

2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル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 2 年 11 月 20 日付け 2 消安第 1717 号をもって諮問された 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステルについて、飼料安全部会において効果安全性や基準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. 指定する飼料添加物

飼料添加物名：2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル
用 途：飼料の栄養成分その他の有効成分の補給

2. 経過

令和 2 年 7 月 31 日 飼料添加物効果安全性小委員会
令和 2 年 11 月 20 日 諮問
令和 2 年 12 月 24 日 飼料添加物規格小委員会
令和 3 年 11 月 18 日 飼料添加物規格小委員会

3. 各小委員会の審議結果

- ・効果安全性を確認した（資料 P2～17 のとおり）。
- ・基準及び規格を作成した（資料 P18～21 のとおり）。

飼料添加物の効果安全性について（案）

2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル

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	2
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	2
3	効果に関する事項	2
3-1	反すう動物の体内における代謝	2
3-2	効果を裏付ける野外応用試験	3
3-2-1	牛	3
3-2-2	牛	4
3-2-3	牛	4
4	残留性に関する事項	5
5	安全性に関する事項	6
5-1	毒性試験	6
5-1-1	一般毒性試験	6
5-1-1-1	単回投与毒性試験	6
5-1-1-2	反復投与毒性試験（短期）	6
5-1-1-3	反復投与毒性試験（短期）	6
5-1-2	特殊毒性試験	7
5-1-2-1	変異原性試験	7
5-1-3	生体内動態	7
5-1-3-1	生体内動態に関する試験	7
5-1-3-2	ルーメンにおける HMBi の代謝	9
5-1-3-3	2-プロパノール及びアセトン	9
5-2	対象家畜等を用いた飼養試験	10
5-2-1	牛	10
6	審議結果	13
7	参照（参考文献及び参考資料）	14

2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステルに関する効果安全性について

1 名称等

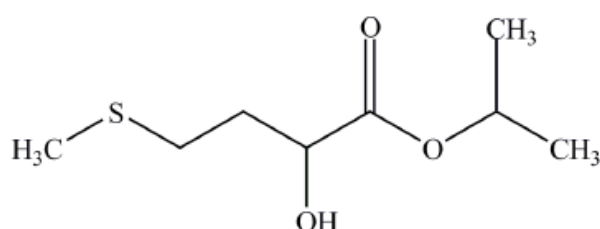
一般名：2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル（以下「HMBi」とする。）

化学名：isopropyl ester of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid

化学式：C₈H₁₆O₃S

CAS 番号：57296-04-5

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

対象家畜及び至適添加量： 牛用飼料 25～30 g/頭/日（47.3 mg/kg 体重/日）
（企業推奨量）

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

メチオニンは哺乳類、鳥類、魚類及び甲殻類における必須アミノ酸の一つであり、乳牛においては乳中のたん白質量に影響を与えるとされている。

国内ではメチオニンの補給を目的とし、DL-メチオニン、L-メチオニン及び2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニン（以下「HMB」とする）が全ての家畜等を対象とする飼料添加物として指定されている。

HMBi は HMB と 2-プロパノールとがエステル結合した化合物である。飼料添加物 HMB は反すう動物のルーメンにおいては微生物による分解を受けやすいことから、反すう動物に効率的に補給することが難しい。これに対し HMBi は、一部がルーメン内の微生物に分解されることなくルーメン壁から吸収される。吸収された HMBi は、HMB に分解されることにより家畜のメチオニン源となる〔参照 14〕。このことから、HMBi は反すう動物にメチオニン源を供給する飼料添加物としての利用が期待されている。

なお、EU 諸国においては反すう動物への飼料添加物としての使用が認められている。
〔参照 1～3〕

3 効果に関する事項

3-1 反すう動物の体内における代謝

HMBi を牛のルーメン内に直接投与すると、数分後に周辺の血液から HMB として検出され、2 時間以内に血しょう中濃度はピークに達した。続いて HMB の濃度が低下するとともに血しょう中のメチオニン濃度が上昇し、約 4 時間後にピークに達した後低下

した。

同様にルーメン内での分解を受けにくい保護メチオニン（rumen protected methionine：RPM, DL-メチオニンをルーメン分解耐性のある油脂等または pH 感受性のあるポリマーでコーティングすることによりルーメンでの分解への耐久性を上げた製品の総称）を牛のルーメン内に直接投与すると、すぐに血中から検出されたが、濃度のピークに達するまでに 24 時間以上を要した。

