

平成14年度 食品添加物安全性再評価等の試験検査

食品添加物規格策定

(既存添加物の規格基準の設定)

— 食品用酵素の海外における規制

及び指針に関する調査報告 —

平成15年3月

日本食品添加物協会

専務理事 福江 紀彦

食品用酵素提案のための資料に関する指針

(1991年4月11日)

はじめに

本指針の対象は、食品製造に用いることを目的とする酵素剤である。食品用酵素剤は加工助剤 processing aids として用いられるものと真の食品添加物 true food additives として用いられる場合とがある。この使用方法の違いによる区別は管理上重要な場合もあるが、毒物学的には、両カテゴリーとも酵素剤が食品中に残留する可能性があることを考慮すると、区別して扱うものではないと考えられる。

本指針は、Scientific Committee for Food (SCF) が食品用酵素剤の使用の安全性評価を行なう際に最低限必要な情報と考えるものである。特定の酵素剤の評価において、不適当と思われる要求項目があるときには、十分な根拠の提示があれば省略できる場合もある。

酵素剤の使用に関する安全性問題は次のカテゴリに分けられる。

1. 酵素剤（即ち、活性酵素それ自体、及び全ての副生物や汚染物質を含む）の毒物学的特性

酵素剤中に毒性を持つ汚染物質（例えば、微生物基原の酵素ではマイコトキシンや抗生物質）が含まれないことを確実にするための注意が払われなければならない。

一定した品質と安全性を持つ製品の確保には次のことが必要である：

- a) 適切な品質保証チェックを含む生産工程規格
- b) 基原原料又は基原生物の性質が時間とともに変化しないことを確実にする

2. 酵素の消費量

酵素消費量は、食品への添加量、人によって摂取される食品中の濃度、酵素が使用されていると考えられる食品の種類及びそれらの食物が人によって摂取される頻度に依存する。

3. 最終製品中の酵素活性によって生じるアレルギーや刺激

これは主として高濃度の酵素剤を取扱う仕事に従事する者の健康に関わる問題であるとみなされる。消費者が酵素処理された食品の摂取によってアレルギーが誘引されるという傾向はこれまでみとめられていない。

4. 最終食品中での酵素処理に起因する意図しない反応生成物（例えば、histidine の histamine への変換）

これにより健康への悪影響の可能性が考えられる場合は、申請資料に記載すること。

5. 基原微生物の安全性

市販の酵素剤中に基原微生物の生菌が混入してはならないことから、病原菌使用の問題は主として酵素の生産に従事する者の健康に関わる問題である。しかし一般原則として病原菌は食品用の酵素の生産に使用すべきではない。

酵素剤の毒物学的特性から、動・植物の食用の部分为原料とする酵素は一般に健康上の問題はないと考えられる。標準的な使用で予測される消費で、その原料動・植物の通常の消費より多量の成分の摂取が生じない限りは、十分な化学的、微生物学的規格の他に安全性に関する特別な書類は不要である。

微生物由来酵素では、最終製品中に残存する恐れのある毒物を生成しない基原微生物を確保することが大変重要である。また、毒性試験は個々の生産菌毎に行なわれるべきである。なぜならば：

1. 同じ種の菌でも菌株によって異なった動向を示すことがある。微生物では同じ種に属する菌株で無害なものと同様に有毒なものがあることが知られている。
2. 単離されたカビ類、特に *Penicillium* と *Aspergillus* で、同定が正しくないことがたびたびあった。即ち、カビでは菌株があやまって分類同定されている恐れがある。例として、*A. oryzae* であるかアフラトキシン生産性のある *A. flavus* であるかの同定が困難なケースなどがこれまでにあった。単利された菌株が誤って同定される恐れがある限り、使用する微生物を正しく同定し、疑いのある場合には独立した認定研究機関による検証を受けることが非常に重要である。
3. 微生物のトキシン生産性（毒素の種類や生産量）は、培地成分、pH、温度、培養時間等の培養環境ファクターに依存する。従って、ある条件下で毒素を生産しない微生物が他の条件下では毒素を生産するという恐れもある。
4. 酵素生産性の最大化・最適化のために行なう基原微生物の継続的な選抜プロセスは、毒性の無い菌株を有毒な菌株に変える可能性を増大する自然発生的突然変異のおこる確率を高める危険性を持つ。
5. 食品用酵素の生産に遺伝子改変の新技术が応用される可能性は高い。望ましい特徴を導入する際にトキシン生産性を持ち込む可能性がある。従って宿主、ベクター、挿入物の性質、遺伝子構成の性質を明確にし、評価する必要がある。（「2.4 提出すべき情報」の項参照）

