

(案)

添加物評価書

Aspergillus niger ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ

2013年2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	4
I. 評価対象品目の概要	5
1. 用途	5
2. 名称等	5
3. 基原、製造方法、成分、性状等及び使用方法	5
(1) 基原	5
(2) 製造方法	5
(3) 成分	6
(4) 性状等	7
(5) 使用方法	7
4. 評価要請等の経緯	7
5. 添加物指定の概要	8
II. 安全性に係る知見の概要	8
1. 生産菌株の安全性	8
(1) 非病原性の確認	9
(2) 非毒素産生性の確認	9
(3) その他	10
2. 本品目の安全性	10
(1) 体内動態（消化管内での分解性等）	10
(2) 毒性	11
III. 一日摂取量の推計等	15
IV. 国際機関等における評価	15
1. FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）における評価	15
2. 米国における評価	15
3. 欧州における評価	15
4. その他の国における評価	16
5. 我が国における評価等	16

V. 食品健康影響評価.....	16
別紙1：略称.....	17
別紙2：各種毒性試験等成績.....	18
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）.....	19
参照.....	20

1 <審議の経緯>

2 2012年9月27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
3 ついて要請（厚生労働省発食安0926第2号）、関係書類の
4 接受

5 2012年10月1日 第448回食品安全委員会（要請事項説明）

6 2013年2月22日 第115回添加物専門調査会

7

8 <食品安全委員会委員名簿>

(2012年7月1日から)

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)
上安平 冽子
石井 克枝
村田 容常

9

10 <食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿>

(2012年10月1日から)

今井田 克己 (座長)
梅村 隆志 (座長代理)
石井 邦雄
石塚 真由美
伊藤 清美
江馬 眞
久保田 紀久枝
高橋 智
塚本 徹哉
頭金 正博
中江 大
森田 明美
山田 雅巳

<参考人>

鎌田 洋一
手島 玲子

11

12

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

要 約

酵素として使用される添加物「*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」(EC 番号：3.5.1.1、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)) 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。

評価に用いた試験成績は、*A. niger* ASP-72 株の病原性及び毒素産生性に関するもの並びに *A. niger* ASP-72 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反復投与毒性、遺伝毒性、アレルギー性等に関するものである。

1 I. 評価対象品目の概要

2 1. 用途

3 加工助剤（参照 1）【委員会資料】

5 2. 名称等

6 和名：*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ

7 英名：Asparaginase from *Aspergillus niger* expressed in *Aspergillus niger*

8 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）

9 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）

10（参照 1、2）【委員会資料、本体】

12 3. 基原、製造方法、成分、性状等及び使用方法

13 (1) 基原

14 今般、厚生労働省に添加物「*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産さ
15 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
16 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
17 う。）によれば、本品目の生産菌株の宿主である *A. niger* は、一般環境中に
18 見出される糸状菌であり、食品の加工等に用いられる酵素や、クエン酸等の
19 有機酸の生産に使用されてきた歴史を有するとされている。（参照 2、3）【本
20 体、文献 6】

22 指定等要請者によれば、本品目の生産菌株 *A. niger* ASP-72 株は、*A. niger*
23 が本来有しているアスパラギナーゼ遺伝子を増幅させて生産性を向上させた
24 ものであり、組換え DNA 技術を応用して得られた微生物であるが、*A. niger*
25 宿主株自身及び *A. niger* 遺伝子供与体に由来する DNA 以外の DNA 配列は
26 存在しないものとされている。（参照 2）【本体】

