

肥料・飼料等専門調査会における審議結果について

1. 審議結果

農林水産大臣から食品安全委員会に意見を求められた「*Corynebacterium glutamicum* KCCM80189 株により生産された L-イソロイシンを有効成分とする飼料添加物」に係る食品健康影響評価（令和 3 年 8 月 10 日付け農林水産省 3 消安第 2704 号）については、令和 3 年 9 月 3 日に開催された第 166 回肥料・飼料等専門調査会において審議結果（案）がとりまとめられた。

2. 「*Corynebacterium glutamicum* KCCM80189 株により生産された L-イソロイシンを有効成分とする飼料添加物」に係る食品健康影響評価についての意見・情報の募集について

上記品目に関する「審議結果（案）」を食品安全委員会ホームページ等に公開し、意見・情報を募集する。

1) 募集期間

令和 4 年 1 月 18 日（火）開催の食品安全委員会（第 844 回会合）の翌日、令和 4 年 1 月 19 日（水）から令和 4 年 2 月 17 日（木）までの期間

2) 受付体制

電子メールフォーム（ホームページ上）、ファックス及び郵送

3) 意見・情報提供等への対応

いただいた意見・情報等を取りまとめ、肥料・飼料等専門調査会の座長の指示のもと、必要に応じて専門調査会を開催し、審議結果を取りまとめ、食品安全委員会に報告する。

(案)

飼料添加物評価書

Corynebacterium glutamicum
KCCM80189 株により生産された
L-イソロイシンを有効成分とする
飼料添加物

令和４年（２０２２）年１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	5
1. 原体に関する情報	5
(1) 有効成分に関する情報	5
(2) 原体混在物に関する情報	5
2. 製剤に関する情報	5
3. 用途	5
4. 対象飼料及び添加量	6
5. 使用目的及び使用状況	6
II. 安全性に係る知見の概要	7
1. 製剤の概要	7
(1) 原体に関する情報	7
(2) 賦形物質等に関する知見	7
2. 体内動態試験	7
3. 残留試験	8
4. 遺伝毒性試験（参考資料）	8
5. 急性毒性試験	9
6. 亜急性毒性試験	10
(1) ラットの 13 週間亜急性毒性試験（参考資料）	10
(2) ラットの 13 週間亜急性毒性試験（参考資料）	11
(3) ラットの 90 日間亜急性毒性試験（参考資料）	11
7. 慢性毒性・発がん性試験	11
104 週間慢性毒性・発がん性試験（参考資料）	12
8. 生殖発生毒性試験	12
(1) 1 世代生殖毒性試験（参考資料）	12
(2) 発生毒性試験（参考資料）	12
9. 対象動物における安全性試験	13
(1) 豚の耐容性試験（参考資料）	13
(2) 鶏の飼養試験（参考資料）	13
10. その他	14
(1) 耐性菌出現に関する試験	14
(2) 皮膚及び眼刺激性試験	14
III. 国際機関等における評価	14
1. JECFA における評価	14
2. 欧州における評価	15

3. 米国における評価	15
IV. 食品健康影響評価	16
〈別紙：検査値等略称〉	17
〈参考資料〉	18

〈審議の経緯〉

2021 年 8 月 10 日 農林水産大臣から飼料添加物の指定並びに飼料添加物の基準及び規格の設定に係る食品健康影響評価について要請（3 消安第 2704 号）、関係資料の接受

2021 年 8 月 17 日 第 828 回食品安全委員会（要請事項説明）

2021 年 9 月 3 日 第 166 回肥料・飼料等専門調査会

2022 年 1 月 18 日 第 844 回食品安全委員会（報告）

〈食品安全委員会委員名簿〉

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〉

（2021 年 9 月 30 日まで）	（2021 年 10 月 1 日から）
今井 俊夫（座長）	森田 健（座長*）
山中 典子（座長代理）	川本 恵子（座長代理*）
新井 鐘蔵 下位 香代子	吉田 敏則（座長代理*）
荒川 宜親 代田 真理子	赤沼 三恵 小林 健一
今田 千秋 中山 裕之	新井 鐘蔵 佐々木 一昭
植田 富貴子 宮島 敦子	荒川 宜親 代田 真理子
川本 恵子 森田 健	井上 薫 高橋 研
小林 健一 山口 裕子	今田 千秋 中山 裕之
佐々木 一昭 山田 雅巳	植田 富貴子

*：2021 年 10 月 25 日から

〈第 166 回肥料・飼料等専門調査会専門参考人名簿〉

唐木 英明（公益財団法人食の安全・安心財団理事長）

吉田 敏則（東京農工大学農学研究院動物生命科学部門准教授）

要 約

飼料添加物である L-イソロイシン（CAS No.73-32-5）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。

L-イソロイシンは、生体構成必須アミノ酸であり、飼料原料や食品中に広く存在し、飼料添加物として海外で登録・使用されている。また、食品添加物としても使用されており、指定添加物としてその使用基準は設定されていない。