食品用酵素剤の評価に必要な情報について

管理上のデータ：

申請者名、酵素製造者名、申請書責任者名

技術的データ：

1. 活性成分

- 1.1. 主要酵素活性を、系統名と EC 番号によって性質を明確にする。
- 1.2. 酵素剤の活性は個別の酵素の触媒する反応に従って測定し、通常、単位重量あるいは単位容量あたりの活性単位数で表す。市場では、製品の活性を、目的の効果を達成するために一定量の食品に添加する酵素剤の量として表すことがある。
- 1.3. 副酵素活性のリスト、それらが有効な機能を発揮しようが、しまいが

2. 基原原料

有害性を持つ恐れのある成分を含む可能性が高い基原を用いる場合、酵素剤がその成分を含有しないことを明らかにする必要がある（8.6 参照）。

- 2.1. 動物由来原料：用いられる動物ならびにその部位を特定すること。酵素の調製に使用される動物組織は食肉検査の要求事項に適合し、優良衛生規範に基づいて処理されなければならない。
- 2.2. 植物由来原料：用いられる植物ならびにその部位を特定すること。
- 2.3. 酵素剤の基原微生物としては、野生株または変異株、あるいは選択的培養または遺伝子的改変によって得られる変異株が用いられる。基原微生物は単離された安定な菌株、またはその変異株で、個別の規格基準において酵素剤の基原として特定できるように同定検索表に基づいて性質を明確にしなければならない（「はじめに」の微生物由来酵素に関する事項の第2点目を参照のこと）。

酵素生産菌の類型菌株 type culture は、その性質が変化しない条件で保存しなければならない。また、酵素剤の製造に用いる時には、バッチ毎の一貫性と再現性を確保できる方法と培養条件を用いる。これらの方法により、基原微生物のトキシンの非生産性を確保し、また、有毒物質やその他の望ましくない物質を生成しうる微生物の混入を防止しなければならない。

2.4. 遺伝子組換え生物

規格には宿主、ベクター（プラスミド）とベクターまたは染色体に導入されるDNA配列に関する情報を含むこと。植物、動物、微生物にかかわらず、供与体生物についても同定する。

関連する遺伝子構造についての詳細な知見により、宿主本来の遺伝子と挿入遺伝子間の望ましくない相互作用を予測できるようにすることが重要である。ヒトの健康、動物、植物、生態系への好ましからざる影響の予測のためには、遺伝子構造に関するデータ、即ち、宿主染色体遺伝子上にプラスミドや外来遺伝子由来のDNAの存在についての情報、特定の遺伝子の性質（マーカー）、突然変異によって発現する可能性のある休眠中の遺伝子の存在、遺伝的安定性（突然変異の起こる確率と変異を誘発する要因、分子間及び分子内組換えの起こり易さ、制限障壁）に関する情報、遺伝子の移動性（移動性、接合性）、耐性（抗生物質耐性、重金属耐性）に関する情報が有用である。

あるベクターの導入により宿主微生物の安全性レベルが向上するか低くなるかの評価はそのベクターについての正確な同定と生物学的知見に基づいてなされる。ベクターの性質を、DNAレベル（サイズ、制限酵素地図、全DNA配列）と遺伝子的性質（ベクターに

存在する遺伝子、マーカー遺伝子等)について明らかにすること。ベクターは、非接合型且つ非移動性で、有害な配列が含まれていてはならない。

宿主生物に挿入されるDNA配列は分子レベル、挿入遺伝子数、およびレギュレーションのタイプ(プロモーター活性)と遺伝子生産物に関して性質を明らかにすること。適切な安全性評価のためには構築遺伝子の供与体の特定、系統に関する正確な情報が必要である。

