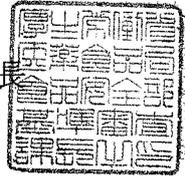


食安基発0919第1号

平成25年9月19日

内閣府食品安全委員会事務局評価第一課長 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長



食品健康影響評価に係る補足資料の提出について

平成25年3月14日付け府食第203号により提出依頼のありました *Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼの食品健康影響評価に係る補足資料につきまして、別紙のとおり提出いたします。



平成 25 年 3 月 14 日付けの食品安全委員会からの「*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼの食品健康影響評価に必要な補足資料」のご請求に対し、以下の通り回答申し上げます。

1. 以下に挙げる試験を実施し、結果を報告すること。また、これらの結果を踏まえ、*A. niger* ASP-72 株のフモニシン産生性について考察すること。

(1) *A. niger* ASP-72 株について、フモニシン合成にかかわる主要遺伝子の有無を調べる試験

A. niger CBS 513.88 株について、2007 年にその全ゲノム塩基配列解析が行われた結果、フモニシンの合成遺伝子クラスターの存在が認められた（添付資料 A）。CBS 513.88 株は本アスパラギナーゼ生産菌 *A. niger* ASP-72 株の祖先に当たることから、ASP-72 株も同様にフモニシン合成にかかわる主要遺伝子群を持つと考えられる。

(2) *A. niger* ASP-72 株の培養液中の、フモニシン群の存在の有無を調べる試験

本生産菌 ASP-72 株の培養液中の、フモニシン群の存在について試験した結果、*A. niger* が生産するとされるフモニシン B₂、B₄ 及び B₆ は検出されなかった（添付資料 B、C、D）。

(3) 最終製品中の、フモニシン群の存在の有無を調べる試験

本生産菌 ASP-72 株により生産されたアスパラギナーゼの最終製品中のフモニシン群の存在について液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS/MS）を用いて試験した結果、フモニシン群の中でも一般的にフザリウム属菌が生産することで知られ、発がん性があり最重要とみなされているフモニシン B₁ 及び B₂ は検出されなかった（添付資料 D、E、F、G、H）。

考察：以上より、本生産菌 *A. niger* ASP-72 株はフモニシンの合成に関わる遺伝子クラスターを保有するが、標準的な商業用の酵素生産に用いられる培養条件下ではフモニシン群を産生することはなく、本生産菌により生産されるアスパラギナーゼは安全に食品に利用することが可能である。

2. *Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ（以下「本品目」という。）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ことを確認するため、以下の事項について資料を整理し、提出すること。

（1）本品目について、人口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を実施し、その結果をもとに「食品添加物の指定および使用基準改正に関する指針について（平成 8 年 3 月衛化第 29 号）」（以下平成 8 年厚生省ガイドラインという。）の表 2 の 1～4 の検討事項が満たされることを確認すること。

本品について、人口消化液を用いた消化性を調査する試験を行った（添付資料 I）。この結果を踏まえ、平成 8 年厚生省ガイドライン 表 2 の 1～4 に沿って検討した結果を以下の通りまとめた。

1. 食品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解して食品常在成分と同一物質になること。

アスパラギナーゼについて、人工胃液による消化実験を行った。アスパラギナーゼを 5mg/mL の濃度に調整し、2 種類のサンプルを作成した。一つは 95℃で 5 分間加熱処理したもので、もう一つは加熱処理をしていないものである。これらのサンプルをペプシンを含む人工胃液中で、37℃にて反応を開始させた。0、0.5、2、5、10、20、30 及び 60 分後に反応を停止させたのち、SDS-PAGE により、アスパラギナーゼタンパク質の分子量を測定した。その結果、両サンプルにおいて反応開始後 0.5 分以内に本品のバンドが消失し、ペプシンのバンド（36.5kD）とペプシン産物に由来するマイナーバンドのみが確認された。これは本品が、SDS-PAGE の分子量マーカータンパク質である 3.5kDa タンパク質より小さなペプチド又はアミノ酸レベルにまで分解されたためと考えられる。反応開始後 0 分で反応を停止させたサンプルについては、あらかじめ 37℃に加温した人工胃液中にアスパラギナーゼを添加し、混和し、37℃の水浴に浸したのち速やかに水浴中から取り出し、反応を停止させたものである。SDS-PAGE においてペプシン及びアスパラギナーゼタンパク質の 2 種類のバンドが検出されると予想されたが、結果としてペプシン及びペプシンに由来するマイナーバンドしか検出されなかったことから、ペプシンによるアスパラギナーゼの分解は、非常に短時間で行われると考えられる。

