

食品添加物の指定要請資料
Aspergillus oryzae NZYM-SP 株由来の
アスパラギナーゼ

ノボザイムズ ジャパン株式会社

2014年 10月

目次

	頁
I. 評価対象添加物の概要	2
1. 名称及び用途	2
(1) 名称	2
(2) 用途	2
2. 起源又は発見の経緯	3
3. 諸外国における使用状況	5
4. 国際機関等における評価	6
5. 物理化学的性質	6
(1) 本品の有効成分	6
(2) 性質	6
(3) 組成	8
(4) 性状	8
(5) 確認試験	8
(6) 純度試験、微生物限度	8
(7) 酵素活性測定法	8
(8) 安定性	10
(9) 食品中の分析方法	10
6. 使用基準案	10
7. その他	11
(1) 関連酵素の自然界での存在	11
(2) 他のアクリルアミド除去方法との比較	11
(3) 製造方法	11
(4) 成分規格案の設定根拠	12
II. 安全性に係る知見	13
1. 体内動態試験	13
2. 毒性	14
(1) 9 1 日間反復投与毒性試験 げっ歯類	14
(2) 遺伝毒性試験	14
(3) アレルゲン性試験	15
3. ヒトにおける知見	16
4. 一日摂取量の推計等	16
5. 生産菌の安全性	17
III. 添付資料	21

I. 評価対象添加物の概要

1. 名称及び用途

(1) 名称

1) 名称

Aspergillus oryzae (*A. oryzae*) NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ

(Asparaginase from *Aspergillus oryzae* expressed in *Aspergillus oryzae* NZYM-SP)

2) 用語の定義

a) 本品：

今般、指定添加物「アスパラギナーゼ」の定義に基原として *A. oryzae* NZYM-SP 株の追加を要請するにあたり、本株を用いて生産されるアスパラギナーゼ。規格化された最終酵素製品であり、液状品と顆粒品の 2 種類がある（液状品及び顆粒品ともに TOS は 4%）。

b) 酵素試験液：

本品の製造過程（12 頁の図 8 参照）のステップ 5 の後に濃縮した酵素液。保存剤・安定化剤を含まず、製品化のための工程を経ていない。毒性試験などに用いる（TOS は 8.4%）。

(2) 用途

本品の有効成分は、アスパラギンを特異的に分解する酵素、アスパラギナーゼである。アスパラギンは食品中のアクリルアミド生成原因物質であり、その分解によりアクリルアミド量を低減することができる。

本品をビスケットやクラッカーなどの食品に添加することによって、そのアクリルアミド量を 50%から 90%低減させる効果があることが確かめられている。具体的なデータは、米国製パン協会（American Institute of Baking）および代表的な食品メーカーの協力のもとに実施された、本品のアクリルアミド生成抑制試験から得られた。ビスケットでは、小麦の重量あたり 180 ppm のアスパラギナーゼを添加することによって 90%の低減（図 1）、ジンジャースナップにおいては、570 ppm の添加で 45%、1430 ppm では 50%の低減（図 2）、また、クラッカーでは 290 ppm の添加で 85%の低減が認められた（図 3）。

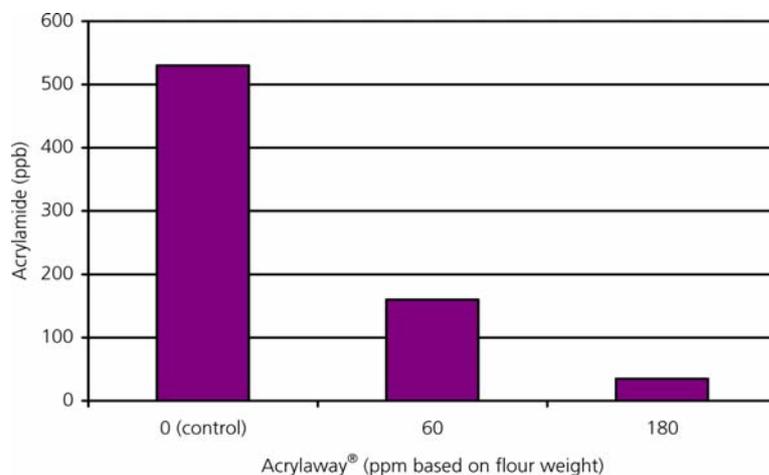


図 1 ビスケットにおけるアスパラギナーゼによるアクリルアミド低減効果
(Acrylaway®は本品の商品名)

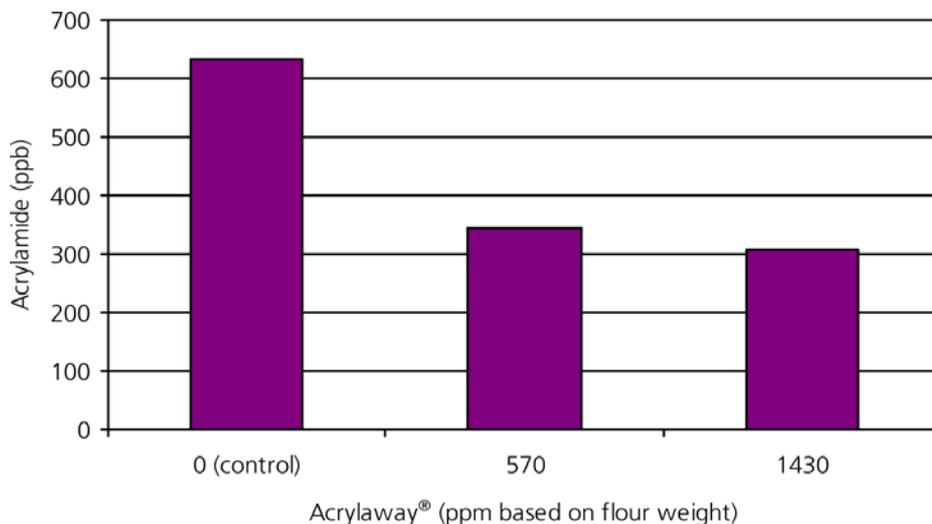


図2 ジンジャースナップにおけるアスパラギナーゼによるアクリルアミド低減効果

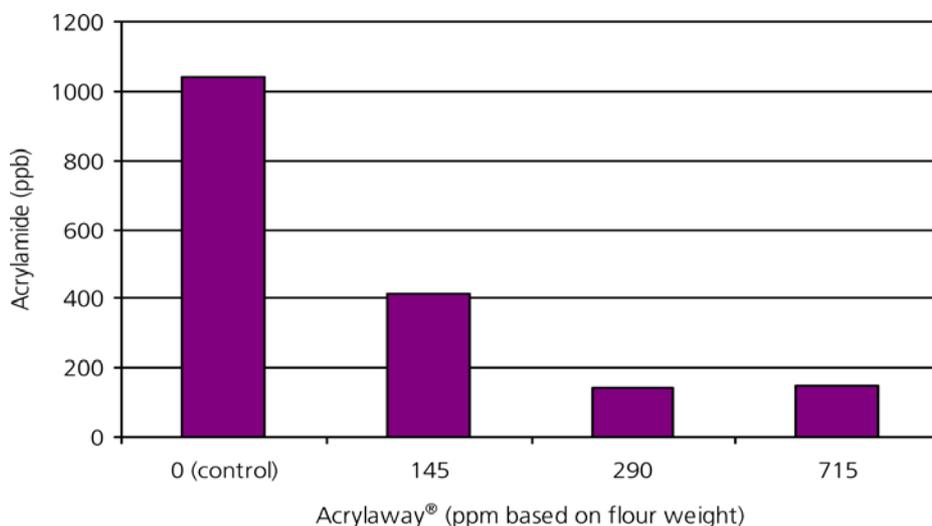


図3 クラッカーにおけるアスパラギナーゼによるアクリルアミド低減効果

2. 起源又は発見の経緯

本品は、食品添加物の酵素に分類されるものであり、その有効成分は食品中に存在するアスパラギンをアスパラギン酸に変換する作用を有する。アスパラギンはポテトや小麦などのデンプンを主成分とする食品に比較的多く含まれることが知られている。

2002年4月にスウェーデン政府は、これらのデンプンを多く含む食品を「焼く」、「揚げる」など、高温で調理された時にアスパラギンとブドウ糖などが反応し（メイラード反応）、発がん性が指摘されるアクリルアミドが生成されると発表した（スウェーデン国立食品局とストックホルム大学との共同研究）。国際がん研究機関（IARC: International Agency for Research on Cancer）によると、アクリルアミドは発がん性分類 2A（人に対しておそらく発がん性がある）であり、現時点では人に対する発がん性は確認されていない。このスウェーデン政府の発表以降、各国で加工食品中のアクリルアミド濃度の調査が始まり、毒性評価や生成機序の検討などに必要なデータ収集が行われるようになった。

