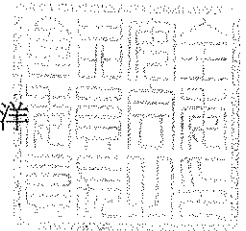




府 食 第 599号
令 和 2年 9月 1日

農林水産大臣
江藤 拓 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

令和2年8月7日付け2消安第2088号をもって貴省から当委員会に意見を求められた遺伝子組換え技術によって得られた*Bacillus licheniformis*から産生されるアルカリ性プロテア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

Bacillus licheniformis JPBL001株が産生するアルカリ性プロテアーゼを原体とする飼料添加物が、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程度と考えられる。

飼料添加物評価書

(第2版)

Bacillus licheniformis JPBL001 株
が産生するアルカリ性プロテアーゼ
を原体とする飼料添加物

2020年9月

食品安全委員会

目 次

	頁
○ 審議の経緯	3
○ 食品安全委員会委員名簿	3
○ 食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会専門委員名簿	4
○ 要約	5
I. 評価対象飼料添加物の概要	6
1. 原体	6
(1) 一般名	6
(2) 化学名	6
(3) 製造方法の概要	6
2. 製剤	6
3. 用途	6
4. 対象飼料及び添加量	6
5. 開発の経緯等	7
II. 安全性に係る知見の概要	9
1. 体内動態試験	9
2. 残留試験	9
3. 遺伝毒性試験	9
4. 急性毒性試験	10
5. 亜急性毒性試験	10
(1) 13 週間亜急性毒性試験 (ラット)	10
6. 慢性毒性及び発がん性試験	11
7. 生殖発生毒性試験	11
8. 対象動物における飼養試験	12
(1) 耐容性試験 (鶏)	12
(2) 耐容性試験 (豚)	12
(3) 飼養試験 (有効性確認試験、豚)	13
9. 製剤に含まれる物質に関する安全性	13
(1) 固形製剤	13
(2) 液状製剤	13
10. その他の試験	14
(1) 皮膚刺激性試験	14
(2) 眼刺激性試験	14
III. 国際機関等における評価	15
1. EFSA における評価	15

2. JECFA における評価.....	15
3. FDA における評価.....	15
4. FSANZ における評価.....	16
IV. 食品健康影響評価	17
・ 別紙：検査値等略称	18
・ 参照	19

〈審議の経緯〉

第 1 版関係

- 2017年 12月 20日 農林水産大臣から飼料添加物の基準及び規格並びに飼料添加物を含む飼料の基準の改正に係る食品健康影響評価について要請（29 消安第 4601 号）、関係資料の接受
- 2017年 12月 26日 第 679 回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2018年 2月 2日 第 131 回肥料・飼料等専門調査会
- 2018年 2月 27日 第 686 回食品安全委員会（報告）
- 2018年 2月 28日 から 3月 29 日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2018年 4月 4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
- 2018年 4月 10日 第 692 回食品安全委員会（報告）
同日付で食品安全委員会委員長から農林水産大臣へ通知

（第 2 版関係）

- 2020年 8月 7日 農林水産大臣から飼料添加物の基準及び規格並びに飼料添加物を含む飼料の基準の改正に係る食品健康影響評価について要請（2 消安第 2088 号）、関係資料の接受
- 2020年 8月 18日 第 787 回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2020年 9月 1日 第 788 回食品安全委員会（審議）
同日付で食品安全委員会委員長から農林水産大臣へ通知

〈食品安全委員会委員名簿〉

（2018年6月30日まで） （2018年7月1日から）

佐藤 洋（委員長）	佐藤 洋（委員長*）
山添 康（委員長代理）	山本 茂貴（委員長代理*）
吉田 緑	川西 徹
山本 茂貴	吉田 緑
石井 克枝	香西 みどり
堀口 逸子	堀口 逸子
村田 容常	吉田 充

*：2018年7月2日から

〈食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会専門委員名簿〉

(2019年9月30日まで)

今井 俊夫 (座長*)

山中 典子 (座長代理*)

新井 鐘蔵 下位 香代子

荒川 宜親 菅井 基行

今田 千秋 高橋 和彦

植田 富貴子 中山 裕之

川本 恵子 宮島 敦子

桑形 麻樹子 山田 雅巳

小林 健一 吉田 敏則

佐々木 一昭

* : 2017年10月25日から

〈第131回肥料・飼料等専門調査会専門参考人名簿〉

唐木 英明 (公益財団法人食の安全・安心財団理事長)