本製剤は、野生株の *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 株の突然変異株である *Corynebacterium glutamicum* KCCM80189 株から発酵法により生産された L-イソロイシンを 90%以上含有する。また、全家畜種を対象とした飼料添加物であり、推奨添加量は、配合飼料当たり 0.01～0.5%と設定されている。また、生産菌株である *Corynebacterium glutamicum* は、EFSA における QPS（特定微生物の安全性推定）に分類され、その代謝物は安全であるとされている。本製剤の非有効成分の大部分が L-イソロイシン以外の遊離アミノ酸であり、有害物質の分析試験を行ったが、製品の安全性に影響を及ぼす成分は未検出または影響を与えない量であった。本製剤は原体をそのまま製剤としたものであり、本製剤の含有成分を食品を介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。

L-イソロイシンに関する遺伝毒性試験では、飼料添加物として使用された場合、遺伝毒性はないと考えた。

豚に、通常給与量の 10 倍量を 21 日間、鶏に、最大推奨添加量の 6 倍量を 10 日間混餌投与した飼養試験では、これらの動物には異常な変化は認められなかった。

以上のことから、*Corynebacterium glutamicum* KCCM80189 株から生産された L-イソロイシンを有効成分とする飼料添加物は、飼料添加物として適切に使用される限りにおいて、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. 原体に関する情報

(1) 有効成分に関する情報

① 一般名

L-イソロイシン

② 化学名等

IUPAC : (2S,3S) -2-Amino-3-methylpentanoic acid

分子式 : $C_6H_{13}NO_2$

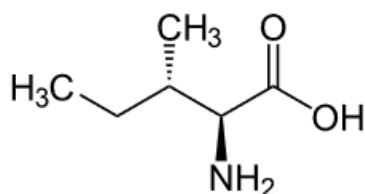
CAS 番号 : 73-32-5

(参照 1)

③ 分子量

131.18 (参照 2)

④ 構造式 (参照 1)



(2) 原体混在物に関する情報

本製剤は L-イソロイシン ($C_6H_{13}NO_2$) を 90%以上含有する (参照 1、3)。

純度試験については、塩化物 (Cl として 0.021%以下)、鉛 (Pb として 2 $\mu\text{g/g}$ 以下) 及びヒ素 (As として 3 $\mu\text{g/g}$ 以下) について規格が設定されている。(参照 1)

2. 製剤に関する情報

原体をそのまま製剤としたものである。

3. 用途

全家畜等¹を対象とする飼料の栄養成分その他の有効成分の補給である。(参照 1)

¹ 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律施行令 (昭和 51 年政令第 198 号) で定める動物

4. 対象飼料及び添加量

全家畜種を対象とした飼料添加物であり、評価要請者による本製剤の配合飼料への推奨添加量は、概ね 0.01~0.5%である。(参照 1)

5. 使用目的及び使用状況

家畜の配合飼料の経済的利用及び環境負荷低減のためには、配合飼料の低タンパク質化が望まれており、加えて畜産現場では有効かつ効率的なアミノ酸の供給が待望されている。哺乳類、家きん、魚類及び甲殻類の必須アミノ酸であるイソロイシンは、化学合成法や発酵法等で製造されるが、これまで価格が高く、飼料原料として用いることができなかった。

現在の配合飼料原料は、イソロイシン含量を高めると粗タンパク質含量が増加し、飼料の低タンパク質化が制限されるが、本製剤を豚（授乳用）飼料へ添加するシミュレーションでは、イソロイシンをはじめとした必須アミノ酸を添加し、大豆粕やその他のアミノ酸等含量を低下させることにより、粗タンパク質含量の低下が示唆されている。そのため本製剤は、低タンパク質化が進む現在の配合飼料設計を損なわず、家畜の効率的なタンパク質供給に資することが期待される。また、本製剤は新たに開発された発酵法により安価に製造できることから、アミノ酸の有効利用の推進に貢献すると考えられている（参照 1、4）。

L-イソロイシンは、日本国内では、食品添加物として指定されており、調味料及び栄養強化剤として用いられている。また、指定添加物としてその使用基準は設定されていない（参照 5）。日本薬局方には、他アミノ酸とのヒト用複合製剤として承認・製造されている（参照 4）。Food Chemicals Codex（米国化学物質規格集）にも、食品添加物として収載されており、欧州やアジア圏などでも広く使用されている（参照 1、6）。

国内では、動物用医薬品及び飼料添加物として承認されていない。

米国では GRAS（一般に安全と認められる物質）の認定を受けている。（参照 7）。韓国、ベトナム及びヨルダンで、飼料添加物としても登録、使用されている（参照 8、9、10）。

EU ではこれまでに EFSA で飼料添加物及び生産菌株の安全性を確認しており（参照 11、12）、2020 年 10 月に飼料添加物として登録された。（参照 1、12）

