

(案)

添加物評価書

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

2014年11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	8
(5) 使用方法	8
4. 起源又は発見の経緯等	8
5. 我が国及び諸外国における使用状況	8
(1) コーデックス委員会	8
(2) 米国における使用状況	9
(3) EUにおける使用状況	9
(4) その他の国における使用状況	9
(5) 我が国における使用状況	9
6. 評価要請等の経緯	9
7. 添加物指定の概要	9
8. 国際機関等における評価	10
(1) JECFAにおける評価	10
(2) FDAにおける評価	10
(3) EUにおける評価	10
(4) その他の機関における評価	10
(5) わが国における評価等	10
II. 一日摂取量の推計等	11
III. 安全性に係る知見の概要	12
1. 生産菌株の安全性	12
(1) 非病原性の確認	12
(2) 非毒素産生性の確認	13
(3) その他	15
2. 本品目の安全性	15
(1) 消化管内での分解性等	15

(2) 毒性.....	18
IV. 食品健康影響評估.....	20
別紙 1：安全性試驗結果	21
< 參照 >	22

1 <審議の経緯>

2

3 2014年10月17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
4 ついて要請（厚生労働省発食安1017第1号）、関係書類の
5 接受

6 2014年10月21日 第534回食品安全委員会（要請事項説明）

7 2014年11月17日 第136回添加物専門調査会

8

9 <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)

石井 克枝

上安平 冽子

村田 容常

10

11 <食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿>

(2013年10月1日から)

梅村 隆志 (座長)

頭金 正博 (座長代理)

穂山 浩

石井 邦雄

石塚 真由美

伊藤 清美

今井田 克己

宇佐見 誠

久保田 紀久枝

祖父江 友孝

高橋 智

塚本 徹哉

戸塚 ゆ加里

中江 大

北條 仁

森田 明美

山田 雅巳

<参考人>

鎌田 洋一

高須 伸二

要 約

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

酵素として使用される添加物「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 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）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。

評価に供した試験成績は、*A. oryzae* NZYM-SP 株の病原性及び毒素産生性に関するもの並びに *A. oryzae* NZYM-SP 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遺伝毒性、反復投与毒性、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 a】

4
5 2. 名称等

6 和名： *Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ

7 英名： Asparaginase from *Aspergillus oryzae* expressed in *Aspergillus oryzae*
8 NZYM-SP

9 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)

10 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) (参
11 照 1、2、3)【委員会資料 a、本体、17】

12
13 3. 基原、製造方法、成分、性状等及び使用方法

14 (1) 基原

15 添加物「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナー
16 ゼ」(以下「本品目」という。)の生産菌株の宿主である *A. oryzae* は様々
17 な食品用酵素の産生菌として安全な工業的利用実績があり、製パンや味噌、醬
18 油、酒などの醸造などの食品分野で長年広く使用されてきた歴史を有するとさ
19 れている。(参照 4)【39】

20
21 今般、厚生労働省に添加物「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産さ
22 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
23 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」という。)
24 及び FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) の Chemical and
25 Technical Assessment (CTA) (2007) によれば、本品目の生産菌株 *A. oryzae*
26 NZYM-SP 株は、清酒麴から分離された野生株である *A. oryzae* IFO4177 の夾
27 雑酵素活性 (α -アミラーゼ、アルカリプロテアーゼ、中性メタロプロテアーゼ)
28 及びシクロピアゾン酸の産生能を欠損させ、コウジ酸の産生能を低減させた改
29 良株 (*A. oryzae* BECh2) を宿主とし、*A. oryzae* IFO4177 が菌体外に産生する
30 アスパラギナーゼ遺伝子を導入して作成されたものであるとされている。(参
31 照 2、5)【本体、15】

32 鎌田専門参考人：

asnAO 遺伝子の化学構造等、本遺伝子の詳細についての情報がない中、本品目の
食品添加物としての健康影響評価を行うことに懸念があります。

事務局より：

本品目は遺伝子組換え専門調査会でも審議される品目です。遺伝子組換え専門調
査会では、*asnAO* 遺伝子についても審議され、非公開情報ですが、*asnAO* 遺伝子の配
列も確認予定です。

33
34 (2) 製造方法

35 指定等要請者によれば、本品の製造方法の概略は図1のとおりとされている。

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。

この製造方法においては、*Aspergillus oryzae* NZYM-SP株を液体培養（ステップ1～3）した後、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、その後に製剤化されることから、生産菌は最終製品に残存することはないとされている。（参照2）【本体】

図1 アスパラギナーゼ製造方法の概略



また、最終製品には液状品と顆粒品の2種類があり、いずれも全有機固形物（TOS）は4%（w/w）であるとされている。また、評価に供した試験成績の主な被験物質であるバッチPPV24743は、最終製品の製造過程の途中（図1におけるステップ6）で濃縮を行ったものであり、保存剤、安定化剤を含まない。バッチPPV24743のTOSは8.4%であるとされている。（参照2、6、7）【本体、36、37】

（3）成分

指定等要請者によれば、本品目の有効成分は、生産菌株により産生される 359 アミノ酸からなるたん白質であり、当該 359 アミノ酸の一次配列は図2のとおりであるとされている。当該有効成分の分子量は、アミノ酸組成からの計算では約 37 kDa であるとされている。その等電点は 4.9 であるとされている。（参照2）【本体】

