

アミラーゼの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 4 年 3 月 8 日付け 3 消安第 6608 号をもって諮問されたアミラーゼの基準及び規格の改正について、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：アミラーゼ

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 4 年 3 月 8 日 諮問

令和 4 年 3 月 15 日 飼料添加物効果安全性小委員会

令和 4 年 6 月 3 日 飼料添加物規格小委員会

令和 4 年 12 月 20 日 飼料分科会

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. 2～22 のとおり）。

基準及び規格を作成した（資料 P. 23～24 のとおり）。

飼料添加物の効果安全性について（案）

Bacillus licheniformis JPBL011 株を利用して
生産されたアミラーゼ

令和5年3月6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	効果を裏付ける野外応用試験	5
3-1-1	鶏（ブロイラー）	5
3-1-2	鶏（ブロイラー）	5
3-1-3	豚	7
3-1-4	豚	8
3-1-5	牛	9
3-1-6	牛	11
3-1-7	牛	12
4	残留性に関する事項	13
5	安全性に関する事項	13
5-1	毒性試験	13
5-1-1	一般毒性試験	13
5-1-1-1	反復投与毒性試験（短期）	13
5-1-2	特殊毒性試験	13
5-1-2-1	変異原性試験	13
5-2	対象家畜を用いた飼養試験	14
5-2-1	鶏（ブロイラー）	14
5-2-2	豚	15
5-2-3	牛	19
6	審議結果	21
7	参照（参考文献及び参考資料）	22

アミラーゼに関する効果安全性について

1 名称等

一般名：アミラーゼ

化学名： α -amylase

CAS 番号：9000-90-2

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：鶏、豚、牛

推奨添加量：

鶏用飼料 210～420 でんぷん糖化力/kg 飼料

豚用飼料 210～420 でんぷん糖化力/kg 飼料

牛用飼料 1050～1400 でんぷん糖化力/kg 飼料

※ 1 でんぷん糖化力単位は、アミラーゼがバレイショデンプンに 37°C で作用するとき、反応初期の 1 分間に 1 mg のブドウ糖に相当する還元力の増加をもたらす酵素量に相当する。

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

アミラーゼは、唾液や膵液に含まれる常在酵素で、食物中のでんぷんのグルコシド結合を加水分解してオリゴ糖や二糖類を産生する酵素である。アミラーゼを添加した飼料を摂取させることにより、消化管中のでんぷんの消化が促進され、エネルギーの消化効率が上昇し、対象動物の成長促進につながる。

国内においては、平成 2 年にアミラーゼが飼料添加物として指定された。現在、*Aspergillus oryzae* 又は *Rhizopus delemar*、*Bacillus subtilis* 又は *Bacillus amyloliquefaciens* 由来のものが指定されている。

今回指定が要望されたアミラーゼは、*Bacillus licheniformis* Ca63 株を宿主とし、*Geobacillus stearothermophilus* ATCC7953 株由来のアミラーゼを産生する組換え体を培養して得られる組換え体利用アミラーゼである。

海外において、EU 諸国では、2015 年に本剤が飼料添加物として認められ、乳牛に使用されている。米国では、2007 年に牛用の飼料添加剤として self-GRAS を取得した。その他諸外国では、鶏、豚用として指定を受けている。

3 効果に関する事項

3-1 効果を裏付ける野外応用試験（提出資料 11）

3-1-1 鶏（ブロイラー）

（1）方法

ブロイラー（Ross 種、1 日齢、平均体重 44.4 g）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にアミラーゼを 280 でんぷん糖化力単位（10.2 でんぷん糖化力単位/kg 体重/日）で添加した飼料を 42 日間給与した（1 群 25 羽、12 反復）。

（2）統計解析

試験結果について、一元配置分散分析により行い、群間に有意差が認められた項目については、Tukey の方法により多重比較を行った。

（3）結果

飼料摂取量について、アミラーゼ添加群は基礎飼料群と比較して有意な差はなかった。

増体重について、アミラーゼ添加群は基礎飼料群と比較して有意に高かった。

飼料要求率について、アミラーゼ添加群は基礎飼料群と比較して低い傾向にあった。

斃死について、アミラーゼ添加群は基礎飼料群と比較して低い傾向にあった。（参照 1）

表 1 鶏用飼料に添加したときのアミラーゼの効果

試料及び測定項目	基礎飼料群	アミラーゼ添加群
最終体重(g)	2752±55 ^a	2823±85 ^b
増重量(g/日)	64.5±1.3 ^a	66.2±2.0 ^b
飼料摂取量(g/日)	100.9±2.5	102.4±3.4
飼料要求率	1.565±0.028	1.548±0.022
斃死率 (%)	1.33±1.97	0.32±1.11

各値は平均値を表す

各項目の異文字間に有意差あり（ $P \leq 0.05$ ）

3-1-2 鶏（ブロイラー）（提出資料 12）

【試験①】

（1）方法

ブロイラー（Cobb 種、雄、0 日齢、平均体重 52 g）をそれぞれ試験開始までは基礎飼料を給与した後、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にアミラーゼを 280 でんぷん糖化力単位/kg 飼料（19.3～31.2 でんぷん糖化力単位/kg 体重/日）で添加した飼料を各試験期間中給与した（0～11 日：1 群 25 羽、11～21 日：1 群 20 羽、21～42 日：1 群 16 羽、42～56 日：1 群 10 羽、各 8 反復）。

（2）統計解析

得られたデータは、開始時体重をブロックングファクターとし、GLM Procedure（SAS 製）を使用して統計解析された。統計的有意差は P 値 ≤ 0.05 、傾向は $0.05 < P$

