

フィターゼの基準及び規格の設定

飼料添加物については、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和 28 年法律第 35 号）第 2 条第 3 項並びに第 3 条第 1 項及び第 2 項の規定に基づき、農林水産大臣が農業資材審議会の意見を聴いて指定し、その基準又は規格を設定している。

令和 4 年 3 月 8 日付け 3 消安第 6608 号をもって諮問されたフィターゼの基準及び規格の改正について、飼料安全部会の各小委員会において効果安全性及び規格について検討した。その概要は次のとおりである。

1. 飼料の製造の方法の基準を改正する飼料添加物

飼料添加物名：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

令和 4 年 3 月 8 日 諮問

令和 4 年 3 月 15 日 飼料添加物効果安全性小委員会

令和 4 年 6 月 3 日 飼料添加物規格小委員会

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. 2～21 のとおり）。

基準及び規格を作成した（資料 P. 22～26 のとおり）。

飼料添加物の効果安全性について（案）

Trichoderma reesei RF8694株を利用して
生産されたフィターゼ

令和４年７月２９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	効果を裏付ける基礎的試験 (<i>in vitro</i> 試験)	5
3-1-1	酵素の最大活性を示す pH	5
3-1-2	ペレット加工温度が酵素活性に及ぼす影響	5
3-2	効果を裏付ける基礎的試験 (<i>in vivo</i> 試験)	6
3-2-1	鶏	6
3-2-2	豚	7
3-3	効果を裏付ける野外応用による試験	8
3-3-1	鶏	8
3-3-2	鶏	9
3-3-3	豚	11
3-3-4	水産動物	12
3-3-5	水産動物	13
4	残留性に関する事項	13
5	安全性に関する事項	14
5-1	毒性試験	14
5-1-1	一般毒性試験	14
5-1-1-1	反復投与毒性試験 (短期)	14
5-1-2	特殊毒性試験	16
5-1-2-1	変異原性試験	16
5-2	対象家畜等を用いた飼養試験	16
5-2-1	鶏	16
5-2-2	鶏	17
5-2-3	豚	18
5-2-4	水産動物	19
6	審議結果	20
7	参照 (参考文献及び参考資料)	21

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

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：

鶏用飼料	150～500 FTU/kg 飼料
うずら用飼料	150～500 FTU/kg 飼料
豚用飼料	150～500 FTU/kg 飼料
水産動物用飼料（さけ科、すずき科の魚類）	おおよそ 500 FTU/kg 飼料

※ 飼料は非フィチンリンを減量し、フィチンリンを十分量含有する飼料とする。

※ 1 フィチン酸分解力単位 (FTU) は、フィターゼがフィチン酸に 37℃で作用する際、反応初期の 1 分間に 1 μmol のリン酸を遊離させる酵素量に相当する。

2 起源又は発見の経緯、外国での飼料添加物としての許可状況及び使用状況等

フィターゼは穀物等に含まれるフィチン酸（イノシトール-6-リン酸）を分解し、無機リンを遊離させる酵素群の総称である。鶏や豚などの単胃動物では消化管でのフィターゼの活性が弱く、フィチン酸に含まれるリンの利用率が極めて低い。このことから、フィターゼを飼料に添加することでリンの利用率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、6 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、*Trichoderma reesei* RF7727 株を宿主としたフィターゼを産生する組換え体 *Trichoderma reesei* を培養して得られる組換え体利用フィターゼであり、ペレット加工時等の製造工程中の加熱に対する耐熱性の高さが期待される。

本菌株が生産する本剤は、飼料添加物として米国や EU 等諸外国において使用が認められている。【参照 1、2、3】

3 効果に関する事項

3-1 効果を裏付ける基礎的試験 (*in vitro* 試験)

3-1-1 酵素の最大活性を示す pH

今回指定を要望されたフィターゼ（以下 QPT2 フィターゼ）の 37 °C における活性を評価した。

本フィターゼは、pH4.5 前後で最大の活性を示した（図 1 参照）。[参照 4]

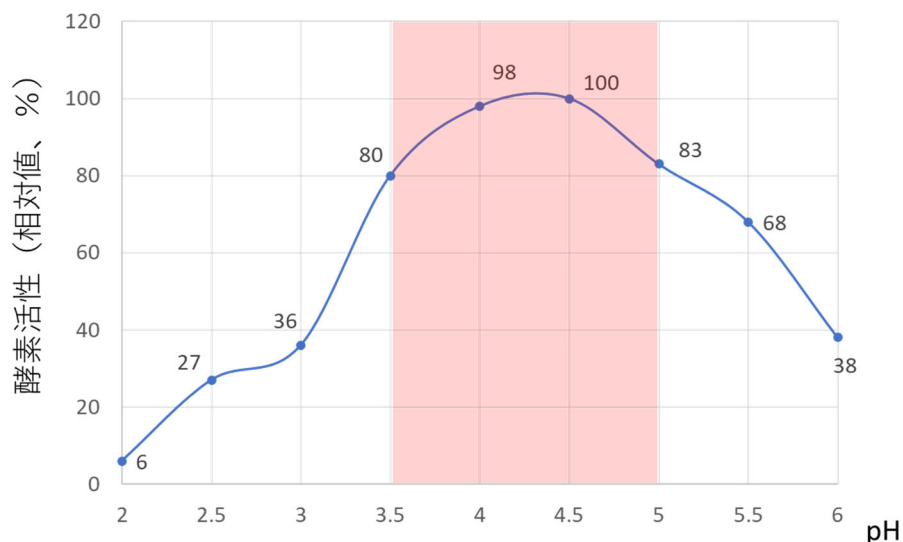


図 1：QPT2 フィターゼが最大酵素活性を示す pH

3-1-2 ペレット加工温度が酵素活性に及ぼす影響

QPT2 フィターゼのペレット加工温度が酵素活性に及ぼす影響を評価した（図 2 参照）。【参照 5】

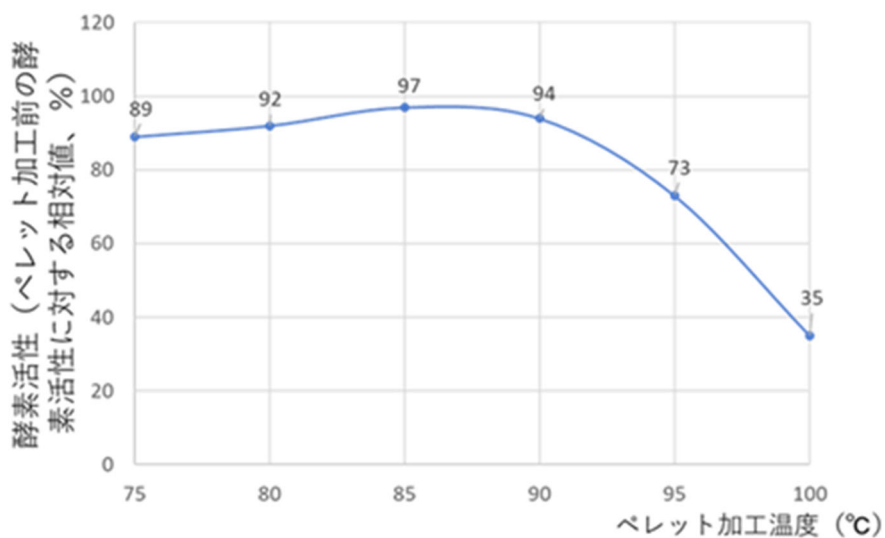


図 2：QPT2 フィターゼ（粉末製剤）の酵素活性に及ぼすペレット加工温度による影響

3-2 効果を裏付ける基礎的試験 (*in vivo* 試験)

