

ムラミダーゼの飼料添加物としての指定並びに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。

平成 31 年 2 月 26 日付け 30 消安第 4965 号をもって諮問されたムラミダーゼについて、飼料安全部会において効果安全性や基準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. 指定する飼料添加物

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

平成 31 年 2 月 26 日 諮問

平成 31 年 3 月 1 日 飼料安全部会（飼料添加物効果安全性）

令和元年 7 月 30 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 P2～12 のとおり）。

4. 飼料添加物規格小委員会の審議結果

基準及び規格を作成した（資料 P13～17 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

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

ムラミダーゼに関する効果安全性について

1 名称等

一般名：ムラミダーゼ

化学名：Muramidase

CAS 番号：9001-63-2

用途：飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進

対象家畜及び推奨添加量：

ブロイラー用飼料 25,000～45,000 ペプチドグリカン分解力 (LSU) 単位/kg 飼料

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

ムラミダーゼは別名リゾチームとも呼ばれ、ムコ多糖類やムコペプチドの N-アセチルグルコサミンと N-アセチルムラミン酸の β 1,4 結合部を切断する加水分解酵素である。鶏卵中から発見された生体内常在酵素で、生体内防御に関わる溶菌酵素とも言われている。国内においては既存添加物（酵素）として、成分規格が食品添加物公定書に記載されている。

ムラミダーゼをブロイラー用飼料に添加することで、消化管内に滞留する難消化性の細菌由来ムコ多糖類を分解し、他の栄養素の消化利用を促進して家畜を増体させることが期待される。

今回指定が要望されたムラミダーゼは、遺伝子組換え生産菌 *Trichoderma reesei* QM6a 株を宿主株として、*Acremonium alcalophilum* 株由来のムラミダーゼ遺伝子を合成して得た DNA を挿入させた組換え生産菌 *Trichoderma reesei* JPTR003 株から生産された組換え体利用ムラミダーゼである。

本剤は米国において 2011 年に評価を受け、飼料中のたん白質の消化率改善目的で鶏用飼料添加物として使用されている。また、EU においても 2018 年に安全性評価が終了している。

ムラミダーゼの動物用医薬品としての承認はされていない。

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）

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。

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 (one-way ANOVA, Tukey HSD test, p<0.05)

3-1-2 鶏（ブロイラー）

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）。

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 (ANOVA F-test, Duncan, $p \leq 0.05$)

3-1-3 鶏 (ブロイラー)

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)。

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 (ANOVA F-test, Duncan, $p \leq 0.05$)、(x,y) 間に有意差に近い傾向あり (ANOVA F-test, Duncan, $0.05 < p \leq 0.10$)

3-1-4 鶏 (ブロイラー)

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)。

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 (Tukey test, $p < 0.05$)

3-1-5 鶏 (ブロイラー)

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)。

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 (One way ANOVA, LSD test, $p < 0.10$)

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)

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)。

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 6]。

4-1-2 特殊毒性試験

4-1-2-1 変異原性試験

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*1	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98、TA100、 TA1535、TA1537 <i>E. coli</i> WP2uvrA	156、313、625、1250、2,500、 5,000 µg TOS/mL (±S9)	陰性	参照 7
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 8

*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 6 参照)。[参照 7、8]

4-2 対象家畜等を用いた飼養試験

4-2-1 鶏 (ブロイラー)

ブロイラー（Ross 308種、雌雄、1日齢、平均体重43g）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）。

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7参照）。

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8参照）。[参照9]

表7 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
斃死率 (%)		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

各値は平均値

表 8 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 (log ₁₀ 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

4-3 耐性菌出現に関する試験

EFSA が推奨する 5 種類の参考菌株、家禽の糞中に一般的に見られる 2 種類の菌株及び鶏から分離された 6 種類 30 株の野生菌株について、0.39 mg/L~400 mg/L のムラミダーゼ (酵素活性：1,265 LSU(F)/mg)、陽性対照として鶏卵由来の卵白リゾチームを添加し、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した (菌株ごとに 3 回実施)。

参考菌株について、ムラミダーゼでは *Bacillus subtilis* ATCC 6633 に対してのみ 2 試験で 400 mg/L の低い抗菌活性を示し、その他のいずれの菌株にも抗菌活性を示さなかった。卵白リゾチームでは *Bacillus subtilis* ATCC 6633 に対してのみ 25 mg/L の抗菌活性を示し、その他のいずれの菌株にも抗菌活性を示さなかった (表 9 参照)。

野生菌株について、ムラミダーゼでは *Clostridium perfringens* の 2 株に対してのみ 1 試験で 400 mg/L の低い抗菌活性を示し、その他のいずれの菌株にも抗菌活性を示さなかった。卵白リゾチームはいずれの菌株にも抗菌活性を示さなかった (表 10 参照)。

