

(案)

飼料添加物評価書

Trichoderma reesei JPTR003 株
を用いて生産されたムラミダーゼ濃
縮・精製物を原体とする飼料添加物

(第2版)

令和5年(2023年) 月

食品安全委員会

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.....	4
○要 約.....	5
I. 評価対象飼料添加物の概要.....	6
1. 原体の名称等.....	6
2. 原体の製造方法.....	6
3. 製造方法.....	6
(1) 液状製剤.....	6
(2) 固形製剤（小片、粉末又は粒子）.....	6
4. 用途.....	6
5. 対象飼料及び添加量.....	6
6. 使用目的及び使用状況.....	7
II. 安全性に係る知見の概要.....	9
1. 原体及び賦形物質等に関する情報.....	9
(1) 原体の有効成分（組換え体）に関する知見.....	9
(2) 原体の製造工程に関する知見.....	9
(3) 賦形物質等に関する知見.....	9
2. 体内動態試験（参考資料）.....	10
(1) 消化試験（ <i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> ）.....	10
(2) 吸収.....	11
(3) 分布.....	12
(4) 代謝.....	12
(5) 排泄.....	13
3. 遺伝毒性試験.....	13
4. 急性毒性試験.....	14
5. 亜急性毒性試験.....	14
(1) 28日間亜急性毒性試験（ラット）.....	14
(2) 13週間亜急性毒性試験（ラット）.....	14
(3) 4週間亜急性毒性試験（ウサギ、静脈内投与）.....	15
6. 対象動物に対する安全性.....	15
(1) 安全性試験（鶏）.....	15
(2) 安全性試験（豚）.....	15
(3) 飼養試験（有効性確認試験）.....	16
7. その他.....	16
(1) 対象動物における抗菌作用に関する試験.....	16

Ⅲ. 国際機関等における評価.....	17
1. JECFA における評価	17
2. EFSA における評価	17
3. 米国における評価等	17
Ⅳ. 食品健康影響評価	18
・ 別紙：検査値等略称	19
・ 参照	20

〈審議の経緯〉

第1版関係

- 2019年 12月 11日 農林水産大臣から飼料添加物の指定及び飼料添加物の基準及び規格の設定並びに飼料添加物を含む飼料の基準及び規格の改正に係る食品健康影響評価について要請（元消安第3782号）、関係資料の接受
- 2019年 12月 17日 第767回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2020年 1月 20日 第150回肥料・飼料等専門調査会
- 2020年 3月 9日 第151回肥料・飼料等専門調査会
- 2021年 3月 26日 第160回肥料・飼料等専門調査会
- 2021年 5月 11日 第815回食品安全委員会（報告）
- 2021年 5月 12日 から6月10日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2021年 6月 16日 肥料・飼料等専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告
- 2021年 6月 22日 第821回食品安全委員会
（同日付で農林水産大臣に通知）
- 2022年 1月 21日 飼料添加物に指定（ブロイラー用飼料）

第2版関係

- 2023年 6月 20日 農林水産大臣から飼料一般の製造の方法の基準改正（豚、鶏(全用途)用飼料への適用拡大)に係る食品健康影響評価について要請（5消安第1732号）、関係資料の接受
- 2023年 6月 27日 第903回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2023年 7月 4日 第904回食品安全委員会（審議）

〈食品安全委員会委員名簿〉

第1版関係

（2018年7月1日から）

佐藤 洋（委員長*）
山本 茂貴（委員長代理*）
川西 徹
吉田 緑
香西 みどり
堀口 逸子
吉田 充

*：2018年7月2日から

第2版関係

(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〉

第1版関係

(2020年3月31日まで)

今井 俊夫 (座長*)
山中 典子 (座長代理*)
新井 鐘蔵 佐々木 一昭
荒川 宜親 下位 香代子
井手 鉄哉 中山 裕之
今田 千秋 宮島 敦子
植田 富貴子 森田 健
川本 恵子 山口 裕子
栗形 麻樹子 山田 雅巳
小林 健一

(2020年4月1日から)

今井 俊夫 (座長)
山中 典子 (座長代理)
新井 鐘蔵 代田 真理子
荒川 宜親 下位 香代子
井手 鉄哉 森田 健
今田 千秋 中山 裕之
植田 富貴子 宮島 敦子
川本 恵子 山口 裕子
小林 健一 山田 雅巳
佐々木 一昭

* : 2019年11月6日から

〈第150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)

〈第151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)

〈第160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

Trichoderma reesei JPTR003 株を用いて生産されたムラミダーゼ（以下「ムラミダーゼ JPTR003」という。）を原体とする飼料添加物について、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。

食品安全委員会は、ムラミダーゼ JPTR003 について、遺伝子組換え体に関する評価を実施し、当該飼料添加物を摂取した家畜に由来する畜産物について安全上の問題はないと評価している。

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。

ムラミダーゼ JPTR003 に関する遺伝毒性試験では、*in vitro* の復帰突然変異試験及び染色体異常試験の結果は陰性であったことから、ムラミダーゼ JPTR003 には、飼料添加物として用いる限りにおいて、生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないと考えた。

ラットの 13 週間亜急性毒性試験において、ムラミダーゼ JPTR003 の投与による毒性所見はみられなかったことから、本試験における NOAEL は投与最高用量である 1.132 g TOS/kg 体重（384,616 LSU(F)/kg 体重/日）と判断した。

