

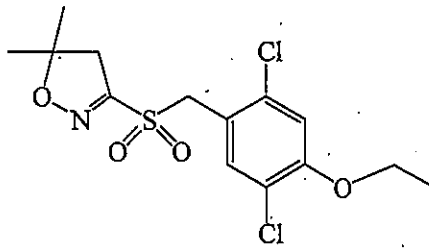
6月4日 食品衛生分科会

# 審議事項に関する資料

(1) 審議事項

①食品中の農薬の残留基準設定について	
・フェノキサスルホン （新規＋魚介類）	・・・・・・・・・・1
②告示試験法の改定について	
・オラキンドックス及びカルバドックス試験法	・・・・・・・・・・4
・クレンブテロール試験法	・・・・・・・・・・12
③食品添加物の指定等について	
・グルタミルバリルグリシン	・・・・・・・・・・21
・アスパラギナーゼ（Aspergillus niger ASP-72株を 用いて生産されたもの）	・・・・・・・・・・26

フェノキサスルホン (Fenoxasulfone)

審議の対象	農薬の食品中の残留基準の設定										
経緯	農薬取締法に基づく新規の農薬登録申請に伴う基準値設定の要請及び魚介類への基準値設定の要請があったもの。										
構造式											
用途	農薬／除草剤										
作用機構	イソキサゾリン系の除草剤である。植物の超長鎖脂肪酸伸長酵素 (VLCFAE) の阻害により、植物のワックス層の構造維持を妨げ除草効果を示すと考えられている。										
適用作物／適用雑草等	農薬登録申請：稲／水田一年生雑草、マツバイ										
我が国の登録状況	農薬登録はない。(新たに農薬登録申請がなされたものである。)										
諸外国の状況	JMPR における毒性評価はなされておらず、国際基準も設定されていない。 米国、カナダ、欧州連合 (EU)、オーストラリア及びニュージーランドについて調査した結果、いずれの国及び地域においても基準値が設定されていない。										
食品安全委員会における食品健康影響評価結果	一日摂取許容量 (ADI) 0.17 mg/kg 体重/day [設定根拠] 18 か月 発がん性試験 (マウス・混餌) 無毒性量 17.6 mg/kg 体重/day 安全係数 100										
基準値案	別紙 1 のとおり。 残留の規制対象物質：フェノキサスルホンとする。										
暴露評価	TMDI/ADI 比は、以下のとおり。 <table border="1" data-bbox="582 1444 1428 1691"> <thead> <tr> <th></th> <th>TMDI/ADI 比 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>国民平均</td> <td>0.1</td> </tr> <tr> <td>幼小児 (1~6 歳)</td> <td>0.2</td> </tr> <tr> <td>妊婦</td> <td>0.1</td> </tr> <tr> <td>高齢者 (65 歳以上)</td> <td>0.1</td> </tr> </tbody> </table> <p>TMDI：理論最大一日摂取量 (Theoretical Maximum Daily Intake)</p>		TMDI/ADI 比 (%)	国民平均	0.1	幼小児 (1~6 歳)	0.2	妊婦	0.1	高齢者 (65 歳以上)	0.1
	TMDI/ADI 比 (%)										
国民平均	0.1										
幼小児 (1~6 歳)	0.2										
妊婦	0.1										
高齢者 (65 歳以上)	0.1										
意見聴取の状況	平成 26 年 1 月 28 日に在京大使館への説明を実施 平成 26 年 4 月 30 日～5 月 29 日パブリックコメントを実施 (WTO 通報は対象外)										
答申案	別紙 2 のとおり。										

農薬名

フェノキサスルホン

(別紙1)

食品名	基準値 案 ppm	基準値 現行 ppm	登録 有無	参考基準値		作物残留試験成績等 ppm
				国際 基準 ppm	外国 基準値 ppm	
米(玄米をいう。)	0.05		申			<0.01,<0.01
魚介類	0.04		申			推:0.037

申:農薬の登録申請等に伴い基準値設定依頼がなされたもの  
推:推定される残留量であることを示す

答申(案)

(別紙2)

フェノキサスルホン

食品名	残留基準値 ppm
米(玄米をいう。)	0.05
魚介類	0.04

# オラキンドックス及びカルバドックス試験法について（案）

オラキンドックスの食品安全委員会における評価結果（遺伝毒性を有しているものと考えられるほか、発がん性及び催奇形性を有する可能性も否定できないことから、ADIを設定することは適当でない。）に基づき、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会において、オラキンドックスの規格基準を「食品に含有されるものであってはならない」（以下、「不検出基準」という。）と改正することとされた。

従来より、不検出基準を含む農薬等については、試験法の検出限界により規制が行われることから、規格基準の改正と同時に試験法を告示し、併せて、その検出限界を別途通知しているところである。

以上のとおり、オラキンドックスの試験法について開発を進めていたところ、今般、その開発が終了したため、同試験法について、上記分科会において審議を行うものである。試験法が告示されているカルバドックスについても類似化合物であることから、本試験法により同時分析が可能であるため、当該2品目の試験法を併せて「オラキンドックス及びカルバドックス試験法」として告示する。なお、本試験法の改正に伴い、既存のカルバドックス試験法は廃止することとする。

## 1. 概要

### (1) 分析対象の化合物

- ・ 3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸（以下、「MQCA」という。）  
　　オラキンドックスの代謝物
- ・ キノキサリン-2-カルボン酸（以下、「QCA」という。）  
　　カルバドックスの代謝物

### (2) 分析対象食品

畜水産物

### (3) 試験法の概要

はちみつ以外の試料については、試料を水酸化カリウム・メタノール溶液で加水分解した後、MQCA及びQCAを抽出し、塩酸酸性下でスチレンジビニルベンゼン共重合体カラムで精製した後、ヘキサンで洗浄する。酢酸エチルに転溶し、エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルカラム及び弱塩基性陰イオン交換樹脂カラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認を行う。はちみつについては、MQCA及びQCAを試料から塩酸酸性下メタノールで抽出し、酢酸エチルに転溶し、エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルカラム及び弱塩基性陰イオン交換樹脂カラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認を行う。

