

飼料添加物の基準の見直し (ムラミダーゼの対象飼料拡大)

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ムラミダーゼ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 : ムラミダーゼ

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 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. 1～24 のとおり）

基準を作成した（資料 P. 25 のとおり）。

飼料添加物の効果安全性について（案）

ムラミダーゼ

（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	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による試験（鶏）	5
3-1-1	鶏（ブロイラー）	5
3-1-2	鶏（ブロイラー）	5
3-1-3	鶏（ブロイラー）	6
3-1-4	鶏（ブロイラー）	7
3-1-5	鶏（ブロイラー）	7
3-2	効果を裏付ける野外応用による試験（豚）	8
3-2-1	豚	8
3-2-2	豚	8
3-2-3	豚	9
3-2-4	豚	10
3-3	効果を裏付ける野外応用による試験（鶏）	11
3-3-1	鶏（採卵鶏）	11
3-3-2	鶏（採卵鶏）	11
4	安全性に関する事項	13
4-1	毒性試験	13
4-1-1	一般毒性試験	13
4-1-1-1	反復投与毒性試験（短期）	13
4-1-2	特殊毒性試験	13
4-1-2-1	変異原性試験	13
4-2	対象家畜等を用いた飼養試験	14
4-2-1	鶏（ブロイラー）	14
4-2-2	豚	16
4-3	耐性菌出現に関する試験	21
5	審議結果	23
6	参照（参考文献及び参考資料）	24

3 効果に関する事項

3-1 効果を裏付ける野外応用による試験

3-1-1 鶏（ブロイラー）

(1) 方法

ブロイラー（Cobb 500 種、雄、1 日齢、平均体重 39.7 g）を用いて、基礎飼料及びムラミダーゼをそれぞれ 25,000、35,000、45,000 LSU(F)/kg 飼料（それぞれ 2,200～5,500、3,000～7,700、3,900～9,900 LSU(F)/kg 体重/日）で添加した飼料を 35 日間給与した（1 群 20 羽、12 反復）。各成分の消化率は、試験終了時に各群 36 羽から回腸の内容物を採取し確認した。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、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、Tukey 検定法を用いた。

(3) 結果

増体量について、ムラミダーゼ添加飼料群は基礎飼料群と比べて高い傾向にあった。飼料要求率について、ムラミダーゼ添加飼料群は基礎飼料群と比較して有意に低かった。

粗たん白質及び粗脂肪の見かけの回腸消化率について、ムラミダーゼ 45,000 LSU(F)/kg 飼料添加飼料群は基礎飼料群と比べ有意に高かった（表 1 参照）。[参照 1]

表 1 鶏用飼料に添加したときのムラミダーゼの給与効果

		基礎飼料群	ムラミダーゼ添加飼料群 (LSU(F)/kg 飼料)		
			25,000	35,000	45,000
増体量 (g)		2,171.8 ± 50.9	2,213.8 ± 47.1	2,217.1 ± 37.1	2,215.8 ± 34.1
飼料摂取量 (g)		3,030.4 ± 113.0	3,017.3 ± 77.8	3,006.4 ± 61.1	2,998.9 ± 42.3
飼料要求率		1.395 ± 0.043 ^a	1.363 ± 0.015 ^b	1.356 ± 0.023 ^b	1.354 ± 0.016 ^b
見かけの 回腸消化 率 (%)	粗たん白質	72.77 ± 4.05 ^a	74.72 ± 4.17 ^{ab}	76.64 ± 3.12 ^{ab}	77.52 ± 2.80 ^b
	粗脂肪	91.29 ± 1.49 ^a	91.49 ± 1.49 ^{ab}	92.93 ± 1.78 ^{ab}	93.07 ± 01.46 ^b
	粗灰分	44.46 ± 3.51	45.78 ± 3.54	45.68 ± 2.79	46.41 ± 2.06
	カルシウム	53.90 ± 1.38	53.93 ± 1.30	54.31 ± 1.46	54.80 ± 1.53
	リン	60.86 ± 2.74	62.01 ± 2.93	62.76 ± 2.28	63.68 ± 1.89

各値は平均値±SD である

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 種、雄、1 日齢、平均体重 40 g）を用いて、基礎飼料及びムラミダーゼをそれぞれ 25,000、35,000 LSU(F)/kg 飼料（それぞれ 2,200～5,500、3,000～7,700 LSU(F)/kg 体重/日）で添加した飼料を 35 日間給与した（1 群 10 羽、33 反復）。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、Duncan 検定法を用いた。

(3) 結果

飼料要求率について、ムラミダーゼ添加飼料群は基礎飼料群と比べて有意に低かった(表 2 参照)。[\[参照 2\]](#)

表 2 鶏用飼料に添加したときのムラミダーゼの給与効果

	基礎飼料群	ムラミダーゼ添加飼料群 (LSU(F)/kg 飼料)	
		25,000	35,000
試験最終日の体重 (kg)	2.481 ± 0.079	2.512 ± 0.110	2.520 ± 0.083
1 日増体量 (g/日)	69.6 ± 2.3	70.5 ± 3.1	70.7 ± 2.4
1 日飼料摂取量 (g/日)	105.6 ± 4.3	105.8 ± 5.1	106.3 ± 4.8
飼料要求率	1.518 ± 0.028 ^b	1.490 ± 0.026 ^a	1.493 ± 0.033 ^a

