

フェロシアン化カリウムに係る
使用基準改正のための概要書

令和 3 年 5 月 2 1 日
独立行政法人酒類総合研究所

用語の定義.....	4
序 フェロシアン化カリウムの食品添加物使用基準改正の必要性	6
I. 添加物の概要.....	6
1. 名称及び用途	6
2. 起源または発見の経緯	6
3. 諸外国における使用状況.....	7
(1) CODEX.....	7
(2) OIV.....	7
(3) EU	7
(4) 米国	9
(5) オーストラリア・ニュージーランド	9
(6) 日本	10
4. 国際機関等における安全性評価.....	10
(1) JECFA	10
(2) SCF、SCAN 及び EFSA.....	10
(3) FDA.....	11
(4) FSANZ	11
(5) 食品安全委員会	11
5. 物理化学的性質	13
(1) 構造式等	13
(2) 製造方法	13
(3) 成分規格	13
(4) 食品添加物の安定性.....	17
(5) 食品中の食品添加物の分析法	17
6. 使用基準案.....	17
(1) 使用基準案	17
(2) 使用基準案の設定根拠	18
II. 有効性に関する知見.....	21
(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	21
(2) 食品中での安定性	22
(3) 食品中の栄養成分に及ぼす影響	23
III. 安全性に係る知見	25
1. 体内動態試験.....	26
(1) フェロシアン化カリウム	27
(2) フェロシアン化ナトリウム	32
(3) 体内動態試験のまとめ	36
2. 毒性試験	37
(1) 亜急性毒性試験及び慢性毒性試験.....	37
(2) 発がん性試験.....	44

(3) 1年間反復投与毒性試験／発がん性併合試験.....	44
(4) 生殖毒性試験.....	45
(5) 出生前発生毒性試験.....	45
(6) 遺伝毒性試験.....	46
(7) アレルゲン性試験	50
(8) 一般薬理試験.....	50
(9) その他の試験.....	50
(10) 毒性試験のまとめ	50
3. ヒトにおける知見.....	51
4. 1日摂取量の推計等.....	51
(1) 現状におけるフェロシアン化カリウム摂取量の推計	51
(2) 使用基準改正後のぶどう酒由来のフェロシアン化カリウム摂取量の推計	54
(3) 使用基準改正後のフェロシアン化カリウムの摂取量推計.....	54
IV. 海外添加物取り扱い社	57
V. 引用文献一覧.....	57

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
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主原料としたもの。
ADI	Acceptable Daily Intake：1 日摂取許容量
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry：米国毒性物質疾病登録機関
BIBRA	British Industrial Biological Research Association：英国産業生物学研究協会
CAS	Chemical Abstracts Service：ケミカル・アブストラクト・サービス
CFR	Code of Federal Regulations：米国連邦規則集
COT	Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment：英国毒性委員会
EC	European Commission：欧州委員会
ECHA	European Chemicals Agency：欧州化学品庁
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 of the United Nations：国際連合食糧農業機関
FAS	WHO Food Additives Series
FASEB	Federation of American Societies for Experimental Biology：米国実験生物学学会連合
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
GRAS	Generally Recognized As Safe：一般に安全とみなされている
GSFA	General Standard for Food Additives：食品添加物の一般規格
IARC	International Agency for Research on Cancer：国際がん研究機関
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives：FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
LD ₅₀	Lethal Dose, 50 %：半数致死量
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level：無毒性量
OIV	Organisation internationale de la vigne et du vin：国際ブドウ・ワイン機構
SCAN	Scientific Committee for Animal Nutrition：欧州動物栄養に関する科学委

	員会
SCF	Scientific Committee for Food：欧州食品科学委員会
TTB	Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau：米国酒類タバコ税貿易管理局
WHO	World Health Organization：世界保健機関

序 フェロシアン化カリウムの食品添加物使用基準改正の必要性

この概要書により使用基準改正を要請するフェロシアン化カリウムは、その使用対象をぶどう酒とし、主に鉄の除去のために使用される。過剰量の鉄がぶどう酒中に存在する場合、製品中で不溶性の混濁物質を形成し、商品価値を大きく損なう原因となる。フェロシアン化カリウムのうち、主として鉄の除去に関与する成分は、フェロシアン化物イオンであり、ぶどう酒中に存在する過剰量の鉄イオンと不溶性の塩を形成し、滓引きやろ過などの固液分離処理によりぶどう酒中より除かれる。フェロシアン化カリウム処理により鉄イオンが極微量に低減化されたぶどう酒は、鉄イオン混濁等による品質劣化の可能性が減少するため、長期間の貯蔵にも耐えうるようになり、品質の保全等消費者の利益保護に繋がる。

I. 添加物の概要

1. 名称及び用途

名称：(和名) フェロシアン化カリウム [1]
(和名別名) ヘキサシアノ鉄(Ⅱ)酸カリウム [1]
(英名) Potassium ferrocyanide [1,2,3]
(英名別名) Potassium hexacyanoferrate(II) trihydrate [1]
CAS 登録番号：13943-58-3 [1,3]
INS 番号：536 [2]
E 番号：E536 [4]
用途：製造用剤(清澄剤) [2,4]

2. 起源または発見の経緯

ぶどう酒の透明度は、飲む人々にぶどう酒の品質を保証する印象を与えている。ぶどう酒が変質した時には、何らかの沈殿とともに濁りを生じる場合があるが、ぶどう酒の混濁の原因として考えられるのは大きく分けて、①ポリフェノールの酸化によるもの、②微生物の増殖によるもの、③金属イオン、タンパク質、酒石等に起因するものの3つである [5,6,7]。

ぶどう酒中には少量ながらもいくつかの金属イオンを含んでおり、鉄、銅などによるぶどう酒の汚染は、ぶどう酒の物理化学的安定性に影響を与え、褐変、白濁及び沈殿物の形成を引き起こす [5,6,8]。ぶどう酒中の過剰な鉄の典型的な除去方法の一つとして、1903年にドイツの化学者 Möslinger によって発見されたフェロシアン化カリウム ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) による処理が知られ、「ブルーファイニング」とも呼ばれている [7,9]。1923年にドイツでは、フェロシアン化カリウムをワイン¹に使用することが推奨されており、フランスでは、1962年にスパークリングワインを含む白ワイン及びロゼワインへフェロシアン化カリウムを使用することが許可された [8]。フェロシアン化カリウムによる鉄等の除去は発酵終了後のぶどう酒に対して行われ、一般的にはフェ

¹ 他国及び国際機関の規則等に記述のある“Wine”に関しては、ぶどう酒ではなくワインと訳す。

ロシアン化カリウム水溶液をぶどう酒に添加し、4～6 日後に形成された沈殿物を滓引きやろ過等により除去する [7,8,10]。

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 OIV や EU をはじめ多くの国では、ワインについてはその製造に関し、操作や使用物品等をポジティブリストとしてまとめており、一般的には食品添加物 (Additive) 及び加工助剤 (Processing aid) を含んだ規則として定めている。国・地域により規則の内容に違いがあるが、ワインが国際性の高い商品であることから、相互に承認する協定 (一方の国・地域における当該規則に従い製造されたワインは、他方の国・地域で市場流通させることができる。) が締結されている例もある。

(1) CODEX

CODEX の GSFA においては、フェロシアン化カリウムは、フェロシアン化ナトリウム、フェロシアン化カルシウムとともに無水フェロシアン化ナトリウムとして、食塩に対して 14 mg/kg まで、食塩代用品及び調味料に対して 20 mg/kg まで使用できると記載されている [11]。

(2) OIV

OIV の定める醸造規則の中では、安定化剤として、フェロシアン化カリウムの記載があり、加工助剤に分類されている [2]。最大使用量に関する記載はない [2]。

(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 (EC) No 1333/2008 [12,13] で定められている。欧州議会・閣僚理事会規則 (EC) No 1333/2008 [12,13] の ANNEX II の中で、フェロシアン化カリウムは塩及び塩代用品に使用可能な食品添加物として掲名されており、フェロシアン化カリウム、フェロシアン化ナトリウム及びフェロシアン化カルシウムのフェロシアン化物をそれぞれ単品あるいは併用して使用する場合、最大使用量は無水フェロシアン化カリウムとして 20 mg/kg と設定されている。また、食品添加物としての規格については、欧州議会・閣僚理事会規則 (EU) No 231/2012 [14] で定められている。

ワインに使用できる食品添加物及び加工助剤については、欧州委員会委任規則 (EU) 2019/934 [4] の Annex I PART A に記載され、この中で TABLE 2 の 6 番目に安定化剤の項目があり、ここにフェロシアン化カリウムが記載されている。使用基準については、同規則 [4] の Annex I PART A に、「EU 加盟国の当局によって正式に承認されたエノログ (ワイン醸造技術管理士) もしくは専門技術者の監督下でのみ使用され、その責任の範囲は、必要に応じて関係する EU 加盟国によって修正されるものとする。フェロシアン化カリウムで処理した後、ワインには微量の鉄が含まれていなければならない」と記載されている。また、同規則 [4] の Article 9 において、「欧州委員会規則 (EU) No 231/2012 に記載がないものについては、その純度及び仕様は Annex 1 Part A の Table 2 のカラム 4 に記載の OIV Codex file に従う」とあ

り、フェロシアン化カリウムは欧州委員会規則（EU）No 231/2012 [14]に記載がある物品であるため、同規則に従うこととなる。

EU 域内での食品添加物に係る規則及びフェロシアン化カリウムの規定は、以下のとおりである。

規則名	
規則の内容	フェロシアン化カリウムの規定
欧州議会・閣僚理事会規則（EC）No 1333/2008 [12,13]	
● 食品への使用が承認された食品添加物名とその使用条件（Annex II） ● 食品添加物、食品酵素、食品香料、栄養素への使用が承認された、キャリアを含む食品添加物名とその使用条件（Annex III）	● 塩及び塩代用品に使用可能 ● 塩及び塩代用品における最大使用量は、フェロシアン化カリウム、フェロシアン化ナトリウム及びフェロシアン化カルシウムのフェロシアン化物を単品あるいは併用した場合、無水フェロシアン化カリウムとして 20 mg/kg と設定されている（Annex II）。※
欧州委員会委任規則（EU）2019/934 [4]	
● 承認されたワイン醸造規則（Annex I PART A） ● ワイン添加物の規格参照先（Article 9, point 1）	● ワイン醸造に用いられるフェロシアン化カリウムの規格は欧州委員会規則（EU）No 231/2012 規格に記載がある。 ● 使用時の基準として、「フェロシアン化カリウムで処理した後、ワインには微量の鉄が含まれていなければならない」と記載されている。
欧州委員会規則（EU）No 231/2012 規格 [14]	
● 食品添加物としての規格（Annex）	● フェロシアン化カリウムは E 番号 536 の食品添加物として規格設定されている（Annex）。

※欧州議会・閣僚理事会規則（EC）No 1333/2008 [12,13]において”E-number: E 535-538”, ”Name: Ferrocyanides”, ” Maximum level (mg/l or mg/kg as appropriate): 20”, ” The additives may be added individually or in combination”, ” The maximum level is expressed as anhydrous potassium ferrocyanide”と記載されている。E 535 はフェロシアン化ナトリウム、E 536 はフェロシアン化カリウム、E 538 はフェロシアン化カルシウムであるが、E 537 については規則（EC）No 1333/2008 [12,13]に掲載されておらず、EU において食品添加物として認

可されていない。

(4) 米国

米国で食品に使用できる物質などについて、FDA が発表しているものは CFR の Title 21 (2020 年度版) の中にまとめられている [15]。一方、ワインなど TTB によって管轄される分野は CFR Title 27 (2020 年度版) にまとめられている [16]。

各 Title は複数の Part から構成され、Title 21 では Part 172 (直接食品添加物)、Part 173 (副次直接食品添加物)、Part 174~178 (間接食品添加物)、Part 180 (暫定直接／間接食品添加物)、Part 182 (GRAS 物質)、Part 184 (GRAS 確認済直接食品添加物)、Part 186 (GRAS 確認済間接食品添加物) となっている。ここには、フェロシアン化カリウムの記載はない。フェロシアン化ナトリウム十水和物 (yellow prussiate of soda) に関しては、Part 172 の Subpart E に記載があり、食塩の Anticaking agent としてその最大使用量は無水フェロシアン化ナトリウムとして 13 ppm を超えないこととされている [17]。

一方、ワインについては CFR Title 27 (2020 年度版) Part 24 (ワイン) に製造方法等の詳細が規定されており、製造に使用できる主な物質はこの中の Subpart L にまとめられている。この中でフェロシアン化物²⁾は FDA の advisory opinion of 06/22/82 により GRAS とされ、ワインの処理に使用可能な承認済み物質として掲載されている³⁾。なお、最終食品に残存するフェロシアン化物の不溶性及び可溶性残留分の合計が 1 ppm を超えないことが定められている [16]。

(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それぞれ別の法律にまとめられている。オーストラリアとニュージーランドに共通する食品添加物については、Australia New Zealand Food Standards Code の Schedule 15 [18]にまとめられており、食塩及び食塩代替品に対してフェロシアン化カリウムを使用してよく、その最大使用量は 50 mg/kg (フェロシアン化ナトリウム及びフェロシアン化カリウムの総量) と設定されている⁴⁾。

また、オーストラリアとニュージーランドに共通する加工助剤については、Australia New Zealand Food Standards Code の Schedule 18 [19]にまとめられている。このリストにフェロシア

²⁾ CFR Title 27 (2020 年度版) Part 24 (ワイン) では、物質名は“Ferrocyanide compounds”とされており、塩種については明記されていない。

³⁾ FDA では GRAS 物質を網羅的に発表していないため、CFR Title 21 に掲載されていない場合がある [107]。

⁴⁾ フェロシアン化ナトリウム及びフェロシアン化カリウムの使用量の合算を行うための換算に関する記載はない。指定等要請者は、それぞれの物質に対して 50 mg/kg の最大使用量の基準が設けられていることから、添加時の形態における総量で規制されていると考えた。

ン化カリウムが記載されており、ワインの製造において、脱色剤、清澄剤、ろ過剤や吸着剤として技術的な目的で 0.1 mg/kg を超えない範囲で使用が認められている。

(6) 日本

我が国においては、フェロシアン化カリウム、フェロシアン化ナトリウム、フェロシアン化カルシウムが食塩の固結防止の目的で 2002 年に食品添加物として指定された [20]。食品添加物等の規格基準によれば、「フェロシアン化カリウムの使用量は、無水フェロシアン化ナトリウムとして食塩 1 kg につき 0.020 g 以下でなければならない。ただし、フェロシアン化カルシウム若しくはフェロシアン化ナトリウムの 1 種又は 2 種と併用する場合にあっては、それぞれの使用量の和が無水フェロシアン化ナトリウムとして、食塩 1 kg につき 0.020 g 以下でなければならない。」とされている [21]。

4. 国際機関等における安全性評価

(1) JECFA

JECFA は、1969 年の第 13 回会合 [22]、1973 年の第 17 回会合 [23,24] 及び 1974 年の第 18 回会合 [25,26] においてフェロシアン化物グループ（フェロシアン化カリウム、フェロシアン化カルシウム及びフェロシアン化ナトリウム）の評価を実施した。JECFA における安全性評価では、1969 年の第 13 回会合において初めて評価が行われ、ラットのフェロシアン化ナトリウム混餌による 13 週間亜慢性毒性試験における腎臓への影響を根拠として、無毒性量（Level causing no toxicological effect）を 0.05 %（500 ppm 相当）混餌したものとする結果に基づき、25 mg/kg 体重/日に相当すると評価し、そこから暫定 ADI として 0-0.00125 mg/kg 体重/日が設定された。その後、1973 年の第 17 回会合でこの無毒性量に基づき、長期の混餌試験がないため通常より大きい安全係数（1,000）を用い、暫定 ADI は 0-0.025 mg/kg 体重/日と再評価され、1974 年の第 18 回会合において JECFA は、同グループの ADI をフェロシアン化ナトリウムとして 0~0.025 mg/kg 体重/日と結論した。

(2) SCF、SCAN 及び EFSA

SCF は、1990 年に添加物フェロシアン化カリウム及び添加物フェロシアン化ナトリウムの評価を実施した。SCF は、JECFA が設定したフェロシアン化物グループの ADI であるフェロシアン化ナトリウムとして 0.025 mg/kg 体重/日に同意し、両物質の ADI をフェロシアン化ナトリウムとして 0.025 mg/kg 体重/日と評価した。SCF は、ワイン製造における加工助剤としての使用ではわずかな残留しか見つからず、また、食塩の固結防止剤としてはわずかな量が必要とされるのみであるとした上で、毒性学的根拠に基づき、これらの目的での継続使用に異議はないと結論した [27]。

SCAN は、2001 年に動物の飼料に添加する塩の固結防止剤であるフェロシアン化カリウム及びフェロシアン化ナトリウムの評価を実施した。SCAN は、飼料への使用に特化した安全性試験はなかったが、人での使用許可の際に使用された試験結果、英国の COT の評価結果

(無毒性量)などを検討し、提案された飼料に使用する塩の固結防止剤としての使用方法で、対象動物及び消費者に対して、安全性について許容されると結論した [28]。

EFSA 専門家パネルは、EC から EFSA への要請を受けて、利用可能な試験結果を基に、食塩及び食塩代替品の固結防止用途で認められている添加物フェロシアン化カリウム及び添加物フェロシアン化ナトリウムについての再評価、並びに添加物フェロシアン化カルシウムの評価を実施し、2018 年に科学意見書を公表した。この科学意見書によると、フェロシアン化物は低吸収でヒトへの蓄積はなく、急性毒性は低く遺伝毒性及び発がん性に関する懸念もなかった。利用可能な生殖毒性試験はなかったが、ラットの出生前発生毒性試験（経口投与）から NOAEL は、フェロシアン化ナトリウムとして 1,000 mg/kg 体重/日（最大用量）と特定された。ラットの混餌による 2 年間慢性毒性試験の NOAEL であるフェロシアン化ナトリウムとして 4.4 mg/kg 体重/日を基に、毒性はフェロシアン化物イオンのみによるものと推測し、フェロシアン化物グループ（フェロシアン化カリウム、フェロシアン化カルシウム及びフェロシアン化ナトリウム）の ADI をフェロシアン化物イオンとして 0.03 mg/kg 体重/日と特定した。以上のことから、EFSA 専門家パネルは、現在の許可された使用法や使用量で安全性の懸念はないと結論した [29]。

(3) FDA

厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会毒性・添加物合同部会に提出された資料によると（原資料は入手不可能）、FDA は、1961 年頃、フェロシアン化ナトリウムを食塩の固結防止剤（人用と動物用）として使用することについて、指定等要請者から提出された亜慢性毒性試験成績や生成する可能性のあるシアンなどを検討した結果、申請された使用量で安全性の懸念はないとした [30,31]。

FDA の委託を受けて FASEB は、1981 年にワイン醸造の際に清澄剤として使用されるフェロシアン化物（フェロシアン化カリウム、フェロシアン化鉄カリウム及びフェロシアン化鉄）の混合物に関して評価を実施し、現在の使用方法で、ヒトへの有害影響を示す合理的根拠はないと報告した [32]。

(4) FSANZ

フェロシアン化カリウムについて、FSANZ の食品基準の添加物及び加工助剤のリストに記載されているが、公表されている資料には評価結果は見いだせなかった [18,19]。なお、2009 年に FSANZ が出版している「食品規制目的のための食事ばく露評価の原則と実践」において、加工助剤は製造後の食品には残留しないため、加工助剤については一般的に食事ばく露評価を実施しないとある [33]。

(5) 食品安全委員会

フェロシアン化カリウムは、食品安全委員会において未評価である。3（6）で記載のとおり、フェロシアン化カリウムは、食品安全委員会設立以前に食品添加物に指定されている。

なお、2002 年 7 月に厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会において、フェロシアン化物グループ（フェロシアン化カリウム、フェロシアン化カルシウム及びフェロシアン化ナトリウム）について審議されているため、参考としてこの際の審議について記載する。

