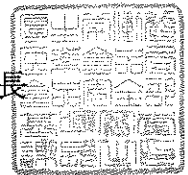




食安基発0601第1号
平成22年 6月 1日

内閣府食品安全委員会事務局評価課長 殿

厚生労働省医薬食品局
食品安全部基準審査課長



食品健康影響評価に係る補足資料の提出依頼について（報告）

高濃度にジアシルグリセロールを含む食品に係る標記については、平成21年8月25日付け府食第812号及び平成21年9月4日付け府食第858号にて依頼され、平成21年9月17日付け食安基発0917第1号及び平成21年12月1日付け食安基発1201第1号にて、DAG油の製造に責任を有している企業からの報告について報告したところです。

今般、当該企業からグリシドール脂肪酸エステル及びグリシドールの遺伝毒性試験の結果について別添1のとおり報告があり、また、厚生労働省（国立医薬品食品衛生研究所）において実施した、食用油等のグリシドール脂肪酸エステルの含有実態調査結果について別添2のとおり取りまとまりましたので、合わせて報告いたします。

なお、DAG油の製造に責任を有している企業から報告されたグリシドール脂肪酸エステル及びグリシドールの遺伝毒性試験の結果については、信頼性及び中立性の確保を図るため、国立医薬品食品衛生研究所の研究者を中心とした専門家による確認を実施し、妥当であるとの報告を受けている旨申し添えます。



平成22年5月31日

厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長 殿

花王株式会社
代表取締役社長執行役員
尾崎 元規

グリシドール脂肪酸エステルおよびグリシドールに関する補足資料の提出について

平素は格別のご高配を賜り厚く御礼申し上げます。

標記の件につきましては、基準審査課長殿より平成21年9月8日付け食安基発0908第1号を以って補足資料提出のご連絡をいただき、優先している3項目について、平成21年11月30日付けで弊社より報告いたしました。その後の進捗について、以下のとおりご報告いたします。

1. グリシドール脂肪酸エステルおよびグリシドールの遺伝毒性試験

グリシドールリノール酸エステルおよびグリシドールについて、GLP基準に適合した試験受託機関にて遺伝毒性試験（Ames試験、染色体異常試験、小核試験）を実施いたしました。このたび、第三者試験機関から最終報告書を手に入れましたので提出いたします。これらの試験は、厚生労働省より依頼されました専門家の方々に信頼性及び中立性をご確認いただいております。また、関連する弊社の自主研究につきましても、併せて提出いたします。

2. 体内動態研究のための分析方法の開発状況

体内動態研究を実施するにあたり、血液中の成分の影響を受けない、信頼性の高い高感度微量定量分析法を確立することは、評価において最も重要ですが、グリシドール脂肪酸エステル、および予想代謝物の一つであるグリシドールの分析法は、いまだ世界的に報告例はありません。

血漿中のグリシドール脂肪酸エステルの分析については、LC/MS法により、定量限界が5ppbレベルの高感度分析法を開発いたしました。一方グリシドールの分析につきましては、低分子量であり、揮発性が高く、不安定なことから、高感度分析法の開発には予想以上に時間を要しましており、このたび、GC/MS法により定量限界0.2ppmレベルまでの分析法が開発できましたが、専門家の方々には、体内動態の正確な全容の解明には、より高感度の分析方法の開発が必要とのご指摘をいただいております。

3. その他の関連情報

(1) 食用油脂中のグリシドール脂肪酸エステルの分析方法

食用油脂中のグリシドール脂肪酸エステルの分析法を、昨年末に開発し、本年1月に日本油化学会発行の専門誌に掲載しました（J. Oleo Science, 59:81-88, 2010）。更に改良法にいて検討を行っております。

(2) 欧州食品安全機関（EFSA）における研究の情報

昨年11月にEFSAが、3-MCPD脂肪酸エステル（およびその関連エステル）のデータベース作成のための取り組みを開始しました。これによると、3-MCPD脂肪酸エステルにつきましては、ドイツを中心に、分析方法、低減化法、生成メカニズム、体内動態、安全性などの研究を、産官学の研究機関が一体となって取り組んでいます。その中に、グリシドール脂肪酸エステルの項が設けられており、ベルギーの大学機関が、分析方法、食品中の量、生成機構などの研究計画を公表するなど、研究の広がりを見せています。本情報は今後も注視してまいります。なおEFSAの情報は下記のURLに記載されています。

