

新規呈味素材グルタミンバリングリシン

食品添加物の指定要請添付資料概要

2012年12月6日

味の素株式会社

目次

1 名称	3
2 用語の定義	3
3 起源または発見の経緯および外国における使用状況に関する資料	3
1) 起源または発見の経緯	3
2) 外国における使用状況	4
3) 食品中での存在	4
4) 国際機関等における評価	4
4 物理化学的性質および成分規格案	5
1) 有効成分	5
2) 有効成分の性質	5
3) 製造方法	5
4) 成分規格案および試験法	6
5) 成分規格案の設定根拠	8
6) 食品添加物の安定性	9
5 有効性に関する資料	9
1) 食品添加物としての有効性	9
2) 食品中での食品添加物の安定性	9
3) 食品中の食品添加物の分析法	9
4) 食品中の栄養成分に及ぼす影響	10
6 安全性に関する資料	10
1) 体内動態に関する検討	10
2) 毒性に関する検討	13
7 一日摂取量の推計等	16
8 使用基準	16
9 参照	18

1 名称

グルタミルバリングリシン

その他の名称:

Glutamyl-valyl-glycine

L- γ -glutamyl-L-valyl-glycine

N-(N-L- γ -glutamyl-L-valyl)-glycine

2 用語の定義

グルタミルバリングリシン: L- γ -glutamyl-L-valyl-glycine を有効成分とする食品添加物

γ EV: L- γ -glutamyl-L-valine

VG: L-valyl-glycine

CaSR: カルシウムセンシングレセプター (Calcium sensing receptor)

FEMA: Flavor and Extract Manufacturers Association of the United States (米国食品香料製造者協会)

GSH: グルタチオン (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine)

LC/MS: 液体クロマトグラフ質量分析計

LC/MS/MS: 液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計

3 起源または発見の経緯および外国における使用状況に関する資料

1) 起源または発見の経緯

にんにくや玉ねぎは料理をより美味しくする食材として各国の料理に使用されており、日本ではこの美味しさは古くからコクやコク味として知られている。コク味は、甘味、塩味、酸味、苦味、うま味の5基本味では表せない味で、基本味だけではなく、厚み・ひろがり・持続性・まとまりなど基本味の周辺の味をも増強した味と考えられている⁽¹⁾。このコク味機能を有する物質としてはグルタチオン(以下 GSH)が知られているが⁽²⁾、GSH はその構造中に含硫アミノ酸であるシステインを含むことから不安定であり⁽³⁾、また特有の臭いがあることから⁽⁴⁾、その使用範囲に制限があった。

味の素㈱はコク味と CaSR(カルシウムセンシングレセプター)活性に正の相関のあることを見出し、各種ペプチドのCaSR活性を、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いたCaイオン濃度依存性Clイオン電流測定法により評価した。その結果、システインを含まず、GSHと比べて約10倍活性が強いグルタミルバリングリシンを見出した⁽⁵⁾。本品は無臭であることから、スープやスナックといったGSH高含有食品が使用されている食品の他、アイスクリーム、チーズやヨーグルトなど様々な食品に利用する事が期待される。

なお、グルタミルバリングリシンが有する γ グルタミル構造(グルタミン酸の γ 位のカルボキシル基とアミノ酸のアミノ基がペプチド結合した構造)をもつ種々のペプチドは、にんにく⁽⁶⁾や玉ねぎ⁽⁷⁾の他、チーズ⁽⁸⁾、肉、貝、ワインや酒⁽²⁾などに含まれている。これらの食品は世界中で調理され、食されている。

2) 外国における使用状況

外国における使用実績はない。

3) 食品中での存在

種々の食品中のグルタミンバリングリシンについて LC/MS/MS を用いて分析した⁹⁾。

分析結果を表 1 に示した。選択した 66 食品のうち、41 食品でグルタミンバリングリシンが定量された。種類別では、海外魚醤 20 種類中 14 種類、海外調味料 5 種類中 4 種類、国内魚醤 8 種類中 4 種類に、国内醤油 11 種類中 9 種類に、乳製品 8 種類中 2 種類に、調味料原料 6 種類全てに、魚介 8 種類中 2 種類にグルタミンバリングリシンが確認された。グルタミンバリングリシンが定量された食品種類のうち、1ppm 以上の比較的高い濃度のサンプルが乳製品を除くいずれの食品種類にも認められ、特に海外魚醤、海外調味料、国内醤油および調味料原料には 5ppm を超えるサンプルも見られた。

表 1 食品中のグルタミンバリングリシン濃度のまとめ

食品種類	収集サンプル数	グルタミンバリングリシン	
		定量 サンプル数	濃度* (ppm)
海外魚醤	20	14	0.4 ~ 12.6
海外調味料	5	4	0.1 ~ 5.2
国内魚醤	8	4	0.5 ~ 2.8
国内醤油	11	9	1.5 ~ 6.1
乳製品	8	2	0.4 ~ 0.7
調味料原料	6	6	0.8 ~ 48.3
魚介類	8	2	0.1 ~ 1.0

*: 定量限界値以上であったサンプルの濃度範囲を示した。

ND: 検出限界未満

4) 国際機関等における評価

グルタミンバリングリシン (Glutamyl-valyl-glycine) は 2012 年にスイスのジュネーブで開催された第 76 回 JECFA (the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) 会議において、フレーバーの中の「AMINO ACIDS AND RELATED SUBSTANCES」グループで Structural Class I として評価され、「No safety concern」と判断された。

(<http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/summaries/Summary76.pdf>、)。

グルタミンバリングリシンは 2010 年 2 月に FEMA の expert panel により指定の使用範囲において GRAS (FEMA GRAS No. 4709) 認証された¹²⁾。その後、2011 年には食品カテゴリーの拡大が認定された¹³⁾。

