

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。

基準及び規格を作成した。

飼料添加物の効果安全性について（案）

Komagataella phaffii BSY-0007 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試験	5
3-1-1	最大活性の pH	5
3-1-2	ペレット加工温度域の酵素活性	5
3-2	効果を裏付ける野外応用試験	6
3-2-1	鶏	6
3-2-2	豚	7
3-3	消化率の向上を確認する試験	8
3-3-1	鶏	8
3-3-2	鶏（産卵鶏）	9
3-3-3	豚	10
4	残留性に関する事項	11
5	安全性に関する事項	12
5-1	毒性試験	12
5-1-1	一般毒性試験	12
5-1-1-1	単回投与毒性試験	12
5-1-1-2	反復投与毒性試験（短期）	12
5-1-2	特殊毒性試験	13
5-1-2-1	変異原性試験	13
5-2	対象家畜等を用いた飼養試験	13
5-2-1	鶏	13
5-2-2	豚	15
6	審議結果	16
7	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

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 250 FTU/kg 飼料

うずら用飼料 250 FTU/kg 飼料

豚用飼料 250 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、*Komagataella phaffii* BG10 株を宿主とし、*Escherichia coli* B 株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り、ペレット加工等に対する耐熱性の高さが期待される。

本生産菌から産出されるフィターゼは、飼料添加物として米国や EU 等において使用が認められている。

3 効果に関する事項

3-1 効果を裏付ける基礎的試験（*in vitro*試験）

豚及び鶏におけるフィターゼの主な作用部位は、豚では胃、鶏では腺胃及び筋胃とされており、それぞれの pH は豚の胃では 3～5、鶏の腺胃では 5.5、鶏の筋胃では 2.5～3.5 である。[参照 1、2、3]

pH について、以下の試験のとおり試験を実施した。

3-1-1 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「A2P フィターゼ」という。）の製造用原体を用いて、pH2.0～6.0 の酵素活性を測定した。

pH4.0 で最大の活性を示し、pH2.5～5.5 で最大活性の 75%以上の酵素活性を示した。（表 1 参照）。[参照 4]

表 1.A2P フィターゼの異なる pH 域における酵素活性

pH	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
酵素活性（相対値）[%]	48	75	89	98	100	90	83	75	50

3-1-2 ペレット加工時のコンディショニング温度域における酵素活性

（試験 1）

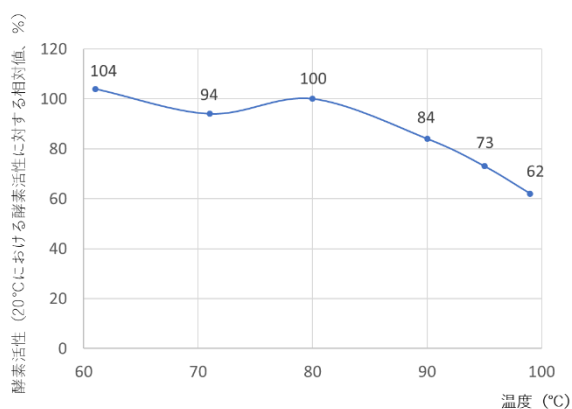
A2P フィターゼ製造用原体を用いて、61～99℃ における酵素活性を測定した。

95℃ においても最大活性の 73%以上を示した。（図 1 参照）。[参照 4]

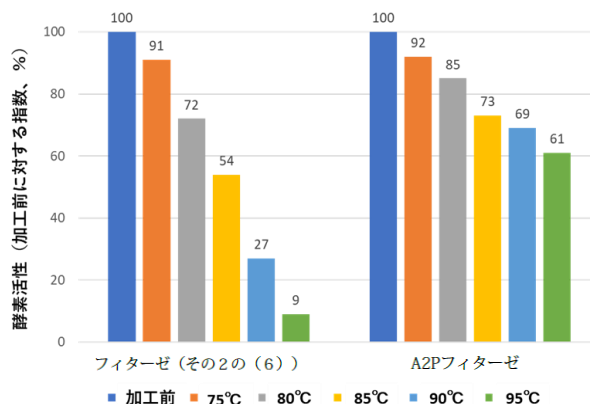
（試験 2）

A2P フィターゼ製剤（非コーティング）及び既指定のフィターゼ（その 2 の（6））を添加した飼料について、ペレット化した後の酵素活性を測定し、比較した。

80℃ 以上において、既指定のフィターゼ（その 2 の（6））のコーティング製剤に対して酵素活性が高い傾向がみられた。（図 2 参照）。[参照 4]