28 (2) 製造方法

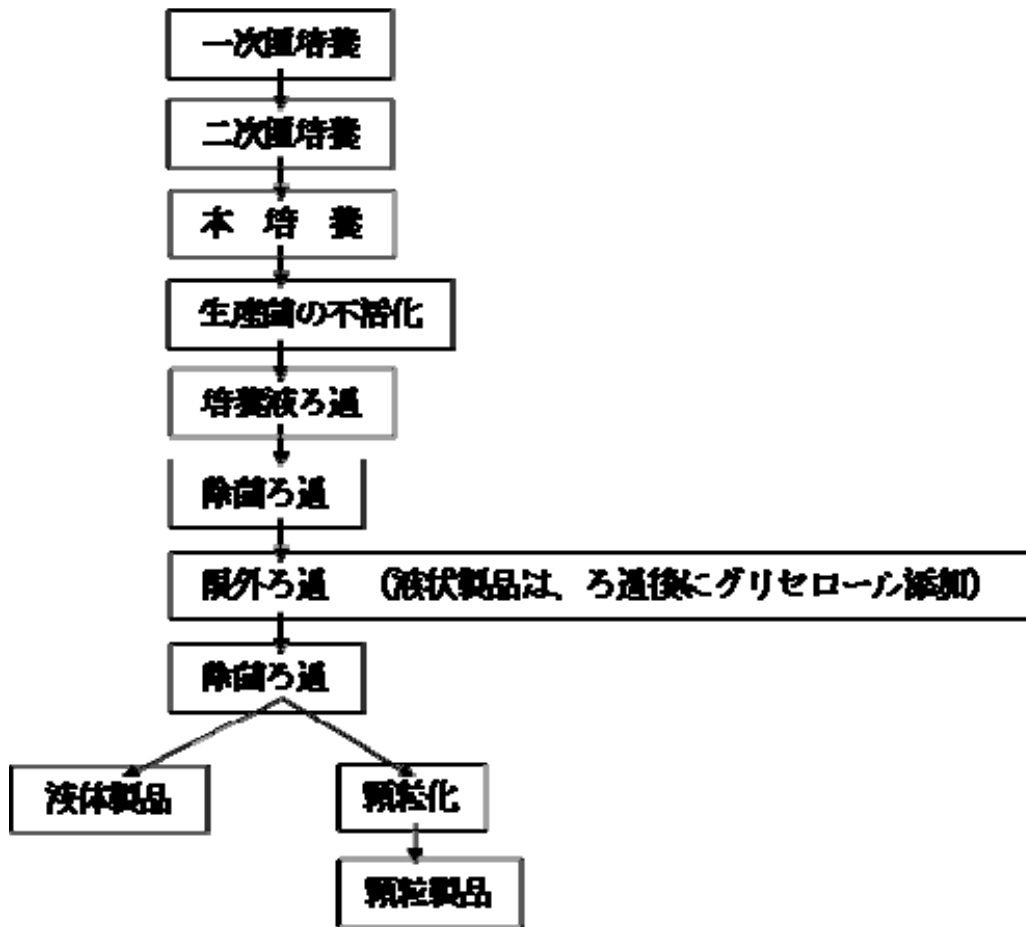
29 指定等要請者によれば、本品目の製造方法の概略は図 1 のとおりだとされて
30 いる。この製造方法における「除菌ろ過」の過程において、生産菌及び菌体断
31 片が本品目から完全に分離されるとされている。本品目には液状製品と顆粒製
32 品の 2 種類があり、いずれも酵素活性はそれぞれ 2,500 ASPU⁽²⁾/mL、2,500
33 ASPU/g に調整されるとされている。（参照 2）【本体】

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 指定等要請者によれば、L-アスパラギンを基質とし、pH5.0、37℃の条件下で本品目を作用させ、生成するアンモニアをフェノールニトロプルシド等と反応させ、吸光度を測定する。1 分間にアンモニア 1 μmol に相当する吸光度（波長 600 nm）の増加を与える酵素量が 1 ASPU であるとされている。

1 図1 アスパラギナーゼ製造方法の概略（参照2）【本体】

2



3

4

5 (3) 成分

6 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
7 される378アミノ酸からなる単量体のたん白質であり、その一次配列は図2の
8 とおりであるとされている。分子量は、アミノ酸組成からの計算では39,584
9 kDa、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
10 (SDS-PAGE) による測定では40~42 kDaであるとされている。等電点は、
11 アミノ酸組成組成からの計算では4.48、実測値は3.6とされている。指定等要
12 請者は、これらの理論値と実測値の違いについて、本品目が7箇所の糖鎖部位
13 を有するため、糖鎖の結合の程度により生じるもの又は末端のアミノ酸が欠損
14 することにより生じるものであるとしている。至適pHは4~5、至適温度は
15 50℃とされている。本品目中の製剤中の総有機固形分(TOS)の含有率は、6
16 ~10%に調整されるとされている。(参照2)【本体】

1		
2	MPLKPILLSALASLASASPLLYSRTTNETFVFTNANGLNF	40
3	TQMNTTLPNVTFATGGTIAGSDSSSTATTTGYTSGAVGVL	80
4	SLIDAVPSMLDVANVAGVQVANVGSEDTSDILISMSKKL	120
5	NRVVCEDPTMAGAVITHGTDLEETAFFLDATVNCVKPIV	160
6	IVGAMRPSTAISADGPFNLLEAVTVAASTSARDRGAMVVM	200
7	NDRIASAYYVTKTNANTMDTFKAMEMGYLGEMISNTPFFF	240
8	YPPVKPTGKVAFDITNVTEIPRVDILFSYEDMHNDTLYNA	280
9	ISSGAQGIVIAGAGAGGVTTSFNEAIEDVINRLEIPVVQS	320
10	MRTVNGEVPLSDVSSDTATHIASGYLNPQKSRILLGLLS	360
11	QGKNITEIADVDFALGTDA	378

12 **図2 有効成分のアミノ酸一次配列（参照2）【本体】**

13
14 指定等要請者の成分規格案によれば、本品目は、1 g 又は 1 mL 当たり 2,375
15 ASPU 以上の酵素活性（アスパラギナーゼ活性）を有するとされている。（参
16 照2）【本体】

17
18 **（4）性状等**

19 指定等要請者の成分規格案によれば、本品目は、「ごくうすい灰み若しくは
20 ごくうすい黄みを帯びた灰色の顆粒又は黄～褐色の透明な液体」とされて
21 いる。（参照2）【本体】

