

資料 2 - 1

二炭酸ジメチル概要書

ランクセス株式会社

平成 30 年 1 月 10 日

目 次	
	頁
本要請の目的及び理由 ¹⁻⁸⁾	3
有用性：食品分野への利用 ^{2, 9-18)}	4
評価対象品目の概要.....	5
1. 名称及び用途 ¹⁹⁾	5
2. 起源又は発見の経緯.....	5
3. 殺菌料とする根拠 ^{20, 21)}	5
4. 諸外国における使用状況 ^{5, 6, 17, 21-30)}	6
5. 国際機関等における評価 ^{20, 31-35)}	7
6. 物理化学的性質 ³⁶⁻⁵²⁾	8
7. 有効性 ^{2, 9-16, 22, 31, 33, 34, 36, 53-65)}	25
8. 使用基準案 ^{4, 9-16, 20, 22-25, 27, 30, 32-35, 55, 66, 67)}	34
安全性に係わる知見.....	35
9. 体内動態試験 ^{31, 65, 68-81)}	35
10. 毒性試験 ^{31, 77, 82-164)}	40
・ 二炭酸ジメチル (DMDC) の毒性.....	41
・ 飲料における反応生成物 N-カルボメトキシ化合物 (N-CMC) の毒性.....	49
・ 飲料における反応生成物炭酸メチルエチル (MEC) の毒性.....	50
・ 飲料における加水分解生成物カルバミン酸メチル (MC) の毒性.....	51
・ DMDC の製造工程における副成物炭酸ジメチル (DMC) の毒性.....	58
・ 分解物メタノールの毒性.....	59
11. ヒトにおける知見 ^{34, 68, 146, 148, 163-166)}	66
12. 1日摂取量の推計等 ^{8, 31, 35, 63, 74, 167-168)}	67
13. まとめ ^{31, 35, 36, 64, 68, 69, 77, 82-164, 169, 170)}	70
参考資料一覧.....	73

本要請の目的及び理由¹⁻⁸⁾

清涼飲料水の製造には容器包装に充てんし、密栓若しくは密封した後殺菌するか、又は殺菌したもの、若しくはろ過器等で除菌したものを自動的に容器包装に充てんした後、密栓若しくは密封しなければならない。殺菌は加熱あるいは発育し得る微生物を死滅させるのに十分な効力を有する方法で行わなければならない。(厚生省, 1959¹⁾)

飲料の保存のためには、変質を防ぎ、色調・味覚への影響を及ぼさないよう微生物の増殖を抑制する保存料、加熱処理殺菌やろ過除菌が用いられるが、保存料は飲用時まで飲料中に長期間残存し、体内への摂取は避けられない。加熱処理では、揮発性、熱に不安定な成分を含む飲料では、品質・味覚を保つために技術的に高度な管理、特定の温度保存、慎重な賞味期限の設定が必要となる。また、ろ過除菌を適用できる飲料種は限られる。飲料を加熱することなく、添加後は容易に分解して天然成分と差のない濃度で細菌の不活化が持続する添加物の有用性は高いと考えられる。

今回、指定を要請する二炭酸ジメチル(以下「DMDC」)は無色の液体でワイン並びに清涼飲料水に添加して細菌繁殖を抑え、不活化させる新規の殺菌料である(Bayer, 1988²⁾)。DMDCは飲料を容器に充てんする前に添加して細菌内の主要酵素を阻害し、静菌ないし殺菌作用を発現する。添加(注入)後は数時間(10℃で5時間, 21℃で2時間)で二酸化炭素とメタノールに加水分解される。分解生成されるメタノールは市販の天然果汁に含まれる範囲内(Lanxess, 2008³⁾)で味覚に影響を及ぼすことなく、出荷時点では、DMDCは飲料中には検出されない。

DMDCは適正製造規範(Good Manufacturing Practice: GMP)に遵守した一定の高い品質が保たれるよう専用の自動注入装置(DT Touch)(Lanxess, 2009⁴⁾)で適量添加され、その操作・管理は簡便である。

DMDCは、1988年にアメリカ食品医薬品局(Food and Drug Administration: FDA)により、ワイン(ぶどう酒)(以下「ワイン」とする)の酵母菌の不活化の用途で許可された。その後、各種飲料(ワイン、茶系飲料、スポーツ飲料、果汁飲料)への許可が拡大され、海外98カ国で使用されている。注目すべき点は、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関が、上記に説明されたDMDCの特性が保存料としての規定に合わないことを認め、2011年にDMDCを加工助剤として分類し直すことを決定したことである

(New Zealand Gazette, 2011⁵⁾; Food Standards Australia New Zealand, 2011⁶⁾)。DMDCは酵母菌、糸状菌類、細菌と広範囲な抗菌スペクトルを示すのみならず、耐熱性の糸状菌にも効果を示し、耐性菌も産生しない²⁾。

我が国における果実酒(ぶどう酒の他にフルーツワインやシードルを含む)の消費/生産量は、2005年から2015年までの間に、国産果実酒(輸入原料を使用したものを含む)は99,000 kLから113,000 kLと14%増加した。輸入果実酒は158,000 kLから266,000 kLと68%増加し、成長が期待される飲料である。(日本ワイナリー協会, 2016⁷⁾)

清涼飲料水の消費/生産量は、2010年から2015年までの間に18,667,700 kLから20,466,400 kLと9.6%の増加がみられた。2015年度の内訳は炭酸飲料3,729,200 kL (対2010年度8.1%増 (以下同様))、果汁飲料1,808,300 kL (18.4%)、トマトを含む野菜飲料533,100 kL (5.3%)、スポーツ飲料1,472,700 kL (-19.7%)、コーヒー飲料2,978,200 kL (3.5%)、茶系飲料5,736,200 kL (7.1%)、その他 (ミネラルウォーター、豆乳、乳、他の清涼飲料) 4,208,700 kL (35.1%)であった。特に、果汁及び野菜系飲料は年間2,341,400 kLで清涼飲料シェア11.4%を占め、1人あたりの年間消費量は18.4 Lで、欠かせない嗜好 (しこう) ・健康飲料となっている。(社団法人全国清涼飲料工業会, 2016⁸⁾)

以上、今後拡大が見込まれるワイン、その他の果実酒、清涼飲料水における細菌の不活化を目的とした食品添加物DMDCの意義は高いと考えられる。

有用性：食品分野への利用^{2, 9~18)}

本品目の食品分野への利用におけるメリット並びに現状の微生物管理をさらに改善する点を以下にまとめる。

1. DMDCは、イミダゾール、アミン、チオール等の求核基と常温で反応し、たん白を介する微生物の酵素反応を阻害して代謝および細胞分裂を妨げることにより殺菌効果を発揮する。充填時に即時殺菌に至らなかった微生物細胞に対する作用は静菌作用に似ているが、微生物細胞は数時間以内に死滅する。その幅広い抗菌スペクトルゆえにマイコトキシンの産生を防ぎ、耐熱性の糸状菌に対する効果が期待できる²⁾。
2. 欧米における25年間以上の使用経験でDMDCによる耐性菌検出の報告はない。
3. DMDCは、飲料中で数時間以内に二酸化炭素とメタノールに完全に加水分解するため、保存料と異なり飲料中に残存しない。分解物であるメタノール濃度は、天然果汁に含まれる濃度と同等あるいはそれ以下であり、安全性は高い。
4. 果汁含量、炭酸含量、糖分含量に関係なく幅広い種類の飲料に使用できる。(Bayer, 1998^{9~13)}; Bayer Chemicals, 2003^{14~16)}; Codex GSFA, 2017¹⁷⁾)
5. 加熱殺菌や保存料と比較して飲料の風味に影響を与えない。(Fresenius, 2005¹⁸⁾)

以上より、世界98カ国で使用され、その有効性、ヒトにおける安全性は確認されていることから、DMDCの飲料への適用は、従来の保存料、加熱処理を代替し、風味などへの影響も少なく、利便性、有用性の高い殺菌料と考えられる。

評価対象品目の概要

1. 名称及び用途¹⁹⁾

(1) 名称

二炭酸ジメチル (英名) Dimethyl dicarbonate

CAS 番号 : 4525-33-1

INS 番号 : 242

(2) 用途

殺菌料 (Lanxess, 2014¹⁹⁾)

2. 起源又は発見の経緯

果汁を含む飲料の微生物の増殖を抑制し、変質、腐敗を防ぎ保存効果を高めるために、安息香酸ナトリウム等の保存料の添加、加熱殺菌、ろ過による除菌等の処理が行われるが、保存料は品質、味覚への影響が懸念され、加熱では殺菌のための装置・施設は比較的高価で、高度な品質管理とともに大きな設備投資とエネルギーコストを要する。新しい殺菌・除菌方法として、常温における簡便な操作と品質管理で、味覚への影響がない添加物が求められる。

ワイン、清涼飲料水等の飲料は密封された環境で保存され、開封後は比較的短時間で消費される特性がある。そのため殺菌料を添加後、短時間で強力な殺菌効果を発現し、その後は速やかに分解し、天然の飲料に含まれる成分に変化する物質を探索した。その結果、1978年にバイエル社(現:ランクセス社)はDMDCの細菌への強力な不活化作用並びに飲料中における速やかな加水分解性を見だし、1979年ドイツで殺菌のための加工助剤として市販した。その後、各種飲料における効力並びに安全性試験を実施して、有効性、優位性、安全性が確認された。

3. 殺菌料とする根拠^{20, 21)}

EU諸国には、食品添加物として殺菌料の分類がないが、日本においては、食品添加物の中に殺菌料の分類が設けられている。DMDC自体は、本来、殺菌の機能を持つものであるが、EU諸国には殺菌料の分類がないため、やむを得ず保存料として分類されている。保存料は、食品の腐敗や変質の原因となる微生物の増殖を抑制し、腐敗、変質を防ぐ静菌

作用により、食品中に留まって食品の保存性を高める添加物で、微生物を死滅させることを目的とした殺菌料とは異なる。

他方、殺菌料は、食品中の腐敗細菌などの微生物を死滅させることを目的に食品に添加されるものであるから、微生物の死滅によりその役割は完了する。DMDCは、微生物を死滅させた後、最終食品の完成前に分解し残存しないから、まさに殺菌料に該当するものであり、食品中に存在し続けることにより食品の腐敗や変質を防止する保存料とは異なるものである。

国際基準である Codex 収載に伴う国連の食糧農業機関 (FAO) および世界保健機関 (WHO) の合同食品添加物専門家会議 (JECFA) の評価では、1990 年に「Miscellaneous food additives」(その他の食品添加物) と分類され、「a cold sterilizing agent」(冷殺菌料) であることが JECFA に認められた。2013 年には、FAO・WHO 発行の FA/45 INF/03 において、DMDC は加工助剤の一つとしてリストに記載され、加工助剤中の一カテゴリーである「Micro-organism control agents」(微生物制御剤) に分類されている。さらに、その JECFA コメント欄において、「a cold sterilizing agent」(冷殺菌料) としての使用が認められている旨が明示されている。(JECFA, 1990²⁰⁾; CCFA, 2013²¹⁾)

4. 諸外国における使用状況^{5, 6, 17, 21~30)}

DMDC はワイン、果実酒、コーヒーマシ、茶、シードル、蜂蜜酒、ノンアルコールワイン、果汁・果汁飲料の細菌の不活化のための食品添加物又は加工助剤として、各国で広く用いられている。

コーデックス委員会 (Codex Alimentarius Commission: CAC) では、2009 年に DMDC は細菌の不活化を目的とした加工助剤とされ、2013 年に再確認されている²¹⁾。また、コーデックス食品添加物部会 (Codex Committee on Food Additives: CCFA) が作成する添加物の使用基準 (食品添加物に関するコーデックス一般規格 (Codex General Standard for Food Additives: GSFA)) に表 1 のとおり、規格が設定されており、各国は、この使用基準を参考にしている。¹⁷⁾

米国 FDA では、食品添加物として、1988 年にワインの酵母菌の不活化のために許可された (Federal Register, 1988²²⁾)。その後、各種飲料 (1993 年に低アルコールワイン²³⁾、1994 年に茶系飲料²⁴⁾、1996 年にソフトドリンク、果汁飲料) 用に許可が拡大された²⁵⁾。2000 年に果汁 100% ジュース、2005 年にフレーバードウォーターへの使用が食品接触物質 (food-contact substance: FCS) として許可された^{26, 27)}。2001 年には最終規則で使用目的が「Microbial control agent」(微生物制御剤) に変更された²⁸⁾。(米国の連邦規則集 (Code of Federal Regulations: CFR²⁹⁾)

DMDC は、1980 年代にドイツで、ワイン及びノンアルコール着香飲料用に初めて導入された。1995 年には、食料添加物法律制定の統一によって、DMDC は欧州連合諸国でノンアルコール着香飲料、アイスティー及びノンアルコールワイン用に認められた (European Commission, 1995³⁰⁾)。2006 年に DMDC はワイン用に認められ、2010 年にはワイン混合飲料 (wine mix beverages) , そして 2012 年に他のアルコール混合飲料 (alcoholic mix beverages) にも使用が認められた。

豪州、ニュージーランドでは、オーストラリア・ニュージーランド食品局 (Australia New Zealand Food Authority: ANZFA) 1996 年に DMDC と DMDC の分解生成物の安全性評価が行われ、他国と統一するため、冷殺菌料として分類され、ノンアルコールの炭酸入り飲料とノンアルコールの非炭酸飲料への使用を認められた。2004 年にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (Food Standards Australia New Zealand: FSANZ) がワインへの使用を認め、2011 年に保存料から加工助剤に分類し直した。^{5,6)}

表 1 : GSFA における DMDC の規格

Number	Food category	Max. level
14.1.4	Water-based flavor drinks, including “sport” “energy” , or “electrolyte” drinks and particulated drinks	250 mg/kg
14.1.5	Coffee, coffee substitute, tea, herbal infusions, and other hot cereal and grain beverages, excluding cocoa	250 mg/kg
14.2.2	Cider and perry	250 mg/kg
14.2.3	Grape wines	200 mg/kg
14.2.4	Wines (other than grape)	250 mg/kg
14.2.5	Mead	200 mg/kg

5. 国際機関等における評価^{20, 31-35)}

(1) FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA)

FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) では、1990 年に DMDC の一日許容摂取量 (Acceptable Daily Intake: ADI) について「現在の使用を認める (Acceptable) 」²⁰⁾とされ、37 回会議の毒性評価報告書 (JECFA, 1991³¹⁾) が 1991 年に公開されている。

(2) 欧州食品安全機関 (EFSA)

1992 年、1997 年および 2001 年に欧州共同体食品科学委員会 (Scientific Committee for Food: SCF; 1997 年以降 Scientific Committee on Food, 2003 年以降 EFSA に属している) が既に DMDC を評価していたところ、更に 2015 年に、欧州委員会 (European Commission: EC) の要請に基づいて欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority: EFSA) の食品添加物及び食品に添加される栄養源に関する科学パネル (Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food: ANS) が DMDC の再評価を実施したが、結果的に ADI の設定にまでは至らなかった。この再評価においては、DMDC の分解生成物であるメタノールおよびいくつかの反応生成物についても安全性の再検討が行われたが、結論として、現在認可さ

れている使用量，使用条件における DMDC の安全性に関する懸念は一切指摘されなかった (SCF, 1990³²⁾, 1990³³⁾, 2001³⁴⁾; EFSA, 2015³⁵⁾)。

EFSA 再評価結果 2015 (Scientific opinion on the re-evaluation of DMDC³⁵⁾ の和訳)

結論 (conclusions) :

- 現行の毒性データベースから ADI を設定することはできなかった。
- 現在報告されている用途，使用量において，食品添加物としての DMDC(E242)の使用に関して安全性に関する懸念は示されていない。
- 使用条件を変更する場合は，新たな評価を実施する必要がある。

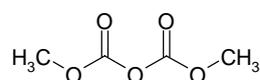
提案 (recommendations) :

- 食品添加物としての DMDC(E242)が食品における有意な毒性成分が含まれないよう，DMDC(E242)の不純物に関する EC 規格の毒性成分 (鉛，水銀，砒素) について上限値を見直すべきである。
- リスクを避けるために，DMDC とその使用が認められている飲料 (例えば，赤ワイン，茶，サイダーおよびペリー酒) の成分および同じ飲料で併用される可能性のある食品添加物との相互作用から生じる反応生成物の性状と量について，更なる情報を作成する必要がある。
- このようなデータが不足の場合，また反応物質の生成を制限するために，他の食品添加物は DMDC が完全に分解した後に添加するべきである。

6. 物理化学的性質³⁶⁻⁵²⁾

1 構造式等

(1) 構造式 (Lanxess, 2011³⁶⁾; JECFA, 1990³⁷⁾)



(2) 分子式及び分子量^{36, 37)}

分子式 : C₄H₆O₅

分子量 : 134.09

2 製造方法

(1) 原材料規格

二炭酸ジメチル (DMDC) の製造には以下の原料を用いる。

- ・クロロギ酸メチル (CAS 番号 : 79-22-1)

- ・水酸化ナトリウム水溶液（水酸化ナトリウムの CAS 番号：1310-73-2）
- ・トルエン（CAS 番号：108-88-3）

原材料の規格を表 2～4 に示す。

表 2：クロロギ酸メチルの規格

性状/分析法	規格/単位
分子量	95.5 g/mol
分子式	C ₂ H ₃ ClO ₂
性状	無色澄明な液体
屈折率	1.3855~1.3875
含量/ガスクロ分析	99.0%以上
塩化メチル/ガスクロ分析	0.1%以下
ホスゲン/滴定	0.2%以下
塩酸/滴定	0.1%以下
炭酸塩/ガスクロ分析	0.3%以下

表 3：水酸化ナトリウム水溶液の規格

性状/分析法	規格/単位
分子量	40.0 g/mol
分子式	NaOH
性状	無色液体
含量	31~33%
塩化物	50 mg/kg 以下
硫酸塩	20 mg/kg 以下
炭酸塩	160 mg/kg 以下
塩素酸塩	10 mg/kg 以下
シリカ（二酸化ケイ素として）	7 mg/kg 以下
鉄（Fe ²⁺ 又はFe ³⁺ として）	3 mg/kg 以下
アルミニウム	1 mg/kg 以下
アルカリ土類（Ca ²⁺ として）	3 mg/kg 以下

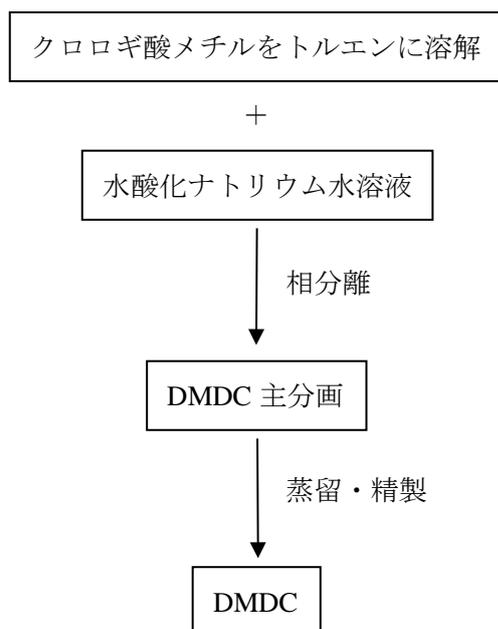
表 4：トルエンの規格

性状/分析法	規格/単位
分子量	92.1 g/mol
分子式	C ₇ H ₈
性状	無色澄明な液体
含量/ガスクロ分析	99.9%以上
屈折率	1.4963-1.4990
密度(Density)	0.865-0.869

(2) 製造方法

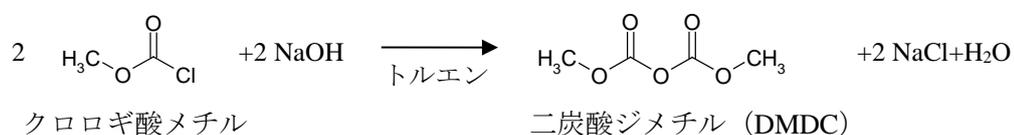
クロロギ酸メチルをトルエンに溶解した後、水酸化ナトリウム水溶液を加えて、DMDC を生成した後、相分離を行い、蒸留精製する。

図 1：製造方法



縮合反応では、個々の成分の流量、pH と温度管理を正確に調整する。規格に沿った純度は最終蒸留で得られる。温度、圧、流量の管理を蒸留時にも行う。

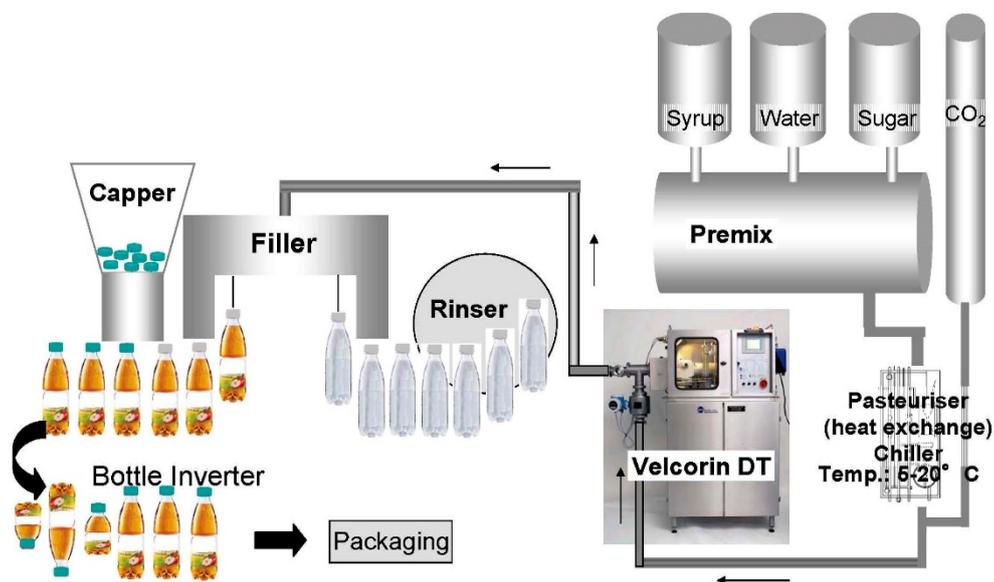
(3) DMDC の化学反応



3 使用方法

DMDC の使用は各種飲料の充てん工程中に専用の自動注入装置⁴⁾を設置して、所定の添加量を飲料中に添加する (図 2 参照)。GMP 基準適合工場の適切に管理された環境下で行ない、充てん後 8 時間経過することにより製品は完成する。

図 2 : DMDC 使用時の飲料充填工程模式図



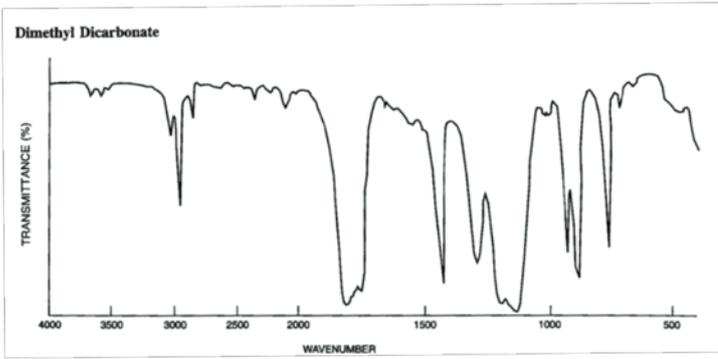
注 : Velcorin DT : DMDC 専用自動注入装置

4 成分規格

(1) 成分規格案 ³⁶⁻⁴⁰⁾

表 5 : 成分規格案

項目	成分規格案	参照規格
① 名称	二炭酸ジメチル	36, 37
② 英名	Dimethyl dicarbonate	36, 37
③ 英名別名	DMDC	36, 37
日本名別名	ジメチルジカーボネート	36, 37
④ 構造式 又は示性式	$\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_3$	36, 37
⑤ 分子式 又は組成	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$	36, 37

式		
分子量 又は式量	134.09	36, 37
⑥ 化学名	methoxycarbonyl methyl carbonate メトキシカルボニルメチルカルボナート	36, 37
⑦ CAS 登録 番号	4525-33-1	36, 37
⑧ 定義	—	
⑨ 含量	本品は、99.8%以上を含む。	36, 37
⑩ 性状	本品は、無色の液体である。	36, 37
⑪ 確認試験	<p>本品を赤外吸収スペクトル測定法中の液膜法により測定し、本品の参照スペクトルと比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収を認める。</p>  <p style="text-align: center;">参照スペクトル</p>	36, 37
⑫ 比旋光度 及び pH 値	—	
⑬ 純度試験	<p>(1) 炭酸ジメチル (DMC) 0.2%以下 <u>DMC の定量法：ガスクロマトグラフィー (GC) 法³⁸⁾</u></p> <p>1) 試薬 溶媒：t-ブチルメチルエーテル (C₅H₁₂O) ; >99.5% 内部標準：ジエチルケトン (C₅H₁₀O) ; >99% 炭酸ジメチル (DMC) , (C₃H₆O₃) ; ≥98.5%</p> <p>2) 機器・器具 ガスクロマトグラフ, サンプラー (手動), 検出器 (FID : 水素炎イオン化型), 積分器 (integrator), メスフラスコ</p>	36 ~ 39 ¹⁾

¹⁾ (Bayer, 2003³⁸⁾; Food Chemical Codex, 2016³⁹⁾)

	<p>(50 mL) , バイアル瓶 (公称 10 mL) , ピペット (5 mL) , マイクロ注射器 (10 μL) , 融解シリカ針を用いる。</p> <p>3) 操作法</p> <p>DMC 並びにその他の不純物を測定するために測定範囲は 1kg 当たり約 20~3,000 mg DMC であり, 検出限界は 1kg 当たり約 20 mg DMC である。試料は CP-Sil 5 CB 融解シリカキャピラリーに注入する。定量は内部標準を用いて求める。ガス保持時間の較正及び補正率を求めるために, ジエチルケトン (W00 mg) 250 mg 及び DMC (W01 mg) 40 mg を正確にひょう量 (0.1 mg の桁まで) し, 50 mL フラスコに入れ, t-ブチルメチルエーテルで満たし, かくはんする (母液 R00)。ピペットで母液 5 mL を 50 mL フラスコに入れ, t-ブチルメチルエーテルで満たし, かくはんする (較正液 R01)。較正液 R01 の 0.5 μL をガスクロマトグラフに注入し, 下記 5) の操作条件でクロマトグラフィーを操作する。ジエチルケトン (F00) 及び DMC (F01) のピーク面積及び保持時間を測定する。</p> <p>試料を 10,000 mg から 12,000 mg (W mg) を正確にひょう量 (0.1 mg の桁まで) してバイアル瓶に入れ, ジエチルケトン 約 6~8 mg (0.1 mg の桁まで) を正確に追加 (ジエチルケトン 6~8 mg は約 10 μL に相当) , 混和する (R 液)。R 液 0.5 μL をガスクロマトグラフに注入して保持時間を確認した後, DMC (F1) 及びジエチルケトン (F0) のピーク面積を測定する。</p> <p>4) DMC 含量の算出</p> <ul style="list-style-type: none"> 炭酸ジメチル (DMC) の補正率 f の算出 $f(\text{DMC}) = \frac{W01 * F00}{F01 * W00}$ <ul style="list-style-type: none"> DMC の含量算出 (mg/kg) $w(\text{DMC}) = \frac{F1 * f * W0 * 100 * 10,000}{F0 * W}$ $= \frac{F1 * f * W0 * 1,000,000}{F0 * W} \text{ mg/kg}$ <p>W: 試料重量(mg)</p>	
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

