

食安基発 0724 第 1 号  
平成 27 年 7 月 24 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 26 年 12 月 24 日付け府食第 973 号により提出依頼のありました *Aspergillus oryzae* NZYM-SP 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 27 年 7 月 22 日

厚生労働省医薬食品局食品安全部

基準審査課長 殿

ノボザイムズ ジャパン株式会社

平成 26 年 12 月 24 日付けの食品安全委員会からの「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 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」の提出依頼に対し、以下の通り回答申し上げます。

1. 「指定要請資料 *Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」（以下「申請資料」という）の図 9「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株の作製」について、作製工程の情報が十分でないことから、*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 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）の宿主株である *A. oryzae* BECh2 株がアフラトキシン非生産性であることも含めて説明を追加すること。

*A. oryzae* BECh2 株の作製の図（図 9）に、各種遺伝子の欠失及び突然変異導入の方法に関する情報を追加し、また、*A. oryzae* BECh2 株がアフラトキシン非産生性であることについて説明を追記した。

修正後の図 9 を以下に示す。

*A. oryzae* IF04177 株（野生株）

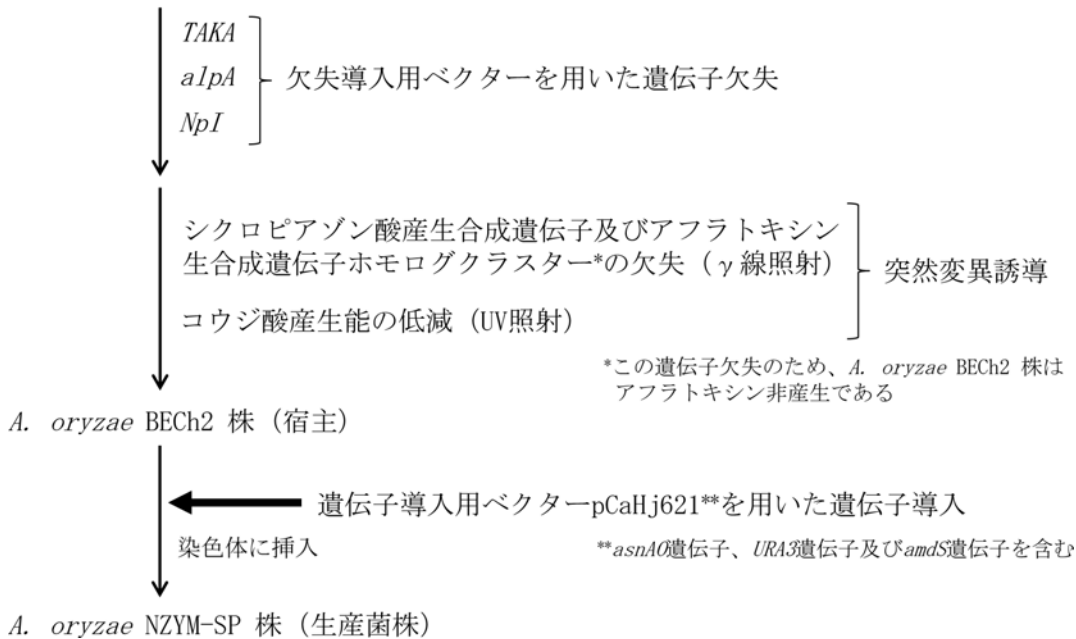


図9 *A. oryzae* NZYM-SP株の作製

2. *A. oryzae* NZYM-SP 株及び本品目のアフラトキシン類産生の存在の有無を確認する試験を実施し、*A. oryzae* NZYM-SP 株及び本品目のアフラトキシン類産生性について考察すること。

酵素試験液 (*A. oryzae* NZYM-SP 株の培養液を除菌濾過・濃縮したもの) 及び本品目 (液状品及び顆粒品) について、総アフラトキシン (アフラトキシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 及び G<sub>2</sub> の総和) の分析を試験機関に委託した。試験には、高速液体クロマトグラフ法が用いられた。その結果、どの供試品も総アフラトキシンが定量限界 (1 μg/kg) 未満であることが示された (補足文献 1)。

*A. oryzae* NZYM-SP 株はアフラトキシン生合成遺伝子ホモログクラスターを欠失しているためアフラトキシン非産生性であり、本品目にアフラトキシンが含まれることはない。補足文献 1 の試験結果は、このことを裏付けるものである。

3. 申請資料 II. 1. 体内動態試験において実施された消化試験 (添付資料 23 及び 24) について、当該物質が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の確認が十分でないことから、以下の点に留意して試験を行い、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)」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。