要 約

Bacillus licheniformis JPBL001 株が生産するアルカリ性プロテアーゼに係る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の改正に関して、飼料添加物指定審査用資料等を用いて、本アルカリ性プロテアーゼを原体とする飼料添加物の食品健康影響評価を実施した。

B. licheniformis JPBL001 株が生産するアルカリ性プロテアーゼを原体とする飼料添加物の製剤は、固形及び液状製剤の 2 種類あり、推奨添加量は豚及び鶏用飼料 1 kg 当たり 15,000 タンパク質分解酵素単位 (PROT) (24,000 たん白消化力単位相当) とされている。

本アルカリ性プロテアーゼについて、体内動態及び残留試験は実施されていない。しかし、人工胃液による消化試験で実施した 30 分間の処理により本アルカリ性プロテアーゼは消化された。

遺伝毒性試験では、*in vitro* の 2 試験の結果がいずれも陰性であったこと及び消化試験の結果から、本アルカリ性プロテアーゼには生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないと考えた。

ラットの 13 週間亜急性毒性試験において、本アルカリ性プロテアーゼの投与による毒性所見はみられなかったことから、本試験における NOAEL は最高用量である 500.1 mg TOS/kg 体重/日 (287,469 PROT/kg 体重/日相当) と判断した。

本製剤を用いた豚及び鶏の飼養試験では、推奨添加量の 10 倍量 (150,000 PROT/kg 飼料) を混餌投与しても、投与による悪影響はみられなかった。

製剤に含まれている物質は、その使用状況、既存の毒性評価及び本製剤の用法・用量を考慮すると、本製剤の含有成分として摂取した場合のヒトへの健康影響は無視できる程度と考えた。

以上のことから、*B. licheniformis* JPBL001 株が生産するアルカリ性プロテアーゼを原体とする飼料添加物が、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程度と考えた。

なお、本アルカリ性プロテアーゼについては、農林水産省から、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 の規定に基づき、遺伝子組換え飼料添加物の安全性に関する評価要請がされ、食品安全委員会は、2018 年 4 月 10 日付け府食第 234 号により、「「JPBL001 株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼ」については、「遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方」(平成 16 年 5 月 6 日食品安全委員会決定)に基づき評価した結果、改めて「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」(平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定)に準じて安全性評価を行う必要はなく、当該飼料添加物を摂取した家畜に由来する畜産物について安全上の問題はないと判断した。」と評価している。

I. 評価対象飼料添加物の概要

1. 原体

Bacillus licheniformis JPBL001 株が生産するアルカリ性プロテアーゼである。

(1) 一般名

アルカリ性プロテアーゼ

(2) 化学名

和名：セリンプロテアーゼ

英名：Serine Protease

IUBNo. EC No. 3.4.21 (Serine endopeptidases) (参照 1)

CAS No.37259-58-8 (参照 1)

(3) 製造方法の概要

Bacillus licheniformis Si-3 株を宿主株として、*Nocardiosis prasina* 由来アルカリ性プロテアーゼ遺伝子を挿入した組換え *B. licheniformis* JPBL001 株を培養し、生産する。(参照 1)

2. 製剤

剤形として固形及び液状がある。(参照 1)

(1) 固形製剤

原体に、セルロース、デキストリン、ショ糖、炭酸カルシウム、植物油、水及び硫酸ナトリウムを混合した粉末である。

(2) 液状製剤

原体に、水、グリセリン、ソルビトール、安息香酸ナトリウム及びソルビン酸カリウムを混合した水溶性液状物である。

3. 用途

飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進である。(参照 1)

4. 対象飼料及び添加量

要請者によれば、本飼料添加物の飼料への推奨添加量は、豚及び鶏用飼料 1 kg 当たり 15,000 タンパク質分解酵素単位 (PROT)¹ (24,000 たん白消化力

¹ 1 PROT は、37℃、pH 9.0 で基質 (*N*-スクシニル-*L*-アラニル-*L*-アラニル-*L*-プロリル-*L*-フェニルアラニン-4-ニトロアニリド) 1 μmol/L から 1 分間当たり *p*-ニトロアニリン 1 μmol を放出する酵素量と定義されている。(参照 4)

単位²相当) である。(参照 1; 追 1)

5. 開発の経緯等

プロテアーゼはタンパク質中のペプチド結合を加水分解する酵素であり、食品の食感の向上、調味料の製造改善、衣類の洗浄効果の向上等、古くから食品や洗剤に広く使用されてきた。(参照 2)

