴として、果汁に亜硫酸を加えることと酵母に対して資化性の窒素分であるアンモニウムイオンを供給することが同時にできるという利点がある。

表 4.SO_2を発生させる代表的な食品添加物とその特徴



SO_2 Forms

Forms	Descriptions	Advantages	Disadvantages
Liquified SO_2 gas	For large tank and barrel sulfiting.	**Automation** for large tank sulfiting.	High technique to control dosing; investment.
Potassium metabisulfite ($K_2S_2O_5$)	In powder or tablet, contain 50% SO_2, for must and wet-preserving barrel.	Suitable for **small tank**.	Potassium content decreases acidity and tartaric precipitation
Potassium bisulfites ($KHSO_3$)	In yellow powder or liquid, contain 15~18% SO2, mainly for must.	Easy to use for **small tank**, approved for **organic wine**.	Deacidification, tartaric precipitation, short shelf life
Ammonium bisulfite ($(NH_4)HSO_4$)	Contain 70% SO_2 and 30% NH_4	Easy to use, **long shelf life**. N supply for yeast	Max. legal addition 125 mg/L SO_2
Sulphur sticks	Barrel preservation by burning sulphur	Easy to use	less effective, sulphur residuals

(Schandelmaier, 2016; Ribéreau-Gayon et al. 2006)

(イ)アンモニウム塩

酵母の増殖、発酵を促すために必要な FAN は果汁に含まれる糖度、使用する酵母菌株によっても異なるが、満足に発酵が行われるためには、少なくとも 140mg/L の FAN が必要とされていることが報告されており、最大 900mg/L、可能であれば 400～500mg/L の FAN が必要であることが示唆されている［43］。ワインの原料であるブドウは米や麦のような穀類に比べ、含まれる窒素分が少なく［44］、その果汁中のアンモニアは 24～309mg/L（平均値として 123mg/L）との報告がある［2］。

アンモニウム塩は果汁において FAN が欠乏しているときに FAN の一種であるアンモニアを果汁に供給する。我が国ではリン酸二アンモニウム（DAP）や硫酸アンモニウムの形でよく添加されている。DAP は粉末で水に溶かして添加することから使用が容易である［45］。

しかし、いずれも発酵助成剤としての機能しか持たないという点において亜硫酸水素アンモニウムと異なっている。

2．食品中での安定性

本指定要請する亜硫酸水素アンモニウム水は基本的に健全な発酵のための資化性窒素が不足している果汁に使用することを前提としており、使用基準案上限の 0.2g/L を添加するとき、分解して生じるアンモニウムイオンはアンモニアとして 34.4 mg/L（(17.03/99.11)×200＝34.37)程と

考えられるが、発酵の際に酵母により栄養分として吸収、資化されるため、製品ワインにはほぼ残存しないと考えられる [2]。また、同じく分解して生じた亜硫酸は有害微生物の増殖防止及び酸化防止の効果を発揮しつつ大気中に揮散、あるいは酸化により徐々に消失する。

3．食品中の栄養成分に及ぼす影響

本指定要請する亜硫酸水素アンモニウム水を使用することにより、食品成分に及ぼす影響を考える。アンモニウムイオンに関しては、マスト及びアルコール発酵後のワインに含まれる量はそれぞれ約 100mg/L と約 10mg/L との報告がある [42]。ここから酵母がアルコール発酵時に吸収、資化される量をおよそ 90mg/L と推定すると、資化性窒素が不足した果汁に対して亜硫酸水素アンモニウム水を使用した際、資化性窒素の一種であるアンモニウムイオンは理論的には 2．で算出したとおり最大で 34.4 mg/L 発生する。そのため他の資化性窒素の含有量にもよるが、アンモニウムイオンが 55.6 mg/L 以下の果汁に対して必要分が酵母に吸収、資化されると、資化性窒素が不十分で亜硫酸水素アンモニウム水を使用基準最大使用して製造したワインと資化性窒素が十分で亜硫酸水素アンモニウム水を添加せずに製造したワインとを比較してもその濃度に差はみられないと考えられる。なお、資化性窒素濃度は簡単に測定することができ、製造者は果汁を分析して必要分を添加する [44]ことから、資化性窒素が十分であるにもかかわらず亜硫酸水素アンモニウムを添加する可能性は低いものを考えられる。また、亜硫酸に関しては、ワインに含まれるアルデヒドやケトンなどのカルボニル化合物や、フェノール化合物、糖類などの物質に結合し、結合型亜硫酸を形成する [44]が、こちらも前述の使用基準案における使用上限量（二酸化硫黄としてぶどう酒 1kg につき 0.35g 未満）を適用することで、現行と変わらず、特段の問題は生じないものと考えられる。

Ⅲ．安全性に係る知見

１．　体内動態試験

（１）亜硫酸水素アンモニウム

亜硫酸水素アンモニウムに関する体内動態試験の知見を見出すことはできなかった [46] [47]。

そのため、亜硫酸水素アンモニウムの分解産物として想定される化学種について、検討を行うこととした。亜硫酸水素アンモニウム水をワインの製造過程で添加した場合、亜硫酸水素アンモニウムの分解によりアンモニウムイオン、また、二酸化硫黄 （SO_2） が生成される [1]ことから、まずはアンモニウムイオンの体内動態を参照した。また、二酸化硫黄は果汁中で水と反応し、一部 SO_2、HSO_3^-、SO_3^{2-}といった化学種の形をとることから、二酸化硫黄については二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の体内動態を参照した。

（２）アンモニウムイオン／アンモニア

①アンモニウムイオン／アンモニアに関する吸収、分布、代謝及び排泄

アンモニウムイオン／アンモニアの体内動態に関しては、食品安全委員会が、「添加物評価　硫酸アルミニウムアンモニウム、硫酸アルミニウムカリウム」 (2017 年 12 月) において、以下のようにまとめている [38]。また、その後新たな知見は認められていない[243]。

『(引用開始)

Ⅳ．食品健康影響評価

本委員会としては、硫酸アルミニウムアンモニウム及び硫酸アルミニウムカリウムは、消化管内でイオン化して吸収されることを考えると、添加物「硫酸アルミニウムアンモニウム」及び添加物「硫酸アルミニウムカリウム」の評価に当たっては、これらを構成する各イオンの体内動態及び毒性を評価する必要があると考えた。そこで、硫酸アルミニウムアンモニウム及び硫酸アルミニウムカリウムに加え、硫酸イオン、アンモニウムイオン、カリウムイオン及びアルミニウムイオンで構成される物質を被験物質とした体内動態及び毒性に係る知見も併せ、総合的に添加物「硫酸アルミニウムアンモニウム」及び添加物「硫酸アルミニウムカリウム」の安全性に関する検討を行うこととした。

１．アンモニウムイオン、硫酸イオン及びカリウムイオン

アンモニウムイオンについては、添加物「アンモニウムイソバレレート（第 2 版)」の評価書（2014）において、ヒトが食品を摂取することにより、消化管内において、1 日当たり十二指腸で 10 mg、結腸で約 3 g のアンモニアが産生されるとされている。産生されたアンモニアはほとんどが吸収された後、門脈循環に入るとされている。健常なヒトではアンモニウムイオンは肝臓で速やかに尿素に変換され、尿中に排泄されるとされている。

「硫酸アルミニウムアンモニウム」を摂取することで体内に取り込まれるアンモニアの量は、ヒトにおいて食事から産生されるアンモニアの量の変動の範囲内と考えられるこ

と、また、ヒト体内で産生されたアンモニアと同様に代謝されると考えられることから、本評価書では体内動態及び毒性の検討は行わないこととした。(引用おわり)』

その結論として、『(引用開始) 以上から、本委員会としては、硫酸イオン、アンモニウムイオン及びカリウムイオンについては、安全性に懸念のある知見はないと考えた。(引用終わり)』としている。

ここで引用されている The EFSA Journal (2009) [37]では、香料のグループとしてアンモニア及び 2 種のアンモニア化合物について摂食量や毒性試験などのデータから評価を行っている。その中でアンモニアは無害な物質に代謝されるとあるほか、MSDI (Maximised Survey-derived Daily Intake) アプローチによって計算された摂取量に基づく安全上の懸念はないとされている。このことから指定等要請者は添加物由来の推定摂取量 (後述する摂取量推計から最大量でアンモニウムイオンとして 1.646 mg/人/日) と食品由来の摂取量の割合等結腸において、1 日当たりアンモニアとして 3g 程度産出後吸収される。また、The EFSA Journal [37]では、ニンジンやレタス、トウモロコシなどの野菜類の含有量は、3,970 ~ 19,600 mg/kg と報告されている。) から総合的に判断してアンモニウムイオンについて、安全上の懸念はないと考えた。

(3) 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類 [4]

①.二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の化学的性状

(1)Green(1976)によると、pH における二酸化硫黄と水の一般的な平衡について亜硫酸水素イオンは pH4 のときに存在比が最大となり、pH が 2~5 のほぼすべての範囲で 2/3 以上の遊離型亜硫酸は亜硫酸水素イオンとして存在する。その一方でごく低い pH においては遊離二酸化硫黄の存在比が最大となる [48]。

これを受けて、JECFA (1987) では次のようにまとめている。

溶液中の二酸化硫黄および硫黄 (Ⅳ) オキソアニオンは、二酸化硫黄、亜硫酸、亜硫酸水素イオン及び亜硫酸イオンとの間で pH 依存性平衡状態にある。正常な生理学的 pH 値及び 1 M よりも高い濃度では、平衡は亜硫酸水素塩と亜硫酸塩がほぼ等し

[4] 本概要書において亜硫酸塩類とは、二酸化硫黄、亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム (メタ亜硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム)、亜硫酸水素ナトリウム、及びピロ亜硫酸カリウムを指す。なお、二酸化硫黄は溶液中で速やかに水と反応し、式 1 に従い pH に応じてプロトンを放出する。亜硫酸ナトリウムは水溶液中ではそのほとんどが電離するため、溶解された時点で SO_3^{2-} となり、その後速やかに式 1 で示すように pH に応じた化学種の存在比率をとる。また、ピロ亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウム及び亜硫酸水素ナトリウムに関しても溶解後速やかに電離、又は電離した $S_2O_5^{2-}$ の加水分解により HSO_3^- となり、その後他の化合物同様 pH に応じた化学種の存在比率をとる。したがって、いずれの塩でも溶解後のカチオンの差はあるが、アニオンは同じ挙動をとることから、本概要書では亜硫酸塩類として考察した。

い割合にあり、空腹時のヒトの胃より低い pH では、平衡は基本的に亜硫酸水素イオンと遊離二酸化硫黄の間にある [21]。

(2) Burroughs と Sparks(1973a) (1973b) (1973c)の 3 件の論文によると、亜硫酸結合能について次のような報告がある。

pH3~4 における亜硫酸水素化合物とアセトアルデヒド等計 8 種類のカルボニル化合物について見かけの平衡定数 K を測定した。質量作用の法則により平衡定数 K は亜硫酸水素カルボニルの可逆的な解離及び形成反応の速度定数を表しており、水素イオン濃度と反比例することが明らかになった。このことからほとんどの食品及び飲料をカバーする範囲の pH(3~7)で亜硫酸のカルボニル化合物との結合平衡を計算により求められることが示された [49]。

質量作用の法則はワインやサイダー中のカルボニル化合物の亜硫酸への結合挙動を説明し、亜硫酸結合能へのそれぞれのカルボニル化合物の寄与を計算するために用いられる。モデルワインでは遊離型亜硫酸の濃度の増加に伴う結合型亜硫酸の理論値と実験結果が一致した。Dowex1（亜硫酸水素塩）のカラムでのモデルワインの分別により個々の成分は良好に回収された（95～103.5%） [50]。

ペーパークロマトグラフィーによりワインを分析し亜硫酸結合能を計算値と実測値で比較した。カビや細菌に侵されたブドウから製造したワインの亜硫酸結合能は高かった。その原因のひとつとして微生物由来のジカルボニル化合物が挙げられ、計算値と実測値はほぼ一致した。一方通常のブドウから製造したワインの亜硫酸結合能は低かったが、計算値は実験値よりも 7～10%ほど高かった [51]。

また、Adachi ら(1979)の報告によると、結合力が異なる 3 種の結合型亜硫酸を用いて食品中に残存する亜硫酸塩量の測定に利用されてきた従来の 5 法の正確性を比較し、そのうち改良 Monier-Williams 法が最も効果的であることを示した。また、遊離型亜硫酸とアセトアルデヒド、ピルビン酸、D-マンノースからなる 3 種類の結合型亜硫酸は、弱酸から微アルカリ性の pH 範囲においてにより短時間で形成され、約 50%の結合型亜硫酸は等量の亜硫酸水素ナトリウムとアセトアルデヒドまたはピルビン酸の反応によって生じた [52]。

JECFA（1987）ではこれらの内容を受け次のようにまとめている。

二酸化硫黄は、幅広い食物成分と反応する。二酸化硫黄は、アルデヒドやケトン類（還元糖、アセトアルデヒド、キノン類、およびケト酸等)、アントシアニン類、およびタンパク質のシステイン残基と可逆的に反応し付加物を生成する。大部分の飲食物で、カルボニル化合物との付加物、即ちヒドロキシ硫酸体は、結合型亜硫酸のほとんどを占める。この平衡反応については詳細に研究された。pH1～8 の範囲ではヒドロキシ硫酸体が優位で、より高い pH 値では解離が生じる [21]。

(3) McWeeny ら(1974)の報告によると亜硫酸と糖やカルボニル化合物、メライノイジン等の色素との非酵素的褐変反応を比較したところ、このうち α、β-不飽和カルボニ

ル化合物は亜硫酸がオレフィン結合の部位に不可逆的に付加し、また、非常に安定であることから胃や腸内の化学的条件においても分解しないため、適切なメカニズムが存在する場合、この形のままそれぞれの部位から吸収される [53]。

また、Wedzicha と McWeeny(1974a) (1974b) (1975)は亜硫酸と食品の褐変反応について調査し、3 件の論文において、次のように報告している。

亜硫酸イオンとアスコルビン酸-グリシン複合体の pH3 における褐変抑制について研究を行った。グリシンはアスコルビン酸由来の着色化合物の形成を促進するが、この反応は反応性に富んだ褐変の中間生成物である 3-デオキシペントオスロースの形成には関与しない。褐変反応における亜硫酸の反応のひとつに 3-デオキシペントオスロースなどのカルボキシ化合物の中間体から他の反応性に富む中間体ひいては着色化合物の生成へとつながる一連の反応を阻害することが挙げられる。亜硫酸と 3-デオキシペントオスロースまたはその脱水化合物の 3,4-ジデオキシペントオスロース-3-エンが反応すると 3-デオキシ-4-スルホペントオスロースが生じることがある。この生成物はモデル系から除かれるが、ここでは反応した亜硫酸水素塩の 1/3 を占める [54]。

脱水され、亜硫酸を添加したキャベツ中に 3-デオキシ-4-スルホペントスロースの存在することが、質量分析によって確認されており、3-デオキシ-4-スルホヘキソスロースが形成されることの有力な証拠となる。これらの化合物は、食品で確認できる亜硫酸塩に由来する最初の「安定した」有機スルホン酸塩である。前者は亜硫酸塩によるアスコルビン酸の非酵素的褐変反応の阻害から生じ、後者はメイラード反応の中間体と亜硫酸塩の相互作用から生じるものである [55]。

キャベツ等の二酸化硫黄の添加が許可された食品に存在する 3-デオキシ-4-スルホオスロースの量を測定した。測定値は、食品の化学組成と亜硫酸塩添加後に受ける処理を反映している。他の食品成分との反応により、3-デオキシ-4-スルホオスロースは他の硫黄含有製品を生成する可能性がある [56]。

ここでジャム製造の原料となるイチゴは、ジャムに加工される前に、亜硫酸水溶液で長期間保管されることがある。McWeeny ら(1980)の報告によると、 ^{35}S でラベリングした亜硫酸塩を使用し、この工程について調査した結果、果物・水溶液間において ^{35}S でラベリングされた亜硫酸化学種が広く平衡状態にあることが示された。また、亜硫酸損失の大部分は、(i) イチゴ保管中の化学反応 (ii) ジャム製造中の物理的損失の観点から説明された。この研究では、亜硫酸水溶液の約 78%がイチゴ果実に取り込まれた。このうちの 98.5%が化学的に反応、あるいは揮発した。保管中に 38%が不揮発性化合物に変換され、ジャム製造中にはさらに 11%が反応、50%が揮発し、1.5%がジャム中に残存していた [57]。

JECFA（1987）ではこれらの内容を受け、次のようにまとめている。

メイラード反応の α、β-不飽和カルボニル化合物との安定な付加物の生成が報告されている。他の非酵素的褐色反応の中間体との不可逆的反応は、安定な 3-デオキシ-4-スルホ-オスロース（3-deoxy-4-sulpho-osulose）の生成につながる。これらの安定な生

成物は、貯蔵脱水野菜類に当初添加した亜硫酸の大部分に由来するものであろうし、また亜硫酸処理した果物から作ったジャム類に存在する主要な最終生成物であろう[21]。

(4) Gunnison(1981)の報告によると、次のようにまとめられている。

亜硫酸は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）のピリジン環の 3- 4 二重結合に可逆的に付加し、ヒドリドイオンによって還元されるため活性部位にスルホン酸基を形成する。 pH 7.5（25℃）における、この付加物単独の安定性は中程度であり、その解離定数は約 3 × 10^{-2} mol/L である。また、亜硫酸はイソアロキサジン環の N5 原子であるフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）とフラビンモノヌクレオチド（FMN）と類似の亜硫酸付加物を形成する。これらの付加物は、解離定数が約 2 mol/L と NAD-亜硫酸付加物よりもさらに不安定であるが、後者と同様に、タンパク質に結合すると安定性が大幅に向上する。このほか亜硫酸は、ウラシル、ウリジンまたはウリジン 5'-リン酸の 5-6 二重結合に可逆的に付加し、5,6-ジヒドロ-6-スルホン酸塩を形成する [64]。

Shapiro(1983)の報告によると、次のとおり記載がある。

亜硫酸水素塩は核酸と多くの反応を起こすが、その中で最もよく知られているのは、シトシンからウラシルへの脱アミノ化である。この変換は一本鎖核酸に特異的であり、濃度が 1 mol/L 以上の亜硫酸水素塩溶液では pH 5〜6 で最も急速に反応が進行する。アデニンとグアニンはこれらの条件下では反応しないため、脱アミノ化はシトシンに特異的である [71]。

この結果を受けて JECFA（1987）は次のようにまとめた。

亜硫酸は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）、フラビン類、及びシトシンやウラシルとそれらのヌクレオシドやヌクレオチドと付加物を生成する [21]。

②. 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類に関する吸収

(1) Gibson と Strong(1973) の報告によると [58]、アルビノラット（体重：90－100g、各群 3 匹）に $Na_2{}^{35}SO_3$ と混合した $NaHSO_3$（二酸化硫黄として 10、50 mg / kg）を強制経口投与し、投与後（24 時間、48 時間、1 週間、2 週間）所定の時間で死骸から放射能を測定、および尿及び糞便からの放射能も測定した。その結果、50 mg / kg 投与したラットでは投与後 24 時間で ^{35}S 投与量の 70-80％、48 時間で 80-85％が尿中に排出される。糞便では 24 時間で ^{35}S 投与量の 4-17％、48 時間で 13-18％が排出され、死骸では 24 時間 9-21%、48 時間 4-7%、1 週間 2%、2 週間 1%が観察された。10 mg / kg 投与した場合でもほぼ同様の結果を得られたが 2 週間後の死骸から ^{35}S の検出は 0 であった。

アルビノマウス（体重：15g、各群 3 匹）に $Na_2{}^{35}SO_3$ と混合した $NaHSO_3$（二酸化硫黄として 50 mg / kg）を強制経口投与し、投与後（24 時間、48 時間、1 週間、2 週間）所定の時間で死骸から放射能を測定、および尿及び糞便からの放射能も測定した。その結果、投与後 24 時間で ^{35}S 投与量の平均 78.7％、48 時間で 80.8％が尿中に排出される。

糞便では 24 時間で ^{35}S 投与量の平均 15.6%、48 時間で 14.8 %が排出され、死骸では 24 時間 3.1%、48 時間 1.8 %、1 週間 0.83 %、2 週間 0.36 %が観察された。

アカゲザル（*Macaca mulatta*）（体重：約 6 kg、雌 4 匹雄 1 匹）に $Na_2{}^{35}SO_3$ と混合した $NaHSO_3$ を 50 mg / kg（二酸化硫黄として）強制経口投与し、投与後（24 時間、48 時間、72 時間、96 時間、120 時間）所定の時間毎に尿と糞便から放射能を測定した。その結果、尿では 24 時間で平均して 94.9%、48 時間で 3.2%、72 時間で 1.1%、96 時間で 0.6%、120 時間で 0.7%が排出され、糞便では 24 時間で平均して 1.8%、48 時間で 2.2%、72 時間で 0.4 %、96 時間で 0.2 %、120 時間で 0.1 %が排出された。

この Gibson と Strong(1973)の報告を受けて JECFA（1987） [21]では、各生物種について摂取された亜硫酸塩の運命を次のように報告した。まずラット、マウス、およびサルに対して $Na_2{}^{35}SO_3$ と混合した $NaHSO_3$ を 10、50 mg / kg（二酸化硫黄として）で経口投与したところ、^{35}S の大部分（70-95%）が腸から吸収され、24 時間以内に全 3 動物種で尿中に排泄された。残りの ^{35}S の大部分は糞便として排泄され、排泄率は種に依存していた。1 週間後の死骸に残留した ^{35}S は、全動物種で投与量の 2%以下であったと報告している。

以上のことから指定等要請者は $Na_2{}^{35}SO_3$ と混合した $NaHSO_3$ を経口投与した場合ラット、マウス、およびサルにおいてその大部分は尿や糞便として 24 時間以内に排出されるが、ラット及びマウスにおいては投与量の 2%以下が 1 週間後の体内から検出されたことから経口投与により 2%以下の極微量の $NaHSO_3$ は吸収されると考えた。

(2) Agency for Toxic Substances and Disease Registry in USA(1998)の報告によると、吸入された二酸化硫黄は湿った気道の壁に溶解し、亜硫酸イオン（SO_3^{2-}）、亜硫酸水素イオン（HSO_3^-）、および水素イオンの混合物が生成する。これらのイオンの形成は以下に示す平衡に従う [59]。

$$\underset{\text{pKa=1.8 pKa=7.2}}{SO_2 + H_2O \overset{+H^+}{\underset{-H^+}{\leftrightarrow}} H_2SO_3 \overset{+H^+}{\underset{-H^+}{\leftrightarrow}} HSO_3^- \leftrightarrow SO_3^{2-}}$$

また、Lester(1995)の報告によると、喘息患者の亜硫酸塩に関連する悪影響を説明するために、最も広く掲げられている理論として亜硫酸塩を含む食品または飲料の摂取後に胃で生成された SO_2 の吸入の結果として反応が起こるというものがある。Simon（1989）は亜硫酸塩が溶液に溶けると SO_2 が生成し、この反応は温度が高いほど、また、pH がより低いほどで促進されると指摘した。口や胃中の高温酸性の環境は、SO_2 が発生する主要な条件である [60]。

これらの内容を受けて EFSA（2016）は、次のようにまとめている [27]。

SO_2 のトキシコキネティクスについては Agency for Toxic Substances and Disease Registry in USA(1998) [59]と JECFA (1987) [21]により検討された。

亜硫酸と亜硫酸水素のナトリウム及びカリウム塩は水溶液中で亜硫酸イオン(SO_3^{2-})と亜硫酸水素イオン(HSO_3^-)の混合物として存在している。

$$SO_2 + H_2O \quad \rightleftarrows \quad HSO_3^- + H^+ \quad \rightleftarrows \quad SO_3^{2-} + 2H^+$$
pKa=1.8　　pKa=7.2

メタ亜硫酸は acid sulfite の無水物であり、水溶性溶液中では亜硫酸水素イオンを生成する。

$$S_2O_5^{2-} + H_2O \quad \rightleftarrows \quad 2HSO_3^-$$

上記の全ての出発物質について、水溶液中の二酸化硫黄、亜硫酸、および亜硫酸水素の相対的なレベルは pH 依存性の平衡式により計算できる。

したがって、パネルは亜硫酸水素と二酸化硫黄との間の平衡は胃の pH に依存して変化すると考えた。即ち、絶食状態や無酸症では亜硫酸水素が優勢である。また、酸性状態では二酸化硫黄が優勢である。一方、亜硫酸と亜硫酸水素は消化管中及び吸収過程ではほぼ等モルの混合物として存在している。亜硫酸を含む食物の摂取から二酸化硫黄が遊離されることについては、既に Lester(1995) [60]により報告されている [27]。また、EFSA はパネルの意見をもとに、以下のとおり考察している。

二酸化硫黄を摂取すると、水と反応して亜硫酸水素イオン、亜硫酸イオン、二酸化硫黄を形成する可能性がある。胃で見られる主な化学種は亜硫酸水素イオンと二酸化硫黄であり、これらのバランスは胃相の酸性度によって決まる。また、腸の pH 中性環境においては、主な化学種は亜硫酸イオンと亜硫酸水素イオンとなる [27]。

以上のことから、指定等要請者は、EFSA(2016)の考えをもとに次のように考えた。

添加物として摂取された二酸化硫黄は生体内の水と反応し、亜硫酸水素イオン、亜硫酸イオン、二酸化硫黄を発生させる。これらの化学種は消化管に移行し、pH が酸性の胃内では主に亜硫酸水素イオン及び二酸化硫黄として吸収される。また、腸にまで移行したものは中性の pH 環境により、主に亜硫酸イオンと亜硫酸水素イオンとして吸収される。

(3)Wever (1985)の報告によると、Sprague-Dawley 雄ラット（8 週齢、体重 190 g 、匹数不明）の十二指腸内に亜硫酸ナトリウム溶液（100 mg Na_2SO_3 / kg 体重）を投与した後 120 分まで門脈から血液を採取し、血漿中の遊離の亜硫酸と、S-スルホン酸の量を測定した。その結果、亜硫酸ナトリウム水溶液を投与 10 分以内に血漿中の遊離の亜硫酸 10~15nmol/mL に増加し 30 分以降は約 5nmol/mL を示している。S-スルホン酸は 10 分以内に 5nmol/mL 以下ではあるがもっとも高い濃度となり、その後も 120 分までほぼ同じ値を維持している。

同様に Sprague-Dawley 雄ラット（8 週齢、体重 220 g 、匹数不明）の十二指腸内に亜硫酸ナトリウム溶液（100 mg Na_2SO_3 / kg 体重）を投与した後 150 分まで大静脈から血液を採取し、血漿中の遊離の亜硫酸と、S-スルホン酸の量を測定した。その結果、血漿

中に遊離の亜硫酸は確認されず、S-スルホン酸は門脈よりも低い値ではあるが 10 分から 60 分までほぼ同じ値を示し、その後減少していった。

また、Sprague-Dawley ラット（8 週齢、各群雌雄各 3 匹、雄体重：276±32g、雌体重：242±4g）の十二指腸内に亜硫酸ナトリウム溶液（100 mg Na_2SO_3 / kg 体重）を投与後（0、10，20，30 分）で門脈と大静脈で血液を採取し、血液中の S-スルホン酸と亜硫酸塩の濃度を測定した。その結果、雌雄ともに有利亜硫酸は門脈の血漿中で亜硫酸ナトリウム水溶液投与後確認され、S-スルホン酸は門脈、大静脈双方で確認された [66]。

これらの報告を受けて JECFA（1987） [21]では、以下の記載がある。

Wever (1985)は血液採取のために門脈と大静脈にカニューレを挿入した Sprague-Dawley ラットの十二指腸内に亜硫酸ナトリウム溶液を投与した。血漿の検査で、S-スルホン酸が肝臓前後の血液中に認められたが、遊離型亜硫酸は門脈血のみに検出された。以上の結果から著者は、亜硫酸は吸収された後、速やかに酸化されるか、または S-スルホン酸を生成すると結論している [21]。

以上のことから指定等要請者は十二指腸内に入った遊離の亜硫酸は 10~30 分の短い時間で吸収され門脈を通じて速やかに肝臓に運ばれると考えられる。さらに 30 分以降亜硫酸濃度が減少すること、S-スルホン酸が門脈及び大静脈で見られたことから亜硫酸は吸収の後速やかに酸化などが行なわれ S-スルホン酸を生成するという Wever (1985)の考察も十分に考えられるが明確な酸化の証拠となるデータが当該報告内にはないため亜硫酸の酸化などが行なわれ S-スルホン酸を生成するという考察に関してはここでは得られないと考えた。

(4) Gunnison と Palmes（1978）の報告によると、健康な成人男性を 2 つのグループに分け実験を行った。グループ 1 では肺機能が正常で平均年齢 22 歳の非喫煙者 13 人で、グループ 2 では平均年齢 34 歳のヘビースモーカー（タバコ 20~40 本／日）で構成された。グループ 1 では無作為に被験者（各 3 人）を二酸化硫黄濃度（0、0.3，1.0，3.0 ppm）に 120 時間連続ばく露した。さらに別の実験として無作為で選ばれた 3 人は二酸化硫黄濃度（3.0、6.0 ppm）に 48 時間連続ばく露を行った。（グループ 1 では 2 つの 120 時間の実験と 48 時間の実験双方を行った被験者が 2 人存在している。）グループ 2 でも被験者（各 3 人）を二酸化硫黄濃度（0、0.3，1.0，3.0 ppm）に 96 時間連続ばく露した。さらに別の実験として無作為で選ばれた 2 人は二酸化硫黄濃度（4.2 ppm）にばく露を行った。試験と試験の間には少なくとも 9 日間のインターバルを設けた。ばく露後各被験者から血液サンプルを採取し、血漿中の S-スルホン酸量を測定した。その結果、大気中の二酸化硫黄濃度と血漿中の S-スルホン酸量の得られた 80 のデータを分析して得られた回帰直線は有意な相関（$r = 0.61$、$p < 0.001$）をもたらし、ばく露量 1 ppm ごとに血漿の S-スルホン酸量が 1.1±0.16 nmole/mL 増加するという考察を得られた [65]。

この Gunnison と Palmes（1978）の報告を受けて JECFA（1987） [21]では、大気中 0.3、1.0、3.0、4.2 及び 6.0 ppm の濃度の二酸化硫黄に 120 時間ばく露されたヒトの血漿 S-スルホン酸量は、ばく露量 1 ppm ごとに 1.1±0.16 nmole/mL 増加したとまとめている [21]。

以上のことから指定等要請者は Gunnison と Palmes（1978）や JECFA（1987）の考察を支持し、大気中の二酸化硫黄（6.0 ppm まで）のばく露によって人はばく露量 1 ppm ごとに血漿の S-スルホン酸量が 1.1±0.16 nmole/ｍL 増加すると考えた。

③.二酸化硫黄及び亜硫酸塩類に関する分布

(1) Cecil と Wake（1961）の報告によると、内因性タンパク質（オキシトシン、リボヌクレアーゼ、インスリン、リゾチーム、α―キモトリプシノーゲン、α―キモトリプシン、トリプシノーゲン、トリプシン）0.1mM に Na_2SO_3 を 37℃、 p H6.5－7.0 で反応させて、酸化フェニル水銀または塩化水銀を用いた計量滴定でシステイン残基濃度とにジスルフィド橋量を測定した。その結果鎖内のジスルフィド橋のみが亜硫酸イオンにより切断されていることが示された [62]。Swan (1959)の報告によると形成されたタンパク S-スルホン酸は、スルフヒドリル化合物の存在下で緩やかに亜硫酸イオンを遊離することが知られている [63]。

Gunnison(1981)の報告では、Gunnison と Palmes（1978）[67]および Gunnison と Benton（1971）を引用して、亜硫酸塩（原著に記載がないため不明）（約 0.5 mM）を数種の哺乳類（原著に記載がないため不明）の生理的血漿とインキュベートすると、数分または数時間で化学的に安定な血漿タンパク質 S-スルホン酸化合物が形成されるとまとめている [64]。

Gunnison と Palmes (1978)の報告では、雄の Sprague-Dawley ラット 11 匹(450~650g)に亜硫酸塩を 2.8 mmol/kg 体重/日の用量で 11 日間経口投与し、投与前後で血漿中の S-スルホン酸濃度を測定したところ、2-8nmol/L から 6-20nmol/L となった。同様に雌のアカゲザル 5 匹(3.75~5.25kg) に亜硫酸塩（原著に記載がないため不明）を平均 2.8 mmol/kg 体重/日の用量で 11 日間経口投与し、投与前と投与開始から 3、6、9、11 日目で血漿中の S-スルホン酸濃度を測定した。すると投与前はいずれも 0nmol/L であったが、3、6、9、11 日目にはそれぞれ平均で 46、56、56、46nmol/L と変動していた。また、前述のラット 11 匹に pH7.4 に調製した亜硫酸水溶液を 3.2 mmol/kg 体重/日の用量で 5 日間腹腔内投与し血漿中の S-スルホン酸濃度を測定したところ、19-40nmol/L となった。さらに前述と異なる雄の Sprague-Dawley ラット 3 匹に pH7.4 に調製し、^{35}S で亜硫酸水溶液を 9.9 mmol/kg 体重/日の用量で 5 日間腹腔内投与し、このうちの 2 匹に対して血漿中の S-スルホン酸クリアランスを調べたところ、半減期はそれぞれ 3.9、3.5 日であった。さらに前述の雌のアカゲザル 5 匹に対しても血漿中の S-スルホン酸クリアランスを調べたところ、半減期はそれぞれ 6-83 日であった。しかし、著者はこのうちの 2 匹の半減期について他の 3 匹の値と大きく異なるうえ、他のアカゲザル 1 匹と ^{35}S を用いたクリアランス試験とも傾向が一致しないため、外れ値とみなし、半減期を 6-13 日とした [67]。

これらの報告を受けて JECFA（1987） [21]では、内因性の鎖内のジスルフィド橋のみが亜硫酸イオンにより切断され、形成されたタンパク S-スルホン酸は、スルフヒドリル化合物の存在下で緩やかに亜硫酸イオンを遊離する [21]。亜硫酸イオンは血漿蛋白に

S-スルホン酸の形で強く結合し、全体的には不明な機構により血中から徐々に消失するという報告があるとしている [21]。

以上のことから指定等要請者は、JECFA（1987）の考察と同様に考えた。

(2) Gunnison と Farruggella （1979）の報告によると、雄の New Zealand White ウサギ（体重：2.5~3.5 kg）の辺縁耳静脈に p H7.4 の亜硫酸溶液（0.9 mmol/kg/h）を 0.6～6 時間、動脈内亜硫酸濃度 545～560 μM となるように静脈内にカテーテル注入を行い注入終了後 2 時間以内に窒息死させ、肺と大動脈の S-スルホン酸を分析した。各組織での S-スルホン酸量は注入時間の長さ依存的に量が増加することが示された。また、このデータをもとに、S-スルホン酸の漸近値は、肺と大動脈でそれぞれ約 900 及び 9000 nmole/g 乾燥組織重量と算出された[68]。

この Gunnison と Farruggella （1979）の報告を受けて JECFA（1987）では、動脈内亜硫酸濃度 545～560 μM を 0.6～6 時間ばく露したウサギ肺と大動脈の S-スルホン酸を分析した。生成は 1 次元的で、S-スルホン酸の漸近値は、肺と大動脈でそれぞれ約 900 及び 9000 nmole/g 乾燥組織重量であったとまとめている [21]。

以上のことから指定等要請者は New Zealand White ウサギに静脈注射された亜硫酸溶液によって肺と大動脈に S-スルホン酸が確認されたことから注射によって亜硫酸は血流にのって肺や大動脈にも運ばれると考えた。しかし、この報告は静脈注射による投与の結果であるため経口投与による場合も同様の分布を行うかは判断しかねる 。

(3) Gunnison ら（1981）の報告によると、雄の New Zealand White ウサギ（体重：3～3.5 kg）を 1.3m^2 のチャンバーそれぞれに 3~4 匹いれ、空気中の二酸化硫黄（3 ppm で 1~24 時間もしくは 10 ppm で 1~72 時間）に連続ばく露させた。ばく露後 30 分以内に、二酸化硫黄非存在下で 55 mg のエントバルビタールナトリウム静脈内注射によって屠殺し、気管、肺、大動脈などの組織で S-スルホン酸を測定した。その結果、気管の組織からはどちらの投与量でも外因性の S-スルホン酸が測定された。しかし、動脈組織では外因性の S-スルホン酸が認められず、痕跡程度のみが後肺葉の遠隔領域で検出されたことから、二酸化硫黄は部分的に肺組織で代謝されることを示していると考えられた[69]。

Gunnison ら（1981）の報告を受けて JECFA（1987）では以下の記載がある。

空気中 3 ppm の二酸化硫黄に 3 及び 24 時間吸入ばく露したウサギの気管の S-スルホン酸の量は、約 53 nmoles/g 乾燥重量と一定であった。10 ppm 二酸化硫黄にばく露したウサギの血漿 S-スルホン酸の量は、3 及び 24 時間後でそれぞれ 9 及び 30 nmoles/ｍL であった。外因性の S-スルホン酸は動脈では検出されなかったが、痕跡程度のみが後肺葉の遠隔領域で検出され、二酸化硫黄は部分的に肺組織で代謝されることを示している。10 ppm 二酸化硫黄にばく露 3 時間後に気管 S-スルホン酸濃度は 107 nmoles/g 乾燥重量に達し、72 時間後には 163 nmoles/g 乾燥重量に増加し、その増加は粘液産生増加に起因するとされた。72 時間ばく露の間、S-スルホン酸の血漿中濃度は 70 nmoles/ｍL に上

昇したが、血漿中に遊離の亜硫酸は検出されなかった。この結果を受けて JECFA（1987）では心臓と肺は多分例外として、吸入した二酸化硫黄の吸入部位から遠隔器官への輸送はないものと結論した [21]。

以上のことから指定等要請者は二酸化硫黄の吸入ばく露により血中の吸収や気管への分布が考えられるが、JECFA（1987）の考察と同様に心臓と肺は多分例外として、吸入した二酸化硫黄の吸入部位から遠隔器官への輸送はないと考えた。

(4)Gause と Barker(1978)の報告によると、雄の同系交配 Sprague-Dawley ラット（体重：375-450 g）を動的フロー条件下で、空気中の二酸化硫黄濃度を 0ppm(コントロール)、5ppm、20ppm として、7 日間連続吸入ばく露させた。各群から 2 匹ずつ、ばく露から 0、96、144、192 時間後にそれぞれ屠殺し鼻粘膜試料を採取した。このうち 0、192 時間後の試料を電気泳動にかけると 5ppm、20ppm ばく露群はコントロール群にもみられる糖タンパク画分に加えて 3〜5 本の酸性画分を示すバンドが観察された。なお、他の実験でこのような酸性画分を示すバンドは二酸化硫黄濃度 5ppm に対し、2 時間以内の吸入ばく露で現れるようになることが分かった [70]。

この結果を受けて JECFA（1987）は次のようにまとめた。

二酸化硫黄は、タンパク分子の架橋を促進する。そして空気中 5 または 20 ppm の二酸化硫黄に 7 日間吸入ばく露したラット鼻粘膜糖タンパク質の電気泳動では、酸性画分に 3〜5 個の新規のバンドが出現し、それは架橋の増加によるものとされた。この作用はばく露 2 時間後に最初に明確になった。糖タンパク質の重合化は、通常、二酸化硫黄吸入伴う鼻粘液の流速減少及び粘度上昇につながる [21]。

以上のことから指定等要請者は二酸化硫黄に対し、数分単位の短時間の吸入ばく露では鼻粘膜に分布しないと考えた。

(5) Gunnison と Palmes(1978)の報告によると、雄の Sprague-Dawley ラット 11 匹(450~650g)に亜硫酸塩（原著に記載がないため不明）を 2.8 mmol/kg 体重/日の用量で 11 日間経口投与し、投与前後で血漿中の S-スルホン酸濃度を測定したところ、2-8nmol/L から 6-20nmol/L となった。同様に雌のアカゲザル 5 匹(3.75~5.25kg) に亜硫酸塩（原著に記載がないため不明）を平均 2.8 mmol/kg 体重/日の用量で 11 日間経口投与し、投与前と投与開始から 3、6、9、11 日目で血漿中の S-スルホン酸濃度を測定した。すると投与前はいずれも 0nmol/L であったが、3、6、9、11 日目にはそれぞれ平均で 46、56、56、46nmol/L と変動していた。また、前述のラット 11 匹に pH7.4 に調製した亜硫酸水溶液を 3.2 mmol/kg 体重/日の用量で 5 日間腹腔内投与し血漿中の S-スルホン酸濃度を測定したところ、19-40nmol/L となった。さらに前述と異なる雄の Sprague-Dawley ラット 3 匹に pH7.4 に調製し、^{35}S で亜硫酸水溶液を 9.9 mmol/kg 体重/日の用量で 5 日間腹腔内投与し、このうちの 2 匹に対して血漿中の S-スルホン酸クリアランスを調べたところ、半減期はそれぞれ 3.9、3.5 日であった。さらに前述の雌のアカゲザル 5 匹に対しても血漿中の S-スルホン酸クリアランスを調べたところ、半減期はそれぞれ 6-83 日であった。

しかし、著者はこのうちの 2 匹の半減期について他の 3 匹の値と大きく異なるうえ、他のアカゲザル 1 匹と ^{35}S を用いたクリアランス試験とも傾向が一致しないため、外れ値とみなし、半減期を 6-13 日とした。 [67]

この結果を受けて JECFA（1987）は次のようにまとめた。

タンパク質 S-スルホン酸の生成は、in vitro 及び in vivo ともに濃度依存的である。亜硫酸 2 mmole/kg 体重/日の用量では、ウサギとアカゲザルの血漿は測定可能な濃度の S-スルホン酸を含有したが、ラットでは測定できなかった。3.2 mmole 亜硫酸/kg 体重/日を 5 日間ラットに非経口的に投与すると血漿 S-スルホン酸濃度は 19-40 nmole/ｍL に増加した。血漿 S-スルホン酸画分の半減期は、ラットとアカゲザルでそれぞれ 4 日と 8 日であった [21]。

以上のことから指定等要請者は経口摂取した亜硫酸塩の一部は吸収後血漿中に S-スルホン酸として存在すると考えた。

(6)Gunnison と Farrugella(1979)の報告によると、雄の New Zealand White ウサギ 6 匹(2.5~3.5kg)に pH7.4 に調製された亜硫酸溶液を辺縁耳静脈から 400~650 μM (平均 545 μM として計算)の濃度となるように注入し 5 時間ばく露し、ばく露 2 日後または 4 日後に 3 匹ずつ屠殺し、大動脈及び肺中の S-スルホン酸量の残存割合を測定したところ、大動脈では 2 日後に 63%、62%、57%で 4 日後に 41%、41%、21%となり、肺では 2 日後に 50%、55%、67%で 4 日後に 36%、37%、33%となった。著者はこれらのデータから、大動脈と肺の両組織における S-スルホン酸のクリアランスは単一指数関数的で半減期は 2～3 日であると示唆された。ただし、クリアランスパターンを決定するためにはより多くのデータを要すると報告した。 [68]