RPM は吸収される前にルーメンから小腸へ通過する割合が大きいのに対し、HMBi の吸収は主にルーメン壁で起こると考えられた。[参照 1]

3-2 効果を裏付ける野外応用試験

3-2-1 牛

(1) 方法

牛（ホルスタイン種、雌、泌乳 8 週目、平均乳量 31.5 kg/日）を用いて、基礎飼料と、基礎飼料に HMBi を 44 mg/kg 体重 /日、HMB を 42 mg/kg 体重/日又は RPM を 27 mg/kg 体重/日（いずれも可消化メチオニンとして 10.6 g/日）添加した飼料をそれぞれ 2 週間給与した（1 群 4 頭、4 反復）。

(2) 統計解析

解析はラテン方格法により行った。

(3) 結果

乳 1 kg 中のたん白質含量について、HMBi 添加群及び RPM 添加群は基礎飼料群及び HMB 添加群に比べ有意に高かった。

カゼイン含量について、HMBi 添加群は基礎飼料群、HMB 添加群及び RPM 添加群に比べ有意に高かった。

1 日当たりの乳中たん白質量は、HMBi 添加群及び RPM 添加群は基礎飼料群より有意に高かった（表 1 参照）。[参照 4]

表 1 各メチオニン供給源を牛用飼料に添加したときの乳中成分（g）

	基礎飼料群	メチオニン添加群		
		HMBi	HMB	RPM
乳 1 kg 中のたん白質含量*1	30.9 ^a	31.9 ^b	31.0 ^a	31.6 ^b
乳 1 kg 中のカゼイン量*2	26.0 ^b	26.8 ^a	25.7 ^b	26.2 ^b
1 日当たりの乳中たん白質量*3	962 ^a	994 ^b	980 ^{ab}	1003 ^b

各値は平均値を表す

*1 異文字間に有意差あり（P<0.001）

*2 異文字間に有意差あり（P<0.01）

*3 異文字間に有意差あり（P<0.05）

3-2-2 牛

(1) 方法

牛（ホルスタイン種、雌、分娩後 58～167 日）を用いて、表 2 のとおり基礎飼料に HMBi、HMB 及び RPM を添加した飼料をそれぞれ 2 週間給与した（1 群 5 頭、2 反復）。

乳は試験 8 日目から 14 日目に採取した。

(2) 結果

乳中のたん白質量について、HMBi 添加群、RPM 添加群及び HMB+HMBi 添加群において、添加により高くなった（表 3 参照）。〔参照 5〕

表 2 各添加群における飼料への物質の添加量（mg/kg 体重/日）

各添加群において 添加した物質	飼料 25 kg あたりのメチオニンとしての添加量（g）							
	0	10	15	20	25	30	35	45
HMBi	0		33.0	43.9	56.0	66.8		
HMB	0		27.6	38.2	46.8	56.0		
RPM	0	21.4	31.8	43.4	54.0			
HMB+HMBi								
HMB	0		8.7		14.1		20.0	25.5
HMBi	0		21.7		35.4		50.0	64.4

表 3 各メチオニン供給源を牛用飼料に添加したときの乳中たん白質量（%）

添加群	飼料 25 kg あたりのメチオニンとしての添加量（g）							
	0	10	15	20	25	30	35	45
HMBi	3.05		3.11	3.16	3.17	3.19		
HMB	3.04		3.02	3.03	3.06	3.03		
RPM	2.99	3.08	3.15	3.15	3.13			
HMB+HMBi	3.07		3.13		3.12		3.16	3.18

各値は平均値を表す

3-2-3 牛

(1) 方法

牛（ホルスタイン種、平均乳量 44±6 kg/日、平均体重 632±63 kg の経産牛及び平均乳量 39±3 kg、平均体重 535±42 kg の初産牛）を用いて、基礎飼料、たん白質豊富飼料（陽性対照）、基礎飼料に 0.17% の HMBi（71 mg/kg 体重/日）を添加した飼料、0.06% の RPM（24 mg/kg 体重/日）を添加した飼料及び 0.10% の HMB（41 mg/kg 体重/日）と 0.06% の RPM（25 mg/kg 体重/日）を添加した飼料をそれぞれ 12 週間給与した（メチオニン添加飼料はいずれも飼料乾燥重量 24 kg あたりに利用可能なメチオニンとして 9 g を含む）（1 群 14 頭）。