値<0.10 で設定された。

(3) 結果

飼料摂取量について、アミラーゼ添加群は、陰性対照群と比較して有意な差はなかった。

増体重について、アミラーゼ添加群は、基礎飼料群と比較して有意に高かった。

飼料要求率について、アミラーゼ添加群は基礎飼料群と比較して有意に低かった。

回腸消化率及び全消化管保持率について、いずれの成分もアミラーゼ添加群は基礎飼料群に比べて有意に高かった。(参照 2)

表 2 鶏用飼料に添加したときのアミラーゼの飼養効果

試験期間	0-11 日		11-21 日		21-42 日		42-56 日		P 値※
アミラーゼ添加量 (でんぷん糖化力 単位/kg 飼料)	0	280	0	280	0	280	0	280	
開始時体重 (g)	52	52	403	403	1,145	1,145	3,113	3,112	0.689
最終体重 (g) *	295	298	1,072	1,089	3,254	3,313	4,601	4,685	0.003
増体重 (g/羽) *	243	245	668	686	2,109	2,167	1,488	1,573	0.002
飼料摂取量 (g/ 羽)	369	365	1,112	1,146	3,934	3,870	4,540	4,527	0.726
飼料効率 (g/kg) *	658	672	601	598	536	560	328	348	0.003

各値は調整済み平均値を表す

*有意差あり (P≤0.05)

※アミラーゼ効果に対する P 値

表 3 鶏用飼料に添加したときのアミラーゼの回腸消化率

試験期間	0-11 日		11-21 日		21-42 日		42-56 日		P 値※
アミラーゼ添加量 (でんぷん糖化力 単位/kg 飼料)	0	280	0	280	0	280	0	280	
回腸消化率									
DM (％) *	73.6	76.4	72.6	75.4	71.5	73.4	70.6	75.7	<0.001
でんぷん (％) *	95.5	98.2	96.5	97.3	96.0	98.2	96.6	98.7	<0.001
総エネルギー (％) *	70.6	75.1	73.5	75.9	71.8	74.3	71.3	76.5	<0.001
回腸可消化エネルギー (kcal/kgDM) *	3,184	3,289	3,397	3,432	3,266	3,411	3,321	3,478	<0.001
全消化管保持率									
DM (％) *	74.7	79.0	73.5	77.3	71.7	75.0	74.8	76.4	<0.001
でんぷん (％)	98.0	98.2	97.7	98.1	97.6	98.3	98.1	98.3	0.01
見かけの代謝エネルギー (％) *	76.9	80.3	76.3	78.9	75.6	78.1	76.0	79.5	<0.001
見かけの代謝エネルギー (kcal/kgDM)	3,466	3,514	3,523	3,566	3,512	3,586	3,539	3,612	0.001
窒素 (％) *	71.7	76.0	71.1	74.7	70.4	72.8	72.3	73.8	<0.001
窒素補正見かけの 代謝エネルギー (％) *	72.1	75.0	71.4	73.5	70.9	73.1	71.0	74.2	<0.001
窒素補正見かけの 代謝エネルギー (kcal/kgDM) *	3,252	3,284	3,297	3,324	3,291	3,357	3,310	3,375	0.005

DM：乾物

各値は調整済み平均値を表す

*いずれかに有意差あり (P≤0.05)

3-1-3 豚（提出資料 13）

（１）方法

豚（21 日齢、平均体重 5.793 kg）を用いて、基礎飼料を 2 つ（陰性対照群 1 及び 2）、基礎飼料 1 にアミラーゼを 140、280、420 でんぷん糖化力単位/kg 飼料（3.7、7.3、12.0 でんぷん糖化力単位/kg 体重/日）で添加した飼料、基礎飼料 2 にアミラーゼを 280 でんぷん糖化力単位/kg 飼料（7.8 でんぷん糖化力単位/kg 体重/日）で添加した飼料を 42 日間給与した（1 群 3 頭、各 10 反復）。

（２）統計解析

試験結果について、一元配置分散分析により行い、群間に有意差が認められた項目については、Tukey の方法により多重比較を行った。

（３）結果

増体重について、基礎飼料 1 及び 2 のアミラーゼ各用量群は、それぞれ対応する陰性対照群 1 及び 2 と比較して高い傾向にあった。

飼料摂取量について、基礎飼料 1 及び 2 のアミラーゼ各用量群は、それぞれ対応する陰性対照群 1 及び 2 と比較して高い傾向にあった。

飼料要求率について、基礎飼料 1 にアミラーゼ 140、280 でんぷん糖化力単位/kg 飼料添加群は陰性対照群 1 と比較して有意に低かった。（参照 3）

表 4 豚用飼料に添加したときのアミラーゼの飼養効果

試料		基礎飼料 1				基礎飼料 2	
アミラーゼ添加量 (でんぷん糖化力 単位/kg 飼料)		0	140	280	420	0	280
体 重	試験開始時(kg)	5.79	5.79	5.79	5.80	5.80	5.80
	試験終了時(kg)	21.34	21.82	21.88	21.46	21.46	22.27
増重量(kg/日)		0.37	0.38	0.38	0.39	0.37	0.39
飼料摂取量(kg/日)		0.59	0.57	0.57	0.63	0.58	0.62
飼料要求率*		1.58 ^{aA}	1.49 ^b	1.52 ^{bB}	1.56 ^a	1.55 ^A	1.58 ^A

各項目の異文字間に有意差あり（ $P \leq 0.05$ ）

基礎飼料 1 及び基礎飼料 2 の間での有意差の比較は、同添加量の間のみ

3-1-4 豚（提出資料 14）

（１）方法

豚（PIC 種、63 日齢、平均体重 21.4 kg）を用いて、基礎飼料（陰性対照群）、基礎飼料にアミラーゼを 280 でんぷん糖化力単位/kg 飼料（6.8 でんぷん糖化力単位/kg 体重/日）で添加した飼料（アミラーゼ添加群）を 99 日間給与した（1 群 3 頭、各 8 反復）。