プロテアーゼは、その作用に至適 pH があることから、酸性、中性又はアルカリ性プロテアーゼに分類される。(参照 1)

プロテアーゼは、日本では飼料添加物として既に使用されており、酸性、中性又はアルカリ性プロテアーゼのほかに、セルラーゼ・プロテアーゼ・ペクチナーゼ複合酵素が指定されている。(参照 3)

対象動物にプロテアーゼを添加した飼料を摂取させると、消化管でタンパク質の消化が促進し、エネルギーの利用効率が上昇し、その結果、対象動物の成長促進につながると考えられている。アルカリ性プロテアーゼに関しては、*B. licheniformis*、*Aspergillus melleus* 又は *Streptomyces caespitosus* が産生するアルカリ性プロテアーゼが 1990 年に、*Bacillus subtilis* が産生するアルカリ性プロテアーゼが 1998 年に飼料添加物として指定されている。(参照 1)

本評価書における評価対象飼料添加物は、Novozymes A/S 社が開発した *B. licheniformis* JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼを原体とし、DSM 株式会社 (共同申請者: ノボザイム ジャパン株式会社) が飼料添加物として申請したものである。

本製剤は、2009 年に EFSA、2011 年に FDA の評価を受けて、鶏用飼料添加物として使用されており、アジア・オセアニア地域においても鶏用又は鶏及び豚用飼料添加物として使用されている。日本では、食品健康影響評価 (2018 年 4 月 10 日付け、府食第 244 号) を経て、2018 年 10 月に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 項の規定に基づく規格基準の改正が行われ、飼料添加物として利用可能となっている。食品添加物としては、*B. licheniformis* JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼは、海外では 2016 年から販売されている。また、日本においても、食品安全委員会における遺伝子組換え食品等に関する食品健康影響評価を経て、2018 年 5 月に食品衛生法 (昭和 22 年法律第 233 号) に基づき、食品添加物としての利用が可能となっている。(参照 1、4、5)

今般、農林水産省から、*B. licheniformis* JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼの対象家畜の拡大について、飼料の安全性の確保及び品質の

² 「1 たん白消化力単位は、プロテアーゼが乳製カゼインに 37℃で作用するとき、反応初期の 1 分間に 1 µg のチロシンに相当する非たん白性のフォリン試液呈色物質の増加をもたらす酵素量に相当する」と規定されている。(参照 3)

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当該飼料添加物を含む飼料の基準の改正に関する食品健康影響評価の要請がなされた。

なお、本アルカリ性プロテアーゼは、遺伝子組換え技術を用いて生産していることから、農林水産省から、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 の規定に基づき、遺伝子組換え飼料添加物の安全性に関しても評価要請がなされ、食品安全委員会は、2018 年 4 月 10 日付け府食第 234 号により、「「JPBL001 株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼ」については、「遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方」（平成 16 年 5 月 6 日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、改めて「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に準じて安全性評価を行う必要はなく、当該飼料添加物を摂取した家畜に由来する畜産物について安全上の問題はないと判断した。」と評価している。

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、*B. licheniformis* JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼの毒性に関する主な知見を整理した。

検査値等略称を別紙に示した。

1. 体内動態試験

実施されていない。

2. 残留試験

実施されていないが、人工胃液及び人工腸液による消化試験が実施されている。

人工胃液として、水に塩化ナトリウム及び塩酸を加えて溶液としたものにペプシンを加えた溶液を用いた。人工腸液として、水にリン酸二水素カリウム及び水酸化ナトリウムを加えて pH を 6.8 に調整した溶液に、パンクレアチンを加えた溶液を用いた。

B. licheniformis JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼを人工胃液（0.5、2、30、120 又は 180 分間）又は人工腸液（0.5、2、4 又は 6 時間）で処理し、SDS 電気泳動で分離後にウエスタンブロット法により本アルカリ性プロテアーゼを検出した。

その結果、本アルカリ性プロテアーゼは、人工胃液で 30 分間処理した場合は消化された。一方、人工腸液では、6 時間処理でも消化されなかった。（参照 5、6）

3. 遺伝毒性試験

B. licheniformis JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼの遺伝毒性試験結果を表 1 に示した。

表 1 *Bacillus licheniformis* JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼの遺伝毒性試験結果

