

## 飼料添加物フィターゼの基準及び規格の改正

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。

平成 25 年 9 月 10 日付け 25 消安第 2853 号をもって諮問された飼料添加物フィターゼについて、効果安全性の確認や基準及び規格の改正案を作成した。その概要は次のとおりである。

## 1. 要望品目

飼料添加物名：フィターゼ

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

平成 25 年 9 月 10 日 諮問

25 年 9 月 13 日 第 9 回飼料安全部会（飼料添加物効果安全性）

26 年 3 月 17 日 第 12 回飼料安全部会（飼料添加物効果安全性）

27 年 12 月 25 日 第 21 回飼料安全部会（飼料添加物効果安全性）

28 年 7 月 1 日 第 22 回飼料安全部会（飼料添加物規格）

## 3. 飼料安全部会の審議結果

資料 8-2 及び資料 8-3 のとおり。

## フィターゼの概要（基準及び規格の改正）

項 目	概 要
製品の概要	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ フィターゼは、飼料に含まれるフィチン酸を分解して無機リン酸を遊離する酵素群の総称であり、コウジカビ属が産生するものが飼料添加物として平成 8 年に指定されている。</li> <li>・ 今回申請のあったフィターゼは、大腸菌由来のフィターゼ産生遺伝子を分裂酵母に導入し産生させるものであり、従来品に比べ、胃内 pH 環境下で酵素活性が高く、リンの消化性に優れている。</li> <li>・ 本剤は、海外では、米国、EU などでは家禽及び豚用飼料への使用が認められている。</li> <li>・ 要望者が推奨する飼料への添加量            鶏用飼料：250～750 単位/kg            豚用飼料：250～1,000 単位/kg</li> <li>・ 飼料安全部会（飼料添加物効果安全性）の審議では、鶏及び豚用飼料で無機リンの添加を減量した飼料へ添加する場合において、飼料添加物としての効果及び安全性が確認された。</li> <li>・ 遺伝子組換え飼料部会の審議では、組換え DNA 技術を用いた飼料添加物の安全性が確認された。</li> <li>・ 飼料安全部会（飼料添加物規格）の審議では、本剤を飼料添加物として追加するにあたり、フィターゼの飼料添加物の基準及び規格の改正案が作成された。</li> </ul>
日本における審議状況	<p>農業資材審議会（遺伝子組換え飼料部会）  H23. 10. 28 遺伝子組換え飼料部会  H25. 7. 23 遺伝子組換え飼料部会（終了）</p> <p>農業資材審議会（飼料安全部会）  H25. 9. 13 飼料安全部会（飼料添加物効果安全性）  H26. 3. 17 飼料安全部会（飼料添加物効果安全性）（終了）  製剤の成分規格の変更  H27. 12. 25 飼料安全部会（飼料添加物効果安全性）（終了）  H28. 7. 1 飼料安全部会（飼料添加物規格）（終了）</p>

飼料添加物の効果安全性について（案）

フィターゼ

平成 28 年 8 月 9 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	効果を裏付ける基礎的試験	3
3-1	効果を裏付ける基礎的試験 ( <i>in vivo</i> 試験)	3
3-1-1	鶏	3
3-1-2	豚	4
3-2	効果を裏付ける野外応用による試験	6
3-2-1	鶏	6
3-2-2	鶏	7
3-2-3	鶏	8
3-2-4	豚	8
3-2-5	豚	10
3-2-6	豚	11
4	安全性に関する事項	11
4-1	毒性試験	11
4-1-1	一般毒性試験	11
4-1-1-1	単回投与毒性試験 (ラット)	12
4-1-1-2	反復投与毒性試験 (短期、ラット)	12
4-1-2	特殊毒性試験	13
4-1-2-1	復帰変異試験 (サルモネラ菌、大腸菌)	13
4-1-2-2	マウスリンフォーマ tk 試験 (マウスリンパ腫細胞)	13
4-1-2-3	小核試験 (マウス)	14
4-2	対象家畜等を用いた飼養試験	14
4-2-1	鶏	14
4-2-2	豚	15
5	審議結果	16
6	参照 (参考文献及び参考資料)	17

## フィターゼに関する効果安全性について

### 1 名称等

一般名：フィターゼ (phytase)

化学名：*myo*-inositol-hexakisphosphate 6-phosphohydrolase (6-phytase)

CAS 番号：9001-89-2

商品名：Phyzyme XP、Phyzyme XP TPT

用途：飼料原料に含まれる成分の有効利用

対象家畜及び至適添加量：鶏 250～750 単位/kg 飼料

(企業推奨量) 豚 250～1,000 単位/kg 飼料

※ 飼料は無機リンの添加を減量した飼料とする。

### 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および使用状況等

フィターゼは、フィチン酸 (イノシトール-6-リン酸) を分解して、無機リンを遊離する酵素群の総称である。鶏や豚等の単胃動物ではフィターゼの活性が弱いため、フィチン酸に含まれるリンの利用率が極めて低い (鶏：10%程度、豚：20～30%程度)。飼料中に含まれるリンを有効に利用するため、フィターゼを飼料に添加することにより、リンの利用性を改善することができる。

国内においては、1996年に *Aspergillus niger* のフィターゼ生産菌由来のフィターゼが飼料添加物として指定された。その後、2種類の組換え体利用フィターゼ生産菌由来のフィターゼが飼料添加物に指定された。

今回指定が要望されたフィターゼは、*Schizosaccharomyces pombe* に属する菌株を宿主とし、大腸菌由来のフィタ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フィターゼである。これまで指定されているフィターゼは、真菌由来のフィターゼであるが、大腸菌由来のフィターゼは、胃内 pH 域において真菌由来のフィターゼより活性が高く、リンの利用効率が改善される。[参照 1]

本剤は、2016年8月時点で、米国や EU 等 25 개국以上において、液剤及び散剤の製剤が承認されている。

本剤に用いられているポリビニルアルコール (以下「PVA」という。) はペレット加工時の酵素の耐熱性を高める目的で使用されている。PVA の日本における使用状況は、飼料添加物セルラーゼ (その2) の製剤 (その2) の成分規格において、使用が認められており、また医薬品添加物規格にも収載されている。

米国においては、飼料添加物への使用及び食品添加物、医薬品添加物としての使用が認められており、本剤に使用される PVA は、米国において食品添加物として使用が認められているものと同グレードの原材料を使用している。

### 3 効果を裏付ける基礎的試験

#### 3-1 効果を裏付ける基礎的試験 (*in vivo* 試験)

##### 3-1-1 鶏

鶏（ブロイラー種、8日齢）を、標準飼料群（有効リン 0.50%）、無機リン無添加飼料群（有効リン 0.12%）、フィターゼ添加飼料群（無機リン無添加飼料にフィターゼを添加；500、1,000 FTU/kg）に振り分け（1群 48羽（8ペン×6羽））、当該飼料を14日間給与した。リン及びカルシウムを定量するため、給与期間の後半4日間（17～21日齢）に排泄物を採取した。

増体量については、フィターゼ添加群は、無機リン無添加飼料群に対して用量依存的に有意な上昇が見られた（ $p < 0.05$ ）。また、標準飼料群に対しては、500 FTU/kg 添加飼料群では有意に低かったが（ $p < 0.05$ ）、1,000 FTU/kg 添加飼料群では有意差はなかった。

飼料摂取量については、フィターゼ添加飼料群は、無機リン無添加飼料群に対して、500 FTU/kg 添加飼料群では有意差はなかったが、1,000 FTU/kg 添加飼料群では有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。また、標準飼料群に対して有意差はなかった。

飼料効率については、フィターゼ添加飼料群は、無機リン無添加飼料群に対して、500 FTU/kg 添加飼料群では有意差はなかったが、1,000 FTU/kg 添加飼料群では有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。また、標準飼料群に対して有意差はなかった（表1参照）。〔参照2〕

表1 鶏用飼料に添加したときのフィターゼの給与効果

	標準飼料群*1	無機リン無添加飼料群*2	フィターゼ添加飼料群 (FTU/kg) *2,3	
			500	1,000
無機リン添加の有無	+	-		
総リン含量 (%) (有効リン含量)	0.77 (0.50)	0.39 (0.12)		
フィターゼ添加の有無	-	-	+	+
フィターゼ添加量 (g/kg)			1	2
試験動物数 (羽)	48	48	48	48
増体量 (g/羽)	514.1 <sup>a</sup>	445.5 <sup>b</sup>	472.5 <sup>c</sup>	527.7 <sup>a</sup>
飼料摂取量 (g/羽)	790.8 <sup>a</sup>	713.1 <sup>b</sup>	749.9 <sup>ab</sup>	785.6 <sup>a</sup>
飼料効率	0.649 <sup>ab</sup>	0.623 <sup>a</sup>	0.629 <sup>a</sup>	0.671 <sup>b</sup>
骨灰分含量 (%)	脛骨	53.1 <sup>a</sup>	41.5 <sup>b</sup>	45.8 <sup>c</sup>
	指骨	14.5 <sup>a</sup>	10.1 <sup>b</sup>	11.3 <sup>c</sup>
蓄積率 (%)	リン	40.65 <sup>a</sup>	54.50 <sup>b</sup>	66.44 <sup>c</sup>
	カルシウム	46.50 <sup>a</sup>	60.72 <sup>b</sup>	64.69 <sup>bc</sup>
回腸消化率 (%)	リン	50.68 <sup>a</sup>	53.14 <sup>a</sup>	68.79 <sup>b</sup>
	カルシウム	48.91 <sup>a</sup>	71.11 <sup>b</sup>	74.12 <sup>b</sup>

増体量、飼料摂取量、飼料効率、骨灰分含量、蓄積率及び回腸消化率の値は平均値  
各項目内の異文字間に有意差あり（ $p < 0.05$ ）

\*1 標準飼料群：無機リンを添加してリンを十分量含んだ標準飼料（総リン含量：0.77%、有効リン含量：

0.50%)

\*2 無機リン無添加飼料群：無機リンを添加しない標準飼料（総リン含量：0.39%、有効リン含量：0.12%）

\*3 フィターゼ添加飼料群：無機リン無添加飼料 1kg 当りにフィターゼを以下の用量で添加

500 FTU/kg 添加飼料群：1g (0.149g/kgBW/日 (0.090~0.435g/kgBW/日))

1,000 FTU/kg 添加飼料群：2g (0.290g/kgBW/日 (0.172~0.912g/kgBW/日))

### 3-1-2 豚

① 豚（去勢雄、体重約 15 kg）を、標準飼料群（総リン 0.55%）、無機リン無添加飼料群（総リン 0.33%）、フィターゼ添加飼料群（無機リン無添加飼料にフィターゼを添加；500、1,000 FTU/g）に振り分け（1群 6頭）、当該飼料を 10 日間給与した。乾物、窒素、総エネルギー及びリンの消化率を算出するため、期間後半 5 日間に糞便を採取した。

乾物、窒素及び総エネルギーの消化率については、無機リン無添加飼料群とフィターゼ添加飼料群との間に有意差はなかった。

リン消化率については、フィターゼ添加飼料群は無機リン無添加飼料群に対して用量依存的に有意な上昇が見られた ( $p<0.05$ )。標準飼料群に対しては、500 FTU/kg 添加飼料群では有意に低く、1,000 FTU/kg 添加飼料群では有意に高かった ( $p<0.05$ )（表 2 参照）。〔参照 3〕

