

資料 1 - 1

食安基発0906第2号
平成23年9月6日

内閣府

食品安全委員会事務局評価課長 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長



食品健康影響評価に係る補足資料の提出について

平成22年6月28日付け府食第493号により提出依頼のありましたプロ
テイングルタミンナーゼの食品健康影響評価に係る補足資料につきまして、別添
のとおり提出いたします。



(別添)

プロテイングルタミナーゼの食品健康影響評価に係る補足資料

厚生労働省

平成 23 年 9 月

目 次

プロテイングルタミナーゼの食品健康影響評価に係る補足資料

I	補足資料要求 1	1
II	補足資料要求 2	2
III	補足資料要求 3	3
IV	補足資料要求 4	5

[資料 I] 24 kDa 夾雑たん白質の除去・低減工程の確立

[資料 II] 改良製造法の工程

[資料 III] 24 kDa 夾雑たん白質とホモロジーの高いたん白質の食経験の可能性
の検討

[資料 IV] 24 kDa 夾雑たん白質の消化吸収の可能性についての検討

[資料 V] 24 kDa たん白質の吸収試験 試験計画書

[資料 VI] 24 kDa たん白質の吸収試験 最終報告書

[資料 VII] AFSSA Letter 2010-SA-0016

[資料 VIII] AFSSA Letter 2010-SA-0016 日本語訳

[資料 IX] AFSSA Letter 2010-SA-0016 における安全マージンの算出について

[資料 X] 2010 年 3 月以降に報告された *Chryseobacterium* 属の新菌種

[参考] 食品健康影響評価に係る補足資料の提出依頼について
(府食第 493 号, 平成 22 年 6 月 28 日)

平成 23 年 9 月 6 日

平成 22 年 6 月 28 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ープロテイン
グルタミンナーゼの提出依頼補足資料」(府食第 493 号) に対する回答

【補足資料要求 1】

本品目に含有される約 24 kDa の夾雑たん白質 (以下「24 kDa 夾雑たん白質」という。) の除去・低減の可能性について考察すること。

【回答】

1. 24 kDa 夾雑たん白質は、塩類の 8% (w/v) 以上の添加による塩析工程の導入によりほぼ除去・低減されることが判明した。本塩析工程を導入することにより、24 kDa 夾雑たん白質をほぼ除去・低減できる改良製造法を確立した。
2. 改良製造法により実機生産した試作製剤 3 ロット中のたん白質は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、プロテイングルタミンナーゼたん白質 (有効成分) がそのほとんどを占めていると考えられた。サンドイッチ ELISA 法により定量された同試作製剤 3 ロット中の 24 kDa 夾雑たん白質含量はそれぞれ 0.2ppm、1.8ppm 及び 1.3ppm であり、従来製造法による試作製剤の約 200 分の 1 (約 400→1.8) のレベルまで低減されていた。

詳細を以下に説明する。

- 1) 精製 24 kDa 夾雑たん白質 3.0 mg/ml 水溶液に塩類を 2~10% (w/v) になるように添加し、一晚静置して塩析を行い、生じた沈殿物を除去して得られた上清中のたん白質濃度を測定したところ、塩類を 8% (w/v) 以上添加した溶液の遠心上清中からは 24 kDa 夾雑たん白質が検出されない (検出下限値 : 0.01mg/ml) ことが、280 nm における吸光度の測定によるたん白質の定量及び SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で示された (資料 I の表 1 及び図 1)。次に、実機生産本品から取り出して精製したプロテイングルタミンナーゼたん白質 (有効成分) 3.43 mg/ml 水溶液に塩類を 6~10% (w/v) になるように添加し、同様の実験を行ったところ、精製プロテイングルタミンナーゼたん白質 (有効成分) は、塩類を 10% (w/v) 添加する塩析処理によってもほとんど沈殿せず、また、精製プロテイングルタミンナーゼたん白質 (有効成分) 上清画分には、未処理時の酵素活性の 90%以上が回収されていた。
- 2) 本性質を利用して、塩類を 8~10% (w/v) 添加する塩析工程を、作業性を考慮して「除菌ろ過」工程と「脱塩・濃縮」工程との間に組み入れ、改良製造法を設計した。資料 II にそのフローを示す。
- 3) 改良製造法により、塩析工程直前の除菌ろ過工程までプロテイングルタミンナーゼたん白