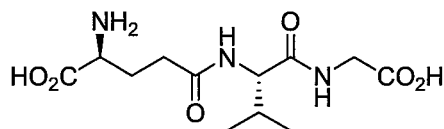
4 物理化学的性質および成分規格案

1) 有効成分

(ア) 化学式

L- γ -glutamyl-L-valyl-glycine

(イ) 構造式:



CAS No.:38837-70-6

(ウ) 分子式および分子量:



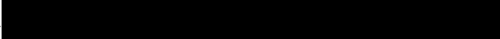


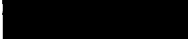
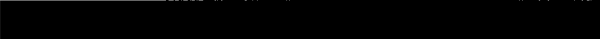
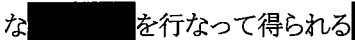



分子式: $C_{12}H_{21}N_3O_6$

分子量:303.31

2) 有効成分の性質

白色で無臭の結晶であり、融点は225~228°C、比旋光度 $[\alpha]^{20}_D -29$ ($c = 1.0, H_2O$)、酸解離定数は $pK_{a1}=2.5$ 、 $pK_{a2}=3.8$ 、 $pK_{a3}=9.6$ である。水に溶けやすく、非極性溶媒に対して溶けにくい。

3) 製造方法

グルタミルバリングリシンは、とを縮合させて得られるをによりとした後、これととにより選択的なを行なって得られるをし、により晶析を行なって得られる(図1)。

Glutamyl-valyl-glycine

図1 グルタミルバリングリシン製造方法

4) 成分規格案および試験法

- (ア) 含量 本品を乾燥物換算したものはグルタミルバリングリシン($C_{12}H_{21}N_3O_6$) 95.0～102.0%を含む。
- (イ) 性状 本品は白～淡赤色の粉末である。
- (ウ) 確認試験 本品を赤外吸収スペクトル測定法中の臭化カリウム錠剤法により測定するとき、 $3,321\text{cm}^{-1}$ 、 $3,282\text{cm}^{-1}$ 、 $1,712\text{cm}^{-1}$ 、 $1,654\text{cm}^{-1}$ 、 $1,619\text{cm}^{-1}$ 及び $1,541\text{cm}^{-1}$ のそれぞれの付近に吸収帯を認める。

(エ) 純度試験

(1)ヒ素 As_2O_3 として $1.0\mu\text{g/g}$ 以下(2.0g、第1法、装置B)

(2)鉛 Pbとして $1.0\mu\text{g/g}$ 以下

本品約 5.0g を蒸発皿に精密に量り、25%硫酸 5ml を加えてガラス棒でかき混ぜた後、水浴上で水分を蒸発させる。次に、徐々に加熱し硫酸の白煙がなくなるまで加熱する。必要があれば 25%硫酸を更に加え、試料がほとんど炭化するまで加熱する。容器に蓋をして電気炉に入れ、徐々に温度を上げて 525°C で灰化するまで加熱する。残留物に、 1mol/L 塩酸 5ml を加え、水浴上で蒸発乾固する。冷後、 3mol/L 塩酸 1ml 及び水 5ml を加え、残留物を水浴上で加温して溶かし、冷後、蒸発皿の内容物を 10ml のメスフラスコに移し、少量の水で蒸発皿の内壁を洗い、洗液をメスフラスコに合わせ、水を加えて 10ml とし、検液とする。別に、鉛標準液 5ml を正確に量り、 3mol/L 塩酸 10ml 及び水を加えて正確に 100ml とし、比較液とする。検液及び比較液につき、鉛試験法第 1 法により試験を行う。

操作条件

光源ランプ 鉛中空陰極ランプ

分析線波長 283.3nm

支燃性ガス 空気

可燃性ガス アセチレン

(オ) 乾燥減量 1.0%以下(105°C 、1時間)

(カ) 定量法 本品及び定量用グルタミルバリングリシン約 25 mg ずつを精密に量り、それぞれを水に溶かし、正確に 25 ml とする。それぞれの液 5 ml ずつを正確に量り、それぞれに水を加え、正確に 50 ml とし、検液及び標準液とする。検液及び標準液をそれぞれ $20\mu\text{l}$ ずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。検液及び標準液のグルタミルバリングリシンのピーク面積 A_T 及び A_S を測定し、次式より含量を求める。

グルタミルバリングリシン($C_{12}H_{21}N_3O_6$:303.31)の含量

$$= \frac{\text{乾燥物換算した定量用グルタミルバリングリシンの採取量(mg)}}{\text{乾燥物換算した試料の採取量(mg)}} \times \frac{A_T}{A_S} \times 100(\%)$$

試

操作条件

検出器:紫外吸光光度計(測定波長:210 nm)

カラム充てん剤:5 μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管:内径 4.6mm、長さ 25cm のステンレス管

カラム温度:30℃付近の一定温度

移動相 A:リン酸二水素カリウム 6.80g を水 1000mL に溶かし、リン酸を加えて、pH3.0 に調整する。

移動相 B:移動相 A 400mL にアセトニトリル 600mL を加える。

濃度勾配:移動相 A を 100% で 25 分間保持した後、移動相 A:移動相 B(100:0)から(0:100)までの直線濃度勾配を 25 分間行う。

流量:1.0 mL/分

システム適合性

システムの性能:標準溶液 20 μ L につき、上記の条件で操作するとき、グルタミルバリングリシンのピークのシンメトリー係数は 1.3 以下、理論段数は 15000 以上である。

システムの再現性:標準溶液 20 μ L につき、上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、グルタミルバリングリシンのピーク面積の相対標準偏差は 1.0%以下である。

