

## ピロールの概要

## 1. はじめに

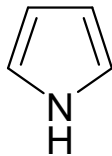
ピロールは、コーヒー、タマリンド、麦芽等の食品に天然に含まれ、牛肉、鶏肉、ばかがい等の加熱調理により生成する成分<sup>1)</sup>である。欧米では、焼菓子、肉製品、冷凍乳製品類、ゼラチン・プリン類、朝食シリアル類、ソフト・キャンデー類等の様々な加工食品において香りを再現し、風味を向上させるために添加されている<sup>2)</sup>。

## 2. 名称等

名称：ピロール

英名：Pyrrole

構造式：



化学式：C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>N

分子量：67.09

CAS 番号：109-97-7

## 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の結果<sup>i)</sup>、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) 遺伝毒性

枯草菌 (H17(*rec+*)、M45(*rec-*)) を用いた DNA 損傷試験 (*rec-assay*) では、代謝活性化系非存在下で弱い陽性、また、大腸菌 M65 由来ラムダファージを用

<sup>i)</sup> 反復投与毒性試験 (引用文献13) 13-2)、および2種類の遺伝毒性試験 (引用文献8) 8-2)、12) 12-2)) が厚生労働省の委託により行われている。各試験に使用された被験物質については、被験物質と同じロットのサンプルあるいは同等品について分析を行い、(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、ピロール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<sup>21) 22) 23)</sup>。なお本被験物質は、添加物として指定する際に予定されている規格に合致しているものである。

いた DNA 切断試験（アガロースゲル電気泳動、Cu<sup>2+</sup>存在下）で陽性が認められた<sup>9)</sup>。

ラット肝細胞を用いた DNA 修復試験では陰性の結果であった<sup>10)</sup>。

細菌（サルモネラ菌 TA98<sup>3) 4) 5) 6) 7)</sup>、TA100<sup>3) 4) 6) 7)</sup>、TA102<sup>4)</sup>、TA1535<sup>6)</sup>、TA1537<sup>6) 7)</sup> 及び大腸菌 343/113<sup>polA<sup>+</sup> 7)</sup>、KMBL1787<sup>polA<sup>-</sup> 7)</sup>）を用いた複数の復帰突然変異試験では、代謝活性化系存在の有無にかかわらず、いずれも陰性であった。チャイニーズ・ハムスターの培養細胞（CHL/IU 細胞）を用いた染色体異常試験（最高用量は、代謝活性化系非存在下の短時間処理群が 680 µg/mL、代謝活性化系存在下の短時間処理群が 85 µg/mL、代謝活性化系非存在下の連続処理群が 680 µg/mL）では、代謝活性化系非存在下で短時間処理した場合は、陰性であった。代謝活性化系存在下で短時間処理した中濃度群及び高濃度群で、構造異常の増加（出現率：ともに 6.5 %）が認められた。この陽性結果の D<sub>20</sub> 値は 0.28 mg/mL、TR 値は 35 であり、弱いながらも染色体異常を誘発すると考えられた。なお、代謝活性化系非存在下で連続処理した場合は陰性であった<sup>8) 8-2) 21) 22)</sup>。

8 週齢の ICR 系マウス(各群雄 6 匹)を用いた *in vivo* 骨髄小核試験(最高用量 100mg/kg 体重/日×2、強制経口投与)では陰性であった<sup>12) 12-2) 22) 23)</sup>。

以上の結果から、染色体異常試験、DNA 損傷試験及び DNA 切断試験では陽性の結果が得られているが、染色体異常試験については中～高濃度群での結果であること、復帰突然変異試験及び最大耐量まで試験されたマウスの *in vivo* 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遺伝毒性はないものと考えられる<sup>ii)</sup>。

