

飼料添加物の基準の見直し

(グアニジノ酢酸の対象飼料拡大及び添加上限量の引き上げ)

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 4 年 9 月 28 日付け 4 消安第 3261 号をもって諮問されたグアニジノ酢酸を含む飼料の基準の改正について、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. 基準を改正する飼料添加物

飼料添加物名：グアニジノ酢酸（令和元年 5 月 31 日指定）

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 4 年 9 月 28 日 諮問

令和 4 年 9 月 28 日 飼料添加物効果安全性小委員会

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. 2～44 のとおり）。

基準及び規格を作成した（資料 P. 45 のとおり）。

飼料添加物の効果安全性について（案）

グアニジノ酢酸

（第 2 版）

令和 4 年 12 月 20 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	5
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	5
3	効果に関する事項	7
3-1	効果を裏付ける野外応用試験（鶏）	7
3-1-1	鶏	7
3-1-2	鶏	7
3-1-3	鶏	8
3-1-4	鶏	8
3-1-5	鶏	9
3-1-6	鶏	9
3-1-7	鶏	10
3-1-8	鶏	11
3-1-9	鶏	12
3-2	効果を裏付ける野外応用試験（豚）	13
3-2-1	豚	13
3-2-2	豚	14
4	残留性に関する事項	15
4-1	残留性試験（鶏）	15
4-1-1	鶏	15
4-1-2	うずら	15
4-1-3	鶏	16
4-1-4	鶏	17
4-1-5	鶏	18
4-1-6	鶏	19
4-1-7	鶏	19
4-1-8	鶏	20
4-1-9	鶏	20
4-1-10	鶏	22
4-1-11	鶏	22
4-2	残留性試験（豚）	23
4-2-1	豚	23
5	安全性に関する事項	25
5-1	毒性試験	25
5-1-1	一般毒性試験	25
5-1-1-1	単回投与毒性試験（ラット）	25
5-1-1-2	反復投与毒性試験（短期、ラット）	25
5-1-1-3	反復投与毒性試験（短期、ラット）	28
5-1-2	特殊毒性試験	32

5-1-2-1	遺伝毒性試験	32
5-1-2-2	局所毒性試験（皮膚刺激性）	32
5-1-2-3	局所毒性試験（眼刺激性）	33
5-1-2-4	生殖毒性試験（鶏）	33
5-1-2-5	生殖毒性試験（鶏）	33
5-1-3	生体内動態に関する試験	33
5-1-3-1	ラット	34
5-1-3-2	鶏	35
5-1-3-3	鶏	36
5-2	対象家畜等を用いた飼養試験	37
5-2-1	鶏	37
5-2-2	鶏	38
5-2-3	鶏	39
5-2-4	豚	39
5-2-5	豚	40
6	審議結果	42
7	参照（参考文献及び参考資料）	43

グアニジノ酢酸に関する効果安全性について

1 名称等

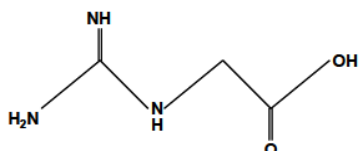
一般名：グアニジノ酢酸

化学名：*N*-(aminoiminomethyl)glycine

化学式： $C_3H_7N_3O_2$ （分子量 117.1）

CAS 番号：352-97-6

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

対象家畜及び添加上限量：鶏用飼料 0.12%

うずら用飼料 0.12%

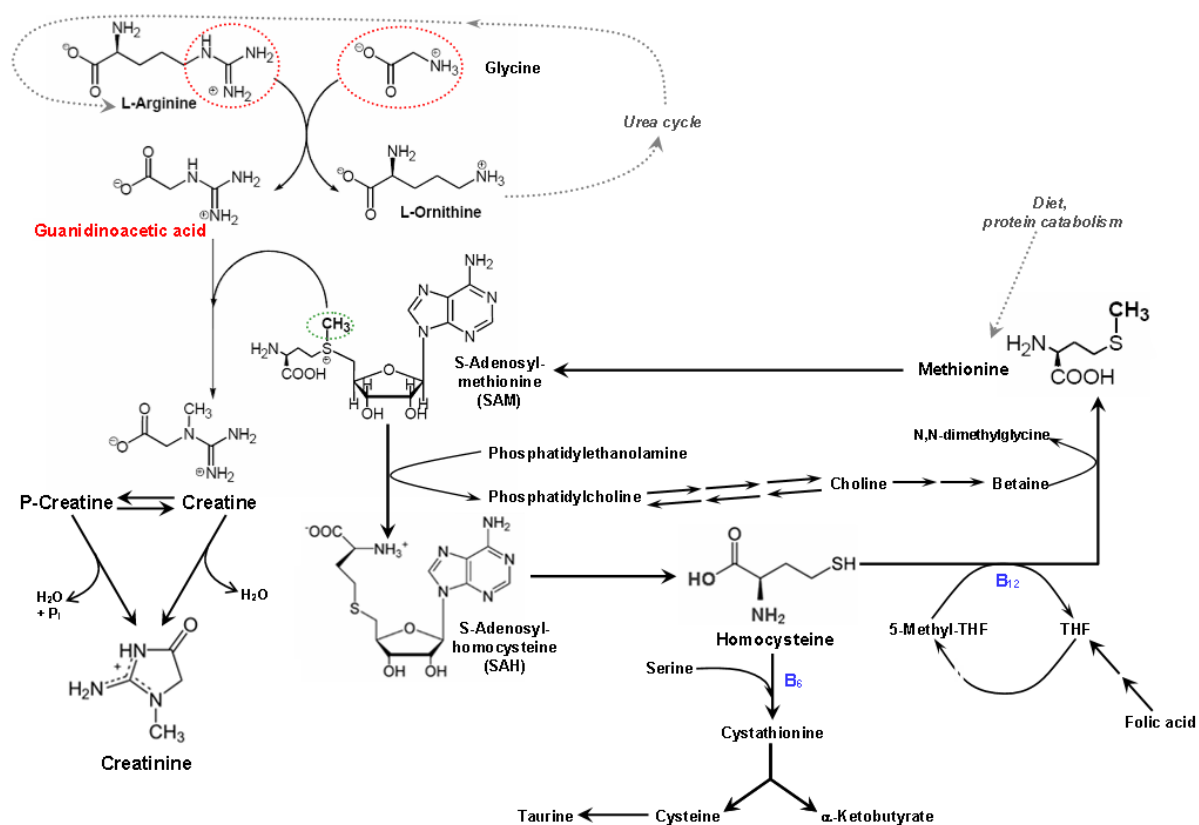
豚用飼料 0.12%

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

グアニジノ酢酸は主に腎臓と膵臓でグリシンと L-アルギニンから生合成され、肝臓でメチル化を受けて、クレアチンに変換される。クレアチンは筋細胞のエネルギー代謝において重要であり、特にブロイラーのような生産回転率の速い家畜においては、飼料への添加が有益と考えられる。

本物質は、海外では、米国、EU 等で飼料添加物としての使用が認められており、EU ではブロイラー及び豚用飼料に 0.12%の添加が認められている。日本国内においても、令和元年 4 月に飼料添加物の指定を受け、ブロイラー用飼料に 0.06%を上限として添加が認められている。

(参考) グアニジノ酢酸代謝経路〔参照 1〕 (補足資料 2009)



3 効果に関する事項

3-1 効果を裏付ける試験（鶏）

3-1-1 鶏（ブロイラー）

（1）方法

ブロイラー（Cobb500、雄、1日齢）を用い、肉骨粉含有飼料、非含有飼料のそれぞれについて、基礎飼料（対照群）又は基礎飼料にグアニジノ酢酸を 0.058%（42mg/kg 体重/日）添加した飼料を 42 日間給与した（1 群 36 羽、10 反復）。肉骨粉含有飼料は、1 日目から 10 日目までは 7.3%、11 日目から 21 日目までは 6.2%、22 日目から 42 日目までは 4.962%の肉骨粉を含んでいた。

（2）結果

肉骨粉含有飼料において、飼料要求率については、グアニジノ酢酸 0.058%添加群は対照群よりも有意に低かった（ $p<0.05$ ）（表 1 参照）。〔参照 2〕

表 1 動物タンパク質を含んだ鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の給与効果

	肉骨粉非含有飼料		肉骨粉含有飼料	
	対照群	0.058%グアニジノ酢酸添加群	対照群	0.058%グアニジノ酢酸添加群
増体量 (g)	3028.8 ^b	3106.9 ^a	3102.4 ^a	3081.7 ^a
飼料摂取量 (g)	4814.8 ^a	4856.9 ^a	4838.8 ^a	4696.1 ^b
飼料要求率	1.604 ^a	1.554 ^b	1.578 ^{ab}	1.515 ^c

各項目内の異文字間に有意差あり（ $p<0.05$ ）

3-1-2 鶏（ブロイラー）

（1）方法

ブロイラー（Ross 308、雄、1日齢）を用い、魚粉非含有飼料、魚粉 5%含有飼料（前期用飼料のみ）、魚粉 5%含有飼料（全期間）のそれぞれについて、基礎飼料（対照群）又は基礎飼料にグアニジノ酢酸を 0.058%（49mg/kg 体重/日）添加した飼料を 36 日間給与した（1 群 10 羽、9 反復）。

（2）結果

魚粉 5%含有飼料（全期間）において、増体量については、グアニジノ酢酸 0.058%添加群は対照群よりも有意に高く、飼料要求率については、有意に低かった（ $p<0.05$ ）（表 2 参照）。〔参照 3〕

表 2 動物タンパク質を含んだ鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の給与効果

	魚粉非含有飼料		魚粉 5%含有飼料 (前期用飼料のみ)		魚粉 5%含有飼料 (全期間)	
	対照群	0.058%グアニ ジノ酢酸添加群	対照群	0.058%グアニ ジノ酢酸添加群	対照群	0.058%グアニ ジノ酢酸添加群
1 日増体量 (g/日)	75.5 ^{bc}	77.0 ^b	74.6 ^c	77.6 ^{ab}	75.8 ^{bc}	79.3 ^a
飼料摂取量 (g)	4306.4	4294.0	4244.4	4324.8	4292.4	4363.2
飼料要求率	1.584 ^a	1.550 ^b	1.581 ^a	1.549 ^b	1.572 ^a	1.528 ^c

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

3-1-3 鶏（ブロイラー）

（1） 方法

ブロイラー（Ross708、雄、1 日齢）を用い、チキンミール 5%含有飼料（対照群）、チキンミール 5%含有飼料にグアニジノ酢酸を 0.058%（38mg/kg 体重/日）添加した飼料を 48 日間給与した（1 群 20 羽、16 反復）。

なお、基礎飼料（チキンミール非含有飼料）は 1 日目から 14 日目までは 22.11%、14 日目から 35 日目までは 20.95%、35 日目から 48 日目までは 19.31%の粗タンパク質を含んでいた。

（2） 結果

飼料要求率については、グアニジノ酢酸添加群は対照群よりも有意に低かった p<0.05）（表 3 参照）。〔参照 4〕

表 3 動物タンパク質を含んだ鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の給与効果

	チキンミール含有飼料	
	対照群	0.058%グアニジノ酢酸添加 群
増体量 (g)	4173	4212
飼料摂取量 (g)	6663	6665
飼料要求率	1.58 ^a	1.55 ^b

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

3-1-4 鶏（ブロイラー）

（1） 方法

ブロイラー（Ross 308、雄、1 日齢）を用いて、基礎飼料（対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 0.06、0.08、0.10%（27.8、37.4、46.7 mg/kg 体重/日）添加した飼料をそれぞれ 42 日間給与した（1 群 41 羽、8 反復）。なお、基礎飼料中には動物由来原料は含まれていなかった。