3-2-1 鶏 (ブロイラー)

(1) 方法

【増体日量、飼料摂取日量及び飼料効率、全リン (TP) の見かけの回腸消化率、脛骨灰分】

室内で平飼いたしたブロイラー (Ross308、雄、21 日齢、平均体重 933.5 g) を用いて、トウモロコシ・大豆粕主体の高カルシウム (Ca) 飼料、低 Ca 飼料、QPT2 フィターゼを 250、750 FTU/kg 飼料 (1 日体重当たりのフィターゼ摂取量は、高 Ca 飼料ではそれぞれ 30.0、91.2 FTU/kg 体重/日、低 Ca 飼料ではそれぞれ 31.0、89.0 FTU/kg 体重/日) 添加した高 Ca 飼料及び低 Ca 飼料をそれぞれ 14 日間連続給与した (1 群 11 羽、各 10 反復)。

なお、飼料に含まれる全リン (TP) 及びカルシウムは高 Ca 飼料では TP : 0.51%、Ca : 1.54%、低 Ca 飼料では TP : 0.51%、Ca : 0.98% だった。供試飼料は蒸気を用いてペレット加工しており、フィターゼ添加飼料においては、フィターゼ添加後にペレット加工している。

増体量、飼料摂取日量及び飼料効率について、試験開始後 9 日までの成績を用いて算出した。

TP の見かけの回腸消化率について、試験開始後 9 日 (30 日齢) に、各反復群から 9 羽を抽出して回腸内容物を採取し、反復群毎にまとめて酸化チタンを指標物質としたインデックス法により測定した。

脛骨灰分について、残りの供試雛 (35 日齢) から脛骨を採取し、測定した。

【TP の見かけの全消化管消化率】

代謝ケージに収容したブロイラー雛 (18 及び 25 日齢) に TP の見かけの回腸消化率等の試験に用いた供試飼料と同様の飼料を 9 日間連続給与した (1 群 1 羽、各 5 反復)。

TP の全消化管消化率について、給与開始後 5 日以降の糞尿排泄物を採取し、酸化チタンを指標物質としたインデックス法により測定した。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、一元配置法により行った。試験群間に危険率 5% 以下で有意差が認められた項目については、Tukey の方法により試験群間の平均値の差の有意性を検討した。

(3) 結果

各項目の測定結果を表 1 に示した。

増体日量、飼料摂取日量、飼料効率については、高 Ca 飼料、低 Ca 飼料ともに対照群に対して高まる傾向を示したが、いずれの用量群においても有意差はなかった。

TP の見かけの回腸消化率については、高 Ca 飼料、低 Ca 飼料のいずれにおいても、QPT2 フィターゼ添加群は対照群と比較して有意に高かった。

脛骨灰分については、高 Ca 飼料、低 Ca 飼料のいずれにおいても、QPT2 フィターゼ添加群は対照群と比較して有意に増加した。低 Ca 飼料では、添加群において用量依存的に増加し、750 FTU/kg 飼料添加群は 250 FTU/kg 飼料添加群と比較して有意に増加した。

TP の全消化管消化率については、QPT2 フィターゼ添加群の見かけの全消化管消化率は対照群と比較して有意に高まった。低 Ca 飼料では、対照群と比較して、250

FTU/kg 飼料添加群では有意に高まったが、750 FTU/kg 飼料添加群では有意差がなかった。【参照 6】

表 1 鶏用飼料に添加したときの給与効果

	低 Ca 対照群	低 Ca フィターゼ添加群 (FTU/kg 飼料)		高 Ca 対 照群	高 Ca フィターゼ添加群 (FTU/kg 飼料)	
		250	750		250	750
増体日量 (g/日)	90.9	92.2	92.7	82.4	86.4	86.5
飼料摂取日量 (g/日)	163.7	166.0	160.6	158.2	159.5	162.4
飼料効率	0.55	0.56	0.58	0.52	0.54	0.53
TP の見かけの回腸 消化率 (%)	43.8 ^y	54.7 ^x	55.9 ^x	35.8 ^b	51.1 ^a	50.6 ^a
脛骨灰分 (%)	42.3 ^z	45.1 ^y	47.2 ^x	42.7 ^b	44.9 ^a	45.8 ^a
TP の見かけの全消 化管消化率 (%)	42.3 ^y	51.9 ^x	40.7 ^y	37.0 ^c	50.8 ^b	44.5 ^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（子豚）

（1）方法

室内に設置した代謝ケージを用いて、子豚（(ダーマシン×デンマークランドレース)×ピエトレン、去勢雄、6 週齢、平均体重 13.5 kg）に、とうもろこし・大豆粕主体の対照飼料、対照飼料にフィターゼを 250、500、750、1000 FTU/kg 飼料（1 日体重当たりのフィターゼ摂取量は、それぞれ 5.5、11.3、15.7、20.5 FTU/kg 体重/日）で添加した飼料をそれぞれ 28 日間（14 日間×2 期）定量給与した（1 群 1 頭、4 反復）。

試験に用いた対照飼料に含まれる TP、可消化リン、Ca は、TP：0.38%、可消化リン：0.13%、Ca：0.69%だった。供試飼料は蒸気を用いない方法でペレット加工しており、フィターゼ添加飼料においては、フィターゼ添加後にペレット加工を行っている。

TP の見かけの全消化管消化率について、各期の終了前 5 日間に排泄された糞を採取し、全糞採取法により測定した。

（2）統計解析

試験結果の解析は、一元配置法により行った。試験群間に危険率 5%以下で有意差が認められた項目については、Tukey の方法により試験群間の平均値の差の有意性を検討した。

（3）結果

測定結果を表 2 に示した。

フィターゼ添加群の TP の見かけの消化管消化率は、いずれの用量群においても対照群と比較して用量依存的に増加し、対照群と比べて用量依存的に有意に高まった。

【参照 7】

表 2 豚用飼料に添加したときのフィターゼ給与効果

	対照飼料 群	フィターゼ添加群 (FTU/kg 飼料)			
		250	500	750	1000
TP の見かけの 全消化管消化率 (%)	27.3 ^a	47.7 ^b	55.6 ^{bc}	58.5 ^c	61.1 ^c

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

3-3 効果を裏付ける野外応用による試験

3-3-1 鶏（ブロイラー）

(1) 方法

室内で平飼いたしたブロイラー（Ross308、雄、初生、平均体重 39.1 g）を用いて、トウモロコシ・大麦・大豆粕主体の陰性対照飼料、陰性対照飼料に第二リン酸カルシウムを添加した陽性対照飼料、陰性対照飼料に QPT2 フィターゼ又は比較対照フィターゼをそれぞれ 250、500、750 FTU/kg 飼料（1 日体重当たりのフィターゼ摂取量は、それぞれ 28.0、54.0、80.7 FTU/kg 体重/日、比較対照フィターゼでは、26.6、55.0、81.9 FTU/kg 体重/日）を添加した飼料をそれぞれ 22 日間連続給与した（1 群 5 羽、12 反復）。