表 遺伝毒性試験概要

試験		対象	処理濃度・投与量	結果	参照
<i>in vitro</i>	DNA 損傷試験 (rec-assay) [1987年]	<i>Bacillus subtilis</i> (H17( <i>rec</i> <sup>+</sup> ), M45( <i>rec</i> <sup>-</sup> ))	[-S9*1] 4.02、20.1 mg/disk	陽性*2	9
			[+S9*1] 4.02、20.1 mg/disk	*3	
	DNA 切断試験 [1987年]	<i>Escherichia coli</i> M65 由来 ラムダファージ	[Cu <sup>2+</sup> 存在下、電気泳動] 0、 <u>6.25</u> 、 <u>12.5</u> 、 <u>25</u> 、 <u>50</u> mM	陽性*4	9

ii なお引用文献 11) は本物質が mutagen との前提に基づいて各種の試験を行っているため、被験物質を選択した根拠の部分(Materials & Methods)で参照されている文献 (H.Omura et al., *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, **215**, 537(1983):参照文献番号 13)) にさかのぼって確認したが、本物質そのものの試験を行ったわけではなく「グルコースとリジンの反応生成物中の変異原物質について検討したところ、pyrrole-2-carbaldehyde に関連した物質、おそらくは ε-(2-formyl-5-(hydroxymethyl)pyrrol-1-yl)norleucine と 5-HMF(5-hydroxymethylfurfural)が主な変異原と示唆される。」(p548)旨の記述があるのみであった。

			(0, <u>0.419</u> 、 <u>0.839</u> 、 <u>1.68</u> 、 <u>3.35</u> mg/mL)		
	DNA 修復試験 [1980年]	ラット肝細胞	67 mg/L (10 <sup>-3</sup> mol/L)	陰性	10
	復帰突然変異試験 [1994年]	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98、TA100)	[+/-S9*1] 用量不詳	陰性	3
	復帰突然変異試験 [1989年]	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA102)	[+/-S9*1] 939 ng~93.9 mg/plate (14 nmol~1.4 mmol/plate)	陰性	4
	復帰突然変異試験 [1981年]	<i>S. typhimurium</i> (TA98*5)	[+/-S9*1] 100、250、500 µg/plate	陰性	5
	復帰突然変異試験 [1980年]	<i>S. typhimurium</i> (TA98)	[+/-S9*1] 20、201、2012 µg/ plate (0.3、3、30 µmol/plate)	陰性	6
		<i>S. typhimurium</i> (TA100、TA1535、TA1537)	[+/-S9*1] 201 µg/plate(3 µmol/plate)		
	復帰突然変異試験 [1982年]	[プレインキュベーション法] <i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1537)	[+/-S9*1] プレインキュベーション時の濃度：0、23、117、587、1174、2348 mg/L (0、0.35、1.75、8.75、17.5、35 mmol/L)	陰性	7
		<i>E. coli</i> (343/113 <i>polA</i> +、KMBL1787 <i>polA</i> -)	10 µ g/plate		
	染色体異常試験 [2007年、GLP]	チャイニーズ・ハムスター、雌肺由来細胞 (CHL/IU 細胞)	[短時間(6時間)処理、-S9*1] 0.17、0.34、0.68*6 mg/mL	陰性	8
			[短時間(6時間)処理、+S9*1] 0.04、 <u>0.06</u> 、 <u>0.085</u> mg/mL*6	陽性*7	
			[連続時間(24時間)処理、-S9*1] 0.17、0.34、0.68*6 mg/mL	陰性	
<i>In vivo</i>	骨髄小核試験 [2010年、GLP]	8週齢のICR系マウス (CrIj:CD1(ICR)、各群雄6匹)	0、25、50、100 mg/kg 体重/日(2日間、オリーブ油溶液、強制経口投与)	陰性	12

注) \*1: +/-S9 : 代謝活性化系存在及び非存在下。 +S9 : 代謝活性化系存在下。

-S9 : 代謝活性化系非存在下。

\*2: (M45の阻止帯長さ (mm))から(H17の阻止帯長さ (mm))をマイナスすることで求められた値が、順に 2.9、3.2 mm で、弱い陽性が認められた。

\*3: (M45の阻止帯長さ (mm))から(H17の阻止帯長さ (mm))をマイナスすることで求められた値はそれぞれ 0.5、1.6mmであった。

- \*4: グラフより、移動度が、表記載の濃度順に 2.95、9.29、15.60、19.83、19.45 mm と読み取ることができ、陰性対照に比べ強い DNA 切断作用が認められた。
- \*5: 文中には TA100、TA1535、TA1537、TA1538 についても試験をし、一番感受性の高い TA98 の結果のみを掲載したとあるが、試験濃度や結果が明記されていないためこれらについては記載をしなかった。
- \*6: 10 mmol/L 相当.+S9 の短時間処理群についても 10 mmol/L まで試験は行われたが、分裂指数の結果を元にこれらの用量群を観察対象とした。
- \*7: 中濃度(0.06) mg/mL 群及び高濃度(0.085 mg/mL)群で、構造異常の増加（出現率：ともに 6.5%）が認められた。D<sub>20</sub> 値は 0.28 mg/mL、TR 値は 35。