この結果を受けて JECFA（1987）は次のようにまとめた。

動脈内亜硫酸濃度 545～560 μM を 0.6～6 時間ばく露したウサギ肺と大動脈の S-スルホン酸を分析した。生成した S-スルホン酸の両組織からの消失は一次元的で、半減期は 2～3 日であった。肝、腎、睾丸、心臓、脳、骨格筋、卵巣、脾臓、あるいは眼には、容易に測定できるほどの S-スルホン酸量は存在しなかった [21]。

以上のことから指定等要請者は JECFA（1987）の考察と同様に考えた。

④. 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類に関する代謝

(1) Larson と Salisbury（1960）の報告によると、健康な雄牛（7 匹）から精液（各 51 mL）を採取し、精子に運動エネルギーを供給する代謝経路について調べるために酸化ヨウ素を使用して精液の還元力を評価した。その結果、ウシ精液中のグルタチオンなどのスルフヒドリル化合物の存在が示唆され、定量分析をおこなったところ亜硫酸 0.10－0.12 meq/100 mL が存在していることが示された。このことから精液中の代謝経路では亜硫酸が還元に大きな役割を担っていると考えられた [72]。

Larson と Salisbury（1960）の報告を受けて JECFA（1987）では以下の記載がある。

少量の亜硫酸は、体内のシスチンの異化反応の中間代謝において、8－スルフィニルピルビン酸のピルビン酸と二酸化硫黄への非酵素的分解により、定常的に生成している。細胞内の亜硫酸の定常的な濃度は極めて低く、測定できない。しかし、0.10－0.12 meq/100 mL が雄牛精液中で示されている [21]。

以上のことから指定等要請者は精液中では亜硫酸の還元力により精子の運動エネルギーを得ている可能性があるが外部投与による亜硫酸が関係しているかは当該報告からは判断できない。

(2) Cohen と Fridovich (1971)の報告によると、亜硫酸オキシダーゼ（EC 1.8.3.1）の亜硫酸への作用を調べるために、1.7×10^{-4} M 亜硫酸 1.9 mL(pH 7.8) に 1×10^{-4} M EDTA、0.05 M リン酸カリウム、 亜硫酸オキシダーゼを添加した試験液に追加で 1500 units カタラーゼまたは 1500 units カタラーゼと 1%エタノールを添加する場合と無添加の場合で、酸素の消費はポーラログラフ的に追跡した。この結果、カタラーゼの存在下での酸素の総消費量は、対照またはカタラーゼとエタノールの存在下で見られる半分だった。直接分光光度分析を使用した制御実験では、カタラーゼもエタノールも酸化された亜硫酸塩の総量に影響を及ぼさないことが示された。さらに亜硫酸オキシダーゼの反応速度を測定すると $Ks=5.8\times10^{-4}$ M と示された[73]。

Johnson ら（1980）の報告によると、ヒトの亜硫酸オキシダーゼの構成成分を調べた結果、シトクロム b_5 型のヘムタンパクであるモリブデン原子含有サブユニットと、プテリン補因子を含む二量体であった。ミトコンドリア外膜上のモリブデン補因子は、ミトコンドリア膜間腔における新生亜硫酸オキシダーゼの内在化または「パッケージング」に不可欠であると考えられる。この内在化力がない場合、サイトゾル中の補因子なしの亜硫酸オキシダーゼは、 外来タンパク質であり、急速に分解される可能性がある [74]。

以上の報告を受けて報告を受けて JECFA（1987）では以下の記載がある。

亜硫酸塩は、in vivo でミトコンドリアの膜内空隙に局在する亜硫酸オキシダーゼ（亜硫酸塩;フェリチトクローム C オキシドレダクターゼ、EC[5] 1.8.2.1） による触媒で硫酸に酸化される。本酵素は、シトクロム b5 型のヘムタンパクであるモリブデン原子含有サブユニットと、プテリン補因子を含む二量体としての特徴がある。本酵素は、in vitro 及び in vivo でタングステン酸によって阻害される [21]。

これを受けて指定等要請者は JECFA（1987）の「亜硫酸オキシダーゼは、in vitro 及び in vivo でタングステン酸によって阻害される」という記載に相当する実験結果を該当文献から得ることができなかったため、この一文に関しては支持しないがそれ以外の JECFA（1987）考察に関しては同様に考えた。

[5] ここでは Enzyme Commission（酵素委員会）のことであり、以下の 4 組の数字は酵素委員会によって反応形式に従って整理された酵素番号を示している。

(3) Gunnison(1981)の報告によると、哺乳類における亜硫酸代謝の主な経路は、酵素的に媒介された硫酸への酸化である。関与する酵素である亜硫酸：チトクローム酸化還元酵素は、亜硫酸オキシダーゼと呼ばれ、哺乳類種の間で明らかに遍在しており、肝臓および肝臓に高レベルで存在する[64]。

MacLeod ら(1961)の報告によると、ラットの肝臓、心臓、脾臓、肺、腎臓、脳、精巣の組織を使用してシトクロム c レダクターゼ活性を測定すると肝臓では 472.5、心臓 227.2、脾臓 48.0、肺 11.8、腎臓 189.2、脳 41.0、精巣 44.0 の活性（unit／g 組織）を表し、活性は肝臓、心臓、腎臓に強く表れることが示された。さらにこの報告ではラット、イヌ、ウシの肝臓から亜硫酸オキシダーゼを精製し、スペクトル特性を比較した。一般条件下では吸収最大値 280mμ および 413mμ の追加のピークを示し、亜硫酸塩の嫌気的添加は、後者のピークを各インスタンスで 423mμ に移行した。ウシから精製した亜硫酸オキシダーゼのでは 528mμ および 556mμ で新しい吸収極大の出現も確認された。すべての種でシトクロム c レダクターゼ活性を確認できた[75]。

Johnson と Rajagopalan (1976a)の報告によると、ヒト肝臓組織から亜硫酸オキシダーゼを精製し、ラットと比較した。その結果、モリブデン含有量は 2 つの調製物で同等であるが、ヒト酵素の活性はラット酵素の活性よりもかなり低いことが示された。これはシトクロム c の還元だけでなく、電子受容体としてフェリシアン化物または酸素を用いた亜硫酸酸化にも適用される。ヒトとラットの亜硫酸オキシダーゼの間に見られる大きな類似性は、ヒト酵素がラット肝臓酵素に対する抗体調製物と交差反応する可能性があると考察された[76]。

Johnson と Rajagopalan (1976b)の報告によると、亜硫酸オキシダーゼ欠乏症と診断された患者と健康なヒトの肝臓組織から亜硫酸オキシダーゼを精製し、比較した実験では肝臓のモリブデンレベルおよびキサンチンオキシダーゼ活性は正常な値の範囲内であり、亜硫酸オキシダーゼの活性化に必要な特定のモリブデン補因子を合成する肝臓の能力も損なわれない。ヒト酵素も阻害および沈殿するラット肝臓亜硫酸オキシダーゼに対する抗体調製物を使用すると、抗体を阻害することによって認識される決定基との交差反応物質も患者の肝臓サンプルに存在しないことが判明した。 [77]。

Cohen ら(1973)の報告によると、雄の CD ラット（体重 150 g 各群 8 匹）を亜硫酸オキシダーゼ欠乏状態と健康な場合で二酸化硫黄（224、593、965、1168、1319、50000、500000 ppm）をチャンバー内に 30 分注入し、注入開始から 4 時間チャンバー内で過ごさせた後 2 週間の死亡率を調べた。その結果、50000ppm では注入後 10 分以内、500000 ppm では 2 分で両群のすべての個体が死亡した。224、593 ppm では両群ともにすべての個体が生存し、965 ppm では亜硫酸オキシダーゼ欠乏群は 2 匹、健康な群は 3 匹死亡した。1168 ppm では亜硫酸オキシダーゼ欠乏群は 8 匹、健康な群は 5 匹死亡し、1319 ppm では両群ともにすべての個体が死亡した。亜硫酸オキシダーゼ欠乏群と健康な群に有意な差はなかった。ラットの肺の亜硫酸オキシダーゼ活性は、1 日あたり少なくとも 600μmol の吸入 SO_2 に由来する重亜硫酸塩を無害化できることが計算さる。これは 20

ppm のばく露量に匹敵する。さらに 200g 体重のラット個体の総亜硫酸オキシダーゼ活性は 150,000μmol、5000ppm のばく露量に匹敵する。本実験の結果からこれは吸入による全身毒性の結果とはことなることが示された。吸入による全身毒性試験の結果から Cohen らは 925 ppm 未満の SO_2 レベルでは、動物に重亜硫酸塩の有意な蓄積はないと結論付けるのが合理的であると判断した [78]。

これらの報告を受けて JECFA(1987)は以下のとおりまとめている。

亜硫酸オキシダーゼは哺乳類の組織に広く分布しており、ほとんどの活性は肝臓、心臓、腎臓に認められている。 ラット、ウサギ、イヌ、ウシ、サル及びヒトを含むいくつかの種の肝臓において、亜硫酸オキシダーゼ活性の比較研究が行われている。 一般に、ヒトにおける亜硫酸オキシダーゼ活性は、アカゲザル及びウサギよりやや低く、研究された他の哺乳動物よりもかなり低い。ヒト肝臓の亜硫酸オキシダーゼの比活性は、ラット肝臓のわずか 5〜10% である。ラットの亜硫酸オキシダーゼは、一日あたり 750 mmole/kg 体重(150000μmol÷200g)の亜硫酸を酸化できると概算されている。これは、48 g SO_2/kg 体重（750mmol×亜硫酸 1 mol の分子量：82.07g／1000×亜硫酸中の二酸化硫黄の分子量 64.07g／82.07g）に相当する [21]。

以上のことから指定等要請者は JECFA(1987)のラットの亜硫酸オキシダーゼ活性に関する考察には同意するが Cohen ら(1973)の報告にあるように個体全体で換算される亜硫酸オキシダーゼ活性能と実際の毒性試験結果は不一致が生じるため毒性試験を踏まえて ADI を決める必要があると考えた。

(4) Johnson ら(1974)の報告によると、雄の Sprague-Dawley ラットに 0.7 g/ kg のタングステン酸ナトリウム（タングステン 400 ppm）を含む試料を数か月与え、その肝臓から亜硫酸オキシダーゼを精製して対照群の酵素と活性を比較したところ、比活性が 3% 未満であった [79]。この報告を受けて JACFA(1987)は、亜硫酸オキシダーゼ活性の抑制は、ラットで飲料水中にタングステン酸ナトリウムを入れることにより誘導することができるし、亜硫酸オキシダーゼの活性は、タングステンの量を調節することで減少、望む程度に低下させることができると考えた [21]。

Guunison ら(1981a)の報告によると、雌 Winster ラット 4-12 匹(200-225g) に低モリブデン飼料とタングステンナトリウム水溶液(100-200ppm)を与え、モリブデン 4ppm を補給した対照群と、モリブデンを補給せず肝臓の亜硫酸オキシダーゼの活性を対照群の約 1%とした欠損群に対して、0-25mmol/kg/日のメタ亜硫酸ナトリウム水溶液を経口摂取させ、大動脈、耳介、血漿中の S-スルホン酸濃度を測定したところ表 5 のとおりの結果を得た。大動脈において対照群と欠損群を比較すると欠損群の方が、平均スルホン酸濃度が高くなっており、耳介及び血漿においても同様の傾向が見られたと報告した [80]。

また、Guunison ら(1981b)の報告によると、Guunison ら(1981a)の報告と同様に雌 Winster ラット (200-225g) に低モリブデン飼料とタングステンナトリウム水溶液(100-200ppm)を与え、モリブデン 4ppm を補給した対照群と、モリブデンを補給せず肝臓の亜硫酸オキシダーゼの活性を対照群の約 1%とした欠損群に対して、0-25mmol/kg/日のメタ亜硫

酸ナトリウム水溶液を経口摂取させ、肝臓の亜硫酸オキシダーゼ活性と大動脈、耳介、血漿中の S-スルホン酸濃度及び尿中の S-スルホン酸とチオ硫酸濃度を測定した。すると実験開始から欠損群の肝臓の亜硫酸オキシダーゼ活性が 4 日の半減期で 28 日目まで 1 次的に低下していき、その後 63 日目まで安定して対照群の約 1%の活性を保った。それとほぼ逆相関するように欠損群の大動脈、耳介、血漿中の S-スルホン酸濃度が上昇した。また欠損群の尿中への S-スルホン酸とチオ硫酸濃度も同様に肝臓の亜硫酸オキシダーゼ活性にほぼ逆相関するように上昇していた [81]。

さらに、Oshino と Chance(1975)の報告によると、雄の Sprague- Dawley ラット(180-250g)の肝臓及び肝臓から単離されたミトコンドリア画分を用いて、これらにおける亜硫酸酸化の特性を調べた。ラット肝臓に亜硫酸溶液を灌流すると亜硫酸の酸化速度は、亜硫酸の濃度が増加すると直線的に増加し、最大 2mM にまでなるほか、灌流後の溶液の亜硫酸濃度が灌流前の溶液の亜硫酸濃度の 25-40%低下しても飽和状態には達しなかった。一方、ミトコンドリア内の Km 値が 20μM 未満と低い値を示すことと対照的である。このことは亜硫酸塩の細胞内濃度は細胞外濃度よりもはるかに低くなければならないことを示唆している [82]。

これらを受けて、JECFA(1987)は以下のとおりまとめている。

亜硫酸オキシダーゼ欠損ラットではチオ硫酸と S -スルホン酸の組織中濃度及び尿中排泄がかなり増加した [80] [81]。0.5 mmole/kg 体重の亜硫酸を亜硫酸オキシダーゼ欠損ラットに投与した場合、血漿中 S -スルホン酸濃度は 10 mmole/kg 体重で投与された正常ラットと同様の値となり、血漿中亜硫酸濃度より高かった。亜硫酸オキシダーゼ欠損ラットに相当する全身の亜硫酸塩濃度を産生するためには、正常ラットに 10-20 倍の亜硫酸の胃管投与が必要であった。一方、正常動物は欠損動物より 100 倍もの亜硫酸オキシダーゼ活性を有している [80]。このことは、亜硫酸の酸化は、ミトコンドリアへの拡散速度に制約されていることを示唆している [21] [82]。

以上のことから、指定等要請者は、亜硫酸オキシダーゼ欠損ラットにおいて、当該酵素による亜硫酸の正常な代謝が阻害されることにより、S-スルホン酸やチオ硫酸濃度が増加するという結果を踏まえ、亜硫酸は主に肝臓の亜硫酸オキシダーゼによって代謝を受けると考えた。

表５.亜硫酸オキシダーゼ欠損群及び対照群の組織 S-スルホン酸濃度

試験群	試験期間(日)	平均外因性亜硫酸イオン摂取量(mmol/kg/日)	平均 S-スルホン酸濃度		
			大動脈(nmol/g 乾燥重量)	耳介(nmol/g 乾燥重量)	血漿(nmol/70mg タンパク質)
対照群	63	0	1083±210(6)	286±49(4)	21±3(3)
	63	0	1268±244(6)	—	26±8(3)
	63	0	948±177 (4)	—	—
欠損群	63	0	6,415±3219(12)	560±158(4)	63±15(9)
	63	2.0	10,524±2440(7)	—	64±10(6)
	63	3.5	16,532±210(6)	1322±200(7)	91±19(6)

(5) Sorbo(1957)の報告によると、予備試験においてラットの肝ホモジネート(2%)に、亜硫酸水溶液(0.02mol/L)とメルカプトピルビン酸(0.01mol/L)を加え、pH7.4 で 30 分間インキュベートした結果、メルカプトピルビン酸の 89%がチオ硫酸及びピルビン酸に変換されると述べられている [83]。

また、Sorbo(1958)の報告によると、リンガー溶液にラットの肝臓の切片と 0.01mol/L(50mg 組織重量/mL)のスルホシステインを加え pH7.9、37℃で 1 時間インキュベートすると、チオ硫酸が 0.18 μmol/mL 形成された。また、0.025mol/L リン酸緩衝液にラットの肝臓のホモジネートと 0.01mol/L(50mg 組織重量/mL)のスルホシステインを加え pH7.9、37℃で 1 時間インキュベートすると、チオ硫酸が 0.64 μmol/mL 形成された。さらにこの反応は嫌気条件でも進み、熱に不安定であることが分かった。著者は既報でチオ硫酸がメルカプトピルビン酸と亜硫酸から急速に形成されることが示されており、この反応により肝臓ホモジネートがチオ硫酸塩を形成する能力は、スルホシステインに対する触媒活性よりも約 10^4 倍高いことが実証されたと述べている [84]。

さらに、Szczepkowski と Wood (1967)の報告によると、亜硫酸はロダナーゼを急速に不活性化する。これを回避するため pH7.4 の 0.1mol/L リン酸緩衝液 0.5mL にシスタチオナーゼ 0.25units と[^{35}S]で標識したシスチン 1 μmol を加え 15 分間インキュベートしてからロダナーゼ 16units と 0.1mol/L 亜硫酸 0.5mL を加えて総量 1.12mL、さらに 5 分間インキュベートしたところ 0.2 μmol のチオ硫酸が形成された。著者はシスタチオナーゼ-ロダナーゼの 2 酵素はシスチンをチオ硫酸に変換する可能性があると考えている一方で、生体内では発生する硫黄化合物の相互関係が複雑であるため、この反応が発生しているかは定かではないとしている [85]。

これらの報告を受けて JECFA(1987)は以下のようにまとめている。

吸収された亜硫酸の一部は、次のようにしてチオ硫酸に変換される；(a) メルカプトピルビン酸との反応、(b) システイン-S-スルホン酸の代謝、(c) チオシスチンとの反応。

亜硫酸オキシダーゼ欠損動物では体液中のチオ硫酸量の増加が認められた（上記参照）[21]。

以上のことから、指定等要請者は吸収された亜硫酸の一部は主にメルカプトピルビン酸と反応することでチオ硫酸に変換されると考えた。

(6) Sun ら（1989）の報告によると、雄の Sprague-Dawley ラット（体重：200-225 g、匹数については原著に記載がないため不明）に麻酔をかけた後、肝臓を摘出した。摘出した肝臓は硫黄成分が含まれない洗浄液で洗浄した後、酸素と二酸化炭素存在下でインキュベートした。インキュベート中に亜硫酸ナトリウム、パラセタモール、アリルアルコール、アクロレイン、NAPQI をさまざまな組み合わせで添加し、亜硫酸イオン、硫酸イオン、グルタチオン及びシステインを測定した。その結果、亜硫酸イオン（200μmol/L ～ 2mmol/L）はラット肝細胞とインキュベートすると 35 ～40 μM SO_2^{3-}/min/10^6 cells で急速に硫酸イオンに変換されることが示された。この時最高濃度でも細胞毒性は観察されなかった。ラット肝臓を 1mmol/L 亜硫酸で灌流した場合、最初の 3 分間の灌流中に灌流液から約 98% の亜硫酸イオンが抽出された。同時に、硫酸イオンは灌流液中に急速に蓄積し、5 分で 830μmol/L に達し、30 分以内にほぼ 100% 変換したことが示された。また、肝臓の灌流では、灌流液中にグルタチオンが放出され、急速相では最初の 5 分間にグルタチオンが 11.3μM まで蓄積し、その後ゆっくりと増加し、60 分後に 17.2μM まで蓄積した。遊離システインは、どの時間でも灌流液中に検出されなかった。単離肝細胞を 0.5、1 及び 2mmol/L 亜硫酸ナトリウムとインキュベーションすると、細胞に関連する遊離グルタチオン量は時間依存的に増加したが、システインは増加しなかった。これらのことから著者らは、グルタチオンは肝細胞及び灌流肝臓のタンパク質と低分子量のチオール類との混合ジスルフィド及び酸化型グルタチオンから放出されており、新規に生合成されたものではないと述べている [86]。

Sun ら（1989）の報告を受けて JECFA（1987）では以下の記載がある。

亜硫酸塩の代謝動態は、摘出ラット灌流肝（再灌流系）及び単離ラット肝細胞で研究された。特に、亜硫酸イオンの無機硫酸イオンへの代謝の動態及び内因性の、低分子量チオール含有分子であるグルタチオン及びシステインに及ぼす亜硫酸イオン濃度の影響に興味がもたれた。200μmol/L ～ 2mmol/L の亜硫酸は単離肝細胞によって急速に硫酸に変換された。この変換速度は、この濃度範囲で直線的かつ定量的であった。これらの結果は、肝臓に相当濃度の亜硫酸オキシダーゼが存在することを確認したものである。最高濃度の亜硫酸において細胞毒性はみられなかった。単離ラット肝臓を 1mmol/L 亜硫酸で灌流した場合、最初の 3 分間の灌流中に灌流液から約 98% の亜硫酸が抽出された。同時に、硫酸イオンは灌流液中に急速に蓄積し、5 分で 830μmol/L に達し、30 分以内にほぼ 100% 変換したことが示された。また、肝臓の灌流では、灌流液中にグルタチオンが放出され、急速相では最初の 5 分間にグルタチオンが 11.3μM まで蓄積し、その後ゆっくりと増加し、60 分後に 17.2μM まで蓄積した。遊離システインは、どの時間でも灌流液中に検出されなかった。単離肝細胞を 0.5、1 及び 2mmol/L 亜硫酸塩とイ

ンキュベーションすると、細胞に関連する遊離グルタチオン量は時間依存的に増加したが、システインは増加しなかった。著者らは、グルタチオンは肝細胞及び灌流肝臓のタンパク質と低分子量のチオール類との混合ジスルフィド及び酸化型グルタチオンから放出されており、新規に生合成されたものではないと述べている。生理学的 pH での亜硫酸イオンによるジスルフィドの亜硫酸分解は、酸化型グルタチオンと亜硫酸塩のインキュベーションによって示され、ジスルフィドからのグルタチオンの時間及び濃度依存性の放出が明らかになった [23]。

以上のことから指定等要請者は JECFA（1987）で考察されたように in vitro では生理学的 pH での亜硫酸イオンによるジスルフィドの亜硫酸分解が起こるという考えを支持する。

(7)Gunnison（1981）の報告によると、哺乳動物における亜硫酸代謝の主な経路は、硫酸塩への酵素媒介酸化である。関与する酵素は亜硫酸オキシダーゼと呼ばれ、哺乳類種の肝臓に高濃度の存在が認められ、その他の組織にも広く存在している[64]。

Johnson ら（1974）の報告によると、雄の Sprague-Dawley ラットの組織に亜硫酸オキシダーゼ抗体を用いて亜硫酸オキシダーゼ活性量を調べた。その結果、亜硫酸オキシダーゼ活性は肝臓（Homogenate ratio 1:30）、腎臓（Homogenate ratio 1:12）、小腸（Homogenate ratio 1:4）及び心臓（Homogenate ratio 1:1）において高く、肝臓において最も高く発現していることが示された[79]。

Woo らの 2003 年の報告によると、ヒトの組織（脳、心臓、骨格筋、結腸、胸腺、脾臓、腎臓、肝臓、小腸、胎盤、肺、末梢血白血球）を使用したノーザンブロット分析で亜硫酸オキシダーゼ遺伝子の発現を調べた結果、肝臓、腎臓、骨格筋、心臓では亜硫酸オキシダーゼ遺伝子が強く発現していることが示された。結腸、胸腺、小腸、肺、末梢血白血球に関しては亜硫酸オキシダーゼ遺伝子がほとんど発現を示さなかった [89]。

これらの報告を受けて EFSA（2016）では以下のように報告されている。

亜硫酸は吸収されてから硫酸イオン(SO_4^{2-})に変わる。これは亜硫酸オキシダーゼの作用による。哺乳類における亜硫酸オキシダーゼ活性は肝臓、腎臓及び心臓において高く、肝臓において最も高く発現している。しかし、脳、脾臓、肺、および精巣においては低い。Johnson ら (1974) はラットの消化管における亜硫酸オキシダーゼ活性を調べ、回腸末端部での活性は肝臓の約 20%であることを示した。なお、小腸及び結腸における亜硫酸オキシダーゼ mRNA の発現レベルは肝臓や腎臓と比べ極めて低いと報告された。回腸末端に亜硫酸オキシダーゼが存在し、肝臓において（高い）活性があることは、どの程度であるかは分からないが、亜硫酸が有意に初回通過代謝を受けることを示唆している [27]。

以上のことから指定等要請者は、EFSA（2016）が考察しているようにどの程度であるかは分からないが、亜硫酸が有意に初回通過代謝を受けると考える。これは哺乳類における亜硫酸代謝は主に亜硫酸オキシダーゼにより行われ、亜硫酸オキシダーゼは多くの組織に存在する。経口投与において亜硫酸が消化管を通過すると考えると、小腸（回

腸末端）に亜硫酸オキシダーゼが存在し、肝臓において高い活性があることが関与すると考えられるからである。

(8) Cohen ら(1974)の報告によると、1、5、11、18、25、32 日齢及び成体の雌の Date-bred ラットを各群 6 匹ずつ用意し、ラットの出生後の肝臓に含まれる酵素の量を調べた。このうち、亜硫酸オキシダーゼについては表 6 のとおりの結果を得た。その含有量は出生後しばらくあまり増加せず、5〜11 日齢の期間で最大の増加を示す。酵素の比活性の増加も主にこの期間中に起こり、その後の成長期間中にさらに増加する [90]。

Gunnison と Palmes (1976)の報告によると、雄の New Zealand White ウサギ (10 匹、2.835-4.440kg)と雌アカゲザル (1 匹、5.200kg)に対して、静脈に ^{35}S で標識した亜硫酸(0.14~0.62nmol/kg)及び硫酸(0.3-1.2mmol/kg)を注射した後、血液と尿を分析し、薬物動態パラメータを測定し、亜硫酸クリアランスを求めた。ここで構築した理論レートの精度は、特定の分布モデルを推定せずに、定常状態でのクリアランスの測定と十分に一致することが示された。また、亜硫酸の排泄量は、総除去量のごく一部に過ぎないため、後者は代謝クリアランスの優れた近似値であり、主に硫酸塩への直接酸化により生じる。そのため、著者は、クリアランスは組織の亜硫酸オキシダーゼ活性に直接依存すると考えた [91]。

Tejnorova (1978)の報告によると、いずれも雄の Wistar ラット(19 匹、185.00±14g)、strain-H マウス(20 匹、25.62±2.4g)、モルモット(20 匹、376.25±48.68g)、シリアンハムスター(20 匹、111.75±4.55g)、及びチンチラウサギ(10 匹、3241.50±270.18g)を使用した。それぞれ標準的なゲージに収容し、水を自由に飲める環境においてペレット食を与えた後、エーテル麻酔下において肝臓及び腎臓を摘出した。そして、摘出した肝臓及び腎臓について亜硫酸オキシダーゼの酵素活性を測定した。いずれの組織においても最も活性が高かったのはラットで最も活性が低かったのはチンチラウサギであった [92]。

Johnson と Rajagopalan (1976b)の報告によると、亜硫酸オキシダーゼ欠乏患者 1 名（2 歳半男性）と対照群 3 名（成人男性 1 名、成人女性 1 名及び 4 か月男性 1 名。成人男性と成人女性の年齢は原著に記載がないため不明）の肝臓からホモジネートを調製し、酵素活性を測定したところ、亜硫酸オキシダーゼ活性について、対照群では 27.5-13.5U/g であったのに対し、患者においては検出限界以下、すなわち 0.1U/g 未満であった。また、著者は本報告において正常なヒト肝臓の亜硫酸オキシダーゼ活性は 10-25U/g の範囲であること、亜硫酸オキシダーゼ活性中心のモリブデンの電子常磁性共鳴を利用した肝臓粗ホモジネート分析の検討において、ラットでは可能であるが、ヒトの亜硫酸オキシダーゼ活性がラットの約 5%であるため、確実な検出が難しいことを述べている [77]。

これらの報告を受けて EFSA（2016）では以下のように報告されている。

成熟ラットと比較し、若いラットの肝臓では亜硫酸オキシダーゼ活性が低かった 。1 日齢のラットでは成熟ラットの約 1/10 であった。肝亜硫酸オキシダーゼ活性はラットの成熟に応じて上昇し、32 日齢でほぼ成熟ラットの半分に達する。亜硫酸酸化反応

の効率は主に亜硫酸オキシダーゼ活性に依存している。5 種類の実験動物を用いた研究で、肝臓と腎臓における亜硫酸オキシダーゼ活性には有意な種差が存在することが示された。最も活性が高かったのはラットで、マウス、モルモット、ハムスター、ウサギの順で活性が低くなった。ヒト肝臓ホモジネートにおける活性はラットのそれの 1/20 であった [27]。

以上のことから、指定等要請者は EFSA（2016）をもとに次のように考えた。亜硫酸酸化反応の効率を決定する亜硫酸オキシダーゼ活性には動物種間で有意な差が存在し、ヒトの肝臓における亜硫酸オキシダーゼ活性はラットの約 5%である。また、成熟ラットと若いラットの肝臓の亜硫酸オキシダーゼ活性を比較すると後者の方が低いという知見はあるが、前述の動物種間の差を鑑みてヒトに同様の傾向がみられるかは判断できない。

表 6 .ラット肝臓に含まれる亜硫酸オキシダーゼの発達

日齢		1	5	11	18	25	32	(成体)
亜硫酸オキシダーゼ含有量	U/g	17.6±0.3	34.4±0.5	88.5±0.9	108.5±2.4	122.7±3.1	118.7±4.3	182.9±3.7
	U/mg	0.190±0.004	0.192±0.002	0.391±0.004	0.513±0.010	0.665±0.018	0.666±0.024	1.063±0.021

(9) Constantin ら (1994)の報告によると、ヒト(7 名、原著に記載がないため不明)のバフィーコートから分離した多形核白血球を pH7.4 の 1mmol/L リン酸緩衝生理食塩水に細胞数が 5×10^6 となるようにし、さらに 1mmol/L 亜硫酸ナトリウムのみ、100nmol/L ホルボールミリステートアセテートのみ及び両方を加えそれぞれ総量 3mL とした試料を調製して酸素消費を比較したところ、亜硫酸を添加することで多形核白血球の酸素取り込みが有意に刺激される。また、酸素消費量は異なるドナーの細胞間で大幅に異なり低容量（0-200 nmol O_2 / ml / min）と高容量（> 200 nmol O_2 / ml / min）に分かれた。さらに、(a)水中に亜硫酸ナトリウムを溶かした試料、(b)ヒト多形核白血球存在下で亜硫酸ナトリウムを溶かした試料、(c)ホルボールミリステートアセテートによって活性化したヒト多形核白血球存在下で亜硫酸ナトリウムを溶かした試料の 3 種の試料について EPR スペクトルを調べたところ、亜硫酸が水中で自動酸化されて生じる三酸化硫黄ラジカルのスペクトルが(a)、(b)にみられ、(c)には三酸化硫黄ラジカル及び DMPO とのヒドロキシル付加物の存在に一致する EPR スペクトルがみられた。これらの試験から、著者はヒト多形核白血球における亜硫酸塩から硫酸塩への酸化の代替経路が存在し、主となる亜硫酸オキシダーゼが触媒する経路のほか、三酸化硫黄ラジカルの中間体形成を伴って自動酸化される経路があることが示された [94]。

また、Constantin ら (1996)の報告によると、健康な若いドナー(平均 25 歳)、高齢の健康なドナー(平均年齢 64 歳)、健康な超高齢者(3 名、100 歳以上)及びダウン症候群患者の 4 群（各性別及び各年齢は原著に記載がないため不明）からそれぞれヒト多形核白血

球(PMN)を単離して、5 × 10^6 細胞/ mL）をリン酸緩衝生理食塩水(最終容量 3 ml、pH 7.4)に懸濁し酸素消費量を測定することで亜硫酸オキシダーゼの活性を測定し、さらに EPR-ST も測定した。その結果、調査した 4 群で、硫酸塩の形成につながる亜硫酸オキシダーゼ依存経路と、中間体としての SO_3-ラジカルアニオンの形成を通じて硫酸塩の形成に至るラジカル活性化経路の両方が存在することが示された [95]。

これらの報告を受けて EFSA（2016）では以下のように報告されている。

ヒト多形核白血球から得られたデータにより亜硫酸の添加は酸素(O_2)取り込みを有意に刺激することが示された。EPR の結果は三酸化硫黄ラジカルが亜硫酸の自動酸化の間に生成することと一致した。著者らはヒトの多形核白血球が亜硫酸を硫酸に酸化する際に二つの異なる経路があると結論した。一つは亜硫酸オキシダーゼが関与するものであり、他の一つは三酸化硫黄ラジカルを中間体として生成する経路である。三酸化硫黄ラジカルの形成速度は、非常に高齢の患者やダウン症患者から分離した白血球のように、亜硫酸オキシダーゼ活性が低い場合では高い [27]。

以上のことから、指定等要請者は EFSA（2016）と同様にヒトの多形核白血球が亜硫酸を硫酸に酸化する際に二つの異なる経路が存在すると考えたが、亜硫酸の酸化代謝全体において多形核白血球の代謝経路の差異は影響を及ぼさないものと考えた。

⑤. 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類に関する排泄

(1) Bhaghat と Lockett （1960）の報告によると [96]、雌の Wistar ラット（体重：260.5±1.6g、3 匹ごと 4 グループ）に体重の 2.5%に相当する水量（約 6.5 g ）を 18 時間絶食の後に与え、その 1 時間後に体重の 5%に相当するメタ亜硫酸水素ナトリウム水溶液（$Na_2S_2O_5$、3.46 w/v%、約 13.0 g、投与硫黄量：3.46÷100×13.0÷190.11×32.1×2 ≒0.152 g）を、強制経口投与し 4 時間以内の尿を採取した。その結果、投与後 4 時間以内に投与された硫黄 55.1±6.24%が尿中に排出された [96]。

Bhaghat と Lockett （1960）の報告を受けて JECFA（1987）では以下の記載がある。メタ亜硫酸ナトリウム 0.2% 溶液をラット（4 匹）に経口投与した場合、4 時間以内に投与された硫黄の 55% が硫酸塩として尿中に排泄された [21]。

以上のことから指定等要請者は JECFA（1987）で考察されたようにメタ亜硫酸ナトリウム水溶液を経口投与すると投与された硫黄分の約 55%（算出方法不明）が 4 時間以内に排出されると考えた。

(2) Gibson と Strong(1973)の報告によると [58]、アルビノラット（体重：90－100g、各群 3 匹）に $Na_2{}^{35}SO_3$ と混合した $NaHSO_3$（二酸化硫黄として 10、50 mg / kg）を強制経口投与し、投与後（24 時間、48 時間、1 週間、2 週間）所定の時間で死骸から放射能を測定、および尿及び糞便からの放射能も測定した。その結果、50 mg / kg 投与したラットでは投与後 24 時間で ^{35}S 投与量の 70-80%、48 時間で 80-85%が尿中に排出される。糞便では 24 時間で ^{35}S 投与量の 4-17%、48 時間で 13-18%が排出され、死骸では 24 時間 9-21%、48 時間 4-7%、1 週間 2%、2 週間 1%が観察された。10 mg / kg 投与した場合

でもほぼ同様の結果を得られたが 2 週間後の死骸から ^{35}S の検出は 0 であった。別の実験ではアルビノラット(各群 6 匹)に対して $NaHSO_3$（二酸化硫黄として 200 mg / kg / day）単回経口投与および（二酸化硫黄として 50、200 mg / kg / day）30 日間経口投与を行ったが、いずれにおいても肝臓の亜硫酸オキシダーゼの誘導はみられなかった。

アルビノマウス（体重：15g、各群 3 匹）に $Na_2{}^{35}SO_3$ と混合した $NaHSO_3$（二酸化硫黄として 50 mg / kg）を強制経口投与し、投与後（24 時間、48 時間、1 週間、2 週間）所定の時間で死骸から放射能を測定、および尿及び糞便からの放射能も測定した。その結果、投与後 24 時間で ^{35}S 投与量の平均 78.7%、48 時間で 80.8%が尿中に排出される。糞便では 24 時間で ^{35}S 投与量の平均 15.6%、48 時間で 14.8 %が排出され、死骸では 24 時間 3.1%、48 時間 1.8 %、1 週間 0.83 %、2 週間 0.36 %が観察された。

アカゲザル（*Macaca mulatta*）（体重：約 6 kg、雌 4 匹雄 1 匹）に $Na_2{}^{35}SO_3$ と混合した $NaHSO_3$ を 50 mg / kg（二酸化硫黄として）強制経口投与し、投与後（24 時間、48 時間、72 時間、96 時間、120 時間）所定の時間毎に尿と糞便から放射能を測定した。その結果、尿では 24 時間で平均して 94.9%、48 時間で 3.2%、72 時間で 1.1%、96 時間で 0.6%、120 時間で 0.7%が排出され、糞便では 24 時間で平均して 1.8%、48 時間で 2.2%、72 時間で 0.4 %、96 時間で 0.2 %、120 時間で 0.1 %が排出された [58]。

なお、JECFA（1987）では [21]、Gibson と Strong(1973) [58]について、マウス、ラット、及びサルにおいて、$Na_2{}^{35}SO_3$ と $NaHSO_3$ 混合物を 10 または 50 mg/kg （二酸化硫黄として）の経口投与後、^{35}S の 70 から 90% が腸から吸収され、24 時間以内に尿中に排泄された。残りの ^{35}S の大部分は糞便中に排泄され、その割合は種に依存していた。 1 週間後には、^{35}S の わずかに 2% 以下が死骸に残っていた。0.5%グルコース溶液に $NaHSO_3$ を二酸化硫黄相当で 400 mg/kg を混ぜたものを単回経口投与した後でも、遊離型亜硫酸はラットの尿に検出されなかった。肝臓亜硫酸オキシダーゼの誘導は、200 mg SO_2/kg/日の 単回または 30 日間の連続投与のいずれでも認められなかったとまとめている。

これらの結果を踏まえ、指定等要請者は、マウス、ラット、及びサルにおいて $Na_2{}^{35}SO_3$ と $NaHSO_3$ 混合物を経口投与すると ^{35}S 約 90% が腸から吸収され、24 時間以内に尿中に排泄され、約 10%は糞便で排出されることから経口投与されたほぼ 100%が速やかに尿や糞便で排出されると考えた。

(3) Gunnison と Palmes(1978)の報告によると、雌のアカゲザル 5 匹(3.75~5.25kg) に亜硫酸塩を平均 2.8 mmol/kg 体重/日の用量で 11 日間経口投与し、投与前と投与開始から 3、6、9、11 日目で血漿中の S-スルホン酸濃度を測定した。すると投与前はいずれも 0nmol/L であったが、3、6、9、11 日目にはそれぞれ平均で 46、56、56、46nmol/L と変動していた。血漿中の S-スルホン酸クリアランスを調べたところ、半減期はそれぞれ 6-83 日であった。しかし、著者はこのうちの 2 匹の半減期について他の 3 匹の値と大きく異なるうえ、他のアカゲザル 1 匹と ^{35}S を用いたクリアランス試験とも傾向が一致しないため、外れ値とみなし、半減期を 6-13 日とした。この時血漿中の遊離の亜硫酸

を測定すると遊離の亜硫酸はすべてのサンプルで検出され、27-67 nmol/70 mg タンパク質の範囲であった。また、C3HeB/FeJ、C57L/J、 SWR/J、 129/J の 4 系統を掛け合わせた Millerton Ha(ICR)マウス（体重：18~25g、雌雄混在 50 匹）に平均 6.7 mmol/kg 体重/日の用量で 7 日間連続腹腔投与し、血漿中の遊離の亜硫酸を調べたところすべてのサンプルから検出されなかった [67]。

Gunnison と Palmes(1978)の報告を受けて JECFA（1987）では以下の記載がある。亜硫酸オキシダーゼによる迅速な代謝の結果、亜硫酸塩は慢性投与でも組織に蓄積することはなく、主に硫酸塩として尿中に排泄される。 いくつかの種では、投与量の 10%未満が亜硫酸塩として尿中に発現した [21]。

以上のことから指定等要請者は Gunnison と Palmes(1978)の報告では血漿中の遊離の亜硫酸が確認されるが、尿中での明確な遊離の亜硫酸の測定結果はないため JECFA（1987）の投与量の 10%未満が亜硫酸塩として尿中に発現するという考察は支持しないこととした。

(4) Gunnison と Palmes（1974）の報告によると、健康な成人男性を 2 つのグループに分け実験を行った。グループ 1 では肺機能が正常で平均年齢 22 歳の非喫煙者 13 人で、グループ 2 では平均年齢 34 歳のヘビースモーカー（タバコ 20~40 本／日）で構成された。グループ 1 では無作為に被験者（各 3 人）を二酸化硫黄濃度（0、0.3, 1.0, 3.0 ppm）に 120 時間連続ばく露した。さらに別の実験として無作為で選ばれた 3 人は二酸化硫黄濃度（3.0、6.0 ppm）に 48 時間連続ばく露を行った。（グループ 1 では 2 つの 120 時間の実験と 48 時間の実験双方を行った被験者が 2 人存在している。）グループ 2 でも被験者（各 3 人）を二酸化硫黄濃度（0、0.3, 1.0, 3.0 ppm）に 96 時間連続ばく露した。さらに別の実験として無作為で選ばれた 2 人は二酸化硫黄濃度（4.2 ppm）にばく露を行った。試験と試験の間には少なくとも 9 日間のインターバルを設けた。ばく露後各被験者から血液サンプルを採取し、血漿中の S-スルホン酸量を測定した。その結果、大気中の二酸化硫黄濃度と血漿中の S-スルホン酸量の得られた 80 のデータを分析して得られた回帰直線は有意な相関（$r = 0.61$、$p < 0.001$）をもたらし、ばく露量 1 ppm ごとに血漿の S-スルホン酸量が 1.1±0.16 nmole/mL 増加するという考察を得られた[65]。

この Gunnison と Palmes（1974）の報告を受けて JECFA（1987）では以下のようにまとめている。

亜硫酸負荷の条件下で、かなりの量の S-スルホン酸が形成され、システイン-S-スルホン酸が尿中に検出されている [21] [65]。

以上のことから指定等要請者は血漿中での S-スルホン酸の増加は確認できるが尿中で検出されたという実験結果はないため JECFA（1987）の考察を支持しない。

(5) Yokoyama ら（1971）の報告によると、9 匹の雑種犬（性別については原著に記載がないため不明）を麻酔した状態で 30~60 分 $^{35}SO_2$ を吸入ばく露させた。5 匹は $^{35}SO_2$-（22±2 ppm）で暴露し、その他の 4 匹は $^{35}SO_2$（50 ppm 放射能レベル）で暴露しまし