(4) 検出限界 MQCA 0.001 mg/kg  
QCA 0.001 mg/kg

## 2. 真度及び精度の評価

<試験法開発における検討対象食品>

豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏の筋肉、鶏卵、牛乳、うなぎ、さけ、しじみ、はちみつ

### MQCA

	検討結果	目標値
真度	72.1~94.7%	70~120%
併行精度	2.3~11.8%	30%未満

### QCA

	検討結果	目標値
真度	71.6~96.9%	70~120%
併行精度	2.4~16.8%	30%未満

(参考) これまでの経緯

- 平成20年 3月11日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請
- 平成21年10月 1日 食品安全委員会から委員長から厚生労働大臣あてに食品健康影響評価について通知
- 平成22年 1月27日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会
- 平成22年 3月 3日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
- 平成22年度 試験法開発
- 平成24年 6月～平成26年 3月  
残留農薬等公示分析法検討会で随時検討
- 平成26年 5月20日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに告示試験法改定に係る食品健康影響評価について照会
- 平成26年 5月20日 食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに回答について通知
- 平成26年 5月21日 薬事・食品衛生審議会へ諮問
- 平成26年 5月23日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

● 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

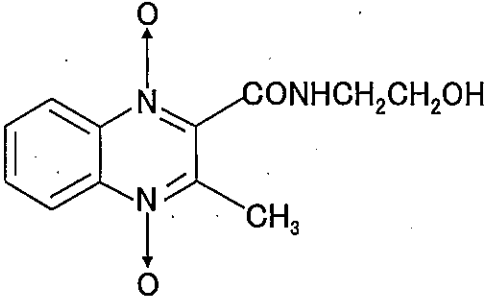
[委員]

- 石井 里枝 埼玉県衛生研究所水・食品担当部長
- 延東 真 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科教授
- 大野 泰雄 公益財団法人木原記念横浜生命科学振興財団理事長
- 尾崎 博 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室教授
- 斉藤 貢一 星薬科大学薬品分析化学教室教授
- 佐藤 清 一般財団法人残留農薬研究所業務執行理事・化学部長
- 高橋 美幸 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所上席研究員
- 永山 敏廣 明治薬科大学薬学部薬学教育研究センター薬学教育部門教授
- 根本 了 国立医薬品食品衛生研究所食品部第一室長
- 宮井 俊一 一般社団法人日本植物防疫協会技術顧問
- 山内 明子 日本生活協同組合連合会執行役員組織推進本部長
- 由田 克士 大阪市立大学大学院生活科学研究科公衆栄養学教授
- 吉成 浩一 静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野教授
- 鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学教授

(○：部会長)



オラキンドックス (Olaquinox)

審議の対象	飼料添加物及び動物用医薬品の食品中の残留基準の設定
経緯	ポジティブリスト制度導入時に設定した残留基準の見直しを行うもの
構造式	
適用動物/適用疾患	豚/成長の促進、豚赤痢及び細菌性下痢症の防止
我が国の承認状況	平成 13 年に飼料添加物の指定を削除されている。また、動物用医薬品としての承認はされていない。
諸外国の状況	国際基準は設定されていない。 オーストラリアにおいて豚、鶏等に基準値が設定されている。
食品安全委員会における食品健康影響評価結果	現時点で評価した知見から見る限り、オラキンドックスについては、遺伝毒性を有しているものと考えられるほか、発がん性及び催奇形性を有する可能性も否定できないことから、オラキンドックスに ADI を設定することは適当でない。
基準値案	別紙のとおり、食品安全委員会における評価結果を踏まえ、オラキンドックスは食品に含有されるものであってはならないものとする。 残留の規制対象物質：3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸（代謝物）
答申案	食品に含有されるものであってはならないとする食品規格を設定することが適当である。

## オラキンドックス

食品名	基準値案 ppm	基準値現行 ppm	豪州 ppm
豚の筋肉		0.3	0.3
豚の脂肪		0.3	
豚の肝臓		0.3	0.3
豚の腎臓		0.3	0.3
豚の食用部分*1		0.3	0.3
鶏の筋肉		0.3	0.3
鶏の脂肪		0.3	
鶏の肝臓		0.3	0.3
鶏の腎臓		0.3	0.3
鶏の食用部分		0.3	0.3
その他の家きんの筋肉		0.3	0.3
その他の家きんの脂肪		0.3	
その他の家きんの肝臓		0.3	0.3
その他の家きんの腎臓		0.3	0.3
その他の家きんの食用部分		0.3	0.3

平成 17 年 11 月 29 日厚生労働省告示第 499 号において新しく設定した基準値については、網をつけて示した。

\* 1 : 食用部分とは、食用に供される部分のうち、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓以外の部分をいう。

答申 (案)

## オラキンドックス及びカルバドックス試験法 (畜水産物)

(6) オラキンドックス及びカルバドックス試験法 (畜水産物に限る。)

### 1. 分析対象化合物

オラキンドックスは3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸を、カルバドックスはキノキサリン-2-カルボン酸を分析対象とする。

### 2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS)

### 3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、第2 添加物の部C 試薬・試液等の項に示すものを用いる。

なお、「(特級)」と記載したものは、日本工業規格試薬の特級の規格に適合するものであることを示す。

アセトニトリル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) 内径8~9 mmのポリエチレン製のカラム管に、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル500 mgを充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

酢酸エチル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム (150 mg) 内径約12~13 mmのポリエチレン製のカラム管に、弱塩基性陰イオン交換樹脂150 mgを充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (500 mg) 内径12~13 mmのポリエチレン製のカラム管に、スチレンジビニルベンゼン共重合体500 mgを充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

*n*-ヘキサン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

水 蒸留水、精製水あるいは純水などの化学分析に適したものを用いる。当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含む場合には、*n*-ヘキサン等の溶媒で洗浄したものを用いる。

無水硫酸ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

メタノール 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

### 4. 標準品

3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸 本品は3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸 96%以上を含む。

キノキサリン-2-カルボン酸 本品はキノキサリン-2-カルボン酸 95%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出法

##### ① 筋肉、肝臓、腎臓、魚介類、乳、卵及び脂肪の場合

検体を細切均一化した後、筋肉、肝臓、腎臓、魚介類、乳及び卵の場合はその10.0 gを量り採り、脂肪の場合はその5.00 gを量り採る。

これに2 mol/L水酸化カリウム・メタノール溶液20 mLを加え、還流冷却器を取り付けて、85℃の水浴中で2時間加熱した後、放冷する。これにメタノール60 mLを加え、10分間激しく振とうした後、吸引ろ過する。ろ過器をメタノール20 mLで洗い、洗液を先のろ液に合わせて、メタノールで正確に200 mLとした後、20 mLを採り、3 mol/L塩酸2 mLを加える。

