

平成 27 年 12 月 2 日

食品安全委員会

委員長 佐藤 洋 殿

添加物専門調査会

座長 梅村 隆志

添加物に係る食品健康影響評価に関する審議結果について

平成 27 年 10 月 17 日付け厚生労働省発食安 1017 第 1 号をもって厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた *Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼに係る食品健康影響評価について、当専門調査会において審議を行った結果は別添のとおりですので報告します。

(案)

添加物評価書

Aspergillus oryzae NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ

2015年12月

食品安全委員会添加物専門調査会

目次

	頁
○審議の経緯.....	3
○食品安全委員会委員名簿.....	3
○食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿.....	3
○要 約.....	5
I. 評価対象品目の概要.....	6
1. 用途.....	6
2. 名称等.....	6
3. 基原、製造方法、成分、性状等及び使用方法.....	6
(1) 基原.....	6
(2) 製造方法.....	7
(3) 成分.....	8
(4) 性状等.....	9
(5) 使用方法.....	9
4. 起源又は発見の経緯等.....	10
5. 我が国及び諸外国における使用状況.....	10
(1) コーデックス委員会.....	10
(2) 米国における使用状況.....	10
(3) EUにおける使用状況.....	10
(4) その他の国における使用状況.....	10
(5) 我が国における使用状況.....	10
6. 国際機関等における評価.....	11
(1) JECFAにおける評価.....	11
(2) 米国における評価.....	11
(3) EUにおける評価.....	11
(4) その他の機関における評価.....	11
(5) 我が国における評価等.....	11
7. 評価要請等の経緯、指定の概要.....	11
II. 一日摂取量の推計等.....	12
(1) 国際機関等における推計.....	12
(2) 我が国における推計.....	12
III. 安全性に係る知見の概要.....	13
1. 生産菌株の安全性.....	13
(1) 非病原性の確認.....	13

(2) 非毒素產生性の確認.....	14
(3) その他.....	16
(4) まとめ.....	16
2. 本品目の安全性.....	16
(1) 消化管内での分解性等.....	16
(2) 毒性.....	18
IV. 食品健康影響評価.....	20
○別紙1：略称.....	22
○別紙2：毒性試験成績.....	23
○参照.....	24

<審議の経緯>

2014年10月17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ついて要請（厚生労働省発食安1017第1号）、関係書類の接受
2014年10月21日	第534回食品安全委員会（要請事項説明）
2014年11月17日	第136回添加物専門調査会
2014年12月24日	補足資料の提出依頼
2015年7月27日	補足資料の接受
2015年8月31日	第146回添加物専門調査会
2015年10月13日	第580回食品安全委員会（報告）
2015年10月14日から11月12日まで	国民からの意見・情報の募集
2015年12月2日	添加物専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告

<食品安全委員会委員名簿>

（2015年6月30日まで）

熊谷 進（委員長）
佐藤 洋（委員長代理）
山添 康（委員長代理）
三森 国敏（委員長代理）
石井 克枝
上安平 冽子
村田 容常

（2015年7月1日から）

佐藤 洋（委員長）
山添 康（委員長代理）
熊谷 進
吉田 緑
石井 克枝
堀口 逸子
村田 容常

<食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿>

（2015年9月30日まで）

梅村 隆志（座長）
頭金 正博（座長代理）
穠山 浩
石井 邦雄
石塚 真由美
伊藤 清美
今井田 克己
宇佐見 誠
久保田 紀久枝
祖父江 友孝
高橋 智
塚本 徹哉

戸塚 ゆ加里
中江 大
北條 仁
森田 明美
山田 雅巳

<参考人>

鎌田 洋一
高須 伸二

要 約

酵素として使用される添加物「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」（EC 番号：3.5.1.1、CAS 登録番号：9015-68-3）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、*A. oryzae* NZYM-SP 株の病原性及び毒素産生性に関するもの並びに *A. oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼを被験物質とした遺伝毒性、反復投与毒性、アレルギー性等に関するものである。

本専門調査会としては、本品目の製造を目的として適切に管理された本生産菌株については、本品目の添加物としての摂取において問題となるような病原性及び毒素産生性の懸念はないと判断した。

本専門調査会としては、本品目が「添加物に関する食品健康影響評価指針」における「酵素が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」に該当すると判断したことから、本品目の毒性について、同指針に基づき、遺伝毒性、反復投与毒性及びアレルギー性に係る試験成績を用いて評価を行うこととした。

本専門調査会としては、本品目の毒性に係る知見を検討した結果、本品目については、遺伝毒性、反復投与毒性の懸念はないと判断した。

本専門調査会としては、本品目のアレルギー性の懸念は極めて低いと判断した。

以上を踏まえ、本専門調査会としては、ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験における最高用量から得られた NOAEL 10.0 mL/kg 体重/日（TOS 換算：880 mg TOS/kg 体重/日）と、本品目の推定一日摂取量 114 µgTOS/kg 体重/日とを比較して得られる安全マージンが十分であること及び本品目が食経験のある基原微生物である *A. oryzae* を用いて生産されることを勘案して、本品目について、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と判断した。

I. 評価対象品目の概要

1. 用途

加工助剤（参照 1）

2. 名称等

和名：*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ

英名：Asparaginase from *Aspergillus oryzae* expressed in *Aspergillus oryzae* NZYM-SP

