

アスパラギナーゼ (*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたもの) の食品添加物の指定に関する部会報告書 (案)

今般の添加物としての新規指定並びに使用基準及び成分規格の設定の検討については、事業者より指定等の要請がなされた当該添加物について、食品安全委員会において食品健康影響評価がなされたことを踏まえ、添加物部会において審議を行い、以下の報告を取りまとめるものである。

1. 品目名

和名：アスパラギナーゼ (*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたもの)

英名：Asparaginase from *Aspergillus niger* expressed in *Aspergillus niger*

CAS 番号：9015-68-3

INS 番号：なし

EC 番号：EC 3.5.1.1

2. 構造式、分子式及び分子量

構造式：アミノ酸配列 (378 アミノ酸) は以下のとおり。

```
MPLKPILLSALASLASASPLLYSRTTNETFVFTNANGLNFTQMNTTLPNVTIFATGGTIAGSDSSSTATTGYT
SGAVGVLSLIDAVPSMLDVANVAGVQVANVGSEDITSIDLISMSKKLNRVVCEDPTMAGAVITHGTDLEETA
FFLDATVNCCKPIVIVGAMRPSTAISADGPFNLLEAVTVAASTSARDRGAMVVMNDRIASAYYVTKTNANTMD
TFKAMEMGYLGEMISNTPFFFYPPVKPTGKVAFDITNVTEIPRVDILFSYEDMHNDTLNNAISSGAQGIVIA
AGAGGVTTSFNEAIEDVINRLEIPVVQSMRTVNGEVPLSDVSSDTATHIASGYLNPQKSRILLGLLLSQGKNI
TEIADV FALGTDA
```

分子式及び分子量：

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動では 40-42 kDa (糖鎖部位を除去後)、アミノ酸配列から計算される分子量は 39584 Da である。本品は、7 箇所の糖鎖部位を有するため、糖鎖の結合の度合いによって分子量が異なるバンドが現れ、また末端のアミノ酸が幾つか欠けたバンドも現れる。

3. 用途

製造用剤 (食品加工の際のアクリルアミド生成抑制)

4. 概要及び諸外国での使用状況等

(1) 概要

アスパラギナーゼ (*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたもの) は、*A. niger* (黒色こうじ菌) が本来有しているアスパラギナーゼ遺伝子を増幅して、アスパラギナーゼの生産性を向上させたものである。アスパラギナーゼは、アクリルア

ミド¹生成の起因とな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作用を有する酵素であり、食品加工の際に生成するアクリルアミドを低減する目的で使用される。

JECFAでは、2008年に、GMPに沿って適切に製造され、特定の目的（アクリルアミド生成の低減）で使用される場合、ADIは特定しない（not specified）と評価されている。

なお、本品目に関しては、平成25年9月に食品安全委員会より、「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）の対象ではなく、安全性評価は必要ないと判断された²ため、厚生労働省において組換えDNA技術応用添加物に該当しないものとみなしている。

（参考）アクリルアミドの主な生成経路

食品中のアクリルアミドの主要な生成経路は、アミノ酸の一種である遊離アスパラギンと還元糖に分類されているグルコース等によるアミノ・カルボニル反応であるとされている。グルコースやアスパラギンは、穀類、いも類及び野菜類等に豊富に含まれており、これらを原料にして、①揚げる、②焼く、③焙る等の高温での加熱（120℃以上）で加工した食品にアクリルアミドが含まれる。

¹ 国際がん研究機関（IARC：International Agency for Research on Cancer）による発がん性分類において、アクリルアミドは2A（人に対しておそらく発がん性がある）に分類されている。国内では、食品安全委員会が自ら行う食品健康影響評価の案件として、加熱時に生じるアクリルアミドの食品健康影響評価を実施している。

² 「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）に規定する「組換えDNA技術によって最終的に宿主に導入されたDNAが、当該微生物と分類学上の同一の種に属する微生物のDNAのみである場合」に該当する微生物を利用して製造されたものであることから、安全性評価は必要ないと判断した旨が厚生労働大臣あてに通知されている。

