

## $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナ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。

令和 8 年 1 月 9 日付け 7 消安第 5479 号をもって諮問された  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナーゼについて、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. 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 :  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナーゼ

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 8 年 1 月 9 日 諮問

令和 8 年 1 月 13 日 飼料添加物効果安全性小委員会

令和 8 年 4 月 20 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. 2～17 のとおり）。

基準及び規格を作成した（資料 P. 18～25 のとおり）。

## 飼料添加物の効果安全性について（案）

$\alpha$ －ガラクトシダーゼ・キシラナーゼ

令和8年6月5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	6
3-1	効果を裏付ける基礎的試験 ( <i>in vitro</i> )	6
3-1-1	酵素の最大活性を示す温度及び pH	6
3-1-2	ペレット加工温度が酵素活性に及ぼす影響	6
3-2	効果を裏付ける野外応用試験	7
3-2-1	鶏 (ブロイラー)	7
3-2-2	鶏 (ブロイラー)	7
3-2-3	鶏 (ブロイラー)	8
4	安全性に関する事項	10
4-1	毒性試験	10
4-1-1	一般毒性試験	10
4-1-1-1	単回投与毒性試験 (ラット)	10
4-1-2	特殊毒性試験	11
4-1-2-1	遺伝毒性試験	11
4-2	対象家畜等を用いた飼養試験	12
4-2-1	鶏	12
4-2-2	鶏	13
5	審議結果	15
6	参照 (参考文献及び参考資料)	16

## α-ガラクトシダーゼ・キシラナーゼに関する効果安全性について

### 1 名称等

一般名：α-ガラクトシダーゼ

化学名：alpha-galactosidase

CAS 番号：9025-35-8

EC 番号：3.2.1.22

一般名：キシラナーゼ

化学名：endo-1,4-beta-xylanase

CAS 番号：9025-57-4

EC 番号：3.2.1.8

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 14～20 GALU<sup>\*1</sup>・18～25 AXC<sup>\*2</sup>/kg 飼料

<sup>\*1</sup> 1 GALU は 37 °C、pH 5.5 の条件にてパラニトロフェニル-α-D-ガラクトピラノシド 1 μmol を 1 分間に分解する量に相当する。

<sup>\*2</sup> 1 AXC は 30 °C、pH 4.7 の条件にてアラビノキシラン 0.058 μmol を 1 分間にキシロースへ分解する量に相当する。なお、1 AXC は 2.0858 キシラン糖化単位に相当する

### 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および使用状況等

α-ガラクトシダーゼは、大豆等の飼料に含まれる難消化性オリゴ糖の一種であるα-ガラクトシドを加水分解する酵素である。

キシラナーゼは、大豆、とうもろこし、小麦等の飼料に含まれる、難消化性の非でんぷん質多糖類（NSP）の一種であるキシランを加水分解する酵素である。NSP は腸管内における消化物の粘度を高め、栄養素の吸収効率を低下させることが知られており、これらはエネルギー効率を阻害する可能性がある。

α-ガラクトシドは腸管内のオスモル濃度を上昇させ、腸管内容物の通過速度を促進することが知られている。

今回指定の要望があったα-ガラクトシダーゼ・キシラナーゼは、*Aspergillus tubingensis* 由来のα-ガラクトシダーゼと *Trichoderma orientale* 由来のキシラナーゼの合剤である。

α-ガラクトシダーゼ及びキシラナーゼ 2 種の酵素を飼料中に添加することにより、飼料効率の改善が期待される。

本剤は、EU において、ブロイラーへの使用が認められている他、中国、タイ等の諸外国において鶏、豚、養殖水産動物への使用が認められている。【参照 1】

国内においては、平成 10 年に *Trichoderma longibrachiatum* 由来のキシラナーゼが飼料添加物として指定されている。α-ガラクトシダーゼについては、現時点で飼料添加物としての指定はないものの、構造上類似する酵素としてラクターゼが飼料添加物として指定されている。

本 α-ガラクトシダーゼの生産菌である *Aspergillus tubingensis* は *Aspergillus niger* var. *tubingensis* に相当し、現在は別種であるものの、多くの飼料添加物の生産菌として利用されている *Aspergillus niger* と近縁の種とされている。本キシラナーゼの生産菌株は、諸外国での承認時 *Trichoderma longibrachiatum* とされていたが、その後 ITS 領域の解析及び GenBank データベースに存在する配列と比較した遺伝子解析が実施され、従来は区別が困難であった *Trichoderma longibrachiatum* と近縁の種である *Trichoderma orientale* であることが確認された。また、今回指定の要望の対象となった製品の製造に用いる菌株は、いずれもマイコトキシン等、飼料添加物として与える上で有害な物質を産生しないことを確認している。【参照 1】【参照 2】【参照 3】【参照 4】【参照 5】

### 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*)

##### 3-1-1 酵素の最大活性を示す温度及び pH

今回指定の要望があったキシラナーゼ及び  $\alpha$ -ガラクトシダーゼについて、それぞれ活性を示す適切な温度と pH を確認した。

$\alpha$ -ガラクトシダーゼは 40~45°C、pH 4.5~6.5 で、キシラナーゼは 45~50 °C、pH 4.5~6.0 で高い活性を示すことを確認した (図 1 参照)。**【参照 6】**

