

平成30年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

（※研究全体の期間（初年度及び2年目以降）について記載する。）

研究課題名 (研究項目名)	食品添加物のリスク評価手法に関する研究－乳児を対象とした評価手法及び毒性試験全般に関する最新の国際動向等を踏まえた提言－（課題番号：1805） （3新たなリスク評価方法等の確立 （5）食品添加物のリスク評価手法に関する研究）
主任研究者	研究者名：梅村 隆志 所属機関：ヤマザキ動物看護大学

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

平成30年度（1年間）

2 研究目的

生後3～4ヶ月までの乳児にとって母乳あるいは調整乳は唯一の栄養摂取源であり、乳児の外来化学物質に対する吸収・分布・代謝・排泄機構は成人とは異なると考えられていることから、乳児を対象とした添加物のリスク評価においては、わが国でもこれらの特殊性を考慮した評価方法の確立が求められている。本研究は、乳児を対象とした添加物のリスク評価方法に関する国際動向を参照しながら、ばく露量推定に関する特殊性並びに毒性学的な面からの特殊性について考察し、わが国に適した乳児を対象とした添加物のリスク評価方法を提案することを目的とする。また、添加物指針では毒性試験に関する試験方法について「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」（平成8年厚生省）を参照することになっているが、20年以上の歳月が経っていることから、OECDやICHをはじめとする国際評価機関における各試験のガイドラインを確認し、現在の添加物指針で示されている試験方法の妥当性を検証する。加えて、レポーター遺伝子導入動物を用いた*in vivo*変異原性試験など、OECDでガイドラインが示されているがリスク評価への導入が未だ実施されていない試験法やread across法、最高用量NOAEL、単用量試験からのNOAELを設定などの新たな考え方に基づいた毒性評価方法を提案する。

3 研究体制（※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。）

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
-------	-------	---------------

乳児を対象とした評価手法及び毒性試験全般に関する最新の国際動向等を踏まえた指針案の策定	1) 国際的な動向の解析	梅村隆志（ヤマザキ動物看護大学）、佐藤恭子（国立医薬品食品衛生研究所）、森田明美（三重大学）、石井邦雄（横浜薬科大学）、高須伸二（国立医薬品食品衛生研究所）
	2) 乳児を対象にした添加物のリスク評価方法についての提言	梅村隆志（ヤマザキ動物看護大学）、佐藤恭子（国立医薬品食品衛生研究所）、森田明美（三重大学）、石井邦雄（横浜薬科大学）、高須伸二（国立医薬品食品衛生研究所）
	3) 毒性試験の実施方法についての提言	梅村隆志（ヤマザキ動物看護大学）、高須伸二（国立医薬品食品衛生研究所）
	4) 毒性評価方法についての提言	梅村隆志（ヤマザキ動物看護大学）、石井邦雄（横浜薬科大学）、高須伸二（国立医薬品食品衛生研究所）

4 倫理面への配慮について

本研究では、乳児摂取量の聞き取り調査に関して、三重大学研究倫理委員会において、審査を受け承認された。個人情報保護については、対象の行政府と覚書をかわし、倫理委員会の指針に従って、個人情報保護に努めた。

II 研究内容及び成果等

(1) 研究項目名：乳児を対象とした評価手法及び毒性試験全般に関する最新の国際動向等を踏まえた指針案の策定

1) 個別課題名：国際的な動向の解析（研究担当者名：梅村隆志（ヤマザキ動物看護大学）、佐藤恭子（国立医薬品食品衛生研究所）、森田明美（三重大学）、石井邦雄（横浜薬科大学）、高須伸二（国立医薬品食品衛生研究所））

（研究内容・方法）

平成 29 年度食品安全確保総合調査「海外における食品添加物のリスク評価手法に関する実態調査」¹⁾において収集された食品添加物のリスク評価手法の国際動向に関する情報を毒性学的、栄養学的、化学的見地から精査して、乳児を対象とした添加物のリスク評価方法、毒性試験の実施方法、毒性評価方法に関する国際動向を把握した。

(研究成果、考察及び今後の課題)

乳児用添加物のリスク評価に関しては、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) 及び欧州食品安全機関 (EFSA) の手法を整理した。その結果、リスク評価には幼若動物を用いた安全性試験が必要とされ、ヒト乳児との腸管吸収機能の類似性から新生児ブタ／ミニブタを用いた直接経口試験が重要視されていた。一般的な添加物の場合と比較した際の特記すべき違いの一つは MOE の考え方であり、JECFA では毒性学的・ばく露評価的視点から乳児の特性が十分考慮された場合には、1～10 と非常に小さい MOE の範囲でも健康リスクは低いと考えられると評価されていた。具体的には、対象添加物の毒性が低く、NOAEL が新生児ブタ／ミニブタモデルの試験から得られ、ヒト乳児を対象とした調査で有害事象が報告されていない場合、MOE の値が 1～10 程度であれば安全性に懸念はないと評価されていた¹⁻³⁾。

個別の評価事例を検討する目的で、JECFA において 2016 年までに評価された乳児用添加物 6 品目 (カラギーナン、グリセリンクエン酸脂肪酸エステル (CITREM)、ペクチン、Octenyl succinic acid (OSA) 加工澱粉、イナゴマメガム、キサントガム) について、具体的な評価事項を整理した¹⁻³⁾。その結果、何れの添加物も過去に「ADI を特定しない」と評価されていた。6 品目のうち 4 品目では新生児ブタ／ミニブタモデルの試験が実施され、最終的に MOE による評価が行われていた。一方、新生児ブタ／ミニブタモデル試験が実施されていない 2 品目については、MOE による評価がなされていなかった。また、最終的な MOE の値は 2～12 程度であった (添付資料 1)。

