

塩酸 L-ヒスチジンの飼料添加物としての指定並びに基準及び規格の設定

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 3 年 7 月 29 日付け 3 消安第 2258 号をもって諮問された塩酸 L-ヒスチジンを含む飼料の製造の方法の基準の改正について、飼料安全部会の各小委員会において効果安全性及び規格について検討した。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：塩酸 L-ヒスチジン

用 途：飼料の栄養成分その他有効成分の補給

2. 経過

令和 3 年 7 月 29 日 諮問

令和 3 年 8 月 3 日 飼料添加物効果安全性小委員会

令和 3 年 11 月 18 日 飼料添加物規格小委員会

3. 飼料安全部会の審議結果

効果安全性を確認した（資料 P. 2～9 のとおり）。

基準及び規格を作成した（資料 P. 10～12 のとおり）。

飼料添加物の効果安全性について（案）

塩酸 L-ヒスチジン

令和 4 年 1 月 19 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	5
3-1	効果に関する基礎的事項	5
4	安全性に関する事項	5
4-1	毒性試験	5
4-1-1	一般毒性試験	5
4-1-1-1	単回投与毒性試験	5
4-1-1-2	反復投与毒性試験（短期）	5
4-1-2	特殊毒性試験	6
4-1-2-1	発がん性試験	6
4-1-2-2	変異原性試験	7
4-2	対象家畜を用いた飼養試験	7
4-3	生体内動態	8
5	残留性に関する事項	8
6	審議結果	8
7	参照（参考文献及び参考資料）	9

塩酸 L-ヒスチジンに関する効果安全性について

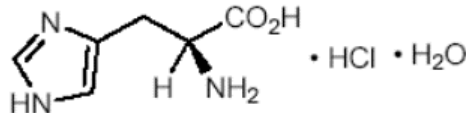
1 名称等

一般名：塩酸 L-ヒスチジン

化学名：L-ヒスチジン一塩酸塩一水和物（L-Histidine Monohydrochloride Monohydrate）

CAS 番号：5934-29-2

化学構造式：



用途：飼料の栄養成分その他の有効成分の補給

対象家畜：全家畜等

推奨添加量：飼料中の L-ヒスチジンが不足している全畜種（全ステージ）用飼料に対し 0.01%～0.50%程度

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および使用状況等

L-ヒスチジンはタンパク質を構成するアミノ酸の一つであり、哺乳動物、鳥類、魚類の必須アミノ酸として知られている。工業的には、発酵法及び羽毛や人毛の加水分解物から分離・精製する方法により製造されている。現在飼料業界では、たん白質原料の価格高騰や排泄窒素による環境汚染問題に対応するため、飼料中の粗たん白含量は年々低下傾向にあり、ヒスチジンが制限アミノ酸となる可能性がある。L-ヒスチジン塩酸塩が飼料添加物として指定されることにより、さらなる飼料の低たん白化が進められると期待される。

今回指定が要望された塩酸 L-ヒスチジンは、*Corynebacterium glutamicum* により生産される、L-ヒスチジンの塩酸塩であり、動物に摂取された後、速やかに解離するため、動物は遊離 L-ヒスチジンとして利用することができる。

なお、生産菌株が属している *Corynebacterium* 属 *glutamicum* 種は、アミノ酸の生物工学的な製造法で広く用いられている[※]こと、既知の有毒な化合物を産生しないこと等から、EFSA ではアミノ酸生産目的において安全性適格推定（QPS）リストに掲載されている。EFSA では、QPS を利用して製造された飼料添加物の安全性評価においては、変異原性試験及び亜慢性経口毒性試験が免除されている【参照 1、2、3】。ただし、最終製品に生産生物の生細胞が存在しないことが条件となっている【参照 4、5】。

※一例として、EU では、2019 年 4 月に飼料添加物として承認されたアルギニンの生産菌株が使用されている。

L-ヒスチジンの海外の使用状況としては、EU では、L-ヒスチジン塩酸塩一水和物が全畜種を対象とした飼料添加物として承認されている【参照 6】他、米国等においても飼料添加物として使用が認められている。