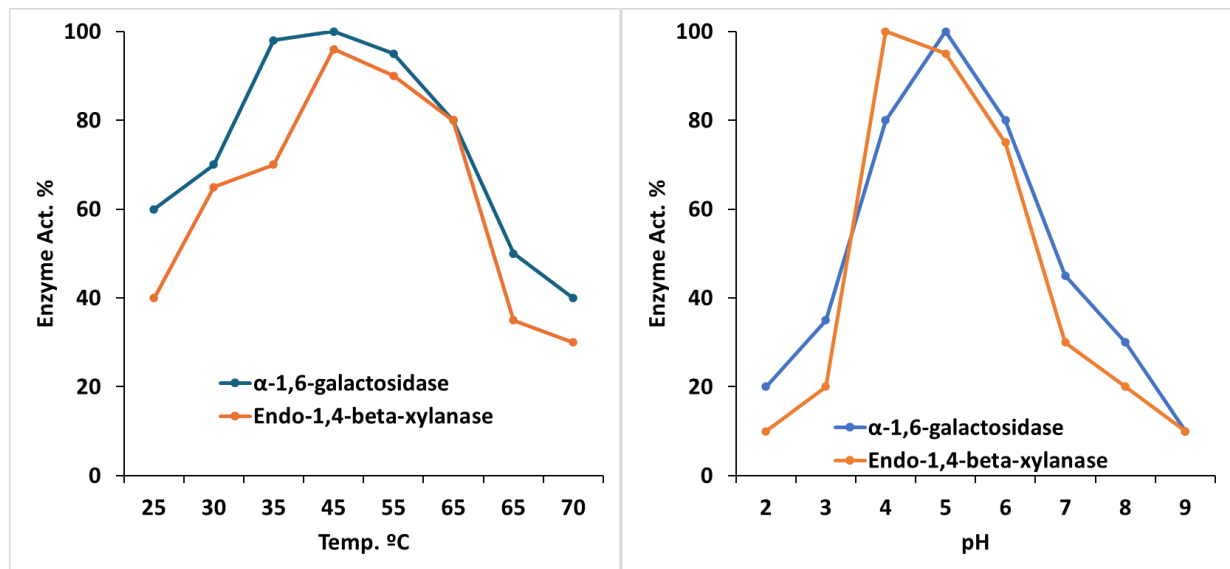


図 1：酵素の最大活性を示す温度及び pH

##### 3-1-2 ペレット加工温度が酵素活性に及ぼす影響

今回指定の要望があった  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナーゼ合剤について、ペレット加工温度及び加熱時間が酵素活性に及ぼす影響を評価した。

95 °Cのペレット加工による加熱においては、30秒で89%、1分で87%の活性が維持されたものの、100 °Cの加熱においては、30秒で83%、1分で80%まで活性が減少した (図 2 参照)。**【参照 7】**

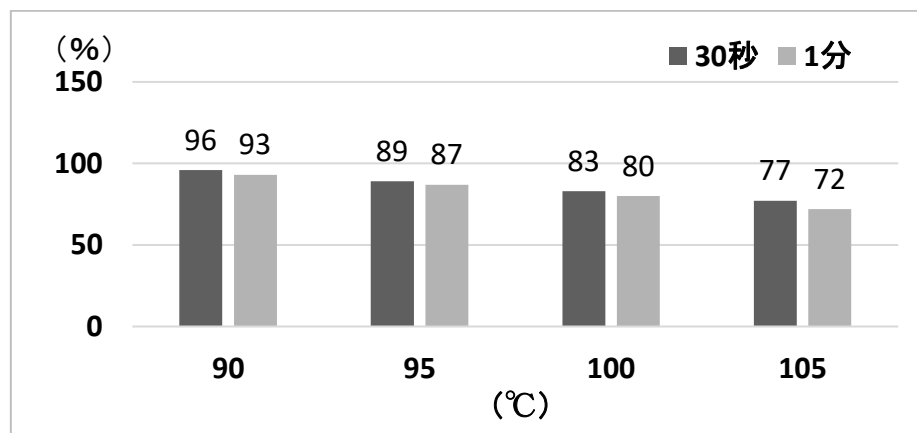


図 2：ペレット加工温度が  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナーゼ合剤に及ぼす影響

### 3-2 効果を裏付ける野外応用試験

#### 3-2-1 鶏（ブロイラー）

##### (1) 方法

ブロイラー（Cobb500、雌、1日齢）390羽を用い、小麦、ライ麦、とうもろこし及び大豆粕を主体とした対照飼料（対照群）、対照飼料に $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナーゼ合剤を350 ppm（14 GALU/kg 及び 17.5 AXC 飼料）（350 ppm 群）、500 ppm（20 GALU 及び 25 AXC /kg 飼料）（500 ppm 群）を添加した飼料をそれぞれ35日間給与した。各群の試験開始時体重は、それぞれ39.8、39.9、39.9 gであった（1群10羽、各13反復）。

##### (2) 統計解析

試験結果の解析は、SAS 9.4 ソフトウェアを用いて、有意水準は5%として一元配置分散分析及び Tukey test により検証された。

##### (3) 結果

各項目の測定結果を表1に示した。

1日あたりの被験物質摂取量は350 ppm 群で0.61~37.9 GALU/体重 kg/Day 及び0.76~47.3 AXC/体重 kg /Day、500 ppm 群で0.87~53.5 GALU/体重 kg/Day 及び1.08~66.9 AXC/体重 kg/Day と推定された。

