

(案)

添加物評価書

Chryseobacterium proteolyticum
9670 株を利用して生産されたプロ
テイングルタミナーゼ

2010年6月

食品安全委員会添加物専門調査会

目次

	頁
○審議の経緯	2
○食品安全委員会委員名簿	2
○食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿	3
要 約	4
I. 評価対象品目の概要	5
1. 用途	5
2. 名称等	5
3. 基原、製造方法、成分、性状等及び使用方法	5
(1) 基原	5
(2) 製造方法	5
(3) 成分	5
(4) 性状等	7
(5) 使用方法	7
4. 評価要請等の経緯	8
5. 添加物指定の概要	8
II. 安全性に係る知見の概要	8
1. 生産菌株の安全性	8
(1) 非病原性の確認	9
(2) 非毒素産生性の確認	10
2. 本品目の安全性	11
(1) 体内動態（消化管内での分解性等）	11
(2) 毒性	13
3. 一日摂取量の推計等	17
III. 国際機関等における評価	17
1. JECFA における評価	17
2. FDA における評価	17
3. EU における評価	17
4. 我が国における評価等	18
IV. 食品健康影響評価	18
別紙 1：安全性試験結果	19
別紙 2：本品目の推定一日摂取量（使用食品（群）摂取量ベース）	22
別紙 3：本品目の推定一日摂取量（使用食品たん白質素材生産量ベース）	23
<参照>	24

1 <審議の経緯>

2
3 2007 年 8 月 2 日 厚生労働大臣から添加物の指定に係る食品健康影響評価に
4 ついて要請（厚生労働省発食安第 0802001 号）、関係書類
5 の接受

6 2007 年 8 月 9 日 第 202 回食品安全委員会（要請事項説明）

7 2008 年 7 月 18 日 第 60 回添加物専門調査会

8 2008 年 8 月 29 日 第 61 回添加物専門調査会

9 2010 年 6 月 2 日 第 85 回添加物専門調査会

10
11
12 <食品安全委員会委員名簿>

(2009 年 6 月 30 日まで)

見上 彪 (委員長)
小泉 直子 (委員長代理)
長尾 拓
野村 一正
畑江 敬子
廣瀬 雅雄
本間 清一

(2009 年 7 月 1 日から)

小泉 直子 (委員長)
見上 彪 (委員長代理*)
長尾 拓
野村 一正
畑江 敬子
廣瀬 雅雄
村田 容常

* 2009 年 7 月 9 日から

1 <食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿>

(2007年9月30日まで)

福島 昭治 (座 長)
山添 康 (座長代理)
石塚 真由美
井上 和秀
今井田 克己
江馬 眞
大野 泰雄
久保田 紀久枝
中島 恵美
西川 秋佳
林 眞
三森 国敏
吉池 信男

<参考人>

梅村 隆志

(2009年10月1日から)

今井田 克己 (座 長)
山添 康 (座長代理)
石塚 真由美
伊藤 清美
井上 和秀
梅村 隆志
江馬 眞
久保田 紀久枝
塚本 徹哉
頭金 正博
中江 大
林 眞
三森 国敏
森田 明美
山田 雅巳

<参考人>

宇理須 厚雄
鎌田 洋一
手島 玲子

(2009年9月30日まで)

福島 昭治 (座 長)
山添 康 (座長代理)
石塚 真由美
井上 和秀
今井田 克己
梅村 隆志
江馬 眞
久保田 紀久枝
頭金 正博
中江 大
中島 恵美
林 眞
三森 国敏
吉池 信男

<参考人>

宇理須 厚雄
鎌田 洋一
手島 玲子
森田 明美

要 約

酵素として使用される添加物「*Chryseobacterium proteolyticum* 9670 株を利用して生産されたプロテイングルタミナーゼ」(EC 番号 : 3.5.1.44、CAS 番号 : 62213-11-0 (protein-glutamine glutaminase として)) について、各種試験成績等を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に供した試験成績は、*C. proteolyticum* 9670 株の病原性及び毒素産生性に関するもの並びに *C. proteolyticum* 9670 株を利用して生産されたプロテイングルタミナーゼ又はその原液を被験物質とした反復投与毒性、遺伝毒性、アレルギー性等に関するものである。

I. 評価対象品目の概要

1. 用途

酵素（参照 1、2）

2. 名称等

和名：*Chryseobacterium proteolyticum* 9670 株を利用して生産された
プロテイングルタミナーゼ

英名：Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*

EC 番号：3.5.1.44 (protein-glutamine glutaminase として)

CAS 番号：62213-11-0 (protein-glutamine glutaminase として)
(参照 1、2、3)

3. 基原、製造方法、成分、性状等及び使用方法

(1) 基原

本品目の基原微生物である *C. proteolyticum* は、筑波地方の田園土壌から単離された好気性グラム陰性桿菌である（参照 4）。16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹（参照 5、6、7）において、当該基原微生物と類縁の *Chryseobacterium* 属の細菌は、DSMZ¹リスクグループ²の 1 又は 2 に分類されている（参照 8、9）。なお、これまでに JECFA（Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives：FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議）において *Chryseobacterium* 属の細菌を基原微生物とする添加物たる酵素が評価されたことはない。

本品目の生産菌株 *C. proteolyticum* 9670 株（FERM P-17664、BP-7351）は、基原微生物について、紫外線照射、次いで *N*-methyl-*N'*-nitro-nitrosoguanidine を用いて変異させ、作製されたものである（参照 2）。

(2) 製造方法

本品目は、シードロットシステムにより管理された生産菌株 *C. proteolyticum* 9670 株をバッチ法により液体培養し、培養液を除菌ろ過したものについて、限外ろ過及びイオン交換クロマトグラフィーにより脱塩・濃縮・精製を行い、無菌ろ過を行って得られた原液に、製造助剤（食品素材）を加えて粉末としたものとされている（参照 2、10、11）。評価要請者は、当該製造工程において、適切な管理の下、除菌ろ過工程及び無菌ろ過工程を経ることにより、本品目中から生産菌株は完全に除去されることを確認している（参照 10、12）。

(3) 成分

¹ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)

² DSMZ リスク分類は WHO（世界保健機関）が制定した Laboratory biosafety manual に基づき、ドイツ政府が定めた基準（Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen）に沿って、病原性、菌の伝播様式、宿主域、有効な予防方法の有無、有効な治療法の有無を考慮した分類様式である。なお、分類には 1～4 があるが、分類 3 及び 4 に該当するものは高い病原性があるとされる。評価要請者は、*Chryseobacterium* 属に関する情報が充実していることから本分類を参照したとしている。リスク分類 1 及び 2 の内容は以下である。
リスク・グループ 1（個体及び地域社会に対する低危険度）：ヒトに疾病を起こし、あるいは動物に獣医学的に重要な疾患を起こす可能性のないもの。
リスク・グループ 2（個体に対する中等度危険度、地域社会に対する軽微な危険度）：ヒトあるいは動物に病原性を有するが、実験室職員、地域社会、家畜、環境等に対し重大な災害とならないもの、実験室内で暴露されると重篤な感染を起こす可能性はあるが、有効な治療法、予防法があり、伝播の可能性は低いもの。

本品目の有効成分は、生産菌株により菌体外に産生される 185 アミノ酸からなる単量体のたん白質であり、そのアミノ酸の一次配列は図 1、組成は表 1 のとおりであるとされている。当該有効成分の分子量は、アミノ酸組成からの計算では 19,860、SDS-PAGE（SDS-ポリアクリルアミド電気泳動）による測定では 20 kDa であるとされている。等電点は 10.0（参照 3）であるとされている。（参照 1、2）

実生産スケールで製造された本品目の試作製剤（500 単位品）（ロット PGG0552902）は、培養物由来たん白質を 1.90%含有していたとされている。この培養物由来たん白質については、96%が有効成分、残る 4%が約 24 kDa の夾雑たん白質（以下「24 kDa 夾雑たん白質」という。）であるとされている。本品目から当該試作製剤への賦形率は 2 倍であることから、本品目中には、デキストリン等の食品素材のほか、培養物由来たん白質が 3.80%（有効成分 3.65% + 24 kDa 夾雑たん白質 0.16%）含まれるとされている。（参照 10、13）

また、本品目中の TOS（total organic solids：全有機固形物）の含有率は、JECFA の定めた方法（参照 14）により、4.6%と算出されている。（参照 2）

LASVIPDVATLNSLFNQIKNQSCGTSTASSPCITFRYPVD	40
GCYARAHKMRQILMNNGYDCEKQFVYGNLKASTGTCCVAW	80
SYHVAILVSYKNASGVTEKRIIDPSLFSSGPVTDTAWRNA	120
CVNTSCGSASVSSYANTAGNVYYRSPSNSYLYDNNLINTN	160
CVLTKFSLLSGCSPSPAPDVSSCGF	185