（2） 結果

飼料要求率については、グアニジノ酢酸 0.06、0.10%添加群は対照群よりも有意に低かった ($p<0.05$) (表 4 参照)。^{〔参照 5〕}

表 4 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の給与効果

	対照群	グアニジノ酢酸添加群 (%)		
		0.06	0.08	0.10
1 日増体量 (g/日)	69.1	68.6	68.2	69.0
1 日飼料摂取量 (g/日)	140.6 ^a	135.5 ^b	136.1 ^b	135.9 ^b
飼料要求率	2.037 ^a	1.976 ^b	1.998 ^{ab}	1.971 ^b

各項目内の異文字間に有意差あり ($p<0.05$)

3-1-5 鶏（ブロイラー）

（1）方法

ブロイラー（Ross308、雄、1 日齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 314、628、942、1,256 mg/kg 飼料（6 週齢時点で約 21.4、42.8、64.3、85.7 mg/kg 体重/日）で添加した飼料（グアニジノ酢酸添加群）、魚粉を用いた飼料（陽性対象群、前期飼料 5%、後期飼料 3%）をそれぞれ 42 日間給与した（1 群 40 羽、6 反復）。なお、基礎飼料中には動物由来原料は含まれていなかった。

（2）統計解析

試験結果の解析は、ANOVA procedures (GenStat Release 6.1)を用いて、LSD 検定を実施した。

（3）結果

飼料要求率について、942、1,256 mg/kg グアニジノ酢酸添加群は、陰性対照と比較して有意に低下した（表 5 参照）。^{〔参照 6〕}

表 5 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の給与効果

	陰性対照 群	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)				陽性対照 群
		314	628	942	1,256	
増体量 (g)	2,557 ^{bc}	2,685 ^{abc}	2,664 ^{abc}	2,735 ^{ab}	2,660 ^{abc}	2,774 ^a
飼料摂取量 (g)	4,493	4,423	4,446	4,518	4,372	4,397
飼料要求率	1.75 ^a	1.65 ^b	1.67 ^{ab}	1.65 ^b	1.64 ^b	1.60 ^b

各項目内の異文字間に有意差あり ($p\leq 0.05$)

3-1-6 鶏（ブロイラー）

（1）方法

ブロイラー（Ross308、雄雌、1 日齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 400、600、800、1,200 mg/kg 飼料（6 週齢時点で約 27.3、41.0、54.6、81.9 mg/kg 体重/日）で添加した飼料（グアニジノ酢酸添加群）、肉骨粉を用いた飼料（陽性対象群）をそれぞれ 42 日間給与した（1 群 44 羽、8 反復）。なお、基礎飼料

中には動物由来原料は含まれていなかった。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、ANOVA を用いて、LSD 検定を実施した。

(3) 結果

増体重について、400、800 mg/kg グアニジノ酢酸添加群は、陰性対照と比較して有意に低下した。

飼料要求率について、全てのグアニジノ酢酸添加群は、陰性対照と比較して有意に低下した (表 6 参照)。[参照 7]

表 6 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の給与効果

	陰性対照 群	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)				陽性対照 群
		400	600	800	1,200	
増体量 (g)	2,443 ^c	2,486 ^{ab}	2,476 ^{abc}	2,516 ^a	2,475 ^{abc}	2,448 ^{bc}
飼料摂取量 (g)	4,274	4,248	4,241	4,309	4,194	4,233
飼料要求率	1.76 ^a	1.71 ^b	1.71 ^b	1.71 ^b	1.69 ^b	1.73 ^b
へい死率 (%)	11.9	10.8	8.2	11.9	9.1	11.4

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

3-1-7 鶏 (採卵鶏)

(1) 方法

採卵鶏 (イサ・ブラウン、雌、72 週齢) を用いて、基礎飼料 (陰性対照群)、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 500、1,000、1,500 mg/kg 飼料 (体重当たりの摂取量: 不明) で添加した飼料 (グアニジノ酢酸添加群をそれぞれ 36 日間給与した (1 群 4 羽、8 反復))。なお、基礎飼料中には動物由来原料は含まれていなかった。

産卵率や飼料要求率に加えて、各週 2 反復から 2 個採卵し、卵質検査を行った。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、ANOVA procedures of the IBM SPSS software program を用いて、Duncan's 多重範囲検定を実施した。

(3) 結果

産卵率及び卵重量について、1,500 mg/kg グアニジノ酢酸添加群は、陰性対照と比較して有意に増加した。

飼料要求率について、1,000 及び 1,500 mg/kg グアニジノ酢酸添加群は、陰性対照と比較して有意に低下した。

殻の厚さと卵黄係数について、1,000 及び 1,500 mg/kg グアニジノ酢酸添加群は、陰性対照群及び 500 mg/kg グアニジノ酢酸添加群と比較して有意に優れていました (表 7 参照)。[参照 8]

表 7 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の給与効果

	陰性対照群	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)		
		500	1,000	1,500
産卵率 (HDPE, %)	69	71	73	75
卵重量 (g/羽/日)	50.5	53.1	53.7	54.2
飼料要求率	2.22	2.13	1.94	1.90
卵白重量 (%)	65.6	65.7	64.7	62.6
卵黄重量 (%)	24.9	25.0	25.9	27.3
卵殻重量 (%)	9.5	9.3	9.7	10.0
卵殻厚 (mm)	0.30	0.31	0.34	0.35
卵黄係数	0.45	0.46	0.48	0.49
ハウユニット※	87.7	90.7	91.9	91.2

各項目内の異文字間に有意差あり ($p<0.05$)

※鶏卵の鮮度を表す指標の一つであり、卵の質量と卵白の盛り上がりの高さから求められる。一般に数値が高いほど卵の内部品質が良く、新鮮であるとみなされる。

3-1-8 鶏（種鶏、雌）

（1）方法

鶏（Cobb-500、雌、50 週齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 400、800、1,200、1,600 mg/kg 飼料で添加した飼料（グアニジノ酢酸添加群）をそれぞれ 10 週間給与した（1 群 44 羽、8 反復）。

60 週齢の初日及びその 4 日後に、グアニジノ酢酸を投与していない雄鶏から採取した精液を用いて人工授精を 2 回行った。産卵率に加えその採取した卵について、受精率、孵化率及び胚死亡率を検査した。

なお、基礎飼料中には動物由来原料は含まれていなかった。

（2）統計解析

試験結果の解析は、GLM procedure of SAS を用いて、Tukey 検定を実施した。

（3）結果

孵化率について、800 及び 1,200 mg/kg 飼料グアニジノ酢酸添加群は、陰性対照群及び 1,600 mg/kg 飼料投与群に比べて有意に高かった（表 8 参照）。

ふ化した雄鶏の飼料効率について、800 及び 1,200 mg/kg 飼料グアニジノ酢酸添加は、陰性対照群及び 1,600mg/kg 飼料投与群に比べて有意に高かった（表 9 参照）。〔参照 9〕

表 8 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の給与効果

	陰性対照群	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)			
		400	600	800	1,200
産卵率 (%)	52.1	50.4	53.2	53.4	50.5
受精率 (%)	80.3	85.2	96.5	96.4	81.8
ふ化率 (%)	65.7 ^a	65.6 ^a	83.8 ^b	84.0 ^b	65.0 ^a

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

表 9 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸のふ化した雄鶏への効果

	陰性対照群	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)			
		400	600	800	1,200
増体重 (g)	2,866	2,790	2,816	2,780	2,949
飼料摂取量 (g)	4,615	4,194	4,052	4,102	4,724
飼料要求率	1.61 ^b	1.51 ^{ab}	1.44 ^a	1.48 ^a	1.61 ^b

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

3-1-9 鶏（種鶏、雄）

（１）方法

鶏（Ross308、雄、27 週齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 600、1,200、1,800 mg/kg 飼料で添加した飼料（グアニジノ酢酸添加群）をそれぞれ 26 週間給与した（1 群 5 羽、1 反復）。

2 週間の馴致期間後に、毎週精液を採取し精液性状を検査した。また、25 週目及び 26 週目の精液を人工受精に用いて検査した。

なお、基礎飼料中には動物由来原料は含まれていなかった。

（２）統計解析

試験結果の解析は、MIXED procedure of SAS 9.1 および GLM and GENMOD procedures of SAS 9.1,を用いて、Tukey 検定を実施した。

（３）結果

精液濃度について、800 及び 1,200 mg/kg 飼料グアニジノ酢酸添加群は、陰性対照群及び 1,600 mg/kg 飼料投与群に比べて有意に高かった。

ふ化した雄鶏の飼料効率について、800 及び 1,200 mg/kg 飼料グアニジノ酢酸添加は、陰性対照群及び 1,600mg/kg 飼料投与群に比べて有意に高かった。（表 10 参照）。

〔参照 10〕

表 10 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の給与効果

	陰性対照群	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)		
		600	1,200	1,800
精液量 (mL/羽)	0.41±0.02	0.40±0.02	0.45±0.02	0.36±0.02
精液濃度 (×10 ⁹ /mL)	3.07±0.17 ^b	2.51±0.18 ^c	3.64±0.17 ^a	2.82±0.17 ^{bc}
精子活性 (前進精子率、%)	65.73±1.86 ^b	64.72±2.04 ^b	73.45±1.93 ^a	72.01±1.94 ^a
精子生存率	87.12±1.29	86.99±1.33	90.17±1.30	89.89±1.30
異常率	10.53±2.56	13.40±2.72	6.25±2.64	9.30±2.65
精子貫通穴数 (個/卵)	20.92±8.11	34.40±6.54	50.93±7.81	37.73±7.55
受精率	83.50±2.77 ^b	92.86±2.51 ^a	96.23±2.73 ^a	91.51±2.73 ^a

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

3-2 効果を裏付ける試験 (豚)

3-2-1 豚

(1) 方法

豚 (交雑種、雄、28 日齢、平均体重約 7.5 kg) を用いて、基礎飼料 (陰性対照群)、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 600、900、1,200 mg/kg 飼料で添加した飼料 (グアニジノ酢酸添加群) をそれぞれ 42 日間給与した (1 群 3 頭、14 反復)。

なお、基礎飼料中には動物由来原料 (スキムミルク粉) は含まれている。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、GLM procedure of SAS software (v 9.0)を用いて、正規分布は proc UNIVARIATE で、線形効果と二次効果は proc REG を使用して実施した。

(3) 結果

最終体重及び日増体重について、1,200 mg/kg 飼料グアニジノ酢酸添加群は、陰性対照群に比べて有意に高かった。

(表 11 参照)。[参照 11]

表 11 豚用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の給与効果

	陰性対照群	グアニジノ酢酸添加群 (%)		
		600	900	1,200
体重 (33 日齢、kg)	8.51	8.3	8.3	8.04
最終体重 (kg)	25.5 ^a	26.0 ^{ab}	26.3 ^{ab}	27.3 ^b
日増体重 (g/日)	406.7 ^a	419.8 ^{ab}	426.3 ^{ab}	451.1 ^b
飼料摂取量 (g/日)	581.7	600.7	612.9	634.1
飼料要求率	1.46	1.44	1.42	1.43
へい死率 (%)	2.4	2.4	3.6	2.4

各項目内の異文字間に有意差あり

3-2-2 豚

(1) 方法

豚（交雑種、雄、30 日齢、平均体重約 7.17±0.03 kg）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 800、1,200 mg/kg 飼料で添加した飼料（グアニジノ酢酸添加群）をそれぞれ 150 日間給与した（1 群 6 頭、10 反復）。

なお、試験開始からの 30 日間は動物由来原料が含まれた。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、General linear model (GLM) with the fixed effect of treatment using SAS 9.4 を用いて、Tukey 検定を実施した。

(3) 結果

最終体重及び日増体重について、1,200 mg/kg 飼料グアニジノ酢酸添加群は、陰性対照群に比べて有意に高かった。

（表 12 参照）。〔参照 12〕

表 12 豚用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の給与効果

	陰性対照群	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)	
		600	1,200
増体重 (g/日)	588 ^c	600 ^b	625 ^a
飼料摂取量 (g/日)	1,659	1,670	1,662
飼料効率	0.353 ^c	0.361 ^b	0.374 ^a