ムラミダーゼの MIC 値はいずれの菌株に対しても 200 mg/L (酵素活性として約 250,000 LSU(F)/kg) より大きく、ムラミダーゼの最大推奨添加量である 45,000 LSU(F)/kg 飼料の 5.6 倍であった[参照 10]。

表 9 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 10 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：ブロイラー

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. Report, Lysozyme, Batch PPL41125: Toxicity Study by Oral Gavage Administration to Han Wistar Rats for 13 Weeks, [REDACTED] (2017)
7. Report, Lysozyme, batch PPL41125: Test for Mutagenic Activity with Strains of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, [REDACTED] (2016)
8. Final Report, Lysozyme, batch PPL41125: In Vitro Human Lymphocyte Chromosome Aberration Assay, [REDACTED] (2016)
9. Evaluation of the tolerance of broiler chickens to dietary intake of a muramidase (DSM) (2017)
10. Antibacterial activity testing of lysozyme product PPL41125, [REDACTED] (2016)

ムラミダーゼの基準及び規格（案）

1. 飼料一般の成分規格並びに製造、使用及び保存の方法及び表示の基準

飼料一般の製造の方法の基準

ムラミダーゼは、プロイラーを対象とする飼料（飼料を製造するための原料又は材料を含む。）以外の飼料に用いてはならない。

2. 飼料一般の成分規格並びに製造、使用及び保存の方法及び表示の基準

飼料一般の表示の基準（下線部が改正箇所）

飼料添加物名	名称
L-アスコルビン酸 (略)	ビタミンC (略)
ムラミダーゼ (略)	ペプチドグリカン分解酵素 (略)
リン酸二水素ナトリウム（結晶）	リン酸二水素ナトリウム

3. 各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

ア 製造用原体

(ア) 成分規格

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、1g中に30,000ペプチドグリカン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～濃褐色の液体である。
- ② 本品の水溶液又は水懸濁液（1→100）のpHは、3.0～5.0である。
- ③ 本品は、pH 4.0～7.5において最大の酵素活性を有する。

純度試験

- ① 鉛 本品0.5g（0.45～0.54g）を量り、鉛試験法（原子吸光光度法第1法）により鉛の試験を行うとき、その量は、20µg/g以下でなければならない。
- 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、標準色より濃くてはならない（2µg/g以下）。

- ③ 抗菌活性 本品 1 g (0.5~1.4 g) を量り、*Micrococcus luteus* ATCC 9341 及び *Escherichia coli* ATCC 27166 について抗菌活性試験法により試験を行うとき、抗菌活性を示してはならない。

強熱残分 5.0%以下 (1 g)

酵素力試験 ペプチドグリカン分解力試験法により試験を行う。

(イ) 製造の方法の基準

Trichoderma reesei に属する菌株を宿主としたムラミダ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。

(ロ) 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)

(ア) 成分規格

本品は、ムラミダーゼ製造用原体に、必要に応じて硫酸ナトリウムを加え、さらに、賦形物質を混和した小片、粉末又は粒子である。

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、表示ペプチドグリカン分解力単位の 85~170% を含む。

酵素力試験 ペプチドグリカン分解力試験法により試験を行う。

(イ) 保存の方法の基準

ムラミダーゼ製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(ロ) 表示の基準

ムラミダーゼ製造用原体の表示の基準を準用する。

ウ 製剤 (その 2 液状)

(ア) 成分規格

本品は、ムラミダーゼ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、表示ペプチドグリカン分解力単位の 85~170% を含む。

酵素力試験 ペプチドグリカン分解力試験法により試験を行う。

(イ) 保存の方法の基準

ムラミダーゼ製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(ロ) 表示の基準

ムラミダーゼ製造用原体の表示の基準を準用する。

4. 飼料添加物一般の試験法

(14) 酵素力試験

ペプチドグリカン分解力試験法

ペプチドグリカン分解力試験法は、蛍光標識ペプチドグリカンにムラミダーゼが作用するときに、加水分解に伴って増加する蛍光強度により、飼料添加物中のムラミダーゼの量を測定する方法であり、その単位は、ペプチドグリカン分解力単位で示す。

1 ペプチドグリカン分解力単位は、ムラミダーゼがフルオレセイン標識ペプチドグリカンに pH 6.0、30°C で作用するとき、1 分間に 0.06 nmol のフルオレセインイソチオシアナート（アイソマーI）に相当する蛍光強度を増加させる酵素量に相当する。

希釈液

リン酸一水素ナトリウム・二水和物 22.5 g (22.45~22.54 g) 及びクエン酸 7.74 g (7.735~7.744 g) を量り、1 L の全量フラスコに入れ、800 mL の水を加え、溶解するまで攪拌した後、トリトン X-100 試液 1 mL を加え、0.05 mol/L 水酸化ナトリウム試液又は 0.1 mol/L 塩酸試液を用いて pH を 5.9~6.1 に調整する。更に水を標線まで加える。

