

(案)

飼料添加物評価書

2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニン
イソプロピルエステル

令和6年（2024年）3月

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会

目次

	頁
○審議の経緯.....	3
○食品安全委員会委員名簿.....	3
○食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会専門委員名簿.....	3
○要約.....	4
I. 評価対象飼料添加物の概要.....	6
1. 原体の情報.....	6
(1) 原体に関する情報.....	6
(2) 原体の製造方法.....	6
2. 製剤の情報.....	6
(1) 製造方法.....	6
(2) 賦形物質等.....	6
3. 用途.....	7
4. 対象飼料及び添加量.....	7
5. 使用目的及び使用状況.....	7
II. 安全性に係る知見の概要.....	7
1. 原体及び賦形物質等に関する知見.....	7
(1) 原体.....	7
(2) 賦形物質等.....	8
2. 体内動態試験.....	9
(1) 体内動態試験 (牛).....	9
(2) 体内動態試験 (牛).....	10
(3) 体内動態試験 (牛).....	10
(4) 体内動態試験 (牛).....	11
(5) 体内動態試験 (牛).....	12
(6) 体内動態試験 (牛).....	12
(7) 体内動態試験 (<i>in vitro</i>).....	13
3. 残留試験.....	15
(1) 残留試験 (牛①).....	15
(2) 残留試験 (牛②).....	15
4. 遺伝毒性試験.....	17
5. 急性毒性試験.....	17
6. 亜急性毒性試験.....	18
(1) 14日間亜急性毒性試験 (ラット).....	18
(2) 90日間亜急性毒性試験 (ラット).....	18
7. 慢性毒性及び発がん性試験.....	19
8. 生殖発生毒性試験.....	20
9. 対象動物における安全性試験.....	20
(1) 安全性試験 (牛).....	20
10. その他の試験.....	21
(1) 皮膚及び眼刺激性試験.....	21

(2) 皮膚感作性試験	21
Ⅲ. 国際機関等における評価	21
1. JECFA における評価	21
2. EC における評価	22
3. EFSA における評価	22
4. ECHA における評価	22
5. EPA における評価	22
Ⅳ. 食品健康影響評価	23
・ 別紙：検査値等略称	25
・ 参照	26
＜別添＞（案）対象外物質評価書「メチオニン」（第4版）	

〈審議の経緯〉

- 2023年 7月 12日 農林水産大臣より飼料添加物の指定に係る食品健康影響評価について要請（5消安第2271号）、関係資料の接受
- 2023年 7月 13日 厚生労働大臣よりメチオニンを有効成分とする飼料添加物 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステルを飼料添加物として使用した家畜に由来する食品の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発生食0712第1号）、関係資料の接受
- 2023年 7月 18日 第906回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2023年 11月 15日 第194回肥料・飼料等専門調査会
- 2024年 1月 19日 第195回肥料・飼料等専門調査会
- 2024年 3月 19日 第934回食品安全委員会（報告）

〈食品安全委員会委員名簿〉

（2021年7月1日から）

山本 茂貴（委員長）
浅野 哲（委員長代理 第一順位）
川西 徹（委員長代理 第二順位）
脇 昌子（委員長代理 第三順位）
香西 みどり
松永 和紀
吉田 充

〈食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会専門委員名簿〉

（2023年10月1日から）

森田 健（座長*）
川本 恵子（座長代理*）
吉田 敏則（座長代理*）
赤沼 三恵 佐々木 一昭
新井 鐘蔵 高橋 研
井上 薫 平田 暁大
今井 俊夫 山田 雅巳
植田 富貴子 山中 典子

*：2022年4月25日から

要 約

飼料添加物 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル (HMBi) について、飼料添加物指定審査用資料等を用いて、食品健康影響評価を実施した。

HMBi は、2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニン (HMTBa) と 2-プロパノールがエステル結合した化合物である。本飼料添加物はメチオニンを補給する目的で牛用及び子牛用飼料に添加して使用される。推奨添加量は 47.3 mg/kg 体重/日とされている。

本飼料添加物の構成成分である HMTBa は HMBi と同様にメチオニンを補給する目的の飼料添加物として指定されており、2-プロパノールは食品添加物として承認されている。

本飼料添加物に含まれている賦形物質等は、その使用状況及び既存の評価並びに本飼料添加物の用法・用量を考慮すると、本飼料添加物の含有成分として摂取した場合の人への健康影響は無視できる程度と考えた。

体内動態試験及び残留試験の結果から、HMBi は牛に投与された後、HMTBa と 2-プロパノールへ加水分解され、両物質は第一胃壁から吸収されて、HMTBa はメチオニンの供給源となり、2-プロパノールは肝臓で可逆的にアセトンに酸化されると考えられた。投与された HMBi が組織中及び乳汁中に残留する可能性は低いと考えられた。また、動物体内で生成する代謝物のうち、メチオニンは、動物用医薬品及び飼料添加物として通常使用される限りにおいて、食品に残留することにより人の健康を損なうおそれのないと評価されている物質である。一方で、2-プロパノールから生成するアセトンについては、乳汁中に残留がみられた。しかしながら、HMBi 投与後のアセトンの平均乳汁中濃度は、牛において代謝性アシドーシスを発症する濃度を大きく下回り、牛に対して問題となる濃度ではなかった。また、残留試験において HMBi 投与群でみられた乳汁中アセトン濃度を用いて試算した小児の体重当たりの摂取量は、EPA において算出されたアセトンの人への慢性的な経口ばく露における RfD 未満であった。この摂取量の試算値は、全ての牛に HMBi が投与されたと仮定した場合の過大な見積もりであった。アセトンは揮発性があり、市場に流通する乳由来製品は一般的に殺菌処理を経ていることから、処理過程においてアセトンの量はさらに低くなり、乳製品を摂取することにより人がアセトンにばく露されるおそれはより低くなると考えられる。これらのことから、HMBi が想定しうる使用方法に基づき通常使用される限りにおいて、投与による乳汁中のアセトンの濃度は人の健康に悪影響を与える可能性は極めて低いと判断した。

遺伝毒性試験では、HMBi に遺伝毒性はないと判断した。

亜急性毒性試験では、主な毒性影響として肝臓 (肝細胞の空胞化又は色素沈着)、腎臓 (硝子滴沈着)、脾臓 (ヘモジデリン沈着及び髄外造血) 及び血液 (貧血) の所見がみられ、これらの試験のうち最小の NOAEL は、100 mg/kg 体重/日であった。

慢性毒性及び発がん性試験並びに生殖発生毒性試験は実施されていないが、本飼料添加物が動物に摂取された後速やかに HMTBa と 2-プロパノールに加水分解され、生成する両物質について、慢性毒性や発がん性、催奇形性が懸念される報告はないことをもって、安全性に問題はないと考えた。

対象動物における安全性試験では、本飼料添加物の牛への推奨添加量での混餌投与について、牛に対する安全性に問題はないと考えた。

以上のことから、食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、本飼料添加物が、飼料添加物として適切に使用される限りにおいては、食品を通じて人の健康に影響を与える可能性は無視できる程度と考えた。

I. 評価対象飼料添加物の概要

1. 原体の情報

(1) 原体に関する情報

①一般名

2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル

②化学名

IUPAC : propan-2-yl 2-hydroxy-4-methylsulfanylbutanoate

CAS No. : 57296-04-5

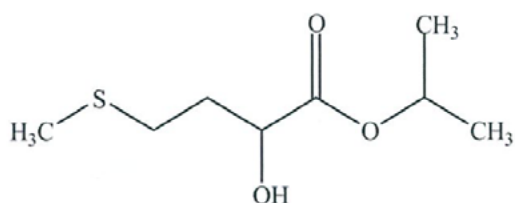
③分子式

$C_8H_{16}O_3S$

④分子量

192.28

⑤構造式



(参照 1)

(2) 原体の製造方法

プロピレン、メチルメルカプタン、硫酸、2-プロパノール（別名：イソプロパノール）等を反応させて合成する。（参照 2）

2. 製剤の情報

(1) 製造方法

本飼料添加物は、原体をそのまま製剤としたもの（製剤（その1））と、原体を無水ケイ酸に吸着させて得られた粉末（製剤（その2））がある。（参照 2）

(2) 賦形物質等

製剤（その1）は、賦形物質等を含まない。

製剤（その2）は、賦形物質等として無水ケイ酸を含む。（参照 2）

3. 用途

飼料の栄養成分その他の有効成分の補給

(参照 1)