日本では、国立医薬品食品衛生研究所がその調査の依頼を受け、緊急の研究班が組織された（厚生労働科学特別研究班）。その調査・研究結果を踏まえて2002年10月に厚生労働省食品保健部がこの問題に対する対応が発表した（添付資料1）、その中で産業界に対しては、アクリルアミド生成を抑制する製造条件等の研究を早急に実

施することを要請している。厚生労働科学特別研究班はこの後も引き続き調査・研究を続け、その調査・研究結果はコーデックス委員会食品添加物・汚染物質部会（CCFAC）や FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）に提出された。このように、アクリルアミドの食品中濃度の調査・研究に関して、日本は国際的な活動に参画した。

JECFA は CCFAC の依頼を受けて、2005 年 2 月の第 64 回会合で食品中のアクリルアミドについて最初のリスク評価を実施し、「神経の形態変化などにおいて、平均摂取量では影響がないが、高摂取量の場合には影響の可能性を否定できない」等の結論を下した。また、「食品中に含まれるアクリルアミドの量を低減するための適切な努力を継続すること」などの勧告を出している。JECFA はその後、2010 年 2 月の第 72 回会合において再評価を実施したが、新たに得られたデータから前回会合時の評価結果が裏付けられたとしている（添付資料 2）。

一方、コーデックス委員会では 2007 年に結成された食品汚染物質部会（CCCF）においてアクリルアミド低減のための実施規範の検討を開始し、2009 年 7 月の総会で「食品中のアクリルアミド低減のための実施規範」（添付資料 3）を国際規格として最終採択した。この規約には、大きく分けて以下の 3 つの有効な対策が示されている。

- ①適切な原材料の選択
- ②原材料の配合比率や組成の見直し
- ③調理加工条件、特に加熱条件の見直し

②の原材料の配合比率や組成の見直しの中で、アクリルアミド生成原因物質であるアスパラギンを酵素によって特異的に分解することが方法の 1 つとして挙げられている（図 4）。酵素反応は化学反応に比べて基質特異性が非常に高く、食品中で特定の基質に対する酵素反応が起こっても、他の物質に影響しないことが利点である。

このような状況の中で、当社では微生物由来のアスパラギン分解酵素、アスパラギナーゼの探索を始め、有用酵素を見出すに至った。本品の有効成分は、旧（財）大阪発酵研究所（Institute for Fermentation, Osaka (IFO)、現（独）製品評価技術基盤機構、生物遺伝資源部門（NITE Biological Research Center (NBRC)）から IFO4177（現 NBRC4177）として入手した *A. oryzae* が菌体外に生産するアスパラギナーゼである。

本品はビスケットやクラッカーなどの食品に添加されることによって、そのアクリルアミド量を 50%から 90%低減させる効果があり、また、その特異的な反応から食品の栄養特性や焼き色、風味などに影響を与えないことが確認されている（添付資料 4、5）。また、本品を用いるにあたり、新たな設備投資の必要もない。このような効果・利点から、現在では世界の多くの食品製造業者が本品を使用している。

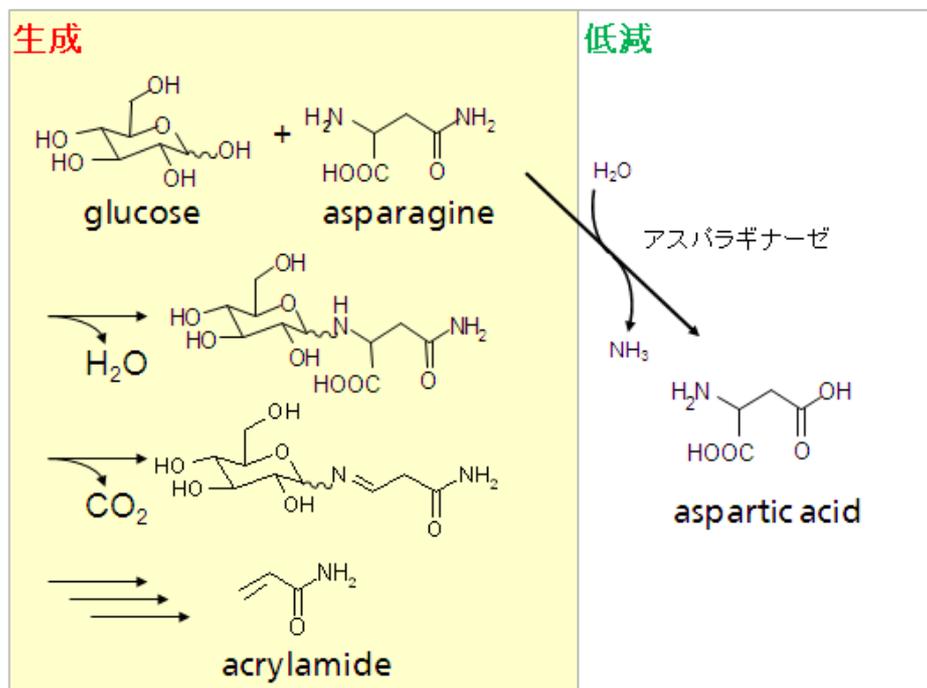


図4 メイラード反応によるアクリルアミドの生成及びアスパラギナーゼによるアクリルアミド生成の低減

3. 諸外国における使用状況

米国において、本品について一般的に安全とみなされる（GRAS）物質としての届出を行ったところ、2006年11月24日付でFDAから当該届出に異論がない旨の回答が出された（添付資料6）。欧州では加工助剤として用いられる酵素に対し、現時点では欧州レベルの規制はないが、デンマークとフランスにおいては独自の規制が実施されている。本品はこの2国において承認を受けている（添付資料7、8及び9）。その他、オーストラリア/ニュージーランド（添付資料10及び11）やカナダ（添付資料12及び13）など、各国における承認状況は以下に示す通りである。このように、本品はさまざまな国で使用され始めている。

国名	承認年
デンマーク	2008年上半期
オーストラリア/ニュージーランド	2008年上半期
フランス	2008年下半期
カナダ	2009年上半期
メキシコ	2008年上半期
韓国	2008年上半期
ベトナム	2008年上半期
ロシア	2008年下半期
シンガポール	2008年下半期
ブラジル	2009年上半期
中国	2009年下半期
タイ	2009年下半期

欧州において、2008年に公布された新たな欧州議会・欧州理事会規則（添付資料14）により、食品用酵素は、改良剤の1つとして規制されることになった。この規制は以下のように段階的に施行されることになっている。なお、安全性評価はEFSA（European Food Safety Authority）が行う。

- 既存製品の安全性評価申請 2011年9月～2015年3月
- EFSAによる安全性評価
- EC（European Commission）による認可リスト策定
- 新規食品用酵素の安全性評価

現在当社では、欧州に対して既存製品の安全性評価申請を行っている。本品においては2013年6月に申請し、現在EFSAによる安全性評価が行われている。

4. 国際機関等における評価

食品添加物の安全性評価は、国際的組織であるJECFAにおいて定期的に行われ、その会議報告はWHOテクニカルレポートシリーズ等として公表されている。2007年6月に開催された当該定例会議において、本品についてGMPに従って特定の目的で使用される限りはADIを「特定しない（not specified）」と結論された（添付資料15、16及び17）。

5. 物理化学的性質

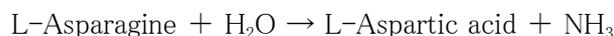
（1）本品の有効成分

- 1) 一般名： アスパラギナーゼ（Asparaginase）
- 2) Enzyme Commission No. : 3.5.1.1
- 3) CAS No. : 9015-68-3

（2）性質

1) 反応様式

遊離のL-アスパラギンを加水分解し、遊離のL-アスパラギン酸とアンモニアを生成する反応を触媒する。



2) 構造式

アスパラギナーゼのアミノ酸配列を表1に示した。アミノ酸残基数は359である。

表1 アスパラギナーゼ（本品の有効成分）のアミノ酸配列

SPLLYPRATDSNVTYVFTNPNGLNFTQMNTTLPNVTIFATGGTIAGSSADNTATTGY
KAGAVGIQTLIDAVPEMLNVANVAGVQVTNVGSPDITSDILLRLSKQINEVVCNDPT
MAGAVVTHGTDLTLEESAFFLDATVNCRKPVVIVGAMRPSTAISADGPLNLLQSVTV
ASPKARDRGALIVMNDRIVSAFYASKTNANTVDTFKAIEMGNLGEVVS NKPYFFYPP
VKPTGKTEVDIRNITSIPRVDILYSYEDMHNDTLYSAIDNGAKGIV IAGSGSGSVST
PFSAAMEDITTKHNIPIVASTRTGNGEVPSSAESSQIASGYLNP AKSRVLLGLLLAQ
GKSIEEMRAVFERIGVA