図 1 有効成分のアミノ酸一次配列（参照 2、3）

表 1 有効成分のアミノ酸組成（参照 2）

アミノ酸名称	記号	残基数	アミノ酸名称	記号	残基数
Aspartic acid	D	7	Isoleucine	I	8
Asparagine	N	16	Leucine	L	12
Threonine	T	13	Tyrosine	Y	11
Serine	S	27	Phenylalanine	F	6
Glutamic acid	E	2	Lysine	K	7
Glutamine	Q	4	Histidine	H	2
Glycine	G	11	Arginine	R	6
Alanine	A	15	Proline	P	9
Valine	V	14	Tryptophan	W	2
Methionine	M	2	Cysteine	C	11

24 kDa 夾雑たん白質をトリプシン処理して得られたペプチド断片の N 末端アミノ酸配列（①LQDLPVGSGR、②ILYLR、③TNAPTANFHTVGTVR、④SVALGWK 及び⑤SFGVIGAGTGG）からプライマーを設計し、生産菌株の染色体 DNA を鋳型として degenerate PCR が行われた。得られた断片をプローブとして、各種制限酵素で処理した生産菌株染色体 DNA 断片について pUC119 を用いたコロニーハイブリダイゼーションを行った結果、陽性コロニーのプラスミドから約 4 kbp の DNA 断片が得られた。当該 DNA 断片配列上の ORF（オープンリーディングフレーム）のうち、上記①～⑤及びプローブに係る塩基配列を含むものは、390 のアミノ酸（図 2）からなる約 41 kDa のたん白質をコードしていたとされている。

一方、24 kDa 夾雑たん白質の精密質量を MALDI-TOF/MS により測定したところ、m/z は 24,109.1 であった。また、24 kDa 夾雑たん白質をトリプシン

処理して得られたペプチド断片について LC-MS/MS 解析を行うと、195 アミノ酸の組成をもつものが同定されたが、当該組成から計算される分子量（約 20 kDa）は、上記 m/z よりも小さく、かつ、その 195 アミノ酸組成に相当する 390 アミノ酸一次配列上の配列の N 末端及び C 末端はいずれもトリプシンの切断点であった。したがって、390 アミノ酸一次配列上において、24 kDa 夾雑たん白質の配列を特定することはできなかったが、24 kDa 夾雑たん白質は、390 アミノ酸一次配列の 8～282 番目までの 275 アミノ酸のうちの 230～240 アミノ酸で構成されるものと考えられた。評価要請者は、24 kDa 夾雑たん白質は、この 390 アミノ酸から構成されるたん白質が、本品目の製造工程において何らかの原因により分解して生じるものと考えている。（参照 10、15）

MRTSLLCVKNSIAAAMVFLTGMAGAQQWLVNGNSGIVPNN	40
YVGTVDSRILYLRTNGATSNPNQALLNEFGSFIVETTNNT	80
NASKAKGSIAGISNTLGGQAGSSIVGGWTNNLSNAGGAN	120
IVGGQDNAVLNNAASKSVALGWKNIRNHNEFALGVGIDLT	160
EEYSGGFGIDLAAGNRSFVIGAGTGGAKLTNTIPYSIML	200
GMSGNSTMLIKDQSVGIRTNAPTANFHTVGTVRLQDLPVG	240
SGRALVVDSDNGNVMVSNLSILSRTAPSDETVQKLEDRIKTL	280
ENTVEELKQLLVSKNAITDISLSDTPFLGQNAPNPVKNET	320
SIRYFLPHHIKTASLDIYNISGQLIKSVPLREKGNGTIRL	360
SGSELQSGTYVYKMTADGKVTDKAKKLIQD	390

註：網掛部分は 195 アミノ酸配列、下線ボールド部分はプロープに係る配列。

図 2 24 kDa 夾雑たん白質（230～240 アミノ酸）の一次配列を含むと考えられた 390 アミノ酸一次配列（参照 15）

評価要請者の成分規格（案）によれば、本品目は、1 g 当たり 500 単位³以上の力価（酵素活性）を有することとされている。（参照 2、16）

（4）性状等

評価要請者の成分規格（案）によれば、「本品は、白～淡黄白色の粉末で、においがないか又はわずかに特異なにおいがある。」とされている。（参照 2、16）

（5）使用方法

本品目は、たん白質又はペプチド中のグルタミン残基に作用し、グルタミン側鎖のアミド基を加水分解してグルタミン酸残基に変換（脱アミド化）する作用を有する。評価要請者は、その他に既知の副反応はないとしている。食品たん白質素材又は食品中のたん白質の溶解性、乳化特性等を向上させるものであるとされている。（参照 1、2）。

本品目については、至適 pH が 5～7、至適温度が 50～60℃で、50℃1 時間処理では安定であるが、70℃1 時間処理ではほぼ完全に失活するとされている。阻害剤として Ag⁺、Zn²⁺、Cu²⁺及びヨードアセトアミドが挙げられている。（参

³ 評価要請者は、Cbz-Gln-Gly（ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンリグリン）を基質とし、37±0.5℃で 10 分間、本品目を作用させ、生成するアンモニアをインドフェノール法により測定したとき、1 分間にアンモニア 1 μmol に相当する吸光度（波長 630 nm）の増加を与える量が 1 単位であるとしている。

照 2、3）。

評価要請者によれば、本品目は、**別紙 2** の食品（群）に最大 0.020%又は 0.001% 含有され、**別紙 3** の食品たん白質素材に対してたん白質あたり最大 2.0%添加して使用するものであるとしている。（参照 2）

4. 評価要請等の経緯

食品たん白質素材（カゼイン、乳清たん白質、乾燥卵白、大豆たん白質、小麦たん白質等）は、ハム・ソーセージ類、パン類、魚介（練り製品）等の様々な加工食品に使用されている。しかしながら、溶解特性、乳化特性、泡沫特性、ゲル化特性といった物理的な機能特性が低いために用途が限られている素材もあるとされている。こうした機能特性は、たん白質中のグルタミン残基等のアミド基の加水分解（脱アミド化）によって改善されるといわれている。化学的手段（酸による加水分解）による脱アミド化では、意図しない反応（ペプチド結合の切断、他のアミノ酸残基の修飾等）によるたん白質本来の栄養価や機能特性の低下、予期せぬ副生成物等の問題（参照 1 7）があるとされている。本品目は、酵素反応という生物化学的手段により、食品たん白質素材や食品中のたん白質の脱アミド化を行うものであり、反応選択性等において化学的手段よりも優れているとされている。

米国では、評価要請者が本品目について GRAS (generally recognized as safe : 一般に安全とみなされるもの) としての届出を行ったところ、2009 年 7 月、FDA（米国食品医薬品庁）から当該届出に異議がない旨の回答がなされている。（参照 1 8）

EU（欧州連合）では、これまで一部の加盟国を除き、加工助剤たる酵素を添加物として規制していなかった。しかしながら、2008 年に公布された新たな欧州議会・欧州理事会規則により、加工助剤たる酵素についても添加物としての規制の対象となる見込みである（参照 1 9）。

今般、評価要請者から厚生労働省に指定要請がなされ、評価資料が取りまとめられたことから、食品安全基本法に基づき、食品健康影響評価が食品安全委員会に依頼されたものである。

5. 添加物指定の概要

C. proteolyticum 9670 株を利用して生産されたプロテイングルタミナーゼについて、酵素としての使用に関する基準及び成分規格を定めた上で、新たに添加物として指定しようとするものであるとされている。（参照 1）

II. 安全性に係る知見の概要

1. 生産菌株の安全性

添加物たる酵素が微生物を基原とするものである場合においては、一般的に、その微生物は非病原性のものであって、毒素を産生するおそれのないものであることとされている（参照 1 4、2 0）。評価要請者は、本品目の製造工程において、適切な管理の下、除菌ろ過工程及び無菌ろ過工程を経ることにより、本品目中から生産菌株は完全に除去されることを確認している（参照 2、1 0、1 2）が、生産菌株の非病原性及び非毒素産生性を確認するために、以下のような試験等が行われている。

1 (1) 非病原性の確認

2 農林水産省農林水産技術会議事務局「動物性飼料並びに微生物飼料の安全性
3 評価手法の開発」(参照 2 1、2 2)に記載された方法に準じ⁴、生産菌株並び
4 にその培養液の上清及び菌体破碎後上清について、静脈内投与試験及び経口投
5 与試験が行われている。

7 ① 生産菌株の静脈内投与試験

8 a. 緑膿菌株との比較

9 5週齢のICRマウス(対照群雄5匹、各投与群雄10匹)に、菌株(0、生産
10 菌株 2.9×10^7 CFU、 2.9×10^8 CFU又は緑膿菌株(*Pseudomonas aeruginosa*
11 IFO3919株) 1.1×10^6 CFU若しくは 1.1×10^7 CFU)又は生産菌株の培養液⁵
12 の上清若しくは菌体破碎後上清を単回静脈内投与した。投与後14日間の観察
13 の後、剖検、病理組織学的検査等が行われた。