質（有効成分）の工程収率がほぼ同一の、適正な管理下で製造されたものとみなすことができるロットの培養液を用いて実機生産した試作製剤については、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、24 kDa 夾雑たん白質がほぼ除去・低減されていることが確認され、本試作製剤中のたん白質に対して、プロテイングルタミナーゼたん白質（有効成分）の割合がそのほとんどを占めていると考えられた（資料 I の図 3A 及び B）。

- 4) 24 kDa 夾雑たん白質を高感度で定量するため、ウサギ由来の抗 24 kDa 夾雑たん白質抗体（ポリクローナル抗体）を用いたサンドイッチ ELISA 法を確立した。
- 5) 本サンドイッチ ELISA 法により、改良製造法による試作製剤 3 ロット中の 24 kDa 夾雑たん白質を定量したところそれぞれ 0.2ppm、1.8ppm 及び 1.3ppm であった。一方、従来製造法による試作製剤 6 ロット中の 24 kDa 夾雑たん白質についても定量したところ、うち 4 ロットで約 400ppm、他の 2 ロットで 17.2ppm 及び 6.0ppm であった。従って、改良製造法による試作製剤中の 24 kDa 夾雑たん白質は、従来製造法試作製剤の約 200 分の 1（約 400→1.8）のレベルまで低減されていた。

【補足資料要求 2】

24 kDa 夾雑たん白質とホモロジーの高いたん白質の食経験の可能性について考察すること。

【回答】

1. 本考察を行うに当たり、市販の食品中の抗 24 kDa 夾雑たん白質抗体が認識する物質をサンドイッチ ELISA 法により測定したところ、生鮮食品については、肉類及び魚類では試験したサンプル 10 点のすべてから検出され、野菜類では試験したサンプル 6 点のうち 1 点（キュウリ）からのみ検出され、果物類では試験したサンプル 6 点のすべてから検出されなかった。一方、加工食品については、固形・ペースト状、液状にかかわらず、試験したサンプル 12 点のすべてから検出されなかった。
2. 本生産菌並びに同属の菌株で分離源が食品であるか又は食経験の可能性のある 6 種の合計 7 株の培養上清について、抗 24 kDa 夾雑たん白質抗体が認識する物質をサンドイッチ ELISA 法により測定した。結果、チーズ製造用のプロテアーゼの生産菌として使用されたとの報告のある菌株の培養上清中から抗 24 kDa 夾雑たん白質抗体が認識する物質が検出された。
3. 従って、肉類及び魚類といった生鮮食品及び分離源が食品で食経験の可能性のある類縁菌の一部の培養液中には、24kDa 夾雑たん白質と構造上ホモロジーのある物質が存在する可能性が示唆された。