表 2 豚用飼料に添加したときのフィターゼの給与効果

	標準飼料群*1	無機リン無添加飼料群*2	フィターゼ添加飼料群 (FTU/kg) *2,3		
			500	1,000	
無機リン添加の有無	+		-		
総リン含量 (%)	0.55		0.33		
フィターゼ添加の有無	-		+	+	
フィターゼ添加量 (g/kg)			1	2	
試験動物数 (頭)	6	6	6	6	
消化率 (%)	乾物	85.8 <sup>a</sup>	87.6 <sup>bc</sup>	87.2 <sup>b</sup>	88.3 <sup>c</sup>
	窒素	80.3 <sup>a</sup>	84.0 <sup>b</sup>	82.6 <sup>b</sup>	84.2 <sup>b</sup>
	総エネルギー	83.5 <sup>a</sup>	85.8 <sup>bc</sup>	84.9 <sup>b</sup>	86.2 <sup>c</sup>
	リン	37.5 <sup>a</sup>	24.0 <sup>b</sup>	32.1 <sup>c</sup>	49.5 <sup>d</sup>

消化率の値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり ( $p<0.05$ )

\*1 標準飼料群：無機リンを添加してリンを十分量含んだ標準飼料（総リン含量：0.55%）

\*2 無機リン無添加飼料群：無機リンを添加しない標準飼料（総リン含量：0.33%）

\*3 フィターゼ添加飼料群：無機リン無添加飼料 1 kg 当りにフィターゼを以下の用量で添加

500 FTU/kg 添加飼料群：1g (0.049g/kgBW/日 (0.043~0.057g/kgBW/日))

1,000 FTU/kg 添加飼料群：2g (0.098g/kgBW/日 (0.086~0.113g/kgBW/日))

② 豚（去勢雄・未経産雌、平均体重約 10 kg）を、標準飼料給与群（総リン 0.57%）、無機リン無添加飼料給与群（総リン 0.40%）、フィターゼ添加飼料給与群（無機リン無添加飼料にフィターゼを添加；500、1,000 FTU/g）に振り分け（1 群 12 頭）、当該飼料を 21 日間給与した。

1 日増体量については、フィターゼ添加飼料群は、無機リン無添加飼料群に対して有意に高かったが（ $p < 0.05$ ）、標準飼料群に対して有意に低かった（ $p < 0.05$ ）。

1 日飼料摂取量については、フィターゼ添加飼料群は、無機リン無添加飼料群及び標準飼料群に対して有意差はなかった。

飼料効率については、フィターゼ添加飼料群は、無機リン無添加飼料群に対して、500 FTU/kg 添加飼料群では有意差はなかったものの、1,000 FTU/kg 添加飼料群では有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。標準飼料群に対しては有意差はなかった。

血漿中リン濃度については、フィターゼ添加飼料群は、無機リン無添加飼料群に対して有意に高かった（ $p < 0.05$ ）（表 3 参照）。〔参照 3〕

表 3 豚用飼料に添加したときのフィターゼの給与効果

	標準飼料群*1	無機リン無添加飼料群*2	フィターゼ添加飼料群 (FTU/kg) *2,3		
			500	1,000	
無機リン添加の有無	+		-		
総リン含量 (%)	0.57		0.40		
フィターゼ添加の有無			+	+	
フィターゼ添加量 (g/kg)			1	2	
試験動物数 (頭)	12	12	12	12	
1 日増体量 (g/頭)	524 <sup>a</sup>	419 <sup>b</sup>	470 <sup>c</sup>	470 <sup>c</sup>	
1 日飼料摂取量 (g/頭)	1,025	1,039	1,006	965	
飼料効率	0.517 <sup>a</sup>	0.415 <sup>b</sup>	0.472 <sup>ab</sup>	0.496 <sup>a</sup>	
血漿リン濃度 (mg/L)	開始時	4.21	4.02	4.05	3.95
	終了時	3.45 <sup>a</sup>	1.43 <sup>b</sup>	2.04 <sup>c</sup>	2.34 <sup>c</sup>

1 日増体量、1 日飼料摂取量、飼料効率及び血漿リン濃度の値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり（ $p < 0.05$ ）

\*1 標準飼料群：無機リンを添加してリンを十分量含んだ標準飼料（総リン含量：0.57%）

\*2 無機リン無添加飼料群：無機リンを添加しない標準飼料（総リン含量：0.40%）

\*3 フィターゼ添加飼料群：無機リン無添加飼料 1 kg 当たりにフィターゼを以下の用量で添加

500 FTU/kg 添加飼料群：1g (0.068g/kgBW/日 (0.051~0.102g/kgBW/日)) 添加

1,000 FTU/kg 添加飼料群：2g (0.131g/kgBW/日 (0.098~0.196g/kgBW/日)) 添加

### 3-2 効果を裏付ける野外応用による試験

#### 3-2-1 鶏

鶏（ブロイラー、雄、初生齢）を、標準飼料群（有効リン 前期用飼料 0.40%、後期用飼料 0.32%）、無機リン低量添加飼料群（有効リン 前期用飼料 0.28%、後期用飼料 0.20%）、フィターゼ添加飼料群（無機リン低量添加飼料にフィターゼを添加；250、500、750、1,000 FTU/kg）及び対照物質添加飼料群（無機リン低量添加飼料に既指定のフィターゼを添加；500、750 FTU/kg）に振り分け（1群 252羽）、当該飼料を42日間給与した。なお、対照物質としてフィターゼ（その2の(2)製剤（その2））を使用した。

終了時体重については、フィターゼ添加飼料群は、無機リン低量添加飼料群に対して有意に高く（ $p<0.05$ ）、標準飼料群と有意差はなかった。フィターゼ添加飼料群での群間の比較では、有意差はなかったが、750 FTU/kg 添加飼料群が最も高い値を示した。フィターゼ添加飼料群と対照物質添加飼料群の比較では、それぞれのフィターゼを500及び750 FTU/kg 添加した群間に有意差はなかったが、フィターゼ添加飼料群が対照物質添加飼料群よりも高値を示した。

飼料摂取量については、フィターゼ添加飼料群は、無機リン低量添加飼料群、標準飼料群及び対照物質添加飼料群に対して有意差はなかった。

飼料効率については、フィターゼ添加飼料群は、無機リン低量添加飼料群に対して有意に高く（ $p<0.05$ ）、標準飼料群に対して有意差はなかった。フィターゼ添加飼料群の群間の比較では、500及び750 FTU/kg 添加飼料群が250 FTU/kg 添加飼料群よりも有意に高かった（ $p<0.05$ ）。フィターゼ添加飼料群と対照物質添加飼料群の比較では、それぞれのフィターゼを500 FTU/kg 添加した群間に有意差はなかったが、750 FTU/kg 添加した群間では、フィターゼ添加飼料群が対照物質添加飼料群に対して有意に高かった（ $p<0.05$ ）（表4参照）。〔参照4〕

表4 鶏用飼料に添加したときのフィターゼの給与効果

		標準飼料群*1	無機リン低量添加飼料群*2	対照物質添加飼料群 (FTU/kg) *2,4	
				500	750
無機リン添加の有無		+	+ (低量)		
総リン含量 (%) (有効リン含量)	前期用飼料	0.64 (0.40)	0.52 (0.28)		
	後期用飼料	0.57 (0.32)	0.45 (0.20)		
フィターゼ (その2の(2)) 製剤 (その2) 添加の有無		-	-	+	+
フィターゼ添加量 (g/kg)				0.5	0.75
試験動物数 (羽)		252	252	252	252
終了時体重 (g/羽)		2,117 <sup>ab</sup>	1,939 <sup>c</sup>	2,045 <sup>b</sup>	2,105 <sup>ab</sup>
飼料摂取量 (g/羽)		3,780 <sup>ab</sup>	3,688 <sup>b</sup>	3,677 <sup>b</sup>	3,937 <sup>a</sup>
飼料効率		0.553 <sup>ab</sup>	0.516 <sup>d</sup>	0.550 <sup>ab</sup>	0.528 <sup>c</sup>

		フィターゼ添加飼料群 (FTU/kg) *2,3			
		250	500	750	1,000
無機リン添加の有無		+ (低量)			
総リン含量 (%)	前期用飼料	0.52 (0.28)			
(有効リン含量)	後期用飼料	0.45 (0.20)			
フィターゼ製剤 (散剤) 添加の有無*3		+	+	+	+
フィターゼ添加量 (g/kg)		0.088	0.176	0.263	0.351
試験動物数 (羽)		252	252	252	252
終了時体重 (g/羽)		2,126 <sup>ab</sup>	2,160 <sup>ab</sup>	2,195 <sup>a</sup>	2,138 <sup>ab</sup>
飼料摂取量 (g/羽)		3,847 <sup>ab</sup>	3,827 <sup>ab</sup>	3,862 <sup>ab</sup>	3,819 <sup>ab</sup>
飼料効率		0.544 <sup>b</sup>	0.558 <sup>a</sup>	0.559 <sup>a</sup>	0.555 <sup>ab</sup>

終了時体重、飼料摂取量及び飼料効率の値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

\*1: 標準飼料群: 無機リンを添加してリンを十分量含んだ標準飼料 (有効リン含量: 前期用飼料; 0.40%、後期用飼料; 0.32%)

\*2: 無機リン低量添加飼料群: 無機リンを低量添加した標準飼料 (有効リン含量: 前期用飼料; 0.28%、後期用飼料; 0.20%)

\*3: フィターゼ添加飼料群: 無機リン低量添加飼料 1 kg 当りに製剤 (散剤) を以下の用量で添加  
 250 FTU/kg 添加飼料群: 0.088g (0.007g/kgBW/日 (0.004~0.230g/kgBW/日))  
 500 FTU/kg 添加飼料群: 0.176g (0.015g/kgBW/日 (0.007~0.458g/kgBW/日))  
 750 FTU/kg 添加飼料群: 0.263g (0.022g/kgBW/日 (0.011~0.691g/kgBW/日))  
 1,000 FTU/kg 添加飼料群: 0.351g (0.029g/kgBW/日 (0.015~0.912g/kgBW/日))

\*4: 対照物質添加飼料群: 無機リン低量添加飼料 1 kg 当りに市販フィターゼ製剤 (フィターゼ (その2の(2)) 製剤 (その2)) を以下の用量で添加

対照物質 500 FTU/kg 添加飼料群: 対照物質 0.5g

対照物質 750 FTU/kg 添加飼料群: 対照物質 0.75g

### 3-2-2 鶏

鶏 (ブロイラー種、雄、3日齢) を標準飼料群 (有効リン 0.39%)、無機リン低量添加飼料群 (有効リン 0.19%)、PVA 使用フィターゼ添加飼料群 (無機リン低量添加飼料に PVA 使用フィターゼを添加; 500 FTU/kg) に振り分け (1群 60羽)、当該飼料を 21日間給与した。給与飼料は、いずれも 90°C でペレット加工した。

1日増体量については、PVA 使用フィターゼ添加飼料群は、無機リン低量添加飼料群に対して、有意に高かった (p<0.05)。

1日飼料摂取量については、PVA 使用フィターゼ添加飼料群は、無機リン低量添加飼料群に対して、有意差はなかった (表 5 参照)。[参照 5]

表5 鶏用飼料に添加したときのフィターゼの給与効果（ペレット加工時）

	標準飼料群	無機リン低量 添加飼料群	PVA 使用フィターゼ 添加飼料群
試験動物数（羽）	60	60	60
1日増体量（g/日）	1,012 <sup>a</sup>	808 <sup>b</sup>	901 <sup>c</sup>
1日飼料摂取量（g/日）	1,458 <sup>a</sup>	1,154 <sup>b</sup>	1,230 <sup>b</sup>
飼料要求率	1.44	1.44	1.36