4. 対象飼料及び添加量

本飼料添加物は、牛用及び子牛用飼料に添加して使用する。推奨添加量は 47.3 mg/kg 体重/日とされている。(参照 1)

5. 使用目的及び使用状況

2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル (HMBi) は、2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニン (HMTBa) と 2-プロパノールがエステル結合した化合物である。本飼料添加物は反芻動物に対してメチオニンを補給する目的で使用される。

メチオニンは哺乳類、鳥類、魚類及び甲殻類における必須アミノ酸の一つであり、乳牛においては乳中のタンパク質量に影響を与えるとされている。国内では、メチオニン補給を目的として DL-メチオニン、L-メチオニン、HMTBa 等が全ての家畜等を対象とする飼料添加物として指定されている (参照 3)。メチオニンは、反芻動物の第一胃 (ルーメン) において微生物による分解を受けやすいため、反芻動物に効率的に補給されることが難しいが、HMBi は、第一胃内の微生物による利用が抑えられていることが特徴で、第一胃壁から吸収されて家畜のメチオニン源となる。

海外では、米国及び EU において飼料添加物として使用が認められている。(参照 1)

今般、株式会社ワイピーテックから農林水産省へ、HMBi の飼料添加物の指定について申請がなされたことに伴い、同省より飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律(昭和 28 年法律第 35 号) 第 2 条第 3 項の規定に基づく飼料添加物としての指定並びに同法第 3 条第 1 項の記載に基づく飼料添加物の基準及び規格の設定に関する食品健康影響評価の要請がなされた。また、厚生労働省より、食品安全基本法(平成 15 年法律第 48 号) 第 24 条第 3 項の規定に基づき、HMBi を飼料添加物として使用した家畜に由来する食品の安全性について食品健康影響評価の要請がなされた。

II. 安全性に係る知見の概要

本評価書では、申請資料等をもとに毒性に関する主な知見を整理した。

検査値等略称を別紙に示した。

1. 原体及び賦形物質等に関する知見

(1) 原体

HMBi は家畜に経口投与された後、HMTBa 及び 2-プロパノールに加水分解される。このため、HMTBa 及び 2-プロパノールの知見を以下に整理した。

①HMTBa

HMTBa は、HMBi と同様にメチオニンの補給源となる化合物で、国内では飼料添加

物として指定されている。食品安全委員会は、対象外物質¹「メチオニン」の飼料添加物の一剤型として、動物に投与された HMTBa は、「細胞内タンパク質の連続的な代謝に利用され、メチオニンが過剰になったとしても、動物体内で代謝され、蓄積されることがないことから、食品を通じて動物用医薬品及び飼料添加物由来のメチオニンを人が過剰に摂取することはないと考えた」と評価しており、アミノ酸であるメチオニンについて、「飼料添加物として通常使用される限りにおいて、食品に残留することによりヒトの健康を損なうおそれのないことは明らかである」と結論付けている。(参照：別添)

また、食品安全委員会では HMTBa の各種修飾体である類似物質として、2018 年 2 月に HMTBa の亜鉛キレート化合物である 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニン亜鉛 (Zn-(HMTBa)₂) を、2019 年 3 月に HMTBa の銅キレート化合物である 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニン銅 (Cu-(HMTBa)₂) 及び HMTBa のマンガンキレート化合物である 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンマンガン (Mn-(HMTBa)₂) を評価しており、いずれも「飼料添加物として適切に使用される限りにおいては、食品を通じてヒトの健康に影響を与える可能性は無視できる程度」と結論付けている。(参照 4、5、6)

②2-プロパノール

2-プロパノールは、国内では食品添加物として承認されている。また、食品安全委員会では、2-プロパノールについて食品添加物として評価しており、「添加物として適切に使用される場合、安全性に懸念がないと考えられ、ADI を特定する必要はない」と評価している。また、2-プロパノールの評価において、代謝物アセトンによる影響については、2-プロパノールに係る毒性試験成績及びヒトにおける知見をもって包括的に評価を行うことは可能であると判断している。(参照 7)

海外では、2005 年に EFSA において着香料、加工助剤等として評価され、ADI として 2.4 mg/kg 体重/日が設定されている。(参照 8)

(2) 賦形物質等

製剤 (その 1) には賦形物質等は含まれていない。

製剤 (その 2) に賦形剤として含まれている無水ケイ酸 (二酸化ケイ素) は、食品安全委員会において、飼料添加物の賦形物質及び希釈物質に使用される物質として、人の健康に影響を及ぼす悪影響の内容及び程度が明らかであると評価している (参照 9、10、11)。また JECFA では、食品添加物として「ADI を特定しない (Not Specified)」と評価されている (参照 12)。このため、無水ケイ酸については、「動物用ワクチンの添加剤の食品健康影響評価の考え方」(平成 26 年 10 月 14 日食品安全委員会決定) の「3. 一日摂取許容量 (ADI) の設定や最大残留基準値 (MRL) の設定は不要とされている成分」に該当すると考えられる。

以上のことから、本飼料添加物に含まれている賦形物質等は、その使用状況及び既存の評価並びに本飼料添加物の用法・用量を考慮すると、本飼料添加物の含有成分として摂取

¹ 食品衛生法 (昭和 22 年法律第 233 号) 第 13 条第 3 項の規定に基づき、人の健康を損なうおそれのないことが明らかであるものとして厚生労働大臣が定める物質

した場合の人への健康影響は無視できる程度と考えた。

2. 体内動態試験

(1) 体内動態試験 (牛)

牛 (ホルスタイン種、平均体重 569 kg、雌 3 頭/群) に HMBi (^{14}C -カルボニル基標識 HMBi 又は ^{14}C -イソプロピル基標識 HMBi、10 g) を含むゼラチンカプセルを 1 日 2 回、7 日間経口投与 (35 mg/kg 体重/日) した。標識は図 1 及び図 2 に示した。投与終了後 24、72 及び 168 時間にと殺し、尿、糞便、乳汁、脂肪、腎臓、肝臓、筋肉、ルーメン内容物及び全血中における放射活性を測定した。

結果を表 1 及び表 2 に示した。

(標識の図)

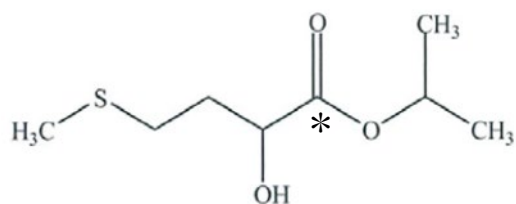


図 1 ^{14}C -カルボニル基標識 HMBi

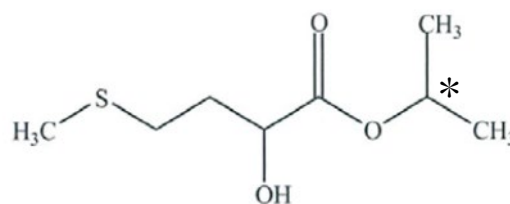


図 2 ^{14}C -イソプロピル基標識 HMBi

いずれの標識 HMBi 投与群において、脂肪、筋肉、ルーメン内容物、血液及び血漿中に低いレベルの放射活性がみられた。両標識 HMBi 投与群の間で、組織中の分布に差はなかったが、放射活性の減少は ^{14}C -イソプロピル基標識 HMBi 投与群の方が早かった。(参照 1、13、14)

表 1 牛における ^{14}C -カルボニル基標識 HMBi 投与後の平均放射活性 (%TAR)

	試料	投与後時間 (時間)		
		24	72	168
排泄	尿	6.05	7.25	6.72
	糞便	2.54	3.17	3.01
	乳汁	8.12	11.99	16.05
	総排泄量	16.72	22.42	25.78
組織残留	脂肪	0.58	0.62	0.48
	腎臓	0.30	0.19	0.14
	肝臓	2.11	1.75	1.42
	筋肉	5.54	7.17	5.54
	ルーメン内容物	0.31	0.11	0.05
	血液	0.01	0.01	0.01
	血漿	NA	NA	NA
	計 (総排泄量+組織残留量)	25.57	32.27	33.42

