

令和 2 年度

既存添加物の安全性評価 に関する調査研究

調査研究報告書



国立医薬品食品衛生研究所

調査研究報告書

既存添加物の安全性評価に関する調査研究

令和 3 年 3 月

主任研究者

平林容子

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター長

研究協力者

北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部長
佐藤恭子	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長
今井俊夫	国立がん研究センター研究所動物実験支援施設長
山田雅巳	防衛大学校応用科学群応用化学科 教授
諫田泰成	国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部長
小川久美子	国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部長
杉山圭一	国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター変異遺伝部長
広瀬明彦	国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター安全性予測評価部長

目次

A. 研究要旨	3
B. 研究目的	3
C. 研究方法	3
D. 研究結果	4
E. 考察.....	4
F. 結論	4
G. 各論.....	6
L-ヒドロキシプロリン	7
粉末モミガラ	12
ヘム鉄.....	15
略号	20

A. 研究要旨

平成8年度厚生科学研究報告書「既存天然添加物の安全性評価に関する調査研究」（主任研究者 林裕造、以下「林班報告書」という）において、既存添加物の基本的な安全性について検討した結果、「基原、製法、本質からみて、現段階において安全性の検討を早急に行う必要はないもの」に分類された109品目のうち、令和2年現在に調査研究によって情報が得られた3品目についてその安全性の評価を行った。

本事業において評価した既存添加物3品目については、国立医薬品食品衛生研究所（国衛研）で実施した安全性試験、使用実態及び文献情報から総合的に判断して、食品添加物としての使用においては安全性に懸念はないと結論された。

B. 研究目的

平成7年の食品衛生法（昭和22年法律第233号）の改正において、既存添加物名簿（平成8年厚生省告示第120号）に収載された既存添加物は、引き続き使用等が認められることとされ、それに伴い、安全性の見直しを行うこととされた。これらの既存添加物について、平成8年度厚生科学研究報告書「既存天然添加物の安全性評価に関する調査研究」（主任研究者 林裕造、以下「林班報告書」という）において、国際的な評価結果、欧米での許認可状況、並びに安全性試験成績結果等から既存添加物の基本的な安全性について検討した結果、①「今後、新たな毒性試験の実施も含め、安全性について検討することが必要であるもの」、②「基原、製法、本質からみて、現段階において安全性の検討を早急に行う必要は

ないもの」、③「入手した試験成績の評価により、安全性の検討を早急に行う必要はないもの」、④「既に国際的な評価がなされており基本的な安全性は確認されているもの」とに分類された。本調査研究は、②に分類された既存添加物について、これまでの試験から得られた結果、文献情報等を活用し、安全性評価に係る資料整備を行い、評価（考察）することを目的としている。

C. 研究方法

国衛研において実施された安全性に関する試験結果（反復投与毒性試験、遺伝毒性試験等）、対象品目の安全性に関して報告された文献、及び海外の評価機関における評価の情報等について取り纏め¹、複数の専門家から構成された食品添加物安全性評価検討会において、対象品

¹ 文献調査に当たっては、次の組織のデータベース及び成書を対象とした。

- ・ European Food Safety Authority (EFSA)
- ・ Food and Drug Administration (FDA)
- ・ Food Standards Australia New Zealand (FSANZ)

- ・ Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)
- ・ Health Canada
- ・ Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS)

目の安全性に関する評価（考察）を行った。

令和 2 年度の事業における既存添加物の評価対象品目は以下の 3 品目である。

既存添加物 3 品目

L-ヒドロキシプロリン

粉末モミガラ

ヘム鉄

D. 研究結果

1) L-ヒドロキシプロリン

日本における流通実態は確認されなかった。L-ヒドロキシプロリンを用い 0（溶媒：水）、40、200、1,000、4,000 mg/kg 体重/日の用量で強制経口投与にてラット 90 日間反復投与毒性試験が実施され、NOAEL は雌雄ともに中用量の 300 mg/kg 体重/日と判断された。遺伝毒性に関しては、Ames 試験、染色体異常試験、*in vivo* 小核試験が実施され、いずれも陰性と判定され、L-ヒドロキシプロリンに遺伝毒性はないものと考えられた。

