

9. BARNETT, V. & LEWIS, T. (1978) Outliers in statistical data, New York, John Wiley and Sons.

ANNEX III. GUIDELINES FOR THE EVALUATION OF VARIOUS GROUPS OF FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS

These guidelines have been established by JECFA and are reproduced here for easy reference. They are valid within the context in which they were generated, and are intended to serve as examples of guidance by JECFA for evaluating specific categories of substances.

1. Enzyme Preparations Used in Food Processing (adapted from: 1, p. 49; 2)

(a) Toxicological evaluation

For the purpose of toxicological evaluation, enzyme preparations used in food processing can be grouped into 5 major classes:

- (i) Enzymes obtained from edible tissues of animals commonly used as foods. These are regarded as foods and, consequently, considered acceptable, provided that satisfactory chemical and microbiological specifications can be established.
- (ii) Enzymes obtained from edible portions of plants. These are also regarded as foods and, consequently, considered acceptable, provided that satisfactory chemical and microbiological specifications can be established.
- (iii) Enzymes derived from microorganisms that are traditionally accepted as constituents of foods or are normally used in the preparation of foods. These products are regarded as foods and, consequently, considered acceptable, provided that satisfactory chemical and microbiological specifications can be established.
- (iv) Enzymes derived from non-pathogenic microorganisms commonly found as contaminants of foods. These materials are not considered as foods. It is necessary to establish chemical and microbiological specifications and to conduct short-term toxicity studies to ensure the absence of toxicity. Each preparation must be evaluated individually and an ADI must be established.
- (v) Enzymes derived from microorganisms that are less well known. These materials also require chemical and microbiological specifications and more extensive toxicological studies, including a long-term study in a rodent species.

Safety assessments for enzymes belonging to classes i - iii will be the same regardless of whether the enzyme is added directly to food or is used in an immobilized form. Separate situations should be considered with respect to the enzymes described in classes iv and v:

- (i) Enzyme preparations added directly to food but not removed.
- (ii) Enzyme preparations added to food but removed from the final product according to good manufacturing practice.

- (iii) Immobilized enzyme preparations that are in contact with food only during processing.

For (i) above, an ADI should be established to ensure that levels of the enzyme product present in food are safe. The studies indicated in these guidelines are appropriate for establishing ADIs (the guidelines were originally drafted for this situation). For (ii), an ADI "not specified" may be established, provided that a large margin of safety exists between possible residues and their acceptable intake. For (iii), it may not be necessary to set an ADI for residues that could occur in food as a result of using the immobilized form of the enzyme. It is acceptable to perform the toxicity studies relating to the safety of the enzyme on the immobilized enzyme preparation, provided that information is given on the enzyme content in the preparation.

(b) Specifications for identity and purity

Prior to revising existing specifications and developing new specifications for enzyme preparations for food processing, the following data are necessary:

- (i) A comprehensive description of the main enzymatic activity (or activities), including the Enzyme Commission number(s) if any.
- (ii) A list of the subsidiary enzymatic activities, whether they perform a useful function or not.
- (iii) A clear description of the source.
- (iv) A list of non-enzymatic substances derived from the source material(s), with limits where appropriate.
- (v) A list of added co-factors, with limits where appropriate.
- (vi) A list of carriers and diluents, with limits where appropriate.
- (vii) A list of preservatives present from manufacture or deliberately added, with limits where appropriate.

(c) Immobilizing agents

A number of procedures involving different chemical substances are used for immobilizing enzymes. These processes include microencapsulation (e.g., entrapment in gelatin to form an immobilized complex), immobilization by direct addition of glutaraldehyde, immobilization by entrapment in porous ceramic carrier, and complexation with agents such as DEAE-cellulose or polyethylenimine. Several agents may be used in the immobilizing process. Substances derived from the immobilizing material may be in the final product due to either the physical breakdown of the immobilized enzyme system or to impurities contained in the system. The amount of data necessary to establish the safety of the immobilizing agent depends on its chemical nature. The levels of residues in the final product are expected to be extremely low.

Some of the substances used in the preparation of immobilizing systems are extremely toxic. The levels of these substances or their contaminants permitted in the final product should be at the lowest levels that are technologically feasible, provided that these levels are below those of any toxicological concern. An ADI will not be established.