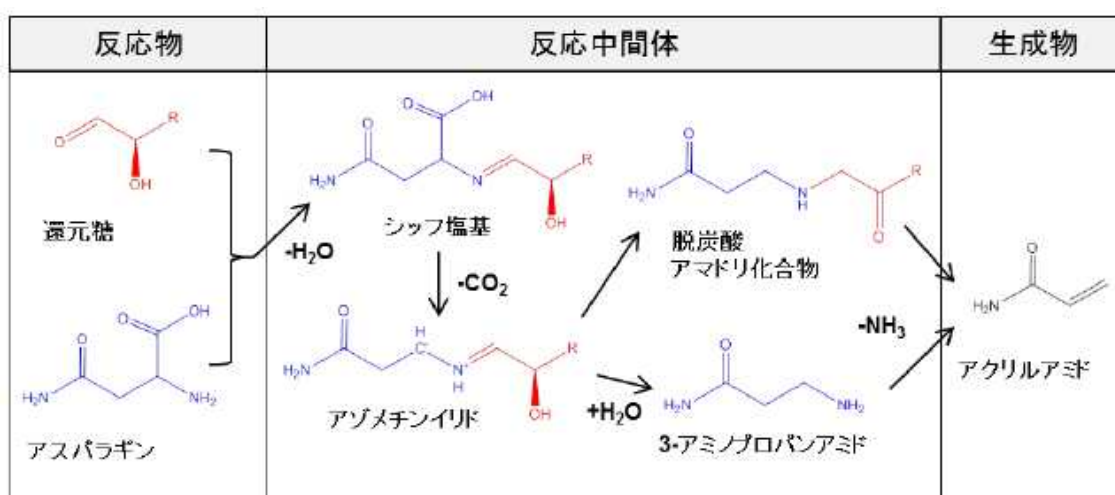


図1 食品中のアクリルアミドの主な生成経路³

(2) 諸外国での使用状況等

コーデックス委員会では、本添加物が添加物ではなく加工助剤に分類されるため⁴、CCFA（コーデックス食品添加物部会）が作成する添加物の使用基準（GSFA⁵（食品添加物に関するコーデックス一般規格））に規格は設定されていない。

米国では、GRAS（一般に安全と認められる物質）として認定されている。

欧州連合（EU）では、フランス及びデンマークでは、個別に認可されている。その他の国においては、現時点では、加工助剤としての酵素の使用に規制はない。

オーストラリア及びニュージーランドでは、加工助剤としての使用が認められている。

5. 食品添加物としての有効性

(1) アスパラギナーゼの有効性

(ア) アスパラギナーゼの機能

アスパラギナーゼは、アクリルアミド生成の起因となるアスパラギンをアスパラギン

³ 「食品中のアクリルミドを低減するため指針」（2013年11月 農林水産省）より抜粋

⁴ コーデックス委員会では、加工助剤は、「装置若しくは器具類を含まず、それ自体では食品の原材料として消費されることのない物質又は材料であって、処理若しくは加工過程において技術的な目的を達成すべく、原料、食品又はその原材料を加工する際に意図的に使用するものをいう。ただし、「加工助剤」を使用することで、意図的ではないが、その残渣又は派生物が最終製品中に存在することが回避できない場合がある。」と定義されている。

⁵ コーデックスにおける食品添加物の最も基本的な規格。食品添加物の使用に関する一般原則（食品添加物の安全性、使用の妥当性及び適正製造規範（GMP）の考え方等）、食品へのキャリーオーバー（食品の原材料の製造等に使用された食品添加物が食品中に存在すること）の考え方等の他、生鮮食品及び加工食品を階層的に分類した「食品分類システム」や、個別の食品添加物について、使用が認められている食品分類ごとに食品中の最大濃度を規定した「食品添加物条項」等から構成されている。

酸とアンモニアに加水分解する作用を持つ。食品の加工の際にアスパラギナーゼを添加することにより、アクリルアミドの生成が低減される。

(イ) 食品の製造時にアスパラギナーゼを添加した場合の効果

①パン、ドーナツ、クラッカー及び調味料に対する効果

パン、ドーナツ及びクラッカーの生地（図2-1～3参照）並びに調味料の原料である酵母エキスに、アスパラギナーゼを添加し、各食品を製造した場合のアクリルアミドの含有量を測定した。

本試験結果において、最もアクリルアミドの低減効果が認められたアスパラギナーゼの添加条件下では、47%～87%のアクリルアミド低減効果が認められた（表1参照）。

(i) パン（フランスパン）（外側の皮の部分のアクリルアミド量を測定）

パン生地に0～20ppmのアスパラギナーゼを添加し、数回の発酵の後、230℃前後の温度で20～30分焼いたものについて、その外側の皮の部分（アクリルアミドを多く含有する部位）のアクリルアミド含量を測定した。その結果、最大で47%のアクリルアミドの低減効果が認められた。

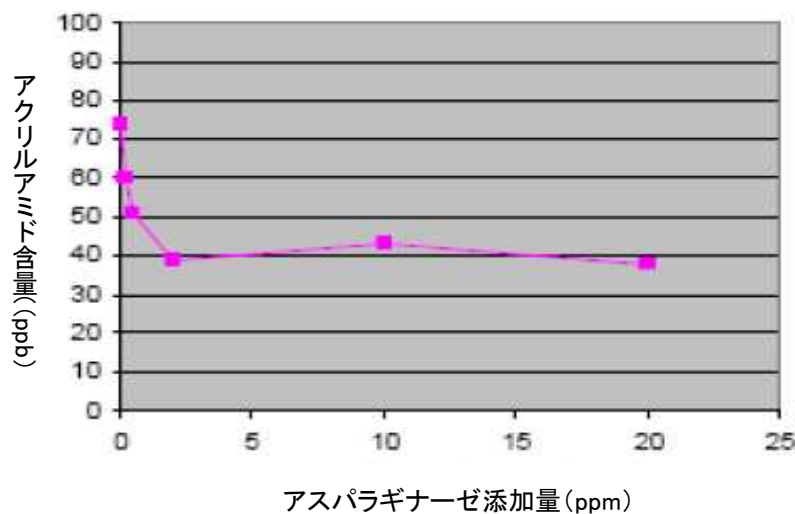


図2-1 パンにアスパラギナーゼを添加した場合のアクリルアミド低減効果

(ii) ドーナツ（外側と中側のアクリルアミド量を測定）

ドーナツ生地に0～20ppmのアスパラギナーゼを添加し、発酵、形成の後、180℃の油で7分又は10分揚げたものについて、アクリルアミド含量を測定した。その結果、最大で87%のアクリルアミドの低減効果が認められた。