<http://www.efsa.europa.eu/en/ahawtopics/topic/monochloropropane.htm>

グリシドールリノール酸エステルおよびグリシドールの遺伝毒性試験 (概要)

グリシドールリノール酸エステルは、Ames 試験にて陽性、染色体異常試験および小核試験では陰性の結果が得られ、グリシドールは Ames 試験および染色体異常試験にて陽性、小核試験では陰性の結果が得られた (表 1、2)。

グリシドールリノール酸エステルの Ames 試験において、陽性結果の得られた *Salmonella typhimurium* TA100 株の実験系について、花王(株)において自主研究を実施したところ、この Ames 試験条件下において、

- ・ 復帰変異コロニー数の増加に相当する程度のグリシドールが生成していること
- ・ リパーゼ阻害剤の添加によりその生成が抑制され、かつ、復帰変異コロニー数の増加も抑制されること

が確認され、Ames 試験の陽性結果は、グリシドールリノール酸エステルより生成したグリシドールによるものである可能性が示唆された。

表 1 グリシドールリノール酸エステルの結果概要

試験	対象	処理濃度・投与量	結果	
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験 (Ames 試験)	TA98 株 39-1250 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (-S9) 10-313 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (+S9)	陰性	
		TA100 株 39-1250 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (-S9) 10-1250 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (+S9)	陽性	
		TA1535 株 4.9-1250 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (-S9) 4.9-313 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (+S9)	陽性	
		TA1537 株 39-1250 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (-S9) 10-313 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (+S9)	陰性	
		WP2 <i>uvrA</i> 株 156-5000 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (-S9) 156-5000 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (+S9)	陰性 陽性	
	染色体異常試験	チャイニーズハムスター由来 CHL 細胞	425~3400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (短時間処理 +/-S9、 連続処理 24hr) 53.1~3400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (連続処理 48hr)	陰性
<i>in vivo</i>	小核試験	ICR マウス (骨髄細胞) 一群雄 5 匹	250, 500, 1000 mg/kg (2 回経口投与)	陰性

+/-S9: 代謝活性化系存在下及び非存在下

表 2 グリシドールの結果概要

試験	対象	処理濃度・投与量	結果	
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験 (Ames 試験)	TA98 株 313-5000 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (+/-S9)	陽性	
		TA100 株 4.9-313 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (-S9) 10-313 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (+S9)	陽性	
		TA1535 株 0.31-313 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (-S9) 0.31-78 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (+S9)	陽性	
		TA1537 株 313-5000 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (-S9) 313-5000 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (+S9)	陽性 陰性	
		WP2 <i>uvrA</i> 株 1.2-313 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (-S9) 10-313 $\mu\text{g}/\text{g}$ 投与 (+S9)	陽性	
	染色体異常試験	チャイニーズハムスター由来 CHL 細胞	25~350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (短時間処理 +/-S9) 25~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (連続処理 24hr) 5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (連続処理 48hr)	陽性
<i>in vivo</i>	小核試験	ICR マウス (骨髄細胞) 一群雄 5 匹	50, 100, 200 mg/kg (2 回経口投与)	陰性

+/-S9: 代謝活性化系存在下及び非存在下

食用油等のグリシドール脂肪酸エステルの含有実態調査結果について

平成 22 年 6 月
厚生労働省

1. 調査概要

・調査実施機関

国立医薬品食品衛生研究所

・調査対象食品

DAG 油については、花王（株）により販売自粛が行われる以前に市販されていた製品を用いた。その他の食用油については（社）日本植物油協会、マーガリン及びファットスプレッドについては日本マーガリン工業会、乳幼児用調製粉乳については（社）日本乳業協会より提供された製品を用いた（各2製品3ロット）。

・分析対象物質

食用油中の含量割合の高い脂肪酸上位3種（パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸）の各グリシドール脂肪酸エステルとした。

・分析方法

常温下で液状の食用油を対象として妥当性確認した抽出法により得られた試料をLC/MSにより分析した（定量限界5ppm）。常温下で固形のマーガリン及びファットスプレッドについては日本農林規格、乳幼児用調製粉乳については食品衛生法に記載されている油脂含有率に係る規格試験法により油脂を抽出し、以降の操作は食用油の分析法に従った（別紙1参照）。

・分析結果

DAG 油については、すべての製品からその他の食品に比較して高濃度のグリシドール脂肪酸エステル（3種の脂肪酸エステルの合計値166～286ppm）が検出された。その他の食用油については、こめ油から定量限界をわずかに上回る検出が確認されたが（3種の脂肪酸エステルの合計値10.3～16.1ppm）、マーガリン、ファットスプレッド及び乳幼児用調製粉乳については、すべて定量限界未満であった（別紙2参照）。