NA : 適用せず

表2 牛における¹⁴C-イソプロピル基標識 HMBi 投与後の平均放射活性 (%TAR)

	試料	投与後時間 (時間)		
		24	72	168
排泄	尿	3.22	3.46	2.67
	糞便	1.58	1.70	1.87
	乳汁	11.72	14.56	15.11
	総排泄量	16.53	19.73	19.65
組織残留	脂肪	1.90	1.16	0.73
	腎臓	0.06	0.04	0.21
	肝臓	0.34	0.49	0.39
	筋肉	4.99	4.03	2.78
	ルーメン内容物	0.18	0.03	0.02
	血液	<0.01	<0.01	<0.01
	血漿	NA	NA	NA
	計 (総排泄量+組織残留量)	24.00	25.48	23.78

NA : 適用せず

(2) 体内動態試験 (牛)

牛に HMBi を第一胃内投与したところ、HMBi はその約 50%が生体に利用され、残りは第一胃内の微生物によって分解されることが示された。第一胃内では微生物のエステラーゼにより、HMBi は HMTBa 及び 2-プロパノールに加水分解された。(参照 13、15)

in vitro での HMBi と第一胃微生物叢の培養試験では、HMBi は 8 時間以内に約半量となり、48 時間後には検出されなかった。微生物のはたらきにより生成する 2-プロパノールの一部は酸化されてアセトンとなるが、これは可逆的な反応であり、アセトンの一部は還元されて、再び 2-プロパノールとなる。試験 [2 (1)] に示したように、HMBi 由来の 2-プロパノールは糞便中にはほとんど検出されていなかったことから、HMBi は第一胃壁から吸収されるか、暖気²を通じて排出されると考えられた。(参照 1、13、15)

(3) 体内動態試験 (牛)

牛 (非泌乳・非妊娠牛) に HMBi を第一胃内投与 (69 g/頭) し、投与後の血漿中 2-プロパノール濃度及びアセトン濃度を経時的に測定した。試験は 2 回実施した。

結果を表 3 に示した。

1 回目の試験 (2 頭) において、血漿中の 2-プロパノール濃度は、投与前は 0 mg/L であったが、投与 1 時間後には 2.33 ± 0.33 mg/L となった。血漿中のアセトン濃度は、投与前は 1.58 ± 0.28 mg/L であったが、投与 1 時間後には 17.71 ± 1.53 mg/L、投与 2 時間後は 25.21 ± 0.99 mg/L となった。

2 回目の試験 (4 頭) において、血漿中の 2-プロパノール濃度は、投与前は 0.01 ± 0.01 mg/L であったが、投与 2 時間後に 2.65 ± 2.86 mg/L となり、投与 24 時間後には $1.13 \pm$

² 「あいき」という。げっぷのこと。

0.81 mg/L に低下した。血漿中のアセトン濃度は、投与前は 2.42 ± 0.32 mg/L であったが、投与 6 時間後に 22.40 ± 3.55 mg/L となり、投与 24 時間後には 12.35 ± 2.27 mg/L に低下した。(参照 13、15、16、17)

表 3 HMBi の第一胃内投与後の血漿中 2-プロパノール及びアセトン濃度
(平均値±標準偏差 (mg/L))

投与後時間 (時間)	1 回目の試験 (n=2)		2 回目の試験 (n=4)	
	2-プロパノール	アセトン	2-プロパノール	アセトン
0	0	1.58 ± 0.28	0.01 ± 0.01	2.42 ± 0.32
0.5	1.30 ± 0.38	9.04 ± 2.28	1.42 ± 1.53	11.04 ± 6.26
1	2.33 ± 0.33	17.71 ± 1.53	1.50 ± 1.16	16.43 ± 6.40
1.5	2.03 ± 0.03	23.67 ± 2.70	2.43 ± 2.35	15.40 ± 3.82
2	2.11 ± 0.04	25.21 ± 0.99	2.65 ± 2.86	16.70 ± 2.64
6			2.10 ± 1.80	22.40 ± 3.55
24			1.13 ± 0.81	12.35 ± 2.27

斜線：該当なし

(4) 体内動態試験 (牛)

第一胃における HMBi の吸収について 2 つの試験が実施され、HMBi は第一胃壁より速やかに吸収され、血液循環に入ることが示唆された。(参照 18)

① HMBi、HMTBa 及び DL-メチオニンの吸収の比較

牛 (ジャージー種、体重 472 ± 6 kg、7 歳齢、乾乳期、2 頭 (HMBi 投与群は 1 頭) / 群) に HMBi、HMTBa 又は DL-メチオニンを第一胃内投与 (メチオニンとして 50 g) し、投与 2 日後まで経時的に採血して、血漿中の HMTBa 濃度及びメチオニン濃度を測定した。

結果を表 4 に示した。

HMBi を投与した群では、血漿中の HMTBa 濃度は投与 30 分以内に 22.15 mg/100 g 血漿に達した。また、血漿中のメチオニン濃度は投与 3 時間以内に 0.33 mg/100 g 血漿から 5.11 mg/100 g 血漿に上昇し、48 時間後には投与前の水準に戻った。

なお、HMTBa を投与した群における血漿中の HMTBa 濃度は、HMBi を投与した群と比較して 1/15 であり、メチオニン濃度の変化はごくわずかであった。また、DL-メチオニンを投与した群では、血漿中のメチオニン濃度の変化は 0.38 mg/100 g 血漿から最大 1.79 mg/100 g 血漿で、わずかであった。

表4 牛における HMBi、HMTBa 又は DL-メチオニン投与後のメチオニン利用率

投与群	動物	AUC	消化性メチオニン (g)	メチオニン利用率	
				%	平均値±se, %
HMBi	A	74.5	45.4	90.5	—
HMTBa	A	5.41	7.0	13.9	16.5±2.6
	B	7.95	9.5	19.1	
DL-メチオニン	A	6.61	8.0	16.1	19.1±3.0
	B	9.52	11.0	22.0	

se : 標準誤差

メチオニン利用率 : (消化性メチオニン量/50 g メチオニン) ×100

— : HMBi 投与群は1頭で実施しているため、平均値のデータはなし

② HMBi の第一胃壁からの吸収

HMBi の第一胃壁からの吸収を調べるために、牛(ホルスタイン種、体重 678±20 kg、5 歳齢、2 頭/群) に HMBi を第一胃投与 (メチオニンとして 50 g) し、投与後から経時的に採血して、血漿中の HMBi 及び HMTBa の濃度を測定した。

HMBi は第一胃静脈血から検出されたが、頸静脈血では検出できなかった。一方、HMTBa はいずれの静脈血中からも検出され、HMTBa 濃度は、第一胃静脈血中 (8.53 ±0.19 mg/100 g 血漿) の方が頸静脈血中 (4.62±0.19 mg/100 g 血漿) よりも高値であった。

(5) 体内動態試験 (牛)

牛 (泌乳牛) に HMBi を 2 週間 (30 g/頭/日) 又は 120 日間 (27 g/頭/日) 混餌投与し、血漿中の 2-プロパノール、アセトン及び HMBi 濃度を測定した。

2 週間投与群では、最終投与終了直後及び 2 時間後の血漿中の 2-プロパノール濃度は 0.5 mg/L 未満であった。一方で、血漿中のアセトン濃度は 11.4 mg/L (HMBi 非添加群で 4.8 mg/L) であった。また、最終投与 2 時間後の血漿中の HMBi 濃度は 1.02 mg/L であった。

120 日間投与群では、最終投与終了後の血漿中に 2-プロパノールは検出されなかったが、血漿中のアセトン濃度は 8.3 mg/L (HMBi 非添加群で 4.1 mg/L) であった。また、血漿中の HMBi 濃度は 0.6 mg/L であった。(参照 15)

(6) 体内動態試験 (牛)

牛 (ホルスタイン種、体重 824±18 kg、乾乳期 (非妊娠)、19 頭) に HMBi を第一胃内投与 (メチオニンとして 50 g) し、投与前 (3 時点) 並びに投与日 (1~2 時間毎に 1 回、14 時間後まで)、投与 1 日後及び 2 日後 (各 4 時点) に採血して、血漿中の HMTBa、メチオニン、2-プロパノール及びアセトン濃度を測定した。HMBi 投与後の 2-プロパノール及びアセトン濃度については、4 頭の試料を用いて測定した。