JECFA 食品加工に用いる酵素製剤の評価の指針

「食品添加物の安全性評価の原則（薬事日報社）」

付録Ⅲ．食品添加物および汚染物質の各種のグループごとの評価の指針

より抜粋

1. 食品加工に用いる酵素製剤（文献1、p. 49、および文献2より引用）

(a) 毒性評価

食品加工に用いられる酵素製剤は、毒性評価の目的で、以下の五つの主な種類に分類することができる。

- (i) 通常食品として用いられる動物の可食組織から得られる酵素。これらは食品とみなされ、したがって、満足すべき化学的および微生物学的規格が作成できるならば、容認できると考えられる。
- (ii) 植物の可食部分から得られた酵素。これらも食品とみなされ、したがって、満足すべき化学的および微生物学的規格が作成できるならば、容認できると考えられる。
- (iii) 伝統的に食品の成分として容認されているか、あるいは一般に食品の調製に用いられている微生物から得られた酵素。これらの製品は食品とみなされ、したがって、満足すべき化学的および微生物学的規格が作成できるならば、容認できると考えられる。
- (iv) 通常、食品中に混在して見出される非病原性微生物から得られる酵素。これらの物質は 食品とは考えられない。化学的および微生物学的規格を作成し、毒性のないことを確証す

るための短期毒性試験を行うことが必要である。それぞれの製品は個別に評価されなければならない。許容一日摂取量が設定されなければならない。

- (v) それほど良く知られていない微生物から得られた酵素。これらの物質も、化学的および微生物学的規格が必要で、かつ、齧歯類を用いた長期毒性試験を含む、より広範な毒性試験が必要である。

i ~ iiiの分類に属する酵素の安全性評価は、酵素が直接に食品に加えられるか、あるいは固定化した形で使われるかに関係なく、同じであろう。しかし、ivおよびvの分類に述べられている酵素については、以下のように状況を区別して考察すべきであろう。

(i) 食品に直接加えるが、取り除かない酵素製剤。

(ii) 食品に加えるが、製造操作規範 (Good Manufacturing Practice) に従って最終製品から取り除かれる酵素製剤。

(iii) 加工の過程においてのみ、食品と接触する固定化酵素製剤。

上記(i)については、食品中に存在する酵素製品のレベルが安全であることを確実にするため、許容一日摂取量が設定されるべきである。この指針中に記載してある試験は、許容一日摂取量を設定するために適当なものである (この指針は本来この状況について書かれたものである)。(ii)については、残留する可能性のある量と許容できる摂取量との間に大きな安全の余裕があれば、許容一日摂取量“特定せず”が設定できるであろう。(iii)の場合は、固定化した形の酵素の使用の結果として食品中に生ずる可能性のある残留量について、許容一日摂取量を定める必要はないだろう。固定化酵素製剤中の酵素含量について情報が与えられているならば、固定化製剤としての酵素の安全性に関する毒性試験の実施は容認できる。

(b) 物質同定および純度についての規格

食品加工のための酵素製剤の現在ある品質を改訂したり、新しい規格を作成するには、それに先立って以下のデータが必要である。

- (i) 主な酵素作用 (一つまたは複数の) の包括的な説明。もし酵素委員会の番号があればそれも含めること。
- (ii) それらが有用な機能であるか否かにかかわらず、副次的な酵素作用についてのリスト。
- (iii) 製造起源の明確な説明
- (iv) 製造起源物質から由来する非酵素物質のリスト。範囲は適切のところまで。
- (v) 加えた補助因子 (cofactor) のリスト。範囲は適切のところまで。
- (vi) 担体および希釈剤のリスト。範囲は適切のところまで。

- (vii) 製造中に加えられた、あるいは製剤に故意に加えられた保存料のリスト、範囲は適切なところまで。

(c) 固定化剤

各種の化学物質を含むいくつかの処理が酵素の固定化に用いられている。これらの処理には、マイクロカプセル化(たとえば、ゼラチン中にとらえこんで固定化した複合体をつくる方法)、グルタルアルデヒドの直接添加による固定化、多孔性陶器性の担体中へのとらえこみによる固定化、DEAE-セルロース(ジエチルアミノエチルセルロース)やポリエチレンイミンのような薬品と複合体を作る方法などがある。数種の薬品が固定化処理に用いられる可能性がある。固定化酵素システムの物理的破損、あるいはシステム中に含まれる不純物のため、固定化物質から由来する物質が最終製品中に存在する可能性がある。固定化剤の安全性の確立に必要なデータの量は、その化学的性質による。最終製品中のその残留性レベルはきわめて低いと予測される。

固定化システムの調製に用いられる物質はきわめて毒性の強いものがある。これら物質あるいはそれらの中の汚染物質の最終製品中に許容されるレベルは、技術的に実行可能な最低レベルであるべきであり、これらレベルはいかなる毒性であろうとそれが懸念されるレベルより低くなければならない。許容一日摂取量は設定されないだろう。