各値は平均値±SD である

各項目内の異文字間に有意差あり ($p \leq 0.05$)

3-1-3 鶏 (ブロイラー)

(1) 方法

ブロイラー (Ross 308 種、雄、1 日齢、平均体重 40 g) を用いて、基礎飼料及びムラミダーゼをそれぞれ 15,000、25,000 LSU(F)/kg 飼料 (それぞれ 1,300~3,300、2,200~5,500 LSU(F)/kg 体重/日) で添加した飼料を 35 日間給与した (1 群 10 羽、33 反復)。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、Duncan 検定法を用いた。

(3) 結果

1 日増体量について、ムラミダーゼ 25,000 LSU(F)/kg 飼料群は基礎飼料群と比べ高い傾向が見られた。

飼料要求率について、ムラミダーゼ添加飼料群は基礎飼料群と比べ有意に低かった(表 3 参照)。[\[参照 3\]](#)

表 3 鶏用飼料に添加したときのムラミダーゼの給与効果

	基礎飼料群	ムラミダーゼ添加飼料群 (LSU(F)/kg 飼料)	
		15,000	25,000
試験最終日の体重 (kg)	2.584 ± 0.070	2.608 ± 0.077	2.622 ± 0.065
1 日増体量 (g/日)	72.6 ± 2.0 ^y	73.3 ± 2.2 ^{xy}	73.7 ± 1.9 ^x
1 日飼料摂取量 (g/日)	109.0 ± 4.5	109.8 ± 7.0	108.5 ± 3.7
飼料要求率	1.492 ± 0.055 ^b	1.466 ± 0.040 ^a	1.451 ± 0.028 ^a

各値は平均値±SD である

各項目内の (a,b) 間に有意差あり ($p \leq 0.05$)、(x,y) 間に有意差に近い傾向あり ($0.05 < p \leq 0.10$)

3-1-4 鶏（ブロイラー）

（１）方法

ブロイラー（Ross、雄、1日齢、平均体重 39.34 g）を用いて、基礎飼料及びムラミダーゼをそれぞれ 25,000 LSU(F)/kg、35,000 LSU(F)/kg 飼料（それぞれ 2,200～5,500、3,000～7,700 LSU(F)/kg 体重/日）で添加した飼料を 42 日間給与した（1 群 25 羽、8 反復）。

（２）統計解析

試験結果の解析は、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、Tukey 検定法を用いた。

（３）結果

体重及び増体量について、ムラミダーゼ 35,000 LSU(F)/kg 飼料添加飼料群は基礎飼料添加群と比べて有意に高かった。

飼料要求率について、ムラミダーゼ添加飼料群は基礎飼料群と比べて有意に低かった（表 4 参照）。[参照 4]

表 4 鶏用飼料に添加したときのムラミダーゼの給与効果

	基礎飼料群	ムラミダーゼ添加飼料群 (LSU(F)/kg 飼料)	
		25,000	35,000
試験最終日の体重 (g)	3304 ^b	3359 ^{ab}	3436 ^a
増体量 (g)	3265 ^b	3320 ^{ab}	3397 ^a
飼料摂取量 (kg)	5.35	5.15	5.22
飼料要求率	1.68 ^a	1.59 ^b	1.59 ^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)

3-1-5 鶏（ブロイラー）

（１）方法

ブロイラー（Cobb 500、雄、1日齢、平均体重 44.4 g）を用いて、基礎飼料及びムラミダーゼを 25,000 LSU(F)/kg 飼料（2,200～5,500 LSU(F)/kg 体重/日）で添加した飼料を 42 日間給与した（1 群 20 羽、32 反復）。

（２）統計解析

試験結果の解析は、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、LSD 検定法を用いた。

（３）結果

増体量、飼料摂取量について、ムラミダーゼ添加飼料群は基礎飼料群と比べて有意に高かった。

飼料要求率について、ムラミダーゼ添加飼料群は基礎飼料群と比べて有意に低かった（表 5 参照）。[参照 5]

表 5 鶏用飼料に添加したときのムラミダーゼの給与効果

	基礎飼料群	ムラミダーゼ添加飼料群 (25,000 LSU(F)/kg 飼料)
増体量 (kg)	2.138 ^b	2.246 ^a
飼料摂取量 (g/日)	71.18 ^b	72.59 ^a
飼料要求率	1.681 ^a	1.639 ^b

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.10)

3-2 豚

3-2-1 豚

(1) 方法

子豚 (PIC L1050×L337、雄雌、21 日齢、平均体重 6.2 kg) を用いて、基礎飼料 (陰性対照群)、基礎飼料にムラミダーゼを 50,000 LSU/kg 飼料 (約 1500~3000 LSU/kg 体重/日) で添加した飼料 (ムラミダーゼ群)、をそれぞれ 42 日間給与した (1 群 6 頭、24 反復)。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、t 検定を用いて検討した。

(3) 結果

増体について、ムラミダーゼ群は、陰性対照と比較して有意に高くなった。

(表 6 参照)。[参照 6]