2. 結 論

食用油等に含まれるグリシドール脂肪酸エステルの分析法を検討し、これにより分析を行ったところ、DAG 油のみにその他の食用油等に比べ、高濃度のグリシドール脂肪酸エステルの含有が認められた。

<別紙 1> グリシドール脂肪酸エステル分析法の概要

1. 食用油の分析フロー

試料

- ↓ サンプル (100 mg) を遠心管に採取
- *常温下で固体の試料は加温 (55°C) して溶解

抽出

- ↓ アセトニトリル (4 mL) を加え混合
- *常温下で固体の試料は加温 (55°C) したアセトニトリルを加え混合
- ↓ 遠心 (3,500 rpm、室温) 10 分

上清

↓

オクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) カートリッジカラム

- ↓ メタノール (1 mL)、アセトニトリル (2 mL) を順次添加しコンディショニング
- ↓ 上清を全量添加
- ↓ アセトニトリル (4 mL) で溶出

溶媒留去

- ↓ 窒素ガスで溶媒を留去
- ↓ 残渣はクロロホルム (2 mL) に溶解

シリカゲルカートリッジカラム

- ↓ クロロホルム (2 mL) を添加しコンディショニング
- ↓ 試料液を一部採取 (200 μ L) し添加
- ↓ クロロホルム (8 mL) で溶出

溶媒留去

- ↓ 窒素ガスで溶媒を留去
- ↓ 残渣はメタノール/2-プロパノール混合溶液 (1:1) (1 mL) に溶解

LC/MS 分析

2. マーガリン及びファットスプレッドの分析フロー

試料

- ↓ サンプル (1.5 g) をビーカーに秤量
- ↓ 分液ロートにジエチルエーテル (80 mL) で洗い込む

抽出

- ↓ 無水硫酸ナトリウム 10 g を加え、4~5 秒激しく振り混ぜて放置
- ↓ この浸とう操作を 5 回程度繰り返す

ろ過

↓ ジエチルエーテル溶液をナスフラスコにろ過

溶媒留去

*日本農林規格では恒温水槽 (50~80℃) を使用するが、GE を構成している脂肪酸の酸化を防ぐため、下記の操作に変更した。

↓ 減圧下、40℃で溶媒を留去

↓ 窒素ガスを吹き付けて溶媒を留去 (60℃)

乾燥

*日本農林規格では恒温乾燥器 (105℃) を使用するが、GE を構成している脂肪酸の酸化を防ぐため、下記の操作に変更した。

↓ デシケーター内で減圧下、一晚以上放置

抽出油脂

↓ 秤量

食用油中の GE 分析法に従い分析

3. 乳幼児用調製粉乳の分析フロー

試料

*分析に必要な油脂を十分に確保するため、食品衛生法に記載されている試料量の 5 倍量を試験に供した。従って、抽出操作に用いる全ての溶媒についても食品衛生法に記載されている 5 倍量を使用した。

↓ サンプル (5 g) をビーカーに秤量し、温水 20 mL に溶解

抽出

*食品衛生法ではレーリッヒ管を使用しているが、本研究では分液ロートを代わりに使用した。また、抽出液に含まれる水分を除去するため、無水硫酸ナトリウムによる脱水操作を本試験で追加した。

↓ 全量を分析ロートに移し、温水 (15 mL×2 回)、アンモニア水 (10 mL)、エチルアルコール (50 mL) でビーカーを順次洗い込み、良く混和

↓ ジエチルエーテル (125 mL) を加え、静かに回転した後、振とう (30 秒)