## (2) 反復投与毒性

5 週齢の SD 系ラット（各群雌雄各 10 匹）への強制経口投与による 90 日間反復投与毒性試験（0、0.03、0.3、3 mg/kg 体重/日<sup>iii</sup>）では、一般状態、体重および摂餌量、尿検査、眼科学的検査、剖検及び病理組織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。血液学的検査では、雌の 0.3 および 3mg/kg 投与群に白血球数の有意な減少が、また血液生化学的検査では雄の 3mg/kg 投与群に、総コレステロール濃度、カルシウム濃度およびγ-GTP の有意な上昇が認められた<sup>13) 13-2) 21) 22)</sup>。

この結果から、本試験条件下での無毒性量（NOAEL）は 0.03 mg/kg 体重/日と考えられる。

## (3) 発がん性

発がん性試験は行われておらず、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)）でも、発がん性の評価はされていない。

## (4) その他

内分泌かく乱性及び生殖発生毒性に関する試験は行われていない。

## 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<sup>iv</sup>による 1995 年の米

<sup>iii</sup> 投与量に関し本試験では、欧米の使用量、具体的には欧州、米国の 1995 年の使用量を基に、後述の PCTT 法で算出した推定摂取量では、非常に小さな投与量となることから、JECFA の香料の安全性に懸念がないとする摂取量の閾値 1.5 µg/人/日(0.03 µg/kg 体重/日)に対して 1,000、10,000、100,000 倍に相当する 3 用量群で試験を実施した。

<sup>iv</sup> [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 <sup>14)</sup>	欧州 <sup>2)</sup>
年間使用量(kg)	0.1	0.9
人口(億人)	2.6	3.2
報告率	0.8	0.6

国及び欧州における一人一日あたりの推定摂取量は、それぞれ 0.01 µg、0.1 µg<sup>14)</sup>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<sup>15)</sup>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 0.01~0.1 µg/人/日の範囲になると推定される。

なお、米国における食品中にもともと存在する成分としての本物質の年間摂取量は 2,315 kg/総人口<sup>16)</sup>と算出されており、香料としての意図的添加に基づく年間摂取量との比は、約 23,150 倍となる。

## 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 0.03 mg/kg 体重/日と、想定される推定摂取量 (0.01~0.1 µg/人/日) を日本人平均体重 (50 kg) で割ることで算出される推定摂取量 (0.0000002~0.000002 mg/kg 体重/日) と比較し、安全マージン 15,000~150,000 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Ⅲに分類され<sup>17)</sup>、ピリジン、ピロール及びキノリン誘導体に分類される食品成分である。なお腹腔内投与による試験のため参考ではあるが、本物質に関しては、ラット及びウサギに投与したところラット肝細胞質でのグルタチオン *S*-転移酵素を誘導した<sup>18) 25)</sup>がウサギではその傾向がみられなかったとの結果がある<sup>18)</sup>。また、ヒト由来 U-937 細胞を用いた試験では、NADPH-チトクローム *C* を用量依存的に活性化したとの結果が得られている<sup>11)</sup>。なお関連する物質としてピロール環を構造内に持つ薬物 (Ro5-3335) のラット、イヌ及びヒトの肝細胞質を用いた薬物代謝試験では、37°C、1 時間のインキュベーションによりピロール環の α-位が水酸化されたという結果が得られている<sup>19)</sup>。以上より本物質は、環の C2 位の水酸化と、それに伴う抱合を受けて、尿中に排泄されると考えられる<sup>14)</sup>。

## 7. JECFA における評価

本物質は、2004 年第 63 回 JECFA 会議で、ピリジン、ピロール及びキノリン

---

推定摂取量(µg/人/日)	(計算値) 0.013…	(計算値) 0.128…
---------------	--------------	--------------

