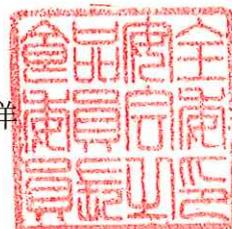




府食第650号  
平成28年10月25日

農林水産大臣  
山本 有二 殿

食品安全委員会  
委員長 佐藤 洋



食品健康影響評価の結果の通知について

平成28年10月11日付け28消安第2839号をもって貴省から当委員会に意見を求められた *Schizosaccharomyces pombe* ASP595-1 株が生産する6-フィターゼに係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第23条第2項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和28年法律第35号）第3条第1項の規定に基づき、*Schizosaccharomyces pombe* ASP595-1 株が生産する6-フィターゼについて、必要に応じて、ポリビニルアルコールの水溶液を加えて製剤を製造することができるよう成分規格を変更することについては、飼料添加物として適切に使用される限りにおいて、食品を介してヒトの健康に影響を与える可能性は無視できると考えられる。

# 飼料添加物評価書

*Schizosaccharomyces pombe* ASP595-1 株  
が生産する 6-フィターゼ

(第2版)

2016年10月

食品安全委員会

## 目次

	頁
○ 食品安全委員会委員名簿.....	3
○ 食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会専門委員名簿.....	3
○ 要約.....	5
I. 評価対象飼料添加物の概要.....	6
1. 用途.....	6
2. 有効成分の一般名.....	6
3. 化学名.....	6
4. 製造方法の概要.....	6
5. 使用目的及び使用状況.....	6
II. 安全性に係る知見の概要.....	7
1. 薬物動態試験.....	7
2. 残留試験.....	7
3. 遺伝毒性試験.....	8
4. 急性毒性試験.....	8
(1) 経口投与毒性試験（ラット）.....	8
(2) 吸入毒性試験（ラット）（参考資料）.....	9
5. 亜急性毒性試験.....	9
(1) 14日間経口投与試験（ラット）.....	9
(2) 90日間亜急性毒性試験（ラット）.....	9
6. 慢性毒性及び発がん性試験.....	10
7. 生殖発生毒性試験.....	10
8. 一般薬理試験.....	10
9. 対象動物における飼養試験.....	10
(1) 飼養試験（豚）.....	10
(2) 飼養試験（鶏）.....	10
(3) 飼養試験（肉用鶏、卵用鶏、七面鳥、あひる、肥育豚、母豚）.....	11
10. その他の試験.....	11
(1) 皮膚刺激性試験.....	11
(2) 眼刺激性試験.....	12
(3) 感作性試験.....	12
11. ヒトにおける知見（参考資料）.....	12
(1) 忍容性試験（子供）（参考資料）.....	12
(2) 忍容性試験（成人）（参考資料）.....	13

1 2. 豚又は鶏が飼料から摂取するポリビニルアルコール量について .....	13
Ⅲ. 国際機関等における評価.....	13
1. EFSA における評価.....	13
Ⅳ. 食品健康影響評価 .....	13
・ 別紙：検査値等略称.....	15
・ 参照 .....	16

## 〈審議の経緯〉

### 第1版関係

- 2015年 10月 22日 農林水産大臣から飼料添加物の基準及び規格並びに当該飼料添加物を含む飼料の基準及び規格の改正に係る食品健康影響評価について要請（27 消安第 3952 号）、関係資料の接受
- 2015年 10月 27日 第 582 回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2015年 12月 21日 第 110 回肥料・飼料等専門調査会
- 2016年 2月 9日 第 594 回食品安全委員会（報告）
- 2016年 2月 10日 から 3月 10 日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2016年 3月 23日 肥料・飼料等専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告
- 2016年 3月 29日 第 600 回食品安全委員会（報告）  
（同日付け農林水産大臣に通知）

### 第2版関係

- 2016年 10月 12日 農林水産大臣から、*Schizosaccharomyces pombe* ASP595-1 株が生産する 6-フィターゼについて、必要に応じて、ポリビニルアルコールの水溶液を加えて製剤を製造する成分規格の変更に係る食品健康影響評価について要請（28 消安第 2839 号）、関係資料の接受
- 2016年 10月 18日 第 626 回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2016年 10月 25日 第 627 回食品安全委員会（審議）  
（同日付け農林水産大臣に通知）

