

(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

2015年8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 .....	5
I. 評価対象品目の概要 .....	6
1. 用途 .....	6
2. 名称等 .....	6
3. 基原、製造方法、成分、性状等及び使用方法 .....	6
(1) 基原 .....	6
(2) 製造方法 .....	7
(3) 成分 .....	9
(4) 性状等 .....	11
(5) 使用方法 .....	11
4. 起源又は発見の経緯等 .....	12
5. 我が国及び諸外国における使用状況 .....	12
(1) コーデックス委員会 .....	12
(2) 米国における使用状況 .....	12
(3) EUにおける使用状況 .....	12
(4) その他の国における使用状況 .....	13
(5) 我が国における使用状況 .....	13
6. 国際機関等における評価 .....	13
(1) JECFAにおける評価 .....	13
(2) 米国における評価 .....	13
(3) EUにおける評価 .....	13
(4) その他の機関における評価 .....	14
(5) 我が国における評価等 .....	14
7. 評価要請等の経緯、指定の概要 .....	14
II. 一日摂取量の推計等 .....	15
(1) 国際機関等における推計 .....	15
(2) 我が国における推計 .....	15
III. 安全性に係る知見の概要 .....	16
1. 生産菌株の安全性 .....	16
(1) 非病原性の確認 .....	16
(2) 非毒素産生性の確認 .....	17
(3) その他 .....	22
(4) まとめ .....	22

2. 本品目の安全性 .....	22
(1) 消化管内での分解性等 .....	22
(2) 毒性.....	26
IV. 食品健康影響評価.....	29
<別紙1：略称> .....	31
<参照> .....	32

1 <審議の経緯>

2 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  
3 ついて要請（厚生労働省発食安1017第1号）、関係書類の  
4 接受

5 2014年10月21日 第534回食品安全委員会（要請事項説明）

6 2014年11月17日 第136回添加物専門調査会

7 2014年12月24日 補足資料の提出依頼

8 2015年7月27日 補足資料の接受

9 2015年8月31日 第146回添加物専門調査会

10

11

12 <食品安全委員会委員名簿>

（2015年6月30日まで2012年7月1日（2015年7月1日から）  
から）

熊谷 進（委員長）	佐藤 洋（委員長）
佐藤 洋（委員長代理）	山添 康（委員長代理）
山添 康（委員長代理）	熊谷 進
三森 国敏（委員長代理）	吉田 緑
石井 克枝	石井 克枝
上安平 冽子	堀口 逸子
村田 容常	村田 容常

13

14 <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

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10

## 要 約

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 穂山専門委員、久保田専門委員：  
3 この案で問題ありません。

4 1. 用途

5 加工助剤（参照 1）【委員会資料 a】

6 2. 名称等

7 和名：*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ  
8 英名：Asparaginase from *Aspergillus oryzae* expressed in *Aspergillus*  
9 *oryzae* NZYM-SP

10 EC<sup>(1)</sup>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）

11 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  
12 照 1、2、3）【委員会資料 a、本体、17】