（２）統計解析

試験結果について、一元配置分散分析により群間に有意差が認められた項目については、Tukey 検定により多重比較を行った。

（３）結果

増体重について、アミラーゼ各用量群は、基礎飼料群と比較して有意に高かった。

飼料摂取量について、アミラーゼ各用量群は、基礎飼料群と比較して差はなかった。

飼料要求率について、アミラーゼ各用量群は、基礎飼料群と比較して低い傾向にあった。（参照 4）

表 5 豚用飼料に添加したときのアミラーゼの飼養効果

		陰性対照群 (0 でんぷん糖化力単位/kg 飼料)	アミラーゼ添加群 (280 でんぷん糖化力単位/kg 飼料)
体 重	試験開始時 (kg)	21.41	21.41
	試験終了時 (kg)	113.46	117.15
増重量(kg/日)		0.97 ^a	1.01 ^b
飼料摂取量(kg/ 日)		2.42	2.43
飼料要求率		2.50	2.41

各項目の異文字間に有意差あり (P≤0.05)

3-1-5 牛（提出資料 15）

（１）方法

牛（ホルスタイン種、経産、平均体重 643 ± 49 kg、泌乳日数 51±22 日）を用いて、基礎飼料、でんぷん低減飼料、でんぷん低減飼料にアミラーゼを 1050 でんぷん糖化力単位/kg 飼料（38.9 でんぷん糖化力単位/kg 体重/日）で添加した飼料を 12 週間給与した（1 群 1 頭、各 12 反復）。

（２）統計解析

試験結果について、Mixed procedure PDIFF option（SAS 製）を使用して統計解析された。

（３）結果

増体重について、群間で有意差が見られなかった。（表 6 参照）

飼料効率として、各項目について、アミラーゼ各用量群は、でんぷん低減飼料と比較して有意に高かった。（表 7 参照）

搾乳成績として、乳量及び乳成分の各項目について、群間で有意差が見られなかった。

MUN（乳中尿素窒素）について、でんぷん低減飼料群及びアミラーゼ添加群は、基礎飼料群に比べて有意に高い値を示したが、背景データの範囲内であった。（表 8 参照）

栄養摂取量として、乾物摂取量（kg/日および%/体重）、中性デタージェント繊維摂取量（kg/日および%/体重）及びでんぷん摂取量について、でんぷん低減飼料群は基礎飼料群及びアミラーゼ添加群に比べて有意に高くなった。（表 9 参照）

乾物の消化率について、アミラーゼ添加群は、基礎飼料群及びでんぷん低減飼料群と比較して有意に高かった。

でんぷんの消化率について、アミラーゼ添加群は、基礎飼料群に比べて有意に高かった。（表 10 参照）（参照 5）

表 6 牛用飼料に添加したときのアミラーゼの飼養効果

	基礎飼料	でんぷん低減飼料	アミラーゼ添加群
試験終了時体重 (kg)	692	701	699
増体重 (kg/日)	0.40	0.47	0.41
コンディションスコア	2.2	2.2	2.1

表 7 牛用飼料に添加したときのアミラーゼの飼料効率効果

	基礎飼料群	でんぷん低減飼料群	アミラーゼ添加群
乳量/乾物摂取量 (kg/kg)	1.91 ^a	1.77 ^b	1.98 ^a
乳脂肪 3.5%補正乳量(FCM)/ 乾物摂取量 (kg/kg)	1.77 ^a	1.70 ^a	1.90 ^b
固形分補正乳量(SCM)/乾物 摂取量 (kg/kg)	1.65 ^a	1.56 ^a	1.75 ^b
エネルギー補正乳量(ECM)/ 乾物摂取量 (kg/kg)	1.78 ^a	1.68 ^a	1.90 ^b
概算飼料エネルギー含量 (Mcal/kg 乾物)	1.69 ^a	1.62 ^a	1.82 ^b

各項目の異文字間に有意差あり (P≤0.05)

表 8 牛用飼料に添加したときのアミラーゼの泌乳に対する効果

		基礎飼料群	でんぷん低減飼料	アミラーゼ添加群
乳量 (kg/日)		49.8	50.9	50.4
乳脂肪 3.5%補正乳量 (kg/日)		46.2 ^a	49.1 ^b	48.2 ^b
固形分補正乳量 (kg/日)		43.0 ^a	45.1 ^b	44.5 ^b
エネルギー補正乳量 (kg/日)		46.4 ^a	48.7 ^b	48.1 ^b
乳組成脂肪	%	3.08	3.33	3.26
	kg/日	1.52 ^a	1.68 ^b	1.63 ^b
たん白質	%	3.07	2.99	3.06
	kg/日	1.52	1.52	1.54
乳糖	%	4.93	4.93	4.92
	kg/日	2.45	2.51	2.47
乳中尿素窒素 (mg/dL)		11.1 ^a	13.0 ^b	12.2 ^c

各項目の異文字間に有意差あり (P≤0.05)

表 9 牛用飼料に添加したときのアミラーゼの栄養補給に対する効果

		基礎飼料群	でんぷん低減飼料	アミラーゼ添加群
乾物摂取量	kg/日	26.7 ^a	29.1 ^b	25.9 ^a
	%/体重	3.88 ^a	4.16 ^b	3.69 ^a
有機物摂取量	kg/日	24.7 ^a	26.9 ^b	24.0 ^a
中性デタージェント繊維摂取量	kg/日	8.2 ^a	10.7 ^b	9.5 ^c
	%/体重	1.19 ^a	1.52 ^b	1.35 ^c
でんぷん摂取量	kg/日	7.2 ^a	6.4 ^b	5.4 ^c
たん白摂取量	kg/日	4.4 ^a	4.7 ^a	4.2 ^b

各項目の異文字間に有意差あり (P≤0.05)

