

平成15年度 食品・添加物等規格基準に関する試験検査等

食品添加物規格基準策定

(既存添加物の規格基準の設定)

— 食品用酵素剤の添加物指定に関する指針(案) —

調査報告書

平成16年3月

日本食品添加物協会

専務理事 福江 紀彦

食品加工において使用される微生物酵素剤の安全性の評価：新世紀に向けての改訂¹

Michael W. Pariza² and Eric A. Johnson

〒53706 米国ウィスコンシン州マディソン,

ウィスコンシン-マディソン大学 食品微生物&毒性学部門, 食品リサーチ研究所

2000年10月30日受理

<要約>

食品加工において使用される微生物由来酵素は、通常目的とする酵素活性のみでなく、保存料及び安定剤等として添加された物質や、生産菌株の代謝産物を含んだ酵素剤 (Enzyme Preparation) として販売される。添加される物質は食品等級 (Food Grade) であり、適格な規則の基準に適合したものでなければならない。本報告書の目的は酵素剤に存在する生産菌株の代謝産物 (目的とする酵素活性のみに限定されるものではない) の安全性評価に使用されるガイドラインを提示することである。今回の議論は、前報で公表した 判断樹メカニズム (Decision Tree Mechanism) に基き、商業的に有用な酵素の特異性を高めるために酵素の一次構造を組換えるといったような新しい遺伝子組換え技術についての検討を加えた。酵素の安全性を評価する場合主要な点として生産菌の安全性、特に生産菌の毒性について考慮することは従来どおり重要である。よく特徴づけられた非病原性・非毒素生産性の微生物菌株のうち、特に食品酵素製造で安全に使用されてきた歴史をもつ菌株は、安全な菌株系 (*Safe strain lineage*) を作出する論理的候補である。それらは伝統的・古典的な方法又は 遺伝子組み換え技術のどちらかを使用し遺伝的に改良された菌株を用いて得られたものである。安全な菌株系を確立するために必要とされる要素としては、宿主の特徴を完全に明らかにすること、宿主に導入された全ての新規 DNA の安全性を決定すること、及び宿主を改変するために使用された方法が食品利用に適していることを確実にすることが挙げられる。アミノ酸配列を意図的に改変すること (例: タンパク質工学) によって、酵素機能を変化させたような場合、その改変がもともと安全な酵素の安全性に影響するかどうか問われるかもしれない。我々はこの疑問について、自然発生した酵素構造変異の範囲 (バリエーション) と機能変化の範囲とについて既に知られている事実から、望む酵素機能の改良によって毒性蛋白質が産生されるというようなことは起こり難いと結論した。しかし、慎重を期して、改変された酵素に関して限定された毒性試験を実施することによって、理論的には非常に小さいと思われるリスクを評価することはできる。本報告書の主要な目的は酵素学の進展に適応するために、以前提唱した酵素安全性評価のための判断樹 (Decision Tree) (Pariza と Foster, 1983 年 ; IFBC, 1990 年) のメカニズムの改訂について述べることである。我々は、この判断樹を酵素の安全性評価に使用する場合別個の変異原性試験は必要としないと結論づけた。この判断樹メカニズム (Decision Tree Mechanism) の基準では、全ての新規食品用酵素に対して的確な安全性の評価をすることを義務付けている。

¹ 著者らは酵素技術協会 (Enzyme Technical Association) に本原稿を準備する際サポートして頂いたことに感謝する。

² 投書の連絡先. Fax : (608) 263-1114, Email:mwpariza@facstaff.wisc.edu

<序論>

食品加工において使用される微生物酵素は、一般的に、目的とする酵素活性のみだけでなく、それ以外の生産菌株の代謝産物や、保存料及び安定剤等として添加された物質をも含んだ酵素剤として販売される。添加される物質は食品等級 (Food Grade) であり、酵素の用途に即した規則 (Regulatory Policy) の基準に適合しているものと考えられる。従って本報告書の目的は、酵素剤に存在する生産菌株の代謝産物、即ち目的とする酵素活性に加えてそれ以外の代謝物をも含む生産物の安全性の評価のために使用されるガイドラインを提示することである。今回の議論は以前公表した判断樹メカニズム (Pariza and Foster, 1983 ; IFBC, 1990 ; Kessler ら, 1992) に基づき、商業的に有用な酵素の特性を高めるために酵素の一次構造を変えるといったような新しい遺伝子組換え技術についての検討を加えた。

食品加工において使用された又は現在使用されている酵素の多くを Table 1 に示す。Pariza と Foster が 1983 年に公表したリストに掲載されていた酵素には印を付けた。時の経過と共に、新しく酵素がこのリストに追加されたり、現在リストにある酵素が今後削除されるという変更が今後出てくると思われる。このリストは酵素技術協会 (Enzyme Technical Association, ETA) によって定期的に更新され、ウェブサイト (<http://www.enzymetechnicalassoc.org/>) に掲載されている。

1983 年のリストと現在のリストを比較してみると、酵素の数及び生産菌株用の菌種が過去 20 年間で大きく増加したことがわかる。この増加は、常に発展する多様な国際的食品加工産業の要求に応じてきたことによるものである。

例えば、1983 年版リストには遺伝子組換え技術を用いて得られた酵素は収載されていない。1983 年にはまだ遺伝子組換え技術が商業的に使用されていなかったためである。これはこの数年に変化し、Table 1 には多くの遺伝子組換え技術を使用して改良された生産菌株が収載されている。ともあれ、最も重要なのは、Table 1 にある各酵素及び各生産菌株は Pariza と Foster (1983 年) 及び IFBC (1990 年) によって記述されたものに相当する基準を使用して安全性の評価がなされたものであるということである。