13 3. 基原、製造方法、成分、性状等及び使用方法

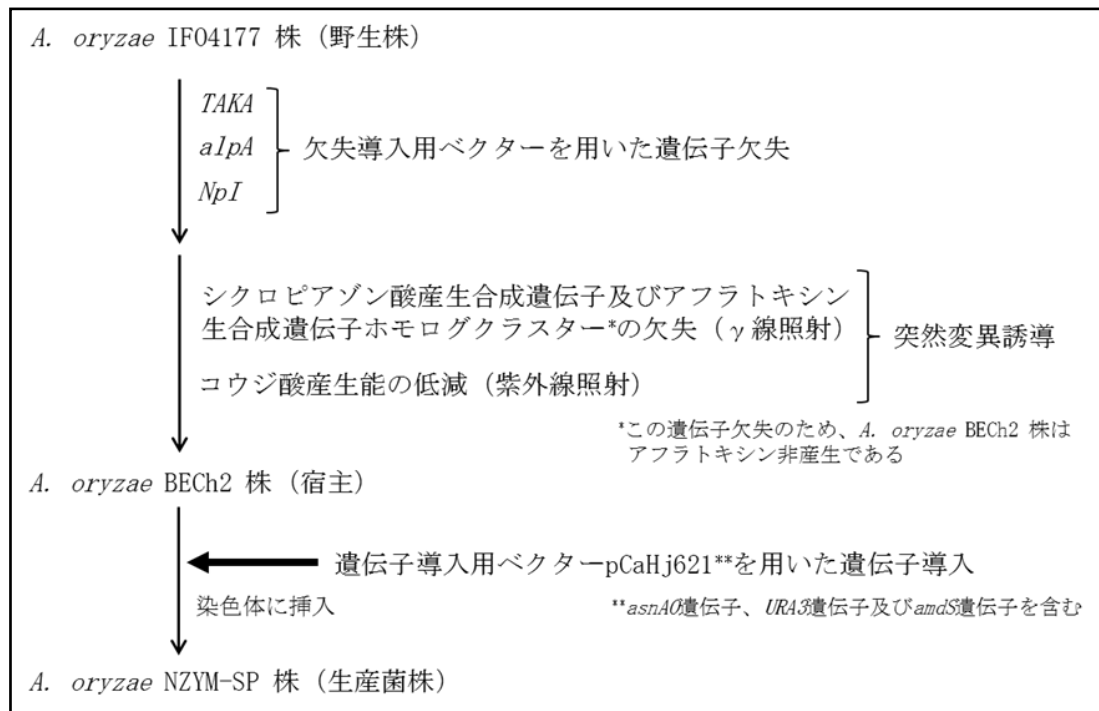
14 (1) 基原

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

19  
20 今般、厚生労働省に添加物「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産  
21 さ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  
22 及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  
23 う。）及び FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）の Chemical and  
24 Technical Assessment（CTA）（2007）によれば、本品目の生産菌株である  
25 *A. oryzae* NZYM-SP 株は、清酒麴から分離された野生株である *A. oryzae*  
26 IFO4177 株の夾雑酵素活性（ $\alpha$ -アミラーゼ、アルカリプロテアーゼ、中性メ  
27 タロプロテアーゼ）、アフラトキシン及びシクロピアゾン酸の産生能を欠損さ  
28 せ、コウジ酸の産生能を低減させた改良株（*A. oryzae* BECh2 株）を宿主とし、  
29 *A. oryzae* IFO4177 株が菌体外に産生するアスパラギナーゼの遺伝子を導入し  
30 て作成されたものであるとされている。（図 1）（参照 2、5、6）【本体、  
31 15、補足資料本体】

32  
33 図 1. *Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株作製の概略

<sup>1</sup> 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。



1  
2

事務局より：

補足資料提出依頼を踏まえ、指定等要請者より、*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株の作製概略について、修正版が提出されましたので、評価書案に反映しております。図中の文言については、専門委員・専門参考人のご意見を踏まえ、提出された修正版からさらに修正して掲載しております。

アフラトキシンの欠失についても本文に追記いたしました。

3

鎌田専門参考人【第136回調査会の際に頂いたコメントです】：

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食品等専門調査会でも審議された品目です。遺伝子組換え食品等専門調査会での審議は終了し、「審議結果(案)」について、2015年7月15日から8月13日まで、国民からの意見・募集を行ったところです。「審議結果(案)」ではasnAO遺伝子の配列や安全性について確認されております。

asnAO遺伝子の配列自体は非公開情報ですが、遺伝子組換え食品等専門調査会に添付資料として提出され、遺伝子組換え食品等専門調査会では、その情報を踏まえて、審議が行われました。

4  
5  
6

## (2) 製造方法

指定等要請者によれば、本品目且の製造方法の概略は図2のとおりとされてい



1            る。この製造方法においては、*Aspergillus\_ oryzae* NZYM-SP 株を液体培養（ス  
2            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  
3            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、  
4            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】  
5

鎌田専門参考人：

「生産菌は最終製品に残存することはない」ことの根拠が微生物除去専用の濾過  
によるとされています。

評価書案図 2 のアスパラギナーゼ製造方法の概略にある「除菌濾過 1」および「除  
菌濾過 2」に当たると理解します。濾過用の支持体（紙や膜など）を使用されたと  
推察しますが、このときの支持体の、菌体を捕捉する能力（除菌能力）を記載され  
ると、支持体を通過した溶液（濾液）には菌体が含まれない状態を証することにな  
ると考えます。

穂山専門委員：

生産菌の安全性については、記述の通り、*A.oryzae*は食用に使われておりますし、  
そのマイコトキシン産生性がないことを実験で確認しておりますので、残存したと  
しても安全性に問題ないと思われます。

従って、成分規格案の「微生物限度本品 1 g 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。」で生産菌の残存を制限してもらえればよい  
かと考えます。

鎌田専門参考人：

穂山専門委員のご意見を踏まえ、問題ないと考えます。

6  
7            図 2   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2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、7、8）【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タンパク質であり、当該359アミノ酸の一次配列は図3のとおりであるとされている。当該有効成分の分子質量は、~~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】

事務局より：

第136回のご審議を踏まえ、修正いたしました。

図3 有効成分のアミノ酸一次配列<sup>(2)</sup>

<sup>2</sup> 指定等要請者によれば、*A. 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あり、当該アスパラギナーゼの遺伝子が翻訳される際はメチオニンから始まる配列（N末端側）を持つが、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

1	SPLLYPRATDSNVTYVFTNPNGLNFTQMNTTLPNVTIFAT	40
2	GGTIAGSSADNTATTGYKAGAVGIQTLIDAVPEMLNVANV	80
3	AGVQVRNVGSPDITSDILLRLSKQINEVVCNDPTMAGAVV	120
4	THGTDITLEESAFFLDATVNCRKPVVIVGAMRPSTAISADG	160
5	PLNLLQSVTVAASPKARDRGALIVMNDRIVSAFYASKTNA	200
6	NTVDTFKAIEMGNLGEVVSINKPYFFYPVKPTGKTEVDIR	240
7	NITSIPRVDILYSYEDMHNDTLYSAIDNGAKGIVIAGSGS	280
8	GSVSTPFSAAMEDITTKHNIPIVASTRTGNGEVPSSAESS	320
9	QIASGYLNPAKSRVLLGLLLAQQGKSIEEMRAVFERIGVA	360

10  
11

**【第136回と同じです】**

鎌田専門参考人：

図3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。

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。

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るとされている。

↓

MGVNFKVLAL SALATISHAS PLLYPRATDS NVTYVFTNPN GLNFTQMNTT  
 LPNVTIFATG GTIAGSSADN TATTGYKAGA VGIQTLIDAV PEMLNVANVA  
 GVQVTNVGSP DITS DILLRL SKQINEVVCN DPTMAGAVVT HGTDTLEESA  
 FFLDATVNCR KPVVIVGAMR PSTAISADGP LNLLQSVTVA ASPKARDRGA  
 LIVMNDRIVS AFYASKTNAN TVDTFKAIEM GNLGEVVS NK PYFFYPPVKP  
 TGKTEVDIRN ITSIPRVDIL YSYEDMHNDT LYS AIDNGAK GIVIAGSGSG  
 SVSTPFS AAM EDITTKHNIP IVASTRTGNG EVPSSAESSQ IASGYL NPAK  
 SRVLLG LLLA QGKSIEEMRA VFERIGVA