以上の実験結果より、アスパラギナーゼは通常の使用条件下で、容易に消化管（胃）で分解され、食品常在成分になると考えられる。

なお、以上の通り人工胃液における分解が確認されたため、人工腸液における分解性の試験は行っていない。

2. 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。

1. で示した通り分解に関わる主要な因子はペプシンであり、pH1.2の酸性条件下で小分子のペプチド又はアミノ酸レベルにまで分解されると考えられる。

3. 食品添加物の通常の使用条件下で適正な量を使用した場合、本品の体内への吸収が食品常在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。

本品は体内で食品常在成分であるアミノ酸として吸収される。糖質、ビタミン、ミネラル等の他の栄養成分の吸収は阻害しないと考える。

4. 摂取された本品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。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積しないこと。

1. に示した通り、本品は消化酵素によって分解されアミノ酸となり、通常の代謝経路をたどると考えられ、未加水分解物や部分加水分解物が大量に糞便中に排泄されること、また生体内に蓄積することは考え難い。

(2) 本品目の我が国における推定一日摂取量をもとに、平成8年厚生省ガイドラインの表2の5の検討事項が満たされることを確認すること。

5. 本品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ニアに加水分解されている。アスパラギン酸及びアンモニアは、様々な食品に元来含まれる成分である。本品の使用目的は、高温で食品を加工する際、アスパラギンがブドウ糖、果糖などの還元糖と反応して生じるアクリルアミドの生成を低減することであるため、その対象食品は限定され、本品を食品添加物として適正に使用した場合、通常の商品を摂取した場合と比較してもアスパラギン酸及びアンモニアの過剰摂取の問題はないと考えられる。

本品の推定最大一日摂取量は、申請書 p14 「(5) 一日摂取量に関する資料」 に示す通り 0.549 TOS mg/体重 kg/日であり、一人当たりの推定摂取量は 27.45 TOS mg/日である。これは、日本人のたんぱく質の平均一日摂取量 67.8g (添付資料 J) の約 0.04% に過ぎない。従って、本品を使用した食品を摂取することによる、当該食品の主成分の過剰摂取の可能性は低いと考えられる。

3. 上記2(1)で実施した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の結果をもとに、本品目のアレルゲン性について再考察すること。

A. niger 由来の酵素は安全に食されてきた歴史がある。本品については、2007年にアメリカやヨーロッパをはじめとする諸外国で使用が開始されて以降、これまでに本品を使用した食品を摂取後にアレルギー症状を発症したという報告はない。

(1) 既知のアレルゲンとの配列の相同性の比較

既知のアレルゲンとの配列の相同性の比較(添付資料K)を、次の通り実施した。

FAO/WHOのガイドライン(添付資料L)に沿って、6、7及び8アミノ酸配列の連続一致検索および80アミノ酸配列で35%以上の相同性を示すものの検索を行った。検索には、FAO/WHO 専門家会議報告書において提案されている手順であり、網羅性の高いと考えられているアレルゲン情報が収載されているSDAP(Structural Database of Allergenic Proteins)データベースを使用した(添付資料M)。SDAPを用いた資料は、第69回JECFA会議の際に提出され、評価されている。検索の結果、連続6アミノ酸の一致が2件認められたが、連続7及び8アミノ酸ではヒットは認められなかった。また、80アミノ酸配列で35%以上の相同性を示すものもヒットしなかった。一般的には、6アミノ酸配列以下の連続一致は、ノイズ(擬陽性)の可能性が高いと言われている(添付資料N)。

(2) 人工胃液での分解試験

2. に示す通り、本品は人工胃液により速やかに分解され、食品常在成分となることが明らかとなった。

以上より、*A. niger* 由来のアスパラギナーゼには、アレルギー反応を誘発する可能性は無いもしくは非常に低いといえる。

他の物理化学的処理による感受性に関する事項は実施していない。

4. 13 週間反復投与毒性試験について

(1) 予備試験 (TNO report V6998/RF, 9 June 2006) の詳細を提出し、用量設定の根拠を明らかにすること。

本 13 週間反復投与毒性試験は OECD のガイドライン 408 に則って行われており、このガイドラインによると、「16. 本ガイドラインに記載された方法で試験を行った結果、1000 mg/kg 体重/day 以上に相当する 1 用量において有害作用がみられなかった場合、および構造的に関連する化合物のデータから毒性がないと予想される場合には 3 段階の用量を用いた完全な試験は不要と考えられ、ヒトの暴露量からより高い用量の必要性が示唆されない限り、限度試験が適用される。」とされている。