表 10 牛用飼料に添加したときのアミラーゼの消化率に対する効果

	乾物 (%)	有機物 (%)	たん白 (%)	中性デタージェント繊維 (%)	でんぷん (%)
基礎飼料群	66.6 ^a	69.2 ^a	64.8 ^a	39.4 ^a	94.9 ^a
でんぷん低減飼料	71.0 ^b	73.1 ^b	68.8 ^b	54.1 ^b	97.2 ^b
アミラーゼ添加群	74.7 ^c	76.6 ^c	73.0 ^c	57.8 ^c	97.6 ^b

各項目の異文字間に有意差あり (P≤0.05)

3-1-6 牛 (提出資料 16)

(1) 方法

牛 (ホルスタイン種、経産、平均体重 654 kg、泌乳日数 71.5 日) を用いて、基礎飼料、基礎飼料にアミラーゼを 1050 でんぷん糖化力単位/kg 飼料 (33.3 でんぷん糖化力単位/kg 体重/日) で添加した飼料を 12 週間給与した (1 群 35 頭、各 1 反復)。

(2) 統計解析

試験結果について、Kolmogorov-Smirnov により正規分布であることを確認し、t 検定により有意差検定を行った。

(3) 結果

体重について、群間で有意差が見られなかった。

乳量について、アミラーゼ各用量群は、基礎飼料群と比較して有意に多かった。

乳糖について、アミラーゼ各用量群は、基礎飼料と比較して有意に低かった。

乳脂肪及び乳たん白質について、群間で有意差が見られなかった。(表 11 参照) (参照 6)

表 11 牛用飼料に添加したときのアミラーゼの飼養効果

	基礎飼料群	アミラーゼ添加群
最終体重(kg)	685	697
乳量(kg/日)	37.7 ± 7.0 ^b	38.7 ± 7.0 ^a
脂肪補正乳量(kg/日)	30.9	31.6
エネルギー補正乳量(kg/日)	31.3	31.9
乳脂肪(%)	2.80 ± 0.74	2.78 ± 0.79
乳たん白質(%)	3.12 ± 0.25	3.11 ± 0.25
乳糖(%)	4.60 ± 0.16 ^a	4.55 ± 0.22 ^b
乾物(%)	11.34 ± 0.82	11.32 ± 0.94

各項目の異文字間に有意差あり (P≤0.05)

3-1-7 牛（提出資料 24）

（1）方法

肥育牛（ネロール種、月齢不明、平均体重 330±33kg）を用いて、15 日間の予備飼育後、濃厚基礎飼料、濃厚基礎飼料にアミラーゼを 1176 でんぷん糖化力単位/kg 飼料（22.5 でんぷん糖化力単位/kg 体重/日）で添加した飼料（アミラーゼ添加群）を 16-93 日目まで（78 日間）給与した。（1 群 5 頭、12 反復）

（2）統計解析

試験結果について、群間に有意差が認められた項目については、Tukey-Kramer により比較検定を行った。

（3）結果

体重について、基礎飼料群と比較して高い傾向にあった。

乾物摂取量について、基礎飼料群と比較して有意に高かった。

全消化管でんぷん消化率について、基礎飼料群と比較して高い傾向にあった。（表 12 参照）（参照 14）

表 12 牛用飼料に添加したときのアミラーゼの飼養効果

	基礎飼料群	アミラーゼ添加群
27 日目体重(kg)	373	376
最終体重(kg)	486	494
乾物摂取量(kg)	9.24 ^a	9.46 ^b
平均像体重(kg)	1.67	1.76
飼料要求率	0.182	0.186
全消化管でんぷん消化率(%)	88.8	90.5

各項目の異文字間に有意差あり (P≤0.05)

4 残留性に関する事項

アミラーゼは消化管内で反応した後アミノ酸に分解・消化され、生体内に残留しないと考えられる。

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 反復投与毒性試験（短期）（提出資料 17）

（方法）

ラット（CrI:CD 系、雄雌各 5 匹、46～50 日齢、平均体重（雄）254～289 g、平均体重（雌）171～209 g）を用いて、0、5,842、19,275、58,412 でんぷん糖化力単位/kg 体重/日のアミラーゼを 90 日間強制経口投与した。

（結果）

一般的な外観および行動、感覚反応性応答、握力、運動活性、体重増加、摂餌量、飼料要求率、血液学的検査、臓器重量、眼科学検査において被験物質投与による影響は見られなかった。特に傾向がみられた事項は以下のとおり。

A. 摂水量及び血液生化学検査について、19,275、58,412 でんぷん糖化力単位/kg 体重/日投与群において、摂水量及び血清リン及びカルシウム濃度が増加したが、電解質の排泄に対する機能的な反応考えられる。血清クレアチニン及び腎臓重量について、対照群と比較して有意な差が見られなかったことから、毒性学的に有意差はないと考えられる。

B. 肉眼的所見について、58,412 でんぷん糖化力単位/kg 体重/日投与群において、盲腸の拡張が見られたが、盲腸内容物の浸透圧の変化に対する生理学的適用であると考えられ、それ以外に盲腸に所見に見られなかったことから毒性学的に有意性はないと考えられる。

これらの結果から、NOAEL は 58,412 でんぷん糖化力単位/kg 体重/日とされた。

（参照 7）

5-1-2 特殊毒性試験

5-1-2-1 変異原性試験

アミラーゼの変異原性試験の結果を表 13 に示した。

表 13 アミラーゼの変異原性試験の結果

分類	試験	対象	用量	結果	参照
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA98、TA100、 TA1535、TA1537 <i>Escherichia coli</i> WP2 uvrA、 WP2uvrApKM101	156～5000 µg/ml (+/-S9)	陰性	参照 8 (提出 18)
	染色体異常試験	ヒトリンパ球培養細胞	1050～5000 µg/mL (+/-S9) 3 又は 20 h 処理	陰性	参照 9 (提出 19)

変異原性試験では、*in vitro*系において、細菌を用いる復帰突然変異試験、ヒトから採取したリンパ球の培養細胞を用いた染色体異常試験が実施された。結果はいずれも代謝活性系の有無にかかわらず陰性であった（表 12 参照）。