本飼料添加物を用いた豚及び鶏の安全性試験では、対象家畜の最大推奨添加量の 10 倍量を 6 週間混餌投与しても、投与による悪影響はみられなかった。

以上のことから、今回評価要請された本飼料添加物は、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. 原体の名称等

原体名： *Trichoderma reesei* JPTR003 株を用いて生産されたムラミダーゼ濃縮・精製物（ムラミダーゼ JPTR003 原体）

有効成分名：ムラミダーゼ JPTR003

酵素名：ムラミダーゼ (Muramidase) 別名：リゾチーム (Lysozyme)

酵素番号：EC 3.2.1.17

CAS No.：9001-63-2（参照 1）

2. 原体の製造方法

T. reesei QM6a 株を宿主菌株とし、*A. alcalophilum* の特定菌株由来のムラミダーゼをコードする合成遺伝子を導入した組換え *T. reesei* JPTR003 株を培養し、得られた培養液から菌体成分の除去等の処理を行った後、濃縮・精製する。（参照 1）

3. 製造方法

本飼料添加物の剤形は、液状及び固形（小片、粉末又は粒子）があり、それぞれに以下のとおり賦形物質等を加えて製造する。（参照 1）

（1）液状製剤

原体に、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム及びソルビトールを混和した液状物である。

（2）固形製剤（小片、粉末又は粒子）

原体に、硫酸ナトリウム、ショ糖及び賦形物質を混和した小片、粉末又は粒子である。

4. 用途

飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進である。（参照 1）

5. 対象飼料及び添加量

評価要請者によれば、本飼料添加物の飼料への推奨添加量は、以下のとおり。

豚用飼料 50,000～65,000 ペプチドグリカン分解力 (LSU(F)¹) /kg

肉用鶏用飼料 25,000～45,000 LSU(F)/kg 飼料

採卵鶏用飼料 30,000 LSU(F)/kg 飼料

（参照 1、2、56）

¹ 1 LSU(F)は、ペプチドグリカン分解力単位のことであり、1 LSU(F) はムラミダーゼが 12.5µg/mL フリオレセイン標識ペプチドグリカンに 30℃で作用するとき、反応初期の 1 分間に 0.06 nmol のフルオレセインイソチオシアナート（アイソマーI）に相当する蛍光強度を増加させる酵素量に相当。（参照 2）

6. 使用目的及び使用状況

ムラミダーゼは、酵素活性に基づく分類名としては、リゾチームの別名であり、細菌の細胞壁の主要構成成分であるペプチドグリカンと呼ばれる *N*-アセチルグルコサミン及び *N*-アセチルムラミン酸が交互に重合する多糖間の β 1-4 結合を切断する加水分解酵素のことであり、細菌の溶解を引き起こす。ほかにムコペプチドグリコヒドロラーゼと呼ばれることがある。本酵素は、1922 年にアレキサンダー・フレミング博士によりヒトの体液中の成分として発見された。その後、細菌、植物、無脊椎動物、脊椎動物まで広く生物に分布していることが判明した。本酵素は、脊椎動物では鼻汁、母乳、卵白等に存在し、細菌の細胞壁のペプチドグリカン層を分解する生理活性により、感染防御機能を担っていると考えられている。

本酵素は、日本においては、食品添加物として指定されており、食品添加物としては、放線菌 (*Actinomyces* 又は *Streptomyces*) 又は細菌 (*Bacillus*) 由来物をムラミダーゼとし、卵白由来物をリゾチームと分類している(参照 1、3)。また、過去にヒト用の医薬品(内服)として卵白由来のリゾチーム塩酸塩が製造販売承認されていたが、有効性について再評価された結果、2016 年に鎮咳去痰作用について認められないとされた(参照 4)。

動物用医薬品としては、日本では卵白由来のリゾチーム塩酸塩が、まだいを対象とする水産用医薬品(水産用ポトチーム)として製造販売承認(1995 年)されている。効能・効果は、まだいの粘液を増加させることにより白点虫 (*Cryptocaryon irritans*) の付着を防ぎ、寄生による死亡や摂餌低下を改善することであり、投与量はリゾチーム塩酸塩として 20 mg/kg 魚体重(力価)を 7 日間経口投与(飼料に添加)するもので、休薬期間は 3 日間と設定されている。本動物用医薬品について、食品安全委員会は、2005 年に再審査に係る食品健康影響評価を実施しており、「提出された資料の範囲において、当該動物用医薬品に関する安全性に係る新たな知見の報告は認められないと考えられる」と評価している。(参照 5)

今回の評価対象である本飼料添加物は、消化管内に滞留する難溶性の細菌由来ムコ多糖類を分解することにより、飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進を目的として、令和 4 年 1 月に飼料添加物の指定を受け、ブロイラー用飼料に添加が認められている。(参照 1、56)

米国では 2011 年にブロイラー、2020 年に豚に対して GRAS (Generally Recognized as Safe: 一般に安全と認められる (FDA による安全基準合格)) の認定を受け、使用が認められている。(参照 1、6、57)

EU ではブロイラー、七面鳥その他の家きん類の飼料要求率改善及び消化機能補助を目的とした場合における安全性評価が 2018 年及び 2019 年に終了している。また、2021 年に子豚について同様の評価を行っている(参照 1、7、8、9、58)。

豪州においては採卵鶏を含む全畜種を対象とした飼料添加物として使用されている。

第2版では、農林水産省から、*Trichoderma reesei* JPTR003株を用いて生産されたムラミダーゼ濃縮・精製物を原体とする飼料添加物について、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3条第1項の記載に基づく、飼料一般の製造の方法の基準の改正（豚、鶏（全用途）への適用拡大）に関する食品健康影響評価の要請がなされた。

