シンポジウム：食品添加物に関する問題点*

食品添加物と食品成分との反応

—— とくに亜硝酸塩について ——

谷 村 頭 雄**

Reactions of Food Additives with Foods Components —— In Relation to Nitrite ——

Akio TANIMURA

(National Institute of Hygienic Sciences: 18-1, Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo)

近年食品添加物の毒性，あるいは安全性についてさかんに論議されているが，食品添加物単独投与の場合の毒性試験は，すでにほとんどの食品添加物についてなされており，少なくとも現在の学問のレベルからみれば，これらの安全性は確認されているといつてよいと思う．しかし2種以上の食品添加物の相加毒性，相乗毒性，あるいは食品添加物が食品成分と反応して二次的に生成されたものの毒性については，いまだほとんど検討されていないのが現状である．とくに食品添加物と食品成分との反応に関しては，例えば過酸化ベンゾイルなどの酸化作用のある添加物を使用した場合に，ビタミンなどの微量栄養成分が破壊されるとか，あるいは今回の講演会で発表されたタンパク食品に過酸化水素を使用した場合，微量ではあるが食品中にホルムアルデヒドが生成するなど，二，三の報告にとどまり，ほとんどまだ未知のまま手がつけられていない．

亜硝酸塩の問題も，これを食品添加物として食品に添加しなくても自然に広く分布しているし，これが食品の常成分の一つであるジメチルアミンなどの第2級アミンと反応して生成するニトロソ化合物の中には，強い発ガン性を有するものが少なくないため，食品衛生上とくに注目されているわけである．すでに亜硝酸塩の安全性に対する危惧は，わが国だけの問題ではなく世界的な問題となりつつあり，WHO でも各国に手持ちのデーターを要求しているし，また FDA でもわが国を含めた主要な

各国に対し，研究結果の提出を求めている．本食品衛生学会でも昨年秋に「食品衛生からみたニトロソ化合物」というテーマで，石館学会長が特別講演をされているが，今回は従来発表された主要な報告について紹介するとともに，演者らの行なった実験結果を若干加味してお話し致したい．

亜硝酸塩の効果と毒性

亜硝酸塩は単独で，あるいは食塩と併用した場合には微生物，とくにボツリヌスの増殖をおさえるのに効果的といわれている．米国では五大湖産の chub (ウグイの一種) のくん製により，大きなボツリヌス中毒事件が過去に3回も起こったので，chub のくん製には亜硝酸塩を100 ppm 以上200 ppm 以下添加するように決められている．

以上が保存料としての効果であるが，もう一つは食肉製品，鯨肉製品，すじこ，いくらなどの発色効果である．食肉製品に添加された亜硝酸塩は血色素と反応して，ニトロソミオグロビン(赤色)を経て，淡紅色のニトロソヘモクロモゲンを生成する．この色素は安定で，加熱しても，あるいは長期間保存しても変色せず，食肉製品を美化するためには不可欠の発色剤であつて，古くから世界各国でハム，ソーセージ，ベーコンなどに使用されている．またわが国ではいくら，すじこの発色剤としてもわずかながら使用されているが，この場合の発色機構はまだ明らかではない．

亜硝酸塩の毒性としてはLD₅₀: 0.08 g (ラット，経口)~0.22 g (マウス，経口)/kg で示されるとおり，その急性毒性はかなり強い．したがってもし使用量を誤つ

* 第21回日本食品衛生学会学術講演会(昭和46年5月8日，東京)において講演

** 国立衛生試験所：東京都世田谷区上用賀 1-18-1

て大量に添加すれば、中毒事件につながることもあり得る。米国で誤って多量の亜硝酸ナトリウムを添加したウィナーソーセージにより、中毒事件が発生したことが報告されている。亜硝酸塩の長期毒性としては、生長のわずかな遅延、あるいは寿命の若干の短縮などが報告されているが、発ガン性、催奇形性については報告されていない。しかし亜硝酸（遊離酸）はある種のバクテリア、あるいはビールスに対し強力な突然変異誘発物質として作用している。亜硝酸塩の単独投与の場合の毒性は以上述べたとおりであるが、7～8年前から食品の常成分の一つである第2級アミンと反応して、発ガン性のあるニトロソ化合物を食品中で形成するのではないかということが懸念されるようになった。この可能性を裏付けるものとして、1957年ノルウェーで起きたニシンの魚粉を混じた飼料による家畜の中毒死事件がある。

