

Ｌ－イソロイシン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 6 年 7 月 23 日付け 6 消安第 2529 号をもって諮問されたＬ－イソロイシン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：Ｌ－イソロイシン

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 6 年 7 月 23 日 諮問

令和 6 年 7 月 23 日 飼料添加物効果安全性小委員会

令和 6 年 11 月 27 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. 2～31 のとおり）。

基準及び規格を作成した（資料 P. 32 のとおり）。

飼料添加物の効果安全性について（案）

たん白質の加水分解により製造される
L-イソロイシン

令和 6 年 12 月 24 日

農林水産省 消費・安全局 畜水産安全管理課

目 次

1	名称等	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	3
3-1	効果を裏付ける基礎的事項	3
3-2	効果を裏付ける野外応用による試験	3
3-2-1	豚	3
4	残留性に関する事項	4
5	安全性に関する事項	4
5-1	毒性試験	4
5-1-1	一般毒性試験	4
5-1-1-1	単回投与毒性試験	4
5-1-1-2	反復投与毒性試験（短期）	4
5-1-1-3	反復投与毒性試験（長期）	12
5-1-2	特殊毒性試験	12
5-1-2-1	世代繁殖試験	12
5-1-2-2	発生毒性試験	13
5-1-2-3	変異原性試験	13
5-1-3	生体内動態	14
5-2	対象家畜を用いた飼養試験	14
5-2-1	豚	14
5-2-2	鶏	15
6	審議結果	16
7	参照（参考文献及び参考資料）	17

L-イソロイシンに関する効果安全性について

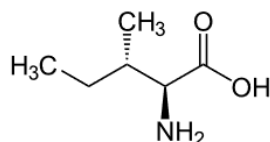
1 名称等

一般名：L-イソロイシン

化学名：L-Isoleucine

CAS 番号：73-32-5

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：全家畜等

推奨添加量： 0.01%～0.50%

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-イソロイシンはたん白質を構成するアミノ酸の一つであり、哺乳動物、家禽、魚類及び甲殻類の必須アミノ酸である。

国内においては、令和4年に *Corynebacterium glutamicum* KCCM 80189 株より算出される L-イソロイシンが飼料添加物に指定されている。

今回指定を要望された L-イソロイシンは、現在定められている産生菌株を培養して生産する発酵法による製造とは異なり、羽毛及び羊毛の加水分解により製造されるものとなっている。[参照 1]

EU においては、加水分解により製造される L-イソロイシンが飼料添加物として使用が認められており、アメリカ及びインドにおいては今回指定を要望された L-イソロイシンが食品添加物としての使用が認められている。

国内においては、今回指定を要望された L-イソロイシンが食品添加物として使用がされている。[参照 2,3,4,5,6]

また、国内においては L-イソロイシンを主成分とする動物用医薬品は承認されており、EU においては、全ての食品生産種に対する動物用医薬品として承認されており、残留基準値は設定されていない。[参照 7,8]

3 効果に関する事項

3-1 効果を裏付ける基礎的事項

- ・イソロイシンは、鶏、豚、魚類及びエビの必須アミノ酸であると定義されている。
[参照 9,10]
- ・ほ乳類である牛等の反芻動物においても、イソロイシンは必須アミノ酸であるといえる。
[参照 11,12,13]

3-2 効果を裏付ける野外応用による試験

3-2-1 豚

(1) 方法

豚（ピエトレン×ランドレース種、去勢雄及び雌、週齢不明、初期体重 8kg）を用いて、イソロイシンを制限した基礎飼料とイソロイシンを制限した基礎飼料に飼料用イソロイシン（L-イソロイシンを 97.1 %含む）を 0.102 , 0.206 %（それぞれ 23.41 , 53.18 mg/kg 体重/日）となるように添加した飼料および医療用イソロイシン（L-イソロイシンを 99.9 %含む）を 0.100 , 0.200 %（それぞれ 23.28 , 50.35 mg/kg 体重/日）となるように添加した飼料をそれぞれ 42 日間給与して、飼育成績（増体重、飼料摂取量、飼料要求率）の比較を行った（1 群 2 頭、5 反復）。

(2) 結果

各項目の結果を表 1 に示した。

増体重および飼料摂取量について、無添加群と比較して良好な結果を示した。

飼料用イソロイシン添加群と医薬品用イソロイシン添加群間において差は認められなかった。
[参照 14]

表 1 L-イソロイシンの給与効果

	無 添 加 群 (%)	飼 料 用 イ ソ ロ イ シ ン (97.1%) 添加群 (%)		医 薬 品 用 イ ソ ロ イ シ ン (99.9%) 添加群 (%)	
	0	0.102	0.206	0.100	0.200
増体重 (g/日)	161a	306b	499c	330b	465c
飼料摂取量 (g/日)	289a	478b	748c	509b	693c
飼料要求率	1.87a	1.57b	1.50b	1.55b	1.50b
遊離 L-イソロイシン (%)	<0.02	0.105	0.192	0.105	0.198
総 L-イソロイシン	0.41	0.49	0.59	0.50	0.59

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

4 残留性に関する事項

L-イソロイシン等のアミノ酸について、一般的に、タンパク質の分解によって生じた遊離アミノ酸は、小腸粘膜を通り体内に吸収され、代謝に利用されることから、生体内に過剰なアミノ酸は蓄積されないとしている。また、アミノ酸の分解によって生じた過剰な窒素は、尿素に変換して排泄されることから、生体内に過剰なアミノ酸は蓄積されにくいとしている。[参照 15]

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

【試験①】

ラット (SD 系、雌、7 週齢) を用いて、L-イソロイシンを強制経口投与した。投与量は 300、2000 mg/kg 体重とし、投与後 15 日間観察を行った。

死亡例はなく、一般状態の変化も認められなかった。また、体重は順調に推移し、観察終了日の剖検では、全身の器官において異常は認められなかった。[参照 14]

【試験②】

ラット (CrI:(WI) WU BR 系、雌、7-8 週齢) を用いて、L-イソロイシンを経口投与した。投与量は 2,000 mg/kg 体重とし、投与後 14 日間観察を行った。

死亡例はなく、一般状態の変化も認められなかった。また、体重は順調に推移し、観察終了日の剖検では、全身の器官において異常は認められなかった。

以上の試験①②から、LD₅₀ > 2000 mg/kg 体重と推測された。[参照 16]

5-1-1-2 反復投与毒性試験 (短期)

【試験①】

(1) 方法

ラット (F344 系、雄雌、購入時 4 週齢) を用いて、L-イソロイシン 0、1.25、2.5、5.0、8.0% を 13 週間基礎食に混餌経口投与した (1 群各 10 匹)。

(2) 統計解析

スチューデントの t 検定により有意差を検定し、尿 pH の差はマン・ホイットニーの方法により検定を行った。病理組織学的病変の発生率は、フィッシャーの正確確率の片側確率検定により検定を行った。

(3) 結果

各項目の結果について表 2 に示した。

体重、飼料摂取量について、投与による有害事象は認められなかった。尿量の増加、尿の pH 上昇、相対腎重量の増加について、8.0% 添加群の雌雄で認められた。

1.25% 添加群の雌及び 5.0% 添加群の雄で白血球数やヘモグロビン値が対象群と比較して有意に高かったが、用量依存性は認められなかった。

器官の相対重量について、脳、肝臓、脾臓において対照群と比較して有意差が認めら

れたが、用量依存性は認められなかった。

血液学的検査において、対照群と比べて 8.0%投与群の雄で無機リン（IP）の増加傾向及び Mg の有意な低下が、雌で Ca の有意な減少が認められた。Ca 及び Na の有意な減少は、2.5%、5.0%及び 8.0%投与群の雌並びに 8.0%投与群の雄に認められた。