保存基準 気密容器に入れ、保存する。

通則の改正

容器

42. 気密容器とは、通常の手扱い、運搬又は保存状態において、固形又は液状の異物が侵入せず、内容物の損失、風解、潮解又は蒸発を防ぐことができる容器をいう。

43. 密封容器とは、通常の手扱い又は貯蔵の間に空気又はその他のガスが侵入しないように内容物を保護する容器をいう。

(キ) 試薬・試液

3mol/L 塩酸 塩酸 270ml に水を加えて 1000mL とする。

グルタミルバリングリシン, 定量用

含量 本品はグルタミルバリングリシン($C_{12}H_{21}N_3O_6$) 99.0%以上を含む。

性状 本品は白～淡赤色の粉末である。

確認試験 本品を赤外吸収スペクトル測定法中の臭化カリウム錠剤法により測定するとき、 $3,321\text{cm}^{-1}$ 、 $3,282\text{cm}^{-1}$ 、 $1,712\text{cm}^{-1}$ 、 $1,654\text{cm}^{-1}$ 、 $1,619\text{cm}^{-1}$ 及び $1,541\text{cm}^{-1}$ のそれぞれの付近に吸収帯を認める。

純度試験 類縁物質 本品約 25 mg を精密に量り、水を加えて溶かし、正確に 25ml とし、検液とする。この液 5ml を正確に量り、水を加えて正確に 50ml とする。この液 5ml を正確に量り、水を加えて正確に 50ml とし、標準液とする。検液及び標準液 20 μ l につき、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行い、検液の主ピーク以外のピーク面積及び標準液の主ピークの面積を測定し、次式より類縁物質の総量を求めると

き、0.5%以下である。

$$\text{類縁物質の総量} = \frac{\text{検液の主ピーク以外のピークの合計面積}}{\text{標準液の主ピークの面積}} \quad (\%)$$

操作条件 「グルタミルバリルグリシン」の定量法の操作条件を準用する。

乾燥減量 1.0%以下(105℃, 1時間)

定量法 本品約 0.4g を精密に量り、ギ酸 3mL を加えて溶かし、酢酸 50mL を加え、0.1mol/L 過塩素酸で滴定する。終点の確認は、通例、電位差計を用いる。別に空試験を行い補正する。

0.1mol/L 過塩素酸 1mL = 30.331mg $C_{12}H_{21}N_3O_6$

定量用グルタミルバリルグリシン グルタミルバリルグリシン, 定量用を見よ。

25%硫酸 水 300mL に硫酸 100mL を加える。冷やしながらかくはんする。

5) 成分規格案の設定根拠

(ア) 含量

複数ロットの実測定の結果、下限は 96.5%、上限は 99.0%であった。定量法は、定量用グルタミルバリルグリシンを対照とする HPLC による分析であるため、分析のばらつきを考慮して含量の規格は、「本品を乾燥物換算したものはグルタミルバリルグリシン ($C_{12}H_{21}N_3O_6$) 95.0~102.0%を含む。」とした。

(イ) 性状

実測定の結果を基に、性状の規格は「本品は白～淡赤色の粉末である。」とした。

(ウ) 確認試験

実測定の結果得られた特徴的な吸収波数帯を表 4 に示すとともに代表的なスペクトルを参照 14) に示した。本結果から、確認試験の規格は、「本品を赤外吸収スペクトル測定法中の臭化カリウム錠剤法により測定するとき、 $3,321\text{cm}^{-1}$ 、 $3,282\text{cm}^{-1}$ 、 $1,712\text{cm}^{-1}$ 、 $1,654\text{cm}^{-1}$ 、 $1,619\text{cm}^{-1}$ 及び $1,541\text{cm}^{-1}$ のそれぞれの付近に吸収帯を認める。」とした。

表 4 赤外吸収スペクトル

波数	帰属
3321cm^{-1} 付近	N-H 伸縮振動
3282cm^{-1} 付近	N-H 伸縮振動
1712cm^{-1} 付近	C=O 伸縮振動
1654cm^{-1} 付近	カルボン酸イオン伸縮振動
1619cm^{-1} 付近	アミド I 吸収帯
1541cm^{-1} 付近	アミド II 吸収帯

(エ) 純度試験

- (1)ヒ素:実測定の結果、ヒ素は検出されなかったことから、ヒ素の規格値は「As₂O₃として 1.0 μg/g 以下」とした。
- (2)鉛:重金属の管理ではなく、諸外国で一般的に考えられている鉛の個別管理とした。実測定の結果、鉛は検出されなかったことから、鉛の規格値は「Pbとして 1.0 μg/g 以下」とした。

6) 食品添加物の安定性

本品を保存条件 25℃/60%RH および 40℃/75%RH にて 12 ヶ月まで保存した時の安定性を「4) 成分規格案および試験法、(オ)定量法」に示す方法にしたがって確認した⁽¹⁵⁾。保存により含量および光学異性体に変化は認められなかった。類縁物質については、温度依存的に α-Glu-Val-Gly (α 体) が環化した PCA-Val-Gly (PCA 体) への経時変化が認められたが、これら以外の個々の類縁物質および総量に変化は認められなかった。以上の結果から、有効期間を 2 年と設定した。

5 有効性に関する資料

1) 食品添加物としての有効性

コク味は、甘味、塩味、酸味、苦味、うま味で表される5基本味では表せない味で、基本味だけではなく、厚み・ひろがり・持続性・まとまりなど基本味の周辺の味をも増強した味と考えられている。グルタミンバルグリシンはこのコク味付と機能を有する調味料であり、スープやスナックといった食品の他、アイスクリーム、チーズやヨーグルトなど様々な食品に利用可能である。その添加濃度は食品分類により 15 から 80ppm である⁽¹⁶⁾。単純系においては 0.47ppm 以上の濃度でその効果を発揮する¹⁷⁾。