3) 分子量

37 kDa (アミノ酸配列から計算)

4) 等電点

pI4.9

5) 基質特異性

遊離の L- アスパラギンに対して特異的に反応する。副反応があることは知られていない。

6) 温度依存性

本品の有効成分の至適温度は、pH 7 において 50℃であり、80℃で失活する。

実際の食品加工工程において、本品で処理された食品がその後にアクリルアミドが生成される 120℃以上の温度で加熱されるが、本品の有効成分はその温度で失活する。

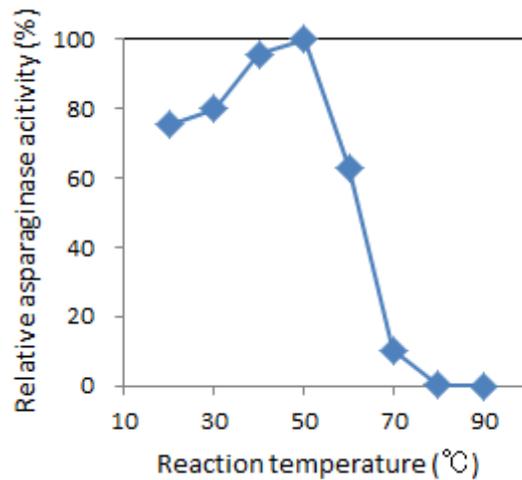


図5 アスパラギナーゼの温度依存性

7) pH 依存性

本品の有効成分の至適 pH は 7 である。

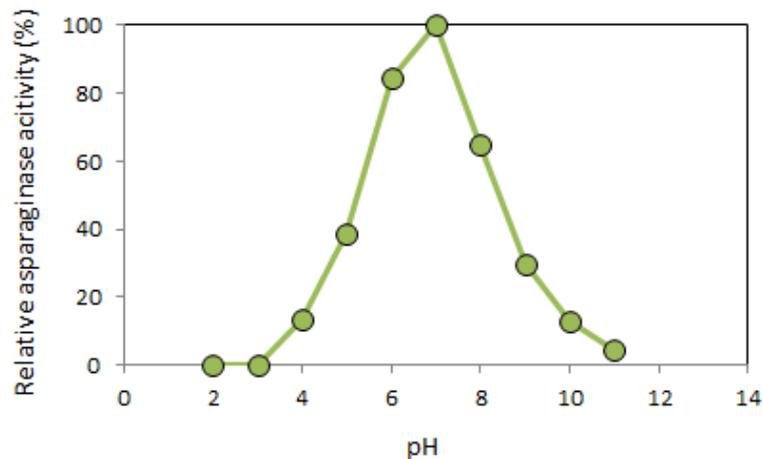


図6 アスパラギナーゼのpH依存性

8) 阻害剤

特に知られていない。

(3) 組成

本品は *A. oryzae* NZYM-SP 株の培養物と安定化剤等との混合物である。顆粒品には安定化剤として塩化ナトリウムと小麦粉が用いられ、この顆粒品は 1g 当り 3,500 単位以上の力価を有する。液状品には安定化剤としてグリセロール、保存剤としてソルビン酸カリウム（通常 0.1%以下）と安息香酸ナトリウム（通常 0.3%以下）が添加され、この液状品は 1g 当り 3,500 単位以上の力価を有する。ソルビン酸カリウム及び安息香酸ナトリウムは本品の品質保持のために少量添加され、また、食品に対する本品の添加量も少量（0.1%以下）であるため、当該食品には影響を及ぼさない。よって、本品に添加されるソルビン酸カリウム及び安息香酸ナトリウムは食品衛生法で定めるみなし規定に該当せず、それらの使用基準を考慮する必要はないと考えられる。

(4) 性状

淡褐色液状（液状品）、白色～灰白色顆粒（顆粒品）。

(5) 確認試験

I. 5. (6) に記載した酵素活性測定法に準じた試験において、酵素活性を示す。

(6) 純度試験、微生物限度

微生物を用いて食品用酵素を製造する際の製造に由来する有害物質成分、及び微生物限度の規定値を定めているものに、米国 Food Chemicals Codex (FCC) の“Enzyme Preparations, General Requirements”(the Seventh Edition, 2011)（添付資料 18、酵素の項を抜粋）、或いは JECFA の“General Specification and Considerations for Enzyme Preparations Used in Food Processing”（添付資料 19）があり、本品はこれらの要求事項を満たしている。表 2 に酵素試験液の分析値の例を示す。

また、実際の酵素製品（本品）の分析値の例は添付資料 20 に示した通りである。

表 2 酵素試験液の分析値

測定項目	単位	PPV 24743
重金属 ^a	ppm	3.9
Pb	ppm	<1
As	ppm	<0.1
Cd	ppm	<0.05
Hg	ppm	<0.03
総生菌数	/g	<2x10 ²
Total coliforms	/g	<10
病原性大腸菌	/25g	ND ^b
サルモネラ	/25g	ND
抗生物質		ND
アスパラギナーゼ生産菌	/g	ND

^a) 重金属 = Σ of Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, Sb, Sn

^b) ND = Not Detected

(7) 酵素活性測定法

酵素活性の測定には、アスパラギナーゼによる L - アスパラギンの分解によって生じるアンモニアに α -ケトグルタル酸を結合させ、L-グルタミン酸を生成させる際に消費

されるNADH (NADに変換されるNADH) を定量する方法を使用した。NADHの定量は、波長 340 nmでの吸光度測定法により行った。この方法は、当該波長の光を吸収しないNADの性質を利用している。

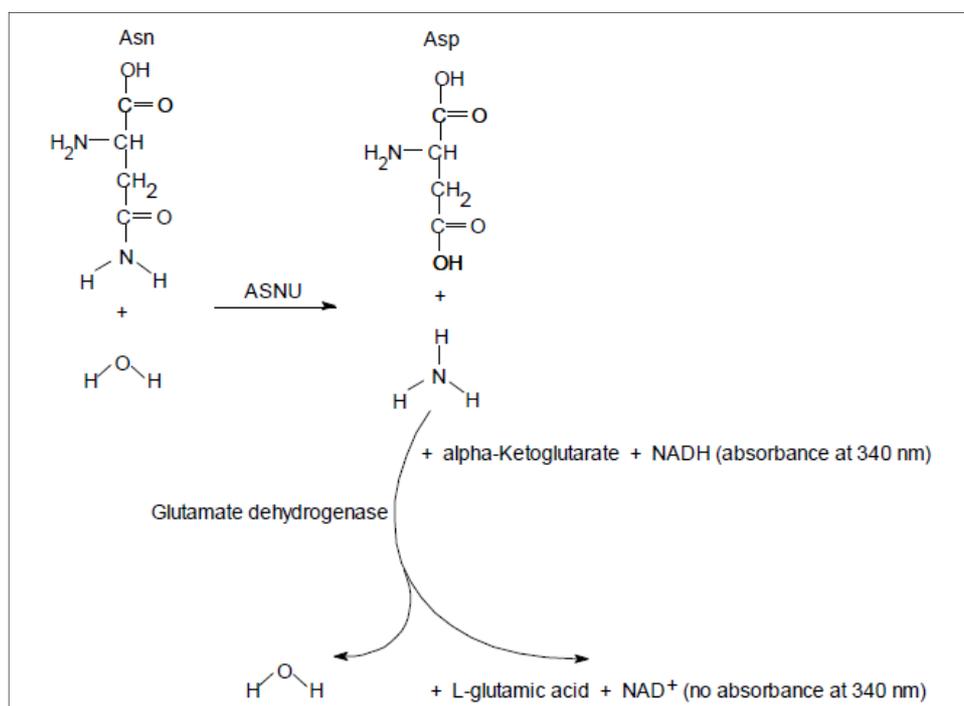


図7 アスパラギナーゼ活性の測定の原理

i. 基質溶液

L-アスパラギン一水和物 0.25±0.02g を量り、10-15ml の MOPS 緩衝液 (pH7.0、0.1mol/L) を加えて完全に溶けるまでかくはんした後、遮光し、A液とする。β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド二ナトリウム水和物 (還元型) 0.011±0.001g、2-ケトグルタル酸二ナトリウム 0.063±0.005g 及び 1680 単位以上に対応する量の L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (ウシ肝臓由来) を量り、A液に加えてかくはんして溶かし、MOPS 緩衝液 (pH7.0、0.1mol/L) を加えて正確に 25ml とする。用時調製する。

