

アルカリ性プロテアーゼ（その 3）の飼料添加物における対象家畜拡大

飼料添加物については、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 項並びに第 3 条第 1 項及び第 2 項の規定に基づき、農林水産大臣が農業資材審議会の意見を聴いて指定し、その基準又は規格を設定している。

令和元年 10 月 25 日付け元消安第 2718 号をもって諮問されたアルカリ性プロテアーゼ（その 3）を含む飼料の製造の方法の基準の改正について、効果安全性を飼料添加物効果安全性小委員会において検討した。その概要は次のとおりである。

1. 飼料の製造の方法の基準を改正する飼料添加物

飼料添加物名：アルカリ性プロテアーゼ（その 3）

用 途：飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進

2. 経過

令和元年 10 月 25 日 諮問

令和元年 11 月 1 日 飼料添加物効果安全性小委員会

3. 飼料添加物効果安全性小委員会の審議結果

効果安全性を確認した（資料 P2～11 のとおり）。

飼料添加物の効果安全性について（案）

アルカリ性プロテアーゼ

令和元年 12 月 24 日

農林水産省 消費・安全局 畜水産安全管理課

目 次

1	名称等	4
2	起源又は発見の経緯、外国での飼料添加物としての許可状況及び使用状況等	4
3	効果に関する事項	4
3-1	効果を裏付ける基礎的試験 (<i>in vivo</i> 試験)	4
3-1-1	豚	4
3-2	効果を裏付ける野外応用試験	5
3-2-1	豚	5
3-2-2	豚	5
3-2-3	豚	7
4	安全性に関する事項	9
4-1	毒性試験	9
4-1-1	一般毒性試験	9
4-1-1-1	反復投与毒性試験 (短期)	9
4-1-2	特殊毒性試験	9
4-1-2-1	変異原性試験	9
4-2	対象家畜等を用いた飼養試験	9
4-2-1	豚	9
5	審議結果	10
6	参照 (参考文献及び参考資料)	11

アルカリ性プロテアーゼに関する効果安全性について

1 名称等

一般名：アルカリ性プロテアーゼ

化学名：Chymotrypsin

CAS 番号：37259-58-8

用途：飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進

対象家畜及び添加推奨量：豚用飼料 24,000 単位/kg 飼料

※単位…たん白消化力単位を示す

2 起源又は発見の経緯、外国での飼料添加物としての許可状況及び使用状況等

プロテアーゼは、ペプチド結合を加水分解する酵素の総称である。飼料に添加することで、消化管でたん白質・アミノ酸の消化率を向上させ、生体内での利用を促進する。

国内においては 1990 年に *Aspergillus melleus*、*Bacillus licheniformis* 又は *Streptomyces caespitosus* 由来のアルカリ性プロテアーゼが飼料添加物として指定され、1998 年に *Bacillus subtilis* 由来のアルカリ性プロテアーゼが追加された。また 2018 年に *Bacillus licheniformis* Si3 株を宿主とし、遺伝子組換え技術により、*Nocardioopsis prasina* 株由来のアルカリ性プロテアーゼ遺伝子を合成して得た DNA を挿入させ、アルカリ性プロテアーゼ産生能を向上させた組換え生産菌 *Bacillus licheniformis* JPBL001 株由来のアルカリ性プロテアーゼが追加された。

今回は、既に飼料添加物として指定されている組換え生産菌 *Bacillus licheniformis* JPBL001 株由来のアルカリ性プロテアーゼについて、豚用飼料への対象家畜適用拡大が要望された。

本物質は、海外では、米国、EU 等で飼料添加物として、鶏用飼料等への使用が認められている。

3 効果に関する事項

3-1 効果を裏付ける基礎的試験 (*in vivo* 試験)

3-1-1 豚

豚（ラージホワイト×ルドン、雌雄、28 日齢、平均体重 8.2 kg）を用いて、基礎飼料、プロテアーゼを 24,000 単位/kg (720~1,440 単位/kg 体重/日) 添加した飼料をそれぞれ 29 日間給与した。

各栄養成分の消化率を確認するために、各試験飼料に酸化チタンを添加し、14 日及び 29 日で回腸内容物を採取した。(1 群 12 頭、10 反復)。

最終体重、1 日増体量及び飼料要求率については、有意差は認められなかった。

消化率については、14 日目にヒドロキシプロリン、29 日目に可消化エネルギー、全窒素及び 11 種のアミノ酸において、プロテアーゼ添加群が有意に高かった ($p < 0.05$)

(表 1,2 参照)。[参照 1]

表 1 豚用飼料に添加したときのプロテアーゼの給与効果 (14 日目)

