

アンモニウムイソバレレート の概要

1. はじめに

アンモニウムイソバレレートは、食品中に天然に存在することが確認されていない成分である¹⁾。本物質は、欧米では、肉製品、焼菓子、ソフト・キャンデー類、冷凍乳製品類、清涼飲料、ゼラチン・プリン類などの様々な加工食品において風味を向上させるために添加されている²⁾。

本物質はイソ吉草酸とアンモニアとの塩であることから、以下参考までにそれぞれの存在について記載する：

イソ吉草酸は、ホップ油、ティルジットチーズ、白ワイン、ヨーグルト、ヤマドリタケ、はちみつ等の食品中に存在する成分である¹⁾。

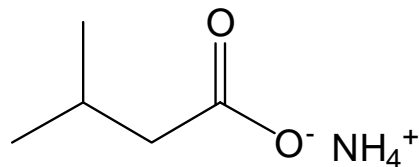
アンモニアは、ティルジットチーズ、セロリ、ケール、ホップ油、レタス等の食品中に存在するほか、赤キャベツ等の加熱調理により生成する成分である¹⁾。

2. 名称等

名称：アンモニウムイソバレレート

英名：Ammonium isovalerate

構造式：



化学式：C₅H₁₃NO₂

分子量：119.16

CAS 番号：7563-33-9

3. 安全性に係る知見の概要

厚生労働省が行った安全性試験の結果ⁱ⁾、National Library of Medicine(NLM：PubMed、TOXLINE)、米国香料工業会のデータベース(RIFM-FEMA database)、製品評価技術基盤機構(NITE)データベースの検索結果、JECFA モノグラフの内容等に基づき、遺伝毒性試験、反復投与毒性試験等の成績をとりまとめた。なお、動物を用いた試験成績については経口投与のものに限定した。

また本物質はイソ吉草酸とアンモニアとの塩であるため、これらの物質につ

ⁱ⁾ 反復投与毒性試験（引用文献 3）、および 2 種類の遺伝毒性試験（引用文献 6、7）が厚生労働省の委託により行われている。各試験に使用された被験物質については、試験機関において保存されていた被験物質の一部を譲り受けて構造解析を行った結果から、アンモニウムイソバレレートであることが国立医薬品食品衛生研究所の専門家により確認されている^{14) 15)}。なお本被験物質は、添加物として指定する際に予定されている規格に合致しているものである。

いても以下参考までに知見の概要を記載する。

(1) 遺伝毒性

細菌(サルモネラ菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び大腸菌 WP2*uvrA*)を用いた添加物(香料)アンモニウムイソバレレート⁶⁾の復帰突然変異試験(最高用量 5,000 µg/plate)では、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であった⁶⁾。チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU 細胞)を用いた添加物(香料)アンモニウムイソバレレートの染色体異常試験(最高濃度 1,192 µg/mL、短時間処理法及び連続処理法)では、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であった⁷⁾。以上の結果から、細菌を用いた試験及び動物の培養細胞を用いた試験のいずれにおいても陰性の結果が得られているので、生体にとって問題となるような遺伝毒性はないものと考えられる。なおイソ吉草酸については、調べた範囲では遺伝毒性に関する試験は行われていない。

表 遺伝毒性試験概要

試験		対象	処理濃度・投与量	結果	参照
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験 [2006年、GLP]	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1535、TA1537) <i>Escherichia coli</i> (WP2 <i>uvrA</i>)	[+/-S9] 0、156、313、625、1250、2500、5000 µg/plate	陰性	6
	染色体異常試験 [2006年、GLP]	チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/IU 細胞)	[短時間(6時間)、処理法、+/-S9]及び[連続(24時間)、処理法、-S9] 0、298、596、1192*1 µg/mL (0、2.5、5、10 mM 相当)	陰性	7

注)+/-S9：代謝活性化系存在及び非存在下 -S9：代謝活性化系非存在下

*1：被験物質は 74.5、149、298、596、1192 µg/mL (0.625、1.25、2.5、5、10 mM 相当)の 5 用量で試験を行い、すべての用量で相対細胞増殖率が 50%以上であったため最高用量から連続する 3 用量を観察対象とした。