鎌田専門参考人：

タンパク質の分子量をアミノ酸組成から計算した場合、数字で記載されるべきと考えます。kDaという単位は、「アミノ酸組成（あるいは配列）を考慮しない場合に用いる相対的な単位」であるので、「組成から計算した」の部分を取り除くか、

正確な分子量の記載をすべきと考えます。

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

図2 有効成分のアミノ酸一次配列

SPLLYPRATDSNVTYVFTNPNGLNFTQMNTTLPNVTIFAT	40
GGTIAGSSADNTATTGYKAGAVGIQTLIDAVPEMLNVANV	80
AGVQVRNVGSPDITSDILLRLSKQINEVVCNDPTMAGAVV	120
THGTDITLEESAFFLDATVNCRKPVVIVGAMRPSTAISADG	160
PLNLLQSVTVAAASPKARDRGALIVMNDRIVSAFYASKTNA	200
NTVDTFKAIEMGNLGEVVSINKPYFFYPVKPTGKTEVDIR	240
NITSIPRVDILYSYEDMHNDTLYSAIDNGAKGIVIAGSGS	280
GSVSTPFSAAEDITTKHNIPIVASTRTGNGEVPSSAESS	320
QIASGYLNPASRVLLGLLLAQGKSIEMRAVFERIGVA	360

鎌田専門参考人：

図2において、有効成分のアミノ酸配列の最初のアミノ酸は「S（セリン）」となっております。通常、タンパク質はアミノ酸が「M（メチオニン）」からその合成が開始されます。Mでない場合、当該タンパク質の遺伝子が翻訳されアミノ酸が連結したあと、菌が産生するタンパク質分解酵素で切断を受けたことを示します。すなわち、アミノ酸配列が記載されている部分は、成熟型の酵素のそれであり、図および文面において、酵素の性状の記述に正確さが欠けていると考えます。

13

事務局より：

本ご指摘について、指定等要請者に確認したところ以下の回答が寄せられました。

*Aspergillus oryzae*由来のアスパラギナーゼは菌体外に分泌される酵素です。当該アスパラギナーゼの遺伝子が翻訳される時はMから始まる配列（N末端側）を持ちますが、分泌の際にはN末端側の19アミノ酸残基（菌体外分泌シグナル配列）が菌体内のシグナルペプチダーゼによって切断され、成熟型となったアスパラギナーゼ（S（セリン）から始まる配列を持つ）のみが菌体外に分泌されます。

本品は菌体外に分泌された成熟型アスパラギナーゼを有効成分としていますので、本要請資料には成熟型アスパラギナーゼのアミノ酸配列を記載し、その性質について説明しています。以下に、菌体外分泌シグナル配列が切断される前のアミノ酸配列を示し、切断箇所を矢印で示します。

↓

```
MGVNFKVLAL SALATISHAS PLYPRATDS NVTYVFTNPN GLNFTQMNTT
LPNVTIFATG GTIAGSSADN TATTGYKAGA VGIQTLIDAV PEMLNVANVA
GVQVTNVGSP DITSDILLRL SKQINEVVCN DPTMAGAVVT HGTDTLEESA
FFLDATVNCR KPVVIVGAMR PSTAISADGP LNLLQSVTVAA ASPKARDRGA
LIVMNDRIVS AFYASKTNAN TVDTFKAIEM GNLGEVVSINK PYFFYPVKPT
TGKTEVDIRN ITSIPRVDIL YSYEDMHNDT LYSIDNGAK GIVIAGSGSG
SVSTPFSAAAM EDITTKHNIP IVASTRTGNG EVPSSAESSQ IASGYLNPAS
RVLLGLLLA QGKSIEMRA VFERIGVA
```

14

1 JECFA-CTA (2007) によれば、*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて
2 生産されたアスパラギナーゼは、TOS が 4% (w/w) 、水分が 46 % (w/w) 、
3 グリセロールが 50%、安息香酸ナトリウムが 0.3%、ソルビン酸カリウムが 0.1%
4 であるとされている。(参照 5) 【15】

5
6 指定等要請者委託試験 (2006) によれば、本品目のバッチ PPV24743 は、
7 水分が 89.5% (w/w) 、乾燥物が 10.5% (w/w) 、灰分 (600℃) が 2.1% (w/w) 、
8 TOS が 8.4% (w/w) 、比重が 1.049 g/mL、pH が 5.4 であるとされている。
9 (参照 8) 【29】

10
11 指定等要請者の成分規格 (案) によれば、本品目は、1 g 当たり 3,500 単位
12 以上の力価 (酵素活性) を有することとされている。(参照 2) 【本体】

13 14 (4) 性状等

15 指定等要請者の成分規格 (案) によれば、本品目の性状は、液状品について
16 は淡褐色液状、顆粒品については白色～灰白色顆粒とされている。(参照 2)
17 【本体】

18 19 (5) 使用方法

20 指定等要請者等によれば、本品目は、食品の加工の際に原材料に添加し、原
21 材料に含まれるアス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こ
22 とにより、当該加工食品について、味、色等に影響を与えずに、アクリルアミ
23 ド生成を低減させるものであるとされている。また、本品目の使用において副
24 反応があることは知られていないとされている。

25 指定等要請者等によれば、本品目は、本品の有効成分の至適温度は、pH 7
26 において 50℃であり、80℃で失活するとされている。本品目の使用方法では、
27 すべて 120℃を超える加熱を伴うものであり、最終食品において本品目の活性
28 が残存することはないとされている。(参照 2、9、10) 【本体、4、5】

