

(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

2011年10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	4
○要約	5
I. 評価対象品目の概要	7
1. 用途	7
2. 名称等	7
3. 基原、製造方法、成分、性状等及び使用方法	7
(1) 基原	7
(2) 製造方法	7
(3) 成分	8
(4) 性状等	10
(5) 使用方法	10
4. 評価要請等の経緯	10
5. 添加物指定の概要	11
II. 安全性に係る知見の概要	11
1. 生産菌株の安全性	11
(1) 非病原性の確認	11
① 静脈内投与試験	12
② 経口投与試験	13
(2) 非毒素産生性の確認	14
2. 本品目の安全性	14
(1) 体内動態（消化管内での分解性等）	14
(2) 毒性	16
① 遺伝毒性	16
② 反復投与毒性（ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験）	17
③ アレルゲン性	17
3. ヒトにおける知見	21
4. 一日摂取量の推計等	22
III. 国際機関等における評価	22
1. JECFA における評価	22
2. 米国における評価	22

3. 欧州における評価	23
4. 我が国における評価等	23
IV. 食品健康影響評価	23
別紙1：略称	25
別紙2：各種毒性試験等成績	26
別紙3：本品目の推定一日摂取量（使用食品（群）摂取量ベース）	29
別紙4：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）	30
参照	31

<審議の経緯>

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ついて要請（厚生労働省発食安第 0802001 号）、関係書類の接受
2007年 8月 9日	第 202 回食品安全委員会（要請事項説明）
2008年 7月 18日	第 60 回添加物専門調査会
2008年 8月 29日	第 61 回添加物専門調査会
2008年 9月 22日	補足資料の提出依頼
2010年 5月 7日	補足資料の接受
2010年 6月 2日	第 85 回添加物専門調査会
2010年 6月 28日	補足資料の提出依頼
2011年 9月 6日	補足資料の接受
2011年 9月 27日	第 99 回添加物専門調査会
2011年 10月 20日	第 404 回食品安全委員会（報告）

<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

(2011年 1月 6日まで)

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

(2011年 1月 7日から)

小泉 直子 (委員長)
熊谷 進 (委員長代理※)
長尾 拓
野村 一正
畑江 敬子
廣瀬 雅雄
村田 容常

※ 2011年 1月 13日から

<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

(2010年12月20日まで)

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

(2010年12月21日から)

今井田 克己 (座長)
梅村 隆志 (座長代理)
石塚 真由美
伊藤 清美
井上 和秀
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
山添 康
山田 雅巳

<参考人>

宇理須 厚雄
手島 玲子

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 登録番号：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、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評価した。

本専門調査会としては、本品目の主たる成分が「添加物に関する食品健康影響評価指針」における「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、染色体異常試験においても陰性の結果であり、また、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と評価した。

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原液の NOAEL を、本試験の最高用量である 100%×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。) と評価した。

本専門調査会としては、本品目の有効成分は、既知のアレルゲンとの 8 アミノ酸配列連続一致をはじめとする構造相同性が低いこと、及び人工消化液により速やかに分解することから、そのアレルギー性の懸念は低いと評価した。また、本専門調査会としては、24 kDa 夾雑たん白質は、人工消化液に対して難消化性を示したが、既知のアレルゲンとの 8 アミノ酸配列連続一致をはじめとする構造相同性が低いこと、高用量での経口摂取でも体内にほとんど吸収されないこと、当該たん白質と構造上ホモロジーのある物質の食経験の可能性が示唆されていること、及び改良製造法によって本品目中の含量が数 ppm 程度に低減されると報告されていることから、本品目が添加物として適切に製造・使用され、添加物として摂取される限りにおいては、アレルギー性の懸念は低いと評価した。

本専門調査会としては、ヒトにおける知見として入手したものからは、本品目の安全性上の懸念をもたらすような証拠は得られていないと判断した。

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 NOAEL 93 mgTOS/kg 体重/日と、本品目の推定一日摂取量 0.224 mgTOS/kg 体重/日とを比較して得られる安全マージン (約 400) が、13 週間反復経口投与毒性試験

の適切な安全マージンとされる 1,000 を下回ること、本品目は食経験のない微生物を基原とした生産菌株を利用して生産されるものであること、及び本品目はそれが使用された食品中から最終的に取り除かれないものであることを勘案すると、本品目について ADI を特定することが必要と判断した。

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の NOAEL 93 mgTOS/kg 体重/日を根拠とし、試験期間が短いことを考慮して安全係数 1,000 で除して得られる 0.093 mgTOS/kg 体重/日を本品目の ADI とした。

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⁽¹⁾番号： 3.5.1.44 (protein-glutamine glutaminase として)

CAS 登録番号： 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

今般、厚生労働省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を要請した者（以下「指定等要請者」という。）によれば、本品目の基原微生物である *Chryseobacterium 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とされている（参照 2、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、DSMZ 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、10）。なお、これまでに JECFA 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。

指定等要請者によれば、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*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジンを用いて変異させ、作製されたものであるとされている（参照 2）。

(2) 製造方法

指定等要請者によれば、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、その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であるとされている（参照 2、11、12）。指定等要請者は、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、生産菌株が本品目中から完全に除去されるこ

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。

² DSMZ リスク分類は、WHO 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、当該リスク分類はリスク・グループ 1~4 で構成されているが、リスク・グループ 3 及び 4 に該当するものは高い病原性があるとされる。指定等要請者は、*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・グループ 1 及び 2 の内容は次のとおりである。

リスク・グループ 1（個体及び地域社会に対する危険度が低いもの）：ヒトに疾病を起し、又は動物に獣医学的に重要な疾患を起す可能性のないもの。

リスク・グループ 2（個体に対する危険度が中等度であり、地域社会に対する危険度が軽微であるもの）：ヒト又は動物に対して病原性を有するが、実験室職員、地域社会、家畜、環境等に対し重大な害を及ぼさないもの。実験室内で暴露されると重篤な感染を起す可能性はあるが、有効な治療法又は予防法があり、伝播の可能性は低いもの。

とを確認したとしている。(参照 2、11、13)

さらに、指定等要請者は、後述の約24 kDaの夾雑たん白質を低減するために、除菌ろ過工程と脱塩・濃縮工程との間に塩析工程を導入した改良製造法を確立したとしている。(参照 14、15、16)

(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、当該 185 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 による測定では 20 kDa であるとされている。その等電点は 10.0 (参照 3) であるとされている。(参照 1、2)

指定等要請者によれば、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、その 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。) であったとされている。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%) 含まれていたと推定されている (参照 2、11、17)。さらに、指定等要請者は、上述の改良製造法によって、実生産スケールで製造された本品目の試作製剤 (ロット PGI0951331R、PGJ0550631R 及び PGJ0553031R) 中の 24 kDa 夾雑たん白質の含量は 0.2、1.8 及び 1.3ppm (本品目中含量は 0.4、3.6 及び 2.6ppm と推定される。) まで低減されたとしている (参照 14、15)。なお、食品衛生法では、食品中に含まれる特定原材料³⁾の総たん白量が数 µg/mL 濃度レベル又は数 µg/g 含有レベルに満たない場合においては、当該食品に当該特定原材料を含む旨を表示する必要はないとされている (参照 18)。