これらの血清電解質の変化については、腎障害に関連する BUN、T-CHO 並びに TG の値が対照群と比較して変化が認められなかったため、尿量の増加による影響と考えられ、腎障害を示唆する組織病理学的変化も観察されなかった。

2.5%以上の投与群の両性で、GPT の有意な減少が認められた。5.0%及び 8.0%の雄で ALP 活性の有意な増加、雌で TP の有意な低下が認められた。

以上の結果から、L-イソロイシンの NOEL は 2.5%とされた。[参照 17]

表 2 ラットにおける L-イソロイシンの反復投与毒性試験結果

			無添加群	L-イソロイシン添加群 (%)			
				1.25	2.5	5.0	8.0
一般症状及び死亡率			・死亡や異常所見なし	・死亡や異常所見なし	・死亡や異常所見なし	・死亡や異常所見なし	・死亡や異常所見なし
臨床検査所見 (13 襲名)	血液学的検査	赤血球 (×1000)	雄 950 ± 64	雄 985 ± 34	雄 951 ± 81	雄 984 ± 98	雄 949 ± 104
			雌 885 ± 58	雌 905 ± 51	雌 927 ± 92	雌 944 ± 140	雌 901 ± 61
		白血球 (×100)	雄 74.1 ± 10.0	雄 71.0 ± 11.2	雄 72.8 ± 8.3	雄 76.1 ± 10.4	雄 74.2 ± 13.0
			雌 64.0 ± 8.0A	雌 73.2 ± 10.2B	雌 68.3 ± 13.0	雌 61.0 ± 16.6	雌 57.0 ± 11.5
		ヘモグロビン (g/dl)	雄 15.6 ± 0.5A	雄 15.7 ± 0.3	雄 15.7 ± 0.5	雄 16.1 ± 0.5B	雄 16.0 ± 0.6
			雌 15.8 ± 0.4	雌 15.7 ± 0.4	雌 15.5 ± 0.5	雌 16.0 ± 0.6	雌 15.6 ± 0.3
		ヘマトクリット (%)	雄 49.4 ± 4.4	雄 51.9 ± 1.6	雄 50.5 ± 4.0	雄 52.0 ± 5.4	雄 51.1 ± 5.9
			雌 49.4 ± 3.8	雌 50.7 ± 3.2	雌 52.7 ± 4.4	雌 53.0 ± 6.7	雌 50.3 ± 3.4
	血液生化学的検査	GOT (IU/L)	雄 81.5 ± 13.6	雄 80.3 ± 13.1	雄 76.6 ± 9.9	雄 81.5 ± 12.1	雄 71.6 ± 10.1
			雌 71.9 ± 28.1	雌 64.2 ± 6.5	雌 63.6 ± 6.5	雌 63.9 ± 5.6	雌 66.6 ± 6.5
		GPT (IU/L)	雄 23.1 ± 2.6A	雄 21.7 ± 2.8	雄 20.4 ± 2.7B	雄 20.8 ± 1.5B	雄 19.6 ± 3.6B
			雌 19.5 ±	雌 19.4 ±	雌 16.7 ±	雌 16.7 ±	雌 16.1 ±

			2.5aA	1.5	1.7b	1.8B	2.1b
	ALP (IU/L)	雄 256.0 ±23.5aA 雌 180.8 ±53.2	雄 254.3± 22.5 雌 170.5± 32.1	雄 261.0 ±28.3 雌 151.1 ±21.1	雄 284.7 ±25.0B 雌 153.3 ±23.1	雄 284.1 ±14.3b 雌 168.5 ±21.6	
	BUN (mg/dl)	雄 21.9± 2.1 雌 20.3± 2.0	雄 21.1 ± 1.5 雌 20.8 ± 3.5	雄 21.5 ± 1.7 雌 20.3 ± 2.5	雄 22.4 ± 2.4 雌 20.1 ± 2.0	雄 21.5 ± 2.1 雌 20.4 ± 1.8	
	総 コ レ ス テ ロ ー ル (mg/dl)	雄 61.9± 7.0 雌 88.5± 10.2	雄 64.0 ± 7.1 雌 88.8 ± 6.1	雄 62.4 ± 7.8 雌 88.2 ± 4.6	雄 62.8 ± 6.2 雌 90.8 ± 6.3	雄 61.5 ± 7.3 雌 92.0 ± 5.8	
	TG (mg/dl)	雄 100.9 ±26.9 雌 56.1± 17.3	雄 90.7 ± 25.8 雌 57.9 ± 17.6	雄 96.3 ± 26.8 雌 66.3 ± 17.5	雄 96.6 ± 22.8 雌 55.7 ± 18.4	雄 81.0 ± 23.5 雌 41.8 ± 12.9	
	TP (mg/dl)	雄 6.1 ± 0.2 雌 6.2 ± 0.3A	雄 6.1 ± 0.2 雌 6.3 ± 0.3	雄 6.1 ± 0.2 雌 6.1 ± 0.2	雄 6.2 ± 0.2 雌 6.0 ± 0.3B	雄 6.0 ± 0.1 雌 5.9 ± 0.1B	
	IP (IU/dl)	雄 5.4 ± 0.3a 雌 4.7 ± 0.7	雄 5.4 ± 0.6 雌 4.5 ± 1.1	雄 5.6 ± 0.5 雌 4.7 ± 0.7	雄 5.8 ± 0.5 雌 4.8 ± 1.1	雄 6.0 ± 0.5 b 雌 5.1 ± 0.6	
	Ca (IU/dl)	雄 9.8 ± 0.2 雌 10.0± 0.3A	雄 9.8 ± 0.1 雌 9.9 ± 0.3	雄 9.9 ± 0.2 雌 9.9 ± 0.2	雄 9.9 ± 0.2 雌 9.7 ± 0.5	雄 9.9 ± 0.2 雌 9.7 ± 0.2B	
	MG (mg/dl)	雄 2.04± 0.07A 雌 2.15± 0.12	雄 2.08 ± 0.06 雌 2.13 ± 0.07	雄 2.06± 0.07 雌 2.12± 0.06	雄 2.02± 0.08 雌 2.09 ± 0.22	雄 1.95± 0.08B 雌 2.11 ± 0.07	
	Na (mEq/dl)	雄 142.1 ±0.6a 雌 144.5 ±1.6aA	雄 141.7± 0.8 雌 144.5± 1.4	雄 141.6 ±0.5 雌 143.0 ±1.1B	雄 141.6 ±1.1 雌 142.0 ±2.4B	雄 140.9 ±0.8b 雌 141.9 ±0.8b	
	K (mEq/dl)	雄 4.81± 0.31	雄 4.78 ± 0.22	雄 4.77± 0.26	雄 4.78± 0.35	雄 4.74± 0.36	