事務局より：

第136回のご審議を踏まえ、脚注を追記いたしました。

1  
2 JECFA-CTA (2007) によれば、*A. oryzae* NZYM-SP 株を用いて生産され  
3 たアスパラギナーゼは、TOS が 4% (w/w)、水分が 46% (w/w)、グリセロ  
4 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%である  
5 とされている。(参照 5) 【15】

6  
7 指定等要請者委託試験 (2006) によれば、本品目のバッチ PPV24743 は、  
8 水分が 89.5% (w/w)、乾燥物が 10.5% (w/w)、灰分 (600℃) が 2.1% (w/w)、  
9 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。  
10 (参照 9) 【29】

11  
12 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  
13 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】

#### 14 (4) 性状等

15  
16 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  
17 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)  
18 【本体】

#### 19 (5) 使用方法

20  
21 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  
22 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  
23 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  
24 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  
25 反応があることは知られていないとされている。

26 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  
27 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、

1 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  
2 が残存することはないとされている。（参照 2、10、11）【本体、4、5】  
3

#### 4. 起源又は発見の経緯等

5 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  
6 究の結果、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  
7 中に、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結果、  
8 高温に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、  
9 アクリル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  
10 (IARC) は、アクリルアミドについて、発がん性を「2A」（ヒトに対してお  
11 そらく発がん性がある。）と分類している。（参照 12）【1】  
12

13 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  
14 関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  
15 因物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  
16 がア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 13）【3】  
17

#### 5. 我が国及び諸外国における使用状況

##### (1) コーデックス委員会

18 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）  
19 では、加工助剤（酵素を含む）は対象とされていない。  
20  
21  
22

事務局より：

第136回のご審議を踏まえ、修正いたしました。

##### (2) 米国における使用状況

23 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）  
24 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）~~  
25 から当該届出に異議がない旨の回答がなされている。（参照 14）【6】  
26  
27  
28

##### (3) EUにおける使用状況

29 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  
30 食品用酵素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  
31 欧州議会・欧州理事会規則により、加工助剤たる 食品用酵素についても添加物  
32 としての規制の対象となる見込みである<sup>3)</sup>。（参照 15、16）【7、14】  
33

事務局より：

<sup>3</sup> 評価指定等要請者によれば、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ているとされている。

第 136 回のご審議を踏まえ、修正いたしました。

#### (4) その他の国における使用状況

2008 年 5 月、Food Standards Australia New Zealand (FSANZ) は、本品目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 17) 【11】

#### (5) 我が国における使用状況

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<sup>4</sup>。

事務局より：

「*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」が我が国でも使用が可能になった旨脚注に追記いたしました。

### 6-8. 国際機関等における評価

事務局より：

以降の項目だてを直近の評価書の例に合わせております。  
また、参考文献より JECFA-CTA 【15】 を削除しました。

#### (1) JECFA における評価

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 を特定しないとしている。(参照 3、~~5~~-18) 【~~153~~、16、~~14~~】

#### (2) 米国における評価

上述 (p12) のとおり 2006 年、~~米国~~-FDA は、意図した条件下において使用される限りにおいて、本品目を GRAS 物質とする指定等要請者からの届出に対し、異論はない旨の回答をしている。(参照 14) 【6】

#### (3) EU における評価

上述 (p12) のとおり EU (フランス及びデンマークを除く。) では、2008 年に公布された欧州議会・欧州理事会規則により、加工助剤たる食品用酵素が添加物とし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全性評価は行われていない。(参照 15) 【14】

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

<sup>4</sup> なお、本品目とは生産菌株が異なるが、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」は 2014 年 11 月より我が国において、添加物としての使用が可能になった。



1 験における NOAEL 880 mgTOS/kg 体重/日と一日推定摂取量とのマージンが  
2 2,500 であり、安全性に懸念がないと評価している。（参照 1 9）【9】  
3

【第136回と同じです】

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。

#### 4 5 (4) その他の機関における評価

6 2008 年、FSANZ は、本品目にかかる安全性評価を行った結果、組換え DNA  
7 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  
8 られず、NOAEL は 880 mgTOS/kg 体重/日以上であること、*in vitro* 遺伝毒性  
9 試験に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  
10 ている。（参照 1 7）【11】  
11

#### 12 (5) 我が国における評価等

13 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<sup>(5)</sup>。  
14

#### 15 7-6. 評価要請等の経緯、指定の概要

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  
17 及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、  
18 食品安全基本法第 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  
19 て、食品健康影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~~み~~換え DNA 技術に関する安全性審  
22 査について、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  
23 委員会に対して、食品健康影響評価の要請を行っているところである。（参  
24 照 2 0）【委員会資料 b】  
25

事務局より：

組換え DNA 技術の安全性審査については、「基原」の項目に記載したとおり、  
遺伝子組換え専門調査会にて審議されました。遺伝子組換え調査会の最終的な評価

<sup>5</sup> なお、本品目とは生産菌株が異なるが、2014 年 1 月、食品安全委員会は、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」の食品健康影響評価をとりまとめた。

結果が通知された際には、その旨を本評価書案の記載に反映いたします。

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、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。