14 緑膿菌株 1.1×10^7 CFU投与群では投与2日後から6日後にかけて6例が死
15 亡したが、投与後14日間において、緑膿菌株 1.1×10^6 CFU投与群のほか、
16 対照群及び生産菌株投与群に死亡例はなかった。

17 一般状態では、生産菌株 2.9×10^8 CFU投与群及び生産菌株培養液上清投与
18 群において、投与15分後から自発運動の低下、腹這い位及び立毛が認められ
19 たが、投与約3時間後には消失した。緑膿菌株 1.1×10^7 CFU投与群では、投
20 与直後から立毛及び斜頸が認められた。

21 体重については、生産菌株、生産菌株培養液上清及び生産菌株培養液菌体
22 破碎後上清の投与群では変化は認められなかった。一方、緑膿菌株 1.1×10^6
23 CFU投与群では増加抑制が認められ、さらに 1.1×10^7 CFU投与群では観察
24 期間を通じた体重の低値及び増加抑制が認められた。

25 剖検では、生産菌株、生産菌株培養液上清及び生産菌株培養液菌体破碎後
26 上清の投与群では異常は認められなかった。一方、緑膿菌株 1.1×10^6 CFU
27 投与群では1例に腎臓の褪色が認められ、さらに 1.1×10^7 CFU投与群の生存
28 4例では脾臓の腫脹及び褪色並びに腎臓の褪色、萎縮等が認められた。

29 生残菌については、生産菌株投与群のいずれの器官においても検出されな
30 かった。一方、緑膿菌株 1.1×10^6 CFU投与群では、10例中1例の腎臓におい
31 て検出され、 1.1×10^7 CFU投与群の生存4例では、脳(1/4)、肺(2/4)、
32 肝臓(2/4)及び腎臓(4/4)において検出された。

33 病理組織学的検査では、対照群及び生産菌株 2.9×10^7 CFU投与群において
34 変化は認められなかったが、生産菌株 2.9×10^8 CFU投与群の10例中4例及び
35 生産菌株培養液上清投与群の10例中1例において、肝臓に軽度の巣状壊死が
36 認められた。緑膿菌株 1.1×10^6 CFU投与群10例では、軽度の肝臓巣状壊死
37 (5/10)、軽度の腎炎(1/10)及び中等度の化膿性腎盂腎炎(1/10)が認め
38 られた。さらに 1.1×10^7 CFU投与群の生存4例では、軽度の脳髄膜炎(1/4)、
39 軽度～中等度の肝臓巣状壊死(4/4)及び中等度～重度の化膿性腎盂腎炎(4/4)
40 がみられ、死亡した6例においても、肝臓の巣状壊死(5/6)、化膿性腎盂腎
41 炎(6/6)等が認められたとされている。評価要請者は、巣状壊死について、

⁴ 微生物の非病原性及び非毒素産生性を実験データから評価する国際的に認められた手法は見当たらない。評価要請者は、本試験が微生物の安全性を評価する手法として唯一公開されており、接種条件として最も厳しい条件(血中に直接接種)であるため、これに準じて試験を実施したとしている。

⁵ 2.9×10^9 CFU/mL相当の生産菌株培養液。

菌体の病原性にかかわらず、血中の細菌を補足し、排除する主要器官である肝臓において、その殺菌の過程において過剰な活性酸素種や炎症性サイトカインが発生し、周辺の肝細胞を含む実質細胞の細胞死を招いたことによるものであるとしている。（参照 10、23、24）

b. 乳酸菌株との比較

5週齢のICRマウス（各群雄5匹）に、菌株（0、生産菌株 1.2×10^8 CFU又は乳酸菌株（*Lactobacillus casei* ATCC393株） 3.7×10^8 CFU）を単回静脈内投与した。投与14日後の肝臓について病理組織学的検査が行われた。生産菌株投与群の肝臓においては、3例に限局性かつ散在性の変性壊死が認められたが炎症反応は伴っていなかったとされている。他方、乳酸菌株投与群の肝臓においては、5例全てに変性壊死が認められ、いずれも炎症性細胞浸潤を伴う急性肝炎像を示していたとされている。なお、陰性対照群の肝臓においては明らかな病変は認められていない。試験担当者は、生産菌株投与群における肝病変は、乳酸菌株投与群におけるものよりも軽度であること、さらに、生産菌株投与群では炎症反応がみられなかったが、乳酸菌株投与群ではリンパ球浸潤を伴う急性炎症を引き起こしており、肝傷害作用のほかに強い免疫刺激能を有すると考えられることから、生産菌株は当該乳酸菌株よりも病原性が低いと結論している。（参照 10、24）

② 生産菌株の経口投与試験

5週齢のICRマウス（対照群雄5匹、投与群雄10匹）に、生産菌株（0、 1.3×10^9 CFU）を単回強制経口投与（胃内挿管）した。投与後14日間の観察の後、剖検、病理組織学的検査等が行われた。対照群及び生産菌株投与群に死亡例はなかった。生残菌については、いずれの器官においても検出されなかった。病理組織学的検査においては、対照群の1例において軽度の肝臓巣状壊死がみられたが、生産菌株投与群では異常所見は認められなかった。そのほか、一般状態、体重及び剖検では生産菌株の投与に関連した変化は認められなかったとされている。（参照 23）

以上より、静脈内単回投与試験において観察した器官に生残菌が認められなかったことに加え、本品目の製造工程においては、適切な管理がなされることにより菌体が完全に除去されることから、本生産菌株には問題となるような感染性の懸念はないものと考えられる。静脈内投与試験において、緑膿菌株投与群では死亡例が認められたが、当該群を上回る量の生産菌株を投与した群において死亡例はなかった。本生産菌株投与群において認められた肝臓の巣状壊死については、緑膿菌株投与群、さらに食経験のある乳酸菌株投与群よりも、発生率及び程度は低く、また、その発症機序は本生産菌株の病原性によるものとは考えにくい。加えて、静脈内投与と同程度の量の経口投与では異常所見は認められていない。したがって、適切に管理された本生産菌株については、経口摂取において病原性の懸念はないものと考えられる。

（2）非毒素産生性の確認

（1）の静脈内投与試験において、生産菌株培養液上清投与群では、一般状態及び病理組織学的検査において、生産菌株投与群と同様又はより軽度の所見がみ

られたが、生産菌株培養液菌体破碎後上清投与群では、特段の異常所見は認められなかった。また、生産菌株に係る基原微生物はグラム陰性菌であるものの、本品目は食品への添加を通じて摂取されるものであり、エンドトキシンによる有害影響の懸念はないと考えられるが、(1)の試験に用いられた生産菌株培養液(2.9×10⁹ CFU/mL相当)の上清又は菌体破碎後上清のエンドトキシン濃度を測定した結果、3~30 EU/mLであったとされている。試験担当者によれば、この濃度は0.3~6.0 ng/mLに相当し、飲料水中に含まれるとされる0.1~2.0 ng/mLと同程度の低いレベルであるとしている(参照23)。

したがって、適切に管理された本生産菌株については、経口摂取において、毒素産生性の懸念はないものと考えられる。

なお、参考までに、本生産菌株が分類されている *Flavobacteriales* 目に属する合計3科69属⁶まで範囲を拡大し検索したところ、毒素産生性に係る報告は、アヒル病原菌として知られる *Riemerella anatipestifer* の産生する CAMP 試験陽性溶血素の解明に関するもの一報(参照25)及び *Capnocytophaga canimorsus* が感染したマウス・マクロファージ由来培養細胞株(J774)の生存率低下等に関するもの一報(参照26)の合計2報が見出されたのみであった。しかしながら、このことは、同一目内とはいえそれほど類縁性が高くない他の細菌も含めた事実であることから、本生産菌株の非毒素産生性を担保するものではない。

以上を総合的に勘案すると、本専門調査会としては、適切に管理された本生産菌株については、経口摂取において、病原性及び毒素産生性の懸念はないものと考えられる。

2. 本品目の安全性

(1) 体内動態(消化管内での分解性等)

本品目は、デキストリン等の食品素材及び有効成分(185 アミノ酸から構成されるたん白質)を主たる成分とするものであることから、他の食品素材及び食品由来のたん白質と同じように消化管で分解され、体内へ吸収されると推定される。このことをより明らかにするため、厚生省の「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」の表2「食品添加物が食品内又は消化管内で分解して食品常在成分となることを確認する場合の検討事項」に従って整理した。

① 添加物の通常の使用条件下で、当該物質が容易に食品内又は消化管内で分解して食品常在成分と同一物質になること。

本品目の有効成分、速やかに分解されるものとして RubisCO (ほうれんそうのリブロース1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ)、分解されにくいものとして Ovm (卵白のオボムコイド) 又は非常に分解されにくいものとして BLG (牛乳のβ-ラクトグロブリン) を、SGF (simulated gastric fluid: 人工胃液) 又は SIF (simulated intestinal fluid: 人工腸液) に添加し、37℃で0、0.5、2、5、10、20、30又は60分間インキュベートを行った後、SDS-PAGEによる測定が行われた。SGFの組成はILSI (International Life Science Institute: 国際生命科学協会) の Allergy and Immunology Institute の主導により国際的に