## 〈食品安全委員会委員名簿〉

（2015年7月1日から）

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

## 〈食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会専門委員名簿〉

（2015年10月1日から）

今井 俊夫（座長\*）  
山中 典子（座長代理\*）  
荒川 宜親 高橋 和彦

石原 加奈子 戸塚 恭一  
今田 千秋 中山 裕之  
植田 富貴子 細川 正清  
桑形 麻樹子 宮島 敦子  
小林 健一 宮本 亨  
下位 香代子 山田 雅巳  
菅井 基行 吉田 敏則

\* : 2015年10月28日から

〈第 110 回肥料・飼料等専門調査会専門参考人名簿〉

唐木 英明

## 要 約

飼料添加物である、*Schizosaccharomyces pombe* ASP595-1 株が生産する 6-フィターゼについて、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和 28 年法律第 35 号）第 3 条第 1 項の規定に基づく飼料添加物の基準及び規格並びに飼料の基準及び規格を改正することについて、飼料添加物指定審査用資料等を用いて食品健康影響評価を実施した。今回、当該飼料添加物の製剤に使用するポリビニルアルコールに関する資料が提出された。

薬物動態及び残留試験は実施されていない。

遺伝毒性試験については、*in vitro* の細菌を用いた復帰突然変異試験及びマウスリンパ腫細胞を用いた遺伝子突然変異試験、並びに *in vivo* のマウス骨髄細胞を用いた小核試験の結果はいずれも陰性であった。以上から、生体にとって問題となる遺伝毒性を示さないと考えられた。

慢性毒性試験及び発がん性試験、並びに生殖発生毒性試験は実施されていないが、ラットを用いた 14 日間及び 90 日間亜急性毒性試験、並びに各種動物を用いた飼養試験において影響はみられなかった。

ポリビニルアルコールを使用した製剤については、6-フィターゼの飼料への添加量は評価済みの製剤と同じであり、畜産物を介してヒトが摂取するポリビニルアルコール量は極めて微量であると判断した。

以上のことから、*S. pombe* ASP595-1 株が生産する 6-フィターゼが飼料添加物として適切に使用される限りにおいて、食品を通じてヒトの健康に影響を与える可能性は無視できると考えられる。

なお、農林水産省における本飼料添加物の取扱いについては、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）別表第 2 の 2 の規定に基づく遺伝子組換え飼料添加物の安全性に関する食品健康影響評価の結果も踏まえる必要がある。

## I. 評価対象飼料添加物の概要

### 1. 用途

飼料添加物（豚及び鶏用飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進）

### 2. 有効成分の一般名

和名：フィターゼ

英名：Phytase（参照 1、2）

### 3. 化学名

和名：6-フィターゼ

英名：6-Phytase

IUB No. EC 3.1.3.26 (*myo*-inositol-hexakisphosphate 6-phosphohydrolase)

### 4. 製造方法の概要

*Schizosaccharomyces pombe* に属する菌株を宿主として、*Escherichia coli* B 株由来の 6-フィターゼをコードする *appA* 遺伝子を挿入した *S. pombe* ASP595-1 株を培養し、培養後ろ過等により菌体を除去して製造する。（参照 1、2）

### 5. 使用目的及び使用状況

今回の評価対象である *S. pombe* ASP595-1 株が生産する 6-フィターゼは、飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進を目的として、豚及び鶏の飼料に添加して使用される（豚：250～750 FTU<sup>1</sup>/kg 飼料、鶏：250～1,000 FTU/kg 飼料）。（参照 1）また、本飼料添加物は、ダニスコ・アニマル・ニュートリション社（英国）により 2001 年から商業生産が開始され、既に海外において使用されている。（参照 1、3、4）

フィターゼは、フィチン酸<sup>2</sup>を分解して無機リン酸を遊離する酵素群の総称であり、フィターゼ生産菌を培養して得られる。（参照 1、3）フィターゼには、主に 6-フィターゼと 3-フィターゼがあり、植物や *E. coli* のフィターゼは 6-フィターゼ、真菌類や多くの細菌のフィターゼは 3-フィターゼであると報告されている。フィターゼの作用は、フィチン酸のイノシトール環にあるリン酸エステル結合の加水分解であり、6-フィターゼはイノシトール環の第 6 位にあるリン酸エステル結合を優先的に加水分解し、3-フィターゼは第 3 位にあるリン酸エステル結合を優先的に加水分解する。（参照 5、6、7）

反芻動物では、消化管内に存在するフィターゼによりフィチン酸が消化されるが（参照 10）、鶏や豚などの単胃動物ではフィターゼの活性が弱いため、飼料中のフィチン酸に含まれるリンの利用性は低く、鶏では約 10%、豚では 20～30%とされている。そのため、必要とされるリンを補充するために、通常は飼料に無機リンが添加されるが、フィ