ii. 試料液

本品約 1.0g を精密に量り、酢酸緩衝液 (pH 5.0、0.1mol/L、ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル含有) を加えて溶かし、正確に 100ml とする。この溶液を酢酸緩衝液 (pH 5.0、0.1mol/L、ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル含有) を用いて希釈し、1ml 中に約 0.6 単位を含む溶液を調製し、試料液とする。

iii. 標準原液

775 単位に対応する量の酵素活性測定用アスパラギナーゼ (*A. oryzae* 由来) を量り、酢酸緩衝液 (pH 5.0、0.1mol/L、ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル含有) を加えて溶かし、正確に 100ml とする。この液を酢酸緩衝液 (pH 5.0、0.1mol/L、ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル含有) を用いて 8、10、15、20 及び 30 倍に希釈して、1ml 中に 0.9688、0.7750、0.5167、0.3875 及び 0.2583 単位を含む 5 つの液を調製し、標準原液とする。

iv. 操作法

基質溶液 4.6ml を正確に量り、37.0±0.5°Cで 8 分加温した後、試料液 0.4ml を正確に加えてかくはんし、37.0±0.5°Cで 1 分 30 秒間加温した液を検液とする。検液につき、水を対照として、波長 340nm における吸光度 A を測定する。別に、基質溶液 4.6ml を正確に量り、5 本の試験管に入れ 37.0±0.5°Cで 8 分加温し、試料液の代わりにそれぞれの試験管に異なる濃度の標準原液 0.4ml を加えて、以下検液

の調製と同様に操作して得られた液につき、水を対照として波長 340nm における吸光度を測定する。得られた吸光度と標準原液 1ml 中の酵素活性 (単位/ml) から検量線を作成する。試料液中の酵素活性 U (単位/ml) を吸光度 A と検量線から求め、次式により試料の酵素活性を求める。その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験する時、1 分間にアンモニア 1 μmol を遊離させる酵素量を 1 単位とする。

$$\text{酵素活性(単位/g)} = \frac{U \times D \times 100}{M}$$

ただし、

U : 試料液中の酵素活性 (単位/ml)

D : 試料液の希釈係数

M : 試料の採取量 (g)

v. 試薬・試液

- 3- (N-モルホリノ) プロパンスルホン酸 (Sigma M1254 又は同等品)
- Brij35 (ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル溶液、Sigma B4184 又は同等品)
- L-アスパラギン-水和物 (Sigma A7094 又は同等品)
- β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド二ナトリウム水和物 (還元型) (Roche 107735 又は同等品)
- 2-ケトグルタルサン二ナトリウム (Sigma K3752 又は同等品)
- L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (ウシ肝臓由来) (Sigma G2626 又は同等品)
- 酢酸緩衝液 (pH 5.0、1mol/L) : 酢酸ナトリウム三水和物 88.8g を水 1800ml に溶解し、酢酸で pH を 5.0 に調整し、水を加えて正確に 2000ml とする。
- 酢酸緩衝液 (pH 5.0、0.1mol/L、ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル含有) : 酢酸緩衝液 (pH 5.0、1mol/L) 500ml に水 3500ml を加え、さらに Brij35 (1→2) を 7.5ml 加える。適当な濃度の水酸化ナトリウムで pH を 5.0±0.05 に調整し、水を加えて正確に 5000ml とする。
- MOPS 緩衝液 (pH7.0、0.1mol/L) : 10.5±0.5g の 3- (N-モルホリノ) プロパンスルホン酸に水 450ml を加え、適当な濃度の水酸化ナトリウムで pH を 7.0±0.05 に調整し、水を加えて正確に 500ml とする。

(8) 安定性

冷蔵～常温保存(0～25℃)においては6ヶ月間安定である。

(9) 食品中の分析方法

本品は、使用基準を設定する必要がないと判断されるため (I. 6. で詳述)、食品中での本品の分析法設定は必要ないと考えられる。また、本品は、加工助剤として利用されるものであり、最終食品中では失活又は分解して、食品の常在成分 (タンパク質、ペプチド、アミノ酸) となるため、定性的分析方法の設定も困難である。

6. 使用基準案

13週間反復投与と毒性試験 (II. 2. (1)) の結果から、本品の無毒性量 (NOAEL) は、0.88 g TOS/kg体重/日である。また、II. 4. に記載した一日摂取量の推計から、本品の推定1日摂取量は90.2 μg TOS/kg体重/日である。これらの数値から安全マージンは以下のように算出され、100を大幅に超える値が得られた。

$$880 \text{ mg TOS/kg体重/日} \div 0.0902 \text{ mg TOS/kg体重/日} = 9,756 > 100$$

また、体内動態試験 (II. 1.) に記載したように、本品は消化管内で速やかに分解され、食品の常在成分になる。さらに本品は食品の製造の際に加工助剤として用いられるものであり、過剰摂取の可能性は低いと考えられる。よって、使用基準は設定する必要は無いと判断した。

7. その他

(1) 関連酵素の自然界での存在

自然界において、アスパラギナーゼは植物細胞の窒素代謝に重要な役割を果たすことが知られている（添付資料21）。豆科植物の植物細胞によって生成されたアスパラギンは、根の輸送系により根粒内から植物内に輸送される。アスパラギンはアスパラギナーゼによりアスパラギン酸とアンモニアとに分解される。この時、アスパラギンのアミドの窒素がアンモニウムイオンとして遊離され、グルタミン合成酵素の作用によりグルタミンへと取り込まれる。グルタミンは、植物体内の生合成において窒素源として用いられる。

(2) 他のアクリルアミド除去方法との比較

工業的にアクリルアミドを分解除去する方法については知られていない。アクリルアミドは水溶性が高く、水環境中で加水分解するため（加水分解半減期は約1年間）、水系に抽出して時間をかけてアクリル酸及びアンモニアに分解することによって除去する方法が取られている。

アスパラギナーゼによるアクリルアミド除去方法は、アクリルアミドの材料としてのアスパラギンを分解することによってアクリルアミド形成を阻止するものであるため、上述の既存のアクリルアミド除去方法と直接比較はできない。しかし、本法が食品の風味や食感に影響なくアクリルアミドを除去できる唯一の方法として、他のものより優れていることは明らかである。

(3) 製造方法

本品の製造に用いられる発酵原料、精製・濾過助剤、安定化、製剤化原料を含むすべての製造原料は、食品原料あるいは食品への使用が認められた品質のものを用いており、個々の原料の社内規格は米国 FCC 等の規格に基づいて設定している。発酵用器材ならびに精製・製剤化工程に用いる製造器材も当社において、食品用酵素の製造に長期間安全に用いられてきたものである。本品は、これらの原料と器材を用い、食品GMPに則って従来の食品用酵素と同じ方法で製造され、ISO 22000 認証取得品質システムによって品質の確保がなされている。

本品の製造方法の概略を図8に示す。A. *oryzae* NZYM-SP 株を液体培養した後（ステップ1～3）、ステップ4以降に示す複数回の微生物分離除去専用の濾過によって、生産菌は生産物より分離除去され、その後製剤化される。よって、生産菌は最終製品（本品）に残存することはない。



図8 アスパラギナーゼ製造方法の概略

(4) 成分規格案の設定根拠

本品の成分規格は、微生物を用いて食品用酵素を製造する際の製造に由来する有害物質成分及び微生物限度を定めている、米国 FCC の”Enzyme Preparations, General Requirements” (the Seventh Edition, 2011)及び JECFA の”General Specification and Considerations for Enzyme Preparations Used in Food Processing”(2006)に基づき設定している (I. 5. (5) 参照)。規格対比表を表3に示す。

表3 規格対比表

項目	規格案	JECFA (添付資料 19、22)	FCC VII FDA-GRAS (添付資料 6、18)
名称	<i>A. oryzae</i> NZYM-SP株 由来のアスパラギナーゼ	A asparaginase from <i>Aspergillus oryzae</i> expressed in <i>Aspergillus oryzae</i>	GRN No. 201 : A asparaginase preparation produced by <i>Aspergillus oryzae</i> expressing the <i>Aspergillus oryzae</i> asparaginase gene
性状	淡褐色の液体、または白色～灰白色の顆粒	Light brown liquid	Light brown liquid
酵素活性	3,500単位/g以上あるいは3,500単位/ml以上	-	-
確認試験	本品は、酵素活性測定法により試験を行うとき酵素活性を示す。	The sample shows asparaginase activity under TESTS	-
純度試験			
鉛 Pbとして	5.0 µg/g 以下	5 µg/kg 以下	5 µg/kg 以下
ヒ素 As ₂ O ₃ として	4.0 µg/g以下	-	-
微生物限度	本品1gにつき生菌数は50000以下である。また大腸菌、サルモネラは認めない。	大腸菌： 陰性/25g 大腸菌群数： 30/g 以下 サルモネラ： 陰性/25g	大腸菌群数： 30/g 以下 サルモネラ： 陰性/25g
酵素活性測定法	L-Asparagine を基質として、生成した NH ₃ を Glutamate dehydro-genase によって、NADH 存在下で α-ketoglutaric acid と反応させる。その時の NADH の消費量を NH ₃ 生成量に換算して活性値を計算する。	TESTS : L-Asparagine を基質として、生成した NH ₃ を Glutamate dehydro-genase によって、NADH 存在下で α-ketoglutaric acid と反応させる。その時の NADH の消費量を NH ₃ 生成量に換算して活性値を計算する。	-