なお、供試飼料に含まれる TP、非フィチンリン（npP）、Ca は、陰性対照飼料では TP：0.45%、npP：0.21%、Ca：0.70%であり、陽性対照飼料では TP：0.65%、npP：0.41%、Ca：1.00%だった。供試飼料は蒸気を用いてペレット加工しており、フィターゼ添加飼料においては、フィターゼ添加後にペレット加工している。

増体日量、飼料摂取量について、算出した。

脛骨灰分については、試験終了時に脛骨を採取し、測定した。

TP の見かけの回腸消化率については、試験終了時に回腸内容物を採取して、酸化クロムを指標物質としたインデックス法により測定した。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、一元配置法により行った。試験群間に危険率 5%以下で有意差が認められた項目については、Duncan の多重検定により試験群間の平均値の差の有意性を検討した。

(3) 結果

各項目の結果を表 3 に示した。

増体日量については、陽性対照群は陰性対照群に対して有意に増加した。QPT2 フィターゼ添加群及び比較対照フィターゼ添加群の各用量群は、陰性対照群に対して用量依存的に増加し、いずれも有意に増加した。

飼料要求率については、陽性対照群は陰性対照群に対して有意に低下した。QPT2 フィターゼ添加群の各用量群では、陰性対照群に対して用量依存的に低下し、いずれの用量群においても陰性対照群と比較して有意に低下した。比較対照フィターゼの各用量群では、用量依存的な傾向は見られなかったが、陰性対照群に対して有意に低下した。

脛骨灰分については、陽性対照群は陰性対照群と比較して有意に増加した。QPT2

フィターゼ添加群及び比較対照フィターゼ添加群のいずれの用量群において、用量依存的に増加し、いずれも有意に増加した。

TP の見かけの回腸消化率については、陽性対照群は陰性対照群に対して有意な差が見られなかった。QPT2 フィターゼ添加群の各用量群では、500 FTU/kg 飼料群までは陰性対照群に対して用量依存的に有意に高まった。750 FTU/kg 飼料群は、500 FTU/kg 飼料群に対して差がなかったが、陰性対照群及び 250 FTU/kg 飼料群に対して有意に高まった。[参照 8]

表 3 鶏用飼料に添加したときのフィターゼ給与効果

	陰性対照群	QPT2 フィターゼ添加群 (FTU/kg 飼料)			比較対照フィターゼ添加群 (FTU/kg 飼料)			陽性対照群
		250	500	750	250	500	750	
増体日量 (g/日)	26.1 ^f	32.9 ^d	36.5 ^{bc}	38.4 ^{ab}	28.8 ^e	32.4 ^d	36.0 ^c	39.4 ^a
飼料摂取 日量 (g/ 日)	37.7 ^e	44.9 ^{cd}	47.6 ^{bc}	49.7 ^{ab}	38.0 ^e	43.5 ^d	47.5 ^{bc}	51.9 ^a
飼料要求 率	1.450 ^a	1.369 ^b	1.307 ^c	1.298 ^c	1.326 ^{bc}	1.351 ^{bc}	1.322 ^{bc}	1.317 ^{bc}
斃死率 (%)	15.0 ^a	1.7 ^b	0 ^b	0 ^b	3.3 ^b	0 ^b	0 ^b	1.7 ^b
脛骨灰分 (%)	38.4 ^e	41.2 ^{cd}	42.6 ^{bc}	43.9 ^b	40.0 ^d	41.4 ^{cd}	42.5 ^{bc}	46.0 ^a
TP の見 かけの回 腸消化率 (%)	49.0 ^d	57.4 ^c	67.4 ^a	67.5 ^a	59.2 ^{bc}	58.0 ^c	65.3 ^{ab}	49.0 ^d

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

3-3-2 鶏（産卵鶏）

（1）方法

室内に設置したケージで単飼した産卵鶏（Lohmann-Brown、雌、35 週齢、平均体重 1900.2 g）を用いて、トウモロコシ・大豆粕主体の陰性対照飼料、陰性対照飼料に第一リン酸カルシウムを添加した陽性対照飼料、陰性対照飼料に QPT2 フィターゼを 150、300、600、1200 FTU/kg 飼料（1 日体重当たりのフィターゼ摂取量は、それぞれ 9.2、18.3、36.0 及び 71.1 FTU/kg 体重/日）を添加した飼料をそれぞれ 42 日間連続給与した（1 群 1 羽、12 反復）。

なお、供試飼料に含まれる TP、Ca は、陰性対照飼料では TP : 0.25%、Ca : 3.50% であり、陽性対照飼料では TP : 0.53%、Ca : 3.50% だった。供試飼料は、マッシュの形状で給与された。

試験期間中は、産卵成績を調査した。

脛骨灰分については、試験終了時に脛骨を採取し、測定した。

TP の見かけの回腸消化率については、試験終了時に回腸内容物を採取し、酸化クロムを指標物質としたインデックス法により測定した。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、一元配置法により行った。試験群間に危険率 5%以下で有意差が認められた項目については、Tukey の多重検定により試験群間の平均値の差の有意性を検討した。

(3) 結果

各項目の結果を表 4 に示した。

飼料摂取日量、産卵個数、卵重及び総産卵量については、陰性対照群に対して陽性対照群は、増加傾向が見られ、飼料要求率が低下傾向を示したが、いずれも有意差はなかった。QPT2 フィターゼ添加群の飼料摂取日量、産卵個数、卵重、総産卵量及び飼料要求率は、陰性対照群及び陽性対照群に対して有意差はなかった。

TP の見かけの回腸消化率については、陽性対照群では陰性対照群に対して有意に増加した。QPT2 フィターゼ添加群では、600 FTU/kg 飼料添加群までは陰性対照群に対して用量依存的に有意に高まった。1200 FTU/kg 飼料添加群では、陰性対照群及び 150 FTU/kg 飼料に対して有意に増加したが、300 及び 600 FTU/kg 飼料添加群に対しては有意差がなかった。

脛骨の灰分量については、陽性対照群では陰性対照群に対して有意に増加した。QPT2 フィターゼ添加群では、600 FTU/kg 飼料添加群までは陰性対照群に対して用量依存的に有意に高まった。1200 FTU/kg 飼料添加群では、陰性対照群及び 150 FTU/kg 飼料に対して有意に増加したが、300 及び 600 FTU/kg 飼料添加群に対しては有意差がなかった。[参照 9]

表 4 鶏用飼料に添加したときの QPT2 フィターゼ給与効果

	陰性対照群	フィターゼ添加群 (FTU/kg 飼料)				陽性対照群
		150	300	600	1200	
増体量 (g)	45.6	46.8	74.2	90.6	111.6	87.8
飼料摂取量 (g/日)	117.4	117.8	117.7	116.9	116.0	120.2
飼料要求率	1.916	1.905	1.912	1.887	1.834	1.887
産卵数 (個)	41.1	42.1	41.1	40.9	41.3	42.0
卵重 (g/個)	62.6	61.7	63.0	63.8	64.5	63.7
総産卵量 (g/羽)	2573.3	2597.4	2586.5	2606.7	2660.6	2673.7
TP の見かけの回腸消化率 (%)	33.29 ^a	43.73 ^b	51.41 ^c	57.00 ^d	56.48 ^{cd}	54.11 ^{cd}
脛骨灰分 (%)	43.677 ^a	44.469 ^{ab}	45.723 ^{cd}	47.466 ^d	47.071 ^{cd}	47.010 ^{cd}