<sup>1</sup> FTU は、フィチン酸分解力単位のことであり、1 FTU はフィターゼがフィチン酸に 37°C で作用するとき、1 分間に 1 μmol のリン酸を遊離させる酵素量に相当。（参照 1）

<sup>2</sup> *myo*-Inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis(dihydrogen phosphate) (CAS 83-86-3)。穀物等の植物種子に多く含まれる。植物にとっては主要なリン酸の貯蔵物質。（参照 8、9）

ターゼを飼料に添加することによって飼料中のリンの利用性が改善されることから、飼料添加物としてのフィターゼが開発された。フィターゼを鶏用又は豚用の飼料に添加することにより、飼育成績を損なうことなく飼料への無機リンの添加量を低く設定することが可能となり、糞便中へのリンの排泄量が低減されることも確認されている。現在では、鶏及び豚用の配合飼料の製造時に、無機リンの添加量を少なくした飼料にフィターゼが添加<sup>3</sup>されている。(参照 1、3)

日本では、1996年9月に *Aspergillus niger* を培養して得られたフィターゼが飼料添加物として指定された。その後 *A. oryzae* 又は *A. niger* に属する菌株を宿主としたフィターゼ生産組換え体を培養して作製されるフィターゼ 2 品目が飼料添加物として指定された。(参照 1、3) 現在、これらのフィターゼを含有する対象家畜用飼料について、飼料の基準及び規格は定められていない。また、*A. niger* の培養液から得られるフィターゼは、既存添加物名簿に記載されている。(参照 11)

海外においても、飼料添加物又は食品添加物として使用されている。(参照 12、13) 飼料添加物としては、様々な真菌類等 (*A. oryzae*, *A. niger*, *Komagataella pastoris* 等) を宿主としたフィターゼ生産組換え体を培養して作製される 3-及び 6-フィターゼが使用されている。(参照 12)

今般、農林水産省より、*S. pombe* ASP595-1 株が生産する 6-フィターゼについて、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律第 3 条第 1 項の規定に基づき、必要に応じて、ポリビニルアルコールの水溶液を加えて製剤を製造することができるよう成分規格を変更することに係る食品健康影響評価の要請がなされた。

## II. 安全性に係る知見の概要

本評価書は、飼料添加物指定審査用資料等を基に、*S. pombe* ASP595-1 株が生産する 6-フィターゼの毒性に関する主な知見を整理した。なお、各種毒性試験には、*S. pombe* ASP595-1 株を培養して得られた培養液から遠心分離により菌体を除去した後、上清を凍結乾燥して調整したもの（以下「未精製 6-フィターゼ」という。）又は *S. pombe* ASP595-1 株を培養して得られた培養液から遠心分離、精密ろ過及び限外ろ過により菌体を除去した後、ろ液を凍結乾燥して調整したもの（以下「精製 6-フィターゼ」という。）が使用された。

検査値等略称を別紙に示した。

### 1. 薬物動態試験

実施されていない。

### 2. 残留試験

実施されていない。

---

<sup>3</sup> フィターゼを無機リン無添加の飼料 1 kg 当たり 500～1,000FTU 添加すると、約 0.1%の無機リンに相当するとされている。(参照 1)

### 3. 遺伝毒性試験

*S. pombe* ASP595-1 株が生産する 6-フィターゼの遺伝毒性試験結果を表 1 に示した。

精製 6-フィターゼの細菌を用いた復帰突然変異試験、マウスリンパ腫細胞を用いた遺伝子突然変異試験及びマウス骨髄細胞を用いた *in vivo* 小核試験の結果はいずれも陰性であった。(参照 1、4、14、15、16、17)

以上のことから、*S. pombe* ASP595-1 株が生産する 6-フィターゼは、生体にとって問題となる遺伝毒性を示さないと考えられた。

参考<sup>4</sup>であるが、*A. niger* を宿主としたフィターゼ生産組換え体から生産した 3-フィターゼの遺伝毒性試験として、*in vitro* の細菌を用いた復帰突然変異試験及びヒトリンパ球を用いた染色体異常試験が実施されており、いずれの試験結果も陰性であることが報告されている。(参照 13)

表 1 *S. pombe* ASP595-1 株が生産する 6-フィターゼの遺伝毒性試験結果

	試験	対象	用量	結果	参照
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA (pKM101)	33.3、100、333、1,000、3,330、5,000 µg/plate (±S9) ただし、プレインキュベーション 60 分	陰性	1、4、14、15
	遺伝子突然変異試験	マウスリンパ腫細胞 (L5178Y <i>tk<sup>+</sup></i> )	39.3、78.5、157、313、625、1,250、2,500、5,000 µg/mL (±S9)	陰性	1、4、14、16
<i>in vivo</i>	小核試験	ICR 系マウス骨髄細胞 雄 5 匹/群	500、1,000、2,000 mg/kg 体重 単回経口投与	陰性	1、4、14、17