II. 安全性に係る知見

1. 体内動態試験

元来酵素は、天然に存在するタンパク質(アミノ酸のポリマー、糖や脂質等が結合している場合もある)であり、食品常在成分からなる物質である。本品も、表 1 に示すアミノ酸組成からなることが明らかにされている。従って、本品が消化管で分解しても常在成分以外のものが生じることはなく、体内動態試験を行う必要はないと考えられる。本品が消化管で食品常在成分と同一になり、生体に対して影響がないことを明らかにするため、衛化学第 29 号「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」にある表 2 の 5 つの項目に従って、以下に試験及び考察を加えた。

(1) 通常の使用条件下で、本品が容易に消化管内で分解して食品常在成分と同一になること：

酵素試験液を用いた人工胃液による消化実験及び本品を用いた人工腸液による消化実験を行った(添付資料 23、24)。消化実験に用いた人工胃液の組成は USP 23 (NF18) (添付資料 25) に、人工腸液の組成は USP 26 (NF21) (添付資料 26) に従った。

人工胃液による本酵素分解は非常に速やかに行われ、反応開始 15 秒でそのバンドは SDS-PAGE で確認できないほどの大きさのペプチド或いはアミノ酸レベルにまで分解されていることを示している。

人工腸液中での分解も速やかで、反応開始後 2 分 30 秒で人工胃液の場合と同様、SDS-PAGE でそのバンドは確認できないほどの分解性を示した。

以上の実験結果から、本品は消化管内で非常に速やかに分解され、食品常在成分と同一になることが示された。

(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：

人工胃液による本品の消化実験において、その条件・因子は pH1-2 の酸性条件であること及びペプシンである。また、腸液 (pH6.8) 中のトリプシン及びキモトリプシンも分解に関与している。

(3) 本品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：

(1) で示した通り、本品は消化管内で速やかに食品常在成分に分解され、他の食品由来のタンパク質と同じように体内へ吸収されると考えられる。また、本品が食品中に含まれる量は微量であり (II. 4.)、糖質、ミネラル、ビタミンなどその他の栄養成分の吸収を阻害する懸念はない。

(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) で示した通り、本品は人工胃液内においては非常に速やかに分解され、未加水分解物、部分加水分解物は確認されない。よって、未加水分解物、部分加水分解物が大量に糞便中に排泄されることも、生体組織中に蓄積する懸念もない。

(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：

本品のタンパク質としての一日摂取量は、最大で 4.97 mg/人/日と推定され (II. 4.)、日本人のタンパク質の平均一日摂取量 68.0 g (添付資料 27) の約 0.007%に過ぎず、本品目の主成分の過剰摂取の問題がおこることはないと考えられる。

2. 毒性

「添加物に関する食品健康栄養評価指針」(食品安全委員会 2010 年 5 月)の第 2 章第 6 に、「なお、酵素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(平成 8 年厚生省ガイドラインの表 2 の事項について検討の上判断する。)には、原則として別表 1 のうち毒性に関する資料の添付を省略することができるが、別表 2 に掲げる毒性に関する資料は添付する。」とある。II. 1. において、当指針に記載のあるガイドラインの表 2 に従って検討した結果、本品が消化管内で分解して食品常在成分になることが示されたため、別表 2 に従い下記の試験を実施した。なお、反復投与毒性試験は 13 週間(91 日間)とした。

(1) 91 日間反復投与毒性試験 げっ歯類

本試験は酵素試験液(バッチ番号 PPV 24743)を使用し、化学品の試験に係る OECD 及び EU ガイドライン並びに現行の国際 GLP 基準を遵守して実施した。

OECD guideline 408 (添付資料 28)に「被検物質の 1 日の投与容量は 100 g の動物体重あたり 1.0 ml を超えてはならないが、被検物質をその水溶液として摂取させる場合には 2.0 ml まで許容されることがある」と示されている。この記載に基づき、最大投与量を 10 ml/kg 体重/日(ガイドラインでは体重 100 g あたり 1 ml)とした。試験群は、2 週間の予備試験結果をもとに以下の通り設定した。

- 1) 精製水 (0 g TOS/kg 体重/日)
- 2) 10% PPV 24743 溶液 (0.088 g TOS/kg 体重/日*)
- 3) 33% PPV 24743 溶液 (0.29 g TOS/kg 体重/日*)
- 4) 100% PPV 24743 溶液 (0.88 g TOS/kg 体重/日*)

* PPV 24743 の密度 1.049 g/ml 及び TOS 値 8.4%から計算(添付資料 29、11 頁)

投与期間中に一般状態及び詳細な状態の観察、感覚運動反応の検査、握力測定、自発運動量の測定、体重及び摂餌量/摂水量の測定、眼科学的検査を行った。投与期間終了時に採血したサンプルを用いて血液学的検査及び血液生化学的検査を行い、解剖後の各臓器は湿重量を測定した上で病理組織学的検査に供した。

その結果、血液生化学的検査において、雄の 0.29 及び 0.88 g TOS/kg 体重/日投与群ならびに雌の 0.88 g TOS/kg 体重/日投与群でカリウムが対照群と比べて有意(有意水準 0.01)に増加した。しかしながら、他の電解質には影響がなく、腎機能への影響を示唆する血液及び病理組織学的所見は得られていないことから、本所見に毒性学的意義はないものと考えられた。他の検査項目についても、毒性学的に意義のある変化はみられなかった。

従って、PPV 24743 投与に関連する毒性所見は認められないことから、本試験の NOAEL は最高用量の 0.88 g TOS/kg 体重/日であるとした(添付資料 29)。

(2) 遺伝毒性試験

当社における遺伝毒性試験は EC のガイドラインに基づき(添付資料 30)、「微生物を用いる復帰変異試験」と「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」を行っている。以下に示すように、この 2 つの試験結果はどちらも陰性であった。

なおこの 2 つの試験は、「添加物に関する食品健康影響評価指針」(2010 年 5 月食品安全委員会)の遺伝毒性試験に「標準的組合せ」として記載された 3 つの試験のうち 2 つに相当する。残りの 1 つは「げっ歯類を用いる小核試験」であるが、2 つの試験で既に陰性の結果が出ていたので、この試験は行っていない。

① 微生物を用いる復帰変異試験

OECD ガイドライン (No. 471, 1997) に従い、医薬品 GLP (1997) 及び OECD GLP (1997) に準じて、微生物を用いる復帰変異試験を実施した。

Salmonella typhimurium の TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 株ならびに *Escherichia coli* の WP2uvrA pKM101 株を用い、処理濃度 0、156、313、625、1250、2500 及び 5000 µg/ml で試験した。試験は代謝活性化系 (S-9) 存在下及び非存在下の両方で行い、陰性対照(滅菌脱イオン水)及び適切な陽性対照物質の試験を含めた。初回及び 2 回目確認試験 (Treat and plate assay) では、被験物質を添加した試験菌株の培養液を 3 時間培養し、その後、被験物質に含まれると考えられるアミノ酸(ヒスチジン、トリプトファン)を取り除くため、2 度、遠心分離及び緩衝液による洗浄を行った。TA98 及び TA100 及び WP2uvrA pKM101 を用いた 3 回目確認試験 (Re-incubation) では、3 時間培養後にさらに一晚培養を行った。

その結果、試験用量において、陰性対照の 2 倍以上を示し、かつ用量相関性及び再現性を伴うコロニー数の増加はみられなかった (添付資料 31)。

② 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

OECD ガイドライン (No. 473, 1997) に従い、医薬品 GLP (1997) 及び OECD GLP (1997) に準じて哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

PPV 24743 について、ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験を実施した。リンパ球細胞は、3 人の女性ドナーから採取しプールしたものをを用いた。いずれの試験も処理濃度 5000 µg/ml まで行い、うち以下の濃度を選択して染色体異常の評価に供した。陰性対照(溶媒)には滅菌精製水を用い、陽性対照には、S-9 非存在下では 4-ニトロキノリン 1-オキシド、存在下ではシクロホスファミドを用いた。