(2) 反復投与毒性

① アンモニウムイソバレレート

5 週齢の SD 系ラット(各群雌雄各 10 匹)への添加物(香料)アンモニウムイソバレレートの強制経口投与による 90 日間反復投与毒性試験(0、0.314、3.14、31.4 mg/kg 体重/日ⁱⁱ⁾)では、一般状態、尿検査について対照群、投与群ともに異常は

ii 投与量は、欧米における使用量調査を基に、安全マージンを確保するため、算定した推定摂取量に対して 1,000、10,000、100,000 倍に相当する 3 用量群とされた。具体的には、年間使用量が最大となる 1995 年の欧州の 1995 年の年間使用量 127 kg を基に、

みられず、摂餌量の推移及び臓器重量には対照群と投与群の間に明らかな違いは無かった。体重、血液学的検査、血液生化学的検査、眼科学的検査において、被験物質投与に関連した毒性影響は認められなかった。病理組織学的検査においては、前胃／腺胃の境界縁の扁平上皮過形成が 31.4 mg/kg 体重/日投与群で、雄 8 例、雌 4 例に、また、雄の 3.14 mg/kg 体重/日投与群で 1 例にそれぞれ認められた³⁾。これらの結果から、本試験条件下における無毒性量(NOAEL)は、0.314 mg/kg 体重と考えられる。

②イソバレリック アシド

27～29 日齢のラット(各群雌雄各 12 匹ⁱⁱⁱ⁾への 12 週間の混餌による反復投与毒性試験(餌中のイソバレリック アシド濃度は 25 ppm、雄 5.1 mg/kg 体重/日、雌 5.9 mg/kg 体重/日)^{iv)}では、体重増加、摂餌量、一般状態、血液ヘモグロビン量、尿糖、尿アルブミン、肝及び腎重量において、被験物質投与に関連した毒性影響はなかったとの報告がある⁴⁾。

また、4 週齢の SD 系ラット(各群雄 5～6 匹)への 90 日間の混餌による反復投与毒性試験^{v)}の報告がある。尿検査(70 日目で試料採取)では pH 値が対照群より高い値を示した(投与群 8.4、対照群 7.2)が、著者らはこれを、ナトリウムの高濃度摂取により過剰なナトリウムを尿に排泄するために緩衝能がシフトしたためとしており、被験物質の投与による影響とはみなしていない。また血液学的検査(80 日目で試料採取)においてみられたヘモグロビン値の有意な減少(対照群の値より 10%低い)がそのほかにみられた唯一の有意な変化として記載されているが、著者らはこれを毒性影響とはみなしていない。その他摂餌量(14 日目に比較)、剖検時の体重と器官重量に対照群との間の有意な変化は認められず、病理組織学的検査において、被験物質の投与に由来すると推測されるような異常はみられなかったとされている。以上より本試験条件下における NOAEL は餌中

√人口統計より当時の欧州の人口を 3.7 億人として、後述の PCTT 法により推定摂取量を算出し、日本人の平均体重 50 kg で除して上述の安全マージンを乗じた。

iii 本文中(Procedure)には雌雄各 12 匹を使用と記載されているが、結果表(Table1)では投与群・対照群とも雄 11 匹、雌 12 匹と記載されている。また試験期間中に投与群の雄と対照群の雌にそれぞれ 1 匹ずつ死亡が確認された(それぞれの生存数が 10 匹、11 匹であった)が、解剖の結果肺疾患によるものと判明した。なお対照群の雌は生存数 11 匹であるが、肝臓と腎臓の臓器重量の測定はうち 10 匹について行われている(Table2)。

iv 餌中の各香料の割合は、アミル ホーメート：アミル アセテート：アミル プロピオネート：アミル ブチレート：アミル イソバレレート：イソバレリック アシド=100：206：1：211：22：25(ppm)。雄のイソバレリック アシドに対する平均摂取量(mg/kg 体重/日)は $115 \times 25 / 565 = 5.08 \dots$ 、雌の平均摂取量は $134 \times 25 / 565 = 5.92 \dots$ と算出。

v 被験物質は水酸化ナトリウムで pH7.4 に調整された後濃縮されて(酸含量 40～50 % (w/w))餌に添加された。最初の 14 日間で、適切(投与群と対照群で食餌量や体重増が比較可能)な最大投与量を確認し、適切な投与量(今回の場合 5 %)では 90 日まで投与を継続した。