表 6 豚用飼料に添加したときのムラミダーゼ給与効果

	陰性対照群	ムラミダーゼ添加群 (50,000 LSU(F)/kg 飼料)
終了時体重 (kg)	22.9±2.4	24.0±2.1
増体量 (g/日)	395±53 ^a	423±39 ^b
飼料摂取量 (kg/日)	647±78	688±65
飼料要求率	1.64±0.05	1.62±0.04
へい死	5	2

各値は平均値±SD

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

子豚 (Danbred×Duroc、雄雌、26 日齢、平均体重 7.2 kg) を用いて、基礎飼料 (陰性対照群)、基礎飼料にムラミダーゼを 50,000 LSU/kg 飼料 (約 1500~3000 LSU/kg 体重/日) で添加した飼料 (ムラミダーゼ群)、をそれぞれ 42 日間給与した (1 群 10 頭、60 反復)。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、Duncan 検定を用いて検討した。

(3) 結果

増体量について、ムラミダーゼ群は、陰性対照と比較して有意に高くなった。

飼料要求率について、ムラミダーゼ群は、陰性対照と比較して有意に低下した。

便の性状について、ムラミダーゼ群は、陰性対照と比較して有意な改善がみられた。

(表 7 参照)。[参照 7]

表 7 豚用飼料に添加したときのムラミダーゼ給与効果

	陰性対照群	ムラミダーゼ群 (50,000 LSU(F)/kg 飼料)
増体量 (g/日)	521 ^a	541 ^b
飼料摂取量 (kg/日)	35.8	36.0
飼料要求率	1.645 ^a	1.603 ^b
便の性状※	0.146 ^a	0.113 ^b
へい死 (%)	0.5	0.8

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

※スコア (0 : 正常便、1 : 柔らかい便、2 : 軽度の下痢、3 : 重度の下痢)

3-2-3 豚

(1) 方法

子豚 (DanBred × Pietrain、雄雌、25 日齢、平均体重 7.54 kg) を用いて、基礎飼料 (陰性対照群)、基礎飼料に性状の異なるムラミダーゼをそれぞれ 50,000 LSU/kg 飼料 (約 1500~3000 LSU/kg 体重/日) で添加した飼料 (ムラミダーゼ群)、をそれぞれ 42 日間給与した (1 群 2 頭、20 反復)。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、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、Tukey 法を用いた。

(3) 結果

飼料要求率について、両ムラミダーゼ群は、陰性対照と比較して有意に低下した。

(表 8 参照)。[参照 8]

表 8 豚用飼料に添加したときのムラミダーゼ給与効果

	陰性対照群	ムラミダーゼ T1 群 (50,000 LSU(F)/kg 飼料)	ムラミダーゼ T2 群 (50,000 LSU(F)/kg 飼料)
増体量 (g/日)	514±39	520±35	526±21
飼料摂取量 (g/日)	828±52	818±50	813±40
飼料要求率	1.614±0.056 ^a	1.573±0.046 ^b	1.545±0.054 ^b
便の性状※	0.18±0.12	0.15±0.05	0.14±0.10
へい死 (頭)	0	0	0

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

※スコア (0 : 正常便、1 : 柔らかい便、2 : 軽度の下痢、3 : 重度の下痢)

3-2-4 豚

(1) 方法

子豚 (Danbred × Pietrain、雄雌、25 日齢、平均体重 8.2 kg) を用いて、基礎飼料 (陰性対照群)、基礎飼料にムラミダーゼを 50,000 LSU/kg 飼料 (約 1500~3000 LSU/kg 体重/日) で添加した飼料 (ムラミダーゼ群)、をそれぞれ 42 日間給与した (1 群 10 頭、64 反復)。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、一元配置分散分析及び Tukey 法を用いた。

(3) 結果

飼料要求率について、ムラミダーゼ群は、陰性対照と比較して有意に低下した。

便の性状について、ムラミダーゼ群は、陰性対照と比較して有意な改善がみられた。

(表 9 参照) 。[参照 9]

表 9 豚用飼料に添加したときのムラミダーゼ給与効果

	陰性対照群	ムラミダーゼ群 (50,000 LSU(F)/kg 飼料)
増体量 (g/日)	456±82	470±72
飼料摂取量 (g/日)	699±110	708±104
飼料要求率	1.542±0.107 ^a	1.508±0.088 ^b
便の性状※	0.35±0.16 ^a	0.27±0.19 ^b
へい死 (%)	4	5

各値は平均値±SD

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

※スコア (0 : 正常便、1 : 柔らかい便、2 : 軽度の下痢、3 : 重度の下痢)

3-3 採卵鶏

3-3-1 採卵鶏

(1) 方法

採卵鶏 (Isa Brown、雌、22 週齢、平均体重 1,695 g) を用いて、基礎飼料 (陰性対照群)、基礎飼料にムラミダーゼを 30,000 LSU/kg 飼料 (約 2,000 LSU/kg 体重/日) で添加した飼料 (ムラミダーゼ群)、をそれぞれ 140 日間給与した (1 群 5 羽、21 反復)。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、一般化線形モデル及び Tukey 法を用いた。