22
23 **（5）使用方法**

24 指定等要請者によれば、本品目は、アクリルアミド生成の起因となるアス
25 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作用を有し、食品加
26 工の際に本品目を添加することにより、食品の味や色等に影響を与えずにア
27 クリルアミド生成を低減させるとされている。また、アスパラギンをアスパ
28 ラギン酸とアンモニアに加水分解する以外の副反応はないとされている。（参
29 照2）【本体】

30
31 **4. 評価要請等の経緯**

32 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
33 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
34 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進展の結
35 果食品中のアスパラギンが、ブドウ糖、果糖等の還元糖と高温で反応してアクリ
36 ルアミドへ変化することが明らかにされている。国際癌研究機関（IARC）は、
37 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
38 ある。）と分類している。（参照4）【文献1】

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
3 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
4 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
5 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5）【文献2】

6
7 米国では、指定等要請者が本品目について一般的に安全とみなされる
8 (GRAS) 物質としての届出を行ったところ、2007年3月、FDAから当該届
9 出に異論がない旨の回答がなされている。（参照6）【文献4】

10
11 欧州連合（EU）（一部の加盟国を除く）では、加工助剤たる酵素は添加物
12 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
13 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
14 る。（参照7）【文献13】

15
16 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
17 び規格基準の設定の要請がなされ、関係資料が取りまとめられたことから、食品
18 安全基本法第24条第1項第1号に基づき、食品安全委員会に対して食品健康影
19 響評価の要請がなされたものである。

20
21 なお、厚生労働省は、本品目における組換えDNA技術に関して、「遺伝子組
22 換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」(平成16年3月25
23 日食品安全委員会決定)でいう「組換えDNA技術によって最終的に宿主に導
24 入されたDNAが、当該微生物と分類学上の同一の種に属する微生物のDNA
25 のみである場合」に該当するのではないかとして、当該基準による遺伝子組換
26 え添加物の安全性評価の対象とはならないことの確認を食品安全委員会に求め
27 ている。

28 29 5. 添加物指定の概要

30 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、
31 本品目について、添加物としての指定の可否及び規格基準の設定について検討す
32 るとしている。なお、使用基準は設けないことを提案している。（参照1、2）
33 【委員会資料、本体】

34 35 II. 安全性に係る知見の概要

36 1. 生産菌株の安全性

37 前述のとおり、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
38 *A. niger*であるとされている。（参照2）【本体】

1
2 指定等要請者は、本品目の製造工程において、除菌ろ過工程を経ることによ
3 り、生産菌及び菌体断片が最終製品に残存することがないことを確認し、さら
4 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。（参照
5 2）【本体】

6 7 (1) 非病原性の確認

8 Nyiredy ら (1975) の報告によれば、1 日齢のニワトリ (10 羽) に *A. niger*
9 の孢子を大量に経口投与させる試験が実施されている。その結果、真菌症を
10 発症せず、かつ、投与翌日において消化管から検出されなかったとされてい
11 る。（参照 8）【文献 2 7】

12
13 Schuster ら (2002) の報告によれば、*A. niger* は自然界に広く存在してお
14 り、一般的に非病原性と考えられ、ヒトは日常的に *A. niger* の孢子の暴露を
15 受けているが、それにより感染症に罹患するということはないとされている。
16 また、ごくまれに *A. niger* がヒト体内で日和見感染により増殖するような場
17 合があるが、そのほぼ全例で、当該患者には重篤な疾病や免疫抑制処置の経
18 歴があるとされている。また、*A. niger* 感染によるヒトの疾病としては、肺
19 アスペルギルス症、原発性皮膚アスペルギルス症、特に熱帯地域における耳
20 真菌症等について報告がなされているとされている（参照 3）【文献 6】。
21 本専門調査会としては、上記の症例のほとんどが吸入や経皮といった、経口
22 以外の経路からの暴露によるものであり、薬剤の使用や疾患のために免疫機
23 能が低下していたり、皮膚表面を傷つけたりした症例にみられたものが多く、
24 健全なヒトにとって問題となるようなものではないと判断した。

25 26 (2) 非毒素産生性の確認

27 Schuster ら (2002) の報告によれば、*A. niger* については、アフラトキシ
28 ン類を産生する能力を有していないことが明らかにされており、また、トリ
29 コテセン類を産生することを証明する知見は存在しないとされている。また、
30 *A. niger* を利用した酵素生産条件下において、コウジ酸の産生は経験的に認
31 められていないとされている。一方、*A. niger* に属する菌株がオクラトキシ
32 ン A を産生したとする報告があることから、*A. niger* を生産菌株として食品
33 に使用される酵素を生産するに当たっては、オクラトキシ A の産生の可能
34 性をチェックすべきであると指摘されている（参照 3）【文献 6】。指定等
35 要請者は、当該生産菌株 *A. niger* ASP-72 株について、毒性のある二次代謝
36 産物に関して HPLC により分析を行ったところ、オクラトキシ A 及びオクラ
37 トキシ B に関連する代謝産物を含め、信頼に足るかび毒のデータライブラリ
38 に収載されているマイコトキシンが検出されなかったとしている。（参照 9）
39 【文献 2 6】