なお、ムラミダーゼ JPTR003については、遺伝子組換え技術を用いて生産していることから、食品安全基本法第24条第1項第14号、食品安全委員会令（平成15年政令第273号）第1条第1項及び食品安全委員会令第1条第1項の内閣府令で定めるときを定める内閣府令（平成15年内閣府令第66号）第3号の規定に基づき、農林水産省より評価要請がされ、食品安全委員会は「当該飼料添加物を摂取した家畜に由来する畜産物について安全上の問題はないと判断した。」と評価している。（参照10）

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、ムラミダーゼ JPTR003 を原体とする飼料添加物の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情報

(1) 原体の有効成分（組換え体）に関する知見

ムラミダーゼ JPTR003 は、遺伝子組換え技術を利用して開発された酵素（タンパク質）である。ムラミダーゼ JPTR003 が飼料添加物として利用された場合、本飼料添加物を摂取した家畜に由来する畜産物については、2021年6月に食品安全委員会は安全上の問題はないと評価している（参照 10）。

(2) 原体の製造工程に関する知見

原体の有効成分を含む培養物をろ過し、又は水で抽出後、菌体をろ過除去し、ろ液を濃縮する。（参照 1）

(3) 賦形物質等に関する知見

① 液状製剤

液状製剤の製造には、必要に応じて安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム及びソルビトールが添加される。このうち、ソルビトールは、食品安全委員会は、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 11）

安息香酸ナトリウムは、国内では食品添加物に指定されており（参照 12）、JECFA では安息香酸類についてグループ ADI が 0～5 mg/kg 体重/日と設定されている（参照 13）。

ソルビン酸カリウムは、国内で食品添加物に指定されており（参照 12）、食品安全委員会は、ソルビン酸並びにそのカルシウム塩及びカリウム塩のグループ ADI として 25 mg/kg 体重/日（ソルビン酸として）と評価している（参照 14）。JECFA では、ソルビン酸並びにそのカルシウム塩、カリウム塩及びナトリウム塩のグループ ADI として、0～25 mg/kg 体重/日（ソルビン酸として）と評価している（参照 15）。

② 顆粒製剤

顆粒製剤の製造では、硫酸ナトリウム、ショ糖、カオリン、セルロース及び植物油が添加される。このうち、カオリン、セルロース及び植物性油脂については、食品安全委員会は、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 11）

硫酸ナトリウムは国内で食品添加物に指定されており（参照 12）、JECFA

では、ADI を「not specified」（特定しない）と評価している（参照 16）。

シヨ糖は、食品に通常含まれている。

カオリンはアルミニウムを含んでおり、JECFA は 2011 年にアルミニウムの PTWI (2 mg/kg 体重/週) を設定している（参照 17）。しかしながら、本飼料添加物におけるカオリンの含有量及びヒトへのばく露が家畜を経由することを踏まえると、本飼料添加物を使用することによる畜産物を介したヒトへのアルミニウムのばく露は無視できる程度と考えられる。

以上のことから、食品安全委員会は、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用法・用量を考慮すると、本飼料添加物の含有成分として使用され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（参考資料²⁾）

ムラミダーゼ JPTR003 に関する体内動態試験は実施されていないが、リゾチームについては広く試験が実施されている。

(1) 消化試験（*in vitro* 及び *in vivo*）

リゾチーム（卵白由来）及びグルコースにより修飾した本リゾチームを用いた *in vitro* 及び *in vivo* での消化試験が実施されている。

① *in vitro* での消化試験

リゾチーム試料（100 mg/13 mL 0.1N HCl）を 5°C、12 時間インキュベーション後、2 mL ペプシン溶液（1.5 mg/13 mL 0.1N HCl）を添加し 37°C、3 時間反応させた後、中性化し、7.5 mL パンクレアチン溶液（5 mg/7.5 mL、pH 8.0）添加し 37°C、20 時間反応させる *in vitro* 消化試験が実施された。ペプチド産生量を測定した。

結果を表 1 に示した。

無処置リゾチームの分解は、ペプシン及びパンクレアチンの反応条件下では、分子量 3,000 以下が大部分（93.9%）であり、3,000～10,000 のものが 0.6% 及び 10,000 以上のものが 5.5% であった。グルコースによる修飾時間（4～50 日）の延長に伴い多量体が増加し、ペプシン-パンクレアチン消化系では低分子量画分が減少し、高分子画分が増加、グルコースによる修飾が約 60%（30 日）に達すると、*in vitro* の消化系では完全に分解することは困難であった。（参照 18）

²⁾ ムラミダーゼ JPTR003 ではないリゾチームを用いた試験であることから参考資料とした。

表 1 グルコース修飾リゾチームを *in vitro* ペプシンーパンクレアチン系で消化（3 時間+20 時間）後の消化

分子量	消化状況 (%)					
	グルコース 未修飾	グルコース修飾時間 (日)				
		4	7	21	30	50
<3,000	93.9	92.5	75.8	66.1	37.3	33.2
3,000~10,000	0.6	1.9	5.2	2.2	3.4	8.2
>10,000	5.5	5.6	19.0	31.7	59.8	58.6

② *in vivo* での消化試験

ラット (Wistar 系、体重 200 g、雄) に卵白由来リゾチーム (250 mg/0.5 mL) を経口投与し、投与 90~180 分後の胃及び小腸内試料を採取し、HPLC により測定する、*in vivo* 消化試験が実施された。