		基礎飼料群	プロテアーゼ添加群
最終体重 (kg)		11.49 ± 1.40	11.47 ± 1.13
1 日増体量 (g)		238 ± 50	236 ± 58
1 日飼料摂取量 ¹⁾ (g)		286 ± 34	295 ± 44
飼料要求率 ¹⁾ (%)		1.037 ± 0.050	1.036 ± 0.064
消化率 ²⁾ (%)	ヒドロキシプロリン	38.0 ± 17.2	48.4* ± 9.2

各値は平均値±SD である

* : 基礎飼料群との間に有意差あり (ANOVA, t 検定, p<0.05)

1) 1 群あたり 12 頭、10 反復

2) 1 群あたり 7 頭、10 反復

表 2 豚用飼料に添加したときのプロテアーゼの給与効果 (29 日目)

		基礎飼料群	プロテアーゼ添加群
最終体重 ¹⁾ (kg)		16.95 ± 1.98	17.36 ± 1.81
1 日増体量 ¹⁾ (g)		346 ± 64	348 ± 63
1 日飼料摂取量 ²⁾ (g)		517 ± 44	536 ± 41
平均飼料要求率 ²⁾ (%)		1.496 ± 0.061	1.541 ± 0.074
消化率 ¹⁾ (%)	全窒素	64.2 ± 8.3	68.4* ± 4.8
	アルギニン	80.1 ± 5.2	83.0* ± 3.3
	アスパラギン+アスパラギン酸	70.5 ± 7.9	75.0* ± 4.8
	グルタミン酸+グルタミン	75.9 ± 7.7	80.6* ± 5.1
	ヒスチジン	73.5 ± 6.2	78.5* ± 3.3
	ヒドロキシプロリン	33.4 ± 12.6	45.2* ± 9.1
	イソロイシン	71.4 ± 9.3	76.9* ± 6.7
	リジン	86.1 ± 6.7	89.5* ± 3.9
	フェニルアラニン	75.0 ± 5.9	78.4* ± 4.1
	トレオニン	64.7 ± 8.8	69.5* ± 6.6
	チロシン	71.2 ± 7.4	75.1* ± 3.8
	バリン	70.0 ± 9.8	76.2* ± 7.3

各値は平均値±SD である

* : 基礎飼料群との間に有意差あり (ANOVA, t 検定, p<0.05)

1) 1 群あたり 5 頭、10 反復

2) 1 群あたり 1 頭、10 反復

3-2 効果を裏付ける野外応用による試験

3-2-1 豚

豚((ランドレース×ヨークシャー)×デュロック、雌雄、28日齢、平均体重7.1kg)を用いて、基礎飼料、たん白質低減飼料及びたん白質低減飼料にプロテアーゼを24,000単位/kg飼料(720~1,440単位/kg体重/日)添加した飼料をそれぞれ42日間給与した(1群5頭、5反復)。なお、基礎飼料に含まれる粗たん白質は24.17%、たん白質低減飼料では23.51%であった。

乾物、粗たん白質及びエネルギーの消化率を算出するため、期間最終週の3日間に糞便を、42日目に回腸内容物を採取した。

試験終了時の体重及び1日増体量については、基礎飼料群及びプロテアーゼ添加群はたん白質低減飼料群に比べ有意に高かった(p<0.05)。

下痢の発生率については、プロテアーゼ添加群は基礎飼料群及びたん白質低減飼料群に比べ有意に低かった(p<0.05)。

回腸の絨毛の絨毛高/陰窩深度(VH/CD)比については、プロテアーゼ添加群は基礎飼料群に比べて有意に大きかった(表3参照)。

消化率については、回腸では乾物、粗たん白質及びエネルギーで、全消化管では乾物、粗たん白質について、基礎飼料群及びプロテアーゼ添加群においてたん白質低減飼料群に比べ有意な改善が示された(p<0.05)。[参照2]

表3 豚用飼料に添加したときのプロテアーゼの給与効果

	基礎飼料群	たん白質低減飼料群	プロテアーゼ添加群
最終体重(kg)	20.56 ^a	16.26 ^b	20.69 ^a
1日増体量(g)	322.45 ^a	219.75 ^b	322.79 ^a
1日飼料摂取量(g)	748.49	722.19	708.56
飼料効率(%)	0.431 ^a	0.304 ^b	0.456 ^a
下痢の発生率(%)	41.4 ^y	35.7 ^y	15.7 ^x
回腸の絨毛のVH/CD比*	3.11 ^b	2.87 ^b	3.67 ^a

各値は平均値

各項目内の異文字(a,b)間に有意差あり(ANOVA, Orthogonal contrasts, p<0.05)