(3) 結果

総増体量について、ムラミダーゼ群は、陰性対照と比較して有意に増加した。

飼料要求率、産卵率及びエッグマスについて、ムラミダーゼ群は、陰性対照と比較して有意な改善がみられた。

(表 10 参照)。[参照 10]

表 10 鶏用飼料に添加したときのムラミダーゼ給与効果

	陰性対照群	ムラミダーゼ群 (30,000 LSU(F)/kg 飼料)
総増体量 (g)	134 ^b	223 ^a
産卵率 (%)	90.9 ^b	95.1 ^a
卵重 (g)	60.6	60.3
エッグマス (g/羽/日) ※	55.0 ^b	57.3 ^a
飼料摂取量(g/日)	124.5	124.1
飼料要求率/kg 卵	2.27 ^b	2.17 ^a
へい死 (%)	0.9	1.9

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

※エッグマス : 産卵率 (%) × 卵重 (g) / 100

3-3-2 採卵鶏

(1) 方法

採卵鶏 (HyLine Brown、雌、22 週齢、平均体重 1,532 g) を用いて、基礎飼料 (陰性対照群)、基礎飼料にムラミダーゼを 15,000 又は 30,000 LSU/kg 飼料 (1,000、2,000 LSU/kg 体重/日) で添加した飼料 (ムラミダーゼ群)、をそれぞれ 168 日間給与した (1 群 8 羽、24 反復)。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、二元配置分散分析、Duncan 検定及び Tukey 検定を用いた。

(3) 結果

体重について、ムラミダーゼ 15,000 添加群は、陰性対照と比較して有意に高くなった。

エッグマス、産卵率、飼料要求率について、ムラミダーゼ 30,000 添加群は、陰性対照と比較して有意に改善した。

(表 11 参照) 。[参照 11]

表 11 鶏用飼料に添加したときのムラミダーゼ給与効果

	基礎飼料群	ムラミダーゼ添加飼料群 (LSU(F)/kg 飼料)	
		15,000	30,000
開始時体重 (g)	1,518±38.1	1,528±54.1	1,524±51.4
終了時体重 (g)	1,882±95.3 ^{Bb}	1,947±52.3 ^{Aa}	1,922±99.5 ^{ABab}
産卵率 (%)	92.9±4.14 ^B	94.1±3.30 ^{AB}	95.2±3.30 ^A
卵重 (g)	61.3±1.13	61.4±1.25	62.1±1.03
エッグマス (g/羽/日) ※)	56.9±2.31 ^{Bb}	57.7±2.27 ^{ABab}	59.1±2.47 ^{Aa}
飼料摂取量 (g)	105.9±3.34	106.7±3.42	105.9±3.14
飼料要求率/kg 卵	1.862±0.0674 ^{Aa}	1.849±0.0617 ^{Aa}	1.794±0.0635 ^{Bb}
へい死 (%)	4.2	2.6	4.7

各項目内の異文字間に有意差あり (大文字: Duncan test, $p < 0.05$ 、小文字: Tukey test, $p < 0.05$)

※エッグマス: 産卵率 (%) × 卵重 (g) / 100

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 反復投与毒性試験（短期）

(1) 方法

ラット（Han Wistar 系統、雌雄、44～50 日齢、体重 146～188 g（雄）、125～161 g（雌））を用いて、ムラミダーゼを 0、0.113、0.374、1.132 gTOS/kg 体重/日（0、38,462、126,923、384,616 LSU(F)/kg 体重/日）で添加した飼料をそれぞれ強制経口投与にて 13 週間給与した（1 群雌雄各 10 匹）。

(2) 結果

外観、行動、感覚反応性応答、握力、運動活性、体重、摂餌量及び飲水量について、投与に起因する影響は認められなかった。

13 週目に実施した血液学的検査及び血液生化学検査において、投与に起因する影響は認められなかった。

剖検において、肉眼及び顕微鏡での観察では投与に起因した影響は認められなかった。また臓器重量においても投与に起因する影響は認められなかった。

以上の結果から、ムラミダーゼの NOAEL は 1.132 gTOS/kg 体重/日（384,616 LSU(F)/kg 体重/日）と推定された [参照 12]。

4-1-2 特殊毒性試験

4-1-2-1 変異原性試験

表 12 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*1	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98、TA100、 TA1535、TA1537 <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	156、313、625、1250、2,500、 5,000 µg TOS/mL (±S9)	陰性	参照 13
染色体異常試験*2	ヒトリンパ球培養細胞	0、3000、4000、5000 µgTOS/mL (-S9) 3 h 処理後 17 h 培養 0、1000、3000、5000 µgTOS/mL (+S9) 3 h 処理後 17 h 培養 0、500.0、2000、4000 µgTOS/mL (-S9) 20 h 処理後 0 h 培養	陰性	参照 14

*1 被験物質は滅菌水に懸濁

*2 被験物質は精製水に懸濁

変異原性試験では、*in vitro* 系で細菌を用いた復帰突然変異試験とヒト細胞を用いた染色体異常試験が実施された。細菌を用いた復帰突然変異試験は代謝活性化の有無にか