亜硝酸塩添加ニシンによる家畜中毒事件

従来ノルウェーではニシンの魚粉を家畜の飼料に混じて投与していたが、ニシンは一時に大量に漁獲されるため、ニシンの処理工場で加工できず、腐敗させることも少なくなかった。そこで1957年より製造工程の一部を変更し、ニシンに亜硝酸ナトリウムを添加して保存し、あとで加熱して魚粉を製造することにした。ところがこの方法によって製造した魚粉を投与したミンク、ヒツジ、ウシなどの家畜が、急性肝障害を起こし多数中毒死したというのが、この事件の概要である。この中毒症状は亜硝酸塩によるものとは異なるし、またニシン自体に毒性は認められない。この原因究明には数年間を要したが、この間の研究経過について Ender らが1964年に発表している。すなわちニシンの中にこの毒物の母体があり、この母体と亜硝酸塩とが反応して、二次的に毒物を形成したという考え方で、まずこの母体の単離究明にとりかかった。この母体はニシンの脊椎、皮の部分に多く、またタラの脊椎、皮の部分にはより多く含まれていることがわかり、この母体はジメチルアミンであることが明らかとなった。ついでジメチルアミンと亜硝酸塩が魚体中で反応して生成した毒物の本体は、ジメチルニトロソアミンであることがわかり、この中毒事件は一応結末がついたのであるが、この事件は大きな波紋を投じた。それはすでに1954年に英国の Magee 一派が、ジメチルニトロソアミン (DMNA) は強い発ガン性を有することを発表していたからである。食肉製品の発色剤、あるいは保存料として広く使用されている亜硝酸塩が、食品中にしばしば多量に検出されるジメチルアミン (DMA) などの第2級アミンと食品中で反応し、DMNA などのニトロソ化合物を生成する可能性は十分に考えられる。

ニトロソ化合物の毒性

1954年 Magee らは、ラットに DMNA を投与するとき、25 mg/kg で肝にネクロシスを起こし、また 50 ppm の DMNA を飼料に混じてラットに長期間投与す

ると、ほとんど100%に近い高率で肝ガンを発生することを発表した。Magee 一派はその後もニトロソ化合物の発ガン性、代謝あるいは発ガン機構について精力的に研究を続けているが、DMNA が肝に特異的にガンを発生する理由として、DMNA が肝で代謝されてジアゾメタンを生ずることによると推定した。事実ジアゾメタンをラット、マウスに吸入させると高率で肝ガンを発生する。またガン発生のメカニズムとして、肝で生じたジアゾメタンが、DNA, RNA のグアニンをメチル化して、7-メチルグアニンを生じ、これがレプリケーションをミスさせることがガン発生の一つの理由であるとしている。この説に対する反論もあるが、いずれにせよ DMNA は強力な発ガン物質であることには違いはなく、最近のラットの実験では飼料中 2～5 ppm の DMNA でも肝腫瘍を生ずることが明らかにされている。食品中には DMA 以外にジエチルアミン (DEA)、ジプロピルアミンなどのジアルキルアミン、タンパクの熱分解時に生ずるピペリジン、ピロリジンなどの第2級アミンが存在するし、またプロリン、アルギニンなどイミノ基を有するアミノ酸も少なくない。これらのうちの多くのものは亜硝酸塩の存在で容易にニトロソ化合物を生成する。生成したニトロソ化合物のすべてが発ガン性を有するものとは思えないが、現在までにテストされたニトロソ化合物のうち、かなりのものが発ガン性を有することから、食品中でニトロソ化合物を生成するような条件は可能な限り避けるにこしたことはない。一般にニトロソ化合物は広い動物の種にわたって発ガン性を示し、また器官特異性を有する。しかも急性毒性は比較的弱いものも多いので、食品中に存在し得る発ガン物質としては、3,4-ベンツピレンなどの多核芳香族炭化水素などよりも、むしろ注意を要するものであろう。ジアルキルニトロソアミン以外のニトロソ化合物の発ガン性については、すでに多くの報告が発表されているので、省略する。