JECFA 及び EFSA の手法を比較した結果¹⁻⁴⁾、乳児の対象年齢を JECFA は 12 週まで、EFSA は 16 週までとしている点や、EFSA では拡張 1 世代生殖毒性試験 (OECD テストガイドライン 443) を要求している点など、JECFA と EFSA で異なる点も認められた。

毒性試験全般に関しては、前述の実態調査の情報を基に添加物指針に記載されている試験と OECD テストガイドラインの対応状況を確認した結果、一般薬理試験と免疫毒性試験がテストガイドラインに対応していないことが明らかになった。

毒性評価方法に関しては、国際評価機関の添加物評価におけるリードアクロス法適応事例や単用量の NOAEL を採用した事例を把握することを最終的な目的とし、具体的な事例を調査する方針とした。

- 2) 個別課題名：乳児を対象にした添加物のリスク評価方法についての提言 (研究担当者名：梅村隆志 (ヤマザキ動物看護大学)、佐藤恭子 (国立医薬品食品衛生研究所)、森田明美 (三重大学)、石井邦雄 (横浜薬科大学)、高須伸二 (国立医薬品食品衛生研究所))

(研究内容・方法)

国際的な動向を踏まえつつ、食事からのばく露量推定に関する特殊性、毒性学的な面からの特殊性について考察し、我が国に適した乳児を対象にした添加物のリスク評価方法を提案する。

ばく露量推定に関しては、我が国の母乳・調整乳の摂取状況について調査を実施した。具体的には、郡部 (関東地方) および市部 (首都圏近辺) 在住者の出生児について、管理

栄養士の聞き取りにより、乳児健診時（郡部は4か月及び7か月、市部は3～4か月）に、乳児の栄養摂取について、詳細に記録している。郡部では、これまでのデータに追加して、本年度1年間の詳細な調査を実施して、これらのデータを分析することによって、乳児の母乳・調整乳の摂取量を推定した。なお、当該郡部では、これまでのデータの対象者のフォローアップにより、健康診断時に、離乳食を始めた乳児後期や幼児における栄養摂取量調査を行っており、当該郡部の乳幼児の摂取量を分析することにより、体重あたり換算による摂取量が成長に伴いどのように変化するか、補足的に確認することを考えている。

毒性学的な面からの検討に関しては、乳児の消化管や肝臓の未成熟性に起因した外来物質に対するADMEの成人との差異を薬物動態学的見地から検証し、ヒトへの外挿性が高い、適切な実験動物の選別とライフステージの選択を検討した。加えて、幼弱動物を用いた毒性試験を実施する際の留意点と健康影響評価の考え方を検討した。

（研究成果、考察及び今後の課題）

食事からのばく露量推定に関する特殊性に関しては、調査協力の得られた首都圏近辺の1つの市（市部）における平成29年度乳児3～4カ月検診（3～6ヶ月の乳児が受診可能）の問診票（1376名分）の母乳・調整乳の摂取状況のデータをまとめた。1376名の内訳は、健常児1348名、病児28名であり、健常児1348名のうち、調整乳のみを摂取している乳児（調整乳のみの乳児）は114名（男子58名、女子56名）、母乳および調整乳を摂取している乳児（母乳＋調整乳の乳児）は418名（男子196名、女子221名、調整乳のデータ不足女子1名）であった（資料 Table 1）。健常児中の調整乳のみの乳児は8.5%と少ないことが明らかとなった。1日一人あたりの調整乳の摂取量及び体重あたりの摂取量は、平均値（±標準偏差）、中央値及び95パーセンタイル値ともに母乳＋調整乳の乳児に比べ、調整乳のみの乳児の方が多いという結果になった（資料 Table 2～5）。調整乳のみの乳児の1日一人あたりの摂取量（mL）の平均値は、男子および女子でそれぞれ937±146 mL および 878±132 mL であり、男子の方が多い傾向が見られたが、体重あたりの摂取量の平均値（中央値）は130±21 (130) mL/kg 体重/日 および 132±21 (129) mL/kg 体重/日 とほぼ同じ値となった。このことは、調製乳摂取量と体重に相関があることを示していると考えられる。

4～6か月の月齢別にみると、男子は、1日一人あたりの調整乳の摂取量（mL）の平均値（中央値）および体重あたりの摂取量の平均値（中央値）ともに月齢が高い方が少ない傾向が見られたが、女子は、6か月で高値であった。6か月については、人数が少なく、値が偏った可能性が考えられる（資料 Table 6、7）。

郡部（関東地方）での調査に関しては、出生数が少ないことも鑑み、調査協力の得られた1つの村における平成20～29年度乳児健診（2, 4, 6, 7, 10か月齢）の問診票から、保健師・管理栄養士が聞き取り調査をした、母乳・調整乳の摂取状況のデータをまとめた。若い月齢では調整乳のみという児は少なく、月齢が高くなると混合栄養を実施していた母は、母乳は与えずに調整乳のみが増える傾向であった（資料 Table 8）。調整乳のみの乳児は2か月齢では7.8%と少ないが、7か月齢では22.5%に増加することが明らかとなった。1日一人あたりの調整乳の摂取量及び体重あたりの摂取量は、市部と同様に、平均値

(±標準偏差)、中央値及び95パーセンタイル値ともに母乳＋調整乳の乳児に比べ、調整乳のみの乳児の方が多いという結果になった。調整乳の1日一人あたりの摂取量(mL)の平均値は、男子の方が多い傾向が見られたが、有意な男女差は示されなかった。体重あたりの摂取量の平均値(中央値)は、4か月、7か月齢では女子の方が高かったが、こちらも有意な男女差はなかった。このことは、調製乳摂取量と体重に相関があることを示していると考えられる(資料 Table 9～11)。