- 1) 短時間暴露、S-9 非存在下、0、1187、2813 及び 5000 µg/ml
- 2) 短時間暴露、S-9 存在下、0、1582、2109 及び 5000 µg/ml
- 3) 連続暴露、S-9 非存在下、0、429.5、838.9 及び 1311 µg/ml
- 4) 短時間暴露、S-9 存在下、0、3200、4000 及び 5000 µg/ml

その結果、試験用量において、染色体異常出現細胞数及び倍数体の有意な増加は認められなかった。

従って、PPV 24743 は代謝活性化の存在下及び非存在下にかかわらず、ヒト末梢血リンパ球において染色体異常を誘発しないと結論した (添付資料 32)。

(3) アレルゲン性試験

本品のアレルギー性評価として、本品と既知のアレルゲンのアミノ酸配列における相同性を調べた。

アスパラギナーゼ遺伝子が挿入された遺伝子導入用ベクター全体について、Open Reading Frame (ORF) 検索を行い (添付資料 33、1 頁 3. 1)、アスパラギナーゼのアミノ酸配列を含む 364 の ORF を検出し (添付資料 33、C List of ORF's)、これらの ORF とデータベース SDAP に登録された 855 種の既知のアレルゲン (添付資料 33、E List of allergens) との相同性について検討した。相同性を調べる上で、2 種類の検索方法を用いた。1 つは、比較する配列全体からアミノ酸残基数 80 のフラグメントをすべて抽出し、そのすべてについて相同性の高いフラグメントを検索し、35%以上の相同性を示すフラグメントを検出する方法である。もう 1 つの方法として、連続したアミノ酸残基が同一である配列の検索を行ったが、その連続アミノ酸残基数は 8 とした (添付資料 34、35)。

その結果、80 アミノ酸で 35%以上一致する既知アレルゲン及び 8 連続アミノ酸で 100%一致する既知アレルゲンは検出されることが示された (添付資料 33、3 頁 3. 2 及び D Scripts for the allergen database queries)。

この結果から、本品の摂取によるアレルギー誘発性の懸念はないと考えられる。

3. ヒトにおける知見

本品のヒトにおける安全性の知見は特に知られていない。しかし、本品の食品中含量は微量であり（II. 4.）、また、II. 1. で考察した通り、本品は消化管内で速やかに食品常在成分に分解され、他の食品由来のタンパク質と同じように吸収されると考えられる。よって、ヒトに対して影響があるとは考えにくい。

4. 一日摂取量の推計等

本品はビスケット、クラッカー、揚げパン、スナック菓子などの加工食品の製造工程において、直接生地に添加される。本品が使用される可能性のある食品（群）の一日摂取量を厚生労働省の「平成24年国民健康・栄養調査報告」（添付資料27、該当する表を抜粋）から得、また、文献に記載されたアスパラギン酸の添加量（添付資料5）を参考にし、日本における1日あたりのアスパラギナーゼ摂取量を推定した（表4）。

その結果、本品の推定一日摂取量は4.97 mg TOS/人/日であった。この値を日本人の平均体重55.1 kgで除すると、本品の推定一日摂取量は90.2 µg TOS/kg 体重/日と計算された。

表4 アスパラギナーゼが応用される食品の摂取量

食品（群）	a	b	c	d	e
	食品摂取量	本品最大添加量	本品一日摂取量 ($a \times b / 1000000 \times 1000$)	本品由来 TOS 一日摂取量 ($c \times 0.04$)	本品由来 TOS 一日摂取量 ($d / 55.1$)
	g/人/日	ppm ^{*1}	mg /人/日	mg TOS ^{*2} /人/日	µg TOS/ kg 体重/日 ^{*3}
小麦・加工品 (パン類等)	102.4	290	29.70	1.188	21.56
その他の穀類・加工品	8.1	715 ^{*4}	5.79	0.232	4.20
いも類	54.3	715 ^{*4}	38.82	1.553	28.18
ケーキ・ペストリー類	7.1	290	2.06	0.082	1.49
ビスケット類	1.9	290	0.55	0.022	0.40
その他の菓子類 (ポテトチップス等)	6.2	715	4.43	0.177	3.22
その他の調味料	59.9	715 ^{*4}	42.83	1.713	31.09
合計	239.9		124.2	4.97	90.2

*1最終製品重量に対する数値

*2本品のTOS（全有機固形分）は4%（添付資料36、37）

*3体重55.1kgと仮定して推定

*4アスパラギナーゼ添加量のデータがないため、添付資料5にある最大添加量で計算

5. 生産菌の安全性

生産菌である *A. oryzae* NZYM-SP 株は、*A. oryzae* IF04177 株由来の *asnA0* 遺伝子（アスパラギナーゼ遺伝子）を、宿主である *A. oryzae* BECh2 株に導入することによって作製された。*A. oryzae* BECh2 株は、親株である *A. oryzae* IF04177 株を改良したものである。親株から生産菌を作製した流れは図9に示す通りである。

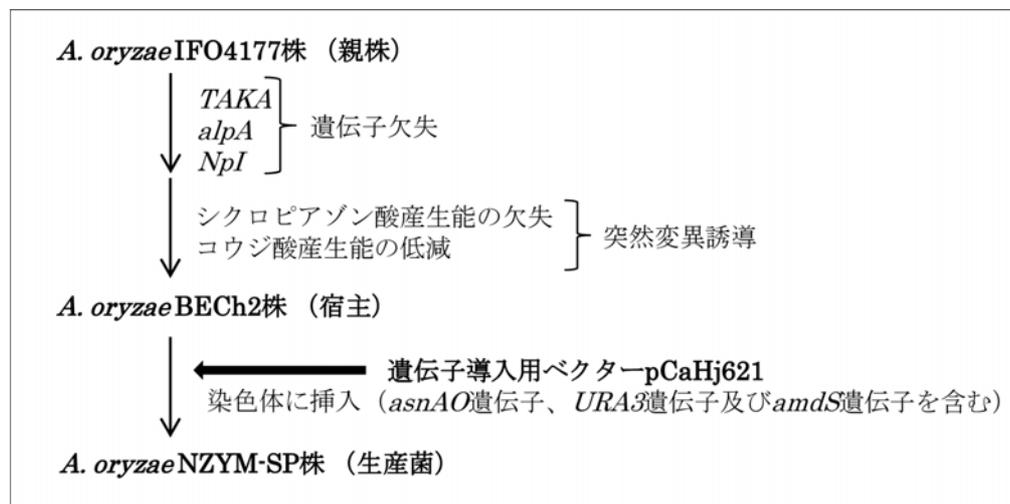


図9 *A. oryzae* NZYM-SP株の作製

生産菌の安全性を示すために、次の4つの点について説明する。

- (1) *A. oryzae* IF04177 株の起源
- (2) *A. oryzae* BECh2 株及び *A. oryzae* NZYM-SP 株の作製
- (3) *A. oryzae* IF04177 株及び *A. oryzae* BECh2 株の利用経験
- (4) *A. oryzae* NZYM-SP 株の非病原性・非毒素産生性

(1) *A. oryzae* IF04177 株の起源

A. oryzae IF04177 株は坂口謹一郎博士らによって京都の酒蔵で清酒麴から分離された野生株である（添付資料38）。この菌株は当初、東京大学農学部でS-4-17として登録されたが、その後 *A. oryzae* IF04177 株として大阪発酵研究所に移管された。現在では、製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源部門においてNBRC4177株として登録、保管されている。

(2) *A. oryzae* BECh2 株及び *A. oryzae* NZYM-SP 株の作製

① *A. oryzae* BECh2 株の作製

A. oryzae BECh2 株は、*A. oryzae* IF04177 株の *TAKA*、*alpA* 及び *NpI* 遺伝子を欠失させ、さらに突然変異を誘導することでシクロピアゾン酸生合成機能欠失及びコウジ酸の産生を低減させた菌株である。これらの欠失によって、*A. oryzae* BECh2 株はアミラーゼ（*TAKA* 遺伝子（*amyA*、*amyB* 及び *amyC*））、アルカリプロテアーゼ（*alpA* 遺伝子）、中性プロテアーゼ（*NpI* 遺伝子）及びシクロピアゾン酸産生能を欠失され、さらにコウジ酸の産生を低減されている。

これらは目的遺伝子産物の純度を高め、二次代謝物産生のリスクを軽減させるために行った。

② *A. oryzae* NZYM-SP 株の作製

A. oryzae NZYM-SP 株は以下のように作製された。

- 1) *asnA0* 遺伝子、*URA3* 遺伝子及び *amdS* 遺伝子を pUC19 プラスミドに組み込み、遺伝子導入用ベクター pCaHj621 を構築した。この際、pUC19 プラスミドが有するアンピシリン耐性遺伝子は除去された。
- 2) pCaHj621 をプロトプラスト法により *A. oryzae* BECh2 株に導入した。
- 3) pCaHj621 全体が多コピーでタンデムに *A. oryzae* BECh2 株の染色体に挿入された。