各項目内の異文字間に有意差あり（ $p < 0.05$ ）

\*1：標準飼料群：無機リンを添加してリンを十分量含んだ標準飼料（総リン含量：0.65%、有効リン含量：0.39%）

\*2：無機リン低量添加飼料群：無機リンを低量添加した標準飼料（総リン含量：0.44%、有効リン含量：0.19%）

\*3：フィターゼ添加飼料群：無機リン低量添加飼料 1 kg 当りに製剤（散剤）を以下の用量で添加  
500 FTU/kg 添加飼料群：0.05g（0.005g/kgBW/日）（PVA 摂取量：0.20 g/kgBW/日）

### 3-2-3 鶏

鶏（ブロイラー種、雄、1日齢）を無機リン低量添加飼料群（有効リン0.27%）、PVA未使用フィターゼ添加飼料群（無機リン低量添加飼料にフィターゼを添加；500 FTU/kg）、PVA使用フィターゼ添加飼料群（無機リン低量添加飼料にフィターゼを添加；500 FTU/kg）に振り分け（1群48羽）、当該飼料を21日間給与した。なお、給与飼料は、いずれも粉餌とした。

1日飼料摂取量、脛骨灰分については、PVA使用フィターゼ添加飼料群は、PVA未使用フィターゼ添加飼料群に対して、有意差はなかった（表6参照）。〔参照6〕

表6 鶏用飼料に添加したときのフィターゼの給与効果（PVA未使用フィターゼとの比較）

	無機リン低量 添加飼料群	PVA未使用フィター ゼ添加飼料群	PVA使用フィターゼ 添加飼料群
試験動物数（羽）	48	48	48
1日増体量（g/日）	36.9	38.9	38.3
1日飼料摂取日量（g/日）	47.6 <sup>b</sup>	49.9 <sup>a</sup>	49.3 <sup>ab</sup>
飼料要求率	1.29	1.28	1.30
脛骨灰分（%）	45.9 <sup>a</sup>	49.2 <sup>b</sup>	49.1 <sup>b</sup>

各項目内の異文字間に有意差あり（ $p < 0.05$ ）

\*1：無機リン低量添加飼料群：無機リンを低量添加した標準飼料（総リン含量：0.53%、有効リン含量：0.27%）

\*2：フィターゼ添加飼料群：無機リン低量添加飼料 1 kg 当りに製剤（粉剤）を以下の用量で添加  
500 FTU/kg 添加飼料群：0.05g（0.005g/kgBW/日）（PVA 摂取量：0.23 g/kgBW/日）

### 3-2-4 豚

離乳豚（去勢雄・未産雌、平均体重約7kg）を、標準飼料群（有効リン 前期用飼料0.42%、後期用飼料0.32%）、無機リン低量添加飼料群（有効リン 前期用飼料0.28%、

後期用飼料 0.20%)、フィターゼ添加飼料群（無機リン低量添加飼料にフィターゼを添加；250、500、750、1,000 FTU/kg）及び対照物質添加飼料群（無機リン低量添加飼料に既指定のフィターゼを添加；500、750 FTU/kg）に振り分け（1群雌雄18頭）、当該飼料を42日間給与した。なお、対照物質としてフィターゼ（その2の（2）製剤（その1））を使用した。

1日増体量については、フィターゼ添加飼料群は、無機リン低量添加飼料群に対して、250及び500 FTU/kg添加飼料群では有意差はなかったが、750及び1,000 FTU/kg添加飼料群では有意に増加した（ $p < 0.05$ ）。標準飼料群に対しては、250 FTU/kg添加飼料群では有意に低く（ $p < 0.05$ ）、500、750及び1,000 FTU/kgフィターゼ添加飼料群では有意差はなかった。フィターゼ添加飼料群と対照物質添加飼料群の比較では、それぞれのフィターゼを500及び1,000 FTU/kg添加した群間に有意差はなかった。

1日飼料摂取量については、フィターゼ添加飼料群は、無機リン低量添加飼料群に対して有意差はなかった。標準飼料群に対しては、250、500及び1,000 FTU/kg添加群では有意に低かったが（ $p < 0.05$ ）、750 FTU/kg添加群では有意差はなかった。フィターゼ添加飼料群と対照物質添加飼料群の比較では、それぞれのフィターゼを500及び1,000 FTU/kg添加した群間に有意差はなかった。

飼料効率については、フィターゼ添加飼料給与群は、標準飼料群に対して有意に高く（ $p < 0.05$ ）、無機リン無添加飼料添加群に対しても、750 FTU/kg添加飼料群を除いた3つの群では、有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。フィターゼ添加飼料群と対照物質添加飼料群の比較では、それぞれのフィターゼを500及び1,000 FTU/kg添加した群間に有意差はなかった（表7参照）。〔参照7〕

表7 豚用飼料に添加したときのフィターゼの給与効果

		標準飼料群*1	無機リン低量添加飼料群*2	対照物質添加飼料群 (FTU/kg) *2,4	
				500	1,000
無機リン添加の有無		+	+ (低量)		
総リン含量 (%) (有効リン含量)	前期用飼料	0.64 (0.40)	0.52 (0.28)		
	後期用飼料	0.57 (0.32)	0.45 (0.20)		
フィターゼ (その2の(2)) 製剤 (その1) 添加の有無		-	-	+	+
フィターゼ添加量 (g/kg)				0.10	0.20
試験動物数 (頭)		18	18	18	18
1日増体量 (g/頭)		0.587 <sup>a</sup>	0.552 <sup>b</sup>	0.560 <sup>b</sup>	0.595 <sup>a</sup>
1日飼料摂取量 (g/頭)		0.885 <sup>a</sup>	0.822 <sup>bc</sup>	0.817 <sup>bc</sup>	0.850 <sup>ab</sup>
飼料効率		0.665 <sup>a</sup>	0.674 <sup>ab</sup>	0.685 <sup>bc</sup>	0.702 <sup>cd</sup>

	フィターゼ添加飼料群 (FTU/kg) *2,3			
	250	500	750	1,000
無機リン添加の有無	+ (低量)			
総リン含量 (%)	0.52 (0.28)			
(有効リン含量)	0.45 (0.20)			
前期用飼料				
後期用飼料				
フィターゼ製剤 (液剤) 添加の有無	+	+	+	+
フィターゼ添加量 (g/kg)	0.05	0.10	0.15	0.20
試験動物数 (頭)	18	18	18	18
1日増体量 (g/頭)	0.571 <sup>b</sup>	0.578 <sup>ab</sup>	0.591 <sup>a</sup>	0.591 <sup>a</sup>
1日飼料摂取量 (g/頭)	0.807 <sup>c</sup>	0.827 <sup>bc</sup>	0.860 <sup>ab</sup>	0.843 <sup>bc</sup>
飼料効率	0.710 <sup>d</sup>	0.697 <sup>cd</sup>	0.688 <sup>bc</sup>	0.702 <sup>cd</sup>

1日増体量、1日飼料摂取量及び飼料効率の値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

\*1: 標準飼料群: 無機リンを添加してリンを十分量含んだ標準飼料 (総リン含量: 前期用飼料; 0.65%、後期用飼料; 0.56%、有効リン含量: 前期用飼料; 0.40%、後期用飼料; 0.32%)

\*2: 無機リン低量添加飼料群: 無機リンを低量添加した標準飼料 (総リン含量: 前期用飼料; 0.54%、後期用飼料; 0.47%、有効リン含量: 前期用飼料; 0.30%、後期用飼料; 0.22%)

\*3: フィターゼ添加飼料群: 無機リン低量添加飼料 1 kg 当たりに製剤 (液剤) を以下の用量で添加

250 FTU/kg 添加飼料群: 0.05g (0.002g/kgBW/日 (0.001~0.006g/kgBW/日))

500 FTU/kg 添加飼料群: 0.10g (0.004g/kgBW/日 (0.003~0.012g/kgBW/日))

750 FTU/kg 添加飼料群: 0.15g (0.007g/kgBW/日 (0.004~0.018g/kgBW/日))

1,000 FTU/kg 添加飼料群: 0.2g (0.009g/kgBW/日 (0.005~0.024g/kgBW/日))

\*4: 対照物質添加飼料群: 無機リン低量添加飼料 1 kg 当たりに市販フィターゼ製剤 (フィターゼ (その2の(2)) 製剤 (その1)) を以下の用量で添加

対照物質 500 FTU/kg 添加飼料群: 対照物質 0.10g

対照物質 1,000 FTU/kg 添加飼料群: 対照物質 0.20g

### 3-2-5 豚

子豚 (LWD 種、体重: 7.5kg) を無機リン低量添加飼料群 (有効リン 0.22%)、PVA 使用フィターゼ添加飼料群 (無機リン低量添加飼料にフィターゼを添加; 500 FTU/kg) に振り分け (1群 80羽)、当該飼料を 21 日間給与した。給与飼料は、いずれも 90°C でペレット加工した。

飼料要求率については、PVA 使用フィターゼ添加飼料群は、無機リン低量添加飼料群に対して有意に低かった。(p<0.05) (表 8 参照)。[参照 8]

表 8 豚用飼料に添加したときの PVA 使用フィターゼの給与効果 (ペレット加工時)

	無機リン低量添加群	PVA 使用フィターゼ添加飼料群
試験動物数 (頭)	80	80
1 日増体量 (g/日)	449	520
飼料摂取日量 (g/日)	698	708
飼料要求率	1.57 <sup>a</sup>	1.36 <sup>b</sup>

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

\*1: 無機リン低量添加飼料群: 無機リンを低量添加した標準飼料 (総リン含量: 0.47%、有効リン含量: 0.22%)

\*2: フィターゼ添加飼料群: 無機リン低量添加飼料 1 kg 当たりに製剤 (粉剤) を以下の用量で添加  
500 FTU/kg 添加飼料群: 0.05g (0.003g/kgBW/日) (PVA 摂取量: 0.11 g/kgBW/日)

### 3-2-6 豚

子豚 (LWD 種、体重: 7.5kg) を、標準飼料群 (有効リン 0.37%)、無機リン低量添加飼料群 (有効リン 0.22%)、PVA 未使用フィターゼ添加飼料群 (無機リン低量添加飼料にフィターゼを添加; 500 FTU/kg)、PVA 使用フィターゼ添加飼料群 (無機リン低量添加飼料にフィターゼを添加; 500 FTU/kg) に振り分け (1 群 80 頭)、当該飼料を 21 日間給与した。給与飼料は、いずれも粉餌とした。

1 日増体量については、PVA 使用フィターゼ添加飼料群は、PVA 未使用フィターゼ添加飼料群に対して、有意差はなかった (表 9 参照)。[参照 9]

表 9 豚用飼料に添加したときのフィターゼの給与効果 (PVA 未使用フィターゼとの比較)

	標準飼料群	無機リン低量 添加飼料群	PVA 未使用フィ ターゼ添加飼料群	PVA 使用フィ ターゼ添加飼料群
試験動物数 (頭)	80	80	80	80
1 日増体量 (g/日)	567 <sup>a</sup>	435 <sup>b</sup>	500 <sup>ab</sup>	490 <sup>ab</sup>
1 日飼料摂取日量 (g/日)	785	690	712	698
飼料要求率	1.39	1.58	1.45	1.44