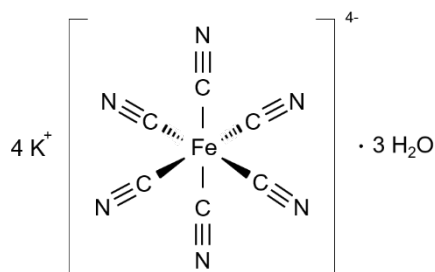
初めに、同分科会毒性・添加物合同部会において、当該評価における指定等要請者（日本輸入食品安全推進協会）からの提出資料 [34]、FDA の評価資料 [30]等を基に審議が行われた。同合同部会は、JECFA の評価結果（ADI の設定）、FDA の評価結果（生成する可能性のあるシアンの安全性）と EU での評価結果（無毒性量）等から ADI の妥当性を検討し、JECFA 及び EU の評価結果の妥当性を確認し、同グループの ADI をフェロシアン化ナトリウムとして 0～0.025 mg/kg 体重/日とし、使用基準案及び成分規格案を定め、同分科会に報告した [30,34,35]。この報告を受け、同分科会においては、同合同部会報告等を基に審議した結果、フェロシアン化物（フェロシアン化カリウム、フェロシアン化カルシウム及びフェロシアン化ナトリウム）を添加物として指定して差し支えない、使用基準及び成分規格を設定すると決議された [36,37]。厚生労働省は、同分科会での審議結果を受けて、2002 年 8 月フェロシアン化物（フェロシアン化カリウム、フェロシアン化カルシウム及びフェロシアン化ナトリウム）を添加物として指定し、食塩における使用基準及び成分規格を設定した [38]。

5. 物理化学的性質

(1) 構造式等

①構造式又は示性式

構造式： [29]



②分子式及び分子量 [1]

分子式： $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$

分子量： 422.39（三水和物）

(2) 製造方法

フェロシアン化カリウムの製造方法として次の二つがある。①粗製シアン化ナトリウムと硫酸鉄（Ⅱ）との加熱反応後再結晶によりフェロシアン化ナトリウムを得る。得られたフェロシアン化ナトリウムと水酸化カルシウムとの反応でカルシウム塩とした後、塩化カリウムと炭酸カリウムを添加することにより製造する。②シアン化カルシウムと硫酸鉄（Ⅱ）を加熱反応（>100 °C）させて得られる溶液から不溶性物質を除去する。その後、塩化カリウムを添加することで生成したフェロシアン化カリウムカルシウムの沈殿に炭酸カリウムを添加し、カリウム塩として溶解させた上で不溶化した炭酸カルシウムの沈殿を除去し、急速冷却することで再結晶化する [29]。

(3) 成分規格

① 成分規格

現在の成分規格から変更はない。

② 食品添加物公定書と国際機関の規格の対照表

次表（表 1）に当該添加物の食品添加物公定書の規格、OIV 規格 [39]、欧州委員会規則（EU） No 231/2012 規格 [14]及び JECFA 規格 [40]を参考として記載した。

表1 食品添加物公定書と国際機関の規格の対照表

	食品添加物公定書規格 [1]	OIV 規格 [39]	欧州委員会規則 (EU) No 231/2012 規格 [14]	JECFA 規格 [40]
含量	99.0 %以上	—	99.0 %以上	99.0 %以上
性状	本品は、黄色の結晶又は結晶性の粉末である。	黄色の単斜晶系結晶で、においはなく、苦味と塩味がある。	レモンイエローの結晶	黄色の結晶又は結晶性の粉末である。
確認試験				
	本品の水溶液（1→100）10 mL に塩化鉄（Ⅲ）試液 1 mL を加えるとき、濃青色の沈殿を生ずる。 本品は、カリウム塩の反応を呈する。	本品の 1 %（m/v）水溶液は、ヘキサシアノ鉄（Ⅱ）酸イオンを生じ、特に鉄（Ⅲ）カチオンと反応して、希薄無機酸に不溶な濃青色のヘキサシアノ鉄（Ⅱ）酸鉄（Ⅲ）（プルシアンブルー）の沈殿を生じる。また、銅カチオンと反応し、希薄無機酸に不溶な紫色のヘキサシアノ鉄（Ⅱ）酸銅（Ⅱ）の沈殿を生じる。 また、この 1 %（m/v）水溶液は、カリウム塩の反応を呈する。	フェロシアン化合物の反応及びカリウム塩の反応を呈する。	本品の 1 %水溶液 10 mL に塩化鉄試液 1 mL を加えるとき、濃青色の沈殿を生じる。 カリウム塩の反応を呈する。
純度試験				
乾燥減量	—	12～13 % (100°C、恒量)	—	—
水分	—	—	1.0 %以下	—
水不溶物	—	10 g のフェロシアン化カリウムを 100 mL の水に溶解したとき、その溶液は透明であること。	0.03 %以下	—
塩化物	—	1 g/kg 未満	0.2 %以下	—

		(塩酸として)		
硫酸塩	—	1 g/kg 未満 (硫酸として)	0.1 %以下	—
硫化物	—	100 mg/kg 未満 (硫黄として)	—	—
シアン化物	硫酸銅 (II) 五水和物 10 mg に水 8 mL 及びアンモニア試液 2 mL を加えて溶かす。この液にろ紙片を浸し、当該ろ紙片を硫化水素にさらすとき、当該ろ紙片は、褐色を呈する。このろ紙片に、本品の水溶液 (1→100) 1 滴を滴加するとき、白色の輪を生じない。	100 mg/kg 未満 (シアン化水素として)	不検出	不検出 水 8 mL 及びアンモニア試液 2 mL の混合液に硫酸銅 10 mg を溶かす。この液にろ紙片を浸し、湿らせたろ紙片を硫化水素気流化に置く。褐色になったこのろ紙片に、本品の 1 %水溶液 1 滴を滴加するとき、白色の輪を生じない。
フェリシアン化物	本品 10 mg を量り、水に溶かして正確に 100 mL とし、検液とする。別にヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウム 10 mg を量り、水を加えて正確に 100 mL とする。この液 2 mL を正確に量り、水を加えて正確に 100 mL とし、比較液とする。検液及び比較液をそれぞれ 10 μ L ずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、検液のヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンのピーク面積は、比較液のヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンのピーク面積を超えない。	—	不検出	不検出 本品 10 mg を 10 mL の水に溶かし、この液を 1 滴スポットプレートに滴加する。1 %硝酸鉛水溶液を 1 滴加え、その後、冷却した 2 N 酢酸をベンジジンで飽和させることにより調製した溶液を数滴滴下するとき、青色の沈殿又は青色の呈色を示さない。
鉛	5 μ g/g 以下 (Pb として)	5 mg/kg 未満	5 mg/kg 以下	5 mg/kg 以下

	水銀	—	1 mg/kg 未満	—	—
	ヒ素	—	3 mg/kg 未満	—	3 mg/kg 以下
	アンモニア	—	100 mg/kg 未満	—	—
	強熱残分	—	—	—	—
	定量法				
	フェロシアン化カリウム	本品約 1 g を精密に量り、水 200 mL を加えて溶かす。この液に硫酸 10 mL を加え、0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム溶液で滴定する。終点は、液の淡赤色が 30 秒間持続するときとする。 0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム溶液 1 mL = 42.24 mg $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	—	—	本品 3 g を 0.1 mg 単位で量り、400 mL 容ビーカーに入れ、225 mL の水に溶解後、25 mL の硫酸試液を添加する。攪拌しながら <i>o</i> -フェナントロリン試液を添加し、0.1N 硫酸セリウムで橙色から黄色に変化するまで滴定する。 0.1N 硫酸セリウム 1 mL = 42.24 mg $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
	保存基準	—	湿気を避け気密容器で保存	—	—

(4) 食品添加物の安定性

オランダの食品添加物メーカーGent्रोchema BV における食品添加物としてのフェロシアン化カリウムの Safety Data Sheet [41]によれば、保管条件は「直射日光を避け乾燥した冷所に保管」であり、当該環境下で安定であると記載されている。また、60℃以上になることで水和水が失われ風解する [41]。

(5) 食品中の食品添加物の分析法

フェロシアン化カリウムは水溶液中ではフェロシアン化物イオンとカリウムイオンに解離しているため、イオン交換やイオンペア試薬を用いた液体クロマトグラフにより分析が可能であることが報告されている。義平ら (1991) は、弱陰イオン交換カラム (DEAE) を使用した電気化学検出器付きイオンクロマトグラフにより、ぶどう酒中のフェロシアン化カリウムが定量可能であったことを報告している [42]。当該手法では、改良ランキン装置によりぶどう酒試料を硫酸酸性下で窒素通気加熱蒸留を行い、得られる気体を水酸化ナトリウム溶液に通じることで、水酸化ナトリウム溶液中に吸収・遊離したシアン化物イオンを前記装置により検出する (定量下限は無水フェロシアン化ナトリウムとして 1 ng/mL (0.001 mg/L)) [42]。一方、広くシアン化合物の分析に用いられている方法の原理に基づく定量法として、衛生試験法・注解 2020 の 4.1.4.3 シアン化合物(2)総シアンの分析法 [43]がある。遊離型シアンのみでなくフェロシアン化カリウム等の錯塩型シアンも HCN として捕集し、クロラミン T との反応で生じる塩化シアンをピリジン・ピラゾロン溶液又は 4-ピリジンカルボン酸・ピラゾロン溶液と混合し、生じる青色色素の可視部吸光度を測定し定量する方法である [43]。この方法の定量下限は、シアンとして 1 µg/10 mL (無水フェロシアン化カリウム相当で 0.24 mg/L⁵) とされており、後述する使用基準案における残存量の確認が可能な精度を有すると考えられる [43]。

6. 使用基準案

(1) 使用基準案

現行 [21]	改正後
フェロシアン化カリウムは、食塩以外の食品に使用してはならない。 フェロシアン化カリウムの使用量は、無水フェロシアン化ナトリウムとして、食塩 1 kg につき 0.020 g 以下でなければならない。ただし、フェロシアン化カルシウム	フェロシアン化カリウムは、食塩及び <u>ぶどう酒</u> 以外の食品に使用してはならない。 フェロシアン化カリウムの使用量は、無水フェロシアン化ナトリウムとして、食塩 <u>にあつてはその</u> 1 kg につき 0.020 g 以下

⁵ 無水フェロシアン化カリウム換算濃度 (mg/L) = 0.1 (mg/L, シアン濃度) ÷ 156.06 (シアニド配位子分子量合計) × 368.34 (無水フェロシアン化カリウム分子量) = 0.236

及びフェロシアン化ナトリウムの1種以上と併用する場合にあっては、それぞれの使用量の和が無水フェロシアン化ナトリウムとして、食塩1 kgにつき0.020 g以下でなければならない。	でなければならない。ただし、フェロシアン化カルシウム及びフェロシアン化ナトリウムの1種以上と併用する場合にあっては、それぞれの使用量の和が無水フェロシアン化ナトリウムとして、食塩1 kgにつき0.020 g以下でなければならない。 <u>また、フェロシアン化カリウムは、無水フェロシアン化カリウムとして、ぶどう酒にあってはその1 Lにつき、0.001 gを超えて残存しないように使用しなければならない。</u>
---	---

(2) 使用基準案の設定根拠

本使用基準改正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、EU での使用基準を確認した。EU でのワインにおけるフェロシアン化カリウムの使用基準は、欧州委員会委任規則(EU)2019/934 [4]のAnnex I PART Aにおいて、「EU 加盟国の当局によって正式に承認されたエノログ（ワイン醸造技術管理士）もしくは専門技術者の監督下でのみ使用され、その責任の範囲は、必要に応じて関係する EU 加盟国によって修正されるものとする。フェロシアン化カリウムで処理した後、ワインには微量の鉄が含まれていなければならない」と記載されている。このようにEUの基準では微量の鉄が残存することが求められており、ワイン中に未反応の微量の鉄が残存する状態であれば、フェロシアン化物と鉄との反応で形成される不溶性プルシアンブルー ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) の溶解度積が約 3.0×10^{-41} と極めて小さいことから（原著論文入手不可能：Tananaev, 1956） [44,45]、使用したフェロシアン化カリウムは、ほとんど鉄と反応してワイン中に残存していないと考えられており、技術書 Principles and Practices of Winemaking によれば [44]、鉄が 0.8 mg/L 残存している時のフェロシアン化物イオンの残存量は 0.02 mg/L であると予測されており、指定等要請者らの推計でもおおむね一致する⁶。

また、OIV が公表している International code of oenological practices にもフェロシアン化カリウムに関する記載があり、有資格醸造責任者が事前に添加量に関する試験を行い、試験処理後のワインにフェロシアン化物及びその誘導体が残存しないことを確認した添加量で、製品となるワインに対し使用することとされている [2]。詳細な試験方法は示されていないが、ぶどう酒醸造に関する書籍 [45]によれば、様々な濃度でフェロシアン

⁶ K_{sp} （溶解度積）＝[鉄イオンのモル濃度]⁴×[フェロシアン化物イオンのモル濃度]³

[フェロシアン化物イオン濃度]＝ $\sqrt[3]{(3.0 \times 10^{-41} \text{（溶解度積）} \div (0.0008 \text{（鉄の含有量 g/L）} \div 55.845 \text{（鉄の原子量）})^4} \times 211.94 \text{（フェロシアン化物イオン分子量）} = 0.0189 \text{ mg/L}$

化カリウムを添加処理したのち、飽和鉄ミョウバン溶液を添加し青色呈色の有無で、余剰のフェロシアン化物の残存を判断するとされている。

一方、いずれも最終食品における残存量に関しては、数値として明確に規定していない。しかしながら、フェロシアン化カリウムの使用にあたっては、前述のとおり事前に試験を行い、十分検討した上で使用量を決定することとされていることから、指定等要請者は、適切に処理されたぶどう酒は、OIV の International code of oenological practices [2] の基準を満たし、基本的にはフェロシアン化物イオンはほとんど含まれていないと考えた。

ここで、使用基準案を設定するに当たり、まず一般的に残存しうるフェロシアン化物イオンの量について試算を行うこととした。Moreno ら (2012) により執筆された Enological Chemistry によれば [45]、ぶどう酒における鉄イオン濃度が分かっている時、1 mg/L の鉄イオンの除去を行う際には、実用上は 6 mg/L のフェロシアン化カリウムを使用するとして概算量を計算し、計算された値と ± 20 mg/L の範囲で事前試験により使用量を検討した上で、見積もられた使用量から 30 mg/L を減算し決定するとされている。Byrne ら (1937) の報告によれば [46]、ぶどう酒中の鉄イオン濃度の平均値は 5.4 mg/L であり、最大量ではぶどう酒 (赤) で 35 mg/L であったとされていることから、35 mg/L (0.627 mM) の鉄を含むぶどう酒 (赤) に対しフェロシアン化カリウム処理を行うとして試算すると、その概算量はフェロシアン化カリウム三水和物として 210 mg/L となり、検討範囲は 190 mg/L ~ 230 mg/L となる。この範囲内で最も使用量が多い場合を想定し 230 mg/L から 30 mg/L を減算し、200 mg/L (0.473 mM) を使用量として残存量を試算した。添加されたフェロシアン化物イオンは鉄イオンと反応後、不溶性プルシアンブルーを形成し、その極めて低い溶解度積のため沈殿し、滓引きやろ過により除去される。処理後のぶどう酒にはフェロシアン化物イオン 0.003 mM が最大で残存することとなり⁷、これは無水フェロシアン化カリウムとして 1.105 mg/L に相当する⁸。ここから、最大の残存量が無水フェロシアン化カリウムとして 1 mg/L と見積もられたことから、使用基準案として無水フェロシアン化カリウムとして 0.001 g/L とした場合の安全性について検討することとした。

まず、残存基準値の存在する他国の状況と比較した場合、米国では「最終食品に残存するフェロシアン化物の不溶性及び可溶性残留分の合計が 1 ppm を超えないこと」と設定されている。不溶性残留分は対イオンと塩を形成し残留分の質量に対イオンの質量も含まれることとなるため、フェロシアン化物の可溶性残留分 (フェロシアン化物イオン) のみ

⁷ $4\text{Fe}^{3+} + 3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} \rightarrow \text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$

上記の反応式より、 $0.627 \text{ mM } (\text{Fe}^{3+}) \times 0.75 = 0.470 \text{ mM}$ (消費される $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$)

0.473 mM (使用量) - 0.470 mM (消費量) = 0.003 mM (最大残存量)

⁸ 0.003 mM (フェロシアン化物イオン) $\times 368.34$ (無水フェロシアン化カリウム分子量) = 1.105 mg/L

が残存し、かつ、その濃度が 1 ppm である場合がフェロシアン化物の上限値となるが、その時の含有量は無水フェロシアン化カリウム換算で 1.74 ppm⁹となり、前記の使用基準案 0.001 g/L は米国の上限値のおおむね 58 %弱となり大きく下回る。また、フェロシアン化物イオンは鉄イオンとシアニド配位子の錯体であることから、解離によるシアン化物イオンの食品への移行が懸念されるが、後述（食品中での安定性及び安全性に係る知見）の理由により指定等要請者はフェロシアン化カリウムの分解により生成するシアン化物イオンについて、毒性影響はないと判断した。

以上のことから、使用基準のフェロシアン化カリウム残存量を 0.001 g/L を超えないこととすれば、フェロシアン化カリウムの摂取量は米国より低い水準となり、かつ対 ADI 比が後述（1 日摂取量の推計等）のとおり約 2.8 %と安全性に懸念がないと考えられるため、使用基準案を「フェロシアン化カリウムは、無水フェロシアン化カリウムとして、ぶどう酒にあってはその 1 L につき、0.001 g を超えて残存しないように使用しなければならない。」と設定した。

⁹ 1 ppm（残留分上限値）÷ 211.94（フェロシアン化物イオン分子量）× 368.34（無水フェロシアン化カリウム分子量）＝ 1.74 ppm（無水フェロシアン化カリウムとしての残留分上限値）

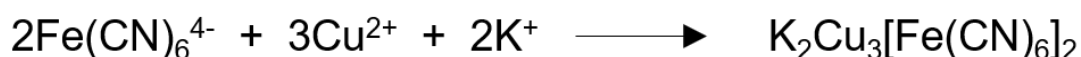
II. 有効性に関する知見

(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

ぶどう酒の製品品質において、混濁は商品特性を大きく損なうことから、避けるべき問題である。混濁の原因としては複数存在するが、鉄イオンが原因となり発生する場合がある。一般に、鉄イオンはぶどう酒中に 1～10 mg/L 程度含まれており、高濃度になると混濁物質を形成する原因となる [47,48]。混濁を形成しないと考えられる鉄イオンの最大濃度は 5 mg/L 程度と見積もられており、5～10 mg/L 以上になると混濁のリスクが高くなると考えられている [47,48,49]。EU 等諸外国ではフェロシアン化カリウムは、ぶどう酒中の鉄イオンの除去に用いられており、以下の反応によりフェロシアン化鉄 (III) を形成する [50,51]。フェロシアン化鉄 (III) の溶解度積は極めて低いため (約 3.0×10^{-41} , [44,52])、形成されたフェロシアン化鉄 (III) は沈殿し、その後滓引き、ろ過等の工程により除去される。また、フェロシアン化物処理は、銅など他の金属イオンも沈殿させることができるため効果的な除去法であるとされており [53]、後述のとおり品質への影響も少ないことが知られている。



ぶどう酒中には鉄イオンと比較し低濃度ではあるものの、銅イオンが 0.03–1.5 mg/L (平均的には 0.2 mg/L) 程度含まれており、0.4 mg/L を超えると混濁のリスクが高まると考えられている [48]。銅イオンもまた、フェロシアン化物処理により効果的に除去可能であることが知られている [51,52]。以下に示すような反応によりフェロシアン化銅カリウム塩を形成し [54]、フェロシアン化鉄 (III) と同様滓引き、ろ過等の工程により除去される。