3 効果に関する事項

3-1 効果に関する基礎的事項

- ・ヒスチジンは鶏の必須アミノ酸であると定義されており、鶏種並びにステージ別に要求量が定められている【参照 7】。
- ・ヒスチジンは豚の必須アミノ酸であると定義されており、ステージ別に詳しく要求量が定められている【参照 8】。
- ・魚類の必須アミノ酸の研究においても、ヒスチジンは必須アミノ酸であると結論づけられている【参照 9】。
- ・搾乳牛において、ヒスチジンが乳たん白質合成及び成長に対して制限アミノ酸となる可能性があることを示唆されている【参照 10】。
- ・ヒスチジンが動物や魚類と同様にクルマエビ（甲殻類）でも必須アミノ酸であると報告されている【参照 11】。

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 単回投与毒性試験

ラット（Wistar 系、雌、8～12 週齢）を用いて、塩酸 L-ヒスチジンを経口投与した。投与量は 300 mg/kg 体重、2000 mg/kg 体重及び 2000 mg/kg 体重とし、投与後 2 週間観察を行った（300 mg/kg 体重：1 匹、2000 mg/kg 体重：1 匹、2000 mg/kg 体重：4 匹）。

1 週目に 2000 mg/kg 体重投与された内の 1 匹に体重の減少が見られたが、2 週目には他のラットとほぼ同じ体重まで増加した。その他のラットには体重の減少は見られなかった。観察終了までの間に死亡したラットはおらず、臨床徴候にも異常が見られなかった。

観察終了後の剖検では、全身の器官に異常は見られなかった。

これらの結果より、半数致死量 LD₅₀ は 2000 mg/kg 体重より大きいと推定された【参照 12】。

4-1-1-2 反復投与毒性試験（短期）

ラット（F344 系、雌雄、6 週齢）を用いて、プラセボ又は L-ヒスチジン塩酸塩 0.31、0.62、1.25、2.5、5.0%（雄：0、190、400、780、1,630、3,480 mg/kg 体重/日、雌：0、220、440、870、1,760、3,590 mg/kg 体重/日）をそれぞれ 13 週間混餌投与した（1 群、雌雄各 10 匹）。

雄の 5.0%投与群では、体重増加の抑制、摂餌量の低下が認められた。

血液学的検査・血液生化学的検査において、雄の 5.0%投与群ではヘマトクリット及びヘモグロビンが有意に増加した。雌の 5.0%投与群ではクレアチニンが増加、1.25 及び 5.0%投与群では尿素窒素が増加したが、これらの変化はヒスチジン代謝の関与によ

るものであると考えられた。

病理組織学的検査において、雄の 5.0%投与群では精巣上体の精子肉芽腫が認められた。

5.0%投与群において、体重増加抑制、ヘマトクリット・ヘモグロビンの増加、及び精巣上体の精子肉芽腫が認められたが、2.5%投与群では認められなかったため、NOAELは2.5%（雄で 1630 mg/kg 体重/日、雌で 1760 mg/kg 体重/日）とされた【参照 13】。

4-1-2 特殊毒性試験

4-1-2-1 発がん性試験

ラット（F344 系、雌雄、6 週齢）を用いて、基礎飼料に L-ヒスチジン塩酸塩 0、1.25、2.5%をそれぞれ混餌投与した（1 群、雌雄各 50 匹）。各濃度の L-ヒスチジン塩酸塩を混餌した飼料を 104 週間与え、生き残ったラット全てに基礎飼料を 3 週間与えた後に剖検した。

L-ヒスチジン塩酸塩の一日摂取量は、1.25%投与群で雄 472.9 mg/kg 体重/日、雌 558.4 mg/kg 体重/日、2.5%投与群では雄 955 mg/kg 体重/日、雌 1105.2 mg/kg 体重/日だった。総摂取量は、1.25%投与群では雄 558.4 mg/kg 体重/104 週、雌 407.7 g/kg 体重/104 週、2.5%投与群では雄 1105.2 mg/kg 体重/104 週、雌 806.8 g/kg 体重/104 週だった。

生存率は、0%投与群では雄 80%、雌 88%、1.25%投与群では雄 76%、雌 90%、2.5%投与群では雄 76%、雌 74%だった。

陰性対照群と比較して、104 週目には 2.5%投与群の雄は 4.9%、雌は 6.3%体重が減少していた。

血液学的検査は、2.5%投与群の雄では赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板の増加傾向が見られたが、雌では変化は見られなかった。