また、指定等要請者によれば、本品目中の TOS の含有率は、JECFA の定めた方法 (参照 19) により 4.6% と算出されている。(参照 2)

LASVIPDVATLNSLNFNQIKNQSCGTSTASSPCITFRYPVD	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)

³⁾ 食物アレルギーを引き起こすことが明らかになった食品のうち、特に発症数、重篤度から勘案して表示する必要性の高いえび、かに、小麦等 (特定原材料) を含む加工食品については、当該特定原材料を含む旨を表示しなければならないとされている。

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
アスパラギン酸	D	7	イソロイシン	I	8
アスパラギン	N	16	ロイシン	L	12
トレオニン	T	13	チロシン	Y	11
セリン	S	27	フェニルアラニン	F	6
グルタミン酸	E	2	リシン	K	7
グルタミン	Q	4	ヒスチジン	H	2
グリシン	G	11	アルギニン	R	6
アラニン	A	15	プロリン	P	9
バリン	V	14	トリプトファン	W	2
メチオニン	M	2	システイン	C	11

指定等要請者の報告によれば、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 (①LQDLPGVSGR、②ILYLR、③TNAPTANFHTVGTVR、④SVALGWK 及び⑤SFVIGAGTGG) からプライマーが設計され、生産菌株の染色体 DNA を鋳型とした degenerate PCR が実施されている。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が実施された結果、陽性コロニーのプラスミドから約 4 kbp の DNA 断片が得られたとされている。当該 DNA 断片の配列上の ORF 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 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、指定等要請者によれば、24 kDa 夾雑たん白質を MALDI-TOFMS により測定したところ、その精密質量 (m/z) は 24,109.1 であったとされている。また、指定等要請者によれば、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を LC-MS/MS により測定したところ、それが 195 アミノ酸の組成をもつものであると同定されたが、当該組成から計算されるその分子量 (約 20 kDa) は上記精密質量よりも小さく、かつ、当該 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とされている (図 2)。以上より、390 アミノ酸一次配列上における 24 kDa 夾雑たん白質の一次配列は明確には特定されていないが、24 kDa 夾雑たん白質は、390 アミノ酸一次配列上の 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であると考えられている。指定等要請者によれば、24 kDa 夾雑たん白質は、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であるとされている。(参照 2、11、20)

MRTSLLCVKNSIAAAMVFLTGMAGAQQWLVNGNSGIVPNN	40
YVGTVDSRILYLRTNGATSNPQNALLNEFGSFIVETTNT	80
NASKAKGSIAGISNTLGGQAGSSIVGGWTNLSNAGGAN	120
IVGGQDNAVLNNASKSVALGWKNIIRNHNEFALGVGIDLT	160
<u>EEYSGGFGIDLAAGNRSFVIGAGTGGAKLTNTIPYSIML</u>	200
<u>GMSGNSTMLIKDQSVGIRTNAPTANFHTVGTVRLQDLPVG</u>	240
<u>SGRALVVDSSNGNVMVSNLSRTPSDETVQKLEDRIKTL</u>	280
ENTVEELKQLLVSKNAITDISLSDTPFLGQNAPNPVKNET	320
SIRYFLPHHIKTASLDIYNISGQLIKSVPLREKGNGTIRL	360
SGSELQSGTYVYKMTADGKVTDKAKLIIQD	390

註：網掛部分は195アミノ酸配列、下線ボールド部分はブローブに係る配列。

図2 24 kDa 夾雑たん白質 (230~240 アミノ酸) の一次配列を包含すると考えられた390アミノ酸一次配列 (参照20)

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 500 単位⁴⁾以上の力価 (酵素活性) を有することとされている。(参照2、21)

(4) 性状等

指定等要請者の成分規格 (案) によれば、「本品は、白~淡黄白色の粉末で、においがい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、21)

(5) 使用方法

指定等要請者によれば、本品目は、たん白質の脱アミド化 (たん白質中のグルタミン残基に作用し、その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すること。) を行うものであるとされている。指定等要請者は、本品目の使用において既知の副反応はないとしている。指定等要請者によれば、本品目は、食品中のたん白質又は食品たん白質素材の溶解性、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)

指定等要請者によれば、本品目の至適 pH は 5~7、至適温度は 50~60℃ であり、本品目は、70℃1 時間処理でほぼ完全に失活するとされている。本品目の阻害剤としては、Ag⁺、Zn²⁺、Cu²⁺及びヨードアセトアミドが挙げられている。(参照2、3)

指定等要請者は、本品目について、別紙3の食品 (群) に対して最大 0.020% 若しくは 0.001% 添加して、又は別紙4の食品たん白質素材に対してたん白質当たり最大 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、指定等要請者は、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

⁴ 指定等要請者は、本品目を Cbz-Gln-Gly (基質) に 37±0.5℃ で 10 分間作用させ、生成した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) の増加を与える本品目の量が 1 単位であるとしている。

る素材もあり、そのような機能特性は、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している。指定等要請者は、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 2 2）があるとしている。指定等要請者によれば、本品目は、酵素反応という生物化学的手段によって食品中のたん白質又は食品たん白質素材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、指定等要請者が本品目について GRAS 物質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 2 3）

EU（一部の加盟国を除く。）では、加工助剤たる酵素は添加物として規制されていなかったが、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。（参照 2 4）

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。

5. 添加物指定の概要

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。（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 9、2 5）。指定等要請者は、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、生産菌株が本品目中から完全に除去されることを確認したとしている（参照 2、1 1、1 3）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を実施している。

（1）非病原性の確認

指定等要請者は、農林水産省農林水産技術会議事務局の「動物性飼料並びに微生物飼料の安全性評価手法の開発」（参照 2 6、2 7）に記載された方法に準じて⁵、生産菌株並びにその培養液の上清及び菌体破碎後上清につい

⁵ 指定等要請者は、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が見当たらない中で、本評価手法に記載された方法が微生物の安全性を評価する方法として唯一公開されたものであり、かつ、最も厳しい条件（血中に直接）で摂取を行うこととしているものであることから、これに準じて試験を実施したとしている。

て、静脈内投与試験及び経口投与試験を実施している。

① 静脈内投与試験

a. 緑膿菌株との比較

指定等要請者（2000）の報告によれば、5週齢のICRマウス（対照群雄5匹、各投与群雄10匹）について、対照群のほか、生産菌株 2.9×10^7 CFU若しくは 2.9×10^8 CFU、緑膿菌株（*Pseudomonas aeruginosa* 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⁶の上清若しくは菌体破碎後上清を投与する群を設定し、単回静脈内投与を行い、投与後14日間の観察の後、剖検、病理組織学的検査等を行う試験が実施されている。

その結果、緑膿菌株 1.1×10^7 CFU投与群で投与2日後から6日後にかけて6/10匹が死亡したが、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で死亡例はなかったとされている。

一般状態については、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で投与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時間後にはそれらは消失したとされている。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とされている。

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とされている。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、さらにその 1.1×10^7 CFU投与群では観察期間を通じた低値及び増加抑制が認められたとされている。