各項目内の異文字間に有意差あり

4 残留性に関する事項

4-1 残留性試験（鶏）

4-1-1 鶏

（１）方法

ブロイラー（Ross 308、雄、1日齢、平均体重 44.5g）を用いて、基礎飼料（対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 0.06、0.15、0.30、0.60%（49.1、122.4、239.2、480.4mg/kg 体重/日）添加した飼料を 35 日間給与した（1 群 32 羽、8 反復）。なお、基礎飼料中には動物由来原料は含まれていなかった。

（２）結果

胸肉中、肝臓中のグアニジノ酢酸濃度は添加上限量である 0.06% 添加群では、対照群に対して有意差はなかった（表 13 参照）。〔参照 13〕

表 13 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の残留性

	対照群	グアニジノ酢酸添加群（%）			
		0.06	0.15	0.30	0.60
胸肉中グアニジノ酢酸濃度（mg/kg）	3.95 ^a	3.01 ^a	1.26 ^b	0.78 ^b	0.85 ^b
肝臓中グアニジノ酢酸濃度（mg/kg）	45.0 ^a	49.3 ^a	47.3 ^a	13.5 ^b	6.2 ^b

各項目内の異文字間に有意差あり（ $p < 0.05$ ）

4-1-2 うずら

（１）方法

うずら（ヨーロッパウズラ、雌、25 週齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 600、1,200、1,800、2,400 mg/kg 飼料で添加した飼料（グアニジノ酢酸添加群）をそれぞれ 4 週間給与した。（1 群 6 羽、8 反復）

最終投与後に卵を各群 24 個採取し、卵 3 個をまとめたものを 1 つの試料としてグアニジノ酢酸、クレアチン及びクレアチニン濃度を HPLC によって測定した。

（２）結果

卵中のグアニジノ酢酸、クレアチン及びクレアチニン濃度について、グアニジノ酢酸添加量に従い、増加した。（表 14 参照）。〔参照 14,15〕

表 14 うずら用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の残留性

試料	測定対象（ $\mu\text{g/g}$ ）	陰性対照群	グアニジノ酢酸添加群（mg/kg/飼料）			
			0.06	0.12	0.18	0.24
卵	グアニジノ酢酸	0	0.25	1.50	1.88	3.00
	クレアチン	19.63	24.88	24.13	25.38	26.75
	クレアチニン	2.25	2.88	2.63	2.88	3.25

4-1-3 鶏

(1) 方法

鶏（肉用種、雄、1日齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 600、1,500、3,000、6,000 mg/kg 飼料で添加した飼料（グアニジノ酢酸添加群）をそれぞれ 35 日間給与した。（1 群あたり 256 羽）

最終投与 1 日後に試料を採取し、測定した。

(2) 結果

卵中のグアニジノ酢酸、クレアチン及びクレアチニン濃度について、グアニジノ酢酸添加量の増加に従い、増加した。（表 5 参照）。[参照 6]

肝臓中のグアニジノ酢酸濃度について、3,000 mg/kg 飼料以上投与群は、グアニジノ酢酸濃度の上昇に伴い、減少した。

胸部筋肉中のグアニジノ酢酸濃度について、1,500 mg/kg 飼料以上投与群で、グアニジノ酢酸濃度の上昇に伴い、減少した。

組織及び血漿中のクレアチン及びクレアチニン濃度について、用量依存性に増加した。

血漿中ホモシステイン濃度について、最高用量の 6,000 mg/kg 飼料投与群は、他群と比べて有意な増加がみられた。

なお、血液学的検査を実施した結果、1,500 mg/kg 飼料以上投与群に MCV の有意な増加が見られた。原因は基礎飼料のビタミン B12、葉酸及びコリンの不足によると考察されている（表 15 参照）。[参照 14, 16]

表 15 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の残留性

試料	測定対象 ($\mu\text{g/g}$)	陰性対照群	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)			
			600	1,500	3,000	6,000
肝臓	グアニジノ酢酸	45.0 ^a	49.3 ^a	47.3 ^a	13.5 ^b	6.2 ^b
	クレアチン	67.3 ^c	90.0 ^{bc}	113.2 ^{ab}	114.2 ^{ab}	132.4 ^a
	クレアチニン	検出限界未 満	検出限界未 満	検出限界未 満	検出限界未 満	検出限界未 満
胸部筋 肉	グアニジノ酢酸	3.95 ^a	3.01 ^a	1.26 ^b	0.78 ^b	0.85 ^b
	クレアチン	4,741 ^c	5,157 ^b	5,678 ^a	5,863 ^a	5,920 ^a
	クレアチニン	11.8 ^c	12.3 ^c	15.3 ^{bc}	17.9 ^{ab}	21.4 ^a
血液	クレアチン (mg/dL)	1.2 ^c	1.1 ^c	1.3 ^{bc}	1.8 ^b	2.6 ^a
	クレアチニン ($\mu\text{mol/L}$)	3.6 ^b	3.7 ^{ab}	4.0 ^{ab}	4.2 ^a	4.2 ^a
	ホモシステイン ($\mu\text{mol/L}$)	42.9 ^b	39.1 ^b	42.9 ^b	39.6 ^b	56.1 ^a

各項目内の異文字間に有意差あり ($p < 0.05$)

4-1-4 鶏

(1) 方法

鶏（肉用種、雄、1日齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 600、1,200、3,000、6,000 mg/kg 飼料で添加した飼料（グアニジノ酢酸添加群）をそれぞれ 35 日間給与した。（1 添加群 17 羽、1200 mg/kg 飼料群のみ 16 羽）

最終給与後に、各添加群 10 羽から、血液及び組織を採取し、グアニジノ酢酸、クレアチン、クレアチニン濃度及びホモシステイン濃度を測定した。

(2) 結果

(ア) 血液

グアニジノ酢酸濃度について、グアニジノ酢酸の増加に伴い有意に増加した。

クレアチン濃度について、3,000 mg/kg 飼料以上の添加群は他群に比べて有意に高かった（表 16 参照）。

ホモシステイン濃度について、6,000mg/kg 添加群は他群に比べて有意に高かった。

(イ) 肝臓、腎臓及び胸部筋肉

肝臓及び胸部筋肉中のグアニジノ酢酸濃度について、6,000 mg/kg 飼料添加群は、陰性対照群と比べて有意に高かった。腎臓中について、600、3,000 及び 6,000 mg/kg 飼料添加群は、陰性対照群と比べて有意に高かった。

肝臓中のクレアチン濃度について、3,000 mg/kg 飼料以上添加群は、対照群と比較して有意に高かった。腎臓中について、1,200 mg/kg 飼料以上添加群は、対照群と比較して有意に高かった（表 17 参照）。[参照 14]

表 16 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の残留性

試料	測定対象 ($\mu\text{mol/L}$)	陰性対照群	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)			
			600	1,500	3,000	6,000
血液	グアニジノ酢酸	0.8 ^a	9.2 ^b	13.7 ^b	44.8 ^c	116.2 ^d
	クレアチン	118 ^a	134 ^{ab}	123 ^{abc}	183 ^d	281 ^e
	クレアチニン	4.1	3.8	3.1	4.2	4.4
	ホモシステイン	74 ^a	79 ^{ab}	58 ^{abc}	88 ^{abd}	131 ^e

各項目内の異文字間に有意差あり ($p \leq 0.01$)

表 17 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の残留性

試料	測定対象 ($\mu\text{g/g}$)	陰性対照群	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)			
			600	1,500	3,000	6,000
肝臓	グアニジノ酢酸	26	22	24	19	319 ^a
	クレアチン	97	76	106	406 ^a	893 ^a
	クレアチニン	0.6	0.6	0.6	1.1	2.6 ^a
	ホモシステイン	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1
腎臓	グアニジノ酢酸	27	50 ^a	45	139 ^a	253 ^a
	クレアチン	65	73	91 ^a	123 ^a	225 ^a
	クレアチニン	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0
	ホモシステイン	1.6	2.0	1.6	1.9	2.4 ^a
胸部筋肉	グアニジノ酢酸	6	5	5	4	12 ^a
	クレアチン	5,026	5,036	5,373	5,687	5,825
	クレアチニン	8.0	7.4	9.4	10.5	8.6
	ホモシステイン	2.8	2.6	2.6	3.1	4.4 ^a

a : 対象群と比較して有意差あり

4-1-5 鶏

(1) 方法

鶏（肉用種、雄、1日齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 314、628、942、1,256 mg/kg 飼料で添加した飼料、魚粉飼料（陽性対照群）をそれぞれ 35 日間給与した。（1 添加群 240 羽、陽性及び陰性対照群のみ 280 羽）

最終給与後に、被験物質給与群の各 18 羽、陽性及び陰性対照群の各 21 羽から筋肉を採取し、グアニジノ酢酸及びクレアチン濃度を測定した。

(2) 結果

筋肉中グアニジノ酢酸濃度について、全グアニジノ酢酸添加群は、陰性対照群と比較して有意に低かった。

筋肉中クレアチン濃度について、全グアニジノ酢酸添加群は、陰性対照群と比較して有意に高かった（表 18 参照）。[参照 14, 17]

表 18 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の残留性

試料	測定対象 ($\mu\text{g/g}$)	陰性対照群	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)				陽性対照群
			314	628	924	1,256	
筋肉	グアニジノ酢酸	7.59 ^a	1.30 ^b	1.78 ^b	1.21 ^b	0.91 ^b	1.41 ^b
	クレアチン	4,665 ^a	5,337 ^b	5,370 ^b	5,322 ^b	5,689 ^c	5,215 ^d

各項目内の異文字間に有意差あり ($p \leq 0.05$)

4-1-6 鶏

(1) 方法

鶏（肉用種、雄、1日齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 200、400、600 mg/kg 飼料で添加した飼料をそれぞれ 41 日間給与した。（1 添加群 780 羽）

最終給与後に、各添加群 30 羽から肝臓及び胸部筋肉を採取し、グアニジノ酢酸、クレアチン及びクレアチニン濃度を測定した。

(2) 結果

胸部筋肉中グアニジノ酢酸濃度について、全グアニジノ酢酸添加群は、陰性対照群と比較して有意に低かった。

胸部筋肉中クレアチン濃度について、400 mg/kg 飼料以上添加群は、陰性対照群と比較して有意に高かった（表 19 参照）。[参照 14]

表 19 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の残留性

試料	測定対象 ($\mu\text{g/g}$)	陰性対照群	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)		
			200	400	600
肝臓	グアニジノ酢酸	161.2 ^a	215.0 ^b	205.0 ^{ab}	222.5 ^b
	クレアチン	45.3	52.0	48.8	54.2
胸部筋肉	グアニジノ酢酸	23.7 ^a	13.7 ^b	6.2 ^c	3.7 ^c
	クレアチン	3,896 ^a	4,006 ^a	4,257 ^b	4,560 ^c

各項目内の異文字間に有意差あり ($p \leq 0.05$)

4-1-7 鶏

(1) 方法

鶏（肉用種、雄、1日齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 800 mg/kg 飼料で添加した飼料をそれぞれ 42 日間給与した。（1 添加群 96 羽）

最終給与後に、各群 24 羽から胸部筋肉を採取し、グアニジノ酢酸、クレアチン及びクレアチニン濃度を測定した。

(2) 結果

胸部筋肉中グアニジノ酢酸濃度について、グアニジノ酢酸の添加量増加に伴い低下傾向がみられた。

胸部筋肉中クレアチン濃度について、グアニジノ酢酸の添加量増加に伴い増加傾向がみられた。（表 20 参照）。[参照 14]