上記のように、ぶどう酒の品質劣化に繋がる鉄イオンや銅イオンの除去にはフェロシアン化物処理が高い効果を発揮し、以下の表 2 で記載のとおり、フェロシアン化カリウムの添加量に応じて残存している鉄イオンや銅イオン等が減少する [55]。現在使用可能なイオン交換樹脂やフイチン酸も鉄の除去に対して効果的であるとされているが [47,56]、いずれも銅の除去には効果的ではなく、イオン交換樹脂は樹脂の選択によっては香りや味などぶどう酒の品質に影響が出る [56]。また、フェロシアン化カリウムは鉛などのその他の金属イオンも除去可能とされていることに加え [51]、他の清澄剤と比較しても、色の減少や過剰清澄化等、ぶどう酒の品質への悪影響も少ないこと (表 3) [57] が報告されており、ぶどう酒に対するフェロシアン化カリウムの処理は、鉄イオン等が原因となる混濁抑制に非常に有効な手段であると考えられる。

表 2 フェロシアン化カリウム添加によるぶどう酒中の各種金属の除去効果

各種金属濃度	フェロシアン化カリウム		
	未処理	50 mg/L	90 mg/L
鉄 (mg/L)	14	7	1
銅 (mg/L)	4	0.4	0.2
亜鉛 (mg/L)	2.5	1.0	0.2
鉛 (mg/L)	2.5	2.0	0.8
マグネシウム (mg/L)	1.5	1.5	0.5
アルミニウム (mg/L)	10	10	10

表3 色調や品質等の悪化に対する各清澄剤の効果

色の減少	タンニンの減少	滓の形成の減少	透明度及び安定性の向上	過剰清澄化	総合的な品質の低下
炭素	ゼラチン	ベントナイト	ベントナイト	ゼラチン	炭素
ゼラチン	アルブミン	ゼラチン	フェロシアン化物	アルブミン	ベントナイト
カゼイン	アイシングラス	カゼイン	炭素	アイシングラス	カゼイン
アルブミン	カゼイン	アルブミン	アイシングラス	カゼイン	ゼラチン
アイシングラス	ベントナイト	アイシングラス	カゼイン	フェロシアン化物	アルブミン
ベントナイト	炭素	フェロシアン化物	ゼラチン		アイシングラス
フェロシアン化物	フェロシアン化物	炭素	アルブミン		フェロシアン化物

※ 各項目に対する効果や活性の影響の大きいものが上に、小さいものが下に記載されている [57]。

(2) 食品中での安定性

フェロシアン化カリウムは、水への溶解度が 34.9 °Cで 100 g 当たり 28.01 g と溶けやすい [58]。また、フェロシアン化カリウムはイオン結晶であることから、ぶどう酒中では溶解後フェロシアン化物イオンとカリウムイオンとして存在すると考えられる。したがって、フェロシアン化カリウムが鉄や銅などと比較し過剰量添加された場合、残存するフェロシアン化物イオンが酸性条件下あるいは光ばく露条件下のぶどう酒中において分解し、シアン化物イオンを生成する可能性が考えられる。

Chadwick ら (1966) の報告によると、水溶液中におけるシアニド配位子の解離定数は 10^{-35} と見積もられており [59]、フェロシアン化物イオンにおけるシアニド配位子と鉄イオンの結合は一般的に強固であることが知られている。また、Gail ら (2000) の報告によると、 $pK_{\text{dissociation}}$ は、約 42 と見積もられており [60]、鉄イオンとシアニド配位子の結合が非常に強く、実用上無毒であるとしている。ところが、主に低 pH 溶液中において、フェロシアン化物イオンはシアン化物イオンと二価鉄イオンに解離する可能性も指摘されている [52]。フェロシアン化物イオンの分解によるシアン化物イオンの生成とそれに伴う安全性上の懸念についての詳細は、Ⅲ「安全性に係る知見」に記載するが、低濃度のフェロシアン化物イオンが酸性溶液中にあった場合の分解

速度を検討した小野ら（2001）の報告¹⁰を踏まえると [61]、ぶどう酒のような酸性条件とはいえ比較的低温な保管環境下において、フェロシアン化物イオンが分解し、シアン化物イオンが生成する反応は、活性化エネルギーが約 23.2 kcal/mol であり 20 kcal/mol を超えていることに加え室温よりも 10℃程度低い温度であることから、通常起こりにくい反応であると考えられる¹¹。

また、光ばく露条件下においては、フェロシアン化物イオンが一部分解し、シアン化物イオンを放出してペンタシアノアqua鉄（II）酸イオンとなることが知られている。本分解反応は可逆的であり、暗所下でフェロシアン化物イオンに戻ることも報告されている [62]。これについては、ぶどう酒の製品管理上、光のばく露は品質劣化を引き起こすため避けられることに加え、一般的に遮光性が高いガラス瓶を用いているためぶどう酒自体に直接光が照射されることは考えにくく、また、拡散光では安定である [62]とされていることから、ぶどう酒においては光のばく露に起因する分解を無視できると要請者は考えた。

以上のことから、フェロシアン化カリウムは、通常ぶどう酒中においてフェロシアン化物イオンとカリウムイオンに解離して存在し、酸性条件下や光ばく露条件下に起因するシアン化物イオンへの分解については無視できる程度であると言える。

（3）食品中の栄養成分に及ぼす影響

本使用基準改正要請するフェロシアン化カリウムを使用することにより、食品成分に及ぼす影響を考える。ぶどう酒中でフェロシアン化カリウムが解離した際のフェロシアン化物イオンとカリウムイオンに分けて考える。

まず、前述のとおり鉄イオンに対しフェロシアン化カリウムを過剰に添加した場合には、未反応のフェロシアン化物イオンはぶどう酒中に残存することとなる。技術書 Table Wines の Development and stabilization of wine [63]で引用されている 1963 年の Jaulmes の研究では（入手不可能）、ぶどう酒中のビタミンやアミノ酸に対する清澄剤の作用について検討しており、20 mg/L の濃度でフェロシアン化物を添加した場合、シアノコバラミンやチアミン、ビオチンなどのビタミンは化合物により 1～33 %、リジンやメチオニンなどのアミノ酸は 10～21 %が減少するとされている。しかし、これまでに既に使用が認められているベントナイトでも同様の作用（ビタミン類で 16～65 %の減少、アミノ酸で 13～23 %の減少）が認められており [63]、清澄剤の作用として特異なものではなく、他の清澄剤と比較し栄養成分に対し大きく影響しないと考えられる。

また、カリウムイオンは、ブドウに含まれるミネラルの中で最も多く、平均してぶどう酒（白）で約 800 mg/L、ぶどう酒（赤）で約 1,100 mg/L との報告がある [48]。表 2 に記載のぶどう酒中の鉄イオンで試算し、ぶどう酒 1 L 当たり 14 mg の鉄イオンを除去する際に使用したフェロシアン化カリウムが 90 mg であったとすると、ぶどう酒 1 L 当たり増加するカリウムイオンは

¹⁰ 見かけの頻度因子 A_T (4.1×10^{11})、活性化エネルギー E_T (9.7×10^4) 及び pH の影響を反映する因子として m_T (0.40) について決定している。

¹¹ 反応速度定数は pH 3.6、15℃において、 $3.803 \times 10^{-8} \text{ M s}^{-1}$ と推定される。

33.3 mg となり、ぶどう酒（白）の平均カリウムイオン量に対して約 4.2 %、ぶどう酒（赤）の平均カリウムイオン量に対して約 3.0 %であることから、ぶどう酒中の栄養成分に大きく影響しないと考えられる。

III. 安全性に係る知見

「II. (2) 食品中での安定性」に記載したとおり、フェロシアン化カリウムはぶどう酒中でフェロシアン化物イオンとカリウムイオンに解離すると考えられる。そこで指定等要請者は、フェロシアン化カリウムの知見のほか、解離によりフェロシアン化物イオンを生じるフェロシアン化ナトリウム等の知見も、必要に応じ併せて検討することとした。

なお、「II. 有効性に関する知見 (2) 食品中での安定性」に記載したとおり、酸性条件であるぶどう酒中にフェロシアン化物イオンとして残存した場合、鉄イオンとシアン化物イオンに分解される可能性がある。しかし、フェロシアン化物イオンの分解によるシアン化物イオンの生成とそれに伴う安全性上の懸念は、次の理由により極めて低いと考えた。

まず、フェロシアン化カリウムの使用によるシアン化物イオンの蓄積に関する実態として、Table wines で引用されている Tarantola ら (1964) の報告によれば (原著論文入手不可能)、ぶどう酒をフェロシアン化物で処理後、15℃で1か月静置した際の遊離及び総シアン量は0.01 mg/L 以下であったとされている [63]。後述 (1日摂取量推計) のぶどう酒を好んで摂取した場合の1日のぶどう酒摂取量 46.5 mL/人/日を用いて推計すると、ぶどう酒からのシアン化物イオン摂取量は最大でも0.000465 mg/人/日となる。ここで、我が国における清涼飲料水中のシアンの耐容1日摂取量 [64] 4.5 µg/kg 体重/日から日本人成人の平均体重 55.1 kg として推計すると 0.248 mg/人/日となり、ぶどう酒からのシアン化物イオン摂取量はこれと比較し非常に少ない。このように、実態として処理後のぶどう酒にはシアン化物イオンはほとんど含まれないと考えられることに加え、ぶどう酒中ではシアン化物イオンは、水分子やケトン、アルデヒドと反応し消失していくとされており [65]、適正に使用される範囲内では安全性上の懸念はないと考えられた。

一方、使用基準改正に伴うリスクについては最大限見積もる必要がある。前述のとおり (I. 6. (2) 使用基準案の設定根拠)、フェロシアン化カリウムの使用にあたって、既に使用事例のある OIV における作業手順に沿って適切に処理を行う場合、処理後のぶどう酒には通常ほとんどフェロシアン化物イオンは含まれないと考えられるが、未反応のフェロシアン化物イオンが無水フェロシアン化カリウムとして1 mg/L (使用基準案残存上限値) が残存した場合を想定し、フェロシアン化物イオンの分解について推計を行うこととした。指定等要請者らが前述 (食品中での安定性②) の熱力学的パラメータを用いて推計を行った結果、15℃ (一般的なぶどう酒保管温度) において3年間 (一般的なぶどう酒の飲用までの期間 [66]) 保管した場合、0.412 mg/L のシアン化物イオンが生成し、ぶどう酒由来のシアン化物イオン1日摂取量は約0.019 mg/人/日となると見積もられた¹²。これは残存した

¹² $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ の濃度: C_T 、温度 T における反応速度定数: k_T 、 C_T の際の減少量: $(-dC_T/dt) = k_T \cdot C_T$

初期フェロシアン化物イオン濃度: $2.714 \times 10^{-6} \text{ M}$ (無水フェロシアン化カリウムとして 1.0 mg/L)

$k_T = A_T \cdot \exp(-E_T/RT) \cdot C_{H^+}^{mT} = 4.1 \times 10^{11} \times \exp\{-9.70 \times 10^4 / (8.3144 \times 288)\} \times (10^{-3.6})^{0.40} = 3.803 \times 10^{-8}$

3年後における $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ の残存量 $= 2.714 \times 10^{-6} \times \exp(-3.803 \times 10^{-8} \times 365 \times 24 \times 60 \times 60) = 2.714 \times 10^{-6} \times 0.028295 = 0.077 \times 10^{-6} \text{ M}$

全てのフェロシアン化物イオンが分解した場合 (0.424 mg/L¹³) の約 97 %に当たることから、フェロシアン化物イオンの大部分がシアン化物イオンに分解していると考えられる。前述の清涼飲料水中のシアンの評価 [64]において、「(引用開始) 飲料水に対する寄与率を 10 %、体重 50 kg のヒトが 1 日 2 L 飲むと仮定して、シアンの評価値は 0.01 mg/L と求められる (引用終わり)」とされており、ここから 1 日摂取量を見積もると 0.02 mg/人/日となる。ぶどう酒由来のシアン化物イオン 1 日摂取量の見積値 0.019 mg/人/日は、今回要請する使用基準上限量が残存し貯蔵過程における経時的な減少を考えない場合の最大の推計摂取量であるが、飲料水から摂取されうるシアン化物イオンとほぼ同程度であるとともに、前述の清涼飲料水中の耐容 1 日摂取量から推計される 0.248 mg/人/日の約 8%と非常に低い水準である。また、フェロシアン化カリウム摂取後、酸性環境下である胃内で分解しシアン化物イオンが生成する可能性については、体温 37 °C、胃液の pH が 1.5 で胃内での滞在時間が 3 時間と仮定して試算すると、1 mg/L の無水フェロシアン化カリウムを含むぶどう酒を 46.5 mL 摂取した場合に胃内で生成するシアン化物イオンは 0.00097 mg¹⁴であり極めて低い。従って、指定等要請者はフェロシアン化カリウムの使用によるシアン化物イオンについて、ぶどう酒において適正に使用される範囲内では安全性上の懸念はないと結論付けた。

なお、「3. 諸外国における使用状況 (6) 日本」で記載のとおり、2002 年 7 月に厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会において、フェロシアン化物 (フェロシアン化カリウム、フェロシアン化カルシウム及びフェロシアン化ナトリウム) について審議されており、既に食品添加物として指定済みである。このことを踏まえ、2002 年以降の新たな知見について、JECFA, SCF, SCAN, EFSA, FDA 等の国際機関の再評価等新規な調査結果の有無の確認及び Pubmed (従来の Toxline データベースを含む) による調査を行い、2002 年に行われた過去の評価と併せて安全性に関して総合的に考察を実施した。

1. 体内動態試験

体内動態の検討にあたっては、フェロシアン化カリウムに加え、同様に胃でフェロシアン化物イオンに解離すると考えられ、体内動態試験について複数の知見が蓄積しているフェロシアン化ナトリウムの結果も併せて検討することとした。また、フェロシアン化カリウムを被験物質とした報告が少なかったことから、腸管内で一部フェロシアン化物イオンに解離し吸収されることが報告されているフェロシアン化鉄カリウム [67]についても検討し総合的に考察することとした。なお、フェ

$$3 \text{ 年後におけるシアン化物イオンの生成量 (mg/L)} = (2.714 - 0.077) \times 10^{-6} \times 6 \times 26.01 \text{ (g/mol)} \times 10^3 = 0.4115$$

$$\text{ぶどう酒摂取によるシアン化物イオン摂取量 (mg/人/日)} = 0.4115 \times 0.0465 \text{ (L)} = 0.01913 \text{ mg/人/日}$$

$$^{13} \text{ 1 mg/L のフェロシアン化カリウムが全量分解した場合のシアン化物イオン生成量 (mg/L)} = 2.714 \times 10^{-6} \times 6 \times 26.01 \text{ (g/mol)} \times 10^3 = 0.4235$$

$$^{14} k_T = 4.1 \times 10^{11} \times \exp\{-9.7 \times 10^4 / (8.3144 \times 310)\} \times (10^{-1.5})^{0.40} = 4.662 \times 10^{-6}$$

$$\text{胃内でのシアン化物イオン生成量 (mg)} = 2.714 \times 10^{-6} \times \{1 - \exp(-4.662 \times 10^{-6} \times 3 \times 60 \times 60)\} \times 6 \times 26.01 \times 1000 \times 0.0465 = 0.00097$$

ロシアン化鉄カリウムに関しては、フェロシアン化カリウムと考察上密接な関連性があるため、フェロシアン化カリウムの中で検討することとした。

(1) フェロシアン化カリウム

①吸収

Nielsen ら (1990a) の報告では [67]、雌のラット 3 匹 (Wistar ラット : 250~280 g) に 24 時間絶食の後、合成した ^{59}Fe 及び ^{14}C (シアニド配位子) の二重標識フェロシアン化カリウム又はフェロシアン化鉄カリウムの懸濁液を、動物当たりフェロシアン化物が 10~13 mg となるように腹腔内もしくは胃管挿入により投与し、その 7 日後に全身放射能検出器を用いて ^{59}Fe の放射活性を調べている。その結果、胃管挿入による経口投与では投与量に対して、 $\text{K}^{59}\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ で約 0.7 %、 $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ で約 0.03 %、 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ で約 0.09 % の残存であった (腹腔内投与では投与量に対して、 $\text{K}^{59}\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ で約 96 %、 $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ で約 8.6 %、 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ で約 1.2 % の残存)。経口投与した際のフェロシアン化カリウムの鉄イオンは生物学的利用率が非常に低く、尿として排出された分を含めた吸収量は $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ で 2.6 % であり、内 2.5 % は尿として排出されていることから、実際の体内ではフェロシアン化物イオンからの吸収可能な鉄イオンの放出はほとんど起こらない可能性があるとしている。また、 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ の吸収量が 2.6 % であり、 $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ の投与量に対する残存が尿で排泄された量を含め 0.18 % であった結果を踏まえると、 $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ の腸管内での解離は 6.9 % 程度であったと見積もっている。また、 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を経口投与した際の放射性標識シアニド化物イオンの吸収を呼気中及び尿中に排出される ^{14}C から見積もった場合、投与量 36 mg/kg 体重に対し、吸収量はシアニド化物イオンとして 16~60 $\mu\text{g/kg}$ 体重と非常に低いことを踏まえて、フェロシアン化物イオンを経口投与した際の鉄イオン、シアニド化物イオンの生物学的利用率は極めて低いと結論付けている。

Nielsen ら (1988) の報告では [68]、雌雄のブタ (Deutsche Landrasse : 4 週齢、平均体重 6.9 ± 1.0 kg。各群 8-11 匹) に 4 時間絶食の後、 ^{59}Fe -標識フェロシアン化鉄カリウム水溶液 50 mL を経口投与 (0.3 mmol の $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 又は $\text{K}^{59}\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を投与) し、14 日後の ^{59}Fe の放射活性から体内残留率を調べている。その結果、投与量に対する体内残留率は $\text{K}^{59}\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ で 1.47 % だったのに対し、 $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ では 0.20 % と低く、 Fe^{3+} として解離している鉄と比較し、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ の鉄イオンの吸収は少なかった。これらの結果より、ブタにおいては、フェロシアン化鉄カリウムの経口摂取によるシアニド化物イオン、鉄イオンの吸収は低いと結論付けている。

Dvorak ら (1971) の報告によれば [69]、 $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を経口投与した試験からは (Heiligenbergstammes 雄ラット 3 匹 : 200~250 g、個体当たり 40 mg 投与)、投与量の 0.15 % 程度が $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ イオンとして吸収されていたとしている。

②分布

Nielsen ら (1990a) の報告では [67]、雌のラット 3～4 匹 (Wistar ラット : 250～280 g) に 24 時間絶食の後、合成した ^{59}Fe 及び ^{14}C (シアニド配位子) の二重標識フェロシアン化カリウムまたはフェロシアン化鉄カリウムの懸濁液を、動物当たりフェロシアン化物が 10～13 mg となるように胃管挿入により経口投与し、その 7 日後に全身放射能検出器を用いて各臓器の ^{59}Fe の放射活性を調べている。フェロシアン化物イオン由来の鉄イオン、シアニ化物イオンの吸収については前述の通り非常に少ない水準であったが、吸収された ^{59}Fe の臓器局在に関しては、 $\text{K}_4[^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]$ の場合でカーカス (Carcass) が全身保持量の 53.6 % と多く、次いで腎臓の 24.2 %、腸の 11.2 % であり、血中、肝臓、心臓、肺、脾臓などは低い水準であった。一方、 $\text{KFe}[^{59}\text{Fe}(\text{CN})_6]$ では、カーカス (Carcass) と肝臓、血液中が 25 % 前後と同程度で、腎臓や腸、心臓、脾臓などは低い水準となった。

表 4 二重標識フェロシアン化カリウム及び二重標識フェロシアン化鉄カリウムの各組織中における全身保持量に対する割合 (%)

