

マスキング版

黒塗り部分を除き、公開でお取り扱い頂いて差し支えございません。

食品添加物指定の要請資料

*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産された  
アスパラギナーゼ

DSM ニュートリション ジャパン株式会社

2012年9月24日

## 目 次

1. 本要請の目的及び理由	1
2. 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況に関する資料	2
(1) 起源又は発見の経緯	
(2) 外国における使用状況	
3. 物理化学的性質及び成分規格に関する資料	3
(1) 名称	
(2) 性質	
(3) 酵素活性規格	
(4) 組成	
(5) 製造方法	
(6) 性状	
(7) 確認試験	
(8) 純度試験	
(9) 微生物限度	
(10) 酵素活性測定法	
(11) 食品添加物の安定性	
(12) 食品中の食品添加物の分析法	
(13) 成分規格案の設定根拠	
4. 有効性に関する資料	7
(1) 食品添加物としての有効性	
(2) 食品中での安定性	
5. 安全性に関する資料	9
(1) 生産菌の安全性	
(2) 本品が消化管内で分解して食品常在成分となることの確認のための検討	
(3) 毒性に関する資料	
① 13 週間反復投与毒性試験	
② 出生前発生毒性試験	
③ アレルゲン性	
④ 変異原性試験	
⑤ 一般薬理試験	
(4) 体内動態に関する資料	
(5) 1 日摂取量に関する資料	
6. 使用基準案に関する資料	15
7. 国際機関における評価	16
資料一覧	17-18

## 1. 本要請の目的及び理由

近年、食品加工の際の加熱によりアミノ酸の一種であるアスパラギンが還元糖と反応してアクリルアミドが生成されることが明らかとなってきた（図1）。主に、アスパラギンと還元糖が含まれ、高温で加熱して製造されるパンやケーキ等の小麦粉製品やシリアル、フライドポテトやポテトチップスなどにアクリルアミドが含まれていることが報告されている。アクリルアミドは動物実験等で毒性が示されており、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）では、食品中のアクリルアミドがヒトへの健康に有害な影響を及ぼす可能性があるとして確認されている。JECFA では FAO、WHO、Codex 及びそれらの加盟国に対し、さらなる健康影響の調査や食品中のアクリルアミド量の低減策の開発などの勧告を行っている。これを受けて、各国では食品中のアクリルアミド含有量の調査や低減策の検討などの対策がとられており、日本でもアクリルアミドに関する情報や食品中のアクリルアミド量等を公表している<sup>1)</sup>。

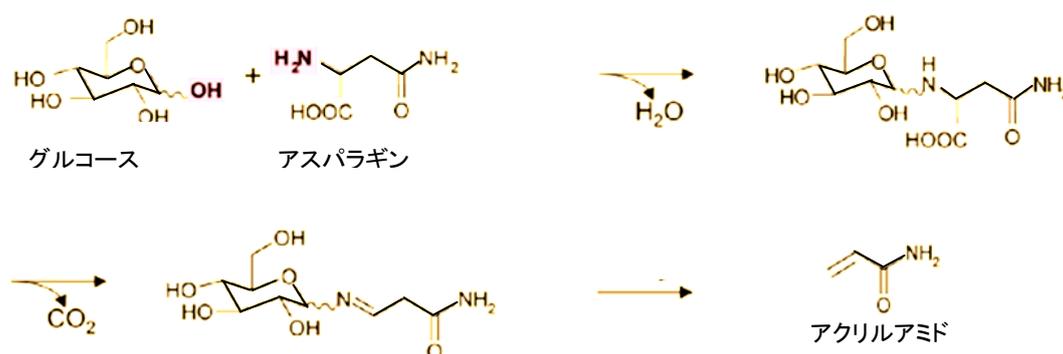


図1 アクリルアミドの生成経路

DSM 社（ディー エス エム社、オランダ）では、*Aspergillus niger* ASP-72 株から生産される酵素であるアスパラギナーゼの製剤化に成功し、液状製品（商品名：PreventASe™ L）及び顆粒製品（商品名：PreventASe™ M、PreventASe™ W）を海外で販売している。アスパラギナーゼはアクリルアミド生成の起因となる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作用を有するため、食品加工の際に本品を添加することにより、アクリルアミドの生成を低減させることが可能である。

コーデックス委員会において「食品中のアクリルアミド低減のための実施規範/Code of Practice for the Reduction of Acrylamide in Foods (2009)」<sup>2)</sup>が国際規格として採択され、本品アスパラギナーゼ添加が、じゃがいも製品などの食品中のアクリルアミド低減策として記載されている。

本品については、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）での評価が終了しており、第 69 回会議（2008 年）において、「一日摂取許容量（ADI）は特定しない（not specified）」とされた<sup>3)</sup>。また、アメリカにおいては、2007 年に「一般に安全と認められる物質（GRAS）」として認定されており<sup>4)</sup>、ヨーロッパでも安全性が認められすでに使用されている。

以上より、我が国においても、食品加工の際のアクリルアミド生成を抑える目的で用いられることで国民の健康の増進において有益であると考えられることから、食品添加物としての指定を要請するものである。

## 2. 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況に関する資料

### (1) 起源又は発見の経緯

アスパラギナーゼはアクリルアミド生成の起因となる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作用を有するため、食品加工の際に本品を添加することにより、アクリルアミドの生成を低減させることが可能である。現在世界各国においてアクリルアミド低減策の検討を行っているが、欧米では本品の利用が注目されている<sup>5)</sup>。

DSM 社では、アクリルアミド低減策についての研究において、本品の開発・製造に成功し、CODEX をはじめ各国に対するプロモーション活動を実施している。

本品の生産菌は、*A. niger* を宿主として構築された菌株であり、生産菌株も *A. niger* と同定されている。*A. niger* は、安全な微生物で食品生産、食品加工に使用されている酵素や有機酸の生産において安全に使用されてきた歴史があり<sup>6)</sup>、*A. niger* から生産されたプロテアーゼ等の種々の酵素においては、米国 FDA で GRAS (一般に安全と認められる物質[substances Generally Recognized As Safe]) の位置づけを得ている<sup>7)</sup>。

本品は *A. niger* が本来有してい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生産菌株から得られた酵素であり、*A. niger* 由来のアスパラギナーゼは 2007 年に GRAS として認定されている<sup>4)</sup>。

### (2) 外国における使用状況

JECFA (第 69 回会議、2008 年) で本品の安全性が評価され、「GMP に従って製造され、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」という結論に達し、酵素の規格も設定された<sup>3)</sup>。