濃度 5%^{vi}とされている⁵⁾。

(3) 発がん性

アンモニウムイソバレレートおよびイソ吉草酸について、発がん性試験は行われておらず、国際機関(International Agency for Research on Cancer (IARC)、European Chemicals Bureau (ECB)、U. S. Environmental Protection Agency (EPA)、National Toxicology Program(NTP))でも、発がん性の評価はされていない。

(4) その他

アンモニウムイソバレレートおよびイソ吉草酸について、内分泌かく乱性に関する試験は行われていない。またアンモニウムイソバレレートに関しては、生殖発生毒性に関する試験は行われていない。なお両生類を用いた試験であるため参考ではあるが、イソ吉草酸についてはアフリカツメガエルの胚を用いた発生毒性試験法(FETAX)による報告²³⁾がある(試験濃度：0～880 mg/L、EC₅₀：580～590 mg/L)。

またイソ吉草酸に関しては、1%ペトロラタム溶液を用いたパッチテストによるヒトでの感作性誘導試験(48時間×5回貼付の後、更に48時間の貼付、被験者数：31人)において、局所反応はみられなかったとの報告がある²⁶⁾。

アンモニアは、プリン分解やアミノ酸の脱アミノ反応における代謝物として内因的に生成される成分である。また消化管内では、摂取した食品に由来するアミノ酸や核酸が細菌により分解されてアンモニアが形成され、その量は1日あたり10mg(十二指腸)～3g(結腸)と推算されている。欧州食品安全機関(EFSA)のAFCパネルは2008年にアンモニア及び関連物質(塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム)の香料としての使用に関する評価書を採択している。評価当事遺伝毒性に関する入手可能なデータは限られていたが、その内容からアンモニア及び関連物質を香料として評価する事は可能として香料の評価手順を適用している。またアンモニアは消化管から速やかに吸収されること、内因的に産生する量はこれらの物質の香料としての使用量よりはるかに高いことなどから、香料としての想定される使用レベル(アンモニアは34 µg/人/日)においては無害な物質に代謝されることが予測されるとしている²⁾。

^{vi} 本文献は、イソバレリックアシドのJECFA評価でも参照されており、モノグラフではNOELを2,500 mg/kg 体重/日と換算している。餌中の被験物濃度と摂取量との関係について、JECFAで用いている換算表は以下のとおりであり、このときの計算には老齢ラットのパラメータ(下段)が用いられたと考えられる。

種	最終体重(g)	摂取量(g/動物/日)	摂取量(g/kg 体重/日)
ラット(若)	100	10	100
ラット(老)	400	20	50

4. 摂取量の推定

アンモニウムイソバレートの香料としての年間使用量の全量を人口の10%が消費していると仮定する JECFA の PCTT(Per Capita intake Times Ten)法による 1995 年の米国及び欧州における一人一日あたりの推定摂取量は、それぞれ 16 µg、18 µg となる^{vii}。正確には認可後の追跡調査による確認が必要と考えられるが、既に許可されている香料物質の我が国と欧米の推定摂取量が同程度との情報⁹⁾があることから、我が国での本物質の推定摂取量は、おおよそ 16~18µg/人/日の範囲になると推定される。

またイソバレリック アシドについて 1995 年の米国及び欧州における一人一日あたりの推定摂取量を求めると、それぞれ 279 µg、476 µg となる^{viii}。