組織 (%)	投与物質	
	$\text{K}_4[^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]$ 全身保持率: 0.09 %	$\text{KFe}[^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]$ 全身保持率: 0.03 %
全血	2.8 ± 1.0 (0.00252)	24.9 ± 3.4 (0.00747)
肝臓	9.9 ± 3.6 (0.00891)	25.9 ± 2.6 (0.00777)
脾臓	1.1 ± 0.3 (0.00099)	1.7 ± 0.2 (0.00051)
腎臓	24.2 ± 14.8 (0.02178)	8.2 ± 2.1 (0.00246)
肺, 心臓	1.1 ± 0.5 (0.00099)	4.6 ± 1.4 (0.00138)
消化管	11.2 ± 0.6 (0.01008)	5.8 ± 3.5 (0.00174)
カーカス (Carcass)	53.6 ± 11.0 (0.04824)	28.6 ± 6.7 (0.00858)

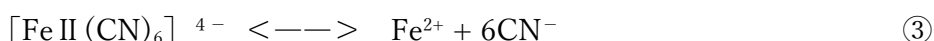
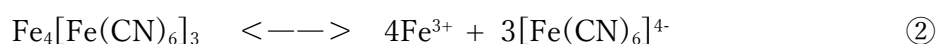
注 1 全身保持率は各投与物質の投与量に対する全身保持量の割合 (%)

注 2 カッコ内は全身保持率及び各組織中における ^{59}Fe の全身保持量に対する割合 (%) を用いて、指定等要請者が推定した投与量に対する割合 (%)

③代謝

Nielsen ら (1990b) の報告によると [70]、ヒト 3 名 (成人男性、体重 70～81 kg) に Fe (III) あるいは Fe (II) 及びシアニド配位子の ^{14}C に標識したフェロシアン化鉄カリウム ($\text{K}^{59}\text{Fe}[\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]$ もしくは $\text{KFe}^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6$) 500 mg (6.2～7.1 mg/kg 体重) を経口投与し、投与から 7 日間の ^{59}Fe の全身保持量と糞便、尿中の ^{59}Fe 並びに ^{14}C の放射活性を計測し、 ^{59}Fe の全身保持率と尿量から標識化した Fe の吸収率を測定した。その結果、 $\text{KFe}^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6$ を投与した際の 7 日経過後の全身保持率は 0.07 % で、尿への排泄は 0.15 % であったが、尿中に排泄された ^{59}Fe はおそらくシアニ化物イオンと結合した $[\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]^{4-}$ の状態であったと推定している。一方、 $\text{KFe}^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6$ を投与後尿から排出された ^{14}C は 0.42 % と ^{59}Fe の 0.15 % と比較し有意に高く、フェロシアン化物イオンが分解し、シアニ化物イオンとなっていることも示唆されていた。これは、呼気から 0.01～0.02 % の $^{14}\text{CO}_2$ が 2 時間以内に排出されたことから裏付けられた。 $\text{KFe}^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6$ を投与した際の尿中に排出された ^{14}C の活性と ^{59}Fe の活性の差 (0.27 %) から、投与された 500 mg の $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ から 0.9 mg のシアニ化物イオン (70 kg の男性として 0.01 mg-CN/kg 体重) が吸収されたことが推定された。この大まかな推定値はヒトにおける致死量 (0.5～3.5 mg CN/kg 体重) の 100 分の 1 以下であり、生体の解毒能を鑑みるとフェロシアン化物の投与によるシアニ化物イオンの蓄積はおそらくないとしている。

Nielsen ら (1990a) の報告によれば [67]、雌のラット 3 匹 (Wistar ラット：250～280 g) に 24 時間絶食の後、合成した ^{59}Fe 及び ^{14}C (シアニド配位子) の二重標識フェロシアン化鉄カリウムの懸濁液を腹腔内投与した結果、鉄イオンとシアニド配位子はおそらく解離していない $[\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]^{4-}$ の状態で投与量の 84～88 % が尿より排泄されているのに対して、 $^{59}\text{Fe}^{3+}$ は一定量が体内に保持 (投与量の 96.2 ± 3.8 %) された。この結果を受けて Nielsen らは、腹腔内投与を行った場合は下記の反応①がほぼ完全に進行したと考察しており、また、各組織から計測した放射活性 $^{59}\text{Fe}/^{14}\text{C}$ の比を算出すると 1.0 に近い数値であり、反応③のような Fe^{2+} イオンとシアニ化物イオンの解離は起こらず、おそらくフェロシアン化物イオンとして存在しているとしている。



①又は②の反応で解離した Fe^{3+} はアポトランスフェリンと結合し、輸送されるため反応が右に傾き進行するが、解離したフェロシアン化物イオンは腎臓を経由し尿として排出されていると Nielsen らは考察している。一方、Nielsen らは解離したフェロシアン化物イオンが③の反応式によりシアニ化物イオンを生成する可能性について、Chadwick らの報告 [59] に基づき水溶液中で分解反応の解離定数は非常に小さい (10^{-35}M) としながらも、経口投与後、胃液や十二指腸液、胆汁、腸内細菌により、有意なシアニ化物イオンと鉄イオンの遊離と吸収に至ることがあるかも知れないと言及している。

Dvorak ら (1971) の報告によると [69]、 $\text{KFe}[^{59}\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を静脈注射により投与した試験から (Heiligenbergstammes 雄ラット 3 匹: 200~250 g、個体当たり 1 mg (2 μCi) 投与)、肝臓などの臓器や筋肉においては $[\text{Fe}(\text{CN})_4]^{4-}$ イオンとしての吸収があったが、その分解の証拠はなかったとしている。また、フェロシアン化物イオンの分解とそれに伴うシアン化物イオンの生成に関して、フェロシアン化物イオンが分解されてできた Fe^{2+} は、フェロシアン化物イオンを構成しない Fe^{3+} と血液中で同様の挙動を示すと考えられるが、 $\text{KFe}[^{59}\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を静脈注射により投与した際は血中の ^{59}Fe の含有量が増加する一方、 $\text{KFe}[^{59}\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を静脈注射により投与した際には血中の ^{59}Fe の含有量は大きく変化していないため、フェロシアン化物イオンの分解による鉄イオンとシアン化物イオンの生成は生体内ではほとんど起こらなかったと結論付けている。

④排泄

JECFA (1975) が引用 [71] している Gage (1950) の報告 (非公開データ) によれば、ラット (系統、性別、匹数不明) にフェロシアン化カリウム (200 mg/kg) を単回経口投与し、尿及び糞便中の物質の排泄量を調べた (計測時間不明)。その結果、未変化体で総投与量の 47 % は便に排泄され、3 % は尿中に排泄された。排泄量は投与後 1~3 日で最大となり、それ以降は低いレベルに低下した。

Nielsen ら (1990a) の報告によると [67]、雌のラット 3 匹 (Wistar ラット: 250~280 g) に ^{14}C -標識フェロシアン化カリウム及びフェロシアン化鉄カリウム (10 mg の $\text{K}_4[^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]$ もしくは $\text{KFe}[^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]$) を経口投与もしくは単回腹腔内投与し、7 日間の単独飼育後に尿や糞便中の ^{59}Fe 及び ^{14}C 、及び投与後 24 時間の呼気中の $^{14}\text{CO}_2$ 放射活性を調べた。その結果、投与量に対し二重標識されたフェロシアン化物イオン ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) は ^{59}Fe を検出対象とすると、経口投与の場合は尿として 2.5 % ($\text{K}_4[^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]$ 投与) 及び 0.15 % ($\text{KFe}[^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]$ 投与)、便として 94.4 % ($\text{K}_4[^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]$ 投与) 及び 101.8 % ($\text{KFe}[^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]$ 投与) が排泄された。腹腔内投与の場合は尿として 98.8 % ($\text{K}_4[^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]$ 投与) 及び 87.2 % ($\text{KFe}[^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]$ 投与)、便として 3.8 % ($\text{K}_4[^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]$ 投与) 及び 3.2 % ($\text{KFe}[^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]$ 投与) が排泄された。また、呼気中の $^{14}\text{CO}_2$ を測定した結果、経口投与の場合は投与量の 0.04~0.08 % に近い程度の放射活性が呼気中に確認され、腹腔内投与の場合は機器のノイズレベルとなる投与量の 0.01 % 未満の放射活性が呼気中に確認された。

表5 ラットにおける ^{59}Fe 及び ^{14}C 二重標識 $\text{K}_4[^{59}\text{Fe}(^{14}\text{CN})_6]$ 投与後の尿及び糞中排泄率 (%)

投与回数	投与量 (mg/kg 体重)	性別	試料	投与後 7 日間	合計
単回	35.7~40 (要請者換算値) ¹⁵	雌	尿	2.5 $\pm$ 0.8	96.9

¹⁵ 二重標識フェロシアン化カリウムの単回投与量が 10 mg であり、投与したラット体重が 250~280 g であったことから、 $10 \text{ mg} \div 0.28 \text{ kg} = 35.7 \text{ mg/kg}$ 体重から $10 \text{ mg} \div 0.25 \text{ kg} = 40.0 \text{ mg/kg}$ 体重の範囲と換算した。

(経口)			糞	94.4 ± 2.9	
単回 (腹腔)	35.7～40 (要請者換算値) ¹⁵	雌	尿	98.8 ± 1.8	102.6
			糞	3.8 ± 2.6	

Nielsen ら (1990b) の報告によると [70]、ヒト 3 名 (成人男性、体重 70～81 kg) に Fe (III) あるいは Fe (II) 及びシアニド配位子の ^{14}C に標識したフェロシアン化鉄カリウム ($\text{K}^{59}\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ もしくは $\text{KFe}^{59}\text{Fe}(\text{CN})_6$) 500 mg (6.2～7.1 mg/kg 体重 (要請者換算値)) を経口投与し、投与から 150 分間で得られる呼気中の $^{14}\text{CO}_2$ 量、投与から 7 日間の ^{59}Fe の全身保持量と糞便、尿中の ^{59}Fe 並びに ^{14}C の放射活性を計測し、 ^{59}Fe の全身保持率と尿量から標識化した Fe の吸収率を測定した。その結果、7 日経過後の全身保持率は $\text{K}^{59}\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を投与した場合 0.03 %、 $\text{KFe}^{59}\text{Fe}(\text{CN})_6$ を投与した場合 0.07 % で、尿に排泄された部分と合わせると吸収率はそれぞれ 0.04 %、0.22 % であった。いずれの投与においても糞便中に投与量の 99 % 以上が排泄されていた。上記の結果を受け、Nielsen らは $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ が重大な放射線事故における放射性セシウムの腸管吸収の阻害や吸収された 137/134Cs の排泄促進に対する安全な解毒薬であると結論している。

Dvorak ら (1971) の報告によると [69]、 $\text{K}_4[\text{Fe}^{59}\text{Fe}(\text{CN})_6]$ の経口投与後 (Heiligenbergstammes 雄ラット 6 匹：200～250 g、個体当たり 0.5～50 mg 投与)、24 時間後に約 2.1 % の ^{59}Fe が尿中に排出されており、血液や肝臓、脾臓、腎臓における保持は極めてわずかであった。また、 $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を経口投与した場合は、約 7 % が解離し、そのうち約 2 % が腸で吸収されたと推定している。静脈内投与した場合には (Heiligenbergstammes 雄ラット 4～8 匹：200～250 g、個体当たり 1.2 mg (2 μCi) 投与)、 $[\text{Fe}^{59}\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ イオンは急速に尿中に排泄され、血液と組織における保持は無視できるほど小さかった。さらに、 $\text{KFe}^{59}\text{Fe}(\text{CN})_6$ の静脈注射による投与では (Heiligenbergstammes 雄ラット 3 匹：200～250 g、個体当たり 1 mg (2 μCi) 投与)、投与した $\text{KFe}^{59}\text{Fe}(\text{CN})_6$ の約 55 % 程度が $[\text{Fe}^{59}\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ として尿や糞便中に速やかに排泄され、残りはコロイドとしての挙動を示すため、腎臓や肝臓などの細網内皮系に保持されていたが、2 日後にはそれらの保持は投与量の約 17 % に減少していた。Dvorak らは、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ が分解している証拠は得られず、フェロシアン化鉄の慢性的投与による有害な副作用も見られなかったと結論付けている。

⑤まとめ

ラットを用いた試験では (Dvorak ら (1971)、Nielsen ら (1990a))、 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 及び $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ の経口投与について調査されている。 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ではその大半 (> 94 %) が吸収されることなく便として排泄され、吸収された $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ のほとんどは尿として排泄され、体内への残存は非常に少ない水準であった (約 0.09 %)。また、Nielsen ら (1990a) の報告によれば [67]、 $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ に関しても、体内でのフェロシアン化物イオンへの解離のしやすさに影響は受けるが、投与量の 0.18 % が $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ イオンとして吸収され、その多くは尿と

して排泄されており、投与量に対し体内への残存は非常に少ない水準であった。このデータの傾向は Nielsen ら (1988) によるブタを用いた報告 [68] 及び Nielsen ら (1990b) によるヒトへの投与試験報告 [70] でも裏付けられており、 $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を経口投与した場合、その体内残留率はブタで 0.20 %、ヒトで 0.22 % であり、投与量のほとんど (80~100 %) は便中に排泄されていた。

EFSA (2018) の報告 [72] では、Gage (1950) 及び Nielsen ら (1990a) の報告に基づき、消化管におけるフェロシアン化カリウムの吸収は限定的であり、大半 (投与量の 95 % 程度) は未変化体のまま糞便中に排泄されると結論している。

指定等要請者は、EFSA(2018)の結論について、次のように考えた。まず、Nielsen ら (1990a) の考察しているラットにおける投与後 7 日後の $\text{KFe}[^{59}\text{Fe}(\text{CN})_6]$ の尿中の排泄量が 0.15 % であり、Nielsen ら (1990b) で行われたヒトにおける試験でも投与後 7 日後の $\text{KFe}[^{59}\text{Fe}(\text{CN})_6]$ の尿中の排泄量が 0.15 % であったことを踏まえ、解離した $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ はラットとヒトでおおむね同様の体内動態を示すと考えた。また、Nielsen ら (1990a) のラットを用いたフェロシアン化カリウムを経口投与した際の吸収率に基づき、フェロシアン化カリウムの経口摂取による吸収率は 2.6 % 程度と考えた。このことは、Dvorak ら (1971) の報告における $\text{K}_4[^{59}\text{Fe}(\text{CN})_6]$ の経口投与時の臓器等への蓄積がほとんど見られず尿中への排泄が約 2.1% であったこととも一致する。さらに、吸収されたフェロシアン化物イオンは、Nielsen ら (1990a) のフェロシアン化カリウムの腹腔内投与による試験結果を踏まえると、その 99 % 程度は尿として排泄されることから、経口投与されたフェロシアン化カリウムはそのほとんどが代謝を受けずに糞便及び尿中に排泄され、体内への吸収は極めて限定的と考えた。

なお、フェロシアン化物イオンから発生するシアン化物イオンについては、フェロシアン化鉄カリウムを用いた報告が複数ある。ブタを用いた Nielsen ら (1988) の報告、ラットを用いた Nielsen ら (1990a) の報告 (いずれも経口投与) では、シアン化物イオンの吸収率、生物学的利用率は低いと結論付けている。ヒトについては Nielsen ら (1990b) の報告があり、経口投与された 500 mg の $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ からフェロシアン化物イオンが分解し、0.9 mg のシアン化物イオン (70 kg の男性として 0.01 mg-CN/kg 体重) が吸収されたと推定している。

Nielsen ら (1990a) は、この推定値はヒトにおける致死量 (0.5~3.5 mg-CN/kg 体重) の 100 分の 1 以下であり、生体の解毒能を鑑みるとフェロシアン化物の投与によるシアン化物イオンの蓄積はおそくないとしている。

指定等要請者は、上記の知見に加えて、I 6 「使用基準案」に記載の添加物「フェロシアン化カリウム」の使用基準、およびⅢ 4 「一日摂取量の推計」に記載の摂取量推計も踏まえると、添加物「フェロシアン化カリウム」由来のシアン化物の吸収は無視できるほどわずかであり、シアン化物イオンの蓄積はないと考えた。

(2) フェロシアン化ナトリウム

①吸収

PubMed（従来の Toxline データベースを含む）で検索したが、フェロシアン化ナトリウムを対象とした体内における吸収挙動を検討した報告は見つからなかった [73]。

②分布

Gersh と Stieglitz（1934）の報告によると [74]、雄のウサギ（1.6～2.2 kg、系統、匹数不明）に無水フェロシアン化ナトリウムとして 0.16 g/kg 体重又は 0.31 g/kg 体重を動物ごとに静脈内注射し、0.16 g/kg 体重の場合は 15 分、0.31 g/kg 体重の場合は 8 分経った後に腎臓、尿細管を摘出、凍結乾燥したものを切片にして観察した。その結果、0.15 g/kg 体重の場合は、いくつかの腎小体のうち特にボーマン囊に近い部分に細かいプルシアンブルーの付着が確認されたほか、尿細管の内腔、特に体の中心に近い側面にもプルシアンブルー分子の付着が確認された。加えて、尿細管の中でも髓質に近い場所でプルシアンブルー由来の青色が多くみられるとある。0.31 g/kg 体重の場合、すべての腎小体の、特にボーマン囊に近い部分で多くのプルシアンブルーが確認された。その他、近位尿細管の内腔、特に末端部分でも多くプルシアンブルーが観察された。フェロシアン化物の組織学的な消去過程を一般化すると、まず、フェロシアン化物の投与直後で血中濃度が高い状況では、フェロシアン化物は糸球体内に存在する。その後、フェロシアン化物を含む腎小体は髓質に近い皮質の深部で見られるようになる。プルシアンブルーの堆積は糸球体よりも近位曲尿細管の管腔で密度が高くなり、ヘンレ係蹄や集合管でより濃縮が見られるようになる。また、ネフロンや集合管内の細胞内ではプルシアンブルーは、検出されないとしている。

Kleeman ら（1955）の報告では [75]、麻酔下のイヌ（雑種、雌、8 匹、体重 10～20 kg）にフェロシアン化ナトリウム 1,000 mg を静脈注射で投与した後、採血を行い、経時的に動脈血を分析することで、赤血球への浸透を推定した。まず、全血中の実測フェロシアン化物イオンと赤血球に取り込まれなかった場合を仮定し推定されたフェロシアン化物イオンの予測値を比較した結果、フェロシアン化物イオンの赤血球への有意な浸透は見られなかったとしている。また、胃液や糞便中からもフェロシアン化物は検出されなかった。

③代謝

PubMed（従来の Toxline データベースを含む）で検索したが、フェロシアン化ナトリウムを対象とした体内における吸収挙動を検討した報告は見つからなかった [73]。

④排泄

Gersh と Stieglitz（1934）の報告によると [74]、雄のウサギ（1.6～2.2 kg、系統、匹数不明、結果 3 例）に無水フェロシアン化ナトリウムを 0.25 g/kg 体重となるように静脈内注射し、一定期間ごと（未記載）にカテーテルを用いて採尿し、尿中のフェロシアン化物イオンを投与後 200 分まで定量した。フェロシアン化物イオンの定量は、25 容量%に希釈した硫酸を尿と

等量加え、攪拌後に硫酸銅（Ⅱ）の標準溶液を滴下することで行った。その結果、投与から 200 分経過した時点で、約 52～58 % のフェロシアン化物イオンが尿中で検出された。

Van Slyke ら（1935）の報告によると [76]、片側の腎臓摘出を行ったイヌ（系統、性別、匹数不明）に、食事から 18～20 時間経過後にフェロシアン化ナトリウムを、0.5 g/kg 体重となるように、1.5～2 時間かけて毎分 1.5～2.7 mL 静脈に注射（無水塩の質量数で計算して 15 質量%の溶液）し、腎臓による血漿からのフェロシアン化物の排出率（%）を測定した。測定に当たって動脈血と腎静脈血を採取し、それぞれの血漿中のフェロシアン化物の濃度を測定してそれぞれ A、R とした場合に、 $\{ (A-R) / A \} \times 100$ の解を排出率（%）とした。この結果、決定数 25 の本実験において排出率の平均は 18.8 %、標準偏差は 5.5 % となった。なお、イヌリン、クレアチニンについて排出率はそれぞれ 22.3 %、19.9 % であった。また、フェロシアン化物のクリアランスはイヌリン・クリアランス、クレアチニン・クリアランスとおおむね同程度であり、フェロシアン化物はイヌにおいてはクレアチニンと同様の経路によって排泄されていることが示唆された。