今般、農林水産省から、韓国 CJ チェイルジェダン社（製造工場所在地：中国）が開発し、あすかアニマルヘルス株式会社が輸入し、全家畜等を対象とする飼料添加物として国内販売を企図している「*Corynebacterium glutamicum* KCCM80189 株により生産された L-イソロイシンを有効成分とする製剤」について（参照 1）、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の指定及び同法第 3 条第 1 項の規定に基づく飼料添加物の基準及び規格を設定することに関し、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

本評価書は、飼料添加物指定審査用資料、文献等を基に、本製剤の毒性に関する主な知見を整理した。(参照 1、13、14)

検査値等略称は別紙に示した。

1. 製剤の概要

(1) 原体に関する情報

① 原体の有効成分

原体の有効成分である L-イソロイシンは、生体構成必須アミノ酸であり、飼料原料や食品中に広く存在しており、家畜の飼料に添加することにより、アミノ酸としてタンパク質の利用性を高める。(参照 1)

② 原体の製造工程及び原体混在物

ショ糖、酵母エキス、 MgSO_4 、 CaCl_2 、 KOH 、コーンスティープリカー、消泡剤等を培地成分として、野生株である *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 株を突然変異させて得られた非遺伝子組換え株である *Corynebacterium glutamicum* KCCM80189 株を、発酵タンク内で培養する発酵法によって L-イソロイシン粗結晶を生成させた後、不純物をろ過、水洗して除去したものを乾燥し、製造用原体を得る。(参照 1)

本製剤は L-イソロイシンを 90% 以上含有する。生産菌株である *Corynebacterium glutamicum* KCCM80189 株が属する *Corynebacterium glutamicum* は、EFSA における特定微生物の安全性推定 (QPS) に分類されており、QPS には、*Corynebacterium glutamicum* の代謝物が安全であることが記載されている。(参照 12、14、15)

また、本製剤の非有効成分は、その大部分が L-イソロイシン以外の遊離アミノ酸であり、それらについて有害物質の分析試験を行ったが、製品の安全性に影響を及ぼす成分は未検出又は影響を与えない含量であった (参照 1、3、16)。

(2) 賦形物質等に関する知見

本製剤は原体をそのまま製剤としたものであり、賦形物質等の添加はない。(参照 1)

以上 (1) 及び (2) から、本製剤の含有成分を食品を介して摂取した場合における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

Corynebacterium glutamicum KCCM80189 株により生産された L-イソロイシンに関する体内動態試験は実施されていないが、一般的な L-イソロイシンの体内動態については、多くの知見で明らかにされている。

一般に、タンパク質の分解によって生じた遊離アミノ酸は、小腸粘膜を通りナトリウム依存能動輸送によって吸収される。吸収された遊離アミノ酸は、細胞内タンパク質の連続的な代謝に利用される。遊離されたアミノ酸の約 75%は再利用され、新しいタンパク質にすぐに取り込まれないアミノ酸は速やかに両性代謝中間体に代謝されるため、生体内に過剰なアミノ酸は蓄積されない。アミノ酸の分解によって生じた過剰な窒素を、魚類はアンモニアとして直接排泄し、鳥類はアンモニアを尿酸に変換し、高等脊椎動物はアンモニアを尿素に変換して排泄する。結晶性の粉末である本製剤を混餌投与した場合、L-イソロイシンは速やかに遊離アミノ酸として吸収され、同様の体内動態を示すと考えられる。

また、イソロイシンは、トランスアミナーゼによってアミノ基が転移し、 α -ケト- β -メチル吉草酸になり、次いで酸化脱炭酸を受け、炭素原子が一つ少ない α -メチルブチリル-CoA になる。それ以後は脂肪酸酸化の経路に似た反応で酸化を受け、最終的にはアセチル-CoA とプロピオニル-CoA 各 1 分子を生じる。プロピオニル-CoA はスクシニル-CoA へと変換されクエン酸回路において利用される。(参照 1、17)

3. 残留試験

2. 体内動態試験において記載した通り、生体内に過剰なアミノ酸は蓄積されないことから、L-イソロイシンが体内に過剰に蓄積されるとは考えにくく、食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、残留試験は不要と判断した。

4. 遺伝毒性試験

本製剤の主成分である L-イソロイシンは、飼料原料中や食物中に広く存在し、食品添加物としても使用されていることから、動物及びヒトにおいて食経験が十分にあると言え、変異原性を示す報告もないことから、食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、遺伝毒性及び変異原性試験の実施は必要ないと判断した。(参照 14)

以下に、本製剤以外の L-イソロイシンについての遺伝毒性試験結果（表 1）を示した。

表 1 L-イソロイシンの遺伝毒性試験結果（参考資料 2）

試験系		対象	用量	結果	参照
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA92, TA94, TA98, TA100, TA1535, TA1537	~3.3 mg /plate ($\pm$ S9)	陰性	参照 18