血漿中の 2-プロパノール濃度は、投与前では未検出であったが、投与直後から速やかに上昇し、投与 2 時間後には 44.1±27.5 µmol/L³と最大値を示した。ただし、この 2-プロパ

³ 2-プロパノール 1 µmol/L は 0.0601 mg/L に相当。

ノールの値は、ケトーシス状態の牛の血中濃度である 1.4 mmol/L と比較して著しく低値であった（参照 19、20）。 $T_{1/2}$ は 19.8 時間、 T_{last} は 24 時間であった。血漿中のアセトン濃度について、投与前では $41.7 \pm 3.1 \mu\text{mol/L}^4$ であったが、投与 6 時間後には $385.7 \pm 35.3 \mu\text{mol/L}$ と最大値を示した。ただし、このアセトンの値は、ケトーシス状態の牛の 1/10 の水準であった。その後、血漿中のアセトン濃度は直線的に減少し、 $T_{1/2}$ は 22.6 時間であった。2-プロパノール及びアセトンについて、それぞれ投与 40 時間後及び 46 時間後に投与前の水準に戻った。

HMBi 投与後の HMTBa 濃度について、15 頭の試料（投与 27 時間後まで）を用いて測定した。投与前の HMTBa 濃度は $3.26 \pm 1.00 \mu\text{mol/L}^5$ であったが、投与 10 分後には末梢血中の濃度上昇がみられ、投与 1 時間後には $216.57 \mu\text{mol/L}$ と最大値を示した。一方で、HMBi については末梢血では投与前後のいずれの時点でも検出されなかった。投与された HMBi は、HMBi として吸収されるのか、HMTBa として吸収されるのかは不明であるが、HMBi の投与から末梢血で HMTBa 濃度が最大となるまでの時間が速やかであるため、腸管で吸収されるのではなく、第一胃壁で吸収されると考えられた。

HMBi 投与後のメチオニン濃度について、15 頭の試料（投与 48 時間後まで）を用いて測定した。血漿中の HMTBa 濃度及びメチオニン濃度並びにメチオニン利用能について、表 5 に示した。

投与前のメチオニン濃度は $20.29 \pm 0.74 \mu\text{mol/L}^6$ であったが、投与 4 時間後には血漿中メチオニン濃度は $145.9 \pm 5.34 \mu\text{mol/L}$ と最大値を示した。メチオニン濃度の減少は緩やかに投与 48 時間後に投与前の水準に戻った。（参照 21）

表 5 牛における HMBi 投与後の体内動態パラメータ（平均値±標準誤差）

体内動態パラメータ	HMTBa	メチオニン
投与前濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	3.26 ± 1.00	20.29 ± 0.74
T_{max} (分)	59 ± 7	240 ± 23
C_{max} ($\mu\text{mol/L}$)	268.4 ± 20.7	145.9 ± 5.34
HMBi 投与による消化性メチオニン (g)	/	
メチオニン利用能 (%)	/	

斜線：該当なし

(7) 体内動態試験 (*in vitro*) <参考資料 7>

牛の第一胃上皮から作製したチャンバーを用いて、*in vitro*で HMBi の膜透過性について検討した。HMBi (18 mL の緩衝液に HMBi を 8 mg (0.44 mg/mL) 又は 16 mg (0.88 mg/mL) を添加) を含む緩衝液を第一胃粘膜側に添加し、120 又は 180 分間処理した。処

4 アセトン 1 $\mu\text{mol/L}$ は 0.0581 mg/L に相当。

5 HMTBa 1 $\mu\text{mol/L}$ は 0.150 mg/L に相当。

6 メチオニン 1 $\mu\text{mol/L}$ は 0.149 mg/L に相当。

7 牛の第一胃壁を介した HMBi 及び HMTBa の吸収の機序を検討した知見であるが、*in vitro*試験のため、参考資料とした。

理開始後 5 分以内（基準値）及び処理 120 又は 180 分後の第一胃粘膜側緩衝液、組織及び漿膜側緩衝液を採取し、各試料中の HMBi 及び HMTBa について、基準値からの増加量を測定した。

結果を表 6 に示した。

HMBi を第一胃粘膜側に添加すると、添加後ただちに HMTBa ($6.3 \pm 0.46\%$) が検出された。これは第一胃上皮表面で HMBi が加水分解されたことを示している。HMBi はいずれの試験条件でも平均して漿膜側緩衝液中に 0.58% 検出された。大部分の HMTBa は漿膜側緩衝液中に検出 (8.94%) された。

第一胃粘膜側緩衝液中の HMTBa は、処理時間の増加に伴い濃度が上昇（処理 120 分後で 34.0%、処理 180 分後で 43.4%）し、HMBi 濃度は低下（処理 120 分後で 37.9%、処理 180 分後で 28.1%）した。漿膜側緩衝液中の HMTBa 濃度は HMBi 濃度の 10 倍であった。これらの結果は、HMBi から HMTBa への加水分解に第一胃上皮又は上皮に付着する微生物の存在が必要であることを示唆しており、本試験によると、血中のメチオニン濃度の上昇に、第一胃壁における HMBi 態での吸収の関与は低いと考えられた。（参照 22）

表 6 *in vitro* における添加量及び処理時間の違いによる
HMBi 及び HMTBa の回収率

試料	測定項目	添加量 (mg)		処理時間 (分)		統計処理 (p<)	
		8	16	120	180	量	時間
第一胃粘膜側緩衝液	HMBi (%)	30.3	35.6	37.9	28.0	0.02	0.01
	HMTBa (%)	40.5	37.0	34.0	43.4	0.08	0.01
	HMTBa (mg)	3.24	5.92	4.08	5.21	—	
組織	組織重量 (mg)	351	322	372	372	NS	NS
	HMBi (%)	ND	ND	ND	ND	—	
	HMTBa (%)	2.64	2.00	2.58	1.88	NS	0.01
漿膜側緩衝液	HMBi (%)	0.3	0.9	0.6	0.6	0.01	NS
	HMTBa (%)	10.5	7.3	7.9	10.0	量×時間 : p<0.01	
	HMTBa (mg)	0.84	1.17	0.95	1.27	—	
合計	総回収量 (HMBi + HMTBa) (%)	84.2	82.8	83.0	83.9	NS	0.10
	HMBi から HMTBa への加水分解 (%)	10.5	7.3	7.9	10.0	—	

— : データなし、ND : 検出されず、NS : 有意差なし

<体内動態試験のまとめ>

HMBi は牛に投与された後、HMTBa と 2-プロパノールへ加水分解され、両物質は第一胃壁から吸収されて、HMTBa はメチオニンの供給源となり、2-プロパノールは肝臓で可逆的にアセトンに酸化される。牛に HMBi を一定期間投与した後の血漿中の HMBi 濃

度は微量 (0.6~1.02 mg/L) であり、HMBi が組織中に残留する可能性は低いと考えられた。また、投与された HMBi 由来の代謝物は、尿、糞便及び乳汁中に排泄され、組織中の残留は低いと考えられた。また、乳汁中への排泄は他の排泄経路よりも高かった。動物体内で生成する代謝物のうち、メチオニンは、動物用医薬品及び飼料添加物として通常使用される限りにおいて、食品に残留することにより人の健康を損なうおそれのないと評価されている物質である。一方で、生成したアセトンはクエン酸回路に組み込まれて二酸化炭素になるか、血液循環に再分泌される。また、乳牛においては、アセトンは肝臓における糖新生に利用されるか、乳汁中へ分泌される。さらに、一部の血漿中のアセトンは第一胃へ循環し、微生物のはたらきによって 2-プロパノールが再生成する経路も考えられる。このため、2-プロパノール及びアセトンの除去は比較的緩やかに行われると考えられた。(参照 21)

このことから、HMBi を牛に投与した後、体内に比較的長く残留する代謝物は 2-プロパノール及びアセトンであり、その残留は組織中よりも乳汁で高いと考えられ、乳汁中の 2-プロパノール又はアセトンの測定から、牛に投与された本飼料添加物の残留を検討することは可能と考えられた。