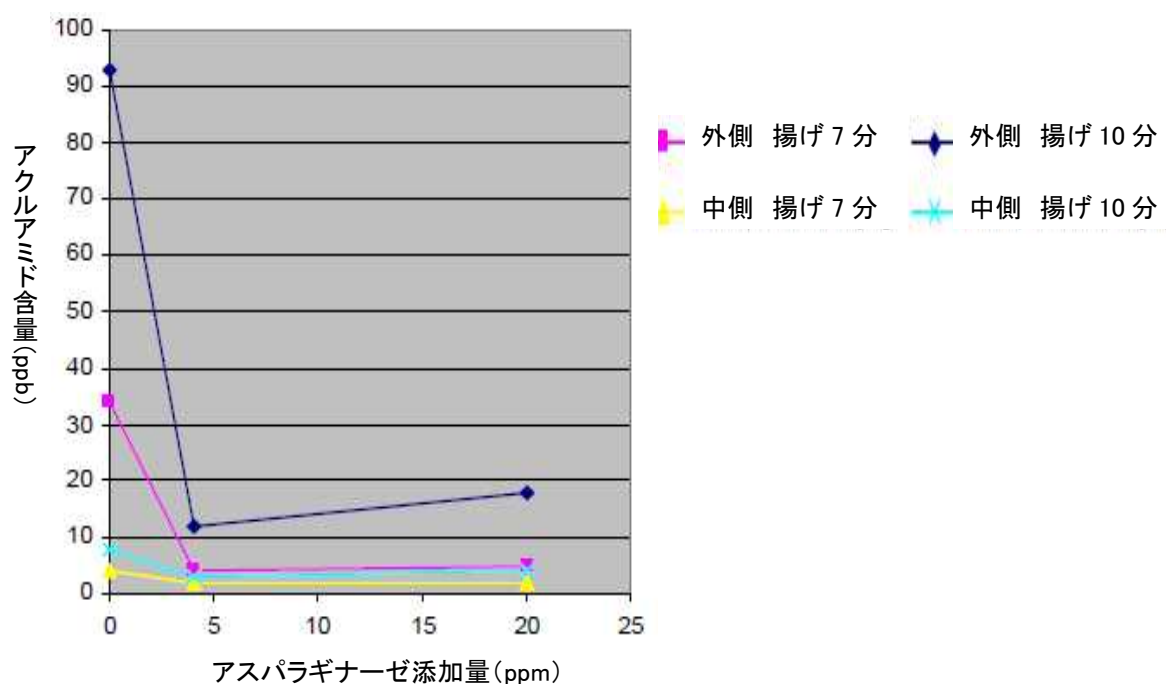


図 2-2 ドーナツにアスパラギナーゼを添加した場合のアクリルアミド低減効果

(iii) クラッカー（アスパラギナーゼを添加しない場合を 100%とした）

クラッカー生地 に 0~25ppm のアスパラギナーゼを添加し、室温で休ませた後、270℃で 7 分間焼いたものについて、アクリルアミド含量を測定した。その結果、最大で 87% のアクリルアミドの低減効果が認められた。

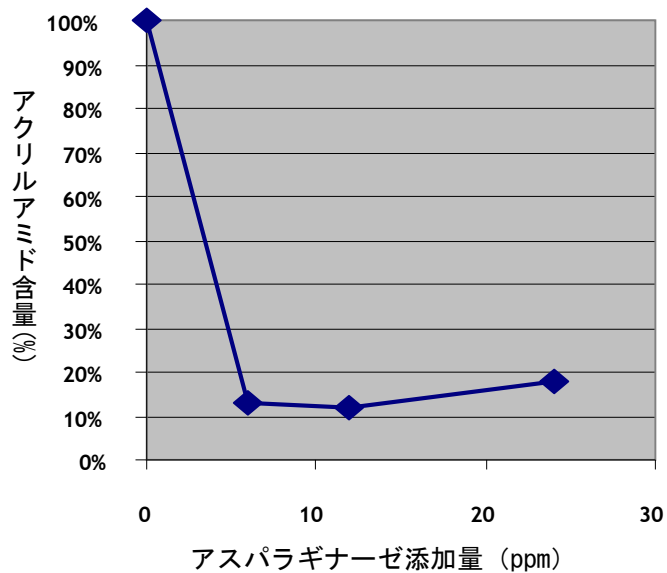


図 2-3 クラッカーの生地にアスパラギナーゼを添加した場合のアクリルアミド低減効果

(iv) 調味料

酵母エキスを 325ppm のアスパラギナーゼを添加し、51℃で 4 時間反応させた後、180℃で 40 分間加熱加工して作成した調味料について、アクリルアミド含量を測定したところ、80%のアクリルアミドの低減効果が認められた。