↓ 石油エーテル (125 mL) を加え、振とう後 (30 秒)、2 時間以上静置

↓ 上清を採取

↓ 下層にジエチルエーテル (125 mL)、石油エーテル (125 mL) を加え、振とう後 (30 秒)、2 時間以上静置

↓ 上清を採取

↓ 下層にジエチルエーテル (125 mL)、石油エーテル (125 mL) を加え、振とう後 (30 秒)、2 時間以上静置

↓ 上清を採取

↓ 得られた上清を無水硫酸ナトリウムで脱水後、ろ過

溶媒留去

*食品衛生法では恒温水槽（約 75℃）を使用するが、GE を構成している脂肪酸の酸化を防ぐため、下記の操作に変更した。

↓ 減圧下、40℃で溶媒を留去

↓ 窒素ガスを吹き付けて溶媒を留去（60℃）

乾燥

*食品衛生法では恒温乾燥器（100～105℃）を使用するが、GE を構成している脂肪酸の酸化を防ぐため、下記の操作に変更した。

↓ デシケーター内で減圧下、一晩以上放置

抽出油脂

↓ 秤量

食用油中の GE 分析法に従い分析

4. LC/MS 分析条件

LC 条件

カラム：L-column ODS（4.6 mm×150 mm, 5 μm）

ガードカラム：L-column ODS（4.6 mm×10 mm, 5 μm）

移動相 A：アセトニトリル：メタノール：水=17：17：6（v/v/v）

移動相 B：2-プロパノール

グラジエント：0.0 min（A98%, B2%）→15.0 min（A55%, B45%）→15.1 min（A0%, B100%）→25.0 min（A0%, B100%）→25.1 min（A98%, B2%）→35.0 min（A98%, B2%）

流速：1 mL/min

注入量：20 μL

カラム温度：40℃

MS 条件

イオン化法：APCI ポジティブ

コロナ電流：5.0 μA

ベーパーライザ温度：500℃

シースガス：40

AUX ガス：5

キャピラリー温度：340℃

SIM モニターイオン：m/z 313（パルミチン酸グリシジル）

m/z 337（リノール酸グリシジル）

m/z 339（オレイン酸グリシジル）

Dwell time：約 0.3 秒

<別紙2> グリシドール脂肪酸エステル分析結果

1. 食用油中のグリシドール脂肪酸エステル類濃度

食用油	製品情報		グリシドール脂肪酸エステル類, ppm ¹⁾			
			パルミチン酸 グリシジル	オレイン酸 グリシジル	リノール酸 グリシジル	合計 ²⁾
DAGを主成分とする油	製品A	ロット1	5.7	105	139	249
		ロット2	5.2	117	156	277
		ロット3	(4.0)	74	96	174
	製品B	ロット1	5.5	100	129	234
		ロット2	5.6	119	161	286
		ロット3	(3.7)	70	93	166
なたね油	製品A	ロット1	- ³⁾	-	-	-
		ロット2	-	-	-	-
		ロット3	-	(1.1)	-	(1.1)
	製品B	ロット1	-	-	-	-
		ロット2	-	-	-	-
		ロット3	-	-	-	-
大豆油	製品A	ロット1	-	-	-	-
		ロット2	-	-	-	-
		ロット3	-	-	-	-
	製品B	ロット1	-	-	-	-
		ロット2	-	-	-	-
		ロット3	-	-	-	-
コーン油	製品A	ロット1	-	(1.9)	(3.3)	(5.2)
		ロット2	-	(1.4)	(1.9)	(3.3)
		ロット3	-	(1.7)	(3.1)	(4.8)
	製品B	ロット1	-	(1.8)	(3.0)	(4.9)
		ロット2	-	(1.9)	(3.0)	(4.9)
		ロット3	(0.77)	(1.7)	(2.7)	(5.2)
こめ油	製品A	ロット1	-	(2.3)	(2.2)	(4.5)
		ロット2	-	(2.1)	(2.0)	(4.1)
		ロット3	-	(2.1)	(1.9)	(4.1)
	製品B	ロット1	(1.3)	(4.6)	(4.3)	(10)
		ロット2	(2.1)	7.4	6.7	16
		ロット3	(1.5)	5.4	(4.6)	11
紅花油	製品A	ロット1	-	(0.75)	-	(0.75)
		ロット2	-	-	-	-
		ロット3	-	-	-	-
	製品B	ロット1	-	(0.93)	-	(0.93)
		ロット2	-	-	-	-
		ロット3	-	(1.3)	-	(1.3)
ごま油	製品A	ロット1	-	-	-	-
		ロット2	-	-	-	-
		ロット3	-	-	-	-
	製品B	ロット1	-	-	-	-
		ロット2	-	-	-	-
		ロット3	-	-	-	-
綿実油	製品A	ロット1	-	(0.82)	-	(0.82)
		ロット2	-	(0.85)	-	(0.85)
		ロット3	-	-	-	-
	製品B	ロット1	-	(1.5)	(0.86)	(2.4)
		ロット2	-	(1.6)	(0.99)	(2.6)
		ロット3	-	(1.6)	(1.0)	(2.6)
ひまわり油	製品A	ロット1	-	(1.6)	-	(1.6)
		ロット2	-	(1.4)	-	(1.4)
		ロット3	-	(1.3)	-	(1.3)
	製品B	ロット1	-	(1.6)	(0.85)	(2.5)
		ロット2	-	(1.6)	(0.82)	(2.4)
		ロット3	-	(1.6)	(0.85)	(2.5)
オリーブ油	製品A	ロット1	-	-	-	-
		ロット2	-	-	-	-
		ロット3	-	-	-	-
	製品B	ロット1	-	-	-	-
		ロット2	-	-	-	-
		ロット3	-	-	-	-
パーム油 ⁴⁾	製品A	ロット1	-	-	-	-
		ロット2	-	-	-	-
		ロット3	-	-	-	-
	製品B	ロット1	-	-	-	-
		ロット2	-	-	-	-
		ロット3	-	-	-	-