ニトロソ化合物と食品衛生

DMNA の前駆物質の一つである DMA は、海産魚類をはじめ一般の食品に広く分布されている。またもう一つの前駆物質である亜硝酸塩は食品添加物として使用されているほか、野菜、穀類などの農産物にもかなり広く存在しているので、つぎの二つの可能性について検討する必要がある。

① 食品添加物として亜硝酸塩を添加した食品中で、第2級アミンと反応してニトロソ化合物を生成するのではないか？

② 多量の第2級アミンを含む食品と、比較的少量の亜硝酸塩を含む食品とを、同時に大量に摂取した場合に、ヒトの胃の中でニトロソ化合物を生成するのではないか？

この二つの可能性については、これに関連ある基礎実験や分析結果について後に述べるが、その前に第2級ア

ミンと亜硝酸塩とからニトロソ化合物が生成する条件について触れてみよう。

ニトロソ化の条件

第2級アミンがニトロソ化される反応は2つの因子によって支配される。その①は第2級アミンの pK_B である。芳香族アミンなどのような pK_B 値の高い(塩基性の弱い)アミンは、ジアルキルアミンのような pK_B 値の低い(塩基性の強い)アミンに比べると容易にニトロソ化される。したがってニトロソ化合物の生成率も高く、反応速度も大きい。塩基性の強いアミンではニトロソ化反応が造塩反応と競合するため、反応速度は遅く、収率も低い。②は反応液の pH で、ニトロソ化には $[H^+]$ が大になるほど、反応速度が大となる。

$$\frac{[NO^+][OH^-]}{[HNO_2]} = k$$

上の反応式でニトロソ化には NO^+ が必要で、 $[NO^+]$ が大きいほど反応速度が大となる。 $[NO^+]$ を大きくするには $[H^+]$ を高める、すなわち pH を低くすればニトロソ化には好都合となる。たとえば、Fig. 1 に示すとおり弱塩基性アミンであるジフェニルアミンのニトロソ化の至適 pH は 1.0 付近であり、その収率は約 85% であるが、メチルアニリンでは至適 pH は 1~2 の間にあり、収率は約 45% に下がる(以上 Sander らの報告による)。またわれわれの測定した DMA の至適 pH は 3.6、収率は約 10% である。

Fig. 1. Formation of nitrosamines from sec. amines and nitrite

(N. P. Sen *et al.*: *Fd. and Cosmet. Toxicol.* 7, 301 (1969), A. Sakai *et al.*: *J. Food Hyg. Soc. Japan* 12, 170 (1971))

また pH 2 において、ジフェニルアミンとジプロピルアミンのニトロソ化の反応速度は、弱塩基性の前者が、強塩基性の後者の 1,000 倍も大きいことが Sander らによって報告されているし、DMA ではジプロピルアミンよりもさらに小さい。反応速度あるいは生成率からだけみると、もっとも発ガン性の強いものの一つである

DMNA は、生成速度も小さいし、収率も低いといえる。

食品中ニトロソ化合物生成の可能性

食肉に含まれる第2級アミンの量は微量であるので、食肉製品に亜硝酸塩を添加してもニトロソ化合物はほとんど生成しないであろう。しかし、わが国では魚肉ソーセージが大量に製造されているし、プレスハムなどにもかなり魚肉が使用されている。魚肉には第2級アミンが含まれているので、魚肉を使用した製品に亜硝酸塩が使用されれば、多少なりともニトロソ化合物が生成すると考えるのが当然である。また第2級アミンを多量含んでいるたらこに亜硝酸塩が使用されれば(これは食品衛生法違反である)、まず間違いなくニトロソ化合物を生成するであろう。わが国ではまたすじこ、いくらにもわずかながらあるが発色剤として使用されているが、すじこの第2級アミン含量はたらの数十分の一であるし、また添加量も 5 ppm (残存 NO_2 として) と低く抑えてあるので、ニトロソ化合物の量は生成しているとしてもごく微量であろう。

