

飼料添加物リボフラビンに係る提出資料の概要

1 基準・規格改正の概要

飼料添加物リボフラビンは、飼料の栄養成分その他の有効成分の補給の用途に用いられ、現在、化学的合成法及び微生物 (*Ashbya gossypii* のリボフラビン生産菌株、*Bacillus subtilis* に属する菌株を宿主としたリボフラビン生産組換え体) を用いた発酵法により製造されるリボフラビンに係る基準・規格が定められている。

今回の基準・規格の改正は、今般指定要望者から要望があった新たな生産菌 (*Candida famata* のリボフラビン生産菌株) を用いた発酵法により製造されるリボフラビンの基準・規格を追加するものである。

2 名称

リボフラビン (riboflavin; 7,8-dimethyl-10- (1'-D-ribithyl) isoalloxazine)
(商品名: マイクロビット B₂ スupra 80)

3 構造及び性状【概要、抄録 3~4 ページ、資料 2】

分子式: C₁₇H₂₀N₄O₆

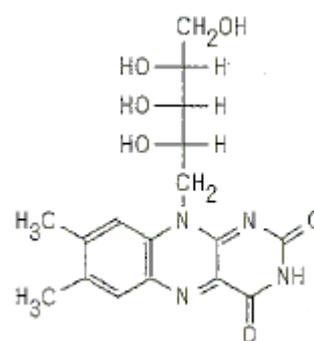
分子量: 376.76

含 量: 乾燥した後定量するとき、リボフラビン 80%
以上を含む。

性 状: だいたい黄色~黄褐色の微細粒子で、特異なにおいを有する。

溶解性: 水に極めて溶けにくく、エタノール、エーテル又はクロロホルムにほとんど溶けない。

安定性: 光によって分解する。



4 起源または発見の経緯並びに外国における許可状況及び使用状況等

【概要、抄録 1~2 ページ、資料 1】

1935 年に Kuhn 及び Karrer らによってリボフラビンの構造決定及び合成に成功して以来、工業的リボフラビンの生産において化学的合成法、微生物による発酵法について多くの研究がなされてきた。発酵法によるリボフラビンの生産は、*Clostridium acetobutylicum* を用いたものからはじまり、より生産効率が高い *Eremothecium ashbyii* や *Ashbya gossypii* 等を用いた製法がこれまでに開発されている。工業的リボフラビン生産においては、今なお化学的合成法が大きな部分を占めているが、コスト低減、再生可能資源利用等の面で有利な、発酵法による生産法に置き換えられつつある。現在、リボフラビン生産に用いられる微生物には、*Ashbya gossypii*、*Candida famata* 及び *Bacillus subtilis* の 3 種類がある。

外国における本品の使用状況は、北米では 1994 年より、欧州各地では 1995 年、アジア・オセアニア地域では 1995 年後半から 1996 年にかけて発売されている。

5 安全性に関する試験成績の概要

(1) 単回投与試験【概要、抄録 6・11 ページ、資料 5】

Crl:WI(Glx/BRL/Han)BR 系ラットを用いた強制経口 (2,500mg/kg (純品で 2,000mg/kg 相当)) 投与による単回投与試験を行い、14 日間観察し、15 日目に剖検した結果、観察期間中では、投与開始後 2 日目に雌雄とも黄色に変色した糞を排泄し、雄では 3 日目に黄色の糞と濃黄色の尿を排泄したが、死亡例はなく、毒性を示す徴候は認められなかった。剖検においても、肉眼的な変化はみられなかった。従って、急性経口 LD₅₀ は、雌雄共に 2,500mg/kg (純品で 2,000mg/kg 相当) より高値と考えられる。