Berliner ら（1950）の報告によると [77]、雌のイヌ 8 匹（系統不明）に、フェロシアン化ナトリウムとクレアチニンを血漿中濃度が約 20 mg/100 mL となるように継続的に静脈内投与し、個別に設定したクリアランス期間（具体的な開始時間並びに終了時間、期間不明）で得られた尿と動脈血中の血漿から両物質のクリアランスを算出して比較した。尿は留置カテーテルによって採取され、静脈血はクリアランス期間の中間点で採取された。その結果、各クリアランス期間のフェロシアン化物-クレアチニンのクリアランス比は、平均 0.966、標準偏差は 0.041 で分布した。また、いずれの実験によってもフェロシアン化物による毒性影響は見られなかったとしている。この結果を受けて、1975 年の JECFA の報告 [71] では、血漿クリアランスに関して、フェロシアン化ナトリウムとクレアチニンは同一の排泄挙動を示すと考察している。

Kleeman ら（1955）の報告では [75]、麻酔下のイヌ（雑種、雌、7 匹、体重 10～20 kg）にフェロシアン化ナトリウム 1,000 mg を静脈注射で投与した後、尿中のフェロシアン化物イオンを、最初の 3～5 時間は膀胱留置カテーテルにて採取し、その後は自然に排泄された尿を採取し測定した結果、24 時間で投与量の 94～99.7 %（平均 94.8 %）が排泄された。腎排泄は非常に速く最初の 3 時間で少なくとも 80 % が排泄されていた。

Calcagno ら（1951）の報告では [78]、0.01 % フェロシアン化ナトリウム及び 1 % イヌリンを含む 5 % ブドウ糖液を年齢 9 日から 14 カ月までの乳幼児 6 名に、静脈点滴により投与した。イヌリン・クリアランスと比較し、フェロシアン化物のクリアランスは低い値となり（約 0.82～0.85）、このイヌリンとフェロシアン化ナトリウムの糸球体ろ過の比較速度の違いは、新生児においてはフェロシアン化ナトリウムの尿細管での再吸収があることを示唆した。また、フェロシアン化ナトリウムを投与された乳幼児で、排尿障害の証拠は認められなかった。

Kleeman と Epstein（1956）の報告によると [79]、ヒト 9 名（健常（男性）：4 名、腹水のある全身浮腫患者（性別不明）：2 名、浮腫・腹水のない肝硬変患者（性別不明）：1 名、重度

の腎不全患者（性別不明）：2名）に ^{59}Fe で標識化されたフェロシアン化ナトリウム（30～50 mg）を静脈内注射し、24～48 時間尿を採取し、投与量に対し排泄された放射線量を決定した。健常男性4名の24～48 時間に尿で排泄されたフェロシアン化物イオンの放射線量は投与量の68～87%であった。また、プールした糞便、唾液、胃液中に有意な放射活性は検出されなかった。また、健常男性4名におけるクレアチニン・クリアランスの結果を基に計算したフェロシアン化物の処理量はクレアチニンの20～37%であった。投与から10分～1時間のインターバルで静脈血中の血漿を回収し、放射線量の消失する速度及び平衡に達するまでの時間を算出した結果、健常者の検体において、半減期（ $T_{1/2}$ ）は135分であった。

Miller と Winkler (1936) の報告では [80]、7名のボランティア（16～69歳の男性6名、59歳の女性1名）にフェロシアン化ナトリウムを0.55 g から 6.2 g の範囲で静脈内注射後のフェロシアン化物及び尿素のクリアランス速度は本質的に同様であることを示した。これはヒトにおいてはフェロシアン化物が約40%の再吸収率である尿素のように排泄されたことを示唆している。過剰量（推奨用量の5倍量）のフェロシアン化物を投与した被験者では、多数の顆粒円柱、白血球、上皮細胞、希に赤血球を伴う顕著なアルブミン尿症を発症したが、症状は2週間以内に消失した。この間、当該症状を発症した被験者においてフェロシアン化物の投与後5日間で、尿素クリアランスに基づく腎機能の低下は見られなかった。

JECFA (1975) の報告書で引用されている Forero と Koch (1942) の報告（文献入手不可）によれば、115名のヒトにおける糸球体機能に関して、健常人45名と糸球体腎炎患者、高血圧及びアミロイド症の患者70名を対象に研究した。投与された10 mL の5%フェロシアン化ナトリウムの25%が80分以内に排泄され、残りは次の90分で糸球体濾過により排泄されたとしている [71]。

⑤まとめ

JECFA (1975) の報告書によれば、Van Slyke ら (1935) 及び Berliner ら (1950) の報告に基づき、次のように報告している。鉄とシアン化物基との強い化学結合のためこれらの塩の毒性は低く、イヌにフェロシアン化ナトリウム（0.5 g/kg 体重）を静脈内投与した時、高い尿素クリアランス、肉眼的または顕微鏡的に血尿もないことから、腎障害を示すこともなく塩が排泄されていた。注射後数週間のクリアランスでは、慢性の血尿、アルブミン尿または円柱尿症を生じることもなく、完全に正常であると判明した。フェロシアン化ナトリウム、イヌリン及びクレアチニンは、血漿クリアランスに関して同一の排泄挙動を示し、イヌではフェロシアン化物はおそらく糸球体濾過によって完全に排泄されるとしている [71,76,77]。

排泄速度に関する検討としては Gersh と Stieglitz (1934) の報告、Kleeman ら (1955) の報告、Kleeman と Epstein (1956) の報告及び JECFA (1975) の報告書で引用されている Forero と Koch (1942) の報告があり、Gersh と Stieglitz (1934) の報告によれば [74]、ウサギにフェロシアン化ナトリウムを静脈内投与した場合200分で約52～58%が排泄され、Kleeman ら (1955) の報告では [75]、イヌにフェロシアン化ナトリウムを静脈内投与した場合3時間で

投与量の 80%、24 時間で投与量の 94～99.7 %が排泄され、Kleeman と Epstein (1956) の報告では健常男性 4 名における半減期 ($T_{1/2}$) は 135 分とされ、Forero と Koch (1942) の報告では (文献入手不可能)、115 名のヒトを対象とした試験において投与量の 25%が 80 分以内に排泄され残りは次の 90 分で排泄されたとしている。

指定等要請者は、JECFA(1975)の考察について、Miller と Winkler(1936)の報告や Calcagno ら (1951) の報告にあるようにヒトでは再吸収される可能性があるが、Van Slyke ら (1935) 及び Berliner ら (1950) の結果でイヌにおいてはフェロシアン化ナトリウムのクリアランスがイヌリン等のクリアランスとおおむね同程度あることを踏まえ、投与されたフェロシアン化ナトリウムは代謝を受けずに糸球体濾過によりそのまま速やかに排泄されると考えた。

(3) 体内動態試験のまとめ

フェロシアン化カリウムについて、Dvorak ら (1971)、Nielsen ら (1990a) により行われたラットを用いた報告では [67,69]、経口投与された量の大半 (> 94 %) が吸収されることなく糞便中に、また、吸収されたフェロシアン化物イオンもほとんどが尿中に排泄されたとされている。EFSA (2018) の報告書でも [72]、Gage (1950、入手不可能) 及び Nielsen ら (1990a) の報告に基づき [67]、消化管におけるフェロシアン化カリウムの吸収は限定的であり、大半 (投与量の 95 %程度) は未変化体のまま糞便中に排泄されたとしている。また、フェロシアン化ナトリウムについて、JECFA の報告書 [71]では、Van Slyke ら (1935) 及び Berliner ら (1950) の報告 [76,77]に基づき、イヌを用いた静脈投与試験でフェロシアン化物は糸球体濾過で完全に排泄されたとしている。

また、体内における代謝に関して Nielsen ら (1990b) の報告によれば [70]、フェロシアン化物中の分解産物としてのシアン化物は、ヒトに対し $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を 500 mg 投与した際に、0.9 mg 程度シアン化物として吸収されたと見積もられているが、これはヒトの中毒量の 20～100 分の 1 以下の値であり、タバコ等他のばく露源からの吸収量よりも低いと見積もられている。なお、微量検出されるシアン化物イオンは、生体内代謝を受けチオシアンイオン (ロダンイオン) として尿中排泄されていることが動物で明らかにされており、ヒトにおいてもシアン化物イオンの代謝解毒系としてのロダネーゼまたは 3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素によるチオシアンイオンの産生はよく知られている。清涼飲料水におけるシアン化物イオンの耐容 1 日摂取量は 0.248 mg/人/日 ($4.5 \mu\text{g/kg}$ 体重/日、体重 55.1 kg として [64]) であり、フェロシアン化物の体内での分解がおおむね同程度起こるとした場合、約 137 mg/人/日以上の投与時にシアン化物の TDI を超えると見積もられる。

一方、EFSA (2018) の報告書では [72]、フェロシアン化ナトリウム、フェロシアン化カリウム及びフェロシアン化カルシウムにおけるグループ ADI の 0.03 mg/kg 体重/日 (フェロシアン化物イオンとして) の範囲内での使用において、潜在的にありうるシアンの遊離量では安全性上の懸念はないと結論している。指定等要請者も、今回要請する使用基準案による摂取量

推計では ADI を下回るため、フェロシアン化物の分解により生じるシアン化物による安全性の懸念は極めて低いと判断した。

指定等要請者は、フェロシアン化カリウムの経口投与試験の結果、経口投与したこれらのフェロシアン化物塩はほとんどが糞便として排泄され吸収されないと考えた。また、フェロシアン化ナトリウムも含め腹腔内投与や静脈注射投与など体内に吸収されやすい経路で投与し、吸収後の挙動を解析した結果から、吸収されたフェロシアン化物イオンのほとんどはそのまま尿中に排泄されると判断した。以上を総合的に勘案し、指定等要請者は、フェロシアン化カリウム及びフェロシアン化ナトリウムの経口投与後の生物学的利用率は極めて低く、経口で摂取されたフェロシアン化物は大半が糞便として排泄され、わずかに吸収されたフェロシアン化物も尿として排泄されと考え、フェロシアン化カリウム及びフェロシアン化ナトリウムの体内動態からみたフェロシアン化カリウムの安全性に関する懸念は示されていないと結論した。

2. 毒性試験

フェロシアン化カリウムを被験物質とした毒性に係る知見は非常に限られており、急性毒性試験と遺伝毒性試験成績のみであった。そこで、フェロシアン化カリウム同様、胃でフェロシアン化物イオンに解離すると考えられるフェロシアン化ナトリウムを被験物質とした試験成績も含め、総合的にフェロシアン化カリウムの毒性に関する検討を行うこととした。

(1) 亜急性毒性試験及び慢性毒性試験

1) 急性毒性試験

① ラットを用いた単回経口投与毒性試験

JECFA (1975) が引用している未公開資料によると [81]、Fasset (1958、未公開資料かつ入手不可能) がラット (匹数、性別不明) を用いて経口投与による急性毒性試験 (投与物質、及び用量設定等の詳細不明) を行った結果、LD₅₀ 値は 1,600～3,200 mg/kg 体重だったと報告されている。また、2018 年に EFSA でも同様の資料を引用していると考えられるが [82]、Fasset (1958、未公開資料かつ入手不可能) がラット (匹数、性別不明) に行ったフェロシアン化カリウムの経口投与試験の結果、フェロシアン化カリウムの LD₅₀ 値は 1,600～3,200 mg/kg 体重だったと報告されている。

ECHA (1984) の報告によると [83]、OECD ガイドライン 401 にしたがって Wistar ラット (雄 (55 日齢、144～166 g)、雌 (66 日齢、139～153 g)、雌雄各群 5 匹) にフェロシアン化ナトリウムを強制経口投与 (用量不明) した。その結果、5,110 mg/kg 体重投与した時点ですべてのラットが死亡せず、投与初日に下痢を発症した。ここから、LD₅₀ は 5,110 mg/kg 体重であると報告されている。また ECHA ではこの結果を受けて、フェロシアン化カリウムについても Read-across により 5,110 mg/kg 体重と評価している。

以上の試験結果を、下記の表 6 にまとめた

表6 各フェロシアン化物の急性毒性試験

被験物質	投与経路	試験対象	LD ₅₀	参考文献
フェロシアン化カリウム	経口	ラット (匹数、性別不明)	1,600～ 3,200 mg/kg 体重	[82]
フェロシアン化ナトリウム	強制 経口投与	ラット (雌雄各 5 匹)	5,110 mg/kg 体重	[83]
不明	経口	ラット (匹数、性別不明)	1,600～ 3,200 mg/kg 体重	[81]

2) 亜急性毒性試験及び慢性毒性試験

① ラットを用いた 90 日間反復投与毒性試験

JECFA の報告でも引用されている Oser (1959) の未公表資料 (入手不可能) について、1969 年に BIBRA がまとめ、公表している [84]。それによれば、各群雌雄各 10 匹のラットにフェロシアン化ナトリウムを 0、0.05、0.5 又は 5 %の用量で 90 日間混餌投与した結果、生育が 5 %群でわずかに遅れたが、雄のみ有意であった。体重増加率で差はみられなかった。摂餌量の減少はいずれの群においても認められなかったが、飼料効率も雌雄とも 5 %群で減少した。ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値は雌雄とも 5 %群で低値を示し、雄では両方とも有意に減少したが、雌ではヘマトクリット値のみ有意であった。BIBRA は赤血球数の減少がないことから、これらの所見は小赤血球性貧血を示唆しているとしている。その他の群では対照群と差はみられなかった。臓器重量では、雌雄の 5 %群及び雌の 0.5 %群で腎重量が増加し、また、雄の 5 %群で副腎、雌の 5 %群では下垂体重量も増加した。肉眼的変化は 5 %群の腎臓でのみ観察されたが、病理組織学的検査では、0.5 %群の腎臓で曲尿細管上皮の障害が限局的に観察され、5 %群ではこの病変はより広範囲の尿細管で観察された。さらに 5 %群では、腎盂上皮に顆粒状物質の沈着と石灰沈着が観察され、また、一部腎盂粘膜には扁平上皮化生もみられた。この結果を受けて BIBRA では、ラットへの 90 日間混餌投与でのフェロシアン化ナトリウムの無影響量を 0.05 % (25 mg/kg 体重/日に相当) と評価し、またヒトの安全な摂取量としては、安全係数 100 を適用し 0.25 mg/kg 体重/日とした。

表7 用量設定

用量設定 (混餌率, %)	0、0.05、0.5、5 %
mg/kg 体重/日に換算 ¹⁶ (JECFA)	0、25、250、2,500 mg/kg 体重/日

¹⁶ JECFA の報告書 [85]に記載の”Rat: 500 ppm (0.05 %) in the diet equivalent to 25 mg/kg bw.”から 0.05 %を 25 mg/kg 体重として、0.5 及び 5 %については指定等要請者が換算した値。

mg/kg 体重/日に換算 ¹⁷ (EFSA)	0、45、450、4,500 mg/kg 体重/日
------------------------------------	---------------------------

表 8 90 日間反復投与毒性試験（ラット）で認められた毒性所見

投与群	毒性所見	
	雄	雌
25 mg/kg 体 重 / 日 以下	毒性所見なし	
250 mg/kg 体重/日		・ 腎重量の増加
	・ 腎臓の曲尿細管上皮に限定的な障害	
2,500 mg/kg 体 重/日	・ 有意な生育の遅れ ・ ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値が有意に減少 ・ 副腎重量の増加	・ 生育の遅れ ・ ヘモグロビン濃度が低値を示し、ヘマトクリット値が有意に減少 ・ 下垂体重量の増加
	・ 飼料効率の低下 ・ 腎重量の増加 ・ 腎組織の外観変化 ・ 腎臓の尿細管に障害 ・ 腎盂上皮に顆粒状物質の沈着と石灰沈着 ・ 一部腎盂粘膜に扁平上皮化生	

一方、JECFA（1974）の報告では [85]、Oser（1959）の未公表資料（入手不可能）を引用し、無毒性量をラットで 500 ppm（25 mg/kg 体重/日に相当）と評価した上で、安全係数として 1,000 を適用してヒトにおける ADI を 0～0.025 mg/kg 体重/日と評価した。

EFSA では前述の JECFA で引用されている Oser（1959）の未公表資料（入手不可能）の結果から、0.5 %の用量において腎臓の尿細管損傷が観察され、5 %の用量においては尿細管へのより顕著な損傷に加え、生育の遅れ、食餌量の減少、ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の減少、腎重量の増加、副腎重量（雄）、下垂体重量（雌）の増加が見られたとし、0.5 %以上で用量依存的な影響が腎臓において観察されたとしているが、この試験に基づいた NOAEL の決定及び ADI の設定は行っていない。

¹⁷ EFSA の報告書 [82]に記載の換算値（EFSA では実測値の算出が困難な場合には、ラットにおける亜急性毒性試験の場合には 0.09 の係数を用いて補正することとしている）。

厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会毒性・添加物合同部会の報告 [86]では JECFA (1974) の報告 [85]を元に評価を行い、無毒性量を 0.05 % (25 mg/kg 体重/日に相当) とした上で、安全係数について試験期間の短さを鑑みて 1,000 と判断し、ADI を JECFA と同様に無水フェロシアン化ナトリウムとして 0 ～0.025 mg/kg 体重/日としている。

指定等要請者は、Oser (1959) のラットを用いた 90 日間反復投与毒性試験において、0.5 % 群及び 5 % 群の腎臓で投与量依存的な曲尿細管上皮の障害が限局的に観察されたことに基づき、NOAEL を設定するに当たっては影響が観察されなかった 25 mg/kg 体重/日を考慮することとした。

② イヌを用いた 13 週間反復投与毒性試験

JECFA の報告 [85]でも引用されている Morgaridge (1970) の未公表資料 (入手不可能) によると、表 9 の用量でフェロシアン化ナトリウムを混餌し、各群 8 匹のイヌ (雌雄各 4 匹、ビーグル) に 1 日当たり 1 時間、1 週間に 6 日間の間隔で 13 週間投与し、影響を評価している。

表 9 用量設定

用量設定	0、10、100、1,000 ppm
mg/kg 体重/日に換算 ¹⁸ (JECFA)	0、0.26、2.6、26 mg/kg 体重/日
mg/kg 体重/日に換算 ¹⁹ (EFSA)	0、0.25、2.5、25 mg/kg 体重/日

その結果、体重や摂食量は対照群と投与群で同程度であり、また、血液学的検査、生化学的検査、尿検査並びに肉眼的及び病理組織学的検査においても正常範囲内であった。対照群と投与群で臓器重量に顕著な差は生じず、組織学的研究で 1,000 ppm 投与を行った 1 匹で腎臓と肝臓に慢性的な炎症が見られたものの、その他の被験動物では特段の影響は観察されなかったとしている。

また、Morgaridge (1970) の報告は EFSA の評価 [82]にあたっても引用されており、EFSA では、外観、行動、体重変化、体調、泌尿器病理学的、血液学的、生化学的パラメーターや組織病理学的に用量依存的な効果は観察されず、イヌに 13 週間フェロシアン化ナトリウムを混餌投与した場合最大 1,000 mg/kg (25 mg/kg 体重/日) まで用量依存的な影響は見られないとしている。

¹⁸ JECFA の報告書 [85]に記載の換算値。1 日の平均摂食量に関するデータが公開されていないため、指定等要請者における換算が不可能。

¹⁹ EFSA の報告書 [82]に記載の換算値。

表 10 13 週間反復投与毒性試験（イヌ）で認められた毒性所見

投与群	毒性所見	
	雄	雌
2.6 mg/kg 体重/日以下	・ 毒性所見なし	
26.0 mg/kg 体重/日	・ 1,000 ppm を投与した 1 匹において腎臓、肝臓に慢性的な炎症	