## 7. 添加物指定の概要

### II. 一日摂取量の推計等

事務局より；

前回の審議を踏まえ、項目だて等修正いたしました。

森田専門委員：

この案で問題ありません。

#### (1) 国際機関等における推計

##### ① JECFA における推計

前述 (p13) の通り、JECFA は保守的な推定を行った場合の本品目の一日摂取量を  $0.4 \text{ mgTOS/kg}$  体重/日としている。(参照 3、18) 【17、16】

#### (2) 我が国における推計

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、消費される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  $4.97 \text{ mgTOS/人/日}$  と推定している。この値を体重  $55.1 \text{ kg}$  で除すと、 $90.2 \text{ } \mu\text{gTOS/kg}$  体重/日と算出される。(参照 2、11、21) 【本体、5、27】

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 <sup>*1</sup>	mg/人/日	mgTOS <sup>*2</sup> /人/日	$\mu\text{gTOS/kg}$ 体重/日 <sup>*3</sup>
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 <sup>*4</sup>	5.79	0.232	4.20
いも類	54.3	715 <sup>*4</sup>	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 <sup>*4</sup>	4.43	0.177	3.22
その他の調味料	59.9	715 <sup>*4</sup>	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11)

【5】

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、本品目の推定一日摂取量を 90.2 µgTOS/kg 体重/日と判断した。

### III. 安全性に係る知見の概要

事務局より：

第 136 回の審議を受け、修正いたしました。ご確認よろしくお願ひいたします。

鎌田専門参考人：

この案で問題ありません。

#### 1. 生産菌株の安全性

上述 (p-6) 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 *A. oryzae* であるとされている。

指定等要請者によればは、上述 (p7) のとおり、生産菌は最終製品に残存することはないとされている。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。

##### (1) 非病原性の確認

後述 (p27) のとおり、本品目の生産菌株である *A. oryzae* NZYM-SP 株とは株の種類が異なるものの、Barbesgaard ら (1991) の報告によれば、*A. oryzae* 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、

1 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  
2 とされている。(参照 4) 【39】

3  
4 *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  
5 BSL 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、  
6 米国 NIH の “Guidelines for Research Involving Recombinant DNA  
7 Molecules”の定義では Risk Group1 に分類され、非病原性の微生物とみなされ  
8 ている。(参照 2 2、2 3) 【40、41】

9  
10 なお、指定等要請者からは、本品目の生産菌株である *A. oryzae* NZYM-SP  
11 株に関して、病原性に関する知見は提出されていない。(参照 2) 【本体】

## 12 (2) 非毒素産生性の確認

### 13 ① アフラトキシン類産生性

14 a. *A. oryzae* ATCC14895 株のアフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモ  
15 ログの解析 (Watson ら (1999))

16 本品目の生産菌株である *A. oryzae* NZYM-SP 株とは株の種類が異なる  
17 ものの、Watson ら (1999) によれば、*A. oryzae* ATCC14895 は、ア  
18 フラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログと調節遺伝子を有するが、ア  
19 フラトキシン 産生遺伝子の発現は見られないとされている。(参照 2 4)  
20 【42】

21 事務局より：

第 136 回のご審議を踏まえ、修正いたしました。また、本品目とは異なる株に関する知見である旨を追記いたしました。

22 【第 136 回と同じです】

鎌田専門参考人：

申請書には Watson 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。

・ Watson 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、指定等要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。

1  
2 b. *A. oryzae* NRC-MCCU-1 株のマイコトキシン産生能試験 (Attalla ら  
3 (2003))

4 本品目の生産菌株である *A. oryzae* NZYM-SP 株とは株の種類が異なる  
5 ものの、Attalla ら (2003) によれば、*A. oryzae* NRC-MCCU-1 株がアフラ  
6 トキシン類などのマイコトキシンを産生するとされている。(参照 2 5)  
7 **【46】**

事務局より：

第 136 回のご審議を踏まえ、修正いたしました。また、本品目とは異なる株に関する知見である旨を追記いたしました。

8  
9 ~~指定等要請者によれば、本生産菌である *A. oryzae* NZYM-SP 株は、宿~~  
10 ~~主である *A. oryzae* BECh2 株を作製する際に、 $\gamma$  線照射を用いた突然変~~  
11 ~~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~~  
12 ~~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。(参照~~  
13 ~~2 6) **【47】**~~

14  
15 c. *A. oryzae* NZYM-SP 株のアフラトキシン産生能試験 (指定等要請者委託  
16 試験報告 (2015))

事務局より：

17  
18 補足資料提出依頼を踏まえ、指定等要請者より、本生産菌株である *A.*  
19 *oryzae* NZYM-SP 株のアフラトキシン産生能試験結果が提出されました  
20 のので、追記しております。

21  
22 指定等要請者委託試験 (2015) によれば、*A. oryzae* NZYM-SP 株の培  
23 養液を除菌ろ過、濃縮した溶液及び本品目 (液状品及び顆粒品) について、  
24 総アフラトキシン量 (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) は定  
25 量限界である 1  $\mu$ g/kg 以下であったとされている。(参照 2 6) **【補足 1】**

26  
鎌田専門参考人：

一般的に  $\gamma$  線照射による突然変異誘導は、対象遺伝子 (遺伝子クラスター) 特異的ではないと考えます。  $\gamma$  線照射後の菌株について、どのような

検査法で当該遺伝子および遺伝子クラスターが「欠失」したのか、その方法を記載することがよいと考えます。対象遺伝子（遺伝子クラスター）の有無や変化を調べる検査法と、その実施結果の記載があることが望ましいと考え、その旨脚注に記載しております。