<食品酵素の安全性評価に関する考察>

生産菌株の安全性

Pariza と Foster は伝統的な (遺伝子組換え技術を用いない) 方法によって改良された生産菌株由来の食品加工用酵素の安全性に関する検討を議論した (1983 年)。同報告書では以下の点が検討されている。

生産菌株 (同報告書では「起源微生物 (source organism)」と記載) の特に毒素産生性・病原性に関する安全性、アレルギーと一次刺激性、発ガン性物質と変異原、催奇形性物質と生殖影響、抗生物質、酵素反応による産生物、酵素と他の食品成分との相互作用、消費者への食品用酵素の直接的な

影響。

同報告書は、生産菌株の安全性は酵素の安全性を評価する際、最も考慮すべきことであると結論づけた。生産菌株の安全性の評価において、まず課題となるのは毒素産生性、とりわけ生産菌株により経口摂取で活性を示す毒性物質が合成される可能性があるか否かである。

病原性については、酵素剤に生きた生産菌が含まれることはほとんどないことから、通常、消費者に対してその安全性を懸念する必要はない。しかしながら、病原性の評価は作業者の安全性に対しては重要である

毒素産生性

細菌又は糸状菌（カビ）には、経口で活性をもつ微生物毒素を産生する可能性があるものがある。これとは対照的に、酵母がそのような毒素を産生することは知られていない。

細菌によって産生された経口毒素は食中毒の原因物質である。その本質は蛋白質で、急速な反応を引き起こす。In vivo, in vitro 試験によりこれらの毒素の検出が可能である。主要な細菌性食中毒毒素は精製され、その関係する遺伝子配列の多くが明らかにされている。また、それらの毒素のほとんどは特徴がよく分析され、徹底的に調査されている。(Aktories と Just, 2000 年 ; Alouf と Freer, 1999 年 ; Rappuoli と Montecucco, 1997 年)。それらの毒素を産生する細菌及びカビ類についても広範囲にわたって性質が明らかにされている (Doyle ら, 1997 年 ; Fischetti, 2000 年)。これらの情報は、新規に分離された細菌の毒素産生性を調べるための基礎を提供している。

糸状菌によって産生される経口毒素は通常 1000Da 以下の低分子有機化合物で (Chu, 2000 年)、それらはマイコトキシンと呼ばれている。ほとんどのマイコトキシンは動物に対し急性毒性物質であり、また、それらの多くが慢性毒性を有し (例えば、発ガン性)、反復投与された場合は、その毒性作用を増大させる可能性を持つ。重要度の高いマイコトキシンについてはその検出方法が開発されてきた (Chu, 2000 年)。この化学試験は急性反応を導かない低濃度のマイコトキシンまで測定することができる

病原性

明らかなヒトの病原菌が食品用酵素製造に使用されてきたとは考え難いこと、食品用酵素剤に生きた生産菌が含まれることはほとんどないことから、病原性の問題は食品用酵素の生産菌株に関してはほとんど意味が無いと考えられる。それにもかかわらず、試験データのない宿主微生物の病原性を動物モデルを使用して調査することは産業界においてよく行われている。

病原性と日和見感染を区別することは重要である。多くの微生物は、生体防御機構によって通常は保護されている組織部位に入り込むと、宿主に日和見感染を引き起こす。例えば、深い傷を負った場合や免疫機能の低下した宿主に生じる通常は無害の微生物による感染がそれである。真の病原性菌はこれとは対照的に健康と思われる宿主にも病気又は感染を引き起こす。このことから病原性は免疫機能の低下していない宿主の防御機構を通過し、宿主内に進入することができると考えられる (Falkow, 1997 年 ; Mims, 1991 年)。従って、免疫機能の低下した宿主に対する病原性は正

しく評価することはできない。

微生物に対する宿主の反応を微生物自身による影響と混同しないようにすることが重要である。例えば、動物に死滅した細菌を注入すると敗血症性ショック死を起こす代謝カスケードに至る可能性がある。死滅した細菌が感染することはないため、この反応は細菌の病原性によるものではなく、むしろ死細菌の存在に反応して宿主の免疫細胞からホルモン様の物質（サイトカイン）を放出したことによって起こったものである（Beutler と Cerami, 1997 年）。従って、単純に動物に微生物を注入するような方法では適切に病原性を評価することはできない。

微生物のヒトに対する病原性に関する情報は、例えば次のウェブサイト等で得られる。

http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/Biosafety_manual_rev_1994.pdf,

<http://www4.od.nih.gov/oba/guidelines.html> (NIH Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules)

安全な菌株系統(Safe Strain Lineage)

特性が完全に明らかとなっている非病原性、非毒素産生性の微生物菌株、特に食品用酵素製造で安全に使用された歴史をもつ菌株より、伝統的、典型的な方法又は遺伝子組換え技術を用いる方法により遺伝的に改良して得られる菌株は、安全な菌株系統と見なされる (IFBC, 1990 年)。安全な菌株系統を確立するために必要とされる要素は、宿主微生物の特性を完全に明らかとすること、宿主に導入された全ての新規 DNA の安全性を決定すること及び宿主を改変するために使用された方法が食品利用に適したものであることを確実にすることである。