### 4. 急性毒性試験

#### (1) 経口投与毒性試験 (ラット)

ラット (SD 系、5 週齢、雌雄各 5 匹/群) に未精製 6-フィターゼを単回強制経口投与 (0、30,000 又は 50,000 FTU/kg 体重) し急性毒性試験が実施された。対照群には注射用滅菌水を投与した。

その結果、本試験において死亡例はみられず、毒性徴候もみられなかった。また、体重及び投与 14 日後の剖検所見に投与の影響はみられなかった。

著者は、本試験における LD<sub>50</sub> は、雌雄ともに 50,000 FTU/kg 体重以上と考えた。(参

<sup>4</sup> 今回の評価対象である 6-フィターゼを用いた試験ではないことから、参考とした。

照 1、14、18)

## (2) 吸入毒性試験 (ラット) (参考資料<sup>5)</sup>)

ラット (SD 系、雌雄各 5 匹) に、未精製 6-フィターゼを 6 時間鼻部暴露 (2.20 mg/L) した。暴露後、一般状態及び体重測定を実施し、暴露 14 日後に剖検した。

試験期間中死亡例はみられなかった。

一般状態では、顔面付近に暗色の付着物がみられ、糞量が減少した。

体重は、試験 0~7 日には雌 3 例、試験 7~14 日には雌 1 例で減少したが、その他の投与動物では試験期間中増加した。

剖検では、投与に起因する影響はみられなかった。

著者は、本試験における LC<sub>50</sub> は、2.20 mg/L 以上と考えた。(参照 14)

## 5. 亜急性毒性試験

### (1) 14 日間経口投与試験 (ラット)

ラット (系統及び年齢不明、雌雄各 10 匹/群) に未精製又は精製 6-フィターゼを 14 日間強制経口投与した。未精製 6-フィターゼの投与量は 5,000、30,000 又は 50,000 FTU/kg 体重/日、精製 6-フィターゼの投与量は 100,000 FTU/kg 体重/日であった。

その結果、投与 14 日後に最高用量である 100,000 FTU/kg 体重/日投与群で悪影響はみられなかった。(参照 4)

### (2) 90 日間亜急性毒性試験 (ラット)

ラット (SD 系、6 週齢、雌雄各 20 又は 25 匹/群<sup>6)</sup>) に未精製又は精製 6-フィターゼを 90 日間強制経口投与し、亜急性毒性試験が実施された。未精製 6-フィターゼの投与量は 5,000、30,000 又は 50,000 FTU/kg 体重/日、精製 6-フィターゼの投与量は 100,000 FTU/kg 体重/日であった。対照群 (雌雄各 25 匹) には注射用滅菌水を投与した。一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、眼科的、血液学的及び血液生化学的検査、剖検並びに病理組織学的検査を実施した。

一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検及び臓器重量に投与に起因する影響はみられなかった。

病理組織学的検査で、対照群にはみられなかったが、全投与群の雌雄に肺の炎症が高率にみられた。このことは、多量の被験物質を注射用滅菌水に溶解したことによって粘稠性が高くなり、そのため強制経口投与時に被験物質を誤嚥したことによって生じた所見と考えられた。

著者は、本試験における NOAEL を未精製 6-フィターゼでは 50,000 FTU/kg 体重/日、精製 6-フィターゼでは 100,000 FTU/kg 体重/日と考えた。(参照 1、4、14、19)

<sup>5</sup> 投与経路が経口ではないことから、参考資料とした。

<sup>6</sup> 未精製 6-フィターゼの 5,000 及び 30,000 FTU/kg 体重/日投与群は雌雄各 20 匹/群、未精製 6-フィターゼの 50,000 及び精製 6-フィターゼの 100,000 FTU/kg 体重/日投与群は雌雄各 25 匹/群であった。