詳細を以下に説明する。

- 1) 生鮮食品として、市販の肉類 3 点、魚類 7 点、果物類 6 点及び野菜類 6 点のサンプルに

- ついて、抗 24 kDa 夾雑たん白質抗体が認識する物質をサンドイッチ ELISA 法により測定した。その結果、肉類及び魚類では試験したサンプル 10 点のすべてから抗 24 kDa 夾雑たん白質抗体が 73~795 ng/100g 食品検出された（検出限界値：20~40 ng/100 g 食品）。野菜類では試験したサンプル 6 点のうち 1 点（キュウリ）からのみ抗 24 kDa 夾雑たん白質抗体が 492 ng/100g 食品検出され、果物類では試験したサンプル 6 点のすべてから検出されなかった（検出限界値：0.2 ng/ml サンプル溶液）（資料 III の表 3）。
- 2) 加工食品として、みそ、ヨーグルト、炊飯米等の固形・ペースト状のもの 7 点、しょうゆ、牛乳等の液状のもの 5 点について、同じく抗 24 kDa 夾雑たん白質抗体が認識する物質をサンドイッチ ELISA 法により測定した。その結果、試験したサンプル 12 点のすべてから検出されなかった（検出限界値：0.2 ng/ml サンプル溶液）（資料 III の表 4）。
 - 3) 本生産菌並びに同属の菌株で分離源が食品であるか又は食経験の可能性のある 6 種（*Chryseobacterium balustinum*、*C.hryseobacterium joostei*、*C.hryseobacterium oranimense*、*C.hryseobacterium bovis*、*C.hryseobacterium haifense* 及び *C.hryseobacterium shigense*）の培養上清について、抗 24 kDa 夾雑たん白質抗体が認識する物質をサンドイッチ ELISA 法により測定した。
 - 4) 結果、資料 III の表 5 のように、本生産菌培養上清中に比べると少ない量ではあるが、チーズ製造用プロテアーゼの生産菌として利用されたとの報告のある *Chryseobacterium balustinum* の培養上清中から抗 24 kDa 夾雑たん白質抗体が認識する物質が検出された。また、*Chryseobacterium joostei* 及び *Chryseobacterium shigense* のプロテイングルタミナーゼ生産培地由来の培養上清中から抗 24 kDa 夾雑たん白質抗体が認識する物質が微量ではあるが検出された。
 - 5) 一般に、抗体はたん白質などの抗原の構造を認識して結合する。よって、抗 24 kDa 夾雑たん白質抗体が認識する物質は、24 kDa 夾雑たん白質と構造上のホモロジーを有すると考えられる。従って、肉類及び魚類といった生鮮食品並びに分離源が食品で食経験の可能性のある類縁菌の一部の培養液中には、24 kDa 夾雑たん白質と構造上ホモロジーのある物質が存在する可能性が示唆された。

【補足資料要求 3】

24 kDa 夾雑たん白質の消化管吸収の可能性について考察すること。

【回答】

1. 本可能性を考察するために、ラットを用いた精製 24 kDa 夾雑たん白質の吸収試験を実施した。24 kDa 夾雑たん白質の定量はサンドイッチ ELISA 法により行った。24 kDa 夾雑たん白質 4 mg/kg 体重を単回経口投与したラットの血漿中では、投与 30 分後から 24 時間後まで、測定した計 30 匹（各時間群 5 匹）すべてにおいて、24 kDa 夾雑たん白質は検出限界値未満であった（検出限界値：0.1 ng/ml）。一方、24 kDa 夾雑たん白

質 4 mg/kg 体重を単回静脈内投与したラットの血漿中では、投与 5 分後に、投与量とほぼ一致する量に相当する濃度の 24 kDa 夾雑たん白質が検出された。

2. 24 kDa 夾雑たん白質を経口投与したラットの投与後 24 時間尿及び糞便並びに投与 24 時間後の腸内容物中の 24 kDa 夾雑たん白質を定量した結果、経口投与された 24 kDa 夾雑たん白質は体内にほとんど吸収されずに糞便中に排泄されたか、腸内に留まっていたと考えられた。
3. 仮に、経口投与した 24 kDa 夾雑たん白質が吸収され、血中に移行し、その血漿中濃度が測定したすべての時間帯で検出限界値であったとした場合、その吸収率は、薬物動態パラメータとして汎用される AUC (Area Under the Curve、血漿中濃度曲線下面積) を用いると 0.0021%と算出される。