（左）図 1. A2P フィターゼの異なる温度域における酵素活性



（右）図 2. A2P フィターゼとフィターゼ（その 2 の（6））添加飼料を異なる加工温度でペレット化した場合の酵素活性の比較

3-2 効果を裏付ける野外応用試験

3-2-1 鶏（ブロイラー）（ペレット飼料）

（1）方法

ブロイラー（Ross 308 種、雄、6 日齢、平均体重 149 g）を用いて、有効リン減量飼料（陰性対照群）、有効リン添加飼料（陽性対照群）、有効リン減量飼料に A2P フィターゼを 250、500 FTU/kg 飼料（それぞれ約 24、48 FTU/kg 体重/日）で添加した飼料（フィターゼ群）、比較対照フィターゼを同濃度で添加した飼料（比較対照群）2 つをそれぞれ 35 日間給与した（1 群 11 頭、12 反復）。

なお、飼料に含まれる有効成分は表 2 のとおり。

表 2 飼料中の有効成分濃度

有効成分	前期後期	有効リン減量飼料	有効リン添加飼料
有効リン濃度	前期用飼料（6~21 日齢）	0.191%	0.341%
	後期用飼料（22~35 日齢）	0.162%	0.310%
全リン濃度	前期用飼料	0.48%	0.63%
	後期用飼料	0.46%	0.60%
カルシウム濃度	前期用飼料	0.63%	0.75%
	後期用飼料	0.60%	0.70%

（2）統計解析

試験結果の解析は乱塊法を用いて行った。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 の方法により各群の平均値間の差の有意性を確認した。

（3）結果

増体について、フィターゼ各用量群は、陰性対照と比較して有意に高かった。

飼料要求率について、フィターゼ各用量群は、陰性対照と比較して有意に低かった。

脛骨灰分含量について、フィターゼ各用量群は、陰性対照と比較して有意に高かった。

全リンの消化率について、フィターゼ各用量群は、陰性対照と比較して高い傾向を示し、250 FTU/kg 飼料のフィターゼ群は陰性対照に比べ有意に高かった。（表 3 参照）。
[参照 5]

表 3 鶏用飼料に添加したときのフィターゼ給与効果

試験群	被験物質の投与量 (FTU/飼料kg)	増体日量(g/日)	飼料要求率	脛骨灰分含量 (%)	全リン消化率 (%)
陰性対照群	—	65.7 ^b	1.582 ^c	37.6 ^d	47.1 ^b
陽性対照群	—	73.4 ^a	1.479 ^a	43.9 ^a	48.9 ^{ab}
フィターゼ群	250	73.2 ^a	1.516 ^{ab}	41.4 ^c	53.1 ^a
	500	74.5 ^a	1.506 ^{ab}	43.4 ^{ab}	51.5 ^{ab}
比較対照群 (1)	250	71.1 ^a	1.491 ^{ab}	41.6 ^c	51.0 ^{ab}
	500	72.4 ^a	1.498 ^{ab}	41.9 ^{bc}	53.5 ^a
比較対照群 (2)	250	71.1 ^a	1.523 ^b	41.1 ^c	48.5 ^{ab}
	500	73.3 ^a	1.485 ^{ab}	42.2 ^{abc}	51.0 ^{ab}

各値は平均値

各項目の異文字間に有意差あり ($p \leq 0.05$)

3-2-2 豚（ペレット飼料）

(1) 方法

子豚（ピエトレン×RA-SE Genetics 種、去勢雄及び雌、4 週齢、平均体重 8.2 kg）を用いて、有効リン減量飼料（陰性対照群）、その有効リン減量飼料に A2P フィターゼを 125、250、500、1000 FTU/kg 飼料（それぞれ約 4.8、9.1、19.1、37.4 FTU/kg 体重/日）で添加した飼料（フィターゼ群）、をそれぞれ 42 日間給与した（1 群 10 頭（去勢雄 5 頭及び雌 5 頭）、3 反復）。

なお、飼料に含まれる有効成分は表 4 のとおり。

表 4 豚用飼料中の有効成分濃度

有効成分	有効リン減量飼料
有効リン濃度	0.15%
全リン濃度	0.44%
カルシウム濃度 前期用飼料(4~6 週齢)	0.55%
カルシウム濃度 後期用飼料(7~10 週齢)	0.56%

(2) 解析

試験結果の解析は回帰分析により行い、フィターゼ群とその他試験群との一次回帰及び二次回帰の有意性を検討した。

(3) 結果

増体について、フィターゼ群は、陰性対照と比較して用量依存的に高くなった。

飼料要求率について、フィターゼ群は、陰性対照と比較して用量依存的に低くなった。

中手骨灰分含量について、フィターゼ群は、陰性対照と比較して用量依存的に増加した。

全リンの消化率について、フィターゼ群は、陰性対照と比較して用量依存的に増加し

た。(表 5 参照)。^[参照 6]