乳は週に 1 回採取した。

（２）統計解析

解析は MIXED procedure (SAS Institute, 1999-2000) において、反復測定モデル及び SP(POW)を用いて行った。体重の変化及び排泄のデータについては共変量を含めず、その他については共変量を含めた。各群の最小二乗平均値の比較に PDIFF を、1 週間ごとの平均の比較に SLICE を用いた。

（３）結果

乳中の純たん白質量について、HMBi 添加群は基礎飼料群及び陽性対照群と比べて有意に高かった（表 4 参照）。[参照 6]

表 4 牛用飼料に添加したときの各メチオニン源の給与効果

	基礎飼料群	HMBi	HMB+RPM	RPM	陽性対照群
飼料摂取量 DMI(kg/日)	24.9	25.7	25.1	24.6	24.7
1 日増体量 (kg/日)	0.65	0.69	0.66	0.50	0.45
乳量 (kg/日)	41.8	42.1	41.7	41.7	41.2
エネルギー補正乳量 ECM(kg/日) *1	37.9 ^b	41.0 ^a	39.0 ^{ab}	40.2 ^{ab}	39.4 ^{ab}
エネルギー補正乳量における飼料効率(ECM/DMI) *1	1.54 ^b	1.59 ^{ab}	1.57 ^{ab}	1.63 ^a	1.61 ^{ab}
純たん白質(%)*1	3.03 ^c	3.19 ^a	3.17 ^a	3.15 ^{ab}	3.05 ^b
無脂乳固形分(%)*1	8.73 ^b	8.94 ^a	8.92 ^a	8.84 ^{ab}	8.73 ^b
乳中尿素体窒素(mg/dl) *2	10.0 ^c	10.2 ^c	10.8 ^{bc}	11.2 ^b	13.2 ^a

各値は最小二乗平均値を表す

*1 異文字間に有意差あり ($P \leq 0.05$)

*2 異文字間に有意差あり ($P \leq 0.10$)

4 残留性に関する事項

4-1 牛

（１）方法

牛（ホルスタイン種、雌、泌乳 8 週目、平均乳量 31.5 kg/日）を用いて、基礎飼料、基礎飼料に HMBi を 44 mg/kg 体重/日添加した飼料をそれぞれ 2 週間給与した（1 群 4 頭、4 反復）。

（２）統計解析

分散分析は共分散分析によって行い、有意差が認められた項目については平均値に対して Fisher's PLSD test による多重比較を行った。

（３）結果

乳中の HMBi 濃度は 1.0 mg/L 未満であった。

乳中の 2-プロパノール濃度について、HMBi 添加群と基礎飼料群との間に有意差は見られなかった。

乳中のアセトン濃度について、HMBi 添加群は基礎飼料群と比較して有意に高かった

が、通常認められる範囲内の値であった（表 5 参照）。[参照 4]

表 5 牛用飼料に添加したときの HMBi 代謝物の乳中への残留濃度（mg/L）

	基礎飼料群	HMBi 添加群
2-プロパノール*	0.5±0	0.6±0.4
アセトン	1.7 ^b	2.8 ^a

各値は平均値を表す

異文字間に有意差あり（P<0.05）

* 検出下限（0.5 mg/l）未満の値を 0.5 として平均値を算出した

5 安全性に関する事項

5-1 毒性試験

5-1-1 一般毒性試験

5-1-1-1 単回投与毒性試験

ラット（CrI:WI(Glx/BRL/Han)BBR 系統、約 9～10 週齢、体重 256～277 g の雄及び体重 176～185 g の雌）を用いて、2000 mg/kg 体重の HMBi を強制経口投与し、15 日間観察した（雌雄各 3 頭）。

観察期間中に死亡例が認められず、観察後の剖検においても明確な影響が肉眼で認められなかったことから、LD50 は 2000 mg/kg 体重以上と考えられる。[参照 7]

5-1-1-2 反復投与毒性試験（短期）

ラット（Wistar、6～7 週齢、体重 244～281 g の雄及び体重 171～211 g の雌）を用いて、0、100、300、1000 mg/kg 体重/日の HMBi を 14 日間強制経口投与した（1 群雌雄各 5 頭）。

増体、飼料摂取量及び最終体重に異常は認められなかった。

100 mg/kg 体重/日投与群の 2 頭及び 300 mg/kg 体重/日投与群と 1000 mg/kg 体重/日投与群の全頭において唾液の増加が認められたが、有害事象ではないと判断された。

剖検において、臓器の絶対重量、相対重量及び肉眼所見に異常は認められなかったが、顕微鏡観察により、1000 mg/kg 体重/日投与群の雄で、肝臓における肝細胞中間部の液胞化と、腎臓における硝子滴の蓄積が認められた。