3. 残留試験

(1) 残留試験 (牛①)

牛 (ホルスタイン種、雌 16 頭 (初産牛及び経産牛各 8 頭 (泌乳 8 週目、乳量 31.5 kg/日))) に HMBi を 8 週間混餌投与 (44 mg/kg 体重/日 (メチオニンとして 10.6 g)) し、投与最終週に乳汁中の HMBi、2-プロパノール及びアセトン濃度を測定した。なお、対照群には HMBi 非添加の基礎飼料を与えて、同様に乳汁中濃度を測定した。

結果を表 7 に示した。

乳汁中の HMBi 濃度は LOD 未満 (LOD : 1.0 mg/L) であった。2-プロパノール濃度は HMBi 投与群と対照群との間に統計学的な有意差はみられなかった。アセトン濃度については HMBi 投与群で有意に高かったが、通常認められる範囲であった。(参照 1、23)

表 7 牛における HMBi 投与後の乳汁中濃度 (mg/L) (平均±標準偏差)

	対照群	HMBi 投与群
2-プロパノール	0.5±0	0.6±0.4
アセトン	1.7±0.7	2.8±1.6*

LOD : 0.5 mg/L

* : 対照群との間に有意差あり (p<0.05)

(2) 残留試験 (牛②)

牛 (ホルスタイン種、雌 16 頭 (泌乳 17 週目、乳量 32 kg/日)) に HMBi (メチオニンとして 19 g/日相当) を 8 週間混餌投与し、乳汁中の HMBi、2-プロパノール及びアセトン濃度を測定した。なお、対照群には HMBi 非添加の基礎飼料を与えて、同様に乳汁中濃度を測定した。

結果を表 8 に示した。

乳汁中の2-プロパノール濃度はLOD付近（LOD：0.5 mg/L）であり、アセトン濃度の増加がHMBi投与群でみられた。HMBi及びHMTBaについては検出されなかった。（参照13）

表8 牛におけるHMBi投与後の平均乳汁中濃度（mg/L）

	対照群	HMBi投与群
2-プロパノール	0.5	0.5
アセトン	3.2	9.4*

*：対照群との間に有意差あり（ $p<0.05$ ）

<残留試験についてのまとめ>

本飼料添加物投与後の乳汁中HMBi濃度は、LOD未満であった。また体内動態試験においても、本飼料添加物を一定期間投与した後の血漿中HMBi濃度は微量（0.6～1.02 mg/L）である結果が得られており、これらのことから、投与された本飼料添加物が、HMBiのまま組織及び乳汁中に残留する可能性は低いと考えられる。

畜産現場での乳汁中アセトン濃度を測定した事例では、その濃度範囲は、0.00～4.0 mmol/L（0～230.3 mg/L、相乗平均値⁸：7.49 mg/L）であり、牛の代謝疾患である代謝性アシドーシスは、乳汁中濃度が81.3 mg/L（1.4 mmol/L）を超えると発症するとされている（参照20、21、24、25、26、27、28、29）。実施された残留試験におけるHMBi投与後のアセトンの平均乳汁中濃度は、代謝性アシドーシスを発症する濃度と比較して大きく下回る濃度であり、牛に対して問題となる濃度ではなかった。

また、残留試験においてHMBi投与群でみられたアセトンの平均乳汁中濃度である9.4 mg/Lを用いて小児の体重当たりの摂取量を試算⁹すると、0.182 mg/kg 体重/日であった。EPAでは、アセトンの人への慢性的な経口ばく露でのRfDを0.9 mg/kg 体重/日としていることを考慮すると、試算した小児の体重当たりの摂取量は、RfD未満であった（参照30）。この摂取量の試算値は、全ての牛にHMBiが投与されたと仮定した場合の過大な見積もりであり、人が摂取する乳由来製品中のアセトンの残留量はさらに低い値になると考えられた。また、アセトンは揮発性があり、市場に流通する乳由来製品は一般的に殺菌処理を経ていることから、処理過程においてアセトンの量はさらに低くなり、乳由来製品を摂取することにより人がアセトンにばく露されるおそれはより低くなることが考えられる（参照13）。

これらのことから、食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、HMBiが想定しうる使用方法に基づき通常使用される限りにおいて、投与による乳汁中のアセトンの濃度は人の健康に悪影響を与える可能性は極めて低いと判断した。

⁸ 各種文献のデータに基づき算出（ $n=3,829$ ）

⁹ 小児体重：16.5 kg、乳の一日摂取量：332 g/人/日を用いて試算（平成22年度食品摂取頻度・摂取量調査の特別集計業務報告書より）

4. 遺伝毒性試験

HMBi の遺伝毒性試験の結果を表 9 に示した。

表 9 HMBi の遺伝毒性試験結果

	試験	対象	用量	結果	参照
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98、TA100、 TA102、TA1535、 TA1537	1.6、8、40、200、1,000、5,000 µg/plate (±S9) (プレート法) 51.2、128、320、800、2,000、5,000 µg/plate (±S9) (プレインキュベ ーション法)	陰性	1、15、 31
	染色体異常試験	ヒト末梢血リンパ球	1,231、1,538、1,923 µg/mL (± S9) : 3 時間処理、17 時間培養 608.5、1,082、1,923 µg/mL (- S9) : 20 時間処理 1,736、1,827、1,923 µg/mL (+ S9) : 3 時間処理、17 時間培養	陰性	1、15、 32
	遺伝子突然変異試験	マウスリンパ腫細胞 (L5178Y <i>Tk</i> ⁺)	62.5、125、250、500、1,000、1,930 µg/mL (±S9) : 3 時間処理 1,000、1,250、1,500、1,750、1,930 µg/mL (±S9) : 3 時間処理	陰性	1、15、 33

HMBi の遺伝毒性試験では、*in vivo* の試験は実施されていないが、*in vitro* における細菌を用いた復帰突然変異試験、ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験及びマウスリンパ腫細胞を用いた遺伝子突然変異試験が実施され、いずれも陰性であった。

以上から、食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、HMBi に遺伝毒性はないと判断した。

5. 急性毒性試験

急性毒性試験の結果について表 10 に示した。

表 10 HMBi の急性毒性試験結果

動物種	性別	投与経路	LD ₅₀ (mg/kg 体重)	参照
Wistar 系ラット	雌雄 (3 匹/群)	強制経口	>2,000	1、34
ラット (系統不明)	雌雄 (5 匹/群)	経皮 <参考資料 ¹⁰ >	>2,000	13

¹⁰ 投与経路が経口ではなく経皮のため、参考資料とした。

6. 亜急性毒性試験

(1) 14日間亜急性毒性試験（ラット）

ラット（Wistar系、雄：244～281g、雌：171～211g、雌雄各5匹/群）に、HMBi¹¹を14日間強制経口投与（0、100、300、1,000 mg/kg 体重/日）した。

一般状態、体重、摂餌量等を調べるとともに、試験最終日にと殺、剖検し、全投与群の肝臓及び腎臓、並びに対照群及び1,000 mg/kg 体重/日投与群における脾臓、卵巣、精巣及び甲状腺について病理組織学的検査を実施した。

毒性所見を表11に示した。

投与期間を通し、死亡例はなく、摂餌量及び体重増加量に影響はみられなかった。

100 mg/kg 体重/日投与群の雄2例並びに300及び1,000 mg/kg 体重/日投与群の雌雄全個体において唾液分泌の増加がみられたが、この反応は〔6.（2）〕の試験において、投与直後の一過性の変化であったことから、本試験においても唾液分泌の増加を毒性所見とはみなさなかった。剖検時における臓器重量及び肉眼的観察に変化はみられなかった。病理組織学的検査において100 mg/kg 体重/日投与群の雄1例でわずかな腎臓への硝子滴沈着がみられたが、300 mg/kg 体重/日投与群ではみられなかったため、毒性所見とはみなさなかった。（参照1、13、35）

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、1,000 mg/kg 体重/日投与群の雄でみられた肝細胞の空胞化及び腎尿細管上皮細胞の硝子滴沈着の所見から、NOAELを雄では300 mg/kg 体重/日、雌では最高用量である1,000 mg/kg 体重/日とした。