結果を表 2 に示した。

単量体は投与後 90 分以内にほとんどが胃から小腸へ移送され、99.6%の投与物質が消化・吸収された。7 日間グルコース修飾処理を行ったリゾチームの投与 180 分後では胃及び上部小腸には残留物はみられず、0.2%が下部小腸にみられた。30 日間修飾した場合には、90 分後では胃で 4.2%、上部小腸で 0.5%及び下部小腸で 6.7%³残存していた。無処置及び 30 日間修飾リゾチームを投与した 90 分後の小腸における分子量 3,000 以下の画分中にはリゾチームは検出されず、被験分子は胃及び小腸で消化・吸収されたと考えられた。(参照 18)

表 2 単量体及び多量体リゾチームのラット消化管内残留率

消化時間 (分)	無処置		7 日間修飾	30 日間修飾
	90	180	180	90
胃 (%)	0.38	0.00	0.00	4.23
上部小腸 (%)	0.00	0.00	0.00	0.50
下部小腸 (%)	0.05	0.00	0.20	0.69 ³

(2) 吸収

リゾチーム (鶏又は卵白由来リゾチーム) を、ヒト、ラット、ウサギ又は鶏に経口投与した場合の吸収試験が実施されている。

これらの結果、リゾチーム (鶏及び卵白由来リゾチーム) は、ヒト、ラット、ウサギ及び鶏では、少量であるが腸間膜を通過して吸収された。吸収後、リゾチームは、主に血流へ移行した。リンパ系への移行は血流と比較して微量であった。

腸管における吸収部位は、上部小腸であり、粘膜上皮細胞の貪食作用及び

³ 参照 18 の通りに記載した。

傍細胞輸送経路から吸収された。腸管から吸収されたリゾチームは、投与10数分後から1時間以内に血中に出現し、その消失は速やかに生じるとされている（1時間から2日程度まで）。（参照 19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29）

（3）分布

① ラットを用いた試験

ラットにリゾチームを注射投与する複数の分布試験が実施されている。

これらの結果によると、注射投与後、多くの組織への分布がみられ、その主要な組織は、肝臓、腎臓、脾臓、肺、小腸、心筋、骨格筋、関節面、気管及び副鼻腔等であり、このうち腎濃度が最も高く、骨格筋では低かった。結果の一部を表3に示した。（参照 30、31、32、33、34、35）

表3 ラットに¹²⁵I標識リゾチームを静脈内投与（65 µg/動物）した3時間後の組織分布量（Hansenら1971）

	血漿	尿	白血球	肺	腎臓	骨髄	脾臓	小腸	肝臓
平均値	12.2	1.5	25.4	574	563	425	158	78	14
SD	2.6	1.1	15.3	100	185	169	38	75	5

単位：µg/mL又はµg/g

白血球：µg/10⁶細胞

（4）代謝

リゾチームをラット又はマウスに経口投与する複数の代謝試験が実施されている。

これらの結果によると、経口投与されたリゾチームの大部分は、上部消化管（胃及び上部小腸）において、ペプシン-カテプシン系で消化・吸収されるが、極めて少量の消化分解されないリゾチームが腸粘膜細胞の貪食作用及び傍細胞透過経路により吸収される。その多くは腎臓及び肝臓へ移送され、代謝・分解される。腎臓では尿細管上皮細胞内のリソソームに取り込まれ、分解される。（参照 36、37、38）

ヒトへのリゾチームの静脈内投与の結果、リゾチームの異化率は、時間当たり76%であり、その多くは腎臓が担っているが、腎臓以外でも約15%が異化されると考えられる。（参照 34）

表 4 成人への ^{125}I 標識ヒトリゾチーム (100 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) の静脈内投与におけるリゾチームの血漿中・尿中濃度と腎臓における異化率・糸球体濾過率

N=9	血漿 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	尿 ($\mu\text{g}/\text{日}$)	異化率 (/時間)	合成量 ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時間}$)	糸球体ろ過率 (%クレアチニン クリアランス)
平均値	8.5	610	0.760	287	34.8
SD	1.4	650	0.090	72	6.9

(5) 排泄

イヌにリゾチームを静脈投与した試験が実施されている。血流中の外因性リゾチームの尿細管透過性はクレアチニン比 38%であり、その変動は大きく (SD: 11%)。リゾチームの尿細管での最大吸収能は、1.0 mg/100 mL 糸球体ろ過であった (SD: 0.44/100 mL)。リゾチームの腎閾値は 1.0 mg/100 mL であったことから、細胞へ吸収されたリゾチームは異化され、リゾチームの血流への再吸収は生じないと考えられた。(参照 39)

3. 遺伝毒性試験

ムラミダーゼ JPTR003 の遺伝毒性試験結果を表 5 に示した。

表 5 ムラミダーゼ JPTR003 の遺伝毒性試験結果

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> TA98、TA100、TA1535、TA1537、 <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	156、313、625、1,250、2,500、5,000 $\mu\text{gTOS}^{\text{a}}/\text{plate}$ ($\pm\text{S9}$)	陰性	1、40、41
	染色体異常試験	ヒト末梢リンパ球	1,000、3,000、4,000、5,000 $\mu\text{g TOS}/\text{mL}$ 、($\pm\text{S9}$)、3 時間ばく露後 17 時間培養して標本作製	陰性	1、41、42
		500、2,000、4,000 $\mu\text{g TOS}/\text{mL}$ 、(-S9)、20 時間ばく露後に標本作製	陰性		

a: TOS : 総有機固形物 (Total Organic Solids)