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

\*1: 標準飼料群: 無機リンを添加してリンを十分量含んだ標準飼料 (総リン含量: 0.63%、有効リン含量: 0.37%)

\*2: 無機リン低量添加飼料群: 無機リンを低量添加した標準飼料 (総リン含量: 0.47%、有効リン含量: 0.22%)

\*3: フィターゼ添加飼料群: 無機リン低量添加飼料 1 kg 当たりに製剤 (粉剤) を以下の用量で添加  
500 FTU/kg 添加飼料群: 0.05g (0.003g/kgBW/日) (PVA 摂取量: 0.11 g/kgBW/日)

## 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（ラット）

ラット（SD系、5週齢、体重：雄；119～142 g、雌；112～126 g）を用意し、注射用滅菌水（溶媒）でフィターゼを溶解して、0（対照群）、30,000（1,523）、50,000（2,540）FTU/kgBW（mg/kgBW）で単回経口投与した（1群雌雄各5匹）。

死亡例はなく、臨床観察及び体重に異常は見られなかった。また、15日目の剖検においても肉眼的に異常は見られなかった。

以上の結果から、経口投与によるLD50は、ラット（SD系）の雌雄ともに2,540 mg/kgBW（フィチン酸分解力単位として50,000 FTU/kgBW）以上と考えられた。〔参照10〕

#### 4-1-1-2 反復投与毒性試験（短期、ラット）

ラット（SD系、6週齢、体重：雄；198～238 g、雌；137～178 g）を用意し、注射用滅菌水（溶媒）でフィターゼを溶解して、0（対照群）、DV006U投与群（5,000（0.30）、30,000（1.79）、50,000（2.98）FTU/kgBW/日（mg/kgBW/日））、DV006R投与群（100,000 FTU/kgBW/日（0.92 g/kgBW/日））で90日間強制経口投与した（1群雌雄各20又は25匹）。DV006UはDV006Rよりも精製度の低いフィターゼであり、  
[REDACTED]である。

試験開始後 [REDACTED]

[REDACTED]はなかった。増体量及び飼料摂取量に有意差が散見されたが、用量依存的ではなく、また一貫した傾向は見られなかった。血液学的検査及び血液生化学的検査、器官及び組織の重量検査において、有意差が散見されたが、いずれも試験実施施設における標準的なデータの範囲内であった。

全投与群の一部において、肺に炎症が見られた。発生数及び重症度は、100,000 FTU/kgBW/日投与群（DV006R）よりも50,000 FTU/kgBW/日投与群（DV006U）の方が高かった。DV006U投与群の発生率は、用量依存的であった。炎症は回復期間に剖検したラットにおいても見られた。炎症は、細気管支及びその周囲の実質に1か所から数か所の比較的小さい病巣として見られ、軽度から中等度であった。慢性的な炎症反応は気管支肺炎様で、異物吸入による所見と一致していた。また、精製度の低いDV006Uでより重症度が高かったことから、肺の炎症については、検体を強制経口投与したときに食道内壁や咽頭周辺に残存した検体が、誤嚥によって肺に吸入され生じた所見であると考えられ、全身性の所見もなく、投与に起因したものではないと考えられた。

以上の結果から、本試験における無毒性量は、DV006Uでは最高用量の50,000 FTU/kgBW/日、DV006Rでは100,000 FTU/kgBW/日と考えられた。〔参照11〕

(参考)

90 日反復投与毒性試験でラットの肺に炎症が見られたことから、EFSA の評価書におけるヒト等に対する感作性及び刺激性に関するデータや考察を確認した。

EFSA では、今回指定の要望があったフィターゼ (Phyzyme XP) の 90 日反復投与毒性試験におけるラットの肺炎は技術的な問題によるものであり、安全性評価には関連しないと考察した。しかし、吸入した際に炎症を起こす可能性を示唆している可能性があるため、製品には潜在的な感作物質であることの表示、防護服の着用を推奨した。〔参照 12〕

さらに、EFSA は他のフィターゼ製剤について、フィターゼがタンパクであるということ を考慮すれば、フィターゼの固体製剤は呼吸器感作物質であると仮定しなければならないとしている。液体製剤では皮膚刺激性・目刺激性の兆候は見られなかったとする知見があるものの、固体製剤では試験が行われていないため、固体製剤は皮膚や目に刺激性があると仮定し、適切な安全策を講じる必要があると評価している。〔参照 13〕

また、ヒトでのフィターゼの影響については、フィターゼを取り扱っている飼料製造工場 で品質管理の担当者が適切な防護具を着用せず作業したため、吸い込んだフィターゼにより過敏性肺炎を発症したという事例が報告されている。〔参照 14、15〕

以上により、感作性及び刺激性は、フィターゼ (Phyzyme XP) に特異的なものではないことが示唆された。

#### 4-1-2 特殊毒性試験

##### 4-1-2-1 復帰変異試験 (サルモネラ菌、大腸菌)

*Salmonella typhimurium* の 4 株 (TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) 及び *Escherichia coli* の 1 株 (WP2uvrA) を、6 段階のフィターゼ添加群 (0.0333、0.100、0.333、1.00、3.33、5.00mg/plate) にて、代謝活性化系 (S9mix) の存在下及び非存在下で培養した。陰性対照として溶媒のみを添加した群を、陽性対照として被験菌株と代謝活性化系の有無ごとにベンゾピレン、2-ニトロフルオレン、2-アミノアンスラセン、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、ICR-191 及び 4-ニトロ基のリン-N-オキシドを添加した群を設けた。なお、フィターゼの添加量は、あらかじめ行なった用量設定試験において生育阻害が認められなかった濃度から 5 mg/plate を最高用量とした。

代謝活性化系 (S9mix) の存在下及び非存在下のいずれでも、最高用量を含む全てのフィターゼ添加群において復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、細菌を用いる復帰変異試験の結果は陰性であった。〔参照 16〕

##### 4-1-2-2 マウスリンフォーマ tk 試験 (マウスリンパ腫細胞)

マウスリンパ腫細胞 L5178Y tk+/-3.7.2c 株を用い、フィターゼ濃度は 5mg/mL を最高用量とする 8 段階のフィターゼ添加群 (39.3、78.5、157、313、625、1,250、2,500、5,000µg/mL) を設定し、代謝活性化系 (S9mix) の存在下及び非存在下で処理した。陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として methylmethanesulfonate (代謝活性化系非存在下)、methylcholanthrene (代謝活性化系存在下) で処理した群を設けた。検体の各用量群については 1 系列、陽性対照群については 2 系列、陰性対照群については 3 系列の処理を行った。

代謝活性化系の非存在下及び存在下のいずれも、全てのフィターゼ添加群において、陰性対象と比較して染色体異常を持つ細胞の出現頻度の増加は認められなかった。

以上の結果から、マウスリンフォーマ tk 試験の結果は陰性であった。〔参照 17〕

#### 4-1-2-3 小核試験 (マウス)

マウス (CD 系、雄、体重 20~45g) に、注射用滅菌水に溶解したフィターゼ (500、1,000 及び 2,000mg/kgBW) を単回で強制経口投与した。陽性対照には [ ] を滅菌蒸留水に溶解したものを、陰性対照には滅菌蒸留水のみを供試した。投与後 24 時間では陰性対照群、試験群 (500、1,000 及び 2,000mg/kg) 及び陽性対照群、また、投与後 48 時間では陰性対象群及び 2,000mg/kg 投与群を対象にそれぞれ 5 匹ずつ屠殺し、骨髓塗沫標本を作製した。これらの標本を用いて、個体当たり [ ] 個以上の多染性赤血球について、小核の有無及び正染性赤血球に対する多染性赤血球の比率を検索した。

多染性赤血球における小核の発現率及び正染性赤血球に対する多染性赤血球の出現率にはいずれも被験物質の投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、マウスを用いる小核試験の結果は陰性であった。〔参照 18〕

#### 4-2 対象家畜等を用いた飼養試験

##### 4-2-1 鶏

鶏 (ブロイラー種、雄、初生齢、体重約 35g) を、無機リン低量添加飼料群 (有効リン 前期用飼料 0.26%、後期用飼料 0.22%) 及びフィターゼ添加飼料群 (無機リン低量添加飼料にフィターゼを添加; 500、7,500 FTU/kg) に振り分け (1 群 252 羽)、42 日間給与した (初生~21 日齢: 前期飼料、22~42 日齢: 後期飼料)。

一般症状ではフィターゼの投与に起因すると考えられる異常所見は認められず、試験期間中の斃死率にも差はなかった。

終了時体重及び飼料摂取量については、フィターゼ添加飼料群は、無機リン低量添加飼料群に対して、それぞれ用量依存的に有意な上昇が見られた ( $p < 0.05$ )。

飼料効率については、フィターゼ添加飼料群は、無機リン低量添加飼料群に対して、500 FTU/kg 添加飼料群では有意に高く ( $p < 0.05$ )、7,500 FTU/kg 添加飼料群では有意差はなかった。

以上の結果から、本剤の至適添加量 (250~750 FTU/kg) の上限量の 10 倍量を添加した飼料をブロイラー種に 42 日間連続給与しても、一般症状及び飼育成績には投与に起因する異常所見及び悪影響は認められなかった。なお、一般症状及び飼育成績に異常が認められなかったことから、血液学的検査、生化学的検査及び病理学的検査は実施しなかった (表 10 参照)。〔参照 19〕

表 10 鶏用飼料に添加したときのフィターゼの影響

		無機リン低量 添加飼料群*1	フィターゼ添加飼料群 (FTU/kg) *1,2	
			500	7,500
無機リン添加の有無		+ (低量)		
総リン含量 (%) (有効リン含量)	前期用飼料	0.516 (0.26)		
	後期用飼料	0.450 (0.22)		
フィターゼ製剤 (散剤) 添加の有無		-	+	+
フィターゼ摂取量 (g/kg)			0.344	5.165
試験動物数 (羽)		252	252	252
終了時体重 (g)		1,791 <sup>a</sup>	1,982 <sup>b</sup>	2,085 <sup>c</sup>
飼料摂取量 (g/羽)		3,175 <sup>a</sup>	3,424 <sup>b</sup>	3,638 <sup>c</sup>
飼料効率		0.554 <sup>a</sup>	0.573 <sup>b</sup>	0.567 <sup>ab</sup>

終了時体重、飼料摂取量及び飼料効率の値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

\*1: 無機リン低量添加飼料群: 無機リンを低量添加した標準飼料 (総リン含量: 前期用飼料; 0.516%、後期用飼料; 0.450%、有効リン含量: 前期用飼料; 0.26%、後期用飼料; 0.22%)

\*2: フィターゼ添加飼料群: 無機リン低量添加飼料 1 kg 当たりに製剤 (その 2) を以下の用量で添加  
500 FTU/kg 添加飼料群 (至適添加量の下限量の 2 倍量): 0.344g (0.028g/kgBW/日 (0.014~0.801g/kgBW/日)) 添加  
7,500 FTU/kg 添加飼料群 (至適添加量の上限量の 10 倍量): 5.165g (0.422g/kgBW/日 (0.215~12.782g/kgBW/日)) 添加

#### 4-2-2 豚

豚 (PIC337×C22 系統、離乳後 1 週間、去勢雄・未経産雌) を、標準飼料群、無機リン低量添加飼料群 (有効リン前期用飼料 0.22%、後期用飼料 0.17%) 及びフィターゼ添加飼料群 (無機リン低量添加飼料にフィターゼを添加; 10,000 FTU/kg) に振り分け (1 群 32 頭)、28 日間給与した。試験終了時に剖検を行って腓骨を採材した。