² 試験に用いた L-イソロイシンの生産方法が不明であることから参考資料とした。

		<i>S. typhimurium</i> TA97, TA102	0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg /plate (±S9)	陰性	参照 19
		<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537 <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	0.062～5 mg/plate (±S9)	陰性	参照 11
		<i>Escherichia. coli uvrB; uvrB umuC uvrB lexA</i>	2 mM (262 µg/mL) (-S9)	陰性	参照 20
	染色体異常試験	チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 (CHL)	～2.0 mg/mL, 48 時間処理 (-S9)	陰性	参照 18
		マウスリンフォーマ細胞 (L5178Y)	0.076～1.25 mg/mL (±S9)	陰性	参照 11
		チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO)	～1.31 mg/mL (±S9)	陰性	参照 11
	DNA 修復試験 (Rec アッセイ)	<i>Bacillus. subtilis</i> H17; M45	2 mg/plate 10 mg/mL (±S9)	陰性	参照 20
	姉妹染色分体交換試験	ヒト末梢血リンパ球	47, 87, 137 µg/mL (-S9)	陰性	参照 20
		ヒト末梢血リンパ球	～100 µg/mL (-S9) (D,L-体不明)	陰性	参照 20

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、*in vivo* 試験データは認められなかったものの、実施された全ての *in vitro* 試験が陰性であったことから、L-イソロイシンには、飼料添加物として使用された場合、遺伝毒性はないと判断した。

5. 急性毒性試験

本製剤の急性毒性試験 (LD₅₀) 結果を表 2 に、本製剤とは異なる生産菌株を使用した L-イソロイシンの結果を参考資料として表 3 に示した。

表 2 L-イソロイシンの急性毒性試験結果 (mg/kg 体重)

動物種	投与経路	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		参照
		雄	雌	
ラット	経口	—	>2,000 ^a	参照 14, 21

a: 最大試験用量を記した。

表3 L-イソロイシンの急性毒性試験結果 (mg/kg 体重) (参考資料³⁾)

動物種	投与経路	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		参照
		雄	雌	
ラット	経口	—	>2,000	参照 22
	経口	>2,000 (性不明)		参照 11
	腹腔	6,822 (性不明)		参照 23
	吸入	LC ₅₀ > 5.07 (mg/L)		参照 12

6. 亜急性毒性試験

申請者らは、下記のラットを用いた2つの13週間亜急性毒性試験(参考資料)により、L-イソロイシンのNOAELが明らかとなっているとして、本製剤を用いた亜急性毒性試験は新たに実施していない。(参照1)

(1) ラットの13週間亜急性毒性試験(参考資料⁴)

ラット(F344系、4週齢、雌雄各10匹/群)にL-イソロイシン(Ajinomoto Co., Ltd)を13週間混餌投与(1.25、2.5、5.0又は8.0%飼料)する亜急性毒性試験が実施された。主な毒性所見を表4に示した。

2.5%以上の投与群で尿pH及び尿量に変化がみられたものの、8.0%投与群の雄での尿量だけが有意な増加であった。

2.5%以上の投与群で、各種血清生化学的検査値に変動がみられたが、2.5%投与群には有意な変化はみられなかった。5%以上の投与群では雄でALPの増加、Clの低下、雌でTP及びClの低下、8.0%投与群の雄で無機リン(IP)の増加及びMg及びNaの低下、雌でCa及びNaの低下は対照群に比較して有意な変化であった。また、8.0%投与群では腎臓の相対重量の増加がみられたが、腎臓に病理組織学的変化はみられなかった。

これらの結果から、L-イソロイシンのNOELを2.5%飼料とした。(参照24)

表4 ラットを用いた13週間混餌投与試験における主な毒性所見

投与用量 (%飼料)	毒性所見	
	雄	雌
8	尿量増加、血清IPの増加、Mg及びNa低下、腎相対重量増加	血清Ca及びNa低下、腎相対重量増加

³ 試験に用いたL-イソロイシンの生産菌株は、本製剤の菌株と異なっており、また、一部の試験は投与経路が経口ではなく吸入であることから参考資料とした。

⁴ 試験に用いたL-イソロイシンの生産菌株及び生産方法が不明であることから参考資料とした。

5 以上	血清 ALP 増加、血清 Cl 低下	血清 TP 及び Cl 低下
2.5 以下	なし	なし

（２）ラットの 13 週間亜急性毒性試験（参考資料⁵）

ラット（SD 系、6 週齢、雌雄各 12 匹/群）に L-イソロイシン（Ajinomoto Co., Ltd）を 13 週間混餌投与（1.25、2.5 又は 5.0%飼料）し、その後 5 週間の回復期を設ける亜急性毒性試験が実施された。主な毒性所見を表 5 に示した。