食品安全委員会は、*in vitro* の復帰突然変異試験及び染色体異常試験が陰性であったことから、ムラミダーゼ JPTR003 は、飼料添加物として使用された場合、生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないと判断した。

4. 急性毒性試験（参考資料⁴）

ムラミダーゼ JPTR003 の急性毒性試験に関する資料は提出されていないが、表 6 のとおりリゾチームについて急性毒性試験が実施され、50%致死用量（LD₅₀）が得られている。

表 6 卵白由来リゾチームの急性毒性試験結果（mg/kg 体重）

動物種	投与経路	LD ₅₀	参照
マウス	経口	>4,000	43
ラット	経口	>4,000	43

5. 亜急性毒性試験

（1）28 日間亜急性毒性試験（ラット）（参考資料⁵）

ラット（Wistar 系、7 週齢、雌雄各 5 匹/群）に組換えヒトリゾチーム（コメで発現させ、抽出、濃縮したヒトリゾチーム、130,700 U/mg タンパク質）を 28 日間強制経口投与（0（生理食塩水 7.3 mL/kg 体重）、36 又は 360 mg/kg 体重/日）する亜急性毒性試験が実施された。

健康状態、体重、摂餌量、血液学的検査及び血液生化学的検査を実施するとともに、病理学的検査を実施した。

試験期間中に投与に関連する死亡例はみられず、360 mg/kg 体重/日投与群の雌雄各 1 匹に脱毛がみられた以外、異常所見はみられなかった。

体重に影響はみられなかったが、第 3 週において、36 mg/kg 体重/日投与群の雌で対照群に比べ摂餌量が増加した。血液学的検査では毒性影響はみられなかった。血液生化学的検査では、雄で低カルシウム値及び高クレアチン値並びに雌で高ビリルビン値がみられたが、個体間の変動範囲内であった。

臓器重量には投与群と対照群との間に有意な差はみられなかった。病理学的検査においても、投与に関連する所見はみられなかった。（参照 44）

（2）13 週間亜急性毒性試験（ラット）

ラット（Wistar Han 系、44～50 日齢、雌雄各 10 匹/群）にムラミダーゼ JPTR003（比重：1.48、TOS：10.8%）を 13 週間経口投与（0.113、0.374 又は 1.132 g TOS/kg 体重/日及び 38,462、126,923 又は 384,616 LSU(F)/kg 体重/日）する亜急性毒性試験が実施された。

試験期間を通して一般状態、摂餌量、体重等の検査を行い、試験終了時に眼科的検査、運動機能観察試験、自発運動量試験、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、病理検査、病理組織学的検査等を実施した。

試験期間を通じて、死亡例はみられず、体重、摂餌量、眼科的検査、運動

⁴ 卵白由来リゾチームを用いた試験であることから参考資料とした。

⁵ ヒト由来リゾチームを用いた試験であることから参考資料とした。

機能、自発運動量、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査に毒性影響はみられず、各種組織の病理組織学的検査においても投与に関連する病理学的変化はみられなかった。

これらの結果から、試験者はラットへの13週間のムラミダーゼの強制経口投与において毒性はみられず、最大投与量 1.132 g TOS/kg 体重 (384,616 LSU(F)/kg 体重/日) に耐容したとしている。

以上から申請者は、本試験での NOAEL は 1.132 g TOS/kg 体重 (384,616 LSU(F)/kg 体重/日) とした。(参照 1、41、45)

食品安全委員会は、本試験ではいずれの用量でも毒性所見はみられなかったことから、本試験の NOAEL は投与最高用量である 1.132 gTOS/kg 体重 (384,616 LSU(F)/kg 体重/日) と判断した。

(3) 4週間亜急性毒性試験 (ウサギ、静脈内投与) (参考資料⁶)

ウサギ (ニュージーランド種、雄 10 匹/群) に卵白由来リゾチーム塩酸塩 (500 mg/kg 体重/日) を 4 週間 (5 回/週) 静脈内投与する亜急性毒性試験が実施された。

血液学的、血液生化学的及び病理学的検査を実施した。

投与群では投与 1 週後に 1 匹、対照群では 1 週後に 1 匹及び 2 週後に 2 匹の死亡例がみられた。卵白由来リゾチーム投与群では比較的深い頻呼吸がみられたが、迅速に回復し、最終投与時点まで生存した。そのほか、投与物質に起因する毒性影響はみられなかった。(参照 43、46)

6. 対象動物に対する安全性

(1) 安全性試験 (鶏)

鶏 (肉用種、1 日齢、雌雄各 18 羽×4 区画/群) に本飼料添加物を混餌投与 (0、45,000、225,000、450,000 LSU(F)/kg 飼料) する安全性試験が実施されている。

最大推奨添加量の 10 倍となる 450,000 LSU(F)/kg 飼料を鶏 (肉用種) に 6 週間混餌投与した結果、本飼料添加物の投与による毒性影響はみられなかった。(参照 7、41、47)

(2) 安全性試験 (豚)

豚 (ランドレース×ラージホワイト種、56 日齢、雌雄各 5 頭/群) に本飼料添加物を 6 週間混餌投与 (0、65,000、325,000、650,000 LSU(F)/kg 飼料) する安全性試験が実施されている。

最大推奨添加量の 10 倍となる 650,000 LSU(F)/kg 飼料を混餌投与した群において、卵巣重量が低値の個体が 5 頭中 2 頭でみられたが、病理組織学的検査の結果、性成熟が不十分であったことが原因と考えられ、食品安全委員