W00: 母液 R00 中のジエチルケトンの重量(mg)
 W01: 母液 R00 中の DMC の重量(mg)
 F00: 較正液 R01 液中のジエチルケトンのピーク面積
 F01: 較正液 R01 液中の DMC のピーク面積
 F0: R 液中のジエチルケトンのピーク面積
 F1: R 液中の DMC のピーク面積
 W0: R 液中のジエチルケトンの重量(mg)
 10,000 重量%から mg/kg への変換ファクター
 100 重量%への変換ファクター

5) 操作条件

検出器 :

カラム : 融解シリカキャピラリー (CP-Sil 5 CB, Agilent
 Technologies), 内径 0.53 mm, 長さ 60 m, 膜厚 1.5 μ m

注入量 : 0.5 μ L

カラム温度 キャピラリー 45 $^{\circ}$ C (7.5 分) \rightarrow (10 $^{\circ}$ C/分) \rightarrow
 75 $^{\circ}$ C \rightarrow (25 $^{\circ}$ C/分) \rightarrow 125 $^{\circ}$ C (2 分) \rightarrow (30 $^{\circ}$ C/分) \rightarrow
 260 $^{\circ}$ C (4.5 分)

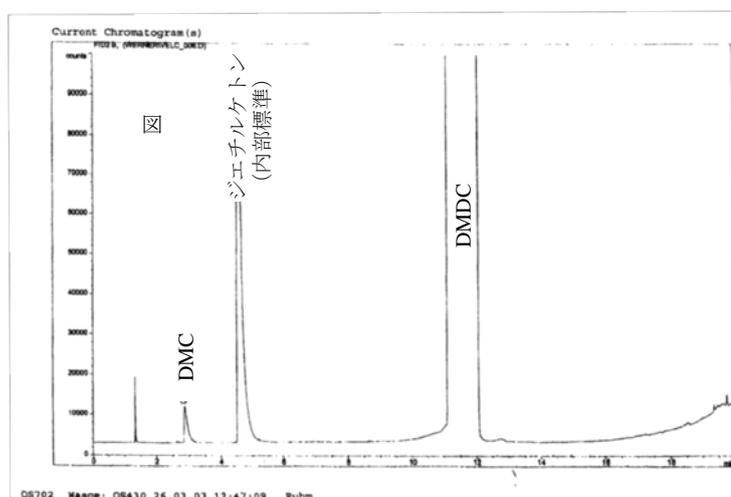
注入口温度

検出器温度 300 $^{\circ}$ C

キャリアガス : ヘリウム

流量 : 17 mL /分

注入方式 :



DMC の参照クロマトグラム

	<p>(2) 鉛 Pb として 1 µg/g 以下</p> <p>1) 機器 黒鉛炉原子吸光分析装置（波長：283.3 nm） オートサンプラー，パイロ化グラファイトチューブ，熱分解した固体黒鉛チャンバー，ガラス器具</p> <p>2) 標準液 鉛の標準液は 5%硝酸液で調製する。原液は 1,000～10,000 µg/mL とし，中間濃度の 10 µg/mL を 5%硝酸液で週に 1 回調製する。希釈標準液は測定日に 10 µg/mL 液を 1:10 に希釈して用いる。 較正用標準液は 100.0 ng/mL，50.0 ng/mL，25.0 ng/mL，10.0 ng/mL の濃度に原液から希釈して調製する。 標準液は酸で洗浄したポリエチレンチューブ又は瓶に入れる。</p> <p>3) 試料の分解 試料 1.5 g をプラスチックチューブ，石英チューブ又はフラスコに量り，65%硝酸 0.75 mL を加え，試料液とする。試料液を，水槽又は加熱ブロックに入れてマグネチックスターラーでかくはんしながら 90～95℃までゆっくり沸騰しないよう加熱する。試料液の減量を避けるために，プラスチック管，石英管の場合は蓋をし，フラスコの場合にはビグローカラム等を取り付ける。95℃で 30 分間加熱する。冷後，過酸化水素 0.85mL を滴加し，かくはんしながら 95℃まで加熱する。冷後，上記と同様の手順で過酸化水素を加えて加熱処理を冷却段階まで行う。 冷後，試料液をメスフラスコに移し入れ，蒸留水を加えて 10 mL とし，検液とする。</p> <p>4) 操作法 炉作業は以下の手順で行う。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 アルゴンガス流（300 mL/分）雰囲気下，200℃で加熱乾燥する。（20 秒昇温，30 秒加熱） 2 空気流（300 mL/分）雰囲気下，750℃で灰化する。（40 秒昇温，40 秒加熱） 3 温度を 20℃に設定し，アルゴンガス流（300 mL/分）雰囲気下，1 分間冷却、排気するする。 	36 ~ 39
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

	<p>4 アルゴンガスを止めて原子化は 1800℃で行う。(0 秒昇温, 10 秒加熱)</p> <p>5 2600℃で洗浄する。(1 秒昇温, 7 秒加熱)</p> <p>6 アルゴンガス流 (300 mL/分) 雰囲気下, 炉は必要に応じて 20℃に冷却する。(1 秒昇温, 5 秒加熱)</p> <p>オートサンプラーで 20 μL のブランク, 校正用標準液, 検液及び 5 μL の modifier working solution (硝酸マグネシウム 6 水和物 20 g を 100 mL に溶解した原液を用時に 1:10 に希釈したもの, 5 μL に硝酸マグネシウムを 0.06 mg 含有する) を黒鉛炉原子吸光分析装置に注入する。これを 3 回繰り返し, 平均値を求める。定量には極大値を用いる。炉を 5%硝酸液で洗浄して, 校正用標準液 25 ng/mL で測定器の感度を調べる。</p> <p>感度は以下の式から鉛の質量として求める。</p> $\text{質量(mo)} = (0.0044 \text{ abs-sec})(25 \text{ pg/mL})(20 \text{ mL}) / (25 \text{ pg/mL abs-sec 測定値})$ <p>5) 標準曲線 (検量線)</p> <p>校正用標準液を 3 回注入して機器の線形性を調べる。機器の検出限界(DL)並びに定量限界(QL)は pg 単位で 7~10 回測定して以下の式から求める。</p> $DL = (3) (\text{s.d. ブランク abs-sec})(10 \text{ pg/mL})(20\text{mL}) / (\text{abs-sec } 10 \text{ ng/mL std})$ $QL = (10) (\text{s.d. ブランク abs-sec})(10 \text{ pg/mL})(20 \text{ mL}) / (\text{abs-sec } 10 \text{ ng/mL std})$ <p>6) 試料の測定</p> <p>試料を 3 回注入して統合吸光度を求める。測定値が標準曲線の線形範囲を超える場合には, 5%硝酸液で希釈して範囲内とする。この場合, 希釈倍率 (DF) を記録する。すべての試料はブランクの吸光度で補正する。</p> <p>7) 鉛 (Pb) 含量の算出</p> <p>以下の式に従い算出する。</p> $Pb \text{ (ng/g)} = (\text{ブランク補正 Pb ng/mL})(DF)[\text{試料容量}(10 \text{ mL})] / [\text{試料重量}(\text{約 } 1.5 \text{ g})]^2$	
--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

⑭ 乾燥減量	—	
⑮ 強熱残分	—	
⑯ 微生物限度	—	
⑰ 定量法	<p>滴定法</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 アセトン 40 mL を 100 mL ビーカーに入れる。 2 検体 0.5～0.7 g を注射器に入れ、約 0.1 mg の精度でひょう量して、上記のビーカーに入れる。 3 ジブチルアミン液をかくはんしながら、ピペットで正確に 10 mL を採取する。塩酸滴定液を用いて電位差で滴定をする。消費量 V mL を求める。 4 空試験にはアセトン 40 mL を 100 mL ビーカーに入れて、上記 3 に従い滴定を行う。消費量 V0 mL を求める。 5 DMDC 含量の算出 $w(\text{DMDC}) = \frac{(V_0 - V) * t * 134.1 * 100 * 1}{W * 1000} \%$ $= \frac{(V_0 - V) * t * 13.41}{W} \%$ <p>t : 塩酸滴定液のタイター V : 試料 mL に対する塩酸滴定液の消費量 V0 : 空試験における塩酸滴定液の消費量 w : 試料中の DMDC 含有量 (%) W : 試料重量 (g) 1 : 塩酸滴定液の設定モル濃度 (mol/L) 100 : w に対するファクター 134.1 : DMDC のモル質量 (g/mol) 1000 : L から mL への変換ファクター</p>	40 ²
⑱ 保存基準	遮光した密閉容器に入れ、20-30℃で保管する。	

(2) 既存の規格との対照表 ^{37, 41, 42)}² (Lanxess, 1995 ⁴⁰⁾)

表 6 : 成分規格 (案) と JECFA, EU, FCC の対比

試験項目	成分規格 (案)	FAO/WHO 合同食品 添加物専門家会議 (37 th JECFA, 1990 ³⁷⁾)	欧州委員会 (Commission Regulation (EU) 231/2012 ⁴¹⁾)	米国食品化学物質 規格集 (Food Chemical Codex, 2004 ⁴²⁾)
含量	99.8%以上	同左	同左	99.8~101.5%
性状	無色の液体	無色の液体	無色の液体	無色澄明な液体
確認試験	本品を赤外吸収スペクトル測定法中の液膜法により測定し、本品の参照スペクトルと比較するとき、同一波長のところに同様の強度の吸収を認める。	水で分解して溶ける。トルエンとは混和する。参照吸収スペクトルが一致すること。	希釈後二酸化炭素とメタノール陽性を示し、融点は17℃、沸点は172℃で分解、20℃における密度は約1.25 g/cm ³ 、赤外吸収で1156及び1832 cm ⁻¹ に極大を認める。	塩化ナトリウムの2枚のプレート間に試料を満たして参照赤外吸収スペクトルと比較して同一条件下で同一の波長に極大を示す。
純度試験				
炭酸ジメチル	0.2%以下	同左	同左	同左
鉛	1 µg/g 以下	2 mg/kg 以下	2 mg/kg 以下	1 mg/kg 以下
ヒ素	-	-	3 mg/kg 以下	-
水銀	-	-	1 mg/kg 以下	-
定量法				
二炭酸ジメチル (DMDC)	滴定法	滴定法	—	滴定法

— : 設定なし (全量 100%より不純物含量を差し引くため)

(3) 成分規格案の設定根拠³⁷⁻⁴⁵⁾

成分規格案は欧州 Commission Regulation (EU) 231/2012⁴¹⁾, Commission Regulation (EU) 1129/2011⁴³⁾ (以下, EU) の規格 (以下「EU 規格」), JECFA (JECFA, 1990³⁷⁾ の規格 (以下「JECFA 規格」), 米国食品化学物質規格集 (Food Chemicals Codex: FCC) (FCC, 2004⁴²⁾, 2011⁴⁴⁾, 2016³⁹⁾ (以下, FCC) を参考に設定した。

化学式, 分子量

化学式は EU 規格, JECFA 規格及び FCC のいずれも C₄H₆O₅, 分子量は EU 規格, FCC では, 134.09, JECFA 規格は 139.09, としていることから, 本規格案でも, 同様に化学式は C₄H₆O₅, 分子量は EU 規格, FCC に合わせて 134.09 を採用した。

CAS 登録番号

CAS 登録番号は EU 規格に記載はなく, JECFA 規格では 004-525-33-1, FCC で

は 4525-33-1 と違いがみられるが、正式な CAS 登録番号は 4525-33-1 であることから、本規格案では、4525-33-1 を採用した。

含量

含量は EU 規格では「99.8%以上」、JECFA 規格では、「99.8%以上」、FCC では「99.8%以上、101.5%以下」としていることから本規格案では、EU 規格、JECFA 規格に合わせて「99.8%以上」を採用した。

性状

性状は EU 規格、JECFA 規格では「無色の液体」、FCC では「無色澄明な液体」としていることから、本規格案では、EU 規格、JECFA 規格に合わせて「無色の液体」を採用した。

確認試験

確認試験は EU 規格では「希釈後二酸化炭素とメタノール陽性を示し、融点は 17°C、沸点は 172°C で分解、20°C における濃度は約 1.25 g/cm³、赤外吸収で 1156 及び 1832 cm⁻¹ に極大を認める。」、JECFA 規格では「水で分解して溶ける。トルエンとは混和する。参照赤外吸収スペクトルと一致すること。」、FCC では「塩化ナトリウムの 2 枚のプレート間で参照赤外吸収スペクトルと同一条件下で同一波長に極大を示す。」としていることから、本規格案は「本品を赤外吸収スペクトル測定法中の液膜法により測定し、本品の参照スペクトルと比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収を認める。」を採用した。

純度試験

1) 炭酸ジメチル (DMC)

EU 規格、JECFA 規格、FCC は、共に 0.2% 以下であることから本規格案では、「0.2% 以下」を採用した。炭酸ジメチル (DMC) の量はガスクロマトグラフィー (GC) で求める。

2) 塩素

EU 規格では、3 mg/kg 以下と設定されているが、混在物ではなく、JECFA 規格、FCC では、設定されていないことから本規格案では設定しない。

3) 鉛

EU 規格では、2 mg/kg 以下、JECFA 規格では、原子吸光分析法により 2 mg/kg 以下、FCC では、1 mg/kg 以下と設定されていることから、本規格案では、FCC にあわせて「1 µg/g 以下」を採用した。

4) ヒ素

EU 規格では、3 mg/kg 以下と設定されているが、混在物ではなく、JECFA 規格、FCC では、設定されていないことから本規格案では設定しない。

5) 水銀

EU 規格では、1 mg/kg 以下と設定されているが、混在物ではなく、JECFA 規格、FCC でも設定されていないことから本規格案では設定しない。

定量法

JECFA 規格、FCC では、滴定法を設定しているが、EU 規格では、全量 100% から不純物含量を差し引いて求めるため定量法は設定されていない。JECFA 規格及び FCC に倣い滴定法を本規格案に採用した。

なお、試料の採取量は JECFA 規格、FCC より減量し、それに合わせて試薬も減量した。

(4) 試験法の検証データ及び試験成績

表 7：成分規格案と各バッチの成分分析成績⁴⁵⁾

特性	本規格案	バッチ番号				
		CHEV 1501	CHEV 1502	CHEV 1503	CHEV 1504	VHEV 2705
性状	無色の液体	適合	適合	適合	適合	適合
DMDC 含量	99.8 % 以上	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
DMC 含量	0.2 % 以下	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
鉛含量	1 µg/g 以下	0.05 µg/g 未満				

以上より、各バッチにおける添加物の品質は規格（案）に準拠している。

5 食品添加物の安定性⁴⁶⁾

DMDC は水溶液中で不安定なため、出荷時容器に密封した状態で高温は避けて 20~30℃ で 1 年間は安定である⁴⁶⁾。

6 食品中の添加物の分析法^{38, 47-52)}

DMDC は、水溶液中では二酸化炭素とメタノールに速やかに分解され残存しないため、副成物である炭酸ジメチル（DMC）の含有量³⁸⁾を測定し、その結果から DMDC の純度を算出する。飲料（アルコール飲料を含む）中の DMDC の分析法と分解により生成したメタノールの分析法を以下に示す。なお、分解物メタノールの量⁴⁷⁾からも DMDC の測定精度を確認することが可能で、この測定方法についてバリデーション^{48, 49)}を行い、良好な結果が得られている。

DMDC 0.05～40 mg/L の濃度範囲の飲料における分析方法

DMDC は水溶液中では不安定で、添加後は速やかに二酸化炭素とメタノールに分解される。信頼における GMP 製造管理下では、飲料が消費者に届いた時点で DMDC は検出されないが、GC/MS による DMDC 0.05～40 mg/L の濃度範囲の測定は Labor Dr. Haase-Aschoff による標準操作法 (SOP 0012E) ⁵⁰⁾による。また、原液と比べて微量測定への最適化を行う。

1) 測定法の概略

ガスを抜いた飲料から内部標準マロン酸ジメチルを加えた有機溶媒で DMDC を抽出、濃縮して相分離後、有機相を直ちに固相抽出カートリッジでクリーンアップ後、又はクリーンアップなしでキャピラリーガスクロマトグラフィー/マススペクトロメーターに注入して分析する。

分析試料 (飲料) ガス抜きはフィルター又は超音波バスで行う。

分析試料調製法は飲料中の成分により異なる。

2) 植物エキスを含まない清涼飲料水における分析試料の調製

遠沈管に塩化ナトリウム 1 g を秤取し、ガス抜きした飲料 5 mL に入れる。内部標準 (マロン酸ジメチル 20 mg/L, t-ブチルメチルエーテル+ジクロロメタン 9 : 1 混合抽出溶媒希釈液) 2 mL を加えてガラス栓をし、45～60 秒間激しく振盪する。その後、直ちに 3,000～4,000 rpm で 5 分間遠心分離する。ピストン・ピペットで有機相を吸い上げ、試料用バイアル瓶に入れ、密封して GC に注入する。

3) 植物エキスを含む飲料における分析試料の調製

上記の清涼飲料水のように抽出を行い、次のクリーンアップ・プロセスを行う。有機相 0.3 mL をアルキルスルホン酸変性シリカゲル 100 mg を充てんした 1 mL 固相抽出カートリッジ (Bond Elut SCX カートリッジ, 100mg, 1ml, 40 μ m, 100/pk, UNSPSC (国際標準製品/サービス分類コード) : 4111571 (使用前に酢酸エチル 1 mL 及び t-ブチルメチルエーテル 1 mL での抽出・洗浄を 2 回繰り返し, 50 $^{\circ}$ C 真空デシケータで乾燥させる。) に注入し、溶出液は廃棄する。さらに抽出物 (有機相) 0.5 mL を固相抽出カートリッジに注入し、溶出液をバイアル瓶に滴下し、GC/MS で分析・測定する。

4) 検量線用試料の調製 (飲料中 DMDC 濃度 0.2 及び 20 mg/L)

上記と同様な方法で調製、測定する。

5) GC 操作条件

カラム : OV1701, 内径 0.3 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.6 μ m

リテンションギャップ融解シリカキャピラリー (圧入して連結) :

OV 6530660-15, 内径 0.53 mm, 長さ 0.10~0.15 m

注入量 : 2 μ L

カラム温度 : 55°C

注入

55°C (4 分間等温加熱) \rightarrow (40°C/分) \rightarrow 70°C (1 分間等温加熱)

\rightarrow (1°C/分) \rightarrow 90°C (0 分間等温加熱) \rightarrow (70°C/分)

\rightarrow 250°C (10 分間等温加熱)

冷却

DMDC 及び内部標準は 90°C 未満, 1°C/分で溶出した後, 検出器を止めて, キャピラリーカラムを 250°C に加熱する。

注入口温度 : 55°C

インターフェース : 300°C

キャリアガス : ヘリウム

流量 : 25 cm/秒

注入方式 : オンカラムインジェクション

スプリット比 : ー

6) 検出器 (MS)

電子イオン化 (EI Ionization) のイオン源温度 : 200°C

電子倍增管 : 1800 V

マスフラグメント : m/z=45/59/60

保持時間 : 0.0025/0.0025/0.0025 分

7) 算出法

約 0.008 分の総測定サイクルは, 各質量に対して 2 積分/秒に相当する。12 秒間の平均ピーク幅で, 各質量フラグメントのピーク面積の 96% を算出するために 24 の面積スライスを用いる。

DMDC は 3 個の m/z 値のピーク面積率を計算することにより求める。

相対的強度 : m/z=45/59/60

DMDC : 6:20:1

マロン酸ジメチル : 7:47:1

スパイクのない基質では, DMDC のピークは示さない。軽度な値のみとなる。20 mg/L の添加時の成績から, 回帰式により 0.2 mg/L とブランクの値より求める。試料の DMDC 含量 (DMDC 濃度) は回帰直線から算出する。

検量線は DMDC の濃度で直線性を示さない (80% と 120% との回収率) ため, 概略的な計算では, 回帰直線を推奨するが, 基準曲線は分析試料の種類ごとに検量すること。より正確な測定のためには, ブランクとスパイクのない基

質の値を用いて算出する。

表 8 : 分析試料の調製と回収率との関連

DMDC 添加量 (DMDC 濃度)	DMDC 測定値 (DMDC 濃度)	回収率%
0.267	0.226	84.6
0.534	0.465	87.1
1.07	0.994	92.9
2.67	2.68	100.4
5.34	5.68	106.4
26.7	30.7	115.0
53.4	57.8	108.2

8) 測定法の信頼性

飲料中の DMDC の検出限界は 0.05 mg/L で、飲料中の DMDC の定量限界は 0.2 mg/L である。

測定法の併行精度 (p=95%) は、植物エキスを含まない清涼飲料水を用いて DMDC の添加濃度を 3 段階で行い、次のような結果であった。

表 9

DMDC 添加濃度 (mg/L)	DMDC 測定値 (mg/L)	標準偏差 (mg/L)	併行精度 r=(mg/L)
0.267	0.229	0.008	0.023
2.67	2.66	0.033	0.094
26.7	29.6	0.025	0.71

測定法の併行精度 (p=95%) は、植物エキスを含む飲料を用いて DMDC の添加濃度を 3 段階で行い、次のような結果であった。

表 10

DMDC 添加濃度 (mg/L)	DMDC 測定値 (mg/L)	標準偏差 (mg/L)	併行精度 r=(mg/L)
0.20	0.22	0.01	0.03
2.04	1.95	0.06	0.2
20.45	19.38	0.94	2.7

9) 各種分析試料と DMDC 分析結果⁵¹⁾

各種の分析試料と分析結果を以下に示す。

表 11 : 分析試料の調製及び DMDC の含量

飲料混合物	DMDC 添加量	DMDC 含量	6 時間後の DMDC 含量
オレンジ天然果汁 (ジュース)			
オレンジジュース 200 mL のみ	52.4 mg	262.0 mg/L	検出限界未満
オレンジジュース 160 mL+水 40 mL	52.7 mg	263.5 mg/L	検出限界未満
オレンジジュース 100 mL+水 100 mL	52.3 mg	261.5 mg/L	検出限界未満
チェリー ドリンク			

チェリー ドリンク 200 mL のみ	53.8 mg	269.0 mg/L	検出限界未満
チェリー ドリンク 160 mL+水 40 mL	51.8 mg	259.0 mg/L	検出限界未満
チェリー ドリンク 100 mL+水 100 mL	51.2 mg	256.0 mg/L	検出限界未満
りんご天然果汁 (アップルジュース)			
アップルジュース 200 mL のみ	52.4 mg	262.0 mg/L	検出限界未満
アップルジュース 160 mL+水 40 mL	52.4 mg	262.0 mg/L	検出限界未満
アップルジュース 100 mL+水 100 mL	52.0 mg	260.0 mg/L	検出限界未満
クロフサスグリ (カシス) ネクター			
カシス ネクター200 mL のみ	56.4 mg	282.0 mg/L	検出限界未満
カシス ネクター160 mL+水 40 mL	52.1 mg	260.5 mg/L	検出限界未満
カシス ネクター100 mL+水 100 mL	70.7 mg	282.8 mg/L	検出限界未満

検出限界 : 0.05 mg/L, 定量限界 : 0.2 mg/L

アルコール飲料中のメタノール, 炭酸メチルエチルの測定方法

DMDC は飲料中に分解され、二酸化炭素とメタノールに分解するが、アルコール飲料中では DMDC とエタノールが反応して炭酸メチルエチルも生成される。アルコール飲料中におけるメタノール, エタノール, 炭酸メチルエチルの分析は Labor Dr. Haase-Aschoff による標準操作法 (SOP 0060_06)⁵²⁾に従って、固定化したカーボワックスカラムを用いる GC/FID 法で行う。

1) 測定法の概略

検量線のための標準液は、ストック溶液 (標準物質 500mg を 90%エタノール 20 mL で溶解し水を加えて 50 mL) 1 mL を適切な基質 100mL で希釈する。アルコールを含まない飲料では、エタノールの標準含量は 0.5%未満とする。ワインでは、標準液は 10%エタノール含量として、エタノール中のメタノール含量はブランク溶液で測定する。蒸留酒では 10%エタノール含量に希釈し、その後はワインと同様に測定する。清涼飲料水は基質 100 mL 中にサッカロース 5 g, クエン酸 0.5 g を加える。

分析試料は、塩基性ではエステル加水分解を引き起こし、測定できないため、軽度な酸性にすること。

- 10 mL のヘッドスペース バイアルに塩化ナトリウム 1.0 g を加える。
- 分析試料 2.0 mL を加える (標準液も同様に)。
- 内部標準液 0.5 mL (ジオキサン約 250 mg/100 mL) を加える。
- バイアル瓶を密封する。
- ブランク測定として、検量線標準液のストック溶液の代わりに水 1mL を分析試料にする。

2) GC 操作条件

カラム : 融解シリカキャピラリー (Carbowax ; 担体:ポリエチレングリコール), 内径 0.32 mm, 長さ 50 m, 膜厚 1.0~1.5 μm

検出器：水素炎イオン化検出器

検出器温度： 250℃

スプリットインジェクター：180℃，スプリット流量 25 mL/分

試料・インキュベーション：80℃，8分，300 rpm でかくはん

注入量：250 μL

上部圧力：50 kPa

温度管理：キャピラリー60℃（1分間保持）→（1.0℃/分）→ 66℃

→（40.0℃/分）→ 80℃ →（2.0℃/分）→ 87℃ →（40℃/分）

→ 200℃（5分間保持）

3) 算出法

各種の飲料は内部標準を加えることなく測定し、ピーク コインシデンスを求めた。

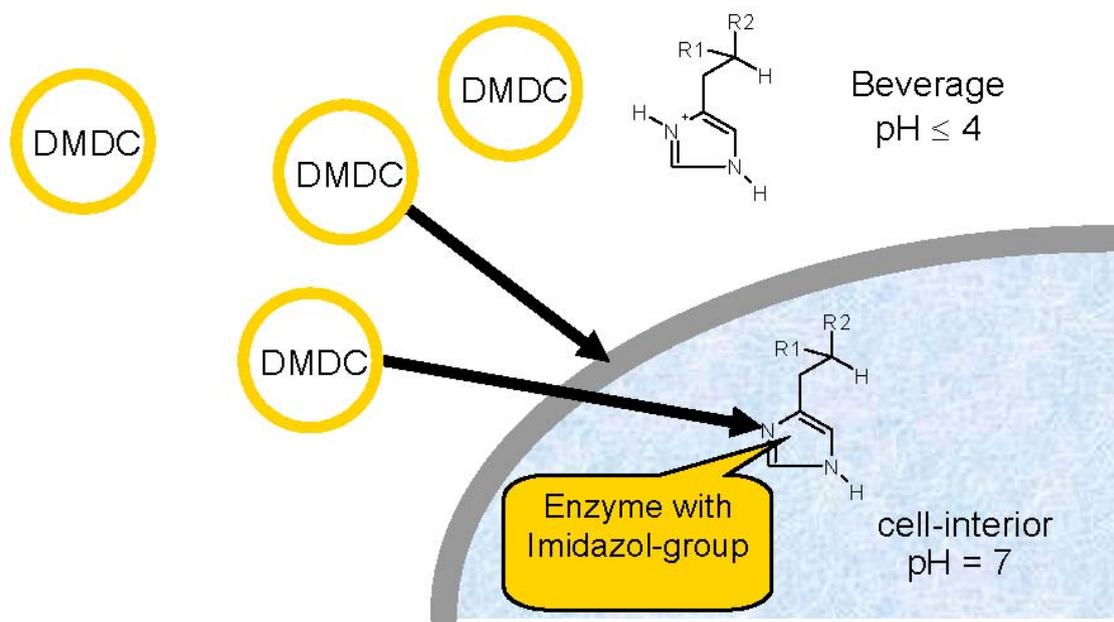
測定は内部標準と試料とのピークで算出した。溶離はメタノール，エタノール，炭酸メチルエチル，内部標準のジオキサンの順であった。