表 5 豚用飼料に添加したときのフィターゼ給与効果

試験群	被験物質の投与量 (FTU/飼料 kg)	増体日量(g/日) ^a	飼料要求率 ^a	中手骨灰分含量(%) ^a	全リン消化率(%) ^{ab}
陰性対照群	—	351	1.61	33.1	44.2
フィターゼ群	125	400	1.63	42.0	45.4
	250	387	1.56	47.6	47.9
	500	440	1.54	53.6	49.4
	1000	436	1.51	61.6	52.4

各値は平均値

a：被験物質投与量との間に、有意な一次回帰あり (p<0.05)

b：被験物質投与量との間に、有意な二次回帰あり (p<0.05)

3-3 消化率の向上を確認する試験

3-3-1 鶏（ブロイラー）（ペレット飼料）

(1) 方法

ブロイラー雛（Ross 308 種、雄、6 日齢、平均体重 127 g）を用いて、有効リン減量飼料（陰性対照群）、有効リン添加飼料（陽性対照群）、その有効リン減量飼料に A2P フィターゼを 250、500 FTU/kg 飼料（それぞれ約 21、43 FTU/kg 体重/日）で添加した飼料（フィターゼ群）、比較対照フィターゼを同濃度で添加した飼料（比較対照群）をそれぞれ 30 日間給与した（1 群 20 羽、6 反復）。

なお、飼料に含まれる有効成分は表 6 のとおり。

表 6 飼料中の有効成分濃度

有効成分	前期後期	有効リン減量飼料	有効リン添加飼料
有効リン濃度	前期用飼料（6~21 日齢）	0.191%	0.341%
	後期用飼料（22~35 日齢）	0.162%	0.310%
全リン濃度	前期用飼料	0.48%	0.63%
	後期用飼料	0.46%	0.60%
カルシウム濃度	前期用飼料	0.65%	0.75%
	後期用飼料	0.60%	0.70%

(2) 統計解析

結果の解析は一元配置法により行い、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 の方法により各群の平均値間の差の有意性を検討した。

(3) 結果

増体について、フィターゼ各用量群は、陰性対照と比較して有意に高かった。

飼料要求率について、フィターゼ各用量群は、陰性対照と比較して低い傾向を示した。

脛骨灰分含量について、フィターゼ各用量群は、陰性対照と比較して有意に高かったが、陽性対照と比較して有意に低くなった。

全リンの消化率について、フィターゼ各用量群は、陰性対照及び陽性対照と比較して高い傾向を示し、陽性対照に比べ有意に高かった。

フィチン態リンの消化率について、フィターゼ各用量群は、陰性対照及び陽性対照に比べ有意に高かった。

斃死数について、各群間に有意差はなかった。

(表 7 参照)。[参照 7]

表 7 鶏用飼料に添加したときのフィターゼ給与効果

試験群	被験物質 の投与量 (FTU/飼 料 kg)	増体日量 (g/日)	飼料要求 率	脛骨灰分 含量 (%)	全リン消 化率 (%)	フィチン 態リン消 化率 (%)	斃死数 (羽)
陰性対照群	—	62.6 ^c	1.498	41.6 ^c	49.9 ^a	69.7 ^d	6
陽性対照群	—	76.6 ^a	1.462	49.4 ^a	38.7 ^b	56.6 ^e	4
フィターゼ 群	250	72.2 ^b	1.483	45.5 ^b	52.8 ^a	85.9 ^{bc}	10
	500	73.2 ^{ab}	1.474	46.5 ^b	51.8 ^a	95.0 ^a	5
比較対照群	250	73.0 ^{ab}	1.471	45.6 ^b	54.7 ^a	82.4 ^c	8
	500	74.8 ^{ab}	1.475	46.8 ^b	50.2 ^a	91.7 ^{ab}	7

各項目の異文字間に有意差あり ($p \leq 0.05$)

3-3-2 鶏（産卵鶏）（マッシュ飼料）

(1) 方法

産卵鶏（イサ・ブラウン種、雌、25 週齢、平均体重 1776 g）を用いて、有効リン減量飼料（陰性対照群）、有効リン添加飼料（陽性対照群）、その有効リン減量飼料に A2P フィターゼを 250、500 FTU/kg 飼料（それぞれ約 14.6、29.3 FTU/kg 体重/日）で添加した飼料（フィターゼ群）をそれぞれ 84 日間給与した（1 群 2 羽、22 反復）。

なお、飼料に含まれる有効成分は表 8 のとおり。

表 8 飼料中の有効成分濃度

有効成分	有効リン減量飼料	有効リン添加飼料
非フィチンリン濃度	0.18%	0.30%
全リン濃度	0.43%	0.55%
カルシウム濃度	3.63%	3.63%