現在使用されている酵素生産菌株の元株 (original isolates) は、歴史的には、産業的規模の発酵条件の下でよりよく成長するものとしてスクリーニングされ、望む酵素の適切な産生性で選抜されてきたものである。得られた菌株は突然変異誘発処理 (化学的誘導又は UV 誘導) され、得られたランダム突然変異体からさらに産出量の多い菌株が選抜された。最近ではより直接的に 遺伝子組換え技術を用いて望む酵素蛋白質をコードする遺伝子を分離、操作して、菌株の酵素生産能力を向上させることが行われてきている。

微生物分類学は、特に細菌及び糸状菌に関して、この 10 年間で多いに進歩してきた (Balows と Duerden, 1998 年 ; Claridge ら, 1997 年 ; Fink, 1999 年 ; Pit と Hocking, 1997 年 ; Ward, 1998 年)。ゲノム DNA の増幅が可能になり、微生物ゲノムの塩基配列が得られるようになって、我々の微生物学的分類、系統発生学 (進化学) 及び病原性学に関する理解には革命的進歩がもたらされた (Fink, 1999 年 ; Strauss と Falkow, 1997 年)。表現型分析と対になった DNA 配列データの分析により、産業用酵素の開発と製造に使用される供与体及び生産菌の正確な評価ができるようになった。食品産業及び酵素製造に使用される *Aspergillus oryzae* (Barbesgaard ら, 1992 年), *Bacillus licheniformis* (de Boer ら, 1994 年), *Bacillus subtilis* と *Bacillus amyloliquefaciens* (de Boer と Diderichsen, 1991 年), *Kluyveromyces lactis* (Bonekamp と Oosterom, 1994 年) 及び *Trichoderma reesei* (Nevalainen ら, 1994 年) 等の数種の微生物の安全性評価についてはすでに報告されている。最近の技術的及び分類に関する論文では、細菌、酵母及び真菌における系統学的な

詳細な調査に基づき酵素生産微生物の安全性が洞察されている(Balows と Duerden, 1998 年, Kurtzman と Fell, 1999 年, Pitt と Hocking, 1997 年, Wolf, Kurtzman と Fell, 1997 年, Wolf, 1995 年)。ゆえに、伝統的手法と現代の分子学的技術を用いることにより、食品用酵素生産で使用される微生物間の相互関係は正確に決定することができる(例, Geiser ら, 1998 年, Kuhls ら, 1996 年)。また FDA によれば(FDA, 1993 年),「…国際的に認められている命名法に従う場合, 微生物の分類(taxonomic placement)の変更によって, 微生物の毒素生産性や病原性, または食品, 酵素生産への使用などに関する照会等の, 微生物に関する科学的な言及に至るほどの影響が出てはいけない」としている。

酵素生産の能率の向上は, 生合成, 回収及び精製により得られる酵素蛋白質の量を直接的又は間接的に増加させる微生物菌株を開発することによって成し遂げられよう(Archer と Peberdy, 1997 年; Demain と Davies, 1999 年)。遺伝子組換えは, 成長速度を高め, 遺伝子のコピー数を増やし, 遺伝子発現量を高め, 酵素分泌を高めることに利用される。

伝統的技術及び分子遺伝学的技術は, 不都合な特定の内因性酵素活性やその他の性質を減少または除去するためにも使用される。特定の用途においてはそれらの副活性が不要な反応を起こす場合もある。例えば, 多くの微生物が大量多種のプロテアーゼを分泌する。この特性はある使用には望まれるが, 分泌された他の酵素蛋白質の分解を招いたり, ある食品用途に望ましくない影響を持つこともあり得る。いくつかの生産菌株は1個から数個のプロテアーゼ遺伝子を除いたり, 不活性化することによって開発された。

非常に有用な酵素活性が発見されたが, 産業用発酵における生産菌としては使用に向かないという例がある。この場合, この産業用発酵に不適格な微生物から欲しい酵素蛋白質をコードする遺伝子配列をクローニングし, 安全な利用の歴史のある特徴のよく分かった生産菌株に導入し, 発現させる。この酵素の異種発現手法は現在, 産業界でよく行われており, 今後多くの酵素の商業化において標準的手法として実施され続けるだろう。

通常使用されている, 酵母, 真菌および細菌の酵素生産菌株に関して, 遺伝子発現の分子学的基礎に立脚した知識が増えるほど, 遺伝子組換えによって酵素生産微生物のさらなる改良は続けられるであろう。蛋白質工学により改変された酵素

蛋白質工学は蛋白質の機能に影響を与えるために蛋白質のアミノ酸配列を意図的に変化させる手法である(Arnold と Volkov, 1999 年; Atwell と Wells, 1999 年; Cleland と Craik, 1996 年, 1999 年; Kuchner と Arnold, 1997 年; Shaw ら, 1999 年)。これは化学的変異, UV 照射, 変異誘発株, エラープロン PCR などによって任意の変異を誘発又は導入するなどの従来法によって可能である。今日では, 部位特定的変異法によって, 特定の蛋白質の特性に関係すると思われる遺伝子の標的部位を変化させるという方法もある。さらに進化した最近の分子学的アプローチとして異なる新たな手法が用いられている。蛋白質の遺伝子配列のさまざまな変異を作出するために遺伝子の断片または機能的なブロックを組み換える遺伝子シャッフリングなどがその例である。どの手法においても, 望んだ機能特異性をもつように改変された蛋白質を同定するには効果的で能率のよい選定やスクリーニング方法が必要とされる。

蛋白質工学を酵素に利用すると、酵素の特性を改変したり、特別な用途向けに酵素を改良したりすることができる。例としては、至適 pH を変える、熱安定性を増加させる、金属イオンなどの補酵素を必要としないようにする、酸化に対して酵素を安定化するなどが挙げられる。