7. 有効性 ^{2, 9~16, 22, 31, 33, 34, 36, 53~65)}

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 ^{2, 9~16, 53~60)}

DMDCは常温で主にイミダゾール，アミン，チオールなどの求核基との反応でたん白を介する酵素反応を阻害して菌の発育を抑制ないし殺菌作用を示す。すなわち，アルコールデヒドロゲナーゼ及びグリセルアルデヒド-3-ホスフェート-デヒドロゲナーゼの酵素のイミダゾールを含むヒスチジン基をメトキシカルボキシル化する。（Ough, 1983⁵³⁾）この反応は，微生物細胞内のpH 7前後の環境で最も強く，pH 2~4の飲料（炭酸飲料，清涼飲料水，スポーツ栄養飲料）⁵⁴⁾ 中では弱い。このスキーマを図3に示す。

図3：DMDCの有効性



DMDCの有効性は広いスペクトルの抗菌活性に加えて、マイコトキシンの産生を防ぎ、耐熱性の糸状菌に対して効果を示し、菌の耐性を誘発しない。事実、食品添加物の安息香酸、抗生物質ナタマイシンに耐性を示す大腸菌、酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* に細胞毒性に近いDMDC用量をそれぞれ33回、29回、26回培地に投与したが、突然変異を含めて耐性は認められなかった。(Bayer AG, 1988²⁾) また、飲料の充てん後、分解までの数時間殺菌作用が持続し、充てん中の容器、キャップ等への殺菌効果も見込まれ、高い保存効果が持続する。

それぞれの菌種に対する最小致死濃度 (Minimum Lethal Concentration: MLC) 並びに飲料における有効性を以下に示す。最小致死濃度の測定結果では、300 ppm あるいはそれ以上の濃度が必要な微生物でも、実際に飲料の通常製造レベルでは250 ppm あるいは200 ppm 以下の濃度で殺菌効果を発揮することが確認された^{9-16, 55)}。

表 12 : DMDC の最小致死濃度⁵⁶⁾

菌種	mg/L
酵母 ^{注1)}	
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> (non-flocculating yeast)	100
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> (flocculating yeast)	60
<i>Saccharomyces diastolicus</i>	200
<i>Saccharomyces oviformis</i>	100
<i>Saccharomyces bayanus</i>	120
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ISA1000 ⁵⁷⁾	100
<i>Saccharomyces uvarum</i>	30
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	100
<i>Saccharomyces apiculatus</i>	60
<i>Saccharomyces globosum</i>	40

	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> ISA1190	100
	<i>Zygosaccharomyces priorianus</i>	75
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	50
	<i>Rhodotorula glutinosa</i>	40
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	50
	<i>Candida ethanolica</i>	100
	<i>Rhodofurula rubra</i>	200
	<i>Candida krusei</i>	200
	<i>Zygoascus hellenicus</i> ISA2284	25
	<i>Pichia membranefaciens</i>	40
	<i>Pichia farinose</i>	100
	<i>Torulopsis candida</i>	100
	<i>Torulopsis versatilis</i>	100
	<i>Torulopsis stellata</i>	65
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	100
	<i>Pichia guilliermondii</i> ISA2126	100
	<i>Torula utilis</i>	250
	<i>Endomyces lactis</i>	70
	<i>Kloeckera apiculata</i>	30
	<i>Hansenula anomala</i>	50
糸状菌 ^{注2}	<i>Byssochlamy fulva</i>	100
	<i>Penicillium glaucum</i>	200
	<i>Botrytis cinerea</i>	100
	<i>Fusarium oxysporum</i>	100
細菌 ^{注3}	<i>Acefobacter pasforianum</i>	80
	<i>Staphylococcus aureus</i>	100
	<i>Pediococcus damnosus</i>	250
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100
	<i>Lactobacillus thermotolerans</i> 72	25
	<i>Lactobacterium buchneri</i>	40
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	250
	<i>Lactobacillus brevis</i>	200
	<i>Pediococcus cerevisiae</i>	300
	<i>Acetobacter xylinum</i>	300
	<i>Oenococcus oeni</i>	>300

上記資料は参考資料 56 による。この資料は参考資料 2, 57~61 をまとめたものである。

注 1: 播種: 500 菌/mL; 28°C で 3 週間後に測定

注 2: 播種: 500 菌/mL; 28°C で 3 週間後に測定

注 3: 播種: 1×10^3 菌/mL; 室温 12 時間後に測定

表 13: 清涼飲料水における DMDC の最小致死濃度⁹⁻¹⁶⁾

飲料	菌種	mg/L
非発泡性飲料		
りんご果汁飲料 (50% 果汁) ⁹⁾	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	200
	<i>Saccharomyces bailii</i>	150~200
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	200~250
	<i>Pichia anomala</i>	150~200
	<i>Candida krusei</i>	150
	<i>Kloeckera apiculata</i>	150
ぶどう果汁飲料 (50% 果汁) ¹⁰⁾	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	150~250

	<i>Saccharomyces bailii</i>	150
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	150~200
	<i>Pichia anomala</i>	150~200
	<i>Candida krusei</i>	150
	<i>Kloeckera apiculata</i>	150
オレンジ果汁飲料（50%果汁） ¹¹⁾	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	200~250
	<i>Saccharomyces bailii</i>	150
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	200~250
	<i>Pichia anomala</i>	150
	<i>Candida krusei</i>	150
	<i>Kloeckera apiculata</i>	150
モロチェリーネクター果汁飲料（60%果汁） ¹²⁾	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	200
	<i>Saccharomyces bailii</i>	150~200
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	200~250
	<i>Pichia anomala</i>	150
	<i>Candida krusei</i>	150
	<i>Kloeckera apiculata</i>	150
ピーチネクター果汁入り清涼飲料水（45%果汁） ¹³⁾	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	200~250
	<i>Saccharomyces bailii</i>	150~200
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	150~250
	<i>Pichia anomala</i>	150
	<i>Candida krusei</i>	150
	<i>Kloeckera apiculata</i>	150
発泡性果汁飲料		
りんご果汁飲料飲料（50%果汁） ¹⁴⁾	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Trier	175~250
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , NCYC 9370	175
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> , NCYC 1427	175~250
非発泡性着香飲料		
着香飲料 ^{15, 16)}	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Trier	175~250
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , NCYC 9370	175~175
		<175~175
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> , NCYC 1427	175~250

ワインの有効性については、FDA で、DMDC は当初ワイン製造時の酵母不活化の用途で認可されたが、その際に最大添加量は 200 ppm に設定され、GMP の下では、微生物数が 500 菌/mL 以下に減少するので、この基準値で十分に効果が発揮されるものとされた²²⁾。

保存料との有効性の比較^{22, 24, 55)}

DMDC の有効性について、果汁飲料の保存料の安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム（日本では清涼飲料への使用が認められていない）と比較、検討した。アップルジュースに酵母菌 (*S. cerevisiae*) を 20,000 cfu/mL を播種し、所定の保存料を添加して 26°C で 24 時間培養した後、検体を 10, 100, 1000 倍希釈して、それぞれの細菌数をプレート法により求めた。その結果、表 14 「DMDC と保存料との有効性の比較」のように DMDC では生菌は検出されなかったが、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウムでは共に検出され、DMDC の有効性、優位性が認められた⁵⁵⁾。

また、海外で DMDC を使用して製造した飲料を長期間保管して悪影響を発現したとの

報告はない。

ワイン用と清涼飲料用とで最大添加量が異なる理由は、これらが異なる時期に別個に認可されたことによる。すなわち、FDA で、DMDC は、当初ワイン製造時の酵母不活化の用途で認可されたが、その際に最大添加量は 200 ppm に設定され、GMP の下では、微生物数が 500 菌/mL 以下に減少するので、この基準値で十分に効果が発揮されるものとされた²²⁾。その後、FDA で、認可が清涼飲料にも拡大され、清涼飲料での最大添加量は 250 ppm と設定されたが²⁴⁾、ワインでは当初の設定のまま最大添加量 200 ppm での使用が認められたのである。その後、EU においても、同様の使用基準が設定された。

なお、ソルビン酸カリウムは、日本では清涼飲料への使用が認められていないが、EU では清涼飲料への使用が飲料用食品添加物として認められており、食品製造業者の立場では、ソルビン酸カリウムに代えて DMDC を使用することのメリットを確認するために、有効性の比較対象として一般的にソルビン酸カリウムを取り上げることが多い。

表 14 : DMDC と保存料との有効性の比較⁵⁵⁾

添加物	希釈率	10 倍	100 倍	1000 倍
無処置		+/+	+/+	+/+
DMDC, 250 mg/L		-/-	-/-	-/-
安息香酸ナトリウム, 177 mg/L		+/+	+/+	71/69
ソルビン酸カリウム, 402 mg/L		+/+	+/+	64/68

+ : 300 cfu 以上, 数値 : 肉眼的な cfu, - : 肉眼的に細菌を認めず

2 食品中での安定性^{36, 61-64)}

DMDC は、清涼飲料水、アルコール飲料に添加された後、二酸化炭素とメタノールに分解するが、その過程で飲料中の微生物を不活化する。結果として飲料中に残存しないため、通常の実験試験では DMDC 未変化体の検出が困難である。

DMDC は水溶液（アルコールを含まない飲料に相当）中で速やかに加水分解し、その分解速度は主に温度に依存する。DMDC の半減期は 20°C では 17 分であり、pH 2~6 における加水分解は実質的に水素イオン濃度の影響はみられなかった。すべての水溶性液体（例えば、飲料）中で DMDC は加水分解される。加水分解に要する時間は、4°C で約 7.5 時間、10°C で約 4.5 時間、20°C で約 2 時間、30°C で約 1 時間であった。したがって、飲料に添加された DMDC は、冷蔵条件下でも 7-8 時間以内には加水分解が進み、飲料が出荷された後、消費される段階では飲料中に残存しない。

また、炭酸飲料に含まれる二酸化炭素は 6 気圧の陽圧まで DMDC の加水分解に意義ある影響は認められていない（Krefeld-Uerdingen, 1979⁶¹⁾）。なお、DMDC の定量下限値 0.2 mg/L、検出下限値 0.05mg/L である。

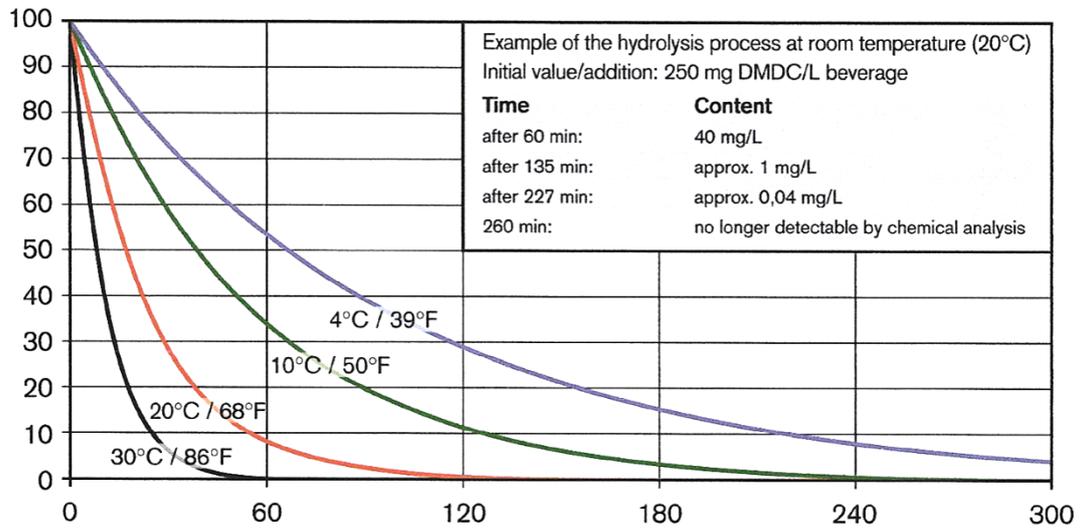
図 4 : 飲料中の DMDC 加水分解曲線及び半減期³⁶⁾

表 15

温度	加水分解時間	半減期
4°C	約 7.5 時間	約 70 分
10°C	約 4.5 時間	約 40 分
20°C	約 2 時間	約 17 分
30°C	約 1 時間	約 8 分

表 16 : 赤及び白ワイン中 (20°C) の DMDC 濃度 ⁶²⁾

投与後時間	DMDC 濃度 (%)	
	赤ワイン (12 vol%アルコール)	白ワイン (10 vol%アルコール)
30 分	21	13
1 時間	7	6
1.5 時間	2	1
2 時間	0	0
2.5 時間	0	0
3 時間	0	0
4 時間	0	0
5 時間	0	0
6 時間	0	0

「0」… ND (検出下限値未満)

表 17 : 炭酸飲料 (pH3.2) 中の DMDC 濃度 ⁶¹⁾

投与後時間	DMDC 濃度 (%)		
	10°C	20°C	30°C
15 分	78	50	30
30 分	60	25	8
45 分	46	11	2
1 時間	36	5	0
2 時間	12	0	0
3 時間	4	0	0
4 時間	2	0	0
5 時間	0	0	0

「0」… ND (検出下限値未満)

表 18 : 果汁非炭酸飲料 (pH3.4) 中の DMDC 濃度 ⁶¹⁾

投与後時間	DMDC 濃度 (%)		
	10°C	20°C	30°C
15 分	78	50	30
30 分	60	25	8
45 分	46	11	6
1 時間	36	6	0
2 時間	12	0	0
3 時間	4	0	0
4 時間	2	0	0
5 時間	0	0	0

「0」… ND (検出下限値未満)

表 19 : 炭酸飲料 (pH4.0) 中の DMDC (30 g/L) 加水分解⁶¹⁾

温度	加水分解 時間 (時間)	二酸化炭素圧 (バール)		
		1	3	6
		DMDC 濃度 (%)		
20	0.5	30	28.5	29.0
20	1.0	9	8.5	7.7
20	2.0	1	0.2	0.1

また、DMDC は飲料に添加後、7～8 時間以内に完全に分解して二酸化炭素とメタノールに分解するが、飲料に添加した際に生じる反応生成物は飲料に含まれる成分により、種類や量が異なり、N-カルボメトキシ化合物(N-CMC)、炭酸エチルメチル(MEC)、カルバミン酸メチル(MC)が知られている。また、製造工程中の副成物は炭酸ジメチル(DMC)である。以下に関連化合物一覧⁶³⁾を示す。

なお、二酸化炭素は水道水にも含まれ、また炭酸飲料中に大量に添加されていることから、食品から相当量が摂取されている。また、JECFA (FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議) では、二酸化炭素は天然代謝産物であり、かつ、ヒトは大気中の二酸化炭素に日常的にばく露されていることから、ADI を「特定しない」という安全性評価を行っている (1979 年, 1985 年)。一方、炭酸飲料 500 mL に DMDC を最大添加量 250ppm で使用した時に DMDC の加水分解生成物として生成されている二酸化炭素量 (0.045 L*) を、炭酸飲料に含まれている二酸化炭素量 (1.5 L (食安委⁶⁴⁾) に比較するときわめて微量である。したがって、DMDC の加水分解生成物としての二酸化炭素量の安全性については評価しなかった。

* : 炭酸飲料 500 ml に添加した DMDC (250 mg/L) の加水分解で、二酸化炭素 82.125 mg (DMDC の 65.7%) が生成される。換算すると 0.045 L (20 °C, 1013 hPa) となる。

表 20 : 関連化合物一覧⁶³⁾

名称	略号	一般名	生成量 mg/L
N-カルボメトキシ化合物 (N-カルボメトキシアラニン, N-カルボメトキシアルギニン, N-カルボメトキシアスパラギン, N-カルボメトキシジシステイン, N-カルボメトキシグルタミン酸, N-カルボメトキシグリシン, N-カルボメトキシヒドロキシプロリン, N-カルボメトキシロイシン, N-カルボメトキシモノシステイン, N-カルボメトキシフェニルアラニン, N-カルボメトキシプロリン)	N-CMC	N-carbomethoxy compounds (N-carbomethoxy alanine, N-carbomethoxy arginine, N-carbomethoxy asparagines, N-carbomethoxy dicysteine, N-carbomethoxy glutamic acid N-carbomethoxy glycine, N-carbomethoxy hydroxyproline, N-carbomethoxy leucine, N-carbomethoxy monocysteine, N-carbomethoxy phenylalanine, N-carbomethoxy proline)	4
炭酸エチルメチル	MEC	methylethylcarbonate	10
カルバミン酸メチル	MC	methylcarbamate	0.004
炭酸ジメチル	DMC	dimethylcarbonate	0.5
メタノール	メタノール	methanol	120
二酸化炭素	CO ₂	Carbon dioxide	164

生成量は飲料に DMDC を飲料に 250mg/L 添加した場合の最大量を示す。

3 食品中の栄養成分に及ぼす影響^{32, 33, 34, 31, 65)}

食品中の他の栄養成分との相互作用について DMDC はポリフェノール、タンニン、アミノ酸等との様々な N-カルボメトキシ化合物の生成が示唆される³¹⁾が、具体的な報告はなく、DMDC は飲料中に低い濃度 (250 mg/L 以下) で添加後、速やかにメタノールと二酸化炭素に分解される。分解物中のメタノールの含量は天然果汁中のメタノールの含量とほぼ等しく、飲料の品質 (香, 風味, 色調) に影響を与えないと考えられる。

(Wucherpfenning, 1983⁶⁵⁾)

なお、「食品中の栄養成分に及ぼす影響」並びに「食品中栄養成分との相互作用」について、欧州共同体食品科学委員会 (SCF: Scientific Committee for Food, 1997 年以降 Scientific Committee on Food, 2003 年以降 EFSA に属している) では、以下のように栄養成分に及ぼす影響は極めて軽微であり、特定の条件下でわずかに増加する場合を除いて保存後に天然成分との反応生成物が増加する現象は認められていないため、安全性を含めて検討する必要はないと結論付けている。

SCF, 2001³⁴⁾によれば、DMDC は主に二酸化炭素とメタノールに分解し、また、天然原料に由来するアミン、アミノ酸、糖類および果実酸 (乳酸、クエン酸、酒石酸、アスコルビン酸) とのカルボキシメトキシ化合物のような微量の反応物質を生成する (カルボキシメトキシ化合物の総量として 1.75-5 mg/L)。アンモニアやアンモニウムイオンの存在下においては、少量のカルバミン酸メチルが生成する (<25 mg/L)。アルコール飲料およびノンアルコール飲料では、炭酸水素メチルや炭酸ジメチル (DMC) 等その他のメタノールとの反応生成物が確認され、アルコール飲料の場合にはエタノールとの反応生成物、たとえば炭酸エチルメチル (MEC) も検出された。(8.2-10.3 mg/L)

DMDC とその反応生成物 (エタノールとの反応物質を含む) は前回 SCF の評価を受け、問題は無いと結論付けられた。(SCF, 1990³²⁾)

ワイン中で生成するカルバミン酸メチルの量は、エタノールの存在に影響を受けることはなく、非アルコール飲料の場合と同様にアンモニアやアンモニウムイオンが存在するかどうかによってのみ決まる。処理したワインを 12 ヶ月間貯蔵した後に分析した結果では、カルバミン酸エチルについて元の含有量を超える増加は認められなかった。

結論として、アルコール飲料やワインの処理用に DMDC を使用した結果としてのメタノールやその他の反応物質の生成は、非アルコール飲料に使用した場合に類似している。したがって、非アルコール飲料用としてのベルコリンの使用に関する前回の意見 (SCF, 1990³²⁾) は、DMDC で処理したワインについても同様に適用が可能である。

DMDC 200 mg/L をワインに添加した場合、98 mg/L のメタノールが生成するが、天然果汁中には平均約 140 mg/L のメタノールが存在するので、(Wucherpfenning, 1983⁶⁵⁾)

ワイン中に含まれるメタノールは計約 240 mg/L となる。健常なヒトでは 1500 mg/時のメタノールを問題を起こすことなく代謝するが、ワイン中のメタノール含有量約 240 mg/L は充分にその許容範囲内であり、ワインの摂取量を考えてもメタノールによる健康被害の危険性はないと判断される。(SCF, 2001³⁴⁾)

ノンアルコール飲料³³⁾との比較では、ワインのメタノール並びに反応生成物は類似しており、考慮すべきものはないと結論づけられる。

8. 使用基準案 4, 9-16, 20, 22-25, 27, 30, 32-35, 55, 66, 67)

表 21 : 使用基準案

使用基準	<p>・二炭酸ジメチル (DMDC) は果実酒及び清涼飲料水 (ミネラルウォーター類を除く。以下この目において同じ。) 以外の食品に使用してはならない。二炭酸ジメチルの使用量は、果実酒 (ぶどう酒を除く。) 及び清涼飲料水にあつてはその 1kg につき 0.25g 以下、ぶどう酒にあつてはその 1kg につき 0.20g 以下でなければならない。</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>飲料</th> <th>DMDC 最大添加量</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>清涼飲料水</td> <td>250 mg/L</td> </tr> <tr> <td>果実酒</td> <td>250 mg/L (ぶどう酒は 200 mg/L)</td> </tr> </tbody> </table>	飲料	DMDC 最大添加量	清涼飲料水	250 mg/L	果実酒	250 mg/L (ぶどう酒は 200 mg/L)
飲料	DMDC 最大添加量						
清涼飲料水	250 mg/L						
果実酒	250 mg/L (ぶどう酒は 200 mg/L)						

使用基準案の設定根拠

- ・添加適用量は、飲料中での有効性試験結果に従って、各菌種に殺菌作用の得られる量とした。^{9-16, 55)}
- ・使用基準 (案) は FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA, 1991)²⁰⁾、欧州共同体食品科学委員会 (Scientific Committee for Food 及び Scientific Committee on Food: SCF)、欧州食品安全機関 (EFSA)、米国 FDA (米国の連邦官報 (Federal Register: FR) 及び米国食品接触物質 (Food Contact Substance: FCS)) に準拠している。

表 22 : 本使用基準案と海外使用基準との比較 DMDC の使用量等の最大添加量

本使用基準案		SCF ^{30, 32, 33, 34, 66, 67), EFSA³⁵⁾}		FDA (FR ^{22, 23, 24, 25), FCS²⁷⁾)}	
使用できる食品等	最大添加量	使用できる食品等	最大添加量	使用できる食品等	最大添加量
清涼飲料水 ^{注1)}	250 mg/L	果汁飲料, 果汁入り清涼飲料水	250 mg/L	非発泡性天然果汁, 果汁飲料並びに果汁入り清涼飲料水, 発泡性果汁飲料並びに果汁入り清涼飲料 (果汁 50% 以下)	250 mg/L

		茶系飲料（濃縮） ノンアルコールワイン、ワイン（ぶどう酒）を原料とした飲料、ノンアルコール着香飲料、ソフトドリンク		茶系飲料 着香飲料（果汁1%以下）、清涼飲料水、スポーツ飲料	
果実酒	250 mg/L （ぶどう酒は200mg/L）	ワイン（ぶどう酒）、シードル、ペアワイン、フルーツワイン、低アルコールワイン、その他15%未満のアルコール飲料（アルコール飲料とノンアルコール飲料の混合飲料を含む）	250 mg/L （ワイン（ぶどう酒）は200 mg/L）	ワイン（ぶどう酒）、低アルコールワイン、ノンアルコールワイン	200 mg/L

注1) ノンアルコールワインは清涼飲料水に含める。

安全性に係わる知見

9. 体内動態試験^{31, 65, 68-81)}

DMDC は飲料に添加された後、二酸化炭素とメタノールに速やかに分解するため飲料中に DMDC は検出されない状態で出荷が行われる。このように DMDC は不安定で、現実的に DMDC がヒトに摂取されないことから、DMDC 投与後のトキシコキネティクスの報告はみられない。また、DMDC を飲料に添加して生成する副成物、分解物も極めて僅かで、その毒性も低い。

メタノール：

ここでは、DMDC 添加処理後に生成するメタノールのラット、サル、ヒトにおける体内動態について検討する。

メタノールはヒト、動物及び植物に天然に存在するもので、血液、尿、唾液及び呼気中の常成分である⁶⁸⁾。

Fisher 系ラット 1 群雄各 5 匹に ¹⁴C 標識メタノールを 0, 25, 125, 600, 3,000 mg/kg を腹腔内投与して、投与後 48 時間までの血中濃度、尿、糞、呼気への排泄を調べた結果、投与量が増加すると血中濃度は高くなるが、600 mg/kg 以下では経時的变化は同様で、投与後約 2 時間で最高血中濃度に達し、その後は急速に低下して、投与後 24 時間目には最高濃

度の数分の1程度となった。その後は漸減した。しかし、3,000 mg/kgでは、死亡例、中毒症状がみられ、餌の摂取はなかった。また、血中濃度は高く、投与後48時間目でも最高血中濃度の1/2程度であった。600 mg/kg以下では、呼気中の排泄は二酸化炭素が主体で、60~70%に達した。呼気中のメタノール排泄は10%以下であるが、投与量が増加するにしたがい、漸増する。尿・糞への排泄は数%と少ない。投与後48時間で排泄はほぼ終了した。しかし、3,000 mg/kgでは死亡例の発現、中毒症状がみられ、他の用量とは排泄様式も異なり、排泄率は低く、代謝の飽和が疑われた。(NEDO, 1983⁶⁹⁾, 1984⁷⁰⁾)

カニクイザル(推定4~6.5歳)雄にラットと同様に¹⁴C標識メタノールを0, 25, 125, 600, 3,000 mg/kgを腹腔内投与して、投与後48時間まで採血を行った。その結果、尿素窒素、ナトリウム、カリウム、クロリド、葉酸は対照群と投与群で意義ある差はみられなかった。pH 7.30以下をアシドーシスとすると対照群5例、25 mg/kg群9例、125 mg/kg群6例、600 mg/kg群2例、3,000 mg/kg群9例であった。3,000 mg/kg群では1例では、pHの低下が投与後30時間目もみられ、pCO₂の経時的な低下、HCO₃⁻の経時的な低下、ギ酸の増加、β-ヒドロキシ酪酸の著明な増加がみられた。このことから3,000 mg/kg群では個体差はあるものの代謝性アシドーシスとみなされた。(NEDO, 1983⁶⁹⁾, 1984⁷⁰⁾)