食品中に検出される第2級アミンの大部分は DMA であり、一部の食品に DEA、ジプロピルアミンが検出されている。タンパクの熱分解によってもピペリジンピロリジンなどの第2級アミンを生ずるといわれているが、ごく微量であるし、日常の食品からは、われわれはまだ検出していない。したがって食品中の第2級アミンのほとんどは DMA などの強塩基性のジアルキルアミンであるので、前項にのべたとおり、ニトロソ化合物の生成率はきわめて低い。またハム、ソーセージなどの pH は 5.6~6.5 の間にあるので、製造工程中 70~80° に加熱されるけれども、著量のニトロソ化合物が生成されるとは考えられない。

胃中ニトロソ化合物生成の可能性

1968年 Sander らは、われわれの生活環境、とくに食品、医薬品などにニトロソアミン生成の原因が少なからず存在していることを指摘した。すなわち、第2級アミンは、食品中に、また食品添加物としてかなり存在するし、また医薬品にいたっては無数にある。また亜硝酸塩は食品添加物として各国で使用されているほか、天然に食品中に広く分布しているし、唾液にも含まれている。また胃の中で、胃酸が減少すれば硝酸塩が細菌によって還元されて亜硝酸を生ずることもある。以上のように胃の中で第2級アミンと亜硝酸塩とによりニトロソ化合物が生成する可能性は十分にある、と述べている。

この可能性を裏付けるため Sander らは第2級アミンと亜硝酸塩を飼料中で混じてラットに投与した場合に、ガンが発生するかどうかの動物実験を行なった。すなわち 0.3% の DEA と 0.3% の $NaNO_2$ を含む飼料で、6 か月間ラットを飼育した場合には、腫瘍は発生せず、組織学的にも異常を認めていない。またメチルアニリンと $NaNO_2$ でも、ラットでは腫瘍を発生していない、これ

に関連ある動物実験をまとめてみると、DMA および NaNO_2 、あるいは DEA および NaNO_2 添加飼料をラットに投与した場合には腫瘍の発生はなく、催奇形性も認められていない。しかしメチルベンジルアミンと NaNO_2 をラットに投与すると、14週後に食道に腫瘍が多発している。DEA あるいは DMA と NaNO_2 とで、ラットに腫瘍を発生しない理由としては、ラットの胃の pH が 4～5 で比較的高いので、ニトロ化には適さぬこと、DEA、DMA のいずれも強塩基性であるためニトロ化されにくいことによるものであろう。メチルベンジルアミンは、これらに比べると塩基性は弱いので収率よくニトロ化されたと解釈すべきであろう。

1969年 Sen らは各種動物の胃液に DEA と NaNO_2 を添加して、DENA の生成量を測定した。ウサギの胃液の pH は低く 2 近辺であるので、かなりの量の DENA を生成しているが、ラット、イヌでは pH が高いため生成量は微量である。ヒトの胃液はウサギよりも低いため、ウサギの場合よりも生成量が多い。また Sen らはヒトの胃液に、実際に食品から摂取されると考えられる程度の量の DEA と NaNO_2 を添加し、37°で20～60分間放置して DENA 生成量を測定した (Table 1)。生成量はいずれも 0.5 μg 以下であるがヒト胃液中で DENA を生成することを確実に認めている。

Table 1. Diethylnitrosamine Produced in Human Gastric Juice

pH	$\text{Et}_2\text{NH} \cdot \text{HCl}$ (mg)	NaNO_2 (mg)	Time (mins.)	DENA (μg)
1.9	100	2	20	0.5
1.7	100	1	20	0.3
1.9	100	0.5	20	0.2
1.5	100	0.5	20	0.5
1.2	100	0.5	60	0.4
1.9	100	0.2	20	0
1.9	50	1	20	0
1.2	50	0.2	60	0.2
1.7	10	1	20	0
1.9	1	10	20	0

(N. P. Sen *et al.*: *Fd. and Cosmet. Toxicol.* 7, 301 (1969))

また Sen らはウサギとネコに DEA と NaNO_2 を経口投与し、30分～2時間後に胃内容物中に DENA の生成を認めている。

以上の実験はいずれも DEA と NaNO_2 より DENA の生成を検討したものであるが、それよりもはるかに毒性の強い、また発ガン性の強い DMNA の生成については実験されていない。これは DMA は DEA よりさらに強塩基性であるため、ニトロ化されにくいこと、