表 20 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の残留性

試料	測定対象 ($\mu\text{g/g}$)	陰性対照群	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)
			200
肝臓	グアニジノ酢酸	1.81	0.70
	クレアチン	4,481 ^a	5,045 ^b
	クレアチニン	6.7	8.0

各項目内の異文字間に有意差あり ($p \leq 0.05$)

4-1-8 鶏

(1) 方法

鶏（肉用種、雄、1日齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 785、1,178、7,850 mg/kg 飼料で添加した飼料をそれぞれ 42 日間給与した。（1 添加群の羽数不明）

最終給与後に、各群 5 羽から肝臓及び胸部筋肉を採取し、肝臓ではグアニジノ酢酸及びクレアチン、胸部筋肉ではグアニジノ酢酸、クレアチン及びクレアチニン濃度を測定した。

(2) 結果

肝臓中のグアニジノ酢酸及びクレアチン濃度について、7,850 mg/kg 飼料添加群は、陰性対照群と比較して有意に高かった。

胸部筋肉のクレアチン及びクレアチニン濃度について、全グアニジノ酢酸添加群は、陰性対照群と比較して有意に高かった。（表 21 参照）。[参照 14]

表 21 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の残留性

試料	測定対象 ($\mu\text{g/g}$)	陰性対照群	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)		
			785	1,178	7,850
肝臓	グアニジノ酢酸	22.7 ^a	14.6 ^a	12.4 ^a	103.9 ^b
	クレアチン	85.4 ^a	131.6 ^a	116.0 ^a	1,667.5 ^b
胸部筋肉	グアニジノ酢酸	1.5 ^{ab}	0.6 ^a	0.4 ^a	2.6 ^b
	クレアチン	4,051 ^a	5,109 ^b	5,192 ^b	5,667 ^b
	クレアチニン	14.9 ^a	23.6 ^b	24.4 ^b	34.0 ^c

各項目内の異文字間に有意差あり ($p \leq 0.05$)

4-1-9 鶏

(1) 方法

鶏（品種不明、性別不明、8日齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 600、1,200 mg/kg 飼料で添加した飼料をそれぞれ 14 日間給与した。

試験開始の前週には、アルギニン欠乏の基礎飼料を給与することで、各グアニジノ酢酸添加群は更に 2 群（アルギニンの添加：0 又は 1.6 g/kg 飼料）に分けた。陰性対照群は 3 群（アルギニンの添加：0、1.6 又は 3.2 g/kg 飼料）に分けた。（1 添加群 40 羽）

最終給与後に、各群 16 羽から血液を採取し、血清中グアニジノ酢酸添加、総クレアチン及びクレアチニン並びに血漿中ホモシステインを測定した。また、各群 8 羽から胸部筋肉を採取し、グアニジノ酢酸添加、クレアチン、クレアチニン、ホモシステイン及びホスホクレアチンを測定した。

（２）結果

（ア）血液

血清中グアニジノ酢酸及びクレアチン濃度について、アルギニン 1.6 g/kg 飼料添加群は、グアニジノ酢酸添加量に伴い増加した。

血清中クレアチニン濃度について、検出限界未満であった。

血漿中ホモシステイン濃度について、グアニジノ酢酸添加による影響はみられなかった（表 22 参照）。

（イ）肝臓、腎臓及び胸部筋肉

胸部筋肉中グアニジノ酢酸濃度について、多くの試料で検出限界未満であった。

胸部筋肉中総クレアチン及びホスホクレアチン濃度について、アルギニン添加飼料投与群内ではグアニジノ酢酸添加量に伴い増加した。

胸部筋肉中ホモシステイン濃度について、アルギニン欠乏飼料投与群内ではグアニジノ酢酸添加量に伴い増加したが、アルギニン添加飼料投与群内では、グアニジノ酢酸の両添加群の濃度は、陰性対照群と比較して低かった（表 23 参照）。[参照 14]

表 22 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の残留性

試料	測定対象 (μmol/L)	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)						
		0			600		1,200	
		10.1 a	11.6 a	13.1 a	10.1 a	11.6 a	10.1 a	11.5 a
胸部 筋肉	グアニジノ酢酸	0.39	0.48	0.91	3.85	4.91	9.84	13.95
	クレアチン	14.2	19.8	28.3	22.3	26.0	37.1	43.2
	ホモシステイン	155.4	178.2	134.4	151.6	170.5	150.5	157.7

表 23 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の残留性

試料	測定対象	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)						
		0			600		1,200	
		10.1 ^a	11.6 ^a	13.1 ^a	10.1 ^a	11.6 ^a	10.1 ^a	11.5 ^a
胸部 筋肉	総クレアチン (mg/g)	2.4	3.3	3.7	3.0	4.1	4.0	5.1
	クレアチニン (μg/g)	5.1	6.5	8.3	6.8	12.3	12.6	8.0
	ホモシステイン (nmol/kg)	75.3	108.6	119.0	114.3	78.3	82.7	70.9
	ホスホクレアチン (nmol/g 乾物)	37.6	61.7	74.4	56.1	82.4	91.0	108.7

4-1-10 鶏

(1) 方法

鶏（肉用種、雄、8日齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 600、1,200 mg/kg 飼料で添加した飼料、魚粉飼料（陽性対照群）をそれぞれ 39 日間給与した。（1 添加群 192 羽）

給与開始 26 日後に、各群 12 羽から胸部筋肉を採取し、グアニジノ酢酸、クレアチン、クレアチニン濃度及びホスホクレアチニン：アデノシン三リン酸 ATP の比を測定した。

(2) 結果

胸部筋肉中のグアニジノ酢酸濃度について、各グアニジノ酢酸添加群において低下した。

胸部筋肉中のクレアチン濃度について、各グアニジノ酢酸添加群において増加した。（表 24 参照）。[参照 14]

表 24 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の残留性

試料	測定対象 (μg/g)	陰性対照群	グアニジノ酢酸添加群 (mg/kg 飼料)		陽性対照群
			314	628	
筋肉	グアニジノ酢酸	8.2 ^a	2.2 ^b	1.4 ^b	5.9 ^a
	クレアチン	4,789 ^a	5,322 ^b	5,541 ^b	4,940 ^a
	クレアチニン	5.5	6.0	6.1	5.7
	ホスホクレアチン/ATP	2.4 ^a	2.7 ^{ab}	3.0 ^b	2.6 ^{ab}

各項目内の異文字間に有意差あり ($p \leq 0.05$)

4-1-11 鶏

(1) 方法

鶏（肉用種、雄、1日齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ

酢酸を 310、630、940、1,260 mg/kg 飼料で添加した飼料、基礎飼料にクレアチンを 400、800、1,200 mg/kg 飼料で添加した飼料、フィッシュミール飼料（陽性対照群）をそれぞれ 42 日間給与した。（1 添加群 240 羽）

最終給与後に、被験物質添加群は各 18 羽、対照群は各 21 羽から胸部筋肉を採取し、筋肉中グアニジノ酢酸及びクレアチン濃度を HPLC によって測定した（定量限界不明）。

（２）結果

胸部筋肉中グアニジノ酢酸濃度について、全グアニジノ酢酸添加群、クレアチン 800 mg/kg 飼料以上添加群及び陽性対照群は、陰性対照群より有意に低かった。一方で、これらの試験群のクレアチン濃度は、陰性対照群より有意に高かった（表 25 参照）。[参照 14]

表 25 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の残留性

被験物質	添加濃度 ^a (mg/kg 飼料)	胸部筋肉中濃度	
		グアニジノ酢酸	クレアチン
グアニジノ酢酸	314	1.30 ^b	5,337 ^{bc}
	628	1.78 ^b	5,370 ^{bc}
	942	1.21 ^b	5,322 ^{bc}
	1,256	0.91 ^b	5,689 ^d
クレアチン	400	6.96 ^c	4,713 ^e
	800	1.15 ^b	5,472 ^b
	1,200	0.00 ^b	5,893 ^f
陰性対象		7.59 ^c	4,665 ^e
陽性対象		1.41 ^b	5,215 ^c

a：グアニジノ酢酸又はクレアチンとしての添加濃度
異符号間に有意差あり（ $p < 0.05$ ）

4－2 残留性試験（豚）

4－2－1 豚

（１）方法

豚（交雑種、雄雌、33 日齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 600、900、1,200、4,500、6,000 mg/kg 飼料で添加した飼料（グアニジノ酢酸添加群）をそれぞれ 42 日間給与した。最終給与後に各群 12 頭から血液を採取し、グアニジノ酢酸、クレアチン、クレアチニン及びホモシステイン濃度を測定した。また、最終給与後に各群 6 頭から肝臓、腎臓及び筋肉を採取し、各濃度を測定した。

（２）結果

肝臓中グアニジノ酢酸濃度について、4,500 mg/kg 飼料以上のグアニジノ酢酸添加群は、1,200 mg/kg 飼料以下のグアニジノ酢酸添加群と比較して有意に高かった。

肝臓及び腎臓中クレアチン濃度について、4,500 mg/kg 飼料以上のグアニジノ酢酸添

加群は、陰性対照群と比較してそれぞれ約 5～15 倍の濃度であった。

腎臓中ホモシステイン濃度について、6,000 mg/kg 飼料グアニジノ酢酸添加群は、陰性対照群と比較して有意に高かった。

なお、剖検した結果、900 及び 6,000 mg/kg 飼料投与群の肝臓の絶対及び相対重量は、対照群と比較して有意に高かったが、6,000 mg/kg 飼料投与群の肝臓に病理組織学的異常所見はみられなかった。また、体重及び飼料摂取量を測定し、飼料効率を算出した結果、投与による影響はみられなかった。血液学的及び血液生化学的検査を実施した結果については、投与による悪影響はみられなかった（表 26 参照）。〔参照 14, 18〕

表 26 豚用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の残留性

試料	測定対象	給与量 (mg/kg 飼料)					
		0	600	900	1,200	4,500	6,000
血漿	グアニジノ酢酸 (μmol/L)	8.0 a	9.2 a	9.4 a	9.7 a	27.7 b	20.9 ab
	クレアチン (mg/dL)	1.8 a	2.5 a	2.5 a	2.2 a	3.9 b	4.3 b
	クレアチニン (μmol/L)	88.8	90.8	90.6	92.5	101.3	96.3
	ホモシステイン (μmol/L)	15.6 a	15.5 a	15.4 a	19.6 ab	20.2 ab	23.1 b
肝臓 (μg/g)	グアニジノ酢酸	2.2 a	2.0 a	3.5 a	5.7 a	117.2 a	293.7 b
	クレアチン	130 a	276 ab	395 ab	339 ab	1056 b	1940 c
	クレアチニン	10.3 a	14.5 a	12.2 a	13.0 a	44.8 b	17.0 a
	ホモシステイン	1.47	NA	NA	NA	NA	1.23
腎臓 (μg/g)	グアニジノ酢酸	154	131	133	89	134	135
	クレアチン	81 a	146 ab	215 b	137 ab	387 c	378 c
	クレアチニン	73	63	67	58	116	56
	ホモシステイン	1.37 a	1.69 a	1.66 a	2.28 ab	1.93 a	2.96 b
筋肉 (μg/g)	グアニジノ酢酸	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	2.24	1.24
	クレアチン	5759	5704	5555	5831	6019	5938
	クレアチニン	41.0 ab	78.7 c	40.5 a	45.8 ab	80.5 c	54.0 b
	ホモシステイン	0.37	NA	NA	NA	NA	0.57

異文字間に有意差あり

NA：測定せず

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）

（1）方法

ラット（CrI:CD(SD)IGS BR、雌、約 8 週齢）に 300、2,000mg/kg 体重のグアニジノ酢酸を単回強制経口投与した（1 群 3 匹、各用量 2 群）。投与後、0～0.5、0.5～1、1～2、2～4、4～6 時間の各時間に 1 回ずつ観察し、その後 14 日目まで、少なくとも 1 日 1 回観察した。投与 14 日後に、剖検した。