そのような改変は酵素の安全性に影響するかもしれないと問われるかもしれない。この質問に答えるために、我々は自然変異による酵素の構造と機能の変化の範囲について検討する必要がある。

Table 1 の酵素は、国際生化学連合の命名委員会による系統的名称（即ち、IUB または EC ナンバー）（IUB, 1992 年）システム及び化学妙録サービス（CAS）登録番号に基づいて記載している。しかし、触媒活性を主に基盤としている伝統的な IUB 体系とは別に、酵素をコードした遺伝子のヌクレオチド配列、相同アミノ酸配列や酵素の 3 次元構造に関する情報が利用できるデータベースもある（Brenner ら, 1998 年 ; Doolittle, 1996 年）。この情報は、酵素の進化的関係を決定するのに価値があり、また、構造／機能の決定因子への理解が深められる。分子学的解析により、特定の分類（class）に属する酵素は、酵素分子内に共通のドメインを含む特徴的なフォールドで構成されていることが示された（Creighton, 1993 年 ; Doolittle, 1996 年 ; Henrissat と Davies, 1997 年 ; Jancek ら, 1999 年）。

同一のファミリーまたはスーパーファミリーに属する酵素は、多様な生態の微生物から得られたものでも共通の 3 次構造及び酵素特性を維持する（Siezen と Keunissen, 1997 年 ; Jancek ら, 1999 年 ; Conrad ら, 1995 年 ; Todd ら, 1999 年）が、安定性や基質特異性といったある機能的な性質が異なる場合がある（Creighton, 1993 年）。そのような同じファミリー内での自然変異によって経口の毒性物質が産生される例は知られていない。また、これは毒性という性質は蛋白質が通常有している特性ではないという観察結果からもいえる。Pariza と Foster は、食品中には何千種類の蛋白質があるが、そのうちごく一部だけが経口で毒性を示すということを指摘した（1983 年）。その既知の毒素蛋白質は構造において商業的に利用される食品用酵素の蛋白質とはかなり異なっている。

蛋白質工学的に改変した酵素における広範囲な調査研究においても、この技術によって改変された同じファミリーやスーパーファミリー（例えば subtilases）に属する酵素は特徴のある 3 次元構造及び触媒活性を保持することを示した（Bott ら, 1992 年）。よって、蛋白質工学的に改変した酵素は自然界で観察される変異の範囲と同様の変異を示す。

酵素構造と機能の検討により、望ましい酵素機能を得るために行った改変により毒性蛋白質が産生されることはないということが示唆される。しかしながら、蛋白質工学的に改変した酵素に対し限定された毒性試験を実施し、この非常に小さな理論的リスクの評価を行うことは賢明な方法と考える。蛋白質工学的に改変した遺伝子を同じベクターシステムで同じ宿主に挿入して生産し、それらの酵素が適格な毒性試験によって安全であることを示すデータが蓄積されていくと、同様にして得られる酵素製品についてさらなる毒性試験を行う必要はいずれなくなるであろうと我々は予想している。充分とされるデータ蓄積がどの程度であるかについては各状況に応じて専門家によって確立されるであろう。

以上の結論は今後試験から得られる知識の蓄積により定期的に再評価されるべきである。

In vitro の遺伝毒性試験について

新しい食品用酵素剤に対する変異原性試験に関しては、Pariza 及び Foster が指摘した科学的合理性及び必要性に関する疑問（1983 年）にも関わらず、依然としていくつかの国においては行政的な要求事項として試験の実施が続いている。我々の知る限りでは、新しい酵素剤に対し要求されるこの in vitro 遺伝毒性試験で、Pariza と Foster（1983 年）及び IFBC（1990 年）が示した化学分析及び混餌投与による限定的動物試験による包括的な判断樹によるアプローチで検出されないような変異原あるいは染色体異常誘発物質が存在することを証明した事例はない。

これには以下に示す 3 つの理由があると思われる。即ち、あるバクテリアが産生する、食餌性の腸管毒素及び神経毒素を含む蛋白質は遺伝毒性を持たないこと。既知のすべてのマイコトキシンのうち、いくつかは遺伝毒性があるが、それらは他の毒性も示すため動物を使用した短期の混餌試験でたやすく検出されること。新規の生産菌株の安全性を決定するときに通常使用される分析手法により、すべての既知の食餌性の毒性蛋白質及びマイコトキシンは検出できること、である。

1999 年 6 月の時点で、酵素技術協会（ETA）のメンバー会社は酵素剤 102 品目の変異原性試験（Ames ら、1980 年；OECD, 1984 年；EEC, 1992 年）及び 63 品目の染色体異常試験（Amacher ら、1980 年；OECD, 1984 年；EEC, 1992 年；Clive and Spector, 1975 年；Clive ら、1979, 1987 年）を実施し結果を報告した。実施した染色体異常試験は、哺乳類培養細胞を用いた遺伝毒性試験（例えば、ヒト抹消血リンパ球を用いた染色体異常試験、マウスリンフォーマ試験およびマウス卵巣細胞を用いた染色体異常試験）および染色体又は有糸分裂機構の損傷を検出するマウスを用いた in vivo 試験（OECD, 1984 年；EEC, 1992 年；Amacher ら 1979, 1987 年）である。試験された酵素剤は伝統的技術あるいは遺伝子組換え技術を用いて改良された生産菌から製造されたものである（そのうち Ames 試験 49 品目、染色体異常試験 27 品目は遺伝子組換え技術で改良された微生物（GMM）由来の酵素剤）。用いられた酵素剤の生産菌は以下のものである。*Actinoplanes missouriensis*, *Aspergillus melleus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Bacillus alcalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. naganoeensis*, *B. subtilis*, *Candida pseudotropicalis*, *C. rugosa*, *Chaetomium erraticum*, *Disporotrichium dimorphosporum*, *Kluyveromyces lactis*, *Leptographium procerum*, *Microbacterium imperial*, *Mucor javanicus*, *Penicillium camembertii*, *P. citrinum*, *P. decumbens*, *P. roqueforti*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus niveus*, *R. oryzae* (*R. delemar*), *Streptomyces lividans*, *Talaromyces emersonii*, *Trichoderma reesei*, *Verticidadiella procera*