EC⁽¹⁾番号：3.5.1.1（L-アスパラギン酸アミドヒドロラーゼとして）

CAS 登録番号：9015-68-3（L-アスパラギン酸アミドヒドロラーゼとして）（参照 1、2、3）

3. 基原、製造方法、成分、性状等及び使用方法

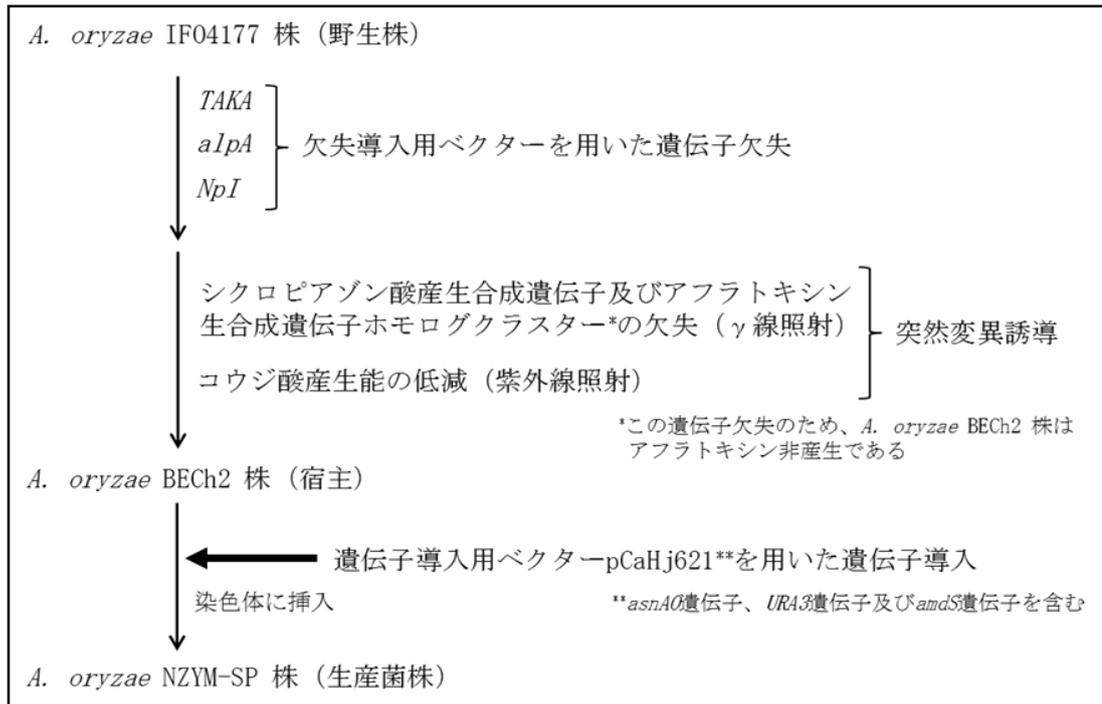
（1）基原

添加物「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」の生産菌株の宿主である *A. oryzae* は様々な食品用酵素の産生菌として安全な工業的利用実績があり、製パンや味噌、醤油、酒の醸造等の食品分野で長年広く使用されてきた歴史を有するとされている。（参照 4）

今般、厚生労働省に添加物「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」（以下「本品目」という。）の添加物としての指定及びそれに関連した規格基準の設定を要請した者（以下「指定等要請者」という。）並びに FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）の Chemical and Technical Assessment（CTA）（2007）によれば、本品目の生産菌株である *A. oryzae* NZYM-SP 株は、清酒麴から分離された野生株である *A. oryzae* IFO4177 株の夾雑酵素活性（ α -アミラーゼ、アルカリプロテアーゼ、中性メタロプロテアーゼ）並びにアフラトキシン及びシクロピアゾン酸の産生能を欠損させ、コウジ酸の産生能を低減させた改良株（*A. oryzae* BECh2 株）を宿主とし、*A. oryzae* IFO4177 株が菌体外に産生するアスパラギナーゼの遺伝子を導入して作成されたものであるとされている。（図 1）（参照 2、5、6）

¹ 本文中で用いられた略称については、別紙 1 に名称等を示す。

図1 *Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株作製の概略



(2) 製造方法

指定等要請者によれば、本品目の製造方法の概略は図2のとおりとされている。この製造方法においては、*A. oryzae* NZYM-SP 株を液体培養（ステップ1～3）した後、ステップ4以降に示す複数回の微生物分離除去専用の濾過によって、生産菌は生産物より分離除去され、その後に製剤化されることから、生産菌は最終製品に残存することはないとされている。（参照2）

図2 アスパラギナーゼ製造方法の概略



また、最終製品には液状品と顆粒品の2種類があり、いずれも全有機固形物(TOS)は4% (w/w) であるとされている。また、評価に供した試験成績の主な被験物質であるバッチ PPV24743 は、最終製品の製造過程の途中(図2におけるステップ5の後)で濃縮を行ったものであり、保存剤、安定化剤を含まない。バッチ PPV24743 の TOS は 8.4% であるとされている。(参照2、7、8、9)

(3) 成分

指定等要請者によれば、本品目の有効成分は、生産菌株により産生される359アミノ酸からなるタンパク質であり、当該359アミノ酸の一次配列は図3のとおりであるとされている。当該有効成分の質量は約37 kDa であるとされている。その等電点は4.9 であるとされている。(参照2)

図 3 有効成分のアミノ酸一次配列⁽²⁾

SPLLYPRATDSNVTYVFTNPNGLNFTQMNTTLPNVTIFAT	40
GGTIAGSSADNTATTGYKAGAVGIQTLIDAVPEMLNVANV	80
AGVQVRNVGSPDITSDILLRLSKQINEVVCNDPTMAGAVV	120
THGTDITLEESAFFLDATVNCRKPVVIVGAMRPSTAISADG	160
PLNLLQSVTVAAASPWARDGALIVMNDRIVSAFYASKTNA	200
NTVDTFKAIEMGNLGEVVSINKPYFFYPVKPTGKTEVDIR	240
NITSIPRVDILYSYEDMHNDTLYSAIDNGAKGIVIAAGSGS	280
GSVSTPFSAAMEDITTKHNIPIVASTRTGNGEVPSSAESS	320
QIASGYLNPAKSRVLLGLLLAQGKSIEMRAVFERIGVA	360

JECFA-CTA (2007) によれば、*A. oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼは、TOS が 4% (w/w)、水分が 46% (w/w)、グリセロールが 50%、安息香酸ナトリウムが 0.3%、ソルビン酸カリウムが 0.1%であるとされている。(参照 5)

指定等要請者委託試験 (2006) によれば、本品目のバッチ PPV24743 は、水分が 89.5% (w/w)、乾燥物が 10.5% (w/w)、灰分 (600°C) が 2.1% (w/w)、TOS が 8.4% (w/w)、比重が 1.049 g/mL、pH が 5.4 であるとされている。(参照 9)

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

(4) 性状等

指定等要請者の成分規格案によれば、本品目の性状は、液状品については淡褐色液状、顆粒品については白色～灰白色顆粒とされている。(参照 2)

(5) 使用方法

指定等要請者等によれば、本品目は、食品の加工の際に原材料に添加し、原材料に含まれ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ことにより、当該加工食品について、味、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ものであるとされている。また、本品目の使用において副反応があることは知られていないとされている。

指定等要請者等によれば、本品目の有効成分の至適温度は、pH 7 において 50°C であり、80°C で失活するとされている。本品目の使用方法では、すべて 120°C を超える加熱を伴うものであり、最終食品において本品目の活性が残存することはないとされている。(参照 2、10、11)

² 指定等要請者によれば、*A. oryzae* 由来のアスパラギナーゼは菌体外に分泌される酵素であり、当該アスパラギナーゼの遺伝子が翻訳される際はメチオニンから始まる配列 (N 末端側) を持つが、分泌の際には N 末端側の 19 アミノ酸残基 (菌体外分泌シグナル配列) が菌体内のシグナルペプチダーゼによって切断され、成熟型となったアスパラギナーゼ (S (セリン) から始まる配列を持つ) のみが菌体外に分泌されるとされている。