詳細を以下に説明する。

- 1) 24 kDa 夾雑たん白質の消化管吸収の可能性を考察するため、ラットを用いた吸収試験を実施した (資料 IV、V、VI)。生理食塩水に溶解した精製 24 kDa 夾雑たん白質を、プロテイングルタミナーゼの安全性評価で実施された 90 日間反復投与毒性試験での原液の最高用量中に含まれる 24 kDa 夾雑たん白質の量である 4 mg/kg 体重になるように 7 週齢の雄のラットに経口投与し、投与 30 分後から、一般にラットにおいて経口投与された物質が尿中及び糞便中にほぼ排泄される時間として 24 時間後まで経時的に血漿中の 24 kDa 夾雑たん白質をサンドイッチ ELISA 法で定量した。また、投与後 24 時間尿及び糞便並びに投与 24 時間後の腸内容物中の 24 kDa 夾雑たん白質も定量した。対照として、同量を静脈内投与したラットについても、投与 5 分後から 24 時間後までの血漿、投与後 24 時間尿及び糞便並びに投与 24 時間後の腸内容物中の 24 kDa 夾雑たん白質を定量した。
- 2) 結果、経口投与したラットの血漿中では、投与 30 分後から 24 時間後まで、測定した 30 匹 (投与 30 分、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、24 時間後の各群 5 匹) すべてにおいて 24 kDa 夾雑たん白質は、検出限界値未満であった (検出限界値 : 0.1 ng/ml)。一方、静脈内投与したラットの血漿中では、投与 5 分後に 122.3 µg/ml の 24 kDa 夾雑たん白質が検出された。この濃度は、計算上、投与量とほぼ一致する量 (106%) に相当するものである。その後速やかに減少し、投与 24 時間後の血漿中の濃度は 0.068 µg/ml であった。この量は投与量の 0.06%であった (資料 IV の表 1)。
- 3) 経口投与したラットの投与後 24 時間尿及び糞便並びに投与 24 時間後の腸内容物中の 24 kDa 夾雑たん白質量は、それぞれ 0.0003 mg 未満、1.233 mg 及び 0.092 mg であった (資料 IV の表 2)。これらは投与量の 0.028%未満、115%及び 8.6%であった。従って経口投与された 24 kDa 夾雑たん白質は体内にほとんど吸収されずに糞便中に排泄されたか、腸内に留まっていたと考えられた。投与後 24 時間尿中からも 24 kDa 夾雑たん白質が微量検出されたが、その排泄率 0.028%未満の最大値は、AUC から試算された

最大吸収率 0.0021%（下記参照）よりも 1 オーダー高いこと、糞便のコンタミを完全に防げる機器を用いた分離採取によらなかったことから、吸収によるものではなく、糞便のコンタミによるものである可能性が考えられた。なお、経口投与された 24 kDa 夾雑たん白質の大部分が糞便中で検出されたことは、ラットの消化管において、本 24 kDa 夾雑たん白質が少なくとも抗原性を消失するほどまでには分解されなかったことを示しているものと考えられる。

- 4) 静脈内投与したラットの投与後 24 時間尿及び糞便並びに投与 24 時間後の腸内容物中の 24 kDa 夾雑たん白質量は、それぞれ 0.324 mg、0.027 mg 及び 0.003 mg であった（資料 IV の表 2）。これらは投与量の 29.5%、2.5% 及び 0.3% に相当し、残りの約 7 割の 24 kDa 夾雑たん白質はラットの体内の臓器等に蓄積されたか、又は体内で分解され ELISA に用いた抗体に対する反応性を消失したものと推定される。
- 5) 経口投与した場合、血漿中の 24 kDa 夾雑たん白質は検出限界値未満であったが、薬物動態パラメータとして汎用される AUC（Area Under the Curve、血漿中濃度曲線下面積）を用い吸収率の算出を試みた。すなわち、静脈内投与後 24 時間の AUC（AUC_{iv(0-24)}）は 114,205 ng・hr/ml であり、仮に、経口投与した 24 kDa 夾雑たん白質が吸収され、血中に移行し、その血漿中濃度が測定したすべての時間帯で検出限界値（0.1 ng/ml）であったとした場合、経口投与後 24 時間の AUC（AUC_{po(0-24)}）は 2.38 ng・hr/ml となる（資料 IV の表 3）ことから、最大吸収率は、 $AUC_{po(0-24)} / AUC_{iv(0-24)} \times 100 = 0.0021\%$ と算出される。

【補足資料要求 4】

上記 1～3 に関連し、評価に有益な資料があれば、併せて整理すること。

【回答】

上記 1～3 に直接は関連しないが、諸外国での認可状況としてフランス食品衛生安全庁 AFSSA（French Agency of Food Safety）による審査でプロテイングルタミナーゼ製剤の使用認可申請を認める決定が下されたこと、及び本品の「指定要請添付資料（2010 年 5 月 7 日改定）」の〔添付資料 14〕以降に報告された *Chryseobacterium* 属の新菌種についてまとめた資料を添付する。