			雌 4.24 ± 0.36A	雌 4.15 ± 0.33	雌 4.28 ± 0.31	雌 4.56 ± 0.57	雌 4.60 ± 0.31B
		Cl (mEq/dl)	雄 102.0 ±0.8a 雌 105.7 ±1.9aA	雄 102.1 ± 0.8 雌 105.0 ± 1.1	雄 101.6 ±1.1 雌 103.9 ±0.6B	雄 100.8 ±0.7b 雌 103.7 ±1.2b	雄 100.1 ±0.9b 雌 103.4 ±1.0b
	尿 検 査	尿 pH	pH6.0 雄 1 匹 雌 0 匹 pH6.5 雄 4 匹 雌 2 匹 pH7.0 雄 3 匹 雌 2 匹 pH7.5 雄 2 匹 雌 1 匹 pH8.0 雄 0 匹 雌 3 匹 pH8.5 雄 0 匹 A 雌 2 匹	pH6.0 雄 0 匹 雌 0 匹 pH6.5 雄 5 匹 雌 0 匹 pH7.0 雄 2 匹 雌 2 匹 pH7.5 雄 1 匹 雌 1 匹 pH8.0 雄 1 匹 雌 4 匹 pH8.5 雄 1 匹 雌 3 匹	pH6.0 雄 0 匹 雌 0 匹 pH6.5 雄 1 匹 雌 0 匹 pH7.0 雄 2 匹 雌 0 匹 pH7.5 雄 0 匹 雌 3 匹 pH8.0 雄 6 匹 雌 5 匹 pH8.5 雄 1 匹 B 雌 2 匹	pH6.0 雄 0 匹 雌 0 匹 pH6.5 雄 2 匹 雌 0 匹 pH7.0 雄 2 匹 雌 2 匹 pH7.5 雄 0 匹 雌 5 匹 pH8.0 雄 5 匹 雌 2 匹 pH8.5 雄 1 匹 B 雌 1 匹	pH6.0 雄 0 匹 雌 0 匹 pH6.5 雄 1 匹 雌 0 匹 pH7.0 雄 4 匹 雌 0 匹 pH7.5 雄 0 匹 雌 4 匹 pH8.0 雄 3 匹 雌 3 匹 pH8.5 雄 2 匹 B 雌 3 匹
			尿量 (g)	雄 0.65 ± 0.31a 雌 0.83 ± 0.33	雄 0.69 ± 0.46 雌 0.78 ± 0.39	雄 0.77 ± 0.30 雌 0.64 ± 0.25	雄 1.02 ± 0.43 雌 0.68 ± 0.28
病 理 学 的 所 見	器 官 の 相 对 重 量 (%)	脳	雄 0.60 ± 0.02A 雌 0.99 ± 0.04	雄 0.58 ± 0.04 雌 0.97 ± 0.06	雄 0.58 ± 0.03 雌 0.98 ± 0.05	雄 0.58 ± 0.05 雌 0.98 ± 0.07	雄 0.57 ± 0.02B 雌 0.98 ± 0.04
		心臓	雄 0.28 ± 0.02 雌 0.33 ± 0.02	雄 0.28 ± 0.01 雌 0.31 ± 0.02c	雄 0.28 ± 0.01 雌 0.32 ± 0.02	雄 0.28 ± 0.02 雌 0.32 ± 0.02	雄 0.28 ± 0.01 雌 0.32 ± 0.01
		肝臓	雄 2.36 ± 0.12 雌 2.24 ±	雄 2.36 ± 0.06 雌 2.14 ±	雄 2.31 ± 0.08 雌 2.18 ±	雄 2.30 ± 0.08 雌 2.17 ±	雄 2.30 ± 0.08 雌 2.26 ±

			0.09a	0.08b	0.03	0.20	0.09
	脾臓	雄 0.19 ± 0.01a 雌 0.22 ± 0.01A	雄 0.18 ± 0.01 雌 0.22 ± 0.02c	雄 0.20 ± 0.01 雌 0.23 ± 0.02B	雄 0.20 ± 0.01 雌 0.23 ± 0.03	雄 0.21 ± 0.01b 雌 0.24 ± 0.03B	
	腎臓	雄 0.62 ± 0.03a 雌 0.67 ± 0.02a	雄 0.62 ± 0.03 雌 0.65 ± 0.02	雄 0.62 ± 0.04 雌 0.65 ± 0.02	雄 0.63 ± 0.03 雌 0.66 ± 0.03	雄 0.67 ± 0.03b 雌 0.71 ± 0.03b	
	精巣	0.85±0.18	0.85±0.18c	0.83±0.16	0.90±0.06	0.83±0.18	
	卵巢	0.041±0.01 0	0.042±0.009 c	0.048±0.01 0	0.045±0.00 9	0.051±0.01 2	

AB:各項目異文字間に有意差あり (p<0.05)

ab:各項目異文字間に有意差あり (p<0.01)

c:9匹ラットを用いた解析

【試験②】

(1) 方法

ラット (Sprague-Dawley 系、雄雌、6 週齢) を用いて、L-イソロイシン 1.25、2.5、5.0%を基礎食への混餌投与にて 13 週間投与した (1 群 12 頭)。さらに回復試験として、5 週間飼育した (無添加群及び 5.0%添加群より各 6 頭)。

(2) 統計解析

バートレット検定により均一性を検定し、有意確率 5%が確認されたデータについて、群間比較するために一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、ノンパラメトリックのクラスカル・ウォリス検定による順位和検定を行った。有意差が認められたものについては、多重比較検定を行った。

(3) 結果

各項目の結果について表 3 に示した。

体重、飼料摂取量について、投与による有害事象は認められなかった。

眼科検査及び尿検査において観察された変化の多くは対照群で観察された範囲内に留まった。

組織病理学において、投与による有害事象は認められなかった。

血液生化学的検査において、グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ活性及びグルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ活性のわずかな増加が雌の 5.0%添加群で、総コレステロール及びリン脂質の低下が雄の 5.0%添加群で見られたが、これらの変化は回復試験期間内に回復した。

以上の結果から、L-イソロイシンの NOAEL は 2.5% (雄: 1.565 ± 0.060g/kg 体重/日、雌: 1.646 ± 0.095g/kg 体重/日) と考えられた。[参照 18]

表3 ラットにおける L-イソロイシンの反復投与毒性試験結果

				無添加群	L-イソロイシン添加群（％）		
					1.25	2.5	5.0
一般症状及び死亡率				・死亡や異常所見なし 雌 1 匹：後肢の腫れ 雄 1 匹：切歯の不正咬合	・死亡や異常所見なし	・死亡や異常所見なし	・死亡や異常所見なし 雌 2 匹：皮膚の擦り傷
平均増体重（g）	13 週目			雄 337.2±48.5 雌 134.3±24.1	雄 360.0 ±38.8 雌 142.4 ±23.0	雄 353.4 ±44.3 雌 147.8 ±26.6	雄 348.2 ±40.6 雌 146.3 ±25.2
	回復期間後			雄 34.0 ±7.0 雌 19.8 ±9.2	—	—	雄 42.5 ±14.5 雌 20.0 ±4.4
体重（g）（13 週目）				雄 501.9±48.5 雌 271.3±28.8	雄 530.6 ±37.3 雌 278.8 ±25.4	雄 523.8 ±45.1 雌 285.5 ±27.7	雄 523.9 ±43.1 雌 277.8 ±29.3
平均飼料摂取量（mg/kg/日）				—	雄 783.0 ±22.9 雌 944.0 ±46.1	雄 1564.8 ±60.1 雌 1646.3 ±95.0	雄 3007.6 ±112.9 雌 3701.6 ±227.3
眼科検査（13 週目）		黄斑変性症		—	—	雄 1 匹 雌 1 匹	—
臨床検査所見	血液生化学的検査	13 週目	トロンボプラスチン時間(s)	雄 16.0 ±0.9	—	雄 14.5 ±1.6	—
			GOT（U/L）	雌 57.5 ±6.1	—	—	雌 75.4 ±21.0
			GPT（U/L）	雌 31.5 ±5.6	—	—	雌 49.2 ±21.5
		回復期間後	総コレステロール（mg/dl）	雄 113.8±19.5	—	—	雄 79.8 ±16.6
			リン脂質（mg/dl）	雄 170.5±26.9	—	—	雄 131.3 ±21.8