実施した Ames 試験のうち 7 品目（そのうち 6 品目は GMM 由来酵素剤）が擬陽性を示した。染色体異常試験では 6 品目（そのうち 2 品目は GMM 由来酵素剤）が擬陽性を示した。残り（Ames 試験 95 品目、染色体異常試験 57 品目）は陰性であった。

Ames 試験で得た擬陽性の結果は酵素剤中に存在するヒスチジンの成長促進効果による影響であったことを示した（これは treat and plate 法を使用した再試験により、変異原性が認められなかつ

たことによって証明された)。

染色体異常試験から得られた擬陽性の結果に関する説明は以下のとおりである。

- ヒトリンパ球細胞において認められた染色体異常誘発性は、チャイニーズハムスター卵巣細胞における *in vitro* 試験では明らかに陰性であった (2 試験のうち 1 試験は GMM 由来)
- *In vitro* 試験で認められた陽性結果は *in vivo* 細胞遺伝試験 (3 試験) で陰性であった。
- ある種の酵素反応によって染色体異常誘発の原因となることが知られている過酸化水素を生産する (GMM 1 種で 1 試験に認める)

これらの所見は、伝統的技術あるいは遺伝子組換え技術によって改変された微生物を生産菌として製造した酵素剤に対し、遺伝毒性試験を実施することは、その安全性の評価に不必要であることを明らかにしている。

<21 世紀に向けた食品用酵素の安全性評価方針>

改良された特性をもつ新しい酵素は、今日遺伝子改変 (蛋白質工学) (Arnold と Volkov, 1999 年 ; Atwell と Wells, 1999 年 ; Cleland と Craik, 1996 年 ; Ford, 1999 年 ; Shaw ら, 1999 年), 蛋白質の「育種 (breeding)」 (Minshull と Stemmer, 1999 年), 化学的改変 (DeSantis と Jones, 1999 年), あるいは新しく探査した環境からの分離 (Adams ら, 1995 年 ; Demain and Davies, 1999 ; Pace, 1997 年) といった数多くの方法で得られる。従って、生物学の進歩に伴い、以前の酵素安全性評価メカニズム (Pariza と Foster, 1983 年, IFBC, 1990 年) を改訂することは重要である。Fig.1 に示す判断樹はこの目的を達成するために開発した。Fig. 2 はこれを図式化したものである。

判断樹の脚注に補足の説明及び議論を記載した。重要な点は、この判断樹の基準では、全ての新規食品用酵素に対して的確な安全性の評価をすることを義務付けていることである。また、判断樹にある判断基準に合致するとともに、安全な食品用酵素が GMP を遵守して生産されるべきこと、Food Chemicals Codex (FCC, 1996 年) 及び FAO/JECFA (JECFA, 1992 年) に記載された食品用酵素規格に適合することも重要である。

<むすび>

食品加工において使用される微生物由来酵素は、通常、目的とする酵素活性のみでなく、保存料及び安定剤等として添加された物質や、生産菌株の代謝産物を含んだ酵素剤として販売される。添加される物質は食品等級 (Food Grade) であり、適格な規則の基準に適合したもので無ければならない。本報告書の目的は酵素剤に存在する生産菌株の代謝産物 (目的とする酵素活性のみに限定されるものではない) の安全性評価のために使用されるガイドラインを提示することである。今回の

議論は前報 (Pariza and Foster, 1983; IFBC, 1990) に基き、これに商業的に有用な酵素の特異性を高めるために酵素の一次構造を改変するといったような新しい遺伝子組換え技術についての検討を加えた。

生産菌株の安全性評価は、酵素の安全性を評価する際最も考慮すべき点であると結論づけた。生産菌株の安全性評価の主要な項目はその毒素産生性、とりわけ、経口摂取で活性を有する毒素の産生能である。病原性については、通常酵素剤が生きた生産菌を含むことはほとんどないため、消費者に対してその安全性を懸念する必要はない。しかしながら、病原性の評価は作業員(労働者)の安全性に対しては重要である。

完全に特徴が明らかとなっている非病原性、非毒素産生性の微生物菌株、特に食品用酵素製造で安全に使用された歴史をもつ菌株は、それを元株として伝統的、古典的な方法又は遺伝子組み換え技術で改良して、安全な菌株系(*safe strain lineage*)を作出する論理的候補である (IFBC, 1990年)。安全な菌株系を確立するために必要とされる要素は、宿主の特徴を明らかにすること、宿主に導入された全ての新規 DNA の安全性を決定すること及び宿主を改変するために使用された方法が食品利用に適していることを確実にすることである。