以上のラット、サルの結果から、メタノールによる影響は600 mg/kg以下の濃度では、アシドーシスに関連した変化は特に認められなかった。(NEDO, 1983⁶⁹⁾, 1984⁷⁰⁾)

メタノールに未曝露のヒトにおける尿中の平均メタノール濃度は0.73 mg/L (0.3~2.61 mg/L)、呼気中濃度は0.06~0.32 µg/Lの範囲であることが報告⁶⁸⁾されている。メタノールは、新鮮な果物と野菜、フルーツジュース(クリアタイプ: 83~289 mg/L, 果肉入り: 64~326 mg/L, 全般12~680 mg/mL[平均141 mg/mL])、発酵飲料(各種ワイン平均32~452 mg/mL)及び食事制限食(主に清涼飲料水)などの飲食物からも摂取される。

(Wucherpfenning, 1983⁶⁵⁾, Françot, 1956⁷¹⁾)

環境保健クライテリア(EHC, 1998⁶⁸⁾)によれば、メタノールは吸入、経口摂取、皮膚への曝露により容易に吸収され、体液の分布に従って、組織中へ速やかに分布する。メタノールの少量は未変化体として肺と腎臓から排泄される。

経口摂取後、30~90分以内に血清中濃度がピークに達し、約0.6 L/kgの分布容積で、メタノールが全身に分布する。

メタノールは主に肝臓において、ホルムアルデヒド、ギ酸及び二酸化炭素へと連続的に酸化される。最初の反応は肝アルコールデヒドロゲナーゼによるホルムアルデヒドへの酸化であり、飽和される律速の過程である。エタノールとメタノールのアルコールデヒドロゲナーゼに対する相対的な親和性は約20:1である。第2段階で、ホルムアルデヒドはホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼによってギ酸又はギ酸塩に酸化され、この反応はpHに依存している。第3段階で、ギ酸は葉酸依存性反応により二酸化炭素へ解毒される。

メタノールの血液から尿及び呼気中への排泄と代謝による消失は、特にエタノールと比較した場合、全ての動物種で遅い。1 g/kg以上の用量では半減期が約24時間、0.1 g/kg以

下の用量では半減期が 2.5～3 時間と報告されている。代謝による解毒，すなわち，ギ酸の排泄はゲッ歯類と霊長類で大きな差が認められ，ゲッ歯動物と霊長類間にみられるメタノールの毒性の劇的な差異の原因になっている。

Roe⁷²⁾によれば，エタノール未摂取で，未投薬の健常なヒトにおけるメタノールの致死量は約 1 g/kg と推定している。メタノールの代謝速度に関する資料はないが，アカゲザルでは，37 mg/kg/hr と報告されており，ヒトも同様と考えられる。ヒトで重篤なアシドーシスがじゃっ起されるまでの時間は 18 時間で，この間のメタノールの代謝量は 0.666 g/kg とされ，ヒトでの最小致死量 1 g/kg と良く符合する。一方，げっ歯類のラット，ウサギ，非げっ歯類のイヌの最小致死量はそれぞれ，9.5，7，8 g/kg と報告されている。このヒトにおける致死量 1 g/kg は代謝性アシドーシスによる影響が示唆され，死亡例では，血中ギ酸濃度が高い値を示した。一方，ラットやウサギでは，血中ギ酸濃度の上昇は認められず，イヌ，サルでは，血中ギ酸濃度の上昇並びに代謝性アシドーシスを認めたもののヒトと比べて，その値は低かった。これらのことから，ヒトで重篤な一般状態（おう吐，クスマウル呼吸，背部のとう痛等）並びに弱視や黒内障を示し，失明に至った血中ギ酸濃度は，サルの重篤な代謝性アシドーシスが認められる量より更に高い値であることから，メタノールの代謝量を下回る摂取では血中ギ酸濃度の上昇はみられず，毒性発現はないとみなされた。

これらの最小致死量，用量に応じた一般状態，メタノールの毒性についての動物種差を表 23 にまとめる。

表 23：メタノールの毒性における種差⁷²⁾

	ラット	ウサギ	イヌ	サル	ヒト
最小致死量 (g/kg)	9.5	7	8	3, 7	1
代謝性アシドーシス					
1 g/kg	認めない	認めない	認めない	認めない	重篤
3 g/kg	認めない	認めない	認めない	重篤	重篤
6 g/kg	認めない	認めない	認めない	重篤	—
8 g/kg	—	—	認める	—	—
視神経の萎縮	認めない	認めない	認めない	認めない	認める
網膜神経節細胞	正常	正常	正常	—	変性
血中ギ酸濃度 (mmol/L)	0[6]	0[3.9]	2.6[2] 3.2[2] 8.7[1.7] 11.0[1.9]	7.5	15-22.8[0.275] 15-23[0.277]

[]内はメタノール量を示す。単位は動物の投与量では g/kg，ヒトでは血中濃度で g/L である。

なお，副生成物，反応生成物，加水分解生成物，製造副生成物の体内動態の知見を JECFA³¹⁾ の知見より以下にまとめる。

N-カルボメトキシ化合物 (N-CMC) :

ラットにN-カルボメトキシアラニン (NCMA) 及びN-カルボメトキシプロリン

(NCMP) を経口投与した結果、0.5 mg/匹の低投与量でも、その多くは未変化体として尿中に速やかに排泄される。NCMAの排泄はNCMPと比較して速やかなため、低用量でもわずかではあるがNCMAの排泄は早い。NCMPをラットに投与した場合、分解されなかった部分は速やかに未変化体として腎臓より排泄される。(Schmidt, 1978⁷³⁾)

DMDCと飲料(アミノ酸, フェノール, 乳酸塩)との反応生成物であるカルボメトキシ化合物の酵素分解についてブタとヒトの肝ホモジネート並びに腎ホモジネートで調べた結果、ほとんどのカルボメトキシ化合物は速やかに加水分解されたが、この実験条件下ではアミノ酸誘導体(カルボメトキシプロリン, ジカルボメトキシシステイン, カルボメトキシリジン, 芳香族アミノ酸誘導体)は加水分解されず、安定であった。(Rauenbusch, 1974⁷⁴⁾)

炭酸エチルメチル (MEC) 及び炭酸ジメチル (DMC) :

MEC と DMC の体内動態に関する知見は認められなかったが、MEC と DMC をブタとヒト由来の肝ホモジネートと腎ホモジネートでインキュベートした結果、両化合物共に水酸化されたが、MEC の加水分解は DMC より速やかであった。(Rauenbusch, 1974⁷⁴⁾)

カルバミン酸メチル (MC) :

ラットに MC 500 mg/kg を腹腔内投与し、尿を採取して排泄率を求めた。その結果、24 時間以内に投与量の 7.25% (4.9~9.8%) が尿中に排泄された。この排泄率は体内の水分が 24 時間で排尿される値と同じであり、MC は腎臓で濃縮されないと筆者は結論づけている。MC の分布について正常ラット並びに担癌 (Walker carcinomata) ラットに MC 500, 1,000 mg/kg を腹腔内投与して調べた。その結果、MC は投与後 144 時間内に血液、肺及び肝臓で検出された。MC は投与後速やかに全身に分布するが、検査した組織中の濃度の消失は遅延した。明らかに消失半減期は 24 時間と推定された。(Boyland & Papadopoulos, 1952⁷⁵⁾)

カルバミン酸エステルと N-ヒドロキシ誘導体である MC の尿中排泄を調べた比較試験では、雌性ラットに MC 0.3~1.0 g/kg (20 w/v% 水性液) を単回腹腔内投与し、投与後 1~24 時間と 24~48 時間の尿を採取した結果、初日の未変化体は投与量の 3.3%, N-ヒドロキシ誘導体は 0.008% であったが、2 日目の未変化体は投与量の 4.9%, N-ヒドロキシ誘導体は 0.06% であった。N-ヒドロキシカルバミン酸メチル 0.02~0.4 g/kg (5 w/v% 水性液) を腹腔内投与した結果、初日の尿中に N-ヒドロキシカルバミン酸メチルの 29%, MC の 4.1% が排泄され、2 日目には N-ヒドロキシ体の 3.9%, MC の 5.7% が排泄された。これは N-ヒドロキシ化が起こっているが、デヒドロキシ化も起こっていることが示唆される。(Boyland & Nery, 1965⁷⁶⁾)

MC の尿中排泄及びその代謝酵素に及ぼす影響をラットで調べた。Wistar 系ラット雄 5 匹, Fisher 344 ラット雄 5 匹に MC 1,000 mg/kg を単回経口投与、又は 800 mg/kg を 7 日間

連日経口投与した群を設けた。ラットは代謝ケージに入れ、24時間採尿した。Wistar系ラットに単回経口投与した群では、投与後3日間でMCの16.2%が排泄されたが、Fisher 344ラットではMCの排泄は投与量の15.5%とわずかに低かった。MCの7日間反復投与では、MCの未変化体の排泄は漸増し、Wistar系ラットでは30%、Fisher344ラットは32%に達した。その後、Wistar系ラットでは、MCの尿中排泄は軽度な増加がみられた。これらの軽微な差は動物種2種におけるMCの肝毒性発現の差と解釈された。

ラットに800 mg/kgを7日間連日投与した群と対照群の肝臓ホモジネートの10,000 g上清液について7-ethoxycoumarin deethylase (EOD), aldrin epoxidase (ALD), biphenyl-4-hydroxylase (BH), epoxide hydrolase (EH), GSH-transferase (GST)の酵素を測定した。無処置Wistar系ラットと比較してFisher系ラットはBHとALDの酵素活性が高く、EHとGSTの値が低かった。MC 800 mg/kgの7回投与では、Fisher系ラットの肝ALD活性は軽度に低く、Wistar系ラットではEODの活性は軽度に高かった。その他は統計学的に有意な差はみられなかった。(Schmidt & Schmidt, 1987⁷⁷⁾) 同様な目的からWistar系ラット並びにF344ラットにMC 250, 500, 1,000 mg/kgを連日7回強制経口投与して上記酵素を測定した結果、両系統では明らかな肝酵素活性に差異が認められた。(Bomhardら, 1989⁷⁸⁾)

雄性B6C3F₁マウス、雄性Fisher 344ラットに[Carbonyl-¹⁴C]MCを40, 400, 1,000 mg/kg経口投与、又は400 mg/kg静脈内投与した(いずれも20 μCi/kg)。二酸化炭素への代謝を調べるために0.4 mg/kg静脈内投与を追加した。動物は糞尿、二酸化炭素及び揮発性の化合物を分離して採取するために個別にガラス製の代謝ケージで飼育した。その結果、両動物種ともMCの初期分布は同様であったが、マウスのMC代謝と排泄は非常に速やかであった。マウスでは、48時間以内に投与の70%はCO₂として排泄されたが、ラットでは、18%であった。両動物種の尿中排泄は親化合物の90%に達した。投与の4%以下は両動物種ともに糞中に排泄された。MCの反復投与によりMCの16.2%の蓄積性がラットでは認められたが、マウスではみられなかった。これはラットではMCの代謝能が低いと考えられる。MC由来の放射能とDNAとの共有結合はマウス肝でみられたが、タンパクとの結合は両動物種とも筋肉及び肝臓組織で認められた。(Ioannouら, 1988⁷⁹⁾)

酵素並びに生化学的検査項目への影響を調べるために、雄性NMRJマウスにトリチウム標識したMC 375 mg/kgを注射後24時間目に屠殺して肝RNAを採取した。放射能はRNAに取り込まれ、RNA合成の増加が示唆された。(Williamsら, 1971⁸⁰⁾) また、¹⁴C標識したMCのマウス肝、肺、腎のDNAとの親和性について調べた。Crackenbushマウスに標識(6 μCi)したMC 10mgを生理食塩液で溶解して腹腔内投与してカルバミン酸エチル、カルバミン酸プロピル、カルバミン酸ブチルと比較した結果、カルバミン酸エチルのみ肝及び腎に意義ある放射能活性を検出した。MCの値はカルバミン酸エチルと比較して低く、その意義は低いと考えられた。(Lawsonら, 1973⁸¹⁾)

10. 毒性試験 ^{31, 77, 82-164)}

DMDC は揮発性で水性液中では不安定な物理化学的性状から、多くの動物に短時間で正確に DMDC を経口投与することは技術的に困難なため、単回投与毒性試験にとどめ、反復経口投与毒性試験は DMDC 添加飲料を用いて実施した。また、反復投与における DMDC の全身性の毒性は吸入投与で調べた。

なお、DMDC は飲料に添加後、速やかに加水分解され、メタノールと二酸化炭素となる。その半減期は室温（20℃）で約 17 分である。市販される飲料は DMDC 処理後 5～7 時間保存した後、12～24 時間後に出荷されるため、DMDC 添加処置ジュース並びにワインを被験物質として一連の毒性を調べることはヒトでの安全性評価に最も適切な方法と考えられる。

また、DMDC を飲料に添加して生じる反応生成物（N-カルボメトキシ化合物(N-CMC)、炭酸メチルエチル(MEC)、カルバミン酸メチル(MC)）、副成物（炭酸ジメチル(DMC)）、分解物（メタノール）の毒性についても調べた結果、これらを含む DMDC 添加ジュース、ワインの毒性試験で安全性の評価は可能と考えられる。

表 24：毒性試験の一覧

被験物質	DMDC	反応生成物	反応生成物	反応生成物	副成物	分解物
		N-CMC	MEC	MC	DMC	メタノール
単回投与試験	○	○	○	○	○	○
マウス	PO, IP, IH	PO	PO, IP	PO, SC	PO, IP	PO, IP
ラット	PO, IP, PC, IH	PO	PO, IP	PO, SC	PO, IP	PO, IP
ハムスター	IH	—	—	—	—	—
ウサギ	—	—	—	—	—	PO
イヌ	—	—	—	—	—	PO
サル	—	—	—	—	—	PO
亜急性毒性試験及び慢性毒性試験	◎/○ — PO, IH PO	×	○ — PO —	○ PO PO —	○ — PO —	○ — IH IH
発がん性試験	×	×	×	×	×	×
1年間反復投与毒性／発がん性併合試験	◎ — PO	×	×	○ PO PO	×	○ IH —

生殖毒性試験	◎ PO	×	×	×	×	○ IH
出生前発生毒性試験	◎ — PO	×	○ — PO	×	×	○ IH PO, IH
遺伝毒性試験	◎/○	×	×	○	×	○

○：被験物質単体の試験，◎：飲料に混入した試験，×又は—：試験は実施せず

PO：経口投与，IP：腹腔内投与，SC：皮下投与，PC：経皮投与，IH：吸入

DMDC は飲料に添加して細菌を不活化後は速やかに二酸化炭素とメタノールに分解され、飲料中に残存しないため、DMDC 自体の毒性を評価することは必ずしも容易ではないが、DMDC を添加したジュースやワイン等の飲料について、その安全性を評価することは、ヒトへの影響を判断する上で現実的で適切な方法である。DMDC を飲料に 4,000 ppm (mg/L) (市販の飲料の 16 倍量) 添加して、一連の長期間反復投与毒性、繁殖毒性、催奇形性、発がん性を調べた結果、DMDC に起因した毒性徴候は認められなかった。この用量は 55.1 kg のヒトに飲料 2L/日を連日摂取した場合のラットで 60~150 倍、イヌで 17~44 倍に相当し、その安全性が担保された。

● 二炭酸ジメチル (DMDC) の毒性

DMDC の経口投与における毒性試験は、その揮発性、水溶液中における不安定な物理化学的性状から、技術的に可能な単回投与とし、反復経口投与試験、繁殖・催奇形性試験は DMDC 添加飲料を用いた。なお、DMDC の反復 3 ヶ月間投与毒性については吸入経路で行った。

1 単回投与毒性試験⁸²⁻⁸⁴⁾

マウス、ラット、ハムスター (吸入のみ) に DMDC を経口、腹腔内及び吸入投与を行った結果、経口 LD₅₀ 値はマウスで 752.7 (雌), 906.5 (雄) mg/kg, ラットで 334.6 (雌), 496.5 (雄) mg/kg であった。腹腔内 LD₅₀ 値はマウスで 44.5 (雌), 44.9 (雄) mg/kg, ラットで雌雄ともに 186.0 mg/kg, 吸入 LD₅₀ 値は、吸入時間が増加すると値は減少し、4 時間吸入では、マウスで 850 (雄) mg/m³, ラットで 520~577 (雄), 827~1,350 (雌) mg/m³ ハムスターで 1,477 (雄) mg/m³ を超える値であった。

DMDC は水溶液中で不安定なため現実的ではないが、最大 DMDC 250 mg/L を添加した大量(2 L)の飲料で DMDC が分解しない場合を想定するとヒトの体重を 55.1 kg として 9.1 mg/kg の DMDC が摂取されたことになる。この値はマウス、ラットの経口 LD₅₀ のいずれの値よりも約 1/40*以下となる。したがって、DMDC の急性毒性における安全性は高いと

考えられる。

* : (マウス : 752.7~906.5 mg/kg) / (ヒト : 9.1 mg/kg/日) = (83~99)

* : (ラット : 334.6~496.5 mg/kg) / (ヒト : 9.1 mg/kg/日) = (37~55)

表 25 : マウス, ラット, ハムスターの単回投与毒性試験成績

動物種	投与経路	性別	DMDC LD ₅₀ (mg/kg)/LC ₅₀	資料番号/GLP
マウス	経口	雄 / 雌	906.5 / 752.7	82 /GLP 適用外
	腹腔内	雄 / 雌	44.9 / 44.5	
	吸入 (4 時間)	雄	850 mg/m ³	83 /GLP 適用外
ラット	経口	雄 / 雌	496.5 / 334.6	82 /GLP 適用外
	腹腔内	雄 / 雌	186 / 186	
	経皮 (7 日間貼付)	雄	>1,000 μL/kg	83 /GLP 適用外
	吸入 (1 時間)	雄 / 雌	約 2,300 / >3,017 mg/m ³	
	吸入 (4 時間)	雄 / 雌	520 / 1350 mg/m ³	
	吸入 (4 時間×5 回)	雄 / 雌	>102 / >102 mg/m ³	
	吸入 (1 時間)	雌雄	1,422 mg/m ³	84 /GLP 適合
	吸入 (4 時間)	雄 / 雌	577 / 827 mg/m ³	
吸入 (6 時間×5 回)	雌雄	NOEL:<18.6 mg/m ³		
ハムスター	吸入 (4 時間)	雄	>1,477 mg/m ³	83 /GLP 適用外

NOEL : 無影響量

2 亜急性毒性試験及び慢性毒性試験⁸⁵⁻⁸⁸⁾

1) ラットの3ヵ月間経口投与毒性試験^{85, 86)}

Wistar 系ラット 1 群雌雄各 15 匹に DMDC をフルーツジュース及びアルコール飲料に 4,000 mg/L 添加して 3 ヶ月間飲水投与した結果, 投与群における諸検査成績は DMDC 無添加の対照群と差が認められなかった。このことから, 無毒性量はいずれの飲料ともに DMDC 4,000 mg/L 添加を超える量とみなされた。

なお, DMDC 4,000 mg/L の添加量は飲料への添加用の最大 250 mg/L の 16 倍濃度に相当し, 飲料に均一に分布する量である⁸⁵⁾。DMDC 換算でオレンジ天然果汁 (ジュース) では, 1,043.32 mg/kg (雄), 1,401.76 mg/kg (雌), クロフサスグリ天然果汁 (カシスジュース) では, 902.68 mg/kg (雄), 1,308.04 mg/kg (雌), ビールでは, 629.88 mg/kg (雄), 813.52 mg/kg (雌), ワインでは, 565.08 mg/kg (雄), 688.72 mg/kg (雌) の 3 ヶ月間摂取の無毒性量と考えられる。この無毒性量は, 市販における最大添加量の DMDC 250 mg/L 添加処理ジュース, 又はワインを大量 2L/日をヒト (体重 55.1 kg) が飲用量した場合の DMDC 換算量 9.1 mg/kg/日の約 60 倍~150 倍以上となり, その安全性は高いと考えられた。

* : (雄 : 565~1401 mg/kg/日) / (ヒト : 9.1 mg/kg/日) = (62~154)

表 26 : ラットの 3 ヶ月間経口投与毒性試験成績

被験物質	DMDC 4,000 mg/L 添加フルーツジュース (オレンジ又はカシス) 及びアルコール飲
------	-------------------------------------------------

	料（ビール又はワイン）							
動物種及び系統	Wistar 系ラット							
投与経路及び期間	飲水投与，3 ヶ月間							
投与量 (mg/L)	オレンジ		カシス		ビール		ワイン	
	0 (対照)	4,000	0 (対照)	4,000	0 (対照)	4,000	0 (対照)	4,000
動物数 (雄/雌)	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15
飲水量 (mL/匹/日)	42/40	43/42	38/37	41/41	32/28	31/27	20/19	24/21
死亡例	0/0	0/0	0/0	0/1*	0/1**	0/0	0/0	0/0
一般状態	—	—	—	—	—	—	—	—
体重	—	—	—	—	—	—	—	—
摂餌量	—	—	—	—	—	—	—	—
飲水量 (mL/kg/日)	242.05/	260.83/	214.98/	225.67/	159.62/	157.47/	122.12/	141.27/
雄/雌	329.28	350.44	305.31	327.01	215.02	203.38	149.84	172.18
尿検査	—	—	—	—	—	—	—	—
血液学的検査	—	—	—	—	—	—	—	—
血液生化学的検査	—	—	—	—	—	—	—	—
剖検	—	—	—	—	—	—	—	—
器官重量	—	—	—	—	—	—	—	—
病理組織学的検査	—	—	—	—	—	—	—	—
無毒性量	4,000 mg/L		4,000 mg/L		4,000 mg/L		4,000 mg/L	
	雄: 1043mg/kg 相当 雌: 1401mg/kg 相当		雄: 903 mg/kg 相当 雌: 1308 mg/kg 相当		雄: 630 mg/kg 相当 雌: 814 mg/kg 相当		雄: 565 mg/kg 相当 雌: 689 mg/kg 相当	
資料番号/GLP	86 /GLP 適用外							

* : 死因は不明。 ** : 採血による事故死， — : 特記すべき所見なし

2) ラットの3 ヶ月間吸入毒性試験⁸⁷⁾

Wistar 系ラット 1 群雌雄各 10 匹に DMDC 0 (対照) , 0.3, 1, 3, 15 mg/m³ の濃度の空気を 1 日 6 時間, 1 週 5 日, 3 ヶ月間吸入投与した。その他, 対照群と高用量群 1 群雌雄各 10 匹には 3 ヶ月間投与後, 6 週間の休薬を行い, 回復性を調べた。その結果, 1 mg/m³ 以上の濃度群では上部気道, 角膜に刺激性の変化が認められ, 15 mg/m³ 群では体重増加抑制, 摂餌量及び飲水量の減少を伴った。脾臓, 胸腺, 副腎重量の減少は DMDC の直接作用と考えるより, ストレスによる二次的な変化とみなされた。いずれの所見も 6 週間の休薬により差がみられない, 又はその程度は軽減しており, 回復性の変化とみなされた。無毒性量は上部気道に刺激性変化のみられない 0.3 mg/m³ (実測値 : 0.23 mg/m³) とみなされた。

表 27 : ラットの 3 ヶ月間吸入毒性試験成績

被験物質	DMDC				
動物種及び系統	Wistar 系ラット雌雄				
投与経路及び期間	吸入投与, 1 日 6 時間曝露, 1 週 5 日間, 3 ヶ月間投与				
投与量 (mg/m ³)	0 (対照)	0.3	1	3	15
動物数 (雄/雌)	20/20*	10/10	10/10	10/10	20/20*
死亡例	—	—	—	—	—
一般状態	—	—	上部気道 : 刺激性変化	上部気道 : 刺激性変化	上部気道 : 刺激性変化

体重	—	—	—	—	↓ (雄)
摂餌量	—	—	—	—	↓ (雄)
飲水量	—	—	—	—	↓ (雄)
直腸温/呼吸機能	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
眼科学的検査	—	—	—	角膜血管増生	角膜血管増生
尿検査	—	—	—	—	—
血液学的検査	—	—	—	—	—
血液生化学的検査	—	—	—	—	—
剖検	—	—	—	—	—
器官重量	—	—	—	↓脾臓, 胸腺, 副腎 (雄)	↓脾臓, 胸腺, 副腎 (雄)
病理組織学的検査	—	—	—	鼻腔, 咽頭, の炎症性変化	鼻腔内の炎症性変化
無毒性量 (mg/m ³)	0.3 (実測値 : 0.23)				
回復性	体重, 摂餌量, 飲水量, 眼科学的所見は休薬により対照群と差がみられず, 病理組織学的変化は休薬によりその程度は軽減し, いずれの所見も回復性的変化とみなされた。				
資料番号/GLP	87 /GLP 適合				

* : 休薬動物を含む。 — : 特記すべき所見なし, ↓ : 減少

3) イヌの1年間経口投与毒性試験⁸⁸⁾

ビーグル犬1群雌雄6匹にDMDCをオレンジ天然果汁(ジュース)に4,000 ppm添加して1年間飲水投与した結果, 飲水量の減少がDMDC添加ジュース群で認められたが, その他の諸検査成績に変化はみられないことから, 飲水量の減少は毒性徴候とは考えられず, 無毒性量はDMDC 4,000 ppm添加群とみなされた。DMDC換算摂取量は雄で284 mg/kg/日, 雌で268 mg/kg/日相当となり, 市販における最大添加量のDMDC 250 mg/L添加処理ジュースをヒト(体重55.1 kg)が大量2L/日を飲用量した場合の雄で24~44倍, 雌で17~38倍を1年間摂取した量となり, その安全性は高いと考えられた。

* : (雄 : 220~400 mg/kg/日) / (ヒト : 9.1 mg/kg/日) = (24~44)

* : (雌 : 160~350 mg/kg/日) / (ヒト : 9.1 mg/kg/日) = (17~38)

表 28 : イヌの1年間経口投与毒性試験成績

被験物質	DMDC 4,000 ppm 添加オレンジ天然果汁 (ジュース)		
動物種及び系統	ビーグル犬		
投与経路及び期間	飲水投与, 1年間		
投与量 (ppm)	0 (市水対照)	0 (ジュース対照)	4,000
動物数 (雄/雌)	6/6	6/6	6/6
飲水量 (mL/匹/日)	1160/1010	840/900	880/700
死亡例	—	—	—
一般状態	—	—	—
体重	—	—	—
摂餌量	—	—	—
飲水量	—	↓ (市水対照と比較)	↓ (市水対照と比較) ↓ : 雌 (ジュース対照と比較)

眼科学的検査	—	—	—
心電図	—	—	—
尿検査	—	—	—
血液学的検査	—	—	—
血液生化学的検査	—	—	—
剖検	—	—	—
器官重量	—	—	—
病理組織学的検査	—	—	—
無毒性量	4,000 ppm (雄 284 mg/kg/日相当 (220~400 mg/kg/日), 雌 268 mg/kg/日相当 (160~350 mg/kg/日))		
資料番号/GLP	88 /GLP 適合		