(2) 統計解析

結果の解析は一元配置法により行い、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 の方法により各群の平均値間の差の有意性を検討した。

(3) 結果

産卵率、卵重について、フィターゼ各用量群は、陰性対照及び陽性対照と比較して有意差はなかった。陽性対照は陰性対照と比較して有意差はなかった。

飼料要求率について、フィターゼ各用量群は、陰性対照及び陽性対照と比較して有意差はなかった。陽性対照は陰性対照と比較して有意差はなかった。

脛骨灰分含量について、フィターゼ各用量群は、陰性対照と比較して有意に高かった。

全リンの消化率について、フィターゼ各用量群は、陰性対照及び陽性対照と比較して有意に高かった。

斃死数について、各群において発生しなかった。

(表 9 参照)。[参照 8]

表 9 鶏用飼料に添加したときのフィターゼ給与効果

試験群	被験物質 の投与量 (FTU/飼 料 kg)	産卵率 (%)	卵重(g)	飼料要求 率	脛骨灰分 含量 (%)	TP 消化 率 (%)	斃死数 (羽)
陰性対照群	—	96.3	59.32	1.929	47.97 ^b	25.18 ^b	0
陽性対照群	—	96.3	58.59	1.924	49.93 ^{ab}	23.98 ^b	0
フィターゼ 群	250	97.0	59.37	1.894	50.54 ^a	28.75 ^a	0
	500	97.0	58.84	1.909	52.06 ^a	30.90 ^a	0

各項目の異文字間に有意差あり (p≤0.05)

3-3-3 豚 (マッシュ飼料)

(1) 方法

子豚 (Naima×(ピエトレン×デュロック) 種、去勢雄、28 日齢、平均体重 9.95 kg) を用いて、有効リン減量飼料 (陰性対照群)、有効リン添加飼料 (陽性対照群)、その有効リン減量飼料に A2P フィターゼを 250 FTU/kg 飼料 (13.7 FTU/kg 体重/日) で添加した飼料 (フィターゼ群)、比較対照フィターゼを同濃度で添加した飼料 (比較対照群) をそれぞれ 42 日間給与した (1 群 1 頭、12 反復)。

なお、飼料に含まれる有効成分は表 10 のとおり。

表 10 飼料中の有効成分濃度

有効成分	前期後期	有効リン減量飼料	有効リン添加飼料
可消化リン濃度	前期用飼料 (試験日:0~21 日)	0.22%	0.32%
	後期用飼料 (試験日:22~42 日)	0.20%	0.30%
全リン濃度	前期用飼料	0.51%	0.61%
	後期用飼料	0.49%	0.60%
カルシウム濃度	前期用飼料	0.59%	0.75%
	後期用飼料	0.57%	0.73%

(2) 統計解析

結果の解析は乱塊法により行い、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 の方法により各群の平均値間の差の有意性を検討した。

(3) 結果

増体重について、フィターゼ各用量群は、陰性対照と比較して有意に高かった。

飼料要求率について、フィターゼ各用量群は、陰性対照と比較して有意に低かった。

中手骨灰分含量について、フィターゼ各用量群は、陰性対照と比較して有意に高かった。

全リンの消化率について、フィターゼ各用量群は、陰性対照と比較して有意に高かった (表 11 参照)。^[参照 9]

表 11 豚用飼料に添加したときのフィターゼ給与効果

試験群	被験物質の投与量(FTU/飼料 kg)	増体重(kg)	飼料要求率	中手骨灰分含量 (%)	全リン消化率 (%)
陰性対照群	—	26.9 ^b	2.202 ^a	29.9 ^b	27.6 ^b
陽性対照群	—	28.6 ^{ab}	2.010 ^b	33.8 ^a	40.7 ^a
比較対照群	250	29.4 ^a	1.929 ^b	34.3 ^a	46.8 ^a
フィターゼ群	250	30.0 ^a	1.916 ^b	34.6 ^a	48.4 ^a

各項目の異文字間に有意差あり (P≤0.05)

4 残留性に関する事項

4-1 消化性

フィターゼの人工胃液及び人工腸液中での消化性について、人工胃液中では処理後 60 分間でフィターゼの存在が認められたが、人工腸液内では、処理後 2 分間で完全に消失した。

5 安全性に関する事項

5-1 毒性試験

5-1-1 一般毒性試験

5-1-1-1 単回投与毒性試験

ラット（Fischer 344 系、雄 6 匹、体重 190～200 g）を用いて、20,000 mg/kg 体重（3,000,000 FTU/kg 体重以上）の A2P フィターゼを強制経口投与し、14 日間観察した。