本品の諸外国での許可状況および使用状況は以下の通りである。

国名	許可状況	使用状況
アメリカ	米国食品医薬品庁 (FDA) に安全性試験等の資料を提出し、 <i>A. niger</i> 由来の本品は、2007 年 3 月に GRAS として認定 (GRN000214) された <sup>4)</sup> 。	○
カナダ	2012 年 3 月 14 日に Health Canada は、 <i>A. niger</i> 由来の本品を許可 <sup>8)</sup> 。	—
フランス (本品の製造国)	食品安全機関 (AFSSA) において安全性が審議され、2007 年 5 月に許可 <sup>9)</sup>	○
デンマーク	2007 年 9 月に許可 <sup>10)</sup>	○
ロシア	2007 年 8 月に認可	○
スイス	2008 年 6 月に許可 <sup>11)</sup>	○
メキシコ	2007 年 12 月に許可 <sup>12)</sup>	○
その他の EU 諸国	食品への加工助剤としての酵素使用に規制はなく使用可能であるが、欧州議会及び理事会規則 (EC) 1331/2008 により、新規あるいは規格や使用条件の改正が必要な食品用酵素は、食品添加物と共通の評価及び認可の手続きが求められることになった <sup>13)</sup> 。委員会規則 (EU) No 234/ 2011 により、EFSA へ提出すべきデータ要件が規定されている <sup>14)</sup> 。	○

オーストラリア及び ニュージーランド	2008年11月に許可 <sup>15)</sup>	○
中国	2009年8月に許可	○

### 3. 物理化学的性質及び成分規格に関する資料

#### (1) 名称

名称：アスパラギナーゼ

英名：Asparaginase from *Aspergillus niger* expressed  
in *Aspergillus niger*

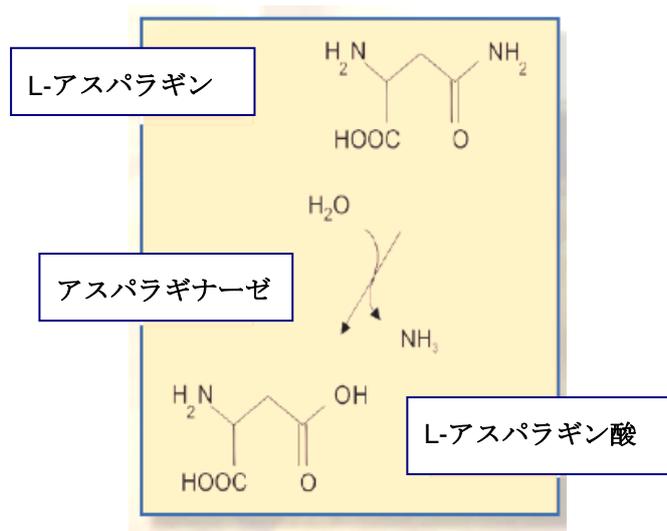
別名：Asparaginase II, L-asparaginase, α-asparaginase

CAS No. : 9015-68-3

EC : 3.5.1.1

#### (2) 性質

- ①反応様式：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。  
これ以外の副反応はない。



#### ②構造式

本品のアミノ酸配列（378アミノ酸）は以下の通りである。

```
MPLKPILLSALASLASASPLLYSRTTNETFVFTNANGLNFTQMNTLTPNVTIFATGGTIAGSDSSSTATT
GYTSGAVGVLSLIDAVPSMLDVANVAGVQVANVGSEDI TSDILISMSKKNRVVCEPTMAGAVITHGTD
TLEETAFFLDATVNCCKPIVIVGAMPSTAI SADGPFNLLEAVTVAASTSARDRGAMVVMNDRIASAYYV
TKTNANTMDTFKAMEMGYLGEMISNTPFFFYPPVKPTGKVAFDITNVTEIPRVDILFSYEDMHNNTLYNA
ISSGAQGI VIAGAGAGGVTTSFNEAIEDVINRLEIPVVQSMRTVNGEVPLSDVSSDTATHIASGYLNPQK
SRILLGLLSQGKNITEIADV FALGTDA
```

③分子量：SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動では 40-42 kD（糖鎖部位を除去後）、アミノ酸配列から計算される分子量は 39584 Da である。本品は、7 箇所の糖鎖部位を有するため、糖鎖の結合の度合いによって分子量が異なるバンドが現れ、また末端のアミノ酸が幾つか欠けたバンドも現れる。

④等電点：アミノ酸配列から理論値 4.48、実測値 3.6

この違いは、本品は 7 箇所の糖鎖部位を有するため、糖鎖の結合により分子量がアミノ酸配列からの理論的分子量と異なることによる。

⑤至適 pH：4-5

⑥至適温度：50℃

### (3) 酵素活性規格

本品は、1g あるいは 1 mL 当たり 2375 ASPU 以上の酵素活性（アスパラギナーゼ活性）を有する。

ASPU (asparaginase units)：L-アスパラギンから、pH5.0、37℃の条件下において、1 分間に 1 マイクロモルのアンモニアを遊離させる量を 1ASPU とする。

### (4) 組成

本品は 7 箇所の糖鎖部位を有するため、糖鎖の結合の度合いによって、あるいは末端のアミノ酸が幾つか欠けることにより分子量が異なる。本品はこれらの混合物である。製剤化するにあたり、液状製品 (PreventASe™ L) にはグリセロール、顆粒製品にはマルトデキストリン (PreventASe™ M) または小麦粉