かわらず陰性であり、ヒトリンパ球培養細胞を用いた染色体異常試験も陰性であった。

したがって、表 6 に示されているとおり全て陰性であったことから、ムラミダーゼには変異原性は認められないと判断された（表 12 参照）。[参照 13、14]

4-2 対象家畜等を用いた飼養試験

4-2-1 鶏（ブロイラー）

(1) 方法

ブロイラー（Ross 308 種、雌雄、1 日齢、平均体重 43 g）を用いて、基礎飼料及びムラミダーゼをそれぞれ 45,000、225,000、450,000 LSU(F)/kg 飼料（それぞれ 3,900～9,900、19,500～49,500、39,000～99,000 LSU(F)/kg 体重/日）で添加した飼料を 43 日間給与した（1 群 18 羽、雌雄それぞれ 4 反復）。

(2) 結果

1 日増体量、最終体重について、ムラミダーゼ添加飼料群は基礎飼料群と比べて高い傾向にあった。

飼料要求率について、ムラミダーゼ添加飼料群は基礎飼料群と比べて低い傾向にあった。

試験中、問題となる臨床徴候はいずれの飼料群においても認められなかった。

血液生化学的検査及び血液学的検査においてムラミダーゼ添加に起因する有意な変化はなかった（表 13 参照）。

肉眼での剖検結果及び回腸組織の組織学的検査について、ムラミダーゼ添加飼料群のみで有意に認められた変化はなかった。

盲腸の細菌叢について、ムラミダーゼ添加飼料群では基礎飼料群と比べて乳酸菌、総好気性細菌が多く見られた。サルモネラ、カンピロバクター及びクロストリジウムについてはいずれの飼料群においても検出下限以下であった（表 14 参照）。[参照 15]

表 13 鶏用飼料に添加したときのムラミダーゼの給与効果

		基礎飼料群	ムラミダーゼ添加飼料群 (LSU(F)/kg 飼料)		
			45,000	225,000	450,000
試験最終日の体重 (g)		2834	2931	2959	2985
1 日増体量 (g/日)		66.5	68.9	69.6	70.0
飼料要求率		1.547	1.506	1.515	1.505
へい死率 (%)		2.1	0.7	3.5	0.7
血液学的検査	ALP(U/L)	3454	3631	3182	3302
	GGT(U/L)	77.0	83.4	77.6	70.8
	GLDH(U/L)	20	22	21	19
	GOT/AST(U/L)	317	328	426	317
	GPT/ALT(U/L)	11.1	10.3	9.8	11.1
	LDH(U/L)	1529	1608	2074	1280

	アミラーゼ(U/L)	607	695	573	664
	総ビリルビン(mg/dL)	0.64	0.64	0.59	0.6
	カルシウム(mg/dL)	10.5	10.5	10.5	10.5
	総コレステロール(mM)	3.6	3.6	3.6	3.5
	クロム(umol/L)	24	24.4	24.4	24.6
	グルコース(mM)	13.9	14.2	13.8	13.9
	リン(mM)	2.8	2.4	2.5	3
	カリウム(mM)	4.4	4.2	4.3	4.4
	たん白(g/L)	33.6	32.8	32.2	32.5
	ナトリウム(mM)	129	130.9	130.6	130.1
	塩素(mM)	118	117	124	115
	尿素(mg/dL)	7.4	7.3	7.6	7.4
肉眼的剖検	空腸				
	赤変単一	0	0	0	1
	赤変複数	1	1	0	1
	回腸				
	赤変単一	18	8	8	12
	軽微な肥厚	0	0	1	0
	大腸				
	赤変少数	2	3	0	1
	点状出血	0	0	1	0
	充血	0	0	1	0
盲腸	0	0	0	0	
回腸組織の病理組織学的検査	上皮	0	0	0	0
	粘膜細胞	0	0	0.03	0
	粘膜発赤	0.34	0.28	0.31	0.53
	パイエル板	0.22	0.20	0.11	0

各値は平均値

表 14 鶏用飼料に添加したときのムラミダーゼの給与効果

		基礎飼料群	ムラミダーゼ添加飼料群 (LSU(F)/kg 飼料)		
			45,000	225,000	450,000
盲腸における 細菌叢 (log10 cfu/g)	乳酸菌	8.56	8.97	9.16	9.15
	大腸菌	7.19	7.00	7.44	7.21
	サルモネラ	<2	<2	<2	<2
	カンピロバクター	<2	<2	<2	<2
	クロストリジウム	<2	<2	<2	<2
	総好気性細菌	8.15	8.52	8.59	8.50

各値は平均値

検出限界：100 cfu/g

4-2-2 豚

(1) 方法

子豚 (子豚 (ランドレース × ラージホワイト種、雄雌、56 日齢、平均体重 18.7 ± 2.3 kg) を用いて、基礎飼料 (陰性対照群)、基礎飼料にムラミダーゼをそれぞれ 65,000、325,000、650,000 LSU/kg 飼料 (それぞれ、2,742、14,495、31,368 LSU/kg 体重/日) で添加した飼料 (ムラミダーゼ群)、をそれぞれ 42 日間給与した (1 群 10 頭、1 反復)。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、一元配置分散分析及び Tukey 検定を用いた。