各項目内の異文字(x,y)間に有意差あり(カイ二乗検定, p<0.05)

*: 1群あたり5頭、5反復

3-2-2 豚

豚((ランドレース×ヨークシャー)×デュロック、雌雄、28日齢、平均体重7.0kg)を用いて、基礎飼料(市販の飼料)、たん白質低減飼料、たん白質低減飼料にプロテアーゼを24,000単位/kg飼料(720~1,440単位/kg体重/日)添加した飼料及びたん白質低

減飼料にプロテアーゼを 24,000 単位/kg 飼料とビタミン C を 0.02%添加した飼料をそれぞれ 42 日間給与した (1 群 6 頭、5 反復)。なお、基礎飼料及びたん白質低減飼料に含まれる粗たん白質はそれぞれ、28~48 日齢では 23.71%及び 23.20%、49~69 日齢では 22.36%及び 21.75%であった。

試験終了時の体重及び 1 日増体量については、基礎飼料群及びプロテアーゼ添加群はたん白質低減飼料に比べ有意に高かった ($p<0.05$)。

下痢の発生率については、プロテアーゼ添加群は基礎飼料群及びたん白質低減飼料群に比べ低い傾向にあったが有意差は認められなかった。

回腸の絨毛の絨毛高/陰窩深度 (VH/CD) 比については、プロテアーゼ添加群及び基礎飼料群はたん白質低減飼料群に比べて有意に大きかった ($p<0.05$) (表 4 参照)。

消化率については、回腸では乾物、粗たん白質及びエネルギーについて、全消化管では粗たん白質について、基礎飼料群及びプロテアーゼ添加群においてたん白質低減飼料群よりも有意に高かった ($p<0.05$)。[参照 2]

表 4 豚用飼料に添加したときのプロテアーゼの給与効果

	基礎飼料群	たん白質低減飼料群	プロテアーゼ添加群	プロテアーゼ+ビタミン C 添加群
最終体重 (kg)	32.50 ^a	30.26 ^b	32.95 ^a	33.01
1 日増体量 (g)	607.15 ^a	553.98 ^b	620.33 ^a	618.42
1 日飼料摂取量 (g)	921.84	925.62	934.66	974.18
飼料効率 (%)	0.659	0.598	0.664	0.635
下痢の発生率 ¹⁾ (%)	41.4	41.4	22.9	22.9
回腸の絨毛の VH/CD 比 ²⁾	3.36 ^a	2.51 ^b	3.50 ^a	3.02

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (ANOVA, Orthogonal contrasts, $p<0.05$)

1) カイ二乗検定, $p<0.05$,

2) 1 群あたり 6 頭、5 反復

3-2-3 豚

豚 ((ランドレース×ヨークシャー) ×デュロック、雌雄、70 日齢、平均体重 25.3 kg) を用いて、基礎飼料 (T1)、基礎飼料にプロテアーゼを 18,000 単位/kg 飼料 (900~1,250 単位/kg 体重/日) 添加した飼料 (T2) 及びたん白質低減飼料にプロテアーゼを 18,000 単位/kg 飼料 (900~1,250 単位/kg 体重/日) 添加した飼料 (T3) をそれぞれ 77 日間給与した (1 群 4 頭、7 反復)。なお、基礎飼料及びたん白質低減飼料に含まれる粗たん白質はそれぞれ、70~111 日齢では 18.42%及び 17.93%、112~146 日齢では 16.53%及び 16.18%であった。

1 日増体量及び飼料効率については、T2 群及び T3 群が T1 群と比べて有意に改善された ($p<0.05$) (表 5 参照)。[参照 3]

表 5 豚用飼料に添加したときのプロテアーゼの給与効果

	基礎飼料群 (T1 群)	プロテアーゼ添加群 (18,000 単位/kg 飼料)	
		基礎飼料 (T2 群)	たん白質低減飼料 (T3 群)
最終体重 (kg)	96.50	100.41	100.89
1 日増体量 (kg)	0.924 ^b	0.977 ^a	0.980 ^a
1 日飼料摂取量 (kg)	2.852	2.756	2.707
飼料効率 (%)	0.326 ^b	0.355 ^a	0.364 ^a

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (ANOVA, Orthogonal contrasts, $p < 0.05$)

1 群あたり 4 頭、7 反復

4 安全性に関する事項

4-1 毒性試験

4-1-1 一般毒性試験

4-1-1-1 反復投与毒性試験（短期、ラット）

ラット（SD系、5週齢、平均体重：20g）にプロテアーゼを0、45,995、144,144、459,950単位/kg体重（0、50、165.1、500.1mg/kg体重）添加した飼料を、90日間強制経口投与した（1群雌雄各10匹、各用量1群）。