器官重量は、1.25%投与群では雄の肺に減少傾向が見られ、雌の副腎に増加傾向がみられた。2.5%投与群では雄の肺に増加傾向が見られ、雌の脳、副腎に増加傾向が見られた。しかし、病理組織学的には、1.25%投与群及び 2.5%投与群ともに全身の器官のいずれにも塩酸 L-ヒスチジンに起因する良性腫瘍及び悪性腫瘍の発現率増加は見られず、催腫瘍性は認められなかった。

よって、L-ヒスチジン塩酸塩には発がん性は見られなかったと結論付けられた【参照 14】。

4-1-2-2 変異原性試験

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および使用状況等に記載したとおり、生産菌株として使用されている *Corynebacterium glutamicum* は、既知の有毒な化合物を産生しないことから、EFSA において QPS リスト掲載されており、変異原性試験が免除されている。このことから変異原性試験を省略した。

なお、参考に表 1 に塩酸 L-ヒスチジンの変異原性試験の結果を示した。

表 1 変異原性試験結果（参考）

試験	対象	用量	結果	参照
復帰突然変異試験	WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	0 ~ 5,000 µg/plate (+/-S9)	inconclusive	参照 15
	TA100-10	0 ~ 40.0 mg/plate (+/-S9) (溶媒：Na-K リン酸緩衝液)		参照 16
染色体異常試験	チャイニーズハムスターCHL細胞	・ 6 時間処理 0 ~ 5,000 µg/mL (-S9) 0 ~ 2,500 µg/mL (+S9) ・ 24 時間処理 0 ~ 625 µg/mL (-S9)	陰性	参照 17
突然変異試験	<i>E. coli uvrB; uvrB umuC; uvrB LexA</i>	0 ~ 310 µg/mL (-S9)	陰性	参照 18
	<i>E. coli WP2 uvrA/pkM101oxyR⁺ and oxyR⁻</i>	5000 µg/plate (+/-S9)	陰性	参照 18
姉妹染色体交換試験	ヒト末梢リンパ球	0 ~ 111 µg/mL (-S9)	inconclusive	参照 18
	ヒト末梢血	0 ~ 100 µg/mL (-S9)	inconclusive	参照 18

4-2 対象家畜等を用いた飼養試験

鶏のひな（単冠白色レグホーン種、雄、8 週齢）を用いて、CP10%の基礎飼料及び基礎飼料中のコーンスターチ含有量（43.3%）からその 3%を L-ヒスチジンに代えて、添加した飼料をそれぞれ 10 日間給与し、過剰障害を調査した。

その結果、基礎飼料給与群と比較して、L-ヒスチジン過剰摂取群では日増体量及び飼料摂取量の低下が見られ、毒性有りと考察された。しかしながら、安全性が確認されて飼料添加物として指定されている L-メチオニン等と比較して影響は小さいものであった【参照 19】。

4－3 生体内動態

たん白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。吸収されたアミノ酸は、細胞内たん白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、新しいたん白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、過剰のアミノ酸は蓄積されない。

ヒスチジンの異化はウロカニン酸等を経て進行し、生成したホルムイミノ基がテトラヒドロ葉酸に転移されてグルタミン酸が生成する。次いで α -ケトグルタル酸に変換され、上記のクエン酸回路に入る。アミノ酸の分解により生じた過剰の窒素は、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、高等脊椎動物はアンモニアを尿素に変換して排泄する。

結晶の形で給与された塩酸 L-ヒスチジンも速やかに血中に取り込まれて遊離アミノ酸となり、同様の体内動態であると考えられる【参照 20、21】。

5 残留性に関する事項

L-ヒスチジンは、たん白質を構成するアミノ酸の一つで生体の構成成分であること、また、食品添加物として認められている成分でもあることから、安全性は高いと考えられる。

6 審議結果

Corynebacterium glutamicum のヒスチジン生産菌株から得られる塩酸 L-ヒスチジンの効果安全性について審議した結果、安全上問題となるおそれがないと判断された。

「飼料の栄養成分その他の有効成分の補給」を本剤の効果とし、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：飼料栄養成分その他の有効成分の補給