(3) 結果

最終体重について、ムラミダーゼ群は基礎飼料群と比べて有意差はなかった。

試験中、問題となる臨床徴候はいずれの飼料群においても認められなかった。

血液学的検査において、ムラミダーゼ添加に起因する有意な変化はなかった

生化学的検査において、活性化部分トロンボプラスチン時間及びグルタミン酸デヒドロゲナーゼについて、325,000 LSU/kg のムラミダーゼ群は、基礎飼料群及び 65,000 LSU/kg のムラミダーゼ添加群と比べて有意な差が見られた。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼについて、325,000 LSU/kg のムラミダーゼ群は、基礎飼料群と比べて有意な差が見られた。ソルビトール脱水素酵素について、650,000 LSU/kg のムラミダーゼ群は、65,000 LSU/kg のムラミダーゼ添加群と比べて有意な差が見られた。これらについては生理学的に正常な範囲内であった。

また、体重に対する副腎重量について、325,000 LSU/kg のムラミダーゼ群は 65,000 LSU/kg のムラミダーゼ群に比べ有意に低い値をが、成熟の度合が影響したものと考察される。

肉眼的剖検及び病理組織学的検査において、いくつかの所見が確認されたが、重篤な所見はなく、全群で散見され、用量相関性が見られなかったことからムラミダーゼによる影響とは考えられないと考察されている。(表 15 参照)。[参照 16]

表 15 豚用飼料に添加したときのムラミダーゼの影響

	基礎飼料群	ムラミダーゼ添加飼料群 (LSU/kg 飼料)			
		65,000	325,000	650,000	
試験最終日の体重 (g)	64.85±6.06	63.94±3.78	61.68±5.05	65.74±6.45	
日間平均飼料摂取量(kg/頭)	1.96±0.21	1.74±0.13	1.73±0.17	1.81±0.26	
日間平均摂水量(kg/頭)	3.64±0.79	3.32±0.35	3.32±0.69	3.87±0.62	
便の性状 (※1)					
2 日目	1.4	1.5	1.4	1.3	
42 日目	1.3	1.2	1.1	1.2	
へい死 (頭)	0	0	1	0	
血液学的検査	ヘモグロビン (g/L)	134±8	138±8	137±4	138±7
	ヘマトクリット(L/L)	0.414±0.026	0.425±0.025	0.421±0.016	0.425±0.025
	白血球数 (10 ⁹ /L)	14.86±1.11	15.54±2.10	17.18±3.66	15.54±2.01
	好中球数 (10 ⁹ /L)	4.17±0.94	4.13±0.86	4.63±0.66	4.13±0.86
	好中球/白血球 (%)	27.9±5.0	26.7±5.2	27.8±6.4	27.8±6.4
	リンパ球数 (10 ⁹ /L)	9.62±0.87	10.19±1.78	11.28±3.49	10.19±1.78
	リンパ球/白血球 (%)	64.9±5.4	65.5±5.7	64.8±7.0	65.5±5.7
	単球 (10 ⁹ /L)	0.58±0.14	0.70±0.23	0.69±0.13	0.70±0.23
	単球/白血球 (%)	3.9±0.9	4.5±1.2	4.1±1.0	4.5±1.2
	好酸球数 (10 ⁹ /L)	0.35±0.10	0.35±0.15	0.34±0.11	0.35±0.15
	好酸球/白血球 (%)	2.4±0.8	2.3±1.0	2.0±0.6	2.3±1.0
	好塩基性球数(10 ⁹ /L)	0.07±0.03	0.10±0.06	0.15±0.14	0.13±0.07
	好塩基性球/白血球 (%)	0.5±0.2	0.6±0.3	0.8±0.5	0.7±0.3
	ペルオキシダーゼ非染色大型細胞 (10 ⁹ /L)	0.06±0.03	0.07±0.02	0.08±0.04	0.09±0.03
	赤血球数 (10 ¹² /L)	7.17±0.46	7.51±0.37	7.36±0.21	7.60±0.42
	血小板数 (10 ⁹ /L)	383±53	354±61	374±114	346±61
	網状赤血球数 (10 ⁹ /L)	129.9±44.1	120.7±39.1	117.7±37.2	129.1±44.3
	平均赤血球容積 (fL)	57.8±1.7	56.5±1.5	57.1±1.3	57.0±2.1
	平均赤血球ヘモグロビン量 (pg)	18.7±0.6	18.3±0.6	18.7±0.5	18.1±0.8
平均赤血球ヘモグロビン濃度 (g/dL)	32.4±0.4 ^{ab}	32.4±0.4 ^{ab}	32.7±0.7 ^a	31.8±0.4 ^b	
プロトロンビン時間 (秒)	11.0±0.5	11.2±0.3	10.8±0.5	11.0±0.5	