2) 食品中での食品添加物の安定性

グルタミンバルグリシンはγ-グルタミルトリペプチドであることから、たんぱく質と同様に強酸や高温で分解されることが想定された。そこで食品の調理条件を考慮し、グルタミンバルグリシンの安定性に及ぼす温度(50℃及び80℃)及びpH(pH2から10)の影響を水溶液中で評価した。その結果、50℃ではいずれのpHでも48時間まで安定であった。その結果、50℃ではいずれの条件においても、48時間後まで水溶液中のグルタミンバルグリシンの残存率の変化は見られなかった。80℃ではpH低下及びインキュベーション時間の長さに関連して水溶液中のグルタミンバルグリシンの残存率の低値傾向がみられ、pH2の48時間後における水溶液中のグルタミンバルグリシンの残存率は約80%であった。⁽¹⁸⁾以上のことから、グルタミンバルグリシンは当該条件下においても有効に機能すると考えられる。

3) 食品中の食品添加物の分析法

本品は、使用基準を設けないため、分析法を簡便に以下に示す。固体の食品サンプルは抽出操作後に徐タンパク処理を行う。液体の食品サンプルは徐タンパク処理を行う。除タンパク処理したサンプルを内部標準物質と混合し、誘導体化操作を行った後、LC/MS/MS装置を用いて分析を行う。分離には逆相クロマトグラフィーを用いるほか、イオン化はESI(ポジティブ)の条件下で行う。

グルタミルバリルグリシンに由来するピークの検出と定量はMRM(Multiple Reaction Monitoring)モードを用いて行う。「食品中におけるグルタミルバリルグリシンならびにその想定加水分解物の分析」⁽⁹⁾の「2 方法」に詳細を示した。

4) 食品中の栄養成分に及ぼす影響

本品は食品由来のたんぱく質やペプチド等と同様、消化管で容易に分解すると考えられることから、糖質、ミネラル、ビタミンなどそのほかの栄養成分の吸収を阻害する懸念はないと考えられる。

なお、ラットを用いた28日間混餌投与毒性試験⁽¹⁹⁾において本品をラットの基礎飼料と0.01および2%の濃度にて混合し、14日間のグルタミルバリルグリシンの安定性を確認したところ、特に変化を認めなかったことから、グルタミルバリルグリシンが他の栄養成分に及ぼす影響は少ないと考えられる。また同試験において、1000mg/kgまでラットの栄養状態に影響を及ぼさなかったことから、栄養成分の吸収に影響を与える可能性は低いと考えられる。

6 安全性に関する資料

1) 体内動態に関する検討

グルタミルバリルグリシンはトリペプチドであることから、食品由来のたんぱく質と同じように消化管で分解されると推定される。このことをより明らかにするため、厚生労働省の「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」の表2「食品添加物が食品内または消化管内で分解して食品常在成分となることを確認する場合の検討事項」に従って整理した。

- ① 食品添加物の通常の使用条件下で、当該物質が容易に食品内又は消化管内で分解して食品常在成分と同一物質になること。

(ア) 人工胃液⁽²⁰⁾

グルタミルバリルグリシンについて人工胃液による消化実験を行った。豚ペプシンを含む人工胃液中で、グルタミルバリルグリシンを20ppmの濃度、37°Cの温度にて反応を開始し、0、2、4、6時間後に反応を停止させ、グルタミルバリルグリシン濃度をLC/MSにて測定した。その結果、グルタミルバリルグリシンは反応6時間後に97%が残存しており、ほとんど分解が見られなかった。

(イ) 人工腸液⁽²¹⁾

グルタミルバリルグリシンについて人工腸液による消化実験を行った。豚パンクレアチンを含む人工腸液中で、グルタミルバリルグリシンを5ppmの濃度、37°Cの温度にて反応を開始し、0、3、6時間後に反応を停止させ、残存するグルタミルバリルグリシンおよび想定される分解物であるγEV(L-γ-glutamyl-L-valine)およびVG(L-valyl-glycine)濃度をLC/MS/MSにて測定した。その結果、6時間後では約40%のグルタミルバリルグリシンが残存していたほか、VGの増加が認められた。γEVには変化はなかった。以上のことからグルタミルバリルグリシンは人工腸液によってその一部がVGに分解されると推定された。

(ウ) ヒト小腸粘膜ホモジネート液⁽²²⁾

グルタミルバリルグリシンについてヒト小腸粘膜ホモジネート液による消化実験を行

った。ヒト小腸粘膜ホモジネート液で、グルタミルバリルグリシンを 5ppm の濃度、37°C の温度にて反応を開始し、0、10、30、60 および 90 分後に反応を停止させ、残存するグルタミルバリルグリシンおよび想定される分解物である γ EV および VG 濃度を LC-MS/MS にて測定した。その結果、グルタミルバリルグリシンはヒト小腸粘膜ホモジネート液で速やかな分解が認められ、30 分後には約 20% が、60 分後には 2.6% が残存するのみであった。反応中、VG は増加したが、90 分後には初期濃度と同等になった。 γ EV には変化がなかった。以上のことからグルタミルバリルグリシンはヒト小腸粘膜において速やかに VG に分解され、さらに VG も分解されることが確認された。

(エ) ヒト小腸粘膜マイクロソーム画分⁽²³⁾

グルタミルバリルグリシンについてヒト小腸粘膜マイクロソーム画分による消化実験を行った。ヒト小腸粘膜マイクロソーム画分で、グルタミルバリルグリシンを 5ppm の濃度、37°C の温度にて反応を開始し、0、5、10、15、30 および 60 分後に反応を停止させ、残存するグルタミルバリルグリシンおよび想定される分解物である γ EV および VG 濃度を LC-MS/MS にて測定した。その結果、グルタミルバリルグリシンはヒト小腸粘膜マイクロソーム画分では速やかな分解が認められ、15 分後には定量下限未満となった。その間、VG が 5 分後をピークとして増加し、その後減少した。 γ EV には変化がなかった。以上のことからグルタミルバリルグリシンはヒト小腸粘膜マイクロソーム画分において速やかに VG に分解し、さらに VG も分解されることが確認された。