以上の結果から、HMBi は 300 mg/kg 体重/日までの濃度で投与による影響を与えないと考えられた。[参照 8]

5-1-1-3 反復投与毒性試験（短期）

ラット（Wistar、8 週齢、体重 255～278 g の雄及び体重 171～206 g の雌）を用いて、0、100、300、1000 mg/kg 体重/日の HMBi を 90 日間強制経口投与した（1 群雌雄各 10 頭）。

観察期間中に投与に起因する死亡例は認められなかった。300 及び 1000 mg/kg 体重/日投与群においては唾液の増加が認められたが、有害事象ではないと判断された。

1000 mg/kg 体重/日を投与した雄において、対照群の雄と比べて飼料摂取量、増体量

が有意に減少した他、血液学的、血液生化学的な変化（赤血球数の減少、ヘモグロビンの減少、ヘマトクリットの減少、平均赤血球容積の上昇、平均赤血球ヘモグロビン量の上昇及び血清中無機リン濃度の上昇）と尿 pH の低下が認められた。

肉眼的、組織学的検査については、1000 mg/kg 体重/日投与群においてのみ肝臓の着色、脾臓でのヘモジデリン蓄積と髄外造血が認められた。雄においては腎臓の相対重量及び絶対重量が対照群と比べて有意に高かった。

以上の結果から、HMBi は 300 mg/kg 体重/日までの濃度で投与による影響を与えないと考えられた。[参照 9]

5-1-2 特殊毒性試験

5-1-2-1 変異原性試験

HMBi の変異原性試験の結果を表 6 に示した。

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、TA102	1.6、8、40、200、1000、5000 µg/plate (+/-S9)	陰性	参照 10
染色体異常試験	ヒト末梢血リン パ球培養細胞	1231、1538、1923 µg/mL (+/-S9) 3h 処理後 17h 培養 608.5、1082、1923 µg/mL (-S9) 20h 処理 1736、1827、1923 µg/mL (+S9) 3h 処理後 17h 培養	陰性	参照 11
遺伝子突然変異試験	マウスリンパ腫 培養細胞 L5178Y	62.5、125、250、500、1000、1930 µg/mL (+/-S9) 3h 処理 1000、1250、1500、1750、1930 µg/mL (+/-S9) 3h 処理	陰性	参照 12

変異原性試験では、*in vitro* 系で細菌を用いた復帰突然変異試験、及び哺乳類細胞を用いた染色体異常試験と遺伝子突然変異試験が実施された。結果は、いずれも代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であった。

したがって、HMBi には変異原性は認められないと判断された（表 6 参照）。

5-1-3 生体内動態

5-1-3-1 生体内動態に関する試験

牛（ホルスタイン種、雌、平均体重 569 kg）を用いて、 ^{14}C でカルボニル基またはイソプロピル基を放射性標識した HMBi をそれぞれ 10 g を 1 日 2 回 (35 mg/kg 体重/日)、7 日間経口投与し、24、72、168 時間後に尿、糞、乳、脂肪、腎臓、肝臓、筋肉、ルーメン内容物及び全血中における放射活性を測定した（1 群 3 頭）。

いずれの投与群においても 24、72、168 時間後、脂肪、筋肉、ルーメン内容物、全血及び血しょう中に低いレベルの放射活性が見られ、組織中での分布について HMB と 2-プロパノールとの間に差は見られなかった。

放射活性の減退は HMB より 2-プロパノールの方が早い傾向が見られ、HMB が組織中に留まりやすく 2-プロパノールが体外に排出されやすい傾向が示された（表 7、8 参照）。[参照 13]

表 7 排せつ物及び組織等中の残留（カルボニル基 ^{14}C 標識 HMBi） (%TAR)

	24 時間後	72 時間後	168 時間後
尿	6.05	7.25	6.72
糞	2.54	3.17	3.01
乳	8.12	11.99	16.05
総排せつ量	16.72	22.42	25.78
脂肪	0.58	0.62	0.48
腎臓	0.30	0.19	0.14
肝臓	2.11	1.75	1.42
筋肉	5.54	7.17	5.54
ルーメン内容物	0.31	0.11	0.05
全血	0.01	0.01	0.01
計	25.57	32.27	33.42

各値は平均値を表す

表 8 排せつ物及び組織等中の残留（イソプロピル基 ^{14}C 標識 HMBi） (%TAR)