試験系		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> WP2 <i>uvrA</i> pKM101	156、313、625、1,250、2,500、5,000 µg/mL ^a (±S9)	陰性	1、4、7、8
	染色体異常試験	ヒト末梢血リンパ球	1,582、2,813、5,000 µg/mL (±S9、3 時間処理後 17 時間培養)	陰性	1、4、8、9
1,311、2,048、4,000 µg/mL (-S9、20 時間処理) 2,048、3,200、5,000 µg/mL (+S9、3 時間処理後 17 時間培養)			陰性		

a : 試験菌株と被験物質を混ぜて培養し、平板に撒く前に菌を洗って被験物質を除いた。

食品安全委員会は、*in vivo* の遺伝毒性試験は実施されていないが、*in vitro* の復帰突然変異試験及び染色体異常試験の結果は陰性であったこと並びに消化試験の結果から本アルカリ性プロテアーゼは消化管では消化されると考えられることから、本アルカリ性プロテアーゼ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。

4. 急性毒性試験

実施されていない。

5. 亜急性毒性試験

(1) 13 週間亜急性毒性試験 (ラット)

ラット (SD 系、6 週齢、雌雄各 10 匹/群) に *B. licheniformis* JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼ³を 13 週間強制経口投与 (0、50、165.1 又は 500.1 mg 総有機固形分(TOS)/kg 体重/日)した。対照群には水を同量投与した。

投与期間中、50 mg TOS/kg 体重/日投与群の雄 1 例及び 165.1 mg TOS/kg 体重/日投与群の雌雄各 1 例の死亡がみられた。また、165.1 mg TOS/kg 体重/日投与群の雌 1 例が瀕死状態となった。これらの死亡 4 例は、肉眼所見に基づき、投与過誤によると考えられた。

³ 被験物質 1 g 当たりの酵素活性は 54,600 PROT、TOS 含有率は 9.5%であった。

一般状態、体重、体重増加量、摂餌量及び眼底検査に被験物質の投与による影響はみられなかった。

飲水量の増加が 500.1 mg TOS/kg 体重/日投与群で時々みられ、50 及び 165.1 mg TOS/kg 体重/日投与群でまれにみられた。しかし、他の検査項目に有害な影響はみられなかったことから、飲水量の増加は被験物質の嗜好性によるもので、有害な影響ではないと考えられた。

血液学的検査では、165.1 mg TOS/kg 体重/日投与群の雌にのみ WBC の低値がみられたが、用量依存性もみられなかったことから、被験物質の影響と考えられなかった。

血液生化学的検査では、500.1 mg TOS/kg 体重/日投与群の雄でアルカリホスファターゼの高値、全投与群の雌で ALT の低値、及び 500.1 mg TOS/kg 体重/日投与群の雌で AST の低値がみられたが、一方の性のみにみられた所見であり、毒性学的に有意な変動ではなかったこと及び病理組織学的検査において被験物質の投与による影響はみられなかったことから、これらの所見は偶発的なものと考えられた。

165.1 mg TOS/kg 体重/日投与群の雄で肝臓の相対重量が対照群より低かったが、絶対重量の減少はみられなかった。相対重量の減少は、雄のみにみられた所見であり、用量依存性もみられなかったことから、偶発的なものと考えられた。

病理組織学的検査でも被験物質の影響はみられなかった。

また、試験終了前 2 週間にオープンフィールド法により運動機能障害並びに聴覚、視覚、触覚等の刺激に対する感覚機能障害の検出試験を実施した。165.1 mg TOS/kg 体重/日投与群の雄にのみ立ち上がり回数の増加がみられたが、用量依存性がなかったことから、被験物質の影響と考えられなかった。

JECFA は、被験物質による毒性学的影響がみられなかったことから、本試験における NOAEL を最高用量である 500 mg TOS/kg 体重/日と判断した。

EFSA は、本試験において被験物質の投与に関連した影響はみられなかったと判断した。(参照 1、4、8、10)

食品安全委員会は、本試験で被験物質の投与による毒性所見がみられなかったことから、本試験における NOAEL を最高用量の 500.1 mg TOS/kg 体重/日 (287,469 PROT/kg 体重/日相当)と判断した。

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. 対象動物における飼養試験

(1) 耐容性試験 (鶏)