対照群と比して、350 ppm 群では日増体量に有意な増加がみられ、500 ppm 群では飼料要求率が有意に低かった。【参照8】

表1 鶏用飼料に添加したときのブロイラーへの給与効果

	対照群	350 ppm 群	500 ppm 群
日増体(g/day)	67.2 <sup>a</sup> ±2.199	69.6 <sup>b</sup> ±2.271	69.3 <sup>ab</sup> ±2.199
飼料摂取量(g/day)	106.2±3.822	107.9±4.002	106.7±3.822
飼料要求率	1.58 <sup>a</sup> ±0.036	1.55 <sup>ab</sup> ±0.04	1.54 <sup>b</sup> ±0.036

各項目の数値は平均値±標準偏差

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

#### 3-2-2 鶏（ブロイラー）

##### (1) 方法

ブロイラー（Ross308、雄、1日齢、試験開始時体重41g）870羽を用い、小麦、ライ麦、トウモロコシ、大豆粕を主体とした対照飼料（対照群）、対照飼料に $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナーゼ合剤を350 ppm（14 GALU/kg 及び 17.5 AXC）（350 ppm 群）添加した飼料をそれぞれ35日間給与した（1群15羽、各29反復）。

##### (2) 統計解析

試験は無作為化完全区画法により設計され、試験結果の解析は、STATISTICA 13.1 を用いて、Student の t 検定により検証された。有意差は P 値が0.05 以下の時に認められ、P 値が0.05 より大きく0.10 以下の場合は有意傾向とされた。

##### (3) 結果

各項目の測定結果を表2に示した。

1日あたりの被験物質摂取量は350 ppm群で0.57～33.4 GALU及び0.71～41.7 AXC/体重 kg /Day と推定された。

対照群と比して、350 ppm 群では日増体量の有意な増加及び飼料要求率の有意な減少が認められた。【参照9】

表2 鶏用飼料に添加したときのブロイラーへの給与効果

	対照群	350 ppm 群
日増体(g/day)	63.6±2.9 <sup>a</sup>	67.7±2.3 <sup>b</sup>
飼料摂取量(g/day)	97.8±2.9	97.7±2.5
飼料要求率	1.542±0.054 <sup>a</sup>	1.445±0.035 <sup>b</sup>

各項目の数値は平均値±標準偏差

各項目内の異文字間に有意差あり (p≤0.05)

### 3-2-3 鶏 (ブロイラー)

#### (1) 方法

ブロイラー (Ross308、雄、21日齢) 96羽を用い、0.3%の酸化クロムを添加した対照飼料 (対照群)、対照飼料に  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナーゼ合剤を350 ppm (14 GALU 及び 17.5 AXC /kg 飼料) (350 ppm 群) 添加した飼料をそれぞれ3日間の順化期間の後、4日間給与した。

各ケージごとに、排泄物を回収し、80℃、24時間にて乾燥させたのち、乾燥減量、総エネルギー、見かけの代謝エネルギー (AME)、窒素補正した見かけの代謝エネルギー (AMEn) を測定した。また試験終了日の排泄物については、粗蛋白及びアミノ酸を測定した。試験終了時に、回腸内容物を回収し、各ケージごとに乾燥重量、粗蛋白、アミノ酸、酸化クロム比率を測定し、アミノ酸利用効率を算出した。各群の試験開始時体重は、それぞれ1,288g、1,302gであった。(1群8羽、各6反復)

#### (2) 統計解析

試験結果の解析は、SAS 9.4 ソフトウェアを用いて、ANOVA が実施された。群間の有意差は Duncan's 多重範囲検定により検証された。

#### (3) 結果

各項目の測定結果を表3及び表4に示した。

1日あたりの被験物質摂取量は、350 ppm 群で4.51～5.87 GALU 及び5.64～7.34 AXC/体重 kg /Day と推定された。

対照群と比して、AME 及び AMEn は有意に高値を示した。また、システイン及びプロリンについて、アミノ酸利用効率が有意に高値を示したものの、タンパク質全体及び他のアミノ酸の利用効率に差は認められず、本結果のみからは被験物質添加によるアミノ酸の利用効率改善への寄与は明確ではないと考えられる。【参照10】

表3 鶏用飼料に添加したときのブロイラーへの給与効果

	対照群	350 ppm 群
日増体 (g/day)	375	392
飼料摂取量 (g/day)	546	561
飼料要求率 (kg/kg)	1.460	1.433
AME (乾燥) (Kcal/kg)	3517 <sup>a</sup>	3549 <sup>b</sup>
AMEn (乾燥) (Kcal/kg)	3312 <sup>a</sup>	3341 <sup>b</sup>

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

表 4 鶏用飼料に添加したときのブロイラーのアミノ酸利用効率

(%)	対照群	350 ppm 群
タンパク質	70.33	72.08
システイン	63.48 <sup>a</sup>	66.79 <sup>b</sup>
ロイシン	59.89	63.58
ヒスチジン	58.55	62.82
アスパラギン酸	60.87	63.98
プロリン	59.45 <sup>a</sup>	63.56 <sup>b</sup>

各値は平均値

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

## 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）

###### (1) 方法

ラット（Sprague Dawley、雌雄、約 34 日齢）に、飼料に  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナーゼ合剤を 0、0.12、0.60、1.20% で添加し、90 日間連続給与した（1 群雌雄各 10 匹）。体重当たりの被験物質摂取量は、1.20% 添加群において 42.3mg/kg 体重であった。