したがって、アミラーゼには生体に影響する変異原性は認められないと判断された。（参照 8、9）

5-2 対象家畜等を用いた飼養試験

5-2-1 鶏（提出資料 20）

（1）方法

鶏（Ross308 種、雄、0 日齢、平均体重 41 g）を用いて、基礎飼料、基礎飼料にアミラーゼを 280、1400、2800 でんぷん糖化力単位/kg 飼料（14.9、73.1、144.1 でんぷん糖化力単位/kg 体重/日）で添加した飼料を 36 日間給与した（1 群 18 羽、12 反復）。

（2）統計解析

試験結果については、一元配置分散分析により群間に有意差があることを確認した後、有意差がある項目について Tukey 法を用いて多重比較を行った。

（3）結果

斃死、体重、飼料摂取量、飼料効率、血液学的検査、血液生化学的検査、肉眼的所見において、添加による有害事象は認められなかった。

肉眼的所見において、肝臓の変色及び硬さの変化について全試験群で確認されたが、用量依存性がみられなかった。心膜水腫も確認されたが、対照群でも確認されたことから、アミラーゼ投与によって生じる組織学的な変化ではないと推定された。（表 14 参照）。（参照 10）

表 14 アミラーゼを鶏用飼料に添加したときの飼養、血液学及び臓器重量への影響

	基礎飼料群	アミラーゼ添加群			
	0 でんぷん 糖化力単位 /kg 飼料	280 でんぷ ん糖化力単 位/kg 飼料	1400 でん ぷん糖化力 単位/kg 飼 料	2800 でん ぷん糖化力 単位/kg 飼 料	
斃死	6	14	16	9	
増体重 (g/羽)	1938	1965	2001	2001	
飼料摂取量 (g/羽)	3719	3845	3839	3784	
飼料効率	1.921	1.959	1.920	1.893	
【血液学的検査】					
ヘマトクリット値 (%)	28.3	28.6	27.3	28.4	
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	10.2	10.3	10.1	10.2	
白血球 (10 ⁴ /mL)	1.19	1.16	1.15	1.02	
赤血球 (10 ⁶ /mL)	2.11	2.12	2.03	2.06	
平均赤血球容積 (fL)	135	136	137	140	
平均赤血球血色素量 (pg)	49.0	49.0	50.9	50.3	
平均赤血球血色素濃度 (g/L)	36.3	36.1	37.0	36.0	
血小板 (10 ⁴ /mL)	2.89	2.62	2.48	2.59	
【血液生化学的検査】					
アラニントランスアミナーゼ (U/L)	2.84	2.35	3.14	2.62	
アスパラギン酸トランスアミナーゼ (U/L)	229	227	238	250	
アルブミン (g/dL)	1.20	1.21	1.19	1.23	
γ-グルタミルトランスフェラーゼ (U/L)	20.6	19.4	19.0	19.6	
尿酸 (mg/dL)	4.57	4.46	5.01	4.83	
総たんぱく質 (g/L)	26.7	26.8	26.2	27.8	
【臓器重量】					
消化管全体 (g)	141.1	139.1	140.6	142.3	
肝臓 (g)	43.6	43.1	43.0	43.3	
十二指腸 (g)	19.9	19.9	20.6	20.4	
空腸 (g)	43.3	41.2	42.3	44.4	
回腸 (g)	34.3	34.9	34.8	34.3	
【肉眼的所見】					
心臓	軽度心膜水腫	11	12	12	14
	心膜水腫	11	9	8	9
	心房うっ血	6	5	7	7
腎臓	外観変化	0	0	0	0
	変色	0	2	1	0
	うっ血	3	1	0	2

		0 でんぷん 糖化力単位 /kg 飼料	280 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	1400 でん ぷん糖化力 単位/kg 飼 料	2800 でん ぷん糖化力 単位/kg 飼 料
肝臓の硬さ	軽度脆弱	14	9	13	13
	中度脆弱	0	6	7	2
肝臓の色	変色	11	12	16	12
	蒼白	4	2	2	2
脾臓	外観変化	0	0	0	0
肺	外観変化	0	0	0	0
消化管	反応性パイエル板	1	2	1	1
	黄斑	1	1	0	1

5-2-2 豚（提出資料 21）

（１）方法

豚（PIC L1050×L337 種、雌又は去勢、21 日齢、平均体重 7.7 ± 0.4 kg）を用いて、基礎飼料にアミラーゼを 315、1,575、3,150 でんぷん糖化力単位/kg 飼料（8.3、41.5、83.2 でんぷん糖化力単位/kg 体重/日）で添加した飼料を 42 日間給与した（1 群 4 頭、6 反復）。

（２）統計解析

試験結果については、一元配置分散分析により群間に有意差があることを確認した後、有意差がある項目について Tukey 法を用いて多重比較を行った。用量依存性を確認するため、多項式比較を実施した。

（３）結果

一般症状、最終体重、増体重、飼料摂取量、飼料効率及び尿検査について、アミラーゼ添加群は基礎飼料群に比べて有意差は見られなかった。

血液学的検査について、アミラーゼ添加群は基礎飼料群に比べて有意差は見られなかった。

血液生化学的検査において、総たんぱく質及びグロブリンについて、アミラーゼ 315 でんぷん糖化力単位/kg 飼料添加群は、基礎飼料群に比べて有意に高かったが、いずれも背景データの範囲内であった。ラクトースデヒドロゲナーゼについて、アミラーゼによる用量依存的に増加したが、背景データの範囲内であった。カリウムについて、アミラーゼ各用量群は、背景データの範囲よりも低かったが、血清中カリウム濃度は必ずしもカリウム欠乏症を示しているとは限らず、また通常過剰の場合に異常が見られる。以上のことから、いずれも投与による影響ではないと推定された。