注) 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。なお、年間使用量は 1995 年の調査に基づく。通常引用文献 2) の値を用いるが、米国の 1995 年の値が 0 と記載されているため、米国に関しては引用文献 14) の値を用いた。米国香料工業会によれば、この違いは提出先の数値の取り扱いによるものとされている (おおもとのデータはポンドで報告されており<sup>24)</sup>、値は 0.2 ポンド(0.09 kg)である)。

▼ 引用文献 16) ではこの値は 11,575 倍と算出されているが、これは 1982 年の米国での使用量(0.2 kg; おおもとの値は 0.4 ポンド(0.18kg)で報告されている<sup>26)</sup>)を計算に用いているためである。

誘導体の一つとして評価され、推定摂取量 (0.01~0.1 µg/人/日) が、構造クラス I の摂取許容値 (1,800 µg/人/日) を下回ることなどから、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<sup>14)</sup>。なお JECFA が本物質を構造クラス I とした理由については不明である。

#### 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」<sup>20)</sup>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 III に分類され、安全マージン (15,000~150,000) 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 (0.01~0.1 µg/人/日) が構造クラス III の摂取許容値 (90 µg/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 12.2 - The Netherlands : TNO Quality of Life (website accessed in Jan. 2011)(未公表)
- 2) RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc.)-FEMA (Flavor and Extract Manufacturers' Association) database, Material Information on Pyrrole (website accessed in Jan. 2011) (未公表)
- 3) Lee, H., Bian, S.S., and Chen Y.L. Genotoxicity of 1,3-dithiane and 1,4-dithiane in the CHO/SCE assay and the Salmonella/microsomal test. *Mutation Research*, **321**, 213-218.(1994)
- 4) Aeschbacher, H.U., Wolleb, U., Loliger, J., Spadone, J.C. and Liardon, R. Contribution of coffee aroma constituents to the mutagenicity of coffee, *Food. Chem. Toxicol.*, **27(4)**:227-232.(1989)
- 5) Ho, C.-H., Clark, B.R., Guerin, M.R., Barkenbus, B.D., Rao, T.K. and Epler, J.L. Analytical and biological analyses of test materials from the synthetic fuel technologies. IV. Studies of chemical structure-mutagenic activity relationships of aromatic nitrogen compounds relevant to synfuels. *Mutation Research*, **85**, 335-345.(1981)
- 6) Florin, I., Rutberg, L., Curvall, M. and Enzell, C.R. Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames' test. *Toxicology*, **18(3)**, 219-232.(1980)
- 7) Riebe M., Westphal K., and Fortnagel P. Mutagenicity testing, in bacterial test systems, of some constituents of tobacco.(1982) *Mutation Research*, **101**, 39-43
- 8) ピロールのチャーニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

- (2007) (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)
- 8-2) 最終報告書訂正書 (表題: ピロールのチャーニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験) (2009) (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
- 9) Kim, E.-H., Shinohara, K., Murakami, H., Omura, H. Pyrrole Compounds as Food Mutagens, *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **31** (3), 279-285 (1987)
- 10) Williams G.M., Mori H., Hirono I., and Nagao M. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids in the hepatocyte primary culture/DNA-repair test. (1980) *Mutation Research*, **79**, 1-5
- 11) Shinohara K., Kong Z.L., Miwa M., Tsushida T., Kurogi M., Kitamura Y., and Murakami H. Effect of Mutagens on the Viability and Some Enzymes of a Serum-free Cultured Human Histocytic Lymphoma Cell Line, U-937. (1990) *Agric. Biol. Chem.*, **54**(3), 373-380.
- 12) ピロールのマウスを用いる小核試験(2010) 株式会社DIMS医科学研究所 (厚生労働省委託試験)
- 12-2) ピロールのマウスを用いる小核試験の用量設定再試験(2010) 株式会社DIMS医科学研究所
- 13) ピロールのラットを用いる 90 日間反復経口投与毒性試験 (2007) (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)
- 13-2) 最終報告書訂正書 (表題: ピロールのラットを用いる 90 日間反復経口投与毒性試験) (2011) (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
- 14) 第 63 回 JECFA WHO Food Additives Series 54, (2006) Safety evaluation of certain food additives
- 参考: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v54je01.pdf>
- 15) 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
- 16) Stofberg J. and Grundschober F. Consumption ratio and food predominance of flavoring materials. (1987) *Perfumer & Flavorist*, **12**(4), 27-56.
- 17) ピロールの構造クラス (要請者作成資料)
- 18) Primiano T., Kim S.G., and Novak, R.F. Differences between rats and rabbits in hepatic cytosolic glutathione S-transferase expression in response to nitrogen heterocycle and other inducers. (1992) *Toxicology and Applied Pharmacology*, **113**, 64-73.
- 19) Town C., Chang D., Henderson L., and Garland W.A. Short Communication: Disposition of the Human Immunodeficiency Virus