(オ) 食品中の γ EV 及び VG⁽⁹⁾

種々の食品中の γ EV 及び VG について、LC/MS/MS を用いて分析した。

結果を表 5 に示した。乳製品を除き、ほとんどのサンプルで γ EV 及び VG が検出された。海外魚醤の中には、 γ EV および VG がそれぞれ 378.6ppm および 253.6ppm を示すサンプルがみられたほか、国内醤油でも γ EV および VG がそれぞれ 109.9ppm および 75.8ppm を示すサンプルが見られた。

表 5 食品中の γ EV、VG 濃度のまとめ

食品種類	収集サンプル数	γ EV 濃度* (ppm)	VG 濃度* (ppm)
海外魚醤	20	2.7 ~ 378.6	0.1 ~ 253.6
海外調味料	5	4.6 ~ 9.9	6.8 ~ 14.2
国内魚醤	8	4.7 ~ 99.5	16.0 ~ 38.1
国内醤油	11	6.4 ~ 109.9	24.8 ~ 75.8
乳製品	8	23.6 ~ 70.2	2.1
調味料原料	6	2.6 ~ 211.7	22.2 ~ 850.4
魚介類	8	0.01 ~ 8.5	ND

*: 定量限界値以上であったサンプルの濃度範囲を示した。

ND: 検出限界未満

(カ) 考察

グルタミンバリングリシンは胃ではほとんど分解を受けないが、小腸液で一部が分解されるほか、小腸粘膜の主にマイクロソーム画分に含まれる成分により VG に速やかに分解されること、さらに VG も分解されることが確認された。従ってグルタミンバリングリシンは、主に小腸粘膜において速やかに VG に分解されるほか、グルタミン酸、バリンおよびグリシンに分解されるものと推定された。また、グルタミンバリングリシンの分解物と推定される VG は種々の食品中に含まれており食品常在成分と考えられた。

従ってグルタミンバリングリシンは通常の使用条件下で、容易に消化管で分解して食品常在成分と同一物質になると考えられた。

- ② 食品内又は消化管内での分解に関わる主要な因子(pH、酵素等)が明らかであること。
 グルタミンバリングリシンが消化管において容易に分解することを示した上記の試験において、パンクレアチン及び小腸粘膜のマイクロソーム画分に含まれる成分により分解されることが明らかとなっている。GSH などの γ グルタミン基を転移させる Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)⁽²⁴⁾は膜たん白質として小腸に発現していることが知られている⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾。グルタミンバリングリシンは γ グルタミン基を有しているトリペプチドであり、小腸粘膜のマイクロソーム画分で速やかに分解されたこと及びバリングリシンが主要な代謝物であることを考慮すると、グルタミンバリングリシンは小腸に存在する GGT によって分解される可能性が推察される。
- ③ 食品添加物の通常の使用条件下で適正な量を使用した場合、当該食品添加物の体内への吸収が食品成分と同程度であり、他の栄養成分の吸収を阻害しないこと。
 グルタミンバリングリシンの想定最大 1 日摂取量は「7 一日摂取量の推計等」に示す如く、約 44mg/人/日と推定され、日本人のタンパク質の平均一日摂取量 67.3g 人/日(平成 21 年国民健康・栄養調査報告 <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/dl/h22-houkoku-07.pdf>)の 0.065%に過ぎないことから、仮にグルタミンバリングリシンが未変化体のまま全て吸収されたとしても、1 日の総たんぱく摂取量に与える影響はほとんどない。また上述のとおり、グルタミンバリングリシンは消化管で速やかにジペプチドもしくはアミノ酸に分解され、他の食品のタンパク質、ペプチドあるいはアミノ酸と同じように生体に利用されると考えられる。従って、糖質、ミネラル、ビタミン等その他の栄養成分の吸収を阻害する懸念はないものと考えられる。
- ④ 摂取された食品添加物の未加水分解物又は部分加水分解物が大量に糞便中に排泄されないこと及び未加水分解物又は部分加水分解物が生体組織中に蓄積しないこと
 上述のとおり、グルタミンバリングリシンは消化管で速やかにジペプチドもしくはアミノ酸に分解され、他の食品のタンパク質、ペプチドあるいはアミノ酸と同じように生体に利用されると考えられる。従って、グルタミンバリングリシンの未加水分解物又は部分加水分解物が大量に糞便中に排泄されることは考えにくく、またグルタミンバリングリシンの最終代

謝産物が体タンパク構成アミノ酸であり生体成分であることを考慮すると、生体組織中への蓄積を懸念する意義は低いと考えられる。

- ⑤ 食品添加物を使用した食品を摂取したとき、当該食品の主成分の過剰摂取の問題が起きないこと。

グルタミルバリングリシンの想定最大1日摂取量は「7 一日摂取量の推計等」に示す如く、約44mg/人/日と推定され、日本人のタンパク質の平均一日摂取量67.3g 人/日の0.065%に過ぎない。従って、グルタミルバリングリシンを新たに使用することによって食品の主成分の過剰摂取の問題は起こらないものと考えられる。

- ⑥ まとめ

以上の結果からグルタミルバリングリシンは消化管内で分解して食品常在成分になることが科学的に明らかである場合に該当すると考えられる。

2) 毒性に関する検討

グルタミルバリングリシンは上記の「6 1)体内動態」に示すように、指針及び平成8年厚生省ガイドラインに基づく「当該食品添加物が食品常在成分であるか又は食品内若しくは消化管内で分解して食品常在成分になることが科学的に明らかな場合」に該当すると考えられた。同指針においては本品のようなペプチドについて評価に必要な毒性試験に関する記載がないため、「食品添加物の指定および使用基準改正に関する指針」(平成8年3月22日衛化第29号)の「原則として、表1のうち毒性に関する資料の添付を省略することができるが、げっ歯類の28日間反復投与毒性試験および変異原性試験は添付することが望ましい。」との記載に従って、ラット28日間混餌反復毒性試験および遺伝毒性試験(Ames試験、染色体異常試験および*in vivo*マウス小核試験)をOECDのGLPを遵守し、OECD毒性試験法ガイドラインに準拠して実施した。