- ① 本品目及び本品目を加熱処理したものについて、人工胃液処理を行い、14,400Da より小さい質量、例えば 3,500Da 程度の質量まで分解されたことを確認すること
- ② 仮に、①の処理後に、高分子の生成物が認められる場合は、人工胃液処理後の生成物を基質とし、人工腸液を用いる 2 段階目の処理を行い、人工腸液による生成物の分子サイズの確認を行うこと

また、これらの結果を踏まえ、本品目が添加物の通常の使用条件下で、当該物質が消化管内で分解して食品常在成分と同一物質になるか考察すること。

本品目が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を確認するために、本品目及び本品目を加熱処理したものについて人工胃液による消化試験を行った (補足文献 2)。通常の使用条件では、本品目はアクリルアミドが生成される 120℃以上の温度で加熱処理されるが、常圧では 100 度以上の実験系を組むことができないため、処理温度は 99℃とした。

この結果を踏まえ、「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)」の表 2 の 1~4 の検討事項が満たされることを確認した。

**表2 食品添加物が食品内又は消化管内で分解して食品常在成分となることを確認する場合の検討事項。**

(1) 食品添加物の通常の使用条件下で、当該物質が用意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。

本品目について人工胃液消化試験を行った。まず、99℃で5分間の加熱処理有り及び加熱処理無しの本品目をサンプルとして用意した。これらのサンプルを人工胃液中において37℃で反応させ、0.5、2及び10分後に反応を停止させた。また、ペプシンを含まない人工胃液中

にサンプルを添加することにより対照サンプルを調製した。この対照サンプルと共に、人工胃液で反応させたサンプルをSDS-PAGE及びウェスタンブロットにより分析した。

その結果、人工胃液中で反応させたサンプルにおいて、反応開始後0.5分以内にアスパラギナーゼのバンドが消失しペプシンのバンドのみが確認された。これは本アスパラギナーゼが、SDS-PAGE の分子量マーカータンパク質である2kDa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。

以上の試験結果より、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、本品目は加熱処理の有無に関わらず、人工胃液における分解が確認されたため、人工腸液を用いた処理を行っていない。

**(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、消化管内での分解に関わる主要な因子はペプシンであり、pH1-2の酸性条件下で食品常在成分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。**

(1)で示した通り、本品目は消化管内で速やかに食品常在成分に分解されるため、他の食品由来のタンパク質と同様に体内へ吸収されると考えられる。また、本品目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、本品目は消化管内で速やかに食品常在成分に分解されるため、通常の代謝経路をたどると考えられる。従って、本品目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ること、または生体組織中に蓄積されることは考え難い。

4. 申請資料 II.2. (1) 91 日間反復投与毒性試験に関する添付資料 29 (Huntingon Life Sciences Ltd.: Asparaginase, PPV 24743 - Toxicity Study by Oral Administration to CD Rats for 13 weeks. October 17, 2006) 72 ページの TABLE11 雌の 10.0mL/kg 体重/日投与群の所見「Prominent Numbers of Alveolar Macrophages」において、対照群との間に有意差があるが、本所見を「偶発的変動であり、毒性学的に意義がない」と判断した理由や根拠について考察すること。

本所見を毒性学的意義がないと判断した根拠及び理由について、試験実施機関への考察を求め、補足文献3の通り回答を得た。

試験機関は、以下の 5 つの理由により、本所見に検体投与との関連性及び毒性学的意義がないと考察しており、申請者は本考察を妥当と考える。

- 1) 本所見の重篤度(グレード)はいずれも最小であること。
- 2) 本所見の発現頻度は背景データ(補足文献 3 内 Appendix 1)の範囲内であること。
- 3) 本所見の多くは限局性であり、検体投与に関連する炎症性反応及び/または有害性反応を示唆する肺の病理学的所見(例えば肺胞上皮過形成)を伴っていないこと。

- 4) 関連する臨床所見(呼吸困難など)がなく、動物の健康全般において悪影響を及ぼしていない(体重への影響や他の検査項目における毒性学的所見がない)と考えられること。
- 5) 検体投与に関連した泡沫状肺胞マクロファージの増加を伴わない(関連性がみられない)こと。

5. 上記 1~4 に関連する資料や考察があれば、併せて提供すること。

上記 3 に関連して、本品目を酵素で分解させるシミュレーションを行った。分析ツールにはウェブサーバー ExPASy で提供されている「ペプチドカッター」を用いた。結果を補足文献 4 として提出する。

また、コウジ酸及び 3-β-ニトロプロピオン酸の産生性に関するデータが記載された社内文書を補足文献 5 として提出する。