た。ばく露中、ばく露後最大で 3 時間まで膀胱に通したカテーテルを通じて各サンプル 1.5 mL 以上採取したが採取時間や間隔はばらつきがある。尿のサンプルから ^{35}S を測定すると鼻咽頭に入るすべてが粘膜に取り込まれたと仮定する粘膜に取り込まれたと仮定すると体内に入った ^{35}S 総量の 1~6%が 3 時間以内に尿中に排泄され、そのうち硫酸塩の割合は 90%以上（平均 92.4%）であり、無機硫酸塩は 80%以上（平均 84.4%）であった [97]。

Savic ら（1987）の報告によると、二酸化硫黄を使用した製造工場で働くヒト（冬期：56 人、夏期：45 人、性別については原著に記載がないため不明）を対象に尿サンプルを回収して、尿中の硫酸塩を調べた。工場内の空気サンプルから冬期のばく露量は 17.1～149.4 mg/m^3、夏期のばく露量は 0～0.75 mg/m^3 であった。冬期ばく露後被験者は尿中の総硫酸塩は 21.2 μmol/L、夏期ばく露後被験者は 19.3μmol/L であり、対象の非ばく露者（39 人）の 16.7μmol/L と比較して有意に上昇していることが示された [98]。

以上の報告を受けて EFSA（2016）では以下のように考察している。

二酸化硫黄は主に硫酸塩として尿中に排泄される。イヌ及びヒトにおける硫酸塩の尿中排泄の増加が二酸化硫黄へのばく露後に検出された [27]。

これらの結果を踏まえ、指定等要請者は吸入ばく露された二酸化硫黄は主に硫酸塩として尿中に排泄されると考えた。

表 7.体内動態試験における国際評価機関引用知見 [6]

国際評価機関	引用知見	
	原著確認可能	原著未入手
JECFA (1987)	[48][49][50][51][52][53][54][55][56][57][58][62][63][64][65][66][67][68][69][70][71][72][73][74][75][76][77][78][79][80][81][82][83][84][85][96]	Gunnison & Benton(1971)
JECFA (1999)	[86]	なし
EFSA (2016)	[48][49][50][51][52][53][54][56][57][59][60][62][63][64][65][66][77][79][80][89][90][91][92][94][95][97][98]	なし

[6] これらの国際評価機関の引用した知見は非常に広範な報告がなされていることから、本概要書ではその一部をまとめている。

・二酸化硫黄及び亜硫酸塩類に関する体内動態試験まとめ

以上の報告を受けて以下のように考える。

・二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の吸収

添加物として摂取された二酸化硫黄は生体内の水と反応し、亜硫酸水素イオン、亜硫酸イオン、二酸化硫黄を発生させる。これらの化学種は消化管に移行し、pH が酸性の胃内では主に亜硫酸水素イオン及び二酸化硫黄として吸収される。また、腸にまで移行したものは中性の pH 環境により、主に亜硫酸イオンと亜硫酸水素イオンとして吸収される[59]。経口投与した場合ラット、マウス、およびサルにおいてその大部分は尿や糞便として 24 時間以内に排出されるが、ラット及びマウスにおいては投与量の 2%以下が 1 週間後の体内から検出されたことから経口投与により 2%以下の極微量が吸収されると考えた[58]。ヒトにおいては大気中の二酸化硫黄（6.0 ppm まで）のばく露によって人はばく露量 1 ppm ごとに血漿の S-スルホン酸量が 1.1±0.16 nmole/mL 増加する[65]。

これらのことから経口投与や吸入ばく露された二酸化硫黄及び亜硫酸塩類はヒトを含む多くの動物種でその大半は排出されるが極微量が血中に吸収されると考えた。

・二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の分布

New Zealand White ウサギに二酸化硫黄を吸入ばく露（3 ppm で 1~24 時間もしくは 10 ppm で 1~72 時間）すると気管の組織からは S-スルホン酸が確認されたが動脈組織では外因性の S-スルホン酸が認められなかった。通常、亜硫酸分解は、二酸化硫黄を吸入することで濃度の上昇した SO_3^{2-} がタンパクのジスルフィド結合を切断することで、S-スルホン酸を形成するが、これは肺や大動脈などの組織で起こる。大動脈組織での S-スルホン酸の形成が確認できず、吸入した二酸化硫黄の吸入部位から遠隔器官への輸送はないと考えた[69]。その他のラットの二酸化硫黄吸入ばく露実験から、数分単位の短時間の吸入ばく露では鼻粘膜に分布しないという結果が得られている [70]。吸収のまとめでも記載しているようにいろいろな動物種で経口摂取した亜硫酸塩の一部は吸収後血漿中に S-スルホン酸として存在する結果がえられている [67][65]。ウサギの静脈注射投与での各組織の S-スルホン酸を分析した結果、特定の部位に測定できるほどの S-スルホン酸は存在しなかった [68]。

これらの事から投与された二酸化硫黄及び亜硫酸塩類は血液中に吸収されて体内をめぐるが体内の特定の部位に蓄積する懸念はないと考えた。

・二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の代謝

亜硫酸は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD)、フラビン類、及びシトシンやウラシルとそれらのヌクレオシドやヌクレオチドと付加物を生成する [64][71]。 亜硫酸塩は、in vivo でミトコンドリアの膜内空隙に局在する亜硫酸オキシダー

ゼ（亜硫酸塩;フェリチトクローム C オキシドレダクターゼ、EC　1.8.2.1） による触媒で硫酸に酸化される。本酵素は、シトクロム b_5 型のヘムタンパクであるモリブデン原子含有サブユニットと、プテリン補因子を含む二量体としての特徴がある[73] [74]。

亜硫酸オキシダーゼは哺乳類の組織に広く分布しており、ほとんどの活性は肝臓、心臓、腎臓に認められている[75]。一般に、ヒトにおける亜硫酸オキシダーゼ活性は、アカゲザル及びウサギよりやや低く、研究された他の哺乳動物よりもかなり低い。ヒト肝臓の亜硫酸オキシダーゼの比活性は、ラット肝臓のわずか 5〜10% である。ラットの亜硫酸オキシダーゼは、一日あたり 750 mmole/kg 体重（150000 μ mol÷200g）の亜硫酸を酸化できると概算されている。これは、48 g SO_2/kg 体重（750mmol×亜硫酸 1 mol の分子量：82.07g／1000×亜硫酸中の二酸化硫黄の分子量 64.07g／82.07g）に相当する[78]。しかし、48 g SO_2/kg 体重に相当する空気を吸引ばく露すると数分でラットが死亡したことから亜硫酸オキシダーゼ活性能と実際の毒性試験結果は不一致が生じるため毒性試験を踏まえて ADI を決める必要があると考えた。

・二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の排泄

ラットにメタ亜硫酸ナトリウム水溶液を経口投与すると投与された硫黄分の約 55% が 4 時間以内に排出される [96]。マウス、ラット、及びサルにおいて $Na_2{}^{35}SO_3$ と $NaHSO_3$ の混合物を経口投与すると ^{35}S 約 90% が腸から吸収され、24 時間以内に尿中に排泄され、約 10%は糞便で排出されることから経口投与されたほぼ 100%が速やかに尿や糞便で排出される [58]。イヌにおいても $^{35}SO_2$ を吸入ばく露させると体内に入った ^{35}S 総量の 1~6%が 3 時間以内に尿中に排泄され、そのうち硫酸塩の割合は 90% 以上（平均 92.4%）であり、無機硫酸塩は 80%以上（平均 84.4%）であった [97]。二酸化硫黄を使用した製造工場で働くヒトの尿サンプルでも尿中の総硫酸塩はばく露量に応じて増加化した [98]。このことから吸入ばく露された二酸化硫黄は主に硫酸塩として尿中に排泄されると考えた。

これらを踏まえて、経口投与や吸収ばく露した二酸化硫黄及び亜硫酸塩類はその大半が尿や糞便中に硫酸塩として速やかに排出される。しかし、微量は S-スルホン酸として血液中に取り込まれて体全体をめぐる。血液中取り込まれた S-スルホン酸は体内の特定の部位に蓄積することはなく肝臓などで亜硫酸オキシダーゼなどによって代謝されるが実験で得られた亜硫酸オキシダーゼ活性能と実際の毒性試験結果は不一致が生じるため毒性試験を踏まえて ADI を決める必要があると考えた。

2.　毒性試験

亜硫酸水素アンモニウムを被験物質とした毒性試験成績を見出すことは出来なかった[46] [47]。

亜硫酸水素アンモニウム水をワインの製造過程で添加した場合、亜硫酸水素アンモニウムの分解によりアンモニウムイオン、また、二酸化硫黄（SO_2）が生成されることから [1]、二酸化硫黄については JECFA がグループ評価しており、亜硫酸水素アンモニウムと同様に水溶液中で pH 依存的に二酸化硫黄、亜硫酸水素イオン及び亜硫酸イオンを生じる二酸化硫黄と亜硫酸塩類（ピロ亜硫酸カリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、以下、２.毒性試験の項において同様。）を被験物質とした毒性試験を主として参照した。更に、EFSA による二酸化硫黄と亜硫酸塩類[7]の再評価結果報告を参照し、亜急性毒性試験、慢性毒性試験及び生殖毒性試験については NOAEL が設定される毒性試験を参照した。

一方アンモニウムイオンについては、食品安全委員会が、添加物評価書「硫酸アルミニウムアンモニウム、硫酸アルミニウムカリウム」（2017 年 12 月）の安全性に係る知見の概要の体内動態において、添加物「アンモニウムイソバレレート（第 2 版）」の評価書（2014）の EFSA のアンモニアに係る知見を参照し、次のようにまとめている [38]。

『（引用開始）

アンモニウムイオンについては、添加物「アンモニウムイソバレレート（第 2 版）」の評価書（2014）において、ヒトが食品を摂取することにより、消化管内において、1 日当たり十二指腸で 10 mg、結腸で約 3 g のアンモニアが産生されるとされている。産生されたアンモニアはほとんどが吸収された後、門脈循環に入るとされている。健常なヒトではアンモニウムイオンは肝臓で速やかに尿素に変換され、尿中に排泄されるとされている。

「硫酸アルミニウムアンモニウム」を摂取することで体内に取り込まれるアンモニアの量は、ヒトにおいて食事から産生されるアンモニアの量の変動の範囲内と考えられること、また、ヒト体内で産生されたアンモニアと同様に代謝されると考えられることから、本評価書では毒性の検討は行わない。（引用終わり）』

以上のことより亜硫酸水素アンモニウムのアンモニアについては、後述する摂取量推計から、亜硫酸水素アンモニウムが最大量使用されそのまま残存したとしても、アンモニアとしての摂取量は平均で 0.33 mg／日であり、体内に取り込まれるアンモニアの量は、ヒトにおいて食事から産生されるアンモニアの量の変動の範囲内と考えられること、また、ヒト体内で産生されたアンモニアと同様に代謝されると考えられること、2017 年 12 月以降でアンモニウムの代謝に係る新たな知見がみられないこと[243]から、本評価書では上記同様に毒性の検討は行っていない。

[7] 亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウムに加え、亜硫酸カルシウム、亜硫酸水素カルシウム、亜硫酸水素カリウムを含む。

（1）亜急性毒性試験及び慢性毒性試験

1）急性毒性試験

①亜硫酸水素アンモニウム

亜硫酸水素アンモニウムの急性毒性に関する知見を見出すことは出来なかった［46］［47］。

②二酸化硫黄及び亜硫酸塩類

JECFA（1987）及びEFSA（2016）の報告によれば、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類を被験物質とした急性毒性試験に関する試験成績は以下の通りである。この試験成績から指定等要請者は、これらの亜硫酸塩類による急性毒性は低いと判断した。

表 8.　亜硫酸塩類の単回経口投与試験における LD_{50} 値 [8]

動物種	被験物質	LD_{50}（mg/kg 体重）	観察された症状	参照
SD 系ラット（雌雄）	亜硫酸ナトリウム	二酸化硫黄として 1606（3160×64.06/126.04）	不明	EFSA（2016）[27]（原著 BASF, Akute toxizitaet. BASF aktiengesellchaft abteilung fuer toxikologie, “Abschaetzung des akuten gefaerhrdugspotentials bei einmaliger verabreichung (bestimmug der LD50). Natriumsulfit wasserfrei Z,” 1981, Submitted by BASF, June 2010.）
ウサギ（性別不明）	亜硫酸ナトリウム	二酸化硫黄として 600-700	不明	EFSA（2016）[27]（原著 Rost E and Franz F, “Vergleichende Untersuchung der pharmakologischen Wirkungen der organisch gebunenen schweflichen Säuren und des neutralen schwefligsäuren Natriums. II. Teil,” Arb. Gsndhtsamte (Berl.), 1913.）
ラット（雌:14 週齢）	亜硫酸水素ナトリウム	二酸化硫黄として 948（1540×64.06/104.06）	チアノーゼ、毛皮の汚れ、鎮静状態、昏睡、健康状態悪化、腹臥位	EFSA（2016）[27]（原著 BASF, “Natriumsulfitlauge. Untersuchungen zur akuten oralen Toxizitaet an weiblichen ratten,” 1982, Submitted by Lanxess, June 2010.）
ラット（雄:9 週齢）	亜硫酸水素ナトリウム	二酸化硫黄として 714（1160×64.06/104.06）	チアノーゼ、毛皮の汚れ、鎮静状態、昏睡、健康状態悪化、腹臥位	EFSA（2016）[27]（原著 BASF, “Natriumsulfitlauge. Untersuchungen zur akuten oralen Toxizitaet an maennlichen ratten,” 1982, Submitted by Lanxess, June 2010.）
ラット（性別不明）	ピロ亜硫酸ナトリウム	二酸化硫黄として 1088（3200×64.06/188.44）	不明	EFSA（2016）[27]（原著 BASF, “Natriumdisulfit pulver. Verkaufsprodukt: Reduktionsmittel; Konservierungsmittel. XXIII 355. 10.8.1973,” 1973, Submitted by SDIOEC EWIV, December 2015.）
ラット（性別不明）	ピロ亜硫酸カリウム	二酸化硫黄として 663（2300×64.06/222.32）	不明	EFSA（2016）[27]（原著 BASF, “Kaliumpyrosulfit. Verkaufsprodukt: Bei der Weinbereitung; Konservierungsmittel. XXIII 354. 10.8.1973,” 1973, Submitted by BASF, June 2010.）

[8]第 9 版食品添加物公定書付録　原子量表 [3]をもとに、分子量を二酸化硫黄 64.06、亜硫酸ナトリウム 126.04、亜硫酸水素ナトリウム 104.06、ピロ亜硫酸ナトリウム 188.44、ピロ亜硫酸カリウム 222.32 とし、原著から二酸化硫黄として換算した。

2）亜急性毒性試験及び慢性毒性試験

①亜硫酸水素アンモニウム

亜硫酸水素アンモニウムの亜急性毒性試験及び慢性毒性試験に関する知見を見出すことは出来なかった [46] [47]。

②二酸化硫黄及び亜硫酸塩類

○ラットを用いた慢性毒性試験

Til らの報告によれば [119]、雌雄各群各 20 匹の Wistar 系ラット 6 群に、チアミンを 50 ppm 添加した餌にピロ亜硫酸ナトリウムを以下の用量で 2 年間混餌投与した。すべてのラット（F0）は 21 週目に各用量群内で交配させ、さらに各群の半数は 34 週目に再び交配させた。最初に交配させた同腹児から離乳時に雌雄各群各 10 匹（F1a）が選ばれ F0 世代と同様の用量の飼料が 2 年間投与された。F1a 世代のラットは 12 週目と 30 週目に交配させ、最初に交配させた同腹児から離乳時に各群雄 10 匹及び雌 15 匹（F2a）が選ばれ F0 世代と同様の用量の飼料が 30 週間投与された試験が実施されている。

表 9.　用量設定

用量設定	0(対照群)、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 %
mg/kg 体重/日(二酸化硫黄として換算)	0、37、75、150、300、600 mg/kg 体重/日

その結果、飼料中のピロ亜硫酸ナトリウムは保管中に減少し、ピロ亜硫酸ナトリウムは、0.125、0.25、0.5、 1 及び 2%含有飼料で、それぞれ 22、14、12、8 及び 4.5%減少した。また、ピロ亜硫酸ナトリウム濃度の上昇に伴い、チアミン含量がそれぞれ 2.7、1.7、8.3、14.5 及び 15.4%減少した。

F0、F1 及び F2 世代のラットの一般状態は 72 週までは良好な状態を維持したが、その後、多くのラットで加齢性の兆候が進行し、全ての群で死亡動物が急速に増加した。ピロ亜硫酸ナトリウム群の生存率は F1 世代の 2%群の雄を除いて一般的に対照群より高値を示した。F0 世代の体重はピロ亜硫酸ナトリウムの投与にかかわらず全ての群で類似していた。2%のピロ亜硫酸ナトリウムが投与された F1 及び F2 世代の雌雄ラットで体重増加量が僅かに減少した。摂餌量に明らかな差は認められなかった。

尿と肝臓のチアミン含量は、0.125%以上の群で尿中のチアミン含量及び 0.25%以上の群の肝臓でチアミン含量が用量に依存して減少した。

血液学的検査では、ヘモグロビン、ヘマトクリット値および赤血球数のわずかな減少が、52、78 及び 100 週目に 2 %ピロ亜硫酸ナトリウムを摂取した F 0 世代の雌で観察され、一方、2 %群の F 1 世代の雄は、102 週で白血球数が増加した。その他は、すべての世代において被験物質投与動物および対照群の動物ともに血液学的検査値は正常の範囲内であった。

最高用量群では各世代で全てのラットが糞便中に潜血反応を示したが、この徴候はピロ亜硫酸ナトリウム 1 %含有飼料を摂取した動物では 13～60%に観察された。また、0.25%群の雌の 10%及び 0.5%群の雄の 10%に潜血の徴候が第 32 週に限って観察された。

1 年後に実施した中間屠殺の結果では、臓器重量にピロ亜硫酸ナトリウムの影響はみられなかった。F0、F1 及び F2 世代の肝臓の相対重量は、対照群と比べ明らかな差は認められなかった。腎臓の相対重量がわずかに、しかし有意に、F2 世代の 2%群の雌で増加した。ピロ亜硫酸ナトリウムの摂取は、その後の世代のいずれの臓器の相対重量にも明らかな影響を及ぼさなかった。

ピロ亜硫酸ナトリウムの摂取に起因した病理学的変化は胃でのみ観察された。1 及び 2%の高用量のピロ亜硫酸ナトリウムが投与された群では、明らかに盛り上がって肥厚した境界縁と少量の赤茶色の羊毛状の物質が腺胃の粘液層で見られた。組織学的検査で観察された被験物質投与と関連した胃の病変は前胃および腺胃の両方で観察され、過形成または炎症のいずれかによって特徴づけられた。また病変の発生率は 1 及び 2%群で明らかに増加した。0.5%群の F2 世代の少数の雌雄ラットで前胃に亜硫酸塩と関連した病変がみられた。観察されたその他の非腫瘍性病変の種類及び発生率は、被験物質投与群及び対照群で同程度であった。

腫瘍では、雄の肺でリンパ網内系腫瘍の発生数が、飼料中のピロ亜硫酸ナトリウム濃度の増加に伴い減少した。雄ラットの対照群において甲状腺及び下垂体腫瘍の発生率が非常に低かったが、ピロ亜硫酸ナトリウム投与群において認められた腫瘍の数、分布または種類に被験物質投与との明らかな関係はなかった。

以上のことより Til らは本試験においてピロ亜硫酸ナトリウムによる最も敏感な影響は、便中の潜血及び胃の形態学的変化であることを明らかにした。また、本試験における無影響量は 0.25%であるが、亜硫酸塩の消失を考慮すると、無影響量は 0.215%であり、これは二酸化硫黄換算で 72 mg/kg 体重/日に相当するとしている [119]。JECFA 及び EFSA パネルも Til らの NOAEL に同意している [21] [27]。

○ブタを用いた亜慢性毒性試験

Til らの報告によれば [120]、各群 20 頭の去勢した雄及び 20 頭の雌からなるブタ（ランドレース種）6 群それぞれにチアミンを 50 ppm 添加した餌にピロ亜硫酸ナトリウムを以下の割合で混餌投与した。15 週後、雌雄各群各 14 頭が屠殺され、残りの雌雄各群各 6 頭は同様の餌で 48 週まで飼育する試験が実施されている。

また別途、豚の成長と飼料転換効率に与える亜硫酸の影響を調べるため、各群 15 頭の去勢した雄ブタ及び 15 頭の雌ブタ（ランドレース種）からなる 2 群に 0（対照群）及び 1.72%ピロ亜硫酸ナトリウムを 18 週間投与する試験が実施されている。

表 10.　用量設定 [9]

用量設定	0（対照群)、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 %
mg/kg 体重/日(二酸化硫黄として換算)	0、37、75、150、300、600 mg/kg 体重/日

その結果、尿及び肝臓中のチアミン含量は飼料中のピロ亜硫酸ナトリウム含量の増加に伴い減少した。この影響は 1 及び 2%群で著しかったが、飼料へのチアミンの添加によりチアミン欠乏は防止された。

一般状態では、2%群のブタは試験の初期から食欲が低下し、この群の動物の健康状態はよくなかったが、その他の動物の健康状態は良好であった。1%群を除き、対照群を含む各群で動物が死亡したが、死亡率にピロ亜硫酸ナトリウムの摂取と関連した影響はみられなかった。成長率及び摂餌量は 2%群で著しく抑制され、また、1%群でも軽度に抑制された。

試験終了時の血液学的検査及び糞便中の潜血反応にピロ亜硫酸ナトリウム投与群と対照群との間に明らかな違いはみられなかった。

48 週の臓器重量では、1%群の肝重量を除いて、肝臓、腎臓、心臓及び脾臓の相対重量が 1 及び 2%群で有意に増加するとともに、2%群で肝臓と腎臓のみ相対重量が有意に増加しており、心臓及び脾臓の相対重量の増加はこれらの群の体重が低値であったことに起因するとみなされた。

15 及び 48 週の剖検で肉眼的に 1 及び 2%群の数頭の動物で胃の噴門部ならびに幽門部粘膜が乳頭状あるいは敷石状を呈し、また、盲腸粘膜が変色し黒色を呈した。組織学的に胃の噴門ならびに幽門部分で粘膜腺及び表層上皮の過形成が 1 及び 2%群で観察された。食道では、上皮内小膿瘍及び好中球の浸潤を伴った上皮の過形成が 1 及び 2%群の数例の動物で観察された。盲腸の粘膜固有層に緑黒色の色素顆粒を多数含んだ相当数のマクロファージが 1 または 2%群の数頭の動物、また、0.5%群の 1 頭で観察された。また、肝臓で、最高用量群の 12 頭中 4 頭で多くの脂肪を含んだ Kupffer 細胞が観察された。その他、組織学的検査において、いずれの組織においてもピロ亜硫酸ナトリウム投与群と対照群との間に明らかな差はなかった。

以上のことより、Til らは本試験条件におけるピロ亜硫酸ナトリウムの無影響量を 0.5%とした。また亜硫酸塩の消失量を考慮し、NOAEL を 0.35%としている [120]。JECFA 及び EFSA パネルも Til らの NOAEL に同意している [21] [27]。

[9] 原著に計算方法は示されていないが、原著において Til（1972）らが示したピロ亜硫酸ナトリウムの NOAEL: 0.35%（亜硫酸の消失を考慮した値、上表では 0.5%に相当）を基に、JFCFA（1987）が二酸化硫黄換算で 72 mg/kg 体重/日と決定したと EFSA に記載がある。この値は、Til ら（1972）に Rat を用いて算出した値と一致していることから、表 9 と同じ値を使用している。

○亜急性毒性試験及び慢性毒性試験まとめ

ラット及びブタにピロ亜硫酸ナトリウムを混餌投与した反復投与毒性試験の結果、標的臓器はラット及びブタともに胃であることが明らかにされ、Til ら(1972)の報告によれば、NOAEL はラットでは 0.215%（二酸化硫黄として 72 mg/kg 体重/日）で、ブタでは 0.35%とされている。また、EFSA(2016)において、ブタについては当該結果を基に JECFA（1987）が二酸化硫黄として 72 mg/kg 体重/日とした旨記載がある。指定等要請者は本項の実験結果より、Til らの実験結果及び当該結果を基に算出した JECFA の NOAEL を支持する。

（２）発がん性試験

①亜硫酸水素アンモニウム

PubMed 及び Toxline で検索したが亜硫酸水素アンモニウムの発がん性試験に関する知見を見出すことは出来なかった [46] [47]。

②二酸化硫黄及び亜硫酸塩類

Tanaka ら（1979）[121]（JECFA（1983）[122]、JECFA（1987）[21]及び EFSA（2016）[27]で引用）の報告では、ICR/JCL マウス（各群雌雄各 50 匹）にピロ亜硫酸カリウム水溶液（0、1 および 2 % : 0、432 および 864 mg / kg 体重/日）を 2 年間飲水投与した。（換算方法） JECFA(1983)[122]において 1%のピロ亜硫酸カリウム水溶液は 1500 mg/kg/day、2%は 3000 mg/kg/day と記載されている。指定等要請者がこれらの値用いて二酸化硫黄に換算すると以下の通りとなる。なお、JECFA（1983）[122]、JECFA（1987）[21]及び EFSA（2016） [27]においては二酸化硫黄までの換算は実施されていない。

（第 9 版食品添加物公定書付録　原子量表 [3]をもとにピロ亜硫酸カリウムの分子量を 222.32、二酸化硫黄の分子量を 64.06 として換算。）

1500×64.06÷222.32=432（小数点以下四捨五入）

3000×64.06÷222.32=864（小数点以下四捨五入）

その結果、180 日以上生存した動物は対照群で雄 50 匹及び雌 49 匹、1%群で雄 49 匹及び雌 47 匹、及び 2%群で雄 48 匹及び雌 46 匹であった。白血病や肺腺腫を含む様々な腫瘍が対照群と同様に被験物質投与群でも観察された。しかしながら、腫瘍ごとの発生率及びすべての腫瘍の発生率ともに、被験物質群と対照群間及び二つの用量群間に著しい差は観察されなかった。これらの結果から、少なくともマウスではピロ亜硫酸カリウムは発がん性を示さないと推測された [121]。JECFA（1983）[122]及び JECFA（1987）[21]では、Tanaka ら(1979)[121]を引用し、長期発がん性試験の結果は陰性であったとしている。EFSA(2016)[27]では、非常に古い結果が中心とはなるが、発がん性は検出されなかったとしている。ただし、ラットにおいては、胃粘膜の腺で亜硫酸塩の活動を促進している可能性を伴う腫瘍が

確認されており、この腫瘍は、ピロ亜硫酸ナトリウムによって誘導される胃腺の過形成に関係する可能性があると報告されている。

○発がん性試験まとめ

Tanaka ら（1979） [121]の報告によれば、マウスにピロ亜硫酸カリウムを最大で 2%で２年間投与した発がん性試験が実施されているが、本試験条件下では発がん性は認められていない。指定等要請者は、この実験結果を支持する。

（３）１年間反復投与毒性試験／発がん性併合試験

①亜硫酸水素アンモニウム

PubMed 及び Toxline で検索したが亜硫酸水素アンモニウムの 1 年間反復投与毒性試験／発がん性併合試験に関する知見を見出すことは出来なかった [46] [47]。

②二酸化硫黄及び亜硫酸塩類

PubMed 及び Toxline で検索したが二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の 1 年間反復投与毒性試験／発がん性併合試験に関する知見を見出すことは出来なかった [123] [124]。

（４）生殖毒性試験

①亜硫酸水素アンモニウム

PubMed 及び Toxline で検索したが亜硫酸水素アンモニウムの生殖毒性試験に関する知見を見出すことは出来なかった [46] [47]。

②二酸化硫黄及び亜硫酸塩類

Til らの報告によれば [119]、雌雄各群各 20 匹の Wistar 系ラット 6 群に、それぞれにチアミンを 50 ppm 添加した餌にピロ亜硫酸ナトリウムを以下の用量で 2 年間混餌投与した。すべてのラット（F0）は 21 週目に各用量群内で交配させ、さらに各群の半数は 34 週目に再び交配させた。最初に交配させた同腹児から離乳時に雌雄各群各 10 匹（F1a）が選ばれ F0 世代と同様の用量の飼料が 2 年間投与された。F1a 世代のラットは 12 週目と 30 週目に交配させ、最初に交配させた同腹児から離乳時に各群雄 10 匹及び雌 15 匹（F2a）が選ばれ F0 世代と同様の用量の飼料が 30 週間投与された。F2a 世代のラットは 14 週目と 22 週目に交配させ F3 世代を設ける試験が実施されている。

表 11.　用量設定 [10]

用量設定	0（対照群)、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 %
mg/kg 体重/日(二酸化硫黄として換算)	0、37、75、150、300、600 mg/kg 体重/日*

その結果、雌の妊娠率、同腹児数、出生時体重あるいは新生児の死亡率に群間で差は認められなかった。授乳期間中、2%群の新生児の体重が対照群及び低用量群より低下した。また、1%あるいはそれ以下の用量で、8 日及び 21 日目に体重の有意な減少が認められたが、明らかな用量相関はみられなかったとしている。

表 12.　毒性所見

投与群	雌の妊娠率	同腹児数	出生時体重	新生児の死亡率
F0 世代	差なし	差なし	2%群で有意に減少	差なし
F1a 世代				
F2a 世代		0.5～2%群で有意に減少		
F2b 世代		差なし	差なし	

以上のことより Til らは、本研究の結果では、2%ピロ亜硫酸ナトリウムが投与されたグループの新生児においてみられたわずかな成長遅延を除いて、生殖試験でピロ亜硫酸ナトリウムの影響を明らかにすることは出来なかったとしており [119]、JECFA では、雌の妊娠率、出生時体重、新生児の死亡率は正常であったとしている [21]。

EFSA パネルは Til らの結論に同意し、NOAEL は、1%投与群で、ピロ亜硫酸ナトリウムの減少を考慮すると、二酸化硫黄として 262 mg/kg 体重/日に相当するとしている [27]。

○生殖毒性試験まとめ

ピロ亜硫酸ナトリウムを 3 世代に亘り投与した試験が実施されており、Til(1972)らの報告によれば、最高用量の 2%投与群でも雌の妊娠率、同腹児数、出生時体重あるいは新生児の死亡率に毒性影響はみられなかったが、2%群の新生児に成長遅延がみられたとあり、本試験の結果から、EFSA パネルは 1%投与群の二酸化硫黄として 300mg/kg 体重/日から損失を考慮し、NOAEL を二酸化硫黄として 262 mg/kg 体重/日に相当するとしている。指定等要請者は本項の実験結果より、Til らの実験結果を基に算出した EFSA の NOAEL を支持する。

[10] Til らの算出をもとに EFSA(2016)はピロ亜硫酸カリウム（ピロ亜硫酸ナトリウムの誤記と思われる）1%=300 mg kg 体重/日(二酸化硫黄として)から損失を考慮するとして、262mg kg 体重/日(二酸化硫黄として)としているが、その損失の原因と、計算過程については明記されていない。

（５）出生前発生毒性試験

①亜硫酸水素アンモニウム

PubMed 及び Toxline で検索したが亜硫酸水素アンモニウムの出生前発生毒性試験に関する知見を見出すことは出来なかった [46] [47]。

②二酸化硫黄及び亜硫酸塩類

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類に関しては、ピロ亜硫酸カリウムに関する検討として Ema ら（1985）の報告が、亜硫酸ナトリウムに関する検討として Itami ら（1989）の報告があり、JECFA（1999）及び EFSA（2016）の報告でも引用されている。Ema らの報告では、妊娠 Wistar ラット（各群雌各 12～13 匹）にピロ亜硫酸カリウムを下記の用量で妊娠 7 日～14 日の間混餌投与し、妊娠 20 日に 0、0.1、10%ピロ亜硫酸カリウム投与群の 2/3 と 1%ピロ亜硫酸カリウム投与群の全てのラットを屠殺、胎児を検査し、また、残りのラットは出産させ、15 週間飼育する試験が実施されている。

表 13.　用量設定 [11]

用量設定	0（対照群）、0.1、1、10 %
mg/kg 体重/日として換算	0、130、1300、2900 mg/kg 体重/日*
mg/kg 体重/日（二酸化硫黄として換算）	0、75、760、1700 mg/kg 体重/日*

その結果、10%ピロ亜硫酸カリウム投与群の体重増加は妊娠 7 日～14 日のピロ亜硫酸カリウム投与期間中に著しく低下したが、0.1 及び 1%ピロ亜硫酸カリウム群は対照群と同等であった。いずれの群においても臨床症状に毒性影響は確認出来なかった。ピロ亜硫酸カリウム投与群で対照群に比べ子宮内での胎児死亡の発生率がわずかに増加したが、この差は有意ではなかった。母動物あたりの生存胎児数や胎児の性比にも差はみられなかった。10%ピロ亜硫酸カリウム投与群で胎児体重が対照群と比べて有意に低値を示した。ピロ亜硫酸カリウム投与と関連した外表や骨格の異常はいずれの群にも見られなかった。なお、全ての群で肋骨、胸骨または椎骨で骨格の異常が認められているが、ピロ亜硫酸カリウム投与群と対照群との間で発生率に有意差はみられなかった。10%ピロ亜硫酸カリウム群の胸骨分節、尾椎骨、中手骨または中足骨の骨化の程度は対照群より低かったが有意差はみられず、0.1 及び 1 %ピロ亜硫酸カリウム群では対照群と同様

[11] 換算値は JECFA FAS 42（1999）に記載の値を引用。ピロ亜硫酸カリウムの分子量を 222.32、二酸化硫黄の分子量を 64.06、ピロ亜硫酸カリウム 1 分子から生じる二酸化硫黄を 2 分子として二酸化硫黄に換算すると、ピロ亜硫酸カリウムとして 0、130、1300、2900 mg/kg 体重/日は、二酸化硫黄として、それぞれ 0、75、749、1671 mg/kg 体重/日となる。二酸化硫黄としての換算値に若干の差異があるが問題ないと判断し、JECFA 報告書記載値に従った。

に観察された。対照群を含む全ての群の胎児で内臓の異常が観察されたが、これらも投与量に依存していなかった。

妊娠期間に群間で差はみられなかった。10%ピロ亜硫酸カリウム群で生存新生児数、出生率（生存新生児数を着床数で割った値）及び生後 4 日での新生児の生存率はいずれも低く、死産児数も多かったが、対照群と比べ有意ではなかった。生後 21 日での 10%ピロ亜硫酸カリウム群の新生児の生存率は対照群と同様であった。離乳前の雌雄の体重に群間で有意差は認められなかった。

著者らは 0.1 及び 1 %ピロ亜硫酸カリウム投与群では見られない 10%ピロ亜硫酸カリウム投与群における生存新生児数等の減少に関しては、妊娠期間中の母体の栄養失調が原因の一つと考えられ、ピロ亜硫酸カリウム投与は新生児の出生後の生育には影響しないと考察している。以上の結果より、本試験条件下において、ピロ亜硫酸カリウムはラットで催奇形性を示さないと結論付けている [125]。

JECFA は以上の試験成績を基に、10%ピロ亜硫酸カリウム投与期間中に母動物の体重増加が有意に低下したが、催奇形性は認められず、児の生存率や体重増加に固執した影響はみられないとして、本試験における NOEL を二酸化硫黄として 760 mg/kg 体重/日に相当するとしている [23]。

EFSA パネルは 10%群で毒性影響が確認されたため、本試験における NOAEL を中用量と評価し、二酸化硫黄として 759 mg/kg 体重/日に相当するとしている [27]。

Itami ら（1989）の報告では、妊娠 Wistar ラット（各群雌各 10～12 匹）に亜硫酸ナトリウム 7 水和物を下記のような投与群を設定して妊娠 8 日～20 日まで混餌投与し、妊娠 20 日目に全てのラットを屠殺し、検査する試験が実施されている。また、別途 0（対照群）、0.32 及び 5%の亜硫酸ナトリウム 7 水和物が混餌投与された母動物（各 4～5 匹/群）は分娩後、亜硫酸ナトリウムを含まない基礎飼料が離乳時まで投与された試験が実施されている。

表 14.　用量設定 [12]

用量設定	0（対照群）、0.32、0.63、1.25、2.5、5.0%
mg/kg 体重/日として換算	0、269、516、1,165、2,249、3,528 mg/kg 体重/日
mg/kg 体重/日（二酸化硫黄として換算）	0、68、131、296、571、896 mg/kg 体重/日

[12] 亜硫酸ナトリウム 7 水和物の摂取量（mg/kg 体重/日）は、Itami ら（1989）の報告における試験期間中の用量毎の亜硫酸ナトリウム 7 水和物摂取量を試験日数及びラット体重平均値で除することで算出した。二酸化硫黄への換算は、第 9 版食品添加物公定書付録　原子量表 [3]をもとに亜硫酸ナトリウム 7 水和物の分子量を 252.15、二酸化硫黄の分子量を 64.06 として、各用量に対し 64.06/252.15 を乗じることで換算した。

その結果、妊娠ラットに死亡も毒性影響も観察されなかった。妊娠ラットの摂餌量が対照群に比べ 0.32、0.63.及び 5.0%群で有意な低値を示したが、体重増加は 5.0%群でのみ有意に低値を示した。妊娠 20 日目の帝王切開で、着床数、生存胎児数及び子宮内死亡数（吸収胚及び死亡胎児）、また、胎児の性比には対照群と亜硫酸ナトリウム投与群間に有意差はみられなかった。2.5%群を除いて亜硫酸ナトリウムが投与された全ての群の胎児体重が対照群より有意に低下した。胎児の検査では、どの群の胎児にも外観、骨格あるいは内臓に異常は観察されなかった。しかし、1.25%群を除いて亜硫酸ナトリウム投与群の胎児に腰肋、第 13 肋骨の低形成及び頭蓋骨や胸骨分節の骨化遅延など数種類の骨格変異が観察されたが、対照群との間に有意差はみられなかった。腎盂及び側脳室の拡張が少数の胎児で観察されたが、用量依存性は認められなかった。

出産後 3 週での母動物の体重増加に妊娠期間中に亜硫酸ナトリウムが投与された影響はみられなかった。新生児の出生率及び出生後 4 週での生存率は全ての群で高値を示した。生後 3 週での新生児体重は群間に明らかな差はなく、亜硫酸ナトリウム投与群で発育遅延やその他の毒性徴候はみられていない。

以上の結果より、著者らは、本試験から推定される母動物に対する亜硫酸ナトリウム 7 水和物の最大耐量は 2.5%～5.0%の間にあり NOEL は 2.5%と考えられ、また、胎児の体重が本試験の中で最も低い投与群である 0.32%から有意に低くなっていることから、本試験で検討した用量は胎児に対する NOEL を上回っていたように見えるが、生存新生児に対する影響は見られなかったとしている。一方、催奇形性に関しては、本試験条件下において、母動物に毒性影響が認められた用量でラットに催奇形性はみられなかったとしている [126]。

JECFA は本試験において、母動物では最高用量の 5.0%でのみ毒性影響が発現しているが、胎児では全ての用量で発育遅延がみられたため、本試験においては LOEL を二酸化硫黄等量として 80 mg/kg 体重/日（二酸化硫黄としての換算値）[13]としている [23]。

EFSA パネルは、Itami らは母動物の毒性による NOAEL は 2.5% （飼料中の亜硫酸ナトリウム 7 水和物として）、あるいは 560mg/kg 体重/日（二酸化硫黄としての換算値）[14]で、胎児毒性による NOAEL は 0.32%（飼料中の亜硫酸ナトリウム 7 水和物として）、あるいは 81 mg/kg 体重/日（二酸化硫黄としての換算値）以下としているが、試験の生存新生児に有害影響はみられなかったことを指摘している [27]。なお、体重当たりの一日摂取量は、JECFA 及び EFSA 報告書ともに指定等要請者の換算した値とは 1 割程度の差異があったが、これは、Itami らの同一の報告からの引用部分の違いによるものであり、問題ないと判断した。

---

[13] JECFA 報告書では、体重当たりの一日摂取量として Itami らの報告の本文中に記載の丸められた値（0.32%群、1.25%群、2.5%群、5%群でそれぞれ約 0.3、1.1、2.1、3.3 g/kg 体重/日）を用いて計算している（それぞれ二酸化硫黄として 80、280、530、840 mg/kg 体重/日）。

[14] EFSA 報告書でも JECFA と同様に本文中に記載の丸められた値を使用している（0.32%群, 2.5%群でそれぞれ二酸化硫黄として 81, 560 mg/kg 体重/日）。

○出生前発生毒性試験まとめ

Ema ら（1985）及び Itami ら（1989）の報告によれば、出生前発生毒性試験としてピロ亜硫酸カリウムと亜硫酸ナトリウムを妊娠期間（7～14 日及び 8～20 日）に投与された試験が実施されており、共に催奇形性は認められていない。JECFA では Ema らの結果に基づき、ピロ亜硫酸カリウムでは高用量の 10%で母動物の体重が減少したことにより胎児体重への影響がみられたが、催奇形性や新生児生存率及び新生児の体重増加に対する持続的な影響は見られず、NOEL を 760 mg/kg 体重/日（二酸化硫黄としての換算値）[15]としている。一方、EFSA パネルは Itami らの結果に基づき、亜硫酸ナトリウムでは母動物の NOAEL は 560mg/kg 体重/日（二酸化硫黄としての換算値）としている。胎児に関しては、JECFA は Itami らの結果に基づき、亜硫酸ナトリウム 7 水和物投与群の全ての用量の胎児で発育遅延がみられており、本試験においては LOEL を 80 mg/kg 体重/日（二酸化硫黄としての換算値）[16]としている。EFSA パネルも Itami らの結果に基づき、胎児に関して NOAEL は 81 mg/kg 体重/日（二酸化硫黄としての換算値）としているが、新生児に関して有害影響はみられなかったことを指摘している。指定等要請者は、本項の結果から母動物に対する NOAEL は 560 mg/kg 体重/日を、胎児に対する NOAEL は 80 mg/kg 体重/日を支持する。

（6）遺伝毒性試験

①亜硫酸水素アンモニウム

PubMed 及び Toxline で検索したが亜硫酸水素アンモニウムの出生前発生毒性試験に関する知見を見出すことは出来なかった [46] [47]。

そのため二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（ピロ亜硫酸カリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム及び亜硫酸ナトリウム）の遺伝毒性試験成績を参照し、総合的に亜硫酸水素アンモニウムの遺伝毒性に関する検討を行うこととした。

②二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（ピロ亜硫酸カリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム及び亜硫酸ナトリウム）

---

[15] Ema ら（1985）の報告における 1%ピロ亜硫酸カリウム投与群の $K_2S_2O_5$ の摂取量（平均 1,320 mg）をピロ亜硫酸カリウムの分子量を 222.32、二酸化硫黄の分子量を 64.06 として二酸化硫黄として換算すると、760 となる。

[16] JECFA 及び EFSA 報告書に記載の 0.32%亜硫酸ナトリウム 7 水和物投与群の亜硫酸ナトリウム 7 水和物の摂取量 300 mg/kg 体重/日を基に、亜硫酸ナトリウム 7 水和物の分子量を 252.12、二酸化硫黄の分子量を 64.06 として二酸化硫黄として換算すると 76.2 となり、値を丸めると 80 mg/kg 体重/日となる。