なお、食品中にもともと存在する成分としてのアンモニウムイソバレートに関する情報はないが、イソ吉草酸の摂取量は、意図的に添加されたイソバレリック アシドの 265 倍^{ix}であるとの米国での報告¹⁰⁾がある。

5. 安全マージンの算出

90 日間反復投与毒性試験成績の NOAEL 0.314 mg/kg 体重/日と、想定される推定摂取量(16~18 µg/人/日)を日本人平均体重(50kg)で割ることで算出される推定摂取量(0.00032~0.00036 mg/kg 体重/日)と比較し、安全マージン 900~

vii [年間使用量(kg)]/[人口(億人)]/[365(日)]/[報告率]/[人口の1割で消費]×10 で求める。

	米国	欧州
年間使用量(kg)	118	127
人口(億人)	2.6	3.2
報告率	0.8	0.6
推定摂取量 (µg/人/日)	(計算値) 15.54...	(計算値) 18.12...

注)調査年により年間使用量に差があるが、その原因として、香料物質の場合、世界的に製造業者数も少なく、数年に1回在庫がなくなるたびに製造するようなものが多く、また、加工食品の流行に依存するため、変動があるものと考えられる。なおおもとのデータでは米国の 1995 年の年間使用量は 260 ポンド(117.9kg)と報告されている¹⁶⁾。

viii 本物質は日本でも脂肪酸類の一つ(イソバレリック アシド)として使用の実績があり、¹⁷⁾ 2005 年の調査結果を元に推算すると、一人一日あたりの推定摂取量は 159 µg となる²⁵⁾。なお米国の 1995 年の年間使用量は、おもとのデータでは 4660 ポンド(2114kg 弱)と報告されている¹⁶⁾。

	米国	欧州	日本
年間使用量(kg)	2115	3334	558
人口(億人)	2.6	3.2	1.2
報告率	0.8	0.6	0.8*
推定摂取量 (µg/人/日)	(計算値) 278.5...	(計算値) 475.7...	(計算値) 159.1...

* : 報告書²⁵⁾の処理方法には 0.9 と記載されているが、実際の結果表では 0.8 で計算されていたため、0.8 を採用した。

ix 香料由来の摂取量としては 1982 年の米国での年間使用量(607kg)が用いられている。

1,000 が得られる。

なお参考までにイソバレリック アシドについて安全マージンを計算すると、90 日間反復投与毒性試験成績の NOAEL は 2,500 mg/kg 体重/日、推定摂取量 0.00578~0.00952mg/kg 体重/日から 260,000~430,000 となる^x。

6. 構造クラスに基づく評価

アンモニウムイソバレレートは構造クラス I に分類される^{8) 12)}。本物質はイソ吉草酸とアンモニアとの塩であることから、摂取後体内で速やかにイソ吉草酸とアンモニアに加水分解されることが予測される。イソ吉草酸は食品脂肪酸の一種であり、脂肪酸の酸化経路によりアセチル CoA とプロピオニル CoA を生じ、最終的に TCA 回路にて水と二酸化炭素に分解されて排泄されると考えられる⁸⁾。また、その出発物質となるイソバレリル CoA はアミノ酸であるロイシンの代謝中間体でもあり、ロイシンの代謝系を経てアセチル CoA とアセト酢酸を生じ、同様に TCA 回路にて代謝されるという系も想定される¹⁸⁾。またアセチル CoA とアセト酢酸は、コレステロールや脂肪酸の体内合成にも用いられる事が知られている¹⁹⁾。なおラットのミトコンドリアを用いた *in vitro* の試験では、イソ吉草酸あるいはイソバレリル CoA を TCA 回路のいくつかの基質と共にミトコンドリアと反応させたところ、基質の代謝が阻害されたとの報告があるが、用いられたイソ吉草酸の濃度(1.19 mM)はロイシンの先天的代謝障害を持つヒトの血中レベルと同等であり²⁰⁾、健康なヒトにおいてはほぼ問題にはならないと考えられる。