⁶ 卵白由来リゾチーム塩酸塩を用いた試験であることから参考資料とした。

会は毒性影響ではないと考えた。そのほか子豚に 6 週間混餌投与では本飼料添加物の投与による毒性影響はみられなかった。(参照 56)

(3) 飼養試験 (有効性確認試験)

鶏 (肉用種) に、本飼料添加物を最大推奨用量まで 35 又は 42 日間混餌投与する飼養試験が数種実施された。

いずれの試験においても、投与による毒性影響はみられなかった。(参照 7、41、48、49、50、51、52、53)

7. その他

(1) 対象動物における抗菌作用に関する試験 (参考資料⁷⁾)

ムラミダーゼ JPTR003⁸について、EFSA の指示に基づき、抗菌活性の有無を検討するために、EFSA の指針に記載された参照菌 5 株 (*E. coli* ATCC25922、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853、*Staphylococcus aureus* ATCC25923、*Enterococcus faecalis* ATCC29212 及び *Bacillus subtilis* ATCC6633)、家きんの糞便からも一般的に分離される追加の参照菌 2 株 (*Campylobacter jejuni* ATCC33560 及び *Clostridium perfringens* ATCC13124) 及び家きん由来野生分離株である 5 菌種 30 株 (*E. coli* (5 株)、*Salmonella* Enteritidis (5 株)、*E. faecium* (5 株)、*Enterococcus faecalis* (5 株)、*C. jejuni* (5 株) 及び *C. perfringens* (5 株)) を用いて、ISO (International Organization for Standardization) 及び CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute : 臨床・検査標準協会) ガイドラインに従い、最小発育阻止濃度 (MIC) が測定された。対照として卵白リゾチームが用いられた。

ムラミダーゼ JPTR003 は、全ての試験菌株に対して 400 mg/L 又はそれよりも高い MIC を示した。(参照 8、54)

⁷ 本酵素の抗菌活性の有無に関する試験であることから参考資料とした。

⁸ 製造用原体と同一かは不明

Ⅲ. 国際機関等における評価

1. JECFA における評価

JECFA は、食品添加物としてのリゾチームの評価を実施しており、卵白由来リゾチームの動物及びヒトへのアレルギー誘発性の作用は、食料として長い摂取の歴史のある卵アルブミンや他のアルブミンよりも低いとしている。また、得られた資料から、チーズを介した低い量のリゾチームの摂取はヒトの健康に悪影響を及ぼすものでないと結論している。動物の可食部位からのリゾチームは食品として使用されており、クラス I 酵素として使用できるとしている。

これらのことから、食品製造基準に基づき食品製造過程に用いることは許容されると結論している。(参照 43、55)

2. EFSA における評価

本飼料添加物について、*T. reesei* DSM 32338 株由来ムラミダーゼとして、2018 年に肥育用の鶏及びその他マイナーな家きん類の、2019 年に肥育用及び繁殖用の七面鳥、繁殖用の鶏並びに産卵用のその他家きん類の、2021 年に離乳後の子豚の飼料添加物としての使用に関する評価を実施している。

評価対象物質は、遺伝子組換えにより作出された *T. reesei* を用いて生産されたものであり、最終産物には培養可能な生物は含まれておらず、導入 DNA は検出限界未満であった。

肉用鶏及びその他家きん類への最小推奨添加量は 25,000 LSU(F)/kg 飼料、最大推奨添加量は 45,000 LSU(F)/kg 飼料とされ、肉用鶏では推奨用量の 10 倍まで耐容したことから、家きん類に対して安全であるとしている。(参照 7、8)

子豚への最大推奨添加量は 65,000 LSU(F)/kg で、経口投与の亜慢性毒性試験の結果から、離乳後の子豚に対して安全であるとしている。(参照 58)

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及びヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験では影響がみられなかったこと並びにラットを用いた 13 週間亜急性毒性試験では投与による影響がみられなかったことから、本飼料添加物の食用動物への使用による消費者へのリスクはないとしている。

また、ムラミダーゼは酵素であり、眼及び皮膚への刺激性を有する可能性はあるが、検出されなかった。皮膚及び呼吸器系への感作性試験は実施されていないが、固形製剤は感作作用がほとんどないことから使用者へのリスクはないと考えられるとしている。(参照 7)

3. 米国における評価等

評価資料は公表されていないが、提出された資料によると、GRAS によって、2017 年に鶏（肉用鶏）飼料、2020 年に豚飼料への飼料添加物として認証されたとしている。(参照 6、57)

IV. 食品健康影響評価

T. reesei JPTR003 株を用いて生産されたムラミダーゼを原体とする飼料添加物には、固形及び液状の 2 種類があり、推奨添加量は、豚用飼料 1kg 当たり 50,000～65,000 LSU(F)、肉用鶏用飼料 1 kg 当たり 25,000～45,000 LSU(F)、採卵鶏用飼料 1 kg 当たり 3,0000 LSU(F)とされている。

食品安全委員会では、ムラミダーゼ JPTR003 について、遺伝子組換え体に関する評価を実施し、当該飼料添加物を摂取した家畜に由来する畜産物について安全上の問題はないと評価している。

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。

ムラミダーゼ JPTR003 に関する遺伝毒性試験では、*in vitro* の復帰突然変異試験及び染色体異常試験の結果は陰性であったことから、ムラミダーゼ JPTR003 には、飼料添加物として用いる限りにおいて、生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないと考えた。