	活性化部分トロンボプラスチン時間 (秒)	10.0±0.9 ^a	10.5±0.8 ^a	8.7±0.9 ^b	9.6±1.2 ^{ab}
	フィブリノゲン (mg/dL)	6.05±0.33	5.69±0.78	6.25±0.54	5.77±0.74
		基礎飼料群	ムラミダーゼ添加飼料群 (LSU/kg 飼料)		
			65,000	325,000	650,000
生化学的検査	アラニンアミノトランスフェラーゼ (U/L)	34±5	34±9	36±7	36±6
	アルブミン(g/L)	47±2	47±2	47±1	48±1
	アルブミン/グロブリン	5.2±1.6	5.4±1.3	5.4±1.4	5.6±2.7
	アルカリフォスファターゼ (U/L)	189±37	190±25	182±16	215±37
	アミラーゼ (U/L)	2475±299	2383±445	2783±724	2288±520
	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (U/L)	34±5 ^b	39±12 ^{ab}	53±23 ^a	38±9 ^{ab}
	カルシウム (mmol/L)	2.94±0.08	2.93±0.07	2.94±0.06	2.97±0.09
	塩化物 (mmol/L)	102±3	103±1	103±1	103±3
	クレアチニン (umol/L)	80±8	83±10	72±12	81±12
	クレアチンキナーゼ (U/L)	2184±1838	1962±821	2548±1014	2320±1870
	γ-グルタミルトランスフェラーゼ (U/L)	36±4	37±5	37±8	38±7
	グロブリン (g/L)	10±3	9±2	9±2	10±3
	グルコース (mmol/L)	6.60±0.73	6.89±0.37	6.16±1.01	6.40±0.76
	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (U/L)	1.2±1.0 ^a	1.2±0.9 ^a	2.7±1.7 ^b	1.3±0.5 ^{ab}
	ハプトグロビン (g/L)	1.07±0.33	0.84±0.41	0.94±0.40	1.01±0.45
	乳酸脱水素酵素 (U/L)	563±68	563±76	606±83	619±93
	マグネシウム (mmol/L)	0.73±0.04	0.77±0.09	0.77±0.08	0.77±0.05
	リン酸塩 (mmol/L)	3.10±0.25	3.16±0.22	3.20±0.32	3.19±0.23
	リン脂質 (mmol/L)	1.3±0.2	1.4±0.2	1.3±0.2	1.3±0.1
	カリウム (mmol/L)	5.1±0.8	5.4±0.4	5.4±0.5	5.6±0.8
ナトリウム (mmol/L)	147±3	146±2	148±3	149±4	
トリグリセリド (mmol/L)	0.25±0.09	0.30±0.14	0.25±0.07	0.30±0.09	
ソルビトール脱水素酵素 (U/L)	33±10 ^{ab}	30±6 ^b	30±5 ^{ab}	41±11 ^a	

	総コレステロール (mmol/L)	2.3±0.3	2.3±0.3	2.3±0.3	2.2±0.3
	総たん白 (g/L)	57±3	57±4	57±3	57±2
	尿素 (mmol/L)	4.0±0.7	3.9±0.6	4.1±0.8	4.3±0.7
	総ビリルビン (umol/L)	<1.3	<1.3	<1.3	<1.3
	直接ビリルビン (umol/L)	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8
		基礎飼料群	ムラミダーゼ添加飼料群 (LSU/kg 飼料)		
			65,000	325,000	650,000
臓器重量	脳 (g)	81.28±8.18	84.69±15.91	81.58±11.15	81.52±8.87
	脳/体重 (%)	0.12±0.01	0.13±0.02	0.13±0.02	0.12±0.02
	精巣上体 (g)	41.71±3.51	43.32±6.73	47.40±9.72	41.99±7.54
	精巣上体/体重 (%)	0.061±0.011	0.065±0.007	0.075±0.018	0.059±0.008
	副腎 (g)	3.91±0.78	3.24±0.78	3.80±0.46	3.76±0.47
	副腎/体重 (%)	0.0059± 0.0008ab	0.0050± 0.0012a	0.0061± 0.0005b	0.0057± 0.0008ab
	脳下垂体 (g)	0.17±0.09	0.15±0.05	0.22±0.12	0.19±0.09
	脳下垂体/体重 (%)	0.00026± 0.00013	0.00023± 0.00008	0.00035± 0.00019	0.00029± 0.00015
	甲状腺 (g)	6.78±1.25	6.34±1.27	6.09±0.81	6.69±1.69
	甲状腺/体重 (%)	0.010±0.001	0.010±0.002	0.010±0.001	0.010±0.002
	心臓 (g)	327.48± 76.29	299.43± 19.37	290.28± 17.97	305.44± 24.65
	心臓/体重 (%)	0.50±0.09	0.46±0.03	0.47±0.02	0.46±0.02
	腎臓 (g)	322.95± 44.23	312.58± 30.19	314.03±33.11	328.06± 52.78
	腎臓/体重 (%)	0.49±0.03	0.48±0.03	0.50±0.05	0.49±0.06
	肝臓 (g)	1600.8± 234.0	1539.9± 184.8	1518.6± 129.0	1600.3± 282.6
	肝臓/体重 (%)	2.43±0.24	2.38±0.28	2.43±0.18	2.40±0.31
	肺 (g)	703.91± 152.43	621.78± 140.27	738.28± 161.57	711.28± 172.80
	肺/体重 (%)	1.07±0.19	0.97±0.23	1.19±0.26	1.08±0.29
	卵巣 (g)	7.30±1.02b	5.35±2.38ab	5.18±2.78ab	3.02±2.20a
	卵巣/体重 (%)	0.012± 0.002b	0.009± 0.004ab	0.009± 0.004ab	0.005± 0.003a