	尿 検 査	5 週 目	尿蛋白陽性 (30～ 70mg/dl)	6 匹	—	10 匹	16 匹
			リン酸塩の尿 沈渣	6 匹	—	9 匹	14 匹
		13 週 目	ナトリウム排 泄量 (mEq/24h)	2.38±0.46	—	—	1.71±0.49
			カリウム排泄 量(mEq/24h)	3.80±0.71	—	—	3.06±0.71
			クロール排泄 量(mEq/24h)	2.82±0.50	—	—	2.07±0.52
			尿蛋白陽性 (30～ 70mg/dl)	1 匹	—	—	7 匹
			尿糖陽性	1 匹	—	—	7 匹
			尿ウロビリノ ーゲン陽性	4 匹	—	—	9 匹
病 理 学 的 検 査 所 見	器 官 の 絶 対 重 量	脳 (g)		雄 2.17 ± 0.1 雌 1.93 ± 0.08	雄 2.17 ± 0.07 雌 1.93 ± 0.06	雄 2.18 ± 0.08 雌 1.93 ± 0.05	雄 2.17 ± 0.07 雌 1.91 ± 0.08
		脳下垂体 (mg)		雄 12.2 ± 1.2 雌 14.1 ± 2.3	雄 13.1 ± 2.1 雌 13.2 ± 1.9	雄 13.9 ± 1.9 雌 14.1 ± 1.5	雄 13.5 ± 1.4 雌 14.1 ± 1.7
		唾液腺 (mg)		雄 759 ± 99 雌 486 ± 54	雄 798 ± 102 雌 477±42	雄 811 ± 121 雌 488±42	雄 832±71 雌 496±50
		胸腺 (mg)		雄 279 ± 57 雌 250 ± 38	雄 302±97 雌 240±42	雄 313±97 雌 237±62	雄 323±34 雌 249±39
		心臓 (g)		雄 1.38 ± 0.09 雌 0.83 ± 0.06	雄 1.37 ± 0.10 雌 0.87 ± 0.09	雄 1.50 ± 0.10 雌 0.86 ± 0.10	雄 1.39 ± 0.07 雌 0.85 ± 0.07
		肺 (g)		雄 1.41 ±	雄 1.44 ±	雄 1.46 ±	雄 1.47 ±

			0.14 雌 1.05 ± 0.10	0.11 雌 1.05 ± 0.08	0.14 雌 1.09 ± 0.06	0.06 雌 1.05 ± 0.09
		肝臓 (g)	雄 13.43± 1.81 雌 6.65 ± 0.76	雄 13.83 ± 1.12 雌 6.88 ± 0.73	雄 13.43 ± 2.05 雌 6.87 ± 0.67	雄 13.49 ± 1.41 雌 6.70 ± 0.71
		脾臓 (g)	雄 0.75 ± 0.09 雌 0.50 ± 0.06	雄 0.81 ± 0.20 雌 0.50 ± 0.05	雄 0.83 ± 0.16 雌 0.53 ± 0.08	雄 0.85 ± 0.12 雌 0.47 ± 0.06
		腎臓 (g)	雄 2.99 ± 0.11 雌 1.73 ± 0.15	雄 3.17 ± 0.22 雌 1.76 ± 0.15	雄 3.08 ± 0.24 雌 1.73 ± 0.12	雄 3.18 ± 0.30 雌 1.75 ± 0.13
		副腎 (mg)	雄 57±8 雌 65±10	雄 60±10 雌 63±10	雄 57±10 雌 63±9	雄 56±6 雌 69±12
		精巣 (g)	3.2±0.15	3.27±0.25	3.10±0.22	3.13±0.24
		前立腺 (g)	1.33±0.16	1.32±0.30	1.21±0.18	1.25±0.25
		卵巣 (g)	70.0±12.9	81.7±17.7	78.6±17.3	74.1±14.4
		子宮 (mg)	613±86	569±117	543±64	524±94
	組 織 学 的 検 査	13 週 目	肺の限局性出血	雄 3 匹	雄 2 匹	雄 1 匹
びらん性胃炎			雌 1 匹	—	雌 1 匹	雌 1 匹
肉芽腫			—	—	雌 1 匹	雌 1 匹
盲腸粘膜への浸潤			雌 1 匹	雄 3 匹 雌 1 匹	雌 3 匹	雄 1 匹 雌 2 匹
肝細胞の軽度の細胞壊死			—	—	—	雌 1 匹 (13 週目に確認)
小肉芽腫			雄 1 匹 雌 2 匹	雄 2 匹 雌 3 匹	雄 2 匹 雌 3 匹	雄 1 匹 雌 2 匹
脾臓の線維化			—	—	雄 2 匹	雄 1 匹
異所性胸腺			—	—	雄 2 匹 雌 1 匹	雌 2 匹
腎臓の動脈炎			—	—	—	雄 1 匹
腎臓の嚢胞			—	—	—	雌 2 匹
精巣の精細管の萎縮			—	—	雄 1 匹	

			間質細胞浸潤	—	—	—	雌 1 匹
			結膜の石灰沈着、肉芽腫	—	—	雄 1 匹	
			大腿筋繊維の変性	—	—	—	雄 1 匹
			後肢の関節炎	雌 1 匹	—	—	—
		回復期間後	びらん性胃炎	1 匹 (性別不明)	—	—	—
			小肉芽腫	雄 1 匹	—	—	雄 1 匹 雌 3 匹
			脾臓の線維化	1 匹 (性別不明)	—	—	—
			目の硝子体の出血	—	—	—	雄 1 匹

【試験③】

ラット（系統不明、雌雄、週齢不明）を用いて、L-イソロイシンを 0、2,000、10,000、50,000mg/kg 飼料（それぞれ、0、100、600、3,000mg/kg 体重/日相当）を混合投与にて、90 日間投与した。

体重、飼料摂取量について、投与による有害事象は認められなかった。

50,000mg/kg 飼料（3,000mg/kg 体重/日）添加群において、雄で赤血球数及びヘモグロビンの増加、雌で血小板数の減少及び発情周期の有意な増加が認められた。

以上の結果から、L-イソロイシンの NOAEL は 10,000mg/kg 飼料（600mg/kg 体重/日）と考えられた。[参照 14]

5-1-1-3 反復投与毒性試験（長期）

ラット（ラット、系統不明、週齢不明）を用いて、イソロイシンを 0、25,000、50,000 mg/kg 飼料を混合投与にて、104 週間投与した（1 群雌雄各 50 匹）。

0、25,000、50,000 mg/kg 飼料添加群それぞれの生存率は、雄で 86%、82%及び 74%、雌で 84%、86%及び 76%であった。

体重については無添加群と比較して有意に増加した。

飼料摂取量については、いずれの投与群においても影響は認められなかった。

血液学的検査及び尿検査については、いずれの投与群においても影響は認められなかった。

血液生化学検査については、片性の 50,000mg/kg 飼料添加群においていくつかの変化が認められた。

臓器重量については、50,000 mg/kg 飼料添加群（雄）は無添加群と比較して、腎臓の相対重量は増加し、精巣重量は減少した。精巣重量の低下については、萎縮の影響と考えられた。50,000 mg/kg 飼料添加群（雄）において、甲状腺の C 細胞腺腫の発生が低

いことを除いて、腫瘍の発生頻度は添加群間に差は認められなかった。

以上の結果から、L-イソロイシンの NOAEL は 924.7mg/kg 体重/日とされた。[参照 14]