剖検においては、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異常は認められなかったとされている。一方、緑膿菌株 1.1×10^6 CFU投与群で1/10匹に腎臓の褪色が認められ、さらにその 1.1×10^7 CFU投与群の生存4匹で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とされている。

生残菌については、生産菌株投与群ではいずれの器官においても検出されていない。一方、緑膿菌株 1.1×10^6 CFU投与群で1/10匹の腎臓において検出され、さらにその 1.1×10^7 CFU投与群の生存4匹で脳（1/4匹）、肺（2/4匹）、肝臓（2/4匹）及び腎臓（4/4匹）において検出されている。

病理組織学的検査においては、対照群及び生産菌株 2.9×10^7 CFU投与群で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4/10匹及び生産菌株培養液上清投与群の1/10匹で軽度の肝臓巣状壊死が認められたとされている。緑膿菌株 1.1×10^6 CFU投与群では軽度の肝臓巣状壊死

（5/10匹）、軽度の腎炎（1/10匹）及び中等度の化膿性腎盂腎炎（1/10匹）が認められたとされている。さらにその 1.1×10^7 CFU投与群の生存4匹では軽度の脳髄膜炎（1/4匹）、軽度～中等度の肝臓巣状壊死（4/4匹）及び中等度～重度の化膿性腎盂腎炎（4/4匹）がみられ、同群の死亡した6匹でも肝臓巣状壊死（5/6匹）、化膿性腎盂腎炎（6/6匹）等が認められたとさ

⁶ 2.9×10^9 CFU/mL 相当の生産菌株培養液。

れている。指定等要請者は、肝臓巣状壊死について、菌体の病原性にかかわらず、肝臓におけるその捕捉・殺菌の過程で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 11、28、29）

b. 乳酸菌株との比較

指定等要請者委託報告によれば、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、投与14日後の肝臓について病理組織学的検査を行う試験が実施されている。その結果、生産菌株投与群では肝臓に限局性かつ散在性の変性壊死（3/5匹）が認められたが、それらは炎症反応を伴うものではなかったとされている。他方、乳酸菌株投与群では、5匹全ての肝臓に変性壊死が認められ、それらは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、陰性対照群では肝臓に明らかな病変は認められていない。試験担当者は、生産菌株投与群での肝病変は、乳酸菌株投与群でのそれよりも軽度なものであったこと、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がみられており、乳酸菌株に肝傷害作用のほか強い免疫刺激能が認められた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 11、29）

② 経口投与試験

指定等要請者（2000）の報告によれば、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、投与後14日間の観察の後、剖検、病理組織学的検査等を行う試験が実施されている。その結果、対照群及び生産菌株投与群で死亡例はなかったとされている。生残菌については、いずれの器官においても検出されていない。病理組織学的検査においては、対照群で1/5匹に軽度の肝臓巣状壊死がみられたが、生産菌株投与群で異常所見は認められなかったとされている。そのほか、一般状態、体重及び剖検において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 28）

以上より、静脈内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、及び本品目の製造工程において適切な管理がなされることにより菌体が本品目中から完全に除去されることから、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、問題となるような感染性の懸念はないと評価した。静脈内投与試験において、緑膿菌株投与群で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では死亡例はなかった。本生産菌株投与群で認められた肝臓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で認められたものよりも発生率及び程度が低く、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、静脈内投与試験における量を上回る量の生産菌株の経口投与で異常所見は認められていない。したがって、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、本品目の添加物としての摂取において病原性の懸念はないと評価

した。

(2) 非毒素産生性の確認

(1) の静脈内投与試験での一般状態観察及び病理組織学的検査において、生産菌株培養液上清投与群では生産菌株投与群と同等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とされている。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経口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。指定等要請者(2000)の報告によれば、(1)の静脈内投与試験に用いられた生産菌株の培養液(2.9×10^9 CFU/mL相当)の上清又は菌体破碎後上清中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。指定等要請者は、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28)。

したがって、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、本品目の添加物としての摂取において毒素産生性の懸念はないと評価した。

なお、指定等要請者によれば、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⁷⁾まで範囲を拡大して文献を検索したところ、それらの毒素産生性に係るものは、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1報(参照30)及び *Capnocytophaga canimorsus* が感染した J774 (マウス・マクロファージ由来培養細胞株) の生存率低下等に関するもの1報(参照31)の合計2報が見出されたのみであったとされている。しかしながら、このことは、同一目内とはいえ類縁性がそれほど高くないそのほか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必ずしも担保するものではない。

以上を総合的に勘案し、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、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評価した。

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 アミノ酸からなるたん白質)を主たる成分とするものであることから、一般的な食品由来のたん白質及び食品たん白質素材と同じように消化管内で分解されると推定される。このことをより明らかにするため、「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「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」に該当するかどうかについて、以下のとおり整理した。

① 添加物の通常の使用条件下で、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。

指定等要請者の報告によれば、本品目の有効成分、速やかに分解するもの

⁷ 2006年4月現在の NCBI の Taxonomy Browser に拠るとされている。

としてRubisCO、分解しにくいものとしてOvm又は非常に分解しにくいものとしてBLGについて、SGF又はSIF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に供する試験が実施されている。なお、SGFの組成はILSIのAllergy and Immunology Instituteの主導により国際的にバリデートされたもの（参照3 2）に、SIFの組成はUSP28-NF23（参照3 3）に拠ったとされている。その結果、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中では0.5分間、pH2.0のSGF中では5分間で2,500 Da⁸以下のペプチド又はアミノ酸まで分解し、RubisCO とほぼ同等の易分解性を示したほか、pH6.8のSIF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3 4）。

以上より、本品目の主たる成分は、消化管内で容易に分解して食品常在成分と同一物質になると考えられた。

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内で容易に分解することを示した①の試験成績において、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3 4）と、分解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、ほかの栄養成分の吸収を阻害しないこと。

上述のとおり、本品目の主たる成分は、消化管内で容易に分解し、そのほかの食品由来のペプチド等と同様に体内へ吸収され、糖質、ミネラル、ビタミン等そのほかの栄養成分の吸収を阻害する懸念はないと考えられる。

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、本品目の主たる成分は消化管内で容易に分解したとされている。特に①の試験成績においては、本品目の有効成分は、pH1.2のSGF中では0.5分間で2,500 Da以下のペプチド又はアミノ酸まで分解したとされている。したがって、添加物として摂取された本品目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ることはなく、生体組織中に蓄積する懸念はないと考えられる。

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脱アミド化を行うものであるとされている。本品目のたん白質としての一日摂取量は、最大で

⁸ 試験に用いられた最小の分子量マーカーの分子量が 2,500 Da であるとされている。

9.238 mg/人/日⁹⁾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が起こることはないと考えられる。一般的に通常の食品中のグルタミンの大部分は、摂取後に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。したがって、本品目により処理された食品又は本品目により処理された食品たん白質素材を用いた食品を摂取した場合と、通常の食品を摂取した場合との間で栄養学的な大差はないと考えられる。

以上より、本専門調査会としては、本品目の主たる成分が「添加物に関する食品健康影響評価指針」における「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