以上の情報から、現状の使用においては、人の健康影響に対する懸念はないと結論された。

2) 粉末モミガラ

日本における流通実態は確認されなかった。粉末モミガラを用い 0、12,500、25,000、50,000 ppm の濃度で混餌投与にてラット 90 日間反復投与毒性試験が実施され、NOAEL は雌雄ともに高用量の 50,000 ppm（雄：2.32 g/kg 体重/日、雌：3.30 g/kg 体重/日に相当）と判断された。遺伝毒性に関しては、Ames 試験、染色体異常試験が実施され、いずれも陰

性と判定され、粉末モミガラに遺伝毒性はないものと考えられた。

以上の情報から、現状の使用においては、人の健康影響に対する懸念はないと結論された。

3) ヘム鉄

日本における推定摂取量は 1.05 mg/人/日である。ヘム鉄を用い 0%、0.8%、2%、5%の濃度で混餌投与にてラット 90 日間反復投与毒性試験が実施され、NOAEL は雌雄ともに高用量の 5%（雄：2.89 g/kg 体重/日、雌：3.84 g/kg 体重/日）と判断された。遺伝毒性に関しては、Ames 試験、染色体異常試験が実施され、いずれも陰性と判定され、ヘム鉄に遺伝毒性はないものと考えられた。

以上の情報から、現状の使用においては、人の健康影響に対する懸念はないと結論された。

E. 考察

本事業において評価した既存添加物である L-ヒドロキシプロリン、粉末モミガラ、ヘム鉄について、安全性試験の成績等から食品添加物としての使用においては安全性に懸念はないと考えられた。

F. 結論

平成 8 年度厚生科学研究「林班報告書」において「基原、製法、本質からみて、現段階において安全性の検討を早急に行う必要はないもの」に分類された既存添加物 109 品目のうち、粉末モミガラ、ヘム鉄、L-ヒドロキシプロリンについて安

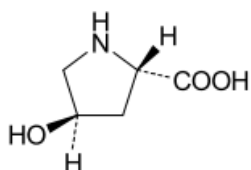
全性の評価を行った結果、毒性試験に関する情報から総合的に判断すると、食品

添加物として使用する限りにおいて安全性上の懸念はないと判断された。

G. 各論

L-ヒドロキシプロリン

英名：	L-Hydroxyproline
CAS No.	51-35-4
JECFA No.	該当なし
別名：	L-オキシプロリン (2S,4R)-4-Hydroxypyrrolidine-2-carboxylic acid Hydroxy-L-proline Hydroxyproline 4-Hydroxyproline L-4-Hydroxyproline trans-4-Hydroxyproline trans-Hydroxyproline trans-L-Hydroxyproline L-Proline, 4-hydroxy-, trans- (9CI)
化学式：	C ₅ H ₉ NO ₃
分子量：	131.13
構造式：	



1. 基原・製法

ゼラチン等を、加水分解し、分離して得られたものである。主成分は L-ヒドロキシプロリンである。

2. 主な用途

調味料、強化剤

3. 安全性試験の概要

1) 急性毒性試験

ラット経口 LD₅₀ >16 g/kg 体重¹⁾

2) 反復投与毒性試験

① 90 日間反復投与毒性試験

CrI:CD (SD)ラット (6 週齢、雌雄各 10 匹/群) を用いた L-ヒドロキシプロリンの強制経口投与 (溶媒: 水、0、100、300 及び 1,000 mg/kg 体重/日) による 90 日間

反復投与毒性試験が実施された²⁾。

その結果、投与による死亡はみられず、一般状態、体重、眼科学検査、尿検査、血液学的検査及び血液生化学的検査に異常はみられなかった。摂餌量については、1,000 mg/kg 群の雄において第 7 週以降に有意な低値がみられた。摂水量については、1,000 mg/kg 群の雌雄において投与期間の前半に有意な低値がみられた。剖検では、1,000 mg/kg 群の雄において腎臓の腫大及び表面粗造が認められ、腎臓相対重量の有意な高値もみられた。病理組織学的検査では、1,000 mg/kg 群において、雌雄に尿細管内又は腎盂内の結晶及び閉塞性腎症、雄に腎盂の尿路上皮過形成が認められた。

以上の結果から、本試験における L-ヒドロキシプロリンの無毒性量 (NOAEL) は、雌雄ともに 300 mg/kg 体重/日と考えられた。

② 28 日間反復投与毒性試験

CrI:CD(SD)ラット (6 週齢、雌雄各 10 又は 16 匹/群) を用いた L-ヒドロキシプロリンの強制経口投与 (溶媒: 水、0、40、200、1,000 及び 4,000 mg/kg 体重/日) による 28 日間反復投与毒性試験が行われた¹⁾。対照群及び 4,000 mg/kg 群は 14 日間の回復性を評価する群を設定した (雌雄各 6 匹/群)。