1
2 (3) その他

3 厚生労働省の「既存添加物名簿収載品目リスト」においては、*A. niger*を
4 基原とする添加物として α -アミラーゼ、アントシアナーゼ、イヌリナーゼ、
5 インベルターゼ、カタラーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、キシラナーゼ、キトサ
6 ナーゼ、グルカナーゼ、 β -グルコシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、酸性
7 ホスファターゼ、セルラーゼ、トランスグルコシダーゼ、フィターゼ、プロ
8 テアーゼ、ペクチナーゼ、ペプチダーゼ、ヘミセルラーゼ、ホスホジエステ
9 ラーゼ、ホスホリパーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ及びリパーゼが掲げ
10 られている（参照10）【文献28】ことから、我が国においては、既に *A.*
11 *niger* を基原とする添加物が食品の加工等に使用されてきているものと考え
12 られる。また、米国 FDA は、*A. niger* 由来の α -アミラーゼ、セルラーゼ、
13 アミログルコシダーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、リパーゼ、
14 ペクチナーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、カルボヒドラーゼ、プロテアーゼ及び
15 カタラーゼについて、非病原性・非毒素産生性の生産菌株を用いて適正使用
16 規範（GMP）の下で生産される限りにおいては GRAS 物質とみなされると
17 の認識を示している。（参照3、11）【文献6、7】

18
19 2. 本品目の安全性

20 (1) 体内動態（消化管内での分解性等）

21 本品目の有効成分は、378 アミノ酸からなるたん白質であることが明らかに
22 されており、経口的に摂取された後は消化管内で速やかに分解され、他の食品
23 由来のたん白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
24 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
25 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
26 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
27 した。

28
29 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
30 解して食品常在成分と同一物質になること。

31 指定等要請者によれば、ウェブサーバExPASy³⁾において提供されている
32 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、アス
33 パラギナーゼのアミノ酸配列をペプシン（pH1.3又はpH>2）、トリプシン
34 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、初回の
35 酵素分解においてオリゴペプチド（30～50アミノ酸を含む）まで分解される

³⁾ 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、たん白質及びプロテオミクス（網羅的たん白質解析）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。指定等要請者によれば、本品目の豪州・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）における評価の際にも、ExPASyを用いた資料が用いされたとされている。

1 ことが示唆されたとされ、体内では、このオリゴペプチドはペプチダーゼに
2 より更に分解され、アミノ酸として吸収されて通常の代謝経路をたどると考
3 えられるとされている。（参照 2、12、13）【本体、文献 29、30】

4
5 **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。**

6
7 上述のとおり、指定等要請者によれば、本品目の有効成分の分解に関わる
8 主要な因子は、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン及びペプチダーゼ等
9 の酵素であるとされている。（参照 2）【本体】

10
11 **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
12 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。**

13 上述のとおり、指定等要請者によれば、本品目の有効成分は、体内で食品
14 常在成分であるアミノ酸として吸収されることから、糖質、ビタミン、ミネ
15 ラル等のほかの栄養成分の吸収は阻害しないとされている。（参照 2）【本
16 体】

17
18 **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
19 排泄されないこと。更に、未加水分解物又は部分加水分解物が生体組織中に蓄
20 積しないこと。**

21 上述のとおり、指定等要請者によれば、本品目の有効成分は体内で分解さ
22 れてアミノ酸となり、通常の代謝経路をたどると考えられることから、未加
23 水分解物や部分加水分解物が大量に糞便中に排泄すること及び生体内に蓄
24 積することは考え難いとされている。（参照 2）【本体】

25
26 **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
27 題が起きないこと。**

28 指定等要請者によれば、本品目は、高温で食品を加工する際、アスパラギ
29 ンがブドウ糖、果糖等の還元糖と反応して生じるアクリルアミドの生成を低
30 減することが使用目的であるため、対象食品は限定されるとされている。よ
31 って、本品目を使用した食品では、アスパラギンがアスパラギン酸とアンモ
32 ニアに加水分解されるが、アスパラギン酸の過剰摂取の問題はないと考えら
33 れるとされている。（参照 2）【本体】

34
35 **（2）毒性**

36 指定等要請者は、本品目の主たる成分が、「添加物に関する食品健康影響
37 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
38 に明らかである場合」に該当するとして、遺伝毒性、90 日間反復投与毒性及

1 びアレルギー性に係る試験成績を提出している。また、併せて出生前発生毒
2 性試験の試験成績も提出している。

3 4 ① 遺伝毒性

5 a. 遺伝子突然変異を指標とする試験

6 (a) 微生物を用いる復帰突然変異試験

7 指定等要請者委託試験報告(2006a)によれば、本品目に係る製剤化
8 前原末(ロットAPE0604、TOS 89.68%)について、細菌(*Salmonella*
9 *typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び*Escherichia coli*
10 *WP2uvrA*)を用いた復帰突然変異試験(最高用量5 mg/plate)が実施さ
11 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。
12 (参照 1 4) 【文献 3 7】