鶏 (肉用種、1日齢、雌雄各99羽/群) に *B. licheniformis* JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼ製剤⁴を37日間混餌投与 (アルカリ性プロテアーゼとして0、15,000、75,000又は150,000 PROT/kg 飼料(製剤として0、172.5、862.5又は1725.0 mg/kg 飼料)) し、耐容性試験が実施された。飼料は、投与開始22日目にスターター飼料⁵からグロワー飼料⁶に切り替えた。投与開始22及び35日目に体重を測定した。また、最終投与日には、各群の雌雄各6羽について、血液学的及び血液生化学的検査並びに剖検を実施した。剖検時には、体重のほかに消化管及び肝臓の重量を測定した。

各群間の死亡率に違いはみられなかった。

投与開始35日後の150,000 PROT/kg 飼料投与群の体重及び一日当たりの体重増加量は、対照群及び15,000 PROT/kg 飼料投与群と比較して有意に高かった。

血液学的及び血液生化学的検査では、各群間に違いはみられなかった。

75,000 PROT/kg 飼料以上投与群の消化管の絶対重量が対照群と比較して有意に低かったが、相対重量に違いはみられなかった。肝臓の絶対及び相対重量は、各群間に違いはみられなかった。

臓器の肉眼所見として、対照群を含む全群で皮下の点状出血、肝臓の肥大若しくは萎縮、上大静脈の肥厚、胸腺の肥大、脾臓の萎縮又はファブリキウス嚢の肥大が少数例にみられたが、これらの所見は投与に関連する影響とは考えられなかった。

以上から、被験物質を鶏に推奨添加量の10倍量まで37日間混餌投与しても、鶏の安全性に懸念はないと考えられた。(参照1、8、11)

(2) 耐容性試験 (豚)

豚 ((デュロック×ランドレース)×ピエトレン交雑種、26日齢、平均体重7.6 kg、36頭(4頭×9区画)/群) に *B. licheniformis* JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼ製剤を43日間混餌投与 (基礎飼料、15,000、75,000又は150,000 PROT/kg 飼料 (すなわち、0、152、760又は1,520 mg/kg 飼料)) し、耐容性試験が実施された。

本試験の最大投与量である推奨用量の10倍量投与群においても、対照群および他群との間に有意な変化がみられなかった。血液学的検査、生化学的検査及び病理学的検査において、用量依存性の変化はみられなかったこと

⁴ 被験製剤は固形製剤であり、耐熱コーティングしている。製剤1g当たりの酵素活性は86,973 PROTである。

⁵ 参照3におけるブロイラー用飼料の「前期用」に相当すると考えられる。

⁶ 参照3におけるブロイラー用飼料の「後期用」に相当すると考えられる。

から、申請者らは、豚に本製剤の至適添加量の 10 倍量を投与しても安全性に懸念はないとしている。(参照 32、33)

以上のことから、本アルカリ性プロテアーゼの推奨用量の 10 倍量投与に対し豚は耐容であり、安全性に懸念はないと考えられた。

(3) 飼養試験（有効性確認試験、豚）

豚（子豚、肥育豚）に、11,250～15,000（推奨添加量）PROT/kg 飼料の *B.licheniformis* JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼ製剤を混餌投与する飼養試験が実施された。

最長 11 週間混餌投与した結果、いずれも *B.licheniformis* JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼ製剤の投与による毒性影響はみられなかった。(参照 32、34、35、36)

9. 製剤に含まれる物質に関する安全性

(1) 固形製剤

固形製剤の製造に使用される物質のうち水以外の物質は、賦形物質及び希釈物質として使用が認められている物質であり、これまで飼料添加物の製造において使用されてきたものである。(参照 3)

硫酸ナトリウムは、国内で食品添加物に指定され、JECFA で ADI は「not specified」（特定しない）とされている。(参照 12、13)

セルロースは、国内で食品添加物に「粉末セルロース」、「微小繊維状セルロース」及び「微結晶セルロース」が指定されており（参照 14）、JECFA で微結晶セルロース及び粉末セルロースの ADI は「not specified」とされている。(参照 15、参照 16)

デキストリンは、国内でヒト用医薬品の添加物として使用され、経口投与では 1 日当たり最大 12.015 g 使用されている。(参照 17)

ショ糖は、食品に通常含まれている。(参照 18)

炭酸カルシウムは、国内で食品添加物に指定されており（参照 12）、食品安全委員会で評価している⁷（参照 19）。JECFA で ADI は「not specified」とされている（参照 20）。また、国内ではヒト用医薬品の添加物として使用され、経口投与では 1 日当たり最大 640 mg 使用されている。(参照 21)

植物油は、食用の目的で植物から抽出された油脂である。(参照 22)