② はちみつの場合

検体を均一化した後、その10.0 gを量り採る。これに水20 mLを加えて溶かし、塩酸0.5 mLを加える。これにメタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にメタノール50 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。得られたろ液を合わせて、メタノールで正確に200 mLとする。この20 mLを採り、水100 mLを加え、酢酸エチル50 mLで3回振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にギ酸及びメタノール(1:500)混液5 mLを加えて溶かす。

2) 精製法

① 筋肉、肝臓、腎臓、魚介類、乳、卵及び脂肪の場合

a スチレンジビニルベンゼン共重合体カラムクロマトグラフィー

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム(500 mg)に水及びメタノール(1:10)混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1)で得られた溶液を注入した後、水及びメタノール(1:10)混液6 mLを注入し、溶出液を合わせて分液ロートに移し、*n*-ヘキサン20 mLで2回振とうしてヘキサン層は捨てる。次いで、水100 mLを加え、酢酸エチル50 mLで3回振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にギ酸及びメタノール(1:500)混液5 mLを加えて溶かす。

b エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム(500 mg)にギ酸及びメタノール(1:500)混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムにaで得られた溶液を注入し、さらにギ酸及びメタノール(1:500)混液5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、ギ酸及びメタノール(3:97)混液20 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にギ酸及びメタノール(3:97)混液2 mLを加えて溶かし、水3 mLを加え、よく混合する。

c 弱塩基性陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム(150 mg)にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムにbで得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。次いで、水5 mLを注入し、流出液は捨てる。さらにメタノール10 mLを注入し流出液を捨てた後、25%アンモニア水及びメタノール(1:19)混液5 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を水及びメタノール(1:1)混液に溶解し、脂肪以外の場合は正確に1 mL、脂肪の場合は正確に0.5 mLとしたものを試験溶液とする。

② はちみつの場合

a エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム(500 mg)にギ酸及びメタノール(1:500)混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1)で得られた溶液を注入し、さらにギ酸及びメタノール(1:500)混液5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、ギ酸及びメタノール(3:97)混液20 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にギ酸及びメタノール(3:97)混液2 mLを加えて溶かし、水3 mLを加え、よく混合する。

b 弱塩基性陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム(150 mg)にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、

流出液は捨てる。このカラムに a で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。次いで、水 5 mL を注入し、流出液は捨てる。さらにメタノール 10 mL を注入し流出液を捨てた後、25%アンモニア水及びメタノール (1:19) 混液 5 mL を注入し、溶出液を 40℃ 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を水及びメタノール (1:1) 混液に溶解し、正確に 1 mL としたものを試験溶液とする。

#### 6. 検量線の作成

3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸及びキノキサリン-2-カルボン酸各標準品をそれぞれメタノールに溶解して標準原液を調製し、混合した後、水及びメタノール (1:1) 混液を用いて標準溶液を数点調製する。それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中 0.001 mg/kg に相当する試験溶液中濃度は各化合物ともに 0.001 mg/L である。

#### 7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6 の検量線で 3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸及びキノキサリン-2-カルボン酸の含量を求める。

#### 8. 確認試験

LC-MS/MS により確認する。

#### 9. 測定条件

(例)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び 0.1 vol% 酢酸 (1:19) から (1:1) までの濃度勾配を 15 分間で行う。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (*m/z*) :

3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸 プリカーサーイオン 189、プロダクトイオン 145、143

キノキサリン-2-カルボン酸 プリカーサーイオン 175、プロダクトイオン 129、102

注入量：5 μL

保持時間の目安：3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸 11分

キノキサリン-2-カルボン酸 11分

## クレンプテロール試験法について（案）

クレンプテロールについては、ポジティブリスト制度導入時に設定された暫定基準の見直しが平成22年に行われ、食品安全委員会の食品健康影響評価の結果、クレンプテロールの毒性が著しく高い\*ことから、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会において、残留基準が設定される一部の食品を除き、「食品に含有されるものであってはならない」（以下「不検出基準」という。）と改定することとされた。

従来より、不検出基準を含む農薬等については、試験法の検出限界により規制が行われることから、規格基準の改正と同時に試験法を告示し、併せてその検出限界を別途通知しているところである。

以上のとおり、クレンプテロールの試験法について開発を進めてきたところ、今般、その開発が終了したため、同試験法について上記分科会で審議するものである。

※ ポジティブリスト制度導入時に、JECFAにおけるクレンプテロールのADI ( $0.004 \mu\text{g}/\text{kg}$  体重/day) が一律基準 ( $0.01\text{ppm}$ ) を検討した際の根拠である暴露量の目安 ( $1.5 \mu\text{g}/\text{day}$  : 50kg体重換算のADIとして  $0.03 \mu\text{g}/\text{kg}$  体重/day) を下回っていたことから、国際基準及び薬事法に基づく基準が設定された食品以外には不検出基準が設定されていた。

### 1. 概要

#### (1) 分析対象の化合物

クレンプテロール

#### (2) 分析対象食品

畜水産物

#### (3) 試験法の概要

クレンプテロールを試料からアセトンで抽出し、10%w/v塩化ナトリウム溶液及び酢酸エチルによる液々分配で精製をした後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂をする。シリカゲルカラム及び強酸性陽イオン交換体カラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認を行う。

#### (4) 検出限界 $0.00005 \text{ mg}/\text{kg}$

### 2. 真度及び精度の評価

#### <試験法開発における検討対象食品>

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、豚の筋肉、牛乳、鶏卵、さけ、うなぎ、しじみ  
はちみつ

	検討結果	目標値
真度	73.5～94.5%	70～120%
併行精度	2.45～9.66%	30%未満

(参考1) これまでの経緯

- 平成18年10月16日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請
- 平成21年 6月18日 食品安全委員会から委員長から厚生労働大臣あてに食品健康影響評価について通知
- 平成22年 5月11日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会
- 平成22年 6月 2日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
- 平成23年度 試験法開発
- 平成24年 6月～平成26年 3月  
残留農薬等公示分析法検討会で随時検討
- 平成26年 5月20日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに告示試験法改定に係る食品健康影響評価について照会
- 平成26年 5月20日 食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに回答について通知
- 平成26年 5月21日 薬事・食品衛生審議会へ諮問
- 平成26年 5月23日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

(参考2)

