資料１－１

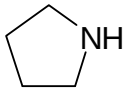
ピロリジンの概要

１．はじめに

ピロリジンは、ラディッシュ、チーズ、コーヒー、とうもろこし、麦芽、ホップ油等の食品中に存在する成分である[1)]。欧米では、チューインガム、ソフト・キャンデー類、焼菓子、朝食シリアル類、冷凍乳製品類、清涼飲料等の様々な加工食品において香りを再現し、風味を向上させるために添加されている[2)]。

２．名称等

名称：ピロリジン
英名：Pyrrolidine
構造式：



化学式：C_4H_9N
分子量：71.12
CAS 番号：123-75-1

３．安全性に係る知見の概要

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

(1) 反復投与毒性

5 週齢の SD 系ラット（Crl:CD(SD)：各群雌雄各 10 匹）への強制経口投与による 90 日間（雄 90 日間、雌 91 日間）反復投与毒性試験（0、0.25、2.5、25 mg/kg 体重/日[ii]）では、いずれの投与群でも、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、

---

[i] 反復投与毒性試験（引用文献 3) 3-2)）、および 2 種類の遺伝毒性試験（引用文献 13)、15)）が厚生労働省の委託により行われている。なお、各試験に使用された被験物質については、製造会社から当時の品質管理データを譲り受け(独)産業技術総合研究所により公開されているスペクトルと比較したところ両者のパターンが一致したこと等から、ピロリジンであることが国立医薬品食品衛生研究所の専門家により確認されている[7) 8) 16)]。

[ii] 投与量に関し報告書には、推定摂取量 12.7[3-2)]μg/人/日に対する 1,000、10,000、100,000 倍に相当する 3 用量群との記載がある。国際汎用香料に関する当該試験の投与量設定は、欧米における使用量調査を基に後述の PCTT 法により算出した推定摂取量の最大値を日本人の平均体重 50kg で除し、これに上記のマージンを乗じた値を元とすることとなっているが、後述の PCTT 法により算出すれば本物質の推定摂取量は 0.1～2μg/人/日であり↗

血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査において、被験物質投与に関連した毒性影響は認められなかった。器官重量では雌の 25mg/kg 体重投与群で脾臓の相対重量が有意な高値を示したが、絶対重量では有意差は認められず、剖検により同投与群の雌 1 例に脾臓の腫大が認められたこと、また病理組織学的検査においてこの群と対照群の髄外造血および褐色色素の沈着に程度の差は認められなかったことから、偶発的なものと判断された。またこの 1 例には好中球の浸潤を伴う限局性の壊死も観察されたが、1 例だけの変化であるため偶発的なものと判断された[3) 3-2) 7) 8)]。

この結果から、本試験条件下における無毒性量（NOAEL）は、25mg/kg 体重/日と考えられる[iii]。

(2) 発がん性

離乳直後の雌のスイスーICR 系マウスを用い、1g/L 相当の亜硝酸と 0.1g/L 相当のピロリジンを含む水溶液を給水器で投与した飲水複合投与試験（各群総計 36 匹、投与期間：1 年、自由飲水・自由摂餌。ピロリジン投与量 0.66 g/匹/日相当（SD 値：±0.14)、投与終了後剖検）では、対照群（水のみを飲水として同様に投与）と比較して摂餌・摂水量、最終体重獲得率、生存率、1 匹あたりの平均腫瘍発生数に有意差は見られなかった[4)]。

同様に、8～10 週齢の MRC ラット（雌雄各 15 匹）を用い、本物質 0.0.25%と亜硝酸ナトリウム 0.05%を含む水溶液による断続的（5 日/週）飲水複合投与試験[6)]（投与期間：75 週、毎週 5 日夜間のみ二種の被験物質の混合水溶液、それ以外の期間は水を給水器に設置[5)]。ピロリジン投与量総計 1.8[6)] g、投与終了後死亡まで通常状態にて飼育し死亡後剖検）において本物質と亜硝酸ナトリウムの複合投与は発がん性を示さなかった[6)]。

副腎皮質における有糸分裂の増加を発がんのプロモーター活性（PTA 活性）と関連する作用と仮定して[iv]行なわれた試験（4.5～5 月齢の Wistar 系ラット（各群雄 7 ～8 匹）に Tylose1%水溶液又は DMSO を溶媒とする溶液にて 100 mg/kg 体重を単回強制経口投与、36 時間後に解剖、標的組織固定、染色）では、DMSO を溶媒とした場合にのみヘマトキシリン・エオシン染色で副腎赤道面の有糸分裂像が、溶媒対照と比較して有意に増加した[14)]。ただし、これは実際の推定摂