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

3-3-3 豚

(1) 方法

群飼の豚（（デュロック×ランドレース）×ピエトレン、去勢雄、66 日齢、平均体重 25.1 kg）を用いて、トウモロコシ・大豆粕主体の陰性対照飼料、陰性対照飼料に第一リン酸カルシウムを添加した陽性対照飼料、陰性対照飼料に QPT2 フィターゼを 250 及び 500 FTU/kg 飼料（1 日体重当たりのフィターゼ摂取量は、それぞれ 9.0、17.7 FTU/kg 体重/日）を添加した飼料をそれぞれ 112 日間連続給与した（1 群 3 頭、8 反復）。

なお、供試飼料に含まれるリン、カルシウムは、陰性対照飼料（前期用飼料）では TP : 0.38%、可消化リン : 0.13%、Ca 0.58%、陰性対照飼料（育成期用飼料）では TP : 0.37%、可消化リン : 0.12%、Ca : 0.56%、陰性対照飼料（肥育期用飼料）では TP : 0.36%、可消化リン : 0.11%、Ca : 0.43%であり、陽性対照飼料（前期用飼料）では TP : 0.61%、可消化リン : 0.33%、Ca : 0.72%、陽性対照飼料（育成期用飼料）では TP : 0.59%、可消化リン : 0.32%、Ca : 0.66%、陰性対照飼料（肥育期用飼料）では TP : 0.48%、可消化リン : 0.22%、Ca : 0.51%だった。

前期用飼料は、体重が 25～45 kg の豚に給与し、育成期用飼料は体重が 46～70 kg の豚、肥育期用飼料は体重が 71～120 kg の豚に給与した。供試飼料は、マッシュの形状で給与された。

試験期間中は、発育成績を調査した。

脛骨灰分については、試験終了時に各群 10 頭測定した。

TP の見かけの全消化管消化率については、各期の終了週に酸化クロムを指標物質としたインデックス法により測定した。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、一元配置法により行った。試験群間に危険率 5%以下で有意差が認められた項目については、Tukey の多重検定により試験群間の平均値の差の有意性を検討した。

(3) 結果

各項目の結果を表 5 に示した。

増体量については、陽性対照群は、陰性対照群に対して有意に増加した。QPT2 フィターゼ添加群は、陰性対照群に対して用量依存的に有意に増加し、500 FTU/kg 飼料群は陽性対照群と有意差がなかった。

飼料摂取日量については、陽性対照群は、陰性対照群に対して増加傾向を示したが、有意差はなかった。QPT2 フィターゼ添加各群は陰性対照群に対して有意差は認められなかった。

飼料効率については、陽性対照群は、陰性対照群に対して有意に高まった。QPT2 フィターゼ添加群は、各添加群で陰性対照群に対して用量依存的に有意に高まり、陽性対照群に対して有意な差はなかった。

TP の見かけの全消化管消化率については、陽性対照群は、いずれのステージにおいても陰性対照群に対して有意に高まった。QPT2 フィターゼ添加群は、全ステージにおいて、陰性対照群に対して用量依存的に有意に高まり、陽性対照群に対しては、前期では各用量群、肥育期では 500 FTU/kg 飼料添加群で有意に高まった。

脛骨灰分については、陽性対照群は、陰性対照群に対して有意に増加した。QPT2

フィターゼ添加群では、陰性対照群に対して有意に増加し、陽性対照群とは有意な差はなかった。[参照 10]

表 5 豚用飼料に添加したときのフィターゼ給与効果

		陰性対照群	QPT2 フィターゼ添加群 (FTU/kg 飼料)		陽性対照群
			250	500	
増体日量 (g/日)		781 ^a	824 ^b	833 ^{bc}	858 ^c
飼料摂取日量 (kg/日)		2.53	2.54	2.53	2.61
飼料効率		0.308 ^b	0.324 ^a	0.330 ^a	0.328 ^a
TP の見 かけの全 消化管消 化率 (%)	前 期	35.50 ^a	44.33 ^c	52.89 ^d	40.11 ^b
	育成期	32.18 ^a	39.57 ^b	48.39 ^c	43.74 ^{bc}
	肥育期	32.09 ^a	43.39 ^b	54.37 ^c	42.93 ^b
脛骨灰分 (%)		48.5 ^a	52.8 ^b	51.3 ^b	51.9 ^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)

3-3-4 水産動物（ニジマス）

（1）方法

ニジマス（平均体重 56 g）を用いて、大豆たん白・エンドウ豆たん白・小麦粉を用いた陰性対照飼料、陰性対照飼料に第一リン酸カルシウムを添加した陽性対照飼料、陰性対照飼料に QPT2 フィターゼを 500、2500 FTU/kg 飼料（1 日体重当たりのフィターゼ摂取量は、それぞれ 5.7、28.6 FTU/kg 体重/日）を添加した飼料をそれぞれ 75 日間連続給与した（1 群 35 尾、3 反復）。

なお、供試飼料に含まれる TP、非フィチン態リン（npP）は、陰性対照飼料では TP：0.51%、npP：0.28%であり、陽性対照飼料では TP：0.91%、npP：0.66%だった。供試飼料はペレット加工を行っているが、フィターゼ添加飼料においては、ペレット加工後に噴霧添加を行っている。

発育成績については、試験期間中調査した。

TP 蓄積率については、試験終了時の全魚体の TP 含量を測定した。

（2）統計解析

試験結果の解析は、二元配置法により行った。試験群間に危険率 5%以下で有意差が認められた項目については、Tukey の多重検定により試験群間の平均値の差の有意性を検討した。斃死率については、Kruskal-Wallis 検定により各群間の差の有意性を検討した。

（3）結果

増体日量、瞬間成長率（SGR）及び飼料摂取日量については、陽性対照群及び QPT2 フィターゼ添加群共に陰性対照群に対して有意に増加した。QPT2 フィターゼ添加群では、陰性対照群に対して用量依存的に増加した。

飼料要求率については、陽性対照群及び 2500 FTU/kg 飼料添加群では、陰性対照群に対して有意に低下した。QPT2 フィターゼ添加群は、陰性対照群に対して用量依存的に低下した。

TP 蓄積率については、陽性対照群及び QPT2 フィターゼ添加群共に陰性対照群に対して有意に増加した。QPT2 フィターゼ添加群については、陰性対照群に対して用量依存的な増加だった。

斃死率については、試験群間で有意差はなかった。[参照 11]