4. 起源又は発見の経緯等

2002年4月、スウェーデン政府は、ストックホルム大学と共同で行った研究の結果、じゃがいも等炭水化物を多く含む材料を高温で加熱して作った食品中に、アクリルアミドが生成されることを発表した。その後の調査研究の結果、食品中のアスパラギンが、高温により、ブドウ糖、果糖等の還元糖と反応して、アクリルアミドが生成されることが明らかにされている。国際がん研究機関 (IARC) は、アクリルアミドについて、発がん性を「2A」（ヒトに対しておそらく発がん性がある。）と分類している。（参照 1 2）

2009年、コーデックス委員会において、食品中のアクリルアミドの低減に関する実施規範が採択されている。本採択においては、アクリルアミド生成原因物質であるアスパラギンをアスパラギナーゼによって特異的に分解することがアクリルアミド低減の方法の1つとして挙げられている。（参照 1 3）

5. 我が国及び諸外国における使用状況

(1) 我が国における使用状況

我が国において、本品目の添加物としての使用は認められていない³⁾。

(2) コーデックス委員会

コーデックス委員会の策定したコーデックス食品添加物一般基準 (GSFA) では、加工助剤（酵素を含む）は対象とされていない。

(3) 米国における使用状況

米国では、指定等要請者が本品目について一般に安全とみなされる (GRAS) 物質としての届出を行ったところ、2006年、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 4）

(4) EUにおける使用状況

欧州連合 (EU)（フランス及びデンマークを除く。）では、加工助剤たる食品用酵素を添加物として規制していなかったが、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、加工助剤たる食品用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⁴⁾。（参照 1 5、1 6）

(5) その他の国における使用状況

2008年5月、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) は、本品目について加工助剤としての使用を認めるとしている。（参照 1 7）

³⁾ なお、本品目とは生産菌株が異なるが、2014年11月、添加物「*Aspergillus niger* ASP-72株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」について、添加物としての使用が認められた。

⁴⁾ 指定等要請者によれば、加工助剤たる酵素を規制しているフランス及びデンマークにおいては、添加物としての使用が認められているとされている。

6. 国際機関等における評価

(1) 我が国における評価等

我が国において、本品目の食品健康影響評価は行われていない⁵⁾。

(2) JECFA における評価

2007 年の第 68 回会合において、JECFA は、本品目の 13 週間反復投与毒性試験における NOEL 880 mgTOS/kg 体重/日と、保守的な推定を行った場合の一日摂取量 0.4 mgTOS/kg 体重/日とのマージンが 2,200 であることから、適正使用規範 (GMP) に基づき特定の目的で使用される限りにおいては、ADI を特定しないとしている。(参照 3、18)

(3) 米国における評価

上述 (p10) のとおり 2006 年、FDA は、意図した条件下において使用される限りにおいて、本品目を GRAS 物質とする指定等要請者からの届出に対し、異論はない旨の回答をしている。(参照 14)

(4) EU における評価

上述 (p10) のとおり EU (フランス及びデンマークを除く。) では、2008 年に公布された欧州議会・欧州理事会規則により、加工助剤たる食品用酵素が添加物としての規制の対象とされる見込みであるものの、現在のところ本品目についての安全性評価は行われていない。(参照 15)

なお、フランスにおいては、2008 年 12 月、仏食品衛生安全庁 (AFSSA) が本品目にかかる安全性評価を行った結果、本品目の 90 日間反復投与毒性試験における NOAEL 880 mgTOS/kg 体重/日と一日推定摂取量とのマージンが 2,500 であり、安全性に懸念がないと評価している。(参照 19)

(5) その他の機関における評価

2008 年、FSANZ は、本品目にかかる安全性評価を行った結果、組換え DNA は安定で、安全性に懸念がないこと、ラットの 90 日間毒性試験で毒性が認められず、NOAEL は 880 mgTOS/kg 体重/日以上であること、*in vitro* 遺伝毒性試験において陰性であることなどを根拠として、安全性に懸念がないと評価している。(参照 17)

7. 評価要請等の経緯、指定の概要

今般、本品目について、指定等要請者から厚生労働省に添加物としての指定及び規格基準の設定の要請がなされ、関係書類が取りまとめられたことから、食品

⁵⁾ なお、本品目とは生産菌株が異なるが、2014 年 1 月、食品安全委員会は、添加物「*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」の食品健康影響評価をとりまとめた。

安全基本法第 24 条第 1 項第 1 号の規定に基づき、食品安全委員会に対して、食品健康影響評価の要請がなされたものである。

なお、厚生労働省は、本品目における組換え DNA 技術に関する安全性審査について、食品安全基本法第 24 条第 1 項第 14 号の規定に基づき、食品安全委員会に対して、食品健康影響評価の要請を行い、2015 年 9 月、食品安全委員会において、人の健康を損なうおそれはないと判断されている。（参照 20）

厚生労働省は、食品安全委員会の食品健康影響評価結果の通知を受けた後に、本品目の添加物としての指定及びそれに関連した規格基準の設定の可否等について検討するとしている。なお、使用基準は設けないこととしている。

II. 一日摂取量の推計等

1. 国際機関等における推計

(1) JECFA における推計

上述 (p11) の通り、JECFA は保守的な推定を行った場合の本品目の一日摂取量を 0.4 mgTOS/kg 体重/日としている。（参照 3、18）

2. 我が国における推計

指定等要請者によれば、本品目は、小麦・加工品（パン類等）、その他の穀類・加工品、いも類、ケーキ・ペストリー類、ビスケット類、その他の菓子類（ポテトチップス等）、その他の調味料といった食品（群）に直接使用されるものとされている。

本専門調査会としては、本品目の一日摂取量について、指定等要請者の推計を基に、最大添加量について一部修正し、当該食品（群）又はそれらの原材料の全てに本品目が表 1 の最大添加量で添加され、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し、平成 24 年国民健康・栄養調査から得られる食品（群）の一日摂取量を用いて、表 1 のとおり算出した。その結果、本専門調査会としては、本品目の一日摂取量を 6.26 mgTOS/人/日（114 µgTOS/kg 体重/日）と判断した。なお、日本人の平均体重 55.1 kg を用いている。（参照 2、11、21）

表 1 本品目の推定一日摂取量

食品（群）	a 食品摂取量	b 本品目最大添加量	c 本品目一日摂取量 $a \times b / 1000000 \times 1000$	d 本品目由来 TOS 一日摂取量 $c \times 0.04$	e 本品目由来 TOS 一日摂取量 $d \times 1000 / 55.1$
	g/人/日	ppm ^{*1}	mg/人/日	mgTOS ^{*2} /人/日	µgTOS/kg 体重/日
小麦・加工品 （パン類等）	102.4	570 ^{*3}	58.37	2.335	42.38
その他の穀類・ 加工品	8.1	715 ^{*4}	5.79	0.232	4.20