臓器重量において、アミラーゼ各用量群は基礎飼料群に比較して有意な差は見られなかった。

肉眼的所見において、すべての試験群で肺に所見が見られたが、これらの病変は呼吸器系の疾患で見られるものであることから、投与による影響ではないと推定された。

（表 15 参照）。（参照 11）

表 15 アミラーゼを豚用飼料に添加したときの飼養、血液学及び臓器重量等への影響

		基礎飼料群	アミラーゼ添加群		
		0 でんぷん 糖化力単位 /kg 飼料	315 でんぷ ん糖化力単 位/kg 飼料	1575 でんぷ ん糖化力単 位/kg 飼料	3150 でんぷ ん糖化力単 位/kg 飼料
【一般症状と飼育成績】					
一般症状・機能観察		一般状態の異常は認められなかった。			
死亡		なし	なし	なし	なし
平均体重 0 日目(kg)		7.67	7.65	7.67	7.66
平均体重 42 日目(kg)		31.30	31.74	31.06	30.92
増体重(g/日)		548	574	557	540
飼料摂取量(g/日)		803	832	818	817
飼料効率		1.47	1.45	1.47	1.52
【血液学的検査】					
	背景データ の範囲	0 でんぷん 糖化力単位 /kg 飼料	315 でんぷ ん糖化力単 位/kg 飼料	1575 でんぷ ん糖化力単 位/kg 飼料	3150 でんぷ ん糖化力単 位/kg 飼料
白血球数(10 ⁹ /L)	15.6～38.9	20.18	22.93	20.92	20.21
好中球数(10 ⁹ /L)	3.0～17.4	8.09	8.92	8.19	7.06
好中球(%)	—	39.50	38.78	38.90	35.27
リンパ球数(10 ⁹ /L)	7.7～20.4	10.24	12.32	11.07	11.34
リンパ球(%)	—	50.72	53.85	53.18	55.75
単球数(10 ⁹ /L)	0.6～3.4	0.81	1.02	0.92	0.95
単球(%)	—	4.32	4.42	4.45	4.70
好酸球数(10 ⁹ /L)	0.1～2.3	0.62	0.55	0.66	0.71
好酸球(%)	—	3.18	2.42	3.08	3.50
好塩基球数(10 ⁹ /L)	0.1～0.3	0.10	0.13	0.09	0.15
好塩基球(%)	—	0.60	0.53	0.38	0.78
赤血球数(10 ⁹ /L)	6.4～8.4	6.56	7.28	7.24	6.89
ヘモグロビン濃度(g/L)	105～135	111.17	117.00	117.67	114.33
ヘマトクリット値(%)	34～44	37	40	39	37
平均赤血球容積(fL)	49～59	53.40	55.77	53.60	53.92
平均赤血球色素量(Pg)	14～21	16.38	16.13	16.32	16.62
平均赤血球色素濃度(g/L)	287～325	306.67	290.33	304.00	308.50
血小板数(10 ⁹ /L)	211～887	402.57	423.23	433.57	407.90
プロトロンビン時間(Sec)	11～18	13.05	15.72	14.47	15.25
活性化部分トロンボプラス チン時間(Sec)	13～26	14.26	14.18	12.69	11.19
フィブリノゲン(mg/dL)	100～500	196.7	175.6	194.5	191.0
白血球数(10 ⁹ /L)	15.6～38.9	20.18	22.93	20.92	20.21
【血液生化学的検査】					

	背景データの範囲	0 でんぶん 糖化力単位 /kg 飼料	315 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	1575 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	3150 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料
総たんぱく質(g/L)	49～67	53.11 ^b	56.19 ^a	53.16 ^b	52.94 ^b
アルブミン(g/L)	19～29	29.73	29.60	29.62	29.18
グロブリン(g/L)	28～41	23.38 ^b	26.77 ^a	23.54 ^b	23.68 ^b
アルブミン/グロブリン比()	0.52～0.95	1.27	1.08	1.26	1.24
アスパラギン酸トランスアミナーゼ(U/L)	0～125	48.55	51.85	53.25	55.22
アラニントランスアミナーゼ(U/L)	0～103	55.32	59.42	53.26	59.62
総コレステロール (mmol/L)	2.0～4.2	2.33	2.15	2.25	2.53
	背景データの範囲	0 でんぶん 糖化力単位 /kg 飼料	315 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	1575 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	3150 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料
中性脂肪(mmol/L)	0.3～2.7	0.509	0.568	0.542	0.530
グルコース(mmol/L)	4.3～8.6	10.30	9.99	10.58	10.32
アルカリホスファターゼ (U/L)	0～300	223.2	252.8	231.7	217.0
クレアチニン(umol/L)	88～130	76.9	77.5	75.0	77.6
尿素(mmol/L)	1.7～4.5	2.60	1.90	2.42	2.79
γ-グルタミルトランスフェラーゼ(U/L)	0～82	23.51	22.96	24.73	22.28
ラクテートデヒドロゲナーゼ(U/L)	0～1893	349.1	355.9	392.6	553.8
	背景データの範囲	0 でんぶん 糖化力単位 /kg 飼料	315 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	1575 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	3150 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料
総ビリルビン(umol/L)	0～1.0	0.61	0.76	0.59	0.70
カルシウム(mmol/L)	2.5～3.1	2.15	2.10	2.10	2.09
クロール(mmol/L)	99.5～112.3	113.7	113.8	113.5	113.3
マグネシウム(mmol/L)	0.9～1.2	0.855	0.778	0.803	0.824
ナトリウム(mmol/L)	143～156	154.7	156.6	155.5	153.3
カリウム(mmol/L)	4～7	2.61	2.68	2.63	2.43
グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(U/L)	0～8	5.13	5.84	5.67	5.72
リン(mmol/L)	1.45～2.90	1.01	1.15	1.12	1.12
ソルビトールデヒドロゲナーゼ(U/L)	-	2.12	2.25	2.16	2.30