一般症状ではフィターゼの投与に起因すると考えられる異常所見は認められなかった。

1 日増体量、飼料効率及び骨灰分量については、無機リン低量添加飼料群は、標準飼料群よりも有意に低かった (p<0.05)。一方、フィターゼ添加飼料群は、無機リン低量添加飼料群に対して有意に高く (p<0.05)、標準飼料群に対して有意差はなかった。

以上の結果から、本剤の至適添加量 (250~1,000 FTU/kg) の上限量の 10 倍量を添加した飼料を子豚に 28 日間連続給与しても、一般症状及び飼育成績には投与に起因する異常所見及び悪影響は認められなかった。なお、一般症状及び飼育成績に異常が認められなかったことから、血液学的検査、生化学的検査及び病理学的検査は実施しなかった (表 11 参照)。[参照 20]

表 11 豚用飼料に添加したときのフィターゼの影響

	標準飼料群*1	無機リン低量添加飼料群*2	フィターゼ添加飼料群 (FTU/kg) *2,3
			10,000
無機リン添加の有無	+		+ (低量)
総リン含量 (%)	前期用飼料	0.58 (0.32)	0.48 (0.22)
(有効リン含量)	後期用飼料	0.57 (0.27)	0.47 (0.17)
フィターゼ製剤 (散剤) 添加の有無			+
フィターゼ摂取量 (g/kg)			1
試験動物数 (頭)	32	32	32
1日増体量 (g/頭)	419 <sup>a</sup>	371 <sup>b</sup>	410 <sup>a</sup>
1日飼料摂取量 (g/頭)	723	710	698
飼料効率	0.577 <sup>a</sup>	0.526 <sup>b</sup>	0.588 <sup>a</sup>
骨灰分含量 (%)	45.33 <sup>a</sup>	41.56 <sup>b</sup>	47.70 <sup>a</sup>

1日増体量、1日飼料摂取量、飼料効率及び骨灰分含量の値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

\*1: 標準飼料群: 無機リンを添加してリンを十分量含んだ標準飼料 (総リン含量: 前期用飼料; 0.58%、後期用飼料; 0.57%、有効リン含量: 前期用飼料; 0.32%、後期用飼料; 0.27%)

\*2: 無機リン低量添加飼料群: 無機リンを低量添加した標準飼料 (総リン含量: 前期用飼料; 0.48%、後期用飼料; 0.47%、有効リン含量: 前期用飼料; 0.22%、後期用飼料; 0.17%)

\*3: フィターゼ添加飼料群: 無機リン低量添加飼料 1 kg 当たりに製剤 (その 1) を以下の用量で添加  
10,000 FTU/kg 添加飼料群 (至適添加量の上限量の 10 倍): 3.125g (0.172g/kgBW/日 (0.125~0.280g/kgBW/日)) 添加

## 5 審議結果

フィターゼ (企業推奨量: 鶏 250~750 単位/kg 飼料、豚 250~1,000 単位/kg 飼料) 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」による増体を本剤の効果とし、給与対象は鶏及び豚で、無機リンの添加を減量した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: 鶏及び豚

また、飼料工場においてフィターゼを取り扱う際には、作業者に対する安全確保にも努めることが望ましいと付言された。

## 6 参照 (参考文献及び参考資料)

1. Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins (Igbasan et. al) (Arch. Anim. Nutr. 2000)
2. Evaluation of the Efficacy of Phytase in Broiler Diets FFI study reference: 02 8102 DIG. (study #2) (Dr. Layi Adeola) (2002)
3. Evaluation of the Efficacy of Phytase in Swine Diets DAN study reference: 02 F08109 (studies 1& 2) (Dr. Layi Adeola) (2003)
4. EFFICACY OF FINNFEEDS PHYTASE IN A 42 DAY BROILER STUDY (Dr. Janice Berg) (2002)
5. Phyzyme<sup>®</sup> XP TPT improves performance of broilers fed corn-soya based diets pelleted at 90°C(194°F)(DANISCO technical report)(2007)
6. Phyzyme<sup>®</sup> XP TPT and Phyzyme<sup>®</sup> XP give equivalent performance in broilers fed corn-soya based mash diets(DANISCO technical report)(2007)
7. The Effect of Dietary Phytase Supplementation on Growth Performance of Weanling Pigs Offered Wheat-Based Nursery Diets (Murray J. Pettitt) (2003)
8. Phyzyme<sup>®</sup> XP TPT improves performance of young pigs fed corn-soya based diets pelleted at 90°C(194°F)(DANISCO technical report)(2007)
9. Phyzyme<sup>®</sup> XP TPT and Phyzyme<sup>®</sup> XP give equivalent performance in young pigs fed corn-soya based mash diets(DANISCO technical report)(2007)
10. Acute Oral Toxicity Study in Rats with DV006U (Scou Technology Park) (2002)
11. A 90-Day Oral Toxicity Study in Rats with DV006U and DV006R (Scou Technology Park) (2002)
12. phyzyme XP : opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed and the scientific panel on genetically modified organisms on the safety and efficacy of the enzymatic preparation phyzyme XP (6-phytase) for use as feed additive for chickens for fattening. (the EFSA journal (2006) 350, 1-14)
13. Ronozyme : safety and efficacy of the product Ronozyme NP (6-phytase) for use as feed additive for poultry, weaned piglets and pigs for fattening. (the EFSA journal (2009) 1097, 1-20)
14. Hypersensitivity pneumonitis caused by occupational exposure to phytase (R. C. van Heemst) (2009)
15. Bibliographic review on the potential of microorganisms, microbial products and enzymes to induce respiratory sensitization (Cyril Martel) (2009)
16. *Salmonella-Escherichia Coli*/Mammalian-Microsome Reverse Mutation Assay with DV006R: Treat and Plate Method with a Confirmatory Assay (Leon F. Stankowsk, Jr., PhD) (2002)
17. L5178Y TK<sup>+/+</sup> Mouse Lymphoma Forward Mutation Assay with a Confirmatory Assay with DV006R (Maria A. Cifone, Ph.D.) (2002)
18. *In vivo* Mouse Micronucleus Assay with DV006R (Gregory L. Erexson, PhD) (2002)

19. TOLERANCE AND EFFICACY OF FINNFEEDS PHYTASE IN A 42 DAY BROILER STUDY (Lakeside Research) (2001)
20. Tolerance test to evaluate the effects of a high dietary inclusion rate of Danisco phytase on animal health, growth performance, and bone ash in nursery pigs (Dr. Jason Sands) (2004)

飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和五十一年農林省令第三十五号）の改正案別表第2の8 各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

## フィターゼ（その2の（3））

### ア 製造用原体

#### (7) 成分規格

**酵素力単位** 本品は、酵素力試験を行うとき、1g中に5,000フィチン酸分解力単位以上を含む。

#### 物理的・化学的性質

- ① 本品は、淡褐色の液体で、僅かに特異な臭いを有する。
- ② 本品の水溶液又は水懸濁液（1→100）のpHは、3.5～6.5である。
- ③ 本品は、pH 4.5～6.0において最大の酵素活性を有する。

**純度試験** フィターゼ（その1）製造用原体の純度試験を準用する。

**強熱残分** 5.0%以下（0.5g）

**酵素力試験** フィチン酸分解力試験法第1法により試験を行う。ただし、「操作法」の項中、「試料の最大酵素活性を示すpHに調整した0.005mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液」とあるのは、「試料の最大酵素活性を示すpHに調整した0.2mol/L酢酸・酢酸ナトリウム1L当たり、ポリソルベート20を0.1gの割合で含む緩衝液」と読み替えるものとする。

#### (4) 製造の方法の基準

*Schizosaccharomyces pombe*に属する菌株を宿主としたフィタ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。

#### (5) 保存の方法の基準

遮光した密閉容器に保存すること。

#### (6) 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）

#### (7) 成分規格

本品は、フィターゼ（その2の（3））製造用原体に、塩化ナトリウム、クエン酸及びソルビトール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、表示フィチン酸分解力単位の85～170%を含む。

**酵素力試験** フィチン酸分解力試験法第1法により試験を行う。ただし、「操作法」の項中、「試料の最大酵素活性を示すpHに調整した0.005mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液」とあるのは、「試料の最大酵素活性を示すpHに調整した0.2mol/L酢酸・酢酸ナトリウム1L当たり、ポリソルベート20を0.1gの割合で含む緩衝液」と読み替えるものとする。

#### (4) 保存の方法の基準

フィターゼ（その2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

フィターゼ（その2の（3））製造用原体の表示の基準を準用する。

## ウ 製剤（その2）

(7) 成分規格

本品は、フィターゼ（その2の（3））製造用原体に、必要に応じて、ポリビニルアルコールの水溶液を加え、さらに、硫酸ナトリウム及び賦形物質を加えて混和若しくは造粒した又はクエン酸、小麦粉及びプロピオン酸カルシウムを混和した小片、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、表示フィチン酸分解力単位の85～170%を含む。

**酵素力試験** フィチン酸分解力試験法第1法により試験を行う。ただし、「操作法」の項中、「試料の最大酵素活性を示す pH に調整した 0.005mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を加えて溶かし、」とあるのは、「試料の最大酵素活性を示す pH に調整した 0.2mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム 1L 当たり、ポリソルベート 20 を 0.1g の割合で含む緩衝液を加えて水中で 60 分間攪拌して溶かし、」と読み替えるものとする。

(イ) 保存の方法の基準

フィターゼ（その2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

フィターゼ（その2の（3））製造用原体の表示の基準を準用する。

## フィターゼの基準及び規格

## 8 各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

## (140) フィターゼ

## フィターゼ (その1)

## ア 製造用原体

## (7) 成分規格

**酵素力単位** 本品は、酵素力試験を行うとき、1g中に1,500フィチン酸分解力単位以上を含む。

## 物理的・化学的性質

- ① 本品は、白色～淡褐色の粉末で、僅かに特異な臭いを有する。
- ② 本品の水溶液又は水懸濁液 (1→100) のpHは、4.5～7.5である。
- ③ 本品は、pH5.0～6.0において最大の酵素活性を有する。

## 純度試験

- ① 重金属 本品1.0g (0.95～1.04g) を量り、重金属試験法第2法により試料溶液を調製し、鉛標準液5.0mLを用いて比較液を調製して重金属の試験を行うとき、試料溶液の呈する色は、比較液の呈する色より濃くはない (50 $\mu$ g/g以下)。
- ② ヒ素 本品1.0g (0.95～1.04g) を分解フラスコに入れ、硝酸10mL及び硫酸5mLを加え、静かに加熱する。溶液がなお褐色を呈するときは、放冷した後、硝酸1～2mLを追加して加熱し、溶液が無色～微黄色になるまでこの操作を繰り返す。放冷した後、過塩素酸0.5mLを加え、白煙が発生するまで加熱する。放冷した後、飽和シュウ酸アンモニウム溶液15mLを加え、再び白煙が発生するまで加熱する。放冷した後、水を加えて約10mLとし、これを試料溶液として装置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、標準色より濃くはない (2 $\mu$ g/g以下)。
- ③ 抗菌活性 本品1g (0.5～1.4g) 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。

**乾燥減量** 12.0%以下 (1g, 105 $^{\circ}$ C, 3時間)

**強熱残分** 25.0%以下 (0.5g)

**酵素力試験** フィチン酸分解力試験法第1法により試験を行う。

## (イ) 製造の方法の基準

*Aspergillus niger* のフィターゼ生産菌株を培養し、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、ろ液を乾燥して、又はろ液に溶媒を加えて生じた沈殿物を乾燥して製造すること。