いも類	54.3	715*4	38.82	1.553	28.18
ケーキ・ペストリー類	7.1	715*4	5.07	0.203	3.68
ビスケット類	1.9	570*5	1.08	0.043	0.78
その他の菓子類 (ポテトチップス等)	6.2	715*4	4.43	0.177	3.22
その他の調味料	59.9	715*4	42.83	1.713	31.09
合計	239.9		124.2	6.26	114

*1 最終製品の重量に対する数値

*2 本品目のTOSを4%として算出

*3 指定等要請者は小麦・加工品（パン類等）の本品目最大添加量を290 ppmとしているが、本専門調査会としては、中嶋（2009）（参照1 1）のクリスピーブレッドの値を用い、最大添加量を570 ppmと判断した。

*4 アスパラギナーゼ添加量のデータがないため、本専門調査会としては、中嶋（2009）（参照1 1）の様々な食品の推奨添加量のうち最大添加量の値である715 ppmを用いて算出した。

*5 指定等要請者はビスケット類の本品目最大添加量を290 ppmとしているが、本専門調査会としては、中嶋（2009）（参照1 1）のジンジャークッキーの値を用い、最大添加量を570 ppmと判断した。

Ⅲ. 安全性に係る知見の概要

1. 生産菌株の安全性

上述（p6）のとおり、本品目の生産菌株の宿主及び導入遺伝子の供与体は、ともに *A. oryzae* であるとされている。

指定等要請者によれば、上述（p7）のとおり、生産菌は最終製品に残存することはないとされている。さらに、以下のように生産菌株の非病原性及び非毒素産生性を確認している。

（1）非病原性の確認

本品目の生産菌株である *A. oryzae* NZYM-SP 株とは株の種類が異なるものの、Barbesgaardら（1991）によれば、*A. oryzae* がアスペルギルス症に関連する可能性がある事例があるとされている。しかし、これは非常に稀な場合であり、*A. oryzae* は一般的に非病原性の微生物であるとされている。（参照4）*A. oryzae* は、国立感染症研究所病原体等安全管理規程別冊1「病原体等のBSL分類等」（平成22年6月）におけるバイオセーフティレベル（BSL）1、米国NIHの“Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules”の定義では Risk Group1 に分類され、非病原性の微生物とみなされている。（参照2 2、2 3）

なお、指定等要請者からは、本品目の生産菌株である *A. oryzae* NZYM-SP 株に関して、病原性に関する知見は提出されていない。（参照2）

(2) 非毒素産生性の確認

① アフラトキシン類産生性

a. *A. oryzae* ATCC14895 株のアフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログの解析 (Watson ら (1999))

本品目の生産菌株である *A. oryzae* NZYM-SP 株とは株の種類が異なるものの、Watson ら (1999) によれば、*A. oryzae* ATCC14895 株は、アフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログと調節遺伝子を有するが、アフラトキシン産生遺伝子の発現は見られないとされている。(参照 2 4)

b. *A. oryzae* NRC-MCCU-1 株のマイコトキシン産生能試験 (Attalla ら (2003))

本品目の生産菌株である *A. oryzae* NZYM-SP 株とは株の種類が異なるものの、Attalla ら (2003) によれば、*A. oryzae* NRC-MCCU-1 株がアフラトキシン類などのマイコトキシンを産生するとされている。(参照 2 5)

c. *A. oryzae* NZYM-SP 株のアフラトキシン産生能試験 (指定等要請者委託試験報告 (2015))

指定等要請者委託試験 (2015) によれば、*A. oryzae* NZYM-SP 株の培養液を除菌ろ過、濃縮した溶液及び本品目 (液状品及び顆粒品) について、総アフラトキシン量 (アフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ の総和) は定量限界である 1 µg/kg 以下であったとされている。(参照 2 6)

指定等要請者は、本品目の生産菌株である *A. oryzae* NZYM-SP 株は、宿主である *A. oryzae* BECh2 株を作製する際に、γ線照射を用いた突然変異により、アフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログを欠失しているため⁶、アフラトキシン非産生性であるとしている。したがって、本品目にアフラトキシンが含まれることはないとされており、本結果は、このことを裏付けるものであると考察している。(参照 2、6、2 7)

② CPA 産生性

a. CPA 生合成遺伝子クラスターの同定及び CPA 産生能試験 (Kim ら (2014))

発酵食品から単離された 18 株の *A. oryzae* において、シクロピアゾン酸 (CPA) 生合成遺伝子クラスターの存在及び CPA の産生性を調べた。その結果、12 株の *A. oryzae* にその遺伝子クラスターが存在することが示されたが、その中で CPA を産生するものは 7 株であった。(参照 2 8)

b. CPA 生合成遺伝子クラスターの同定および CPA 産生能試験 (Tokuoka ら (2008))

Tokuoka らによれば、*A. oryzae* NBRC4177 (IFO4177) 株はアフラトキシ

⁶ 指定等要請者によれば、アフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログのサザンブロット解析の結果、*A. oryzae* BECh1 株及び BECh2 株において不検出であったとされている。

ン生合成遺伝子クラスターホモログ近隣に CPA 生合成遺伝子クラスターを有し、CPA を産生するとされている。（参照 2 9）

指定等要請者によれば、本生産菌株の親株である *A. oryzae* IFO4177 株は CPA を産出するが、（参照 2 7）宿主である *A. oryzae* BECh2 株を作製する際に、 γ 線照射を用いた突然変異により、アフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログとともに CPA 生合成遺伝子クラスターを欠失しているため、本品目の生産菌株である *A. oryzae* NZYM-SP 株は CPA 産生能を失っているとされている。（参照 2、5）

③ β -ニトロプロピオン酸産生性

a. β -ニトロプロピオン酸産生能 (Blumenthal (2004)、Barbesgaard ら (1991) (再掲))

Blumenthal によれば、 β -ニトロプロピオン酸は *A. oryzae* から産生されるマイコトキシンの 1 つであり、*A. oryzae* より食品用酵素を生産する際に、その産生を確認するべきであるとされている。（参照 3 0）

また、Barbesgaard ら (1991) によれば、Iwasaki and Kosikowski (1973) を引用し、6 種類の *A. oryzae* のうち 4 種類に β -ニトロプロピオン酸の産生がみられたとされている。（参照 4）

b. β -ニトロプロピオン酸産生能試験 (指定等要請者社内資料 (2005))

指定等要請者によれば、*A. oryzae* NZYM-SP 株について、製造バッチ PPV24743 等におけるコウジ酸及び β -ニトロプロピオン酸の産生量の分析を、液体クロマトグラフィー質量分析法を用いて行った結果、 β -ニトロプロピオン酸は検出限界 (0.6 mg/kg) 未満であることが示されたとされている。（参照 2、5、3 1）

④ コウジ酸産生性

a. コウジ酸産生能 (Blumenthal (2004) (再掲)、Barbesgaard ら (1991) (再掲))