表11 ラットの14日間亜急性毒性試験における毒性所見

投与量 (mg/kg 体重/日)	毒性所見	
	雄	雌
1,000	小葉中間帯の肝細胞空胞化（軽微又は軽度）、腎尿細管上皮細胞の硝子滴沈着 ¹² （軽微又は軽度）	毒性所見なし（1,000以下）
300以下	毒性所見なし	

(2) 90日間亜急性毒性試験（ラット）

ラット（Wistar系、8週齢、体重：雄；255～278g、雌；171～206g、雌雄各10匹/群）にHMBi¹³を90日間強制経口投与（0、100、300、1,000 mg/kg 体重/日）した。

一般状態、体重、摂餌量等を調べるとともに、血液学的及び血液生化学的検査並びに尿検査を実施し、試験終了後、全個体を剖検して、各種組織及び臓器を採取し、病理組織学的検査を実施した。また、馴化期及び試験12週に眼科的検査（対照群及び1,000 mg/kg 体

¹¹ 溶媒：0.5%メチルセルロース 5 mL/kg/日

¹² 雄のみに発生していることから α 2u-グロブリン腎症である可能性が高いが、硝子滴の本体が α 2u-グロブリンであると確認されていないため、本評価では毒性所見として扱った。

¹³ 溶媒：0.5%メチルセルロース 5 mL/kg/日

重/日投与群のみ) 及び神経毒性検査を実施した。

毒性所見を表 12 に示した。

採血の際の麻酔中に 1,000 mg/kg 体重/日投与群の雌雄各 1 例で、投与期間中に 300 mg/kg 体重/日投与群の雌 2 例及び 1,000 mg/kg 体重/日投与群の雄 1 例で死亡が確認されたが、剖検により被験物質に起因する死亡ではないと考えられた。眼科的検査及び神経毒性検査では、異常はみられなかった。300 及び 1,000 mg/kg 体重/日投与群において唾液分泌の増加がみられたが、投与直後の反応のため有害事象ではないと判断した。300 及び 1,000 mg/kg 体重/日投与群の雄において尿の pH 低下がみられた。1,000 mg/kg 体重/日投与群の雌において尿量の増加がみられた。(参照 1、36)

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、300 mg/kg 体重/日投与群の雄でみられた腎尿細管上皮細胞の硝子滴沈着から、雄の NOAEL を 100 mg/kg 体重/日とし、1,000 mg/kg 体重/日投与群の雌でみられた脾臓のヘモジデリン沈着及び髓外造血から、雌の NOAEL を 300 mg/kg 体重/日とした。

表 12 ラットの 90 日間亜急性毒性試験における毒性所見

投与量 (mg/kg 体重/日)	毒性所見	
	雄	雌
1,000	摂餌量減少、体重増加量減少 RBC 減少、Hb 減少、Ht 減少、 MCV 増加、MCH 増加、血清 P 上昇 肝臓の色素沈着 脾臓のヘモジデリン沈着（軽 度又は中等度）及び髓外造血 （軽度又は中等度） 腎臓絶対及び相対重量増加	脾臓のヘモジデリン沈着及 び髓外造血（いずれも軽度）
300 以上	腎尿細管上皮細胞の硝子滴沈 着 ¹⁴	毒性所見なし（300 以下）
100	毒性所見なし	

7. 慢性毒性及び発がん性試験

HMBi について、慢性毒性及び発がん性試験は実施されていない。

HMBi は摂取後速やかに HMTBa と 2-プロパノールに加水分解される。

HMTBa について、食品安全委員会において実施した対象外物質「メチオニン」の評価の中で、「動物に投与されたメチオニン及び HMTBa（メチオニンの水酸化体であり、体内でメチオニンに代謝される）は、細胞内タンパク質の連続的な代謝に利用され、メチオニンが過剰となったとしても動物体内で代謝され、蓄積されることはないことから、食品を

¹⁴ 雄のみに発生していることから α2u-グロブリン腎症である可能性が高いが、硝子滴の本体が α2u-グロブリンであると確認されていないため、本評価では毒性所見として扱った。

通じて動物用医薬品及び飼料添加物由来のメチオニンをヒトが過剰に摂取することはない」としている。また、ラット（F344系、雄）を用いたDL-メチオニンの二段階肝発がん性試験において、「DL-メチオニン単独、DL-メチオニン及び0.05%フェノバルビタール又は0.05%ジクロロジフェニルトリクロロエタンとの混合投与は、ジエチルニトロソアミンにより引き起こされる肝発がん率に影響を及ぼさないことが報告された」としている。（参照：別添）

また、2-プロパノールについては食品添加物として評価を行い、Burleigh-Flayerら（1997）の報告における吸入毒性試験成績（発がん性試験）において、「経口投与による試験ではないので参考データであるが、マウスについては被験物質のばく露に関連した腫瘍の発生率の増加は認められていない。一方、ラットについては雄で被験物質のばく露に関連したライディヒ細胞腺腫の発生率の増加が見られたとされているが、対照群での発生頻度の異常低値によるものではないかと考察されている。」としており、「入手した長期反復投与毒性試験成績は経口投与による試験ではないので参考データであるが、本試験成績において雄ラットで見られたとされるライディヒ細胞腺腫の発生率の増加について、本委員会としては、対照群での発生頻度の異常低値によるものであり、本品目の添加物としての使用において安全性に懸念をもたらすものではない」としている。（参照7）

8. 生殖発生毒性試験

HMBiについて、生殖発生毒性試験は実施されていない。

HMBiは摂取後速やかにHMTBaと2-プロパノールに加水分解される。

HMTBaは体内でメチオニンに代謝されるが、食品安全委員会において実施した対象外物質「メチオニン」の評価の中で、生殖発生毒性試験は実施されていないが、「様々な分野での使用実績においても、これまでに安全性に関する特段の問題はみられていない」としている。（参照：別添）

また、2-プロパノールについては食品添加物として評価を行い、「入手した生殖発生毒性試験成績から、本品目に催奇形性はない」としている。また、「Tylら（1994）のラット発生毒性試験より母体毒性及び発生毒性に係るNOAELを400 mg/kg体重/日、ウサギ発生毒性試験より母体毒性に係るNOAELを240 mg/kg体重/日及び発生毒性に係るNOAELを最高用量である480 mg/kg体重/日」と、「Bateら（1994）のラット神経発生毒性試験により母体毒性に係るNOAELを700 mg/kg体重/日及び神経発生毒性に係るNOAELを最高用量である1,200 mg/kg体重/日」と、「Bevanら（1995）のラット二世代生殖発生毒性試験より、500 mg/kg体重/日以上投与群のF1及びF2で認められた離乳前の生存率低下を踏まえて、NOAELを100 mg/kg体重/日」と評価している。（参照7）

9. 対象動物における安全性試験

（1）安全性試験（牛）

牛（ホルスタイン種、経産（2～5産）、泌乳開始2～6か月、体重633±59 kg、雌3頭/群）にHMBiを濃厚飼料に添加し、14日間混餌投与（0、75、150、300 g/頭/日（それぞれ0、118.4、236.9、473.9 mg/kg体重/日（メチオニンとして0、82.98、165.87、331.75 mg/kg体重/日））〔推奨添加量（47.3 mg/kg体重/日）の2.5倍、5倍及び10倍量〕）した。なお、

別途自由摂食で、粗飼料及び水を与えた。

試験期間を通し、投与に関連する死亡例はみられなかった。

5倍量投与群及び10倍量投与群では、摂餌量が対照群及び2.5倍量投与群に比べ減少し、5倍量投与群及び10倍量投与群の摂餌量はそれぞれ6.0 kg及び2.0 kg（給餌量は8.0 kg）に低下した。10倍量投与群では拒食量が50%以上であり、投与開始6日以降はHMBiの飼料への添加を中止したところ、中止1日後に摂餌量は回復し、数日後には乳生産が回復した。5倍量投与群では摂餌量が試験最終日まで約20%低下した。粗飼料の摂取量に違いはみられなかった。

体重の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、乳生産量の測定及び乳成分の検査を行うとともに、病理解剖を実施し、肝臓及び腎臓の病理組織学的検査を行ったが、本飼料添加物投与による異常はみられなかった。（参照1、13、37）