1. フランス競争・消費・不正抑制総局（DGCCRF）から 2010 年 1 月 20 日に依頼されたフランス食品衛生安全庁（AFSSA、French Agency of Food Safety）（現 ANSES、French Agency for Food、Environmental and Occupational Health & Safety）は、*Chryseobacterium proteolyticum* 由来プロテイングルタミナーゼの使用認可申請に対し、2010 年 5 月 4 日「この申請を認める」決定を下した（資料 VII、その日本語訳資料 VIII）。これを受け、2011 年 1 月 5 日にフランスのポジティブリスト（Arrêté du 19 octobre 2006）に *C. proteolyticum* 由来プロテイングルタミナーゼを収載するための改

定がなされ、同年 1 月 13 日に官報告示された。

2. フランス食品衛生安全庁によるプロテイングルタミンナーゼ製剤の評価においては、安全マージンとして 2,200 が採用された。これは、フランスにおける食品摂取量統計値から算出したプロテイングルタミンナーゼ製剤の EDI の TOS 換算値(0.021~0.042 mgTOS/kg 体重/日)及びたん白質摂取量統計値から算出したプロテイングルタミンナーゼ製剤の EDI の TOS 換算値(0.004~0.007 mgTOS/kg 体重/日)並びに Budget 法に基づき算出したプロテイングルタミンナーゼ製剤の EDI の TOS 換算値(0.04 mgTOS/kg 体重/日)と、プロテイングルタミンナーゼ原液の NOAEL の TOS 換算値(92.89 mgTOS/kg 体重/日)から計算された安全マージン(24,000~2,200)のうち、最も低い数値が採用されたものである (資料 IX)。

注 1 : フランス申請においては対象食品へのプロテイングルタミンナーゼ製剤の添加率を 0.09%とした。一方日本における今回の申請においては対象食品へのプロテイングルタミンナーゼ本品の添加率を 0.02%としている。0.09%は対象食品中のたん白質量に対する添加率であるため、EDI 算出にあたっては対象食品中のたん白質量に対しこの数値を乗じて求めるべきであるが、フランスにおける対象食品中のたん白質量を求めることが困難であったため、過大となるが対象食品に直接 0.09%を乗じて EDI を求めた。日本における今回の申請においては、対象食品のたん白質量が統計 (国民健康・栄養調査) において明らかとされているため、たん白質量とプロテイングルタミンナーゼ本品の対たん白質添加率 (0.09%) から、対象食品そのものに対する添加率を計算し、得られた値 (0.0019~0.02%) のうち最も高い値 (0.02%、チーズ) を、過小評価にならない値として採用した。

注 2 : フランス申請 (2010 年 1 月申請) においては、プロテイングルタミンナーゼ製剤中の TOS 含有率を 3.5%とした。一方、日本における今回の申請においては、プロテイングルタミンナーゼ本品中の TOS 含有率を 4.6%とした。プロテイングルタミンナーゼ製剤はプロテイングルタミンナーゼ本品を約 2 倍希釈したものであるため、プロテイングルタミンナーゼ製剤中の TOS 含有率はプロテイングルタミンナーゼ本品中のその半分の 2.3%前後となるはずであるが、フランス申請で使用した 3.5%はそれよりも高い値となっている。この違いは、フランス申請においてプロテイングルタミンナーゼ製剤中の TOS 含有率を 3.5%と算出した際には、賦形率として推定値 90%を用いたためである。実際のプロテイングルタミンナーゼ製剤の賦形率は、本来、プロテイングルタミンナーゼ製剤の調製前の粉末 (日本における今回の申請では「プロテイングルタミンナーゼ本品」に該当。) の賦形率とプロテイングルタミンナーゼ製剤調製時の希釈倍率から求められる。プロテイングルタミンナーゼ本品の賦形率 (87%) とプロテイングルタミンナーゼ製剤調製時の希釈倍率 (実機生産品 3 ロットの平均=2.16 倍) から計算すると $(87 + (216 - 100)) / 216 \times 100 = 94.0\%$ となり、この賦形率 94.0%を用いてプロテイングルタミンナーゼ製剤中の TOS 含有率を算出すると $100 - (5.60 + 0.90 + 94.0) = -0.5\%$ となった。そこで、フランス申請においては、およその賦形率として 90%と設定し議論を進めることとし、プロテイングルタミンナーゼ製剤中の TOS 含有率を $100 - (5.60 + 0.90 + 90) = 3.5\%$ と算出したもの