(i)～(iv)の結果をまとめると、表 1 のとおり。

表 1 パン、ドーナツ及びクラッカーの生地並びに酵母エキスをアスパラギナーゼを添加した場合のアクリルアミド低減率 (%)

食 品	原料への酵素添加濃度	製品中のアクリルアミド濃度 (ppb)	アクリルアミド低減率 (%)
パン(フランスパン)	0ppm	75	
	2ppm	40	47
ドーナツ(外側部分)	0ppm	94	
	4ppm	12	87
クラッカー	0ppm	45	
	6ppm	6	87
調味料	0ppm	1497	
	325ppm	296	80

②揚げじゃがいもに対する効果

乾燥じゃがいもフレークに水とオリーブオイルを混ぜたじゃがいも生地に約 2000ppm (約 2g/kg) のアスパラギナーゼを添加し、酵素反応時間を変化させ、それぞれ 180℃の油で 2.5 分間揚げた揚げじゃがいも(約 1g の球状のもの)中のアスパラギン及びアクリルアミドの含有量(乾燥じゃがいも換算)を測定した(図 3 参照)。その結果、最大で 93%のアクリルアミドの低減効果が認められた。また、じゃがいも生地中のアスパラギン含量の減少に相関してアクリルアミドが減少することが確認された。

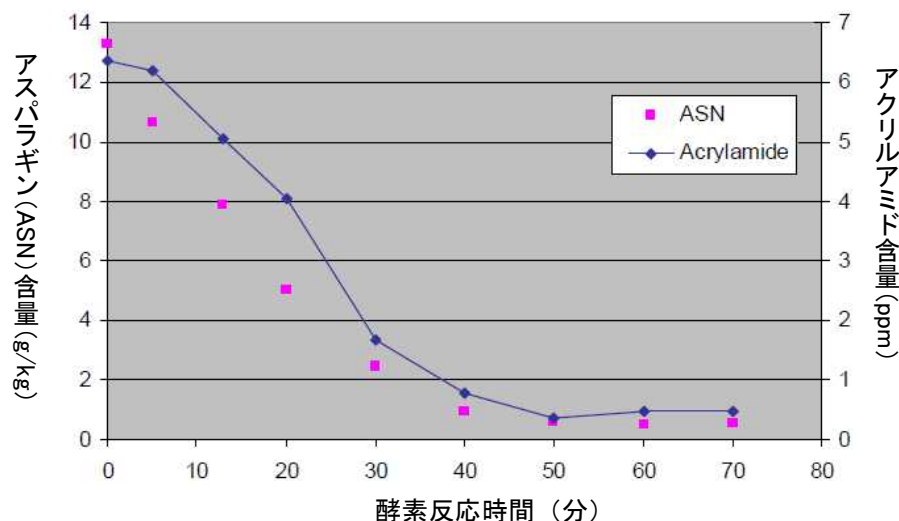


図3 ジャがいも生地にアスパラギナーゼを添加した場合の揚げじゃがいも中のアスパラギン及びアクリルアミドの低減効果

(ウ) コーデックス委員会におけるアクリルアミド生成の低減対策

コーデックス委員会では、行政、食品事業者等の関係者向けの手引きとして「食品中のアクリルアミド低減に関する実施規範」を2009年に採択し、加盟国がこの規範に従って食品中のアクリルアミド低減に取り組むことを勧告している。当該実施規範において、アスパラギナーゼの使用がアクリルアミド低減の方法の一つとして挙げられている⁶。

(2) 食品中での安定性

アスパラギナーゼは70℃以上の熱処理により失活する。アスパラギナーゼは、アクリルアミドが生成する120℃以上の高温で加熱加工する食品の製造に使用されるため、アスパラギナーゼは最終食品の完成前に失活し、活性を示すことは想定されない。

(3) 食品中の栄養素に及ぼす影響

アスパラギナーゼは、食品中のアスパラギンをアスパラギン酸とアンモニアに分解する。

6. 食品安全委員会における評価結果

食品添加物としての指定及び規格基準設定並びに食品中の残留基準設定のため、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第24条第1項第1号の規定に基づき、平成24年9月26日付け厚生労働省発食安0926第2号により食品安全委員会あて意見を求

⁶ その他の低減の方法として、じゃがいもを6℃以下で保存することを避ける、加熱温度や加熱時間を最適化する等の方法が挙げられている。

めたアスパラギナーゼに係る食品健康影響評価については、平成 25 年 2 月 22 日、及び 9 月 24 日に開催された添加物専門調査会の議論を踏まえ、以下の評価結果が平成 26 年 1 月 27 日付け府食第 97 号で通知されている。

【食品健康影響評価（添加物評価書抜粋）】

本委員会としては、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素産生性の懸念はないと判断した。

本委員会としては、本品目が指針における「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らかである場合」に該当すると判断したことから、本品目の安全性について、同指針に基づき、遺伝毒性、反復投与毒性、アレルギー性等に係る試験成績を用いて評価を行うこととした。