試験期間を通し投与に関連する健康状態、体重、摂餌量、摂水量、眼底検査に異常な変化はみられなかった。

尿検査においては、5 週間での検査で尿中タンパク質の増加傾向がみられる個体もあるが、有意な変化ではなかった。13 週では Na、K 及び Cl 排泄が 5%投与群で低下した。2.5%投与群の雄でトロンボプラスチン時間の低下、5%投与群の雌で AST、ALT の増加がみられた。投与に関連する、病理及び病理組織学的異常はみられなかった。

以上の結果から、本試験における L-イソロイシンの NOAEL を 2.5%飼料とした。（参照 25）

表 5 ラットを用いた 13 週間混餌投与試験における主な毒性所見

投与用量（%飼料）	毒性所見	
	雄	雌
5	尿 Na、K、Cl 低下	尿 Na、K、Cl 低下、血清 AST、ALT 増加
2.5 以下	なし	なし

（３）ラットの 90 日間亜急性毒性試験（参考資料⁶）

ラット（系統不明、6 週齢、雌雄各 10 匹/群）に L-イソロイシンを 90 日間混餌投与（2,000、10,000 又は 50,000 mg/kg 飼料）し、その後 5 週間の回復期を設ける亜急性毒性試験が実施された。

高用量投与群の雄では、赤血球数、ヘモグロビンの増加、雌では血小板の低下、発情周期の長期化がみられた。

以上の結果から、NOAEL を 10,000 mg/kg 飼料（600 mg/kg 体重/日）とした。（参照 11）

7. 慢性毒性・発がん性試験

申請者らは、L-イソロイシンはタンパク質を構成する生体成分であること、

⁵ 試験に用いた L-イソロイシンの生産菌株及び生産方法が不明であることから参考資料とした。

⁶ 試験に用いた L-イソロイシンの生産菌株は、本製剤の菌株と異なることから参考資料とした。

及び上述の亜急性毒性試験結果も踏まえ、毒性は極めて低いものと考えられることから、本製剤を用いた慢性毒性・発がん性試験は実施していない。(参照 1)

104 週間慢性毒性・発がん性試験 (参考資料⁷⁾)

ラット (系統不明、雌雄各 50 匹/群) に L-イソロイシン (純度 100%) を 104 週間混餌投与 (25,000 又は 50,000 mg/kg 飼料) した。

104 週での生存率は、それぞれ雄雌の無処理対照群で 86%、84%、25,000 mg/kg 飼料群で 82%、86%、50,000 mg/kg 飼料群で 74%、76%であった。試験終了時の投与群の体重は対照群に比べ高値であったが、摂餌量に差はみられず、尿検査、血液検査及び血液生化学検査値に投与に関連する変化はみられなかった。腎臓の相対的重量は 50,000 mg/kg 飼料群の雄で増加し、精巣重量は低下した。腎臓では組織学的変化はみられなかったが、精巣では萎縮がみられた。腫瘍の発現頻度は群間に差がみられなかった

以上の結果から、NOAEL を 924.7 mg/kg 体重/日とした。(参照 11)

8. 生殖発生毒性試験

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、L-イソロイシンは、飼料原料や食物中に広く存在し、食品添加物としても使用されていることから、動物及びヒトにおいて食経験が十分にあり、繁殖成績に悪影響を及ぼす報告はないとして、生殖及び発生に関する試験を実施する必要はないと判断した。(参照 1)

(1) 1 世代生殖毒性試験 (参考資料⁸⁾)

ラット (系統不明、雌雄各 28 匹/群) に L-イソロイシン (Ajinomoto Co., Ltd) を混餌投与 (10,000、20,000、30,000、40,000 又は 50,000 mg/kg 飼料 (推定換算値：雄；550、1,080、1,580、2,110 又は 2,720、雌；880、1,750、2,610、3,430 又は 4,280 mg/kg 体重/日)) し、交配前 14 日から分娩後 21 日まで投与した 1 世代生殖毒性試験が実施された。

最高用量投与群では他の投与群及び対照群に比べ発育不良児数が有意に多かったが、この変化は平均体重に差がないことから、投与の影響としていない。(参照 11)

(2) 発生毒性試験 (参考資料⁹⁾)

ラット (系統不明、雌匹数不明/群) に L-イソロイシンを受胎から妊娠又は分娩 21 日 (参照資料に明確な記載なし) まで混餌投与 (2,000、10,000 又は 50,000

⁷ 試験に用いた L-イソロイシンの生産菌株は、本製剤の菌株と異なることから参考資料とした。

⁸ 試験に用いた L-イソロイシンの生産菌株は、本製剤の菌株と同一であることが確認できないことから参考資料とした。

⁹ 試験に用いた L-イソロイシンの生産菌株は、本製剤の菌株と同一であることが確認できないことから参考資料とした。

mg/kg 飼料：推定換算値、90～150, 480～750 及び 2,320～3,640 mg/kg 体重/日）し、OECD ガイドラインに基づいて、発生毒性試験が実施された。