月齢別にみると、調整乳のみの乳児の摂取量(mL)は2か月齢でやや低く、4,6か月齢ではやや高くなり、また7か月齢で低くなっていた。一方、体重あたりの摂取量の平均値は、月齢が高い方が少ない傾向が見られた。しかしながら、今回の分析データはそれぞれの月齢での横断分析であり、各個人個人の時系列的な変化を見たものではないことに注意が必要である(資料 Table 12、13)。

6か月、7か月齢では90%の児がすでに、離乳食を開始しており、10か月齢では、ほとんどの児が、規則的な3回の離乳食を摂取していた。しかしながら、10か月齢でも、離乳食と同時に母乳を摂取しているものも70%存在し、哺乳瓶で調整乳またはフォローアップミルクを摂取しているものが40%、コップ等で離乳食として調整乳またはフォローアップミルクを摂取しているものも40%存在した。離乳食が始まると、乳汁の摂取量の把握が困難になってくるが、哺乳瓶で作る1回あたりの調整乳量と、哺乳瓶での1日摂取回数を掛け合わせると、母乳を摂取せず調整乳のみ摂取している群では、1日当たりおおよそ1300mL近くの調整乳を摂取していると推定された。12～13か月齢では、母乳摂取は53%、調整乳(フォローアップミルク含む)摂取は50%の児に見られ、1歳6か月においても、母乳は27%、調整乳は11%の児が摂取していた。離乳期の摂取量については、まだまだ詳細な調査が必要ではあるが、今回の分析結果から、12か月程度までは調整乳を相応に飲んでいるという可能性が考えられた。従って、乳児用調整乳への添加物の影響を考える場合には、ばく露評価という観点からは、母乳又は調整乳のみを摂取している期間の検討のみではなく、もう少し上の月齢(1歳～1歳6か月前後)までの検討が必要だと考えられた。

「海外における食品添加物のリスク評価手法に関する実態調査」¹⁾では、ばく露量推定について、JECFA(2014年)では、①乳児用調整乳は、母乳で育てられない12週未満の乳児の唯一の栄養源であり、②食品添加物は、許容された最大限のレベルで使用、③1日の乳児用調整乳のエネルギーは、67 kcal/100 mL(280 kJ/100 mL)のエネルギー密度で計算、④ばく露(摂取)期間は限られ、その期間中に体重ベースで摂取量は徐々に減少(出典：JECFA 第79回会合)する点を考慮するとしている。また、EFSA(2017年)では、16週齢未満の乳児について検討され、米国では、多くの乳児には、6ヶ月齢まで代用乳が与えられ、調整乳の利用は現実的に考えられるべきであるとされている。

JECFA 第79回会合(2014年)²⁾においては、カラギーナン、グリセリン酸脂肪酸エステル(CITREM)、ペクチン、オクテニルコハク酸(OSA)加工デンプンの安全性評価が行われた。食事からの摂取量の評価において、乳児用調製粉乳の消費推定値の中央値が、完全調合乳を摂取した乳児の推定エネルギー所要量に、一般的なエネルギー密度(67 kcal/100 mL(280 kJ/100 mL))を使用して導き出された。さらに、調整乳を摂取した乳児について報告された一日当たりの高エネルギー摂取量(95パーセンタイル)を用

いて、さらなるばく露シナリオが検討され、報告された体重 1 キログラム当たりのエネルギー摂取量の 95 パーセンタイル値のうち、最も高いのは 14～27 日の乳児のものであったとされている。

カラギーナンについては、0～6 ヶ月の乳児を対象に摂取量評価が行われた。乳児用調製粉乳へのカラギーナンの使用量が 300 mg/L の場合、カラギーナンの推定摂取量の中央値は、37～54 mg/kg 体重/日の範囲であり、使用量が 1000 mg/L の場合、推定摂取量の中央値は 124～180 mg/kg 体重/日と推定された。それぞれの添加物の摂取量は、最大推奨使用量等に、一日に摂取される調整乳量に乗じることで求められるが、報告書²⁾には、一日に摂取される調整乳量に関する詳細は記載されていない。

一方、国連食糧農業機関/世界保健機関/国連大学 (FAO 他) によりヒトのエネルギー必要量の研究がなされ⁵⁾、イギリス等の様々な研究データを基に、月齢毎 (1～12 か月) の調製乳のみを摂取する乳児および母乳のみを摂取する乳児の 1 日の平均エネルギー所要量 (kcal/kg 体重/日) が算出されている。そこで、1～6 か月の調製乳のみを摂取する乳児の 1 日の平均エネルギー所要量 (kcal/kg 体重/日) を一般的なエネルギー密度 (0.670 kcal/mL) で除すことにより、一日に摂取される調整乳量を求めると、1 か月児の男子が最も多く、182 mL/kg 体重/日であり、6 か月の男子が最も少なく、124 mL/kg 体重/日であった (資料 Table 14)。4、5 か月児の値については、今回の調査結果と近いものと考えられた (4 か月男子 128、女子 133、5 か月男子 127、女子 130 mL/kg 体重/日)。

また、求めた調整乳量に、カラギーナンの調整乳への添加量 (300 及び 1000 mg/L) を乗じて添加物の摂取量を算出したところ、添加量 300 mg/L では、最小値は 6 か月の男子の値 (37 mg/kg 体重/日) であり、最大値は 1 か月の男子の値 (55 mg/kg 体重/日) であり、添加量 1000 mg/L では、最小値は 6 か月の男子の値 (124 mg/kg 体重/日)、最大値は 1 ヶ月の男子の値 (182 mg/kg 体重/日) となり、いずれも、第 79 回会合で求められた推定摂取量の中央値と同様であった (資料 Table 15)。また、CITREM、OSA 加工デンプン、ペクチンについて、求めた調整乳量にそれぞれの添加量等乗じて、摂取量を求めたところ、同様の結果となった (資料 Table 16～18)。このことから、JECFA 第 79 回会合の評価で用いられた 0～6 か月の推定エネルギー所要量データは FAO 他により算出された平均エネルギー所要量と同様のものであると考えられた。