Inhibitor, Ro-5335, in Rats and Dogs. (1992) *Drug Metabolism and Disposition*, **20**(6), 954-957.

- 20) 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
- 21) SIGMA-ALDRICH Certificate of Analysis(Product Name: ピロール,  $\geq 98\%$ , FCC、Product Number: W338605、Product Brand: ALDRICH、LOT: 09026LE)
- 22) 被験物質「ピロール」の確認結果
- 23) SIGMA-ALDRICH Certificate of Analysis(Product Name: ピロール,  $\geq 98\%$ , FCC、Product Number: W338605、Product Brand: ALDRICH、LOT: S44913) (website accessed in Jan. 2011)
- 24) Lucas CD, Putnam JM, and Hallagan JB. FLAVOR AND EXTRACT MANUFACTURERS' ASSOCIATION OF THE UNITED STATES 1995 POUNDAGE AND TECHNICAL EFFECTS UPDATE SURVEY. FEMA ; 1999, pp.3-9, 12-14, and 260.
- 25) York, J.L., Primiano, T., Gandy, J. and Novak, R.F. Glutathione S-transferase expression in rat hepatic cytosol following treatment with pyrrole. (1993) *The Toxicologist*, **13**, 330.
- 26) Committee on Food Additives Survey Data, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences(ed.) *1987 Poundage and Technical Effects Update of Substances Added to Food*, Washington, D.C., 1989; pp.5-9 and 505.



No.	項目	内容
(1)	名称	ピロール
	一般的名称	Pyrrole
	化学名	1H-Pyrrole
	CAS番号	109-97-7
(2)	JECFA等の国際的評価機関の結果	FEXPANにより評価され1973年のGRAS 6に公表された <sup>1)</sup> 。 本物質は、2004年のJECFA会議において、ピリジン類、ピロール類、キノリン類の一つとして、また、構造クラスはクラス I に分類され、クラス I の閾値以下であることなど、総合的に安全性に懸念がないと評価された <sup>2)</sup> 。
	JECFA番号	1314
(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	3386
	CoE番号	2318
	CFR21掲載	なし
	EUレジスター	FL No. 14.041
	使用量データ	0.1kg(米国、1995年) <sup>2)</sup> 、0.9kg(EU、1995年) <sup>3)</sup>
(4)	我が国での添加物としての必要性	本物質は食品に存在する成分であり、様々な加工食品において香りを再現し、風味を向上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	コーヒー、タマリンド、麦芽等の食品に天然に含まれ、牛肉、鶏肉、ばかがい等の加熱調理により生成する成分 <sup>4)</sup> である。
	米国での食品への使用例(平均添加率)	焼菓子 3ppm、肉製品 3ppm、冷凍乳製品類 3ppm、ゼラチン・プリン類 3ppm、朝食シリアル類 3ppm、ソフト・キャンデー類 3ppm <sup>3)</sup>
(5)	参考資料	1) Food Technology(1973) Vol.27. No.1, pp64-67. 2) WHO Food Additives Series 54.Safety Evaluation of Certain Food Additives(2006) (Report of 63rd JECFA meeting) <a href="http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v54je01.pdf">http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v54je01.pdf</a> 3) RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc.)-FEMA (Flavor and Extract Manufacturers' Association) database, Material Information on Pyrrole (website accessed in Jan. 2011)(未公表) 4) VCF Volatile Compounds in Food : database / Nijssen, L.M.; Ingen-Visscher, C.A. van; Donders, J.J.H. [eds]. - Version 12.2 - The Netherlands : TNO Quality of Life (website accessed in Jan. 2011)(未公表)