酵素の機能はアミノ酸配列を意図的に変化させること(例えば、蛋白質工学)によって改変可能である。例としては、至適 pH の変更、熱安定性の増加、金属イオンなどの補酵素の必要性の削減、酸化に対する酵素の安定化が挙げられる。そのような改変が、もともと安全な酵素の安全性に影響する可能性があるのではないかと懸念があるかもしれない。この疑問に対処するために、我々は酵素の構造と機能の自然変異について既に知られている事実について検討し、望む酵素機能の改良によって毒性蛋白質の産生を生じるということは起こり難いと結論づけた。そのような懸念に対しては慎重を期して限定的な毒性試験を実施し評価することができる。

新しい食品用酵素剤に対して変異原性試験をすることに関し、Pariza 及び Foster が指摘した科学的合理性及び必要性に関する疑問(1983年)にも関わらず、依然としていくつかの国においては行政的な要求事項として試験の実施が続いている。我々の知る限りでは、新しい酵素剤に対し要求される *in vitro* 遺伝毒性試験で、Pariza と Foster (1983年) 及び IFBC (1990年) が示した、化学分析及び混餌投与による限定的動物試験による包括的な判断樹によるアプローチで検出されないような変異原あるいは染色体異常誘発物質が存在することを証明した事例がないことは注目に値する。

本報告書の主要な目的は酵素学の進展に適応するために、以前提唱した酵素の安全性評価のための判断樹のメカニズム (Pariza と Foster, 1983年 ; IFBC, 1990年) の改定について述べることである。この判断樹の基準の下では、全ての新規食品用酵素に対して的確な安全性の評価をすることが義務付けられている。

Fig.1 微生物由来の酵素剤の安全性評価に関する判断樹

1. 生産菌株^aは遺伝的に改変^bされている。
「はい」^cなら2へ、「いいえ」なら6へ
2. 生産菌株はrDNA技術を使用して改変されている。
「はい」なら3へ、「いいえ」なら5へ
3. 導入DNA^{d,e}に関連する質問項目は3a~3eへ。
 - 3a. エンコードされた導入DNAによって発現した酵素製品は食品として安全に使用された歴史がある。^f
「はい」なら3cへ、「いいえ」なら3bへ
 - 3b. 被験物質の安全性を確認するための適切な短期経口試験^gにおいてNOAEL^hは充分ⁱに高い値である。
「はい」なら3cへ、「いいえ」なら12へ
 - 3c. 被験物質に転移可能な抗生物質耐性遺伝子^kはない。
「はい」なら3eへ、「いいえ」なら3dへ
 - 3d. その抗生物質耐性遺伝子の対象となる薬物はヒト又は動物の疾病の治療薬として使用されている。
「はい」なら12へ、「いいえ」なら3eへ
 - 3e. 他のすべての導入DNAは特徴づけられ、かつ、食品グレードの製品を生産するために使用される微生物を作出するのにその遺伝子を危険にさせる特性はない。
「はい」なら4へ、「いいえ」なら12へ
4. 導入DNAは染色体にランダムに組み込まれる。
「はい」なら5へ、「いいえ」なら6へ
5. 用いられた遺伝子改変方法によって、毒素又は他の安全でない代謝産物の合成の結果を招く可能性のある予期しない多面的な影響が生じないように、生産菌株は充分に特徴づけられている。
「はい」なら6へ、「いいえ」なら7へ
6. この評価方法を通じ、生産菌株は安全な系統に由来すると繰り返し評価されている。
「はい」なら、その被験物質は適合している、「いいえ」なら7へ
7. その微生物は非病原性である。^m
「はい」なら8へ、「いいえ」なら12へ
8. その被験物質は抗生物質を含まない。ⁿ
「はい」なら9へ、「いいえ」なら12へ
9. その被験物質には同種の他の菌株で生産されていることが分かっている経口毒素を含まない。
「はい」なら11へ、「いいえ」なら10へ
10. その被験物質に含まれる前述の毒素の量は懸念される程ではない。^p

「はい」なら 11 へ, 「いいえ」なら 12 へ

11. その被験物質における適性な経口試験において, NOAEL^a は安全性を確立するために十分に高い値である。

「はい」なら適合^c, 「いいえ」なら 12 へ

12. その被験物質は望まれていない特性又は物質が存在している可能性があり, 食品用に適していない。ただしその望まれていない特性又は物質を産生する遺伝的能力が永久に不活化された場合, あるいは取り除かれた場合, 被験物質は再度この判断樹に従った評価の結果「適合」と判断されることがある。

- a. 生産菌株は酵素製造において使用されることになる微生物菌株を指す。生産菌株は非病原性, 非毒素産生性かつ完全に特徴づけられていることが想定される。ステップ 6 ~ 11 はこれを確認するものである。
- b. 「genetically modified」は菌株 DNA のいかなる改変も意味するものである。それは伝統的方法（例えば UV 又は化学的導入変異原）や遺伝子組換え技術を含む。
- c. この質問及びこの判断樹にあるその他の質問に対する答えが分からない場合, または決定していない場合, その答えは「いいえ」とみなされる。
- d. 導入 DNA とは生産菌株に導入されるすべての DNA 配列を指しており, ベクターや遺伝子作製中に組み込まれるその他の DNA 配列, 抗生物質耐性遺伝子をコード化する DNA 及び望む酵素をエンコードする DNA を含む。

ベクターやその他の DNA 配列とは以下のものを含む。

抗生物質耐性以外の選択マーカー遺伝子, 目的酵素の分泌をコントロールする遺伝子配列, 制限酵素部位および/あるいはそのリンカー配列, 中間宿主に由来する配列, 及びベクターの保持, 接合, 自己複製, および/あるいは操作のために必要とされる配列。これらの配列は天然の微生物から得られるもの, in vitro 技術によって特定のヌクレオチドの変化を導入して得られるもの, またはまったく新たに合成されるものの場合もある。