（2）結果

死亡例はなく、臨床観察及び剖検において異常は認められなかった。

以上の結果から、グアニジノ酢酸の LD₅₀ は 2,000mg/kg 体重より大きいものと推測された。〔参照 19〕

5-1-1-2 反復投与毒性試験（短期、ラット）（5-（1）-ア（イ））

（1）方法

SPF ラット（F344、雌雄、約 7 週齢）に、飼料にグアニジノ酢酸を 0、0.05、0.15、0.50、1.50、5.00% で添加し、28 日間連続給与した（1 群雌雄各 5 匹、各用量 1 群）。0、5.00% 添加群ではサテライト群を設定し、サテライト群については試験終了後、グアニジノ酢酸非添加飼料でさらに 14 日間飼育した。体重当たりのグアニジノ酢酸摂取量は、添加群でそれぞれ、雄では 45、135、449、1,246、4,390mg/kg 体重、雌では 46、138、455、1,259、3,864mg/kg 体重であった。サテライト群は雄では 4,626mg/kg 体重、雌では 3,826mg/kg 体重であった。

（2）結果

死亡例はなく、臨床観察では 5.00% 添加群の雌で健康状態の悪化の兆候が見られたが、サテライト群における回復期（41 日目）には異常は認められなかった。

体重は、5.00% 添加群の雌で、対照群と比較して有意に減少し、回復期においても、有意に減少したままであった。しかし、増体量は回復期（28 日目から 35 日目、35 日目から 43 日目）において、増加傾向を示した。飼料摂取量についても、有意に減少したが、回復期においては、有意差はなかった。

また、剖検によって、5.00% 添加群の雌で、尿管と膀胱において、結石が観察された。組織病理学的検査では、グアニジノ酢酸投与に関連した異常は認められなかった。

血液学的検査、血液生化学的検査において、有意な変化が見られた項目を表 6 に示す。このうち、血漿中のトリグリセリドとホモシステインの増加は特に顕著であり、グアニジノ酢酸の既知の生化学的な特徴とも一致している。コレステロール値の変化も、脂質代謝の変化に付随したものと考えられるため、毒性の影響というよりも、代謝の変化によると考えられる。

一方、雌の健康状態、体重と飼料摂取の減少、上記以外の血液学的、血液生化学的検査の測定値、尿結石、雄の血漿中のアルブミン及び γ -GTP は、有害事象と考えられる。

以上の結果から、グアニジノ酢酸の NOAEL は 1.5% (1250 mg/kg 体重)、NOEL は雄 0.15%、雌 1.5%と考えられた (表 27、28 参照)。〔参照 20〕

表 27 ラットを用いた反復毒性試験の結果 (試験開始後 29 日目)

		対照群	グアニジノ酢酸添加群 (%)				
			0.05	0.15	0.50	1.50	5.00
赤血球 (1/pL)	雄	8.25 (0.22)	8.06 (0.17)	8.25 (0.21)	8.37 (0.14)	8.32 (0.34)	8.08 (0.26)
	雌	7.70 (0.17)	7.67 (0.15)	7.80 (0.16)	7.86 (0.25)	7.97 (0.17)	7.98 (0.25)
血小板 (1/nL)	雄	670.80 (51.48)	658.60 (55.98)	655.20 (28.29)	684.20 (48.09)	620.40 (101.22)	649.80 (40.02)
	雌	543.20 (59.94)	632.00 (27.76)	601.60 (139.36)	611.00 (58.11)	667.00 (87.15)	601.60 (196.83)
単球 (%)	雄	1.40 (0.55)	1.80 (0.84)	1.20 (0.84)	1.60 (0.55)	1.80 (0.84)	1.40 (0.55)
	雌	2.00 (1.22)	2.60 (1.67)	2.00 (1.00)	2.40 (0.89)	3.00 (1.58)	1.80 (1.10)
リンパ球 (1/nL)	雄	6.19 (0.72)	6.81 (1.03)	6.37 (0.42)	6.56 (0.87)	5.38 (0.31)	6.00 (0.85)
	雌	4.68 (0.44)	4.85 (0.99)	4.94 (1.08)	5.59 (0.94)	5.24 (0.51)	4.80 (1.30)
平均赤血球 容積 (fL)	雄	55.12 (0.85)	55.48 (0.75)	54.98 (0.68)	55.10 (0.81)	55.00 (0.82)	56.82 (0.89)
	雌	55.68 (0.28)	55.96 (0.30)	55.80 (0.27)	55.68 (0.19)	55.42 (0.34)	54.62* (0.53)
ホモシステ イン (μmol/L)	雄	8.92 (0.58)	7.46 (0.74)	9.28 (1.49)	9.66 (1.56)	14.70* (2.26)	29.24* (2.29)
	雌	7.86 (0.49)	8.30 (1.27)	7.70 (1.11)	9.52 (0.79)	10.30 (1.27)	25.60* (9.74)
アルブミン (g/L)	雄	42.94 (0.45)	42.30 (0.79)	43.34 (0.90)	43.06 (0.39)	43.58 (1.29)	45.52* (0.97)
	雌	42.46 (0.84)	42.60 (0.40)	42.90 (1.40)	42.72 (1.10)	42.94 (0.61)	41.88 (2.10)
コレステロ ール (mmol/L)	雄	1.46 (0.09)	1.34 (0.15)	1.32 (0.10)	1.07* (0.10)	1.02* (0.10)	1.21* (0.12)
	雌	1.70 (0.20)	1.70 (0.10)	1.68 (0.17)	1.53 (0.15)	1.81 (0.21)	2.12* (0.21)

		対照群	ゲアニジノ酢酸添加群 (%)				
			0.05	0.15	0.50	1.50	5.00
アルカリホ スファター ゼ (U/L)	雄	220.40 (11.74)	230.00 (31.57)	232.60 (25.16)	298.80 (27.68)	216.40 (24.37)	235.80 (19.72)
	雌	191.60 (13.90)	191.40 (9.50)	190.60 (12.70)	212.40 (12.82)	205.80 (16.05)	181.00 (25.41)
γ -GTP (U/L)	雄	1.46 (0.47)	1.46 (0.44)	1.94 (0.75)	2.04 (0.82)	1.70 (0.46)	3.52* (1.27)
	雌	1.38 (0.41)	1.80 (0.44)	1.92 (0.38)	1.64 (0.76)	1.24 (0.68)	2.56 (0.28)
トリグリセ リド (mmol/L)	雄	0.54 (0.14)	0.55 (0.17)	0.68 (0.25)	0.63 (0.10)	0.57 (0.10)	0.77 (0.25)
	雌	0.28 (0.06)	0.30 (0.07)	0.30 (0.07)	0.33 (0.07)	0.41 (0.09)	0.63* (0.07)
ナトリウム (mmol/L)	雄	141.80 (1.10)	142.00 (0.71)	142.20 (1.10)	142.20 (0.84)	141.00 (1.22)	139.80 (0.84)
	雌	142.20 (0.84)	142.60 (0.55)	142.80 (0.84)	142.00 (0.71)	142.00 (1.22)	140.00* (0.71)
カリウム (mmol/L)	雄	4.16 (0.25)	4.02 (0.40)	4.36 (0.43)	4.08 (0.42)	4.48 (0.31)	4.26 (0.38)
	雌	3.62 (0.30)	3.68 (0.29)	3.64 (0.31)	3.80 (0.21)	3.76 (0.38)	3.74 (0.29)
尿素 (mmol/L)	雄	18.95 (1.47)	18.49 (1.03)	17.61 (1.19)	17.75 (1.66)	18.82 (2.57)	17.22 (0.38)
	雌	16.83 (1.67)	16.86 (1.30)	18.09 (0.67)	18.14 (0.99)	18.69 (1.51)	30.18* (8.32)

各値は平均値、() は標準偏差

* : 対照群との比較で有意差あり (p<0.05)

表 28 ラットを用いた反復毒性試験の結果 (試験開始後 44 日目、サテライト群)

		対照群	ゲアニジノ酢酸 5.00% 添加群
赤血球数 (1/pL)	雄	8.36 (0.11)	8.31 (0.09) * ¹
	雌	7.97 (0.10)	7.58* (0.32)
血小板数 (1/nL)	雄	581.60 (33.28)	520.75 (123.78) * ¹
	雌	592.80 (52.44)	696.60* (33.75)
単球 (%)	雄	1.20 (0.84)	2.20* (0.45)
	雌	2.60 (1.67)	2.00 (0.71)

		対照群	グアニジノ酢酸 5.00%添加群
リンパ球 (1/nL)	雄	8.04 (0.36)	7.08* (0.41) * ¹
	雌	5.02 (0.78)	5.68 (0.56)
平均赤血球容積 (fL)	雄	54.48 (1.19)	54.98 (0.64) * ¹
	雌	55.88 (0.48)	56.72 (0.66)
ホモシステイン (μmol/L)	雄	8.74 (1.33)	7.70 (1.17)
	雌	7.58 (1.05)	5.24* (0.59)
アルブミン (g/L)	雄	35.36 (15.53)	41.60 (3.17) * ¹
	雌	44.78 (0.69)	44.18 (0.65)
コレステロール (mmol/L)	雄	1.80 (0.07)	1.93 (0.18) * ¹
	雌	2.02 (0.21)	2.14 (0.24)
アルカリホスファターゼ (U/L)	雄	176.80 (12.91)	176.60 (20.61)
	雌	153.60 (5.37)	182.40* (18.96)
γ-GTP (U/L)	雄	0.98 (0.55)	1.16 (0.26)
	雌	0.94 (0.25)	1.58* (0.54)
トリグリセリド (mmol/L)	雄	0.79 (0.21)	0.83 (0.16)
	雌	0.31 (0.05)	0.35 (0.05)
ナトリウム (mmol/L)	雄	141.20 (0.84)	141.40 (1.52)
	雌	141.60 (1.14)	140.60 (0.89)
カリウム (mmol/L)	雄	3.46 (0.15)	3.58 (0.22)
	雌	3.34 (0.18)	3.76* (0.27)
尿素 (mmol/L)	雄	18.07 (1.32)	17.02 (1.64) * ¹
	雌	18.51 (1.35)	19.44 (1.32)

各値は平均値、() は標準偏差

* : 対照群との比較で有意差あり (p<0.05)

*¹ : 試験動物数は 4 匹

5-1-1-3 反復投与毒性試験（短期、ラット）

（1）方法

SPF ラット (F344/DuCrI、雌雄、7 週齢) に、飼料にグアニジノ酢酸を 0、0.05、0.10、0.30、1.00、5.00%添加し、90 日間連続給与した (1 群雌雄各 10 匹、各用量 1 群)。0、5.00%添加群ではサテライト群を設定し、試験終了後、グアニジノ酢酸非添加飼料でさらに 28 日間飼育した。体重当たりのグアニジノ酢酸摂取量は、添加群でそれぞれ、雄では 34、66、210、685、3,468mg/kg 体重、雌では 39、74、234、754、3,448mg/kg 体重であった。サテライト群は雄では 3,544mg/kg 体重、雌では 3,523mg/kg 体重であった。また、臓器や血漿へのグアニジノ酢酸及びその代謝物の分布、血管病変の有無の確認のための詳細な組織学的試験のために、それぞれ上記と同様にグアニジノ酢酸を飼料に添加した群 (それぞれ 1 群雌雄各 4 匹) を設定した (追加群)。

(2) 結果

追加群の 5.00% 添加群の雌 1 匹が 43 日後に死亡した。死亡後の試験で胃潰瘍が見られたが、自己融解のため、それ以上の検査は困難であった。グアニジノ酢酸が死因であった可能性は低いと考えられた。