5倍量以上投与群において摂餌量の低下がみられたことから、食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、本飼料添加物の推奨添加量の2.5倍量までの混餌投与について、牛に対する安全性に問題はないと考えた。

10. その他の試験

(1) 皮膚及び眼刺激性試験

① ウサギ（ニュージーランドホワイト種、3頭）の皮膚にHMBi（0.5 mL）を塗布し、パッチで被覆して4時間ばく露した。3日間の観察期間中に皮膚に有害な影響はみられなかった。（参照13）

② ウサギ（ニュージーランドホワイト種、3頭）の片側の結膜嚢にHMBiを点眼投与（0.1 mL）した。継続的な有害影響はみられなかった。

角膜及び結膜に小さな一過性の影響（詳細不明）がみられた。（参照13）

(2) 皮膚感作性試験

モルモット（試験群：10匹、対照群：5匹）にHMBiを皮下投与（溶媒ピーナツ油/アジュバント）し、さらに皮膚適用（HMBi単独）した後に惹起用皮膚適用（HMBi単独/HMBiとピーナツ油の混合物）し、皮膚感作性を調べた。

惹起投与24及び48時間後に1例の個体で投与部位の両側に明瞭な紅斑を示す陽性反応がみられた。（参照13）

III. 国際機関等における評価

1. JECFAにおける評価

HMBiについては評価されていないが、代謝物であるアセトン及び2-プロパノールについては、欧米での摂取規制値について記述しており、動物実験から香料としてのアセトンの経口摂取規制値は、米国では36 mg/人/日、欧州では7.1 mg/人/日とされている。

また、2-プロパノールの香料としての摂取規制値は、米国では9.9 mg/人/日、欧州では99 mg/人/日であるとしている。現在の摂取量から考えると安全性の懸念はないとしている。（参照38、39）

2. ECにおける評価

EC (SCAN) では、2003年に本剤の特性や安全性を検証した。対象動物（乳牛）を用いた耐用試験において HMBi の過剰投与により摂餌量の減少がみられた。これはアミノ酸の不均衡が原因である可能性があり、実際の理由は不明であるが、過剰摂取の悪影響からの保護ではないかと考えられた。牛へのメチオニン供給源として適用した時には、迅速に HMTBa と 2-プロパノールに分離され、対象動物では HMBi は検出限界未満であり、代謝物として微量の 2-プロパノール及びその代謝物アセトンが検出されることを、体内動態試験及び残留試験で確認している（参照 2）。これらの試験から人は HMBi ではなく 2-プロパノール及びその代謝物アセトンにばく露されるため、安全性評価にはこれらの影響をも考慮すべきであるとしている。

実験動物を用いた安全性試験では、ラットの 90 日間亜急性毒性試験において、HMBi の 300 mg/kg 体重/日投与までは、唾液の分泌増加以外の影響はみられないことが示唆されたとしている（参照 13）。遺伝毒性試験の結果から HMBi は遺伝毒性がないと結論付けている。

HMBi を対象動物に投与した場合、微量の代謝物（2-プロパノール及びアセトン）が乳汁に検出されるが、その濃度は毒性学的影響を及ぼす濃度でないことから、本剤を投与した牛の乳汁による人への健康影響はないと結論付けている（参照 13）。EC では 2013 年には適用動物種を反芻動物全般としている（参照 40）。

3. EFSA における評価

EFSA は 2012 年に、提案された使用条件の下では、HMBi は動物の健康、人の健康又は環境に悪影響を及ぼさず、対象動物におけるタンパク質合成のためのメチオニンの効果的な供給源であると結論付けている。また、EFSA はこの結論を乳牛からすべての反芻動物に使用できると評価している。（参照 41）

4. ECHA における評価

ECHA では、HMBi の代謝物であるアセトンについて、ラットの 13 週間経口投与（飲水）試験から、NOAEL は 900 mg/kg 体重/日としている。（参照 42）

5. EPA における評価

EPA では、HMBi の代謝物であるアセトンの人への慢性的な経口ばく露での RfD を 0.1 mg/kg 体重/日としていたが（参照 43、44）、その後摂取方法及び不確定係数の再検討から、経口摂取時の RfD を 0.9 mg/kg 体重/日としている。（参照 30）

IV. 食品健康影響評価

2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル (HMBi) は、2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニン (HMTBa) と 2-プロパノールがエステル結合した化合物である。本飼料添加物は反芻動物に対してメチオニンを補給する目的で使用される。

本飼料添加物に含まれている賦形物質等は、その使用状況及び既存の評価並びに本飼料添加物の用法・用量を考慮すると、本飼料添加物の含有成分として摂取した場合の人への健康影響は無視できる程度と考えた。

体内動態試験の結果から、HMBi は牛に投与された後、HMTBa と 2-プロパノールへ加水分解され、両物質は第一胃壁から吸収されて、HMTBa はメチオニンの供給源となり、2-プロパノールは肝臓で可逆的にアセトンに酸化されると考えられた。HMBi を一定期間投与した後の血漿中の HMBi 濃度は微量 (0.6~1.02 mg/L) であり、HMBi が組織中に残留する可能性は低いと考えられた。また、投与された HMBi 由来の代謝物は、尿、糞便及び乳汁中に排泄され、組織中の残留は低いと考えられた。また、乳汁中への排泄は他の排泄経路よりも高かった。動物体内で生成する代謝物のうち、メチオニンは、動物用医薬品及び飼料添加物として通常使用される限りにおいて、食品に残留することにより人の健康を損なうおそれのないと評価されている物質である。したがって、HMBi を牛に投与した後、体内に比較的長く残留する代謝物は 2-プロパノール及びアセトンであり、その残留は組織中よりも乳汁で高いと考えられた。

残留試験の結果から、本飼料添加物投与後の乳汁中の HMBi 濃度は LOD 未満であった。また HMBi の代謝物の乳汁中濃度については、2-プロパノールは HMBi を投与しても変化はみられなかった一方で、アセトンは増加した。しかしながら、HMBi 投与後のアセトンの平均乳汁中濃度は、牛において代謝性アシドーシスを発症する濃度と比較して大きく下回る濃度であり、牛に対して問題となる濃度ではなかった。また、残留試験において HMBi 投与群でみられたアセトンの平均乳汁中濃度である 9.4 mg/L を用いて小児の体重当たりの摂取量を試算したところ 0.182 mg/kg 体重/日であり、EPA において算出されたアセトンの人への慢性的な経口ばく露における RfD である 0.9 mg/kg 体重/日未満であった。この摂取量の試算値は、全ての牛に HMBi が投与されたと仮定した場合の過大な見積もりであり、人が摂取する乳由来製品中のアセトンの残留量はさらに低い値になると考えられた。また、アセトンは揮発性があり、市場に流通する乳由来製品は一般的に殺菌処理を経ていることから、処理過程においてアセトンの量はさらに低くなり、乳製品を摂取することにより人がアセトンにばく露されるおそれはより低くなることが考えられる。

これらのことから、食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、HMBi が想定しうる使用方法に基づき通常使用される限りにおいて、投与による乳汁中のアセトンの濃度は人の健康に悪影響を与える可能性は極めて低いと判断した。

遺伝毒性試験では、*in vitro* の細菌を用いた復帰突然変異試験、ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験及びマウスリンパ腫細胞を用いた遺伝子突然変異試験はいずれも陰性であり、HMBi に遺伝毒性はないと判断した。

亜急性毒性試験では、ラットを用いた 14 日間及び 90 日間経口投与試験が実施され、主な毒性影響として肝臓 (肝細胞の空胞化又は色素沈着)、腎臓 (硝子滴沈着)、脾臓 (ヘモジデリン沈着及び髄外造血) 及び血液 (貧血) の所見がみられ、これらの試験のうち最小

の NOAEL は、90 日間経口投与試験のラット雄の 300 mg/kg 体重/日投与群でみられた腎尿細管上皮細胞の硝子滴沈着に基づく 100 mg/kg 体重/日であった。

慢性毒性及び発がん性試験並びに生殖発生毒性試験は実施されていないが、本飼料添加物が動物に摂取された後速やかに HMTBa と 2-プロパノールに加水分解され、生成する両物質について、慢性毒性や発がん性、催奇形性が懸念される報告はないことをもって、安全性に問題はないと考えた。