指定等要請者は、本品目の生産菌株である *A. oryzae* NZYM-SP 株は、宿主である *A. oryzae* BECh2 株を作製する際に、 $\gamma$ 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ホモログクラスターを欠失しているため<sup>6</sup>、アフラトキシン非産生性であるとしている。したがって、本品目にアフラトキシンが含まれることはないとされており、本結果は、このことを裏付けるものであると考察している。（参照 2、6、27）【本体、補足本体、47】

## ② CPA 産生性

### 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 (2014))

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。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 28）【43】

### 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 ら (2008)）

*A. oryzae* NBRC4177 (=IFO4177) 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。（参照 29）【48】

指定等要請者によれば、本生産菌株の親株である *A. oryzae* IFO4177 株は CPA を産出するが、(参照 27) 【47】宿主である *A. oryzae* BECh2 株を作製する際に、 $\gamma$ 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、本品目の生産菌株である *A. oryzae* NZYM-SP 株は CPA 産生能を失っているとされている。（参照 2、5）【本体、15】

## ③ 3- $\beta$ -ニトロプロピオン酸産生性

<sup>6</sup> 指定等要請者によれば、アフラトキシン生合成遺伝子ホモログクラスターのサザンブロット解析の結果、*A. oryzae* BECh1 株及び BECh2 株において不検出であったとされている。

- 1 a. 3-β-ニトロプロピオン酸毒素産生能試験—レビュー— (Blumenthal  
2 (2004))、Barbesgaardら (1991) (再掲)

3 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  
4 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  
5 すべきであるとされている。(参照 30) 【49】

6 また、Barbesgaardら (1991) によれば、Iwasaki and Kosikowski  
7 (1973) を引用し、6種類の *A. oryzae* のうち4種類に3-β-ニトロプロ  
8 ピオン酸の産生がみられたとされている。(参照 4) 【39】

9  
10 事務局より：

11 表題を修正いたしました。

12 Barbesgaardら (1991) の文献そのもので産生を確認しているのではなく、  
13 Iwasaki and Kosikowski (1973) を引用していることから、(p571)  
14 その旨を明確にいたしました。

- 15  
16 b. 3-β-ニトロプロピオン酸産生能試験 (指定等要請者 (20054))

17 事務局より：

18 補足資料として提出された原著【補足 5】をもとに本文、引用文献等を修  
19 正いたしました。

20 *A. oryzae* NZYM-SP 株について、任意の製造バッチ PPV24743 等にお  
21 けるコウジ酸と及び 3-β-ニトロプロピオン酸の発現量産生量の分析が、  
22 液体クロマトグラフィー質量分析法を用いて行われている。その結果、3-  
23 β-ニトロプロピオン酸は検出限界 (0.6 mg/kg) 以下未満であることが示  
24 された。(参照 2、5、31) 【本体、15、補足 5】

#### 25 ④ コウジ酸産生性

- 26 a. コウジ酸毒素産生能試験—レビュー— (Blumenthal (2004)) (再掲)、  
27 Barbesgaardら (1991) (再掲)

28 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  
29 を生じさせる懸念はないと評価している。(参照 30) 【49】

30 一方、Barbesgaardら (1991) によれば、Manabeら (1984) を引用  
31 し、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とさ  
れている。(参照 4) 【39】

事務局より：

表題を修正いたしました。

Barbesgaardら (1991) の文献そのもので産生を確認しているのではなく、  
Manabe (1984) を引用していることから、(p571) その旨を明確

1 にいたしました。

2  
3  
4 **b. コウジ酸産生能試験（指定等要請者（20052004））（再掲）**

5 上述（p:20）のとおり、*A. oryzae* NZYM-SP 株について、任意の製造  
6 バッチ PPV24743 等におけるコウジ酸及び3-β-ニトロプロピオン酸の  
7 発現量産生量の分析が、液体クロマトグラフィー質量分析法を用いて行わ  
8 れている。その結果、コウジ酸は検出限界（1.4 mg/kg）以下未滿である  
9 ことが示された。（参照 2、5、31）【本体、15、補足 5】

10  
11 指定等要請者によるとれば、*A. oryzae* NZYM-SP 株において、*A.*  
12 *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、  
13 コウジ酸産生能を低減させたとされているおり、本試験結果は、このこと  
14 を裏付けるものであると考察している。（参照 2、5、31）【本体、15、  
15 補足 5】

16 鎌田専門参考人：

UV 照射は微生物ゲノムに障害を与えますが、γ線同様、その障害が特定の遺  
伝子に限定して起こるものではないと理解します。

UV 照射で誘導された突然変異によりコウジ酸産生能が低減した部分につい  
て、文献の引用が直接的でないように見受けられます。また、コウジ酸産生能  
が低減したからと言って製品の安全性が示されたわけではありません。産生さ  
れたコウジ酸の量が、病原性を発揮しない量になっていないと意味を成しませ  
ん。UV 照射後のコウジ酸量について、あるいは、使用菌株が UV 照射で低病原  
性化したことを明瞭に示す文章を追記した方がよいと考えます。

事務局より：

補足資料として提出された原著【補足 5】をもとに本文、引用文献等を修正い  
たしました。

17 【第 136 回と同じです】

事務局より：

指定等要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 LD<sub>50</sub> についての記載がありましたが、  
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

18



1 (3) その他

2 「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  
3 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*  
4 を基原とする添加物として  $\alpha$ -アミラーゼ等が掲げられており、（参照 32）

5 【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。

6  
7 (4) まとめ

8 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  
9 れた本生産菌株である *A. oryzae* NZYM-SP 株については、本品目の添加物と  
10 しての摂取において問題となるような病原性及び毒素産生性の懸念はないと判  
11 断した。