	24 時間後	72 時間後	168 時間後
尿	3.22	3.46	2.67
糞	1.58	1.70	1.87
乳	11.72	14.56	15.11
総排せつ量	16.53	19.73	19.65
脂肪	1.90	1.16	0.73
腎臓	0.06	0.04	0.21
肝臓	0.34	0.49	0.39

筋肉	4.99	4.03	2.78
ルーメン内容物	0.18	0.03	0.02
全血	<0.01	<0.01	<0.01
計	24.00	25.48	23.78

各値は平均値を表す

5-1-3-2 ルーメンにおける HMBi の代謝

ルーメンにおいて HMBi はその約 50%が家畜によって代謝され、残りはルーメン細菌叢によって代謝されることが示されている。HMBi は細菌によって脱エステル化され、HMB と 2-プロパノールを生じる。一部の 2-プロパノールは酸化されアセトンとなるが、これは可逆的な反応であり、アセトンの一部は還元され再び 2-プロパノールとなる。[参照 14]

5-1-3-3 2-プロパノール及びアセトン

牛のルーメンに 69 g の HMBi を直接投与し、牛の血しょう中の 2-プロパノール、アセトン濃度の経時変化を測定したところ、血しょう中 2-プロパノール濃度及びアセトン濃度は 24 時間後にはそれぞれ 1.13 mg/L、12.4 mg/L に低下した（表 9、10 参照）。[参照 14]

表 9 牛の血しょう中 2-プロパノール濃度及びアセトン濃度の経時変化（試験 1）（mg/L）

	0 分後	30 分後	1 時間後	2 時間後
2-プロパノール	0	1.30	2	—*
アセトン	1.6	9	—*	25

* 報告なし

表 10 牛の血しょう中 2-プロパノール濃度及びアセトン濃度の経時変化（試験 2）（mg/L）

	0 分後	10 分後	1 時間後	6 時間後	24 時間後
2-プロパノール	—*	1	2.65	—*	1.13
アセトン	—*	—*	—*	23	12.4

* 報告なし

一方、牛に経口的に HMBi を投与した試験においては、30 g/頭/日を 2 週間投与したとき、最後の投与から 2 時間後の血しょう中 2-プロパノール濃度は 0.5 mg/L 未満、血しょう中アセトン濃度は 11.4 mg/L（対照群で 4.8 mg/L）となった。同様に、27 g/頭/日の HMBi を経口的に 120 日間投与したとき、血しょう中に 2-プロパノールは検出されず、血しょう中アセトン濃度は 8.3 mg/L（対照群で 4.1 mg/L）となった。[参照 14]

アセトンは哺乳類の脂質代謝において生じる代謝物である。また乳用牛においては、泌乳開始時に過剰な脂質代謝によりケトン体の蓄積が起こるアセトン血症やケトーシ

スを起こすことがある。

HMBi を給与された泌乳牛について、これまで報告されている血しょう中アセトン濃度は約 10 mg/L 程度であり、正常な値とされる数 mg/L～50 mg/L の範囲内であった。[参照 14]

5-2 対象家畜等を用いた飼養試験

5-2-1 牛

(1) 方法

牛（ホルスタイン種、雌、平均体重 633±59 kg、泌乳開始後 2～6 か月）を用いて、基礎飼料、HMBi を 121、245、464 mg/kg 体重/日添加した飼料をそれぞれ 14 日間給与した（1 群 3 頭）。添加は濃厚飼料に対して行い、別に自由摂食で粗飼料を与えた。

体重、飼料摂取量、体温、乳量を記録した。乳については乳中成分の測定を、血液については血液学的検査及び血液生化学的検査を行った。試験期間終了後、剖検及び組織学的検査を行った。

(2) 結果

試験期間を通して致死は見られず、粗飼料の摂取量及び体温は通常の範囲内であった。

体重、血液学的検査、血液生化学的検査、乳量及び乳中成分について、HMBi 摂取による違いは見られなかった（表 11 参照）。

剖検及び肝臓と腎臓の組織学的検査においても、HMBi 摂取の影響は見られなかった。

濃厚飼料の摂食拒否が 245 mg/kg 体重/日以上添加群において認められた。464 mg/kg 体重/日添加群では 5 日後までに 50%以上の摂食拒否が見られたため、6 日後午後から基礎飼料を与えたところ、1 日の間に開始時と同等の摂食量となった。245 mg/kg 体重/日添加群では試験期間を通して飼料の 20%程度の拒否が見られた。