最高用量投与群で摂餌量の低下がみられたが、試験期間を通し、投与に関連した異常な変化はみられなかった。（参照 11）

9. 対象動物における安全性試験

Corynebacterium glutamicum KCCM80189 株により生産された L-イソロイシンについて、対象動物を用いた飼養試験は実施されていないが、他の L-イソロイシンについては、広く試験が実施されている。

（1）豚の耐容性試験（参考資料^{10）}

豚（子豚、16 頭/群）に L-イソロイシンを 21 日間混餌投与する耐容性試験（対照群、10 倍（対照群飼料の 10 倍量）L-イソロイシン、L-イソロイシン+L-バリン及び陽性対照群（L-バリン投与群））が実施された。摂餌量、体重を各週測定し、試験終了時には各群 5 頭の血液採取、剖検を実施した。

結果を表 6 に示した。

10 倍量投与群における摂餌量及び増体量は増加したが、血清ロイシン濃度並びに L-バリン濃度については、10 倍量の投与に際し、異常な変化は認められなかった。（参照 11）

表 6 子豚の L-イソロイシン耐容性試験の結果

	対照群	10 倍 L-イソロイシン
L-イソロイシン添加量 (%)	0.0760	0.7605
L-バリン添加量 (%)	0.1019	0.1019
摂餌量 (g/日)	767	786
増体量 (g/日)	459	475
血清バリン (mg/L)	23.7	23.7
血清イソロイシン (mg/L)	15.9	20.6
血清ロイシン (mg/L)	23.0	20.3

（2）鶏の飼養試験（参考資料^{11）}

鶏（単冠白色レグホーン種、雄、8 日齢、4 羽/群）に過剰な L-イソロイシンを 10 日間混餌投与（3%飼料：最大推奨添加率 0.5%の 6 倍量）する飼養試験を実施した。また、同時に 11 種類のアミノ酸をそれぞれ過剰投与する群を設けた。

試験終了時に採血し、血漿各種アミノ酸量を測定（Moore らの方法）した。

¹⁰ 試験に用いた L-イソロイシンは、本製剤と異なることから参考資料とした。

¹¹ 試験に用いた L-イソロイシンの由来が不明であることから参考資料とした。

L-イソロイシン投与群の摂餌量及び日増体量は、対照群（基礎飼料群）と比較して低値であったが、飼料要求率に差はみられず、成長阻害はほとんどみられないことから、過剰投与による影響はないかわずかな影響であると結論した。（参照 26）

10. その他

（1）耐性菌出現に関する試験

申請者らは、L-イソロイシンはアミノ酸であり、抗菌活性を有さないため、耐性菌に関する試験は実施していない。（参照 1）

（2）皮膚及び眼刺激性試験

① OECD guideline 439 に基づき *in vitro* 皮膚刺激性試験を実施したが、本製剤による刺激性はみられなかった。

OECD guideline 437 に基づき *in vitro* 眼刺激性試験を実施したが、本製剤には眼への刺激性はみられなかった。

② （参考資料¹²）ウサギ（3匹）を用いて OECD guideline 404 に基づき皮膚刺激性試験を実施したが、刺激性はみられなかった。

ウサギ（3匹）に OECD guideline 405 に基づき眼刺激性試験を実施した。適用直後にわずかな反応がみられたが、48 時間内に完全に回復し、L-イソロイシンに眼刺激性は示されなかった。

（3）皮膚感作性試験

① OECD guideline 429 及び EC No 440/2008 に基づき局所リンパ節反応を用いた皮膚反応感作性試験（いずれも局所リンパ節反応）を実施したが、本製剤には皮膚刺激感作性はみられなかった。（参照 12）

② マウスを用いて OECD guideline 429 に基づき局所リンパ節反応を用いた皮膚刺激感作性試験を実施した。³H-チミジンの取り込みは対照群との間に差がみられたが、その程度は陽性反応とする基準に達しないものであり、L-イソロイシンに皮膚刺激感作性はみられなかった。（参照 11）

Ⅲ. 国際機関等における評価

1. JECFA における評価

JECFA は、着香料としての L-イソロイシンの評価を実施しており、2008 年の EFSA との共通見解によると、MSDI 法による評価では、人の健康に及ぼす影響はないとしている（参照 27）。

¹² 試験に用いた L-イソロイシンの生産菌株は、本製剤の菌株と異なることから参考資料とした。

また、食品添加物としての評価から、本アミノ酸は主要な栄養素であり、タンパク質の構成要素でもあることから、着香料として用いる量よりはるかに高用量が使用されるが、食品を介した人へのばく露では、その安全性に懸念はないとしている（参照 28）。