基準値案

食品名	基準値(案) (ppm)
牛の筋肉	0.0002
その他の陸棲哺乳類に属する動物*1の筋肉	0.0002
牛の脂肪	0.0002
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.0002
牛の肝臓	0.0006
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.0006
牛の腎臓	0.0006
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.0006
牛の食用部分*2	0.0006
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.0006
乳	0.00005

\*1：その他の陸棲哺乳類に属する動物とは、陸棲哺乳類のうち、牛及び豚以外のものをいう。

\*2：食用部分とは、食用に供される部分のうち、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓以外の部分をいう。

● 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

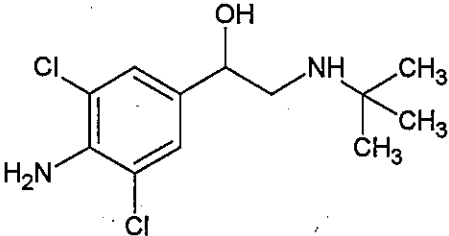
[委員]

- |     |    |                             |
|-----|----|-----------------------------|
| 石井  | 里枝 | 埼玉県衛生研究所水・食品担当部長            |
| 延東  | 真  | 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科教授        |
| ○大野 | 泰雄 | 公益財団法人木原記念横浜生命科学振興財団理事長     |
| 尾崎  | 博  | 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室教授   |
| 斉藤  | 貢一 | 星薬科大学薬品分析化学教室教授             |
| 佐藤  | 清  | 一般財団法人残留農薬研究所業務執行理事・化学部長    |
| 高橋  | 美幸 | 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所上席研究員 |
| 永山  | 敏廣 | 明治薬科大学薬学部薬学教育研究センター薬学教育部門教授 |
| 根本  | 了  | 国立医薬品食品衛生研究所食品部第一室長         |
| 宮井  | 俊一 | 一般社団法人日本植物防疫協会技術顧問          |
| 山内  | 明子 | 日本生活協同組合連合会執行役員組織推進本部長      |
| 由田  | 克士 | 大阪市立大学大学院生活科学研究科公衆栄養学教授     |
| 吉成  | 浩一 | 静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野教授        |
| 鰐淵  | 英機 | 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学教授       |

(○：部会長)



クレンブテロール (Clenbuterol)

審議の対象	動物用医薬品の食品中の残留基準の設定
経緯	ポジティブリスト制度導入時に設定した残留基準の見直しの実施及び薬事法に基づく動物用医薬品の再審査申請に伴うもの
構造式	
適用動物/適用疾患	牛/早流産の防止、馬/肺炎における呼吸器症状の軽減
我が国の承認状況	動物用医薬品として承認されている。
諸外国の状況	牛、馬及び乳について国際基準は設定されている。 EUにおいて牛、馬及び乳等に基準値が設定されている。
食品安全委員会における食品健康影響評価結果	<p>許容一日摂取量 (ADI) 0.004 μg/kg 体重/day</p> <p>[設定根拠] 単回 経口投与 (ヒト)</p> <p>無毒性量 0.042 μg/kg 体重/day</p> <p>安全係数 10</p>
基準値案	別紙1のとおり。 残留の規制対象物質：クレンブテロール本体
答申案	別紙2のとおり。

## クレブテロール

食品名	基準値案 ppm	基準値 現行 ppm	薬事法 ppm	国際基準 ppm	EU ppm
牛の筋肉	0.0002	0.0002	0.0001	0.0002	0.0001
豚の筋肉	不検出	不検出			
その他の陸棲哺乳類に属する動物*1*2の筋肉	0.0002	0.0002	0.0001	0.0002	
牛の脂肪	0.0002	0.0002	0.0001	0.0002	
豚の脂肪	不検出	不検出			
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.0002	0.0002		0.0002	
牛の肝臓	0.0006	0.0006	0.0001	0.0006	0.0005
豚の肝臓	不検出	不検出			
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.0006	0.0006	0.0001	0.0006	0.0005
牛の腎臓	0.0006	0.0006	0.0001	0.0006	0.0005
豚の腎臓	不検出	不検出			
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.0006	0.0006	0.0001	0.0006	0.0005
牛の食用部分*3*4	0.0006	0.0001	0.0001		
豚の食用部分	不検出	不検出			
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.0006	0.0001	0.0001		
乳	0.00005	0.00005	0.0001	0.00005	0.00005
鶏の筋肉	不検出	不検出			
その他の家きん*5の筋肉	不検出	不検出			
鶏の脂肪	不検出	不検出			
その他の家きんの脂肪	不検出	不検出			
鶏の肝臓	不検出	不検出			
その他の家きんの肝臓	不検出	不検出			
鶏の腎臓	不検出	不検出			
その他の家きんの腎臓	不検出	不検出			
鶏の食用部分	不検出	不検出			
その他の家きん食用部分	不検出	不検出			
鶏の卵	不検出	不検出			
その他の家きんの卵	不検出	不検出			

食品名	基準値案 ppm	基準値 現行 ppm	薬事法 ppm	国際基準 ppm	EU ppm
魚介類(さけ目魚類に限る。)	不検出	不検出			
魚介類(うなぎ目魚類に限る。)	不検出	不検出			
魚介類(すずき目魚類に限る。)	不検出	不検出			
魚介類(その他の魚類* <sup>6</sup> に限る。)	不検出	不検出			
魚介類(貝類に限る。)	不検出	不検出			
魚介類(甲殻類に限る。)	不検出	不検出			
その他の魚介類* <sup>7</sup>	不検出	不検出			
はちみつ	不検出	不検出			

平成 17 年 11 月 29 日厚生労働省告示第 499 号において新しく設定した基準値については、網をつけて示した。

- \* 1 : その他の陸棲哺乳類に属する動物とは、陸棲哺乳類のうち、牛及び豚以外のものをいう。
- \* 2 : その他の陸棲哺乳類に属する動物については、国際基準の馬の基準値を参照した。
- \* 3 : 食用部分とは、食用に供される部分のうち、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓以外の部分をいう。
- \* 4 : 食用部分については、肝臓又は腎臓の値を参照した。
- \* 5 : その他の家きんとは、家きんのうち、鶏以外のものをいう。
- \* 6 : その他の魚類とは、魚類のうち、さけ目類、うなぎ目類及びすずき目類以外のものをいう。
- \* 7 : その他の魚介類とは、魚介類のうち、魚類、貝類及び甲殻類以外のものをいう。

答申(案)