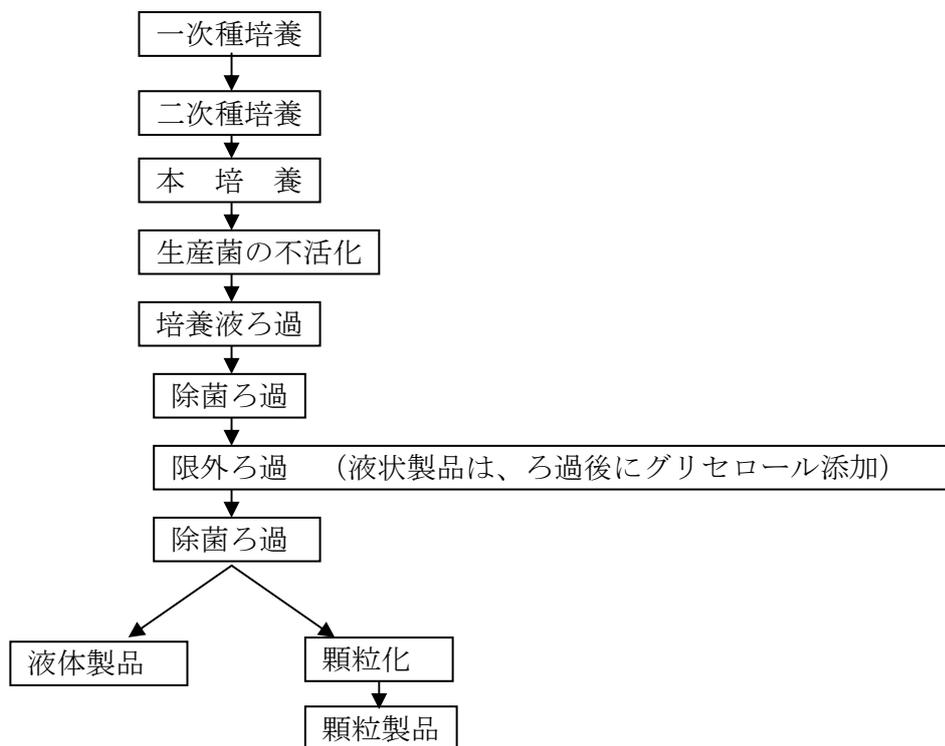
(PreventASe™ W) を添加して安定化させ、酵素活性を 2500 ASPU/mL あるいは 2500 ASPU / g に調整している。本品の製剤の TOS 含量は 6~10%の範囲である。第 67 回 JECFA の定めた方法<sup>16)</sup>により測定算出される本品の TOS 含量は、製剤のロットによって異なるが、JECFA 申請資料の TOS (%) は平均 15.2%である。アメリカ GRAS 申請資料の TOS (%) は平均 13.7%である。カナダ、オーストラリア及びニュージーランド申請資料では TOS (%) は平均 13.0%である。

なお、本要請書は、JECFA の TOS (%) である 15.2%を用いて一日摂取量の推定計算を行っている<sup>17)</sup>。

### (5) 製造方法

次に除菌ろ過により、生産菌及び菌体断片もアスパラギナーゼから完全に分離する。

## 製造方法フローチャート



(6)性状：ごくうすい灰み又はごくうすい黄みを帯びた白色の顆粒若しくは黄～褐色の澄明な液体

### (7)確認試験

3. (10) 項記載の酵素活性測定法に準じて試験を行うとき、酵素活性を示す。

### (8)純度試験

鉛：5 mg/kg 以下

ヒ素：3 mg/kg 以下

抗菌活性：抗菌活性を示してはならない

### (9)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、サルモネラは認めない。

### (10)酵素活性測定法

アスパラギナーゼがL-アスパラギンからアスパラギン酸とアンモニアに加水分解して生成されたアンモニアがフェノールニトロプルシドとアルカリ次亜塩素酸と反応して青色を呈色する (Berthelot 反応)。これを吸光度で測定する。

#### 試薬・溶液

- ・ フェノールニトロプルシド溶液 (Sigma-Aldrich P6994 または同等)
- ・ 次亜塩素酸ナトリウム 0.2%アルカリ溶液 (Sigma-Aldrich A1727 または同等)

- 水酸化ナトリウム溶液 4M：水酸化ナトリウム 160g を水 800mL に溶かし、室温まで冷却し、水を加えて 1000mL として、完全に溶解する。
- クエン酸希釈液 0.1M, pH5.00±0.03：クエン酸一水和物 21.01g を水 900mL に溶解し、4M 水酸化ナトリウムで pH を 5.00±0.03 に調整し、水を加えて 1000mL とする。
- L-アスパラギン基質溶液：L-アスパラギン（L-アスパラギン一水和物≥99%，Sigma-Aldrich A8381 または同等）1.50g をクエン酸緩衝液 80mL に入れ、攪拌して完全に溶解し、緩衝液を加えて 100mL として混ぜる。
- TCA stop 液：トリクロロ酢酸 25g（Sigma-Aldrich27242（Riedel-de Haen）または同等）を水 80mL に溶解し、水を加えて 100mL とする。
- 標準液：硫酸アンモニウム（分析用試薬）3.9g をクエン酸緩衝液 40mL に溶解し、15 分間攪拌し溶解する。さらに緩衝液を加えて 50mL として混ぜる。緩衝液で 5 つの濃度で希釈液を作成し、硫酸アンモニウム量をもとに濃度を算出する。

#### 標準液 5 濃度の作成例

	希釈係数	濃度 (mg/ml)
S1	60	1.3
S2	30	2.6
S3	10	7.8
S4	6	13.0
S5	4	19.5

- 対照液：アスパラギナーゼ製剤 4000ASPU/g を±0.1mg の誤差で量り、クエン酸緩衝液 20mL に溶解し、さらに緩衝液を加えて 25mL とする。溶液を緩衝液で活性が 6ASPU/ml になるまで希釈する。
- 試料溶液：アスパラギナーゼ製剤 2.5g（±0.1mg）をクエン酸緩衝液 20mL に溶解し、さらに緩衝液を加えて 25mL とする。溶液を緩衝液で活性 6ASPU/ml になるまで希釈する。

#### 操作法

- 5 つの濃度の試験管（S1-S5）に基質溶液 2.0mL を入れ、水槽に 10 分間放置する。各試験管に標準液 100 μL を加えて混ぜ、水槽に正確に 30 分間放置する。トリクロロ酢酸（TCA）反応停止液 0.4mL を加えて反応を停止させ、水 2.5mL を加えて混合したものを反応液とする。
- 5 つの濃度の試験管（S1-S5）に水 800 μL と反応液 20 μL を加える。フェノールニトロプルシド溶液 170 μL を加えて混合し、アルカリ次亜塩素酸ナトリウム溶液 170 μL を加えて発色させる。混ぜて水槽に 10 分間放置し、600nm における吸光度を測定する。
- 標準溶液中の硫酸アンモニア濃度で検量線を作成する。

#### 対照・試料液の調整

- 標準液作成手順の 1 と 2 と同様に調整する。
- 別に基質溶液 2.0mL 及びトリクロロ酢酸反応停止薬 0.4mL を試験管に入れて混ぜ、対照液もしくは試料液を加える。混合したら水槽に 30 分間放置する。

水 2.5mL を加え、標準溶液作成手順 Step2 の操作を続ける。これをブランクとする

$$\text{酵素活性 (ASPU/g)} = \frac{A \times V \times Df \times 2 \times 10^6}{a \times M \times W \times 30 \times 10^3}$$

- A: 試料とブランクの吸光度の差
- V: 試料溶液の量 (25mL)
- Df: 希釈係数
- 2: 硫酸アンモニア 1 モル当たりのアンモニアのモル数
- 10<sup>6</sup>: mole から μmole への変換係数 (換算)
- a: 標準線
- M: 硫酸アンモニウムのモル質量 (132.14g/mol)
- W: 試料重量 (g)
- 30: 反応時間 (分)
- 10<sup>3</sup>: ミリグラムからグラムへの変換係数