13 14 b. 染色体異常を指標とする試験

15 (a) 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

16 指定等要請者委託試験報告(2006b)によれば、本品目に係る製剤化
17 前原末(ロットAPE0604、TOS 89.68%)についての培養ヒト末梢血リ
18 ンパ球を用いた染色体異常試験(最高用量5 mg/mL)が実施されており、
19 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
20 1 5) 【文献 3 9】

21
22 以上のとおり、本品目については、ガイドラインに規定された最高用量
23 まで実施された試験において、遺伝子突然変異誘発性及び染色体異常誘発
24 性のいずれも認められていない。したがって、本品目には、生体にとって
25 特段問題となる遺伝毒性はないものと考えられた。

26 27 ② 反復投与毒性

28 a. 13 週間反復投与毒性試験

29 指定等要請者委託試験報告(2006c)によれば、6週齢のWistarラット
30 (各群雌雄各20匹)に本品目に係る製剤化前原末(ロットAPE0604)
31 (34,552 ASPU/g、TOS 89.68%) (0、0.2、0.6、1.8% ; 雄0、130、391、
32 1,157、雌0、151、452、1,331 mg/kg体重/日。TOS換算で雄0、117、351、
33 1,038、雌0、135、405、1,194 mgTOS/kg体重/日。)を13週間混餌投与
34 する試験が実施されている。その結果、いずれの群においても死亡動物は
35 認められなかったとされている。血液学的検査においては、投与開始8日
36 後の高用量群の雄で単球の増加が認められ、13週目の全投与群の雄で好塩
37 基球の減少が認められたとされている。これについて試験担当者は、被験
38 物質の用量や投与期間に関連したものではなく、かつ、背景データの範囲

1 内の変化であったことから、毒性学的に意義はないものと考察している。
2 血液生化学的検査においては、投与開始8日後の高用量群の雌雄及び中用
3 量群の雌でソルビトールデヒドロゲナーゼ活性の低値が認められたとさ
4 れている。これについて試験担当者は、その後の検査では確認されず、か
5 つ、病理組織学的検査での肝臓に係る所見との関連性も認められなかった
6 ことから、毒性学的に意義はないものと考察している。尿検査においては、
7 雄の高用量群で三リン酸結晶の僅かな増加が認められたとされている。こ
8 れについて試験担当者は、三リン酸は尿中に通常存在する物質であり、増
9 加の程度は臨床的に問題となるものではないと考察している。そのほか、
10 一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科学的検査、その他の機能検査（機
11 能観察総合検査（FOB）、自発運動量等）、器官重量並びに剖検及び病理
12 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認められなかつ
13 たとされている。以上の結果より、試験担当者は、本品目に係る製剤化前
14 原末（ロットAPE0604）に係るNOAELを、雌雄共に本試験の最高用量で
15 ある1.8%（雄1,157 mg/kg体重/日（1,038 mgTOS/kg体重/日）、雌1,331
16 mg/kg体重/日（1,194 mgTOS/kg体重/日））としている（参照16）【文
17 献31】。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
18 おける被験物質のNOAELを、雌雄共に本試験の最高用量である1.8%（雄
19 1,157 mg/kg体重/日（1,038 mgTOS/kg体重/日）、雌1,331 mg/kg体重/日
20 （1,194 mgTOS/kg体重/日））と考えた。

21 ③ 生殖発生毒性

22 a. 出生前発生毒性試験

23 指定等要請者委託試験報告（2006d）によれば、Wistarラット（各群25
24 匹）に、本品目に係る製剤化前原末（ロットAPE0604）（34,552 ASPU/g、
25 TOS 89.68%）（0、0.2、0.6、1.8%；0、136、403、1,205 mg/kg体重/
26 日。TOS換算で0、122、361、1,081 mgTOS/kg体重/日。）を、交尾確認
27 日を妊娠0日として、妊娠0～21日に混餌投与し、妊娠21日に胎児を検査
28 する試験が実施されている。その結果、母動物の一般状態、体重、摂餌量、
29 病理組織学的検査に、被験物質の投与に関連した影響は認められなかつ
30 たとされている。胎児の検査では、低用量群及び中用量群の胎児で外表、内
31 臓及び骨格の奇形が散見されたとされている。これらについて試験担当者
32 は、奇形発現の頻度は低く、用量相関性が認められなかったことから、被
33 験物質の投与に関連したものではないとしている。また、着床後胚死亡率、
34 胎児死亡率、吸収並びに胎児及び胎盤重量に被験物質の投与に関連した影
35 響は認められなかったとされている。以上の結果より、試験担当者は、本
36 品目に係る製剤化前原末（ロットAPE0604）に係るNOAELは、本試験の
37 最高用量である1.8%（1,205 mg/kg体重/日（1,081 mgTOS/kg体重/日））
38