なお、ウサギにイソブタノール(2 mL/kg 体重)を強制投与後飽和水溶液による自然排尿により尿中の成分を確認した試験において、イソ吉草酸が主成分として得られたとの報告があり²¹⁾、また上述の代謝異常においては尿中にグリシン抱合体²⁰⁾、さらに、グルクロン酸抱合体²⁸⁾の存在も確認されており、またグルクロン酸抱合体は特にグリシン抱合の系が飽和したと考えられる条件下で多く確認されている²⁸⁾ことから、供給過剰の場合にはイソ吉草酸がそのままあるいはグリシン抱合体として、またグリシン抱合の系も飽和するような場合にはグルクロン酸抱合により排出されることが想定される。

アンモニアは内因的に生成されるものも含めほとんどすべてが吸収されて門脈循環に入り、健康体のヒトではこれらのアンモニウムイオンのほとんどは肝臓でオルニチン回路を経由して速やかに尿素に転換され、尿中に排出される。ごく少量のみが体循環に入り、一部(全生成量の 1%未満)は糞中に排出され、いくらかは組織を形成するタンパク質に組み込まれることが報告されている²²⁾。

7. JECFA における評価

アンモニウムイソバレレートは、2003 年第 61 回 JECFA 会議で脂肪族分岐飽

^x 日本の使用量を元に計算した場合、780,000 強となる。

和・不飽和アルコール、アルデヒド、脂肪酸及び関連エステルの一つとして評価され、推定摂取量(16~18 µg/人/日)が、構造クラス I の摂取許容値(1,800 µg/人/日)を下回る事などから、香料としての使用において安全性の懸念はないとされた⁸⁾。

イソバレリック アシドは 1997 年第 49 回 JECFA 会議で飽和脂肪族分岐鎖一級アルコール、アルデヒド及び酸の一つとして評価され、推定摂取量(96^{xi}~480 µg/人/日)が、構造クラス I の摂取許容値(1,800 µg/人/日)を下回る事などから、香料としての使用において安全性の懸念はないとされた²⁴⁾。

8. 「国際的に汎用されている香料の我が国における安全性評価法」¹³⁾に基づく評価

本物質は香料としての使用において生体にとって特段問題となる毒性はないと考えられる。本物質は構造クラス I に分類され、安全マージン(900~1,000)は 90 日間反復投与毒性試験の適切な安全マージンとされる 1,000 は確保できていないが、想定される最大推定摂取量(16~18 µg/人/日)は構造クラス I の摂取許容値(1,800 µg/人/日)を下回る。

引用文献

- 1) VCF Volatile Compounds in Food : database / Nijssen, L.M.; Ingen-Visscher, C.A. van; Donders, J.J.H. [eds]. - Version 12.3 - The Netherlands : TNO Quality of Life (website accessed in Mar. 2011)(未公表)
- 2) RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc.)-FEMA (Flavor and Extract Manufacturers' Association) database, Material Information on Ammonium isovalerate (website accessed in Mar. 2011) (未公表)
- 3) ラットによるアンモニウムイソバレレート^{xi}の 90 日間反復強制経口投与毒性試験 (2006) (株)ボゾリサーチセンター(厚生労働省委託試験)
- 4) Oser, B.L. (1957) Toxicological screening of Food flavors Class II. Amyl esters of aliphatic acids. Trubek Laboratories, Inc. (未公表)
- 5) Amore, J.E., Gumbmann, M.R., Booth, A.N. and Gould D.H. (1978) Synthetic flavors; efficiency and safety factors for sweaty and fishy odorants. Chemical Senses and Flavour 3, 307-317
- 6) アンモニウム イソバレレートの細菌を用いる復帰突然変異試験 (2006) (財)食品農医薬品安全性評価センター(厚生労働省委託試験)