一方、第 82 回会合 (2016 年)³⁾における、イナゴマメ (カロブビーンガム)、ペクチン、キサンタンガムの安全性評価の摂取量評価では、0～12 週齢の乳児における乳児用調製粉乳における提案された使用レベル (カロブビーンガム : 10000 mg/L、ペクチン : 2000 mg/L、キサンタンガム : 1000 mg/L) での各添加物の推定摂取量は、それぞれ 600～1800 mg/kg 体重/日、120～360 mg/kg 体重/日、60～180 mg/kg 体重/日の範囲であった。使用レベルと推定摂取量から、最低ばく露量および最高ばく露量に対応する調整乳量を算出すると、いずれの添加物でも 60 mL/kg 体重/日および 180 mL/kg 体重/日となった。60 mg/kg 体重/日については一日の摂取量としては、少ないと考えられるが、180 mL/kg 体重/日は、FAO 他のデータから算出した調整乳量と同様であった。

また、カロブビーンガム、ペクチン、キサンタンガムのエネルギー摂取量が高い (95 パーセンタイル) 乳児のばく露量はそれぞれ 2200 mg/kg 体重/日、440 mg/kg 体重/日、220 mg/kg 体重/日に達する可能性があると考えたことから、使用レベルと推定摂取量から、

95 パーセントの乳児の調整乳量を算出すると、すべて 220 mL/kg 体重/日であった。以上から、JECFA の評価においては、摂取量の算出には、調製乳のみを摂取する乳児の 1 日の平均エネルギー所要量 (kcal/kg 体重/日) を一般的なエネルギー密度で除すことにより求められる調整乳量を用いており、4、5 か月児の調整乳量については、日本の市部の調査結果と大きく離れてはいなかった。

日本では、0～6 カ月の 1 日のエネルギー所要量は 110～120 kcal/kg 体重であり、個人差が大きい、一般的に、1 日の授乳量は 165～180 mL/kg 体重といわれている⁶⁾。上限値については、FAO 他のエネルギー所要量から算出された調製乳量 (124～182 mL/kg 体重/日) と同様であることから、食品添加物の摂取量の算出に用いる値としては、海外の数値と大きく離れていないと考えられる。

生理学・毒性学的観点からの検討では、新生児や乳児と成人との生理学的な差異を検討した。その結果、腸管吸収に関しては一定の類似性があると考えられたが、吸収後の分布・代謝・排泄機構の類似性については不明であったことから、乳児における食品添加物の体内動態の特殊性を明らかにすること、また乳児における食品添加物の体内動態を予測可能な動物実験系の探索を目的として「海外における食品添加物のリスク評価手法に関する実態調査」によって収集された食品添加物のリスク評価手法に関連する文献をもとに、引用されているデータの詳細な分析を行った。具体的には、乳児の成長に伴う経時的な 1) 各臓器の形態的及び機能的な変化、2) 消化管からの化学物質の吸収特性の変化 (Absorption ; A)、3) 水、脂質、タンパク質、ミネラル等の身体構成成分の量的変化並びに各臓器の相対的重量の変化 (Distribution ; D) と血液脳関門等のバリア機能の変化、4) 薬物代謝酵素を始めとする食品添加物の代謝に関連する酵素活性の変化 (Metabolism ; M)、5) 食品添加物の体外排泄を担う腎臓及び肝臓の機能の変化 (Excretion ; E)、6) ADME 各要素の変化の総体としての食品添加物の体内動態の変化について検討した。

続いて、乳児における食品添加物の体内動態予測のための実験モデルとしての有用性という観点から、各種幼若動物を用いた毒性試験の妥当性について検討した。その結果、新生児ブタ (ミニブタ) が解剖学的、生理学的、生物学的にヒトに類似しており、化学物質や医薬品の安全性・薬効薬理試験の動物モデルとしてもよく用いられていること⁷⁾、また、胃腸管、心肺系、皮膚、泌尿器、代謝系、免疫系などの機能が、げっ歯類に比べヒトに類似することが知られている⁸⁻¹²⁾。加えて、添加物の使用方法から被験物質を直接経口投与した毒性試験が重要であると考えられるが、従来の生殖毒性試験や発生毒性試験では直接経口投与を実施しないことが多かった。その原因は、げっ歯類の新生児に被験物質を直接経口投与することは技術的に困難である点にあるが、新生児ブタでは容易に直接経口投与を行うことが可能である。以上の点から、乳児を対象とした添加物の生体影響を検討するためには、乳児期ばく露の毒性試験は新生児ブタ (ミニブタ) を用いて、直接経口投与毒性試験を実施することが望ましいと考えられた。

新生児ブタ (ミニブタ) を用いた毒性試験を実施するうえでの留意点としては、以下のような点が考えられた。被験物質の投与期間は哺乳期間に合わせて設定する必要があり、JECFA では生後 2 日から投与を開始し、3 週間投与を継続する試験が評価されている。これは、新生児ブタ (ミニブタ) は消化管機能及び IgG 移行に関して、生後 2 日目からヒト乳児に類似することが知られているためであると考えられた。従って、JECFA で評