その結果、4,000 mg/kg 群の雄において摂餌量低下を伴う体重増加抑制がみられた。病理組織学的検査では、1,000 及び 4,000 mg/kg 群の雄、並びに 4,000 mg/kg 群の雌の腎臓において、限局性の尿細管拡張及び間質の線維化が認められた。血液生化学的検査及び尿検査において腎臓特異的な所見がみられないことから、腎臓における変化は非常に軽度であり、回復性も認められた。

以上の結果から、本試験における L-ヒドロキシプロリンの NOAEL は 200 mg/kg 体重/日と考えられた。

①、②は同じ系統のラットでの試験であり、いずれも所見が見られたのは最高用量の 1,000mg/kg 群である。このため、毒性の見られない最大値である 300 mg/kg 体重/日が NOAEL とされた。

3) 遺伝毒性試験

ネズミチフス菌 (TA100、TA1535、TA98、TA1537)、及び大腸菌 (WP2uvrA) を用い、プレインキュベーション法により、非代謝活性化及び代謝活性化条件下で復帰突然変異試験が行われた。50.0、150、500、1,500 及び 5,000 µg/plate の 5 用量を設定して用量設定試験を行った。その結果、生育阻害は、非代謝活性化及び代謝活性化条件下のいずれの検定菌においても認められなかった。被験物質に由来する沈殿は、非代謝活性化及び代謝活性化条件下のいずれの用量においても認められなかった。陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は、非代謝活性化及び

代謝活性化条件下のいずれの検定菌においても認められなかった。

以上の結果に基づき、L-ヒドロキシプロリンは、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない（陰性）と判定された³⁾。

L-ヒドロキシプロリンの染色体異常誘発性の有無について、チャイニーズ・ハムスター細胞(CHL/IU)を用い、短時間処理法の非代謝活性化、及び代謝活性化の両条件を設けて試験が実施された。また、連続処理法においては、24 時間連続処理を設けた。L-ヒドロキシプロリン 0.06560 g（濃度設定試験）及び 0.13005 g（本試験）に、日局注射用水を加えて溶解させた後、5.046 mL（濃度設定試験）及び 10 mL（本試験）に定容して最高濃度（13 mg/mL）の被験物質調製液を調製した。

濃度設定試験では、全ての処理条件で 0.020、0.041、0.081、0.16、0.33、0.65 及び 1.3 mg/mL の被験物質処理群を設定した。その結果、いずれの処理条件においても 50%を超える細胞増殖抑制は認められなかった。また、被験物質の沈殿（処理終了時）は、全ての被験物質処理群において認められなかった。

本試験では、全ての処理条件で 0.081、0.16、0.33、0.65 及び 1.3 mg/mL の被験物質処理群を設定した。その結果、全ての処理条件で 50%を超える細胞増殖抑制は認められなかった。また、被験物質の沈殿（処理終了時）は、全ての被験物質処理群において認められなかった。以上の結果に基づき、全ての処理条件で 0.33、0.65 及び 1.3 mg/mL を設定し、染色体分析を行った。染色体分析の結果、短時間処理の代謝活性化条件下においては、構造異常を有する細胞数の傾向性検定において、5%水準で有意な用量依存性が認められた。ただし、いずれの処理条件においても、構造異常を有する細胞数及び倍数性細胞数の統計学的に有意な増加は認められなかった。

以上の結果より、L-ヒドロキシプロリンは当該試験条件下で、CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発作用は無い（陰性）と結論された³⁾。

ヒト末梢血リンパ球細胞を用いた *in vitro* 小核試験が、4 時間処理（非代謝活性化及び代謝活性化条件下）、及び 24 時間処理（非代謝活性化条件下）の条件下で実施された。その結果、被験物質 2,000 µg / mL 培地の濃度まで試験したが、小核を有する細胞の出現頻度は、有意な増加を示さなかった。以上の結果より、本試験条件下で L-ヒドロキシプロリンは、*in vitro* 小核試験で染色体損傷性を示さなかった⁴⁾。