12  
13 2. 本品目の安全性

14 (1) 消化管内での分解性等

頭金専門委員、石井専門委員：

この案で問題ありません。

頭金専門委員：

追加試験の結果を踏まえて、本品目が「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」に該当すると判断して  
よいと思います。

15 本品目は、359 のアミノ酸からなる たん白タンパク 質を主たる成分とするも  
16 のである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  
17 ペプチド又はアミノ酸は、他の食品由来の たん白タンパク 質の場合と同様に体  
18 内へ吸収されると考えられる。このことをより明確にするため、「添加物に関  
19 する食品健康影響評価指針」（2010 年 5 月食品安全委員会決定）における「消  
20 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  
21 当するか否かについて、以下のとおり整理した。

22  
23 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  
24 解して食品常在成分と同一物質になること。

事務局より：

補足資料提出依頼を踏まえ、消化管内での分解性等に対して、指定等要  
請者が新たに試験を実施し、結果の提出がありましたので、その旨を記載  
しております。

それに伴い、前回の調査会で用いた評価書案に掲載された試験（人工胃  
液による消化試験（指定等要請者委託試験（2005））【23】、人工腸液  
による消化試験（指定等要請者委託試験（2010））【24】）は本文中よ

り削除し、脚注の記載といたしました。

#### a. 人工胃液による消化試験（指定等要請者委託試験報告（2015））

指定等要請者委託試験（~~2005、2010~~2015）によれば、本品目（Lot 番号：HON30029）を、99℃で5分間の加熱処理したもの<sup>(7)</sup>及び非加熱処理のサンプルを人工胃液中<sup>(8)</sup>において、37℃で0.5、2、10分間インキュベーションを行った後、本品目の有効成分（製造バッチPPV24743）を人工胃液（SGF）に、またアスパラギナーゼ（Acrylaway® 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、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ゲル電気泳動（SDS-PAGE）及びウエスタンブロット分析に供する試験が実施されている。<sup>(9)</sup>その結果、SDS-PAGE及びウエスタンブロット分析の結果から、人工胃液処理0.5分のサンプルにおいて、アスパラギナーゼのバンドが消失し、人工胃液由来のペプシンのバンドのみ確認された。指定等要請者によれば、本品目は人工胃液処理により、SDS-PAGEの最小の分子量マーカーサイズ（2 kDa）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とされている。

指定等要請者によれば、以上の試験結果より、通常の使用条件下で、本品目は容易に消化管（胃）で分解され、食品常在成分になると考えられるとされている。なお、本品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による試験は行っていないとされている<sup>(10)</sup>。本品目の有効成分は、pH2以下のSGFでは0.25分後に、pH6.8のSIF中では2.5分後に検出限界である14,400 Da<sup>(11)</sup>以下のペプチド又はアミノ酸まで分解したとされている。（参照6、33、34）【補足本体、25、26補足2】

#### b. 「ペプチドカッター」による *in silico* 消化シミュレーション（指定等要請者委託試験報告（2015））

指定等要請者によれば、ウェブサーバ ExPASy<sup>(12)</sup>において提供されてい

<sup>7</sup> 指定等要請者によれば、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℃以上の実験系を組むことができないため、処理温度は99℃としたとされている。

<sup>8</sup> 人工胃液の組成はUSP23（NF18）に拠ったとされている。

<sup>9</sup> 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。

<sup>10</sup> 指定等要請者は、別途、本品目の有効成分（特定のバッチ）を人工胃液で、本品目を人工腸液で処理した試料をSDS-PAGEに供する試験を実施しているが、検出限界分子量（最小分子量マーカーの分子量）が14,400 Daと比較的大きいため、本専門調査会としては、分解性試験としては適切でないと判断し、記載していない。

<sup>11</sup> 試験に用いられた最小の分子量マーカーの分子量が14,400 Daであるとされている。

<sup>12</sup> 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、タンパク質及びプロテオミクス（網羅的タンパク質解析）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。



1 る分析ツールである「ペプチドカッター」を用いて、コンピュータ上で、本  
2 品目のアミノ酸配列をペプシン (pH1.3 又は pH>2)、トリプシン及びキモ  
3 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、表 2 のように分  
4 解されることが示唆されたとされている。

5 指定等要請者によれば、この結果は、本品目が胃における初回の酵素反応  
6 において、既に 1~40 アミノ酸程度のオリゴペプチドにまで分解されること  
7 を示唆しているとされている。(参照 3 5) 【補足 4】

8  
9 表 2 酵素処理によるアミノ酸残基数

<u>酵素</u>	<u>アミノ酸残基数 (個)</u>
<u>ペプシン (pH1.3)</u>	<u>1~40</u>
<u>ペプシン (pH&gt;2)</u>	<u>1~39</u>
<u>キモトリプシン (高特異性)</u>	<u>1~75</u>
<u>キモトリプシン (低特異性)</u>	<u>1~26</u>
<u>トリプシン</u>	<u>2~51</u>

10  
11 頭金専門委員：

12 該当するバンドが短時間で完全に消失しているので、これまでの解釈に  
13 変更を加える必要はないと思います。

14 石井専門委員：

15 アスパラギナーゼは速やかに分解されるということで、問題はなかろう  
16 とと思います。

- 17  
18  
19 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  
20 であること。

21 指定等要請者によれば、上述 (p22) の①の試験成績において、本品目の  
22 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~~  
23 ~~pH1~2 の酸性条件及び~~ペプシン、~~SIF については pH6.7~6.9 及び~~パンクレ  
24 ~~アチン (トリプシン)~~であるとされている。(参照 6) 【補足本体 25、26】