表 6 水産動物用飼料に添加したときのフィターゼ給与効果

	陰性対照群	フィターゼ添加群 (FTU/kg 飼料)		陽性対照群
		500	2500	
増体日量 (g/日)	1.05 ^b	1.33 ^a	1.43 ^a	1.53 ^a
瞬間成長率 (SGR) (%/日)	1.18 ^b	1.36 ^a	1.43 ^a	1.49 ^a
飼料摂取日量 (g/日)	1.02 ^b	1.21 ^{ab}	1.25 ^a	1.33 ^a
飼料要求率	0.963 ^a	0.919 ^{ab}	0.874 ^b	0.870 ^b
TP 蓄積率 (%)	26.22 ^d	45.68 ^b	55.64 ^a	39.10 ^c
斃死率 (%)	0	0	1.9	1.0

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

3-3-5 水産動物 (ヨーロップスズキ)

5-2-4 水産動物 (ヨーロップスズキ) と同一試験のため、5-2-4 に記載した。

4 残留性に関する事項

(1) 方法

消化管内でのたん白質分解酵素に対する感受性を確認するため、*In silico* でペプシン、トリプシン及びキモトリプシンによる切断活性によるアミノ酸配列内の切断部位の有無を検索した。

(2) 結果

ペプシン、トリプシン及びキモトリプシンによる切断部位が数多く検出されたため、消化管内で短鎖のペプチドに切断されるものと考えられた。

以上のことから、フィターゼが体内に残留することがないと考えられ、残留性に関する試験を省略した。[参照 12]

5 安全性に関する事項

5-1 毒性試験

5-1-1 一般毒性試験

5-1-1-1 反復投与毒性試験（短期）

（1）方法

ラット（Wistar 系、雌雄、7 週齢、平均体重 191 g（雄）、155 g（雌））を用いて、QPT2 フィターゼを 0、100、300、1,000 mg/kg 体重（22,700、68,100、227,000 FTU/kg 体重/日）で再蒸留水に溶解し、それぞれ強制経口投与にて 90 日間給与した（1 群雌雄各 10 匹）。試験期間中は、水と飼料は自由摂取とした。

体重及び飼料摂取量について、毎週個体毎に測定した。

一般症状及び死亡等の異常の有無については、試験期間中に毎日観察した。

眼科的検査については、試験開始前及び試験開始後 88 日に実施した。

握力、自発運動性検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査について、試験終了時に行い、その後各群の器官重量測定及び剖検を行った。

病理学検査については、対照群及び 1,000 mg/kg 体重投与群の全個体で行い、100 及び 300 mg/kg 体重群においては、剖検時に異常が見られた部位について行った。

（2）統計解析

Dunnett 検定、Steel の多重範囲検定あるいは Fisher の正確検定により行い、投与群と対照群との平均値間の差の有意性を検討した。

（3）結果

平均増体量、平均摂餌量及び平均飼料効率については、対照群に対して有意な差はなく、用量依存的な傾向も見られなかった。

一般症状においては、対照群、100、300 mg/kg 体重投与群の雌雄において明確な影響は認められなかった。

死亡例については、1,000 mg/kg 体重投与群で試験開始後 13 日目に雄 1 匹の死亡が確認されたが、投与ミスによるものと考えられた。この個体以外に死亡例は認められなかった。

眼科的検査については、試験開始前の QPT2 フィターゼ添加群、試験開始後 88 日後の 1,000 mg/kg 体重投与群において角膜の混濁、瞳孔膜の遺残及びガラス体血管の遺残が散見されたが、対照群にも散見される症状であり、用量依存性もなく、発生頭数について対照群に対して有意な差がなかった。このことから、QPT2 フィターゼ投与に起因するものではないと考えられた。

握力及び自発運動性については、QPT2 フィターゼ投与群と対照群の間に有意な差はなかった。

血液学的検査については、対照群に対して 300 mg/kg 体重投与群の雌雄で白血球数が有意に低下し、雄では好酸球の割合が有意に増加した。しかし、その他の用量群では対照群に対して有意な差が見られず、用量依存性もないことから、QPT2 フィターゼ投与に起因する影響ではないものと考えられた。

血液生化学検査において、ビリルビンが用量依存的に減少する傾向が見られたが、変化は背景データの変動内のものだった。ナトリウム及び塩素については、300 mg/kg 体重投与群の塩素濃度並びに 1,000 mg/kg 体重投与群の塩素及びナトリウム濃度は、対照群に対して有意に増加した。用量依存性もあることから、QPT2 フィターゼ

投与の影響と考えられるが、有害な影響ではないものと考えられた。リンについては、100、300 mg/kg 体重投与群の雄で対照群に対して有意に減少したが、雌では有意な差が見られず、用量依存性もないことから、QPT2 フィターゼ投与による影響ではないものと考えられた。その他の項目については、QPT2 フィターゼ投与による変化は雌雄共に有意な差があるものではなく、用量依存性も認められなかった。

尿検査においては、300 mg/kg 体重投与群の雌で、pH が対照群に対して有意に低下したが、用量依存性がないことから、QPT2 フィターゼ投与に起因するものではないと考えられた。その他の項目では、QPT2 フィターゼ投与群と対照群の間で有意な差はなく、用量依存性も認められなかった。

器官重量においては、300 mg/kg 体重投与群の雌で、脾臓の絶対重量及び相対重量が対照群に対して有意に低下したが、用量依存的ではないことから、QPT2 フィターゼ投与の影響ではないものと考えられた。雄の 300 mg/kg 体重投与群では、脾臓の絶対重量及び相対重量の有意な差は見られず用量依存性も見られなかった。その他の器官では、雌雄共に QPT2 フィターゼ投与群と対照群の間で有意な差はなく、用量依存性も認められなかった。

器官の肉眼的所見においては、雄では肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣上体、脾臓、胸腺及びリンパ節において変化が認められた。雌では肝臓、脾臓、腎臓、卵巣、子宮及びハーダー腺において変化が認められた。しかし、いずれの変化も供試ラットで発生する範囲のものであり、用量依存性もないことから、QPT2 フィターゼ投与に起因するものではないと考えられた。

組織学的検査においては、観察された異常は、供試ラットに発生する範囲のものであり、用量依存性もないことから、QPT2 フィターゼに起因するものではないと考えられた。

これらの結果から、QPT2 フィターゼの NOEL は 300 mg/kg 体重（フィターゼとして 68,100 FTU/kg 体重）、NOAEL は 1,000 mg/kg 体重であると推測された。[参照 13]

5-1-2 特殊毒性試験

5-1-2-1 変異原性試験

表 7 変異原性試験結果

分類	試験	対象	用量	結果	参照
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98、TA100、TA1535、TA1537 <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	3、10、33、100、333、1,000、2,500、5,000 µg/plate (+/-S9) *1	陰性	参照 14
			33、100、333、1,000、2,500、5,000 µg/plate (+/-S9) *2	陰性	参照 14
	染色体異常試験	チャイニーズハムスターV79 細胞	19.5、39.1、78.1、156.3、312.5、625.0、1,250.0、2,500.0、5,000.0 µg/mL (+/-S9) 4 h 処理	陰性	参照 15
			19.5、39.1、78.1、156.3、312.5、625.0、1,250.0、2,500.0、5,000.0 µg/mL (-S9) 18 h 処理		
			312.5、625.0、1,250.0、2,500.0、5,000 µg/mL (+S9) 4 h 処理		
<i>in vivo</i>	小核試験	Wistar 系 ラット (雌雄各 7 匹、骨髓)	500、1,000、2,000 mg/kg 体重 単回強制経口投与	陰性	参照 16