## 6. 慢性毒性及び発がん性試験

実施されていない。

## 7. 生殖発生毒性試験

実施されていない。

## 8. 一般薬理試験

実施されていない。

## 9. 対象動物における飼養試験

### (1) 飼養試験 (豚)

離乳豚 (交雑種、体重  $8.07 \pm 0.054$  kg、雌雄各 16 頭/群) に 6-フィターゼ製剤を 28 日間混餌投与し、飼養試験が実施された。試験群として、陽性対照群 (リン含量が多い飼料群(リンの含量: 前期用飼料 0.32%、後期用飼料: 0.27%))、陰性対照群 (リン含量が少ない飼料群(リンの含量: 前期用飼料 0.22%、後期用飼料 0.17%)) 及び添加投与群 (リン含量が少ない飼料に 6-フィターゼを添加(10,000 FTU/kg 飼料)) を設定した。添加投与群に添加した 6-フィターゼは、豚における推奨添加量の上限量の 10 倍量に相当した。一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定し、体重増加量及び飼料効率を算出した。試験終了時には腓骨の骨灰分量を調べた。

その結果、一般状態に投与の影響はみられなかった。陰性対照群では、体重増加量、飼料効率及び骨灰分重量が陽性対照群よりも有意 ( $p < 0.05$ ) に低下した。添加投与群では、体重増加量、飼料効率及び骨灰分重量が陰性対照群よりも有意 ( $p < 0.05$ ) に増加し、陽性対照群と同等であった。

以上の結果から、6-フィターゼ製剤の推奨添加量の上限量の 10 倍量を添加した飼料を子豚に 28 日間投与しても、一般状態及び飼育成績に投与に起因する異常所見及び悪影響はみられなかった。(参照 1、20、21)

### (2) 飼養試験 (鶏)

鶏 (肉用種、初生雛、252 羽/群) に 6-フィターゼ製剤を 42 日間混餌投与し、飼養試験が実施された。飼料はリン含量の少ない飼料 (リンの含量: 前期用飼料 0.26%、後期用飼料 0.22%) を使用し、当該飼料への 6-フィターゼの添加は、0、500 (推奨添加量の下限の 2 倍量) 又は 7,500 FTU/kg 飼料 (推奨添加量の上限の 10 倍量) の 3 群とした。一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定した。

その結果、試験期間中の死亡率及び一般状態に投与の影響はみられなかった。両添加投与群の体重増加及び摂餌量は、無添加投与群と比較して、用量依存的に有意 ( $p < 0.05$ ) に増加した。飼料効率にも添加に起因する影響はみられなかった。

以上の結果から、6-フィターゼ製剤の推奨添加量の上限量の 10 倍量を添加した飼料を鶏に 42 日間投与しても、一般状態及び飼育成績に投与に起因する異常所見及び悪影響はみられなかった。(参照 1、4、22)

### (3) 飼養試験（肉用鶏、卵用鶏、七面鳥、あひる、肥育豚、母豚）

肉用鶏、卵用鶏、七面鳥、あひる、肥育豚及び繁殖用雌豚に6-フィターゼ製剤を混餌投与し、飼養試験が実施された。投与方法、添加濃度等について表2に示した。なお、肉用鶏を用いた試験では陰性対照群のみ、その他の試験ではリンを十分含んだ標準飼料を投与した陽性対照群及び無機リンの添加量を少なくした低リン添加飼料を投与した陰性対照群が設定された。各試験の6-フィターゼ製剤添加群には、低リン添加飼料に6-フィターゼ製剤を添加した飼料が投与された。

その結果、いずれの動物においても、6-フィターゼ製剤の推奨添加量の上限量の10～15倍量を添加した飼料を投与しても、投与に起因する異常所見及び悪影響はみられなかった。(参照20)

表2 各動物種を用いた6-フィターゼ製剤の飼養試験方法と6-フィターゼ添加量

動物		日齢等 (性別)	頭羽数	投与期間	添加量 (FTU/kg 飼料)
鶏	肉用	初生雛 (雄)	計 126 羽	42 日間	0、500、7500(10 倍量)
	卵用	50 週齢 (雌)	計 128 羽	61 日間	0、900 <sup>a</sup> 、15,000 <sup>b</sup> (16 倍量)
七面鳥		初生雛 (雄)	計 216 羽	112 日間	0、10,000(10 倍量)
家鴨		初生雛 (雄)	計 288 羽	42 日間	0、15,000(15 倍量)
豚	肥育	日齢、性別不明 <sup>c</sup>	計 96 頭	42 日間	0、10,000(10 倍量)
	繁殖雌	月齢不明	計 24 頭	全妊娠及び哺乳期間	0、7,500(15 倍量)

a : 実際の投与量は 814 FTU/kg 飼料

b : 実際の投与量は 11,278 FTU/kg 飼料 (12 倍量に相当)

c : 試験開始時の平均体重 24 kg

## 10. その他の試験

### (1) 皮膚刺激性試験

ウサギ（ニュージーランドホワイト種、雌雄各3匹）の背部皮膚に、未精製6-フィターゼを4時間半開放塗布（0.5 mL<sup>7</sup>）して皮膚刺激性試験が実施された。パッチの除去直後、除去24、48及び72時間後に観察を実施した。