###### (2) 統計解析

試験結果の解析には SAS 9.3 ソフトウェアを使用し、有意水準 5% で一元配置分散分析を実施した。群間の平均値の比較は、Student の t 検定および Tukey 検定により検証した。

###### (3) 結果

各項目の測定結果を表 5 に示した。

死亡例はなく、臨床観察において、一般状態に異常は認められなかった。

体重、摂餌量、眼科学的検査、血液生化学的検査及び血液学的検査において、有意な差は認められなかった。

臓器重量について、0.12% 及び 1.20% 添加群において、対照群と比して、雌の脳相対重量に有意な低値 ( $p=0.0099$ ) がみられた。一方、絶対重量において差は認められず、臨床所見には有害事象がみられなかったこと及び組織学的検査において異常がみられなかったことから、有害事象ではないと考えられる。

以上の結果から、NOAEL は 1.20% (600 AXC/kg 及び 480 GALU/kg、42.3 mg/kg 体重) と考えられた。【参照 11】

表 5 ラットを用いた反復毒性試験の結果

試験群及び投与量 (g/kg 飼料)		0 (対照群)	1.2	6.0	12.0
一般症状及び死亡率		所見－ 0%	所見－ 0%	所見－ 0%	所見－ 0%
平均増体量 (g/日)	雄	3.93±0.35	4.14±0.38	4.06±0.31	4.17±0.33
	雌	1.46±0.26	1.66±0.22	1.55±0.15	1.66±0.30
臨床検査所見	一般状態の観察	－	試験 42 日目 において、雄 の瞳孔の大き さが対照と比 較して有意に 大きかった。	試験 42 日目 において、雄 の瞳孔の大き さが対照と比 較して有意に 大きかった。	－
	血液学的検査	－	－	－	－

	血液生化学的検査	-	-	-	-
	尿検査	-	-	-	-
病理学的検査所見	肉眼的観察	-	-	-	-
	器官重量				
	絶対重量 (g)				
	脳 雄	1.990±0.11	2.059±0.11	1.982±0.12	2.028±0.10
	雌	1.897±0.09	1.867±0.11	1.871±0.09	1.830±0.07
	相対重量 (% 1w)				
	脳 雄	0.411±0.02	0.411±0.03	0.400±0.04	0.402±0.04
	雌	0.756±0.06 <sup>a</sup>	0.693±0.05 <sup>bc</sup>	0.722±0.04 <sup>abc</sup>	0.681±0.05 <sup>c</sup>
雌の脳重量 (相対重量) 中央値	0.755	0.681	0.731	0.68	
組織学的検査	-	-	-	-	

- : 異常なし

臨床検査所見及び病理学的検査所見は有意差のみられた項目のみ記載した。

各値は平均値±標準偏差

各項目内の異文字間に有意差あり (p<0.05)

#### 4-1-2 特殊毒性試験

##### 4-1-2-1 遺伝毒性試験

α-ガラクトシダーゼ・キシラナーゼ合剤の遺伝毒性試験の結果を表6に示した。結果はいずれも陰性であった【参照12、13】。

表6 遺伝毒性試験結果

分類	試験	対象	用量	結果	参照
in vitro	復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98、TA100、 TA1535、TA1537 <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	0、50、158、500、1,581、 5,000 µg/plate (+S9/-S9) 0、100、1266、707、1,880、 5,000 µg/plate (+S9/-S9)	陰性	参照 12
	哺乳類細胞小核試験	ヒト末梢血リンパ球	0、500、1000、2000 µg /mL (+S9/-S9) 3時間処理 0、500、1000、2000 mg/mL (-S9) 24時間連続処理	陰性	参照 13

#### 4-2 対象家畜等を用いた飼養試験

#### 4-2-1 鶏

##### (1) 方法

ブロイラー (Ross 708、雄、1日齢、平均体重 42.6g) 504羽を用いて、小麦、大豆粕、トウモロコシ、ライ麦を主体とする基礎飼料 (対照群)、基礎飼料に  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナーゼ合剤を 0.35 g/kg 飼料 (17.5AXC/kg 飼料及び 14GALU/kg 飼料)、5 g/kg 飼料添加した飼料をそれぞれ 35日間給与した (1群 12又は 15羽、1試験群あたり 12反復)。体重は 0, 10, 28, 35日目に測定され、飼料摂取量は各飼育区ごと 0~10日、10~28日、28~35日の各期間で記録された。体重当たりの  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナーゼ合剤摂取量は、0.35 g/kg 添加群で 0.82~27.1 GALU/体重 kg/日及び 1.03~33.9AXC/体重 kg/日、5 g/kg 添加群で 111~3820GALU/体重 kg/日及び 138~4770AXC/体重 kg/日であった。

##### (2) 統計解析

試験結果の解析は、SAS 9.3 ソフトウェアを用いて、ANOVA が実施された。群間の有意差は Student の t 検定及び Tukey test により検証された。

##### (3) 結果

各項目の測定結果を表 7 に示した。

試験期間中、全ての群で、死亡例はなく、一般状態は良好であった。

体重、平均日増体量及び飼料摂取量について、いずれの期間においても有意な差は認められなかった。

飼料要求率は、5 g/kg 添加群で、0~10日の期間において対照群及び 0.35 g/kg に対して有意に減少し ( $p \leq 0.05$ )、全期間において対照群に比して減少傾向を示した ( $0.05 < p \leq 0.10$ )。(表 7 参照) 【参照 14】