- 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  
27 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。

28 指定等要請者によれば、上述 (p22) のとおり、本品目の有効成分は消化  
29 管内で容易に分解し、~~そのほかのその他の~~食品由来のペプチド等タンパク質  
30 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  
31 あることから、(参照 1 1) 【5】糖質、ミネラル、ビタミン等~~そのほかそ~~  
32 ~~の他~~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 6 ~~2 3 4~~)

1 **【補足本体 25】**

- 2
- 3 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
- 4 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
- 5 蓄積しないこと。

6 指定等要請者によれば、上述 (p22) のとおり、本品目 は消化管内で速や

7 かに食品常在成分にの有効成分は消化管内で速やか分解し、通常の代謝経路

8 をたどるととされている。特に④の試験成績においては、~~本品目の有効成分~~

9 ~~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~~

10 ~~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~~

11 ~~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

12 加水分解物が大量に糞便中に排泄されることはなく、さらに又は生体組織中

13 に蓄積する懸念はないものと考えられることは考え難いととされている。(参

14 照 6-2、3-4) **【補足本体 25、26】**

- 15
- 16 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
- 17 題が起きないこと。

18 指定等要請者によれば、上述 (p15) のとおり、本品目のたん白タンパク

19 質としての一日摂取量は最大で 4.97 mg/人/日と推定され、日本人のたん白タ

20 ンパク質の平均一日摂取量 68.0 g の約 0.007%に過ぎず、本品目の主成分の

21 過剰摂取の問題がおこることはないとされている。(参照 2、21) **【本体、**

22 **27】**

23

事務局より：

第 136 回のご審議を踏まえ、修正いたしました。

24

25 ~~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~~

26 ~~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~~

27 ~~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~~

28 ~~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~~

29 ~~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~~

30 ~~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~~

31 ~~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。~~

32 ~~—(参照 2)—【本体】~~

33

34 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

35 評価指針」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

36 学的に明らかである場合」に該当すると判断した。

1  
2 (2) 毒性

3 (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  
4 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  
5 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」  
6 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  
7 評価を行うこととした。

8  
9 ① 遺伝毒性

戸塚専門委員、山田専門委員  
この案で問題ありません。

10 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  
11 は、表 3 のとおりである。

12  
13 表 3 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 3 6) 【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 3 7) 【32】

14  
15 以上の結果を踏まえから、本専門調査会としては、本品目~~が~~消化管内で  
16 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ことも勘案し  
17 かり、本品目には生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないと判断した。

18  
19 ② 反復投与毒性

石塚専門委員、高須専門参考人：  
この案で問題ありません。

20 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(2006c)、  
21 GLP)

22 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  
23 PPV24743)を、表 4 のような投与群を設定して、13 週間強制経口投与す  
24 る試験が実施されている。

25  
26 表 4 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

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。

- ・ 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リウム濃度の有意な上昇（参照 9）【29】

事務局より：

補足資料提出依頼を踏まえ、指定等要請者より、反復投与毒性試験に対して、試験実施機関に所見の解釈を確認した結果の提出がありましたので、その旨を記載しております。

なお、1 項目目の「背景データ」は【補足 3】の Appendix 1 を指します。

なお、10.0mL/kg 体重/日投与群の雌の所見「Prominent Numbers of Alveolar Macrophages」については、実施試験機関は、以下の理由により、本所見に被験物質投与との関連性及び毒性学的意義がないと考察している。（参照 3 8）【補足 3】

- ・ 本所見の重篤度はいずれも最小であり、発現頻度は背景データの範囲内であること。
- ・ 本所見の多くは限局性であり、肺胞上皮過形成等の、被験物質投与に関連する炎症性反応又は有害性反応を示唆する肺の病理学的所見を伴っていないこと。
- ・ 関連する臨床所見（呼吸困難等）が認められないとともに、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等、動物の健康全般において悪影響を及ぼしていないと考えられること。
- ・ 被験物質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こと。

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。

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 10.0 mL/kg 体重/日 (TOS 換算：880 mg TOS/kg 体重/日) としている。

1 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  
2 mL/kg 体重/日 (TOS 換算 : 880 mg TOS/kg 体重/日) と判断した。

3 **【第 136 回と同じご意見です】**

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、雌の最高用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、最高用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。

4  
5 **③ アレルゲン性**

6 本品目のアレルゲン性については、食品安全委員会の遺伝子組換え食品等  
7 評価書 (案) 「Aspergillus oryzae NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパ  
8 ラギナーゼ」において以下のとおり評価がなされている。

9 A. oryzae NZYM-SP 株の宿主である A. oryzae BECh2 株は TAKA 遺伝  
10 子を欠失しており、 $\alpha$ -アミラーゼ産生性を失っている。そのため、A. oryzae  
11 BECh2 株によるアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられるとしている。

12 また、上述 (p22) の人工胃液を用いた消化試験において、本品目は、試  
13 験開始後 0.5 分以内に消化されることが確認されたとしている。

14 さらに、導入遺伝子である asnA0 遺伝子、amdS 遺伝子、URA3 遺伝子  
15 を含む導入領域に同定された open reading frame (ORF) 及びベクター導入

1 により生じる新たな ORF に、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質と相同  
2 性を示すものがないことが確認されている。(参照 3 9) 【追加 1】

3  
4 本専門調査会としても、遺伝子組換え食品等評価書(案)を是認し、添加  
5 物として適切に使用される場合、本品目のアレルゲン性の懸念は極めて低い  
6 と判断した。