1 としている（参照 1 7）【文献 3 2】。本専門調査会としては、試験担当
2 者の判断を是認し、本試験における被験物質のNOAELを、本試験の最高
3 用量である1.8%（1,205 mg/kg体重/日（1,081 mgTOS/kg体重/日））と考
4 えた。

6 ④ アレルゲン性

7 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
8 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、有効成分
9 がたん白質であることから、「遺伝子組換え食品（微生物）の安全性評価基
10 準」（平成20年6月食品安全委員会決定）を参考に、①既知のアレルゲンと
11 の構造相同性及び②物理化学的処理に対する感受性に関する事項について
12 考察を行うこととした。

14 a. 既知のアレルゲンとの構造相同性

15 指定等要請者の報告によれば、相同性検索機能を備えているたん白質デ
16 ータベースとして、網羅性が高いと考えられているSDAP⁴)を用いて、国
17 際連合世界食糧農業機関（FAO）/世界保健機関（WHO）のガイドライン
18 に沿って、6、7及び8アミノ酸配列の連続一致検索並びに80アミノ酸配列
19 で35%以上の相同性を示すものの検索が実施されている。その結果、6ア
20 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が2件認め
21 られたが、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
22 ん白質は認められなかったとされている。（参照 2、1 8、1 9、2 0）

23 【本体、文献 3 3、3 4、3 5】なお、Hilemanら（2002）によれば、一
24 般的に、6アミノ酸配列以下の連続一致は、ノイズ（＝アレルゲン性の有
25 無とは関係ない偶然の一致）の範囲内と判断できる可能性が高いとされて
26 いる。（参照 2 1）【文献 3 6】また、指定等要請者の報告によれば、有
27 効成分についての80アミノ酸スライディングウインドウ検索（アミノ酸配
28 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
29 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
30 ている。（参照 2、1 8）【本体、文献 3 3】

32 b. 人工消化液による分子量又は免疫反応性の変化

33 人工消化液による分子量又は免疫反応性の変化に係る試験は実施され
34 ていないが、上述のとおり、本品目の有効成分はペプシン、トリプシン及
35 びキモトリプシンの最初の酵素分解においてオリゴペプチド（30～50アミ
36 ノ酸を含む）まで分解されることが示唆されると報告されている。（参照

⁴ 指定等要請者によれば、SDAP を用いた資料は、JECFA における本品目の評価で用いられたとされている。
（参照 2）【本体】

1 2、13) 【本体、文献30】

2
3 **c. 加熱処理による免疫反応性の変化**

4 加熱処理による免疫反応性の変化に関する試験は実施されていない。

5
6
7 **Ⅲ. 一日摂取量の推計等**

8 本品目が使用される可能性のある食品（群）に対する本品目の使用量及び最終
9 製品中の残存量は、指定等要請者によれば別紙3の表1に掲げたとおりである。
10 その残存量と、平成21年国民健康・栄養調査から得られる食品（群）の一日摂
11 取量と、本品目の最大添加率から、本品目の推定一日摂取量は、体重を50kgと
12 して、別紙3の表2のとおり、0.549 mgTOS/kg 体重/日と算出される。（参照2）
13 【本体】

14
15
16 **Ⅳ. 国際機関等における評価**

17 **1. FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）における評価**

18 2008年の第69回会合において、JECFAは、本品目について、13週間反復
19 投与毒性試験におけるNOEL 1,038 mgTOS/kg 体重/日と、最も保守的な推定
20 を行った場合の一日摂取量 4.1 mgTOS/kg 体重/日とのマージンが約250であ
21 ることをもって、GMPに従って特定の目的で使用される限りにおいては、ADI
22 を「特定しない（not specified）」と結論している。（参照22、23）【文献3
23 ①、3②】

24
25 **2. 米国における評価**

26 米国では、2007年3月、意図した条件下において使用される限りにおいて
27 本品目はGRAS物質であるとする指定等要請者からの届出に対し、FDAから
28 異論はない旨の回答がなされている。（参照6）【文献2】

29
30 **3. 欧州における評価**

31 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
32 として規制されていなかった。しかしながら、2008年に公布された欧州議会・
33 欧州理事会規則により、加工助剤たる酵素についても添加物としての規制の対
34 象となる見込みである。（参照7）【文献13】

35
36 加工助剤たる酵素を規制しているフランスにおいては、2007年5月、仏食
37 品衛生安全庁（AFSSA）において安全性に懸念がないと評価されている（参照
38 24）【文献9】。同じく加工助剤たる酵素を規制しているデンマークにおい

1 ては 2007 年 9 月に、スイスにおいては 2008 年 6 月にそれぞれ添加物として
2 の本品目の使用が認められている。（参照 2 5、2 6）【文献 1 0、1 1】