である。

3. 本品の「指定要請添付資料（2010年5月7日改定）」の〔添付資料14〕においては、2010年3月6日までに報告されていた *Chryseobacterium* 属の菌種について調査した。それ以降、新たに6種の新菌種が報告されているため、これら6菌種について、分離源、リスクグループ及びバイオセーフティレベル、16SrRNA 遺伝子配列に基づく系統樹での位置づけについて資料 IX にまとめた。新たに分離された6種の分離源は、アトランティックサーモン、永久凍土、湖、土壌、小川、森林土壌であった（資料X）。

本回答において作成・提出された資料は以下である。

提出依頼補足資料に関する資料

本文	平成22年6月28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493号）に対する回答
資料 I	24k Da 夾雑たん白質の除去・低減工程の確立
資料 II	改良製造法の工程
資料 III	24k Da 夾雑たん白質とホモロジーの高いたん白質の食経験の可能性の検討
資料 IV	24k Da 夾雑たん白質の消化吸収の可能性についての検討
資料 V	24k Da たん白質の吸収試験 試験計画書
資料 VI	24k Da たん白質の吸収試験 最終報告書
資料 VII	AFSSA Letter 2010-SA-0016
資料 VIII	AFSSA Letter 2010-SA-0016 日本語訳
資料 IX	AFSSA Letter 2010-SA-0016 における安全マージンの算出について
資料 X	2010年3月以降に報告された <i>Chryseobacterium</i> 属の新菌種
文献	
1. 「超高感度酵素免疫測定法」 p25-40. III.抗体と抗体フラグメントの調製	
2. 動衛研研究報告第111号 p37-41. キットを用いたモノクローナル抗体の迅速・簡便なペルオキシダーゼ標識法	
3. Peroxidase Labeling Kit プロトコル 同仁化学研究所	
4. Kämpfer P, Fallschissel K, and Avendaño-Herrera R. <i>Chryseobacterium chaponense</i> sp. nov., isolated from Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>) farmed in Chapo lake, Chile. <i>Int J Syst Evol Microbiol.</i> 2011, 61, 497-501	
5. Zhao Q, Bai Y, Zhang G, Zhu S, Sheng H, Sun Y, and An L. <i>Chryseobacterium xinjiangense</i> sp. nov., isolated from alpine permafrost. <i>Int J Syst Evol Microbiol.</i> 2011, 61, 1397-1401	
6. Joung Y, and Joh K. <i>Chryseobacterium yonginense</i> sp. nov., isolated from a mesotrophic artificial lake. <i>Int J Syst Evol Microbiol.</i> 2011, 61, 1413-1417	

7. Im WT, Yang JE, Kim SY, and Yi TH. <i>Chryseobacterium ginsenosidimutans</i> sp. nov., with ginsenoside converting activity isolated from soil of <i>Rhus vernicifera</i> cultivating field. <i>Int J Syst Evol Microbiol.</i> 2011, 61, 1430-1435
8. Strahan BL, Failor KC, Batties AM, Hayes PS, Cicconi KM, Mason CT, and Newman JD. <i>Chryseobacterium piperi</i> sp. nov., isolated from a freshwater creek. <i>Int J Syst Evol Microbiol.</i> 2010 Oct 1.
9. Zhi-kun Li, Hong-hui Zhu. <i>Chryseobacterium vietnamense</i> sp. Nov., isolated from forest soil. <i>Int J Syst Evol Microbiol.</i> 2011 May 13.
10. 「分析バリデーションのための統計学」国立医薬品食品衛生研究所 林 譲、松田りえ子 P103

以上