	前立腺 (g)	4.09±1.06	4.57±1.15	5.12±0.73	4.07±0.94				
	前立腺/体重 (%)	0.006±0.002	0.007±0.002	0.008±0.002	0.006±0.001				
	脾臓 (g)	116.87±15.03	133.97±27.11	122.04± 15.54	131.33± 21.22				
	脾臓/体重 (%)	0.18±0.02	0.21±0.04	0.20±0.03	0.20±0.02				
	精巣 (g)	83.91±17.93	93.78±21.25	86.41±17.20	94.67±35.00				
	精巣/体重 (%)	0.122±0.022	0.141±0.032	0.137±0.037	0.132±0.043				
	胸腺 (g)	273.81± 71.08	238.63± 38.87	259.24± 57.46	295.42± 59.99				
	胸腺/体重 (%)	0.41±0.08	0.37±0.06	0.41±0.08	0.44±0.07				
	子宮 (g)	99.20±33.16	71.15±22.94	84.18±48.70	61.90±41.83				
	子宮/体重 (%)	0.16±0.05	0.12±0.04	0.14±0.09	0.10±0.07				
		基礎飼料群		ムラミダーゼ添加飼料群 (LSU/kg 飼料)					
				65,000		325,000		650,000	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
病理組 織学	精巣 未成熟	5						5	
	腎臓								
	浸潤	1	2					1	1
	肥大	1	1	1				2	
	嚢胞	1						1	
	筋肉・骨格 変性	1		2				1	
	小腸・回腸 炎症	1							
	脊髄 神経膠症、限局性、 極小	1							
	脳								
	浸潤	1	1					1	2
	嚢胞		1						
	心臓 浸潤・混合性細胞	1							
	肺								
出血	2	4		2	2	4	3	5	
肉芽腫				1					
脾臓 異常細胞	1								
胃									
炎症	1								

表 16 参考菌株に対する卵白リゾチーム及びムラミダーゼの抗菌活性

参考菌株	MIC(mg/L)	
	卵白リゾチーム	ムラミダーゼ
<i>E. coli</i> ATCC 25922		
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923		
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633		
<i>C. jejuni</i> ATCC 33560		
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124		

表 17 野生菌株に対する卵白リゾチーム及びムラミダーゼの抗菌活性

野生菌株		MIC(mg/L)	
		卵白リゾチーム	ムラミダーゼ
<i>E. coli</i>	134.30 他 (5 株)		
<i>S. enteritidis</i>	395.42 他 (5 株)		
<i>E. faecium</i>	101.11 他 (5 株)		
<i>E. faecalis</i>	99.54 他 (5 株)		
<i>C. jejuni</i>	69.19 他 (5 株)		
<i>C. perfringens</i>	10018365-02 他 (3 株)		
	606526-1		
	10017316-1		

5 審議結果

ムラミダ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、飼料に添加することは適当であると判断された。

- ①本剤の効果：飼料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

6 参照 (参考文献及び参考資料)

1. Efficacy of supplemented muramidase on performance and apparent ileal digestibility in broiler chickens from 1 to 35 days of age, DSM, 2017.
2. Efficacy of Bond on performance and carcass characteristics of male broiler chickens, DSM, 2017.
3. Efficacy of Bond on preparation on performance and carcass characteristics of male broiler chickens, DSM, 2017.
4. Effect of BALANCIUS on Broiler Performance, DSM, 2016.
5. Evaluation of a digestive enzyme (muramidase) in a broiler growth performance trial, DSM, 2017.
6. The performance of nursery pig fed diet supplemented with Balancius™, DSM, 2018
7. Final Report, Effect of Bond supplementation on performance of weaned piglets, DSM, 2019
8. Effects of different supplemental Balancius GT and Balancius c-CT on growth performance and health status in post-weaning piglets from d 25 to d 66 of age, DSM, 2019.
9. Effects of Bond supplementation on performance in post-weaning piglets from d 25 to d 66 of age, DSM, 2018.
10. Effect of Balancius™ supplementation on production performance of laying hens in the first phase of production, DSM, 2021,2022.
11. Effect of Balancius™ on performance of laying hens, DSM, 2022
12. Report, Lysozyme, Batch PPL41125: Toxicity Study by Oral Gavage Administration to Han Wistar Rats for 13 Weeks, Novozymes A/S, 2017.
13. Report, Lysozyme, batch PPL41125: Test for Mutagenic Activity with Strains of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, Novozymes A/S, 2016.
14. Final Report, Lysozyme, batch PPL41125: In Vitro Human Lymphocyte Chromosome Aberration Assay, Novozymes A/S, 2016.
15. Evaluation of the tolerance of broiler chickens to dietary intake of a muramidase, DSM, 2017.
16. A target animal safety in pigs orally supplemented with the feed additive bond in feed, DSM, 2019
17. Antibacterial activity testing of lysozyme product PPL41125, Novozymes A/S, 2016.

ムラミダーゼの基準及び規格（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) 飼料一般の製造の方法の基準

ムラミダーゼは、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。