II 1 のとおり、適切に管理された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考えられ、II 2 (1) のとおり、本品目の主たる成分が「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、本専門調査会としては、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

a. 遺伝子突然変異を指標とする試験

(a) 微生物を用いる復帰突然変異試験

指定等要請者委託試験報告(2004a)によれば、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)についての細菌(*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び *Esherichia 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)が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 3 5)

b. 染色体異常を指標とする試験

(a) ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

指定等要請者委託試験報告(2004b)によれば、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を用いた染色体異常試験(観察対象とした最高濃度: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)が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 3 6)

(b) げっ歯類を用いる小核試験

指定等要請者委託試験報告(2006)によれば、9週齢のICRマウス(各

⁹⁾ 使用食品(群)摂取量ベース及び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の和(67.543+175.574=243.117 mg/人/日)を基に、243.117×3.80%=9.238 mg/人/日と算出される。

群雄5匹) に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/g⁽¹⁰⁾) を2日間強制経口投与する *in vivo* 骨髄小核試験(最高用量2,000 mg/kg体重/日) が実施されており、陰性であったとされている。(参照37)

以上より、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、染色体異常試験においても陰性の結果であり、また、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と評価した。

② 反復投与毒性(ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験)

指定等要請者委託試験報告(2005)によれば、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又は100% (v/v) を10 mL/kg体重/日ずつ。本品目換算で0、635、1,269又は2,538 mg/kg体重/日。TOS換算で0、23、46又は93 mgTOS/kg体重/日。) を13週間強制経口投与する試験が実施されている。その結果、いずれの群でも死亡動物は認められなかったとされている。一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科学的検査、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とされている。尿検査においては、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とされている。これについて試験担当者は、本品目の精製工程由来⁽¹¹⁾の不純物であるナトリウム及び塩素の摂取⁽¹²⁾に伴う体液恒常性維持の結果であると考察している。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/日としている(参照38)。本専門調査会としては、試験担当者の判断を是認し、本試験における原液のNOAELを、本試験の最高用量である100%×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。) と評価した。

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、たん白質である有効成分について、「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39)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に関する試験等が実施されている。

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

¹⁰ 指定等要請者は、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においても同一ロットの被験物質を用いているが、前二試験と小核試験とでは試験実施日が異なるため、被験物質の活性測定結果が僅かではあるが異なるとしている。

¹¹ 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であるとされている。

¹² 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/日であるとされている。

されたものであることを踏まえ、本品目中に0.16% (=1,600ppm。指定等要請者は、改良製造法によって数ppm程度に低減されるとしている。)含まれていたと推定されている24 kDa夾雑たん白質について、有効成分と同様の試験が実施されているほか、消化管吸収の可能性及び当該夾雑たん白質と構造上ホモロジーのある物質の食経験の可能性について試験が実施されている。

a. 既知のアレルゲンとの構造相同性

(a) 有効成分

指定等要請者は、ILSI-HESIのProtein Allergenicity Technical Committeeによるモノグラフ(参照40)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ADFS、AllerMatch、SDAP及びFARRPの4つのたん白質データベースを用いて検討を行っている。

指定等要請者の報告によれば、7~8アミノ酸配列が有効成分と連続一致する既知アレルゲンたん白質は、いずれのデータベースにおいても認められなかったとされている。6アミノ酸配列が連続一致する既知アレルゲンたん白質は、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であったとされている(参照41)。Gal d 1については、そのエピトープ(抗原決定基)と推定される複数か所のドメインは、有効成分と連続一致がみられた6アミノ酸配列と完全には一致しなかったとされている。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は、有効成分と連続一致がみられた6アミノ酸配列と一致しなかったとされている。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、有効成分と連続一致がみられた6アミノ酸配列がエピトープに該当するものかどうかは不明であったとされている(参照42)。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言われている(参照43、44)⁽¹³⁾。

指定等要請者の報告によれば、有効成分と既知アレルゲンたん白質について、アラインメントを行った上で全長のblast検索を実施した結果、相同性に関するE-value⁽¹⁴⁾は最低でも0.43であったとされている⁽¹⁵⁾が、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種類の既知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45、46)

指定等要請者の報告によれば、有効成分についての80アミノ酸スラ

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についてはノイズ(=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を限定していない。

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。すなわち、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とされている。

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)」が該当したとされている。

イデイ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）を実施した結果、35%以上の相同性を示したものは認められなかったとされている。（参照4 1）

（b）24 kDa夾雑たん白質

指定等要請者の報告によれば、24 kDa夾雑たん白質（230～240アミノ酸）の一次配列を包含すると考えられた275アミノ酸一次配列について、有効成分についての場合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24 kDa夾雑たん白質と連続一致する既知アレルゲンたん白質は認められなかったとされている。6～7アミノ酸配列が連続一致する既知アレルゲンたん白質は、①*Phleum pratense*（チモシーグラス）由来のPhl p 5（6アミノ酸配列連続一致）、②*Daucus carota*（にんじん）由来のDau c 1.0201（6アミノ酸配列連続一致）、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アミノ酸配列連続一致）であったとされている。（参照4 7）

Maglioら（2002）の報告によれば、Phl p 5については、その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されている（参照4 8）が、指定等要請者の報告によれば、24 kDa夾雑たん白質と連続一致がみられた6アミノ酸配列は、Phl p 5の配列上、当該コンフォメーション・エピトープよりも下流に位置しているとされている（参照4 7）。

指定等要請者の報告によれば、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、24 kDa夾雑たん白質と連続一致がみられた6アミノ酸配列がエピトープに該当するものかどうかは不明であったとされている。（参照4 7）

指定等要請者の報告によれば、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は、24 kDa夾雑たん白質と連続一致がみられた6又は7アミノ酸配列と一致しなかったとされている。（参照4 7）

指定等要請者の報告によれば、24 kDa夾雑たん白質と既知アレルゲンたん白質について、アラインメントを行った上で全長のblast検索を実施した結果、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、24 kDa夾雑たん白質についての80 アミノ酸スライディングウインドウ検索を実施した結果、35%以上の相同性を示したものは認められなかったとされている。（参照4 7）

なお、指定等要請者の報告によれば、24 kDa夾雑たん白質について、市販の落花生たん白質測定キットに供したところ、当該キットに用いられている動物抗体は必ずしもAra h 3/4グループを抗原と認識するものとは限らないため参考データではあるが、陰性の結果であったとされている。（参照4 9）

b. 人工消化液による分子量又は免疫反応性の変化

（a）有効成分

II 2 (1) ①の試験成績においては、本品目の有効成分は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まで分解したと 報告されている。(参照 3 4)

(b) 24 kDa夾雑たん白質

指定等要請者の報告によれば、24 kDa夾雑たん白質を、pH1.2のSGF に添加し、37°C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に供する試験が実施されている。その結果、 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、24 kDa 夾雑たん白質は、あらかじめ70°C30分間加熱処理された場合においても、 SGFに対して難分解性を示したとされている。

他方、24 kDa夾雑たん白質は、あらかじめ90°C30分間又は100°C10 分間加熱処理された場合においては、SGFに添加して5分間で2,500 Da 以下のペプチド又はアミノ酸までほぼ分解したとされている。(参照 5 0)