## (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）

### (7) 成分規格

フィターゼ（その1）製造用原体の成分規格を準用する。

### (4) 製造の方法の基準

フィターゼ（その1）製造用原体の製造の方法の基準を準用する。

### (5) 保存の方法の基準

フィターゼ（その1）製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

### (1) 表示の基準

フィターゼ（その1）製造用原体の表示の基準を準用する。

## ウ 製剤（その2）

### (7) 成分規格

本品は、フィターゼ（その1）製造用原体に、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、表示フィチン酸分解力単位の85～170%を含む。

**酵素力試験** フィチン酸分解力試験法第1法により試験を行う。

### (4) 保存の方法の基準

フィターゼ（その1）製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

### (5) 表示の基準

フィターゼ（その1）製造用原体の表示の基準を準用する。

## フィターゼ（その2の（1））

### ア 製造用原体

#### (7) 成分規格

**酵素力単位** 本品は、酵素力試験を行うとき、1g中に5,000フィチン酸分解力単位以上を含む。

#### 物理的・化学的性質

① 本品は、淡褐色の液体で、僅かに特異な臭いを有する。

② 本品の水溶液（1→100）のpHは、3.5～6.5である。

③ 本品は、pH4.0～6.0において最大の酵素活性を有する。

**純度試験** フィターゼ（その1）製造用原体の純度試験を準用する。

**強熱残分** 5.0%以下（0.5g）

**酵素力試験** フィチン酸分解力試験法第2法により試験を行う。

**試料溶液の調製** ポリソルベート20 0.1g（0.05～0.14g）に0.25mol/L酢酸塩酸緩衝液を加えて溶かし、更に同緩衝液を加えて1Lとしたものを希釈液とする。試料について試験を行うために必要な量を有効数字3桁まで量り、その数値を記録し、1mL当たりの濃度が50フィチン酸分解力単位となるように希釈液を加え、激しく攪拌して溶かし、試料原液とする。この原液適量を全量ピペットを用いて量り、1mL当たりの濃度が0.5フィチン酸分解力単位となるように希釈液を加え、試料溶液とする。

(イ) 製造の方法の基準

*Aspergillus oryzae* に属する菌株を宿主としたフィタ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、フィターゼ（その2の（1））製造用原体に、必要に応じてソルビトールを加え、さらに、グリセリン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、表示フィチン酸分解力単位の85～170%を含む。

**酵素力試験** フィチン酸分解力試験法第2法により試験を行う。

**試料溶液の調製** フィターゼ（その2の（1））製造用原体の試料溶液の調製を準用する。

(イ) 保存の方法の基準

フィターゼ（その2の（1））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

フィターゼ（その2の（1））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、フィターゼ（その2の（1））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、表示フィチン酸分解力単位の85～170%を含む。

**酵素力試験** フィチン酸分解力試験法第2法により試験を行う。

**試料溶液の調製** ポリソルベート20 5g (4.5～5.4g) 及び牛血清アルブミン0.6g (0.55～0.64g) に0.25mol/L酢酸塩酸緩衝液を加えて溶かし、更に同緩衝液を加えて1Lとして抽出液とする。希釈液については、フィターゼ（その2の（1））製造用原体を準用する。試料について試験を行うために必要な量を有効数字3桁まで量り、その数値を記録し、1mL当たりの濃度が50フィチン酸分解力単位となるように、抽出液を加え、トライアングル回転子を用いて激しく攪拌しながら20分間超音波処理し、更に20分間激しく攪拌して溶かした後、毎分14,000回転で3分間遠心分離し、その上澄液を試料原液とする。この原液適量を全量ピペットを用いて量り、1mL当たりの濃度が0.25フィチン酸分解力単位となるように希釈液を加え、試料溶液とする。

(イ) 保存の方法の基準

フィターゼ（その2の（1））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

フィターゼ (その2の(1)) 製造用原体の表示の基準を準用する。

フィターゼ (その2の(2))

ア 製造用原体

(7) 成分規格

**酵素力単位** 本品は、酵素力試験を行うとき、1g中に5,000フィチン酸分解力単位以上を含む。

**物理的・化学的性質**

- ① 本品は、淡黄褐色の液体で、僅かに特異な臭いを有する。
- ② 本品の水溶液 (1→100) のpHは、3.5~6.5である。
- ③ 本品は、pH5.0~6.0において最大の酵素活性を有する。

**純度試験** フィターゼ (その1) 製造用原体の純度試験を準用する。

**強熱残分** 5.0%以下 (0.5g)

**酵素力試験** フィチン酸分解力試験法第1法により試験を行う。ただし、「操作法」の項中、「試料の最大酵素活性を示すpHに調整した0.005mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液」とあるのは、「試料の最大酵素活性を示すpHに調整した0.005mol/L酢酸・酢酸ナトリウム1L当たり、ポリソルベート20を0.1gの割合で含む緩衝液」と読み替えるものとする。

(イ) 製造の方法の基準

*Aspergillus niger* に属する菌株を宿主としたフィターゼ生産組換え体を培養し、培養を終了した後、菌体を殺菌した後ろ過し、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。

(イ) 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)

(7) 成分規格

本品は、フィターゼ (その2の(2)) 製造用原体に、ソルビトール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、表示フィチン酸分解力単位の85~170%を含む。

**酵素力試験** フィチン酸分解力試験法第1法により試験を行う。ただし、「操作法」の項中、「試料の最大酵素活性を示すpHに調整した0.005mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液」とあるのは、「試料の最大酵素活性を示すpHに調整した0.005mol/L酢酸・酢酸ナトリウム1L当たり、ポリソルベート20を0.1gの割合で含む緩衝液」と読み替えるものとする。

(イ) 保存の方法の基準

フィターゼ (その2の(2)) 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

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)及び次の文字を記載すること。

有効期間 製造の日から6か月

ウ 製剤(その2)

(7) 成分規格

本品は、フィターゼ(その2の(2))製造用原体に、コーンスターチ及び硫酸マグネシウムを加えて造粒した小片又は粒子である。

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、表示フィチン酸分解力単位の85~170%を含む。

酵素力試験 フィチン酸分解力試験法第1法により試験を行う。ただし、「操作法」の項中、「試料の最大酵素活性を示すpHに調整した0.005mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液」とあるのは、「試料の最大酵素活性を示すpHに調整した0.005mol/L酢酸・酢酸ナトリウム1L当たり、ポリソルベート20を0.1gの割合で含む緩衝液」と読み替えるものとする。

(イ) 保存の方法の基準

フィターゼ(その2の(2))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

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)及び次の文字を記載すること。

有効期間 製造の日から9か月

## フィターゼの試験法

### 6 飼料添加物一般の試験法

(9) 強熱残分試験法

強熱残分試験法は、試料を次の操作法により強熱するとき、揮発せずに残留する物質の量を測定する方法である。この方法は、通例、有機物中に不純物として含まれる無機物の含量を知るために用いるが、場合によっては、有機物中に構成成分として含まれる無機物又は熱時揮発する無機物中に含まれる不純物の量を測定するために用いる。

各条に、例えば、「0.1%以下(1g)」と規定するものは、本品約1gを0.1mgの桁まで量り、その数値を記録し、次の操作法により強熱するとき、その残分が本品1gにつき、1mg以下であることを示す。また、乾燥した後とあるときは、乾燥減量の項の条件で乾燥した後、測定する。

操作法

あらかじめ白金製、石英製又は磁製のるつぼを450~550℃で恒量になるまで強熱し、放冷した後、その質量を0.1mgの桁まで量り、その数値を記録する。

試料は、各条に規定する量の±10%の範囲内で採取し、前記の容器に入れ、その質量を0.1mgの桁まで量り、その数値を記録する。これに硫酸少量を加えて試料を潤し、徐々に加熱して、できる限り低温でほとんど灰化し、又は揮散した後、いったん放冷し、更に硫酸少

量で潤して徐々に加熱し、白煙が生じなくなった後、450～550℃で強熱して残留物を完全に灰化する。放冷した後、その質量を0.1mgの桁まで量り、その数値を記録する。放冷は、デシケーター（シリカゲル）で行う。

各条における強熱残分の規定が%以下又はmg以下で示されている場合において、上記の操作により得た値がこの値より大きいとき又は強熱残分の規定が一定の範囲をもって示されているときは、恒量になるまで強熱を行う。

## (12) 抗菌活性試験法

抗菌活性試験法は、飼料添加物中の酵素の抗菌活性の有無を生物学的方法により測定する試験法である。この試験に使用する水、試薬、試液、計量器、容器及びディスクは、必要に応じて無菌のものを用いる。

### 試験用器具

ディスクは、直径10mmのものを、メンブランフィルターは、孔径0.45μmのものを使用し、ペトリ皿は、内径90mm、高さ20mmの硬質ガラス製又は合成樹脂製であって、底面が平滑で、これに適合する蓋を有するものを使用する。

### 培地の種類並びにその組成及びpH

別に規定する場合を除き、次の表に掲げる組成及びpHを有するものを使用する。

#### 培地の組成及びpH

培地の組成及びpH					
培地 1,000mL の組成	培地番号		1	2	3
	ペプトン	(g)	10		
	肉エキス	(g)	5		
	食塩	(g)	2.5	5	5
	ブドウ糖	(g)		2.5	
	胰消化カゼイン	(g)		17	15
	パパイン消化大豆	(g)		3	5
	リン酸一水素カリウム	(g)		2.5	
	寒天	(g)	13-15		13-15
	蒸留水		適量	適量	適量
滅菌後のpH			6.5±0.1	7.3±0.1	7.3±0.1

### 試験菌液の調製

- ① *Micrococcus luteus* ATCC 9341 及び *Escherichia coli* ATCC 27166 にあつては、1号培地に約1週間間隔で移植を繰り返し、35～37℃で純粋培養しながら継代保存した種菌を、使用に当たって2号培地に移植した後、35～37℃で22～24時間静置培養し、よく振り混ぜて試験菌液とする。
- ② *Bacillus subtilis* ATCC 6633 にあつては、1号培地に約3か月間隔で移植を繰り返し、35～37℃で純粋培養しながら継代保存した種菌を、使用に当たって、ルー瓶中の同一培地に移し、35～37℃で1週間培養して芽胞を生じさせる。この菌苔をかき取って適量の水に均等に浮遊させ、毎分3,000回転で30分間遠心分離してその上澄液を捨てたものに、適量の水を加え、振とうした後、24時間間隔で、65℃で20分間2回加熱

し、毎分 1,000 回転で 5 分間遠心分離してその上層液を採取し、芽胞数を計算し適当な濃度の芽胞浮遊液を調製する。この芽胞浮遊液を水で希釈して、 $1 \times 10^6$  個/mL の芽胞浮遊液を調製し、試験菌液とする。

#### 平板培地の調製

3 種類の試験菌液 1.5 mL ずつを量り、それぞれ一度溶かし、試験菌の活力を阻害しない温度に冷却した 3 号培地 13.5 mL に加え、完全に混和した後、滅菌ペトリ皿に注入し、水平に静置して培地を凝固させる。