クレンプテロール

食品名	残留基準値 ppm
牛の筋肉	0.0002
その他の陸棲哺乳類に属する動物 <sup>*1</sup> の筋肉	0.0002
牛の脂肪	0.0002
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.0002
牛の肝臓	0.0006
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.0006
牛の腎臓	0.0006
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.0006
牛の食用部分 <sup>*2</sup>	0.0006
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.0006
乳	0.00005

\* 1 : その他の陸棲哺乳類に属する動物とは、陸棲哺乳類のうち、牛及び豚以外のものをいう。

\* 2 : 食用部分とは、食用に供される部分のうち、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓以外の部分をいう。

また、牛及びその他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び食用部分並びに乳以外の食品については、含有されるものであってはならないとする食品規格を設定することが適当である。

クレンブテロール試験法（畜水産物）

(7) クレンブテロール試験法（畜水産物に限る。）

1. 分析対象化合物

クレンブテロール

2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、第2 添加物の部C 試薬・試液等の項に示すものを用いる。

なお、「（特級）」と記載したものは、日本工業規格試薬の特級の規格に適合するものであることを示す。

アセトン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

アセトニトリル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

塩化ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

強酸性陽イオン交換体ミニカラム（500 mg） 内径8～9 mmのポリエチレン製のカラム管に、ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲル 500 mg を充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

酢酸エチル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

シリカゲルミニカラム（1,000 mg） 内径8～9 mmのポリエチレン製のカラム管に、シリカゲル 1,000 mg を充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

トリエチルアミン トリエチルアミン（特級）

*n*-ヘキサン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

水 蒸留水、精製水あるいは純水などの化学分析に適したものを用いる。当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含む場合には、*n*-ヘキサン等の溶媒で洗浄したものを用いる。

無水硫酸ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

メタノール 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

4. 標準品

クレンブテロール標準品 本品は塩酸クレンブテロール 98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出法

検体を細切均一化した後、筋肉、肝臓、腎臓、魚介類、乳及び卵の場合はその10.0 gを量り採り、脂肪の場合はその5.00 gを量り採る。はちみつの場合は、検体を均一化した後、その10.0 gを量り採り、これに水 20 mLを加えて溶かす。

これにアセトン 100 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトン 50 mLを加え、ホモジナイズし、上記と同様に遠心分離する。得られた上澄液を合わせ 40℃以下で約 30 mLまで濃縮する。これに 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 100 mL及び 2 mol/L水酸化ナトリウム 5 mLを加え、酢酸エチル 100 mL及び 50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に *n*-ヘキサン 30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL

ずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン、トリエチルアミン及び*n*-ヘキサン（30：1：170）混液5 mLを加えて溶かす。

## 2) 精製法

### ① シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にアセトン及び*n*-ヘキサン各10 mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに1)で得られた溶液を注入した後、さらにアセトン、トリエチルアミン及び*n*-ヘキサン（30：1：170）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン15 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に水及びメタノール（1：1）混液5 mLを加えて溶かす。

### ② 強酸性陽イオン交換体カラムクロマトグラフィー

強酸性陽イオン交換体ミニカラム（500 mg）にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに①で得られた溶液を注入した後、メタノール10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアンモニア水及びメタノール（1：49）混液10 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル、ギ酸及び水（300：1：700）混液に溶かし、正確に2 mL（脂肪の場合は1 mL）としたものを試験溶液とする。

## 6. 検量線の作成

クレンブテロール標準品のアセトニトリル、ギ酸及び水（300：1：700）混液の溶液を数点調製し、それぞれをLC-MS/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.00005 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.00025 mg/Lである。

## 7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線でクレンブテロールの含量を求める。

## 8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

## 9. 測定条件

（例）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3.5 μm

カラム温度：40℃

移動相：0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び0.1 vol%ギ酸の混液（1：19）で1分間保持した後、（1：19）から（3：7）までの濃度勾配を13分間で行う。

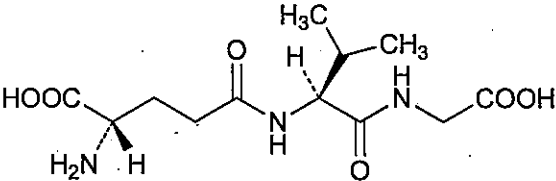
イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（*m/z*）：プリカーサーイオン277、プロダクトイオン203、132

注入量：10 μL

保持時間の目安：10分

グルタミルバリルグリシン

審議の対象	食品添加物としての指定の可否及び使用基準・成分規格の設定。
経緯	事業者等からの指定等の要請により指定を行うもの。
構造式	
用途	調味料
概要	グルタミルバリルグリシンは、γグルタミル構造を有するトリペプチドの調味料である。魚醤や醤油等の食品中に微量含まれており、コク味 <sup>1</sup> 機能を有する成分とされている。
諸外国での状況	<p>(1)JECFAの評価 JECFAでは、2012年にフレーバー<sup>2</sup>として「安全性上の懸念は無い」と評価されている。</p> <p>(2)諸外国の使用状況 コーデックス委員会では、特段使用基準は設定されていない。 米国では、2010年にFEMA-GRASとして認められており、スナック菓子（使用上限値 160ppm）やスープ（使用上限値 50ppm）等の食品に対して使用が認められている。 EUでは、2014年に「安全上懸念は無い」と評価されている。 その他諸外国等については、2014年4月現在、タイ、韓国、台湾、インドネシア等において使用が認可されており、</p>

<sup>1</sup> 要請者によると、コク味とは甘味、塩味、酸味、苦味、うま味の5基本味では表せない味を指し、基本味及び基本味の周辺の味の厚み・ひろがり・持続性・まとまりなども増強する効果を持つとされている。

<sup>2</sup>米国及び欧州等における「フレーバー」とは、日本でいう「香料」のみならず、日本でいう「香料」に分類されない「調味料」（旨味等を付与する物質等）が含まれる場合がある。

	タイ、韓国、台湾及びインドネシアにおいては、使用基準は特段定められていない。
食品安全委員会における食品健康影響評価結果	添加物として適切に使用される場合、安全性に懸念がないと考えられ、ADIを特定する必要はない。
摂取量の推計	使用が想定される各食品分類（スープ、スナック菓子等）に対して、それぞれ最大添加濃度（30～160ppm）で使用した時に摂取されるグルタミンバリングリシンの推定一日摂取量を算出すると、約44 mg/人/日（約0.88 mg/kg体重/日）とされる。
使用基準案	<p>使用基準は設定しない。</p> <p>なお、使用基準を設定しない理由については、以下のとおりである。</p> <p>① 消化管内で分解して食品常在成分になることが科学的に明らかであるため、ヒトが摂取する際の安全性の懸念は低い。</p> <p>② 食品安全委員会の評価結果において、ADIを特定する必要はないとされている。</p>
成分規格案	別紙のとおり。
意見聴取の状況	パブリックコメント及びWTO通報は終了。
答申案	別紙のとおり。