—：特記すべき所見なし，↓：減少

3 発がん性試験^{89, 90)}

1) ラットの2年間経口投与毒性試験/発がん性併合試験（オレンジ天然果汁）⁸⁹⁾

Wistar系ラット1群雌雄各65匹にDMDCを4,000 ppm添加したオレンジ天然果汁（ジュース）を30ヵ月飲水投与して長期反復投与毒性及び発がん性を調べた。なお、1群雌雄各15匹は投与6ヵ月目に中間屠殺して毒性を調べた。また、この濃度はジュースへの推奨添加量の16倍に相当する。また、この試験条件はDMDC処理ジュースをヒトが摂取する量の80~260倍と推定される。この試験の結果、無処置ジュース対照群と比較して投与群では諸検査成績に差は認められなかった。ただ、市水対照群と比較して、摂餌量の減少、飲水量の増加がみられた。また、病理組織学的検査では、非腫瘍性及び腫瘍性病変ともに対照群と比較して投与群で差は認められなかった。

表 29：ラットの2年間経口投与毒性試験/発がん性併合試験成績

被験物質	DMDC 4,000 ppm 添加オレンジ天然果汁（ジュース）		
動物種及び系統	Wistar系ラット		
投与経路及び期間	飲水投与, 30ヵ月間		
投与量 (ppm)	0 (市水対照)	0 (ジュース対照)	4,000
動物数 (雄/雌)	65/65*	65/65*	65/65*
飲水量 (mL/匹/日)	28/27	51/49	49/47
死亡率	—	—	—
一般状態	—	—	—
体重増加	—	↓ (市水対照と比較して)	—
摂餌量	—	↓ (市水対照と比較して)	↓ (市水対照と比較して)
飲水量	—	↑ (市水対照と比較して)	↑ (市水対照と比較して)
尿検査	—	—	—
血液学的検査	—	—	—
血液生化学的検査	—	—	—
剖検	—	—	—
器官重量	—	↑: 肝・腎・副腎絶対重量 (市水対照と比較して)	—
病理組織学的検査	—	—	—

(6, 30 ヶ月)			
無毒性量	4,000 ppm (雄 518 mg/kg/日相当, 814 mg/kg/日相当)		
資料番号/GLP	89/GLP 適用外		

*: 1 群雌雄各 15 匹は投与 6 ヶ月目に中間屠殺, - : 特記すべき所見なし, ↓: 減少, ↑: 増加

2) ラットの 2 年間経口投与毒性試験/発がん性併合試験 (ワイン) ⁹⁰⁾

Wistar 系ラット 1 群雌雄各 65 匹に DMDC を 4,000 ppm 添加したワインを 30 ヶ月飲水投与して長期反復投与毒性及び発がん性を調べた。なお, 1 群雌雄各 15 匹は投与 12 ヶ月目に中間屠殺して毒性を調べた。その結果, 無処置ワイン対照群と比較して投与群では諸検査成績に差はみられなかった。ただ, DMDC 処置ワインの飲水量の増加, 市水対照群と比較して, 摂餌量の減少が認められた。また, 病理組織学的検査では, 非腫瘍性及び腫瘍性病変ともに対照群と比較して投与群で差は認められなかった。

表 30 : ラットの 2 年間経口投与毒性試験/発がん性併合試験成績

被験物質	DMDC 4,000 ppm 添加ワイン		
動物種及び系統	Wistar 系ラット		
投与経路及び期間	飲水投与, 30 ヶ月間		
投与量 (ppm)	0 (市水対照)	0 (ワイン対照)	4,000
動物数 (雄/雌)	65/65*	65/65*	65/65*
飲水量 (mL/匹/日)	27/25	29/26	38/34
死亡例	—	—	—
一般状態	—	—	—
体重増加	—	—	—
摂餌量	—	↓ (市水対照と比較して)	↓ (市水対照と比較して)
飲水量	—	—	↑
尿検査	—	—	—
血液学的検査	—	—	—
血液生化学的検査	—	—	—
剖検	—	—	—
器官重量	—	—	—
病理組織学的検査 (12, 30 ヶ月)	—	—	(非腫瘍性, 腫瘍性変化)
無毒性量	4,000 ppm (雄 390 mg/kg/日相当, 雌 580 mg/kg/日相当)		
資料番号/GLP	90/GLP 適用外 (Bayer, 1984 ⁹⁰⁾)		

*: 1 群雌雄各 15 匹は 12 ヶ月目に中間屠殺, - : 特記すべき所見なし, ↓: 減少, ↑: 増加

以上より, DMDC の 4,000 ppm 添加オレンジジュース, ワインに催腫瘍性は認められず, その長期反復投与も毒性徴候とされる所見は認められなかった。

4 1 年間反復投与毒性/発がん性併合試験

1 年間反復投与毒性試験/発がん性併合試験は 1 年間経口投与毒性試験及び 2 年間/発がん性併合試験で代替した。

5 生殖毒性試験⁹¹⁾1) ラットの生殖毒性試験⁹¹⁾

Wistar 系ラット 1 群雄 10 匹，雌 20 匹に DMDC をオレンジ天然果汁（ジュース）に 4,000 ppm 添加して 2 世代に渡って飲水投与した。F₀ 出生児は交尾 2 回前 70 日間投与した。その結果，F₀ 及び F₁ とともに一般状態，体重増加，生殖能力，器官重量，病理組織学的所見に被験物質投与による影響は認められなかった。

表 31：ラットの経口投与 2 世代生殖毒性試験成績

被験物質	DMDC 4,000 ppm 添加オレンジ天然果汁（ジュース）		
動物種及び系統	Wistar 系ラット		
投与経路及び期間	飲水投与，2 世代		
投与量（ppm）	0（市水対照）	0（ジュース対照）	4,000
動物数（F ₀ ：雄/雌）	10/20	10/20	10/20
死亡率（F ₀ ，F _{1b} ）	—	—	—
一般状態（F ₀ ，F _{1b} ）	—	—	—
体重増加（F ₀ ，F _{1b} ）	—	—	—
飲水量（F ₀ ，F _{1b} ）	—	↑	—
生存児数/死産児数	—	—	—
一腹あたりの重量	—	—	—
出生児の発育	—	—	—
妊娠期間	—	—	—
剖検	—	—	—
器官重量(F _{1b})	—	—	—
病理組織学的検査	—	—	—
無毒性量	4,000 ppm		
資料番号/GLP	91 /GLP 適用外（Bayer, 1983）		

—：特記すべき所見なし，↓：減少，↑：増加

6 出生前発生毒性試験⁹²⁾1) ラットの出生前発生毒性試験⁹²⁾

Long Evans ラット 1 群雌 25 匹に DMDC をオレンジ天然果汁（ジュース）に 4,000 ppm 添加して妊娠 0 日から 20 日まで飲水投与した。妊娠 20 日に帝王切開を行い，諸検査を実施した。その結果，着床数，1 腹の胎児数，吸収胚数，平均胎児体重，平均胎盤重量，未熟児頻度，軽度な骨格異常の頻度，奇形の頻度は対照群と投与群で差がみられなかった。したがって，この試験条件下では DMDC 添加オレンジジュースの催奇形性はないとみなされた。

表 32：ラットの経口投与出生前発生毒性試験成績

被験物質	DMDC 4,000 ppm 添加オレンジ天然果汁（ジュース）
動物種及び系統	Long Evans ラット
投与経路及び期間	飲水投与，妊娠 0 日から 20 日

投与量 (ppm)	0 (ジュース対照)	4,000
動物数 (雌)	25	25
死亡率	—	—
一般状態	—	—
体重	—	—
飲水量	—	—
着床数	—	—
一腹あたりの胎児数	—	—
吸収胚数	—	—
平均胎児重量	—	—
平均胎盤重量	—	—
未熟児頻度	—	—
骨格観察	—	—
外表/内臓観察	—	—
無毒性量	4,000 ppm	
資料番号/GLP	92 /GLP 適用外 (Bayer, 1980)	

— : 特記すべき所見なし, ↓ : 減少, ↑ : 増加

7 遺伝毒性試験⁹³⁻⁹⁶⁾

1) 微生物を用いる復帰変異試験⁹³⁻⁹⁵⁾

ヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* (ネズミチフス菌) TA98, TA100, TA1535, TA1537 を用いて, ラットの肝ホモジネート画分による代謝活性化法及び直接法により復帰突然変異を調べた結果, 細胞毒性のみられない DMDC 200 µg/プレート及び DMDC 4,000 ppm 添加オレンジ天然果汁 (ジュース) 1,000 µL/プレートまで変異誘発性は認められなかった。

2) げっ歯類を用いる小核試験⁹⁶⁾

マウス雌雄に DMDC 4,000 ppm 添加オレンジ天然果汁 (ジュース) 50 mL/kg を単回経口投与して, 投与後 24, 48, 72 時間目に大腿骨骨髓を採取して検査した結果, 小核を有する多染性赤血球の増加はみられず, 陰性であった。

以上より, DMDC 及び DMDC 添加ジュースに変異原性はないとみなされた。

表 33 : DMDC の遺伝毒性試験成績

試験項目	被験物質	試験条件 菌株/動物種	処理濃度/ 投与量	試験成績	資料番号/GLP
微生物を用いる復帰変異試験					
	DMDC	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537	直接法及び代謝活性化 法 : 1.6, 8, 40, 200, 1,000 µg/プレート	1,000 µg : 細胞毒 性 200 µg 以下 : 陰性	93 /GLP 適用外

	DMDC 4,000 ppm 添加オレンジ天然果汁（ジュース）	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537	直接法及び代謝活性化 法：6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200(TA100), 400(TA100), 500(TA100) μL/プレート	陰性	94 /GLP 適用外
			直接法及び代謝活性化 法：250, 500, 1,000 μL/ プレート	陰性	95 /GLP 適合
げっ歯類を用いる小核試験					
	DMDC 4,000 ppm 添加オレンジ天然果汁（ジュース）	マウス, 骨髄	50 mL/kg	陰性	96 /GLP 適合

● 飲料における反応生成物 N-カルボメトキシ化合物 (N-CMC) の毒性

DMDC はフルーツジュースに含まれるポリフェノール、タンニン、アミノ酸と結合し、種々な N-カルボメトキシ化合物 (N-CMC) を生成する可能性がある。DMDC をフルーツジュースに 250 ppm 添加した場合に、DMDC 約 4 mg/L (1.6%) が最大で結合すると報告されている。(JECFA, 1991³¹⁾) ここでは、一連の N-カルボメトキシ化合物の単回投与毒性について検討した結果、以下のように DMDC との結合により、DMDC の毒性 (LD₅₀) を増強することはなく、むしろ毒性が明らかに減弱した。飲用後、体内で N-カルボメトキシ化合物が代謝され、DMDC とポリフェノール、タンニン、アミノ酸のそれぞれに分離されたとしても、DMDC 約 4 mg/L は、その不安定な物理化学的性状を含めて、毒性学的な意義は低いと考えられる。

1 N-CMC のマウス、ラットの単回投与毒性試験⁹⁷⁾

マウス、ラット雌に一連の N-CMC を経口投与した結果、いずれの化合物も経口 LD₅₀ 値はマウス、ラットともに約 5,000 mg/kg ないし 5,000 mg/kg を超える値であった。経口 LD₅₀ 値はマウス、ラットともに DMDC より明らかに高い値 (5~15 倍) を示した。

表 34 : N-CMC のマウス、ラットの単回投与毒性試験成績

被験物質	動物種	投与経路	性別	LD ₅₀ (mg/kg)	資料番号/GLP
N-カルボメトキシアラニン	マウス	経口	雌	5,534	97 /GLP 適用外
	ラット	経口	雌	約 6,000~6,500	
N-カルボメトキシアルギニン×1/2H ₂ O	マウス	経口	雌	>15,000	97 /GLP 適用外
	ラット	経口	雌	>15,000	
N-カルボメトキシアスパラギン	マウス	経口	雌	>15,000	97 /GLP 適用外
	ラット	経口	雌	約 15,000	
N-カルボメトキシ	マウス	経口	雌	6,397	

ジシステイン	ラット	経口	雌	>10,000	97 /GLP 適用外
N-カルボメトキシ グルタミン酸	マウス	経口	雌	6,390	97 /GLP 適用外
		経口	雌	5,435	
	ラット	経口	雌	>8,000	
		経口	雌	>15,000	
N-カルボメトキシ グリシン	マウス	経口	雌	6,275	97 /GLP 適用外
	ラット	経口	雌	6,000~7,000	
N-カルボメトキシ ヒドロキシプロリン	マウス	経口	雌	9,115	97 /GLP 適用外
	ラット	経口	雌	約 12,000	
N-カルボメトキシ ロイシン	マウス	経口	雌	4,633	97 /GLP 適用外
	ラット	経口	雌	>5,000	
N-カルボメトキシ モノシステイン	マウス	経口	雌	4,733	97 /GLP 適用外
	ラット	経口	雌	>4,000	
N-カルボメトキシ フェニルアラニン	マウス	経口	雌	6,926	97 /GLP 適用外
N-カルボメトキシ プロリン	マウス	経口	雌	5,403	97 /GLP 適用外
	ラット	経口	雌	6,000~10,000	

亜急性毒性試験，発がん性試験，1年間反復投与毒性試験，生殖発生毒性試験，遺伝毒性試験等，その他毒性試験は実施していない。

● 飲料における反応生成物炭酸メチルエチル（MEC）の毒性

DMDC は飲料中のエタノール（ワインで約 11%～14%含有）と反応して，極めて微量な MEC を生成する。Stafford & Ough, 1976⁹⁸⁾によれば，11.9%のアルコール含有飲料に DMDC を約 200 ppm 添加した場合に MEC の生成量は 10 ppm（飲料の 0.001%）未満と報告されている。その単回投与毒性，3 ヶ月投与毒性，催奇形性について検討した結果，以下の成績のように DMDC の毒性試験成績より明らかに弱かった。

1 MEC の単回投与毒性試験⁹⁹⁾

マウス，ラット雌に MEC を経口及び腹腔内投与を行った結果，経口 LD₅₀ 値はマウス，ラットともに 15,000 mg/kg を超える値で，腹腔内 LD₅₀ 値はマウスで 3,537 mg/kg，ラットで 2,885 mg/kg であった。経口 LD₅₀ 値は DMDC と比較してマウスで 20 倍，ラットで 40 倍以上と明らかに高く，その単回投与毒性の弱いことが示唆された。

表 35 : MEC のマウス，ラットの単回投与毒性試験成績

動物種	投与経路	性別	MEC LD ₅₀ (mg/kg)	資料番号/GLP
マウス	経口	雌	>15,000	99 /GLP 適用外
	腹腔内	雌	3,637	
ラット	経口	雌	>15,000	
	腹腔内	雌	2,885	

2 MEC の 90 日間経口投与毒性試験¹⁰⁰⁾

Wistar 系ラット 1 群雌雄各 20 匹に MEC を 0 (対照) , 0.1, 0.3, 1.0%濃度で飲水に混入して 3 ヶ月以上与えた。ただし, 対照群は雌雄 40 匹とした。ラットは毎日一般状態を観察し, 体重, 摂餌量, 飲水量を毎週測定した。その結果, 生存率, 体重増加には MEC の影響はみられなかった。血液学的検査を投与 1 及び 3 ヶ月目に 1 群雌雄各 5 匹について実施した結果, MEC による変化は認められなかった。尿検査及び血液生化学的検査成績では, 肝臓及び腎臓に及ぼす影響はみられなかった。また, MEC による血糖, コレステロールへの影響も認められなかった。試験終了時にラット全例について剖検し, 病理組織学的検査を行った。その結果, 絶対及び相対器官重量には投与量に応じた変化はなかった。病理組織学的検査では, 形態学的な変化又は毒性学的に意義ある変化はみられなかった。このことから, MEC の無毒性量は 1.0%とみなされた。(Löser, 1973¹⁰⁰⁾)

以上より, MEC の無毒性量 1.0% (10,000 mg/L) は, DMDC の 250 mg/L 添加における MEC の最高 5%生成量 (12.5 mg/L) に比較して 800 倍高く, その反復投与時の安全性は高いとみなされる。

3 MEC の出生前発生毒性試験¹⁰¹⁾

Long Evans 系妊娠ラット雌各 20 匹に MEC を 0 (対照) , 0.01, 0.1, 1.0%濃度で飲水に混入して妊娠 6 日から 15 日まで与えた。妊娠 20 日に全例を屠殺して, 子宮内を検査した結果, いずれの母体にも毒性徴候はみられなかったが, 飲水量の減少が高用量 1.0%群で認められた。体重増加抑制が投与群でみられた。着床数, 吸収胚数, 生存児数, 胎児重量, 胎盤重量には投与による影響は認められなかった。骨格異常が胎児 4 例に認められたが, いずれの群にも散発し, 投与との関連は明らかでなかった。投与に関連した奇形はみられなかった。このことから, MEC の 1.0%以下の濃度では胎児毒性, 催奇形性はみられないと報告している。(Machemer, 1976¹⁰¹⁾)

● 飲料における加水分解生成物カルバミン酸メチル (MC) の毒性

カルバミン酸メチル(MC)はアンモニア/アンモニウムイオンの存在下, すなわち, フルーツジュースやワインで DMDC の加水分解により生成されることが報告されている。

(JECFA, 1991³¹⁾) その単回投与毒性, 1 週間, 2 週間, 13 週間, 生涯投与毒性, 変異原性について調べた結果, 以下の成績のように DMDC の毒性を増強する所見はなく, 分解物の生成量を考慮するとその安全性は高いと考えられる。

なお MC の生成は飲料中の NH₃濃度, pH の上昇とともに増加するが, 一般的な飲料 (NH₃濃度 20 mg/L 以下, pH 3.75 以下) で, DMDC 100 mg/L の添加で MC 10 µg/L (0.01%) 未満の生成との報告がある。(Ough & Langbehen, 1976¹⁰²⁾) ワインにおける分析では約半数では MC が検出されなかったが, 検出されたものでは 4 µg/L であった。

1 MCの単回投与毒性試験¹⁰²⁻¹⁰⁸⁾

マウス，ラットにMCを経口及び腹腔内投与を行った結果，経口LD₅₀値はマウスでは約5,000～6,000 mg/kg，ラットでは約2,500～5,000 mg/kg，腹腔内LD₅₀値はマウスで4,500 mg/kg，ラットで3,400～3,900 mg/kgであった。経口及び腹腔内LD₅₀値ともにDMDCよりマウス経口投与で約7倍，ラット経口投与で20倍以上高く，DMDCからMCの生成量（0.01%）（Suvalova, 1973¹⁰³⁾）を考慮すると，その単回投与毒性の弱いことが示唆された。

表 36 : MC のマウス，ラットの単回投与毒性試験成績

動物種	投与経路	性別	MC LD ₅₀ (mg/kg)	資料番号/GLP
マウス	経口	雄	6,200	103 /GLP 適用外
		雌	6,310	104 /GLP 適用外
		雌雄	4,925	105 /GLP 適用外
	皮下	雌	4,450	106 /GLP 適用外
ラット	経口	雄	4,287	105 /GLP 適用外
		雌	2,462	105 /GLP 適用外
		雌	4,935	107 /GLP 適用外
		雌	3,900	108 /GLP 適用外
	皮下	雄	3,900	108 /GLP 適用外
		雌	3,400	

2 MCの1及び2週間経口投与毒性試験^{105, 109)}

MCの90日間経口投与毒性試験を実施して検討しているが，マウス，ラットにおける1又は2週間反復経口投与毒性試験も報告されているので，その成績を示す。

B6C3F₁マウス1群雌雄各5匹にMC 0（対照），250，500，1,000，2,000，4,000 mg/kgを16日間飲水投与した。一般状態は1日2回観察，体重は投与1，8，15日目に測定した。剖検は全例について行ったが，病理組織学的検査は1,000 mg/kg群とした。その結果，4,000 mg/kg群全例，2,000 mg/kg群雄全例，雌1例が死亡した。1,000 mg/kg群では，剖検，病理組織学的検査で被験物質に起因した変化は認められなかった。（NTP, 1987¹⁰⁵⁾）

Wistar系ラット1群雄5匹にMC 0（対照），250，500，1,000 mg/kgを1日1回7日間連日強制経口投与した。一般状態は1日2回観察した。体重，摂餌量，飲水量は試験開始前と試験終了時に測定した。試験最終日に採血を行い，諸検査を実施した。その結果，1,000 mg/kg群に死亡例1例が認められた。500，250 mg/kg群では，一般状態，体重，摂餌量，飲水量，血液生化学的検査における肝機能に意義ある変化はみられなかった。1,000 mg/kg群では，一般状態の悪化，体重増加抑制，摂餌量及び飲水量の減少，コレステロールの増加及び血漿トリグリセリドの減少が認められた。このことは，脂質代謝に及ぼす影響が示唆された。FisherラットにMCを投与してみられた肝細胞の障害はWistar系ラットでは認められなかった。（Bomhard & Kaliner, 1984¹⁰⁹⁾）

Fisher-344 ラット 1 群雌雄各 5 匹に MC 0 (対照) , 250, 500, 1,000, 2,000, 4,000 mg/kg を 16 日間飲水投与した。一般状態は 1 日 2 回観察した。体重は投与 1, 8, 15 日に測定した。剖検はいずれの群も行い、病理組織学的検査は 500 mg/kg 群について実施した。その結果、2,000, 4,000 mg/kg 群では全例死亡した。1,000 mg/kg 群では雄 5 例中 3 例が死亡した。500mg/kg 群雌雄では、剖検、病理組織学的検査で被験物質に起因した変化は認められなかった。(NTP, 1987¹⁰⁵)

3 MC の 90 日間経口投与毒性試験^{105, 110, 111)}

B6C3F₁ マウス 1 群雌雄各 10 匹に MC 0 (対照) , 93.75, 187.5, 375, 750, 1,000 mg/kg (雄) , 0 (対照) , 125, 250, 500, 1,000, 2,000 mg/kg (雌) を 13 週間強制経口投与した。2,000 mg/kg 群雌 1 例は投与 4 週目に死亡した。嗜眠、運動失調、呼吸促迫が高用量群雄、高用量 2 群雌で投与開始 3 週間以上にわたって認められたが、それ以後は、一般状態に変化はみられなかった。体重増加抑制、肝臓の炎症性変化が 2,000, 1,000 mg/kg 群で認められた。剖検では、いずれの投与群も変化は認められなかったが、病理組織学的所見では肝臓の炎症性の変化、一部で壊死性変化が雄で、投与用量に応じてみられた。雌ではいずれの例にも変化は認められなかった。(NTP, 1987¹⁰⁵, Questら, 1987¹¹⁰)

Fisher-344 ラット 1 群雌雄各 10 匹に MC 0 (対照) , 50, 100, 200, 400, 800 mg/kg (雄) , 0 (対照) , 62.5, 125, 250, 500, 1,000 mg/kg (雌) を 1 週 5 日間 13 週間強制経口投与した。一般状態、生死確認は 1 日 2 回実施した。生存例全例は投与 13 週目に屠殺し、病理組織学的検査は対照群と最高用量群全例について行った。また、組織学的に変化がみられた場合には、変化のみられない用量群まで検査を行った。肝細胞の有糸分裂係数も測定した。その結果、最高用量群では雄 10 例中 5 例、雌 10 例中 4 例の死亡例がみられた。雄では 200 mg/kg までの用量群、雌では 250 mg/kg までの用量群で毒性徴候は観察されなかった。その他の群では、肝臓の Kupffer 細胞の着色、細胞内の好塩基性封入体、好塩基性/抗酸性/明細胞の肝病巣及び肝細胞変性領域が用量に応じてみられた。異型分裂を含む有糸分裂指数の増加も認められた。高用量群では、体重増加抑制、明らかな肝障害、骨髄の一部の委縮、脾臓着色の増大、精巣委縮が認められた。(NTP, 1987¹⁰⁵; Quest, 1987¹¹⁰)

Wistar 系ラット 1 群雌雄各 5 匹に MC 0 (対照) , 200, 400, 800 mg/kg を連日 13 週間強制経口投与した。さらに、1 群雌雄 5 匹については MC 0 (対照) , 800 mg/kg を飲水投与して、投与 4 週目に屠殺した。その結果、200mg/kg 群では、一般状態、体重増加、摂餌量、飲水量に変化はみられなかった。400 mg/kg 以上の用量群では、体重増加抑制、摂餌量の減少が認められた。800 mg/kg 群 1 例では、投与 4 週目に非特異的な徴候を示して、死亡した。800 mg/kg 群雌雄では、強制経口投与、飲水投与ともに、アルカリホスファターゼの減少、トランスアミナーゼ (GOT 及び GPT) , コレステロール、トリグリセリドの増加が認められたが、その変化は軽微で、病理組織学的所見には変化はみられなかった。Kupffer 細

胞の色素沈着の増加が 800 mg/kg 群雌雄の強制経口投与、飲水投与で認められた。剖検では、高用量群雌雄で精巣重量及び脾臓重量の減少がみられ、MC による毒性徴候とみなされた。これらの変化は Fisher-344 ラットで行った試験でも認められたが、Wistar 系ラットでは、Fisher-344 ラットでみられた肝臓障害は認められなかった。これは種差、又は他の代謝系によるものと考えられるが、肝臓障害を除き、Fisher-344 ラットにおける成績と良く一致した。(Bomhard & Karbe, 1985¹¹¹⁾)

以上より、Fisher-344 ラットでは、高用量群で肝毒性がみられたが、Wistar 系ラットでは、認められず、標的器官に種差が認められた。いずれにしても、MC の 13 週間経口投与の無毒性量は Fisher-344 ラットで雄 200 mg/kg、雌 250 mg/kg、Wisher 系ラットで 200 mg/kg とみなされ、DMDC から MC の生成量 (0.01%) を考慮すると、その反復投与毒性における安全性は極めて高いとみなされた。

4 MC の発がん性試験^{78, 104, 105, 107, 112-119)}

NMRI マウス 1 群雌雄各 75 匹に MC を 0.5, 2.5, 12.5, 62.5 mg/kg とするよう飲水に混入して、雌雄 1:1 で交配前 3 週間投与した。交尾後は、雌に投与を継続して、F₀ 試験終了時に相当する 4 週間の授乳期間終了時まで与えた。F₁ 出生児は 4 週齢で無作為に選別して同じ濃度の MC を与えた。このようにして、MC に感受性を高めたマウス 1 群 54-64 匹に MC を生涯投与し、瀕死時又は投与 818 日に屠殺して発がん性を調べた。全てのマウスの剖検を行い、すべての腫瘍及び腫瘍を含む組織を採取して固定した。病理組織学的検査は高用量 2 群について実施した。その結果、腫瘍の頻度はいずれの群も差はなく、用量相関もみられなかった。また、腫瘍の種類は正常範囲内であった。したがって、MC は本試験条件下では発がん性はないとみなされた。(Steinhoff, 1978¹⁰⁴⁾)