(2) 液状製剤

液状製剤の製造に使用されるグリセリン及びソルビトールは、賦形物質及び希釈物質として使用が認められている物質である。(参照 3)

グリセリンは、国内で食品添加物に指定されており（参照 12）、動物用医

⁷ 通常の食事以外からのカルシウムの摂取量に関する上限値として 2,000 mg/kg 体重/日（カルシウムとして）

薬品の添加剤としても使用されている。(参照 23)

ソルビトールは、国内で D-ソルビトールとして食品添加物に指定されており、JECFA で ADI は「not specified」とされている。(参照 12、24)

安息香酸ナトリウムは、国内で食品添加物に指定され、JECFA で ADI⁸ が設定されている。(参照 12、25)

ソルビン酸カリウムは、国内で食品添加物に指定されており(参照 12)、食品安全委員会において ADI⁹が設定されている(参照 26)。JECFA でも ADI¹⁰が設定されている。(参照 27)

以上のことから、本製剤に含まれている物質は、その使用状況、既存の毒性評価及び本製剤の用法・用量を考慮すると、本製剤の含有成分として摂取した場合のヒトへの健康影響は無視できる程度と考えた。

10. その他の試験

(1) 皮膚刺激性試験

ウサギ(系統不明、3匹)を用いて皮膚刺激性試験が実施された。

B. licheniformis JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼの投与 1 時間後から、軽度又は明瞭な紅斑及び極めて軽度又は軽度な浮腫がみられたが、これらの症状は投与 7 日間後には消失した。投与 24 時間後に 1 例で中度の虚血性壊死がみられ、48 時間後では中程度の痂皮形成となり、14 日後には消失した。

EFSA は、本試験の結果から、本製剤はヒトの皮膚に対して刺激性であると判断した。(参照 8)

(2) 眼刺激性試験

ウサギ(NZW 種、雄 3 匹)を用いて眼刺激性試験が実施された。

B. licheniformis JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼの投与 1 時間後に、結膜の軽度の発赤及び軽度から中度の腫脹並びに軽度の眼漏が全例にみられた。結膜の腫脹の有無にかかわらず、投与 24 時間後の全例で軽度の発赤がみられた。投与 48 時間後には、眼への影響は消失した。

EFSA は、本試験の結果から、本製剤に眼刺激性はないと判断した。(参照 8)

⁸ 安息香酸、安息香酸塩(カルシウム、カリウム、ナトリウム)、ベンズアルデヒド、酢酸ベンジル、ベンジルアルコール及び安息香酸ベンジルのグループ ADI(安息香酸として 0~5 mg/kg 体重/日)

⁹ ソルビン酸及びその塩類(ソルビン酸カリウム、ソルビン酸カルシウム)のグループ ADI(ソルビン酸として 25 mg/kg 体重/日)

¹⁰ ソルビン酸並びにそのカルシウム塩、カリウム塩及びナトリウム塩のグループ ADI(ソルビン酸として 0~25 mg/kg 体重/日)

Ⅲ. 国際機関等における評価

1. EFSA における評価

2009 年に、本製剤の鶏の肥育用飼料への使用に関する評価を実施した。

最終製剤 1 g 当たりに培養可能な生物は含まれておらず、新たに導入した DNA は検出限界未満であったことを確認した。

鶏用飼料への推奨添加量 (15,000 PROT/kg 飼料) に対して鶏は耐容であったことから、本製剤は鶏に対して安全であると考えた。

2 つの遺伝毒性試験 (*in vitro* の細菌を用いた復帰突然変異試験及びヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験) で遺伝毒性がみられなかったこと及び 90 日間亜急性毒性試験で投与による影響がみられなかったことから、本製剤の食用動物への使用による消費者へのリスクはないと考えた。

また、本製剤は皮膚刺激性物質とされた。皮膚感作性及び呼吸器感作性に関する試験成績は提供されなかったことから、皮膚感作性及び呼吸器感作性を有する可能性があるかと判断した。

本製剤の有効成分はタンパク質であり、投与した動物の消化管で分解、不活化されるため、環境へのリスクもないと判断した。(参照 8)

2. JECFA における評価

2012 年に、食品添加物としての本アルカリ性プロテアーゼの評価が実施されている。

N. prasina 由来のプロテアーゼ遺伝子を *B. licheniformis* に導入した産生菌は、遺伝学的に安定しており、抗生物質耐性遺伝子及び異種 DNA を含んでいないとしている。

B. licheniformis JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼのアミノ酸構成の相同性に関する生命情報科学 (バイオインフォマティクス (bioinformatics)) 解析の結果から、経口摂取によるアレルギー性は予期されないと考えたとされている。