1) 試料の定量限界は5ppm、検出限界は0.75ppmとした。試料濃度が定量限界未満であるが、検出限界以上である場合は、測定値に()を付した。

2) 定量限界未満の数値もそのままの値を用いて合計した。各測定値がいずれも定量限界未満である場合は、合計値に()を付した。

3) 検出限界未満

4) 本試験法は常温下で液状の植物油を適用範囲としている。したがって、常温下で固体の製品については本試験法の適用範囲外である。

2. 食用油を原料に含む食品中のグリシドール脂肪酸エステル類濃度

食用油脂を原料に含む食品 ¹⁾	製品情報		抽出油脂中のグリシドール脂肪酸エステル類 ppm ²⁾				製品中のグリシドール脂肪酸エステル類 ppm ³⁾			
			パルミチン酸 グリシジル	オレイン酸 グリシジル	リノール酸 グリシジル	合計 ⁴⁾	パルミチン酸 グリシジル	オレイン酸 グリシジル	リノール酸 グリシジル	合計 ⁴⁾
マーガリン	製品A	ロット1	- ⁵⁾	(1.2)	-	(1.2)	- ⁵⁾	(0.87)	-	(0.87)
		ロット2	-	(1.1)	-	(1.1)	-	(0.80)	-	(0.80)
		ロット3	-	(1.3)	-	(1.3)	-	(1.0)	-	(1.0)
	製品B	ロット1	-	-	(0.97)	(0.97)	-	-	(0.71)	(0.71)
		ロット2	-	-	(0.89)	(0.89)	-	-	(0.68)	(0.68)
		ロット3	-	-	(0.94)	(0.94)	-	-	(0.72)	(0.72)
ファット スプレッド	製品A	ロット1	-	-	-	-	-	-	-	-
		ロット2	-	-	-	-	-	-	-	-
		ロット3	-	-	-	-	-	-	-	-
	製品B	ロット1	-	-	(0.87)	(0.87)	-	-	(0.60)	(0.60)
		ロット2	-	-	(0.82)	(0.82)	-	-	(0.56)	(0.56)
		ロット3	-	(0.82)	(1.2)	(2.1)	-	(0.56)	(0.85)	(1.4)
乳幼児用 調整粉乳	製品A	ロット1	-	-	-	-	-	-	-	-
		ロット2	-	-	-	-	-	-	-	-
		ロット3	-	-	-	-	-	-	-	-
	製品B	ロット1	-	(0.85)	-	(0.85)	-	(0.22)	-	(0.22)
		ロット2	-	(0.96)	-	(0.96)	-	(0.24)	-	(0.24)
		ロット3	-	(0.84)	-	(0.84)	-	(0.21)	-	(0.21)

1) 本試験法は常温下で液状の食用油を適用範囲としている。したがって、食用油を原料に含むマーガリン、ファットスプレッド及び乳幼児用調整粉乳については本試験法の適用範囲外であるため、得られた分析値の信頼性は低い。

2) 抽出油脂中の定量限界は5ppm、検出限界は0.75ppmとした。試料濃度が定量限界未満であるが、検出限界以上の場合は、測定値に（ ）を付した。

3) 抽出油脂含量に基づく算出した製品中濃度。定量限界及び検出限界は、それぞれマーガリン（約3.7ppm、約0.56ppm）、ファットスプレッド（約3.3ppm、約0.50ppm）、乳幼児用調整粉乳（約1.2ppm、約0.18ppm）。試料濃度が定量限界未満であるが、検出限界以上の場合は、測定値に（ ）を付した。

4) 定量限界未満の数値もそのままの値を用いて合計した。各測定値がいずれも定量限界未満である場合は、合計値に（ ）を付した。

5) 検出限界未満