⁶ 2006年4月現在の NCBI (National Center for Biotechnology Information: 米国立生物工学情報センター) の Taxonomy Browser より

バリデートされたもの（参照 2 7）に、SIFの組成はUSP28-NF23（参照 2 8）に拠っている。Ovm及びBLGは難分解性を示した一方で、本品目の有効成分は、pH1.2のSGFでは0.5分間、pH2.0のSGFでは5分間で2,500 Da⁷以下のペプチド又はアミノ酸レベルに分解され、RubisCO とほぼ同等の易分解性を示した。また、pH6.8の人工腸液中でもRubisCO及びOvmと同等の分解性を示したとされている（参照 2 9）。

以上より、本品目の有効成分は、消化管内で速やかに2,500 Da以下のペプチド又はアミノ酸レベルに分解すると考えられた。

② 食品内又は消化管内での分解に関わる主要な因子（pH、酵素等）が明らかであること。

本品目の有効成分が消化管において容易に分解することを示した上記の試験において、SGFについてはpH1.2～2.0及びペプシン、SIFについてはpH6.7～6.9及びパンクレアチン（トリプシン）（参照 2 9）と、消化に関わる主要な因子が明らかにされている。

③ 添加物の通常の使用条件下で適正な量を使用した場合、当該添加物の体内への吸収が食品成分と同程度であり、他の栄養成分の吸収を阻害しないこと。

上述のとおり、本品目の有効成分は消化管内で速やかに分解され、他の食品由来のペプチド又はアミノ酸と同じように体内へ吸収されると考えられる。糖質、ミネラル、ビタミン等その他の栄養成分の吸収を阻害する懸念はないものと考えられる。

④ 摂取された添加物の未加水分解物又は部分加水分解物が大量に糞便中に排泄されないこと。さらに、未加水分解物又は部分加水分解物が生体組織中に蓄積しないこと。

上述のとおり、本品目の有効成分はSGF中においては速やかに2,500 Da以下のペプチド又はアミノ酸まで分解された。未加水分解物、部分加水分解物が大量に糞便中に排泄されることはなく、生体組織中に蓄積する懸念はないものと考えられる。

⑤ 添加物を使用した食品を摂取したとき、当該食品の主成分の過剰摂取の問題が起きないこと。

本品目は、食品中のたん白質又は食品たん白質素材のグルタミン残基をグルタミン酸残基へ変換するものである。たん白質としての推定摂取量は、最大で6.7 mg/人/日⁸と推定され、日本人のたん白質の平均一日摂取量69.8 g/人/日の約0.01%に過ぎない。したがって、本品目を新たに使用することによって食品の主成分の過剰摂取の問題は起こらないものと考えられる。通常、食品たん白質中のグルタミンの大部分は、胃酸存在下でグルタミン酸に変化していると考えられる。よって、本品目により処理された食品たん白質素材を摂取しても、通常の食品たん白質を摂取した場合と栄養学的に大差はないものと考えられる。

⁷ 試験に用いた分子量マーカーのうち、最小のものの分子量が 2,500 Da であった。

⁸ 使用食品（群）摂取量ベースよりも高い数値となった、使用食品たん白質素材生産量ベースの本品目の推定一日摂取量 175.58 mg/人/日を基に、 $175.58 \times 3.80\% = 6.7 \text{ mg/人/日}$ と算出される。

(2) 毒性

II 1 のとおり、生産菌株については経口摂取において病原性及び毒素産生性の懸念はないと考えられ、II 2 (1) のとおり、本品目の主たる成分については「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場合」に該当すると考えられたことから、90 日間反復投与毒性、遺伝毒性及びアレルギー性に係るデータについて下記のとおり評価を行った。

① 反復投与毒性

6週齢のSDラット（各群雌雄各12匹）に、実生産スケールで製造された、本品目を粉末化する前の原液（ロットPG-Y57-002@、本品目換算濃度253.8 mg/mL、549単位/mL、TOS 0.93%（w/v））（0、25、50、100%（v/v）を10 mL/kg体重/日ずつ。本品目換算で0、635、1,269、2,538 mg/kg体重/日。TOS換算で0、23、46、93 mgTOS/kg体重/日。）を13週間強制経口投与した。その結果、いずれの群においても死亡動物は認められなかった。一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科学検査、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量並びに剖検及び病理組織学的検査において、被験物質の投与に関連した影響はみられなかった。尿検査では100%×10 mL/kg体重/日投与群の雌でナトリウム及び塩素の排泄量の高値がみられたが、試験担当者は、これを本品目の精製工程由来⁹の不純物であるナトリウム及び塩素の摂取¹⁰に伴う体液恒常性維持の結果と考えている。以上の結果より、試験担当者は、原液のロットPG-Y57-002@に係るNOAELを、雌雄ともに本試験の最高用量である100%×10 mL/kg体重/日（当該ロットの本品目換算で2,538 mg/kg体重/日、TOS換算で93 mgTOS/kg体重/日）としている。（参照 3 0）

本専門調査会としても、本試験における当該ロットのNOAELを、TOS換算で93 mgTOS/kg体重/日とした。

② 遺伝毒性

a. 微生物を用いた復帰突然変異試験

実生産スケールで製造された本品目（ロットPGP2-030930、1,024単位/g）について、細菌（*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び *Escherichia coli* WP2uvrA）を用いた復帰突然変異試験（プレインキュベーション法）（最高用量5 mg/plate）では、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性の結果が報告されている（参照 3 1）。

b. ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験

実生産スケールで製造された本品目（ロットPGP2-030930、1,024単位/g）についてのCHL/IU（チャイニーズ・ハムスター肺由来培養細胞株）を用いた染色体異常試験（観察対象とした最高用量：短時間処理代謝活性化系非存在下0.675 mg/mL；同存在下0.425 mg/mL；連続処理0.250 mg/mL）では、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性の結果が報告されている。（参照 3 2）

⁹ 緩衝及び pH 調整に用いたナトリウム塩並びに溶離に用いた塩化ナトリウムに由来するものとされている。

¹⁰ 対照群での摂取量はナトリウム 0.054 mEq/kg 体重/日、塩素 0.051 mEq/kg 体重/日であるのに対し、100%×10 mL/kg 体重/日投与群での摂取量はナトリウム 0.238 mEq/kg 体重/日、塩素 0.082 mEq/kg 体重/日であった。

c. げっ歯類を用いた小核試験

実生産スケールで製造された本品目（ロットPGP2-030930、1,015 単位/g¹¹）についての、9週齢のICRマウス（各群雄5匹）への2日間強制経口投与による *in vivo* 骨髄小核試験（最高用量2,000 mg/kg体重/日）では、陰性の結果が報告されている。（参照 3 3）

以上の結果から、本品目については、最高用量まで実施された復帰突然変異試験において代謝活性化系の有無にかかわらず陰性の結果であり、染色体異常試験でも陰性の結果であるほか、最高用量まで実施された小核試験においても陰性の結果であったことから、本専門調査会としては、本品目に遺伝毒性はないものと考えた。

③ アレルゲン性

本品目がヒトに対するアレルゲン性を有するという知見は現時点で報告されていない。本品目は遺伝子組換え微生物を利用して製造されたものではないが、有効成分がたん白質であることから、「遺伝子組換え食品（微生物）の安全性評価基準」（平成20年6月食品安全委員会決定）（参照 3 4）に準じて、①既知のアレルゲンとの構造相同性及び②人工消化液による分子量又は免疫反応性の変化及び等に関する試験が行われており、これらを基に、本品目のアレルゲン性について評価を行うこととした。また、本品目が食経験のない微生物を基原とする生産菌株を利用して生産されたものであることを踏まえ、本品目中に0.16%含まれ、食品中に最大0.32 ppm¹²存在することになると考えられる24 kDa夾雑たん白質のアレルゲン性についても評価を行うこととした。

a. 既知のアレルゲンとの構造相同性

(a) 有効成分

ILSI-HESI (Health and Environmental Sciences Institute) のProtein Allergenicity Technical Committeeによるモノグラフ（参照 3 5）に記載されているものの中から、相同性検索機能を備えているたん白質データベースとして、ADFS (Allergen Database for Food Safety)、AllerMatch、SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins) 及びFARRP (Food Allergy Research and Resource Program) の4つのデータベースが選択されている。

7～8アミノ酸配列が連続一致するたん白質は、いずれのデータベースにおいても認められなかった。6アミノ酸配列が連続一致するたん白質は、卵白由来のOvm (Gal d 1)、ラテックスアレルゲンであるゴムの木由来のクラスIキチナーゼ（推定）(Hev b 11.0101 及びそのアイソザイムHev b 11.0102) 並びに *Aspergillus fumigatus* 由来の機能未知たん白質Asp f 9 及びAsp f 16であった（参照 3 6）。なお、一般的に、6アミノ酸配列以下の連続一致は、ノイズの範囲内と判断できる可能性が高いといわれている。