その結果、6例中5例に軽度の紅斑がみられ、1例では24時間持続した。(参照4、14)

<sup>7</sup> 6-フィターゼの含量は不明。

## (2) 眼刺激性試験

ウサギ（ニュージージーランドホワイト種、雌雄各 3 匹）の右眼に未精製 6-フィターゼを直接点眼し（169.1 FTU/0.1 mL/眼）、眼刺激性試験が実施された。

その結果、投与 1 時間後に 2 例で結膜の充血がみられたが、投与 24、48 及び 72 時間後には全例で眼刺激性は観察されなかった。（参照 4、14）

## (3) 感作性試験

モルモット（雌雄各 10 匹/投与群、各 5 匹/対照群）を用いた未精製 6-フィターゼの感作性試験が Buehler の方法により実施された。7 日間間隔で 3 回、被験物質<sup>8</sup>を 6 時間動物の皮膚に塗布し、感作暴露した。感作暴露の最終塗布 14 日間後に、被験物質を動物に惹起暴露した。対照群には、注射用滅菌水を塗布した。

惹起暴露 19 時間後に除毛した。惹起暴露 24 及び 48 時間後に皮膚反応を観察した。その結果、遅発型接触過敏症はみられなかった。（参照 4、14）

### 1 1. ヒトにおける知見（参考資料<sup>9</sup>）

*S. pombe* を宿主としたフィターゼ生産組換え体から作製される 6-フィターゼについて、ヒトにおける知見は得られていない。

しかし、3-フィターゼについては、ヒトの食品添加物として使用されている *A. niger* 由来の遺伝子を *A. niger* に導入して発現させた 3-フィターゼを用いて忍容性試験が実施され、子供を対象としたプラセボ対照介入試験及び成人を対象とした 3-フィターゼの Fe の吸収における影響<sup>10</sup>を調べる試験が実施された。

#### (1) 忍容性試験（子供）（参考資料<sup>9</sup>）

南アフリカの小学校 2 校の生徒（200 名、平均 8 歳、平均体重 22.6 kg、5 名/投与群、3 名/対照群）を対象にトウモロコシ粥を 1 週間に 5 回投与（湿重量 250 g/日）し、3-フィターゼ酵素製剤の二重盲検法によるプラセボ対照介入試験が実施された。投与群には 3-フィターゼを含む微量栄養素粉末（380 FTU/ヒト、暴露量：0.160 mg TOS/kg 体重/日）が、対照群にはデキストロースが粥に添加された。投与は合計 19 週間（23 週間の投与を目標としていたが、7 月に 3 週間、9 月に 1 週間の休日で中断した。）であった。身体測定（身長、体重、皮下脂肪）が実施され、血中の Hb、Fe、Zn 及び CRP が測定された。

結果として、微量栄養素混合物により、投与群の鉄欠乏症及び亜鉛欠乏症の割合は減少し、外因性のフィターゼを摂取直前に食品に添加すると食品中のミネラルの放出が強化されバイオアベイラビリティを増加させることが報告された。また、3-フィタ

<sup>8</sup> フィターゼの含量は不明。

<sup>9</sup> 今回の評価対象である 6-フィターゼを用いた試験ではないことから、参考資料とした。

<sup>10</sup> フィチン酸は Ca、Mg、Zn 及び Fe と不溶性塩を形成するため（参照 9）、フィターゼを摂取することによりこれらの吸収率も向上すると考えられる。ヒトの食品添加物としてのフィターゼは、フィチン酸塩を豊富に含む食品の消化吸收を目的としている。（参照 13）

一ゼを 19 週間（5 回/週）食餌に添加することによって、子供に特段影響はみられなかった。（参照 13、23）

## （2）忍容性試験（成人）（参考資料<sup>9</sup>）

健康な成人ボランティア（20～52 歳、10 名/試験）を対象に、Fe の吸収に対するふすまの内因性のフィターゼ及び *A. niger* 由来の 3-フィターゼの影響が調べられた。第 1 試験では、フィターゼ活性がある又は活性がないふすまを添加した小麦のロールパンの食餌、第 2 試験ではフィターゼを不活性化したふすまを加えたロールパンに *A. niger* 由来の 3-フィターゼ製剤（200,000 FTU/ヒト）を添加又は非添加した食餌を用いて Fe の吸収を測定した。その結果、摂取直前にフィチン酸を含む食餌に *A. niger* 由来の 3-フィターゼ製剤を加えることによって、Fe の吸収は約 2 倍（14 から 26% に）となった。3-フィターゼを摂取することによる悪影響は報告されなかった。以上のことから、*A. niger* 由来の 3-フィターゼ製剤の経口投与は、Fe の吸収を促進させることに加え、成人ヒトに特段影響はみられなかった。（参照 13、24）

