

(案)

特定保健用食品評価書

朝食プロバイオティクスヨーグルト
Bifix

2014年12月

食品安全委員会新開発食品専門調査会

目 次

| | 頁 |
|--|---|
| <審議の経緯>..... | 2 |
| <食品安全委員会委員名簿>..... | 2 |
| <食品安全委員会新開発食品専門調査会専門委員名簿> | 2 |
| 要 約..... | 3 |
| I. 評価対象品目の概要..... | 4 |
| 1. 製品..... | 4 |
| 2. 関与成分..... | 4 |
| 3. 作用機序等..... | 4 |
| II. 安全性に係る試験等の概要..... | 4 |
| 1. 食経験..... | 4 |
| 2. <i>in vitro</i> 及び動物を用いた <i>in vivo</i> 試験..... | 4 |
| (1) 復帰突然変異試験..... | 4 |
| (2) 単回強制経口投与試験..... | 5 |
| (3) 28日間反復強制経口投与試験..... | 5 |
| 3. ヒト試験..... | 5 |
| (1) 12週間連続摂取試験（対象者：健常者）..... | 5 |
| (2) 4週間連続 4.5倍過剰摂取試験（対象者：健常者）..... | 6 |
| 4. その他..... | 6 |
| (1) <i>B. lactis</i> GCL2505の腸内での定着性について（対象者：健常者）... | 6 |
| (2) バクテリアルトランスロケーションの可能性について..... | 7 |
| (3) 抗生物質耐性遺伝子の存在及びその伝播の可能性について..... | 7 |
| III. 食品健康影響評価..... | 8 |
| <参照>..... | 9 |

<審議の経緯>

- 2014年 4月 15日 内閣総理大臣から特定保健用食品の安全性の審査に係る食品健康影響評価について要請（消食表第70号）、関係書類の接受
- 2014年 4月 22日 第512回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2014年 5月 16日 第97回新開発食品専門調査会
- 2014年 7月 30日 第99回新開発食品専門調査会
- 2014年 12月 2日 第540回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

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

<食品安全委員会新開発食品専門調査会専門委員名簿>

清水 誠（座長）
尾崎 博（座長代理）
石見佳子 酒々井眞澄
磯 博康 林 道夫
梅垣敬三 平井みどり
漆谷徹郎 本間正充
奥田裕計 山本精一郎
小堀真珠子 脇 昌子
佐藤恭子

（専門参考人）

五十君静信（第99回新開発食品専門調査会）

要 約

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* GCL2505 を関与成分とし、「腸内環境を改善し、おなかの調子を整える」旨を特定の保健の用途とするはっ酵乳である「朝食プロバイオティクスヨーグルト BifiX」について、申請者作成の資料を用いて食品健康影響評価を実施した。

本食品一日当たりの摂取目安量 100 g 中に含まれる関与成分は、*B. lactis* GCL2505 10 億個以上である。

本食品の評価では、食経験、細菌を用いた復帰突然変異試験、ラットを用いた単回強制経口投与試験及び 28 日間反復強制経口投与試験、ヒト試験（健常者を対象とした 12 週間連続摂取試験及び 4 週間連続 4.5 倍過剰摂取試験）、その他の試験等を用いた。

上記試験結果等を用いて評価した結果、「朝食プロバイオティクスヨーグルト BifiX」については、提出された資料に基づく限りにおいて安全性に問題はないと判断した。

I. 評価対象品目の概要

1. 製品

- (1) 商 品 名：朝食プロバイオティクスヨーグルト BifiX
(申請者：グリコ乳業株式会社)
- (2) 食 品 の 種 類：はっ酵乳
- (3) 関 与 成 分：*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505
10 億個以上¹
- (4) 一日摂取目安量：100 g
- (5) 特定の保健の用途：腸内環境を改善し、おなかの調子を整える

2. 関与成分

本食品の関与成分は *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505 (以下 *B. lactis* GCL2505 という。) であり、*B. lactis* はビフィズス菌の中で他の菌種に比べ有意に高い胃酸耐性を有している (参照 1)。

3. 作用機序等

ヒトを対象とした試験により、*B. lactis* GCL2505 が生きた状態で腸まで到達することによって、腸内の総ビフィズス菌数及びビフィズス菌占有率が増加し、腸内環境を改善することで、排便が促進されることが示唆された (参照 2、3)。

II. 安全性に係る試験等の概要

1. 食経験

B. lactis は、世界各地においてはっ酵乳の製造に使用されてきたビフィズス菌である。また、*B. lactis* GCL2505 は、2008 年より申請者の複数のはっ酵乳製品に使用されている菌株である。これまでに 4 億食以上の販売実績があり、健康被害等は報告されていないとしている。

2. *in vitro* 及び動物を用いた *in vivo* 試験

(1) 復帰突然変異試験

B. lactis GCL2505 (3.1×10^9 cfu/mg) について、*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 株並びに *Escherichia coli* WP2uvrA 株を用い、5,000 µg/plate を最高用量として復帰突然変異試験が実施されており、代謝活性化系 (S9mix) の有無にかかわらず、結果は全て陰性であった (参照 4)。