観察期間中に死亡例が認められず、観察後の剖検においても明確な影響が肉眼で認められなかったことから、LD₅₀ は 20,000 mg/kg 体重以上（3,000,000 FTU/kg 体重以上）と考えられる。[参照 10]

5-1-1-2 反復投与毒性試験（短期）

（方法）

ラット（Wistar 系、雄雌各 10 匹、7 週齢、平均体重（雄）328.0 g、（雌）208.2 g）を用いて、0、100、500、1000 mg/kg 体重/日（30,000、150,000、300,000 FTU/kg 体重）の A2P フィターゼを 90 日間強制経口投与した

（統計解析）

結果の解析は、Dunnett 検定あるいは Kruskal-Wallis 検定により行い、A2P フィターゼ投与群と対照群との平均値間の差の有意性を検討した。

（結果）

- A. 一般症状及び死亡例について、異常な臨床所見は観察されず死亡例は発生しなかった。
- B. 増体重、飼料摂取量及び飼料効率について、異常はほぼ認められなかった。飼料摂取量のうち、雌におけるフィターゼ 100 及び 1,000 mg/kg 体重群は、対照群に対して有意に低くなった。
- C. 眼科的検査について、異常な所見は観察されなかった。
- D. 血液学的検査について、単球数、好中球数、MCH、MCHC、PT、APTT において対照群と比較して有意な差が見られたが、いずれも、背景データの範囲内での変動であって、用量依存性は見られなかったことから、毒性に関係するものではないと考えられた。
- E. 血液生化学的検査について、ナトリウム、クロール、カルシウム、ビリルビン、胆汁酸、LDH、ALT、AST、ALP、コレステロール、総たん白、アルブミン、グリブリン、A/G 比において対照群と比較して有意な差が見られたが、いずれも、背景データの範囲内での変動であって、用量依存性は見られなかったことから、毒性に関係するものではないと考えられた。
- F. 尿検査について、ウロビリノーゲン、尿蛋白、白血球及び尿比重に見られた用量依存的な変化は、フィターゼ投与によるたん白質摂取量の増加に起因している可能性を示しているが、血液学的検査及び血液生化学的検査結果には、これらの変化と関連する影響は見られない。
- G. 病理学的検査所見（器官重量、肉眼的所見、組織学的検査）について、フィターゼ

投与に関連する変化は認められなかった。

以上の結果から、A2P フィターゼは 1,000 mg/kg 体重/日までの濃度で投与による影響を与えないと考えられた。[参照 11]

5-1-2 特殊毒性試験

5-1-2-1 変異原性試験

A2P フィターゼの変異原性試験の結果を表 6 に示した。

表 12 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> TA 98、TA 100、TA 1535 及び TA 1537 <i>Escherchia coli</i> WP2uvrA	16、50、160、500、1,600、5,000 µg/plate (+/-S9)	陰性	添付資料 6
<i>in vivo</i>	小核試験	マウス (NMRI 系) 骨髓	500、1,000、2,000 mg/kg 体重 (24 時間間隔で 2 回強制経口投与)	陰性	添付資料 7

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 *in vivo* 系でマウスを用いた小核試験が実施された。結果は、いずれも陰性であった。

したがって、A2P フィタ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 12, 13]

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

ブロイラー雛 (Ross 308 種、雄雌、0 日齢、平均体重 42.2 g 雌) を用いて、基礎飼料 (対照群)、基礎飼料に A2P フィターゼを 500、50,000 FTU/kg 飼料 (それぞれ 39.2、3,885.2 FTU/kg 体重/日) で添加した飼料 (フィターゼ群) をそれぞれ 35 日間給与した (1 群 15 羽、26 反復)。

なお、飼料に含まれる有効成分は表 13 のとおり。

表 13 飼料中の有効成分濃度

有効成分	前期後期	有効リン減量飼料
------	------	----------

全リン濃度	前期用飼料（0～14 日齢）	0.656%
	中期用飼料（14～28 日齢）	0.543%
	後期用飼料（28～35 日齢）	0.501%
カルシウム濃度	前期用飼料	0.901%
	中期用飼料	0.800%
	後期用飼料	0.700%

（２）統計解析

結果の解析は一元配置法により行い、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 の方法により平均値の差の有意性を検討した。

（３）結果

増体重について、フィターゼ 50,000 FTU/kg 飼料群は、対照群と比較して有意に高かった。

飼料摂取量について、通常の範囲内であった。

飼料要求率について、フィターゼ各用量群は、対照群と比較して有意に低かった。（表 14 を参照）

斃死について、通常の範囲内であった。斃死及び淘汰の原因に関しては、以下のとおり（表 15 参照）。[参照 14]