遺伝毒性については、*in vitro* の細菌を用いた復帰突然変異試験の結果から突然変異誘発性はなく、*in vitro* のヒトリンパ球を用いた染色体異常試験の結果から染色体異常誘発性もないと考えたとされている。

ラットを用いた 13 週間亜急性毒性試験では、投与に関連した毒性学的影響はみられなかったことから、本試験における NOAEL を最高用量の 500 mg TOS/kg 体重/日と判断された。

ヒトにおける本アルカリ性プロテアーゼの一日食事ばく露量の推定値は、1.5 mg TOS/kg 体重/日であり、ラットを用いた亜急性毒性試験の NOAEL (500 mg TOS/kg 体重/日) と比較して、ばく露マージンは約 350 倍であった。ADI については、「not specified」と結論している。(参照 4)

3. FDA における評価

2011 年に、本アルカリ性プロテアーゼを飼料添加物として認可している。

(参照 1、28)

また、2015年には、食品添加物として、動物・植物性タンパク質食品の加水分解酵素として使用する際に原材料のタンパク質 1 kg 当たり最大 785 mg TOS までの使用であれば GRAS (Generally Recognized as Safe(一般に安全とみなされる物質)) であるとされている。(参照 29)

4. FSANZ における評価

2011年に、本製剤について認可している。(参照 30)

また、2015年に本アルカリ性プロテアーゼを食品添加物として認可しており、その評価内容は以下のとおりである。

- ・産生菌である *B. licheniformis* は、毒素産生、病原性及び芽胞形成能はなく、加工助剤として使用される最終製剤には存在しない。さらに、*B. licheniformis* は、既に承認されている数多くの加工助剤目的の酵素の産生菌として安全に使用されてきた歴史がある。
- ・酵素が最終食品に残留するかもしれないが、不活化していると考えられる。
- ・バイオインフォマティック解析から、本アルカリ性プロテアーゼは既知のアレルゲンや毒素と生物学的相同性がないことが示された。
- ・ラットを用いた 90 日間亜急性毒性試験で、最高用量で影響がみられず、本試験における NOAEL は 500 mg TOS/kg 体重/日であった。
- ・本アルカリ性プロテアーゼは *in vitro* の試験で遺伝毒性を示さなかった。

以上から、本アルカリ性プロテアーゼを食品加工助剤として用いた場合、ヒトの健康及び安全性に関する問題はないと結論した。また、特定できるハザードはないことから、ADI は「not specified」と結論し、そのため食事ばく露量の評価は必要ないと判断した。(参照 31)

IV. 食品健康影響評価

B. licheniformis JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼを原体とする飼料添加物の製剤は、固形及び液状製剤の 2 種類あり、推奨添加量は豚又は鶏用飼料 1 kg 当たり 15,000 タンパク質分解酵素単位 (PROT) (24,000 たん白消化力単位相当) とされている。

本アルカリ性プロテアーゼについて、体内動態及び残留試験は実施されていない。しかし、人工胃液による消化試験で実施した 30 分間の処理により本アルカリ性プロテアーゼは消化された。

本アルカリ性プロテアーゼを用いた遺伝毒性試験では、*in vivo* の試験は実施されていないが、*in vitro* の 2 試験の結果がいずれも陰性であったこと及び消化試験の結果から、本アルカリ性プロテアーゼには生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないと考えた。

ラットの 13 週間亜急性毒性試験において、本アルカリ性プロテアーゼの投与による毒性所見はみられなかったことから、本試験における NOAEL は最高用量である 500.1 mg TOS/kg 体重/日 (287,469 PROT/kg 体重/日相当) と判断した。

本製剤を用いた豚及び鶏の飼養試験では、推奨添加量の 10 倍量 (150,000 PROT/kg 飼料) を混餌投与しても、投与による悪影響はみられなかった。

製剤に含まれている物質は、その使用状況、既存の毒性評価及び本製剤の用法・用量を考慮すると、本製剤の含有成分として摂取した場合のヒトへの健康影響は無視できる程度と考えた。

以上のことから、*B. licheniformis* JPBL001 株が産生するアルカリ性プロテアーゼを原体とする飼料添加物が、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程度と考えた。