¹ 100 g 当たり

(2) 単回強制経口投与試験

SD ラット（一群雌雄各 5 匹）を用いた強制経口投与（*B. lactis* GCL2505（ 1.3×10^9 cfu/mg）：0、200、2,000 mg/kg 体重）による単回強制経口投与試験が実施された。

その結果、死亡例はなく、一般状態、体重及び剖検所見に被験物質投与による異常は認められなかった（参照 5）。

(3) 28 日間反復強制経口投与試験

SD ラット（一群雌雄各 6 匹）を用いた強制経口投与（*B. lactis* GCL2505（ 1.3×10^9 cfu/mg）：0、20、400 mg/kg 体重/日）による 28 日間反復強制経口投与試験が実施された。

その結果、死亡例はなく、一般状態では雌雄の対照群及び雄の 400 mg/kg 体重/日群の各 1 例で投与 17~21 日に前肢の痂皮形成が観察されたが、その後回復した。雌の 20 mg/kg 体重/日群の 1 例で投与 21 日に軟便がみられたが、一過性であった。体重及び摂餌量は観察期間を通じて、雌雄とも被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。尿検査は、雌雄とも被験物質投与群と対照群との間に全検査項目で有意差は認められなかった。血液検査では雄の 20 mg/kg 体重/日群では対照群と比較して、クレアチニンの有意な高値が認められたが、用量に関連した変化ではなかった。また、雌の 400 mg/kg 体重/日群では対照群と比較して、アルブミン/グロブリン比の有意な低値が認められたが、軽微な変化であり、総タンパク及びアルブミンとも正常値の範囲内であったことから、毒性学的意義の乏しい変化であると考えられた。器官重量は雌雄とも被験物質投与群と対照群を比較して各検査器官の絶対重量及び相対重量に有意差は認められなかった。剖検所見及び病理組織学的検査に異常は認められなかった（参照 6）。

3. ヒト試験

(1) 12 週間連続摂取試験（対象者：健常者）

健常成人男女 30 名を対象に、本食品（*B. lactis* GCL2505 を 1.0×10^7 cfu/g 以上含有するはっ酵乳；100 g/日）又は対照食（*B. lactis* GCL2505 を含まないはっ酵乳；100 g/日）を 12 週間摂取させるランダム化二重盲検並行群間比較試験が実施された。なお、試験途中で 1 名が試験を中止したため、試験完了被験者は 29 名であった。

その結果、体重及び BMI について、摂取開始時との比較において有意な変動が散見されたが、いずれも生理的変動の範囲内であった。拡張期血圧及び脈拍数について、摂取開始時との比較において有意な変動が散見されたが、いずれも基準値内の変動であった。血液検査について、摂取開始時又は対照食群との比較において有意な変動が散見されたが、いずれも基準値の範囲内であった。尿検査について、本食品群と対照食群との間に有意な差は認められなかった。便中総ビフィズス菌数について、本食品群の摂取 12 週後には摂取開始時と比

較して有意に高値であった。問診及び自他覚症状について、問題となる所見は認められなかった。

有害事象として、本食品群では風邪（3例）、痒みを伴う湿疹、膀胱炎、倦怠感、足のイボ、めまい・吐き気及び腹痛（各1例）、対照食群では風邪、鼻水、便秘気味及び下痢を伴う腹痛（各1例）が認められた。本食品との因果関係は、めまい・吐き気のみ「多分関連なし」とし、その他の事象は「関連なし」としている（参照7）。

（2）4週間連続4.5倍過剰摂取試験（対象者：健常者）

健常成人男女30名を対象に、本食品（*B. lactis* GCL2505を 1.0×10^7 cfu/g以上含有するはっ酵乳）を摂取目安量の4.5倍（450g/日）又は対照食（*B. lactis* GCL2505を含まないはっ酵乳；450g/日）を4週間摂取させるランダム化二重盲検並行群間比較試験が実施された。

その結果、収縮期血圧及び脈拍数について、摂取開始時との比較において有意な変動が散見されたが、いずれも生理的変動の範囲内であった。血液検査でも、摂取開始時又は対照食群と比較して有意な変動が散見されたが、いずれも基準値内の変動であった。尿検査、問診及び自他覚症状について、問題となる所見は認められなかった。

有害事象として、本食品群では風邪（2例）、軟便及びあせも（各1例）、対照食群では下痢（1例）が認められた。本食品との因果関係は、軟便のみ「多分関連なし」とし、その他の事象は「関連なし」としている（参照8）。

4. その他

（1）*B. lactis* GCL2505の腸内での定着性について（対象者：健常者）

*B. lactis*を保有していないことを確認した健常成人男性17名を対象に、*B. lactis* GCL2505（ $1 \times 10^{9.3}$ 又は $1 \times 10^{10.3}$ cfu/100 mL）を含有する飲料100 mLを単回摂取させ、摂取1、2、3、4及び7日後の便を採取し、糞便中の*B. lactis* GCL2505の菌数を測定した。