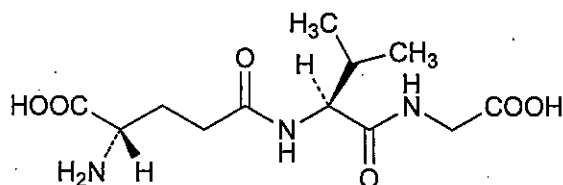
## 答申(案)

1. グルタミルバリルグリシンについては、添加物として人の健康を損なうおそれはないことから、指定することは、差し支えない。
2. グルタミルバリルグリシンの添加物としての成分規格については、以下のとおり設定することが適当である。

## 成分規格(案)

グルタミルバリルグリシン

Glutamyl-valyl-glycine

L- $\gamma$ -Glutamyl-L-valyl-glycine $C_{12}H_{21}N_3O_6$ 

分子量 303.31

(2*S*)-2-Amino-4-[(1*S*)-1-[(carboxymethyl) carbamoyl]-2-methylpropyl] carbamoylbutanoic acid [38837-70-6]

含量 本品を乾燥物換算したものは、グルタミルバリルグリシン ( $C_{12}H_{21}N_3O_6$ ) 95.0~102.0%を含む。

性状 本品は白~淡赤色の粉末である。

確認試験 本品を赤外吸収スペクトル測定法中の臭化カリウム錠剤法により測定するとき、 $3,321\text{cm}^{-1}$ 、 $3,282\text{cm}^{-1}$ 、 $1,712\text{cm}^{-1}$ 、 $1,654\text{cm}^{-1}$ 、 $1,619\text{cm}^{-1}$ 及び $1,541\text{cm}^{-1}$ のそれぞれの付近に吸収帯を認める。

## 純度試験

(1) 鉛 Pbとして $1.0\mu\text{g/g}$ 以下

本品 4.0g を量り、白金製、石英製若しくは磁製のるつぼ又は石英製ビーカーに入れる。硫酸(1→4)を加えて試料全体を潤した後、徐々に温度を上げ、試料が炭化し、硫酸の白煙が発生しなくなるまで加熱する。必要があれば硫酸(1

→4) を更に加え、試料がほとんど炭化するまで加熱する。試料が炭化した後、必要があれば容器に緩くふたをして電気炉に入れ、徐々に温度を上げて 450～600℃で強熱して灰化する。炭化物が残る場合は、必要があればガラス棒で炭化物を砕き、硫酸 (1→4) 1 ml 及び硝酸 1 ml で潤し、白煙が発生しなくなるまで加熱した後、電気炉で強熱して完全に灰化する。残留物に塩酸 (1→4) 10ml を入れ、水浴上で加熱して蒸発乾固する。残留物に少量の硝酸 (1→100) を加え、加温して溶かし、冷後、更に硝酸 (1→100) を加えて正確に 10ml とし、検液とする。別に、鉛標準原液 1 ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とする。この液 4 ml を正確に量り、硝酸 (1→100) を加えて正確に 10ml とし、比較液とする。検液及び比較液につき、鉛試験法第 1 法により試験を行う。

(2) ヒ素  $As_2O_3$  として 1.0 $\mu$ g/g 以下

本品 2.0g を量り、水 20ml を加え、加温し、必要があれば超音波処理して溶かし、検液とする。装置 B を用いる。

乾燥減量 1.0%以下 (105℃, 1 時間)

定量法 本品及び定量用グルタミルバリルグリシン約 0.05g ずつを精密に量り、それぞれを水に溶かし、正確に 50ml とする。それぞれの液 5ml ずつを正確に量り、それぞれに水を加え、正確に 20ml とし、検液及び標準液とする。検液及び標準液をそれぞれ 20 $\mu$ l ずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。検液及び標準液のグルタミルバリルグリシンのピーク面積  $A_T$  及び  $A_S$  を測定し、次式により含量を求める。

$$\begin{aligned} & \text{グルタミルバリルグリシン (C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6) \text{ の含量 (\%)} \\ & = \frac{\text{乾燥物換算した定量用グルタミルバリルグリシンの採取量 (g)}}{\text{乾燥物換算した試料の採取量 (g)}} \times \frac{A_T}{A_S} \times 100 \end{aligned}$$

操作条件

検出器 紫外吸光光度計 (測定波長 210nm)

カラム充てん剤 5 $\mu$ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管 内径 4.6mm, 長さ 25cm のステンレス管

カラム温度 30 ～40℃の一定温度

移動相 A リン酸一カリウム 6.8 g を水 1,000ml に溶かし、リン酸で pH3.0 に調

整する。

移動相B 移動相A 400ml にアセトニトリル 600ml を加える。

濃度勾配 A : B (100 : 0) で 25 分間保持した後, A : B (100 : 0) から (0 : 100) までの直線濃度勾配を 25 分間行う。

流量 1.0 ml/分

#### 試薬・試液

グルタミルバリルグリシン, 定量用  $C_{12}H_{21}N_3O_6$ 。本品は白～淡赤色の粉末である。

含量 本品を乾燥物換算したものは, グルタミルバリルグリシン ( $C_{12}H_{21}N_3O_6$ ) 99.0%以上を含む。

確認試験 本品を赤外吸収スペクトル測定法中の臭化カリウム錠剤法により測定するとき,  $3,321\text{cm}^{-1}$ ,  $3,282\text{cm}^{-1}$ ,  $1,712\text{cm}^{-1}$ ,  $1,654\text{cm}^{-1}$ ,  $1,619\text{cm}^{-1}$  及び  $1,541\text{cm}^{-1}$  のそれぞれの付近に吸収を認める。