最も影響を受けた臓器は泌尿器系であり、5.00% 添加群において、結晶性の物質が尿とともに排泄され、泌尿生殖口に痂皮様の沈着物を形成した。剖検により、炎症及びしばしば結石を伴う上皮の増殖を腎盂、尿管、膀胱に認めたが、腎皮質には形態学的な変化は見られなかった。泌尿器系への影響は 5.00% 添加群のみで見られ、雄よりも雌でより高頻度に見られた。腎結石はほとんど未変化体のグアニジノ酢酸を含んでいるため、過量のグアニジノ酢酸の未変化体が腎より排泄されることによる負担が泌尿器系の障害の主な原因であると考えられる。

血液学的検査、血液生化学的検査において、有意な変化が見られた項目を表 7-2 に示す。5.00% 添加群において、 γ -GTP、ALT の増加が見られたが、その他に肝障害を示す所見は見られなかった。1.00、5.00% 添加群において、血漿中ホモシステイン値が有意に上昇した ($p < 0.05$)。ホモシステインはグアニジノ酢酸の代謝の過程で生成するものである。

コレステロール及びトリグリセリドの減少は代謝順応と考えられる。

以上の結果から、グアニジノ酢酸の NOAEL は 1% (雄 690 mg/kg 体重、雌 750 mg/kg 体重)、NOEL は雄 0.1%、雌 0.3% と考えられた (表 29、30、31 参照)。[参照 21]

表 29 ラットを用いた反復毒性試験の結果 (試験開始後 83 日目)

		対照群	グ ア ニ ジ ノ 酢 酸 添 加 群 (%)				
			0.05	0.10	0.30	1.00	5.00
試験動物数 (匹)		10	10	10	10	10	10
ホモシステイン ($\mu\text{mol/L}$)	雄	17.3 (9.31)	14.8 (10.25)	15.6 (8.97)	17.0 (9.36)	31.6 (13.34)	61.7 (31.93)
	雌	8.0 (0.71)	8.4 (1.23)	8.2 (0.64)	10.0 (1.06)	19.6 (1.63)	33.0 (3.30)

表 30 ラットを用いた反復毒性試験の結果 (雄 91 日目、雌 92 日目)

		対照群	グ ア ニ ジ ノ 酢 酸 添 加 群 (%)				
			0.05	0.10	0.30	1.00	5.00
平均赤血球 血色素量 (pg)	雄	16.6 (0.21)	16.6 (0.19)	16.6 (0.26)	16.5 (0.11)	16.5 (0.20)	17.3* (0.39)
	雌	18.0 (0.16)	18.1 (0.10)	18.1 (0.17)	18.0 (0.17)	18.2* (0.10)	18.2* (0.17)
平均赤血球 容積 (fL)	雄	47.4 (0.90)	47.8 (0.45)	47.7 (0.93)	47.2 (0.47)	46.5 (0.63)	48.9* (0.94)

		対照群	グ ア ニ ジ ノ 酢 酸 添 加 群 (%)				
			0.05	0.10	0.30	1.00	5.00
平均赤血球容積 (fL)	雌	51.6 (0.74)	52.0 (0.68)	52.1 (0.58)	51.5 (0.59)	51.9 (0.69)	52.1 (0.50)
ナトリウム (mmol/L)	雄	141 (0.79)	141 (0.85)	141 (1.03)	141 (1.03)	141 (0.79)	138* (1.05)
	雌	142 (4.16)	140 (3.84)	142 (4.59)	140 (2.95)	141 (4.48)	139 (3.63)
カリウム (mmol/L)	雄	2.92 (0.19)	3.1 (0.22)	3.21 (0.16)	2.98 (0.24)	3.08 (0.18)	3.46* (0.43)
	雌	3.11 (0.19)	3.58 (0.61)	3.33 (0.59)	3.3 (0.43)	3.44 (0.37)	3.51 (0.21)
カルシウム (mmol/L)	雄	2.85 (0.04)	2.865 (0.03)	2.86 (0.05)	2.855 (0.03)	2.815 (0.03)	2.83 (0.08)
	雌	2.86 (0.06)	2.84 (0.09)	2.83 (0.11)	2.80 (0.06)	2.80 (0.08)	2.73* (0.06)
トリグリセリド (mmol/L)	雄	2.89 (0.58)	2.93 (0.56)	2.72 (0.71)	2.19 (0.39)	2.00* (0.23)	1.82* (0.43)
	雌	0.70 (0.20)	0.68 (0.18)	0.72 (0.12)	0.65 (0.18)	0.65 (0.16)	0.67 (0.13)
コレステロール (mmol/L)	雄	2.05 (0.23)	2.01 (0.21)	1.92 (0.21)	1.62* (0.17)	1.45* (0.07)	1.49* (0.10)
	雌	2.63 (0.30)	2.50 (0.21)	2.48 (0.16)	2.45 (0.18)	2.24* (0.18)	2.37 (0.22)
ALP* ² (U/L)	雄	107 (5.7)	109 (11.4)	106 (10.5)	102 (8.2)	101 (9.3)	101 (6.2)
	雌	68 (5.7)	69 (10.1)	70 (6.3)	67 (6.1)	70 (10.2)	98* (15.6)
ALT* ³ (U/L)	雄	69.9 (8.86)	67.8 (7.05)	70.6 (7.01)	74.0 (5.75)	78.6 (5.93)	72.4 (4.09)
	雌	58.5 (4.90)	61.5 (7.21)	62.8 (9.31)	64.4 (8.93)	65.6 (7.55)	79.6* (7.53)
γ -GTP* ⁴ (U/L)	雄	-0.07 (0.30)	0.01 (0.03)	0.11 (0.35)	0.06 (0.10)	0.00 (0.00)	0.85 (1.18)
	雌	0.49 (0.30)	0.92 (0.74)	0.63 (0.29)	0.87 (0.35)	0.79 (0.48)	2.31* (0.69)
尿素 (mmol/L)	雄	7.99 (0.82)	7.84 (0.62)	7.79 (0.58)	7.59 (0.60)	7.97 (0.93)	8.89 (1.14)

		対照群	グ ア ニ ジ ノ 酢 酸 添 加 群 (%)				
			0.05	0.10	0.30	1.00	5.00
尿素 (mmol/L)	雌	6.70 (0.81)	6.93 (0.59)	6.67 (0.72)	6.62 (0.47)	7.18 (0.61)	11.10* (2.65)
ホモシステ イン (μmol/L)	雄	8.25 (0.87)	8.42 (0.76)	8.24 (0.87)	9.07 (0.86)	11.47* (0.94)	49.44* (6.43)
	雌	7.2 (0.92)	6.756* ¹ (0.88)	5.95* (1.08)	7.06 (0.62)	9.64* (1.32)	25.54* (3.37)

表 31 ラットを用いた反復毒性試験の結果（試験開始後、119 日目サテライト群）

		サ テ ラ イ ト 群	
		対 照 群	5.00%グアニジノ酢酸添加群
試験動物数（匹）		10	10
赤血球数（1/pL）	雄	9.56 (0.11)	9.51 (0.17)
	雌	9.25 (0.15)	8.88* (0.21)
ヘモグロビン（g/L）	雄	157 (2.35)	159 (2.85)
	雌	164 (2.67)	160* (3.79)
平均赤血球血色素量 (pg)	雄	16.4 (0.23)	16.7* (0.26)
	雌	17.7 (0.15)	18.0* (0.10)
平均赤血球容積 (fL)	雄	46.7 (0.50)	47.1 (0.56)
	雌	49.9 (0.42)	51.4* (0.44)
平均赤血球血色素濃度 (g/L)	雄	351 (3.03)	355* (3.68)
	雌	356 (2.42)	350* (3.41)
好酸球（1/nL）	雄	0.19 (0.12)	0.10 (0.10)
	雌	0.06 (0.05)	0.11* (0.06)
カリウム (mmol/L)	雄	3.39 (0.09)	3.44 (0.16)
	雌	3.15 (0.18)	3.35* (0.19)
カルシウム (mmol/L)	雄	2.825 (0.04)	2.82 (0.03)
	雌	2.80 (0.05)	2.74 (0.04) *
コレステロール (mmol/L)	雄	2.12 (0.22)	2.06 (0.09)
	雌	3.20 (0.39)	2.57 (0.29) *
アルカリホスファター ゼ（U/L）	雄	74 (8.2)	72 (3.6)
	雌	52 (7.0)	62 (6.7) *
尿素（mmol/L）	雄	5.54 (0.36)	5.21* (0.35)
	雌	5.89 (0.56)	5.85 (0.56)
総タンパク質 (g/L)	雄	74.3 (2.87)	73.8 (1.99)
	雌	74.2 (2.62)	68.7* (2.06)

		サ テ ラ イ ト 群	
		対 照 群	5.00%グアニジノ酢酸添加群
アルブミン (g/L)	雄	44.7 (0.67)	45.0 (1.15)
	雌	47.5 (1.27)	44.4* (0.84)
ホモシステイン (μmol/L)	雄	9.56 (0.78)	8.93 (0.81)
	雌	9.41 (1.09)	7.93* (0.93)

各値は平均値、() は標準偏差

*：対照群との比較で有意差あり (p<0.05)

*1：試験動物数は 9 匹

*2 ALP：アルカリホスファターゼ

*3 ALT：アラニンアミノトランスフェラーゼ

*4 γ-GTP：γ-グルタミルトランスペプチダーゼ

5-1-2 特殊毒性試験

5-1-2-1 遺伝毒性試験

グアニジノ酢酸の変異原性試験の結果を表 32 に示した。結果はいずれも陰性であった（表 32 参照）〔参照 22、23、24〕。

表 32 変異原性試験結果

分類	試験	対象	用量	結果
in vitro	復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA97a、TA98、 TA100、TA102、 TA1535	62、185、556、1,667、 5,000μg/plate (±S9)	陰性
	染色体異常試験	ヒト培養末梢血リンパ球	0.04、0.13、0.39、1.17mg/mL (+S9) 3h 培養 0.04、0.13、0.39、1.17mg/mL (-S9) 3、20h 培養	陰性
	遺伝子突然変異試験	チャイニーズハムスター由来 V79 細胞	37.5、75、150、300、600、 1200μg/mL (±S9) 4h 培養 37.5、75、150、300、600、 1200μg/mL (-S9) 4、24h 培養	陰性

5-1-2-2 局所毒性試験（皮膚刺激性）（ウサギ）

（1）方法

ウサギ（New Zealand White、雌、体重 1.9～2.0kg）を 3 匹用意し、5 日間又は 12 日間予備飼育した。グアニジノ酢酸約 0.5g を脱イオン水 1.0mL で溶解して皮膚に塗

布し（3 か所）、ガーゼパッチで被覆し、それぞれ 3 分、1 時間、4 時間後に取り除いた。ガーゼパッチ除去直後（1 匹）、除去後 1、24、48、72 時間後（3 匹）の様子を観察した。

（２）結果

皮膚刺激性の症状及び全身毒性の兆候は見られなかった。

以上から、局所毒性試験（皮膚刺激性）の結果は陰性であった。〔参照 25〕

5－1－2－3 局所毒性試験（眼刺激性）（ウサギ）

（１）方法

ウサギ（New Zealand White、雌、体重 2.3～2.7kg）を 3 匹用意し、7 日間又は 14 日間予備飼育した。グアニジノ酢酸 0.1mL（42～45mg）を右眼に点眼し、1、24、48、72 時間後の様子を観察した。

（２）結果

眼刺激性の症状及び全身毒性の兆候は見られなかった。

以上から、局所毒性試験（眼刺激性）の結果は陰性であった。〔参照 26〕

5－1－2－4 生殖毒性試験（鶏）

（１）方法

鶏（肉用種、雄、29 週齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 600、900、1,200、1,800 mg/kg 飼料で添加した飼料（グアニジノ酢酸添加群）をそれぞれ 26 週間給与した。（1 添加群 29 羽）