Blumenthal (2004) は、通常の食品摂取においては、コウジ酸が安全上の懸念を生じさせることはないと評価している。（参照 3 0）

一方、Barbesgaard ら (1991) によれば、Manabe ら (1984) を引用し、47 種類の *A. oryzae* のうち 19 種類にコウジ酸の産生がみられたとされている。（参照 4）

b. コウジ酸産生能試験 (指定等要請者社内資料 (2005) (再掲))

上述 (p15) のとおり、*A. oryzae* NZYM-SP 株について、製造バッチ PPV24743 等におけるコウジ酸及び β -ニトロプロピオン酸の産生量の分析を、液体クロマトグラフィー質量分析法を用いて行った結果、コウジ酸は検出限界

(1.4 mg/kg) 未満であることが示されたとされている。(参照 2、5、31)

指定等要請者によれば、*A. oryzae* NZYM-SP 株において、*A. oryzae* BECh2 株を作製する際に、紫外線照射を用いた突然変異により、コウジ酸産生能を低減させたとされており、本試験結果は、このことを裏付けるものであると考察している。(参照 2、5、31)

(3) その他

「食品衛生法に基づく添加物の表示等について」(平成 22 年 10 月 20 日消食表第 377 号) 別添 1「既存添加物名簿収載品目リスト」においては、*A. oryzae* を基原とする添加物として α -アミラーゼ等が掲げられており、(参照 32) 既に *A. oryzae* を基原とする添加物が我が国において使用されている。

(4) まとめ

以上を踏まえ、本専門調査会としては、本品目の製造を目的として適切に管理された本生産菌株である *A. oryzae* NZYM-SP 株については、本品目の添加物としての摂取において問題となるような病原性及び毒素産生性の懸念はないと判断した。

2. 本品目の安全性

(1) 消化管内での分解性等

本品目は、359 アミノ酸からなるタンパク質を主たる成分とするものであるとされていることから、消化管内で速やかに分解し、その結果生じるペプチド又はアミノ酸は、他の食品由来のタンパク質の場合と同様に体内へ吸収されると考えられる。このことをより明確にするため、「添加物に関する食品健康影響評価指針」(2010 年 5 月食品安全委員会決定)における「酵素が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」に該当するか否かについて、以下のとおり整理した。

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。

a. 人工胃液による消化試験(指定等要請者社内資料(2015a))

指定等要請者によれば、本品目(Lot 番号:HON30029)を 99°C で 5 分間の加熱処理したもの⁽⁷⁾及び非加熱処理のサンプルを、人工胃液中⁽⁸⁾において、37°C で 0.5、2、10 分間インキュベーションを行った後、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)及びウエスタンブロッ

⁷ 指定等要請者によれば、通常の使用条件では、本品目はアクリルアミドが生成される 120°C 以上の温度で加熱処理されるが、常圧では 100°C 以上の実験系を組むことができないため、処理温度は 99°C としたとされている。

⁸ 人工胃液の組成は USP23 (NF18) に拠ったとされている。

ト分析に供する試験が実施されている。その結果、SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析の結果から、人工胃液処理 0.5 分のサンプルにおいて、アスパラギナーゼのバンドが消失し、人工胃液由来のペプシンのバンドのみ確認された。指定等要請者によれば、本品目は人工胃液処理により、SDS-PAGE の最小の分子量マーカーサイズ (2 kDa) より小さなペプチド又はアミノ酸レベルにまで分解されたためと考えられるとされている。

なお、本品は加熱処理の有無に関わらず、人工胃液中における分解が確認されたため、人工腸液を用いた処理による試験は行っていないとされている⁽⁹⁾。(参照 6、33、34)

b. *in silico* 酵素分解シミュレーション (指定等要請者社内資料 (2015b))

指定等要請者によれば、ウェブサーバ ExPASy⁽¹⁰⁾において提供されている分析ツールである「ペプチドカッター」を用いて、コンピュータ上で、本品目のアミノ酸配列をペプシン (pH1.3 又は pH>2)、トリプシン及びキモトリプシンで分解させるシミュレーションを行ったところ、表 2 のように分解されることが示唆されたとされている。指定等要請者によれば、この結果は、本品目が胃における初回の酵素反応において、既に 1~40 アミノ酸程度のオリゴペプチドにまで分解されることを示唆しているとされている。(参照 35)

表 2 酵素処理によるアミノ酸残基数

酵素	アミノ酸残基数 (個)
ペプシン (pH1.3)	1~40
ペプシン (pH>2)	1~39
キモトリプシン (高特異性)	1~75
キモトリプシン (低特異性)	1~26
トリプシン	2~51

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。

指定等要請者によれば、上述 (p16) の①の試験成績において、本品目の分解に関わる主要な因子は、pH1~2 の酸性条件及びペプシンであるとされている。(参照 6)

⁹ 指定等要請者は、別途、本品目の有効成分 (特定のバッチ) を人工胃液で、本品目を人工腸液で処理した試料を SDS-PAGE に供する試験を実施しているが、検出限界分子量 (最小分子量マーカーの分子量) が 14,400 Da と比較的大きいため、本専門調査会としては、分解性試験としては適切でないと判断し、記載していない。

¹⁰ スイスバイオインフォマティクス研究所の集学的研究班により提供され、タンパク質及びプロテオミクス (網羅的タンパク質解析) についての種々のデータベース及び分析ツールを利用できるウェブサーバであり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とされている。

- 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。

指定等要請者によれば、上述（p16）のとおり、本品目は消化管内で容易に分解し、その他の食品由来のタンパク質と同様に体内へ吸収されること、また本品目が食品中に含まれる量は微量であることから、（参照 1 1）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とされている。（参照 6）

- 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。

指定等要請者によれば、上述（p16）のとおり、本品目は消化管内で速やかに食品常在成分に分解し、通常代謝経路をたどるとされている。したがって、本品目の未加水分解物、部分加水分解物が大量に糞便中に排泄されること、又は生体組織中に蓄積することは考え難いとされている。（参照 6）

- 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。

指定等要請者によれば、上述（p12）のとおり、本品目のタンパク質としての一日摂取量は最大で 4.97 mg/人/日と推定され、日本人のタンパク質の平均一日摂取量 68.0 g の約 0.007%に過ぎず、本品目の主成分の過剰摂取の問題がおこることはないとされている。（参照 2、2 1）

以上を踏まえ、本専門調査会としては、本品目が「添加物に関する食品健康影響評価指針」における「酵素が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」に該当すると判断した。

（2）毒性

（1）のとおり、本品目が「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。したがって、本専門調査会では、本品目の毒性について、「添加物に関する食品健康影響評価指針」に基づき、遺伝毒性、反復投与毒性及びアレルギー性に係る試験成績を用いて評価を行うこととした。