B6C3F1 マウス 1 群雌雄 50 匹に MC を 0 (対照), 500, 1,000 mg/kg とするよう飲水に混入して週 5 日、103 週間飲水投与した。また、1 群雌雄 30 匹に MC を 0 (対照), 1,000 mg/kg 同様に飲水に混入して、6, 12, 18 ヶ月目に屠殺する群を設けた。一般状態は毎日観察し、試験期間中の死亡例又は瀕死状態で屠殺した例はすべて剖検した。すべての臓器・組織は肉眼で病変を観察した。病理組織学的検査は高用量群と対照群について実施し、肉眼的に病変のみられた部位は投与群に関係なく検査した。また、MC に関連した標的器官についても実施した。

その結果、MC に関連した腫瘍性変化は 6, 12, 18 ヶ月試験では認められなかった。2 年間試験では、高用量 (1,000 mg/kg) 群雄の平均体重は対照群と比較して投与 24 週目以降 8%~18% 減少した。1,000 mg/kg 群雌の平均体重は対照群と比較して、投与 16 週目で 16%、投与 64 週目で 30% 減少した。投与群の生存率は対照群と比較して差がみられなかった (雄: 8/50, 35/50, 28/50, 雌: 38/50, 36/50, 32/50)。2 年試験では、肝臓に多核巨細胞の頻度増加が投与群雄でみられた (14/50, 31/50, 31/49)。肺の組織球増生、腺腫様過形成が投与群雄で認められた (腺腫様過形成; 雄: 13/50, 19/50, 24/49, 雌: 9/49,

10/50, 21/50)。MC 500, 1,000 mg/kg 群では雌雄ともに発がん性はないとみなされた。
(NTP, 1987¹⁰⁵⁾)

Swiss マウスに MC 0 (対照), 800mg/kg, カルバミン酸エチル (EC) 590 mg/kg を出生後 1, 10, 25 日目に経口投与した。出生児の母動物には妊娠 13, 16, 17 日目に MC 及び EC を同様な用量で投与した。マウスは生涯飼育して腫瘍の発生を調べた。MC は対照群と比較して腫瘍の発生頻度に差がなかったが, EC では, 肺腺腫が増加した。ただ, MC は対照群では死亡率が高かったことから, 発がん性が十分に検出できなかった懸念もあり, この結果からは催腫瘍性について断定できなかった。(Port ら, 1980¹¹²⁾)

Wistar 系ラット 1 群雌雄各 75 匹に MC 0 (対照), 0.5, 2.5, 12.5, 62.5 mg/kg となるよう飲水に混入して, 雌雄 1:1 交配前 3 週間投与した。交尾後は, 雌に投与を継続して, F₀ 試験終了時に相当する 4 週間の授乳期間終了時まで与えた。F₁ 出生児は 4 週齢で無作為に選別して同じ濃度の MC を与えた。このようにして, MC に感受性を高めたマウス 1 群 54-62 匹に MC を生涯投与して発がん性を調べた。

その結果, 交配による産児数には対照群と投与群で差はみられなかったが, 最高用量群では軽微な減少が認められた。一般状態, 行動には投与に関連した変化はみられなかった。また, 生存時間/期間は対照群と投与群で差は認められなかった。体重増加は最高用量群ではその他の投与群, 対照群と比較して抑制がみられた。試験終了時に全例を剖検して, 全ての腫瘍性変化について病理組織学的検査を行った結果, 投与に関連した剖検所見はみられず, MC による腫瘍性変化も認められなかった。また, 良性腫瘍の頻度は対照群と比較して最高用量群では減少した。これらのことから, Wistar 系ラットにおける MC の発がん性はないとみなしている。(Steinhoff, 1977¹⁰⁷⁾)

Fisher-344 ラット 1 群雌雄 50 匹に MC 0 (対照), 100, 200 mg/kg を 1 週 5 日, 103 週間強制経口投与した。その他, 1 群雌雄各 30 匹に MC 0 (対照), 400 mg/kg を 1 週 5 日投与して, 投与 6, 12, 18 ヶ月目にそれぞれ 1 群雌雄各 10 匹屠殺して, 諸検査を実施した。一般状態は 1 日 2 回観察し, 死亡例, 瀕死例は剖検に供した。全ての器官・組織, 肉眼で異常のみられる部位は病理組織学的検査を行った。

その結果, 投与 6 ヶ月では, 対照群, 400 mg/kg 群で死亡例はみられなかったが, 投与例全例に肝臓に細胞学的変化, 異型細胞の浸潤がみられた。投与 12 ヶ月では 400 mg/kg 群雄 1 例が死亡した。腫瘍性の結節が投与群雄 10 例中 7 例, 雌 10 例中 9 例にみられ, 肝細胞癌が投与群雄 10 例中 8 例, 雌 10 例中 6 例に認められた。投与 18 ヶ月では, 400 mg/kg 群雄 9 例, 雌 2 例が死亡した。肝細胞癌は投与群雄 10 例中 9 例, 雌 10 例中 8 例に認められた。

2 年投与では, 対照群と比較して, 体重増加抑制が高用量群 (200 mg/kg) 群雄で投与 20 週以降, 雌で投与 56 週以降にみられた。生存率は対照群と投与群で差が認められなかった (対照群雄: 19/50, 低用量群雄: 16/50, 高用量群雄: 29/50, 対照群雌: 29/50, 低用量群雌: 36/50, 高用量群雌: 35/50)。肝臓に慢性炎症巣及び細胞変性の頻度増加が高用

量群雌雄でみられた。肝細胞過形成の頻度増加は投与群雄，高用量群雌で認められた。肝細胞癌は雌では投与量に応じて有意な増加傾向（対照群：0/50，低用量群：0/50，高用量群：6/49）がみられ，肝細胞癌ないし腫瘍性結節の頻度は対照群と比較して高用量群雌では高かった。投与群雄における肝腫瘍の頻度は対照群と比較して有意な差は認められなかった（対照群雄：4/50，低用量群雄：0/50，高用量群雄：7/49）。ハーダー腺の炎症性変化の頻度が投与群で高かった（雄：4/50；11/50；16/50，雌：7/50；16/50；30/50）。この変化は被験物質によるものと考えられた。ラットにおける2年試験では，白血病（雌雄），下垂体腫瘍（雄），副腎腫瘍（雄），乳腺腫瘍（雌）の頻度が投与群で減少した。

これらの肝細胞腫瘍/浸潤性変化の頻度増加から，MCはFisher-344ラット雌雄に発がん性のあることが明らかである。また，MCはハーダー腺に炎症性変化をじゃっ起させる。（NTP，1987¹⁰⁵⁾

Wistarラット雌雄（匹数不明）にMC 0（対照），3,100 mg/kg，EC 1,300 mg/kgを生涯にわたり1日1回経口投与して腫瘍の発生を調べた。その他，妊娠19日にMC 1,300，1,700 mg/kg，EC 1,300 mg/kgに投与した母動物からの出生児も調べた。その結果，MCに催腫瘍性は認められなかったが，ECでは，出生後に投与された群で発がん性の可能性が疑われた。この結果はがん原性を調べるために十分な試験計画とは言えず，催腫瘍性がないとは断定できなかった。（Portら，1980¹¹²⁾

以上より，Fisher-344ラットではMC投与による肝細胞腫瘍の発生が確認されたが，Wistar系ラットではみられないこと，変異原性試験では陰性であることを考えると，Fisher-344ラットに特異的な反応とみなされる。（IARC，1976¹¹³⁾

この原因として，Wistar系ラット及びFisher-344ラットでは，肝酵素及び腎排泄の違いが，この種特異的な肝臓の変化をじゃっ起させたと推察している。（Schmidt & Schmidt，1987⁷⁷⁾

その他，肺の発がん物質に感受性の高いStrain Aマウス雌雄にMC 0.5（46匹），1.0（43匹），2.0 g/kg（49匹）を週1回，13週間腹腔内投与して肺腫瘍を調べた結果，対照群と投与群で有意な差は認められなかったと報告している（IARC，1976¹¹³⁾；Larsen，1974¹¹⁴⁾。

また，マウスを用いてEC誘発皮膚腫瘍にカルバミン酸誘導体及びECを併用して催腫瘍性を調べた。MC 5，10，20 mg/kgとEC 25mg/kgを併用皮下投与した結果，EC単独投与群と比較して腫瘍の発生頻度の増加はみられなかった。（Pound，1972¹¹⁵⁾

”S”マウス雄20匹にMC 25%液を経皮投与した。週1回15週間の塗布でMC 1.12gを投与したことになる。MC投与開始3日目よりクロトン油（5%をアセトンに溶解して0.3 mL）を18週間適用した。クロトン油投与終了時に生存例18匹を屠殺した。18例中1例に皮膚に腫瘍が認められたが，クロトン油単独に投与した群20例中1例にも腫瘍がみられており，MCは本実験下では催腫瘍性はないとみなされた。（Roe & Salaman，1955¹¹⁶⁾

Crackenbush マウスに標識したカルバミン酸 6 mg (6 μ Ci) を単回腹腔内投与し DNA の結合能を調べた。DNA を抽出、放射能を調べた結果、MC と真皮及び表皮の DNA が共有結合し、投与後 6~12 時間目が最大値を示した。(Pound & Lawson, 1976¹¹⁷⁾)

A/He 系マウスを用いて MC の肺腫瘍の誘発性を調べた。マウス 16 匹に MC を週 3 回腹腔内投与 12 回実施した。総量 60 mg を投与した。最終投与後 20 週目にマウスを屠殺して肺の腫瘍を調べた。MC 投与マウスの肺腫瘍発生頻度は 6% で、水媒体対照群は 19%、無処置対照群は 7% であった。またマウスあたりの肺腫瘍数は平均 0.1 で水媒体対照群 0.2、無処置対照群は 0.1 であった。このことから本試験では MC に発がん性はないとみなされた。(Shimkin ら, 1969¹¹⁸⁾)

雄性マウスに MC 1mg/kg を 2 日間隔で 3 回皮下投与を行い、3 ヶ月間観察した。また、MC 0.1 mg/kg を 3 回皮下投与して 6 ヶ月間観察する群も設けた。3 ヶ月間で 29 例中 6 例に肺腺腫を認めた。対照群では肺腺腫は 22 例中 3 例に認められた。6 ヶ月間観察例では、26 例中 2 例に肺腺腫がみられ、対照群では 26 例中 0 例であった。このことから、MC は本試験条件下では発がん性はないとみなされた。(Yagubov ら, 1973¹¹⁹⁾)

5 MC の遺伝毒性試験^{105, 113, 120~137)}

MC の遺伝毒性について、微生物を用いる復帰変異試験、培養細胞を用いる染色体異常試験、DNA に及ぼす影響について調べた結果を以下に示した。ほとんどの試験結果は陰性であったが、一部では陽性もみられた。

なお、ヒトの平均寿命を 70 年と見積もり、毎日ワインを平均 250 mL、50 年間摂取したとすると MC の生涯平均 1 日摂取量は 55.7×10^{-6} mg/kg (ヒトの体重を 60 kg とする、体重 55.1 kg の場合 60.8×10^{-6} mg/kg) と試算される。この条件下での生涯最大リスクは 2.98×10^{-8} と見積もられる。1 日ワインを 1 L 摂取したとしても、生涯最大リスクは $1 \sim 2 \times 10^{-7}$ となる。(Hahnemann, 1986¹²⁰⁾) DMDC 処理した清涼飲料水における MC のリスク評価を一般的な例 (変異原性がん原性陽性を高濃度で曝露) で試算した。DMDC 処理清涼飲料水を生涯 70 年間 1 日 1.0~1.5 L 摂取したとして、清涼飲料水の DMDC 250 mg/L から MC 6 μ g/L 曝露し、論理的には生涯最大のリスクは 1×10^{-7} と試算され、そのリスクは無視できる。(Hahnemann, 1986¹²¹⁾) IARC では、動物における発がん性に関する意義ある報告はみられていないが、関連化合物の成績も考慮する必要がある。また、ヒトでは発がん性に関する症例報告も疫学的な試験も得られていない。(IARC, 1974¹²²⁾, 1976¹¹³⁾)

表 37 : MC の遺伝毒性試験成績

試験項目	試験条件 菌株/動物種	処理濃度/ 投与量	試験 成績	資料番号/GLP
微生物を用いる復帰変異試験				
	<i>B. subtilis</i> 1681	5, 6 %	陰性	123 /GLP 適用外
	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1536, TA1537, TA1538	直接法及び代謝活性化法: 1,000 μ g/プレート	陰性	124 /GLP 適用外

	<i>E. coli</i> B/Sd-4/1, 3, 4, 5, B/Sd-4.3, 4	4~8 %	陰性	125 /GLP 適用外
	<i>E. coli</i> Sd-4	50, 80 mg/mL	陰性	126 /GLP 適用外
	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1538	直接法及び代謝活性化法： 500 µg/プレート	陰性	127 /GLP 適用外
	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537	直接法及び代謝活性化法： 10~1,000 µg/プレート	陰性	128 /GLP 適用外
	<i>S. typhimurium</i> TA97, TA98, TA100, TA1535	直接法及び代謝活性化法： 10 mg/プレート	陰性	105 /GLP 適用外
培養細胞を用いる染色体異常試験				
	<i>A. nidulans</i>	0.4 mg/mL	陰性	129 /GLP 適用外
	マウスリンフォーマ L5178 Y/TK	約 2,821~21,208 µg/mL	陰性	130 /GLP 適用外
	マウスリンフォーマ L5178 Y/TK	直接法及び代謝活性化法： 最大 5 mg/mL	陰性	105 /GLP 適用外
遺伝子突然変異を指標とする試験				
	ショウジョウバエ(劣性致死試験)	直接法及び代謝活性化法： 25,000~50,000 ppm	陰性	105 /GLP 適用外
染色体異常を指標とする試験				
優性致死試験	マウス	200, 1,000 mg/kg i.p.	陰性	131 /GLP 適用外
DNA損傷を指標とする試験				
DNA修復試験	<i>S. cerevisiae</i> D3	直接法及び代謝活性化法： 5 %	陰性	132 /GLP 適用外
	<i>E. coli</i> pol A ⁻	直接法及び代謝活性化法： 250 µg/mL	陰性	127 /GLP 適用外
	<i>E. coli</i> WP-2, WP-2 uvrA, CM611, WP-100, W-3110 pol A [±] , P3478 pol A	直接法及び代謝活性化法： 5,000 µg/試験	陰性	133 /GLP 適用外
	<i>B. subtilis</i> H-17 rec [±] M-45 rec	直接法及び代謝活性化法： 5,000 µg/試験	陰性	134 /GLP 適用外
不定期DNA合成 (UDS) 試験	F344 ラット肝細胞	1.0~1,000 µg/mL	陰性	105 /GLP 適用外
姉妹染色分体交 換 (SCE) 試験	マウス (骨髄, 肺, 肝臓)	直接法及び代謝活性化法： ip : 6.75 mmol/kg	陰性	135 /GLP 適用外
	CHO 細胞	最大 5 mg/mL	陰性	105 /GLP 適用外
	マウス (肺胞マクロファージ, 骨髄, 肝臓)	i.p. : 2.2, 6.6 mmol/kg	陰性	136 /GLP 適用外
形質転換試験	SHEM 細胞	0.05~50 µg/mL	陰性	137 /GLP 適用外
	白血病ウイルス感染 F344 ラット 胚細胞	12.0~1,200 µg/mL	陽性	137 /GLP 適用外

● DMDC の製造工程における副成物炭酸ジメチル (DMC) の毒性

DMDC の精製工程で、DMDC から CO₂ が放出され DMC が生成される可能性があり、DMDC の規格では DMC が最高 0.2% (0.5 mg/L) となっている。ここでは、その単回投与毒性、3 ヶ月間投与毒性について調べた結果、以下の成績のように DMDC の毒性を増強する所見は認められず、副成物の生成量を考慮すると、その安全性は高いと考えられる。

1 DMC の単回投与毒性試験¹³⁸⁾

マウス及びラット雌に DMC を経口及び腹腔内投与を行った結果、経口 LD₅₀ 値はマウスで 10,163 mg/kg, ラットで 10,349 mg/kg であった。腹腔内 LD₅₀ 値はマウスで 3,222 mg/kg, ラットで 2,848 mg/kg であり、経口及び腹腔内 LD₅₀ 値ともに、DMDC よりマウス経口で 10 倍以上、ラット経口で 30 倍以上高い値を示した。また、DMC は最大 0.2% 含有を考慮すると、その単回経口投与における毒性学的意義は極めて低いと考えられる。

表 38 : DMC のマウス, ラットの単回投与毒性試験成績

動物種	投与経路	性別	DMC LD ₅₀ (mg/kg)	資料番号/GLP
マウス	経口	雌	10,163	138 /GLP 適用外
	腹腔内	雌	3,222	138 /GLP 適用外
ラット	経口	雌	10,349	138 /GLP 適用外
	腹腔内	雌	2,848	138 /GLP 適用外

2 DMC の 90 日間経口投与毒性試験¹³⁹⁾

Wistar 系ラット 1 群雌雄各 20 匹に DMC を 0 (対照), 0.1, 0.3, 1.0% 濃度で飲水に混入して 3 ヶ月間以上与えた。雌雄ラットの生存率、一般状態には 1.0% 群まで変化はみられなかった。また、体重増加には DMC による影響は認められなかった。臨床化学的検査を投与 1 及び 3 ヶ月目に 1 群雌雄各 5 匹について実施した。その結果、血液学的検査成績には、いずれの投与群ともに DMC による毒性徴候はみられなかった。血液生化学的検査成績では、いずれも背景データ範囲内の値で対照群と差は認められなかった。尿検査を投与 1 及び 3 ヶ月目に 1 群雌雄各 5 匹について実施した結果、対照群と投与群で差はみられなかった。3 ヶ月間の試験終了時にラット全例について剖検し、心臓、肺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣及び卵巣重量を測定した。その結果、絶対及び相対器官重量には投与量に応じた変化はなかった。29 器官及び組織試料をブアン液で固定し、肝臓の左葉は脂肪染色のためにホルマリン・カルシウム固定を行った。その結果、病理組織学的検査成績には DMC の 1.0% 濃度までの群雌雄のいずれの器官にも変化はみられず、投与に関連した肝脂肪の増加も認められなかった。このことから、DMC の 3 ヶ月間投与における無毒性量は 1.0% (10,000 mg/L) 飲水投与とみなされた。(Eiben ら, 1982¹³⁹⁾)

以上より、DMC の無毒性量 (10,000 mg/L) は DMDC の 250 mg/L 添加における DMC の最高 0.2% の含有量 (0.5 mg/L) と比較して 20,000 倍高く、その反復投与時の安全性は高いとみなされる。

● 分解物メタノールの毒性

DMDC の分解によりメタノールは重量比で 47.8 % 生成し、飲料に最大 250 mg/L を添加

した場合、メタノール濃度は最大 120 mg/L を生成する³。しかし、この濃度のメタノールは、動物及び植物に天然に存在するもので、血液、尿、唾液及び呼気中の常成分である。また、霊長類と非霊長類ではメタノール代謝が異なり、毒性発現にバラツキのあることも良く知られている。毒性の差異はメタノールの代謝物であるギ酸の代謝速度との差と言われ、霊長類のギ酸の血中クリアランスはげっ歯類に比べて 50%遅く、霊長類にみられるメタノール毒性は代謝性アシドーシスと眼毒性とされている。メタノールで報告されている一連の動物の毒性試験成績を以下のように調べて検討した結果、飲料に添加した量並びにメタノールの代謝を考慮すると、その安全性は極めて高いと考えられる。

メタノールの代謝・毒性における動物種差について体内動態試験成績を加えて以下のよう

にまとめた。
Roe⁷²⁾によれば、エタノール未摂取で、未投薬の健常なヒトにおけるメタノールの致死量は約 1g/kg と推定している。メタノールのヒトでの代謝速度に関する資料はないが、アカゲザルでは、37 mg/kg/hr と報告されており、ヒトも同様と考えられる。ヒトで重篤なアシドーシスがじゃっ起されるまでの時間は 18 時間で、この間のメタノールの代謝量は 0.666 g/kg とされ、ヒトでの最小致死量 1 g/kg と良く符合する。一方、げっ歯類のラット、ウサギ、非げっ歯類のイヌの最小致死量はそれぞれ、9.5, 7, 8 g/kg と報告されている。このヒトにおける致死量 1 g/kg は代謝性アシドーシスによる影響が示唆され、死亡例では、血中ギ酸濃度が高い値を示した。一方、ラットやウサギでは、血中ギ酸濃度の上昇は認められず、イヌ、サルでは、血中ギ酸濃度の上昇並びに代謝性アシドーシスを認めたもののヒトと比べて、その値は低かった。これらのことから、ヒトで重篤な一般状態（おう吐、クスマウル呼吸、背部の疼痛等）並びに弱視や黒内障を示し、失明に至った血中ギ酸濃度は、サルの重篤な代謝性アシドーシスが認められる量より更に高い値であることから、メタノールの代謝量を下回る摂取では血中ギ酸濃度の上昇はみられず、毒性発現はないとみなされた。

これらの最小致死量、用量に応じた一般状態、メタノールの毒性についての動物種間差を表 39 にまとめる。

表 39：メタノールの毒性における種差⁷²⁾

	ラット	ウサギ	イヌ	サル	ヒト
最小致死量 (g/kg)	9.5	7	8	3, 7	1
代謝性アシドーシス					
1 g/kg	認めない	認めない	認めない	認めない	重篤
3 g/kg	認めない	認めない	認めない	重篤	重篤
6 g/kg	認めない	認めない	認めない	重篤	—
8 g/kg	—	—	認める	—	—
視神経の萎縮	認めない	認めない	認めない	認めない	認める
網膜神経節細胞	正常	正常	正常	—	変性

3

DMDC 134 g/mol + 水 18 g/mol = (メタノール 32 g/mol + 二酸化炭素 44 g/mol) × 2

上式に従い DMDC の最大濃度 250 mg/L を飲料に添加した場合のメタノール最大濃度は 250 ÷ 134 × 64 ≈ 120 mg/L となる。

血中ギ酸濃度 (mmol/L)	0[6]	0[3.9]	2.6[2] 3.2[2] 8.7[1.7] 11.0[1.9]	7.5	15-22.8[0.275] 15-23[0.277]
-----------------	------	--------	-------------------------------------------	-----	--------------------------------

[]内はメタノール量を示す。単位は動物の投与量では g/kg, ヒトでは血中濃度で g/L である。

1 メタノールの単回投与毒性試験^{68, 140-148)}

経口 LD₅₀ はマウスで 7,300~10,000 mg/kg, ラットで 6,200~13,000 mg/kg, ウサギで 7,000 mg/kg (最小致死量), イヌで 8,000 mg/kg であったが, 霊長類のサルでは, 2,000~7,000 mg/kg (最小致死量) で霊長類の方が, 急性経口投与毒性が強い傾向がみられた。その種差の原因として, メタノールの代謝物, ギ酸を速やかに代謝するマウス, ラット, ウサギ, イヌでは LD₅₀ が高く, ギ酸の代謝が遅いことから, 感受性の高い霊長類では LD₅₀ が低いと考えられる。

しかし, DMDC 250 mg/L 添加した飲料では, 完全に分解するとメタノール 120 mg/L が含まれ, 大量(2L)の飲料を摂取した場合, ヒトの体重を 55.1 kg として 4.36 mg/kg のメタノール摂取となる。この値は霊長類サルの経口最小致死量の 1/459 に相当し, その急性経口毒性における安全性は高いと考えられる。

表 40 : メタノールのマウス, ラット, ウサギ, イヌ, サルにおける単回投与毒性試験成績

動物種	投与経路	LD ₅₀ (mg/kg)	資料番号/GLP
マウス	経口	420 [#]	140 /GLP 適用外
		7,300~10,000	141 /GLP 適用外
	腹腔内	10,500~11,000	142 /GLP 適用外
		336 mmol/kg	143 /GLP 適用外
	静脈内	147 mmol/kg	143 /GLP 適用外
ラット	経口	6,200 ^{##}	144 /GLP 適用外
		9,100	145 /GLP 適用外
		9,500*	146 /GLP 適用外
		12,800	147 /GLP 適用外
		13,000 [#]	140 /GLP 適用外
	腹腔内	237 mmol/kg	142 /GLP 適用外
	静脈内	66.5 mmol/kg	142 /GLP 適用外
ハムスター	腹腔内	267 mmol/kg	142 /GLP 適用外
ウサギ	経口	7,000	146 /GLP 適用外
	静脈内	278 mmol/kg	143 /GLP 適用外
イヌ	経口	8,000	146 /GLP 適用外
サル	経口	2,000~3,000	146 /GLP 適用外
		7,000*	148 /GLP 適用外

* : 最小致死量, # : WHO EHC⁶⁸⁾より引用したが, 元資料¹⁴⁰⁾に記載はない。

: 元資料¹⁴⁴⁾では 7.4~13.0 mL/kg で, mg/kg の換算値は WHO EHC⁶⁸⁾によった。

2 メタノールの 28 日間吸入毒性試験^{149, 150)}

Sprague-Dawley系ラット雌雄にメタノールを 650, 2,600, 6,500 mg/m³ (500, 2,000, 5,000 ppm)を 1 日 6 時間, 週 5 日間で 4 週間吸入投与した結果, 鼻及び眼周囲の分泌物が増加したが, 上部呼吸器系の刺激によると考えられた。体重, 眼学的検査, 器官重量, 病理組織学的検査成績に投与に関連した変化は認められなかった。眼への無毒性量は 6500 mg/m³ (5000 ppm)とみなされた。(Andrews et al., 1987¹⁴⁹⁾)

Sprague-Dawley系ラット雄にメタノールを 260, 2,600, 13,000 mg/m³ (200, 2,000, 10,000 ppm)を 1 日 6 時間, 週 5 日間で 6 週間吸入投与した結果, 呼吸器系への影響は認められなかった。また, 肺表面, 肺組織に意義ある変化はみられなかった。(White et al., 1983¹⁵⁰⁾)

カニクイザル 1 群雌雄各 3 匹にメタノール 650, 2,600, 6,500 mg/m³ (500, 2,000, 5,000 ppm)を 1 日 6 時間, 週 5 日間で 4 週間吸入投与した結果, 上部気道に刺激性変化がみられた。しかし, 剖検及び眼科学的検査で変化は認められなかった。(Andrews et al., 1987¹⁴⁹⁾)

3 メタノールの 90 日間吸入毒性試験^{151, 152)}

Fisher-344 ラットに一般的な飼料と葉酸欠乏飼料を与え, それぞれにメタノール 1,050 mg/m³ (800 ppm)を 1 日 8 時間, 週 7 日間で 13 週間吸入投与した結果, Fisher-344 ラットでは一般的な飼料, 葉酸欠乏飼料ともに網膜及び視神経の自然発生的な変性がみられたが, Long-Evansラットでは, このような変化は認められなかった。(Leeら, 1990¹⁵¹⁾)

イヌ雄 2 匹にメタノール 13,000 mg/m³ (10,000 ppm)を 1 日当たり 1 時間ごとに 8 回, 3 分間の吸入で 100 日間投与した結果, 一般状態, 異常行動, 視覚毒性は認められなかった。1 週間間隔で測定した血中メタノール濃度の中央値は 65, 140 mg/Lであった。(Sayersら, 1944¹⁵²⁾)