ラットの 13 週間亜急性毒性試験において、ムラミダーゼ JPTR003 の投与による毒性所見はみられなかったことから、本試験における NOAEL は投与最高用量である 1.132 g TOS/kg 体重 (384,616 LSU(F)/kg 体重/日) と判断した。

本飼料添加物を用いた豚及び鶏の安全性試験では、対象家畜の最大推奨添加量の 10 倍量を 6 週間混餌投与しても、投与による悪影響はみられなかった。

以上のことから、今回評価要請された、本飼料添加物は、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
ADI	Acceptable Daily Intake：許容一日摂取量
CLSI	The Clinical & Laboratory Standards Institute：臨床・検査標準協会
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
GLP	Good Laboratory Practice：優良試験所基準
GRAS	Generally Recognized as Safe：一般に安全と認められる (FDAによる安全基準合格)
ISO	International Organization for Standardization：国際標準化機構
JECFA	FAO/WHO Joint 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
LSU(F)	ペプチドグリカン分解力単位
MIC	Minimum inhibitory concentration：最小発育阻止濃度
NOAEL	No-Observed- Adverse-Effect Level：無毒性量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development： 経済協力開発機構
PTWI	Provisional Tolerable Weekly Intake：暫定耐容週間摂取量
TOS	Total Organic Solids：総有機固形物

〈参照〉

- 1 DSM 株式会社:飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 抄録 (非公表)
- 2 DSM 株式会社:飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 添付資料 6 (非公表)
- 3 DSM 株式会社:飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 添付資料 3 (非公表)
- 4 DSM 株式会社:飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 添付資料 2 (非公表)
- 5 食品安全委員会. 動物用医薬品評価書, 塩化リゾチームを有効成分とするまだいの飼料添加剤(水産用ポトチーム)の再審査に係る食品健康影響評価について. 2005.
- 6 DSM 株式会社:飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 添付資料 5 (非公表)
- 7 DSM 株式会社:飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 添付資料 4 (非公表)
- 8 EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP): Safety and efficacy of muramidase from *Trichoderma reesei* DSM 32338 as a feed additive for turkeys for fattening, turkeys reared for breeding, chickens reared for breeding and other poultry species reared for breeding. *EFSA Journal*. 2019; 17(5): 568.
- 9 EC: Evaluation report on the analytical methods submitted in connection with the application for authorization of a feed additive according to regulation (EC) No 1831/2003. Muramidase produced by *Trichoderma reesei* DSM 32338. 2018
- 10 食品安全委員会: 遺伝子組換え食品等評価書「JPTR003 株を利用して生産されたムラミダーゼ」(2021年6月)
- 11 食品安全委員会 平成 24 年 4 月 5 日付け府食第 342 号
- 12 食品衛生法施行規則 (昭和 23 年 07 月 13 日厚生省令第 23 号)
- 13 JECFA: Benzyl derivatives. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series 911, 2002
- 14 食品安全委員会: 添加物評価書「ソルビン酸カルシウム」(平成 20 年 11 月)
- 15 JECFA (the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives): Sorbic acid and its calcium, potassium and sodium salts. WHO Food Additives Series 5, 1974
- 16 JECFA (the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives): Sodium Sulfate. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series 909, 2002
- 17 JECFA(the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives): Evaluation of certain food additives and contaminants: WHO technical report series, 966, 2011
- 18 Umetsu H , Van Chuyen N. : Digestibility and peptide patterns of modified lysozyme after hydrolyzing by protease. *J Nutr Sci Vitaminol*. 1998; 44(2): 291-300.
- 19 Yuzuriha T, Katayama K, Tsutsumi J.: Studies on biotransformation of Lysozyme. IV Radioimmunoassay of Lysozyme and its evaluation. *Chem.*

- Pharm. Bull. 1978; 26(3): 908-14.
- 20 Hashida S , Ishikawa E, Nakamichi N, Sekino H.: Concentration of egg white lysozyme in the serum of healthy subjects after oral administration. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2002; 29(1-2): 79-83. (abst)
 - 21 Yuzuriha T, Katayama K, Fujiita T. : Absorption route of ¹³¹I-labeled lysozyme in rats. Chem. Pharm. Bull. 1973; 21(12): 2807-9.
 - 22 Yuzuriha T, Katayama K, Tsutsumi J.: Studies on biotransformation of Lysozyme. I. Preparation of labeled Lysozyme and its intestinal absorption. Chem. Pharm. Bull. 1975; 23(6): 1309-14.
 - 23 友田 寛、田中友希夫、谷口 寿生、村上 正裕、岡田 直貴、藤田 卓也、村西 昌三、山本 昌.: リゾチームの消化管吸収性及びリンパ移行性に及ぼす脂肪酸修飾の影響に関する研究。薬剤学 2001; 61:129-143.(Full)
 - 24 Yokooji T , Hamura K, Matsuo H. Intestinal absorption of lysozyme, an egg-white allergen, in rats: kinetics and effect of NSAIDs. Biochemical Biophys Res. Commun. 2013; 438(1) 61-65. (abst)
 - 25 Yokooji T, Nouma H, Matsuo H.: Characterization of Ovalbumin Absorption Pathways in the Rat Intestine, Including the Effects of Aspirin. Biol. Pharm. Bull. 2014; 37(8):1359-65.
 - 26 Takano M , Koyama Y, Nishikawa H, Murakami T, Yumoto R. : Segment-selective absorption of lysozyme in the intestine. Eur J Pharmacol. 2004; 502(1-2):149-55. (abst)
 - 27 村地 孝 生物物理化学, [シンポジウム] 蛋白質分析と消化器, 4.小腸粘膜の蛋白質吸収. 1975; 19 (4). 35-39.(Full)
 - 28 Basova NA, Mikelsone VIa, Tarvid IL, Kushak RI, Grigor'eva V.: Hydrolysis and absorption of lysozyme in the small intestine. Vopr Pitan. 1992; (1):56-60. (Russian) (abst)
 - 29 Seno S, Inoue S, Akita M, Setsu K, Tsugaru Y, Furuhashi Y.: Intestinal absorption of Lysozyme molecules and their destination, an immunohistochemical study on rat. Act Histochem Cytochem. 1998; 31: 329-34.
 - 30 Yuzuriha T, Katayama K, Fujita T.: Studies on biotransformation of lysozyme. II. Tissue distribution of ¹³¹I-labelled lysozyme and degradation in kidney after intravenous injection in rats. Chem Pharm Bull. 1975; 23(6) 1315-22. (Full)
 - 31 Yuzuriha T, Katayama K, Ohtake S: Autoradiographic study on the distribution of ¹²⁵I-labeled Lysozyme after intravenous injection in rats. Chem Pharm. Bull. 1977; 25(4):836-8. (Full)
 - 32 Yuzuriha T, Katayama K, Fujita T.: Studies on biotransformation of lysozyme. III. Comparative studies on biotransformation of exogenous and endogenous lysozyme in rats. Biochim Biophys Acta. 1977;