#### (11) 食品添加物の安定性

- 顆粒製品：冷暗所保存において 1 年間安定である。
- 液体製品：4～8℃保存において 1 年間安定である。

#### (12) 食品中の食品添加物の分析法

本品は、使用基準を設定する必要がないと判断されるため、食品中での本品の定量法の設定は必要ないと考えられる。また、本品は、食品加工の際の熱処理により酵素活性が失活され、食品の常在成分（アミノ酸）となってしまうため定性的に確認する方法の設定も困難である。

#### (13) 成分規格案の設定根拠

成分規格（案）は、JECFA（第 69 回会議、2008 年）にて ADI 設定の際に使用された規格を参考に設定した<sup>18)</sup>。

### 4. 有効性に関する資料

#### (1) 食品添加物としての有効性

本品は、アクリルアミド生成の起因となる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作用を有し、食品加工の際に本品を添加することにより、食品の味や色等に影響を与えずにアクリルアミド生成を低減させる。

アクリルアミド低減のために必要なアスパラギナーゼ添加量は、食品の種類や使用されている原材料、製造方法等により異なる。各食品への推奨添加量を以下に示す。

- ・小麦粉を使用したパン：77～385 ASPU/粉 1kg、平均 150 ASPU/粉 1kg
- ・トウモロコシ粉を使用したシリアル製品：20～850 ASPU/粉 1kg、平均 200 ASPU/粉 1kg
- ・片栗粉を使用したじゃがいも製品：500～15,000 ASPU/粉 1kg、平均 2000 ASPU/粉 1kg
- ・調味料：4700～6200 ASPU/ kg、平均 5400 ASPU/kg

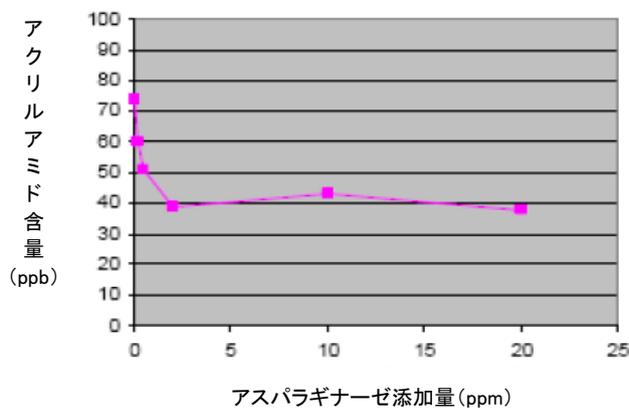
パン、ドーナツ、クラッカーの生地および調味料の原料である酵母エキスにアスパラギナーゼを添加して、各食品を製造した場合のアクリルアミド低減効果を表1、図2に<sup>19,20,21)</sup>に示す。各食品においても、47%、87%、87%および80%のアクリルアミド低減効果が認められた。

また、乾燥じゃがいもフレークに水とオリーブオイルを混ぜた生地にあスパラギナーゼを添加して油で揚げた揚げじゃがいも中のアスパラギンおよびアクリルアミド低減効果を図3に示す<sup>22)</sup>。5 ASPU/g じゃがいも乾燥薄片で処理したところ、93%の低減効果が認められた。

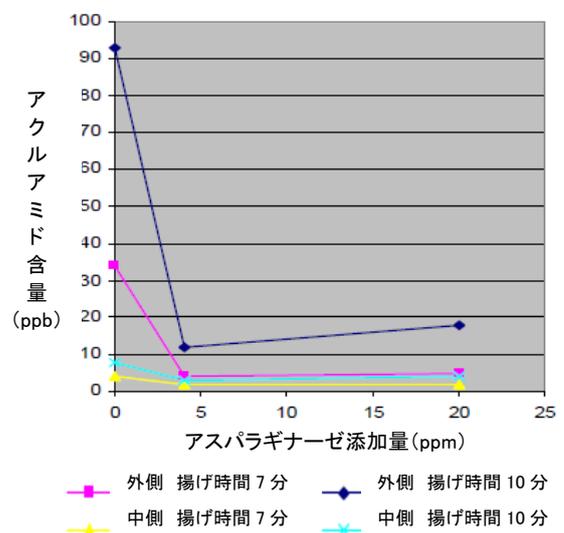
表1 食品製造の際にアスパラギナーゼを添加した場合のアクリルアミド低減効果

食品	原料への酵素添加濃度	製品中のアクリルアミド濃度 (ppb)	アクリルアミド低減率 (%)
バタール(フランスパン)	0ppm	75	
	2ppm	40	47
ドーナツ (外側部分)	0ppm	94	
	4ppm	12	87
クラッカー	0ppm	45	
	6ppm	6	87
調味料	0ppm	1497	
	325ppm	296	80

A. バタール (フランスパン)  
: 外側の皮の部分のアクリルアミド量を測定



B. ドーナツ : 外側と中側のアクリルアミド量を測定



### C. クラッカー

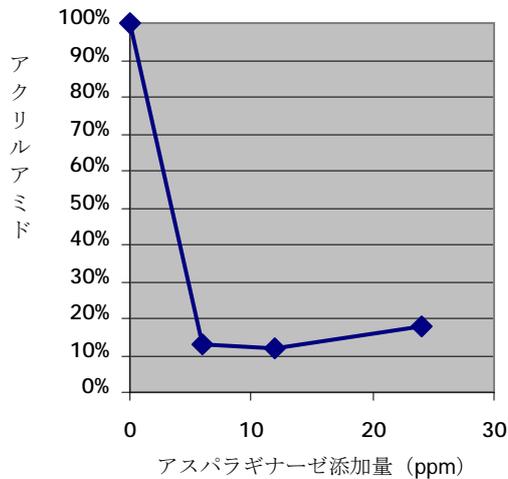


図2 食品製造の際にアスパラギナーゼを添加した場合のアクリルアミド低減効果

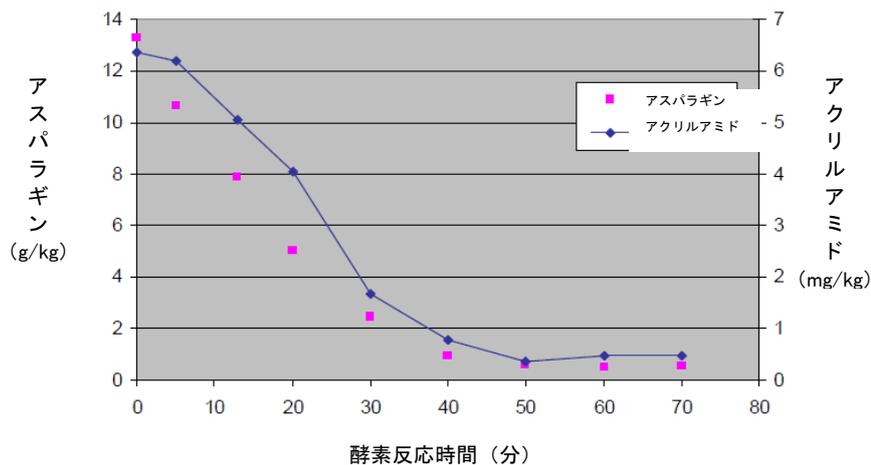


図3 じゃがいも生地にあスパラギナーゼを添加して揚げた場合のアスパラギンおよびアクリルアミドの低減効果

#### (2) 食品中での安定性

本品は食品加工の加熱の前段階で添加される。本品は 70℃以上の熱処理により失活するため、それ以上で加熱加工された最終食品中でその作用を示すことはない<sup>23)</sup>。