*1 プレート法

*2 プレインキュベーション法

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チャイニーズハムスターV79 細胞を用いた染色体異常試験が実施された。*in vivo* 系ではマウスを用いた小核試験が実施された。各試験の結果を表 7 に示した。結果は、いずれの試験も陰性だった。

したがって、QTP2 フィターゼに変異原性は認められないと判断された。【参照 14、15、16】

5-2 対象家畜等を用いた飼養試験

5-2-1 鶏（ブロイラー）

(1) 方法

ブロイラー（Ross 308、雄、初生、平均体重 44.8 g）を用いて、トウモロコシ・大豆粕主体の陰性対照飼料、陰性対照飼料に第一リン酸カルシウムを添加した陽性対照飼料、陰性対照飼料に QPT2 フィターゼをそれぞれ 500、2,500、250,000 FTU/kg 飼料（1 日体重当たりのフィターゼ摂取量は、それぞれ 19.2、192.0、19,188.6 FTU/kg 体重/日）を添加した飼料をそれぞれ 35 日間連続給与した（1 群 10 羽、15 反復）。

なお、飼料に含まれる TP、有効リン（avP）、Ca は、陰性対照飼料では TP : 0.60%（1～21 日齢）、0.49%（22～35 日齢）、avP : 0.21%（1～21 日齢）、0.17%（22～35

日齢)、Ca : 0.92% (1～21 日齢)、0.76% (22～35 日齢)、陽性対照飼料では TP : 0.74% (1～21 日齢)、0.69% (22～35 日齢)、avP : 0.26% (1～21 日齢)、0.24% (22～35 日齢)、Ca : 1.12% (1～21 日齢)、1.04% (22～35 日齢) だった。

増体量、飼料摂取日量、飼料要求率、健康状態、斃死数について、試験期間中調査した。

(2) 統計解析

試験結果の解析は、一元配置法により行った。試験群間に危険率 5%以下で有意差が認められた項目については、Tukey の多重検定により試験群間の平均値の差の有意性を検討した。斃死数においては、カイ二乗検定により試験群間の有意差を検討した。

(3) 結果

各項目の結果を表 8 に示した。

増体量及び飼料摂取日量については、陽性対照群は、陰性対照群に対して有意差はないものの、増加傾向を示した。QPT2 フィターゼ添加群は、陰性対照群に対して有意に増加し、2,500 FTU/kg 飼料添加群までは用量依存的だった。2,500 FTU/kg 飼料及び 250,000 FTU/kg 飼料添加群は、陽性対照群に対して有意に増加した。

飼料要求率においては、QPT2 フィターゼ添加群は、陰性対照群に対して有意に低下し、2,500 FTU/kg 飼料添加群までは用量依存的だった。2,500 FTU/kg 飼料及び 250,000 FTU/kg 飼料添加群は、陽性対照群に対して有意に低下した。

斃死数については、QPT2 フィターゼ添加群、陽性対照群共に陰性対照群と有意差がなかった。[参照 17]

表 8 鶏用飼料に添加したときのフィターゼ給与効果

	陰性対照群	フィターゼ添加群 (FTU/kg 飼料)			陽性対照群
		500	2,500	250,000	
増体量 (g)	2453 ^a	2599 ^{bc}	2671 ^c	2648 ^c	2534 ^{ab}
飼料摂取量 (g/日)	99 ^a	103 ^{ab}	106 ^b	105 ^b	103 ^{ab}
飼料要求率	1.41 ^{ab}	1.39 ^{bc}	1.39 ^{bc}	1.38 ^c	1.42 ^a
斃死数 (羽)	3	5	7	3	4

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

5-2-2 鶏 (採卵鶏)

(1) 方法

採卵鶏 (Hi-Line、20 週齢、平均体重 1.66 kg) を用いて、トウモロコシ・大豆粕主体の陰性対照飼料、陰性対照飼料に第二リン酸カルシウムを添加した陽性対照飼料、陰性対照飼料に QPT2 フィターゼをそれぞれ 2,500 及び 250,000 FTU/kg 飼料 (1 日体重当たりのフィターゼ摂取量は、それぞれ 155.5、15,684.8 FTU/kg 体重/日) を添加した飼料をそれぞれ 49 日間連続給与した (1 群 15 羽、12 反復)。

なお、飼料に含まれる TP、avP、Ca は、陰性対照飼料では TP : 0.33%、avP : 0.11%、Ca : 3.30%、陽性対照飼料では TP : 0.54%、avP : 0.32%、Ca : 3.60% だった。

産卵率、産卵日量、卵重、飼料摂取日量、飼料要求率及び健康状態について、試験期間を通して調査した

(2) 統計解析

試験結果の解析は、二元配置法により行った。試験群間に危険率5%以下で有意差が認められた項目については、Duncan の多重検定により試験群間の平均値の差の有意性を検討した。

(3) 結果

各項目の結果を表9に示した。

産卵率については、QPT2 フィターゼ添加群、陽性対照群の間で有意差がなかったが、QPT2 フィターゼ添加群、陽性対照群共に陰性対照群に対して有意に高まった。産卵日量について、QPT2 フィターゼ添加群、陽性対照群共に陰性対照群に対して有意差はないものの増加傾向を示した。

飼料摂取日量について、QPT2 フィターゼ添加群は、陰性対照群に対して増加傾向を示したが、陰性対照群、陽性対照群の両群に対して有意な差はなかった。

卵重、飼料要求率については、各群間に有意な差がなかった。

健康状態について、陰性対照群の1羽が事故で斃死し、陽性対照群の2羽及び2,500 FTU/kg 飼料添加群の1羽が卵塞症により斃死したが、その他の個体に異常な所見は見られなかった。[参照 18]

表9 鶏用飼料に添加したときのフィターゼ給与効果

	陰性対照群	フィターゼ添加群 (FTU/kg 飼料)		陽性対照群
		2,500	250,000	
産卵率 (%)	90.3 ^b	93.6 ^a	93.1 ^a	93.2 ^a
産卵日量 (g/日)	54.4	55.9	55.9	56.4
卵重 (g/個)	60.2	59.8	60.0	60.4
飼料摂取日量 (g/日)	104.1 ^b	106.1 ^{ab}	106.5 ^{ab}	107.5 ^a
飼料要求率	1.915	1.897	1.908	1.908
斃死数 (羽)	1	1	-	2

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

5-2-3 豚

(1) 方法

離乳子豚 (TEMPO× (PORKUSS× (BH2P×Pietrain))、雌雄、26 日齢、平均体重 8.5 kg) を用いて、トウモロコシ・大豆粕主体の陰性対照飼料、陰性対照飼料に第一リン酸カルシウムを添加した陽性対照飼料、陰性対照飼料に QPT2 フィターゼを 2,500 及び 250,000 FTU/kg 飼料 (1 日体重当たりのフィターゼ摂取量は、それぞれ 102.6、10,074.3 FTU/kg 体重/日) を添加した飼料をそれぞれ 42 日間連続給与した (1 群 12 頭、10 反復)。

なお、飼料に含まれる TP、Ca は、陰性対照飼料では TP : 0.50%、Ca : 0.70%、陽性対照飼料では TP : 0.60%、Ca : 0.80%だった。