組換え体生産物の評価は、宿主、ベクター、挿入物について検討し、また最終生産物による危害はそれらの一つ一つの要素の単純な足し算以上の影響となる可能性があることを考慮に入れ「ケースバイケース」で行う。

3. 製造工程

- 3.1. 製造の方法に関する適切な情報：微生物基原の場合、発酵培地並びに発酵条件についての情報を明示すること。用いる成分は全て食品グレード品質でなければならない。
- 3.2. 精製の方法に関する情報を提出すること。

酵素剤の製造工程あるいは精製工程に変更が生じた場合は、変更によって最終製品が前の手順によって製造されたものと変わらないことを示さない限り、新規なもののみなされる。

4. 担体およびその他の添加物と成分

- 4.1. 酵素剤の製造、流通、応用のために用いられる担体、希釈剤、賦形剤、支持体その他の添加物や成分(加工助剤を含む)についての情報を示すこと。これらの物質は、酵素剤が応用される食品への使用が認められている物質、あるいは不溶性で、酵素処理し消費される前に食品から除去されるものでなければならない。
- 4.2. 固定化酵素剤に用いられる担体と固定化剤は関連する用途への使用が認められているものでなければならない。新しい物質の使用にあたっては、有害な残渣が食品中に漏れ出ないことを試験により証明すること。固定化剤あるいは酵素の漏出が個別の規格に定める範囲内であることを試験で確認すること。
- 4.3. 基原より得られた酵素剤の割合と、希釈剤やその他の添加物等原材料成分とを区別するために総有機固形分(T.O.S)の項目を個別規格に入れる場合もある。

$$\text{T.O.S. (\%)} = 100 - (\text{A} + \text{W} + \text{D})$$

A : 灰分 (%)

W : 水分 (%)

D : 希釈剤, 添加剤, その他の成分 (%)

T.O.S. は純粋な活性成分(即ち酵素含量)の比率として表わす場合もある。その値はほぼ1に近い数値と推測される。

5. 使用法

使用方法について次の情報を示すこと：

- 5.1. 酵素の技術的機能効果
- 5.2. 酵素を応用する食品の種類
- 5.3. 用途毎の酵素剤の最大使用量

6. 食品中での安定性と最終の状態

次の情報を示すこと：

- 6.1. 最終食品中での酵素剤量（活性酵素およびその他の構成成分）。
- 6.2. 主反応生成物と、食品の酵素処理あるいは保存中に生成する可能性のある、食品の通常成分ではない反応生成物（「はじめに」の一般的安全性に関する事項の第4点目を参照のこと）。
- 6.3. 栄養学的効果

一般的要求項目並びに規格

7. 衛生

- 7.1. 酵素剤は優良食品製造規範に基づいて製造しなければならない。酵素剤の基原微生物の保存菌株は定期的検査を行い純度を確保する（2.3 参照）。
- 7.2. 食品へ酵素剤を加えることにより食品中の総微生物数が増加してはならない。

8. 汚染物質

- 8.1. 重金属：酵素剤は、鉛、カドミウム、ヒ素、水銀等の重金属を毒物学的に有意な量含んではならない。重金属の実際の含有量は酵素剤毎に明示する。
- 8.2. 微生物汚染：
 - ・ 病原性菌(*Salmonella*, *Shigella*, 大腸菌, *Listeria*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens*)は検出されてはならない。
 - ・ 大腸菌群は1 g 当たり 30 以下（たとえば ISO4837 による）
 - ・ 総生菌数は1 g 当たり 10^2 - 10^4 以下
- 8.3. 最終製品に生産菌の生菌が存在しないことを検査で確認する。
- 8.4. 酵素剤が抗菌活性を含まないことを検査で確認する。
- 8.5. 酵素剤中にトキシンが検出されてはならない。基原生物にトキシン生産性があることが知られている場合、そのトキシンが含まれないことを適当な方法で示すこと。