1．微生物を用いる復帰突然変異試験

Ishidate ら（1984）の報告によると［132]、ピロ亜硫酸カリウムについて、細菌株（Salmonella typhimurium TA92、TA94、TA98、TA100、TA1535、TA1537）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 3,000 μg/plate）が実施されており、代謝活性化の有無にかかわらず陰性の結果が得られている。

Munzner（1980）の報告によると［135]、亜硫酸水素ナトリウムについて、細菌株（Salmonella typhimurium G46、TA98、TA100、TA1535、TA1538）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 10.4mg /plate：pH 5.9）が実施されており、代謝活性化系 0.5 M（5.2 mg/plate）および 1.0 M（10.4 mg/plate）の用量で G46 株のみに陽性の結果が得られている。その他の細菌株については陰性の結果が得られている。G46 株は OECD ガイドライン 471[244]に記載のある信頼性が高く再現性が示されている菌株に含まれず、TA98、TA100、TA1535 株は OECD ガイドライン 471 の信頼性が高く再現性が示されている菌株が含まれるため、指定等要請者は TA98、TA100、TA1535 株の結果、すなわち陰性との判定を本試験の結果と考えた。

SRI International（1978）の報告によると［138]、亜硫酸水素ナトリウムについて、細菌（Salmonella typhimurium TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538）及び大腸菌（Escherichia coli WP2）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 10 mg/plate、pH7.0）が実施され、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性の結果が得られている。

Hayatsu H と Miura A（1970）の報告によると［139]、亜硫酸水素ナトリウムについて、大腸菌（Escherichia coli）を用いた突然変異試験（3 M（pH 5.6）での 1.5 時間処理）が実施され、変異原性の増加が観察されたとの陽性の結果が得られている［139]。しかし、指定等要請者は使用した大腸菌株（E.coli K12）及び被験物質の濃度が 1 容量であることについては OECD ガイドライン 471[244]に準じていないため、結果の妥当性に疑問が残ると考えた。

Mukai F ら（1970）の報告によると[140]、亜硫酸水素ナトリウムについて、大腸菌（Escherichia coli K12、15）を用いた復帰突然変異試験（1 M（pH 5.2)での 30 分処理）では変異原性が観察されたとの陽性の結果が得られており、これはシトシンとグアニンに対して特異的であると考察されている。しかし、指定等要請者は使用した大腸菌株（E.coli K12 及び K15）及び被験物質の濃度が 1 容量であることについては OECD ガイドライン 471[244]に準じていないため、結果の妥当性に疑問が残ると考えた。

Kunz BA と Glickman BW（1973）の報告によると［141]、亜硫酸水素ナトリウムについて、大腸菌（Escherichia coli NR3838、KA797、NR3956、NR5040、NR3883）を用

いた突然変異試験（1 M（pH 5.2～6.0）の 1 用量）が実施され、陰性の結果が得られている。

Mallon RG と Rossman TG（1981）の報告によると [142]、亜硫酸水素ナトリウムについて、大腸菌（Escherichia coli WP2、WP2s、WP6、WP5、WP10）を用いた復帰突然変異試験（0.1 M での 15 分処理）が実施され、陰性の結果が得られている。一方、UV 照射（18.6J/m^2）と合わせた試験においては陽性の結果が得られており、著者は DNA 修復プロセスが亜硫酸水素ナトリウムによって阻害されていると考察している。この報告を受けて、EFSA（2016） [27]は亜硫酸水素ナトリウムについて、使用した大腸菌細胞への変異原性はないと考察している。

Mallon RG と Rossman TG（1981）の報告によると [142]、亜硫酸水素ナトリウムについて、チャイニーズ・ハムスター由来の細胞株（V79）を用いた突然変異試験（10 及び 20 mM の 2 用量での 15 分間処理並びに 1 及び 5 mM の 2 用量での 48 時間処理；pH はいずれも中性）が実施され、陰性の結果が得られている。一方、UV 照射（18.6J/m^2）と合わせた試験においては陽性の結果が得られており、著者は DNA 修復プロセスが亜硫酸水素ナトリウムによって阻害されていると考察している。この報告を受けて、EFSA（2016） [27]は亜硫酸水素ナトリウムについて、使用した細胞株（V79）への変異原性はないと考察している。

Litton Bionetics（1972）の報告によると[143]、亜硫酸水素ナトリウムについて、細菌（Salmonella typhimurium G-46、TA1530）及び酵母（Saccharomyces cerevisiae D3）を用いたマウス宿主経由試験（最高用量 150 mg/kg 体重、単回及び 5 日間連続経口投与）が実施され、陰性の結果が得られている。

Meng と Zhang（1999）の報告によると [145]、亜硫酸ナトリウム（75 mM）と亜硫酸水素ナトリウム（25 mM）の混合物について、CHO-AS52 細胞による突然変異試験（亜硫酸水素塩として 5 mM 及び 10 mM の 2 用量での 4 時間処理）が実施され、非代謝活性化系で陽性の結果が得られているが、高用量での相対細胞生存率が 34.5%と低く且つ欠失変異が増加していることから、著者は高用量での細胞毒性により生じた DNA 損傷が関与しているものと判断しており、EFSA（2016） [27]もこれに同意している。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

De Giovanni-Donnelly（1985）の報告によると [136]、亜硫酸水素ナトリウムとピロ亜硫酸ナトリウムの混合物について、細菌（Salmonella typhimurium hisG46、TA92、TA1950、TA2410、TS24、GW19）を用いた復帰突然変異試験（1 M（pH5.2）のみ）が

実施され、非代謝活性化系で陽性の結果が得られている。これを受けて EFSA （2016）[27]は陰性対照群の値が極めて低いこと、報告に関する実験が行われた時点で適用されていた OECD ガイドライン 471[244]に準じていない（TA1535、TA1537 または TA97a または TA97、TA98 及び TA100 の 4 つの菌株が含まれていない点及び復帰コロニーの平均個数や標準偏差が示されていない点）ことから、結果の妥当性に疑問を呈している。

Prival ら（1991）の報告によると [156]、ピロ亜硫酸ナトリウム及び亜硫酸水素ナトリウムについて、細菌（Salmonella typhimurium TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538、Escherichia coli WP2）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 10 mg/plate）が実施され、ともに代謝活性化の有無にかかわらず陰性の結果が得られている。

Simmon と Eckford（1978）の報告によると [157]、ピロ亜硫酸ナトリウムについて、細菌（Salmonella typhimurium TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538）及び大腸菌（Escherichia coli WP2）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 10 mg/plate）が実施され、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性の結果が得られている。

Stanford Research Institute（1972）の報告によると [158]、ピロ亜硫酸ナトリウムについて、細菌（Salmonella typhimurium G-46、TA1530）及び酵母（Saccharomyces cerevisiae D3）を用いたマウス宿主経由試験（最高用量 1,200 mg/kg 体重、単回及び 5 日間連続経口投与）が実施され、陰性の結果が得られている。

Ishidate ら（1984）の報告によると[132]、無水亜硫酸水素ナトリウムについて、細菌（Salmonella typhimurium TA92、TA94、TA98、TA100、TA1535、TA1537）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 50mg/plate）が実施され、代謝活性化の有無にかかわらず陰性の結果が得られている。

Litton Bionetics（1975）の報告によると[164]、亜硫酸ナトリウムについて、細菌（Salmonella typhimurium TA1535、TA1537、TA1538）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 0.028%）及び酵母（Saccharomyces cerevisiae D4）を用いた突然変異試験（最高用量 5.0%）が実施され、代謝活性化の有無にかかわらず陰性の結果が得られている。

Ueno ら（2002）の報告によると[165]、亜硫酸ナトリウムについて、枯草菌（Bacillus subtilis M45、H17）を用いた修復試験（Rec-assay）（5 mg/plate の単一用量）が実施され、代謝活性化の有無にかかわらず陽性の結果が得られているが、EFSA （2016） [27]は本試験が一般的に用いられておらず、その妥当性も不明であるとしている。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

De Giovanni-Donnelly（1985）の報告によると [136]、亜硫酸水素ナトリウムとピロ亜硫酸ナトリウムの混合物について細菌株（Salmonella typhimurium hisG46、TA92、TA1950、TA2410、TS24、GW19）を用いた復帰突然変異試験（1 M：pH5.21 容量のみ、インキュベーション時間（0,30,60,90 分））が実施されており、すべての細菌株でインキュベーション時間 60 分もしくは 90 分において陽性の結果が得られている。しかし、EFSA （2016） [27]は陰性対照群の値が極めて低いこと、被験物質の濃度が 1 容量であり OECD ガイドライン 471[244]に準じていないことから 、結果の妥当性に疑問を呈している。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Pagano と Zeiger（1987）の報告によると[137]、細菌（Salmonella typhimurium TA88、TA90、TA92、TA97、TA98、TA100、TA110、TA1535、TA1537、TA1538、TA1977、SB2061 及び SB2802）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 0.64 M）が非代謝活性化系で実施され、TA88、TA90、TA92、TA97、TA100、TA110、TA1535、SB2061 及び SB2802 において陽性の結果が得られている（最大の変異原性は用量 0.1M 又は 0.3M で見られた） [137]が、EFSA （2016） [27]は試験方法が高濃度の亜硫酸緩衝液に細菌を植菌する方法であり、OECD ガイドライン 471[244]に準じていないこと、被験物質の確認が不十分（亜硫酸水素ナトリウムと記しているが、供給者はピロ亜硫酸ナトリウムと記している）であること、使用した大部分の細菌は変異試験において推奨されていないものであること、被験物質の純度に関する記載がないこと及び陽性対象群が設定されていないことより、安全性評価が不適切であると指摘している。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

上記以外に非公表の論文として、次の報告がある。

EFSA （2016） [27]はピロ亜硫酸カリウムについて、細菌（Salmonella typhimurium TA98、TA100、TA1535、TA1537）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 5,000 µg/plate）において代謝活性化の有無にかかわらず陰性の結果が得られている（BASF 1989c 非公表）、と記載している。

EFSA（2016）[27]は亜硫酸水素ナトリウムについて、細菌（Salmonella typhimurium TA98、TA100、TA1535、TA1537）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 10 µl/plate）が実施され、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性の結果が得られており、再試験（最高用量 96 µl/plate）においても陰性の結果が得られている（Bayer 1988 非公表）、と記載している。

EFSA（2016）[27]はピロ亜硫酸ナトリウムについて、細菌（Salmonella typhimurium TA98、TA100、TA1535、TA1537）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 5,000 μg/plate）が実施され、代謝活性化の有無にかかわらず陰性の結果が得られている（BASF 1989b 非公表）、と記載している。

EFSA （2016） [27]はピロ亜硫酸ナトリウムについて、マウスリンフォーマ細胞（L5178Y）による突然変異試験（最高用量 1,902 μg/mL）が実施され、代謝活性化の有無にかかわらず陰性の結果が得られている（Covance 2010 非公表）、と記載している。

EFSA （2016） [27]は亜硫酸ナトリウムについて、細菌（Salmonella typhimurium TA98、TA100、TA1535、TA1537）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 5,000 μg/plate）が実施され、代謝活性化の有無にかかわらず陰性の結果が得られている（BASF 1989a 非公表）、と記載している。

２．ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

Meng と Zhang （2002）の報告によると [128]、二酸化硫黄（0、7、14、28、56 mg）についてマウス（雌雄各群各 4 匹）の骨髄細胞による染色体異常試験（最大用量 56 mg/m^3、1 日 4 時間の 7 日間吸入ばく露し、最終ばく露後 24 時間に標本作製）が実施され、28 mg 以上のばく露量で染色体異常が有意に増加（カイ二乗検定、28 mg において $P<0.05$、56 mg において $P<0.01$）し、陽性と判断している [128]が、これを受けて、EFSA（2016）[27]は最高用量である 56mg/m^3 での異常細胞の出現頻度が顕著でなく（56mg/m^3；4.86%、陰性対照群；1.81%）、陰性対照群の背景データが提示されていないことを指摘している。さらに、損傷した細胞は細胞分裂中に選択的に排除され蓄積することができないため、染色体異常誘発性化合物の異常細胞の頻度の時間に関連した増加を 7 日間保持することは困難であること、本試験では陽性対照群を設定していないため得られた結果が陽性なのか判断しかねること、用いた統計処理法も適切とはいえないことを踏まえ、結果の判定に疑問を呈している。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Ishidate らの 1984 年の報告によると [132]、ピロ亜硫酸カリウムについて、チャイニーズ・ハムスター由来の細胞株（CHL）による染色体異常試験（最高用量 0.06 mg/mL、24 及び 48 時間処理）が実施され、非代謝活性化系が実施され陰性の結果が得られている。

Abe ら（1977）の報告によると [133]、ピロ亜硫酸カリウム（0.1、0.5、1 mM）についてチャイニーズ・ハムスター由来の細胞株（Don）による染色体異常試験（最高用量 1

mM、37℃で 26 時間処理）が実施され、細胞あたりの染色体切断量が対照と比較して 2 倍未満であったことから、陰性の結果が得られている。

Yavuz-Kocaman ら（2008）の報告によると [134]、ピロ亜硫酸カリウム（25、50、100、200 µg/ml）についてヒト（雌雄各 2 人、非喫煙者、健康、22-23 歳）から採取した血液 0.2　ml を 2.5 ml の chromosome medium B に添加し、10 µg/ml の 5-bromo-2'-deoxyuridine を加えて 37℃、72 時間培養したリンパ球による染色体異常試験（最高用量 200 µg/ml、24 時間及び 48 時間処理）が実施され、細胞あたりの数的異常数及び構造異常数を合計した染色体異常数が、実施した全ての用量（25、50、100、200 µg/ml）及び全ての処理時間（24 時間、48 時間）で対照と比較して有意に増加（t 検定、24 時間処理の 25、100 µg/ml 及び 48 時間処理の 200 µg/ml では $P < 0.05$、24 時間処理の 50、200 µg/ml 及び 48 時間処理の 25、50 µg/ml では $P < 0.01$、48 時間処理の 100 µg/ml では $P < 0.001$）し、陽性と判断している。これを受けて EFSA （2016） [27]は染色体異常試験に必要とされていない高濃度（10 µg/mL）の 5-bromo-2'-deoxyuridine を含む培養液を使用している [17]こと及び、染色体切断の自然発生を引き起こす光照射への防御のない実験条件での試験であることを重大な欠点とし、試験内容に問題のあることを指摘している。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Yavuz-Kocaman ら(2008)の報告によると [134]、ピロ亜硫酸カリウム（150、300、600 mg/kg 体重）についてアルビノラット（雌雄各郡各 2 匹、12-16 週）の骨髄を用いた染色体異常試験（最高用量 600 mg/kg 体重、腹腔内単回投与後 12 及び 24 時間に標本作製）が実施され、細胞あたりの数的異常数及び構造異常数を合計した染色体異常数が、実施した全ての用量（150、300、600 mg/kg 体重）及び全ての時間（12 時間、24 時間）で対照と比較して有意に増加（t 検定、12 時間処理の 150 mg/kg 体重及び 24 時間処理の 600 mg/kg 体重では $P < 0.05$、12 時間処理の 300、600 mg/kg 体重及び 24 時間処理の 150、300 mg/kg 体重では $P < 0.01$）し、陽性と判断している。これを受けて EFSA （2016） [27]は in vivo の試験においては統計単位を個々の動物とすべきところ、本研究では 4 匹のラットの染色体異常数を合計したものを統計の対象としていることから、結果の正しい評価としては不十分であると考察している。また、染色体と染色分体が同時に破壊されている結果は、化学物質による遺伝毒性機構と矛盾する。さらに、染色体異常を判別する基準はヒトの試験に使用するものであり、通常ラットの試験において使用する基準ではないとしており、これらのことから評価に使用することは妥当でないと

[17]同じ試薬が使用されている試験[149]では、6.1 µg/mL の添加量であった。また、メーカー(Shigma - Aldrich 社)の試薬情報によると、約 3.1µg/mL(10µmol/L÷1000×307.1g/mol≒3.1µg/mL)の添加量で使用された報告例[249]がある。

している。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Ishidate ら(1984)の報告によると [132]、無水亜硫酸水素ナトリウムについて、チャイニーズ・ハムスター由来の細胞株(CHL)による染色体異常試験(最高用量 0.125mg/ml、24 及び 48 時間処理）が実施され、非代謝活性化系で陰性の結果が得られている。

Litton Bionetics（1972）の報告によると [143]、亜硫酸水素ナトリウムについて、ラットを用いた染色体異常試験(最高用量 150 mg/kg 体重、単回及び 5 日間連続経口投与）が実施され、陰性の結果が得られている。

Tsutsui と Barrett（1990）の報告によると [146]、亜硫酸水素ナトリウム（0、0.2、0.5、1、2、5 mM）について、シリアン・ハムスター胎児由来の細胞株（SHE）による染色体異常試験（最高用量 5mM、24 及び 48 時間連続処理）が実施され、陰性の結果が得られている。

Popescu と DiPaolo（1988）の報告によると [147]、亜硫酸水素ナトリウム（10、20、40 mM）について、ハムスター胎児由来の細胞株（HFC）による染色体異常試験（最高用量 40 mM、6 及び 24 時間処理）が実施され、陰性の結果が得られている。

Beckman と Nordenson（1986）の報告によると [148]、亜硫酸水素ナトリウム（0.4 mM）について、ヒト（性別不明、2 人、非喫煙者であり採血前の数か月において伝染病の感染及び薬物投与なし）の血液から培養したリンパ球による染色体異常試験（0.4 mM、48 時間処理）が実施され、400 細胞中に確認された染色体異常数が対照と比較して有意に増加（カイ二乗検定、$P<0.01$）し、陽性と判断している。これを受けて、指定等要請者は亜硫酸水素ナトリウムが溶液を酸性にすることが知られており、pH や浸透圧が遺伝的な損傷を引き起こすことがあることに留意する必要があり、本研究全体を通じて pH や浸透圧の適切な測定がないことから、これらのような非生理的条件が誘発に関連している可能性を考慮し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Meng と Zhang（1992）の報告によると [149]、亜硫酸水素ナトリウム（0、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00 mM）について、ヒト（雌雄混合、計 4 人、健康）の血液から培養したリンパ球による染色体異常試験（最大用量 2.0 mM であるが生育不能であったことから実際の最大用量は 1.0 mM、48 時間生育）が実施され、200 分裂中期細胞中に観察された染色体及び染色分体の破壊数が 4 人個別及び 4 人平均において有意に増加（カイ二乗検定、有意水準については個別）し、陽性と判断している。これらを受けて、指

定等要請者は亜硫酸水素ナトリウムが溶液を酸性にすることが知られており、pH や浸透圧が遺伝的な損傷を引き起こすことがあることに留意する必要があり、本研究全体を通じて pH や浸透圧の適切な測定がないことから、これらのような非生理的条件が誘発に関連している可能性を考慮し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Stanford Research Institute(1972)の報告によると [158]、ピロ亜硫酸ナトリウム (30、700、1200 mg/kg 体重) について、ラットを用いた染色体異常試験 (最高用量 1,200 mg/kg 体重、投与後 6、24、48 時間後に標本作製) が実施され、陰性の結果が得られている [158]。

Rencüzoğullari E ら (2001) の報告によると [159]、ピロ亜硫酸ナトリウムについて、ヒト培養リンパ球による染色体異常試験 (用量 75、150 及び 300 µg/mL、24 及び 48 時間処理) が実施され、すべての用量及び処理時間において陽性 (染色体異常、用量依存性) の結果が得られているが、EFSA (2016) [27]は染色体異常試験の対照群の値が高く、染色体異常試験に必要とされていない高濃度(10 µg/mL)の 5-bromo-2'-deoxyuridine を含む培養液の使用と光照射への防御のない実験条件での試験であること、通常のドナーでは観察されない染色分体交換や倍数体細胞が見られたことから試験内容に問題のあることを指摘している。

Renner HW と Wever J (1983) の報告によると [160]、ピロ亜硫酸ナトリウムについて、正常なチャイニーズ・ハムスター及び NMR1 マウス、並びに亜硫酸オキシダーゼ欠損チャイニーズ・ハムスター及び NMR1 マウスを用いた染色体異常試験が実施されている。正常チャイニーズ・ハムスター及びマウスには 660 mg/kg 体重の 2 回 (標本作製の 30 と 6 時間前) の経口投与が行われ、陰性の結果が得られている。亜硫酸オキシダーゼ欠損チャイニーズ・ハムスター及びマウスではそれぞれ 330 mg/kg 体重と 165 mg/kg 体重の 2 回 (標本作製の 30 と 6 時間前) 経口投与が行われ、陰性の結果が得られている。

Pal BB と Bhunya SP(1992)の報告によると [161]、ピロ亜硫酸ナトリウムについて、マウス骨髄を用いた染色体異常試験が実施されており、400 mg/kg 体重の用量を腹腔内投与後 6、24、48 時間に標本作製、用量 200、300 及び 400 mg/kg 体重を腹腔内投与後 24 時間に標本作製、400 mg/kg 体重の用量を腹腔内投与、経口投与及び皮下投与し、24 時間後に標本作製、400 mg/kg 体重の用量を 5 分割し、各分割は 24 時間間隔で連続的に腹腔内投与し、最初の投与後 120 時間に標本作製という 4 種のプロトコールが用いられた。試験では 400mg/kg 体重の用量を腹腔内投与後 24 及び 48 時間に調整した標本、300mg/kg 体重の用量を腹腔内投与後 24 時間に調整した標本、400 mg/kg 体重の用量を 5 分割し、各分割は 24 時間間隔で連続的に腹腔内投与し、最初の投与後 120 時間に調整した標本並びに 400 mg/kg 体重の用量を皮下投与後 24 時間に調整した標本において陽

性（染色体異常）の結果が得られたが、200mg/kg 体重の用量を腹腔内投与後 24 時間に調整した標本、400mg/kg 体重の用量を腹腔内投与後 6 時間に調整した標本及び経口投与では陰性の結果が得られた。しかし、EFSA （2016） [27]は染色体異常の集計に通常除外する染色分体及び同位染色分体ギャップが含められていること、用いられたプロトコールは OECD ガイドライン 473[245]及び 474[246]と異なっており、陽性対照群が含まれておらず、動物数や観察細胞数も不十分であることより、試験内容に問題があり、リスク評価においては信頼できない研究であると考察している。 以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

３．げっ歯類を用いる小核試験

Meng ら(2002)の報告によると [129]、二酸化硫黄（14、28、56、84 mg/m^3）について、マウス（雌雄各群各 5 匹）の骨髄による小核試験（最大用量 84 mg/m^3、1 日 4 時間の 7 日間吸入ばく露し、最終ばく露後 24 時間に標本作製）が実施され、全ての用量設定（14、28、56、84 mg/m^3）において小核割合が有意に増加（t 検定、14、28 mg/m^3 においては P<0.01、56、84 mg/m^3 においては P<0.001）し、陽性と判断している。これらをうけて、EFSA （2016） [27]は、本試験において観察した多染性赤血の数が 1 動物あたり球陰 1,000 個と限定的であること、対照群の背景データが提示されていないこと、細胞増殖活性の指標となる NEC を観察されていないことに重大な欠点があるとしている。また、本試験では陽性対照群を設定していないため得られた結果が陽性なのか判断しかね、試験内容に問題のあることを指摘している。これを受けて指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Ziemann ら(2010)の報告によると [131]、二酸化硫黄（1、3、10、30 ppm）について NMRI マウス（雌雄各群各 6 匹であるが対照においては各 5 匹、8-12 週齢）骨髄による小核試験（最大用量 30 ppm、1 日 4 時間の 7 日間吸入ばく露し、最終ばく露開始後 24 時間に標本作製）が実施され、陰性の結果が得られている。これを受けて、EFSA （2016） [27]は OECD474[246]に準じて適切に試験が実施されていることを記載している。

Meng と Zhang (1992) の報告によると [149]、亜硫酸水素ナトリウム (0、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00 mM) について、ヒト（雌雄混合、計 4 人、健康）の血液から培養したリンパ球による小核試験（最大用量 2.0 mM であるが生育不能であったことから実際の最大用量は 1.0 mM、72 時間生育）が実施され、分裂指数が 4 人個別及び 4 人平均において有意に増加（カイ二乗検定、有意水準については個別）し、陽性と判断している。これらを受けて、指定等要請者は亜硫酸水素ナトリウムが溶液を酸性にすること

が知られており、pH や浸透圧が遺伝的な損傷を引き起こすことがあることに留意する必要があり、本研究全体を通じて pH や浸透圧の適切な測定がないことから、これらのような非生理的条件が誘発に関連している可能性を考慮し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Renner HW と Wever J（1983）の報告によると [160]、ピロ亜硫酸ナトリウムについて、正常なチャイニーズ・ハムスター及び NMR1 マウス、並びに亜硫酸オキシダーゼ欠損チャイニーズ・ハムスター及び NMR1 マウスを用いた小核試験では、正常チャイニーズ・ハムスター及びマウスには 660 mg/kg 体重の 2 回（標本作製の 30 と 6 時間前）の経口投与が行われ、陰性の結果が得られている。亜硫酸オキシダーゼ欠損チャイニーズ・ハムスター及びマウスではそれぞれ 330 mg/kg 体重と 165 mg/kg 体重の 2 回（標本作製の 30 と 6 時間前）経口投与が行われ、陰性の結果が得られている。

Pal BB と Bhunya SP(1992)の報告によると [161]、ピロ亜硫酸ナトリウムについて、マウス骨髄を用いた小核試験が実施されている。試験では 200 、300 及び 400mg/kg を 24 時間間隔で 2 回腹腔内投与し、2 回目の投与後 6 時間に標本作製され、300 mg/kg 体重で統計的に有意な小核の増加がみられた。しかし、EFSA （2016） [27]は中間量の 300 mg/kg 体重で統計的に有意な増加がみられたが、その頻度は陰性対照群で観察される程度の低いものであること、用いられたプロトコールは OECD ガイドライン 473[245]及び 474[246]と異なっており、陽性対照群が含まれておらず、動物数や観察細胞数も不十分であることより、試験内容に問題があり、リスク評価においては信頼できない研究であると考察していることを指摘している。 以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Carvalho ら(2011)の報告によると [162]、ピロ亜硫酸ナトリウム（0.5、1、2 g/kg 体重）について CFI マウス（雌雄各群各 5 匹、5-7 週齢）による小核試験（最高用量 2 g/kg 体重、単回経口投与後 24 時間に標本作製）が実施され、2 g/kg 体重のみの血液と骨髄で小核頻度が対照と比較して有意に増加（Kruskal-Wallis 検定、P<0.01）し、陽性と判断している。これを受けて EFSA（2016） [27]は 2 g/kg 体重のみでの陽性結果で用量依存性がみられておらず、ギムザ染色法を用いたことから PCE と NEC の判別が困難で、骨髄での陰性対照群の PCE/NEC の値（1.67±0.67）が高い値（通常は 1 近辺）を示していること、そして対照群の背景データが提示されていないことから安全性評価に不適切であることを指摘している。これを受けて指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

非公表の論文として、EFSA （2016） [27]は亜硫酸ナトリウムについて、マウス骨髄小核試験（250、500、1,000 mg/kg 体重の 3 用量を皮下注入し、24 時間及び 48 時間後

（最高用量と陰性対照）に標本作製）が実施され、陰性の結果が得られている（BASF 2008 非公表）、と記載している。

４．姉妹染色分体交換（SCE）試験

Uren ら（2014）の報告によると［127]、二酸化硫黄について、ヒト培養リンパ球の非代謝活性化系による姉妹染色分体交換（SCE）試験（用量 0.10, 0.50, 1.00 ppm）が実施され、用量 0.50ppm 及び 1.00ppm で陽性の結果が得られているが、EFSA（2016）[27] はこの試験における最大の SCE の頻度（最高用量（1.00ppm）添加時、4.62）は、絶対量として大きい値ではなく、一般的なヒト培養リンパ球でも観察されうる程度であると指摘している。また、陽性対照群に代謝活性化が必要な薬剤であるシクロホスファミドを使用しているのにも関わらず実験系が非代謝活性化系のため陽性対照として不適切であること並びに陰性対照群の背景データが提示されていないことから、安全性評価に不適切であることを指摘している。これを受けて指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Abe ら(1977)の報告によると［133]、ピロ亜硫酸カリウム（0.1、0.5、1 mM）について、チャイニーズ・ハムスター由来の細胞株（Don）による姉妹染色体交換（SCE）試験（最高用量 1 mM、37℃で 26 時間処理）が実施され、最高用量の 1mM で細胞あたりの SCE が対照と比較して有意に増加している（t 検定、有意水準 5 %）といった結果が得られている。しかし、Abe らは報告の中で細胞あたりの SCE が対照と比較して 2 倍未満であったことから、明確な量的効果ではないと判断している。

Yavuz-Kocaman ら(2008)の報告によると［134]、ピロ亜硫酸カリウム（25、50、100、200 µg/ml）について、ヒト（雌雄各 2 人、非喫煙者、健康、22-23 歳）から採取した血液 0.2 ml を 2.5 ml の chromosome medium B に添加し、10 µg/ml の 5-bromo-2'-deoxyuridine を加えて 37℃、72 時間培養したリンパ球による姉妹染色体交換（SCE）試験（最高用量 200 µg/ml、24 時間及び 48 時間処理）が実施され、細胞あたりの SCE が、実施した全ての用量（25、50、100、200 µg/ml）及び全ての処理時間（24 時間、48 時間）で対照と比較して有意に増加（t 検定、24 時間処理の 25、50 µg/ml 及び 48 時間処理の 25 µg/ml では $P < 0.05$、24 時間処理の 100、200 µg/ml 及び 48 時間処理の 200µg/ml では $P < 0.01$、48 時間処理の 50、100 µg/ml では $P < 0.001$）し、陽性と判断している。これを受けて EFSA （2016） [27]は染色体異常試験に必要とされていない高濃度（10 µg/mL）の 5-bromo-2'-deoxyuridine を含む培養液を使用していること及び、染色体切断の自然発生を引き起こす光照射への防御のない実験条件での試験であることを重大な欠点とし、試験内容に問題のあることを指摘している。以上のことから指定等要請者は

EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Tsutsui と Barrett (1990) の報告によると [146]、亜硫酸水素ナトリウム (0、5、10、20 mM) について、シリアン・ハムスター胎児由来の細胞株 (SHE) による姉妹染色分体交換 (SCE) 試験 (最高用量 20 mM、15 分処理) が実施され、陰性の結果が得られている。

Tsutsui と Barrett (1990) の報告によると [146]、亜硫酸水素ナトリウム (0、0.5、2.0、5.0 mM) についてシリアン・ハムスター胎児由来の細胞株 (SHE) による姉妹染色分体交換 (SCE) 試験 (最高用量 5.0 mM、24 時間処理) が実施され、対照を除く全ての用量設定 (0.5、2.0、5.0 mM) で細胞あたりの SCE が用量依存的に有意な水準 ($P < 0.01$) で誘導され、陽性と判断している。これを受けて、EFSA (2016) [27]は亜硫酸水素ナトリウムが溶液を酸性にすることが知られており、pH や浸透圧が遺伝的な損傷 (Brusick, 1987; Scott ら., 1991; Seeberg ら, 1988)を引き起こすことがあることに留意する必要があると指摘している。本研究全体を通じて pH や浸透圧の適切な測定がないことから、これらのような非生理的条件が誘発に関連している可能性を示唆している。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

ここで、上記のとおり、EFSA (2016) [27]は pH や浸透圧が遺伝的な損傷を引き起こすことについて、以下の 3 件の報告を参照している。

Brusick(1987)によると、イオン濃度や pH の変化は哺乳動物細胞を用いた試験において、直接的に遺伝毒性に対して影響を与えると考えられている。In vivo 試験においても、高いイオン濃度や pH の変化はラットの腺胃や膀胱での腫瘍増殖に関係することが分かっている。これらの知見は、In vivo や In vitro 試験の計画やイオン濃度や pH に影響を与えやすい材料を用いた試験結果の解釈に活用されるべきである[248]。

Scott ら(1991)によると、極端な pH の設定は、哺乳動物細胞の染色体異常や大腸菌、マウスのリンパ球細胞の変異、酵母の遺伝子置換といった現象を誘導するが、その機構はいまだ明らかではない。よって、溶媒中の pH については常に測定されるべきであり、1 を超える pH の変化に関連する陽性結果については注意深く観察する必要があり、中性条件において確認する必要がある[249]。

Seeberg ら(1988)によると、浸透圧の違いによる哺乳類動物細胞における突然変異誘発性を調査するために、塩化ナトリウムと塩化カリウムをモデル化合物として使用した試験を実施した。チャイニーズ・ハムスターの V79 細胞を用いた 6-チオグアニン抵抗性突然変異試験やチャイニーズ・ハムスターの卵巣細胞を用いた染色体異常試験において、

誘発性の増加が認められた。ただし、その他の結果を踏まえると、浸透圧単独による機構によりこれらの誘発が起きていることは説明できない状況であった[249]。

指定等要請者は以上の 3 つの報告における考察に同意し、pH や浸透圧が遺伝的な損傷に影響を引き起こすことがあるという EFSA の判断を支持する。

Popescu と DiPaolo（1988）の報告によると [147]、亜硫酸水素ナトリウム（10、20 mM）についてハムスター胎児由来の細胞株（HFC）による姉妹染色分体交換（SCE）試験（最高用量 20 mM、15 分間処理）が実施され、全ての用量設定（10、20 mM）において SCE 頻度が有意に増加（t 検定、P<0.001）し、陽性判断している [147]。これを受けて但し、EFSA（2016） [27]は本研究の結果は生理的条件の限界である 10 mM を超えていることを指摘している。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Beckman と Nordenson（1986）の報告によると [148]、亜硫酸水素ナトリウム（0.4 mM）について、ヒト（性別不明、2 人、非喫煙者であり採血前の数か月において伝染病の感染及び薬物投与なし）の血液から培養したリンパ球による姉妹染色体交換（SCE）試験（0.4 mM、48 時間処理）が実施され、20 細胞中に確認された SCE 数が対照と比較して有意に増加（カイ二乗検定、P<0.01）し、陽性と判断している。これを受けて、指定等要請者は亜硫酸水素ナトリウムが溶液を酸性にすることが知られており、pH や浸透圧が遺伝的な損傷を引き起こすことがあることに留意する必要があり、本研究全体を通じて pH や浸透圧の適切な測定がないことから、これらのような非生理的条件が誘発に関連している可能性を考慮し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することする。

Meng と Zhang（1992）の報告によると [149]、亜硫酸水素ナトリウム（0、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00 mM）について、ヒト（雌雄混合、計 4 人、健康）の血液から培養したリンパ球による姉妹染色体交換（SCE）試験（最大用量 2.0 mM であるが生育不能であったことから実際の最大用量は 1.0 mM、48 時間生育）が実施され、細胞あたりの SCE 数が 4 人個別及び 4 人平均において有意に増加（カイ二乗検定、有意水準については個別）し、陽性と判断している。これらを受けて、指定等要請者は亜硫酸水素ナトリウムが溶液を酸性にすることが知られており、pH や浸透圧が遺伝的な損傷を引き起こすことがあることに留意する必要があり、本研究全体を通じて pH や浸透圧の適切な測定がないことから、これらのような非生理的条件が誘発に関連している可能性を考慮し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

MacRae と Stich（1979）の報告によると [150]、亜硫酸水素ナトリウム（0、0.03、0.09、0.27、0.81、2.4、7.3mM）について、チャイニーズ・ハムスター由来の細胞株（CHO）

による姉妹染色体交換（SCE）試験（最高用量 7.3 mM、2 及び 24 時間処理）が実施され、分裂中期細胞あたりの SCE 数が最高用量である 7.3 mM、2 時間処理の結果において対照と比較して約 3 倍に、7.3 mM、24 時間処理では更にその約 2 倍となっており、陽性と判断している。これを受け、EFSA （2016） [27]は、亜硫酸水素ナトリウムが溶液を酸性にすることが知られており、pH や浸透圧が遺伝的な損傷を引き起こすことがあることに留意する必要があると指摘している。本研究では 0.1 M 水酸化ナトリウムを用いて一般的な中和を実施したと記録されているが、本研究全体を通じて pH や浸透圧の適切な測定がないことから、これらのような非生理的条件が誘発に関連している可能性を示唆している。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Rencüzoğullari E ら（2001）の報告によると [159]、ピロ亜硫酸ナトリウムについて、ヒト培養リンパ球による姉妹染色分体交換（SCE）試験（用量 75、150 及び 300 µg/mL、24 及び 48 時間処理）が実施され、すべての用量及び処理時間において陽性（姉妹染色分体交換、用量依存性）の結果が得られているが、EFSA （2016） [27]は高濃度（10 µg/mL）の 5-bromo-2’-deoxyuridine を含む培養液の使用と光照射への防御のない実験条件での試験であることなど、試験内容に問題のあることを指摘している。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Renner HW と Wever J（1983）の報告によると [160]、ピロ亜硫酸ナトリウムについて、正常なチャイニーズ・ハムスター及び NMR1 マウス、並びに亜硫酸オキシダーゼ欠損チャイニーズ・ハムスター及び NMR1 マウスを用いた SCE 試験が実施されている。SCE 試験では、正常チャイニーズ・ハムスター及びマウスには 660 mg/kg 体重の単回経口投与及び 50 mg/kg 体重の 20 分毎の 12 回皮下注入が行われた。亜硫酸オキシダーゼ欠損チャイニーズ・ハムスターとマウスではそれぞれ 330 mg/kg 体重と 165 mg/kg 体重の単回経口投与及び 50 mg/kg 体重の 20 分毎の 12 回皮下注入が行われ、陰性の結果が得られている。

５．その他の試験

Tsutsui と Barrett（1990）の報告によると [146]、亜硫酸水素ナトリウム（0、5、10、20 mM）についてシリアン・ハムスター胎児由来の細胞株（SHE）による突然変異試験（最高用量 20 mM、15 分間処理）が実施され、陰性の結果が得られている。

Tsutsui と Barret（1990）の報告によると [146]、亜硫酸水素ナトリウム（0、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mM）についてシリアン・ハムスター胎児由来の細胞株（SHE）によ

る突然変異試験（最高用量 5.0 mM、24 時間処理）が実施され、陰性の結果が得られている。

Uren ら（2014）の報告によると [127]、二酸化硫黄（用量 0.10, 0.50, 1.00 ppm）についてヒト培養リンパ球の非代謝活性化系による小核試験が実施され、用量 0.50ppm 及び 1.00ppm で陽性の結果が得られている。これを受けて EFSA （2016） [27]はこの試験における最大の小核出現頻度（最高用量（1.00ppm）添加時、5.50）は、絶対量として大きい値ではなく、一般的なヒト培養リンパ球でも観察されうる程度であると指摘している。また、陽性対照群に代謝活性化が必要な薬剤であるシクロホスファミドを使用しているのにも関わらず実験系が非代謝活性化系のため陽性対照として不適切であること並びに陰性対照群の背景データが提示されていないことから、安全性評価に不適切であることを指摘している。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Yavuz-Kocaman ら（2008）の報告によると [134]、ピロ亜硫酸カリウム（25、50、100、200 µg/ml）についてヒト（雌雄各 2 人、非喫煙者、健康、22-23 歳）の血液 0.2　ml から採取したリンパ球による小核試験（最高用量 200 µg/ml、24 時間及び 48 時間処理）が実施され、小核の割合が、実施した全ての用量（25、50、100、200 µg/ml）及び全ての処理時間（24 時間、48 時間）で対照と比較して有意に増加（t 検定、24 時間処理の 25、200 µg/ml 及び 48 時間処理の 200 µg/ml では $P < 0.05$、24 時間処理の 50、100 µg/ml では $P < 0.01$、48 時間処理の 25、50、100 µg/ml では $P < 0.001$）しているが、用量依存的な増加ではないと考察している。これを受けて EFSA （2016） [27]は被験物質、サイトカラシン B、PHA の同時処理という通常用いない方法で試験が行われていることを指摘している。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Meng ら（2005）の報告によると [130]、二酸化硫黄について、マウスによるコメットアッセイ（用量 12～112 mg/m^3、1 日 6 時間の 7 日間吸入ばく露し、最終ばく露直後に標本作製）が実施され、全ての臓器（脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓、小腸、精巣）及びリンパ球について用量依存的に DNA 損傷が観察されたほか、小腸では 28 mg/m^3 以上、その他では 14mg/m^3 以上で陰性対照群との有意差が確認された。これらを受けて EFSA （2016） [27]は各器官の陰性対照群の背景データが提示されておらず、陽性対照群を設定していないことから、結果の妥当性に留意すべきとしている。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Meng ら（2004）の報告によると［155]、亜硫酸ナトリウムと亜硫酸水素ナトリウムの混合物（3:1 M/M）ついてのマウスを用いたコメットアッセイ（用量 125, 250, 500 mg/kg 体重、7 日間連続腹腔内投与後 24 時間に標本作製）では全ての臓器（脳、肺、心臓、肝臓、胃、脾臓、胸腺、骨髄、腎臓）で全ての用量において陽性の結果が得られているが、EFSA（2016）[27]は全ての臓器の背景データがなく、陽性対照を含めておらず、単回投与後短時間（2〜6 時間）のデータがないことから最終投与後 24 時間に DNA 損傷が持続していることを確証できず、結果の妥当性に留意すべきとしている。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Carvalho ら（2011）の報告によると［162]、ピロ亜硫酸ナトリウム（0.5、1、2 g/kg 体重）について CFI マウス（雌雄各群各 5 匹、5-7 週齢）によるコメットアッセイ（最高用量 2 g/kg 体重、単回経口投与後 24 時間に標本作製）が実施され、1、2 g/kg 体重の血液、肝臓と骨髄において DNA 損傷指数（the damage index）及び DNA 損傷頻度（the damage frequency）が対照と比較して有意に増加（Kruskal-Wallis 検定、1 g/kg 体重においては P<0.05、2 g/kg 体重においては P<0.001）し、陽性と判断している。これを受けて EFSA（2016） [27]はコメットアッセイに通常用いない DNA 損傷指標を用いていること、単回投与後短時間（3〜6 時間）のデータがないことから最終投与後 24 時間に DNA 損傷が持続していることを確証できないこと、そして対照群の背景データが提示されていないことから、安全性評価に不適切であることを指摘している。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Tsutsui と Barrett（1990）の報告によると［146]、亜硫酸水素ナトリウム（0、5、10、20 mM）についてシリアン・ハムスター胎児由来の細胞株（SHE）による形質転換試験（最高用量 20 mM、15 分間処理）が実施され、対照を除く全ての用量設定（5、10、20 mM）で形質転換コロニー数が有意な水準（5、10mM では $P < 0.05$、20mM では $P < 0.01$）で誘導され、陽性と判断している。これを受けて、EFSA（2016） [27]は亜硫酸水素ナトリウムが溶液を酸性にすることが知られており、pH や浸透圧が遺伝的な損傷(Brusick, 1987; Scott ら., 1991; Seeberg ら, 1988)を引き起こすことがあることに留意する必要があると指摘している。本研究全体を通じて pH や浸透圧の適切な測定がないことから、これらのような非生理的条件が誘発に関連している可能性を示唆している。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Tsutsui と Barret（1990）の報告によると［146]、亜硫酸水素ナトリウム（0、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mM）についてシリアン・ハムスター胎児由来の細胞株（SHE）によ