¹¹ 評価要請者は、復帰突然変異試験、染色体異常試験及び小核試験のいずれも同一ロットを被験物質として用いているが、前二試験と小核試験の試験実施日が異なるため、被験物質の活性測定結果がわずかではあるが異なつたとしている。

¹² 食品中の本品目最大含有率 $0.02\% \times 0.16\% = 0.32 \text{ ppm}$ と算出される。なお、使用食品（群）摂取量ベースよりも高い数値となった、使用食品たん白質素材生産量ベースの本品目の推定一日摂取量 175.58 mg/人/日 と、平成18年国民健康・栄養調査における食品摂取総量 $2,087.1 \text{ g/人/日}$ を基に、食品摂取総量に対する 24 kDa 夾雑たん白質摂取量の比は $175.58 \times 0.16\% / (2,087.1 \times 10^3) = 0.13 \times 10^{-6}$ と算出される。

る（参照 3 7、3 8）¹³。Gal d 1については、その抗原決定基（エピトープ）と推定される複数か所のドメインのうち、連続一致がみられた部位と完全に一致するものはなかった。Hev b 11.0101 及びHev b 11.0102については、そのエピトープとされるドメインと、連続一致がみられた部位とは一致しなかった。Asp f 9及びAsp f 16については、そのエピトープは決定されておらず、連続一致がみられた部位がエピトープに該当するものかどうかは分からなかった。（参照 3 9）

既知のアレルゲンとのアラインメントを行い、全長のblast検索を行った場合においては、相同性に関するE-value¹⁴は最低でも0.43であった¹⁵。6アミノ酸配列の連続一致がみられた、ホモログを含む5種類のアレルゲンたん白質（Gal d 1、Hev b 11.0101、Hev b 11.0102、Asp f 9、Asp f 16）との相同性に関するE-value値は最低でも48であったとされている。（参照 4 0、4 1）

80 アミノ酸スライディングウインドウ検索（アミノ酸配列を80個単位に区切り、その中で35%以上の相同性を示すものの検索）の結果から、35%以上の相同性を有するものは認められなかったとされている。（参照 3 6）

(b) 24 kDa夾雑たん白質

24 kDa夾雑たん白質の230～240アミノ酸一次配列を包含すると考えられた（I 3（3））275アミノ酸一次配列について、有効成分と同様のたん白質データベースを用いて検索を行ったところ、8アミノ酸配列が連続一致するたん白質は認められなかった。6～7アミノ酸配列が連続一致するたん白質は、①*Phleum pratense*（チモシーグラス）由来のPhl p 5（6アミノ酸配列）、②*Daucus carota*（にんじん）由来のDau c 1.0201（6アミノ酸配列）、③*Arachis hypogaea*（落花生）由来のAra h 3/4グループ（Ara h 3、Ara h 4、Ara h 3/4 及び iso-Ara h 3）（6又は7アミノ酸配列）であった。

Phl p 5については、N末端側のフラグメントPhl p 5（56-165）がコンフォメーション・エピトープを形成しているとの報告（参照 4 2）があり、連続一致した6アミノ酸配列はそれよりも下流に位置している。

Dau c 1.0201については、そのエピトープは決定されておらず、連続一致がみられた配列がエピトープに該当するものかどうかは分からなかった。

Ara h 3/4グループについては、その4つのエピトープが存在するN末端側の酸性サブユニットには、連続一致がみられた配列は含まれていなかった（参照 4 3）。

なお、参考までに、24 kDa夾雑たん白質について、動物抗体を用いた市販の落花生たん白質測定キットに供したところ、当該キットの抗体には

¹³ 2001年、FAO/WHO 専門家会議は6アミノ酸以上の連続完全一致を指標として評価する指針としてアレルゲン性評価の判断樹（decision tree）を設けたが、6アミノ酸連続一致を指標とする評価はノイズ（＝アレルゲン性有無とは関係のない偶然の一致）が多いため偽陽性が出やすいとの指摘がある。2003年 Codex 委員会の組換え DNA 植物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドラインのアレルゲン性評価に関する添付資料では、比較すべき連続するアミノ酸残基の個数までは限定していない。

¹⁴ E-Value: データベース登録された配列との類似性が偶然に出現する期待値を示す。つまり、E-Value が小さい一致ほど偶然ではない確かな一致であるとみなすことができる。

¹⁵ 0.43 に対応したアレルゲンは、キウイ由来のプロテアーゼである「アクチニジン（Act c 1）」が該当した。なお、当該酵素は既存添加物名簿に収載されている。

必ずしもAra h 3/4グループに対する抗体が含まれているとは限らないが、陰性の結果が報告されている（参照 4 4）。

既知のアレルゲンとのアラインメントを行い、全長のblast検索を行った場合においても、相同性に関するE-valueが0.01を下回るような相同性の高いものは見当たらなかったとされている。

また、80 アミノ酸スライディングウインドウ検索の結果から、35%以上の相同性を有するものは認められなかったとされている。（参照 4 3）

b. SGF又はSIFによる分子量又は免疫反応性の変化

(a) 有効成分

2 (1) 「消化管内での分解性等」の項で述べたように、SGF及びSIFを用いた分解性に係る試験の結果、本品目の有効成分は最も分解性の速いたん白質グループに分類され、pH1.2のSGF中では0.5分後に2,500 Da以下のペプチド又はアミノ酸レベルに分解されたと報告されている。（参照 2 9）

(b) 24 kDa夾雑たん白質

24 kDa夾雑たん白質を、pH1.2のSGFに添加し、37℃で0、0.5、2、5、10、20、30又は60分間インキュベートを行った後、SDS-PAGEによる測定を行った結果、24 kDa夾雑たん白質は難分解性を示したとされている。

また、あらかじめ70℃30分間加熱処理した場合においても、24 kDa夾雑たん白質はSGFに対して難分解性を示したとされている。

他方、あらかじめ90℃30分間又は100℃10分間加熱処理した場合においては、24 kDa夾雑たん白質は、SGFに添加して5分後には2,500 Da以下のペプチド又はアミノ酸レベルにほぼ分解されたとされている。（参照 4 5）

24 kDa夾雑たん白質を、SIFに添加し、上記と同様のインキュベートを行った後、SDS-PAGEによる測定を行った結果、24 kDa夾雑たん白質は難分解性を示したとされている。

一方、あらかじめ90℃30分間又は100℃10分間加熱処理した場合においては、24 kDa夾雑たん白質は、SIFに添加して10～20分後に2,500 Da以下のペプチド又はアミノ酸レベルにほぼ分解されたとされている。（参照 4 6）

24 kDa夾雑たん白質は、SGF又はSIFで1時間以上処理した後においても、抗24 kDa夾雑たん白質ウサギ血清を用いたSDS-PAGE～ウェスタンブロッティング解析で免疫反応性の変化が認められなかった。（参照 4 7）

以上より、本専門調査会としては、本品目の有効成分については、既知アレルゲンとの構造相同性は低く、SGF又はSIFにより速やかに分解されることから、アレルゲン性の懸念は低いと考える。

④ ヒトにおける知見

本生産菌株は、1997年にその基原微生物が土壌より単離されてから、2005年10月末時点まで、天野エンザイム株式会社筑波研究所、中央研究所、岐阜研

究所において、研究開発のために継続して培養されてきた。その間、岐阜研究所内での3 Lスケールのジャーファーメンター培養を130回延べ約1,000バッチ、西春工場での800 Lスケールのタンク培養を17回延べ約34バッチ、養老工場55 kLスケールのタンク培養を3回3バッチ繰り返してきた。それらに携わった従業員は20余名に及ぶが、生産菌株の取扱いに起因すると考えられる健康上の異変、異常所見はみられていないとされている。（参照 2）

Chryseobacterium 属の類縁菌について、抵抗力の弱った患者等での感染例（日和見感染例）が報告されている。（参照 2）

3. 一日摂取量の推計等

本品目は、カゼイン、乳清たん白質、乾燥卵白、大豆たん白質、小麦たん白質等といった食品たん白質素材に添加して使用される。これらの素材が使用され、又は本品目が直接使用される可能性のある食品（群）としては、パン類、麺類等の小麦・加工品、ケーキ・ペストリー類等の菓子類、豆腐、油揚げ類等の大豆・加工品、魚介（練り製品）等の魚介加工品、ハム・ソーセージ類、チーズ等の牛乳・乳製品、ビール、茶等のアルコール飲料及びその他の嗜好飲料並びにしょうゆ等の調味料が挙げられている。かかる食品（群）又はそれらの原材料の全てに本品目が別紙 2 の最大含有率で含まれ、全量がそのまま最終食品に移行して消費されたとした場合を想定した。平成 18 年国民健康・栄養調査から得られる食品（群）の一日摂取量と、本品目の最大添加率から、本品目の推定一日摂取量は 3.1 mgTOS/人/日であった。この値を体重 50 kg で除すと 0.063 mgTOS/kg 体重/日となる。（別紙 2 参照）