価されている毒性試験デザインは、乳児期ばく露の生体影響を評価するうえで妥当であると考えた。投与方法に関しては、直接経口投与で実施する必要があるものの、評価対象品目の物性によっては調整乳が消化管内に停滞することもあり、高濃度で投与することが困難な場合もある。従って、投与量は実際に使用が想定される添加量に加えて、栄養障害の可能性にも配慮して設定する必要があると考えられた。また、新生児モデルにおけるエンドポイントの判定は、毒性試験データのみならず、全般的な体内動態や毒性をふまえた乳児の体内動態や生理学的な違いも十分考慮し、特に、乳児で代謝や吸収等が大きく変化することや感受性が高いことが想定される場合は、詳細な解析を追加することが望ましいと考えられた。加えて、新生児ブタ（ミニブタ）の試験結果並びに体内動態を考察した結果、免疫毒性や神経毒性等が疑われた場合には、必要に応じて、追加の試験を検討する必要があると考えられた。しかしながら、新生児ブタ（ミニブタ）を用いた特殊毒性試験は実施方法が確立されていないことから、特殊毒性はげっ歯類等を用いた試験により検討する必要があると考えられ、その場合は動物種差及び種特異性等を十分考慮し、ヒトへの外挿可能性については慎重に考察する必要があると考えられた。

食品健康影響評価に関しては、ADI は「ヒトがある物質を毎日一生涯にわたって摂取し続けても、現在の科学的知見からみて健康への悪影響がないと推定される一日当たりの摂取量」として設定されるが、調整乳を介した乳児のばく露期間は限られていることから、一生涯摂取することを想定して設定される従来の ADI の考え方はそぐわないと考えた。従って、乳児を対象にした添加物の食品健康影響評価は、現行の添加物評価指針における「ADI の設定の考え方」を適用せず、評価対象添加物の NOAEL と一日摂取量とを比較するばく露マージンの評価を行うのが妥当であると考えた。

ばく露マージンの評価は NOAEL の設定根拠となる動物試験のデザイン（動物種、投与期間、投与量等）、新生児モデルにおける毒性、全般的な毒性プロファイル、毒性の作用機序、ヒト乳児を対象とする試験成績などを考慮して総合的に判断する必要がある。健康へのリスクは低いと評価されるばく露マージンに関して、JECFA は一般的な毒性試験において毒性が低く、新生児ブタ（ミニブタ）を用いた試験から NOAEL が得られ、その試験で顕著な毒性影響が認められておらず、ヒト乳児のデータでも有害影響が示唆されていない場合には 1～10 程度でも健康へのリスクは低いことを示唆としている²⁾。本研究班では、JECFA のばく露マージンの評価基準は一定の妥当性があると考えたものの、今後さらなる検討が必要であると考えた。

以上のような点を踏まえ、本研究班における乳児を対象にした添加物の食品健康影響評価の考え方案を取りまとめた（添付資料 2）。

- 3) 個別課題名：毒性試験の実施方法についての提言（研究担当者名：梅村隆志（所属機関名：ヤマザキ動物看護大学）、高須伸二（国立医薬品食品衛生研究所））

（研究内容・方法）

毒性試験方法の国際的な動向を参照しながら、科学的に適切な試験方法について考察し、「添加物に関する食品健康影響評価指針」への具体的な毒性試験方法の実施上の留意点を提示する。現在は、平成 8 年の厚生省指針を参照することとなっているが、20 年以

上の歳月が経っていることから、OECD や ICH をはじめとする国際評価機関における各試験のガイドラインを確認し、現在の添加物指針で示している試験方法の妥当性を検証した。

（研究成果、考察及び今後の課題）

現在の添加物指針と OECD テストガイドラインを比較した結果、各試験の実施方法及び留意事項は OECD テストガイドラインに詳細に規定されており¹³⁻²⁴⁾、国際的な動向に合致するものであると考えられた。従って、現行の添加物指針のうち、「第2安全性に係る知見」における「体内動態試験」、「亜急性毒性試験及び慢性毒性試験」、「発がん性試験」、「1年間反復投与毒性／発がん性併合試験」、「生殖毒性試験」、「出生前発生毒性試験」、「遺伝毒性試験」に関しては、それぞれ対応する OECD テストガイドラインを基本として各試験の実施方法並びに留意点をまとめることが妥当であると考えた（添付資料 3-9）。

添加物指針の試験方法を国際評価機関のガイドラインやリスク評価の現状と比較した結果、試験に用いる動物種に相違が認められた。現行の添加物指針では、「亜急性毒性試験及び慢性毒性試験」は「げっ歯類 1 種（通常、ラットが用いられる。）及び非げっ歯類 1 種（通常、イヌが用いられる。）で実施する。」とされている。一方、JECFA の添加物リスク評価ガイダンスでは、Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Foods²⁵⁾において、一般的に「げっ歯類 1 種及び非げっ歯類 1 種」又は「げっ歯類 2 種」で実施するとされており、一律的に非げっ歯類の毒性試験を要求していない。OECD テストガイドラインのうち、「非げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験」（OECD TG409）では、非げっ歯類を用いた試験は「他の試験で影響が認められ、第二の動物種の非げっ歯類でこれを明確化／特徴付けする必要性が示された場合、またはトキシコキネティクス試験により、特定の非げっ歯類が実験動物として最も関連性の高い選択肢であることが示された場合、または非げっ歯類の使用を正当化する他の特別な理由がある場合。」に実施することとされている¹⁵⁾。農薬の食品健康影響評価では、イヌを用いた 1 年間反復経口投与毒性試験の取扱いについて、「「イヌ慢性毒性試験が必要であると考えられる場合」に該当する場合は、非げっ歯類（イヌ）1 種の試験結果も要求する。」とされており²⁶⁾、非げっ歯類の慢性毒性試験は一律必要とはされていないケースも認められる。