29 30 4. 起源又は発見の経緯等

31 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の
32 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に、
33 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結果、高温に
34 より食品中のアスパラギンが、ブドウ糖、果糖等の還元糖と反応して、アクリル
35 アミドが生成されることが明らかにされている。国際がん研究機関 (IARC) は、
36 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ある。
37)と分類している。(参照 11) 【1】

38
39 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する
40 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質
41 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クリ
42 ルアミド低減の方法の 1 つとして挙げられている。(参照 12) 【3】

43 44 5. 我が国及び諸外国における使用状況

45 (1) コーデックス委員会

1 コーデックス委員会の策定したコーデックス食品添加物一般基準（GSFA）で
2 は、加工助剤（酵素）は対象とされていない。
3

事務局より：

申請者の提出資料にはコーデックスについての記載はありませんが、酵素は GSFA の対象ではない旨を記載いたしました。

4 (2) 米国における使用状況

5 米国では、指定等要請者が本品目について一般に安全とみなされる（GRAS）
6 物質としての届出を行ったところ、2006 年、アメリカ食品医薬品局（FDA）か
7 ら当該届出に異議がない旨の回答がなされている。（参照 1 3）【6】
8

9 (3) EU における使用状況

10 欧州連合（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
11 を添加物として規制していなかったが、2008 年に公布された新たな欧州議会・欧
12 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象と
13 なる見込みである。⁽²⁾（参照 1 4、1 5）【7、14】
14

15 (4) その他の国における使用状況

16 2008 年 5 月、Food Standards Australia New Zealand（FSANZ）は、本品目
17 について加工助剤としての使用と認めるとしている。（参照 1 6）【11】
18

19 (5) 我が国における使用状況

20 我が国において、本品目の添加物としての使用は認められていない。
21
22

23 6. 評価要請等の経緯

24 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
25 び規格基準の設定の要請がなされ、関係書類が取りまとめられたことから、食品
26 安全基本法第 24 条第 1 項第 1 号の規定に基づき、食品安全委員会に対して、食
27 品健康影響評価の要請がなされたものである。
28

29 なお、厚生労働省は、本品目における組み換え DNA 技術に関する安全性審査
30 について、食品安全基本法第 24 条第 1 項第 14 号の規定に基づき、食品安全委員
31 会に対して、食品健康影響評価の要請を行っているところである。（参照 1 7）
32

【委員会資料 b】
33

事務局より：

組換え DNA 技術の安全性審査については、遺伝子組換え専門調査会にて審議さ
れる予定です。

34 7. 添加物指定の概要

35 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、
36 本品目の添加物としての指定及びそれに関連した規格基準の設定の可否等につい
37

² 評価要請者によれば、加工助剤たる酵素を規制しているフランス及びデンマークにおいては、添加物としての使用が認められたとされている。

1 て検討するとしている。なお、使用基準は設けないこととしている。

2 3 8. 国際機関等における評価

4 (1) JECFAにおける評価

5 2007年の第68回会合において、JECFAは、本品目の13週間反復投与毒性
6 試験におけるNOEL 880 mgTOS/kg 体重/日と、最も保守的な推定を行った場合
7 の一日摂取量 0.4 mgTOS/kg 体重/日とのマージンが 2,200 であることから、適
8 正使用規範（GMP）に基づき特定の目的で使用される限りにおいては、ADI を
9 特定しないとしている。（参照 3、5、18）【15、16、14】

10 11 (2) 米国における評価

12 上述（p9）のとおり 2006年、米国FDAは、意図した条件下において使用さ
13 れる限りにおいて、本品目をGRAS物質とする指定等要請者からの届出に対し、
14 異論はない旨の回答をしている。（参照 13）【6】

15 16 (3) EUにおける評価

17 上述（p9）のとおり EU（フランス及びデンマークを除く。）では、2008年
18 に公布された欧州議会・欧州理事会規則により、加工助剤たる酵素が添加物とし
19 ての規制の対象とされる見込みであるものの、現在のところ本品目についての安
20 全性評価は行われていない。（参照 14）【14】

21
22 なお、フランスにおいては、2008年12月、仏食品衛生安全庁（AFSSA）が
23 本品目にかかる安全性評価を行った結果、本品目の90日間反復投与毒性試験に
24 おけるNOAEL 880 mgTOS/kg 体重/日と一日推定摂取量とのマージンが 2,500
25 であり、安全性に懸念がないと評価している。（参照 19）【9】

事務局より：

フランスAFSSAの評価書については、英訳等は提出されていないことから、「食
品安全委員会、食品安全関係情報」を引用して記載しております。

評価要請者によれば、デンマークにおいては、2011年4月に添加物としての
使用が認められたとされておりますが、当局からの評価書について、評価要請者
から提出されていないため、本文中には記載しておりません。

26 27 (4) その他の機関における評価

28 2008年、FSANZは、本品目にかかる安全性評価を行った結果、組み換えDNA
29 は安定で安全性に懸念がないこと、ラットの90日間毒性試験で毒性が認められ
30 ず、NOAELは880 mgTOS/kg 体重/日以上であること、*in vitro* 遺伝毒性試験に
31 おいて陰性であることなどを根拠として、安全性に懸念がないと評価している。
32 （参照 16）【11】