表 7 鶏用飼料に添加したときの  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナーゼ合剤の安全性

試験群	対照群	0.35 g/kg 添加群	5 g/kg 添加群
飼料要求率 (飼料摂取量/日増体)			
0~10日	2.04 <sup>b</sup> ±0.0571	2.00 <sup>b</sup> ±0.0571	1.81 <sup>a</sup> ±0.0571
10~28日	2.09±0.0595	2.07±0.0595	1.95±0.0595
28~35日	2.21±0.0473	2.20±0.0473	2.11±0.0473
全期間 (0~35日)	2.14 <sup>B</sup> ±0.0451	2.12 <sup>AB</sup> ±0.0451	2.00 <sup>A</sup> ±0.0451

各値は平均±標準誤差。

a,b: 異文字間に有意差あり ( $p \leq 0.05$ )

A,B: 異文字間に有意傾向あり ( $0.05 < p \leq 0.10$ )

## 4-2-2 鶏

### (1) 方法

ブロイラー (Ross308、雄、1日齢、試験開始時体重 45.8 g) 1900羽を用いて、原材料の構成および栄養成分設計が異なる基礎飼料 A (Tr1) 及び基礎飼料 B (Tr4)、各基礎飼料に  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナーゼを 350g/t 飼料それぞれ添加した飼料 (Tr2 及び Tr5)、基礎飼料 A に  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナーゼを 50,000 g/t 飼料添加した飼料 (Tr3) をそれぞれ 35 日間給与した。(1 群 20 羽、19 反復)

### (2) 統計解析

試験結果は SAS 9.4 ソフトウェアを用いて解析された。一元配置分散分析 (Tr1、Tr2、Tr3) もしくは基礎飼料及び酵素添加を因子として、二元配置分散分析を実施し、群間の差異は Tukey 法もしくは Tukey-Kramer 法により評価された。

### (3) 結果

各項目の測定結果を表 8 及び表 9 に示した。

体重当たりの被験物質摂取量は、Tr2 (350 g/t 添加) で 0.58~34.4 GALU/体重 kg/日及び 0.73~43.0 AXC/体重 kg/日、Tr3 (50,000 g/t 添加) で 80.5~4840 GALU/体重 kg/日及び 101~6050 AXC/体重 kg/日、Tr5 (350 g/t 添加) で 0.58~34.2 GALU/体重 kg/日及び 0.72~42.7 AXC/体重 kg/日であった。

試験期間中の一般状態は良好であった。各群の死亡率は 1.1 % から 4.2 % の範囲であり、無添加群 (Tr1 及び Tr4) の死亡率 1.7 % 及び 350 g/t 添加群 (Tr2 及び Tr5) の死亡率 3.2 % の間に統計学的有意差がみられたものの ( $p=0.076$ )、50,000 g/t 添加群 (Tr3) の死亡率 2.6 % との間に統計学的有意差は認められず、偶発的な変化と考えられた。

飼料摂取量について、各処理群間に統計学的に有意な差は認められなかった。

全期間における日増体量は、無添加群 (Tr1 及び Tr4) と比して、350 g/t 添加群 (Tr2 及び Tr5) において有意な増加がみられた ( $p=0.007$ )。

飼料要求率について、無添加群 (Tr1 及び Tr4) と比して、350 g/t 添加群 (Tr2 及び Tr5) において有意な低下が認められた ( $p=0.001$ )。

50,000 g/t 添加群 (Tr3) について、無添加群 (Tr1) と比して日増体量 ( $p=0.031$ )、飼料摂取量 ( $p=0.024$ ) 及び飼料要求率 ( $p<0.001$ ) に有意な改善が認められた。【参照 15】

表 8 2種の鶏用飼料に添加したときの  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナーゼ合剤の効果

試験群	無添加群 (Tr1 及び Tr4)	350g/t 添加群 (Tr2 及び Tr5)
基礎飼料	A (Tr1) 又は B (Tr4)	A (Tr2) 又は B (Tr5)
日増体(g/day)	72.7 <sup>a</sup>	74.0 <sup>b</sup>
飼料摂取量(g/day)	112.5	112.2
飼料要求率	1.55 <sup>a</sup>	1.52 <sup>b</sup>

各値は平均値。

a,b: 異文字間に有意差あり ( $p\leq 0.05$ )

表9 鶏用飼料に添加したときの $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナーゼ合剤の安全性

試験群	無添加群 (Tr1)	350 g/t 添加群 (Tr2)	50,000 g/t 添加群 (Tr3)
基礎飼料	A	A	A
死亡率 (%)	2.4	2.2	2.6
日増体(g/day)	73.2	73.8	75.2
飼料摂取量(g/day)	113.8 <sup>a</sup>	112.3 <sup>ab</sup>	110.8 <sup>b</sup>
飼料要求率	1.56 <sup>a</sup>	1.52 <sup>b</sup>	1.47 <sup>c</sup>

各値は平均値。

a,b: 異文字間に有意差あり ( $p \leq 0.05$ )