5-1-2 特殊毒性試験

5-1-2-1 世代繁殖試験(1 世代)

(1) 方法

ラット（系統不明、雌雄、体重不明）を用いて、飼料に L-イソロイシンを 0、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000mg/kg 飼料（それぞれ雄では、550、1,080、1,580、2,110、2,720mg/kg 体重/日相当。雌では、880、1,750、2,610、3,430、4,280mg/kg 体重/日相当）添加した飼料を交配 14 日前から分娩後 21 日まで投与した（1 群、雌雄各 28 匹）。

(2) 結果

妊孕能、生殖能、同腹個体数、性比、仔体重については、投与による影響は認められなかった。

50,000mg/kg 飼料添加群においては、無添加群と比較して分娩後 21 日目に発育不良と診断される個体が有意に増加したが、平均体重には有意な差が認められなかったため、投与による影響とはみなされなかった。[参照 14]

5-1-2-2 発生毒性試験

(1) 方法

ラット（系統不明、雌雄、体重不明）を用いて、飼料に L-イソロイシンを 0、2,000、10,000、50,000mg/kg 飼料（それぞれ、0、90-150、480-750、2320-3640mg/kg 体重/日）添加した飼料を妊娠から分娩後 21 日目まで投与した。

(2) 結果

体重について、投与による影響は認められなかった。

飼料摂取量は 50,000mg/kg 飼料添加群で、7-10 日目、14-17 日目に無添加群と比較して減少した。その他、被験物質の投与による影響は認められなかった。[参照 14]

5-1-2-3 変異原性試験

L-イソロイシンの変異原性試験の結果を表 4 に示した。

表 4 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</i> Typhimutium TA92,TA94,TA98. TA100,TA1535,TA1537	0 ~ 3300 µg/plate (+/-S9)	陰性	参 照 19
	<i>Salmonella</i> Typhimutium TA97,TA102	0~1000 µg/plate(+/-S9)	陰性	参 照 20

	<i>Salmonella</i> Typhimutium TA100,TA98,TA1535,TA1537 お よび <i>E.coli</i> WP2uvrA	62~5000 µg/plate (+/-S9)	陰性	参 照 14
	<i>E.coli</i> (uvr B 株、uvr B umu C 株、 uvr B Lex A 株)	0~262 µg/mL(-S9)	陰性	参 照 21,22
染色体異常 試験	チャイニーズハムスター肺腺維芽 細胞 (CHL)	0~2.0mg/mL,48hr 連続処理 (-S9)	陰性	参 照 19
	チャイニーズハムスター卵巣由来 細胞 (CHO)	0~1.31 mg/mL, (+/-S9)	陰性	参 照 14
哺乳類細胞 を用いる突 然変異試験	マウスリンフォース細胞 (L5178Y)	0.076~1.25mg/mL(-S9)	陰性	参 照 14

5-1-3 生体内動態に関する試験

摂取されたペプチド及び単一アミノ酸は、十二指腸及び小腸において、さまざまな輸送系により、刷子縁膜を超えて小腸上皮細胞に輸送される。ペプチドかアミノ酸かに関係なく、単一のアミノ酸として肝門脈循環に入る。吸収されたアミノ酸は肝門脈系から末梢血液循環に入る。L 体のアミノ酸は、細胞タンパクの合成やその他生理学的目的のために組織に取り込まれ、余剰なアミノ酸は主に肝臓で分解される。L 体アミノ酸の分解には、アミノ基の除去も含まれており、哺乳動物はアミノ基を尿素に変換して、尿中に排泄する。アミノ基を除去した後、残りの酸はエネルギーや内因性物質の合成に使用される。[参照 23]

一般に、タンパク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、吸収された遊離アミノ酸は、細胞内タンパク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、新しいタンパク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、生体内に過剰なアミノ酸は蓄積されない。アミノ酸の分解によって生じた過剰な窒素を、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変換し、高等脊椎動物はアンモニアを尿素に変換して排泄する。結晶性の粉末である本製剤を混餌投与した場合、L-イソロイシンは速やかに遊離アミノ酸として吸収され、同様の体内動態を示すと考えられる。[参照 23]

5-2 対象家畜を用いた飼養試験

5-2-1 豚

(1) 方法

子豚（品種不明、体重 12kg）を用いて、対照飼料（L-イソロイシン 0.076%添加）と対照飼料の 10 倍量の L-イソロイシン又は L-バリンを単独あるいは組み合わせて添

加した飼料をそれぞれ 21 日間給与した（1 群 16 頭、1 反復）。

（２）結果

対照群（L-イソロイシン 0.076%添加）と比較して、10 倍量 L-イソロイシン添加群（L-イソロイシン 0.7605%添加）で飼料摂取量及び増体重がわずかに増加した。

血漿中のロイシン及びバリンの濃度については、10 倍量投与による影響は認められなかった。[参照 14]

5－2－2 鶏

（１）方法

鶏のひな（単冠白色レグホーン種、雄、8 日齢）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-イソロイシンに代えて添加した飼料をそれぞれ 10 日間給与した（1 群 4 頭）。

（２）結果

結果について表 5 に示した。

基礎飼料給与群と比較して、L-イソロイシン給与群では、飼料摂取量、増体重がわずかに低かったが、飼料要求率について差は認められなかった。

L-イソロイシン過剰給与における悪影響はわずかであった。[参照 23]

表 5 L-イソロイシンの給与試験結果

	基礎飼料給与群	L-イソロイシン添加群
増体重（g/10 日）	58±1	48±3
飼料摂取量（g/10 日）	179±3	148±7
飼料要求率（%）	32±1	32±1

6 審議結果

たん白質を加水分解して製造される L-イソロイシン (企業推奨添加量: 0.01~0.50%) 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. 農林水産省, “飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令別表第2（抜粋）
2. European Commission, “COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2018/249 of 15 February 2018 concerning the authorisation of taurine, beta-alanine, L-alanine, L-arginine, L-aspartic acid, L-histidine, D,L-isoleucine, L-leucine, L-phenylalanine, L-proline, D,L-serine, L-tyrosine,” vol. 2016, no. 68, pp.48–119, 2018.
3. European Commission, “COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2018/1567 of 18 October 2018,” vol. 12, no. February, pp. 23–25, 2018.
4. European Commission, “COMMISSION REGULATION (EU) No 348/2010 of 23 April 2010 concerning the authorisation of L-isoleucine as a feed additive for all animal species,” Off. J. Eur. Union, vol. L104/29, 2010.
5. 日本食品化学研究振興財団公益財団法人, “指定添加物リスト（規則別表第1）”
6. 厚生労働省, “第10版食品添加物公定書”
7. 動物医薬品検査所, “動物用医薬品等データベース検索結果,” 2024.
8. European Parliament and the Council of the European Union, “COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin,” Off. J. Eur. Union, no. L 15/1, 2010.
9. 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構, 日本飼養標準 家禽(2011年版)
10. 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構, 日本飼養標準 豚(2013年版)
11. V. Bampidis et al., “Safety and efficacy of a feed additive consisting of l-isoleucine produced by *Corynebacterium glutamicum* KCCM 80185 for all animal species (CJ Europe GmbH),” EFSA J., vol. 19, no. 12, p. 6977, 2021, doi:10.2903/j.efsa.2021.6977.
12. V. Bampidis et al., “Safety and efficacy of l-isoleucine produced by fermentation with *Corynebacterium glutamicum* KCCM 80189 for all animal species,” EFSA J., vol. 18, no. 2, p. 6021, 2020, doi:10.2903/j.efsa.2020.6021.
13. V. Bampidis et al., “Assessment of the application for renewal of authorisation of l-isoleucine produced by *Escherichia coli* FERM ABP-10641 as a 20 nutritional additive, its extension of use in water for drinking and a new use as a flavouring additive for all animal species,” EFSA J., vol. 18, no. 2, 2020, doi:10.2903/j.efsa.2020.6022.
14. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), “Scientific Opinion on the safety and efficacy of L-isoleucine for all animal species,” EFSA J., vol. 8, no. 1, pp. 1–19, 2010, doi:10.2903/j.efsa.2010.1425.
15. 食品安全委員会, “飼料添加物評価書 *Corynebacterium glutamicum* KCCM80189 株により生産された L-イソロイシンを有効成分とする飼料添加物,” 2022.

16. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to Flavouring Group Evaluation 26: Amino acids from chemical group 34 (The EFSA Journal) (2006)
17. SUBCHRONIC TOXICITY STUDY OF L-ISOLEUCINE IN F344 RATS (Journal of Toxicology and Environmental Health,) (1996)
18. Thirteen-Week Oral Toxicity Study of Branched-Chain Amino Acids in Rats (International Journal of Toxicology) (2004)
19. 石館基、祖父尼俊雄、吉川邦衛, “食品添加物の変異原性試験成績 (その3),” 変異原と毒性, vol. 5, no. 6, pp. 579-587, 1982.
20. 藤田博、佐々木美枝子, “Salmonella typhimurium TA97,TA102 を用いた食品添加物の変異原性試験 第5報,” 東京都立衛生研究所研究年報 (Annual Rep. Tokyo Metrop.Res. Lab. Public Heal., vol. 41, pp. 315-322, 1990.
21. N. J. Sargentini and K. C. Smith, “Mutagenesis by normal metabolites in *Escherichia coli*: phenylalanine mutagenesis is dependent on error-prone DNA repair,” Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen., vol. 161, no. 2, pp. 113-118, 1986, doi: 10.1016/0027-5107(86)90002-3.
22. P. Aids, “Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavouring, Processing Aids and Materials in contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to Flavouring Group Evaluation 26: Amino acids from chemical group 34,” EFSA J., vol. 373, pp. 1-48, 2006, doi:10.2903/j.efsa.2008.790.
23. J. OKUMURA and K. YAMAGUCHI, “Effect of Excess of Individual Essential Amino Acids in Diets on Chicks,” Japanese Poult. Sci., vol. 17, no. 3, pp. 135-139, 1980, doi: 10.2141/jpsa.17.135.

飼料添加物の効果安全性について

L-イソロイシン

令和3年9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	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	3
3-1	効果を裏付ける基礎的試験 (<i>in vivo</i> 試験)	3
3-2	効果を裏付ける野外応用試験	3
3-2-1	鶏	3
3-2-2	豚	4
3-2-3	豚	5
3-2-4	牛	6
4	安全性に関する事項	7
4-1	毒性試験	7
4-1-1	一般毒性試験	7
4-1-1-1	単回投与毒性試験	7
4-1-1-2	反復投与毒性試験 (短期)	7
4-1-2	特殊毒性試験	7
4-1-2-1	変異原性試験	8
4-1-3	生体内動態に関する試験	8
5	その他	9
6	審議結果	9
7	参照 (参考文献及び参考資料)	10

L-イソロイシンに関する効果安全性について

1 名称等

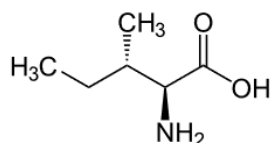
一般名：L-イソロイシン

化学名：L-Isoleucine

化学式：C₆H₁₃NO₂（分子量 131.17）

CAS 番号：73-32-5

化学構造式：



商品名：L-イソロイシン

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 0.01～0.50%

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

2-1 類縁物質

L-イソロイシン、L-バリン、L-ロイシンは、構造が似ていることから分岐鎖アミノ酸と呼ばれている。ヒトではこれら3種のアミノ酸混合物の摂取により、筋肉タンパク質合成促進、筋肉タンパク質分解抑制、筋損傷軽減などの効果が期待されている。国内では、L-バリンは飼料添加物として指定され、栄養補給の目的で使用されている。

2-2 起源又は発見の経緯、許可状況及び使用状況等

L-イソロイシンはたん白質を構成するアミノ酸の一つであり、哺乳動物、家禽、魚類及び甲殻類の必須アミノ酸である。現在、飼料中のL-イソロイシン量はたん白質原料を使用することで要求量が満たされていると考えられるが、L-イソロイシンを飼料添加物として指定することで、粗たん白質やリン量を抑えた環境負荷低減型配合飼料を製造するための原料等の選択肢が増えることが期待される。今回指定が要望されたL-イソロイシンは、発酵-酵素法により安価に製造する技術が近年確立された。

日本国内では、L-イソロイシンが食品添加物として使用を認められている。

海外では、アジア諸国においてL-イソロイシンが飼料添加物としての使用を認められている。米国では、アミノ酸としてGRAS指定を受けた。EU諸国では、要望があったL-イソロイシンを生産する菌株の安全性確認は終了している。

3 効果に関する事項

3-1 効果を裏付ける基礎的試験

イソロイシンは、鶏、豚、魚類及びエビの必須アミノ酸であると定義されている。[参照 1, 2, 3, 4]

ほ乳類である牛等の反芻動物においても、イソロイシンは必須アミノ酸であるといえる。

3-2 効果を裏付ける野外応用による試験

3-2-1 鶏（産卵鶏）

（1）方法

【試験①】

産卵鶏（Shaver white 種、雌、20 週齢、平均体重 1.39 ± 0.06 kg）を用いて、基礎飼料（飼料中の粗たん白質含有率（以下、「CP」とする）18%、L-イソロイシン 0.60%）又はたん白質低減飼料（CP 16%、L-イソロイシン 0.52 %）に L-イソロイシン含量が 0.52、0.60、0.67、0.75%となるように添加した飼料をそれぞれ 49 日間給与した。イソロイシン添加飼料では、リジン含量 0.75%に対して、イソロイシン含量が、70、80、90、100%の割合となる。（1 群 35～36 羽、6 反復）。

【試験②】

試験①後の産卵鶏（Shaver white 種、雌、28 週齢）を用いて、基礎飼料（CP 16%、L-イソロイシン 0.57 %）又はたん白質低減飼料（CP 14%、L-イソロイシン 0.50 %）に L-イソロイシン含量が 0.50、0.57、0.64、0.71%となるように添加した飼料をそれぞれ 126 日間給与した。イソロイシン添加飼料では、リジン含量の 0.71%に対して、イソロイシン含量が、70、80、90、100%となるように添加した。（1 群 35～36 羽、6 反復）。

（2）統計解析

各群の産卵率、平均飼料摂取量及び卵重の平均値について、二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、Tukey 法を用いて多重比較を行った。

（3）結果

産卵率について、試験①及び②において L-イソロイシンを ILE: LYS（飼料中のリジン量に対する L-イソロイシンの割合）90, 100 %で添加することで、基礎飼料群と同程度の値となった。

卵中について、試験①においては L-イソロイシンを ILE: LYS が 70, 80, 90, 100 %になるように添加することで、基礎飼料群と同程度の値となった。試験②においては L-イソロイシンを ILE: LYS が 70, 80, 90 %になるように添加することで、基礎飼料群と同程度の値となった。

以上から、不足分のイソロイシンを補填することにより、産卵率が回復したことから、たん白質低減飼料にて、制限アミノ酸となり影響を与える可能性があることが示唆された。（表 1、2 参照）[参照 6]