指定等要請者の報告によれば、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に供する試験が実 施されている。その結果、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、24 kDa夾雑たん白質は、あらかじめ90°C30分間又は100°C10 分間加熱処理された場合においては、SIFに添加して10~20分間で 2,500 Da以下のペプチド又はアミノ酸までほぼ分解したとされている。 (参照 5 1)

指定等要請者の報告によれば、24 kDa夾雑たん白質については、そ れをSGF又はSIFに添加して1時間以上インキュベートした後において も、抗24 kDa夾雑たん白質ポリクローナル抗体を用いたSDS-PAGE~ ウェスタンブロッティングで免疫反応性の変化が認められなかったと されている。(参照 5 2)

c. 24 kDa夾雑たん白質の消化管吸収の可能性

指定等要請者委託試験報告(2010)によれば、7週齢のSDラット(各 投与・時間群雄5匹)に24 kDa夾雑たん白質(4 mg/kg体重)を単回 経口投与又は単回静脈内投与し、投与5、15若しくは30分後¹⁶⁾又は1、 2、4、8若しくは24時間後の血漿、投与後24時間尿及び糞便並びに投 与24時間後の腸管内容物中の24 kDa夾雑たん白質を抗24 kDa夾雑たん 白質ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法により測定 する試験が実施されている。その結果、経口投与群では、投与30分後 から24時間後まで測定した全動物のいずれにおいても血漿中24 kDa 夾雑たん白質濃度は検出下限値(0.1 ng/mL)未満であったとされてい る。一方、静脈内投与群では、血漿中24 kDa夾雑たん白質濃度は、投 与5分後には122 µg/mLであったが、時間の経過とともに速やかに低下

¹⁶⁾ 投与5及び15分後については静脈内投与群でのみ測定したとされている。

し、投与 24 時間後には 0.068 µg/mL であったとされている。経口投与群の投与後 24 時間尿及び糞便並びに投与 24 時間後の腸管内容物中の 24 kDa 夾雑たん白質は、0.0003 mg 未満、1.233 mg 及び 0.092 mg であり、それぞれ投与量 (1.074 mg) の 0.028% 未満、115% 及び 8.6% であったとされている。以上より指定等要請者は、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ると推定している。(参照 14、53、54、55)。

d. 24 kDa 夾雑たん白質と構造上ホモロジーのある物質の食経験の可能性

指定等要請者の報告によれば、国内の市販食品各種を試料として、抗 24 kDa 夾雑たん白質ポリクローナル抗体が認識する物質をサンドイッチ ELISA 法により測定する試験が実施されている。その結果、生鮮食品については、肉類及び魚類では試験した 10 検体全てから検出され、野菜類では試験した 6 検体のうち 1 検体 (きゅうり) のみから検出され、果物類では試験した 6 検体の全てから検出されなかった。加工食品については試験した 12 検体の全てから検出されなかった。

また、指定等要請者の報告によれば、本生産菌株及びそれと同属の菌株であって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 株の培養上清を試料として、抗 24 kDa 夾雑たん白質ポリクローナル抗体が認識する物質をサンドイッチ ELISA 法により測定する試験が実施されている。その結果、チーズ製造用のプロテアーゼの生産菌株として使用されたとの報告のある *Chryseobacterium balustinum* の培養上清中から検出されている。以上より指定等要請者は、肉類及び魚類といった生鮮食品中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上清中に、24 kDa 夾雑たん白質と構造上ホモロジーのある物質の食経験の可能性が示唆されたとしている。(参照 14、56)

以上より、本専門調査会としては、本品目の有効成分は、既知のアレルゲンとの 8 アミノ酸配列連続一致をはじめとする構造相同性が低いこと、及び人工消化液により速やかに分解することから、そのアレルゲン性の懸念は低いと評価した。また、本専門調査会としては、24 kDa 夾雑たん白質は、人工消化液に対して難消化性を示したが、既知のアレルゲンとの 8 アミノ酸配列連続一致をはじめとする構造相同性が低いこと、高用量での経口摂取でも体内にほとんど吸収されないこと、当該たん白質と構造上ホモロジーのある物質の食経験の可能性が示唆されていること、及び改良製造法によって本品目中の含量が数 ppm 程度に低減されると報告されていることから、本品目が添加物として適切に製造・使用され、添加物として摂取される限りにおいては、アレルゲン性の懸念は低いと評価した。

3. ヒトにおける知見

指定等要請者によれば、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、指定等要請者の筑波研究所、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、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が 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が 17 回延べ約 34 バッチ、養老工場での 55 kL スケ-

ルのタンク培養が3回3バッチ繰り返されたと報告されている。指定等要請者の報告によれば、それらに携わった従業員は20余名に及ぶが、これらの者に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及び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）

4. 一日摂取量の推計等

指定等要請者によれば、本品目は、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といった食品（群）に直接使用されるものであるとされている。指定等要請者は、当該食品（群）の全てに本品目が別紙3の最大添加率で使用され、全量がそのまま最終食品に移行して消費されるとした場合を想定し、平成18年国民健康・栄養調査から得られる食品（群）の一日摂取量から、本品目の一日摂取量を3.107 mgTOS/人/日と推定している。この値を体重50 kgで除すと0.062 mgTOS/kg体重/日と算出される。（別紙3参照）

さらに、指定等要請者によれば、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も使用されるものであるとされている。指定等要請者は、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4の最大添加率で使用され、全量がそのまま最終食品に移行して消費されるとした場合を想定し、本品目の一日摂取量を8.076 mgTOS/人/日と推定している。この値を体重50 kgで除すと0.162 mgTOS/kg体重/日と算出される。（別紙4参照）

一般的に、本品目を使用済みの食品たん白質素材を原料とした食品（群）に本品目を改めて使用することは想定しにくく、別紙3及び別紙4の推定一日摂取量についてはそれぞれの一部が重複していると考えられる。

他方、上記の推計においては、食品等への最大添加率について一部多めの見積りをしていると考えられるものの、食品等の摂取量については平均値等を用いていることから過少な見積りをしている可能性も否定できない。

以上を総合的に勘案し、本専門調査会としては、安全側に立って過少な推計とならないことを第一に考え、我が国における本品目の推定一日摂取量を別紙3及び別紙4の推定一日摂取量の和、すなわち0.224 mgTOS/kg体重/日と評価した。

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. 米国における評価

米国では、指定等要請者が本品目について GRAS 物質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23）

3. 欧州における評価

EU（フランス及びデンマークを除く。）では、加工助剤たる酵素は添加物として規制されていなかった（インペルターゼ（E1103）及びリゾチーム（E1105）といった酵素については添加物として規制対象とされていた。）。しかしながら、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（参照24）。指定等要請者は、本品目の欧州への供給を開始したとしている（参照2）。

なお、フランスにおいては、2010年5月、AFSSAが本品目に係る製剤について安全性評価を行った結果、指定等要請者の申請した使用条件において消費者に安全性上のリスクを生じないと評価している。（参照57、58、59）