本委員会としては、本品目に係る製剤化前原末についての毒性に係る知見を検討した結果、本品目については、遺伝毒性、反復投与毒性及び発生毒性の懸念はないと判断した。

本委員会としては、添加物として適切に使用される場合、本品目が易消化性であり、既存アレルギーとの相同性が認められないことから、本品目のアレルギー性の懸念は極めて低いと判断した。

以上を踏まえ、本委員会としては、ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験における最高用量から得られた NOAEL 1,038 mgTOS⁷/kg 体重/日と、本品目の推定一日摂取量 0.549 mgTOS/kg 体重/日と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原微生物である *A. niger* を用いて生産されることを勘案して、本品目について、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 を特定する必要はないと判断した。

7. 摂取量の推計

食品安全委員会の評価の結果によると次のとおりである。

【一日摂取量の推計等（添加物評価書抜粋）】

1. 欧州における摂取量

JECFA（2008）の報告によれば、本品目の主要な暴露源と考えられる 2 食品群に

⁷ TOS：総有機固形物（Total Organic Solids）

本品目が最大量添加され、その 2 食品群を大量（欧州の成人の摂取量の 95 パーセント）に摂取する人口集団を考慮して、本品目の一日摂取量を最大 4.1 mgTOS/kg 体重/日と推定している。なお、JECFA は、この推定は過小推計を避けたもの（conservative）であると言及している。（参照 10）

2. 我が国における摂取量

指定等要請者によれば、本品目が使用される可能性のある食品（群）に対する本品目の最大使用量及び最終製品中の残存量は、別紙 3 の表 1 に掲げたとおりとされている。その残存量及び平成 21 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、本品目の推定一日摂取量は、体重を 50 kg として、別紙 3 の表 2 のとおり、0.549 mgTOS/kg 体重/日と算出される（参照 2）。本委員会としては、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、0.549 mgTOS/kg 体重/日と判断した。

8. 新規指定について

アスパラギナーゼを食品衛生法第 10 条の規定に基づく添加物として指定することは、要請された使用方法において、食品安全委員会において人の健康に悪影響をおよぼすおそれがない旨が確認されていることから、差し支えない。

なお、指定の名称は「アスパラギナーゼ」とし、成分規格において基原を特定することが適当である。

9. 規格基準の設定について

同法第 11 条第 1 項の規定に基づく規格基準については、次のとおりとすることが適当である。

（1）使用基準について

Aspergillus niger ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼについては、①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ため、ヒトが摂取する際の安全性の懸念は低いこと、②食品安全委員会の評価結果において、ADI を特定する必要はないこと等を踏まえて、使用基準を設定しないこととするのが適当である。

なお、米国、EU 及びオーストラリア・ニュージーランドでは、GMP のもとでの使用が認められている。

（2）成分規格について

成分規格を別紙 1 のとおり設定することが適当である（設定根拠は別紙 2、JECFA 規格との対比表は別紙 3 のとおり）。

アスパラギナーゼ

Asparaginase

定 義 本品は、糸状菌 (*Aspergillus niger*に限る) が本来有するアスパラギナーゼ遺伝子を増幅させて生産性を向上させた糸状菌 (*A. niger* ASP-72 株に限る) より得られた、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酵素である。食品(賦形, 粉末化, 希釈, 安定化, 保存又は力価調整の目的に限る。)又は添加物(賦形, 粉末化, 希釈, 安定化, 保存, pH 調整又は力価調整の目的に限る。)を含むことがある。

酵素活性 本品は、1 g あるいは 1 ml 当たり 2375 単位以上の酵素活性を有する。

性 状 本品は、黄～褐色の澄明な液体若しくはごくうすい灰み又はごくうすい黄みを帯びた白色の顆粒である。

確認試験 本品は、酵素活性測定法により試験を行うとき、活性を示す。

純度試験 (1) 鉛 Pbとして5.0 μ g/g 以下

本品 0.8 g を量り、白金製、石英製若しくは磁製のるつぼ又は石英製のビーカーに入れる。硫酸(1→4)を加えて試料全体を潤した後、徐々に温度を上げ、試料が炭化し、硫酸の白煙が発生しなくなるまで加熱する。必要があれば硫酸(1→4)を更に加え、試料がほとんど炭化するまで加熱する。なお、液体試料及び炭化しにくい試料等の場合には、硫酸(1→4)の代わりに硫酸を用いてもよい。試料が炭化した後、必要があれば容器に緩くふたをして電気炉に入れ、徐々に温度を上げて450～600℃で強熱して灰化する。炭化物が残る場合は、必要があればガラス棒で砕き、硫酸(1→4) 1 ml 及び硝酸 1 ml で潤し、白煙が発生しなくなるまで加熱した後、電気炉で強熱して完全に灰化する。残留物に塩酸(1→4) 10 ml を入れ、水浴上で加熱して蒸発乾固する。残留物に少量の硝酸(1→100)を加え、加温して溶かし、冷後、更に硝酸(1→100)を加えて正確に 10 ml とし、検液とする。なお、500℃以下で灰化操作を行う場合には、耐熱ガラス製のビーカーを使用することができる。別に、鉛標準原液 1 ml を正確に量り、水を加えて正確に 100 ml とする。この液 4 ml を正確に量り、硝酸(1→100)を加えて正確に 10 ml とし、比較液とする。検液及び比較液につき、鉛試験法第 1 法により試験を行う。