このように、非げっ歯類を用いた毒性試験の取扱いは規定や対象化学物質により異なっている。現行の添加物指針では原則的に非げっ歯類を用いた試験成績を要求している一方、JECFA では非げっ歯類を用いた毒性試験を一律必要とはしていない。従って、国際的な動向を考慮すると、現行の「亜急性毒性試験及び慢性毒性試験」における「げっ歯類 1 種（通常、ラットが用いられる。）及び非げっ歯類 1 種（通常、イヌが用いられる。）で実施する。」は、「げっ歯類 1 種及び非げっ歯類 1 種、又はげっ歯類 2 種」に改めるのが望ましいと考えた。今後、非げっ歯類を用いた毒性試験の取扱いの可否を含めて、さらに検討する必要があると考えられた。

「アレルギー性試験」に関して、現行の現在の添加物指針では「化学物質を経口的に摂取した場合のアレルギー誘発能を予測する方法は十分に確立されておらず、特に、即時型

アレルギーの誘発性を予測し得る方法は未確立であるが、添加物に係る知見、使用形態等を考慮した上で、専門家が適切と判断した感作及び惹起方法で試験を実施するべきである。当面は、少なくとも遅延型アレルギーを指標とするアレルギー性試験を実施する必要があるが、モルモットを用いた皮膚感作性試験（例：OECD テストガイドライン 406 のうちマキシミゼーション試験（GPMT））又はマウスを用いたリンパ節反応試験（例：OECD テストガイドライン 429（局所リンパ節試験（LLNA）））を利用することができる。」とされている。また、平成 8 年厚生省ガイドラインでは、即時型アレルギー試験として、モルモットにおける能動全身性アナフィラキシー反応試験、ウサギ又はモルモットにおける同種 PCA 反応試験、感作マウス血清におけるラット PCA 反応試験が、遅延型アレルギー試験として、モルモットにおける接触皮膚反応試験、マウスにおける足蹠反応又はリンパ節反応試験が、高分子又は蛋白質と結合すると考えられる食品添加物では、感作動物血清の抗体力価、蛋白質との結合性の程度、類縁化合物との交差反応性などを検討することとされる。

現在の添加物指針でのアレルギー性試験と OECD テストガイドラインを比較した結果、「モルモットを用いた皮膚感作性試験」と「マウスを用いたリンパ節反応試験」については、OECD テストガイドラインに規定されており、国際的な動向に合致すると考えた。従って、OECD テストガイドラインを基本としてアレルギー性試験の実施方法並びに留意点をまとめることが妥当であると考えた（添付資料 10）。しかしながら、その他のアレルギー性の評価方法に関する指針や考え方に関しては、さらに検討する必要があると考えられた。

一般薬理試験については、概ね平成 8 年厚生省ガイドラインに記載されている内容で問題ないと考えられたが、薬理学研究の現状に鑑みると、必ずしも適当とは考えられない箇所も散見されたため、それらについては別紙に修正点を記述した（添付資料 11）。以下のように修正するのが望ましい。

修正箇所	現行	修正後
1. 試験動物及び試験系	マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、等	マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、 <u>ブタ（ミニブタ）</u> 等
3. 試験項目 B. (1)	<u>機器</u> を用いて解析を行う	<u>コンピューター等</u> を用いて解析を行う
3. 試験項目 B. (2)	<u>局所麻酔作用</u> に及ぼす影響について検討する	<u>知覚神経</u> に及ぼす影響について検討する
3. 試験項目 B. (3)	<u>瞳孔径及び瞬膜収縮</u> に及ぼす影響	瞳孔径に及ぼす影響
3. 試験項目 B. (3)	<u>器官</u>	<u>気管</u>
3. 試験項目 B. (4)	迷走神経 <u>刺激</u>	迷走神経 <u>作用薬</u>

現行の添加物指針のうち、「第5 評価に必要な資料等の考え方」では「(1) 当該添加物が食品常在成分であること」についての記載がある。この記載は、添加物が食品常在成分に分解されることが明らかな場合に毒性試験の一部を省略できることを述べたものであるが、この「食品常在成分」になることの定義は平成8年厚生省ガイドラインで規定されている。一方、この「食品常在成分」という表現がしばしば分かりにくく、添加物(酵素)に関する食品健康影響評価指針での表現とは相違がある。今後、各種ガイドラインを参照しながら、適当な表現を検討する必要があると考える。

- 4) 個別課題名：毒性評価方法についての提言(研究担当者名：梅村隆志(所属機関名：ヤマザキ動物看護大学)、石井邦雄(横浜薬科大学)、高須伸二(国立医薬品食品衛生研究所))

(研究内容・方法)

近年の毒性評価方法の国際的な変動を参照しながら、ばく露に関する評価方法、毒性データセットに関する新たな考え方、毒性指標に関する新たな考え方について考察し、評価に際しての留意点を提言としてまとめる。

毒性データセットに関する新たな考え方に関しては、国際的な食品添加物評価におけるリードアクロス法の適用状況を検討した。また、毒性指標に関する新たな考え方については、「添加物に関する食品健康影響評価指針」では複数の投与量を設定している毒性試験から NOAEL を求めることとしているが、香料評価では試験の最高用量を NOAEL とする、いわゆる最高用量 NOAEL の採用が一般的であり、単用量試験からの NOAEL を設定する場合もある。本研究では、JECFA などの国際評価機関において単用量試験から NOAEL を設定したケースなど複数の投与量を設定した毒性試験から NOAEL を求めている事例を整理した。

(研究成果、考察及び今後の課題)