33 34 (5) 我が国における評価等

35 我が国において、本品目の食品健康影響評価は行われていない。

II. 一日摂取量の推計等

森田専門委員：

この案で問題ありません。

指定等要請者によれば、本品目は、小麦・加工品（パン類等）、その他の穀類・加工品、いも類、ケーキ・ペストリー類、ビスケット類、その他の菓子類（ポテトチップス等）、その他の調味料といった食品（群）に直接使用されるものであるとされている。指定等要請者は、当該食品（群）又はそれらの原材料の全てに本品目が表1の最大添加量で添加され、全量がそのまま最終食品に移行して、消費されたとした場合を想定し、平成24年国民健康・栄養調査から得られる食品（群）の一日摂取量から、本品目の一日摂取量を4.97 mgTOS/人/日と推定している。この値を体重55.1 kgで除すと、90.2 µgTOS/kg 体重/日と算出される。（参照2、10、20）【本体、5、27】

1
2

表1 本品目の推定一日摂取量

食品（群）	a 食品摂取量	b 本品目 最大添 加量	c 本品目一日摂 取量 $a \times b / 1000000$ $\times 1000$	d 本品目由来 TOS 一日摂取量 $c \times 0.04$	e 本品目由来 TOS一日摂 取量 $d / 55.1$
	g/人/日	ppm ^{*1}	mg/人/日	mgTOS ^{*2} /人/ 日	μgTOS/ 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}	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

3
4
5
6
7
8
9

*1 最終製品重量に対する数値

*2 本品目のTOS（全有機固形分）は4%として算出

*3 体重55.1 kgとして計算

*4 アスパラギナーゼ添加量のデータがないため、推奨添加量の最大添加量で計算（参照10）

【5】

10 本専門調査会としては、指定等要請者による推計は適切であると判断し、本
11 品目の推定一日摂取量を 90.2 μgTOS/kg 体重/日と判断した。

12
13

14 Ⅲ. 安全性に係る知見の概要

15 1. 生産菌株の安全性

16 上述（p.5）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、
17 ともに *A. oryzae* であるとされている。

18
19

指定等要請者は、生産菌株が最終製品に残存することがないことを確認し、さ
20 ら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。

21
22

(1) 非病原性の確認

23 後述（p.20）のとおり、Barbesgaardら（1991）の報告によれば、*A. oryzae*
24 がアスペルギルス症に関連する可能性がある事例があるとされている。しかし、
25 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と
26 されている。（参照4）【39】

1 *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
2 分類等」（平成 22 年 6 月）におけるバイオセーフティレベル（BSL）1、米国
3 NIH の “Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules” の
4 定義では Risk Group1 に分類され、非病原性の微生物とみなされている。（参
5 照 2 1、2 2）【40、41】

7 (2) 非毒素産生性の確認

8 ① アフラトキシン類産生性

9 a. アフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログの解析（Watoson ら 10 (1999)）

11 *A. oryzae* ATCC14895 は、アフラトキシン生合成遺伝子クラスターホ
12 モログと調節遺伝子を有するが、アフラトキシンの発現は見られないとさ
13 れている。（参照 2 3）【42】

14 鎌田専門参考人：

申請書には Watoson ら (1999)、Kusumoto ら (2000)、Kim ら (2014) を引用し、「アフラトキシン生合成遺伝子が転写機能を失っている」とありますが、各文献を確認し、評価書案の記載を検討しました。

・Watoson ら (1999) には、アフラトキシン生合成遺伝子が転写活性を失っているとする記載はありません。

・Kusumoto ら (2000) では、アフラトキシン合成酵素遺伝子クラスターが、欠失していることを示しており、同遺伝子の転写活性についての記述を、要約中にも本文中にも確認できておりません。また、本文献には、食品健康影響評価の対象である *A. oryzae* IFO4177 の情報は記載されておらず、関連が薄いため、評価書案には記載しておりません。

・千葉ら (2014) では、*A. oryzae* 株が、アフラトキシン非産生 *A. flavus* 株と同じクラスターに属することを示していますが、同文献のなかで検討された *A. oryzae* は 1 株のみで、菌株も NBRC30113T 株とあり、申請者が使用している *A. oryzae* 株との関係が全く不明で、使用菌株のアフラトキシン非産生性を担保する根拠は脆弱であり、評価書案には記載しておりません。

15 b. マイコトキシン産生能試験（Attalla ら (2003)）

16 *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
17 を産生するとされている。（参照 2 4）【46】

18 指定等要請者によれば、本生産菌である *A. oryzae* NZYM-SP 株は、宿
19 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
20 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
21 ため、アフラトキシン類を産生することができないとされている。（参
22 照 2 5）【47】

23 ② CPA 産生性

24 a. CPA 生合成遺伝子クラスターの同定および CPA 産生能試験（Kim ら 25 (2014)）

1 発酵食品から単離された 18 株の *A. oryzae* において、シクロピアゾン
2 酸 (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。
3 その結果、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
4 されたが、その中で CPA を産生するものは 7 株であった。(参照 2 6)
5 【43】

6
7 b. CPA 生合成遺伝子クラスターの同定および CPA 産生能試験 (Tokuoka
8 ら (2008))

9 *A. oryzae* NBRC4177 (=IFO4177) 株はアフラトキシン生合成遺伝子
10 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
11 産生するとしている。(参照 2 7) 【48】

12
13 指定等要請者によると、本生産菌の親株である *A. oryzae* IFO4177 株は
14 CPA を産出するが、(参照 2 5) 【47】 宿主である *A. oryzae* BECh2 株を
15 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
16 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
17 たため、*A. oryzae* NZYM-SP 株は CPA 産生能を失っているとされている。
18 (参照 2、5) 【本体、15】