- ① 亜急性毒性試験(ラットを用いた28日間混餌投与毒性試験)⁽¹⁹⁾

グルタミルバリングリシンの毒性を検討する目的で、粉末基礎飼料にグルタミルバリングリシンを混合し、100、300および1000mg/kg/日の用量で6週齢のSprague-Dawley系SPFラット[CrI:CD(SD)、1群雌雄各10匹]に28日間混餌投与する毒性試験を実施した。対照群には粉末基礎飼料のみを同様に与えた。投与期間中の各被験物質投与群の平均被験物質摂取量は100、300および1000mg/kg投与群の雄でそれぞれ113.9、336.5および1112.7mg/kg/日、雌でそれぞれ114.0、327.9および1123.8mg/kg/日であった。

投与期間を通じて死亡動物はみられず、詳細な観察を含む一般状態、機能検査、握力、自発運動量、体重、摂餌量、摂水量、眼科学検査、血液学検査、剖検および病理組織学検査のいずれの検査項目においても被験物質投与に起因すると考えられる変化はみられなかった。

尿検査では、たんぱく質陽性例の増加傾向が300mg/kg以上の投与群の雄にみられた。腎臓等の臓器障害を示唆する血液化学検査、解剖検査もしくは病理組織学検査の変化が認められなかったことから、毒性学的意義のない変化と考えられる。

血液化学検査では尿素窒素およびクレアチニンの低値が1000mg/kg投与群の雄に

みられたが、高値ではないことから毒性学的意義のない変化と考えられる。

器官重量で脾臓の相対および絶対重量の低値が 100 および 1000 mg/kg 投与群の雌にみられた。認められた変化は試験施設の背景値の範囲内の変化であり、軽微なものであった。また血液学検査や脾臓を含むリンパ・造血器系の病理組織学検査で異常は認められなかったことから、毒性学的意義のない変化と考えられる。

以上の結果、グルタミルバリルグリシンの本試験条件下における無毒性量は、雌雄ともに 1000 mg/kg/日を上回るものと判断した。

② 遺伝毒性試験

(ア) 細菌を用いた復帰突然変異試験⁽²⁷⁾

グルタミルバリルグリシンの遺伝子突然変異誘発能の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略す) TA100、TA1535、TA98、TA1537 および大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) WP2 uvrA を用いて、代謝活性化する場合および代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。なお、被験物質の溶媒には注射用水を用いた。

試験は、19.5～5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果より本試験は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 については 39.1～1250 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1537 については 156～5000 µg/plate の範囲の 6 用量で実施した。また、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、*E. coli* WP2 uvrA については、生育阻害が認められなかったため、313～5000 µg/plate の範囲の 5 用量で実施した。なお、本試験は同一用量で 2 回実施した。

被験物質による沈殿および着色：本被験物質によるプレート上の沈殿および着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

生育阻害：実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 1250 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1537 の 5000 µg/plate の用量において生育阻害が認められた。

復帰変異コロニー数：本試験 1 回目および本試験 2 回目ともに代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

以上の試験結果より、本試験条件下において、グルタミルバリルグリシンは細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない(陰性)と判定した。

(イ) ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験⁽²⁸⁾

グルタミルバリルグリシンのチャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞(CHL/IU)を用いた染色体異常試験を実施し、その染色体異常誘発性を検討した。

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理法および連続処理法ともに最高用量を 3100 µg/mL とし、公比 2 で 3 用量を設定して染色体異

常試験を実施した。

その結果、短時間処理法および連続処理法ともに、すべての用量でギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率(TA値)および倍数体の出現頻度は5%未満を示した。

すべての処理法において、陰性対照群では試験施設の背景値または陰性の判定基準内のTA値および倍数体の出現頻度を示し、陽性対照群では試験施設の背景値内のTA値を示したことから、試験は適切に実施されたと考えられる。

以上の結果より、グルタミルバリルグリシンは本試験条件下において染色体構造異常および染色体数的異常(倍数体)誘発性を有しないと判定した。

(ウ) *in vivo* マウス小核試験⁽²⁹⁾

グルタミルバリルグリシンの染色体異常誘発能の有無を検討するため、CrIj:CD1(ICR)SPF マウスを用いた小核試験を実施した。グルタミルバリルグリシンの500、1000 および 2000 mg/kg/日を約24時間間隔で2回経口投与し、2回目投与後約24時間に骨髓塗抹標本を作製した。また、陰性対照として注射用水、陽性対照としてマイトマイシンCの1 mg/kgを1回投与する群を設定した。

その結果、各被験物質投与群の小核を有する幼若赤血球の出現頻度は、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示さず、用量依存的な変化も認められなかった。また、各被験物質投与群における全赤血球200個中に占める幼若赤血球の出現頻度も、陰性対照群と比較して、統計学的に有意な変化を示さなかった。なお、陰性対照群と陽性対照群の小核を有する幼若赤血球の出現頻度は、試験施設における各々の背景データのmean ± 3S.D.の範囲内であったことから、試験は適切に実施されたものと考えられる。

以上の結果から、グルタミルバリルグリシンは本試験条件下でCrIj:CD1(ICR)SPFマウスの骨髓において、染色体異常誘発能は無いと判定した。

③ 一般薬理

ラットを用いた28日間混餌投与毒性試験⁽¹⁹⁾の投与第4週において、OECD毒性試験法ガイドラインに準拠して詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定を実施したほか、尿検査を実施した。その結果、いずれの項目においても異常は認められておらず、一般薬理学的な影響はないと考えられた。