使用上の安全性に関する情報

9. 基本的な毒物学的要求項目

9.1. 動・植物の可食部位から得られる酵素は通常毒性試験は不要である。一般的可食部位ではないと思われる部分を使用され、且つその安全性に関する情報が不十分である場合には、毒性試験が要求されることがある。

9.2. 微生物由来酵素剤に関して通常要求される試験項目：

a) げっ歯類に対する90日間経口毒性試験

b) その他

1. 細菌を用いた変異原性試験

2. 染色体異常試験（インビトロ試験が望ましい）。

毒性試験に用いる試料は、できれば精製工程後の担体や希釈剤等加えて製剤化する直前から取ったサンプルを用いて行う。試験は原則として確立された指針（E C/O E C Dの指針、参考文献8および11）に基づいて行う。しかし、酵素が蛋白質であることから、また酵素の活性特性によっては、特にインビトロ試験では標準試験プロトコルに若干の修正が必要とされることもある。十分な説明がつけば、このような修正は可能である。

この毒性試験システムは、不特定の毒性反応を見つけ出し、遺伝毒物学的影響を明らかにすることを意図している。一般規格と毒性試験の両方の情報をあわせることによって、生産物の既知のトキシンと未知の毒物質の両方の存在についての評価ができる。

毒性試験報告書には、試験に用いた試料が技術資料に記載の市販製品に用いられる酵素原体であることを明示する。

10. 基本的毒性試験要求項目の免除

毒物学の見地から、微生物由来酵素は個別の酵素剤について毒性試験を行なう必要がある。

10.1. しかしながら、1つの酵素剤について徹底的に試験がなされており、製造工程がほとんど同じであるならば、同じ菌株に由来する酵素剤については全毒性試験の一部が免除される場合がある。ケースバイケースで判断するものとする。

10.2. 酵素剤の製造に用いられた微生物が、

- 食品用途に長期間安全に使用された歴史を持ち、
- 毒素生産性でないことが報告されている種に属しており、

且つ

- 実際の使用菌株の由来の記録が十分になされている場合

には、毒性試験が不要と判断される場合もある。この場合、基原生物が正しく同定され、検証されていることが特に重要になる。

現在、当委員会がこのような条件を満たす微生物の例として認めるのは *Saccharomyces cerevisiae* のみである。

ただし、このような基原の酵素剤であっても一般規格は満たすものでなければならない。

- 10.3. ある菌株を用いて生産した酵素剤が毒性試験に基づいた承認を受けている場合で、同菌株の変異株を生産に用いるケースでは、包括的毒性試験の一部を省略できる場合もある。省略できると考える正当な理由をケース毎に提供すること。
- 10.4. 固定化酵素剤の場合、毒性試験に基づく承認を受けた酵素剤を、適切な毒性試験に基づく承認を受けている技術を用いて固定化した場合には、固定化酵素剤からの成分の漏出が許容範囲内であることを示す分析データがあれば、追加の毒性試験が必要のない場合もある。
- 10.5. 十分に特定された非毒素生産性遺伝子組み換えの原料生物を食品用酵素剤の生産に導入することにより、極めて高純度で、特異性の高い酵素を生産することが将来可能になる。酵素剤の高純度、高特異性が明示されれば、全毒性試験の一部を省略できる場合もある。

以上は毒性試験を一部免除できる可能性のある場合について述べたが、一方で、基本の毒性試験により問題性が浮かび上がってきた場合には、追加の毒性試験が要求されることもある。

使用上の安全性の評価

委員会はこれらの技術的・毒物学的データに基づいて酵素剤の使用の安全性を確保する。これらの情報より個別の酵素剤について許容可能な使用条件を特定したり、場合によっては、げっ歯類を用いる亜慢性毒性試験結果より得られるNOELに安全性ファクターを乗じて、許容1日摂取量を設定することもできる。

評価は提出書類に記載の製品に限定して行ない、異なる基原生物や異なる工程によって生産される同じ酵素剤を自動的に包括するものではない。

参考文献

(略)