②給与対象：全家畜等

7 参照（参考文献及び参考資料）

1. EFSA journal (2007) 587, 1-16.
2. EFSA journal 2019;17(1):5555, 1-46.
3. EFSA journal 2012;10(1):2535, 1-14.
4. EFSA journal 2020;18(2):5966, 1-56.
5. EFSA journal 2021;19(7):6689, 1-5.
6. EU No. 2020/1090
7. 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構編，日本飼養標準-家禽（2011 年版），中央畜産会
8. 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構編，日本飼養標準-豚（2013 年版），中央畜産会
9. 渡邊武編，改訂魚類の栄養と飼料，恒星社厚生閣（2009）
10. Moro et al.: Histidine: A Systematic Review on Metabolism and Physiological Effects in Human and different Animal Species, *Nutrients*, **12**, 1414 (2020).
11. A. Kanazawa et al.: Essential Amino Acids of the Prawn, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 1375-1377 (1981).
12. Envigo Research Limited, L-Histidine Monohydrochloride Monohydrate: Acute Oral Toxicity in the Rat – Fixed Dose Procedure.
13. 池崎信一郎 他，F344 系ラットを用いた L-ヒスチジン塩酸塩の 13 週間亜慢性毒性試験，衛生試験所報告，第 112 号，17 (1994).
14. S. Ikezaki et al.: Long-term Toxicity/Carcinogenicity Study of L-Histidine Monohydrochloride in F344 Rats, *Food and Chemical Toxicology*, **34**, 687-691 (1996).
15. Biototech Co. Ltd.: Bacterial Reverse Mutation Test of L-Histidine HCL.
16. 石館基、祖父尼俊夫、吉川邦衛，I. 食品添加物の変異原性成績（その 5），トキシコロジーフォーラム，7(6): 634-643, 1984.
17. Biototech Co. Ltd.: *in vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test of L-Histidine HCL using Mammalian Cultured Cell.
18. EFSA journal (2006) 373, 1-48.
19. 奥村純一、山口清人，飼料中のアミノ酸の単一過剰がニワトリヒナに及ぼす影響，日本家禽学会誌，**17**，135～139 (1980)
20. イラストレイテッドハーパー・生化学 原書 27 版，丸善出版（2007）
21. 対象外物質評価書 ヒスチジン（食品安全委員会）（2012）

塩酸 L-ヒスチジンの成分規格等（案）

1. 各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

ア 製造用原体

(ア) 成分規格

含量 本品は、105℃で3時間乾燥した後、定量するとき、塩酸 L-ヒスチジン一水和物（ $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）98.0%以上を含む。

物理的・化学的性質

- ① 本品は、白色の結晶又は結晶性粉末である。
- ② 本品の水溶液（1→10）の pH は、3.5～4.5 である。

確認試験

- ① 本品の水溶液（1→1,000）5 mL にニンヒドリン溶液（1→1,000）1 mL を加え、3分間加熱するとき、紫色を呈する。
- ② 本品の水溶液（1→10）は、塩化物の定性反応を呈する。

純度試験

- ① 比旋光度 本品約 5.5 g を 0.01 g の桁まで量り、その乾燥物に換算した数値を記録し、6mol/L 塩酸試液に溶かし、50 mL とし、必要ならばろ過し、この溶液につき、旋光度を測定するとき、 $[\alpha]_{20D} = +8.5 \sim +10.5^\circ$ でなければならない。
- ② 鉛 本品 5.0 g（4.95～5.04 g）を量り、鉛試験法（原子吸光光度法第1法）により鉛の試験を行うとき、その量は、2 $\mu\text{g/g}$ 以下でなければならない。このとき、鉛標準液は、1.0 mL を全量ピペットを用いて量り、10 mL の全量フラスコに入れ、硝酸（1→150）を標線まで加えて 10 mL とし、標準液とする。
- ③ ヒ素 本品 1.0 g（0.95～1.04 g）を分解フラスコに量り、硝酸 10 mL 及び硫酸 5 mL を加え、静かに加熱する。溶液がなお褐色を呈するときは、放冷した後、硝酸 1～2 mL を追加して加熱し、溶液が無色～微黄色になるまでこの操作を繰り返す。放冷した後、過塩素酸 0.5 mL を加え、白煙が発生するまで加熱する。放冷した後、飽和シュウ酸アンモニウム溶液 15 mL を加え、再び白煙が発生するまで加熱する。放冷した後、水を加えて約 10 mL とし、これを試料溶液として装置 A を用いる方法によりヒ素の試験を行うとき、吸収液の色は、標準色より濃くてはならない（2 $\mu\text{g/g}$ 以下）。
- ④ アンモニウム塩 アミノ酢酸製造用原体の純度試験③を準用する。この場合において、「0.1 g」とあるのは「0.05 g」と、「1 mL」とあるのは「0.5 mL」と読み替えるものとする（0.04%以下）。