厚生労働省でも、2002 年の薬事食品衛生分科会毒性・添加物合同部会の資料 [86]において、Morgaridge (1970) の未公表資料（入手不可能）に基づいて、フェロシアン化ナトリウムを 1,000 ppm までの用量でイヌ（雌雄各 4 頭、ビーグル）に 13 週間混餌投与しても、一般状態、体重、体調、血液学的検査、生化学的検査、尿検査、病理学的解剖検査及び病理検査においてフェロシアン化ナトリウム投与に起因する影響は認められなかったとしている。

指定等要請者は、Morgaridge (1970) の報告におけるイヌを用いた 13 週間反復投与毒性試験において、1,000 ppm 投与を行った 1 個体の組織学的試験で腎臓と肝臓に慢性的な炎症が見られているものの、他の個体では特段の影響は観察されていないことから、その炎症が投与に関連していると結論することはできないと考え、NOAEL を設定するに当たり影響が観察されなかった 1,000 ppm（JECFA 換算値：25 mg/kg 体重/日）を考慮することとした。

③ ラットを用いた 49 週間反復投与毒性試験

EFSA (2018) の報告 [82]で引用されている COT (1994) の報告（入手不可能、未公表：1974 年から 1976 年の間に BIBRA が実施した試験）によれば、各群雌雄各 12 匹の Wistar ラット（体重未記載のため不明）にフェロシアン化ナトリウム十水和物を 0、50、500 又は 5000 mg/kg の用量（表 11）で 49 週間混餌投与し、47～49 週で尿のサンプリングを、試験終了時に血液のサンプリングを行い、血液は赤血球数、白血球数、赤血球容積比、ヘモグロビン濃度、白血球分類計数値及び網状赤血球数を、尿はビリルビン、糖、潜血、ケトン体及び蛋白質を分析した。試験終了時はすべてのラットの解剖を行い、心臓、腎臓、肝臓、肺及び脾臓の病理組織学検査を行った。その結果、尿検査では、対照群と比較して 500 及び 5,000 mg/kg 群の雌雄のラットにおける 2 時間尿サンプル中の平均細胞数が統計学的に有意に増加した（表 12）。また、6 時間目及び 18 時間目に採取した雌雄の最高用量群からの尿サンプルの濃度が対照と比べて統計的に有意な高値を示した。一方、49 週間フェロシアン化ナトリウムを 0, 4.5, 45, 450 mg/kg 体重/日となるよう投与したラットにおいて、腎臓における投与に関連した影響は見られなかったとしている。

指定等要請者らは、COT (1994) の報告における 49 週間反復投与毒性試験において観察された 2 時間尿サンプル中の平均細胞数の有意な増加が腎臓への影響を示唆することから、50 mg/kg で毒性影響が見られていないことは NOAEL 設定の根拠となると判断した。

表 11 用量設定

用量設定 ²⁰ (mg/kg フェロシアン化ナトリウム)	0 (対照群)、50、500、5,000 mg/kg
--	----------------------------

表 12 49 週間反復投与毒性試験 (ラット) で認められた毒性所見

投与群 (mg/kg)	0 (対照群)	50	500	5,000
2 時間尿サンプル中の平均細胞数 (個/時間)				
雄	683	533	<u>1,517</u>	<u>4,000</u>
雌	250	418	<u>4,200</u>	<u>4,782</u>

注：下線は対照群に比べ統計学的に有意

④ ラットを用いた 2 年間反復投与毒性試験

EFSA (2018) の報告 [82] で引用されている COT (1994) の報告 (入手不可能、未公表：1974 年から 1976 年の間に BIBRA が実施した試験) によれば、各群雌雄各 48 匹の Wistar ラット (初期体重 40～60 g) にフェロシアン化ナトリウム十水和物を 0、50、500 又は 5000 mg/kg の用量で 2 年間混餌投与し (表 13)、経時的に血液、尿のサンプリングを行い、血液は赤血球数、白血球数、赤血球容積比、ヘモグロビン濃度、白血球分類計数値及び網状赤血球数を、尿は容量、比重、pH、ビリルビン、糖、潜血、ケトン体及び蛋白質を分析した。また、試験終了時には主要な臓器における腫瘍成分、非腫瘍成分について調査した。その結果、9 ヶ月までの期間の飲水量が、高用量群のラットでは雌雄ともに対照群及び他の二つの投与群 (低用量及び中用量) と比べて増加した。尿検査では、投与群 (特に中及び高用量群) で対照群と比較して、2 時間尿サンプル中の平均細胞数が統計学的に有意に高値を示した ($p < 0.05$, $p < 0.001$) ことを除いては、投与に関連した有害影響は観察されなかった (また、平均細胞数の上昇も試験期間を通して一貫性はないとしている)。2 年間フェロシアン化ナトリウムを 0, 4.5, 45, 450 mg/kg 体重/日となるよう投与したラットにおいて、腎臓における投与に関連した影響は見られなかったとしている。

²⁰ 当該試験期間における 1 日の平均摂食量に関するデータが公開されていないため、指定等要請者による mg/kg 体重/日への換算が不可能。

表 13 用量設定

用量設定 (mg/kg フェロシアン化ナトリウム)	0 (対照群)、50、500、5,000 mg/kg
mg/kg 体重/日に換算 ²¹	雄：0、4.4、45、450.7 mg/kg 体重/日 雌：0、6.2、62.5、630.1 mg/kg 体重/日

また、対照群と比べて高用量群の雄ラットで肺炎（20/48 匹）、並びに中用量及び高用量群の雌雄両方で肺気腫の発生数（7/48 匹及び 13/48 匹）が統計学的に有意に増加したが、その他に投与に関連した統計学的に有意な影響は報告されていないとしている。

指定等要請者は、2 年間反復投与毒性試験の結果、高用量群における飲水量の増加、高用量群の雄ラットでの肺炎、中用量及び高用量群の雌雄両方での肺気腫の発生数の増加、並びに中用量及び高用量投与群における 2 時間尿サンプル中の平均細胞数の増加が見られていることについて、次のように考えた。飲水量の増加は、対イオンであるナトリウムイオンによる影響（根拠は後述の（5）出征前発生毒性試験に記載）と判断した。肺炎及び肺気腫の増加については、フェロシアン化物の主な標的臓器は腎臓であり、Nielsen らにより行われたフェロシアン化カリウムを用いた体内動態試験 [67]における分布においても肺における蓄積は極めて低いことから（前述の III 1（1）②分布の表 4、経口投与時の投与量に対する肺と心臓における保持率推定値合計 0.00099 %）、フェロシアン化ナトリウム投与による影響と結論付けることはできないと考えた。一方、2 時間尿サンプル中の平均細胞数の一過性の増加は前述のとおり 49 週間反復投与試験でも観察されており、中用量及び高用量群で統計的に有意な影響があったと考えられることから、49 週間反復投与試験と同様に、50 mg/kg（雄：4.4 mg/kg 体重/日、雌：6.2 mg/kg 体重/日）で毒性影響が見られていないことは NOAEL 設定の根拠となると判断した。

⑤ 反復投与毒性試験のまとめ

反復投与毒性試験に関しては、Oser (1959) のラットや Morgaridge (1970) のイヌを用いたフェロシアン化ナトリウムの混餌投与試験のほか、EFSA (2018) が引用している COT (1994) により実施されたラットを用いた 49 週間及び 2 年間混餌投与試験が報告されている。EFSA パネルは、中用量及び高用量群の動物は 2 時間尿サンプルにおいて、対照群よりも著しい細胞排出率（cell excretion rate）を示したことについて、この影響は雄と雌の両方で見られたが、一貫性はなく動物間の変動も大きかったとしている。また、対照群と比べて細胞排泄率の増加は低用量群でも見られたが、3 回のみであり、病理組織学的検査で腎臓に有害影響は見られなかったとまとめている。この結果を受け、EFSA パネ

²¹ EFSA の報告書 [82]に記載の換算値を使用。1 日の平均摂食量に関するデータが公開されていないため、指定等要請者における換算が不可能。

ルでは、腎臓がフェロシアン化物の標的臓器であることが知られていることから、一過性の腎臓毒性を示唆する細胞排出率の増加を考慮し、NOAEL を 50 mg/kg (雄で 4.4 mg/kg 体重/日、雌では 6.2 mg/kg 体重/日に相当) と判断している。JECFA (1975) の報告書によれば、BIBRA (1969) がまとめたラットに 0、0.05、0.5 または 5 % の用量で 13 週間混餌投与した試験では 0.5 % 以上の群において曲尿細管上皮で障害が観察されていることから、NOAEL を 0.05 % (25 mg/kg 体重/日に相当) と評価し、ADI を 0 ~ 0.025 mg/kg 体重/日と評価している [26]。一方、JECFA の報告 [85] で引用されている Morgaridge (1970) の未公表資料 (入手不可能) では、イヌに 0、10、100、1,000 ppm の用量で 13 週間混餌投与した試験では、最高用量においても毒性影響は観察されなかったと報告されているが、NOAEL に関しては言及されていない。

指定等要請者は、Oser (1959)、Margaridge (1970) 及び COT (1994) の試験結果について、試験期間の長さで NOAEL を設定可能な結果が得られているかに基づいて検討したところ、COT (1994) により実施されたラットを用いた 49 週間混餌投与試験及び 2 年間混餌投与試験において 500 mg/kg 及び 5,000 mg/kg で 2 時間尿サンプル中の平均細胞数の増加が見られたことから、これらの結果が他の短期間の試験に比べ正確に毒性影響を見積もられていると判断し、反復投与に係るフェロシアン化ナトリウムの NOAEL は 4.4 mg/kg 体重/日であり、ADI は 0.044 mg/kg 体重/日と考えた。

(2) 発がん性試験

ラットを用いた発がん性試験

前述したように EFSA (2018) の報告 [82] で引用されている COT (1994) の報告では、表 13 に示す 4 群の用量設定で各群雌雄各 48 匹の Wistar ラット (初期体重 40~60 g) にフェロシアン化ナトリウム十水和物を 2 年間混餌投与し、試験終了時には主要な臓器における腫瘍成分、非腫瘍成分について調査している。その結果、これらの試験で発がん性は見られず、また、毒性学的に被験物質投与と関連性があると考えられる非腫瘍性病変も観察されていないとしている。

指定等要請者としては、EFSA (2018) の報告で引用されている COT (1994) の 2 年間の混餌投与で発がん性が見られていないという結果に基づき、発がん性は認められなかったと結論した。

(3) 1 年間反復投与毒性試験／発がん性併合試験

PubMed (従来の Toxline データベースを含む) で検索したが、フェロシアン化物の 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いだすことは出来なかった [87]。

(4) 生殖毒性試験

PubMed（従来の Toxline データベースを含む）で検索したが、フェロシアン化物の生殖毒性試験に関する知見を見いだすことは出来なかった [87]。

(5) 出生前発生毒性試験

① ラットを用いた出生前発生毒性試験

ECHA (1992) の報告によれば [88]、各群 25 匹の妊娠 Crl:CD (SD) BR VAF/Plus 系ラット（初期体重 173～248 g）に、フェロシアン化ナトリウム十水和物を脱イオン水に溶解し、0（対照群）、100、500 又は 1,000 mg/kg 体重/日の用量で妊娠 6 日から 15 日まで 1 日 1 回経口投与した試験が実施されている。

表 14 用量設定

用量設定 (mg/kg フェロシアン化ナトリウム)	0（対照群）、100、500、1,000 mg/kg 体重/ 日
------------------------------	-------------------------------------

1,000 mg/kg 体重/日の投与群では投与後に唾液分泌が誘発される個体が見られ、投与の 4 日後に最も多くなり、約半数の個体で見られた。また、試験期間を通して、飲水量の増加が全ての投与群で統計学的に有意に認められ、1,000 mg/kg 体重/日の投与群で最も多くなった。腎盂/尿管の拡張を伴う胎児数が対照群と比べて 500 mg/kg 体重/日の投与群（4 同腹児の内 4 胎児）及び 1,000 mg/kg 体重/日の投与群（4 同腹児の内 5 胎児）でわずかに増加したが、統計的に有意ではなく、被験物質投与による影響とは考えられないとしている。また、子宮内での生存胎児の生育や形態学的発達から判断される被験物質投与に関連した応答は見られず、以上の結果から ECHA は、母体及び発生無毒性量が >1,000 mg/kg 体重/日であると結論している。

表 15 出生前発生毒性試験（ラット）で認められた毒性所見

投与群	毒性所見	
	母動物	胎児
100 mg/kg 体重/日	・有意な飲水量の増加	
500 mg/kg 体重/日	・有意な飲水量の増加	・腎盂/尿管の拡張を伴う胎児数のわずかな増加（有意差なし）
1,000 mg/kg 体重/日	・有意な飲水量の増加 ・唾液分泌	・腎盂/尿管の拡張を伴う胎児数のわずかな増加（有意差なし）

この結果は、おそらく 1994 年の COT の報告に引用され、その COT の記載を引用する形で 2018 年の EFSA の報告において、NOAEL を最高用量の 1,000 mg/kg 体重/日と判断している（COT の報告は未公表資料であり入手できないため断定はできないが、実験条件が同一であるため 1992 年の ECHA の報告を引用していると指定等要請者は考えた）。

指定等要請者は、投与群の全ての用量において飲水量の有意な増加が見られていることについて、対イオンであるナトリウムイオンの影響を考えた。イヌを用いた試験では低塩食期で 0.4 mEq/kg/日（ナトリウムとして 9.2 mg/kg/日、要請者換算値）、高塩食期で 8 mEq/kg/日（ナトリウムとして 184 mg/kg/日、要請者換算値）となるよう食塩を混餌投与した際の飲水量の増加について検討されており、低塩食期の飲水量は 18.8 mL/kg 体重に対し高塩食期の飲水量は 38.8 mL/kg 体重と有意に高かったとされている [89]。指定等要請者としては、動物種の違いはあるがフェロシアン化ナトリウムの投与による飲水量の増加はナトリウムイオンによる影響があると考え NOAEL の決定において考慮せず、フェロシアン化ナトリウム十水和物 1,000 mg/kg 体重/日の投与により統計的に有意な毒性影響が認められなかったことを踏まえ、出生前発生毒性に係る NOAEL は 1,000 mg/kg 体重/日以上であると考えた。

（6）遺伝毒性試験

1）フェロシアン化カリウム

① 微生物を用いる復帰突然変異試験

Nishioka（1975）の報告によると [90]、細菌株（*Bacillus subtilis* H17、M45）を用いた Rec-assay 試験（0.05 M で 0.05 mL/ペーパーディスク）が実施されており、フェロシアン化カリウムの試験では H17 株（Rec 保有）でも H45 株（Rec 欠損）でも阻止円の形成は見られず、陰性の結果が得られている。

Kanematsu ら（1980）の報告によると [91]、細菌株（*Bacillus subtilis* H17、M45）を用いた Rec-assay 試験（最高用量 500 mM で 0.05 mL/ペーパーディスク）が実施されており、陰性の結果が得られている。

Oliver ら（1987）の報告によると [92]、細菌株（*Escherichia coli* PQ37）を用いたフェロシアン化カリウム三水和物の SOS chromotest（最高用量 3 mM）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。

Yamada ら（2018）の報告によれば [93]、フェロシアン化カリウムの遺伝毒性を Ames 試験及び染色体異常試験により評価した結果（いずれの試験も条件等未記載）では、いずれも陰性であったとしている。

② ヒトリンパ球を用いる DNA 異常試験

Basu (2013) の報告では [94]、ヒトリンパ球をフェロシアン化カリウム 1、5、10 mM の 3 用量で作成した RPMI-1640 培地溶液に 37 °C で 3 時間露出した後、レサズリンによる細胞増殖試験、トリパンプルーによる生細胞計測及び *in vitro* コメットアッセイ（単一細胞ゲル電気泳動）を実施し、遺伝毒性を評価している。トリパンプルーによる解析では生細胞は 97～99 % で推移したが、レサズリンによる細胞増殖試験では対照群と比較し、全ての用量で 77～81 % に統計的に有意に減少していた。また、コメットアッセイの結果、非代謝活性化系において 5、10 mM の用量で DNA 損傷がみられたとしている。

2) フェロシアン化ナトリウム

① 微生物を用いる復帰突然変異試験

厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会毒性・添加物合同部会の報告によると [86]、細菌株 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538) を用いた復帰突然変異試験（最高用量 2.5 mg/プレート）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（引用未記載のため原著論文入手不可能）。

Yamada ら (2018) の報告によれば [93]、フェロシアン化ナトリウムの遺伝毒性を Ames 試験及び染色体異常試験により評価した結果（いずれの試験も条件等未記載）では、いずれも陰性であったとしている。

② ヒトリンパ球を用いる DNA 異常試験

Basu (2013) の報告では [94]、ヒトリンパ球をフェロシアン化ナトリウム 1、5、10 mM の 3 用量で作成した RPMI-1640 培地溶液に 37 °C で 3 時間露出した後、レサズリンによる細胞増殖試験、トリパンプルーによる生細胞計測及び *in vitro* コメットアッセイ（単一細胞ゲル電気泳動）を実施し、遺伝毒性を評価している。トリパンプルーによる解析では生細胞は 97～99 % で推移したが、レサズリンによる細胞増殖試験では対照群と比較し、10 mM の用量で約 84 % に統計的に有意に減少していた。また、コメットアッセイの結果、非代謝活性化系において統計的に有意な差は見られなかったとしている。

3) 塩種不明なフェロシアン化物

厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会毒性・添加物合同部会の報告によると [86]、ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験（用量等不明）及びマウスリンフォーマ細胞を用いた *in vitro* 突然変異試験（用量等不明）において、いずれも陰性であったとの報告がある（引用未記載のため原著論文入手不可能）。

4) 遺伝毒性試験のまとめ

微生物を用いたフェロシアン化物の遺伝毒性試験では Rec-assay や SOS chromotest、Ames 試験など異なるアプローチの複数の試験においてすべて陰性の結果が得られている。

一方、ヒトリンパ球を用いる DNA 異常試験として Basu (2013) の報告ではコメットアッセイの結果から、非代謝活性化系においてフェロシアン化ナトリウムでは DNA の損傷が見られなかったものの、フェロシアン化カリウムでは 5、10 mM の用量で DNA 損傷がみられたとしている。しかしながら、同報告を引用している EFSA (2018) の報告では [82]、フェロシアン化物による DNA 損傷への影響は *in vitro* の環境下では活性酸素種などの間接的なメカニズムにより引き起こされていた可能性を指摘している。

指定等要請者としては、Basu らの試験においてはフェロシアン化カリウムの用量依存的な応答が見られておらず、また、培養液中では完全に解離していると考えられるにもかかわらずフェロシアン化ナトリウムとフェロシアン化カリウムでは挙動が異なっていることから、フェロシアン化物イオンによる DNA 損傷への直接の影響と判断する十分な根拠がなく、当該細胞増殖性への影響及び DNA 損傷への影響は *in vitro* 試験下による限定的なものであると判断した。

その他、SCAN (2001) においては、Ames 試験、ヒトリンパ球及びマウスリンパ腫細胞を用いた *in vitro* の細胞遺伝学的試験を総合的に検討し、遺伝毒性はないと判断している。上記の遺伝毒性試験成績及び国際的になされている評価を総合的に勘案し、指定等要請者はフェロシアン化カリウムには生体において特段問題となる遺伝毒性はないものと判断した。