(2) 反復投与試験 【概要、抄録 6・12 ページ、資料 6】

Wistar 系ラットを用いた混飼 (500、5,000、50,000ppm) 投与による 90 日間の反復投与試験において、全ての投与動物の尿が黄色に着色した以外は死亡例もなく、いかなる投与に関連する臨床症状は認められなかった。肉眼的検査でも変化がないことが示された。餌の消費量は雌雄共に有意に増加した。組織学的検査においても投与に関連する変化は観察されなかった。従って、最大無作用量は、雌雄ともに 50,000ppm (雄: 3,868.6mg/kg/day、雌: 3,210.7mg/kg/day) であった。

(3) 変異原性試験 【概要、抄録 6 ページ、資料 7】

ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535 (以上、塩基対置換型)、TA98、TA1537、TA1538 (以上、フレームシフト型) 及び大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (塩基対置換型) を用いた変異原性試験をプレインキュベーション法で代謝活性化 (S-9mix) を加えた条件と加えない条件下で行った。その結果、検体処理による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無に関わらず塩基対置換型、フレームシフト型のいずれの菌株においても陰性対照と比較して 2 倍以上には増加せず、用量反応性も認められないことから、突然変異誘発能を有しないと判断された。

(4) 生産菌の安全性 【概要、抄録 1 ページ、資料 1】

原体の生産菌である *Candida famata* の原株は、*Candida famata* ATCC20849 及び 20850 であり、その安全性については、国立感染症研究所の病原体等安全管理規定において、「3. 真菌」のレベル 2 及び 3 に属さないの生産上 (工業利用面で) ヒトに疾患を起こし、あるいは動物に重要な疾患を起こす危険性はないと考えられる。

(5) 本品中のリボフラビン以外の 20% について

【資料: マイクロビット B₂ スupra 80 製剤中の残り 20% の内容について】

本品 3 ロットについて飼料一般成分の分析を実施し、製剤の成分構成を考察した。結果は次のとおり。

リボフラビン	: 80.73 ~ 81.61%	粗灰分	: 3.7 ~ 6.6 %
粗タンパク質	: 4.19 ~ 4.44%	水分 (乾燥減量)	: 0.97 ~ 1.10%
粗脂肪	: 0.2 ~ 0.3 %	可溶化無窒素物 (NFE)	: 5.23 ~ 7.76%
粗繊維	: 0.1 %		

(6) 生体内動向【資料: ビタミン B₂ 製剤の溶出試験結果】

本品と従来のリボフラビン製剤(針状結晶の粉末、含有率 96%)の生体内動向について差があるかどうかを確認するために、溶出過程を指標として比較検討を行った。本品製剤 12.5mg と対象製剤(従来のリボフラビン製剤) 10.4mg(いずれも純品 10mg 相当)を容器内底に入れ、pH3.0リン酸緩衝液 900mLを溶出液とし、回転数毎分 120 回転、溶出液温度 37℃、溶出点 10,30,60,90 分の 4 時点で、日本薬局方溶出試験第 2 法(パドル法)により溶出試験を行い、溶出点にて採取した検体中のリボフラビン量から溶出率を求めた結果、各溶出時点における溶出率は、本品製剤と対象製剤で大差はなかったことから、本品の生体内動向は従来のリボフラビン製剤と異なるものと考えられた。

(5) その他

実施された毒性試験の概要は別添のとおり。

(別添)

資料 No.	試験の種類、期間	供試生物	1群当り供試数	投与方法	投与量	LD ₅₀ 又は 最大無作用量など	試験機関 (報告年)
5	急性毒性 (14日間)	ラット	3 3	強制経口	2500(mg/kg)	LD ₅₀ > 2500	Covance Laboratories Ltd. 2000年
6	短期毒性 (90日間)	ラット	10 10	経口 (飼料添加)	500,5000, 50000(ppm)	最大無作用量 50000	Aventis CropScience 2000年
7	変異原性	ネズミ チフス菌 大腸菌		Ames test	313,625,1250, 2500,5000 (µg/plate)	S-9Mix(-):陰性 S-9Mix(+):陰性	株式会社ビー・エム・エル総合研究所 2002年

注) 投与量、LD₅₀ 及び最大無作用量は製剤での数値であり、製剤中のリボフラビン含量は 80% (w/w) 以上。