4 メタノールの 1 年間吸入毒性試験^{69, 153, 154)}

B6C3F1 マウス 1 群雌雄各 30 匹 (10 匹は 6 ヶ月間), Fischer-344 ラット 1 群雌雄各 20 匹にメタノール 13, 130, 1,300 mg/m³ (10, 100, 1,000 ppm)を 12 ヶ月間吸入投与して毒性を調べた結果, 無毒性量(NOEL)はマウス, ラットともに 130 mg/m³ (100 ppm)であった。

マウスでは, 最高用量群で有意な体重増加亢進が, 雄で投与 6 ヶ月以降, 雌で投与 9 ヶ月以降に認められた。さらに, 肝細胞の脂肪変性の程度, 頻度が最高用量群で有意に増加したが, これは体重増加亢進と関連した変化と考えられた。

ラットでは, 最高用量群で有意な体重増加抑制が雌雄で認められた。また, 肝臓及び脾臓の相対重量の軽度な増加が最高用量投与群雌でみられたが, 統計学的に有意差は認められなかった。(NEDO, 1983⁶⁹⁾, 1986¹⁵³⁾; Katoh, 1989¹⁵⁴⁾)

カニクイサル 1 群雌各 8 匹にメタノール 13, 130, 1,300 mg/m³ (10, 100, 1,000 ppm) を 1 日 22 時間で 29 ヶ月間吸入投与した結果, 体重, 血液学的検査, 病理学的検査に投与に関連した変化は認められなかった。ただ, 神経系に反応性のグリア細胞の過形成がみられたが, 用量及び曝露時間との関連はみられず, 休薬により回復する可逆性の変化であった。(NEDO, 1986¹⁵³)

5 メタノールの 2 年間吸入毒性試験/発がん性併合試験^{69, 153, 154}

B6C3F1 マウス雌雄及びFisher-344 ラット雌雄にメタノールを 13, 130, 1,300 mg/m³ (10, 100, 1,000 ppm) を 1 日 20 時間, それぞれ, 18 ヶ月間, 24 ヶ月間吸入投与を行った。その結果, マウス, ラットともに催腫瘍性は認められなかった。ただ, 高用量群では乳頭状腺腫の発現頻度が対照群と比べて高かったが, 統計学的に有意差は認められなかった。この変化は病理組織学的には腫瘍性変化と非腫瘍性変化の中間に位置するものであった。さらに, 副腎の褐色細胞腫が高用量群で 7 例, 対照群で 1 例にみられた。この頻度は Fisher 確立検定で有意差は認められなかった。(NEDO, 1983⁶⁹, 1986¹⁵³; Katoh, 1989¹⁵⁴)

6 メタノールの生殖毒性試験^{69, 153-156}

Sprague-Dawley 系ラット雄にメタノール 260, 2,600, 13,000 mg/m³ (200, 2,000, 10,000 ppm) を 1 日 8 時間, 週 5 日で 1, 2, 4, 6 週間吸入投与した結果, 循環血中遊離テストステロンの有意な減少が 260 mg/m³ の 2 及び 6 週間投与, 2,600 mg/m³ の 6 週間投与で認められた。黄体ホルモン(LH)の有意な変化が 13,000 mg/m³ の 6 週間投与で認められたが, 卵胞刺激ホルモン(FSH)はいずれの吸入投与濃度でも変化はなかった。(Cameron ら, 1984¹⁵⁵)

Sprague-Dawley 系ラットにメタノール 260 mg/m³ (200 ppm) を 6 時間 1 日又は 1 週間吸入投与した結果, 初回の吸入投与で血清テストステロンの減少がみられたが, 1 日 6 時間の 1 週間吸入投与では, 血清テストステロンの減少は認められなかった。(Cameron ら, 1985¹⁵⁶)

Fisher-344 ラットにメタノール 13, 130, 1,300 mg/m³ (10, 100, 1,000 ppm) を 1 日 18~20 時間, 2 世代にわたり吸入投与した結果, 生殖能への影響は認められなかった。ただ, F₁ 出生児 3, 6, 8 週齢の脳重量に有意な減少が 1,300 mg/m³ 群で認められた。F₂ 世代では, 脳, 胸腺, 下垂体重量の減少がみられた。(NEDO, 1983⁶⁹, 1986¹⁵³; Katoh, 1989¹⁵⁴)

7 メタノールの出生前発生毒性試験^{69, 153, 154, 157-161)}

CD-1 妊娠マウスにメタノール 1,300, 2,600, 6,500, 7,500, 13,000, 19,500 mg/m³ (1,000, 2,000, 5,000, 7,500, 10,000, 15,000 ppm)を1日7時間、妊娠6~15日に吸入投与した。その結果、6,500 mg/m³以上の用量群で脳ヘルニア(exencephaly)、口蓋裂の有意な頻度増加がみられた。吸収胚を含め胚・胎児死亡の増加は10,000 mg/m³以上の用量群で認められた。胎児体重の減少は13,000 mg/m³以上の用量群で認められた。頸椎の増加が投与用量に応じてみられ、2,600 mg/m³以上の用量では、有意差が認められた。本試験条件における無毒性量は1,300 mg/m³ (1,000 ppm)とみなされた。また、10,000 mg/m³未満のメタノール曝露では母体毒性はみられなかった。(Rogersら, 1993¹⁵⁷⁾)

CD-1 妊娠マウスにメタノール 19,500 mg/m³ (15,000 ppm)を1日6時間、妊娠7~9日に吸入投与した結果、周産期(妊娠17日)に頭部神経管欠損が認められた。15%群の胎児で閉鎖不全、主に脳ヘルニアで、頭蓋顔面における骨格に複数の骨の欠損又は減少を伴い、眼の異常(早期眼瞼開裂、白内障、網膜嚢)がみられた。メタノール高用量(19,500 mg/m³)の曝露により、マウス胚の神経系における幹集団の多発性障害が生じた。肉眼的な障害が認められなくても、有意な神経病理学的な受胎産物遺残であろう。(Boltonら, 1994¹⁵⁸⁾)

CD-1 妊娠マウスにメタノール 4 g/kgを強制経口投与した結果、胚吸収、外表欠損(口蓋裂を含む)、胎児体重の減少がみられ、これは13,000 mg/m³ (10,000 ppm)吸入投与でみられた結果と同様であった。口蓋裂(1腹あたり43.5%)及び脳ヘルニア(1腹あたり29%)は、メタノールの経口投与でみられる特徴的な外表異常であった。経口投与における血中メタノール濃度は4 mg/mLで、13,000 mg/m³ (10,000 ppm)吸入投与時のそれと同様と報告されている。(Rogersら, 1993¹⁵⁷⁾)

Sprague-Dawley系妊娠ラットにメタノール 6,500, 13,000 mg/m³ (5,000, 10,000 ppm)を1日7時間、妊娠1~19日に吸入投与した。また、メタノール 26,000 mg/m³ (20,000 ppm)を1日7時間、妊娠7~15日に吸入投与した。その結果、血中メタノール濃度は26,000 mg/m³群で投与1日目に8.34~9.26 mg/mL、投与10日目に4.84~6.00 mg/mLを示した。メタノールは用量に応じた胎児体重の減少、奇形の増加を誘発した。最高用量群(26,000 mg/m³)では、投与初日より軽度な母体毒性(軽度な歩様蹣跚)がみられ、過剰ろっ骨、痕跡様頸肋、尿路欠損、心血管系欠損の頻度の高い奇形の増加(p<0.001)が認められた。同様な奇形は13,000 mg/m³群でもみられたが、頻度は対照群と比較して有意な差は認められなかった。6,500 mg/m³ (5,000 ppm)群では奇形の頻度増加はみられず、この試験条件下での無毒性量(NOEL)とみなされた。(Nelsonら, 1985¹⁵⁹⁾)

Long-Evansラットにメタノール 1.3, 2.6, 5.2 mL/kgを妊娠10日に単回経口投与を行った。その結果、出生児に投与用量に応じた奇形(例えば、停留精巢、眼球突出、無眼球症の眼の欠損)がみられた。5.2 mL/kg群では、20%以上の母体体重の減少が認められたが、その他の一般状態における毒性徴候及び病理組織学的変化がみられなかった。胎児体重の

有意な減少（11-19.5%）は、母体のメタノール経口摂取に伴うものであった。メタノールは母体に明らかな毒性反応がみられなくても、急激なメタノールの投与は出生時に奇形を誘発する可能性がある。（Youssefら, 1997¹⁶⁰⁾

Holtzmanラットにメタノール 1.6, 2.4, 3.2 g/kgを妊娠 1~8 日に強制経口投与を実施した。その結果、妊娠 9 日目の妊娠子宮及び着床重量の減少がみられ、脱落膜の反応による正常な子宮膜の脱落がメタノールにより阻害された結果と考えられた。メタノール 3.2g/kg/日の用量は、妊娠 9 日までに非特異的な母体毒性（体重減少）をじゃっ起させたが、妊娠 11 日、20 日の胚及び胎児の生存率、発生には影響はみられなかった。

（Cummings, 1993¹⁶¹⁾

Sprague-Dawley系ラットにメタノール 260, 1,300, 6,500 mg/m³ (200, 1,000, 5,000 ppm) を 1 日 22 時間、妊娠 7~17 日に吸入投与した結果、6,500 mg/m³ 群で出生児の脳、甲状腺、胸腺重量の有意な減少が認められ、メタノール吸入による変化と考えられた。しかし、病理組織学的検査では異常はみられなかった。この群では、死亡例を含め母体毒性と胎児毒性が報告された。1300 mg/m³ 群では、変化は認められなかった。（NEDO, 1983⁶⁹⁾, 1986¹⁵³⁾; Katoh, 1989¹⁵⁴⁾

8 メタノールの遺伝毒性試験^{69, 162)}

メタノールの変異原性試験について、微生物を用いる復帰変異試験、哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験、姉妹染色分体交換試験、げっ歯類を用いる小核試験で検討した結果、いずれも陰性で、メタノールに変異原性はないとみなされた。

表 41 : *In vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験成績

試験項目	被験物質	試験条件 菌株/動物種	処理濃度/ 投与量	試験成績	資料番号/GLP
復帰変異試験	メタノール	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 <i>E. coli</i> WP2uvR	直接法及び代謝活性化法：5~5,000 µg/プレート	陰性	162 /GLP 適用外
			直接法及び代謝活性化法：5~5,000 µg/プレート	陰性	69 /GLP 適用外
染色体異常試験	メタノール	チャイニーズハムスター Don 細胞	7.1, 14.3, 28.5 mg/mL	陰性	69 /GLP 適用外
姉妹染色分体交換試験	メタノール	チャイニーズハムスター Don 細胞	7.1, 14.3, 28.5 mg/mL	陰性	
小核試験	メタノール	マウス, 骨髄細胞	1.05, 2.11, 4.21, 8.41 g/kg, 単回経 口投与	陰性	

11. ヒトにおける知見^{34, 68, 146, 148, 163-166)}

DMDCは食品添加物として海外98カ国から許可を受けて、飲料の細菌を不活化することを目的として使用されている。この使用による有害な事象は報告されていない。

また、DMDCは飲料に添加された後、速やかに分解され、二酸化炭素とメタノールとなる。飲料の出荷時にはDMDCが検出されないことが確認されている。そのためメタノールのヒトにおける安全性について調べた。その結果、飲料中のDMDC最大濃度250 mg/Lが完全に分解した場合のメタノール濃度120 mg/L⁴と比べて、その安全性に影響を及ぼす報告は認められなかった。(Bayer AG, 1987¹⁶³⁾)

EHC⁶⁸⁾によれば、ヒト並びに霊長類はメタノールに対して特有の感受性を示し、ギ酸血症、代謝性アシドーシス、眼毒性、神経系の抑制、失明、昏睡と死亡という特徴的な毒性をじゃっ起させる。ヒトにおけるメタノール毒性に関する情報のほとんどは、慢性曝露よりむしろ急性曝露に関する報告であった。メタノールに関連する中毒の多くは、メタノールを混入した飲料やメタノール含有製品によって引き起こされている。経口摂取は中毒発生の最も多い経路であるが、高濃度のメタノール蒸気吸入と液状メタノールの経皮吸収も急性毒性発現に際して、経口摂取と同じような変化がみられている。低濃度のメタノールを長期間曝露した場合の注目すべき健康への影響は眼に及ぼす変化と考えられる。

メタノールの毒性はメタノールからギ酸への変換と引き続いて起こる葉酸経路におけるギ酸の二酸化炭素への代謝による。すなわち、ギ酸の代謝速度より速くギ酸が生成されれば、毒性が発現する。健常なヒトではメタノールの代謝は1時間あたり1,500 mgとされている。(Scientific Committee on Food, 2001³⁴⁾)

ヒトにおけるメタノールの致死量は明らかにされていない。中毒に対する処置を施さない場合のメタノールの最小致死量は0.3から1 g/kgの範囲とされている。永久的な視力障害を起こす最小用量は不明である。(WHO, 1997¹⁶⁴⁾)

代謝性アシドーシスの重篤度には変動がみられ、メタノールの摂取量との関連は少なく、個体間の変動がメタノールの急性中毒の特徴である。サルにおける代謝性アシドーシスは1,000 mg/kgで認められた。(Clay et al., 1975¹⁶⁵⁾; Cooper and Felig, 1961¹⁴⁸⁾; McMartin et al., 1977¹⁶⁶⁾; Gilger et al., 1955¹⁴⁶⁾)

メタノールの毒性に対するヒトの感受性に係わる2つの主な決定要因は、(1)メタノールの代謝を遅延させるエタノールの同時摂取、(2)ギ酸の解毒速度を左右する肝臓における葉酸の恒常性と考えられる。

メタノール中毒の症状と徴候には、視力障害、悪心、腹部及び筋肉の疼痛、めまい、衰弱と昏睡から間代性発作に至る意識障害が含まれ、視力障害は、通常、メタノール摂取後

⁴ DMDC 134 g/mol + 水 18 g/mol = (メタノール 32 g/mol + 二酸化炭素 44 g/mol) × 2
その結果、DMDCの最大濃度250 mg/Lを飲料に添加した場合のメタノール最大濃度は
250 ÷ 134 × 64 ≈ 120 mg/Lとなる。

12 時間から 48 時間の間に発現し、軽度の羞明、霧視から著しい視力の低下と完全な失明に至る。極端な場合には死亡する。主要な臨床的特徴はアニオンギャップ型 (anion-gap type) の重篤な代謝性アシドーシスとされている。アシドーシスは主としてメタノールの代謝で生じるギ酸に起因する。

内因性メタノールの正常な血中濃度は 0.5 mg/L (0.02 mmol/L) で、食物摂取によりメタノールの血中濃度が上昇する場合がある。メタノールの血中濃度が 200 mg/L (6 mmol/L) 以上では、中枢作用が発現し、眼症状は 500 mg/L (16 mmol/L) 以上でみられ、メタノールの初期の濃度が 1,500~2,000 mg/L (47~62 mmol/L) の範囲で処置を怠れば死亡も認められる。健常人又は中程度の葉酸欠乏のヒトでは、260 mg/m³ 以下のメタノール蒸気を急性的に吸入するか、20 mg/kg までのメタノールを経口摂取した場合でも、内因性のレベル以上にギ酸が蓄積されることはない。

視覚障害 (視力のかすみ、視野の狭窄、色覚の変化、一過性又は永久的な失明) の一部が約 1,500 mg/m³ (1,200 ppm) 又はそれ以上の大気中のメタノールに曝露された作業従事者で報告されている。

広く用いられているメタノールの職業的曝露限界は 260 mg/m³ (200 ppm) で、これはメタノールによるギ酸の代謝性アシドーシスと眼及び神経毒性から作業者を保護するように設定されている。260 mg/m³ (200 ppm) 以上の曝露で、軽度の皮膚と眼刺激を起こす以外は、ヒトにおけるメタノールのその他の有害な影響は報告されていない。(EHC⁶⁸⁾)

EFSA 再評価結果¹⁵⁾によれば、米国 FDA は、メタノールのヒトに対する無毒性量 (NOAEL) に 10 倍の安全係数をみて、ADI 値を 7.1~8.4 mg/kg 体重/日と算出している。

12. 1 日摂取量の推計等^{8, 31, 35, 63, 74, 167-170)}

我が国における飲料の摂取量に関する資料としては、厚生労働省が実施した国民健康栄養調査の中に食品群別摂取量データ¹⁶⁷⁾がある。本資料より野菜ジュース、果汁・果汁飲料および嗜好飲料類の年齢層別 1 日摂取量を表 42 に示す。嗜好飲料類のうち、日本酒及びビールを除外して、アルコール飲料/洋酒・その他と、その他の嗜好飲料がすべて DMDC の使用対象であると仮定すると、野菜ジュース、果汁・果汁飲料も含めて DMDC の対象飲料全体としての総数での 1 人 1 日摂取量の合計は 544.2 g (= 618.8 g - 9.8 g - 64.8 g) となる。

表 42 : 国民健康栄養調査における各種飲料の 1 日平均摂取量 (単位 : g)¹⁶⁷⁾

食品群	総数	1-6 歳	7-14 歳	15-19 歳	20-29 歳	30-39 歳	40-49 歳	50-59 歳	60-69 歳	70 歳 以上
野菜ジュース	11.4	12.0	10.7	10.9	12.6	9.2	10.8	14.6	11.4	10.9
果汁・果汁飲料	9.4	22.2	20.4	19.8	14.8	7.7	7.8	9.8	5.9	4.5

日本酒（対象外）	9.8	1.4	2.5	3.0	3.2	5.7	7.1	10.3	15.7	15.0
ビール（対象外）	64.8	0.0	0.0	1.0	24.8	83.0	110.7	117.7	86.1	41.4
洋酒・その他	33.3	0.1	0.4	0.3	4.2	30.4	47.2	53.0	51.2	32.1
アルコール飲料	107.9	1.5	2.9	4.3	32.2	119.1	165.0	181.0	153.0	88.5
茶	257.7	50.2	81.2	173.9	255.7	194.2	213.6	303.9	317.6	347.5
コーヒー・ココア	131.2	2.8	7.5	36.0	88.2	139.9	200.8	203.1	172.7	109.9
その他の嗜好飲料	101.2	145.3	206.4	210.3	129.4	146.6	115.3	83.1	60.7	46.0
その他の嗜好飲料	490.1	198.3	295.1	420.2	473.3	480.7	529.7	590.1	551.0	503.4
嗜好飲料類（合計）	598.0	199.8	298.0	424.5	505.5	599.8	694.7	771.1	704.0	591.9
合計	618.8	234.0	329.1	455.2	532.9	616.7	713.3	795.5	721.3	607.3

食品群は国民健康栄養調査の名称とした。

一方、上記の国民健康栄養調査のデータとの比較のために、飲料の生産量統計資料に基づく年間生産量及び年間輸入・輸出量から1人当たりの推定年間消費量及び推定1日消費量を算出した。計算の結果、DMDC使用対象飲料の推定1日消費量は368 mLとなるが、算出の基礎が異なるため国民健康栄養調査データとの比較は困難である。推定1日消費量は最大消費可能量と捉えることもできるが、結果として、国民健康栄養調査による1日摂取量は生産量統計に基づく推定1日消費量より大きいいため、ここでは国民健康栄養調査による1日摂取量を計算の基礎として使用することとする。

表 43：飲料の生産量統計による1人当たり推定年間消費量および1日消費量^{8, 168)}

	推定年間消費 量 ⁸⁾ (mL)	推定1日消費 量 (mL)	年間輸入・輸 出量 ⁸⁾ (mL)	輸入・輸出量 を加算した推 定年間消費量 (mL)	輸入・輸出量 を加算した推 定1日消費量 (mL)
果汁ジュース	3,325	9			
果汁入り飲料	10,902	30			
野菜系飲料	4,401	12			
果汁・野菜系飲料（小計）	18,628	51	1,912・34	20,506	56
コーヒー飲料	23,430	64			
スポーツ飲料	11,586	32			
炭酸飲料*	29,338	80			
茶系飲料	45,128	124			
ノンアルコール飲料	2,414	7			

清涼飲料系（小計）	111,896	307	878・641	112,133	307
果実酒類	3,704	10	0 [#] ・34 ¹⁶⁸⁾	3,670	10
合計	134,228	368	2,790・709	136,309	373

（2016年 清涼飲料関係統計資料，2015年 酒類の輸出金額・数量の推移）

[#]：生産量統計に輸入量が含まれている

国民健康栄養調査による対象飲料の合計1日摂取量に基づいて、各関連化合物の1人1日摂取量とヒトの体重を55.1 kgとした場合の体重kg当たりの1日摂取量を推計すると、それぞれ表44のとおりとなる。DMDCの添加量はワイン（ぶどう酒）では最大200 mg/Lに対して、その他の飲料では最大250 mg/Lと異なるが、国民健康栄養調査結果ではワイン（ぶどう酒）の摂取量は明らかではないので、本推計に当たってはすべての対象飲料に対して250 mg/LのDMDCを添加したと仮定して、各成分の1日摂取量を算出した。また、対象飲料によって比重は異なるが、ここではすべての飲料の比重を1（容量1Lの重量が1kg）として計算した。

表44：国民健康栄養調査による飲料の1日摂取量から推計した関連化合物の1日摂取量

	総数			体重1kg当たり
	清涼飲料 1日摂取量	洋酒・その他 1日摂取量	対象飲料合計 1日摂取量	対象飲料合計 1日摂取量
対象飲料	510.9 g	33.3 g	544.2 g	
メタノール	61.3 mg	4.0 mg	65.3 mg	1.19 mg
N-CMC	2.55 mg	0.17 mg	2.72 mg	50 μg
MEC	0 mg	0.33 mg	0.33 mg	6 μg
MC	0.013 mg	0.001 mg	0.014 mg	0.25 μg
DMC	0.26 mg	0.02 mg	0.27 mg	5 μg

関連化合物略称：N-CMC...N-カルボメトキシ化合物，MEC...炭酸エチルメチル（アルコール飲料のみ），MC...カルバミン酸メチル（以上，反応生成物），DMC...炭酸ジメチル（副成物）

すべての対象飲料に250 ppmのDMDCを添加し、飲料中のDMDCが分解した結果120 ppmのメタノールが生成したと仮定すると、飲料からのメタノール1日摂取量は65.3 mgである。したがって体重kg当たりのメタノール摂取量は1.19 mg/kg 体重/日となるが、この値は、FDAがDMDCの無毒性量（NOAEL）に基づいて算出したADI値7.1~8.4 mg/kg 体重/日³⁵⁾と比較しても明らかに低い値である。

SCF 2001³⁴⁾によれば、DMDC250ppmを飲料に添加した場合に生成する反応生成物N-カルボメトキシ化合物（N-CMC）の総量は1.7~5 mg/Lである。最大値5 mg/Lと対象飲料の合計1日摂取量544.2 mgを基に計算すると、N-CMCの1日摂取量は2.72mgとなる。したが

って、N-CMC の体重 kg 当たり 1 日摂取量は最大で 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日となるが、本化合物には DMDC がフェノール、アミノ酸等飲料中の他成分と反応した結果生成する一連の化合物が含まれることから、N-CMC と総称される個々の化合物の体重 kg 当たり 1 日摂取量はさらに少ない量になると推定できる。^{31, 63, 74)}

炭酸エチルメチル (MEC) は、DMDC をアルコール飲料に使用した場合の DMDC とエタノールの反応生成物として知られている。250 mg/L の DMDC から最大 10 mg/L の MEC が生成するとして洋酒・その他の 1 日摂取量 33.3 g を基に計算すると、MEC の 1 日摂取量は 0.33mg となり、体重 kg 当たり 1 日摂取量は 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日と微量である。これは、EFSA 再評価結果³⁵⁾ において判断の指標として用いられている Cramer class I 物質の毒性学的閾値 (Threshold of Toxicological Concern: TTC) 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日を下回る量である。(EFSA, 2012³⁵⁾; EFSA, 2012¹⁶⁹⁾; EFSA・WHO¹⁷⁰⁾)

カルバミン酸メチル (MC) は、やはり DMDC が飲料中で分解する過程で飲料中の他成分と反応して生成する化合物であるが、250 mg/L の DMDC から 0.025mg/L の MC が生成するとして計算すると、1 日摂取量は 0.014mg となり、体重 kg 当たり 1 日摂取量は 0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日とごく微量である。これは、EFSA 再評価結果において判断の指標としている Cramer class I 物質の TTC 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日を下回る量である。(EFSA, 2012³⁵⁾; EFSA, 2012¹⁶⁹⁾; EFSA・WHO¹⁷⁰⁾)

炭酸ジメチル (DMC) は製品としての DMDC に副成物として含有されるが、製品規格上で含有量は 0.2%以下と規定されているので、1 日摂取量は 0.27mg 以下となり、体重 kg 当たり 1 日摂取量は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日以下である。。これは、EFSA 再評価結果³⁵⁾ において判断の指標ととしている Cramer class I 物質の TTC 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日を下回る量である。

13. まとめ^{31, 35, 36, 64, 68, 69, 77, 82-164, 169, 170)}

本概要書の「安全性に係わる知見」および一部参考資料からの情報に基づき、DMDC および DMDC を飲料用に使用した結果生成する可能性のある関連化合物の安全性について、以下のように総括することができる。

DMDC は飲料中で短時間内に加水分解するため、消費される時点で飲料製品中に残存しない。したがって、DMDC の加水分解生成物メタノールと主な反応生成物 (炭酸ジメチル、炭酸メチルエチルおよびカルバミン酸メチル) を評価することで DMDC の使用に伴うリスクを判断することが可能である。³⁵⁾

DMDC については、4,000 mg/L を添加した飲料を用いて一連の反復投与毒性、繁殖毒性、催奇形性、発がん性を調べた結果、毒性の兆候は認められなかった。^{31, 77, 82-164)}

DMDC の加水分解の結果、少量の二酸化炭素とメタノールが生成する³⁶⁾ が、二酸化炭素は水道水や炭酸飲料をはじめ食品中に多く含まれており、DMDC 由来の二酸化炭素がヒ

トの健康に影響を与えるとは考えられない。⁶⁴⁾ メタノールについては、単回投与毒性試験^{68, 140-148)}、28日間吸入毒性試験^{149, 150)}、90日間吸入毒性試験^{151, 152)}、1年間吸入毒性試験^{69, 153, 154)}、2年間吸入毒性試験^{69, 153, 154)}、生殖毒性試験^{69, 153-156)}、出生前発生毒性試験等^{69, 162)}においてその毒性について評価が行われているが、出生前発生毒性試験等一部の試験においては、毒性の兆候が確認されている。また、ヒトではメタノールの致死量は明らかにはされておらず、中毒に対する処置を施さない場合のメタノールの最小致死量は0.3から1 g/kgの範囲と推定される。¹⁶⁴⁾ 一方、米国FDAでは、ヒトに対するNOAELのデータに基づいてメタノールのADI値を7.1~8.4 mg/kg 体重/日と推計している。³⁵⁾

飲料に添加したDMDCが分解した結果生成する可能性のある微量のメタノール(DMDCの添加量250 ppmの場合120 ppm)と天然原料由来のメタノール含有量(果汁飲料の場合、平均で約140 ppm)を合計すると260 ppmとなる。この値から国民健康栄養調査における飲料の推定一日摂取量544.2gに基づいて前記同様にメタノールの体重kg当たり1日摂取量を算出すると2.57 mg/kg 体重/日となる。この値は、FDAの推計によるADI値7.1~8.4 mg/kg 体重/日と比較しても明らかに低い数値である。^{32, 35)}