(2) ヒ素 As₂O₃として4.0 μ g/g 以下(0.50 g, 第 3 法, 装置 B)

微生物限度 微生物限度試験法により試験を行うとき、本品 1 g につき、細菌数は50,000以下である。また、大腸菌及びサルモネラは認めない。なお、サルモネラの試験は、「ナイシン」の微生物限度試験を準用する。

酵素活性測定法

(i) 基質溶液

L-アスパラギン 1 水和物 1.50 g を量り、クエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.0)に加え、かくはんして完全に溶かした後、更にクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.0)を加えて正確に 100 ml とする。用時調製する。

(ii) 試料溶液

本品約 2.5 g を精密に量り、クエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 20ml を加えて溶かし、更にクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) を加えて正確に 25ml とする。この液をクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) で希釈して、1 ml 中に 6 単位を含む液を調製し、試料溶液とする。

(iii) 比較原液

4000 単位に対応する量のアスパラギナーゼを量り、クエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 20ml を加えて溶かし、更にクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) を加えて正確に 25ml とする。この液をクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) で希釈して、1 ml 中に 6 単位を含む液を調製し、比較原液とする。

(iv) 硫酸アンモニウム標準液

硫酸アンモニウム約 3.9 g を精密に量り、クエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 40ml を加えて 15 分間かくはんする。更にクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) を加えて 50ml とし、標準原液とする。標準原液をクエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.0) で 4, 6, 10, 30, 60 倍に希釈し、硫酸アンモニウム標準液とする。

(v) 操作法

2 本の試験管に、基質溶液 2.0ml ずつを入れ、37℃で 10 分間加温する。1 本の試験管に試料溶液 0.100ml を、もう 1 本の試験管に比較原液 0.100ml を加えて混和する。これらの試験管を 37℃で正確に 30 分間加温した後、トリクロロ酢酸溶液 (1 → 4) 0.400ml を加えて混和し、更に水 2.5ml を加えて混和する。2 本の試験管からそれぞれ 0.100ml を量り、水 4.00ml に加え、フェノール・ニトロプルシド試液 0.850ml を加えて混合し、次亜塩素酸ナトリウム・水酸化ナトリウム試液 (アスパラギナーゼ活性試験用) 0.850ml を加えて 37℃で 10 分間放置した液を検液及び比較液とする。検液及び比較液につき、水を対照として、波長 600nm における吸光度 A_T 及び A_C を測定する。また、別の 2 本の試験管に、基質溶液 2.0ml ずつを入れ、それぞれにトリクロロ酢酸溶液 (1 → 4) 0.400ml を加えて混和し、試料溶液又は比較原液 0.100ml を加えて混和し、37℃で 30 分間加温した後、水 2.5ml を加えて混和する。これらの液 0.100ml ずつを量り、それぞれ水 4.00ml に加え、フェノール・ニトロプルシド試液 0.850ml を加えて混合し、次亜塩素酸ナトリウム・水酸化ナトリウム試液 (アスパラギナーゼ活性試験用) 0.850ml を加えて 37℃で 10 分間放置した液をそれぞれ検液の対照液及び比較液の対照液とする。対照液につき、水を対照として、波長 600nm における吸光度 A_{BT} 及び A_{BC} を測定する。別に、基質溶液 2.0ml ずつを量り、5 本の試験管に入れ、37℃で 10 分間加温し、試料溶液の代わりに、それぞれの試験管に異なる濃度の硫酸アンモニウム標準液 0.100ml ずつを加えて、以下検液の調製と同様に操作して得られた液につき、水を対照として、波長 600nm における吸光度を測定する。硫酸アンモニウム標準液の硫酸アンモニウムの濃度と得られた吸光度により検量線を作成し、その傾きを a (ml/mg) とする。次式により、比較液の調製に用いたアスパラギナーゼの酵素活性を求め、酵素活性が表示量の 91~109% のとき、試料の酵素活性を求める。その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、L-アスパラギンから、1 分間にアンモニア 1 μ mol を遊離させる酵素量を 1 単位とする。

$$\text{酵素活性 (単位/g)} = \frac{A \times D_f \times 25 \times 2 \times 10^3}{a \times W \times 132.14 \times 30}$$

ただし、A：検液又は比較液の吸光度（ A_T 又は A_C ）から対照液の吸光度（ A_{BT} 又は A_{BC} ）を引いた値

D_f ：試料溶液又は比較原液の希釈係数

W：試料又は比較液の調製に用いたアスパラギナーゼの採取量（g）

試薬・溶液

アスパラギナーゼ 本品は、糸状菌（*Aspergillus niger*に限る）が本来有するアスパラギナーゼ遺伝子を増幅させて生産性を向上させた糸状菌（A. niger ASP-72 株に限る）より得られた、黄～褐色の澄明な液体若しくはごくうすい灰み又はごくうすい黄みを帯びた白色の顆粒である。本品の1単位は、L-アスパラギンを基質として、pH5.0、37℃において1分間に1 μ molのアンモニアを遊離する酵素量とする。