表 14 鶏用飼料にフィターゼを添加したときの影響

試験群	被験物質の投与量(FTU/飼料 kg)	増体(g)	飼料摂取量(g)	飼料要求率	育成率(%)
対照群	—	73.3 ^b	105.4	1.434 ^a	97.2
フィターゼ群	500	72.9 ^b	103.5	1.419 ^b	97.9
	50,000	75.1 ^a	105.6	1.404 ^c	98.5

各項目の異文字間に有意差あり（ $p < 0.05$ ）

表 15 鶏用飼料にフィターゼを添加したときの斃死

原因	対照群（羽）	500 FTU/kg 飼料（羽）	50,000FTU/kg 飼料（羽）
急死症候群	2	2	2
腹水症	3	1	1
矮小淘汰	4	4	2
脚異常	2	0	0
腸ねん転	0	1	0
嘴異常	0	0	1

5－2－2 豚

（１）方法

子豚（ランドレース×デュロック種、去勢雄及び雌、28 日齢、平均体重 6.97 kg）を

用いて、基礎飼料（対照群）、基礎飼料に A2P フィターゼを 500、50,000 FTU/kg 飼料（それぞれ 21.0、2,095.2 FTU/kg 体重/日）で添加した飼料（フィターゼ群）をそれぞれ 42 日間給与した（1 群 4 頭、21 反復）。

なお、飼料に含まれる有効成分は表 15 のとおり。

表 15 飼料中の有効成分濃度

有効成分	前期後期	有効リン減量飼料
可消化リン濃度	前期用飼料（試験:0~2 週）	0.294%
	後期用飼料（試験:3~6 週）	0.280%
全リン濃度	前期用飼料	0.535%
	後期用飼料	0.523%
カルシウム濃度	前期用飼料	0.841%
	後期用飼料	0.800%

（２）統計解析

結果の解析は一元配置法により行い、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 の方法により平均値の差の有意性を検討した。

（３）結果

増体重と飼料摂取量について、通常の範囲内であった。

飼料要求率について、フィターゼ 50,000 FTU/kg 飼料群は、対照群と比較して有意に低かった。

健康状態について、異常な所見はみられなかった。[参照 15]

表 16 豚用飼料にフィターゼを添加したときの影響

試験群	被験物質の投与量(FTU/飼料 kg)	増体(g)	飼料摂取量(g)	飼料要求率	育成率(%)
対照群	—	399.8	642.0	1.6070 ^a	100
フィターゼ群	500	403.1	645.7	1.6031 ^a	98.8
	50,000	420.4	660.0	1.5704 ^b	100

6 審議結果

フィターゼ（企業推奨添加量：250 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。

- 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：豚、鶏、うずら

7 参照（参考文献及び参考資料）

1. Y. Dersjant-Li, A. Awati, H. Schulze and G. Partridge: Phytase in Non-ruminant Animal Nutrition: a Critical Review on Phytase Activities in the Gastrointestinal Tract and Influencing Factors, J. Sci. Food Agric., 95, 878-896, 2015
2. Q. Sciascia, G. Daş and C.C. Metges: REVIEW: The Pig as a Model for Humans: Effects of Nutritional Factors on Intestinal Function and Health, J. Anim. Sci., 94, 441-452, 2016
3. V. Ravindran: Feed Enzymes: The Science, Practice, and Metabolic Realities, J. Appl. Poult. Res., 22, 628-636, 2013
4. HUVEPHARMA: Comparative Feed Pelleting Test for OptiPhos® 5000 CT and OptiPhos® Plus 5000 G（社内資料）
5. K. Kozłowski, L. Nollet, A. Lanckriet, E. Vanderbeke, P. Mielnik, N. Outchkourov and S. Petkov: Effect of different phytases derived from *E. coli* AppA gene on the performance, bone mineralisation and nutrient digestibility of broiler chicken, Journal of Applied Animal Nutrition, Vol. 7; e7; page 1 of 9, 2019
6. C. De Cuyper, L. Nollet, M. Aluwé, J. De Boever, L. Doudah, E. Vanderbeke, N. Outchkourov, S. Petkov and S. Millet: Effect of supplementing phytase on piglet performance, nutrient digestibility and bone mineralization, Journal of Applied Animal Nutrition online, 2020
7. Joris Michiels: Effect of phytases administered in broiler feed on P retention, bone mineralisation and performance, Bone Mineralisation and Nutrients Digestibility of Broiler Chicken, Ghent University, Laboratory for Animal Nutrition and Animal Product Quality (LANUPRO), 2018.（社内資料）
8. J. Jankowski, D. Mikulski and K. Kozłowski: Efficacy of TSP 161 Phytase in Laying Hens, Olsztyn University of Warmia and Mazury, 2019.（社内資料）
9. Zuzanna Wiśniewska, Lode Nollet, Anouk Lanckriet, Erik Vanderbeke, Spas Petkov, Nikolay Outchkourov, Małgorzata Kasprończ-Potocka, Anita Zaworska-Zakrzewska and Sebastian A. Kaczmarek: Effect of Phytase Derived from the *E. coli* AppA Gene on Weaned Piglet Performance, Apparent Total Tract Digestibility and Bone Mineralization, Animals, 10, 121, 2020
10. Biovet : Study on the acute oral toxicity of Optiphos Plus - liquid concentrate (Huvepharma) in albino rats (Fischer - 344), 2020.（社内資料）
11. J. Nováková: Phytase TSP 161 Concentrate, 90-day Oral Toxicity Study with 14-day Recovery in Rats, MediTox, 2019.（社内資料）
12. A. Vértesi: Bacterial Reverse Mutation Assay with Phytase TSP 161 Concentrate, TOXI-COOP ZRT., 2018.（社内資料）
13. E. Béres: Phytase TSP 161 Concentrate Mouse Micronucleus Test, TOXI-COOP ZRT., 2018.（社内資料）
14. D. Currie: Evaluation of the Tolerance of Phytase TSP161 in Administered in Feed in Broilers, Roslin Nutritional Ltd., 2019.（社内資料）