体重、増体量、飼料摂取量、水分摂取量、血液学的検査、血液生化学的検査、眼科鏡検査及び臓器重量については、投与に起因した影響は認められなかった。

剖検において、肉眼的観察からは投与に起因した影響は認められなかった。病理組織学検査で観察された所見は、試験実施の研究所の有する同週齢及び同系統のラットにおける背景データの発生範囲内であった。

以上の結果から、プロテアーゼのNOAELは500.1mg/kg体重/日（459,950単位/kg体重/日）と考えられた。[参照4]

4-1-2 特殊毒性試験

4-1-2-1 変異原性試験

プロテアーゼの変異原性試験の結果を表6に示した。結果はいずれも陰性であった（表6参照）。[参照5、6]

表6 変異原性試験結果

試験	対象	用量	結果	参照
復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98、TA100、 TA1535、TA1537 <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	0、156、313、625、1,250、 2,500、5,000 µg/plate (±S9)	陰性	参照8
染色体異常試験	ヒト培養末梢血リンパ球	1,582、2,813、5,000 µg/ml (±S9) 3 h 培養 1,311、2,048、4,000 µg/ml (-S9) 20 h 培養 2,048、3,200、5,000 µg/ml (+S9) 3 h 培養	陰性	参照9

4-2 対象家畜等を用いた飼養試験

4-2-1 豚

豚（（デュロック×ランドレース）×ピエトレン、雌雄、26日齢、平均体重7.6kg）を用いて、基礎飼料、プロテアーゼを24,000、120,000、240,000単位（それぞれ640

～1,280、3,200～6,400、6,400～12,800 単位/kg 体重/日) で添加した飼料をそれぞれ 43 日間給与した (1 群 4 頭、9 反復)。なお、基礎飼料及びたん白質低減飼料に含まれる粗たん白質はそれぞれ、26～39 日齢では 19.00%、40～68 日齢では 17.00%であった。

最終体重、1 日増体量、1 日飼料摂取量、飼料要求率及び血液学的検査について、全群において有意差は認められなかった。

血液生化学的検査について、アルカリホスファターゼ活性が全てのプロテアーゼ添加群で基礎飼料群と比較して有意に高かったが、いずれも生理学的に正常な範囲内の値であった (表 7 参照)。死亡率及び剖検所見において、投与に起因した影響は認められなかった。[参照 7]

表 7 豚用飼料に添加したときのアルカリ性プロテアーゼの安全性

	基礎飼料群	プロテアーゼ添加群 (単位/kg 飼料)		
		24,000	120,000	240,000
最終体重 (kg)	19.80	19.96	19.45	20.29
1 日増体量 (g)	284	286	276	295
1 日飼料摂取量 (g)	584	591	613	615
飼料要求率 (%)	2.07	2.07	2.28	2.11
アルカリホスファターゼ (IU/L)	486.2 ^b	609.9 ^a	637.2 ^a	651.8 ^a

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (ANOVA, Orthogonal contrasts, p<0.05)

5 審議結果

鶏用飼料に対して既に添加が認められているアルカリ性プロテアーゼについて、給与対象として新たに豚用飼料を追加することに関して、本剤の効果安全性を審議した。

「飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進」を本剤の効果とし、豚用飼料へ添加することは適当であると判断された。

- ①本剤の効果：飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進
- ②対象家畜：豚

6 参照 (参考文献及び参考資料)

1. Effect of dietary supplementation with the protease RONOZYME ProAct on growth performance and apparent ileal digestibility of total nitrogen, total energy and amino acids in the weaned piglet (2016)
2. Values of Protease and Vitamin C in Nursery Diets (2016)
3. Effects of ProAct on growth Performance of Growing-Finishing Pigs (2017)
4. 10R Protease, PPA 26797: A 13-WEEK ORAL(GAVAGE) TOXICITY STUDY IN RATS, Scantox (2007)
5. 10R Protease, PPA 26797:Test for Mutagenic Activity with Strains of Salmonella typhimurium and Escherichia coli, Novozymes A/S (2007)
6. 10R Protease: Induction of chromosome aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes, COVANCE (2007)
7. Efficacy and tolerance study with protease Ronozyme® ProAct in weaned piglets (2012)

アルカリ性プロテアーゼの基準及び規格（案）

飼料一般の成分規格並びに製造、使用及び保存の方法及び表示の基準

飼料一般の製造の方法の基準

アルカリ性プロテアーゼ（その3）は、豚及び鶏を対象とする飼料（飼料を製造するための原料または材料を含む。）以外の飼料に用いてはならない。