細菌を用いた復帰突然変異試験、染色体異常試験、並びに *in vitro* 小核試験の結果、L-ヒドロキシプロリンには遺伝毒性はないと考えられた。

遺伝毒性試験のまとめ

Ames 試験	陰性
染色体異常試験	陰性
<i>in vitro</i> 小核試験	陰性
総合判定	陰性

4) その他

L-ヒドロキシプロリンはグリオキシル酸を経てシュウ酸へ代謝される⁵⁾。シュウ酸はカルシウムイオンと結合して腎結石となり腎障害を引き起こす⁶⁾。

5) 海外評価書における扱い

JECFA は、調味料及び強化剤用途としての L-ヒドロキシプロリンの評価を行っていない。

欧州委員会の食品科学委員会 (SCF) は、特定の栄養目的で食品に使用することが提案されている物質として、ビタミン、ミネラル、微量元素、アミノ酸等の評価を行っている。この中で、医療用途の物質として L-4-ヒドロキシプロリンを含むアミノ酸誘導体が検討されたが、SCF は申請者から提出されたデータは評価には不十分であると判断している⁷⁾。

4. 検討結果

L-ヒドロキシプロリンの流通量について、生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定において、アミノ酸の推定摂取量は 7.1mg/人/日 (0.13mg/kg 体重/日) である。7.1mg/人/日のアミノ酸の推定摂取量について、全量 L-ヒドロキシプロリンであると仮定し、L-ヒドロキシプロリンの推定摂取量であると仮定したとき、90 日間反復投与毒性試験によって得られた無毒性量 (NOAEL) 300 mg/kg 体重/日に対し、L-ヒドロキシプロリンの曝露マージンは 10^3 であった。また、遺伝毒性の総合判定は陰性と判断されている。

以上の情報を踏まえ、食品添加物としての現状の使用において、人の健康影響に対する懸念はないと結論された。

5. 参考資料

1. Akiduki S, et al., Twenty-eight-day oral toxicity study of L-hydroxyproline in rats with 14-day post-treatment observation period. *Fundam Toxicol Sci.* 2019; 6 (3): 65-74.
2. 土井悠子：平成31年度添加物の安全性に関する試験「L-ヒドロキシプロリンに関する90日間反復投与毒性試験」、株式会社DIMS医科学研究所、2020年
3. 本間正充：平成30年度 指定添加物等の安全性に関する試験報告書、2019年3月25日

4. ECHA, L-4-hydroxyproline, <https://echa.europa.eu/it/registration-dossier/-/registered-dossier/21207/7/7/2/?documentUUID=60fbc4da-92c3-453a-80ea-e97c9571a456>
5. Takayama T., et al., Control of oxalate formation from L-hydroxyproline in liver mitochondria, *J Am Soc Nephrol* 2003 Apr;14(4):939-46.
6. Convento M. B. et al, Calcium oxalate crystals and oxalate induce an epithelial-to-mesenchymal transition in the proximal tubular epithelial cells: Contribution to oxalate kidney injury, *Sci Rep.* 2017; 7: 45740.
7. European Commission Scientific Committee on Food: Opinion on substances for nutritional purposes which have been proposed for use in the manufacture of foods for particular nutritional purposes ('PARNUTS'), SCF/CS/ADD/NUT/20/Final, 12/05/99, 1999

粉末モミガラ

英名：	Powdered rice hulls
CAS No.	該当なし
JECFA No.	該当なし
別名：	—
化学式：	—
分子量：	—
構造式：	—

1. 基原・製法

イネ科イネ (*Oryza sativa* LINNE) のもみ殻を微粉碎して得られたものである。主成分はセルロースである。

2. 主な用途

ガムベース

3. 安全性試験の概要

1) 急性毒性試験

経口投与の情報なし

2) 反復投与毒性試験

6 週齢の雌雄 CrI:CD(SD)ラットに粉末モミガラを 0、12,500、25,000、50,000 ppm の濃度で 90 日間混餌投与し、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、尿検査、血液学的検査、血清生化学的検査、臓器重量測定、肉眼病理学的検査及び病理組織学的検査が実施された。

その結果、いずれの検査項目においても被験物質投与による毒性影響は認められなかった。以上の結果から、本試験における粉末モミガラの無毒性量は雌雄ともに最高用量である 50,000 ppm (雄：2.32 g/kg 体重/日、雌：3.30 g/kg 体重/日) と判断された¹⁾。