① 遺伝毒性

本品目の有効成分（製造バッチ PPV24743）に関する遺伝毒性の試験成績は、表 3 のとおりである。

表 3 本品目に関する遺伝毒性の試験成績

指標	試験種類	試験対象	用量等	試験結果概要	参照
遺伝子突然変異	復帰突然変異試験 (<i>in vitro</i> 、GLP)	細菌 (<i>Salmonella typhimurium</i> TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA)	最高用量 5 mg/plate	陰性 (代謝活性化系の有無に関わらず)	指定等要請者社内資料 (2006a) (参照 3 6)
染色体異常	染色体異常試験 (<i>in vitro</i> 、GLP)	ヒト末梢血リンパ球	最高用量 5 mg/mL	陰性 (代謝活性化系の有無に関わらず)	指定等要請者社内資料 (2006b) (参照 3 7)

以上の結果を踏まえ、本専門調査会としては、本品目が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ことも勘案し、本品目には生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないと判断した。

② 反復投与毒性

a. ラットを用いた 13 週間経口投与試験 (指定等要請者委託試験報告 (2006c)、GLP)

CD ラット (各群雌雄各 10 匹) に、本品目の有効成分 (製造バッチ PPV24743) を、表 4 のような投与群を設定して、13 週間強制経口投与する試験が実施されている。

表 4 用量設定

用量設定	0、1.0、3.3、10.0 mL/kg 体重/日
酵素活性換算	0、4,658、15,370、46,576 単位/kg 体重/日
TOS 換算	0、88、290、880 mg TOS/kg 体重/日

その結果、以下の所見が認められたとされている。なお、腎機能への影響を示唆する血液及び組織病理学的所見は認められなかったとされている。(参照 9)

- ・ 10.0 mL/kg 体重/日投与群の雌において、肺胞マクロファージの顕著な増加
- ・ 3.3 mL/kg 体重/日投与群の雄と 10.0 mL/kg 体重/日投与群の雌雄において、血漿カリウム濃度の有意な上昇

なお、10.0 mL/kg 体重/日投与群の雌の所見である肺胞マクロファージの顕著な増加については、試験実施機関は、以下の理由により、本所見に被験物質投与との関連性及び毒性学的意義がないと考察している。(参照 3 8)

- ・ 本所見の重篤度はいずれも最小であり、発現頻度は背景データの範囲内であること。

- ・ 本所見の多くは限局性であり、肺胞上皮過形成等の、被験物質投与に関連する炎症性反応又は有害性反応を示唆する肺の病理学的所見を伴っていないこと。
- ・ 関連する臨床所見（呼吸困難等）が認められないとともに、体重への影響や他の検査項目における毒性学的所見がない等、動物の健康全般において悪影響を及ぼしていないと考えられること。
- ・ 被験物質検体投与に関連した泡沫状肺胞マクロファージの増加を伴わないこと。

また、その他の電解質に変化はなかったため、試験実施者は、血漿カリウム濃度の変化に毒性学的な意義はないとしている。

以上の結果より、試験実施者は、本試験における NOAEL を最高用量である 10.0 mL/kg 体重/日（TOS 換算：880 mg TOS/kg 体重/日）としている。

本専門調査会としては、指定等要請者の判断を妥当と考え、本試験における NOAEL を最高用量である 10.0 mL/kg 体重/日（TOS 換算：880 mg TOS/kg 体重/日）と判断した。

③ アレルゲン性

本品目のアレルゲン性については、食品安全委員会の遺伝子組換え食品等評価書「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」において以下のとおり評価がなされている。

A. oryzae NZYM-SP 株の宿主である *A. oryzae* BECh2 株は *TAKA* 遺伝子を欠失しており、 α -アミラーゼ産生性を失っている。そのため、*A. oryzae* BECh2 株によるアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられるとしている。

また、上述（p16）の人工胃液を用いた消化試験において、本品目は、試験開始後 0.5 分以内に消化されることが確認されたとしている。

さらに、導入遺伝子である *asnA0* 遺伝子、*amdS* 遺伝子、*URA3* 遺伝子を含む導入領域に同定された open reading frame (ORF) 及びベクター導入により生じる新たな ORF に、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質と相同性を示すものがないことが確認されている。（参照 20）

本専門調査会としても、遺伝子組換え食品等評価書を是認し、添加物として適切に使用される場合、本品目のアレルゲン性の懸念は極めて低いと判断した。

IV. 食品健康影響評価

本専門調査会としては、本品目の製造を目的として適切に管理された本生産菌株については、本品目の添加物としての摂取において問題となるような病原性及び毒素産生性の懸念はないと判断した。

本専門調査会としては、本品目が「添加物に関する食品健康影響評価指針」に

おける「酵素が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」に該当すると判断したことから、本品目の毒性について、同指針に基づき、遺伝毒性、反復投与毒性及びアレルギー性に係る試験成績を用いて評価を行うこととした。

本専門調査会としては、本品目の毒性に係る知見を検討した結果、本品目については、遺伝毒性、反復投与毒性の懸念はないと判断した。

本専門調査会としては、本品目のアレルギー性の懸念は極めて低いと判断した。

以上を踏まえ、本専門調査会としては、ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験における最高用量から得られた NOAEL 10.0 mL/kg 体重/日 (TOS 換算 : 880 mg TOS/kg 体重/日) と、本品目の推定一日摂取量 114 µgTOS/kg 体重/日とを比較して得られる安全マージンが十分であること及び本品目が食経験のある基原微生物である *A. oryzae* を用いて生産されることを勘案して、本品目について、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と判断した。

<別紙 1 : 略称>

略称	名称等
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments : 仏食品衛生安全庁
BSL	biosafety level : バイオセーフティレベル
CPA	シクロピアゾン酸
CTA	Chemical and Technical Assessment
EC	Enzyme Commission : 国際生化学・分子生物学連合酵素委員会
EU	European Union : 欧州連合
FSANZ	Food Standards Australia New Zealand : オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関
GRAS	Generally Recognized As Safe : 一般的に安全とみなされる
GSFA	General Standard for Food Additives : コーデックス食品添加物一般基準
IARC	International Agency for Research on Cancer : 国際癌研究機関
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives : FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
ORF	open reading frame
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis : ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
TOS	total organic solids : 総有機固形分

<別紙 2 : 毒性試験成績>

試験項目	試験種類	動物種等	試験期間	投与方法	群設定	被験物質	投与量	試験結果概要及び本専門調査会の判断	参照
反復投与毒性	13週間経口投与試験	ラット	13週間	強制経口	各群雌雄各10匹	本品目の有効成分	0、1.0、3.3、10.0 mL/kg 体重/日 (TOS 換算 0、88、290、880 mg TOS/kg 体重/日)	毒性所見なし 最高用量 NOAEL 10.0 mL/kg 体重/日 (TOS 換算 : 880 mg TOS/kg 体重/日)	指定等要請者委託試験報告 (2006c) (参照 9)