他方、食品たん白質素材の生産量を基に、我が国において製造・輸入された当該素材の全てに本品目が別紙 3 の最大添加率（TOS ベース）で添加され、全量がそのまま最終食品に移行して消費されたとした場合を想定すると、本品目の推定一日摂取量は 8.1 mgTOS/人/日となる。この値を体重 50 kg で除すと 0.16 mgTOS/kg 体重/日となる。（別紙 3 参照）

Ⅲ. 国際機関等における評価

1. JECFA における評価

JECFA においては、本品目についての評価はこれまでに行われていない。

2. FDA における評価

米国では、評価要請者が本品目について GRAS としての届出を行ったところ、2009 年 7 月、FDA から当該届出に異議がない旨の回答がなされている。（参照 1 8）

3. EU における評価

評価要請者によれば、EUでは本品目のような加工助剤たる酵素を添加物として規制していなかった（ただしインベルターゼ（E1103）及びリゾチーム（E1105）については、添加物としての規制対象とされていた。）（参照 1 9）ため、規制を実施しているフランス及びデンマークを除き、本品目の欧州への供給を開始しているとしている。（参照 2）

4. 我が国における評価等

本品目のようなたん白質中のグルタミン残基を脱アミド化する酵素であって、食品やその原材料の中に元々含まれるものとしては、発芽中の「いんげん」等に存在が報告されているものがあるが、本品目と同一のものはこれまでに見出されていない（参照 2）。*Bacillus circulans*の菌体内に存在することが報告されているペプチドグルタミナーゼは、ペプチド中のグルタミン残基を脱アミド化するものの、高分子のたん白質には作用せず、本品目とは異なるものとされている（参照 2、48）。

本品目と同様に脱アミド化能を有する酵素として、トランスグルタミナーゼ及びグルタミナーゼが既存添加物名簿に収載されている。しかしながら、グルタミナーゼはたん白質及びペプチドには反応しない（参照 2）。また、トランスグルタミナーゼによるたん白質の脱アミド化は、他の一級アミノ基との架橋反応が主たるものであり、本品目による脱アミド化のような反応は副次的なものとされている（参照 2）。本品目には、トランスグルタミナーゼのような架橋反応を起こす作用は認められていないとされている（参照 4）。

他のたん白質の脱アミド化法としては物理化学的方法が知られており、我が国では高温での塩酸処理がなされた小麦粉グルテンが市販されている。ただし、塩酸加水分解では、グルタミン残基のほか、アスパラギン残基も脱アミド化されるといわれている。（参照 2）

以上のことから、評価要請者は、我が国においては、本品目のような酵素により処理された脱アミド化たん白質の食経験はほとんどないが、塩酸加水分解による脱アミド化たん白質やトランスグルタミナーゼの副反応で生じた脱アミド化たん白質の食経験はあると考えられるとしている。（参照 2）

IV. 食品健康影響評価

1 別紙 1 : 安全性試験結果
2

試験 種類	動物種	試験 期間	投与 方法	動物数 /群	被験 物質	投与量	試験結果	参照 No.
非 病 原 性	マウス	単回	静脈 内	対照群雄 5 投与群雄 5	菌株	0 生産菌株 2.9×10^7 、 2.9×10^8 CFU 緑膿菌株 1.1×10^6 、 1.1×10^7 CFU 生産菌株培養液 上清 生産菌株培養液 菌体破碎後上清	緑膿菌株1.1×10^7 CFU投与群では投与2日 後から6日後にかけて6例が死亡したが、投与 後14日間において、緑膿菌株1.1×10^6 CFU 投与群のほか、対照群及び生産菌株投与群に 死亡例はなかった。 一般状態では、生産菌株2.9×10^8 CFU投与 群及び生産菌株培養液上清投与群において、 投与15分後から自発運動の低下、腹這い位及 び立毛が認められたが、投与約3時間後には 消失した。緑膿菌株1.1×10^7 CFU投与群で は、投与直後から立毛及び斜頸が認められ た。 体重については、生産菌株、生産菌株培養 液上清及び生産菌株培養液菌体破碎後上清 の投与群では変化は認められなかった。一 方、緑膿菌株1.1×10^6 CFU投与群では増加抑 制が認められ、さらに1.1×10^7 CFU投与群で は観察期間を通じた体重の低値及び増加抑 制が認められた。 剖検では、生産菌株、生産菌株培養液上清 及び生産菌株培養液菌体破碎後上清の投与 群では異常は認められなかった。一方、緑膿 菌株1.1×10^6 CFU投与群の生存4例では1例 に腎臓の褪色が認められ、さらに1.1×10^7 CFU投与群では脾臓の腫脹及び褪色並びに 腎臓の褪色、萎縮等が認められた。 生残菌については、生産菌株投与群のいず れの器官においても検出されなかった。一 方、緑膿菌株1.1×10^6 CFU投与群では、10 例中1例の腎臓において検出され、1.1×10^7 CFU投与群の生存4例では、脳（1/4）、肺 （2/4）、肝臓（2/4）及び腎臓（4/4）におい て検出された。 病理組織学的検査では、対照群及び生産菌 株2.9×10^7 CFU投与群において変化は認め られなかったが、生産菌株2.9×10^8 CFU投与 群の10例中4例及び生産菌株培養液上清投与 群の10例中1例において、肝臓に軽度の巣状 壊死が認められた。緑膿菌株1.1×10^6 CFU 投与群10例では、軽度の肝臓巣状壊死 （5/10）、軽度の腎炎（1/10）及び中等度の 化膿性腎盂腎炎（1/10）が認められた。さら に1.1×10^7 CFU投与群の生存4例では、軽度 の脳髄膜炎（1/4）、軽度～中等度の肝臓巣 状壊死（4/4）及び中等度～重度の化膿性腎 盂腎炎（4/4）がみられ、死亡した6例におい ても、肝臓の巣状壊死（5/6）、化膿性腎盂 腎炎（6/6）等が認められたとされている。 評価要請者は、巣状壊死について、菌体の 病原性にかかわらず、血中の細菌を補足し、 排除する主要器官である肝臓において、その 殺菌の過程において過剰な活性酸素種や炎 症性サイトカインが発生し、周辺の肝細胞を 含む実質細胞の細胞死を招いたことによる ものであるとしている。	2 3

試験種類	動物種	試験期間	投与方法	動物数/群	被験物質	投与量	試験結果	参照No.
病原性	マウス	単回	静脈内	各群雄 5	菌株	0 生産菌株 1.2×10^8 CFU 乳酸菌株 3.7×10^8 CFU	生産菌株投与群の肝臓については、3例に限局性かつ散在性の変性壊死が認められたが炎症反応は伴っていなかったとされている。他方、乳酸菌株投与群の肝臓においては、5例全てに変性壊死が認められ、いずれも炎症性細胞浸潤を伴う急性肝炎像を示していたとされている。なお、陰性対照群の肝臓においては明らかな病変は認められていない。 試験担当者は、生産菌株投与群における肝病変は、乳酸菌株投与群におけるものよりも軽度であること、さらに、生産菌株投与群では炎症反応がみられなかったが、乳酸菌株投与群ではリンパ球浸潤を伴う急性炎症を引き起こしており、肝傷害作用のほかに強い免疫刺激能を有すると考えられることから、生産菌株は当該乳酸菌株よりも病原性が低いと結論している。	2 4
	マウス	単回	強制経口	対照群雄 5 投与群雄 5	菌株	0 生産菌株 1.3×10^9 CFU	対照群及び生産菌株投与群に死亡例はなかった。生残菌については、いずれの器官においても検出されなかった。病理組織学的検査においては、対照群の1例において軽度の肝臓巣状壊死がみられたが、生産菌株投与群では異常所見は認められなかった。そのほか、一般状態、体重及び剖検では生産菌株の投与に関連した変化は認められなかったとされている。	2 3
非毒素産生性						0 生産菌株培養液上清 生産菌株培養液 菌体破砕後上清	生産菌株培養液 (2.9×10^9 CFU/mL相当)の上清又は菌体破砕後上清のエンドトキシン濃度を測定した結果、3~30 EU/mLであったとされている。	2 3
反復投与毒性	ラット	13週間	強制経口	雌雄各 12	原液	0、25、50、 $100\%(v/v) \times 10$ mL/kg 体重	いずれの群においても死亡動物は認められなかった。一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科学検査、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量並びに剖検及び病理組織学的検査において、被験物質の投与に関連した影響はみられなかった。 尿検査では $100\% \times 10$ mL/kg体重/日投与群の雌でナトリウム及び塩素の排泄量の高値がみられたが、試験担当者は、これを本品目の精製工程由来の不純物であるナトリウム及び塩素の摂取に伴う体液恒常性維持の結果と考えている。以上の結果より、試験担当者は、原液のロットPG-Y57-002@に係るNOAELを、雌雄ともに本試験の最高用量である $100\% \times 10$ mL/kg体重/日(本品目換算で2,538 mg/kg体重/日、TOS換算で93 mgTOS/kg体重/日)としている。	3 0
遺伝毒性	<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験		TA98 TA100 TA1535 TA1537 WP2 <i>uvrA</i>	本品目	~5 mg/plate	代謝活性化系の有無にかかわらず陰性の結果が報告されている。	3 1
	<i>in vitro</i>	染色体異常試験		CHL/IU	本品目	短時間-S9 ~0.675 mg/mL 短時間+S9 ~0.425 mg/mL 連続処理 ~0.250 mg/mL	代謝活性化系の有無にかかわらず陰性の結果が報告されている。	3 2