	背景データの範囲	0 でんぶん 糖化力単位 /kg 飼料	315 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	1575 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	3150 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料
クレアチンホスホキナーゼ (U/L)	100~2500	1250	1549	1357	2062
【臓器重量】					
	背景データの範囲	0 でんぶん 糖化力単位 /kg 飼料	315 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	1575 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	3150 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料
心臓(g)	141±10	151.0	155.6	141.8	151.6
心臓(%)	0.47±0.04	0.466	0.482	0.469	0.464
肺(g)	312±101	344.5	341.9	354.2	363.3
肺(%)	1.04±0.34	1.069	1.054	1.169	1.117
腎臓(g)	172±12	171.2	171.6	163.3	172.0
腎臓(%)	0.57±0.03	0.528	0.526	0.533	0.528
肝臓(g)	841±96	866	853.4	903.6	910.6
肝臓(%)	2.79±0.30	2.669	2.626	2.980	2.796
脾臓(g)	70±10	70.1	70.2	77.6	73.5
脾臓(%)	0.16±0.03	0.216	0.221	0.255	0.230
【肉眼的所見】					
	病変の程度	0 でんぶん 糖化力単位 /kg 飼料	315 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	1575 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	3150 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料
心臓	所見なし	6/6	6/6	6/6	6/6
	軽微	0/6	0/6	0/6	0/6
	中程度	0/6	0/6	0/6	0/6
	重度	0/6	0/6	0/6	0/6
肝臓	所見なし	6/6	6/6	6/6	6/6
	軽微	0/6	0/6	0/6	0/6
	中程度	0/6	0/6	0/6	0/6
	重度	0/6	0/6	0/6	0/6
肺	所見なし	4/6	5/6	4/6	4/6
	軽微 1	1/6	0/6	1/6	1/6
	中程度 2	1/6	1/6	1/6	1/6
	重度	0/6	0/6	0/6	0/6
腎臓	所見なし	6/6	6/6	5/6	6/6
	軽微	0/6	0/6	0/6	0/6
	中程度 3	0/6	0/6	1/6	0/6
	重度	0/6	0/6	0/6	0/6
脾臓	所見なし	6/6	5/6	6/6	6/6
	軽微 4	0/6	1/6	0/6	0/6

	病変の程度	0 でんぷん 糖化力単位 /kg 飼料	315 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	1575 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	3150 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料
	中程度	0/6	0/6	0/6	0/6
	重度	0/6	0/6	0/6	0/6
【尿検査】					
		0 でんぷん 糖化力単位 /kg 飼料	315 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	1575 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料	3150 でんぷ ん糖化力単位/kg 飼料
pH		6.58	7.00	6.25	6.58
比重		1.021	1.017	1.022	1.019
白血球(cell/uL)		陰性	陰性	陰性	陰性
ケトン体(mmol/L)		陰性	陰性	陰性	陰性
ウロビリノーゲン(umol/L)		陰性	陰性	陰性	陰性
ビリルビン(umol/L)		陰性	陰性	陰性	陰性
たんぱく質(g/L)		陰性	陰性	陰性	陰性
色		淡黄色	淡黄色	淡黄色	淡黄色

異符号間に有意差あり (P≤0.05)

5-2-3 牛（提出資料 22、23）

（１）方法

牛（ホルスタイン種、4～8 歳齢、平均体重 600～800 kg）を用いて、基礎飼料にアミラーゼを 4,200、420,000 でんぷん糖化力単位/kg 飼料（75.6、7,536.9 でんぷん糖化力単位/kg 体重/日）となるように調整した飼料を 8 週間給与した（1 群 12 頭）。

調整前の飼料（アミラーゼ：4,200、420,000 でんぷん糖化力単位/kg 飼料）について、試験期間中に定量分析した。

（２）統計解析

試験結果については、Genstat 7（Lawes Agricultural Trust 社製、2003 年）を用いて、一般線形モデリング手順を使用して解析された。試験開始 1 及び 2 週目の試験結果を共分散分析に使用し、1 及び 2 週間の平均値は共分散調整に使用された。

（３）結果

調整前の飼料のアミラーゼ活性について、アミラーゼ 4,200 でんぷん糖化力単位/kg 飼料添加群で想定 1.82～5.38 倍、アミラーゼ 420,000 でんぷん糖化力単位/kg 飼料添加群で 0.71～0.77 倍の酵素活性を確認した。（表 16 参照）

増体重、乾物摂取量、乳量、乳成分、乳腺炎及び蹄病の発症率について、アミラーゼ各用量群は基礎飼料群と比較して有意な差は見られなかった。

乳中体細胞数については、アミラーゼ 420,000 でんぷん糖化力単位/kg 飼料添加群は基礎飼料群と比較して有意に低下した。乳中体細胞数の増加は乳房炎の指標として使用されており、国際的な基準として用いられている。EU では、400,000 個/ml が市場流通の基準として用いられており、すべての試験群で基準以下であった。（表 17 参照）。

（参照 12、13）

表 16 調整前飼料中のアミラーゼ活性

	アミラーゼ 4,200 でんぷん糖化力単位/kg 飼料				アミラーゼ 420,000 でんぷん糖化力単位/kg 飼料			
	1 回目	2 回目	3 回目	4 回目	1 回目	2 回目	3 回目	4 回目
想定値	4375	4375	4375	4375	387100	387100	387100	387100
分析値	23531 ±2692	16496 ±1120	12271 ±1089	7956 ±1474	289748 ±7123	296562 ±5408	293727 ±2671	273147 ±17087
分析値 /想定 値の比	5.38	3.77	2.80	1.82	0.75	0.77	0.76	0.71