増体日量、飼料摂取日量、飼料要求率及び健康状態について、試験期間を通して調査した。

（２）結果の解析

線形計画法により行った。

（３）結果

各項目の結果を表 10 に示した。

増体日量、飼料摂取日量及び飼料要求率について、各群間に有意差は認められなかった。

健康状態については、陰性対照群の 1 頭が下痢、陽性対照群の 2 頭が心不全、250,000 FTU/kg 飼料の 2 頭が下痢で斃死した。[参照 19]

表 10 豚用飼料に添加したときのフィターゼ給与効果

	陰性対照群	フィターゼ添加群 (FTU/kg 飼料)		陽性対照群
		2,500	250,000	
増体日量 (g/日)	538	526	553	539
飼料摂取日量 (g/日)	804	804	814	804
飼料要求率	1.50	1.53	1.48	1.50
斃死数 (頭)	1	-	2	2
淘汰数 (頭)	3	2	4	2

各値は平均値

５－２－４ 水産動物（ヨーロップスズキ）

（１）方法

ヨーロップスズキ（平均体重 31 g）を用いて、大豆たん白・エンドウ豆たん白・小麦粉・ナタネ粕を用いた陰性対照飼料、陰性対照飼料に QPT2 フィターゼを 500、2,500 及び 400,000 FTU/kg 飼料（1 日体重当たりのフィターゼ摂取量は、それぞれ 8.1、43.2、7,333.3 FTU/kg 体重/日）を添加した飼料をそれぞれ 91 日間連続給与した（1 群 100 尾、3 反復）。

なお、供試飼料に含まれる TP、フィチン態リン（pP）は、陰性対照飼料では TP : 0.75%、pP : 0.28%だった。

発育成績及び健康状態については、試験期間中調査した。

TP 蓄積率については、試験終了時の全魚体の TP 含量を測定した。

（２）統計解析

試験結果の解析は、二元配置法により行った。試験群間に危険率 5%以下で有意差が認められた項目については、Tukey の多重検定により試験群間の平均値の差の有意性を検討した。斃死率については、Kruskal-Wallis 検定により各群間の差の有意性を検討した。

（３）結果

各項目の結果を表 11 に示した。

増体日量について、QPT2 フィターゼ 2,500 FTU/kg 飼料添加群のみ陰性対照群に対して有意差があった。

瞬間成長率、飼料摂取日量、飼料要求率及び斃死率については、QPT2 フィターゼ添加群は、陰性対照群に対して有意差がなかった。

TP 蓄積率については、陰性対照群に対して用量依存的に増加し、2,500 及び 400,000 FTU/kg 飼料添加群では陰性対照群に対して有意に増加した。[参照 20]

表 11 水産動物用飼料に添加したときのフィターゼ給与効果

	陰性対照群	フィターゼ添加群 (FTU/kg 飼料)		
		500	2,500	400,000
増体日量 (g/日)	0.75 ^b	0.74 ^b	0.87 ^a	0.78 ^b
瞬間成長率 (SGR) (%/日)	1.30 ^{ab}	1.26 ^b	1.40 ^a	1.32 ^{ab}
飼料摂取日量 (g/日)	1.17	1.05	1.21	1.21
飼料要求率	1.55	1.43	1.39	1.57
TP 蓄積率 (%)	44.1 ^b	54.2 ^{ab}	57.9 ^a	62.4 ^a
斃死率 (%)	0.7	0.3	0.0	1.7

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

6 審議結果

フィターゼ（企業推奨添加量：鶏、うずら、豚に 150～500 FTU/kg 飼料、水産動物用飼料におおよそ 500 FTU/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」を本剤の効果とし、飼料へ添加することが適当であると判断された。

なお、有害事象が認められなかったことから他の水産動物への使用を制限するものではないが、本剤で効果があると確認された水産動物は、さけ科及びすずき科の魚類である。

- 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、うずら、豚及び水産動物

7 参照（参考文献及び参考資料）

1. EFSA journal 2013;11(10):3364, 1-30.
2. EFSA journal 2013;11(10):3433, 1-10.
3. Official Publication. (Association of American Feed Control Officials) (2016)
4. AB Enzymes Oy: To evaluate pH optimum of QUANTUM Blue phytase. (AB agri) (2011)
5. Enzyme Services and Consultancy (ESC): Laboratory Report. (AB agri) (2011)
6. Efficacy of a new phytase (QPT 2) on P and Ca availability in broiler chickens fed diets with different Ca level. (AB agri) (2010)
7. Efficacy of a new phytase on P digestibility in piglets. (AB agri) (2011)
8. Comparative effects of a novel phytase QPT2 and Quantum TR 5000 P on phosphorus availability and bone mineralisation in broilers chickens. (AB agri) (2011)
9. Efficacy of QPT2 phytase on performance and ileal apparent digestibility in laying hens from 35 to 40 weeks of age. (AB agri) (2011)
10. Efficacy of supplemented QPT2 phytase on apparent nutrient digestibility, performance and bone mineralisation in crossbred barrows from 25 to 120 kg body weight. (AB agri) (2012)
11. Efficacy study in trout: Quantum Blue. (AB agri) (2019)
12. In silico protease digestion of QPT2 phytase. (AB agri) (2020)
13. Modified E. Coli phytase produced by *Trichoderma reesei*: 90-Day Oral Toxicity (Gavage) Study in the Wistar Rat. (AB agri) (2011)
14. *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* Reverse Mutation Assay with Modified E.coli phytase produced by *Trichoderma reesei*. (AB agri) (2010)
15. *In vitro* Chromosome Aberration Test in Chinese Hamster V79 Cells with Modified *E.coli* phytase produced by *Trichoderma reesei*. (AB agri) (2011)
16. Micronucleus Assay in Bone Marrow Cells of the Rat with Modified E.coli phytase produced by *Trichoderma reesei*. (AB agri) (2011)
17. Efficiency and tolerance study of the novel phytase QPT 2 in broilers. (AB agri) (2011)
18. Tolerance Study with a Novel Phytase QPT2 on Layers. (AB agri) (2012)
19. Effect of QPT2 Phytase at recommended and high application rate in feed on performance and health of piglets. (AB agri) (2011)
20. Tolerance study in European sea bass: Quantum Blue. (AB agri) (2020)

フィターゼの成分規格等（案）

1. 飼料一般の成分規格並びに製造、使用及び保存の方法及び表示の基準

飼料一般の製造方法の基準

フィターゼ（その２の（８））は、豚、鶏、うずら、魚類及び甲殻類を対象とする飼料（飼料を製造するための原料又は材料を含む。）以外の飼料に用いてはならない。

2. 各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

ア 製造用原体

(ア) 成分規格

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、1 g 中に 50,000 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、褐色の液体である。
- ② 本品の懸濁液（1→100）の pH は、4.0～5.0 である。
- ③ 本品は、pH 3.5～5.0 において最大の酵素活性を有する。

純度試験

- ① 鉛 本品 2.0 g（1.95～2.04 g）を量り、鉛試験法（原子吸光光度法第 1 法）により鉛の試験を行うとき、その量は、5 μ g/g 以下でなければならない。
- ② ヒ素 フィターゼ（その 1）製造用原体の純度試験②を準用する。
- ③ 抗菌活性 フィターゼ（その 1）製造用原体の純度試験③を準用する。