2. 欧州における評価

EFSA は、着香料として、また飼料添加物としてイソロイシン及び L-イソロイシン（最大量 25 mg/kg 飼料）を全動物種¹³に投与した時、人が動物の生産物を摂取しても健康に影響を与えるものでないとしている（参照 29、30）

EU は、*Corynebacterium glutamicum* KCCM80189 株の発酵により産生された本製剤の全動物種における飼料添加物及び着香料としての適用は、人への害作用を有さないとしている。EFSA は、飲水と飼料からアミノ酸を同時に摂取することについて留意すべきとしたが、最高添加量での試験は要求しなかった。したがって、飲水に L-イソロイシンを添加する場合には、飼料由来の必須アミノ酸及び条件付必須アミノ酸の摂取量を考慮するように使用者に注意喚起することが適当としている。（参照 31）。

また、EFSA の評価においては、本製剤を飼料添加物として全動物種に適用した時、動物及び人の健康に有害な影響を及ぼすものでないと結論している（参照 12）。

この他、遺伝子組換え体を用いて産生した L-イソロイシンを飼料添加物として動物の必要量を適用し、その動物種の生産物を人が摂取した時、人の健康への懸念はなく、安全であるとしている（参照 11）。

3. 米国における評価

FDA では、L-イソロイシンは飼料添加物として安全であるとしている（参照 7）。また、米国食品香料製造者協会（FEMA）は、L-イソロイシンを着香料として評価し、GRAS としている（参照 32）。

¹³ 牛、豚、馬、めん羊、山羊、家きん（採卵鶏、肉用鶏、七面鳥）、ウサギ、魚（サケ、マス）（参照 30）

IV. 食品健康影響評価

L-イソロイシンは、生体構成必須アミノ酸であり、飼料原料や食品中に広く存在し、飼料添加物として海外で登録・使用されている。また、食品添加物としても使用されており、指定添加物としてその使用基準は設定されていない。

本製剤は、野生株の *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 株の突然変異株である *Corynebacterium glutamicum* KCCM80189 株から発酵法により生産された L-イソロイシンを 90%以上含有する。また、全家畜種を対象とした飼料添加物であり、推奨添加量は、配合飼料当たり 0.01~0.5%と設定されている。また、生産菌株である *Corynebacterium glutamicum* は、EFSA における QPS に分類され、その代謝物は安全であるとされている。本製剤の非有効成分の大部分が L-イソロイシン以外の遊離アミノ酸であり、有害物質の分析試験を行ったが、製品の安全性に影響を及ぼす成分は未検出または影響を与えない量であった。本製剤は原体をそのまま製剤としたものであり、本製剤の含有成分を食品を介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。

L-イソロイシンに関する遺伝毒性試験では、飼料添加物として使用された場合、遺伝毒性はないと考えた。

豚の飼養試験では、通常給与量の 10 倍量を 21 日間給与、鶏の飼養試験では、最大推奨添加量の 6 倍量を 10 日間混餌投与した場合、それらの動物には異常な変化は認められなかった。

以上のことから、*Corynebacterium glutamicum* KCCM80189 株から生産された L-イソロイシンを有効成分とする飼料添加物は、飼料添加物として適切に使用される限りにおいて、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〉

略称等	名称
ADFI	Average Daily Feed Intake：1 日平均飼料摂取量
ADG	Average Daily Gain：平均日増体量
ADI	Acceptable Daily Intake：許容一日摂取量
ALP	Alkaline Phosphatase：アルカリ性ホスファターゼ
ALT	Alanine aminotransferase：アラニンアミノ基転移酵素
AST	Aspartate aminotransferase：アスパラギン酸アミノ基転移酵素
BUN	Blood urea nitrogen：血漿中尿素窒素
EFSA	European Food Safety Authority：欧州食品安全機関
EU	European Union：欧州連合
FDA	US Food and Drug Administration：米国食品医薬品庁
FEMA	Flavor Extract Manufacturers Association：米国食品香料製造者協会
GRAS	Generally Recognized as Safe：一般に安全と認められる
IP	Inorganic phosphorus：無機リン
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives：FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
LC ₅₀	Lethal Concentration 50：半数致死濃度
LD ₅₀	Lethal Dose 50：半数致死量
MSDI	Maximised Survey-derived Daily Intake：香料物質摂取量推定法
NOAEL	No-Observed- Adverse-Effect Level：無毒性量
NOEL	No-Observed-Effect Level：無作用量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development：経済協力開発機構
QPS	Qualified presumption of safety：特定微生物の安全性推定
TP	Total protein：総タンパク質量