る形質転換試験（最高用量 5.0 mM、24 時間処理）が実施され、対照と 0.2mM を除く全ての用量設定（0.5、1.0、2.0、5.0 mM）で形質転換コロニー数が有意な水準（$P < 0.01$）で誘導され、陽性と判断している。これを受けて、EFSA（2016） [27]は亜硫酸水素ナトリウムが溶液を酸性にすることが知られており、pH や浸透圧が遺伝的な損傷(Brusick, 1987; Scott ら, 1991; Seeberg ら., 1988)を引き起こすことがあることに留意する必要があると指摘している。本研究全体を通じて pH や浸透圧の適切な測定がないことから、これらのような非生理的条件が誘発に関連している可能性を示唆している。以上のことから、指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Borek C, Ong A と Mason H（1985）の報告によると [152]、亜硫酸水素ナトリウムについて、ハムスター胎児由来細胞及びマウス C3H/10T-1/2 細胞を用いた形質転換試験（最高用量 100 ppm）が実施され、陰性の結果が得られている。

DiPaolo JA ら（1981）の報告によると [153]、亜硫酸水素ナトリウムについて、シリアン・ハムスター胎児由来の細胞株（HEC）を用いた形質転換試験（最高用量 20 mM（pH 中性）での 15 分間処理）が実施され、陽性の結果が得られている。また、UV 照射（0.6J/m^2）と組み合わせた形質転換試験（最高用量 10 mM（pH 中性）での 15 分間処理）が実施され、UV 照射のみと比べて形質転換数が増加したが、亜硫酸水素ナトリウム処理のみと比較した場合には形質転換数の増加は見られなかったとの結果が得られている。これを受けて、指定等要請者は EFSA（2016） [27]が [146]の試験に対して指摘しているように、亜硫酸水素ナトリウムが溶液を酸性にすることが知られており、pH や浸透圧が遺伝的な損傷(Brusick, 1987; Scott ら, 1991; Seeberg ら, 1988)を引き起こすことがあることに留意する必要があると考えた。ここで本研究全体を通じて pH や浸透圧の適切な測定がないことから、これらのような非生理的条件が誘発に関連している可能性を示唆していると考え、本試験の陽性結果については他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Litton Bionetics（1972）の報告によると [143]、亜硫酸水素ナトリウムについて、ラットを用いた優性致死試験（最高用量 150 mg/kg 体重、単回及び 5 日間連続経口投与）が実施され、陰性の結果が得られている。

Generoso ら（1978）の報告によると [154]、亜硫酸水素ナトリウムについて、マウスを用いた優性致死試験（雄に 300 mg/kg 体重を 54 日間に 38 回腹腔内投与及び 400 mg/kg 体重を 26 日間に 20 回腹腔内投与、雌に 550 mg/kg 体重を単回腹腔内投与）が実施され、陰性の結果が得られている。

Stanford Research Institute（1972）の報告によると［158]、ピロ亜硫酸ナトリウムについて、ラット（詳細は不明）を用いた優性致死試験（最高用量 1,200 mg/kg 体重、単回及び複数回投与）が実施され、条件によってはところどころに対照と比較して有意な変化（P<0.01、P<0.05、P<0.10）が見受けられるものの、時間や濃度に依存しない結果となっており、一貫性のない結果が得られている。ただし、P<0.20 の基準では陽性の傾向がみられることから、本試験はより多くの動物を用いて再試験すべきであると結論付けている。以上のことから指定等要請者は Stanford Research Institute の考察に同意し、本試験の結果については一貫性が見られないことから、他の試験結果を踏まえて判断することとする。

SRI International（1979）の報告によると［163]、ピロ亜硫酸ナトリウム（125、416.7、1250 mg/kg 体重）についてラット（雄は 53-62 日齢、雌は 70-94 日齢、各群雄を 20 匹使用）を用いた優性致死試験（最高用量 1,250 mg/kg 体重、10 週間混餌投与）が実施され、最小用量である 125 mg/kg 体重の妊娠雌あたりの黄体数が対照と比較して有意に低く（t 検定、P<0.05）なっているが、その他の条件においては有意差が得られていないほか、時間や濃度に依存しない結果となっており、一貫性がないとの結論が得られている。以上のことから指定等要請者は SRI International の考察に同意し、本試験の結果については一貫性が見られないことから、他の試験結果を踏まえて判断することとする。

Doniger J ら（1982）の報告によると［151]、亜硫酸水素ナトリウムについて、シリアン・ハムスター胎児由来の細胞株（HEC）を用いたアルカリ溶出法による DNA 鎖切断試験（20、50 mM の 2 用量で 15 分間処理）が実施され、陰性の結果が得られている。

Generoso ら（1978）の報告によると［154]、亜硫酸水素ナトリウムについて、マウスを用いた転座試験（雄に 300 mg/kg 体重を 54 日間に 38 回腹腔内投与及び 400 mg/kg 体重を 26 日間に 20 回腹腔内投与、雌に 550 mg/kg 体重を単回腹腔内投与）が実施され、陰性の結果が得られている。

Pal BB と Bhunya SP（1992）の報告によると［161]、ピロ亜硫酸ナトリウムについて、マウス骨髄を用いた精子形態異常試験が実施されている。試験では 200 、300 及び 400 mg/kg 体重を 24 時間毎に 5 回腹腔内投与し、最初の投与後 35 日に標本作製された。試験の結果、精子異常の総頻度に用量依存性がみられた。しかし、EFSA （2016） [27]は遺伝毒性の評価と関連性がないことを指摘している。以上のことから指定等要請者は EFSA の考察に同意し、本試験の結果については遺伝毒性の評価と関連性がないものと考え、他の試験結果を踏まえて判断することとする。

・遺伝毒性試験まとめ

上記の微生物を用いる復帰突然変異試験、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、げっ歯類を用いる小核試験、姉妹染色分体交換(SCE)試験等において陽性の結果が得られているものが散見されるが、いずれもプロトコールが OECD ガイドライン 471,473,474[244][245][246]に準じていないものであることや、高濃度の 5-bromo-2'-deoxyuridine を含む培養液の使用などにより非生理的な条件下の試験となったことなどが影響しているものと考えられる。一方、OECD ガイドラインに準じて適切に試験が実施されている、Ziemann ら(2010)のげっ歯類を用いる小核試験においては陰性の結果が得られている [131]。以上のことから二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の遺伝毒性試験成績から総合的に評価して、指定等要請者は亜硫酸水素アンモニウムが生体において特段問題となる遺伝毒性を発現する可能性は低いと判断した。

（7）アレルゲン性試験

①亜硫酸水素アンモニウム

PubMed 及び Toxline で検索したが、亜硫酸水素アンモニウム及び亜硫酸の実験動物を用いたアレルゲン性試験に関する知見を見出すことはできなかった [46] [47] [123] [124]。

②二酸化硫黄及び亜硫酸塩類

亜硫酸塩類のヒトへの影響に関する JECFA の報告 [21] [23]（FAS 21 1987 及び FAS 42 1999)、EFSA の報告(2016) [27]、並びに PubMed で検索した文献を基に、主に原報を入手できた論文等をもとに、二酸化硫黄あるいは亜硫酸塩類によるばく露に関連したヒトへの影響のうちアレルゲン性試験に関係するものを本項にまとめた。なお、それ以外の報告を 3．ヒトにおける知見に記載している。

1）食品による特発性亜硫酸感受性

Prenner と Stevens(1976)の報告によると [166]、非喘息性の人での有害反応は稀であると思われるが、非喘息性の 50 歳白人男性が亜硫酸を噴霧（噴霧量は原著に記載がないため不明）したサラダを含む食事の後にアナフィラキシーを起こした事例が報告された。その後、同患者に 10 mg の亜硫酸水素ナトリウム溶液の一回経口負荷試験を行った結果、紅斑、痒み、悪心、熱感（warmness)、咳、及び気管支収縮が約 1 時間現れた。

Fisher(1975)の報告によると [167]、私信の報告(E. Epstein, 1970)として、一人のサラダ調理者（年齢、性別不明）における亜硫酸水素ナトリウムを感作性物質とした接触性皮膚炎の事例があった。

Schwartz(1983)は、ピロ亜硫酸塩過敏症の消化管痛と低血圧症の症例 2 例（24 歳男性と 34 歳女性）を報告している［168]。一症例（24 歳男性）では、湿疹、倦怠感、めまい及び解離を訴えた患者に対し、これらの症状の寛解後 Steven と Simon(1981)の方法に基づき、ピロ亜硫酸塩（Steven と Simon(1981)の方法からピロ亜硫酸カリウムと推定されるが、原著に記載がないため不明）の漸増経口負荷試験が行われた。3 回（10mg、25mg、50mg）の投与の後、段階的な消化管の異状と血圧低下が見られたが、肺機能に異状は見られなかった。もう一つの症例（34 歳女性）では、食物アレルギーの症状を訴える患者に対し同様のピロ亜硫酸塩漸増経口負荷試験を行った。3 回（10mg、25mg、30mg）の投与の後、こちらも段階的な消化管の異状と血圧低下が見られたが、肺機能に異状は見られなかった。

Botey ら（1987）の報告によると［169]、亜硫酸感受性と思われる 2-7 歳の女性 6 人と男性 2 人に対し亜硫酸ナトリウムの経口負荷試験（5mg 及び無症状 1 時間後 25 mg 投与、2 回目投与後 48 時間観察）が行われた。2 症例（4 歳女性及び 7 歳男性）は 5mg 投与後に、残りの症例も 25mg 投与後に陽性反応が見られた。陽性反応の症状は蕁麻疹及び一部血管性浮腫であった。呼吸器系の症状は見られなかった。

宮澤ら(2018)の報告によると［170]、我が国において、亜硫酸を含む食品により全身の浮腫性紅斑と呼吸困難等のアナフィラキシーを発症したと思われる症例が報告されている。66 歳の男性が夕食にハム、チーズ、及びするめを食べながらみかんワインを飲み、急速に全身の浮腫紅斑および呼吸困難が発現した。患者は過去に 3 回同様の病歴があったが、その時点では原因を特定できなかった。今回、ワインに使用される亜硫酸塩をアレルゲンとして疑い試験を行った。亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム及びピロ亜硫酸ナトリウム（各 1%及び 10%水溶液）についてプリックテストを実施したところ、全ての化合物及び全ての用量（1%及び 10%水溶液）において陰性の結果が得られた。亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム及びピロ亜硫酸ナトリウム（各 0.1%、1%及び 10%水溶液）について皮内テストを実施したところ、全ての化合物及び全ての用量（0.1%、1%及び 10%水溶液）において陽性反応（生理食塩水を対照として膨疹が 5 mm 以上、または対照である生理食塩水の 2 倍以上）を示したことから、亜硫酸塩によるアナフィラキシーと診断された。

２）経口負荷試験の結果

Kochen(1973)の報告によると［171]、弱い喘息様症状を有する小児について、亜硫酸を含む食品（防腐剤として亜硫酸が用いられた食品をプラスチック容器に密閉することによって亜硫酸がより保持されやすくなる傾向がある）摂取した場合に急性かつ一過性の喘息様症状が繰り返し現れたとする事例が報告された。同じ食品を十分に空気に曝すか調理した場合にはそのような症状を誘起しなかった。

Freedman(1977)の報告によると［172]、272 人の喘息患者のうち、30 人が亜硫酸水素ナトリウムを含むオレンジ飲料の摂取後に気管支収縮を起こした経験があると報告された。こ

の 30 人の感受性患者の内の 14 人について 25mg のピロ亜硫酸ナトリウムの単回経口負荷試験が行われた。その結果、8 人の患者（年齢 13〜64 歳、男性 3 人、女性 5 人）がピロ亜硫酸ナトリウムに対し陽性反応を示し、2-25 分以内に FEV1（一秒あたりの強制排気量）が 12%以上低下した。プラセボによる試験は行われていなかった。

Baker ら(1981）の報告によると［173]、缶入りのカニ肉サラダにピロ亜硫酸ナトリウムが入っている酢ドレッシングをかけて食べた後に気管支攣縮を発症した病歴のある 67 歳の女性喘息患者がピロ亜硫酸ナトリウムの経口負荷試験（用量は未記載）を受けた後、30 分以内に重篤な気管支痙攣を起こした。カニ肉の単独摂取後にはどんな反応も起きなかった。また、ワインにより喘息症状を引き起こした別の 23 歳女性患者が、単盲検でカプセル入りの 500 mg ピロ亜硫酸ナトリウムで経口負荷試験を受けたところ、最大呼吸流量が試験前の 440 L/min から 100 L/min に低下した。プラセボとしてラクトースで試験した場合は何の変化も見られなかった。

Stevenson と Simon(1981)の報告によると［174]、重篤な気管支収縮の病歴があり、レストランでの食事に関連してアナフィラキシーを起こしたことのある 4 人の患者について、単盲検での試験が行われた。プラセボのカプセルにはラクトースを入れ、絶食患者に 30 分間隔で投与された。翌日、1, 5, 10, 25 及び 50 ｍｇのピロ亜硫酸カリウムを含むカプセルが投与された。10 mg から 50 mg の用量での試験後、４人全てで喘息様症状が誘発された。試験後 30-90 分の時点で FEV1 が 34-49%低下した。その他の症状には紅潮、刺痛及び失神があった。なお、これらの患者の全てにおいてピロ亜硫酸カリウムに対するレアギン性の抗体を検出できなかった。また、レストランの食事に対して有害反応を起こしたことのない 5 人のステロイド依存性喘息患者では亜硫酸水素の経口負荷試験による有害反応は認められなかった。

Asero(2005)の報告によると［175]、体幹、上肢及び頭部の重篤な痒みが 6 ケ月間継続していた 56 歳の男性患者が 1 月の添加物除去食で完全に回復した後に二重盲検プラセボ対照試験が行われ、ピロ亜硫酸ナトリウム 10mg の試験で亜硫酸不耐性であると診断された。

Schwartz(1983)の報告によると［168]、レストランにおける食事後に脱力感、悪心、胸苦しさ、頻脈および呼吸困難の症状を現した二人の患者へのピロ亜硫酸ナトリウム（10mg 及び 25mg）の経口投与後に軽い悪心、頭痛及び血圧低下が現れた。しかし、肺機能には変化が無かった。

３）吸入による試験

Werth(1982)の報告によると［176]、亜硫酸処理した食物を入れた容器中の隙間に存在する空気(headspace gas)に含まれる二酸化硫黄の吸引も食品による特発性亜硫酸感受性に寄与する因子の一つかも知れない。亜硫酸処理した乾燥杏子の headspace gas の吸入により喘鳴

を経験したことのある 34 歳の喘息患者はカプセルに詰めた 50 mg のピロ亜硫酸ナトリウムによる経口負荷試験に応答しなかったがピロ亜硫酸カリウムを滅菌水に溶かした液 0.5 mL（10 mg/mL）の吸引では FEV1 の大きな低下が起きた。

吉川ら(1990)の報告によると[177]、ステロイド剤で呼吸困難を生じた 26 歳の気管支喘息患者において 5mg/mL の亜硫酸水素ナトリウム溶液の 1 mL の吸引で FEV1 の大きな低下が認められた。

Freedman(1977)の報告によると [172]、70 ppm の二酸化硫黄水溶液上の気体中には、室温で 1 ppm の二酸化硫黄が含まれていると推定されている。室温気体中 1ppm という濃度は、喘息患者によっては気管支収縮を起こす濃度である。

なお、ATSDR は [59]、入手可能なデータの解析により、過敏性喘息患者は空気中 0.1 ppm という低濃度の二酸化硫黄にも反応する可能性があるとしている。

４）静脈内投与試験

Baker ら（1981）の報告によると[173]、以前 500 mg のピロ亜硫酸ナトリウムを含む総量 500 mg のカプセルの経口負荷試験後に最大呼気流量/ピークフロー値の大幅な低下を来たしたことのある患者に、亜硫酸を含む治療薬（テオフィリンとデキサメタゾン）の静脈内注入を行ったところ喘息様発作がひどく悪化した。この患者においては、ピロ亜硫酸を含むメタクロプロミドの静脈内注射も気管支痙攣をおこした 。

Huang と Fraser(1984)の報告によると [179]、チリスープ、サンドイッチ、サラダ、ハラペーノ（jalapenos)、ピザ、中国料理の酢漬け青カブ、あるいは乾燥エビを食べた 15 分後に足裏の痒みを訴えた患者に、ピロ亜硫酸ナトリウムを含む 0.5mg/mL 塩酸リドカイン 1.8mL を接種したところ同様の症状が現れた。

５）食品による試験

Sonin と Patterson(1985)の報告によると [180]、特発性のアナフィラキシーを起こした病歴のある 12 人の被験者(その内 9 人がレストランの食事に対し有害反応歴を持っていた)と対照被験者 10 人がピロ亜硫酸ナトリウムを 1、 5、 10、 25、 50、 100 及び 200 mg 含むレモネードを順次経口投与されたところ、いずれのグループにおいても同じ程度の非特異的な刺激症状と自覚症状が現れたが、蕁麻疹、喘息、アナフィラキシー反応は観察されなかった。

Taylor ら(1988)の報告によると [181]、二重盲検によるカプセル又は飲料を用いた試験で亜硫酸過敏症であると同定された男性 3 人及び女性 5 人（25-55 歳）の喘息患者が様々な亜硫酸処理した食品による試験を受けた。FEV1 の低下をもって陽性反応とされた。最初の試

験は二重盲検での亜硫酸処理したレタスで行われた。次いで新鮮なきのこ、乾燥杏子、白ぶどうジュース、脱水ポテト、及びエビで行われた。4 人の被験者がレタスによる試験に反応した。また、このうちの 3 人は、他の亜硫酸処理食品のうちの複数に反応した。そのうちの 1 人は結合型及び遊離型の亜硫酸の皮膚プリックテスト及び皮内テストで陽性であり、彼らの亜硫酸過敏症には免疫学的な機構が関与していることが示唆された。なお、1 人は皮内テストにのみ陽性で、もう一人はいずれの皮膚試験にも陰性であった。なお、亜硫酸処理したレタスにのみ反応した被験者は亜硫酸の酸性溶液に反応したが、カプセルには反応しないという記録があった。なお、レタスはその組成から結合型亜硫酸を含んでいない。残る 4 人の被験者はいずれの食品による試験にも反応しなかった。著者らはレタス以外の亜硫酸処理食品への反応にはばらつきがあると述べている。加えるに、特定の亜硫酸処理した食品への反応の起こりやすさは食品から摂取した亜硫酸の量には相関していなかった。

Gastaminza ら(1995)の報告によると [182]、10 人の男性及び 8 人の女性（年齢：12-23 歳）において、酢漬けの玉葱を食べた直後に見られた喘息発作が亜硫酸の存在によるものであったか否かを決定するための試験が実施された。全ての被験者は空中浮遊アレルゲンにアレルギーを示した履歴があり、ステロイド依存性喘息患者は 3 名であった。彼らの内の多くは他の亜硫酸を含有すると思われる食品、例えば、サラダ、食用酢、果物ジュース、ビール、サイダー、グレープフルーツ、貝、およびいくつかの酢漬け野菜に反応しなかったし、生及び調理した玉葱にも反応しなかった。単盲検による試験がレモンジュースに入れたピロ亜硫酸ナトリウム水溶液について実施された。投与液の pH は 4.2 及び 3.3 に調整し、投与用量は段階的に最高 150 mg まで増加させた。結果は FEV1 が 20%以上の低下を示した時に陽性と判定された。ピロ亜硫酸ナトリウム(pH 4.2)に対する陽性反応は 18 人中 6 人の患者(33%)に認められ、pH 3.3 では他の 4 人も陽性となった。ピロ亜硫酸、酢漬け玉葱、酢漬け玉葱の保存液、及び生の玉葱についての皮膚プリックテストでは全ての患者で陰性であった。患者の内の 7 人は、引き続き、酢漬け玉葱による経口負荷試験を行うことに同意した。試験の結果、その内 3 人が陽性反応を示した。また、これらの患者はいずれもピロ亜硫酸による試験のどれかに陽性反応を示した。問題となった酢漬け玉葱中の亜硫酸濃度は 800-1200 ppm で、酢漬け玉葱の他の製品における濃度（200 ppm 以下）よりもずっと高く、また、認可された濃度（100 ppm）以上であった。ピロ亜硫酸溶液の pH 低下は遊離される二酸化硫黄の量を 2.5 倍に増加させた。著者らは二酸化硫黄の吸入が喘息発作を起こす機構であると推測した。

Vally ら(2007)の報告によると [183]、8 人の自己申告ワイン過敏性喘息患者による研究において、亜硫酸を高濃度及び低濃度含むワインを二重盲検法で別々の日に試験したところ、全員が臨床的に有意な FEV (1)の低下(15%以上)を起こさなかった。ただし、一人の患者は、亜硫酸を高濃度(250-300 ppm)および低濃度（<20 ppm）含むワインで試験した後に臨床的に有意なヒスタミンに対する気管支の過敏性反応(BHR: bronchial hyperresponsiveness の上昇)が現れた。プラセボとして作成した亜硫酸を含まない白ワインを試験した場合にも BHR

のわずかな上昇が現れた。二番目の患者では低濃度の亜硫酸で試験した後に BHR の有意な上昇が、もう一人の患者では有意な減少が現れた。4 番目の患者ではいずれのワインによる試験でもわずかな BHR 上昇を示したのみであった。これらのことから、著者は、今回調査された患者では”ワインにより誘起された喘息応答に亜硫酸添加物が主たる役割を果たしている”という考えを、本研究は支持せず、ワイン誘起喘息応答の発生原因は複雑で患者により異なるものと思われる、と結論した。

③亜硫酸塩への特発性反応の機序についての検討

Yang ら(1986)の報告によると [184]、摂取した亜硫酸への過敏症が疑われた 53 人について調べた結果、3 人の患者がアレルギー性の反応を有することが示された。これらの患者は全て女性で、年齢は 22-55 歳であった。その内二人はステロイド依存性喘息で、3 人ともレストランで食べた食物とワインにより激しい反応を経験したことがあった。1 人はワイン製造中にピロ亜硫酸カリウムの吸引で同様の反応を起こした経験があった。彼女たちの血清 IgE 濃度は上昇していた。また、皮膚試験（刺入あるいは皮内）でピロ亜硫酸カリウムに対し陽性であった。同様の反応が 1-50mg のピロ亜硫酸カリウム含有カプセルによる経口負荷試験により誘起された。その反応には、蕁麻疹あるいは血管浮腫，喘息、頭痛、鼻結膜炎、腹痛、およびアナフィラキシーがあった。受身転移試験(passive transfer test)が実施された二人の血清負荷試験が確認された。

Acosta ら(1989）の報告によると [185]、アレルギーの家族歴があり、血清 IgE が高値の 38 歳女性で、薬剤、食品、亜硫酸含有飲料などによる一連の刺激により重篤な気管支痙攣を起こした女性について、二重盲検でピロ亜硫酸ナトリウムの経口負荷試験が行われた。経口負荷試験により中枢気道(central airway)の明確な中程度狭窄と末梢気道(peripheral airway)の弱い狭窄を起こした。著者らは、症状が速やかに起こることと、亜硫酸に対するアトピー性マーカーの欠如、また、皮膚過敏症試験で陰性の結果が得られたことから、副交感神経系を介した作用により仲介されていることと整合している、と示唆した。

Sprenger ら(1989）の報告によると [186]、慢性喘息と亜硫酸感受性が示唆される病歴を有する患者について、ピロ亜硫酸カリウムの摂取がマスト細胞の脱顆粒に関与しているか否か調べるために、アナフィラキシーの好中球走化性因子への影響が検討された。単盲検で、最高 200 mg までのピロ亜硫酸カリウム水溶液の経口負荷試験が 13 人の患者になされた。試験の前と 180 分後に全ての患者から血清が採取され、51Cr マイクロチャンバー化学走行アッセイ(microchamber chemotaxis assay)と白血球分極（polarization）技術の両方を用いて、好中球走化性因子の存在が検討された。6 人の患者が試験により FEV1 が 20%以上低下するという陽性の結果を示したが、いずれの患者の血清においても、好中球化学作動物質の有意な増加は認められなかった。10 名の患者において実施されたピロ亜硫酸カリウムを用いた皮

膚試験では全て陰性であった。著者らは、皮膚テストで陰性であった患者におけるピロ亜硫酸水溶液に対する感受性はマスト細胞の脱顆粒に付随したものではない、と結論した。

Sokol と Hydick(1990)の報告によると [187]、長期に続くアレルギー性鼻炎、鼻ポリープ症及び再発性副鼻腔炎の病歴を有する 34 歳の女性について、レストランの食事に対する反応が何回か報告された。いくつかのアレルゲンが皮膚プリックテストにより確認されたが、それらにはレストランで食べた食物は含まれていなかった。彼女の血清 IgE 濃度は正常範囲にあった。彼女は、ピロ亜硫酸ナトリウムをゼラチンカプセルに 50 mg あるいはレモネードに 1 mg 加え、繰り返し実施された経口負荷試験において、一貫して陽性反応を示した。それらの反応には鼻鬱血、多量の鼻漏、顔と唇の腫脹、及び手、肘窩、足裏、及び上腹部の蕁麻疹が含まれていた。詳細な観察により鼻ポリープの腫脹が判明した。これらの諸症状はエピネフリン投与により寛解した。肺機能はピロ亜硫酸による試験でも変わらなかった。皮膚プリックテストでは、好塩基球ヒスタミン遊離試験の場合と同様に、ピロ亜硫酸ナトリウムに対し陽性反応を示した。このピロ亜硫酸ナトリウムに対する有害反応事例は、IgE により仲介される機構があることを確信させる証拠の一つである。著者らは、この事例が、患者が喘息気味でないという点および喘息が臨床的な応答の一部を成していないという点で通常とは異なるものであること、また、おそらく極めて稀なことではあるが、IgE により仲介される亜硫酸過敏症が確かに存在すること、を指摘した。

Frick と Lemanske (1991)の報告によると [188]、生後 2 ケ月で喘息の診断がなされた 2 歳の男子が亜硫酸を含む食事の摂取により喘鳴発作を起こした。彼は他にもピーナッツとミルクに対する有害食物反応（蕁麻疹）の病歴があり、吸入アレルゲンの皮膚試験で即時性の過敏症を示した。亜硫酸が喘鳴発作における起因物質であることを確認するために、二重盲検での経口負荷試験が行われた。リンゴの砂糖煮に粉末のピロ亜硫酸カリウムを混ぜ、1 mg から 25 mg までの段階的用量増加法で心拍数、呼吸頻度、および血圧の変化が評価された。25 mg の用量に対する応答は 2 分後に観察された。その症状としては、心拍数の増加（約 100→約 130)、呼吸頻度の増加（約 17→約 30）及び血圧の上昇（約 80→約 100）に加え、咳、発汗過多、および喘鳴が認められた。プラセボの試験ではどんな反応も観察されなかった。これとは別に実施された事前の皮膚プリックテストでは陰性であったが、ピロ亜硫酸の皮内テストではヒスタミンの場合と同様のみみず腫れと発赤（wheal-and-flare）反応が誘発された。

Belchi-Hernandez ら(1993)の報告によると [189]、花粉症による季節性の鼻結膜炎の病歴を有する 22 歳の女性に対し、ピロ亜硫酸塩の経口負荷試験が行われた。彼女の病歴には、ブドウをベースとした飲料、サラダバー製品、及び貝を摂取した後の顔、首、上胸部の蕁麻疹と血管浮腫および発声困難があった。なお、呼吸困難と胃腸管症状は示さなかった。患者の血球数は好中球を含め正常であり、血清 IgE 値は正常範囲の上限に位置し、皮膚プリックテ

ストで花粉には陽性を示したが、いくつかの食物に対しては陰性であった。皮膚プリックテスト及び皮内テストではピロ亜硫酸カリウムに対し過敏症を示さなかった。肺機能は正常であった。25 mg の試験で陽性反応を示し、顔面及び上頸部の蕁麻疹、鼻の痒み、鼻漏、発声困難の症状が現れた。これらの症状はエピネフリン投与により軽減された。 1 週間後、二重盲検プラセボ対照試験において chromolyn sodium 400mg 投与 30 分後に 25 mg のピロ亜硫酸カリウムで試験したところ、同様の陽性反応が現れた。2 ケ月後同じ試験を 5,000 μg のシアノコバラミン(Vitamin B 12)投与 90 分後に実施したところ、以前より弱いが、同じ症状が現れた。結果として、患者に現れた蕁麻疹は亜硫酸により誘起されたものと考えられた。著者らは、患者に現れた臨床症状は IgE により仲介される機構によるもの、と示唆した。しかし、皮膚試験の結果は陰性であり、ピロ亜硫酸による経口負荷試験は cromolyn sodium 前投与により抑制されなかったことから、著者らは病態発生機構を定められなかった。

Wuthrich(1993)は 2 症例を報告している [190] [191]。最初の事例は、前 1 年間に気管支喘息と鼻炎があり、レストランでの食事によりアナフィラキシー様症状、即ち潮紅、全身性蕁麻疹、重篤な喘鳴、及び呼吸困難を示し、ショックに至った 45 歳の女性である。血中好酸球数が上昇していたが、血清 IgE は正常範囲にあった。ピロ亜硫酸ナトリウム溶液による引っ掻きテスト(scratch test)では強い陽性反応（原著に記載がないため不明）を示し、IgE により仲介された喘息患者における亜硫酸アレルギーであると診断された。

二番目の事例は固有の喘息と鼻炎の病歴を有する 36 歳の女性で、カフェテリアでの食事中に全身性の痒み、熱感、頻脈、顔面と唇の血管浮腫、及び胸部圧迫感（chest tightness）を生じた。亜硫酸水素ナトリウムについてのプリックテストでは陰性であった。カプセルに入れたピロ亜硫酸ナトリウムによる経口負荷試験では、25 mg の用量に達した時に FEV1 が低下した。これには鼻充血、頭部熱感、指の紅潮、及び息切れが伴った。診断は亜硫酸感受性によるアナフィラキシー様反応であった [190]。

さらに、Wuthrich ら(1993)の報告によると [191]、三番目の事例は 47 歳の男性患者が、再発性で重篤な急性蕁麻疹、血管浮腫、及び呼吸困難を、その前 1 年間に少なくとも 3 ケ月に一回、主として夜間に起こした。IgE レベルは幾分上昇していた（180 KU/L)。単盲検による負荷試験が、症状が出ていない時期に行われた。50 mg のピロ亜硫酸ナトリウムを含むカプセルによる単回経口負荷試験 1 時間後、手に蕁麻疹が現れ、抗ヒスタミン薬とコルチゾンで治療したにも拘わらず、漸増し、全身に広がった。蕁麻疹が現れてから 5 時間後にバイオプシーを行ったところ好中球を伴う白血球破砕性血管炎(leukocytoclastic vasculitis)であることが示され、亜硫酸により誘発された蕁麻疹様血管炎(urticarial vasculitis)であると診断された。

Gall ら(1996)の報告によると [192]、25 歳の男性が様々なブランドのワインと特定ブランドのビールを飲んだ後、数分の内に顔面に痒みを伴う紅斑性皮疹と顔面腫脹を何度も経験した。ビールについて経口負荷試験を行ったところ、100 mL により同様の反応が誘起され

た。これには血清ヒスタミンの統計的に有意な増加を伴っていた。同様の症状が 10 mg のピロ亜硫酸ナトリウム処置後でも観察された。患者の血清にピロ亜硫酸ナトリウムに特異的な IgE や IgG 抗体は検出されなかった。ビールには 3-4 mg/L の亜硫酸が含まれていた。ピロ亜硫酸ナトリウムによる試験で、特定のブランドのビールを摂取したときと同じ症状が誘起されたことから、原因物質としては亜硫酸が最も可能性が高いとみなされた。著者らは、反応の用量依存性と特定の抗体が存在しない状況下でのヒスタミン遊離があったことは、この男性の反応がアレルギーというよりも不耐性による、と示唆した。

Park と Nahm(1996)の報告によると [193]、点眼による眼窩周囲の浮腫を何回か経験した 53 歳の女性の浮腫を、ピロ亜硫酸含有デキサメタゾンの筋肉内投与で処置したところ、眼窩周囲の浮腫と紅潮が憎悪した。これは抗ヒスタミン薬の投与により軽減した。患者は鼻結膜炎の経歴は無く、下部呼吸器系の疾患歴は無く、皮膚プリックテストで 80 種の一般的なアレルゲンに対して陰性であった。単盲検経口負荷試験により 200 mg の亜硫酸水素ナトリウム摂取 12 時間後に眼窩周囲の紅斑性浮腫が左目に現れたが、これは抗ヒスタミン剤の処理で消失した。なお、亜硫酸水素ナトリウム(100 mg/mL)による皮膚プリックテストは陰性であった。また、亜硫酸含有食物の回避と治療により再発が防止された。著者らは、発症機構の解明には更なる研究が必要であると考察した。

Di Lorenzo ら(2002)の報告によると [194]、20 人の慢性蕁麻疹患者を 2 群に分けて実施した二重盲検プラセボ対照試験において、一人の患者が 10 mg のメタ亜硫酸水素ナトリウムの経口負荷試験に反応した。著者らは亜硫酸の試験によるヒスタミン、ロイコトリエン、および他のメディエーターの肥満細胞や好塩基性細胞からの遊離は IgE を介したものでは無いと考察した。

Vally と Thompson (2001)の報告によると [195]、ワインに過敏性を有すると自己申告した喘息患者 24 人のうち 4 人が単回投与による試験においてワイン中の亜硫酸に反応した。二重盲検による用量反応試験において 4 人全てにおいて、300 ppm の亜硫酸を含むワインを 150 mL 摂取することにより、1 秒当たりの強制呼気量(Forced expiratory volume：FEV(1))がベースラインから 15%を超えて、有意に低下した。なお、20、 75、 150 ppm の亜硫酸を含むワインでは応答は見られなかった。応答は摂取後 5 分(最大低下量は 28.7±13% (平均±SD))で最大となり、ベースラインまでへの回復には 15-60 分を要した。蓄積性用量反応試験(Cumulative dose-response study)においては、測定したいずれの肺機能パラメーター（FEV(1),最大呼気速度(PEF)、中間強制呼気速度(FEF(25-75))）においても、ワイン過敏性喘息患者及び正常喘息患者の間で差は認められなかった。著者らは、喘息応答誘発において、亜硫酸とワインの役割が過大評価されており、ワイン中の共役因子(cofactor)や他の因子がワインにより誘発される喘息において重要な役割を果たしているのかも知れないと示唆した。

Nair と Elmore (2003)の報告によると [210]、亜硫酸感受性の喘息患者の多くはアレルギー検査のために実施された皮膚試験で陰性であり、アトピー性ではないことが示唆されている。

Twarog と Leung (1982)の報告によると [215]、ハンバーガーとフレンチフライを食した後に蕁麻疹と喘鳴を起こした 18 歳の女性喘息患者において、ピロ亜硫酸ナトリウムに対する急性反応時（原著に記載がないため不明）に IgE や好酸球数、ヒスタミン濃度は正常であり、IgE の関与は無い、と示唆されている。

Linneberg ら（2008）によって [211]、コペンハーゲンにおける 18-69 歳、6,000 人のランダム調査（有効回答者 4091 人、うち男性 1871 人、女性 2220 人）で上気道、下部気道及び皮膚におけるアルコール誘起症候の発現について、全てのアルコール飲料が誘起因子として報告されたが、最も一般的なものは赤ワインであり、亜硫酸の添加はワインにより誘起される喘息様反応に関係していた。しかし、文献的にワイン過敏性の喘息患者のうち実験室の状況で亜硫酸に反応した者はわずかであることが示されている。このことから、共役因子(cofactor)あるいは他の因子が応答に必要である可能性が示唆されるとされた。

ヒトにおける亜硫酸酸化酵素活性には、通常、大きな余裕がある。しかし、稀に亜硫酸酸化酵素活性が欠損している場合があり、 Johnson と Rajagopalan（1976 年）は 亜硫酸酵素欠損患者の肝臓から亜硫酸酸化酵素を精製し、正常者では検出される亜硫酸酸化酵素活性が欠損患者では検出限界以下であることを報告した [76] [77]。

Shih ら（1977）の報告によると [216]、患者（4.5 歳男児）の主な臨床的特徴は片麻痺の突然発症、進行性の舞踏病様運動などの中枢神経系関連症状や水晶体偏位であり、線維芽細胞で亜硫酸酸化酵素活性欠損が観察され、両親の亜硫酸酸化酵素活性も平均より低かった。また、患者の尿中に大量の硫黄含有代謝物、血漿中に亜硫酸塩と S-スルホシステインが観察された。

Ogier ら（1982）の報告によると [217]、小児（生後 2 か月、チュニジア出身）で摂食困難、体重増加不良、重症の初期脳症、神経障害等が観察され、肝臓の亜硫酸酸化酵素とキサンチン酸化酵素の活性欠損が確認された。なお、JECFA (FAS21, 1987) [21]は、無症候性の亜硫酸酸化酵素欠損症の頻度と規模、亜硫酸塩不耐性の研究についてさらに研究が必要であり、亜硫酸酸化酵素の欠損と亜硫酸処理した食物に対する有害反応とを結びつけるには、情報は十分ではない、と考察しているが、指定等要請者もこの意見を支持する。

Ranguelova ら (2012) の報告によると [218]、ヒト好中球が亜硫酸水素の酸化により亜硫酸ラジカルを生じさせ、肺の炎症や喘息のような肺に関係する疾患患者における亜硫酸水素の毒性発現にはフリーラジカル生成が関係しているかも知れないと考察した。

④発症率についての検討

Buckley ら(1985)の報告によると [196]、喘息及び関連症状を有する 1,073 人から選択された 134 人の喘息患者に 1.4、 14、 144、 288 mg のピロ亜硫酸カリウムを含むカプセルを逐次的に投与したところ、15%を超える FEV1 の低下が 50 人に認められた。この研究結果に基づき、喘息患者の 4.6%が亜硫酸試験に反応すると推定された。

Simon ら（1982）の報告によると [197]、食品による重篤な特発性の反応を示したことのある 61 人の喘息患者についてピロ亜硫酸を含むカプセル経口投与漸増試験（10mg、25mg、50mg、100mg、200mg を 30 分毎投与）により 6 人（8.2%）が亜硫酸感受性であることが示された。

Nair ら(2003)の報告によると [210]、喘息患者の 2-5%が亜硫酸感受性であり、また、亜硫酸感受性患者の多くは喘息患者であると推算した。

Vally ら（2009）の報告によると [219]、多くの研究では、喘息患者の内 3-10%に亜硫酸過敏性があると報告されている。これらの反応の重篤度はばらついており、著明な気道過敏を有するステロイド依存性の喘息患者や小児の慢性喘息患者ではリスクが高いと思われた。突発的に起こる急性症状に加え、亜硫酸は慢性の皮膚及び呼吸器系症状にも関与しているのかもしれない。

上記及びその他の研究結果から喘息患者における亜硫酸過敏症の頻度推定がなされているが、JECFA (FAS21, 1987) [21]は、有害反応の指標として用いたエンドポイントが研究により異なっていたこと、また被験者集団にバイアス（例えば、参照された試験において重篤な症状の現れた患者やステロイド依存性喘息患者の数の不均一）があり、それらの推計結果は複雑である、としていた。

１）成人での発症率

Bush ら(1988)の報告によると [198]、前向きの単盲検スクリーニング試験において、120 名のステロイド非依存性喘息患者及び 83 名のステロイド依存性喘息患者がピロ亜硫酸カリウムを含むカプセルの経口負荷試験を受けた。30 分以内に FEV1 が 20%を超えて減少するか否かという基準で、ステロイド非依存性患者の 5 人、ステロイド依存性患者の 16 人が陽性と判定された。このステロイド非依存性患者及びステロイド依存性応答者の内のそれぞれ 5 人と 7 人が二重盲検試験において、ピロ亜硫酸カリウムの用量漸増法により、再試験された。このプロトコールでは単盲検で陽性を示した患者の多くが反応しなかった。即ち、5 人のステロイド非依存性患者の内の 1 人、及び 7 人のステロイド依存性患者の内の 3 人にのみ陽性反応が認められた。著者らは亜硫酸過敏症の有病率は、彼らの研究対象とした患者数全体の 3.9%であると推定した。彼らは、研究対象集団におけるステロイド依存性患者の割合が

一般の喘息患者集団におけるより高かったことから、この推定値が過大評価であると見做している。ステロイド非依存性喘息患者で影響される者は 1%より低く、ステロイド依存性群では 8%に近い値であったことは、後者において亜硫酸過敏症のリスクがより高いことを示している。

Prieto ら（1988)の報告によると [199]、44 人の非アトピー性でステロイド依存性気管支喘息患者（男性 14 人、女性 30 人、年齢 14-74 歳）に経口負荷試験が実施された。ピロ亜硫酸ナトリウムの用量増加(0.5-50 mg)は水溶液で行い、高用量(100 mg と 200 mg)ではカプセルを用いて投与した。被験者は亜硫酸過敏症の病歴のない者であった。22 名の患者には単盲検試験プロトコール、残りの 22 名の患者には二重盲検プロトコールであった。単盲検試験で反応した者については二重盲検プロトコールで再試験された。陽性反応の基準は FEV1 の 20%以上の低下とされた。最初に陽性と判定された 6 人のうち、2 人のみしか二重盲検試験で陽性が確認されなかった。これらの結果から亜硫酸過敏症の有病率はステロイド依存性喘息患者において 4.5%であると示唆された。

Vena ら(1994)の報告によると[200]、亜硫酸に対する遅延性の過敏性反応の発生について、2,894 人の湿疹患者で検討された。患者は 1%ピロ亜硫酸ナトリウムによるパッチテストを欧州で標準的に実施される方法に基づいて受けたところ、ピロ亜硫酸ナトリウムに対する陽性反応が 1.7%の患者（50 名）で認められた。陽性反応が現れた患者は引き続き、1%ピロ亜硫酸カリウム、1%及び 5%亜硫酸水素ナトリウム及び 1%亜硫酸ナトリウムをフィンチャンバーとスカンポールテープを用いた標準的な方法で試験した。ピロ亜硫酸ナトリウムに反応した患者はピロ亜硫酸カリウムと亜硫酸水素ナトリウムにも反応したが、亜硫酸ナトリウムに反応したものは 2 人のみであった。パッチ試験反応の組織学的パターンはアレルギー性接触皮膚炎のものであった。表皮の変化はエキソサイトーシスを伴う海綿症からなり、リンパ球からなる炎症性浸潤物が乳頭下血管の周囲に見られた。ピロ亜硫酸ナトリウム溶液(10mg/ml)でのプリックテストと皮内テストが 20 人の患者で実施された。また、30 及び 50mg のピロ亜硫酸ナトリウムの経口負荷試験が 5 人の患者に実施された。パッチテストで反応した被験者のいずれもプリックテスト及び皮内テストで反応しなかった。また、経口負荷試験により皮膚炎やパッチ部位の再燃は起こらなかった。