給与 24 週後まで毎週精液を採取し、精液濃度、精子数、前進運動精子率及び精子細胞膜機能を調べた。投与期間の最終 2 週間に採取した精液は、鶏（肉用種、54 週齢）に授精し、精子侵入性及び受精率の検査に用いた。

（２）結果

精液濃度、精子数及び前進運動精子率について、1,200 mg/kg 飼料添加群は陰性対照群より有意に高かった。

前進運動精子率について、600 mg/kg 飼料添加群は陰性対照群と同等であり、1,800 mg/kg 飼料添加群では有意に高かった。

精子膜細胞機能及び精子侵入性について、グアニジノ酢酸添加による上昇傾向がみられた。

受精率について、グアニジノ酢酸添加群は陰性対照群より有意に高かった。〔参照 14〕

5－1－2－5 生殖毒性試験（鶏）（抄録 5-1-2-5）

（１）方法

うずら（ヨーロッパウズラ、雄雌、25 週齢）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 600、1,200、1,800、2,400 mg/kg 飼料で添加した飼料（グアニジノ酢酸添加群）をそれぞれ 4 週間給与した。（1 添加群あたり雄 16 羽、雌 32 羽）

給与期間中、飼料摂取量、産卵数及び産卵率を調べ、毎週 3 日間連続で卵重量を調べた。また、各群 64 個の受精能を有する卵について、卵黄膜中精子数並びに各群の卵 196 個について、孵化率、受精能を有する割合及び受精能を有する卵の孵化率を調べた。

29 週齢で採取した卵を孵化させ、各群 80 羽ずつ 35 日齢までグアニジノ酢酸無添加の飼料を給与し、体重及び飼料摂取量を調べた。

(2) 結果

親動物の飼料摂取量、産卵率及び卵重量、卵黄膜中精子数について、グアニジノ酢酸添加による影響はみられなかった。

孵化率、受精能を有する卵の割合及びその孵化率については、グアニジノ酢酸添加による増加がみられた。

初生ひなの体重について、グアニジノ酢酸添加による影響はみられなかったが、その後の体重増加量が上昇した。[参照 14]

5-1-3 生体内動態に関する試験

5-1-3-1 ラット

【試験①】

(1) 方法

ラット (Wistar 系、雄、6 週齢) を用いて、基礎飼料、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 2.5、5.0、7.5、10 g/kg 飼料で添加した飼料をそれぞれ 10 日間給与した。(1 添加群あたり 5 又は 6 匹)

(2) 結果

血漿中ホモシステイン濃度について、5.0、10.0 g/kg 飼料添加群は、基礎飼料群と比較して、それぞれ 255 及び 421%に増加した。

肝臓中 S-アデノシルメチオニン濃度について、グアニジノ酢酸の用量依存的に減少したが、S-アデノシルホモシステイン及びホモシステイン濃度は、グアニジノ酢酸の用量依存的に増加した。結果として、肝臓の S-アデノシルメチオニン/S-アデノシルホモシステイン比は、グアニジノ酢酸添加によって低下した。

肝臓中シスタチオニン B 合成酵素活性は、グアニジノ酢酸の用量依存的に低下した。

【試験②】

(1) 方法

ラット (Wistar 系、雄、6 週齢) を用いて、基礎飼料、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 5.0 g/kg 飼料で添加した飼料をそれぞれ 1、5 又は 10 日間給与した。1 及び 5 日給与群には、基礎飼料をそれぞれ 9 及び 5 日間給与した。(1 期間群あたり 6 匹)

(2) 結果

血漿中ホモシステイン濃度について、1 日間給与群が基礎飼料群と比較して有意に増加しており、平衡状態の濃度に達していた。

肝臓中 S-アデノシルメチオニン濃度及びシスタチオニン B 合成酵素活性について、1 日間給与群が基礎飼料群と比較して有意に低下しており、5 日間以上給与群と同様の低

値であった。

肝臓中 S-アデノシルホモシステイン濃度について、1 日間給与群の濃度が基礎飼料群と比較して有意に増加していたが、5 日間以上給与群の濃度は平衡状態であった。

肝臓中 S-アデノシルメチオニン/ S-アデノシルホモシステイン比について、1 日間給与群が基礎飼料群と比較して有意に低かったが、5 日間以上給与群の方がより低い値であった。

肝臓中ホモシステイン濃度は、5 日間以上給与群の濃度が対照群と比較して有意に高く、平衡状態の濃度であった。[参照 14]

5-1-3-2 鶏

(1) 方法

鶏（肉用種、雄、34 日齢、結腸にカニューレ装着）を用いて、基礎飼料、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 0.6、6.0 g/kg 飼料で添加した飼料をそれぞれ 8 日間給与した。（1 添加群あたり 8 羽）

(2) 結果

・排出について

基礎飼料群について、尿中のグアニジノ酢酸、クレアチン及びクレアチニン濃度は、糞中濃度より高かった。

尿及び糞中のグアニジノ酢酸、クレアチン及びクレアチニン濃度について、6 g/kg 飼料添加群は、基礎飼料群及び 0.6 g/kg 飼料添加群と比べて有意に高かった。（表 33）

・吸収及び体内利用について

吸収率はグアニジノ酢酸の添加量に影響されなかった。

尿及び糞中グアニジノ酢酸量から算出した体内利用率は、0.6 及び 6.0 g/kg 飼料添加群でそれぞれ 83.28 及び 71.34%であった。この差は、グアニジノ酢酸の尿排泄の増加によるものであった。

尿及び糞中グアニジノ酢酸、クレアチン及びクレアチニン量から算出した体内利用率は、0.6 及び 6.0 g/kg 飼料添加群でそれぞれ 76.21 及び 45.6%であった。10 倍のグアニジノ酢酸添加量の場合に体内利用率が大きく低下したことは、鶏がグアニジノ酢酸のクレアチン及びクレアチニンへの変換の増加による供給過剰を和らげ、これらの代謝物を尿に排泄する有効な機構を有していることを示唆している（表 34 参照）。[参照 14, 16]

表 33 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の生体内動態

試料	測定対象 (mg/kg ^{0.75} /日)	グアニジノ酢酸投与量 (g/kg 飼料)		
		0 (0) ^a	0.6 (37.68) ^a	6.0 (359.2) ^a
尿	グアニジノ酢酸	3.374 ^b	9.549 ^b	102.624 ^c
	クレアチン	1.072 ^b	2.141 ^b	29.430 ^c
	クレアチニン	3.395 ^b	4.789 ^b	66.965 ^c
糞	グアニジノ酢酸	0.098 ^b	0.334 ^b	4.217 ^c
	クレアチン	0.169 ^b	0.266 ^b	0.826 ^c
	クレアチニン	0	0	0

異符号間に有意差あり、^a：基礎体重当たりのグアニジノ酢酸摂取量 (mg/kg^{0.75}/日)

表 34 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の生体内動態

	グアニジノ酢酸投与量 (g/kg 飼料)	
	0.6	6.0
吸収率 ^a	99.4	98.8
グアニジノ酢酸量からのみ算出した体内利用率 ^b	83.28	71.34
グアニジノ酢酸、クレアチン及びクレアチニン量から算出した体内利用率 ^c	76.21	45.6

^a：吸収率＝(グアニジノ酢酸摂取量－投与後の糞中グアニジノ酢酸量＋内因性糞中グアニジノ酢酸量)÷グアニジノ酢酸摂取量×100

^b：体内利用率＝(グアニジノ酢酸摂取量－投与後の糞中グアニジノ酢酸量－投与後の尿中グアニジノ酢酸量＋内因性糞中グアニジノ酢酸量＋内因性尿中グアニジノ酢酸量)÷グアニジノ酢酸摂取量×100

^c：上記 ^b の算出式の分子に、投与後の糞中及び尿中クレアチン及びクレアチニン量をグアニジノ酢酸量に換算した量を加え、内因性糞及び尿中クレアチン及びクレアチニン量をグアニジノ酢酸に換算した量を加えたものをグアニジノ酢酸摂取量で除した。

5－1－3－3 鶏

(1) 方法

鶏（肉用種、雄、256 日齢）を用いて、基礎飼料、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 0.6、6.0 g/kg 飼料で添加した飼料をそれぞれ 35 日間給与した。（1 添加群あたり 256 羽）

(2) 結果

血漿中クレアチン、クレアチニン及びホモシステイン濃度について、6.0 g/kg 飼料添加群は、0.6 g/kg 飼料添加群と比較して有意に増加した。これらの濃度変化は、肝臓及び胸部筋肉でみられた変化を反映していた。（表 35 参照）。[参照 14, 16]

表 35 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の生体内動態

組織	測定対象	グアニジノ酢酸投与量 (g/kg 飼料)		
		0	0.6	6.0
肝臓	グアニジノ酢酸	45.00 ^a	49.25 ^a	6.13 ^b
	クレアチン	67.4 ^a	90.0 ^b	132.5 ^c
	クレアチニン	< LoD	< LoD	< LoD
胸部筋肉	グアニジノ酢酸	4.57 ^a	3.01 ^{ab}	0.85 ^b
	クレアチン	4,741 ^a	5,157 ^b	5,920 ^c
	クレアチニン	11.78 ^a	12.28 ^a	21.38 ^b

異符号間に有意差あり、<LoD：検出限界未満（検出限界不明）

グアニジノ酢酸を混餌投与した場合、アルギニン及びグリシンからのグアニジノ酢酸のデノボ合成が減少した代わりに、混餌投与したグアニジノ酢酸がクレアチンの産生に使用され、その結果として組織中グアニジノ酢酸濃度が低下することが示唆された。

また、グアニジノ酢酸投与量が増加すると、血漿中クレアチン及びクレアチニン濃度が増加していることは、肝臓及び胸部筋肉でみられた変化を反映しており、これらの代謝物の排泄器官への輸送が増大していることが示唆された。

なお、本試験では、6.0 g/kg 飼料添加与群の体重増加量及び摂餌量は、対照群及び0.6 g/kg 飼料投与群と比較して有意に減少していたが、飼料効率に影響はみられなかった。

5-2 対象家畜等を用いた飼養試験

5-2-1 鶏

(1) 方法

ブロイラー (Ross 308、雄、1 日齢、平均体重 44.5g) を用いて、基礎飼料 (対照群)、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 0.06、0.15、0.30、0.60% (49.1、122.4、239.2、480.4 mg/kg 体重/日) 添加した飼料をそれぞれ 35 日間給与した (1 群 32 羽、8 反復)。なお、基礎飼料中には動物由来原料は含まれていなかった。

(2) 結果

1 日増体量及び 1 日飼料摂取量は、0.60% 添加群で対照群に対して有意に減少した ($p<0.05$)。

添加上限量である 0.06% 添加群では、血液学的検査及び血液生化学的検査のいずれの項目においても対照群に対して有意差はなかった。

血液学的検査では、0.15%、0.30%、0.60% 添加群で、平均赤血球容積 (MCV) が対照群に対して有意に増加し、0.30%、0.60% 添加群で平均赤血球血色素量 (MCH) が有意に増加した。また、0.60% 添加群で、白血球数が有意に減少した。

血液生化学的検査では、0.30%、0.60% 添加群でクレアチン及びクレアチニン値が対照群に対して有意に増加し、0.60% 添加群でホモシステイン値が有意に増加した (表 36