## 5. 安全性に関する資料

### (1) 生産菌の安全性

生産菌である ASP-72 株はアスパラギナーゼを高生産させることを目的に構築された株で、オランダ菌株コレクション Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) (菌類培養中央研究所)において、宿主 GAM-53 株と同様に、v. Tieghem の形態的記述に従って *A. niger* と同定され<sup>24, 25)</sup>、同じく、アスパラギナーゼをコードしている遺伝子の供与体 GAM-8 株の親株 GAM-4 株も *A. niger* と同定されている<sup>24)</sup>。

選択マーカーであるアセトアミダーゼをコードしている遺伝子の供与体は、*A. nidulans* 由来であるが、選択マーカーは相同組換えにより最終的に除去されている。

ベクターpTZ18Rには、アンピシリン耐性遺伝子が含まれているが、*A. niger* に導入する発現ユニット（ベクターフリー）の*E. coli* 中での構築の目的にのみ使用されたため、本ベクターは最終生産菌には含まれず、抗生物質耐性マーカー遺伝子も挿入されていない。

よって、生産菌 *A. niger* ASP-72 株には、*A. niger* 宿主株自身及び *A. niger* 遺伝子供与株に由来する DNA 以外の DNA 配列は存在しない。

*A. niger* は糸状菌に属するが、多くの糸状菌は二次代謝産物を生産することが知られており、その幾つかは毒性（マイコトキシン）を有する。試験したところ 3 から 10% の *A. niger* の Strain でマイコトキシンであるオクラトキシンを産生するといわれているが、本生産菌 ASP-72 株の食品使用における安全性は確認されている<sup>6), 26)</sup>。

ヒナに *A. niger* の胞子を大量に摂食させた試験において、マイコトキシンによる症状は認められなかったという報告がある<sup>27)</sup>。*A. niger* は、安全な微生物で食品生産、食品加工に使用されている酵素や有機酸の生産において安全に使用されてきた歴史があり<sup>6)</sup>、本菌株の複数の酵素は、数十年に渡って様々な食品加工に安全に使用されている。このようなプロテアーゼ、ペクチナーゼなどを含む多くの酵素は、長きに渡り安全に使用された歴史に基づき、米国 FDA で GRAS（一般に安全と認められる物質 [substances Generally Recognized As Safe]）の位置づけを得ている<sup>7)</sup>。本品の生産菌は *A. niger* 由来であるが、我が国では *A. niger* 由来の  $\alpha$ -アミラーゼやプロテアーゼ等が既存添加物として幅広い食品に使用されている<sup>28)</sup>。もともと *A. niger* はアスパラギナーゼも生産するが、これまではアスパラギナーゼの食品添加物としての有用性が明らかではなかったため商業化されていなかった。

## (2) 本品が消化管内で分解して食品常在成分となることの確認のための検討

タンパク質はヒト消化管において、消化酵素の働きにより小分子ペプチドに分解され、さらに酵素がペプチド結合に作用してアミノ酸に分解される。アスパラギナーゼは 20 種のアミノ酸から構成されており、本品の消化は他のタンパク質と同様のメカニズムで消化される。

ExPASy (Expert Protein Analysis System)<sup>29)</sup> システム中のツールであるペプチドカッターの手法を用いて、コンピュータ上で、アスパラギナーゼのアミノ酸配列 (378 アミノ酸) をペプシン、トリプシンおよびキモトリプシンで分解させてみたところ、最初の酵素分解においてオリゴペプチド (30~50 アミノ酸を含む) 以下まで分解されることが示唆された<sup>30)</sup>。これらの小分子ペプチドは、さらに特異的ペプチダーゼ等により分解されると考えられる。ExPASy は、スイス バイオインフォマテックス研究所に属するタンパク質とプロテオミクス（網羅的タンパク質解析）のサーバーで、研究者によく知られ、国際的に食品のアレルゲン性評価の際に用いられている実績がある。酵素はタンパク質であることから消化管で分解されるとされ、分解性を示すデータは通常求められないことから、消化酵素による分解性をみるためのペプチドカッターの手法自体は、JECFA などの国際的な評価機関で安全性評価に用いられていないが、Food Standards Australia New Zealand (FSANZ/豪州・ニュージーランド食品基準機関)へ申請の際に、本要請書に添付の資料が提出され、評価されている。

平成8年厚労省ガイドライン「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」表2の1~5に沿って検討した内容を以下のとおりまとめた。

**1. 食品添加物の通常の使用条件下で、本品が容易に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**

酵素はタンパク質から構成されており、「ExPASy (Expert Protein Analysis System)」を使用して、アスパラギナーゼのアミノ酸配列 (378アミノ酸) をペプシン、トリプシンおよびキモトリプシンで分解させてみたところ、最初の酵素分解においてオリゴペプチド (30~50アミノ酸を含む) 以下まで分解され、これらの小ペプチドはペプチダーゼにより更に分解されて、アミノ酸として、通常の代謝経路をたどると考えられる。  
よって消化管内で食品の常在成分であるアミノ酸に分解されると考えられる。

**2. 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**  
分解に関わる主要な因子は、ペプシン、トリプシンおよびキモトリプシンといった酵素である。

**3. 食品添加物の通常の使用条件下で適正な量を使用した場合、本品の体内への吸収が**

**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**

体内で食品常在成分であるアミノ酸として吸収されることから、糖質、ビタミン、ミネラル等の他の栄養成分の吸収は阻害しないと考える。

**4. 摂取された本品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。更に、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**

消化酵素によって分解されアミノ酸となり通常の代謝経路をたどると考えられ、

未加水分解物や部分加水分解物が大量に糞便中に排泄すること、また生体内に蓄積するとは考え難い。

**5. 本品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**

本品を使用した食品では、アスパラギンがアスパラギン酸とアンモニアに加水分解されている。高温で食品を加工する際、アスパラギンがブドウ糖、果糖などの還元糖と反応して生じるアクリルアミドの生成を低減することが、アスパラギナーゼの使用目的であるため、対象食品は限定され、アスパラギン酸の過剰摂取の問題はないと考えられる。