Garcia-Gavin ら(2012)の報告によると [201]、2,763 人の患者に International Contact Dermatitis Research Group の基準に基づいて実施したパッチテストにおいて 124 例（4.5%）がピロ亜硫酸ナトリウムに対して陽性であったと報告した。このうち、最も頻繁な病変の局在は顔（40.3%）と手（24.2%）であり、6 人は全身症状を報告した。13 例（10.5%）が職業関連であり、その内 10 例が手に湿疹を呈していた。陽性反応の認められた者の内の 76 例(61.3%)においてはピロ亜硫酸ナトリウムが唯一のアレルゲンであった。

２）小児での発症率

Towns と Mellis (1984)の報告によると [202]、単盲検試験で、29 人の慢性喘息の小児にピロ亜硫酸ナトリウムが投与された。小児の年齢は 5.5 歳から 14 歳で、男は 15 人、女は 14 人でほぼ同数であった。29 人のうち 28 名が空中浮遊アレルゲンにアトピー性であった。陽性反応は肺機能の減少で判断された。患者は最高 100 mg までの用量のカプセルと最高で 50 mg のピロ亜硫酸ナトリウムを含むクエン酸溶液で試験された。ピロ亜硫酸に対する過敏症が 19 人の小児で検出された。彼らのすべてがピロ亜硫酸溶液に反応したもので、カプセルで投与された場合には誰も反応しなかった。反応者の多くは、最初はのどの焼ける感覚、胸が締めつけられるような咳、喘鳴、及び呼吸窮迫徴候を含む即時的な反応を示した。19 人の内の 7 人は食品中のピロ亜硫酸に対する過敏症が示唆される病歴を有していた。著者らは、カプセルに詰めたピロ亜硫酸に対する応答が無かったことと気管支徴候の開始が速やかであったことから、二酸化硫黄の吸入が引き金であったと示唆した。

Friedman と Easton (1987)の報告によると [203]、亜硫酸過敏症の有病率がアレルギー専門医院から選抜した 51 人の慢性喘息小児により決められた。彼らの年齢は 5 歳から 16 歳で平均は 10.3 歳であった。ほぼ 90%の子供がアトピー性であり、18%がステロイド依存性であった。オープン法で、レモネードにピロ亜硫酸カリウムを加え、0.5-100 mg の範囲で用量段階が設定され、15 分間隔で順次投与された。51 人の内 18 人がピロ亜硫酸溶液を飲んだ後に FEV1 が 20%以上低下した。18 人の内 14 人にプラセボが投与されたが、その内 1 例において 2 回目のプラセボ投与で FEV1 が 20%以上低下する陽性反応が現れた。ステロイド依存性被験者と非依存性被験者の間に亜硫酸過敏症の発生率に差はなかった。ピロ亜硫酸溶液に反応した全ての患者が、反応しなかったものでは 2/3 の患者のみがスモッグ過敏症であると報告されている。

Van Bever ら (1989)の報告によると [204]、重篤なアトピー性皮膚炎の病歴を有する 5 ケ月から 14 歳までの 6 人の子供について、食品及び食品添加物についての研究の一部として、二重盲検プラセボ対照試験によりピロ亜硫酸ナトリウムが経鼻胃管で投与された。2 人の子供が陽性で、症状としては孤立性の痒みと皮膚紅潮の悪化があった。呼吸器系の症状は認められなかった。

Boner ら(1990)の報告によると [205]、6-14 歳の慢性喘息患者（男 35 人、女 21 人）でのオープン法でピロ亜硫酸カリウムを溶液あるいはカプセルの形態で段階的に用量を増加させながら投与し、肺機能検査が実施された。二人を除くすべての小児で様々な物質に対するアレルギーの病歴があったが、皮膚プリックテストでピロ亜硫酸に対するアレルギーを示した者はいなかった。カプセルで試験された場合、最高用量である 200 mg を投与した場合にのみ陽性反応（肺機能の低下）が 4 人の子供で認められた。ピロ亜硫酸カリウムカプセルでの試験に反応しなかった二人の子供はピロ亜硫酸カリウム溶液に対し、それぞれ 50 mg と 100

mg を投与した場合に FEV1 が 20%以上低下する陽性反応を示した。ピロ亜硫酸による試験で全身性の症状（紅潮、ひりひり感、及び/或いは失神）や血圧低下症状を示したものはいなかった。いずれかの試験で陽性反応を示した全ての患者はメタコリンにより重篤から中程度の気管支反応を示した。一方、反応しなかった者はメタコリンに緩和な反応しか示さなかった。

Steinman ら(1993)の報告によると [206]、59 名の慢性喘息の小児(5-13 歳)がランダムに処置群(37 人)と対照群(22 人)に分けられた。亜硫酸過敏症の発症率がステロイド依存性患者 5 人を含む慢性喘息の少女 14 人、少年 23 人（年齢 5-13 歳）で調べられた。二重盲検により、リンゴジュースに溶解した 66 mg のピロ亜硫酸ナトリウム(41 mg の二酸化硫黄に相当)による経口負荷試験が実施された。対照群の 22 人(少女 10 人、少年 12 人)にはリンゴジュースのみが投与された。試験への反応の有無は FEV1 の 10%又は 20%以上の低下を基準に決定された。対照群の 22 人ではいずれも 10%を超える変化は認められなかったが、亜硫酸含有ジュースを摂取した 37 人の小児の内 8 人に 20%以上の FEV1 低下が起こった。この発現率は少年のみ、少女のみ、及びステロイド依存性喘息患者のみの場合でも、ほぼ同じであった。

⑤まとめ

１）JECFA による評価

JECFA による報告(FAS 42 1999) [23]では、亜硫酸による有害作用について、以下のようにまとめている。

食品による有害反応において亜硫酸への過敏症が疑われたヒトで、亜硫酸含有溶液あるいはカプセルの単盲検あるいは二重盲検経口負荷試験により確認された事例が多くある。慢性喘息患者においては、呼吸器系の応答が現れる事例が多いが、喘息でない人において呼吸器系症状以外の有害アレルギー性応答が現れた事例も多く報告されている。これらの内の何人かは慢性のアレルギー状態にあった患者である。それらの応答は U.S. FDA の有害反応モニタリングシステムに記載されている自己申告の症状と同様である。遊離及び結合型亜硫酸による有害反応にアレルギーが関与しているとする証拠が多くの事例報告がある。皮膚プリックテストのみが実施され、更なる試験が実施されなかった事例ではアレルギー反応を除外することはできない。亜硫酸処理した様々な食品による試験によっても陽性反応が得られた。二重盲検試験においては、亜硫酸処理したレタスが最も一貫して応答を誘発した。亜硫酸処理したレタス中の亜硫酸は、主に遊離型の亜硫酸として存在するとみなされている。亜硫酸の摂取が特発性の有害反応を起こす機構は確立していないが、摂取された亜硫酸の有害作用が副交感神経系の受容体への一酸化窒素の作用により仲介されているという証拠がいくらかある。

亜硫酸過敏症の発症率はステロイド依存性及び非依存性喘息の成人及び小児で明らかにされた。成人ステロイド依存性喘息患者における発症率は 4-8%であり、非依存性患者では1%より低いと思われる。全ての成人喘息患者における発症率は4%であると推定されている。小児喘息患者にける発症率はより高く、ステロイド依存性及び非依存性喘息の小児における二重盲検経口負荷試験の結果によれば、おおよそ 20-30%である。

2）EFSA による評価

EFSA の評価パネル(2016) [27]は以下のようにまとめている。

☒IgE 試験は通常陰性であり、反応が免疫系を介したものでは無いことを意味している。
☒亜硫酸が食品添加物として使用された場合の過敏性応答の多くは不耐性反応である。
☒亜硫酸に対する反応はアトピー性の背景のあるヒト（主に喘息患者）においては、より頻繁に発現する。おそらく、特殊な遺伝的な背景により様々な組織・臓器（肺、皮膚）に症状を起こしうる。
☒亜硫酸ばく露は動物でのアレルギーモデルや喘息患者において過敏症の発生数、症状、および重篤度の増加をもたらしうる。
☒亜硫酸に対する過敏性に、亜硫酸酸化酵素の部分的な欠損が関与している可能性については実証されていない。

3）指定要請物質の対象食品からアレルゲン性のまとめ

亜硫酸水素アンモニウムは製造過程で添加した場合、分解によりアンモニウムイオン、また、二酸化硫黄（SO_2）が生成される [1]。このことから本概要書では毒性試験に関してアンモニウムイオンと二酸化硫黄を含む知見を考察する。

二酸化硫黄に関しては上記に上げたように多くの知見がある。これらは試験方法や被験者の性質が多岐にわたり、結果についても差異がある。本概要書で指定要請する亜硫酸水素アンモニウムはその対象食品をぶどう酒、使用用途を発酵助成剤、保存料、酸化防止剤としている。我が国において飲酒は 20 歳以上に定められていることから、小児におけるアレルゲン性に関する知見は参考として記載したが、本項では除外して考えた。成人に関する知見は JECFA のまとめでは成人ステロイド依存性喘息患者における亜硫酸過敏症の発症率は 4-8%であり、非依存性患者では 1%より低いと思われる。全ての成人喘息患者における発症率は4%であると推定されている(FAS21, 1987) [21]。しかし、ぶどう酒の使用に関する知見では Vally らの 2007 年のワイン過敏性喘息患者による研究において、著者は調査した患者では”ワインにより誘起された喘息応答に亜硫酸添加物が主たる役割を果たしている”という考えを、本研究は支持せず、ワイン誘起喘息応答の発生原因は複雑で患者により異なるものと思われる、と結論している [183]。Vally と Thompson (2001)の報告でも同様に結論されている [195]。

さらに、我が国において二酸化硫黄及び亜硫酸塩として、亜硫酸ナトリウム、次亜硫酸ナトリウム、二酸化硫黄、ピロ亜硫酸カリウム及びピロ亜硫酸ナトリウムが指定添加物として認可されており、漂白、酸化防止、変色防止などを目的として、果実酒、天然果汁などに使用されているがこれまでにこれらの指定添加物についてアレルゲン性が報告されていない。

以上のことから亜硫酸水素アンモニウムは本概要書で提案する使用基準内においてアレルゲン性の懸念はないと考える。

表 15.　JECFA(FAS 42 1999)による報告 [23]参照文献一覧

著者	年次	表題	掲載誌	文献番号
Acosta et al.	1989	Sulfite sensitivity: Relationship between sulfite plasma levels and bronchospasm: case report.	Ann. Allergy, 62, 402-405.	[185]
Akanji et al.	1993	Effect of chronic consumption of metabisulphite on the intergrity of the rat kidney cellular system.	Toxicology, 81, 173-179.	－
Belchi-Hernandez et al.	1993	Sulfite-induced urticaria.	Ann. Allergy, 71, 230-232.	[189]
Boner et al.	1990	Metabisulfite oral challenge: Incidence of adverse responses in chronic childhood asthma and its relationship with bronchial hyperactivity.	Allergy Clin. Immunol., 85, 479-483.	[205]
Botey et al.	1987	Sulfites and skin pathology in children.	Immunopathol., 15, 365-367.	[169]
Bush et al.	1986	Prevalence of sensitiviy to sulfiting agents in asthmatic patients.	Am. J. Med., 81, 816-820.	[198]
Ema et al.	1985	Effect of potassium metabisulfite on pregnant rats and their offspring.	J. Food Hyg. Soc. Jpn, 26, 454-459.	[125]
Frick et al.	1991	Oral sulfite sensitivity and provocative challenge in a 2 year old.	J. Asthma, 28, 221-224.	[188]
Friedman et al.	1987	Prevalence of positive metabisulfite challenges in children with asthma.	Pediatr. Asthma Aller. Immunol., 1, 53-59.	[203]
Gall et al.	1996	Intolerance to sodium metabisulfite in beer.	Allergy, 51, 516-517.	[192]
Gastaminza et al.	1995	Pickled onion-induced asthma: A model of sulfite-sensitive asthma?	Clin. Exp. Allergy, 25, 698-703.	[182]
Harvey et al.	1995	Reaction on nitric oxide and its derivatives with sulfites: A possible role in sulfite toxicity.	Biochim. Biophys. Acta, 1267, 41-44.	[118]

Howland et al.	1989	Sulfite-treated lettuce challenges in sulfite-sensitive subjects with asthma.	J. Allergy Clin. Immunol., 83, 1079-1082.	−
Hui et al.	1989	Comparative subchronic oral toxicity of sulphite and acetaldehyde hydroxysulphonate in rats.	Food Chem. Toxicol., 27, 349-359.	−
Itami et al.	1989	Evaluation of teratogenic potential of sodium sulfite in rats.	Drug Chem. Toxicol., 12, 123-135.	[126]
Leung et al.	1985	Glutathione S-sulfonate, a sulfur dioxide metabolite, as a competitive inhibitor of glutathione S-transferase, and its reduction by glutathione reductase.	Toxicol. Appl. harmacol., 77, 388-394.	[110]
Meng et al.	1992	Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by sodium bisulfite.	Mutat. Res., 298, 63-69.	[149]
Park et al.	1996	Localized periorbital edema as a clinical manifestation of sulfite sensitivity.	J. Korean Med. Sci., 11, 356-357.	[193]
Prieto et al.	1988	Oral challenge test with sodium metabisulfite in steroid-dependent asthmatic patients.	Allergol. Immunopathol., 16,393-396.	[199]
Rodriguez-Vieytes et al.	1994	Effect of sulfite intake on intestinal enzyme activity in rats.	Gastroenterol. Clin. Biol., 18, 306-309.	[111]
Sanz et al.	1992	Intolerance to sodium metabisulfite in children with steroid-dependent asthma.	J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 2, 36-38.	−
Selner et al.	1987	Skin reactivity to sulfited foods in a sulfite-sensitive asthmatic.	J. Allergy Clin. Immunol., 79, 241.	−
Simon	1994	Oral challenges to detect aspirin and sulfite sensitivity in asthma.	Allerg. Immunol., 26, 216-218.	−

Simon et al.	1986	IgE mediated sulfite sensitive asthma.	J. Allergy Clin. Immunol., 77, 157.	－
Sokol et al.	1990	Nasal congestion, urticaria, and angioedema caused by an IgE-mediated reaction to sodium metabisulfite.	Ann. Allergy, 65, 233-238.	[187]
Sprenger et al.	1989	Studies of neutrophil chemotoactic factor of anaphylaxis in metabisulfite sensitivity.	Ann. Allergy, 62, 117-121.	[186]
Steinman et al.	1993	Sulphur dioxide sensitivity in South African asthmatic children.	S. Afr. Med. J., 83, 387-390.	[206]
Sun et al.	1989	The metabolism of sulfite in liver: Stimulation of sulfate conjugation and effects on paracetamol and allyl alcohol toxicity.	Pharmacol., 38, 4299-4305.	[86]
Takahashi et al.	1986	Effects of ethanol, potassium metabisulfite, formaldehyde and hydrogen peroxide on gastric carcinogenesis in rats after initiation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.	Jpn. J. Cancer Res. (Gann), 77, 118-124.	－
Taylor et al.	1988	Sensitivity to sulfited foods among sulfite-sensitive subjects with asthma.	J. Allergy Clin. Immunol., 81, 1159-1167.	[181]
Timberlake et al.	1992	Precipitation of asthma attacks in Melanesian adults by sodium metabisulphite.	PNG Med. J., 35, 186-190.	－
Tollefson	1988	Monitoring adverse reactions to food additives in the US Food and Drug Administration.	Regul. Toxicol. Pharmacol., 8,438-446.	[209]
Towns & Mellis	1984	Role of acetyl salicylic acid and sodium metabisulfite in chronic childhood asthma.	Pediatrics, 73, 631-636.	[202]
Tsevat et al.	1987	Fatal asthma after ingestion of sulfite-containing wine.	Ann. Intern. Med., 102, 263.	[208]
Van Bever et al.	1989	Food and food additives in severe atopic dermatitis.	Allergy, 44, 588-594.	[204]

Vena et al.	1994	Sulfite contact allergy.	Contact Dermatitis, 31, 172-175.	[200]
Wüthrich	1993	Adverse reactions to food addtives.	Ann.Allergy, 71, 379-384.	[190]
Wüthrich et al.	1993	Disulfite-induced acute intermittent urticaria with vasculitis.	Dermatology, 187, 290-292.	[191]
Yang et al.	1986	Positive skin tests and Prausnitz-Küstner reactions in metabisulfite-sensitive subjects.	J. Allergy Clin. Immunol., 78, 443-449.	[184]

表 16.　EFSA(2016)評価パネル [27]参照文献一覧

著者	年次	表題	掲載誌	参考文献
ATSDR	1998	Toxicological Profile for Sulfur Dioxide, December 1998.	Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Available online: http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=253&tid=46.	[59]
Brusick	1987	Implications of treatment-condition-induced genotoxicity for chemical screening and data interpretation.	Mutation Research/Genetic Toxicology 189, 1–6.	－
Carvalho et al.	2011a	Genotoxicity of sodium metabisulphite in mouse tissues evaluated by the comet assay and the micronucleus test.	Mutation Research/Genetic Toxicology 720, 58–61.	[162]
Cohen et al.	1974	Molecular basis of the biological function of molybdenum. Developmental patterns of sulphite oxidase and xanthine oxidase in the rat.	Archives of Biochemistry and Biophysics 164, 440–446.	[90]
Constantin et al.	1994	Alternative Pathways of Sulphite Oxidation in Human Polymorphonuclear Leukocytes.	Pharmacology and Toxicology 74, 136–140.	[94]
Constantin et al.	1996	Age-related differences in the metabolism of sulphite to sulphate and in the identification of sulphur trioxide radical in human polymorphonuclear leukocytes.	Mechanisms of Ageing and Development 88, 95–109.	[95]
De Giovanni-Donnelly	1985	The mutagenicity of sodium bisulfite on base-substitution strains of Salmonella typhimurium.	Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 5, 195–203.	[136]

Ema et al.	1985	Effect of potassium metabisulphite on pregnant rats and their offspring. II. Studies on the fetal toxicity of food additives.	Shokuhin Eiseigaku Zasshi 26, 454– 459.	[125]
Gunnison	1981	Sulphite toxicity: A critical review of in vitro and in vivo data.	Food Cosmet. Toxicol. 19, 667–682.	[64]
Gunnison and Palmes	1976	A model for the metabolism of sulphite in mammals.	Toxicology and Applied Pharmacology 38, 111–126.	[91]
Itami et al.	1989	Evaluation of teratogenic potential of sodium sulfite in rats.	Drug and Chemical Toxicology, 12, 123–135.	[126]
JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)	1987	621. Sulfur dioxide and sulphites. In: Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants.	Prepared by the 30th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additives Series: 21. Available online:http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v21je15.htm	[21]
Johnson and Rajagopalan	1976	Human sulphite oxidase deficiency. Characterization of the molecular defect in a multicomponent system	Journal of Clinical Investigation 58, 551–556	[77]
Johnson et al.	1974	Molecular basis of the biological function of molybdenum	Journal of Biological Chemistry. 249, 5046–5055.	[79]
MacRae and Stich	1979	Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells by the reducing agents bisulphite and ascorbic acid	Toxicology 13, 167–174	[150]
Meng and Zhang	1999	Polymerase chain reactioin-based deletion screening of bisulfite (sulfur dioxide)-enhanced gpt-mutant in CHO-AS52 cells	Mutation Research/Fundamental and	[145]

			Molecular Mechanisms of Mutagenesis 425, 81–85	
Meng and Zhang	2002	Induction effects of sulfur dioxide inhalation on chromosomal aberrations in mouse bone marrow cells	Mutagenesis, 17, 215–217	[128]
Meng and Zhang	2005	DNA damage in mice treated with sulfur dioxide by inhalation	Environmental and Molecular Mutagenesis 46: 150–155	[130]
Meng et al.	2002	Micronuclei induced by sulfur dioxide inhalation in mouse bone marrow cells in vivo	Inhalation Toxicology 14: 303–309	[129]
Meng et al.	2004	DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from varios organs of mice	Mutagenesis, 19, 465–468	[155]
Ough and Were	2005	Sulfur dioxide and sulfites. In: Antimicrobials in Food. Third edition. edited by: Davidson PM, Sofos JN and Branen AL	CRC Taylor & Francis. 143–167	−
Pagano and Zeiger	1987	Conditions affecting the mutagenicity of sodium bisulfite in Salmonella typhimurium	Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 179, 159–166	[137]
Pal and Bhunya	1992	Genotoxic effect of a preservative, sodium meabisulphite as revealed by mammalian invivo bioassays	Cytologia 57, 455–461	[161]
Paz-y-Miño et al.	2002	Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador	Environmental Health Perspectives 110, 1077–1180	−
Popescu and DiPaolo	1988	Chromosome alterations in Syrian hamster cells trnasformed in vitro by sodium bisulfite, a nonclastogenic carcinogen	Cancer reserach, 48, 7246–7251	[147]
Rencüzoğullari et al.	2001	Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulphite, a food preservative	Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 490, 107–112	[159]

Savic et al.	1987	Discomforts and laboratory findings in workers exposed to sulfur dioxide	International Archives of Occupational and Environmental Health 59, 513–518	[98]
Scott et al.	1991	International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9.	Mutation Research 257, 147–205	−
Seeberg et al.	1988	High dose-level effects in mutagenicity assays utilizing mammalian cells in culture	Mutagenesis 3, 213–218	−
Tanaka et al.	1979	Carcinogenicity test of potassium metabisulphite in mice	Ecotoxicology and Environmental Safety 3, 451–453	[121]
Tejnorová	1978	Sulphite oxidase activity in liver and kidney tissue in five laboratory animal species	Toxicology and Applied Pharmacology 44 (2), 251–256	[92]
Til et al.	1972 a	Toxicity of sulphite. II. Short- and longterm feeding studies in pigs	Food and Cosmetics Toxicology 10, 463–473	[120]
Til et al.	1972 b	Toxicity of sulphite. I. Long-term feeding and multigeneration studies in rats	Food and Cosmetics Toxicology 10, 291–310	[119]
Tsutsui and Barrett	1990	Sodium bisulphite induces morphological transformation of cultured Syrian hamster embryo cells but lacks the ability to induce detectable gene mutations, chromosome mutations or DNA damage	Carcinogenesis 11, 1869–1874	[146]
Ueno et al.	2002	Spore rec-assay by dry sheet medium culture plate for bacterial counts	Shokuhin Eiseigaku Zasshi 43, 44–48	−
Uren et al.	2014	Genotoxic effects of sulfur dioxide in human lymphocytes	Toxicology and Industrial Health, 30, 311–315	[127]

Woo et al.	2003	Sulphite oxidase gene expression in human brain and in other human and rat tissues	Biochemical and Biophysical Research Communications, 305, 619–623	[89]
Yavuz-Kocaman et al.	2008	The genotoxic effect of potassium metabisulphite using chromosome aberration, sister chromatid exchange, micronucleus tests in human lymphocytes and chromosome aberration test in bone marrow cells of rats	Environmental and Molecular Mutagenesis 49, 276–282	[134]
Yokoyama et al.	1971	Distribution of 35S in the blood and its excretion in urine in dogs exposed to 35sulfur dioxide	Archives of Environmental Health 22, 389–395	[97]
Ziemann et al.	2010	Genotoxicity testing of sulfur dioxide (SO_2) in a mouse bone marrow micronucleus test complemented with haematological endpoints	Mutation Research/Genetic Toxicology and Enviromental Mutagenisity 697, 38–46	[131]

表 17. JECFA(FAS 42 1999)による報告 [23]及び EFSA(2016)評価パネル [27]において参照されていない文献一覧

著者	年次	表題	掲載誌	参考文献
Johnson and Rajagopalan	1976	Purification and Properties of Sulfite Oxidase from Human Liver	The Journal of Clinical Investigation	[76]
Prenner and Stevens	1976	Anaphylaxis after ingestion of sodium bisulfite	Ann Allergy	[166]
Fisher	1975	Contact dermatitis due to food additives	Cutis	[167]
Schwartz	1983	Sensitivity to ingested metabisulfite; Variations in clinical presentation	J Allergy Clin Immunol	[168]

宮澤ら	2018	ワインに含まれた亜硫酸塩によりアナフィラキシーを生じた１例	臨皮	[170]
Kochen	1973	Sulfur dioxide, a respiratory tract irritant, even if ingested	Pediatrics	[171]
Freedman	1977	Asthma induced by sulfur dioxide, benzoate and tartrazine contained in orange drinks	Clin Allergy	[172]
Baker et al.	1981	Bronchospasm induced by metabisulfite-containing foods and drugs	Med J Aust	[173]
Stevenson and Simon	1981	Sensivity to ingested metabisulfites in asthmatic subjects	J Allergy Clin Immunol	[174]
Asero	2005	Food additive-induced chronic pruritus: further evidence	Clinical and Experimental Dermatology	[175]
Werth	1982	Inhaled metabisulfite sensitivity	J Allerg Clin Immunol	[176]
吉川ら	1990	Sulfite(硫黄化合物)により発作が増強された気管支喘息の１例	日胸疾会誌	[177]
Huang and Fraser	1984	Are sulfite additives really safe	N Engl J Med	[179]
Sonin and Patterson	1985	Metabisulfite challenge in patients with idiopathic anaphylaxis	J Allergy Clin Immunol	[180]
Vally et al.	2007	Changes in bronchial hyperresponsiveness following high- and low-sulphite wine challenges in wine-sensitive asthmatic patients	Clinical And Experimental Allergy	[183]
Di Lorenzo et al.	2002	Urinary metabolites of histamine and leukotrienes before and after placebocontrolled challenge with ASA and food additives in chronic urticaria patients	Allergy	[194]
Vally and Thompson	2001	Role of sulfite additives in wine induced asthma: single dose and cumulative dose studies	Thorax	[195]
Buckley et al.	1985	The prevalence and degree of sensitivity to ingested sulfites	J Allergy Clin Immunol	[196]
Simon et al.	1892	The incidence of ingested metabisulfite sensitivity in an asthmatic population	J Allergy Clin Immunol	[197]

García-Gavín et al.	2012	Allergic contact dermatitis caused by sodium metabisulphite: a challenging allergen: a case series and literature review	Contact Dermatitis	[201]
Nair and Elmore	2003	Final report on the safety assessment of sodium sulfite, potassium sulfite, ammonium sulfite, sodium bisulfite, ammonium bisulfite, sodium metabisulfite and potassium metabisulfite	Int J Toxicol	[210]
Linneberg et al.	2008	Prevalence of selfreported hypersensitivity symptoms following intake of alcoholic drinks	Clinical And Experimental Allergy	[211]
Shih et al.	1977	Sulfite oxidase deficiency: Biochemical and clinical investigations of a hereditary metabolic disorder in sulfur metabolism	N Engl J Med	[216]
Ogier et al.	1982	Double déficit en sulfite et xanthine-oxidase. Cause d'encéphalopathie due à une anomalie héréditaire du métabolisme du molybdène [Double deficiency of sulfite and xanthine oxidase causing encephalopathy and due to a hereditary anomaly in the metabolism o	Ann Intern Med(Paris)	[217]
Ranguelova et al.	2012	Formation of reactive sulphite-derived free radicals by the activation of human neutrophils : an ESR study	Free Radical Biology and Medicine	[218]
Vally et al.	2009	Clinical effects of sulphite additives	Clinical And Experimental Allergy	[219]

（８）一般薬理試験

PubMed 及び Toxline で検索したが亜硫酸水素アンモニウムの一般薬理試験に関する知見を見いだすことは出来なかった [46] [47]。

（９）その他の試験

知見はない。

・表 18.亜硫酸塩類等の毒性試験提出状況 [18]（○：報告有、×：報告無）

試験名	亜硫酸水素アンモニウム	亜硫酸ナトリウム	ピロ亜硫酸ナトリウム	ピロ亜硫酸カリウム	亜硫酸水素ナトリウム
(1)1)急性毒性試験 (表 8 参照)	×	○ [27]	○ [27]	○ [27]	○ [27]
(1)2)亜急性毒性試験/慢性毒性試験	×	×	○ [119][120]	×	×
(2)発がん性試験	×	×	×	○ [121]	×
(3)1 年間反復投与毒性試験/発がん性併合試験	×	×	×	×	×
(4)生殖毒性試験	×	×	○ [119]	×	×
(5)出生前発生毒性試験	×	○ [126]	×	○ [125]	×
(6)遺伝毒性試験	×	○ [132][145] [164][165]	○ [136][156] [157][158]	○ [132]	○ [135][136][138][139] [140][141][142][143]
(7)アレルゲン性試験 (表 15,16,17 参照)	×	○	○	○	○
(8)一般薬理試験	×	×	×	×	×
(9)その他の試験	×	×	×	×	×

上記の表 15、16、17、18 は、本項で記載のある亜硫酸塩類の毒性試験ごとの報告の有無を取りまとめたものである。JECFA、EFSA による報告を参照したところ、亜硫酸塩類の毒性に関して、非常に広範な報告がなされていた。そこで、毒性を適切に評価する観点から、試験条件が明

[18] 参考文献 125、156 は JECFA（1999）[23]で引用されている。参考文献 119、120、121、136、145 は EFSA（2016） [27]で引用されている。他の参考文献は JECFA（1999）[23]、EFSA （2016） [27]で引用されていない。

確化されているもの、用量段階が設定されているもの、平成８年厚生省ガイドラインに則ったもの、NOAEL が設定されているものを主に引用した。

指定等要請者は、亜硫酸水素アンモニウムを被験物質とした毒性試験成績を見出すことは出来なかった [46] [47]。このため亜硫酸水素アンモニウムの分解産物として想定される化学種（アンモニウムイオン、二酸化硫黄）について検討した。

アンモニウムイオンについて指定等要請者はⅢ１（２）や、Ⅲ２の冒頭で述べた通り、食品安全委員会（2017 年）［38］の見解を支持しており、新たな知見もないことから、安全上の懸念はないと判断した。

一方、二酸化硫黄については、亜硫酸水素アンモニウムと類似の亜硫酸塩類で、分解産物として二酸化硫黄を生ずる、亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウム及び亜硫酸水素ナトリウムの毒性試験を参照した。上記類似の亜硫酸塩類の毒性試験結果をみると、特段問題となるような遺伝毒性を発現する可能性は低いと考えられる。また、本概要書で提案する使用基準内において、アレルゲン性の懸念はないと考えた。その他の毒性知見に関しても、二酸化硫黄に換算した NOAEL を設定するのに最高量で設定している。以下、いずれも二酸化硫黄として、亜急性毒性及び慢性毒性試験では NOAEL を 72mg/kg 体重/日、発がん性試験では発がん性なし、生殖毒性試験では NOAEL を 262mg/kg 体重/日、出生前発生毒性試験では NOAEL を母動物においては 560mg/kg 体重/日、胎児においては 80mg/kg 体重/日と判断した。ここで投与期間の長さが最も長かったこと、また、亜硫酸水素アンモニウムについては酒類の一種であるワインの原料に対して用いるため、妊婦や子供が摂取する可能性を除外して考えられることから、亜硫酸水素アンモニウムの NOAEL を二酸化硫黄として 72mg/kg 体重/日とすることとした。これを安全係数 100 で除した二酸化硫黄として 0. 72mg/kg 体重/日を亜硫酸水素アンモニウムの ADI と考えた。また、この値は亜硫酸塩類に対する JECFA の ADI である、二酸化硫黄として 0.7 mg/kg 体重/日に非常に近似している。以上のことから、指定等要請者は亜硫酸水素アンモニウムの ADI 設定にあたり二酸化硫黄として 0.7 mg/kg 体重/日を適用して、今後の安全性に関する考察を行うこととした。

3．ヒトにおける知見

① 亜硫酸水素アンモニウム

PubMed 及び Toxline で検索したが、亜硫酸水素アンモニウムのヒトに関する知見を見出すことは出来なかった [46] [47]。

②二酸化硫黄及び亜硫酸塩類

（1）ヒトへの作用

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類のヒトへの影響に関する JECFA の報告 [21] [23] (FAS 21 1987 及び FAS 42 1999)、EFSA の報告(2016) [27]、並びに PubMed で検索した文献を基に、主に原報を入手できた論文等をもとに、二酸化硫黄あるいは亜硫酸塩類によるばく露に関連したヒトへの影響のうち、先のアレルゲン性試験で報告した以外の知見を以下のようにまとめた。

1）食品による特発性亜硫酸感受性

Tsevat ら（1987）の報告によると [208]、致死的なアナフィラキシー反応が慢性のステロイド依存性喘息の男性(33 歳)で報告された。患者は 1982 年に乾燥杏子の摂取による急性の喘息発作の既往歴があった。1983 年にはレストランでサラダを食した直後にめまいや悪心、呼吸困難を起こした。その後、彼は亜硫酸を含む食品を避けていた。しかし、1985 年に白ワインを数口飲んだだけでアナフィラキシー反応を起こし、死亡した。なお、そのワインには 92 ppm の亜硫酸が含まれていた。

Tollefson ら（1988）の報告によると [209]、米国の食品安全と栄養センターの有害反応モニターシステム（Adverse Reaction Monitoring System at the Center for Food Safety and Applied Nutrition of the US FDA）に報告された亜硫酸による有害反応の分析の結果、最も頻繁に食品関連有害反応を起こす品目はサラダバー提供品 280 件、サラダバー以外での新鮮果実及び野菜 143 件、ワイン 111 件、および海産食物 98 件であった。最も頻繁に報告されている症状は喘息あるいはアレルギー反応に関連した症状（呼吸困難 314 件、喘鳴 50 件、嚥下困難 64 件、蕁麻疹 64 件、痒み 61 件、局所腫脹 58 件）および消化管不調（下痢 112 件、嘔吐及び吐気 112 件、腹部痛および痙攣 88 件）であった。報告された患者の多く(74%)は女性であった。年齢を報告している消費者のうち、66%が 20～59 歳で、27%が 60 歳以上であった。報告された重篤な反応事例の 23.2%に呼吸困難が報告された。発現率はわずかであったが、亜硫酸ばく露後の死亡事例の報告もあった。

Nair ら（2003）の報告によると [210]、FDA は亜硫酸処理した食品摂取に原因があるとされた 767 例の有害反応を分析した。ほとんどの反応はステロイド依存性喘息患者に発生しており、多くに呼吸困難と呼吸不全、あるいはアナフィラキシーが起きていた。FDA は亜硫酸摂取による死亡と申し立てられている 22 例を分析し、重篤な喘息患者の死亡 9 例は多分亜硫酸摂取によるものであり、喘息患者の死亡 5 例は亜硫酸摂取による可能性があるとした

（年齢・性別不明)。喘息患者の約 2〜5%が亜硫酸塩感受性と推定され、亜硫酸塩に敏感な人のほとんどは喘息である。

Tollefson ら（1988）の報告によると [209]、FDA は、亜硫酸塩化合物が公衆衛生上有害であるとの証拠が蓄積した結果として、1986 年の 8 月にジャガイモとブドウを除き、新鮮な果実や野菜への亜硫酸塩化合物の使用を禁止した。

Linneberg ら（2008）の報告によると [211]、コペンハーゲンにおけるアルコールにより誘起される上気道､下部気道及び皮膚の過敏症症状についての自己申告による大規模調査(18〜69 歳の無作為サンプル（n=6000)）において、分析対象とした 4091 人（男性 1871 人、女性 2220 人）の回答者のうち、アルコール摂取後、鼻 7.6%、下気道 3.2%、皮膚 7.2%に症状の申告があった。鼻と皮膚からの症状は、男性よりも女性に有意に多く見られ、鼻炎の症状は 40〜60 歳の間で有病率がピークに達した。いずれの症状もアレルギー性鼻炎および喘息と有意に関連があった。全てのアルコール飲料が誘起因子とされたが、最も一般的なものは赤ワインであり、亜硫酸の添加はワインにより誘起される喘息様反応に関係していた。

Vally ら（2012）の報告によると [212]、亜硫酸塩は食品および製薬業界で防腐剤および抗酸化添加剤として広く使用されている。亜硫酸に対するばく露は、主に亜硫酸塩を含む食品添加物を含む食品や飲料の消費によるが、化粧品や医薬品、労働環境を通じても起こりうる。亜硫酸塩を含む化粧品には、髪の色やブリーチ、クリーム、香水が含まれる。亜硫酸塩を含む薬には、点眼薬、局所薬、アドレナリン、フェニレフリン、コルチコステロイド、局所麻酔薬などの非経口薬がある。 亜硫酸塩はまた、写真および繊維産業を含む多くの産業用途を有しており、労働環境を通じての暴露も起こりうる。

2）吸入についての報告

Koenig ら（1982）の報告によると [213]、健康な青少年（12 歳から 14 歳の 3 人の女性と 5 人の男性）を中強度の運動時に 1 ppm の SO_2 に暴露すると呼吸器系の反応が出るが、喘息者では健康者よりも 1 ppm の SO_2 に対する呼吸器系の反応が強く出る上、SO_2 暴露に対し、健康な青少年は主観的反応を報告しなかったが、喘息者は息切れと喘鳴を報告した。

また、Koenig ら（1982 年）以外にも、Schachter ら（1984 年）が SO_2 暴曝露の急性呼吸器影響について、喘息患者（男性 5 名、女性 5 名、平均年齢 27.3 歳）と健康な被験者（男性 4 名、女性 6 名、平均年齢 26.1 歳）を用いた二重盲検試験結果を報告している。被験者はチャンバー内で、0、0.25、0.50、0.75、および 1 ppm に 40 分間暴露され、最初の 10 分間、サイクロエルゴメーターで運動（450 kpm / min）させた。これによると、喘息患者に運動負荷すると 1 または 0.75 ppm の SO_2 吸入でも大きな変化が呼吸器系機能に現れると報告されている [214]。

3）食品についての報告

ワインには一般的に亜硫酸塩が比較的高濃度で含まれ、ビール製造においてホップに亜硫酸を添加するとビール中に低濃度の亜硫酸が残留することにつながる可能性がある。Gall ら（1996）の報告によると［192]、25 歳の白人男性において、$SO_2$3-4 mg/L を含むビールを 100 mL 摂取しただけでも顔面にかゆみを伴う紅潮や浮腫のような I 型過敏症症状が観察された。また、アレルギー検査の結果、この症状は 10mg のピロ亜硫酸ナトリウムによっても再現できた。

4． 亜硫酸の相互作用

JECFA(1987)や JECFA（1999）では亜硫酸が食品中のその他の物質に及ぼす作用についても示唆されている [21] [23]。

ア．チアミンに及ぼす影響

(1) Morgan ら（1935）の報告によると、イチジクに亜硫酸処理を行いドライフルーツにするとチアミン（ビタミン B1）が処理前の 33～43%と減少する[99]。

Williams ら（1935）の報告によると、チアミン（ビタミン B1）100g を十分な亜硫酸を含む 15 ccの亜硫酸ナトリウム水溶液に溶解し､室温で 1 晩置いた後に結晶残留物を解析した結果、チアミンの 97%が分解していることが示された[100]。

Hotzel（1962）の報告によると、ラット（雌雄匹数不明）に生存に必要な最低限のビタミン B 群を含む半合成飼料を 1 回与え、その後、各群にビタミン B 群を 1 回目より多い郡毎に異なる量で 154 日間投与した。同時毎日に SO_2（80 もしくは 180 mg/kg 体重/日）いずれか 1 方を与え、34 グループの実験を行った。その結果、SO_2によってその他のビタミン群には影響を与えないがチアミン（ビタミン B1）が低減することが示された[101]。

なお、これらの報告を受けて JECFA（1987）では以下のように記載している。

亜硫酸塩処理により、食品のチアミン含量が減少することは以前から知られている。飲料中の SO_2 摂取は、他の食物中のチアミン含量を低下させることが示唆されている [21]。

以上の報告を受けて指定等要請者は JECFA（1987）で考察されたように亜硫酸塩処理により、食品のチアミン含量が減少することは示されたと考えられるが Hotzel（1962）の報告は実験の詳細が不明であるので判断ができないため、食物中の SO_2 摂取は、他の食物中のチアミン含量を低下させるという考察はこの報告からは断言できないと考えた。

(2) Causeret ら（1965）の報告によると、Wister ラット（雌雄不明成体 6 匹）に 40 μg チアミン含有食を連日摂取させ、週間隔で、追加として 160 μg のチアミンを摂取させ、その後 2 日間にわたってチアミンの尿中排泄を測定した。その結果、亜流戦投与後翌日にチアミンの尿中に排出量が約 1／3 の量まで減少した[102]。

なお、これらの報告を受けて JECFA（1987）では以下のように記載している。

ラット 6 匹に 40 μg チアミン含有食を連日摂取させた。週間隔で、追加として 160 μg のチアミンを摂取させ、その後 2 日間にわたってチアミンの尿中排泄を測定した。チアミンの尿中排泄が一定になった時点で、160 μg チアミンを 120 ㎎メタ亜硫酸カリウムと共に摂取させた。SO_2 の添加は、チアミンの尿中排泄を大幅に減少させ、特に両者を一緒に与えた日には、顕著であった [21]。

以上の報告を受けて指定等要請者は JECFA（1987）の考察と同様に考えた。

(3) Hotzel ら（1969）の報告によると、12 人の健康なヒト（女性 6 人、男性 6 人）に通常食事の事前観察期間が終了した後、50 日のチアミン不足食事（120 mcg チアミン/1000 カロリ

ー）を摂取してもらった。チアミン不足食事を開始してから 15 日後から 25 日間、亜硫酸を 400 ㎎/ヒト/日を摂取してもらい、その後 10 日間実験後観察期間を設けた。臨床化学検査を事前期間の終了時、主要期間の中間および終了時ならびに事後期間の終了時に行った。血清中の GOT、GPT、LDH、α-HBDH、アルカリホスファターゼ、血清電気泳動、チモール混濁試験、ヘマトクリット値および赤血球数。その場合、酵素活性、ヘモグロビン含有量、赤血球数またはヘマトクリット値の顕著な変化は見られなかった。運動神経伝導速度の測定を伴う神経生理学的検査を投与開始時および事後期間の終了後 3 日以内に行った。その場合、運動神経伝導速度の延長が生じることはなく、同時に実施された神経学的検査でも同様に、反射挙動における変化または感度の障害は見られなかった [103]。

なお、これらの報告を受けて JECFA（1987）では以下のように記載している。

チアミン欠乏食による一群の研究で、亜硫酸を 400 ㎎/ヒト/日を摂取させた。この食事により 50 日間でビタミン欠乏症状を呈した。別の実験では、ワインやブドウジュースに溶かした亜硫酸を 15 日目から 40 日目まで摂取させた。血中チアミン濃度の測定、尿中排泄、あるいはチアミン依存性酵素活性の測定からみて、チアミン状態に対する何の影響も認められなかった。臨床的、神経生理学的及び生化学的観察からは、亜硫酸による有害影響の兆候は認められなかった [21]。