国際評価機関の添加物評価におけるリードアクロス法適用事例や単用量の NOAEL を採用した事例を把握することを最終的な目的とし、具体的な事例を調査した。添加物評価に対して単用量試験から NOAEL を採用した国際評価機関の事例を調査した結果、JECFA のキシランタングムの評価において、新生児ブタを用いた2用量の試験と単用量の試験を1つの試験として評価し、単用量試験の用量から NOAEL を採用していることが明らかとなった³⁾。この単用量試験は、2用量の試験のフォローアップのために実施された試験であり、同一のプロトコール、同一の研究所で2ヶ月以内に実施された試験であったことから、JECFA では両試験を合わせ3用量の試験として NOAEL を設定した。我が国における添加物の安全性評価では、複数の投与量を設定している毒性試験から NOAEL を求めることが原則であり、基本的には単用量の試験から NOAEL は設定できない。一方、JECFA では上記のように一定の条件下の元、単用量試験から NOAEL を判断しているケースが認められた。このような評価方法は、毒性評価の新たな考え方として添加物のリスク評価にも受け入れられる可能性が考えられたものの、未だ事例も少ないことから、その適応条件等に関しては、さらなる検討が必要であると考えられた。一方、リードアクロス

法の適用事例に関しては、「海外における食品添加物のリスク評価手法に関する実態調査」に記載のとおり、農薬・医薬分野での検討が主だが、EFSA では食品添加物に関する検討が行われていた。今後さらに調査をする必要があると考えられた。

（２）研究全体の成果、考察及び結論

本研究では、わが国に適した乳児を対象とした添加物のリスク評価方法を提案することを目的に、ばく露量推定並びに毒性学的の面から、それぞれの特殊性を検討した。

ばく露量推定の特殊性に関しては、郡部および市部在住者の出生児を対象にした母乳・調整乳の摂取状況を調査した結果、市部在住者の出生児では、1 日一人あたりの調整乳の摂取量及び体重あたりの摂取量は、平均値、中央値及び 95 パーセンタイル値ともに母乳＋調整乳の乳児に比べ、調整乳のみの乳児の方が多かった。市部と同様に、郡部の平均値（±標準偏差）、中央値及び 95 パーセンタイル値ともに母乳＋調整乳の乳児に比べ、調整乳のみの乳児の方が多という結果になった。また、調整乳のみの乳児の 1 日一人あたりの摂取量の平均値は、男子の方が高い傾向が見られたが、体重あたりの摂取量の平均値（中央値）は男女でほぼ同じ値となったことから、調製乳摂取量と体重に相関があることを示していると考えられた。JECFA では、摂取量の算出には、調製乳のみを摂取する乳児の 1 日の平均エネルギー所要量（kcal/kg 体重/日）を一般的なエネルギー密度（0.670 kcal/mL）で除すことにより求められる調整乳量を用いており、4、5 か月児の調整乳量については、日本の市部の調査結果と大きく離れてはいなかった。日本では、0～6 カ月の 1 日のエネルギー所要量は 110～120 kcal/kg 体重であり、個人差が大きい、一般的に、1 日の授乳量は 165～180 mL/kg 体重といわれている。上限値については、FAO 他のエネルギー所要量から算出された調製乳量（124～182 mL/kg 体重/日）と同様であることから、食品添加物の摂取量の算出に用いる値としては、海外の数値と大きく離れていないと考えられた。

毒性学的な面からの検討では、乳児における食品添加物の体内動態予測のための実験モデルとしての有用性という観点から、各種幼若動物を用いた毒性試験の妥当性について検討した。その結果、乳児を対象とした添加物の生体影響を検討するためには、乳児期ばく露の毒性試験は新生児ブタ（ミニブタ）を用いて、直接経口投与毒性試験を実施することが望ましいと考えられ、試験を実施するうえでの留意点を取りまとめた。

食品健康影響評価に関しては、従来の ADI の考え方はそぐわないと考えられたことから、乳児を対象にした添加物の食品健康影響評価は、評価対象添加物の NOAEL と一日摂取量とを比較するばく露マージンの評価を行うのが妥当であると考えた。さらに、ばく露マージンの評価は NOAEL の設定根拠となる動物試験のデザイン、新生児モデルにおける毒性、全般的な毒性プロファイル、毒性の作用機序、ヒト乳児を対象とする試験成績などを考慮して総合的に判断する必要があると考えられた。しかし、ばく露マージンの評価基準については、JECFA の考え方に一定の妥当性があると考えられたものの、今後さらなる検討が必要であると考えた。

毒性試験に関する実施方法について国際的な動向を確認し、現在の添加物指針で示し

されている試験方法の妥当性を検証した。現在の添加物指針と OECD テストガイドラインを比較した結果、各試験の実施方法及び留意事項は OECD テストガイドラインに詳細に規定されており、これらは国際的な動向に合致するものであると考えられたことから、それぞれ対応する OECD テストガイドラインを基本として各試験の実施方法並びに留意点をまとめた。

以上より、本研究では、わが国に適した乳児を対象とした添加物のリスク評価方法並びに各種毒性試験の実施方法について、国際的な動向を踏まえ考え方を提示した。本研究成果は我が国に適したリスク評価手法の開発に資すると考えられた。