<参照>

- 1 厚生労働省, 「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」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, 第 534 回食品安全委員会 (平成 26 年 10 月 21 日)
- 2 ノボザイムズ ジャパン (株), 食品添加物の指定要請添付資料 *Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株由来のアスパラギナーゼ, 2014 年 10 月 3 日
- 3 Asparaginase from *Aspergillus oryzae* expressed in *A. oryzae*. In WHO (ed.), Technical Report Series 947, Evaluation of certain food additives and contaminants, Sixty-eighth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 19-28 June 2007, WHO, Geneva, 2008; 55-63.
- 4 Barbesgaard P, Heldt-Hansen HP, Diderichsen B: On the Safety of *Aspergillus oryzae*: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992; 36: 569-72
- 5 In WHO (ed.), Chemical and Technical Assessments, Evaluation of certain food additives and contaminants, Sixty-eighth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Zofia Olempska-Beer; Asparaginase from *aspergillus oryzae* encoded by the asparaginase gene from *A. oryzae*.; 2007; 1-7
- 6 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課, 「食品健康影響評価に係る補足資料の提出について」, 2015 年 7 月
- 7 ノボザイムズ ジャパン (株): Typical Composition - Acrylaway 3500 BG (ノボザイムズ ジャパン (株)) (未公表)
- 8 ノボザイムズ ジャパン (株): Typical Composition - Acrylaway L (ノボザイムズ ジャパン (株)) (未公表)
- 9 Huntingdon Life Sciences Ltd.: Asparaginase, PPV 24743 – Toxicity Study by Oral Administration to CD Rats for 13 weeks. 2006 (ノボザイムズ ジャパン (株)) (未公表)
- 10 ノボザイムズ ジャパン (株): Application sheet of Acrylaway®, (ノボザイムズ ジャパン (株)) (未公表)
- 11 中嶋 康之: 酵素による加熱食品中のアクリルアミド低減. 食品の包装 2009; 40: 2 平成 21 年
- 12 食品安全委員会, 加工食品中のアクリルアミドについて. 参考: <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2002/10/h1031-2.html>
- 13 Codex Alimentarius Commission, Code of practice for the reduction of acrylamide in foods, CAC/RCP 67-2009

-
- ¹⁴ U.S. Food and Drug Administration, Agency Response Letter, GRAS Notice No. GRN 000201, November 24, 2006
参考：
<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm153693.htm>
- ¹⁵ 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
- ¹⁶ Ministry of Food, Agriculture and Fisheries. Danish Veterinary And Food Administration (DVFA), Preventase/Approval, File: 2006-20-5406-00107 and 2011-20-25-02414/BICB, April 1, 2011.
- ¹⁷ Food Standards Australia New Zealand (FSANZ): Application A606 Asparaginase as a Processing Aid (Enzyme), Final Assessment Report 8-08, May 22, 2008
参考：
<http://www.foodstandards.gov.au/foodstandards/applications/applicationa606aspar3637.cfm>
- ¹⁸ Asparaginase from *Aspergillus niger* expressed in *A. niger*. In WHO (ed.), Food Additives Series 59, Safety evaluation of certain food additives, prepared by the sixty-eighth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Geneva, 19-28 June 2007, WHO, Geneva, 2008; 55-63.
- ¹⁹ 食品安全委員会, 食品安全関係情報詳細, 平成 20 年 12 月 15 日
参考：<http://www.fsc.go.jp/fsciis/foodSafetyMaterial/show/syu02730410188>
- ²⁰ 食品安全委員会, 遺伝子組換え食品等評価書「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」, 平成 27 年 9 月
- ²¹ 厚生労働省, 平成 24 年国民健康・栄養調査報告, 平成 26 年 3 月
参考：<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyuu/h23-houkoku.html>
- ²² 国立感染症研究所, 国立感染症研究所病原体等安全管理規程別冊 1 「病原体等の BSL 分類等」, 平成 22 年 6 月
- ²³ National Institutes of Health (NIH). NIH Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules. Office of biotechnology activities
参考：http://oba.od.nih.gov/oba/rac/guidelines_02/APPENDIX_B.htm
- ²⁴ Watson AJ, Fuller LJ, Jeenes DJ and Archer DB: Homologs of Aflatoxin

-
- biosynthesis genes and sequence of *affR* in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. Appl. Environ. Microb. 1999; 65 (1): 307-10
- ²⁵ Atalla MM, Hassanein NM, El-Beih AA and Youssef YA: Mycotoxin production in wheat grains by different *Aspergilli* in relation to different relative humidities and storage periods. Nahrung/Food 2003; 1: 6-10
- ²⁶ 一般財団法人 食品環境検査協会, 試験成績証明書. 2015
- ²⁷ ノボザイムズ ジャパン (株), *Aspergillus oryzae* BECh2 株に関する情報 (ノボザイムズ ジャパン (株)) (未公表)
- ²⁸ Kim NY, Lee JH, Lee I and Ji GE: An evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid production in *Aspergillus oryzae*. J. Food Protect. 2014; 77(6): 1010-6
- ²⁹ Tokuoka M, Seshime Y, Fujii I, Kitamoto K, Takahashi T and Koyama Y: Identification of a novel polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase (PKS-NRPS) gene required for the biosynthesis of cyclopiaxonic acid in *Aspergillus oryzae*. Fungal Genet. Biol. 2008; 45, 1608-15
- ³⁰ Blumenthal CZ: Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi Regul. Toxicol. Pharm. 2004; 39, 214-28
- ³¹ ノボザイムズ ジャパン (株), Analysis of beta-nitropropionic acid and kojic acid in 4 batches of asparaginase produced by *Aspergillus oryzae* (ノボザイムズ ジャパン (株)). 2005 (未公表)
- ³² 消費者庁, 既存添加物名簿収載品目リスト, 平成 26 年 1 月 30 日
- ³³ The United States Pharmacopoeia(USP)(ed.), The United States Pharmacopoeia 26(NF21) - the National Formulary 21, 2003; 2053
- ³⁴ ノボザイムズ ジャパン (株), Artificial digestion test of AoASP in Simulated Gastric Fluid (SGF) (ノボザイムズ ジャパン (株)). 2015a (未公表)
- ³⁵ ノボザイムズ ジャパン (株), 「ペプチドカッター*」を用いたアスパラギナーゼ (Acrylaway®) の酵素分解シミュレーション (ノボザイムズ ジャパン (株)). 2015b (未公表)
- ³⁶ Asparaginase, PPV 24743: Test for Mutagenic Activity with Strains of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (ノボザイムズ ジャパン (株)). 2006 (未公表)
- ³⁷ Covance Laboratories Ltd., Asparaginase, PPV 24743 – Introduction of