強熱残分 5.0 %以下（0.5 g）

酵素力試験 フィチン酸分解力試験法第 5 法により試験を行う。

試料溶液の調製 本品 0.25 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、酢酸ナトリウム緩衝液(0.25 mol/L、pH 5.5)で 25 mL とする。この溶液を試験反応溶液と試験対照溶液の吸光度差が 0.4～1.1 の範囲になるように同緩衝液で希釈し、試料溶液とする。

(イ) 製造の方法の基準

Trichoderma reesei 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、培養液をろ過し、菌体を除去して製造すること。

(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（8））製造用原体に、安息香酸ナトリウム、クエン酸三ナトリウム、ソルビトール及び硫酸ナトリウムを加え、精製水で希釈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 5 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（8））製造用原体の酵素力試験を準用する。

(イ) 保存の方法の基準

フィターゼ（その 2 の（8））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（8））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（8））製造用原体を噴霧乾燥し、必要に応じて小麦粉及び植物油を混和、あるいは、フィターゼ（その 2 の（8））製造用原体に小麦粉、植物油、抗酸化剤及びプロピオン酸を加え、顆粒化した後、乾燥させた小片、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 5 法により試験を行う。

試料溶液の調製 本品 0.5 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、酢酸ナトリウム緩衝液(0.25 mol/L、pH 5.5)を加え、室温で 20 分間攪拌した後、同緩衝液で 50 mL とする。この溶液を試験反応溶液と試験対照溶液の吸光度差が 0.4～1.1 の範囲になるように同緩衝液で希釈し、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（8））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（8））製造用原体の表示の基準を準用する。

3. 飼料添加物一般の試験法

(14) 酵素力試験法

⑧ フィチン酸分解力試験法

(v) 第5法

基質溶液の調製

フィチン酸ナトリウム 0.98 g (0.975~0.984 g) を量り、酢酸ナトリウム緩衝液 (0.25 mol/L、pH 5.5) 約 80 mL を加えて溶かし、酢酸で pH を 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 20 g (19.5~20.4 g) を水 180 mL に溶かし、アンモニア水 2 mL を加えた後、水で 200 mL 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 0.47 g (0.465~0.474 g) に水 160 mL を加え、水浴中で攪拌しながら約 50 °C に加温して溶かした後、硝酸 (175→500) 4 mL を加え、室温まで冷却した後、水で 200 mL とし、バナジ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原液 25 mL に、バナジン酸アンモニウム試液 25 mL を加え、よく振り混ぜ、硝酸 (175→500) 16.5 mL を加えた後、水で 100 mL とする。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 2 mL を全量ピペットを用いて量り、15 mL プラスチック製遠心沈殿管に入れ、 37 ± 0.5 °C に加温し、5~10 分間放置する。この基質溶液に、別に、 37 ± 0.5 °C に加温し、5~10 分間放置した試料溶液 1 mL を全量ピペットを用いて加え、 37 ± 0.5 °C で正確に 60 分間放置する。その後、反応停止発色液 2 mL を全量ピペットを用いて加え、よくかき混ぜ、室温で 20 分間放置し、さらに $2,500\times g$ で 10 分間遠心分離を行い、得られた上澄み液を試験反応溶液とする。この溶液につき、水を対照液として、波長 415 nm における吸光度 OD_T を測定する。別に、基質溶液 2 mL を全量ピペットを用いて量り、15 mL プラスチック製遠心沈殿管に入れ、これに反応停止発色液 2 mL を全量ピペットを用いて加え、かき混ぜた後、試料溶液 1 mL を全量ピペットを用いて加え、よくかき混ぜ、室温で 20 分間放置し、さらに $2,500\times g$ で 10 分間遠心分離を行い、得られた上澄み液を試験対照溶液とする。この溶液につき、水を対照液として、波長 415 nm における吸光度 OD_B を測定する。

1 g 中のフィチン酸分解力単位 $=(\text{OD}_T - \text{OD}_B) \times F \times V \times 1/60 \times 1/W \times Z$

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 ($\mu\text{mol/mL}$)

V：試料溶液の定容量 (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 0.0980 g (0.0975 ~ 0.0984 g) を量り、酢酸ナトリウム緩衝液 (0.25 mol/L、pH 5.5) を加えて溶かし、100 mL の全量フラスコに入れ、更に酢酸ナトリウム緩衝液 (0.25 mol/L、pH 5.5) を標線まで加えて 100 mL とした後、pH 5.5 であることを確認し、7.20 $\mu\text{mol/mL}$ 標準原液を調製する。

標準原液の一定量をそれぞれ試験管に入れ、酢酸ナトリウム緩衝液 (0.25 mol/L、pH 5.5) で正確に 1.25 倍、2.5 倍、5 倍及び 10 倍に希釈し、標準液 S1、S2、S3 及び S4 を調製する。

各標準液 1 mL を全量ピペットを用いて量り、15 mL プラスチック製遠心沈殿管に入れ、基質溶液 2 mL 及び反応停止発色液 2 mL を全量ピペットを用いて加え、よくかき混ぜ、室温で 20 分間放置し、さらに 2,500×g で 10 分間遠心分離を行い、得られた上澄み液をリン酸標準反応溶液とする。試験反応液と同様に操作法に従い、 OD_{S1} 、 OD_{S2} 、 OD_{S3} 、 OD_{S4} を測定する。

別に、酢酸ナトリウム緩衝液 (0.25 mol/L、pH 5.5) 1 mL を全量ピペットを用いて量り、15 mL プラスチック製遠心沈殿管に入れ、基質溶液 2 mL 及び反応停止発色液 2 mL を全量ピペットを用いて加え、よくかき混ぜ、室温で 20 分間放置し、さらに 2,500×g で 10 分間遠心分離を行い、得られた上澄み液をリン酸標準対照溶液とする。試験反応液と同様に操作法に従い、 OD_{SB} を測定する。

リン酸イオン濃度を縦軸に、測定した OD_{SB} との吸光度差 ($\text{OD}_{S1} - \text{OD}_{SB}$)、($\text{OD}_{S2} - \text{OD}_{SB}$)、($\text{OD}_{S3} - \text{OD}_{SB}$)、($\text{OD}_{S4} - \text{OD}_{SB}$) を横軸にとり、検量線を作成する。

4. 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

(2) 試薬・試液

酢酸ナトリウム緩衝液 (0.25 mol/L、pH 5.5)

酢酸ナトリウム 30.02 g (30.015～30.024 g) に水約 900 mL を加えて溶かし、氷酢酸 1.68 mL をマイクロピペットを用いて加え、塩化カルシウム 0.147 g (0.1465～0.1474 g) を加え、さらにポリソルベート 20 試液 1 mL を全量ピペットを用いて加え、1 mol/L 酢酸試液又は 1 mol/L 水酸化ナトリウム試液を用いて pH を 5.5 に調整した後、水を加えて 1,000 mL とする。

ポリソルベート 20 試液

ポリソルベート 20 5 mL に水を加えて溶かし、50 mL とする。

酢酸試液、1 mol/L

氷酢酸 12 g (11.5～12.4 g) に水を加えて溶かし、200 mL とする。