4. 我が国における評価等

本品目のようにたん白質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、60）。

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記載されている。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においては、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であるとされている（参照2）。指定等要請者によれば、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）。

そのほかのたん白質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言われている。（参照2）

以上より指定等要請者は、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

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、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評価した。

本専門調査会としては、本品目の主たる成分が「添加物に関する食品健康影響評価指針」における「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、染色体異常試験においても陰性の結果であり、また、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と評価した。

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原液の NOAEL を、本試験の最高用量である 100%×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。）と評価した。

本専門調査会としては、本品目の有効成分は、既知のアレルゲンとの 8 アミノ酸配列連続一致をはじめとする構造相同性が低いこと、及び人工消化液により速やかに分解することから、そのアレルギー性の懸念は低いと評価した。また、本専門調査会としては、24 kDa 夾雑たん白質は、人工消化液に対して難消化性を示したが、既知のアレルゲンとの 8 アミノ酸配列連続一致をはじめとする構造相同性が低いこと、高用量での経口摂取でも体内にほとんど吸収されないこと、当該たん白質と構造上ホモロジーのある物質の食経験の可能性が示唆されていること、及び改良製造法によって本品目中の含量が数 ppm 程度に低減されると報告されていることから、本品目が添加物として適切に製造・使用され、添加物として摂取される限りにおいては、アレルギー性の懸念は低いと評価した。

本専門調査会としては、ヒトにおける知見として入手したものからは、本品目の安全性上の懸念をもたらすような証拠は得られていないと判断した。

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 NOAEL 93 mgTOS/kg 体重/日と、本品目の推定一日摂取量 0.224 mgTOS/kg 体重/日とを比較して得られる安全マージン（約 400）が、13 週間反復経口投与毒性試験の適切な安全マージンとされる 1,000 を下回ること、本品目は食経験のない微生物を基原とした生産菌株を利用して生産されるものであること、及び本品目はそれが使用された食品中から最終的に取り除かれないものであることを勘案すると、本品目について ADI を特定することが必要と判断した。

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の NOAEL 93 mgTOS/kg 体重/日を根拠とし、試験期間が短いことを考慮して安全係数 1,000 で除して得られる 0.093 mgTOS/kg 体重/日を本品目の ADI とした。

ADI	0.093 mgTOS/kg 体重/日
(ADI 設定根拠資料)	反復投与毒性試験
(動物種)	ラット
(期間)	13 週間
(投与方法)	強制経口
(無毒性量)	93 mgTOS/kg 体重/日
(安全係数)	1,000

別紙 1 : 略称

略称	名称等
ADFS	Allergen Database for Food Safety
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments : 仏食品衛生安全庁
BLG	牛乳の β -ラクトグロブリン
Cbz-Gln-Gly	ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンイルグリシン
CHL/IU	チャイニーズ・ハムスター肺由来培養細胞株
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)
EC	Enzyme Commission : 酵素委員会
EU	European Union : 欧州連合
FARRP	Food Allergy Research and Resource Program
GRAS	generally recognized as safe : 一般的に安全とみなされる
HESI	Health and Environmental Sciences Institute
ILSI	International Life Science Institute : 国際生命科学協会
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives : FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
MALDI-TOFMS	matrix assisted laser desorption ionization-time of flight/mass spectoloscropy : マトリックス支援レーザー脱離イオン化法-飛行時間型質量分析計
NCBI	National Center for Biotechnology Information : 米国立生物工学情報センター
ORF	オープンリーディングフレーム
Ovm	卵白のオボムコイド
RubisCO	ほうれんそうのリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ
SDAP	Structural Database of Allergenic Proteins
SDS-PAGE	SDS-ポリアクリルアミド電気泳動
SGF	simulated gastric fluid : 人工胃液
SIF	simulated intestinal fluid : 人工腸液
TOS	total organic solids : 総有機固形分
WHO	World Health Organization : 世界保健機関

別紙 2 : 各種毒性試験等成績

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	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	<p>緑膿菌株1.1×10⁷ CFU投与群で投与2日後から6日後にかけて6/10匹が死亡したが、投与後14日間において、緑膿菌株1.1×10⁶ CFU投与群のほか対照群及び生産菌株投与群で死亡例はなかったとされている。</p> <p>一般状態については、生産菌株2.9×10⁸ CFU投与群及び生産菌株培養液上清投与群で投与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時間後にはそれらは消失したとされている。緑膿菌株1.1×10⁷ CFU投与群では投与直後から立毛及び斜頸が認められたとされている。</p> <p>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とされている。一方、緑膿菌株1.1×10⁶ CFU投与群では増加抑制が認められ、さらにその1.1×10⁷ CFU投与群では観察期間を通じた低値及び増加抑制が認められたとされている。</p> <p>剖検においては、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異常は認められなかったとされている。一方、緑膿菌株1.1×10⁶ CFU投与群で1/10匹に腎臓の褪色が認められ、さらにその1.1×10⁷ CFU投与群の生存4匹で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とされている。</p> <p>生残菌については、生産菌株投与群ではいずれの器官においても検出されていない。一方、緑膿菌株1.1×10⁶ CFU投与群で1/10匹の腎臓において検出され、さらにその1.1×10⁷ CFU投与群の生存4匹で脳 (1/4匹)、肺 (2/4匹)、肝臓 (2/4匹) 及び腎臓 (4/4匹) において検出されている。</p> <p>病理組織学的検査においては、対照群及び生産菌株2.9×10⁷ CFU投与群で変化は認められなかったが、生産菌株2.9×10⁸ CFU投与群の4/10匹及び生産菌株培養液上清投与群の1/10匹で軽度の肝臓巣状壊死が認められたとされている。緑膿菌株1.1×10⁶ CFU投与群では軽度の肝臓巣状壊死 (5/10匹)、軽度の腎炎 (1/10匹) 及び中等度の化膿性腎盂腎炎 (1/10匹) が認められたとされている。さらにその1.1×10⁷ CFU投与群の生存4匹では軽度の脳髄膜炎 (1/4匹)、軽度～中等度の肝臓巣状壊死 (4/4匹) 及び中等度～重度の化膿性腎盂腎炎 (4/4匹) がみられ、同群の死亡した6匹でも肝臓巣状壊死 (5/6匹)、化膿性腎盂腎炎 (6/6匹) 等が認められたとされている。指定等要請者は、肝臓巣状壊死について、菌体の病原性にかかわらず、その補足・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。</p>	28

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	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	生産菌株投与群では肝臓に限局性かつ散在性の変性壊死 (3/5匹) が認められたが、それらは炎症反応を伴うものではなかったとされている。他方、乳酸菌株投与群では、5匹全ての肝臓に変性壊死が認められ、それらは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、陰性対照群では肝臓に明らかな病変は認められていない。試験担当者は、生産菌株投与群での肝病変は、乳酸菌株投与群でのそれよりも軽度なものであったこと、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がみられており、肝傷害作用のほかに強い免疫刺激能が認められた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 9
	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で死亡例はなかったとされている。生残菌については、いずれの器官においても検出されていない。病理組織学的検査においては、対照群で1/5匹に軽度の肝臓巣状壊死がみられたが、生産菌株投与群で異常所見は認められなかったとされている。そのほか、一般状態、体重及び剖検において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 8
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	生産菌株の培養液 (2.9×10 ⁹ CFU/mL相当) の上清又は菌体破砕後上清中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 8
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であったとされている	3 5
	<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であったとされている。	3 6
	マウス	小核試験	強制経口	雄 5	本品目	~2,000 mg/kg 体重/日	陰性であったとされている。	3 7