表 11 牛用飼料に HMBi を添加したときの牛への影響

試験項目		基礎飼料群	HMBi 添加群		
			121 mg/kg 体重/日	245 mg/kg 体重/日	464 mg/kg 体重/日 *2
1 日増体重 (kg/日)		0.17	-0.62	-1.60	0.24
体重 (kg)	開始 1 日前	638	626	624	644
	6 日後	635	636	622	639
	13 日後	640	617	602	648
1 日飼料摂取量 (kg/日) *1		8.0	8.0	6.5	5.5
	開始日	8.0	8.0	4.5	2.2
	1 日後	8.0	8.0	5.7	2.8
	2 日後	8.0	8.0	6.8	3.6
	3 日後	8.0	8.0	6.8	3.6
	4 日後	8.0	8.0	6.7	1.8
	5 日後	8.0	8.0	7.6	3.1

	6 日後	8.0	8.0	5.8	5.0
	7 日後	8.0	8.0	4.9	8.0
	8 日後	8.0	8.0	4.9	8.0
	9 日後	8.0	8.0	4.9	8.0
	10 日後	8.0	8.0	5.1	8.0
	11 日後	8.0	8.0	4.6	8.0
	12 日後	8.0	8.0	4.6	8.0
	13 日後	8.0	8.0	5.6	8.0
乳量及び乳中成分					
乳量 (kg)	開始日	17.8	18.9	22.5	21.8
	1 日後	17.7	18.7	20.1	19.7
	2 日後	17.4	18.3	19.4	17.8
	3 日後	17.2	18.4	19.8	16.3
	4 日後	17.8	18.2	19.8	16.4
	5 日後	17.7	18.2	20.1	15.1
	6 日後	17.4	18.2	19.2	15.3
	7 日後	18.1	17.8	19.5	16.1
	8 日後	18.3	17.7	20.3	18.0
	9 日後	18.1	17.9	19.9	19.3
	10 日後	18.4	17.8	19.0	20.7
	11 日後	18.6	18.5	19.5	20.5
	12 日後	18.6	17.8	19.9	20.5
	13 日後	17.6	17.5	19.2	21.4
ラクトース (g/l)	1 日後	46.3	49.0	46.3	50.2
	2 日後	46.3	48.4	46.2	48.5
	3 日後	45.1	48.5	45.7	49.5
	8 日後	47.2	48.3	46.1	50.2
	9 日後	47.0	48.2	46.0	49.3
	10 日後	46.7	47.6	45.4	49.9
脂肪 (g/l)	1 日後	44.1	45.6	48.5	50.0
	2 日後	41.4	45.1	47.8	45.9
	3 日後	41.8	45.3	43.1	43.6
	8 日後	42.6	49.5	44.9	40.8
	9 日後	41.6	52.7	46.9	37.5
	10 日後	42.8	48.7	46.0	36.8
たん白質 (g/l)	1 日後	30.3	31.7	28.5	26.1
	2 日後	30.2	31.6	28.6	27.2
	3 日後	30.7	31.9	30.1	26.8

	8 日後	30.9	33.3	31.4	29.7
	9 日後	31.6	33.1	32.5	29.4
	10 日後	31.7	33.4	32.4	29.5
血液学的検査及び血液生化学的検査（13 日後）					
白血球（G/l）		9.5	8.2	8.0	5.8
赤血球（T/l）		6.7	7.1	7.0	6.3
ヘモグロビン（g/dl）		10.1	10.4	11.2	10.1
ヘマトクリット（%）		30.0	28.7	31.0	27.7
VGM（fl）		44	41	44	44
TCMH（pg）		15	15	16	16
CCMH（g/dl）		34	36	36	36
血小板（G/l）		242	239	147	260
好塩基球（%）		0	0	0	0
好酸球（%）		11	8	6	11
好中球（桿状核好中球）（%）		52	58	45	40
好中球（その他）（%）		0	0	0	0
リンパ球（%）		28	24	41	38
単球（%）		9	8	1	8
たん白質（g/l）		83	81	82	83
アルブミン（%）		48.20	52.47	49.43	50.20
α -グロブリン（%）		14.2	13.4	13.4	15.3
β 1-グロブリン（%）		8.0	8.3	7.8	8.2
γ -グロブリン（%）		29.6	25.9	29.3	26.2
GOT (ASAT) (U/l)		49	43	46	35
GPT (ALAT) (U/l)		23	23	21	20
γ -GT (U/l)		20	13	15	16
アルカリホスファターゼ (U/l)		71	57	49	56
LDH (U/l)		1170	1079	1113	1087
アミラーゼ (U/l)		43	50	45	54
ビリルビン (mg/l) *3		1.0	1.0	1.0	1.3
尿素 (g/l)		0.22	0.23	0.15	0.25
クレアチニン (mg/l)		13.7	13.7	12.3	10.7
クレアチニンキナーゼ (U/l)		53	60	83	47
グルコース (g/l)		0.51	0.55	0.47	0.59