試験種類	動物種	試験期間	投与方法	動物数/群	被験物質	投与量	試験結果	参照No.
遺伝毒性	マウス	小核試験	強制経口	雄 5	本品目	～2,000 mg/kg 体重/日	陰性の結果が報告されている。	3 3
ヒトにおける知見	ヒト	不詳	不詳	20 余名	本品目等	不詳	本生産菌株は、1997年にその基原微生物が土壌より単離されてから、2005年10月末時点まで、天野エンザイム株式会社筑波研究所、中央研究所、岐阜研究所において、研究開発のために継続して培養されてきた。その間、岐阜研究所内での3 Lスケールのジャーファーメンター培養を130回延べ約1,000バッチ、西春工場での800 Lスケールのタンク培養を17回延べ約34バッチ、養老工場55 kLスケールのタンク培養を3回3バッチ繰り返してきた。それらに携わった従業員は20余名に及ぶが、生産菌株の取扱いに起因すると考えられる健康上の異変、異常所見はみられていないとされている。	2
	ヒト	不詳	不詳	不詳	同属類縁菌	不詳	<i>Chryseobacterium</i> 属の類縁菌について、抵抗力の弱った患者等での感染例（日和見感染例）が報告されている。	2

別紙２：本品目の推定一日摂取量（使用食品（群）摂取量ベース）

本品目が添加された食品たん白質素材が使用され、又は本品目が直接使用される可能性のある食品（群）摂取量（平成18年国民健康・栄養調査（参照 4 9）より）を基にした推定一日摂取量（参照 5 0）

中分類	小分類	a 一日食品 摂取量	b 本品目 最大 含有率	c 本品目 一日 摂取量	d 本品目由来 TOS 一日摂取量 (c×0.046)	e 本品目由来 TOS 一日摂取量 (d/50)
		g/人/日	%	mg/人/日	mgTOS/人/日	mgTOS/ kg体重/日
小麦・加工品	小麦粉類	4.2	0.020	0.84	0.039	0.0008
	パン類 (菓子パンを除く。)	30.0	0.020	6.00	0.276	0.0055
	菓子パン類	6.0	0.020	1.20	0.055	0.0011
	うどん、中華めん類	38.4	0.020	7.68	0.353	0.0071
	即席中華めん	4.3	0.020	0.86	0.040	0.0008
	パスタ類	8.0	0.020	1.60	0.074	0.0015
	その他の小麦加工品	4.9	0.020	0.98	0.045	0.0009
大豆・加工品	豆腐	35.2	0.020	7.04	0.324	0.0065
	油揚げ類	8.2	0.020	1.64	0.075	0.0015
	その他の大豆加工品	3.5	0.020	0.70	0.032	0.0006
魚介加工品	魚介（練り製品）	9.8	0.020	1.96	0.090	0.0018
	魚肉ハム、ソーセージ	0.5	0.020	0.10	0.005	0.0001
畜肉	ハム、ソーセージ類	12.4	0.020	2.48	0.114	0.0023
牛乳・乳製品	チーズ	2.3	0.020	0.46	0.021	0.0004
	発酵乳・乳酸菌飲料	21.3	0.020	4.26	0.196	0.0039
	その他の乳製品	8.2	0.020	1.64	0.075	0.0015
	その他の乳類	0.1	0.020	0.02	0.001	0.0000
油脂類	(省略)	10.2	0.020	2.04	0.094	0.0019
菓子類	ケーキ・ペストリー類	7.2	0.020	1.44	0.066	0.0013
	ビスケット類	1.7	0.020	0.34	0.016	0.0003
	キャンデー類	0.3	0.020	0.06	0.003	0.0001
	その他の菓子類	6.0	0.020	1.20	0.055	0.0011
アルコール飲料	ビール	58.6	0.001	0.59	0.027	0.0005
その他の嗜好飲料	茶	310.1	0.001	3.10	0.143	0.0029
	コーヒー・ココア	118.1	0.001	1.18	0.054	0.0011
	その他の嗜好飲料	97.5	0.001	0.98	0.045	0.0009
調味料	しょうゆ	17.5	0.020	3.50	0.161	0.0032
	マヨネーズ	3.2	0.020	0.64	0.029	0.0006
	味噌	12.4	0.020	2.48	0.114	0.0023
	その他の調味料	56.9	0.020	11.38	0.523	0.0105
合計				68.39	3.145	0.0630

別紙3：本品目の推定一日摂取量（使用食品たん白質素材生産量ベース）

本品目が添加される食品たん白質素材の生産量を基にした推定一日摂取量（参照51）

食品たん白質素材	a 生産量	b 一日摂取量 ($a \times 10^6 / (127,692,000 \times 365)$)	c 本品目 最大 添加率	d 本品目 一日 摂取量	e 本品目由来 TOS 一日摂取量 ($d \times 0.046$)	f 本品目由来 TOS 一日摂取量 ($e/50$)
	トン/年	g/人/日	%	mg/人/日	mgTOS/人/日	mgTOS/ kg体重/日
カゼイン	6,440	0.138	2.0	2.76	0.127	0.003
カゼイネート	9,265	0.199	2.0	3.98	0.183	0.004
乳清たん白質 (WPC、WPI)	8,660	0.186	2.0	3.72	0.171	0.003
乳たん白濃縮物 (TMP、MPC等)	8,551	0.183	2.0	3.66	0.168	0.003
乾燥卵白	9,555	0.205	2.0	4.10	0.189	0.004
大豆たん白質	42,672	0.916	2.0	18.32	0.843	0.017
小麦たん白質	22,158	0.475	2.0	9.50	0.437	0.009
コーングルテン	292,400	6.274	2.0	125.48	5.772	0.115
ゼラチン	9,453	0.203	2.0	4.06	0.187	0.004
合計				175.58	8.077	0.162

註：

- 「カゼイネート」には、カゼインナトリウム、カゼインマグネシウム及びカゼインカルシウムが含まれる。
- 「WPC」：whey protein concentrateの略。
- 「WPI」：whey protein isolateの略。
- 「TMP」：total milk proteinの略。
- 「MPC」：milk protein concentrateの略。

1 <参照>

- 1 厚生労働省,「プロテイングルタミナーゼ」及び「5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム」の添加物指定及び規格基準の設定に関する食品健康影響評価について(平成19年8月2日付けで食品健康影響評価を依頼した事項),第202回食品安全委員会(平成19年8月9日).
- 2 天野エンザイム株式会社,食品添加物の指定要請添付資料 *Cryseobacterium proteolyticum* 9670株由来のプロテイングルタミナーゼ,2006年9月22日(2010年5月7日改定).【当初要請資料本体】
- 3 Yamaguchi S, Jeenes DJ and Archer DB: Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*, an enzyme that deamidates glutaminy residues in proteins, purification, characterization and gene cloning. Eur J Biochem 2001; 268: 1410-21 【当初要請資料参考文献 18】
- 4 Yamaguchi S and Yokoe M: A novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a newly isolated bacterium from soil. Applied and Environmental Microbiology 2000; 66(8): 3337-43 【当初要請資料参考文献 8】
- 5 Shimomura K, Kaji S and Hiraishi A: *Chryseobacterium shigense* sp. nov., a yellow-pigmented, aerobic bacterium isolated from a lactic acid beverage. International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology 2005; 55: 1903-6 【当初要請資料参考文献 23】
- 6 Behrendt U, Ulrich A and Schumann P: *Chryseobacterium gregarium* sp. nov., isolated from decaying plant material. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2008; 58:1069-74 【当初要請資料参考文献 61】
- 7 Vaneechoutte M, Kämpfer P, De Baere T, Avesani V, Janssens M and Wauters G: *Chryseobacterium hominis* sp. nov., to accommodate clinical isolates biochemically similar to CDC groups II-h and II-c. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2007; 57: 2623-8 【当初要請資料参考文献 62】
- 8 天野エンザイム株式会社, *Chryseobacterium* 属の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹.【当初要請資料本体 図表 6】
- 9 天野エンザイム株式会社, *Chryseobacterium* 属における本菌株の位置づけ.【当初要請資料添付資料 11】
- 10 天野エンザイム株式会社,平成20年9月22日付け「食品健康影響に係る補足資料の提出依頼について - プロテイングルタミナーゼの提出依頼補足資料(府食第1002号)に対する回答,平成22年5月7日.【補足資料本体】