19
20 ③ 3- β -ニトロプロピオン酸産生性

21 a. 毒素産生能試験 レビュー (Blumenthal (2004))

22 3- β -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
23 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
24 すべきであるとされている。(参照 2 8) 【49】

25 また、6 種類の *A. oryzae* のうち 4 種類に 3- β -ニトロプロピオン酸の産
26 生がみられたとされている。(参照 4) 【39】

27
28 b. 3- β -ニトロプロピオン酸産生能試験 (指定等要請者 (2004))

29 *A. oryzae* NZYM-SP 株について、任意の製造バッチにおけるコウジ酸と
30 3- β -ニトロプロピオン酸の発現量の分析が行われている。その結果、3-
31 β -ニトロプロピオン酸は検出限界 (0.6 mg/kg) 以下であることが示され
32 た。(参照 2、5) 【本体、15】

33
34 ④ コウジ酸産生性

35 a. 毒素産生能試験 レビュー (Blumenthal (2004)) (再掲)

36 Blumenthal は、通常の商品摂取においては、コウジ酸が安全上の懸念
37 を生じさせる懸念はないと評価している。(参照 2 8) 【49】

38 一方、47 種類の *A. oryzae* のうち 19 種類にコウジ酸の産生がみられた
39 とされている。(参照 4) 【39】

40
41 b. コウジ酸産生能試験 (指定等要請者 (2004)) (再掲)

42 上述 (p.14) のとおり、*A. oryzae* NZYM-SP 株について、任意の製造バ
43 ッチにおけるコウジ酸と 3- β -ニトロプロピオン酸の発現量の分析が行わ
44 れている。その結果、コウジ酸は検出限界 (1.4 mg/kg) 以下であること
45 が示された。(参照 2、5) 【本体、15】

1
2 指定等要請者によると、*A. oryzae* NZYM-SP 株において、*A. oryzae*
3 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
4 酸産生能を低減させたとされている。(参照 2、5) 【本体、15】
5

事務局より：

申請者より提出された文献 39 (Barbesgaard ら (1992)) において、3-β-ニトロ
プロピオン酸及びコウジ酸の LD₅₀ についての記載がありました。評価書には記載
していません。

- ・ 3-β-ニトロプロピオン酸；マウス 160～240 mg/kg 体重)
- ・ コウジ酸；マウス 30 mg/匹

6 7 (3) その他

「食品衛生法に基づく添加物の表示等について」(平成 22 年 10 月 20 日消
8 食表第 377 号) 別添 1「既存添加物名簿収載品目リスト」においては、*A. oryzae*
9 を基原とする添加物として α-アミラーゼ等が掲げられており、(参照 29)

10 【50】既に *A. oryzae* を基原とする添加物が我が国において使用されている。
11
12

13 以上より、本専門調査会としては、本品目の製造を目的として適切に管理された
14 本生産菌株については、本品目の添加物としての摂取において問題となるような病
15 原性及び毒素産生性の懸念はないと判断した。
16

17 2. 本品目の安全性

18 (1) 消化管内での分解性等

19 本品目は、359 のアミノ酸からなるたん白質を主たる成分とするものである
20 とされていることから、消化管内で速やかに分解し、その結果生じるペプチド
21 又はアミノ酸は、他の食品由来のたん白質の場合と同様に体内へ吸収されると
22 考えられる。このことをより明確にするため、「添加物に関する食品健康影響
23 評価指針」(2010 年 5 月食品安全委員会決定)における「消化管内で分解し
24 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」に該当するか否か
25 について、以下のとおり整理した。
26

27 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 28 解して食品常在成分と同一物質になること。

29 指定等要請者委託試験 (2005、2010) によれば、本品目の有効成分 (製造
30 バッチ PPV24743) を人工胃液 (SGF) に、またアスパラギナーゼ (Acrylaway®
31 L の特定のロット) を人工腸液 (SIF) に添加し、SGF では 37℃ で 0、0.25、
32 0.5、1、2、10、30 又は 60 分間、SIF では 37℃ で 0、2.5、5、10 又は 30 分間イ
33 ンキュベーションを行った後、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド
34 ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供する試験が実施されている。³⁾ (参
35 照 30、31) 【25、26】

36 その結果、本品目の有効成分は、pH2 以下の SGF では 0.25 分後に、pH6.8

³⁾ SGF の組成は USP23 (NF18) に、SIF の組成は USP26 (NF21) に拠ったとされている。

1 のSIF中では2.5分後に検出限界である14,400 Da⁴以下のペプチド又はアミ
2 ノ酸まで分解したとされている。(参照2、32、33)【本体、23、24】
3

頭金専門委員：

SGF や SIF で速やかに分解される検出限界が 14,400Da と少し大きい
ことが気になります。昨年に評価した「*Aspergillus niger* ASP-72 株を用
いて生産されたアスパラギナーゼ」の場合は、検出限界が 3,500Da だっ
たと思います。

4

事務局より：

14,400 Da の分子量マーカを用いて試験を実施した理由・根拠につ
いて申請者に確認したところ、以下の回答がありました。

SDS-PAGE で通常用いるゲルを使用致しました。このゲルの場合、分
子量の範囲は 14,400~97,000 になり、アスパラギナーゼの消化酵素によ
る分解を見るためにはこのゲルを用いるのが適切と考えました(分子量
3,500 辺りを検出する SDS-PAGE のゲルは分子量の上限が 26,600 にな
り、アスパラギナーゼ(分子量 37,000)を検出することができません)。