L-アスパラギン1水和物 $C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$ [K8021]

フェノール・ニトロプルシド試液（アルカリ性） 水酸化ナトリウム溶液（13→50）8～10mlをとり、ニトロプルシドナトリウム溶液（1→100）0.1mlを加えてかくはんし、フェノール・エタノール溶液（5→8）10mlを加えた後、水を加えて50mlとする。用時調製する。

次亜塩素酸ナトリウム・水酸化ナトリウム試液（アスパラギナーゼ活性試験用） 次亜塩素酸ナトリウム試液2.5mlに水を加えて10mlとする。この液の採取量を3mlとし、以下「次亜塩素酸ナトリウム」の定量法に準じて標定し、0.32～0.38mol/L次亜塩素酸ナトリウムになるように調製した後、適当な濃度の水酸化ナトリウム溶液を用いてpH12.5に調整する。この液3mlに水85mlを加え、適当な濃度の水酸化ナトリウム溶液を用いてpH12.5に調整した後、水を加えて100mlとする。冷暗所に保存する。

クエン酸・水酸化ナトリウム緩衝液（pH5.0） クエン酸1水和物21gを量り、水500mlを加えて溶かし、水酸化ナトリウム試液（2mol/L）でpH5.0に調整し、水を加えて1000mlとする。

アスパラギナーゼの規格設定の根拠

アスパラギナーゼは、JECFA Combined Compendium of Food Additive Specificationsには、**ASPARAGINASE FROM *ASPERGILLUS NIGER* EXPRESSED IN *A. NIGER***と**ASPARAGINASE FROM *ASPERGILLUS ORYZAE* EXPRESSED IN *A. ORYZAE***という2つの規格が設定されているが、*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼについて指定要請があったことから、**ASPARAGINASE FROM *ASPERGILLUS NIGER* EXPRESSED IN *A. NIGER***のJECFA規格及び指定要請書の成分規格案（以下「指定要請規格案」という。）並びにJECFAのGeneral Specifications and Considerations for Enzyme Preparations used in Food Processing（以下、酵素一般規格）、第8版食品添加物公定書（8版公定書）及び第9版食品添加物公定書（9版公定書）を参考に成分規格案を設定した。

定義

他の酵素品目では、基原及び本質並びに賦形剤等の添加される可能性のある化合物を規定していることから、本規格案では、JECFA 規格及び指定要請書の記載を参考に、基原及び本質を、「本品は、糸状菌（*Aspergillus niger*に限る）が本来有するアスパラギナーゼ遺伝子を増幅させて生産性を向上させた糸状菌（*A. niger* ASP-72 株に限る）より得られた、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酵素である。」とし、含まれる可能性のある化合物について、9版公定書に収載予定の酵素規格の定義に倣い、「食品（賦形、粉末化、希釈、安定化、保存又は力価調整の目的に限る。）又は添加物（賦形、粉末化、希釈、安定化、保存、pH 調整又は力価調整の目的に限る。）を含むことがある。」とした。

酵素活性

JECFA 規格には規格値は設定されていないが、指定要請規格案では、「本品は、1g あるいは1 mL 当たり 2375 ASPU 以上の酵素活性（アスパラギナーゼ活性）を有する。ASPU (asparaginase units) : L-アスパラギンから、pH5.0, 37℃の条件下において、1 分間に1 マイクロモルのアンモニアを遊離させる量を 1ASPU とする。」と規定している。本規格案では、後述の酵素活性測定法の試料採取量はg 単位であることから、「酵素活性 本品は、1 g 当たり 2375 単位以上の酵素活性を有する。」とし、活性の単位については、8版公定書及び9版公定書の他の酵素規格に倣い、酵素活性測定法の項に規定した。

性状

JECFA 規格では、「黄～褐色の澄明な液体又はオフホワイト（わずかに灰色又は黄色がかった白色）の細粒である。」、指定要請規格案では、「黄～褐色の澄明な液体若しくはごくうすい灰み又はごくうすい黄みを帯びた白色の顆粒である。」としている。本規格案は、「本品は、黄～褐色の澄明な液体若しくはごくうすい灰み又はごくうすい黄みを帯びた白色の顆粒である。」とした。

確認試験

JECFA 規格及び指定要請規格案では、いずれも酵素（アスパラギナーゼ）活性を示すとしていることから、本規格案では、「本品は、酵素活性測定法により試験を行うとき、活性を示す。」とした。