#### 操作法

試料 1 g に水 9 mL を加え、よく振り混ぜ、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、その上澄液をメンブランフィルターを用いてろ過滅菌して試料溶液とする。ディスク 6 枚に試料溶液 0.1 mL ずつを十分に吸着させ、3 種類の平板培地上に各 2 枚ずつ対角になるように置く。さらに、ディスク 6 枚に水 0.1 mL を十分に吸着させ、2 枚ずつを正方形の各頂点となるように置き、冷所で 2 時間放置する。次に、 $35 \sim 37^\circ\text{C}$  で 22~24 時間培養し、ディスク周囲の発育阻止円の有無を観察する。

#### 判定基準

直径 12 mm 以上の明瞭な発育阻止円を認めたとき、抗菌活性を示すものとする。

### (14) 酵素力試験法

#### ⑧ フィチン酸分解力試験法

フィチン酸分解力試験法は、フィチン酸にフィターゼが作用するとき、加水分解により生成されるリン酸イオンの量により、飼料添加物中のフィターゼの量を測定する方法であり、その単位は、フィチン酸分解力単位で示す。

1 フィチン酸分解力単位は、フィターゼがフィチン酸に  $37^\circ\text{C}$  で作用するとき、反応初期の 1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  のリン酸を遊離させる酵素量に相当する。

#### (i) 第 1 法

##### 基質溶液の調製

あらかじめフィチン酸ナトリウムをデシケーター（シリカゲル）中で 24 時間以上乾燥し、その 0.271 g ( $0.2705 \sim 0.2714$  g) を量り、試料の最大酵素活性を示す pH に調整した 0.2 mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液約 50 mL を加えて溶かし、0.2 mol/L 酢酸試液を加えて pH 5.5 に調整した後、100 mL の全量フラスコに入れ、同緩衝液を標線まで加えて 100 mL とする。

##### 反応停止発色液の調製

モリブデン酸アンモニウム 1.236 g ( $1.2355 \sim 1.2364$  g) に水を加えて溶かし、100 mL とし、モリブデン酸アンモニウム試液を調製する。モリブデン酸アンモニウム試液 1 容量に、2.5 mol/L 硫酸試液 1 容量及びアセトン 2 容量を加え、よく振り混ぜ、30 秒以内に氷中で冷却する。反応停止発色液は、用時調製する。

#### 操作法

試験を行うために必要な量の試料を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、1 mL 当たりの濃度が  $0.04 \sim 0.06$  フィチン酸分解力単位となるように、試料の最大酵素活性

を示すpHに調整した0.005mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を加えて溶かし、必要ならばろ過し、試料溶液とする。基質溶液0.5mLを全量ピペットを用いて量り、10mLの丸底遠沈管又は試験管に入れ、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に加温する。この基質溶液に、別に、全量ピペットを用いて $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に加温した試料溶液0.5mLを加え、30秒以内に振り混ぜ、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で正確に10分間放置する。その後、全量ピペットを用いて水中で冷却した反応停止発色液2mLを加え、よくかき混ぜ、さらに、全量ピペットを用いて1mol/Lクエン酸試液0.1mLを加え、よくかき混ぜる。この溶液につき、5分以内に水を対照液として波長380nmにおける吸光度 $OD_T$ を測定する。別に、試料溶液0.5mLを全量ピペットを用いて量り、全量ピペットを用いて水中で冷却した反応停止発色液2mLを加え、よくかき混ぜた後、全量ピペットを用いて基質溶液0.5mLを加え、よくかき混ぜ、全量ピペットを用いて1mol/Lクエン酸試液0.1mLを加え、更によくかき混ぜる。以下同様の方法で操作して吸光度 $OD_B$ を測定する。

$$1 \text{ g 中のフィチン酸分解力単位} = (OD_T - OD_{TB}) \times F \times 2 \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W} \times Z$$

F: 検量線から求めた吸光度差1に対応するリン酸イオン濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ )

W: 試料採取量 (g)

Z: 希釈倍率

#### 検量線の作成

リン酸二水素カリウムをデシケーター(シリカゲル)中で24時間以上乾燥し、その0.680g(0.6795~0.6804g)を量り、水を加えて溶かし、1,000mLの全量フラスコに入れ、更に水を標線まで加えて1,000mLとする。この溶液1mL、2mL、3mL及び4mLを全量ピペットを用いて量り、50mLの全量フラスコに入れ、それぞれに水を標線まで加えて50mLとする。それぞれの溶液1mLを全量ピペットを用いて量り、全量ピペットを用いて水中で冷却した反応停止発色液2mLを加え、よくかき混ぜ、さらに、全量ピペットを用いて1mol/Lクエン酸試液0.1mLを加え、よくかき混ぜる。この溶液につき、水を対照液として波長380nmにおける吸光度 $OD_{S1}$ 、 $OD_{S2}$ 、 $OD_{S3}$ 及び $OD_{S4}$ を測定する。別に、水1mLを全量ピペットを用いて量り、全量ピペットを用いて水中で冷却した反応停止発色液2mLを加え、よくかき混ぜ、さらに、全量ピペットを用いて1mol/Lクエン酸試液0.1mLを加え、よくかき混ぜる。この溶液につき、水を対照液として波長380nmにおける吸光度 $OD_{SB}$ を測定する。リン酸イオン濃度を縦軸に、吸光度差( $OD_{S1} - OD_{SB}$ )、( $OD_{S2} - OD_{SB}$ )、( $OD_{S3} - OD_{SB}$ )及び( $OD_{S4} - OD_{SB}$ )を横軸にとり、検量線を作成する。

#### (ii) 第2法

##### 基質溶液の調製

フィチン酸ナトリウム0.8g(0.75~0.84g)を量り、pH5.5に調整した0.25mol/L酢酸塩酸緩衝液を加えて溶かし、塩酸でpHを5.5に調整した後、100mLの全量フラスコに入れ、同緩衝液を標線まで加えて100mLとする。

##### 反応停止発色液の調製

モリブデン酸アンモニウム100g(99.5~100.4g)を水800mLに溶かし、25%アンモニア水10mLを加えた後、水を加えて1,000mLとし、モリブデン酸アンモニウム試液を調製

する。バナジン酸アンモニウム2.35g (2.345~2.354g) に50°Cに温めた水400mLを加えて溶かし、硝酸(1→3) 20mLを加え、更に水を加えて1,000mLとし、バナジン酸アンモニウム試液とする。モリブデン酸アンモニウム試液1容量に、バナジン酸アンモニウム試液1容量及び硝酸(1→3) 2容量を加え、混合する。反応停止発色液は、用時調製する。

#### 操作法

試料溶液は、各条で規定する方法で調製する。基質溶液0.8mLをマイクロピペットを用いて量り、2mLのプラスチック製遠沈管に入れ、37±0.5°Cに加温し、5分間放置する。この基質溶液に、別に、37±0.5°Cに加温し5分間放置した試料溶液0.04mL及び各条に定める希釈液0.36mLをマイクロピペットを用いて加え、37±0.5°Cに加温し、30分間放置する。その後、反応停止発色液0.8mLをマイクロピペットを用いて加え、よくかき混ぜ、室温で10分間放置する。さらに、毎分14,000回転で3分間遠心分離を行い、得られた上澄液につき、水を対照液として、波長415nmにおける吸光度 $OD_T$ を測定する。別に、希釈液0.4mLを全量ピペット又はマイクロピペットを用いて量り、これに反応停止発色液0.8mLを加え、かき混ぜた後、基質溶液0.8mLを加え、10分間室温で放置する。以下同様の方法で操作して吸光度 $OD_B$ を測定する。

$$1\text{g 中のフィチン酸分解力単位} = (OD_T - OD_{TB}) \times F \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{W} \times Z$$

F: 検量線から求めた吸光度差1に対応するリン酸イオン濃度 ( $\mu\text{mol/mL}$ )

W: 試料採取量 (g)

Z: 希釈倍率

#### 検量線の作成

105°Cで2時間乾燥させた後、デシケーターで保存したリン酸二水素カリウム0.682g (0.6815~0.6824g) を量り、希釈液を加えて溶かし、100mLの全量フラスコに入れ、更に希釈液を標線まで加えて100mLとする。この溶液3mL、6mL、12mL及び25mLを全量ピペットを用いて量り、それぞれ50mLの全量フラスコに入れ、それぞれに希釈液を標線まで加えて50mLとする。試料溶液と同様に操作法に従い、 $OD_{S1}$ 、 $OD_{S2}$ 、 $OD_{S3}$ 及び $OD_{S4}$ を測定する。リン酸イオン濃度を縦軸に、測定した $OD_B$ との吸光度差 ( $OD_{S1}-OD_B$ )、( $OD_{S2}-OD_B$ )、( $OD_{S3}-OD_B$ ) 及び ( $OD_{S4}-OD_B$ ) を横軸にとり、検量線を作成する。

#### (16) 重金属試験法

重金属試験法は、試料中に混在する重金属の限度試験である。この重金属とは、酸性で硫化ナトリウム試液により呈色する金属性混在物をいい、その量は、鉛 (Pb) の量として表す。

各条には、重金属 (Pbとして) の限度を $\mu\text{g/g}$ で ( ) 内に付記する。

#### 操作法

試料溶液及び比較液の調製法は、別に規定する場合を除き、次の方法によるものとする。

##### ① 第1法

各条に規定する量の試料をネスラー管に入れ、適量の水を加えて溶かし、40mLとす

る。これに希酢酸 2 mL 及び水を加えて 50 mL とし、試料溶液とする。

比較液は、各条に規定する量の鉛標準液をネスラー管に入れ、希酢酸 2 mL 及び水を加えて 50 mL とする。

## ② 第 2 法

各条に規定する量の試料を石英製又は磁製のるつぼに量り、ゆるく蓋をし、弱く加熱して炭化する。放冷した後、硝酸 2 mL 及び硫酸 5 滴を加え、白煙の生じるまで注意して加熱した後、500~600℃で強熱して灰化する。放冷した後、塩酸 2 mL を加え、水浴上で蒸発乾固し、残留物を塩酸 3 滴で潤し、熱湯 10 mL を加え、2 分間加温する。次に、フェノールフタレイン試液 1 滴を加え、アンモニア試液を溶液が微赤色となるまで滴加し、希酢酸 2 mL を加え、必要ならば、ろ過し、水 10 mL で洗い、ろ液及び洗液をネスラー管に入れ、水を加えて 50 mL とし、試料溶液とする。

比較液は、硝酸 2 mL、硫酸 5 滴及び塩酸 2 mL を水浴上で蒸発し、更に砂浴上で蒸発乾固し、残留物を塩酸 3 滴で潤し、以下試料溶液の調製法と同様に操作し、各条に規定する量の鉛標準液及び水を加えて 50 mL とする。

## ③ 第 3 法

各条に規定する量の試料を石英製又は磁製のるつぼに量り、初めは注意して弱く加熱し、その後、強熱して灰化する。放冷した後、王水 1 mL を加え、水浴上で蒸発乾固し、残留物を塩酸 3 滴で潤し、熱湯 10 mL を加え、2 分間加温する。次に、フェノールフタレイン試液 1 滴を加え、アンモニア試液を溶液が微赤色となるまで滴加し、希酢酸 2 mL を加え、必要ならば、ろ過し、水 10 mL で洗い、ろ液及び洗液をネスラー管に入れ、水を加えて 50 mL とし、試料溶液とする。