-
- 1 1 天野エンザイム株式会社, 本品の製造方法について. 【補足資料1】
- 1 2 天野エンザイム株式会社, 本品（プロテイングルタミナーゼ）生産菌株のメンブレンフィルター（MF）除菌試験. 【補足資料 2】
- 1 3 天野エンザイム株式会社, 製剤中の有効成分プロテイングルタミナーゼ及び夾雑たん白質の含量分析. 【補足資料 6】
- 1 4 General specifications and considerations for enzymes used in food processing. In Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 67th meeting 2006 (ed.), Compendium of food additive specifications, FAO JECFA Monographs 3, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2006; pp.63-7.【当初要請資料参考文献 72】
- 1 5 天野エンザイム株式会社, 24 kDa 夾雑たん白質のアミノ酸配列解析. 【補足資料 7】
- 1 6 天野エンザイム株式会社, 成分規格案 *Chryseobacterium proteolyticum* 由来のプロテイングルタミナーゼ（protein glutaminase derived from *Chryseobacterium proteolyticum*). 【当初要請資料添付資料 16】
- 1 7 Schwenke KD: 13 Enzyme and chemical modification of proteins. In Damodaran S and Paraf A (ed.), Food proteins and their applications, Marcel Dekker, New York, 1997; pp.393-423 【当初要請資料参考文献 7】
- 1 8 Tarantino LM (Director, Office of Food Additive Safety, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration), Re: GRAS Notice No.GRN 000267, Jul.15 2009. 【当初要請資料添付資料 13】
- 1 9 European Parliament and Council of the European Union: Regulation (EC) No 1332/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food enzymes and amending Council Directive 83/417/EEC, Council Regulation (EC) No 1493/1999, Directive 2000/13/EC, Council Directive 2001/112/EC and Regulation (EC) No 258/97. Official Journal of the European Union, 31.12.2008, L354/7-15 【当初要請資料参考文献 71】
- 2 0 Pariza MW and Johnson EA: Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2001; 33: 173-86 【当初要請資料参考文献 24】
- 2 1 農林水産省農林水産技術会議事務局：動物性飼料並びに微生物飼料の安全性評価手法の開発. 研究成果 1985 ; 170 : 70-7 【当初要請資料参考文献 46】
- 2 2 Yoshida M and Minato H: Assessment of the pathogenicity of bacteria used

-
- in the production of single cell protein. Agric Biol Chem 1987; 51(1): 241-2
【当初要請資料参考文献 47】
- 2 3 天野製薬株式会社品質管理部安全性試験チーム, *Chryseobacterium proteolyticum*産生プロテイングルタミナーゼの安全性試験 – マウスを用いた生産菌株 *Chryseobacterium proteolyticum* 9670株の病原性及び毒素産生性に関する試験 –. 【当初要請資料添付資料1】
- 2 4 横地高志 (愛知医科大学医学部微生物・免疫学講座), プロテイングルタミナーゼ産生菌接種マウスにおける肝病変の病理組織学的解析と乳酸菌との病原性比較. 【補足資料 5】
- 2 5 Crasta KC, Chua KL, Subramaniam S, Frey J, Loh H and Tan HM: Identification and characterization of CAMP cohemolysin as a potential virulence factor of *Riemerella anatipestifer*. J Bacteriol 2002; 184(7): 1932-9
【当初要請資料参考文献 25】
- 2 6 Fischer LJ, Weyant RS, White EH and Quinn FD: Intracellular multiplication and toxic destruction of cultured macrophages by *Capnocytophaga canimorsus*. Infection and Immunity 1995; 63(9): 3484-90
【当初要請資料参考文献 26】
- 2 7 Thomas K, Aalbers M, Bannon GA, Bartels M, Dearman RJ, Esdaile DJ et al.: A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2004; 39: 87-98 【当初要請資料参考文献 48】
- 2 8 The United States Pharmacopeia (USP) (ed.), The United States Pharmacopeia 28 – the National Formulary 23, 2005; p.2858. 【当初要請資料参考文献 60】
- 2 9 天野エンザイム株式会社, 人工胃液、人工腸液による消化性試験. 【当初要請資料添付資料 4】
- 3 0 株式会社ボゾリサーチセンター, 最終報告書 Protein-glutaminase のラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験 B-5339 (2005 年 6 月 17 日), 天野エンザイム株式会社社内資料. 【当初要請資料添付資料 5】
- 3 1 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Final report, safety studies of protein-glutaminase produced by *Chryseobacterium proteolyticum* – reverse mutation test in bacteria – for Amano Enzyme Inc., 03-K-135, January 26, 2004, 天野エンザイム株式会社社内資料. 【当初要請資料添付資料 6】
- 3 2 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Final report,

-
- safety studies of protein-glutaminase produced by *Chryseobacterium proteolyticum* – chromosomal aberration test using Chinese hamster lung (CHL/IU) cells – for Amano Enzyme Inc., 03-K-135, January 23, 2004, 天野エンザイム株式会社社内資料. 【当初要請資料添付資料 7】
- ^{3 3} Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Safety studies of protein-glutaminase produced by *Chryseobacterium proteolyticum* – *in vivo* micronucleus test using mouse bone marrow cells –, 天野エンザイム株式会社社内資料. 【当初要請資料添付資料 8】
- ^{3 4} 食品安全委員会, 遺伝子組換え食品（微生物）の安全性評価基準, 平成 20 年 6 月 【当初要請資料参考文献 80】
- ^{3 5} Gendel SM and Jenkins JA: Allergen sequence databases. In ILSI Health and Environmental Sciences Institute (HESI) Protein Allergenicity Technical Committee (ed.), Bioinformatics Expert Panel Workshop, February 22 – 24, 2005, Mallorca, Spain, Monograph. 【当初要請資料参考文献 81】
- ^{3 6} 天野エンザイム株式会社, 6～8連続完全一致アミノ酸・80アミノ酸スライディングウインドウ検索結果. 【当初要請資料本体 図表10】
- ^{3 7} Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, Evaluation of allergenicity of genetically modified foods, Rome, Italy, 22-25 January 2001. 【当初要請資料参考文献52】
- ^{3 8} Hileman RE, Silvanovich A, Goodman RE, Rice EA, Holleschak G, Astwood JD, et al.: Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128(4): 280-91 【当初要請資料参考文献 53】
- ^{3 9} 天野エンザイム株式会社, 連続 6 アミノ酸一致部位の分析. 【当初要請資料添付資料 12】
- ^{4 0} 天野エンザイム株式会社, プロテイングルタミナーゼと連続 6 アミノ酸の一致が見られたアレルゲン蛋白質の E-value 解析. 【当初要請資料添付資料 10】
- ^{4 1} 天野エンザイム株式会社, Hev b 11.0101、Hev b 11.0102、Ovomucoid、Asp f 9、Asp f 16とのアミノ酸配列の相同性検索結果. 【当初要請資料本体 図表11～14】
- ^{4 2} Maglio O, Saldanha JW, Vrtala S, Spitzauer S, Valenta R and Pastore A: A major IgE epitope-containing grass pollen allergen domain from Phl p 5 folds as a four-helix bundle. *Protein Engineering* 2002; 15(8): 635-42 【補足資料文献 10】

-
- 4 3 天野エンザイム株式会社, 24 kDa 夾雑たん白質と既知アレルゲンとのアミノ酸配列の比較. 【補足資料 8】
- 4 4 天野エンザイム株式会社, 製剤及び 24 kDa 夾雑たん白質の落花生たん白質測定用キットを用いた交差反応性検討. 【補足資料 9】
- 4 5 天野エンザイム株式会社, 24 kDa 夾雑たん白質の人工胃液による消化性評価. 【補足資料 11】
- 4 6 天野エンザイム株式会社, 24 kDa 夾雑たん白質の人工腸液による消化性評価. 【補足資料 12】
- 4 7 天野エンザイム株式会社, 人工胃液、人工腸液処理による 24 kDa 夾雑たん白質の免疫反応性の変化. 【補足資料 14】
- 4 8 Kikuchi M, Hayashida H, Nakano E and Sakaguchi K: Peptidoglutaminase, enzymes for selective deamidation of γ -amide of peptide-bound glutamine. Biochemistry 1971; 10(7): 1222-9 【当初要請資料参考文献 17】
- 4 9 厚生労働省, 平成 18 年国民健康・栄養調査報告, 平成 21 年 1 月. 【当初要請資料参考文献 58】
- 5 0 天野エンザイム株式会社, 本品の推定一日摂取量の算出 (加工食品の製造工程で添加される場合). 【当初要請資料本体 図表 17】
- 5 1 天野エンザイム株式会社, 本品の推定一日摂取量の算出 (食品たん白質素材生産量ベースの推計). 【当初要請資料本体 図表 16】