乾燥減量 0.3%以下 （3 g、105℃、3時間）

強熱残分 0.1%以下 （1 g）

定量法 本品を 105 °C で 3 時間乾燥し、その約 0.5 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、水を加えて溶かし、1,000 mL の全量フラスコに入れ、更に水を標線まで加えて 1,000 mL とし、試料溶液とする。この溶液 5 µL につき、次の条件で、液体クロマトグラフ法により試験を行う。得られたクロマトグラムから、ヒスチジンのピーク面積を測定し、別に求める検量線により塩酸 L-ヒスチジン一水和物濃度を求め、含量を算出する。

操作条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：210 nm）

カラム：内径 4.6 mm、長さ 150 mm のステンレス管に粒径 3 µm の液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填する。

カラム温度：35 °C

移動相：リン酸二水素カリウム 2.27 g（2.265～2.274 g）及び 1-オクタンスルホン酸ナトリウム 1.08 g（1.075～1.084 g）を水 850 mL に溶かし、リン酸で pH を 2.5 に調整した後、アセトニトリル 100 mL を加え、混和し、更に水を加えて 1,000 mL とする。

流速：毎分 1.0 mL

検量線の作成

定量用塩酸 L-ヒスチジン約 0.05 g、0.1 g、0.5 g 及び 1 g をそれぞれ 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、水約 800 mL を加えて溶かし、1,000 mL の全量フラスコに入れ、更に水を標線まで加えて 1,000 mL とし、1 mL 中に 0.05 mg、0.1 mg、0.5 mg 及び 1 mg を含有する標準液とする。標準液 5 µL ずつにつき、以下試料溶液の場合と同様に液体クロマトグラフ法により試験を行う。得られたクロマトグラムからヒスチジンのピーク面積を求めて検量線を作成する。

(イ) 製造の方法の基準

Corynebacterium glutamicum のヒスチジン生産菌株を好氣的に培養し、培養を終了した後、培養物をろ過して菌体を除去し、L-ヒスチジン粗結晶画分を分離する。さらに、粗結晶を精製し、得られた固形物を乾燥して製造すること。

(ウ) 保存の方法の基準

密閉容器に保存すること。

イ 製剤

(ア) 成分規格

塩酸 L-ヒスチジン製造用原体の成分規格を準用する。

(イ) 保存の方法の基準

塩酸 L-ヒスチジン製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

2. 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

飼料一般の表示の基準（下線部が改正箇所）

飼料添加物名	名称
L-アスコルビン酸 (略)	ビタミン C (略)
塩酸チアミン	ビタミン B ₁
<u>塩酸L-ヒスチジン</u>	<u>ヒスチジン</u>
塩酸ピリドキシン (略)	ビタミン B ₆ (略)
リン酸二水素ナトリウム（結晶）	リン酸二水素ナトリウム

3. 飼料添加物一般の試験法並びに各飼料添加物の成分規格及び製造方法等の基準に用いる標準品、試薬・試液、容量分析法標準液、標準液、色の比較液、計量器・用器、ろ紙、滅菌法及びベルトラン糖類定量表の規定

試薬・試液

塩酸 L-ヒスチジン、定量用 乾燥したものを定量するとき、塩酸 L-ヒスチジン（ $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$ ） 98.5%以上を含むもの。

定量用塩酸 L-ヒスチジン 塩酸 L-ヒスチジン、定量用の項に定める。

アセトニトリル、液体クロマトグラフィー用 CH_3CN 無色澄明の液で水と混和する。
水を対照液として、層長 10mm で吸光度を測定するとき、波長 200nm において 0.07 以下、波長 210nm において 0.046 以下、波長 220nm において 0.027 以下、波長 230nm において 0.014 以下、波長 240nm において 0.009 以下のものとする。

液体クロマトグラフィー用アセトニトリル アセトニトリル、液体クロマトグラフィー用に定める。