以上の報告を受けて指定等要請者は JECFA（1987）の考察と同様に考えた。

(4) Guunison ら(1981)の報告によると、亜硫酸酸化酵素活性の正常レベルを有する雌 Winster ラット各群 3 匹(200-225g) にピロ亜硫酸ナトリウム（0， 6％）を含み、6%にはチアミン 50ppm（ピロ亜硫酸ナトリウム 0％には投与しない）を混ぜた食事を 21 日間摂取させた後、肝チアミン濃度を測定した。その結果、肝臓のチアミン濃度は 0%では 10.1±0.7μg/ g 体重、6％では 8.8±1.2μg/ g 体重で有意差は確認できなかった。この結果から筆者らは極度の全身性 SO_3^{2-}暴露の条件下であっても、ラットのチアミンの全身性破壊の証拠はないと結論付けている[80]。

なお、これらの報告を受けて JECFA（1987）では以下のように記載している。

亜硫酸による in vivo でのチアミンの破壊は、チアミンの補給を枯渇するのに十分であるという報告はないし、亜硫酸水素による毒性症状がチアミン欠乏と一致しているということも示されていない [21]。

以上の報告を受けて指定等要請者は JECFA（1987）の考察と同様に考えた。

その他に JECFA（1987）では以下のように記載がある。

Jaulmes（1965）の報告によると、400 ppm の SO_2 を含むワインでは、チアミンの 50%が 1 週間で分解された。しかし、48 時間でチアミンの損失は観察されなかったことから、ワインでの推奨レベルの使用から生じる少量の SO_2 は、比較的短い消化期間中に食事中のチアミンを不活性化する可能性はない。

Sharratt（1970）の報告によると、飲料中の SO_2 が残りの食事中のチアミンのレベルを低下させないという見解がある。

これら記載については原著論文を確認することができなかったため記載していない。

イ．シアノコバラミンに及ぼす影響

Guunison ら(1981)の報告によると、亜硫酸酸化酵素活性の正常レベルを有する雌 Winster ラット各群 8～15 匹(200-225g) にピロ亜硫酸ナトリウム（0，1、2、6％）を含み、チアミン 50ppm（ピロ亜硫酸ナトリウム 0％には投与しない）を混ぜた食事を 21 日間摂取させた後、血液中のヘモグロビン（Hb）とヘマトクリット（Hc）を測定した。その結果、Hb/Hc の値が 6％投与群では有意に減少し重篤な貧血が確認された。Guunison らはこの重篤な貧血は亜硫酸によるシアノコバラミンの分解が原因ではないかと考察している [80]。

なお、これらの報告を受けて JECFA（1987）では以下のように記載している。

ラットに 6％ピロ亜硫酸ナトリウム含有食を 21 日間摂取させたところ、重篤な貧血になった。食事中あるいは消化管中の高濃度の亜硫酸によるシアノコバラミンの破壊が、貧血発症機構である可能性があると考えられた [21]。

以上の報告を受けて指定等要請者は Guunison ら(1981)と JECFA（1987）の考察は可能性として考えられるが実際に 6％のピロ亜硫酸ナトリウムを投与したラットでシアノコバラミンを測定しているデータはないため推測の域を出ないと考えた。

その他に JECFA（1987）では以下のように記載がある。

Jacobsen ら（1984）の報告　によると、シアノコバラミンは、喘息患者における亜硫酸塩誘発気管支収縮の効果的な遮断薬であると主張されているが、メカニズムは説明されていない。

この記載については原著論文を確認することができなかったため記載していない。

ウ．酵素類に及ぼす影響

(1) Pfleiderer ら(1956)の報告によると、心筋由来の乳酸脱水素酵素とリンゴ酸脱水素酵素（試験溶液は、酵素のターンオーバー数に応じて 1 mL 当たり 0.1～3 μg のタンパク質）に、試験溶液 1 mL 当たり 2.5 μg の亜硫酸塩を加えると 50%の活性阻害が確認された。その他実験に使用されたグルタミン酸デヒドロゲナーゼおよび α-グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、グリセリンアセトアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（PGDH）は、亜硫酸感受性が低い。肝臓 ADH は亜硫酸塩の感受性の低いが 1 mL 当たり 50 μg の亜硫酸塩を用いれば 70%の阻害が得られる。このことから亜硫酸塩に対して高感度の酵素は乳酸脱水素酵素とリンゴ酸脱水素酵素である[104]。

なお、これらの報告を受けて JECFA（1987）では以下のように記載している。

亜硫酸は、数種の脱水素酵素（例えば乳酸脱水素酵素(心臓)とリンゴ酸脱水素酵素）の強力な阻害物質であり、その 50%阻害は約 10-5M の亜硫酸で生じる [21]。

以上の報告を受けて指定等要請者は JECFA（1987）の考察と同様に考えた。

(2) Muller と Massey （1971)の報告によると、フラビンたんぱく質中のフラビンに亜硫酸塩を添加すると複合体を形成することが分かった。元素分析やスペクトル分析によって、フラビンはN5 原子のスルホン化を起こし亜硫酸と結合する。フラビン、亜硫酸の比率は同量である。亜硫酸は数種のフラビンタンパク質の酸化酵素(例、D- 及び L-アミノ酸酸化酵素、オキシニトリダーゼ、乳酸酸化酵素及びグリコール酸酸化酵素)と安定な付加物を形成することが示され。その解離定数は、10-3 から 10-7M である。フラビンたんぱく質の脱水素酵素類は、亜硫酸 20mM の濃度では付加物を形成しないことも示された[105]。

なお、これらの報告を受けて JECFA（1987）では以下のように記載している。フラビンたんぱく質中のフラビンは、亜硫酸と化学付加物を形成し、水素を受け入れる活性部位である N5 原子のスルホン化を起こす。このことは、多分脱水素酵素阻害の機構である。数種のフラビンタンパク質の酸化酵素(例、D- 及び L-アミノ酸酸化酵素、オキシニトリダーゼ、乳酸酸化酵素及びグリコール酸酸化酵素)と安定な付加物を形成する。その解離定数は、10-3 から 10-7M である。フラビンたんぱく質の脱水素酵素類は、亜硫酸 20mM の濃度では付加物を形成しない [21]。

以上の報告を受けて指定等要請者は JECFA（1987）の考察と同様に考えた。

(3) Cooperstein の（1963）の報告によると、シトクロム酸化酵素（2～3%調製）に 0.5 mM 亜硫酸塩（亜硫酸ナトリウム）を加えて 4 時間室温でインキュベートすると酵素活性の 37% 阻害された[106]。

Kamogawa と Fukui（1973）の報告によると、２%の可溶性デンプンに 5.7μg ジャガイモ由来 α-グルカンホスホリラーゼを入れる試験液（１mL）に亜硫酸水素ナトリウム水溶液（亜硫酸濃度 0，1，3，5，10，17 mM）を混合した試験液を 30℃でインキュベートすると 17mM でジャガイモ由来 α-グルカンホスホリラーゼの阻害が発生する。さらにウサギの筋肉由来の α-グルカンホスホリラーゼ 7 μg に 1%のグリセロール、15mM システイン、１mM AMP を混合した試験液（１mL）に亜硫酸水素ナトリウム水溶液（亜硫酸濃度 0，10，20，30 mM）を混合した試験液を 30 度でインキュベートすると 10mM 以上で α-グルカンホスホリラーゼの阻害が発生する結果が得られた[107]。

Harkness と Roth（1969)の報告によると、2,3-ジホスフォグリセリン酸ホスファターゼ(0.33 mM）に亜硫酸水素イオン（0~40mM）加え 37℃で 60 分インキュベートすると 2.5 mM で 15 倍、20~30 mM で 37 倍に活性が上昇した [108]。

Roy ら(1976)の報告によると、スルファターゼ A の亜硫酸イオンの阻害定数は 2 μM(EDTA などで金属除去を行うなど予防処置を行うと 0.2μM）と報告されている[109]。

なお、これらの報告を受けて JECFA（1987）では以下のように記載している。

シトクロム酸化酵素は、pH 7 で 0.5 mM 亜硫酸で 37%阻害された。そして α-グルカンホスホリラーゼは、10 から 30mM の亜硫酸で阻害された。亜硫酸はグリコーゲン合成と分解におけるリン酸の競合的阻害物質であり、in vivo でアルカリホスファターゼが阻害された。逆に、

2,3-ジホスフォグリセリン酸ホスファターゼは、2.5 mM の亜硫酸により 15 倍活性が上昇した。亜硫酸は、多くのスルファターゼの強力な阻害物質である [21]。

以上の報告を受けて指定等要請者は JECFA（1987）の考察と同様に考えた。

(4) Leung ら（1985）の報告によると、ラットの肝臓由来細胞、肺由来細胞、ヒトの肺がん由来細胞（A549 Cell）の各グルタチオン S-転移酵素に亜硫酸と酸化型グルタチオンとの反応生成物であるグルチオン S －スルホン酸を処理して活性を測定することで阻害定数を導き出すとラット肝臓由来細胞の細胞質では 14μM、ミクロソームでは 21μM、ラット肺由来細胞の細胞質では 9μM、ミクロソームでは 14μM、ヒトの肺がん由来細胞（A549 Cell）の細胞質では 4μM、ミクロソームでは 60μM の阻害定数が得られた。このことからグルチオン S －スルホン酸はグルタチオン S-転移酵素の強力な競合的阻害物質である事がわかり、グルタチオン経路は亜硫酸の酸化型グルタチオンとの反応による影響を受けやすく、グルタチオン供給を枯渇させる可能性を示唆した[110]。

なお、これらの報告を受けて JECFA（1999）では以下のように記載している。よく知られた亜硫酸と酸化型グルタチオンとの反応生成物であるグルチオン S －スルホン酸とラット肝、肺、およびヒト肺がん由来細胞の各グルタチオン S-転移酵素との研究において、グルチオン S －スルホン酸は、いずれの細胞株においても細胞質及びミクロソームのグルタチオン S-転移酵素の強力な競合的阻害物質であった。グルチオン S －スルホン酸は、次いで酸化型グルタチオンあるいはグルタチオンに還元された。これらの結果は、グルタチオン経路は亜硫酸の酸化型グルタチオンとの反応による影響を受けやすく、グルタチオン供給を枯渇させる [23]。

以上の報告を受けて指定等要請者は JECFA（1999）の考察と同様に考えた。

(5) Rodriguez-Vieytes ら（1994）の報告によると、雌の Wister ラット（体重：70~100 g 、各群 10 匹）にメタ亜硫酸ナトリウム（$Na_2S_2O_5$:0、0.25、2.5%）を 5 週間に混餌投与した。ラットを屠殺する 18 時間前に食餌を除去し、頸椎脱臼により屠殺した。十二指腸の幽門および回盲の接合部が切断し、小腸を取り出しマルターゼ、スクラーゼ、ラクターゼ、及びアルカリホスファターゼの酵素活性をホモジネート画分と刷子縁膜画分で測定した。ホモジネート画分では 2.5% メタ亜硫酸の摂餌で、マルターゼ及びラクターゼの活性がわずかに増加したが、統計的に有意ではなかった。刷毛縁画分における 3 種のジサッカライダーゼ活性は、高用量で統計的に有意に増加した。アルカリホスファターゼ活性は、粗ホモジネート及び高用量を投与したラットの刷子縁画分の両方で有意に増加した。著者らは、炭水化物消化に関与する酵素活性の増加は、それらの分解の減少によるものである可能性を考察した[111]。

なお、これらの報告を受けて JECFA（1999）では以下のように記載している。
メタ重亜硫酸ナトリウムを投与した雌ラットで、いくつかの腸内酵素活性を測定した。 体重 70 ～ 100g の 10 匹の Wister 雌ラットに、各群 0.5 または 2.5% メタ亜硫酸ナトリウムを 5 週間自由に混餌投与した。屠殺後、小腸全体を取り出してホモジナイズした。マルターゼ、スクラーゼ、ラクターゼ、及びアルカリホスファターゼの活性を粗腸ホモジネート及び刷

子縁膜画分でアッセイした。2.5% メタ亜硫酸の摂餌で、ホモジネート中のマルターゼ及びラクターゼの活性がわずかに増加したが、統計的に有意ではなかった。刷毛縁画分における 3 種のジサッカライダーゼ活性は、高用量で統計的に有意に増加した。アルカリホスファターゼ活性は、粗ホモジネート及び高用量を投与したラットの刷子縁画分の両方で有意に増加した。著者らは、炭水化物消化に関与する酵素活性の増加は、それらの分解の減少によるものである可能性を考察した。しかし、アルカリホスファターゼ活性の増加はおそらく酵素濃度の増加に起因するので、これは二糖類の活性の増加の要因でもあり得る [23]。

以上の報告を受けて指定等要請者は JECFA（1999）の考察と同様に考えた。

エ．カルシウムバランスに及ぼす影響

（1) Causeret と Hugot(1960)の報告によると、雄の Wister ラット（合計 83 匹）に精製カゼイン（18%)、落花生油（9%)、澱粉（45%)、ショ糖（24%)、Huhbel 他の塩混合物（2%)、ゼラチン（2%)、水溶性または脂溶性ビタミン（とくにビタミン D は 100g につき 300IU）をベースに脱脂粉乳（カルシウム含量 0.1、0.2、0.35、0.5、0.7%）もしくは炭酸カルシウム（カルシウム含量 0.1、0.2、0.35、0.5、0.7%）添加し、糞尿中のカルシウム排泄量を測定した。その結果 0.2%までは、カルシウム排泄に影響はなかったが食餌中に 0.5 から 0.7%の炭酸カルシウム量があると、糞中カルシウム排泄は増加し、尿中含量は減少することが示された [112]。

Hugot ら（1965）の報告によると、生後 30 日の雄 Wister ラット（体重：60~75 g 各群 8~9 匹合計 49 匹）に炭酸カルシウム：ピロ亜硫酸カリウム［0.5%：0%、0.5%：0.5%（0.29%SO_2 相当)、0.5%：1.0%（0.58%SO_2 相当)、1.0%：0%、1.0%：0.5%、1.0%：1.0%］を 10 日間混餌投与した。3 日間の順応期間の後、毎日尿と糞便を採取した。その結果カルシウムを 0.5%含むエサのラットは、ピロ亜硫酸カリウムの投与でカルシウムの糞便による排泄に目立った変化がないが、尿による排泄には有意な増加が見られた。逆に、カルシウムを 1%含むエサのラットは、亜硫酸塩がカルシウムの糞便による排泄を有意に増加させたが、尿による排泄には影響ない。カルシウム量に関係なく、糞便および尿によるカルシウムの排泄は、ピロ亜硫酸カリウムのエサへの含有量が 0.5%から 1%に推移したとき、有意な変化はない [113]。

なお、これらの報告を受けて JECFA（1987）では以下のように記載している。カルシウムバランスへの関心は、亜硫酸が代謝されて生成する硫酸が、ヒトの尿及び糞中へのカルシウム排泄を増加させることに寄与している可能性から出てきたものである。

食餌中に 0.5 から 0.7%の炭酸カルシウム量があると、糞中カルシウム排泄は増加し、尿中含量は減少した。0.2%までは、カルシウム排泄に影響しなかった。

若年ラットに、0.5 及び 1 %炭酸カルシウムと 0.5 及び 1 %ピロ亜硫酸カリウム（それぞれ 0.29 及び 0.58%SO_2 相当）含有食を摂取させ、糞及び尿中カルシウム排泄を 10 日間測定した。低用量の食事性カルシウムでは、ピロ亜硫酸カリウムは、尿中カルシウム排泄を有意に増加させ、糞中排泄には影響しなかった。高用量の食事性カルシウム量では、逆のことが起こった。両濃

度間のピロ亜硫酸カリウムが及ぼす影響には、特に差異は認められなかった。このことは、亜硫酸を硫酸に変換する生体（容量）能力が飽和されたことによると説明されている［21］。

以上の報告を受けて指定等要請者はJECFA（1987）の考察と同様に考えた。

オ．ビタミンAに及ぼす影響

Causeret ら（1965）の報告によると、Wistar ラット（雌雄各群10~17匹）に、20 ヶ月バランスのとれたエサを与え、飲物として蒸留水もしくは 1.2%のピロ亜硫酸カリウム溶液を与えた。試験終了後肝臓のビタミン A の含有量を測定するとピロ亜硫酸カリウム溶液を飲んでいたラットの肝臓のビタミンAの含有量が雌雄ともに減少していた。さらに、離乳したばかりのWisterラット（雌雄各群4~8匹）に痕跡量のビタミンA含有飼料、飲物として蒸留水もしくは1.2%のピロ亜硫酸カリウム溶液を与え4か月間飼育した。肝臓中ビタミンA含量を各月末に測定した結果、両群とも緩やかに肝ビタミンA含量が減少し、飲料水へのSO_2の添加は、この減少を増強することはなかった［102］。

なお、これらの報告を受けてJECFA（1987）では以下のように記載している。

肝臓中のビタミンA含量を、飲料水中1.2 g /Lのピロ亜硫酸カリウム（SO_2として700 ㎎/L）を投与したラットで測定した。10日後にラットの肝臓中ビタミンA含量がわずかに減少した。別の実験では一群40匹ラット2群を痕跡量のビタミンA含有飼料で4か月間飼育した。1群のラットは、ピロ亜硫酸カリウムを1.2 g/L含有飲料水を与えた。肝臓中ビタミンA含量を各月末に測定した。両群とも、緩やかに肝ビタミン A 含量が減少した。飲料水へのSO_2の添加は、この減少を増強することはなかった［21］。

以上の報告を受けて指定等要請者は飲水へのSO_2の添加による肝臓のビタミン A の含有量への影響は少ないと考える。

カ．脂質に及ぼす影響

(1) Kaplan ら(1975)の報告によると、1.5%ポリソルベート溶液中に懸濁したトウモロコシ油に亜硫酸水素（0.5、1、5、10mM）添加し30分反応させると全ての濃度でトウモロコシ油の酸化を誘発した［114］。

Inouye（1978年）の報告によると、in vivoでは脂質の過酸化が起こるとキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系の効果でO2-が指標となることが知られている。これを利用して、亜硫酸添加による脂質の過酸化への影響を調べた結果、1mM の亜硫酸を添加すると酸化を誘発した［115］。

なお、これらの報告を受けてJECFA（1987）では以下のように記載している。

低濃度の亜硫酸水素（0.5mM）は、1.5%ポリソルベート溶液中に懸濁したトウモロコシ油の酸化を誘発した。同様な影響は、肝ホモジネートでも報告された［21］。

以上の報告を受けて指定等要請者は亜硫酸が脂質の酸化を誘発すると考える。

(2) Akogyeram と Southerland （1980）の報告によると、不飽和膜脂質と亜硫酸（モル比 1：200)を 37℃、pH7.0 で 2 時間インキュベートして薄層クロマトグラフィーを行うとオレイン酸とアラキドン酸はそれぞれ 0.58 と 0.59 の Rf 値で移動したが、亜硫酸水素塩反応脂肪酸は元のままであった。これはホスファチジルエタノールアミンを使用して行われた実験に類似していた。亜硫酸水素塩によってもたらされる特性の変化は、不飽和脂質の二重結合を横切る重亜硫酸塩の元素の添加によるものであることが示唆され、亜硫酸水素塩を含む脂質は無傷の膜構造を形成できない可能性があると考えられる [116]。

なお、これらの報告を受けて JECFA（1987）では以下のように記載している。

不飽和膜脂質を過剰量の亜硫酸水素とインキュベートすると、クロマトグラフ上の挙動の変化を生じ、二重結合へ亜硫酸水素の付加が示唆された。膜脂質のこのような変化は、SO_2 の刺激性作用を説明するものかもしれない [21]。

以上の報告を受けて指定等要請者は JECFA（1987）の考察と同様に考えたが、Akogyeram と Southerland （1980）の報告では詳細な実験データの記載がないため推察の域を出ない。

(3) Haider ら（1981）の報告では、雄の成体モルモット（体重：250~500 g 各群 12 匹）に実験チャンバー内で通常の空気を吸入ばく露した場合と 10 ppm の SO_2 に毎日 1 時間、21 日間吸入ばく露した場合の脳（大脳、小脳、脳幹）の総脂質、リン脂質、コレステロール、遊離脂肪酸、エステル化脂肪酸の含有量を測定した。その結、脳のすべての領域で総脂質及び遊離脂肪酸が減少した。リン脂質とコレステロールは大脳では上昇したが小脳と脳幹では減少、エステル化脂肪酸は小脳では上昇し、大脳と脳幹では減少した。さらに過酸化の速度及びリパーゼ活性を各群 6 匹ずつの 2 グループに分けて測定すると SO_2 をばく露した場合に有意に活性が上昇した [117]。

なお、これらの報告を受けて JECFA（1987）では以下のように記載している。

空気中、10 ppm の SO_2 に、連日 1 時間、21 日間ばく露したモルモットでは、総脂質及び遊離脂肪酸が脳の全領域で減少した。しかし、リン脂質やコレステロールのような他の脂質画分の変化は領域により異なった。過酸化の速度及びリパーゼ活性は、脳の全領域で有意に上昇した [21]。

以上の報告を受けて指定等要請者は Haider ら（1981）の報告と JECFA（1987）が述べているように SO_2 をばく露した場合に脳の総脂質及び遊離脂肪酸が脳の全領域で減少し、過酸化の速度及びリパーゼ活性は上昇するという考えを支持する。

キ．酸化窒素に及ぼす影響

Harvey と Nelsestuen (1995) の報告では、血小板濃縮液 (500000±100000 platelets/μL) にウシトロンビン（2000 U / mg）と共に一酸化窒素（4 μM)、一酸化窒素（4 μM）＋亜硫酸塩（メタ重亜硫酸ナトリウム 30 μM)、一酸化窒素（4 μM）＋亜硫酸塩（メタ重亜硫酸ナトリウム 100 μM)、酸化窒素なしで処理すると亜硫酸塩を加えた場合は濃度依存的に一酸化窒素による血小板凝集の阻害が起こった。さらに血小板濃縮液（500000±100000 platelets/μL）に

ウシトロンビン（20 mU）を処理する前に、S-ニトロソグルタチオン（600 nM)、S-ニトロソグルタチオン（600 nM）＋亜硫酸塩（50 μM)、S-ニトロソグルタチオン（600 nM）＋亜硫酸塩（100 μM)、200 μM の亜硫酸塩と 100 μM の S-ニトロソグルタチオンを含む溶液で 15 分間プレインキュベートした S-ニトロソグルタチオン（600 nM)、亜硫酸塩（100 μM)、添加物なしの 6 つの条件で血小板凝集を確認した。その結果、亜硫酸濃度依存的に血小板凝集の阻害がおこり、S-ニトロソグルタチオンの亜硫酸塩との 15 分間の事前インキュベーションにより、S-ニトロソグルタチオンの有効性がほぼ消滅した[118]。

なお、これらの報告を受けて JECFA（1999）では以下のように記載している。

亜硫酸塩の摂取に起因する気管支収縮を含む有害作用が副交感神経経路の一部として、酸化窒素に対する作用によって介されている可能性が、一連の in vitro 実験で試験された。亜硫酸塩は、溶液中で一酸化窒素及び酸化窒素の生物学的担体（S-ニトロシル化ウシ血清アルブミン及び S-ニトロソグルタチオン）と反応し、血小板凝集の阻害のような生物学的過程における酸化窒素の影響を妨げることを示した。結果は、亜硫酸塩が生理学的に現実的な濃度で酸化窒素の生物学的効果を妨げることを示唆した [23]。

以上の報告を受けて指定等要請者は JECFA（1999）の考察と同様に考えた。

5.　一日摂取量の推計等

（1）背景

毒性試験結果を受けて、亜硫酸水素アンモニウム水の ADI については二酸化硫黄として 0.7mg/kg 体重/日を適応することとした。今回申請している亜硫酸水素アンモニウム水は、使用基準案として亜硫酸水素アンモニウムとしてぶどう酒にあっては 1 L につき 0.2g 以下としている（使用基準の項参照)。実際には亜硫酸水素アンモニウム水はワインの製造工程で用いられる。発酵前あるいは発酵中の果汁やマストに添加された亜硫酸水素アンモニウム水は、二酸化硫黄及びアンモニウムイオン（NH_4^+）に解離し、二酸化硫黄は水中で SO_2 として存在するほか、水と反応して pH の影響を受けて HSO_3^-及び SO_3^{2-}が生じる。亜硫酸水素アンモニウム水が使用基準案で示した最大量である、0.2g/L で使用される場合、二酸化硫黄として 129 mg/L≒129mg/kg[19]((64.06/99.11) [3]×200 =129.27)、アンモニアとして 34.4 mg/L≒34.4mg/kg((17.03/99.11) [3]×200＝34.37)　が生じると計算される。

このことをふまえて、食品添加物生産量調査やマーケットバスケット調査を踏まえて我が国における亜硫酸やアンモニアの摂取量を推計した上で亜硫酸水素アンモニウムの対象食品からの摂取量を検討する。

（2）現状の亜硫酸、アンモニウム摂取量

（a）亜硫酸

食品添加物生産量調査

我が国では、二酸化硫黄及び亜硫酸塩として、亜硫酸ナトリウム、次亜硫酸ナトリウム、二酸化硫黄、ピロ亜硫酸カリウム及びピロ亜硫酸ナトリウムが指定添加物として認可されており、漂白、酸化防止、変色防止などを目的として、かんぴょう、乾燥果実、コンニャク粉、果実酒、糖蜜、天然果汁など多くの食品に使用される。平成 28 年度生産量調査によると、それら食品添加物の食品への使用に基づく二酸化硫黄（SO_2）摂取量の総和は 12.3 mg/人/日と推定される（表 18) [227]。この値は、国内における食品添加物の生産量に基づくものであるため、輸入食品を加えると推定摂取量は更に高くなる。

[参考として記載：輸入ワイン由来摂取量

製品ワインは保存中の品質低下を抑えるため、小分け・瓶詰めにあたり、亜硫酸濃度を調整（添加）することが認められており、国内においては食品衛生法により SO_2 残留量として 350mg/kg 未満と規定されている [41]。一方、直近の国税庁調査による輸入果実酒及び甘味果実酒輸入量は、それぞれ、261,403kL、3,618kL と報告されており[223]、合計 265,021kL である。したがって、輸入ワイン由来の 1 人一日当たりの平均亜硫酸摂取量は、全ての輸入ワインの亜硫酸濃度が上記基準限度に近いと仮定すると、最大　2.44mg SO_2/人/日と計算される（(350×265,021,000）/104,011,000/365=2.44、但し、成人人口

[19] ワインの密度の平均値を資料 [230] [238]から算出すると 0.999058kg/L となり、本計算（有効数字 2 桁）では 1.00kg/L としている。以下、この値を用いて有効数字に応じて換算する。

104,011,000 人[224]として)。しかし、国税庁の平成 29 年全国市販酒調査結果で輸入酒と国内果実酒の亜硫酸含有量を測定した結果、平均値は国内製造酒 77.89 mg/L（105 点)、輸入酒 73.91 mg/L（78 点）であり、基準値である 350 mg/kg を超えたものは 183 点中 1 点のみであった [230]。輸入果実酒の平均値から平均亜硫酸摂取量は 0.52mg SO_2/人/日と計算される（73.91×265,021,000）/104,011,000/365=0.52）]

マーケットバスケット調査

マーケットバスケット方式による摂取量調査は市販食品中の食品添加物濃度の測定と国民健康栄養調査による消費者が摂取する食品量を組み合わせたもので、実際に消費者が摂取する食品添加物量を推定することが出来る。直近の平成 28 年度マーケットバスケット方式による摂取量実態調査の結果では、亜硫酸塩類（SO_2 として）の一日推定摂取量は 0.164 mg/人/日で、対 JECFA　ADI 比では 0.40%と報告されている [231]。

生産量調査とマーケットバスケット調査を比較すると推定摂取量に約 70 倍の差がある。この大きな乖離は、亜硫酸塩の特性から食品の加工工程での酸化や二酸化硫黄として揮散して消失することが原因とされている [232]。すなわち、マーケットバスケット方式による摂取量調査の方が、国民が摂取する実態に近いと考えられる。そこで本概要書では我が国における亜硫酸塩類(SO_2 として)の一日推定摂取量は 0.164 mg/人/日とする。

（b）アンモニウム

アンモニウムについては、食品安全委員会の添加物「アンモニウムイソバレレート（第 2 版)」の評価書（2014） [36]において、ヒトが食品を摂取することにより、消化管内において、1 日当たり十二指腸で 10 mg、結腸で約 3 g のアンモニアが産生され、産生されたアンモニアのほとんどが吸収された後、門脈循環に入るとされている。また、健常なヒトではアンモニウムイオンは肝臓で速やかに尿素に変換され、尿中に排泄されるとされている。

（3）亜硫酸水素アンモニウム水由来摂取量

（a）亜硫酸

①. 食品摂取頻度・摂取量調査報告からの摂取量

ワインの平均的な 1 人一日飲酒量は（独法）国立健康・栄養研究所による平成 22 年度食品摂取頻度・摂取量調査報告 [222]において、20 歳以上　赤ワイン 1.47 g;　白ワイン 0.73 g; ロゼワイン 0.03 g; 合計 2.23 g（1 年間で、814 g (750 mL 入り 1 瓶強)に相当する。）と報告されている。全てのワインの原料となる果汁に亜硫酸水素アンモニウム水が亜硫酸水素アンモニウム塩として最大量 0.2 g/L で使用され、亜硫酸（129 mg/L≒129mg/kg）が製品ワインにそのまま残存すると仮定すると下記のように算出される [3]。

亜硫酸

129 mg/ 1000 g×2.23 g ＝ 0.288 mg/人/日

②. 酒税課税実績からの摂取量

酒税課税実績からわが国のワイン摂取量を推計した。ワインはブドウ又はブドウ果汁を発酵させたアルコール飲料であるが、国内においては酒税法上、果実酒（果実を原料として発酵させたもの（アルコール分 20 度未満)、若しくは、果実、糖類を原料として発酵させたもの（アルコール分 15 度未満）と、甘味果実酒（果実酒に糖類、ブランデー、香味成分などを混和したもの、ポートワイン、シェリー、ベルモット、サングリアなど）の 2 種類に大別される（以下、果実酒と甘味果実酒を合わせて果実酒類と総称する。)。果実酒にはブドウのほかリンゴ、ナシなどの果実を原料とするものもあるが、ブドウを原料としたものが主である。甘味果実酒は、製法が異なる多品種のものが含まれるが、果実酒に比べ消費量は果実酒の 2〜3%程度である。果実酒の国内消費量は近年増加、また、国内生産量も少しずつ増加してきたものの、消費量の約 7 割は外国からの輸入品である [223]。国税庁は、酒税法に基づき酒類の課税実績及び販売（消費）数量を調査・公表している。直近の平成 29 年分販売数量の資料に報告されている成人 1 人当たりの果実酒及び甘味果実酒の販売数量の全国総計から算定された成人 1 人、年間販売（消費）量は以下の通りである [224]。平成 29 年国税庁酒類販売統計によると、我が国の成人においてワインのみの統計値はないが、果実酒、甘味果実酒として年間それぞれ 3.5L/人、0.1 L/人、合計で 3.6L/人消費されている[224]。果実酒、甘味果実酒はブドウを主原料とする本来のワインのほか、リンゴやナシを主原料とする醸造酒、糖類やブランデーなどを加えた飲料も含まれるが、ワインの摂取量が多めに推定されるようにここでは全てワインと見なして算定する。若干過大にはなるが、この数量をもってワインの年間飲酒量と見なすこととする。

果実酒　3.5 L; 甘味果実酒　0.1 L　果実酒類合計 3.6 L（成人人口　104.011 千人）

したがって、果実酒類由来の亜硫酸の平均 1 人一日摂取量は、亜硫酸水素アンモニウム水の使用基準案最大値 0.2g/L より、下記の通りに推計した。

果実酒類 1 人一日飲酒量　9.86 mL (3600÷365＝9.86)

亜硫酸

129 mg/ 1000 mL ×9.86 mL ＝ 1.272 mg/人/日

③. ぶどう酒を好んで摂取する場合の摂取量

ぶどう酒が特定の集団で好んで摂取され、摂取量に差が生じる可能性を考慮し、平成 29 年国民健康・栄養調査において、飲酒習慣のある者（週に 3 度以上、飲酒日 1 日あたり清酒換算で 1 合以上すると回答した者）の割合（20.0%）を成人人口にかけて計算した場合、当該対象者すべてがぶどう酒を摂取したと仮定した 1 人当たりのぶどう酒推定摂取量は 49.3 mL／人／日と推計される［6]。

単純にこの量に亜硫酸水素アンモニウム水が亜硫酸水素アンモニウム塩として最大量 0.2 g/L で使用され、亜硫酸（129 mg/L）が製品ワインにそのまま残存すると仮定すると下記のように算出される [3]。

亜硫酸

129 mg/1000 mL× 49.3ｍL＝6.360 mg/人/日

④. 亜硫酸水素アンモニウム水由来の摂取量まとめ

国民健康・栄養調査に基づくワイン飲酒量は、酒税課税実績に基づく果実酒類の消費量推定値よりも少ない。そこで過小評価は避けるべく、酒税課税実績に基づく果実酒類の消費量推定値に基づく 1.272 mg/人/日を亜硫酸の平均的な摂取量とした。ぶどう酒を好んで摂取する者については亜硫酸の摂取量は 6.360 mg /人/日と換算された。

ここで、それぞれこの値を食品安全委員会が定める、食品健康影響評価に用いる平均体重である 55.1kg で除すことで二酸化硫黄として、下記のとおり 1 日当たり体重 1 kg 当たりの摂取量を推計した [228]。

a.平均　　：1.272mg/人/日÷55.1kg=0.0231mg/kg 体重/日
b.ぶどう酒を好んで摂取する者
　　：6.360 mg /人/日÷55.1kg=0.1154mg/kg 体重/日

上記 a.及び b.は本概要書で指定等要請者が提案した ADI である 0.7mg/kg 体重/日と比較するとそれぞれおよそ 3.3%、16.5%である。

これらの値に（１）のマーケットバスケット調査から求められた、我が国の亜硫酸塩類の一日推定摂取量 0.164 mg/人/日を合算すると以下のようになる。

c.平均　　：（1.272mg/人/日＋0.164 mg/人/日）÷55.1kg=0.0260mg/kg 体重/日
d.ぶどう酒を好んで摂取する者
　　：（6.360 mg mg /人/日＋0.164 mg/人/日）÷55.1kg=0.1184mg/kg 体重/日

c.及び d.も本概要書で指定等要請者が提案した ADI である 0.7mg/kg 体重/日よりも下回るため安全性に懸念はないと考える。なお、SO_2 はワインの酸化防止、雑菌抑制に主に寄与する一方で徐々に揮発して失われていく。わが国における酒類製造における亜硫酸の適正使用については平成 25 年に国税庁が留意点などをまとめている [220]。ここで揮発性は pH が低く、湿度が高い方が揮発しやすい事、温度が 20℃になると 2 倍の揮発性を示すと記載されている。また、山梨県ワイン製造マニュアルによると、発酵前に添加した亜硫酸は製成時に減少することが知られている [44]。実際に貯蔵時とビン詰め時の遊離型の亜硫酸濃度を測ったデータでは赤ワインも白ワインも 10 mg/L から 30 mg/L 程度濃度が減少している。ま

た、酸化により硫酸イオン（SO_4^{2-}）にも変化する。一方、アンモニウムイオンも pH の影響を受けアンモニア（NH_3）ともなるが、これらは酵母の窒素源として資化される。したがって、発酵の進行と共に SO_2 及び亜硫酸イオン類や、アンモニア及びアンモニウムイオン濃度は大きく減少する。このことから、この値は実際には一層低くなると考えられる。

（b）アンモニウム

アンモニウムは前記のように発酵過程の進行に伴い減少するが、そのまま 33.4 mg/L≒33.4mg/kg 残存すると仮定する [3]。前述の（a）亜硫酸と同様にワインの消費量から摂取量を推計した。

①食品摂取頻度・摂取量調査報告からの摂取量 [222]

アンモニウム
33.4 mg/ 1000 g×2.23 g＝ 0.074 mg/人/日

②. 酒税課税実績からの摂取量 [223] [224]

果実酒　3.5 L; 甘味果実酒　0.1 L　果実酒類合計 3.6 L（成人人口　104.011 千人）
果実酒類 1 人一日飲酒量　9.86 mL (3600÷365＝9.86)

アンモニウム
33.4 mg/ 1000 mL×9.86 mL ＝ 0.329 mg/人/日

③. ぶどう酒を好んで摂取する場合の摂取量［6］

1 人当たりのぶどう酒推定摂取量は 49.3ｍL／人／日

単純にこの量に亜硫酸水素アンモニウム水が亜硫酸水素アンモニウム塩として最大量 0.2g/L で使用され、アンモニウム（33.4 mg/kg）が製品ワインにそのまま残存すると仮定すると下記のように算出される) [3]。

アンモニウム
33.4 mg/1000 mL× 49.3 mL＝1.646 mg/人/日

④. 亜硫酸水素アンモニウム水由来の摂取量まとめ

国民健康・栄養調査に基づくワイン飲酒量は、酒税課税実績に基づく果実酒類の消費量推定値よりも少ない。そこで過小評価は避けるべく、酒税課税実績に基づく果実酒類の消費量推定値に基づく 0.329 mg/人/日をアンモニウムの平均的な摂取量とした。ぶどう酒を好んで摂取する者についてはアンモニウムの摂取量は 1.646 mg/人/日と換算された。

なお、ワイン原料の果汁にはアンモニアが、天然由来で 24〜309 mg/L、平均 123 mg/L 含まれていると報告されている [2] 。また、上記のようにヒトは毎日食事摂取由来で約 3000 mg のアンモニアを体内で産生しており、この摂取量はその変動の範囲内と考えられる。

以上のことから、亜硫酸水素アンモニウム水が使用基準に従ってワイン製造に使用される場合、現状の亜硫酸及びアンモニウム摂取量には特段の影響はないと考えられる。

表 19.　食品添加物生産統計調査（平成 28 年度）に基づく亜硫酸塩類摂取量 [3] [227]

品目	摂取量 (kg)	1 日摂取量 SO_2 として	(mg/人/日) ADI＊	(mg/人/日) 対 ADI 比（%）
亜硫酸ナトリウム	400,000	4.31	38.57	11.2
次亜硫酸ナトリウム	120,000	0.95	38.57	2.5
二酸化硫黄	48,000	1.02	38.57	2.6
ピロ亜硫酸カリウム	24,000	0.15	38.57	0.4
ピロ亜硫酸ナトリウム	800,000	5.82	38.57	15
合　計	—	12.25	—	31.7

（注：＊については、ADI；SO_2 として 0.7 mg/kg 体重/日（JECFA）、日本人の平均体重 55.1 ｋｇとして、mg/人/日で表した。）

IV. 海外添加物取り扱い社

ア. Laffort, 11 Rue Aristide Berges, 33270 Floirac, France [39](文献：Bissulfite NH4 400 https://laffort.com/en/products/bisulfite-nh4-400/)

イ. Agrovin, Avda. de los Vinos, P.I. Alces, s/n, 13600 Alcázar de San Juan, Cdad. Real, Spain [40]

ウ. Dolmar, Calle Industria, 32, 26200 Haro, La Rioja, Spain [233]

エ. AZ3-OENO,Polígono Akarregi Pab, 5B, 20120 Hernani, SS, Spain [234]

オ. OENOFRANCE, 79 Avenue A.A Thévenet CS11031, 51530 Magenta, France [235]

カ. LAMOTHE-ABIET, Avenue Ferdinand de Lesseps 33610, CANEJAN / BORDEAUX, France [236]

キ. Juan Messina S.A, Sarmiento 451, Villa Nueva, Mendoza, Argentina [237]

Ⅴ．参考文献

[1]	FSANZ, “Supporting document 1 – Risk and technical assessment report,” 26 4 2017. [オンライン]. Available: https://www.foodstandards.gov.au/code/applications/Documents/A1127%20PAs%20in%20wine%20SD1%20Risk%20and%20tech%20assess.pdf.
[2]	財団法人　日本醸造協会, 醸造物の成分, 1999.
[3]	厚生労働省, “第 9 版食品添加物公定書,” 2018. [オンライン]. Available: https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzenbu/0000192874.pdf.
[4]	髙本進ら, 化合物の辞典, 朝倉書店, 1997.
[5]	OIV, “INTERNATIONAL OENOLOGICAL CODEX　Ammonium Hydrogen Sulfite,” 2007. [オンライン]. Available: http://www.oiv.int/public/medias/4048/e-coei-1-ammhyd.pdf.
[6]	Australian Covernment, “STANDARD 4.5.1 WINE PRODUCTION REQUIREMENTS,” 27 2 2019. [オンライン]. Available: https://www.legislation.gov.au/Details/F2019C00225.
[7]	JECFA, “GENERAL STANDARD FOR FOOD ADDITIVES CODEX STAN 192-1995,” 2018. [オンライン]. Available: http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192e.pdf.
[8]	OIV, “International Code of Oenological Practices,” 1 2019. [オンライン]. Available: http://www.oiv.int/public/medias/6558/code-2019-en.pdf.
[9]	EU, “REGULATION (EC) No 1333/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL,” 16 12 2008. [オンライン]. Available: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1333&from=EN.
[10]	EU, “COMMISSION REGULATION (EU) No 1129/2011,” 11 11 2011. [オンライン]. Available: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1129&from=EN.
[11]	EU, “COMMISSION REGULATION (EC) No 2019/934,” 12 3 2019. [オンライン]. Available: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0934&from=EN.
[12]	EU, “REGULATION (EU) No 1308/2013 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL,” 17 12 2013. [オンライン]. Available: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R1308&from=EN.
[13]	“ELECTRONIC CODE OF FEDERAL REGULATIONS PART184,” 26 9 2019. [オンライン]. Available: https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=93963d5d980187e1dcafc3672b8bdbbb&mc=true&node=pt21.3.184&rgn=div5. [アクセス日: 30 9 2019].
[14]	Official Journal of the European Union, “AGREEMENT between the European Community and the United States of America on trade in wine,” 2006. [オンライン]. Available: http://ec.europa.eu/world/agreements/downloadFile.do?fullText=yes&treatyTransId=2541..