各値は平均値を表す

*1 濃厚飼料の摂取量を示す

*2 飼料摂取量の著しい低下のため 6 日後の夜以降は基礎飼料を与えたことから参考データとする

*3 1.0 未満の値は 1.0 として計算に用いた

6 審議結果

2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステルの効果安全性について審議した。「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、牛用飼料に添加することは適当であると判断された。

①本剤の効果：飼料の栄養成分その他の有効成分の補給

②対象家畜：牛

7 参照（参考文献及び参考資料）

1. Report of the scientific committee on animal nutrition on the use of a HMBi (Isopropyl ester of the hydroxylated analogue of methionine), EUROPEAN COMMISSION 203
2. EFSA Journal 2012; 10 (3): 2063
3. Official journal of the European Union, COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) No. 469/2003 of 22 May 2013
4. Evaluation of the Bioavailability of New Type of protected Methionine, EXPERIMENT 9920) I.N.R.A.
5. A comparison of 2-Hydroxy-4-Methylthio Butanoic Acid (HMB) and the Isopropyl Ester of HMB (HMBi) with Smartamine M in Their Ability to Provide Methionine for Milk Protein Synthesis in Holstein Cows. (Aventis Animal Nutrition)
6. Z. H. Chen and G. A. Broderick, Effect of feeding different sources of rumen-protected methionine on milk production and N-utilization in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 94: 1978-1988
7. Covance Report Number 1822/1-D6144. HMBi: Acute Oral Toxicity Study in the Rat
8. HYDROXYMETHILTHIOBUTYRIC ACID ISOPROPYL ESTER(HMBi): EXPLORATORY 14-DAY TOXICITY STUDY IN THE RAT BY GAVAGE (Aventis)
9. HYDROXYMETHILTHIOBUTYRIC ACID ISOPROPYL ESTER(HMBi) 90-DAY TOXICITY STUDY IN THE RAT BY GAVAGE (Aventis)
10. CLE Study Number 1822/6. HMBi: Reverse Mutation in five Histidine-requiring strains of *Salmonella typhimurium*
11. Covance Report Number 1822/23-D6172. HMBi: Induction of chromosome aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes
12. Covance Report Number 1822/22-D6173. HMBi: Mutation at the Thymidine Kinase(*tk*) Locus of Mouse Lymphoma L5178Y Cells (MLA) using the Microtitre^R Fluctuation Technique.
13. HMBi: Absorption, Distribution and Excretion of [¹⁴C] -HMBi following Reported Oral Administration to the Lactating Cow (Aventis)
14. F. Alleman and JC Robert, Description of the metabolism of HMBi in dairy cows
15. Tolerance study of HMBi in dairy cows after oral administration in concentrate. (Aventis)

＜別紙 1：検査値等略称＞

略称	名称
CCMH	平均赤血球ヘモグロビン濃度
GOT (ASAT)	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
GPT (ALAT)	アラニンアミノトランスフェラーゼ
γ-GT	γ-グルタミルトランスペプチダーゼ
LDH	乳酸脱水素酵素
TCMH	ヘモグロビン量
VGM	平均赤血球容量

2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル 成分規格及び規格（案）

1. 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

2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステルは、牛を対象とする飼料（飼料を製造するための原料又は材料を含む。）以外の飼料に用いてはならない。

2. 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

(7) 成分規格

含量 本品は、定量するとき、2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル（ $C_8H_{16}O_3S$ ）として 95.0 %以上を含む。

物理的・化学的性質

- ① 本品は、無色から褐色のやや粘性のある液体である。
- ② 本品は、メタノール又はアセトンに極めて溶けやすく、水にやや溶けにくい。
- ③ 本品の pH は 3.5~5.0 である。

確認試験

- ① 本品 25 mg（24.5~25.4 mg）に無水硫酸銅を飽和させた硫酸 1 mL を加えるとき、その溶液は黄色を呈する。
- ② 本品 5 mg（4.5~5.4 mg）に水 5 mL を加えて溶かし、1 mol/L 水酸化ナトリウム試液 2 mL を加え、よく振り混ぜ、ニトロプルシドナトリウム試液 0.3 mL を加え、再びよく振り混ぜ、30~40 °C で 10 分間放置した後、2 分間氷冷し、希塩酸 2 mL を加え、振り混ぜるとき、その溶液は赤色を呈する。