**(3) 毒性に関する資料**

本品が消化管内で分解して食品常在成分となると考えられるために、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」によれば、原則として慢性毒性試験等を省略することができるとされている。

13週間反復投与毒性試験、出生前発生毒性試験、変異原性試験を実施した。これらの試験結果は JECFA 及び FDA に提出されている。各試験の概要は以下のとおりである。

**①13週間反復投与毒性試験<sup>31)</sup>**

ラット (Wistar 系、雌雄各 20 匹) にアスパラギナーゼ (0.2%、0.6%、1.8%) を 13 週間混餌投与した結果、一般症状、体重、摂餌量、血液生化学検査、肉眼検査、組織病理学検査などにおいて、投与による影響は認められなかった。最高用量群において、尿中三リン酸結晶の僅かな上昇が見られたが、尿中に通常存在する物質であり、僅かな上昇は臨床的に問題となるものではない。本試験において被験物質投与による異常は認められなかったため、本試験における無作用量 (NOEL) は最高投

与量である、雄で 1157mg/ (TOS 1038mg) kg 体重/日、雌で 1331mg (TOS 1194mg/kg 体重/日と考えられる。

試験の種類		13 週間反復投与毒性試験
報告者		B. A. R. Lina
動物種・例数		Wistar 系ラット 雌雄各 20 匹/群
試験方法	被験物質	アスパラギナーゼ原末 (ロット番号 APE0604、活性値 34552ASPU/ g、TOS (%) 89.68 )
	投与経路 投与量	混餌投与 0 (通常飼料：対照群)、 0.2%群：雄 130、雌 151 mg/kg 0.6%群：雄 391、雌 452mg/kg 1.8%群：雄 1157、雌 1331mg/kg
	投与期間	13 週間
試験成績	死亡率	試験期間中に死亡したラットはなかった。
	一般症状	投与による影響は認められなかった。
	体重	投与による影響は認められなかった。
	摂餌量	投与による影響は認められなかった。
	血液学的検査	雌雄各 10 匹の投与 2 週間後、投与 7 週間後および剖検時の検査において、投与による影響は認められなかった。
尿検査	高用量群 (雌雄各 10 匹) において、13 週間後に尿中三リン結晶の僅かな上昇が認められたが、通常存在する成分であり、僅かな上昇は病的な異常ではないと考察される。	
臓器重量 剖検	投与による影響は認められなかった。 投与による影響は認められなかった。	

## ②出生前発生毒性試験<sup>32)</sup>

ラット (Wistar 系、各群雌各 25 匹) にアスパラギナーゼ (0.2%、0.6%、1.8%) を妊娠中 0~21 日間混餌投与した結果、投与期間中における母体の一般症状、体重、摂餌量、子宮・卵巣の重量などへの異常は認められなかった。胎児においても、胎児数・性別、外見・臓器・骨格などへの投与による異常は認められなかった。本試験において、被験物質投与による出生前発生毒性は観察されなかったため、NOAEL は最高投与量の 1205mg (TOS 1081mg) /kg 体重/日と考えられる。

試験の種類		出生前発生毒性試験
報告者		M. M. Tegelenbosch-Schouten M. Sc.
動物種・例数		Wistar 系ラット、雌 25 匹/群
試験方法	被験物質	アスパラギナーゼ原末 (ロット番号 APE0604、活性値 34552ASPU/ g、TOS (%) 89.68 )
	投与経路 投与量	混餌投与 0 (通常飼料：対照群)、 0.2%群：136mg/kg、0.6%群：403mg/kg、 1.8%群：1205mg/kg
	投与期間	妊娠中 0~21 日まで継続投与
試験成績	体重	投与による影響は認められなかった。

験 成 績	一般症状 生殖機能	投与による影響は認められなかった。 投与による影響は認められなかった。
-------------	--------------	--

### ③アレルギー性

*A. niger* 由来の酵素はこれまで安全に食されてきた歴史がある。アスパラギナーゼがアレルゲンとなる可能性は低いといえる。さらに、酵素の暴露量は少なく、最終食品に残存する酵素は消化器系において消化される。これまでに本品を使用した食品を摂取後にアレルギー症状を発症したという報告はない。

既知のアレルゲンとの配列の相同性の比較<sup>33)</sup>を、次のとおり実施した。

FAO/WHO のガイドライン<sup>34)</sup>に沿って、6、7及び8アミノ酸配列の連続一致検索および80アミノ酸配列で35%以上の相同性を示すものの検索を行った。検索には、FAO/WHO 専門家会議報告書において提案されている手順であり、網羅性の高いと考えられているアレルゲン情報が収載されているSDAP (Structural Database of Allergenic Proteins) データベースを使用した<sup>35)</sup>。SDAP を用いた資料は、第69回JECFA 会議の際に提出され、評価されている。検索の結果、連続6アミノ酸の一致が2件認められたが、連続7及び8アミノ酸ではヒットは認められなかった。また、80アミノ酸配列で35%以上の相同性を示すものもヒットしなかった。一般的には、6アミノ酸配列以下の連続一致は、ノイズの可能性が高いと言われている<sup>36)</sup>。

*A. niger* 由来のアスパラギナーゼには、アレルギー反応を誘発する可能性は無いもしくは非常に低いといえる。

物理化学的処理による感受性に関する事項は実施していない。

### ④変異原性試験

復帰突然変異試験 (Ames 試験)<sup>37)</sup>

*Salmonella typhimurium* (ネズミチフス菌) および *Escherichia coli* (大腸菌) を用いて Ames 試験を行った。これらの菌は生育のためにヒスチジン及びトリプトファンを要求するが、被験物質中にヒスチジン/トリプトファンが存在する場合、変異が起こっていても生育が認められる。この場合、陰性対照の2倍以上の変異コロニーの増加が観察されると陽性と判定される<sup>38)</sup>。

本試験の結果は、代謝活性化 (S9-mix) の有無にかかわらず、用量依存的または陰性対照の2倍以上の変異コロニーの増加は観察されず、変異原性は認められなかった。

試験の種類	復帰変異原性試験 (Ames Test)
報告者	M. J. M. van den Wijngaard, BSc. 2006
被験物質	アスパラギナーゼ原末 (ロット番号 APE0604、 活性値 34552ASPU/g、TOS (%) 89.68)
菌株	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537) <i>Escherichia coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> )
濃度	0, 62, 185, 556, 1667, 5000 $\mu$ g/プレート
試験方法	Ames test
試験成績	ラットの肝臓ホモジネート画分による代謝活性化の有無に関わらず、突然変異を誘発しなかった。