④ 考察

グルタミルバリルグリシンの反復毒性を検討する目的で、粉末基礎飼料にグルタミルバリルグリシンを混合し、100、300 および 1000 mg/kg/日の用量で6週齢のSprague-Dawley系SPFラット[CrI:CD(SD)、1群雌雄各10匹]に28日間混餌投与する毒性試験を実施した結果、被験物質投与の影響と考えられる毒性変化はみとめられず、また投与第4週の一般薬理学的な影響も認められなかった。従って無毒性量(NOEL)は1000mg/kg以上であった。また遺伝毒性の有無を評価する目的で、Ames試験、染色

体異常試験および *in vivo* マウス小核試験を実施した結果、いずれの試験においても陰性であった。

7 一日摂取量の推計等

グルタミルバリングリシンが添加される食品分類とグルタミルバリングリシンの摂取量を示した⁽¹⁶⁾。スープやスナックといった GSH 高含有食品が使用されている食品群のほか、アイスクリーム、チーズやヨーグルトといったコク味が好まれる食品群に、平均添加濃度として 15 から 80ppm を、また最大添加濃度として、30 から 160ppm をそれぞれ添加するものとした。グルタミルバリングリシンの添加が想定される食品分類の 1 日摂取量を年齢別食品摂取量(新食品添加物マニュアル第 3 版)から示した。それぞれの食品分類の 1 日摂取量と本品の最大添加濃度を乗じ、各食品分類から摂取される本品の想定最大摂取量を求め、これらを合計することにより本品の想定最大 1 日摂取量を算出した。その結果、約 44mg/人/日となり、この値を日本人の平均体重 50kg で除することにより得られた本品の最大 1 日摂取量は約 0.88mg/kg/日と推定された。

グルタミルバリングリシンが適用される主要な日本国内事業の市場規模および人口に基づいてグルタミルバリングリシンの摂取量を算出した⁽³⁰⁾。グルタミルバリングリシンの日本国内での主要な食品事業(コーヒー飲料、アイスクリーム、飲料、マーガリン、クリーマー、ビール様飲料、スープ類、つゆ・たれ類、粉体調味料、ハム・ソーセージ、乳系使用冷凍食品)の市場規模(富士経済調べ)に平均的な喫食時濃度である 40ppm および、すべての商品に添加されるわけではないことから納入率 1%を乗じて年間消費量として約 4000kg を算出した。日本の人口 1 億 2751 万人(「日本の統計 2011」平成 21 年の統計値)のうちその 1 割がグルタミルバリングリシンを摂取すると想定し、一人あたりの推定 1 日摂取量として $4000\text{kg} \div 12,751,000 \text{人} \div 365 \text{日} = 0.859\text{mg/人/日}$ を算出した。さらにこの値を日本人の平均体重 50kg で除することにより得られた本品の一人あたりの 1 日摂取量は約 0.017mg/kg/日と推定された。

参考までに、米国 FEMA GRAS 取得時の最高 1 日摂取量の算出結果を以下に示す。

該当食品カテゴリーの数値の合計値である最大 1 日摂取量は、各食品カテゴリーの最高濃度と米国における各食品の摂取量⁽¹³⁾を乗じた結果、32.63mg/人/日となった。この値を米国人の平均体重 60kg で除することにより得られた本品の米国における 1 日摂取量は約 0.54mg/kg/日と推定された。

8 使用基準

グルタミルバリングリシンは調味料原料や長い食経験のある魚醤、醤油など種々の食品に含まれている。分解物と想定される VG についても、調味料原料や長い食経験のある魚醤、醤油などにも含まれており、食品常在成分と考えられる。また、本品の最終代謝産物と考えられるグルタミン酸、バリン及びグリシンは食品常在成分であり、かつ本邦の指定添加物である。また、本品の *in vitro* の消化管分解試験を実施したところ、小腸液で一部が分解されるほか、小腸粘膜の主にマイクロソーム画分に含まれる成分により VG に速やかに分解され、さらに VG も分解されることが確認された。このことから、本品は消化管でグルタミン酸、バリン及びグリシンの他、VG に分解すると考えられた。以上のことから本品は「添加物に関する食品健康影響評価指針」(2010 年 5 月)における「消化管内で分解して食品常在成分になることが科学的に明らかである場合」に該当すると考えられる。

同指針においては本品のようなペプチドについて評価に必要な毒性試験に関する記載がないため、「食品添加物の指定および使用基準改正に関する指針」(平成 8 年 3 月 22 日衛化第 29 号)の「原則として、表1のうち毒性に関する資料の添付を省略することができるが、げっ歯類の 28 日間反復投与毒性試験および変異原性試験は添付することが望ましい。」との記載に従うこととした。その結果、ラット 28 日間混餌反復毒性試験における無毒性量(NOABL)は 1000mg/kg 以上であり、遺伝毒性試験は陰性であった。さらにラット 28 日間混餌反復毒性試験における無毒性量を「7 一日摂取量の推計等」に示した最大 1 日摂取量 0.88mg/kg/日で除して得られた安全係数は 1132 倍以上となり十分な安全域が得られたことから、ヒトが摂取する際の本品の安全性上の懸念は低いと考えられる。

以上のように、本品はその消化管内で分解して食品常在成分になることが科学的に明らかであること、ヒトが摂取する際の安全性上の懸念は低いことから、使用基準の設定は必要ないと考えられる。