- 490(1):235-246. (abst)
- 33 Hansen NE, Karle H, Andersen V. : Lysozyme turnover in the rat. *J Clin Invest.* 1971; 50: 1473-77.
 - 34 Hansen NE, Karle H, Andersen V, Qlgaard K. : Lysozyme turnover in man. *J Clin Invest.* 1972; 51: 1146-55.
 - 35 Ottosen PD, Bode F, Madsen KM, Maunsbach AB. : Renal handling of lysosome in the rat. *Kidney International.* 1979; 15:246-54.
 - 36 Christensen EL, Maunsbach A.: Intralysosomal digestion of lysozyme in renal proximal tubule cells. *Kidney International.* 1974; 6: 396-40.
 - 37 Nagai J, Katsube T, Murakami T, Takano M.: Effect of gentamicin on pharmacokinetics of lysozyme in rats: interaction between megalin substrates in the kidney. *J Pharm Pharmacol.* 2002; 54(11):1491-6. (abst)
 - 38 Maack T, Mackensie DD, Kinter WB.: Intracellular pathways of renal reabsorption of lysozyme. *Am J Physiol.* 1971; 221(6): 1609-16.(Abst)
 - 39 Harrison JF, Barnes AD: The urinary excretion of lysozyme in dogs. *Clin Scie.* 1970; 38(4): 533-47.
 - 40 DSM 株式会社 : 飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 添付資料 17 (非公表)
 - 41 Lichtenberg J, Perez Calvo E, Madsen K, Østergaard Lund T, Kramer Birkved F, van Cauwenberghe S, Mourier M, Wulf-Andersen L, Jansman AJM, Lopez-Ulibarri R.: Safety evaluation of a novel muramidase for feed application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2017; 89: 57-69.
 - 42 DSM 株式会社 : 飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 添付資料 18 (非公表)
 - 43 JECFA, WHO Food Additives Series 30, 749. Lysozyme. 1993.
 - 44 Cerven D, DeGeorge G, Bethell D: 28-Day repeated dose oral toxicity of recombinant human apo-lactoferrin or recombinant human lysozyme in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2008; 51: 162-7.
 - 45 DSM 株式会社 : 飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 添付資料 16
 - 46 平成 30 年調査研究報告書. 既存添加物の安全性評価に関する調査研究. 国立医薬品食品衛生研究所 平成 31 年 3 月
 - 47 DSM 株式会社:飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 添付資料 19 (非公表)
 - 48 DSM 株式会社:飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 添付資料 11 (非公表)
 - 49 DSM 株式会社:飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 添付資料 12 (非公表)
 - 50 DSM 株式会社:飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 添付資料 13 (非公表)
 - 51 DSM 株式会社:飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 添付資料 14 (非公表)
 - 52 DSM 株式会社:飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 添付資料 15 (非公表)

- 53 Goodarzi Boroojeni F, Manner K, Rieger J, Pérez Calvo E, Zentek J: Evaluation of a microbial muramidase supplementation on growth performance, apparent ileal digestibility, and intestinal histology of broiler chickens. *Poultry Science* 2019; 98: 2080-86.
- 54 DSM 株式会社 : 飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料. 添付資料 20 (非公表)
- 55 JECFA (the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives): WHO Technical Report Series 828, EVALUATION OF CERTAIN FOOD ADDITIVES AND NATURALLY OCCURRING TOXICANTS. Lysozyme, 1992.
- 56 DSM 株式会社 : 飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料 (対象家畜適用拡大) 抄録 (非公表)
- 57 DSM 株式会社 : 飼料添加物「ムラミダーゼ」審査用資料 (対象家畜適用拡大) 添付資料 5 (非公表)
- 58 EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP): Safety and efficacy of the additive consisting of muramidase produced by *Trichoderma reesei* DSM 32338 (Balancius™) for use in weaned piglets. *EFSA Journal*. 2021; 19(3): 6452