↙記載に齟齬が見受けられる。12.7 という数値自体は米国の 1995 年の使用量に見られる[2)]ものであり、試験委託の過程のどこかの時点で使用量と推定摂取量の転記ミスが発生したものと考えられる。結果として投与量は、実際設定すべき値よりも高く設定されたが、後に述べるとおり充分な安全性マージンが得られたため特に問題は生じていない。

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

[iv] 筆者らはこれまで、発がん性物質の単回投与により副腎皮質の有糸分裂が増加することを報告している。発がん性物質はほ乳類動物組織において正常な細胞の増殖を抑制することがよく知られているが、本報告は、これと矛盾する現象であったとしている。したがって、発がん物質による副腎の有糸分裂増加はその物質のプロモーター活性に関連があるのではないかと考えて当該試験を行ったとしている。

取量からかけ離れた高濃度で得られた結果であり、またそもそも PTA 活性は、その物質単独での発がん性を示すものでは無い。

なお国際機関(International Agency for Research on Cancer (IARC)、European Chemicals Bureau (ECB)、U. S. Environmental Protection Agency (EPA)、National Toxicology Program (NTP))では、発がん性の評価はされていない[v]。

(3) 遺伝毒性

細菌(サルモネラ菌 TA98[9) 10)]、TA100[9) 10)]、TA1530[11)]、TA1531[11)]、TA1532[11)]、TA1534[11)] [vi]、TA1535[9)]、TA1537[9)]、TA1950[11)]、TA1951[11)]、TA1952[11)]及び TA1964[11)]))を用いた複数の復帰突然変異試験では、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であった。

チャイニーズ・ハムスター培養細胞（CHL/IU 細胞）を用いた染色体異常試験（最高用量は短時間処理：710μg/mL、連続処理：270μg/mL）では、代謝活性化系存在下の短時間処理の 710μg/mL 群で、倍数性細胞は増加した（代謝活性化系存在下 D_{20} 値 3.2mg/ml［倍数性細胞の誘発］）[7) 8) 13)] [vii]。

9 週齢の BDF_1 系マウス（各群雄 5 匹）への強制経口投与による骨髄小核試験(最高用量 320mg/kg 体重/日× 2)では陰性であった[8) 15) 16)]。

以上の結果から、染色体異常試験の一部で陽性の結果が報告されているが、これは若干の生育阻害(但し 50%は超えない）の見られる高用量でのみ得られた結果であり、DNA の損傷に基づくとされる構造異常はいずれの投与群においても誘発されていない。また十分高用量まで試験された *in vivo* の小核試験では陰性であることを考慮して総合的に判断すると、本物質は少なくとも香料として用いられるような低用量域では、生体にとって特段問題となるような遺伝毒性

---

[v] 宿主経由復帰突然変異試験の結果と発がん性との関連性について評価することを目的に、既存の文献データを収集・精査して各々の試験結果を物質・構造クラス毎に比較した文献[12)]ではピロリジンの発がん性が陽性と記載されていたが、その記載の根拠とされている文献にさかのぼってみても、ピロリジンに関する記載を確認することは出来なかった。なお本文献で参照されている宿主経由試験の結果は文献 11)から引用されている。本文献において発がん性の記載根拠とされた文献を参考までに以下に示す：

- Griesemer, R.A. and C. Cueto, Jr. (1980) in R. Monsanto, H. Batsch and L. Tomatis(Eds.), Molucular and Cellular Aspects of Carcinogen Screening Tests, *IARC Science Publ.*, **27**, 259-281.
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki. E and Ames, B.N. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.)*, **72**, 5135-5139
- Rinkus, S.J., and Legator, M.S. (1979) *Cancer Res.*, **39**, 3289-3318
- Tomatis, L. et al. (1978) *Cancer Res.* **38**, 877-885.