比較液は、王水 1 mL を水浴上で蒸発乾固し、以下試料溶液の調製法と同様に操作し、各条に規定する量の鉛標準液及び水を加えて 50 mL とする。

試料溶液の試験は、別に規定する場合を除き、次の方法によるものとする。

試料溶液及び比較液に硫化ナトリウム試液 1 滴ずつを加え、混和し、5 分間放置した後、両管を白色の背景を用い、上方又は側方から観察して液の色を比較する。

このとき試料溶液の呈する色は、比較液の呈する色より濃くはならない。

## (31) ヒ素試験法

ヒ素試験法は、試料中に混在するヒ素の限度試験である。その限度は、三酸化ヒ素 ( $As_2O_3$ ) の量として表す。

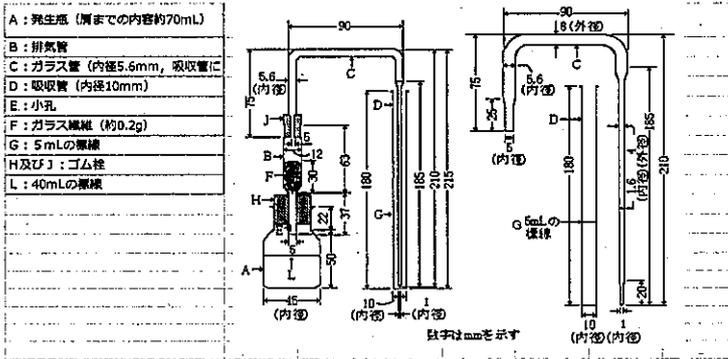
各条には、ヒ素 ( $As_2O_3$ ) の限度を  $\mu g/g$  で ( ) 内に付記する。

### 装置 A

図 1 に示すものを用いる。

排気管 B に、約 30 mm の高さまでガラス繊維 F を詰め、酢酸鉛試液及び水の等容量混液で均等に潤した後、下端から弱く吸引して過量の溶液を除く。これをゴム栓 H の中心に垂直に差し込み、B の下部の小孔 E は、下に僅かに突き出るようにして発生瓶 A に付ける。B の上端には、ガラス管 C を垂直に固定したゴム栓 J を付ける。C の排気管側の下端は、ゴム栓 J と同一平面とする。

図 1

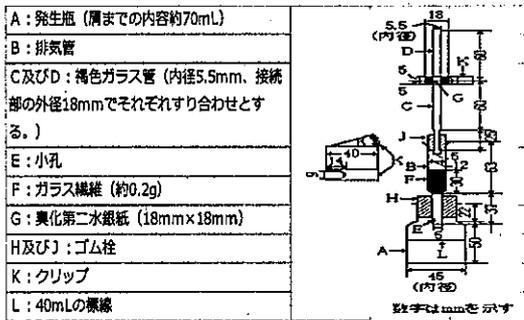


装置 B

図 2 に示すものを用いる。

排気管 B に、約 30mm の高さまでガラス繊維 F を詰め、酢酸鉛試液及び水の等容量混液で均等に潤した後、下端から弱く吸引して過量の溶液を除く。これをゴム栓 H の中心に垂直に差し込み、B の下部の小孔 E は、下に僅かに突き出るようにして発生瓶 A に付ける。B の上端には、ガラス管 C を垂直に固定したゴム栓 J を付ける。C の下端は、J の下端と同一平面とする。次に、使用直前に C 及び D のすり合わせ面の間に臭化第二水銀紙 G をはさみ、クリップ K で C 及び D を固定する。

図 2



操作法

試料溶液の調製は、別に規定する場合を除き、次の方法によるものとする。

① 第 1 法

各条に規定する量の試料を量り、水 5 mL を加え、必要ならば、加温して溶かし、試料溶液とする。

② 第 2 法

各条に規定する量の試料を量り、水 5 mL 及び硫酸 1 mL を加える。ただし、無機酸の場合には、硫酸を加えない。これに亜硫酸水 10 mL を加え、小ビーカーに入れ、水浴上で加熱して亜硫酸がなくなり約 2 mL となるまで蒸発させ、水を加えて 5 mL とし、試料溶液とする。

③ 第 3 法

各条に規定する量の試料を量り、白金製、石英製又は磁製のるつぼにとる。これに硝酸マグネシウムのエタノール溶液 (1 → 50) 10 mL を加え、エタノールに点火して燃焼させた後、徐々に加熱して灰化する。この方法で、なお炭化物が残るときは、少量

の硝酸で潤し、再び強熱して灰化する。放冷した後、残留物に塩酸 3 mL を加え、水浴上で加温して溶かし、試料溶液とする。

試料溶液の試験は、別に規定する場合を除き、次の方法によるものとする。

① 装置 A を用いる方法

試料溶液を発生瓶 A に入れ、必要ならば、少量の水で洗い込む。これに、ブロムフェノールブルー試液 1 滴を加え、アンモニア試液、強アンモニア水又は希塩酸を用いて中和した後、塩酸 (1 → 2) 5 mL 及びヨウ化カリウム試液 5 mL を加え、2 ~ 3 分間放置し、さらに、酸性塩化第一スズ試液 5 mL を加え、室温で 10 分間放置する。次に、水を加えて 40 mL とし、無ヒ素亜鉛 2 g (1.5 ~ 2.4 g) を加え、30 秒以内に B 及び C を連結したゴム栓 H を発生瓶 A に付ける。C の細管部の端は、あらかじめヒ化水素吸収液 5 mL を入れた吸収管 D の底に達するように入れておく。その後、発生瓶 A は、25°C の水中に肩まで浸し、1 時間放置する。吸収管を外し、必要ならば、ピリジンを加えて 5 mL とし、吸収液の色を観察する。この場合において、吸収液の色は、標準色より濃くってはならない。なお、標準色の調製は、同時に行う。

② 装置 B を用いる方法

発生瓶 A に試料溶液を入れ、必要ならば、少量の水で洗い込む。これにメチルオレンジ試液 1 滴を加え、アンモニア試液、強アンモニア水又は希塩酸を用いて中和した後、塩酸 (1 → 2) 5 mL 及びヨウ化カリウム試液 5 mL を加え、2 ~ 3 分間放置する。さらに、酸性塩化第一スズ試液 5 mL を加え、室温で 10 分間放置する。次に、水を加えて 40 mL とし、無ヒ素亜鉛 2 g (1.5 ~ 2.4 g) を加え、30 秒以内に B、C、D 及び G を連結してゴム栓 H を発生瓶 A に付け、25°C の水中に発生瓶 A の肩まで浸し、1 時間放置した後、30 秒以内に臭化第二水銀紙の色を観察する。この色は、標準色より濃くってはならない。なお、標準色の調製は、同時に行う。

**標準色の調製**

標準色の調製は、別に規定する場合を除き、次の方法によるものとする。

発生瓶 A にヒ素標準液 2 mL を全量ピペットを用いて加え、さらに、塩酸 (1 → 2) 5 mL 及びヨウ化カリウム試液 5 mL を加え、2 ~ 3 分間放置した後、酸性塩化第一スズ試液 5 mL を加え、室温で 10 分間放置する。以下試料溶液と同様に操作して得られた吸収液又は臭化第二水銀紙の呈色を標準色とする。この色は、三酸化ヒ素 ( $As_2O_3$ ) 0.002 mg に相当する。

**標準液の調製**

標準液の調製は、別に規定する場合を除き、次の方法によるものとする。

ヒ素標準原液：三酸化ヒ素を微細の粉末とし、105°C で 4 時間乾燥し、その 100 mg (99.5 ~ 100.4 mg) を量り、水酸化ナトリウム溶液 (1 → 5) 5 mL を加えて溶かす。この溶液に希硫酸を加えて中性とし、1,000 mL の全量フラスコに入れ、更に希硫酸を追加し、新たに煮沸し冷却した水を標線まで加えて 1,000 mL とする。

ヒ素標準液：ヒ素標準原液 10 mL を全量ピペットを用いて量り、1,000 mL の全量フラスコに入れ、希硫酸 10 mL を加え、新たに煮沸し冷却した水を標線まで加えて 1,000 mL とする。この溶液 1 mL は、三酸化ヒ素 ( $As_2O_3$ ) 0.001 mg を含む。この溶液は、用時調製し、

共栓瓶に保存する。

注意：試験に用いる器具、試薬及び試液は、ヒ素を含まない又はほとんど含まないものを用い、必要ならば、空試験を行う。

## フィチン酸ナトリウムの規定

7 飼料添加物一般の試験法並びに各飼料添加物の成分規格及び製造方法等の基準に用いる標準品、試薬・試液、容量分析用標準液、標準液、色の比較液、計量器・用器、ろ紙、滅菌法及びベルトラン糖類定量表の規定

(2) 試薬・試液

フィチン酸ナトリウム  $C_6H_6O_{24}P_6Na_{12} \cdot xH_2O$  [コメ由来、含量90%以上]

## セルラーゼ（その2）の基準及び規格

8 各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

(137) セルラーゼ

セルラーゼ（その2）

ア 製造用原体

(7) 成分規格

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、1g中に250繊維糖化力単位以上を含む。

物理的・化学的性質

- ① 本品は、淡黄色～褐色の粉末で、臭いはない、又は僅かに特異な臭いを有する。
- ② 本品の水溶液又は水懸濁液（1→100）のpHは、4.0～7.5である。
- ③ 本品は、pH4.0～5.5において最大の酵素活性を有する。

純度試験

- ① 重金属 本品1.0g (0.95～1.04g) を量り、重金属試験法第2法により試料溶液を調製し、鉛標準液5.0mLを用いて比較液を調製して重金属の試験を行うとき、試料溶液の呈する色は、比較液の呈する色より濃くしてはならない（50μg/g以下）。
- ② ヒ素 本品1.0g (0.95～1.04g) 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、標準色より濃くしてはならない（2μg/g以下）。
- ③ 抗菌活性 本品1g (0.5～1.4g) 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。

乾燥減量 10.0%以下（1g, 105℃, 3時間）

強熱残分 25.0%以下（1g）

酵素力試験 繊維糖化力試験法により試験を行う。

(i) 製造の方法の基準

*Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Humicola insolens* 又は *Trichoderma viride* のセルラーゼ生産菌株を培養し、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、ろ液を乾燥して、又は溶媒を加えて生じた沈殿物を乾燥して製造すること。

(7) 保存の方法の基準

遮光した密閉容器に保存すること。

(E) 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)

(7) 成分規格

セルラーゼ(その2) 製造用原体の成分規格を準用する。

(4) 製造の方法の基準

セルラーゼ(その2) 製造用原体の製造の方法の基準を準用する。

(7) 保存の方法の基準

セルラーゼ(その2) 製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(E) 表示の基準

セルラーゼ(その2) 製造用原体の表示の基準を準用する。

ウ 製 剤 (その2)

(7) 成分規格

本品は、セルラーゼ(その2) 製造用原体に、必要に応じて、ポリビニルアルコールの水溶液を加えて造粒した又は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、表示繊維糖化力単位の85~170%を含む。

**酵素力試験** 繊維糖化力試験法により試験を行う。

(4) 保存の方法の基準

セルラーゼ(その2) 製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(7) 表示の基準

セルラーゼ(その2) 製造用原体の表示の基準を準用する。

エ 製 剤 (その3 液状)

(7) 成分規格

本品は、セルラーゼ(その2) 製造用原体に、必要に応じてソルビトールを加え、さらに、グリセリン、食塩、ブドウ糖、乳糖、麦芽糖又は白糖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、表示繊維糖化力単位の85~170%を含む。

**酵素力試験** 繊維糖化力試験法により試験を行う。

(4) 保存の方法の基準

セルラーゼ(その2) 製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(7) 表示の基準

セルラーゼ（その2）製造用原体の表示の基準を準用する。