純度試験 類縁物質 0.50%以下

本品 25mg を量り, 水を加えて溶かして 25ml とし, 検液とする。この液 5ml を正確に量り, 水を加えて正確に 50ml とする。この液 5ml を正確に量り, 水を加えて正確に 50ml とし, 比較液とする。検液及び比較液 20 $\mu$ l につき, 次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行い, 検液の主ピーク以外のピークの面積及び比較液の主ピーク的面積を測定し, 次式より類縁物質の量を求める。

$$\text{類縁物質の量 (\%)} = \frac{\text{検液の主ピーク以外のピークの合計面積}}{\text{比較液の主ピークの面積}}$$

操作条件 「グルタミルバリルグリシン」の定量法の操作条件を準用する。

乾燥減量 1.0%以下 (105°C, 1時間)

定量法 本品約 0.4g を精密に量り, ギ酸 3ml を加えて溶かし, 酢酸 50ml を加え, 0.1mol/L 過塩素酸液で滴定する。終点の確認は, 通例, 電位差計を用いる。別に空試験を行い補正し, 更に乾燥物換算する。

0.1mol/L 過塩素酸液 1 ml = 30.33mg  $C_{12}H_{21}N_3O_6$

定量用グルタミルバリルグリシン グルタミルバリルグリシン, 定量用を見よ。

アスパラギナーゼ

審議の対象	食品添加物としての指定の可否及び使用基準・成分規格の設定。
経緯	事業者等からの指定等の要請により指定を行うもの。
用途	製造用剤（食品加工の際のアクリルアミド生成抑制）
概要	<p>アスパラギナーゼは、<i>Aspergillus niger</i>（黒色こうじ菌）が本来有しているアスパラギナーゼ遺伝子を増幅して、アスパラギナーゼの生産性を向上させた <i>A. niger</i> ASP-72 株を用いて生産されるものである。アスパラギナーゼは、アクリルアミド<sup>1</sup>を低減する目的で使用される。なお、本品は、食品安全委員会により、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成16年3月25日食品安全委員会決定）の対象ではなく、安全性評価は必要ないと判断されており、組換えDNA技術応用添加物に該当しない。</p>
諸外国での状況	<p>(1) JECFAの評価 JECFAでは、2008年に、GMP（適正製造規範）に沿って適切に製造され、特定の目的（アクリルアミド生成の低減）で使用される場合、ADIは特定しない（not specified）と評価されている。</p> <p>(2) 諸外国の使用状況 コーデックスでは、加工助剤は添加物として取り扱われないため、規格は設定されていない。 米国では、GRASとして認定されている。 EUでは、フランス及びデンマークでは、個別に認可されている。その他の国においては、現時点では、加工助剤としての酵素の使用に規制はない。</p>

<sup>1</sup> 国際がん研究機関（IARC: International Agency for Research on Cancer）による発がん性分類において、アクリルアミドは2A（人に対しておそらく発がん性がある）に分類されている。国内では、食品安全委員会が自ら行う食品健康影響評価の案件として、加熱時に生じるアクリルアミドの食品健康影響評価を実施している。

食品安全委員会における食品健康影響評価結果	添加物として適切に使用される場合、安全性に懸念がないと考えられ、ADIを特定する必要はない。
摂取量の推計	使用される可能性のある食品（群）の一日摂取量及び残存量から、アスパラギナーゼの推定一日摂取量を算出すると、0.549 mgTOS <sup>2</sup> /kg 体重/日とされる。
使用基準案	<p>使用基準は設定しない。</p> <p>使用基準を設定しない理由については、以下のとおりである。</p> <p>① 消化管内で分解して食品常在成分になることが科学的に明らかであるため、ヒトが摂取する際の安全性の懸念は低いこと。</p> <p>② 食品安全委員会の評価結果において、ADI を特定する必要はないと評価されたこと。</p>
成分規格案	別紙のとおり。
意見聴取の状況	今後パブリックコメント及びWTO通報を実施予定。
答申案	別紙のとおり。

<sup>2</sup> 総有機固形物 (Total Organic Solids)

答申(案)

1. アスパラギナーゼについては、添加物として人の健康を損なうおそれはないことから、指定することは、差し支えない。
2. アスパラギナーゼの添加物としての成分規格については、以下のとおり設定することが適当である。

成分規格(案)

アスパラギナーゼ

Asparaginase

定 義 本品は、糸状菌 (*Aspergillus niger* に限る。) が本来有するアスパラギナーゼ遺伝子を増幅させて生産性を向上させた糸状菌 (*A. niger* ASP-72 株に限る。) より得られた、アスパラギンをアスパラギン酸とアンモニアに加水分解する酵素である。食品(賦形、粉末化、希釈、安定化、保存又は力価調整の目的に限る。)又は添加物(賦形、粉末化、希釈、安定化、保存、pH 調整又は力価調整の目的に限る。)を含むことがある。

酵素活性 本品は、1 g あるいは 1 ml 当たり 2,375 単位以上の酵素活性を有する。

性 状 本品は、黄～褐色の澄明な液体又はごくうすい灰み若しくはごくうすい黄みを帯びた白色の顆粒である。

確認試験 本品は、酵素活性測定法により試験を行うとき、活性を示す。

純度試験 (1) 鉛 Pbとして5.0 $\mu$ g/g以下

本品 0.8 g を量り、白金製、石英製若しくは磁製のろつぼ又は石英製のビーカーに入れる。硫酸(1→4)を加えて試料全体を潤した後、徐々に温度を上げ、試料が炭化し、硫酸の白煙が発生しなくなるまで加熱する。必要があれば硫酸(1→4)を更に加え、試料がほとんど炭化するまで加熱する。なお、液体試料及び炭化しにくい試料等の場合には、硫酸(1→4)の代わりに硫酸を用いてもよい。試料が炭化した後、必要があれば容器に緩くふたをして電気炉に入れ、徐々に温度を上げて450～600℃で強熱して灰化する。炭化物が残る場合は、必要があればガラス棒で炭化物を砕き、硫酸(1→4) 1 ml 及び硝酸 1 ml で潤し、白煙が発生しなくなるまで加熱した後、電気炉で強熱して完全に灰化する。残留物に塩酸(1→4) 10 ml を入れ、水浴上で加熱して蒸発乾固する。残留物に少量の硝酸(1→100)を加え、加温して溶かし、冷後、更に硝酸(1→100)を加えて正確に 10 ml

とし、検液とする。なお、500℃以下で灰化操作を行う場合には、耐熱ガラス製のビーカーを使用することができる。別に、鉛標準原液1mlを正確に量り、水を加えて正確に100mlとする。この液4mlを正確に量り、硝酸(1→100)を加えて正確に10mlとし、比較液とする。検液及び比較液につき、鉛試験法第1法により試験を行う。