[vi] 本文中の記載。結果をまとめた表(Table4)ではこの使用菌株を TA1964 と記載しているが、本文ではその選択理由も含めて使用された菌株が説明されていることから本文中の記載が正しいものと判断した。

[vii] 参考までに、陽性対象の MMC の D_{20} 値は 0.000032mg/mL、TR 値は 1000000 であり、CP の D_{20} 値は 0.0093mg/mL、TR 値は 4200 である。出展：祖父尼俊雄（監修）染色体異常試験データ集 改定 1998 年版、(株）エル・アイ・シー

はないものと考えられる。

表 遺伝毒性試験概要

試験		対象	処理濃度・投与量	結果	参照
in vitro	復帰突然変異試験 [1980 年]	*Salmonella typhimurium* (TA98、TA1535、TA1537)	[+/-S9*1] 213μg/plate*2	陰性	9
		S. typhimurium (TA100)	[+/-S9*1] 0.213、2.13、21.3、213 μg/plate*3		
	復帰突然変異試験 [1993 年]	*S. typhimurium* (TA98、TA100)	[+/-S9*1] 処理濃度不明	陰性	10
	復帰突然変異試験 [1978 年]	*S. typhimurium* (TA1530、TA1531、TA1532、TA1964)	[+/-S9*1] 0、1000～5000 μg/plate	陰性	11
	復帰突然変異試験[1978 年]	*S. typhimurium* (TA1530、TA1531、TA1532、TA1964)	[+S9*1] 0、35560*4 μg/mL (C3H/HeJ マウス(10～14 週齢、雄、各群 3 匹)の肝)	陰性	
	復帰突然変異試験（宿主経由試験）[1978 年]	雄C3H/HeJマウス *S. typhimurium* (TA1534*5、TA1950、TA1951、TA1952)	0、800mg/kg 体重	陰性	
	染色体異常試験 [2006 年、GLP]	雌のチャイニーズ・ハムスター肺由来細胞（CHL/IU細胞）	[短時間(6 時間)処理、-S9*1] 0、180、360、710μg/mL	陰性	13
			[短時間(6 時間)処理、+S9*1] 0、180、360、710*6 μg/mL	陽性	
			[連続(24 時間)処理、-S9*1] 0、68、140、270μg/mL	陰性	
in vivo	骨髄小核試験 [2007 年、GLP]	9 週齢の BDF_1 系マウス(各群雄、投与数 6 匹、評価数 5 匹)	0、80、160、320 mg/kg 体重（2 日間強制経口投与）	陰性	15

注）下線：陽性が認められた用量。

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

*2：3μmol/plate に相当。

*3：定量的に 4 段階、TA100 について 3μmol/plate まで試験されたとの表の記載に基づく。

*4：0.5M に相当。

*5：文献本文中の記載に基づく。結果をまとめた表(Table4)ではこの使用菌株を TA1964 と記載しているが、本文ではその選択理由も含めて使用された菌株が説明されていることから、本文中の記載が正しいものと判断した。

*6：倍数性細胞は 710μg/mL 群で増加（出現率 4.6%）（D_{20} 値 3.2mg/ml［倍数性細

胞の誘発]）。

(4) その他

内分泌かく乱性及び生殖発生毒性に関する報告は見つからなかった。

４．摂取量の推定

本物質の香料としての年間使用量の全量を人口の 10%が消費していると仮定する JECFA の PCTT（Per Capita intake Times Ten）法による 1995 年の米国及び欧州における一人一日あたりの推定摂取量[viii]は、それぞれ 2μg、0.1μg[17) ix]となる。正確には認可後の追跡調査による確認が必要と考えられるが、既に許可されている香料物質の我が国と欧米の推定摂取量が同程度との情報 [18)]があることから、我が国での本物質の推定摂取量は、おおよそ 0.1～2μg/人/日の範囲になると推定される。

なお、食品中にもともと存在する成分としての本物質の食品中の存在量は、総計で 6,693kg と推算されており [19)]、JECFA では、意図的に添加された本物質との摂取量の比は 515 倍(米国)と報告されている [17) x]。

５．安全マージンの算出

90 日間反復投与毒性試験成績の NOAEL 25mg/kg 体重/日と、想定される推定摂取量（0.1～2μg/人/日）を日本人平均体重（50kg）で割ることで算出される推定摂取量（0.000002～0.00004mg/kg 体重/日）と比較し、安全マージン 625,000～12,500,000 が得られる。

６．構造クラスに基づく評価

本物質は構造クラスⅡに分類される [17) 20)]。5 員環構造を持つ脂環式２級アミ

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

	米国	欧州
年間使用量(kg)	13	1
人口(億人)	2.6	3.2
報告率	0.8	0.6
推定摂取量(μg/人/日)	（計算値）1.712…	（計算値）0.142…