3) 遺伝毒性試験

粉末モミガラについて、ネズミチフス菌 (TA100、TA1535、TA98、TA1537)、及び大腸菌 (WP2uvrA) を用い、プレインキュベーション法により、非代謝活性化及び代謝活性化条件下で復帰突然変異試験が行われている。50.0、150、500、1,500 及び 5,000 µg/plate の 5 用量を設定して用量設定試験が実施された。

その結果、生育阻害は、非代謝活性化及び代謝活性化条件下のいずれの検定菌においても認められなかった。被験物質に由来する沈殿は、非代謝活性化及び代謝活性化条件下ともに認められた。陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加

は、非代謝活性化及び代謝活性化条件下のいずれの検定菌においても認められなかった。

以上の結果に基づき、粉末モミガラは、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない（陰性）と判定された²⁾。

粉末モミガラの染色体異常誘発性の有無について、チャイニーズ・ハムスター細胞（CHL/IU）を用いて、短時間処理法の非代謝活性化、及び代謝活性化の両条件を設けて試験が実施された。また、連続処理法においては、22 時間連続処理を設けた。高圧蒸気滅菌済みの粉末モミガラ 0.11016 g（濃度設定試験）及び 0.18231 g（本試験）に、日局注射用水を加えて懸濁させた後、5.508 mL（濃度設定試験）及び 9.116 mL（本試験）に定容して最高濃度（20 mg/mL）の被験物質調製液を調製した。濃度設定試験では、全ての処理条件で 0.016、0.031、0.063、0.13、0.25、0.50、1.0 及び 2.0 mg/mL の被験物質処理群を設定した。その結果、連続処理法において 50%を超える細胞増殖抑制が認められた。その他の処理条件については 50%を超える細胞増殖抑制は認められなかった。また、被験物質の沈殿（処理終了時）は、全ての被験物質処理群において認められた。本試験では、短時間処理法では、0.016、0.031、0.063、0.13、0.25、0.50、1.0 及び 2.0 mg/mL の被験物質処理群を設定した。また、連続処理法では、0.016、0.031、0.063、0.13、0.25、0.50、1.0、1.5 及び 2.0 mg/mL の被験物質処理群を設定した。その結果、連続処理法において 50%を超える細胞増殖抑制が認められた。その他の処理条件については 50%を超える細胞増殖抑制は認められなかった。また、被験物質の沈殿（処理終了時）は、全ての被験物質処理群において認められた。以上の結果に基づき、短時間処理法では 0.50、1.0 及び 2.0 mg/mL、連続処理では 1.0、1.5 及び 2.0 mg/mL を設定し、染色体分析を行った。

染色体分析の結果、短時間処理の非代謝活性化及び代謝活性化条件下については、構造異常を有する細胞数及び倍数性細胞数の統計学的に有意な増加は認められなかった。連続処理については、1.5 及び 2.0 mg/mL 処理群において、構造異常を有する細胞数の増加が 5%水準で認められた。また、傾向性検定において、5%水準で有意な用量依存性が認められたが、1%水準では有意な用量依存性は認められなかった。ただし、陰性対照群の構造異常を有する細胞数は 0 であった。倍数性細胞数の統計学的に有意な増加は認められなかった。以上のことから、連続処理の陰性対照群及び被験物質処理群（1.0、1.5 及び 2.0 mg/mL）について、構造異常の種類と数の追加観察（300 細胞/群）を行った。その結果、いずれの被験物質処理群についても統計学的に有意な増加は認められなかった。なお、各処理条件の陰性対照群における構造異常を有する細胞数及び倍数性細胞数は、背景値の 95%管理限界内であった。

以上の結果より、粉末モミガラは当該試験条件下で、CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発作用は無い（陰性）と結論された²⁾。

細菌を用いた復帰突然変異試験、並びに染色体異常試験の結果、粉末モミガラには遺伝毒性はないと考えられた。

遺伝毒性試験のまとめ

Ames 試験 陰性

染色体異常試験 陰性

総合判定 陰性

4) その他

その他試験に関する情報はない

5) 海外評価書における扱い

海外では評価されていない。

4. 検討結果

現状の使用において、人の健康影響に対する懸念はないものと結論された。

5. 参考資料

1. 石井雄二、高須伸二、木島綾希、小川久美子：令和元年度 既存添加物の安全性に関する試験「ラットを用いた粉末モミガラの90日間反復経口投与毒性試験」（最終報告書）、2020年
2. 本間正充：平成30年度 指定添加物等の安全性に関する試験報告書、2019年3月25日