対象動物における安全性試験では、本飼料添加物の牛への推奨添加量での混餌投与について、牛に対する安全性に問題はないと考えた。

以上のことから、食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、本飼料添加物が、飼料添加物として適切に使用される限りにおいては、食品を通じて人の健康に影響を与える可能性は無視できる程度と考えた。

<別紙：検査値等略称>

略称	名称
ADI	Acceptable Daily Intake：一日摂取許容量
C _{max}	maximum drug concentration：最高血中濃度
EC	European Commission：欧州委員会
ECHA	European Chemicals Agency：欧州化学品庁
EFSA	European Food Safety Authority：欧州食品安全機関
EPA	United States Environmental Protection Agency：アメリカ合衆国環境保護庁
EU	European Union：欧州連合
Hb	Hemoglobin：血色素量
HMBi	2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル
HMTBa	2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニン (2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸)
Ht	Hematocrit：ヘマトクリット値
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives：FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
LD ₅₀	Lethal Dose 50：半数致死量
LOD	Limit of Detection：検出限界
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin：平均赤血球ヘモグロビン
MCV	Mean Corpuscular Volume：平均赤血球容積
MRL	Maximum Residue Limit：最大残留基準
NOAEL	No-Observed-Adverse-Effect Level：無毒性量
RBC	Red blood cell：赤血球 (数)
RfD	Reference Dose：参照用量
SCAN	Scientific Committee for Animal Nutrition：動物栄養に関する科学委員会
T _{max}	maximum drug concentration time：最高血中濃度到達時間
T _{1/2}	half life：血中濃度半減期
T _{last}	last drug concentration time：最終測定時点

<参照>

- 1 株式会社ワイピーテック：飼料添加物指定審査用資料「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル」効果安全性抄録
- 2 株式会社ワイピーテック：飼料添加物指定審査用資料「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル」規格抄録
- 3 農林水産省：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）
- 4 食品安全委員会：飼料添加物評価書「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニン亜鉛」2017
- 5 食品安全委員会：飼料添加物評価書「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニン銅」2019
- 6 食品安全委員会：飼料添加物評価書「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニン マンガン」2019
- 7 食品安全委員会：添加物評価書「イソプロパノール（第 3 版）」2013
- 8 EFSA, Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on Request from the Commission Related to Propan-2-ol as a Carrier Solvent for Flavourings. The EFSA Journal 202, pp.1-10, 2005.
- 9 厚生労働省：食品添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）指定添加物
- 10 厚生労働省：医薬品添加物規格 2018
- 11 食品安全委員会：「食品健康影響評価について（回答）」（平成 24 年 4 月 5 日付け府食第 342 号）
- 12 JECFA, silicon dioxide, amorphous, 2017
- 13 European Commission (Health & Consumer Protection directorate-general), Report of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the use of a HMBi (Isopropyl ester of the hydroxylated analogue of methionine), 2003
- 14 株式会社ワイピーテック：飼料添加物指定審査用資料「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル」参照資料 13
- 15 株式会社ワイピーテック：飼料添加物指定審査用資料「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル」参照資料 14
- 16 株式会社ワイピーテック：飼料添加物指定審査用資料「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル」参照資料 14 Study Report RTS 91.
- 17 株式会社ワイピーテック：飼料添加物指定審査用資料「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル」参照資料 14 Study Report RTS97
- 18 Graulet B, Richard C, Robert JC. : The isopropyl ester of methionine hydroxy-analogue is absorbed through the rumen wall in the cow. Journal of Animal and Feed Sciences, 13, Suppl. 1, 2004.
- 19 Bruss and Lopez, 2000, Mixed ruminal microbes of cattle produce isopropanol in the presence of acetone but not 3-D-hydroxybutyrate. J. Dairy Sci. 83:2580-2584.
- 20 Gustafsson A.H. and Emanuelson U: Milk acetone concentration as an indicator of hyperketonaemia in dairy cows: the critical value revised. Animal Science, 63.183-188.1996.
- 21 Graulet B, Richard C, Robert JC. : Methionine Availability in Plasma of Dairy Cows Supplemented with Methionine Hydroxy Analog Isopropyl Ester. Journal of Dairy Science, 88: 3640-3649, 2005.

- 22 Breves G, Schröder B, Heimbeck W, Patton RA. : Short communication: Transport of 2-hydroxy-4-methyl-thio-butanoic isopropyl ester by rumen epithelium in vitro. *J. Dairy Sci.* 2010, 93:260–264
- 23 株式会社ワイピーテック : 飼料添加物指定審査用資料「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル」参照資料 4
- 24 Heuer C, Luinge HJ, Lutz ETG, Schukken YH, van der Maas JH, Wilmink H, Noordhuizen JPTM: Determination of Acetone in Cow Milk by Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Detection of Subclinical Ketosis. *J. Dairy Sci.* 2001, 84:575–582
- 25 de Roos APW, van den Bijgaart HJCM, Hørlyk J, de Jong G: Screening for Subclinical Ketosis in Dairy Cattle by Fourier Transform Infrared Spectrometry. *J. Dairy Sci.* 2007, 90:1761–1766
- 26 藤木 なつみ・佐藤 博. サイレージ主体 TMR 給与の乳牛における乳汁のアセトン、3-ヒドロキシ酪酸およびアルコール濃度. *北獣会誌* 2007, 51:4-8.
- 27 van der Drift SGA, van Hulzen KJE, Teweldemedhn TG, Jorritsma R, Nielen M, Heuven HCM: Genetic and nongenetic variation in plasma and milk β -hydroxybutyrate and acetone concentrations of early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2012, 95 :6781–6787
- 28 Denis-Robichaud J, Dubuc J, Lefebvre D, DesCôteaux L: Accuracy of milk ketone bodies from flow-injection analysis for the diagnosis of hyperketonemia in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2014, 97 :3364–3370
- 29 Grelet C, Bastin C, Gelé M, Davière JB, Johan M, Werner A, Reding R, Fernandez Pierna JA, Colinet FG, Dardenne P, Gengler N, Soyeurt H, Dehareng F: Development of Fourier transform mid-infrared calibrations to predict acetone, β -hydroxybutyrate, and citrate contents in bovine milk through a European dairy network. *J Dairy Sci.* 2016, 99(6):4816-4825.
- 30 EPA: Toxicological review of acetone, 2003. EPA/635/R-03/004.
- 31 株式会社ワイピーテック : 飼料添加物指定審査用資料「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル」参照資料 10
- 32 株式会社ワイピーテック : 飼料添加物指定審査用資料「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル」参照資料 11
- 33 株式会社ワイピーテック : 飼料添加物指定審査用資料「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル」参照資料 12
- 34 株式会社ワイピーテック : 飼料添加物指定審査用資料「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル」参照資料 7
- 35 株式会社ワイピーテック : 飼料添加物指定審査用資料「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル」参照資料 8
- 36 株式会社ワイピーテック : 飼料添加物指定審査用資料「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル」参照資料 9
- 37 株式会社ワイピーテック : 飼料添加物指定審査用資料「2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル」参照資料 15
- 38 JECFA (IPCS INCHEM, 941. Saturated aliphatic acyclic secondary alcohols, ketones, and related saturated and unsaturated esters. WHO FOOD ADDITIVES SERIES: 42, 1999.

- 39 JECFA WHO Technical Report Series 891. Evaluation of certain Food additives. Fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2000.
- 40 Official Journal of the European Union, COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) No 469/2013 of 22 May 2013. concerning the authorisation of DL-methionine, DL-methionine sodium salt, hydroxy analogue of methionine, calcium salt of hydroxy analogue of methionine, isopropyl ester of hydroxy analogue of methionine, DL-methionine protected with copolymer vinylpyridine/styrene and DL-methionine protected with ethylcellulose as feed additives.
- 41 EFSA Journal - 2012
- 42 ECHA, Acetone, 2020
- 43 U. S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES Public Health Service : TOXICOLOGICAL PROFILE FOR ACETONE. 1994, 1-276
- 44 RAIS, Acetone, The Risk Assessment Information System, Toxicity Profiles. Formal Toxicity summary for Acetone. 1995. 1-14. (2020)