〈参考資料〉

1. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料、L-イソロイシンについての試験成績等の申請資料抄録, 2020
2. Merck Index Web 版
<https://www.rsc.org/Merck-Index/searchresults?searchterm=isoleucine>
3. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, Analytical report Qualitative and quantitative composition of L-isoleucine, CJ Research Institute of Biotechnology
4. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, 起源または発見の経緯、外国での飼料添加物としての許可状況及び使用状況等、2020
5. 厚生労働省:各添加物の使用基準及び保存基準、厚生省告示第370号 食品、添加物等の規格基準、指定添加物, 2020
6. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料 FCC, Monographs, 2014.
7. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, 21 CFR Subpart F - Nutrients and/or Dietary Supplements: L-isoleucine. 2020
8. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, (非公表)
9. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, (非公表)
10. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, (非公表)
11. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, EFSA. SCIENTIFIC OPINION, Scientific Opinion on the safety and efficacy of L-isoleucine for all animal species. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) and EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) . EFSA Journal 2010; 8 (1) :1425.
12. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料 EFSA, SCIENTIFIC OPINION : Safety and efficacy of L-isoleucine produced by fermentation with *Corynebacterium glutamicum* KCCM 80189 for all animal species. J.EFSA.2020.6021.
13. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, 効果に関する事項
14. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, 安全性に関する事項
15. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, Test report 414883, SGS EFSA2007 QPS
16. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, Test report 414883, SGS
17. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料第17改正日本薬局方解説書_L-イソロイシン, 2016.
18. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, 石館・祖父尼・吉川. 食品添加物の変異原性試験成績 (その3) . 変異原と毒性. 1982, 5:579-587.
19. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, 藤田・佐々木. *Salmonella typhimurium* TA97, TA102 を用いた食品添加物の変異原性試験 (第5報) . 東京衛研年報 Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H., 1990, 41: 315-322.
20. あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, EFSA, Opinion of the Scientific

- Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to: Flavouring Group Evaluation 26: Amino acids from chemical group 34. The EFSA Journal (2006) 373, 1-48 p.5/14.
- 21.あすかアニマルヘルス株式会社申請資料,非公表
 - 22.あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, ECHA 毒性データ, L-isoleucine, dossier.
 - 23.医薬品インタビューフォーム2013, [p23/26] 分岐鎖アミノ酸製剤, 日本薬局 方 イソロイシン・ロイシン・バリン顆粒 アミノマイラン配合顆粒.
 - 24.あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, Kawabe M, Takesada Y, Tamano S, Hagiwara A, Ito N, Shirai T. SUBCHRONIC TOXICITY STUDY OF L-ISOLEUCINE IN F344 RATS. Journal of Toxicology and Environmental Health, 1996, 47:499– 508.
 - 25.あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, Tsubuku S, Hatayama K, Katsumata T, Nishimura N, Mawatari K, Smriga M, Kimura T. Thirteen-Week Oral Toxicity Study of Branched-Chain Amino Acids in Rats. International Journal of Toxicology, 2004, 23:119–126.
 - 26.あすかアニマルヘルス株式会社申請資料, Okumura T and Yamaguchi K. Effect of Excess of Individual Essential Amino Acids in Diets on Chicks. Japan Poultry Sci. 1980, 17:135-139.
 - 27.EFSA, SCIENTIFIC OPINION, Flavouring Group Evaluation 79, (FGE.79) , Consideration of amino acids and related substances evaluated by JECFA (63rd meeting) structurally related to amino acids from chemical group 34 evaluated by EFSA in FGE. 26Rev1 (2008) , Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food. The EFSA Journal (2008) 870, 1-46.
 - 28.JECFA. Safety evaluation of certain food additives. WHO FOOD ADDITIVES SERIES: 67.2012
 - 29.EFSA. SCIENTIFIC OPINION: Scientific Opinion on the safety and efficacy of the use of amino acids (chemical group 34) when used as flavourings for all animal species. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) . EFSA Journal 2014;12 (5) :3670.
 - 30.Official Journal of the European Union: COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) No 429/2008 of 25 April 2008, on detailed rules for the implementation of Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the preparation and the presentation of applications and the assessment and the authorisation of feed additives.

31. Official Journal of the European Union: COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2020/1397 of 5 October 2020, concerning the renewal of the authorisation of L-isoleucine produced by *Escherichia coli* FERM ABP-10641 as a nutritional additive, its extension of use and the authorisation of L-isoleucine produced by *Corynebacterium glutamicum* KCCM 80189 as a feed additive for all animal species, and repealing Regulation (EU) No 348/2010.
32. Smith, R.L., Waddell, W.J., Cohen, S.M., Fukushima, S., Gooderham, N.J., Hecht, S.S., Marnett, L.J., Portoghese, P.S., Rietjens, I.M.C.M., Adams, T.B., Lucas Gavin, C., McGowen, M.M., and Taylor, S.V. : GRAS Flavoring Substances 25: The 25th publication by the Expert Panel of the Flavor and Extract Manufacturers Association provides an update on recent progress in the consideration of flavoring ingredients generally recognized as safe under the Food Additive Amendment. Food Technology, 65 (7) , 44-75. FEMA 4667-4727. 25. GRAS Substances (4667-4727) . FEMA GRAS Publications.2011.