ヘム鉄

英名：	Heme iron
CAS No.	該当なし
JECFA No.	該当なし
別名：	—
化学式：	
分子量：	
構造式：	

1. 基原・製法

ヘモグロビンをタンパク分解酵素で処理したものより、分離して得られたものである。主成分はヘム鉄である。

2. 主な用途

強化剤

3. 安全性試験の概要

1) 急性毒性試験

ラット経口 LD₅₀ 2,500 mg/kg 体重¹⁾

2) 反復投与毒性試験

6週齢の雌雄 CrI:CD(SD)ラットにヘム鉄を0%、0.8%、2%、5%の濃度で90日間混餌投与し、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、尿検査、血液学的検査、血清生化学的検査、臓器重量測定、肉眼病理学的検査及び病理組織学的検査が実施された。

その結果、いずれの検査項目においても被験物質投与による毒性影響は認められなかったことから、本試験におけるヘム鉄の無毒性量 (NOAEL) は雌雄ともに5% (雄：2.89 g/kg 体重/日、雌：3.84 g/kg 体重/日) と判断された²⁾。

3) 遺伝毒性試験

ネズミチフス菌 (TA100、TA1535、TA98、TA1537)、及び大腸菌 (WP2*uvrA*) を用い、プレインキュベーション法により、非代謝活性化及び代謝活性化条件下で復帰突然変異試験が実施された。

50.0、150、500、1,500及び5,000 µg/plateの5用量を設定して用量設定試験が実施され、その結果、生育阻害は、非代謝活性化及び代謝活性化条件下のいずれの検定菌においても認められなかった。被験物質に由来する沈殿は、非代謝活性化及び代謝活性化条件下ともに認められた。陰性対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は、非代謝活性化及び代謝活性化条件下のいずれの検定菌においても認めら

れなかった。

用量設定試験の結果に基づき、全ての検定菌について 5 用量を設定して本試験が行われた。その結果、生育阻害は、非代謝活性化及び代謝活性化条件下のいずれの検定菌においても認められなかった。被験物質に由来する沈殿は、非代謝活性化及び代謝活性化条件下ともに認められた。陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は、非代謝活性化及び代謝活性化条件下のいずれの検定菌においても認められなかった。

以上の結果に基づき、ヘム鉄は、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない（陰性）と判定された³⁾。

ヘム鉄の染色体異常誘発性の有無について、チャイニーズ・ハムスター細胞 (CHL/IU) を用い、短時間処理法の非代謝活性化、及び代謝活性化の両条件を設けて試験が実施された。また、連続処理法においては、24 時間連続処理（濃度設定試験）及び 22 時間連続処理（本試験）を設けた。ヘム鉄 0.20500 g（濃度設定試験）及び 0.20078 g（本試験）に、日局注射用水を加えて懸濁させた後、10.25 mL（濃度設定試験）及び 10.039 mL（本試験）に定容して最高濃度（20 mg/mL）の被験物質調製液を調製した。

濃度設定試験では、全ての処理条件で 0.016、0.031、0.063、0.13、0.25、0.50、1.0 及び 2.0 mg/mL の被験物質処理群が設定され、その結果、全ての処理条件で 50% を超える胞増殖抑制は認められなかった。また、被験物質の沈殿（処理終了時）は、全ての被験物質処理群において認められた。

本試験では、全ての処理条件で 0.016、0.031、0.063、0.13、0.25、0.50、1.0 及び 2.0 mg/mL の被験物質処理群が設定された。その結果、全ての処理条件で 50% を超える細胞増殖抑制は認められなかった。また、被験物質の沈殿（処理終了時）は、全ての被験物質処理群において認められた。以上の結果に基づき、全ての処理条件で 0.50、1.0 及び 2.0 mg/mL を設定し、染色体分析を行った。染色体分析の結果、いずれの処理条件においても構造異常を有する細胞数及び倍数性細胞数の統計学的に有意な増加は認められなかった。なお、各処理条件の陰性対照群における構造異常を有する細胞数及び倍数性細胞数は、背景値の 95% 管理限界内であった。

以上の結果より、ヘム鉄は当該試験条件下で、CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発作用は無い（陰性）と結論された³⁾。