^{xi} JECFA 評価時には米国の使用量として、1987 年のデータが用いられている。

- 7) アンモニウム イソバレレートのは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 (2006) (財)食品農医薬品安全性評価センター(厚生労働省委託試験)
- 8) 第 61 回 JECFA WHO Food Additives Series 52, Aliphatic branched-chain saturated and unsaturated alcohols, aldehydes, acids, and related esters(2004)参考：
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v52je15.htm>
- 9) 平成 14 年度厚生労働科学研究報告書「日本における食品香料化合物の使用量実態調査」、日本香料工業会
- 10) Stoffberg J. and Grundschober F. Consumption ratio and food predominance of flavoring materials. (1987) *Perfumer & Flavorist*. **12**(4), 27-56.
- 11) RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc.)-FEMA (Flavor and Extract Manufacturers' Association) database, Material Information on Isovaleric acid (website accessed in Mar. 2011) (未公表)
- 12) アンモニウムイソバレレートの構造クラス(要請者作成資料)
- 13) 香料安全性評価法検討会. 国際的に汎用されている香料の安全性評価の方法について(最終報告・再訂正版). 平成 15 年 11 月 4 日
- 14) Penta Manufacturing Company CERTIFICATE OF ANALYSIS AMMONIUM ISOVALERATE, LOT NUMBER 85725, DATE February 14, 2006
- 15) 被験物質アンモニウムイソバレレートの確認結果
- 16) Lucas CD, Putnam JM, and Hallagan JB. FLAVOR AND EXTRACT MANUFACTURERS' ASSOCIATION OF THE UNITED STATES 1995 POUNDAGE AND TECHNICAL EFFECTS UPDATE SURVEY. FEMA ; 1999, pp.3-9 and 12-14, and p.11 and 157 of Appendix 2.
- 17) Committee on Food Additives Survey Data, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences(ed.) *1987 Poundage and Technical Effects Update of Substances Added to Food*, Washington, D.C., 1989; pp.5-9 and p.37 of Appendix I.
- 18) Voet, D and Voet, J.G. ヴォート生化学 第 3 版 (下). 田宮信雄, 村松正実, 八木達彦, 吉田浩, 遠藤斗志也訳. 東京化学同人 (2005) p788-791.
- 19) Kodama H., Azumi T., Shimomura, T., and Fujii Y. Metabolic fates of isovaleric acid and isovalthine in rats. *Acta Medica Okayama*. (1966) **20**(3), 107-113.

20) Bergen, B.J., Stumpf, D.A., Haas, R., Parks, J.K. and Eguren, L.A. A mechanism of toxicity of isovaleric acid in rat liver mitochondria. *Biochem Med.* (1982), **27**(2), 154-160.

21) 斎藤誠, 各種低級アルコールの代謝について. *日大医誌.* (1975) **34**(7), 569-584.

22) EFSA Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from Commission on Flavouring Group Evaluation 46 (FGE.46): Ammonia and two ammonium salts from chemical group 30. *The EFSA journal* (2009), *ON-955*, 1, 5, 14-15, and 23-24.

23) Dawson, D.A., Additive Incidence of Developmental Malformation for *Xenopus* Embryos Exposed to a Mixture of Ten Aliphatic Carboxylic Acids. *Teratology* (1991) **44**(5), 531-546.

24) 第 49 回 JECFA WHO Food Additives Series 40, Saturated aliphatic acyclic branched-chain primary alcohols, aldehydes, and acids.(1998)

参考 : <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v040je11.htm>

25) 平成 18 年度厚生労働科学研究報告書「我が国で使用している食品香料化合物の生産使用量・摂取量に関わる調査研究(第 2 回使用量実態調査)(調査対象期間 : 2005 年 1 月~12 月)」、日本香料工業会

26) BIBRA International Ltd. (ed.), Toxicity profile, Isovaleric acid and its common salts, 1988.

27) 厚生労働省. 「アンモニウムイソバレレート」の添加物指定及び規格基準の設定に関する食品健康影響評価について 食品安全委員会第 369 回会合配布資料(2011)

28) Hine, D.G. and Tanaka, K., The identification and the excretion pattern of Isovaleryl glucuronide in the urine of patients with isovaleric acidemia. *Pediatr Res.* (1984), **18**(6), 508-512.