上記 SDS-PAGE の条件では分子量の小さいペプチドを検出することが
できないため、ウェブサーバー ExPASy において提供されている分析ツ
ールである「ペプチドカッター」を用いてコンピューター上で当該アスパ
ラギナーゼを酵素で分解させるシミュレーションを行いました。この中で消
化酵素に該当するものはペプシン (pH1.3 又は pH>2)、トリプシン及び
キモトリプシンであり、それぞれの酵素による当該アスパラギナーゼの分
解によってできるオリゴペプチドのアミノ酸残基数は以下に示す範囲で
あることが示唆されました。

(胃)

ペプシン (pH1.3) : 1~40

ペプシン (pH>2) : 1~39

(腸)

キモトリプシン (高特異性) : 1~75

キモトリプシン (高特異性) : 1~26

トリプシン : 2~51

なお、この資料については、申請時には提出していないため、今後、追加
資料として正式に提出いたします。

5

頭金専門委員：

14,400Da よりもっと小さいペプチドあるいはアミノ酸レベルにまで分
解される一定の科学的根拠が必要と考えました。「*Aspergillus niger*
ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」の場合も、「ペプチド
カッター」のデータを使用したと思いますので、それを今回も根拠に加え

⁴ 試験に用いられた最小の分子量マーカ-の分子量が 14,400 Da であるとされている。

ていただければ、「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」と判断して良いと思います。

石井専門委員：

基本的には、頭金先生のお考えに賛成です。

ただ、厳密に言えば、ペプチドカッターによるシミュレーションでは、分解産物の分子量はペプシンの場合で最大 6,000 Da 程度、キモトリプシン（高特異性）の場合で 10,000 Da 程度ですので、このサイズになったペプチドが食品常在成分と同一物質と言えるか否かについては、疑問なしとしません。

事務局より：

なお、本品目は遺伝子組換え調査会でも審議予定の品目です。遺伝子組換え調査会でのご議論も踏まえ、対応を検討させていただきます。

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。

指定等要請者によれば、上述（p15）の①の試験成績において、本品目の有効成分の分解に関わる主要な因子は、SGF については pH1.2～2.0 及びペプシン、SIF については pH6.7～6.9 及びパンクレアチン（トリプシン）であるとされている。（参照 30、31）【25、26】

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。

指定等要請者によれば、上述（p15）のとおり、本品目の有効成分は消化管内で容易に分解し、そのほかの食品由来のペプチド等と同様に体内へ吸収されること、また本品目が食品中に含まれる量は微量であることから、糖質、ミネラル、ビタミン等そのほかの栄養成分の吸収を阻害する懸念はないとされている。（参照 30、31）【25、26】

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排泄されないこと。さらに、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。

指定等要請者によれば、上述（p15）のとおり、本品目の有効成分は消化管内で速やか分解したとされている。特に①の試験成績においては、本品目の有効成分は、pH2以下のSGF中では0.25分間で14,400 Da以下のペプチド又はアミノ酸まで分解し、未加水分解物、部分加水分解物は確認されなかったとされている。したがって、添加物として摂取された本品目の未加水分解物、部分加水分解物が大量に糞便中に排泄されることはなく、さらに生体組織中に蓄積する懸念はないものと考えられる。（参照 30、31）【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題が起きないこと。

指定等要請者によれば、本品目のたん白質としての一日摂取量は最大で4.97 mg/人/日と推定され、日本人のたん白質の平均一日摂取量68.0 gの約0.007%

1 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されてい
2 る。(参照20) 【27】

3 指定等要請者によれば、本品目は、食品中のアスパラギンをアスパラギン
4 酸へ変換するものであるとされている。一般的に通常の食品中のアスパラギ
5 ンの大部分は、摂取後に胃酸存在下でアスパラギン酸に変化していると考え
6 られている。したがって、本品目により処理された食品又は本品目により処
7 理された食品タンパク質素材を用いた食品を摂取した場合と、通常の食品を
8 摂取した場合との間で栄養学的な大差はなく、本品目を新たに使用すること
9 によって食品の主成分の過剰摂取の問題は起こらないものと考えられる。(参
10 照2) 【本体】

11
12 以上より、本専門調査会としては、本品目が「添加物に関する食品健康影響評価
13 指針」における「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
14 らかである場合」に該当すると判断した。

15 (2) 毒性

16 (1) のとおり、本品目が「消化管内で分解して食品常在成分になることが
17 科学的に明らかである場合」に該当すると考えられた。したがって、本専門調
18 査会では、本品目の毒性について、「添加物に関する食品健康影響評価指針」
19 に基づき、遺伝毒性、反復投与毒性及びアレルギー性に係る試験成績を用いて
20 評価を行うこととした。

21 ① 遺伝毒性

22
23 本品目の有効成分(製造バッチPPV24743)に関する遺伝毒性の試験成績は、
24 表2のとおりである。

25
26
27 表2 本品目に関する遺伝毒性の試験成績

指標	試験種類	試験対象	用量等	試験結果概要	参照
遺伝子突然変異	復帰突然変異試験 (<i>in vitro</i> 、GLP)	細菌 (<i>Salmonella typhimurium</i> TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA)	最高用量 5 mg/plate	陰性 (代謝活性化系の有無に関わらず)	指定等要請者委託試験報告(2006a) (参照34) 【31】
染色体異常	染色体異常試験 (<i>in vitro</i> 、GLP)	ヒト末梢血リンパ球	最高用量 5 mg/mL	陰性 (代謝活性化系の有無に関わらず)	指定等要請者委託試験報告(2006b) (参照35) 【32】