15.D. Currie: To Evaluate the Tolerance of Phytase TSP161 in Weaned Piglets, Roslin Nutritional Ltd., 2019. (社内資料)

<別紙 1 : 検査値等略称>

略称	名称
MCH	平均赤血球ヘモグロビン量
MCHC	平均赤血球ヘモグロビン濃度
PT	プロトロンビン時間
APTT	活性化部分トロンボプラスチン時間
LDH	乳酸脱水素酵素
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ALP	アルカリホスファターゼ
A/G 比	アルブミン及びグロブリン量の比

フィターゼ（その２の（７））の成分規格等（案）

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 150,000 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、帯緑褐色の液体である。
- ② 本品の水溶液（1→100）の pH は、4.0～5.0 である。
- ③ 本品は、pH 2.5～5.5 において最大の酵素活性を有する。

純度試験

- ① 鉛 本品 1.0 g (0.95～1.04 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 µg/g 以下でなければならない。このとき、鉛標準液は、0.5 mL を全量ピペットを用いて量り、10 mL の全量フラスコに入れ、硝酸（1→150）を標線まで加えて 10 mL とし、標準液とする。
- 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 4 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、100 mL の全量フラスコに入れ、ポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液（pH 5.5）80 mL を加え、回転子を用いて室温で 30 分間攪拌した後、回転子を取り出し、同緩衝液を標線まで加えて 100 mL とし、試料原液とする。この試料原液適量をマイクロピペットを用いて量り、1 mL あたりの濃度が約 0.1 フィチン酸分解力単位となるように同緩衝液を加え正確に希釈し、試料溶液とする。

(イ) 製造の方法の基準

Komagataella phaffii 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（7））製造用原体に安息香酸ナトリウムを加えた後、塩酸を用いて pH を調整し、必要に応じて水及び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 4 法により試験を行う。

試料溶液の調製 本品 1 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、ポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液 (pH 5.5) 80 mL を加え、回転子を用いて室温で 30 分間攪拌した後、回転子を取り出し、同緩衝液を標線まで加えて 100 mL とし、試料原液とする。この試料原液適量をマイクロピペットを用いて量り、1 mL あたりの濃度が約 0.1 フィチン酸分解力単位となるように同緩衝液を加え正確に希釈し、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（7））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（7））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（7））製造用原体を噴霧乾燥した後、小麦粉及び α -デンプンを加えた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4法により試験を行う。

試料溶液の調製 本品 1 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の三角フラスコに入れ、ポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液 (pH 5.5) 100 mL を加え、回転子を用いて室温で 30 分間攪拌した後、約 2 mL を 11,000×g で 3 分間遠心分離し、得られた上澄液を試料原液とする。この試料原液適量をマイクロピペットを用いて量り、1 mL あたりの濃度が約 0.1 フィチン酸分解力単位となるように同緩衝液を加え正確に希釈し、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 (7)) 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 (7)) 製造用原体の表示の基準を準用する。

エ 製剤 (その 3)

(ア) 成分規格

本品は、フィターゼ (その 2 の (7)) 製造用原体に、小麦粉を加えて乾燥した後、植物油及びグリセリン脂肪酸エステルで被覆し、必要に応じてもみがらを加え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4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 (7)) 製剤 (その 2) 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 (7)) 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 (7)) 製造用原体の表示の基準を準用する。