参照)。〔参照 13〕

表 36 鶏用飼料に添加したときのグアニジノ酢酸の安全性

	対照群	グアニジノ酢酸添加群 (%)			
		0.06	0.15	0.30	0.60
1 日増体量 (g/日)	61.2 ^a	60.8 ^a	60.5 ^a	59.7 ^a	55.6 ^b
1 日飼料摂取量 (g/日)	88.2 ^a	88.9 ^a	88.1 ^a	85.1 ^{ab}	79.8 ^b
飼料要求率	1.48 ^a	1.49 ^a	1.48 ^a	1.47 ^a	1.48 ^a
クレアチン (mg/dL)	1.2 ^c	1.1 ^c	1.3 ^{bc}	1.8 ^b	2.6 ^a
クレアチニン (μmol/L)	3.6 ^b	3.7 ^{ab}	4.0 ^{ab}	4.2 ^a	4.2 ^a
ホモシステイン (μmol/L)	42.9 ^b	39.1 ^b	42.9 ^b	39.6 ^b	56.1 ^a
コレステロール (mmol/L)	3.4 ^{ab}	3.7 ^a	3.8 ^a	3.3 ^b	3.5 ^{ab}
白血球 (G/L)	7.8 ^{ab}	9.9 ^a	8.0 ^{ab}	7.6 ^{ab}	3.9 ^b
平均赤血球容積 (fL)	133.6 ^c	141.4 ^{bc}	169.9 ^{ab}	182.8 ^a	184.5 ^a
平均赤血球血色素量 (pg)	0.44 ^b	0.45 ^b	0.54 ^{ab}	0.58 ^a	0.59 ^a

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

5-2-2 鶏

(1) 方法

「4-1-4 鶏」の試験を参照。

鶏（肉用種、雄、1 日齢）を用いて、基礎飼料（ビタミン B12 : 20 μg/kg 飼料、葉酸 : 1 mg/kg 飼料、塩化コリン : 460 mg/kg 飼料）、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 600、1,200、3,000、6,000 mg/kg 飼料で添加した飼料をそれぞれ 35 日間給与した。（1 添加群あたり 17 羽）

(2) 結果

死亡率について、グアニジノ酢酸添加による影響はみられなかった。

体重について、給与開始 21 日後及び最終給与後において、6,000 mg/kg 飼料添加群は、基礎飼料群と比較して有意に低かった。これは、1 日当たりの飼料摂取量が対照群と比較して有意に少なかったためと考えられた。

(ア) 血液学的検査

被検物質の投与による影響はみられなかった。

グアニジノ酢酸の代謝に関連する血漿中アミノ酸濃度については、6,000 mg/kg 飼料添加群で血漿中シスチン濃度の有意な低下及びオルニチン濃度の有意な上昇がみられた。セリンは 3,000 mg/kg 飼料添加群で減少がみられた。

各組織のグアニジノ酢酸、クレアチン、クレアチニン及びホモシステイン濃度は、「4-1-4 鶏」のとおり。

(イ) 血液生化学的検査

血漿中コレステロール濃度について、3,000 mg/kg 飼料以上添加群は、基礎飼料群と比較して低い傾向がみられ、3,000 mg/kg 飼料添加群のみ有意に低かった。

トリグリセリド濃度について、1,200 及び 6,000 mg/kg 飼料添加群は基礎飼料群と比較して有意に低かった。

総タンパク質濃度について、600、3,000 及び 6,000 mg/kg 飼料添加群は、基礎飼料群と比較して有意に低かった。

アルブミン濃度について、3,000 mg/kg 飼料以上添加群は、基礎飼料群と比較して有意に低かった。

(ウ) 臓器重量

肝臓及び腎臓の相対重量について、3,000 mg/kg 飼料添加群は、基礎飼料群と比較して低かったが、6,000 mg/kg 飼料添加群には同様の変化がみられなかったことから、偶発的なものと考えられた。

肝臓、腎臓及び脳の相対重量について、6,000 mg/kg 飼料添加群は、体重の減少のため基礎飼料群と比較して有意に高くなった。

剖検及び病理組織学的検査

グアニジノ酢酸添加による影響はみられなかった。[参照 14]

5-2-3 鶏

(1) 方法

鶏（肉用種、種鶏、50 週齢）を用いて、基礎飼料、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 400、800、1,200、1,600 mg/kg 飼料で添加した飼料をそれぞれ 10 週間給与し、60 週齢で受精した。（1 添加群あたり 24 羽）

(2) 結果

孵化率について、800 及び 1,200 mg/kg 飼料添加群は、基礎飼料群及び 1,600mg/kg 飼料添加群に比べて有意に高かった。

胚死亡率について、グアニジノ酢酸添加による影響はみられなかったため、孵化率の違いは、受精率の違いの結果であった。

孵化した雄鶏の体重及び飼料摂取量について、グアニジノ酢酸添加による影響はみられなかった。

飼料効率について、800 及び 1,200 mg/kg 飼料投与群は、基礎飼料群及び 1,600 mg/kg 飼料添加群に比べて有意に高かった。[参照 27]

5-2-4 子豚

(1) 方法

豚（交雑種、去勢雄、21 日齢）を用いて、基礎飼料、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 500、1,000、1,500、2,000 mg/kg 飼料で添加した飼料をそれぞれ 42 日間給与した。（1 群 3 頭、6 反復）

(2) 結果

いずれの時点でも血中クレアチニン濃度は標準範囲（1.0～2.7 mg/dL）内であることから腎臓の機能に影響はなかったと考えられる。クレアチンキナーゼについても標準的な範囲（2.4～22.5 UI/L）内であった（表 37 参照）。[参照 28]

表 37 子豚用飼料に添加したときの子豚への安全性

		グアニジノ酢酸製剤投与量 (%)				
		0	0.05	0.10	0.15	0.20
42 日 齢	クレアチニン (mg/dL)	1.006	0.957	0.981	1.029	1.026
	クレアチンキナーゼ (UI/L)	2.912	2.895	6.443	1.681	1.933
63 日 齢	クレアチニン (mg/dL)	1.247	1.305	1.226	1.695	1.393
	クレアチンキナーゼ (UI/L)	4.888	4.360	6.882	5.490	6.956

5-2-5 豚

（１）方法

豚（母豚、雌、3～4 産）を用いて、基礎飼料、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 1,000 mg/kg 飼料で添加した飼料をそれぞれ人工受精の 24 時間後から出産後 23 日目の離乳まで給与した。（1 添加群あたり 40 頭）

生まれた子豚（23 日 齢）を用いて、基礎飼料、基礎飼料にグアニジノ酢酸を 1,000 mg/kg 飼料で添加した飼料をそれぞれ 40 日間給与した。

（２）結果

いずれにおいても、血清中クレアチン及びクレアチンキナーゼ濃度にグアニジノ酢酸製剤の影響は見られなかった（表 38、39 参照）。[参照 29]

表 38 母豚用飼料に添加したときの子豚への安全性

		母豚へのグアニジノ酢酸製剤投与量 (mg/kg 飼料)	
		0	1,000
23 日 齢	クレアチニン (mg/dL)	1.13	1.13
	クレアチンキナーゼ (UI/L)	3.57	3.62
36 日 齢	クレアチニン (mg/dL)	1.33	1.34
	クレアチンキナーゼ (UI/L)	5.76	5.86
63 日 齢	クレアチニン (mg/dL)	1.45	1.48
	クレアチンキナーゼ (UI/L)	6.82	6.83

表 39 子豚用飼料に添加したときの子豚への安全性

		グアニジノ酢酸製剤投与量 (mg/kg 飼料)	
		0	1,000
23 日 齢	クレアチニン (mg/dL)	1.12	1.16
	クレアチンキナーゼ (UI/L)	3.61	3.66
36 日 齢	クレアチニン (mg/dL)	1.32	1.36
	クレアチンキナーゼ (UI/L)	5.75	5.83
63 日 齢	クレアチニン (mg/dL)	1.46	1.50
	クレアチンキナーゼ (UI/L)	6.80	6.88

6 審議結果

グアニジノ酢酸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、豚、鶏及びうずら用飼料に、添加上限値（0.12%）までの濃度で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：飼料の栄養成分その他の有効成分の補給
- ②対象家畜：豚、鶏、うずら
- ③添加上限値：0.12%

7 参照（参考文献及び参考資料）

1. Safety and efficacy of guanidino acetic acid as feed additives for chickens for fattening (The EFSA Journal (2009)988,1-30)
2. Evaluation of a CreAMINO[®] on Broiler Performance (Evonik) (2015)
3. Interaction between CreAmino[®] supplementation and use of fishmeal in broiler diets (Evonik) (2010)
4. Supplementation of guanidino acetic acid (GAA) in corn-soybean meal based diets with animal by-products for broiler chickens (Evonik) (2016)
5. The effect of guanidine acetic acid (GAA) and glutamine in broiler diets on broiler performance Part1: Dose finding study at nutritional inclusion levels (Evonik) (2005)
6. Effects of graded levels of creatine and guanidino acetic acid in vegetable-based diets on performance and biochemical parameters in muscle tissue (Ringel et al.) (2007)
7. Supplemental guanidino acetic acid improved feed conversion weight gain, and breast meat yield in male and female broilers (Lemme et al.) (2007)
8. Effects of Guanidino acetic acid supplements on laying performance, egg quality, liver nitric oxide and energy metabolism in laying hens at the late stage of production (Salah et al.) (2020)
9. EFFECT OF GUANIDINOACETIC ACID SUPPLEMENTATION ON PERFORMANCE OF BROILER BREEDERS AND THEIR PROGENIES (Carpena et al.) (2015)
10. Effects of guanidino acetic acid diet supplementation on semen quality and fertility of broiler breeder roosters (Tapeh et al.) (2017)
11. Efficacy study of CreAMINO[®] in the nursery phase (pre-starter + starter) and its optimal dose on productive performance (Evonik Industries AG) (2015)
12. Supplementation of guanidino acetic acid to pig diets: effects on performance, carcass characteristics, and meat quality (Jayaraman et al.) (2018)
13. Study on effects of graded levels of dietary guanidino acetic acid on broiler performance and carcass parameters (University of Kaposvar) (2006)
14. 飼料添加物評価書グアニジノ酢酸（食品安全委員会）(2018)
15. Effects of dietary supplementation of meat-type quail breeders with guanidino acetic acid on their reproductive parameters and progeny performance (Murakami AE et al.) (2014)
16. METABOLISM AND NUTRITION Digestibility and metabolism of dietary guanidino acetic acid fed to broilers (J.Tossenberger et al.) (2015)
17. Supplemental guanidino acetic acid affects energy metabolism of broilers (Lemme et al.) (2007)

18. Tolerance study of CreAMINO in the nuresery phase (pre-starter + starter) (Evonik) (2015)
19. 7_“Guanidino acetic acid”: Acute oral toxicity study with rats (Acute toxic class method) (Evonik) (2004)
20. 8_Gunidino acetic acid: 28-day oral toxicity study with rats (Evonik) (2006)
21. 9_Gunidino acetic acid: 90-day oral toxicity study with rats (Evonik) (2008)
22. 10_“Guanidino acetic acid”: Salmonella Typhimurium reverse mutation test (Evonik) (2005)
23. 11_“Guanidino acetic acid”: In vitro mammalian cytogenetic study (chromosome analysis) (Evonik) (2006)
24. 12_Gene mutation assay in Chinese hamster V79 cells in vitro (V79/HPRT) with guanidine acetic acid (Evonik) (2010)
25. 13_“Guanidino acetic acid”: Acute dermal irritation/corrosion study with rabbits (Evonik) (2004)
26. 14_“Guanidino acetic acid”: Acute eye irritation/corrosion study with rabbits (Evonik) (2005)
27. 飼料添加物評価書グアニジノ酢酸を原体とする飼料添加物（食品安全委員会）(2018)
28. Effect of diets with different levels of guanidinoacetic acid on newly weaned piglets
29. Dietary supplementation of guanidinoacetic acid for sows and their progenies: Performance, blood parameters and economic viability at nursery phase

グアニジノ酢酸の基準及び規格（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

（1）飼料一般の成分規格

グアニジノ酢酸の飼料（飼料を製造するための原料又は材料を除く。）中の含有量は、グアニジノ酢酸として、0.12%以下でなければならない。

（2）飼料一般の製造の方法の基準

グアニジノ酢酸は、豚、鶏及びうずらを対象とする飼料（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。