事務局より：

アレルゲン性に関しては、遺伝子組換え食品等調査会で審議されました。

食品安全委員会としての正式な評価結果ではありませんが、現状の内容を記載しております。遺伝子組換え食品等評価書が正式に発出された後、適宜表現を修正することといたします。

穂山専門委員：

この記載で問題ありません。

7  
8 ~~④ ヒトにおける知見<参考資料>~~

事務局より；

前回の審議を踏まえ、再確認した結果、本知見はアスパラギナーゼ【本品目】そのものの知見ではなく、生産菌株の知見であることから、生産菌株の項目にのみ記載させていただきました。

9  
10 ~~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、本品目株とは株が異なるが、参考資料として記載する。~~

11  
12  
13 ~~a. 症例報告 (Barbesgaard ら (1991))~~

14 ~~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~~  
15 ~~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】~~

16  
17  
18 **IV. 食品健康影響評価**

事務局より；

先生方から事前に頂いたコメントを踏まえ、食品健康影響評価案を記載いたしました。

19 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本生産菌株  
20 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原性及び毒  
21 素産生性の懸念はないと判断した。

22  
23 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指針」にお



1 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らかである  
2 場合」に該当すると判断したことから、本品目の毒性について、同指針に基づき、  
3 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評価を行うこと  
4 とした。

5  
6 本専門調査会としては、本品目の毒性に係る知見を検討した結果、本品目につい  
7 ては、遺伝毒性、反復投与毒性の懸念はないと判断した。

8  
9 本専門調査会としては、本品目のアレルギー性の懸念は極めて低いと判断した。

10  
11 以上を踏まえ、本専門調査会としては、ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒  
12 性試験における最高用量から得られた NOAEL 10.0 mL/kg 体重/日 (TOS 換算：  
13 880 mg TOS/kg 体重/日) と、本品目の推定一日摂取量 90.2 µgTOS/kg 体重/日と  
14 を比較して得られる安全マージンが十分であること及び本品目が食経験のある基  
15 原微生物である *A. oryzae* を用いて生産されることを勘案して、本品目について、  
16 添加物として適切に使用される場合、安全性に懸念がないと考えられ、ADI を特定  
17 する必要はないと判断した。

18

1 <別紙 1 : 略称>

2

3

4



## 1 <参照>

- 1 厚生労働省, 「*Aspergillus 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 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課, 「食品健康影響評価に係る補足資料の提出について」, 2015 年 7 月 【補足資料本体】
- 7 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】
- 8 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】
- 9 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】
- 10 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】
- 11 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】
- 12 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>
- 13 Codex Alimentarius Commission, Code of practice for the reduction of

---

acrylamide in foods, CAC/RCP 67-2009 【3】

- <sup>14</sup> 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】
- <sup>15</sup> 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】
- <sup>16</sup> 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】
- <sup>17</sup> 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> 【1511】
- <sup>18</sup> 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】
- <sup>19</sup> 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 【9】  
参考：<http://www.fsc.go.jp/fsciis/foodSafetyMaterial/show/syu02730410188>
- <sup>20</sup> 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】
- <sup>21</sup> 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>
- <sup>22</sup> 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】
- <sup>23</sup> 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](http://oba.od.nih.gov/oba/rac/guidelines_02/APPENDIX_B.htm) 【41】

- 2<sup>4</sup> AJ Watson, LJ Fuller, DJ Jeenes and DB Archer: Homologs of Aflatoxin biosynthesis genes and sequence of *affR* in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. Appl. Environ. Microb. 1999; 65 (1): 307-10 【42】
- 2<sup>5</sup> MM Atalla, NM Hassanein, AA El-Beih and YA 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<sup>6</sup> 一般財団法人 食品環境検査協会, 試験成績証明書. 2015【補足 1】
- 2<sup>7</sup> 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<sup>8</sup> NY Kim, JH Lee, I Lee and GE Ji: An evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid production in *Aspergillus oryzae*. J. Food Protect.2014; 77(6): 1010-6 【43】
- 2<sup>9</sup> 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 cyclopiaxonic acid in *Aspergillus oryzae*. Fungal Genet. Biol. 2008; 45, 1608-15 【48】
- 3<sup>0</sup> CZ 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】
- 3<sup>1</sup> ノボザイムズ ジャパン (株), Analysis of beta-nitropropionic acid and kojic acid in 4 batches of asparaginase produced by *Aspergillus oryzae* (ノボザイムズ ジャパン (株) 社内資料) . 2005【補足 5】
- 3<sup>2</sup> 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<sup>3</sup> The United States Pharmacopoeia(USP)(ed.), The United States Pharmacopoeia 26(NF21) - the National Formulary 21, 2003; 2053 【25】
- 3<sup>4</sup> ノボザイムズ ジャパン (株), Artificial digestion test of AoASP in Simulated Gastric Fluid (SGF) (ノボザイムズ ジャパン (株) 社内資料) . 2015【補足 2】
- 3<sup>5</sup> ノボザイムズ ジャパン (株), 「ペプチドカッター\*」を用いたアスパラギナーゼ (Acrylaway®) の酵素分解シミュレーション (ノボザイムズ ジャパン (株) 社内資料) . 2015【補足 4】
- 3<sup>6</sup> 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) .2006 【31】

<sup>37</sup> 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) .2006 【32】

<sup>38</sup> Asparaginase, Batch PPV 24743: Toxicity Study by Oral Administration to CD Rats for 13 weeks (ノボザイムズ ジャパン (株) 社内資料) .2015 【補足 3】

<sup>39</sup> 遺伝子組換え食品等評価書 (案) 「Aspergillus oryzae NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」 , 平成 27 年 7 月 【追加 1】