表 1 試験①鶏用たん白質低減飼料に添加したときの L-イソロイシンの給与効果

試験 1					
	基礎飼料群 ILE:LYS 80	L-イソロイシン添加群			
		ILE: LYS 70	ILE: LYS 80	ILE: LYS 90	ILE: LYS 100
産卵率(%)	97.6 ^a	94.3 ^b	93.8 ^b	95.4 ^{a, b}	97.6 ^a
平均飼料摂取量(g/日)	97	95	98	96	96
卵重(g)	51.7 ^{a, b}	51.3 ^{a, b}	51.5 ^{a, b}	52.1 ^a	51.1 ^b

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (P<0.05)

表 2 試験②鶏用たん白質低減飼料に添加したときの L-イソロイシンの給与効果

試験 2					
	基礎飼料群 (ILE 80)	L-イソロイシン添加群			
		ILE: LYS 70	ILE: LYS 80	ILE: LYS 90	ILE: LYS 100
産卵率(%)	99.2 ^{a, b}	97.7 ^c	98.1 ^{b, c}	99.6 ^a	99.1 ^{a, b}
平均飼料摂取量(g/日)	114 ^a	113 ^{a, b}	116 ^a	110 ^b	111 ^b
卵重(g)	58.2 ^a	58.6 ^a	58.0 ^{a, b}	58.2 ^a	57.3 ^b

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (P<0.05)

3-2-2 豚

(1) 方法

【試験①】

子豚 (Line 326 sire × C22 dams 種、雄雌、17 日齢、体重 7～11 kg) を用いて、基礎飼料 (CP: 20.48%、L-イソロイシン: 0.56 %、リジン: 1.37 %) に、L-イソロイシンが 0.56%、0.62、0.68、0.74、0.80、0.86、0.92%となるように添加した飼料をそれぞれ 16 日間給与した。(1 群 20 頭、12 反復) 。[参照 7]

【試験②】

子豚 (Line 326 sire × C22 dams 種、雄雌、17 日齢、体重 7～11 kg) を用いて、基礎飼料 (CP 18.05 %、L-イソロイシン 0.46 %、リジン 1.21 %) に、L-イソロイシンが 0.46、0.55、0.64、0.73、0.82、0.91%となるように添加した飼料及びリジン高添加飼料群 (CP 18.23 %、イソロイシン 0.91%、リジン 1.36 %) をそれぞれ 16 日間給与した。

(1 群 22 頭、12 反復) [参照 7]

(2) 解析

各群の日増体量、平均飼料摂取量及び平均飼料要求率の平均値について、最小二乗法を用いて群間の比較を行った。

(3) 結果

日増体量、平均飼料摂取量及び平均飼料要求率について、試験①及び②において添加量との間に正の相関が見られた。

試験①では、イソロイシン 0.80%の添加群で日増体量、飼料摂取量が最大を示した。

試験②では、飼料の総イソロイシン含量が増加するに連れて日増体量が増加する傾向となり、この時期の子豚のイソロイシン要求量は 0.68% (ILE: LYS = 0.61)を示した。

(表 3、4 参照)。[参照 7]

表 3 試験①子豚用飼料に添加したときの L-イソロイシンの給与効果

	イソロイシン含有率						
	0.56%	0.62%	0.68%	0.74%	0.80%	0.86%	0.92%
平均増体量 (*,**)(g/日)	149	181	254	310	321	317	305
平均飼料摂取量 (*,**)(g/日)	267	281	348	401	420	412	403
平均飼料要求率 (*,**)(g/g)	1.79	1.55	1.37	1.29	1.31	1.3	1.32

各値は平均値

各項目において、添加量との間に相関あり (*Linear effect (P=0.01)、**Quadratic effect(P=0.01))

表 4 試験②子豚用飼料に添加したときの L-イソロイシンの給与効果

	イソロイシン含有率						リジン 高添加群
	0.46%	0.55%	0.64%	0.73%	0.82%	0.91%	
平均増体量 (*,**)(g/日)	52	111	207	258	246	260	264
平均飼料摂取量 (*,**)(g/日)	165	213	351	365	350	359	343
平均飼料要求率 (*,**)(g/g)	3.17	1.92	1.7	1.41	1.42	1.38	1.3

各値は平均値

各項目において、添加量との間に相関あり (*Linear effect (P=0.01)、**Quadratic effect(P=0.01))

3-2-3 豚

(1) 方法

豚 (Landrace×Yorkshire 種、母豚、2～7 産次) を用いて、基礎飼料 (CP 11.48%、L-イソロイシン 0.20%) に、L-イソロイシンが 0.20、0.28、0.37、0.65、0.92%となるように添加した飼料をそれぞれ 21 日間給与した。(1 群 5 頭、1 反復)。

(2) 解析

各群の平均乳量及び子豚の日増体量の平均値について、回帰分析を行い各群間の比較を行った。回帰分析係数は不等間隔であることを考慮して計算された。

(3) 結果

母乳生産量及び子豚の成長について、添加量の間二次関数的な相関を示し、0.37%で最大を示した。(表 3 参照)。[参照 8]

表 5 母豚用飼料に添加したときの L-イソロイシンの給与効果

	イソロイシン含有率 (%)				
	0.20	0.28	0.37	0.65	0.92
平均乳量 (kg/日)	5.80	6.53	6.98	6.46	5.65
増体量(子豚) (7・21 日 齢)(kg)	1.88	2.19	2.38	2.29	2.06

各値は平均値

各項目において、添加量との間に相関あり

3-2-4 牛

十二指腸カニューレ装着泌乳牛において、アミノ酸要求量算出モデルを用いて算出した要求量と比較し、小腸に供給されるイソロイシンが不足している事を示唆されている。
[参照 9]

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

【試験①】

ラット (SD 系、雌、7 週齢) を用いて、L-イソロイシンを強制経口投与した。投与量は 300、2000 mg/kg 体重とし、投与後 15 日間観察を行った。

死亡例はなく、一般状態の変化も認められなかった。また、体重は順調に推移し、観察終了日の剖検では、全身の器官において異常は認められなかった。[参照 10]

【試験②】

ラット (CrI: (WI) WU BR 系、雌、7-8 週齢) を用いて、L-イソロイシンを経口投与した。投与後 14 日間観察を行った。

死亡例はなく、一般状態の変化も認められなかった。また、体重は順調に推移し、観察終了日の剖検では、全身の器官において異常は認められなかった。

以上の試験①②から、LD₅₀ > 2000 mg/kg 体重と推測された。[参照 11]

4-1-1-2 反復投与毒性試験 (短期)

【試験①】

ラット (F344 系、雄雌、4 週齢) を用いて、L-イソロイシン 0、1.25、2.5、5.0、8.0% を 13 週間混餌経口投与した。

体重、飼料摂取量について、投与による有害事象は認められなかった。

尿量の増加、尿の pH 上昇、相対腎重量の増加について、8.0% 添加群の雌雄で認められた。一方、腎障害に関する他の数値は正常値の範囲内であり、腎障害を示唆する組織病理学的変化は観察されなかった。

血液学的検査において、アルカリホスファターゼ活性のわずかな増加が 5.0% 以上の添加群の雄で認められた。しかしながら、他の数値は正常値の範囲内であり、これらの変化に関連する組織病理学的変化は認められなかった。

以上の結果から、L-イソロイシンの NOEL は 2.5% とされた。[参照 12]