(2) ヒ素  $As_2O_3$ として4.0 $\mu$ g/g以下(0.50g, 第3法, 装置B)

微生物限度 微生物限度試験法により試験を行うとき、本品1gにつき、細菌数は50,000以下である。また、大腸菌及びサルモネラは認めない。なお、サルモネラの試験は、「ナイシン」の微生物限度試験を準用する。

#### 酵素活性測定法

(i) 基質溶液

L-アスパラギン1水和物1.50gを量り、クエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.0)に加え、かくはんして完全に溶かした後、更にクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.0)を加えて正確に100mlとする。用時調製する。

(ii) 試料溶液

本品約2.5gを精密に量り、クエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.0)20mlを加えて溶かし、更にクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.0)を加えて正確に25mlとする。この液をクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.0)で希釈して、1ml中に6単位を含む液を調製し、試料溶液とする。

(iii) 比較原液

4,000単位に対応する量のアスパラギナーゼを量り、クエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.0)20mlを加えて溶かし、更にクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.0)を加えて正確に25mlとする。この液をクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.0)で希釈して、1ml中に6単位を含む液を調製し、比較原液とする。

(iv) 硫酸アンモニウム標準液

硫酸アンモニウム約3.9gを精密に量り、クエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.0)40mlを加えて15分間かくはんする。更にクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.0)を加えて50mlとし、標準原液とする。標準原液をクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.0)で4, 6, 10, 30, 60倍に希釈し、硫酸アンモニウム標準液とする。

(v) 操作法

2本の試験管に、基質溶液 2.0ml ずつを入れ、37°Cで 10 分間加温する。1本の試験管に試料溶液 0.100ml を、もう1本の試験管に比較原液 0.100ml を加えて混和する。これらの試験管を 37°Cで正確に 30 分間加温した後、トリクロロ酢酸溶液 (1→4) 0.400ml を加えて混和し、更に水 2.5ml を加えて混和する。2本の試験管からそれぞれ 0.100ml を量り、水 4.00ml に加え、フェノール・ニトロプルシド試液 0.850ml を加えて混合し、次亜塩素酸ナトリウム・水酸化ナトリウム試液 (アスパラギナーゼ活性試験用) 0.850ml を加えて 37°Cで 10 分間放置した液を検液及び比較液とする。検液及び比較液につき、水を対照として、波長 600nm における吸光度  $A_T$  及び  $A_C$  を測定する。また、別の2本の試験管に、基質溶液 2.0ml ずつを入れ、それぞれにトリクロロ酢酸溶液 (1→4) 0.400ml を加えて混和し、試料溶液又は比較原液 0.100ml を加えて混和し、37°Cで 30 分間加温した後、水 2.5ml を加えて混和する。これらの液 0.100ml ずつを量り、それぞれ水 4.00ml に加え、フェノール・ニトロプルシド試液 0.850ml を加えて混合し、次亜塩素酸ナトリウム・水酸化ナトリウム試液 (アスパラギナーゼ活性試験用) 0.850ml を加えて 37°Cで 10 分間放置した液をそれぞれ検液の対照液及び比較液の対照液とする。対照液につき、水を対照として、波長 600nm における吸光度  $A_{BT}$  及び  $A_{BC}$  を測定する。別に、基質溶液 2.0ml ずつを量り、5本の試験管に入れ、37°Cで 10 分間加温し、試料溶液の代わりに、それぞれの試験管に異なる濃度の硫酸アンモニウム標準液 0.100ml ずつを加えて、以下検液の調製と同様に操作して得られた液につき、水を対照として、波長 600nm における吸光度を測定する。硫酸アンモニウム標準液の硫酸アンモニウムの濃度と得られた吸光度により検量線を作成し、その傾きを  $a$  (ml/mg) とする。次式により、比較液の調製に用いたアスパラギナーゼの酵素活性を求め、酵素活性が表示量の 91~109% のとき、試料の酵素活性を求める。その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、L-アスパラギンから、1分間にアンモニア 1  $\mu$ mol を遊離させる酵素量を 1 単位とする。

$$\text{酵素活性 (単位/g)} = \frac{A \times D_f \times 25 \times 2 \times 10^3}{a \times W \times 132.14 \times 30}$$

ただし、 $A$  : 検液又は比較液の吸光度 ( $A_T$  又は  $A_C$ ) から対照液の吸光度 ( $A_{BT}$  又は  $A_{BC}$ ) を引いた値

$D_f$  : 試料溶液又は比較原液の希釈係数

$W$  : 試料又は比較液の調製に用いたアスパラギナーゼの採取量 (g)



## 試薬・溶液

アスパラギナーゼ 本品は、糸状菌 (*Aspergillus niger* に限る。) が本来有するアスパラギナーゼ遺伝子を増幅させて生産性を向上させた糸状菌 (*A. niger* ASP-72 株に限る。) より得られた、黄～褐色の澄明な液体又はごくうすい灰み若しくはごくうすい黄みを帯びた白色の顆粒である。本品の1単位は、L-アスパラギンを基質として、pH5.0、37°Cにおいて1分間に1 $\mu$ molのアンモニアを遊離する酵素量とする。

L-アスパラギン1水和物  $C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$  [K8021]

クエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.0) クエン酸1水和物21gを量り、水500mlを加えて溶かし、水酸化ナトリウム試液(2mol/L)でpH5.0に調整し、水を加えて1,000mlとする。

次亜塩素酸ナトリウム・水酸化ナトリウム試液(アスパラギナーゼ活性試験用) 次亜塩素酸ナトリウム試液2.5mlに水を加えて10mlとする。この液の採取量を3mlとし、以下「次亜塩素酸ナトリウム」の定量法に準じて標定し、0.32~0.38mol/L次亜塩素酸ナトリウムになるように調製した後、適当な濃度の水酸化ナトリウム溶液を用いてpH12.5に調整する。この液3mlに水85mlを加え、適当な濃度の水酸化ナトリウム溶液を用いてpH12.5に調整した後、水を加えて100mlとする。冷暗所に保存する。

フェノール・ニトロプルシド試液(アルカリ性) 水酸化ナトリウム溶液(13→50)8~10mlをとり、ニトロプルシドナトリウム溶液(1→100)0.1mlを加えてかくはんし、フェノール・エタノール溶液(5→8)10mlを加えた後、水を加えて50mlとする。用時調製する。