N-カルボキシメトキシ化合物(N-CMC)は、DMDCが飲料中に含まれるアミノ基やヒドロキシ基を持つ化合物と反応した結果生成する一連の化合物群であり、例えばN-カルボキシグリシン、N-カルボキシメトキシアラニン、N-カルボキシメトキシアスパラギン等複数の化合物が確認されている。単回投与毒性試験の結果では、すべてのN-カルボキシメトキシ化合物についてLD₅₀値は4,000 mg/kgの以上であった。一方、SCF 2001³⁴⁾と国民健康栄養調査の結果に基づいて算出した体重kg当たり1日摂取量は、一連の化合物群の総量として最大50 µg/kg 体重/日であるが、個々の化合物の体重kg当たり1日摂取量はさらに低い数値になると推定される。。

炭酸メチルエチル(MEC)は、単回投与試験⁹⁹⁾による経口LD₅₀値は15,000 mg/kg以上であることが確認されている。90日間経口投与毒性試験¹⁰⁰⁾、出生前発生毒性試験¹⁰¹⁾の結果においては特に毒性の兆候は認められていない。また、国民健康栄養調査の結果に基づく体重kg当たり1日摂取量は6 µg/kg 体重/日と推計され、EUで一般に用いられている基準値(Cramer class I物質のTTC)(EFSA, 2012¹⁶⁹⁾; EFSA・WHO¹⁷⁰⁾)と比較しても低い量である。³⁵⁾

カルバミン酸メチル(MC)の単回投与毒性試験¹⁰³⁻¹⁰⁸⁾による経口LD₅₀値は2,500~6,300 mg/kg、の範囲であった。1および2週間経口投与毒性試験^{105, 109)}、90日間経口投与毒性試験^{105, 110, 111)}、発ガン性試験^{104, 105, 107, 112)}、遺伝毒性試験^{105, 113, 120-137)}の結果においては、一部の例外を除いて大部分の試験で毒性の兆候は確認されていない。一方、国民健康栄養調査結果から推計される体重kg当たり1日摂取量は0.04 µg/kg 体重/日とごく微量である。これはEUで一般に用いられている基準値(Cramer class I物質のTTC)と比較しても明らかに低い量である。³⁵⁾

また、DMDCの精製工程で微量の副成物として生成する可能性のある炭酸ジメチル

(DMC) についても、単回投与毒性試験¹³⁸⁾、90日間経口投与毒性試験¹³⁹⁾において毒性の所見は認められていない。また、国民健康栄養調査結果に基づくDMCの推計1日摂取量は5 µg/kg 体重/日とEUで一般に用いられている基準値(Cramer class I物質のTTC)と比較しても低い量である。³⁵⁾

以上より、DMDCを各種飲料用の食品添加物として定められた使用基準に従って使用する限り、安全性に関する懸念は認められない。

参考資料一覧

資料番号	題名	出典	年号
1	清涼飲料水の規格基準: 食品, 添加物等規格基準	昭和 34 年 12 月 28 日厚生省告示第 370 号	1959
2	Dimethyl dicarbonate (DMDC), Technical effect	Bayer AG (社内資料)	1988
3	Velcorin® - natural methanol contents in soft drinks	LANXESS Deutschland GmbH (社内資料)	2008
4	Simply convincing technology. Microbial control technology for beverages with Velcorin® DT Dosing Systems	LANXESS Deutschland GmbH (社内資料)	2009
5	Food Standards Australia New Zealand Act 1991: Australia New Zealand Food Standards Code - Amendment No. 121 - 2011	New Zealand Gazette, 14 (Feb. 10): 318-319	2011
6	Application A1025: Classification of DMDC explanatory statement	Food Standards Australia New Zealand - Amendment No. 121 - 2011	2011
7	果実酒課税移出数量の推移 (国内製造分・輸入分の合計)	日本ワイナリー協会 統計資料	2016
8	清涼飲料関係統計資料	社団法人全国清涼飲料工業会	2016
9	Test Report Effectiveness of Velcorin (DMDC) in Apple Juice (50% juice content, non carbonated)	Bayer AG (社内資料)	1998
10	Test Report Effectiveness of Velcorin (DMDC) in a Grape Juice (50% juice content, non carbonated)	Bayer AG (社内資料)	1998
11	Test Report Effectiveness of Velcorin (DMDC) in an Orange Juice (50% juice content, non carbonated)	Bayer AG (社内資料)	1998
12	Test Report Effectiveness of Velcorin (DMDC) in Morello Cherry-Nectar (60% juice content, non carbonated)	Bayer AG (社内資料)	1998
13	Test Report Effectiveness of Velcorin (DMDC) in Peach-Nectar (45% juice content, non carbonated)	Bayer AG (社内資料)	1998
14	Test Report Effectiveness of Velcorin (DMDC) in 'Non alcoholic sparkling Apple Juice' (>50% juice content, carbonated)	Bayer Chemicals (社内資料)	2003
15	Test Report Effectiveness of Velcorin (DMDC) in 'Non alcoholic non carbonated Flavoured Water, Part 1'	Bayer Chemicals (社内資料)	2003
16	Test Report Effectiveness of Velcorin (DMDC) in 'Non alcoholic non carbonated Flavoured Water, Part 2'	Bayer Chemicals (社内資料)	2003
17	CODEX STAN 192-1995, Rev. 2017	Codex Committee on Food Additives (CCFA) - General Standard for Food Additives (GSFA)	2015
18	Test Report Orange Juice	SGS INSTITUT FRESENIUS GmbH	2005
19	Velcorin (DMDC) Registration Background Information	LANXESS Deutschland GmbH (社内資料)	2014

20	Dimethyl Dicarbonate	Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives	1990
21	Inventory of substances used as Processing Aids (IPA), updated list: Dimethyldicarbonate	Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Food Additives (CCFA) Forty Fifth Session	2013
22	Direct Food Additives: Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption, Dimethyl Dicarbonate	Federal Register 53 FR : 41325	1988
23	Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption: Dimethyl Dicarbonate	Federal Register 58 FR 6088	1993
24	Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Dimethyl Dicarbonate	Federal Register 59 FR 5317	1994
25	Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Dimethyl Dicarbonate	Federal Register 61 FR 26786	1996
26	Food Contact Notification (FCN) No. 35	Inventory of Effective Food Contact Substance (FCS) Notifications U.S. Food and Drug Administration (FDA)	2000
27	Food Contact Notification (FCN) No. 483	Inventory of Effective Food Contact Substance (FCS) Notifications U.S. Food and Drug Administration (FDA)	2005
28	Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Dimethyl Dicarbonate	Federal Register 66 13652	2001
29	§ 172.133 Dimethyl dicarbonate	Code of Federal Regulations (CFR) 21 CFR Ch. I (4–1–16 Edition) U.S. Food and Drug Administration (FDA)	2016
30	Food additives other than colours and sweeteners:Dimethyldicarbonate (DMDC)	European Parliament and Council Directive No 95/2/EC	1995
31	Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants: Dimethyldicarbonate (DMDC)	The 37 th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on the Food Additives (JECFA)	1991
32	Second Series of Food Additives of Various Technological Functions: Dimethyldicarbonate (DMDC)	Reports of the Scientific Committee for Food: 26 th series: 9-10	1990
33	Opinion on Dimethyldicarbonate (DMDC, Velcorin)	Reports of the Scientific Committee for Food: 39 th series: 23-26	1997
34	Opinion of the Scientific Committee on Food on the use of dimethyl dicarbonate (DMDC) in wines	Scientific Committee on Food SCF/CS/ADD/CONS/43 Final	2001
35	Scientific opinion on the re-evaluation of dimethyl dicarbonate (DMDC, E 242) as a food additive	EFSA Journal 2015; 13 (12):4319	2015
36	Velcorin: Dimethyl Dicarbonate (DMDC) - Chemical and Physical Properties -	LANXESS Deutschland GmbH (社内資料)	2011
37	Dimethyl dicarbonate	The 37 th JECFA, published in FNP 52 (1990)	1990
38	Velcorin: Dimethyl carbonate - Gas chromatographic method	Bayer Chemicals (社内資料)	2003
39	Appendix III General Tests and Assays, Lead limit test	Food Chemicals Codex, 10 th edition, U.S. Pharmacopeial Convention	2016

40	Velcorin Dimethyl dicarbonate -Volumetric method	LANXESS Deutschland GmbH (社内資料)	1995
41	Laying down specific purity criteria on food additives other than colours and sweeteners (Text with EEA relevance)	Commission Regulation (EU) No 231/2012	2012
42	Monographs: Dimethyl dicarbonate	Food Chemicals Codex, 5 th edition, The National Academies Press, Washington, D.C.	2004
43	Laying down specific purity criteria on food additives other than colours and sweeteners	Commission Directive 2008/84/EC of 27 August 2008	2008
44	Monographs: Dimethyl dicarbonate	Food Chemicals Codex, 7 th edition, U.S. Pharmacopeial Convention	2011
45	Analyses of 5 subsequent batches Velcorin	LANXESS Deutschland GmbH (社内資料)	2008
46	Velcorin® (DMDC) stability test 2008	LANXESS Deutschland GmbH (社内資料)	2011
47	M 3 02-00006 - 09 - E - Analysis of Methanol in Beverages - GC Standard Addition Method	LANXESS Deutschland GmbH (社内資料)	2009
48	Validation report: validation of method 2301-0290301-03D	LANXESS Deutschland GmbH (社内資料)	2005
49	Validation of analytical method: M 3 02-00006 - 09 - E - Analysis of Methanol in Beverages - GC Standard Addition Method (equivalent to M3 02-00006 - 09 - D)	LANXESS Deutschland GmbH (社内資料)	2009
50	Standard operation procedure - SOP0012E, Dimethyl dicarbonate (DMDC), Determination by GC/MS	Labor Haase-Aschoff (社内資料)	1992
51	Sample preparation and determination of DMDC	Labor Dr. Haase-Aschoff (社内資料)	1998
52	Standard operation procedure - SOP0060_06, Determination of Methanol and MEC via Headspace GC/FID	Labor Haase-Aschoff (社内資料)	1990
53	Dimethyl dicarbonate and diethyl dicarbonateI	Antimicrobials in Foods, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, pp. 299-325.	1983
54	清涼飲料水のテスト結果について	福井県消費生活センター	2007
55	Velcorin efficacy testing Log reduction experiment	LANXESS Deutschland GmbH (社内資料)	2011
56	Efficacy data of DMDC (Dimethyl dicarbonate)	LANXESS Deutschland GmbH (社内資料)	2011
57	Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms	Food Microbiology, 25 : 422-427	2008
58	Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent <i>Brettanomyces bruxellensis</i> growth in wine	Food Control 19 : 208-216	2008
59	Dimethyl dicarbonate and diethyl dicarbonate	Antimicrobials in food. Taylor & Francis Group, CRC Press, Boca Raton, 2005, pp 305-326	2005
60	DMDC's role in bottle stability - dimethyl dicarbonate	Wines & Vines, 71 : 18-21	1990
61	Dimethyl dicarbonate - a new disappearing substance for alcohol-free soft drinks containing fruit juice	Mineralwasser-Zeitung, Number 13 , 1-15	1979

62	Hydrolysis of DMDC in alcoholic beverages (Test report Nr.: AX9010147-0148/0)	LANXESS Deutschland GmbH (社内資料)	2011
63	List of related substances	LANXESS Deutschland GmbH (社内資料)	2011
64	生食用鮮魚介類, 生食用かき及び冷凍食品の加工基準に係る食品安全基本法第24条第1項第1号に基づく食品健康影響評価について	食品安全委員会 第594回 会議資料詳細 (平成28年2月9日)	2016
65	Alcohol: Free, total and potential methanol content of fruit juices	Flüssiges Obst, 8 : 348-354	1983
66	amending the Annexes to European Parliament and Council Directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners	Commission Directive 2010/69/EU	2010
67	laying down certain detailed rules for implementing Council Regulation (EC) No 479/2008 as regards the categories of grapevine products, oenological practices and the applicable restrictions	Commission Regulation (EC) No 606/2009	2009
68	メタノール	Environmental Health Criteria No.196	1998
69	昭和57年度石油火力発電所メタノール転換等実証試験成果報告書 環境安全性実証試験(その1)	財団法人 エネルギー総合工学研究所 財団法人 工業開発研究所 株式会社 三菱化成安全科学研究所	1983
70	昭和58年度石油火力発電所メタノール転換等実証試験(環境安全性実証試験)委託業務報告書	新エネルギー開発機構	1984
71	Methanol in fruit juices, fermented beverages, alcohols and spirits	Rev Ferment Ind Aliment, 11: 279-287	1956
72	Species differences in methanol poisoning	Crit. Rev. Toxicol., 10 : 275-286	1982
73	Investigations of the enzymolysis of N-carbomethoxy proline	Bayer AG, (社内資料)	1978
74	Enzymatic hydrolysis of carbomethoxy compounds	Bayer AG, (社内資料)	1974
75	The metabolism of methyl carbamate	Biochem. J., 52 , 267-269	1952
76	The metabolism of urethane and related compounds	Biochem. J., 94 , 198-208	1965
77	Methyl carbamate: Renal elimination and liver enzyme activities after oral treatment of Wistar and Fisher rats.	Bayer AG. (社内資料)	1987
78	Differences in liver sensitivity to methyl carbamate between Wistar and Fischer 344 rats	Arch. Toxicol. Suppl., 13 , 319-321	1989
79	Methyl carbamate Species-dependent variations in metabolism and clearance in rats and mice	Drug Metab. Dispos., 6 , 435-440	1988
80	Changes in mouse liver RNA induced by ethyl carbamate (urethane) and methyl carbamate.	Z. Krebsforsch., 76 , 69-82	1971
81	The interaction of carbon-14-labelled alkyl carbamates, labelled in the alkyl and carbonyl positions, with DNA in vivo	Chem.-Biol. Interact., 6 , 99-105	1973
82	Dimethyl dicarbonate: Acute Toxicity Male Mice (single administration with stomach tube).	Bayer AG (社内資料)	1974

83	Dimethylcarbonate: Acute Toxicology Study.	Bayer AG (社内資料)	1972
84	Dimethyl dicarbonate (Velcorin) Investigations of the acute inhalation toxicity in rats in accordance with OECD guideline No. 403.	Bayer AG (社内資料)	1988
85	Toxicological Studies with beverages treated with 4000 ppm DMDC	LANXESS Deutschland GmbH (社内資料)	2011
86	Dimethyl dicarbonate (DMDC) in fruit juices and alcoholic beverages. Subchronic toxicology studies in rats (3-month drinking experiment).	Bayer AG (社内資料)	1974
87	Dimethyldicarbonate: Subchronic inhalation toxicity in rats. (Exposure for 6 hours/day, 5 days/week for 13 weeks).	Bayer HealthCare (社内資料)	2005
88	One-year oral toxicity study with DMDC-treated orange juice in dogs (Final report).	CIVO Institutes TNO (社内資料)	1983
89	Orange juice sterilized with DMDC/Velcorin. Chronic toxicological tests on rats (30 months drinking test).	Bayer AG (社内資料)	1983
90	Wine, sterilized with DMDC/Velcorin TM . Chronic Toxicity Study in Rats (30 month drinking study).	Bayer AG (社内資料)	1984
91	Orange juice, sterilized with DMDC/Velcorin [®] . Generation test on rats (2 generations study).	Bayer AG (社内資料)	1983
92	Velcorin-treated orange juice. Investigations into pre-implantation damage, embryotoxic and teratogenic effects following oral administration to rats.	Bayer AG (社内資料)	1980
93	DMDC (Dimethyldicarbonate), Salmonella/microsome test for the investigation of point mutagenic effects.	Bayer AG (社内資料)	1978
94	Velcorin-treated orange juice. Salmonella/microsome test for the investigation of point mutagenic effects.	Bayer AG (社内資料)	1980
95	Orange juice treated with 4000 ppm Velcorin. Salmonella/microsome test.	Bayer AG (社内資料)	1989
96	Velcorin treated orange juice. Micronucleus test on the mouse.	Bayer AG (社内資料)	1989
97	Toxicity studies: N-Carbomethoxy compounds	Bayer AG (社内資料)	1973
98	Formation of methanol and ethyl methyl carbonate by dimethyl dicarbonate in wine and model solutions.	Am. J. Enol. Viticult. 27 : 7-11	1976
99	Methyl ethyl carbonate: Acute toxicity in mice and rats	Bayer AG (社内資料)	1973
100	Methyl ethyl carbonate (MEC): Subchronic toxicology study in rats. (3- month experiment)	Bayer AG (社内資料)	1973
101	Methyl ethyl carbonate: Investigation for embryotoxic and teratogenic effects in rats after administration in drinking water.	Bayer AG (社内資料)	1976
102	Measurement of methylcarbamate formed by the addition of dimethyl dicarbonate to model solutions and to wines.	J. Agric. Food Chem., 24 : 428-430.	1976

103	A study of the toxic and specific effects of alkyl carbamates and their binary mixture.	Toksikol Nov Prom Khim Veshchestv, 13 :86-91.	1973
104	Carcinogenesis study with methyl carbamate on oral administration to mice.	Bayer AG. (社内資料)	1978
105	Toxicology and carcinogenesis studies of methyl carbamate in F344/N rats and B6C3F ₁ mice. NTP TR 328	NIH Publication, No. 88-2584.	1987
106	The initiation of skin tumours in mice by homologues and N-substituted derivatives of ethyl carbamate.	Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 45 : 507-516.	1967
107	Carcinogenesis study with methyl carbamate on oral administration to rats.	Bayer AG (社内資料)	1977
108	Methyl-, Ethyl-, n-Propyl- and n-Butylcarbamate: Testing for carcinogenic effect in the foetal or postnatal life stages of Wistar rats and Swiss-mice.	German Cancer Research Centre, Institute of Biochemistry (社内資料)	1979
109	Methyl carbamate: Exploratory subacute toxicity study on Wistar rats relating to the question of a hepatotoxic effect.	Bayer AG. (社内資料)	1984
110	Thirteen-week oral toxicity study of methyl carbamate in rats and mice.	Fund. Appl. Toxicol., 8 : 389-399.	1987
111	Methylcarbamate: Subchronic toxicity study on Wistar rats (13 week experiment with administration of test compound by gavage or in drinking water)	Bayer AG. (社内資料)	1985
112	Methyl carbamate: No evidence for carcinogenicity following perinatal administration in Wistar rats and Swiss mice	Mobay Corporation, (社内資料)	1980
113	Methyl carbamate	IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to man. Vol.12	1976
114	Evaluation of the carcinogenicity of a series of esters of carbamic acid	J. Natl. Cancer Inst., 8 , 99-101	1974
115	Tumour formation in mice by urethane administered with related carbamates	Br. J. Cancer, 26 , 216-225	1972
116	Further studies on incomplete carcinogenesis: Triethylene melamine (TEM), 1,2-benzanthracene and β -propiolactone as initiators of skin tumour formation in the mouse	Br. J. Cancer, 9 , 177-203	1955
117	Carcinogenesis by carbamic acid esters and their binding to DNA	Cancer Res., 36 , 1101-1107	1976
118	Lung tumor response in strain A mice as a quantitative bioassay of carcinogenic activity of some carbamates and aziridines	Cancer Res., 29 , 2184-2190	1969
119	Comparative analysis of the blastomogenic effect of a binary mixture of alkylcarbamates and its components	Gig. Tr. Prof. Zabol., 8 , 19-22	1973
120	Theoretical risk assessment for methyl carbamate based on data from the U.S. National Toxicology Program bioassay for possible carcinogenicity.	Bayer AG. (社内資料)	1986

121	Multistage model risk assessment for methyl carbamate based on data from the NTP (U.S. National Toxicology Program) Study on Fischer 344 rats after chronic oral administration. Model: soft drink.	Bayer AG. (社内資料)	1987
122	Urethane	IARC (International Agency for Research on Cancer) Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man Vol. 7, Lyon, France, pp. 111-140	1974
123	The effect of carbamates on <i>Bacillus subtilis</i> .	Mutat. Res., 4 : 543-551.	1967
124	<i>In vitro</i> mutagenicity assays of chemical carcinogens and related compounds with <i>Salmonella typhimurium</i> .	J. Natl. Cancer Inst., 62 : 893-899.	1979
125	A survey of chemicals for mutagenic action on <i>E. coli</i> .	American Naturalist, 85 : 119-136.	1951
126	XIII. Tests of chemicals for mutagenicity.	Cancer Res., 15 : 69-75.	1955
127	Evaluation of the mutagenicity and DNA-modifying activity of carcinogens and noncarcinogens in microbial systems.	J.Nat. Cancer Inst. 62 : 873-891.	1979
128	Detection of carcinogens as mutagens in the <i>Salmonella</i> /microsome test: Assay of 300 chemicals.	Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72 : 5135- 5139.	1975
129	Analysis of mitotic nondisjunction with <i>Aspergillus nidulans</i> .	Environ. Health Perspect. 31 : 81-95.	1979
130	Mutagenic evaluation of carcinogens and non-carcinogens in the L5178Y/TK assay utilizing postmitochondrial fractions (S9) from normal rat liver.	Mutat. Res. 97 : 49-65.	1982
131	Detection of chemical mutagens by the dominant lethal assay in the mouse.	Toxicol. Appl. Pharmacol., 23 : 288-325.	1972
132	<i>In vitro</i> assays for recombinogenic activity of chemical carcinogens and related compounds with <i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3.	J. Natl. Cancer Inst., 62 : 901-909.	1979
133	An <i>E. coli</i> microsuspension assay for the detection of DNA damage induced by direct-acting agents and promutagens.	Environ. Mutagen., 3 : 429-444.	1981
134	A microsuspension adaption of the <i>Bacillus subtilis</i> "rec" assay.	Environ. Mutagen., 3 : 607-616.	1981
135	Multicellular SCE study of some carbamates esters.	Environ Mutagen 3 : 385 (Abstract).	1981
136	Potency of some carbamates as multiple tissue sister chromatid exchange inducers and comparison with known carcinogenic activities.	Cancer Res., 41 , 4489-4492.	1981
137	Comparative neoplastic transformation responses of Balb/3T3 cells, Syrian hamster embryo cells, and Rauscher murine leukaemia virus-infected Fischer 344 rat embryo cell to chemical carcinogens	J. Natl. Cancer Inst., 67 , 1303-1315	1981
138	Dimethyl carbonate, Acute toxicity	Bayer AG. (社内資料)	1974

139	Dimethyl carbonate (DMC). Subchronic toxicology study in rats. 3-month drinking experiment.	Bayer AG. (社内資料)	1982
140	The single dose toxicity of some glycols and derivatives.	J Ind Hyg Toxicol, 23 : 259-268.	1941
141	Acute toxicity of methanol in the folate-deficient acatalasemic mouse.	Toxicology, 25 : 271-287.	1982
142	Studies on the visual toxicity of methanol: II. The effect of parenterally administered substances on the systemic toxicity of methyl alcohol.	Am J Ophthalmol, 35 (Part 2): 113-126.	1952
143	QSAR analysis and data extrapolation among mammals in a series of aliphatic alcohols.	Environ Health Perspect, 61 : 321-328.	1985
144	Acute toxicity and limits of solvent residue for sixteen organic solvents.	Toxicol. Appl. Pharmacol., 19 : 699-704.	1971
145	Relation of length of carbon chain to the primary and functional toxicities of alcohols	J. Lab. Clin. Med., 28 : 1440-1445.	1943
146	Studies on the visual toxicity of methanol: V. The role of acidosis in experimental methanol poisoning.	Am. J. Ophthalmol., 39 : 63-86.	1955
147	Comparative evaluation of methods employed to express the degree of toxicity of a compound	J. Ind, Hyg, Toxicol., 30 : 373-378.	1948
148	The biochemistry of methanol poisoning: II. Metabolic acidosis in the monkey.	Toxicol. Appl. Pharmacol., 3 : 202-209.	1961
149	Subchronic inhalation toxicity of methanol.	J. Toxicol. Environ. Health, 20 : 117-124.	1987
150	Biochemical and cytological studies of rat lung after inhalation of methanol vapour.	Toxicol. Lett., 17 : 1-5.	1983
151	Unilateral degeneration of retina and optic nerve in Fischer-344 rats.	Vet. Pathol., 27 : 439-444.	1990
152	Methanol poisoning: II. Exposure of dogs for brief periods eight times daily to high concentrations of high methanol vapor in air.	J. Ind. Hyg. Toxicol., 26 : 255-259.	1944
153	昭和 60 年度石油火力発電所メタノール転換等実証試験（環境安全性実証試験）委託業務報告書	新エネルギー総合開発機構	1986
154	Methanol Vapors and Health Effects Workshop: What we know and what we need to know - Summary Report.	ILSI Risk Science Institute/US Environmental Protection Agency/Health Effects Institute/American Petroleum Institute,	1989
155	Circulating concentrations of testosterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in male rats after inhalation of methanol.	Arch. Toxicol., 7 (Suppl.): 441-443.	1984
156	Circulating steroids in male rats following inhalation of n-alcohols.	Arch. Toxicol., 8 (Suppl.): 422-424.	1985
157	The developmental toxicity of inhaled methanol in the CD-1 mouse, with quantitative dose-response modeling for estimation of benchmark doses.	Teratology, 47 : 175-188.	1993
158	Methanol induced neural tube defects in mice: pathogenesis during neurulation.	Teratology, 49 : 497-517.	1994
159	Teratological assessment of methanol and	Fund. Appl. Toxicol., 5 : 727-736.	1985

	ethanol at high inhalation levels in rats.		
160	Teratogenicity of methanol following a single oral dose in Long-Evans rats	Reprod. Toxicol., Vol. II, 4, 503-510.	1997
161	Evaluation of the effects of methanol during early pregnancy in the rat.	Toxicology, 79 : 205-214.	1993
162	Results of microbial mutation test for forty-three industrial chemicals.	Sangyo Igaku, 27 : 400-419	1985
163	Toxicological assessment of the small amounts of methanol anticipated in the sterilization of drinks with dimethyl dicarbonate.	Bayer AG (社内資料)	1987
164	Methanol, Health and Safety Guide	World Health Organization, Geneva	1997
165	Experimental methanol toxicity in the primate: analysis of metabolic acidosis.	Toxicol. Appl. Pharmacol., 34 :49-61.	1975
166	Methanol poisoning; V. Role of formate metabolism in the monkey.	J. Pharmacol. Exp. Ther., 201 :564-572.	1977
167	平成 26 年国民健康・栄養調査 第 1 部 栄養素等摂取状況調査の結果	厚生労働省 健康局健康課栄養指導室	2015
168	酒類の輸出金額・数量の推移	平成 28 年 3 月 国税庁課税部酒税課	2016
169	Scientific Opinion on Exploring options for providing advice about possible human health risks based on the concept of Threshold of Toxicological Concern (TTC)	EFSA Journal 2012;10(7):2750	2012
170	Review of the Threshold of Toxicological Concern (TTC) approach and development of new TTC decision tree	EFSA and WHO EFSA Supporting Publications, Volume 13, Issue 3 2016:EN-1006	2016