3 4 4. その他の国における評価

5 豪州・ニュージーランドにおいては、2008 年、FSANZ において本品目につ
6 いて安全性に懸念がないと評価されている。（参照 2 7）【文献 1 5】

7 8 5. 我が国における評価等

9 我が国において、アスパラギナーゼは添加物としての使用が認められていない。
10 *A. niger*を基原とする添加物としては、II 1（3）で述べたとおり、種々の物質
11 が厚生労働省の「既存添加物名簿収載品目リスト」に掲げられていることから、
12 我が国においては、既に*A. niger*を基原とする添加物が食品の加工等に使用され
13 てきているものと考えられる。

14 15 16 V. 食品健康影響評価

1 別紙 1 : 略称

2

略称	名称等
AFFSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments : 仏食品衛生安全庁
EC	Enzyme Commission : 酵素委員会
EU	European Union : 欧州連合
FAO	Food and Agriculture Organization : 国際連合食糧農業機関
FOB	Functional Observational Battery : 機能観察総合検査
FSANZ	Food Standards Australia New Zealand : 豪州・ニュージーランド食品基準機関
GMP	Good Manufacturing Practice : 適正使用規範
GRAS	Generally Recognized As Safe : 一般的に安全とみなされる
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
SDAP	Structural Database of Allergenic Proteins : アレルゲン性たん白質の構造データベース
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
WHO	World Health Organization : 世界保健機関

3

4

- 1 別紙 2 : 各種毒性試験等成績
- 2 (略)
- 3

1 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）

2

3 指定等要請者によれば、本品目が使用される可能性のある食品（群）に対する本品
 4 目の使用量及び最終製品中の残存量は、以下の表1のとおりである。これは、2008
 5 年にJECFAにおいて評価された際に用いられたデータと同一である。（参照23）

6

7 表1 各食品（群）に対する本品目の使用量及び最終製品中の残存量

対象食品群	a. 原料への酵素最大添加 量 (ASPU/kg)	b. 最終製品中の最大原料 量 (%)	c. 最終製品中の最大残存 酵素量 (ASPU/kg) (a×b)	d. 最終製品中の最大残存 酵素量 (mgTOS/kg) *
パン類	385	91	350	9.97
シリアル食品	850	95	808	23.1
ポテト製品	15,000	100	15,000	428
調味料**	6,200	≤2	124	3.54

8

* JECFAに提出された申請資料に用いられたロットにおける酵素活性及びTOSの平均値から算出されている。

9

** 海外におけるProcess Flavours（アミノ酸や糖等をメイラード反応させて生成する調味料）を想定している。

10

11 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21年国民健康・
 12 栄養調査（参照28）【文献38】より）を基に、本品目の一日摂取量を以下の表2
 13 のように推定している。（参照2）【本体】

14

15 表2 本品目の推定一日摂取量

表1における 対象食品群	「平成21年国民健康・栄養調査」において 参照した分類		d. 最終製品への最 大残存酵素量 (mgTOS/kg)	e. 一日食品摂取量 (g/人/日)	f. 本品目の推定一日摂取量 (mgTOS/kg体重/日) (d÷1,000×e÷50)
	中分類	小分類			
パン類	小麦・加工品		9.97	99.4	0.0198
	菓子類	ケーキ・パストリー類	9.97	6.3	0.0013
		ビスケット類	9.97	1.6	0.0003
シリアル食品	その他の穀類・加工品		23.1	8.2	0.0038
ポテト製品	いも類		428	54.6	0.4674
	菓子類	その他の菓子類***	428	6.1	0.0522
調味料	調味料・香辛料類	その他の調味料****	3.54	59.4	0.0042
合計					0.549

16

*** ポテトチップス等を想定している。

17

****Process Flavoursを想定している。

18

1 <参照>

- 1 厚生労働省,「*Asparaginase niger* ASP-72 株を利用し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 (平成 24 年 9 月 26 日付けで食品健康影響評価を依頼した事項), 第 448 回食品安全委員会 (平成 24 年 10 月 1 日)【委員会資料】
- 2 DSM ニュートリションジャパン(株), 食品添加物指定の要請資料 *Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ (指定等要請者作成資料), 2012 年 9 月 24 日【本体】
- 3 Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC and van Dijck PWM: On the safety of *Aspergillus niger* – a review. Appl Microbiol Biotechnol 2002; 59: 426-35 【文献 6】
- 4 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.fsc.go.jp/sonota/acrylamide-food170620.pdf> (2012 年 8 月閲覧)【文献 1】
- 5 Codex Alimentarius Commission, Code of practice for the reduction of acrylamide in foods, CAC/RCP 67-2009. 【文献 2】
- 6 Tarantino LM (Director, Office of Food Additive Safety, Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), Food and Drug Administration (FDA)), Agency response letter GRAS notice No. GRN 000214, CFSAN/Office of Food Additive Safety, March 12, 2007【文献 4】
- 7 European Parliament and Council of the European Union: Regulation (EC) No 1331/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 establishing a common authorization procedure for food additives, food enzymes and food flavourings, Official Journal of the European Union, 31.12.2008, L354/1-6【文献 1 3】
- 8 Nyireddy I, Etter L, Fesüs I and Mayer G: The fate of mould “spores” in the digestive tract of chicks. Acta Vet Acad Sci Hung 1975; 25: 123-8【文献 2 7】
- 9 Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Science (KNAW) , Report, analyses of two *Aspergillus niger* strains, TM06.055 (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表)【文献 2 6】
- 10 α -アミラーゼ, アントシアナーゼ, イヌリナーゼ, インベルターゼ, カタラーゼ, α -ガラクトシダーゼ, キシラナーゼ, キトサナーゼ, グルカナーゼ, β -グルコシダーゼ, グルコースオキシダーゼ, 酸性ホスファターゼ, セルラーゼ, トランスグルコシダーゼ, フィターゼ, プロテアーゼ, ペクチナーゼ, ペプチダーゼ, ヘミセルラーゼ, ホスホジエステラーゼ, ホスホリパーゼ, ポリフェノールオキシダーゼ, リパーゼ. 日本食品添加物協会技術委員会編, 既存添加