#### ヒト末梢リンパ球を用いた染色体異常試験<sup>39)</sup>

ヒト末梢リンパ球を用いて、アスパラギナーゼを被験物質として in vitro 試験を行った。S9-mix 存在下において、被験物質濃度 1000~5000  $\mu$ g/mL で 4 時間処理（回復時間 24 時間）を行い、代謝活性化非存在下では、1000~5000  $\mu$ g/mL の濃度で 4 時間処理、24 時間処理（回復時間 24 時間）を行った。

試験系の感受性及び S9-mix 活性は、ブレオマイシン、ミトマイシン C を陽性対照物として確認した。両陽性対照物質ともに有意な染色体異常を誘発した。

アスパラギナーゼにおいては、代謝活性化の有無に関わらず、染色体構造異常や数的異常は認められなかった。

以上より、本試験において、アスパラギナーゼの染色体異常誘発性は認められなかった。

試験の種類	染色体異常試験 (Ames Test)
報告者	B. Udta, BSc 2006
被験物質	アスパラギナーゼ原末 (ロット番号 APE0604、 活性値 34552ASPU/g、TOS (%) 89.68)
陽性対照	ブレオマイシン、ミトマイシン C
試験方法及び濃度	S9-mix 存在下：1000、2000、3000、5000 $\mu$ g/mL、4 時間処理 (回復時間 24 時間) S9-mix 存在下：2000、3000、4000、5000 $\mu$ g/mL、4 時間処理 (回復時間 24 時間) 代謝活性化非存在下：1000、2000、3000、5000 $\mu$ g/mL、4 時間 処理 (回復時間 24 時間) 代謝活性化非存在下：1000、1500、2000、3000、4000、5000 $\mu$ g/mL、24 時間処理 (回復時間 24 時間)
試験成績	染色体異常誘発性は認められなかった。

#### ⑤一般薬理試験

本品は 70℃以上の熱処理により失活するため、アクリルアミド生成の低減の目的で使用される際、酵素活性は失活している。よって一般薬理試験は実施していない。

#### (4)体内動態に関する資料

5. (2)で考察した通り、本品はヒト消化管中の消化酵素において分解され、他の食品由来のタンパク質と同じように体内へ吸収されると考えられる。

#### (5)一日摂取量に関する資料

本品はアクリルアミドが生成される食品に対し、低減効果を求めて使用されることが予測される。現在アメリカやオランダ、イギリス、ドイツなどではパン製品やシリアル製品、ポテト製品、プロセスフレーバー（調味料）に使用されているため、日本でも同様の製品に使用されたと仮定して推定摂取量を算出した。

なお、海外における Process Flavours は、日本でもプロセスフレーバーと呼ばれている。日本ではフレーバーというより調味料のカテゴリーとして扱われている。アミノ酸や糖などをメイラード反応させて生成する。畜肉原料を使わずに、酵母エキスなどをベースにミートフレーバーが出せるためにベジタリアン向けの食品やダイエット食品等に使用されている。

食品群の分類については、平成 23 年 10 月に厚生労働省により公表された「平成 21 年国民健康・栄養調査<sup>40)</sup>」における食品群別摂取量の中から類似の食品群を選択して当てはめた。

4. (1)に示した本品の添加量および最終製品に残存する酵素量は JECFA 評価書<sup>3-2)</sup>の Table 2 を参照し、表 2 のように算出される。

これに使用される可能性の高い食品群すべてに、最大添加量で本品が使用されたと仮定して、各食品の一日平均摂取量を当てはめて算出したところ、本品の推定一日摂取量は、19.24ASPU (TOS 0.549mg) /体重 kg/日となった (表 3)。

表 2 各食品に対するアスパラギナーゼの使用量

	原料への酵素添加量 (ASPU/粉 1kg)	最終製品における原料量 (%)	最終製品中の残存酵素量 denatured (ASPU/kg)	最終製品中の残存酵素量 denatured (TOS mg/kg)
パン類	77-385	67-91	52-350	1.48-9.97
シリアル食品	20-850	25-95	5-808	0.14-23.1
ポテト製品	500-15000	20-100	100-15000	2.85-428
調味料	4700-6200	≤2	94-124	2.68-3.54

表 3 日本人におけるアスパラギナーゼの推定 1 日摂取量

	最終製品への残存酵素量 denatured (ASPU/kg)	平均 1 日摂取量 (g)	推定 1 日摂取量 (ASPU/体重 kg/日) <sup>*1)</sup>	推定 1 日摂取量 (TOSmg/体重 kg/日) <sup>*1)</sup>
パン類 <sup>*2)</sup>	52-350	107.3	0.11-0.75	0.003-0.021
シリアル食品 <sup>*3)</sup>	5-808	8.2	0.0008-0.13	0.00002-0.004
ポテト製品 <sup>*4)</sup>	100-15000	60.7	0.12-18.21	0.003-0.520
調味料 <sup>*5)</sup>	94-124	59.4	0.11-0.15	0.003-0.004
計			0.34-19.24	0.009-0.549

\*1) : 体重 : 50kg で算出

\*2) : 「小麦・加工品」、菓子類中の「ケーキ・ペストリー類」及び「ビスケット類」の摂取量

\*3) : 「その他の穀類・加工品」の摂取量

\*4) : 「いも類」及び「その他の菓子類 (ポテトチップス等を含む)」の摂取量

\*5) : 「調味料・香辛料類」のうち「その他の調味料」の摂取量

## 6. 使用基準案に関する資料

食品中のアスパラギンがブドウ糖、果糖などの還元糖と120℃以上の高温条件下で、メイラード反応によりアクリルアミドを生成する。

この「アクリルアミド生成を低減する」ことが、アスパラギナーゼの使用目的であるため、対象食品は、120℃以上の高温条件下で加熱される食品に自ずと限定される。

一方、アスパラギナーゼは、70℃以上の過程で失活する。

このため、アスパラギナーゼが使用される対象食品では、自ずと加熱によりアスパラギナーゼが失活することから、使用基準の設定の必要はないと考える。

なお、本品の 13 週間反復投与毒性試験において評価された NOEL 1157mg(TOS 1038mg) /体重 kg/日と、推定一日摂取量は 19.24 ASPU (TOS 0.549mg) /体重 kg/日と比較して得られる安全マージンは約 1890 であり、アスパラギナーゼが食品添加物として適切に使用される場合は、安全性に懸念がないと考えられる。