また、他の報告においても、染色体異常試験の結果は陰性であった⁴⁾。

細菌を用いた復帰突然変異試験、並びに染色体異常試験の結果、ヘム鉄には遺伝毒性はないと考えられた。

遺伝毒性試験のまとめ

Ames 試験	陰性
染色体異常試験	陰性
総合判定	陰性

4) その他

① 経口ばく露 (介入研究) ⁵⁾

- 献血した成人 97 名 (男性 46 名 (34~48 歳)、女性 51 名 (35~52 歳)) にヘム鉄-非ヘム鉄混合 (18.4 mg Fe/人/日 (豚血液由来ヘム鉄 2.4 mg Fe/人/日及びフマル酸第一鉄 16 mg Fe/人/日)) 又は非ヘム鉄 (フマル酸第一鉄 60 mg Fe/人/日) を 3 か月間摂取させる二重盲検試験が行われた。本試験は、1 か月間を 1 期として連続した 3 期に分けて行われた。全ての被験者は無作為に後半の 2 期のうちの 1 期にプラセボを摂取した。血清フェリチン及びヘモグロビン濃度に有意な差はみられなかったが、非ヘム鉄摂取群はヘム鉄-非ヘム鉄混合摂取群及びプラセボ群と比較して便秘の頻度及び全 4 症状 (悪心、胃痛、便秘及び下痢) を合わせた発生頻度が高かった (Frykman et al. 1994)。
- 19 名の女性 (18~20 歳) に牛の血球由来のヘム鉄 1.5g (30 mg Fe/人/日) を 2 か月間摂取させた結果、肝機能及びその他の生化学的指標への影響はみられなかった (斉藤 1991)。

② 経口ばく露 (観察研究) ⁵⁾

- 米国前向きコホート研究 (結腸癌) : 米国の Iowa Women's Health Study に参加した 34,708 名 (55~69 歳) の閉経後の女性を対象にヘム鉄及び亜鉛の摂取量と結腸癌との関連が調査された。15 年の追跡期間中に 438 名の近位結腸癌及び 303 名の遠位結腸癌が確認された。食事摂取頻度調査 (FFQ) によりヘム鉄 (全ての肉類に含まれる鉄量の 40%として算出) 摂取量を推定した。ヘム鉄摂取量により五分位群に分け、比例ハザードモデルを用いて年齢等で調整し解析を行ったところ、第 1 五分位 (0.76mg/人/日以下) に対する第 5 五分位 (2.05 mg/人/日以上) の結腸がん発生の相対リスク (RR) に有意な増加はみられなかったが、ヘム鉄及び亜鉛を 1 つのモデルで解析し相互に調整した場合には、近位結腸癌で RR は 2.18 (95%CI : 1.24~3.86、Ptrend=0.01) であった (Lee et al. 2004)。
- カナダ前向きコホート研究 (結腸直腸癌) : カナダの Canadian National Breast Screening Study に参加した 49,654 名 (40~59 歳) の女性を対象に鉄の摂取量と結腸直腸癌との関連が調査された。16.4 年の追跡期間中に 617 名の結腸直腸癌が確認された。FFQ により総鉄摂取量及びヘム鉄摂取量 (肉類及び魚に含まれる鉄量の 21~69%として算出) を推定した。鉄摂取量及びヘム鉄摂取量により五分位群に分け、Cox 比例ハザードモデルを用いて年齢