その結果、糞便中の*B. lactis* GCL2505の菌数は摂取1日又は2日後に最大となり、その後減少した。摂取7日後には、 $1 \times 10^{9.3}$ cfu/100 mL群では8名中3名で、 $1 \times 10^{10.3}$ cfu/100 mL群では9名中8名で、*B. lactis* GCL2505は検出されなかった。以上より、*B. lactis* GCL2505の腸管定着性は一過性であることが示唆された（参照3）。

(2) バクテリアルトランスロケーションの可能性について

B. lactis GCL2505 のバクテリアルトランスロケーションの可能性について、*in vitro* でのムチン分解性試験²及び動物への過剰投与試験により評価した。

ムチンを炭素源とする液体培地での生育試験、SDS-PAGE によるムチン分解産物の確認試験及び平板培地上でのムチン分解能の確認試験を実施した結果、*B. lactis* GCL2505 はムチン分解活性がないことが示された。

また、BALB/c マウス（一群雌雄各 6 匹）に、生理食塩水又は生理食塩水に懸濁した *B. lactis* GCL2505 (2.5×10^{10} 又は 2.5×10^{11} cfu/kg 体重/日) を 7 日間強制経口投与後、と殺及び解剖し、肝臓、脾臓、腎臓及び腸間膜リンパ節を採取した。各臓器のホモジネート及び血液を BL 寒天培地に塗抹し嫌気培養後、検出されたコロニーが *B. lactis* GCL2505 であるかをリアルタイム PCR により判別した。その結果、*B. lactis* GCL2505 は検出されなかった。

以上より、申請者は、*B. lactis* GCL2505 のバクテリアルトランスロケーションの可能性は極めて低いと考えられるとしている（参照 9）。

(3) 抗生物質耐性遺伝子の存在及びその伝播の可能性について

抗生物質存在下で *B. lactis* GCL2505 の培養を行い、*B. lactis* GCL2505 の最小発育阻止濃度（MIC 値）を求め、同一亜種の菌株との比較を行った。その結果、*B. lactis* GCL2505 は数種の抗生物質に対して耐性を示したが、申請者は、これらの抗生物質への耐性は、同一属内及び同一亜種と比較して特異的に高い耐性は保有していないことから、獲得耐性ではなく自然耐性であると考え、*B. lactis* GCL2505 は獲得耐性遺伝子を持たないと考えられるとしている。また、文献等から、*Bifidobacterium* 属がプラスミドを保有する頻度は一般的に低いこと、及びこれまでに *B. lactis* からプラスミドの存在は確認されていないことから、*B. lactis* GCL2505 が可動性の高い遺伝因子であるプラスミドを保有する可能性は極めて低いと考えられるとしている。

以上より、申請者は、*B. lactis* GCL2505 における抗生物質耐性遺伝子の水平伝播の可能性は極めて低いと考えられるとしている（参照 10）。

² 腸管壁の表面に存在するムチンが細菌のトランスロケーションを防ぐのに重要であることが報告されている。

Ⅲ. 食品健康影響評価

参照に挙げた資料を用いて「朝食プロバイオティクスヨーグルト BifiX」の食品健康影響評価を実施した。

食経験、細菌を用いた復帰突然変異試験、ラットを用いた単回強制経口投与試験及び 28 日間反復強制経口投与試験、ヒト試験（健常者を対象とした 12 週間連続摂取試験及び 4 週間連続 4.5 倍過剰摂取試験）、その他の試験等において、問題となる結果は認められなかった。

上記試験結果等を用いて評価した結果、「朝食プロバイオティクスヨーグルト BifiX」については、提出された資料に基づく限りにおいて安全性に問題はないと判断した。

<参照>

1. Masco L, Crockaert C, Van Hoorde K, Swings J and Huys G: In vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of *Bifidobacterium*. *J Dairy Sci.* 2007; 90(8): 3572-3578
2. ビフィズス菌 GCL2505 株はお腹の中で増える 2008 (社内報告書)
3. Ishizuka A, Tomizuka K, Aoki R, Nishijima T, Saito Y, Inoue R, et al.: Effects of administration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505 on defecation frequency and bifidobacterial microbiota composition in humans. *J Biosci Bioeng.* 2012; 113(5): 587-591
4. A11-05F の細菌を用いる復帰突然変異試験 2012 (試験報告書)
5. A11-05F のラットを用いる単回経口投与毒性試験 2008 (試験報告書)
6. A11-05F のラットを用いる4週間反復経口投与毒性試験 2008(試験報告書)
7. ビフィズス菌含有ヨーグルトの長期摂取安全性確認試験 2012 (試験報告書)
8. ビフィズス菌含有ヨーグルトの過剰摂取安全性確認試験 2012 (試験報告書)
9. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505 のバクテリアトランスロケーションの可能性について 2013 (社内報告書)
10. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505 の抗生物質耐性遺伝子の存在および伝播の可能性について 2013 (2014 改訂) (社内報告書)