基質溶液の調製

0.5 mg/mL フルオレセイン標識ペプチドグリカン試液 100 µL に 1,900 µL の希釈液を加え混合する。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 0.01~0.03 ペプチドグリカン分解力単位となるように希釈液を加え、45~90 分間かき混ぜて得られた液を試料溶液とする。

標準液 A~G 及び試料溶液を 50 µL ずつマイクロプレート（黒色）に分注し、使用しない隣接ウェルには希釈液を 100 µL 分注する。標準液 A~G 及び試料溶液の入ったウェルに基質溶液を速やかに 50 µL ずつ分注し、直ちに励起波長 485 nm、蛍光波長 528 nm 及び温度 30°C に設定した蛍光マイクロプレートリーダーを用いて、測定間隔 1 分で 30 分間測定する。

$$1 \text{ g 中のペプチドグリカン分解力単位} = \frac{F \times V \times Z}{W}$$

F：検量線から求めたペプチドグリカン分解力単位

V：調製した試料溶液量

Z：試料溶液の希釈倍率

W：試料採取量 (g)

検量線の作成

70,000 ペプチドグリカン分解力単位に相当するムラミダーゼを量り、適量の希釈液を加え、45～90 分間よくかき混ぜて溶かし、100 mL の全量フラスコに入れ、更に希釈液を標線まで加えて 100 mL とする。この液 50 μ L を 100 mL の全量フラスコにとり、希釈液を標線まで加えて 100 mL とし、標準原液とする。この液を下表に従い、希釈液にて希釈し、標準液 A～G とする。

標準液	希釈倍率	標準原液量 (μ L)	希釈液量 (μ L)	ペプチドグリカン分 解力単位/mL
A	40 倍	30	1,170	0.0088
B	30 倍	40	1,160	0.012
C	24 倍	50	1,150	0.015
D	20 倍	60	1,140	0.018
E	15 倍	80	1,120	0.023
F	12 倍	100	1,100	0.029
G	10 倍	120	1,080	0.035

標準液 A～G の 0～30 分までの測定値から 1 分間あたりのそれぞれの蛍光強度増加量 (傾き) を算出する。算出した傾きを縦軸に、各標準液の 1 mL 中のペプチドグリカン分解力単位を横軸にとり、検量線を作成する。

5. 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、容量分析法標準液、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

試薬・試液

トリトン X-100 $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ [オクチルフェノールエトキシレート]

トリトン X-100 試液 トリトン X-100 25 g (24.5～25.4 g) に水を加えて溶かし 250 mL とする。

フルオレセインイソチオシアナート (アイソマー I) $C_{21}H_{11}NO_5S$ 黄橙色の粉末である。

フルオレセイン標識ペプチドグリカン試液、0.5 mg/mL *Micrococcus lysodeikticus* 由来のペプチドグリカンを以下の操作により蛍光物質であるフルオレセインイソチオシアナート (アイソマー I) で標識したもの。

ペプチドグリカン 100 mg (99.5～100.4 mg) を量り、炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 9.3) 35 mL を加え、よく振り混ぜて懸濁液とする。この懸濁液をフルオレセインイソチオシアナート (アイソマー I) 800 mg (799.5～800.4 mg) に加え、更に懸濁液の入っていた容器を炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 9.3) 10 mL で洗浄した後、フルオレセインイソチオシアナート (アイソマー I) に加える。毎分 700 回転、37°C で 4 時間振り混ぜた後、1,500×g で 20 分間遠心分離し、上澄液を捨てる。次に、この残留物に炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 9.3) 35 mL を

加えてよく振り混ぜた後、 $1,500 \times g$ で20分間遠心分離し、上澄液を捨てる。この操作を更に1回繰り返す。次に、この残留物に水 35 mLを加えてよく振り混ぜた後、 $1,500 \times g$ で20分間遠心分離し、上澄液を捨てる。この操作を更に1回繰り返す。次に、この残留物にアセトン 35 mLを加えてよく振り混ぜた後、 $1,500 \times g$ で20分間遠心分離し、上澄液を捨てる。この操作を更に1回繰り返す。さらに、この残留物にエタノール 35 mLを加えてよく振り混ぜた後、 $1,500 \times g$ で20分間遠心分離し、上澄液を捨てる。この操作を更に1回繰り返した後、凍結乾燥し、 -20°C で保存する。

ペプチドグリカン 細菌などの細胞壁に存在する多糖類である。ただし、

Micrococcus lysodeikticus 由来のものを用いる。

炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 9.3) 炭酸水素ナトリウム 21.0 g (20.95~21.04 g) に水を加えて溶かし、1 mol/L 塩酸試液で pH 9.3 に調整した後、更に水を加えて 500 mL とする。

リン酸一水素ナトリウム・二水和物 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