等で調整し解析を行ったところ、結腸直腸癌のリスク増加に関連はみられなかった (Kabat et al. 2007)。

- オランダ前向きコホート研究 (結腸直腸癌) : オランダの **Netherlands Cohort Study** に参加した 120,852 名 (55~69 歳) を対象にヘム鉄の摂取量と結腸直腸癌との関連が調査された。58,279 名の男性及び 62,573 名の女性からケースコホート研究のために 2,156 名の男性及び 2,215 名の女性をサブコホートとして無作為に選択した。9.3 年の追跡期間中に男性では 869 名及び女性では 666 名の結腸直腸癌が確認された。FFQ により鉄摂取量 (ヘムを含む食品) 及びヘム鉄摂取量 (肉類及び魚に含まれる鉄量の 26~65 %として算出) を推定した。鉄摂取量及びヘム鉄摂取量により五分位群に分け、Cox 比例ハザードモデルを用いて年齢等で調整し男女別に解析を行ったところ、結腸直腸癌のリスク増加に関連はみられなかった (Balder et al. 2006)。
- 米国前向きコホート研究 (メタボリックシンドローム・2 型糖尿病・心血管疾患) : 米国の **Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis** に参加した 6,814 名 (45~84 歳) を対象にヘム鉄及び非ヘム鉄の摂取量とメタボリックシンドローム、2 型糖尿病及び心血管疾患との関連が調査された。メタボリックシンドローム及び 2 型糖尿病は平均 4.8 年の追跡期間中にそれぞれ 46.7 例/1,000 人・年 (3,828 名を対象) 及び 16.7 例/1,000 人・年 (4,982 名を対象) が確認された。心血管疾患は平均 6.2 年の追跡期間中に 8.5 例/1,000 人・年 (5,285 名を対象) が確認された。FFQ によりヘム鉄摂取量 (牛肉、家禽の肉、魚からの鉄摂取量の 40%として算出) 及び非ヘム鉄摂取量 (鉄摂取量からヘム鉄摂取量を差し引いて算出) を推定した。ヘム鉄摂取量により五分位群に分け、Cox 比例ハザードモデルを用いて年齢等で調整し解析を行ったところ、ヘム鉄摂取量の第 1 五分位 (0.44 mg/人/日以下) に対する第 5 五分位 (1.07 mg/人/日以上) のハザード比 (HR) は心血管疾患で 1.45 (95%CI : 0.96~2.18、Ptrend=0.02) であった。また、解析の対象を赤肉由来のヘム鉄にしたところ、ヘム鉄摂取量の第 1 五分位 (0.18 mg/人/日以下) に対する第 5 五分位 (0.59mg/人/日以上) の HR はメタボリックシンドロームで 1.25 (95%CI : 0.99~1.56、Ptrend=0.03) 及び心血管疾患で 1.65 (95%CI : 1.10~2.47、Ptrend=0.01) であった。2 型糖尿病との関連はみられなかった (de Oliveira Otto et al.2012)。

5) 海外評価書における扱い

EFSA (European Food Safety Authority) は 2010 年に、食品添加物としてのヘム鉄の使用について、安全性評価に利用可能なデータが不十分としているが²⁾、今回の評価で用いた試験結果は新規に実施したものであり、当時の評価対象となってい

ない。

4. 検討結果

ヘム鉄について、90日間反復投与毒性試験によって得られた無毒性量（NOAEL）と推定摂取量（出荷量 60,846kg から一日摂取量 1.05mg/人と推定⁶⁾）から計算された曝露マージンは 10^5 であり、遺伝毒性の総合判定は陰性と判断されている。食事からの鉄の摂取により、結腸直腸癌の発生率、メタボリックシンドローム、糖尿病、心血管疾患等との関連を示唆する報告があるが（「4、その他の項」参照）、食品安全委員会の清涼飲料水評価書「鉄」においては、一貫した傾向がみられていないことや文献数が限られていること等を理由にこれらの健康影響との因果関係は不明と判断されている。ヘム鉄を用いて実施した安全性試験の結果等からヘム鉄に質的に鉄と異なるハザードを示唆する事象や報告は確認されておらず、ヘム鉄は食品添加物としての現状の使用において、人の健康影響に対する懸念はないと結論された。

5. 参考資料

1. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). (2010) Scientific Opinion on the safety of heme iron (blood peptonates) for the proposed uses as a source of iron added for nutritional purposes to foods for the general population, including food supplements. EFSA Journal, 8(4): 1585.
2. 松下幸平、豊田武士、森川朋美、小川久美子：令和元年度 既存添加物の安全性に関する試験「ラットを用いたヘム鉄の 90 日間反復経口投与毒性試験」（最終報告書）、2020 年
3. 本間正充：平成 30 年度 指定添加物等の安全性に関する試験報告書、2019 年 3 月 25 日
4. 林ら：環境変異原研究 22, 27、2000 年
5. 食品安全委員会清涼飲料水評価書 鉄、2017 年
6. 佐藤恭子：生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に係る研究 その 2 既存添加物品目、令和元年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）「食品添加物の安全性確保に資する研究」分担研究「食品添加物の摂取量推計及び香料規格に関する研究」、2020 年

略号

FFQ	Food Frequency Questionnaire
LD ₅₀	Lethal Dose 50 (50%致死量)
NOAEL	No Observable Adverse Effect Level