## 1 2. 豚又は鶏が飼料から摂取するポリビニルアルコール量について

製剤に添加されたポリビニルアルコール量と豚又は鶏の一日当たりの飼料摂取量を用いて、豚又は鶏が一日当たりに摂取するポリビニルアルコール量を算出したところ、その摂取量は JECFA で設定された ADI<sup>11</sup>と比較して微量であると考えられた。（参照 25、26、27、28）

## Ⅲ. 国際機関等における評価

### 1. EFSA における評価

EFSA は、*S. pombe* に属する菌株を宿主としたフィターゼ生産組換え体を培養して得られる 6-フィターゼの製剤について、ラットを用いた 90 日間経口投与試験において肺に変化がみられたものの、強制経口投与時の手技によるものであり被験物質の影響ではないと考えた。また、細菌を用いた復帰突然変異試験、マウスリンパ腫細胞を用いた遺伝子突然変異試験及びマウス骨髄細胞を用いた *in vivo* 小核試験の結果はいずれも陰性であったことから、EFSA では *S. pombe* に属する菌株を宿主としたフィターゼ生産組換え体を培養して得られる 6-フィターゼの製剤を摂取したヒトの安全性について、懸念するエビデンスはないと結論付けた。（参照 4）

また、ポリビニルアルコールを使用した製剤については、既に承認されている製剤と比べて、飼料への 6-フィターゼの添加量に変更はなく、既に承認されている製剤と同様、ヒトに対して安全であると結論付けた。（参照 29）

## Ⅳ. 食品健康影響評価

*S. pombe* ASP595-1 株が生産する 6-フィターゼについて、薬物動態及び残留試験は

<sup>11</sup> JECFA では、一日摂取許容量（ADI）として 50 mg/kg 体重/日が設定されている。（参照 28）

実施されていない。

遺伝毒性試験については、*in vitro* の細菌を用いた復帰突然変異試験及びマウスリンパ腫細胞を用いた遺伝子突然変異試験、並びに *in vivo* のマウス骨髄細胞を用いた小核試験の結果はいずれも陰性であった。以上から、生体にとって問題となる遺伝毒性を示さないと考えられた。

慢性毒性試験及び発がん性試験、並びに生殖発生毒性試験は実施されていないが、ラットを用いた 14 日間及び 90 日間亜急性毒性試験、並びに各種動物を用いた飼養試験において影響はみられなかった。

ポリビニルアルコールを使用した製剤については、6-フィターゼの飼料への添加量は評価済みの製剤と同じであり、畜産物を介してヒトが摂取するポリビニルアルコール量は極めて微量であると判断した。

以上のことから、*S. pombe* ASP595-1 株が生産する 6-フィターゼが飼料添加物として適切に使用される限りにおいて、食品を通じてヒトの健康に影響を与える可能性は無視できると考えられる。

なお、農林水産省における本飼料添加物の取扱いについては、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）別表第 2 の 2 の規定に基づく遺伝子組換え飼料添加物の安全性に関する食品健康影響評価の結果も踏まえる必要がある。

〈別紙：検査値等略称〉

略称等	名称
ADI	一日摂取許容量
Ca	カルシウム
CRP	C 反応性タンパク
EFSA	欧州食品安全機関
FAO	国際連合食糧農業機関
Fe	鉄
FTU	フィチン酸分解力単位
Hb	ヘモグロビン量 (血色素量)
JECFA	FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
LC <sub>50</sub>	半数致死濃度
LD <sub>50</sub>	半数致死量
Mg	マグネシウム
NOAEL	無毒性量
TOS	総有機固形分 (Total Organic Solids)
WHO	世界保健機関
Zn	亜鉛