注）年間使用量は 1995 年の調査に基づく。欧米で年間使用量に差があるが、その原因として、香料物質の場合、世界的に製造業者数も少なく、数年に 1 回在庫がなくなるたびに製造するようなものが多く、また、加工食品の流行に依存するため、地域や年による変動があるものと考えられる。

[ix] なお年間使用量の値について引用文献 2)と 17)では齟齬があるが、JECFA に対しては有効数字一桁で報告する必要があるため四捨五入した値で報告されたと考えられる。本概要書では公的な数値として JECFA 評価に用いられた値を採用するが、推定摂取量については Table1 と Table2 で数値の丸め方による差異が見られたため、Table2 に報告された使用量の値のみを採用して再計算を行い、算出された数値を四捨五入して用いた。

[x] 文献 19)ではこの値は米国で 735 倍と報告されているが、これは算出のもととなった使用量の調査年の違い（19)は 1982 年、17)は 1995 年）によるものである。

ンに分類される食品成分であり、健康なヒトの尿中或いは血中にも検出される[17]。ピペリジンと同様に塩基性で構造も類似しているため、同様の系により速やかに吸収・代謝・排出されると考えられる。経口投与による試験ではないため参考であるが、アミン基の水素が置換された[$^{14}CH_3$]-*N*-メチルピロリジンについて、ラットとイヌに静脈注射による単回投与を行なったところ、それぞれ投与量の 81%と 91%が 24 時間以内に尿中に排出されたとの報告がある。また、本物質はα位の炭素の酸化を受けやすく、それによりラクタムを生じ、ついで加水分解による開環反応を経てγ-アミノ酸誘導体となるとされる。これは本物質の様々な置換誘導体で観察される反応である。JECFA では、主に酸化物として速やかに尿中に排出されるとしている[17]。

７．JECFA における評価

本物質は、2005 年第 65 回 JECFA 会議で、脂肪族及び芳香族アミン及びアミドの一つとして評価され、推定摂取量（0.1～2μg/人/日）が、クラスⅡの摂取許容値（540μg/人/日）を下回り、無害な物質に代謝されると予見されることなどから、香料としての使用において安全性の懸念はないとされた[17]。

８．「国際的に汎用されている香料の我が国における安全性評価法」[21]に基づく評価

本物質は香料としての使用において生体にとって特段問題となる毒性はないと考えられる。また、構造クラスⅡに分類され、安全マージン（625,000～12,500,000）は 90 日間反復投与毒性試験の適切な安全マージンとされる 1,000 を上回り、かつ想定される推定摂取量（0.1～2μg/人/日）が構造クラスⅡの摂取許容値（540μg/人/日）を下回る。

引用文献

1) VCF Volatile Compounds in Food : database / Nijssen, L.M.; Ingen-Visscher, C.A. van; Donders, J.J.H. [eds]. - Version 12.1 - The Netherlands : TNO Quality of Life (website accessed in Apr. 2010) (未公表)

2) RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc.)-FEMA (Flavor and Extract Manufacturers Association) database, Material Information on Pyrrolidine (website accessed in Apr. 2010) (未公表)

3) ピロリジンのラットにおける 90 日間反復経口投与毒性試験 (2006) （財）食品薬品安全センター 秦野研究所（厚生労働省委託試験）

3-2) 最終報告書訂正書の提出について（2010 年 4 月 1 日付（財）食品薬品安全センター 秦野研究所）

4) Pearson, A.M., Sleight, S.D., Cornforth, D.P., and Akoso, B.T. (1982) Effects of N-nitrosopyrrolidine, nitrite and pyrrolidine on tumour development in mice as related to ingestion of cured meat. Meat Science **7**(4), 259-268

5) Garcia, H and Lijinsky, W (1972) Tumorigenicity of five cyclic nitrosamines in MRC rats. *Z.Krebsforsch.,* **77**, 257-261.

6) Garcia, H and Lijinsky, W (1973) Studies of the tumorigenic effect in feeding of nitrosamino acids and of low doses of amines and nitrite to rats *Z. Krebsforsch,* **79**, 141-144.