Table 2. Formation of Dimethylnitrosamine in Fasted Rabbit Stomach

B. W. (kg)	Dose			pH	DMNA (mg)	Yield (%)
	DMA (mg)	TMA (mg)	NaNO_2 (mg)			
2.4	100		100	2.2	0.09	0.09
2.4	100		100	3.0	0.12	0.13
3.3	250		500	2.5	0.57	0.25
3.0	250		500	4.5	1.25	0.55
3.0	500		1,000	4.8	3.2	0.70
2.7	500		1,000	4.5	5.0	1.10
2.8		1,000	2,000	4.1	>0.02	
2.7		1,000	2,000	4.0	>0.02	

(A. Sakai, A. Tanimura: *J. Fd. Hyg. Soc. Japan* 12, 170 (1971))

DMNA の抽出率、回収率が悪く定量分析が困難なためであろう。しかし一般の食品に含まれている第2級アミンの大部分は DMA であるし、また前述のように発ガン性は DMNA のほうがはるかに強い。そこでわれわれはウサギに DMA と NaNO_2 を経口投与し、30分後に胃内容物をとりだして DMNA が生成しているか否かについて実験した (Table 2)。最高投与量の場合には 5 mg の DMNA の生成を認めたが、本実験はあくまでモデル実験であって、実際の食事から摂取される量と比べると、投与量は非常に多い。まだ調査していないが、通常の食事から摂取する第2級アミンと亜硝酸塩の量は、それぞれ1日に 100 mg および 2 mg 程度と考えられている。また DMNA の前駆物質としてトリメチルアミン (TMA) も考えられるが、大量の TMA と NaNO_2 を投与した場合でも生成する DMNA は痕跡程度であるため、魚肉の常成分である TMA は DMNA の前駆物質とは考えなくてもよいのではなかろうか。ただし酵素反応によって TMA から DMA を生ずる場合には、また別の問題として考慮する必要がある。

食品中の第2級アミン、亜硝酸塩の分布

われわれはつぎに DMNA の前駆物質である DMA と亜硝酸塩の食品における含有量を調査した。食肉、食肉製品中の第2級アミンは微量であり、ロースト、あるいはボイルすることによっても若干増加した程度であるが、魚類中の第2級アミンは多量であり、とくにたらこに多く含まれている。また魚類をローストすると数倍から数十倍に第2級アミンが増加する。水産加工品ではひだら、いかの加工品などが第2級アミンを多く含んでいる。かん詰食品のうち、魚類を原料とするものにはかなり多いが、畜肉、あるいは農産物かん詰にはほとんど検出されていない。つぎに亜硝酸塩であるが、食品中の亜硝酸塩含量についてほとんど報告がないので、国立衛生試験所の原田技官が調査中のデータを一部示すが、一

般食品には意外に亜硝酸塩は少ない。ホウレンソウなどは外国の文献で 250 ppm も含まれていると報告されているが、レタスの 4.9 ppm をのぞき、野菜類、果実類はいずれも 1 ppm 以下である。そのほか一部の漬物に 3.8 ppm、小麦粉に数 ppm、チーズ類に 1 ppm 前後、発色剤添加の食肉製品に 0.5~28 ppm が検出されている。野菜類は保存中に細菌により硝酸塩が還元されて多量の亜硝酸塩を生ずるといわれているが、ホウレンソウ、ダイコン葉を 30° に保存した場合にも、3 日後にそれぞれ最高 16 ppm、1.5 ppm を検出したにすぎなかった。