## 〈参照〉

1. ダニスコジャパン株式会社: フィターゼ 飼料添加物指定審査用資料 抄録 (非公表)
2. ダニスコジャパン株式会社: フィターゼ 飼料添加物指定審査用資料 添付資料 2 (非公表)
3. ダニスコジャパン株式会社: フィターゼ 飼料添加物指定審査用資料 添付資料 1 (非公表)
4. EFSA : Opinion of the Scientific panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed and the Scientific panel on Genetically Modified Organisms on the safety and efficacy of the enzymatic preparation Phyzyme XP (6-Phytase) for use as feed additive for chickens for fattening. EFSA Journal 2006; 350: 1-14
5. Greiner R, Konietzny U and Jany KD : Purification and Characterization of Two Phytases from Escherichia coli. Arch Biochem Biophys 1993; 303(1): 107-113
6. Wyss M, Brugger R, Kronenberger A, Remy R, Fimbel R, Oesterhelt G et al. : Biochemical Characterization of Fungal Phytases (myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Catalytic Properties. Appl Environ Microbiol 1999; 65(2): 367-373
7. Greiner R, haller E, Konietzny U and Jany KD : Purification and Characterization of a Phytase from Klebsiella terrigena. Arch Biochem Biophys 1997; 341(2): 201-206
8. The Merck Index 15<sup>th</sup> Edition
9. 八杉龍一、小関治男、古谷雅樹、日高敏隆 編: 岩波生物学辞典 第4版. 岩波書店 2002年
10. 石川統、黒岩常祥、塩見正衛、松本忠夫、守隆夫、八杉貞雄、山本正幸 編: 生物学辞典. 株式会社東京化学同人 2010年
11. 公益財団法人 日本食品化学研究振興財団ホームページ 既存添加物名簿収載品目リスト  
<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/MHWinfo.nsf/a11c0985ea3cb14b492567ec002041df/c3f4c591005986d949256fa900252700?OpenDocument>
12. EFSA ホームページ : <http://www.efsa.europa.eu/>
13. JECFA : 3-Phytase from *Aspergillus niger* expressed in *Aspergillus niger*. Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series 67, 2012
14. Ciofalo V, Barton N, Kretz K, Bairs J, Cook M, and Shanahan D : Safety evaluation of a phytase, expressed in *Schizosaccharomyces pombe*, intended for use in animal feed. Regul Toxicol Pharmacol 2003; 37: 286-292
15. ダニスコジャパン株式会社: フィターゼ 飼料添加物指定審査用資料 添付資料 17 (非公表)
16. ダニスコジャパン株式会社: フィターゼ 飼料添加物指定審査用資料 添付資料 18 (非公表)
17. ダニスコジャパン株式会社: フィターゼ 飼料添加物指定審査用資料 添付資料 19 (非公表)

18. ダニスコジャパン株式会社：フィターゼ 飼料添加物指定審査用資料 添付資料 15  
(非公表)
19. ダニスコジャパン株式会社：フィターゼ 飼料添加物指定審査用資料 添付資料 16  
(非公表)
20. EFSA : Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the safety and efficacy of the enzyme preparation Phyzyme™ XP 5000L and Phyzyme™ XP 5000G (6-Phytase) as a feed additive for chickens for fattening, laying hens, turkeys for fattening, ducks for fattening, piglets (weaned), pigs for fattening and sows in accordance with Regulation (EC) No 1831/2003. EFSA Journal 2006; 404: 1-20
21. ダニスコジャパン株式会社：フィターゼ 飼料添加物指定審査用資料 添付資料 21  
(非公表)
22. ダニスコジャパン株式会社：フィターゼ 飼料添加物指定審査用資料 添付資料 20  
(非公表)
23. Troesch B, Stuijvenberg ME, Smuts CM, Kruger HS, Biebinger R, Hurrell RF et al. : A Micronutrient Powder with Low Doses of Highly Absorbable Iron and Zinc Reduces Iron and Zinc Deficiency and Improves Weight-For-Age Z-Scores in South African Childres. J Nutr 2011; 141: 237-242
24. Sandberg AS, Hulthen LR and Turk M : Dietary Aspergillus niger phytase Increases Iron Absorption in Humans. J Nutr 1996; 126: 476-480
25. ダニスコジャパン株式会社：飼料添加物フィターゼに使用するポリビニルアルコール安全性検討資料 参考資料 1 (非公表)
26. 中央畜産会：日本飼養標準 豚 (2013年版) (独) 農業・食品産業技術総合研究機構編
27. 中央畜産会：日本飼養標準 家禽 (2011年版) (独) 農業・食品産業技術総合研究機構編
28. JECFA : Polyvinyl Alcohol. Satey evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Food Additives Series 52, 2004
29. EFSA : Safety and efficacy of Phyzyme XP 10000 (TPT/L), 6-phytase, as feed additive for chickens for fattening, laying hens, ducks for fattening, turkeys for fattening, piglets (weaned), pigs for fattening and sows. EFSA Journal 2008; 915: 1-10