各フェロシアン化物の遺伝毒性試験の結果を下記の表 16～18 にまとめた。

表 16 フェロシアン化カリウムの遺伝毒性の試験成績

指標	試験種類	試験対象	用量等	試験結果	参考文献番号
遺伝子突然変異	DNA 修復試験 (Rec-assay) (<i>in vitro</i>)	細菌株 (<i>Bacillus subtilis</i> H17、M45)	0.05 M、0.05 mL /ペーパーディスク	陰性 (非代謝活性化系)	[90]
	DNA 修復試験 (Rec-assay) (<i>in vitro</i>)	細菌株 (<i>Bacillus subtilis</i> H17、M45)	最高用量 500 mM で 0.05 mL/ペーパーディスク	陰性 (非代謝活性化系)	[91]
	SOS chromotest (<i>in vitro</i>)	細菌株 (<i>Escherichia coli</i> PQ37)	最高用量 3 mM	陰性 (非代謝活性化系)	[92]
	Ames 試験 染色体異常試験	不明 (詳細記載無し)	不明 (詳細記載無し)	陰性	[93]
DNA 異常	コメットアッセイ (<i>in vitro</i>)	ヒトリンパ球細胞	1、5、10 mM 含有 RPMI-1640 培地溶液に 3 時間露出	5、10 mM の濃度で DNA 損傷あり。 全ての濃度で細	[94]

常				胞生存率低下 (20 %程度)	
---	--	--	--	--------------------	--

表 17 フェロシアン化ナトリウムの遺伝毒性の試験成績

指標	試験種類	試験対象	用量等	試験結果	参考文献番号
遺伝子突然変異	復帰突然変異試験 (<i>in vitro</i>)	細菌株 (<i>Salmonella</i> typhimurium TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538)	最高用量 2.5 mg/プレート	陰性 (代謝活性化の有無にかかわらず)	[86]
DNA異常	コメットアッセイ (<i>in vitro</i>)	ヒトリンパ球細胞	1、5、10 mM 含有 RPMI-1640 培地溶液に 3 時間露出	陰性 (非代謝活性化系) 10 mM で細胞生存率低下 (15 %)	[94]

表 18 塩種不明なフェロシアン化物の遺伝毒性の試験成績

指標	試験種類	試験対象	用量等	試験結果	参考文献番号
DNA異常	染色体異常試験 (<i>in vitro</i>)	ヒトリンパ球細胞	不明	陰性	[86]
遺伝子突然変異	突然変異試験 (<i>in vitro</i>)	マウスリンフォーマ細胞	不明	陰性	[86]

異					
---	--	--	--	--	--

(7) アレルゲン性試験

ECHA (2013) の報告では [95]、OECD ガイドライン 429 (局所リンパ節試験) に基づくマウスを用いたリンパ節反応試験の結果が報告されている。マウス (CBA/J、雌、体重 20~25 g、試験開始時約 10 週齢、各群 5 匹) を用いて、溶媒はプロピレングリコールとして、フェロシアン化ナトリウムを 0 % (対照群)、10 %、25 %、50 %の用量設定で局所リンパ節アッセイを行ったところ、各群の平均 DPM(壊変毎分)はそれぞれ 254 DPM (0 %)、560 DPM (10 %)、285 DPM (25 %) 及び 697 DPM (50 %) となり、アレルギー活性の指標である SI (刺激指数) は 10 %で 2.2、25 %で 1.1、50 %で 2.7 となった。SI $\geq$ 3 で皮膚感作性の可能性があるとみなすが、いずれの用量でも 3 を超えておらず、ECHA は、フェロシアン化ナトリウムは皮膚感作物質とみなさないと結論している。また、この結果から Read-across によりフェロシアン化カリウムも皮膚感作物質とみなさないとしている。

指定等要請者は ECHA (2013) の結果において、用量依存的な応答が見られておらず、また、最高用量においても SI が 3 未満であったことから、フェロシアン化カリウムはアレルギー活性を示さないと判断した。

(8) 一般薬理試験

PubMed (従来の Toxline データベースを含む) で検索したが、フェロシアン化物の一般薬理についての試験成績は見出されなかった [87]。

(9) その他の試験

PubMed (従来の Toxline データベースを含む) で検索したが、フェロシアン化物に関するその他の試験成績は見出されなかった [87]。

(10) 毒性試験のまとめ

2002 年 7 月に厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会における審議以降に新たに報告された知見として、2018 年の Yamada らによる遺伝毒性試験 [93]、2013 年の Basu らによる遺伝毒性試験 [94]、2013 年の ECHA の報告に基づくアレルゲン試験 [95]、及び EFSA の報告書で引用されている COT により実施された試験 [82]がある。2018 年の Yamada らの報告では用量は不明であるが Ames 試験陰性であり、2013 年の ECHA の報告では最高用量においてもアレルギー活性を示していない。Basu (2013) の報告ではコメットアッセイの結果からフェロシアン化カリウムでは 5、10 mM の用量で DNA 損傷がみられたとしているが、指定等要請者としてはフェロシアン化物イオンによる DNA 損

傷への直接の影響と判断する十分な根拠がなく、フェロシアン化カリウムには生体において特段問題となる遺伝毒性はないものと判断した。なお、EFSA の報告書で引用されている COT により実施された試験は 2002 年の厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会における審議時点では利用可能ではなく、本要請にあたり ADI を見直すべき新たな知見と判断した。指定等要請者は COT により実施されたラットを用いた 49 週間混餌投与試験及び 2 年間混餌投与試験に基づき NOAEL は 4.4 mg/kg 体重/日と判断し、ADI は安全係数 100 を用いて無水フェロシアン化ナトリウムとして 0.044 mg/kg 体重/日と結論した。

3. ヒトにおける知見

PubMed (従来の Toxline データベースを含む) で検索したが、フェロシアン化物のヒトにおける知見は、前述の体内動態試験を除き、見出されなかった [87]。

4. 1 日摂取量の推計等

(1) 現状におけるフェロシアン化カリウム摂取量の推計

フェロシアン化カリウムは、我が国ではフェロシアン化ナトリウム、フェロシアン化カルシウムとともに食品添加物として指定されている。使用基準は、いずれも食塩にのみ使用が認められ、使用量はフェロシアン化ナトリウム、フェロシアン化カリウム、フェロシアン化カルシウムの合計で食塩 1 kg につき 0.020 g 以下 (無水フェロシアン化ナトリウムとして) と定められている [21]。

平成 28 年度厚生労働科学研究の食品添加物生産量統計によれば、フェロシアン化ナトリウム、フェロシアン化カリウム及びフェロシアン化カルシウムは、いずれも国内での製造や輸入は確認できず、食品向け出荷量、使用查定量ともに 0 kg であった [96]。すなわち、我が国ではこれらのフェロシアン化物は食品添加物として流通しておらず、我が国で生産される食塩にも添加されていない。食品添加物生産量統計をもとに摂取量を推計すると、我が国のフェロシアン化カリウムの摂取量は 0 mg/人/日²²となる。

しかし、海外で製造される食品は、フェロシアン化ナトリウム、フェロシアン化カリウム及びフェロシアン化カルシウム添加の食塩を用いて製造される可能性があることから、それらが我が国に輸入されるとフェロシアン化物のばく露源になることが推測される。しかし、我が国で流通する食品中のフェロシアン化物の含有量調査やマーケットバスケット法、陰膳法などによる摂取量推計は報告されておらず、実態は不明である。そこで、輸入食塩及び輸入食品が含

²² 平成 28 年度厚生労働科学研究の食品添加物生産量統計における使用查定量は 0 kg であり、0.5 kg 未滿は切り捨てられている可能性がある。仮に 0.5 kg が年間使用されていたとした場合、0.5 kg を令和元年 10 月の日本の総人口 1 億 2,616 万 7 千人及び 365 日で除した場合、0.0000109 mg/人/日となり 0 mg/人/日とみなしても問題ないと判断した。

有する食塩のみにフェロシアン化カリウムが添加されていると仮定して2つの摂取量推計を試みた。

① 輸入食塩中のフェロシアン化物濃度に基づく推計

令和元年度輸入食品監視統計 [97]によれば、塩類の輸入量は470,581トンとされているため、これらがすべて食塩であり、直接消費されるものとして推計を行った。新野ら(2003)が日本国内で流通している輸入食塩について行った調査によれば [98]、輸入食塩54点中のフェロシアン化物を調査した結果、50点は定性試験により陰性となり、陽性となった4点の含有量はフェロシアン化物イオンとして0.1~3.8 mg/kg (陽性検体平均: 1.6 mg/kg (陰性検体を0.0 mg/Lとして算入した場合の平均値は0.12 mg/kg))であったとされている。ここから、輸入食塩が無水フェロシアン化ナトリウムとして平均2.3 mg/kg²³含有していると仮定して含有量を推定すると、470,581トンの輸入食塩に含まれる無水フェロシアン化ナトリウムは1,082,336 g²⁴となる。令和元年10月の日本の推計総人口は1億2,616万7千人であることから [99]、1人1日当たりの無水フェロシアン化ナトリウム量は0.0235 mg/人/日となる²⁵。ここで、フェロシアン化物のADIは前述のとおり、無水フェロシアン化ナトリウムとして0.044 mg/kg 体重/日とした場合、日本人成人の平均体重を55.1 kgとして1人あたりに換算すると無水フェロシアン化ナトリウムとして2.42 mg/人/日となる。すなわち、0.0235 mg/人/日(無水フェロシアン化ナトリウムとして)は、対ADI比として約1.0%と推計される。

② 輸入食品中の食塩における含有量と輸入食塩中における含有量を組み合わせた摂取量推計

まず輸入加工食品における食塩が国外で使用される食塩であることから、EFSAの報告におけるフェロシアン化物の使用状況調査 [100,101]に基づき9.7 mg/kgのフェロシアン化物を含んでいるとして輸入加工食品由来のフェロシアン化物摂取量を考える。令和元年度の我が国の輸入加工食品量(輸入の畜産加工食品、水産加工食品、農産加工食品、その他の食料品(塩類は除く²⁶)及び飲料の和)は、年間約9,387,876トン(令和元年度輸入食品監視統計、表4)である [97]。一方、令和元年10月の日本の推計総人口は1億2,616万7千人であることから [99]、1人1日当たりの輸入加工食品の摂取量は約203.9 g²⁷である。輸入加工食品の平均食塩含有率について調査したデータは見出せないが、輸入加工食品の食塩含有率が摂取食品全体と

²³ 1.6 mg/kg [フェロシアン化物イオン含有量]×1.434 [フェロシアン化物イオンから無水フェロシアン化ナトリウムへの換算係数(無水フェロシアン化ナトリウム分子量303.91÷フェロシアン化物イオン分子量211.95)] = 2.29 mg/kg [無水フェロシアン化ナトリウム含有量]

²⁴ 470,581,000 kg×2.3 mg/kg÷1,000 = 1,082,336.3 g

²⁵ 1,082,336,000 mg÷126,167,000 人÷365 日 = 0.02350 mg/人/日

²⁶ 輸入塩類は日本国内で流通することから、国外で流通している塩類と分けて考察するため除外した。

²⁷ 9,387,876,000,000 g÷126,167,000÷365 = 203.86 g/人/日

同じ約 0.5 %であると仮定すると²⁸、輸入加工食品 203.9 g 中の食塩量は 1.0 g である。我が国の輸入加工食品中の食塩に含まれるフェロシアン化物をすべて無水フェロシアン化ナトリウムとして推計すると、食塩 1.0 g に含まれるフェロシアン化物は無水フェロシアン化ナトリウムとして 0.0097 mg²⁹となる。

次に、国産食品及び未加工の輸入食品について考える（未加工の輸入食品は国産食品同様日本国内で加工・調理されると仮定した）。令和元年度の未加工の輸入食品量（輸入の畜産食品、水産食品及び農産食品の和）は、年間約 21,667,802 トン（令和元年度輸入食品監視統計、表 4）である [97]。令和元年 10 月の日本の推計総人口で除して一日当たりの摂取量を算出すると約 470.5 g³⁰となる。令和元年国民健康・栄養調査報告の結果によれば [102]、日本人の 1 人 1 日当たりの食事量は 1,979.9 g であることから、国産食品の摂取量は 1305.5 g³¹となり、未加工の輸入食品の摂取量と合計すると、1 人 1 日当たり 1,776 g となる。摂取食品全体に対する食塩含有率を 0.5 %とすると、1 人 1 日当たり 8.9 g³²となる。ここで、リスクを最大限見積もることを目的として、国内加工・調理に使用される食塩は、全て国内に輸入された食塩（前述の輸入食品中の食塩に関する検討で除外した輸入塩類）の使用であると仮定すると、新野ら（2003）の報告 [98]に基づき、前述のとおり輸入食塩には無水フェロシアン化ナトリウムとして平均 2.3 mg/kg 含有しているため、国内加工・調理される食品には、0.0205 mg³³の無水フェロシアン化ナトリウムが含まれる。

したがって、輸入食品中の食塩におけるフェロシアン化物含有量と国産食品に使用した輸入食塩におけるフェロシアン化物含有量を合計すると無水フェロシアン化ナトリウムとして 0.0302 mg/人/日となる。ここで、フェロシアン化物の ADI は前述のとおり、無水フェロシアン化ナトリウムとして 2.42 mg/人/日であるため、0.0302 mg/人/日（無水フェロシアン化ナトリウムとして）は、対 ADI 比として約 1.2 %と推計される。

輸入加工食品を摂取しない場合の無水フェロシアン化ナトリウムの摂取量を②の食塩摂取量に記載の一日当たりの食塩摂取量から算出した場合、0.0223 mg³⁴となり、①の輸入食塩の総量から算出される値とおおむね同程度となるため、②の食塩摂取量からの推計は一定程度の妥当性があると判断した。①の輸入食塩の総量に基づく推計では輸入加工食品に由来するフェロ

²⁸ $9.7 \text{ g} [1 \text{ 人 1 日当たりの食塩摂取量}] \div 1,979.9 \text{ g} [1 \text{ 人 1 日当たりの食事量}] \times 100 = 0.490 \% [食事量当たりの食塩含有率] [102]$

²⁹ $0.001 \text{ kg} \times 9.7 \text{ mg/kg} = 0.0097 \text{ mg}$

²⁵ $21,667,802,000,000 \text{ g} \div 126,167,000 \text{ 人} \div 365 \text{ 日} = 470.52 \text{ g}$

³¹ $1,979.9 \text{ g} [1 \text{ 人 1 日当たり食事量}] - (203.9 \text{ g} [1 \text{ 人 1 日当たり輸入加工食品の摂取量}] + 470.5 \text{ g} [1 \text{ 人 1 日当たり輸入未加工食品の摂取量}]) = 1,305.5 \text{ g}$

³² $1,776 \text{ g} [\text{国内加工・調理される食品の 1 人 1 日当たりの食事量}] \times 0.5 \% = 8.89 \text{ g}$

³³ $0.0089 \text{ kg} \times 2.3 \text{ mg/kg} = 0.02047 \text{ mg}$

³⁴ $9.7 \text{ g} [1 \text{ 人 1 日当たりの食塩摂取量}] \times 2.3 \text{ mg/kg} [\text{食塩 1 kg あたりの無水フェロシアン化ナトリウム含有量}] \div 1000 = 0.0223 \text{ mg}$

シアン化物が考慮されないのに対し、②の食塩摂取量に基づく推計では輸入加工食品中のフェロシアン化物も考慮されることから、推計値としては②によるものが妥当であると考えた。また、EFSA（2018）の報告によれば [100]、実態に近い食塩からのフェロシアン化物の摂取量推定値（Refined Scinario）として、平均的に摂取されうる量は 0.0014 mg/kg 体重/日であるとされており [103]、平均体重 55.1 kg とした場合、EU 域内で一般に摂取されるフェロシアン化物の平均値は 0.077 mg/人/日となる。海外で流通している食塩と日本国内で流通している食塩の違いを考慮し、輸入食品に使用されている食塩中のフェロシアン化物量と日本国内で購入可能な輸入食塩中のフェロシアン化物量を加えて試算した無水フェロシアン化ナトリウムとして 0.0302 mg/人/日とする推計が実態に最も近いと判断した。

（２）使用基準改正後のぶどう酒由来のフェロシアン化カリウム摂取量の推計

前述のとおり（Ⅰ．６．（２）使用基準案の設定根拠）、使用基準改正後の基準上限量（1 mg/L）残存した場合を想定し、1 日摂取量を推計することとした。ここで、ぶどう酒の飲酒量として、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、次によりぶどう酒の摂取量の推計を行った。まず、国税庁より発行されている酒のしおり（令和元年の酒類販売（消費）数量） [104]によると、我が国において 1 年間で果実酒 352,549 kL、甘味果実酒 9,723 kL、合計 362,272 kL が販売、消費されているとされている。ここでは、果実酒及び甘味果実酒がすべてぶどうを主原料として作られているものと仮定し、362,272 kL をぶどう酒の年間消費量として考えた。次に、令和元年国民健康・栄養調査において [105]、飲酒習慣のある者（週に 3 度以上、飲酒日 1 日当たり清酒換算で 1 合以上飲酒すると回答した者）の割合は 20.5 %とされており、これを国税庁より発行されている平成 30 年度分酒税課税関係等状況表の酒類販売（消費）数量 [106]に記載の成人人口 104,013 千人にかけて飲酒習慣のある者の人口を見積もった。ここから、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 46.5 mL/人/日と推計した³⁵。

ぶどう酒から摂取するフェロシアン化カリウムの推定摂取量は、無水フェロシアン化カリウムとして 0.0465 mg/人/日であり、食塩からの摂取量と合計し対 ADI 比を算出するため無水フェロシアン化ナトリウムに換算すると 0.0384 mg/人/日と推計される³⁶。

（３）使用基準改正後のフェロシアン化カリウムの摂取量推計

成人における使用基準改正後のフェロシアン化カリウムの推定 1 日摂取量は、現状における食塩由来の摂取量に改正後のぶどう酒由来の摂取量を加えたものとして推計し次表に示した。現状における食塩由来の摂取量として（１）で推計した① 輸入食塩中のフェロシアン化

³⁵ $362,272 \text{ kL} \div (104,013 \text{ 千人} \times 20.5 \%) \div 365 \text{ 日} \div 46.5 \text{ mL/人/日}$

³⁶ $1 \text{ mg/L (無水フェロシアン化カリウムとして)} \times 0.0465 \text{ L/人/日 (ぶどう酒摂取量)} \times 303.91/368.34 \text{ (無水フェロシアン化ナトリウム分子量} \div \text{無水フェロシアン化カリウム分子量)} = 0.0384 \text{ mg/人/日 (無水フェロシアン化ナトリウムとして)}$

物濃度に基づく推計、② 輸入食品中の食塩における含有量と輸入食塩中における含有量を組み合わせた摂取量推計から得られた2通りの推定値のうち、②が実態をよく反映していると判断できたことに加え、最もばく露が多いケースであることから②の推定値を用いた。

以上より、改正後のフェロシアン化カリウム摂取量は、食塩由来の摂取量とぶどう酒由来の摂取量を合わせ、0.0686 mg/人/日（無水フェロシアン化ナトリウムとして）と推計された。食塩やぶどう酒から最大限摂取するとしても0.0686 mg/人/日、ADIの約2.8 %³⁷であり、安全性に懸念はないと考えられ、したがって、指定等要請者は使用基準改正によるフェロシアン化カリウム由来の毒性影響はないと判断した。

なお、20歳未満の小児、少年、青年については飲酒が禁止されているので、今回申請している使用基準改正が行われても、フェロシアン化カリウムの摂取量に影響は与えない。

³⁷ 対ADI比=0.0686 mg/人/日÷2.42 mg/人/日=0.0283

表 19 使用基準改正後の成人におけるフェロシアン化カリウム（PF） 1 日摂取量の推計

現状における PF 推定摂取量			改正後のぶどう酒由来 PF 推定摂取量			改正後の総 PF 推定摂取量		
推計方法	PF 推定摂取量 mg/人/日	対 ADI 比 %	ぶどう酒 飲酒量	PF 推定摂取量 mg/人/日	対 ADI 比 %	PF 推定摂取量 mg/人/日	PF 推定摂取量 mg/kg 体重/日	対 ADI 比 %
① 輸入食塩量 × PF 平均添加量	0.0285 (0.0235)	1.0	46.5 mL	0.0465 (0.0384)	1.6	0.075 (0.0619)	0.0014 (0.0011)	2.6
② 輸入食品中食塩量 × PF 平均添加量 + 輸入食塩量 × PF 平 均添加量	0.0366 (0.0302)	1.2	46.5 mL	0.0465 (0.0384)	1.6	0.0831 (0.0686)	0.0015 (0.0012)	2.8

（ ）：無水フェロシアン化ナトリウム換算量

対 ADI 比：日本人成人の平均体重を 55.1 kg として、フェロシアン化ナトリウムの ADI 0.044 mg/kg 体重/日を換算すると 1 人 1 日当たり 2.42 mg/人/日であり、これに対する無水フェロシアン化ナトリウム換算摂取量との比を対 ADI 比とした。

IV. 海外添加物取り扱い社

会社名：GENTROCHEMA B.V.