〔上記修正案に規定する一般の試験法で、成分規格等省令別表第2の6に新たに追加する必要があるものの規定案〕

6 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

(IV) 第4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2.00 g（1.95～2.04 g）を量り、0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液（pH 5.5）200 mLを加えて溶解し、6 mol/L 塩酸でpHを5.5に調整した後、250 mLの全量フラスコに入れ、同緩衝液を標線まで加えて250 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 100.0 g（99.95～100.04 g）に水を加えて溶かし、25%アンモニア水 10 mLを加えた後、水を加えて1,000 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 2.35 g（2.345～2.354 g）に50～60℃に温めた水 400 mLを加えて溶かし、硝酸（1→3）20 mLを加え、更に水を加えて1,000 mL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。試料溶液 0.1 mLをマイクロピペットを用いて量り、12×150 mmの試験管に入れ、ポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液（pH 5.5）0.3 mLをマイクロピペットを用いて加え混合し、37±0.5℃に加熱し、5分間放置する。この試料溶液に、あらかじめ37±0.5℃に加熱した基質溶液 0.8 mLをマイクロピペットを用いて加え混合し、37±0.5℃で正確に30分間放置する。その後、反応停止発色液 0.8 mLをマイクロピペットを用いて加え混合し、試験反応溶液とする。

別に試料溶液 0.1 mLをマイクロピペットを用いて量り、12×150 mmの試験管に入れ、ポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液（pH 5.5）0.3 mLをマイクロピペットを用いて加

え混合し、 37 ± 0.5 °Cに加温し、5 分間放置する。この試料溶液に反応停止発色液 0.8 mL をマイクロピペットを用いて加え、さらにあらかじめ 37 ± 0.5 °Cに加温した基質溶液 0.8 mL をマイクロピペットを用いて加え混合し、試験対照溶液とする。

試験反応溶液及び試験対照溶液を室温で 10 分間放置した後、 $11,000\times g$ 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 415 nm における吸光度 OD_T 及び OD_{TB} を測定する。

1 g 中のフィチン酸分解力単位

$$=(OD_T - OD_{TB}) \times F \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{W} \times Z$$

OD_T : 試験反応溶液の平均吸光度

OD_{TB} : 試験対照溶液の平均吸光度

Z : 希釈倍率

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)

検量線の作成

リン酸二水素カリウム約 10 g を 105 °Cで 2 時間乾燥させた後、デシケーターで保存し、その 0.682 g ($0.6715\sim0.6824$ g) を量り、ポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液 (pH 5.5) を加えて溶かし、100 mL の全量フラスコに入れ、さらに同緩衝液を標線まで加えて 100 mL としたものを標準原液とする。

標準原液を順次水で正確に 2 倍、4 倍、8 倍及び 16 倍に希釈し、標準液とする。

各標準溶液 0.04 mL をマイクロピペットを用いて量り、 $12\times150\text{mm}$ の試験管に入れ、ポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液 (pH 5.5) 0.36 mL をマイクロピペットを用いて加え混合した後、基質溶液 0.8 mL 及び反応停止発色液 0.8 mL をマイクロピペットを用いて加え混合したものを、リン酸標準反応溶液とする。リン酸標準反応溶液を室温で 10 分間放置した後、 $11,000\times g$ 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_{S1} 、 OD_{S2} 、 OD_{S3} 及び OD_{S4} を測定する。

別にポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液 (pH 5.5) 0.4 mL をマイクロピペットを用いて量り、12×150mm の試験管に入れ、基質溶液 0.8 mL 及び反応停止発色液 0.8 mL をマイクロピペットを用いて加えて混合したものを、リン酸標準対照溶液とする。リン酸標準対照溶液を室温で 10 分間放置した後、 $11,000\times g$ 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 415 nm における吸光度 OD_B を測定する。

リン酸濃度を縦軸に、測定したリン酸標準反応溶液とリン酸標準対照溶液の吸光度差 ($OD_{S1}-OD_B$)、($OD_{S2}-OD_B$)、($OD_{S3}-OD_B$) 及び ($OD_{S4}-OD_B$) を横軸にとり、検量線を作成する。

〔上記修正案に規定する標準品及び試薬・試液で、成分規格等省令別表第 2 の 7 に新たに追加又は既存の内容を改正する必要があるものの規定案〕

(2) 試薬・試液

(削除)

- ・ 0.25 mol/L 酢酸塩酸緩衝液：酢酸ナトリウム 34.02g (34.015～34.024g) に水を加えて溶かし、塩酸で pH を 5.5 に調整し、水を加えて 1,000mL とする。

(追加)

- ・ 0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液 (pH 5.5)：酢酸ナトリウム 34.02g (34.015～34.024g) に水を加えて溶かし、塩酸で pH を 5.5 に調整し、水を加えて 1,000mL とする。