## 5 審議結果

$\alpha$ -ガラクトシダーゼ・キシラナ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：肉養鶏

## 6 参照（参考文献及び参考資料）

1. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) et al. “Safety and efficacy of a feed additive consisting of  $\alpha$ -galactosidase (produced by *Aspergillus tubingensis* ATCC SD6740) and endo-1,4- $\beta$ -xylanase (produced by *Trichoderma longibrachiatum* CBS 139997) (Capsozyme SB Plus) for chickens for fattening, chickens reared for laying and minor poultry species (for fattening and reared for laying) (Industrial Técnica Pecuaria S.A).” : EFSA journal(2021) 19(12):e06981.
2. Annex\_20\_taxonomic identification\_Trichoderma
3. Annex\_22\_Trichoderma\_genome sequencing\_additional info
4. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) et al. “Safety and efficacy of Capsozyme SB Plus ( $\alpha$ -galactosidase and endo-1,4- $\beta$ -xylanase) as a feed additive for poultry species for fattening or reared for laying and ornamental birds) .” : EFSA journal(2020) 2020;18(4):6086.
5. “Additional information on *Trichoderma orientale* CBS 139997” 社内資料、未公表
6. “Enzymes in CAPSOZYME SB PLUS (profile)” : 社内資料、未公表
7. “REPORT OF CAPSOZYME SB PLUS(Retention Rate with different Temperature and Time)” : 社内資料、未公表
8. “Efficacy of Capsozyme SB Plus in broilers” : Feedtest 社 (ドイツ)、2015 年、社内資料、未公表
9. “Effect of the CAPSOZYME SB PLUS on the performance of broilers” : Olsztyn University of Warmia and Mazury (ポーランド)、2020 年、社内資料、未公表
10. “Effect of CAPSOZYME SB PLUS on nutrient digestibility in broilers” : Bangkok Animal Research Center Co., Ltd. (タイ)、2018 年、社内資料、未公表
11. “Repeated dose 90-day oral toxicity study in rats (CAPSOZYME SB PLUS). Multi-site study.” : Centro di Ricerche per la Zootecnia e l’Ambiente (CERZOO) S.r.l. (イタリア)、2017 年、社内資料、未公表
12. “CAPSOZYME SB PLUS-PURE ENZYMES:Bacterial Reverse Mutation Test”: Advinus Therapeutics Ltd. (インド)、2015 年、社内資料、未公表
13. “CAPSOZYME SB PLUS-PURE ENZYMES: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test In Human Peripheral Blood Lymphocytes” : Advinus Therapeutics Ltd. (インド)、2015 年、社内資料、未公表
14. “Tolerance of chickens for fattening to CAPSOZYME SB PLUS.” : Centro di Ricerche per la Zootecnia e l’Ambiente (CERZOO) S.r.l. (イタリア)、2017 年、社内資料、未公表

15. “Efficacy and Tolerance of Capsozyme SB Plus in male broilers” : feedtest  
社（ドイツ）、2021年、社内資料、未公表

## αーガラクトシダーゼ・キシラナーゼの成分規格等（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

#### (1) 飼料一般の成分規格

αーガラクトシダーゼ・キシラナーゼは、ブ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. 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

###### a αーガラクトシダーゼ

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、1 g 中に 11,000 αーガラクトシダーゼ単位以上を含む。

物理的・化学的性質

- ① 本品は、淡黄色～淡褐色の粉末である。
- ② 本品は、pH4.5～6.5 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、50 μg/g 以下でなければならない。
- ② ヒ素 本品 1.0 g (0.95～1.04 g) 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(2 μg/g 以下)。
- ③ 抗菌活性 本品 1.0 g (0.5～1.4 g) 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（1 g, 105 °C, 4 時間）

強熱残分 10.0%以下（1 g）

酵素力試験 αーガラクトシダーゼ試験法により試験を行う。

試料溶液の調製 試料約 2 g を有効数字 5 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、水を標線まで加えて 100 mL とし、20 分間攪拌する。その後、10 分間静置し、上澄液を試料原液とする。試料原液に水を加え、1 mL 当たりの濃度が約 0.003～0.016

$\alpha$ —ガラクトシダーゼ単位になるように水を加えて希釈し、試料溶液とする。

b キシラナーゼ

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、1 g 中に 30,000 キシラン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～淡褐色の粉末である。
- ② 本品は、pH4.5～6.0 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、50  $\mu\text{g/g}$  以下でなければならない。
- ② ヒ素 本品 1.0 g (0.95～1.04 g) 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(2  $\mu\text{g/g}$  以下)。
- ③ 抗菌活性 本品 1 g(0.5～1.4 g)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 (1 g, 105 °C, 4 時間)

強熱残分 10.0%以下 (1 g)

酵素力試験 キシラン糖化力試験法により試験を行う。

(イ) 製造の方法の基準

a  $\alpha$ —ガラクトシダーゼ

*Aspergillus tubingensis* に属する菌株を宿主とした  $\alpha$ —ガラクトシダーゼ生産菌株を培養し、培養を終了した後、ろ過して菌体を除去し、さらに、ろ液を濃縮し、濃縮液にアルコールを加え、上澄液を除く。さらに、残留物に水を加え、乾燥して製造すること。

b キシラナーゼ

*Trichoderma orientale* に属する菌株を宿主としたキシラナーゼ生産菌株を培養し、培養を終了した後、ろ過して菌体を除去し、さらに、ろ液を濃縮し、濃縮液にアルコールを加え、上澄液を除く。さらに、残留物に水を加え、乾燥して製造すること。

(ウ) 保存の方法の基準

a  $\alpha$ ーガラクトシダーゼ

遮光した気密容器に保存すること。

b キシラナーゼ

遮光した気密容器に保存すること。

(エ) 表示の基準

a  $\alpha$ ーガラクトシダーゼ

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。

b キシラナーゼ

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 粉状）

(ア) 成分規格

本品は、 $\alpha$ ーガラクトシダーゼ・キシラナーゼ中の  $\alpha$ ーガラクトシダーゼ製造用原体及びキシラナーゼ製造用原体に、賦形物質を混和した粉末である。