従って、宿主菌株の染色体に、目的遺伝子である *asnA0* 遺伝子のみでなく、選択マーカーである *URA3* 遺伝子及び *amdS* 遺伝子も挿入されている。選択マーカー遺伝子より発現するタンパク質の機能及び利用経験は以下の通りである。

● *URA3* 遺伝子

URA3 遺伝子の供与体は *Saccharomyces cerevisiae* FL100 株であり、この遺伝子はピリミジン合成経路で機能するオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードする。*URA3* 遺伝子は、大腸菌の *URA3* ホモログ遺伝子欠失を相補することができるため、この遺伝子を有するプラスミドを *URA3* ホモログ遺伝子欠失大腸菌に導入すると、その大腸菌はウラシル非存在下培地で生育することができる。従って、大腸菌を用いて pCaHj621 を調製する際に、この選択マーカー遺伝子を用いた。

URA3 遺伝子は選択マーカーとして長年使われてきた実績があり、この遺伝子が導入された遺伝子組換え微生物は食品用酵素の生産菌として広く用いられている。

● *amdS* 遺伝子

amdS 遺伝子の供与体は *Aspergillus nidulans* Glasgow 野生株であり、この遺伝子はアセトアミドを分解するアセトアミダーゼをコードし、アセトアミドの存在下でのみ発現する。従って、アセトアミドを唯一の窒素源として含む培養液中で、*amdS* 遺伝子が挿入された菌株のみが選択的に生育することができる。pCaHj621 を *A. oryzae* BECh2 株の染色体に挿入する際に、*amdS* 遺伝子を選択マーカー遺伝子として用いた。

amdS 遺伝子は選択マーカーとして長年使われてきた実績があり、この遺伝子が導入された遺伝子組換え微生物は食品用酵素の生産菌として広く用いられている。

(3) *A. oryzae* IF04177 株及び *A. oryzae* BECh2 株の利用経験

A. oryzae IF04177 株及び *A. oryzae* BECh2 株は宿主として様々な食品用酵素の生産菌の作製に用いられてきた。これらの生産菌を用いて製造される食品用酵素の利用実績を表 5 に示す。このように、今回用いた宿主をバックグラウンドとする生産菌は、既に酵素製剤の製造に広く利用されている。

表 5 IF04177 株または BECh2 株を宿主として作製された生産菌が生産する食品用酵素

酵素名	宿主	遺伝子供与菌	利用実績
リパーゼ	<i>A. oryzae</i> IF04177 株	<i>Rhizomucor miehei</i>	10 年以上（日本を含む世界各国） 日本：SP388 として官報に掲載（2001 年） 米国：GRASP ^{1*} 7G0323（1989 年）
リパーゼ		<i>Thermomyces lanuginosus</i>	10 年以上（日本を含む世界各国） 日本：NOVOZYM677 として官報に掲載（2003 年） 米国：GRN ^{2*} No. 43（2000 年）
プロテアーゼ		<i>Rhizomucor miehei</i>	10 年以上（海外のみ） 米国：GRN No. 34（2000 年）
キシラーナーゼ	<i>A. oryzae</i> BECh2 株	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	10 年以上（海外のみ） 米国：Self determined GRAS ^{3*}
リパーゼ		<i>Thermomyces lanuginosus</i> <i>Fusarium</i>	10 年以上（海外のみ） 米国：GRN No. 103（2002 年）

		<i>oxysporum</i>	
グルコースオキシダーゼ		<i>Aspergillus niger</i>	10年以上（海外のみ） 米国：GRN No.106（2002年）
ホスホリパーゼ		<i>Fusarium venenatum</i>	5年以上（海外のみ） 米国：GRN No.142（2004年）
アスパラギナーゼ （本申請品）		<i>Aspergillus oryzae</i>	5年以上（海外のみ） 米国：GRN No.201（2006年）

1* GRASP：GRAS affirmation petition（申請 GRAS）

2* GRN：GRAS notices（届出 GRAS）

3* Self determined GRAS：自己認証 GRAS

(4) *A. oryzae* NZYM-SP 株の非病原性・非毒素産生性

① *A. oryzae* NZYM-SP 株の非病原性

Barbesgaard ら（1991）は、*A. oryzae* がアスペルギルス症に関連する可能性がある事例を紹介している。しかし、これは非常に稀な場合であり、*A. oryzae* は一般的に非病原性の微生物である（添付資料 39）。

A. oryzae は、国立感染症研究所病原体等安全管理規程 別冊 1 「病原体等の BSL 分類等」（平成 22 年 6 月）の分類でレベル 1（添付資料 40）、米国 NIH の” Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules” の定義では Risk Group 1 に分類され（添付資料 41、Group 2 以上のものに該当しない）、安全とみなされている微生物である。

② *A. oryzae* NZYM-SP 株の非毒素産生性

Aspergillus flavus (*A. flavus*) などの糸状菌は二次代謝産物を産生することが知られており、その幾つかはマイコトキシンを有する。*A. oryzae* においても、数種のマイコトキシンが産生されることが報告されている。以下において、*A. oryzae* のマイコトキシン産生性に関する文献を引用するとともに、*A. oryzae* NZYM-SP 株のマイコトキシン産生性について言及する。

1) アフラトキシン類産生性

A. oryzae は *A. flavus* の近縁種であるため、アフラトキシン類を産生する懸念がある。

幾つかの報告（Watoson ら（1999）、Kim ら（2014）、Kusumoto ら（2000））によると、*A. oryzae* がアフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログを有するとされている。しかし、それらのほとんどの菌株において、アフラトキシン生合成遺伝子が転写機能を失っていることが明らかにされている（添付資料 42、43、44）。

また、千葉ら（2014）は、*A. flavus* のアフラトキシン生合成遺伝子クラスターにおける分子系統樹解析によりグループ識別を行った。その結果、アフラトキシン産生・非産生株の識別が可能であり、*A. oryzae* 株はアフラトキシン非産生性の *A. flavus* 株と同じグループに属することが示された（添付資料 45）。

一方、Attalla ら（2003）は、*A. oryzae* NRC-MCCU-1 株がアフラトキシン類などのマイコトキシンを産生することを報告している（添付資料 46）。

本生産菌である *A. oryzae* NZYM-SP 株はアフラトキシン類を産生することができない。この理由は、宿主である *A. oryzae* BECh2 株を作製する際に、 γ 線照射を用いた突然変異により、アフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログが欠失されたためである（添付資料 47）。

2) シクロピアゾン酸（CPA）産生性

Kim ら (2014) の報告によると、韓国の発酵食品から単離された 18 株の *A. oryzae* において CPA 生合成遺伝子クラスターの存在及び CPA の産生性を調べたところ、12 株の *A. oryzae* にその遺伝子クラスターが存在することが示されたが、その中で CPA を産生するものは 7 株であったとしている (添付資料 43)。

また、Tokuoka ら (2008) の報告によると、*A. oryzae* NBRC4177 (=IF04177) 株はアフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログ近隣に CPA 生合成遺伝子クラスターを有し、CPA を産生するとしている (添付資料 48)。

このように、本生産菌の親株である *A. oryzae* IF04177 株は CPA を産出するが、*A. oryzae* NZYM-SP 株は CPA 産生能を失っている。これは、宿主である *A. oryzae* BECh2 株を作製する際に、 γ 線照射を用いた突然変異により、アフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログとともに CPA 生合成遺伝子クラスターが欠失されたためである (添付資料 47)。

3) 3-ニトロプロピオン酸産生性

Blumenthal (2004) によると、3-ニトロプロピオン酸は *A. oryzae* から産生されるマイコトキシンの 1 つであり、*A. oryzae* より食品用酵素を生産する際に、その産生を確認するべきであるとされている (添付資料 49)。

A. oryzae NZYM-SP 株により生産されたアスパラギナーゼ中における 3-ニトロプロピオン酸の存在を、酵素試験液を用いて試験した結果、検出限界 (0.6 mg/kg) 未満であることが示された (添付資料 15)。

4) コウジ酸産生性

コウジ酸は *A. oryzae* から産生される二次代謝物であり、動物試験において発ガン性の可能性を示唆されていた。しかし、Blumenthal (2004) によると、食品中に一般的に含まれるコウジ酸の量は安全性を懸念するレベルではないとされている (添付資料 49)。