## 7. 国際機関における評価

JECFA（第 69 回会議、2008 年）において、「*A. niger* ASP-72 株由来のアスパラギナーゼについて、推定一日摂取量（4.1mgTOS/kg 体重/日）と 13 週間反復投与毒性試験結果から得られた NOEL（1038mgTOS/kg 体重/日）とを比較して得られる安全マージンは約 250 である。GMP 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、本アスパラギナーゼについては” ADI は特定しない（not specified） ” 」と評価されている<sup>3)</sup>。

## 資料一覧

\* グレー網掛け部分を除き、公開でお取り扱い頂いて差し支えございません。

- 1) 加工食品中のアクリルアミドについて：食品安全委員会ホームページより（平成21年6月1日更新版）
- 2) CODE OF PRACTICE FOR THE REDUCTION OF ACRYLAMIDE IN FOODS (CAC/RCP 67-2009)：コーデックス委員会，2009
- 3) 第69回FAO/WHO合同食品添加物専門家会議（JECFA）報告書（Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Sixty-ninth meeting Rome, Italy, 17-26 June 2008）
  - ① Evaluation of Certain Food Additives (WHO Technical Report Series 952)
  - ② Safety Evaluation of Certain Food Additives (WHO Food Additives series 60)
- 4) Agency Response Letter GRAS Notice No.GRN 000214: CFSAN/Office of Food Additive Safety, March 12, 2007
- 5) EU FOOD LAW WEEKLY No.302; Agra Informa Ltd., 2007
- 6) Schuster et al, On the safety of *Aspergillus niger*-a review: Applied Microbiology and Biotechnology Vol.59, 426-435, 2002
- 7) Agency Response Letter GRAS Notice No.GRN 000089: CFSAN/Office of Food Additive Safety, April 13, 2002
- 8) Canada Gazette Part II, Vol.146, No.6 : Health Canada, March 14, 2012
- 9) OPINION of the French Food Safety Agency relating to the application for authorization to use a self-cloned *Aspergillus niger* asparaginase in the preparation of foods containing L-asparagine and carbohydrates which are cooked at temperatures above 120°C, such as bread and the other cereal goods (including breakfast cereals), potato-based fried goods and certain yeast extracts: AFSSA (食品安全機関), May 31, 2007
- 10) Preventase/Approval: Danish Veterinary and Food Administration, September 24, 2007
- 11) Request for authorization of the enzyme asparaginase (PreventASe™) from *Aspergillus niger* strain ASP-72 as processing aid: Federal Office of Public Health, Switzerland, June 2, 2008
- 12) Approval for Asparaginase (Letter No.00538/2007): Mexican Health Ministry, December 7, 2007
- 13) REGULATION (EC) No 1331/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008, establishing a common authorization procedure for food additives, food enzymes and food flavourings: Official Journal of European Union, December 31, 2008
- 14) COMMISSION REGULATION (EU) No 234/2011 of 10 March 2011, implementing Regulation (EC) No 1331/2008 of the European Parliament and of the Council, establishing a common authorization procedure for food additives, food enzymes and food flavourings: Official Journal of the European Union, March 11, 2011
- 15) Application A1003 - Asparaginase from *Aspergillus niger* as a Processing Aid (Enzyme): Food Standards Australia New Zealand, October 1, 2008
- 16) GENERAL SPECIFICATIONS AND CONSIDERATIONS FOR ENZYME PREPARATIONS USED IN FOOD PROCESSING: 67<sup>TH</sup> JECFA, 2006
- 17) From the JECFA dossier (社内資料)

- 18) Specification of “ASPRAGINASE FROM *ASPERGILLUS NIGER* EXPRESSED IN A. NIGER” : 69<sup>th</sup> JECFA, 2008
- 19) Acrylamide reduction by the use of asparaginase from *Aspergillus niger* in bread doughs -Results of laboratory scale experiments- (社内資料)
- 20) Acrylamide reduction by the use of asparaginase from *Aspergillus niger* in doughs for cereal based fine bakery wares-Results of laboratory scale experiments- (社内資料)
- 21) Acrylamide reduction by the use of asparaginase from *Aspergillus niger* in yeast extract-based reaction flavour applications - Results of laboratory scale experiments- (社内資料)
- 22) Acrylamide reduction by the use of asparaginase from *Aspergillus niger* in potato based products - Results of laboratory scale experiments- (社内資料)
- 23) Biochemical characterization of asparaginase from *Aspergillus niger* (社内資料)
- 24) Identification service statement: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, November 29, 1994 (社内資料)
- 25) Identification service statement: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, June 19, 2006 (社内資料)
- 26) Analyses of two *Aspergillus niger* strains: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, September 15, 2006 (社内資料)
- 27) Nyiredy et al., THE FATE OF MOULD “SPORES” IN THE DEGESTIVE TRACT OF CHICKS: Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae, Tomus Vol.25, 123-128, 1975
- 28) 既存添加物名簿収載品目リスト注解書: 日本食品添加物協会, 1999
- 29) Gasteriger et al., ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis: Nucleic Acids Research Vol.31, No.13, 3784-3788, 2003
- 30) Enzymatic breakdown of asparaginase: ExPASy PeptideCutter (社内資料)
- 31) B. A. R. Lina, Repeated-dose (13-week) oral toxicity study with an enzyme preparation of *Aspergillus niger* containing asparaginase activity (ASP72) in rats, 2006 (社内資料)
- 32) M. M. Tegelenbosch-Schouten, Oral prenatal developmental toxicity study with an enzyme preparation of *Aspergillus niger* containing asparaginase activity (ASP72) in rats, 2006 (社内資料)
- 33) Sequence comparison between asparaginase and known (food) allergens (社内資料)
- 34) Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, 22-25 January 2001
- 35) Ivanciuc et al., SDAP: Database and Computational Tools for Allergenic Proteins: Nucleic Acids Res Vol.31, No.1, 359-362, 2003
- 36) Hileman et al., Bioinformatic Methods for Allergenicity Assessment Using a Comprehensive Allergen Database: Int Arch Allergy Immunol, Vol. 128, 280-291, 2002
- 37) M. J. M. van den Wijngaard, Bacterial reverse mutation test with enzyme preparation of *Aspergillus niger* (ASP72), 2006 (社内資料)

- 38) 新規化学物質の判定及び監視化学物質への該当性の判定等に係る試験方法及び判定基準, 厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室, 平成 23 年 4 月 22 日
- 39) B.Usta and N.de Vogel, Chromosomal aberration test with an enzyme preparation of *Aspergillus niger* (ASP72) in cultured human lymphocytes, 2006 (社内資料)
- 40) 平成 21 年国民健康・栄養調査報告より抜粋 (厚生労働省平成 23 年 10 月)

※上記のうち、31、32、37、39 に関しては、自社で行った毒性に関する試験の報告書であり、生データは弊社の知的財産であるため非公開とする。