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、表示  $\alpha$ ーガラクトシダーゼ単位及びキシラン糖化力単位の 85～170%を含む。

酵素力試験  $\alpha$ ーガラクトシダーゼ  $\alpha$ ーガラクトシダーゼ試験法により行う。

試料溶液の調製  $\alpha$ ーガラクトシダーゼ・キシラナーゼ中の  $\alpha$ ーガラクトシダーゼ製造用原体の試料溶液の調製を準用する。

キシラナーゼ キシラン糖化力試験法により試験を行う。

(イ) 保存の方法の基準

遮光した気密容器に保存すること。

(ウ) 表示の基準

$\alpha$ ーガラクトシダーゼ  $\alpha$ ーガラクトシダーゼ・キシラナーゼ中の  $\alpha$ ーガラクトシダーゼ製造用原体の表示の基準を準用する。

キシラナーゼ  $\alpha$ ーガラクトシダーゼ・キシラナーゼ合剤中のキシラナーゼ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

#### ① $\alpha$ -ガラクトシダーゼ試験法

$\alpha$ -ガラクトシダーゼ試験法は、4-ニトロフェニル $\alpha$ -D-ガラクトピラノシドに $\alpha$ -ガラクトシダーゼが作用するとき、加水分解により生成される4-ニトロフェノールの量により、飼料添加物中の $\alpha$ -ガラクトシダーゼの酵素量を測定する方法であり、その単位は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ単位で示す。

1  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ単位は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼが4-ニトロフェニル $\alpha$ -D-ガラクトピラノシドに pH5.5、37℃で作用するとき、1分間に 1  $\mu\text{mol}$  の4-ニトロフェニル $\alpha$ -D-ガラクトピラノシドを加水分解する酵素量に相当する。

#### 基質溶液の調製

無水酢酸ナトリウム 18.1 g (18.05~18.14 g) を量り、900 mL の水を加えて溶かした後、氷酢酸 0.8 mL を加えて数分間攪拌する。この溶液に 1 mL のポリソルベート 20、1 mL の 1 mol/L 塩化カルシウム試液及び牛血清アルブミン 12.0 g (11.95~12.04 g) 加えて溶かし、さらに 2.5 mol/L 酢酸試液又は 4 mol/L 水酸化ナトリウム試液を加えて pH5.5 に調整した後、水を加えて 1,000 mL として、緩衝液とする。4-ニトロフェニル $\alpha$ -D-ガラクトピラノシド 38.3 mg (38.25~38.34 mg) を量り、200 mL の三角フラスコに入れ、96 mL の水を加えた後、緩衝液 4 mL を加え、20 分攪拌して溶かす。5 mol/L 塩酸又は 5 mol/L 水酸化ナトリウムを用いて pH5.5 に調整する。

#### 反応停止液の調製

ホウ酸ナトリウム 23.8 g (23.75~23.84 g) を量り、800 mL の水を加えて溶かした後、4 mol/L 水酸化ナトリウム試液を加えて pH9.7 に調整した後、水を加えて 1,000 mL とする。

#### 操作法

試料溶液は各条に規定する方法で調製する。基質溶液 1 mL を量り、16 × 100 mm の試験管に入れ、試料溶液 0.5 mL を全量ピペット又はマイクロピペットを用いて加え、振り混ぜ、37 °C で正確に 15 分間加温した後、反応停止液 2.5 mL を全量ピペットを用いて加え、振り混ぜ、15 分

以上放置した後 2,000×g で 5 分間遠心分離を行い、得られた上澄液を試料反応液とする。この溶液につき、水を対照として、波長 405 nm における吸光度  $A_T$  を測定する。別に、基質溶液 1 mL を全量ピペットを用いて量り、16 ×100 mm の試験管に入れ、37 °C で正確に 15 分間加温した後、反応停止液 2.5 mL を全量ピペットを用いて加え、更に試料溶液 0.5 mL を全量ピペット又はマイクロピペットを用いて加え、振り混ぜ、15 分以上放置した後 2,000×g で 5 分間遠心分離を行い、得られた上澄液を試料対照液とする。試料対照液につき、試料反応液と同様に操作し、吸光度  $A_T'$  を測定する。

$$1\text{g 中の } \alpha\text{-ガラクトシダーゼ単位} = \frac{(A_T - A_T') \times F \times Z}{W \times 15 \times 0.5}$$

F : 検量線から求めた吸光度差 1 に対応する 4-ニトロフェノール濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ )

Z : 希釈倍率

W : 試料採取量 (g)

#### 検量線の作成

4-ニトロフェノール 0.334 g (0.3335~0.3344 g) を量り、水を加えて溶かし、1,000 mL の全量フラスコに入れ、更に水を標線まで加えて 1,000 mL とする。この溶液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに量り取り、90 mL の水で希釈したものを標準原液とする。