表 17 アミラーゼを牛用飼料に添加したときの飼養影響

	基礎飼料群	アミラーゼ添加群 (でんぷん糖化力単位/kg 飼料)	
	0	4,200	420,000
増体重 (kg)	33	31	28
ボディコンディションスコア	0.06	-0.19	-0.03
総乾物摂取量 (kg/日)	25.4	25.5	24.8
【乳量】			
総乳量 (kg/日)	41.2	40.9	41.0
乳脂肪補正乳量 (kg/日)	42.1	41.7	40.6
エネルギー補正乳量 (kg/日)	42.3	41.8	40.9
【乳成分】			
乳脂肪 (g/kg)	36.6	36	35.1
たん白質 (g/kg)	33.4	32.9	33.4
ラクトース (g/kg)	45.6	46.0	45.6
【乳成分収量】			
乳脂肪 (g/日)	1496	1471	1418
たん白質 (g/日)	1364	1348	1349
ラクトース (g/日)	1884	1884	1870
乳中体細胞数 (Log10/ml)	5.18	5.16	4.92*
乳腺炎発症率 (発症数/牛)	0.42	0.42	0.17
蹄病発症率 (発症数/牛)	0.00	0.17	0.00

*基礎飼料群と比較して有意差あり (P≤0.05)

6 審議結果

アミラーゼの効果安全性について審議した。

「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、飼料へ添加することが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 給与対象：鶏、豚、牛

7 参照（参考文献及び参考資料）

1. Efficacy of Ronozyme® HiStarch in broiler chickens fed maize-based diets Trial B- 560, 社内資料, 2020.
2. A.Aderibigbe, A.J.Cowieson, J.O.Sorbara, O.Adeola, “Growth phase and dietary α -amylase supplementation effects on nutrient digestibility and feedback enzyme secretion in broiler chickens,” Poultry Science, 2020.
3. Effect if RONOZYME Histarch supplementation on piglet diets on performance, 社内資料, 2016.
4. RONOZYME Histarch on pigs performance, 社内資料, 2018.
5. H. Gencoglu, R. D. Shaver, W. Steinberg, J. Ensink, L. F. Ferraretto, S. J. Bertics, J. C. Lopes and M. S. Akins, “Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows,” Journal of Dairy Science, 2010.
6. Tamás TÓTH, Róbert TÓTHI, “ EFFECT OF FEEDING SUPPLEMENTAL EXOGENOUS AMYLASE ON THE PERFORMANCE OF HIGH YIELDING DAIRY COWS,” Acta argiculturae Slovenica, 2016.
7. TOXICITY STUDY BY ORAL GAVAGE ADMINISTRATION TO CD RATS FOR 13 WEEKS, 社内資料, 2005
8. Test for Mutagenic Activity with Strains of Salmonella typhimurium and Echerichia coli, 社内資料, 2005.
9. Induction of chromosome aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes, 社内資料, 2004.
10. Tolerance study with RONOZYME Histarch in broiler chickens ME07_21,” 社内資料, 2021.
11. Tolerance and efficacy study with RONOZYME® HiStarch in weaned piglets,” 社内資料, 2020.
12. The effect of an amylase enzyme on feed intake and milk production of holstein dairy cows, 社内資料, 2008.
13. S. More, Global trends in milk quality: implications for the Irish dairy industry, Irish Veterinary Journal, 2009.
14. Murillo A. P. Meschiatti et al, Feeding the combination of essential oils and exogenous α -amylase increases performance and carcass production of finishing beef cattle, 2019.

アミラーゼの成分規格等（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

飼料一般の製造方法の基準

アミラーゼ（その3）は、牛、豚、鶏を対象とする飼料（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

(ア) 成分規格

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、1 g 中に 2,000 でんぷん糖化力単位以上を含む。

物理的・化学的性質

- ① 本品は、淡褐色～濃褐色の液体である。
- ② 本品の水溶液又は水懸濁液（1→100）の pH は、5.0～7.5 である。
- ③ 本品は、pH 5.0～7.0 において最大の酵素活性を有する。

純度試験

- ① 鉛 本品 1.0 g (0.95～1.04 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、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）。
- ③ 抗菌活性 本品 1 g (0.5～1.4 g) を量り、抗菌活性試験法により試験を行うとき、抗菌活性を示してはならない。

強熱残分 20.0%以下（1 g）

酵素力試験 でんぷん糖化力試験法により試験を行う。

(イ) 製造の方法の基準

Bacillus licheniformis に属する菌株を宿主としたアミラーゼ生産組換え体を培養し、培養を終了した後、培養物をろ過し、又は水で抽出した後、ろ過して菌体を除去し、さらに、ろ液を濃縮して製造すること。

(ウ) 保存の方法の基準

遮光した密閉容器に保存すること。

(エ) 表示の基準

本品の直接の容器又は直接の被包に、最大の酵素活性を示す pH 値（小数点以下第1位まで）を記載すること

イ 製剤（その１ 液状）

(ア) 成分規格

本品は、アミラーゼ（その３）製造用原体に、必要に応じてショ糖、塩化ナトリウム、ソルビン酸カリウムを加え、さらに水を混和した水溶性液状物である。

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、表示でんぷん糖化力単位の 85～170%を含む。

酵素力試験 でんぷん糖化力試験法により試験を行う。

(イ) 保存の方法の基準

アミラーゼ（その３）製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(ウ) 表示の基準

アミラーゼ（その３）製造用原体の表示の基準を準用する。

ウ 製剤（その２）

(ア) 成分規格

本品は、アミラーゼ（その３）製造用原体に、必要に応じて硫酸ナトリウムを加え、さらに、賦形物質を混和した小片、粉末又は粒子である。

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、表示でんぷん糖化力単位の 85～170%を含む。

酵素力試験 でんぷん糖化力試験法により試験を行う。

(イ) 保存の方法の基準

アミラーゼ（その３）製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(ウ) 表示の基準

アミラーゼ（その３）製造用原体の表示の基準を準用する。