Chromosome Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes
(ノボザイムズ ジャパン (株)) . 2006 (未公表)

³⁸ Asparaginase, Batch PPV 24743: Toxicity Study by Oral Administration to
CD Rats for 13 weeks (ノボザイムズ ジャパン (株)) . 2015 (未公表)

(案)

***Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ
に係る食品健康影響評価に関する審議結果 (案)
についての意見・情報の募集結果について**

- 1. 実施期間 平成 27 年 10 月 14 日～平成 27 年 11 月 12 日
- 2. 提出方法 インターネット、ファックス、郵送
- 3. 提出状況 1 通
- 4. 意見・情報の概要及び専門調査会の回答

	意見・情報の概要*	専門調査会の回答
1	<p>今回、貴委員会が公表された「添加物評価書 <i>Aspergillus oryzae</i> NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」(以下、評価書案と表記します。)に関して、以下のコメントを提出いたします。</p> <p>1. 「食品常在成分と同一物質になること」に関する議論を深める必要があると考えます</p> <p>(1) 酵素が「食品常在成分と同一物質になること」について、科学的に明確な定義付けと、その証明に必要な資料を検討すべきです</p> <p>新規指定添加物の指定申請に際しては、一般的に長期の反復投与毒性試験や発がん性試験など、多くの安全性試験のデータが求められます。しかし、「消化管内で分解して食品常在成分と同一物質になる」と判断された場合、試験項目は大幅に省略が可能となり、申請者にとっては必要な資料を揃える時間と費用が削減できることとなります。</p> <p>また、食経験のないものでも、それが消化管内で分解して食品常在成分になるものは、体内に吸収されるのは食品常在成分ですから、結果としてヒトでの食経験があることとなります。貴委員会は、食経験についても、当該物質の安全性を評価する上で重要な因子の一つと考えているものと推察します。</p>	<p>1. について</p> <p>(1) について</p> <p>酵素の安全性評価については、「添加物に関する食品健康影響評価指針」(2010年5月 食品安全委員会) (以下「評価指針」という。)に基づいて行われており、その中で、「酵素が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 (平成8年厚生省ガイドラインの表2の事項について検討の上判断する。) には、原則として、別表1のうち毒性に関する資料の添付を省略することができるが、別表2に掲げる毒性に関する資料は添付する。」こととされており、添加物としての指定等を要請する方々に対し、お示ししているところです。</p> <p>今回、食品健康影響評価の対象とした <i>Aspergillus oryzae</i> NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ (以下「本品目」という。) については、評価指針に基づき、人工消化液による分解性が確認されたことなどから、本品目は「酵素が</p>

<p>こうした観点から、酵素等、タンパク質を主成分とする添加物について、食品常在成分と同一物質になるとはどうかを科学的に定義づけることは重要と考えます。貴委員会においてさらに議論・検討すべきではないでしょうか。さらに、その証明のため申請者に求める資料についても、具体的に明示するべきだと考えます。</p> <p>(2) 現在の分析技術の到達点を考慮すれば、別の分析手法の併用により、今回の評価書案の内容以上の詳細な検証も可能ではないでしょうか</p> <p>評価書案では、①人工胃液とインキュベートした後、2 kDa 以下の分子量のものになったこと、②コンピュータシミュレーションで1~40 アミノ酸程度のオリゴペプチドに分解されることが示唆されたことの2点に基づいて、本品目が「消化管内で分解して食品常在成分になることが明らかである」と判断しています。過去に貴委員会が評価した「<i>Aspergillus niger</i> ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」の場合もほぼ同様です。しかし、こうした手法のみでは食経験のないペプチドが体内に吸収される可能性は排除できないと思います。また、ペプチドの中にも生理活性を持つものが少なくありません。</p> <p>一方、食経験のないタンパク質であっても、消化管内で全てがアミノ酸まで分解された場合には食品常在成分になったといえます。他の分析手法を併用することでこうしたデータを得ることも可能ではないでしょうか。たとえば、タンパク質の分離分析法である SDS-PAGE のみならず、イオンクロマトグラフィーなども活用して低分子のペプチドやアミノ酸を測定し、タンパク質からペプチドやアミノ酸への分解の物質収支を調べる等が考えられます。</p>	<p>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」に該当すると判断しました。</p> <p>なお、現在、酵素を含めた加工助剤の評価方法や必要な資料について、国際機関の評価方法なども参照しつつ、より明確化することを検討しているところです。</p> <p>(2) について</p> <p>評価指針が引用する平成8年厚生省ガイドラインにおいては、「酵素が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」を判断する際に検討するとされている事項として、御指摘の①、②の知見に加え、「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。」などが挙げられており、本専門調査会としては、それらの知見を踏まえ、評価指針に基づき、本品目が「酵素が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」に該当すると判断しました。</p> <p>なお、現在、酵素を含めた加工助剤の評価方法について、国際機関の評価方法なども参照しつつ、より明確化することを検討しているところです。</p>
---	--

<p>2. ラットを用いた 13 週間経口投与試験の評価について</p> <p>評価書案 19 ページに、「10 mL/kg 体重/日投与群の雌において、肺胞マクロファージの顕著な増加」が認められたと書かれていますが、20 ページには「発現頻度は背景データの範囲内である」とあります。「顕著な増加」と「背景データの範囲内である」ことに矛盾はないのか、ご説明をお願いいたします。</p>	<p>2. について</p> <p>本専門調査会としては、指定等要請者より提出された知見に基づき、ラットを用いた 13 週間経口投与試験の試験実施機関において、御指摘のあった、「肺胞マクロファージの顕著な増加」がみられたラットの割合（40%）は、同じ施設において、これまで実施されてきたラットを用いた 13 週間経口投与試験の対照群にみられた割合（背景データ）（0~40%）の範囲内であると判断しました。</p>
--	--

※頂いた意見・情報をそのまま掲載しています。

「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」評価書の変更点

※ 修正箇所の欄は、意見・情報の募集時の公表資料におけるページ数等（下線部修正）

修正箇所	第 587 回食品安全委員会資料 (変更後)	意見・情報の募集時の資料 (変更前)
6 ページ 17 行目	製パンや味噌、醤油、酒の醸造 等	製パンや味噌、醤油、酒などの 醸造など
6 ページ 22 行目	<u>並びに</u>	<u>及び</u>
6 ページ 26 行目	<u>並びに</u> アフラトキシン	<u>、</u> アフラトキシン
17 ページ 7 行目	<u>(削除)</u>	<u>指定等要請者によれば、以上の 試験結果より、通常の使用条件 下で、本品目は容易に消化管内 (胃) で分解され、食品常在成 分になると考えられるとされて いる。</u>
参照 7,8,9,10,27,31,34,35, 36,37,38	<u>(未公表)</u>	<u>社内資料</u>