28
29 以上の結果から、本専門調査会としては、本品目は消化管内で分解して食品
30 常在成分になることが科学的に明らかであることから、生体にとって特段問題
31 となる遺伝毒性はないと判断した。

32 ② 反復投与毒性

33

1 a. ラットを用いた 13 週間経口投与試験（指定等要請者委託試験報告
2 (2006c)、GLP)

3 CDラット(各群雌雄各10匹)に、本品目の有効成分(製造バッチPPV24743)
4 を、表3のような投与群を設定して、13週間強制経口投与する試験が実施さ
5 れている。
6

7 表3 用量設定

用量設定	0、1.0、3.3、10.0 mL/kg 体重/日
酵素活性換算	0、4,658、15,370、46,576 単位/kg 体重/日
TOS 換算	0、88、290、880 mg TOS/kg 体重/日

8
9 その結果、以下の所見が認められたとされている。なお、腎機能への影響
10 を示唆する血液及び組織病理学的所見は認められなかったとされている。

- 11
12 • 3.3 mL/kg 体重/日投与群の雄と10.0 mL/kg 体重/日投与群の雌雄で血漿カ
13 リウム濃度の有意な上昇(参照8) 【29】

14
15 その他の電解質に変化はなかったため、試験実施者は、血漿カリウム濃度
16 の変化に毒性学的な意義はないとしている。

17 以上の結果より、試験実施者は、本試験におけるNOAELを最高用量である
18 10.0 mL/kg 体重/日としている。

19
20 本専門調査会としては、本試験におけるNOAELを最高用量である10.0
21 mL/kg 体重/日と判断した。
22

高須専門参考人：

「その他の電解質に変化はなかったため、試験実施者は、血漿カリウム濃度
の変化に毒性学的な意義はないとしている。」とありますが、原著中の Summary
では血液の変化と記載されており、電解質に限ったことではないように思いま
すがいかがでしょうか。

原著の Histopathology の表に、雌の最高容量群において肺で有意差が認めら
れる項目が 1 点あります。原著中では投与と関係する変化はないとまとめられ
ているだけのようですが、言及する必要はありますでしょうか。頻度が高いわ
けでもなく、他の所見とも相関しないことから、あまり意味のない変化だと考
えましたが、最高容量で有意差が認められていることを考慮しております。

石塚専門委員：

本文中に血漿カリウムの変化との記載があり、他のファクターは軽微で用量
依存性がないことも記載されているので、評価書自体はこの記載でよいのでは
と思います。確かに、他に有意な変化は出ているのでグルコース、アルブミン、
APTT もすべて含めて記載し、用量依存性や病理組織学的変化の観点、そのほか

のパラメーターの変化を伴わないことから毒性としてとらないと記載することもできるかと思いますが、いずれも毒性と取れる変化ではないので原著に従ってカリウムだけの記載でよいかと思いました。

原著には、肺の変化は有意差はついていますが、他の変化に用量依存性がなないので、背景内の変化で被験物質によるものではないとしてもよいと思いました。

③ アレルゲン性

事務局より：

本品目は遺伝子組換え調査会と同時に審議される予定の品目です。アレルゲン性に関してはまず遺伝子組換え調査会で審議することとしておりますので、現段階では記載しておりません。

④ ヒトにおける知見

祖父江専門委員：

この記載で問題ありません。

a. 参考資料

以降の知見については、*A. oryzae*のヒトへの影響の症例報告であったため、本品目とは株が異なるが、参考資料として記載する。

(a) 症例報告 (Barbesgaard ら (1991))

衰弱した患者や外傷を負った患者にアスペルギルス症など *A. oryzae* に由来する可能性のある感染症の事例が報告されている。(参照 4)【39】

IV. 食品健康影響評価

- 1 別紙 1 : 安全性試験結果
- 2

1 <参照>

- 1 厚生労働省, 「*Asparaginase oryzae* NZYM-SP 株を用い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, 第 534 回食品安全委員会 (平成 26 年 10 月 21 日) 【委員会資料 a】
- 2 ノボザイムズ ジャパン (株), 食品添加物の指定要請添付資料 *Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株由来のアスパラギナーゼ, 2014 年 10 月 3 日 【本体】
- 3 Asparaginase from *Aspergillus oryzae* expressed in *A. oryzae*. In WHO (ed.), Technical Report Series 947, Evaluation of certain food additives and contaminants, Sixty-eighth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 19-28 June 2008, WHO, Geneva, 1987; 55-63. 【17】
- 4 Barbesgaard P, Heldt-Hansen HP, Diderichsen B: On the Safety of *Aspergillus oryzae*: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992; 36: 569-72 【39】
- 5 In WHO (ed.), Chemical and Technical Assessments, Evaluation of certain food additives and contaminants, Sixty-eighth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Zofia Olempska-Beer; Asparaginase from *aspergillus oryzae* encoded by the asparaginase gene from *A. oryzae*.; 2007; 1-7 【15】
- 6 ノボザイムズ ジャパン(株): Typical Composition - Acrylaway 3500 BG (ノボザイムズ ジャパン(株)社内資料)【36】
- 7 ノボザイムズ ジャパン(株): Typical Composition - Acrylaway L (ノボザイムズ ジャパン(株)社内資料)【37】
- 8 Huntingon Life Sciences Ltd.: Asparaginase, PPV 24743 – Toxicity Study by Oral Administration to CD Rats for 13 weeks. October 17, 2006 (ノボザイムズ ジャパン(株)社内文書) 【29】
- 9 ノボザイムズ ジャパン(株): Application sheet of Acrylaway®, (ノボザイムズ ジャパン(株)社内資料) 【4】
- 10 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 2009; 40: 2 平成 21 年 【5】
- 11 厚生労働省食品保健部, 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 【1】 参考: <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2002/10/h1031-2.html>
- 12 Codex Alimentarius Commission, Code of practice for the reduction of acrylamide in foods, CAC/RCP 67-2009 【3】