参考資料

- 1) 食品安全委員会、海外における食品添加物のリスク評価手法に関する実態調査、2018
- 2) Evaluation of certain food additives (Seventy-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) WHO Technical Report Series, No. 990, 2014.
- 3) Evaluation of certain food additives (Eighty-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) WHO Technical Report Series, No.1000, 2016.
- 4) EFSA scientific committee, Guidance on the risk assessment of substances present in food intended for infants below 16 weeks of age, EFSA Journal, 15(5), 4849, 2017.
- 5) Human energy requirements: report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation: Rome, 17-24 October 2001 (FAO, food and nutrition technical report series, 1) Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2004.
- 6) 柳沢正義監修, 授乳・離乳の支援ガイド 実践の手引き, 財団法人母子衛生研究会, 東京, pp29-31, 2008.
- 7) Bode G, Clausen P, Gervais F, Loegsted J, Luft J, Nogues V, Sims J; Steering Group of the RETHINK Project. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. J Pharmacol Toxicol Methods. 62, 196-220. 2010.
- 8) Helm RM, Golden C, McMahon M, Thampi P, Badger TM, Nagarajan S. Diet regulates the development of gut-associated lymphoid tissue in neonatal piglets. Neonatology. 91, 248-55. 2007.
- 9) Guilloteau P, Zabielski R, Hammon HM, Metges CC. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? Nutr Res Rev. 23, 4-22. 2010.
- 10) Barrow PC. Use of the swine paediatric model. In: Doberman AM and Lewis EM (eds.). Pediatric Non-Clinical Drug Testing: Principles, Requirements, and Practice. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ, USA. pp. 213-230.2012.
- 11) Heinritz SN, Mosenthin R, Weiss E. Use of pigs as a potential model for research into dietary modulation of the human gut microbiota. Nutr Res Rev. 26, 191-209. 2013.
- 12) Odle J, Lin X, Jacobi SK, Kim SW, Stahl CH. The suckling piglet as an agrimedical model for the study of pediatric nutrition and metabolism. Annu Rev Anim Biosci. 2, 419-44. 2014.
- 13) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 417: Toxicokinetics,

2010. (日本語訳：国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部、TG417：トキシコキネティクス、<http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg417rj.pdf>)
- 14) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents, 2018. (日本語訳：国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部、TG408：げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験、<http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg408j.pdf>)
- 15) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 409: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents, 1998. (日本語訳：国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部、TG409：非げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験、<http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg409j.pdf>)
- 16) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 452: Chronic Toxicity Studies, 2018 (日本語訳：国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部、TG452：慢性毒性試験、<http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg452rj.pdf>)
- 17) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 451: Carcinogenicity Studies, 2018 (日本語訳：国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部、TG451：癌原性試験、<http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg451rj.pdf>)
- 18) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies, 2018 (日本語訳：国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部、TG453：慢性毒性／癌原性併合試験、<http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg453rj.pdf>)
- 19) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 416: Two-Generation Reproduction Toxicity, 2001 (日本語訳：国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部、TG416：二世代生殖毒性試験、<http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg416j.pdf>)
- 20) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study, 2018 (日本語訳：国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部、TG443：拡張一世代生殖毒性試験、<http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg443j.pdf>)
- 21) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 414: Prenatal Developmental Toxicity Study, 2018 (日本語訳：国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部、TG414：出生前発生毒性試験、<http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg414j.pdf>)
- 22) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, 1997 (日本語訳：国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部、TG471：細菌復帰突然変異試験、<http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg471j.pdf>)
- 23) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test, 2016 (日本語訳：国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部、TG473：哺乳類の *in vitro* 染色体異常試験、<http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg473rj.pdf>)
- 24) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 2016 (日本語訳：国立医薬品食品衛生研究所安全性予測

評価部、TG474：哺乳類赤血球小核試験、<http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg474rj.pdf>)

- 25) FAO and WHO. Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. Environmental Health Criteria 240, 2009.
- 26) 食品安全委員会、農薬の食品健康影響評価におけるイヌを用いた1年間反復経口投与毒性試験の取扱いについて、平成29年12月21日農薬専門調査会決定

Ⅲ 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（※別添として別刷（投稿中のものは、受理証明書の写し）を提出すること。また、査読付きの場合は、雑誌名の冒頭に◎を付すこと。）

該当なし

- 2 本研究を基にした学会発表の実績

該当なし

- 3 特許及び特許出願の数と概要

該当なし

- 4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）

該当なし

Ⅳ 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

- 1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
（１）JECFA や EFSA 等の国際機関において乳児としての特性が考慮される期間（３～４ ヶ月齢未満）も考慮しつつ、調整乳を摂取している年齢である生後 7～8 ヶ月までの乳児を対象とした添加物のリスク評価方法について提言する。	5	我が国の乳児の摂取量調査を実施し、毒性学的な評価における新生児ブタ／ミニブタモデルの科学的妥当性を検討し、その課題点を洗い出した。これらの研究成果をもとに、わが国に適した乳児を対象とした添加物のリスク評価の考え方を取りまとめた。
（２）毒性試験方法全般について、準じるべき国際的なガイドラインや試験成績の評価における留意点を提案する。	5	添加物指針の試験と OECD テストガイドラインの対応状況を確認し、各試験の実施方法並びに留意点をまとめた。

(3)OECDでガイドラインが示されているがリスク評価への導入が未だ実施されていない試験法やリードアクロス法、最高用量NOAEL、単用量試験からのNOAEL設定などの新たな考え方に基づいた毒性評価方法を提案する。	5	国際評価機関の添加物評価におけるリードアクロス法適応事例や単用量NOAELを採用した事例を検討し、その事例を確認した。
---	---	--

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

2 研究全体の自己評価

項 目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	5	わが国に適した乳児を対象とした添加物のリスク評価方法並びに各種毒性試験の実施方法について、国際的な動向を踏まえ考え方を提示した。研究目標は概ね達成できたものとする。
(2) 研究成果の有用性	5	我が国の乳児を対象とした添加物のリスク評価手法の確立に役立つものと期待される。
総合コメント 期間内に当初の計画に沿って研究を遂行し、研究目的は概ね達成した。本研究成果は、今後の我が国の添加物のリスク評価手法の確立に資するものと期待される。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

※次のただし書を枠で囲って記載すること。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。