標準原液を、水で正確に 1.5 倍、3.0 倍、6.0 倍に希釈し、標準液とする。各標準液及び標準原液 0.5 mL をマイクロピペットを用いて 16 ×100 mm の試験管に入れ、基質溶液 1.0 mL を加え、37 °C で正確に 15 分間放置した後、反応停止液 2.5 mL を加え、振り混ぜ、検量線用標準液 S1、S2、S3 及び S4 とする。各検量線用標準液につき、水を対照として、波長 405 nm における吸光度  $A_{S1}$ 、 $A_{S2}$ 、 $A_{S3}$  及び  $A_{S4}$  を測定する。別に水 0.5 mL をマイクロピペットを用いて 16 ×100 mm の試験管に入れ、以下標準液と同様の方法で操作し、吸光度  $A_{S0}$  を測定する。4-ニトロフェノール濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) を横軸に、測定した吸光度  $A_{S0}$ 、 $A_{S1}$ 、 $A_{S2}$ 、 $A_{S3}$  及び  $A_{S4}$  を縦軸にとり、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

塩化カルシウム試液、1 mol/L 塩化カルシウム 14.7 g(14.65～14.74 g)に水を加えて溶かし、100 mLとする。

塩酸試液、5 mol/L 塩酸 417mLに水を加えて 1,000 mLとする。

酢酸試液、2.5 mol/L 氷酢酸 15g(14.5～15.4g)に水を加えて溶かし、100 mLとする。

水酸化ナトリウム試液、5 mol/L 水酸化ナトリウム 200 g(199.5～200.4 g)に水を加えて溶かし、1,000 mLとする。ポリエチレン瓶に保存する。

水酸化ナトリウム試液、4 mol/L 水酸化ナトリウム 160 g(159.5～160.4 g)に水を加えて溶かし、1,000 mLとする。ポリエチレン瓶に保存する。

4-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシド  $C_{12}H_{15}NO_8$  本品は、白色～淡黄色の粉末である。

溶状 本品 0.1g (0.095～0.104 g) をメタノール 1 mL に溶かすとき、その溶液は澄明またはわずかに混濁し、無色～淡黄色または無色～淡緑黄色を示す。

含量 99 %以上

水分 6 %以下

4-ニトロフェノール  $C_6H_5NO_3$  本品は、淡黄色～黄色～淡褐色の粉末、結晶、細粒あるいは小片である。

含量 99.0 %以上

[その他所要の改正箇所]

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

塩化カルシウム試液、0.5 mol/L 塩化カルシウム 7.5 g(7.45~7.54 g) に水を加えて溶かし、100 mL とする。

6 飼料添加物一般の試験法

(25) 定性反応

クエン酸塩

①・② (略)

③ クエン酸塩の中性溶液に過量の 0.5 mol/L 塩化カルシウム試液を加え、煮沸するとき、白色の結晶性の沈殿を生じる。沈殿を分取し、この一部に 1mol/L 水酸化ナトリウム試液を加えても溶けない。また、他の一部に希塩酸を加えるとき、溶ける。

8 各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

(1) アルギン酸ナトリウム

ア 製造用原体

(ア) 成分規格

物理・化学的性質 (略)

確認試験

① 本品 0.5 g(0.45~0.54 g)を水 50 mLにかき混ぜながら少量ずつ加えた後、60~70℃でときどきかき混ぜながら20分間加温して均等な溶液とし、放冷した後、これを試料溶液とする。この試料溶液 5 mLに 0.5 mol/L 塩化カルシウム試液 1 mLを加えるとき、30秒以内にゼリー状の沈殿を生じる。

②~④ (略)

純度試験~強熱残分 (略)

(イ) 保存の方法の基準

(略)

イ・ウ (略)

(15) ポリアクリル酸ナトリウム

(ア) 成分規格

物理・化学的性質 (略)

確認試験

- ① 本品 0.2 g(0.15~0.24 g)に水 100 mL を加え、よくかき混ぜて溶かし、これを試料溶液とする。この試料溶液 10 mL に 0.5 mol/L 塩化カルシウム試液 1 mL を加え、振り混ぜるとき、30 秒以内に白色の沈殿を生じる。
- ② (略)

純度試験

- ① 遊離アルカリ 本品 0.2 g(0.15~0.24 g)に水 60 mL を加え、よくかき混ぜて溶かし、これに塩化カルシウム試液 3 mL を加え、水浴上で約 20 分間加熱し、放冷した後、ろ過する。ろ紙上の残留物を水洗し、洗液をろ液に合わせ、更に水を加えて 100 mL とし、これを試料溶液とする。試料溶液 50 mL を量り、フェノールフタレイン試液 2 滴を加えるとき、紅色を呈してはならない。
- ②~⑤ (略)
- ⑥ 低重合物 本品 2 g(1.95~2.04 g)に水 200 mL を加え、ときどき振り混ぜ、約 24 時間放置して溶かす。これに 10 mol/L 塩酸 50 mL をかき混ぜながら滴加し、約 40 °C の水浴中でかき混ぜながら 30 分間加温した後、24 時間放置する。生じた沈殿をろ過し、ろ液にフェノールフタレイン試液 1 滴を加え、水酸化ナトリウム溶液(2→5)をろ液が僅かに紅色を呈するまで加えた後、塩酸(1→30)を紅色が消えるまで滴加する。次に、水 200 mL を加え、かき混ぜながら 0.5 mol/L 塩化カルシウム試液 25 mL を滴加した後、約 40 °C の水浴中でかき混ぜながら 30 分間加温する。生じた沈殿を質量既知のガラスろ過器(1G4)で吸引ろ過し、残留物を水約 10 mL ずつで 3 回洗い、105 °C で 4 時間乾燥し、次式により低重合物の含量を求めるとき、その量は、5 % 以下でなければならない。

乾燥減量・強熱残分 (略)

(イ) 保存の方法の基準

(略)

イ・ウ (略)