-
- 1 3 U.S. Food and Drug Administration, Agency Response Letter, GRAS Notice No. GRN 000201, November 24, 2006
参考：
<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm153693.htm> 【6】
- 1 4 European Parliament and Council of the European Union: Regulation (EC) No 1332/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food enzymes and amending Council Directive 83/417/EEC, Council Regulation (EC) No 1493/1999, Directive 2000/13/EC, Council Directive 2001/112/EC and Regulation (EC) No 258/97, Official Journal of the European Union, 31.12.2008, L354/7-15 【14】
- 1 5 Ministry of Food, Agriculture and Fisheries. Danish Veterinary And Food Administration (DVFA), Preventase/Approval, File: 2006-20-5406-00107 and 2011-20-25-02414/BICB, April 1, 2011. 【7】
- 1 6 Food Standards Australia New Zealand (FSANZ): Application A606 Asparaginase as a Processing Aid (Enzyme), Final Assessment Report 8-08, May 22, 2008
参考：
<http://www.foodstandards.gov.au/foodstandards/applications/applicationa606aspar3637.cfm> 【15】
- 1 7 厚生労働省, *Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を利用して生産されたアスパラギナーゼに係る食品健康影響評価について, 第 534 回食品安全委員会 (平成 26 年 10 月 21 日) 【委員会資料 b】
- 1 8 Asparaginase from *Aspergillus niger* expressed in *A. niger*. In WHO (ed.), Food Additives Series 59, Safety evaluation of certain food additives, prepared by the sixty-eighth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Geneva, 19-28 June 2007, WHO, Geneva, 2008; 55-63. 【16】
- 1 9 食品安全委員会, 食品安全関係情報詳細, 平成 20 年 12 月 15 日
参考：<http://www.fsc.go.jp/fsciis/foodSafetyMaterial/show/syu02730410188> 【9】
- 2 0 厚生労働省, 平成 24 年国民健康・栄養調査報告, 平成 26 年 3 月 【27】
参考：<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyuu/h23-houkoku.html>
- 2 1 国立感染症研究所, 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. 【40】
- 2 2 National Institutes of Health (NIH). NIH Guidelines for Research

Involving Recombinant DNA Molecules. Office of biotechnology activities
参考:http://oba.od.nih.gov/oba/rac/guidelines_02/APPENDIX_B.htm 【41】

- 2 3 A. J. Watson, L. J. Fuller, D. J. Jeenes and D. B Archer: Homologs of Aflatoxin biosynthesis genes and sequence of *afR* in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. Appl. Environ. Microb. 1999; 65 (1): 307-10 【42】
- 2 4 M. M. Atalla, N.M. Hassanein, A. A. El-Beih and Y. A. Youssef: Mycotoxin production in wheat grains by different *Aspergilli* in relation to different relative humidities and storage periods. Nahrung/Food 2003; 1; 6-10 【46】
- 2 5 ノボザイムズ ジャパン(株); *Aspergillus oryzae* BECh2 株に関する情報 (ノボザイムズ ジャパン(株)社内資料) 【47】
- 2 6 N. Y. Kim, J. H. Lee, I. Lee and G. E. Ji: An evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid production in *Aspergillus oryzae*. J. Food Protect.2014; 77(6): 1010-6 【43】
- 2 7 M. Tokuoka Y. Seshime, I. Fujii, K. Kitamoto, T. Takahashi and Y. Koyama: 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. 2008; 45, 1608-15 【48】
- 2 8 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.2004; 39; 214-28 【49】
- 2 9 消費者庁, 既存添加物名簿収載品目リスト, 平成 26 年 1 月 30 日 【50】
- 3 0 The United States Pharmacopia(USP)(ed.), The United States Pharmacopia 26(NF21) - the National Formulary 21, 2003; p. 2053 【25】
- 3 1 The United States Pharmacopia(USP)(ed.), The United States Pharmacopia 26(NF21) - the National Formulary 21, 2003; p. 2528 【26】
- 3 2 ノボザイムズ ジャパン (株) , GMM Asparaginase toxbatch PPV 24743 in a Simulated Gastric Fluid (SGF) (ノボザイムズ ジャパン(株)社内資料) 【23】
- 3 3 ノボザイムズ ジャパン (株) , Asparaginase in Simulated Intestinal Fluid (SIF) (ノボザイムズ ジャパン(株)社内資料) 【24】
- 3 4 Asparaginase, PPV 24743: Test for Mutagenic Activity with Strains of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (ノボザイムズ ジャパン(株)社内資料) 【31】

³⁵ Covance Laboratories Ltd., Asparaginase, PPV 24743 – Introduction of Chromosome Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes (ノボザイムズ ジャパン(株)社内資料) 【32】