物名簿収載品目リスト注解書. 日本食品添加物協会, 東京, 1999 【文献 2 8】

- 1¹ Rulis AM (Director, Office of Food Additive Safety, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration), Re: GRAS Notice No. GRN 000089, April 3, 2002. 【文献 7】
- 1² Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD and Bairoch A: ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(13): 3784-88 【文献 2 9】
- 1³ Enzymatic breakdown of asparaginase: ExPASy PeptideCutter (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表) 【文献 3 0】
- 1⁴ van den Wijngaard MJM (TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek)), TNO report V6805/15, Bacterial reverse mutation test with enzyme preparation of *Aspergillus niger* (ASP72), TNO project number 031.10803/03.41, TNO study code 6805/15, TNO, the Netherlands, 2006a (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表) 【文献 3 7】
- 1⁵ Usta B and de Vogel N (TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek)), TNO report V6802/14, Chromosomal aberration test with an enzyme preparation of *Aspergillus niger* (ASP72) in cultured human lymphocytes, TNO project number 031.10803/03.42, TNO study code 6802/14, TNO, the Netherlands, 2006b. (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表) 【当初文献 3 9】
- 1⁶ Lina BAR (TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek)), TNO report V6998, repeated-dose (13-week) oral toxicity study with an enzyme preparation of *Aspergillus niger* containing asparaginase activity (ASP72) in rats, volume 1, TNO project number 031.10642, TNO study code 6998, TNO, the Netherlands, 2006c. (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表) 【当初文献 3 1】
- 1⁷ Tegelenbosch-Schouten MM (TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek)), TNO report V7043, Oral prenatal developmental toxicity study with an enzyme preparation of *Aspergillus niger* containing asparaginase activity (ASP72) in rats, TNO project number 031.10803, TNO study code 7043, TNO, the Netherlands, 2006d. (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表) 【当初文献 3 2】
- 1⁸ DSM Food Specialties, Sequence comparison between asparaginase and known (food) allergens, reference: DFS/REG 00056472, June 29, 2010 (DSM

- ^{1 9} 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. 【当初文献 3 4】
- ^{2 0} Ivanciuc O, Schein CH and Braun W: SDAP: database and computational tools for allergenic proteins. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(1): 359-362 【当初文献 3 5】
- ^{2 1} 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): 280-291 【当初文献 3 6】
- ^{2 2} WHO and FAO (ed.), Technical Report Series No.952, Evaluation of certain food additives, sixty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, 17-26 June 2008, WHO, 2009; pp.19-22 and 187-190. 【文献 3 ①】
- ^{2 3} Asparaginase from *Aspergillus niger* expressed in *A. niger*. In WHO (ed.), Food Additives Series 60, Safety evaluation of certain food additives, prepared by the sixty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Rome, 17-26 June 2008, WHO, Geneva, 2009; pp.3-13. 【文献 3 ②】
- ^{2 4} AFSSA, Opinion of the French Food Safety Agency relating to the application for authorization to use a self-cloned *Aspergillus niger* asparaginase in the preparation of foods containing L-asparagine and carbohydrates which are cooked at temperatures above 120°C, such as bread and the other cereal goods (including breakfast cereals), potato-based fried goods and certain yeast extracts, Afssa-Submission No.2007-SA-0040, Maisson-Alfort, May 31, 2007. 【文献 9】
- ^{2 5} Danish Veterinary and Food Administration, Preventase/Approval, File: 2007-20-5406-00130/BXJE, September 24, 2007. 【文献 1 0】
- ^{2 6} Federal Office of Public Health FOPH, Request for authorization of the enzyme asparaginase (PrevetaSe™) from *Aspergillus niger* strain ASP-72 as processing aid, June 2, 2008. 【文献 1 1】
- ^{2 7} Foods Standards Australia New Zealand, Application A1003, Asparaginase from *Aspergillus niger* as a processing aid (enzyme) approval report, 1 October, 2008. 【文献 1 5】
- ^{2 8} 厚生労働省, 平成 21 年国民健康・栄養調査報告, 平成 23 年 10 月. 【文献 4 0】