9 参照

- (1) Hiroaki Nagasaki, Naohiro Miyamura and Yuzuru Eto、低脂肪食品、国際公開番号 WO 2008/139945 A1、2008年11月20日公開
- (2) Yoichi Ueda, Makoto Sakaguchi, Kazuo Hirayama, Ryuichi Miyajima, and Akimitsu Kimizuka, Characteristic Flavor Constituents in Water Extract of Garlic, *Agri. Biol. Chem.* 54(1) 163-169, 1990.
- (3) Yoichi Ueda, Munenaki Yonemitsu, Takako Tsubuku, Makoto Sakaguchi, Ryuichi Miyajima, Flavor characteristics of Glutathione in raw and cooked foodstuffs, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61 (12), 1977-1980, 1997
- (4) Takako Terayama、食品組成物、公開特許広報 特開 2000-60482、2000年2月29日公開
- (5) Takeaki Ohsu, Yusuke Amino, Hiroaki Nagasaki, Tomohiko Yamanaka, Sen Takeshita, Toshihiro Hatanaka, Yutaka Maruyama, Naohiro Miyamura, and Yuzuru Eto, Involvement of the Calcium-sensing Receptor in Human Taste Perception, *The Journal of Biological chemistry*, Vol. 285, NO. 2, pp. 1016-1022, January 8, 2010
- (6) Makoto Ichikawa, Nagatoshi Ide, Kazuhisa Ono, Changes in organosulfur compounds in garlic cloves during storage, *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 4849-4854, 2006
- (7) Martin L. Shaw, Meeghan D. Pither-Joyce, John A. McCallum, Purification and cloning of a γ -glutamyl transpeptidase from onion (*Allium cepa*), *Phytochemistry* 66, 515-522, 2005
- (8) Simone Toelstede, Thomas Hofmann, Kokumi-Active Glutamyl Peptides in Cheeses and Their Biogenesis by *Penicillium roquefortii*, *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 3738-3748, 2009
- (9) 味の素株式会社社内資料、食品中における Glutamyl-valyl-glycine ならびにその想定加水分解物の分析、2011年11月
- (10) Motonaka Kuroda, Yumiko Kato, Junko Yamazaki, Yuko Kai, Toshimi Mizukoshi, Hiroshi Miyano and Yuzuru Eto, Determination and Quantification of γ -Glutamyl-valyl-glycine in Commercial Fish Sauces, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7291-7296, 2012
- (11) Motonaka Kuroda, Yumiko Kato, Junko Yamazaki, Naoko Kageyama, Toshimi Mizukoshi, Hiroshi Miyano, Yuzuru Eto, Determination of γ -glutamyl-valyl-glycine in raw scallop and

processed scallop, products using high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Food Chemistry 134, 1640-1644, 2012

- (12) 味の素株式会社社内資料、Letter from the FEMA expert panel dated February 19, 2010
- (13) 味の素株式会社社内資料、Letter from the FEMA expert panel dated February 28, 2011 (additional food categories)
- (14) 味の素株式会社社内資料、代表的な IR スペクトル、2009 年 10 月 6 日
- (15) 味の素株式会社社内資料、KF001 の保存安定性、2011 年 3 月 8 日
- (16) 味の素株式会社社内資料、Glutamyl-valyl-glycine が添加される食品分類と Glutamyl-valyl-glycine の最大摂取量、2012 年 6 月 22 日
- (17) 味の素株式会社社内資料、Taste Test for Flavor Threshold of KF001、2009 年 12 月 29 日
- (18) 味の素株式会社社内資料、調理条件を想定した水溶液中の Glutamyl-valyl-glycine 安定性試験、2011 年 11 月 22 日
- (19) 味の素株式会社社内資料、KF001 のラットを用いた 28 日間混餌投与毒性試験、2010 年 12 月 17 日
- (20) 味の素株式会社社内資料、The *in vitro* study on the degradation of KF001 in the simulated gastric fluid、2010 年 1 月 15 日、修正 2012 年 1 月 18 日
- (21) 味の素株式会社社内資料、The *in vitro* study on the degradation of KF001 (5 ppm) in the simulated intestinal fluid、2010 年 1 月 15 日、修正 2012 年 1 月 18 日
- (22) 味の素株式会社社内資料、The *in vitro* study on the degradation of KF001 (5 ppm) in the homogenate of human small intestinal mucosa、2010 年 1 月 15 日
- (23) 味の素株式会社社内資料、The *in vitro* study on the degradation of KF001 (5 ppm) in the microsomal fraction from human small intestinal mucosa、2010 年 1 月 15 日
- (24) Roselyne Castonguay, Dany Halim, Myle`ne Morin, Alexandra Furtos, Christian Lherbet, Eric Bonneil, Kinetic Characterization and Identification of the Acylation and Glycosylation Sites of Recombinant Human γ -Glutamyltranspeptidase, Biochemistry, 46, 12253-12262, 2007

- (25) 海老原洋子、石井 裕正、宗像 良雄、永田 茂之、加藤 真三、土屋 雅春、高木 敏、荒井 正夫、重田 洋介、奥野 府夫、アルコール性肝障害患者における小腸粘膜 γ -GTP活性の増加とその細胞内局在について、日本消化器病学会雑誌、80(1)、114-114、1983
- (26) Andre Pawlak, Edward H. Cohen, Jean-Noel Octave, Rene Schweickhardt, Shi-Jun Wu, Frederique Bulle, Naima Chikhi, Ja-Hyun Baik, Sylvie Siegrist, and Georges Guellaen, An Alternatively Processed mRNA Specific for γ -Glutamyl, Transpeptidase in Human Tissues, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, No. 6, Issue of February 25, 3256-3262, 1990
- (27) 味の素株式会社社内資料、KF001の細菌を用いる復帰突然変異試験、2010年12月13日
- (28) 味の素株式会社社内資料、KF001の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、2010年12月13日
- (29) 味の素株式会社社内資料、KF001のマウスを用いた小核試験、2010年12月10日
- (30) 味の素株式会社社内資料、日本国内事業市場規模から算出したグルタミンバリングリシンの1日摂取量、2012年6月21日