7) SIGMA-ALDRICH：Certificate of Analysis (PRODUCT NUMBER W352306-SPEC, LOT NUMBER 01830JC, PRODUCT NAME PYRROLIDINE,　99+%)

8) 被験物質ピロリジンの確認結果

9) Florin, I., Rutberg, L., Curvall, M. and Enzell C.R. (1980) Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using Ames' test. *Toxicology* **18** 219-232

10) Takahashi, A. and Ono, H. (1993)　Mutagenicity assessment in 44 epoxy resin hardeners in *Salmonella typhimurium* tester strains. *Chem. Exp.* , **8**, 785-788.

11) Green, N.R. and Savage, J.R. (1978) Screening of safrole, eugenol, their ninhydrin positive metabolites and selected secondary amines for potential mutagenicity. *Mutat. Res.*, **57**, 115-121

12) Legator, M.S., Bueding, E.,Batzinger, R., Connor,T.H., Eisenstadt, E., Farrow M.G., et al., (1982) An evaluation of the host-mediated assay and body fluid analysis. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Part I: Host-Mediated Assay　*Mutat. Res.*, **98**, 319-354.

13) ピロリジンのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験(2006)　(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所 (厚生労働省委託試験)

14) Danz, M. and Urban, H.(1979) Carcinogens, promotors and suspicious drugs: Their identical short-term effect in a promoting activity test(PAT). Experimentelle Pathologie, 17, 181-184.

15) ピロリジンのマウスを用いる小核試験 (2007) (財) 食品農医薬品安全性評価センター　(厚生労働省委託試験)

16) SIGMA-ALDRICH：Certificate of Analysis (PRODUCT NUMBER W352306-SPEC, LOT NUMBER 15307CD, PRODUCT NAME PYRROLIDINE, 99+%)

17）第 65 回 JECFA WHO Food Additives Series 56,（2006）Safety evaluation of certain food additives
参考：http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v56je13.pdf
18）平成 14 年度厚生労働科学研究報告書「日本における食品香料化合物の使用量実態調査」、日本香料工業会
19) Stofberg J. and Grundschober F. (1987) Consumption ratio and food predominance of flavoring materials. *Perfumer & Flavorist.* **12**(4), 27-56.
20）ピロリジンの構造クラス（要請者作成資料）
21）香料安全性評価法検討会．国際的に汎用されている香料の安全性評価の方法について（最終報告・再訂正版）．平成 15 年 11 月 4 日

No.	項目	内容
(1)	名称	ピロリジン
	一般的名称	Pyrrolidine
	別名	Pyrrolidine
	CAS番号	123-75-1
(2)	JECFA等の国際的評価機関の結果	FEXPANにより評価され1977年のGRAS 10 に公表された[1)]。 2005年、第65回JECFA会合にて、本物質はクラスⅡに分類され、安全性に懸念なしと判断された[2)]。
	JECFA番号	1609
(3)	外国の認可状況・使用状況	欧米をはじめ各国で認可され広く使用されている。
	FEMA GRAS番号	3523
	CoE番号	10491
	CFR21掲載	なし
	EUレジスター	FL No. 14.064
	使用量データ	13kg(米国)、1kg(EU)[2)]
(4)	我が国での添加物としての必要性	本物質は食品に通常に存在する成分であり、種々の食品の香りを再現する際に必要不可欠な物質である。本物質は現在日本では未認可であるが、その添加量は微量ながら効果は非常に大きく、様々な加工食品に対してすでに国際的には着香の目的で広く使用されている。したがって国際的整合性の面からみても、これらの物質を日本で使用できるようにすることが不可欠と考えられる。
	天然での存在	ラディッシュ、チーズ、コーヒー、とうもろこし、麦芽、ホップ油等に認められる[3)]。
	米国での食品への使用例(平均的添加率)	チューインガム (3ppm)、ソフト・キャンデー類 (1ppm)、 焼菓子 (0.7ppm)、朝食シリアル類 (0.5ppm)、冷凍乳製品類 (0.4ppm)、 清涼飲料(0.2ppm)等[4)]。
(5)	参考資料	1) Food Technology. (1977) Vol.31, No.1, pp.65-74. 2) WHO food additives series ; 56 http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v56je13.pdf 3) VCF Volatile Compounds in Food : database / Nijssen, L.M.; Ingen-Visscher, C.A. van; Donders, J.J.H. [eds]. - Version 12.1 - The Netherlands : TNO Quality of Life (website accessed in Apr. 2010) (未公表) 4) RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc.)-FEMA (Flavor and Extract Manufacturers Association) database, Material Information on Pyrrolidine (website accessed in Apr., 2010) (未公表)