純度試験及び微生物限度

JECFAの酵素一般規格では、鉛（5mg/kg以下）、微生物限度（サルモネラ：不検出/25 g 試料、大腸菌群：30/g以下、大腸菌：不検出/25 g）及び抗菌物質活性（微生物由来の製剤に活性がないこと）を規定している。また、指定要請規格案では、鉛（5 mg/kg以下）、ヒ素（3 mg/kg以下）、抗菌活性（抗菌活性を示してはならない）、微生物限度（細菌数：50,000/g 以下、大腸菌及びサルモネラ：認めない）を規定している。8版公定書の酵素規格では、鉛（Pbとして5.0µg/g 以下）、ヒ素（As₂O₃として4.0µg/g 以下）、微生物限度（細菌数は50,000/g 以下、大腸菌は認めない）を規定しており、さらに、9版公定書の酵素規格では、微生物限度の細菌数の代わりに生菌数が規定され、サルモネラが追加される。これらを踏まえ、本規格案では、純度試験は、鉛（Pbとして5.0µg/g 以下、9版公定書の鉛試験法を採用）、ヒ素（As₂O₃として4.0µg/g 以下）を規定した。微生物限度は、「微生物限度試験法により試験を行うとき、本品 1 g につき、細菌数は50,000以下である。また、大腸菌及びサルモネラは認めない。なお、サルモネラの試験は、「ナイシン」の微生物限度試験を準用する。」を規定した。

酵素活性測定法

JECFA規格及び指定要請規格案では、L-アスパラギンにアスパラギナーゼを作用させ、L-アスパラギンの分解により生じるアンモニアを、ニトロプロシドナトリウムを触媒として、フェノール、次亜塩素酸と反応させ（Berthelot 反応）、得られる青色色素インドフェノールの吸光度より酵素活性を求めていることから、本規格案でもこれを採用した。

アスパラギナーゼの規格対比表

		本規格案	JECFA
定義		本品は、糸状菌 (<i>Aspergillus niger</i> に限る) が本来有するアスパラギナーゼ遺伝子を増幅させて生産性を向上させた糸状菌 (<i>A. niger</i> ASP-72株に限る) より得られた、アスパラギン酸とアンモニアに加水分解する酵素である。食品 (賦形, 粉末化, 希釈, 安定化, 保存又は力価調整の目的に限る。) 又は添加物 (賦形, 粉末化, 希釈, 安定化, 保存, pH調整又は力価調整の目的に限る。) を含むことがある。	(起源) アスパラギナーゼは、 <i>Aspergillus niger</i> に由来したアスパラギナーゼ遺伝子を含む <i>Aspergillus niger</i> の遺伝子組換え菌株の流加法 (fed-batch) の液体培養によって生産される。酵素はバイオマスを除くためにろ過によって発酵培養液から分離され、限外濾過によって濃縮される。酵素濃縮物は細菌ろ過され、次いで、食品グレードの化合物を使用して調合され、要求された活性に、規格化される。
酵素活性		本品は、1g当たり2375単位以上の酵素活性を有する。	—
性状		本品は、黄～褐色の澄明な液体若しくはごくうすい灰み又はごくうすい黄みを帯びた白色の顆粒である。	黄～褐色の澄明な液体若しくはオフホワイトの細粒である。
確認試験		酵素活性を示す	アスパラギナーゼ活性を示す
純度試験			
鉛		Pbとして5.0µg/g以下	5mg/kg*
ヒ素		As ₂ O ₃ として4.0µg/g以下	—
抗菌活性		設定しない	抗菌活性なし
微生物限度	細菌数	50,000以下	—
	大腸菌	認めない	不検出/25g*
	サルモネラ	認めない	不検出/25g*
	総大腸菌群	設定しない	30/g*
酵素活性測定法		インドフェノール法によるアンモニア態窒素の定量	インドフェノール法によるアンモニア態窒素の定量

*General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations used in Food Processing

これまでの経緯

平成24年 9月27日	厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに 食品添加物の指定に係る食品健康影響評価を依頼
平成24年10月 1日	第448回食品安全委員会（要請事項説明）
平成25年 2月22日	第115回食品安全委員会添加物専門調査会
平成25年 9月24日	第122回食品安全委員会添加物専門調査会
平成25年10月21日	第491回食品安全委員会（報告）
平成25年10月22日	食品安全委員会における国民からの意見募集 （～平成25年11月20日）
平成26年 1月27日	第501回食品安全委員会（報告）
平成26年 1月27日	食品安全委員会より食品健康影響評価の結果の 通知
平成26年 3月20日	薬事・食品衛生審議会へ諮問
平成26年 3月26日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会

●薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会

[委員]

氏 名	所 属
穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長
井手 速雄	東邦大学名誉教授
井部 明広	実践女子大学生生活科学部食生活科学科教授
小川 久美子	国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部長
鎌田 洋一	岩手大学農学部共同獣医学科教授
北田 善三	畿央大学健康科学部健康栄養学科長・教授
佐藤 恭子	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部第一室長
中島 春紫	明治大学農学部農芸化学科教授
堀江 正一	大妻女子大学家政学部食物学科教授
山内 明子	日本生活協同組合連合会執行役員組織推進本部本部長
由田 克士	大阪市立大学大学院生活科学研究科教授
吉成 浩一	東北大学大学院薬学研究科薬物動態学分野准教授
若林 敬二※	静岡県立大学環境科学研究所教授

※部会長