A. oryzae NZYM-SP 株において、*A. oryzae* BECh2 株を作製する際に紫外線照射を用いた突然変異により、コウジ酸の産生は低減されている。*A. oryzae* NZYM-SP 株により生産されたアスパラギナーゼ中におけるコウジ酸の存在を、酵素試験液を用いて試験した結果、検出限界 (1.4 mg/kg) 未満であることが示された (添付資料 15)。

以上のことより、*A. oryzae* NZYM-SP 株の安全性に問題はないと考えられる。なお、*A. oryzae* より生産される食品用酵素には次のものが挙げられる。

厚生労働省の「既存添加物名簿収載品目リスト」において、*A. oryzae* を基原とする添加物として α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、アントシアナーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、酸性ホスファターゼ、タンナーゼ、5'-デアミナーゼ、パーオキシダーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、ヘミセルラーゼ、ホスホリパーゼ及びリパーゼが掲げられていることから、我が国においては、既に *A. oryzae* 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られる (添付資料 50)。

また、欧州の酵素製品製造会社協会 (The Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products (Amfep)) が自主的に作成している酵素製品のリストによると、*A. oryzae* を基原とする酵素製品としてアミノペプチダーゼ、 α -アミラーゼ、アスパラギナーゼ、Endo-1,3(4)- β -グルカナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、ホスホリパーゼ A2、フィターゼ、プロテアーゼ、キシラナーゼが掲載されている (添付資料 51)。

III. 添付資料

1. 加工食品中のアクリルアミドについて
(平成 14 年 10 月 31 日、厚生労働省食品保健部報道発表資料)
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2002/10/h1031-2.html>
2. “Summary and Conclusions” 16th March, 2010
Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), the seventy-second meeting, Rome, 16-25 February 2010
http://www.who.int/foodsafety/chem/summary72_rev.pdf
3. Code of Practice for the Reduction of Acrylamide in Foods (CAC/RCP 67-2009)
4. Application sheet of Acrylaway® (社内文書)
5. 中嶋康之 「酵素による加熱食品中のアクリルアミド低減」食品の包装 Vol. 40, 2, 2009 (参考文献)
6. U.S. Food and Drug Administration, Agency Response Letter,
GRAS Notice No. GRN 000201, November 24, 2006
<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm153693.htm>
7. Statement on Acrylaway by Ministry of Food, Agriculture and Fisheries (デンマーク食料農漁業省のアクリルアウエイ®に関する文書)
8. Article Annexe I C / ” Arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l’emploi d’auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires” (フランスの加工助剤に関する条例にある、食品用酵素のポジティブリスト (付表 I C)、アスパラギナーゼは P. 7)
9. フランス食品衛生安全庁 (AFSSA)、遺伝子組換え *Aspergillus oryzae* 由来アスパラギナーゼの加工助剤としての使用認可申請について意見書を公表 (食品安全委員会 食品安全関係情報 資料管理 ID : syu02730410188)
10. Standard 1.3.3 Processing Aids (オーストラリア・ニュージーランドの加工助剤のポジティブリスト、微生物由来の酵素は P. 12 (Table to clause 17) から、アスパラギナーゼは P. 13)
11. Final Assessment Report Application A606 Asparaginase as a processing aid (FSANZ)
12. Food and Drug Regulations (カナダの食品医薬品規則) の抜粋、食品用酵素のポジティブリストは Table V (p. 539 以降、アスパラギナーゼは P. 542)
13. Health Canada’s Proposal to Amend the *Food and Drug Regulations* to Permit the Use of the Enzyme Asparaginase in Certain Food Products (Health Canada)
14. Regulation (EC) No 1332/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 (欧州議会・欧州理事会規則 No 1332/2008)
15. 68th JECFA Chemical and Technical Assessments
Asparaginase from *Aspergillus oryzae* expressed in *Aspergillus oryzae*
16. Safety evaluation of certain food additives and contaminants, WHO Food Additives Series: 59
Asparaginase from *Aspergillus oryzae* expressed in *A. oryzae*

17. Evaluation of certain food additives and contaminants, WHO Technical Report Series: 947
Asparaginase from *Aspergillus oryzae* expressed in *A. oryzae*
18. Food Chemicals Codex, Seventh edition (2011), p. 322 - 327
19. “General specifications and considerations for enzyme preparations used in food processing” Compendium of food additive specifications, FAO Food and Nutrition Paper 52, Add. 9, FAO
Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, the fifty-seventh meeting, Rome 2001
http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/docs/enzymes_en.htm
20. Certificate of Analysis: Acrylaway L (社内文書)
21. Konrad A. Sieciechowicz et. al: “The Metabolism of Asparagine in Plants” Phytochemistry Vol. 27, No. 3, p. 663 - 671 (1988) (参考文献)
22. Asparaginase from *Aspergillus oryzae* expressed in *A. oryzae*
FAO Food Additive Specification
23. GMM Asparaginase toxbatch PPV 24743 in a Simulated Gastric Fluid (SGF)
(社内文書)
24. Asparaginase in Simulated Intestinal Fluid (SIF) (社内文書)
25. United States Pharmacopia 23 (the National Formulary 18), p. 2053
26. United States Pharmacopia 26 (the National Formulary 21), p. 2528
27. 平成 24 年国民健康・栄養調査報告書 (厚生労働省) 抜粋
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyuu/h23-houkoku.html>
28. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents 21st September 1998
<http://www.oecdilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740801e.pdf?expires=1289888501&id=0000&accname=freeContent&checksum=731878FB8CA85B61506D1F6559EFE452>
29. Asparaginase, PPV 24743 - Toxicity Study by Oral Administration to CD Rats for 13 weeks (社内文書)
30. Commission of the European Communities
food - science and techniques
Reports of the Scientific Committee for Food (Twenty-seventh series)
31. Asparaginase, PPV 24743: Test for Mutagenic Activity with Strains of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (社内文書)
32. Asparaginase, PPV 24743 - Introduction of Chromosome Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes (社内文書)
33. Sequence homology of ORF' s in plasmid pCaHj621 to known toxins and allergens (社内文書)
34. R. L. Fuchs et. al.: “Allergenicity Assessment of Foods Derived from Genetically Modified Plants” Food Technology Vol. 50, p. 80-88 (1996)
(参考文献)

35. D. D. Metcalfe et. al.: “Assessment of the Allergenic Potential of Foods Derived from Genetically Engineered Crop Plants” Critical Reviews in Food Science and Nutrition 36, p. S165-S186 (1996) (参考文献)
36. Typical Composition - Acrylaway 3500 BG (社内文書)
37. Typical Composition - Acrylaway L (社内文書)
38. 坂口 謹一郎 他 「麹菌の形態と其の分類に就て (其の1)」日本農芸化学会誌 Vol.20 (2), pp.141-154 (1944) (参考文献)
39. P. Barbesgaard et. al.: “On the Safety of *Aspergillus oryzae*: a Review” Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 36, p. 569-572 (1992) (参考文献)
40. 国立感染症研究所「病原体等安全管理規程 別冊1「病原体等のBSL分類等」(平成22年6月)」
41. Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules
http://oba.od.nih.gov/oba/rac/guidelines_02/APPENDIX_B.htm
42. A. J. Watson et. al.: “Homologs of Aflatoxin biosynthesis genes and sequence of *aflR* in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*” Appl. Environ. Microb. Vol. 65 (1), p. 307-310 (1999) (参考文献)
43. N. Y. Kim et. al.: “An evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid production in *Aspergillus oryzae*” J. Food Protect. Vol. 77(6), p. 1010-1016 (2014) (参考文献)
44. K. Kusumoto et. al.: “Directed deletions in the aflatoxin biosynthesis gene homolog cluster of *Aspergillus oryzae*” Curr. Genet. 37, 104-111 (2000)
(参考文献)
45. 千葉 隆司 他 「分子系統樹解析とマルチプレックスPCRを用いた *Aspergillus flavus* グループの識別」食品衛生学雑誌 Vol.55(3), p. 135-141 (2014)
(参考文献)
46. M. M. Atalla et. al.: “Mycotoxin production in wheat grains by different *Aspergilli* in relation to different relative humidities and storage periods” Nahrung/Food No. 1, p. 6-10 (2003) (参考文献)
47. *Aspergillus oryzae* BECh2 株に関する情報 (社内文書)
48. M. Tokuoka et. al.: “Identification of a novel polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase (PKS-NRPS) gene required for the biosynthesis of cyclopiazonic acid in *Aspergillus oryzae*” Fungal Genet. Biol. 45, 1608-1615 (2008) (参考文献)
49. C. Z. Blumenthal: “Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi” Regul. Toxicol. Pharm. Vol.39, p. 214-228 (2004) (参考文献)
50. 既存添加物名簿収載品目リスト (平成26年1月30日) (酵素のみ抜粋)
51. List of commercial enzymes (April 2014) /Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products (Amfep)