純度試験

- ① 鉛 本品 0.50 g（0.495~0.504 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 20 µg/g 以下でなければならない。

② ヒ素 本品 1.0 g (0.95~1.04 g) を量り、ヒ素試験法第 3 法により試料溶液を調製し、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 µg/g 以下)。

水分 本品約 500 mg を 1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、水分定量法 (カールフィッシャー法) の逆滴定法により試験するとき、その量は 0.5 %以下でなければならない。

定量法 本品約 30 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、リン酸塩緩衝液・アセトニトリル試液を加えて振り混ぜた後、更にリン酸塩緩衝液・アセトニトリル試液を標線まで加えて 50 mL とし、試料原液とする。この試料原液 5 mL を全量ピペットを用いて量り、50 mL の全量フラスコに入れ、リン酸塩緩衝液・アセトニトリル試液を標線まで加えて 50 mL とし、0.45 µm のメンブランフィルターでろ過し、試料溶液とする。この溶液 20 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 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステルのピーク面積を測定し、別に求める検量線により 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル濃度を求め、次式により含量を算出する。

2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステルの含量 (%)

$$= C \times \frac{50}{W}$$

C : 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステルの濃度 (µg/mL)

W : 本品の採取量 (mg)

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 5 µm の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 : 40 °C

移動相 : 水 (リン酸を用いて pH2 に調整したもの) - アセトニトリル (4:1)

流量 : 毎分 1.0 mL

検量線の作成

定量用 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル約 50 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量

フラスコに入れ、更にリン酸塩緩衝液・アセトニトリル試液を標線まで加えて 50 mL とし、標準原液とする（この溶液 1 mL は、2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル（ $C_8H_{16}O_3S$ ）として 1 mg を含有する。）。使用に際して、標準原液の一定量にリン酸塩緩衝液・アセトニトリル試液を加え、1 mL 中に 20 μ g、50 μ g、100 μ g 及び 200 μ g を含有するように正確に希釈する。各溶液を 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、標準液とする。標準液 20 μ L 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 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステルのピーク面積を求めて検量線を作成する。

(イ) 保存の方法の基準

気密容器に保存すること。

イ 製剤（その 1）

(ア) 成分規格

2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル製造用原体の成分規格を準用する。

(イ) 保存の方法の基準

気密容器に保存すること。

ウ 製剤（その 2）

(ア) 成分規格

本品は、2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル製造用原体に、無水ケイ酸を混和した粉末である。

含量 本品は定量するとき、表示量の 90~110 %に相当する 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル（ $C_8H_{16}O_3S$ ）を含む。

確認試験 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル製造用原体の確認試験を準用する。

定量法 本品 100 mg を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、リン酸塩緩衝液・アセトニトリル試液を加えて振り混ぜた後、更にリン酸塩緩衝液・アセトニトリル試液を標線まで加えて 100 mL とする。30 分間かき混ぜた後、10 分間静置し、その上澄液を試料原液とする。この試料原液 5 mL を全量ピペットを用いて量り、50 mL の全量フラスコに入れ、リン酸塩緩衝液・アセトニトリル試液を

標線まで加えて 50 mL とし、0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、試料溶液とする。以下 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル製造用原体の定量法の操作条件で、液体クロマトグラフ法により試験を行う。

2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステルの含量 (%)

$$= C \times \frac{100}{W}$$

C : 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステルの濃度 (μg/mL)

W : 本品の採取量 (mg)

(4) 保存の方法の基準

密閉容器に保存すること。

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

2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル、定量用 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル製造用原体の規格に適合するもの。ただし、含量は、定量法の測定条件により主ピークの保持時間の 2 倍までの範囲で面積百分率により求めるとき、2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル (C₈H₁₆O₃S) 98.0%以上のもの。

定量用 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル 2-デアミノ-2-ヒドロキシメチオニンイソプロピルエステル、定量用の項に定める。

リン酸塩緩衝液・アセトニトリル試液 リン酸二水素カリウム 2.0 g (1.95~2.04 g) に水 600 mL 及びアセトニトリル 400 mL を加えて溶かし、1 mol/L 水酸化ナトリウム試液を加えて pH7 に調整する。