なお、本アルカリ性プロテアーゼについては、食品安全委員会において、遺伝子組換え飼料添加物の安全性に関しても評価がなされている。農林水産省における本飼料添加物の取扱いについては、当該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
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ [=グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)]
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ [=グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)]
EFSA	欧州食品安全機関
FDA	米国食品医薬品庁
FSANZ	オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関
JECFA	FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
NOAEL	無毒性量
PROT	タンパク質分解酵素単位
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
TOS	総有機固形分 (Total organic solids)
WBC	白血球数

〈参照〉

1. DSM 株式会社：アルカリ性プロテアーゼ 飼料添加物指定審査用資料 抄録（非公表）
2. DSM 株式会社：アルカリ性プロテアーゼ 飼料添加物指定審査用資料 添付資料 1（非公表）
3. 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）
4. JECFA: Serine protease (chymotrypsin) from *Nocardia prasina* expressed in *Bacillus licheniformis*. Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series 67, 2012
5. DSM 株式会社：アルカリ性プロテアーゼ 回答書（非公表）
6. DSM 株式会社：アルカリ性プロテアーゼ 回答添付資料②（非公表）
7. DSM 株式会社：アルカリ性プロテアーゼ 飼料添加物指定審査用資料 添付資料 21（非公表）
8. EFSA (Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed and Panel on Genetically Modified Organisms): Safety and efficacy of Ronozyme® ProAct (serine protease) for use as feed additive for chickens for fattening. EFSA J 2009; 1185: 1-15
9. DSM 株式会社：アルカリ性プロテアーゼ 飼料添加物指定審査用資料 添付資料 22（非公表）
10. DSM 株式会社：アルカリ性プロテアーゼ 飼料添加物指定審査用資料 添付資料 20（非公表）
11. DSM 株式会社：アルカリ性プロテアーゼ 飼料添加物指定審査用資料 添付資料 23（非公表）
12. 食品衛生法施行規則（昭和 23 年厚生省令第 23 号）別表 1
13. JECFA: Sodium Sulfate. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series 909, 2002
14. 既存添加物名簿（平成 8 年厚生省告示第 120 号）
15. JECFA: Microcrystalline. WHO Technical Report Series 884, 1999
16. JECFA: Powdered Cellulose. Evaluation of certain food additives. WHO Technical Report Series 599, 1976
17. 薬事日報社：デキストリン. 医薬品添加物辞典 2016. 日本医薬品添加剤協会編集
18. 株式会社 東京化学同人：生物学辞典 「スクロース」 2010 年
19. 食品安全委員会：添加物評価書「炭酸カルシウム」（平成 28 年 9 月）
20. JECFA: Some antimicrobials, antioxidants, emulsifiers, stabilizers, flour-treatment agents, acids, and bases. WHO Technical Report Series 733, 1986
21. 薬事日報社：炭酸カルシウム. 医薬品添加物辞典 2016. 日本医薬品添加剤協会編集

22. 社団法人日本科学飼料協会：新編 飼料ハンドブック第二版 「植物性油脂」
23. 食品安全委員会：動物用ワクチンの添加剤の食品健康影響評価結果（平成 29 年 11 月 7 日現在）
24. JECFA: Sorbitol. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series 683, 1982
25. JECFA: Benzyl derivatives. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series 909, 2002
26. 食品安全委員会：添加物評価書「ソルビン酸カリウム」（平成 20 年 11 月）
27. JECFA: Sorbic acid and its calcium, potassium and sodium salts. WHO Food Additives Series 5, 1974
28. DSM 株式会社：アルカリ性プロテアーゼ 回答添付資料①（非公表）
29. FDA: Agency Response Letter GRAS Notice No.GRN 000564
30. 豪州政府：APVMA Gazette, No. 1, 18 January 2011
31. FSANZ: Serine protease (chymotrypsin) as a processing aid. Approval Report-Application A1098
32. DSM 株式会社：アルカリ性プロテアーゼ（その 3）豚への適用拡大について。抄録（非公表）
33. DSM 株式会社：アルカリ性プロテアーゼ（その 3）豚への適用拡大について。添付資料 10（非公表）
34. DSM 株式会社：アルカリ性プロテアーゼ（その 3）豚への適用拡大について。添付資料 4（非公表）
35. DSM 株式会社：アルカリ性プロテアーゼ（その 3）豚への適用拡大について。添付資料 5（非公表）
36. DSM 株式会社：アルカリ性プロテアーゼ（その 3）豚への適用拡大について。添付資料 6（非公表）