[15]	CFR, “§24.246 Materials authorized for the treatment of wine and juice.,” 23 4 2019. [オンライン]. Available: https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=f4caf675c698f79831959067a3822112&mc=true&node=se27.1.24_1246&rgn=div8. [アクセス日: 25 4 2019].
[16]	FSANZ, “Schedule 18 Processing aids,” 5 9 2019. [オンライン]. Available: https://www.legislation.gov.au/Details/F2019C00730.
[17]	公益財団法人　日本食品化学研究振興財団, “指定添加物リスト（食品衛生法　規則別表第１）,” 6 6 2019. [オンライン]. Available: https://www.ffcr.or.jp/webupload/28b06426abc629ef7f4c8a453f3dbd5759187542.pdf.
[18]	WHO TRS539, “Seventeenth Report of the JECFA. Toxicological evaluation of certain food,” WHOTechnical Report Series 539, FAO Nutrition Meeting Report Series 539, 1973.
[19]	“FAS 5/Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents,” 1974. [オンライン]. Available: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v05je19.htm. [アクセス日: 14 12 2018].
[20]	WHO TRS751, “Thirtieth Report of the JECFA. Evaluation of certain food additives and contaminants.,” WHO Technical Report Series 751, 1987.
[21]	“FAS21/SULFUR DIOXIDE AND SULFITES,” [オンライン]. Available: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v21je15.htm.
[22]	WHO TRS891, “Fifty-first Report of the JECFA. Evaluation of certain food additives,” WHO Technical Report Series 891, 2000.
[23]	“FAS42/SAFETY EVALUATION OF CERTAIN FOOD ADDITIVES,” 1999. [オンライン]. Available: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v042je06.htm.
[24]	“FAS42/EVALUATION OF NATIONAL ASSESSMENTS OF INTAKE OF SULFITES,” 1999. [オンライン]. Available: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v042je25.htm.
[25]	WHO TRS952, “Sixty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives,” WHO Technical Report Series 952, 2009.
[26]	SCF, “Reports of the Scientific Committee for Food (Thirty-fifth series),” EUROPEAN COMMISSION, 1996.
[27]	EFSA, “Scientific Opinion on the re-evaluation of sulfur dioxide (E 220), sulfite (E 221), sodium bisulfite (E 222), sodium metabisulfite (E 223),potassium metabisulfite (E 224), calcium sodium bisulfite (E 227) and potassium bisulfite (E 228) as food additives,” EFSA Journal, 2016.
[28]	EC, “Call for scientific and technical data on the permitted food additives sulphur dioxide (E 220), sodium sulphite (E 221), sodium bisulphite (E 222), sodium metabisulphite (E 223), potassium metabisulphite (E 224)…,” EC, 2016.
[29]	EC, “Outcome of step 2 of the call for data on sulphur dioxide/sulphites (E 220-228),” EC, 2017.

[30]	FDA, “EVALUATION OF THE HEALTH ASPECTS OF SULFITING AGENTS AS FOOD INGREDIENTS,” LSRO.FASEB, 1976.
[31]	FSANZ, “Approval report – Application A1127 Processing Aids in Wine,” 21 8 2017. [オンライン]. Available: https://www.foodstandards.gov.au/code/applications/Documents/A1127%20Approval%20Report.pdf.
[32]	FSANZ, “21st Australian Total Diet Study - August 2005,” 8 2005. [オンライン]. Available: https://www.foodstandards.gov.au/publications/Pages/21staustraliantotald2963.aspx.
[33]	FSANZ, “Draft Assessment Report (Abandonment) – Proposal P298,” 16 6 2016. [オンライン]. Available: https://www.foodstandards.gov.au/code/proposals/Documents/P298%20DAR%20Abandonment.pdf.
[34]	FSANZ, “Risk and Technical Assessment Report – Proposal P298 Benzoates & Sulphites Permissions in Food,” 2016. [オンライン]. Available: https://www.foodstandards.gov.au/code/proposals/Documents/P298%20SD1%20Risk%20and%20Technical%20Assessmet%20Abandonment.pdf.
[35]	食品安全委員会, “厚生労働省発食安第 0701017 号における亜硫酸塩類に係る食品健康影響評価の結果の通知について,” 2003. [オンライン]. Available: https://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-tuuchi-bunsyo-14.pdf.
[36]	食品安全委員会, “食品健康影響評価の結果の通知について(アンモニウムイソバレレート),” 9 12 2014. [オンライン]. Available: https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20141209297&fileId=201.
[37]	EFSA, “Opinion Flavouring Group Evaluation 46 (FGE.46)1:Ammonia and two ammonium salts from chemical group 30 Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC) (EFSA-Q-2008-050),” 10 2 2009. [オンライン]. Available: https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2009.955.
[38]	“食品健康影響評価の結果の通知について(硫酸アルミニウムアンモニウム、硫酸アルミニウムカリウム),” 19 12 2017. [オンライン]. Available: https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20170321217&fileId=202.
[39]	Laffort, “BISULFITE NH4 400,100 TECHNICAL DETA SHEET,” [オンライン]. Available: https://laffort.com/en/products/bisulfite-nh4-400/.
[40]	Agrovin, “Agrovin SULFAMOL,” [オンライン]. Available: https://www.agrovin.com/en/producto/sulfamol/. [アクセス日: 24 11 2019].
[41]	財団法人 日本食品化学研究振興財団, “各添加物の使用基準及び保存基準,” 6 6 2019. [オンライン]. Available: https://www.ffcr.or.jp/webupload/ddf8ac5456564f24708f9145a04e2aac0973fda6.pdf.

[42]	Yair Margalit, Concepts in wine chemistry, The Wine Appreciation Guild Ltd., 1997.
[43]	Bruce W. Zoecklein et al., WINE ANALYSIS AND PRODUCTION, 1995.
[44]	山梨県ワイン酒造組合, 山梨県ワイン製造マニュアル, 2016.
[45]	Laffort, “DIAMMONIUM PHOSPHATE,”［オンライン］. Available: https://laffort.com/wp-content/uploads/FP/FT_EN_Ammonium_Phosphate_Laffort.pdf.
[46]	“PubMed-亜硫酸水素アンモニウム検索結果,”［オンライン］. Available: ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.
[47]	“Toxline-亜硫酸水素アンモニウム検索結果,”［オンライン］. Available: https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/toxline.htm.
[48]	L. F. GREEN, “SULPHUR DIOXIDE AND FOOD PRESERVATION-A REVIEW,” Fd.Chem., 1976.
[49]	Leonard F. Burroughs/Arthur H. Sparks, “Sulphite-binding Power of Wines and Ciders I. Equilibrium Constants for the Dissociation of Carbonyl Bisulphite Compounds,” J.Sci.Fd Agric., 1973.
[50]	Leonard F. Burroughs/Arthur H. Sparks, “Sulphite-binding Power of Wines and Ciders Ⅱ. Theoretical Consideration and Calculation of Sulphite-binding Equilibria,” J. Sci. Fd Agric, 1973.
[51]	Leonard F. Burroughs/Arthur H. Sparks, “Sulphite-binding Power of Wines and Ciders Ⅲ. Determination of Carbonyl Compounds in a Wine and Calculation of its Sulphite-binding Power,” J. Sci. Fd Agric., 1973.
[52]	Tadao Adachi et al., “On the Combination of Sulphite with Food Ingredients (Aldehydes, Ketones and Sugars). II.,” Z. Lebensm. Unters. Forsch, 1979.
[53]	D. J. McWeeny/M. E. Knowles/J. F. Hearne, “The Chemistry of N on-enzymic Browning in Foods and its Control by Sulphites,” J. Sci. Fd Agric., 1974.
[54]	Bronislaw L. Wedzicha/David J. McWeeny, “Non-enzymic Browning Reactions of Ascorbic Acid and their Inhibition. The Production of 3-Deoxy-4-sulphopentosulose in Mixtures of Ascorbic Acid, Glycine and Bisulphite Ion,” J. Sci. Fd Agric., 1974.
[55]	Bronislaw L. Wedzicha/David J. McWeeny, “Non-enzymic Browning Reactions of Ascorbic Acid and their Inhibition. The Identification of 3-Deoxy-4-sulphopentosulose in Dehydrated, Sulphited Cabbage after Storage,” J. Sci. Fd Agric., 1974.
[56]	Bronislaw L. Wedzicha/David J. McWeeny, “Concentrations of some Sulphonates Derived from Sulphite in Certain Foods and Preliminary Studies on the Nature of Other Sulphite Derived Products,” J. Sci. Fd Agric., 1975.
[57]	D. J. McWEENY/M. J. SHEPHERD/M. L. BATES, “Physical loss and chemical reactions of S02 in strawberry jam production,” J. Fd Technol., 1980.

[58]	W. B. GIBSON and F. M. STRONG, “Metabolism and Elimination of Sulphite by Rats, Mice,” Fd Cosmet. Toxicol., 1973.
[59]	ATSDR, “TOXICOLOGICAL PROFILE FOR SULFUR DIOXIDE,” 12 198. [オンライン]. Available: http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=253&tid=46. [アクセス日: 5 3 2019].
[60]	Lester MR, “Sulphite sensitivity: significance in human health.,” The Journal of the American College of Nutrition, 1995.
[61]	
[62]	R. CECIL/R. G. WAKE, “The Reactions of Inter- and Intra-Chain Disulphide Bonds in Proteins with Sulphite,” Bioclaem. J., 1962.
[63]	J. M. Swan, Sulfur in Proteins I. l. CHEMICAL MODIFICATION, ACADEMIC PRESS INC., 1959.
[64]	A. F. GUNNISON, “SULPHITE TOXICITY: A CRITICAL REVIEW OF IN VITRO AND IN VIVO DATA,” Fd. Cosmet. Toxicol., 1981.
[65]	ALBERT F. GUNNISON/E. D. PALMES, “S-Sulfonates in Human Plasma following Inhalation of Sulfur Dioxide,” New York University Medical Center, Institute of Environmental Medicine,, 1979.
[66]	J. WEVER, “APPEARANCE OF SULPHITE AND S-SULPHONA TES IN THE PLASMA OF RATS AFTER INTRADUODENAL SULPHITE APPLICATION,” Fd Chem. Toxic., 1985.
[67]	ALBERT F. GUNNISON and E.D. PALMES, “SPECIES VARIABILITY IN PLASMA S-SULFONATE LEVELS DURING AND FOLLOWING SULFITE ADMINISTRATION,” Chem.-Biol. Interactions, 1978.
[68]	ALBERT F. GUNNISON/THOMAS J. FARRUGGELLA, “PREFERENTIAL S-SULFONATE FORMATION IN LUNG AND AORTA,” Chem.-Biol., 1979.
[69]	ALBERT F. GUNN ISON et al., “Tissue Distribution of S-Sulfonate Metabolites Following Exposure to Sulfur Dioxide,” ENVIRONMENTAL RESEARCH, 1981.
[70]	E. M. Gause/M. Barker, “INTERACTION OF INHALED SULFUR DIOXIDE WITH MUCUS GLYCOPROTEINS,” Proc. West. Phamlacol. Soc., 1978.
[71]	Robert Shapiro, “ GENETIC EFFECTS OF BISULFITE:IMPLICATIONS FOR ENVIRONMENTAL PROTECTION,” Department of Chemistry New York University, 1983.
[72]	BRUCE L. LARSON/G. W. SALISBURY, “THE REACTIVE REDUCING COMPONENTS OF SEMEN; THE PRESENCE OF SULFITE IN BOVINE SEMEN,” Journal of Biological Chemistry, 1960.
[73]	HARVEY J. COHEN/I. FRIDOVICH, “ Hepatic Sulfite Oxidase PURIFICATION AND PROPERTIES,” THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1971.

[74]	JEAN L. JOHNSON et al., "Inborn errors of molybdenum metabolism: Combined deficiencies of sulfite oxidase and xanthine dehydrogenase in a patient lacking the molybdenum cofactor," Proc. Natl. Acad. Sci., 1980.
[75]	ROBERT M. MACLEOD et al., "Purification and Properties of Hepatic Sulfite Oxidase," THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1961.
[76]	JEAN L. JOHNSON/K. V. RAJAGOPALAN, "Purification and Properties of Sulfite Oxidase from Human Liver," The Journal of Clinical Investigation, 1976.
[77]	JEAN L. JOHNSON/K. V. RAJAGOPALAN, " Human Sulfite Oxidase Deficiency CHARACTERIZATION OF THE MOLECULAR DEFECT IN A MULTICOMPONENT SYSTEM," The Journal of Clinical Investigation, 1976.
[78]	HARVEY J. COHEN et al., "Molecular Basis of the Biological Function of Molybdenum. The Relationship between Sulfite Oxidase and the Acute Toxicity of Bisulfite and S02," Proc. Nat. Acad. Sci., 1973.
[79]	JEAN L. JOHNSON/HARVEY J. COHEN/K. V. RAJAGOPALAN§, "Molecular Basis of the Biological Function of Molybdenum MOLYBDENUM-FREE SULFITE OXIDASE FROM LIVERS OF TUNGSTEN-TREATED RATS*, " THE JOUBNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1974.
[80]	A. F. GUNNISON et al., "A SULPHITE-OXIDASE-DEFICIENT RAT MODEL:SUBCHRONIC TOXICOLOGY," Fd Cosmet. Toxicol, 1981.
[81]	A. F. GuNNISON et al., "A SULPHITE-OXIDASE-DEFICIENT RAT MODEL:METABOLIC CHARACTERIZATION," Fd Cosmet, ., 1981.
[82]	NOZOMU OSHINO/BRITTON CHANCE, "The Properties of Sulfite Oxidation in Perfused Rat Liver; Interaction of Sulfite Oxidase with the Mitochondrial Respiratory Chain," ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, 1975.
[83]	BO SORBO, "ENZYMIC TRANSFER OF SULFUR FROM MERCAPTOPYRUV ATE TO SULFITE OR SULFINATES," BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 1957.
[84]	BO SORBO, "On the Metabolism of Thiosulfate Esters," ACTA CHEMICA SCANDINAVICA, 1958.
[85]	TADEUSZ W. SZCZEPKOWSKI/JOHN L. WOOD, "THE CYSTATHIONASE-RHODANESE SYSTEM," BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 1967.
[86]	Sun Y, Cotgreave I, Lindeke B, Moldéus P, "The metabolism of sulfite in liver: Stimulation of sulfate conjugation and effects on paracetamol and allyl alcohol toxicity," Biochem Pharmacol , 1989.
[87]	
[88]	

[89]	Woo WH, Yang H, Wong, KP, Halliwell B, "Sulphite oxidase gene expression in human brain and in other human and rat tissues.," Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003.
[90]	Cohen HJ, Johnson HJ, Rajagopalan KV, "Molecular Basis of the Biological Function of Molybdenum. Developmental Patterns of Sulfite Oxidase and Xanthine Oxidase in the Rat," Archives of Biochemistry and Biophysics 164: 440–446., 1974.
[91]	Gunnison AF, Palmes ED, "A model for the metabolism of sulphite in mammals.," Toxicology and Applied Pharmacology, 1976.
[92]	Tejnorová I, "Sulphite oxidase activity in liver and kidney tissue in five laboratory animal species.," Toxicology and Applied Pharmacology, 1978.
[93]	
[94]	Constantin D, Mehrotra K, Jernstrom B, Tomasi A, Moldeus P, "Alternative Pathways of Sulphite Oxidation in Human Polymorphonuclear Leukocytes.," Pharmacology and Toxicology, 1994.
[95]	Constantin D, Bini A, Meletti E, Moldeus P, Monti D, Tomasi A, "Age-related differences in the metabolism of sulphite to sulphate and in the identification of sulphur trioxide radical in human polymorphonuclear leukocytes.," Mechanisms of Ageing and Development, 1996.
[96]	B. BHAGHAT/MARY F. LOCKETT, "THE ABSORPTION AND ELIMINATION OF METABISULPHITE AND THIOSULPHATE BY RATS," the Department of Physiology and Pharmacology, Chelsea College of Science and Technology, 1960.
[97]	Yokoyama E, Yoder RE, Frank NR, "Distribution of 35S in the blood and its excretion in urine in dogs exposed to 35sulfur dioxide.," Archives of Environmental Health, 1971.
[98]	Savic M, Siriski-Sasic J, Djulizibaric, "Discomforts and laboratory findings in workers exposed to sulfur dioxide.," International Archives of Occupational and Environmental Health, 1987.
[99]	AGNES FAY MORGAN, et al., "THE VITAMIN CONTENT OF FIGS," Laboratory of Household Science and Fruit Products Laboratory,University of California, Berkeley, 1935.
[100]	ROBERT R. WILLIAMS, et al., "Studies of Crystalline Vitamin B1• III. Cleavage of Vitamin with Sulfite," J. Am. Chem. Soc., 1935.
[101]	D. Hötzel, Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Institut für ErnährungswissenschaftJustus Liebig-UniversitätGießenDeutschland, 1962.
[102]	J. CAUSERET, et al., "L'utilisation des sulfites en technologie alimentaire :Ouelques aspects toxicologiques et nutritionnels," Fruits, 1965.
[103]	D. HöTZEL, et al., "Thiaminmangel und Unbedenklichkeit von Sulfit für den Menschen," Internat. Z. Vit. Forschung, 1969.
[104]	GERHARD PFLEIDERER/DIETER JECKEL/THEODOR WIELAND, "über die Einwirkung von Sulfit auf einige," Biochemische Zeitschrift, Bd., 1956.

[105]	FRANZ MULLER/VINCENT :MASSEY, “Sulfite Interaction with Free,” FLAVINS AND DERIVATIVES, 1971.
[106]	S. J. COOPERSTEIN, “Reversible Inactivation of Cytochrome Oxidase,” THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1963.
[107]	ATSUMI KAMOGAWA/TOSHIO FUKUI, “ INHIBITION OF a-GLUCAN PHOSPHORYLASE BY BISULFITE,” Biochimica et Biophysica Acta, 1973.
[108]	Donald R. Harkness/Sandra Roth, “ PURIFICATION AND PROPERTIES OF 2, 3-DIPHOSPHOGLYCERIC ACID PHOSPHATASE FROM HUMAN ERYTHROCYTE, ” BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 1969.
[109]	A. B. ROY, “SULPHATASES, LYSOSOMES AND DISEASE,” AJEBAK, 1976.
[110]	Leung K-H, Post GB, Menzel DB, “Glutathione S-sulfonate, a sulfur dioxide metabolite, as a competitive inhibitor of glutathione S-transferase, and its reduction by glutathione reductase,” Toxicol Appl Pharmacol , 1985.
[111]	Rodriguez-Vieytes M, Martinez-Sapiña J, Taboada-Montero C, Lama-Aneiros MA, “Effect of sulfite intake on intestinal enzyme activity in rats.,” Gastroenterol Clin Biol., 1994.
[112]	Causeret/Hugot, “COMPTES RENDUS DES SÉANCES DE L'ACADÉMIE DES SCffiNCES,,” 1960.
[113]	HUGOT, et al., “ EFFETS DE L'INGESTION DE SULFITES SUR L'EXCRÉTION DU CALCIUM CHEZ LE RAT,” Ann. Biol. anim., Bioch., Biophys., 1965.
[114]	David Kaplan, et al., “Bisulfite Induced Lipid Oxidation,” Arch Environ Health, 1975.
[115]	BUNJI INOUYE, et al., “ Participation of Superoxide Free Radical and Mn2+ in Sulfite Oxidation,” TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY, 1978.
[116]	Akogyeran C, Southerland WM, “The interaction of bisulfite with membrane lipids,” Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol, 1980.
[117]	Haider SS, Hasan M, Hasan SN, Khan SR, Ali SF, “Regional effects of sulfur dioxide exposure on the guinea pig brain lipids, lipid peroxidation of lipase activity,” Neurotoxicology, 1981.
[118]	Harvey SB, Nelsestuen GL, “Reaction on nitric oxide and its derivatives with sulfites: A possible role in sulfite toxicity.,” Biochim Biophys Acta., 1995.
[119]	Til HP, Feron VJ, DeGroot AP, “Toxicity of sulphite. I. Long-term feeding and multigeneration studies in rats.,” Food and Cosmetics Toxicology, 1972.
[120]	Til HP, Feron VJ, De Groot AP, Van der Wal P, “Toxicity of sulphite. II. Short- and longterm feeding studies in pigs.,” Food and Cosmetics Toxicology, 1972.
[121]	Tanaka T, Fujii M, Mori H, Hirono I, “Carcinogenicity test of potassium metabisulfite in mice.,” Ecotoxicol Environ Safety, 1979.

[122]	FAS18, “WHO FAS 18: Sulfur dioxide and sulfites. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants., ” [オンライン]. Available: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v18je14.htm.
[123]	“PubMed-亜硫酸検索結果,”[オンライン]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.
[124]	“Toxline-亜硫酸分析結果,” [オンライン]. Available: https://www.nlm.nih.gov/toxnet/index.html.
[125]	Ema M, Itami T, Kanoh S, “Effect of potassium metabisulphite on pregnant rats and their offspring. II. Studies on the fetal toxicity of food additives.,” Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 1985.
[126]	Itami T, Ema M, Kawasaki H, Kanoh S, “Evaluation of teratogenic potential of sodium sulfite in rats.,” Drug and Chemical Toxicology, 1989.
[127]	Genotoxic effects of sulfur dioxide in human lymphocytes, “Uren N, Yuksel S, Onal Y,” Toxicology and Industrial Health, 2014.
[128]	Meng Z, Zhang B, “Induction effects of sulfur dioxide inhalation on chromosomal aberrations in mouse bone marrow cells.,” Mutagenesis, 2002.
[129]	Meng Z, Zhang B, Ruan A, Sang N, Zhang J, “Micronuclei induced by sulfur dioxide inhalation in mouse bone marrow cells in vivo,” Inhalation Toxicology, 2002.
[130]	Meng Z, Qin G, Zhang B, “DNA damage in mice treated with sulfur dioxide by inhalation.,” Environmental and Molecular Mutagenesis, 2005.
[131]	Ziemann C, Hanse T, Pohlmann G, Farrar D, Pohlenz-Michel C, Tillmann T, Mangelsdorf I, “Genotoxicity testing of sulfur dioxide (SO_2) in a mouse bone marrow micronucleus test complemented with haematological endpoints.,” Mutation Research/Genetic Toxicology and Enviromental Mutagenisity, 2010.
[132]	Ishidate M Jr, Sofuni T, Yoshikawa K, Hayashi M, Nohmi T, Sawada M, Matsuoka A, “Primary mutagenicity screening of food additives used in Japan,” Food and Chemical Toxicology, 1984.
[133]	Abe S, Sasaki M, “Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals.,” Journal of the National Cancer Institute, 1977.
[134]	Yavuz-Kocaman A, Rencuzogullari E, Ila HB, Topaktas M, “The genotoxic effect of potassium metabisulphite using chromosome aberration, sister chromatid exchange, micronucleus tests in human lymphocytes and chromosome aberration test in bone marrow cells of rats.,” Environmental and Molecular Mutagenesis, 2008.
[135]	Münzner R, “[Investigations of the mutagenic effect of bisulfite.],” Lebensmittel Wiss Technol, 1980.
[136]	De Giovanni-Donnelly R, “The mutagenicity of sodium bisulfite on base-substitution strains of Salmonella typhimurium.,” Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis, 1985.

[137]	Pagano DA, Zeiger E, “Conditions affecting the mutagenicity of sodium bisulfite in Salmonella typhimurium.,” Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1987.
[138]	SRI International:, “Microbial mutagenesisi testing of substances compound report: F76-003, Sodium bisulfite. Prepared for FDA.,” NTIS PB-89-193676, 1978.
[139]	Hayatsu H, Miura A, “The mutagenic action of sodium bisulfite.,” Biochem Biophys Res Comm, 1970.
[140]	Mukai F, Hawryluk I, Shapiro R:, “The mutagenic specificity of sodium bisulfite,” Biochem Biophys Res Comm, 1970.
[141]	Kunz BA, Glickman BW, “Absence of bisulfite mutagenesis in the lacI gene of Escherichia coli.,” Mutat Res letter, 1983.
[142]	Mallon RG, Rossman TG, “Bisulphite (sulfur dioxide) is a comutagen in E. coli, and in Chinese hamster cells.,” Mutation Research/Genetic Toxicology, 1981.
[143]	Litton Bionetics, “Mutagenic evaluation of compound FDA 71-20 sodium bisulfite. Submitted to FDA.,” NTIS PB-245456, 1972.
[144]	
[145]	Meng Z, Zhang B, “Polymerase chain reactioin-based deletion screening of bisulfite (sulfur dioxide)-enhanced gpt-mutant in CHO-AS52 cells.,” Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1999.
[146]	Tsutsui T, Barrett JC, “Sodium bisulphite induces morphological transformation of cultured Syrian hamster embryo cells but lacks the ability to induce detectable gene mutations, chromosome mutations or DNA damage.,” Carcinogenesis, 1990.
[147]	Popescu NC, DiPaolo JA, “Chromosome alterations in Syrian hamster cells trnasformed in vitro by sodium bisulfite, a nonclastogenic carcinogen.,” Cancer research, 1988.
[148]	Beckman L, Nordenson I, “Interaction between some common genotoxic agents.,” Hum Hered, 1986.
[149]	Meng Z, Zhang L, “Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by sodium bisulfite.,” Mutat Res, 1992.
[150]	MacRae WD, Stich HF, “Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells by the reducing agents bisulphite and ascorbic acid.,” Toxicology, 1979.
[151]	Doniger J, O'Neill R, DiPaolo JA, “Neoplastic transformation of Syrian hamster embryo cells by bisulfite is accompanied with a decrease in the number of functioning replicons.,” Carcinogenesis, 1982.
[152]	Borek C, Ong A, Mason H, “Sodium Bisulfite Protects Against Radiogenic and Chemically Induced Transformation in Hamster Embryo and Mouse C3H/10T-1/2 Cells.,” Toxicol Ind Health, 1985.

[153]	DiPaolo JA, DeMarinis AJ, Doniger J, “Transformation of Syrian hamster embryo cells by sodium bisulfite.,” Cancer Letters, 1981.
[154]	Generoso WM, Huff SW, Cain KT, “Tests on induction of chromosome aberrations in mouse germ cells with sodium bisulphite.,” Mutation Research, 1978.
[155]	Meng Z, Qin G, Zhang B, Bai J, “DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from varios organs of mice.,” Mutagenesis, 2004.
[156]	Prival MJ, Simmon VF, Mortelmans KE, “Bacterial mutagenicity testing of 49 food ingredients gives very few positive results.,” Mutation Research/Genetic Toxicology, 1991.
[157]	SRI International, “Microbial mutagenesisi testing of substances compound report: F76-004, Sodium meta-bisulfite.,” Prepared for FDA. NTIS PB-89-193684, 1978.
[158]	Stanford Research Institute, “Study of the mutagenic effects of Sodium meta-bisulfite (71-22).,” Prepared for FDA. NTIS PB-221825, 1972.
[159]	Rencüzoğullari E, Ila HB, Kayraldiz A, Topaktas M, “Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulphite, a food preservative.,” Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2001.
[160]	Renner HW, Wever J, “Attempts to induce cytogenic effects with sulphite in sulphite oxidase-deficient Chinese hamsters and mice.,” Food and Chemical Toxicology, 1983.
[161]	Pal BB, Bhunya SP, “Genotoxic effect of a preservative, sodium meabisulphite as revealed by mammalian in vivo bioassays.,” Cytologia, 1992.
[162]	Carvalho IM, Melo Cavalcante AA, Dantas AF, Pereira DL, Costa Rocha FC, Andrade TJ, Da Silva J, “Genotoxicity of sodium metabisulphite in mouse tissues evaluated by the comet assay and the micronucleus test.,” Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2011.
[163]	SRI International, “Study of the mutagenic effects of Sodium meta-bisulfite (76-73) by the dominant lethal test in rats.,” Prepared for FDA. NTIS PB-299836, 1979.
[164]	Litton Bionetics, “Mutagenic evaluation of compound FDA 73-43 sodium sulfite.,” Submitted to FDA. NTIS PB-245488, 1975.
[165]	上野清一，青木和子，石崎睦雄，“菌数測定用簡易培地（コンパクトドライ®）を利用した Spore Rec-assay,” 食衛誌, 2002.
[166]	Prenner BM, Stevens JJ, “Anaphylaxis after ingestion of sodium bisulfite,” Ann Allergy, 1976.
[167]	Fisher AA, “Contact dermatitis due to food additives.,” Cutis, 1975.
[168]	Schwartz HJ, “Sensitivity to ingested metabisulfite; Variations in clinical presentation.,” J Allergy Clin Immunol, 1983.

[169]	Botey J, Cozzo M, Eseverri JL, Marin A, “Sulfites and skin pathology in children.,” Allergol Immunopathol, 1987.
[170]	宮澤英彦，島津苗胤，松本賢太郎，“ワインに含まれた亜硫酸塩によりアナフィラキシーを生じた 1 例.,” 臨皮, 2018.
[171]	Kochen J, “Sulfur dioxide, a respiratory tract irritant, even if ingested.,” Pediatrics, 1973.
[172]	Freedman BJ, “Asthma induced by sulfur dioxide, benzoate and tartrazine contained in orange drinks.,” Clin Allergy, 1977.
[173]	Baker CJ, Collett P, Allen DH, “Bronchospasm induced by metabisulfite-containing foods and drugs.,” Med J Aust, 1981.
[174]	Stevenson DD, Simon RA, “Sensivity to ingested metabisulfites in asthmatic subjects,” J Allergy Clin Immunol, 1981.
[175]	Asero R, “Food additive-induced chronic pruritus: further evidence.,” Clinical and Experimental Dermatology, 2005.
[176]	Werth GR, “Inhaled metabisulfite sensitivity.,” J Allerg Clin Immunol, 1982.
[177]	吉川隆志，藤内智，稲葉秀一，永井達夫，寺井継男，“Sulfite(硫黄化合物)により発作が増強された気管支喘息の 1 例.,” 日胸疾会誌, 1990.
[178]	
[179]	Huang AS, Fraser WM, “Are sulfite additives really safe?,” N Engl J Med, 1984.
[180]	Sonin L, Patterson R, “Metabisulfite challenge in patients with idiopathic anaphylaxis,” J Allergy Clin Immunol, 1985.
[181]	Taylor SL, Bush RK, Selner JC, Nordlee JA, Wiener MB, Holden K, et al, “Sensitivity to sulfited foods among sulfite-sensitive subjects with asthma.,” J Allergy Clin Immunol, 1988.
[182]	Gastaminza G, Quirce S, Torres M, Tabar A, Echechipia S, Munoz D, Fernandez DeCorres L, “ Pickled onion-induced asthma: A model of sulphite-sensitive asthma?, ” Clinical And Experimental Allergy, 1995.
[183]	Vally H, Thompson PJ, Misso NLA, “Changes in bronchial hyperresponsiveness following high- and low-sulphite wine challenges in wine-sensitive asthmatic patients., ” Clinical And Experimental Allergy, 2007.
[184]	Yang WH, Purchase ECR, Rivington RN, “Positive skin tests and Prausnitz-Küstner reactions in metabisulfite-sensitive subjects.,” J Allergy Clin Immunol, 1986.
[185]	Acosta R, Granados J, Mourelle M, Perez-Alvarez V, Quezada E, “Sulfite sensitivity: Relationship between sulfite plasma levels and bronchospasm: case report.,” Ann. Allergy, 1989.
[186]	Sprenger JD, Altman LC, Marshall SG, Pierson WE, Koenig JQ, “ Studies of neutrophil chemotoactic factor of anaphylaxis in metabisulfite sensitivity,” Ann Allergy, 1989.

[187]	Sokol WN, Hydick IB, “Nasal congestion, urticaria, and angioedema caused by an IgE-mediated reaction to sodium metabisulfite.,” Ann Allergy, 1990.
[188]	Frick WE, Lemanske RF, “Oral sulfite sensitivity and provocative challenge in a 2 year old.,” J Asthma, 1991.
[189]	Belchi-Hernandez J, Florido-Lopez F, Estrada-Rodriguez JL, Martinez-Alzamora F, Lopez-Serrano C, Ojeda-Casas JA, “Sulfite-induced urticaria.,” Ann Allergy, 1993.
[190]	Wüthrich B, “Adverse reactions to food additives.,” Ann Alergy, 1993.
[191]	Wüthrich B, Kägi MK, Hafner J, “Disulfite-induced acute intermittent urticaria wigh vasculitis.,” Dermatology, 1993.
[192]	Gall H, Boehncke WH, Gietzen K, “Intolerance to sodium metabisulphite in beer,” Allergy, 1996.
[193]	Park H-S, Nahm D, “Localized periorbital edema as a clinical manifestation of sulfite sensitivity.,” J Korean Med Sci, 1996.
[194]	Di Lorenzo G, Pacor ML, Vignola AM, Profita M, Esposito-Pellitteri M, Biasi D, Corrocher R, Caruso C, “Urinary metabolites of histamine and leukotrienes before and after placebocontrolled challenge with ASA and food additives in chronic urticaria patients.,” Allergy, 2002.
[195]	Vally H, Thompson PJ, “Role of sulfite additives in wine induced asthma: single dose and cumulative dose studies.,” Thorax, 2001.
[196]	Buckley CEIII, Saltzmann HA, Sieker HO, “The prevalence and degree of sensitivity to ingested sulfites.,” J Allergy Clin Immunol , 1985.
[197]	Simon RA, Green L, Stevenson DD, “The incidence of ingested metabisulfite sensitivity in an asthmatic population,” J Allergy Clin Immunol, 1892.
[198]	Bush RK, Taylor SL, Holden K, Nordlee JA, Busse WW, “Prevalence of sensitiviy to sulfiting agents in asthmatic patients.,” Am J Med, 1986.
[199]	Prieto L, Juyol M, Paricio A, Martinez MA, Palop J, Castro J, “Oral challenge test with sodium metabisulfite in steroid-dependent asthmatic patients.,” Allergol Immunopathol, 1988.
[200]	Vena GA, Foti C, Angelini G, “Sulfite contact allergy.,” Contact Dermatitis, 1994.
[201]	García-Gavín J, Parente J, Goossens A, “ Allergic contact dermatitis caused by sodium metabisulphite: a challenging allergen: a case series and literature review.,” Contact Dermatitis, 2012.
[202]	Towns SJ, Mellis CM, “Role of acetyl salicylic acid and sodium metabisulfite in chronic childhood asthma.,” Pediatrics, 1984.
[203]	Friedman ME, Easton JG, “Prevalence of positive metabisulfite challenges in children with asthma.,” Pediatric Asthma, Allergy & Immunology, 1897.
[204]	Van Bever HP, Docx M, Stevens WJ, “Food and food additives in severe atopic dermatitis.,” Allergy, 1989.

[205]	Boner AL, Guarise A, Vallone G, Fornari A, Piacentini F, Sette L, “Metabisulfite oral challenge: Incidence of adverse responses in chronic childhood asthma and its relationship with bronchial hyperactivity.,” Allergy Clin Immunol, 1990.
[206]	Steinman HA, Le Roux M, Potter PC, “Sulphur dioxide sensitivity in South African asthmatic children.,” S Afr Med J, 1993.
[207]	JECFA, “ WHO_TRS_339, ” 12 1965. [オンライン]. Available: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39853/WHO_TRS_339.pdf;jsessionid=DDED2D8399A521B9E4CFB08C448DD355?sequence=1. [アクセス日: 1 2020].
[208]	Tsevat J, Gross GN, Dowling GP, “Fatal asthma after ingestion of sulfite-containing wine,” Ann Intern Med, 1987.
[209]	Tollefson L, “Monitoring adverse reactions to food additives in the US Food and Drug Administration.,” Regul Toxicol Pharmacol, 1988.
[210]	Nair B, Elmore AR, “Final report on the safety assessment of sodium sulfite, potassium sulfite, ammonium sulfite, sodium bisulfite, ammonium bisulfite, sodium metabisulfite and potassium metabisulfite.,” Int J Toxicol., 2003.
[211]	Linneberg A, Berg ND, Gonzalez-Quintela A, Vidal C, Elberling J, “Prevalence of selfreported hypersensitivity symptoms following intake of alcoholic drinks.,” Clinical And Experimental Allergy, 2008.
[212]	Vally H, Misso NLA, “Adverse reactions to the sulphite additives.,” Gastroenterology and Hepatology from bed to bench, 2012.
[213]	Koenig JQ, Pierson WE, Horike M, Frank R, “Effects of inhaled sulfur dioxide (SO_2) on pulmonary function in healthy adolescents; Exposure to SO_2 alone or SO_2 + sodium chloride droplet aerosol during rest and exercise.,” Arch Environ Health, 1982.
[214]	Schachter EN, Witek TJ Jr, Beck GJ, Hosein HR, Colice G, Leaderer BP, Cain W, “Airway effects of low concentrations of sulfur dioxide: Dose-response characteristics.,” Arch Environ Health, 1984.
[215]	Twarog FJ, Leung DYM, “Anaphylaxis to a component of isoetharine (sodium bisulfite).,” J Am Med Assoc, 1982.
[216]	Shih VE, Abroms IF, Johnson JL, Carney M, Mandell R, Robb RM, et al, “Sulfite oxidase deficiency: Biochemical and clinical investigations of a hereditary metabolic disorder in sulfur metabolism.,” N Engl J Med, 1977.
[217]	Ogier H, Saudubray JM, Charpentier C, Munnich A, Perignon JL, Kesseler J, Frezal A, “Double déficit en sulfite et xanthine-oxidase. Cause d'encéphalopathie due à une anomalie héréditaire du métabolisme du molybdène [Double deficiency of sulfite and xanthine oxidase causing encephalopathy and due to a hereditary anomaly in the metabolism o,” Ann Intern Med(Paris), 1982.

[218]	Ranguelova K, Rice AB, Khajo A, Triquigneaux M, Garantziotis S, Magliozzo RS, Mason RP, “Formation of reactive sulphite-derived free radicals by the activation of human neutrophils : an ESR study,” Free Radical Biology and Medicine, 2012.
[219]	Vally H, Misso NLA, Madan V, “Clinical effects of sulphite additives.,” Clinical And Experimental Allergy, 2009.
[220]	国税庁, “酒類製造における亜硫酸の適正使用について,” 10 2013. [オンライン]. Available: http://budou.jpn.org/budou2/wp-content/uploads/2014/07/7f62d366312537ec72563f2476767952.pdf. [アクセス日: 23 1 2020].
[221]	
[222]	独立行政法人 国立健康・栄養研究所, “食品摂取頻度・摂取量調査の特別集計業務報告書追加資料,” 独立行政法人 国立健康・栄養研究所, 平成 22 年.
[223]	国税庁, “国税庁平成 29 年度分酒税課税実績等の状況表　第 1 、2 、4 表,” [オンライン]. Available: https://www.nta.go.jp/taxes/sake/tokei/kazeikankei2017/01.htm.
[224]	国税庁, “国税庁平成 29 年度分酒類販売（消費）数量等の状況表,” [オンライン]. Available: https://www.nta.go.jp/taxes/sake/tokei/kazeikankei2017/01.htm.
[225]	厚生労働省, 平成 29 年国民健康・栄養調査報告, 厚生労働省, 2018.
[226]	食品安全委員会, “食品健康影響評価に用いる平均体重の変更について,” 31 3 2014. [オンライン]. Available: https://www.fsc.go.jp/iinkai/heikintaijyu_260331.pdf.
[227]	佐藤恭子, “生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関わる研究 その 1 指定添加物品目（第 11 回最終報告）平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）,” 2017.
[228]	
[229]	
[230]	国税庁, “平成 29 年度調査分全国市販酒類調査結果,” 3 2019. [オンライン]. Available: https://www.nta.go.jp/taxes/sake/shiori-gaikyo/seibun/06.htm. [アクセス日: 1 2020].
[231]	厚生労働省, “平成 28 年度マーケットバスケット方式による保存料及び着色料の摂取量調査の結果について. 平成 29 年 10 月 6 日薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会報告.,” 2017. [オンライン]. Available: https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzenbu/0000188990.pdf. [アクセス日: 5 3 2019].
[232]	谷村顕雄, 藤井正美, 義平邦利, 伊藤誉志男, 城照雄/監修, 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類. 食品中の食品添加物分析法 解説書, 講談社, 1992.
[233]	Dolmar, “KILOS BISULFITO AMONICO 600 (G/5K),” [オンライン]. Available: https://www.dolmarproductos.com/en_US/producto/kilos-bisulfito-amonico-600-g-5k-15845. [アクセス日: 24 11 2019].

[234]	AZ3oeno, “ Bisulfito amónico, ” [オンライン]. Available: https://www.az3oeno.com/producto/bisulfito-amonico/?_ga=2.191314729.2050886780.1574593980-497142266.1570277412. [アクセス日: 24 11 2019].
[235]	OENOFRANCE, “ BISULFITE D'AMMONIUM, ” [オンライン]. Available: https://www.oenofrance.com/en/our-products/preservatives/bisulfite-dammonium. [アクセス日: 5 10 2019].
[236]	LAMOTHE-ABIET, “ BISULFITE D'AMMONIUM 400, ” [オンライン]. Available: https://www.lamothe-abiet.com/en/stabilization/bisulfite-dammonium-400-en-gb-1.
[237]	Juan Messina S.A,, “ AMMONIUM BISULFITE, ” [オンライン]. Available: www.juanmessina.com.ar/ammonium_bisulfite.htm. [アクセス日: 24 11 2019].
[238]	国税庁, “国税庁所定分析法 3 清酒, ” [オンライン]. Available: https://www.nta.go.jp/law/tsutatsu/kobetsu/sonota/070622/pdf/03.pdf.
[239]	EU, “COMMISSION REGULATION (EU) No 231/2012,” 12 3 2012. [オンライン]. Available: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0231&from=EN.
[240]	EU, “COUNCIL DECISION of 28 November 2008 on the conclusion of the Agreement between the European Community and Australia on trade in wine(2009/49/EC) ” 28 11 2008. [オンライン]. Available: https://eur-lex.europa.eu/eli/dec/2009/49(1)/oj.
[241]	「日本人の食事摂取基準」策定検討会, “日本人の食事摂取基準（2020 年版）”12 2019. [オンライン]. Available: https://www.mhlw.go.jp/content/10904750/000586553.pdf.
[242]	食品安全委員会, “魚介類に含まれるメチル水銀について” 7 2004. [オンライン]. Available: https://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-hyouka-methylmercury.pdf.
[243]	“ PubMed- アンモニウム検索結果, ” [オンライン]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.
[244]	経済協力開発機構“経済協力開発機構(OECD)の化学物質の試験に関するガイドライン 471“ 21 7 1997. [オンライン]. Available: http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg471j.pdf
[245]	経済協力開発機構“経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン 473 “ 26.9.2014. [オンライン] http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg473rj.pdf.
[246]	経済協力開発機構“経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン 474 “ 26.9.2014. [オンライン] http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg474rj.pdf.
[247]	Sigma-Aldrich, “ 5-ブロモ-2′-デオキシウリジン” [オンライン]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/10280879001?lang=ja&region=JP
[248]	David J. Brusick, “ Implications of treatment-condition-induced genotoxicity for chemical screening and data interpretation” Mutation Research, 1987

[249]	David Scott, Sheila M. Galloway, Richard R. Marshall, Motoi Ishidate Jr., David Brusick, John Ashby and Brian C. Myhr, "Genotoxicity under extreme culture conditions" Mutation Research, 1991
[250]	A.H.Seeberg , P.Mosesso and R.Forster, "High-dose-level effects in mutagenicity assays utilizing mammalian cells in culture" Mutagenesis, 1988