住 所：Lage Ham 190 5102AE DONGEN The Netherlands (TEL +31162249020)

V. 引用文献一覧

1.	厚生労働省：フェロシアン化カリウム. In 第9版食品添加物公定書, 2018 https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokutein/kouteisho9e.html (アクセス日：2021/2/10)
2.	OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin): International Code of Oenological Practices, 2020
3.	ECHA (European Chemicals Agency): Tetrapotassium hexacyanoferrate, General information. https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/24635/1 (アクセス日：2020/10/26)
4.	EU (European Union): COMMISSION DELEGATED REGULATION (EU) No 2019/934 of 12 March 2019 supplementing Regulation (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council as regards wine-growing areas where the alcoholic strength may be increased, authorised oenological. Official Journal of the European Union 2019; L149/1
5.	Margalit Y: Concepts in wine chemistry, Board and Bench Publishing, 2012; 389-390, 393, 395.
6.	工藤 雅：ワインの品質劣化. In 新ワイン学, 戸塚 昭, 東條 一 (編), 株式会社ガイアブックス, 2018 ; 243, 245, 246, 249.
7.	Jackson R: Postfermentation treatments and related topics. In Wine Science: principles and applications, Jackson R (ed.), Academic press, 2008; 425, 426, 428, 430-432, 495.
8.	Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A and Dubourdieu D: Dry Extract and Minerals. In Handbook of Enology, Volume 2, The Chemistry of Wine-Stabilization and Treatments, Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A and Dubourdieu D (eds.), John Wiley & Sons, 2006; 99, 101.
9.	Wein-Plus GmbH: wein plus, Schönen https://glossar.wein.plus/schoenen (アクセス日：2021/1/4)

10.	Moreno J and Peinado R: Inorganic Material and Metal Casse. In Enological Chemistry, Moreno J and Peinado R, editors (eds.), Elsevier Inc., 2012; 368.
11.	FAO/WHO Food standards: GSFA Online, FERROCYANIDES http://www.fao.org/gsfaonline/groups/details.html?id=242 (アクセス日 : 2020/9/1)
12.	EU (EUROPEAN UNION): REGULATION (EC) No 1333/2008 of the European Parliament of the Council of 16 December 2008 on food additives. Official Journal of the European Union, 2008; L354/16
13.	EU (European Union): Consolidated text: Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives. Text with EEA relevance. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02008R1333-20201223&from=EN . (アクセス日 : 2021/3/15)
14.	EU (European Union): COMMISSION REGULATION (EU) No 231/2012 of 9 March 2012 laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union, 2012; L83/1
15.	FDA (US Food and Drug Administration): 21CFR (Code of Federal Regulations title 21), e-CFR data is current as of October 30, 2020
16.	TTB (US Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau): 27CFR (Code of Federal Regulations title 27) Part 24, § 24.246 Materials authorized for the treatment of wine and juice, e-CFR data is current as of October 30, 2020
17.	FDA (US Food and Drug Administration): § 172.490, 21CFR (Code of Federal Regulations title 21), e-CFR data is current as of January 4, 2021
18.	FSANZ (Food Standards Australia New Zealand): Australia New Zealand Food Standards Code Schedule 15 Substances that may be used as food additives (F2020C00203), 2020
19.	FSANZ (Food Standards Australia New Zealand): Australia New Zealand Food Standards Code Schedule 18 processing aids (F2020C00889), 2020
20.	川西 徹, 穂山 浩, 河村 葉子, 佐藤 恭子 : フェロシアン化カリウム. In 第9版食品添加物公定書解説書<下>, 株式会社廣川書店, 2019 ; D1904-6.
21.	厚生労働省 : 食品、添加物等の規格基準, 厚生省告示第 370 号, 1959
22.	JECFA (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives): Toxicological evaluation of some food colours, emulsifiers, stabilizers, anti-caking agent and certain

	other substances, Thirteenth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1969
23.	JECFA (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives): Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents, Seventeenth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives, World Health Organ Tech Rep Ser 539, 1974; 4
24.	JECFA (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives): Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications, Seventeenth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1974
25.	JECFA (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives): Evaluation of certain food additives, Eighteenth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, World Health Organ Tech Rep Ser 557, 1974
26.	JECFA (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives): Toxicological evaluation of some food colours, enzymes, flavour enhancers, thickening agents, and certain food additives., Eighteenth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives, World Health Organ Tech Rep Ser 539, 1975; 4.
27.	Commission of the European Communities: Report of the scientific committee for food on a first series of food additives of various technological functions. Reports of the scientific committee for food, 1991
28.	Scientific Committee for Animal Nutrition (SCAN): Opinion on the scientific committee for animal nutrition on the safety of Potassium - and Sodium ferrocyanide used as anticaking agents, 2001
29.	EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS): Scientific Opinion on the Re-evaluation of sodium ferrocyanide (E 535), potassium ferrocyanide (E 536) and calcium ferrocyanide (E 538) as food additives. EFSA Journal 2018; 16(7): 1, 3, 4, 8, 10, 11, 15, 20-22.
30.	厚生労働省：フェロシアン化物に係る指定要請資料及び添付資料4（フェロシアン化物の安全性に関するFDA評価資料）、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（平成14年7月18日開催）、2002
31.	厚生労働省：薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会 資料1－4「食品添加物の指定等に関する薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会毒性・添加物合同部会報告について」、2002；9.

32.	FASEB: Evaluation of the health aspects of as mixture of diferrous, dipotassium ferrous, and potassium ferrocyanide as a fining agent in wine production, 1981
33.	FSANZ (Food Standards Australia New Zealand): Principles and Practices of Dietary Exposure Assessment for Food Regulatory Purposes, FSANZ, 2009
34.	厚生労働省：フェロシアン化物に係る指定要請資料及び添付資料3（食品添加物指定要請資料），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（平成14年7月18日開催），2002
35.	厚生労働省：薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会毒性・添加物合同部会議事録，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（平成14年7月18日開催），2002
36.	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会：食品添加物の指定等に関する薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会毒性・添加物合同部会報告について，薬食審第0726001号，2002
37.	厚生労働省：薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会議事録，薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会（平成14年7月26日開催），2002
38.	厚生労働省：食品衛生法施行規則の一部を改正する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について。In 食品衛生小六法（令和2年版），厚生労働省（編），新日本法規出版株式会社，2019；867-9
39.	OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin): Potassium Ferrocyanide (COEI-1-POTFER), 2000
40.	JECFA (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives): Ferrocyanides of Calcium, Potassium and Sodium. Combined Compendium of Food Additive Specifications, 2006
41.	Gentrochema BV : Tetrapotassium Hexacyanoferrate Safety Data Sheet. 2019
42.	義平 邦利，合田 幸広，橋本 恭介，山崎 壮，山田 隆：イオンクロマトグラフィーによるワイン中のフェロシアン化物の分析。食品衛生学雑誌，1991；32(6)：559-63
43.	鈴木 俊也ら：4.1 水質試験法 4.1.4.3 シアン化合物 (2)総シアン。In 衛生試験法・注解 2020，公益社団法人日本薬学会（編），金原出版株式会社，2020；966-7.
44.	Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, and Kunklee RE: The fining and clarification of wines. In Principles and Practices of Winemaking, Boston, MA, Springer, 1999; 279-319

45.	Moreno J and Peinado R: Inorganic Material and Metal Casse. In Enological Chemistry, Moreno J and Peinado R, editors (eds.), Elsevier Inc., 2012; 366-367.
46.	Byrne J, Saywell LG, and Cruess WV: The iron content of grapes and wine. Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition, 1937; 9(2): 83-4
47.	田村 隆：料理とワインの相性からの製造技術へのアプローチ．生物工学会誌，2012；90(5)：231-4
48.	Margalit Y: Concepts in wine chemistry, Board and Bench Publishing, 2012；52-53.
49.	工藤 雅：ワインの品質劣化. In 新ワイン学, 戸塚 昭, 東條 一 (編), 株式会社ガイアブックス, 2018; 249.
50.	Adhikamsetty R and Jonnalagadda S: Kinetics and mechanism of prussian blue formation. Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia, 2009; 23(1): 47-54
51.	Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A and Dubourdieu D: Dry Extract and Minerals. In Handbook of Enology, Volume 2, The Chemistry of Wine-Stabilization and Treatments, Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A and Dubourdieu D (eds.), John Wiley & Sons, 2006; 99, 103.
52.	Moreno J and Peinado R: Inorganic Material and Metal Casse. In Enological Chemistry, Moreno J and Peinado R, editors (eds.), Elsevier Inc., 2012; 366, 368, 369, 373.
53.	Jackson R: Postfermentation treatments and related topics. In Wine Science: principles and applications, Jackson R (ed.), Academic press, 2008; 432.
54.	高橋 昭：フェロシアンイオンによる銅（II）イオンの連続電量滴定法．分析化学，1960；9(7)：565-8
55.	Ribéreau-Gayon J, Peynaud É, Sudraud P and Riberau-Gayon P: Traitement par le ferrocyanure de potassium. In Traité d'oenologie: Sciences et techniques du vin. Tome 4., Ribéreau-Gayon J, Peynaud É, Sudraud P and Riberau-Gayon P (eds.), Dunod, 1977; 275-93
56.	Joslyn M and Lukton A: Prevention of copper and iron turbidities in wine. Hilgardia, 1953; 22(14): 451-533
57.	Zoecklein B, Fugelsang K, Gump B, and Nury F: Fining and fining agents. In Wine Analysis and Production, Zoecklein B, Fugelsang K, Gump B, and Nury F (eds.) Boston, MA, Springer, 1999. 242-71
58.	Farrow M: The solubilities of sodium, potassium, and calcium ferrocyanides. Part I. Journal of the Chemical Society, 1926; 129: 49-55

59.	Chadwick BM and Sharpe AG: Transition metal cyanides and their complexes. In Advances in inorganic chemistry and radiochemistry, Academic Press, 1966; 83-176
60.	Gail E, Gos S, Kulzer R, Lorösch J, Rubo A, Sauer M, et al.: Cyano compounds, inorganic. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2000
61.	小野 恭史, 安彦 俊克, 太田 雅壽, 安田 守宏: 低濃度フェロシアンイオンの分解挙動の検討. Electrochemistry, 2001 ; 69(2) : 122-7
62.	Asperger S: Kinetics of the decomposition of potassium ferrocyanide in ultra-violet light. Transactions of the Faraday Society, 1952; 48: 617-24
63.	Amerine MA and Joslyn MA: Development and stabilization of wine. In Table wine, Amerine MA and Joslyn MA (eds.), University of California Press, 1970; 494-564
64.	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, 府食第 815 号, 2010
65.	Moreno J and Peinado R: Inorganic Material and Metal Casse. In Enological Chemistry, Moreno J and Peinado R, editors (eds.), Elsevier Inc., 2012; 369.
66.	Vinotemp Factory: HOW MANY YEARS CAN YOU KEEP A BOTTLE OF WINE? https://www.vinotemp.com/how-many-years-can-you-keep-a-bottle-of-wine . (アクセス日: 2021/4/19)
67.	Nielsen P, Dresow B, Fischer R, and Heinrich H: Bioavailability of iron and cyanide from ⁵⁹ Fe- and ¹⁴ C-labelled hexacyanoferrates(II) in rats. Zeitschrift für Naturforschung C, 1990a; 45(6): 681-90
68.	Nielsen P, Dresow B, Fischer R, Gabbe E, Heinrich H, and Pfau A: Intestinal absorption of iron from ⁵⁹ Fe-labelled hexacyanoferrates(II) in piglets. Arzneimittelforschung, 1988; 38(10): 1469-71
69.	Dvořák P, Gunther M, Zorn U, and Catsch A: Metabolisches Verhalten von kolloidalem Ferrihexacyanoferrat(II). Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Pharmakologie, 1971; 269: 48-56
70.	Nielsen P, Dresow B, Fischer R, and Heinrich H: Bioavailability of iron and cyanide from oral potassium ferric hexacyanoferrate(II) in humans. Archives of toxicology, 1990b; 64(5): 420-2
71.	JECFA (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives): Toxicological evaluation of some food colours, enzymes, flavour enhancers, thickening agents, and certain food additives., Eighteenth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives, World Health Organ Tech Rep Ser 539, 1975; 1-3.

72.	EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS): Scientific Opinion on the Re-evaluation of sodium ferrocyanide (E 535), potassium ferrocyanide (E 536) and calcium ferrocyanide (E 538) as food additives. EFSA Journal 2018; 16(7): 3, 17, 21.
73.	独立行政法人酒類総合研究所：文献検索結果 フェロシアン化ナトリウム（体内動態）(Pubmed), 2020
74.	Gersh I and Stieglitz E: Histochemical studies on the mammalian kidney. I. The glomerular elimination of ferrocyanide in the rabbit, and some related problems. The Anatomical Record, 1934; 58(4): 349-67
75.	Kleeman C, Epstein F, Rubini M, and Lamdin E: Initial distribution and fate of ferrocyanide in dogs. American Journal of Physiology-Legacy Content, 1955; 182(3): 548-52
76.	Van Slyke D, Hiller A, and Miller B: The clearance, extraction percentage and estimated filtration of sodium ferrocyanide in the mammalian kidney. American Journal of Physiology-Legacy Content, 1935; 113(3): 611-28
77.	Berliner RW, Kennedy TJ, and Hilton JG: Renal clearance of ferrocyanide in the dog. American Journal of Physiology-Legacy Content, 1950; 160(2): 325-9
78.	Calcagno P, Husson G, and Rubin M: Measurement of "extracellular fluid space" in infants by equilibration technic using inulin and sodium ferrocyanide. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1951; 77(2): 309-11
79.	Kleeman C and Epstein F: Fate and distribution of Fe59 labelled ferrocyanide in humans and dogs. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1956; 93(2): 228-33
80.	Miller B and Winkler A: The ferrocyanide clearance in man. The Journal of clinical investigation, 1936; 15(5): 489-92
81.	JECFA (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives): Toxicological evaluation of some food colours, enzymes, flavour enhancers, thickening agents, and certain food additives., Eighteenth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives, World Health Organ Tech Rep Ser 539, 1975; 3.
82.	EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS): Scientific Opinion on the Re-evaluation of sodium ferrocyanide (E 535), potassium ferrocyanide (E 536) and calcium ferrocyanide (E 538) as food additives. EFSA Journal 2018; 16(7): 3, 4, 17-21.

83.	ECHA (European Chemicals Agency): Tetrapotassium hexacyanoferrate Acute Toxicity: oral https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/24635/7/3/2 (アクセス日：2020/10/26)
84.	Food and Drug research laboratories Inc.: SHORT-TERM FEEDING STUDY OF SODIUM FERROCYANIDE IN RATS. <i>Fd. Cosmet. Toxicol.</i> , 1969; 7: 409-10
85.	JECFA (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives): Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents, Seventeenth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives, <i>World Health Organ Tech Rep Ser</i> 539, 1974; 2-4.
86.	厚生労働省：薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会 資料1－4「食品添加物の指定等に関する薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会毒性・添加物合同部会報告について」, 2002；3, 5, 6, 8, 9.
87.	独立行政法人酒類総合研究所：文献検索結果 フェロシアン化カリウム及びその他のフェロシアン化物（毒性）(Pubmed), 2020
88.	ECHA (European chemical agency): Tetrasodium hexacyanoferrate, Developmental toxicity/teratogenicity https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14479/7/9/3 (アクセス日：2021/4/16)
89.	三品 美夏, 渡辺 俊文：正常犬・猫の高ナトリウム摂取における血圧および飲水量の変動. <i>日本獣医師会雑誌</i> , 2010；63(1)：45-47.
90.	Nishioka H: Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. <i>Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects</i> , 1975; 31(3): 185-9
91.	Kanematsu N, Hara M, and Kada T: Rec assay and mutagenicity studies on metal compounds. <i>Mutation Research/Genetic Toxicology</i> , 1980; 77(2): 109-16
92.	Olivier P and Marzin D: Study of the genotoxic potential of 48 inorganic derivatives with the SOS chromotest. <i>Mutation Research/Genetic Toxicology</i> , 1987; 189(3): 263-9
93.	Yamada M and Honma M: Summarized data of genotoxicity tests for designated food additives in Japan. <i>Genes and Environment</i> , 2018; 40: 27
94.	Basu A, Biswas D, and Mukherjee A: Genotoxicity testing of two anticaking agents: Sodium and potassium ferrocyanide in vitro. <i>International Journal of Human Genetics</i> , 2013; 13(1): 21-5

95.	ECHA (European Chemicals Agency): Tripotassium hexacyanoferrate, Skin sensitisation: in vitro (LLNA) https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/24635/7/5/2 (アクセス日：2020/10/26)
96.	佐藤 恭子, 多田 敦子, 北村 陽二, 建部 千絵, 山田 雅巳, 久保田 浩樹：生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に係る研究. 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 食品添加物の安全性確保のための研究. 佐藤恭子 (研究代表者). 平成 28 年度総括研究報告書 (厚生労働科学研究成果データベース閲覧システム) (https://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NIDD00.do?resrchNum=201622019A) (2021 年 2 月 10 日に利用)；2017
97.	厚生労働省：令和元年度輸入食品監視統計. 2020
98.	新野 靖, 西村 ひとみ, 古賀 明洋, 中山 由佳, 芳賀 麻衣子：市販食塩の品質 (II). 日本海水学会誌, 2004；58(3)：289-303
99.	総務省：総務省統計局ウェブページ, 人口統計 https://www.stat.go.jp/data/jinsui/ (アクセス日：2021/3/15)
100.	EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS): Scientific Opinion on the Re-evaluation of sodium ferrocyanide (E 535), potassium ferrocyanide (E 536) and calcium ferrocyanide (E 538) as food additives. EFSA Journal 2018; 16(7): 15.
101.	EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS): APPENDIX A in Scientific Opinion on the Re-evaluation of sodium ferrocyanide (E 535), potassium ferrocyanide (E 536) and calcium ferrocyanide (E 538) as food additives. EFSA Journal 2018; 16(7): 4438-588
102.	厚生労働省：令和元年 国民健康・栄養調査報告 第 1 部栄養素等摂取状況調査の結果, 厚生労働省. 2020
103.	EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS): APPENDIX D in Scientific Opinion on the Re-evaluation of sodium ferrocyanide (E 535), potassium ferrocyanide (E 536) and calcium ferrocyanide (E 538) as food additives. EFSA Journal 2018; 16(7): 4438-588
104.	国税庁：酒のしおり (令和 3 年 3 月), 国税庁. 2021
105.	厚生労働省：令和元年 国民健康・栄養調査報告 第 3 部生活習慣調査の結果, 厚生労働省. 2020

106.	国税庁：国税庁ウェブページ，平成 30 年度分酒税課税関係等状況表（第 6 表） https://www.nta.go.jp/taxes/sake/tokei/kazeikankei2018/01.htm（アクセス日：2021/5/13）
107.	TTB (US Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau): Determine If and How Ingredients May be Used in Your Beverage https://www.ttb.gov/formulation/determining-if-and-how-ingredients-may-be-used-in-your-beverage（アクセス日：2021/5/12）