【試験②】

ラット (Sprague-Dawley 系、雄雌、6 週齢) を用いて、L-イソロイシン 1.25、2.5、5.0% を混餌投与にて 13 週間投与した。さらに回復試験として、5 週間飼育した。

体重、飼料摂取量について、投与による有害事象は認められなかった。

眼科検査及び尿検査において観察された変化の多くは対照群で観察された範囲内に留まった。

組織病理学において、投与による有害事象は認められなかった。

血液生化学的検査において、グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ活性及びグルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ活性のわずかな増加が雌の 5.0% 添加

群で、総コレステロール及びリン脂質の低下が雄の 5.0%添加群で見られたが、これらの変化は回復試験期間内に消えた。以上の結果から、L-イソロイシンの NOAEL は 2.5%（雄：1.565 ± 0.060g/kg 体重/日、雌：1.646 ± 0.095g/kg 体重/日）と考えられた。[参照 13]

4-1-2 特殊毒性試験

4-1-2-1 変異原性試験

L-イソロイシン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> TA92、TA94、TA98、 TA100、TA1535、TA1537	0 ～ 3,300 μg/plate (+/-S9)	陰性	参照 14
	<i>Salmonella Typhimurium</i> TA97、TA102	0 ～ 1,000 μg/plate (+/-S9)	陰性	参照 15
	<i>Escherichia coli</i> (uvr B 株、 uvr B umu C 株、uvr B Lex A 株)	0 ～ 262 μg/mL (- S9)	陰性	参照 16
染色体異常試験	チャイニーズハムスター繊維芽 細胞	0 ～ 2,000 μg/mL (- S9)	陰性	参照 14
突然変異試験	<i>Escherichia coli</i> (uvr B 株、 uvr B umu C 株、uvr B Lex A 株)	0 ～ 262 μg/mL (- S9)	陰性	参照 16
姉妹染色分体交 換試験	ヒト抹消リンパ球	0 ～ 137 μg/mL (- S9)	inconclusive	参照 16
	ヒト末梢血	0 ～ 100 μg/mL (- S9)	陰性	参照 16

変異原性試験では、細菌を用いる復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター繊維芽細胞を用いた染色体異常試験、大腸菌を用いた突然変異試験及びヒト抹消リンパ球等を用いた姉妹染色分体交換試験が実施された。結果は、ヒト抹消リンパ球を用いた姉妹染色分体交換試験では「inconclusive」であったが、染色体異常試験を含む実施されたすべての試験は陰性であった。（表 6 参照）。したがって、L-イソロイシンには変異原性は認められないと判断された。[参照 14～16]

4-1-3 生体内動態に関する試験

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。吸収された遊離アミノ酸は、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%は再利用される。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、過剰なアミノ酸は蓄積されない。アミノ酸の分解によって生じた過剰の窒素を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変換し、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 L-イソロイシ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。

イソロイシンは、トランスアミナーゼによってアミノ基が転移し、 α -ケト- β -メチル吉草酸になり、次いで酸化的脱炭酸を受け、炭素原子が一つ少ない α -メチルブチリル-CoA になる。それ以後は脂肪酸酸化の経路に似た反応で酸化を受け、最終的にはアセチル-CoA とプロピオニル CoA 各 1 分子を生じる。プロピオニル-CoA はスクシニル-CoA へと変換されクエン酸回路において利用される。[参照 17]

5 その他

Corynebacterium glutamicum KCCM 80189 株から産出される成分について機器分析等による同定を行った。結果を表 7 に示す。[参照 18]

表 7 *Corynebacterium glutamicum* KCCM 80189 株から産出される成分

成分名	各成分の割合 (%)
イソロイシン	91.76
水分	0.22
アンモニウム	0.24
アラニン	0.10
α -アミノ-n-酪酸	5.77
フェニルアラニン	1.02
バリン	0.48
有機酸類	ND
ナトリウム	0.03
硫黄	0.12
合計	99.74

6 審議結果

Corynebacterium glutamicum KCCM 80189 株から産出される L-イソロイシン（企業推奨添加量：0.01～0.50%）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. 日本飼養標準-家禽（2011 年版）
2. 日本飼養標準-豚（2013 年版）
3. 改訂魚類の栄養と飼料、恒星社厚生閣（2009）
4. The essential amino-acid requirements of the prawn *Palaemon serratus*. The growth of prawns on diets containing proteins of different amino-acid compositions (Marine Biology) (1971)
5. Scientific Opinion on the safety and efficacy of L-isoleucine for all animal species1 (European Food Safety Authority) (2010)
6. Egg production and quality responses to increasing isoleucine supplementation in Shaver white hens fed a low crude protein corn-soybean meal diet fortified with synthetic amino acids between 20 and 46 weeks of age (Poultry Science) (2020)
7. Isoleucine requirements and ratios in starting (7 to 11 kg) pigs (American Society of Animal Science) (2004)
8. Isoleucine requirement of the lactating sow (the Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station) (1997)
9. 泌乳牛におけるアミノ酸供給量と蛋白質飼料のアミノ酸特性(地方独立行政法人北海道立総合研究機構、<https://www.hro.or.jp/list/agricultural/center/kenkyuseika/index.html>) (2009)
10. Acute Oral Toxicity Study of L-Isoleucine 90% in Sprague-Dawley Rats (社内資料) (2018)
11. EHCA ホームページ (L-isoleucine)
12. SUBCHRONIC TOXICITY STUDY OF L-ISOLEUCINE IN F344 RATS (Journal of Toxicology and Environmental Health,) (1996)
13. Thirteen-Week Oral Toxicity Study of Branched-Chain Amino Acids in Rats (International Journal of Toxicology) (2004)
14. 変異原と毒性 VOL.5 (食品添加物の変異原性試験成績その3) (1982)
15. 東京都衛生研究所年報 (食品添加物の変異原性試験(第5報)) (1990)
16. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to Flavouring Group Evaluation 26: Amino acids from chemical group 34 (The EFSA Journal) (2006)
17. 第 17 改正日本薬局方解説書 (2016)
18. ANALYTICAL REPORT Qualitative and quantitative composition of L-isoleucine (Document No.: BA19001) (社内資料)

L-イソロイシン（その2）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

(7) 成分規格

含量 本品は、105℃で 4 時間乾燥した後、定量するとき、L-イソロイシン（ $C_6H_{13}NO_2$ ）98.0% 以上を含む。

物理的・化学的性質 L-イソロイシン（その1）の物理的・化学的性質と同じ。

確認試験 L-イソロイシン（その1）製造用原体の確認試験を準用する。

純度試験 L-イソロイシン（その1）製造用原体の純度試験を準用する。

乾燥減量 2.0%以下(5 g, 105℃, 4 時間)

強熱残分 1.0%以下(1 g)

定量法 本品を 105℃で 4 時間乾燥し、その約 0.25 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、ギ酸 3mL を加えて溶かし、非水滴定用氷酢酸 50mL を加え、0.1mol/L 過塩素酸で滴定する（電位差滴定法）。指示薬（クリスタルバイオレット・氷酢酸試液 1mL）を用いる場合の終点は、溶液の紫色が青色を経て、緑色になるときとする。別に、同様の方法で空試験を行い補正する。

0.1mol/L 過塩素酸 1mL = 13.12 mg $C_6H_{13}NO_2$

(4) 製造の方法の基準

羽毛又は羊毛を加水分解した後、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。

(7) 保存の方法の基準

L-イソロイシン（その1）製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

イ 製剤

(7) 成分規格

L-イソロイシン（その2）製造用原体の成分規格を準用する。

(4) 保存の方法の基準

L-イソロイシン（その2）製造用原体の保存の方法の基準を準用する。