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	参照No.
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) × 10 mL/kg 体重	いずれの群でも死亡動物は認められなかったとされている。一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科学的検査、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とされている。尿検査においては、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とされている。これについて試験担当者は、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であると考察している。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/日としている。	38
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、指定等要請者の筑波研究所、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、岐阜研究所内での3Lスケールのジャーファーメンター培養が130回延べ約1,000バッチ、西春工場での800Lスケールのタンク培養が17回延べ約34バッチ、養老工場での55kLスケールのタンク培養が3回3バッチ繰り返されたと報告されている。指定等要請者の報告によれば、それらに携わった従業員は20余名に及ぶが、これらの者に生産菌株の取扱いに起因すると考えられる健康上の異常及び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3：本品目の推定一日摂取量（使用食品（群）摂取量ベース）

指定等要請者は、本品目が直接使用される食品（群）摂取量（平成18年国民健康・栄養調査（参照61）より）を基に、本品目の一日摂取量を以下のように推定している。（参照62）

中分類	小分類	a	b	c	d	e
		一日食品 摂取量	本品目 最大 添加率	本品目 一日 摂取量	本品目由来 TOS 一日摂取量 (c×0.046)	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	0.840	0.039	0.0008
	パン類 (菓子パンを除く。)	30.0	0.020	6.000	0.276	0.0055
	菓子パン類	6.0	0.020	1.200	0.055	0.0011
	うどん、中華めん類	38.4	0.020	7.680	0.353	0.0071
	即席中華めん	4.3	0.020	0.860	0.040	0.0008
	パスタ類	8.0	0.020	1.600	0.074	0.0015
	その他の小麦加工品	4.9	0.020	0.980	0.045	0.0009
大豆・加工品	豆腐	35.2	0.020	7.040	0.324	0.0065
	油揚げ類	8.2	0.020	1.640	0.075	0.0015
	その他の大豆加工品	3.5	0.020	0.700	0.032	0.0006
魚介加工品	魚介（練り製品）	9.8	0.020	1.960	0.090	0.0018
	魚肉ハム、ソーセージ	0.5	0.020	0.100	0.005	0.0001
畜肉	ハム、ソーセージ類	12.4	0.020	2.480	0.114	0.0023
牛乳・乳製品	チーズ	2.3	0.020	0.460	0.021	0.0004
	発酵乳・乳酸菌飲料	21.3	0.020	4.260	0.196	0.0039
	その他の乳製品	8.2	0.020	1.640	0.075	0.0015
	その他の乳類	0.1	0.020	0.020	0.001	0.0000
油脂類	(省略)	10.2	0.020	2.040	0.094	0.0019
菓子類	ケーキ・ペストリー類	7.2	0.020	1.440	0.066	0.0013
	ビスケット類	1.7	0.020	0.340	0.016	0.0003
	キャンデー類	0.3	0.020	0.060	0.003	0.0001
	その他の菓子類	6.0	0.020	1.200	0.055	0.0011
アルコール飲料	ビール	58.6	0.001	0.586	0.027	0.0005
その他の嗜好飲料	茶	310.1	0.001	3.101	0.143	0.0029
	コーヒー・ココア	118.1	0.001	1.181	0.054	0.0011
	その他の嗜好飲料	97.5	0.001	0.975	0.045	0.0009
調味料	しょうゆ	17.5	0.020	3.500	0.161	0.0032
	マヨネーズ	3.2	0.020	0.640	0.029	0.0006
	味噌	12.4	0.020	2.480	0.114	0.0023
	その他の調味料	56.9	0.020	11.380	0.523	0.0105
合計				67.543	3.107	0.062

別紙4：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）

指定等要請者は、本品目が使用される食品たん白質素材の生産量を基に、本品目の一日摂取量を以下のように推定している。（参照6.3）

食品たん白質素材	a	b	c	d	e	f
	生産量 トン/年	一日摂取量 ($a \times 10\%$ (127,692,000 $\times 365$)) g/人/日	本品目 最大 添加率 %	本品目 一日 摂取量 mg/人/日	本品目由来 TOS 一日摂取量 ($d \times 0.046$) mgTOS/人/日	本品目由来 TOS 一日摂取量 ($e/50$) mgTOS/ kg体重/日
カゼイン	6,440	0.138	2.0	2.763	0.127	0.003
カゼイネート	9,265	0.199	2.0	3.976	0.183	0.004
乳清たん白質 (WPC、WPI)	8,660	0.186	2.0	3.716	0.171	0.003
乳たん白濃縮物 (TMP、MPC等)	8,551	0.183	2.0	3.669	0.169	0.003
乾燥卵白	9,555	0.205	2.0	4.100	0.189	0.004
大豆たん白質	42,672	0.916	2.0	18.311	0.842	0.017
小麦たん白質	22,158	0.475	2.0	9.508	0.437	0.009
コーングルテン	292,400	6.274	2.0	125.473	5.772	0.115
ゼラチン	9,453	0.203	2.0	4.056	0.187	0.004
合計				175.574	8.076	0.162

註：

1. 「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。
2. 「WPC」：whey protein concentrateの略。
3. 「WPI」：whey protein isolateの略。
4. 「TMP」：total milk proteinの略。
5. 「MPC」：milk protein concentrateの略。

<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), 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).
- 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(5): 1410-21
- 4 Yamaguchi S and Yokoe M: A novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a newly isolated bacterium from soil. Appl Environ Microbiol 2000; 66(8): 3337-43
- 5 Shimomura K, Kaji S and Hiraishi A: *Chryseobacterium shigense* sp. nov., a yellow-pigmented, aerobic bacterium isolated from a lactic acid beverage. Int J Syst Evol Microbiol 2005; 55(pt.5): 1903-6
- 6 Behrendt U, Ulrich A and Schumann P: *Chryseobacterium gregarium* sp. nov., isolated from decaying plant material. Int J Syst Evol Microbiol 2008; 58(pt.5): 1069-74
- 7 Vanechoutte 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. Int J Syst Evol Microbiol 2007; 57(pt.11): 2623-8
- 8 天野エンザイム(株), *Chryseobacterium* 属の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹, 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 本体図表 6, 2006 年 9 月 22 日 (2010 年 5 月 7 日改定).
- 9 天野エンザイム(株), *Chryseobacterium* 属における本菌株の位置づけ, 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 添付資料 11, 2006 年 9 月 22 日 (2010 年 5 月 7 日改定).
- 10 天野エンザイム(株), 2010 年 3 月以降に報告された *Chryseobacterium* 属の新菌種, 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 1002

号) に対する回答 資料X, 平成 23 年 9 月 6 日.