本 13 週間反復投与毒性試験の予備試験である、ラットを用いた 14 日間用量設定試験 (添付資料 O) を行うに当たり、2007 年 7 月に食品安全委員会にて評価されたプロテアーゼ (*Aspergillus niger* GEP-44 株由来のプロテアーゼ) (添付資料 P) を被験物質とする 13 週間反復投与毒性試験 (添付資料 Q) の結果を参考とした。本試験における NOAEL (No observed adverse effects level) は 20000 mg/kg 体重/日 (5040 mg TOS/kg 体重/日) であったことから、プロテアーゼと構造的に関連する化合物である本アスパラギナーゼが同用量で毒性を有する可能性は低いと予想された。また、本アスパラギナーゼは *A. niger* GEP-44 株と同系統に属する *A. niger* 生産菌株により生産されるものであることから、培養液に由来するその他の物質が毒性を有する可能性も低いと予想され、5040 mg TOS/kg 体重/日を超える用量での毒性試験は不要と考えた。

この結果を踏まえ、本アスパラギナーゼを被験物質とするラットを用いた 14 日間用量設定試験における投与量を 0、0.2、0.6 又は 1.8% と設定し、ラットに経口投与したところ、1000 mg TOS/kg 体重/日 以上に相当する最高用量 1.8% においても有害作用は認められなかった。これにより、本 13 週間反復投与毒性試験における投与量を、1038 mg TOS/kg 体重/日に相当する 1.8% を最高用量として設定した。

(2) 血液学的検査において投与開始 8 日後の高用量群の雄で認められた単球の増加及び 13 週目の全投与群の雄で認められた好塩基球の減少について、当該試験項目に関する試験実施機関の背景データと、可能であれば当該試験項目の背景データに関する文献的な資料を提出すること。

当該試験項目の背景データを添付して提出する (添付資料 R)。

この背景データによると、本 13 週間反復投与毒性試験の実施期間 (2006 年 6 月から 9 月) を含む 2006 年 6 月から 2007 年 7 月における試験対照ラットの単球数及び好塩基球数はそれぞれ [] であり、本血液学的検査において投与開始 8 日後

の高用量群（1.8%）の雄で認められた単球の増加（下表 *1）及び13週目の全投与群の雄で認められた好塩基球の減少（下表 *2）はこの背景データの範囲内であることから、被験物質投与に起因するものではないと考察される。

雄ラット		単球数	好塩基球数
		投与後 8 日目	投与後 91 日目
投与量	0%	■	■
	0.2%	■	■
	0.6%	■	■
	1.8%	■	■

5. 上記 1～4 に関連する資料や考察があれば、併せて提出すること。

特にございませぬ。

資料一覧

- A. Pel et al., Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Asparagillus niger* CBS 513.88, Nature Biotechnology, Vol. 25, No. 2, 221-31, 2007
- B. Frisvad et al., Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains, PLoS One, Vol. 6, Issue. 8, 2011
- C. Analyses of four fermentation broths on the presence of toxic metabolites, DSM Food Specialities, 2012 (社内資料)
- D. STATEMENT REG#00060018, DSM Food Specialities B.V., 2013 (社内資料)
- E. Frisvad et al., Fumonisin B2 Production by *Asparagillus niger*, J. Agric. Food Chem., Vol. 55, 9727-9732, 2007
- F. Gelderblom et al., Structure-activity relationships of Fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays, Fd Chem. Toxic, Vol. 31, 407-414, 1993
- G. Bartok et al., Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom, Vol. 20, 2447-2462, 2006
- H. Absence of fumonisins in the enzyme asparaginase, DSM Food Specialities (社内資料)
- I. Proteolytic breakdown of asparaginase under simulated gastric conditions, DSM Food Specialities, 2013 (社内資料)
- J. 平成 21 年国民健康・栄養調査報告（一部抜粋），厚生労働省，平成 23 年 10 月
- K. Sequence comparison between asparaginase and known (food) allergens, DSM Food specialities, 2010 (社内資料)
- L. Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, 22-25 January 2001
- M. Ivanciuc et al., SDAP: Database and Computational Tools for Allergenic Proteins: Nucleic Acids Res Vol. 31, No. 1, 359-362, 2003
- N. Hileman et al., Bioinformatic Methods for Allergenicity Assessment Using a Comprehensive Allergen Database: Int Arch Allergy Immunol, Vol. 128, 280-291, 2002
- O. 14-day dose range-finding/ feasibility study with an enzyme preparation of *Asparagillus niger* containing Asparaginase activity (ASP72) in Rats. 2006 (社内資料)
- P. 遺伝子組換え食品等評価書 プロテアーゼ，食品安全委員会，2007 年 7 月

- Q. Repeated dose 90-day oral toxicity study by gavage with enzyme preparation of aspergillus niger (GEP 44) in wistar rats, 2004 (社内資料)
- R. 13wk rat studies - Historical control data clinpath (Provantis) (社内資料)