- e. 遺伝子改変が宿主 DNA の一部を取り除くだけのために行われた場合, また, 異種 DNA が微生物内に残っていない場合は, ステップ 5 に進む。
- f. 組換え酵素が同じ改変方法を使用し, 同じ宿主で分泌される試験済みの組換え酵素と同じ系統に由来していない場合は, その組換え酵素は食品として安全に使用された歴史をもたないともみなされる。
- g. 「NOAEL」は「no observed adverse effect level（無毒性量）」の略語である。

適切な反復経口投与試験（以下参照）において動物 1 匹に投与する被験物質（以下参照）の毒性のない最大用量である。NOAEL は通常, 長期の混餌試験で得られる。しかしながら, 経口で活性をもつ微生物毒素が急性毒素でもあることを示す確立されたデータベースが存在する

ならば、酵素の安全性評価に限って付記 i に記載された短期の強制経口/混餌試験から NOAEL を決定できると結論づけた。

- h. 被験物質とは実際に試験する酵素を含む物質のことを指す。それは最終酵素製品とは形状又は剤型が異なる場合もある。例えば、動物で実験により高濃度で投与するために、凍結乾燥粉末あるいは他の濃縮物の形態の酵素標本を用いることがある。また、経口毒性試験において嗜好性や栄養またはその他に影響するかもしれない、通常酵素剤に添加される安全で適切な保存料、安定剤等の物質を加えないものを被験物質として用いる場合は最終酵素製品の組成とは異なる。

被験物質の製造過程は最終酵素製品の製造過程の代表であるべきである。たとえば、酵素が開放状態で大豆ベースの培地で生育する培養で商業的に生産されることになっている場合、酵母エキス培地中で生育する液体培養から製造した被験物質を用いてはならない。被験物質はしばしば、実際の製造工程を用い、最終的に精製され製剤化される前の工程で止めて作製される。

病原性試験用の被験物質は試験時には増殖細胞、芽胞、分生孢子や微生物の他の生殖細胞よりなるものである。これは試験動物への傷害を最小限にするため水、緩衝液、または他の溶液に懸濁して用いられるのが一般的である。

- i. 我々は2種類の動物試験を酵素の安全性を評価するために適切であると考えている。両試験とも消費者が曝露を受けるとされる経路と同じ、経口投与で実施するものである。どちらを実施するかは、場合に応じて、また、宿主体の種やその宿主に理論的に存在するかもしれない毒素の性質を十分考慮して選択する（例えば、マイコトキシン又は細菌性の腸管毒素）。

第一の試験は Pariza と Foster (1983 年) の提案した単回投与によるラット急性経口毒性試験である。この試験で使用される用量はヒトの予測曝露平均値の最低 100 倍（総有機固形分 total organic solids (TOS) ベースで）又は OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) の化学物質の急性経口毒性試験ガイドライン No.401, 限度試験にのみ適用 (1987 年 2 月 24 日採択) (Paris, 1983 年) に従った最低投与量 2000mg/体重 kg とする。

この試験は LD₅₀ 値を決定することが目的ではないことを強調したい。むしろ、この試験は、バクテリア由来酵素の安全性を決定するために特別に設計された試験である。なぜならば、数種の細菌が産生することが知られている毒素タンパク質又はペプチド（腸毒素および特定の神経毒素）はきわめてまれな例外を除き全て急性毒性を示す毒素であるからである。

2 つ目に提案する毒性試験は動物 1 種類での反復経口投与毒性試験（14~91 日間）である。歴史的にラットにおいてデータの蓄積があるので、ラットが使用されるのが望ましい。被験物質は混餌又は強制経口のどちらかの方法で投与される。この試験の最低濃度はヒトへの予測曝露平均 (TOS ベース) の最低 100 倍にされるべきである。この試験では経口によって活性をもつ既知の微生物毒素の毒性が検出される。

さらに、新しい酵素はすべて論理的に予期されうる毒素について化学的、生化学的、または生物学的な方法で分析されるべきである。例えば、カビ由来の試験物質はすべて、その近縁の種が合成すると分かっているマイコトキシンを分析すべきである。カビによって産生される酵素製品すべてにおいて、アフラトキシン、ゼアラレノン、T-2 トキシン、オクラトキシン A 及びステリグマトシステンの分析が JECFA によって要求されている。(Patterson と Roberts, 1979 年)