むすび

さて、それではわれわれの日常摂取している食品中にニトロソ化合物が存在するか否かという問題であるが、河村氏が発表したように検出限界 0.1 ppm の分析法を使い、約 200 検体について分析したところ、いずれも検出されていない。しかし可能な限り濃縮し、薄層板上に大量スポットした場合、すじこから DMNA, DENA を、プレスハムからは DMNA がごく微量ではあるが検出されている。この方法は回収率などにまた問題があり、正式に発表する段階ではないが、これらの食品中のニトロソ化合物の量を推定すると 10 ppb 前後ではないかと思われる。今後微量分析法が確立されれば、この程度のニトロソ化合物は多くの食品中で検出されてくるものと思われる。しかし、天然物中に微量ではあるが広く分布している 3,4-ベンツピレンと同様、食品中にごく微量のニトロソ化合物が検出されたからといって、それらの食品をすぐに危険視する必要はないであろう。しかし食品中のニトロソ化合物の生成量、あるいはヒトの胃中での生成量はごく微量であるとはいっても、亜硝酸塩の多量摂取はニトロソ化合物の生成につながるものであるから、とくに亜硝酸塩を使用する場合にはその添加量に十分留意する必要があるし、またその使用量を最低におさえるべきである。食品中のニトロソアミンあるいは生体内で生ずるニトロソアミンについては、研究は始まったばかりであるので軽々しい予測は慎しまねばならないが、予期されたほどの carcinogenic hazard とはならないのではあるまいか。

質疑応答

問 日常の食品を通じて、1 回の食事により 0.5~1 mg の亜硝酸塩と 100 mg 前後の第 2 級アミンを摂取しているとのことであるが、これらの量を投与する動物実験を試みたか？

答 さきほどスライドで示したとおり、Sen らは 1969 年に、ヒトの胃液をとり出し、その中にジエチルアミン 100 mg と亜硝酸塩 0.5~1 mg を添加して、ジエチルニトロソアミンの生成を認めている。しかし、われわ

れの方ではまだやっていない。

質 今後このような実験を試みる予定であるか？

答 Sen らの実験のように胃液をとりだしそれに第 2 級アミンと亜硝酸塩を添加した場合と、実際に食品と共に第 2 級アミンと亜硝酸塩が胃の中に摂取された場合とで、ニトロソアミンの生成する割合は非常に異なる。食品と共に摂取した場合には反応速度および生成率の両方ともが大変に低くなる。したがってそのような実験をやって意味があるかどうかを十分に考慮した上で決めたい。

問 消費者にとっては確かに恐怖感がある。どの条件でニトロソ化合物が生成するのか、あるいはどの辺までならば安全なのか、その限界を明らかにしておかないと、いたずらに恐怖感をおおることになる。

答 私の今日の話の趣旨は、亜硝酸塩が正しく使われている食品中のニトロソ化合物、あるいは胃中で生成する可能性のあるニトロソ化合物に対して、必要以上の恐怖感を持つべきではないということを申し上げることであった。ウサギに投与したような苛酷な条件でも、なおかつあの程度しか生成していない。したがって通常の食品で、胃中にニトロソ化合物を生成するとは考えられないし、また食品衛生法で決められている範囲内で正しく亜硝酸塩が使用されている食品であれば、その中のニトロソ化合物がゼロではなくても、食品衛生上有害とは考えられない。例えばラットに対する MNL (最大無作用量) から計算すると、仮に 10 ppb の DMNA を含んだ食品をわれわれが摂取する場合に、体重 50 kg のヒトであれば、1 日にその食品を 10 kg ずつ食べれば、ラットの MNL に 1/100 をかけて得られたヒトの MNL に達する。ハム、ソーセージなどの 1 日の平均摂取量は 10 g 程度であるから、これを危険とみなすのには賛成できない。

発言 ただ今、第 2 級アミンと亜硝酸塩との関連性について伺ったが、われわれも古くから漬物類の亜硝酸塩について調査している。さきほどのスライドの 1 ppm よりも多いものもかなりあるのではないと思う。亜硝酸塩は奈良漬のような長期間漬けるものには認められないが、キャベツ、キュウリ、ナスなどの硝酸を比較的多く含んでいる野菜の塩漬や一夜漬などには多く検出されている。またダイコンの葉も硝酸塩が多いので、亜硝酸塩が検出されることが多い。セロリも硝酸塩が多いが、塩漬を作ることはない。このような漬物で、ちょっと酸味のでてきた時期によく食べられているし、またこの時期には亜硝酸塩も増加している。しかし漬物の摂取量はわずかなものであるから、余り恐怖感を持つ必要はないと思う。