- 1 1 天野エンザイム(株), 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.
- 1 2 天野エンザイム(株), 本品の製造方法について, 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 資料 1, 平成 22 年 5 月 7 日.
- 1 3 天野エンザイム(株), 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, 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 資料 2, 平成 22 年 5 月 7 日.
- 1 4 天野エンザイム(株), 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 1002 号) に対する回答, 平成 23 年 9 月 6 日.
- 1 5 天野エンザイム(株), 24 kDa 夾雑たん白質の除去工程の確立, 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 1002 号) に対する回答 資料 I, 平成 23 年 9 月 6 日.
- 1 6 天野エンザイム(株), 改良製造法の工程, 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 1002 号) に対する回答 資料 II, 平成 23 年 9 月 6 日.
- 1 7 天野エンザイム(株), 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, 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 資料 6, 平成 22 年 5 月 7 日.
- 1 8 厚生労働省医薬局食品保健部企画課長・監視安全課長, アレルギー物質を含む食品に関する表示について, 別添 2 B-13 (平成 13 年 3 月 21 日食企発第 2 号・食監発第 46 号) (平成 20 年 6 月 3 日食安基発第 0603001 号・食安監発第 0603001 号により一部改正).
- 1 9 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.

-
- 20 天野エンザイム(株), 24 kDa 夾雑たん白質のアミノ酸配列解析, 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 資料 7, 平成 22 年 5 月 7 日.
- 21 天野エンザイム(株), 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*), 食品添加物の指定要請添付資料 *Chryseobacterium proteolyticum* 9670 株由来のプロテイングルタミナーゼ 添付資料 16, 2006 年 9 月 22 日 (2010 年 5 月 7 日改定).
- 22 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
- 23 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, 食品添加物の指定要請添付資料 *Chryseobacterium proteolyticum* 9670 株由来のプロテイングルタミナーゼ 添付資料 13, 2006 年 9 月 22 日 (2010 年 5 月 7 日改定) .
- 24 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
- 25 Pariza MW and Johnson EA: Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. Regul Toxicol Pharmacol 2001; 33(2): 173-86
- 26 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
- 27 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
- 28 天野製薬(株)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 -, 2000年4月18日, 食品添加物の指定要請添付資料 *Chryseobacterium proteolyticum* 9670株由来のプロテイングルタミナーゼ 添付資料1, 2006年9

月22日（2010年5月7日改定）.

- 2⁹ 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ン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，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ンナーゼの提出依頼補足資料」（府食第1002号）に対する回答 資料5，平成22年5月7日.
- 3⁰ 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
- 3¹ Fischer LJ, Weyant RS, White EH and Quinn FD: Intracellular multiplication and toxic destruction of cultured macrophages by *Capnocytophaga canimorsus*. *Infect Immun* 1995; 63(9): 3484-90
- 3² 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. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004; 39(2): 87-98
- 3³ The United States Pharmacopeia (USP) (ed.), The United States Pharmacopeia 28 – the National Formulary 23, 2005; p.2858.
- 3⁴ 天野エンザイム(株)，人工胃液、人工腸液による消化性試験，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ンナーゼ 添付資料4，2006年9月22日（2010年5月7日改定）.
- 3⁵ 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, 2004a, 天野エンザイム(株)社内資料，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ンナーゼ 添付資料6，2006年9月22日（2010年5月7日改定）.
- 3⁶ 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, 2004b, 天野エンザイム(株)社内資料，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ンナーゼ 添付資料7，2006年9月22日（2010年5月7日改定）.
- 3⁷ 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 –, October 23, 2006, 天野エンザイム(株)社内資料, 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 添付資料 8, 2006 年 9 月 22 日 (2010 年 5 月 7 日改定).
- 3 8 (株)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)社内資料, 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 添付資料 5, 2006 年 9 月 22 日 (2010 年 5 月 7 日改定).
- 3 9 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.
- 4 0 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; pp.1-15.
- 4 1 天野エンザイム(株), 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, 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 本体図表10, 2006 年9月22日 (2010年5月7日改定) .
- 4 2 天野エンザイム(株), 連続 6 アミノ酸一致部位の分析, 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 添付資料 12, 2006 年 9 月 22 日 (2010 年 5 月 7 日改定).
- 4 3 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.
- 4 4 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
- 4 5 天野エンザイム(株), 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, 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 添付資料 10, 2006 年 9 月 22 日 (2010 年 5 月 7 日改定).
- 4 6 天野エンザイム(株), 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, 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
本体図表11～14, 2006年9月22日 (2010年5月7日改定) .

- 47 天野エンザイム(株), 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, 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 資料 8, 平成 22 年 5 月 7 日.
- 48 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 Eng* 2002; 15(8): 635-42
- 49 天野エンザイム(株), 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, 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 資料 9, 平成 22 年 5 月 7 日.
- 50 天野エンザイム(株), 24 kDa 夾雑たん白質の人工胃液による消化性評価, 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 資料 11, 平成 22 年 5 月 7 日.
- 51 天野エンザイム(株), 24 kDa 夾雑たん白質の人工腸液による消化性評価, 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 資料 12, 平成 22 年 5 月 7 日.
- 52 天野エンザイム(株), 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, 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 資料 14, 平成 22 年 5 月 7 日.
- 53 天野エンザイム(株), 24 kDa 夾雑たん白質の消化管吸収の可能性についての検討, 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 1002 号) に対する回答 資料IV, 平成 23 年 9 月 6 日.
- 54 積水メディカル(株)薬物動態研究所, 試験計画書, 24 kDa たん白質の吸収試験 (Study No.AE-6563), 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 1002 号) に対する回答 資料V, 平成 23 年 9 月 6 日.
- 55 積水メディカル(株)薬物動態研究所, 最終報告書, 24 kDa たん白質の吸収試験 (Study No.AE-6563), 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 1002 号) に対する回答 資料VI, 平成 23 年 9 月 6 日.
- 5 6 天野エンザイム(株), 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, 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 1002 号) に対する回答 資料III, 平成 23 年 9 月 6 日.
- 5 7 AFSSA, Avis, de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une protéine glutaminase issue d'une souche de *Cryseobacterium proteolyticum* non génétiquement modifiée, pour une modification des propriétés technologiques des protéines dans des ingrédients à base de protéines et des denrées alimentaires, Afssa-Saisine n° 2010-SA-0016, Maisons-Alfort, le 4 Mai 2010, 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 1002 号) に対する回答 資料VII, 平成 23 年 9 月 6 日.
- 5 8 天野エンザイム(株), AFSSA Letter 2010-SA-0016 日本語訳, 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 1002 号) に対する回答 資料VIII, 平成 23 年 9 月 6 日.
- 5 9 天野エンザイム(株), AFSSA Letter 2010-SA-0016 における安全マージンの算出について, 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 1002 号) に対する回答 資料IX, 平成 23 年 9 月 6 日.
- 6 0 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
- 6 1 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.
- 6 2 天野エンザイム(株), 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), 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 本体図表 17, 2006 年 9 月 22 日 (2010 年 5 月 7 日改定).
- 6 3 天野エンザイム(株), 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), 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 本体図表 16, 2006 年 9 月 22 日 (2010 年 5 月 7 日改定).