- j. NOAELは、標準方法 (Klaassen, 1996年; Lehman Fitzhugh, 1954年; ILSI, 1997年) で計算されるヒト摂取における安全係数が最低 100 倍でなければならない。
- k. 抗生物質耐性遺伝子は通常、酵素生産菌株を遺伝子の構築の際に、導入 DNA を持つ細胞を同定、選抜及び安定化するために使用される。食品および飼料の製造における抗生物質耐性遺伝子の安全な使用の法則は確立してきた。(IFBC, 1990年 ; “FDA Guidance for Industry: Use of Antibiotic Resistance Marker Genes in Transgenic Plants”, <http://vm.cfsan.fda.gov/dms/opa-armg.html>)。
- l. 安全な菌株系統を決めるときは宿主、すべての導入 DNA、宿主を遺伝的に改変するために使用される方法を検討するべきである (本文参照)。Pariza と Foster (1983年) 及び IFBC (1990年) による方法は安全な菌株系統を確立するときの評価方法に利用できる。
- m. 病原性についての課題は本文に記述されている。酵素剤が生きた生産菌を含まないのならば、病原性に対する問題は消費者の安全性には関連しないと考える。
- n. この文章中の「antibiotic」は、JECFA 試験 (FAO, 1981年) で陽性である抗微生物性物質のことをいう。
- o. 食品用酵素において懸念される毒素というのは経口で活性をもつものである。
- p. 毒素と毒性作用を区別することは重要である。毒素というのは毒性作用を誘導するのに十分な用量で動物又はヒトに投与するとき毒性作用を起こす化学物質である。非常に低濃度の曝露では毒性や考慮すべき作用を起こす心配をする必要はないであろう (Klaassen, 1995年)
- q. 生産菌株を遺伝的に改変して生産した食品に安全に使用された歴史がない酵素、例えばまったく新たに分離された酵素についてステップ 3b で述べている。このような場合は動物試験を再度実施する必要はない。
- r. 新しい菌株 (新しく分離された菌株) の評価においては、判断樹メカニズムによりこの試験の必要性は充分理解できるであろう。しかしながら、菌株や背景に関する知識が増す (多くの製品が試験されることにより、ある系統が安全な菌株系統となる) につれて、行うべき安全性試験の深度は軽減されうる。これはケースバイケースで判断される。例えば Scientific Committee for Foods (SCF) ガイドライン, Section 10 においても、基本的に必要な全毒性試験 (basic-full-toxicologic requirements) からの例外が設けられている (Scientific Committee for Food, 1992年)。

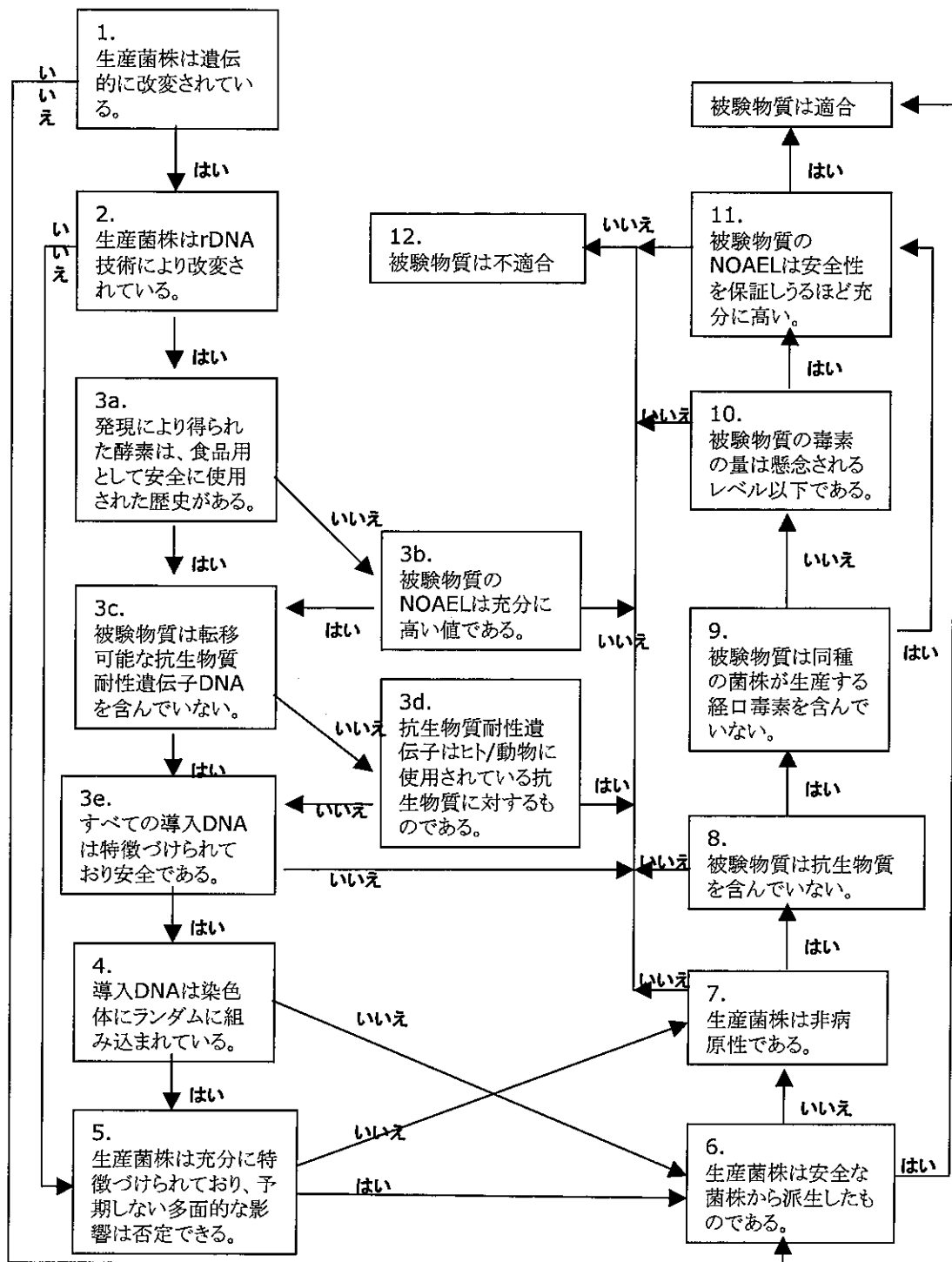


Fig2 フロー図